

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Olomouc 2018**

**Ivana Družbíková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Strategie přípravy modelů lidských onemocnění**

**Diplomová práce**

**Bc. Ivana Družbíková**

**Studijní program: Biologie**

**Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie**

**Forma studia: Prezenční**

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: Mgr. Natálie Táborská**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Natálie Tábořské, dále prohlašuji, že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v přehledu literatury.

V Olomouci: .....

Podpis: .....

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce Mgr. Natálii Táborské za odborné a metodické vedení práce, za rady, připomínky, ochotu a čas. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Agátě Kubičkové, Mgr. Zuzaně Macečkové, Mgr. Petru Vojtovi za odborné rady a pomoc při vypracovávání praktické části. Dále děkuji rodičům a blízkým přátelům za podporu během celého studia.

## SOUHRN

Na přípravu modelů lidských onemocnění lze použít buněčné modely a živočišné modelové organizmy. Základní techniky na přípravu modelů lidských onemocnění jsou transgenoz, inaktivace nebo aktivace konkrétního genu (knock-out/knock-in), modifikace a umlčování genů (RNA interference). Nejnovější metodou pro tvorbu modelů lidských onemocnění je genová terapie.

Termínem haploinsuficience je označován fenotypový projev, kdy diploidní organizmus má pouze jednu funkční kopii genu a druhá kopie genu je inaktivována mutací. Mutace v genech pro ribozomální proteiny vede ke snížení produkce malé nebo velké ribozomální podjednotky a celkovému narušení biogeneze ribozomů. Haploinsuficience RPS7 byla identifikována u pacientů s Diamond-Blackfanovou anémií. Na tvorbu haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie byly použity buněčné modely (HeLa, HEK-293 a U2OS).

V praktické části byly k tvorbě jednoduchého haploinsuficientního modelu připraveny siRNA molekuly k umlčení RPS7 genu v lidských buňkách HeLa a HEK-293. K měření exprese genu *RPS7* po umlčení siRNA byla použita qPCR.

Složitější a sofistikovanější haploinsuficientní model Diamond-Blackfanovy anémie byl tvořen pomocí multicistronického lentivirového expresního systému (MuLE), kde byly použity shRNA proti genu *RPS7* s indukibilním promotorem H1 a wild type a mutantní sekvence genu *RPS7* se zaměněnými kodony s indukibilním promotorem CMV/TO. Lidské embryonální buňky HEK293T/17 byly transfekovány vytvořeným MuLE systémem za vzniku lentivirů. Vzniklé lentiviry byly použity k transdukcii lidských buněk U2OS, na kterých měl být vytvořen vybraný model Diamond-Blackfanovy anémie.

Na základě experimentální práce se nepodařilo dokončit haploinsuficientní model Diamond-Blackfanovy anémie.

## SUMMARY

Cell culture and animal models can be used to prepare models of human diseases. Basic techniques for human disease model preparation are transgenesis, gene knock-out, gene knock-in, gene modification and gene silencing, for example RNA interference. The latest method of human disease model preparation is gene therapy.

The haploinsufficiency is based on the phenotypic expression - the diploid organism has only one functional copy of the gene and the second copy of the gene is inactivated by the mutation. Mutations in genes encoding ribosomal proteins lead to a reduction in the production of small or large ribosomal subunits and then to disruption of the ribosomal biogenesis. The haploinsufficiency of *RPS7* gene was identified in patients with Diamond-Blackfan anemia patients. Cell culture HeLa, HEK-293 and U2OS were used to prepare the haploinsufficient model of the human disease of Diamond-Blackfan anemia.

In experimental part of this work siRNA was synthesized to silence *RPS7* in human cells HeLa and HEK-293 to prepare the haploinsufficient model. qPCR was used to measure the changes in expression of the gene *RPS7* after silencing siRNA.

More complex and more potent haploinsufficient model of the Diamond-Blackfan anemia was created using the multicistronic lentivirus expression system (MuLE) - shRNA was used against the *RPS7* gene under the control of the inducible promoter H1 and the wild type and the mutant *RPS7* gene with shifted codones under the control of the inducible promoter CMV/TO. Human embryonic cells HEK293T/17 were transfected by lentiviral expression vectors. Lentiviruses were used to transduce human U2OS cells.

In conclusion, based on the experimental part the haploinsufficient model of Diamond-Blackfan anemia was not completed.



4.6 Příprava genu <i>RPS7</i> s pozměněnými kodony	52
4.6.1 Sekvence WT a M genu <i>RPS7</i> s pozměněnými kodony	52
4.6.2 Štěpení a izolace WT_shift_cDNA_RPS7/M_shift_cDNA_RPS7 a cílového vektoru	53
4.6.3 Ligace sekvencí <i>RPS7</i> s pozměněnými kodony do cílového vektoru	56
4.7 Klonování dvouvláknových DNA oligonukleotidů	59
4.7.1 Příprava DNA oligonukleotidů a cílového vektoru	59
4.7.2 Ligace ds oligo do plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4	62
4.8 LR klonázová reakce	63
4.9 Produkce lentivirů	65
4.9.1 Optimalizace transfekce HEK293T/17	65
4.9.2 Transdukce U2OS buněk lentiviry	67
5 VÝSLEDKY	69
5.1 Příprava siRNA molekul k umlčení ribozomálního proteinu 7 ( <i>RPS7</i> )	69
5.2 Sekvence genu <i>RPS7</i> s pozměněnými kodony	71
5.3 Štěpení a izolace WT_shift_cDNA_RPS7, M_shift_cDNA_RPS7	72
5.4 Příprava DNA oligonukleotidů exprimující shRNA	73
5.5 Příprava cílových plazmidů na klonování	74
5.6 Ligace WT a M sekvencí s pozměněnými kodony a ds oligo do příslušných vektorů	76
5.7 LR rekombinace	78
5.8 Produkce lentivirů	80
6 DISKUZE	86
7 ZÁVĚR	90
8 LITERATURA	91



## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

$\infty$	nekonečno
AAV	adenoasociované viry
ADA	enzymu adenosin deaminázy
Ago-2	argonaut 2
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CIP	alkalická fosfatáza
DBA	Diamond-Blackfanova anémie
DGRC8	DiGeorge Syndrome critical region gene 8
DNMT3A	DNA metyltransferáza 3 $\alpha$
dNTP	deoxyribonukleotidy
ds oligo	dvouvláknové oligonukleotidy
dsRNA	dvouvláknová RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ews-Fli1	Ewing sarcoma breakpoint region 1-flightless 1 homolog
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
F	fenylalanin
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Food and drug organization
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HDAC-1	histon deacetyláza 1
HI	haploinsuficientní geny
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HS	haplosuficientní geny
HSV	herpes simplex viry
LOF	mutace ztráty funkce
M	mutantní gen
miRISC	mikro RNA indukující umlčovací komplex
miRNA	mikro RNA
MO	morfolínem modifikované antisense oligonukleotidy

mRNA	mediátorová RNA
MuLE	multiple lentiviral expression system
nt	nukleotidy
PACT	aktivátor protein kinázy PKR
pri-miRNA	primární transkript miRNA
PSMA	tumor target prostate specific membrane antigen
PTGS	posttranskripční genetické umlčování
qPCR	kvantitativní PCR
RISC	RNA indukující umlčovací komplex
RNAi	RNA interference
RP	ribosomální podjednotka
RPL	velká ribosomální podjednotka
RPS	malá ribosomální podjednotka
<i>RPS7</i>	gen pro ribosomální protein 7
r.	reakce
rRNA	ribosomální RNA
RT	reverzní transkripce
SCID	těžká kombinovaná imunodeficience
shRNA	krátká vlásenková RNA
siRNA	krátká interferující RNA
ss oligo	jednovláknové oligonukleotidy
TGS	transkripční genetické umlčování
TLR	tool like receptory
TRBP	TAR-RNA vazebný protein
V	valín
WT	normální gen

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Mechanismus RNA interference pomocí siRNA (převzato a upraveno Allen, 2016)
- Obr. 2: Mechanismus RNA interference pomocí shRNA (převzato a upraveno Allen, 2016)
- Obr. 3 a) Mechanismus RNA interference miRNA v jádře buněk (převzato a upraveno Kim, 2007)
- Obr. 3 b) Mechanismus RNA interference miRNA v cytoplasmě buněk (převzato a upraveno Lam, 2015)
- Obr. 4: Princip haploinsuficience (převzato a upraveno W. H. Freeman, 2012)
- Obr. 5: Struktura DNA versus morfolínové oligonukleotidy (převzato: Corey, 2001)
- Obr. 6: Působení morfolínových oligomerů (převzato a upraveno: Timme-Laragy, 2012)
- Obr. 7: *Ex vivo* a *in vivo* přenos vektorů u somatické genové terapie (převzato a upraveno: Crystal, 2017)
- Obr. 8: LR rekombinace Gateway klonovacího systému ([www.addgene.org](http://www.addgene.org))
- Obr. 9: Schéma vektoru pMK-RQ-Bb s cílovým inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7/ M\_shift\_cDNA\_RPS7
- Obr. 10: Schéma vektoru pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5
- Obr. 11: Mapa restrikčních míst plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5
- Obr. 12: Schéma vektoru pMuLE ENTR H1 L5-L4
- Obr. 13: Mapa restrikčních míst plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4
- Obr. 14: Návrhy sekvencí DNA oligonukleotidů na přípravu siRNA (TOP, BOT)
- Obr. 15: siRNA molekuly
- Obr. 16 a): Schéma referenční cDNA sekvence genu *RPS7*
- Obr. 16 b): Schéma pozměněné sekvence WT formy genu *RPS7*
- Obr. 16 c): Schéma pozměnění sekvence genu *RPS7* s konkrétní mutací V134F
- Obr. 17: Izolované inzerty WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7
- Obr. 18: Návrhy sekvencí ssDNA oligonukleotidů (TOP, BOT)
- Obr. 19: Dvouvláknové DNA oligonukleotidy
- Obr. 20: Izolovaný pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4
- Obr. 21: Purifikovaný pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4
- Obr. 22: Plazmid pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 štěpený endonukleázami BamHI a XhoI
- Obr. 23: Plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 štěpený endonukleázami BglII a SacI
- Obr. 24: Kontrolní (colony) PCR genu WT\_shift\_cDNA\_RPS7, M\_shift\_cDNA\_RPS7 a dsDNA oligonukleotidů

- Obr. 25: Kontrolní separace PCR produktů z izolovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4
- Obr. 26: Kontrolní separace PCR produktů WT\_shift\_cDNA\_RPS7 (M\_shift\_cDNA\_RPS7)
- Obr. 27: Separace izolovaných destinačních vektorů pMuLE Lenti Dest eGFP
- Obr. 28: Transfekce buněk HEK293T/17 prázdným pMuLE Lenti Dest eGFP (9 128 bp)
- Obr. 29: Transfekce buněk HEK293T/17 expresním pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)
- Obr. 30: Transfekce buněk HEK293T/17 expresním plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP při větším zvětšení (14 628 bp)
- Obr. 31: Transdukce buněk U2OS lentiviry

## SEZNAM TABULEK

- Tab. 1: Souhrn základních rozdílů genové terapie somatických a zárodečných buněk
- Tab. 2: Komplementární spojení (annealing) DNA oligonukleotidů
- Tab. 3: Reakční směs *in vitro* transkripce
- Tab. 4: Ředění X-tremeGENE siRNA transfekčního reagentu s Opti-MEM médiem
- Tab. 5: Ředění syntetizované siRNA s Opti-MEM médiem
- Tab. 6: Reakční směs master mixu pro RT (1 r. = 9,75  $\mu$ l)
- Tab. 7: Reakční směs qPCR (1 r. = 20  $\mu$ l)
- Tab. 8: Sekvence primerů GAPDH a RPS7 na qPCR
- Tab. 9: Restrikční reakce na štěpění plazmidu pMK-RQ-Bb (1 r. = 20  $\mu$ l)
- Tab. 10: Ligační reakce cílových genů do pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 (1 r.=50  $\mu$ l)
- Tab. 11: Kontrolní (colony) PCR bakteriálních kolonií (1 r. = 20  $\mu$ l)
- Tab. 12 : Podmínky amplifikace
- Tab. 13: Kontrolní PCR izolovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO L1-R5 (1 r. = 20  $\mu$ l)
- Tab. 14: Vybrané 19 nt dlouhé úseky sekvence *RPS7*
- Tab. 15: Komplementární spojení ssDNA oligonukleotidů (TOP a BOT) (1 r. = 20  $\mu$ l)
- Tab. 16: Restrikční reakce na štěpění plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4 (1 r. = 20  $\mu$ l)
- Tab. 17: Reakční směs na ligaci ds oligonukleotidů do pMuLE ENTR H1 L5-L4 (1 r. = 10  $\mu$ l)
- Tab. 18: LR rekombinační reakce
- Tab. 19: Transfekční reakce jet PRIME s prázdným (9 158 bp) a s rekombinovaným plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)
- Tab. 20: Transfekční reakce X-tremeGENE 9 s prázdnými (9 158 bp) a s rekombinovaným plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)
- Tab. 21: Transfekční reakce jetPRIME na produkci lentivirů

Tab. 22: Koncentrace celkové izolované RNA

Tab. 23: Výsledky umlčení RPS7 molekulou siRNA

Tab. 24: Koncentrace izolovaných a extrahovaných pMuLE plazmidů (pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4)

Tab. 25: Koncentrace linearizovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4

Tab. 26: Koncentrace izolovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4 s klonovanými sekvencemi (WT, M, ds oligo)

Tab. 27: Koncentrace izolovaných plazmidů pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)

Tab. 28: Optimalizace transfekce prázdným plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP (9 158 bp)

Tab. 29: Optimalizace transfekce expresním vektorem pMuLE Lenti Dest eGFP (14 658 bp)

# 1 ÚVOD

Lidské buněčné kultury a především živočichové jsou základem pro tvorbu modelů lidských onemocnění za účelem pochopit příčiny a biologickou podstatu chorob. Buněčné kultury neposkytují zcela odpovídající fyziologické podmínky lidskému organismu. Naopak živočichové přesto, že se liší v mnoha znacích, orgánech, chování a potřebách, mají pro tvorbu modelů lepší vypovídající hodnotu. Každý modelový organismus je vhodný na tvorbu jiného modelu lidského onemocnění. K nejpoužívanějším modelovým organismům patří bakterie *Escherichia coli*, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, hlístice *Caenorhabditis elegans*, octomilky *Drosophila melanogaster*, zebříčky *Danio rerio*, myši *Mus musculus* (Foury, 1997; Aboobaker, 2000; Bernards, 2001; Postlethwait, 2004; Yang, 2008).

Existuje celá řada metod a technik na tvorbu modelů lidských onemocnění. Tradiční technikou je cílená mutagenese genů (např. chemickými činidly), které korelují s danou chorobou (Amsterdam a kol., 2006). Dále genové umlčování a morfolínový systém přechodně inhibují expresi genů, jež zodpovídají za propuknutí choroby (Lanc a kol., 2011). RNA interference spočívá ve schopnosti narušit expresi genů způsobujících lidské choroby (Fire a kol., 1998). Prostřednictvím editace genomu a to konkrétně díky technologii CRISPR/Cas9 je možné vytvořit téměř jakýkoli živočišný model lidského onemocnění (Birling a kol., 2017).

U pacientů postižených Diamond-Blackfanovou anémií jsou identifikované mutace genů kódující ribozomální proteiny malé (RPS7, RPS17, RPS19, RPS24) nebo velké (RPL5, RPL11) ribozomální podjednotky. Chybná syntéza ribozomálních proteinů vede k narušení biosyntézy ribozomů, která je kontrolována tumor supresorovým proteinem p53 (Lane, 1992). V případě inaktivace pouze jedné kopie genu pro ribozomální protein 7 se netvoří dostatek proteinu daného genu, a to se projevuje abnormálním stavem. Jev, kdy je funkční pouze jedna alela genu se nazývá haploinsuficience (Kacser, 1981).

Na tvorbu haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie lze použít multicistronický lentivirový expresní systém (Albers a kol., 2015).

## 2 CÍLE PRÁCE

- ❖ Vypracování literární rešerše na téma „Strategie přípravy modelů lidských onemocnění“.
- ❖ Příprava siRNA molekul k umlčení genu pro ribozomální protein 7 (RPS7).
- ❖ Optimalizace a tvorba haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie.
- ❖ Analýza výsledků a vypracování diplomové práce.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Na počátku rozvoje molekulární biologie ve 40. – 50. letech 20. století se vědci snažili přijít na to, jak fungují buňky na molekulární úrovni. Protože se jedná o obrovské množství informací, zaměřili se na několik centrálních mechanismů (replikace, transkripce, translace a kontrolní systém genů) a použili k tomu jednoduché organizmy (bakterie, bakteriofágy). Postupem času a s přibývajícím znalostmi se začaly studovat komplexnější systémy, které vyžadují složitější organizmy (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Danio rerio*, ...). Pro tyto organizmy, jež se staly nenahraditelnými nástroji biologického a klinického výzkumu k pochopení buněčných a molekulárních mechanismů, se používá termín modelový organizmus. Fieldsen a Johnston definují modelový organizmus jako intenzivně studovaný organizmus, jehož zkoumání vede k porozumění základních biologických jevů, a tyto nové objevy poskytují možnost odvozovat vlastnosti a vztahy i pro ostatní organizmy (Fields, 2005).

#### 3.1 Modelové organizmy

K přípravě modelů lidských onemocnění lze použít testy *in vitro* na lidských buněčných liniích nebo testy *in vivo* na živočišných modelech. Výsledky získané z *in vitro* testů nekorelují s *in vivo* výsledky, protože buněčným liniím chybí typické fyziologické prostředí celkového organismu savců. Dále buněčné linie vykazují odlišnou expresi a odlišný buněčný cyklus než buňky v živém modelovém organismu (Plowman, 1999). Buněčné linie přesto nabízejí celou řadu výhod, díky kterým se výrazně zasadily o pokroky ve výrobě vakcín, tvorbě protilátek, umělých tkání a syntéze terapeutik. Největší výhodou je, že poskytují neomezený počet buněk, u nichž je možná reprodukovatelnost. Díky buněčným liniím lze obejít etické obavy spojené s použitím živočišných a lidských tkání (MacDonald, 1990).

K nejjednodušším modelovým organizmům patří viry, bakteriofágy a z říše prokaryota zejména bakterie *Escherichia coli*. Z říše hub je důležitým modelovým organizmem *Saccharomyces cerevisiae*, u níž je popsán životní cyklus a základní buněčné funkce, například regulace buněčného cyklu, metabolismus, skládání proteinů a oprava poškozené DNA (Foury, 1997).



Živočišné modelové organizmy bezobratlých - *Caenorhabditis elegans* (Aboobaker, 2000) nebo *Drosophila melanogaster* (Bernards, 2001) jsou vhodné pro zkoumání aktivity genů, například signální transdukce nebo interakce proteinů. *Caenorhabditis elegans* je mnohobuněčný organizmus, u kterého byl poprvé prezentován mechanismus RNA interference, jež byl původně popsán jen v transgenních rostlinách (Napoli, 1990; Fire, 1998). *Drosophila melanogaster* posloužila k velkým objevům pohlavní dědičnosti a mutacím genů způsobených ionizujícím zářením. Tyto tzv. „ovocné mušky“ mají komplexní nervový systém, který podobně jako u lidí, podmiňuje učení a paměť. Mimo to obsahuje 75 % homologních lokusů, jejichž mutace mohou vést k projevům onemocnění (Reiter, 2001). Na základě těchto poznatků se jedná o ideální modelový organizmus pro studium lidských neurodegenerativních onemocnění – Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Chan, 2000).

Modelovým zástupcem obratlovců je sladkovodní indická ryba *Danio rerio*, která má většinu orgánů shodnou se savci. V roce 2013 byl osekvenován genom *Dania reria*, čímž se dokázalo, že obsahuje homologní sekvence většiny lidských genů včetně funkčních domén některých proteinů. Např. ATP-vazebné domény kináz jsou téměř identické, ale podobnost celých proteinů je pouze 60% (Parng, 2002). *Danio rerio* slouží jako modelový organizmus ke studiu funkce genů a účinku léčiv. Hlavní výhodou této tropické ryby je její vysoká fertilita – za týden je schopná naklást až 300 vajíček. Vývoj jedinců je rychlý a mnoho orgánů vzniká do 24 hodin po oplodnění (Postlethwait, 2004). Přestože postrádá plíce a mléčné žlázy, používá se jako model vybraných lidských onemocnění – diabetes, svalová dystrofie (Rubinstein, 2003).

V klinických výzkumech na tvorbu modelů lidských onemocnění je modelovým organizmem savec *Mus musculus*. S člověkem má podobné fyziologické a patologické znaky, a to především orgánové soustavy - imunitní, kardiovaskulární, nervová a endokrinní. Osekvenováním lidského genomu se zjistilo, že 99 % genů je u těchto dvou organizmů stejných (Rosenthal, 2007). Dalšími savčími modelovými organizmy jsou morčata, křečci, potkani a králíci, na kterých se testují látky z hlediska toxicity, drogy, vakcíny a léky. Z primátů našli uplatnění v reprodukční biologii, genové terapii a při testování toxicity opice *Rhesus macaques* (Yang, 2008). Živočišné modely slouží k přípravě modelů některých zranění - traumatické poranění mozku a míchy, ale zejména lidských onemocnění, jako je vrozená slepota, AIDS, diabetes, obezita, rakovina, Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Pippin, 2009).

Mezi člověkem a živočišnými modelovými organizmy existují podobnosti v rámci stavby těla i struktury genomů. Při tvorbě modelu lidského onemocnění se u živočichů musí

indukovat molekulární stav choroby umělým zásahem do jejich genomu. Při tvorbě modelu je důležité vědět, jaká mutace způsobuje danou chorobu, a pak může být tato mutace vnesena do odpovídajícího živočišného genu v modelovém organismu. Vědci k tomuto úkolu přistupují dvěma způsoby: metodami založenými na mutaci nebo založenými na onemocnění (Hardouin, 2000). Metody založené na mutaci využívají radiační záření nebo chemické látky k vyvolání konkrétní mutace v určitém genu. Metody založené na onemocnění využívají technik genového inženýrství. Genovým inženýrstvím se rozumí oblast molekulární biologie, která na simulaci lidských onemocnění využívá umělého zásahu do genomu živočišného organismu (Gawrylewski, 2007).

K technikám pro přípravy modelů lidských onemocnění patří transgenoze, inaktivace nebo aktivace konkrétního genu (knock-out/knock-in), modifikace a umlčování genů (RNA interference, CRISPR/Cas9 systém, TALEN) (Simmons, 2008). Transgenoze je proces, během kterého je cizí genetická informace vložena do DNA organismu, a tím vzniká geneticky modifikovaný organismus (GMO). V dnešní době existuje už 3 000 transgenních mutantních linií myší, které přispívají ke znalostem molekulárních podstat lidských onemocnění (Abbott, 2004). Dalším přístupem genetické manipulace u modelových organismů - *Mus musculus*, *Danio rerio* je vyřazení genu z funkce (tzv. gene silencing = RNA interference/RNAi). Tímto přístupem genové manipulace se zabývám v samostatné kapitole níže. Nejnovější technikou je genová terapie, jejíž základní podstatou je cílená úprava konkrétního genu (zapnutí/vypnutí genu) v buňkách za účelem léčebného účinku (např. TALEN, CRISPR).

### **3.2 Genové umlčování**

Genové umlčování je regulační mechanismus genů, který snižuje hladinu RNA transkriptu v buňkách, buď potlačením transkripce (transcriptional gene silencing, TGS), anebo aktivací sekvenčně specifického RNA degradačního procesu (post-transcriptional gene silencing, PTGS). Spojitost mezi TGS a PTGS je v krátkých molekulách RNA (krátké interferující RNA - siRNA; microRNA - miRNA) produkovaných z dlouhé dvouvláknové RNA (dsRNA). Tyto dvě dráhy genového umlčování se liší především místem průběhu - TGS probíhá v jádře a PTGS v cytoplazmě (Baulcombe, 2001).

Transkripční genové umlčování s využitím siRNA reguluje expresi genů epigenetickými změnami chromatinu. Přesný mechanismus TGS, kterým je dosažena ztráta funkce genu, není ještě zcela pochopen, a proto jsou zmíněny jen základní informace (Wassenegger, 2005). Podrobně se budu věnovat především post-transkripčnímu mechanismu

genového umlčování, a to konkrétně RNA interferenci (RNAi). Uplatňuje se jako účinný nástroj k potlačení exprese genů, které zodpovídají za lidská onemocnění (Cogoni, 2000; Hammond, 2001). Technologie RNAi mimo jiné umožňuje studovat funkce genů, a to buď vyřazením nebo přidáním konkrétního genu do organismu – reverzní genetika (Friedman and Perrimon, 2004).

### **3.2.1 Genové umlčování na transkripční úrovni**

Tento typ genového umlčování je uskutečněn skrze exogenní siRNA a způsobuje epigenetické změny v DNA oblastech, které jsou homologní k vložené siRNA. Nejčastější epigenetickou modifikací je metylace DNA. Matzke a kolektiv sledovali tento fenomén transkripčního umlčování genů (transcriptional gene silencing, TGS) na transgenních rostlinách tabáku v podobě nadměrné exprese transgenu, která směřovala až k DNA metylaci a výsledným umlčením konkrétního genu (Matzke, 1989). TGS řízené malou nekódující RNA bylo pozorováno u *Arabidopsis thaliana*, *Schistosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*. V lidských buňkách bylo transkripční umlčování genů řízené exogenní siRNA objeveno u transgenního elongačního faktoru 1 promotoru  $\alpha$ , ale jeho mechanismus není dostatečně pochopen (Morris, 2004).

#### **3.2.1.1 Mechanismus transkripčního umlčování genů**

TGS způsobuje dlouhodobé a stabilní epigenetické modifikace v DNA, které se přenáší na potomky i bez toho, že by docházelo ke změnám struktury DNA (Morris, 2008).

Mechanismus TGS se spustí, když je do buněk vložena exogenní siRNA komplementární k promotorové sekvenci umlčovaného genu. Následkem je zvýšené množství enzymu Argonaut 1 a metylovaných histonů, např.: metylace histonu 3 v jeho lysinových zbytcích v pozici 9 a 27 (dimethylace - H3K9me2 a trimethylace H3K27me3) (Kim, 2006). Methylace jsou epigenetické změny tichého stavu, které brání vazbě RNA polymerázy II na promotorovou sekvenci daného genu. Poté v této promotorové oblasti pravděpodobně vzniká epigenetický umlčovací komplex složený z DNA metyltransferázy 3  $\alpha$  (DNMT3A), histon deacetylázy 1 (HDAC-1) a Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) (Morris, 2009). Výsledkem celého procesu TGS je, že siRNA namířená proti promotorové sekvenci inhibuje transkripci daného genu, a tím vede k dlouhodobému genovému umlčování (Hawkins, 2009).

Mechanismus transkripčního umlčování genů je tedy zcela odlišný od mechanismu post-transkripčního umlčování genů, a to konkrétně RNA interference, popsaného v následující podkapitole.

### 3.2.2 Genové umlčování na post-transkripční úrovni (RNA interference)

U rostlin se pro post-transkripční umlčování genu používá termín kosuprese (Krol, 1990), u hub quelling (Cogoni, 1996) a u živočichů RNA interference, která je zprostředkovaná skrze siRNA/shRNA nebo miRNA (Fire, 1998).

Proces RNA interference je důležitým regulačním mechanismem u většiny eukaryotických buněk, za jehož objev byla Andrew Z. Fireovi a Craig C. Mellovi v roce 2006 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu. Jeho hlavní úlohou je regulovat transkripci a expresi genů pomocí 21 – 23 nukleotidů dlouhých dvouvláknových molekul RNA (siRNA) (Almeida, 2005). RNAi kontroluje životně důležité procesy, jako je růst buněk, diferenciace tkání, tvorba heterochromatinu a proliferace buněk. Dysfunkce RNAi je spojena s tvorbou kardiovaskulárních chorob, neurologických poruch a mnoha typů rakovin (Lu, 2008).

Z historie stojí za zmínku objev a molekulární podstata tohoto procesu. V 90. letech minulého století byly provedeny první experimenty s cíleným využitím RNA interference na rostlinných modelech. Jorgensen a kolektiv vložili do *Petunia hybrida* transgen pro chalkon syntázu a dihydroflavonol-4-reduktázu, které zajišťují růst transgenních rostlin s chimérickými až bílými květy místo květů fialových (Napoli, 1990). *Neurospora crassa* byla transformovaná transgenem *al-1*, který vede ke vzniku konidie postrádající charakteristickou oranžovou barvu v důsledku inaktivace genu *al-1* (Cogoni et al., 1996). V roce 1998 Fire a kolektiv popsali molekulární podstatu RNAi u organismu *Caenorhabditis elegans*, když přímo do těla vložili přečištěnou dsRNA komplementární ke umlčovanému genu, což vedlo k degradaci mRNA a celkovému snížení její hladiny v organismu (Holtorf, 1999).

Mechanismus RNA interference je popsán v následujících dvou podkapitolách, ve kterých se rozlišují dvě spouštěcí dráhy – exogenní dráha řízená siRNA (short interfering RNA) a endogenní dráha řízená miRNA (microRNA). Tyto efektorové molekuly RNAi indukují genové umlčování několika způsoby. Při úplné komplementaritě bází siRNA/miRNA s konkrétním umlčovaným genem dochází k přímému štěpení mRNA, ale u nedokonalého párování bází nastává inhibice translace s následnou degradací cílové mRNA (Meister, 2004).

#### 3.2.2.1 Mechanismus RNA interference pomocí malé interferující RNA (siRNA)

Spouštěcí molekulou mechanismu RNAi (Obr. 1) se stala dlouhá dvouvláknová RNA (dsRNA). dsRNA pochází z virové RNA nebo vzniká přepisem repetitivních sekvencí v genomu anebo se vkládá do buněk uměle (Elbashir, 2001). V cytoplasmě je dsRNA zpracována štěpením pomocí specializovaného enzymu RNáza III na menší molekuly

nazývané malé interferující RNA (siRNA). Tyto malé dvouvláknové molekuly RNA jsou dlouhé 21 – 23 nukleotidů a na 3' konci mají dvounukleotidový přesah (Bernstein, 2001).

Nejznámější

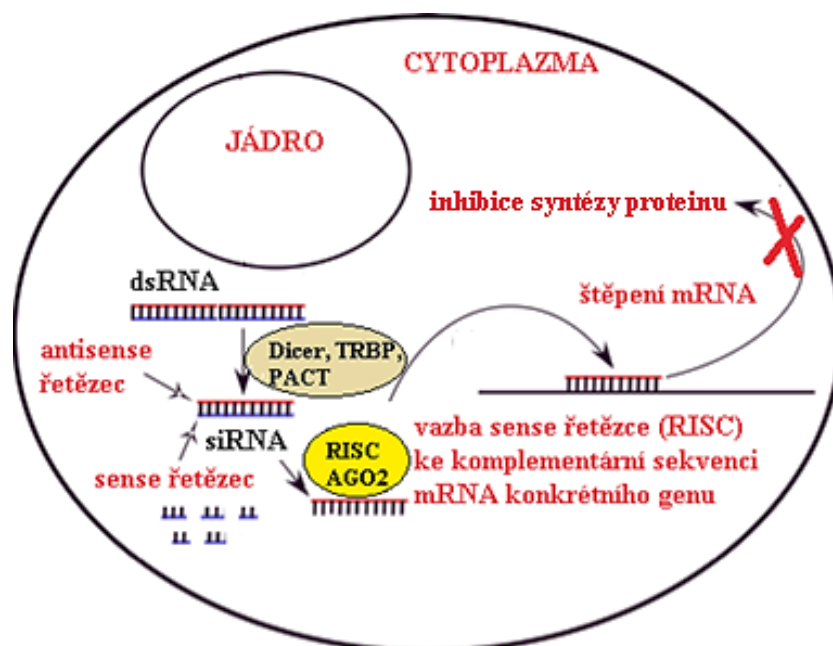
a nejlépe probádanou endoribonukleázou je enzym Dicer (Agrawal, 2003).

Dicer společně s partnerskými proteiny TAR-RNA-vazebným proteinem (TRBP), proteinovým aktivátorem protein kinázy PKR (PACT) a proteinem Argonaut 2 (Ago-2) aktivují komplex RISC (RNA-induced silencing complex) (Martinez, 2002; Meister, 2004). Hlavní součástí RISC komplexu jsou enzymy z rodiny Argonaut. Lidské buňky obsahují 8 těchto enzymů, ale pouze Ago-2 má aktivní katalytickou doménu potřebnou na štěpení sense řetězce siRNA (Liu, 2004). Do komplexu RISC tedy vstupuje dvouvláknová molekula siRNA, ale po štěpení Ago-2 zůstává pouze antisense vlákno siRNA, které směřuje RISC komplex ke své komplementární sekvenci mRNA. Antisense vlákno se váže pouze ke zcela komplementární mRNA mezi 10. a 11. bází vzhledem k 5' konci antisense vlákna siRNA. Komplementarita zajišťuje specifitu v umlčování genů zprostředkovanou siRNA (Elbashir, 2001; Tang, 2005).

Dvouvláknové RNA slouží jako nástroje ke studiu genových funkcí. *In vitro* studie buněčných linií zjistily, že přímé zavádění umělé siRNA namísto dlouhých dsRNA vede k bezproblémové a efektivní odpovědi RNAi, a proto se siRNA používají k účinnému potlačení exprese konkrétního genu. Za *in vitro* transkripci siRNA je zodpovědná vazba T7 RNA polymerázy na T7 promotor (Elbashir, 2001).

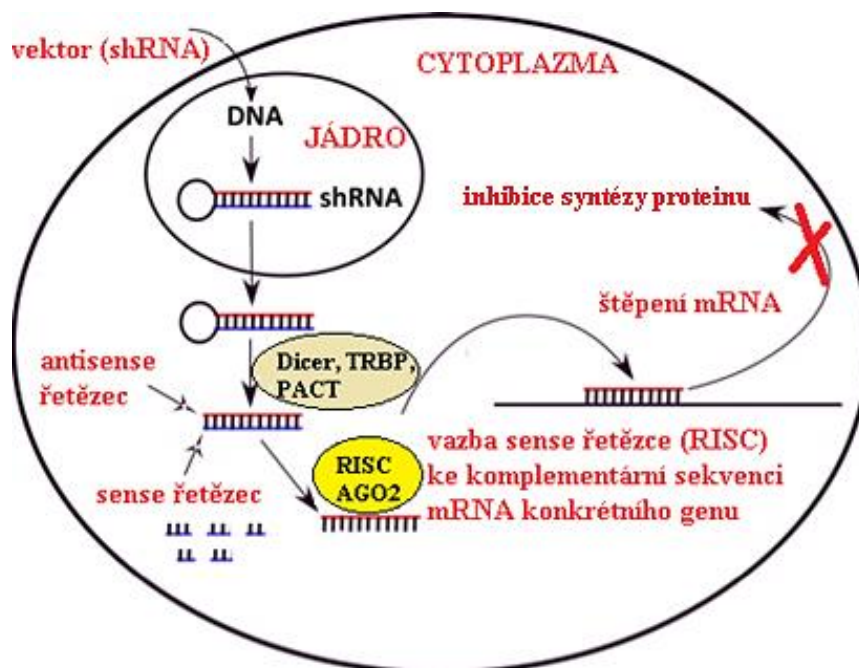
Alternativně místo siRNA mohou sloužit ke specifickému umlčování genu krátké vlásenkové RNA (short hairpin RNA, shRNA) (Obr. 2), které se po transfekci do buněk exprimují v buněčném jádře z virového vektoru. Sekvence vlásenky je rozpoznána a odstraněna Dicerem, a poté se shRNA upravuje stejným mechanismem jako siRNA (Cullen, 2005). Exprese shRNA z vektoru je zprostředkována vazbou RNA polymerázy III na promotor H1, 7SK nebo U6 (Yu, 2002).

Obr. 1: Mechanismus RNA interference pomocí siRNA (převzato a upraveno Allen, 2016)



TRBP- TAR-RNA-binding protein, PACT – protein activator of protein kinase PKR, shRNA – krátká vlásenková RNA, mRNA – mediátorová RNA, AGO2 – argonaut 2, RISC - RNA-induced silencing complex

Obr. 2: Mechanismus RNA interference pomocí shRNA (převzato a upraveno Allen, 2016)



TRBP- TAR-RNA-binding protein, PACT – protein activator of protein kinase PKR, shRNA – krátká vlásenková RNA, mRNA – mediátorová RNA, AGO2 – argonaut 2, RISC - RNA-induced silencing complex

### 3.2.2.2 Mechanismus RNA interference pomocí microRNA (miRNA)

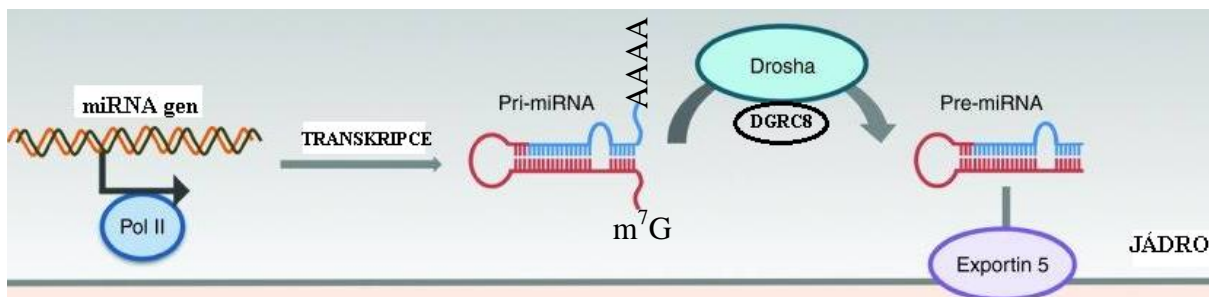
Podobně jako siRNA/shRNA potlačuje genovou expresi post-transkripčním způsobem v cytoplazmě buněk i miRNA. Efekt umlčování genů prostřednictvím miRNA je odlišný, ale protože obě dráhy RNAi zapojují stejné enzymy (Dicer, RISC), je jejich rozdíl navenek skrytý. Hlavním rozdílem je, že siRNA potlačuje expresi pouze jedné určité molekuly mRNA, ale miRNA je schopna regulovat expresi více různých molekul mRNA (Deng, 2014).

První miRNA byla objevena v roce 1993 ve studii zkoumající vývojové regulační geny u organismu *Caenorhabditis elegans* (Lee, 1993). miRNA jsou malé molekuly RNA, které negativně regulují expresi genů. Až 5 % lidského genomu je zaměřeno na kódování a produkci více než 1 000 miRNA molekul, které regulují alespoň 30 % našich genů (Jinek, 2009; MacFarlane, 2010).

Na Obr. 3a) probíhá v buněčném jádře transkripce genu miRNA enzymem RNA polymeráza II. Tvoří se primární transkript miRNA (pri-miRNA), který má na 5' konci 7-metylguanosinovou čepičku, 3' konec je polyadenylován a tvoří dvouvláknovou vlásenkovou strukturu (smyčka). Poté jsou primární transkripty v jádře štěpeny enzymem RNáza III - Drosha. Drosha je součástí proteinového mikroprocesorového komplexu, který obsahuje nezbytný protein vázající dsRNA Pasha nebo-li DGRC8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) (Lee, 2003; Gregory, 2004). Štěpením vzniká dvouvláknová prekurzorová miRNA (pre-miRNA) s charakteristickou vlásenkovou strukturou složenou ze 70 – 100 nukleotidů s občasným výskytem nekomplementárních míst. Prekurzorová miRNA se pomocí Exportinu 5 transportuje z jádra do cytoplazmy (Yi, 2003).

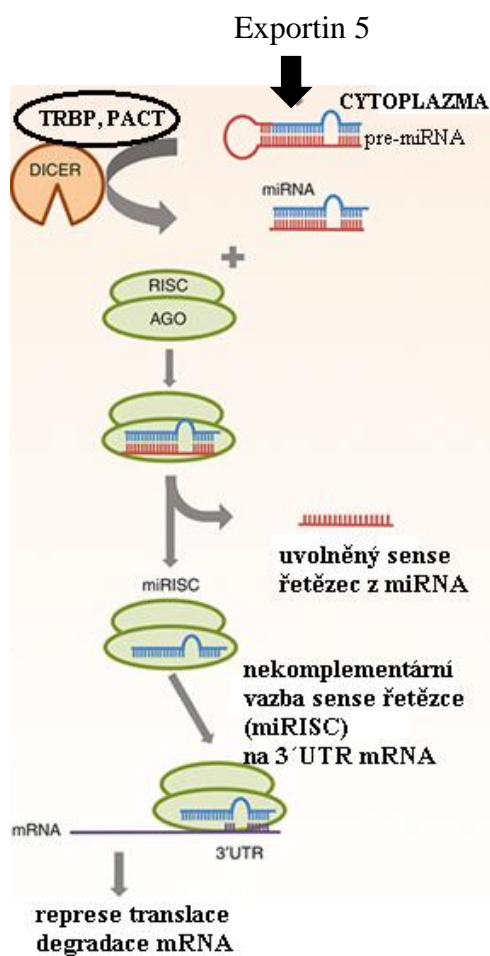
Na Obr. 3b) je už pre-miRNA v cytoplazmě a je zpracována Dicerem spolu s proteiny TRBP a PACT do 18 – 25 nukleotidů dlouhých dvouvláknových molekul miRNA. miRNA se spojuje s komplexem RISC a tvoří miRISC komplex. Aktivace miRISC komplexu probíhá mechanismem „bypass“, kde se z dvouvláknové miRNA helikázovou aktivitou uvolní a odstraní sense řetězec miRNA (Preall, 2005). Antisense řetězec miRNA v miRISC komplexu se váže na 3' netranslatovanou oblast (3'UTR) mRNA prostřednictvím částečné komplementarity bází. Pro částečnou komplementaritu musí být splněna tato podmínka: 2-8 nukleotidů na 5' konci miRNA musí být zcela komplementární k mRNA, ale u 3' konce je tolerována celková nekomplementarita bází (Lewis, 2005). Při částečné komplementaritě miRISC komplex potlačuje translaci proteinu (Liu, 2005) a při úplné komplementaritě se mRNA ihned štěpí (Yekta, 2004).

Obr. 3a) Mechanismus RNA interference miRNA v jádře buněk (převzato a upraveno: Kim, 2007)



Pol II – RNA polymeráza II, pri-miRNA – primární microRNA, pre-miRNA – prekurzorová microRNA, DGRC8 - DiGeorge syndrome critical region gene 8, m<sup>7</sup>G – 7-metylguanositová čepička, AAAA – poly(A) konec

Obr. 3b) Mechanismus RNA interference miRNA v cytoplazmě buněk (převzato a upraveno Lam, 2015)



TRBP - TAR-RNA-binding protein, PACT – protein activator of protein kinase PKR, mRNA – mediátorová RNA, miRNA – microRNA, AGO – argonaut 2, miRISC - microRNA-induced silencing complex, 3' UTR – 3' netranslatovaná oblast



### 3.2.2.3 RNAi jako terapeutický přístup pro léčbu onemocnění

Specifický efekt genového umlčování siRNA je účinným nástrojem pro identifikaci a validaci léků (Perwitasari, 2013). miRNA slouží jako biomarkery, protože potlačují expresi více genů, a to přispívá k propuknutí mnoha onemocnění (rakovina, neurodegenerativní a kardiovaskulární poruchy). Mimo jiné siRNA i miRNA mají obrovský potenciál jako terapeutické látky (Hayes, 2014). Oba typy malých RNA molekul mohou snižovat/potlačovat expresi prakticky všech genů a jejich mRNA transkriptů. Malé siRNA a miRNA otevírají nový terapeutický přístup k léčbě onemocnění tak, že se jejich schopnost potlačovat expresi zaměřuje pouze na geny, jejichž abnormální exprese vede k patologickému stavu. Na seznam takto vznikajících onemocnění patří rakovina, autoimunitní onemocnění, dominantní genetické poruchy a virové infekce.

První klinické využití RNAi bylo zaměřeno na léčbu věkem podmíněné makulární degenerace (AMD), která každý rok způsobuje až u milionu dospělých lidí slepotu nebo poruchy vidění (Fattal, 2006; Tolentino, 2006). V posledních letech je snahou připravit léčebnou terapii založenou na RNAi pro virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), virus hepatitidy B a C (HBV a HCV) a respiračního syncytiálního viru (Leonard, 2006).

Některé *in vivo* studie prokázaly potenciální účinnost terapií založených na RNAi, ale jiné poukázaly na nežádoucí vedlejší účinky, ke kterým patří aktivace Toll-like receptorů (TLRs) a kompetice mezi kompartmenty RNAi dráhy. Ačkoliv je RNAi jedním z revolučních léčebných mechanismů, je nutné dbát opatrnosti při interpretaci výsledků (Svoboda, 2007).

Výhody a nevýhody syntetické siRNA versus shRNA exprimované z vektoru musí být brány v potaz, když se navrhuje léčebná terapie. Stabilitu siRNA zvyšují některé chemické modifikace, např.: 2'-omethylpuriny nebo 2'-fluoropyrimidiny (Czauderna, 2003). Návrhy sekvencí siRNA molekul se provádí pomocí speciálních algoritmů s předem zadanými parametry (Kim, 2005). Existují i delší siRNA (27-mery), které snáze aktivují RISC komplex. RNA molekuly dlouhé 27 nt jsou asymetrické, protože na 3' konci mají 2-nukleotidový přesah a 5' konec je zakončen tupě. Nižší koncentrace 27-merů může zprostředkovat stejně účinnou RNAi odpověď jako vyšší koncentrace klasických 21-23 nt dlouhých siRNA (Amarzguioui, 2006).

Na mechanismu RNAi je nejdůležitější přenos siRNA do příslušné tkáně. siRNA může být dopravena systematicky do různých tkání, kde dojde k umlčení pouze komplementárního genu. Intravenózní doprava siRNA do tkáně se uskutečňuje prostřednictvím konjugace siRNA molekul do cholesterolové skupiny nebo obalením siRNA za vzniku lipozomální částice. Tyto přístupy jsou účinné pouze pro játra

a lačník tenkého střeva. Příkladem je studie, kdy cílem siRNA je protein apolipoprotein B. 3' hydroxylová skupina na dceřiném vlákně siRNA se chemicky spojuje s cholesterolovou skupinou a společně snižují genovou expresi v játrech o více než 50 % a až o 70 % v jícnu (Soutschek, 2004). Dalším přístupem dopravy siRNA do tkání je použití stabilních lipidových částic nukleových kyselin SNALP (stable nucleic acid lipid particles), které inkorporují chemicky modifikovanou siRNA (Morrissey, 2005). Ve studii Zimmermanna a kolektivu z roku 2005 byla primátům aplikována jedna dávka SNALP s siRNA, která snížila hladinu cholesterolu na 11 dní a v játrech o 10 % snížila expresi genu *Apolipoprotein B*. Žádné toxické účinky nebyly pozorovány (Zimmermann, 2005).

V *in vivo* studiích musí být množství dodávané siRNA do tkání pečlivě zvažováno, aby se předešlo ovlivnění ostatních tkání. Na tkáňovou selekci slouží povrchové receptory buněk. siRNA se často spojuje s aptamery, což jsou synteticky vyrobené oligonukleotidy kyseliny ribonukleové (RNA) nebo jednořetězcové deoxyribonukleové kyseliny (ssDNA), které se mohou vázat na cílové molekuly s vysokou afinitou a specificitou díky jejich specifické trojrozměrné struktuře (Dollins, 2008). Existuje metoda, která používá aptamery schopné vazby na membránový antigen specifický pro prostatu PSMA (tumor target prostate specific membrane antigen) exprimovaný na povrchu buněk rakoviny prostaty. Konjugací těchto aptamerů a siRNA se vytvoří hybridní molekula aptamer-siRNA, která efektivně potlačuje růst nádorů u myši (McNamara, 2006).

Dále může docházet ke spojení siRNA s fragmenty protilátek. Například v HIV infikovaných buňkách se molekula siRNA spojuje s fragmenty vázajícími antigen těžkého řetězce protilátek (Fab) a společně rozpoznávají HIV obalový glykoprotein gp120. Pozitivně nabitý protamin konjuguje s molekulami Fab a negativně nabitá siRNA elektrostaticky interagují s protaminem za tvorby komplexu Fab-siRNA. Tento přístup cílení siRNA založený na protilátkách v kultuře T lymfocytů infikovaných HIV demonstroval snížení exprese antigenního proteinu Gag (group specific antigen) až o 70 % (Song, 2005).

Příkladem je i spojení siRNA s nanočásticemi, na jejichž povrchu se nachází receptory specifické pro ligandy, čímž je zajištěn přenos adekvátní dávky siRNA k cílovým buňkám. Příkladem je *in vivo* studie Ewingova sarkomu, v níž byly použity nanočástice s transferinovým ligandem obsahující siRNA. Tyto nanočástice byly zaměřeny na fúzní genový produkt Ews-Fli1 (Ewing sarcoma breakpoint region 1-flightless 1 homolog), což vedlo k inhibici tvorby nádorů u myši (Hu-Lieskovan, 2005).

### 3.2.2.4 RNAi jako nástroj k vytvoření haploinsuficientního modelu onemocnění

Člověk má diploidní somatické buňky složené ze dvou kopií genů, jedna pochází od otce a druhá od matky, a haploidní pohlavní buňky s jednou kopií genu. Tato redundance kopií u somatických buněk poskytuje záložní funkční kopii.

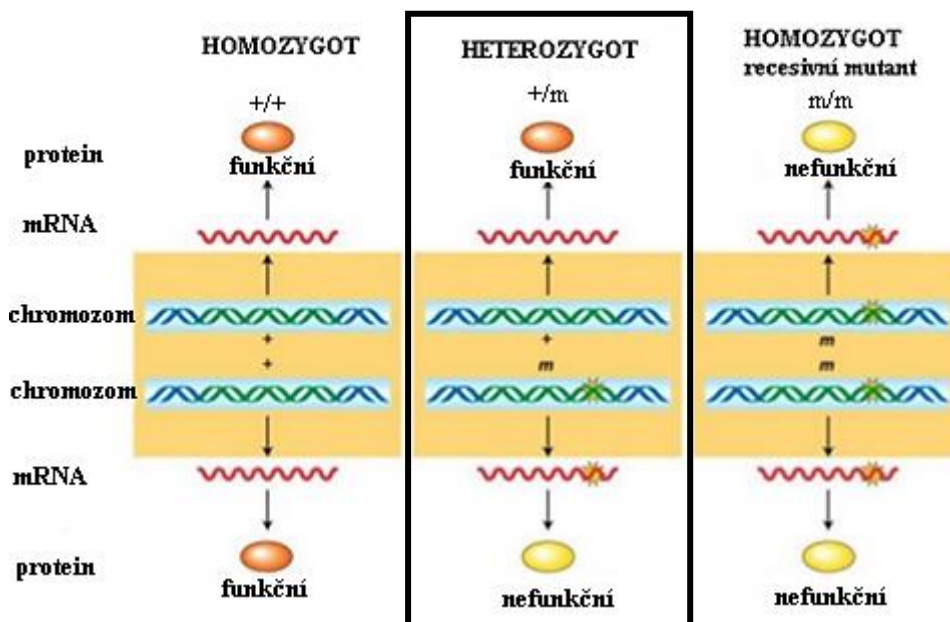
Termínem haploinsuficience se označuje fenotypový projev, kdy diploidní organizmus (člověk) má pouze jednu funkční kopii genu a druhá kopie genu je inaktivována mutací. Všeobecně přítomnost pouze jedné funkční zdravé alely genu (50 %) nestačí pro normální fungování organismu, protože se tak netvoří dostatečné množství produktu daného genu. Tento stav, kdy je přítomna pouze jedna funkční kopie genu ze dvou, se z hlediska genotypu nazývá hemizygozita. Právě ztráta jedné alely genu, která netvoří dostatek proteinu je hlavní příčinou většiny dětských vývojových poruch. Fenotypovým projevem je tedy abnormální/nemocný stav. Haploinsuficience je příkladem neúplné (částečné) dominance, protože heterozygot s jednou normální a s jednou mutovanou alelou se projevuje kombinovaným fenotypovým efektem (Obr. 4). Z toho vyplývá, že mutantní alela je dominantní nad normální (zdravou) alelou, protože jak heterozygoti, tak i homozygoti s mutovanou alelou netvoří funkční produkty (abnormální proteiny). Haploinsuficience je pozorována u všech eukaryotních organismů od *Saccharomyces cerevisiae* až k člověku. Opakem haploinsuficience je haplosuficience, při které jedna funkční normální alela produkuje dostatečné množství proteinu pro udržení normálního fenotypu (Kacser, 1981).

Genetické onemocnění způsobená haploinsuficiencí jsou typicky způsobena mutacemi v genech, jejichž proteiny interagují v pevných kvantitativních poměrech s jinými proteiny (tj. není důležité absolutní množství proteinu, ale poměr všech proteinů zapojených do tohoto metabolického procesu). V jiných případech může být konkrétní protein pro strukturu a funkci některých tkání méně důležitý, zatímco pro jiné tkáně/orgány je naprosto zásadní (musí být 100% funkční v obou kopiích genu). To také vysvětluje, proč je haploinsuficience někdy spojována s takzvaným fenoménem variabilní expresivity. Mutace není haploinsuficientní, ale tzv. loss-of-function (LOF) mutace jsou výsledkem mutací v haploinsuficientních genech (<https://bredagenetics.com/haploinsufficiency-en/>). Za LOF mutace zodpovídají velké genomové delece, které jednoznačně snižují počet funkčních kopií genů. Nejen velké delece, ale i částečné delece klíčových prvků, např. promotoru, start kodonu způsobují tento typ mutace, jehož výsledkem je mutace v haploinsuficientních genech (HI geny).

Při studiu lidských onemocnění bylo za 20 let identifikováno více než 300 haploinsuficientních genů. Kolik z 23 000 genů v lidském genomu je citlivých na ztrátu funkce jedné alely (HI geny), není zcela jasné. Při porovnání 300 genů citlivých k inaktivaci

jedné kopie (HI) s 1000 geny, u nichž nevede ztráta funkce jedné alely k propuknutí choroby (haplosuficientní geny, HS), byly zjištěny jejich evoluční a funkční rozdíly. HI geny jsou obvykle delší, mají více konzervovaných kódujících sekvencí a promotorů než HS geny, a dokonce vykazují vyšší expresi během raného vývoje a větší tkáňovou specifitu. Na základě těchto rozdílů se předpokládá, že 12 443 lidských anotovaných genů bude právě haploinsuficientních (HI) (Huang, 2010). Většina genů kódujících transkripční faktory a geny, které působí ve vývoji, v buněčném cyklu a metabolismu nukleových kyselin, jsou zástupci haploinsuficientních genů. Například lidský chromozom 17 je zvláště obohacen o HI geny, např.: *RAI1* (retinoic acid induced 1), *COPS3* (COP9 signalosome subunit 3), *TOP3A* (DNA topoisomerase 3- $\alpha$ ), *SHMT1* (serine hydroxymethyltransferase 1) (Dang, 2008).

Obr. 4: Princip haploinsuficience (převzato a upraveno W. H. Freeman, 2012)



#### HAPLOINSUFICIENCE

+ - normální alela, m – mutantní alela, mRNA – mediátorová RNA

#### 3.2.2.4.1 Onemocnění spojené s haploinsuficiencí

Ztráta funkce pouze jedné kopie se pro některé geny ukázala být patogenní. Kvůli patogenní mutaci v jedné ze dvou kopií genu se redukuje produkce proteinů na 50 % a to dostačuje k propuknutí choroby. Typická onemocnění spojená s haploinsuficiencí jsou: DiGeorgův syndrom, CHARGE syndrom, Marfanův syndrom, Ehlers-Danosův syndrom, Holt-Oramův syndrom, exostózová choroba, Alagilleův syndrom, myelodysplastický

syndrom (nebo taky 5q- syndrom) a Diamond-Blackfanova anémie (DBA). Vzhledem k cílům praktické části se budu věnovat molekulární podstatě Diamond-Blackfanovy anémie.

DBA je dědičný syndrom s poruchou kostní dřeně charakterizovaný především normochromickou makrocytickou anémií (zvýšená krvácivost, méně krevních destiček) a nedostatkem erytrocytů, ale i zpomaleným růstem, kraniofaciálními malformacemi (rozštěpy), malformacemi srdce, horních končetin a močového systému (Alter, 1998). DBA postihuje obě pohlaví rovnoměrně a celosvětově se udává incidence v rozmezí 5-7 pacientů na 1 milion živě narozených dětí. Z 90 % případů se identifikuje DBA během prvního roku života (Willig, 1999).

Diamond-Blackfanova anémie se stala modelovým příkladem ribozomopatií, což je skupina patologických stavů s defekty v biogenezi ribozomů (Orfali, 2004). Molekulární podstata ribozomopatií (včetně DBA) spočívá v mutacích genů kódujících ribozomální proteiny (RP), čímž se snižuje počet funkčních ribozomálních proteinů a následkem je nedostatečná tvorba ribozomů (Gazda, 2004). Eukaryotické ribozomy se skládají z velké podjednotky (80S) a malé podjednotky (40S), které jsou tvořené ribozomální RNA (rRNA) a ribozomálními proteiny (RP). Podle toho, které proteiny tvoří danou podjednotku, se rozlišují ribozomální proteiny malé podjednotky (ribosomal protein small, RPS) a ribozomální proteiny velké podjednotky (ribosomal protein large, RPL) (Wool, 1979). Narušení ribozomální biogeneze vede až ke vzniku ribozomálního stresu, který tak způsobuje rozpad jadérka v buněčném jádře. Následkem tohoto rozpadu je uvolnění RP do nukleoplazmy (klíčové jsou RPL5 a RPL11). Uvolněné ribozomální proteiny regulují p53 signální dráhu tak, že stabilizují a aktivují protein p53 („strážce genomu“) (Lane, 1992; Vogelstein, 2000). Protein p53 jako transkripční faktor reguluje proteiny, které buď zastavují buněčný cyklus, anebo spouští apoptózu, čímž chrání buňky před tumorogenezí (Fumagalli, 2012). V případě snížení hladiny těchto proteinů pomocí RNA interference se výrazně zeslabuje aktivace p53. Dále lze v buňkách pozorovat strukturální změny jadérka, např. rozpletení a fragmentace.

Heterozygotní mutace genů kódujících proteiny malé podjednotky ribozomů – *RPS19* (Draptchinskaja, 1999), *RPS24* (Gazda, 2006), *RPS17* (Cmejla, 2007) a taky genů kódujících RP velké podjednotky - *RPL35A* se vyskytují u 30 % pacientů s DBA. Tyto mutace v genech RPS a RPL směřují k haploinsuficientnímu výskytu jejich proteinů. Protože jsou tyto mutace vzácné a jejich výskyt je malý, pouze (8 pacientů s mutací v *RPS19*, 1 s *RPS24* a 6 s *RPS17*), je těžké vysvětlit korelaci mezi genotypem a fenotypem (Gazda, 2004). Například haploinsuficience proteinů kódovaných ribozomálními geny *RPS19* a *RPS24* je hlavním faktorem vedoucím až k propuknutí DBA (Draptchinskaja, 1999).

Při cílené degradaci mRNA transkriptu pro gen *RPS19* se prostřednictvím RNA interference zablokuje proliferace a diferenciaci erytroidních progenitorových buněk. Nedostatek proteinů RPS19, RPS17, RPS24 vede ke změnám ve zpracování pre-RNA, což má za následek inhibici syntézy malé ribozomální podjednotky (Farrar, 2008). U dalších čtyř ribozomálních genů *RPL5*, *RPL11*, *RPS17* a *RPS7* byla objevena patogenní mutace, která vede k haploinsuficienci jednotlivých ribozomálních proteinů, což způsobuje taky DBA. Porucha tvorby ribozomálních proteinů RPL5, RPL11 a RPS7 je spojena hlavně s defektní tvorbou rRNA a fyzickými abnormalitami (Bommer, 1988; Cmejla, 2007). Na živočišných modelových organizmech (*Danio rerio*, *Mus musculus*) byl pozorován vliv abnormální (nebo chybějící) biogeneze ribozomů na fenotyp – většinou poruchy erytrocytů. K tomuto výzkumu byly použity morfolínem modifikované antisense oligonukleotidy vysvětlené v následující podkapitole (Choesmel, 2008).

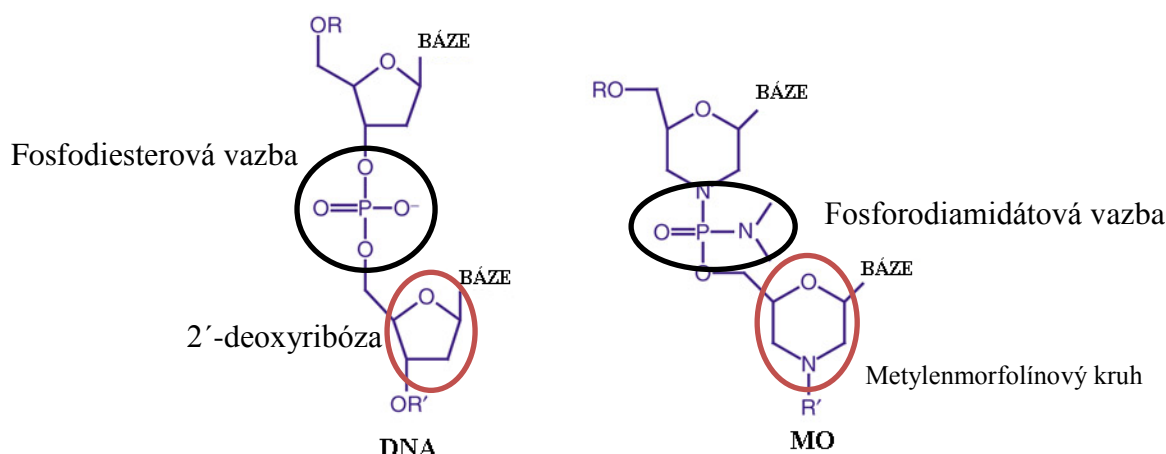
Podobným příkladem onemocnění se stejnou molekulární podstatou i fenotypovým projevem (poruchy kostní dřeně) je myelodysplastický syndrom (5q- syndrom), který vzniká v důsledku haploinsuficience ribozomálního proteinu RPS14 v hematopoetických kmenových buňkách (Boultonwood, 2007). Ebert a kolektiv v roce 2008 prokázali, že prostřednictvím RNAi došlo ke ztrátě funkce genu *RPS14*, a tím zablokovali diferenciaci erytrocytů a spustili jejich apoptózu (Ebert, 2008).

#### **3.2.2.4.2 Morfolínem modifikované antisense oligonukleotidy**

K výzkumu haploinsuficience ribozomálních genů byly použity morfolínem modifikované antisense oligonukleotidy (MO), které slouží jako nástroj k vypínání funkce genů u modelového organismu *Danio rerio*. Morfolín je heterocyklická organická sloučenina obsahující aminovou a etherovou funkční skupinu. Ve farmaceutickém průmyslu se morfolín používá jako rozpouštědlo. Poprvé byly MO objeveny Dr. Jamesem Summertonem při *in vivo* inhibici translace skrze RNA transkripty (Partridge, 1996).

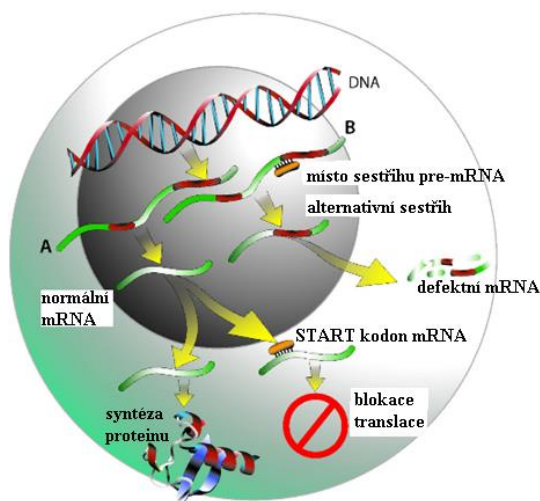
Morfolínové oligomery jsou oligonukleotidy o délce 25 bází. Strukturou připomínají DNA, kdy standardní báze nukleových kyselin (adenin, guanin, thymin, cytosin) jsou vázány do metylenmorfolínových kruhů spojených fosfordiamidátovou skupinou místo fosfátu, jako je tomu v případě DNA struktury (Obr. 5) (Summerton, 1997).

Obr. 5: Struktura DNA versus morfolínové oligonukleotidy (převzato: Corey, 2001)



Všeobecně se morfolínové oligonukleotidy používají ke stanovení funkce genu za předpokladu znalosti sekvence mRNA (princip reverzní genetiky). Vazbou morfolínových oligonukleotidů se ale cílová molekula RNA nedegraduje jako v případě RNAi. Místo toho tato vazba vede k zablokování syntézy proteinů (Nasevicius, 2000). MO se vážou na cílovou mRNA kódující konkrétní gen, a to buď v místě start kodonu mRNA nebo na místo sestřihu pre-mRNA. Na Obr. 6 pod písmenem A je znázorněno, že v jádře probíhá transkripce DNA do pre-mRNA s následným sestřihem intronů a vznikem mRNA. mRNA se transportuje do cytoplazmy, kde podléhá procesu translace. Když se MO navážou na start kodon mRNA (ATG), zablokuje se celý proces translace a následná syntéza proteinu. Dalším přístupem může být vazba MO na místo sestřihu pre-mRNA. Na Obr. 6 pod písmenem B je znázorněna vazba MO na místo sestřihu pre-mRNA, kde potom vzniká defektní primární transkript mRNA. V cytoplazmě se defektní transkripty degradují anebo se syntetizují abnormální proteiny (Timme-Laragy, 2012).

Obr. 6: Působení morfolínových oligomerů (převzato a upraveno: Timme-Laragy, 2012)



### 3.3 Genová terapie

Genová terapie je novým léčebným přístupem chorob na základě změny exprese genů. Spoluobjevitel struktury DNA J. Watson řekl: „Mysleli jsme si, že náš osud je ve hvězdách, ale nyní víme, že náš osud je v našich genech.“ Geny jsou základní funkční jednotky dědičnosti, jejichž sekvence kóduje proteiny, které organizují většinu životních funkcí. Poškozením genů se tvoří abnormální proteiny, které nejsou schopny plnit svou funkci tak, jak mají, což vede k tvorbě genetických chorob (Miller, 1992).

V 80. letech minulého století byla objevena tato experimentální technika, jejíž základní podstatou je oprava chyb v genech zodpovědných za propuknutí konkrétní genetické choroby (August, 1990). Při genové terapii se do buněk vpravuje genetický materiál, který kompenzuje abnormální geny za účelem léčebného účinku. Pokud mutovaný gen způsobí, že nezbytný protein je vadný nebo chybí, jsme schopni pomocí genové terapie vložit funkční kopii genu do organismu, a tím obnovit funkci daného proteinu (Friedmann, 1992).

V praxi by mohl léčebný účinek genové terapie u některých chorob nahradit léčbu prostřednictvím léků nebo operace. Testuje se několik přístupů genové terapie - jedním z nich je výměna abnormálního genu způsobujícího onemocnění za normální zdravou kopii genu prostřednictvím homologní rekombinace a dalším je inaktivace mutovaného genu. Genová terapie je ale stále považována za velmi riskantní techniku z důvodu použití cizího genetického materiálu, a proto se stále studuje, aby se zajistila bezpečnost a vysoká léčebná účinnost. V současné době klinické studie genové terapie probíhají z 67 % ve Spojených státech amerických, z 10 % ve Spojeném království, ze 4 % v Německu a kolem 2 % ve Švýcarsku, Francii, Číně a Japonsku. Česká republika a některé další státy, např. Rakousko, Dánsko, Finsko, Nový Zéland, Polsko, Austrálie, atd., se věnují klinickými studiím spíše sporadicky - 1 % (Hanna, 2017). Široký potenciál genové terapie lze využít k léčbě dědičných onemocnění, jako je hemofilie, cystická fibróza, srpkovitá anémie, ale i získaných genetických chorob, jako je rakovina a některé virové infekce, např. AIDS (Friedmann, 1992). Rozlišujeme dva typy genové terapie – genová terapie somatických a zárodečných buněk. U somatické genové terapie se opravují geny v somatických buňkách pacienta (orgány, tkáně), aniž by došlo k dědičnému přenosu modifikovaných genů na potomky pacienta. Nová DNA (zdravý gen) určená k opravě chybných genů se integruje do genomu, anebo se nejdříve klonuje do příslušného plazmidu, který se následně transfekcí dostává do poškozených somatických buněk pacienta, a tím se trvale koriguje poškozená somatická buňka (Bank, 1996).



Genová terapie zárodečných buněk se liší tím, že dochází k opravě genů v pohlavních buňkách (spermie, vajíčka). Genové modifikace pohlavních buněk jsou dědičné a přenáší se na potomky. Nevýhodou této terapie je, že svým zásahem do genetické informace ovlivňuje dědičnost, a to vyvolává mnoho etických otázek. V Austrálii, Kanadě, Německu, Izraeli, Švýcarsku, Nizozemsku jsou klinické studie genové terapie zárodečných buněk na lidech zakázané a celosvětově není zatím tato léčebná terapie povolena (Mathews, 2007). V Tab. 1 jsou shrnuty základní rozdíly mezi těmito 2 typy genových terapií.

Tab. 1: Souhrn základních rozdílů genové terapie somatických a zárodečných buněk

	<b>GT somatických buněk</b>	<b>GT zárodečných buněk</b>
<b>Cílové buňky</b>	somatické buňky (orgány)	zárodečné buňky
<b>Příklady buněk</b>	buňky kostní dřeně, kožní buňky, krevní buňky	pohlavní buňky (spermie, vajíčka)
<b>Dědičnost</b>	ne	ano
<b>Současnost</b>	léčba geneticky podmíněných chorob (srpkovitá anémie)	není povolena kvůli technickým a etickým otázkám

### 3.3.1 Mechanismus somatické genové terapie

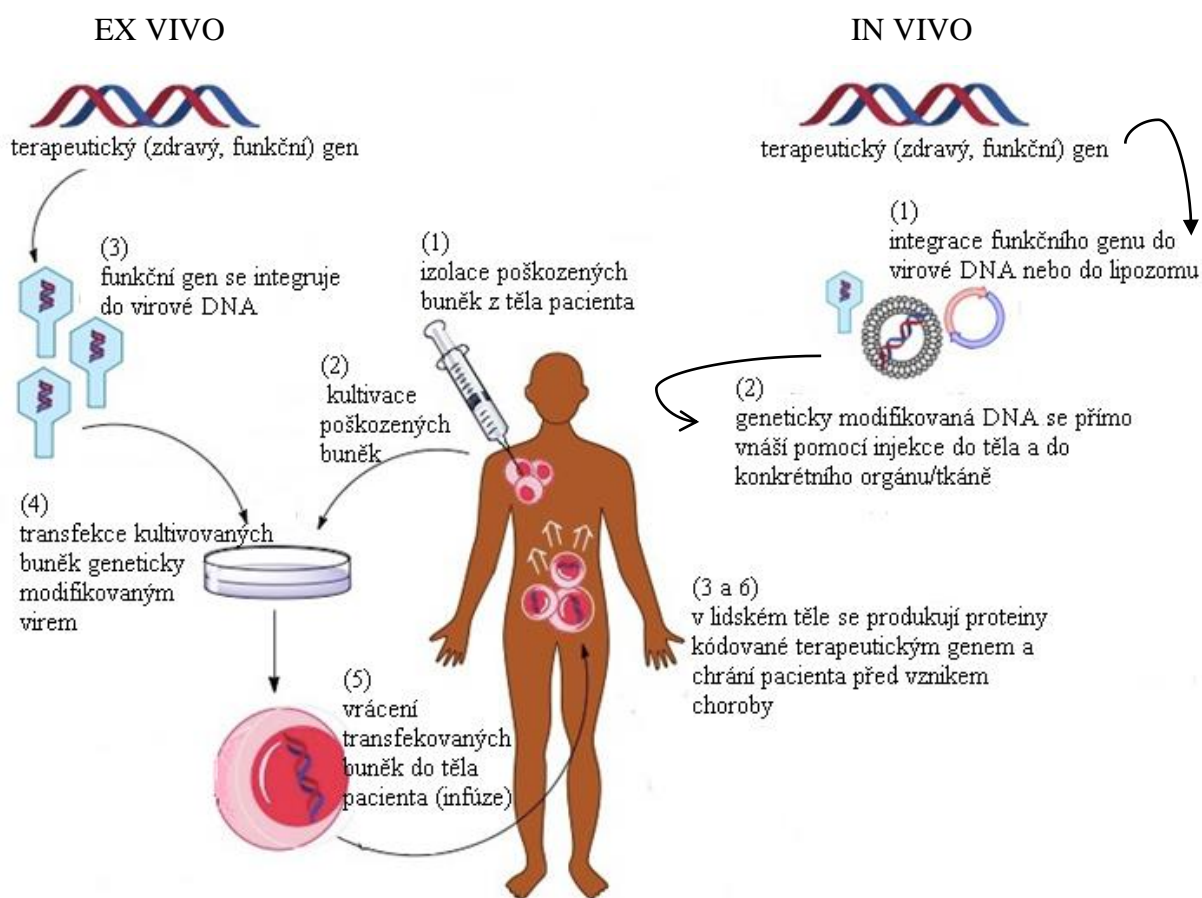
Prvním bodem celého mechanismu somatické genové terapie je nahradit abnormální gen způsobující onemocnění normálně fungujícím genem. Samotný terapeutický (zdravý, funkční) gen dodávaný do buněk pacienta není funkční, a proto se k transportování konkrétního genu do poškozených buněk pacienta používají nosiče, tzv. vektory. Vektor je upraven tak, aby efektivně dodával geny do buněk a zajišťoval expresi nového genu po celý život pacienta. Vložené vektory u pacienta nesmí vyvolávat alergickou reakci nebo zánět (Gardlik, 2005).

Na dodávání genů do buněk existují dva přístupy – *ex vivo* a *in vivo* (Obr. 7). *Ex vivo* genová manipulace se používá častěji, protože se nejprve izolují poškozené buňky z těla pacienta a kultivují se. Poté následuje klonování zdravého funkčního genu do vybraného vhodného vektoru, který se procesem transfekce dostává do vyextrahovaných a kultivovaných buněk pacienta. Transfekované buňky se prostřednictvím infúze (nebo transplantace) vpravují zpět do těla pacienta, kde se z nového zdravého genu exprimuje protein, který tak chrání tělo před vznikem určité choroby. Příkladem *ex vivo* somatické genové terapie je případ čtyřleté dívky, která trpěla těžkou kombinovanou imunodeficiencí (severe combined

immunodeficiency disease, SCID) s charakteristickým nedostatkem enzymu adenosin deaminázy (ADA). Leukocyty izolované z pacientky byly transfekovány funkčním genem kódujícím adenosin deaminázu (ADA) a po zpětné krevní transfúzi geneticky modifikovaných buněk došlo k posílení její imunity (Blaese, 1993).

Naopak u *in vivo* techniky se dopředu neizolují poškozené buňky pacienta. Rekombinantní vektor s novým funkčním genem se pomocí injekce vnáší přímo do krve (orgánu) pacienta, kde se přímo váže na konkrétní poškozené buňky pacienta (Romano, 1999). Příkladem *in vivo* somatické genové terapie jsou pacienti trpící cystickou fibrózou způsobenou mutací genu *CFTR* (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) kódujícího chloridový kanál. Přes nosní epitel byl přímo do těl pacientů aplikován adenovirový vektor s genem produkujícím CFTR protein (Caplen, 1995).

Obr. 7 : *Ex vivo* a *in vivo* přenos vektorů u somatické genové terapie (převzato a upraveno: Crystal, 2017)



### 3.3.1.1 Techniky přenosu genů do virových buněk v somatické genové terapii

Největším problémem genové terapie je přenos zdravého funkčního genu do cílových buněk pacienta, kde má dojít k produkci jeho proteinů. Účinný transport genů zajišťují zejména vektory virového původu - retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry, herpes simplex viry. Viry přenáší svoji vlastní genetickou informaci do infikované hostitelské buňky. Vědci využili molekulární podstatu této infekce ve svůj prospěch, a to tak, že virový genom nahradili terapeutickým genem, čímž se zajistil přirozený přenos cizího genu do lidských buněk. Jakmile se vnesený gen dostane na správné místo v těle pacienta, dochází k tvorbě proteinu, který byl předtím nefunkční (Walther, 2000). Podrobně zde uvádím 4 nejčastěji používané virové vektory.

Prvními použitými viry pro přenos genů byly retroviry (Rochat, 2002). Retroviry jsou obalené viry s jednovláknovou nukleovou kyselinou RNA, které prostřednictvím reverzní transkriptázy přepisují svou genetickou informaci do dvouvláknové dsDNA. V této formě jsou schopny pomocí enzymu integrázy zabudovat svůj genetický materiál (včetně nového genu) do chromozomu hostitelské buňky (Baun, 2003). Integrační enzym může virový genom vložit do libovolného místa hostitelského genomu, což může vést k nežádoucím následkům, jako je mutageneze nebo nekontrolované buněčné dělení vedoucí až k nádorovému bujení. Řešením integračního problému by mohly být umělé nukleázy se zinkovými prsty (Durai, 2005). První úspěšná genová terapie s přenosem genů pomocí retrovirů byla provedena u pacientů s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID) (Blaese, 1993; Gasper, 2005) a u pacientů s cystickou fibrózou, kdy se retroviry s genem přímo aplikovaly do výstelky bronchiální trubice (Caplen, 1995).

Dalším typem virových vektorů jsou adenoviry, což jsou neobalené viry s dvouvláknovou nukleovou kyselinou DNA. Jejich genom se přenáší do jádra, ale neintegruje se do genomu hostitelské buňky. Výhodou adenovirů je schopnost infikovat pomalu se dělící buňky (buňky plic). Nevýhodou je, že existence adenovirů v těle pacienta může vyvolat imunitní odpověď nebo zánět. Navzdory těmto problémům jsou adenoviry vhodné při léčbě rakoviny jater a vaječníků (Vorburger, 2002). Prvním léčivem adenovirálního původu se sekvencí lidského genu pro protein p53 je Gendicin. Jedná se o oficiálně povolenou genovou terapii pro léčbu nádorů trávicího a dýchacího traktu (např. spinocelulární karcinom) (Peng, 2005).

Dalšími virovými vektory jsou adeno-asociované viry (AAV) s jednovláknovou nukleovou kyselinou DNA, které infikují dělící i nedělící buňky. Na rozdíl od adenovirů

poskytují integraci genetického materiálu do konkrétního místa na chromozomu 19, takže máme jistotu v tom, na jaké místo se nový gen dostane. V současnosti se používají v klinických studiích k léčbě dědičných krevních, očních a svalových chorob. V přirozeném stavu mají AAV pouze dva geny, čímž je jejich využití v praxi značně omezené (Sibbald, 2001).

Na závěr zmíním ještě Herpes simplex viry (HSV), které se používají nejčastěji k přenosu nových genů do nervového systému. HSV mají v porovnání s ostatními virovými vektory velký genom, což umožňuje vkládat větší množství nových genů do jediného viru. Infikují širokou škálu tkání včetně svalů, jater, pankreatu, nervových a plicních buněk (Latchman, 1994).

Kromě transfekce buněk virovými vektory existují i metody nevirového původu – chemické a fyzikální. Nejjednodušší fyzikální metodou je přímá injekce cizí DNA do těla pacienta (Wolff, 1990). K dalším metodám patří elektroporace (elektrický šok), sonoporace (frekvence ultrazvuku), magnetofekce (magnetické částice) a biolistika (částice zlata). Nejslibnější metodou je receptorem zprostředkovaný genový transport, který je založen na konjugaci DNA se specifickými virovými proteiny nebo s lipozomy, které se absorbují do buněk prostřednictvím endocytózy (Thorstensen, 1990). Existují i chemické metody k přenosu cizí DNA do buněk, např. syntetické oligonukleotidy, které inaktivují defektní geny.

Mimo jiné existují i hybridní metody, které kombinují více technik dohromady. Příkladem jsou vibrozomy, které kombinují lipozomy s virem chřipky nebo inaktivním HIV (Pierce, 2003). V posledních letech se diskutuje i o použití umělého lidského chromozomu. Tento 47. chromozom by existoval samostatně bez jakéhokoli vlivu na 46 standardních chromozomů a sloužil by jako vektor k přenosu velkého množství genetické informace. Metody nevirového původu zahrnují možnost přenosu relativně velkých fragmentů DNA v porovnání s virovými vektory (Wolff, 1990).

### **3.3.2 Klinické studie somatické genové terapie**

První klinické studie somatické genové terapie u živočichů (hlavně u Pekingské kachny) existují už od roku 1966, ale nebyly získány žádné významné výsledky. Od 80. let 20. století se začala studovat účinnost genové terapie i na savčích buňkách.

V roce 1980 si Mercola a Cline zkusili poprvé léčit pacienty s poruchou tvorby hemoglobinu ( $\beta$ -talasémie) prostřednictvím somatické genové terapie. Pacientovi buňky kostní dřeně transfekovali genem kódujícím  $\beta$ -globin. Z etických důvodů byl tento přístup

pozastaven (Mercola, 1980). Deset let poté provedl americký doktor Anderson úspěšnou genovou terapii u čtyřleté pacientky trpící SCID, u které bylo pozorováno dočasné posílení imunity (Blaese, 1993).

V 90. letech minulého století byly poprvé použity k léčbě dědičných chorob hematopoetické kmenové buňky (Abott, 1992). V roce 1993 byly u narozeného dítěte trpícího SCID extrahovány kmenové buňky a transfekovány retrovirem nesoucím gen pro adenosin-deaminázu. Geneticky modifikované kmenové buňky se dávkovaly do těla jednou týdně, přičemž i tak byla zapotřebí další léčba (Kohn, 1995).

V roce 2003 Food and Drug Administration (FDA) dočasně zastavila všechny studie genové terapie pomocí retrovirového vektoru u krevních kmenových buněk. Po přezkoumání a prokázání prospěšné léčby u řady dětí v USA, Německu, Itálii a Francii došlo k jejímu obnovení (Cavazzana-Calvo, 2004). Téhož roku vědci dokázali vytvořit malé „nanoballs“ (25nm lipozomy), které přenáší cizí DNA přes póry v jaderné membráně. Jejich potenciál spočívá v léčbě talasémie, cystické fibrózy a některých typů nádorů. Prostřednictvím polyethylenglykolových lipozomů se podařilo v Los Angeles vložit cizí terapeutický gen do mozku. Tyto lipozomy lze potenciálně uplatnit v léčbě Parkinsonovy choroby (Pardridge, 2005). Molekulární podstatu RNA interference lze použít i k léčbě Huntingtonovy choroby (Koutsilieric, 2007).

V roce 2006 byla úspěšně použita genová terapie k léčbě onemocnění postihujících myeloidní buňky (Ott, 2006). Italští vědci téhož roku vyvinuli způsob, jak pomocí miRNA zabránit imunitnímu systému pacienta, aby odmítl terapeutický gen (Brown, 2006). V listopadu 2006 uvedla Preston Nixová genovou imunoterapii pro léčbu HIV, která použila lentiviry jako nosiče antisense genu proti obalu HIV. Pacienti na tento přístup reagovali stabilně a zvýšenou imunitní odpovědí (Levine, 2006). V roce 2007 britští lékaři testovali léčbu dědičného onemocnění sítnice - Leberova kongenitální amauroze způsobenou mutací v genu *rPe65*. Aplikací adeno-asociovaných virů s genem *rPe65*, který kóduje protein esenciální pro zrak, došlo k radikálnímu zlepšení vidění (Maguire, 2008). V roce 2009 proběhly první pokusy genové terapie využívající nanotechnologie (geny zabalené v nanočásticích). Technologie nanočástic umožnila trichromatické vidění některým druhům primátů, což by mohlo mít význam pro budoucí léčbu barvosleposti u lidí.

### 3.3.1.3 Bezpečnost a etika somatické genové terapie

Genová terapie je nová léčebná technologie, která s sebou nese nepředvídatelná rizika. Proto je v současnosti stále testována a zkoumána, aby byla zajištěna účinnost a bezpečnost léčby rakoviny, dědičných onemocnění a virových infekcí.

Nejprve se pro práci s GMO navrhuje protokol s přesnými pokyny, který musí být schválen. V USA je touto legislativou pověřen Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a v ČR Státní ústav pro kontrolu léčiv a Ministerstvo životního prostředí ČR. Nakládání s geneticky modifikovanými organizmy je právně upraveno od února 2004 zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organizmy a genetickými produkty, novelizovaným v září 2015 zákonem č. 346/2005 Sb. Prováděcí předpis je ustanoven vyhláškou č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organizmy a genetickými produkty (<https://www.mzp.cz/www/platnalegislati-va.nsf/>). Nakládat s GMO a genetickými produkty lze jen na základě těchto právních předpisů, protože je tak zajištěna ochrana zdraví člověka a zvířat před závažnými zdravotními riziky (toxicita, zánět, rakovina).

Genová terapie zahrnuje změny v genetické informaci člověka, což vyvolává u řady lidí etické otázky. Kdo rozhodne, které příznaky jsou „normální“ a které představují zdravotní poruchu? Budou vysoké finanční náklady genové terapie přístupné pouze lidem s dostatečnými financemi? Mohlo by použití genové terapie vést ve společnosti k ponižování lidí? Byla by možnost použít genovou terapii např. k posílení inteligence či výšky? Je somatická genová terapie etičtější než genová terapie zárodečné linie? (Fletcher, 1990).

### 3.4 MuLE expresní systém na přípravu modelu lidského onemocnění (DBA)

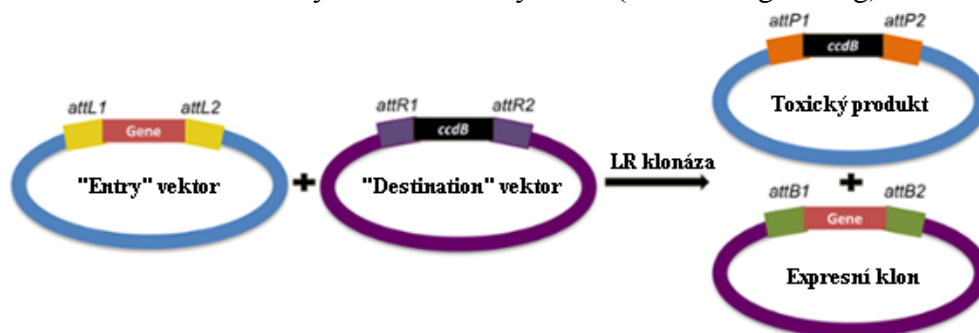
Při studiu biologických procesů je většinou potřeba geneticky manipulovat s více geny současně. V praxi se s tím lze setkat při přípravě nádorových modelů u organismu *Mus musculus*. Díky rozvoji genových manipulací v praxi byly získány cenné poznatky v oblasti genetiky nádorů (Ciriello, 2013; Lawrence, 2014). Techniky genové manipulace umožnily vytvořit linie myši, ve kterých lze geny odstranit, měnit, umlčovat nebo nadměrně exprimovat po určitý čas (Dow, 2012). Pro simultánní manipulaci více genů se používají klonovací techniky plazmidů a virových vektorů, které vedou k tvorbě komplikovaných multicistronických vektorových konstruktů.

Pro přípravu haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie (konkrétně gen *RPS7*) je nutné současně exprimovat shRNA proti genu pro ribozomální protein 7 (*RPS7*) a wild typový a mutantní gen *RPS7* s pozmeněnými kodony. Cílem shRNA je iniciovat umlčení (snížení exprese) vybraného genu *RPS7* na 50 % a tím simulovat haploinsuficienci. K zajištění simultánní exprese cDNA a shRNA v savčích buňkách slouží multicistronický lentivirový expresní systém (multiple lentiviral expression, MuLE), který je založen na klonovací technologii MultiSite Gateway. MuLE umožňuje snadnou produkci polycistronických, replikačně nekompetentních amfotropických lentivirů.

MuLE systém je velmi flexibilní a umožňuje současně zavádět do savčích buněk několik genetických změn: nadměrná exprese genů, genové umlčování, delece genů, genové mutace zprostředkované CRISPR/Cas 9 systémem, exprese fluorescenčních nebo enzymatických reportérů pro kontrolní buněčné, selekční a zobrazovací testy. MuLE systém je tvořen Entry (vstupními) vektory s 3 různými promotory pro RNA polymerázu II (CMV, SV40, SFFV) a mnohočetným klonovacím místem, do kterého lze přes restriční místa klonovat konkrétní cDNA genu (např. gen *RPS7*). Dále obsahuje MuLE systém Entry vektory s promotory pro nasedání RNA polymerázy III (U6, 7SK, H1) umožňující expresi shRNA. Navíc je možné vybírat mezi konstitutivními (SV40, 7SK) i indukčivními promotory (CMV/TO, H1). MuLE systém je tvořen i předem připravenými Entry vektory s cDNA exprimujícími selektivní markery - antibiotikovou rezistenci (Puromycin), fluorescenční proteiny (GFP, tdTOMATO) a enzymatické reportéry (luciferáza). Všechny vstupní vektory se rekombinují přes noc skrze rekombinační sekvenční místa attR a attL s Gateway destinačním lentivirovým vektorem (cílový). Destinační vektor obsahuje buď antibiotikovou rezistenci (Puromycin, Neomycin), nebo fluorescenční (GFP, RFP) a luminiscenční (luciferáza) proteiny.

Gateway klonovací technologie je metoda molekulární biologie komercializovaná firmou Invitrogen, jejíž mechanismus je znázorněn na Obr 8. Nejprve se klonuje konkrétní DNA/RNA do Entry vektoru, na jehož koncích jsou rekombinantní sekvence „attL1“ a „attL2“. Poté následuje LR rekombinace (LR klonázou) prostřednictvím rekombinačních míst mezi vstupním vektorem a cílovým vektorem s „attR1“ a „attR2“. Integrací konkrétního genu ze vstupního vektoru do cílového vektoru se tvoří konečný expresní klon s rekombinačními místy „attB1“ a „attB2“ a toxický produkt (Katzen, 2007).

Obr. 8: LR rekombinace Gateway klonovacího systému ( [www.addgene.org](http://www.addgene.org))



ccdB – přírodní toxin produkovaný některými bakteriemi (Bernard, 1992)

Dalším krokem je transfekce savčích buněk (např. U2OS, HEK-293, HeLa) vzniklým MuLE expresním vektorem společně s lentivirovým obalovacím vektorem (psPAX2) a vektorem kódujícím amfotropní obalové lentivirové proteiny (pMD2.G). Vzniklé lentiviry umožňují transdukcii, tedy přenos původně vloženého genetického materiálu (*RPS7*, *shRNA*) do vybrané kultury buněk, anebo se přímo aplikují do tkáně modelového organismu *Mus musculus*. Gen se tak ve formě proviru integruje do genomu cílových buněk a zajišťuje dědičnost zavedených genetických změn. MuLE expresní systém poskytuje novou experimentální genetickou sílu pro systematické vyšetřování molekulárních mechanismů, které jsou základem lidských onemocnění (Albers, 2017).



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Pro účely klonování byly použity plazmidy z Multiple Lentiviral Expression (MuLE) systému, které byly ve formě bakteriálního glycerolového roztoku zakoupeny od firmy Addgene (Addgene kit, kat. č. 1000000060). Pro tvorbu lentivirů byly zakoupeny z firmy Addgene zabalovací lentivirové plazmidy psPAX2 (kat. č. 12260) a pMD2.G (kat. č. 12259).

Pro transformační účely byl použit kmen bakterií *Escherichia coli*: NEB Stable competent, High Efficiency (F' *proA+B+ lacI<sup>f</sup> Δ(lacZ)M15 zzzf::Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str<sup>R</sup>) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*), které byly poskytnuty ze sbírky bakteriálních konzerv Mgr. Agáty Kubičkové (ÚMTM).

Buňky linie lidských epitelů HeLa (kat. č. CCL-2) a buňky linie odvozené z embryonálních buněk ledvin HEK-293 (kat. č. CRL-1573) z firmy ATCC byly inkubovány při 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub> v kultivačním médiu Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) obsahující 10% fetální bovinní sérum (FBS) a 1x penicilin/streptomycinovou směs.

Lidské embryonální buňky ledvin HEK293T/17 pro tvorbu lentivirů pocházely z firmy ATCC (kat. č. CRL-11268) a byly inkubovány při 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub> v kultivačním médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) obsahující 10% FBS a 1x penicilin/streptomycinovou směs. Pro transdukcii byly použity buňky linie lidského osteosarkomu U2OS, které byly zakoupeny z firmy ATCC (kat. č. HTB-96). Buňky U2OS byly inkubovány při stejných podmínkách jako HEK293T/17 v kultivačním médiu McCoy's 5a Medium Modified (+ 10% fetální bovinní sérum + 1x penicilin/streptomycinová směs).

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Použité chemikálie

10x CutSmart reakční pufr	BioLabs (kat. č. B7204S)
10x K pufr	Clontech (kat. č. A1301A)
10x Thermo-Start PCR pufr	Thermo Scientific (kat. č. AB0908B)
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (kat. č. R0611)
6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific (kat. č. R0631)

6X TriTrack DNA Loading Dye	Thermo Scientific (kat. č. SM1334)
5X Reakční pufr pro RT	Thermo Scientific (kat. č. 601821)
1X Opti-MEM médium	Thermo Scientific (kat. č. 31985062)
Agar	Thermo Scientific (kat. č. LP0028)
Agaróza	Sigma Aldrich (kat. č. A9539)
Alkalická fosfatáza	BioLabs (kat. č. M0290S)
Ampicilin	Sigma Aldrich (kat. č. A9393)
BamHI	Clontech (kat. č. 1010AH)
BglII	Clontech (kat. č. 1021AH)
Dulbecco's Modified Eagles Medium	Sigma Aldrich (kat. č. D5796)
Eagle's Minimum Essential Medium	Sigma Aldrich (kat. č. M2279)
Etanol	Fagron (kat. č. 1000800)
EvaGreen	Biotium (kat. č. 31000)
Fetální bovinní sérum	Sigma Aldrich (kat. č. A0281)
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Thermo Scientific (kat. č. 12538120)
GelRed	Biotium (kat. č. 41003)
GeneRuler 1 kb, DNA Ladder	Thermo Scientific (kat. č. SM0311)
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific (kat. č. SM1334)
Glycerol	Sigma Aldrich (kat. č. G6279)
Hoechst 33342	Thermo Scientific (kat. č. H3570)
Chloroform	Sigma Aldrich (kat. č. 288306)
Izopropanol	Lach-ner (kat. č. 20037-CT0-M1000-1)
Kanamycin	Sigma Aldrich (kat. č. K1377)
MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific (kat. č. AB0908B)
O'RangeRuler 20 bp, DNA Ladder	Thermo Scientific (kat. č. SM1323)
Penicilin-streptomycinová směs	Sigma-Aldrich (kat. č. P4333)
Polybrene	Sigma-Aldrich (kat. č. H9268)
Proteináza K	Thermo Scientific (kat. č. 12538120)
Random primery	Promega (kat. č. C1181)
RNAasin inhibitor ribonukleáz 40 U/ μl	Promega (kat. č. N211A)
RevertAid H Minus reverzní transkriptáza 200 U/μl Fermentas	(kat. č. EP0451)
Quibit dsDNA HS pufr	Thermo Scientific (kat. č. Q32854)
Quibit dsDNA HS reagent	Thermo Scientific (kat. č. Q32854)
SacI	Clontech (kat. č. 1078AH)

Thermo-Start <i>Taq</i> DNA polymeráza 5 U/ $\mu$ l	Thermo Scientific (kat. č. AB0908B)
TRIzol reagent	MPR (kat. č. TR118)
TrypLE Select enzym	Thermo Scientific (kat. č. 12563029)
XhoI	Clontech (kat. č. 1094AH)

### **Použité kity**

jetPRIME (Polyplus transfection, kat. č. 114-07)  
miRNeasy Mini Kit (Qiagen, kat. č. 217004)  
Multiple Lentiviral Expression System Kit (Addgene, kat. č. # 1000000060)  
QIAquick DNA Gel Extraction Kit (Qiagen, kat. č. 28706)  
Quifilter Plasmid Purification MIDI 100 (Qiagen, kat. č. 12643)  
T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi (Promega, kat. č. P1700)  
X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche, kat. č. 06 365 787 001)  
X-tremeGENE siRNA TRansfection Reagent (Roche, kat. č. 04 476 093 001)

### **Použité roztoky a jejich příprava**

10x TAE pufr (1l)	TRIS ..... 48,4 g
	ledová kyselina octová ..... 11,4 ml
	0,5M EDTA pH 8.....20 ml
	destilovaná voda ..... do 1000 ml
1x TAE pufr (1l)	destilovaná voda ..... 900 ml
	10x TAE pufr ..... 100 ml
1x TBE pufr (1l)	TRIS ..... 10,8 g
	kyselina boritá ..... 5,5 g
	0,5M EDTA ..... 4 ml
	pH 8,3
	destilovaná voda..... do 1000 ml
LB médium (200 ml)	destilovaná voda ..... 200 ml
(tekuté)	LB Base ..... 5 g

LB médium (50 ml) (tuhé)	destilovaná voda ..... 50 ml LB Base ..... 1,25 g agar ..... 0,75 g
1x PBS (1l)	NaCl..... 8 g KCl..... 0,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O..... 3,21 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... 0,2 g pH 7,4
10x annealing pufr (50 ml)	1M Tris (pH 7,5)..... 5 ml 0,5M EDTA (pH 8)..... 1 ml 5M NaCl..... 10 ml destilovaná voda ..... 34 ml

#### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Analyzátor Vi-cell XR viability	Beckman
Centrifuga 5430	Eppendorf
Centrifuga MiniSpin	Eppendorf
Centrifuga Rotina 420 R	Hettich
Elektroforetická komora HU10 Mini Plus Horizontal	Scie-plas
Flow box TopSafe 1.2	Euroclone
Fluorescenční mikroskop IX81	Olympus
Fluorometr Qubit 2.0	Invitrogen
Inkubátor C 24 Benchtop	New Brunswick Scientific
Inkubátor IR 230	Cole-Parmer
Laboratorní váhy Sartorius Extend ED423S-OCE	Sartalex
Lightcycler 480 instrument II-II	Roche
Mastercycler nexus	Eppendorf
Nanodrop spektrofotometr ND 1000	Thermo Scientific
ScanR Acquisition	Olympus
Spinning Disk konfokální mikroskop CSU-X1	Zeiss
Termoblok ThermoStat plus	Eppendorf
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad

Transiluminátor 1500 UV Kodak Gel Logic

LabX

Vodní lázeň SUBAqua 12 plus

Grant

Vortex Mixer VX – 200

Labnet

Zdroj stejnosměrného napětí PowerPack HC

Bio-Rad

#### 4.4 Úvod do experimentální části

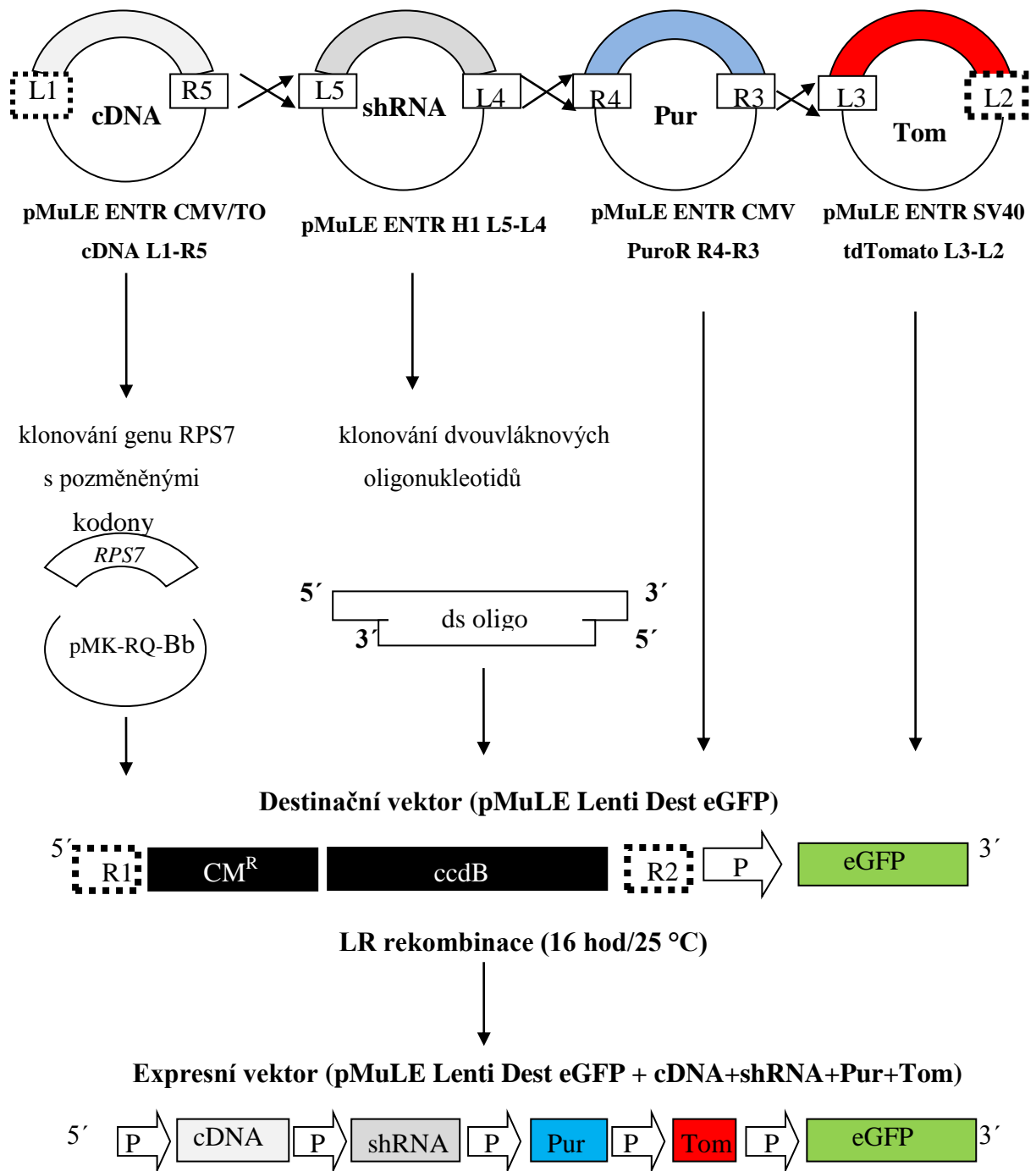
Prvním cílem experimentální práce byla tvorba jednoduchého haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie. Systém byl založen na přípravě siRNA molekul k umlčení genu pro ribozomální protein 7 (RPS7) pomocí T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi. Vytvořenou siRNA byla transfekována buněčná linie HeLa a HEK-293 tak, aby došlo ke snížení exprese genu *RPS7* na 50 %, a byla tak simulována haploinsuficience ribozomálního proteinu způsobujícího Diamond-Blackfanovu anémii. Z transfekovaných buněk byla izolována celková RNA a pomocí reverzní transkripce byla přepsána do cDNA. Pomocí real-time PCR bylo měřeno snížení exprese proteinu RPS7 (kapitola 4.5).

Další část experimentální práce spočívala v tvorbě sofistikovanějšího haploinsuficientního modelu pro lidské onemocnění - Diamond-Blackfanovu anémii. Pro tvorbu modelu byla nutná příprava multicistronického lentivirového expresního systému (Schéma 1), do kterého byla klonována sekvence genu *RPS7* s pozměněnými kodony (kapitola 4.6) a ds oligonukleotidy (exprimující shRNA) k umlčení nativního genu pro ribozomální protein 7 (kapitola 4.7). Pomocí LR rekombinační reakce vznikl ze 4 ENTRY vektorů a DESTinačního vektoru expresní vektor obsahující klonované sekvence *RPS7*, ds oligo, gen pro puromycinovou rezistenci, gen pro tdTomato a gen pro eGFP (kapitola 4.8). Účelem tohoto expresního systému bylo zajistit simultánní expresi zaklonovaných sekvencí v lidských buňkách pod vlivem inducibilních promotorů. Pomocí lentivirů byl navržený systém integrován do genomu savčích buněk (kapitola 4.9).

Expresní systém byl navržen tak, aby byl následně v buňkách U2OS simulován fenotyp DBA. Prostřednictvím shRNA by měla být snížena exprese nativního genu *RPS7* na 50 % a tím simulována haploinsuficience. U buněk se sníženou expresí genu *RPS7* na 50 % by se po spuštění exprese WT genu *RPS7* s pozměněnými kodony měla pozorovat ztráta fenotypového projevu DBA, naopak při spuštění exprese M genu *RPS7* s pozměněnými kodony by měl být fenotypový projev DBA stále zachován nebo zhoršen.

Hlavní přínos tohoto DBA modelu v lidských buňkách by spočíval především v možnosti manipulace s jednotlivými sekvencemi v celém multicistronickém expresním systému.

**Schéma 1: Tvorba expresního systému z ENTR a DEST vektorů**



P – promotor, Tom – tdTomato, Pur - gen pro puromycinovou rezistenci, shRNA – krátká vlásenková RNA (short hairpin RNA), cDNA - komplementární DNA, ENTR – vstupní vektor, L1-R5 + L5-L4 + R4-R3 + L3-L2 – rekombinační místa ve vektorech na LR rekombinaci, CM<sup>R</sup> – gen pro chloramfenikolovou rezistenci, ccdB – gen pro toxin ccdB, - proces rekombinace, , , , - rekombinační místa pro závěrečné vložení 4 sekvencí z ENTRy vektorů do DEST vektoru za vzniku expresního vektoru





#### 4.5.2 Komplementární spojení DNA oligonukleotidů a *in vitro* transkripce

Syntetizované DNA oligonukleotidy byly resuspendovány v destilované vodě na koncentraci 100 pmol/μl. DNA oligonukleotidy pro sense (TOP sense + BOT sense) a antisense (TOP antisense + BOT antisense) řetězec byly komplementárně spojeny (annealovány) podle Tab. 2. Komplementární spojení DNA oligonukleotidů pro tvorbu sense RNA řetězce a antisense RNA řetězce byla provedena zahřátím na 95 °C po dobu 5 minut, a poté pomalu ochlazována o 1°C/1 minutu až na pokojovou teplotu

Tab. 2: Komplementární spojení (annealing) DNA oligonukleotidů

Reagencie	Objem (μl)
TOP sense/BOT sense (100 pmol/μl)	10
TOP antisense/BOT antisense (100 pmol/μl)	10
H <sub>2</sub> O	80

Následovala *in vitro* transkripce sense RNA a antisense RNA řetězce z T7 promotoru podle Tab. 3.

Tab. 3: Reakční směs *in vitro* transkripce

Reagencie	Objem (μl)
2x RiboMAX <sup>TM</sup> Express T7 pufr	10
sense DNA oligonukleotidy (10 pmol/μl) nebo antisense DNA oligonukleotidy (10 pmol/μl)	1
T7 Express Enzyme Mix	2
H <sub>2</sub> O	do 20 μl

Reakční směsi *in vitro* transkripce byly inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin. Poté byl ke směsi přidán 1 μl DNázy z důvodu odstranění původního DNA templátu (30 minut/37 °C). Vzniklé směsi sense a antisense řetězce byly komplementárně spojeny prostřednictvím inkubace při 70 °C po dobu 10 minut a následným ochlazením na pokojovou teplotu během 20 minut. Výsledkem *in vitro* transkripce byla syntéza siRNA.

Vzniklá siRNA byla přečištěna alkoholovou precipitací, když byly ke směsi přidány 4,2 μl 3M octanu sodného (pH 5,2) a 42 μl izopropanolu. Celá směs byla zvortexována,

inkubována 5 minut na ledu (zakalená reakční směs), a poté stočena 10 minut při 13 400 rpm. Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 500 µl studeného 70% etanolu. Po odstranění etanolu byla peleta 15 minut sušena při pokojové teplotě a následně resuspendována ve 100 µl destilované vody.

Celková koncentrace siRNA byla změřena spektrofotometricky. Pro ověření komplementárního spojení DNA oligonukleotidů a velikosti byla siRNA separována 4% agarózovou elektroforézou (TBE pufr, 90 V/90 minut).

#### 4.5.3 Transfekce lidských buněk HeLa a HEK-293 syntetizovanou siRNA

K transfekci buněk HeLa a HEK-293 syntetizovanou siRNA na umlčení genu pro protein RPS7 byl použit X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent kit, Roche.

Na 6-ti jamkovou desku bylo vyseto 1 200 000 buněk/jamku. Po 24 hodinách byla provedena transfekce dle návodu X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent, Roche (Postup 1). Netransfekované buňky sloužily jako negativní kontrola.

Postup 1: Transfekce buněk připravenou siRNA

1. X-tremeGENE siRNA transfekční reagent byl smíchán s médiem Opti-MEM podle Tab. 4 a poté byla směs promíchána.

Tab. 4: Ředění X-tremeGENE siRNA transfekčního reagentu s Opti-MEM médiem

Název	Opti-MEM médium (µl)	X-tremeGENE siRNA transfekční reagent (µl)
35	65	35
17,5	82,5	17,5
2	98	2

35 = označení pro mikrozkušavku s 35 µl X-tremeGENE siRNA transfekčního reagentu; 17,5 = označení pro mikrozkušavku se 17,5 µl X-tremeGENE siRNA transfekčního reagentu; 2 = označení pro mikrozkušavku s 2 µl X-tremeGENE siRNA transfekčního reagentu

2. Syntetizovaná siRNA byla smíchána s Opti-MEM médiem (Tab. 5) a jemně promíchána.

Tab. 5: Ředění syntetizované siRNA s Opti-MEM médiem

Název	Opti-MEM médium (μl)	siRNA(μg)	siRNA (μl)
100 + 5	18,8	5	81,2
100 + 2,5	22,8	2,5	40,6
100 + 0,4	87,7	0,4	6,5

100 + 5 = 100 μl Opti-MEM média+X-tremeGENE transfekční reagent (Tab.4) s 5 μg siRNA, 100 + 2,5 = 100 μl Opti-MEM média+X-tremeGENE transfekční reagent (Tab.3) s 2,5 μg siRNA, 100 + 0,4 = 100 μl Opti-MEM média+X-tremeGENE transfekční reagent (Tab.4) s 0,4 μg siRNA

- Poté byly smíchány obsahy zkumavek (Tab. 4 a Tab. 5):  
35 s (100+5), 17,5 s (100+2,5) a 2 s (100+0,4).
- Vzniklá transfekční směs (transfekční reagent: siRNA) byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě.
- Celá transfekční směs byla pomalu po kapkách aplikována na vyšeté HeLa a HEK-293 buňky, lehce promíchána a inkubována 72 hodin.

#### 4.5.4 Izolace celkové RNA

K měření exprese genu *RPS7* umlčeného syntetizovanou siRNA bylo nutné izolovat celkovou RNA z transfekovaných buněk HeLa a HEK-293. Izolace byla provedena kitem miRNeasy Mini, QIAGEN (Postup 2).

Postup 2: Izolace celkové RNA z buněk (miRNeasy Mini kit, QIAGEN)

- K peletě transfekovaných buněk byl přidán 1 ml TRIzol reagentu.
- K 1 ml buněk bylo přidáno 200 μl chloroformu.
- Směs byla vortexována 15 sekund a 2 minuty inkubována v pokojové teplotě.
- Poté byla směs centrifugována 15 minut při 4 °C na 12 000 g.
- Svrchní vodní fáze byla přenesena do nové 2ml mikrozkušavky.
- K odebranému objemu bylo přidáno 750 μl 100% etanolu.
- Po důkladném promíchání bylo 700 μl vzorku přeneseno na RNeasy kolonku ve 2ml mikrozkušavce. Centrifugace probíhala při pokojové teplotě 15 sekund na 8 000 g.
- Krok 6 byl zopakován pro spotřebování celého vzorku.
- Na kolonku bylo přidáno 700 μl RWT pufru a centrifugace probíhala při pokojové teplotě 15 sekund na 8 000 g. Supernatant byl odstraněn.

10. Dále bylo na kolonku přidáno 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugace probíhala při pokojové teplotě 15 sekund na 8 000 g. Supernatant byl odstraněn.
11. Opět bylo na kolonku přidáno 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugace probíhala při pokojové teplotě 2 minuty na 8 000 g. Supernatant byl odstraněn.
12. Kolonka byla přemístěna do nové 2ml mikrozkušavky a byla centrifugována na maximální rychlost 1 minutu.
13. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky a RNA byla eluována do 30  $\mu$ l RNase-free vody. Centrifugace probíhala 1 minutu na 8 000 g.
14. Na závěr byla proteklá RNA opět aplikována na kolonku a centrifugována (1 minuta/ 8 000g).
15. Koncentrace celkové izolované RNA byla změřena spektrofotometricky.

#### 4.5.5 Reverzní transkripce (RT-PCR), kvantitativní real-time PCR, stanovení exprese genu *RPS7*

Z celkového množství vyizolované RNA byly použity 3  $\mu$ g jako templát pro reverzní transkripci. Každý vzorek byl připraven ve 3 opakováních. Reakční směs pro reverzní transkripci je uvedena v Tab. 4.

Nejprve byla připravena směs složená z 3  $\mu$ g RNA, 0,6  $\mu$ l random primerů a destilované vody (RNA+ H<sub>2</sub>O = 18,9  $\mu$ l), která byla promíchána, stočena a inkubována 5 minut při 70 °C. Ihned poté byla směs 1 minutu chlazená v namraženém stojánku. Poté následovala příprava master mixu podle Tab. 6.

Tab. 6: Reakční směs master mixu pro RT (1 r. = 9,75  $\mu$ l )

Reagencie	Objem ( $\mu$ l)
5x reakční pufr pro RT	6
10 mM dNTP	3
40 U/ $\mu$ l RNAsin inhibitor ribonukleáz	0,75
<b>Celkem</b>	<b>9,75</b>

Master mix (9,75  $\mu$ l) byl přidán ke směsi s RNA a inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Na závěr bylo k reakční směsi RT přidáno 0,75  $\mu$ l RTázy. Inkubace RT probíhala 1 hodinu při 42 °C, a poté 10 minut při 70 °C, nakonec chlazení.

Pro měření exprese genu *RPS7* po umlčení siRNA byla použita relativní kvantifikace real-time PCR (qPCR). Složení reakční směsi pro qPCR je uvedena v Tab. 7. Jako templát byl použit 1  $\mu$ l cDNA. Na qPCR byly použity navržené primery na cDNA sekvenci genu *RPS7*. Pro kvantifikaci je nutné vyhodnotit i referenční gen, kterým byl glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH). Primery použité na qPCR jsou uvedeny v Tab. 8. Podmínky qPCR: úvodní denaturace – 95 °C/15min a 35 cyklů složených z denaturace – 95 °C/30s, nasedání primerů – 58 °C/30s a extenze – 72 °C/1 min. Na základě normalizačních výpočtů z  $\Delta$ Ct,  $\Delta\Delta$ Ct hodnot a fold change hodnoty ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) byla stanovena změna exprese genu *RPS7* po umlčení siRNA molekulou.

Tab. 7: Reakční směs qPCR (1 r. = 20  $\mu$ l)

Reagencie	Objem ( $\mu$ l)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
10 mM dNTP	0,4
10 $\mu$ M forward primer	1
10 $\mu$ M reverse primer	1
cDNA	1
EvaGreen	1
5 U/ $\mu$ l Taq DNA polymeráza	0,4
H <sub>2</sub> O	do 20 $\mu$ l

Tab. 8: Sekvence primerů GAPDH a RPS7 na qPCR

Název primerů	Sekvence 5' - 3'
FP_cDNA_RPS7	TGAACTCGGACCTCAAGGCT
RP_cDNA_RPS7	GCTTGGGAAGACCAAGTCCT
FP_GAPDH	ACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGT
RP_GAPDH	CAAATTTCCATGGCACCGTCAAGG

FP – forward primer, RP – reverse primer

## 4.6 Příprava genu *RPS7* s pozměněnými kodony

Prvním krokem při tvorbě složitějšího a sofistikovanějšího modelu Diamond-Blackfanovy anémie bylo nutné klonovat normální (WT) a mutantní (M) gen *RPS7* s pozměněnými kodony do vektoru pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5.

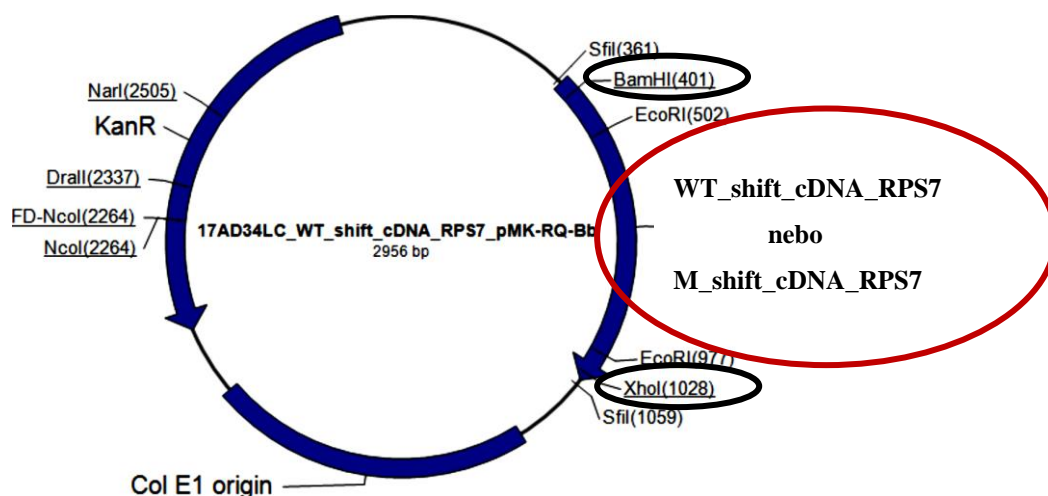
### 4.6.1 Sekvence WT a M genu *RPS7* s pozměněnými kodony

Sekvence cDNA genu *RPS7* (WT) s pozměněnými kodony byly navrženy Mgr. Petrem Vojtou (ÚMTM) tak, aby při jejich expresi v lidských buňkách nahradily nativní *RPS7* a přitom nebyly cíleny použitou shRNA nebo naopak exprese genu *RPS7* (M) s pozměněnými kodony vede k DBA fenotypu. K navrženým sekvencím byla přidána restriční místa endonukleáz BamHI - 5'-G↓GATCC-3' a XhoI - 5'-C↓TCGAG-3'.

WT sekvence genu *RPS7* s pozměněnými kodony nezpůsobuje během translace žádnou záměnu aminokyseliny. Naopak bodová missense mutace V134F v M sekvenci genu *RPS7* s pozměněnými kodony vede u 134. aminokyseliny při translaci k zařazení fenylalaninu (F) místo valinu (V). Jedná se o tzv. missense mutaci V134F, která mění smysl polynukleotidového řetězce.

WT a M sekvence genu *RPS7* byly připraveny ve zdrojovém plazmidu pMK-RQ-Bb firmou GeneArt pod názvy WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7. Schéma dodaného vektoru se sekvencemi WT a M genu *RPS7* je na Obr. 9.

Obr. 9: Schéma vektoru pMK-RQ-Bb s cílovým inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7/ M\_shift\_cDNA\_RPS7



červená barva – WT\_shift\_cDNA\_RPS7 nebo M\_shift\_cDNA\_RPS7, černá barva – restriční místa BamHI a XhoI

#### 4.6.2 Štěpení a izolace WT\_shift\_cDNA\_RPS7/M\_shift\_cDNA\_RPS7 a cílového vektoru

Plazmidy pMK-RQ-Bb se sekvencemi WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 byly štěpeny v restrikčních místech enzymů BamHI – 5'-G↓GATCC-3' a XhoI 5'-C↓TCGAG-3'. Reakční směs na štěpení plazmidu pMK-RQ-Bb se sekvencí WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 probíhala za stejných podmínek a je popsána v Tab. 9. Štěpení plazmidů probíhalo přes noc (16 hodin) při 37 °C, a poté byly restrikční endonukleázy tepelně inaktivovány při 65 °C po dobu 20 minut.

Tab. 9: Restrikční reakce štěpení plazmidu pMK-RQ-Bb (1 r. = 20 µl)

Reagencie	Objem
10 U/µl BamHI	1 µl
10 U/µl XhoI	1 µl
1x K pufr	2 µl
plazmid pMK-RQ-Bb s WT_shift_cDNA_RPS7 (plazmid pMK-RQ-Bb s M_shift_cDNA_RPS7)	500 ng
H <sub>2</sub> O	do 20 µl

Štěpený plazmid byl separován v 1% agarózovém gelu (TAE pufr, 90 V/90 min) a vyštěpené sekvence byly izolovány z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN (Postup 3).

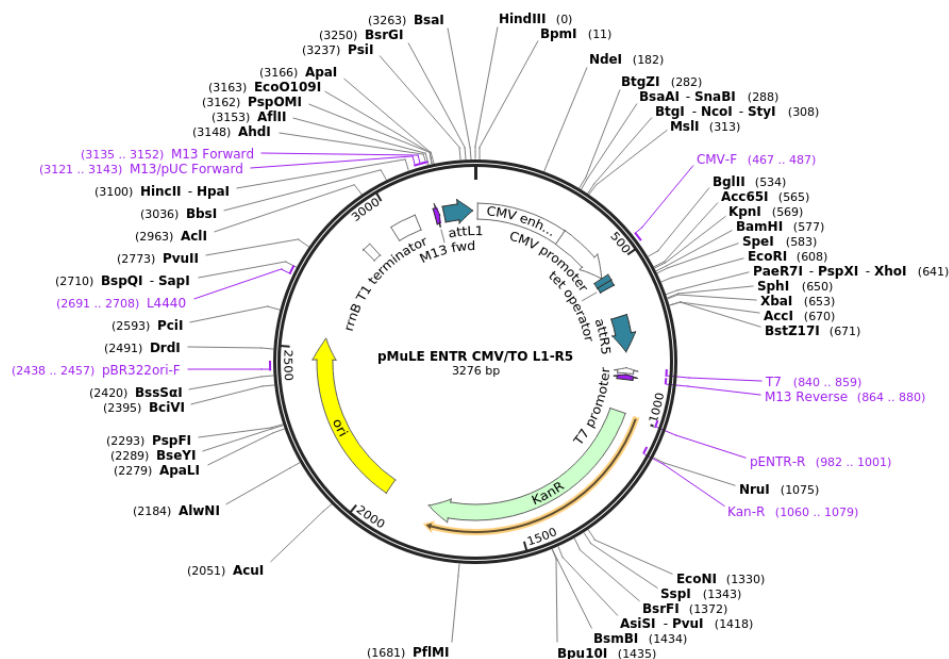
Postup 3: Izolace produktů restrikční reakce WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 z gelu (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)

1. WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 byly vyříznuty z agarózového gelu v UV transiluminátoru sterilním skalpelem, kostička gelu byla vložena do 1,5ml mikrozkušavky.
2. Ke 100 mg gelu bylo přidán QG pufr v poměru 1 mg gelu:3 µl QG pufr.
3. Následovala inkubace mikrozkušavky s gelem v termobloku při 50 °C po dobu 10 minut (až do rozpuštění gelu) a každou 2. minutu byla mikrozkušavka zvortexována.
4. Ke směsi byl přidán izopropanol v poměru 1 mg gelu:2 µl izopropanolu a jemně byla směs zvortexována.
5. Celá směs byla přenesena na QIAquick extrakční kolonu a ta byla centrifugována 1 minutu při 13 400 rpm.

6. Stočený obsah byl odstraněn a na kolonu bylo přidáno 500  $\mu$ l QG pufru a následovala centrifugace 1 minutu při 13 400 rpm.
7. Stočený obsah byl opět odstraněn a kolona byla promyta 700  $\mu$ l PE pufru a centrifugována 1 minutu při 13 400 rpm.
8. Stočený obsah byl odstraněn a kolona byla znovu stočena pro odstranění přebytečných pufrů (vysušení).
9. DNA zachycená na koloně byla eluována do 30  $\mu$ l destilované vody (1 minuta/13 400 rpm).
10. Koncentrace eluované DNA byla změřena pomocí Quibit fluorimetru.
11. Na závěr byla provedena pro ověření velikosti izolovaných sekvencí WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu (TAE pufr, 90 V/ 90 min).

Cílový plazmid pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 (3 276 bp) ke klonování *RPS7* sekvence s pozměněnými kodony byl poskytnut ve formě bakteriálního glycerolového roztoku. Nejprve byl zásobní bakteriální roztok kultivován na agarové plotně, z bakteriálních kolonií byly připraveny tekuté kultury, které sloužily jako biologický materiál pro izolaci cílového plazmidu (QIAfilter Plasmid Purification MIDI 100, QIAGEN) (Postup 4). Byly vytvořeny zásobní suspenze bakteriálních buněk a uskladněny v  $-80$  °C. Schéma vybraného cílového vektoru ke klonování je na Obr. 10.

Obr. 10: Schéma vektoru pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5





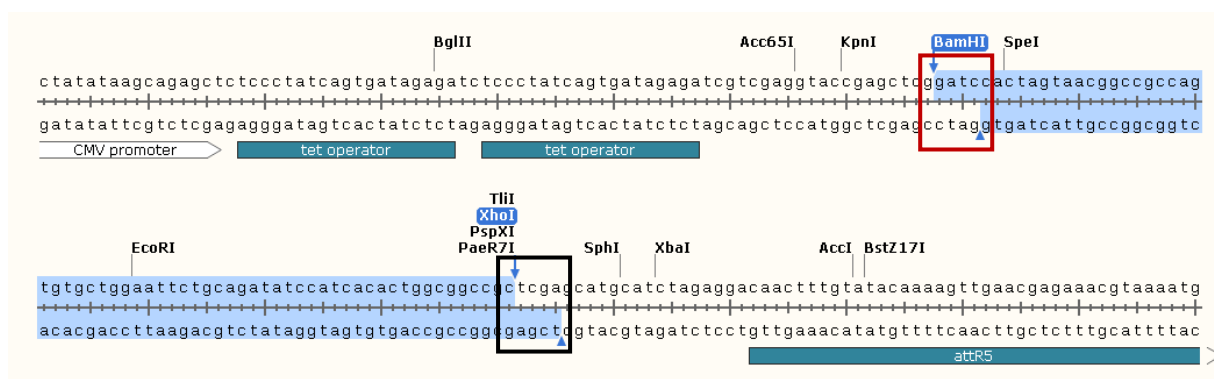
#### Postup 4: Izolace plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5

(QIAfilter Plasmid Purification MIDI 100, Qiagen)

1. Přesnoční kultura bakterií byla centrifugována 15 minut při 4 500 rpm a 4 °C.
2. Supernatant byl odstraněn, peleta byla resuspendována v 6 ml P1 pufru.
3. Bylo přidáno 6 ml pufru P2, 4 - 6x promícháno převrácením zkumavky a inkubováno 5 minut v pokojové teplotě.
4. Bylo přidáno 6 ml pufru P3 a celá suspenze byla promíchána převrácením.
5. Následně byl lyzát přenesen na QIAfilter cartridge a 10 minut inkubován v pokojové teplotě.
6. Během inkubace byla QIAGEN-tip ekvilibrována 4 ml QBT pufru.
7. Z QIAfilter cartridge byl lyzát filtrován do ekvilibrované QIAGEN-tip.
8. Následně byla QIAGEN-tip promyta 20 ml QC pufru.
9. DNA byla eluována do 5 ml QF pufru.
10. K eluované DNA bylo přidáno 3,5 ml izopropanolu (inkubace 5 min).
11. DNA s izopropanolem byla přenesena do 20ml injekční stříkačky, na jejímž konci byl umístěný QIAprecipitátor, a pomocí injekční vsuvky byl celý objem protlačen.
12. Do injekční stříkačky byly přidány 2 ml 70 % etanolu.
13. Dvakrát po sobě následovalo vytlačení vzduchu ze stříkačky na sucho.
14. Po vysušení byl QIAprecipitátor přemístěn na 5ml injekční stříkačku.
15. Plazmidová DNA byla eluována do 1 ml destilované vody.
16. Koncentrace izolovaného plazmidu byla změřena spektrofotometricky.

K získání čistého izolovaného plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 byla provedena extrakce z 1% agarózového gelu (TAE pufr, 90 V/90 min) pomocí QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN (Postup 3). Izolovaný a purifikovaný plazmid pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 byl štěpen v místech uvedených na restriční mapě endonukleázami BamHI a XhoI (Obr. 11). Reakční směs na štěpení plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 je v Tab. 8. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C a endonukleázy byly tepelně inaktivovány při 65 °C po dobu 20 minut.

Obr. 11: Mapa restričních míst plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5



  - restriční místo BamHI (5'-G↓GATCC-3'),   - restriční místo XhoI (5'-C↓TCGAG-3')

Dále byl plazmid pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 štěpený restričními endonukleázami defosforylován alkalickou fosfatázou (CIP) (10 U/ml) v 10x CutSmart pufru. Defosforylace probíhala při 37 °C po dobu 1 hodiny.

K získání čistého lineárního cílového plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 byla provedena elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu (TAE pufr, 90 V/90 min), z kterého byl pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu, QIAGEN extrahován (Postup 3).

#### 4.6.3 Ligace sekvencí *RPS7* s pozměněnými kodony do cílového vektoru

Do linearizovaného plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 byly ligovány izolované sekvence WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 s komplementárními konci vzniklými při jejich vyštěpení ze zdrojového vektoru. Ligace probíhala pomocí komerčně dodávaného návodu k enzymu T4 DNA ligáza (Ligation Protocol with T4 DNA Ligase, BioLab) (Tab. 10).

Tab. 10: Ligační reakce cílových genů do pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5

(1 r. = 50 µl)

Reagencie	Objem
10x T4 DNA ligázový pufr	2 µl
pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 (3 276 bp)	50 ng
WT_shift_cDNA_RPS7/M_shift_cDNA_RPS7 (678 bp)	30 ng
T4 DNA ligáza	1
H <sub>2</sub> O	do 50 µl

RPS – protein malé ribozomální podjednotky, WT – wild type (normální), M – mutant

Ligační směs byla inkubována 18 hodin v 16 °C a T4 DNA ligáza byla poté tepelně inaktivována při 70 °C během 10 minut.

Vzniklý rekombinantní plazmid pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 se sekvencemi WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 byl použit k transformaci kompetentních bakterií *E. coli* NEB Stable (Postup 5).

Postup 5: Transformace kompetentních bakterií *E. coli* NEB Stable teplotním šokem

1. 50µl suspenze kompetentních bakterií *E. coli*, kmen NEB Stable Competent byla rozmrazena na ledu.
2. K bakteriím byly přidány 2 µl ligační směsi z Tab. 3, směs byla jemně promíchána a 30 minut inkubována na ledu.
3. Mikrozkušavka byla umístěna na 30 sekund do termobloku (42 °C), a poté ihned přenesena na led na 5 minut.
4. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 950 µl LB média a směs byla za stálého třepání inkubována v 30 °C 1 hodinu.
5. Během inkubace byly připraveny agarové plotny s příslušným antibiotikem - Petriho misky (plotny) s 20 ml tuhého LB média a 20 µl kanamycinu (100 mg/ml).
6. Po inkubaci byla bakteriální suspenze z kroku 4 (200 µl) vyseta na připravené plotny.
7. Petriho misky byly inkubovány dnem vzhůru při 30 °C po dobu 24 hodin.

Z narostlých bakteriálních kolonií byla provedena kontrolní (colony) PCR, kdy část bakteriální kolonie sloužila jako templát (Tab. 11). Podmínky amplifikace jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 11: Kontrolní (colony) PCR bakteriálních kolonií (1 r. = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2
10 µM primer FP WT/M_shift_cDNA_RPS7	1
10 µM primer RP WT/M_shift_cDNA_RPS7	1
10mM dNTP1	0,4
5 U/µl <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,4
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
H <sub>2</sub> O	13,6
DNA (odpich bakteriální kolonie)	-

WT – normální, M – mutant, FP – forward primer, RP – reverse primer, dNTP - směs deoxyribonukleotidů

Tab. 12 : Podmínky amplifikace

Teplota (°C)	Čas	Opakování
95	5 minut	
95	30 sekund	35x
58	30 sekund	
72	1 minuta	
72	5 minut	
4	∞	

PCR produkty byly následně separovány 1% agarózovou elektroforézou (TBE pufr, 90 V/90 minut). Pouze z bakteriálních kolonií, u kterých byla potvrzena přítomnost a správná velikost cílové sekvence (WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7), byly připraveny zásoby bakteriálních suspenzí. Přes noc byly bakterie kultivovány ve 100ml Erlenmeyerově baňce s 50 ml tekutého LB média a 50 µl kanamycinu při 37 °C za stálého třepání.

Z tekutých bakteriálních kultur byly izolovány plazmidy pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 se sekvencemi WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 (Postup 3). U vyizolované plazmidové DNA byla provedena kontrolní PCR (Tab. 13) za shodných podmínek amplifikace uvedených v Tab. 12. PCR produkty byly separovány 1% agarózovou elektroforézou (TBE pufr, 90 V/90 min) a spektrofotometricky u nich byla změřena koncentrace. Kromě kontroly přítomnosti daného inzertu byla provedena kontrolní analýza sekvencí Sangerovým sekvenováním, které bylo zajištěno firmou SEQme s.r.o.

Tab. 13: Kontrolní PCR izolovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO L1-R5 (1 r. = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x DNA polymerázový reakční pufr	2
10 µM primer FP WT/M_shift_RPS7	1
10 µM primer RP WT/M_shift_RPS7	1
10mM dNTP	0,4
5 U/µl <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,4
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
H <sub>2</sub> O	12,6
plazmid pMuLE ENTR se sekvencemi WT a M <i>RPS7</i>	1

WT – normální, M – mutant, FP – forward primer, RP – reverse primer, dNTP - směs deoxyribonukleotidů

#### 4.7 Klonování dvouvláknových DNA oligonukleotidů

Dalším krokem experimentální části práce bylo klonování dvouvláknových DNA oligonukleotidů (ds oligo) do cílového vektoru pMuLE ENTR H1 L5-L4, ze kterých se pod inducibilním promotorem H1 v lidských buňkách exprimuje shRNA. Účelem shRNA je snížit expresi nativního genu *RPS7* v lidských buňkách.

##### 4.7.1 Příprava DNA oligonukleotidů a cílového vektoru

Pomocí online programu DSIR (<http://biodev.extra.cea.fr./DSIR/DSIR.html>) byly vybrány cílové úseky genu *RPS7* pro návrh jednovláknových DNA oligonukleotidů (ssDNA). Do programu DSIR byla vložena referenční cDNA sekvence genu *RPS7* z NCBI databáze. Program vygeneroval sekvence dlouhé 19 nt z různých částí sekvence a pro další laboratorní práci byly vybrány 4 (Tab. 14).

Tab. 14: Vybrané 19 nt dlouhé úseky sekvence *RPS7*

Název sekvence	Exon	Pozice 1. nt v cDNA <i>RPS7</i>	Sekvence (5' - 3')
50_shRNA	1.	50.	GCGAGATTTGGGTCTCTTC
123_shRNA	2.	123.	CCAAGATCGTGAAGCCCAA
266_shRNA	4.	266.	GGTGGTGGTCGGAAAGCTA
528_shRNA	6.	528.	GCAAGAGAATCCGCGTCAA

Na expresi shRNA bylo nutné připravit z vygenerované sekvence společně s přidanými přesahy restričních míst endonukleáz BglII, SacI, sekvence smyčky a terminátoru dva komplementární řetězce označené jako TOP a BOT (Schéma 3).

Schéma 3: Struktura návrhu TOP a BOT řetězce ssDNA

**TOP:** 5' - **restriční místo BglII (GATCT)** – 19 nt sense sekvence *RPS7* – smyčka – 19 nt antisense sekvence *RPS7* – *terminátor* – **restriční místo SacI (GAGCT)** – 3'

**BOT:** 5' - *terminátor* - 19 nt antisense cílová sekvence *RPS7* – smyčka – 19 nt sense cílová sekvence *RPS7* – 3'

ssDNA oligonukleotidy byly vyrobeny firmou Generi Biotech pod názvy TOP\_ 50\_shRNA, TOP\_ 123\_shRNA, TOP\_ 266\_shRNA a TOP\_ 528\_shRNA a k tomu paralelně BOT\_ 50\_shRNA, BOT\_ 123\_shRNA, BOT\_ 266\_shRNA a BOT\_ 528\_shRNA.

Syntetizované ssDNA oligonukleotidy byly resuspendovány v destilované vodě na koncentraci 100µM.

K 5' konci jednotlivých ssDNA oligonukleotidů byla přidána fosfátová skupina prostřednictvím T4 polynukleotidové kinázy (1 µl) v 1x T4 ligačním pufru (2 µl). Fosforylace probíhala při 37 °C po dobu 40 minut s následnou inaktivací enzymu při 65 °C 20 min. Komplementární spojení (annealing) dvou k sobě patřících ssDNA oligonukleotidů (např. TOP\_ 50\_shRNA + BOT\_ 50\_shRNA) je uvedeno v Tab. 15.

Pro ověření procesu annealování a velikosti vzniklých ds oligonukleotidů (ds oligo) byla provedena elektroforetická separace v 4% agarózovém gelu (TBE pufr, 90 V/ 90 min).

Tab. 15: Komplementární spojení ssDNA oligonukleotidů (TOP a BOT) (1 r. = 20 µl)

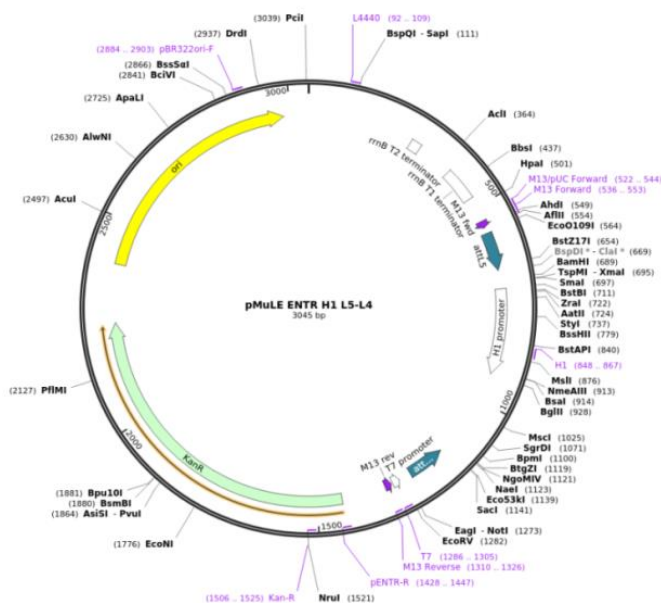
Chemikálie	Objem (µl)
TOP řetězec	5
BOT řetězec	5
10x annealovací pufr	2
H <sub>2</sub> O	8

10x annealovací pufr – složení viz 4.2

Cílový plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 (3 045 bp) ke klonování ds oligonukleotidů (exprimující shRNA) byl poskytnut v bakteriálním glycerolovém roztoku, a proto byl nejprve bakteriální roztok kultivován na agarové plotně. Z bakterií byly připraveny tekuté kultury,

z nichž byl cílový plazmid izolován pomocí QIAfilter Plasmid Purification MIDI 100, QIAGEN (Postup 4) a byly vytvořeny zásobní suspenze bakteriálních buněk (-80 °C). Schéma vybraného cílového vektoru na klonování ds oliga je na Obr. 12.

Obr. 12: Schéma vektoru pMuLE ENTR H1 L5-L4



Izolovaný plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 byl separován 1% agarózovou elektroforézou (TAE pufr, 90 V/90 minut) a následovala jeho extrakce pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN (Postup 3).

Izolovaný a přečištěný plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 byl štěpen v restrikčních místech uvedených na restrikční mapě endonukleázami BglII – 5′A↓GATCT-3′ a SacI – 5′-GAGCT↓C-3′ (Obr. 13). Reakční směs na štěpení je uvedena v Tab. 16.

Obr. 13: Mapa restrikčních míst plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4



  - restrikční místo BglII (5′A↓GATCT-3′),   - restrikční místo SacI (5′-GAGCT↓C-3′)

Tab. 16: Restrikční reakce na štěpění plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4 (1 r. = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10 U/µl BglII	1
10 U/µl SacI	1
0,5 x K pufr	4
plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4	500 ng
H <sub>2</sub> O	do 20 µl

Plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 byl štěpen přes noc při 37 °C, a poté byly restrikční endonukleázy tepelně inaktivovány v 65 °C po dobu 20 minut. Plazmid byl defosforylován alkalickou fosfatázou (CIP) (10 U/ml) v 10x CutSmart pufru, aby bylo možné do něj klonovat fosforylovaná a annealovaná ds oliga. Defosforylace plazmidu byla provedena v 37 °C 1 hodinu.

K získání čistého linearizovaného plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4 byla provedena jeho elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu (TAE pufr, 90V/90 min) a na extrakci byl použit QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN (Postup 3).

#### 4.7.2 Ligace ds oligo do plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4

Do připraveného plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4 byly ligovány fosforylované dvouvláknové oligonukleotidy. Reakční směs na ligaci ds oligo vycházela z protokolu firmy Addgene (Tab. 17).

Tab. 17: Reakční směs na ligaci ds oligonukleotidů do pMuLE ENTR H1 L5-L4 (1 r. = 10 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x T4 DNA ligázový pufr	1
pMuLE ENTR H1 L5-L4	25 ng
ds oligo 50 (123, 266, 528)	75 ng
T4 DNA ligáza	1
H <sub>2</sub> O	do 10 µl

Ligační směs byla inkubována 18 hodin v 16 °C a T4 DNA ligáza byla poté tepelně inaktivována při 70 °C během 10 minut. Rekombinantní plazmidy pMuLE ENTR H1 L5-L4



s inzerty 50\_ds oligo, 123\_ds oligo, 266\_ds oligo a nebo 528\_ds oligo byly použity k okamžité transformaci kompetentních bakterií *E. coli* NEB stable (Postup 5).

Byla provedena kontrolní (colony) PCR u narostlých bakteriálních kolonií. Na reakci byly použity primery plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4 - M13 forward a M13 reverse, které amplifikují celé mnohočetné klonovací místo plazmidu včetně vložených inzertů. Reakční směs kontrolní (colony) PCR je uvedena v Tab. 11 a podmínky amplifikace v Tab. 10. PCR produkty byly následně separovány agarózovou elektroforézou (TBE pufr, 90 V/90 minut). Pouze z kolonií, u kterých byla potvrzena správná velikost inzertu (ds oligo), byly připraveny zásoby bakteriálních suspenzí (-80 °C) a tekuté kultury (37 °C/16 hodin/třepání).

Z tekutých bakteriálních kultur byly izolovány plazmidy pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 s inzerty ds oligo 50, ds oligo 123, ds oligo 266, ds oligo 528 (Postup 3). U izolované plazmidové DNA byla provedena kontrolní PCR (Tab. 13) za shodných podmínek uvedených v Tab. 12. PCR produkty byly separovány 1% agarózovou elektroforézou (TBE pufr, 90 V/90 min) a spektrofotometricky byla změřena jejich koncentrace. Firma SEQme s.r.o. provedla kontrolní analýzu sekvencí Sangerovým sekvenováním.

#### **4.8 LR klonázová reakce**

LR klonázovou reakcí byly současně rekombinovány cílové geny WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 z vektoru pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-L5, ds oligo z vektoru pMuLE ENTR H1 L5-L4, gen pro puromycinovou rezistenci z vektoru pMule ENTR CMV PuroR R4-R3 a gen pro fluorescenční protein tdTomato z vektoru pMuLE SV40 tdTOMATO L3-L2 pomocí rekombinančních míst znázorněných na Schématu 1 (kapitola 4.4) do destinačního vektoru pMULE Lenti Dest eGFP. Plazmidy pMule ENTR CMV PuroR R4-R3, pMuLE SV40 tdTOMATO L3-L2 a pMULE Lenti Dest eGFP byly dodány v bakteriálním glycerolovém roztoku, a proto byly nejprve bakteriální roztoky kultivovány na agarových plotnách. Z bakteriálních kolonií byly připraveny tekuté kultury, z kterých byly cílové plazmidy izolovány - QIAfilter Plasmid Purification MIDI 100, QIAGEN (Postup 4). Byly vytvořeny zásobní suspenze bakteriálních buněk (-80 °C). LR rekombinační reakční směs je uvedena v Tab. 18.

Tab. 18: LR rekombinační reakce

Reagencie	Zásobní molarita (fmol)	Objem (μl)
pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-L5	10	1
pMuLE ENTR H1 L5-L4	10	1
pMule ENTR CMV PuroR R4-R3	10	1
pMuLE SV40 tdTOMATO L3-L2	10	1
pMULE Lenti Dest eGFP	20	1
1x TE pufr (pH 8)	-	3
LR Clonase® II Plus Enzyme mix	-	2

Reakční měs byla centrifugována a inkubována při 25 °C po dobu 16 hodin. Následující den byl ke směsi přidán 1 μl proteinázy K (2 μg/ μl ) (37 °C/10 minut) z důvodu inaktivace LR klonázy.

Vzorky byly ihned použity k transformaci bakterií *E. coli* NEB stable metodou teplotního šoku (Postup 3). Z narostlých bakteriálních kolonií byly izolovány plazmidy pMuLE Dest Lenti eGFP. Byla provedena kontrolní PCR (Tab. 9, 10) na přítomnost inzertu WT a M formy genu *RPS7* s pozměněnými kodony. Velikost PCR produktů a rekombinované plazmidy pMuLE Lenti Dest eGFP byly zkontrolovány na 1% agarózovém gelu (TBE pufr, 90 V/120 min). Koncentrace destinačních vektorů byla změřena spektrofotometricky.

## 4.9 Produkce lentivirů

Dalším krokem experimentální práce bylo vytvoření lentivirových částic obsahující expresní rekombinantní vektory pMuLE Lenti Dest eGFP s WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123 ds oligo, M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123 ds oligo, WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528 ds oligo, M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528 ds oligo. Embryonální buňky HEK293T/17 byly transfekovány rekombinantními plazmidy pMuLE Lenti Dest eGFP spolu s lentivirovými zabalovacími plazmidy psPAX2 a pMD2.G za vzniku lentivirů.

### 4.9.1 Optimalizace transfekce HEK293T/17

Na optimalizaci transfekce byly použity 2 kity – jetPRIME (Polyplus transfection) a X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche).

Na 24 jamkovou desku (24 well glass bottom plate, In Vitro Scientific; kat. č. P24-1.5H-N) bylo vysazeno 25 000 buněk HEK293T/17 na jamku. Následující den se provedla jejich transfekce prázdným plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP v ekvimolárním poměru 1:1:1 s plazmidy psPAX2 a pMD2.G podle Tab. 17. Současně byla provedena transfekce rekombinovanými plazmidy pMuLE Lenti Dest eGFP dle Tab. 19. Směsi plazmidů byly přidány do 50  $\mu$ l jetPrime pufru, zvortexovány a stočeny. Podle poměrů uvedených v Tab. 19 byl přidán ke směsi jetPrime transfekční reagent (1  $\mu$ g DNA:1 $\mu$ l jetPRIME transfekční reagent).

Při použití X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) bylo na 24 jamkovou desku vyseto stejné množství buněk HEK293T/17. Následující den byla připravena transfekční směs smícháním 6  $\mu$ l X-tremeGENE 9 DNA Transfection reagent se 100  $\mu$ l Opti-MEM média. Ke směsi byl přidán 1  $\mu$ g a 2  $\mu$ g plazmidů v ekvimolárním poměru 1:1:1 (pMuLE Lenti Dest eGFP (9 158 bp, 14 628 bp):psPAX2:pMD2.G (Tab. 20).

Transfekční směsi byly zvortexovány, stočeny, inkubovány 15 minut v pokojové teplotě a po kapkách přidány k vysetým buňkám HEK293T/17. Po 24 hodinách bylo vyměněno DMEM médium za čerstvé. Druhý den byly buňky fixovány 4% formaldehydem po dobu 15 minut a promyty 1x PBS. Poté byly jádra buněk barveny roztokem Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/ml) během 5 minut v 37 °C a promyty 1x PBS.

Na závěr proběhla analýza fixovaných HEK293T/17 buněk na konfokálním mikroskopu Spinning Disk CSU-X1 (Zeiss). Buněčná jádra byla barvena modrým fluorescenčním barvivem Hoechst 33342, které bylo excitováno při 350 nm a emitováno při 460 nm. Transfekované buňky HEK293T/17 byly od netransfekovaných

rozpoznány zeleným fluorescenčním proteinem excitovaným při 488 nm a emitovaným při 510 nm.

Tab. 19: Transfekční reakce jet PRIME s prázdným (9 158 bp) a s rekombinovaným plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)

Poměr reagensů ( $\mu\text{g DNA}:\mu\text{l}$ jetPRIME transfekční reagent)	Plazmid	Velikost plazmidu (bp)		Množství do transfekční reakce ( $\mu\text{g}$ )	
1:1	pMule Lenti Dest eGFP	9 158	14 628*	0,2	0,2
1:2	psPAX2	10 668	10 668	0,23	0,15
1:3	pMD2.G	5 882	5 882	0,13	0,08

\* pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp): WT\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 123, M\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 123,  
WT\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 528, M\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 528

Tab. 20: Transfekční reakce X-tremeGENE 9 s prázdným (9 158 bp) a s rekombinovaným plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)

X-tremeGENE 9 transfekční reagent( $\mu\text{l}$ ):Opti- MEM ( $\mu\text{l}$ )	Množství plazmidů ( $\mu\text{g}$ )	Plazmid	Velikost plazmidu (bp)		Množství plazmidů do transfekční reakce ( $\mu\text{g}$ )	
6:100	1	pMuleLenti Dest eGFP	9158	14 628*	0,2	0,2
6:100	2	psPAX2	10 668	10 668	0,23	0,15
6:100	3	pMD2.G	5 882	5 882	0,13	0,08

\*pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp): WT\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 123, M\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 123,  
WT\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 528, M\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 528

#### 4.9.2 Transdukce U2OS buněk lentiviry

Na 4 střední láhve 75 cm<sup>2</sup> (T-75) byly vysety 4 000 000 buněk HEK293T/17 v 13. pasáži. Konfluence buněk byla mezi 80 – 90 %. Na transfekci byl použit transfekční kit jetPRIME (Polyplus transfection).

Po 24 hodinách od vysetí buněk HEK293T/17 byla provedena transfekce rekombinantními plazmidy pMuLE Lenti Dest eGFP v ekvimolárním poměru 1:1:1 s plazmidy psPAX2 a pMD2.G podle Tab. 21. Směsi plazmidů byly přidány do 500 µl jetPrime pufu, zvortexovány a stočeny. K připravené směsi byl přidán jetPrime transfekční reagent v poměru 1 µg DNA:3 µl jetPrime transfekčního reagentu. Transfekční směsi byly zvortexovány, stočeny, inkubovány 15 minut v pokojové teplotě a po kapkách přidány k vyšetým buňkám. Po 18 hodinách bylo DMEM médium vyměněno za čerstvé.

Tab. 21: Transfekční reakce jetPRIME na produkci lentivirů

<b>Poměr reagensů (µg DNA: µl jetPRIME transfection reagent)</b>	<b>Plazmid</b>	<b>Velikost plazmidu (bp)</b>	<b>Množství do transfekční reakce (µg)</b>
1:1	pMuLE Lenti Dest eGFP	14 628*	8
1:2	psPAX2	10 668	5,8
1:3	pMD2.G	5882	3,2

\*pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp): WT\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 123, M\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 123, WT\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 528, M\_shift\_cDNA\_RPS7 + ds 528

Po 72 hodinách bylo DMEM médium s vyprodukovanými lentiviry odebráno a centrifugováno 5 minut při 1 500 rpm. Následně bylo DMEM médium s lentiviry filtrováno přes Syringe filter 0,45 µm (TPP, kat. č. 99745). 4 ml DMEM média obsahující lentiviry byly zakonzentrovány přes centrifugační filtr AMIcon Ultra-4 10 000 MWCO (Millipore, kat. č. UFC800308). Centrifugace probíhala při 700 g po dobu 30 minut, a poté byly lentiviry ihned použity k transdukci buněk U2OS.

Lidské buňky U2OS byly vysety na 24 jamkovou desku – 10 000 buněk/jamku, aby jejich konfluence byla 60 %. Po 24 hodinách od vysetí buněk bylo DMEM médium nahrazeno

500  $\mu$ l transdukční směsi. K 500  $\mu$ l transdukční lentivirové směsi bylo přidáno 0,4  $\mu$ l polybrene, aby výsledná koncentrace byla 8  $\mu$ g/ml.

Na závěr byly pořízeny snímky transdukovaných buněk U2OS pomocí Spinning Disk konfokálního mikroskopu CSU-X1 (Zeiss). Buněčná jádra byla barvena fluorescenčním barvivem Hoechst 33342, které bylo excitováno při 350 nm a emitováno při 460 nm. Transfekované buňky HEK293T/17 byly od netransfekovaných rozpoznány zeleným fluorescenčním zářením GFP proteinu, který byl excitován při 488 nm a emitován při 510 nm a červeným fluorescenčním zářením proteinu tdTomato při excitaci 554 nm a emisi 581 nm.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava siRNA molekul k umlčení ribozomálního proteinu 7 (RPS7)

Pro tvorbu molekul siRNA proti genu *RPS7* byly navrženy 4 DNA oligonukleotidy, jejichž sekvence jsou na Obr. 14.

Obr. 14: Návrhy sekvencí DNA oligonukleotidů na přípravu siRNA (TOP, BOT)

TOP sense řetězec:

5' - GGATCCTAATACGACTCACTATAGCGAGATTTGGGTCTCTTC – 3'

BOT sense řetězec:

5' - AAGAAGAGACCCAAATCTCGCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC – 3'

TOP antisense řetězec:

5' - GGATCCTAATACGACTCACTATAGAAGAGACCCAAATCTCGC – 3'

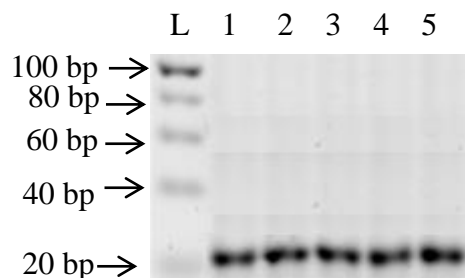
BOT antisense řetězec:

5' - AAGCGAGATTTGGGTCTCTTCTATAGTGAGTCGTATTAGGATCC – 3'

AA = dva adeniny na 5' konci BOT řetězců pro tvorbu 2 uridinů na 3' konci siRNA molekuly; podtržená část sekvence = T7 promotor pro *in vitro* transkripci siRNA

Jednovláknové oligonukleotidy TOP měly délku 42 nt a BOT 44 nt, jejich *in vitro* transkripcí z T7 promotoru vznikly sense a antisense řetězce, jejichž komplementárním spojením vznikla siRNA. Velikost siRNA byla 21 bp (Obr. 15). Koncentrace siRNA byla 61,6 ng/μl, 24,8 ng/ μl, 38,6 ng/μl, 32,4 ng/ μl a 22,8 ng/ μl.

Obr. 15: siRNA molekuly



L = Orange GeneRuler 20 bp, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 - 5 = 5 stejných vzorků siRNA o velikosti 21 bp; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo nukleové kyseliny (NK) – GelRed (Biotium).

Molekuly siRNA z Obr. 15 byly použity k umlčení genu *RPS7* ve dvou lidských buněčných liniích, z nichž byla následně úspěšně izolována RNA. Koncentrace izolované RNA po transfekci HeLa a HEK-293 buněk molekulami siRNA (61,6 ng/μl) je uvedena v Tab. 22 a to včetně koncentrace izolované RNA z netransfekovaných buněk.

Tab. 22: Koncentrace celkové izolované RNA

Buněčná linie	Množství siRNA pro umlčení <i>RPS7</i> (μg)	Koncentrace (ng/μl)
HeLa	0	397,86
	0,4	283,42
	2,5	103,38
	5	175,51
HEK-293	0	215,69
	0,4	196,33
	2,5	128,74
	5	75,64

0 = negativní kontrola (netransfekované buňky); 0,4 = transfekce buněk 0,4 μg siRNA; 2,5 = transfekce buněk 2,5 μg siRNA; 5 = transfekce buněk 5 μg siRNA

cDNA genu *RPS7* přepsaná z RNA pomocí reverzní transkripce byla použita na real-time PCR. Exprese cDNA *RPS7* byla stanovena metodou relativní kvantifikace, kdy byly porovnávány Ct hodnoty testovaných vzorků (buňky transfekovány 0,4 μg; 2,5 μg a 5 μg siRNA) s referenčním genem GAPDH.

Na základě normalizačních výpočtů hodnot  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  a fold change  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  byla u HeLa buněk při použití 0,4 μg siRNA snížena exprese genu *RPS7* o 46 %, při aplikaci 2,5 μg siRNA o 50 % a při použití 5 μg siRNA o 58 %. U buněk HEK-293 byla snížena exprese genu *RPS7* o 35 % při použití 0,4 μg siRNA, o 53 % při 2,5 μg siRNA a o 59 % při aplikaci 5 μg siRNA. Výsledky umlčení *RPS7* genu u buněk HeLa a HEK-293 siRNA molekulou je shrnuta v Tab. 23.



Tab. 23: Výsledky umlčení RPS7 molekulou siRNA

Buněčná linie	Množství siRNA pro umlčení RPS7 (μg)	2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Expres (%)
HeLa	0,4	0,46	46
	2,5	0,50	50
	5	0,58	58
HEK293	0,4	0,35	35
	2,5	0,53	53
	5	0,59	59

## 5.2 Sekvence genu RPS7 s pozměněnými kodony

WT gen *RPS7* s pozměněnými kodony vychází z referenční cDNA sekvence genu *RPS7* (Obr. 16 a). Pozměněná sekvence včetně restričních míst, start, stop kodonů a 3' UTR oblasti je na Obr. 16 b). Navržený inzert byl dlouhý 678 bp a byl označen jako WT\_shift\_cDNA\_RPS7.

Obr. 16 a): Schéma referenční cDNA sekvence genu *RPS7*

ATGTTCAGTTCGAGCGCCAAGATCGTGAAGCCCAATGGCGAGAAGCCGGACGAGTTCGAGTCCGGCATCTCCCAGGCTCTTC  
TGGAGCTGGAGATGAACTCGGACCTCAAGGCTCAGCTCAGGGAGCTGAATATTACGGCAGCTAAGGAAATTGAAGTTGGTGG  
TGGTCGGAAAGCTATCATAATCTTTGTTCCCGTTCCTCAACTGAAATCTTTCCAGAAAATCCAAGTCCGGCTAGTACGCGAAT  
TGGAGAAAAAGTTCAGTGGGAAGCATGTCGTCTTTATCGCTCAGAGGAGAATTCTGCCTAAGCCAACCTCGAAAAAGCCGTAC  
AAAAATAAGCAAAAGCGTCCAGGAGCCGTA CTCTGACAGCTGTGCACGATGCCATCCTTGAGGACTTGGTCTTCCCAAGC  
GAAATTGTGGGCAAGAGAATCCCGCTCAAACTAGATGGCAGCCGGCTCATAAAGTTTCATTTGGACAAAGCACAGCAGAAC  
AATGTGGAACACAAGTTGAACTTTTTCTGGTGTCTATAAGAAGCTCAGGGCAAGGATGTTAATTTTGAATTTCCAGAGTT  
TCAATTGTTAACAAAAATGACTAAATAAAAAAGTATATATTCACAGT

ATG – start kodon, TAA – stop, sekvence psaná kurzívou – 3' UTR nepřekládaná oblast

Obr. 16 b): Schéma pozměněné sekvence WT formy genu *RPS7*

**GGATCC**ATGTTTTCTCTTCAGCTAAAATAGTAAAACCGAACGGTAAAAACCCGATGAATTTGAAAGTGGGATATCACAAAG  
CATTGTTGAACTAGAAATGAATTCAGATTTAAAAGCGCAACTTCGAGAACTAAACATCACCGCCGCGAAAGAGATAGAGGT  
GGGAGGCGGGCGTAAGCCATAATCATATTCGTACCAGTCCCGCAGCTTAAGTCGTTTCAAAAGATTTCAGGTTTCGTCTGGTGA  
GGGAGCTAGAAAAGAAATTTTCAGGTAAACACGTTGTGTTTCATTGCGCAACGACGCATATTGCCAAAACCCACCCGTAAGTC  
GCGCACCAAGAACAACAGAAAAGACCACGGTCTAGGACGTTGACCGCGGTCCATGACGCAATATTGGAAGATCTTGTGTTT  
CCGTCGGAGATAGTCGGTAAACGAATTAGGGTTAAGTTAGACGGTTCTCGTCTGATTAAAGTACACTTAGATAAGGCTCAAC  
AAAATAACGTCGAGCATAAAGTCGAGACGTTCTCGGGCGTGTACAAAAAACTGACAGGGAAAGACGTCAACTTCGAGTTTCC  
TGAATTCAGCTCTTAACAAAAATGACTAAATAAAAAAGTATATATTCACAGTCT**CGAG**

**GGATCC** – restriční místo endonukleázy BamHI, **CTCGAG** - restriční místo endonukleázy XhoI, ATG – start kodon, TAA – stop kodon, sekvence psaná kurzívou – 3' UTR nepřekládaná oblast

Na Obr. 16 c) je sekvence genu *RPS7* se shiftovanými kodony s konkrétní mutací, která mění smysl polynukleotidového řetězce, tzv. missense mutace V134F. U proteinu RPS7 byla substituována 134. aminokyselina (402. nukleotid v cDNA sekvenci genu *RPS7*) tzn., že místo valinu (V) se při translaci zařadí fenylalanin (F). Navržený inzert byl dlouhý 678 bp a byl označen jako M\_shift\_cDNA\_RPS7.

Obr. 16 c): Schéma pozměněné sekvence genu *RPS7* s konkrétní mutací V134F

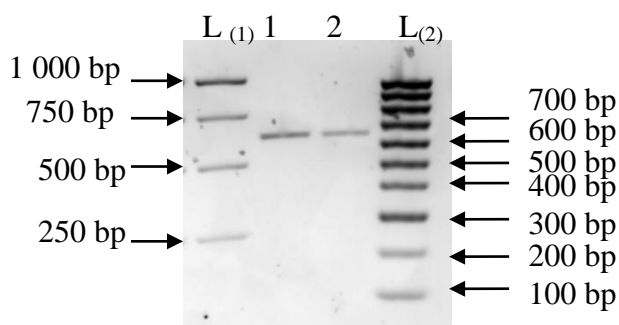
**GGATCC**ATGTTTTCTCTTCAGCTAAAATAGTAAAACCGAACGGTGAAAAACCCGATGAATTTGAAAAGTGGGATATCACAAG  
 CATTGTTGGAAGACTAGAAATGAATTCAGATTTAAAAAGCGCAACTTCGAGAACTAAACATCACCGCCGCGAAAGAGATAGAGGT  
 GGGAGGCGGGCGTAAGGCCATAATCATAATTCGTACCAGTCCCGCAGCTTAAGTCGTTTCAAAAAGATTCAGGTTTCGTCTGGTGA  
 GGGAGCTAGAAAAGAAATTTTCAGGTAAACACGTTGTGTTCATTGCGCAACGACGCATATTGCCAAAACCCACCCGTAAGTC  
 GCGCACCAAGAACAACAGAAAAGACCACGGTCTAGGACGTTGACCGCGGTCCATGACGCAATATTGGAAGATCTTGTTTT  
 CCGTCGGAGATAGTCGGTAAACGAATTAGGGTTAAGTTAGACGGTTCTCGTCTGATTAAGTACACTTAGATAAGGCTCAAC  
 AAAATAACGTCGAGCATAAAGTCGAGACGTTCTCGGGCGTGTACAAAAAACTGACAGGGAAAGACGTCAACTTCGAGTTTCC  
 TGAATTCAGCTCTAAACAAAAATGACTAAATAAAAAAGTATATATTCACAGTCTCGAG

**GGATCC** – restrikční místo endonukleázy BamHI, **CTCGAG** - restrikční místo endonukleázy XhoI, **ATG** – start kodon, **TAA** – stop kodon, **TTT** – bodová mutace valin 134 fenylalanin (V134F), sekvence psaná kurzívou – 3' UTR nepřekládaná oblast

### 5.3 Štěpení a izolace WT\_shift\_cDNA\_RPS7, M\_shift\_cDNA\_RPS7

Štěpení plazmidu pMK-RQ-Bb a následná extrakce navržených sekvencí (WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7) z gelu byla ověřena elektroforetickou separací (Obr. 17). Velikost úspěšně izolovaných sekvencí byla 678 bp. Fluorimetricky naměřená koncentrace WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 byla 1,5 ng/μl.

Obr. 17: Izolované inzerty WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7



L<sub>(1)</sub> = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 = izolovaný a purifikovaný WT\_shift\_cDNA\_RPS7 - 678 bp; 2 = izolovaný a purifikovaný M\_shift\_cDNA\_RPS7 - 678 bp; L<sub>(2)</sub> = HypperLadder 100 bp (Bioline); nanášecí pufr – 6x Orange DNA Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

## 5.4 Příprava DNA oligonukleotidů exprimující shRNA

Oligonukleotidy byly tvořeny z 19 nt dlouhé sekvence odpovídající konkrétnímu úseku nativní cDNA genu *RPS7*. Na nativní gen *RPS7* byly navrženy 4 páry ssDNA oligonukleotidů s názvy – 50\_TOP(BOT)\_oligo, 123\_TOP(BOT)\_oligo, 266\_TOP(BOT)\_oligo, 528\_TOP(BOT)\_oligo, jejichž sekvence jsou na Obr. 18.

Obr. 18: Návrhy sekvencí ssDNA oligonukleotidů (TOP, BOT)

50\_TOP\_oligo:

5'-GATCTGCGAGATTTGGGTCTCTTCTCAAGAGAGAAGAGACCCAAATCTCGCTTTTTGAGCT-3'

50\_BOT\_oligo:

5'-AAAAAAGCGAGATTTGGGTCTCTTCTCTTGAAGAAGAGACCCAAATCTCGC-3'

123\_TOP\_oligo:

5'-GATCTGCCAAGATCGTGAAGCCCAATCAAGAGATTGGGCTTCACGATCTTGGTTTTGAGCT-3'

123\_BOT\_oligo:

5'-AAAAAACCAAGATCGTGAAGCCCAATCTCTTGAATTGGGCTTCACGATCTTGGC-3'

266\_TOP\_oligo:

5'-GATCTGGTGGTGGTTCGGAAAGCTATCAAGAGATAGCTTCCGACCACCACCTTTTTGAGCT-3'

266\_BOT\_oligo:

5'-AAAAAAGGTGGTGGTTCGGAAAGCTATCTCTTGAATAGCTTCCGACCACCACC-3'

528\_TOP\_oligo:

5'-GATCTGCAAGAGAATCCGCGTCAATCAAGAGATTGACGCGGATTCTCTTGCTTTTGAGCT-3'

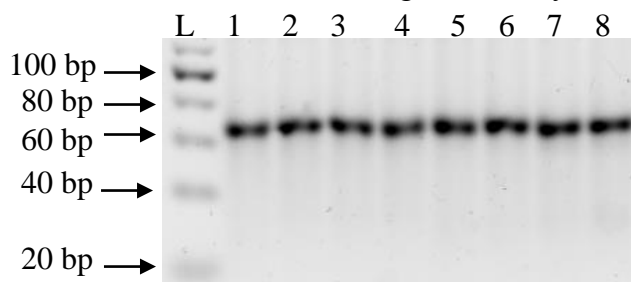
528\_BOT\_oligo:

5'-AAAAAAGCAAGAGAATCCGCGTCAATCTCTTGAATTGACGCGGATTCTCTTGC-3'

GATCT – přesah restričního místa endonuklázy BglII, GAGCT – přesah restričního místa endonukleázy SacI, podtržená oblast – sekvence smyčky shRNA, TTTTTT (AAAAAA) – sekvence terminátoru

Jednovláknové oligonukleotidy TOP měly délku 63 nt a BOT 53 nt, jejich úspěšným komplementárním spojením (annealingem) vznikly dvouvláknové oligonukleotidy (ds oligo) s přesahy restričních míst BglII a SacI, jež sloužily ke klonování. Vzniklé ds oligo byly ověřeny elektroforetickou separací, kdy ds oligo mají délku 63 bp (Obr. 19).

Obr. 19: Dvouvláknové DNA oligonukleotidy

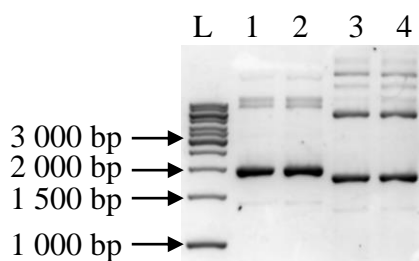


L = Orange GeneRuler 20 bp, DNA ladder (Thermo Fisher); 1,2 = 50 ds oligo; 3,4 = 123 ds oligo; 5,6 = 266 ds oligo; 7, 8 = 528 ds oligo; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo nukleové kyseliny (NK) – GelRed (Biotium).

### 5.5 Příprava cílových plazmidů na klonování

Elektroforetická separace izolovaných cirkulárních plazmidů potvrdila jejich velikostní trend - pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 – 3 276 bp, pMuLE ENTR H1 L5-L4 – 3 045 bp (Obr. 20). Izolované plazmidy byly cirkulární, a proto v agarózovém gelu migrují rychleji než plazmidy lineární, které by tak odpovídaly dané velikosti.

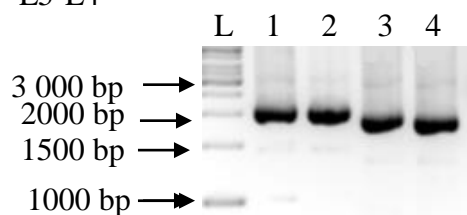
Obr. 20: Izolovaný pMuLE ENTR CMV/TOcDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1, 2 = cirkulární pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 – 3 276 bp; 3, 4 = cirkulární pMuLE ENTR H1 L5-L4 – 3 045 bp; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

Extrakce plazmidů z agarózového gelu byla ověřena elektroforetickou separací (Obr. 21). Fluorimetricky získané koncentrace vyizolovaných plazmidů jsou uvedeny v Tab. 24. Extrahované plazmidy měly stále cirkulární podobu, a proto v agarózovém gelu migrovaly stejně rychle jako na Obr. 17.

Obr. 21: Purifikovaný plazmid pMuLE ENTR CMV/TOcDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4



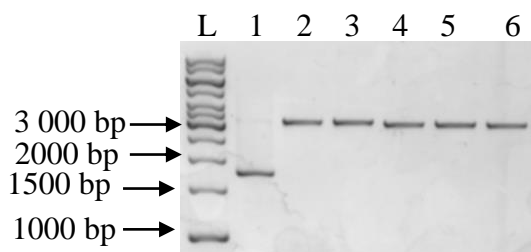
L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1, 2 = cirkulární pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 – 3 276 bp; 3, 4 = cirkulární pMuLE ENTR H1 L5-L4 – 3 045 bp; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

Tab. 24: Koncentrace izolovaných a extrahovaných pMuLE plazmidů (pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4)

pMuLE plazmid	Vzorek č.	Koncentrace (ng/μl)
pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5	1	22,6
	2	24,6
pMuLE ENTR H1 L5-L4	1	29
	2	39

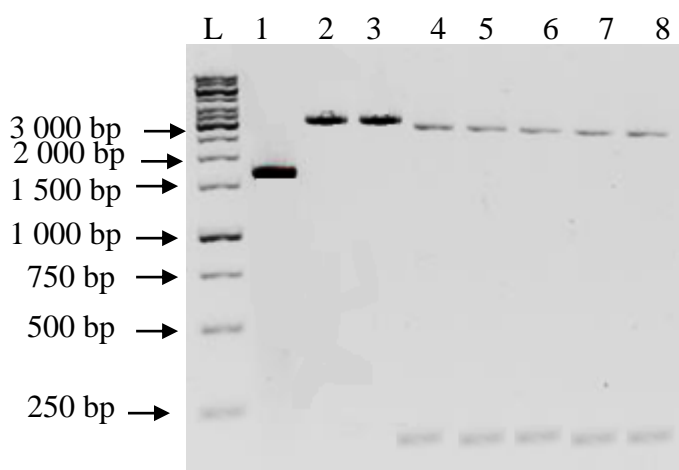
Správnost štěpení plazmidů - pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 (BamHI a XhoI) a plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 (BglII a SacI) byla ověřena elektroforetickou separací (Obr. 22, 23). Fluorimetricky naměřené koncentrace purifikovaných lineárních plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4 je uvedena v Tab. 25.

Obr 22: Plazmid pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 štěpený endonukleázami BamHI a XhoI



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 = izolovaný, purifikovaný a cirkulární pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5; 2 = pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 štěpený BamHI – 3 276 bp; 3 = pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 štěpený XhoI – 3 276 bp, 4 – 6 = izolovaný, purifikovaný a štěpený plazmid pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 endonukleázami BamHI a XhoI – 3 212 bp ; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium)

Obr. 23: Plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 štěpený endonukleázami BglII a SacI



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 = izolovaný, purifikovaný a cirkulární pMuLE ENTR H1 L5-L4; 2 = pMuLE ENTR H1 L5-L4 štěpený BglII – 3 045 bp; 3 = pMuLE ENTR H1 L5-L4 štěpený SacI – 3 276 bp, 4 – 6 = izolovaný, purifikovaný a štěpený (linearizovaný) plazmid pMuLE ENTR H1 L5-L4 endonukleázami BglII a SacI – 2 832 bp; 4, 5, 6, 7, 8 = vyštěpený produkt o velikosti 213 bp; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

Tab. 25: Koncentrace linearizovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4

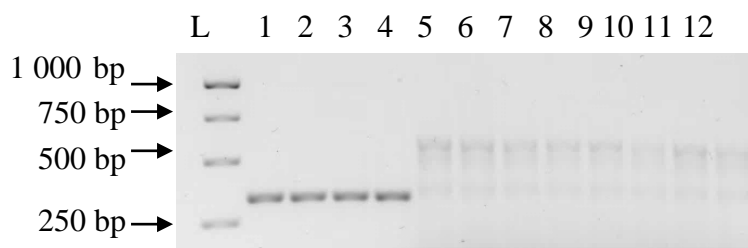
pMuLE plazmid	Vzorek č.	Koncentrace (ng/μl)
pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5	1	6,8
	2	5,5
pMuLE ENTR H1 L5-L4	1	10
	2	9,6

## 5.6 Ligace WT a M sekvencí s pozměněnými kodony a ds oligo do příslušných vektorů

Izolované inzerty WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a M\_shift\_cDNA\_RPS7 byly klonovány do vektoru pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a syntetizované ds oligo do plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4.

Úspěšná transformace bakteriálních buněk *E. coli* NEB stable byla zjištěna kontrolní (colony) PCR u narostlých kolonií s inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7, u kolonií s M\_shift\_cDNA\_RPS7 a u kolonií s inzertem ds oligo (50, 123, 266, 528). Elektroforetická separace potvrdila očekávanou velikost PCR produktu u kolonií s WT a M inzertem – 347 bp i u kolonií s inzertem ds oligo – 638 bp (Obr. 24).

Obr. 24: Kontrolní (colony) PCR genu WT\_shift\_cDNA\_RPS7, M\_shift\_cDNA\_RPS7 a ds oligonukleotidů



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1, 2 = PCR produkt z bakteriálních kolonií s inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7 – 347 bp; 3, 4 = PCR produkt z bakteriálních kolonií s inzertem M\_shift\_cDNA\_RPS7 – 347 bp; 5, 6 = PCR produkt z bakteriálních kolonií s inzertem 50 ds oligo; 7,8 = PCR produkt z bakteriálních kolonií s inzertem 123 ds oligo; 9, 10 = PCR produkt z bakteriálních kolonií s inzertem 266 ds oligo; 11, 12 = PCR produkt z bakteriálních kolonií s inzertem 528 ds oligo; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

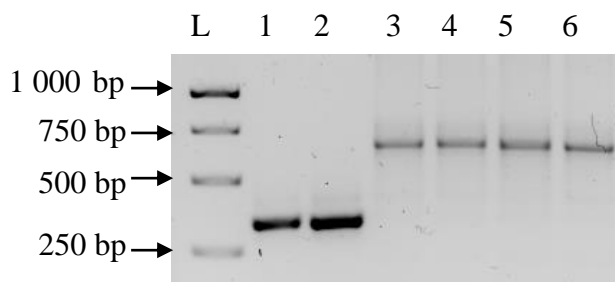
Po izolaci plazmidu byla fluorimetricky změřena koncentrace (Tab. 23). Kontrolní PCR izolovaných plazmidů a jejich elektroforetická separace potvrdila přítomnost klonovaných genů *RPS7* (347 bp) a ds oligo (638 bp) (Obr. 25).

Sangerovo sekvenování potvrdilo vložení cílových sekvencí *RPS7* s pozměněnými kodony do plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5, včetně identifikace bodové mutace (V134F). U plazmidů pMuLE ENTR H1 L5-L4 bylo potvrzeno správné zaklonování ds oligonukleotidů u dvou vzorků, a to 123\_ds oligo a 528\_ds oligo.

Tab. 26: Koncentrace izolovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4 s klonovanými sekvencemi (WT, M, ds oligo)

Izolovaný plazmid	Koncentrace (ng/μl)
pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 s WT_shift_cDNA_RPS7	126
pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 s M_shift_cDNA_RPS7	171
pMuLE ENTR H1 L5-L4 s 123_ds oligo	114
pMuLE ENTR H1 L5-L4 s 528_ds oligo	114

Obr. 25: Kontrolní separace PCR produktů z izolovaných plazmidů pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 a pMuLE ENTR H1 L5-L4



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1 = PCR produkt WT\_shift\_cDNA\_RPS7 z plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 – 347 bp; 2 = PCR produkt M\_shift\_cDNA\_RPS7 z plazmidu pMuLE ENTR CMV/TO cDNA L1-R5 – 347 bp; 3,4 = PCR produkt 123\_ds oligo z plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4 - 638 bp; 5, 6 = PCR produkt PCR produkt 528\_ds oligo z plazmidu pMuLE ENTR H1 L5-L4 - 638 bp; nanášecí pufir – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

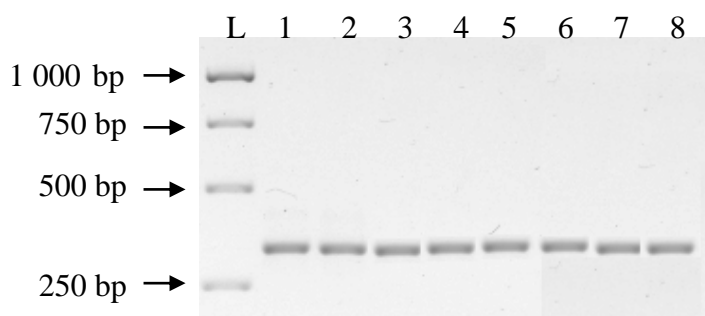
### 5.7 LR rekombinace

Destinační vektor původně obsahoval mezi rekombinačními místy R1 a R2 gen pro toxin ccdB, který zajistil viditelný důkaz úspěšné LR rekombinace. Na agarových plotnách narostly pouze ty bakteriální kolonie, které tento toxin neobsahovaly a to právě z důvodu úspěšné rekombinace cílových sekvencí z ENTRY vektorů do DEST vektoru na místo genu pro tento toxin.

Správný průběh rekombinace byl mimo jiné ověřen ještě kontrolní PCR klonovaných produktů WT\_shift\_cDNA\_RPS7 (M\_shift\_cDNA\_RPS7). Velikost PCR produktů – 347 bp byla identifikována elektroforetickou separací (Obr. 26). Vzniklé expresní vektory pMuLE Lenti Dest eGFP (14 678 bp) byly porovnány na agarózovém gelu se zdrojovým destinačním vektorem (9 158 bp) (Obr. 27). Koncentrace izolovaných plazmidů pMuLE Lenti Dest eGFP byla změřena spektrofotometricky (Tab. 26).

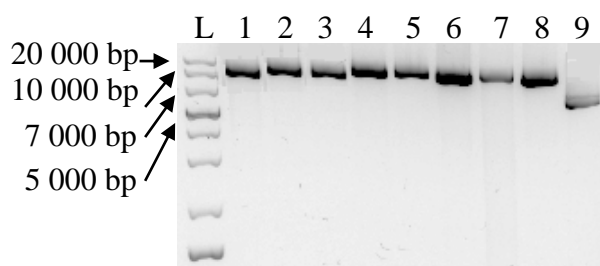


Obr. 26: Kontrolní separace PCR produktů WT\_shift\_cDNA\_RPS7 (M\_shift\_cDNA\_RPS7)



L = GeneRuler 1 kb, DNA ladder (Thermo Fisher); 1,2 = PCR produkt WT\_shift\_cDNA\_RPS7 z plazmidu pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123\_ds oligo – 347 bp; 3, 4 = PCR produkt M\_shift\_cDNA\_RPS7 z plazmidu pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123\_ds oligo; 5, 6 = PCR produkt WT\_shift\_cDNA\_RPS7 z plazmidu pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528\_ds oligo; 7, 8 = PCR produkt M\_shift\_cDNA\_RPS7 z plazmidu pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528\_ds oligo; nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

Obr. 27: Separace izolovaných destinačních vektorů pMuLE Lenti Dest eGFP



L = GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher); 1,2 = plazmid pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123\_ds oligo (14 628 bp); 3, 4 = plazmid pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123\_ds oligo (14 628 bp); 5, 6 = plazmid pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528\_ds oligo (14 628 bp); 7, 8 = plazmid pMuLE Lenti Dest eGFP s inzertem M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528\_ds oligo (14 628 bp); 9 – pMuLE Lenti Dest eGFP (9 158 bp); nanášecí pufr – 6x Loading Dye (ThermoFisher), barvivo NK – GelRed (Biotium).

Tab. 27: Koncentrace izolovaných plazmidů pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)

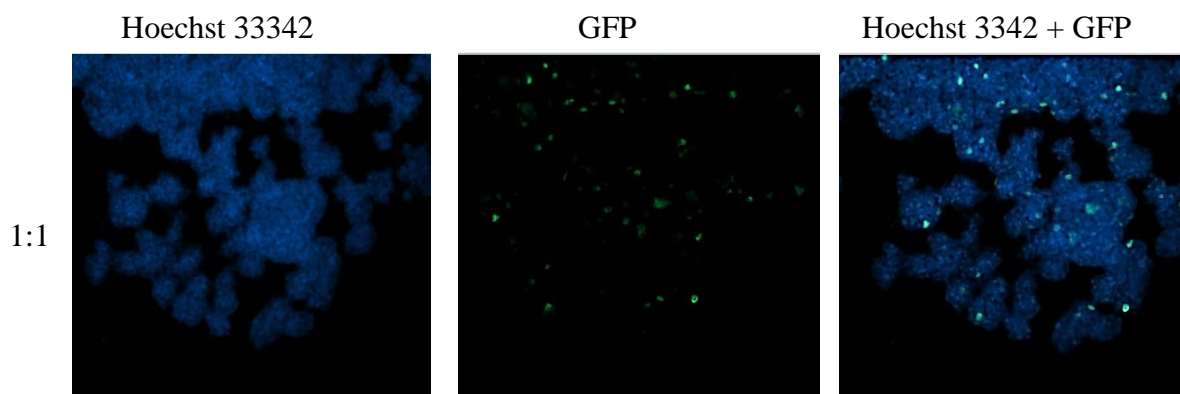
Izolovaný plazmid	Vzorek č.	Koncentrace (ng/μl)
pMuLE Lenti Dest eGFP s WT_shift_cDNA_RPS7 a 123_ds oligoů2	1	57
	2	78
pMuLE Lenti Dest eGFP s M_shift_cDNA_RPS7 a 123_ds oligo	1	121
	2	84
pMuLE Lenti Dest eGFP s WT_shift_cDNA_RPS7 a 528_ds oligo	1	106
	2	35
pMuLE Lenti Dest eGFP s M_shift_cDNA_RPS7 a 528_ds oligo	1	40
	2	50

WT – normální (wild type), M – mutant

## 5.8 Produkce lentivirů

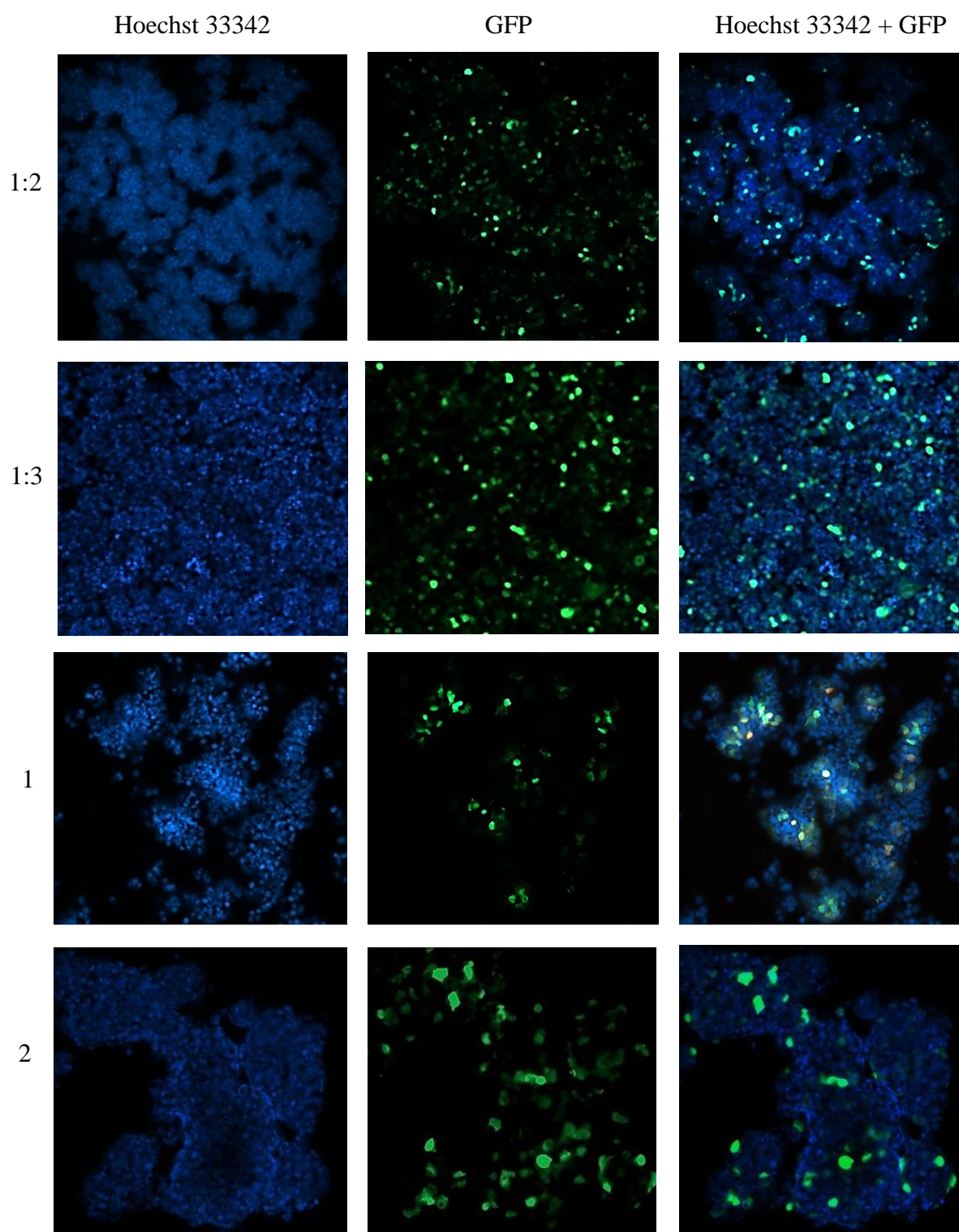
Úspěšná transfekce embryonálních buněk HEK293T/17 byla prokázána u obou použitých transfekčních kitů (jetPrime, X-treme Gene 9) pomocí snímků z konfokálního mikroskopu Spinning Disk CSU-X1. Na základě detekce GFP signálu z transfekovaných buněk byla kontrolována tvorba lentivirů. Na Obr. 28 je optimalizace transfekce HEK293T/17 buněk prázdným destinačním plazmidem dodaným výrobcem pMuLE Lenti Dest eGFP o velikosti 9 158 bp. Srovnání úspěšnosti transfekce na základě obrazové analýzy je v Tab. 28.

Obr. 28 a): Transfekce buněk HEK293T/17 prázdným pMuLE Lenti Dest eGFP (9 158 bp)



Buněčná linie HEK293T/17, zdroj ATCC cell line, zvětšení 10x, fixace 4% formaldehydem 48 hodin po transfekci; 1:1 = 1 μg DNA:1 μl jetPrime transfekční reagent; Hoechst 33342 = barvení jader HEK293T/17 (350/460 nm) GFP = protein GFP exprimující se z expresního systému (488/510 nm), Hoechst 33342 + GFP = spojení Hoechstu 33342 a GFP

Obr. 28 b): Transfekce buněk HEK293T/17 prázdným pMuLE Lenti Dest eGFP (9158 bp)



Buněčná linie HEK293T/17, zdroj ATCC cell line, zvětšení 10x, fixace 4% formaldehydem 48 hodin po transfekci; 1:2 = 1 $\mu$ g DNA:2  $\mu$ l jetPrime transfekční reagent; 1:3 = 1 $\mu$ g DNA:3  $\mu$ l jetPrime transfekční reagent; 1= X-treme Gene 9 transfekce - 1 $\mu$ g DNA, 2 = X-treme Gene 9 transfekce - 2  $\mu$ g DNA, Hoechst 33342 = barvení jader HEK293T/17 (350/ 460 nm) GFP = protein GFP exprimující se z expresního systému (488/ 510 nm), Hoechst 33342 + GFP = spojení Hoechstu 33342 a GFP

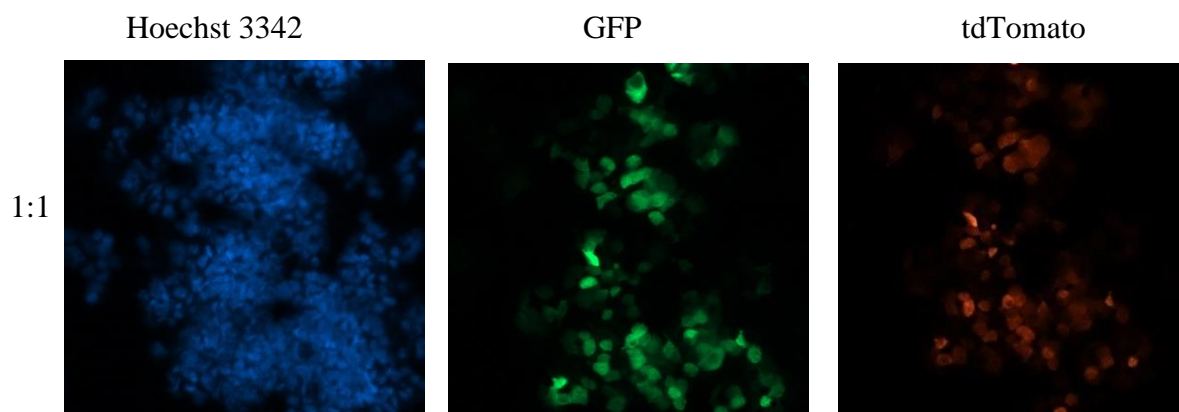
Tab. 28: Optimalizace transfekce prázdným plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP (9 158 bp)

Způsob transfekce	Celkový počet buněk	Transfekované buňky	Netransfekované buňky	% úspěšnost
1:1	100	12	88	12
1:2		31	69	31
<b>1:3</b>		84	16	<b>84</b>
1		5	95	5
2		23	77	23

1:1 = 1 $\mu$ g DNA:1 $\mu$ l jetPrime transfekční reagent, 1:2 = 1 $\mu$ g DNA:2  $\mu$ l jetPrime transfekční reagent; 1:3 = 1 $\mu$ g DNA:3  $\mu$ l jetPrime transfekční reagent, 1 = X-treme Gene 9 transfekce 1 $\mu$ g DNA, 2 = X-treme Gene 9 transfekce 2  $\mu$ g DNA

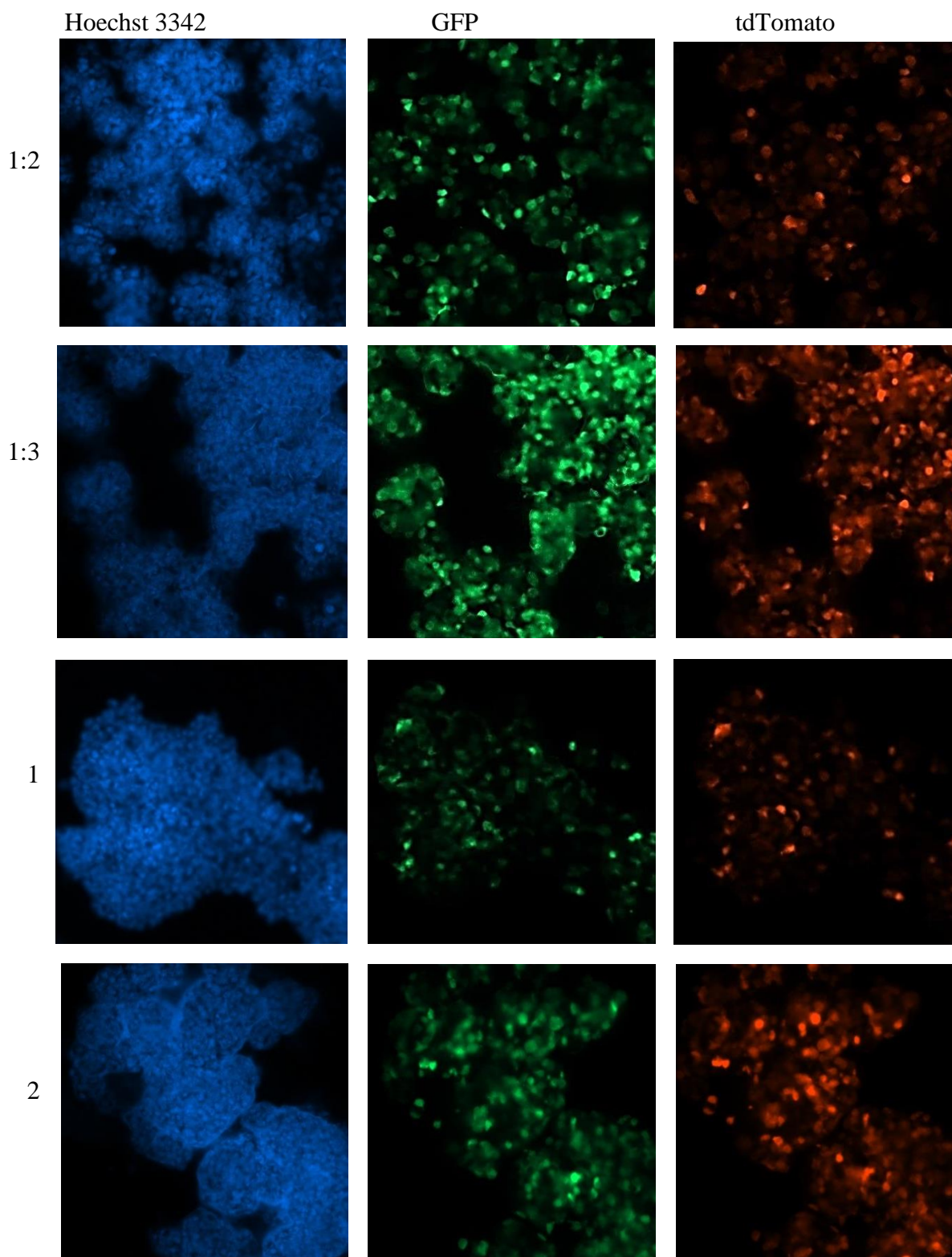
Optimalizace transfekce HEK293T/17 buněk plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP s expresním systémem pMuLE Lenti Dest eGFP s WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123 ds oligo pomocí jetPrime transfekčního kitu a XtremeGENE 9 je na Obr. 30. Výsledky transfekce HEK293T/17 buněk plazmidy pMuLE Lenti Dest eGFP s M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123 dsoligo, s WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528 ds oligo a s M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528 ds oligo korespondovaly s uvedeným příkladem na Obr. 29 a), b). Detail transfekce buněk HEK293T/17 při větším zvětšení (40x) je na Obr. 30. Srovnání úspěšnosti transfekce na základě obrazové analýzy je v Tab. 29.

Obr. 29 a): Ttransfekce buněk HEK293T/17 expresním pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)



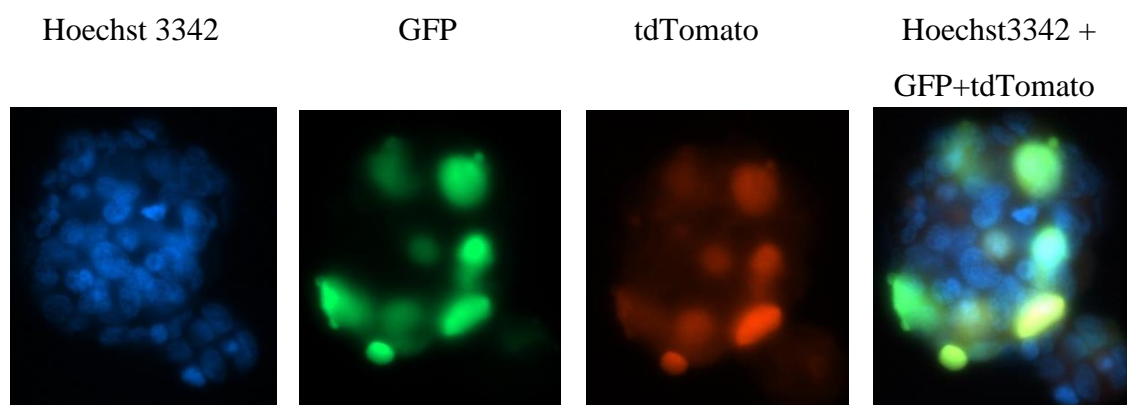
Buněčná linie HEK293T/17, zdroj ATCC cell line, zvětšení 10x, fixace 4% formaldehydem 48 hodin po transfekci; 1:1 = 1 $\mu$ g DNA:1  $\mu$ l jetPrime transfekční reagent, Hoechst 33342 = barvení jader HEK293T/17 (350/, 460 nm) GFP = protein GFP exprimující se z expresního systému (488/, 510 nm), tdTomato = protein tdTomato exprimující se z expresního systému (554/, 581nm)

Obr. 29 b): Transfekce buněk HEK293T/17 expresním pMuLE Lenti Dest eGFP (14 628 bp)



Buněčná linie HEK293T/17, zdroj ATCC cell line, zvětšení 10x, fixace 4% formaldehydem 48 hodin po transfekci; 1:2 = 1 $\mu$ g DNA:2  $\mu$ l jetPrime transfekční reagent; 1:3 = 1 $\mu$ g DNA:3  $\mu$ l jetPrime transfekční reagent, 1= X-treme Gene 9 transfekce 1 $\mu$ g DNA, 2 = X-treme Gene 9 transfekce 2  $\mu$ g DNA, Hoechst 33342 = barvení jader HEK293T/17 (350/, 460 nm) GFP = protein GFP exprimující se z expresního systému (488/, 510 nm), tdTomato = protein tdTomato exprimující se z expresního systému (554/, 581nm)

Obr. 30.: Transfekce buněk HEK293T/17 expresním plazmidem pMuLE Lenti Dest eGFP při větším zvětšení (14 628 bp)



Buněčná linie HEK293T/17, zdroj ATCC cell line, zvětšení 40x, fixace 4% formaldehydem 48 hodin po transfekci; Hoechst 33342 = barvení jader HEK293T/17 (350/, 460 nm) GFP = protein GFP exprimující se z expresního systému (488/, 510 nm), tdTomato = protein tdTomato exprimující se z expresního systému (554/581nm), Hoechst3342 + GFP+tdTomato = spojení Hoechst 3342, GFP a tdTomato

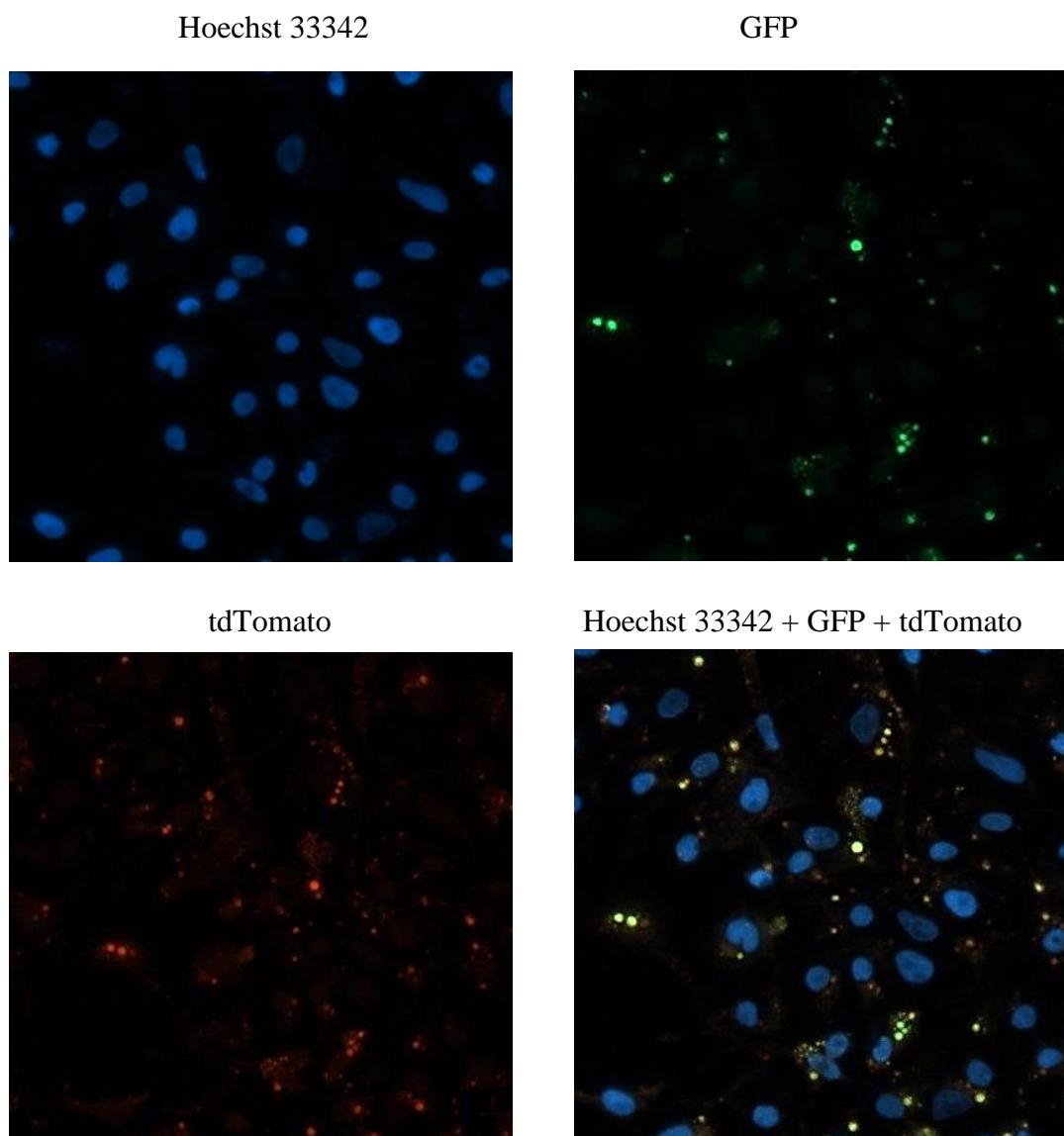
Tab. 29: Optimalizace transfekce expresním vektorem pMuLE Lenti Dest eGFP (14 658 bp)

Způsob transfekce	Celkový počet buněk	Transfekované buňky	Netransfekované buňky	% úspěšnost
1:1	100	13	87	13
1:2		45	55	45
<b>1:3</b>		89	11	<b>89</b>
1		28	72	28
2		39	61	39

1:1 = 1µg DNA:1µl jetPrime transfekční reagent, 1:2 = 1µg DNA:2 µl jetPrime transfekční reagent; 1:3 = 1µg DNA:3 µl jetPrime transfekční reagent, 1= X-treme Gene 9 transfekce 1µg DNA, 2 = X-treme Gene 9 transfekce 2 µg DNA

Na produkci lentivirů byl na základě optimalizačních reakcí vybrán jetPrime transfekční kit v poměru 1 µgDNA : 3 µl transfekční reagent. Na Obr. 31 je ukázka transdukovaných buněk U2OS lentiviry obsahující expresní systém pMuLE Lenti Dest eGFP s WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123 ds oligo. Výsledky transdukce lentivirů s ostatními expresními vektory (M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123 ds oligo, WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528 ds oligo a M\_shift\_cDNA\_RPS7 a 528 ds oligo) korespondovaly s uvedeným příkladem. Úspěšnost transdukce do U2OS buněk byla 37%.

Obr. 31: Transdukce buněk U2OS lentiviry



Buněčná linie U2OS, zdroj ATCC cell line; 24 hodin po transdukci lentiviry s expresním systémem pMuLE Lenti Dest eGFP s WT\_shift\_cDNA\_RPS7 a 123 ds oligo, polybrene 8 mg/ml, zvětšení 40x; Hoechst 3342 = obarvení jader U2OS buněk, GFP = protein GFP exprimující se z expresního systému (Schéma 1), dsRed = protein tdTomato exprimující se z expresního systému (Schéma 1), Hoechst 3342 + GFP + tdTomato = spojení Hoechst 3342, GFP a tdTomato

## 6 DISKUZE

Informace a znalosti o dědičnosti, molekulárních a buněčných procesech jsou odvozeny ze studií aplikovaných na modelových organizmech. K významným modelovým organizmům patří bakterie *Escherichia coli*, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, hlístice *Caenorhabditis elegans*, octomilka *Drosophila melanogaster*, zebřička *Danio rerio*, myš *Mus musculus* (Lederberg a kol. 1996; Barnett a kol., 2007). Na modelovém organismu *Danio rerio* byl u prvního vytvořeného modelu lidského onemocnění definován mutantní gen *ALAS-2*, který zodpovídá za poruchu krve a tvorbu hemoglobinu (Brownlie a kol., 1998).

Některé informace mohou být získány nejen z *in vivo* testů na živočišných organizmech, ale mohou být poskytnuty i z testů *in vitro* z různých buněčných linií. U většiny modelových systémů je důležité mít možnost současně manipulovat s více geny najednou, tak aby byl co nejpřesněji simulován stav vybraného onemocnění (Ciriello a kol., 2013).

Na prvním haploinsuficientním buněčném modelu charakteristickém pro Diamond-Blackfanovu anémii byla k umlčení ribozomálního proteinu 7 (RPS7) použita siRNA, která byla připravena pomocí T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi systému. Příprava siRNA spočívala ve dvou krocích, nejprve *in vitro* transkripci z T7 promotoru vznikly sense a antisense řetězce a ty byly na základě jejich komplementarity spojeny (annealovány). Na základě dostupných publikací od Elbashir a kol., 2001 a Donze a kol., 2002 byly na transfekci molekulami siRNA použity buněčné modely - lidské buňky HeLa a HEK-293. Na transfekci buněk bylo použito více transfečních kitů a to konkrétně Lipofectamin RNAiMAX reagent (Invitrogen) (Zhao a kol., 2008), jetPrime transfeční kit (Polyplus) (Nikala a kol., 2016) a X-tremeGENE 9 siRNA transfeční kit (Roche) (Elbashir a kol., 2001). Právě poslední zmíněný zajistil u obou buněčných linií snížení exprese genu *RPS7* o 35 % - 59 %.

siRNA za účelem umlčení vybraného genu lze použít kromě lidských buněčných linií i přímo u některých modelových organizmů - *Caenorhabditis elegans* (Fraser a kol., 2000) a *Drosophila melanogaster* (Clemens a kol., 2001).

U komplikovanějšího a sofistikovanějšího buněčného haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie byl použit multicistronický lentivirový expresní systém (MuLE) založený na klonovací technologii Gateway (Multiple Lentiviral Expression System Kit, Addgene). Tvůrci tohoto expresního kitu vytvořili 104 vektorů pro klonování různých inzertů (sgRNA, shRNA, cDNA, hCas9) prostřednictvím restričních endonukleáz. Do jednoho z těchto vektorů byly klonovány pozměněné wild type a mutantní sekvence genu *RPS7*, jejichž exprese byla řízena inducibilním promotorem CMV/TO. Do dalšího vektoru,



který byl uzpůsoben k inducibilnímu spuštění exprese shRNA (promotor H1), byla klonována navržená shRNA sekvence syntetizovaná z jednovláknových DNA oligonukleotidů (Addgene). Součástí kitu byly i vektory se zaklonovaným genem pro fluorescenční protein tdTomato a genem pro puromycinovou rezistenci. Všechny tyto 4 inzerty (cDNA, shRNA, tdTomato, Pur) byly přeneseny klonázovou reakcí do destinačního vektoru s fluorescenčním reportérem eGFP. Úspěšnost LR rekombinační reakce (LR Clonase II Plus enzyme, Thermo Scientific) závisí na počtu rekombinovaných sekvencí do destinačního vektoru. Tzn., že při rekombinaci 2 sekvencí je zisk destinačního vektoru s těmito inzerty 90%, při rekombinaci 3 sekvencí se úspěšnost takto získaných vektorů snižuje na 65 % a v našem případě při rekombinování 4 sekvencí je účinnost na pouhých 25 % (Albers a kol., 2015). Embryonální buňky HEK293T/17 byly transfekovány vzniklým destinačním vektorem se zabalovacími lentivirovými plazmidy psPAX2 a pMD2.G za vzniku lentivirů. Lidské buňky osteosarkomu U2OS byly těmito lentiviry s destinačním vektorem transdukovány. V dalších studiích bude proto nutné zlepšit účinnost transdukce U2OS buněk lentiviry, protože úspěšnost transdukce buněk U2OS lentiviry obsahující expresní systém proběhla pouze na 37 %.

Po integraci expresního systému do buněk U2OS by mělo následovat spuštění exprese shRNA proti nativnímu genu *RPS7* pomocí induktoru doxycyklinu a následně pomocí tetracyklinu spuštěna exprese WT a M sekvence genu *RPS7* se zaměněnými kodony. Simultánní exprese těchto dvou sekvencí by měla vést k tvorbě haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie. Změny v expresi genu *RPS7* by byly měřeny stejným způsobem jako je tomu v jednoduchém haploinsuficientním buněčném modelu v kapitole 4.5. Při spuštění exprese WT a M sekvence s pozměněnými kodony by se měly detekovat fenotypové změny typické pro Diamond-Blackfanovu anémii, a to především v jádérku buněk.

Pouze 37% úspěšnost transdukce U2OS buněk lentiviry mohla mít více příčin. Při tvorbě expresního vektoru nebyl použit na izolaci všech plazmidů kit odstraňující endotoxiny (EndoFree Plasmid Kit, Qiagen), které by mohly mít vliv na výtěžek virů. Kritickými faktory pro tvorbu lentivirů jsou reakční podmínky, velikost expresního vektoru určeného k přenosu a transfekční metody. V průběhu transfekce HEK293T/17 nesmí dojít ke snížení pH v DMEM médiu (žlutá barva). Dále má vliv na účinnost produkce lentivirů velikost transfekčního lentivirového destinačního vektoru, tzn. 9 kbp vektor je zabalen do virů snáze než vektor 15 kbp (Logan a kol., 2004; Sena-Esteves a kol., 2004; Mitta a kol., 2005). Pro zvýšení tvorby lentivirů je možné vyzkoušet i jiné transfekční metody, které by mohly zajistit vyšší účinnost vzniku lentivirů. Například firma ATCC doporučuje protokol TransfeX založený na stejném principu jako transfekční kit X-tremeGene 9. Dále je možné použít kalcium fosfátovou

transfekci, která je založena na přenosu DNA do buněk pomocí sraženiny s kladně nabitým vápníkem a záporně nabitými fosfáty (Yacoub a kol., 2007) nebo je DNA přenášena pomocí lipozomů prostřednictvím Lipofectamine 2000 (Logan a kol., 2004).

V důsledku nedostatku množství proteinu RPS7 je narušena biogeneze malé eukarytické ribozomální podjednotky 40S, a tím je narušena celá tvorba ribozomů. Na správnou syntézu ribozomů dohlíží protein p53 (Wool, 1979; Lane, 1992). Chyby v syntéze ribozomů jsou viditelné jak ve struktuře jádérka, tak i na úrovni transportu ribozomálních podjednotek (James a kol., 2014). Na vizualizaci abnormální struktury jádérka v důsledku RNA interference lze v lidských buňkách použít techniku nepřímé imunofluorescence jadérekových proteinů. Jadérekové proteiny jako jsou např. fibrillarin a nukleolin se významně podílí na procesu tvorby pre-rRNA při biogenezi ribozomů (Newton a kol., 2003).

K metodám analýzy změn (snížení/zvýšení) exprese určitého genu pro daný protein slouží kromě imunofluorescenčního značení jádrekových změn zejména real-time PCR a western blot na proteinové úrovni. Při real-time PCR je detekce množství cDNA umožněna přítomností fluorescenčního reagentu (např. Eva green). Následná kvantifikace je prováděna buď častější relativní kvantifikací nebo kvantifikací absolutní založené na kalibrační křivce. Pro kvantifikaci je nutné vyhodnotit vnitřní kontrolu (např.: GAPDH, aktin). Analytická technika western blot slouží k detekování účinku siRNA nebo shRNA na vznik vybraného proteinu ve vzorku.

Z vektorů součástí MuLE expresního kitu lze vytvořit tricistronický, tetracistronický a pentacistronický lentivirový expresní vektor. Například tricistronický vektor pLenti-CMV-TetR-Blast byl navržen tak, aby byla současně exprimována shRNA proti myšimu genu *Trp53* (analog tumor supresorového genu *p53* u člověka) a protoonkogen *H-Ras<sup>G12V</sup>* z indukibilního promotoru CMV/TO. Kontrolním reportérem pro sledování tvorby nádoru byl fluorescenční protein iRFP. Tímto lentivirovým plazmidem byla transdukována myší buněčná linie fibroblastů (MEFs). Analýza western blotem prokázala snížení proteinu p53 a exprese proteinu *H-Ras<sup>G12V</sup>* byla vyvolána po přidání induktoru - doxycyklin. Doxycyklin je tetracyklinové antibiotikum, které spolehlivě ničí grampozitivní/gramnegativní bakterie a indukuje expresi shRNA molekul. Fibroblastové buňky MEFs rostly jako nádorové až pouze po přidání doxycyklinu (Campeau a kol., 2009). Na doxycyklin indukibilním promotoru byla navržena i shRNA k umlčení genu *RPS7* na tvorbu DBA modelu.

Multicistronický expresní systém by mohl mít velký potenciál v novodobém odvětví genového inženýrství. Ke svému zviditelnění byl vytvořen pentacistronický vektor, z kterého byla simultánně exprimována shRNA proti tumor supresorovému genu retinoblastomu (*Rb1*)

a shRNA proti fosfátovému a tenzinovému homologu (*Pten*). Zbývajícími geny, které se z pentacistronického vektoru exprimovaly byl gen *H-Ras<sup>G12V</sup>*, *CreER<sup>2</sup>* a gen pro puromycinovou rezistenci. Vyprodukované lentiviry s pentacistronickým vektorem transdukovaly buněčnou linii myších fibroblastů (MEFs). Pomocí western blotu byla detekována snížená exprese proteinu Rb1, Pten i p53 a naopak nadměrná exprese proteinu H-Ras<sup>G12V</sup>. Na vizuální kontrolu byly buňky dodatečně transdukovány vektorem s fluorescenčním proteinem eGFP (Albers a kol., 2015).

Z dostupných publikací od Platt a kol., 2014; Sanchez-Rivera a kol., 2014a Xue a kol., 2014 vyplývá velká výhoda použití tohoto systému v použití *in vivo* v myších modelech. MuLE systém by se mohl stát ideální experimentální platformou pro tvorbu vektorů, které by umožnily simultánně manipulovat s více sekvencemi najednou použitím technologie CRISPR/Cas9. Na základě této iniciativy byl vytvořen tetracistronový vektor určený k expresi genu *H-Ras<sup>G12V</sup>*, genu *hCas9*, genu pro puromycinovou rezistenci a k expresi sgRNA zaměřené na oblast exonu 7 nebo 8 genu *Trp53*. Vzniklé viry s exprimující se sgRNA proti *Trp53* a s exprimujícím se genem *H-Ras<sup>G12V</sup>* vedla k tvorbě nádorů (Sanchez-Rivera a kol., 2014).

Vektory multicistronického lentivirového expresního kitu lze nejen použít ke studiu a k tvorbě modelů nádorových a dalších onemocnění, ale jsou potenciálním příslibem pro genovou terapii somatických buněk přímo na myších. Otázkou budoucnosti by mohlo být jejich využití i na jiných savcích. Na základě studií Aiuti a kol., 2013 a Biffi a kol., 2013 byla prokázána bezpečnost těchto lentivirových vektorů během genové terapie. Hlavní výhoda tohoto expresního systému spočívá ve schopnosti manipulovat s genetickým materiálem primárních savčích buněk. K manipulacím patří jak schopnost indukovat expresi vybraného genu, tak pomocí shRNA umlčet vybraný cílový gen.

## 7 ZÁVĚR

Jednoduchý model haploinsuficience pro Diamond-Blackfanovu anémii byl vytvořen prostřednictvím syntetizované siRNA molekuly, která sloužila k umlčení exprese ribozomálního proteinu 7 u lidských buněčných linií HeLa a HEK-293. Při použití 0,4 µg siRNA byla snížena exprese genu *RPS7* o 46 %, při aplikaci 2,5 µg siRNA o 50 % a při použití 5 µg siRNA o 58%. U buněk HEK-293 byla snížena exprese genu *RPS7* o 35 % při použití 0,4 µg siRNA, o 53 % při 2,5 µg siRNA a o 59 % při aplikaci 5 µg siRNA. V případě tvorby haploinsuficientního modelu na HeLa nebo i HEK-293 buňkách by bylo použito 2,5 µg siRNA.

Složitější a sofistikovanější haploinsuficientní model Diamond-Blackfanovy anémie byl tvořen pomocí multicistronického lentivirového expresního systému. V navrženém systému byla pro dosažení haploinsuficience navržena shRNA proti ribozomálnímu proteinu 7, kde byl použit indukibilní promotor H1. Součástí navrženého systému byla wild typová a mutantní sekvence genu *RPS7*, jehož exprese je řízena indukibilním promotorem CMV/TO. Na základě optimalizačních reakcí transfekce bylo při transfekci HEK293T/17 buněk prázdným plazmidem pMuLE Lelni Dest eGFP (9 158bp) dosaženo 84% úspěšnosti prostřednictvím jetPrime transfekčního kitu (1:3). Taky při transfekci HEK293T/17 buněk expresním plazmidem pMuLE Lelni Dest eGFP (14 658bp) bylo dosaženo 89% úspěšnosti prostřednictvím jetPrime transfekčního kitu (1:3). Úspěšnost transdukce U2OS buněk byla na 37 %.

Finální tvorba haploinsuficientního modelu Diamond-Blackfanovy anémie nebyla pomocí multicistronického lentivirového expresního systému na základě experimentální části dokončena. Na celém systému se z důvodu jeho časové náročnosti a potenciálu stále pracuje.

## 8 LITERATURA

- Abbott A (2004) Geneticists prepare for deluge of mutant mice *Nature* 432: 541.
- Aboobaker A. A., Blaxter M. L. (2000): Medical significance of *Caenorhabditis elegans*. *Ann Agrawal N.*, (2003): RNA interference: Biology, mechanism and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 657–85.
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., ... Naldini, L. (2013). Lentivirus-based Gene Therapy of Hematopoietic Stem Cells in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148), 1233-1251.
- Albers, J., Danzer, C., Rechsteiner, M., Lehmann, H., Brandt, L. P., Hejhal, T., ... Frew, I. J. (2015): A versatile modular vector system for rapid combinatorial mammalian genetics. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(4), 1603–1619.
- Allen T. D. (2016): “A Computational Strategy for Effective Gene Silencing through siRNAs,” *The Mathematica Journal*.
- Almeida R, Allshire R. C. (2005): RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol* 15: 251–258.
- Alter B. P., Young N. S. (1998): The bone marrow failure syndromes. In: Nathan D.G., Orkin H.S., editors. *Hematology of Infancy and Childhood*. Volume 1. Saunders; Philadelphia, PA: 237–335.
- Amarzguioui M., Lundberg P., Cantin E., Hagstrom J., Behlke M. A., Rossi J. J. (2006): Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat Protocols* 1: 508–517.
- Amsterdam A, Hopkins N. (2006): Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet.*;22(9):473–478.
- Andrew G. Fraser, Ravi S. Kamath, Peder Zipperlen, Maruxa Martinez-Campos, Marc Sohrmann a Julie Ahringer (2000): Functional genomic analysis of *Caenorhabditis elegans* chromosome I by systematic RNA interference, *Nature* 408, 325-330.
- Barnett J. (2007): A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics. *Yeast* 24: 799–845.
- Bartel D. P., Chen C. Z. (2004): Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Rev. Genet.* 5, 396–400.
- Baulcombe D. C. (1996): RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 32, 79–88.

- Baulcombe D. C. (2001): Fast forward genetics based on virus induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 109-113.
- Bernard P., Couturier M. (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* 226, 735-745.
- Bernards A., Hariharan I. K. (2001): Of flies and men—studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11: 274–278.
- Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.
- Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S, Benedicenti F, Vallanti G, Biasco L, Leo S, Kabbara N, Zanetti G, Rizzo WB, Mehta NA, Cicalese MP, Casiraghi M, Boelens JJ, Del Carro U, Dow DJ, Schmidt M, Assanelli A, Neduva V, Di Serio C, Stupka E, Gardner J, von Kalle C, Bordignon C, Ciceri F, Rovelli A, Roncarolo MG, Aiuti A, Sessa M, Naldini L (2013): Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*. 2013;341(6148):1233158.
- Bill B. R., Petzold A. M., Clark K. J., Schimmenti L. A., Ekker S. C. (2009): A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6: 69–77.
- Birling, M.-C., Herault, Y., & Pavlovic, G. (2017). Modeling human disease in rodents by CRISPR/Cas9 genome editing. *Mammalian Genome*, 28(7), 291–301.
- Bommer U.A., Stahl J., Henske A., Lutsch, G., Bielka H. (1988): Identification of proteins of the 40 S ribosomal subunit involved in interaction with initiation factor eIF-2 in the quaternary initiation complex by means of monospecific antibodies. *FEBS Lett.* 233, 114–118.
- Boulwood J, Pellagatti A, Cattani H, Lawrie CH, Giagounidis A, Malcovati L, Della Porta MG, Jadersten M, Killick S, Fidler C, Cazzola M, Hellstrom-Lindberg E, Wainscoat JS. (2007): Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q– syndrome. *British Journal of Haematology* 139: 578–589.
- Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. (2006): Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12: 585-91
- Brownlie A, Donovan A, Pratt SJ, Paw BH, Oates AC, et al. (1998) Positional cloning of the zebrafish sauterne gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nat Genet* 20: 244-250.

- Campeau E, et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One*. 2009;4(8):e6529.
- Caplen N. J., Alton EFWF., Middleton PG. (1995): Liposome mediated CFTR gene transfer to a nasal epithelium of patient with cystic fibrosis. *Nat MED* 1: 39-46.
- Cavazzana-Calvo M., Thrasher A., Mavilio F. (2004): The future of gene therapy. *Nature* 427: 779-81.
- Ciriello G., Miller M. L., Aksoy B. A., Senbabaoglu Y., Schultz N., Sander C. (2013): Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet.* 45 (10): 1127–1133.
- Cmejla R., Cmejlova J., Handrkova H., Petrak J., and Pospisilova D. (2007): Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* 28, 1178–1182.
- Cmejla R., Cmejlova J., Handrkova H., Petrak J., Pospisilova D. (2007): Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* 28: 1178–1182.
- Cogoni C, and Macino G. (2000): Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Genes Dev* 10: 638-643.
- Cogoni C., Irelan J. T., Schumacher M., Schmidhauser T. J., Selker E. U., Macino G. (1996): Transgene silencing of *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interaction or DNA methylation. *EMBO J.* 15: 3153–3163.
- Corey, D. R., & Abrams, J. M. (2001): Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biology*, 2 (5), 1015.1–1015.3.
- Crystal, Ronald G.: “In vivo and ex vivo gene therapy strategies to treat tumors using adenovirus gene transfer vectors.” SpringerLink. Springer-Verlag, n.d. Web. 24 Apr. 2017
- Czauderna F., Fechtner M., Dames S., Aygun H., Klippel A., Pronk G. J., Giese K., Kaufmann J. (2003): Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31: 2705–2716.
- Davidson B. L., McCray P. B. (2011): Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat. Rev. Genet.* 12 (5): 329–40.
- Deng Y., Wang, CC., Choy KW., Du Q., Chen J., Wang Q. (2014): Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene* 538: 217–227.

- Dollins C. M., Nair S., Sullenger B. A. (2008): Aptamers in immunotherapy. *Human Gene Therapy*, 19 (5): 443-450.
- Donze O., Picard D. (2002): RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase, *Nuc. Acids Res.* 30, e46.
- Dow L. E., Lowe S. W. (2012): Life in the fast lane: mammalian disease models in the genomics era. *Cell* 148 (6): 1099–1109.
- Draptchinskaia N., Gustavsson P., Andersson B., Pettersson M., Willig T.N., Dianzani I., Ball S., Tchernia G., Klar J., Matsson H. (1999): The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* 21, 169–175.
- Draptchinskaia N., Gustavsson P., Andersson B., Pettersson M., Willig T. N., Dianzani I., Ball S., Tchernia G., Klar J., Matsson H. (1999): The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* 21: 169–175.
- Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR. (2008): Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451: 335–339.
- Elbashir S. M. (2001c): Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877–88.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498
- Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188–200.
- Farrar J.E., Nater M., Caywood E., McDevitt M.A., Kowalski J., Takemoto C.M., Talbot C.C., Jr., Meltzer P., Esposito D., Beggs A.H. (2008): Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 112: 1582–1592.
- Fattal E, Bochot A. (2006): Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 1203–1223.
- Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–11.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C. elegans*. *Nature* 391: 806–811.



- Foury F (1997): Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195: 1–10.
- Foury F. (1997): Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195: 1–10.
- Friedmann T. A brief history of gene therapy. *Nature Genetics* 2: 93-98
- Gasper HB., Thrasher AJ. (2005): Gene therapy for severe combined immunodeficiencies. *Expert Opin Biol Ther* 9: 1175-82.
- Gawrylewski, A. (2007): The Trouble with Animal Models. *The Scientist*, 21 (7), 44.
- Gawrylewski, A. (2007): The Trouble with Animal Models. *The Scientist*, 21 (7), 44.
- Gazda H.T., Grabowska A., Merida-Long L.B., Latawiec E., Schneider H.E., Lipton J.M., Vlachos A., Atsidaftos E., Ball S.E., Orfali K.A. (2006): Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1110–1118.
- Gazda H.T., Grabowska A., Merida-Long L.B., Latawiec E., Schneider H.E., Lipton J.M., Vlachos A., Atsidaftos E., Ball S.E., Orfali K.A. (2006): Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 1110–1118.
- Gazda H.T., Zhong R., Long L., Niewiadomska E., Lipton J.M., Ploszynska A., Zaucha J.M., Vlachos A., Atsidaftos E., Viskochil D.H. (2004): RNA and protein evidence for haploinsufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with RPS19 mutations. *Br. J. Haematol.* 127, 105–113.
- Greek, R., Shanks, S. (2009): *Animal Models in Light of Evolution*. Boca Raton, FL: BrownWalker Press.
- Greek, R., Shanks, S. (2009): *Animal Models in Light of Evolution*. Boca Raton, FL: Brown Walker Press.
- Gregory L.A., Aguisa-Toure A.H., Pinaud N., Legrand P., Gleizes P.E., Fribourg S. (2007): Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: Structure and function analysis of RPS19. *Nucleic Acids Res.* 35, 5913–5921.
- Gregory R. I. (2004): Microprocessor complex mediates the genesis of miRNAs. *Nature* 432, 235-240.
- Hamilton A. J., Baulcombe D. C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952.
- Hamilton A. J., Baulcombe D. C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952.
- Hammond S. M., Caudy A. A., Hannon G. J. (2001) Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA. *Nature Rev Gen* 2: 110-119.

- Han J., Kim D., Morris K.V. (2007): Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 12422–12427.
- Hanna, E., Rémuzat, C., Auquier, P., Toumi, M. (2017): Gene therapies development: slow progress and promising prospect. *Journal of Market Access Health Policy*, 5 (1), 1265293.
- Hawkins P. G., Santoso S., Adams C., Anest V., Morris K. V. (2009): Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res.*, 2984–2995.
- Hayes, J, Peruzzi, PP and Lawler, S (2014): MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 20: 460–469.
- Holtorf H., Schob H., Kunz C., Waldvogel R. and Meins F. Jr. (1999): Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase genes involves increased RNA turnover-possible role for ribosome-independent RNA degradation. *Plant Cell*, 11, 471–484
- Huang N., Lee I., Marcotte E. M., Hurles M. E. (2010): Characterising and Predicting Haploinsufficiency in the Human Genome. *PLoS Genet* 6 (10): 1001154.
- Hu-Lieskovan S., Heidel J. D., Bartlett D. W., Davis M. E., Triche T. J. (2005): Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65: 8984–8992.
- Chan H. Y., Bonini N. M. (2000): Drosophila models of human neurodegenerative disease. *Cell Death Differ* 7: 1075–80.
- Choemmel V., Fribourg S., Aguisa-Toure A. H., Pinaud N., Legrand P., Gazda H.T., Gleizes P.E. (2008): Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1253–1263.
- Chu T. C., Twu K. Y., Ellington A. D., Levy M. (2006): Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 34: 73.
- James C. Clemens, Carolyn A. Worby, Nancy Simonson-Leff, Marco Muda, Tomohiko Maehama, Brian A. Hemmings, and Jack E. Dixon (2000): Use of double stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways, *PNAS* 97 (12), 6 499- 6 503.

- Jinek M., Doudna J. A. (2009): A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457 (7228): 405–12
- K. Newton, E. Petfalski, D. Tollervey, J.F. Caceres (2003): Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse, *Mol. Cell Biol.* 23, 8519–8527.
- Kacser, H., and J. A. Burns (1981): The molecular basis of dominance. *Genetics* 97: 639–666.
- Katzen F. (2007): Gateway recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov* 2 (4): 571–589.
- Kim D. H., Behlke M. A., Rose S. D., Chang M. S., Choi S., Rossi J. J. (2005): Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23:222–226.
- Kim D. H., Rossi J. J. (2007): Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8: 173-184.
- Kim D. H., Rossi J. J. (2008): RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* 44 (5): 613–616.
- Kim D. H., Villeneuve L. M., Morris K. V., Rossi J. J. (2006): Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol.* 13 (9): 793-7
- Kloosterman W. P.; Lagendijk A. K.; Ketting R. F.; Moulton J. D.; Plasterk R. H. A. (2007): "Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development". *PLoS Biol.* 5 (8): 203.
- Kohn DB. (1995): Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1: 1017-1023.
- Koutsilieric E, Rethwilm A, Scheller C. (2007): The Therapeutic potential of siRNA in gene therapy of neurodegenerative disorder. *J Neural Transm Suppl* 72: 43-49
- Kumar P., Wu H., McBride J. L., Jung K. E., Kim M. H., Davidson B. L., Lee S. K., Shankar P., (2007): Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448: 39–43.
- Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y., & Leung, S. W. S. (2015): siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 4(9), e252–
- Lan CC, Leong IU, Lai D, Love DR (2011): Disease modeling by gene targeting using microRNAs. *MethodsCell Biol.*;105:419–436.
- Lane D. P. (1992): Cancer p53 guardian of the genome. *Nature* 358: 15 - 16.

- Langheinrich U. (2003): Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays* 25 (9): 904–912.
- Latchman D. S. (1994): Herpes simplex virus for gene therapy. *Mol Biotechnol* 2 (2): 179–195.
- Lawrence M. S. (2014): Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505 (7484): 495–501.
- Lederberg J.(1996): Genetic recombination in *Escherichia coli*: disputation at Cold Spring Harbor, Genetics;144:439–43.
- Lee R. C., Feinbaum R. L. and Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.
- Lee Y. (2003): The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Leonard J. N., Schaffer D. V. (2006): Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target. *Gene Ther* 13: 532–540.
- Levine BL, Humeau LM, Boyer J. (2006): Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natle Acad Sci USA* 103: 17372-7.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M., Song J. J., Hammond S. M., Joshua-Tor L. (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437–41.
- Liu J., Valencia-Sanchez M. A., Hannon G. J., Parker R. (2005): MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biol.* 7, 719–723.
- Logan A. C., Nightingale S. J., Haas D.L., Gho G.J., Pepper K. A. Kohn D. B. (2004): Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *HUm Gene Ther* 15: 976 – 988.
- Lu M., Zhang Q., Deng M., Miao J., Guo Y. (2008): An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS ONE* 3 (10): 3420.
- MacDonald C. Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Crit Rev Biotechnol.* 1990;10:155–78
- MacFarlane L. A.,Murphy P. R. (2010): MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr. Genomics* 11(7): 537–61.

- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA. (2008): Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2240-8.
- Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563–574.
- Matzke M. A., Primig M., Trnovsky J. and Matzke A.J.M. (1989): Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.*, 8, 643–649.
- McNamara J.O. II, Andrechek E. R., Wang Y., Viles K. D., Rempel R. E., Gilboa E., Sullenger B. A., Giangrande P. H. (2006): Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24: 1005–1015.
- Med 32: 23–30.
- Med 32: 23–30.
- Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. (2004): Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15: 185–197.
- Meister G., Tuschl T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349
- Miller D. A. (1992): Human gene therapy comes of age. *Nature* 375: 455-460.
- Ming Zhao, Hong Yang, Xingjun Jiang, Wen Zhou, Bin Zhu, Ying Zeng, Kaitai Ya, Caiping Re (2008): Lipofectamine RNAiMAX: An Efficient siRNA Transfection Reagent in Human Embryonic Stem Cells, *Mol. Biotechnol* 40 (1): 19-26.
- Mitta B., Rimann M., Fussenegger M. (2005): Detailed design and comparative analysis of protocols for optimized production of high performance HIV-1-derived lentiviral Particles. *Metab Eng* 7: 426 – 436.
- Morris K. V. (2009b): Non-coding RNAs, epigenetic memory and the passage of information to progeny. *RNA Biol.* 6: 242–247.
- Morris K. V., Chan S. W., Jacobsen S. E., Looney D. J. (2004): Small interfering RNA induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 305, 1289–1292.
- Morrissey D. V., Lockridge J. A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L. (2005): Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23: 1002–1007.
- Moulton JD., Yan YL. (2008): Using Morpholinos to control gene expression. *Current protocols in molecular biology*. Chapter 26 p. 28, Unit 26.

- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–89.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990): Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289.
- Nasevicius A, Ekker SC. (2000): Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nat Genet* 26: 216–220.
- Nasevicius A., Ekker S. C. (2000): Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nat Genet.* 26: 216–220.
- National Research Council (US) Committee on Scientific and Humane Issues in the Use of Random Source Dogs and Cats in Research. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009.
- National Research Council. (2009): Scientific and Humane Issues in the use of Random Source Dogs and Cats in Research. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nikaïa Smith, Pierre-Olivier Vidalain, Sébastien Nisole a Jean-Philippe Herbeuval (2016): An efficient method for gene silencing in human primary plasmacytoid dendritic cells: silencing of the TLR7/IRF-7 pathway as a proof of concept, *Scientific Reports* 6, 29891.
- Orban T. I., Izaurralde E. (2005): Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11, 459–469.
- Orfali K.A., Ohene-Abuakwa Y., Ball S.E. (2004): Diamond Blackfan anaemia in the UK: Clinical and genetic heterogeneity. *Br. J. Haematol.* 125, 243–252.
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K. (2006): Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12: 401-409.
- Pardridge WM. (2005): Tyrosine Hydroxylase Replacement in Experimental Parkinson’s disease with Transvascular gene therapy. *Neuro Rx* 2: 129-138.
- Parg, C. (2002): *Assay Drug Develop. Technol.* 2002, 1, 41–48.
- Partridge M. Vincent A. Matthews P. Puma J. Stein D. Summerton J. (1996): A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6: 169–175.

- Peng Z. (2005): Current status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Human Gene Therapy* 16: 1016-1027.
- Perwitasari, O, Bakre, A, Tompkins, SM and Tripp, RA (2013): siRNA Genome Screening Approaches to Therapeutic Drug Repositioning. *Pharmaceuticals (Basel)* 6: 124–160.
- Pierce EA, Liu Q, Igouchera O, Dmarrudin R, Ma H, Diamond SL. (2003): Oligonucleotide-directed single base DNA alteration in mouse embryonic stem cells. *Gene Therapy* 10: 24-33.
- Pippin, J. (2009): Humane Seal Fact Sheet on Animal Experimentation. PCRM.
- Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., ... Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell*, 159(2), 440–455.
- Postlethwait J., Amores A., Cresko W., Singer A., Yan YL. (2004): Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet.* 20 (10): 481–490
- Preall J. B., Sontheimer E. J. (2005): RNAi: RISC gets loaded. *Cell* 123, 543–245.
- Preall J. B., Sontheimer E. J. (2005): RNAi: RISC gets loaded. *Cell* 123, 543-245.
- Rochat T, Morris MA. (2002): Viral vector for gene therapy. *J Aerosol Med* 15: 229-235.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K. (1990): "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction". *The New England Journal of Medicine.* 323 (9): 570–8.
- Rosenthal N., Brown S. (2007): The mouse ascending: perspectives for human-disease models, *Nature Cell Biology* 9, 993 – 999.
- Rubinstein A. L. (2003): Zebrafish: from disease modeling to drug discovery *Curr Opin Drug Discov Devel* 6: 218–23.
- Sánchez-Rivera, F. J., Papagiannakopoulos, T., Romero, R., Tammela, T., Bauer, M. R., Bhutkar, A., ... Jacks, T. (2014). Rapid modeling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature*, 516(7531), 428–431.
- Sayda M. Elbashir, Jens Harborth, Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber, Thomas Tuschl (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411, 494–498.
- Sena-Esteves M., Tebbetes J.C., Steffens S., Crombleholme T., Flake A.W. (2004): Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virol Methods* 122: 131- 139.

- Sibbald B. (2001): Death but one unintended consequence of gene therapy trial. *CMAJ* 164: 1612.
- Silva, J. M. (2005): Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature Genet.* 37, 1281–1288.
- Simmons, D. (2008): The use of animal models in studying genetic disease: transgenesis and induced mutation. *Nature Education* 1(1):70
- Song E., Zhu P., Lee S. K., Chowdhury D., Kussman S., Dykxhoorn D. M., Feng Y., Palliser D. (2005): Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23: 709–717.
- Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A. (2004): Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432:173–178.
- Svoboda P. (2007): Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells. *Curr Opin Mol Ther* 9: 248–257.
- Tang G. (2005): siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 30: 106–114.
- Thorstensen, K. and Romslo, I. (1990): The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake, *Biochem. J.* 271, 1-10.
- Timme-Laragy A. R., Karchner S. I., Hahn M. E. (2012): Gene knockdown by morpholino-modified oligonucleotides in the zebrafish model: applications for developmental toxicology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 889, 51–71.
- Ting A., Schuebel K. E., Herman J. G., Baylin S. B., (2005): Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat. Genet.* 37: 906–910.
- Tolentino M. (2006): Interference RNA technology in the treatment of CNV. *Ophthalmol Clin North Am* 19: 393–399.
- Van der Krol A. R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N. and Stuitje A.R. (1990): Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2, 291–299.
- Vorburger SA, Hunt KK. (2002): Adenoviral gene therapy. *The Oncologist* 7: 46-59.
- Walther W, Stein U. (2000): Viral vector for gene transfer: a review of their use in the treatment of human disease. *Drug* 60: 249-271.



- Willig T. N., Niemeyer C.M., Leblanc T., Tiemann C., Robert A., Budde J., Lambiliotte A., Kohne E., Souillet G., Eber S. (1999): Identification of new prognosis factors from the clinical and epidemiologic analysis of a registry of 229 Diamond-Blackfan anemia patients. DBA group of Societe d'Hematologie et d'Immunologie Pediatrique (SHIP), Gesellschaft fur Padiatrische Onkologie und Hamatologie (GPOH), and the European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI) *Pediatr. Res.* 46: 553–561.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P. (1990): Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-68.
- Wool I. G. (1979): The structure and function of eukaryotic ribosomes; 27 (1): 41-55.
- Wool I.G. (1979): The structure and function of eukaryotic ribosomes; 27 (1): 41-55.
- Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N. S., ... Jacks, T. (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 514(7522), 380–384.
- Yekta, S., Shih, I. H. & Bartel, D. P. (2004): MicroRNA-directed cleavage of Hoxb8 mRNA. *Science* 304, 594–596
- Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen, B. R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.
- Yu J. Y., DeRuiter S. L., Turner D. L. (2002): RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, pp. 6047-6052
- Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel D. P. (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATPdependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33.
- Zhang H., Kolb F. A., Jaskiewicz L., Westhof E. Filipowicz W. (2004): Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *118: 57–68.*
- Zhang W. (2005): Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral *NS1 gene*. *Nature Med.* 11, 56–62.
- Zimmermann T. S., Lee A. C., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M. N., Harborth J., Heyes J. A. (2006): RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111–114.