

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Tereza Jahodová

**Afinitní purifikace 5'-adenosinmonofosfátem aktivované proteinové
kinasy**

Affinity purification of 5' adenosine monophosphate-activated protein
kinase

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultantka: Ing. Jana Nováková

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Abstrakt

5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa je významným regulátorem buněčného metabolismu, růstu, proliferace, ale i například autofagie. Dle posledních výzkumů hraje důležitou roli i v patogenezi nervosvalového onemocnění myotonická dystrofie typu 1 a je možným terapeutickým cílem.

V této práci byly kultivovány diferencované a nediferencované lidské svalové buněčné linie zdravých jedinců a pacientů s myotonickou dystrofií typu 1. Předmětem práce je studium a porovnání hladin AMPK v kulturách zdravých a nemocných buněk. Dalším bodem práce je afinitní purifikace tohoto enzymu metodou imunoprecipitace pomocí magnetických kuliček s navázanou protilátkou a následně hmotnostně spektrometrická analýza purifikovaného vzorku. Jelikož se spolu s AMPK podařilo afinitně purifikovat i další proteiny její signalizační kaskády, je část práce věnována také popisu těchto interakcí a porovnání množství koimunoprecipitovaných proteinů ve zdravých a nemocných buňkách.

Klíčová slova

5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa, imunoafinitní precipitace, hmotnostní spektrometrie, relativní kvantifikace bílkovin

Abstract

5' adenosine monophosphate-activated protein kinase is an important regulator of cell metabolism, growth, proliferation, as well as autophagy. According to latest research, AMPK plays an important role in the pathogenesis of the neuromuscular disorder myotonic dystrophy type 1 and is a possible therapeutic target.

In this thesis, differentiated and proliferating human muscle cell lines from healthy individuals and myotonic dystrophy type 1 patients were cultivated. The thesis is focused on the study and comparison of AMPK levels in the cultures and affinity purification of AMPK using the method of immunoprecipitation with magnetic beads containing a bound antibody. The purified enzyme was analysed using mass spectrometry. Along with AMPK, parts of its signalling cascade were purified, a section of the thesis is therefore dedicated to the description of AMPK's interaction network and to the comparison of the levels of coimmunoprecipiated proteins in cells from healthy individuals and myotonic dystrophy type 1 patients.

[IN CZECH]

Key words

5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, immunoaffinity precipitation, mass spectrometry, label free quantification

[IN CZECH]

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala konzultantce Ing. Janě Novákové a vedoucímu práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za jejich mimořádnou vstřícnost a trpělivost. Také děkuji členům laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace v BIOCEVu za vřelé přijetí v kolektivu.

Obsah

1. Teoretická část.....	9
1.1. Myotonická dystrofie typu 1	9
1.1.1. Projevy onemocnění – molekulární úroveň.....	10
1.1.2. Terapeutické přístupy	13
1.2. 5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa	13
1.2.1. Vlastnosti a funkce v organismu	13
1.2.2. 5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa při myotonické dystrofii typu 1	17
1.2.3. Terapie myotonické dystrofie typu 1 pomocí aktivace 5'-adenosinmonofosfátem aktivované proteinové kinasy	18
2. Cíle práce.....	20
3. Experimentální část (metody)	21
3.1. Použité chemikálie	21
3.2. Roztoky (připravované pufrы a média)	22
3.3. Biologické vzorky	23
3.4. Použité přístroje a materiál	23
3.5. Použité softwarové prostředky	24
3.6. Kultivace buněčných linií	24
3.6.1. Uchování prvních linií a jejich nasazení.....	24
3.6.2. Diferenciace buněk	25
3.7. Sklizení buněk a buněčná lyze	25
3.7.1. Izolace buněčných jader	26
3.8. Stanovení koncentrace proteinů	26
3.9. Imunoprecipitace pomocí magnetických kuliček	27
3.10. SDS-PAGE elektroforéza	28
3.10.1. Barvení proteinů pomocí Coomassie brilliant blue	29
3.11. Metoda Western blot.....	29
3.12. Hmotnostní spektrometrie.....	30
4. Výsledky.....	31
4.1. Kultivace buněk	31
4.2. Stanovení a lokalizace AMPK ve svalových buňkách	31
4.3. Optimalizace imunoprecipitace	36
4.4. Hmotnostní spektrometrie.....	38
5. Diskuse.....	45
6. Závěr.....	51

Seznam zkratek

3'UTR	3'Nepřekládaná oblast genu (z angl. „3'untranslated region“)
ACC	Acetyl-koenzym A karboxylasa
ADP	Adenosindifosfát
AICAR	5-Aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
AIS	Autoinhibiční sekvence
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
AMPK	5'-Adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa
CAMK2D	Vápník/kalmodulin-dependentní kinasa typu 2 podjednotka delta
CAMKK2	Vápník/kalmodulin-dependentní kinasa kinasy 2
CBS	Cysthation- β -synthasa
CDKN1A	Inhibitor cyklin-dependentních kinas 1
CELF	CUGBP a ETR-3-podobné faktory
CIC-1	Protein chloridového kanálu 1
CTD	C-terminální doména
CTRL	Imortalizované buněčné linie ze svalových biopsií zdravých jedinců (z angl. „control“)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DM1	Myotonická dystrofie typu 1 Imortalizované buněčné linie ze svalových biopsií pacientů s myotonickou dystrofií typu 1
DMPK	Proteinová kinasa myotonické dystrofie
DMSO	Dimethyl sulfoxid
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	Fetální bovinní sérum
GBD	Glykogen-vázající doména (z angl. „glycogen binding domain“)
GLUT	Glukosový transporter
GYS	Glykogen synthasa
HMGCR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktasa
IP	Imunoprecipitace
LKB1	Jaterní kinasa B1
MBNL	Muscleblind-podobné proteiny

ME	Merkaptoethanol
MEF2A	Faktor 2A specifický pro myocyty
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
mTOR	Mechanický cíl rapamycinu
NTD	N-terminální doména
OGA	O-GlcNAcasa
„O-GlcNAcylyce“	O-glykosylace N-acetylglukosaminem
OGT	O-GlcNAc transferasa
PFKFB	6-Fosfofrukto-2-kinasa/fruktosa-2,6-bisfosfatasa
RIC	Rabbit Isotype Control
RNA	Ribonukleová kyselina
RyR1	Ryanodinový receptor 1
SERCA	Ca ²⁺ ATPasa sarko/endoplazmatického retikula
„Spliceopathy“	Problémy způsobené chybným sestřihem
Thr172	Threonin 172 α 2 podjednotky
Thr183	Threonin 183 α 1 podjednotky
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TNNT3	Rychlý kosterní troponin T

1. Teoretická část

1.1. Myotonická dystrofie typu 1

Myotonická dystrofie typu 1 (DM1), také známá jako Steinertova nemoc, je nervosvalové onemocnění. Tímto pojmem se obecně označují patologie, při nichž dochází k poškození periferních nervů nebo svalů. K potížím může docházet například na axonech, nervosvalových spojích nebo jako v případě DM1 přímo na svalech [1]. Myotonická dystrofie typu 1 je autosomálně dominantní onemocnění, ovlivněn je tedy gen na nepohlavním chromosomu a alela obsahující mutantní gen je alelou dominantní. Konkrétně je toto onemocnění způsobeno expansí tripletu CTG v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) genu pro mediátorovou ribonukleovou kyselinu (mRNA) proteinové kinasy myotonické dystrofie (DMPK). Různorodé symptomy nemoci způsobují především mutantní mRNA, vzniklé po přepisu z DMPK genu. Jsou zadržovány v jádře buňky, kde ovlivňují sestřih a expresi široké škály proteinů [2]. CUG opakování v mRNA DMPK tvoří stabilní vlásenkové struktury [3].

Onemocnění je doprovázeno také ovlivněním exprese samotné DMPK, nicméně některé studie uvádí, že abnormální exprese DMPK nemá na vznik symptomů typických pro DM1 pacienty vliv [4], jiné říkají, že způsobuje pouze některé symptomy. Snížená exprese DMPK není tedy jediným faktorem rozvoje onemocnění [5].

Zdraví jedinci mají v 3'UTR DMPK 5-35 opakování CTG [6] (dle jiné literatury do 37 opakování [7] nebo do 34 [8]). Repetitivní sekvence DNA, jako je tato, bývá označována pojmem mikrosatelit. Rozsah 35-49 repetitivních v rámci mikrosatelitu značí tzv. premutační stav. Takovéto alely jsou kvůli své nestabilitě náchylné k expansi při gametogenezi a potomci následně dědí gen s vyšším počtem opakování, než má rodič. Tento fenomén se označuje jako genetická anticipace. Délka mikrosatelitu koreluje u DM1 se závažností a nástupem onemocnění. Obvykle bývají rozlišovány tři formy onemocnění; mírná (50 – 150 opakování, nástup 20-70 let), klasická (100 – 1 000 opakování, nástup 10-30 let), a vrozená (>700 opakování, nástup 0-10 let). Expanse tripletu může dosahovat až tisíců opakování.

Mezi typické symptomy onemocnění patří myotonie, při které dochází k opožděné relaxaci svalu. Pacienti mají například potíže s uvolněním pevného sevření. Nemocní mají také obecnou svalovou slabost, svaly mohou až atrofovat. Na *Obr. 1 (str. 10)* jsou uvedeny typické rysy pacienta s DM1 – povadlé obličejové svaly. Myotonická dystrofie

typu 1 se však neprojevuje pouze problémy se svaly, mezi symptomy dále patří šedý zákal, srdeční potíže, insulinová resistance a kognitivní poruchy [6].



Obrázek 1: Typické obličejové rysy pacienta s DM1 – povislá oční víčka, otevřené rty, ústa trojúhelníkového tvaru. Převzato z [9].

1.1.1. Projevy onemocnění – molekulární úroveň

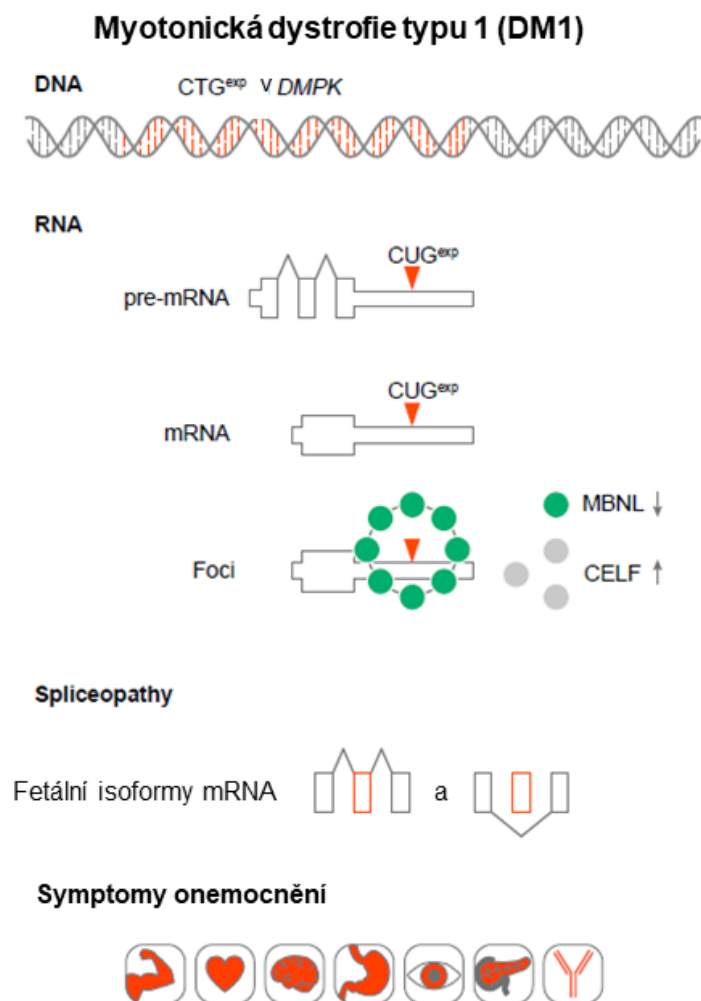
Patologie jaderných agregátů mRNA spočívá především v ovlivnění proteinových rodin muscleblind-podobných proteinů (MBNL) a CUGBP a ETR-3-podobných faktorů (CELF), což jsou rodiny proteinů vázajících ribonukleovou kyselinu (RNA) [10]. Jejich primární funkcí je regulace alternativního sestřihu pre-mRNA. Při DM1 dochází ke snížení hladin proteinů z rodiny MBNL a zvýšení hladiny proteinu CELF1.

Proteiny z rodiny MBNL interagují s molekulami RNA pomocí zinkových prstů, které váží GC motivy obklopené pyrimidiny, tedy i CUG opakování [10]. Vazba na patologicky expandované regiony mRNA vyčerpá zásobu proteinů rodiny MBNL a znemožní jejich funkci jakožto regulátorů sestřihu. V DM1 hrají různé proteiny rodiny MBNL rozdílnou roli a působí nezávisle na sobě. Myši s inaktivovaným genem pro MBNL1 vykazují velmi podobné sestřihové defekty a typické symptomy pozorované u DM1 pacientů. Myši s inaktivovaným genem pro MBNL2 nikoliv. Expresse MBNL1 a MBNL2 se však liší v různých tkáních, například sestřihové defekty v kosterním svalstvu jsou způsobeny především sekvestrací MBNL1, sestřihové defekty v mozkové tkáni ovlivňuje MBNL2.

Protein MBNL1 obecně způsobuje posun od fetálních forem sestřihů k formám typickým pro dospělé jedince [3]. Při snížených hladinách MBNL1 je tak v dospělém organismu přítomno větší množství sestřihových isoform, které běžně nalézáme spíše

u dětí. Například isoforma rychlého kosterního troponinu T (TNNT3) exprimovaná ve svalových vláknech pacientů s DM1 obsahuje exon, který se u dospělých jedinců obvykle nevyskytuje [10].

Protein MBNL1 funguje jako antagonist a CELF1, jeho sekvestrace tak způsobí zvýšení hladiny CELF1, konkrétní princip však znám není. Bylo však zjištěno, že v DM1 buňkách je CELF1 stabilizován díky hyperfosforylaci pomocí protein kinasy C [11]. Shrnutí mechanismu onemocnění myotonická dystrofie typu 1 je znázorněno na Obr. 2.



Obrázek 2: Mechanismus onemocnění DM1. Expandovaný mikrosatelit CTG (CTG^{exp}) v deoxyribonukleové kyselině (DNA) pro DMPK tvoří po přepisu do RNA (CUG^{exp}) tzv. „Foci“ neboli jaderné agregáty. Tyto agregáty váží proteiny rodiny MBNL a působí jejich sekvestraci, kvůli čemuž dochází k zvýšení hladiny proteinů rodiny CELF. Důsledkem je chybný sestřih a tím pádem široké spektrum symptomů (dále „spliceopathy“). Převzato z [12], upraveno.

Mezi proteiny ovlivněné „spliceopathy“ patří mnoho molekul. Jedná se proteiny nacházející se v mozku; např. amyloid-beta prekursorový protein, proteiny nacházející se v srdečním svalu; např. srdeční troponin T, svalové proteiny; např. dystrofin, také insulinový receptor (INSR) nebo protein chloridového kanálu 1 (ClC-1) a další [3].

Nejvýznačnějším symptomem DM1 je myotonie, což je stav patologicky zvýšené vzrušivosti, při kterém ve svalu dochází ke vzniku opakovaných akčních potenciálů. Tento symptom bývá připisován defektu v sestřihu proteinu chloridového kanálu 1, což je hlavní iontový kanál zodpovědný za repolarizaci membrány v buňkách kosterního svalstva [13]. Rozsah sestřihových variant CIC-1 je u DM1 pacientů široký, většina z nich vede k nefunkčnosti proteinu. Na pre-mRNA CIC-1 byla nalezena vazebná doména pro proteiny rodiny CELF, sestřihové defekty jsou tedy pravděpodobně dopadem zvýšených hladin těchto proteinů.

Fetální a neonatální varianty CIC-1 vykazují podobné struktury, jako isoformy DM1 pacientů [13]. V průběhu prvních třech týdnů postnatálního vývoje dochází u zdravých organismů ke zvýšení hladin mRNA kódujících funkční CIC-1. Protože u většiny DM1 pacientů nedochází k nástupu myotonie v brzkém postnatálním vývoji, předpokládá se, že u nich nejprve dochází ke správné změně sestřihu, avšak že se sestřihové varianty v průběhu života vracejí k isoformám běžně nalézáných u plodů a dětí.

Kromě myotonie dochází u pacientů s DM1 ke ztrátě svalové hmoty. Možným důvodem vzniku tohoto symptomu je zvýšená koncentrace Ca^{2+} ve svalových buňkách, která byla v kulturách svalových DM1 buněk prokázána [14]. Homeostáza intracelulární koncentrace Ca^{2+} je ovlivněna především Ca^{2+} ATPasou sarko/endoplazmatického retikula (SERCA) a ryanodinovým receptorem 1 (RyR1). U obou těchto proteinů je u DM1 pacientů v důsledku špatného sestřihu abnormálně vysoký výskyt isoform typických pro nedospělé jedince. Obdobně jako u CIC-1 k tomu pravděpodobně dochází vlivem změn v hladinách sestřihových faktorů rodin MBNL a CELF. V případě RyR1 byla nalezena korelace výskytu špatných sestřihů se zvýšeným výskytem proteinů rodiny CELF a v mRNA kódující SERCA1 lze identifikovat vazebný motiv pro MBNL1.

Strukturu svalstva DM1 pacientů ovlivňuje pravděpodobně také interakce CELF1 s faktorem 2A specifickým pro myocyty (MEF2A) a inhibítorem cyklin-dependentních kinas 1 (CDKN1A) [15]. Zvýšení hladiny CELF1 zapříčiní zvýšení exprese MEF2A i CDKN1A v kosterním svalstvu, důsledkem čehož dochází ke změně charakteru svalové tkáně. Svalová vlákna jsou kratší, mají vyšší počet jader a obecně se zvyšuje zastoupení pomalých červených vláken. To je patrně způsobeno tím, že příliš vysoké hladiny MEF2A a CDKN1A negativně ovlivňují diferenciaci kosterního svalstva.

1.1.2. Terapeutické přístupy

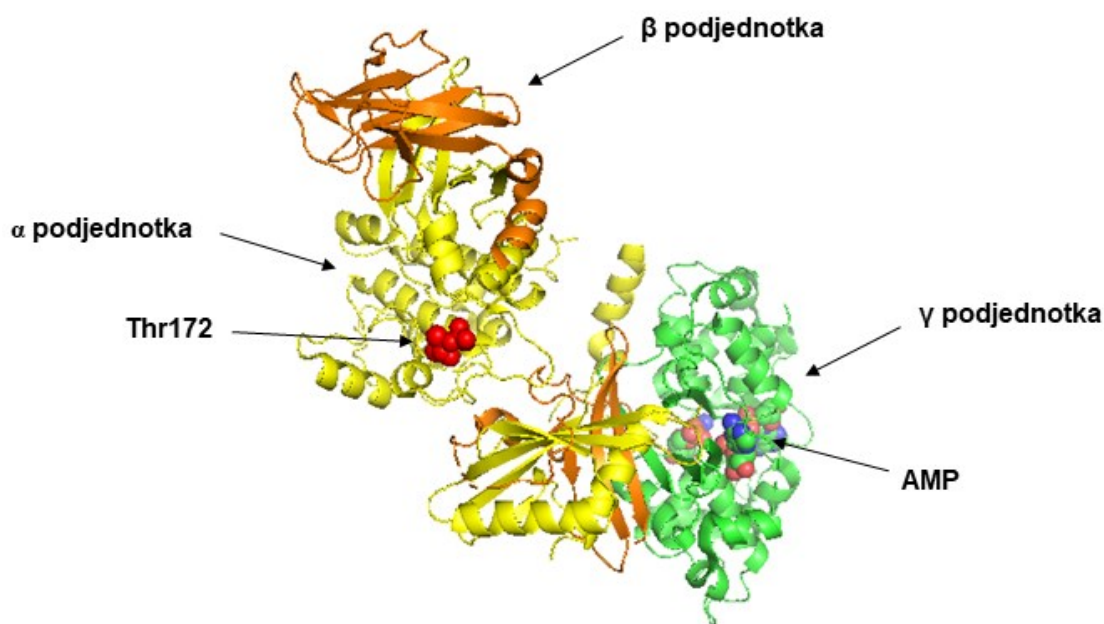
V současné době neexistuje pro myotonickou dystrofii typu 1 léčba. Terapie se zaměřuje na kompenzaci projevů onemocnění. Pacienti využívají pomůcek jako jsou ortézy, vozíky a další. Myotonie a svalové problémy mohou být pro pacienty bolestivé, časté je proto užití léků proti bolesti jako jsou nesteroidní protizánětlivé léky (např. ibuprofen) či antidepressiva [16]. V některých případech je třeba přistoupit k implantaci kardiostimulátoru, chirurgickému odstranění šedého zákalu či suplementaci insulinem. Pacientům se doporučuje fyzická aktivita, protože bylo zjištěno, že přispívá k zmírňování ztráty svalové hmoty a zlepšuje svalovou slabost [17].

1.2. 5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa

1.2.1. Vlastnosti a funkce v organismu

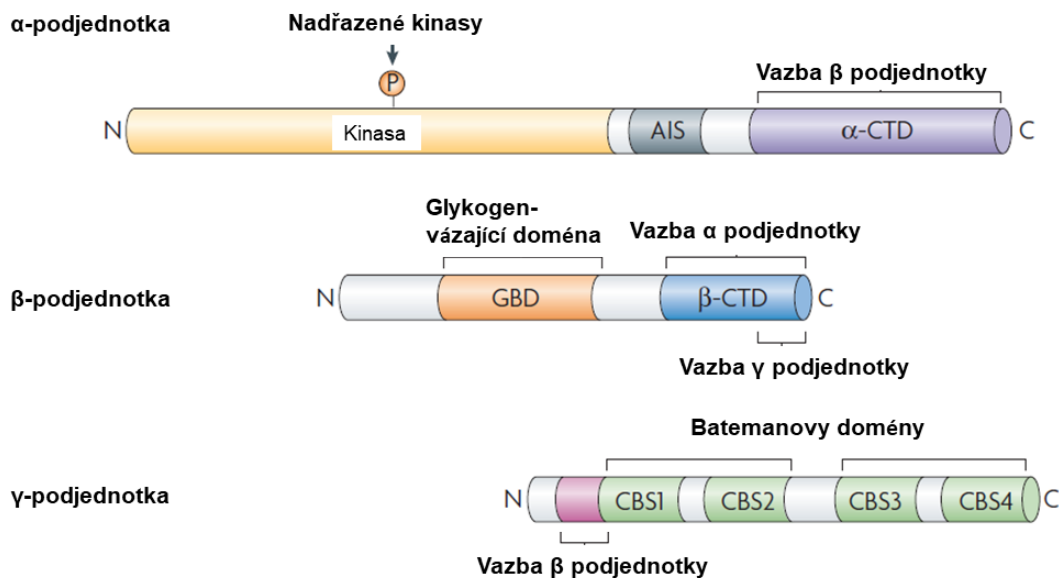
5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa (AMPK) je heterotrimerní protein skládající se ze tří podjednotek; katalytické podjednotky α a regulačních podjednotek β a γ . U savců se vyskytují dvě isoformy podjednotek α a β a tři isoformy podjednotky γ . Exprese isoformem závisí na umístění enzymu v těle. Podjednotky $\alpha 1$, $\beta 1$ a $\gamma 1$ jsou exprimovány napříč organismem. Podjednotka $\alpha 2$ se vyskytuje především v srdečním a kosterním svalstvu, stejně jako podjednotka $\beta 2$ [18]. V ostatních tkáních je nalézáme v nižším zastoupení.

Aktivace AMPK spočívá v její fosforylaci, ke které dochází na N konci α podjednotky. Konkrétně dochází k fosforylaci threoninu 172 (Thr172) $\alpha 2$ podjednotky [18], případně threoninu 183 (Thr183) $\alpha 1$ podjednotky. Na C konci α podjednotky se nachází tzv. autoinhibiční sekvence (AIS), která inhibuje aktivitu kinasy, a dochází zde k interakci s β a γ podjednotkou [19]. β podjednotka se skládá z domény vázající podjednotky α a γ a také z glykogen-vázající domény (GBD). Vazba glykogenu má na enzym inhibiční účinek. Na *Obr. 3 (str. 14)* je zobrazena prostorová struktura AMPK.



Obrázek 3: Prostorová struktura AMPK $\alpha 2\beta 1\gamma 1$. Enzym je zobrazen se třemi molekulami AMP vázanými v Batemanových doménách γ podjednotky. Žlutě je zobrazena α podjednotka, oranžově β podjednotka a zeleně γ podjednotka. Relativní molekulová hmotnost zobrazeného enzymu odpovídá 273,33 kDa. Vytvořeno v programu Pymol [20]. PDB ID: 4CFE.

γ podjednotka je složena ze dvou Batemanových domén, přičemž každá obsahuje dva cysthathion- β -synthasa motivy (CBS) [19]. Pojem CBS motiv označuje tandemovou sekvenci o přibližně 60 aminokyselinách, která byla poprvé rozpoznána v enzymu cysthathion- β -synthasa Alexem Batemanem. Dva CBS motivy tvoří jednu Batemanovu doménu. Každý CBS motiv může vázat jeden adenosinmonofosfát (AMP), adenosindifosfát (ADP) nebo adenosintrifosfát (ATP). Nukleotidy působí jako alosterické regulátory – při vazbě do jedné Batemanovy domény se zvyšuje afinita druhé. Na Obr. 4 (str. 15) je zobrazena doménová struktura podjednotek enzymu.



Obrázek 4: Doménová struktura podjednotek enzymu AMPK. Písmeny N a C je označen N konec a C konec sekvence, CTD značí C-terminální doménu. Dále jsou vyznačena místa vzájemné interakce jednotlivých podjednotek, autoinhibiční sekvence (AIS), glykogen-vázající doména (GBD), CBS motivy, oblast sekvence s katalytickou aktivitou (kinasa) a místo fosforylace nadřazenými kinasami. Převzato z [19], upraveno.

Kinasa AMPK se vyskytuje jak v jádře, tak v cytoplasmě, není však jasné, jakým způsobem je její umístění v buňce regulováno [21]. Buněčná lokalizace AMPK se pravděpodobně liší v různých tkáních a závisí také na konkrétním podjednotkovém složení enzymu. Například AMPK $\alpha 2$ má dle Suzukiho et al. ve své struktuře sekvenci potřebnou pro prostup jadernou membránou, ta se ale stává plně funkční pouze po fosforylaci enzymu v důsledku působení leptinu [22].

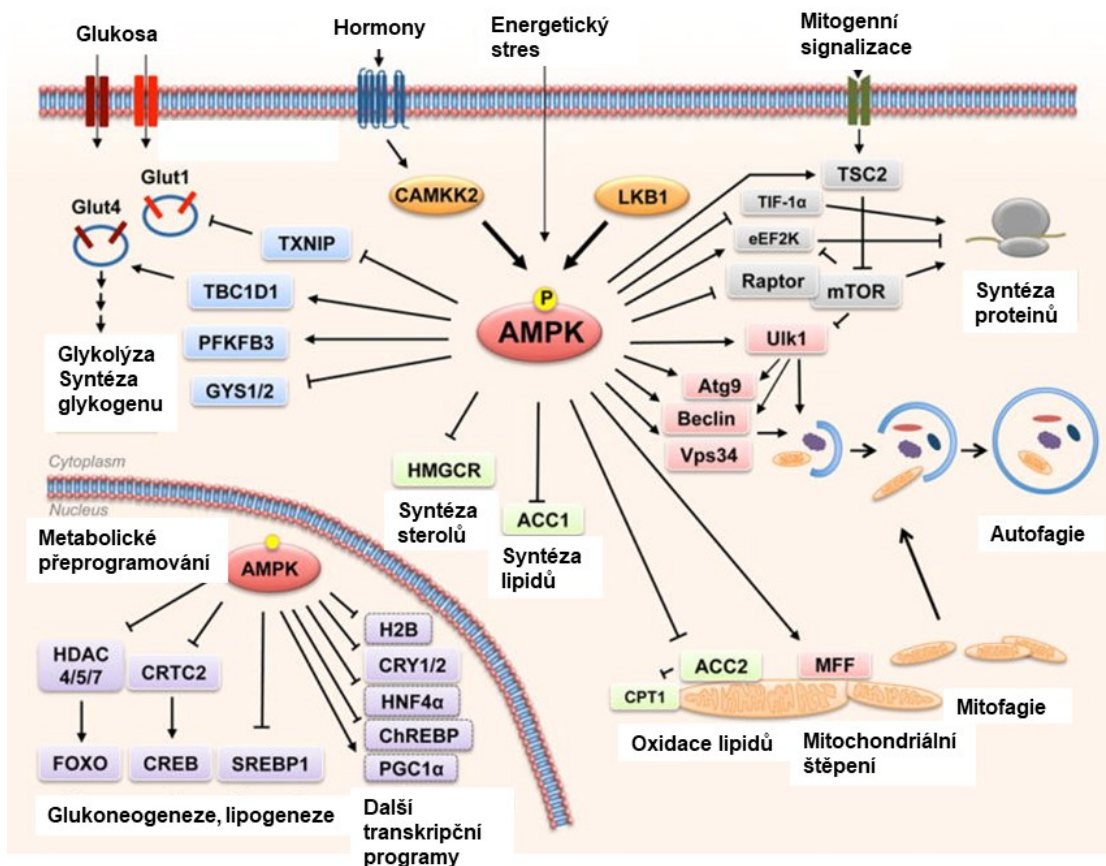
5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa funguje jako senzor koncentrace AMP; je aktivována vzrůstem buněčných hladin poměru AMP:ATP, případně ADP:ATP – jedná se o tzv. nukleotid-dependentní regulaci, která je zprostředkována jaterní kinasou B1 (LKB1). Pokud dojde k vazbě nukleotidů, LKB1 AMPK fosforyluje na Thr172, případně Thr183 [18]. Ke stimulaci AMPK tedy obecně dochází při procesech, které inhibují produkci nebo stimuluji spotřebu ATP. Mezi tyto procesy patří například hypoxie, hypoglykemie nebo svalová kontrakce [23]. AMPK může být dále aktivována hormony tukové tkáně, tzv. adipokiny, leptinem a adiponektinem. Tento enzym je tedy nejen buněčným regulátorem, ale regulátorem energetické bilance organismu jako celku.

Kromě nukleotid-dependentní regulace je AMPK ovlivňována i tzv. nukleotid-independentní regulací [18]. V tomto případě dochází k fosforylaci AMPK pomocí vápník/kalmodulin-dependentní kinasy 2 (CAMKK2), která je aktivována vzrůstem intracelulární hladiny Ca^{2+} .

Stimulace AMPK má za následek inhibici mnoha anabolických drah; konkrétně dochází k inaktivaci 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reductasy (HMGCR), což blokuje syntézu isoprenoidů a sterolů, dále je inaktivována acetyl-koenzym A karboxylasa (ACC), důsledkem čehož neprobíhá syntéza mastných kyselin a v neposlední řadě je inhibována glykogen synthasa (GYS) [23]. Působením AMPK dále dochází k inhibici proteosyntézy a to působením na mechanický cíl rapamycinu (mTOR) a některé jaderné transkripční faktory.

Katabolické procesy jsou aktivací AMPK naopak stimulovány. V kosterním svalstvu stimuluje AMPK přísun glukosy; mechanismus spočívá v translokaci glukosových transportérů (GLUT) do plasmatické membrány a současném zvýšení jejich exprese [24]. V některých typech buněk AMPK fosforyluje a tím aktivuje 6-fosfofrukto-2-kinasu/fruktosu-2,6-bisfosfatasu (PFKFB), která přeměňuje fruktosu-6-fosfát na fruktosu-2,6-bisfosfát, což je regulátor glykolýzy. AMPK také fosforyluje acetyl-koenzym A karboxylasu (ACC), důsledkem čehož dochází k poklesu koncentrace malonyl-koenzymu A, který funguje jako inhibitor karnitin *O*-palmitoyltransferasy 1. Díky poklesu malonyl-koenzymu A může probíhat transport mastných kyselin do mitochondrie a může docházet k jejich oxidaci.

Kromě metabolických drah reguluje AMPK také procesy spojené s buněčnou autofagií – v tomto případě působí AMPK a mTOR antagonisticky (AMPK autofagii podporuje) [18]. Dále se předpokládá, že AMPK ovlivňuje mitofagii, což je proces degradace vadných mitochondrií. Regulací transkripčních faktorů zasahuje AMPK i do zvládnutí oxidativního stresu či řízení cirkadiálních rytmů. Obdobným mechanismem se podílí také na buněčném růstu a proliferaci, jejichž chybná regulace může vést k nádorovému bujení. Na *Obr. 5 (str. 17)* je uveden souhrn signalizačních drah AMPK.



Obrázek 5: Signální dráhy AMPK. Převzato z [18], upraveno.

1.2.2. 5'-adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinová kinasa při myotonické dystrofii typu 1

Jak již bylo zmíněno, mezi nejvýraznější zdravotní potíže pacientů s DM1 patří problémy se svaly. Ve svalových buňkách zodpovídají za metabolickou regulaci především signální dráhy AMPK a mTOR a bylo zjištěno, že při DM1 se jejich hladiny pohybují mimo normální hodnoty [25]. Důvodem může být chybný sestřih nadřazeného regulátoru AMPK – CAMKK2. K chybnému sestřihu dochází také u glykogen synthasy kinasy-3 beta, která se podílí na řízení syntézy glykogenu, což je alosterický regulátor AMPK.

Při diferenciaci kosterního svalstva dochází k přemístění AMPK z cytoplazmy do jádra [26]. Jak již bylo zmíněno, v případě pacientů s DM1 neprobíhá diferenciace ve správné míře a ovlivňuje tak umístění tohoto enzymu. V jádře AMPK interaguje například s heterogenním jaderným ribonukleoproteinem H (hnRNP H), což je RNA-vázající protein, který se účastní mnoha regulačních kroků genové exprese. Pravděpodobně reguluje například geny řídící metabolismus glukosy. Nižší hladiny AMPK v jádře způsobené vadnou regulací diferenciace buněk kosterního svalstva tedy ovlivní funkci hnRNP H a s ním spojených dějů.

Některé studie zároveň hovoří o hnRNP H jako o proteinech, které jsou obdobně jako proteiny rodiny MBNL sekvestrovány vazbou na expandované regiony mRNA [27]. V tomto případě tedy dysfunkce AMPK znásobuje symptomy onemocnění.

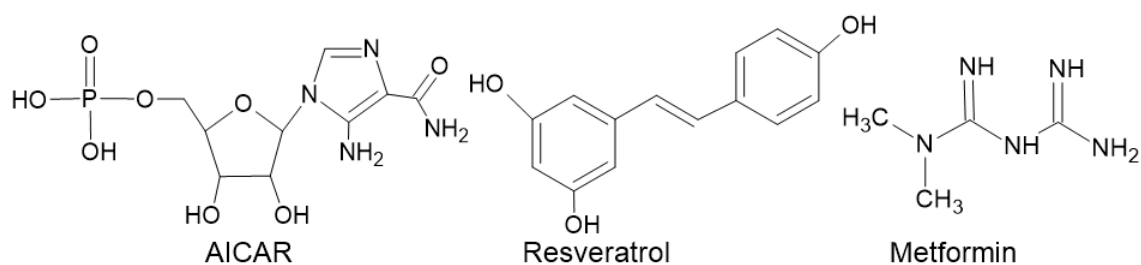
1.2.3. Terapie myotonické dystrofie typu 1 pomocí aktivace 5'-adenosinmonofosfátem aktivované proteinové kinasy

Protože AMPK zastává v organismu významnou regulační roli, jedná se o perspektivní terapeutický cíl z hlediska léčby metabolických poruch, obezity, diabetu, ale i zánětlivých nebo rakovinných procesů a samozřejmě myotonické dystrofie typu 1. Bylo nalezeno množství sloučenin, které působí jako aktivátory AMPK. Mechanismus některých spočívá ve zvyšování intracelulární koncentrace AMP nebo ADP, jiné AMP či ADP napodobují a vážou se do CBS domén γ podjednotky [18]. Některé sloučeniny AMPK stimulují vazbou do glykogen-vázající domény.

5-Aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid (AICAR), je sloučenina, která působí jako aktivátor AMPK obdobným mechanismem, jako AMP či ADP. Bylo zjištěno, že dlouhodobé podávání u DM1 myši zlepšuje strukturu svalů, snižuje agregaci RNA v jádře, sekvestraci MBNL1, zvýšení hladin CUGBP1 a napravuje „spliceopathy“ u TNNT3 a CIC-1 [2]. Obdobný experiment byl proveden na lidských DM1 myoblastech. Bylo pozorováno napravení sestřihu u SERCA1, RyR1, TNNT3 a CIC-1. Zároveň se snížil počet jaderných RNA agregátů.

Další sloučeninou, která má na AMPK stimulační účinky je resveratrol. I v tomto případě vykazovaly DM1 myši, kterým byl resveratrol dlouhodobě podáván, isoformy RyR1, TNNT3 a CIC-1, které se blížili isoformám zdravých jedinců [2]. Nicméně u SERCA1 ke změně alternativního sestřihu nedošlo a i u ostatních proteinů bylo zastoupení „zdravých“ isoform nižší, než při medikaci AICAREm.

Stimulační účinek má na AMPK také metformin, což je terapeutikum používané především pro léčbu diabetu 2. typu. Používá se, protože důsledkem stimulace AMPK je snížení hladiny krevní glukosy. 48h vystavení lidských buněčných kultur 25mmol/l koncentraci metforminu zapříčinilo alespoň částečnou korekci „spliceopathy“ INSR, TNNT3 a CIC-1 [28]. Na *Obr. 6* je zobrazena struktura AICARu, resveratrolu a metforminu.



Obrázek 6: Struktura 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotidu (AICAR), resveratrolu a metforminu. Vytvořeno v programu Chems sketch [29].

K aktivaci AMPK dochází při metabolickém stresu [24], což vede k předpokladu, že příznivé účinky lehké fyzické zátěže u DM1 pacientů vychází právě ze zvýšení aktivity tohoto enzymu. Při studiu DM1 myší, které podstupovaly fyzickou aktivitu, dospěli Ravel-Chapuis et al. k závěru, že cvičení má na „spliceopathy“ pozitivní dopad [2]. V důsledku fyzické aktivity došlo ke snížení tvorby patologických isoformů mRNA kódujících SERCA1, RyR1, TNNT3 i CIC-1.

Tyto výzkumy napovídají, že AMPK přímo ovlivňuje alternativní sestřih či napomáhá s úklidem RNA nahromaděných v jádře. Aktivace AMPK představuje dostupnou terapeutickou strategii pro léčbu DM1 pacientů, ať už je způsobena podáním léčiv, či fyzickou aktivitou.

2. Cíle práce

1. Porovnání hladiny AMPK v buněčných kulturách pacientů s DM1 a v buněčných kulturách zdravých jedinců.
2. Imunoprecipitace AMPK z buněčných kultur.
3. Studium interakce AMPK a jejích podjednotek s jinými proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie.

3. Experimentální část (metody)

3.1. Použité chemikálie

Acetonitril	Honeywell, USA
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories, USA
Cell Extraction Buffer	Invitrogen, USA
Coomassie Brilliant blue R-250	Amresco, USA
DMEM (1X) + GlutaMAX™ -I	Thermo Fisher, USA
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Německo
Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit	Thermo Fisher, USA
Dynabeads™ Protein G 30 mg/ml	Thermo Fisher, USA
Endoproteasa LysC	Promega, USA
Ethylmorfolin	Sigma-Aldrich, USA
F-10 Nut Mix (1X) + GlutaMAX™ -I	Thermo Fisher, USA
Fetální bovinní sérum (FBS)	Gibco, USA
Gentamicin 50 mg/ml	Life Technologies, UK
Glycin	Carl Roth, Německo
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher, USA
Hydroxid amonný 25%	Lach-Ner, Česká republika
Hydroxid sodný	Sigma-Aldrich, Německo
Chloracetamid	Sigma-Aldrich, Německo
Insulin, Human Recombinant	Sigma-Aldrich, Německo
0,5M kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Active Motif, USA
Kyselina octová	VWR Life science, USA
Kyselina kumarová	Sigma-Aldrich, Německo
Laemliho pufr 4X	Bio-Rad Laboratories, USA
Luminol	Sigma-Aldrich, Německo
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, Německo
Methanol	Merck, Německo
Nuclear Complex CO-IP Kit	Active Motif, USA
Peroxid vodíku 35%	Fluka Analytical, Německo
Phosphatase Inhibitors (20X)	Active Motif, USA
Phosphate buffered saline tablet	Sigma-Aldrich, Německo

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher, USA
Precision Plus Protein™ Standards All Blue	Bio-Rad Laboratories, USA
Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Německo
Protilátka Anti-AMPK $\alpha 1, \alpha 2$ (phospho) 1,7 mg/ml	Abcam, UK
Protilátka Anti Human Actin Beta 1 mg/ml	Bio-Rad Laboratories, USA
Protilátka Anti-PRKAA1 0,2 mg/ml	Atlas Antibody, Švédsko
Protilátka Anti-PRKAA2 0,2 mg/ml	Atlas Antibody, Švédsko
Protilátka Goat anti-mouse IgG-HRP 400 μg/ml	Santa Cruz Biotech, USA
Protilátka Goat anti-rabbit IgG-HRP 2 mg/ml	Abcam, UK
Protilátka Rb IgG Isotype Control 3 mg/ml	Invitrogen, USA
Skeletal Muscle Cell Growth Medium Kit C23160	PromoCell, Německo
SuperSignal® West Femto Trial Kit	Thermo Fisher, USA
TCEP HCl	VWR Life science, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Bio-Rad Laboratories, USA
10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories, USA
Trypan Blue Stain (0,4%)	Gibco, USA
Trypsin-EDTA (0,05%).phenol red	Gibco, USA
Trypsin – Gold	Promega, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Německo

3.2. Roztoky (připravované pufrы a média)

Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue: 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 4 μ g/ml Coomassie Brilliant Blue R-250

Diferenciační médium: 10 μ g/ml insulin, 50 μ g/ml gentamycin v DMEM (1X) + GlutaMAX™ -I

HPHEB: 0,5M hydroxid amonný, 0,5mM EDTA

Odbarvací roztok Coomassie Brilliant Blue: 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Proteolytický pufr: 150mM 4-ethylmorfolin acetát, 15% acetonitril, pH 8,5

Růstové médium (připraveno z chemikálií v Skeletal Muscle Cell Growth Medium Kit C23160): 5% (v/v) fetální telecí sérum, 50 μ g/ml fetuin, 10 μ g/ml insulin, 0.4 μ g/ml dexamethason, 10 ng/ml epidermální růstový faktor, 1 ng/ml fibroblastový růstový faktor, 50 μ g/ml gentamycin v Skeletal Muscle Cell Growth médiu

Semi-Dry Transfer Buffer: 20% (v/v) methanol, 48mM Tris, 39mM glycin

STOP médium: 15% (v/v) FBS v DMEM + GlutaMAX™ -I

TTBS: 0,02M Tris, 0,15M NaCl, 0,05% (v/v) Tween, pH 7,6

3.3. Biologické vzorky

V této bakalářské práci byly použity imortalizované lidské buněčné linie ze svalové biopsie DM1 pacienta (tyto kultury dále označeny DM1) s rozsahem mutace 2 600 CTG opakování. Tyto buněčné linie byly připraveny Ludovic et al. [7]. Pro srovnání byly použity buněčné linie ze svalových biopsií zdravých jedinců (dále CTRL) připravené stejnou skupinou obdobným způsobem.

3.4. Použité přístroje a materiál

Aparatura pro elektroforézu:	Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio-Rad Laboratories, USA
Blotovací aparatura:	Trans-blot® SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, USA
Blotovací papíry:	Extra thick blot paper, Bio-Rad Laboratories, USA
Centrifugy:	Centrifuge 5424 R, rotor s pevným úhlem FA-45-24-11, Eppendorf, Německo PK110, výkyvný rotor O-G26/1, ALC, Itálie
Čtečka mikrodestiček:	CLARIOstar® Plus Microplate Reader, BMG Labtech, Německo
Gely pro elektroforesu:	4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad Laboratories, USA
Inkubátor:	MCO-170AICUV-PE IncuSafe CO ₂ Incubator, Panasonic, Japonsko
Kultivační lahve:	T75, Thermo Fisher Scientific, USA T175, Eppendorf, Německo
Kývačka:	BenchBlotter™ Platform Rocker, Benchmark Scientific, USA
Laminární box:	Biohazard box SafeFAST Classic, Schoeller Instruments, Česká republika
Magnetický separační stojánek:	BioLabs, USA

Mikroskop:	Inverzní trinokulární mikroskop IM-3, Optika Microscopes, ČR
Nitrocelulózová membrána:	Amersham™ Protran™ Premium 0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membrane, GE Healthcare Life science, UK
Pipetovací nástavec:	Pipetus, Hirschmann, Německo
Počítadlo buněk:	Luna-II™ Automated Cell Counter, Logos Biosystems, Jižní Korea
Přístroj pro fotografování membrán:	ChemiDoc™ MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories, USA
Rotátor:	Bio RS-24 Mini-Rotator, Biosan, Litva
Termoblok:	Mixing Block MB-102, Bioer, Čína
Vodní lázeň:	VWB2 12, VWR Life science, USA
Vortex:	Vortex V-1 plus, Biosan, Litva
Zdroj stejnosměrného napětí:	PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Bio-Rad Laboratories, USA

3.5. Použité softwarové prostředky

Andromeda, Max-Planck-Institute of Biochemistry

BLAST, U.S. National Library of Medicine

Chemsketch, verze 2020.1.2, Advanced Chemistry Development, Inc.

MaxQuant, verze 1.6.10.43, Max-Planck-Institute of Biochemistry

Microsoft Office 365, Microsoft Corporation

Perseus, verze 1.6.15.0, Max-Planck-Institute of Biochemistry

The PyMOL Molecular Graphics System, verze 2.4.1, Schrödinger, LLC

STRING, verze 11.0, © STRING CONSORTIUM 2020

3.6. Kultivace buněčných linií

3.6.1. Uchování prvních linií a jejich nasazení

První linie byly uchovány v -80 °C v 1 ml alikvotech po 1 000 000 buněk v růstovém médiu s 5% (v/v) DMSO. Při nasazení byly vialky s prvními liniemi rozmrazeny a obsah byl přepipetován do malé falkonky s 10 ml růstového média. Falkonky byly následně centrifugovány 4 min při tíhovém zrychlení 662x g. Poté byl supernatant vylit a peleta resuspendována v 10 ml růstového média. Na udržování kultur

byly použity kultivační lahve T75 (o celkové kultivační ploše 75 cm²). Na jednu lahev T75 bylo nasazováno 800 000 – 1 000 000 živých buněk v celkem 10 ml růstového média. Po dosažení konfluence byly buňky zpasážovány nebo nasazeny na větší kultivační lahve T175 (o celkové kultivační ploše 175 cm²). Na jednu kultivační lahev T175 bylo nasazováno 1 500 000 – 2 500 000 buněk v 50 ml růstového média. Buňky byly počítány pomocí přístroje Luna-II™ Automated Cell Counter. Buněčné linie byly po prvním nasazení udržovány maximálně dva měsíce. Manipulace s buněčnými liniemi probíhala vždy v laminárním boxu. Lahve s kulturami v růstovém médiu byly umístěny do inkubátoru nastaveného na teplotu 37 °C a 5% koncentraci CO₂.

3.6.2. Diferenciace buněk

Diferenciace buněk byla provedena přibližně 3-4 dny po nasazení buněčných linií v momentě, kdy buňky dosáhli vysoké konfluence (80-90 %). Růstové médium v lahvích s buněčnými kulturami bylo vyměněno za připravené diferenciační médium pomocí jednorázových skleněných pipet. Diferenciace probíhala 3 dny. Lahve s kulturami v diferenciačním médiu byly umístěny do inkubátoru nastaveného na teplotu 37 °C a 5% koncentraci CO₂.

3.7. Sklizení buněk a buněčná lyze

Sklizení buněk bylo v některých případech prováděno před diferenciací a v některých případech po diferenciaci buněk. V obou případech je postup sklizení (trypsinizace adherentních buněk) obdobný.

Po vyjmutí kultur z inkubátoru bylo nejprve odpipetováno růstové či diferenciační médium. Následně byly kultury opláchnuty ve 25 ml roztoku F-10 Nut Mix + GlutaMAX™ ohřátého na teplotu 37 °C. Poté byly do každé lahve pipetovány 3 ml roztoku trypsinu (Trypsin-EDTA (0,05%), phenol red od Gibco). Následně byly lahve s kulturami umístěny do inkubátoru (37 °C a 5% CO₂). Po 4 minutách bylo zkontrolováno uvolnění buněk pod mikroskopem. Následně byla trypsinizace zastavena přidáním 17 ml STOP média ohřátého na 37 °C. Pomocí jednorázových skleněných pipet byly trypsinizované buňky přeneseny do 50 ml falkonek. Falkonky byly centrifugovány při tíhovém zrychlení 662x g po dobu 4 min. Po skončení centrifugace byl odlit supernatant a peleta byla resuspendována v 1 ml PBS s 20x ředěnými inhibitory fosfatas a roztok byl přenesen do 1,5ml zkumavek Eppendorf. Následně byly zkumavky opět centrifugovány – tentokrát při 4 °C a tíhovém zrychlení 400x g po dobu 4 min – a tento postup byl

opakován ještě jednou. Po důkladném odsátí supernatantu byla peleta resuspendována v 1 ml Cell Extraction Buffer se 100x ředěným inhibitory proteas a fosfatas. Zkumavky byly umístěny na led a přibližně 30 min probíhalo lyzování buněk. Po uplynutí tohoto času byly zkumavky centrifugovány po dobu 10 min při tíhovém zrychlení 15 000x g a teplotě 4 °C. Supernatant (lyzát) byl přenesen do čistých 1,5ml zkumavek a následně byl umístěn do -80 °C nebo po stanovení koncentrace proteinů použit na elektroforézu či pro imunoprecipitaci.

3.7.1. Izolace buněčných jader

V některých případech byl z buněčných kultur odděleně sklizen jaderný a cytosolární lyzát. Pro získání cytosolické a jaderné frakce byl použit Nuclear Complex CO-IP Kit od Active Motif. Sklizení buněk probíhalo obdobně jako v přechozím případě až po promytí buněk roztokem PBS s inhibitory. Po promytí bylo do každé zkumavky s buňkami pipetováno 500 µl hypotonického roztoku z kitu se 100x ředěným inhibitory proteas a fosfatas. Obsah zkumavky byl jemně resuspendován pipetou a zkumavky byly ponechány 15 min na ledu. Následně bylo do každé zkumavky pipetováno 25 µl detergentu z kitu, roztoky byly jemně promíchány opětovným nasátím pipetou a centrifugovány 30 s při 4 °C a 14 000x g. Po centrifugaci byl odsát supernatant, který byl pipetován do čisté zkumavky. Supernatant představoval cytosolický lyzát. Jaderná peleta byla resuspendována ve 100 µl Digestion buffer se 100x ředěnými inhibitory proteas a fosfatas, 0,5 µl fenylmethylsulfonylfluoridu a s 0,5 µl Enzymatic Shearing Coctail (vše kromě inhibitorů z kitu). Zkumavky byly 60 min na ledu. Nakonec byly zkumavky s jaderným lyzátem 10 min centrifugovány při 4 °C a 14 000x g. Supernatanty, který představovaly jaderný lyzát, byly přeneseny do čistých zkumavek.

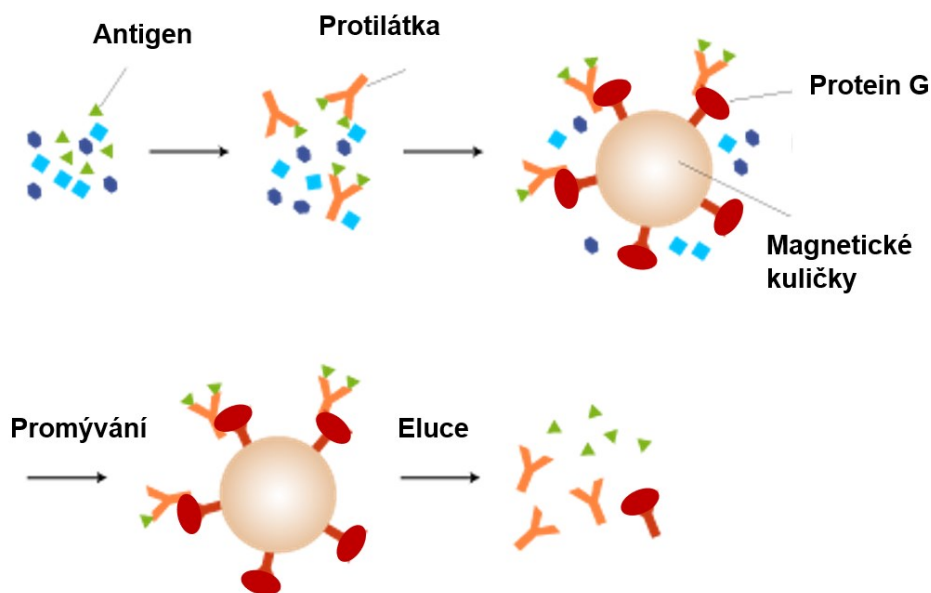
3.8. Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byl využit Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Standardy A-F obsahovaly koncentraci proteinu (hovězí sérový albumin) 2 µg/µl, 1,5 µg/µl, 1 µg/µl, 0,75 µg/µl, 0,5 µg/µl a 0,25 µg/µl. Do jednotlivých mikrozkušavek bylo pipetováno 5 µl standardů A-F z kitu, 5 µl 5x ředěných vzorků v duplikátu (při předchozích experimentech bylo zjištěno, že koncentrace ředěných vzorků oproti neředěným vzorkům lépe vyhovuje kalibrační křivce), 5 µl destilované vody a 5 µl samotného lyzačního pufu. Do všech mikrozkušavek bylo dále připipetováno 200 µl reakčního činidla z kitu.

Celý objem všech vzorků a standardů byl po promíchání na vortexu a krátké centrifugaci pipetován do mikrotitrační destičky. V dalším kroku byla proměřena absorbance při 562 nm. Protože bylo zjištěno, že při 562 nm absorbuje i samotný lyzační pufr, byl od naměřené hodnoty absorbance vzorků vždy odečten rozdíl absorbance lyzačního pufru a destilované vody. Koncentrace proteinů byla využita pro výpočet objemu lyzátů, který byl použit k imunoprecipitaci nebo pro výpočet objemu vzorků, který byl nanesen na elektroforetický gel. Po stanovení koncentrace proteinů v lyzátech byly koncentrovanější vzorky naředěny Cell Extraction Buffer tak, aby byla ve všech vzorcích koncentrace proteinů stejná.

3.9. Imunoprecipitace pomocí magnetických kuliček

Z buněčných lyzátů bylo pomocí imunoprecipitace purifikováno AMPK. Imunoprecipitace pomocí magnetických kuliček je založena na specifické interakci antigenu (v našem případě $\alpha 2$ podjednotka AMPK) a protilátky. Magnetické kuličky používané v této práci obsahují navázaný protein G, který váže protilátku s antigenem a umožňuje tak izolaci antigenu z roztoku. Princip imunoprecipitace je zobrazen na Obr. 7.



Obrázek 7: Princip imunoprecipitace. Převzato z [30], upraveno.

K imunoprecipitaci byla použita protilátka proti $\alpha 2$ podjednotce AMPK – Anti-PRKAA2 od Atlas Antibody. Jako negativní kontrola byla použita protilátka Rabbit Isotype Control (RIC) od Invitrogenu. Imunoprecipitace $\alpha 2$ podjednotky AMPK byla prováděna v triplicátech, tedy ze tří napěstovaných lahví T175 diferencovaných buněk

DM1 nebo CTRL. Do mikrozkušavek bylo odebráno po 500 μ l lyzátu. Při imunoprecipitaci s RIC protilátkou nebyl dělán triplikát, ale místo toho bylo do mikrozkušavky napipetováno 3krát 170 μ l lyzátů (DM1 nebo CTRL). K těmto lyzátům, bylo připipetováno 5 μ g protilátky proti α 2 podjednotce AMPK nebo 5 μ g protilátky RIC. Takto připravené vzorky byly ponechány přes noc na rotátoru při 4 °C.

Druhý den bylo do čistých mikrozkušavek pipetováno 50 μ l magnetických kuliček Dynabeads™ Protein G (odpovídá 1,5 mg kuliček). Mikrozkušavky byly umístěny do magnetického stojánku, pipetou byl odsát uchovávací pufr magnetických kuliček a byly připipetovány buněčné lyzáty s protilátkami. Takto byly roztoky s kuličkami ponechány na rotátoru při pokojové teplotě po dobu 20 min (aby došlo k vazbě protilátky a proteinu G). Pak byly mikrozkušavky umístěny na magnet a lyzát z kuliček byl přenesen do mikrozkušavek a skladován v -80 °C (dále v textu jako zbytek buněčného lyzátu po imunoprecipitaci). Následně byly kuličky s navázanou protilátkou s antigenem 2x promyty 200 μ l LWB z kitu Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit se 100x ředěnými inhibitory proteas a fosfatas. Poté byly kuličky resuspendovány ve 200 μ l LWB s inhibitory proteas a fosfatas a přeneseny do čistých mikrozkušavek. Po odsátí promývacího roztoku byl při posledním kroku imunoprecipitovaný antigen z kuliček eluován do 20 μ l Laemmliho pufru (pokud byly vzorky dále použity pro elektroforézu) nebo 2x 200 μ l HPHEB (pokud byly vzorky dále použity pro hmotnostní spektrometrii). V případě Laemmliho pufru probíhala eluce 5 min při 95°C v termobloku, v případě HPHEB nejprve 20 min a poté 10 min při pokojové teplotě na rotátoru. Eluáty (imunoprecipitáty) byly uskladněny v teplotě -80 °C, případně okamžitě dále zpracovány pro hmotnostní spektrometrii.

3.10. SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza byla využita pro separaci proteinů v buněčném lyzátu, ve zbytku lyzátu po vychytání AMPK na magnetických kuličkách a v imunoprecipitátu. Na gel byl nanášen objem roztoku, který obsahoval 20 μ g či 40 μ g proteinů v 1x Laemmliho pufru s 2,5% merkptoethanolem (ME). Takto připravený roztok byl promíchán na vortexu, krátce centrifugován a následně byl 5 min zahříván na teplotu 95 °C. Poté byl opět promíchán na vortexu, krátce centrifugován a následně byly vzorky nanášeny do polyakrylamidového gelu (4-15% Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Gels 12-well comb) připraveného v elektroforetické aparatuře s 1x Tris/Glycin/SDS pufrem. Jako

standard byl použit Precision Plus Protein™ Standard Dual Color či All Blue. Standardu byly na gel nanášeny 4 µl. Elektroforéza běžela vždy 10 min při napětí 100 V a následně přibližně 50 min při napětí 140 V.

3.10.1. Barvení proteinů pomocí Coomassie brilliant blue

Proteiny separované v gelu byly obarveny barvicím roztokem Coomassie brilliant blue. Gel byl v barvicím roztoku ponechán na kývačce přes noc. Druhý den byl použit odbarvovací roztok. Po zhruba 120 min v odbarvovacím roztoku byl gel vyfotografován na přístroji ChemiDoc.

3.11. Metoda Western blot

Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury. Pro detekci AMPK byla využita metoda Western blot. Nejprve byl připravena nitroceluloseová membrána (Amersham™ Protran™ Premium 0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membrane) a blotovací papíry, které byly namočené do Semi-Dry Transfer Buffer. Tímto pufrem byla navlhčena také blotovací aparatura a byl jím omyt gel se separovanými proteiny. Na aparaturu byl v tomto pořadí položen blotovací papír, nitroceluloseová membrána, gel se separovanými proteiny a znovu blotovací papír. Následně byla uzavřena blotovací aparatura a zapojena ke zdroji stejnosměrného napětí o velikosti 15 V. Přenos probíhal po dobu 60 min

Po uplynutí této doby byla membrána s přenesenými proteiny krátce opláchnuta v TTBS a poté blokována po dobu 60 min v 10 ml 5% Blotting-Grade Blocker (BGB) v TTBS při pokojové teplotě na kývačce. Po zablokování byla membrána přenesena do krabičky s 10 ml 5% BGB a primární protilátkou (ředění 1:1 000 nebo 1:2 000). S primární protilátkou byla membrána inkubována přes noc při 4 °C. Druhý den byla membrána 3x 10 min promývána v TTBS. Následně byla po dobu 45 min inkubována se sekundární protilátkou (ředění 1: 2 000) v 1% roztoku BGB v TTBS a poté znovu 3x 5 min promývána v TTBS.

Použité sekundární protilátky obsahovaly konjugovanou křenovou peroxidasu. Pro vizualizaci proteinů na membráně byly připraveny dva roztoky – první roztok (A) sestával z 10 ml 0,1M Tris o pH 8,8 se 7 µl peroxidu vodíku, druhý (B) z 10 ml 2,5mM roztoku luminolu s 44 µl 90mM kyseliny kumarové v DMSO. Při přípravě 2,5mM roztoku luminolu byl nejprve připraven 250 mM roztok luminolu v DMSO, který byl poté naředěn 100x v 0,1M Tris o pH 8,8.

Vizualizace proteinů na membráně byla provedena smísením obou roztoků A a B, ve kterých byla membrána namočená a následně byla provedena detekce na přístroji ChemiDoc. Pro případnou kontrolu přenosu proteinů byla membrána po dobu 60 min barvena 0,1% roztokem Ponceau S. Po uplynutí této doby byla membrána opláchnuta destilovanou vodou a opět vyfotografována na přístroji Chemidoc.

V některých případech byl signál po použití výše zmíněných roztoků luminolu a peroxidu vodíku velmi slabý. Druhou možností bylo tedy použití SuperSignal® West Femto Trial Kit, který také obsahoval substrát pro křenuvou peroxidasu, nicméně detekce pomocí tohoto kitu byla citlivější. Nejprve bylo ve zkumavce smíšeno 100 µl roztoku Luminol/Enhancer a 100 µl roztoku Stable Peroxide Buffer (oba roztoky z kitu). Takto připravený roztok byl pipetou nanesen na membránu, která již byla položena na desce v přístroji Chemidoc a následně byla membrána vyfotografována.

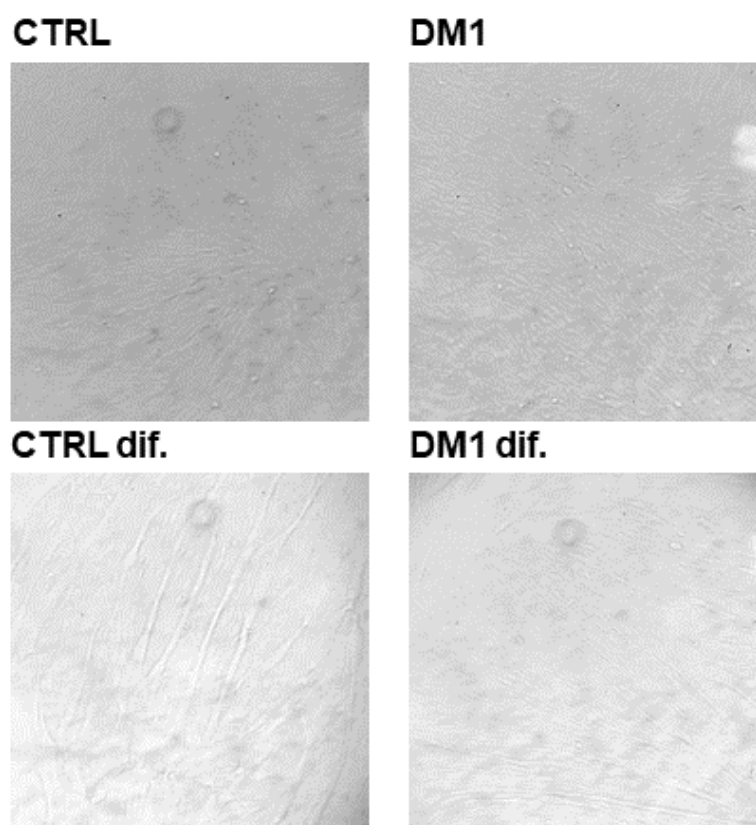
3.12. Hmotnostní spektrometrie

Nejprve byly připraveny zásobní 1M roztoky TCEP-HCl (redukční činidlo) a chloracetamidu (alkylační činidlo). Imunoprecipitované vzorky byly poté smíšeny s proteolytickým pufrům, jehož objem odpovídal polovině objemu vzorku. Následně byl do každé zkumavky přidán takový objem TCEP-HCl a chloracetamidu, aby výsledná koncentrace TCEP-HCl ve zkumavce odpovídala 5 mM a koncentrace chloracetamidu 20 mM. Po dobu 5 min byly vzorky zahřívány na teplotu 70 °C. Do každé zkumavky byl následně přidán 1 µl endoproteasy LysC (koncentrace 1 µg/µl). Takto byly vzorky zahřívány 2 hodiny při teplotě 40 °C. Nakonec byl do každé zkumavky přidán 1 µl trypsinu gold (koncentrace 1 µg/µl) a vzorky byly při teplotě 40 °C ponechány přes noc. Vzorky byly změřeny v servisním centru hmotnostní spektrometrie v BIOCEVu metodou nLC-ESI-MS-MS. Jedná se o nano kapalinovou chromatografii s reverzní fází a tandemovou hmotnostní spektrometrii. Ionizace vzorku byla provedena elektrosprejem. Analýza byla prováděna na přístroji Thermo Orbitrap Fusion od společnosti Thermo Scientific. Získané výsledky byly v servisním centru analyzovány a kvantifikovány softwary MaxQuant [31] a Perseus [32]. Proteiny ve vzorku byly identifikovány s použitím vyhledávače Andromeda [33] s následujícím nastavením – lidská database Uniprot (staženo červen 2020), FDR hodnota 1 %, neúplnost štěpení 2, fixní modifikace cysteinu, variabilní oxidace methioninu a acetylace N-konce proteinů.

4. Výsledky

4.1. Kultivace buněk

Dle výše popsaného postupu se podařilo napěstovat viabilní linie diferencovaných a nediferencovaných buněk. Při pohledu pod mikroskopem si byly nediferencované buněčné linie zdravých jedinců a pacientů s myotonickou dystrofií typu 1 velmi podobné. Po diferenciaci však u zdravých buněk docházelo ke vzniku tlustších vláken, zatímco nemocné buňky tvořily spíše tenká vlákna. Fotografie kultur jsou na *Obr. 8*.

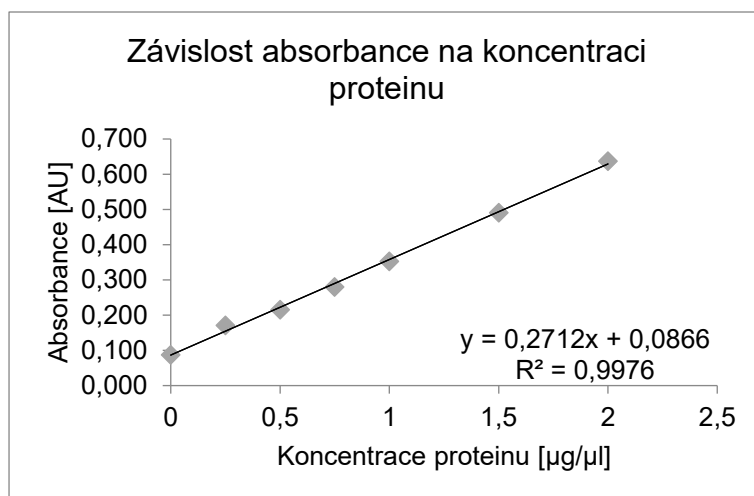


Obrázek 8: Nediferencované buněčné kultury CTRL a DM1, diferencované buněčné kultury CTRL a DM1. Foceno mobilním telefonem přes okulár mikroskopu IM-3, zvětšení okuláru 10x, zvětšení objektivu 10x.

4.2. Stanovení a lokalizace AMPK ve svalových buňkách

Studium zastoupení AMPK ve zdravých a nemocných, diferencovaných a nediferencovaných buňkách bylo provedeno pomocí metody Western blot. Po sklizení kultur bylo v buněčných lyzátech provedeno stanovení koncentrace proteinů metodou BCA. Na *Obr. 9* (str. 32) je uvedena kalibrační přímka sestavená z hodnot absorbance destilované vody a standardů A-F. V *Tab. 1* (str. 32) jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbance buněčných lyzáků, průměrná hodnota absorbance duplikátu, koncentrace proteinů ve vzorcích vypočtená z předpisu kalibrační přímky, objem lyzáků obsahující

20 µg proteinů a objem pufru potřebný pro doplnění objemu vzorku do 12 µl. Hodnoty absorbance vzorků jsou uvedeny s odečteným naměřeným rozdílem absorbance lyzačního pufru a destilované vody (~0,035 AU).

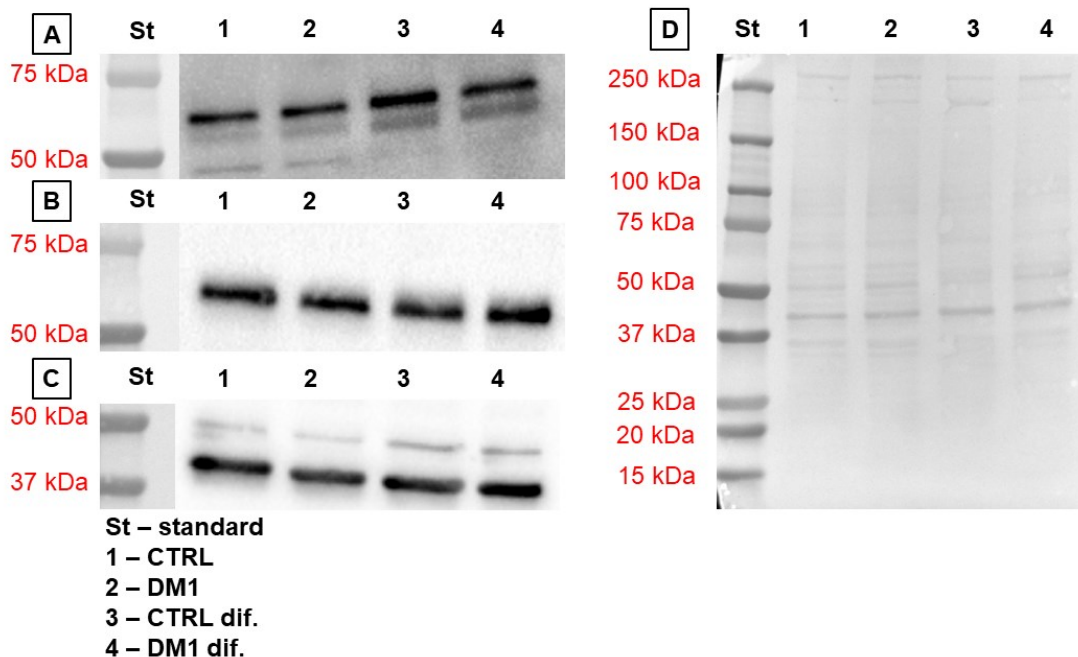


Obrázek 9: Graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu sestavený z naměřených hodnot absorbance destilované vody a standardů A-F z kitu PierceTM BCA Protein Assay Kit při 562 nm.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty absorbance buněčných lyzátů s odečtenou absorbancí pozadí. Proměřeny byly diferencované a nediferencované kultury CTRL a DM1, měření probíhalo v duplikátu (A (1), A (2)), z průměrné hodnoty (A (průměr)) byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku. Dále je uveden objem obsahující 20 µg proteinů (V (lyzát)) a objem pufru potřebný pro doplnění do 12 µl (V (pufr)).

	CTRL	DM1	CTRL dif.	DM1 dif.
A (1) [AU]	0,205	0,246	0,203	0,168
A (2) [AU]	0,207	0,210	0,250	0,186
A (průměr) [AU]	0,206	0,228	0,227	0,177
Koncentrace [µg/µl]	2,2	2,6	2,6	1,7
V (lyzát) [µl]	9,1	7,7	7,8	12,0
V (pufr) [µl]	2,9	4,3	4,2	0,0

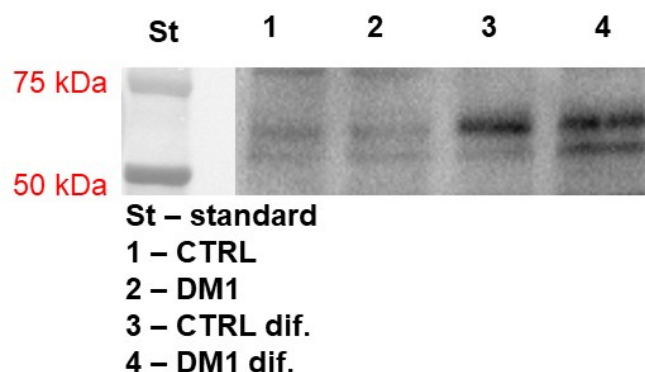
K 12 µl vzorků byly pipetovány 4 µl 4X Laemmliho pufru s ME a vzorky byly zahřívány po dobu 5 min při teplotě 95 °C. Takto byly vzorky nanášeny na dva gely. Po proběhnutí elektroforézy a přenosu na nitrocelulosovou membránu byla provedena detekce metodou Western blot. Pro detekci byla na jedné membráně použita protilátka Anti-PRKAA2 a na druhé membráně protilátka Anti-PRKAA1. α2 podjednotka AMPK má molekulovou hmotnost 62 kDa [34], α1 podjednotka 64 kDa [35], signál odpovídající těmto podjednotkám se tedy na membráně vyskytuje mezi proužky standardu o molekulových hmotnostech 50 a 75 kDa. Na membráně byla po detekci α2 podjednotky AMPK provedena kontrola nanášky detekcí aktinu o molekulové hmotnosti 42 kDa [36] a následně byla membrána obarvena Ponceau S. Fotografie membrán jsou uvedeny na Obr.10 (str. 33).



Obrázek 10: Western blot nediferencovaných a diferencovaných buněčných kultur CTRL a DM1. Detekce byla provedena pomocí protilátek (A) Anti-PRKAA2, (B) Anti-PRKAA1 a (C) Anti Human Actin Beta. (D) Barvení membrány Ponceau S.

Na membránách je patrné, že se AMPK v buňkách skutečně vyskytuje. Na Obr. 10 (A), na kterém byla detekovaná $\alpha 2$ podjednotka, si lze všimnout, že v diferencovaných buňkách je oproti nediferencovaným buňkám detekovaného proteinu více. Naproti tomu $\alpha 1$ podjednotka (Obr. 10 (B)) je ve všech typech buněk zastoupena ve stejné míře. Kontrola detekcí aktinu potvrdila, že je možné hladiny proteinů v jednotlivých vzorcích porovnávat, protože nanášky byly obdobné.

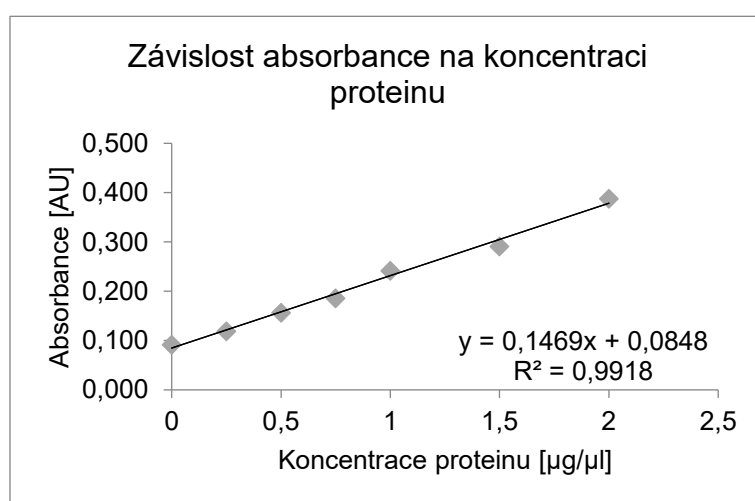
Dále byly pomocí metody Western blot sledovány rozdíly v koncentraci fosforylované formy AMPK mezi diferencovanými a nediferencovanými buňkami. Pro detekci byla použita protilátka proti fosforylované $\alpha 2$ a $\alpha 1$ podjednotce AMPK – Anti-AMPK $\alpha 1$, $\alpha 2$ (phospho). V tomto experimentu byly použity stejné vzorky a stejná nanáška jako v předchozím případě. Fotografie membrány je uvedena na Obr. 11 (str. 34).



Obrázek 11: Western blot nediferencovaných a diferencovaných buněčných kultur CTRL a DM1. Detekce byla provedena pomocí protilátky Anti-AMPK $\alpha 1$, $\alpha 2$ (phospho).

Dle výsledků Ravel-Chapiuse et al. je fosforylovaná forma v buňkách pacientů s DM1 oproti zdravým buňkám zastoupena méně [2]. Na *Obr. 11* se na membráně objevují dva výrazné signály, což komplikuje vyhodnocení. Je ale zřetelné, že se hladina fosforylované formy AMPK v buňkách zvyšuje po diferenciaci.

Detekce $\alpha 2$ podjednotky AMPK v diferencovaných a nediferencovaných buňkách byla také provedena ve vzorcích, u kterých byla izolována jádra a cytosol. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je vhodné pro imunoprecitaci AMPK použít lyzát z celých buněk nebo pouze jaderný či cytosolární lyzát. V lyzátech byla opět nejprve stanovena koncentrace proteinů a následně byl vypočten objem lyzátů obsahující 40 μg proteinů a objem pufru potřebný pro doplnění objemu vzorku do 9 μl . Na *Obr.12* je uveden kalibrační graf a v *Tab. 2* (*str. 35*) jsou uvedeny naměřené a vypočtené údaje pro buněčné lyzáty. Hodnoty absorbance vzorků jsou uvedeny s odečteným naměřeným rozdílem absorbance lyzačního pufru a destilované vody ($\sim 0,032$ AU).

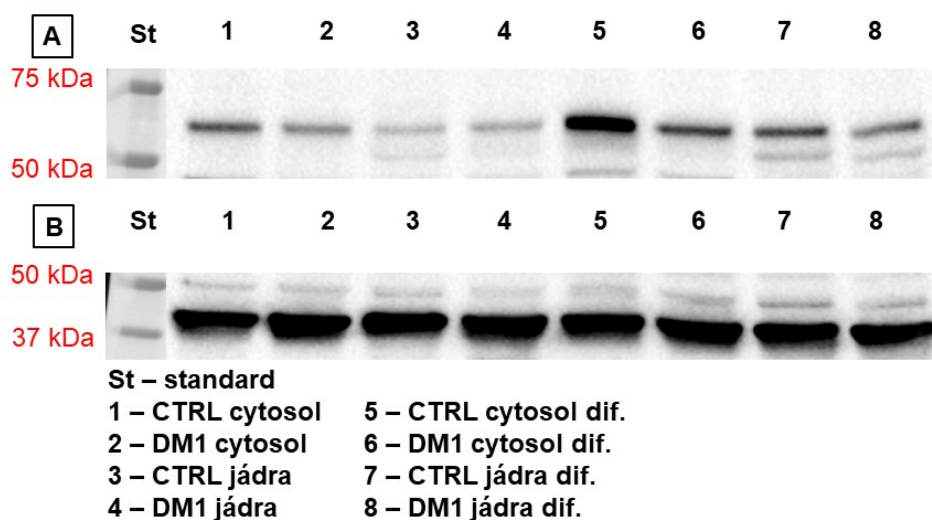


Obrázek 12: Graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu sestavený z naměřených hodnot absorbance destilované vody a standardů A-F z kitu PierceTM BCA Protein Assay Kit při 562 nm.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty absorbance buněčných lyzátů s odečtenou absorbancí pozadí. Proměřeny byly jaderné a cytosolární lyzáty diferencovaných a nediferencovaných kultur CTRL a DM1, měření probíhalo v duplikátu (A (1), A (2)), z průměrné hodnoty (A (průměr)) byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku. Dále je uveden objem obsahující 40 µg proteinů (V (lyzát)) a objem pufru potřebný pro doplnění do 9 µl (V (pufr)).

	CTRL cyt.	DM1 cyt.	CTRL jád.	DM1 jád.	CTRL cyt. dif.	DM1 cyt. dif.	CTRL jád. dif.	DM1 jád. dif.
A (1) [AU]	0,324	0,41	0,233	0,433	0,233	0,300	0,238	0,299
A (2) [AU]	0,327	0,432	0,242	0,423	0,245	0,301	0,254	0,306
A (průměr) [AU]	0,326	0,421	0,238	0,428	0,239	0,301	0,246	0,303
Koncentrace [µg/µl]	8,2	11,4	5,2	11,7	5,2	7,3	5,5	7,4
V (lyzát) [µl]	4,9	3,5	7,7	3,4	7,6	5,4	7,3	5,4
V (pufr) [µl]	4,1	5,5	1,3	5,6	1,4	3,6	1,7	3,6

K 9 µl vzorků byly pipetovány 3 µl 4X Laemmliho pufru s ME a vzorky byly zahřívány po dobu 5 min při teplotě 95 °C. Takto byly vzorky nanášeny na gel a byla provedena elektroforéza. Po přenosu na nitrocelulosovou membránu byly separované proteiny detekovány metodou Western blot pomocí protilátky Anti-PRKAA2. Na membráně byla poté provedena kontrola nanášky detekcí aktinu. Fotografie membrány je uvedena na Obr. 13.

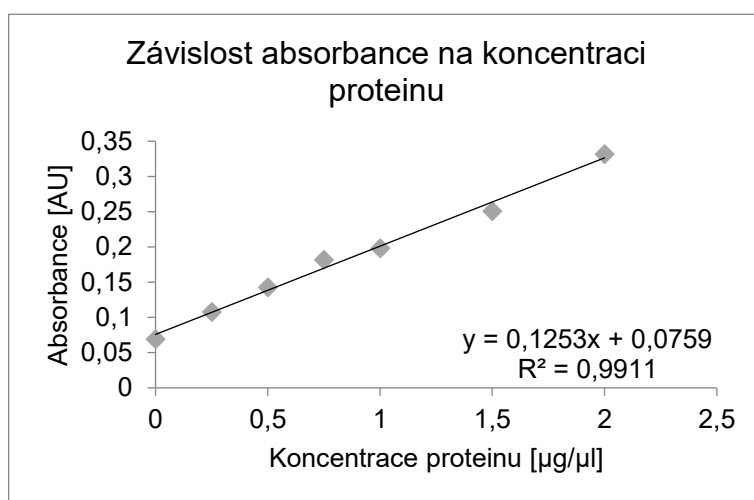


Obrázek 13: Western blot jaderných a cytosolárních lyzátů nediferencovaných a diferencovaných buněčných kultur CTRL a DM1. Detekce byla provedena pomocí protilátky (A) Anti-PRKAA2, (B) Anti Human Actin Beta.

Z výsledků je patrné, že se AMPK vyskytuje jak v cytosolu, tak v jádře, pro imunoprecipitaci byly tedy využity lyzáty celých buněk. Kontrola detekcí aktinu potvrdila, že je možné hladiny proteinů v jednotlivých vzorcích porovnávat, protože nanášky byly obdobné.

4.3. Optimalizace imunoprecipitace

Pro úspěšnou imunoprecipitaci $\alpha 2$ podjednotky z buněčných lyzátů bylo potřeba určit vhodný poměr buněčného lyzátu a magnetických kuliček s navázanou protilátkou tak, aby nedošlo k překročení kapacity afinitního nosiče. Po sklizení diferencovaných buněk bylo v lyzátech provedeno stanovení koncentrace proteinů. Ze získaných hodnot byl opět vypočten objem lyzátů obsahující 20 μg proteinů a objem pufru potřebný pro doplnění objemu vzorku do 12 μl . Na *Obr.14* je uveden kalibrační graf a v *Tab. 3* naměřené a vypočtené údaje pro buněčné lyzáty. Hodnoty absorbance vzorků jsou uvedeny s odečteným naměřeným rozdílem absorbance lyzačního pufru a destilované vody ($\sim 0,027$ AU).



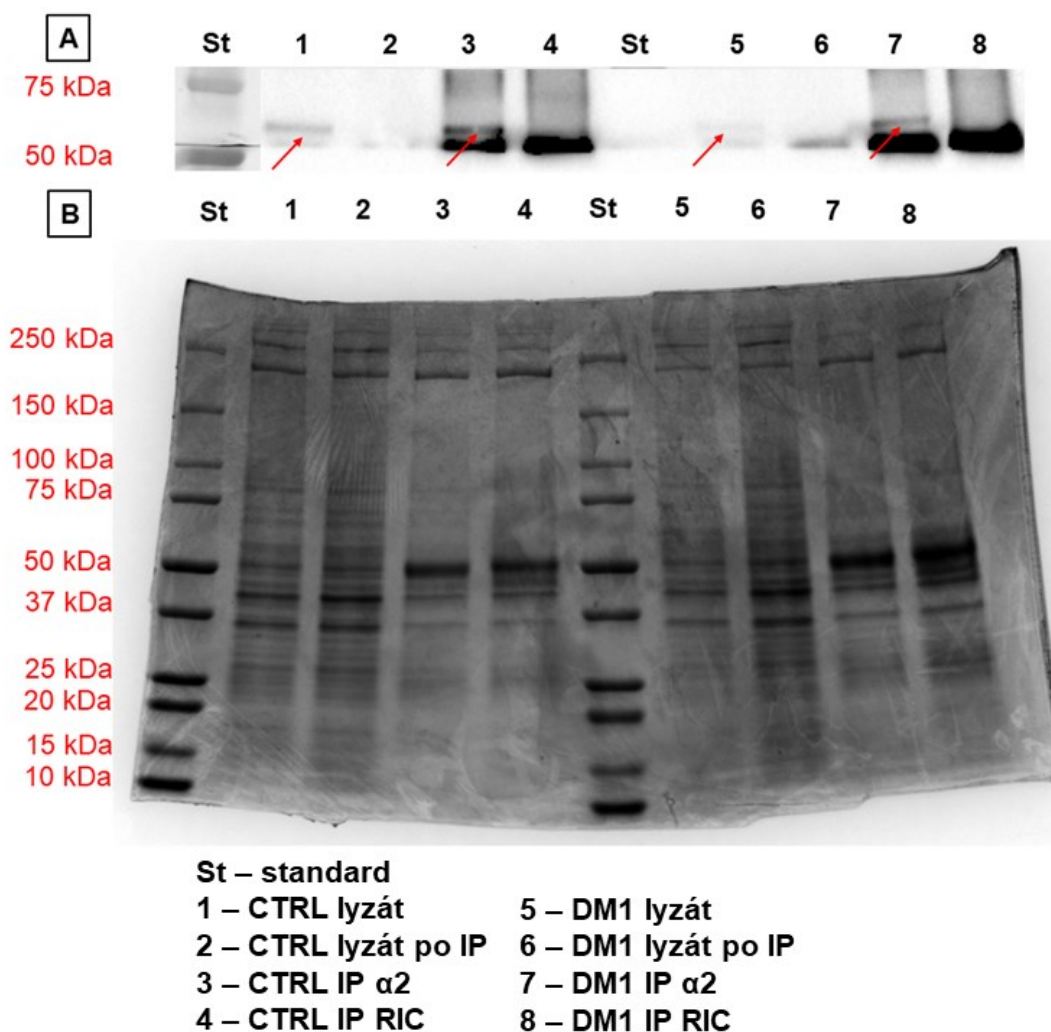
Obrázek 14: Graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu sestavený z naměřených hodnot absorbance destilované vody a standardů A-F z kitu PierceTM BCA Protein Assay Kit při 562 nm.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty absorbance buněčných lyzátů s odečtenou absorbancí pozadí. Proměřeny byly diferencované kultury CTRL a DM1, měření probíhalo v duplikátu (A (1), A (2)), z průměrné hodnoty (A (průměr)) byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku. Dále je uveden objem obsahující 20 μg proteinů (V (lyzát)) a objem pufru potřebný pro doplnění do 12 μl (V (pufr)).

	CTRL dif.	DM1 dif.
A (1) [AU]	0,128	0,144
A (2) [AU]	0,128	0,125
A (průměr) [AU]	0,128	0,135
Koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	2,1	2,3
V (lyzát) [μl]	9,6	8,6
V (pufr) [μl]	2,4	3,4

Pro imunoprecipitaci bylo v obou případech použito 700 μl buněčného lyzátu, ve vzorku CTRL odpovídala tedy hmotnost proteinů přibližně 1,47 mg a ve vzorku DM1 1,61 mg. Po imunoprecipitaci byla provedena elektroforéza. Na gel bylo nanášeno 5 μl imunoprecipitovaných vzorků, které byly přímo eluovány do 1x Laemmliho pufru. Dále

byly na gel naneseny vzorky buněčných lyzátů a zbytků buněčných lyzátů po imunoprecipitaci. Ty byly připraveny smísením 12 μ l vzorků připravených dle údajů v *Tab. 3 (str. 36)* se 4 μ l 4X Laemliho pufru a ME. Tímto způsobem byly připraveny dva gely, na jednom byla provedena detekce metodou Western blot (pro vizualizaci byla použita protilátka Anti-PRKAA2), druhý byl obarven barvivem Coomassie Brilliant Blue. Fotografie jsou uvedeny na *Obr. 15*.



Obrázek 15: (A) Western blot lyzátů diferencovaných buněčných kultur CTRL a DM1, zbytků buněčných lyzátů po imunoprecipitaci (IP) a vzorků imunoprecipitovaných pomocí protilátek Anti-PRKAA2 a RIC. Červenou šipkou je označen signál odpovídající α 2 podjednotce AMPK. (B) Proteiny separované v gelu, obarvené barvivem Coomassie Brilliant Blue.

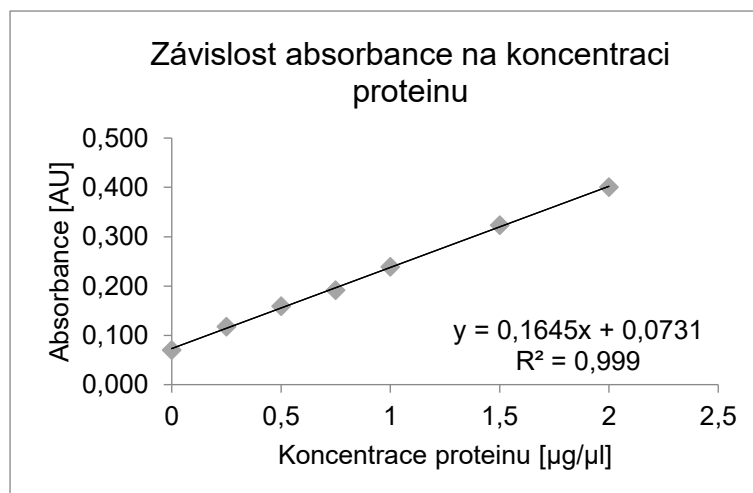
Protilátka Anti-PRKAA2, byla používána i pro imunoprecipitaci. Při jejím použití pro Western blot poté sekundární protilátka na membráně kromě primární protilátky proti α 2 podjednotce AMPK (molekulová hmotnost 62 kDa) značila také těžký řetězec protilátky použité při imunoprecipitaci (molekulová hmotnost 50 kDa [37]). Na membráně byly oba tyto proteiny velmi blízko sebe, což komplikovalo jejich spolehlivé rozlišení. Z tohoto

důvodu byla membrána ustřižena těsně nad proužkem standardu o molekulové hmotnosti 50 kDa, nicméně signál označené protilátky z imunoprecipitace byl stále částečně patrný.

Na membráně lze v oblasti 60 kDa nalézt signál v imunoprecipitovaných vzorcích (CTRL IP $\alpha 2$ a DM1 IP $\alpha 2$), zatímco v negativních kontrolách (CTRL IP RIC a DM1 IP RIC) se tento signál nevyskytuje. Na *Obr. 15 (str. 37)* je také vidět, že v buněčném lyzátu byla detekována $\alpha 2$ podjednotka AMPK, ale ve zbytku lyzátu po imunoprecipitaci na magnetických kuličkách žádný signál není. To znamená, že $\alpha 2$ podjednotka AMPK byla v lyzátu efektivně vychytána a v lyzátu po imunoprecipitaci už nezůstala.

4.4. Hmotnostní spektrometrie

Při pohledu pod mikroskopem i z výsledků analýzy Western blot je patrné, že výrazné rozdíly mezi zdravými a nemocnými buňkami vyvstávají především po diferenciaci. Také bylo zjištěno, že se AMPK vyskytuje jak v jádře, tak v cytosolu. Z toho důvodu byly pro analýzu metodou hmotnostní spektrometrie použity lyzáty z celých buněk diferencovaných buněčných kultur. Po sklizení triplikátu diferencovaných buněk DM1 a CTRL byla v lyzátech stanovena koncentrace proteinů. V předchozím experimentu byla úspěšně provedena imunoprecipitace s buněčnými lyzáty obsahujícími přibližně 1,5 mg proteinů, z údajů získaných po stanovení koncentrace byl tak vypočten objem lyzátů, ve kterém se vyskytovalo toto množství proteinů. Na *Obr.16* je uveden kalibrační graf a v *Tab. 4 (str. 39)* naměřené a vypočtené údaje pro buněčné lyzáty. Hodnoty absorbance vzorků jsou uvedeny s odečteným naměřeným rozdílem absorbance lyzačního pufru a destilované vody ($\sim 0,035$ AU).



Obrázek 16: Graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu sestavený z naměřených hodnot absorbance destilované vody a standardů A-F z kitu PierceTM BCA Protein Assay Kit při 562 nm.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty absorbance buněčných lysátů s odečtenou absorbancí pozadí. Proměřeny byly diferencované kultury CTRL a DM1, měření probíhalo v duplikátu (A (1), A (2)), z průměrné hodnoty (A (průměr)) byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku. Dále je uveden objem obsahující 1,5 mg proteinů (V (lyzát)) a objem pufru potřebný pro doplnění do 500 μ l (V (pufr)).

	CTRL 1	CTRL 2	CTRL 3	DM1 1	DM1 2	DM1 3
A (1) [AU]	0,174	0,186	0,178	0,18	0,173	0,183
A (2) [AU]	0,180	0,185	0,173	0,193	0,169	0,188
A (průměr) [AU]	0,177	0,186	0,176	0,187	0,171	0,186
Koncentrace [μ g/ μ l]	3,2	3,4	3,1	3,4	3,0	3,4
V (lyzát) [μ l]	470	440	480	440	500	440
V (pufr) [μ l]	30	60	20	60	0	60

Vzorky byly imunoprecipitovány pomocí protilátky Anti-PRKAA2 a následně analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie. Výsledkem byly údaje o iontovém proudu přeneseném jednotlivými peptidy identifikovanými v triplikátech CTRL a DM1 a v negativních kontrolách (ty odpovídaly imunoprecipitaci pomocí necílené protilátky RIC). Hodnota je v souboru uvedena jako exponent o základu dva. Ze souboru byly po softwarovém zpracování manuálně odstraněny proteiny, u kterých pouze jeden z multiplikátu obsahoval vyšší hodnoty přeneseného proudu, než byla hladina šumu a proteiny, které obsahovaly příliš vysoké hodnoty přeneseného proudu pro negativní kontroly. Výsledky měření jsou uvedeny v Příloze 1.

Dále je v souboru uvedena hodnota kumulativního iontového proudu přeneseného danými proteiny ve všech vzorcích dohromady. Mezi deset proteinů, které dle výsledků přenesly kumulativně největší iontový proud, ať už se jednalo o vzorky CTRL nebo DM1, patřily následující proteiny (uveden název genu): *TJAP1*, *PRKAA2*, *MYO18B*, *PRKAB2*, *ARGHEF12*, *SQSTM1*, *PRKAG1*, *C4A;C4B*, *PRKAB1*, *SRRT*.

Druhý největší proud z proteinů nalezených ve vzorcích přenesla α 2 podjednotka AMPK (název genu *PRKAA2*), na kterou byla cílena použitá protilátka. Ve vzorcích byly také významně zastoupeny další podjednotky AMPK – β 2 (*PRKAB2*) a γ 1 (*PRKAG1*). Tyto výsledky dokazují, že se α 2 podjednotku AMPK podařilo úspěšně imunoprecipitovat a je možné proteiny nalezené ve vzorku považovat za součást signalizační kaskády AMPK.

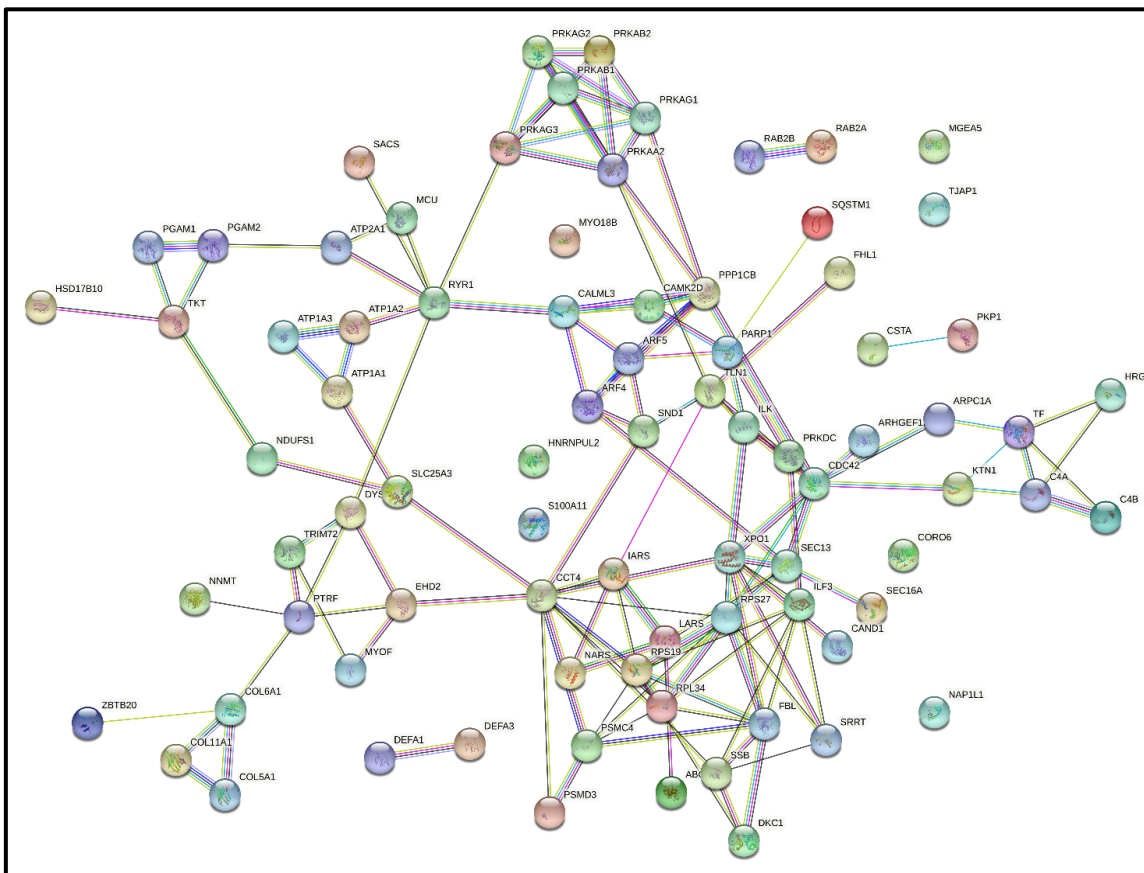
Z hodnot přeneseného proudu pro triplikáty vzorků DM1 i CTRL byl následně pro všechny proteiny vyjádřen medián. Poté byl z mediánů vyjádřen poměr zastoupení daného proteinu v DM1 oproti CTRL a na základě poměru mediánů byly proteiny rozděleny do tří kategorií. Do první kategorie spadaly ty, u kterých bylo zastoupení

v DM1 buňkách oproti CTRL buňkám vyšší, než 1,5násobné ($>1,5$), druhá kategorie obsahovala proteiny, jejichž zastoupení ve zdravých a nemocných buňkách bylo v podstatě obdobné ($<1,5;0,7>$). Rozmezí třetí kategorie bylo analogické prvnímu – spadaly do ní proteiny, které se v DM1 vyskytovaly oproti CTRL výrazně méně – v menším, než dvoutřetinovém množství ($<0,7$). Takto rozřazené výsledky jsou uvedeny v *Tab. 5 (str. 41)*.

Tabulka 5: Výsledky z hmotnostní spektrometrie triplikátu buněčných lysátů DMI a CTRL (diferencované buňky) imunoprecipitovaných protilátkou Anti-PRKAA2. Z mediánů byl vyjádřen poměr proudu přeneseného daným proteinem (odpovídá zastoupení proteinu) ve vzorcích DMI proti CTRL. Podle tohoto poměru byly peptidy rozděleny do tří kategorií od těch, které se v DMI vyskytovaly ve vyšší než 1,5násobné koncentraci po ty, které se naopak v CTRL vyskytovaly ve vyšší než 1,5násobné koncentraci.

>1,5			
Název genu	Zastoupení ve vzorcích DM1/ CTRL	Název genu	Zastoupení ve vzorcích DM1/ CTRL
CSTA	56,31	SQSTM1	2,14
TKT	10,54	C4A;C4B	2,01
NNMT	6,08	SRRT	1,93
ZBTB20	4,42	TF	1,69
MGEA5	3,33	SACS	1,63
TJAP1	2,92	RPS19	1,57
ARHGEF12	2,84	PRKAG2	1,51
HRG	2,54	PRKAB1	1,50
<1,5;0,7>			
Název genu	Zastoupení ve vzorcích DM1/ CTRL	Název genu	Zastoupení ve vzorcích DM1/ CTRL
SEC13	1,41	PRKAG1	1,00
SEC16A	1,41	SND1	0,99
PKP1	1,36	DEFA3;DEFA1	0,92
PRKAG3	1,24	ILF3	0,89
PRKAA2	1,16	PRKAB2	0,87
PGAM1;PGAM2	1,08	PTRF	0,80
MYO18B	1,02	CALML3	0,75
S100A11	1,02	PPP1CB	0,72
<0,7			
Název genu	Zastoupení ve vzorcích DM1/ CTRL	Název genu	Zastoupení ve vzorcích DM1/ CTRL
CAMK2D	0,65	IARS	0,13
RPL34	0,51	COL5A1	0,13
HSD17B10	0,38	TLN1	0,13
PSMD3	0,34	ARF4;ARF5	0,13
COL6A1	0,25	FBL	0,12
CDC42	0,23	MYOF	0,11
ATP1A1;ATP1A2;ATP1A3	0,23	NDUFS1	0,10
XPO1	0,21	NARS	0,10
TRIM72	0,19	HNRNPUL2	0,10
PSMC4	0,18	PARP1	0,10
DKC1	0,17	ATP2A1	0,10
EHD2	0,17	LARS	0,09
RYR1	0,17	DYSF	0,09
ABCF1	0,16	COL11A1	0,09
RAB2A;RAB2B	0,15	RPS27	0,08
CAND1	0,15	KTN1	0,07
NAP1L1	0,15	CORO6	0,06
CCT4	0,15	PRKDC	0,06
MCU	0,15	ARPC1A	0,06
SSB	0,14	FHL1	0,05
ILK	0,14	SLC25A3	0,04

V dalším kroku byly všechny proteiny z upraveného souboru analyzovány pomocí algoritmu STRING [38], který umožňuje vizualizaci známých proteinových interakcí. STRING čerpá informace z řady databází, jako například PDB nebo BioGRID. Kromě toho, že interakce hledá, posuzuje a vizualizuje také jejich „pravdivost“ – s jakou pravděpodobností daná interakce skutečně existuje. „Pravdivější“ interakce jsou zobrazeny silnější čarou. Výsledek z databáze STRING je uveden na *Obr. 17*.



Obrázek 17: Vizualizace známých interakcí proteinů nalezených v imunoprecipitovaných vzorcích DMI a CTRL. Silnější čarou jsou zobrazeny interakce, které byly v literatuře popsány již několikrát. Vytvořeno pomocí databáze STRING [38].

Na *Obr. 17* je patrné, že se skutečně podařilo imunoprecipitovat proteiny, které jsou součástí interakční sítě AMPK, protože algoritmus STRING sestavil mapu, na které je většina proteinů propojená. Zároveň z výsledků databáze vyplynulo, že byly koimunoprecipitovány proteiny, u kterých dosud nebyla v literatuře popsána přímá interakce s AMPK ani s žádným z dalších koimunoprecipitovaných proteinů v souboru. Konkrétně se jedná o proteinovou O-GlcNacasu (*MGEA5*), protein asociovaný s těsnými spoji 1 (*TJAP1*), nekonvenční myosin XVIIIb (*MYO18B*), protein S100-A11 (*S100A11*), neutrofilní defensin (*DEFA1*, *DEFA3*), ras-sprízněný protein Rab-2A a Rab-2B (*RAB2A*, *RAB2B*), nukleosomový montážní protein 1-podobný 1 (*NAP1L1*) a koronin-6 (*CORO6*).

O-GlcNAcasa a protein asociovaný s těsnými spoji 1 patří do kategorie proteinů, které byly v DM1 zastoupeny ve větším než 1,5násobném množství, v obou případech přibližně 3krát více. Nekovneční myosin XVIIIb, protein S100-A11 a neutrofilní defensin byly ve zdravých a nemocných buňkách zastoupeny přibližně stejně. Ras-spřízněný protein Rab-2A a Rab-2B, nukleosomový montážní protein 1-podobný 1 a koronin-6 se v DM1 buňkách oproti CTRL vyskytovaly v menším, než pětinném zastoupení (viz *Tab. 5, str. 41*).

Soubor imunoprecipitovaných proteinů byl dále zobrazen pomocí algoritmu String rozdělený do tří výše zmíněných kategorií. Tyto mapy jsou zobrazeny na *Obr. 18 (str. 44)*.

5. Diskuse

Koncentrace $\alpha 2$ podjednotky AMPK v buňkách po proběhnutí diferenciaci stoupá. Na *Obr. 10 (A) (str. 33)*, *11 (str. 33)* i *13 (A) (str. 35)* je v drahách s buněčnými lyzáty diferencovaných kultur oproti drahám s buněčnými lyzáty nediferencovaných kultur patrný výraznější signál. Z fotografie buněčných kultur na *Obr. 8 (str. 31)* je zároveň patrné, že proces diferenciaci je u pacientů s myotonickou dystrofií výrazně ovlivněn.

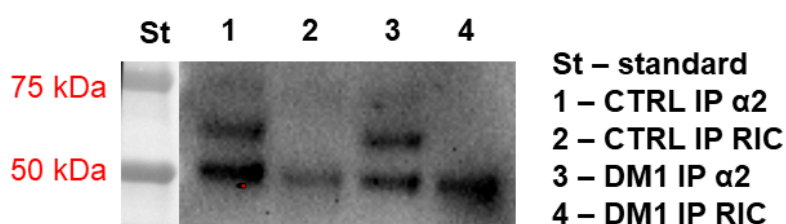
Co se týče rozdílu v koncentraci $\alpha 2$ podjednotky AMPK mezi zdravými a nemocnými buňkami (ať už diferencovanými či nediferencovanými), nejsou však výsledky z experimentů metodou Western blot jednoznačné. Vyhodnocení výsledků komplikuje skutečnost, že se na membránách pod pruhem nejvýraznějšího signálu objevuje na úrovni standardu o molekulové hmotnosti 50 kDa ještě druhý výrazný pruh. Tento signál by mohl představovat částečně degradovanou $\alpha 2$ podjednotku AMPK. K proteolyse $\alpha 2$ podjednotky AMPK mohlo dojít v průběhu experimentů mnoha různými způsoby, například při lyzování buněk, při centrifugaci nebo působením vysoké teploty při vaření vzorků v Laemmliho pufru. Další možností je, že dva pruhy představují $\alpha 1$ a $\alpha 2$ podjednotku. V experimentech byla sice použita protilátka proti $\alpha 2$ podjednotce, aminokyselinová sekvence obou podjednotek je však v oblasti, na kterou míří protilátka Anti-PRKAA2, poměrně podobná. Na *Obr. 19 (str. 46)* je zobrazeno porovnání sekvencí. Molekulová hmotnost $\alpha 2$ a $\alpha 1$ podjednotky se nicméně liší pouze o 2 kDa, není tedy příliš pravděpodobné, že by byly podjednotky na membránách takto výrazně rozlišeny. Třetí možností je, že dva pruhy představují fosforylovanou a nefosforylovanou formu AMPK. Fosforylace proteinu způsobí zvýšení jeho molekulové hmotnosti, výsledný rozdíl v hmotnosti oproti nefosforylovanému proteinu je však velmi malý a proteiny na membráně by nebyly výrazně odlišeny. Fosfát však zároveň proteinu udělí vyšší záporný náboj, který by na pohyblivost v elektroforetickém gelu významnější efekt mít mohl. Zároveň může v důsledku fosforylace docházet ke změně konformace proteinu, která také pohyblivost proteinu v gelu ovlivňuje.

AMPK α 1	AEKQKHDGRVKIGHYILGDTLGVGTFGKVKVKGHELTGHKVAVKILNRQKIRSLDVGKI
identita	AEKQKHDGRVKIGHY+LGDTLGVGTFGKVK+G+H+LTGHKVAVKILNRQKIRSLDVGKI
AMPK α 2	AEKQKHDGRVKIGHYVLGDTLGVGTFGKVKIGEHQLTGHKVAVKILNRQKIRSLDVGKI
AMPK α 1	RREIQNLKLFRRHPHIIKLYQVISTPDI FVMMEYVSGGELFDYICKNGRLDEKESRRLFQ
identita	+REIQNLKLFRRHPHIIKLYQVISTP+D FVMMEYVSGGELFDYICK+GR++E E+RRLFQ
AMPK α 2	KREIQNLKLFRRHPHIIKLYQVISTPTDFVMMEYVSGGELFDYICKHGRVEEMEARRLFQ
AMPK α 1	QILSGVDYCHRHMVVHRDLKPENVLDDAHMNAKIADFGLSNMMSDGEFLR T SCGSPNYAA
identita	QILS VDYCHRHMVVHRDLKPENVLDDAHMNAKIADFGLSNMMSDGEFLR T SCGSPNYAA
AMPK α 2	QILSAVDYCHRHMVVHRDLKPENVLDDAHMNAKIADFGLSNMMSDGEFLR T SCGSPNYAA
AMPK α 1	PEVISGRLYAGPEVDIWSGVILYALLCGTLPFDDDHVPTLFFKKICDGI FYTPQYLNPSV
identita	PEVISGRLYAGPEVDIWS GVILYALLCGTLPFDD+HVPTLFFKKI G+FY P+YLN SV
AMPK α 2	PEVISGRLYAGPEVDIWSGVILYALLCGTLPFDD+HVPTLFFKKIRGGVFYIPEYLNRSV
AMPK α 1	ISLLKHMLQVDPMKRATIKDIREHEWFKQDLPKYLFPEDPSYSSTMIDDEALKEVCEKFE
identita	+LL HMLQVDP+KRATIKDIREHEWFKQDLP YLFPEDPSY + +IDDEA+KEVCEKFE
AMPK α 2	ATLLMHMLQVDPKLRATIKDIREHEWFKQDLP SYLFPEDPSYDANVIDDEAVKEVCEKFE
AMPK α 1	CSEEEVLSCLYRNHQDPLAVAYHLIIDNRRIMN EAKDFYLATSPPD-SFLDDHHL ----
identita	C+E EV++ LY+ + QD LAVAYHLIIDNRRIMN+A +FYLA+SPP SF+DD +
AMPK α 2	CTESEVMNSLYSGDPQDLAVAYHLIIDNRRIMNQASEFYLASSPPSGSFMDDSAMHIPP
AMPK α 1	-TRPHERVFPFLVAETPRARHTLDELNPQKSKHQGVRKAK WHLGIRSQSRPNDIMAEVCR
Identita	+PHPER+P L+A++P+AR LD LN K K V+KAKWHLGIRSQS+P DIMAEV R
AMPK α 2	GLKPHPERMPPLIADSPKARCPLDALNTTKPKSLAVKKAKWHLGIRSQSKPYDIMAEVYR
AMPK α 1	AIKQLDYEWKVVNPPYYLRVRRKNPVTSTYSKMSLQLYQVDSRTYLLDFRSIDDEITEAKS
identita	A+KQLD+EWKVVN Y+LRVRRKNPVT Y KMSLQLY VD+R+YLLDF+SIDDE+ E +S
AMPK α 2	AMKQLDFEWKVVNAYHLRVRRKNPVTGNVYKMSLQLYLVDNRSYLLDFKS IDDEVVEQRS
AMPK α 1	GTATPQRSGSVSNYRSCQRSDSDAEAQGSSEVSLTSSVTSLDSSPVDLTPRPGSHTIEF
identita	G++TPQRS S + + S A+ S SLT S+T S+ ++PR GSHT++F
AMPK α 2	GSSTPQRSCSAAGLHRPRSSFDSTTAESHLSLGSGLTGLTG--STLSSVSPRLGSHTMDF
AMPK α 1	FEMCANLIKILAQ
identita	FEMCA+LI LA+
AMPK α 2	FEMCASLITTLAR

Obrázek 19: Srovnání aminokyselinových sekvencí $\alpha 1$ a $\alpha 2$ podjednotek AMPK. Zeleně jsou vyznačeny imunogeny protilátky Anti-AMPK $\alpha 1$, $\alpha 2$ (phospho). Červeně je vyznačena imunogenní sekvence protilátky Anti-PRKAA1 a modře je vyznačena imunogenní sekvence protilátky Anti-PRKAA2. Vytvořeno pomocí internetového programu Blast [39].

Ve výsledcích experimentu uvedeného na Obr. 11 (str. 33), jehož cílem bylo charakterizovat zastoupení fosforylované (tedy aktivované) formy AMPK, lze opět v oblasti mezi 50 a 75 kDa pozorovat dva výrazné pruhy. Je však zřetelné, že zastoupení fosforylované formy je v CTRL a DM1 buňkách rozdílné. Protože fosforylovaná forma AMPK je formou aktivní, vypovídá tento výsledek o rozdílu v aktivitě tohoto enzymu mezi zdravými a nemocnými buňkami.

Použití protilátky Anti-PRKAA2 od Atlas Antibody pro optimalizaci imunoprecipitace mělo svá úskalí. Signál odpovídající $\alpha 2$ podjednotce nebyl od signálu odpovídajícím těžkému řetězci IgG (protilátka z imunoprecipitace) dostatečně rozlišen. V ideálním případě by měla být pro detekci použita protilátka z jiného zvířete, než z jakého byla protilátka používána pro imunoprecipitaci. Tím by se zamezilo označení obou těchto protilátek sekundární protilátkou. Z tohoto důvodu byl proveden pokus s myší protilátkou Anti-AMPK alpha 1/2 od společnosti Merck. Fotografie membrány je uvedena na *Obr. 20*.



Obrázek 20: Western blot diferencovaných buněčných kultur CTRL a DM1 imunoprecipitovaných pomocí protilátek Anti-AMPK alpha 1/2 a Rabbit Isotype Control (negativní kontrola).

Přestože lze na membráně nalézt signál odpovídající $\alpha 2$ podjednotce AMPK, je patrné, že protilátka výrazně nespecificky značí i jiný protein a signál je oproti membránám značeným protilátkou Anti-PRKAA2 neostrý a rozptýlý. Jiná vhodná protilátka neexistuje, protilátka Anti-PRKAA2 tak zůstala protilátkou volby.

V afinitně purifikovaných vzorcích diferencovaných buněk, které byly studovány metodou hmotnostní spektrometrie, bylo nalezeno množství koimunoprecipitovaných proteinů, které se v nemocných buňkách vyskytovaly v nižším či vyšším zastoupení než ve zdravých buňkách. To, že byly tyto proteiny koimunoprecipitovány, vypovídá o existenci interakce daných proteinů s AMPK, případně s některou z částí její signalizační dráhy, tak, jak je patrné na *Obr. 17 (str. 42)*. To, že se hladiny těchto proteinů v DM1 buňkách oproti nemocným buňkám liší, může být způsobeno dvěma příčinami. Jednak to může být způsobeno celkově vyšší/nížší koncentrací proteinu v buňce (protein se více/méně exprimuje), může to být ale také důsledkem rozdílné afinity proteinu k imunoprecipitačnímu komplexu (dochází ke změně míry interakce proteinu s AMPK nebo s některým z dalších koimunoprecipitovaných proteinů).

V souboru koimunoprecipitovaných proteinů nalézáme dva výše zmíněné proteiny zodpovědné za charakter svalové hmoty – SERCA1 (gen *ATP2A1*) a RyR1. Dle citované literatury jsou svalové potíže DM1 pacientů způsobené především chybným sestřihem genů těchto proteinů, v *Tab. 5 (str. 41)* je však patrné, že jsou v DM1 buňkách SERCA1

i RyR1 zároveň v nižším zastoupení. Špatný sestřih tak pravděpodobně zasahuje i do exprese genů. Důvodem může být například porušení transportu mRNA do cytosolu a snížený výtěžek translace.

Jedním z afinitně purifikovaných proteinů je také vápník/kalmodulin-dependentní kinasa typu 2 podjednotka delta (CAMK2D). Stejně jako CAMKK2, která reguluje AMPK, patří CAMK2D do rodiny vápník/kalmodulin-dependentních kinas. Tyto kinasy jsou součástí signalizačních kaskád stimulovaných vápenatými ionty [40]. Kinasa CAMK2D reguluje mimo jiné i výše zmíněné ryanodinové receptory [41] a ATPasu SERCA [42]. V DM1 buňkách byla CAMK2D oproti zdravým buňkám zastoupena přibližně 1,5krát méně. Protože homeostáza vápenatých iontů významně ovlivňuje svalovou činnost, je snížení hladiny tohoto proteinu pravděpodobně jedním z dalších mechanismů přispívajících ke svalovým problémům pacientů s DM1.

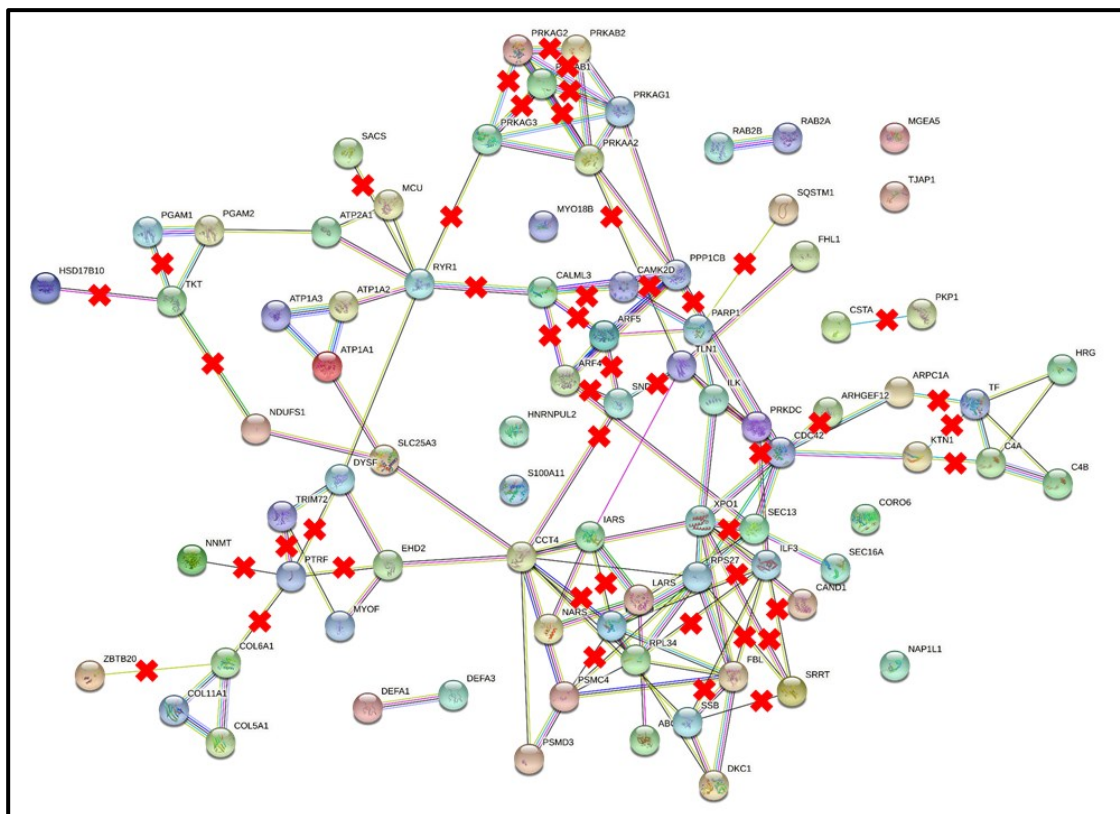
Mezi proteiny, které jsou v DM1 zastoupeny přibližně třikrát více, a u nichž nebyla dosud identifikována interakce s AMPK, ani s žádným z koimunoprecipitovaných proteinů, patří O-GlcNAcasa (gen *MGEA5*). O-GlcNAcasa (OGA) je protein, který zprostředkovává hydrolýzu N-acetylglukosaminu z hydroxylové skupiny serinu nebo threoninu modifikovaného proteinu [43]. O-glykosylace N-acetylglukosaminem (dále „O-GlcNAcylace“) patří mezi významné post-translační modifikace a bylo identifikováno přes 5 000 proteinů, které jsou substráty OGA. Jedná se o proteiny účastníci se buněčné signalizace, regulace genové exprese nebo metabolismu. Tento typ glykosylace se od ostatních odlišuje svou reverzibilitou – protein může být znovu „O-GlcNAcylován“ i po hydrolýze předešlého N-acetylglukosaminu. Zároveň k „O-GlcNAcylici“ dochází v cytosolu a jádře, ne na endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu, jako u ostatních typů glykosylací [44]. V těle neexistuje jiný enzym než OGA, který by byl schopen N-acetylglukosamin z glykosylovaných proteinů odštěpovat, její zvýšená exprese tak zapříčiní snížení podílu modifikovaných proteinů oproti fyziologickým hodnotám [45]. Z těchto informací vyplývá, že výrazně vyšší hladiny OGA mohou k patogenezi myotonické dystrofie typu 1 přispívat mnoha různými způsoby.

„O-GlcNAcylace“ proteinů probíhá působením enzymu O-GlcNAc transferasy (OGT), což je enzym s opačnou funkcí, než OGA – „O-GlcNAcylici“ katalyzuje. Analogicky jako u OGA je funkce OGT jedinečná, jinými slovy neexistuje další enzym,

který by tento typ O-glykosylace katalyzoval. OGT nebyla s AMPK koimunoprecipitována, nicméně je známo, že spolu tyto dva enzymy interagují. OGT „O-GlcNAcytuje“ α a γ podjednotku AMPK a zároveň AMPK fosforyluje OGT [46].

Výsledky z hmotnostní spektrometrie poukazují na dysregulaci v rámci posttranslační „O-GlcNAcylace“ proteinů. Protože „O-GlcNAcylace“ probíhá na stejných residuích, jako fosforylace (seriny a threoniny), hovoří některé studie o spolupráci těchto dvou typů modifikace v rámci buněčné signalizace [46,47]. Konkrétně OGT/OGA a AMPK součinně koordinují růst, proliferaci a především metabolické procesy. Z výsledků výše zmíněných experimentů plyne, že u pacientů s DM1 je narušena nejen signalizace působením AMPK, ale i regulace buněčných pochodů pomocí OGA/OGT.

Z celkem 73 koimunoprecipitovaných proteinů bylo v DM1 buňkách v porovnání se zdravými buňkami v podobné stechiometrii pouze 16 molekul (přibližně 20 %). Na *Obr. 21 (str. 50)* je uvedena upravená mapa z databáze STRING, na které jsou vyznačeny interakce, které jsou v DM1 buňkách narušeny – jeden z dvojice proteinů je v nemocných buňkách buď v nižší nebo vyšší koncentraci oproti zdravým buňkám. Tato upravená mapa byla vytvořena porovnáním mapy se všemi proteiny (*Obr. 17, str. 42*) s mapami rozdělenými na základě zastoupení v DM1 oproti CTRL (*Obr.18, str. 44*).



Obrázek 21: Proteinové interakce porušené v DM1 buňkách oproti CTRL.

To, že je v nemocných buňkách AMPK zastoupena v podobné míře, jako ve zdravých buňkách, ale zároveň je významně narušena její signalizační dráha, může být teoreticky důsledkem kteréhokoliv z mechanismů patogeneze myotonické dystrofie typu 1. Pravděpodobně se však jedná o přímý důsledek porušení funkce AMPK vyplývajícího z její nedostatečné aktivace a potažmo aktivity.

Je důležité zmínit, že u některých proteinů ze souboru byla imunoprecipitace podpořena jejich interakcí s protilátkami IgG. Jedná se konkrétně o histidin-bohatý glykoprotein (gen *HRG*) a komplementy C4-A a C4-B (*C4A*, *C4B*). Nicméně i u těchto proteinů byly nalezeny rozdíly v zastoupení mezi zdravými a nemocnými buňkami.

6. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium 5'-adenosinmonofosfátem aktivované proteinové kinasy a její role v onemocnění myotonická dystrofie typu 1. Cílem práce bylo porovnat zastoupení AMPK v buněčných kulturách zdravých jedinců a v buněčných kulturách pacientů s DM1. Podařilo se zjistit, že koncentrace AMPK v kulturách obecně narůstá důsledkem diferenciací buněk a morfologické znaky diferencovaných kultur DM1 ukázaly, že je tento proces u nemocných jedinců výrazně ovlivněn.

Poté byla AMPK afinitně purifikována metodou imunoprecipitace pomocí magnetických kuliček. Po optimalizaci metody byla imunoprecipitace využita pro studium vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledky z hmotnostní spektrometrie potvrdily, že byla imunoprecipitace úspěšná a spolu s $\alpha 2$ podjednotkou AMPK se podařilo purifikovat i její interakční síť.

Získané výsledky z hmotnostní spektrometrie byly využity pro studium proteinů, s nimiž AMPK interaguje a dále pro studium těchto interakcí. V tomto pokusu se podařilo identifikovat několik proteinů, jejichž komunikace s AMPK (případně komunikace s některou z částí její afinitně nabohacené signální kaskády) nebyla dosud v literatuře popsána. Především se jedná o O-GlcNAcasy, která je klíčovým enzymem v procesu „O-GlcNAcylation“ proteinů. Tento typ modifikace patří spolu s fosforylací mezi zásadní způsoby regulace buněčné signalizace, dysregulace hladiny O-GlcNAcasy tak pravděpodobně významně přispívá k patologii DM1.

Výsledky jasně demonstrují, jak rozsáhlé změny v zastoupení proteinů interagujících s AMPK působí onemocnění myotonická dystrofie typu 1. Mimo hladiny pozorované u zdravých buněk se v DM1 buňkách pohybovalo 80 % koimunoprecipitovaných molekul. Získané poznatky jednoznačně podporují výsledky studií, z kterých vyplývá, že AMPK představuje významný terapeutický cíl pro DM1 pacienty.

Seznam literatury

1. Morrison, B.M. (2016) Neuromuscular Diseases. *Semin. Neurol.* **36**, 409–18.
2. Ravel-Chapuis, A., Al-Rewashdy, A., Bélanger, G., Jasmin, B.J. (2018) Pharmacological and physiological activation of AMPK improves the spliceopathy in DM1 mouse muscles. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 3361–76.
3. López-Martínez, A., Soblechero-Martín, P., de-la-Puente-Ovejero, L., Nogales-Gadea, G., Arechavala-Gomez, V. (2020) An Overview of Alternative Splicing Defects Implicated in Myotonic Dystrophy Type I. *Genes* **11**, 1109.
4. Carrell, S.T., Carrell, E.M., Auerbach, D., Pandey, S.K., Bennett, C.F., Dirksen, R.T., Thornton, C.A. (2016) Dmpk gene deletion or antisense knockdown does not compromise cardiac or skeletal muscle function in mice. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 4328–38.
5. Jansen, G., Groenen, P.J., Bächner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J., Molenaar, P.C., Nederhoff, M.G., van Echteld, C.J., Dekker, M., Berns, A., Hameister, H., Wieringa, B. (1996) Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat. Genet.* **13**, 316–24.
6. Paulson, H. (2018) Repeat expansion diseases. *Handb. Clin. Neurol.* **147**, 105–23.
7. Ludovic, A., Polay Espinoza, M., Magdalena, M., Bazinet, A., Damily, D., Naouar, N., Frédérique, R., Arnaud, J., Frédérique, E.-V., Kamel, M., Mark, T., Puymirat, J., Battail, C., Boland, A., Jean-Francois, D., Mouly, V., Klein, A., Denis, F. (2017) Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Dis. Model. Mech.* **10**, 487–97.
8. Bird, T.D. (1999) Myotonic Dystrophy Type 1 in *GeneReviews*®, Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J.H., Mirzaa, G., Amemiya, A. (Eds.) University of Washington, Seattle (WA).
9. Myotonic dystrophy type 1 URL: <https://www.mun-h-center.se/en/research-and-facts/rare-diseases/myotonic-dystrophy-type-1/> [Viděno únor 18, 2021].
10. Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., Thornton, C.A. (2006) Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2087–97.
11. Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.-S., Cooper, T.A. (2007) Increased Steady-State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyperphosphorylation. *Mol. Cell* **28**, 68–78.
12. Sznajder, Ł.J., Swanson, M.S. (2019) Short Tandem Repeat Expansions and RNA-Mediated Pathogenesis in Myotonic Dystrophy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3365.

13. Mankodi, A., Takahashi, M.P., Jiang, H., Beck, C.L., Bowers, W.J., Moxley, R.T., Cannon, S.C., Thornton, C.A. (2002) Expanded CUG Repeats Trigger Aberrant Splicing of CIC-1 Chloride Channel Pre-mRNA and Hyperexcitability of Skeletal Muscle in Myotonic Dystrophy. *Mol. Cell* **10**, 35–44.
14. Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F., Sakoda, S. (2005) Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2189–2200.
15. Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.-J., Quan, L., Timchenko, L.T. (2004) Overexpression of CUG Triplet Repeat-binding Protein, CUGBP1, in Mice Inhibits Myogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 13129–39.
16. Meola, G., Cardani, R. (2015) Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1852**, 594–606.
17. Roussel, M.-P., Morin, M., Gagnon, C., Duchesne, E. (2019) What is known about the effects of exercise or training to reduce skeletal muscle impairments of patients with myotonic dystrophy type 1? A scoping review. *BMC Musculoskelet. Disord.* **20**, 101.
18. Garcia, D., Shaw, R.J. (2017) AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol. Cell* **66**, 789–800.
19. Hardie, D.G. (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774–85.
20. The PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC).
21. Kazgan, N., Williams, T., Forsberg, L.J., Brenman, J.E. (2010) Identification of a Nuclear Export Signal in the Catalytic Subunit of AMP-activated Protein Kinase. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3433–42.
22. Suzuki, A., Okamoto, S., Lee, S., Saito, K., Shiuchi, T., Minokoshi, Y. (2007) Leptin Stimulates Fatty Acid Oxidation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Gene Expression in Mouse C2C12 Myoblasts by Changing the Subcellular Localization of the $\alpha 2$ Form of AMP-Activated Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4317–27.
23. Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., Spiegelman, B.M. (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12017–22.
24. Hardie, D.G., Hawley, S.A., Scott, J.W. (2006) AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept. *J. Physiol.* **574**, 7–15.
25. Brockhoff, M., Rion, N., Chojnowska, K., Wiktorowicz, T., Eickhorst, C., Erne, B., Frank, S., Angelini, C., Furling, D., Rüegg, M.A., Sinnreich, M., Castets, P. (2017) Targeting deregulated AMPK/mTORC1 pathways improves muscle function in myotonic dystrophy type I. *J. Clin. Invest.* **127**, 549–63.

26. Kim, N., Lee, J.O., Lee, H.J., Lee, S.K., Moon, J.W., Kim, S.J., Park, S.H., Kim, H.S. (2014) AMPK α 2 translocates into the nucleus and interacts with hnRNP H: Implications in metformin-mediated glucose uptake. *Cell. Signal.* **26**, 1800–1806.
27. Kim, D.-H., Langlois, M.-A., Lee, K.-B., Riggs, A.D., Puymirat, J., Rossi, J.J. (2005) HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3866–74.
28. Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., Boland, A., Battail, C., Artiguenave, F., Deleuze, J.-F., Bénit, P., Rustin, P., Franc, S., Charpentier, G., Furling, D., Bassez, G., Nissan, X., Martinat, C., Peschanski, M., Baghdoyan, S. (2015) In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **4**, 262.
29. ChemsSketch (Advanced Chemistry Development, Inc.).
30. The principle and method of immunoprecipitation (IP) URL: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/immunoprecipitation.html> [Viděno květen 22, 2021].
31. Cox, J., Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–72.
32. Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**, 731–40.
33. Journal of Proteome Research: Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr101065j> [Viděno červen 3, 2021].
34. Uniprot: PRKAA2 URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P54646> [Viděno květen 1, 2021].
35. Uniprot: PRKAA1 URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q13131> [Viděno květen 1, 2021].
36. Uniprot: ACTA1 URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P68133> [Viděno květen 31, 2021].
37. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2001) The structure of a typical antibody molecule in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science, New York.
38. Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C. von (2019) STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, 607–13.
39. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–10.

40. Brzozowski, J.S., Skelding, K.A. (2019) The Multi-Functional Calcium/Calmodulin Stimulated Protein Kinase (CaMK) Family: Emerging Targets for Anti-Cancer Therapeutic Intervention. *Pharm. Basel Switz.* **12**, 8.
41. Kushnir, A., Shan, J., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Marks, A.R. (2010) Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10274–79.
42. Mattiazzi, A., Kranias, E.G. (2014) The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front. Pharmacol.* **5**, 5.
43. Wulff-Fuentes, E., Berendt, R.R., Massman, L., Danner, L., Malard, F., Vora, J., Kahsay, R., Olivier-Van Stichelen, S. (2021) The human O-GlcNAcome database and meta-analysis. *Sci. Data* **8**, 25.
44. Hart, G.W., Akimoto, Y. (2009) The O-GlcNAc Modification in *Essentials of Glycobiology*, Varki,A., Cummings,R.D., Esko,J.D., Freeze,H.H., Stanley,P., Bertozzi,C.R., Hart,G.W., Etzler,M.E.(Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
45. Wells, L., Gao, Y., Mahoney, J.A., Vosseller, K., Chen, C., Rosen, A., Hart, G.W. (2002) Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Further Characterization of the Nucleocytoplasmic β -N-Acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J. Biol. Chem.* **277**, 1755–61.
46. Bullen, J.W., Balsbaugh, J.L., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Neumann, D., Hart, G.W. (2014) Cross-talk between Two Essential Nutrient-sensitive Enzymes. *J. Biol. Chem.* **289**, 10592–606.
47. Nagel, A.K., Ball, L.E. (2014) O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids* **46**, 2305–16.

Přílohy

Příloha 1 – Data z hmotnostní spektrometrie imunoprecipitovaných vzorků.

1	LFQ intens	LFQ intens	LFQ intens	LFQ intens	LFQ intens	LFQ intens	LFQ intens	LFQ intens	LFQ intens	N: dm	a: dm	T: Protein	T: Gene	T: id	T: FaSta headers
1	17,7902	27,8184	28,289	28,2122	18,673	28,2432	28,0939	28,8184	1,2E+09	331	0,03102	Q8UIG5	MYO18B	667	Unconventional myosin XVIIIb OS
2	18,0765	27,9969	28,4496	28,447	18,4001	29,9948	29,8268	30,3952	2,1E+09	158	1,5478	1,22424	Q5ITD0	TIAP1	634 Tight junction associated protein 1 OS
3	18,239	28,0148	28,2828	28,2674	18,6468	28,4819	27,813	28,9684	1,3E+09	139	0,21445	-0,1933	P54646.C	PRKAA2	436 5 AMP activated protein kinase catalytic subunit alpha 2 OS
4	18,9624	25,3433	25,7199	25,9213	18,5647	27,2255	27,0422	27,6644	3,1E+08	123	1,50551	1,90319	Q9NZNS	ARHGEF7	739 Rho guanine nucleotide exchange factor 12 OS
5	19,0171	25,8585	26,0696	26,504	18,4649	26,0646	25,6914	26,2828	2,9E+08	82	0,00051	0,54718	P54619	PRKAG1	435 5 AMP activated protein kinase subunit gamma 1 OS
6	18,2885	25,5104	25,857	25,7929	18,4476	26,8235	26,8872	27,1489	2,9E+08	59	1,09426	0,9352	Q13501	SQSTM1	579 Sequestosome 1 OS
7	18,9769	26,7473	27,0355	26,7853	18,1957	26,5896	25,8408	27,0116	4,9E+08	49	-0,1957	0,58558	Q43741	PRKAB2	89 5 AMP activated protein kinase subunit beta 2 OS
8	18,7833	25,3807	25,1847	25,6641	18,3654	25,9362	25,3589	26,6889	2E+08	46	0,55554	0,7749	Q9Y478	PRKAB1	794 5 AMP activated protein kinase subunit beta 1 OS
9	18,8192	25,5235	25,878	25,5805	17,9618	26,5882	26,0537	26,9103	2,5E+08	34	1,00771	1,86516	POCOLA.P	CAA,CAB	206 Complement C4 A OS,Complement C4 B OS
10	18,4493	24,2266	24,4425	24,4573	19,0022	25,2986	25,3909	26,0627	1,1E+08	32	0,94847	0,39566	Q9BXPS	SRRT	721 Serrate RNA effector molecule homolog OS
11	18,777	24,5003	24,5251	23,1965	18,7573	25,0967	24,2616	24,9941	8,6E+07	28	0,49381	0,51349	O15027	SEC16A	77 Protein transport protein Sec16A OS
12	18,3699	21,5221	22,0105	22,1555	17,4245	24,0011	24,1536	24,4677	3E+07	27	2,14315	3,08855	Q9HC78	ZBTB20	734 Zinc finger and BTB domain containing protein 20 OS
13	18,5751	22,8084	22,745	23,3473	18,1296	24,5424	24,1583	25,5395	5,5E+07	27	1,73402	2,17952	O60502	MGEA5	92 Protein O GlcNAcase OS
14	18,1959	18,8129	20,9099	18,5129	18,4008	19,2569	26,7477	18,5799	5,6E+07	25	0,444	0,23907	Q13835	PKP1	586 Plakophilin 1 OS
15	19,0204	21,7764	22,3039	22,137	19,2095	18,2674	18,0485	17,9661	1,3E+07	17	-0,0885	-4,2777	P78527	PRKDC	524 DNA dependent protein kinase catalytic subunit OS
16	18,9539	22,2797	22,0307	21,3026	18,1157	21,9984	22,7864	23,1937	1,9E+07	16	0,75571	1,59389	Q02787	TF	147 Serotransferrin OS
17	18,5833	21,8616	21,6805	22,515	18,1632	21,9487	18,2024	18,3924	1,6E+07	15	-3,4692	-3,0491	Q75923	DYSF	108 Dysferlin OS
18	18,6194	23,3429	23,4807	23,3681	17,8265	22,558	22,7366	23,2491	4,5E+07	14	-6,6315	0,16139	Q13557	CAMK2D	582 Calcium/calmodulin dependent protein kinase type II subunit delta OS
19	19,1	18,2903	18,0182	19,065	17,9333	23,9547	24,1946	24,1057	3,5E+07	12	5,81543	6,98213	P01040	CSTA	130 Cystatin A OS
20	18,3332	24,3391	24,2464	24,286	18,3017	25,632	25,4144	25,7613	1,1E+08	12	1,34602	1,37756	P04196	HRG	155 Histidine rich glycoprotein OS
21	19,1222	23,6079	18,7881	24,3129	19,0267	22,6445	18,6133	22,6937	4,7E+07	12	0,9635	0,8679	P49207	RPL34	414 60S ribosomal protein L34 OS
22	18,4016	21,0985	21,5625	22,0682	18,8354	21,0942	21,4213	18,4859	1,1E+07	11	-0,4683	-0,9021	P62140	PPP1CB	471 Serine/threonine protein phosphatase PP1 beta catalytic subunit OS
23	18,3981	21,5787	18,791	22,2101	18,4852	18,9984	18,153	18,3547	9085700	11	-3,2239	-3,311	Q9NZM1	MYOF	757 Myoferlin OS
24	18,0781	22,1093	21,7259	22,118	19,1792	18,1128	18,362	18,8071	1,2E+07	11	-3,7473	-4,8484	Q86UP2	KTNI	659 Kinctin OS
25	18,3271	21,0581	21,6126	21,504	18,3532	22,0943	18,3116	22,2913	1,1E+07	10	0,5903	0,56418	Q9UGJO	PRKAG2	769 5 AMP activated protein kinase subunit gamma 2 OS
26	21,6055	22,2155	24,116	22,6246	18,0811	22,6222	22,736	22,649	3,8E+07	10	0,02438	3,54876	P31949	S100A11	353 Protein S100 A11 OS
27	18,407	18,6522	21,2205	22,0665	18,6255	18,1213	19,0238	18,4823	1E+07	10	-2,7383	-2,9567	Q86VP6	CAND1	662 Cullin associated NEDD8 dissociated protein 1 OS
28	18,2766	20,9861	21,7019	21,0537	18,3576	18,7451	18,3107	18,095	9200600	10	-2,743	-2,824	P55209.C	NAP1L1	340 Nucleosome assembly protein 1 like 1 OS
29	18,378	21,6535	21,6113	21,9004	18,9083	19,0476	18,3513	18,7522	1E+07	10	-2,9013	-3,4317	P41252	IARS	482 Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic OS
30	18,5669	21,3444	21,6048	21,473	21,3423	18,6296	18,5019	17,8525	9751900	10	-2,9712	-5,7465	Q9Y490	TUN1	795 Talin 1 OS
31	17,7908	23,4201	23,3062	18,4121	18,0653	18,5793	19,1649	19,145	2,9E+07	10	-4,1612	-4,4358	Q92747	ARPC1A	688 Actin related protein 2/3 complex subunit 1A OS
32	18,8612	18,4231	21,3052	18,3296	18,3542	22,0466	21,8212	21,6966	1,8E+07	9	3,39809	3,90514	P29401	TKT	334 Transketolase OS
33	18,5889	21,928	22,8319	22,0513	19,1623	22,3561	22,0234	22,5646	2E+07	9	0,3048	0,2686	Q9UGI9	PRKAG3	768 5 AMP activated protein kinase subunit gamma 3 OS
34	18,0634	21,0585	19,1255	18,1615	17,8568	18,2475	18,9413	18,799	1,1E+07	9	0,3265	-0,1199	Q6NZI2	PTRF	642 Caveolae associated protein 1 OS
35	17,7136	21,4526	21,3892	21,9506	17,9568	17,864	18,9267	18,9343	9142100	9	-2,5259	-2,7691	O60832	DKC1	96 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit DKC1 OS
36	18,6764	18,0609	22,0818	22,7799	18,6158	18,7982	18,754	18,5258	1,2E+07	9	-3,3278	-3,2682	Q43776	NARS	90 Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic OS
37	18,8195	22,0249	22,7074	22,6664	18,9661	18,3635	18,6928	18,1586	1,6E+07	9	-4,3029	-4,4346	Q13642	FHL1	583 Four and a half UM domains protein 1 OS
38	19,0246	19,9648	20,0912	20,4279	18,0158	20,7999	18,816	21,5627	5544100	8	0,70866	1,71752	Q9NZI4	SACS	756 Sacsin OS
39	18,1925	21,8937	18,4958	18,1649	18,3584	18,0705	18,478	18,5815	1,3E+07	8	0,0178	0,1837	Q7KZF4	SND1	654 Staphylococcal nuclease domain containing protein 1 OS
40	19,0722	18,4593	21,3805	21,4369	18,2316	18,7876	18,8245	18,0924	7825700	8	-2,5929	-1,7523	P21817	RYR1	293 Ryanodine receptor 1 OS
41	18,2208	21,058	21,3758	21,4783	18,4043	18,8621	17,9192	18,6389	8820400	8	-2,7369	-2,9204	P61019.C	RAB2A.R	455 Ras related protein Rab 2A OS,Ras related protein Rab 2B OS
42	18,38	21,4259	18,6672	22,2332	18,8137	18,6976	18,5143	18,1924	8591700	8	-2,9116	-3,3453	P20908	COL5A1	288 Collagen alpha 1(V) chain OS
43	17,7575	21,0755	21,4357	22,0136	18,2021	21,5156	18,31	18,4451	9887900	8	-2,9906	-3,7532	P18085.F	ARF4.AR	274 ADP ribosylation factor 4 OS,ADP ribosylation factor 5 OS
44	18,8011	22,5409	19,0512	22,5852	18,6614	22,6767	18,5327	18,8376	2,1E+07	8	-3,7033	-3,5637	P42677	RPS27	384 40S ribosomal protein S27 OS
45	19,3075	22,7714	22,4166	23,3606	18,6353	18,8735	18,6169	18,7078	2,4E+07	8	-4,0636	-3,3915	Q6QEF8	CDRO6	643 Coralin 6 OS
46	18,4859	22,5142	22,4117	22,9717	18,1613	17,9509	18,2987	17,9615	2,8E+07	8	-4,5527	-4,2281	Q00325	SUC2SA3	534 Phosphate carrier protein, mitochondrial OS
47	18,9071	21,4145	22,0618	22,2555	18,8898	22,3329	22,8781	22,7086	2,3E+07	7	0,64674	0,3359	P39019	RPS19	372 40S ribosomal protein S19 OS
48	18,521	22,8346	23,4977	23,1965	19,5135	23,6939	23,4243	23,7674	4,3E+07	7	0,49747	0,4951	P55735	SEC13	441 Protein SEC13 homolog OS
49	19,1939	26,113	17,696	18,5484	18,5173	18,4128	23,2168	17,5897	8,3E+07	7	-0,1256	0,27099	P59666.F	DEFA3.D	445 Neutrophil defensin 3 OS,Neutrophil defensin 1 OS
50	18,9228	20,3593	20,3555	20,6781	18,486	18,8542	18,8018	18,7293	3016500	7	-1,5537	-1,1169	Q43242	PSMD3	83 26S proteasome non ATPase regulatory subunit 3 OS
51	18,5579	21,5136	21,7257	21,8405	17,9625	18,3439	18,5414	18,4485	9652200	7	-3,2772	-2,6819	P28331	NDUFS1	332 NADH ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial OS
52	18,4581	21,2786	18,3798	22,7076	18,8733	18,6615	17,9318	17,704	1,2E+07	7	-3,3468	-3,762	P09874	PARP1	204 Poly (ADP ribose) polymerase 1 OS
53	18,0376	22,5477	21,9753	22,1468	18,6475	19,2325	18,855	18,8376	1,4E+07	7	-3,3918	-4,0017	Q14983	ATP2A1	76 Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 OS
54	19,0153	18,6117	21,784	22,4138	18,1867	17,945	18,3215	18,7488	9350100	7	-3,4625	-2,6339	Q9P215	LARS	765 Leucine-tRNA ligase, cytoplasmic OS
55	18,5932	21,677	22,028	22,3382	18,7962	18,8697	18,5477	18,0532	1,2E+07	7	-3,4804	-3,6833	P12107	COL11A1	226 Collagen alpha 1(X) chain OS
56	18,6009	21,6207	19,0887	21,8997	19,0183	21,4473	19,0132	21,5632	1,5E+07	6	0,1735	0,5909	Q12906	ILF3	569 Interleukin enhancer binding factor 3 OS
57	18,3189	18,6961	22,7018	19,3873	19,3617	19,3059	18,9627	18,2282	1,4E+07	6	0,4246	-1,4675	P27482	CALML3	322 Calmodulin like protein 3 OS
58	18,2801	20,6253	20,8599	20,6781	18,2567	18,3945	18,5525	20,3968	5375600	6	-2,1256	-2,1023	P05023.F	ATP1A1	163 Sodium/potassium transporting ATPase subunit alpha 1 OS; 2 OS; 3 OS
59	18,8315	20,7431	20,8832	21,6677	18,7271	18,994	18,2906	18,2872	7651600	6	-2,5927	-2,4883	Q9NZN4	EHD2	758 EH domain containing protein 2 OS
60	19,0584	18,1825	21,3647	21,7741	18,6637	18,3554	18,5147	18,4847	7916500						