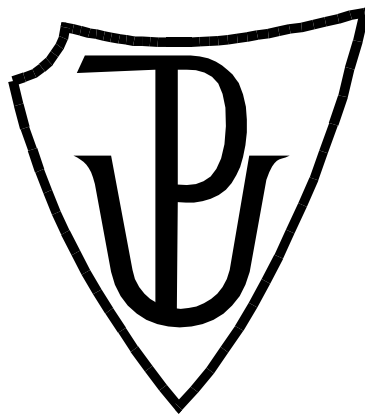


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Olomouc 2024**

**Hana Jančíková**



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Inhibice genové exprese prostřednictvím  
CRISPR interference**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Hana Jančíková</b>
Studijní program:	B0511A030017 Experimentální biologie
Studijní obor:	1501R019 Experimentální biologie
Specializace:	1501R019/01 Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Agáta Kubíčková, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2024

## Bibliografická identifikace

Jméno a přímení autora	Hana Jančíková
Název práce	Inhibice genové exprese prostřednictvím CRISPR interference
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Agáta Kubíčková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Bakalářská práce shrnuje teoretické poznatky o podstatě CRISPR jakožto imunitního systému, dále jeho využití k cílené editaci genomu a CRISPR/dCas9 systému k regulaci genové exprese. Práce rovněž popisuje jiné techniky, kterými lze dosáhnout cílené editace genomu, nebo regulace transkripce. Dále se zabývá vlivem nukleosidového derivátu PNH192 na nádorové buněčné linie, u kterých došlo k inhibici genové exprese prostřednictvím CRISPR interference, přičemž byly identifikovány molekulární cíle nukleosidového derivátu PNH192, který má silné antineoplastické vlastnosti. V práci popisujeme provedený celogenomový screening za použití CRISPR interference, ověření exprese dCas9 proteinu a sgRNA u buněčné linie selektované nukleosidovým derivátem PNH192.</p>
Klíčová slova	CRISPR interference, CRISPR/dCas9, identifikace molekulárních cílů, PNH192, regulace transkripce
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Hana Jančíková
Title of thesis	Inhibition of gene expression through CRISPR interference
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Agáta Kubíčková, Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>The bachelor thesis summarizes the theoretical knowledge about the fundamentals of CRISPR as an immune system, its use for targeted genome editing and the CRISPR/dCas9 system to regulate gene expression. The thesis also describes other techniques that can be used to achieve targeted genome editing or regulation of transcription. Furthermore, it discusses the effect of the nucleoside derivative PNH192 on cancer cell line in which gene expression has been inhibited through CRISPR interference, and the molecular targets of the nucleoside derivative PNH192, which has potent antineoplastic properties, have been identified. This thesis describes the whole-genome screening performed using CRISPR interference, validation of dCas9 protein and sgRNA expression in a cell line selected by the nucleoside derivative PNH192.</p>
Keywords	CRISPR interference, CRISPR/dCas9, molecular targets identification, PNH192, transcription regulation
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí Mgr. Agáty Kubíčkové, Ph.D. za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 30.4.2024

.....  
Hana Jančíková

### **Poděkování:**

Vznik bakalářské práce byl podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Evropská infrastruktura translační medicíny EATRIS-CZ-LM2023053 a Národním ústavem pro výzkum nádorů - program EXCELES, ID projektu č. LX22NPO5102, financovaný Evropskou unií - Next Generation EU).

Ráda bych poděkovala zejména své vedoucí práce Mgr. Agátě Kubíčkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, trpělivost, cenné rady a věnovaný čas při vypracování bakalářské práce. Dále děkuji Ing. Rastislavu Slavkovskému, Ph.D. a Mgr. Patřicií Žižkovičové za zpracování NGS výsledků a celému kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny za vstřícnost a ochotu při zpracování experimentální části bakalářské práce. Taktéž bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za oporu během celého bakalářského studia.

# OBSAH

1	Úvod .....	9
2	Cíle práce .....	10
3	Současný stav řešené problematiky .....	11
3.1	Prokaryotní imunitní systém .....	11
3.1.1	CRISPR/Cas systémy .....	12
3.2	Editace genomu.....	13
3.2.1	Nukleasa zinkového prstu a transkripční aktivátorová efektorová nukleasa.....	13
3.3	Regulace transkripce .....	14
3.3.1	Regulace transkripce nekódujícími RNA.....	14
3.3.2	Snížení exprese pomocí dCas9 systému.....	16
3.3.3	Srovnání systémů regulujících transkripci.....	18
3.4	Využití CRISPR technologie.....	19
3.4.1	Cílené štěpení RNA.....	19
3.4.2	Epigenetické modifikace.....	19
3.4.3	Lokalizace genů.....	19
3.4.4	Potenciální genová terapie.....	20
3.5	PNH192 .....	21
4	Experimentální část.....	22
4.1	Materiál .....	22
4.1.1	Chemikálie .....	22
4.1.2	Sady .....	24
4.1.3	Přístrojové vybavení .....	24
4.1.4	Příslušenství a pomůcky .....	25
4.2	Metody .....	25
4.2.1	Příprava roztoků .....	25
4.2.2	Kultivace buněčné linie K562 dCas9 KRAB.....	26
4.2.3	Selekce buněčné linie 0,5μM PNH192 a 0,5μM DMSO.....	27
4.2.4	Izolace genomické DNA .....	28
4.2.5	PCR transdukované DNA a horizontální elektroforéza sgRNA začleněné v genomické DNA.....	29

4.2.6	Izolace proteinů a detekce dCas9 za použití Western blottingu .....	31
5	Výsledky a diskuze .....	34
5.1	Ověření exprese domény dCas9 KRAB .....	34
5.2	Ověření exprese knihovny sgRNA .....	34
5.3	Stanovení molekulárních cílů látky PNH192 .....	35
5.3.1	<i>TCP11X1, TCP11X2</i> (T-complex 11 family, X-linked 1; T-complex 11 family, X-linked 2) .....	37
5.3.2	<i>NXF2, NXF2B</i> (Nuclear RNA export factor 2; Nuclear RNA export factor 2B) .	37
5.3.3	<i>QRICH1</i> (Glutamine rich 1) .....	38
5.3.4	<i>TBXAS1</i> (Thromboxane A synthase 1) .....	38
5.3.5	<i>ANKRD61</i> (Ankyrin repeat domain 61) .....	38
5.3.6	<i>PHKB</i> (Phosphorylase kinase regulatory subunit beta) .....	38
5.3.7	<i>C3ORF20</i> (Chromosome 3 Open Reading Frame 20) .....	39
5.3.8	<i>LDB2</i> (LIM domain binding 2).....	39
5.3.9	<i>KIF24</i> (Kinesin family member 24) .....	39
5.3.10	<i>MBD3L3</i> (Methyl-CpG binding domain protein 3 like 3).....	40
5.3.11	<i>NRGN</i> (Neurogranin).....	40
5.4	Geny podmiňující rezistenci vůči látce PNH192.....	40
5.4.1	<i>HIBADH</i> (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase) .....	40
5.4.2	<i>BEND3</i> (BEN domain containing 3) .....	40
5.4.3	<i>EMP1</i> (Epithelial membrane protein 1) .....	41
5.4.4	<i>PBX2</i> (PBX homeobox 2).....	41
6	Závěr .....	42
7	Literatura .....	43
8	Seznam symbolů a zkratk .....	52
9	Seznam obrázků .....	57
10	Seznam grafů .....	58



# 1 ÚVOD

CRISPR interference je relativně nový přístup, prostřednictvím kterého lze dosáhnout regulace genové exprese bez trvalé změny genomu. Je založen na principu fungování CRISPR prokaryotního imunitního systému, který je schopen rozpoznat cizorodou genetickou informaci a vytvořit speciální malé RNA komplementární k cizí genetické informaci. RNA poté slouží k navedení nukleasy Cas9, která cizorodou genetickou informaci rozštěpí. V rámci CRISPR interference je Cas9 nahrazena katalyticky nefunkční dCas9, která je fúzována s represivním modifikátorem chromatinu a dCas9-represor doména způsobuje následně inhibici exprese konkrétních genů (Gilbert et al., 2013).

K určení molekulárních cílů cytotoxických látek lze využívat CRISPR interferenční screening, který je založen na inhibici genů v rámci celého genomu. Schopnost proliferovat v prostředí cytotoxické látky mají buňky, u kterých došlo k inhibici genů, které jsou označeny jako molekulární cíle. Současně s určením molekulárních cílů lze určit geny, jejichž produkty poskytují buňce rezistenci na danou cytotoxickou látku.

Nukleosidový derivát PNH192 vykazuje vysokou cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám. Společně s dalšími nukleosidovými deriváty, AB61 a PNH173, je považován za potenciální protinádorové léčivo (Perlíková et al., 2016; Ječmeňová, 2020).

Cílem bakalářské práce bylo prostřednictvím CRISPR interference identifikovat molekulární cíle nukleosidového derivátu PNH192 a ověřit expresi CRISPR komponent v průběhu kultivace buněk při selekčním tlaku látkou PNH192.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na CRISPR/Cas9 technologie a inhibici exprese prostřednictvím CRISPRi systémů
2. Osvojení základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur
3. Transdukce buněčné linie K562 dCas9 KRAB lentiviry nesoucími sgRNA vůči celému lidskému genomu za účelem identifikace molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH192
4. Selektce transdukované linie látkou PNH192 a selekčními antibiotiky
5. Ověření exprese dCas9 a sgRNA v transdukované a selektované linii a izolace DNA
6. Zpracování výsledků a sepsání bakalářské práce

# 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

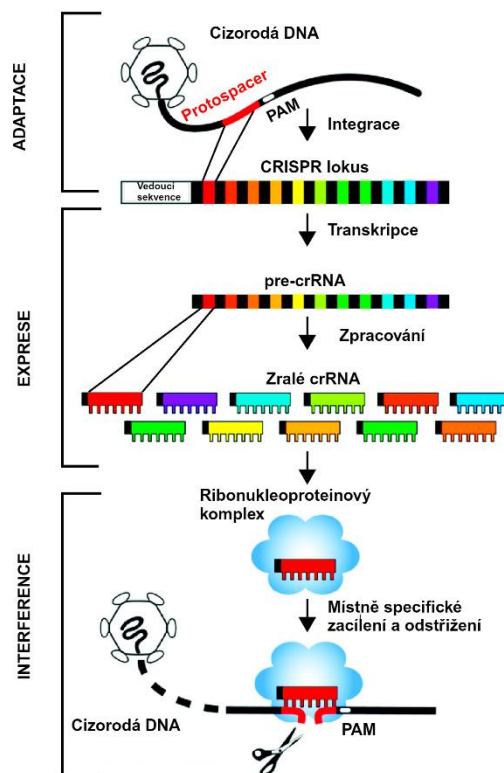
## 3.1 Prokaryotní imunitní systém

Shromážděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice, známé pod zkratkou CRISPR, jsou repetice sekvenční DNA proložené podobně dlouhými nerepetitivními sekvencemi DNA, nazývané jako spacer. CRISPR se vyskytuje u obou domén prokaryot, tedy u bakterií a archeí, a sekvenční dosahují délky od 21 bp do 37 bp (Jansen et al., 2002).

CRISPR/Cas systém je schopen plnit funkci adaptivního imunitního systému u bakterií a archeí proti virům a cizorodé DNA. Jedná se o imunitní systém založený na malých molekulách RNA a jejich schopnosti sekvencně specifické detekce a umlčení cizích nukleových kyselin (Wiedenheft et al., 2012). Systém je přítomen u přibližně 50 % bakterií a 90 % archeí (Grissa et al., 2007).

CRISPR/Cas zprostředkovává imunitu v rámci tří fází (Obrázek 1). V první fázi, tzv. adaptace, je rozeznána genetická informace fága nebo plasmidu a jeho sekvenční, nazývána jako tzv. protospacer (prekurzor spaceru), je vložena do CRISPR lokusu mezi dvě repetitivní sekvenční (Marraffini & Sontheimer, 2010).

Součástí genetické informace cizorodé DNA je krátká sekvenční 2 až 5 nukleotidů, označovaná jako PAM neboli motiv přilehlý k protospaceru, která se nachází bezprostředně



Obrázek 1: Schématický průběh tří fází imunitního CRISPR/Cas procesu (Upraveno podle: Terns & Terns, 2011).

za sekvencí protospaceru a je zodpovědná za specifické zacílení Cas nukleasy během interference (Mojica et al., 2009). Pro integraci protospaceru do palindromické repetitivní sekvence se vyžaduje přítomnost minimálně Cas1 a Cas2 nukleas, které jsou všeobecně přítomné v genomech organismů s CRISPR/Cas (Bhaya et al., 2011).

Ve druhé fázi, tzv. expresi, dojde k expresi Cas genů a transkripci prekurzorové CRISPR RNA (pre-crRNA), která je následně rozštěpena na kratší CRISPR-RNA (crRNA) (Brouns et al., 2008).

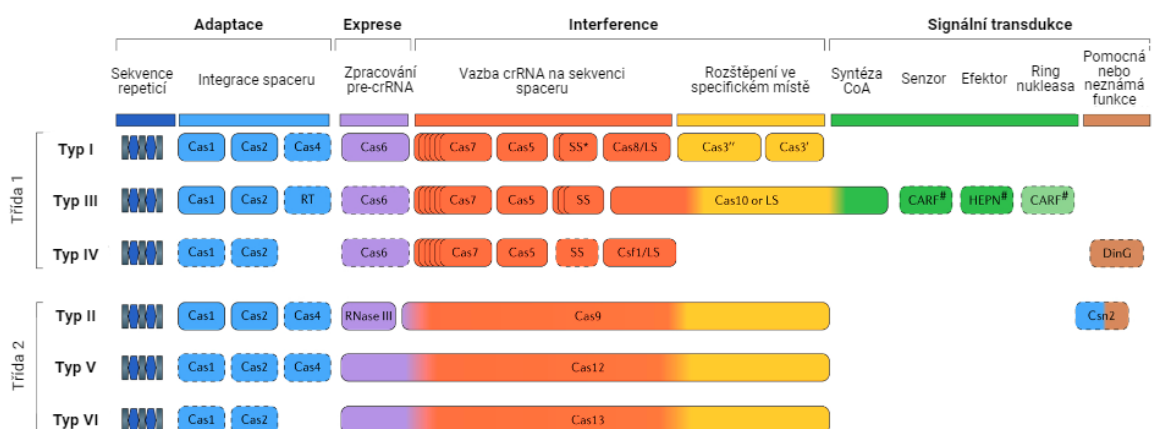
Ve třetí fázi, tzv. interferenci, se crRNA komplementárně váže k sekvenci DNA obsahující protospacer a dochází k odštěpení crRNA spojené s cizí genetickou informací což vede k umlčení nukleové kyseliny (Garneau et al., 2010).

### 3.1.1 CRISPR/Cas systémy

V okolí CRISPR lokusů se nachází geny označované jako Cas, neboli CRISPR-asociované sekvence, kódující specifické Cas proteiny nezbytné pro správnou funkci CRISPR imunitního systému (Jansen et al., 2002).

V současné době existují dvě třídy CRISPR/Cas systémů rozdělené podle přítomných efektorových modulů během exprese a interference (Obrázek 2). Třída 1 obsahuje moduly složené z více Cas proteinů, které tvoří komplexy vázající crRNA a v přítomnosti dalších Cas proteinů zprostředkovávají expresi a interferenci. Jedná se o systémy typu I, III a IV. Naopak třída 2 zahrnuje jeden vícedoménový protein vázající crRNA, který kombinuje aktivity potřebné pro interferenci, popřípadě expresi a interferenci. Jedná se o typy II, V, VI (Makarova et al., 2015; Makarova et al., 2020).

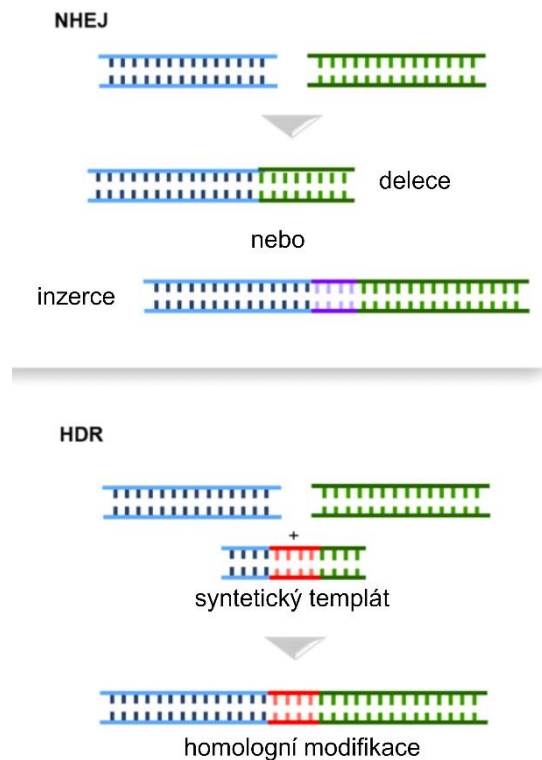
Nejvíce prozkoumaným typem je typ II, kdy během exprese zprostředkování imunitní odpovědi je kromě crRNA přítomna i nekódující transaktivující RNA (tracrRNA). Následné spojení crRNA a tracrRNA s Cas9 nukleasou v ribonukleoproteinový komplex způsobí rozpoznání cizorodé DNA a její následné štěpení (Jinek et al., 2012).



Obrázek 2: Rozdělení CRISPR/Cas systémů do tříd a typů podle přítomných Cas proteinů v jednotlivých fázích CRISPR/Cas procesu, včetně funkce jednotlivých Cas proteinů (Upraveno podle: Makarova et al., 2020).

## 3.2 Editace genomu

Pro editaci genomu pomocí CRISPR/Cas technologie se využívá systému typu II, kdy fúze crRNA a tracrRNA vytvoří jednovláknovou guide RNA (sgRNA), která navádí Cas9 protein do specifických lokusů genomu (Jinek et al., 2012; Mali et al., 2013). Nukleasová povaha Cas9 způsobí dvouřetězcový zlom DNA (DSB) a následuje jeden ze dvou mechanismů opravy (Obrázek 3). Při nepřítomnosti homologního DNA templátu dochází k tzv. nehomolognímu spojování konců (NHEJ), který je náchylný k chybám a způsobuje inserce nebo delece v DNA a tedy dochází ke vzniku tzv. InDel produktů (Barnes, 2001). Pokud je přítomen homologní syntetický templát, dochází k opravě řízené homologií (HDR), která poskytuje možnost změn párů bází, čehož může být využito například ke genové terapii (Bosch et al., 2002).



Obrázek 3: Schéma mechanismu oprav dvouřetězcových zlomů DNA (DSB) prostřednictvím nehomologního spojování konců (NHEJ) a oprav řízených homologií (HDR) (Upraveno podle: Li et al., 2020).

### 3.2.1 Nukleasa zinkového prstu a transkripční aktivátorová efektorová nukleasa

K editaci genomu lze kromě CRISPR/Cas technologie využít i endonukleasy *FokI*, která je součástí dvou restričních enzymů použitelných k tvorbě DSB. Jedná se o nukleasu

zinkového prstu (ZFN) a transkripční aktivátorovou efektorovou nukleasu (TALEN) (Bibikova et al., 2002; Christian et al., 2010).

ZFN je syntetický protein složený ze dvou domén, a to DNA štěpící a DNA vazebné (Li et al., 1992). DNA vazebná doména je sekvenčně specifická a skládá se ze tří sad zinkových prstů, kdy každý prst tvoří přibližně 30 aminokyselin, na které je navázaný jeden atom zinku, a doména váže 3 páry bazí DNA (Pavletich & Pabo, 1991). DNA štěpící doména obsahuje endonukleasu *FokI* (Kim et al., 1996), která získává štěpící vlastnost až po dimerizaci a k editaci genomu je tedy třeba dvojice ZFN (Bitinaite et al., 1998).

TALEN je protein obsahující N-terminální TALE (transkripční aktivátorový efektor) DNA vazebnou doménu a DNA štěpící doménu. TALE DNA vazebná doména je přítomna u bakterií rodu *Xanthomonas* (Boch et al., 2009) a je složena z 33 až 35 opakujících se párů bazí a 2 hypervariabilních aminokyselin, které jsou známé jako Repeat Variable Diresidue (RVD), které dodávají TALEN jeho specifčnost (Deng et al., 2012). DNA štěpící doména obsahuje, stejně jako ZFN, endonukleasu *FokI*, která se musí pro svou aktivitu vyskytovat jako dimer (Miller et al., 2011).

### 3.3 Regulace transkripce

Transkripce eukaryot je regulována molekulárními faktory zahrnujícími transkripční faktory, kofaktory, tedy koaktivátory a korepresory, a regulátory chromatinu (Lee & Young, 2013). Důležitou roli v genové regulaci hrají nekódující RNA (ncRNA), jejichž funkce je rozděluje na provozní a regulační. Mezi provozní ncRNA se řadí RNA se strukturními a katalytickými funkcemi, jako jsou například tRNA, rRNA, malá jaderná RNA (snRNA), malá jadéřková RNA (snoRNA) a gRNA. Regulační ncRNA se rozlišují podle délky na krátké, respektive malé, do délky 200 nukleotidů, a dlouhé, nad délku 200 nukleotidů. Mezi regulační krátké ncRNA patří mikroRNA (miRNA), malá interferující RNA (siRNA) a Piwi interagující RNA (piRNA). Do skupiny regulačních dlouhých ncRNA patří pouze dlouhé nekódující RNA (lncRNA) (Casamassimi et al., 2017).

#### 3.3.1 Regulace transkripce nekódujícími RNA

Přibližně 2 % lidského genomu je transkribováno do nekódujících RNA (ncRNA), přičemž ncRNA nejsou translatovány do sekvence aminokyselin proteinu. ncRNA jsou součástí mnoha biologických procesů, například tRNA a rRNA jsou klíčové během translace, miRNA a siRNA mají vliv na regulaci genové exprese, zároveň však regulují vývojové procesy i během onemocnění, kdy některé RNA vykazují funkci jako tumor-supresory nebo onkogeny (Pavet et al., 2011).

Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) jsou RNA transkripty delší než 200 nukleotidů mající regulační funkci. Jaderné dlouhé nekódující RNA (lncRNA) modulují aktivitu transkripčních faktorů, zprostředkovávají interakce s chromatinem a tím změny struktury chromatinu a vytvářejí prostorovou organizaci jádra, jelikož jsou asociovány s jadérkem, paraspekulami, jadernou laminou a chromozomy (Kugel & Goodrich, 2012; Clemson et al., 2009). Cytoplasmatické lncRNA slouží ke zprostředkování signálních transdukčních drah a kontrole posttranskripční genové exprese, příkladem regulují aktivitu a hladinu mRNA a proteinů (Du et al., 2016).

Malé nekódující RNA (sncRNA) jsou molekuly RNA nepřevyšující délku 200 nukleotidů, které jsou přítomné u bakterií, archeí i eukaryot. Mezi nejvíce prozkoumané sncRNA patří mikroRNA (miRNA) od délce 21-23 nukleotidů, malé interferující RNA (siRNA) o délce 20-25 nukleotidů a RNA interagující s Piwi (piRNA) o délce 24-31 nukleotidů (Wilson & Doudna, 2013; Meister & Tuschl, 2004; Kim et al., 2009)

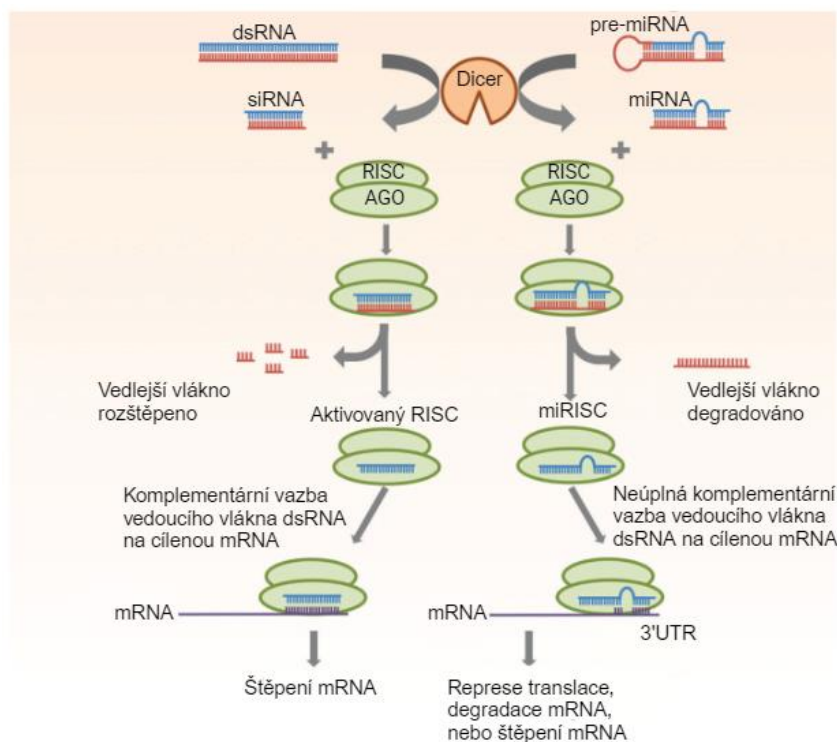
MikroRNA (miRNA) vyvolává degradaci specifické mRNA a translační represi tvorbou RNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC) sdružením s proteinem podrodiny *Argonaute* (AGO) z rodiny *Argonaute*. Biogeneze miRNA z pre-miRNA je závislá na endonuklease *Dicer* (Wilson & Doudna, 2013). miRNA komplementárně interagují s 3' nepřeloženou oblastí (3'UTR) cílových mRNA, avšak miRNA není plně komplementární k mRNA. V cílových oblastech mRNA způsobí RISC deadenylaci a poté ztrátu čepičky komplexem DCP1-DCP2 (Chang et al., 2014) (Obrázek 4 – vpravo).

Malé interferující RNA (siRNA) jsou RNA, s dvounukleotidovými přesahy na 3' konci, vznikající zkrácením dlouhé dsRNA nebo malé vlásenkové RNA (shRNA). dsRNA vzniká transkripcí nebo enzymaticky, například pomocí RNA-dependentní RNA polymerasy (RdRP) (Meister & Tuschl, 2004). Maturace siRNA je závislá na endonuklease *Dicer* a podobně jako miRNA nebo piRNA tvoří RNA-indukovaný umlčovací komplex (RISC) (Hammond et al., 2000). Duplexy siRNA slouží ke spuštění RNA interference (RNAi) a specificky potlačují expresi genů štěpením cílové mRNA, jelikož se v plné délce vážou komplementárně k mRNA (Elbashir et al., 2001) (Obrázek 4 – vlevo).

RNA interagující s Piwi (piRNA) jsou malé RNA, které se sdružují s proteiny Piwi, patřící do rodiny *Argonaut*, za tvorby RNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC) nezávisle na endonuklease *Dicer* (Kim et al., 2009). Vyzrálá piRNA je transportována do jádra, kde se v rámci primární biogeneze piRNA využívá k umlčení transpozónů komplementárním spojením s určitým transpozónem a jeho následným štěpením (Brennecke et al., 2007).

Malá jadérová RNA (snoRNA) slouží k navedení a zprostředkování posttranskripční methylace 2'-O-ribosy a pseudouridylyace rRNA a snRNA, což vede ke zlepšení funkce ribozomů a spliceozomů (Jack et al., 2011).

Malá vlásenková RNA (shRNA) je syntetická jednořetězcová RNA, která má komplementární konce spojené vlásenkovou smyčkou. shRNA je transkribována v jádře z expresního vektoru, zpracována endonukleasou *Dicer* na funkční siRNA a siRNA je začleněna do komplexu RISC, kdy následuje komplementární navázání na mRNA způsobující pouhé potlačení translace nebo celkovou degradaci mRNA (Paddison et al., 2002).



Obrázek 4: Biogeneze siRNA z dsRNA a miRNA z pre-miRNA a schéma následné regulace transkripce maturovanou siRNA a miRNA (Upraveno podle: Lam et al., 2015).

### 3.3.2 Snížení exprese pomocí dCas9 systému

Jak již bylo zmíněno v systému CRISPR/Cas typu II vzniká ribonukleoproteinový komplex, složený z crRNA, tracrRNA a Cas9, kdy Cas9 má schopnost sekvenčně specifického štěpení DNA způsobující dvouřetězcový zlom. Komplex se dá zjednodušit využitím single guide RNA (sgRNA), která vznikla fúzí crRNA a tracrRNA (Jinek et al., 2012).

U bakterií dochází k až stonásobnému potlačení transkripce využitím katalycky neaktivní Cas9 nukleasy (dCas9) a sgRNA cílící na kódující oblast. dCas9 stericky blokuje vazbu RNA polymerasy během elongace nebo transkripčních faktorů během iniciace transkripce. U lidských buněk dochází při použití dCas9 a sgRNA k přibližně dvojnásobnému snížení genové exprese, přičemž regulace je závislá na cílovém lokusu a faktorech jako jsou například vzdálenost od počátku transkripce a stav chromatinu. Pro proces využívající katalycky neaktivní Cas9 (dCas9) a sgRNA k regulaci genové exprese se ujal název CRISPR interference (CRISPRi) (Qi et al., 2013).

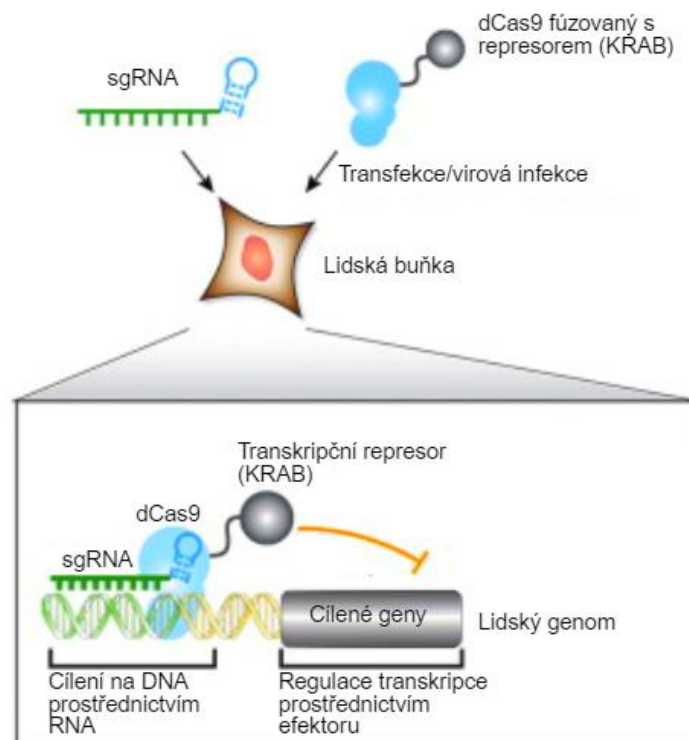


Ke zvýšení regulace exprese, tedy k vyššímu potlačení transkripce, lze dCas9 fúzovat s doménami vyvolávající represivní modifikaci chromatinu (Obrázek 5) (Gilbert et al., 2013).

Mezi první testované domény schopné vyvolat represivní modifikaci chromatinu patřili: Krüppel-associated box (KRAB), ChromoShadow (CS) a WRPW. Ze tří výše zmíněných vykazovala doména KRAB pětinasobné snížení exprese a domény CS a WRPW vykazovaly pouze dvojnásobné snížení, které odpovídalo snížení pouze prostřednictvím dCas9 proteinu (Gilbert et al., 2013).

Následně bylo testováno 28 domén vyvolávajících represivní modifikaci chromatinu po fúzi s dCas9 a při přítomnosti sgRNA. Nejlépe dopadla doména HP1A, u které došlo až k osminásobnému snížení exprese, a následovaly domény NIPP1, MBD2B, HDT1, SIN3A a MeCP2 s menším snížením exprese než HP1A. Zmíněných 6 domén a navíc doména KRAB bylo navzájem fúzováno v bipartitní represory, přičemž spojení dvou represorů vyvolalo ještě silnější snížení exprese od pětinasobku do šedesátinasobku oproti dCas9. Jako nejúčinnější bipartitní represor byl určen KRAB-MeCP2 (methyl-CpG-vazebný protein 2), přičemž na dCas9 je napojena doména KRAB (Yeo et al., 2018).

Doména KRAB patří k nejvíce využívaným represivním efektorům a potlačuje transkripci prostřednictvím interakce s KAP1, která funguje jako lešení pro nábor korepresorů (Friedman et al., 1996).



Obrázek 5: Mechanismus inhibice genové exprese při transfekci buněk sgRNA a dCas9 fúzovaného s transkripčním represorem (Upraveno podle: Gilbert et al., 2013).

### 3.3.3 Srovnání systémů regulujících transkripci

RNA interference (RNAi) bývá v terapeutické aplikaci dosáhnuo nejčastěji využitím siRNA nebo shRNA, jelikož jsou komplementární k cílené části mRNA v celé délce (Elbashir et al., 2001; Paddison et al., 2002).

siRNA je schopna potlačit genovou expresi i mimo cílovou mRNA, jelikož siRNA mohou tolerovat několik komplementárních neshod na cílové mRNA, nebo dochází k její degradaci účinkem endogenních nukleas. Popřípadě může siRNA soutěžit uvnitř buňky s endogenními miRNA (Birmingham et al., 2006). Při použití shRNA je pravděpodobnost specifických i nespecifických zacílení mimo cílové mRNA menší, než při použití siRNA. Jelikož shRNA se syntetizují v jádrech buněk z vektoru, zatímco siRNA je chemicky syntetizována a až poté vpravena do organismu. siRNA se z 99 % degraduje do 48 hodin od aplikace, zatímco shRNA se může exprimovat až 3 roky od aplikace (Rao et al., 2009).

CRISPR interference (CRISPRi) zprostředkovává inhibici genové exprese prostřednictvím sgRNA, dCas9 a domény s represivní funkcí. Dochází k potlačení transkripce genu do mRNA bez trvalé změny DNA sekvence (Gilbert et al., 2013). sgRNA se komplementárně a specificky váže na cílovou DNA sekvenci, může docházet k mimocílové vazbě, ale v menším měřítku než u RNAi (Hsu et al., 2013).

V Tabulka 1 jsou srovnány výše zmíněné systémy schopné regulovat transkripci. Systémy byly srovnány na základě sekvence v rámci, které regulují transkripci, v jaké formě je regulující systém aktivován, za jak dlouho dochází k metabolické eliminaci dané RNA a jaká je pravděpodobnost mimocílové regulace exprese.

Tabulka 1: Srovnání regulace transkripce prostřednictvím siRNA, miRNA a CRISPRi se zaměřením na cílenou sekvenci, formu aktivace, metabolickou eliminaci a pravděpodobnost mimocílového efektu.

	<b>siRNA</b>	<b>shRNA</b>	<b>CRISPRi (sgRNA)</b>
<b>Cílená sekvence</b>	mRNA	mRNA	DNA
<b>Forma aktivace regulujícího systému</b>	Molekula syntetizovaná <i>ex vivo</i>	<i>In vivo</i> exprese z vektoru	<i>In vivo</i> exprese z vektoru
<b>Metabolická eliminace</b>	48 hodin	Až 3 roky	Individuální
<b>Pravděpodobnost mimocílového efektu</b>	Vyšší než u shRNA	Nižší než u siRNA	Nižší než u RNAi

## **3.4 Využití CRISPR technologie**

### **3.4.1 Cílené štěpení RNA**

CRISPR/Cas typu VI obsahuje vícedoménovou nukleasu Cas13, která se dělí na čtyři podtypy Cas13a, známý jako C2c2, Cas13b, Cas13c a Cas13d. Nukleasa Cas13 má schopnost štěpit pouze ssRNA (Abudayyeh et al., 2016).

Při využití cíleného štěpení RNA v rámci genové terapie vyplývá nevýhoda v tom, že Cas13 nezpůsobuje trvalou změnu genetického kódu, a tedy by musely být všechny složky CRISPR/Cas13 systému dodávány do organismu dlouhodobě, což může vyvolat imunitní odpověď. Na druhou stranu, jelikož nedochází k trvalé změně genomu, zdravotnické agentury schvalující léčiva pravděpodobněji přistoupí ke schválení léčiva neupravující genom, než léčiva schopného editace genomu.

V platformě SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) se Cas13 využívá k detekci jednotlivých molekul RNA a funguje na principu detekce fluorescenčního signálu. Cas13 s crRNA, která je komplementární k cílovému RNA fragmentu, jsou spojeny s fluorescenční sondou. Když dojde k rozpoznání fragmentu Cas13, rozštěpí se vazba mezi fluoroforem a zřádkem a dojde k fluorescenci, která je detekována (Gootenberg et al., 2017).

### **3.4.2 Epigenetické modifikace**

Epigenom zahrnuje faktory, které ovlivňují genovou expresi bez změny sekvence DNA. Jedná se nejčastěji o remodelaci chromatinu methylací, acetylací nebo další modifikací nukleotidů.

K regulaci exprese epigenomu lze využít CRISPR/dCas technologie, kdy může docházet například k cílené remodelaci chromatinu a následně aktivaci či inhibici (Liu et al., 2018). K remodelaci chromatinu lze například využít dCas9 fúzovaný s enzymem TET1, což je methylcytosindioxygenasa s deseti nebo jedenácti translokacemi, umožňující cílenou demethylaci sekvence DNA. Fúze s DNA cytosin-5-methyltransferasou 3A (DNMT3A) způsobuje naopak cílenou methylaci (Liu et al., 2016).

### **3.4.3 Lokalizace genů**

Prostřednictvím dCas9 fúzovaného se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) a sekvencně specifickými sgRNA lze dosáhnout vizualizace repetitivních i nerepetitivních sekvencí genomu. Výjimku tvoří geny v blízkosti regulačních elementů, kde by mohlo dojít k porušení exprese (Chen et al., 2013).

Další možností je využití značení pomocí metody nazývané ANCHOR DNA (ANCHOR3). Neopakující se sekvence DNA (ANCH), kratší než 1 kb, se vloží pomocí Cas9 bezprostředně vedle požadovaného genu zájmu a váže na sebe proteiny ParB značené GFP. Komplexy ParB-GFP se akumulují a vytváří fluorescenční ohnisko v místě požadovaného genu, který je lokalizován (Germier et al., 2017).

Ke značení neopakujících se chromozomových oblastí lze využít také metody SHACKTeR (CRISPR/Cas9 zprostředkovaný knock-in krátkých homologních ramen s repeticemi tetracyklin operonu (TetO)). Za pomoci PCR jsou vytvořena krátká homologní ramena, která lemují repetice TetO. Prostřednictvím CRISPR/Cas9 dojde k cílenému štěpení DNA a přítomná homologní ramena jsou inzertována do sekvence DNA. Vizualizace je zprostředkována tetracyklin represorem (TetR) fúzovaným s EGFP (Tasan et al., 2018).

#### **3.4.4 Potenciální genová terapie**

Jak bylo zmíněno výše, prostřednictvím CRISPR/Cas9 systému lze editovat genom a prostřednictvím CRISPR/dCas9, neboli CRISPR interference (CRISPRi), lze snižovat nebo zvyšovat aktivitu exprese genu, a tím ovlivňovat množství exprimovaného proteinu. CRISPR/Cas9 i CRISPRi tedy lze ze svého mechanismu potenciálně použít ke genové terapii. CRISPR/Cas9 by mohl být využit k opravě mutací v sekvenci DNA, zatímco CRISPRi k regulaci exprese proteinů, jejichž snížená, resp. zvýšená exprese je zodpovědná za onemocnění.

Gen *TMC1* kóduje stejnojmenný protein, který je základní složkou mechanotransdukčních kanálů vláskových buněk savců, a mutace v genu způsobuje autozomálně recesivní nebo dominantní ztrátu sluchu (Pan et al., 2013). Komplexy Cas9 a sgRNA transportované prostřednictvím kationtových lipidů způsobují cílené štěpení dominantní alely zodpovědné za ztrátu sluchu. V případě mutace v genu *TMC1* u myší došlo ke zvýšení prahu sluchové odpovědi a k progresivní ztrátě vláskových buněk. Po injekci komplexů Cas9 a sgRNA došlo po 4 týdnech ke snížení prahu sluchové odpovědi o 15 dB, a tedy ke snížení progresivní ztráty sluchu (Gao et al., 2018).

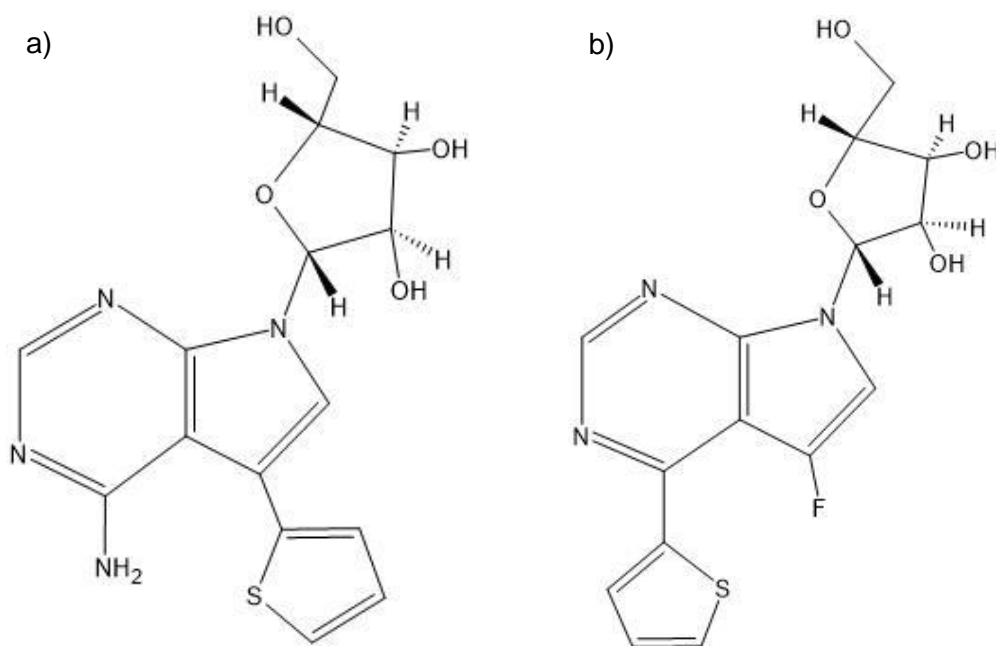
Je známo, že faktory VIII a IX mají zásadní roli v hemokoagulaci. Mutace v kterémkoliv z těchto genů způsobuje nedostatečnou proteosyntézu faktorů, která vede ke zhoršenému srážení krve. V případě mutace v genu *F8* pro faktor VIII se vyvolaná krvácivost nazývá hemofilie A, v případě genu *F9* hemofilie B. Oba geny se nachází na chromozomu X, proto jsou hemofilii téměř pouze postiženi muži. Hemofilie A postihuje přibližně 1 z 5 000 narozených chlapců a hemofilie B přibližně 1 z 30 000. U žen, které nesou jednu mutovanou alelu a jednu zdravou alelu, může být postižení hemofilii v rozmezí od zdravé přenašečky po hemofiličku, jelikož jeden z chromozomů X u žen bývá inaktivován

z důvodu lyonizace. Přestože je hemofilie vnímána jako recesivní X-vázané genetické onemocnění, nejméně 30 % mutací vzniká *de novo* (Berntorp & Shapiro, 2012). V případě hemofilie A a B bylo zjištěno, že cílené narušení genu pro inhibitor serinové proteinasy typu C1 (SERPINC1) u myší, prostřednictvím CRISPR/Cas9, vede k inhibici antitrombinu a k obnově fungování koagulačního systému (Han et al., 2022).

### 3.5 PNH192

Látka PNH192 (Obrázek 6b) je nukleosidový derivát adeninu, který je společně s deriváty PNH173 a AB61 (Obrázek 6a), považován za potenciální protinádorové léčivo.

AB61, neboli 7-(2-thienyl)-7-deazaadenosin, se projevuje jako látka s cytotoxickou aktivitou vůči nádorovým liniím a pouze slabou cytotoxicitou proti normálním fibroblastům, což je způsobeno neefektivní fosforylací AB61 v normálních fibroblastech. Zároveň AB61 vykazuje silnější cytotoxický účinek proti nádorovým buněčným liniím než monofosfát AB61 (AB61-MP), avšak proti normálním fibroblastům má AB61-MP naopak účinek cytotoxičtější než AB61. Cytotoxicita je způsobena tím, že AB61 ovlivňuje dráhy oprav poškození DNA, mechanismy translace a skládání proteinů (Perlíková et al., 2016).



Obrázek 6: Chemická struktura látky AB61 (a) a PNH192 (b).

PNH192 vykazuje vysokou cytotoxicitu na buněčné linie rezistentní vůči cytostatikům 6-merkaptopurinu, 6-thioguaninu, cytarabinu a fludarabinu a jeví se jako potenciální primární protinádorové léčivo nebo jako sekundární léčivo při rezistenci na cytostatika (Ječmeňová, 2020).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

Buněčná linie K562 dCas9 KRAB klon 5 získaná od vedoucí práce. Tato linie stabilně exprimuje dCas9 KRAB konstrukt, jelikož byla připravena transdukcí lentiviry nesoucími vektor Lenti-dCas9-KRAB-blast (kat. č. #89567, *Addgene*).

K562 je suspenzní buněčná linie izolovaná z kostní dřeně 53-leté pacientky s chronickou myeloidní leukemií. Buňky K562 jako označované jako hematopoetické maligní buňky schopné spontánní diferenciaci do předchůdců erytrocytární, granulocytární a monocytární řady (*K562 linie, ATCC, 1995*).

Lentiviry nesoucí celogenomovou knihovnu sgRNA rovněž získané od vedoucí práce a připravené za použití vektorů Human Genome-wide CRISPRi-v2 Libraries (viz Tabulka 2), kat. č. 83969, *Addgene*. Oba vektory získal Ústav molekulární a translační medicíny darem od prof. Jonathana Weissmana z Massachusetts Institute of Technology a doc. Gary Hon z UT Southwestern Medical Center.

Tabulka 2: Doplnkové informace o použité celogenomové knihovně sgRNA.

<i>CRISPR interferenční knihovna navržená na kompletní lidský genom</i>				
Laboratoř	Počet cílených genů	Počet sgRNA na gen	Počet sgRNA	Reference
Weissman	18 905 (celý genom)	5	106 430	<b>Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation</b> (Horlbeck et al., 2016).

#### 4.1.2 Chemikálie

10x TBE (kat.č.: 3932001, Serva)

10x TGS (kat.č.: 1610772; Bio-Rad, USA)

96% denaturovaný ethanol (kat.č.: 11096.01; Serva, Německo)

99% glycerol (kat.č.: G5516; Sigma-Aldrich)

99% nedenaturovaný ethanol (kat.č.: 39556.01; Serva, Německo)

Agarosa (kat.č.: A4718; Sigma Aldrich, USA)

Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (TRIS) (kat.č.: 37180; Serva, Německo)  
Blasticidin (kat.č.: ANT-BL-05; InvivoGen, USA)  
Bovinní sérový albumin (BSA) (kat.č.: A7906; Sigma-Aldrich, USA)  
Bromfenolová modř (kat.č.: B0126; Sigma-Aldrich)  
Butanol (kat.č.: 22130; Penta, ČR)  
Deoxyribonukleotidové trifosfáty (dNTPs) (10 mM) (kat.č.: 18427013; InvitroGen™, USA)  
DEPC voda (ÚMTM, Olomouc)  
Destilovaná voda (ÚMTM, Olomouc)  
Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (kat.č.: 30388-APO, Lachner, ČR)  
Dihydrogenfosforečnan draselný (kat.č.: 30016-APO, Lachner, ČR)  
Dimethylsulfoxid (DMSO) (kat.č.: A3672.0250; AppliChem, Německo)  
Dithiothreitol (DTT) (kat.č.: D9779; Sigma-Aldrich)  
DNA Ladder 100 bp (kat.č.: N3231L; New England Biolabs®, Massachusetts, USA)  
Dodecylsulfát sodný (SDS) (kat.č.: 71729; Sigma-Aldrich)  
Fetální bovinní sérum (FBS) (kat.č.: 26140079; Gibco™, USA) – tepelně inaktivováno (FCSi) (inaktivace v rámci ÚMTM)  
GC pufr (kat.č.: B0519S; New England Biolabs®, Massachusetts, USA)  
Gel Loading Dye barvivo 6x koncentrované (kat.č.:B7024A; New England Biolabs®, Massachusetts, USA)  
GelRed® (kat.č.: 41003; Biotium™, USA)  
Chlorid draselný (kat.č.: P5405; Sigma-Aldrich, USA)  
Chlorid sodný (kat.č.: S5886; Sigma-Aldrich, USA)  
Immobilon® Forte substrát křenové peroxidasy (kat.č.: WBLUF0500; Milipore®, USA)  
Inhibitory fosfatas (cOmplete™ Tablets) (kat.č.: 04693159001; Roche, Švýcarsko)  
Inhibitory proteas (PhosSTOP™) (kat.č.: 04906837001; Roche, Švýcarsko)  
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) modifikováno přísávkem 4mM L-glutaminu a HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina) (kat.č.: SH30228.01; HyClone™, Utah, USA)  
Marker molekulové hmotnosti proteinů (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder) (kat.č.: 26634; Thermo Scientific™, USA)  
MilliQ® voda (UMTM)  
Naředěný set standardů bovinního sérového albuminu (Pierce™) (kat.č.: 23208; Thermo Scientific™, USA)  
Penicilin-Streptomycin (kat.č.: 15140122; Gibco™, USA)  
Peroxodisíran amonný (APS) (kat.č.: A3678; Sigma Aldrich)  
Phusion polymerasa (kat.č.: M0530S; New England Biolabs®)  
PNH192 (UOCHB Praha)

Polybren (kat.č.: TR-1003-G; Merck, Německo)  
Primer antikódující (reverse) (100 µM) a primer kódující (forward) (100 µM) (Generi Biotech Hradec Králové)  
Protilátka primární proti Cas9 (kat.č.: ab210752; Abcam, Velká Británie)  
Protilátka primární proti β-aktinu (kat.č.: A2228; Sigma-Aldrich, USA)  
Puromycin (kat.č.: P9620; Sigma-Aldrich, USA)  
Reagent A BCA proteinového testu (Pierce™) (kat.č.: 23223; Thermo Scientific™, USA)  
Reagent B BCA proteinového testu (Pierce™) (kat.č.: 23224; Thermo Scientific™, USA)  
RIPA pufr (kat.č.: 89901; Thermo Scientific™, USA)  
*Sbfl* restriktasa (kat.č.: R3642L; New England Biolabs®, Massachusetts, USA)  
Sekundární protilátka s navázanou křenovou peroxidázou (A-2304 a A-0545, Sigma Aldrich, USA)  
Tetramethylethylendiamin (TEMED) (kat.č.: 1610801; Bio-Rad, USA)  
Tris-HCl (kat.č.: 10812846001; Roche, Švýcarsko)  
Tween® 20 (kat.č.: P2287; Sigma-Aldrich, USA)

#### **4.1.3 Sady**

Sada pro izolaci genomické DNA na přístroji MagCore® (kat.č.: MCC-01; RBC Bioscience, Taiwan)  
Sada pro přenos na nitrocelulosoovou membránu (kat.č.: 1704270; Bio-Rad, USA)  
Sada pro přípravu 12% akrylamidového gelu (kat.č.: 1610185; Bio-Rad, USA)

#### **4.1.4 Přístrojové vybavení**

Analyzátor buněčné viability Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA)  
Aparatura pro horizontální elektroforézu „Wide Mini-Sub Cell GT Cell“ (Bio-Rad, USA)  
Aparatura pro vertikální elektroforézu „Mini-PROTEAN Tetra Cell“ (Bio-Rad, USA)  
Aparatura pro western blotting „Trans-Blot Turba Transfer Systém“ (Bio-Rad, USA)  
Automatické pipety „Reference®“ (Eppendorf, Německo)  
Centrifuga chlazená „Centrifuge 5810R“ (Eppendorf, Německo)  
Centrifuga nechlazená „ROTINA 420R“ (Hettich, Německo)  
Centrifuga stolní nechlazená (kat.č.: C1301; Labnet, USA)  
Detekční systém „ChemiDoc XRS+“ (Bio-Rad, USA)  
Inkubátor „Heracell™ 150i“ (Thermo Scientific, USA)  
Inverzní mikroskop „Primo Vert“ (kat.č.: 491206-0011-000; Zeiss™, Německo)  
Kombinovaná lednice „LCv 4010“ (Liebherr, Německo)  
Laminární box „KSP 15 Class II Biological Safety Cabinet“ (Thermo Scientific, USA)  
MagCore® (RBC Bioscience, Taiwan)



Mrazicí box „Innova® U725“ (New Brunswick Scientific, USA)  
NanoDrop spektrofotometr (Thermo Scientific, USA)  
PCR termocykler „Mastercycler® nexus“ (Eppendorf, Německo)  
Pipetor „Easypet® 3“ (Eppendorf, Německo)  
Roller na zkumavky (IBI Scientific, USA)  
Třepačka „Rocker 2D Basic“ (IKA®, Německo)  
Třepačka „Vortex Genie 2“ (Scientific Industries, USA)  
Ultrazvuková čistička „Sonorex Digiplus DL“ (Bandelin, Německo)  
Vodní lázeň „Mettmert WNB 29“ (Mettmert, Německo)  
Zdroj stejnosměrného napětí pro horizontální a vertikální elektroforézu „PowerPac Universal Power Supply“ (Bio-Rad, USA)

#### **4.1.5 Příslušenství a pomůcky**

Centrifugační kónické zkumavky s víčkem 15ml a 50ml (kat.č.: 91015, 91050; Techno Plastic Products, Švýcarsko)  
Kultivační lahve 150 cm<sup>2</sup> s víčkem s filtrem (T150) (kat.č.: 90151; Techno Plastic Products, Švýcarsko)  
Nunc™ TripleFlask™ kultivační lahve (kat.č.: 132913; Thermo Scientific™, USA)  
Séologické pipety 10ml a 25ml (kat.č.: 91010, 91025; SPL Life Sciences, Jižní Korea)  
Univerzální sterilní špičky s filtrem (kat.č.: FT-1000-L-R-S-10, FT-200-L-R-S-10, FT-20-L-R-S-10 ; NovasBio, USA)

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Příprava roztoků**

10x koncentrovaný TBS (TRIS pufovaný fyziologický pufr) pufr byl připraven rozpuštěním 24,2 g TRIS báze (amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol) a 80 g chloridu sodného v destilované vodě a doplněním na jeden litr. Poté bylo upraveno pH na 7,6. 1x koncentrované TBS bylo připraveno smícháním 1 dílu 10x koncentrovaného TBS a 9 dílů destilované vody. Do 1x koncentrovaného TBS byl přidán detergent Tween-20 o finální koncentraci 0,1 % (v/v).

10x koncentrovaný fosfátový pufr (PBS) byl připraven rozpuštěním 80 g chloridu sodného, 2 g chloridu draselného, 14,4 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 2 g dihydrogenfosforečnanu draselného v destilované vodě a doplněním na jeden litr. Poté bylo upraveno pH na 6,8. 1x koncentrované PBS bylo připraveno smícháním 1 dílu 10x koncentrovaného PBS a 9 dílů destilované vody.

1x koncentrovaný TBE (TRIS, kyselina boritá, EDTA) pufr byl připraven smícháním 1 dílu 10x koncentrovaného TBE pufru a 9 dílů destilované vody.

1x koncentrovaný TGS (TRIS, glycin, SDS) pufr byl připraven smícháním 1 dílu 10x koncentrovaného TGS pufru a 9 dílů destilované vody.

1x koncentrovaný transferový pufr byl připraven smícháním 1 dílem 5x koncentrovaného Transfer pufru z Bio-Rad sady pro přenos, 1 dílem 99% nedenaturovaného ethanolu a 3 díly MilliQ vody.

Byl připraven 70% denaturovaný ethanol smícháním 7 dílů >96% denaturovaného ethanolu a 3 dílů destilované vody.

Byl připraven 5x koncentrovaný SDS (dodecylsulfát sodný) pufr rozpuštěním 1,576 g Tris-HCl v 17 ml destilované vody a upravením pH na 6,8. V připraveném roztoku bylo rozpuštěno 3,085 g dithiotreitolu a následně bylo přidáno 12 ml 30% glycerolu, který byl připraven ředěním 99 % glycerolu. Poté byly přidány 4 g dodecylsulfátu sodného a pH bylo upraveno na 7,1. Nakonec bylo přidáno 24 mg bromfenolové modři a pH bylo upraveno na 6,8.

Kultivační médium IMDM bylo doplněno inaktivovaným fetálním sérem (FCSi) a antibiotiky Penicilin a Streptomycin (ATB) v takovém objemu, aby FCSi bylo v médiu v koncentraci 10 % (V/V) a ATB v koncentraci 1 % (V/V).

K selekci buněčné linie K562 dCas9 KRAB byl do média přidán blasticidin (BSD) o finální koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ . K selekci buněk transdukovanych knihovnu sgRNA byl do média přidán puromycin (PURO) o finální koncentraci 2  $\mu\text{g/ml}$ .

Zamrazovací médium bylo připraveno smícháním FCSi a dimethylsulfoxidu (DMSO), aby koncentrace DMSO v séru byla 5 % (V/V).

Primární i sekundární protilátky byly ředěny do TBS pufru s 0,1% koncentrací Tween 20 a 5% koncentrací BSA. Primární myší protilátka proti  $\beta$ -aktinu byla ředěna v poměru 1:4 000, primární králičí protilátka proti dCas9 v poměru 1:5 000. Sekundární protilátky proti myší i králičí primární protilátce byly ředěny v poměru 1:10 000.

#### **4.2.2 Kultivace buněčné linie K562 dCas9 KRAB**

Buněčná linie K562 při kultivaci vyžaduje koncentraci  $0,1-1 \cdot 10^6$  buněk na ml média a během kultivace i následné selekce látkami PNH192 a DMSO byla linie kultivována ve stanoveném rozsahu koncentrace buněk.

Buněčná linie K562 stabilně exprimující dCas9 KRAB byla kultivována v IMDM médiu, obsahujícím 10 % (V/V) inaktivované fetální sérum (FCSi), 1 % (V/V) penicilin a streptomycin (ATB) a Blastocidin (BSD) v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ , při 37 °C. K selekci prostřednictvím BSD bylo přistoupeno k zachování buněk exprimujících dCas9 KRAB doménu.

Po dosažení stabilní viability a dostatečného množství buněk byla linie transdukována lentiviry nesoucími celogenomovou knihovnu sgRNA. sgRNA knihovna zanesena v rámci tzv. kazety obsahující konstantní oblasti před a za sekvencí sgRNA (viz Obrázek 7).



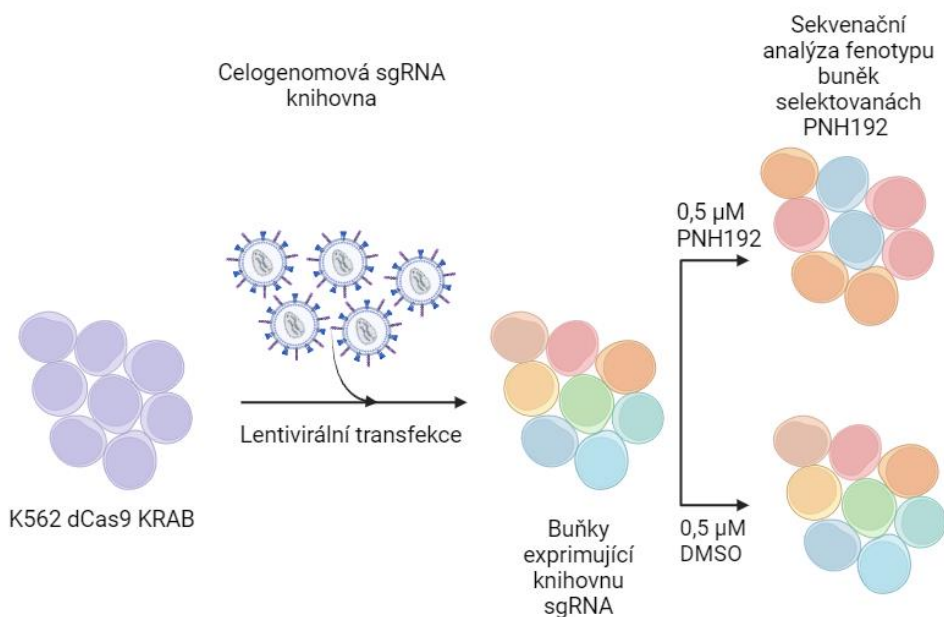
Obrázek 7: Schéma kazety, ve které byla sgRNA zanesena do genomu.

Buněčná linie K562 dCas9 KRAB po transdukcii byla kultivována při 37 °C v IMDM médiu, které obsahovalo 10 % (V/V) inaktivované fetální sérum (FCSi), 1 % (V/V) penicilin a streptomycin (ATB), Blastidicin (BSD) v koncentraci 50 µg/ml a Puromycin (PURO) v koncentraci 2 µg/ml. Puromycin selektoval buňky exprimující sgRNA z celogenomové knihovny.

Po dosažení stabilní viability a selekci buněčné linie selekčními antibiotiky zaručující přítomnost buněk, které exprimují dCas9 KRAB doménu a sgRNA, bylo přistoupeno k selekci látkou DMSO a PNH192.

#### 4.2.3 Selekcce buněčné linie 0,5µM PNH192 a 0,5µM DMSO

Po dosažení stabilní viability po selekci antibiotiky byla v triplikátu zahájena selekcce nukleosidovým derivátem PNH192 v molární koncentraci 0,5 µmol/l a rovněž v triplikátu selekcce DMSO v molární koncentraci 0,5 µmol/l, přičemž selekcce DMSO sloužila jako kontrolní vzorek (viz Obrázek 8).



Obrázek 8: Schéma rozdílné genové exprese při selekci nukleosidovým derivátem PNH192 a DMSO

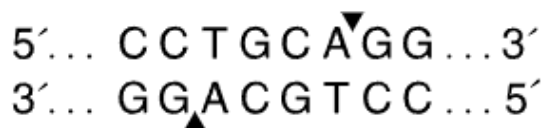
Ošetření probíhalo ve čtyřech opakováních ve třech fázích. Během první fáze neprobíhal selekční tlak. Buňky byly nasazeny v množství  $50 \cdot 10^6$  pro DMSO ošetření a  $50 \cdot 10^6$  pro PNH192 ošetření a kultivovány 1 den v IMDM médiu s FCSi a ATB. Během druhé fáze byly buňky ošetřeny testovanými látkami, které byly přidány do média z předchozího dne, a kultivovány 3 dny. Během třetí fáze byla zastavena selekce testovanými látkami a započala selekce selekčními antibiotiky k zachování exprese CRISPR komponent. Množství  $25 \cdot 10^6$  buněk bylo zpasážováno do IMDM média s FCSi, ATB, BSD, PURO a kultivováno 3 dny.

Během třetí fáze byly připraveny z každého z replikátů dva až čtyři vzorky po  $5 \cdot 10^6$  buněk v závislosti na počtu buněk buněčné kultury. Zároveň během třetí fáze byly buněčné kultury v jednotlivých kultivačních lahvích zamrazovány. Bylo zamraženo mezi  $20 \cdot 10^6$  až  $40 \cdot 10^6$  buněk ve 4 ml zamrazovacího média opět v závislosti na růstu buněčné kultury.

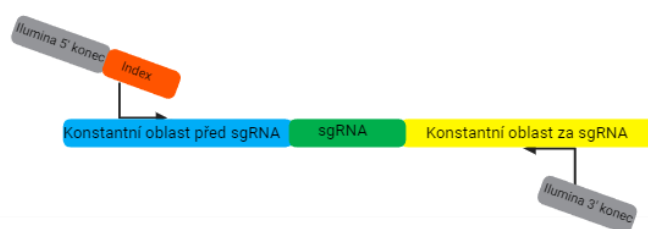
Po čtyřech cyklech ošetření testovanými látkami bylo přistoupeno k sekvenační analýze fenotypu buněk selektovaných látkou PNH192 a látkou DMSO.

#### 4.2.4 Izolace genomické DNA

Z pelet obsahujících  $5 \cdot 10^6$  buněk po čtvrtém ošetření DMSO a PNH192 v triplikátu byla izolována DNA na přístroji MagCore. Byla provedena restrikce pomocí *SbfI* restriktasy, přičemž restriktasa štěpí DNA sekvenci na přesně daném místě sekvence, které je uvedeno v Obrázek 9. Po restrikci vznikl templát pro následné NGS sekvenaci a polymerasovou řetězcovou reakci (PCR), kdy jako templát sloužily konstantní oblasti před a za sgRNA sekvencí vložené kazety. Následná NGS sekvenace byla provedena na Illumina platformě (Obrázek 10). Vzniklé templáty pro PCR byly přečištěny prostřednictvím SPRIselect Beads (Beckman Coulter). Na Nanodropu byla změřena koncentrace a čistota získaných DNA templátů.



Obrázek 9: Místo štěpení restrikční endonukleasy *SbfI*.



Obrázek 10: Schéma kazety, ve které byla sgRNA vložena do genomu, s amplifikovanou Illumina sekvencí na 3' a 5' koncích a indexy umožňující identifikaci vzorků.

#### 4.2.5 PCR transdukované DNA a horizontální elektroforéza sgRNA začleněné v genomické DNA

Byl připraven Master mix pro PCR (polymerasová řetězcová reakce) ve čtyřech krocích. V prvním kroku byly smíchány objemy roztoků pro 8 PCR reakcí podle Tabulka 3. Následně byl do mikrozkušavek pro PCR přidán templát v objemu obsahující 500 ng genomické DNA po restrikci a přečištění a doplněn DEPC vodou do objemu 99  $\mu$ l. V posledním kroku byl přidán 1  $\mu$ l Phusion polymerasy.

Byly použity kódující (forward) a antikódující (reverse) primery poskytnuté Geneti Biotech Hradec Králové se sekvencemi uvedenými v Obrázek 11. Primery amplifikovaly konstantní oblasti kazety s vloženou sgRNA sekvencí.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro 8 reakcí.

Látka	Na 1 PCR reakci	Na 8 PCR reakcí
GC pufr	20,0 $\mu$ l	160,0 $\mu$ l
DMSO	3,0 $\mu$ l	24,0 $\mu$ l
Kódující (forward) primer (100 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ l	3,2 $\mu$ l
Nekódující (reverse) primer (100 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ l	3,2 $\mu$ l
Deoxyribonukleotidové trifosfáty (dNTPs) (10 mM)	2,0 $\mu$ l	16,0 $\mu$ l
DEPC voda	-	-
DNA templát	500,0 ng	-
Phusion polymerasa	1,0 $\mu$ l	-

Forward: 5'→3':

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCC  
AGTCACCTTGTAGCACAAAAGGAACTCACCCCT

Reverse: 5'→3':

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGACTCGGTGCCACTTTTTTC

Obrázek 11: Sekvence použitých primerů pro PCR reakci.

Do termocyklu bylo vloženo 7 vzorků s odlišnými templáty (viz Tabulka 4). V termocyklu probíhala PCR ve třech fázích, denuraci, hybridizaci a elongaci v 35 cyklech. Denurace probíhala 30 vteřin při 98 °C, hybridizace 30 vteřin při 56 °C a elongace 30 vteřin a při 72°C. PCR reakce byla ukončena ochlazením termocyklu na 4 °C.

Tabulka 4: Seznam označení templátů pro PCR se specifikací.

Označení	PCR templát
Voda	Voda po restrikci SbfI (negativní kontrola)
K562 dCas9 KRAB DMSO A	Genomická DNA po restrikci SbfI izolována z linie K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření DMSO z 1. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB DMSO B	Genomická DNA po restrikci SbfI izolována z linie K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření DMSO z 2. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB DMSO C	Genomická DNA po restrikci SbfI izolována z linie K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření DMSO ze 3. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB PNH192 A	Genomická DNA po restrikci SbfI izolována z linie K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření PNH192 z 1. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB PNH192 B	Genomická DNA po restrikci SbfI izolována z linie K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření PNH192 z 2. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB PNH192 C	Genomická DNA po restrikci SbfI izolována z linie K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření PNH192 ze 3. biologického replikátu

Byl připraven 2% agarosový gel rozvařením agarosy v 1x TBE pufru s přidavkem fluorescenčního barviva GelRed. Do jamek v agarosovém gelu byly nanášeny PCR produkty smíchané s nanášecím pufrům Loading Dye a také DNA Ladder k porovnání molekulových hmotností separovaných produktů. Byla provedena horizontální elektroforéza

v 1x TBE pufru při 90 V 1 hodinu a 50 minut. Poté byly prostřednictvím detekčního systému ChemiDoc detekovány rozseparované produkty PCR reakce.

#### **4.2.6 Izolace proteinů a detekce dCas9 za použití Western blottingu**

Pelety obsahující  $5 \cdot 10^6$  buněk K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření DMSO v triplikátu, K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření PNH192 v triplikátu, K562 WT a K562 dCas9 KRAB byly lyzovány 25 minut prostřednictvím RIPA pufru obohaceného o inhibitory proteas a fosfatas. Následně byly vzorky sonifikovány 2 minuty v ultrazvukové lázni a centrifugovány při 4 °C a 14 000 rpm 25 minut. Supernatant obsahující uvolněné proteiny byl přepipetován do nové mikrozkušavky a pomocí Pierce™ BCA kitu byla kolorimetricky stanovena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Následně byly vzorky naředěny na jednotnou koncentraci 50 µg/20 µl a byl k nim přidán 5x koncentrovaný SDS pufr. Vzorky byly promíchány na třepačce Vortex, zahřáty na 95 °C, zcentrifugovány a uskladněny v -20 °C.

Proteiny byly separovány v 12% akrylamidovém gelu vertikální elektroforézou v TGS pufru, při napětí 80 V na 30 minut a poté při 120 V dalších 60 minut. Do jamek byly nanесeny roztoky v pořadí uvedeném v Tabulka 5.

Nitrocelulosoová membrána a filtrační papíry byly namočený v 1x transferovém pufru. Do blotovací aparatury pro semi-dry western blotting byl položen filtrační papír, poté na něj byla umístěna nitrocelulosoová membrána, následně akrylamidový gel obsahující vzorky a nakonec opět filtrační papír. Blotovací aparatura byla nastavena na 2,5 A a 25 W na 10 minut.

Po blotování byla membrána rozříznuta na proužky odpovídající molekulové hmotnosti detekovaných proteinů 45 kD pro β-aktin a 164 kD pro dCas9 podle markeru molekulových hmotností. Části nitrocelulosoové membrány byly blokovány hodinu v blokačním roztoku (1x TBS-T s 5 % BSA). Poté byly membrány inkubovány přes noc v roztoku primární protilátky (viz Tabulka 6) zředěné v 1x TBS-T s 5 % BSA při 4 °C na rolleru.

Po inkubaci byly membrány 3x opláchnuty v roztoku 1x TBS-T na třepačce vždy po dobu 5 min. Opláchnuté membrány byly inkubovány hodinu v roztoku sekundární protilátky (viz Tabulka 6) zředěné v 1x TBS-T s 5 % BSA na kývačce. Po inkubaci byly opět 3x opláchnuty v roztoku 1x TBS-T. Následně byly na membránách vizualizovány dané proteiny prostřednictvím detektoru chemiluminiscence ChemiDoc.

Tabulka 5: Seznam označení vzorků při western blottingu se specifikací.

Označení	Buněčná linie
Marker molekulových hmotností	-
K562 WT	K562 wild type (standardní genotyp)
K562 dCas9 KRAB	K562 dCas9 KRAB
K562 dCas9 KRAB DMSO A	K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření DMSO z 1. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB DMSO B	K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření DMSO z 2. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB DMSO C	K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření DMSO ze 3. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB PNH192 A	K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření PNH192 z 1. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB PNH192 B	K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření PNH192 z 2. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB PNH192 C	K562 dCas9 KRAB po čtvrtém ošetření PNH192 ze 3. biologického replikátu
K562 dCas9 KRAB	K562 dCas9 KRAB



Tabulka 6: Informace primárních a sekundárních protilátek použitých během western blottingu.

<b>Protilátka</b>	<b>Katalogové číslo</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Ředění v TBS pufru s 0,1% Tween 20 a 5% BSA</b>
Primární protilátka proti dCas9 (králíčí)	ab210752	Abcam (Velká Británie)	1:5 000
Primární protilátka proti $\beta$ -aktinu (myši)	A2228	Sigma-Aldrich (USA)	1:4 000
Sekundární protilátka proti myši značená křenovou peroxidasou	A2304	Sigma-Aldrich (USA)	1:10 000
Sekundární protilátka proti králíkovi značená křenovou peroxidasou	A0545	Sigma-Aldrich (USA)	1:10 000

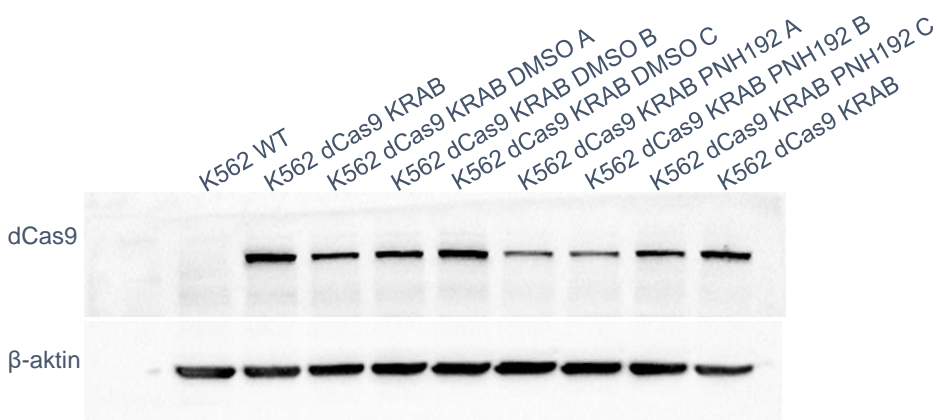
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Ověření exprese domény dCas9 KRAB

Před provedením NGS sekvenování bylo nutné ověřit, zda selektované buněčné linie exprimovaly doménu dCas9 KRAB po ošetření látkami PNH192 a DMSO. Což je jedna ze dvou podmínek provedení CRISPR interferenčního sekvenování. Ověření bylo provedeno pomocí western blottingu, který umožnil detekovat přítomnost dCas9 proteinu v buněčných lyzátech.

K provedení vertikální elektroforézy byly připraveny vzorky z buněčných linií K562 wild type, K562 dCas9 KRAB, K562 dCas9 KRAB s sgRNA knihovnou po čtvrtém ošetření DMSO po kultivaci v triplicátu, K562 dCas9 KRAB s sgRNA knihovnou po čtvrtém ošetření PNH192 po kultivaci v triplicátu.

Z rozseparovaných proteinů byl proveden Western blotting k detekci dCas9 a  $\beta$ -aktinu. Nitrocelulosové membrány po detekci  $\beta$ -aktinu a po detekci dCas9 jsou uvedeny v Obrázek 12. Z detekce  $\beta$ -aktinu vyplývá, že vzorky byly nanесeny ve stejném množství proteinů, a při detekci dCas9 byl protein detekován v drahách 3 až 10, kde byly přítomny i vzorky z buněčných linií po ošetření látkami PNH192 a DMSO. Což potvrzuje expresi dCas9 KRAB domény během celého procesu kultivace a selekce.



Obrázek 12: Nitrocelulosová membrána po specifické detekci dCas9 proteinu (nahore) a  $\beta$ -aktinu (dole) prostřednictvím sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou k ověření exprese dCas9 KRAB domény. Exprese byla potvrzena u buněčných liniích po selekci látkami DMSO a PNH192 ve všech třech biologických replikátech.

### 5.2 Ověření exprese knihovny sgRNA

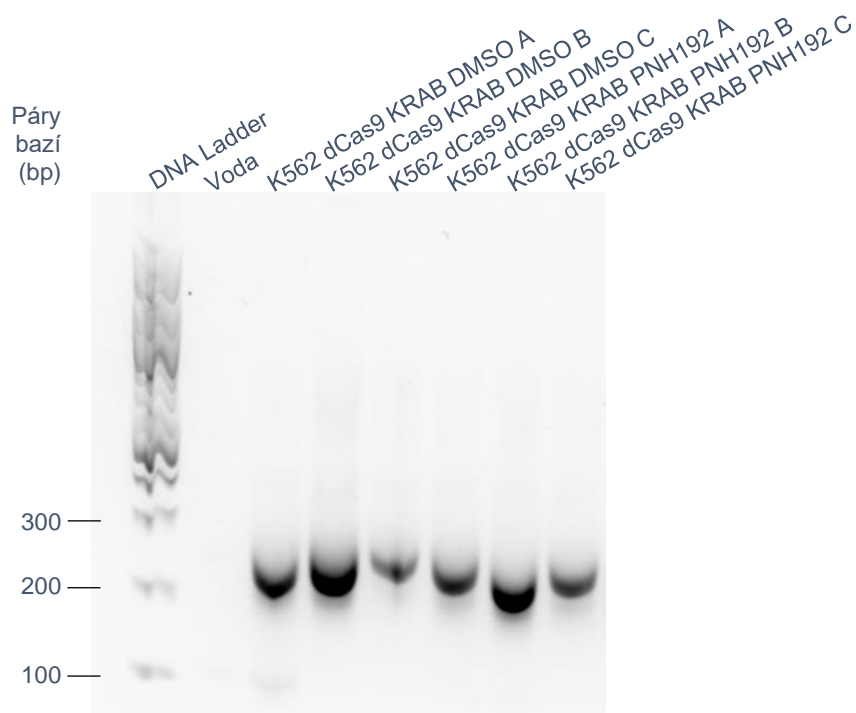
Před NGS sekvenováním bylo nezbytné ověřit, zda buněčné linie, které byly selektovány látkami PNH192 a DMSO, exprimovaly sgRNA, tedy jestli byla knihovna sgRNA integrována do genomu. To představovalo, po ověření exprese dCas9 KRAB domény,

druhou podmínku správného provedení CRISPR interferenčního screeningu. Ověření bylo provedeno pomocí polymerasové řetězové reakce a horizontální elektroforézy.

Z izolované genomové DNA po restrikci enzymem SbfI a přečištění získané kazety pomocí SPRI kuliček byla provedena PCR. Připravené PCR produkty byly separovány horizontální elektroforézou pro určení jejich molekulových hmotností, specifity a výtěžnosti PCR reakce.

Výsledný elektroforetogram je uveden v Obrázek 13 a ukazuje bandy v drahách 3 až 8 potvrzující expresi knihovny sgRNA v buněčných liniích K562 dCas9 KRAB, selektovaných látkami DMSO i PNH192 v každém z kultivovaných triplicátů. Podle elektroforetogramu měly PCR produkty buněčných linií molekulovou hmotnost okolo 200 bp, což odpovídá očekávanému rozmezí molekulové hmotnosti 200 – 300 bp.

Rozdílná intenzita bandů souvisí s nejednotným množstvím nanesených PCR produktů. Vyšší intenzita odpovídá většímu množství PCR produktů, které pak mají tendenci rychleji migrovat v gelové matici.

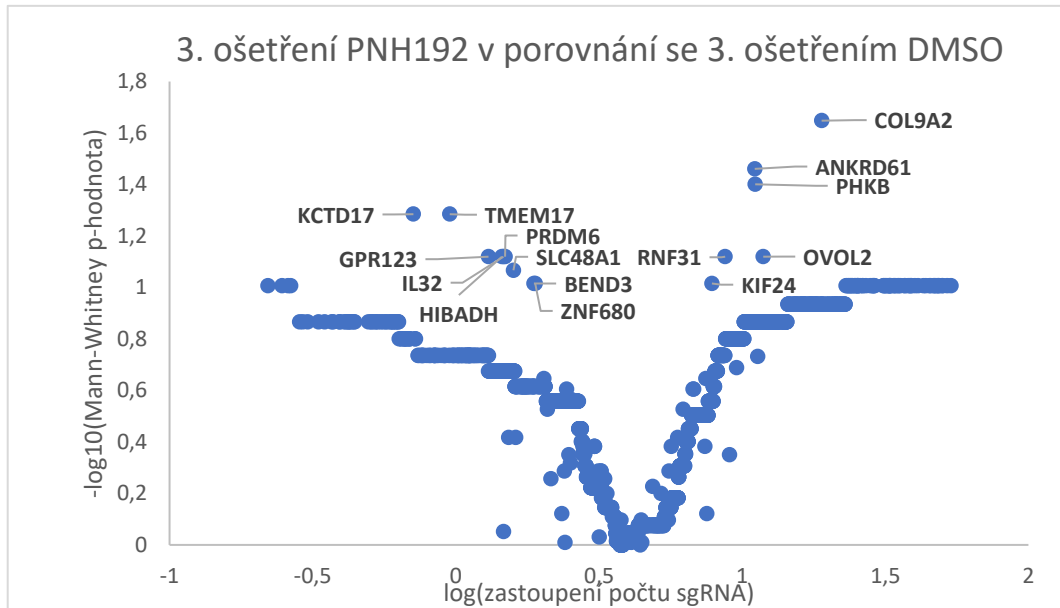


Obrázek 13: Elektroforetogram DNA Ladderu a PCR produktů k ověření exprese sgRNA. Exprese byla potvrzena přítomností bandů v buněčných liniích po selekci látkami DMSO a PNH192 ve všech třech biologických replikátech.

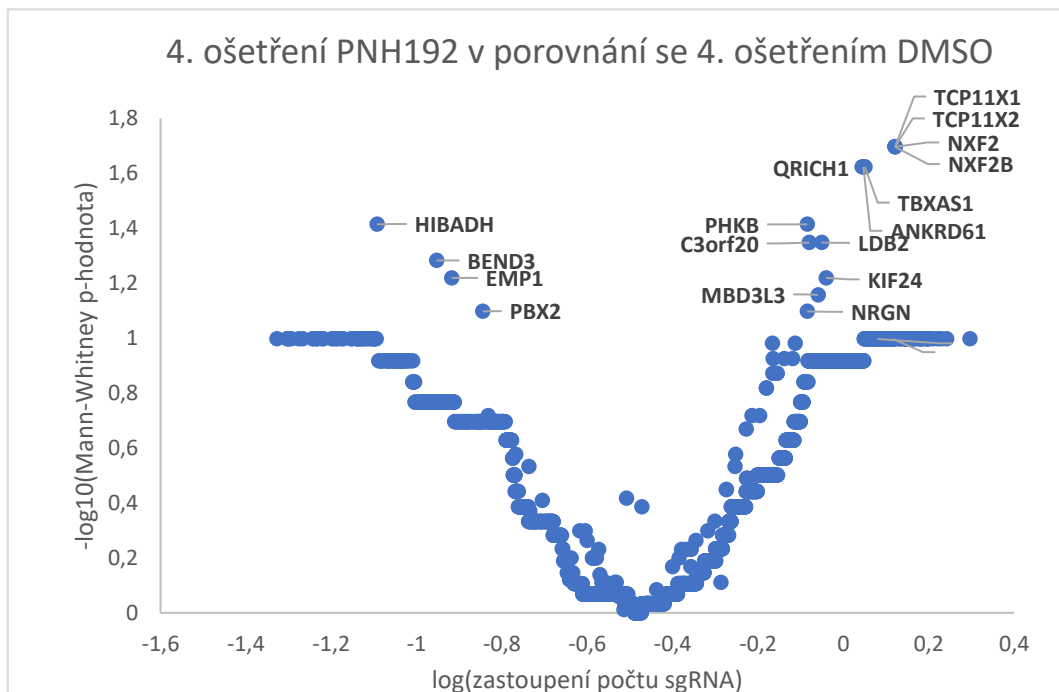
### 5.3 Stanovení molekulárních cílů látky PNH192

Bylo provedeno NGS sekvenování, za použití Illumina platformy, vzorků po třech a čtyřech ošetřeních látkou PNH192 a výsledky uvedené v Graf 1 a Graf 2 jsou vztaženy k selekci

látkou DMSO. Oproti třetímu ošetření došlo během čtvrtého ošetření k vyšší selekci cílových genů a genů podmiňujících rezistenci vůči PNH192.



Graf 1: Molekulární cíle látky PNH192 a geny podmiňující rezistenci na PNH192 porovnané po 3 sériích ošetření PNH192 a DMSO. Osa x vyjadřuje zastoupení počtu jednotlivých sgRNA v logaritickém vyjádření a osa y vyjadřuje míru signifikance tzv. p-hodnotou v logaritickém vyjádření. Statisticky významné hodnoty při logaritickém vyjádření odpovídají hodnotám vyšším než 1,3. V pravé části grafu se nachází geny označené jako molekulární cíle látky PNH192 a levé části geny podmiňující rezistenci na látku PNH192.



Graf 2: Molekulární cíle látky PNH192 a geny podmiňující rezistenci na PNH192 porovnané po 4 sériích ošetření PNH192 a DMSO. Osa x vyjadřuje zastoupení počtu jednotlivých sgRNA v logaritickém vyjádření a osa y vyjadřuje míru signifikance tzv. p-hodnotou v logaritickém vyjádření. Statisticky významné hodnoty při logaritickém vyjádření odpovídají hodnotám vyšším než 1,3. V pravé části grafu se nachází geny označené jako molekulární cíle látky PNH192 a levé části geny podmiňující rezistenci na látku PNH192.

Prostřednictvím CRISPRi došlo k inhibici genů napříč lidským genomem. Během selekce PNH192 proliferovaly buňky, u kterých byl inhibován gen, na který látka cytotoxicky působí, ten byl tedy označen jako molekulární cíl.

Osa x vyjadřuje zastoupení počtu jednotlivých sgRNA a osa y vyjadřuje míru signifikance tzv. p-hodnotou v logaritmickeém vyjádření určenou prostřednictvím Mann-Whitney testu. Podle Mann-Whitney testu jsou statisticky významné sgRNA inhibující geny při p-hodnotě nižší než 0,05, které při logaritmickeém vyjádření odpovídají hodnotám vyšším než 1,3. Jako signifikantní výsledky v Graf 2 se budou označovat rovněž sgRNA, jejichž hodnoty y v grafu jsou vyšší než 1,3.

Z Graf 2 vyplývá, že látka PNH192 cílí na geny *TCP11X1*, *TCP11X2*, *NXF2*, *NXF2B*, *QRICH1*, *TBXAS1*, *ANKRD61*, *PHKB*, *C3ORF20* a *LDB2*, jelikož hodnota statistické signifikance překročila 1,3 a potvrzuje významný vliv na ošetření látkou PNH192. Geny *KIF24*, *MBD3L3* a *NRGN* s nižší pravděpodobností budou také molekulární cíle látky PNH192, jelikož z hlediska Mann-Whitney testu není jejich signifikance tak výrazná.

### **5.3.1 *TCP11X1*, *TCP11X2* (T-complex 11 family, X-linked 1; T-complex 11 family, X-linked 2)**

Gen *TCP11* se nachází na chromozomu 6 a kóduje T-komplex protein 11, který je fyziologicky exprimován ve tkáních a buňkách varlat během spermatogeneze. Změny v genu *TPC11* jsou charakteristické pro karcinosarkom dělohy a zvýšená exprese genu je pozorována u pacientů s bilaterální varikokélou a pacientek s nádorem děložního čípku. Z toho důvodu je možné protein *TCP11* potenciálně použít jako biomarker onemocnění. Zároveň u nádoru děložního čípku je zvýšená exprese spojena s pozitivnější prognózou pro pacientky, jelikož nadměrná exprese genu blokuje buněčný cyklus a zvyšuje apoptosu (*TCP11*, *The Human Protein Atlas*, 2003; Wang et al., 2023).

### **5.3.2 *NXF2*, *NXF2B* (Nuclear RNA export factor 2; Nuclear RNA export factor 2B)**

Gen *NXF2* kóduje protein jaderného RNA exportního faktoru 2, který se exprimuje ve varlatech a má funkci při vývoji spermií, kdy se jako exportér mRNA podílí na mužské plodnosti. *NXF2* je zároveň antigen nádoru varlat, což je skupina antigenů, která je exprimována primárně u zárodečných buněk avšak i u buněk nádorových (*NXF2*, *The Human Protein Atlas*, 2003).

Během mitosy může docházet k tvorbě abnormálního dělicího vřetenka, které je zodpovědné za chyby při segregaci chromozomů a následné možnosti vzniku nádorové buňky. Avšak při vzniku abnormálního dělicího vřetenka často dochází k apoptose buňky,

a tím i omezení růstu nádoru. Aktivace genu *NXF2* je spojená s obnovou správné funkce mitosy minimalizací dysfunkce mitotického vřeténka, a tím je umožněn opětovný růst nádoru (Van Tongelen et al., 2017).

Bylo zjištěno, že u chronické lymfocytární leukémie a akutní myeloidní leukémie po nadměrné expresi *NXF2* vykazoval gen vysokou imunogenicitu k vyvolání nádorově specifické imunitní reakce a *NXF2* by bylo potenciálně možno použít jako cíl imunoterapie (Zhou et al., 2013).

### **5.3.3 *QRICH1* (Glutamine rich 1)**

Gen *QRICH1* kóduje protein bohatý na glutamin 1, který se fyziologicky nejvíce exprimuje ve varlatech. V rámci mozku je nevyšší exprese v mozkové kůře a mozečku. *QRICH1* slouží jako prognostický marker při nádoru vaječníků a byl navržen na kandidátní gen pro diagnózu opožděného vývoje. Mutace v genu *QRICH1* je spojována s vývojovým opožděním jedince a klinickými příznaky jako například chondrodysplazie, mikrocefalie nebo dysmorfismus obličeje (*QRICH1, The Human Protein Atlas, 2003; Kumble et al., 2022*).

### **5.3.4 *TBXAS1* (Thromboxane A synthase 1)**

Gen *TBXAS1* kóduje enzym tromboxan A syntasa 1, který katalyzuje přeměnu prostaglandinu H2 na tromboxan A2. Tromboxan A2 indukuje konstrikci cév a agregaci krevních destiček. Gen se nadměrně exprimuje u nádoru ledvin a myeloidní leukemii a zvýšená exprese v mozku je v rámci imunitní odpovědi u makrofágů a mikroglíí. *TBXAS1* by mohl být jako jeden z šesti genů považován za potenciální biomarker u nádoru močového měchýře, kdy všech šest genů bylo exprimováno v makrofázích asociovanými s tumorem (TAM), zejména s makrofágy M2, které mohou podporovat proliferaci nádoru a vznik metastáz (*TBXAS1, The Human Protein Atlas, 2003; Jiang et al., 2022*).

### **5.3.5 *ANKRD61* (Ankyrin repeat domain 61)**

Gen *ANKRD61* kóduje protein nazývaný ankyrinová repetitivní doména 61, který je lokalizován v nukleoplazmě a exprimuje se ve varlatech. V současné době není gen ani jeho exprese spojována s jakýmkoliv onemocněním (*ANKRD61, The Human Protein Atlas, 2003*).

### **5.3.6 *PHKB* (Phosphorylase kinase regulatory subunit beta)**

Gen *PHKB* kóduje regulační beta podjednotku enzymu fosforylasy kinasy a nadexprimuje se u nádoru ledvin, štítné žlázy a kolorektálního karcinomu. Fosforylasy kinasa (PhK) je serin/threonin specifická proteinkinasa, která katalyzuje fosforylaci serinového zbytku

v substrátech. PhK je složen ze 16 podjednotek, přičemž každá ze skupin  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  poskytuje 4 podjednotky, které jsou kódovány jinými geny. Podjednotky  $\alpha$  jsou kódovány geny *PHKA1*, *PHKA2*, podjednotky  $\beta$  genem *PHKB*, podjednotky  $\gamma$  geny *PHKG1*, *PHKG2* a podjednotky  $\delta$  geny *CALM1*, *CALM2*, *CALM3* (*PHKB, The Human Protein Atlas*, 2003).

Zároveň funkční PhK aktivuje fosforylasu, která katalyzuje uvolnění glukosy z glykogenu ve formě glukosa-1-fosfátu, který se přemění na glukosa-6-fosfát, což souvisí s lepšími podmínkami přežití nádorových buněk při nepříznivých podmínkách (Terashima et al., 2014; Kishnani et al., 2019).

### 5.3.7 *C3ORF20* (Chromosome 3 Open Reading Frame 20)

Gen *C3ORF20* kóduje protein nazývaný otevřený čtecí rámeček 20 chromozomu 3, který se exprimuje ve varlotech a neuronech. Předpokládá se, že gen *C3ORF20* souvisí s citlivostí na opiáty a mohl by být potenciálně používán jako marker pro personalizovanou dávku opioidních analgetik (*C3ORF20, The Human Protein Atlas*, 2003; Nishizawa et al., 2022).

### 5.3.8 *LDB2* (LIM domain binding 2)

Gen *LDB2* kóduje transkripční kofaktor vázající se doménu LIM a exprimuje se v tukové tkáni a neuronech. Snížená exprese *LDB2* se vyskytuje u pacientů s hepatocelulárním karcinomem a způsobuje aktivaci proliferace a migrace buněk karcinomu. V kombinaci s dalšími třemi geny může sloužit jako biomarker pro časnou detekci kolorektálního karcinomu a pokročilých adenomů (*LDB2, The Human Protein Atlas*, 2003; Yu et al., 2017; Gallardo-Gómez et al., 2023).

### 5.3.9 *KIF24* (Kinesin family member 24)

Gen *KIF24* kóduje člen proteinové rodiny kinesin 24, který je exprimován ve varlotech a choroidním plexu a využívá se jako prognostický marker u nádoru děložní čípku. Protein *KIF24* interaguje s centrosomálními proteiny o hmotnosti 97 kD (CEP97) a 110 kD (CP110), které regulují délku centriol a vznik řasinek. Přičemž při plné inhibici *KIF24* dochází k nárůstu počtu vznikajících řasinek, avšak bez vlivu na délku centriol. *KIF24* je nadměrně exprimován v tkáních při nádoru prsu, přičemž inhibice genu *KIF24* způsobuje snížení proliferace nádorových buněk v prsu. (*KIF24, The Human Protein Atlas*, 2003; Li et al., 2020; Kobayashi et al., 2011).

### 5.3.10 *MBD3L3* (Methyl-CpG binding domain protein 3 like 3)

Gen *MBD3L3* kóduje protein vázající methyl-CpG doménu, který slouží jako represor během regulace transkripce. V současné době není gen ani jeho exprese spojována s jakýmkoliv onemocněním (*MBD3L3, The Human Protein Atlas, 2003*).

### 5.3.11 *NRGN* (Neurogranin)

Gen *NRGN* kóduje neurogranin, který se exprimuje v mozku během neuronové signalizace. Neurogranin se váže na kalmodulin při nízkých hladinách vápníku nebo v jeho nepřítomnosti. Gen se používá jako prognostický marker u karcinomu ledvin a existuje předpoklad, že se jedná o cíl pro hormony štítné žlázy. Exprese genu *NRGN* je snižena v buňkách gliomu. Zvýšená exprese způsobuje zhoršení proliferace buněk gliomu, což značí roli genu jako tumor supresoru (*NRGN, The Human Protein Atlas, 2003; Yang et al., 2020*).

## 5.4 Geny podmiňující rezistenci vůči látce PNH192

Naopak během selekce PNH192 nepřežily buňky, u kterých byl inhibován gen, který umožňuje buňkám přežít i po vystavení látce, proto byly tyto geny označeny jako geny podmiňující rezistenci na PNH192.

Z Graf 2 lze za geny podmiňující rezistenci vůči látce PNH192 označit primárně *HIBADH*, dále s nižší pravděpodobností *BEND3*, *EMP1* a *PBX2*.

### 5.4.1 *HIBADH* (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase)

Gen *HIBADH* kóduje enzym 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenasu, která hraje v roli v metabolismu L-valinu a exprimuje se v játrech a ledvinách. Je známa mutace v genu *HIBADH* jejímž vlivem došlo k posunu ve čtecím rámci a vytvoření předčasného stop kodonu, což vede ke ztrátě funkčnosti enzymu. Při narušení exprese genu *HIBADH* dochází ke vzniku metabolické poruchy, jelikož se akumuluje kyselina 3-hydroxybutanová po degradaci valinu. Exprimovaný protein genu *HIBADH* interaguje s proteinem 14-3-3 $\sigma$  a potlačuje proliferaci a tvorbu kolonií lidských kmenových buněk u nádoru tlustého střeva (*HIBADH, The Human Protein Atlas, 2003; Meyer et al., 2021; Zou, 2013*).

### 5.4.2 *BEND3* (BEN domain containing 3)

Gen *BEND3* kóduje protein obsahující doménu BEN, přičemž jeho exprese probíhá zejména v tkáních žaludku během proteolýzy. Protein má funkci jako transkripční represor při transkripci ribozomální DNA. *BEND3* se váže na promotory faktorů souvisejících s diferenciací a na regulátory buněčného cyklu. *BEND3* je vysoce exprimován



v pluripotentních buňkách a indukce diferenciaci vede ke snížení expresi *BEND3*, přičemž při odstranění *BEND3* se buňky začnou chovat jako diferenciované. *BEND3* interaguje s promotory inhibitorů buněčného cyklu, jako je například protein p21, a inhibice v genu *BEND3* vede k vyšší expresi inhibitorů buněčného cyklu, což způsobí inhibici celého buněčného cyklu (*BEND3, The Human Protein Atlas, 2003; Kurniawan et al., 2022*).

#### **5.4.3 *EMP1* (Epithelial membrane protein 1)**

Gen *EMP1* kóduje epiteliální membránový protein 1, který je exprimován v dlaždicovém epitelu, kde probíhá nespecifická imunitní odpověď, jelikož se protein podílí na vychlipování buněčné membrány během apoptosy. Snížená exprese proteinu je zaznamenána v tkáních nasofaryngeálního karcinomu, kde způsobuje snížení efektivity buněčné apoptosy a souvisí s nárůstem schopnosti migrace a invaze do okolních tkání (*EMP1, The Human Protein Atlas, 2003; Sun et al., 2014*).

#### **5.4.4 *PBX2* (PBX homeobox 2)**

Gen *PBX2* kóduje transkripční faktor pre-B-buněčné leukémie. Jedná se o protein z rodiny homeoboxů, který se jako transkripční aktivátor váže na promotor *TLX1*. Lze jej využít jako prognostický marker u karcinomů endometria a vaječníku. Exprese *PBX2* reguluje expresi cyklin-dependentní kinasy 6 (CDK6). Při snížené expresi *PBX2* dochází ke snížení exprese CDK6, což vede k potlačení buněčné proliferace a invazivity (*PBX2, The Human Protein Atlas, 2003; Zhang et al., 2023*).

## 6 ZÁVĚR

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše na témata související s CRISPR/Cas systémem a jeho schopností editace genomu a regulace transkripce. Bylo detailně zpracováno fungování CRISPR prokaryotního imunitního systému, schopnost účinné editace genomu a regulace genové exprese. Zároveň v rámci témat editace genomu a regulace transkripce byly popsány i další metody umožňující podobné manipulace či regulace.

Hlavním cílem praktické části bakalářské práce bylo identifikovat molekulární cíle nukleosidového derivátu PNH192, který prokazuje silnou cytotoxicitu k nádorovým buňkám. Ke stanovení byl využit CRISPR interferenční screening na úrovni kompletního lidského genomu, jehož princip je založen na inhibici genové exprese pomocí CRISPR komponent. Při selekčním tlaku testovanou cytotoxickou látkou dochází k proliferaci buněk, jejichž gen označovaný jako molekulární cíl je inhibován. Ke smrti naopak dochází u buněk, u kterých je inhibován gen podmiňující rezistenci na testovanou látku. Na základě velmi rozdílné proliferace dochází ke stanovení molekulárních cílů a genů zodpovědných za rezistenci k této látce.

Součástí ověření správnosti postupu bylo potvrzení exprese CRISPR komponent v buněčném genomu. Do genomu nádorové buněčné linie K562 byl transdukován gen dCas9 KRAB, jehož přítomnost byla ověřena western blottingem, a sgRNA celogenomová knihovna, u které byla přítomnost ověřena PCR a elektroforézou.

U zkoumané látky PNH192 byly prostřednictvím CRISPR interferenčního screeningu následovaného NGS sekvenováním stanoveny tyto molekulární cíle: *TCP11X1*, *TCP11X2*, *NXF2*, *NXF2B*, *QRICH1*, *TBXAS1*, *ANKRD61*, *PHKB*, *C3ORF20*, *LDB2*, *KIF24*, *MBD3L3* a *NRGN*. Přirozenou rezistenci pak podmiňují geny *HIBADH*, *BEND3*, *EMP1* a *PBX2*.

Určení molekulárních cílů látky PNH192 a genů podmiňujících rezistenci vůči této látce představuje krok vpřed v oblasti výzkumu tohoto nukleosidového derivátu. PNH192 je již považován za potenciální protinádorové léčivo, z důvodu již zmíněné vysoké cytotoxicity k nádorovým buňkám, a pravděpodobně bude předmětem dalších zkoumání a testování zaměřených zejména na ověření mechanismu účinku a jeho využití jako léčiva nádorových onemocnění.

## 7 LITERATURA

Abudayyeh, O., Gootenberg, J., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I., Cox, D., Shmakov, S., Makarova, K., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E., Koonin, E., & Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299). <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>

*ANKRD61*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157999-ANKRD61>

Barnes, D. (2001). Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Current Biology*, 11(12), R455-R457. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00279-2)

*BEND3*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000178409-BEND3>

Berntorp, E., & Shapiro, A. (2012). Modern haemophilia care. *The Lancet*, 379(9824), 1447-1456. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61139-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61139-2)

Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 273-297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>

Bibikova, M., Golic, M., Golic, K., & Carroll, D. (2002). Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in *Drosophila* Using Zinc-Finger Nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169-1175. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.3.1169>

Birmingham, A., Anderson, E., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W., & Khvorova, A. (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature Methods*, 3(3), 199-204. <https://doi.org/10.1038/nmeth854>

Bitinaite, J., Wah, D., Aggarwal, A., & Schildkraut, I. (1998). Fok I dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10570-10575. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10570>

Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326(5959), 1509-1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>

Bosch, M., Lohman, P., & Pastink, A. (2002). DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination. *Biological Chemistry*, 383(6). <https://doi.org/10.1515/BC.2002.095>

Brennecke, J., Aravin, A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell*, 128(6), 1089-1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>

Brouns, S., Jore, M., Lundgren, M., Westra, E., Slijkuis, R., Snijders, A., Dickman, M., Makarova, K., Koonin, E., & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960-964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>

*C3ORF20*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131379-C3orf20>

Casamassimi, A., Federico, A., Rienzo, M., Esposito, S., & Ciccodicola, A. (2017). Transcriptome Profiling in Human Diseases: New Advances and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081652>

Clemson, C., Hutchinson, J., Sara, S., Ensminger, A., Fox, A., Chess, A., & Lawrence, J. (2009). An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles. *Molecular Cell*, 33(6), 717-726. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026>

Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J., Shi, Y., & Yan, N. (2012). Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science*, 335(6069), 720-723. <https://doi.org/10.1126/science.1215670>

Du, Z., Sun, T., Haciosuleyman, E., Fei, T., Wang, X., Brown, M., Rinn, J., Lee, M., Chen, Y., Kantoff, P., & Liu, X. (2016). Integrative analyses reveal a long noncoding RNA-mediated sponge regulatory network in prostate cancer. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms10982>

Elbashir, S., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494-498. <https://doi.org/10.1038/35078107>

*EMP1*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134531-EMP1>

Friedman, J., Fredericks, W., Jensen, D., Speicher, D., Huang, X., Neilson, E., & Rauscher, F. (1996). KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & Development*, 10(16), 2067-2078. <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.2067>

Gallardo-Gómez, M., Rodríguez-Girondo, M., Planell, N., Moran, S., Bujanda, L., Etxart, A., Castells, A., Balaguer, F., Jover, R., Esteller, M., Cubiella, J., Gómez-Cabrero, D., & De Chiara, L. (2023). Serum methylation of GALNT9, UPF3A, WARS, and LDB2 as

noninvasive biomarkers for the early detection of colorectal cancer and advanced adenomas. *Clinical Epigenetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-023-01570-1>

Gao, X., Tao, Y., Lamas, V., Huang, M., Yeh, W., Pan, B., Hu, Y., Hu, J., Thompson, D., Shu, Y., Li, Y., Wang, H., Yang, S., Xu, Q., Polley, D., Liberman, M., Kong, W., Holt, J., Chen, Z. et al. (2018). Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature*, 553(7687), 217-221. <https://doi.org/10.1038/nature25164>

Garneau, J., Dupuis, M., Villion, M., Romero, D., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>

Germier, T., Kocanova, S., Walther, N., Bancaud, A., Shaban, H., Sellou, H., Politi, A., Ellenberg, J., Gallardo, F., & Bystricky, K. (2017). Real-Time Imaging of a Single Gene Reveals Transcription-Initiated Local Confinement. *Biophysical Journal*, 113(7), 1383-1394. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.014>

Gilbert, L., Larson, M., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G., Torres, S., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E., Doudna, J., Lim, W., Weissman, J., & Qi, L. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442-451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>

Gilbert, L., Larson, M., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G., Torres, S., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E., Doudna, J., Lim, W., Weissman, J., & Qi, L. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442-451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>

Gootenberg, J., Abudayyeh, O., Lee, J., Essletzbichler, P., Dy, A., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N., Freije, C., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R., Livny, J., Regev, A., Koonin, E., Hung, D., Sabeti, P., Collins, J., & Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438-442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>

Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>

Hammond, S., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293-296. <https://doi.org/10.1038/35005107>

Han, J., Kim, M., Choi, B., Lee, J., Lee, G., Jeong, M., Lee, Y., Kim, E., Oh, H., Go, N., Lee, H., Lee, K., Kim, U., Lee, J., Kim, S., Chang, J., Lee, H., Song, D., & Yeom, S. (2022). In vivo delivery of CRISPR-Cas9 using lipid nanoparticles enables antithrombin

gene editing for sustainable hemophilia A and B therapy. *Science Advances*, 8(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj6901>

*HIBADH*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106049-HIBADH>

Horlbeck, M., Gilbert, L., Villalta, J., Adamson, B., Pak, R., Chen, Y., Fields, A., Park, C., Corn, J., Kampmann, M., & Weissman, J. (2016). Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19760>

Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, F., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T., Marraffini, L., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827-832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>

Chang, C., Bercovich, N., Loh, B., Jonas, S., & Izaurralde, E. (2014). The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1. *Nucleic Acids Research*, 42(8), 5217-5233. <https://doi.org/10.1093/nar/gku129>

Chen, B., Gilbert, L., Cimini, B., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G., Park, J., Blackburn, E., Weissman, J., Qi, L., & Huang, B. (2013). Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell*, 155(7), 1479-1491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A., & Voytas, D. (2010). Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics*, 186(2), 757-761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>

Jack, K., Bellodi, C., Landry, D., Niederer, R., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A., Thompson, S., Ruggero, D., & Dinman, J. (2011). rRNA Pseudouridylation Defects Affect Ribosomal Ligand Binding and Translational Fidelity from Yeast to Human Cells. *Molecular Cell*, 44(4), 660-666. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.017>

Jansen, R., Embden, J., Gastra, W., & Schouls, L. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565-1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>

Ječmeňová, K. (2020). *Vývoj a charakteristika linií rezistentních k purinovým a pyrimidinovým cytostatikům* [Diplomová práce (Mgr.), Univerzita Palackého v Olomouci]. <https://theses.cz/id/yc95es/>

Jiang, Y., Qu, X., Zhang, M., Zhang, L., Yang, T., Ma, M., Jing, M., Zhang, N., Song, R., Zhang, Y., Yang, Z., Zhang, Y., Pu, Y., & Fan, J. (2022). Identification of a six-gene

prognostic signature for bladder cancer associated macrophage. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.930352>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

*K562 line*, ATCC. (1995). American Type Culture Collection. Retrieved 2024-04-11, from <https://www.atcc.org/products/ccl-243>

*KIF24*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186638-KIF24>

Kim, V., Han, J., & Siomi, M. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126-139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>

Kim, Y., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156-1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>

Kishnani, P., Goldstein, J., Austin, S., Arn, P., Bachrach, B., Bali, D., Chung, W., El-Gharbawy, A., Brown, L., Kahler, S., Pendyal, S., Ross, K., Tsilianidis, L., Weinstein, D., & Watson, M. (2019). Diagnosis and management of glycogen storage diseases type VI and IX: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 21(4), 772-789. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0364-2>

Kobayashi, T., Tsang, W., Li, J., Lane, W., & Dynlacht, B. (2011). Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. *Cell*, 145(6), 914-925. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.028>

Kugel, J., & Goodrich, J. (2012). Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(4), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.12.003>

Kumble, S., Levy, A., Punetha, J., Gao, H., Ah Mew, N., Anyane-Yeboah, K., Benke, P., Berger, S., Bjerglund, L., Campos-Xavier, B., Ciliberto, M., Cohen, J., Comi, A., Curry, C., Damaj, L., Denommé-Pichon, A., Emrick, L., Faivre, L., Fasano, M. et al. (2022). The clinical and molecular spectrum of QRI1 associated neurodevelopmental disorder. *Human Mutation*, 43(2), 266-282. <https://doi.org/10.1002/humu.24308>

Kurniawan, F., Chetlangia, N., Kamran, M., Redon, C., Pongor, L., Sun, Q., Lin, Y., Mohan, V., Shaqildi, O., Asoudegi, D., Hao, Q., Khan, A., Aladjem, M., Prasanth, K., & Prasanth, S. (2022). BEND3 safeguards pluripotency by repressing differentiation-associated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.2107406119>

Lam, J., Chow, M., Zhang, Y., & Leung, S. (2015). siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>

*LDB2, The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169744-LDB2>

Lee, T., & Young, R. (2013). Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease. *Cell*, 152(6), 1237-1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.014>

Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>

Li, L., Wu, L., & Chandrasegaran, S. (1992). Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10), 4275-4279. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4275>

Li, T., Zeng, H., Shan, Z., Ye, R., Cheang, T., Zhang, Y., Lu, S., Zhang, Q., Shao, N., & Lin, Y. (2020). Overexpression of kinesin superfamily members as prognostic biomarkers of breast cancer. *Cancer Cell International*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01191-1>

Liu, P., Chen, M., Liu, Y., Qi, L., & Ding, S. (2018). CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 22(2), 252-261.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.001>

Liu, X., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., Shu, J., Dadon, D., Young, R., & Jaenisch, R. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167(1), 233-247.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.056>

Makarova, K., Wolf, Y., Alkhnbashi, O., Costa, F., Shah, S., Saunders, S., Barrangou, R., Brouns, S., Charpentier, E., Haft, D., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F., Terns, R., Terns, M., White, M., Yakunin, A., Garrett, R., van der Oost, J. et al. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>

Makarova, K., Wolf, Y., Iranzo, J., Shmakov, S., Alkhnbashi, O., Brouns, S., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F., Scott, D., Shah, S., Siksnyš, V., Terns, M., Venclovas, Č., White, M., Yakunin, A. et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J., Norville, J., & Church, G. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>



Marraffini, L., & Sontheimer, E. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 181-190. <https://doi.org/10.1038/nrg2749>

*MBD3L3*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000182315-MBD3L3>

Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>

Meyer, M., Hollenbeck, J., Reunert, J., Seelhöfer, A., Rust, S., Fobker, M., Biskup, S., Och, U., Linden, M., Sass, J., & Marquardt, T. (2021). 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase ( HIBADH ) deficiency—A novel disorder of valine metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44(6), 1323-1329. <https://doi.org/10.1002/jimd.12410>

Miller, J., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K., Wang, J., Xia, D., Meng, X., Paschon, D., Leung, E., Hinkley, S., Dulay, G., Hua, K., Ankoudinova, I., Cost, G., Urnov, F., Zhang, H., Holmes, M., Zhang, L., Gregory, P. et al. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2), 143-148. <https://doi.org/10.1038/nbt.1755>

Mojica, F., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733-740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>

Nishizawa, D., Nagashima, M., Kasai, S., Hasegawa, J., Nakayama, K., Ebata, Y., Fukuda, K., Ichinohe, T., Hayashida, M., & Ikeda, K. (2022). Associations between the C3orf20 rs12496846 Polymorphism and Both Postoperative Analgesia after Orthognathic and Abdominal Surgeries and C3orf20 Gene Expression in the Brain. *Pharmaceutics*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040727>

*NRGN*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000154146-NRGN>

*NXF2*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000269405-NXF2>

Paddison, P., Caudy, A., Bernstein, E., Hannon, G., & Conklin, D. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development*, 16(8), 948-958. <https://doi.org/10.1101/gad.981002>

Pan, B., Géléoc, G., Asai, Y., Horwitz, G., Kurima, K., Ishikawa, K., Kawashima, Y., Griffith, A., & Holt, J. (2013). TMC1 and TMC2 Are Components of the Mechanotransduction Channel in Hair Cells of the Mammalian Inner Ear. *Neuron*, 79(3), 504-515. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.019>

Pavet, V., Portal, M., Moulin, J., Herbrecht, R., & Gronemeyer, H. (2011). Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene*, 30(1), 1-20. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.460>

Pavletich, N., & Pabo, C. (1991). Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å. *Science*, 252(5007), 809-817. <https://doi.org/10.1126/science.2028256>

*PBX2*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204304-PBX2>

Perlíková, P., Rylová, G., Nauš, P., Elbert, T., Tloušťová, E., Bourderioux, A., Slavětínská, L., Motyka, K., Doležal, D., Znojek, P., Nová, A., Harvanová, M., Džubák, P., Šiller, M., Hlaváč, J., Hajdúch, M., & Hocek, M. (2016). 7-(2-Thienyl)-7-Deazaadenosine (AB61), a New Potent Nucleoside Cytostatic with a Complex Mode of Action. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5), 922-937. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0933>

*PHKB*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000102893-PHKB>

Qi, L., Larson, M., Gilbert, L., Doudna, J., Weissman, J., Arkin, A., & Lim, W. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>

*QRICH1*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198218-QRICH1>

Rao, D., Senzer, N., Cleary, M., & Nemunaitis, J. (2009). Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development. *Cancer Gene Therapy*, 16(11), 807-809. <https://doi.org/10.1038/cgt.2009.53>

Sun, G., Lu, Y., Fu, Z., Cheng, Y., & Hu, W. (2014). EMP1 inhibits nasopharyngeal cancer cell growth and metastasis through induction apoptosis and angiogenesis. *Tumor Biology*, 35(4), 3185-3193. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1416-5>

Tasan, I., Sustackova, G., Zhang, L., Kim, J., Sivaguru, M., Hamedirad, M., Wang, Y., Genova, J., Ma, J., Belmont, A., & Zhao, H. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knock-in of an optimized TetO repeat for live cell imaging of endogenous loci. *Nucleic Acids Research*, 46(17), e100-e100. <https://doi.org/10.1093/nar/gky501>

*TBXAS1*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000059377-TBXAS1>

*TCP11*, *The Human Protein Atlas*. (2003). The Human Protein Atlas. Retrieved 2024-03-11, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000124678-TCP11>

Terashima, M., Fujita, Y., Togashi, Y., Sakai, K., De Velasco, M., Tomida, S., & Nishio, K. (2014). KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase  $\beta$ -subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget*, 5(16), 7040-7050. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2220>

Terns, M., & Terns, R. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 321-327. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.005>

Van Tongelen, A., Lorient, A., & De Smet, C. (2017). Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Letters*, 396, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.029>

Wang, F., Song, S., Guo, B., Li, Y., Wang, H., Fu, S., Wang, L., Zhe, X., Li, H., Li, D., Shao, R., & Pan, Z. (2023). Increased TCP11 gene expression can inhibit the proliferation, migration and promote apoptosis of cervical cancer cells. *BMC Cancer*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11129-1>

Wiedenheft, B., Sternberg, S., & Doudna, J. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331-338. <https://doi.org/10.1038/nature10886>

Wilson, R., & Doudna, J. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 217-239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>

Yang, J., Yu, D., Liu, X., Changyong, E., & Yu, S. (2020). LINC00641/miR-4262/NRGN axis confines cell proliferation in glioma. *Cancer Biology & Therapy*, 21(8), 758-766. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1776581>

Yeo, N., Chavez, A., Lance-Byrne, A., Chan, Y., Menn, D., Milanova, D., Kuo, C., Guo, X., Sharma, S., Tung, A., Cecchi, R., Tuttle, M., Pradhan, S., Lim, E., Davidsohn, N., Ebrahimkhani, M., Collins, J., Lewis, N., Kiani, S. et al. (2018). An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nature Methods*, 15(8), 611-616. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0048-5>

Yu, H., Jia, R., Zhao, L., Song, S., Gu, J., & Zhang, H. (2017). LDB2 inhibits proliferation and migration in liver cancer cells by abrogating HEY1 expression. *Oncotarget*, 8(55), 94440-94449. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21772>

Zhang, J., Chen, B., Wang, Y., Liu, X., Yan, H., Wong, K., Chan, A., Cheung, A., Chow, C., Xu, D., Wang, S., Huang, B., Liang, L., Ke, H., Wong, C., Wu, W., Cheng, A., Yu, J., Lo, K. et al. (2023). The E2F1–HOXB9 / PBX2–CDK6 axis drives gastric tumorigenesis and serves as a therapeutic target in gastric cancer. *The Journal of Pathology*, 260(4), 402-416. <https://doi.org/10.1002/path.6091>

Zhou, J., Li, Y., Yao, Y., Wang, L., Gao, L., Gao, X., Luo, X., Li, J., Jiang, M., Zhou, M., Wang, L., & Yu, L. (2013). The cancer-testis antigen NXF2 is activated by the hypomethylating agent decitabine in acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports*, 8(5), 1549-1555. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1659>

Zou, J. (2013). Interaction of 14-3-3 $\sigma$  with KCMF1 suppresses the proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19(24). <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i24.3770>

## 8 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AB61	7-(2-thienyl)-7-deazaadenosin
AB61-MP	7-(2-thienyl)-7-deazaadenosin mono fosfát
AGO	Argonaute (z anglického termínu „Argonaute“)
ANKRD61	ankyrinová repetitivní doména 61 (z anglického termínu „Ankyrin repeat domain 61“)
APS	peroxodisíran amonný (z anglického termínu „Ammonium Persulfate“)
ATB	antibiotika (z anglického termínu „Antibiotic“)
BEND3	doména obsahující Ben 3 (z anglického termínu „Ben Domain Containing 3“)
BSA	bovinní sérový albumin (z anglického termínu „Bovine serum albumin“)
BSD	blastidicin (z anglického termínu „Blasticidin“)
C3ORF20	otevřený čtecí rámec 20 chromozomu 3 (z anglického termínu „Chromosome 3 Open Reading Frame 20“)
Cas	s CRISPRem sdružené sekvence (z anglického termínu „CRISPR-associated sequences“)
CDK	cyklin-dependentní kinasa (z anglického termínu „Cyclin-dependent Kinase“)
CDK6	cyklin-dependentní kinasa 6 (z anglického termínu „Cyclin-dependent Kinase 6“)
CRISPR	shromážděné pravidelně rozmístěné palindromické repetice (z anglického termínu „Clustred Regularly Interspaced Palindromic Repeats“)
CRISPRi	CRISPR interference (z anglického termínu „CRISPR interference“)
crRNA	CRISPR RNA (z anglického termínu „CRISPR RNA“)
CS	Chromoshadow doména (z anglického termínu „ChromoShadow“)
dCas9	deaktivovaná Cas9 nukleasa (z anglického termínu „deactivated Cas9“ nebo „dead Cas9“)
DCP1-DCP2	komplex zajišťující ztrátu čepičky (z anglického termínu „Decapping complex“)
DEPC	diethylpyrokarbonát (z anglického termínu „Diethyl Pyrocarbonate“)
DMSO	dimethylsulfoxid (z anglického termínu „Dimethyl Sulfoxide“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z anglického termínu „Deoxyribonucleic Acid“)
DNMT3A	DNA cytosin-5-methyltransferasa 3A (z anglického termínu „DNA cytosine-5-methyltransferase 3A“)
dNTPs	deoxyribonukleotidové trifosfáty (z anglického termínu „Deoxyribonucleotide Triphosphate“)
DSB	dvouřetězcový zlom (z anglického termínu „Double Strand Break“)

dsRNA	dvouřetězcová RNA (z anglického termínu „Double-stranded RNA“)
DTT	dithiothreitol (z anglického termínu „Dithiotreitol“)
EDTA	kyselina ethylendiaamintetraoctová (z anglického termínu „Ethylenediaminetetraacetic Acid“)
EGFP	zesílený zelený fluorescenční protein (z anglického termínu „Enhanced Green Fluorescent Protein“)
EMP1	epiteliální membránový protein 1 (z anglického termínu „Epithelial Membrane Protein 1“)
FBS	fetální bovinní sérum (z anglického termínu „Fetal Bovine Serum“)
FCSI	inaktivované fetální sérum (z anglického termínu „Fetal Bovine Serum inactivated“)
FokI	endonukleasa <i>FokI</i> (z anglického termínu „Flavobacterium Okeanokoites 1“)
GFP	zelený fluorescenční protein (z anglického termínu „Green Fluorescent Protein“)
gRNA	vodící RNA (z anglického termínu „guide RNA“)
HDR	oprava řízená homologií (z anglického termínu „Homology-directed Repair“)
HDT1	histondeacetyasa 1 (z anglického termínu „Histone Deacetylase 1“)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (z anglického termínu „4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic Acid“)
HIBADH	3-hydroxyisobutyrát dehydrogenasa (z anglického termínu „3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase“)
HP1A	doména Heterochromatin Protein 1A (z anglického termínu „Heterochromatin Protein 1A“)
IMDM	Iscoveho modifikované Dulbeccovo médium (z anglického termínu „Iscove's Modified Dulbecco's Medium“)
InDel	inzerce nebo delece (z anglického termínu „Insertion-Deletion“)
KAP1	protein asociovaný s KRAB (z anglického termínu „KRAB-associated Protein 1“)
KIF24	člen proteinové rodiny kinesin 24 (z anglického termínu „Kinesin Family Member 24“)
KRAB	Krüppel asociovaný box (z anglického termínu „Krüppel-associated box“)
LDB2	LIM 2 doména (z anglického termínu „LIM Domain Binding 2“)
lncRNA	dlouhá nekódující RNA (z anglického termínu „long noncoding RNA“)
MBD2B	methyl-CpG vazebná doména proteinu 2 (z anglického termínu „Methyl-CpG Binding Domain Protein 2“)
MBD3L3	protein 3 podobný methyl-CpG vazebné doméně 3 (z anglického termínu „Methyl-CpG binding domain protein 3 like 3“)

MeCP2	methyl-CpG-vazebný protein 2 (z anglického termínu „Methyl-CpG-Binding Protein 2“)
miRNA	mikroRNA (z anglického termínu „micro RNA“)
mRNA	messengerová RNA (z anglického termínu „messenger RNA“)
ncRNA	nekódující RNA (z anglického termínu „non-coding RNA“)
NGS	sekvenování nové generace (z anglického termínu „Next Generation Sequencing“)
NHEJ	nehomologní spojování konců (z anglického termínu „Non-homologous End Joining“)
NIPP1	jaderný inhibitor proteinové fosfatasy 1 (z anglického termínu „Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase 1“)
NRGN	neurogranin (z anglického termínu „Neurogranin“)
NXF2	jaderný RNA exportní faktor 2 (z anglického termínu „Nuclear RNA export factor 2“)
NXF2B	jaderný RNA exportní faktor 2B (z anglického termínu „Nuclear RNA export factor 2B“)
PAM	motiv přilehlý k protospaceru (z anglického termínu „Protospacer Adjacent Motif“)
ParB	plasmid dělicí B protein (z anglického termínu „Plasmid Partition par B Protein“)
PBX2	PBX homeobox 2 (z anglického termínu „PBX homeobox 2“)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z anglického termínu „Polymerase Chain Reaction“)
PBS	fosfátový pufr (z anglického termínu „Phosphate-buffered saline“)
PHKB	regulační beta podjednotka enzymu fosforylasy kinasy (z anglického termínu „Phosphorylase kinase regulatory subunit beta“)
piRNA	Piwi interagující RNA (z anglického termínu „Piwi-interacting RNA“)
pre-crRNA	prekurzorová CRISPR RNA (z anglického termínu „precursor-CRISPR RNA“)
pre-miRNA	prekurzorová mikro RNA (z anglického termínu „precursor-microRNA“)
PURO	puromycin (z anglického termínu „Puromycin“)
QRICH1	protein bohatý na glutamin 1 (z anglického termínu „Glutamine rich 1“)
RdRP	RNA dependentní RNA polymerasa (z anglického termínu „RNA-dependent RNA polymerase“)
RIPA	radioimunoprecipitační testovací pufr (z anglického termínu „Radioimmunoprecipitation assay buffer“)

RISC	RNA-indukovaný umlčovací komplex (z anglického termínu „RNA-induced Silencing Complex“)
RNA	ribonukleová kyselina (z anglického termínu „Ribonucleic acid“)
RNAi	RNA interference (z anglického termínu „RNA interference“)
rRNA	ribosomální RNA (z anglického termínu „ribosomal RNA“)
RVD	2 hypervariabilní aminokyseliny (z anglického termínu „Repeat Variable Diresidue“)
Sbfl	restriktasa <i>Sbfl</i> (z anglického termínu „Streptomyces Bf-61“)
SDS	dodecylsulfát sodný (z anglického termínu „Sodium Dodecyl Sulfate“)
SERPINC1	inhibitor serpin peptidasy (z anglického termínu „Serpin Peptidase Inhibitor, Clade 1, Member 1“)
sgRNA	jediná vodící RNA („single guide RNA“)
SHACKTeR	CRISPR/Cas zprostředkovaný knock-in krátkých homologních ramen s repeticemi tetracyklin operonu (z anglického termínu „Short Homology and CRISPR/Cas9-mediated Knock-in of a TetO Repeat“)
SHERLOCK	specifické vysoce citlivé enzymové uvolňování reportérů (z anglického termínu „Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking“)
shRNA	malá vlásenková RNA (z anglického termínu „short hairpin RNA“)
SIN3A	doména nezávislá na spínači 3 homolog A (z anglického termínu „Switch-Independent 3 Homolog A“)
siRNA	malá interferující RNA (z anglického termínu „small interfering RNA“)
sncRNA	malé nekódující RNA (z anglického termínu „small non-coding RNA“)
snRNA	malá jaderná RNA (z anglického termínu „small nuclear RNA“)
snoRNA	malá jadéřková RNA (z anglického termínu „small nucleolar RNA“)
SPRI	reverzibilní imobilizace na pevné fázi (z anglického termínu „Solid-phase reversible immobilization“)
ssRNA	jednovláknová RNA (z anglického termínu „single-stranded RNA“)
TALEN	transkripční aktivátorová efektorová nukleasa (z anglického termínu „Transcription Activator-like Effector Nucleases“)
TBE	TRIS, kyselina boritá, EDTA pufr (z anglického termínu „TRIS-borate-EDTA buffer“)
TBS	TRIS pufovaný fyziologický pufr (z anglického termínu „TRIS-Buffered Saline“)
TBS-T	TRIS pufovaný fyziologický pufr s 5 % (V/V) Tween 20 (z anglického termínu „TBS Buffer and Tween 20“)
TBXAS1	tromboxan A syntasa 1 (z anglického termínu „Thromboxane A synthase 1“)
TCP11	T-komplex protein 11 (z anglického termínu „T-complex 11“)

TCP11X1	X-vázaný protein 1 rodiny T-komplex 11 (z anglického termínu „T-complex 11 family, X-linked 1“)
TCP11X2	X-vázaný protein 1 rodiny T-komplex 11 (z anglického termínu „T-complex 11 family, X-linked 2“)
TEMED	tetramethylethyldiamin (z anglického termínu „Tetramethylethylenediamine“)
TET1	methylcytosindioxygenasa s deseti nebo jedenácti translokacemi (z anglického termínu „Ten-eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1“)
TetO	tetracyklin operon (z anglického termínu „Tetracycline Operon“)
TetR	Tetracyklin represor (z anglického termínu „Tetracycline Repressor“)
TGS	TRIS, glycin, SDS pufr (z anglického termínu „TRIS-Glycine-SDS Buffer“)
TLX1	T-lymfocytární leukemický homeobox protein 1 (z anglického termínu „T-cell leukemia homeobox protein 1“)
TMC1	transmembránový kochleární protein 1 (z anglického termínu „Transmembrane Cochlear-Expressed Protein 1“)
tracrRNA	transaktivující RNA (z anglického termínu „trans-activating CRISPR RNA“)
TRIS	amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (z anglického termínu „2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol“)
tRNA	transferová RNA (z anglického termínu „transfer RNA“)
UTR	nepřekládaná oblast (z anglického termínu „Untranslated Regions“)
WRPW	represor s motivem tryptofan-arginin-prolin-tryptofan (z anglického termínu „Trp-Arg-Pro-Trp motif“)
WT	standardní genotyp (z anglického termínu „Wild type“)
ZFN	nukleasa zinkového prstu (z anglického termínu „Zinc Finger Nuclease“)



## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématický průběh tří fází imunitního CRISPR/Cas procesu (Upraveno podle: Terns & Terns, 2011).....	11
Obrázek 2: Rozdělení CRISPR/Cas systémů do tříd a typů podle přítomných Cas proteinů v jednotlivých fázích CRISPR/Cas procesu, včetně funkce jednotlivých Cas proteinů (Upraveno podle: Makarova et al., 2020).....	12
Obrázek 3: Schéma mechanismu oprav dvouřetězcových zlomů DNA (DSB) prostřednictvím nehomologního spojování konců (NHEJ) a oprav řízených homologií (HDR) (Upraveno podle: Li et al., 2020). ....	13
Obrázek 4: Biogeneze siRNA z dsRNA a miRNA z pre-miRNA a schéma následné regulace transkripce maturovanou siRNA a miRNA (Upraveno podle: Lam et al., 2015). 16	
Obrázek 5: Mechanismus inhibice genové exprese při transfekci buněk sgRNA a dCas9 fúzovaného s transkripčním represorem (Upraveno podle: Gilbert et al., 2013). ..	17
Obrázek 6: Chemická struktura látky AB61 (a) a PNH192 (b). ....	21
Obrázek 7: Schéma kazety, ve které byla sgRNA zanesena do genomu. ....	27
Obrázek 8: Schéma rozdílné genové exprese při selekci nukleosidovým derivátem PNH192 a DMSO .....	27
Obrázek 9: Místo štěpení restriční endonukleasy SbfI. ....	28
Obrázek 10: Schéma kazety, ve které byla sgRNA vložena do genomu, s amplifikovanou Illumina sekvencí na 3' a 5' koncích a indexy umožňující identifikaci vzorků. ....	29
Obrázek 11: Sekvence použitých primerů pro PCR reakci. ....	30
Obrázek 12: Nitroceluloseová membrána po specifické detekci dCas9 proteinu (nahore) a $\beta$ -aktinu (dole) prostřednictvím sekundární protilátky značené křenuvou peroxidasou k ověření exprese dCas9 KRAB domény. Expresse byla potvrzena u buněčných liniích po selekci látkami DMSO a PNH192 ve všech třech biologických replikátech. ....	34
Obrázek 13: Elektroforetogram DNA Ladderu a PCR produktů k ověření exprese sgRNA. Expresse byla potvrzena přítomností bandů v buněčných liniích po selekci látkami DMSO a PNH192 ve všech třech biologických replikátech. ....	35

## 10 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Molekulární cíle látky PNH192 a geny podmiňující rezistenci na PNH192 porovnané po 3 sériích ošetření PNH192 a DMSO. Osa x vyjadřuje zastoupení počtu jednotlivých sgRNA v logaritmickeém vyjádření a osa y vyjadřuje míru signifikance tzv. p-hodnotou v logaritmickeém vyjádření. Statisticky významné hodnoty při logaritmickeém vyjádření odpovídají hodnotám vyšším než 1,3. V pravé části grafu se nachází geny označené jako molekulární cíle látky PNH192 a levé části geny podmiňující rezistenci na látku PNH192. .... 36

Graf 2: Molekulární cíle látky PNH192 a geny podmiňující rezistenci na PNH192 porovnané po 4 sériích ošetření PNH192 a DMSO. Osa x vyjadřuje zastoupení počtu jednotlivých sgRNA v logaritmickeém vyjádření a osa y vyjadřuje míru signifikance tzv. p-hodnotou v logaritmickeém vyjádření. Statisticky významné hodnoty při logaritmickeém vyjádření odpovídají hodnotám vyšším než 1,3. V pravé části grafu se nachází geny označené jako molekulární cíle látky PNH192 a levé části geny podmiňující rezistenci na látku PNH192. .... 36