

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Kateřina Fialová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Knock-out A3 adenosinového receptoru
v nádorové linii za použití CRISPR/Cas9
systému**

Bakalářská práce

Kateřina Fialová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Ječmeňová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina FIALOVÁ**
Osobní číslo: **R21742**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Knock-out A3 adenosinového receptoru v nádorové linii za použití CRISPR/Cas9 systému**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Práce bude zaměřena na použití CRISPR/Cas9 systému pro knock-out A3 adenosinového receptoru u nádorových buněčných linií.

1. Vypracování literární rešerše na téma: adenosinové receptory, A3 adenosinový receptor, CRISPR/Cas9.
2. CRISPR/Cas9 knock-out A3 adenosinového receptoru, ověření účinnosti crRNA pomocí molekulárně biologických metod.

Práce bude splňovat všechny požadavky na bakalářskou práci tak, jak jsou definovány v "Pokynech pro zpracování závěrečné práce" Katedrou buněčné biologie a genetiky PFF UPOL.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Kotulová J, Hajdúch M, Džubák P. Current Adenosinergic Therapies: What Do Cancer Cells Stand to Gain and Lose? *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 22;22(22):12569. doi: 10.3390/ijms222212569. PMID: 34830449; PMCID: PMC8617980.
2. Doudna JA, Charpentier E (2014): Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, NY)*, 346, 1258096. doi:10.1126/science.1258096.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Kateřina Ježmeňová

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 16. března 2023
Termin odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2024

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 21. března 2024

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Kateřina Fialová
Název práce	Knock-out A ₃ adenosinového receptoru v nádorové linii za použití CRISPR/Cas9 systému
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Ječmeňová
Rok obhajoby práce	2024
Klíčová slova	Adenosin, adenosinové receptory, A ₃ adenosinový receptor, CRISPR/Cas9 systém
Počet stran	53 + xi
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Souhrn

Předložená bakalářská práce je zaměřena na *knock-out* A₃ adenosinového receptoru v nádorové linii MIA PaCa-2. Teoretická část bakalářské práce pojednává o adenosinu a adenosinových receptorech (A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃), které jsou spřaženy s G-proteinem. Popisuje jejich expresi a v práci se zaměřovalo na jejich roli u nádorových onemocnění. Dále je popsán mechanismus technologie CRISPR/Cas9 a její využití v onkologických terapiích.

Experimentální část práce je zaměřena na *knock-out* A₃ adenosinového receptoru. Přičemž musely být nejprve optimalizovány podmínky elektroporace, které byly následně využity pro samotný *knock-out* genu *ADORA3* pomocí čtyř různých CRISPR RNA. Dle výsledků získaných z kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí bylo zjištěno, že exprese genu byla po transfekci snížena a limitním ředěním byly následně vyselektovány klony, u kterých byla opět ověřena exprese genu. Klon, u kterého byl *knock-out* úspěšně proveden, může být v budoucnosti použit jako buněčný model pro testování nových potenciálních protinádorových léčiv, které budou cílit na A₃ adenosinový receptor.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Fialová
Title	Knock-out of A ₃ adenosine receptor in cancer cell line with CRISPR/Cas9 technology
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký university Olomouc
Supervisor	Mgr. Kateřina Ječmeňová
The year of presentation	2024
Keywords	Adenosine, adenosine receptors, A ₃ adenosine receptor, CRISPR/Cas9 technology
Number of pages	53 + xi
Number of appendices	0
Language	Czech

Abstract

The aim of this bachelor thesis is knock-out of A₃ adenosine receptor in MIA PaCa-2 cancer cell line. The theoretical part is about adenosine and its receptors (A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃) which are a part of a group of G-protein coupled receptors. This thesis describes the expression of these receptors focused on their role in cancer diseases. Furthermore, it describes the CRISPR/Cas9 technology and its use in oncological therapies.

The experimental part is focused on the knock-out of the A₃ adenosine receptor. Whereas the optimization of electroporation conditions had to be made, and these conditions were subsequently used for a knock-out of the A₃ adenosine receptor by four types of CRISPR RNA. According to the results obtained from Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, it was found that the gene expression was reduced after transfection, and the clones were subsequently selected by limiting dilution, in which gene expression was verified. The clone in which the knock-out was successfully made can be used as a cell model for testing new potential antitumor drugs that will target the A₃ adenosine receptor.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Kateřiny Ječmeňové.

V Olomouci dne

.....
Kateřina Fialová

Touto cestou bych chtěla srdečně poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Kateřině Ječmeňové za velmi osobní, trpělivý a vstřícný přístup, za cenné rady a předané zkušenosti, za poskytnutí výborných pracovních podmínek na Ústavu molekulární a translační medicíny, a především za její věnovaný čas během celého průběhu vypracování této práce. Velký dík také patří mé rodině, příteli a přátelům za podporu během celého studia.

Tato práce byla podpořena projektem: Projekt Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Adenosinové receptory	3
3.1.1	Adenosin.....	4
3.1.2	A ₁ adenosinový receptor	5
3.1.3	A ₂ adenosinové receptory	6
3.1.4	Adenosinové receptory a nádorová onemocnění	7
3.2	A ₃ adenosinový receptor	9
3.2.1	Struktura a vlastnosti A ₃ adenosinového receptoru	9
3.2.2	Exprese A ₃ adenosinového receptoru	9
3.2.3	Intracelulární signální přenos A ₃ adenosinového receptoru	10
3.2.4	Agonisté A ₃ AR.....	10
3.2.5	Antagonisté A ₃ AR.....	12
3.3	CRISPR/Cas9 systém.....	14
3.3.1	CRISPR/Cas systém u prokaryot	14
3.3.2	Typ II CRISPR/Cas systému a Cas9 endonukleáza	16
3.3.3	Mechanismus CRISPR/Cas9 a genomové inženýrství.....	17
3.3.4	Katalyticky deaktivovaná Cas9	18
3.3.5	Využití CRISPR/Cas9 technologie.....	20
4	MATERIÁL A METODY	22
4.1	Biologický materiál.....	22
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	22
4.2.1	Použité chemikálie:	22
4.2.2	Použité soupravy:	23
4.2.3	Použité roztoky:.....	23

4.3	Použité přístroje a zařízení	23
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
4.4.1	Design crRNA	24
4.4.2	Příprava reagensů pro provedení CRISPR/Cas9 elektroporace.....	24
4.4.3	Optimalizace elektroporačních podmínek pro buněčnou linii MIA PaCa-2	25
4.4.4	<i>Knock-out</i> A ₃ adenosinového receptoru buněčné linie MIA PaCa-2 pomocí CRISPR/Cas9.....	28
5	VÝSLEDKY	35
5.1	Stanovení optimálních podmínek elektroporace buněčné linie MIA PaCa-2	35
5.2	Určení nejvhodnější crRNA pro <i>knock-out</i> A ₃ adenosinového receptoru buněčné linie MIA PaCa-2.....	37
5.3	Vyhodnocení úspěšnosti <i>knock-outu</i> A ₃ adenosinového receptoru	39
6	DISKUSE.....	42
7	ZÁVĚR	44
8	LITERATURA.....	45

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

A ₁ AR	A ₁ adenosinový receptor
A ₂ AR	A ₂ adenosinový receptor
A _{2A} AR	A _{2A} adenosinový receptor
A _{2B} AR	A _{2B} adenosinový receptor
A ₃ AR	A ₃ adenosinový receptor
ADO	Adenosin
AMP	Adenosinmonofosfát
AnaCas9	<i>Actinomyces naeslundii</i> Cas9
AR	Adenosinové receptory
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X</i> protein
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CAR-T	Chimérický antigenový receptor
Cas	<i>CRISPR-associated proteins</i>
CDK4	Cyklin-dependentní kináza 4
CNS	Centrální nervová soustava
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNP	CRISPR ribonukleoproteinový komplex
CRISPRa	CRISPR aktivace
CRISPRi	CRISPR interference
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	Katalyticky deaktivovaná Cas9
DSB	Dvouvláknový zlom

FP	Forward primer
GPCR	Receptory spřažené s G-proteinem
gRNA	<i>Guide RNA</i>
GSK-3 β	Glykogensytnázakináza 3 β
HCC	Hepatoceleulární karcinom
HDR	<i>Homology-directed repair</i>
HIV-1	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
HPV	Lidský papiloma virus (<i>Human papilloma virus</i>)
IL-12	Interleukin 12
IP3	Inositoltrifosfát
KRAB	Krüppel-associated Box
MAPK	Mitogenem-aktivovaná proteinkináza
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
NF- κ B	Jaderný faktor κ B
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NK	<i>Natural killer</i>
PAM	<i>Proto-spacer-adjacent motif</i>
PAK	Fosfokináza A
PKB	Proteinkináza B
pre-crRNA	Prekurzorová CRISPR RNA
RT-qPCR	Kvantitativní real-time PCR s reverzní transkripcí
RP	Reverse primer
SpyCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
TALENs	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>

TCR	Receptory endogenních T-lymfocytů
tracrRNA	<i>Trans-activating</i> CRISPR RNA
ZFNs	<i>Zinc-finger nucleases</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění struktury receptorů spřažených s G-proteinem.	3
Obrázek 2: Schématické znázornění adenosinových receptorů a jejich vliv na hladinu cAMP	4
Obrázek 3: Chemická struktura adenosinu	5
Obrázek 4: Chemická struktura agonisty A ₃ AR, IB-MECA	11
Obrázek 5: Chemická struktura agonisty A ₃ AR, CI-IB-MECA	12
Obrázek 6: Chemická struktura antagonisty A ₃ AR, MRS-1220.	13
Obrázek 7: Schématické znázornění CRISPR/Cas imunitního systému prokaryot.....	15
Obrázek 8: Schématické znázornění mechanismu CRISPR/Cas9.....	18
Obrázek 9: Schématické znázornění CRISPRa (A) a CRISPRi (B).....	19
Obrázek 10: Schématické znázornění crRNA3 cílené na určitou oblast genu <i>ADORA3</i>	24
Obrázek 11: Optimalizace elektroporačních podmínek pro buněčnou linii MIA PaCa-2	36
Obrázek 12: Elektroporované buňky pomocí RNP-crRNA1, RNP-crRNA2, RNP-crRNA3, RNP-crRNA4	37
Obrázek 13: Graf s výsledky z RT-qPCR znázorňující expresi genu <i>ADORA3</i> normalizovanou na <i>β-actin</i> po provedení elektroporace čtyřmi různými RNP komplexy.....	39
Obrázek 14: Graf s výsledky z RT-qPCR znázorňující expresi genu kódujícího A ₃ AR u vyselektovaných klonů buněčné linie MIA PaCa-2, na které byla provedena elektroporace pomocí RNP komplexu obsahujícího crRNA3	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Sekvence navržených crRNA	24
Tabulka 2: Příprava reagensů přidáním duplex pufru	25
Tabulka 3: Příprava gRNA.....	25
Tabulka 4: Příprava roztoku Cas9 pro provedení optimalizace elektroporace	26
Tabulka 5: Příprava Enhanceru	26
Tabulka 6: Příprava RNP komplexu	27
Tabulka 7: Příprava vzorku pro provedení elektroporace.....	27
Tabulka 8: Optimalizace elektroporace pro buněčnou linii MIA PaCa-2.....	28
Tabulka 9: Příprava roztoku Cas9.....	28
Tabulka 10: Příprava RNP komplexu	29
Tabulka 11: Příprava enhanceru.....	29
Tabulka 12: Schéma přípravy vzorků pro provedení elektroporace RNP komplexu	30
Tabulka 13: Schéma přípravy vzorků pro reverzní transkripci.....	31
Tabulka 14: Příprava Master Mixu pro reverzní transkripci.....	31
Tabulka 15: Příprava PCR reakční směsi	32
Tabulka 16: Sekvence použitých primerů pro RT-qPCR	32
Tabulka 17: Teplotní a časový profil RT-qPCR	33
Tabulka 18: Schéma přípravy vzorků pro reverzní transkripci klonů.....	34
Tabulka 19: Koncentrace mRNA jednotlivých vzorků po izolaci TRI-reagentovou metodou	38
Tabulka 20: Koncentrace mRNA pro přípravu vzorků klonů pro reverzní transkripci	40

1 ÚVOD

A₃ adenosinový receptor (A₃AR) se řadí do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Je hojně exprimován v mnoha typech nádorových onemocnění a jeho aktivací může docházet jak k růstu nádorů a buněčné proliferaci, tak k inhibici proliferace nádorů díky aktivaci apoptických signálních drah. Vzhledem k těmto vlastnostem je A₃AR velmi slibným terapeutickým cílem a výborným nádorovým biomarkerem. Syntetičtí selektivní agonisté A₃AR vykazují proapoptické a antiproliferační účinky, nevykazují výrazné vedlejší účinky, jsou bezpeční, velmi specifictí a mohou tak být potenciálně účinnými léčivy různých onkologických onemocnění.

CRISPR/Cas9 technologie je revolučním a aktuálně velmi účinným nástrojem pro precizní editaci genomu. Je založena na přirozeném obranném mechanismu prokaryot vůči patogenům. Díky enzymu Cas9 lze štěpit a upravovat DNA na přesně daném místě. Tato technologie může být potenciálně využita při onkologických terapiích. Umožňuje totiž modifikovat geny zodpovědné za vývoj a progresi nádorových onemocnění. Může například inaktivovat onkogeny či geny, které způsobují odolnost buněk vůči léčbě. Díky CRISPR/Cas9 lze také modifikovat geny ovlivňující imunitní odpověď, což může vést k posílení imunitního systému a zvýšení účinnosti imunoterapie. V neposlední řadě je tato technologie významným nástrojem pro vytváření modelů nádorových onemocnění v laboratorních podmínkách, což napomáhá vývoji nových terapeutických strategií.

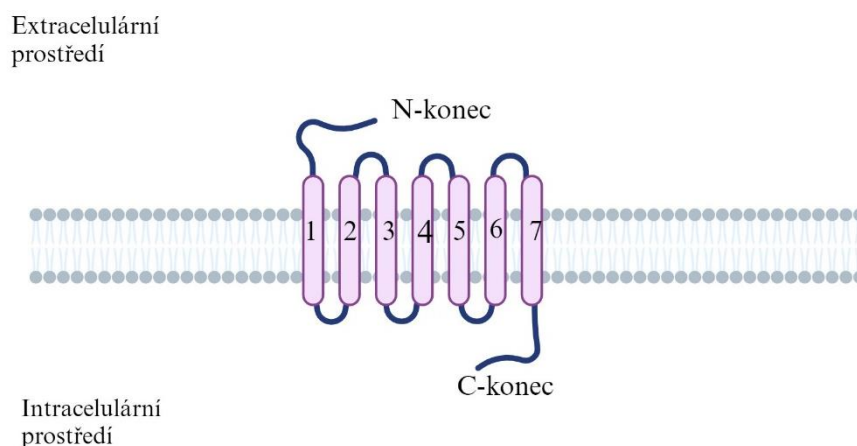
2 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše na téma adenosinové receptory, A₃ adenosinový receptor, CRISPR/Cas9.
- 2) CRISPR/Cas9 *knock-out* A₃ adenosinového receptoru, ověření účinnosti crRNA pomocí molekulárně biologických metod.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Adenosinové receptory

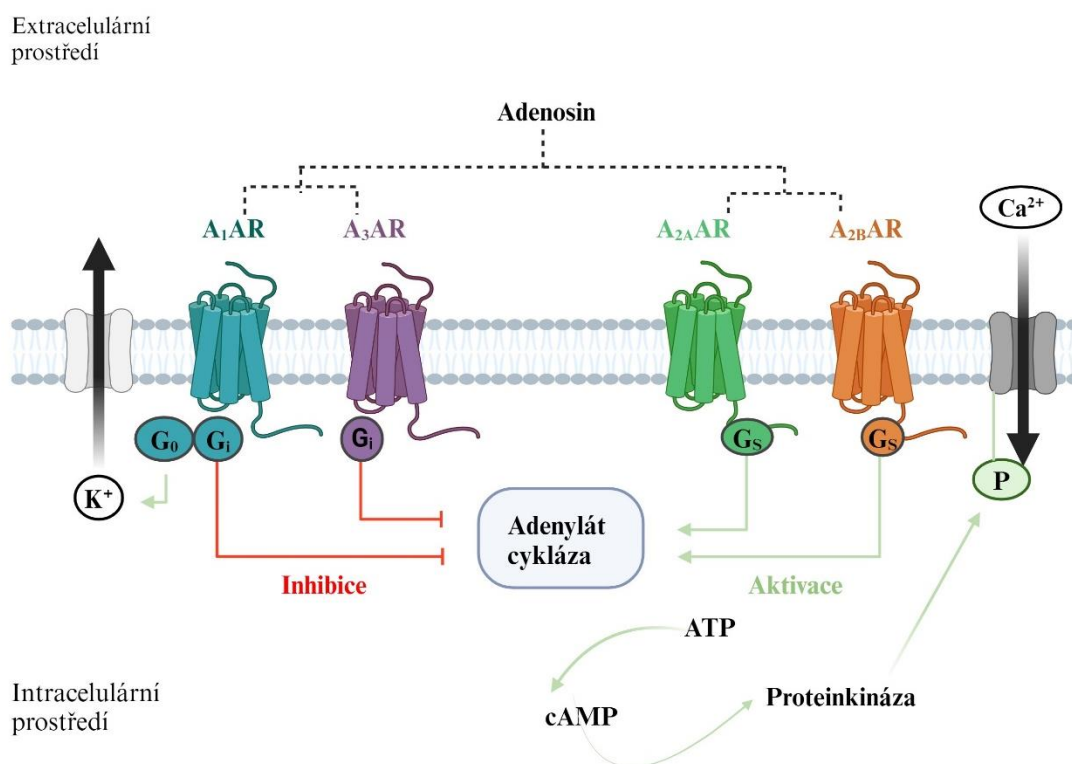
Adenosinové receptory (AR) se řadí do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem (GPCR), jejichž přirozeným agonistou je právě adenosin, který díky těmto receptorům zahajuje své biologické účinky. Tyto receptory jsou hojně exprimovány téměř v každé tkáni a orgánu našeho těla a potenciálně ovlivňují většinu fyziologických funkcí. AR se dělí na čtyři subtypy – A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃. Všechny jsou strukturně velmi podobné, jejich transmembránová doména je složena ze sedmi α -helixů a mají extracelulárně umístěné amino- konce a intracelulárně karboxy- konce (viz obrázek 1). Součástí N-terminální domény jsou N-glykosylační místa, která ovlivňují navádění receptoru do plasmatické membrány (Sheth *et al.*, 2014). Karboxy- konec je bohatý na zbytky aminokyselin serinu a threoninu, které slouží jako fosforylační místa pro protein kinázy a umožňují spojení receptoru s G-proteinem (Sheth *et al.*, 2014).



Obrázek 1: Schématické znázornění struktury receptorů spřažených s G-proteinem. Vytvořeno v programu BioRender.com. Upraveno podle Coy *et al.*, 2014.

Ačkoliv si jsou tyto receptory strukturně podobné, liší se různou afinitou k adenosinu, různou expresí v tkáních a párováním s efektorovými systémy, což znamená, že se odlišují ve vazbě na adenylátcyklázu a její regulaci hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) (viz obrázek č. 2). Co se týče afinity k adenosinu, tak vysokou afinitu mají A₁AR a A_{2A}AR, jejichž hodnota se pohybuje v nanomolárních koncentracích, a to přibližně v hodnotách 10 – 30 nM, kdežto nižší afinitu k tomuto nukleosidu mají A_{2B}AR a A₃AR

(Jacobson, 2009; Sheth *et al.*, 2014; Ballesteros-Yáñez *et al.*, 2018). A_{2B}AR je receptor s nejnižší afinitou k adenosinu, a tato hodnota je větší než 1 μM ($K_i > 1 \mu\text{M}$). Afinita A₃AR je střední, přibližně 1 μM (Jacobson, 2009). Jednotlivé receptory jsou popsány níže.

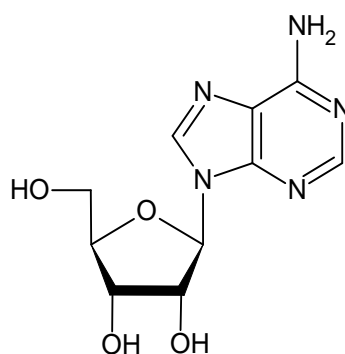


Obrázek 2: Schématické znázornění adenosinových receptorů a jejich vliv na hladinu cAMP. Vytvořeno v programu BioRender.com. Upraveno podle Mazziota *et al.*, 2022.

3.1.1 Adenosin

Substrátem adenosinových receptorů je purinový nukleosid adenosin (ADO), jehož struktura je tvořena adeninem, připojeným na ribózu (viz obrázek č. 3). Tento nukleosid je součástí mnoha fyziologických funkcí, hraje významnou roli při metabolismu organismu a při přenosu energie v buňce. Je tvořen a uvolňován z buněk nukleosidovými transportéry, mikrovezikuly či zcela nespecificky po uvolnění adeninových nukleotidů v průběhu apoptózy (Gorzalczany *et Sagi-Eisenberg*, 2019). Význam má také při tvorbě signálních molekul, jako například cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). ADO je produkován jak intracelulárně, tak extracelulárně. Intracelulární adenosin je tvořen z prekurzoru 5'-adenosinmonofosfátu (5'-AMP) díky aktivitě enzymu 5'-nukleotidázy a následně může následovat několik metabolických či syntetických drah (Sheth *et al.* 2014). Koncentrace ADO v extracelulárním prostředí je velmi nízká, ale po vystavení organismu

stresovým podmínkám se jeho hladina výrazně zvyšuje a indikuje tak různé patologické jevy, jako jsou například různá nádorová onemocnění. ADO také ovlivňuje centrální nervový systém, imunitní systém, endokrinní a kardiovaskulární systém (Gorzalczany *et Sagi-Eisenberg*, 2019). Tyto koncentrace jsou regulovány deaminázou, která degraduje intracelulární adenosin na inosin, nebo adenosinkinázou, která fosforyluje adenosin na adenosinmonofosfát (AMP). Zmíněné enzymy vykazují různé afinity k adenosinu, kdy adenosinkináza vykazuje vyšší afinitu než adenosindeamináza, jelikož ve fyziologických podmínkách se adenosin přednostně transformuje na AMP, kdežto k transformaci na inosin dochází především v patologických podmínkách. Významnými regulátory jsou nukleosidové transportéry, ekvilibrační a koncentrační, které vycytávají adenosin (Ballesteros-Yáñez *et al.*, 2018; Gorzalczany *et Sagi-Eisenberg*, 2019).



Obrázek 3: Chemická struktura adenosinu (ChemSketch).

3.1.2 A₁ adenosinový receptor

A₁ adenosinový receptor (A₁AR) je spřažen s Gi a Go proteinem. Gen tohoto receptoru, *ADORA1*, je lokalizován na chromozomu 1q32.1 (Townsend-Nicholson *et al.*, 1995). A₁AR je silně exprimován v celém těle, avšak nejvíce v centrální nervové soustavě (CNS) především v kůře mozkové a mozečku. Vyskytuje se také v srdečním svalu, tukové tkáni, kosterních svalech a zánětlivých buňkách, jako jsou neutrofilové. Méně je exprimován v plicích a slinivce břišní. Aktivací tohoto receptoru dochází k inhibici adenylátcyklázy, aktivují se draselné kanály, a dochází k inhibici aktivace Ca²⁺ kanálů spřažených s G-proteinem pomocí aktivace fosfolipázy C, což vede ke zvýšení hladiny vápníku v intracelulárním prostředí (Chen *et al.*, 2013; Sachdeva *et Gupta*, 2013; Gorzalczany *et Sagi-Eisenberg*, 2019).

Aktivace A₁AR vyvolává jak zánětlivé, tak protizánětlivé reakce, zvyšuje aktivitu *natural killer* (NK) buněk, indukuje chemotaxi dendritických buněk a zvyšuje endoteliální propustnost. Mezi zánětlivé účinky tohoto receptoru v monocytech patří zesílení fagocytózy

Fcγ receptorem, indukce sekrece vaskulárního endotelového růstového faktoru či podpora diferenciace monocytů na osteoklast (Effendi *et al.*, 2020). A₁AR je silný protizánětlivý mediátor u různých modelů poškození ledvin, srdce, jater, plic a mozku (Effendi *et al.*, 2020). Jak již bylo zmíněno, A₁AR je nejvíce exprimován v CNS, kde přispívá k neuroprotekcí, a podílí se také na neurodegeneraci. Indukcí synaptické deprese pomocí aktivace A₁AR poskytuje neuroprotekcí ischemickým buňkám, kdy dokáže snížit glutamátovou signalizaci, která je způsobena zvýšenou hladinou glutamátu při hypoxii či ischemii (Stockwell *et al.*, 2017). Jeho aktivací při hypoxii dochází k inhibici uvolňování transmiterů, které souvisí s presynaptickým influxem Ca²⁺. Mezi tyto neurotransmitery patří dopamin, acetylcholin, kyselina γ-aminomáslená a glutamát za účelem tvorby neuroprotekcí (Effendi *et al.*, 2020). A₁AR také reguluje draslíkový proud, což vede k hyperpolarizaci klidového membránového potenciálu skrz aktivaci K⁺ kanálů, kdy dochází k aktivaci fosfolipázy C a inhibici adenylátcyklázy (Effendi *et al.*, 2020). Přes to, že endogenní adenosin může vyvolat terapeutickou hypotermii v rámci neuroprotekcí v krátkém časovém intervalu po mrtvici, tak při dlouhodobém působení adenosinu na A₁AR (v řádu hodin či dnů) může dojít právě k neurotoxicitě, dochází tedy ke zvýšené smrti neuronů (Stockwell *et al.*, 2017).

3.1.3 A₂ adenosinové receptory

A₂ adenosinové receptory (A₂AR) jsou spřáhány s Gs a Gq proteinem. Jejich stimulací dochází k aktivaci adenylátcyklázy, což vede ke zvýšení koncentrace intracelulárního cAMP. Tyto receptory jsou exprimovány hlavně v presynaptických a postsynaptických nervových zakončeních, mastocytech, hladkém svalstvu dýchacích cest a leukocytech. Na základě jejich afinity k adenosinu jsou rozděleny na A_{2A} a A_{2B} adenosinové receptory (Sachdeva *et Gupta*, 2013).

3.1.3.1 A_{2A} adenosinový receptor

Gen A_{2A} adenosinového receptoru (A_{2A}AR) *ADORA2A* se nachází na chromozomu 22q11.2 a obsahuje samostatný intron v kódující oblasti (Le *et al.*, 1996). Vysoká hladina A_{2A}AR je ve striatu bazálních ganglií, imunitních buňkách sleziny, v brzlíku, leukocytech, krevních destičkách a v nižších hladinách se nacházejí v srdci, plicích a cévách (Chen *et al.*, 2013). A_{2A}AR jsou nejdominantnější protizánětlivé efekторы extracelulárního adenosinu prostřednictvím jejich hojné exprese na buňkách imunitního systému jako jsou monocyty, makrofágy, dendritické buňky, mastocyty, neutrofilů, eozinofilů, lymfocyty a NK buňky (Effendi *et al.*, 2020). Selektivní agonisté tohoto receptoru mají významnou roli při zánětech dýchacích cest a poškození plicní tkáně zprostředkované neutrofilů a monocytů,

jelikož jeho aktivací dochází k ovlivnění různých aspektů zánětlivého procesu, modulaci aktivace a degranulaci neutrofilů, produkci oxidativních druhů, expresi adhezních molekul, uvolnění cytokinů a degranulaci mastocytů (Effendi *et al.*, 2020). A_{2A}AR se hojně vyskytují v bazálních gangliích v části *nucleus accumbens* a *caudate putamen*. V části *caudate putamen* jsou tyto receptory umístěny v neuronech, kde moduluji neurotransmisi kyseliny γ -aminomáslené, acetylcholinu a glutamátu, čímž se podílí na motorických funkcích (Sachdeva *et Gupta*, 2013).

3.1.3.2 A_{2B} adenosinový receptor

Gen A_{2B} adenosinového receptoru (A_{2BAR}) *ADORA2B* je lokalizován na chromozomu 17p12 (Jacobson *et al.*, 1995). A_{2BAR} jsou široce exprimovány, ale obvykle v menším množství než ostatní subtypy adenosinových receptorů. Nachází se především v gastrointestinálním traktu, močovém měchýři, plicích a mastocytech. A_{2BAR} je exprimován u většiny zánětlivých buněk a má jak zánětlivé, tak protizánětlivé účinky (Effendi *et al.*, 2020). Aktivací tohoto receptoru dochází také k aktivaci adenylátcyklázy, avšak, i přes strukturní podobnost s A_{2A}AR, je funkčně odlišný. A_{2BAR} je ze všech subtypů receptorů nejméně citlivý k adenosinu a k jeho aktivaci je zapotřebí mikromolárních koncentrací, kterých adenosin dosahuje právě při patologických podmínkách, což znamená, že v normálních fyziologických podmínkách je tento receptor neaktivní. Mezi patologické podmínky, které aktivují A_{2BAR} patří například hypoxie, ischemie či zánět, a díky tomu může dojít k adaptaci tkáně na hypoxii, zvýšenou toleranci ischemie či zmírnění akutních zánětů (Chen *et al.*, 2013; Sachdeva *et Gupta*, 2013). Jak již bylo zmíněno, tento receptor má protizánětlivé i zánětlivé účinky. Protizánětlivé účinky jsou generovány navázáním na Gs protein a zánětlivé účinky navázáním na Gq protein (Effendi *et al.*, 2020).

3.1.4 Adenosinové receptory a nádorová onemocnění

Tato kapitola se věnuje A₁, A_{2A} a A_{2B} adenosinovým receptorům a jejich významu při nádorových onemocněních. A₃ adenosinovému receptoru je věnována celá následující kapitola, a proto tady nebude zmíněn. Expresie adenosinových receptorů může být zvýšena při různých typech nádorových onemocnění.

A₁AR je detekovatelný v buněčných liniích lidské leukémie, či v linii lidského melanomu. Agonisté tohoto receptoru dokázali inhibovat proliferaci některých nádorových linií, jako například *Sertoli-like* TM4 a stimulací tohoto receptoru byla proliferace také pozastavena v leukemických liniích, např. MOLT-4, a v několika liniích lidského karcinomu

prsu, mezi které patří například T47D či MCF-7 (Gessi *et al.*, 2011; Sheth *et al.*, 2014). Anti-tumorální účinky jsou pozorovány také u buněčných linií lidského karcinomu tlustého střeva CW2 a LoVo (Sheth *et al.*, 2014). V opačném případě má A₁AR i pro-tumorální aktivitu, a to v případě jeho vysoké endogenní exprese v buňkách melanomu, kde zvyšuje jejich chemotaxi (Woodhouse *et al.*, 1998). Vyšší exprese A₁AR, která je spojena s pro-tumorální aktivitou je i ve tkáních zasažených lidským karcinomem prsu, kde je tento receptor exprimován více než ve zdravé prsní tkáni. Jedná se například o buněčnou linii MDA-MB-468 (Gessi *et al.*, 2011).

Zvýšená exprese A_{2A}AR se může vyskytovat v různých nádorových buněčných liniích, ve kterých ovlivňuje buněčnou proliferaci, apoptózu a protinádorovou imunitu. Pro řadu nádorů je typická akumulace adenosinu vyvolána hypoxií v jeho okolí a po aktivaci signální dráhy A_{2A}AR dochází k imunosupresi a antiapoptóze, což vede k podpoření vzniku nádoru (Sun *et al.*, 2022). Protumorální aktivitu lze pozorovat u buněk lidského karcinomu prsu MCF-7, leukemických buněk Jurkat T, melanomové linie A375, linie lidského glioblastomu U87MG a u linií dalších mnoha nádorových onemocnění, např. karcinomu tlustého střeva a karcinomu plic (Sheth *et al.*, 2014).

Díky transkripční aktivitě faktoru HIF-1 α dochází po navození hypoxie ke zvýšené expresi A_{2B}AR v nádorových buňkách lidského karcinomu prsu a zároveň inhibicí tohoto receptoru bylo prokázáno výrazné snížení plicní metastáze u imunodeficientních myší, kterým byly tyto buňky aplikovány do mléčné žlázy (Lan *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2019). Hypoxie je charakteristickým znakem rakoviny, který přispívá vzniku metastáze, selhání léčby a zvyšuje tak pravděpodobnost úmrtí pacienta (Lan *et al.*, 2018). Aktivace A_{2B}AR hraje velkou roli v pohybu a migraci buněk, které jsou součástí vícestupňového procesu metastáz a to tak, že po navázání adenosinu či jiného agonisty na A_{2B}AR nádorové buňky dojde ke zvýšení jejich metastatické schopnosti. Antagonisté tohoto receptoru tak mohou výrazně přispět protinádorové léčbě. Mezi takové antagonisty patří například PSB 115, který dokáže snížit nádorové metastáze buněk melanomu CD73⁺ a v kombinaci s dakarbazinem, který se aktivně využívá k léčbě melanomu, dokázal tento antagonistu zvýšit účinek tohoto léčiva (Iannone *et al.*, 2013; Mittal *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2019). Dalším antagonistou může být například theofylin, který se v kombinaci s protinádorovými léčivy uplatňuje v léčbě rakoviny močového měchýře a prostaty (Gao *et al.*, 2019).

3.2 A₃ adenosinový receptor

A₃ adenosinový receptor (A₃AR) je v dnešní době velmi slibným terapeutickým cílem a skvělým biologickým markerem, jelikož dochází k jeho nadměrné expresi v zánětlivých a nádorových buňkách (Jacobson *et al.*, 2018). Jeho vlastnosti jsou popsány níže.

3.2.1 Struktura a vlastnosti A₃ adenosinového receptoru

Gen A₃AR *ADORA3* je u člověka lokalizován na chromozomu 1p21-p13 a skládá se ze samostatného řetězce 318 aminokyselin (Atkinson *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 2018). Gen tohoto receptoru je tvořen dvěma exony, které jsou odděleny intronem o přibližné velikosti 2,2 kb (Murrison *et al.*, 1996). Promotorová oblast obsahuje vazebná místa pro několik transkripčních faktorů, kdy *upstream* sekvence má CCAAT sekvenci a vazebná místa pro transkripční faktory SP1, NF-IL6, GATA1 a GATA3. Transkripční faktor GATA3 má významnou roli ve funkci imunitního systému (Jacobson *et al.*, 2018). A₃AR je součástí jaderného faktoru κB (NF-κB) a tím pádem má transkripční faktor NF-κB významnou funkci při určování exprese tohoto receptoru (Nishat *et al.*, 2016). C-konec tohoto receptoru je bohatý na aminokyseliny serin a threonin, které jsou velmi rychle fosforylované kinázami spřaženými s G-proteinovými receptory a tím dochází k rychlé desenzibilaci při působení agonisty (Palmer *et Stiles*, 2000; Fishman *et al.*, 2002; Nishat *et al.*, 2016).

3.2.2 Exprese A₃ adenosinového receptoru

A₃AR je exprimován jak ve zdravých tkáních, tak i v různých typech nádorových onemocnění, kde je jeho exprese velmi vysoká a díky tomu může být užitečným diagnostickým markerem (Madi *et al.*, 2004). Exprese tohoto receptoru ve zdravých tkáních je velmi nízká, s výjimkou varlat, eozinofilů a bazofilů (Fishman *et al.*, 2002). Se zvýšenou expresí A₃AR se lze setkat u melanomu, rakoviny prsu, prostaty, vaječníků, jater, slinivky či plic. Mimo jiné se také objevuje v lymfomech a glioblastomu (Fishman *et al.*, 2002; Madi *et al.*, 2004). Tento receptor je potenciálním protinádorovým cílem, jelikož v *in vitro* modelech bylo prokázáno, že v nanomolárních koncentracích někteří syntetičtí agonisté A₃AR chrání nenádorové buňky před smrtí a v mikromolárních koncentracích vykazují apoptické efekty jak u nenádorových, tak i u nádorových buněk. Mimo jiné se také nachází v buňkách zodpovědných za zánětlivé procesy, jako jsou mastocyty, eosinofily, monocyty, makrofágy, dendritické buňky, lymfocyty a buňky kostní dřeně, což značí, že má roli v zánětlivých procesech organismu, díky čemuž je A₃AR také slibný cíl v protizánětlivých terapiích (Mazziotta *et al.*, 2022).

3.2.3 Intracelulární signální přenos A₃ adenosinového receptoru

A₃AR interaguje s různými G-proteiny, jako jsou Gi, Gq a Go, avšak zejména s Gi proteinem a díky této interakci dochází v důsledku inhibice adenylátcyklázy ke snížení hladiny cAMP a je tak snížena hladina proteinkinázy A. Aktivace A₃AR vede také k aktivaci fosfolipázy C a D (Fishman *et al.*, 2002; Mazziotta *et al.*, 2022). Stimulací aktivity fosfolipázy C dochází v buňce ke zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku (Ca²⁺) a inositoltrifosfátu (IP3), a tento proces indukuje uvolňování faktoru nekrotizující nádory TNF- α v aktivních makrofázích (Nishat *et al.*, 2016; Mazziotta *et al.*, 2022). A₃AR se také podílí na modulaci aktivity mitogenem-aktivované proteinkinázy (MAPK). Aktivací tohoto receptoru také může dojít ke snížení hladiny fosfokinázy A (PKA), *downstream* efektoru cAMP a fosforylované formy proteinkinázy B, známé jako Akt (PKB/Akt) v buňkách melanomu, což má za následek deregulaci Wnt signální dráhy, která je běžně aktivní během embryogeneze a tumorogeneze, aby se zvýšila progresse buněčného cyklu a buněčná proliferace (Nishat *et al.*, 2016). U Wnt dráhy mají důležitou funkci proteinkináza A a Akt, které dokáží inaktivovat glykogensyntázukinázu 3 β (GSK-3 β), která je klíčovým elementem pro správné fungování Wnt dráhy (pro zvýšenou progresi buněčného cyklu a následné proliferaci) (Borea *et al.*, 2015). Další významnou signální drahou je PI3K/Akt, kdy aktivace A₃AR vyvolá snížení hladin cAMP, což vede k redukcí fosforylované aktivní formy PKB/Akt a PKA (Borea *et al.*, 2015; Mazziotta *et al.*, 2022).

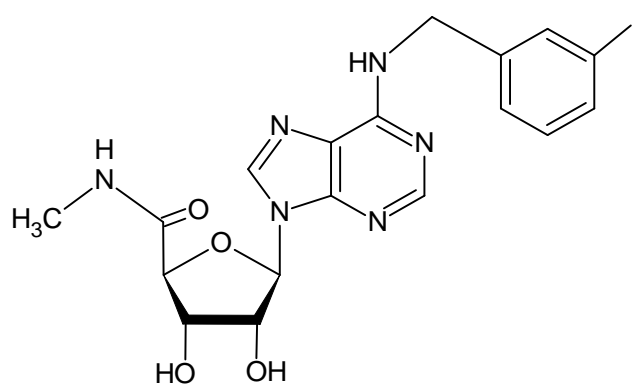
3.2.4 Agonisté A₃AR

Za agonistu je považována molekula vážící se na receptor, která způsobí jeho aktivaci a vede ke změnám v buňce (Pleuvry, 2004). Jelikož účinek přirozeného agonisty A₃AR, adenosinu, je kvůli jeho schopnosti se rychle metabolizovat omezen, tak se pro aktivaci tohoto receptoru využívají především selektivní agonisté tohoto receptoru. Selektivní agonisté A₃AR působí podobně jako adenosin, avšak mají několik výhod. Jsou stabilní, nedegradovatelné a biologicky dostupné (Fishman *et al.*, 2001). Tito agonisté také pozitivně ovlivňují proliferaci nenádorových buněk (Cohen *et al.*, 2011). Mezi nejvýznamnější agonisty A₃AR patří piclidenoson, známý pod názvem IB-MECA (CF101) a namodenoson, neboli Cl-IB-MECA (CF102). Jde o malé, ve vodě nerozpustné, orálně biodostupné adenosinové deriváty (Fishman, 2022). Tyto deriváty nesou lipofilní substituent (3-jodbenzyl) na 6-aminoskupině a modifikaci ribózy v 5' poloze (viz obrázek č. 4). Cl-IB-MECA má navíc 2-chloro substituent, díky kterému je tento agonista více selektivní (viz obrázek č. 5) (Koscsó *et al.*, 2011). Zmínění agonisté se uplatňují například při léčbě

různých zánětlivých onemocnění či kardiovaskulárních problémů a v neposlední řadě při léčbě nádorových onemocnění. K protinádorovému účinku A₃AR agonistů dochází prostřednictvím modulace signální dráhy Wnt/NF-κB (Mazziotta *et al.*, 2022). Syntetičtí agonisté tohoto receptoru jsou popsáni níže.

3.2.4.1 IB-MECA

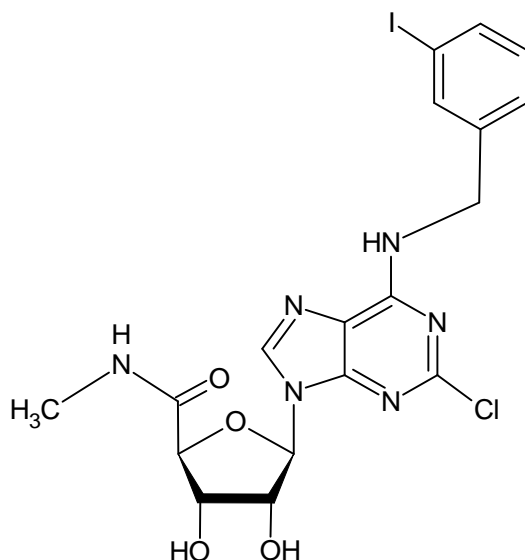
Příznivý účinek IB-MECA je spojován s *up*-regulací GSK-3β a *down*-regulací NF-κB a onkogenů cyklin D1 a c-Myc, jejichž exprese je nadměrně zvýšená v buňkách melanomu (Madi *et al.*, 2003; Koscsó *et al.*, 2011). U zhoubných buněk melanomu dochází k selhání GSK-3β a nedojde tak k fosforylaci β-cateninu, který se hromadí v cytosolu a poté se translokuje do jádra, kde indukuje transkripci cyklinu D1 a c-Myc, což vede k progresi buněčného cyklu (Madi *et al.*, 2003). Aktivaci A₃AR pomocí agonisty IB-MECA lze inhibovat tumorogenezi melanomových buněk *in vivo* i *in vitro*. Dochází k tomu díky *down*-regulaci signální Wnt dráhy, kdy IB-MECA inhibuje expresi PKAc a PKB/Akt, tudíž zabrání fosforylaci a inaktivaci GSK-3β (Fishman *et al.*, 2004). V důsledku toho se ukázalo, že GSK-3β zabraňuje jeho translokaci do jádra, což vede k *down*-regulaci cyklin D1 a c-myc. Pokles fosforylovaného GSK-3β indukovaný agonistou IB-MECA má tedy za následek degradaci β-cateninu, což vede k inhibici růstu nádorových buněk. Protinádorová aktivita tohoto agonisty byla prokázána například na zvířecích modelech melanomu, prsního karcinomu, rakoviny prostaty, štítné žlázy či tlustého střeva (Fishman *et al.*, 2001, 2004; Panjehpour *et Karami-Tehrani*, 2004; Morello *et al.*, 2008).



Obrázek 4: Chemická struktura agonisty A₃AR, IB-MECA (ChemSketch).

3.2.4.2 CI-IB-MECA

CI-IB-MECA má silný protinádorový účinek u hepatocelulárního karcinomu (HCC), což bylo prokázáno na krysích modelech. Tento agonista A₃AR dokáže výrazně inhibovat růst tohoto tumoru skrz mechanismus, který znamenal *up*-regulaci proapoptických proteinů Bax (*Bcl-2-associated X protein*), Bad (*Bcl-2-associated death promoter*) a kaspázu-3, což vede k apoptóze nádorových buněk (Cohen *et al.*, 2011; Fishman *et al.*, 2012). CI-IB-MECA také dokáže indukovat apoptózu buněk rakoviny plic skrz *down*-regulaci cyklin D1, c-Myc a CDK4 a *up*-regulaci kaspázy-3 (Cohen *et al.*, 2011). Tento agonista také zesiluje aktivitu NK buněk, a tím pravděpodobně i destrukci nádorových buněk zprostředkovanou NK buňkami, což bylo prokázáno jak u zdravých myší, tak i u myší s nádorem prostřednictvím indukce IL-12. Tento účinek závisel na inhibici hladin cAMP a expresi PAK. IL-12 je silný stimulant NK buněk a je cytotoxickým faktorem, který vykazuje silný protinádorový účinek *in vivo* (Harish *et al.*, 2003; Gessi *et al.*, 2011). U nádoru štítné žlázy dokázal CI-IB-MECA inhibovat proliferaci nádorových buněk a to tak, že indukoval zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a dokázal také inhibovat fosforylaci ERK1/2, důležitou pro buněčnou proliferaci (Morello *et al.*, 2008).

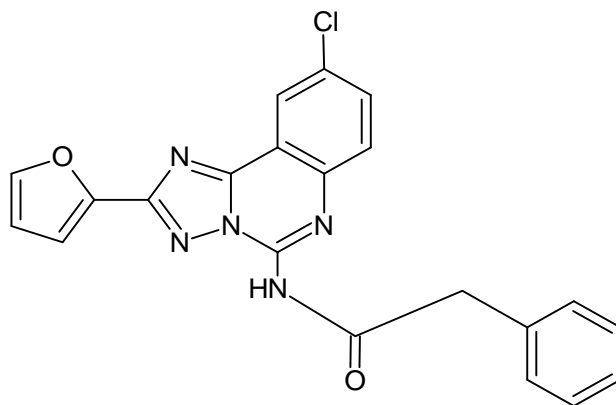


Obrázek 5: Chemická struktura agonisty A₃AR, CI-IB-MECA (ChemSketch).

3.2.5 Antagonisté A₃AR

Antagonista je molekula, která tlumí působení agonisty (Plevry, 2004). Antagonisté A₃AR mohou být také užiteční při léčbě nádorových onemocnění (Mazziotta *et al.*, 2022). Mezi významné antagonisty A₃AR patří například quinazolin (MRS-1220) (viz obrázek č. 6) či MRS-1523 (Fishman *et al.*, 2000; 2001). K A₃AR vyznačují vysokou afinitu fenolové

deriváty, jako jsou flavonoidy, které antagonizují přirozené účinky endogenního adenosinu (Jacobson, 1998). Tato třída byla chemicky optimalizována ve formě MRS-1067, která je vysoce selektivní pro lidský A₃AR. Mezi další selektivní antagonisty patří také triazolopyrimidin. Antagonista MRS-1220 sice není vysoce selektivním antagonistou, avšak vykazuje nejvyšší afinitu k receptoru (Jacobson, 1998).



Obrázek 6: Chemická struktura antagonisty A₃AR, MRS-1220 (ChemSketch).

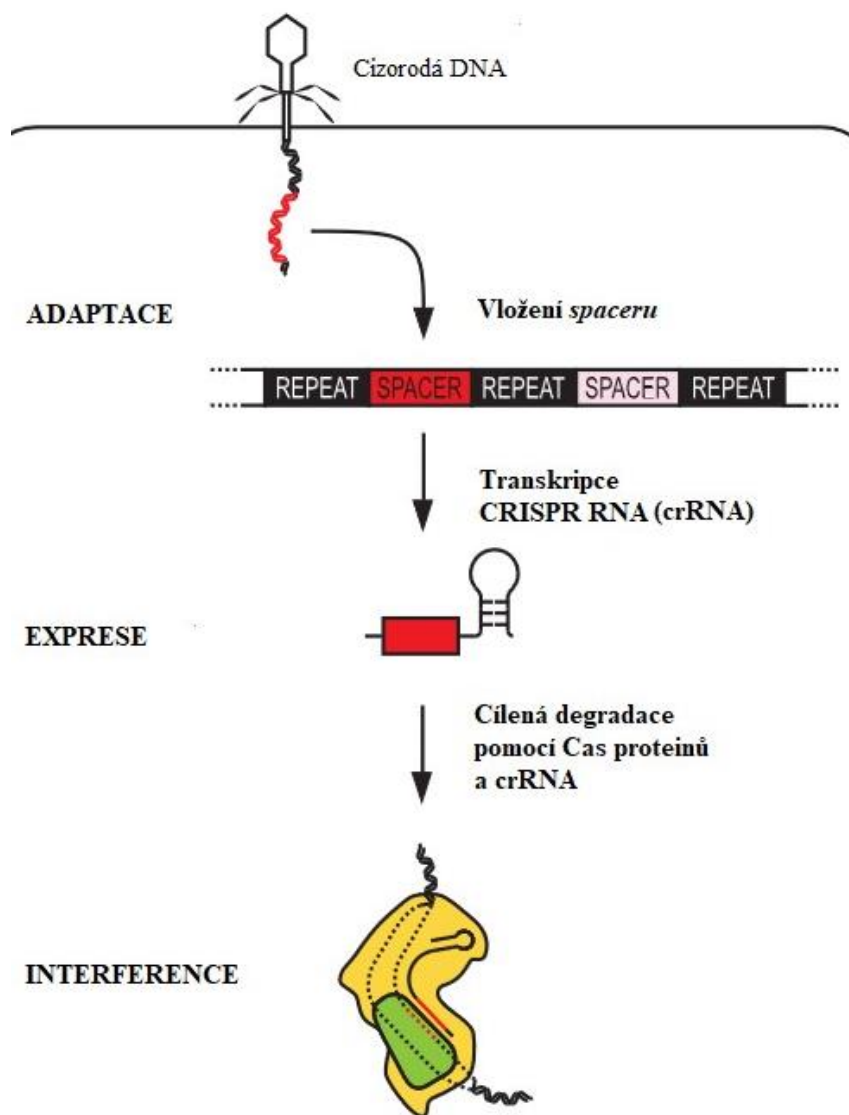
3.3 CRISPR/Cas9 systém

Adaptivní imunita většiny bakterií a archeí je tvořena takzvanými *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-*CRISPR-associated proteins* (Cas). CRISPR byly poprvé objeveny a popsány v roce 1987 v Japonsku, konkrétně v DNA bakterie *Escherichia coli* (Ishino *et al.*, 1987). Díky tomuto systému jsou prokaryotické organismy chráněny před napadením viry (Jinek *et al.*, 2012; Shmakov *et al.*, 2015). Pro svou jednoduchost, účinnost, rychlost a nízké náklady je tento systém nejvíce využívanou technologií úpravy genomu v molekulárně-biologických laboratořích po celém světě (Xu *et Li*, 2020).

Systémy CRISPR-Cas se dělí do dvou základních tříd (třída 1 a třída 2), šesti typů (I - VI) a několika subtypů. Pro třídu 1 jsou typické multi-Cas proteinové efektorové komplexy, konkrétně pro typ I, III a IV. Třída 2 má pouze jeden efektorový protein v typu II, V a VI. V této bakalářské práci je podstatný typ II, jelikož efektorovým proteinem je právě DNA endonukleáza Cas9. Nejčastěji používaná kategorie tohoto systému je odvozena z bakterie *Streptococcus pyogenes* (Xu *et Li*, 2020).

3.3.1 CRISPR/Cas systém u prokaryot

CRISPR-Cas je složen z genomového lokusu CRISPR, který obsahuje krátké repetitivní elementy, které jsou odděleny jedinečnými sekvencemi, takzvanými *spacery*, které mohou pocházet z bakteriofágů, transpozonů či plazmidů (Hille *et Charpentier*, 2016). *Spacery* mohou být transkribovány do CRISPR RNA (crRNA). Nedílnou součástí jsou CRISPR-*associated* geny, díky kterým mohou Cas proteiny zahájit svou endonukleázovou aktivitu (Koonin *et Makarova*, 2009). Další složkou tohoto imunitního systému je *trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA), která je důležitá u typu II, kde je vyžadována k tvorbě prekursorové crRNA (Hille *et Charpentier*, 2016). Hypotéza, že systém CRISPR-Cas hraje důležitou roli v obraně proti napadení DNA byla ověřena pomocí integrace krátké fágově-specifické sekvence do CRISPR lokusu bakterie *Streptococcus thermophilus* (Barrangou *et al.*, 2007; Makarova *et al.*, 2011). Tento obranný mechanismus působí díky specifickému rozpoznání a rozštěpení cizorodé DNA či RNA a lze jej rozdělit do tří základních fází - adaptace, exprese a interference (viz obrázek č. 7) (Hille *et Charpentier*, 2016).



Obrázek 7: Schématické znázornění CRISPR/Cas imunitního systému prokaryot. Převzato a upraveno podle Rath *et al.*, 2015.

3.3.1.1 Adaptace

Ve fázi adaptace dochází k vložení cizorodých *protospacerů* do CRISPR lokusu a díky tomuto kroku si může hostitelský organismus zapamatovat cizí genetický materiál (Hille *et Charpentier*, 2016). Tento mechanismus je však pochopen jen částečně a lze jej rozdělit do dvou kroků: selekce *protospacerů*, generování materiálu spaceru do CRISPR lokusu a syntéza nové repetice (Rath *et al.*, 2015). Každá integrační událost je doprovázená duplikací repetice a vytváří se tak nová *spacer-repeat* jednotka. Výběr *protospacerů* z invazivní DNA je dán rozpoznáním takzvaných *proto-spacer-adjacent motifs* (PAMs), které jsou dlouhé jen několik málo nukleotidů, nachází se těsně vedle *protospaceru* a liší se mezi variantami CRISPR-Cas systémů. Klíčovými proteiny tohoto procesu jsou Cas1 a Cas2

(Makarova *et al.*, 2011; Hille *et Charpentier*, 2016). Co se týče typu II-A CRISPR-Cas systému, za selekci *protospaceru* je zodpovědná PAM-rozlišující doména Cas9 (Hille *et Charpentier*, 2016).

3.3.1.2 Exprese

V této fázi dochází k expresi *cas* genů a následné transkripci do prekursorové CRISPR RNA (pre-crRNA), ze které se díky aktivitě *cas* proteinů stane vyzrálá crRNA, která v sobě již uchovává sekvence cizorodých částic. Všechny systémy transkribují CRISPR lokus a tvoří se tak CRISPR ribonukleoproteinový komplex (crRNP). Ve třídě II je pro zpracování pre-crRNA nezbytná *tracrRNA* a RNasa III, jelikož *tracrRNA* se páruje s pre-crRNA (Rath *et al.*, 2015). Anti-repetitivní sekvence této RNA umožňuje formaci RNA duplexu s každou repetitivní pre-crRNA, který je stabilizován Cas9. Duplex je následně rozpoznán a zpracován pomocí hostitelské RNasy III, čímž vzniká přechodná forma crRNA, která podléhá dalšímu zrání, což vede k výslednému vzniku zralé, vhodně velké *guide* RNA (Deltcheva *et al.*, 2011; Hille *et Charpentier*, 2016).

3.3.1.3 Interference

Poslední fáze imunitní reakce se nazývá interference, v jejímž průběhu je rozpoznána cizorodá cílová nukleová kyselina, která je zničena (interferována) aktivitou zralé crRNA. Jak již bylo zmíněno, pro třídu 2 je potřebný jeden efektorový protein, aby mohla proběhnout úspěšná interference. Díky přítomnosti PAM dochází ke spuštění '*non-self activation*', který brání jednotlivým systémům napadnout svůj vlastní CRISPR lokus (Rath *et al.*, 2015). V typu II navede duplex *tracrRNA:crRNA* efektorový protein Cas9, aby mohlo dojít k dvojitému zlomu a tím tedy k degradaci v cílové DNA (Hille *et Charpentier*, 2016).

3.3.2 Typ II CRISPR/Cas systému a Cas9 endonukleáza

Typ II zahrnuje tzv. HNH systém (*Streptococcus-like*), ve kterém hraje důležitou roli protein Cas9, jehož funkcí je tvorba crRNA a štěpení cílové DNA, spolu s přítomnými proteiny Cas1 a Cas2 (Makarova *et al.*, 2011).

Cas9 proteiny jsou hojné napříč celé bakteriální říší, avšak se velmi liší jak v sekvenci, tak ve velikosti. Na základě CRISPR-Cas lokusu a fylogeneze proteinových sekvencí, se *Cas9* geny třídí do tří subrodin: II-A, II-B a II-C. Pro všechny Cas9 enzymy jsou však společné dvě domény, a to HNH a RuvC. Doména HNH dokáže štěpit DNA vlákno, které je komplementární k vedoucí RNA sekvenci (*guide* RNA), tedy cílové vlákno. RuvC nukleázová doména je potřebná pro štěpení nekomplementárního, a tedy necílového vlákna,

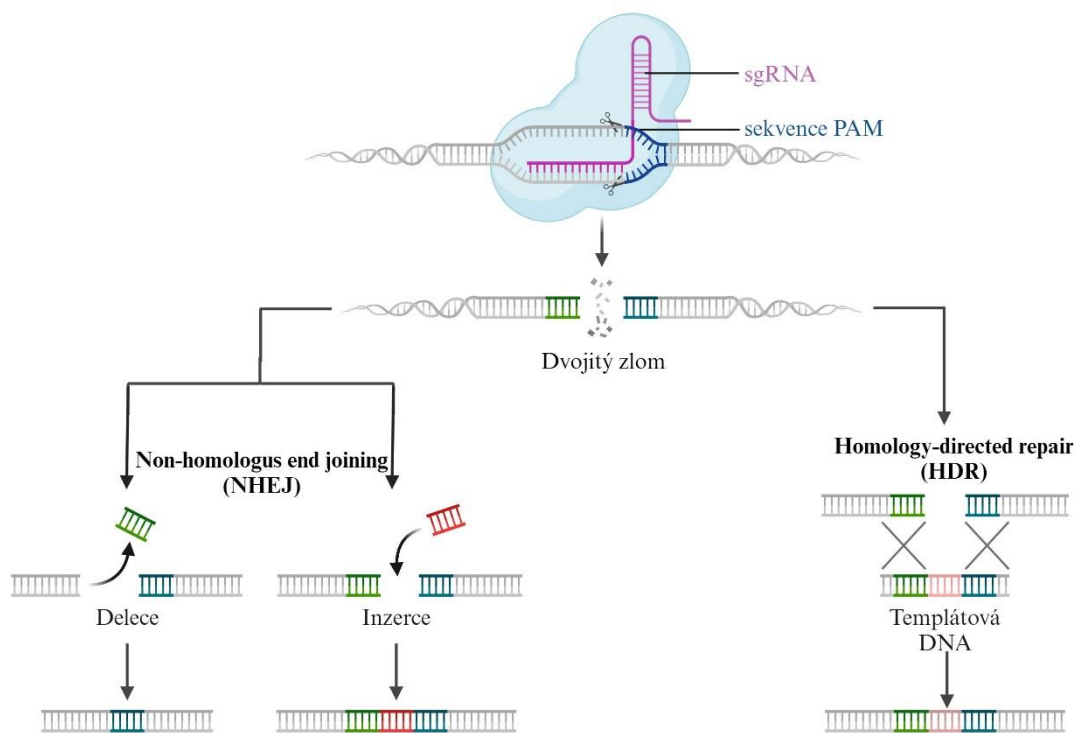
což vede ke tvorbě dvouvláknových zlomů (DSB) (Jinek *et al.*, 2014). Díky možnosti naprogramovat Cas9 pro štěpení DNA na specifických místech, která jsou definována díky *guide* RNA, je tento enzym velmi oblíbeným nástrojem pro editaci genomu. Nejčastěji používanými typy v genomovém inženýrství jsou II-A a II-C. Prototypem typu II-C je *Actinomyces naeslundii* Cas9 (AnaCas9) a II-A je *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9). SpyCas9 je velká, ze 1368 aminokyselin složená, multidoménová, multifunkční endonukleáza, která je nezbytná pro CRISPR/Cas9 interferenci. Mimo tuto funkci se také podílí na tvorbě zralé crRNA a získání *spaceru* (Jinek *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2017). Tento typ obsahuje šest komponentů – Cas1, Cas2, Csn2, Cas9, tracrRNA a *targeting* crRNA (Heler *et al.*, 2015). SpyCas9 je tzv. *dual-RNA-guided* DNA endonukleáza, jelikož k rozštěpení cílové DNA ji navede duplex tracrRNA:crRNA (Deltcheva *et al.*, 2011; Jinek *et al.*, 2012).

3.3.3 Mechanismus CRISPR/Cas9 a genomové inženýrství

Pro genomové inženýrství byly často a účinně používány tzv. *zinc-finger nucleases* (ZFNs) a *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs), které fungují na principu tvorby DSB na cílové DNA. Tvorba DSB iniciuje zahájení opravných mechanismů eukaryotického organismu, což vede k cílenému genetickému přeprogramování. Nevýhodou těchto metod je potřeba vytvořit specifický protein pro každé cílové místo na dsDNA (Jinek *et al.*, 2013). V porovnání s těmito metodami editace genomu, CRISPR/Cas9 požaduje pouze jednu změnu v gRNA sekvenci, je daleko snazší pro navrhnutí, vykazuje vysokou specifitu, a proto technologie používající systém *Streptococcus pyogenes* je velmi často používána k zacílení, editaci a modifikaci genomů obrovského množství buněk a organismů (Ran *et al.*, 2013; Doudna *et al.*, 2014).

Jak již bylo zmíněno, Cas9 je tzv. *dual-RNA-guided* DNA endonukleáza. Potřebný duplex crRNA:tracrRNA může být navrhnut jako tzv. *single-guide* RNA (sgRNA), která má všechny potřebné vlastnosti pro navázání Cas9 a rozpoznání cílového místa DNA (Jinek *et al.*, 2012). Po rozštěpení cílového lokusu pomocí Cas9 dochází k aktivaci reparačních mechanismů (viz obrázek č. 8). Jedním z nich je tzv. *non-homologous end joining* (NHEJ), při kterém, v případě, že není k dispozici opravný templát, dochází v místě rozštěpení k náhodným inzercím či delecím (vznikají tzv. indely). NHEJ může vést k posunovým mutacím nebo k předčasnému začlenění stop kodonu, který vede k narušení genů. NHEJ tak lze využít ke zprostředkování *knock-outu* genů, ke kterému dochází, pokud jsou obě alely genu narušeny pomocí CRISPR-Cas9 systému. V případě náhodných inzercí

nukleotidových sekvencí v průběhu NHEJ dochází k tzv. genovému *knock-inu*. Druhým reparačním mechanismem je *homology-directed repair* (HDR), který je v přítomnosti exogenně zavedeného opravného templátu schopen provést přesnou a precizní modifikaci v cílovém lokusu (Ran *et al.*, 2013; Hiranniramol *et al.*, 2020; Hana *et al.*, 2021).

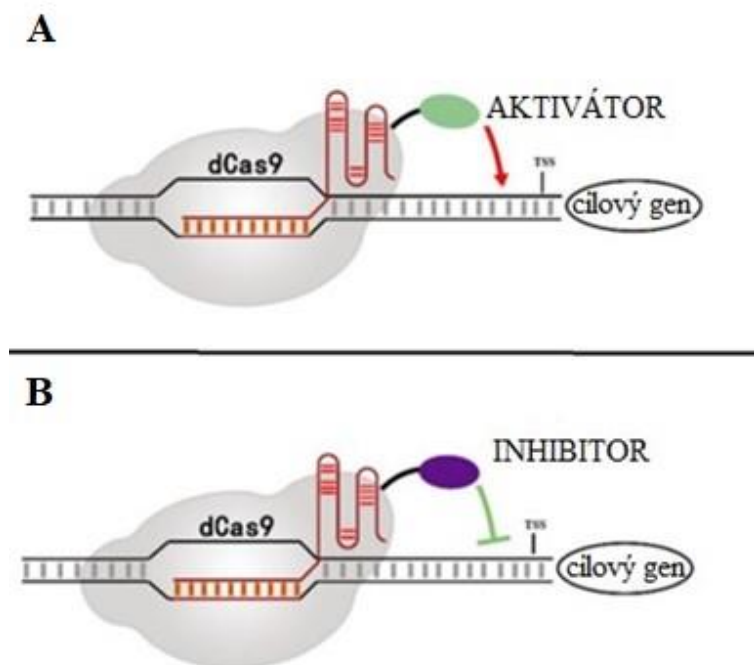


Obrázek 8: Schématické znázornění mechanismu CRISPR/Cas9. Komplex sgRNA je naveden k cílovému místu, enzym Cas9 vytvoří na cílovém místě DNA dvojité zlomy a aktivují se reparační mechanismy buněk. Buď dojde k tzv. *non-homologous end joining* (NHEJ), což vede ke vzniku tzv. indelů nebo dojde v případě přítomnosti opravného templátu k tzv. *homology-directed repair* (HDR). Vytvořeno v programu BioRender.com. Upraveno podle Tang *et al.*, 2019.

3.3.4 Katalyticky deaktivovaná Cas9

Katalyticky deaktivovaná Cas9 (dCas9), neboli Cas9 bez nukleázové aktivity, byla získána zavedením dvou bodových mutací H840A a D10A do HNH a RuvC domény. Díky těmto mutacím nemůže Cas9 provést rozštěpení dsDNA (Qi *et al.*, 2013). Tato technologie využívá deaktivované formy Cas9, která je řízená pomocí sgRNA. Vzniklý komplex dCas9/sgRNA tedy nemůže štěpit vlákna DNA (Karlson *et al.*, 2021). Takto modifikovaná dCas9 se však stále může navázat za pomoci gRNA na specifická místa, která ovlivňují

transkripci genů. Velkou výhodou je, že toto precizní navázání na cílové místo není doprovázeno závažnými vlivy mimo cílové místo. Při fúzi dCas9 s transkripčními efektory dochází k modulaci genové exprese (viz obrázek č. 9). Transkripční efekторы jsou chimerické proteiny, které obsahují DNA-binding domény. Pokud dojde k fúzi transkripčních aktivátorů dCas9, může dojít k tzv. CRISPR aktivaci (CRISPRa). Pokud dojde k fúzi represorů na dCas9, dochází k tzv. CRISPR interferenci (CRISPRi). Při těchto procesech nedochází k modifikaci genomu a jsou reverzibilní (Piatek *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023). Transkripčním aktivátorem pro CRISPRa může být například protein *Herpes simplex virus* (VP16) a dochází ke zvýšení transkripce cílového genu (Sadowski *et al.*, 1988; Casas-Mollano *et al.*, 2020). CRISPRi blokuje elongaci transkripce, napojení RNA polymerázy či napojení transkripčního faktoru v závislosti na místě, které bylo rozpoznáno dCas9-guide RNA komplexem (Doudna *et al.*, 2014). Takovým transkripčním represorem může být například Krüppel-associated Box (KRAB). KRAB byl použit k represi transkripce v savčích buňkách a kvasinkách (Gilbert *et al.*, 2013). Schopnosti přesného programovaného navázání dCas9 se může také využívat při fluorescenčním zobrazování specifického lokusu v živých buňkách, což může napomáhat studiu konformace chromozomů (Doudna *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2023).



Obrázek 9: Schématické znázornění CRISPRa (A) a CRISPRi (B). Převzato a upraveno podle Ding *et al.*, 2022.

3.3.5 Využití CRISPR/Cas9 technologie

CRISPR/Cas9 systém je pro své vlastnosti velmi oblíbeným cílem výzkumu, který však potřebuje svá vylepšení a postupná zdokonalování. Může se uplatňovat v odvětvích, jako je genová terapie a při detekci mnoha lidských onemocnění, jako jsou infekční virových onemocnění, způsobených např. virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV-1) nebo lidský papiloma virus (HPV) (Lin *et al.*, 2021; Bhowmik *et al.*, 2022). Mezi další cílová onemocnění může patřit např. cystická fibróza, Huntingtonova choroba nebo amyloidní dystrofie (Stefanoudakis *et al.*, 2023). V neposlední řadě má tato technologie význam ve výzkumu mnoha nádorových onemocnění, kterým bude v této práci věnována pozornost.

3.3.5.1 CRISPR/Cas9 a využití při výzkumu léčby nádorových onemocnění

Rakovina je onemocnění s velkým výskytem a vysokou mortalitou. Toto onemocnění se standardně léčí pomocí chirurgické resekce, radioterapie a chemoterapie, které s sebou nesou riziko mnoha vedlejších účinků na organismus (Li *et al.*, 2023). Iniclace a progresse nádorových onemocnění jsou spojeny s mutacemi a dysregulací exprese řady genů, včetně onkogenů, tumor-supresorových genů a chemorezistentních genů. Proces rozvoje těchto onemocnění je obvykle doprovázen abnormální expresí velkého počtu genů, jako například p53 či PD-L1. Hlavním cílem léčby zhoubných nádorových onemocnění je potlačit růst a progresi nádoru specifickou korekcí mutací a obnovit expresi dysregulovaných genů (Cha *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). CRISPR/Cas9 technologie má mnoho potenciálních využití v onkologii. Může být využita k vytváření nádorových modelů, identifikaci cílových genů, hodnocení mechanismů rezistence či k modulaci účinnosti imunoterapií (Stefanoudakis *et al.*, 2023). Tuto technologii tedy lze využít k manipulaci s genomem při výzkumu nádorů a ke zkoumání příčin nádorové iniciace, progresse a metastáze. Tento systém je v poslední době využíván k opravě mutací či ke *knock-outu* určitých genů (Morshedzadeh *et al.*, 2023). CRISPR/Cas9 je pro svou schopnost vytvořit místně specifický a účinný genový *knock-out* velmi žádoucím nástrojem pro řešení dlouhodobých problémů, jako vyčerpání T-buněk či imunosuprese nádorového mikroprostředí (Stefanoudakis *et al.*, 2023). Terapie založené na CRISPR/Cas systémech se zaměřují na léčbu nádorových onemocnění krve, léčbu zhoubných nádorů mozku, ledvin, kolorektálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu nebo karcinomu močového měchýře.

Co se týče klinických výzkumů, první *ex vivo* výzkum byl proveden v Číně v roce 2016 u pacienta s rakovinou plic. Pacientovi byly injekčně podány buňky, které byly upraveny

pomocí elektroporace tak, aby došlo k inhibici exprese PD-1 genu skrz receptory endogenních T-lymfocytů (TCR). TCR hraje významnou roli v imunoterapiích nádorových onemocnění. Tento receptor se nachází na povrchu T-lymfocytů a rozpoznává peptidy či antigeny, které se vážou na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), čímž dochází k identifikaci a eliminaci nádorových buněk. U pacientů, kterým byly tyto upravené buňky injektovány byly nalezeny modifikované T-buňky ve velmi krátkém časovém úseku, a v tomto důsledku byla tato metoda považována za účinnou a bezpečnou (He, 2020; Li *et al.*, 2023; Morshedzadeh *et al.*, 2023; Rabaan *et al.*, 2023).

Léčba nádorů je často doprovázena imunitním únikem, který je potřeba pro úspěšnou léčebnou strategii překonat. Významným průlomem jsou terapie pomocí chimérického antigenového receptoru-T (CAR-T), které mají značný terapeutický efekt na zhoubná onemocnění krve, jako lymfom a leukémie. CAR-T buňky jsou geneticky upravené, pro pacienta specifické, T-buňky. CAR-T buňky mají tumor-specifické antigenové chimérické domény, které dokáží aktivovat T-buňky a díky tomu mít smrtící efekt na buňky nádorové (Chen *et al.*, 2022). Příkladem mohou být CD19 CAR-T buňky pro maligní B-buňky. Tyto buňky jsou následně aplikovány pacientovi (Maude *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2020). CAR-T mohou být skvěle modifikovány pomocí metod CRISPR/Cas a pomocí tohoto systému může být také posílena funkce těchto buněk *knock-outem* genů kódujících signální molekuly, nebo T-buněk inhibujících receptory, jako je například PD-1 (Liu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2020).

Ačkoliv je tento systém potenciálně účinným nástrojem pro vývoj léčby rakoviny, byly také zaznamenány výzkumy, ve kterých tvorba DSB pomocí CRISPR/Cas9 aktivovala p53 signální dráhu (Haapaniemi *et al.*, 2018). V důsledku tohoto mají buňky horší fitness a jsou méně schopny proliferovat a diferenciovat se. Tyto poznatky tedy poukazují na fakt, že modifikované buňky mohou také zvýšit riziko vzniku nádorového onemocnění (Xu *et al.*, 2020; Stefanoudakis *et al.*, 2023).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V experimentální části této bakalářské práce byla použita nádorová buněčná linie MIA PaCa-2, která byla získána od firmy *American Type Culture Collection* (ATCC). Tato buněčná linie je odvozena od karcinomu slinivky břišní. Buňky byly kultivovány v T150 cm² kultivačních lahvích a uchovávaly se v inkubátoru při teplotě 37 °C, 5% atmosféře CO₂ a 95% vlhkosti. Pro optimální růst této buněčné kultury bylo použito médium DMEM obohacené o 2,5 % koňského séra a 10 % fetálního bovinního séra bez přídavku antibiotik. Buňky byly udržovány v násadě v přibližném množství 2 miliony na T150 cm² a byly pasážovány třikrát týdně.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie:

- 5× Reaction Buffer for RT (Thermo Scientific, kat. č. 00896678)
- Alt-R[®] Cas9 Electroporation Enhancer (IDT, kat. č. 1075916)
- Alt-R[®] CRISPR-Cas9 tracrRNA, ATTO[™] 550 from Intergrated DNA Technologies (IDT, kat. č. 1077024)
- DMEM High Glucose with L-Glutamine (CAPRICORN SCIENTIFIC, kat. č. DMEM-HA)
- EvaGreen (Biotium, kat. č. 31000)
- Fetální bovinní sérum (Gibco, kat. č.: A5256701)
- Forward A3AR Primer (Generi Biotech, kat. č. 1344G8)
- Forward β-tubulin Primer (Generi Biotech, kat. č. 1296H5)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, kat. č. SHBL6924)
- Isopropylalkohol p.a. (Penta Chemicals Unlimited[®], kat. č. 67-63-0)
- LightCycler[®] 480 Probes Master (Roche, kat.č. 66267720)
- Nuclease-Free Duplex Buffer (IDT, kat. č. 1072570)
- Nuclease-Free Water (Ambion[™], kat. č. 2110036)
- PCR nucleotide mix; dNTPs 10 mM (Promega, kat. č. C1141)
- Random Primers (Promega, kat. č. C118A)
- Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (kat. č. N251B)
- Reverse A3AR Primer (Generi Biotech, kat. č. 1344G9)
- Reverse β-tubulin Primer (Generi Biotech, kat. č. 1296H6)

- RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, kat. č. 01141636)
- TRI-Reagent RNA/DNA/Protein isolation reagent (Molecular Research Center, Inc., kat. č. TR 118)
- TRYPLE Tryple express (Gibco, kat. č. 12604)

4.2.2 Použité soupravy:

- NeonTM transfection system 10 µL Kit (Invitrogen, kat. č. MPK10025)

4.2.3 Použité roztoky:

- 10× fosfátový pufr (PBS) (80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ rozpuštěno v 800 ml destilované H₂O, pH upraveno na 7,4 pomocí HCl, doplněno destilovanou H₂O do 1000 ml, sterilizováno autoklávem)
- 75% ethanol (30 ml 96% ethanol + 10 ml RNA vody)
- DMEM médium (DMEM + 2,5 % koňského séra + 10 % fetálního bovinního séra (FCSI))

4.3 Použité přístroje a zařízení

- Elektroporátor - NeonTM transfection system (InvitrogenTM)
- Inkubátor s příslušenstvím (Thermo Scientific)
- Mikroskop IX51 (Olympus)
- Mikroskop s kamerou - Observer.D1 (ZEISS)
- Spektrofotometr ND-1000 (NanoDrop®)
- Stolní centrifuga - Centrifuge 5430 (Eppendorf)
- Stolní centrifuga - Centrifuge 5804 R (Eppendorf)
- Stolní centrifuga - ROTINA 420 R (Hettich ZENTRIFUGEN)
- Stolní minicentrifuga - Multi-Spin PCV-6000 (Grant-bio)
- Stolní minicentrifuga (Gilson)
- Termocyklér - LightCycler® 480 Instrument II-I (Roche)
- Termocyklér - Peltier Thermal Cycler PTC-100® (MJ Research)
- Termostat - ThermoStat plus (Eppendorf)
- Třepačka - Vortex Genie (Scientific Industries)
- Vi-cell XR – automatický analyzátor (BECKMAN COULTER)
- Vodní lázeň WNB (Mettler)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

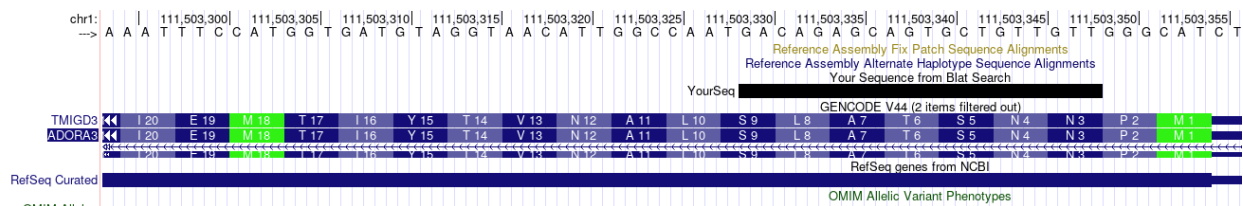
4.4.1 Design crRNA

Pro účel *knock-outu* genu *ADORA3* byly za využití internetového nástroje CHOPCHOP navrženy čtyři různé crRNA (crRNA1, crRNA2, crRNA3 a crRNA4) (Labun *et al.*, 2019). Sekvence těchto crRNA jsou uvedeny v tabulce č.1.

Tabulka 1: Sekvence navržených crRNA

Typ navržené crRNA	Sekvence
crRNA1	TGACAGAGCAGTGCTGTTGT
crRNA2	GTTGGGCATCTTGCCTTCCC
crRNA3	GACAGAGCAGTGCTGTTGTT
crRNA4	CTGTGGAGGTTCCCCTGGGA

Pro design crRNA byla zvolena oblast nacházející se kolem START kodonu obsahující také PAM sekvenci NGG odpovídající následně použité Cas9 nukleáze (viz obrázek č. 10).



Obrázek 10: Schématické znázornění crRNA3 cílené na určitou oblast genu *ADORA3*.

4.4.2 Příprava reagentů pro provedení CRISPR/Cas9 elektroporace

CRISPR RNA (crRNA) v komplexu s tracrRNA a Cas9 nukleáza byla do kultivovaných buněk vložena pomocí elektroporace. Metoda elektroporace je založena na použití krátkých vysokonapěťových elektrických šoků, díky kterým lze bez výrazného poškození buňky překonat buněčnou membránu (Potter *et al.* 1984; Potter, 1988).

Nejprve byly připraveny všechny potřebné reagenty pro provedení elektroporace pomocí čtyř typů crRNA. Jednotlivé reagenty (crRNA1, crRNA2, crRNA3, crRNA4, tracrRNA, enhancer) byly rozpuštěny přidáním duplex pufru a zvortexovány. Použité objemy jsou v tabulce č. 2. Reagenty tracrRNA je fluorescenčně značená pomocí ATTO 550, díky níž lze později identifikovat celý vložený RNP komplex v buňkách.

Tabulka 2: Příprava reagensií přidáním duplex pufru

Reagencie	Duplex pufr [μ l]	Výsledná koncentrace [μ M]
crRNA1		
crRNA2		
crRNA3	50	200
crRNA4		
tracrRNA	100	200
Enhancer	100	100

Byly připraveny roztoky *guideRNA* (gRNA). Pro každou crRNA byl připraven samostatný roztok gRNA. Reagencie byly připraveny dle tabulky č. 3. Po smíchání reagensií byl roztok gRNA inkubován ve vodní lázni při 95 °C po dobu 5 min. Po inkubaci byl tento roztok inkubován při pokojové teplotě přibližně 30 min do doby, než dosáhl pokojové teploty.

Tabulka 3: Příprava gRNA

Reagencie	Koncentrace zásobního roztoku [μ M]	Pipetovaný objem [μ l]
crRNA	200	4,40
tracrRNA	200	4,40
Duplex pufr	-	11,20
Výsledný objem gRNA [μ l]		20
Výsledná koncentrace gRNA [mM]		44

4.4.3 Optimalizace elektroporačních podmínek pro buněčnou linii MIA PaCa-2

O používané buněčné linii MIA PaCa-2 nebyla nalezena publikace s informacemi o provedení elektroporace, a proto bylo nutné tuto metodu nejprve optimalizovat, tedy stanovit ideální podmínky elektroporace. Optimalizace byla prováděna na šesti vzorcích

kultivovaných buněk s RNP komplexem obsahujícím crRNA1. Cílem bylo získat buněčnou linii, která bude po provedení elektroporace vykazovat nejvyšší viabilitu zároveň s největším množstvím elektroporovaných buněk, které budou při pozorování fluorescenčním mikroskopem vykazovat zbarvení, které je způsobeno fluorescenčně značenou tracrRNA. Všechny následující kroky byly prováděny ve sterilních podmínkách.

Byl připraven roztok endonukleázy Cas9 smícháním reagensů dle tabulky č. 4. Pufr R je součástí *NeonTM transfection system 10 µL Kitu*. Tento pufr je vhodný pro adherentní buněčné linie.

Tabulka 4: Příprava roztoku Cas9 pro provedení optimalizace elektroporace

Reagencie	Pipetovaný objem [µl]
Cas9	3,00
Pufr R	2,00
Celkový objem Cas9 roztoku [µl]	5,00

Byl připraven Enhancer o koncentraci 10 µM dle tabulky č. 5.

Tabulka 5: Příprava Enhanceru

Reagencie	Pipetovaný objem [µl]
Enhancer	2,16
Duplex pufr	17,84
Celkový objem Enhanceru [µl]	20,00

Byl připraven RNP komplex dle tabulky č. 6. Tento roztok byl inkubován při pokojové teplotě přibližně 20 minut.

Tabulka 6: Příprava RNP komplexu

Reagencie	Pipetovaný objem [μl]
gRNA	3,50
Roztok Cas9	3,50
Celkový objem RNP komplexu [μl]	7,00

Pro experiment byly připraveny buňky buněčné linie MIA PaCa-2, které byly zpasážovány a následně byla pomocí přístroje ViCell stanovena jejich viabilita a koncentrace. Dále byly buňky naředěny v DMEM médiu tak, aby v jednom elektroporačním replikátu bylo 240 000 buněk. Následně byly buňky centrifugovány při 150 g po dobu 5 minut. Byl odsát supernatant a sediment buněk byl rozsuspendován v 500 μl PBS pufru. Tato suspenze buněk byla opět zcentrifugována při 150 g po dobu 5 minut a supernatant byl odsát. Sediment byl rozsuspendován v 78 μl pufru R.

Do každé z jamek šestijamkové desky byly napipetovány 2 ml DMEM média. Do elektroporační cely byl napipetován elektroporační pufr E. Před každou elektroporací byly vzorky připraveny dle tabulky č. 7.

Tabulka 7: Příprava vzorku pro provedení elektroporace

Reagencie	Pipetovaný objem [μl]
Buněčná suspenze	7,80
RNP komplex	1,00
Pufr R	1,20
Enhancer	2,00

Byly provedeny elektroporace šesti vzorků dle tabulky č. 8 pomocí elektroporátoru *NeonTM transfection system*. Vzorek číslo 1 sloužil jako kontrolní. U tohoto vzorku byla provedena pouze elektroporace bez vložení RNP komplexu, přičemž objem pufru R u tohoto vzorku byl navýšen o objem RNP komplexu. Tedy na 2,2 μl.

Tabulka 8: Optimalizace elektroporace pro buněčnou linii MIA PaCa-2

Vzorek	Napětí [V]	Čas [ms]	Počet elektrických pulsů
1	1500	20	5
2	1200	20	4
3	1200	40	4
4	1700	20	4
5	1700	20	2
6	1500	20	5

Po provedení elektroporace byl každý vzorek přenesen do jamky s médiem a inkubován 24 hodin. Následně byly jednotlivé jamky zkontrolovány pomocí fluorescenčního mikroskopu a podle viability a množství elektroporovaných buněk bylo vyhodnoceno, která z optimalizačních podmínek byla nejvíce vyhovující pro buněčnou linii MIA PaCa-2.

4.4.4 *Knock-out* A₃ adenosinového receptoru buněčné linie MIA PaCa-2 pomocí CRISPR/Cas9

Knock-out A₃ adenosinového receptoru byl proveden za pomoci CRISPR/Cas9 technologie, kdy RNP komplexy byly do buněk transfekovány pomocí elektroporace, jejíž podmínky byly optimalizovány v předchozím kroku. V experimentu byly použity čtyři různé crRNA (crRNA1, crRNA2, crRNA3 a crRNA4). Cílem tohoto experimentu bylo vybrat nejúčinnější crRNA, pomocí které bude *knock-out* A₃AR úspěšný.

Nejprve byl připraven roztok enzymu Cas9, kdy bylo smícháním reagensů dle tabulky č. 9.

Tabulka 9: Příprava roztoku Cas9

Reagencie	Pipetovaný objem [μl]
Cas9	4,50
Pufr R	3,00
Celkový objem Cas9 roztoku [μl]	7,50

Následně byl připraven RNP komplex (gRNA+Cas9 nukleáza) dle tabulky č. 10.

Tabulka 10: Příprava RNP komplexu

Reagencie	Pipetovaný objem [μl]
gRNA	2,50
Roztok Cas9	2,50
Celkový objem RNP komplexu [μl]	5,00

Jako poslední byl připraven enhancer, a to smícháním reagensů dle tabulky č. 11.

Tabulka 11: Příprava enhanceru

Reagencie	Pipetovaný objem [μl]
Enhancer	6,48
Duplex pufr	53,52
Celkový objem Enhanceru [μl]	60,00

Bylo provedeno pasážování buněk a buňky byly spočítány pomocí přístroje ViCell. Buňky byly naředěny v médiu tak, aby jich bylo přibližně 6 000 000 (25 elektroporačních replikátů po 240 000 buňkách). Buněčná suspenze byla zcentrifugována při 150 g po dobu 5 minut a supernatant byl odstraněn. Sediment buněk byl rozsuspendován v 500 μl PBS pufru a opět byla provedena centrifugace při 150 g, 5 minut. Supernatant byl odstraněn a sediment buněk byl rozsuspendován ve 195 μl pufru R.

Byla provedena elektroporace připravených buněk za pomoci čtyř různých RNA komplexů při napětí 1700 V, po dobu 20 ms a 4 pulsech. Pro každý RNP komplex obsahující jednu ze čtyř crRNA byl experiment proveden v triplikátu. Vzorky pro elektroporaci byly naředěny dle schématu v tabulce č. 12.

Tabulka 12: Schéma přípravy vzorků pro provedení elektroporace RNP komplexy

	Elektroporace crRNA [μ l]	Elektroporace (-) [μ l]	Elektroporace (+) [μ l]
Buňky	23,40	23,40	23,40
RNP komplex	3,00	-	-
Pufr R	6,00	6,00	6,00
Enhancer	3,60	6,60	6,60

Buňky byly po provedení elektroporace inkubovány v šestijamkových deskách po dobu 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí této doby byly třikrát promyty médiem a pozorovány na fluorescenčním mikroskopu Observer.D1 (ZEISS). Byla pozorována úspěšnost elektroporace díky fluorescenčně značené tracrRNA fluorescenční značkou ATTO 550 (excitace 561 nm, emise 600/37 nm), jež je součástí elektroporovaného RNP komplexu. Snímky byly snímány za použití objektivu se zvětšením 10 \times .

Buňky byly následně inkubovány při 37 °C a pravidelně pasážovány, než buněčná linie narostla do optimální velikosti.

4.4.4.1 Izolace mRNA tri-reagentovou metodou

Byla provedena izolace mRNA elektroporovaných buněk pomocí tri-reagentové metody. K peletám buněk (přibližně 10 000 000 buněk/vzorek) byl přidán 1 ml TRI-reagentu. Vzorky TRI lyzátů byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 min. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l chloroformu a byly zvortexovány. Vzorky byly následně inkubovány po dobu 10 min při pokojové teplotě. Vzorky byly centrifugovány při 12 000 g, 4 °C po dobu 15 min. Ze vzorků bylo odebráno přibližně 450 μ l svrchní vodné fáze obsahující RNA a ta byla přenesena do nových mikrozkuvek. Ke vzorkům bylo přidáno 450 μ l isopropanolu a krátkým opakovaným protřepáním byly promíchány obě vrstvy. Vzorky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Vzorky byly následně centrifugovány 10 min při 12 000 g a 4 °C. Byl odstraněn supernatant a RNA peleta byla promyta 1,5 ml 75% ethanolu. Zkuvek byly opatrně převráceny a byla tak uvolněna peleta. Vzorky byly opět centrifugovány 5 min při 12 000 g a 4°C. Následně byl odstraněn supernatant a peleta byla vysušena na vzduchu ve flow-boxu (přibližně 10 min). K peletě RNA bylo přidáno 25 μ l DEPC *treated* vody. Vzorky byly vloženy do termobloku a inkubovány při 60 °C po dobu 10 min. Poté byly vzorky ochlazeny ve vychlazeném stojanu na mikrozkuvek.

Byla změřena koncentrace vyizolované mRNA pomocí spektrofotometru NanoDrop a byla tak ověřena úspěšnost izolace.

4.4.4.2 Reverzní transkripce

Po vyizolování mRNA byla provedena reverzní transkripce pro získání genomické cDNA. Dle tabulky č. 13 byly do mikrozkušavek napipetovány jednotlivé reagensie (RNA, DEPC voda a hexamery). Vzorky byly zvortexovány a krátce zcentrifugovány. Následně byly vzorky inkubovány v termocykléru s vyhříváním víkem při 70 °C po dobu 5 min. Po skončení inkubace byly vzorky 1 minutu chlazeny v chladícím stojanu.

Tabulka 13: Schéma přípravy vzorků pro reverzní transkripci

Vzorek	Koncentrace RNA [ng/μl]	RNA [μl]	DEPC voda [μl]	Hexamery [μl]
crRNA 1	672,70	4,46	14,44	0,60
crRNA2	723,90	4,14	14,76	0,60
crRNA3	176,00	17,05	1,85	0,60
crRNA4	797,70	3,76	15,14	0,60
Elektroporace (+)	444,10	6,76	12,12	0,60

Byl připraven Master Mix pro provedení reverzní transkripce smícháním reagensií dle tabulky č. 14. Roztok byl zvortexován a krátce zcentrifugován.

Tabulka 14: Příprava Master Mixu pro reverzní transkripci

Reagensie	Objem pro 1 vzorek [μl]
RT pufr (5x)	6,00
dNTP (10 mM)	3,00
RNAsin	0,75

Ke zchlazeným vzorkům bylo přidáno po 9,75 μl připraveného MasterMixu a vzorky byly 5 minut inkubovány při pokojové teplotě. Následně bylo ke vzorkům přidáno po 0,75 μl RTasy, vzorky byly opět zvortexovány, zcentrifugovány a inkubovány 10 minut při pokojové

teplotě. Poté byly vzorky inkubovány v termocykléru s vyhříváním v 42 °C po dobu 60 min a následně při 70 °C po dobu 10 min. Následně byla pomocí spektrofotometru NanoDrop změřena koncentrace získané cDNA.

4.4.4.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

Efektivita jednotlivých testovaných Cas9 komplexů byla stanovena na základě poklesu exprese cílového genu *A₃AR* v modifikovaných buněčných liniích pomocí RT-qPCR.

Byla připravena PCR reakční směs dle tabulky č. 15. Takto byla připravena PCR reakční směs jak pro detekci genu *A₃AR*, tak pro detekci genu *β-actin*, *housekeeping* genu, který sloužil jako endogenní kontrola k normalizaci hladin mRNA mezi testovanými vzorky.

Tabulka 15: Příprava PCR reakční směsi

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
Probes master	10
DEPC voda	6
Barvivo EvaGreen	1
Primery	2
Celkový objem [μl]	19

Sekvence použitých primerů – forward primer (FP) a reverse primer (RP) jsou znázorněny v tabulce č. 16.

Tabulka 16: Sekvence použitých primerů pro RT-qPCR

Gen	Sekvence	Délka produktu [bp]
hADORA3	FP 5'-TGTTTGGCTGGAACATGAAA-3'	155
	RP 5'-ATAGATGGCGCACATGACAA-3'	
hACTB	FP 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	234
	RP 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	

PCR reakční směs byla rozpipetována po 19 μl do 96jamkové desky a do každé jamky bylo napipetováno po 1 μl cDNA jednotlivých vzorků. Vzorky byly testovány v triplikátech. Jako kontrolní vzorek k porovnání exprese byla použita parentální linie MIA-PaCa2.

Byla provedena RT-qPCR s teplotním a časovým profilem viz tabulka č. 17.

Tabulka 17: Teplotní a časový profil RT-qPCR

Proces	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Denaturace	95	30	1
Denaturace	95	30	
Annealing	60	30	45
Elongace	72	60	
Elongace	60	60	1
	95		1
Chlazení	37	1	1

4.4.4.4 Limitní ředění

Na základě výsledků z RT-qPCR bylo se vzorky, které byly elektroporovány RNP komplexem obsahujícím crRNA3 provedeno limitní ředění. Metoda klonování pomocí limitního ředění je jedna z nejpoužívanějších a nejlevnějších metod k izolaci jednotlivých buněk. Je založena na Poissonovské distribuci, která umožňuje velmi rychlé získání jednotlivých buněk ze zředěných buněčných suspenzí (Ye *et al.*, 2021). Buňky transfekované RNP komplexem obsahujícím crRNA3 byly rozpipetovány do čtrnácti 96jamkových desek tak, aby připadala jedna buňka na každou druhou jamku. Takto připravené desky s buňkami byly inkubovány dva dny při 37 °C. Po dvou dnech inkubace bylo do každé jamky přidáno 50 µl DMEM média. Takto připravené desky byly následně inkubovány ve stejných podmínkách přibližně měsíc. Během této doby byl pravidelně pod mikroskopem pozorován případný nárůst nových buněčných kolonií v jamkách. V jamkách s koloniemi bylo dvakrát týdně vyměňováno médium. Po měsíčním růstu byly vzniklé klony vysazeny do malých kultivačních lahví a byly postupně pasážovány a přesazovány do větších lahví, dokud nebyla kolonie klonů dostatečně velká.

4.4.4.5 Izolace mRNA získaných klonů tri-reagentovou metodou

Byla provedena izolace mRNA tri-reagentovou metodou. Pro izolaci mRNA byl použit stejný postup jako v kroku 4.4.4.1. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace mRNA jednotlivých klonů.

4.4.4.6 Reverzní transkripce

S mRNA jednotlivých klonů byla provedena reverzní transkripce. Byl použit stejný postup jako v kroku 4.4.4.2. Použité reagenty byly smíchány dle tabulky č. 18.

Tabulka 18: Schéma přípravy vzorků pro reverzní transkripci klonů

Vzorek (klon)	koncentrace	RNA [μl]	DEPC voda [μl]	Hexamery [μl]	MasterMix [μl]	RTasa [μl]
	RNA [ng/μl]					
MP-2	618,10	4,85	14,05	0,60	9,75	0,75
12 11F	401,10	7,48	11,42	0,60	9,75	0,75
13 2G	892,60	3,36	15,54	0,60	9,75	0,75
12 5G	453,90	6,61	12,29	0,60	9,75	0,75
8 2C	819,40	3,66	15,24	0,60	9,75	0,75
14 7G	496,20	6,05	12,85	0,60	9,75	0,75
2 4B	900,80	3,33	15,57	0,60	9,75	0,75
4 4E	645,20	4,65	14,25	0,60	9,75	0,75
14 3F	506,40	5,92	12,98	0,60	9,75	0,75
3 4B	638,30	4,70	14,20	0,60	9,75	0,75
5 7G	851,50	3,52	15,38	0,60	9,75	0,75
5 9F	884,50	3,39	15,51	0,60	9,75	0,75

Master mix byl připraven dle tabulky 13 v kroku 4.4.4. Přítomnost cDNA po provedení reverzní transkripce byla následně ověřena spektrofotometricky.

4.4.4.7 RT-qPCR

Byla provedena metoda RT-qPCR pro stanovení hladiny exprese A₃AR v monoklonálních buněčných liniích. Pracovní postup, příprava primerů a ředění vzorků proběhlo stejně, jako v kroku 4.4.4.3. Do jamek destičky bylo napipetováno 1 μl cDNA jednotlivých klonů a 19 μl reakční směsi. Každý vzorek byl testován v triplicátu. Kontrolním vzorkem byla parentální linie MIA-PaCa2. Tento krok byl proveden ve třech opakováních.

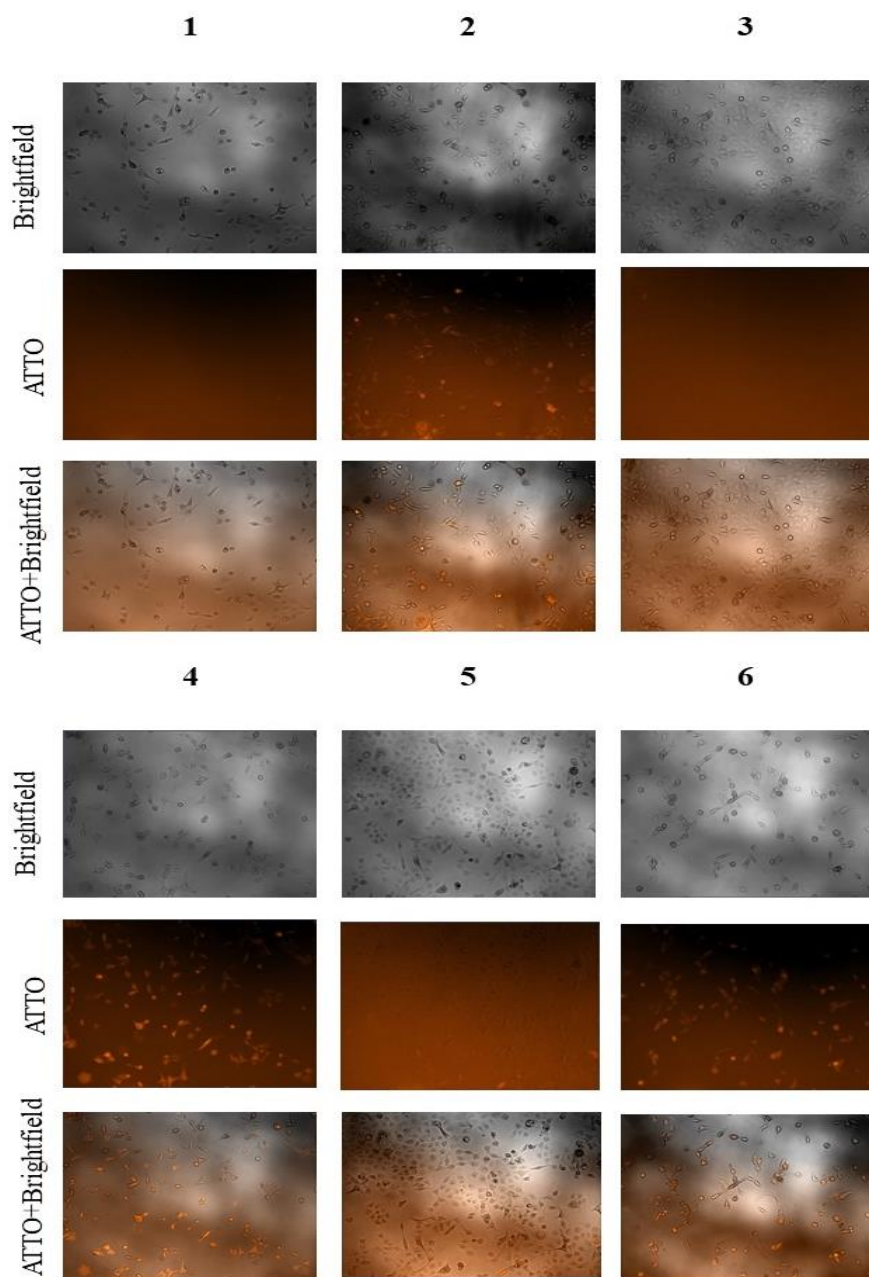
5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení optimálních podmínek elektroporace buněčné linie

MIA PaCa-2

Nejprve byly navrženy čtyři typy crRNA pomocí programu CHOPCHOP. Pro design těchto crRNA byla zvolena oblast nacházející se v blízkosti START kodonu, která obsahuje PAM sekvenci NGG, která odpovídá následně použitému enzymu Cas9.

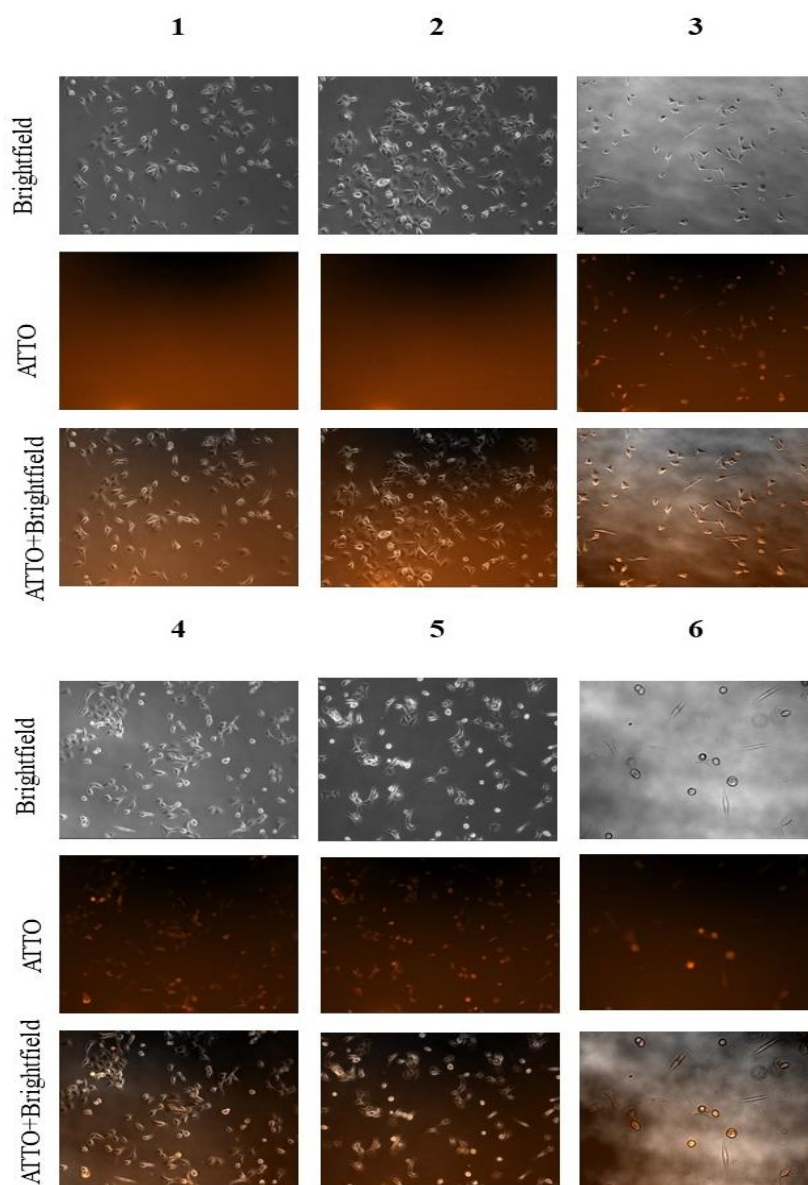
Byla provedena optimalizace elektroporačních podmínek pro buněčnou linii MIA PaCa-2 a po provedení elektroporace této buněčné linie se vizuálně nejlépe jeví podmínky u vzorku č. 4, tj. 1700 V, 20 ms a 4 pulsy (viz obrázek č. 11). Tyto buňky byly silně fluoreskující díky fluorescenční značce ATTO 550, která je navázaná na tracrRNA a zároveň vykazovaly vysokou viabilitu. Pro pozorování byl použit fluorescenční mikroskop Observer.D1 (ZEISS), vzorky byly pozorovány při zvětšení 10×.



Obrázek 11: Optimalizace elektroporačních podmínek pro buněčnou linii MIA PaCa-2. **1)** kontrolní vzorek, bez vložení RNP komplexu 1500 V, 20 ms, 5 el. pulsů.; ostatní vzorky byly podrobeny vložení RNP komplexu obsahující crRNA1 pomocí elektroporace za těchto podmínek: **2)** 1200 V, 20 ms, 4 el. pulsy; **3)** 1200 V, 40 ms, 4 el. pulsy; **4)** 1700 V, 20 ms, 4 el. pulsy; **5)** 1700 V, 20 ms, 2 el. pulsy; **6)** 1500 V, 20 ms, 5 el. pulsů. Nejvhodnější podmínky elektroporace se projevily u vzorku 4.

5.2 Určení nejvhodnější crRNA pro *knock-out* A₃ adenosinového receptoru buněčné linie MIA PaCa-2

Po provedení elektroporace pomocí čtyř RNP komplexů obsahující čtyři různé crRNA (crRNA1, crRNA2, crRNA3, crRNA4) byla mikroskopicky vyhodnocena úspěšnost tohoto kroku, opět díky přítomnosti fluorescenčně značené tracrRNA. Všechny použité RNP komplexy byly úspěšně transfekovány do buněk (viz obrázek č. 12, kde úspěšně transfekované buňky září červeně). Pro pozorování byl použit fluorescenční mikroskop Observer.D1 (ZEISS), vzorky byly pozorovány při zvětšení 10×.



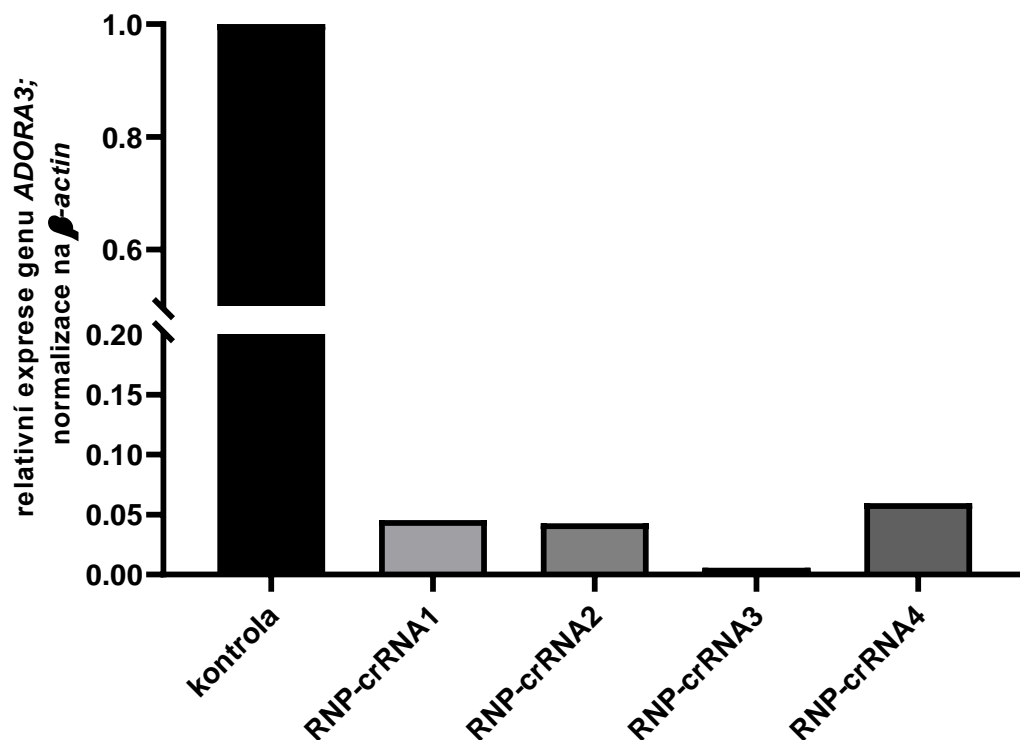
Obrázek 12: Elektroporované buňky pomocí RNP-crRNA1 (3), RNP-crRNA2 (4), RNP-crRNA3 (5), RNP-crRNA4 (6). Kontrolní vzorek – pouze elektroporované buňky bez vložení RNP (1), kontrolní vzorek – buňky bez provedení elektroporace, kultivované v DMEM médiu bez antibiotik (2).

Aby mohlo být určeno, který z použitých RNP komplexů byl nejméně úspěšný, tedy který dokázal nejvíce snížit expresi genu *ADORA3*, byla provedena RT-qPCR. Z elektroporovaných buněk byla vyizolována mRNA, jejíž koncentrace byla následně spektrofotometricky změřena na nanodropu (viz tabulka č. 19) a tím ověřena úspěšnost izolace. Poté byly vzorky mRNA přepsány reverzní transkripcí do cDNA.

Tabulka 19: Koncentrace mRNA jednotlivých vzorků po izolaci TRI-reagentovou metodou

Vzorek	Koncentrace mRNA [ng/μl]
crRNA 1	672,70
crRNA2	723,90
crRNA3	176,00
crRNA4	797,70
Elektroporace (+)	444,10

Na základě výsledků z RT-qPCR bylo vyhodnoceno, že nejvhodnějším RNP komplexem se jeví RNP komplex obsahující crRNA3 (viz obrázek č. 13). Z grafu lze vyčíst, že v porovnání s kontrolní parentální linií MIA PaCa-2, u které je exprese genu *ADORA3* vysoká, byla nejvíce úspěšná crRNA3, jelikož exprese genu po *knock-outu* RNP komplexem obsahujícím tuto crRNA je velmi nízká.



Obrázek 13: Graf s výsledky z RT-qPCR znázorňující expresi genu *ADORA3* normalizovanou na β -actin po provedení elektroporace čtyřmi různými RNP komplexy – RNP-crRNA1, RNP-crRNA2, RNP-crRNA3, RNP-crRNA4. Kontrolním vzorkem je parentální linie MIA PaCa-2. Vytvořeno v programu GraphPad Prism.

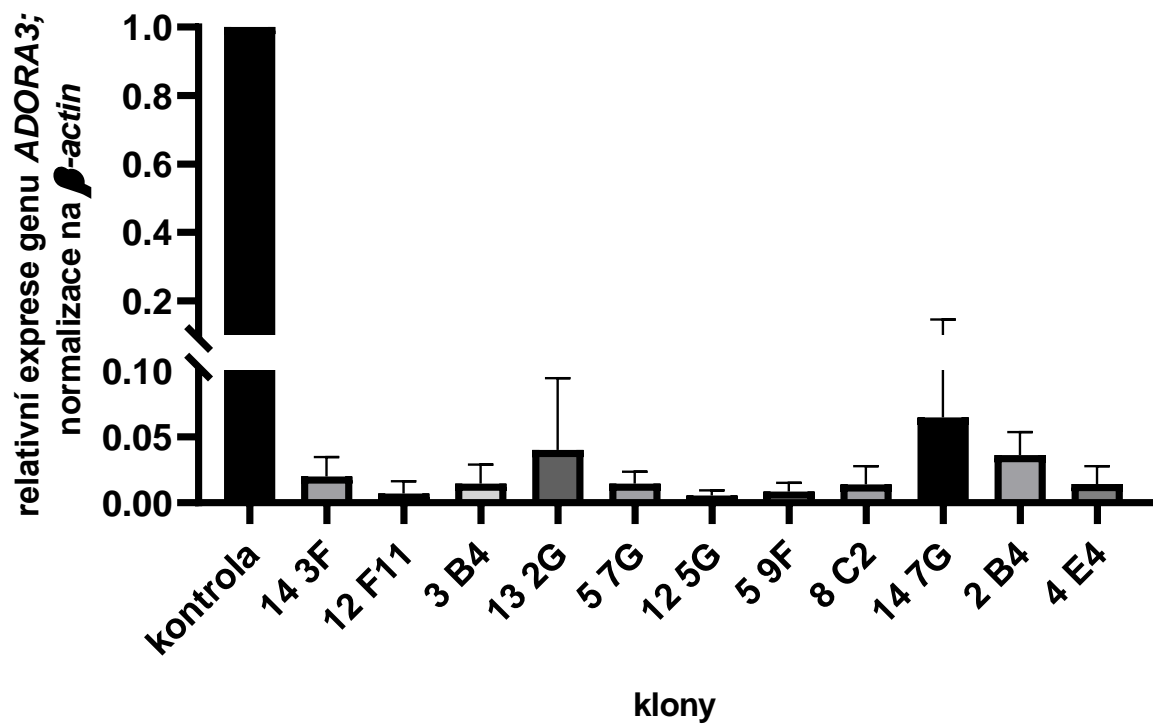
5.3 Vyhodnocení úspěšnosti *knock-outu* A₃ adenosinového receptoru

Po provedení limitního ředění bylo vyselektováno celkem 12 klonů, jež byly dále expandovány. Z takto získaných monoklonálních buněčných linií byla izolována mRNA pomocí tri-reagentové metody. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace získané mRNA (viz tabulka č. 20). Vyizolovaná mRNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Klon 10 10G neměl dostatečnou koncentraci mRNA, a tak byl z experimentu vyřazen.

Tabulka 20: Koncentrace mRNA pro přípravu vzorků klonů pro reverzní transkripci

Vzorek (klon)	Koncentrace mRNA[ng/μl]
MP-2	618,10
12 11F	401,10
13 2G	892,60
12 5G	453,90
8 2C	819,40
14 7G	496,20
2 4B	900,80
4 4E	645,20
14 3F	506,40
3 4B	638,30
5 7G	851,50
5 9F	884,50
10 10G	139,6

Úspěšnost *knock-outu* genu pro A₃AR u klonů, které byly získány limitním ředěním po elektroporaci pomocí RNP komplexu obsahujícího crRNA3 byla ověřena metodou RT-qPCR (viz obrázek 14). V porovnání s kontrolním vzorkem parentální linie MIA PaCa-2 byla exprese genu pro A₃AR u všech klonů velmi nízká. Nejnižší exprese genu kódující A₃AR je viditelná u klonů 12 F11, 5 9F a 12 5G.



Obrázek 14: Graf s výsledky z RT-qPCR znázorňující expresi genu kódujícího A₃AR u vyselektovaných klonů buněčné linie MIA PaCa-2, na které byla provedena elektroporace pomocí RNP komplexu obsahujícího crRNA3 za použití elektroporačních podmínek 1700 V, 20 ms, 4 el. pulsy. Kontrolním vzorkem je parentální linie MIA PaCa-2 bez provedení elektroporace. Vytvořeno v programu GraphPad Prism.

6 DISKUSE

Tato bakalářská práce se zabývá *knock-outem* A₃AR pomocí technologie CRISPR/Cas9. A₃AR je hojně exprimován v různých typech nádorových onemocnění, tudíž je velmi slibným terapeutickým cílem (Fishman *et al.*, 2001). Buněčný model, který byl vyvinut *knock-outem* tohoto genu bude moci být využíván při testování nových terapeutik.

Po neúspěšném *knock-downu* A₃ adenosinového receptoru pomocí siRNA interference na pracovišti, kde byla bakalářská práce vypracována, byla pro účel umlčení exprese genu zvolena metoda CRISPR/Cas9. Jde o revoluční technologii, především pro své precizní míření na cílové místo.

Pro vložení RNP komplexů obsahujících crRNA byla v této práci použita metoda elektroporace. Dle (Potter *et Heller*, 2003) jsou nejvíce kritickými parametry úspěšné *in vitro* elektroporace maximální napětí elektrického šoku a trvání elektrických pulsů, a proto musí být tyto podmínky optimalizovány pro každou buněčnou linii. Jelikož nebyla nalezena publikace stanovující tyto parametry pro buněčnou linii MIA PaCa-2, musela být provedena jejich optimalizace. Efektivita elektroporace byla stanovena pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy byla detekována tracrRNA značená fluorescenční značkou ATTO 550. Tato tracrRNA byla stejně jako testované crRNA a Cas9 nukleáza součástí použitých RNP komplexů, tudíž detekce fluorescenčního signálu ATTO 550 v buňkách značila jejich úspěšnou elektroporaci danými RNP komplexy. Takto byly jako optimální podmínky pro elektroporaci buněčné linie MIA PaCa-2 stanoveny 4 pulsy o trvání 20 ms při napětí 1700 V. U ostatních testovaných podmínek byla buď nízká viabilita, která mohla být způsobena příliš vysokým napětím a velkým množstvím elektrických pulsů, nebo v opačném případě při menším napětí a menším množství pulsů nebyla elektroporace buněk RNP komplexy úspěšná, tedy viabilita buněk byla sice vysoká, nicméně elektroporované buňky neobsahovaly detekovatelné množství RNP komplexů. Tyto podmínky tedy byly vyhodnoceny jako nevyhovující.

Za účelem provedení *knock-outu* A₃AR byly validovány čtyři RNP komplexy lišící se inkorporovanou crRNA. Efektivita testovaných RNP komplexů byla stanovena na základě poklesu exprese cílového genu A₃AR v modifikovaných buněčných liniích pomocí RT-qPCR. Nejprve však u buněk elektroporovaných danými RNP komplexy byla opět ověřena intracelulární lokalizace těchto komplexů pomocí výše zmíněné detekce signálu ATTO 550. U RNP komplexů obsahujících crRNA2 a crRNA3 nebyl nejdříve experiment

úspěšný, jelikož fluorescenční signál nebylo možné detekovat, a tak bylo provedeno opakování. Dle článku (Guarnaccia *et al.*, 2021) může při použití *Neon Electroporation transfection system* dojít k problémům například, pokud jsou buňky ponechány v pufru R více, než 30 minut, jelikož tento pufr snižuje jejich viabilitu, nebo pokud se ve špičce *Neon tip* objeví bubliny. Problémem může být i to, že všechny použité reagencie nejsou zahřáty na optimální teplotu 37 °C. V našem případě se jevila jako nejpravděpodobnější chyba právě přítomnost bublin ve špičce, což vedlo k elektrickému zkratu v elektroporační cele a následnému poškození buněk. Po zopakování experimentu byla elektroporace úspěšně provedena i pomocí těchto RNP komplexů. U RNP komplexu obsahujícího crRNA4 byla pozorována velmi nízká viabilita elektroporovaných buněk. To mohlo být pravděpodobně také způsobeno možným zkratem při provádění elektroporace, kdy mohla být většina buněk usmrcena. Při následném porovnání hladiny exprese A₃AR v modifikovaných liniích s referenční parentální linií MIA PaCa-2 lze konstatovat, že RNP komplex obsahující crRNA3 vykazoval nejvyšší efektivitu, tedy vedl k nejsilnějšímu utlumení exprese studovaného proteinu A₃AR.

Za účelem získání buněčné linie s nejvýraznějším utlumením exprese genu A₃AR či jeho absolutním *knockoutem* bylo provedeno limitní ředění buněk, jež byly elektroporovány výše zmíněným vysoce efektivním RNP komplexem obsahujícím crRNA3. Ačkoli bylo limitní ředění provedeno do celkem čtrnácti 96jamkových desek, bylo získáno pouze 12 klonů, což mohlo být způsobeno kultivací ve standardním, nikoli kondiciovaném médiu. Navzdory této komplikaci byly získané monoklonální buněčné linie podrobeny stanovení hladiny exprese A₃AR pomocí RT-qPCR. Z výsledků vyplývá, že *knock-out* A₃ adenosinového receptoru byl úspěšný, jelikož exprese tohoto receptoru v porovnání s parentální linií byla u vyselektovaných klonů velmi nízká, téměř nulová. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u klonů 12 F11, 5 9F a 12 5G, kde nebyla detekovaná téměř žádná exprese A₃AR.

Jelikož RT-qPCR poskytuje pouze data o genové expresi na úrovni mRNA, bude úspěšnost *knock-outu* u těchto tří klonů dále validována pomocí western blotu, případně imunocytochemie. Pro vyloučení *off-target* aktivity použitého RNP komplexu, tedy ověření, že v genomu nevznikly jiné než zájmové modifikace, budou v daných monoklonálních liniích osekvenována právě potenciální *off-target* místa vyplývající ze sekvence crRNA3.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést *knock-out* A_3 adenosinového receptoru u nádorové linie za použití CRISPR/Cas9 systému. A_3 adenosinový receptor je pro svou hojnou expresi slibným protinádorovým cílem. *Knock-outem* tohoto receptoru může být vytvořen buněčný model pro testování protinádorových terapeutik. Pro experiment byla použita buněčná linie MIA PaCa-2, která je odvozena od karcinomu slinivky břišní.

V první části byla provedena optimalizace elektroporačních podmínek pro buněčnou linii MIA PaCa-2. Tyto podmínky byly úspěšně stanoveny na 1700 V, 20 ms a 4 elektrické pulsy.

V druhé části byla provedena elektroporace buněčné linie MIA PaCa-2 pomocí čtyř RNP komplexů obsahujících předem navržené crRNA. Následně byl určen nejúspěšnější RNP komplex s crRNA, a to s crRNA3. Na základě vyhodnocení RT-qPCR vykazovaly buňky elektroporované RNP komplexem s crRNA3 nejnižší expresi cílového genu.

Třetí část práce byla zaměřena na selekci klonů buněk s *knock-outovaným* A_3 AR pomocí RNP komplexu obsahujícího crRNA3. Bylo vyselektováno celkem 12 klonů. U těchto klonů byla následně ověřena exprese A_3 AR znovu pomocí RT-qPCR. Nejnižší expresi tohoto receptoru vykazovaly celkem tři klony z dvanácti, a to konkrétně u klonů 12 F11, 5 9F a 12 5G.

Jeden z těchto klonů, respektive monoklonální buněčná linie s umlčeným genem pro A_3 AR by po dokončení validací za využití technik western blotu, imunocytochemie a sekvenování mohla sloužit jako buněčný model pro testování nových, potencionálních léčiv, které budou cílit právě na zmíněný receptor.

8 LITERATURA

ATKINSON, Matthew R, Andrea TOWNSEND-NICHOLSON, Jillian K NICHOLL, Grant R SUTHERLAND a Peter R SCHOFIELD, 1997. Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A₃ receptor (ADORA3) gene. *Neuroscience Research* [online]. **29**(1), 73–79. ISSN 01680102. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-0102(97)00073-4

BALLESTEROS-YÁÑEZ, Inmaculada, Carlos A. CASTILLO, Stefania MERIGHI a Stefania GESSI, 2018. The Role of Adenosine Receptors in Psychostimulant Addiction. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **8** [vid. 2023-10-28]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00985>

BARRANGOU, Rodolphe, Christophe FREMAUX, Hélène DEVEAU, Melissa RICHARDS, Patrick BOYAVAL, Sylvain MOINEAU, Dennis A. ROMERO a Philippe HORVATH, 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* [online]. **315**(5819), 1709–1712. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1138140

BHOWMIK, Ruchira a Binay CHAUBEY, 2022. CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1. *AIDS Research and Therapy* [online]. **19**(1), 58. ISSN 1742-6405. Dostupné z: doi:10.1186/s12981-022-00483-y

BOREA, Pier Andrea, Katia VARANI, Fabrizio VINCENZI, Pier Giovanni BARALDI, Mojgan Aghazadeh TABRIZI, Stefania MERIGHI a Stefania GESSI, 2015. The A₃ Adenosine Receptor: History and Perspectives. *Pharmacological Reviews* [online]. **67**(1), 74–102. ISSN 0031-6997, 1521-0081. Dostupné z: doi:10.1124/pr.113.008540

CASAS-MOLLANO, J. Armando, Matthew H. ZINSELMEIER, Samuel E. ERICKSON a Michael J. SMANSKI, 2020. CRISPR-Cas Activators for Engineering Gene Expression in Higher Eukaryotes. *The CRISPR Journal* [online]. **3**(5), 350–364. ISSN 2573-1599, 2573-1602. Dostupné z: doi:10.1089/crispr.2020.0064

COHEN, S., S.M. STEMMER, G. ZOZULYA, A. OCHAION, R. PATOKA, F. BARER, S. BAR-YEHUDA, L. RATH-WOLFSON, K.A. JACOBSON a P. FISHMAN, 2011. CF102 an A₃ adenosine receptor agonist mediates anti-tumor and anti-inflammatory effects in the liver. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **226**(9), 2438–2447. ISSN 0021-9541, 1097-4652. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.22593

DAVID H COY, Lichun Sun, 2014. Anti-Convulsant Drug Valproic Acid in Cancers and in Combination Anti-Cancer Therapeutics. *Modern Chemistry & Applications* [online]. **02**(01) [vid. 2024-03-13]. ISSN 23296798. Dostupné z: doi:10.4172/2329-6798.1000118

DELTCHEVA, Elitza, Krzysztof CHYLINSKI, Cynthia M. SHARMA, Karine GONZALES, Yanjie CHAO, Zaid A. PIRZADA, Maria R. ECKERT, Jörg VOGEL a Emmanuelle CHARPENTIER, 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* [online]. **471**(7340), 602–607. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature09886

DING, Xiao, Lu YU, Luo CHEN, Yujie LI, Jinlun ZHANG, Hanyan SHENG, Zhengwei REN, Yunlong LI, Xiaohan YU, Shuangxia JIN a Jinglin CAO, 2022. Recent Progress and

Future Prospect of CRISPR/Cas-Derived Transcription Activation (CRISPRa) System in Plants. *Cells* [online]. **11**(19), 3045. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11193045

DOUDNA, Jennifer A. a Emmanuelle CHARPENTIER, 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* [online]. **346**(6213), 1258096. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1258096

EFFENDI, Wiwin Is, Tatsuya NAGANO, Kazuyuki KOBAYASHI a Yoshihiro NISHIMURA, 2020. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells* [online]. **9**(3), 785. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9030785

FISHMAN, P., S. BAR-YEHUDA, T. FARBSTAIN, F. BARER a G. OHANA, 2000. Adenosine acts as a chemoprotective agent by stimulating G-CSF production: a role for A1 and A3 adenosine receptors. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **183**(3), 393–398. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200006)183:3<393::AID-JCP12>3.0.CO;2-G

FISHMAN, Pnina, 2022. Drugs Targeting the A3 Adenosine Receptor: Human Clinical Study Data. *Molecules* [online]. **27**(12), 3680. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27123680

FISHMAN, Pnina, Sara BAR-YEHUDA, Faina BARER, Lea MADI, Asha S. MULTANI a Sen PATHAK, 2001. The A3 Adenosine Receptor as a New Target for Cancer Therapy and Chemoprotection. *Experimental Cell Research* [online]. **269**(2), 230–236. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.2001.5327

FISHMAN, Pnina, Sara BAR-YEHUDA, Bruce T. LIANG a Kenneth A. JACOBSON, 2012. Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. *Drug Discovery Today* [online]. **17**(7–8), 359–366. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2011.10.007

FISHMAN, Pnina, Sara BAR-YEHUDA, Lea MADI a Ilan COHN, 2002. A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy: *Anti-Cancer Drugs* [online]. **13**(5), 437–443. ISSN 0959-4973. Dostupné z: doi:10.1097/00001813-200206000-00001

FISHMAN, Pnina, Sara BAR-YEHUDA, Gil OHANA, Faina BARER, Avivit OCHAION, Abigail ERLANGER a Lea MADI, 2004. An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 β and NF- κ B. *Oncogene* [online]. **23**(14), 2465–2471. ISSN 0950-9232, 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1207355

GAO, Zhan-Guo a Kenneth A. JACOBSON, 2019. A2B Adenosine Receptor and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(20), 5139. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20205139

GESSI, Stefania, Stefania MERIGHI, Valeria SACCHETTO, Carolina SIMIONI a Pier Andrea BOREA, 2011. Adenosine receptors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. **1808**(5), Adenosine Receptors, 1400–1412. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2010.09.020

GILBERT, Luke A., Matthew H. LARSON, Leonardo MORSUT, Zairan LIU, Gloria A. BRAR, Sandra E. TORRES, Noam STERN-GINOSSAR, Omn BRANDMAN, Evan H. WHITEHEAD, Jennifer A. DOUDNA, Wendell A. LIM, Jonathan S. WEISSMAN a Lei S. QI, 2013. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* [online]. **154**(2), 442–451. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.06.044

GORZALCZANY, Yaara a Ronit SAGI-EISENBERG, 2019. Role of Mast Cell-Derived Adenosine in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(10), 2603. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20102603

GUARNACCIA, Alissa D., April M. WEISSMILLER a William P. TANSEY, 2021. Gene-specific quantification of nascent transcription following targeted degradation of endogenous proteins in cultured cells. *STAR Protocols* [online]. **2**(4), 101000. ISSN 2666-1667. Dostupné z: doi:10.1016/j.xpro.2021.101000

HAAPANIEMI, Emma, Sandeep BOTLA, Jenna PERSSON, Bernhard SCHMIERER a Jussi TAIPALE, 2018. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine* [online]. **24**(7), 927–930. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-018-0049-z

HANA, Sam, Michael PETERSON, Helen MCLAUGHLIN, Eric MARSHALL, Attila J. FABIAN, Olivia MCKISSICK, Kathryn KOSZKA, Galina MARSH, Michael CRAFT, Shanqin XU, Alexander SORETS, Tess TORREGROSA, Chao SUN, Chris E. HENDERSON a Shih-Ching LO, 2021. Highly efficient neuronal gene knockout in vivo by CRISPR-Cas9 via neonatal intracerebroventricular injection of AAV in mice. *Gene Therapy* [online]. **28**(10), 646–658. ISSN 1476-5462. Dostupné z: doi:10.1038/s41434-021-00224-2

HARISH, Arie, Gil HOHANA, Pnina FISHMAN, Oshra ARNON a Sara BAR-YEHUDA, 2003. A3 adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *International Journal of Oncology* [online]. [vid. 2024-03-15]. ISSN 1019-6439, 1791-2423. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.23.4.1245

HE, Shenghui, 2020. The first human trial of CRISPR-based cell therapy clears safety concerns as new treatment for late-stage lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **5**(1), 1–2. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-020-00283-8

HELER, Robert, Poulami SAMAI, Joshua W. MODELL, Catherine WEINER, Gregory W. GOLDBERG, David BIKARD a Luciano A. MARRAFFINI, 2015. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature* [online]. **519**(7542), 199. Dostupné z: doi:10.1038/nature14245

HILLE, Frank a Emmanuelle CHARPENTIER, 2016. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **371**(1707), 20150496. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2015.0496

HIRANNIRAMOL, Kasidet, Yuhao CHEN, Weijun LIU a Xiaowei WANG, 2020. Generalizable sgRNA design for improved CRISPR/Cas9 editing efficiency. *Bioinformatics*

[online]. **36(9)**, 2684–2689. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btaa041

HU, Jiahao, Jiasheng CAO, Win TOPATANA, Sarun JUENGPANICH, Shijie LI, Bin ZHANG, Jiliang SHEN, Liuxin CAI, Xiujun CAI a Mingyu CHEN, 2021. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. **14(1)**, 157. ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-021-01169-0

CHA, Jong-Ho, Li-Chuan CHAN, Chia-Wei LI, Jennifer L. HSU a Mien-Chie HUNG, 2019. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Molecular Cell* [online]. **76(3)**, 359–370. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2019.09.030

CHEN, Jiang-Fan, Holger K. ELTZSCHIG a Bertil B. FREDHOLM, 2013. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. **12(4)**, 265–286. ISSN 1474-1776, 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd3955

CHEN, Xin-Zhu, Rong GUO, Cong ZHAO, Jing XU, Hang SONG, Hua YU, Christian PILARSKY, Firzan NAINU, Jing-Quan LI, Xin-Ke ZHOU a Jian-Ye ZHANG, 2022. A Novel Anti-Cancer Therapy: CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **13** [vid. 2024-03-18]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.939090

IANNONE, Raffaella, Lucio MIELE, Piera MAIOLINO, Aldo PINTO a Silvana MORELLO, 2013. Blockade of A2b adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)* [online]. **15(12)**, 1400–1409. ISSN 1476-5586. Dostupné z: doi:10.1593/neo.131748

ISHINO, Y, H SHINAGAWA, K MAKINO, M AMEMURA a A NAKATA, 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. **169(12)**, 5429–5433. ISSN 0021-9193.

JACOBSON, Kenneth A., 1998. Adenosine A3 receptors: novel ligands and paradoxical effects. *Trends in pharmacological sciences*. **19(5)**, 184–191. ISSN 0165-6147.

JACOBSON, Kenneth A., 2009. Introduction to Adenosine Receptors as Therapeutic Targets. *Handbook of experimental pharmacology* [online]. (193), 1–24. ISSN 0171-2004. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-89615-9_1

JACOBSON, Kenneth A., Stefania MERIGHI, Katia VARANI, Pier Andrea BOREA, Stefania BARALDI, Mojgan AGHAZADEH TABRIZI, Romeo ROMAGNOLI, Pier Giovanni BARALDI, Antonella CIANCETTA, Dilip K. TOSH, Zhan-Guo GAO a Stefania GESSI, 2018. A₃ Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation: From Medicinal Chemistry to Therapy. *Medicinal Research Reviews* [online]. **38(4)**, 1031–1072. ISSN 0198-6325, 1098-1128. Dostupné z: doi:10.1002/med.21456

JACOBSON, M. A., R. G. JOHNSON, C. J. LUNEAU a C. A. SALVATORE, 1995. Cloning and chromosomal localization of the human A2b adenosine receptor gene (ADORA2B) and its pseudogene. *Genomics* [online]. **27(2)**, 374–376. ISSN 0888-7543. Dostupné z: doi:10.1006/geno.1995.1061

JIANG, Fuguo a Jennifer A. DOUDNA, 2017. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics* [online]. **46**(1), 505–529. ISSN 1936-122X, 1936-1238. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822

JINEK, Martin, Alexandra EAST, Aaron CHENG, Steven LIN, Enbo MA a Jennifer DOUDNA, 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* [online]. **2**, e00471. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.00471

JINEK, Martin, Krzysztof CHYLINSKI, Ines FONFARA, Michael HAUER, Jennifer A. DOUDNA a Emmanuelle CHARPENTIER, 2012. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* [online]. **337**(6096), 816–821. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1225829

JINEK, Martin, Fuguo JIANG, David W. TAYLOR, Samuel H. STERNBERG, Emine KAYA, Enbo MA, Carolin ANDERS, Michael HAUER, Kaihong ZHOU, Steven LIN, Matias KAPLAN, Anthony T. IAVARONE, Emmanuelle CHARPENTIER, Eva NOGALES a Jennifer A. DOUDNA, 2014. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **343**(6176), 1247997. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1247997

KARLSON, Chou Khai Soong, Siti Nurfadhlin MOHD-NOOR, Nadja NOLTE a Boon Chin TAN, 2021. CRISPR/dCas9-Based Systems: Mechanisms and Applications in Plant Sciences. *Plants* [online]. **10**(10), 2055. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants10102055

KOONIN, Eugene V a Kira S MAKAROVA, 2009. CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. *F1000 Biology Reports* [online]. **1**, 95. ISSN 1757-594X. Dostupné z: doi:10.3410/B1-95

KOSCSÓ, Balázs, Balázs CSÓKA, Pál PACHER a György HASKÓ, 2011. Investigational A3 adenosine receptor targeting agents. *Expert opinion on investigational drugs* [online]. **20**(6), 757–768. ISSN 1354-3784. Dostupné z: doi:10.1517/13543784.2011.573785

LABUN, Kornel, Tessa G. MONTAGUE, Maximilian KRAUSE, Yamila N. TORRES CLEUREN, Håkon TJELDNES a Eivind VALEN, 2019. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research* [online]. **47**(W1), W171–W174. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz365

LAN, Jie, Haiquan LU, Debangshu SAMANTA, Shaima SALMAN, You LU a Gregg L. SEMENZA, 2018. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **115**(41) [vid. 2024-02-11]. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1809695115

LE, Fei, Andrea TOWNSEND-NICHOLSON, Elizabeth BAKER, Grant R. SUTHERLAND a Peter R. SCHOFIELD, 1996. Characterization and Chromosomal Localization of the Human A2a Adenosine Receptor Gene: ADORA2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **223**(2), 461–467. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1996.0916

LI, Tianxiang, Yanyan YANG, Hongzhao QI, Weigang CUI, Lin ZHANG, Xiuxiu FU, Xiangqin HE, Meixin LIU, Pei-feng LI a Tao YU, 2023. CRISPR/Cas9 therapeutics:

progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **8**(1), 1–23. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-023-01309-7

LIN, Huafeng, Gang LI, Xiangwen PENG, Aimin DENG, Lei YE, Lei SHI, Tuanmei WANG a Jun HE, 2021. The Use of CRISPR/Cas9 as a Tool to Study Human Infectious Viruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **11** [vid. 2024-03-10]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.590989

LIU, Xiaojuan, Yongping ZHANG, Chen CHENG, Albert W. CHENG, Xingying ZHANG, Na LI, Changqing XIA, Xiaofei WEI, Xiang LIU a Haoyi WANG, 2017. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Research* [online]. **27**(1), 154–157. ISSN 1748-7838. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2016.142

MADI, Lea, Sara BAR-YEHUDA, Faina BARER, Eti ARDON, Avivit OCHAION a Pnina FISHMAN, 2003. A3 Adenosine Receptor Activation in Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **278**(43), 42121–42130. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M301243200

MADI, Lea, Avivit OCHAION, Lea RATH-WOLFSON, Sara BAR-YEHUDA, Abigail ERLANGER, Gil OHANA, Arie HARISH, Ofer MERIMSKI, Faina BARER a Pnina FISHMAN, 2004. The A3 Adenosine Receptor Is Highly Expressed in Tumor *versus* Normal Cells. *Clinical Cancer Research* [online]. **10**(13), 4472–4479. ISSN 1078-0432, 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0651

MAKAROVA, Kira S., Daniel H. HAFT, Rodolphe BARRANGOU, Stan J. J. BROUNS, Emmanuelle CHARPENTIER, Philippe HORVATH, Sylvain MOINEAU, Francisco J. M. MOJICA, Yuri I. WOLF, Alexander F. YAKUNIN, John VAN DER OOST a Eugene V. KOONIN, 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **9**(6), 467–477. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2577

MAUDE, Shannon L., David T. TEACHEY, David L. PORTER a Stephan A. GRUPP, 2015. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [online]. **125**(26), 4017–4023. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2014-12-580068

MAZZIOTTA, Chiara, John Charles ROTONDO, Carmen LANZILLOTTI, Giulia CAMPIONE, Fernanda MARTINI a Mauro TOGNON, 2022. Cancer biology and molecular genetics of A3 adenosine receptor. *Oncogene* [online]. **41**(3), 301–308. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-021-02090-z

MITTAL, Deepak, Debottam SINHA, Deborah BARKAUSKAS, Arabella YOUNG, Murugan KALIMUTHO, Kimberley STANNARD, Franco CARAMIA, Benjamin HAIBEKAINS, John STAGG, Kum Kum KHANNA, Sherene LOI a Mark J. SMYTH, 2016. Adenosine 2B Receptor Expression on Cancer Cells Promotes Metastasis. *Cancer Research* [online]. **76**(15), 4372–4382. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0544

MORELLO, Silvana, Antonello PETRELLA, Michela FESTA, Ada POPOLO, Mario MONACO, Emilia VUTTARIELLO, Gennaro CHIAPPETTA, Luca PARENTE a Aldo PINTO, 2008. CI-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently

of A3 adenosine receptor activation. *Cancer Biology & Therapy* [online]. **7**(2), 278–284. ISSN 1538-4047, 1555-8576. Dostupné z: doi:10.4161/cbt.7.2.5301

MORSHEDZADEH, Firouzeh, Mahmoud GHANEI, Malihe LOTFI, Morteza GHASEMI, Mohsen AHMADI, Parisa NAJARI-HANJANI, Samaneh SHARIF, Sina MOZAFFARI-JOVIN, Maryam PEYMANI a Mohammad Reza ABBASZADEGAN, 2023. An Update on the Application of CRISPR Technology in Clinical Practice. *Molecular Biotechnology* [online]. 1–19. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1007/s12033-023-00724-z

MURRISON, E. M., S. J. GOODSON, M. R. EDBROOKE a C. A. HARRIS, 1996. Cloning and characterisation of the human adenosine A3 receptor gene. *FEBS letters* [online]. **384**(3), 243–246. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(96)00324-9

NISHAT, Shamama, Luqman A. KHAN, Zafar M. ANSARI a Seemi F. BASIR, 2016. Adenosine A3 Receptor: A Promising Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reviews* [online]. **12**(1), 18–26. ISSN 1573-403X. Dostupné z: doi:10.2174/1573403X12666160111125116

PALMER, Timothy M. a Gary L. STILES, 2000. Identification of Threonine Residues Controlling the Agonist-Dependent Phosphorylation and Desensitization of the Rat A₃ Adenosine Receptor. *Molecular Pharmacology* [online]. **57**(3), 539–545. ISSN 0026-895X, 1521-0111. Dostupné z: doi:10.1124/mol.57.3.539

PANJEHPOUR, Mojtaba a Fatemeh KARAMI-TEHRANI, 2004. An adenosine analog (IB-MECA) inhibits anchorage-dependent cell growth of various human breast cancer cell lines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. **36**(8), 1502–1509. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2003.12.001

PIATEK, Agnieszka, Zahir ALI, Hatoon BAAZIM, Lixin LI, Aala ABULFARAJ, Sahar AL-SHAREEF, Mustapha AOUIDA a Magdy M. MAHFOUZ, 2015. RNA-guided transcriptional regulation *in planta* via synthetic DC as9-based transcription factors. *Plant Biotechnology Journal* [online]. **13**(4), 578–589. ISSN 1467-7644, 1467-7652. Dostupné z: doi:10.1111/pbi.12284

PLEUVRY, Barbara J, 2004. Receptors, agonists and antagonists. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. **5**(10), Neurosurgical Anaesthesia and Intensive Care, Pharmacology, 350–352. ISSN 1472-0299. Dostupné z: doi:10.1383/anes.5.10.350.52312

POTTER, H, L WEIR a P LEDER, 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**(22), 7161–7165. ISSN 0027-8424.

POTTER, Huntington, 1988. Electroporation in biology: Methods, applications, and instrumentation. *Analytical Biochemistry* [online]. **174**(2), 361–373. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(88)90035-8

POTTER, Huntington a Richard HELLER, 2003. Transfection by Electroporation. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* [online]. **CHAPTER**, Unit-9.3. ISSN 1934-3639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb0903s62

QI, Lei S., Matthew H. LARSON, Luke A. GILBERT, Jennifer A. DOUDNA, Jonathan S. WEISSMAN, Adam P. ARKIN a Wendell A. LIM, 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* [online]. **152**(5), 1173–1183. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.02.022

RABAAN, Ali A., Hajir ALSAIHATI, Rehab BUKHAMSIN, Muhammed A. BAKHREBAH, Majed S. NASSAR, Abdulmonem A. ALSALEH, Yousef N. ALHASHM, Ammar Y. BUKHAMSEEN, Khalil AL-RUHIMY, Mohammed ALOTAIBI, Roua A. ALSUBKI, Hejji E. ALAHMED, Saleh AL-ABDULHADI, Fatemah A. ALHASHM, Ahlam A. ALQATARI, Ahmed ALSAYYAH, Ramadan Abdelmoez FARAHAT, Rwaah H. ABDULAL, Ali H. AL-AHMED, Mohd. IMRAN a Ranjan K. MOHAPATRA, 2023. Application of CRISPR/Cas9 Technology in Cancer Treatment: A Future Direction. *Current Oncology* [online]. **30**(2), 1954–1976. ISSN 1198-0052. Dostupné z: doi:10.3390/curroncol30020152

RAN, F Ann, Patrick D HSU, Jason WRIGHT, Vineeta AGARWALA, David A SCOTT a Feng ZHANG, 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* [online]. **8**(11), 2281–2308. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2013.143

RATH, Devashish, Lina AMLINGER, Archana RATH a Magnus LUNDGREN, 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* [online]. **117**, 119–128. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025

SADOWSKI, Ivan, Jun MA, Steve TRIEZENBERG a Mark PTASHNE, 1988. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* [online]. **335**(6190), 563–564. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/335563a0

SACHDEVA, Sakshi a Monika GUPTA, 2013. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ* [online]. **21**(3), 245–253. ISSN 1319-0164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2012.05.011

SHETH, Sandeep, Rafael BRITO, Debashree MUKHERJEA, Leonard P. RYBAK a Vickram RAMKUMAR, 2014. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **15**(2), 2024–2052. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15022024

SHMAKOV, Sergey, Omar O. ABUDAYYEH, Kira S. MAKAROVA, Yuri I. WOLF, Jonathan S. GOOTENBERG, Ekaterina SEMENOVA, Leonid MINAKHIN, Julia JOUNG, Silvana KONERMANN, Konstantin SEVERINOV, Feng ZHANG a Eugene V. KOONIN, 2015. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell* [online]. **60**(3), 385–397. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2015.10.008

STEFANOUDAKIS, Dimitrios, Nikhita KATHURIA-PRAKASH, Alexander W. SUN, Melissa ABEL, Claire E. DROLEN, Camille ASHBAUGH, Shiliang ZHANG, Gavin HUI, Yeganeh A. TABATABAEI, Yuliya ZEKTSER, Lidia P. LOPEZ, Allan PANTUCK a Alexandra DRAKAKI, 2023. The Potential Revolution of Cancer Treatment with CRISPR Technology. *Cancers* [online]. **15**(6), 1813. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers15061813

STOCKWELL, Jocelyn, Elisabet JAKOVA a Francisco S. CAYABYAB, 2017. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules* [online]. **22**(4), 676. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22040676

SUN, Changfa, Bochu WANG a Shilei HAO, 2022. Adenosine-A2A Receptor Pathway in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* [online]. **13** [vid. 2024-02-14]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.837230>

TANG, Xi-Dian, Fei GAO, Ming-Jie LIU a Wen-Tao MA, 2019. Methods for Enhancing Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9-Mediated Homology-Directed Repair Efficiency. *Frontiers in Genetics* [online]. **10** [vid. 2024-03-14]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2019.00551

TOWNSEND-NICHOLSON, Andrea, Elizabeth BAKER, Peter R. SCHOFIELD a Grant R. SUTHERLAND, 1995. Localization of the adenosine A1 receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1. *Genomics* [online]. **26**(2), 423–425. ISSN 0888-7543. Dostupné z: doi:10.1016/0888-7543(95)80236-F

WOODHOUSE, E. C., D. F. AMANATULLAH, J. A. SCHETZ, L. A. LIOTTA, M. L. STRACKE a T. CLAIR, 1998. Adenosine receptor mediates motility in human melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **246**(3), 888–894. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1998.8714

XU, Yuanyuan a Zhanjun LI, 2020. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. **18**, 2401. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2020.08.031

YE, Mingyu, Martina WILHELM, Ivaylo GENTSCHEV a Aladár SZALAY, 2021. A Modified Limiting Dilution Method for Monoclonal Stable Cell Line Selection Using a Real-Time Fluorescence Imaging System: A Practical Workflow and Advanced Applications. *Methods and Protocols* [online]. **4**(1), 16. ISSN 2409-9279. Dostupné z: doi:10.3390/mps4010016

ZHANG, Huimin, Chunhong QIN, Changming AN, Xiwang ZHENG, Shuxin WEN, Wenjie CHEN, Xianfang LIU, Zhenghua LV, Pingchang YANG, Wei XU, Wei GAO a Yongyan WU, 2021. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Molecular Cancer* [online]. **20**(1), 126. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-021-01431-6