

**STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**OBOR Č. 06 ZDRAVOTNICTVÍ**

**TAJEMNÉ PROTEINY Z RNFT RODINY  
V MEZIBUNĚČNÉ SIGNALIZACI  
A NÁDORECH II**

---

**MYSTERIOUS PROTEINS FROM RNFT FAMILY IN  
INTERCELLULAR SIGNALING AND TUMORS II**

**AUTOR** KATEŘINA KUDLIČKOVÁ  
**ŠKOLA** GYMNÁZIUM BRNO – ŘEČKOVICE, P. O.  
**KRAJ** JIHOMORAVSKÝ

**KONZULTANTI** Doc. Mgr. VÍTĚZSLAV BRYJA, Ph.D.  
Mgr. MICHAL KUŇÁK, Ph.D.  
TOMASZ WITOLD RADASZKIEWICZ, M.Sc.

**BRNO 2018**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou práci na téma „Tajemné proteiny z RNFT rodiny v mezibuněčné signalizaci a nádorech II“ jsem vypracovala samostatně pod vedením externího konzultanta doc. Mgr. Vítězslava Bryji, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne: .....

Podpis: .....



Práce byla vypracována na Masarykově univerzitě v Brně (Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a imunologie živočichů).

## Poděkování

Tímto bych chtěla vyjádřit své velké díky panu doc. Mgr. Vítězslavu Bryjovi, Ph.D., externímu konzultantovi, za možnost zpracovávat svoji Středoškolskou odbornou činnost pod jeho vedením, za poskytnutí všech prostředků, vynaložené úsilí a především ochotu, se kterou se mi vždy věnoval. A i když to pro něj občas byl trénink trpělivosti, tak se mnou dovedl celou SOČ do následující finální podoby.

Dále patří mé velké díky doktorskému studentovi panu Tomasz Radaskiewiczovi M.Sc., jenž mi po celou dobu práce pomáhal a radil se všemi provedenými pokusy a má na této práci obrovský podíl.

Chci poděkovat i Masarykově univerzitě, konkrétně Přírodovědné fakultě, Ústavu experimentální biologie, Oddělení imunologie a fyziologie živočichů za poskytnutí prostorů a vybavení, jež mi umožnilo provedení všech mých experimentů.

Děkuji i panu Mgr. Michaelu Kuňákovi, Ph.D., internímu konzultantovi, za věcné poznámky k práci a cenné rady, které mi byly velmi nápomocné.

V neposlední řadě chci poděkovat i Martinu Lankovi za pomoc s formální stránkou práce a jazykovou korekturou.

## **ABSTRAKT**

Tato Středoškolská odborná činnost „Tajemné proteiny z RNFT rodiny v mezibuněčné signalizaci a nádorech II“ je věnována studiu neprobádaných proteinů RNFT1 a RNFT2, o kterých donedávna nebyly známy téměř žádné informace, mimo jejich primární aminokyselinové sekvence, predikované role v procesu ubiquitinace, a hypotetické souvislosti s vlivem na chronickou lymfocytární leukémii.

V první části výzkumu byla hledána souvislost mezi mírou exprese genů RNFT1, RNFT2 a chronickou lymfocytární leukémií, tedy klonálním maligním onemocněním krve, na základě navržené hypotézy vycházející z grafu odborné internetové databáze. S využitím reálných vzorků pacientů a anonymní databáze obsahující informace o těchto pacientech byla mezi geny RNFT1 a RNFT2 a chronickou lymfocytární leukémií hledána nějaká spojitost.

Následně bylo *in vitro* zkoumáno, zda má míra exprese genů RNFT1 a RNFT2 nějaké dopady na samotné buňky či zda nadprodukce těchto genů nezpůsobuje defekty v některé fázi buněčného cyklu. K tomuto pokusu byly vytvořeny buňky s modifikacemi genů RNFT1 a RNFT2 naprogramované k nadprodukcí/blokaci exprese těchto genů.

Dalším bodem výzkumu byla determinace role genů RNFT1 a RNFT2 v tzv. Wnt mezibuněčné signální dráze, která řídí diferenciaci, proliferaci a expanzi embryonálních a mnoha dalších buněčných typů. V důsledku zasažení těchto vlastností krevních buněk dochází k rozvoji chronické lymfocytární leukémie, na kterou je tento projekt orientován.

Další signální dráhou, která byla v souvislosti s těmito proteiny zkoumána, je Hippo signalizace, která má na starosti regulaci vývoje orgánů a slouží jako tumorosupresor.

Výstupem práce je značné množství nových informací o genech RNFT1 a RNFT2 a jejich roli v chronické lymfocytární leukemii, buňce, buněčném cyklu a mezibuněčné signalizaci, které by dále mohly vést k lepšímu pochopení mechanismů vzniku a průběhu chronické lymfocytární leukemie.

## **ABSTRACT**

Following project is devoted to research of RNFT1 and RNFT2 protein, which were not well known until now. The only existing information according genes RNFT1 and RNFT2 was their role in ubiquitination, primary aminoacid sequence and hypothetic coherence with chronic lymphocytic leukemia.

The first part of the research was focused on connection between expression of RNFT1 and RNFT2 genes and chronic lymphocytic leukemia, clonal malignant blood disease. This hypothesis was proposed according to the scientific expert database from internet. The impact of these proteins on CLL was searched by using real patients' samples and anonymous data about them.

Then the research was focused on impact of RNFT1 and RNFT2 genes expression on cells itself and if there are some repercussions of these genes on cell cycle, like defects on some phases. To ascertain this, cells were modified with altered genes RNFT1 and RNFT2. These modifications helped to simulate overexpression/blocking of production of these genes.

The next target was to determinate the role of RNFT1 and RNFT2 genes in Wnt intercellular signalling pathway which controls differentiation, proliferation and expansion of embryonic and haematopoietic stem cells. Consequently, to uncontrolled proliferation and expansion of these haematopoietic stem cells originates chronic lymphocytic leukemia, on which this project is targeting.

The next signalling pathway that this project focuses on is Hippo signalling pathway. This pathway is necessary for organs growth and it works as a tumorsupressor.

The main conclusion of following research is huge amount of data according to RNFT1 and RNFT2 genes, their role in chronic lymphocytic leukemia, cells, cell cycle and intercellular signalling. This information could be very helpful for understanding to causes of origination mechanism of chronic lymphocytic leukemia and its process.

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE (CLL) .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 HISTORIE .....	14
1.2.2 ETIOLOGIE .....	14
1.2.3 KLINICKÉ PŘÍZNAKY .....	15
1.2.4 DIAGNOSTIKA .....	15
1.2.5 LÉČBA .....	17
1.2.5.1 CHEMOTERAPIE .....	17
1.2.5.2 KORTIKOSTEROIDY .....	18
1.2.5.3 TRANSPLANTACE KRVETVORNÉ TKÁNĚ .....	18
<b>1.3 ZAŘAZENÍ PROTEINŮ RNFT .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 ANALÝZY EXPRESE RNFT IN SILICO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 WNT SIGNALIZACE .....</b>	<b>21</b>
1.5.1 KANONICKÁ WNT SIGNALIZACE .....	22
1.5.2 NEKANONICKÁ WNT SIGNALIZACE .....	23
1.5.2.1 WNT/PCP SIGNÁLNÍ DRÁHA .....	24
1.5.2.2 WNT/ CA <sup>2+</sup> SIGNÁLNÍ DRÁHA .....	24
1.5.2.3 WNT/ROR SIGNÁLNÍ DRÁHA .....	24
<b>1.6 HIPPO SIGNALIZACE .....</b>	<b>25</b>
<b>2 METODY .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 GELOVÁ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 KVANTITATIVNÍ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (QPCR) .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 KLONOVÁNÍ DNA .....</b>	<b>29</b>
2.4.1 LIGACE .....	30
2.4.2 TRANSFORMACE .....	30
2.4.3 KULTIVACE .....	30
2.4.4 IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA .....	31
2.4.5 OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI INZERTU .....	31
<b>2.5 WESTERN BLOT .....</b>	<b>31</b>
2.5.1 SDS-PAGE .....	31
2.5.2 PŘENOS PROTEINU .....	32
2.5.3 DETEKCE PROTEINU .....	32
<b>2.6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE .....</b>	<b>34</b>
<b>2.7 DC PROTEIN ASSAY .....</b>	<b>35</b>
<b>2.8 SYSTÉM TETON .....</b>	<b>35</b>
<b>3 VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 ANALÝZA EXPRESE A KLINICKÝCH KORELACÍ U PACIENTŮ S CLL .....</b>	<b>37</b>
3.1.1 PŘEŽITÍ U PACIENTŮ S NÍZKOU A VYSOKOU HLADINOU GENŮ RNFT .....	38
<b>3.2 PŘÍPRAVA NA FUNKČNÍ EXPERIMENTY .....</b>	<b>42</b>
3.2.1 KLONOVÁNÍ RNFT1 DO EXPRESNÍCH VEKTORŮ .....	42

3.2.1.1	PŘÍPRAVA INZERTU .....	42
3.2.1.2	PŘÍPRAVA PLASMIDU A VLOŽENÍ INZERTU .....	44
3.2.1.3	VLOŽENÍ PLASMIDU DO BAKTERIE .....	44
3.2.1.4	OVĚŘENÍ INZERTU V PLASMIDU .....	45
3.2.2	MODIFIKACE GENŮ RNFT1 V BUŇKÁCH .....	46
3.2.3	OTESTOVÁNÍ MODIFIKACÍ GENU RNFT1 V BUŇKÁCH METODOU WESTERN BLOT .....	47
<b>3.3</b>	<b>FUNKČNÍ EXPERIMENTY .....</b>	<b>50</b>
3.3.1	VLIV MÍRY EXPRESE GENŮ RNFT1 A RNFT2 NA BUNĚČNOU PROLIFERACI .....	50
3.3.1.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	51
3.3.1.2	VÝSLEDNÉ GRAFY DEMONSTRUJÍCÍ PRŮBĚH BUNĚČNÉ PROLIFERACE .....	52
3.3.2	VLIV MÍRY EXPRESE GENŮ RNFT1 A RNFT2 NA PRŮBĚH BUNĚČNÉHO CYKLU .....	54
3.3.2.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	54
3.3.2.2	VÝSLEDKY MĚŘENÍ .....	55
3.3.3	DOPADY VYSOKÉ EXPRESE GENU RNFT2 NA WNT SIGNALIZACI .....	56
3.3.3.1	ROR1 .....	59
3.3.3.2	DVL2 .....	59
3.3.3.3	CCND1 .....	60
3.3.4	DOPADY VYSOKÉ EXPRESE GENU RNFT2 NA HIPPO SIGNALIZACI .....	60
3.3.4.1	AMOT .....	61
3.3.4.2	PLATS .....	61
3.3.4.3	JUN; PJUN .....	62
3.3.4.4	PARP; CPARP .....	63
<b>4</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM ZDROJŮ .....</b>	<b>68</b>
6.1	INTERNETOVÉ ZDROJE .....	68
6.2	ZDROJE LITERATURY .....	68
<b>7</b>	<b>SEZNAM GRAFŮ, TABULEK A OBRÁZKŮ .....</b>	<b>73</b>
7.1	SEZNAM GRAFŮ .....	75
7.2	SEZNAM TABULEK .....	75
7.3	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	75
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>77</b>

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>AMOT</b>	Angiomotin
<b>AMP</b>	ampicillin
<b>APS</b>	ammonium persulfate
<b>ATF2</b>	Activating Transcription Factor 2
<b>ATP</b>	adenosin triphosphate
<b>AXIN1</b>	Axis Inhibition Protein 1
<b>B</b>	base (báze)
<b>BGG</b>	Bovine Gama Globuline
<b>BioID</b>	Biotin Identification (biotinová identifikace)
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine (hovězí sérový albumin)
<b>CASP3</b>	Caspase3
<b>CCK4</b>	Cholecystokinin 4
<b>CCNA1</b>	Cyclin A1
<b>CCND1</b>	Cyclin D1
<b>CCNE1</b>	Cyclin E1
<b>CD ASSAY</b>	Circular Dichroism Assay
<b>CDC42</b>	Cell Division Control Protein 42
<b>CDK1/2</b>	Cyclin Dependent Kinase 1/2
<b>CDK12</b>	Cyclin Dependent Kinase 12
<b>cDNA</b>	Complementary deoxyribonukleotic acid (komplementární deoxyribonukleová kyselina)
<b>CLL</b>	Chronic Lymphocytic Leukemia (chronická lymfocytární leukémie)
<b>cPARP</b>	cleaved Poly (ADP-ribose) polymerase
<b>CSNK1G2</b>	Casein Kinase 1 Gamma 2
<b>CT</b>	Computer Tomography (počítačová tomografie)
<b>DA</b>	Dalton
<b>DAAM1</b>	Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 1
<b>DAG</b>	diacylglycerol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle medium (živné médium)
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonukleotic acid (deoxyribonukleová kyselina)
<b>DNTPS</b>	deoxyribonukleotid triphosphate's (deoxynukleotidové trifosfáty)
<b>DVL 1/2/3</b>	Dishevelled 1/2/3
<b>EDTA</b>	ethyldiamintetraacid (kyselina ethyldiamintetraoctová)
<b>EGR1</b>	Early Growth Response 1
<b>FBS</b>	fetal bovine serum (sérum z plodové vody tura domácího)
<b>FLT4</b>	Fms Related Tyrosine Kinase 4
<b>FSC</b>	forward scatter
<b>FZ</b>	Frizzled
<b>GSK3B</b>	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
<b>GTPase</b>	Guanosin triphosphate hydrolase



<b>Hb</b>	hemoglobine
<b>HECT</b>	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
<b>HEK CELLS</b>	Human Embryonic Kidney cells (lidské embryonální ledvinové buňky)
<b>IgG</b>	Imunoglobulin G (protilátka G)
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositoltriphosphate
<b>IRAK1</b>	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinases
<b>JUN</b>	Jun Proto-Oncogene
<b>LATS1/2</b>	Large tumor suppressor 1/2
<b>LB</b>	Lysogeny Broth (lysogenní médium)
<b>LRP</b>	Low density lipoprotein Receptor-related Protein
<b>LRP6</b>	LDL Receptor Related Protein 6
<b>miliQ H<sub>2</sub>O</b>	ultračistá voda
<b>MOBK1A/1B</b>	Mps One Binder kinase activator-like 1A/1B
<b>MPM-2</b>	mitotic protein monoclonal 2
<b>mRNA</b>	Mediator Ribonucleotid Acid (mediátorová ribonukleová kyselina)
<b>MST1/2</b>	Mammalian STE20-like protein kinase 1/2
<b>MYC</b>	MYC Proto-Oncogene
<b>NF2</b>	Neurofibromin 2
<b>NLK</b>	Nemo Like Kinase
<b>NPHP3</b>	Nephrocystin-3
<b>OR</b>	Overall Response (odpověď na léčbu)
<b>P/S</b>	Penicilin/Streptomycin
<b>PARP</b>	Poly (ADP-ribose) polymerase
<b>pATF2</b>	phosphorylated Activating transcription factor-2
<b>pATF2</b>	phosphorylated Activating Transcription Factor 2
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem)
<b>PCP</b>	Planar Cell Polarity
<b>PERK2</b>	Proline-rich receptor-like protein kinase PERK2
<b>pGSK3B</b>	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
<b>PI</b>	Propidium Iodide
<b>PIC</b>	Protease Inhibitor Cocktail
<b>PLATS 1</b>	phosphorylated Large tumor suppressor 1
<b>PLC</b>	phospholipase C
<b>Plt</b>	Platelets (krevní destičky)
<b>pRB1</b>	phosphorylated RB Transcriptional Corepressor 1
<b>pWEE1</b>	phosphorylated Wee1-like protein kinase
<b>RB1</b>	RB Transcriptional Corepressor 1
<b>RING</b>	Really Interesting New Gene
<b>RNA</b>	Ribonucleotid Acid (ribonukleová kyselina)
<b>RNASE A</b>	Ribonuklease A
<b>RNFT1</b>	Ring Finger protein Transmembrane 1
<b>RNFT2</b>	Ring Finger protein Transmembrane 2

<b>ROCK1</b>	Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
<b>ROR</b>	Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor
<b>ROR1/2</b>	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1/2
<b>RTG</b>	rentgen
<b>RTTA</b>	Reverse Transcription-controlled Transactivator
<b>RYK</b>	Receptor-like Tyrosine Kinase
<b>S/T</b>	Serine/Threonine
<b>SAV1</b>	Salvador homologue 1
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (sodiumdodecylsulfát – polyakrylamidový elektroforézní gel)
<b>SFL</b>	side fluorescent light
<b>SSC</b>	side scatter
<b>TAZ</b>	Transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain
<b>TBE</b>	tris/borate/EDTA solution
<b>TBS</b>	Tris-Buffered Saline (fyziologický roztok pufrovaný Trisem)
<b>TCF/LEF1</b>	T Cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor 1
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamin
<b>TET</b>	Tetracycline (tetracyklin)
<b>TETR</b>	tetracycline repressor
<b>TMRE</b>	tetramethylrhodamine
<b>TP53</b>	Tumor Protein P53
<b>TRE</b>	Tetracycline response element
<b>TRIS</b>	trisaminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolet (ultrafialové)
<b>VANGL1/2</b>	van Gogh-like protein 1/2
<b>VRK2</b>	Vaccinia Related Kinase 2
<b>WEE1</b>	Wee1-like protein kinase
<b>YAP</b>	Yes Associated Protein
<b>B-kat</b>	β-katenin

# 1 ÚVOD

Následující práce nesoucí název „Tajemné proteiny z RNFT rodiny v mezibuněčné signalizaci a nádorech II“ navazuje na stejnojmennou Středoškolskou odbornou činnost představenou ve školním roce 2016/2017 a jedná se tedy o pokračování výzkumu.

Na počátku výzkumu o genech RNFT1 (*Ring Finger protein Transmembrane 1*) a RNFT2 (*Ring Finger protein Transmembrane 2*) neexistovaly prakticky žádné informace. Dostupná data byla omezena jen na primární aminokyselinovou sekvenci, hypotetickou souvislost s chronickou lymfocytární leukémií (dále jen CLL), a poté údaj, že hrají roli v procesu ubiquitinace.

Chronická lymfocytární leukémie je klonální maligní onemocnění krve, které postihuje pacienty zejména staršího věku, devadesát procent nemocných je starších 50 let<sup>1</sup>. U této formy jsou konkrétně postiženy lymfocyty, nejčastěji B-buňky<sup>2</sup>. CLL je v lékařství jednou z velkých neznámých, nepodařilo se totiž doposud nalézt mechanismus jeho vzniku a ani léčbu, která by jej zcela vyléčila. Pacientům se dá pouze prodloužit život a zmírnit u nich příznaky onemocnění.

Výsledky minulé Středoškolské odborné činnosti vedly k objasnění konsekvencí míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na CLL. Mezi těmito geny a CLL byla na základě grafu z odborné internetové databáze<sup>3</sup> navržena hypotéza o výskytu nějaké spojitosti. S využitím vzorků reálných pacientů z FN Bohunice Brno a anonymní databázi čítající data<sup>4</sup> o těchto pacientech bylo zjištěno, že vysoká exprese obou genů má fatální dopady na průběh nemoci pacientů. Zhruba 40 % pacientů s vysokou expresí jak genu RNFT1, tak genu RNFT2, se nedožilo více než 5,5 roku. Navíc u nich onemocnění probíhalo mnohem agresivněji než u pacientů, u kterých se tato vysoká exprese nevyskytovala. Je tedy zřejmé, že geny RNFT1 a RNFT2 by měly být zkoumány i nadále, jejich podrobnější probádání by mohlo přiblížit pochopení některých mechanismů v CLL.

---

<sup>1</sup> odkaz: <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t201.rtf> [cit. 12. 12. 2016].

<sup>2</sup> typ bílých krvinek, které se dělí na T, B a NK. B-lymfocyty, tedy B-buňky, zprostředkovávají specifickou imunitní reakci organismu pomocí protilátek.

<sup>3</sup> odkaz: <https://genevisible.com/cancers/HS/Gene%20Symbol/RNFT1> [cit. 25. 07. 2016].

<sup>4</sup> anonymní databáze, která zahrnuje údaje o pacientech zahrnující všechny parametry onemocnění každého z nich

Pro bližší pochopení funkce těchto genů bylo nejprve zkoumáno, zda má jejich vysoká exprese dopady i na buňky samotné. Byly proto vytvořeny modifikace genů RNFT1 a RNFT2, které umožnily uměle regulovat míru jejich exprese. To umožnilo sledovat chování buněk s rozdílnou expresí těchto genů a tedy i zjistit, zda existuje spojitost mezi intenzitou produkce proteinů RNFT1 a RNFT2 a buněčnou proliferací<sup>5</sup>.

Následně byly zkoumány dopady vysoké exprese těchto genů na průběh buněčného cyklu, opět s využitím modifikací umožňujících uměle řídit míru exprese genů RNFT1 a RNFT2.

Dalším cílem práce bylo objasnit, zda má vysoká exprese genů RNFT2 dopady na mechanismy v buňkách, což bylo zjišťováno transformacemi v tzv. signálních drahách. Byla zkoumána Wnt a Hippo signální dráha, které hrají důležitou roli v CLL.

Obecně jsou tyto signální dráhy prostředky komunikace mezi buňkami. Konkrétně Wnt signální dráha má vliv na embryonální vývoj jedince a na regulaci proliferace, expanze a diferenciací<sup>6</sup> různých druhů buněk. Pro tuto práci je však nejdůležitější souvislost této dráhy s buňkami krevními. V důsledku mutací ve Wnt dráze se totiž mohou buněčné procesy vymknout kontrole, což může způsobit ztrátu kontroly nad proliferací krevních buněk a sekundárně způsobit rozvoj leukémie.

Geny RNFT1 a RNFT2 byly dále zkoumány i v souvislosti s tzv. Hippo signalizací, která má během vývoje jedince vliv na regulaci velikosti orgánů. Tato signalizace rovněž reguluje rozvoj nádorů a jedná se o důležitý tumorsupresor. Její aktivita způsobuje inhibici<sup>7</sup> aktivity signálních drah a faktorů vyvolávajících onkogenezi<sup>8</sup>.

Na závěr bylo pátráno po tom, zda míra exprese genů RNFT2 nějakým způsobem ovlivňuje standardní hladinu proteinů, které reagují na stres v buňce a způsobují programovanou buněčnou smrt.

---

<sup>5</sup> množení buněk

<sup>6</sup> proces přeměny buněk z nesespecifických na specifické (tvarem a funkcí)

<sup>7</sup> zpomalení daného procesu

<sup>8</sup> proces vzniku nádoru

## 1.1 CÍLE PRÁCE

Pro výzkum, navazující na práci v roce 2016/2017 nesoucí název „Tajemné proteiny z RNFT rodiny v mezibuněčné signalizaci a nádorech“, byly stanoveny následující cíle:

- vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na buněčnou proliferaci
- vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na buněčný cyklus
- vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na aktivaci Wnt signální dráhy
- vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na aktivaci Hippo signální dráhy
- vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na produkci stresových proteinů a apoptózu<sup>9</sup>

---

<sup>9</sup> programovaná buněčná smrt

## 1.2 CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE (CLL)

Chronická lymfocytární leukémie (dále jen CLL) je jedním ze čtyř základních typů leukémie, tedy klonálního<sup>10</sup> maligního<sup>11</sup> onemocnění krve. Lymfocytární z důvodu, že jsou konkrétně zasaženy lymfocyty, tedy typ agranulocytů ze skupiny leukocytů. Dále se tyto lymfocyty dělí na B, T a NK buňky. Drtivá většina CLL je způsobena z důvodu proliferace maligních B-buněk, vzácně zasažením T-buněk, popřípadě T i B buněk (tzv. prolymfocytová leukémie). CLL postihuje především starší osoby, devadesát procent nemocných je starší 50 let.

### 1.2.1 HISTORIE

Jako první diagnostikovali nemoc nezávisle na sobě John Hughes Bennet a Rudolf Virchow v roce 1845. Rudolf Virchow byl v roce 1847 prvním, kdo použil termín „leukemie“, John Bennet nazval onemocnění v roce 1851 „leukocytemií“.

K důkladnějšímu probádání došlo až se zdokonalením mikroskopů a objevením nového medicínského oboru hematologie. První léky k léčbě leukémie se objevily až po roce 1950 a k prvním transplantacím kostní dřeně došlo o 10 let později.

### 1.2.2 ETIOLOGIE

Příčiny vzniku onemocnění jsou doposud neznámé, ale k rozvoji nemoci dochází zároveň s rozvojem chromozomálních poruch nebo genetických mutací. Má se nicméně za to, že toto jsou pouze změny sekundární<sup>12</sup>. Nicméně i kvůli těmto konsekvencím lymfocyty ztrácí schopnost plnit svoji imunitní funkci a nastává jejich nekontrolovatelné rozmnožení po těle. Primární důvod rozvoje CLL však zůstává neznámý. [BRYCHTOVÁ, Yvona, Anna PANOVSÁ a Michael DOUBEK. *Chronická lymfocytární leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké. Brno: Pro Českou leukemickou skupinu - pro život (CELL) vydalo nakladatelství Kmen, spol., 2016. ISBN 978-80-906212-5-1., S. 11]*

---

<sup>10</sup> expanze buněk, při které se buňky dělí nepohlavně z původní nádorové buňky

<sup>11</sup> maligní forma onemocnění, jinak také zhoubná, je agresivní a dochází u ní k prorůstání nádorových buněk i do okolních tkání od jádra nádoru a tvorbě metastáz

<sup>12</sup> vznikající až v důsledku rozvoje chronické lymfocytární leukémie u pacienta

### 1.2.3 KLINICKÉ PŘÍZNAKY

Nemoc má zpočátku velmi pomalý a pozvolný nástup, kdy u pacienta probíhá až několikaleté bezpříznakové období. Během tohoto období se mohou (ale nemusí) objevit klasické leukemické symptomy, např. B-příznaky, tj. zvýšené noční pocení, anémie, trombocytopenie a vysoký úbytek váhy (až kachektizace). V další fázi se objevují příznaky vycházející z napadení tkání nádorovými buňkami a usazení leukemických buněk v těchto ložiscích (zvětšení jater, sleziny a uzlin). V pozdějších stádiích dochází k infiltraci i ostatních tkání. Nedostatek zdravých leukocytů vyvolává pokles imunity, leukemické lymfocyty se množí velmi rychle bez dokončení celého průběhu buněčného cyklu a nejsou tedy dostatečně zralé na plnění své imunitní funkce v organismu. S tím souvisí častý výskyt infekčních onemocnění, obzvláště častý je pásový opar a infekce plic. [BRYCHTOVÁ, Yvona, Anna PANOVSÁ a Michael DOUBEK. *Chronická lymfocytární leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké. Brno: Pro Českou leukemickou skupinu - pro život (CELL) vydalo nakladatelství Kmen, spol., 2016. ISBN 978-80-906212-5-1., S. 12]*

### 1.2.4 DIAGNOSTIKA

Onemocnění může být zjištěno na základě několika příznaků, avšak nejčastěji je diagnostikováno náhodně z krevního obrazu. V krvi osoby s leukémií se nachází extrémně zvýšená hladina leukocytů. U pacientů s pokročilejším stádiem CLL se v krevních obrazech vyskytuje znatelná trombocytopenie<sup>13</sup>, snížená koncentrace erytrocytů a hemoglobinu, a naopak zjevná lymfocytóza<sup>14</sup>. Na základě mezinárodních kritérií je CLL diagnostikována u pacientů s déle než měsíčním absolutním počtem<sup>15</sup> lymfocytů v periferní krvi vyšším než  $10^{10}$ /litr krve. U 18 % pacientů se objevují numerické aberace<sup>16</sup> chromozomu – trizomie<sup>17</sup> 12. chromozomu a delece<sup>18</sup> 13. chromozomu.

---

<sup>13</sup> snížený počet krevních destiček v krvi

<sup>14</sup> zvýšený počet lymfocytů v krvi

<sup>15</sup> počet všech lymfocytů bez rozdílu, zda se jedná o zdravé nebo leukemické lymfocyty

<sup>16</sup> abnormality v počtech chromozomů

<sup>17</sup> výskyt tří stejných chromozomů místo standardních dvou

<sup>18</sup> výskyt pouze jednoho chromozomu ze standardních dvou

K jasnému stanovení diagnózy je nutné provést sternální punkci<sup>19</sup> nebo trepanobiopsii<sup>20</sup> za účelem získání a analyzování kostní dřeně a následné určení prognózy a léčebného postupu.

Dále se u pacientů provádí RTG plic, ultrazvuk a CT<sup>21</sup> vyšetření, které umožňují přesně specifikovat oblasti rozšíření nádoru po těle.

Než může být zahájena léčba, je nezbytné určit stádium nemoci, ve kterém se pacient nachází. Tato stádia se nazývají v závislosti na klasifikačním systému buď „Rai“ nebo „Binet“ (podle svých původců) a zařazují pacienty na základě fyzikálních vyšetření a parametrů krevního obrazu do následujících skupin:

- Rai 0 - Pacienti s nízkými zdravotními riziky
  - lymfoidní buňky > 30 % podíl ze všech leukocytů
  - lymfocytóza s leukemickými buňkami v periferní krvi a/nebo v kostní dřeni
- Rai I. a Rai II. – pacienti se středními zdravotními riziky
  - Pacienti s lymfocytózou, lymfadenopatií<sup>22</sup> v jakékoli lokalizaci a splenomegalií<sup>23</sup> a/nebo hepatomegalií<sup>24</sup>
- Rai III. – pacienti s vysokými zdravotními riziky
  - pacienti s anémií související s onemocněním ( $Hb^{25} < 110 \text{ g/l}$ )
- Rai IV. – pacienti s vysokými zdravotními riziky
  - pacienti s trombocytopenií související s onemocněním ( $Plt^{26} < 10 \times 10^9/l$ )
  
- Binet A – Pacienti s nízkými zdravotními riziky
  - $Hb \geq 100 \text{ g/l}$  a  $Plt \geq 100 \times 10^9/l$
  - 0-2 postižené oblasti
- Binet B – pacienti se středními zdravotními riziky
  - $Hb \geq 100 \text{ g/l}$  a  $Plt \geq 100 \times 10^9/l$

---

<sup>19</sup> odběr vzorku kostní dřeně z hrudní kosti

<sup>20</sup> odběr vzorku kostní dřeně z kyčelní kosti

<sup>21</sup> computer tomography (výpočetní tomografie) - vyšetřovací technika umožňující zobrazující vnitřních orgánů a tkání člověka

<sup>22</sup> zvětšení lymfatických uzlin

<sup>23</sup> zvětšení sleziny

<sup>24</sup> zvětšení jater

<sup>25</sup> hemoglobin

<sup>26</sup> Platelets (krevní destičky)



- 3 a více postižených oblastí
- Binet C – pacienti s vysokými zdravotními riziky
  - Hb < 100 g/l a/nebo Plt < 100×10<sup>9</sup>/l
  - libovolný počet postižených oblastí

Pokud je u pacientů diagnostikována pouze počáteční fáze, jsou pouze sledováni v hematologických ambulancích. Léčba se v počátečních stádiích neprovádí, jelikož nemoc nelze zcela vyléčit, a tudíž by se jednalo pouze o krok zbytečně zatěžující organismus pacienta.

Teprve až pacienti, kteří dojdou do stádia Rai III. a Rai IV. nebo Binet C jsou podrobeni léčbě.

[<http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/chronicka-b-lymfocytarni-leukemie-458620>]

## 1.2.5 LÉČBA

Při léčbě CLL se aplikuje kombinace různých léčiv a léčebných postupů. Bohužel však není možné onemocnění na základě aktuálních znalostí a existujících medikamentů zcela vyléčit, vhodnou indikací léčiv je možné pouze zmírnit průběh onemocnění a prodloužit pacientům život.

### 1.2.5.1 CHEMOTERAPIE

Jedná se o typ léčby, kdy jsou pacientům intravenózně aplikovány chemické látky, jež narušují cytostatické děje<sup>27</sup> a dělení buněk, a tudíž znemožňují další šíření leukemických buněk.

Od 60. let 20. století se k léčbě využíval chlorambucil patřící mezi alkylační<sup>28</sup> cytostatika<sup>29</sup>. Různé zdroje<sup>30</sup> udávají různé hodnoty OR<sup>31</sup> při léčbě chlorambucilem, jedná se však o 30-70 % pacientů. Tento lék je využíván i v současnosti, i když od 80. letech 20. století je upřednostňován spíše fludarabin. Oproti chlorambucilu má mnohem vyšší hodnotu OR

<sup>27</sup> proces růstu nádorových buněk

<sup>28</sup> mají schopnost vázat alkylový zbytek na nukleovou kyselinu při replikaci DNA a tím zabránit dalšímu dělení nádorové buňky

<sup>29</sup> lék na léčbu rakoviny

<sup>30</sup> odkaz: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/chronicka-b-lymfocytarni-leukemie-458620> [cit. 25. 07. 2016].

odkaz: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Hematologie/Soucasne-moznosti-lecby-chronicke-lymfocytarni-leukemie/8-15-Qa.magarticle.aspx> [cit. 25. 07. 2016].

<sup>31</sup> tzv. overall response (odpověď na léčbu)

(65 - 89 %), naproti tomu má však vyšší hematologickou toxicitu a zvyšuje riziko autoimunitní hemolytické anemie<sup>32</sup>, tudíž obě cytostatika mají svá pozitiva, ale i negativa.

Dalšími medikamenty, které se v průběhu let začaly užívat k léčbě, jsou např. protilátky rituximab, ofatumumab, obinutuzumab nebo alemtuzumab či inhibitor ibrutinib. [PANOVSKÁ, Anna, DOUBEK, Michael, *Chronická lymfocytární leukemie - diagnostika a léčba, Onkologie, 2013, 7 (3), 119*]

### 1.2.5.2 KORTIKOSTEROIDY

Používají se k léčbě sekundárních imunitních cytopenií<sup>33</sup>, především v monoterapii nebo v kombinaci režimů. Jedná se o hormony syntetizované z cholesterolu v kůře nadledvin. Kortikosteroidy snižují imunitní reakci organismu, patří tedy do skupiny tzv. imunosupresorů. Nevýhodou je výskyt mnoha nežádoucích účinků, např. začervenání a ztenčení kůže, ukládání tuku v břišní oblasti, řídnutí kostí a s tím související riziko osteoporózy, zvýšená chuť k jídlu a s tím související riziko obezity,... [http://www.stefajir.cz/?q=kortikoidy-nezadouci-ucinky]

### 1.2.5.3 TRANSPLANTACE KRVETVORNÉ TKÁNĚ

Existují tři možné typy transplantace – autologní<sup>34</sup>, alogenní<sup>35</sup> a syngenní<sup>36</sup>. Za jedinou potenciálně kurativní metodu se považuje alogenní, resp. syngenní transplantace, autologní je stále považována spíše za experimentální metodu.

Na seznam čekatelů k transplantaci se zařazují pacienti, u nichž je průběh nemoci agresivní a kteří nereagují adekvátně na jiné režimy léčby. [http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/chronicka-b-lymfocytarni-leukemie-458620]

## 1.3 ZAŘAZENÍ PROTEINŮ RNFT

Proteiny z RNFT rodiny jsou takzvané E3 ubiquitin ligázy. Ubiquitin je globulární protein o délce 76 aminokyselin a je přítomen ve všech eukaryotních buňkách. Hraje v buňkách velmi

---

<sup>32</sup> onemocnění krve, kdy imunitní organismus začne vytvářet protilátky proti erytrocytům, což vede k jejich rozpadu, tzv. hemolýze

<sup>33</sup> nízký počet krevních buněk

<sup>34</sup> tkáň pacienta samotného

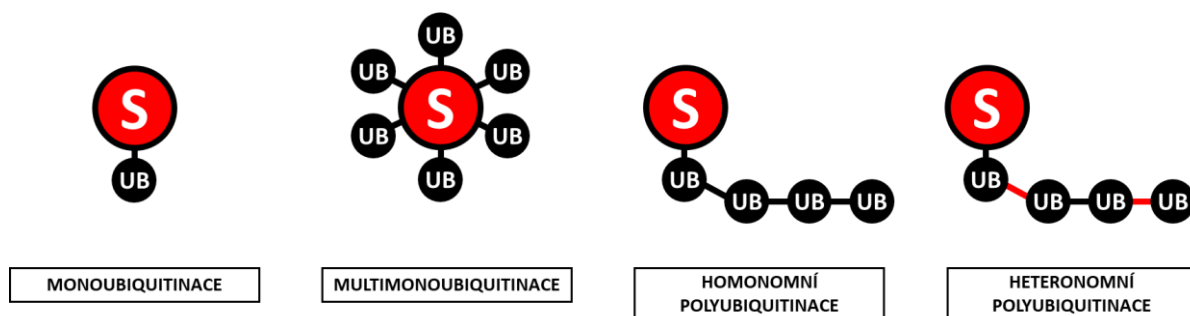
<sup>35</sup> tkáň příbuzného pacienta nebo dárce s vyhovujícími kritérii

<sup>36</sup> tkáň jednovaječného dvojčete

důležitou roli, protože reguluje rozklad proteinů a stimuluje endocytózu. Ubiquitin podněcuje proces ubiquitinace, tedy proces degradace proteinů. Ve všech buňkách totiž neustále dochází jak k proteosyntéze, tedy tvorbě nových proteinů, tak k jejich degradaci. Celý proces probíhá způsobem popsaným a znázorněným níže (viz obrázek č. 2).

Ubiquitin-aktivující enzym aktivuje ubiquitin v buňce za spotřeby ATP<sup>37</sup>. Dále je vázán na ubiquitin-konjugujícího enzym E2 umožňující jeho přenos. E2 ubiquitin-konjugující enzym je spolu s ubiquitinem navázán na E3 ubiquitin-ligázu<sup>38</sup>, jež zajišťuje přenos celého komplexu na specifický protein určený k degradaci. Po kontaktu se substrátem dochází k navázání ubiquitinu jeho C-termálním glycinovým koncem na ε-amino skupinu substrátu. Mezi E3 ubiquitin-ligázy se řadí HECT (*homologous to the E6-AP C-terminal Terminus*), RING (*Really Interesting New Gene*) a U-box domény. V závislosti na typu ubiquitinace zde hraje roli i E4 polyubiquitinová ligáza, jež zajišťuje případnou formaci dalších ubiquitinů do polyubiquitinového řetězce. Tyto formy mohou být následující (viz obrázek č. 1):

1. monoubiquitinace
2. multimonoubiquitinace
3. polyubiquitinace
  - homonomní (mezi jednotlivými ubiquitiny jsou totožné vazby)
  - heteronomní (mezi jednotlivými ubiquitiny jsou střídající se vazby)

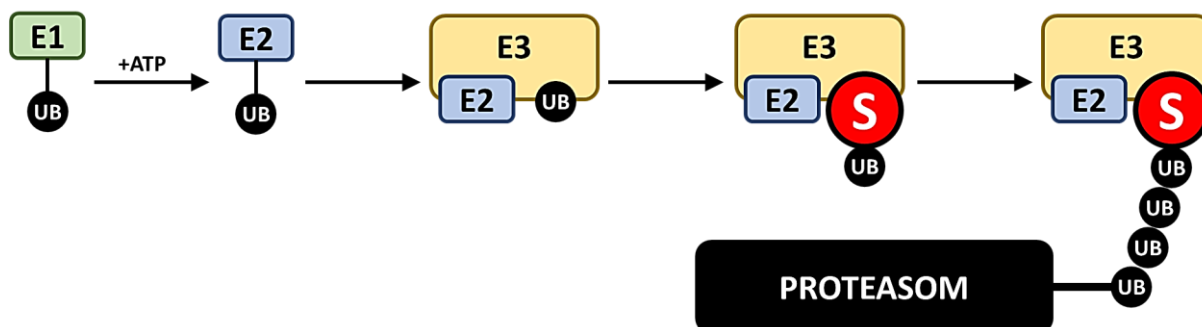


Obrázek 1 formy ubiquitinace

Ubiquitin napojený na degradovaný protein je v posledním kroku tohoto procesu navázán na proteasom, jenž substrát rozdělí na jednotlivé peptidy.

<sup>37</sup> adenosintrifosfát; molekula poskytující energii pro různé procesy v buňce

<sup>38</sup> ligáza je enzym, který má schopnost spojit vzájemně dvě různé molekuly



Obrázek 2 průběh procesu ubiquitinace

A právě do rodiny proteinů s RING doménou, tedy do podskupiny E3 ubiquitin-ligáz, spadají RNFT proteiny. Tyto vlastnosti byly odvozeny na základě srovnání sekvencí z databází<sup>39</sup> – jaká je však detailnější biologická funkce genů RNFT není zatím známo. [GANJI, Sri Ranjani. *Identification and Validation of Dvl interacting partners using Proteomics approach*. 2013; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754430>]

## 1.4 ANALÝZY EXPRESE RNFT IN SILICO

První krok byl zjistit vztah mezi CLL a RNFT proteiny s využitím on-line databází<sup>40</sup>, ve kterých jsou uloženy informace o jednotlivých genech, aktivovaných u jednotlivých buněčných typech a chorob. Právě data z odborných internetových databází vedla k rozhodnutí se zabývat bližšími souvislostmi mezi výskytem proteinů RNFT1 a RNFT2 a CLL. Všechny dostupné informace nasvědčují, že nějaké spojení existuje.

Prvním ukazatelem je graf, jenž znázorňuje 10 nádorových onemocnění, u nichž se vyskytuje největší exprese genu RNFT1.

<sup>39</sup> odkaz: <http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/?=/jobs/result/96ca706b2b3d000d968d34a57638bbca> [cit. 11. 05. 2016].  
odkaz: <http://pfam.xfam.org/protein/Q96EX2> [cit. 11. 05. 2016].

odkaz: <http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=19002481&showAllSites=true> [cit. 11. 05. 2016].  
odkaz: [https://www.nextprot.org/entry/NX\\_Q96EX2/medical](https://www.nextprot.org/entry/NX_Q96EX2/medical) [cit. 11. 05. 2016].

<sup>40</sup> odkaz: [http://www.nextprot.org/db/entry/NX\\_Q5M7Z0/expression#a-ts-line-589](http://www.nextprot.org/db/entry/NX_Q5M7Z0/expression#a-ts-line-589) [cit. 11. 05. 2016].

odkaz: [https://hive.biochemistry.gwu.edu/cgi-bin/prd/biomuta/servlet.cgi?gpageid=11&searchfield1=gene\\_name&searchvalue1=RNFT2](https://hive.biochemistry.gwu.edu/cgi-bin/prd/biomuta/servlet.cgi?gpageid=11&searchfield1=gene_name&searchvalue1=RNFT2) [cit. 11. 05. 2016].

## 10 NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ S NEJVYŠŠÍ EXPRESÍ GENU RNFT1



Graf č. 1 – Srovnání míry exprese genu RNFT1 u různých nádorových onemocnění

Zdroj: <https://genevisible.com/cancers/HS/Gene%20Symbol/RNFT1> (upraveno)

Graf zobrazuje výsledky více, na sobě nezávislých, výzkumů, proto se v něm např. CLL vyskytuje třikrát. Z tohoto důvodu, že CLL je třikrát tolikrát v grafu deseti nádorových onemocnění s nejvyšší expresí genu RNFT1 a vždy je u něj exprese nadstandardně vysoká, je pravděpodobné, že se vyskytuje nějaká souvislost mezi mírou exprese genu RNFT1 a onemocněním CLL.

Vzhledem k tomuto nálezu je práce věnována průzkumu genů RNFT a hledání jejich spojitosti s CLL.

## 1.5 WNT SIGNALIZACE

Jedná se o typ mezibuněčné signalizace, který je důležitý zejména v embryonálním vývoji jednice, ale byla objevena i jeho souvislost u leukémie, a i ostatních hematopoetických<sup>41</sup> onemocnění. Konkrétně kanonická Wnt dráha kontroluje diferenciaci a proliferaci hematopoetických, ale i ostatních buněk těla. Mutace v této dráze může vést právě k rozvoji CLL, kdy dochází k proliferaci, diferenciaci a expanzi nezralých lymfatických buněk.

<sup>41</sup> hematopoetická onemocnění souvisí s diferenciací hematopoetických buněk, tedy kmenových buněk, které mají hluboký význam pro krvetvorbu. Jedná se totiž o primární buňku, která dává vznik všem ostatním krevním elementům (lymfocyty, erytrocyty apod.)

Wnt signalizace je proces spuštěný na Wnt komplexu, který se skládá ze dvou Wnt ligandů<sup>42</sup> (jméno po Wg (*Wingless*) a Int-1 (*Integration 1*). Wnt proteinů bylo zatím popsáno a identifikováno (u savců) celkem 19.

Existují 2 typy Wnt signálních drah lišící se v mechanismu přenosu signálu, a to kanonické a nekanonické. U kanonické dráhy hraje stěžejní roli molekula  $\beta$ -katenin<sup>43</sup>, u dráhy nekanonické tato molekula nefiguruje, ale existují tři podtypy těchto drah, které se liší mechanismem přenosu signálu a výsledným účinkem. Vždy se však reakce účastní receptory, které mohou být, v závislosti na typu Wnt signalizace, z rodin Fz (*Frizzled*), LRP (*Low density Lipoprotein Receptor-related Protein*), RYK (*Receptor-like Tyrosine Kinase*) nebo ROR (*Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor*). Tyto receptory přijímají signál v podobě proteinu Wnt, se kterým interagují.

### 1.5.1 KANONICKÁ WNT SIGNALIZACE

Jedná se o velmi dobře prozkoumaný typ Wnt signalizace, který k přenosu signálu využívá molekulu  $\beta$ -katenin. Signál zde funguje především na principu navázání ligandu Wnt na koreceptory Fz a LRP5 nebo LRP6. Za standardních podmínek je neustále přítomen destrukční komplex, kdy protein GSK3 fosforyluje  $\beta$ -katenin a tím jej označí za nežádoucí částici určenou k degradaci. Následně pomocí ubiquitinace dojde k degradaci  $\beta$ -kateninu. Nedochozí tedy k jeho přenosu do jádra buňky, kde se místo něj naváže na transkripční faktor TCF/LEF - 1 (*Cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor 1*) represor Groucho, který brání transkripci.

Pokud však Wnt je navázán na koreceptory Fz a LRP5/6, dochází k rozpadu tohoto komplexu a přenosu  $\beta$ -katenin do jádra buňky, kde aktivuje transkripční faktor TCF/LEF - 1.

Při interakci mezi Wnt a koreceptory Fz a LRP5/6 dojde k navázání receptoru Fz k proteinu Dvl (*Dishevelled*), což způsobí fosforylaci LRP5/6 a jeho navázání na Axin (*Axis Inhibition Protein 1*). Následně dochází i ke vzniku vazby mezi Axinem a Dvl, která vyvolá zablokování destrukčního komplexu,  $\beta$ -katenin tedy není fosforylován ani destruován, ale dochází k jeho kumulaci v cytoplasmě. Při standardním destrukčním procesu je fosforylován protein  $\beta$ -

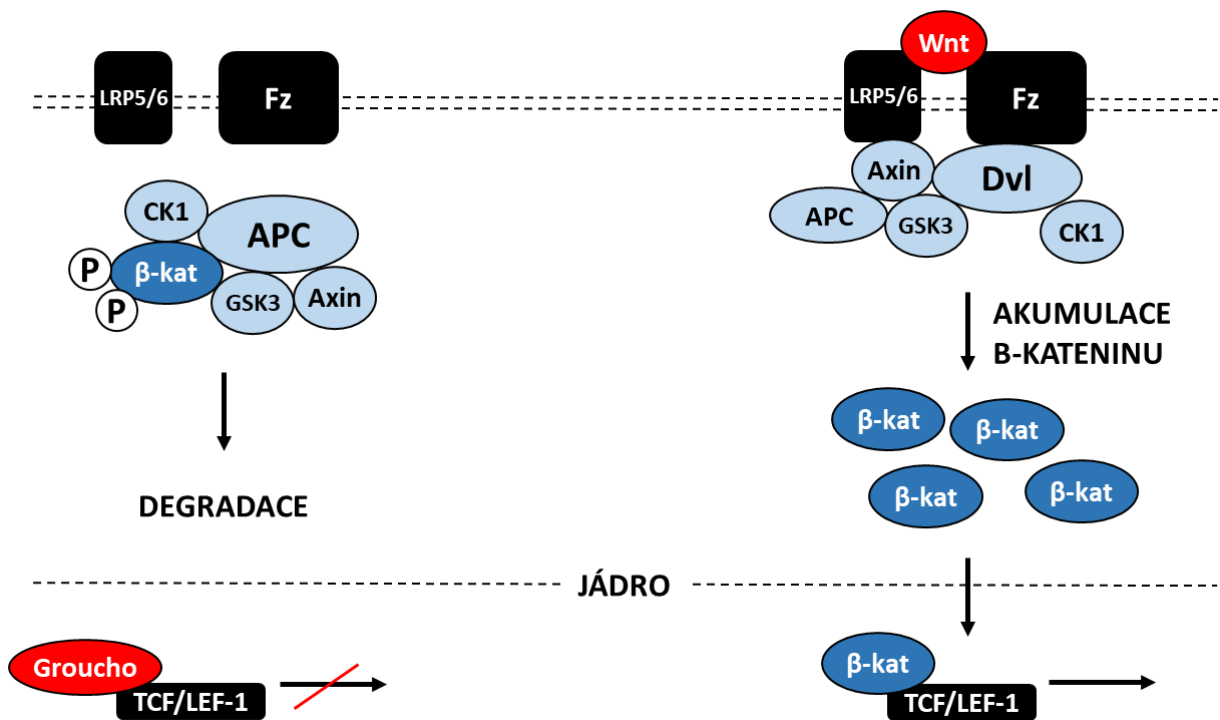
---

<sup>42</sup> ligand je molekula poskytující jeden nebo více elektronových párů centrálnímu atomu

<sup>43</sup>  $\beta$ -katenin je protein důležitý především pro genovou transkripci, tedy přepis DNA na mRNA

katenin. Tato fosfátová skupina slouží jako podnět iniciující ubiquitinaci a degradaci tohoto proteinu.

Po docílení určité koncentrace  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě dojde k jeho transportu do jádra. Zde interaguje  $\beta$ -katenin s transkripčními faktory TCF/LEF - 1, která vyvolá následnou transkripci,  $\beta$ -katenin se totiž naváže na faktor TCF, na který je standardně navázán represor Groucho znemožňující proběhnutí transkripce jako tomu je při absenci Wnt proteinu. Faktory TCF/LEF - 1 následně řídí expresi cílových genů.



Obrázek 3 kanonická Wnt signalizace a její průběh při absenci nebo prezenci Wnt ligandu

### 1.5.2 NEKANONICKÁ WNT SIGNALIZACE

Nekanonická dráha zatím nebyla tolik probádána jako dráha kanonická, probíhá bez přítomnosti  $\beta$ -kateninu. Iniciátorem reakce je však stejně jako u dráhy kanonické interakce mezi receptorem, nejčastěji se jedná o receptor Fz, a ligandem Wnt.

Existuje mnoho typů nekanonickým Wnt drah, lépe popsané jsou však pouze dráhy, kde dochází k interakci Wnt + PCP (*Planar Cell Polarity*), Wnt +  $Ca^{2+}$  a Wnt + ROR. Rozdíl mezi těmito drahami je jak v proteinech, které přenáší signály, tak v cílových genech, ke kterým signály směřují.

### 1.5.2.1 WNT/PCP SIGNÁLNÍ DRÁHA

Jedná se u dráhu objevenou u *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná), obecně u hmyzu má prvořadý význam ve stanovení orientace chlupů na křídlech. U obratlovců má vliv na konvergentní extenzi, tedy regulaci buněčné migrace.

K reakci dochází pouze za přítomnosti Wnt ligandu, který vytvoří vazbu s receptorem Fz a tento komplex následně po interakci s proteinem Dvl přeneše signál na dvě paralelní dráhy GTPázy<sup>44</sup> Rho a Rac. Přenesený signál dále ovlivňuje diferenciaci cytoskeletu.

Rho kináza<sup>45</sup> je závislá na aktivaci proteinem DAAM1 (*Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1*) a následně ovlivňuje kinázu ROCK (*Rho-Associated Protein Kinase*) a myosin.

Rac kináza je nezávislá na reakci s proteinem DAAM1, signál je následně přenesen na kinázu JNK (*c-Jun N-terminal kinase*).

### 1.5.2.2 WNT/ CA<sup>2+</sup> SIGNÁLNÍ DRÁHA

Hlavními figuranty této dráhy jsou PLC (*phospholipase C*), IP<sub>3</sub> (*inositoltriphosphate*), DAG (*diacylglycerol*), kteří jsou aktivováni na základě interakce mezi komplexem Wnt/Fz a G-proteinem a regulují množství uvolněného Ca<sup>2+</sup> z endoplazmatického retikula do cytoplazmy. Na základě zvýšené koncentrace vápenatých iontů jsou aktivováni další figuranti reakce, a to PKC (*Phospho-kinase C*), CaMKII (*Calmodulin-dependent Kinase II*), TAK1 (*TGFβ Activated Kinase*) a NLK (*Nemo Like Kinase*). Hlavním komponentem reakce je PKC, který řídí diferenciaci buněk během gastrulace<sup>46</sup>.

### 1.5.2.3 WNT/ROR SIGNÁLNÍ DRÁHA

Existují 2 formy proteinu ROR, které se mohou účastnit Wnt/ROR signalizace, a to ROR1 a ROR2. Po interakci s ROR2 s ligandem Wnt, dojde k aktivaci dráhy a k přenesení signálu na kinázy PI<sub>3</sub> a CDC42 (*Cell Division Control Protein 42*) a následně na transkripční faktory

---

<sup>44</sup> guanosintrifosfát fosfohydroláza; enzym přeměňující GTP (guanosintrifosfát) na GDP (guanosindifosfát)

<sup>45</sup> kináza je enzymatická částice mající schopnost transportu fosfátové skupiny z jedné molekuly na jinou

<sup>46</sup> jedná se o proces přeměny blastuly na gastrulu, tedy jedno ze stádií embryonálního vývoje



ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*) a c-jun<sup>47</sup>. Při interakci Wnt ligandu s ROR1 se reakce liší v aktivovaném transkripčním faktoru, kterým je v tomto případě NF- $\kappa$ B<sup>48</sup>. Tyto transkripční faktory jsou velmi důležité pro řízení imunitní odpovědi.

Dosud však nebylo objasněno, zda je tato dráha opravdu samostatná či zda se jedná pouze o součást Wnt/PCP signální dráhy.<sup>49</sup>

## 1.6 HIPPO SIGNALIZACE

Hippo signalizace se obdobně jako Wnt signální dráha řadí do signálních drah, které se zúčastňují komunikace mezi nádorovými buňkami. Tato signalizace má vliv zejména při vývoji jedince, kdy reguluje velikost orgánů. Co se týče role v onkogenezi, jedná se zde o důležitý tumorsupresor, má tedy vliv na usměrňování rozvoje nádorů, konkrétně inhibuje aktivitu signálních drah a faktorů vyvolávajících nádorové bujení.

Hippo signalizace nebyla dosud zcela dokonale charakterizována, co se do exaktní role některých proteinů týče. Figuranty této dráhy (viz obrázek č. 4) jsou S/T<sup>50</sup> kináza MST1/2 (*Mammalian STE20-like protein kinase 1/2*), proteinová kináza LATS1/2 (*Large Tumor Suppressor 1/2*) a dále proteiny MOBKL1A/1B (*Mps One Binder kinase activator-like 1A/1B*). Mezi proteiny MOBKL1A/1B a kinázami LATS1/2 dochází ke vzájemnému působení, kdy MOBKL1A/1B funguje v roli aktivátoru proteinů LATS1/2. Při aktivaci Hippo dráhy dochází k tomu, že MST1/2 proteiny fosforylují LATS1/2, jejich vzájemné působení zajišťují tzv. adaptorové proteiny<sup>51</sup> SAV1 (*Salvador homologue 1*), a zahájí tím řetězec fosforylací, kdy fosforylovaný LATS1/2 převádí fosfátovou skupinu dále na YAP (*YES Associated protein*) a TAZ (*Transcriptional coactivator with a PDZ<sup>52</sup>-binding domain*). Fosforylace YAP/TAZ, jakožto konečných efektorů, způsobuje inhibici růstu tumorů. V případě, že k fosforylaci

---

<sup>47</sup> gen kódovaný genem JUN (*JUN proto-oncogene*)

<sup>48</sup> skupina transkripčních faktorů ovlivňujících expresi genů, které mají vliv na imunitu, zánětlivou odpověď organismu, proliferaci, apoptózu a embryonální vývoj; odkaz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882124/> [cit. 12. 02. 2018].

<sup>49</sup> odkaz: <https://theses.cz/id/46hasr>;

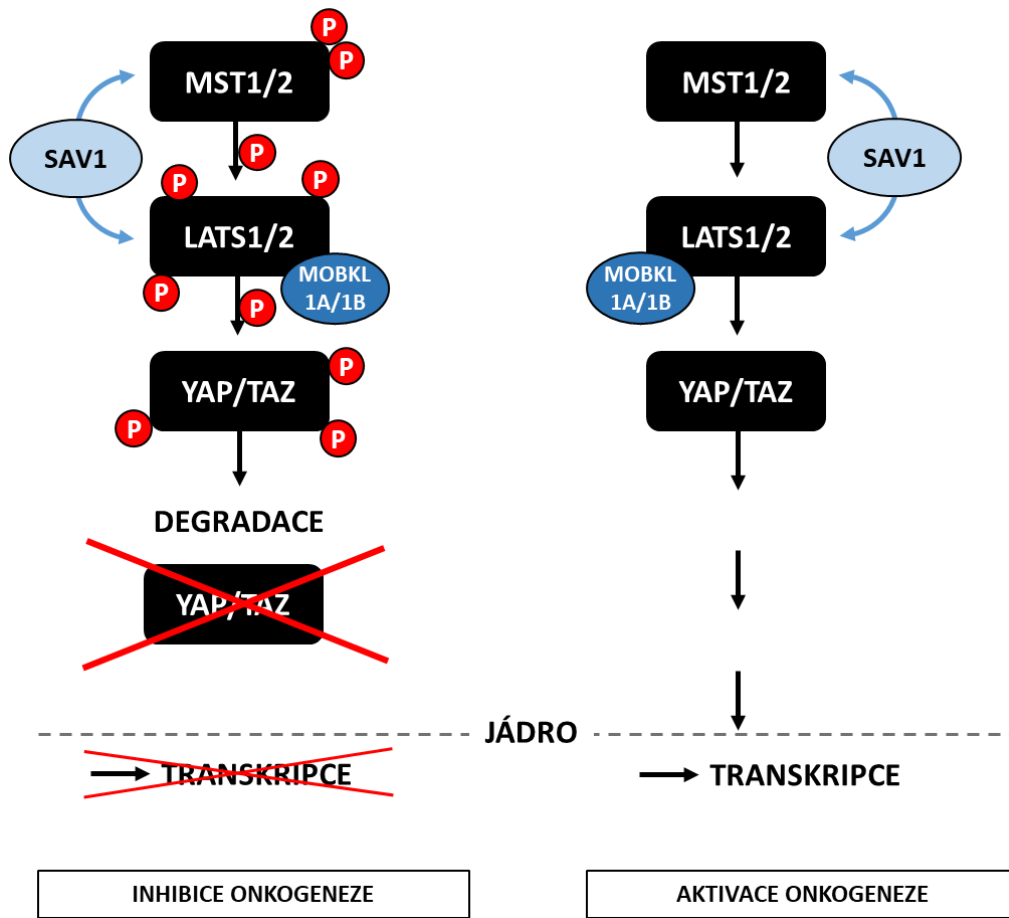
[https://dspace.cuni.cz/bitstream/.../20.../IPRT\\_2010\\_2\\_0\\_168469\\_0\\_84939.pdf](https://dspace.cuni.cz/bitstream/.../20.../IPRT_2010_2_0_168469_0_84939.pdf) [cit. 16. 02. 2018].

<sup>50</sup> jedná se o zkratku tzv. serin/threonin kinázy, tedy kinázu, která navazuje fosfátovou skupinu na serinový nebo threoninový proteinový zbytek

<sup>51</sup> adaptorový protein zajišťuje přiblížení reagujících enzymů na blízkost umožňující interakci mezi nimi

<sup>52</sup> zkratka domény, která byla sestavena z tří prvních objevených proteinů této domény - post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), zonula occludens-1 protein (zo-1)

YAP/TAZ nedochází, mají opačný efekt, tedy aktivují buněčnou proliferaci, a tudíž expanzi nádorových buněk v důsledku spuštění transkripce v jádře buňky.



Obrázek 4 průběh předávání signálu v Hippo signální dráze

## 2 METODY

Pro prozkoumání genů RNFT1 a RNFT2 bylo využito mnoho odborných laboratorních metod a postupů, konkrétně se jednalo o gelovou agarózovou elektroforézu, polymerázovou řetězovou reakci, kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci, klonování DNA pomocí expresního vektoru, western blot, průtoková cytometrie, DC Protein Assay a modifikaci pomocí TetON systému. Podrobnější popis jednotlivých metod a postupů je uveden v následujících podkapitolách.

### 2.1 GELOVÁ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Separční technika používaná pro izolaci a analýzu nukleových kyselin. Metoda využívá pohybu záporně nabitých částic nukleových kyselin v elektrickém poli, tedy směrem k anodě, kdy rychlost jejich pohybu je nepřímo úměrná jejich velikosti.

Dělení probíhá na agarózovém gelu, který je tvořen sítí polymerních molekul s póry, za přítomnosti elektrického proudu. Hustota sítě gelu je závislá na koncentraci agarózy v gelu a je nepřímo úměrná rychlosti molekul v elektrickém poli, přičemž se zvyšující se hustotou gelu klesá rychlost molekul. Použitá koncentrace práškové agarózy v gelu se liší v závislosti na velikosti analyzovaného prvku. Pro zachycení malých molekul je třeba vysoká hustota gelu.

Gel se připravuje z příslušného množství agarózového prášku určeného pro DNA<sup>53</sup> elektroforézu, dle požadované výsledné koncentrace, který se rozpouští v TBE<sup>54</sup> pufru za zvýšení teploty na bod varu. K roztoku se ještě přidává ethidium-bromid, který váže DNA.

Roztok poté v důsledku klesající teploty ztuhne, během tuhnutí je v gelu umístěn hřebínek, který vytvoří jamky pro nanášení vzorků.

Vzorky aplikované do jamek gelu musí být smíchány s nanášecím barvivem, které v kombinaci s ethidium-bromidem v gelu umožní vizualizaci pod UV<sup>55</sup> zářením.

---

<sup>53</sup> deoxyribonukleová kyselina

<sup>54</sup> tris/borate/EDTA roztok

<sup>55</sup> ultraviolet (ultrafialové záření)

Gel připravený k elektroforéze je připojen ke zdroji elektrického napětí, v jehož důsledku dojde k separaci molekul na základě jejich velikosti a rozdílného pohybu v elektrickém poli. [RUML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-499-8. S.45-52*]

## 2.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Jedná se o způsob amplifikace konkrétní zvolené sekvence DNA; udává se, že při tomto procesu může vzniknout až miliarda kopií specifického produktu. Tato metoda se provádí v přístroji, v tzv. termocykleru, který umožňuje rychlé a přesné změny teplot, a tudíž správnou reakci všech látek v reakční směsi určené pro PCR.

Reakční směs, tzv. Master Mix, musí obsahovat vzorek templátové DNA, jejíž daná sekvence má být amplifikována. Daný templát nesmí být kontaminován žádnou jinou DNA, protože by mohlo dojít ke značnému ovlivnění konečných výsledků<sup>56</sup>. Další složkou jsou primery, tedy oligonukleotidy, jež označují počátek a konec sekvence DNA určené k amplifikaci. Tyto primery obsahují DNA komplementární k dané sekvenci v délce 17 až 28 nukleotidů.

Třetí důležitou složkou je polymeráza, tedy enzym katalyzující syntézu DNA. Polymeráza prodlužuje DNA řetězec vkládáním deoxyribonukleotidů do replikační vidlice.

Poslední složkou Master Mixu je tzv. základní reakční roztok. Ten obsahuje všechny čtyři deoxynukleosidtrifosfáty, hořčičnaté ionty, pufr zajišťující ideální iontovou sílu prostředí a ultračistou vodu.

Následným krokem po tvorbě Master Mixu je správné nastavení termocykleru. Toto nastavení se liší v závislosti na charakteru amplifikovaného vzorku. Obecně se však každé reakce týkají následující kroky, jimiž musí každá reakce projít. Prvním krokem je proces denaturace DNA. Master Mix je po dobu 20-30 sekund vystaven teplotě 94-98 °C. Během této doby dochází k denuraci vodíkových můstků mezi bázemi a vzniku jednovláčkové DNA. Následně dochází k tzv. hybridizaci, tedy nasednutí primerů na řetězec jednovláčkové DNA. Na tyto úseky s navázanými primery se dále váže polymeráza. Fáze hybridizace probíhá za teploty snížené na 50-65 °C.

---

<sup>56</sup>I nepatrné množství cizorodé DNA se projeví odchylkami/abnormalitami u výsledků, např. výskytem nespecifického produktu.

Posledním krokem je syntéza DNA za teploty 75-80 °C, tedy tvorba nové komplementární DNA k původní.

Tyto tři kroky znamenají jeden cyklus, který se následně opakuje v závislosti na množství výsledné DNA, které chceme získat. Většinou se však počet cyklů pohybuje kolem třiceti.

Vyhodnocení výsledků probíhá pomocí agarózové gelové elektroforézy. Tato metoda slouží k analýze nukleových kyselin. Je založena na principu schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Využívá faktu, že DNA je záporně nabitá částice, a tudíž putuje ke kladně nabitým pólům a také toho, že různě velké částice se pohybují odlišnou rychlostí.

Vzorky určené k analýze se umisťují do jamek v agarózovém gelu (stejný jako v kapitole 2.1)<sup>57</sup>, jehož součástí je barvivo (SYBR Green<sup>58</sup> nebo ethidium bromid), jež na sebe zkoumaný vzorek naváže a výsledky je poté možné zkoumat pod UV zářením. [OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka. V Praze: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8. 126-128]*

## 2.3 KVANTITATIVNÍ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (qPCR)

Jedná se o téměř shodný proces jako u normální PCR. Rozdíl je v příměsi fluorescenční látky vázající se na nově syntetizované DNA (SYBR Green) do směsi Master Mixu, která nám umožňuje zjistit, jaký je nárůst produktu v konkrétním čase. Průběh reakce je pak monitorován a z dynamiky syntézy produktu je možné určit množství DNA v původním vzorku. Data získaná termocyklerem následně vyhodnotí počítač.

[[https://cs.wikipedia.org/wiki/Kvantitativní\\_polymerázová\\_řetězová\\_reakce](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kvantitativní_polymerázová_řetězová_reakce)]

## 2.4 KLONOVÁNÍ DNA

Klonování DNA je proces amplifikace specifické požadované genové sekvence za použití plasmidového vektoru a následného naklonování tohoto vektoru v bakteriích. Naklonovaná

---

<sup>57</sup> Agarózový gel se připravuje z práškové agarózy a pufru. Gel se míchá 1% pro pouhou analýzu, pro další práci se vzorky (např. extrakci DNA z gelu) se používá v 0,5% koncentraci. Roztok se následně smíchá s ethidium-bromidem a nechá se projít varem, aby vznikla homogenní směs, která se následně nechá ztuhnout.

<sup>58</sup> fluorescenční DNA barvivo

DNA se poté získá zpětnou extrakcí lýzou<sup>59</sup> bakterií a otevřením plasmidů restričními endonukleázami na místě vložení specifické DNA.

#### **2.4.1 LIGACE**

Ligace je proces vložení požadovaného fragmentu do určeného klonovacího vektoru<sup>60</sup>. Pro tento proces je potřeba si vytvořit reakční směs. Nejdůležitějšími částmi směsi je vektor a inzert. Inzert, tedy sekvence DNA určená k replikaci, se nejprve upraví a replikuje za využití metody PCR, aby měl konce kompatibilní ke koncům vektoru, který byl na těchto místech otevřen. Další součástí reakční směsi je T4 DNA ligáza. Tato látka zajišťuje spojení kompatibilních konců vektoru a inzertu. Poslední složkou je ligační pufr obsahující ATP a soli.

Směs se nechá inkubovat při 16 °C po dobu jedné hodiny.

#### **2.4.2 TRANSFORMACE**

V tomto bodu klonování dochází k integraci vektoru s vloženým fragmentem do buňky. K tomu slouží speciálně upravené bakterie, u nichž se vektor snadno dostane dovnitř buňky. Nejprve jsou smíchány kompetentní bakterie s vektorem a nechá se 15 minut inkubovat na ledu. Poté se provede tzv. teplotní šok, kdy se směs ohřívá 90 sekund při 39-42 °C. V tomto kroku dojde k narušení cytoplasmatické membrány buňky, a tedy i průniku vektoru dovnitř buňky. Následně je potřeba směs opět urychleně přenést na led a přidat kultivační médium. Poté se směs nechá hodinu inkubovat na třepačce za teploty 37 °C.

#### **2.4.3 KULTIVACE**

Bakterie, které již nesou vektor s inzertem, se nanesou na připravenou Petriho misku s kultivačním médiem a antibiotikem, ke kterému je klonovaný vektor rezistentní. Bakterie se nechají kultivovat přes noc při teplotě 37 °C, kdy dojde k jejich rozmnožení. Následným krokem je odpíchnutí rozmnožených kolonií bakterií z Petriho misky a přenesení do kultivačního média, které obsahuje příslušné antibiotikum. Směs se přes noc opět nechá inkubovat za teploty 37 °C.

---

<sup>59</sup> protržení cytoplasmatické membrány buněk

<sup>60</sup> Klonovací vektor je kruhová DNA (plasmid), do které lze vložit požadovanou sekvenci DNA. Vektor je vkládán do buněk, kde dochází k jeho replikaci (původních sekvencí DNA vektoru a vložené DNA). Jako vektory se používají plasmidy, fasmidy, kosmidy, bakteriofázy nebo umělé bakteriální a kvasinkové chromosomy.

#### 2.4.4 IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA

K izolaci plasmidové DNA se využije komerční kit podle definovaného postupu. Plasmidy jsou izolovány z bakteriální kultury. Bakterie jsou nejprve zlyzovány a z lyzační směsi odebrány všechny přebytečné látky (DNA, RNA, proteiny). Po sérii kroků a čištění jsou výsledkem procesu jednotlivé plasmidy.

#### 2.4.5 OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI INZERTU

Výskyt inzertu se ověřuje pomocí restriční analýzy. Část plasmidu obsahující inzert se otevře pomocí enzymů, s nimiž se provádělo i jeho otevření před ligací. S takto otevřeným plasmidem se provede agarózová gelová elektroforéza. Výskyt dvou produktů na výsledném gelu (prázdný plasmid a inzert) potvrzuje úspěšné provedení celého pokusu. [ŠMARDÁ, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1. S. 29-45]

### 2.5 WESTERN BLOT

Jedná se o analytickou metodu sloužící k detekci specifického proteinu ve vzorku biologického materiálu. Konkrétní protein je nejprve elektroforeticky separován na polyakrylamidovém gelu na základě své velikosti a izoelektrického bodě. Následně je protein přenesen na polyvinylou nebo nitracelulosovou membránu a v několika krocích je postupně přidána primární protilátka, sekundární protilátka a chemiluminiscenční roztok, což umožní detekci proteinu pod UV zářením.

#### 2.5.1 SDS-PAGE

Prvním krokem metody western blot je SDS-PAGE<sup>61</sup>, tedy elektroforetická separace proteinů zkoumaného vzorku.

Pro reakci je potřeba ze vzorků proteiny uvolnit a rozpustit pomocí lyzačního pufru. Lyzační pufr není pro western blot vždy stejný, ale liší se na základě kritérií protilátek, jež se přidávají v dalším kroku reakce. Nejdůležitější součástí lyzačního pufru je SDS a  $\beta$ -merkaptoetanol/ditiotreitol, jež odstraňuje disulfidické můstky v proteinu. Pufr také obsahuje

---

<sup>61</sup> SDS-PAGE je zkratka pro komponenty umožňující metodu western blot. SDS sodiumdodecylsulfát je látka způsobující denaturaci proteinů a udělení záporného náboje, PAGE je zkratka pro anglický výraz "polyacrylamide gel electrophoresis," tedy elektroforéza s polyakrylamidovým gelem.

glycerol, který zvyšuje hustotu vzorku, a tudíž usnadňuje nanášení na polyakrylamidový gel. Poslední složkou je bromfenolová modř pro vizualizaci postupu vzorků při elektroforéze.

Následně je potřeba proteiny denaturovat, protože většina protilátek je dokáže detekovat pouze v denaturované formě. Vzorky se tedy zahřívají na teplotu 95 °C po dobu pěti minut, aby došlo k denaturaci proteinu a vazbě SDS. Existují ale i protilátky, které jsou schopné detekovat proteiny i v nativní formě, a tudíž není potřeba proteiny denaturovat.

V dalším kroku je potřeba vytvořit polyakrylamidový gel k nanesení vzorků. Gel sestává ze dvou částí – spodní, kde dochází k separaci proteinů na základě jejich velikosti, a vrchní s jamkami, do kterých se nanáší připravené vzorky. Oba gely obsahují stejné složky, jen v rozdílné koncentraci a množství. Spodní gel obsahuje více akrylamidu a má vyšší hodnotu pH (6,8). Krom akrylamidu je součástí i N,N'-metylenbisakrylamid, který sesítovává akrylamid, SDS, Tris pufr, dále APS<sup>62</sup> dodávající volné radikály a TEMED<sup>63</sup> katalyzující tvorbu volných radikálů APS.

Gely s nanesenými vzorky se vloží do aparatury pro western blot elektroforézu a připojí se ke zdroji elektrického napětí. Zde dochází k separaci molekul proteinů dle jejich velikosti. Jako pufr se při reakci používá 1X Tris-glycin-SDS sestávající z Tris báze, glycinu a SDS.

### **2.5.2 PŘENOS PROTEINU**

Přenos proteinů je proces, při kterém se proteiny přenesou z akrylamidového gelu na membránu pro další zpracování. Na gel s elektroforeticky separovanými proteiny se položí membrána, nitracelulosová nebo polyvinyllová, na niž jsou separované proteiny „přebloťovány“ za působení elektrického proudu.

### **2.5.3 DETEKCE PROTEINU**

Dále se provádí tzv. blokování membrány, kdy jsou pomocí blokovacího roztoku, tedy 5% roztoku sušeného odtučněného mléka nebo BSA<sup>64</sup>, vyplněna nespecifická místa membrány, která neobsahují navázané proteiny. Pokud by byl tento krok vynechán, došlo by k navázání

---

<sup>62</sup> ammonium persulfát

<sup>63</sup> N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin

<sup>64</sup> bovine serum albumin



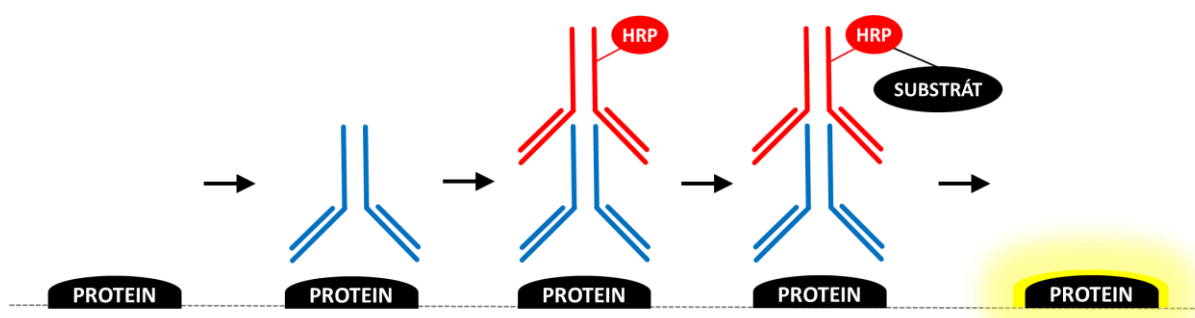
protilátek kromě specifických proteinů i na nesespecifická místa membrány. Proces v blokovacím roztoku probíhá po dobu jedné hodiny za stálého protřepávání.

Po blokování je potřeba membrány promýt v roztoku TBS<sup>65</sup> nebo PBS<sup>66</sup> obsahujícím detergent, aby se zamezilo nesespecifickému navázání protilátek. Promývání probíhá v několika cyklech trvajících řádově několik minut a při každém cyklu se promývací roztok vymění za nový.

Následuje aplikace primárních protilátek (viz obrázek č. 5), které se k membráně přidávají spolu s blokovacím roztokem. Navázání protilátky na antigen trvá několik hodin. Poté je potřeba opět provést cyklus promývání totožný jako po blokování membrány.

Primární protilátky není možné přímo detekovat, tudíž je potřeba aplikovat i protilátky sekundární, což jsou protilátky, které rozpoznávají všechny protilátky, pocházející z hostitelského organismu použitému k produkci primárních protilátek. Sekundární protilátky jsou spojeny („konjugovány“) s enzymem – obvykle je to HRP<sup>67</sup>, který je schopen katalyzovat reakci s chemiluminiscenčním roztokem, vedoucí ke vzniku světla. Ty jsou přidávány k membránám spolu s promývacím roztokem. Proces trvá jednu až dvě hodiny a po skončení je opět potřeba provést promývací cyklus.

Posledním krokem před analýzou je zviditelnění detekovaných proteinů. Nejčastěji se využívá chemiluminiscenčního substrátu, kdy množství signálu, které vydává, je přímo úměrné množství navázaného detekovaného proteinu. [VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7. S. 235-236]



Obrázek 5 proces detekce proteinu na membráně

<sup>65</sup> TBS = Tris buffered saline

<sup>66</sup> PBS = phosphate buffered saline

<sup>67</sup> peroxidáza

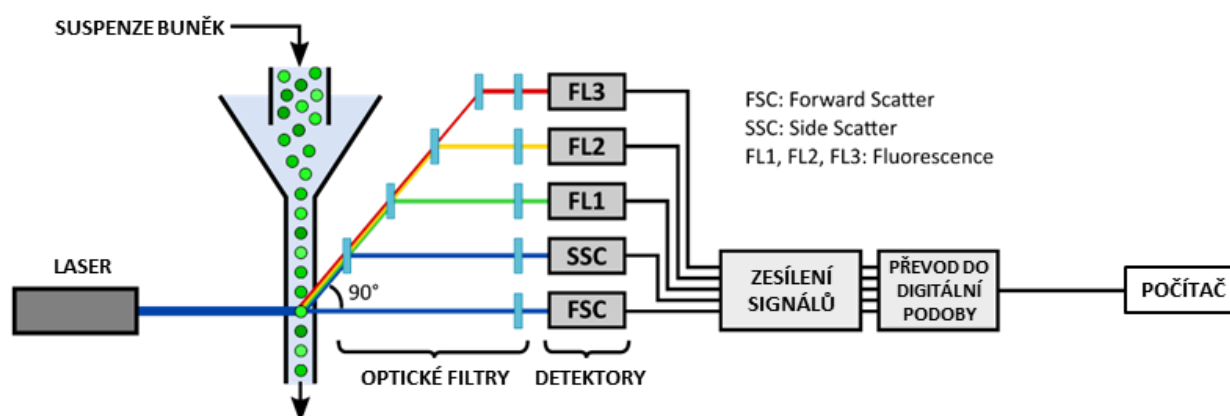
Detekce některých proteinů je možná i jen využitím primárních imunoglobulinů. U často využívaných a známých proteinů byly vyvinuty primární protilátky, které na sobě již mají navázané HRP a není tedy nutná aplikace imunoglobulinů sekundárních.

## 2.6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie je přístrojová metoda umožňující analýzu vzorku suspenze buněk. Konkrétně zprostředkovává data o počtu buněk, jejich velikosti, komplexitě a obsahu DNA v buňkách. Na základě rozboru těchto údajů je možné následně např. zjistit, jaké množství buněk se nachází v jakém buněčném cyklu, vitalitu buněk, počet různých kolonií, ...

Metoda funguje na principu lomu laserového paprsku skrz buňky, při čemž každá z buněk je analyzována separovaně při průchodu přes průtokovou komůrku (viz obrázek č. 6). Světlo z laseru se po průchodu buňkou odrazí v závislosti na její struktuře a dopadá na detektory, tzv. FSC<sup>68</sup>, SSC<sup>69</sup> a SFL<sup>70</sup>. Pomocí FSC je možné získat data o velikosti buňky, intenzita laseru dopadající na FSC je přímo úměrná velikosti buňky. SSC detektor poskytuje údaje o komplexitě buňky – vysoký počet částic uvnitř buňky způsobuje rozptyl laseru do různých směrů. Poslední detektor, tedy SFL, př. jen FL, udává informaci o fluorescenční aktivitě buňky, což umožňuje zjistit obsah DNA, popř. RNA. Hladina fluorescence je tím vyšší, čím vyšší je množství ribonukleové a deoxyribonukleové kyseliny.

Pro měření v této práci byl konkrétně použit průtokový cytometr BD Accuri™ C6.



Obrázek 6: základní schéma principu fungování průtokového cytometru, zdroj: <https://benchling.com/pub/tabor-flowcal> (upraveno)

<sup>68</sup> forward scatter (detektor předního paprsku)

<sup>69</sup> side scatter (detektor bočního paprsku)

<sup>70</sup> side fluorescent light (detektor bočního fluorescenčního světla)

## 2.7 DC PROTEIN ASSAY

Jedná se o kolorimetrickou metodu měření koncentrace proteinů, tedy stanovení koncentrace proteinů v buněčném lyzátu na základě porovnání intenzity zbarvení vzorku neznámé koncentrace vůči vzorku se známou koncentrací, která funguje na principu spektrometrie. Je využito analýzy absorpce a odrazu světla ve vzorku. Pomocí této metody je možné analyzovat vzorky o koncentraci 0,1 - 2 mg/ml.

Pro toto měření musí být nejprve připraveny vzorky. Buňky zasazené na Petriho miskách je potřeba přenést do separovaných Eppendorfových zkumavek a omýt v 10% roztoku PBS (přidat PBS, zvortexovat, zcentrifugovat a odsát přebytečný pufr). Dále se ke vzorkům přidá lyzační pufr, tedy 10% roztok PBS s 1 % SDS a 2 % PIC<sup>71</sup> a vzorky se pomocí sonikace<sup>72</sup> musí zlyzovat.

Dále je potřeba připravit si standardy o koncentracích 0,1; 0,5; 1; 1,5 a 2 mg/ml ve stejném pufru jako měřené vzorky, používají se například proteiny BSA<sup>73</sup>, BGG<sup>74</sup>,...

Vzorky se následně po 3-5 přenesou pomocí pipety do Eppendorfových zkumavek či na 96 jamkovou mikrodestičku. V závislosti na množství použitého vzorku se dále přidají reagenty A a B (1:5) a pomocí spektrometru se změří absorbance, a tedy i koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

## 2.8 SYSTÉM TetON

Systém TetON umožňuje speciální modifikaci buněk, kdy je, po jejich úpravě za využití komerčního kitu<sup>75</sup>, možné cíleně řídit míru exprese specifického genu.

Na modifikovaný gen je připojeno TRE (*Tetracycline response element*), což je sedm za sebou opakujících se 19 nukleotidových tetracyklinových operátorů. Jedná se o molekulu vázanou rtTA (*reverse transcription-controlled transactivator*) skládající se ze dvou elementů, TetR

---

<sup>71</sup> Protease Inhibitor Cocktail

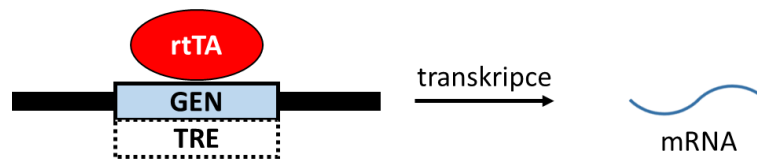
<sup>72</sup> sonikace se provádí pomocí ultrazvukového homogenizátoru a slouží k lýze buněk

<sup>73</sup> Bovine Serum Albumine (hovězí sérový albumin)

<sup>74</sup> Bovine Gama Globuline

<sup>75</sup> souprava látek a pomůcek předpřipravená k provedení konkrétního odborného laboratorního postupu

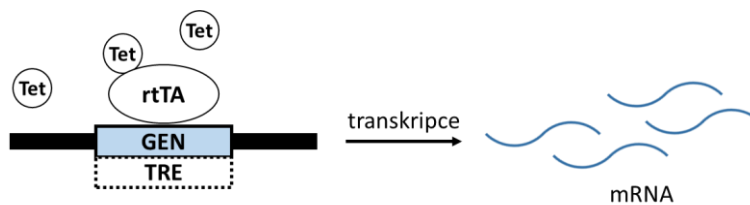
(*tetracycline repressor*) a VP16. TetR je tetracyklinový represor potlačující proces transkripce, VP16 je protein z herpes simplex viru vyvolávající okamžitou genovou transkripci.



Obrázek 7 schéma průběhu transkripce genů modifikovaných TetON systémem bez adice tetracyklinu;

Za standartních podmínek, tedy bez adice tetracyklinu, dochází k interakci rtTA a TRE, kdy TetR, tedy součást rtTA způsobuje stagnaci transkripce genu.

Pokud je však k tomuto komplexu přidán tetracyklin, rtTA interaguje namísto s TRE s tetracyklinem. Interakcí TRE a tetracyklinu je omezena funkce TetR a naopak dochází k aktivaci transkripce doménou VP16, v důsledku které nastává produkce nadstandartního množství mRNA.



Obrázek 8 schéma průběhu transkripce genů modifikovaných TetON systémem po adici tetracyklinu

### 3 VÝSLEDKY

Využitím metod uvedených výše byly provedeny experimenty ke zjištění faktů ohledně genů RNFT1 a RNFT2. Následující kapitola pojednává o výsledcích těchto pokusů.

#### 3.1 ANALÝZA EXPRESE A KLINICKÝCH KORELACÍ U PACIENTŮ S CLL

Při zkoumání, zda existuje nějaká souvislost mezi CLL u pacientů a přítomností proteinů RNFT v buňkách leukémií postižených osob, byla využita metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce. K tomuto bylo využito anonymních vzorků pacientů z nemocnice Bohunice Brno, u nichž však byly známy další informace o onemocnění – např. průběh choroby a molekulární diagnostické markery získané z jejich krve. Zkoumáno bylo celkem 161 vzorků již izolované cDNA, která odráží množství jednotlivých mRNA čili expresi jednotlivých genů.

Ke stanovení množství cDNA kodující RNFT byla použita kvantitativní PCR. Byl připraven Master Mix pro každý vzorek sestávající z následujících komponent:

- 3 µl SyberGreen
- 0,75 µl reverse primer
- 0,75 µl forward primer
- 12,3 µl miliQ H<sub>2</sub>O<sup>76</sup>
- 1,7 µl MgCl<sub>2</sub>

Směs byla poté zpracována dle standardního postupu, tudíž proběhla reakce v Termocycleru.

Pomocí této metody byla ze získaných dat vypočítána míra exprese genů kódující RNFT proteiny. Hodnoty byly zaneseny do tabulky a s pomocí webové aplikace „Cutoff finder“ byly nalezeny hraniční hodnoty pro každou skupinu, pomocí níž byly skupiny pacientů rozděleny na ty s nižší a vyšší expresí RNFT1, resp. RNFT2. Jednotlivé vlastnosti choroby CLL byly porovnány v těchto dvou skupinách a byly vytvořeny následující grafy zvlášť pro proteiny

---

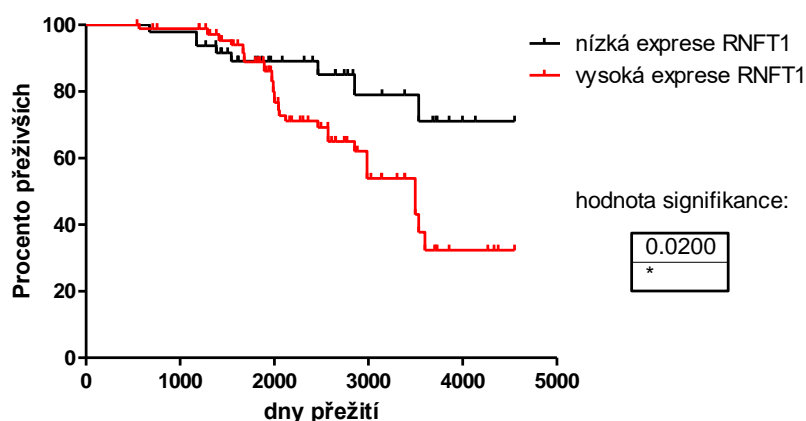
<sup>76</sup> ultračistá voda

RNFT1 a RNFT2, a to pomocí vědecké aplikace „GraphPad Prism“, která dokáže analyzovat data a vytvořit grafy.

### 3.1.1 PŘEŽITÍ U PACIENTŮ S NÍZKOU A VYSOKOU HLADINOU GENŮ RNFT

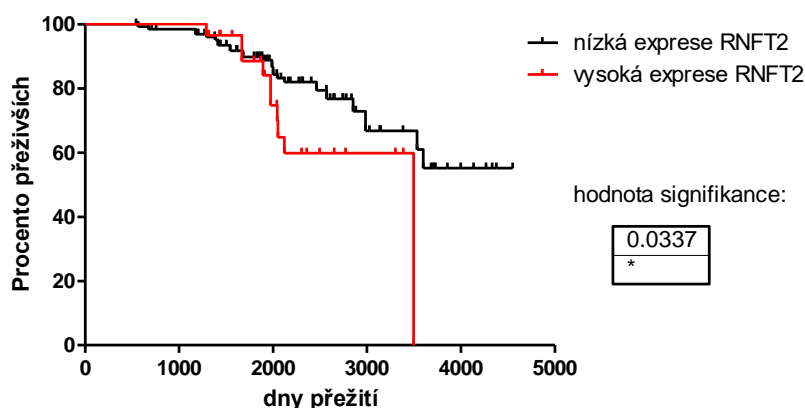
Pro zjištění, zda má vysoká nebo nízká hladina exprese genů RNFT u pacientů s CLL nějaký vliv na postup choroby a přežití pacientů, byla použita metoda takzvaných Kaplan-Meierových křivek přežití. Nejprve byly vytvořeny grafy, do kterých byly zaneseny dny přežití každého pacienta podle toho, zda se u něj vyskytuje vysoká či nízká exprese genů RNFT. Výsledky těchto grafů ukázaly, že míra exprese genů RNFT1 a RNFT2 by u CLL mohla být důležitým faktorem. Dle grafů č. 2 a 3 níže, má totiž vysoká exprese těchto genů evidentní negativní dopady na přežití pacientů, což je podložené i signifikancí<sup>77</sup> výsledků.

**VLIV MÍRY EXPRESE GENU RNFT1 NA PACIENTY S CLL**



Graf č. 2 vliv míry exprese genů RNFT1 na pacienty s CLL

**VLIV MÍRY EXPRESE GENŮ RNFT2 NA PACIENTY S CLL**



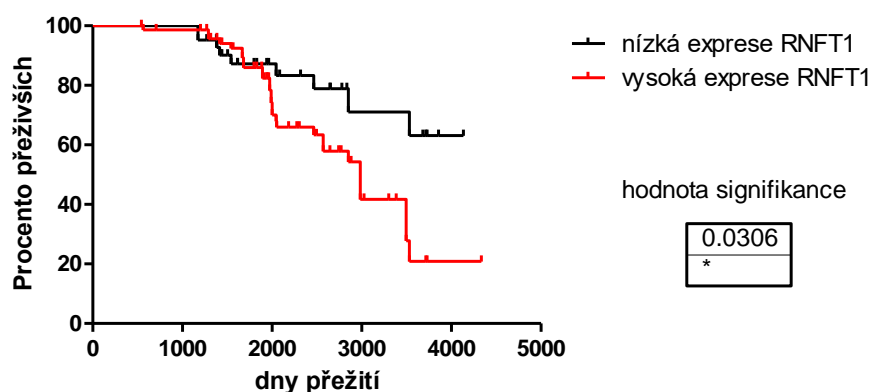
Graf č. 4 vliv míry exprese genů RNFT2 na pacienty s CLL

<sup>77</sup> Statistická signifikantnost byla určena programem GraphPad, který ke stanovení tohoto parametru využívá specifické matematické výpočty, zde konkrétně se jednalo o Mantelův-Haenszelův log-rank test. Tento test využívá pořadí hodnot pozorovaných časů přežití k odvození testové statistiky. O signifikantní faktor se jedná, pokud je výsledek Mantel-Haenszelova log-ranku testu menší než 0,05. Poté se s více než 95% jistotou jedná o příznačný faktor (tento parametr je v grafech znázorněn hvězdičkou).

Dále byly vytvořeny grafy č. 4, 5, 6, a 7, ve kterých byli pacienti rozděleni do skupin na mutovanou a nemutovanou formu leukemie, tedy rozdělení pacientů podle tzv. IgVH statusu<sup>78</sup>. Určuje se sekvence tohoto genu při diagnostice CLL a na základě homolognosti vůči jeho zárodečné linii se určuje, zda se jedná o mutovanou (<98% shoda sekvencí) či nemutovanou (>98% shoda sekvencí) formu CLL. Mutace tohoto genu znamená pro pacienty příznivější prognózu ve srovnání s genem nemutovaným.

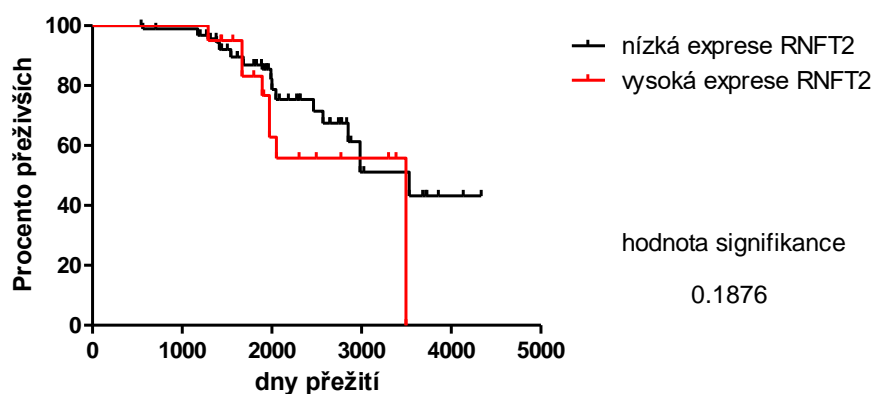
Do skupiny s mutovanou formou CLL spadalo celkem 45 analyzovaných pacientů, do formy nemutované 116.

#### VLIV MÍRY EXPRESE RNFT1 NA PACIENTY S NEMUTOVANOU CLL



Graf č. 6 vliv míry exprese genu RNFT1 na pacienty s nemutovanou formou CLL

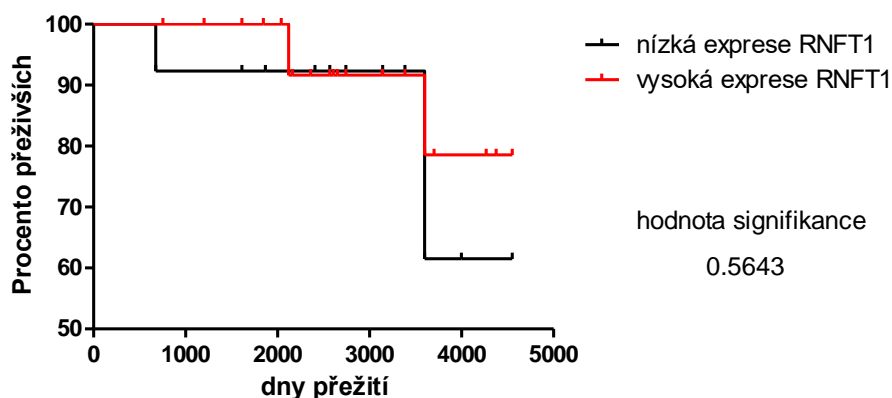
#### VLIV MÍRY EXPRESE RNFT2 NA PACIENTY S NEMUTOVANOU CLL



Graf č. 8 vliv míry exprese genu RNFT2 na pacienty s nemutovanou formou CLL

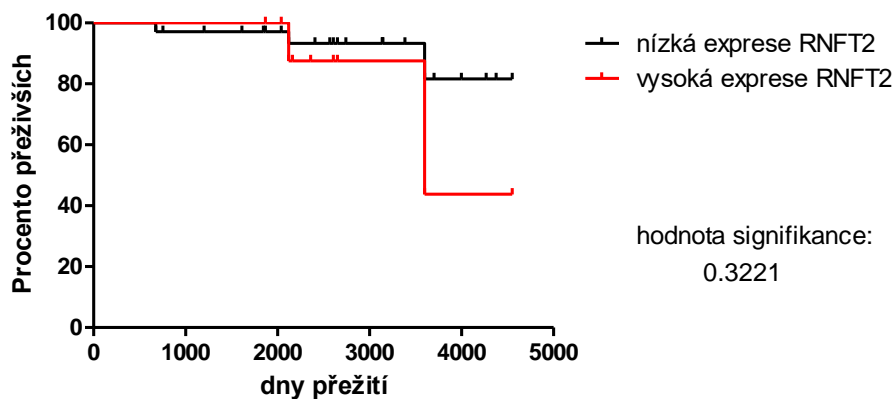
<sup>78</sup> IgVH je gen, který kóduje imunoglobulin. Nemutovaný typ IgVH je v souvislosti s CLL spojen s cytogenetickými abnormalitami a také s rychlejším průběhem nemoci

### VLIV MÍRY EXPRESE RNFT1 NA PACIENTY S MUTOVANOU CLL



Graf č. 11 vliv míry exprese genu RNFT1 na pacienty s mutovanou formou CLL

### VLIV MÍRY EXPRESE RNFT2 NA PACIENTY S MUTOVANOU CLL



Graf č. 10 vliv míry exprese genu RNFT2 na pacienty s mutovanou formou CLL

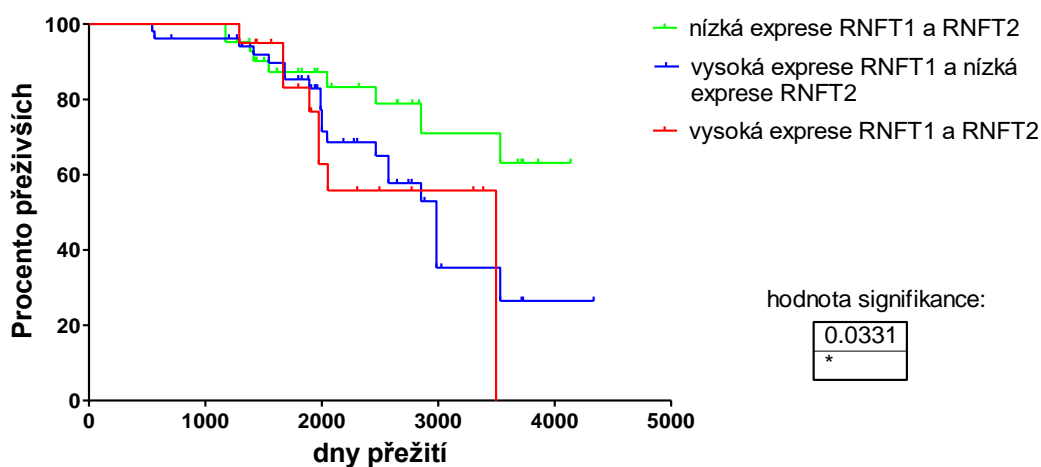
Z výsledků pokusů, které znázorňují grafy výše, bylo zjištěno, že vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na přežití pacientů s CLL se dá považovat za signifikantní faktor, z něhož by se mohl stát další prognostický marker pro určování stádia CLL. Z grafů je zřejmé, že pacienti, u kterých se v buňkách postižených CLL objevuje vyšší exprese genů RNFT1 a RNFT2, umírají v souvislosti s onemocněním znatelně dříve než ti, u nichž exprese není tak vysoká. Tento nálezn však platí pouze pro pacienty, kteří trpí nemutovanou formou nemoci. U pacientů s mutovanou formou CLL se míra exprese genů RNFT1 ani RNFT2 jakožto signifikantní faktor neprokázala.



Z důvodu, že oba proteiny plní v buňkách velmi podobnou funkci, bylo možné vytvořit jeden graf zahrnující oba geny, kde jsou pacienti rozděleni do následujících třech skupin:

1. pacienti s vysokou expresí genu RNFT1 a RNFT2
2. pacienti s vysokou expresí genu a nízkou expresí genu
3. pacienti s nízkou expresí genu RNFT1 a RNFT2

### ZÁVISLOST MÍRY EXPRESE GENŮ RNFT1 A RNFT2 NA PŘEŽITÍ PACIENTŮ S CLL



Graf č. 12 vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na přežití pacientů s CLL

Z grafu č. 8 výše je zřejmé, že u nemutované formy CLL má vysoká exprese genů RNFT1 a RNFT2 opravdu výrazný vliv na život pacientů.

Analýza byla provedena u 114 pacientů, z nichž 20 patřilo do skupiny s vysokou expresí obou genů. Z grafu je možné konstatovat, že zhruba 40 % pacientů s vysokou expresí obou genů se dožije 5,5 roku od diagnostiky onemocnění a zahájení léčby. I kondice pacientů, u kterých byla naměřena vysoká exprese buď jen genu RNFT1 nebo RNFT2 byla lepší než pacientů, u nichž byla naměřena vysoká exprese obou genů zároveň. Tato informace byla pomocí Mantel-Haenszelova log-rank testu vyhodnocena na více než 95 % jako signifikantní faktor.

## 3.2 PŘÍPRAVA NA FUNKČNÍ EXPERIMENTY

Aby bylo možno prozkoumat roli RNFT1 proteinů u buněk CLL, byl v další fázi vytvořen tzv. expresní vektor, což je úsek DNA, který umožňuje specificky zvýšit množství RNFT1 ve stanovených buňkách. Dále byly ověřovány existující protilátky proti RNFT1 proteinům s cílem zjistit, do jaké míry jsou specifické a použitelné pro další experimenty.

### 3.2.1 KLONOVÁNÍ RNFT1 DO EXPRESNÍCH VEKTORŮ

Pro získání většího množství genů RNFT1 pro budoucí experimenty bylo nutné tyto geny amplifikovat, k čemuž bylo využito klonování DNA do expresních vektorů, v tomto případě plasmidů.

#### 3.2.1.1 PŘÍPRAVA INZERTU

Nejprve byla pomocí metody PCR provedena amplifikace komplementární DNA genu RNFT1, který byl získán reverzní transkripcí z mRNA za použití komerčního kitu. U PCR byla pro každý vzorek použita jiná teplota hybridizace, aby byla nalezena teplota, při níž dojde k vytvoření nejvýnosnějšího množství produktu. Master Mix pro reakci byl tvořen následujícími složkami:

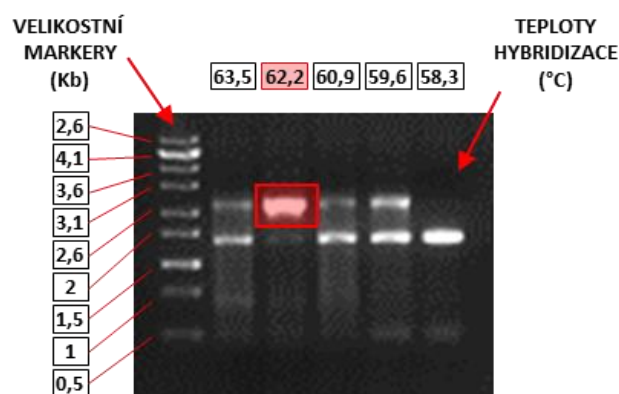
- 10 µl Taq DNA pufr pro DNA polymerázu (10X)
- 3 µl reverse primer<sup>79</sup>
- 3 µl forward primer<sup>80</sup>
- 3 µl dNTPs
- 1,05 µl Pfx50 polymeráza
- 3 µl DMSO
- 55 µl miliQ H<sub>2</sub>O
- 15 µl cDNA

Master Mix byl rozdělen na pět shodných částí o 20 µl a bylo otestováno pět rozdílných teplot pro hybridizaci. Po provedení PCR v termocykleru byly vzorky analyzovány pomocí gelové agarózové elektroforézy.

---

<sup>79</sup> elonguje se proti směru transkripce, tedy 3' - 5'

<sup>80</sup> elonguje se ve směru transkripce, tedy 5' - 3'



Obrázek 9 nejvhodnější teplota pro získání nejvýnosnějšího množství proteinu RNFT1

Výsledné produkty byly zobrazeny pomocí UV záření a bylo zjištěno, že nejvýnosnější teplota je 62,2°C.

Poté následovala další PCR, pro níž byl použit tento Master Mix:

- 15 µl Taq DNA pufr pro PCR polymerázu (10x)
- 4,5 µl reverse primer
- 4,5 µl forward primer
- 4,5 µl dNTPs
- 1,5 µl Pfx50 polymeráza
- 4,5 µl DMSO
- 78 µl miliQ H<sub>2</sub>O
- 22,5 µl cDNA

Amplifikace proběhla standartním způsobem v termocykleru, pro hybridizaci byla použita zjištěná nejvýnosnější teplota 62,2 °C (viz výše). Vzniklé produkty byly přeneseny pipetou do jedné Eppendorfovy zkumavky a byly k nim přidány 3 µl DNA barviva. Vzorek byl nanesen do jamek agarózového gelu a podroben elektroforéze.

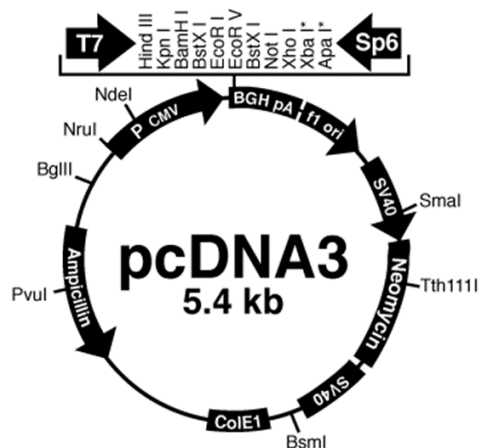
Poté byl z gelu skalpelem odebrán produkt za pomoci vizualizace UV zářením. Pro získání čistého produktu z nežádoucího prostředí gelu byl využit komerční kit „JETQUICK gel Extraction Spin Kit“ a byla provedena i purifikace<sup>81</sup> komplementární DNA genu RNFT1 pomocí komerčního kitu „JETQUICK PCR Purification Spin Kit“. DNA byla štěpena za pomoci restričních endonukleáz EcoR V a Hind III., aby byly vytvořené lepivé konce. Díky

<sup>81</sup> očištění od všech nežádoucích látek

těmto koncům je možné vložit inzert do plasmidu, otevřeného na místech kompatibilních k těmto lepivým koncům.

### 3.2.1.2 PŘÍPRAVA PLASMIDU A VLOŽENÍ INZERTU

Pro inzerci byl použit plasmid pcDNA3, purifikovaný pomocí komerčního kitu „JETQUICK PCR Purification Spin Kit“, který byl otevřen pomocí restrikčních endonukleáz EcoR V a Hind III.



Obrázek 10 schéma plasmidu pcDNA3

zdroj: [https://www.researchgate.net/figure/Map-of-pcDNA3-0-mammalian-expression-vector-of-about-5-4-kb\\_279977088](https://www.researchgate.net/figure/Map-of-pcDNA3-0-mammalian-expression-vector-of-about-5-4-kb_279977088) (upraveno)

Pro vložení inzertu do plasmidu byla vytvořena následující ligační směs:

- 2  $\mu$ l T4 DNA Ligase Buffer (10X)
- 0,2  $\mu$ l T4 ligáza
- 4  $\mu$ l cDNA RNFT1
- 1  $\mu$ l plasmid
- 12,8  $\mu$ l miliQ H<sub>2</sub>O

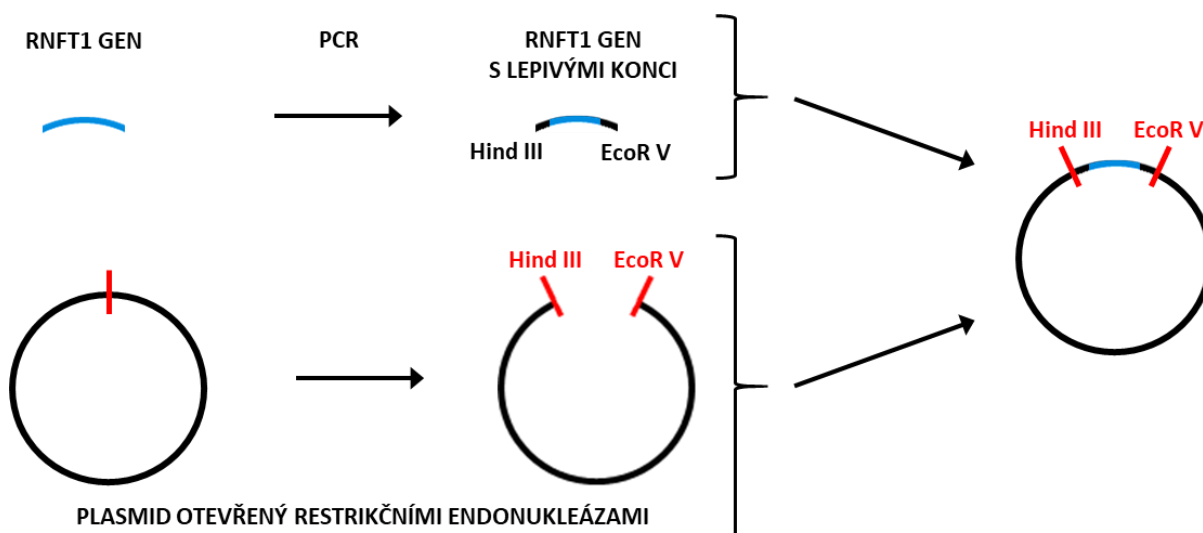
Proces ligace, v průběhu kterého došlo ke spojení lepivých konců inzertu a plasmidu, trval 45 minut.

### 3.2.1.3 VLOŽENÍ PLASMIDU DO BAKTERIE

Ve zkumavce bylo smícháno 50  $\mu$ l bakterie Escherichia coli s 5  $\mu$ l plasmidu a směs byla ponechána 15 minut na ledu, aby došlo k inkubaci. Po inkubaci byl proveden tzv. teplotní šok, kdy byla bakterie a plasmid zahřáty na 42 °C po dobu 90 vteřin. Během této reakce došlo k porušení cytoplasmatické membrány bakterie a díky tomu mohl do buňky plasmid

proniknout. Následně byl ke směsi přidán 1 ml sterilního LB<sup>82</sup> média a tento roztok byl inkubován 60 minut při teplotě 37 °C.

Přebytečné médium bylo odsáto a nainkubované<sup>83</sup> bakterie nanoseny na sterilní Petriho misky o průměru 10 cm s agarovými plotnami, tedy 5% směsi agaru v LB médiu a 0,01% obsahem AMP. Bakterie byly inkubovány za teploty 37 °C po dobu 12 hodin. Po uplynutí této doby byly kolonie odpíchnuty a přeneseny do osmi nových zkumavek s 30 ml sterilního roztoku LB média s 0,01% obsahem AMP. Bakterie byly opět inkubovány po dobu 12 hodin za stálého třepání a teploty 37 °C. Izolace plasmidů z narostlých kolonií bakterie *Escherichia coli* byla provedena pomocí komerčního kitu „JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit“ zvláště pro každou z osmizkumavek.



Obrázek 11 demonstrace vložení inzertu do plasmidu

### 3.2.1.4 OVĚŘENÍ INZERTU V PLASMIDU

Ověření úspěšnosti celého pokusu bylo provedeno pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Byly vytvořeny dva druhy vzorků, jedním byl izolovaný plasmid a druhým plasmid otevřený původními restrikčními endonukleázami na místech původního vložení inzertu, tedy:

- 22 µl Red Buffer
- 2 µl Hind III

<sup>82</sup> lyzogenní médium (lysogeny broth)

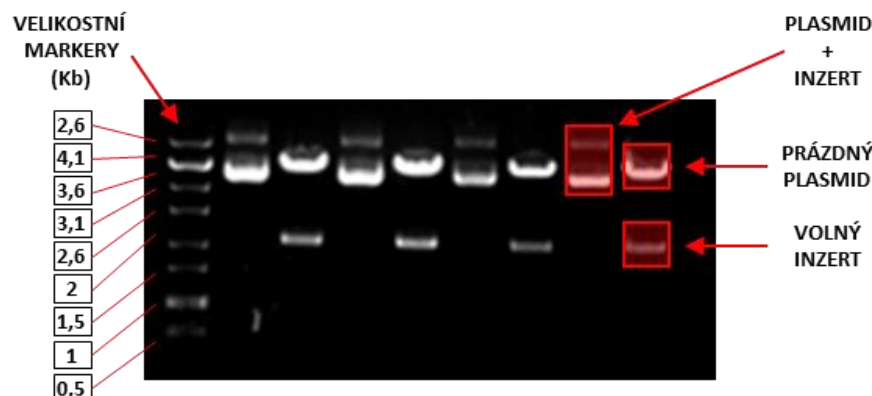
<sup>83</sup> inkubace je výraz pro vývoj buněčných/bakteriálních kultur

- 2  $\mu\text{l}$  EcoR V
- 84  $\mu\text{l}$  miliQ  $\text{H}_2\text{O}$

Tyto složky byly smíchány a u každého z osmi vzorků bylo smíseno 10  $\mu\text{l}$  této reakční směsi s 10  $\mu\text{l}$  plasmidu, směs byla štěpena dvě hodiny za teploty 37 °C.

Poté byly vzorky obarveny 0,5  $\mu\text{l}$  loadovacího barviva a naneseny na agarózový gel. Do první jamky byl nanesen plasmid s cDNA a do druhé jamky plasmid otevřený restrikcí endonukleázami. Ke gelu byl připojen zdroj elektrického napětí, reakce probíhala 30 minut při 105 V. Po reakci byly vzorky analyzovány pomocí UV záření.

Provedené agarózové gelové elektroforézy potvrdil úspěšné vložení inzertu do plasmidu, to je zřetelné z obrázku č. 11 Každý vzorek zabírá na gelu dvě jamky – první jamka je vždy plasmid i s inzertem a nachází se zde tedy pouze jeden produkt, druhá jamka je plasmid otevřený restrikcí endonukleázami a nachází se zde tedy dva produkty a to prázdný plasmid a samotný inzert.



Obrázek 12 ověření správnosti vložení vektorů do plasmidů

Po ověření, že vložení inzertu do plasmidu bylo úspěšné, byla provedena finální izolace genu RNFT1 za pomoci komerčního kitu „JETQUICK Plasmid Maxiprep Spin Kit“ a vzorky byly uloženy v -80 °C.

### 3.2.2 MODIFIKACE GENŮ RNFT1 V BUŇKÁCH

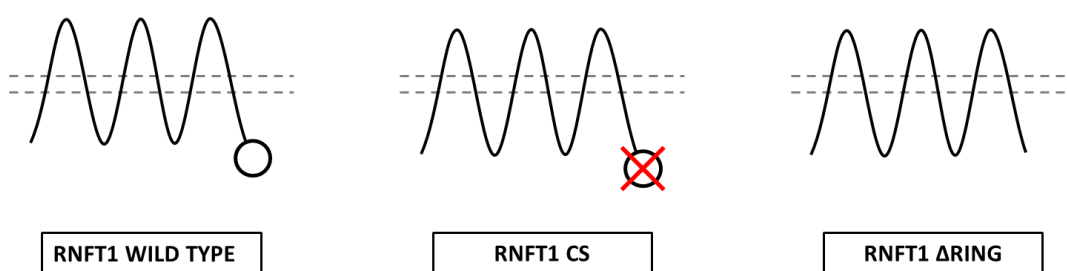
Pro další experimenty byly vytvořeny následující modifikace genu RNFT1 v buňkách:

- RNFT1 Wild Type TetON
- RNFT1  $\Delta$ RING TetON

- RNFT1 CS TetON

RNFT1 Wild Type je gen zcela bez modifikací, tak jak se vyskytuje přirozeně. RNFT1  $\Delta$ RING je modifikací, kdy byla genu zcela odebrána celá RING doména. Modifikace RNFT1 CS blokuje enzymatickou aktivitu umožňující funkci E3 ubiquitin-ligáz (v rámci ubiquitinace).

U všech vzorků byl použit systém TetON, buňky byly již od zasazení na Petriho misku vystaveny působení tetracyklinu. Navíc byly otagovány<sup>84</sup> tzv. HA11 tagem, aby byla možná jejich detekce při western blotu. Jelikož se dosud nepodařilo nalézt vhodné protilátky pro detekci proteinů RNFT1.



Obrázek 13 demonstrace jednotlivých modifikací

Geny byly nejprve vloženy do plasmidů, tedy expresních vektorů, a dle požadovaných modifikací dále upraveny. Tyto modifikace prováděl kolega Tomasz Radaszkiewicz M.Sc.

### 3.2.3 OTESTOVÁNÍ MODIFIKACÍ GENU RNFT1 V BUŇKÁCH METODOU WESTERN BLOT

Vzorky buněk s modifikovanými geny RNFT1, viz výše, byly po dobu 72 hodin pěstovány na Petriho miskách v živném médiu (požadované vzorky navíc s tetracyklinem v poměru 1:1000 vůči médiu). Médium bylo následně odsáto a buňky "odlepeny" ode dna misky 0,4% roztokem EDTA<sup>85</sup> v PBS. Roztoky s buňkami byly přeneseny do Eppendorfových zkumavek a po centrifugaci (200 g, 5 min., 4 °C) byl odsát roztok EDTA v PBS. Buňky byly dvakrát promyty

<sup>84</sup> geny RNFT1 byly otagovány HA11 tagem, protože se nepovedlo najít vhodné protilátky použitelné pro jejich detekci metodou western blot. Tagování se provádí přidáním krátké sekvence DNA, tzv. tagu, k DNA proteinu, který z nějakého důvodu nejde označit protilátkami. To umožňuje následně tento protein detekovat protilátkami proti přidanému tagu

<sup>85</sup> ethyldiamintetraacid (kyselina ethyldiamintetraoctová)

v 10% roztoku PBS a dále byla, dle postupu standartního „DC protein assay“ protokolu, změřena koncentrace proteinů v každém vzorku.

Na základě výsledků měření byly vytvořeny vzorky pro metodu western blot. U každého vzorku bylo spočítané množství na základě jeho koncentrace nutné pro dosažení obsahu 450 µg. Tento objem byl následně v separovaných Eppendorfových zkumavkách smíchán se 75 µl Laemmliho pufru<sup>86</sup> a množství bylo doplněno miliQ H<sub>2</sub>O tak, aby měl každý vzorek dohromady 180 µl. Tato směs byla pomocí sonikace zlyzována a po dobu pěti minut zahřívána při teplotě 95 °C, aby došlo k denaturaci proteinů.

Vzorky připravené tímto způsobem byly nanášeny do jamek v akrylamidovém gelu pro elektroforetickou separaci, přičemž do každé jamky bylo nanášeno 22 µl vzorku. Gely byly v prostředí 1X Tris-glycin-SDS pufru připojeny ke zdroji elektrického napětí na 125 V po dobu jedné hodiny.

Po skončení elektroforézy byly vzorky přebíjeny na polyvinylou membránu. Tento proces opět probíhal v boxu pro western blot v prostředí 1X Tris-glycin-SDS pufru, a to za elektrického napětí 100 V po dobu 1 hodiny a 15 minut.

Následně byl připraven blokovací roztok, tedy 5% směs sušeného odtučněného mléka v TBS pufru. Následně byla v tomto roztoku provedena blokáce membrán, a to po dobu jedné hodiny za konstantního míchání na třepačce.

<b>PROTEIN</b>	<b>VELIKOST</b>	<b>PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA</b>	<b>SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA (PROTI PRIM.)</b>	<b>PROTILÁTKA: BLOKOVACÍ ROZTOK</b>
<b>RNFT1</b>	70 kDa	anti HA11 (MMS-101P)	myší IgG <sup>87</sup>	1:200
<b>B-ACTIN</b>	42 kDa	ab8229	kozí IgG	1:1000

*Tabulka 1 použité protilátky pro testování modifikací genu RNFT1*

<sup>86</sup> 20 % glycerol; 10 % beta-merkaptóetanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, syn. 2-merkaptóetanol, 2-hydroxymetylmerkaptan); 4% SDS; 0,02% bromfenolová modř; 120 mM Tris-HCl, pH 6,8; dH<sub>2</sub>O  
<sup>87</sup> IgG je Imunoglobulin G, který v reakci hraje roli sekundární protilátky proti imunoglobulinu hostitelského organismu primární protilátky

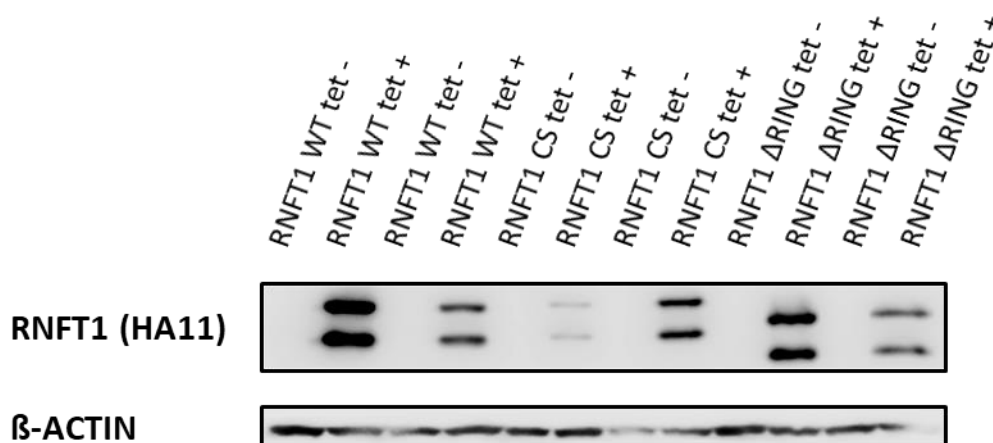


Po blokaci byl roztok odstraněn a membrány byly rozřezány v závislosti na velikosti specifického detekovaného proteinu v kDa<sup>88</sup> a jeho pozici na membráně. Každá membrána byla separovaně vložena do zkumavky se 2 ml blokovacího roztoku a primárními protilátky dle doporučeného ředění na obale (viz tabulka č. 1)

Interakce imunoglobulinů s proteiny probíhala přes noc za stálého míchání na třepačce. Po 12 hodinách byly protilátky omyty 2 ml TBS pufrém, pufr byl ponechán pět minut ve zkumavce za stálého míchání a poté nahrazen novým TBS pufrém. Proces byl opakován ve třech cyklech.

Posledním krokem v přípravě vzorků bylo přidání sekundárních protilátek proti imunoglobulinu z hostitelského organismu primárních protilátek (viz tabulka č. 1). Příslušné sekundární protilátky byly přidány v příslušné koncentraci se 2 ml blokovacího roztoku ke každému vzorku. Interakce mezi sekundárními a primárními imunoglobuliny probíhala jednu hodinu za stálého míchání na třepačce. Následně byl roztok s protilátkami odstraněn a membrány ve třech cyklech promyty TBS pufrém.

Na membrány připravené k analýze byl nanesen roztok chemiluminiscenčního substrátu a vzorky analyzovány pomocí přístrojem FusionSC. Zjištěné výsledky potvrdily správnost modifikací genu RNFT1:



Obrázek 14 western blot testující správnost modifikace buněk genem RNFT1<sup>89</sup>

Podle obrázku č.13 je zřejmé, že všechny modifikace genů RNFT1 byly provedeny úspěšně. Vypovídá o tom, dle obrázku výše, množství produktu u každého vzorku a jeho poloha na gelu.

<sup>88</sup> Da = atomová hmotnostní jednotka; 1 Da = 1,66×10<sup>-27</sup> kg

<sup>89</sup> výskyt dvojitých detekovaných produktů u proteinu RNFT1 nezpochybňuje správnost výsledků, vzhledem k tomu, že toto zdvojení se vyskytovalo u všech produktů a kontrolní protein β-actin vyšel správně. Zdvojení produktů u proteinu RNFT1 může mít následující příčiny: příliš vysoká koncentrace primárních nebo sekundárních protilátek, příliš velká/malá velikost detekovaného proteinu či výskyt lyzátu na loadovaném gelu.

Zatímco u vzorků, ke kterým nebyl přidán tetracyklin, nebyl detekován v podstatě žádný produkt, u vzorků vystavených tetracyklinu je výskyt produktu zcela zjevný. A dále úspěšnost potvrzuje i pozice na gelu. RNFT1 Wild Type, tedy gen bez jakýchkoliv modifikací, má největší velikost, tudíž se na gelu vyskytuje nejvýš. Zato nejmenší velikost má RNFT1  $\Delta$ RING, u kterých byla odstraněna celá RING doména a vyskytuje se ve srovnání s nemodifikovaným typem na gelu mnohem níž.

Správnost provedení pokusu potvrdil tzv. kontrolní loadovací protein  $\beta$ -actin.

### **3.3 FUNKČNÍ EXPERIMENTY**

Hlavním cílem těchto experimentů bylo objasnit biologickou funkci genů RNFT1 a RNFT2, konkrétně jejich funkci v buňkách a v mezibuněčné signalizaci.

#### **3.3.1 VLIV MÍRY EXPRESE GENŮ RNFT1 A RNFT2 NA BUNĚČNOU PROLIFERACI**

Pro zjištění vlivu míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na buněčnou proliferaci byly použity následující buněčné linie s modifikacemi genů RNFT1 a RNFT2:

- T-REx<sup>90</sup> Wild Type<sup>91</sup>
- RNFT1 KO
- RNFT1 Wild Type TetON
- RNFT1 CS<sup>92</sup> mut TetON
- RNFT1  $\Delta$ RING mut TetON
- RNFT2 KO
- RNFT2 Wild Type TetON
- RNFT1/RNFT2 dKO

T-REx Wild Type jsou buňky T-REx bez dalších modifikací genů RNFT1 nebo RNFT2, stejně tak buněčné linie s RNFT1 Wild Type a RNFT2 Wild Type nemají žádné modifikace genů RNFT1 či RNFT2. RNFT1 a RNFT2 KO jsou označení pro buněčné linie, u kterých byly

---

<sup>90</sup> savčí buňky naprogramované tak, aby přidání tetracyklinu vyvolalo nadprodukcii konkrétního genu

<sup>91</sup> divoký typ", buňky s geny bez jakýchkoliv modifikací

<sup>92</sup> geny s blokovanou E3 enzymatickou aktivitou

pomocí metody Crispr/Cas9 zcela odstraněny geny RNFT1 a RNFT2, u linie s modifikací RNFT1/RNFT2 dKO byly odstraněny oba geny v týž buňkách. RNFT1  $\Delta$ RING je modifikací, kdy byla genu zcela odebrána celá RING doména, modifikace RNFT1 CS jsou buňky se zablokovanou E3 enzymatickou aktivitu u genů RNFT1. TetON značí využití tetracyklinového systému u konkrétních buněčných linií. (Tyto modifikace prováděl kolega Tomasz Radaszkiewicz M.Sc.)

### 3.3.1.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Buňky byly nejdříve zasazeny na sterilní 10 cm Petriho misce a pěstovány po dobu čtyř dní v živném médiu, jednalo se o 10% roztok FBS<sup>93</sup> v DMEM<sup>94</sup> médiu s 1 % P/S<sup>95</sup>. Po čtyřech dnech bylo pomocí průtokového cytometru změřeno množství buněk od každého vzorku.

Následně bylo od každé buněčné linie zasazeno 25 000 buněk na kultivační destičku o 6 jamkách do 3 ml živného média, opět se jednalo o roztok DMEM s 10 % FBS a 1 % P/S. Všechny linie byly zasazeny dvakrát. Jedna skupina byla vždy ponechána pouze v čistém médiu, ke druhé byl přidán do živného média tetracyklin v poměru 1:1000.

Poté bylo každých 24 hodin měřeno množství buněk u každé linie. Z jamky bylo odsáto médium a buňky byly několik minut ponechány v 1 ml 0,4% roztoku EDTA v PBS. Následně byly vzorky přeneseny pomocí pipety do Eppendorfovy zkumavky a byl přidán 0,002% roztok TMRE<sup>96</sup> v PBS, tedy fluorescenční barvivo, které vzorky obarvilo a umožnilo analýzu pomocí průtokového cytometru.

Množství buněk bylo měřeno každých 24 hodin po dobu 4 dní. Celý tento cyklus byl zopakován celkem třikrát. Výstupem měření byly informace o průběhu buněčné proliferace každé linie v závislosti na konkrétní modifikaci genů RNFT1 a RNFT2 a vlivu míry exprese těchto genů (viz příloha 1).

Tato data byla následně zanalyzována a byly vytvořeny 2 grafy znázorňující průběh buněčné proliferace u jednotlivých buněčných linií. Jeden pro buňky s modifikacemi genu RNFT1 (viz graf č. 10) a druhý pro buňky s modifikacemi genu RNFT2 (viz graf č. 9).

---

<sup>93</sup> fetal bovine serum (sérum z plodové vody tura domácího)

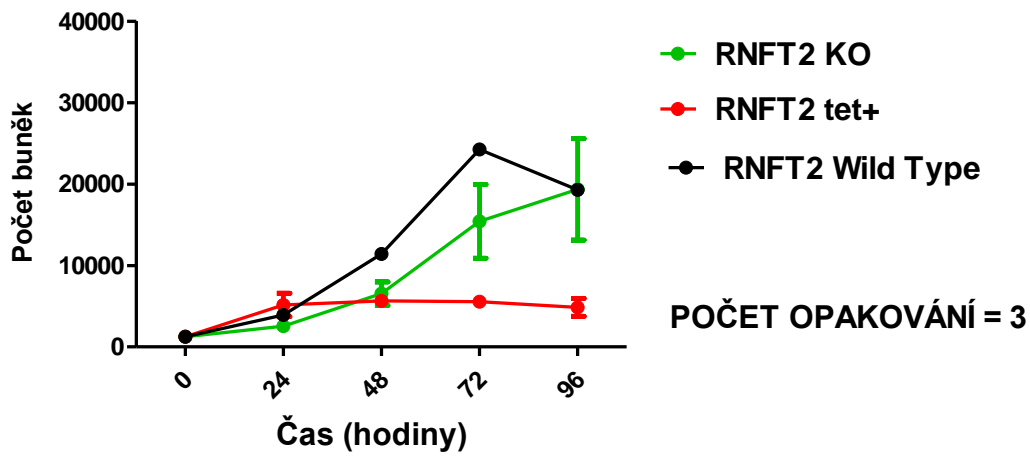
<sup>94</sup> Dulbecco's Modified Eagle medium (živné médium)

<sup>95</sup> Penicilin/Streptomycin

<sup>96</sup> tetramethylrhodamine

### 3.3.1.2 VÝSLEDNÉ GRAFY DEMONSTRUJÍCÍ PRŮBĚH BUNĚČNÉ PROLIFERACE

Do grafů byly zaneseny hodnoty získané ze všech měření. Byly vytvořeny dva grafy zvlášť pro gen RNFT1 a pro gen RNFT2. Pro větší přehlednost, vzhledem k množství měřených objektů, byly použity pouze ty buněčné linie, u kterých byly znatelné rozdíly mezi vzorky s uměle navozenou nadměrnou expresí a standartní hodnotou exprese genů RNFT1 nebo RNFT2.



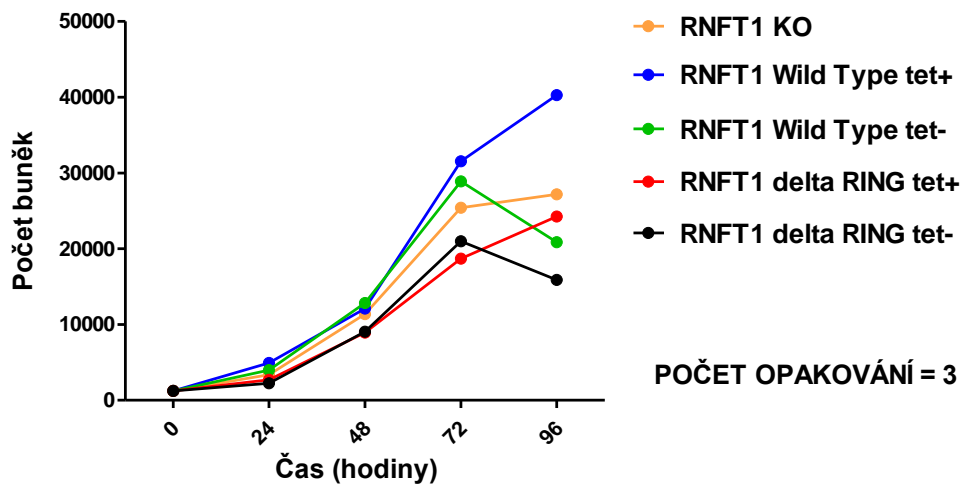
Graf č. 13 průběh buněčné proliferace s uměle řízenou expresí genu RNFT2.

Z grafu č. 9 je znatelný evidentní rozdíl mezi buňkami, u nichž byl zcela odstraněn gen RNFT2 (RNFT2 KO) a buňkami, u nichž byla naopak uměle navýšena hodnota exprese genu RNFT2 (RNFT2 Tet+). Standartní průběh proliferace zde demonstruje RNFT2 Wild Type, tedy linie bez jakýchkoliv modifikací.

Dle těchto dat je tudíž možné říci, že míra exprese genu RNFT2 má zcela patrný vliv na buněčnou proliferaci. Buňky s uměle řízenou nadměrnou expresí tohoto genu se v podstatě nebyly schopny množit, zatímco při absenci genu RNFT2 buňky spíše prosperovaly a o i lépe ve srovnání s nemodifikovanými buňkami.

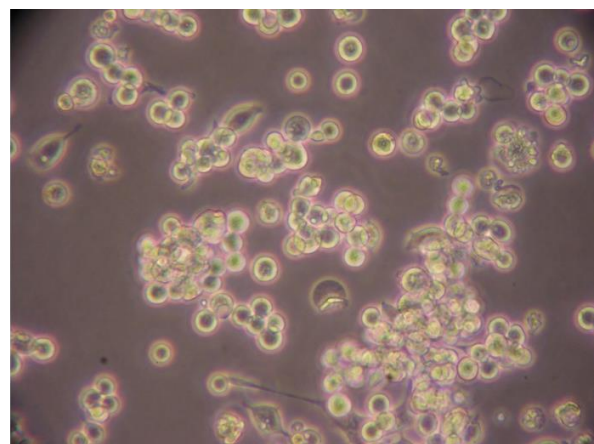
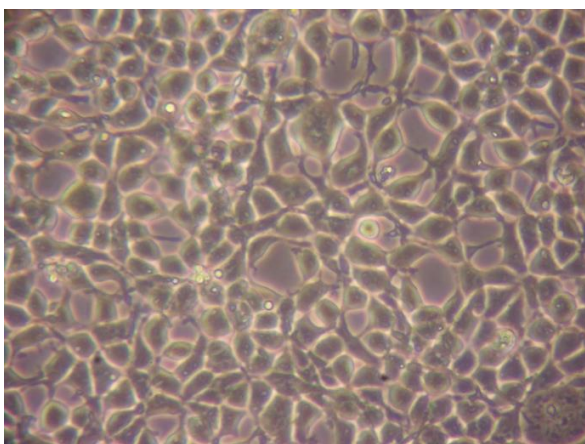
Z grafu č. 10 už nejsou tolik znatelné rozdíly mezi jednotlivými modifikacemi jako u předchozího grafu.

Z výsledků pokusu se dá tedy konstatovat, že vysoká exprese genu RNFT2 má poměrně fatální dopady na buněčnou proliferaci. Počet buněk s vysokou expresí genu RNFT2 byl po 4 dnech zhruba třetinový oproti počtu buněk bez exprese tohoto genu.



Graf č. 14 průběh buněčné proliferace s uměle řízenou expresí genu RNFT1

Tyto výsledky byly potvrzeny i reálnými snímky stejných vzorků buněk jako při měření buněčné proliferace, které byly vystaveny působení tetracyklinu a tím pádem docházelo k vysoké expresi genu RNFT2 a srovnány s buňkami bez přidání tetracyklinu, kde byla tedy hladina exprese genu RNFT2 standardní.



Obrázek 15 a Obrázek 16 ukazují rozdíly v buněčné proliferaci mezi buňkami s a bez tetracyklinu; autor: Tomasz Radaskiewicz M.Sc.

Na obrázku č. 15 jsou zobrazeny buňky se standardní expresí genu RNFT2, na obrázku č. 16 buňky se zvýšenou expresí genu RNFT2. U buněk se zvýšenou expresí genu RNFT2 (obrázek

č. 16), je evidentní, že došlo k výrazné apoptóze a navíc jejich tvar ukazuje na sníženou buněčnou adhezi, což může naznačovat zastavení v některé z fází buněčného cyklu. Toto jen potvrzuje negativní dopady nadprodukce proteinů RNFT2 na buněčnou proliferaci a verifikuje průběh buněčného množení demonstrováný křivkou v grafu č. 9.

V další fázi výzkumu bylo zjišťováno, ve které konkrétně fázi buněčného cyklu dochází při zvýšené expresi genu RNFT2 k zastavení proliferace.

### **3.3.2 Vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na průběh buněčného cyklu**

Vzhledem k výsledkům, které vyšly při měření buněčné proliferace, bylo blíže zkoumáno, jaký konkrétní dopad má vysoká exprese genů RNFT1 a RNFT2 na buněčný cyklus. Ke zjištění této informace byl využit průtokový cytometr, vzorky byly použity totožné jako u měření buněčné proliferace, tedy:

- T-REX Wild Type
- RNFT1 KO
- RNFT1 Wild Type TetON
- RNFT1 CS mut TetON
- RNFT1  $\Delta$ RING mut TetON
- RNFT2 KO
- RNFT2 Wild Type TetON
- RNFT1/RNFT2 dKO

Pokud byl prováděn na shodných buněčných liniích jako u minulého pokusu (viz kapitola 3.3.1), kde jsou všechny linie podrobně popsány.

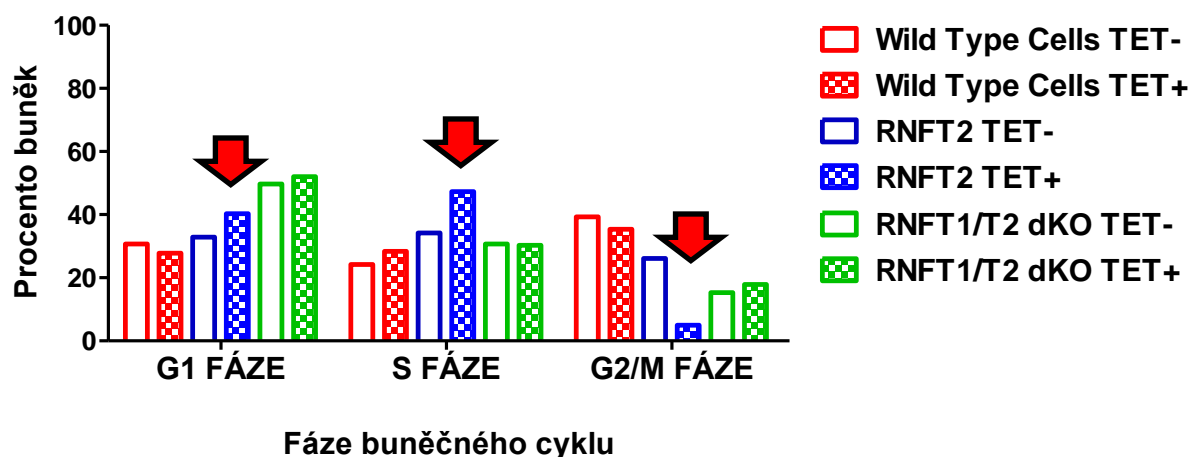
#### **3.3.2.1 Příprava vzorků**

Všechny buněčné linie byly zasazeny na sterilní kultivační destičku do 10 ml do 3 ml živného média, roztoku DMEM s 10 % FBS a 1 % P/S. Po dobu 72 hodin byly všechny buněčné linie vystaveny působení tetracyklinu v poměru s médiem 1 : 1000. Všechny linie byly zároveň pěstovány stejným způsobem bez tetracyklinu. Po 72 hodinách bylo odsáto médium a přidán 1 ml 0,4% roztoku EDTA v PBS, díky kterému se buňky odlepily ode dna. Vzorky byly následně přeneseny do Eppendorfových zkumavek a zcentrifugovány (500 g, 5 min., 4°C).

Roztok PBS s EDTA byl odsát a buněčný pelet očištěn 1 ml 70% roztoku ethanolu. Následně byl roztok ethanolu po centrifugaci (500 g, 5 min., 4°C) odsát a buňky byly dvakrát promyty v 20% roztoku PBS. Po odsátí PBS bylo k buněčnému peletu každého vzorku přidáno 50  $\mu$ l 12,5% roztoku RNase A<sup>97</sup> a 400  $\mu$ l 0,5% roztoku PI<sup>98</sup>. Směsi byly následně 10 minut inkubovány a poté analyzovány pomocí průtokového cytometru.

### 3.3.2.2 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

Buněčný cyklus byl měřen celkem třikrát a průměr výstupních hodnot byl následně analyzována. Byl vytvořen grafy separovaně pro každou buněčnou linii zobrazující, jaké množství buněk se nachází ve kterém buněčném cyklu.



Graf č. 15 vliv vysoké exprese genů RNFT1 a RNFT2 na jednotlivé fáze buněčného cyklu

Markantní rozdíly oproti ostatním vzorkům byly zaznamenány pouze u buněčné linie s uměle zvýšenou expresí genu RNFT2 (RNFT2 Tet+). U ostatních linií nebyly pozorovatelné změny ani mezi vzorky komplexně, ani v rámci výšky exprese u vzorků jednotlivých. Buněčný cyklus tedy probíhal krom genu RNFT2 Tet+ zcela standardně.

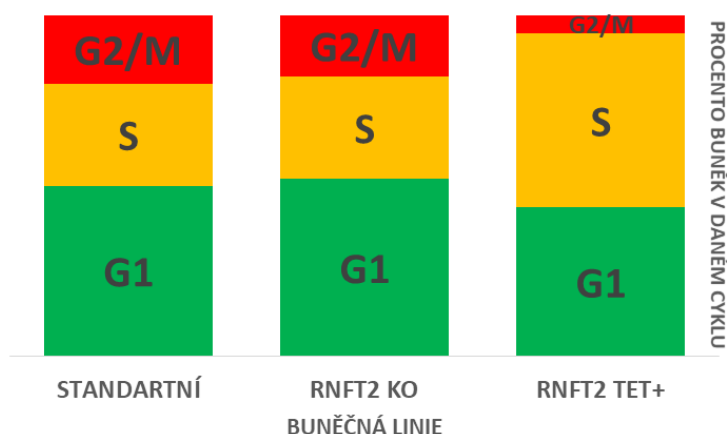
Na základě těchto výsledků tedy bylo zjištěno, že nadměrná exprese genu RNFT2 způsobuje zastavení buněčného cyklu v tzv. S fázi, tedy fázi, kdy dochází k syntetizaci DNA buňky. K tomuto tvrzení vede fakt, že v S fázi buněk s genem RNFT2 Tet+ se vyskytovalo téměř 50 % buněk (oproti standardním 30 %), z čehož se dá konstatovat, že došlo k zastavení právě v této

<sup>97</sup> Ribonuklease A - enzym, který je schopen degradovat molekuly RNA

<sup>98</sup> Propidium Iodide - fluorescenční barvivo, které se váže na DNA přímo úměrně na množství DNA

fázi, buňky nebyly schopné dokončit syntetizaci DNA a přejít do fáze G2/M (v této fázi se u vzorku vyskytovalo necelých 5 % namísto standardních 15 %).

Pro demonstraci rozdílů jsou navíc v grafu zobrazeny rozdíly mezi buňkami bez jakýchkoliv modifikací (Wild Type Cells<sup>99</sup>), buňkám s naprostou absencí genů RNFT1 i RNFT2 (RNFT1/2 dKO) oproti buňkám s nadměrnou expresí genu RNFT2. Zatímco i při absenci obou genů probíhal buněčný cyklus u vzorků zcela standardně<sup>100</sup>, u vzorků s nadměrnou expresí genu RNFT2 došlo k zastavení buněčného cyklu v S fázi a postupné apoptóze buněk.



Graf č. 16 srovnání buněčného cyklu u buněčných linií s absencí genu RNFT2 a uměle řízenou nadměrnou expresí genu RNFT2

### 3.3.3 DOPADY VYSOKÉ EXPRESE GENU RNFT2 NA KOMPONENTY FIGURUJÍCÍ VE WNT SIGNALIZACI

Pro pochopení funkce a dopadů vysoké exprese genů RNFT1 a RNFT2 v buňkách, byly zkoumány interakce mezi těmito geny a jednotlivými komponenty různých typů Wnt mezibuněčné signalizace, která je úzce spjata s leukémií, a je tedy nutné se na ni zaměřit při hledání závislostí mezi geny RNFT a CLL. K zjištění těchto interakcí byla použita metoda western blot, kdy bylo mimo jiné i hledáno, zda dochází k interakci mezi geny RNFT a Wnt komponenty pouze nezávazně či zda v rámci ubiquitinačního komplexu pomocí manipulace s E3 ligačním koncem genů RNFT.

<sup>99</sup> buňky bez jakýchkoliv modifikací

<sup>100</sup> standardní procentuální rozložení cyklu buněk v závislosti na fázi cyklu je 50% cyklu = G1 fáze, 30% cyklu = S fáze, 20% cyklu = G2/M fáze



Byly zkoumány buněčné linie s následujícími modifikacemi genů RNFT2:

- T-REX
- RNFT2 TetON
- RNFT2 CS TetON
- RNFT2  $\Delta$ RING TetON

Tyto modifikace prováděl kolega Tomasz Radaszkiewicz M.Sc.

Modifikované buňky byly nejdříve zasazeny na sterilní 10cm Petriho misku a pěstovány po dobu 4 dní v živném médiu 10% FBS v DMEM. Každá buněčná linie měla 2 duplikáty - jeden vzorek zasazen pouze v čistém médiu a druhý s přidáním tetracyklinem v poměru 1:1000 vůči živnému médiu. Následně bylo médium odsáto a přidáno 1,5 ml 0,4% roztoku EDTA v PBS a vzorky byly přepipetovány do Eppendorfovy zkumavky. Po centrifugaci (200 g, 5 min., 4°C) a odsátí roztoku PBS EDTA byly buňky 2 krát omyty v 10% roztoku PBS. Po omytí bylo opět PBS odsáto a přidán lyzační pufr, tj. roztok PBS s 1 % SDS a 2 % PIC. Následně byla provedena sonikace a buňky byly zlyzovány. Lyzáty byly zcentrifugovány (16 000 g, 15 min., 4°C), byla odebrána vrchní vrstva vzorků (bez sedimentů) a metodou "DC Protein Assay" změřena koncentrace proteinů u každé buněčné linie.

Vzorky byly nanášeny do jamek předpřipraveného 10% akrylamidového gelu pro elektroforetickou separaci. Gely byly v prostředí 1X Tris-glycin-SDS pufru připojeny ke zdroji elektrického napětí na 125 V po dobu 1,5 hodiny.

Po skončení elektroforézy byly vzorky přebíjeny na polyvinyllovou membránu. Tento proces opět probíhal v boxu pro western blot v prostředí 1X Tris-glycin-SDS pufru, a to za elektrického napětí 100 V po dobu 1 hodiny a 15 minut.

Následně byl připraven blokovací roztok, tedy 5% směsi sušeného odtučněného mléka v TBS pufru. Následně byla provedena blokace membrán v tomto roztoku a to po dobu 1 hodiny za konstantního míchání na třepače.

Po blokaci byl roztok odstraněn a membrány byly rozřezány v závislosti na velikosti specifického detekovaného proteinu v kDa a jeho pozici na membráně. Každá membrána byla

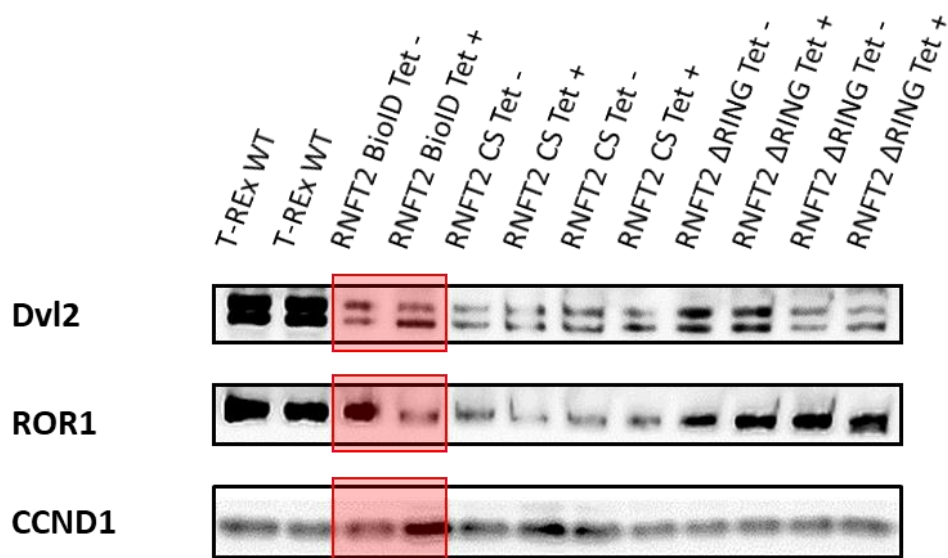
separovaně vložen do zkumavky se 2 ml blokovacího roztoku a primárními protilátky dle doporučeného ředění na obale (viz příloha 2)

Interakce imunoglobulinů s proteiny probíhala přes noc za stálého míchání na třepačce. Po 12 hodinách byly protilátky omyty 2 ml TBS puforem, pufr byl ponechán ve zkumavce za stálého míchání 5 minut a poté nahrazen novým TBS puforem. Proces byl opakován ve 3 cyklech.

Posledním krokem v přípravě vzorků byla adice sekundárních protilátek, tedy imunoglobulinů komplementárních k hostitelskému organismu primárních protilátek (viz příloha 2). Příslušné sekundární protilátky byly přidány v příslušné koncentraci se 2 ml blokovacího roztoku ke každému vzorku. Interakce mezi sekundárními a primárními imunoglobuliny probíhala 1 hodinu za stálého míchání na třepačce. Následně byl roztok s protilátkami odstraněn a membrány ve 3 cyklech promyty TBS puforem.

Na membrány připravené k analýze byl nanesen chemiluminiscenční substrát. Tento roztok se navázal na sekundární protilátky a působením HRP, tedy peroxidázy navázané na sekundárním imunoglobulinu, došlo ke katalyzaci reakce vedoucí ke vzniku světla. To následně umožnilo vzorky vizualizovat pod UV zářením a analyzovat pomocí přístroje FusionSC.

U výsledků pokusů byly následně zkoumány difference mezi množstvím produktu, tedy detekovaného proteinu, u buněk s rozdílnou mírou exprese genu RNFT2. Rozdíly mezi obsahem produktu a vzorky s rozdílným obsahem genů RNFT2 by totiž znamenaly, že geny RNFT2 způsobují nějaké transformace v této dráze a mají vliv na průběh standardních mechanismů.



Obrázek 17 změny v množství proteinů Wnt signalizace v důsledku nadměrné exprese genu RNFT2

### 3.3.3.1 ROR1 (z angl. Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor)

ROR1 je receptor, který interaguje s komponentem nedůležitějším pro předání signálu v rámci Wnt signalizace, tedy proteinem Wnt.

U vzorků buněk se zvýšenou expesí genu RNFT2 (RNFT2 BioID tet+) došlo ke snížené produkci proteinu ROR1. Tím pádem došlo i ke snížení množství proteinu Wnt, který se mohl na receptor ROR1 navázat. Z tohoto výsledku je tedy možné vyvodit, že zvýšená exprese genu RNFT2 vede k inhibici Wnt signální dráhy.

### 3.3.3.2 Dvl2 (z angl. Dishevelled 2)

Dvl2 je protein, který interaguje s receptorem ROR1 po jeho navázání na Wnt. Bylo zjištěno, že u vysoké exprese genu RNFT2 (RNFT2 BioID tet+) došlo ke snížení množství proteinu Dvl2 navázaného na receptoru ROR1. To je pochopitelné vzhledem k tomu, že u zvýšené exprese genu RNFT2 docházelo ke snížení produkce ROR1, na který se tím pádem i váže méně Dvl2. Snížené množství produktu Dvl2 je tedy znatelné na obrázku č. 16 u vzorku RNFT2 BioID Tet+ v horní zóně výskytu na gelu.

Spodní produkt, kterého je naopak více, jak vůči hornímu, tak oproti vzorkům s normální expesí genu RNFT2. Jedná se o protein Dvl2, který není vázán na receptor ROR1 a na který je navázána fosfátová skupina.

### 3.3.3.3 CCND1 (z angl. *Cyclin D1*)

Vyšší množství proteinu CCND1 se vyskytovalo u vzorku se zvýšenou expresí genu RNFT2 (RNFT2 BioID tet+). Produkce tohoto transkripčního faktoru závisí na aktivitě předchozí kaskády, při níž dochází k předání signálu. CCND1 se řadí mezi cílové transkripční faktory NF -  $\kappa$ B. Aktivaci těchto faktorů ovlivňuje míra fosforylace c-junu. V závislosti na tom, že se u Dvl2 vyskytovalo zvýšené množství produktu s fosfátovou skupinou, docházelo k předání fosfátové skupiny přes kaskádu proteinů figurujících ve Wnt/ROR signalizaci. Ve výsledku byla fosfátová skupina přenesena na transkripční faktor c-jun. Míra fosforylace c-junu ovlivňuje aktivaci cílových transkripčních faktorů. V jádře v důsledku toho došlo k nadprodukcii transkripčního faktoru CCND1.

Celkově je tedy možné tvrdit, že zvýšená exprese genu RNFT2 u buněk vede k inhibici signální dráhy Wnt. Svědčí o tom snížená produkce receptoru ROR1, které přijímají signál. Ve výsledku však tato inhibice vede ke zvýšené aktivitě transkripčního faktoru CCND1 v jádře.

Výsledky metody western blot u ostatních proteinů, u kterých nebyly nalezeny žádné vzájemné změny, jsou uvedeny v příloze 3.

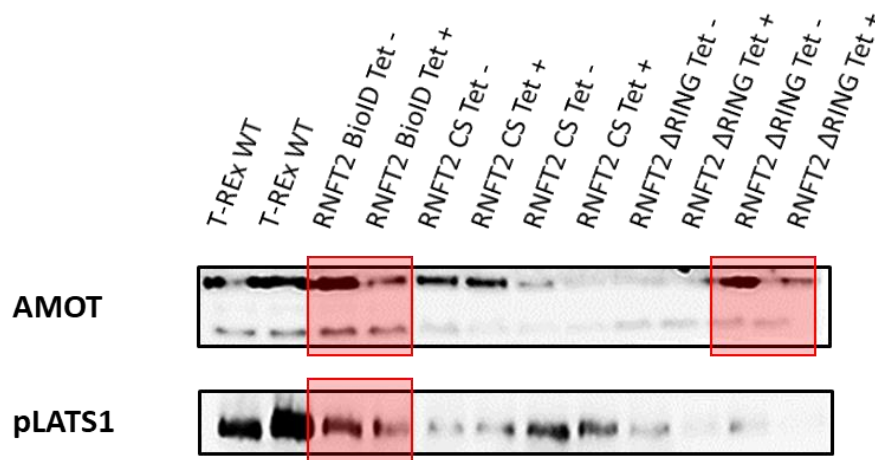
### 3.3.4 DOPADY VYSOKÉ EXPRESE GENU RNFT2 NA KOMPONENTY FIGURUJÍCÍ V HIPPO SIGNALIZACI

Pro tento pokus byly využity stejné vzorky jako při testování interakcí mezi geny RNFT a komponenty Wnt signalizace a při experimentu byl využit i shodný postup (viz kapitola č. 4.3.3.). Jediným rozdílem byly cílové proteiny, u kterých byly hledány rozdíly, tedy zda se liší množství konkrétních proteinů u vzorků buněk se standardním a zvýšeným množstvím genů RNFT2. Testovány byly pomocí metody western blot následující buněčné linie:

- T-REX
- RNFT2 TetON
- RNFT2 CS TetON
- RNFT2  $\Delta$ RING TetON

Cílem bylo opět zjistit potenciální vzájemné působení mezi komponenty Hippo signalizace a geny RNFT2, tedy určit roli genů RNFT2 v této signální dráze. Distance mezi množstvím

zkoumaného proteinu u buněčných linií s rozdílným množstvím genu RNFT2 byly zaznamenány u následujících proteinů:



Obrázek 18 změny v množství proteinů Hippo signalizace v důsledku nadměrné exprese genu RNFT2

#### 3.3.4.1 AMOT (z angl. Angiomotin)

AMOT je protein regulující vnitrobuněčné umístění koaktivátorů YAP a TAZ a aktivující enzymy LATS. U vzorků RNFT2 BioID Tet+ (viz obrázek č. 18), tedy se zvýšenou expresí genu RNFT2, došlo ke snížení produkce proteinů AMOT ve srovnání s buňkami se standardní expresí genu RNFT2.

#### 3.3.4.2 pLATS (z angl. phosphorylated Large tumor suppressor 1)

Jeden ze základních figurantů Hippo signalizace (viz kapitola 2.7)

U vzorků RNFT2 BioID Tet+ byla pozorovatelná snížená produkce LATS1, což koresponduje s faktem, že proteiny AMOT aktivují LATS.

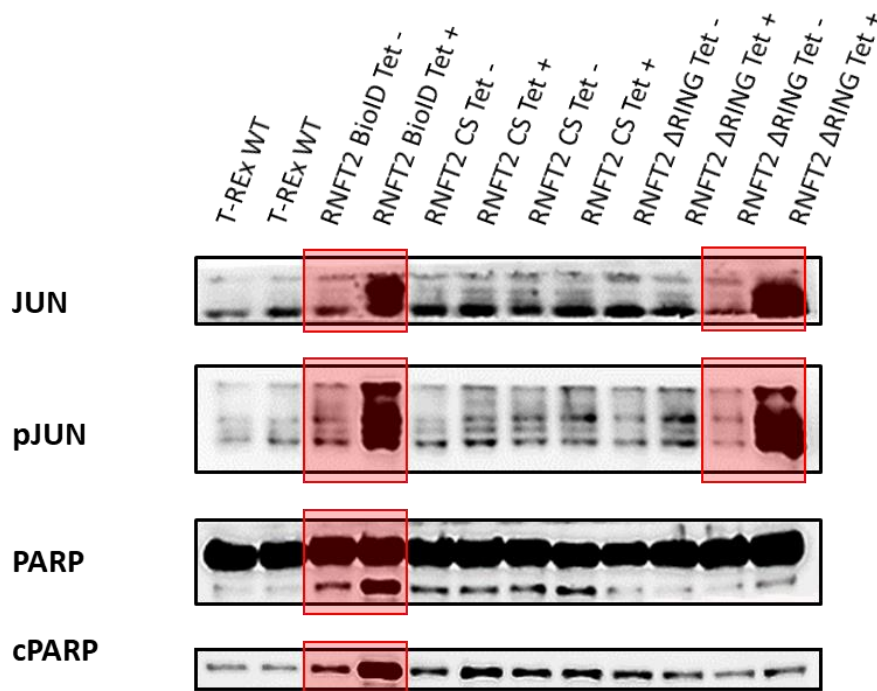
Výsledky vedou ke stejnému zjištění, jako tomu bylo u signalizace Wnt. Zvýšená produkce proteinů RNFT2 způsobuje inhibici signální dráhy Hippo.

Negativní výsledky pokusu, tedy těch kde nebyly nalezeny dopady vysoké exprese genů RNFT2 na množství proteinů ve vzorcích, jsou uvedeny v příloze 4.

### 3.3.4 VLIV VYSOKÉ EXPRESE GENU RNFT2 NA AKTIVACI STRESOVÝCH PROTEINŮ

Pokud na buňku působí z vnějšího prostředí nějaký stres, reaguje buňka nadprodukcí tzv. stresových proteinů. Tyto proteiny následně vyvolávají programovanou buněčnou smrt.

V následujícím pokusu bylo zkoumáno, zda míra exprese genů RNFT2 nějak ovlivňuje produkci těchto stresových proteinů, konkrétně JUN a PARP.



Obrázek 19 vliv vysoké exprese genu RNFT2 na stresové proteiny

#### 3.3.4.3 JUN; pJUN (z angl. (phosphorylated) Jun Proto-Oncogene)

Vyšší množství proteinu JUN a pJUN se vyskytovala u vzorků RNFT2 BioID Tet+ a RNFT2  $\Delta$ RING Tet+, tedy s vysokou expresí genů RNFT2.

Zvýšené množství proteinů se tedy vyskytovalo i u vzorků RNFT2  $\Delta$ RING Tet+, u kterých byla odstraněna RING doména a proteiny tím pádem nemohly vykonávat E3 ubiquitin ligáz. Z toho je možné konstatovat, že buněčný stres nebyl vyvolán v důsledku degradace nějakého buněčného komponentu a mechanismy, které vysoká exprese genu RNFT2 způsobuje. Příčiny vedoucí k nadprodukcí stresových proteinů a apoptóze je tedy nutné hledat jinde.

#### **3.3.4.4 PARP; cPARP (z angl. (cleaved)Poly (ADP-ribose) polymerase)**

U těchto proteinů bylo zvýšené množství zjištěno u vzorků RNFT2 BioID Tet+, tedy opět se zvýšenou expresí genu RNFT2.

Z výsledků tohoto pokusu vyplývá, že zvýšená exprese genu RNFT2 způsobuje nadprodukcí stresových proteinů, vedoucí k programované buněčné smrti. Toto zjištění i koresponduje s dříve zjištěným faktem, tedy že u buněk se zvýšenou expresí genu RNFT2 nedochází ke standardnímu průběhu proliferace, ale spíše jen k apoptóze.

## 4 DISKUZE

Největším přínosem práce za rok 2016/2017 bylo shromáždění dat, která by se dala využít na tvorbu nového prognostického ukazatele pro diagnostiku CLL. K tomuto zjištění vedly výsledky kvantitativní polymerázové řetězové reakce, na základě kterých byly získány hodnoty exprese genů RNFT1 a RNFT2 u pacientů s CLL. Data těchto expresí spolu s podrobnými informacemi o každém z pacientů byla vyhodnocena pomocí webové aplikace. Ve finále byly z vyhodnocených dat sestaveny grafy, ze kterých bylo zřejmé a na základě výpočtů i podložené, že míra exprese genů RNFT má vliv na délku a průběh života pacientů s CLL. Zhruba 40 % pacientů, u kterých byla naměřena vysoká exprese obou genů, se nedožila více než 5,5 roku a navíc u nich byl průběh onemocnění mnohem agresivnější. Tento fakt byl potvrzen i pomocí Mantel-Haenszelova log-rank testu, který potvrdil, že získané výsledky se dají považovat za signifikantní faktory.

Další část výzkumu byla zaměřena na vliv exprese genů RNFT1 a RNFT2 na buněčnou proliferaci a buněčný cyklus. Byla srovnávána reakce buněk na nadměrnou/potlačenou expresi těchto genů. K provedení těchto pokusů bylo nutné vytvořit buňky s modifikacemi genů RNFT1 a RNFT2, aby bylo možné uměle jejich expresi řídit. Exprese genů byla zcela potlačena využitím metody Crip/Cas 9 sloužící k editaci DNA, u buněk s touto modifikací byly geny RNFT1 a RNFT2 zcela odstraněny. Naopak pro cílené zvýšení exprese bylo využito tzv. TetON systému, který umožňuje mnohonásobně zvýšit intenzitu exprese specifického genu.

Byla tedy provedena série pokusů ke zjištění dopadů vysoké exprese těchto genů v buňkách. Buňky s různými modifikacemi byly zasazeny na Petriho misky do kultivačního média a v 24 hodinových intervalech bylo počítáno množství buněk po dobu čtyř dnů. Tento pokus byl zopakován celkem třikrát a získaná data zanalyzována. Výstupem z těchto hodnot byly grafy znázorňující průběh buněčné proliferace v závislosti na míře exprese genů RNFT1 a RNFT2 v buňkách. Ve výsledných hodnotách byly evidentní distance mezi buňkami s rozdílnou mírou exprese genů RNFT2, největší mezi buňkami tzv. RNFT2 KO (zcela odstraněné geny RNFT2) vs. RNFT2 TetON Tet+ (nadměrná exprese genu RNFT2). Buňky se zvýšenou expresí genu RNFT2 nebyly vůbec schopné proliferace, došlo jen k nepatrné proliferaci některých zasazených buněk a k jejich následné apoptóze.



Se stejnými vzorky byl analyzován i buněčný cyklus v závislosti na míře exprese genů RNFT1 a RNFT2. Buňky byly s různými modifikacemi genů opět zasazeny na Petriho misky do kultivačního média. Po 72 hodinách byly vzorky pomocí průtokového cytometru analyzovány a bylo zjišťováno, jaké množství buněk se nachází ve kterém cyklu.

Bylo zjištěno, že vysoká exprese genu RNFT2 má dopady na S-fázi buněčného cyklu, tedy na fázi, kde probíhá syntetizace DNA. Z nějakého důvodu došlo k zastavení buněk v tomto cyklu a snížení buněčné adheze a neschopnosti dále proliferovat. Velmi paradoxní však je, že na jednu stranu způsobila vysoká exprese genů RNFT1 a RNFT2 u pacientů s CLL agresivnější průběh nemoci, tedy intenzivnější proliferaci nezralých a ne zcela diferenciovaných lymfocytů, na druhou stranu při testování dopadu vysoké exprese těchto genů na buňky samotné bylo zjištěno, že naopak blokují proliferaci buněk a způsobují zastavení v S-fázi buněčného cyklu a způsobují apoptózu. Bohužel se pro tento jev zatím nepodařilo najít vysvětlení.

Další část výzkumu byla věnována hledáním interakcí mezi geny RNFT1 a RNFT2 a jejich rolí ve spojitosti s tzv. Wnt a Hippo signalizacemi. Mezibuněčná signalizace je dráha, prostřednictvím které mezi sebou buňky komunikují. Na základě chemické nebo biologické reakce, buňka vyplaví do cytoplasmy ion, molekulu či protein (tato částice se liší v závislosti na konkrétním typu signalizace), který následně přijme buňka s receptory k tomu uzpůsobenými. Pro tento projekt byla nejprve zkoumána tzv. Wnt signální dráha, a to z důvodu, že má vliv jednak na kontrolu proliferace, diferenciace a expanze lidských embryonálních buněk, ale především kvůli spojitosti s hematopoetickými buňkami. V důsledku mutací v těchto drahách dochází k nekontrolované expanzi a proliferaci hematopoetických buněk, které nejsou zcela zralé a jakožto sekundární následek dochází k rozvoji leukémie<sup>101</sup>.

Bylo tedy zkoumáno, zda má vysoká exprese genu RNFT2 nějaké dopady na procesy ve Wnt signální dráze. Výsledkem bádání byl fakt, že při vysoké expresi genu RNFT2 dochází ve Wnt dráze k jistým transformacím. Konkrétně ke snížení produkce receptoru ROR1, který interaguje s proteinem Wnt, tedy stěžejní částicí předávající signál Wnt signální dráhy. To vedlo i ke snížení množství Dvl2 navázaného na receptoru ROR1. Snížená produkce těchto a z toho následně i ostatních figurantů dráhy, naopak umožnila zvýšenou aktivitu transkripčního faktoru CCND1 v jádře. Zvýšená exprese genu RNFT2 v buňkách tedy vede k inhibici Wnt signální dráhy.

---

<sup>101</sup> typ leukémie závisí na druhu buněk, ve kterých došlo k mutaci

Další dráha, která byla v souvislosti s geny RNFT2 zkoumána, byla tzv. Hippo signalizace, která je důležitá během vývoje jedince a má vliv na regulaci velikosti orgánů. Tato signalizace rovněž reguluje rozvoj nádorů. Jedná se o důležitý tumorsupresor, který inhibuje aktivitu signálních drah a faktorů vyvolávajících onkogenezi. Při zkoumání dopadů vysoké exprese genů RNFT2 na tuto dráhu byly zjištěny transformace proteinů AMOT a LATS1. Vysoká exprese genů RNFT2 vedla k útlumu produkce těchto proteinů. Primárně však měly geny RNFT2 vliv jen na AMOT, jelikož LATS1 je aktivován proteinem AMOT, a tudíž se sníženou produkcí AMOT souvisí i snížená produkce LATS1. Opět tedy zvýšená exprese genu RNFT2 vedla k inhibici této signální dráhy

Aktuálně jsou tedy známy konsekvence vysoké exprese genů RNFT2 ve Wnt a Hippo signální dráze. Zároveň je možné konstatovat, že RNFT2 geny způsobují inhibici těchto signalizací, ale jakým způsobem přesně zasahují do přirozeného mechanismu přenosu informací, zatím není známo. Avšak tato záhada je jedním z předmětů dalšího výzkumu.

Posledním cílem práce bylo zjistit vliv míry exprese genů RNFT2 na produkci stresových proteinů. Jedná se o proteiny, které buňka vyplavuje, pokud na ni z vnějšího prostředí působí nějaká forma stresu. Nadprodukce těchto proteinů následně vede k programované buněčné smrti. Pomocí metody western blot, bylo zjišťováno, zda budou existovat rozdíly mezi množstvím stresových proteinů v buňkách s rozdílnou mírou exprese genu RNFT2. Konkrétně byly zkoumány proteiny JUN a PARP. Výsledkem pokusu bylo zjištění, že vysoká exprese genu RNFT2 vede k výrazné nadprodukci těchto stresových elementů a s tím související následné apoptóze.

## 5 ZÁVĚR

Práce „Tajemné proteiny z RNFT rodiny v mezibuněčné signalizaci a nádorech II“ vedla k částečnému objasnění a pochopení vlivu genů RNFT1 a RNFT2 v chronické lymfocytární leukémii a jejich biologické funkce.

Analýzou vzorků reálných pacientů bylo zjištěno, že geny RNFT hrají poměrně podstatnou roli u CLL. Na základě získaných a vyhodnocených dat je možné tvrdit, že u pacientů s vysokou expresí jak genu RNFT1, tak RNFT2 existuje 40% pravděpodobnost, že se nedožijí déle jak pět a půl roku od diagnostiky onemocnění. Tento výsledek by se dal aplikovat jakožto nový prognostický marker pro stanovení vážnosti formy onemocnění u pacienta.

Při pátrání po biologické podstatě genů RNFT1 a RNFT2 v buňkách byla jejich objevena další poměrně významná role. Nadměrná exprese těchto genů má zcela fatální účinky na buněčnou proliferaci. Dochází k zastavení buněčného cyklu v S-fázi.

Následně při hledání souvislostí mezi geny RNFT2 a mezibuněčnými signalizacemi Wnt a Hippo byly nalezeny dopady vysoké exprese genů RNFT2 na mechanismy těchto drah. U Wnt dráhy se jednalo o transformace u proteinů Dvl2, ROR1 a CCND1 a u Hippo dráhy o proteiny AMOT a LATS. U obou signálních drah způsobila vysoká exprese genu RNFT2 jejich inhibici.

Dále bylo zjištěno, že při vysoké expresi genu RNFT2 dochází k produkci tzv. stresových proteinů, které reagují na stres z vnějšího prostředí a indukují v buňkách programovanou buněčnou smrt.

Do budoucna je cílem především verifikovat všechna zjištěná data, objasnit přesné dopady genů RNFT2 na mechanismy v drahách Wnt a Hippo a zjistit, co vše způsobuje vysoká exprese genů RNFT2 v buňkách a z jakého důvodu dochází k apoptóze.

Je však velmi důležité podotknout, že se jedná zatím pouze o pilotní výsledky a verifikace těchto výsledků a jejich rozšíření bude předmětem navazujícího výzkumu. Je také nutné zjistit, jak tyto zjištěné buněčné funkce přispívají k rozvoji chronické lymfocytární leukémie.

Tato práce rozšířila fond biologických poznatků, které by mohly vézt k bližšímu pochopení mechanismu vzniku CLL či jiného nádorového onemocnění a informace o genech RNFT1/2.

## 6 SEZNAM ZDROJŮ

### 6.1 ZDROJE LITERATURY

- [1] AYYANATHAN, Kasirajan, ed. Cancer cell signaling: targeting signaling pathways toward therapeutic approaches to cancer. Toronto: Apple Academic Press, c2015. ISBN 978-1-77188-067-1.
- [2] BRYCHTOVÁ, Yvona, Anna PANOVSKÁ a Michael DOUBEK. Chronická lymfocytární leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké. Brno: Pro Českou leukemickou skupinu - pro život (CELL) vydalo nakladatelství Kmen, spol., 2016. ISBN 978-80-906212-5-1., S. 11-12
- [3] GANJI, Sri Ranjani. Identification and Validation of Dvl interacting partners using Proteomics approach. 2013.
- [4] JANEČKOVÁ, Eva a Martina VAŠÍČKOVÁ. Genová exprese, aneb, Co kódují geny. Brno: Tribun EU, 2015, s. 21-24. ISBN 978-80-263-0905-5.
- [5] KOVÁŘ, Jan. Buněčná proliferace a mechanismy její regulace. Praha: Karolinum, c1997. ISBN 80-7184-429-2.
- [6] LIM, Wendell, Bruce MAYER a T. PAWSON. Cell signaling: principles and mechanisms. New York: Garland Science, c2015. ISBN 978-0-8153-4244-1.
- [7] OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. Základy biologie a genetiky člověka. V Praze: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8. S. 126-128
- [8] PANOVSKÁ, Anna, DOUBEK, Michael, Chronická lymfocytární leukemie - diagnostika a léčba, Onkologie, 2013, 7 (3), S. 117-120
- [9] ROHOŇ, Peter. Nové možnosti v léčbě vybraných hematologických onemocnění. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4220-8.

- [10] RUML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. Genové inženýrství. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-499-8. S.45-52
- [11] ŠMARDA, Jan a Jana ŠMARDOVÁ. Cílené genetické a epigenetické modifikace leukemických buněk. V Brně: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3682-6.
- [12] ŠMARDA, Jan. Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1. S. 29-45
- [13] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7. S. 235-236

## 6.2 INTERNETOVÉ ZDROJE

- [14] Zdravotnictví a medicína [online]. [cit. 25. 07. 2016]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/chronicka-b-lymfocytarni-leukemie-458620>
- [15] Leukemie – Wikipedie. [online]. [cit. 25. 07. 2016]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Leukemie>
- [16] Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně - Úvodní stránka [online]. [cit. 25. 07. 2016]. Dostupné z: <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t201.rtf>
- [17] Akutní leukemie - Fakultní nemocnice Brno [online]. [cit. 25. 07. 2016]. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/akutni-leukemie/t1282>
- [18] Polymerázová řetězová reakce – WikiSkripta. [online]. [cit. 30. 07. 2016]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Polymerázová\\_řetězová\\_reakce](https://www.wikiskripta.eu/w/Polymerázová_řetězová_reakce)

- [19] Zdravotnictví a medicína [online]. [cit. 30. 07. 2016]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/chronicka-lymfocytarni-leukemie-470643>
- [20] Matematická biologie učebnice: Mantelův-Haenszelův log-rank test. Matematická biologie učebnice: Úvod [online]. [cit. 06. 11. 2016]. Dostupné z: <http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=aplikovana-analyza-klinickyh-a-biologickyh-dat--aplikovana-analyza-preziti--metody-pro-srovnani-odhadu-preziti--manteluv-haenszeluv-log-rank-test>
- [21] Kortikoidy - nežádoucí účinky. Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK. [online]. [cit. 06. 11. 2016]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=kortikoidy-nezadouci-ucinky>
- [22] Klonování. LabGuide.cz – Průvodce laboratoří. [online]. [cit. 06. 11. 2016]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/klonovani/>
- [23] Western blot. LabGuide.cz – Průvodce laboratoří. [online]. [cit. 20. 11. 2016]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>
- [24] Western blot – Wikipedie. [online]. [cit. 20. 11. 2016]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](https://cs.wikipedia.org/wiki/Western_blot)
- [25] Sds-page Unit Related Keywords & Suggestions - Sds-page Unit Long Tail Keywords. Google Trends - Hot Keyword Searches [online]. [cit. 20. 11. 2016]. Dostupné z: <http://www.keyword-suggestions.com/c2RzLXBhZ2UgdW5pdA/>
- [26] Klonování. LabGuide.cz – Průvodce laboratoří. [online]. [cit. 10. 12. 2016]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/klonovani/>

- [27] Genevisible. [online]. Nebion AG, Zurich, Switzerland [cit. 12. 12. 2016].  
Dostupné z: <https://genevisible.com/cancers/HS/Gene%20Symbol/RNFT1>
- [28] Ribonuclease - an overview. ScienceDirect Topics. Science, health and medical journals, full text articles and books. [online]. [cit. 20. 12. 2016]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ribonuclease>
- [29] BioProfiling.de. [online]. [cit. 22. 01. 2017]. Dostupné z: <http://www.bioprofiling.de>
- [30] Fakulta veterinární hygieny a ekologie [online]. [cit. 22. 01. 2017]. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/ubchvzz/materialy/prednasky/mbhp\\_2014\\_02.pdf](https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/ubchvzz/materialy/prednasky/mbhp_2014_02.pdf)
- [31] Kvantitativní polymerázová řetězová reakce – Wikipedie. [online]. [cit. 22. 01. 2017]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kvantitativní\\_polymerázová\\_řetězová\\_reakce](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kvantitativní_polymerázová_řetězová_reakce)
- [32] National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 29. 09. 2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754430>
- [33] FlowCal: Software for Analysis and Calibration of Flow Cytometry Data · Benchling. [online]. [cit. 30. 09. 2017]. Dostupné z: <https://benchling.com/pub/tabor-flowcal>
- [34] Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science. Abcam [online]. 1998. [cit. 30. 09. 2017]. Dostupné z: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
- [35] VALNOHOVÁ J. Wnt signalizace v leukemii. Vysokoškolské kvalifikační práce [online]. [cit. 26. 10. 2017]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/46hasr>

- [36] Veřejné služby Informačního systému [online]. [cit. 23. 12. 2017]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/379340/prif\\_m/DP\\_Final\\_ROGOWSKI.pdf](https://is.muni.cz/th/379340/prif_m/DP_Final_ROGOWSKI.pdf)
- [37] Angiomotin - Wikipedia. [online]. [cit. 23. 12. 2017]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Angiomotin>
- [38] LATS1 - Wikipedia. [online]. [cit. 29. 12. 2017]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/LATS1>
- [39] Serin/threonin kináza – Wikipedie. [online]. [cit. 03. 01. 2018]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Serin/threonin\\_kináza](https://cs.wikipedia.org/wiki/Serin/threonin_kináza)
- [40] Propojení buněčné signalizace a metabolismu v nádorových buňkách. [online]. [cit. 03. 01. 2018]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/170124/>
- [41] ResearchGate. Share and discover research [online]. [cit. 28. 01. 2018]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Map-of-pcDNA3-0-mammalian-expression-vector-of-about-5-4-kb\\_279977088](https://www.researchgate.net/figure/Map-of-pcDNA3-0-mammalian-expression-vector-of-about-5-4-kb_279977088)
- [42] Chronická lymfatická leukemie. IV. interní hematologická klinika. Fakultní nemocnice Hradec Králové [online]. [cit. 28. 01. 2018]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/int-2h/cll>
- [43] Výpočetní tomografie – Wikipedie. [online]. [cit. 02. 02. 2018]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Výpočetní\\_tomografie](https://cs.wikipedia.org/wiki/Výpočetní_tomografie)
- [44] National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882124/>
- [45] CCND1 Gene - GeneCards [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1>



- [46] ROR1 Gene - GeneCards [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ROR1>
- [47] LATS1 Gene - GeneCards [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LATS1>
- [48] AMOT Gene - GeneCards [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AMOT>
- [49] JUN Gene - GeneCards [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JUN>
- [50] PARP1 Gene - GeneCards [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PARP1>
- [51] DVL2 Gene - GeneCards [online]. [cit. 12. 02. 2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DVL2>
- [52] National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 20. 02. 2018]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19530173>
- [53] The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 11. 05. 2018]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882124/>
- [54] Pfam: Home page [online]. [cit. 11. 05. 2018]. Dostupné z: <http://pfam.xfam.org/protein/Q96EX2>
- [55] PhosphoSitePlus [online]. [cit. 11. 05. 2018]. Dostupné z: <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=19002481&showAllSites=true>
- [56] NextProt [online]. [cit. 11. 05. 2018]. Dostupné z: [https://www.nextprot.org/entry/NX\\_Q96EX2/medical](https://www.nextprot.org/entry/NX_Q96EX2/medical)

- [57] NextProt [online]. [cit. 11. 05. 2018]. Dostupné z:  
[http://www.nextprot.org/db/entry/NX\\_Q5M7Z0/expression#a-ts-line-589](http://www.nextprot.org/db/entry/NX_Q5M7Z0/expression#a-ts-line-589)
- [58] School of Medicine & Health Science [online]. [cit. 11. 05. 2018]. Dostupné z:  
[https://hive.biochemistry.gwu.edu/cgi-bin/prd/biomuta/servlet.cgi?gpageid=11&searchfield1=gene\\_name&searchvalue1=RNFT2](https://hive.biochemistry.gwu.edu/cgi-bin/prd/biomuta/servlet.cgi?gpageid=11&searchfield1=gene_name&searchvalue1=RNFT2)

## **7 SEZNAM GRAFŮ, TABULEK A OBRÁZKŮ**

### **7.1 SEZNAM GRAFŮ**

Graf č. 1 srovnání míry exprese genu RNFT1 u různých nádorových onemocnění .....	21
Graf č. 2 vliv míry exprese genů RNFT1 na pacienty s CLL .....	38
Graf č. 3 vliv míry exprese genů RNFT2 na pacienty s CLL .....	38
Graf č. 4 vliv míry exprese genu RNFT1 na pacienty s nemutovanou formou CLL.....	39
Graf č. 5 vliv míry exprese genu RNFT2 na pacienty s nemutovanou formou CLL.....	39
Graf č. 6 vliv míry exprese genu RNFT1 na pacienty s mutovanou formou CLL.....	40
Graf č. 7 vliv míry exprese genu RNFT2 na pacienty s mutovanou formou CLL.....	40
Graf č. 8 vliv míry exprese genů RNFT1 a RNFT2 na přežití pacientů s CLL .....	41
Graf č. 9 průběh buněčné proliferace s uměle řízenou expresí genu RNFT2. ....	52
Graf č. 10 průběh buněčné proliferace s uměle řízenou expresí genu RNFT1 .....	53
Graf č. 11 vliv vysoké exprese genů RNFT1 a RNFT2 na jednotlivé fáze buněčného cyklu .	55
Graf č. 12 srovnání buněčného cyklu u buněčných linií s absencí genu RNFT2 a uměle řízenou nadměrnou expresí genu RNFT2 .....	56

### **7.2 SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 použité protilátky pro testování modifikací genu RNFT1 .....	48
--	----

### **7.3 SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 formy ubiquitinace.....	19
Obrázek 2 průběh procesu ubiquitinace .....	20
Obrázek 3 kanonická Wnt signalizace a její průběh při absenci nebo prezenci Wnt ligandu..	23

Obrázek 4 průběh předávání signálu v Hippo signální dráze.....	26
Obrázek 5 proces detekce proteinu na membráně.....	33
Obrázek 6: základní schéma principu fungování průtokového cytometru.....	34
Obrázek 7 schéma průběhu transkripce genů modifikovaných TetON systémem bez adice tetracyklinu.....	36
Obrázek 8 schéma průběhu transkripce genů modifikovaných TetON systémem po adici tetracyklinu.....	36
Obrázek 9 nejvhodnější teplota pro získání nejvýnosnějšího množství proteinu RNFT1 .....	43
Obrázek 10 schéma plasmidu pcDNA3 .....	44
Obrázek 11 demonstrace vložení inzertu do plasmidu.....	45
Obrázek 12 ověření správnosti vložení vektorů do plasmidů .....	46
Obrázek 13 demonstrace jednotlivých modifikací.....	47
Obrázek 14 western blot testující správnost modifikace buněk genem RNFT1 .....	49
Obrázek 15 a obrázek 16 ukazují rozdíly v buněčné proliferaci mezi buňkami s a bez tetracyklinu.....	53
Obrázek 17 změny v množství proteinů Wnt signalizace v důsledku nadměrné exprese genu RNFT2.....	59
Obrázek 18 změny v množství proteinů Hippo signalizace v důsledku nadměrné exprese genu RNFT2.....	61
Obrázek 19 vliv vysoké exprese genu RNFT2 na stresové proteiny .....	62

# 8 PŘÍLOHY

## PŘÍLOHA 1

BUNĚČNÁ LINIE	TET	MNOŽSTVÍ BUNĚK V 50 UL VZORKU				ZVÝŠENÍ MNOŽSTVÍ OPROTI PŘEDCHOZÍMU DNU			
		18. 7.	19. 7.	20. 7.	21. 7.	DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4
T-REX WT	+	8245	14853	39429	72203	1	1,8	4,8	8,8
	-	6438	16029	41638	49166	1	2,5	6,5	7,6
RNFT1 KO	-	15098	27531	60485	52936	1	1,8	4,0	3,5
RNFT2 KO	-	3461	9094	23626	30572	1	2,6	6,8	8,8
RNFT1/2 DKO	-	2348	6587	19636	37510	1	2,8	8,4	16,0
RNFT1 WT	+	5461	12091	31954	57256	1	2,2	5,9	10,5
	-	5343	12821	28889	25159	1	2,4	5,4	4,7
RNFT1 CS	+	2894	4080	15546	32565	1	1,4	5,4	11,3
	-	2707	4783	14329	31170	1	1,8	5,3	11,5
RNFT1 ΔRING	+	3862	9089	24686	36748	1	2,4	6,4	9,5
	-	3770	9086	25094	32049	1	2,4	6,7	8,5
RNFT2 WT	+	4906	4514	4898	3716	1	0,9	1,0	0,8
	-	4656	9799	25581	33080	1	2,1	5,5	7,1

BUNĚČNÁ LINIE	TET	MNOŽSTVÍ BUNĚK V 50 UL VZORKU				ZVÝŠENÍ MNOŽSTVÍ OPROTI PŘEDCHOZÍMU DNU			
		25. 7.	26. 7.	27. 7.	28. 7.	DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4
T-REX WT	+	4052	12671	29537	39169	1	3,1	7,3	9,7
	-	2998	12999	27329	39321	1	4,3	9,1	13,1
RNFT1 KO	-	3113	11381	25426	27168	1	3,7	8,2	8,7
RNFT2 KO	-	2209	6482	14695	18449	1	2,9	6,7	8,4
RNFT1/2 DKO	-	1880	5027	10918	21434	1	2,7	5,8	11,4
RNFT1 WT	+	4920	19044	31549	40276	1	3,9	6,4	8,2
	-	3995	16271	31729	20853	1	4,1	7,9	5,2
RNFT1 CS	+	2881	6631	13247	23072	1	2,3	4,6	8,0
	-	1906	6090	16089	26155	1	3,2	8,4	13,7
RNFT1 ΔRING	+	2598	8928	18690	24239	1	3,4	7,2	9,3
	-	2258	9038	20999	15889	1	4,0	9,3	7,0
RNFT2 WT	+	7750	5912	5730	3817	1	0,8	0,7	0,5
	-	5686	19473	38988	38224	1	3,4	6,9	6,7

BUNĚČNÁ LINIE	TET	MNOŽSTVÍ BUNĚK V 50 UL VZORKU				ZVÝŠENÍ MNOŽSTVÍ OPROTI PŘEDCHOZÍMU DNU			
		1. 8.	2. 8.	3. 8.	4. 8.	DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4
T-REX WT	+	2293	5230	14130	13668	1	2,3	6,2	6,0
	-	1608	6431	12609	14032	1	4,0	7,8	8,7
RNFT1 KO	-	3380	7662	12749	12387	1	2,3	3,8	3,7
RNFT2 KO	-	2027	4047	7950	9013	1	2,0	3,9	4,4
RNFT1/2 DKO	-	1226	1254	4546	11451	1	1,0	3,7	9,3
RNFT1 WT	+	2737	4088	11742	8365	1	1,5	4,3	3,1
	-	2436	5136	12109	11809	1	2,1	5,0	4,8
RNFT1 CS	+	3110	2342	7917	9869	1	0,8	2,5	3,2
	-	3039	3655	6996	19423	1	1,2	2,3	6,4
RNFT1 ΔRING	+	2687	3665	8836	5169	1	1,4	3,3	1,9
	-	2085	4854	10151	9260	1	2,3	4,9	4,4
RNFT2 WT	+	2825	6499	6053	7062	1	2,3	2,1	2,5
	-	3023	4569	9321	17623	1	1,5	3,1	5,8

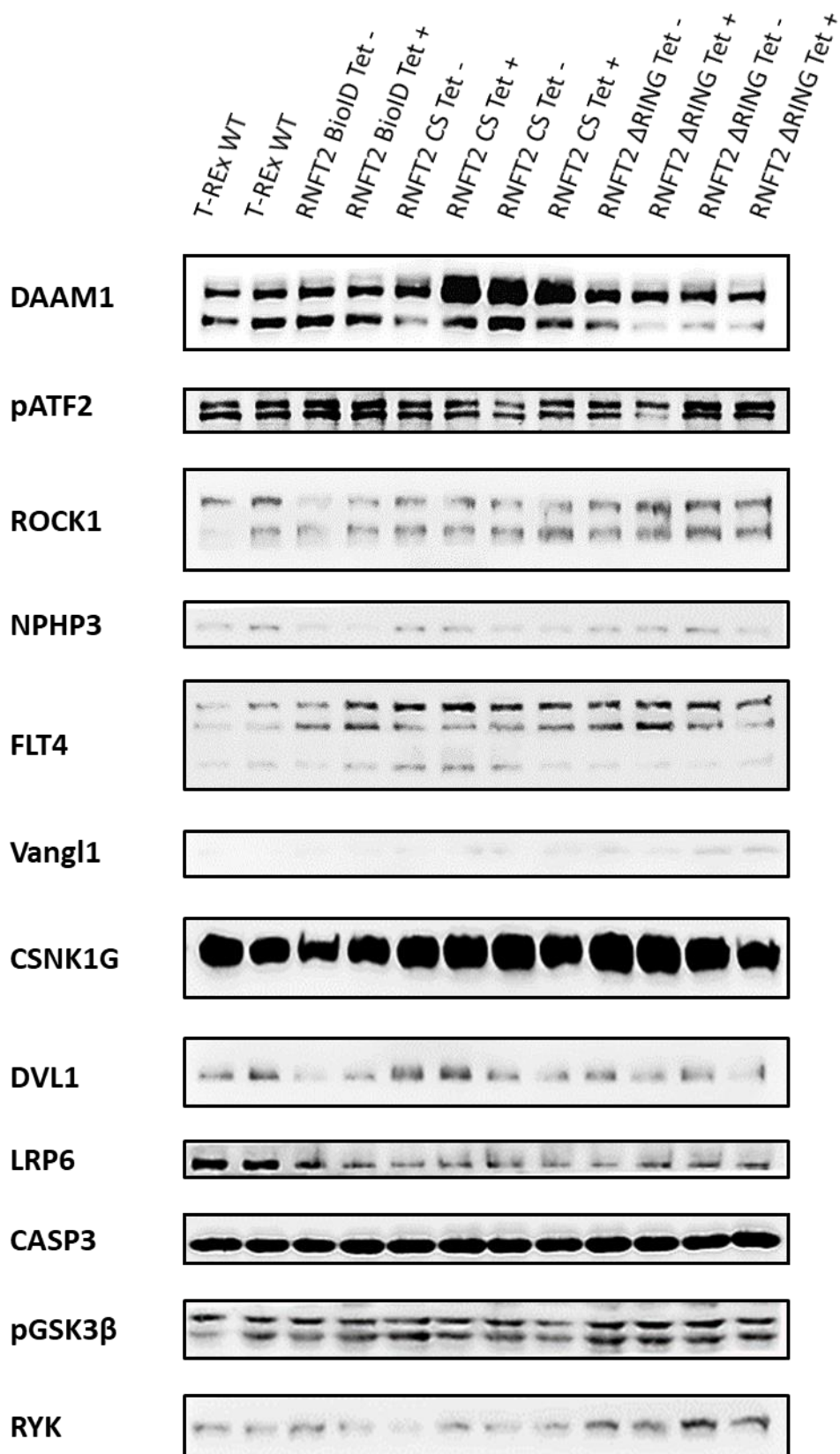
## PŘÍLOHA 2

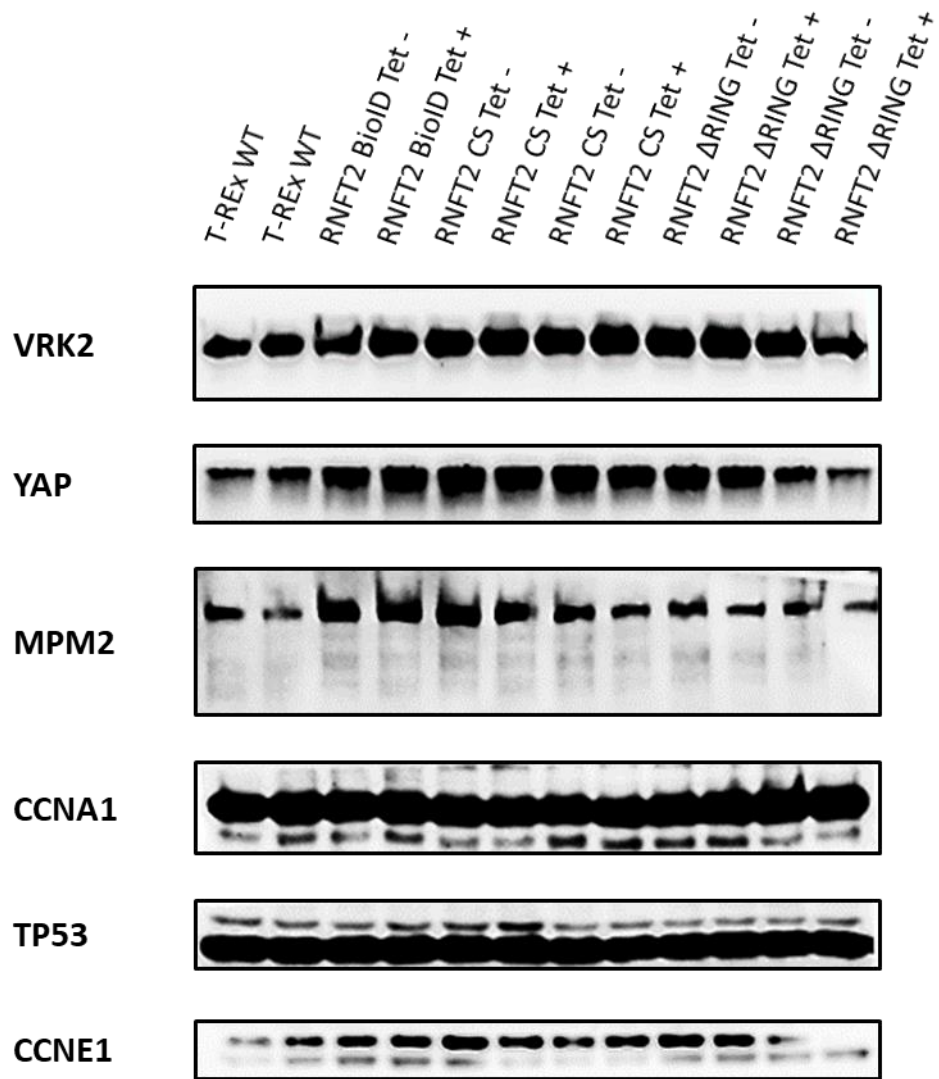
<b>PROTEIN</b>	<b>VELIKOST</b>	<b>KÓD PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY</b>	<b>SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA (PROTI PRIM.)</b>	<b>PROTILÁTKA: BLOKOVACÍ ROZTOK</b>
<b>AMOT</b>	100-140 kDa	sc-166924	myší IgG	1:500
<b>AXIN1</b>	110 kDa	ab55906	králičí IgG	1:1000
<b>CASP3</b>	20-40 kDa	9662	králičí IgG	1:500
<b>CCK4</b>	70-130 kDa	sc-100304	myší IgG	1:500
<b>CCNA1</b>	54 kDa	sc-419506	myší IgG	1:1000
<b>CCND1</b>	61 kDa	sc-450	myší IgG	1:1000
<b>CCNE1</b>	50 kDa	sc481	králičí IgG	1:500
<b>CDK1</b>	34 kDa	MS110P	myší IgG	1:500
<b>CDK1/CDK2</b>	30 kDa	sc-53219	myší IgG	1:500
<b>CDK12</b>	205 kDa	11973S	králičí IgG	1:1000
<b>C-JUN</b>	45 kDa	9165	králičí IgG	1:1000
<b>cPARP</b>	54 kDa	9541	králičí IgG	1:2000
<b>CSNK1G</b>	50 kDa	ab126062	myší IgG	1:500
<b>DAAM1</b>	110 kDa	sc-100942	myší IgG	1:500
<b>DVL1</b>	90-100 kDa	sc-166303	myší IgG	1:500
<b>DVL2</b>	90-100 kDa	3216S	králičí IgG	1:1000
<b>DVL3</b>	90-100 kDa	3218S	králičí IgG	1:1000
<b>FLT4</b>	180-200 kDa	sc-28297	myší IgG	1:500
<b>IRAK1</b>	78-105 kDa	sc-55530	myší IgG	1:500
<b>JUN</b>	44 kDa	sc-398615	myší IgG	1:1000
<b>LRP6</b>	210 kDa	sc-25317	myší IgG	1:1000
<b>MPM2</b>	90-100 kDa	05-368	myší IgG	1:1000
<b>MYC</b>	57-70 kDa	sc-70469	myší IgG	1:1000
<b>NF2</b>	70 kDa	sc-331	králičí IgG	1:1000
<b>NPHP3</b>	145-151 kDa	sc-428691	myší IgG	1:500
<b>PARP</b>	90-120 kDa	9542	králičí IgG	1:2000

<b>pATF2</b>	70 kDa	9221	králíčí IgG	1:1000
<b>pERK</b>	44 kDa	sc-377400	myší IgG	1:1000
<b>pGSK3</b>	40-55 kDa	9331	králíčí IgG	1:1000
<b>pJUN</b>	48 kDa	3270S	králíčí IgG	1:1000
<b>pLATS1</b>	140 kDa	9157S	králíčí IgG	1:500
<b>pNF2</b>	70 kDa	13281S	králíčí IgG	1:1000
<b>pRB1</b>	110n kDa	554136	myší IgG	1:1000
<b>pWEE1</b>	95 kDa	4910S	králíčí IgG	1:500
<b>pYAP1</b>	65-75 kDa	13008S	králíčí IgG	1:1000
<b>ROCK1</b>	160 kDa	sc-374388	myší IgG	1:500
<b>ROR1</b>	130 kDa	16540S	králíčí IgG	1:1000
<b>RYK</b>	60-70 kDa	sc-83082	myší IgG	1:1000
<b>TP53</b>	53 kDa	sc-47698	myší IgG	1:1000
<b>VANGL1</b>	55-70 kDa	sc-166844	myší IgG	1:500
<b>VANGL2</b>	55-70 kDa	MABN750	krysí IgG	1:750
<b>VRK2</b>	50 kDa	sc-365199	myší IgG	1:1000
<b>WEE1</b>	91 kDa	sc-5285	myší IgG	1:500
<b>YAP</b>	64 kDa	sc-101199	myší IgG	1:1000



# PŘÍLOHA 3





# PŘÍLOHA 4

