

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Metody genového inženýrství v molekulární medicíně

Viktoriya Yuskovets
Jihomoravský kraj

Brno 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Metody genového inženýrství v molekulární medicíně

Methods of genome engineering in molecular medicine

Autoři: Viktoriya Yuskovets

Škola: Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace, Křenová
304/36, 602 00 Brno-střed-Trnitá

Kraj: Jihomoravský kraj

Vedoucí práce:

Brno 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brno dne datum

Viktoriya Yuskovets

Anotace

Cílem mojí práce bylo pomocí metod genového inženýrství vytvořit plazmid se standardní variantou genu *MEGF10* a poté dva plazmidy, které nesou specificky mutované varianty genu *MEGF10*. První z nich byla nalezena u pacienta M. R. jako dosud nepopsaná mutace, která je klasifikovaná jako varianta s neznámým významem. Druhý plazmid byl vytvořen pro variantu, která je známá svojí patogenitou, a může tedy sloužit jako kontrola při ověření patogenního dopadu mutace v tomto genu. Tyto plazmidy budou týmem výzkumné skupiny profesora Ondřeje Slabého (CEITEC a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity) dále použity pro analýzu vlivu exprese specificky mutovaného proteinu na buněčné procesy.

Klíčová slova

Plazmidy; mutageneze; MEGF10

Annotation

The goal of my work was to use gene engineering methods to create a plasmid with a standard variation of the MEGF10 gene and then two plasmids that carry specifically mutated variations of the MEGF10 gene. The first was found in patient M. R. as a mutation not yet described, which is classified as a variation with unknown significance. The second plasmid was created for a variation known for its pathogenicity and can therefore serve as a control in verifying the pathogenic impact of the mutation in this gene. These plasmids will be further used for the analysis of the effect of expression of a specifically mutated protein on cellular processes by the team of the research group of professor Ondřej Slabý (CEITEC and the Faculty of Medicine of The Masarykova University).

Keywords

Plasmids; mutagenesis; gene *MEGF 10*

Obsah

1. ÚVOD	7
1.1. Molekulární medicína	7
1.2. Genové inženýrství	7
1.3. Molekulární medicína v klinické praxi u dětí s vzácnými onemocněními	8
1.3.1. MEGF10	9
2. METODY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ	10
2.1. Příprava plazmidu exprimujícího protein <i>MEGF10</i>	10
2.1.1. Plazmidy	12
2.1.2. Izolace RNA	13
2.1.3. Přepis RNA do cDNA	14
2.1.4. Polymerázová řetězová reakce	15
2.1.5. Izolace PCR produktu z gelu	17
2.1.6. Izolace plazmidu	19
2.1.7. Štěpení restrikčními endonukleázami NheI a EcoRV	20
2.1.8. Ligace	22
2.1.9. Transformace kompetentních bakterií	23
2.2. CÍLENÁ MUTAGENEZE V GENU MEGF 10	26
2.2.1. Mutace	26
2.2.2. Mutageneze	28
2.2.3. KLD reakce	30
3. ZÁVĚR	32
Seznam literatury:	33

1. ÚVOD

1.1. Molekulární medicína

Molekulární medicína je jedna z nejvíce progresivních oblastí medicíny, která zasahuje do všech odvětví klinické medicíny. Jedná se o obor založený na aplikaci poznatků a metod molekulární biologie do klinické medicíny vedoucí k cílené prevenci a k integraci diagnózy a terapie. Její vznik a vývoj umožnily pokroky v oblasti molekulární biologie a genetiky, a to jak na úrovni teoretické, tak i technologické.

Jedním z hlavních cílů molekulární medicíny je identifikace individuálních genetických dispozic ke konkrétním chorobám a formulace preventivních opatření. Tímto problémem se zabývá molekulární epidemiologie. Možnost vytvořit účinná preventivní opatření u civilizačních chorob, jako jsou ateroskleróza, diabetes či nádorová onemocnění, je velice žádoucí a představuje také jednu z nejvíce studovaných oblastí molekulární medicíny. Mezi typické příklady můžou patřit zárodečné mutace zodpovědné za dědičné formy nádorových onemocnění, proto přítomnost těchto mutací je spojena s konkrétními doporučeními pro životní styl postižených osob, a především speciálními programy jejich klinického sledování umožňujícího časný záchyt onemocnění a lepší léčebné možnosti. Další oblastí, kterou se molekulární medicína zabývá, je identifikace příčin geneticky podmíněných vrozených chorob a jejich výzkum a léčba pomocí metod genového inženýrství. [1]

1.2. Genové inženýrství

Historicky genové inženýrství významně přispělo k objevu a dalšímu výzkumu nejrůznějších molekulárních jevů a dějů, jako je například existence intronu v eukaryotních genech či složitého genového pozadí variability specifických protilátek proti různým antigenům. Genové manipulace také zahájily novou éru biotechnologii, které umožnily výrobu nové generace vakcín, přinesly produkci čistých lidských hormonů bakteriemi a kvasinkami, z nichž jako první z nich byl inzulin, a další řady farmaceuticky důležitých proteinů. Metody genového inženýrství ve své podstatě představují nepřirozené procesy, ke kterým by v přírodě pravděpodobně nedošlo. [2]

1.3. Molekulární medicína v klinické praxi u dětí s vzácnými onemocněními

Tato práce je součástí projektu, který využívá metody genového inženýrství pro určení patogenicity mutací (variant) nalezených u dětských pacientů léčených v Ambulanci pro dětské pacienty bez diagnózy ve Fakultní nemocnici Brno v Bohunicích, které byly identifikovány pomocí pokročilých genomických sekvenačních metod. Tato ambulance je součástí Centra precizní medicíny, které má cíl umožnit zdravotníkům připravit pacientovi léčbu tzv. šitou na míru na základě pochopení biologických procesů na molekulární úrovni, a posunout tak personalizovanou léčbu na vyšší úroveň.

(<https://www.fnbrno.cz/centrum-precizni-mediciny/t7823>)

Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy se hlavně zaměřuje na poskytnutí péče pro pacienty trpící některou ze vzácných nebo ultra-vzácných onemocnění. Vzácná onemocnění, jsou onemocnění, která zasahují nízký počet lidí a ultra-vzácná onemocnění jsou ještě méně častá. Většina z těchto onemocnění má genetický původ a projevuje se již v dětství. Léčba a výzkum těchto onemocnění může být komplikovaná kvůli omezenému počtu pacientů a nedostatku informací. Hlavním cílem je tedy především koordinace činnosti odborníků zapojených do péče, diagnostiky a léčby s cílem, kdy se navrhuje doplňující vyšetření, které pomůže stanovit diagnózu, určení individuálního léčebného plánu před stanovením diagnózy a poté určení individuální léčebný plán na sledování pacienta. [6]

Jedním z pacientů této ambulance je chlapec M. R., kterému byla pomocí celoexomového sekvenování identifikována homozygotní varianta c.1562G>C/p. R521P v genu *MEGF10*, která dosud nebyla popsána a je prozatím klasifikována jako varianta neznámého významu.

1.3.1. MEGF10

Je to protein transmembránového receptoru typu I, který je vysoce exprimován ve vyvíjejících se myoblastech, svalových satelitních buňkách, centrálním nervovém systému a sítnici. Mutace v MEGF10 způsobují autozomálně recesivní poruchu kosterního svalstva nazývanou myopatie, areflexie, respirační tíseň a dysfagie s časným nástupem (EMARDD), ale postižení pacienti nemají strukturální nebo funkční abnormality mozku, ani ztrátu zraku nebo známky neurogenního poškození. [7]

Chlapec M. R. vykazoval tyto i další znaky syndromu EMARDD, jak je shrnuto v tabulce 1.

Tabulka 1: Klinické znaky syndromu EMARDD a jejich výskyt u pacienta M. R.

EMARDD	Chlapec M. R.
Areflexie	ANO
Slabé sání, potíže s krmením	ANO
Kontraktury v oblasti krku	NEVÍ SE
Hypotonie od kojeneckého věku	NEVÍ SE
Hypomimie	ANO
Hypernasální řeč, rhinolalia	ANO
Gotické patro, rozštěp patra	ANO
Skolióza	ANO
Hyperlordóza	ANO
Respirační selhání	ANO
Svalová hypotrofie	ANO
Lehká CK před 10. rokem	ANO

Cílem této práce bylo pomocí metod genového inženýrství vytvořit plazmid se standardní variantou genu *MEGF10* a ten pak využít pro cílenou mutagenezi v tomto genu).

2. METODY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

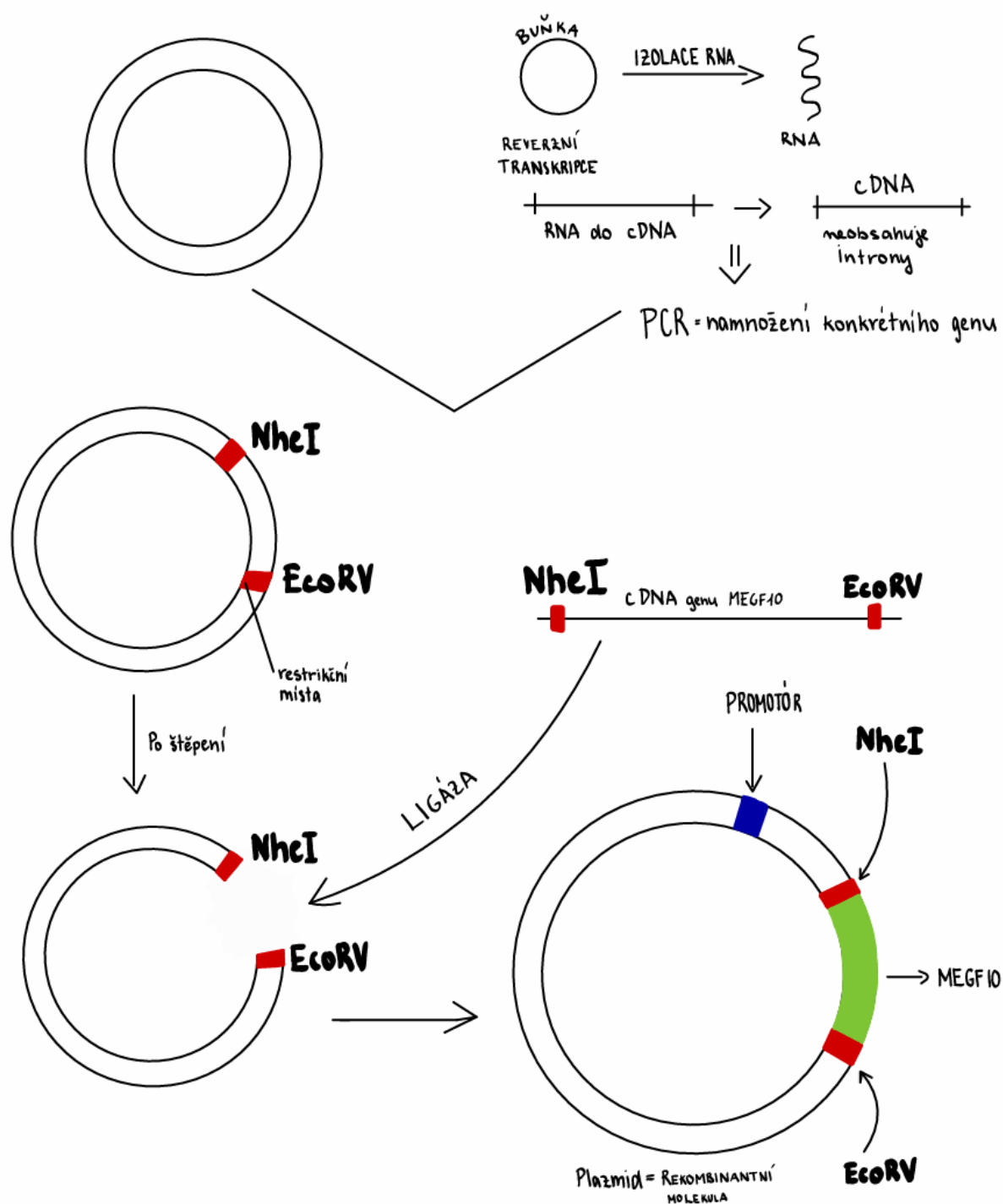
2.1. Příprava plazmidu exprimujícího protein *MEGF10*

Metody molekulární biologie a genového inženýrství přinášejí možnost uměle vytvářet nové nebo záměrně konstruovat takové sestavy genu v živých buňkách, které by nikdy nemohly vzniknout přirozenými procesy spojenými s rozmnožováním nebo mutacemi (nepřirozené molekuly DNA, tzv. rekombinantní molekuly). Je možné genovou DNA izolovat a vázat s genovou DNA jiného původu. Výslednou rekombinantní molekulu pak lze vnést do buněčného jádra příjemce, kde je nejen trvale udržována jako součást genomu, ale exprimovaná, produkuje v příjemcově buňce žádoucí nový, cizorodý protein. [2]

V první části tohoto projektu byl připraven plazmid s inzertovanou kódující sekvencí genu *MEGF10*. Jednotlivé kroky jsou schématicky znázorněny na obrázku 1 a dále detailně popsány.

Izolovaný plazmid

Příprava genu



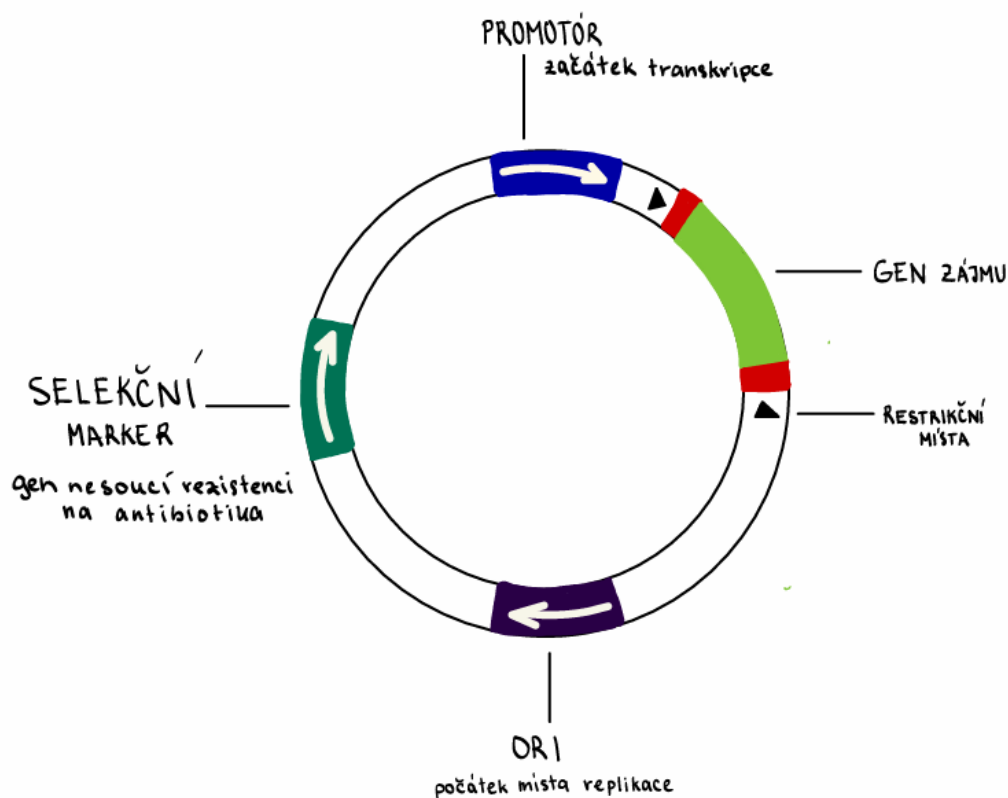
Obrázek 1: Schéma přípravy plazmidu exprimujícího protein MEGF10

2.1.1. Plazmidy

Plazmidy jsou malé kruhové fragmenty DNA, které jsou dvouvláknové. Přirozeně se vyskytují v bakteriích, nejsou pro bakterii životně nezbytné, ale přidávají jim nové vlastnosti nebo je určitým způsobem zvyhodňují, např. zajišťují rezistence na antibiotika. Termín plazmid byl zaveden Joshua Lederbergem v roce 1952. [8]

Nejčastěji používaným vektorem v molekulární biologii jsou právě proto, že se snadno přenášejí. V hostitelských buňkách dosahují vysokého počtu kopií a snadno se izolují. Klasické klonování pak představuje vyštěpení požadovaného úseku specifickou restriktázou a jeho přechištění ze směsi fragmentů vzniklých restrikčním štěpením DNA. Stejnou restriktázou je pak štěpen i příslušný vektor v klonovacím místě (MCS, z angl. multiple cloning site) a s pomocí DNA ligázy jsou obě komponenty spojeny za vzniku rekombinantní molekuly. [1, viz také obrázek 1] [1]

V tomto projektu byla kódující sekvence genu *MEGF10* klonována do expresního plazmidu pcDNA3.1, jehož struktura je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma struktury plazmidu pcDNA3.1 s vloženým genem zájmu

2.1.2. Izolace RNA

Ribonukleová kyselina (RNA) je biopolymer obvykle tvořený jedním řetězcem kovalentně vázaných nukleotidů, v tomto případě ribonukleotidů. Ribonukleotidy jsou tvořeny cukernou složkou-pentózou (D-ribóza), kombinací čtyř bází – purinové: adenin, guanin a pyrimidinové: cytosin, uracil a zbytkem kyseliny trihydrogenfosforečné. Stejně jako DNA je RNA v řetězci spojena 3-5 fosfodiesterovou vazbou. [1]

Typy RNA:

- 1) mRNA (mediátorové) je informační RNA, které je zodpovědné za přenos genetické informace z DNA do primární struktury proteinu
- 2) rRNA (ribosomové) tvoří jednu ze stavebních složek ribozomu, na kterých dochází k syntéze proteinu
- 3) tRNA (transferové) v procesu translace (překlada z mRNA) zajišťuje přenos navázaných aminokyselin z cytoplazmy na ribozomy

POSTUP:

K izolaci celkové RNA byl použit kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research). Izolace proběhla následovně: Nejprve bylo potřeba buňky rozsuspendovat a přidat 350 µl lyzačního roztoku TRI Reagent (Qiagen). Poté byla provedena centrifugace při 16000g/30 s, během níž se RNA zachytila na kolonku a přebývající tekutina byla odstraněna, potom bylo přidáno 400 µl pufru RNA Wash Buffer a následně byl vzorek opět centrifugován při 16000g/30 s.

V RNase-free zkuševce bylo smícháno 5 µl DNázy I a 75 µl pufru DNA Digestion Buffer a tato směs byla přidána na kolonku. Pak následovalo 15 minut inkubace při pokojové teplotě. Po skončení inkubace bylo přidáno 400 µl pufru PreWash do kolonky a byla zase provedena centrifugace při 16000g/30 s. Tento krok byl poté zopakován ještě jednou. Poté bylo přidáno 700 µl pufru RNA Wash Buffer a proběhla centrifugace při 16000g/2 min, při níž byl odstraněn přebývající pufr. Kolonka s navázanou a přečištěnou RNA byla přenesena do nové zkuševky. Pro eluci RNA bylo přidáno do kolonky 100 µl Nuclease-Free (NF) vody a znovu proběhla centrifugace při 16000g/30 s, při níž byla RNA uvolněna z kolonky. Její koncentrace byla změřena na spektrofotometru Nanodrop 2000. Během měření byla ověřena také čistota RNA.

Izolovaná RNA měla koncentraci 193 ng/µl.

2.1.3. Přepis RNA do cDNA

cDNA je komplementární DNA, odtud pochází zkratka c z anglického complementary, je to DNA syntetizovaná reverzní transkriptázou podle mRNA.

cDNA byla získána přepisem izolované RNA pomocí kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

RNA o koncentraci 193 ng/μl byla naředěna na 100 ng/μl. Poté byl připraven 2x master mix (MM) pro reverzní transkripci (RT; dle tabulky 2). Následně bylo napipetováno 10 μl MM na reakci (8jamkový strip) a k tomu bylo přidáno 10 μl naředěné RNA. Strip byl krátce centrifugován a poté byly vzorky vloženy do termocykleru (Biorad), kde proběhl přepis cDNA podle teplotních kroků uvedených v tabulce 3. Po celou dobu přípravy reakce pro RT bylo potřeba pracovat na ledě nebo na chlazených stojácích.

Tabulka 2: Složení 2x MM pro jeden vzorek.

10x RT pufr	2 μl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 μl
10x náhodné primery pro RT	2 μl
MultiScribe reverzní transkriptáza	1 μl
NF (Nuclease Free) H ₂ O	4,2 μl
Celkový objem	10 μl

Tabulka 3: Přepis RNA do cDNA (reverzní transkripce).

	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Teplota (°C)	25	37	85	4
Čas (min)	10	120	5	∞

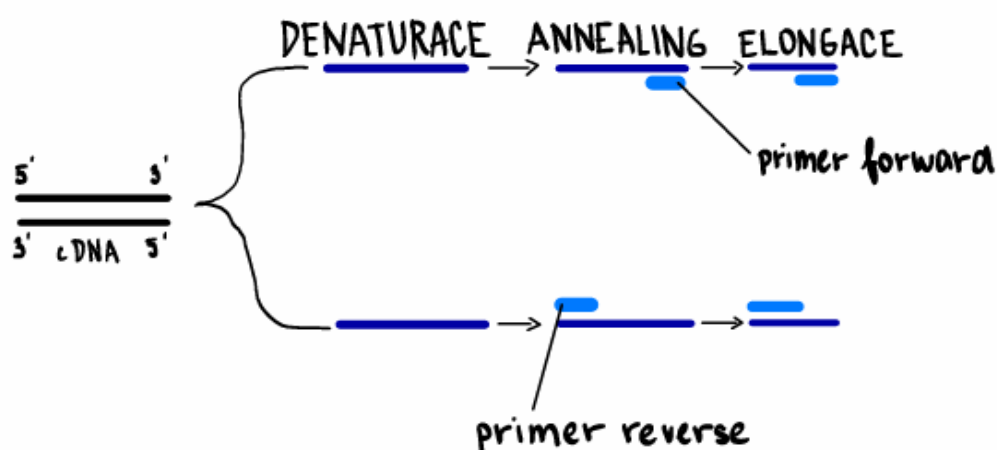
Přepsaná cDNA byla použita pro následnou polymerázovou řetězovou reakci (PCR) jako templát.

2.1.4. Polymerázová řetězová reakce

PCR (z angl. polymerase chain reaction) je metoda, která umožňuje amplifikovat (zmnožit) specifický úsek nukleové kyseliny, přitom využívá obecných rysů replikace DNA.

Podstatou dané metody je mnohonásobná syntéza komplementárního řetězce příslušnou polymerázou, a to v rámci sekvence vymezené krátkými syntetickými oligonukleotidy, tzv. primery, které jsou odvozeny od příslušné sekvence. Polymerázy, které se používají pro PCR jsou taktéž přirozenými enzymy, jsou izolovány z bakterií. Mezi sebou se liší reakčními podmínkami a aktivitou, čímž dovolují metodu částečně přizpůsobit konkrétním požadavkům.

V praxi se PCR metoda provádí v přístroji, termocykleru, který je schopen v krátkém časovém úseku měnit teploty reakční směsi dle požadovaných podmínek v závislosti na jednotlivých krocích reakce. V případě, že je PCR používána pro amplifikaci dvouřetězcové DNA (dsDNA), je tato dvouřetězcová DNA vstupující do reakce nejdříve denaturována vysokou teplotou (94-98 °C), vodíkové můstky mezi bázemi komplementárních řetězců jsou přerušeny. V dalším kroku na přístupné komplementární sekvence nasedají syntetické primery, a to při specifické teplotě T_a (tzv. annealing temperature, 50-65 °C) dané nukleotidovou sekvencí primeru. Annealing temperature představuje teplotu, při níž dochází k tvorbě vodíkových můstků mezi komplementárními sekvencemi primeru a templátu ze dvouřetězce. Primery vymezují amplifikovanou oblast a poskytují volné 3' OH konce pro následnou syntézu komplementárního řetězce (tzv. elongace) příslušnou polymerázou za specifických podmínek, především teploty (65-75 °C) a iontové síly. Tento cyklus se několikrát opakuje (25 - 35x). Řetězce, které vznikly v průběhu jednoho cyklu, slouží vždy jako templáty pro syntézu komplementárních řetězců v dalším cyklu. Schematicky je PCR znázorněna na obrázku 3. [1]



$$2^1 = 2 \text{ kopie} \quad 2^{25} = 33\,554\,432 \text{ kopií}$$

Obrázek 3: Schématické znázornění PCR.

POSTUP:

Jako templát byla použita cDNA (komplementární DNA, která vznikla reverzní transkripcí). Pro amplifikaci DNA byla použita polymeráza Q5 High Fidelity obsažená v pufru NEB Next Ultra II Q5 MasterMix (New England Biolabs). Složení reakce a průběh PCR jsou shrnuty v tabulkách 4 a 5.

Sekvence primerů:

Primer forward (NheI)	5'CAAgctagcCGCCTGAAAGAAGACTCCCA 3'
Primer reverse (EcoRV)	5'GGGTTgatatcGCTACCAAGCGGTCCTTTG 3'

(malými písmeny je označeno rozpoznávací místo pro dané enzymy)

Tabulka 4: složení reakce

2 x Q5 mastermix	12,5 µl
10 uM primer 1 (forward)	1,25 µl
10 uM primer 2 (reverse)	1,25 µl
cDNA (100 ng/µl)	1 µl
NF H ₂ O	9 µl

Tabulka 5: podmínky reakce

Iniciační denaturace	98 °C/2 min
35x cyklus	
DENATURATIONE	98 °C/ 10 s
ANNEALING	56 °C/15 s
ELONGACE	72 ° C/ 2 min 30 s
Závěrečná elongace	72 ° C/ 5 min
Chlazení	10 ° C/ ∞

2.1.5. Izolace PCR produktu z gelu

2.1.5.1. Gelová elektroforéza nukleových kyselin

V molekulární biologii se nejběžněji k separaci nukleových kyselin a proteinu využívá elektroforézy. Ta využívá pohybu nabitých molekul v elektrickém poli, přičemž hlavní náboj je dán záporně nabitými fosfátovými skupinami.

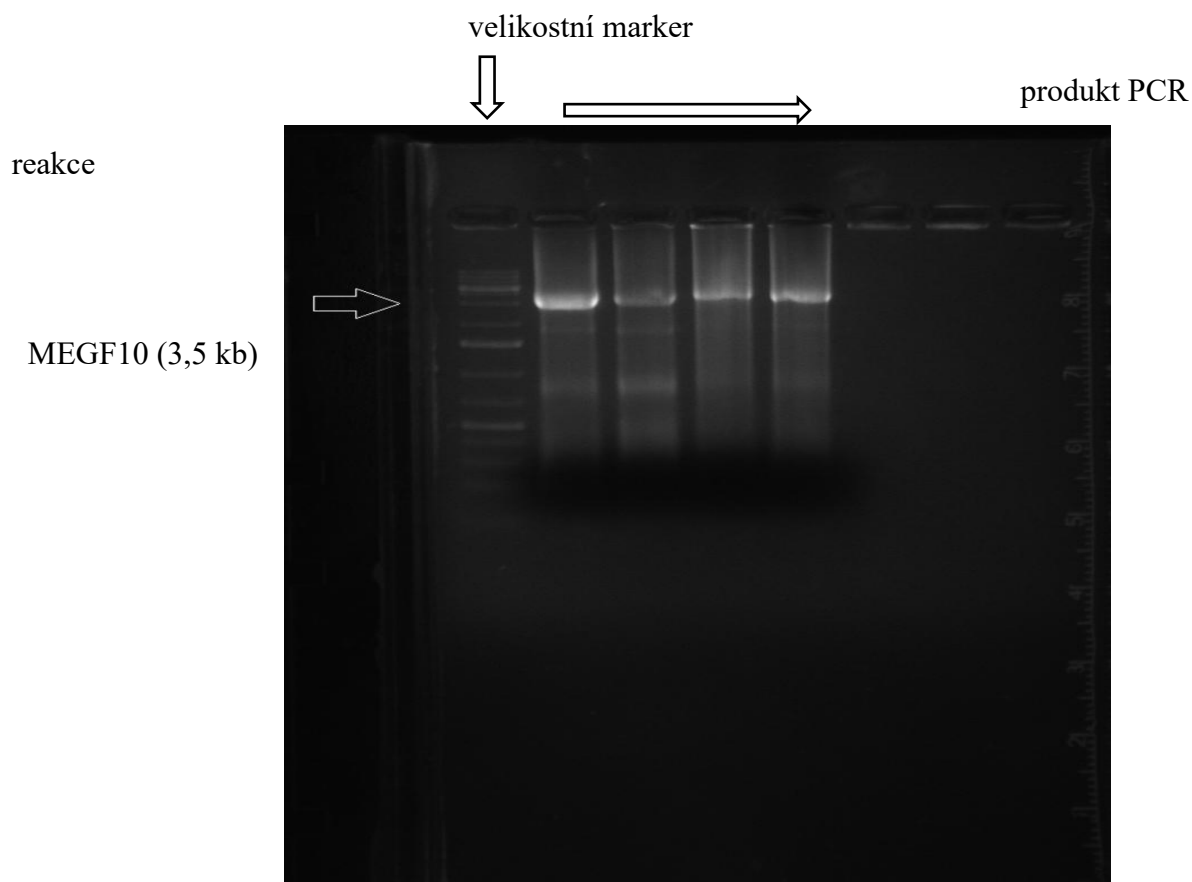
Elektroforéza nukleových kyselin nejčastěji probíhá v gelovém nosiči z agarózy nebo polyakrylamidu, přičemž gel tvoří tzv. molekulární síto, v němž se molekuly pohybují rychlostí závislou na jejich molekulové hmotnosti. Agarózové gely se v praxi používají k separaci molekul o velikosti 100 bp až několik kb, polyakrylamidové gely pak pro menší molekuly o velikosti 10-1 000 bp. Také platí, že čím je gel koncentrovanější, tím vyšší je separační citlivost, tedy lze odlišit molekuly o menším rozdílu v molekulové hmotnosti. Rychlost pohybu je rovněž závislá na konformaci DNA, přičemž kružnicové molekuly (plazmidy) se v gelu pohybují rychleji než lineární molekuly o stejné délce.

Elektroforéza probíhá při určitém napětí, a to v prostředí elektroforetického pufru, který zajišťuje optimální iontové prostředí. Aby bylo možné se mezi separovanými fragmenty orientovat, probíhá elektroforéza společně s tzv. hmotnostními standardy (standardy velikosti). Jedná se o směs fragmentů známých velikostí stanovených sekvenováním, které se v příslušném množství nanesou do jedné či více jamek gelu. Po proběhnutí elektroforézy jsou fragmenty nukleových kyselin vizualizovány např. pomocí etidiumbromidu, červeného barviva, které se zachytává mezi sousední báze DNA a které po ozáření UV světlem (o vlnové délce 240-260 nm) fluoreskuje. Moderní přístupy využívají netoxických komerčních barviv.

Elektroforéza také slouží např. pro ověření vzniku fragmentů DNA při restrikční analýze nebo produktu PCR a lze pomocí ní sledovat i změnu mobility DNA fragmentů při interakci s proteiny. [1]

2.1.5.2. Příprava gelu

1 % agarózový gel byl připraven rozvařením 1 g agarózy ve 100 ml pufru TBE v mikrovlnce, po zchladnutí bylo přidáno 5 µl MidoriGreen (Nippon Genetics) a gel byl nalitý do připravené aparatury a do něj byl vložen hřebínek. Gel byl ponechán tuhnout při pokojové teplotě přibližně 30 minut, poté byl gel umístěn do elektroforetické aparatury s pufrem TBE, byl vytáhnutý hřebínek, do vytvořených jamek byl vnesen vzorek (v tomto případě roztok po proběhnutí PCR) smíchaný s nanášecím pufrem 1:5 (New England Biolabs), poté byla aparatura zapojena do zdroje. Elektroforéza poté probíhala po dobu přibližně 30 minut při napětí 90 V. Následně byl gel vizualizován v transluminátoru (obrázek 4).



Obrázek 4: PCR MEGF10-fotka gelu

Požadovaný DNA fragment (v tomto případě produkt PCR reakce o požadované velikosti, znázorněno šipkou) byl získán vyříznutím z agarózového gelu pomocí skalpelu pod UV zářením. Vyříznutý úsek byl zvážen a přidán do čisté zkumavky. Izolace DNA proběhla pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (Qiagen). K vyříznutému gelu byl přidán pufr QC Buffer o objemu v ml odpovídajícímu číselnému trojnásobku jeho hmotnosti v mg a následně byl inkubován při 50 °C po dobu přibližně 10 minut (dokud se gel zcela nerozpustil). Poté byl k roztoku přidán isopropanol (o objemu v ml odpovídajícímu číselné hodnotě hmotnosti vyříznutého gelu v mg). Následně byl vzorek přenesen na kolonku a proběhla centrifugace (17900g/ 1 min). V dalším kroku byla DNA přečištěna pomocí 750 μ l promývacího pufru PE, který byl přidán do kolonky, inkubován po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Následně byl vzorek centrifugován (17900g/1 min), poté byl odstraněn zbytek pufru a pak proběhla znovu centrifugace (17900 g/1 min) pro důsledné odstranění pufru. Kolonka byla umístěna do nové zkumavky. DNA byla centrifugací uvolněna do 30 μ l elučního pufru (17900g/1 min).

2.1.6. Izolace plazmidu

První den bylo naočkováno přibližně 10 µl bakteriální suspenze nesoucí požadovaný plazmid do 5 ml média LB obsahujícího selekční antibiotikum ampicilin v koncentraci 100 µg/ml. Následující den byl z narostlé bakteriální kultury plazmid izolován pomocí kitu (ZymoPURE Plasmid Miniprep Zymo Research).

Bakteriální kultura byla nejprve centrifugována při 2500g/5 min. Pelet byl následně rozsuspendován ve 250 µl pufru ZymoPURE™ P1. Poté bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru ZymoPURE™ 2, směs byla jemně promíchána převrácením v ruce a ponechána při pokojové teplotě do kompletní lýze bakterií (zprůhlednění roztoku), maximálně však 3 minuty. Poté byl přidán neutralizační pufr ZymoPURE™ 3 a směs byla znovu převrácením promíchána do ukončení neutralizace. Následně proběhla centrifugace při 16000g/5 min a přesně 600 µl supernatantu bylo odebráno a přeneseno do čisté zkumavky. K supernatantu bylo přidáno 260 µl ZymoPURE™ Binding Buffer a směs byla důkladně promíchána na vortexu po dobu 15 sekund. Na kolonku Zymo-Spin™2-PX Column umístěnou do sběrné zkumavky byla přenesena celá směs a inkubována při laboratorní teplotě po dobu jedné minuty, poté proběhla centrifugace při 16000g/1 min. Roztok prošlý přes kolonku byl odstraněn a k DNA navázané na kolonku byly postupně přidány promývací pufrы. Nejprve bylo přidáno 800 µl ZymoPURE™ Wash 1 a centrifugováno při 16000g/1 min, poté bylo přidáno 200 µl ZymoPURE™ Wash 2 a znovu centrifugováno při 16000g/1min. Roztoky prošlé přes kolonku byly pokaždé odstraněny. Pro úplné odstranění zbylého roztoku proběhla centrifugace bez promývacího pufru a kolonka byla následně přemístěná do čisté zkumavky. Sem bylo poté přidáno 25 µl ZymoPURE™ Elution Buffer a inkubováno po 2 minuty při laboratorní teplotě. Poté proběhla poslední centrifugace při 16000g/1 min, při níž byla plazmidová DNA uvolněna z kolonky do roztoku. Koncentrace izolované plazmidové DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop 2000. Během měření byla ověřena také její čistota.

Koncentrace výsledného plazmidu byla 200 ng/µl.

2.1.7. Štěpení restrikčními endonukleázami NheI a EcoRV

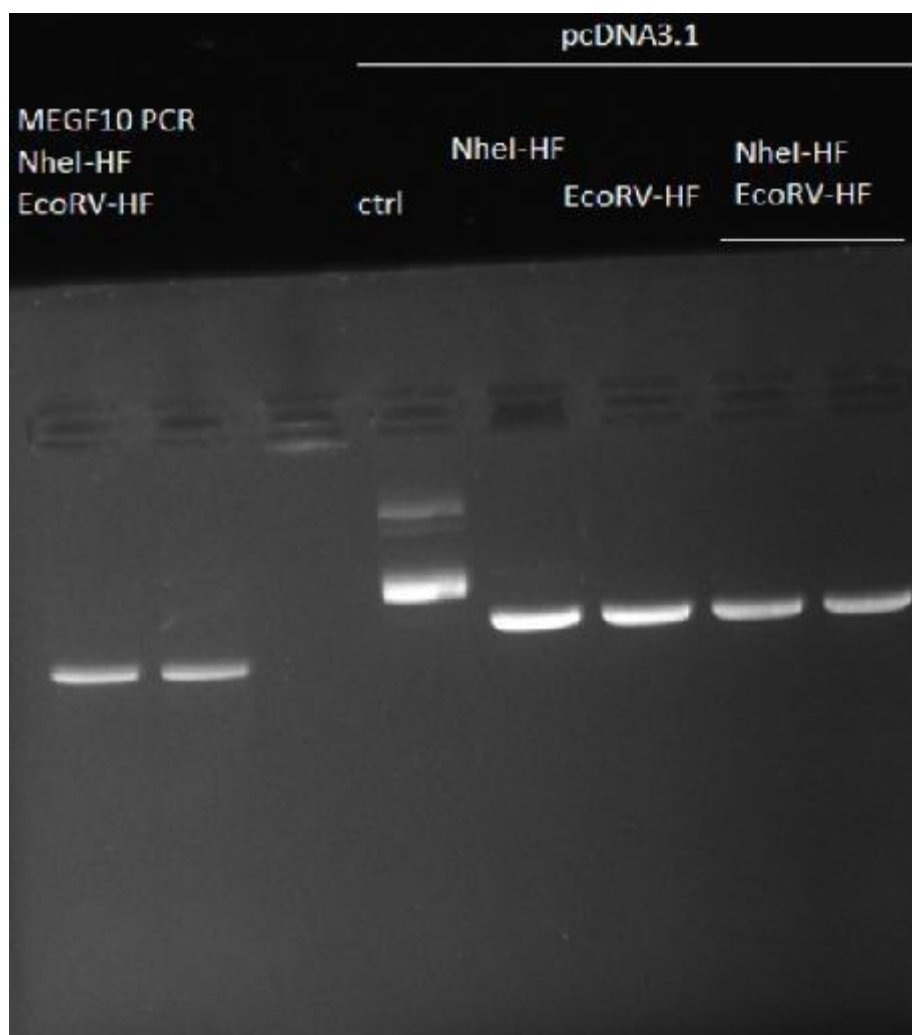
Izolovaný plazmid a cDNA genu *MEGF10* namnožená pomocí PCR (kapitola 2.1.4.) byly poté štěpeny restrikčními endonukleázami NheI a EcoRV (New England Biolabs). Složení reakce je popsáno v tabulkách 6 a 7. Štěpení probíhalo při 37 °C/1 h.

Tabulka 6: Složení reakční směsi při štěpení plazmidu.

10x rCut buffer	2 µl
Plazmid	5 µl
NheI	1 µl
EcoRV	1 µl
NF H ₂ O	11 µl

Tabulka 7: Složení reakční směsi při štěpení produktu PCR – cDNA genu *MEGF10*.

10x rCut buffer	2,5 µl
PCR produkt	15 µl
NheI	1 µl
EcoRV	1 µl
NF H ₂ O	5,5 µl



Obrázek 5: Štěpení pcDNA3.1 a MEGF10 PCR restrikčními endonukleázami NheI a EcoRV

Po štěpení byl celý reakční objem vizualizován pomocí agarózové elektroforézy (kapitola 2.1.5.1.) a štěpený plazmid i kódující sekvence genu *MEGF10* byly izolovány z gelu (kapitola 2.1.5.2.) a následně ligovány.

2.1.8. Ligace

Ligace představuje vložení inzertu (produktu PCR) do štěpeného plazmidu a spojení těchto dvou úseků DNA do jedné kružnicové molekuly pomocí enzymu ligázy.

Složení reakce a postup jsou popsány v tabulce 8.

Tabulka 8: Ligace štěpeného produktu PCR a plazmidu.

NF H ₂ O	14μl
Plazmid štěpený NheI, EcoEV	1 μl
Produkt PCR štěpený NheI, EcoEV	2 μl
ponechána 5 minut	45 °C
přemístěna na led	
10 x pufr T4	2 μl
Enzym T4 DNA ligáza	1 μl
Inkubace při pokojové teplotě	10 min

2.1.9. Transformace kompetentních bakterií

Ligační směs byla použita k transformaci bakterií, v nichž je vytvořený konstrukt (plazmid s inzertem) uchovávan a amplifikován. Pro další použití pak může být plazmid opět izolován (viz kapitola Izolace plazmidu 2.1.6.). Nejčastějším bakteriálním příjemcem je *Escherichia coli*, při transformaci jsou bakteriální buňky nejprve přivedeny vyhladověním do stavu kompetence, ve kterém jsou schopny při teplotním šoku přijímat z roztoku exogenní DNA.

Postup:

Smíchání 10 ul bakteriální suspenze kompetentních *E. coli* (New England Biolabs) a 1 ul ligační směsi na ledu a poté inkubováno s teplotním šokem při podmínkách uvedených v tabulce 9.

Tabulka 9: Podmínky teplotního šoku při transformaci bakterií.

30 min	led
40 s	42 °C
5 min	led

Poté bylo k suspenzi přidáno 950 µl růstového média SOC (New England Biolabs) a bakterie byly kultivovány na třepačce při 37 °C/220 rcf po dobu 60 min. Následně byla kultura stočena na centrifuze (500g/1 min) a bylo odebráno 900 ul média. Pelet byl rozsuspendován ve zbytku média, přenesen na plotnu s tuhým LB obsahujícím ampicilin o koncentraci 100 ug/ml a bakteriální hokejkou rovnoměrně rozetřen. Plotna byla inkubována přes noc při 37 °C. Přes noc narostly na plotně s LB médiem obsahujícím ampicilin jako selekční marker kolonie bakterií nesoucí plazmid pcDNA3.*IMEGF10*.

Jedna kolonie byla naočkována do tekutého LB média s ampicilinem, kultivována přes noc při 37 °C/220 rcf. Následující den byla část bakteriální suspenze zamrazena k uchování při – 80 °C a zbylá část byl centrifugována při 20000 g/5 min. Z peletu byl izolován plazmid postupem uvedeným v kapitole 2.6. a zaslán do společnosti SeqMe pro ověření sekvence vloženého insertu.

Sekvenační primery jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Sekvenační primery

CMV Fw	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
MEGF10_553Fw	GAGCAGGGCACCTATGGTAA
MEGF10_1147Fw	ATGTCTGGAGAGTGTGCCTG
MEGF10_1751Fw	CCCTGCCCTGCTACTGTAAA
MEGF10_2352Fw	ACGGCACTGTGAGCAGAAGT
MEGF10_2958Fw	GAAACATGGCGGCTACCTC

Sekvenování potvrdilo, že byl vytvořen expresní plazmid s kódující sekvencí genu *MEGF10* shodnou se referenční sekvencí uvedenou v datábazi Národního centra pro biotechnologické informace Spojených států amerických. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

CDS (kódující oblast) genu *MEGF10*:

ATGGTTATTTCTTTGAACTCATGCCTGAGCTTTATTTGTTTATTGTTATGCCACTGGA
TTGGGACAGCATCACCTCTGAATCTTGAAGACCCTAATGTGTGTAGCCACTGGGAA
AGCTACTCAGTGACTGTGCAAGAGTCATACCCACATCCCTTTGATCAAATTTACTAC
ACGAGCTGCACTGACATTCTAAACTGGTTTAAATGCACGCGGCACAGAGTCAGCT
ATCGGACAGCCTATCGACATGGGGAGAAGACTATGTATAGGCGCAAGTCTCAGTGT
TGTCCTGGATTTTATGAAAGCGGGGAAATGTGTGTCCCCCACTGTGCTGATAAATG
TGTCCATGGTCGCTGTATTGCTCCAAACACCTGTCAGTGTGAGCCTGGCTGGGGAG
GGACCAACTGCTCCAGTGCCTGCGATGGTGATCACTGGGGTCCCCACTGCACCAG
CCGGTGCCAGTGCAAAAATGGGGCTCTGTGCAACCCCATCACCGGGGCTTGCCAC
TGTGCTGCGGGCTTCCGGGGCTGGCGCTGCGAGGACCGCTGTGAGCAGGGCACCT
ATGGTAACGACTGTCATCAGAGATGCCAGTGCCAGAATGGAGCCACCTGCGACCA
CGTCACGGGGGAATGCCGCTGCCCACCAGGATACACCGGAGCCTTCTGTGAGGAT
CTTTGTCCTCCTGGTAAACATGGTCCACAGTGTGAGCAGAGATGCCCTTGTCAAAA
TGGAGGAGTGTGTCATCACGTCACTGGAGAATGCTCTTGCCCTTCTGGCTGGATGG
GCACAGTGTGTGGTCAGCCTTGCCCCGAGGGTCGCTTTGGAAAGAACTGTTCCCA
AGAATGCCAGTGCCATAATGGAGGGACGTGTGATGCTGCCACAGGCCAATGTCATT
GCAGTCCAGGATACACAGGGGAACGGTGCCAGGATGAGTGTCTGTTGGGACCTA
TGGCGTTCTCTGTGCTGAGACCTGCCAGTGTGTCAACGGAGGGGAAGTGTTACCAC
GTGAGCGGCGCATGCCTCTGTGAAGCAGGCTTTGCTGGCGAGCGCTGCGAAGCAC
GCCTGTGTCCTGAGGGGCTCTACGGCATCAAATGTGACAAACGGTGTCCCTGCCA
CCTGGAAAACACTCATAGCTGTCACCCCATGTCTGGAGAGTGTGCCTGCAAGCCG
GGCTGGTCAGGACTCTACTGTAATGAGACATGTTCTCCTGGATTCTACGGGGGAAGC

TTGCCAGCAGATCTGCAGCTGCCAAAATGGGGCAGACTGTGACAGTGTGACTGGA
AAGTGCACCTGTGCCCCAGGATTCAAAGGAATTGACTGCTCTACCCCATGCCCTCT
GGGAACCTATGGGATAAACTGTTCCCTCTCGCTGTGGCTGTAAAAATGATGCAGTCT
GCTCTCCTGTGGACGGGTCTTGTACTTGCAAGGCAGGCTGGCACGGGGTGGACTG
CTCCATCAGATGTCCCAGTGGCACATGGGGCTTTGGCTGTAACTTAACATGCCAGT
GCCTCAACGGGGGAGCCTGCAACACCCTGGACGGGACCTGCACGTGTGCACCTG
GATGGCGCGGGGAGAAATGCGAACTTCCCTGCCAGGATGGCACGTACGGGGCTGAA
CTGTGCTGAGCGCTGCGACTGCAGCCACGCAGATGGCTGCCACCCTACCACGGGC
CATTGCCGCTGCCTCCCCGGATGGTCAGGTGTCCACTGTGACAGCGTGTGTGCTGA
GGGACGCTGGGGCCCCAACTGCTCCCTGCCCTGCTACTGTAAAAATGGGGCTTCAT
GCTCCCCTGATGATGGCATCTGCGAGTGTGCACCAGGCTTCCGAGGCACCACTTGT
CAGAGGATCTGCTCCCCTGGTTTTTATGGGCATCGCTGCAGCCAGACATGCCCCA
GTGCGTTCACAGCAGCGGGCCCTGCCACCACATCACCGGCCTGTGTGACTGCTTG
CCTGGCTTCACAGGCGCCCTCTGCAATGAAGTGTGTCCCAGTGGCAGATTTGGGA
AAAATGTGCAGGAATTTGTACCTGCACCAACAACGGAACCTGTAACCCCATGA
CAGATCTTGTGAGTGTACCCCGGTTGGATTGGCAGTGAAGTGTCTCAACCATGTC
CACCTGCCCCACTGGGGCCCCAACTGCATCCACACGTGCAACTGCCATAATGGAGC
TTTCTGCAGCGCCTACGATGGGGAATGTAAATGCACTCCTGGCTGGACAGGGCTCT
ACTGCACTCAGAGATGTCCTCTAGGGTTTTATGGAAAAGATTGTGCACTGATATGC
CAATGTCAAAACGGAGCTGACTGCGACCACATTTCTGGGCAGTGTACTTGCCGCA
CTGGATTTCATGGGACGGCACTGTGAGCAGAAGTGCCCTTCAGGAACATATGGCTAT
GGCTGTGCGCCAGATATGTGATTGTCTGAACAACCTCCACCTGCGACCACATCACTGG
GACCTGTTACTGCAGCCCCGGATGGAAGGGAGCGAGATGTGATCAAGCTGGTGTT
ATCATAGTTGGAAATCTGAACAGCTTAAGCCGAACCAGTACTGCTCTCCCTGCTGA
TTCCTACCAGATCGGGGCCATTGCAGGCATCATCATTCTTGTCCTAGTTGTTCTCTT
CCTACTGGCATTGTTTCATTATTTATAGACACAAGCAGAAGGGAAAGGAATCAAGCA
TGCCAGCAGTTACCTACACCCCTGCTATGAGGGTCGTCAATGCAGATTATAACATTT
CAGGAACCCTTCCTCACAGCAATGGTGGAACGCTAATAGCCACTACTTCACCAAT
CCCAGTTACCACACGCTCACCCAGTGTGCCACATCCCCTCACGTCAACAACAGGG
ACAGGATGACTGTCACGAAGTCAAAAAACAATCAACTGTTTGTGAATCTTAAAAA
TGTGAACCCTGGGAAGAGAGGGCCCTGTGGGGGACTGCACTGGGACATTGCCGGCT
GACTGGAAACATGGCGGCTACCTCAACGAGCTCGGTGCTTTTGGACTTGACAGAA
GCTATATGGGAAAATCCTTAAAAGACCTGGGAAAGAATTCTGAATATAATTCAAGT
AACTGCTCCCTAAGCAGTTCTGAGAACCCATATGCCACTATTAAAGACCCACCTGT
ACTTATCCCGAAAAGCTCAGAGTGTGGTTATGTGGAGATGAAATCGCCGGCACGA
AGAGATTCCCCATATGCAGAGATCAATAACTCAACTTCAGCCAACAGGAATGTCTA
TGAAGTTGAACCTACAGTGAGTGTGTCCAAGGAGTATTCAGCAATAATGGGCGTC
TCTCCAGGATCCATATGACCTCCCCAAAGAACAGTCACATCCCTTGTCATTATGACC
TGCTGCCAGTCCGAGACAGTTCATCCTCCCCTAAGCAAGAGGACAGTGGTGGTAG
CAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGTGAATGA

2.2. CÍLENÁ MUTAGENEZE V GENU MEGF 10

2.2.1. Mutace

Mutace jsou změny genotypu vedoucí ke vzniku nových genových forem, tzv. alel, které v konečném důsledku nemusí vykazovat žádný nebo jen minimální vliv na fenotyp, nebo mohou závažným způsobem narušit fungování buňky. [1]

K mutacím dochází v malé frekvenci spontánně, jejich výskyt je náhodný a velmi nízký např. četnost spontánních mutací se odhaduje na 10^{-5} až 10^{-10} pro jeden gen za jednu generaci, nebo mohou být indukovány nejrůznějšími faktory, tzv. mutageny. Četnost mutací se liší podle druhu organismu, je závislá na prostředí, v němž se organismus vyskytuje, a úzce souvisí též s rychlostí rozmnožování, životními podmínkami a zdravotním stavu organismu. [1]

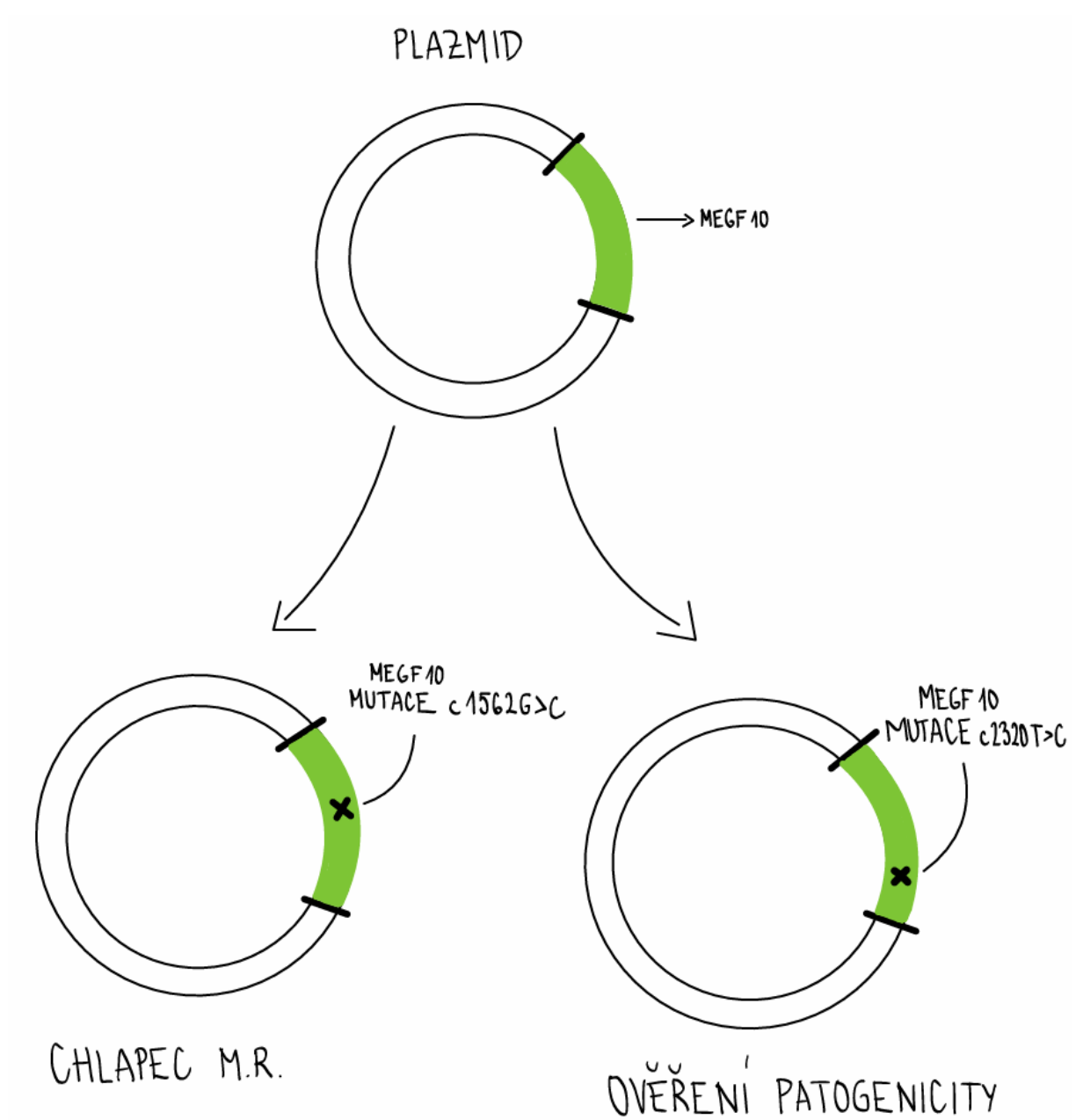
Mezi fyzikální mutageny patří všechny typy ionizujících záření (UV záření, rentgenové záření), z chemických mutagenů (*chemomutagenů*) jsou známy již tisíce anorganické a organické povahy (aromatické chlorované deriváty, alkaloidy, peroxidy). [3]

Genové mutace zahrnují změny struktury jediného genu, mění se struktura DNA, ale nenarušuje se celistvost stavby chromozomu, příčinou může být: [4]

- záměna páru nukleotidů jiným
- ztráta nukleotidového páru
- výskyt nadbytečného páru
- výskyt nefunkčního nukleotidu (s pozměněnou chemickou strukturou)

Většina genových mutací své nositele poškozuje. Část mutací je v daném prostředí bez významu a nepatrná část mutací je pro nositele výhodná v daném prostředí. V tomto případě jsou mutace vnitřním zdrojem dědičné proměnlivosti, zvyšují přizpůsobivost druhu a vytvářejí tak jeden ze základních předpokladů evoluce. [3]

Cílená mutageneze umožňuje na rozdíl od spontánní mutageneze pozměnit pomocí molekulárně biologických metod zcela konkrétní místo v genomu. Cílem této práce bylo vytvořit specifické mutace v genu *MEGF10* – c.1562G>C (mutace nalezená u chlapce M. R.) a c.2320 T>C (známá patogenní mutace způsobující nemoc EMARDD), jak je schematicky znázorněno na obrázku 6. Pro mutagenezi byl využit plazmid pcDNA3.1*MEGF10* připravený v první části práce.



Obrázek 6: Schéma cílené mutagenéze v CDS genu *MEGF10*.

2.2.2. Mutageneze

K cílené mutagenezi byl použit kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs). Nejprve byla provedena PCR s mutagenními primery, které do genu *MEGF10* zanesly požadované mutace. Jako templát byl použitý plazmid pcDNA3.1*MEGF10* vytvořený v první části práce. Složení a podmínky reakce a sekvence primerů (č. 1: c.1562G>C, č. 2: c.2320 T>C) jsou uvedeny v následujících tabulkách 11, 12, 13, 14.

Tabulka 11: Složení reakce PCR pro cílenou mutagenezi.

5x EliZyme pufr	5 μ l
10 uM primer fw 1/2	1 μ l
10 uM primer rev 1/2	1 μ l
Plazmid 0,5 ug	0,8 μ l
Polymeráza EliZyme HIFI	0,5 μ l
NF H ₂ O	16,7 μ l

Tabulka 12: Podmínky reakce PCR pro cílenou mutagenezi.

Iniciační denaturace	95°/2 min
30x cyklus	
Denaturace	95°/15 s
Annealing	68°/15 s
Elongace	72°/5 min
Závěrečná elongace	72°/5 min
Chlazení	10°/ ∞

Tabulka 13: Sekvence primerů pro mutagenezi c.1562G>C/p.R521P.

Primer fw 2	GATGGCCGGGGAGAAATGC
Primer rev 2	CAGGTGCACACGTGCAGGTCC

Tabulka 14: Sekvence primerů pro mutagenezi c.2320 T>C/p.C774R

Primer fw 1	GCAGCGTACTTGCCGCACTGG
Primer rev 1	CCAGAAATGTGGTCGCAGTCAGC

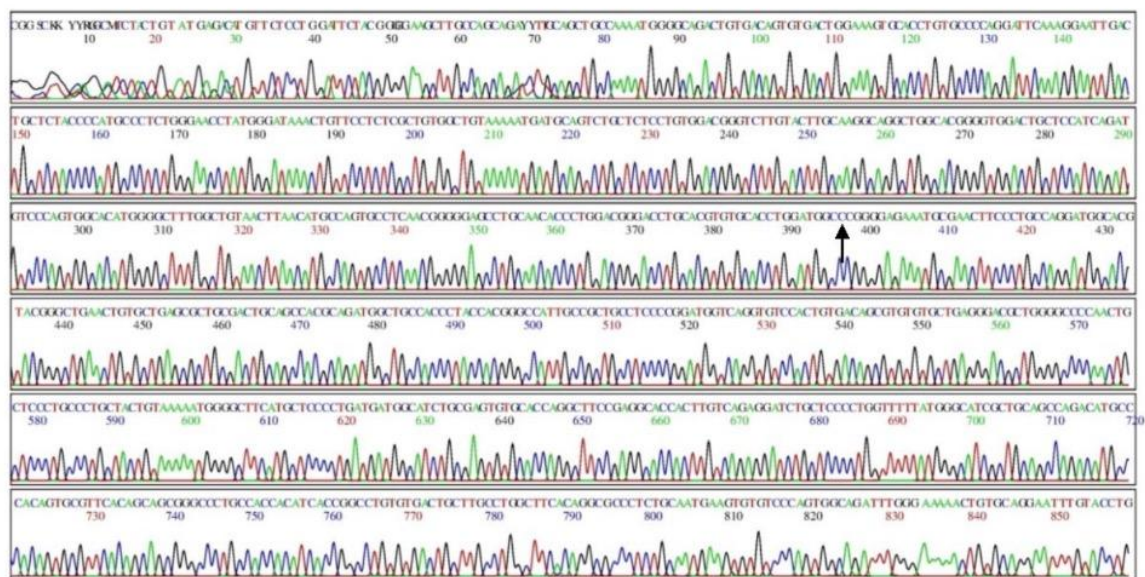
2.2.3. KLD reakce

Po proběhnutí PCR byl produkt reakce využit k následné „KLD“ reakci. Písmena K, L a D označují enzymy (kináza, ligáza a enzym DpnI), které umožňují ligaci nově syntetizovaných molekul DNA s vnesenou konkrétní mutací zpět do kružnicového plazmidu a odstranění původního plazmidu s nemutovanou sekvencí. Složení reakce je popsáno v tabulce 15.

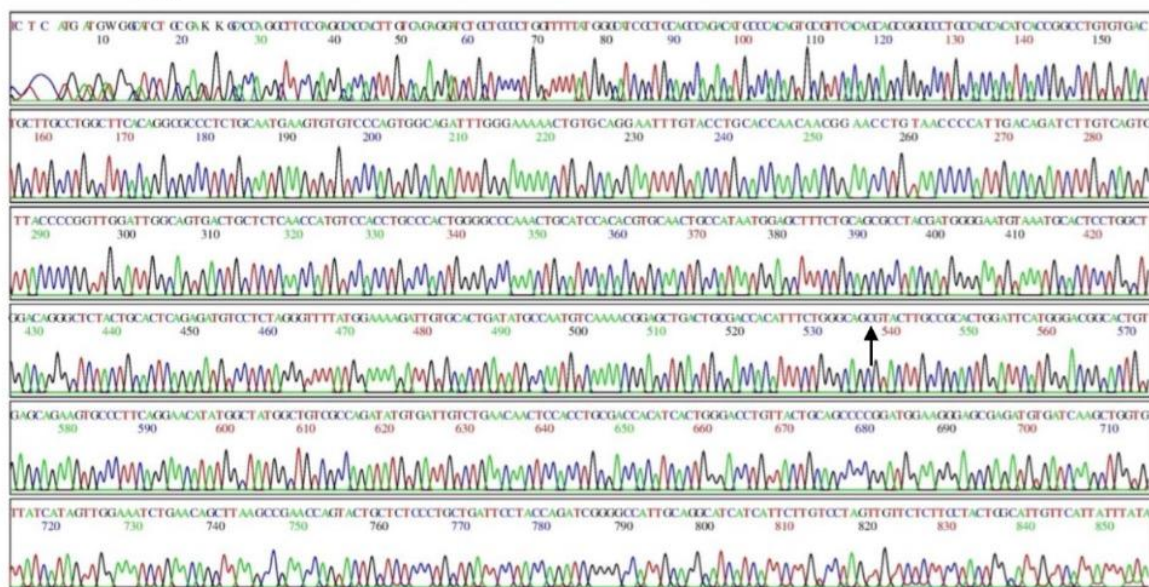
Tabulka 15: Složení KLD reakce.

PCR Product	1 μ l
2x KLD Reaction Buffer	5 μ l
10x KLD Enzyme Mix	1 μ l
Nuclease-free Water	3 μ l

Takto připravená směs byla ponechána 10 min při pokojové teplotě a ihned poté využita pro transformaci bakterií. 2 μ l KLD směsi byly přidány k 10 μ l kompetentních bakterií, samotná transformace a následná izolace plazmidů byly provedeny podle postupů popsanych v kapitolách 2.8. a 2.6. Izolované plazmidy byly poté zaslány do společnosti SeqMe, která sekvenací potvrdila úspěšné vnesení požadovaných změn v CDS genu *MEGF10*, jak je ukázáno na obrázcích 7 a 8.



Obrázek 7: Výsledek sekvenace plazmidu pcDNA3.1MEGF10 s mutací c.1562G>C



Obrázek 8: Výsledek sekvenace plazmidu pcDNA3.1MEGF10 s mutací c.2320T>C

V druhé části práce tedy byly cílenou mutagenézí úspěšně vytvořeny plazmidy pcDNA3.1MEGF10_c.1562G>C a pcDNA3.1MEGF10_c.2320T>C.

3. ZÁVĚR

Pomocí metod genového inženýrství se nám podařilo vytvořit tři plazmidy. V první části práce byl vytvořen plazmid se standardní variantou genu *MEGF10* a ve druhé části výzkumu byly vytvořeny dva plazmidy, které nesou specificky mutované varianty genu *MEGF10*. Jedna z těchto variant genu *MEGF10* byla objevena u pacienta M.R. jako dosud nepopsaná mutace, která je klasifikována jako varianta s neznámým významem. Druhý plazmid nese variantu genu, která je již známá svou patogenitou, a může proto sloužit jako kontrola při ověření patogenního dopadu mutací v tomto genu.

Vytváření expresního plazmidu, který nese gen s konkrétní mutací, se velmi často používá k ověřování patogenecity mutací. Vytvořené expresní plazmidy jsou přeneseny do buněčných linií a poté je sledován vliv exprese konkrétního mutovaného proteinu na buněčné procesy. Také patogenicita varianty genu *MEGF10* c.2320T>C byla ověřena podobným způsobem ve studii, která využívala cílených genových manipulací v myoblastech pro modelování dopadu patogenních mutací v těchto buňkách a zkoumání myších modelů k další charakterizaci buněčných funkcí *MEGF10* ve svalech. Autoři této práce zjistili, že *MEGF10* má velký význam na proliferaci a migraci myoblastů a tyto funkce mohou být v ohrožení při lidském svalovém onemocnění EMMARD. [7]

Plazmidy vytvořené při vypracovávání této práce budou proto sloužit k pozorování vlivu mutace c.1562G>C v genu *MEGF10* nalezené u pacienta M. R. na proliferaci a migraci myoblastů. Plazmidy se standardní variantou tohoto genu a plazmid s mutací c.2320T>C budou sloužit jako kontroly normální funkce proteinu (standardní varianta) a patologické funkce proteinu (varianta c.2320T>C). Tyto kontroly jsou potřeba také proto, že některé buněčné procesy mohou být ovlivněny nejenom expresí studovaného proteinu, ale i samotným procesem vnesení plazmidu do buněk.

Seznam literatury:

- [1] SLABÝ, Ondřej. Molekulární medicína. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
- [2] ŠMARDA, Jan. Genetika pro gymnázia. Praha: Fortuna, 2003. ISBN 80-7168-851-7.
- [3] JELÍNEK, Jan a ZICHÁČEK, Vladimír. Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část). 11. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2014. ISBN 978-80-7182-338-4.
- [4] BENEŠOVÁ, Marika. Odmaturuj! z biologie. 2., přeprac. vyd. Odmaturuj! Brno: Didaktis, c2013. ISBN 978-80-7358-231-9. [5] RNA. Online. <https://www.britannica.com/>
- [6] Ambulance pro dětské pacienty bez diagnózy. Online. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/detska-nemocnice/pediatrica-klinika/ambulance-pro-detske-pacienty-bez-diagnozy/t7743>. [cit. 2024-11-16].
- [7] Consequences of MEGF10 deficiency on myoblast function and Notch1 interactions. Online. Dostupné z: <https://academic.oup.com/hmg/article/26/15/2984/3819203>. [cit. 2024-11-16].
- [8] Plasmids-Definition, Properties, Structure, Types, Functions, Examples. Online. Dostupné z: <https://microbenotes.com/plasmids/>. [cit. 2024-11-16].