

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



Michaela Brichtová

Transport mRNA v savčí buňce a lokalizovaná translace

Intracellular mRNA transport and localized translation in mammals

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tomáš Mašek, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

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

V Praze, 2025

Michaela Brichtová

Abstrakt

V typické eukaryotické buňce tvoří mediátorová RNA (mRNA) asi 5 % celkové RNA, kde slouží jako předloha pro syntézu bílkovin. Nedávné výzkumy ukázaly, že mRNA jsou často transportovány do různých subcelulárních kompartmentů nebo cytoplazmatických oblastí, kde mohou být následně translatovány. Prostřednictvím lokalizace mRNA buňky regulují mnoho procesů, například vytváří lokální koncentraci specifických proteinů v reakci na aktuální nároky nebo určují interakčního partnera kódovaného proteinu. Právě z těchto důvodů lze považovat časoprostorovou distribuci mRNA za mezistupeň genové exprese. Tato práce se zaměřuje především na mechanismy transportu, které zprostředkovávají lokalizaci mRNA do cytozolických oblastí nebo membránových organel v méně diferencovaných a nepolarizovaných savčích buňkách. Recentní pokusy odhalily způsoby, jakými se transkripty shromažďují v protruzivních oblastech, prokázaly existenci několika druhů mRNA ohnisek a osvětlily význam lokalizace v centrozomech. Díky vysokoprůchodným zobrazovacím technologiím dnes známe lokalizační vzorce určitých typů transkriptů, avšak jestli se lokalizace týká i ostatních mRNA by mělo být předmětem dalších výzkumů.

Klíčová slova: mRNA, transport mRNA, lokalizovaná translace, vizualizace, savčí buňka

Abstract

In a typical eukaryotic cell, messenger RNA (mRNA) accounts for about 5 % of the total RNA and it serves as a template for protein synthesis. Recent researches have shown that lots of mRNAs are frequently transported to distinct subcellular compartments or cytoplasmic destinations, where they can subsequently undergo a localized translation. Through the localization cells regulate many processes, for instance they can generate a local concentration of specific proteins in response to the actual needs or determine an interacting partner of the encoded protein. Thus, spatiotemporal mRNA distribution can be considered as an intermediate stage of gene expression. This thesis primarily focuses on transport mechanisms, that direct mRNA localization to cytosolic regions or membranellar organelles in less differentiated and non-polarized mammalian cells. Latest approaches discovered the ways in which transcripts accumulate in protrusions, demonstrated the existence of several mRNA foci and elucidated the importance of centrosome localization. To date high-throughput imaging techniques have revealed some remarkable localization patterns, but relatively a few transcripts has been studied yet, so if this could be applied to other mRNAs needs a further investigation.

Keywords mRNA, mRNA transport, localized translation, visualization, mammalian cell

Poděkování

Tato práce byla financována z projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a z projektu OP JAK CZ.02.01.01/00/22_008/0004575 RNA pro terapii, spolufinancováno Evropskou unií.

Osobně bych chtěla srdečně poděkovat mému školiteli RNDr. Tomáši Maškovi, Ph.D. za čas strávený při konzultacích a za cenné připomínky, které mi pomohly se zpracováním této závěrečné práce.

Obsah

Úvod	1
1 Lokalizace a transport mRNA jako úroveň regulace genové exprese	2
1.1 Mechanismy transportu	3
1.1.1 Aktivní transport.....	3
1.1.2 Pasivní lokalizace	3
1.2 Transport a asociace mRNA s membránovými organelami.....	4
1.2.1 Endoplazmatické retikulum.....	4
1.2.2 Mitochondrie	5
2 Lokalizace mRNA v cytoplazmě.....	6
2.1 Výběžky.....	6
2.2 Centrozomy	10
2.3 Ohniska.....	14
2.4 Perinukleární prostor.....	15
3 Vizualizační metody	16
3.1 FISH.....	16
3.2 Zobrazení v živých buňkách.....	17
3.3 Detekce lokalizované translace.....	19
Závěr.....	21
Reference	23

Seznam použitých zkratek

A375	buněčná linie A375	A375 cell line
AEG-1	RNA-vazebný protein AEG-1	astrocyte elevated gene-1 protein
APC	protein adenomatózní polypózy koli	adenomatous polyposis coli
APEX2	peroxidáza APEX2	APEX2 peroxidase
Arg	arginin	arginine
Ash1	transkripční represor ASH1	transcriptional regulatory protein ASH1
ASPM	protein ASPM	abnormal spindle-like microcephaly-associated protein
BAC	umělý bakteriální chromozom	bacterial artificial chromosome
BF	biotin-fenol	biotin-phenol
BI	benzimidazol	benzimidazole
Bicd2	bicaudal D2	bicaudal D2
Bub1	serin/threoninová protein kináza BUB1	serine/threonine protein kinase BUB1
Bub3	protein BUB3	BUB3 protein
CASK	kalcium/kalmodulin-dependentní serinová proteinkináza	calcium/calmodulin dependent serine protein kinase
Ccdc88c	protein CCDC88C	coiled-coil domain containing 88C protein
Ccnb1	cyklin B1	cyclin B1
CCR4	protein CCR4	carbon catabolite repression 4
CDR2	protein CDR2	cerebellar degeneration-related protein 2
CDR2L	protein CDR2L	cerebellar degeneration related protein 2L
Cen	centrokortin	centrocortin
Cep350	centrozomální protein 350	centrosomal protein 350
<i>cis</i> -NAT	přirozený <i>cis</i> -antisense transkript	natural <i>cis</i> -antisense transcript
CK1 α	kasein kináza 1 α	casein kinase 1 α
CLUH	RNA-vazebný protein CLUH	clustered mitochondria homolog
CNBP	buněčný protein vázající nukleové kyseliny	cellular nucleic acid-binding protein
COS-7	buněčná linie COS-7	COS-7 cell line

CPE	cytoplazmatický polyadenylační element	cytoplasmic polyadenylation element
CPEB1	CPE-vazebný protein 1	CPE-binding protein 1
Ctnnb1	β-catenin	β-catenin
dCas13	katalyticky inaktivní Cas13 protein	catalytically inactive Cas13 protein
ddUTP	dideoxyuridintrifosfát	dideoxyuridinetriphosphate
DFHBI	3,5-difluor-4-hydroxy-benzylidenimidazolinon	3,5-Difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone
dHgm4Cas13b	katalyticky inaktivní dHgm4Cas13b protein	catalytically inactive dHgm4Cas13b protein
Dia1	protein DIA1	DIA1 protein
DLIC	dyneinová podjednotka DLIC	dynein light intermediate chain
dMisCas13b	katalyticky inaktivní dMisCas13b protein	catalytically inactive dMisCas13b protein
Dync1h1	dyneinová podjednotka DYNC1H1	cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
DYNLL2	dyneinová podjednotka DYNLL2	dynein light chain LC8-type 2
EGFP	zesílená forma zeleného fluorescenčního proteinu	enhanced green fluorescent protein
EGL	egalitarian	egalitarian
eIF4E	eukaryotický translační iniciační faktor 4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ER	endoplazmatické retikulum	endoplasmic reticulum
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FLAP	univerzální sekvence FLAP	FLAP universal sequence
FMRP	translační represor FMRP	fragile X mental retardation protein
GDP	guanosindifosfát	guanosinediphosphate
GEF	GDP/GTP výměnný faktor	guanine nucleotide exchange factor
GFP	zelený fluorescenční protein	green fluorescent protein
Gly	glycin	glycine
gRNA	guide RNA	guide RNA
GSK3	glykogensyntáza kináza 3	glycogen synthase kinase 3
GTP	guanosintrifosfát	guanosintriophosphate
Glu-MT	detyrosinované mikrotubuly	detyrosinated microtubules

HeLa	buněčná linie HeLa	HeLa cell line
HMMR	receptor HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor
hnRNP-F	heterogenní jaderný ribonukleoprotein F	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
Iκ2	IκB kinázu typu 2	IκB kinase-like 2
KIF1C	protein KIF1C z rodiny kinesinů	kinesin family member 1C
KIF4A	protein KIF4A z rodiny kinesinů	kinesin family member 4A
KIF5B	protein KIF5B z rodiny kinesinů	kinesin family member 5B
LARP6	translační regulátor LARP6	La-related protein 6
MCP	MS2 obalový protein	MS2 coat protein
MDA-MB-231	buněčná linie MDA-MB-231	MDA-MB-231 cell line
mRNA	mediátorová RNA	messenger RNA
MS2	MS2 vlásenka	MS2 hairpin
MTS	mitochondriální lokalizační signál	mitochondrial localization signal
MYH3	myosinová podjednotka MYH3	myosin heavy chain 3
MYO4P	monomerní myosin MYO4P	monomeric myosin MYO4P
NET1	GDP/GTP výměnný faktor NET1	neuroepithelial cell-transforming 1
NLS	jaderný lokalizační signál	nuclear localization signal
Nin	ninein	ninein
NOT1	protein NOT1	negative on TATA-less 1
Nos	Nanos	Nanos
NUMA1	protein 1 jaderného mitotického aparátu	nuclear mitotic apparatus protein 1
OMM	vnější mitochondriální membrána	outer mitochondrial membrane
PAT1	protein PAT1	amyloid precursor protein tail 1
PCM	pericentriolární materiál	pericentriolar materiál
Pct	pericentrin	pericentrin
PCP	PP7 obalový protein	PP7 coat protein
PH	Plekstrin-homology doména	Plekstrin-homology domain
PINK1	kináza PINK1	PINK1 kinase
PLP	protein podobný pericentrinu	pericentrin-like protein
PMO	fosfordiamidát morfolinový oligonukleotid	phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide

POP2	protein POP2	POP2 protein
PP7	PP7 vlásenka	PP7 hairpin
PUF3P	translační represor PUF3P	translational repressor PUF3P
PUM	Pumilio protein	Pumilio protein
p180	receptor p180	ribosome receptor p180
RAB13	malá GTPáza RAB13	Ras-related protein RAB13
RABIF	GDP/GTP výměnný faktor RABIF	RAB interacting factor
RBP	RNA-vazebný protein	RNA-binding protein
RhoA	GTPáza RhoA	Ras homolog family member A
RP	ribosomální protein	ribosomal protein
Rpl34	ribosomální protein L34	ribosomal protein L34
RPS6	ribosomální protein S6	ribosomal protein S6
scFv	jednořetězcový variabilní fragment	single-chain variable fragment
sfGFP	superfolderový zelený fluorescenční protein	superfolder green fluorescent protein
SG	stresová granule	stress granule
SHE2	protein SHE2	SWI5-dependent HO expression protein 2
SHE3	protein SHE3	SWI5-dependent HO expression protein 3
siRNA	malé interferující RNA	small interfering RNA
smFISH	metoda FISH	single-molecule FISH
smiFISH	metoda FISH	single-molecule inexpensive FISH
Spen	transkripční represor SPEN	SPEN family transcriptional repressor
SR	receptor signální rozpoznávací částice	signal recognition particle receptor
SRE	Smaug responzivní element	Smaug response element
SRP	signální rozpoznávací částice	signal recognition particle
ssDNA	jednořetězcová DNA	single-stranded DNA
TAT	transkripční aktivátor TAT	HIV-1 trans-activator of transcription
tDeg	destabilizační doména tDeg	tDeg destabilization domain
TdT	terminální deoxynukleotidyltransferáza	terminal deoxynucleotidyltransferase

Tom20	podjednotka 20 translokázy vnější mitochondriální membrány	translocase of outer mitochondrial membrane 20
TOP	terminální oligopyrimidinový motiv	terminal oligopyrimidine motif
WNT	signální protein WNT	wingless-related integration site
WNT3A	signální protein WNT3A	wingless-related integration site 3A
ZBP1	Z-DNA vazebný protein 1	Z-DNA-binding protein
3'UTR	3'nepřekládaná oblast	3'untranslated region

Úvod

Na základě mnohých pokusů došlo v posledních letech k posunu vnímání subcelulární lokalizace mRNA a lokalizované translace, které začaly být chápány jako způsob k časoprostorové optimalizaci genové exprese. Moderní zobrazovací technologie odhalily, že se lokalizace mRNA vyskytuje napříč různými formami života, a to od jednoduchých jednobuněčných organismů až po evolučně vyspělé živočišné i rostlinné druhy.

Dlouho se předpokládalo, že mRNA jsou po svém exportu z jádra náhodně rozprostřeny v cytoplazmě. Tento pohled se změnil až v roce 1983, kdy Jeffery a spoluautoři zaznamenali asymetrickou distribuci aktinových transkriptů v raných fázích embryonálního vývoje sumky druhu *Styela plicata* (Jeffery et al., 1983). Zanedlouho poté byla Lawrence a Singerem pozorována konkrétní subcelulární lokalizace pro cytoskeletární transkripty v kultuře kuřecích embryonálních buněk (Lawrence & Singer, 1986). Tyto pilotní práce společně s dalšími výzkumy na modelových organismech ukázaly, že se nejedná pouze o nahodilý jev, ale o další sofistikovanou úroveň v post-transkripční regulaci genové exprese.

Dnes víme, že mRNA mohou být transportovány několika způsoby, přičemž nejznámějším je aktivní transport poháněný molekulárními motory, které se za spotřeby energie pohybují po vláknech cytoskeletu. Propojení transkriptu s motorovým proteinem obvykle zprostředkovává RNA-vazebný protein, který působí jako *trans*-faktor a váže se na *cis*-element nacházející se uvnitř molekuly mRNA. Tímto způsobem jsou obvykle přepravovány transkripty do periferních a protruzivních oblastí buňky. Další klasický mechanismus spočívá v zahájení translace a syntéze signální sekvence aminokyselin. Tento signál může být následně rozpoznán specifickým proteinem, který se účastní přesunu celého komplexu tvořeného mRNA, ribozomem a nascentním peptidem, do cílové destinace. Tento mechanismus lze pozorovat zejména během transportu mRNA na vnější mitochondriální membránu a na membránu endoplazmatického retikula.

Cílem bakalářské práce je představit téma lokalizace mRNA a shrnout nejnovější poznatky ohledně mechanismů vnitrobuněčného transportu u savců. Práce se zaměřuje na savčí buňku, a to především na poznatky získané studiem ne vysoce diferenciovaných buněk jako jsou neurony nebo oocyty, neboť většina informací o lokalizované translaci pochází právě z těchto modelových systémů. Menší část práce je věnována také lokalizaci mRNA, které jsou asociovány s membránovými buněčnými organelami. Nedílnou součástí rešerše je i představení hlavních vizualizačních metod ve fixovaných a živých buňkách včetně popisu jejich přínosů i nedostatků.

1 Lokalizace a transport mRNA jako úroveň regulace genové exprese

Lokalizace mRNA v buňce je fenoménem, který představuje efektivní nástroj k časoprostorové regulaci genové exprese podle aktuálního stavu jak intracelulárního, tak extracelulárního prostředí. Jedná se o proces, kdy buňky cíleně regulují transport mRNA do subcelulárních kompartmentů za účelem maximální optimalizace genové exprese. Regulace na této úrovni s sebou přináší hned několik benefitů, zejména se pak jedná o snížení energetických výdajů, neboť transport jedné molekuly mRNA je méně energeticky náročný než přeprava jednotlivých proteinů (Das et al., 2021). Lokalizovaná translace navíc dokáže v krátkém čase vytvořit místně specifickou koncentraci proteinů v odpovědi na lokální podněty. Rozmístění mRNA má klíčovou roli i z hlediska embryonálního vývoje a diferenciaci. Tak například shlukování mRNA do P-granul a jejich přesun do posteriorní oblasti dává vznik zárodečné linii během embryogeneze *Caenorhabditis elegans* (Strome & Wood, 1982). U mušky *Drosophila melanogaster* je asymetrická distribuce maternálních transkriptů během oogeneze nezbytná ke stanovení antero-posteriorní osy a správnému průběhu vývoje (C. Wang & Lehmann, 1991).

První zmínka o intracelulární lokalizaci pochází od Lawrence a Singera z roku 1986, kteří pozorovali asymetrickou distribuci mRNA pro cytoskeletární proteiny v intaktní kultuře kuřečích embryonálních myoblastů a fibroblastů. Pomocí techniky fluorescentní *in situ* hybridizace (viz kapitola 3.1) objevili specifický typ lokalizace u aktinové mRNA, která se až v 95 % buněk koncentrovala v oblasti protruzivních lamellipodií (Lawrence & Singer, 1986). Na tuto pionýrskou práci navázalo v průběhu let mnoho výzkumů, které pomohly odhalit molekulární podstatu řady procesů. Studium lokalizace mRNA probíhá především na oocytech a časných embryích modelových organismů z různých taxonomických skupin jako je *Drosophila melanogaster* (Zein-Sabatto et al., 2024) a *Xenopus laevis* (Deshler et al., 1997), ale v poslední době se zaměřuje i na savčí oocyty (Jansova et al., 2018). Častým předmětem výzkumů jsou také různé buněčné typy, zejména pak neurony a migrující fibroblasty. Velikost buňky, polarita a vyšší stupeň diferenciaci jsou faktory, které značně usnadňují pozorování, a proto jsou buňky s těmito charakteristikami přednostně vybírány k experimentálním pokusům.

Velmi frekventovaným objektem pro pozorování lokalizace jsou buňky neuronů, kde poruchy regulace a transportu mRNA mohou způsobovat závažná neurologická onemocnění jako je syndrom fragilního X (Miyashiro et al., 2003). Neurony jakožto vysoce diferenciované buňky s dlouhými dendrity a axony musí transportovat mRNA na velké vzdálenosti. Transkripty putují z těla do neuronálních zakončení, kde následně probíhá jejich překlad do proteinů. Nahromadění specifických faktorů v terminálních částech axonů a dendritů je pak relevantní z aspektu tvorby mezibuněčných spojů a synaptické plasticity (Miller et al., 2002). Častým předmětem výzkumu bývají také migrující fibroblasty, kterým lokalizace klíčových mRNA v přední části buňky umožňuje pohyb extracelulárním prostorem (Shestakova et al., 2001), a také epitelální buňky tenkého střeva s jasně stanovenou apiko-bazální polaritou (Moor et al., 2017).

1.1 Mechanismy transportu

1.1.1 Aktivní transport

Nejen různé organismy, ale i buněčné typy mohou disponovat odlišnými mechanismy transportu mRNA v cytoplazmě. Všeobecně nejrozšířenější je aktivní transport po cytoskeletálních vláknech poháněný motorovými proteiny. V takovém případě mRNA interagují s RNA-vazebnými proteiny (RBP), které slouží jako adaptory a zprostředkovávají vazbu na molekulární motory. Asociace je dána rozpoznáním specifické sekvence nacházející se majoritně v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) mRNA, ale není výjimkou, že se vyskytuje i v 5'UTR nebo v kódujících regionech. Klasickým příkladem transkriptu s *cis*-elementem v 3'UTR je mRNA pro β -aktin, u které je znám i konkrétní sekvenční motiv ACACCC (Ross et al., 1997). Lokalizační element ležící v kódující sekvenci lze pozorovat u mRNA pro homolog savčího pericentrinu u *D. melanogaster* (Fang et al., 2024).

V závislosti na typu motoru je transkript následně dopraven do požadované destinace aktivním pohybem po mikrotubulech či aktinových filamentech. Prvně zmíněný mechanismus lze demonstrovat na buňkách fibroblastů a neuronů, kde Z-DNA-vazebný protein 1 (ZBP1) interaguje s *cis*-elementem v 3'UTR β -aktinové mRNA (Ross et al., 1997). V tomto případě je navíc vzniklý ribonukleoproteinový komplex propojen adaptorem PAT1 s kinesinovým nebo dyneinovým motorem, který za spotřeby energie vykonává pohyb podél mikrotubulů (H. Wu et al., 2020). V pučících kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* lze naopak pozorovat transport po aktinovém cytoskeletu. Zde se na lokalizační element mRNA Ash1 váže RNA-vazebný protein SHE2, který tvoří komplex s proteinem SHE3 (Böhl et al., 2000). SHE3 pak interaguje s myozinovým motorem MYO4P, jež aktivním pohybem po aktinových filamentech přepravuje mRNA Ash1 z mateřské buňky do dceřiného pupenu (Bertrand et al., 1998).

Nevýhodou motorem řízeného transportu jsou však vysoké energetické nároky, což lze obejít přichycením transkriptů na aktivně přepravované orgány (Das et al., 2021). Tento mechanismus byl pozorován u neuronů, kde se mRNA mohou „svězt“ do axonálních zakončení na aktivně přepravovaných lysozomech, na jejichž povrchu jsou přichyceny pomocí annexinu A11 a dalších adaptorových proteinů (Y.-C. Liao et al., 2019).

1.1.2 Pasivní lokalizace

Kromě aktivního transportu lze k lokalizaci využít i alternativní mechanismy. Mezi ně řadíme tzv. pasivní transport, který je založen na prosté difuzi v kombinaci s cytoplazmatickým prouděním, následovaný selektivním zachycením v cílové destinaci, či zajištěním mRNA před degradací v určité části buňky. Primární výhodou pasivního transportu je, že k němu není potřeba energie. Limitujícím prvkem tohoto mechanismu je však poměrně nízká přesnost, která neumožňuje precizní intracelulární lokalizaci a vede tak k vytvoření relativně malého koncentračního gradientu transkriptů v rámci buňky. Dalším omezením jsou rozměry buňky, neboť difuze na velké vzdálenosti je časově velmi náročná.

Pasivní difuzi proto najdeme především v menších buňkách jako jsou bakterie, kde je zřejmě hlavním mechanismem, ale v malém počtu případů ji můžeme paradoxně pozorovat i u poměrně velkých a strukturovaných buněk.

Jak již bylo zmíněno dříve, během raného embryonálního vývoje *D. melanogaster* je místně specifická koncentrace maternálně kódovaných faktorů nezbytná pro správné stanovení tělní symetrie. Jedním z regulačních proteinů je i Nanos, jehož mRNA se hromadí v místě presumptivního posterioru a podílí se na determinaci předozadní osy a abdominálních segmentů (C. Wang & Lehmann, 1991). Akumulace Nanos na posteriorním pólu je dána lokální ochranou mRNA Nos před degradací. V tomto procesu hraje významnou roli RNA-vazebný protein Smaug, který interaguje s mRNA Nos skrze Smaug responzivní element (SRE) nacházející se v 3'UTR (Smibert et al., 1996). Na Smaug se váže homolog kvasinkového proteinu NOT1, jež společně s katalytickými podjednotkami CCR4 a POP2 tvoří multimerní deadenylační komplex. Asociace Smaug s mRNA Nos tedy spouští její degradaci, stejně tak jako dalších maternálních mRNA během prvních dvou hodin embryogeneze (Semotok et al., 2005). Před degradací jsou chráněny pouze transkripty Nos vyskytující se v posteriorní oblasti, a to díky akumulaci proteinu Oskar, který zabraňuje vazbě proteinu Smaug na mRNA Nos (Zaessinger et al., 2006).

1.2 Transport a asociace mRNA s membránovými organelami

1.2.1 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum (ER) je membránová organela, v níž probíhá řada klíčových procesů včetně posttranslačních modifikací proteinů v sekreční dráze. Nejvíce prostudovaný transport charakteristický primárně pro mRNA kódující sekreční a transmembránové proteiny probíhá prostřednictvím signální rozpoznávací částice (SRP). Jedná se o ko-translační import, který závisí na překladu N-terminálního konce proteinu, kde se nachází tzv. signální sekvence. Ta je rozpoznána SRP, která inhibuje elongaci translace a přenáší celý komplex na SRP receptor (SR) integrovaný v membráně ER. Zde je translace obnovena a nově syntetizovaný protein je translokován do lumen nebo zakomponován do membrány ER. Nedávný pokus na tkáňové kultuře savčích buněk ukázal, že lokalizace do ER nemusí být nutně SRP-dependentní. V tomto případě byla funkčně vyřazena SRP-dráha pomocí knockoutu genu kódujícího membránovou β -podjednotku SRP receptoru a současně byl malými interferujícími RNA (siRNA) umlčen i gen pro jeho α -podjednotku (Child et al., 2023). Po této kompletní blokaci funkce SRP receptoru se nijak zásadně nezměnil proteom buněk z hlediska přítomnosti a množství sekretovaných proteinů, což naznačuje, že produkce těchto bílkovin může být i SR-nezávislá. Značení nově exportovaných RNA pomocí 4-thiouridinu za současné inhibice iniciace translace však ukázalo, že většina nascentních mRNA kódujících i cytozolické proteiny primárně asociuje s membránou ER. Tento fakt jasně podporuje existenci alternativních mechanismů a zároveň činí z membrány ER jakési centrum pro další distribuci a relokizaci transkriptů v buňce (Child et al.,

2023). Nicméně o jaký mechanismus by se mohlo jednat, nebylo zatím plně objasněno. Zajímavý způsob regulace byl pozorován ve fibroblastech, kde dochází ke ko-translační lokalizaci mRNA Dia1 skrze interakci nově nasyntetizované domény vázající GTPázu s malou GTPázou RhoA, která je zakotvena v membráně perinukleárního ER (G. Liao et al., 2011). Tento způsob lokalizace je tedy poměrně unikátní, neboť závisí na translaci, ale nevyžaduje přítomnost signální sekvence. V neposlední řadě může lokalizace mRNA proběhnout skrze vazbu *cis*-elementu s RNA-vazebným proteinem zakomponovaným v membráně ER. Mezi takové RBP patří třeba protein AEG-1, který asociuje zejména s transkripty kódujícími ER-rezidentní proteiny (Hsu et al., 2018). Dobře prozkoumaný je také receptor p180, jež obstarává zachycení mRNA kódující sekreční a membránové proteiny na povrchu ER prostřednictvím nescifické interakce v regionu bohatém na lysin (Cui et al., 2012). Receptor p180 se hojně vyskytuje v perinukleární membráně ER a jeho nadměrná exprese podporuje translačně nezávislou asociaci t-ftz mRNA s ER v buňkách opičí ledvinové tkáně COS-7 (Cui et al., 2012).

1.2.2 Mitochondrie

Nepostradatelný je pro buňku transport mRNA do mitochondrií, které jsou hlavním místem energetického metabolismu. Mitochondrie má jakožto semiautonomní organela téměř všechny strukturální geny kódované jaderně, a tak mohou být informace k syntéze proteinu přenášeny zpět ve formě mRNA. Zpravidla k tomu dochází dvěma hlavními způsoby, přičemž první z nich funguje na podobném principu jako transport do ER. Tento mechanismus je závislý na syntéze nascentního peptidu, který obsahuje mitochondriální lokalizační signál (MLS). Translace je tedy zahájena na cytozolickém ribozomu a pokračuje až po interakci MLS s receptory translokačního komplexu na povrchu vnější mitochondriální membrány (OMM). Druhou možností je opět transport mRNA skrze vazbu RNA-vazebného proteinu na *cis*-element nacházející se v 3'UTR. U kvasinek plní funkci RBP protein PUF3P, který je mimo jiné i translačním represorem deaktivujícím navázané transkripty (Saint-Georges et al., 2008). V savčích buňkách zastupují roli negativního translačního regulátoru homologní proteiny PUM, nicméně jejich účast na lokalizaci do mitochondrií nebyla dosud prokázána (Sharma & Fazal, 2024). Naopak mezi ověřené RBP patří protein CLUH, který se podílí na lokalizačním procesu některých transkriptů (Gao et al., 2014). Zdá se, že významným lokalizačním faktorem u savců by mohla být i kináza PINK1, která interaguje především s mRNA kódujícími podjednotky komplexů dýchacího řetězce (Gehrke et al., 2015). PINK1 aktivuje na povrchu OMM umlčené transkripty odstraněním represorů PUM a hnRNP-F a navíc podporuje import translatovaných proteinů prostřednictvím své asociace s receptorem TOM20 (Gehrke et al., 2015). Kromě zmíněných procesů existuje několik dalších mechanismů, které jsou shmuty a detailněji popsány v této publikaci (Sharma & Fazal, 2024). Komplexní přehled o lokalizaci a transportu do membránových organel poskytuje například recentní článek (Chen & Collart, 2024).

2 Lokalizace mRNA v cytoplazmě

Dosud publikované studie se většinou zaměřovaly především na funkčně specializované a polarizované buňky jako jsou neurony nebo migrující fibroblasty. Nedávné výzkumy však ukázaly, že nejen tyto buněčné typy vykazují určité vzorce lokalizace mRNA či místně specifickou translaci určitých transkriptů.

Chouaib a jeho spolupracovníci provedli rozsáhlý výzkum na toto téma. Ve své práci použili 523 HeLa buněčných linií, do jejichž genomu byl stabilně integrován umělý bakteriální chromozom (BAC). Součástí genetické výbavy tohoto chromozomu byl gen pro vybraný protein fúzovaný na C-terminálním konci se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Pomocí fluorescenčně značených oligonukleotidových sond proti sekvenci GFP a mírných hybridizačních podmínek bylo možné simultánně pozorovat výskyt GFP značených proteinů a příslušných mRNA. Analýza 411 mRNA transkribovaných z BAC kódovaných genů zapojených do nejrůznějších biologických procesů ukázala, že cca 6 % z nich (26 mRNA) vykazuje specifickou lokalizaci v cytoplazmě (Chouaib et al., 2020). Autoři tyto mRNA následně roztřídili do 6 kategorií podle místa výskytu: ohniska, výběžky, jaderná obálka, periferie, nukleus a centrozomy. Nejčastějším místem lokalizace byla ohniska, avšak po dalším testování se ukázalo, že z velké části se jednalo hlavně o procesní tělíska (P-bodies). Následující kapitoly shrnují informace z hlediska jednotlivých typů lokalizace definovaných v této publikaci, které jsou doplněny o poznatky z dalších recentních studií.

2.1 Výběžky

Jednou z oblastí, kde mohou být mRNA detekovány jsou buněčné výběžky. Tento místně specifický lokalizační vzorec je často pozorován u migrujících buněk. Tak například komplexní analýza všech lidských genů pro kinesiny (59), myosiny (44) a 7 dyneinových podjednotek odhalila, že transkripty pro 3 kinesiny (KIF1C, KIF4A a KIF5B), dyneinovou podjednotku DYNLL2 a myosin MYH3 se vyskytují právě v protruzivních oblastech cytoplazmy (Chouaib et al., 2020). Včetně těchto mRNA bylo ve výběžcích pozorováno mnoho dalších transkriptů, jejichž společným znakem je, že ke správnému průběhu lokalizace vyžadují účast dalších faktorů. Mezi takové faktory patří protein adenomatózní polypózní koli (APC), který je znám především jako nádorový supresor regulující hladinu β -catenin v buňce (Munemitsu et al., 1995). Kromě toho však hraje významnou roli i při lokalizaci některých mRNA do protruzivních oblastí, kde se podílí na jejich přichycení ke stabilním vláknům mikrotubulů (Mili et al., 2008). Transkripty nacházející se v cytoplazmatických výběžcích buňky tedy můžeme rozdělit na dvě skupiny podle účasti proteinu APC na jejich lokalizačním mechanismu, a to na APC-dependenční a APC-nezávislé (T. Wang et al., 2017).

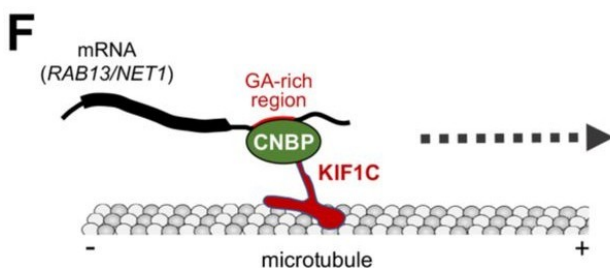
APC-nezávislá skupina je bohatá na faktory, které se účastní zprostředkování genové exprese včetně proteosyntézy, a není proto divu, že velkou část tvoří mRNA pro ribozomální proteiny (RP) (T. Wang et

al., 2017). Součástí 5'UTR transkriptů kódujících RP je terminální oligopyrimidinový motiv (TOP), se kterým interaguje protein LARP6 a ten transportuje mRNA do jejich cílové destinace (Dermitt et al., 2020). Deplece toho proteinu způsobuje sníženou míru lokalizace mRNA Rpl34 a dalších transkriptů pro RP do protruzivních konců migrujících buněk, což potvrzuje jeho relevantnost v tomto procesu (Dermitt et al., 2020).

Mezi APC-dependentní mRNA patří především faktory účastníci se pohybu, růstu nebo signalizace (T. Wang et al., 2017). Do této kategorie spadají například transkripty Pkp4, Ddr2, Kank2 a Rab13. Přesný mechanismus transportu APC-dependentních mRNA do cytoplazmatických výběžků není zatím zcela znám, víme však, že závisí hned na několika dalších faktorech. Prvním je přítomnost sekvenčních elementů bohatých na G a A nukleotidy v 3'UTR, které jsou nezbytné pro dopravení transkriptů na správné místo. mRNA Rab13 se díky tomuto elementu lokalizuje do protruzivních oblastí myších mesenchymálních buněk (Moissoglu et al., 2020). Navíc u Rab13 mRNA se uvnitř regionu s vysokým obsahem G a A nukleotidů nachází jedna nebo více kopií sekvence RGAAGRR, jež jsou nepostradatelné pro úspěšnou lokalizaci, neboť interference zprostředkovaná antisense fosfordiamidát morfolinovými oligonukleotidy (PMO) s těmito motivy způsobuje mislokalizaci Rab13 transkriptů k perinukleárnímu prostoru (Moissoglu et al., 2020).

Druhým kritériem je, že tento druh transportu vyžaduje přítomnost stabilních vláken mikrotubulů, někdy také označovaných jako Glu-MT (Mili et al., 2008). Stabilita mikrotubulů je zajištěna post-transkripční modifikací, která obnáší detyrosinaci tubulinových α -podjednotek (Mili et al., 2008). Pohyb APC-dependentních mRNA po mikrotubulech je zprostředkován motorovým proteinem KIF1C (Pichon et al., 2021). Za normálních okolností vykazují mRNA nesené kinesinem relativně dlouhý a přímočarý pohyb charakteristický pro lokomoci po mikrotubulárním cytoskeletu. Při depleci *KIF1C* genu pomocí siRNA nebo po ošetření buněk nocodazolem (látka blokující polymerizaci mikrotubulů) dochází k mislokalizaci mRNA a dlouhý lineární pohyb není téměř detekovatelný (Pichon et al., 2021). Tato skutečnost jasně dokazuje, že KIF1C je nezbytný pro transport APC-dependentních mRNA do cytoplazmatických výběžků.

Do nedávna se předpokládalo, že by mohl existovat adaptor, který by fyzicky propojoval transkripty skrz vazbu na lokalizační *cis*-element v 3'UTR s molekulárním motorem KIF1C. Moissoglu a jeho kolegové objevili protein, který uvedené požadavky splňuje. Mezi potenciálními kandidáty pouze redukce exprese buněčného proteinu vázajícího nukleové kyseliny (CNBP) anebo knockout jeho genu značně snížily lokalizaci mRNA Rab13 a Net1 do protruzivních konců (Moissoglu et al., 2024). CNBP je znám jako RNA/ssDNA vazebný protein, jež obsahuje sedm zinc-finger domén CCHC typu (Armas et al., 2021). CNBP se přímo váže na sekvenční element bohatý na G a A nukleotidy v 3'UTR oblasti mRNA, které se lokalizují do výběžků, a následně rekrutuje motorový protein KIF1C (viz Obrázek 1) (Moissoglu et al., 2024). Tento výzkum tedy prokázal existenci motor-adaptorového komplexu, který hraje klíčovou roli v transportním mechanismu mRNA do protruzivních oblastí savčích buněk.



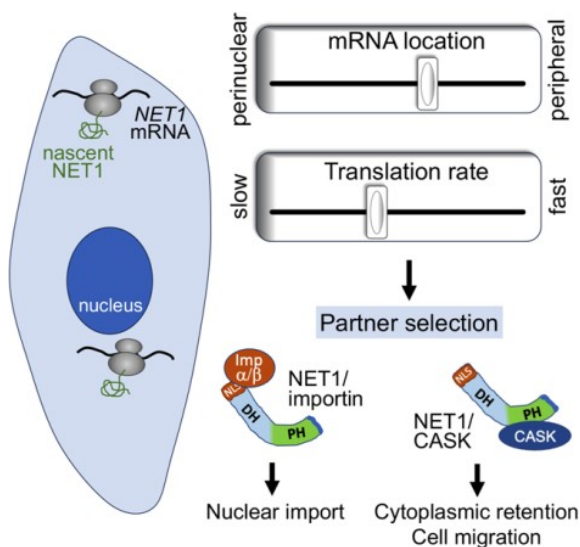
Obrázek 1: Mechanismus transportu mRNA do protruzivních oblastí. mRNA (v tomto případě mRNA kódující malou GTPázu RAB13 nebo výměnný faktor guaninových nukleotidů NET1) jsou transportovány do cytoplazmatických výběžků aktivním transportem. V 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) těchto transkriptů se nachází *cis*-element bohatý na G a A nukleotidy, s nímž interaguje buněčný protein vázající nukleové kyseliny (CNBP). CNBP funguje jako adaptorový protein a propojuje tak mRNA s kinesinovým motorem KIF1C, který se aktivně pohybuje směrem k plus konci mikrotubulů. Převzato z (Moissoglu et al., 2024).

Proč buňky lokalizují mRNA do protruzivních oblastí, může mít různé důvody. U APC-nezávislých mRNA se setkáváme se situací, kdy lokalizace transkriptů pro RP do cytoplazmatických výběžků posiluje tvorbu ribozomů, a tedy i intenzitu proteosyntézy v celé buňce. V protruzivních oblastech MDA-MB-231 buněk se akumuluje mnoho translačních a elongačních faktorů, což podporuje lokální translaci mRNA pro ribozomální proteiny a tím se navyšuje celkové množství RP v buňce (Dermitt et al., 2020). Většina nově nasyntetizovaných ribozomálních proteinů je však z výběžků směřována do jádra, kde se stávají součástí biogeneze ribozomů. Lokální translace mRNA kódujících RP tedy funguje jako zpětnovazebný mechanismus navyšující produkci ribozomů v jádře (Dermitt et al., 2020).

Lokalizace APC-dependentních mRNA je pravděpodobně jednou z možností, jak regulovat interakce nascentního proteinu s vazebnými partnery a tím měnit jeho aktivitu či funkci. To lze demonstrovat na příkladu proteinu RAB13 – malé GTPázy z rodiny RAB proteinů, která se účastní membránového přenosu včetně vezikulárního transportu molekul (Ioannou & McPherson, 2016). Proteiny RAB jsou obecně aktivovány navázáním GTP, což jim umožňuje asociovat s Rab-vazebnou doménou svých efektorových proteinů. Výměnu hydrolyzovaného GDP za nový GTP zprostředkovává skupina faktorů GEF, kam patří i protein RABIF (Burton et al., 1994). Proteiny RAB13 i RABIF vykazují rovnovážný stav v perinukleárním prostoru, přitom interakce těchto partnerů byla detekována jak v oblasti perinuklea, tak i na periférii buňky. Aby však docházelo k tvorbě periferních RAB13-RABIF komplexů, musí dojít k lokalizaci mRNA Rab13 do cytoplazmatických výběžků (Moissoglu et al., 2020). Pokud je transport endogenních mRNA Rab13 narušen pomocí antisense PMO, dojde k mislokalizaci transkriptů do perinukleárního prostoru, a tím k poklesu tvorby komplexů na periférii a redukci aktivity RAB13 GTPázy. Tato fakta ukazují, že lokalizace mRNA Rab13 do výběžků podporuje asociaci proteinu RAB13 s GDP/GTP výměnným faktorem RABIF v okrajových částech buňky (Moissoglu et al., 2020).

Podobný scénář je možné sledovat i u mRNA Net1 rovněž lokalizované do protruzivních oblastí cytoplazmy. NET1 je výměnný faktor guaninových nukleotidů, který nalezneme v jádru i v cytoplazmě. Zatímco cytoplazmatický NET1 aktivuje RhoA GTPázu a reguluje buněčnou migraci, jaderný NET1 se pravděpodobně podílí na odpovědi na poškození DNA (Dubash et al., 2011). Delece sekvenčního

elementu bohatého na GA nukleotidy zabraňuje cytoplazmatické mRNA Net1 v lokalizaci do výběžků, a tak se buď rozprostře difúzně po cytoplazmě anebo se shromáždí kolem perinuklea (Gasparski et al., 2023). Perinukleárně produkovaný protein NET1 vykazuje vyšší míru importu do jádra a jeho přenos přes jadernou membránu je zprostředkován ko-translační interakcí s transportními receptory z rodiny importinů, konkrétně importinem $\beta 1$ (Gasparski et al., 2023). Za tento jev je zodpovědný jaderný lokalizační signál (NLS) ležící v N-terminální části NET1 proteinu. Naopak pro transport do cytoplazmatických výběžků je důležitá Plekstrin-homology (PH) doména nacházející se na C-terminálním konci NET1 proteinu, na kterou se v protruzivních oblastech váže kalcium/kalmodulin-dependentní serinová proteinkináza (CASK) (Gasparski et al., 2023). V tomto případě však nejen lokalizace mRNA, ale i rychlost translace společně determinují interakčního partnera. Pomalá translace vede totiž bez ohledu na lokalizaci mRNA k interakci NET1 s importinem $\beta 1$ a transportu do jádra, zatímco rychlá translace podporuje asociaci s proteinem CASK (viz Obrázek 2) (Gasparski et al., 2023).



Obrázek 2: Lokalizace mRNA a rychlost translace determinuje interakčního partnera kódovaného proteinu a jeho lokalizaci v buňce. mRNA Net1 se za normálních okolností lokalizuje do okrajových oblastí buňky, avšak po delecii sekvenčního elementu bohatého na GA nukleotidy se koncentruje v oblasti perinuklea. Zde dochází ke ko-translační interakci importinu $\beta 1$ s jaderným lokalizačním signálem (NLS) nacházejícím se na N-terminálním konci proteinu NET1. Naopak během translace mRNA Net1 na periferii se na Plekstrin-homology (PH) doménu ležící na C-terminálním konci NET1 váže kalcium/kalmodulin-dependentní serinová proteinkináza (CASK). Tyto interakce jsou však ovlivněny také rychlostí překlada, neboť pomalá translace vede bez ohledu na lokalizaci mRNA k interakci NET1 s importinem $\beta 1$ a transportu do jádra, zatímco rychlá translace podporuje asociaci s proteinem CASK. Převzato z (Gasparski et al., 2023).

Dalším příkladem může být lokalizace mRNA Kif1c. Simultánní vizualizace mRNA Kif1c a KIF1C proteinu odhalila, že se vyskytují v protruzivních oblastech společně (Chouaib et al., 2020). Stejně jako předchozí transkripty, tak i lokalizace mRNA Kif1c ovlivňuje interakce nově syntetizovaného proteinu s místně specifickými faktory. Mislokalizace mRNA Kif1c způsobená odstraněním *cis*-elementu bohatého na G a A nukleotidy zvýšila interakce KIF1C s určitými proteiny, např. s gelsolinem

či atlasinem-3 (Norris & Mendell, 2023). Asociace KIF1C s těmito proteiny jsou pravděpodobně nestandardní a dochází k nim nejspíš jen příležitostně, neboť v normálních buňkách jsou tyto protein-proteinové interakce jen těžce detekovatelné. Zajímavostí je, že ztráta lokalizace mRNA Kif1c neměla žádný dopad na abundanci ani distribuci KIF1C proteinu a zároveň na transport ostatních APC-dependenčních mRNA do buněčných výběžků (Norris & Mendell, 2023).

Lokalizace však může být pro některé buňky esenciální i z aspektu určitých fyziologických funkcí. Například lokalizace mRNA Rab13 ovlivňuje migraci buněčné linie MDA-MB-231, přičemž ztráta této schopnosti fenotypicky kopíruje akutní ztrátu RAB13 proteinu (Moissoglu et al., 2020). Buňky s delokalizovanými mRNA Rab13 mají narušenou schopnost migrace k chemoatraktantu skrz mikroporézní membránu, a tím pádem i zpomalenou rychlost invaze (Moissoglu et al., 2020). Negativní dopad mislokalizace mRNA na migraci lze pozorovat i u buněčné linie A375. V tomto pokusu Moriarty a jeho spolupracovníci nasadili buňky do mikrokanálů, které svými rozměry napodobovaly velmi úzké a silně ohraničené prostředí. Následně bylo pozorováno, že i v takto těsném prostoru podporuje periferní lokalizace mRNA Rab13 migraci buněk, neboť po narušení této lokalizace pomocí antisense PMO, dochází ke snížení rychlosti a persistence migrace (Moriarty et al., 2022).

Regulace lokalizované translace APC-dependenčních mRNA může probíhat různými způsoby. V mezenchymálních buňkách jsou mRNA Rab13 aktivně translatovány na koncích expandujících výběžků, zatímco v retrahujících oblastech jsou umlčeny (Moissoglu et al., 2019). Přičemž bylo prokázáno, že translace není závislá na lokalizaci a že příčinou umlčení Rab13 transkriptů v ustupujících koncích může být jejich shlukování do heterogenních klastrů, které obsahují i další typy mRNA (Moissoglu et al., 2019). Jelikož se v retrahujících oblastech nachází mnoho samostatných mRNA Rab13, není vyloučeno, že se translačně umlčené transkripty objevují i mimo klastry (Moissoglu et al., 2019).

2.2 Centrozomy

Centrozom je nemembránová organela složená ze dvou centriol obklopených pericentriolárním materiálem (PCM). Tato dynamická proteinová matrix slouží jako organizační centrum mikrotubulů a zásadně se tak podílí na tvorbě mitotického vřeténka, které zajišťuje správný průběh buněčného dělení. Význam lokalizace mRNA do centrozomů zatím nebyl příliš objasněn, nicméně recentní genomové studie (Chouaib et al., 2020; Safieddine et al., 2021) přinesly nové informace. Safieddine a jeho tým provedl na lidské buněčné linii HeLa analýzu 602 genů. V rámci tohoto výzkumu byla pozorována centrozomální lokalizace celkem 8 mRNA – Numal, Aspm, Pcnt, Nin, Bicd2, Hmnr, Cep350 a Ccdc88c (Safieddine et al., 2021). Zajímavostí je, že všechny tyto transkripty kódují proteiny, které jsou součástí dynamiky mikrotubulů, maturace centrozomů a organizace dělicího vřeténka. Transkript Numal nese informaci k syntéze proteinu 1 nukleárního mitotického aparátu (NUMA1) organizujícího astrální mikrotubuly (Gaglio et al., 1995), ASPM je jedním z klíčových faktorů pro uspořádání

mitotického vřeténka především během vývoje mozku (Bond et al., 2002), mRNA *Pcnt* produkuje podpůrný centrozomální protein pericentrin (Lawo et al., 2012), mRNA *Nin* je templátem pro syntézu nineinu důležitého pro ukotvení mínus konců mikrotubulů (Mogensen et al., 2000), translací transkriptů *Bicd2* vzniká dyneinový adaptor bicaudal D2 (Hoogenraad et al., 2003) a mRNA *Hmmr* kóduje receptor účastnící se hyaluronanem zprostředkované motility (HMMR) (Hardwick et al., 1992).

K transportu mRNA do centrozomu dochází ko-translačně, neboť inkubace lidských buněk s puromycinem (antibiotikum způsobující předčasnou terminaci translace a disociaci nascentního řetězce od ribozomů) způsobuje mislokalizaci všech výše zmíněných transkriptů, zatímco cykloheximid (látka blokující elongaci translace) nemá na lokalizaci žádný dopad (Safieddine et al., 2021). Na příkladu mRNA *Pcnt* a *Aspm* bylo skutečně potvrzeno, že transport do centrozomu vyžaduje aktivní translaci na polyzomech a nově nasyntetizovaný počáteční úsek kódovaného peptidu (Safieddine et al., 2021; Sepulveda et al., 2018).

Transport polyzomů do centrozomu probíhá prostřednictvím mikrotubulů. Význam mikrotubulů pro tento typ přenosu podporuje fakt, že ošetření buněk nocodazolem (látka blokující polymerizaci mikrotubulů) vyvolává inhibici lokalizace polyzomů asociovaných s *Aspm* transkripty do centrozomu (Safieddine et al., 2021). U mRNA *Pcnt* bylo prokázáno, že přenos do centrozomu je zprostředkován pohybem dyneinového motoru po mikrotubulech směrem k jejich mínus konci (Sepulveda et al., 2018). Zároveň polyzomy navázané na mRNA *Aspm* a *Numa1* vykazují během časně fáze mitózy rapidní pohyb směrem k centrozomu rychlostí kolem 0,25-1,5 $\mu\text{m/s}$, což opět odpovídá rychlosti motorem poháněného pohybu po mikrotubulech (Safieddine et al., 2021). U polyzomů překládajících *Aspm* transkripty lze pozorovat dva druhy lokomoce, přičemž prvním je výše zmíněný pohyb po stabilních vláknech mikrotubulů řízený motorovými proteiny. Při druhém pohybu jsou polyzomy přichyceny na mikrotubulech, které procházející rychlou remodelací, a společně s nimi jsou taženy směrem k centrozomu (Safieddine et al., 2021).

Transport do centrozomů může probíhat také pomocí cytoplazmatického polyadenylačního elementu (CPE) přítomného v 3'UTR, na který se váže rodina CPE-vazebných proteinů (CPEB), kam patří i CPEB1 (Pascual et al., 2021). Tento protein asociuje s transkripty obsahujícími CPE-element, které jsou zahrnuté zejména v brzkých stádiích mitózy, a reguluje jejich expresi. Nedávno bylo prokázáno, že se CPEB1 účastní lokalizace *Ccnb1* a *Bub3* mRNA do dělicího vřeténka (Pascual et al., 2021). mRNA *Ccnb1* nese informaci k syntéze mitotického cyklinu B1 a mRNA *Bub3* kóduje protein BUB3, který je nepostradatelným členem kontrolního bodu pro přechod do mitotické fáze buněčného cyklu (Kalitsis et al., 2000). Deplece CPEB1 nemá vliv na celkovou hladinu ani jedné mRNA, zato značně redukuje lokalizaci obou transkriptů do mitotického vřeténka a zhoršuje syntézu cyklinu B1 (Pascual et al., 2021).

Jednotlivé mRNA se mohou v centrozomech akumulovat v závislosti na aktuální fázi buněčného cyklu (Chouaib et al., 2020; Safieddine et al., 2021; Sepulveda et al., 2018). *Ccdc88c* mRNA se lokalizuje pouze během interfáze, zatímco transkripty pro *Pcnt*, *Nin*, *Bicd2*, *Hmmr* a *Cep350* je možné

sledovat v průběhu interfáze a časně mitózy. Naopak mRNA *Numa1* a *Aspm* se nacházejí v centrozomech jen během mitózy (Safieddine et al., 2021).

Detailnější představu o lokalizaci do centrozomů v určitých fázích buněčného cyklu dále poskytují mRNA *Aspm*, *Numa1* a *Hmmr* a jimi kódované proteiny. Tak například mRNA *Hmmr* se v interfázi nachází v peri-centrozomální oblasti, zatímco během prvních stádií mitózy se hromadí v centrozomech (Chouaib et al., 2020; Safieddine et al., 2021). Interfázni HMMR protein je lokalizován na mikrotubulech a v centrozomu ho lze spatřit teprve několik hodin před buněčným dělením (Safieddine et al., 2021). Během profáze a časně prometafáze se HMMR akumuluje v oblasti dělicího vřeténka společně se svou mRNA (Safieddine et al., 2021). Podobně tomu tak je i u mRNA *Aspm* a *Numa1*, které se v interfázi nacházejí disperzně po cytoplazmě, ale na začátku mitózy se přesouvají do centrozomů (Chouaib et al., 2020; Safieddine et al., 2021). Proteiny ASPM a NUMA1 se vyskytují během interfáze zejména v nukleoplazmě, zatímco se zahájením mitózy se začínají shromažďovat v centrozomech (Safieddine et al., 2021). V průběhu mitózy se oba proteiny akumuluji na pólech dělicího vřeténka – protein NUMA1 ko-lokalizuje se svými transkripty pouze v profázi a časně prometafázi, kdežto protein ASPM a jeho mRNA se ko-lokalizují od pozdní profáze až do časně telofáze (Safieddine et al., 2021). Vzhledem k tomu, že se všechny 3 mRNA ko-lokalizují v určitých fázích se svými proteiny, lze předpokládat, že v centrozomech dochází k lokalizované translaci. Tuto hypotézu podporuje i přítomnost translačních faktorů eIF4E a ribozomálních proteinů RPS6 v mitotických centrozomech (Chouaib et al., 2020).

Subcelulární lokalizace mRNA do centrozomů je relevantní z hlediska příprav na buněčné dělení a organizace mitotického vřeténka. Jako příklad lze uvést lokalizaci lidské mRNA *Pcnt* kódující pericentrin. Pericentrin je poměrně velký protein, který se inkorporuje do pericentriolární matrix, kde slouží jako lešení pro zachycení dalších proteinů (Lawo et al., 2012). mRNA *Pcnt* se hromadí v centrozomech během časně mitózy, tj. profáze a prometafáze a jejich translace je v průběhu těchto fází nezbytná pro začlenění pericentrinu do mitotických centrozomů (Sepulveda et al., 2018). Narušení lokalizace mRNA *Pcnt* inkubací buněk s puromycinem značně snižuje hladinu pericentrinu v centrozomech (Sepulveda et al., 2018). Uvedená fakta tedy naznačují, že narušení lokalizace mRNA *Pcnt* vede ke snížené míře obsahu či totálnímu deficitu specifických proteinů v PCM a celkově tak ovlivňuje průběh buněčného dělení.

Do dnešního data nebylo realizováno mnoho studií, které by se zabývaly centrozomální lokalizací a transportem v savčích buňkách, zato recentní výzkumy provedené na druhu *Drosophila melanogaster* přinesly nové informace. Zdáli jsou poznatky získané z drozofil aplikovatelné i na savčí buňky, by mohlo být zajímavým předmětem budoucích výzkumů, a proto je dobré některé z nich zmínit. Stejně jako u saveců je k lokalizaci potřeba translace. Tento mechanismus můžeme pozorovat u mRNA *Cen* nesoucí informaci k syntéze centrocortinu a mRNA *Plp* kódující homolog savčího pericentrinu, neboť obě vyžadují překlad na intaktních polyzomech (Fang et al., 2024; Zein-Sabatto et al., 2024). U mRNA *Plp* se *cis*-element nachází uvnitř kódující sekvence (Fang et al., 2024), zatímco u mRNA *Cen*

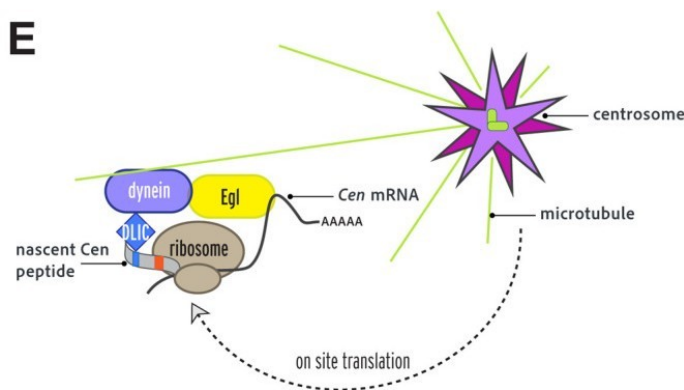
nalezneme lokalizační doménu na N-terminálním konci kódovaného proteinu (Zein-Sabatto et al., 2024). V této oblasti leží tzv. CC1 box, který zprostředkovává vazbu adaptorů na podjednotku dyneinových motorů DLIC, a tak je centrokortin sám sobě motorovým adaptorem (viz Obrázek 3) (Zein-Sabatto et al., 2024). Vzhledem k tomu, že se CC1 box nachází i u savčích paralogů CDR2L a CDR2, lze předpokládat, že obdobný mechanismus využívají i lidské buňky (Zein-Sabatto et al., 2024). Nicméně jestli tomu tak skutečně je, vyžaduje další investigaci. U drozofil často přispívá k transportu mRNA také RNA-vazebný protein egalitarian (EGL), který rozpoznává *cis*-element a následně se váže na dyneinový adaptor bicaudal-D (Dienstbier et al., 2009). Účast EGL na lokalizaci mRNA *Cen* byla skutečně prokázána, neboť embrya nesoucí mutantní transgen *Egl* vykazují snížené množství *Cen* mRNA v centrozomech. Jestli s těmito transkripty interaguje EGL i fyzicky však není zatím známo (Zein-Sabatto et al., 2024).

Ačkoliv pro Plp transkripty nebyla potvrzena asociace s dyneinovým motorem, obě mRNA využívají k transportu do centrozomu vlákna mikrotubulů (Fang et al., 2024; Zein-Sabatto et al., 2024). Zakotvení PLP na centrozomech pravděpodobně probíhá skrze protein-proteinové interakce mezi PLP a centrosominem, jedním z hlavních komponentů PCM (Fang et al., 2024). Z tohoto poznatku vzešla myšlenka, že by PCM mohl podporovat lokalizaci mRNA. Zásadní role PCM během lokalizace byla potvrzena pro mRNA *Cen*, která se za normálních podmínek vyskytuje v interfázních centrozomech ve formě malých granul. Buňky mutované v genu pro centrosomin vykazují redukovanou lokalizaci těchto granul (Fang et al., 2024; Ryder et al., 2020).

Zmíněná granula jsou navíc zajímavá tím, že nejsou tvořena jen centrokortinem, ale i mRNA *Cen* a proteinem syndromu fragilního X (FMRP). FMRP je RNA-vazebný protein, který působí jako translační represor (Laggerbauer et al., 2001). V tomto případě však kromě umlčení translace také reguluje tvorbu granul a jejich lokalizaci k centrozomu (Ryder et al., 2020). Pokud se totiž u embryí provede knockout genu pro FMRP, dojde k rozpadu granul a spustí se nadměrná produkce centrokortinu, která zpravidla vede k poruchám dělicího vřeténka a k embryonální letalitě (Ryder et al., 2020). Jelikož FMRP přímo asociuje také s CDR2L a CDR2, lze předpokládat, že výzkum na drozofilách by mohl poskytnout cenné informace i o FMRP zprostředkované regulaci v savčích buňkách.

Zcela jinou lokalizační techniku můžeme pozorovat u transkriptů pro I κ B kinázu typu 2 (*Ik2*). Bergalet a jeho spolupracovníci objevili, že transport mRNA *Ik2* do centrozomu závisí na mRNA *Cen*, neboť knockout exprese genu *Cen* či narušení lokalizačních schopností mRNA *Cen* vede k delokalizaci *Ik2* transkriptů (Bergalet et al., 2020). Geny *Cen* a *Ik2* se nachází na komplementárních řetězcích DNA ve stejném lokusu na chromozomu 2L, kde se překrývají svými 3'konci, což z nich činí přirozené *cis*-antisense transkripty (*cis*-NAT) (Bergalet et al., 2020). mRNA *Ik2* pravděpodobně nabyla schopnosti lokalizace do centrozomů během evoluce, kdy došlo k překryvu lokusů těchto dvou genů (Bergalet et al., 2020). Lokalizační element mRNA *Cen* se nachází v kódující oblasti, zatímco u *Ik2* leží uvnitř antisense regionu v 3'UTR. Tento fakt potvrzuje, že se nejedná o speciální lokalizační doménu, ale jen o komplementární sekvenci k mRNA *Cen* (Bergalet et al., 2020). Pomocí metody APEX-seq (viz

kapitola 3.2) bylo zjištěno, že *cis*-NAT mají tendenci se společně lokalizovat do subcelulárních kompartmentů i v lidských buňkách (Bergalet et al., 2020), což by mohlo být zajímavým námětem na další výzkum tohoto mechanismu transportu.



Obrázek 3: Schéma transportu mRNA Cen do centrozomu. Transport mRNA Cen je závislý na translaci tzv. CC1 boxu, který se nachází na N-terminálním konci kódovaného proteinu. CC1 box zprostředkovává vazbu na podjednotku DLIC dyneinového motoru, jež se aktivně pohybuje po mikrotubulech směrem k jejich minus konci. Pro lokalizaci mRNA Cen do centrozomu je esenciální také protein EGL, avšak jeho přímá vazba na mRNA Cen nebyla zatím prokázána. Převzato z (Zein-Sabatto et al., 2024)

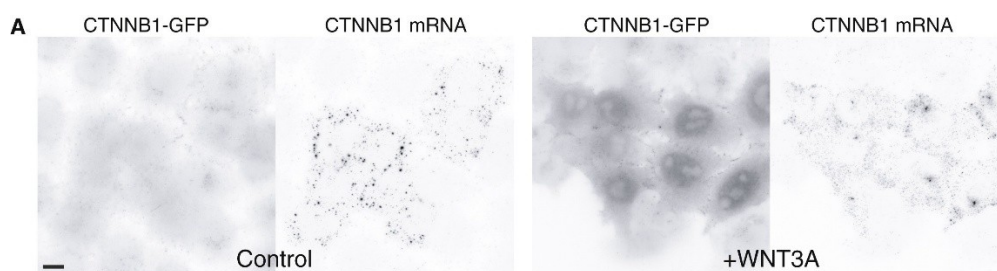
2.3 Ohniska

Některé transkripty se v cytoplazmě koncentrují do útvarů označovaných jako ohniska, a kromě mRNA mohou obsahovat i RNA-vazebné proteiny a další proteinové komponenty. K takovým agregátům patří procesní tělíska (P-bodies), která jsou zapojena v degrační dráze mRNA nebo stresová granula (SG), jež se formují za stresových podmínek. Ačkoliv jsou uvedené struktury dobře prozkoumány, tato práce se jim podrobněji dále nevěnuje. Ucelený přehled o tvorbě, složení a funkci P-bodies a SG nabízí například tento přehledový článek (Riggs et al., 2020).

Chouaib ve svém výzkumu na buněčné linii HeLa pozoroval ohniska odlišná od výše zmíněných struktur a zároveň zjistil, že se do nich samostatně shlukují 4 různé typy mRNA – *Aspm*, *Dync1h1*, *Bub1* a *Ctnnb1* (Chouaib et al., 2020). Tvorba *Aspm*, *Bub1* a *Dync1h1* ohnisek je závislá na aktivní translaci, neboť po hodinové inkubaci buněk s puromycinem tato ohniska zcela zanikají (Chouaib et al., 2020). Z této skutečnosti plyne, že ohniska patrně slouží jako specializované translační továrny (Chouaib et al., 2020).

Přestože o významu těchto agregátů zatím víme jen velmi málo, ohniska tvořená mRNA *Ctnnb1* nabízí pohled na jednu z možných funkcí těchto útvarů. mRNA *Ctnnb1* kóduje protein β -catenin, který v buňkách plní dvě poměrně odlišné funkce. Je hlavním transkripčním faktorem Wnt signální dráhy a zároveň interaguje s E-kadherinem v adhezních spojích, kde napomáhá jeho propojení s aktinovým cytoskeletem (Ozawa et al., 1989). Cytozolický β -catenin je za normálních okolností

účinně degradován, v přítomnosti proteinu z rodiny WNT je však stabilizován a následně se přesouvá do jádra, kde spouští transkripci cílových genů (Chouaib et al., 2020). Chouaib a kolegové zjistili, že inhibice translace mRNA Ctnnb1 vede k zániku ohnisek, což koresponduje s lokálním překladem β -cateninů (Chouaib et al., 2020). Spuštění Wnt signální dráhy inkubací buněk s proteinem WNT3A (silný a nejlépe prostudovaný aktivátor kanonické Wnt dráhy) po dobu 30 min rovněž způsobuje rozpad mRNA Ctnnb1 ohnisek a akumulaci β -cateninů v jádře (viz Obrázek 4) (Chouaib et al., 2020). Tato pozorování vedla autory k myšlence, že translace a degradace β -cateninů se v ohniskách odehrává současně. Degradaci β -cateninů zprostředkovává destrukční komplex tvořený nádorovým supresorem APC, axinem a kinázami CK1 α a GSK3 (Stamos & Weis, 2013). Axin je hlavním proteinem, který slouží jako lešení pro ostatní faktory komplexu, a jeho úkolem je dostat β -catenin do blízkosti kináz (Chouaib et al., 2020). V ohniskách Ctnnb1 transkriptů jsou lokalizovány jak destrukční proteiny axin1 a APC, tak i fosforylovaný β -catenin, což skutečně nasvědčuje ko-translační degradaci (Chouaib et al., 2020). Pokud tedy není přítomen WNT, nově syntetizovaný β -catenin je komplexem ihned degradován. Formace těchto ohnisek tak zřejmě spočívá v regulaci hladiny β -cateninů v buňce a pomáhá předcházet jeho nechtěnému úniku do jádra (Chouaib et al., 2020).



Obrázek 4: Rozpad ohnisek tvořených mRNA Ctnnb1. V cytoplazmě HeLa buněk nalezneme mRNA Ctnnb1 ve formě granulí, jejichž součástí jsou i proteiny destrukčního komplexu (jmenovitě APC, axin a kinázy CK1 α a GSK3). Spuštění Wnt signální dráhy inkubací buněk s proteinem WNT3A vede k rozpadu těchto granulí a akumulaci β -cateninů v jádře. Měřítka 10 μ m. Převzato z (Chouaib et al., 2020)

2.4 Perinukleární prostor

Úlohu lokalizace mRNA v perinukleárním prostoru lze demonstrovat na příkladu mRNA *Aspm* a *Spn*. Komplexní obrazová analýza odhalila, že transkripty pro *Aspm* i *Spn* se hromadí u jaderné obálky (Chouaib et al., 2020). Současně s tím bylo objeveno, že se obě mRNA přednostně lokalizují v blízkosti jaderných pórů (Chouaib et al., 2020). Důkaz, že se nejedná o přechodný jev při nukleárním exportu a že příčinou této lokalizace by mohlo být usnadnění transportu nově syntetizovaných proteinů do jádra, poskytuje experiment s aktinomycinem D (látka inhibující transkripci) a puromycinem (Chouaib et al., 2020). Po hodinové inkubaci buněk s aktinomycinem D lze pozorovat lokalizaci mRNA *Aspm* i *Spn* beze změny, zatímco časově identická kultivace s puromycinem vede k disperznímu

rozmístění obou transkriptů (Chouaib et al., 2020). Mimoto, vystavení buněk účinkům cykloheximidu nemá žádný vliv na lokalizaci ani jedné mRNA, a tak lze v souhrnu konstatovat, že transport mRNA Aspm a Spen k jaderné obálce vyžaduje aktivní translaci na polyzomech (Chouaib et al., 2020).

Lokalizace mRNA v perinukleárním prostoru nebyla dosud podrobněji studována, a tak neexistuje žádná evidence o výskytu dalších typů transkriptů v této subcelulární oblasti.

3 Vizualizační metody

Správně zvolené zobrazovací technologie a metodické přístupy nám pomáhají odhalit časoprostorové uspořádání mRNA v intracelulárním prostředí. Ke studiu subcelulární lokalizace lze přistupovat zpravidla dvěma odlišnými způsoby, a to pozorováním fixovaných nebo živých buněk. Metody založené na *in situ* analýze poskytují poměrně přesné informace o prostorovém rozmístění transkriptů, zatímco pozorování živých buněk nám umožňuje lépe porozumět časoprostorové dynamice jednotlivých mRNA a jejich úloze během různých buněčných procesů. Dnešní doba s sebou přináší stále nové a propracovanější postupy, které usnadňují výzkum tohoto jevu. Účelem následujících kapitol je tak představit standardně aplikované i recentně vyvinuté techniky včetně jejich výhod a nevýhod.

3.1 FISH

Jednou ze základních metod, která umožňuje pozorování lokalizace mRNA je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Poprvé byla tato technika použita k vizualizaci transkriptů Singerem a Wardem v roce 1982 a k jejímu provedení byla použita biotinem značená DNA sonda, která v kuřecích svalových buňkách hybridizovala s komplementární sekvencí aktinové mRNA (Singer & Ward, 1982). Interakce primární protilátky s biotinem následovaná vazbou sekundární protilátky konjugované s rhodaminem umožnila detekci aktinových transkriptů pod fluorescenčním mikroskopem (Singer & Ward, 1982). Soudobá FISH pracuje s fluorescenčně značenými sondami, které jsou inkubovány s fixovanými a permeabilizovanými buňkami, kde interagují s komplementárními sekvencemi vybraných transkriptů. K vizualizaci jednotlivých mRNA a jejich subcelulární lokalizace se standardně používá senzitivnější smFISH. Vyšší citlivost je dána aplikací setu několika oligonukleotidových sond hybridizujících s jednou molekulou transkriptu (Raj et al., 2008). V současné době se často setkáváme s různými variantami, například alternativa známá jako smiFISH je oproti klasické metodě méně nákladná a zároveň velmi flexibilní z hlediska barvení. SmiFISH využívá nepřímé značení, kdy základem jsou primární RNA sondy, které obsahují komplementární úsek k cílové sekvenci endogenní mRNA a zároveň nesou na svém 5'konci univerzální sekvenci FLAP (Tsanov et al., 2016). Sekundární RNA sonda označená fluoroforem na obou koncích se *in vitro* naváže na FLAP sekvenci primární sondy a vzniklé hybridní komplexy se poté vpraví do cílových buněk (Tsanov et al., 2016). K výrobě sond pro

smFISH lze využít také enzymatickou aktivitu. Princip spočívá v přidání jednoho fluorescenčně značeného nukleotidu na 3'konec primární sondy pomocí terminální deoxynukleotidyltransferázy (TdT). Adice pouze jednoho nukleotidu je zajištěna použitím dideoxyribonukleotidů (především ddUTP), jejichž fluorescence je dosaženo konjugací s fluorofor-NHS estery (Gaspar et al., 2017). Všechny výše zmíněné techniky jsou velmi přesné, avšak jejich nevýhodou je, že neodráží distribuci mRNA v čase, a tak mohou být informace získané pomocí těchto technik svým způsobem limitující.

3.2 Zobrazení v živých buňkách

Zásadní metodou, která položila základ vizualizace nativní mRNA v živých buňkách, bylo využití reportéru obsahujícího bakteriofágní MS2 vlásenky v kombinaci s MS2 obalovým proteinem (MCP) fúzovaným se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). MS2 vlásenky jsou obvykle vloženy v několika kopiích do 3'UTR reportérové mRNA a ta je společně s genem pro GFP-MCP transfekována do buňky (Bertrand et al., 1998). Aby byl výsledek pokusu co nejvíce reprezentativní, přidává se ke genu pro GFP-MCP jaderný lokalizační signál, díky kterému jsou volné proteiny transportovány do jádra, čímž se snižuje množství fluorescenčního šumu v cytozolu (Bertrand et al., 1998). V dnešní době se obalové proteiny také často fúzují s červeným fluorescenčním proteinem mCherry (Shaner et al., 2004) nebo HaloTagem (Los et al., 2008). Kromě MS2-MPC systému se později začaly používat i jiné komplexy jako například PP7 vlásenky rozpoznávané PP7 obalovým proteinem (PCP), který se strukturně velmi podobá MCP, ale liší se svou RNA-vazebnou doménou (Chao et al., 2008). Kombinace těchto systémů umožnila současné zobrazení dvou odlišných mRNA v rámci jedné buňky (Hocine et al., 2013).

Ke značení mRNA mohou být využity také aptamery – oligonukleotidové řetězce RNA schopné vázat malé molekuly a měnit jejich chemické vlastnosti. V tomto případě jde o fluorofory podobné GFP, které až po navázání na cílovou strukturu emitují světelný signál, což pomáhá předcházet nechtěné fluorescenci pozadí. Pro studovanou mRNA je připravena její modifikovaná verze nesoucí v 3'UTR tandem aptamerů, zatímco fluorofory musejí být do buňky vpraveny. Některé molekuly přecházejí do intracelulárního prostředí pomocí difúze, jiné vyžadují permeabilizaci membrány, což může ovlivnit fyziologii buňky a znehodnotit výsledek pokusu. Prvním aptamerem vyvinutým k tomuto účelu byl Spinach interagující s molekulou 3,5-difluor-4-hydroxybenzylidenimidazolinonu (DFHBI) (Paige et al., 2011). Dalším významným aptamerem aktivujícím DFHBI se stal Broccoli, který vykazuje vyšší termostabilitu a je designován pro prostředí s nízkou koncentrací Mg^{2+} iontů (Filonov et al., 2014). Limitujícím prvkem této technologie je však poměrně rychlá ztráta fluorescence. Nedávný výzkum fluoroforů aplikovaných na Broccoli ukázal, že nejúčinnější molekulou je benzimidazol (BI) – derivát DFHBI, který stabilizuje terciální strukturu Broccoli a podporuje jeho správné sbalení v savcích buňkách (Li et al., 2020). Od té doby bylo navrženo několik dalších aptamerů a k nim komplementárních fluoroforů emitujících světlo v různých oblastech barevného spektra, např. o-Coral

(Bouhedda et al., 2020) nebo Mango II (Cawte et al., 2020). Ovšem vzhledem k velkému množství kritérií, především pro barviva, je vývoj nových aptamerových systémů velmi náročný.

Kombinace dvou výše zmíněných technik nedávno dala vznik fluorogenním proteinům. Jedná se o fluorescentní proteiny, jež mají na svém C-terminálním konci připojenou destabilizační doménu tDeg. tDeg se skládá z RNA-vazebné domény proteinu TAT a degronové sekvence Arg-Arg-Arg-Gly (J. Wu et al., 2019). Za normálních okolností by byl takto značený protein ubiquitinován a degradován v proteazomu. Pokud se však tDeg doména naváže na Pepper aptamery umístěné v 3'UTR reportérové mRNA, degronová sekvence je skryta a nedochází k jejímu rozpoznání. (J. Wu et al., 2019). Fluorogenní proteiny asociované s Pepper aptamery jsou tedy před ubiquitinací chráněny, zatímco nenavázané proteiny se stávají součástí degradační dráhy. Tímto opatřením je zabráněno nechtěnému signálu v cytozolu, který by mohl znesnadnit pozorování (J. Wu et al., 2019). Výhoda této metody spočívá především v tom, že lze využít širokou škálu fluorescentních proteinů.

V recentní době je snaha aplikovat perspektivní vizualizační techniku odvozenou od systému CRISPR-Cas13 typu C2c2. Cas13 se zde dokáže vázat na jednotlivé RNA za pomoci specifických gRNA. Pro zobrazovací účely se používá katalyticky inaktivní forma Cas13 (dCas13), jehož endonukleázová aktivita je eliminována bodovými mutacemi (Abudayyeh et al., 2017). dCas13 jsou fúzovány s fluorescenčními EGFP a společně s gRNA jsou importovány do buňky, kde vytváří komplexy schopné vazby na mRNA (Yang et al., 2019). Pomocí fluorescenční mikroskopie lze následně detekovat signál emitovaný proteinem dCas13-EGFP, který je skrze gRNA navázaný na cílovém transkriptu (Yang et al., 2019). Nedávné studie ukázaly, že dCas13b získaná z bakteriálního druhu *Prevotella sp.* je pro vizualizaci RNA v živých buňkách ideální (Yang et al., 2019) a že adekvátními kandidáty jsou také subtypy dHgm4Cas13b a dMisCas13b (Yang et al., 2022). Zobrazení pomocí CRISPR-dCas13 dosahuje srovnatelných výsledků jako systém MS2-MPC a během značení dokonce vykazuje podstatně vyšší účinnost (Yang et al., 2019). Navíc recentně vyvinutý systém CRISPRpalette, který je založený na konjugaci gRNA s aptamery a jejich rozeznání RNA-vazebnými proteiny, umožňuje současnou vizualizaci hned několika různých transkriptů v rámci jedné buňky (Yang et al., 2022). Pro jednotlivé typy pozorovaných mRNA jsou vytvořeny komplementární gRNA, z nichž každá nese na svém 3'konci jiné vlásenkové struktury (např. MS2, PP7 a Pepper), které následně interagují s příslušnými RBP fúzovanými s odlišnými fluorescenčními proteiny (Yang et al., 2022).

Na úrovni transkriptomu se k určení lokalizace RNA používá poměrně nová technika proximálního značení známá jako APEX-seq. Tato metoda využívá peroxidázy APEX2, která za přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje přeměnu biotin-fenolu (BF) na biotin-fenoxylové radikály (Lam et al., 2015). Podle potřeb pokusu jsou pak vytvořeny buňky stabilně exprimující APEX2 na povrchu membrán či v lumen různých subcelulárních kompartmentů. Po inkubaci buněk s H₂O₂ a BF, dochází k reakci peroxidáz s molekulami biotin-fenolu, přičemž vzniklé radikály kovalentně interagují jen s mRNA, které se nacházejí v blízkosti několika málo nanometrů (Fazal et al., 2019). Přidáním fluorescenčně značeného neutravidinu (váže se na BF) lze biotinylované transkripty označit a následně detekovat (Fazal et al.,

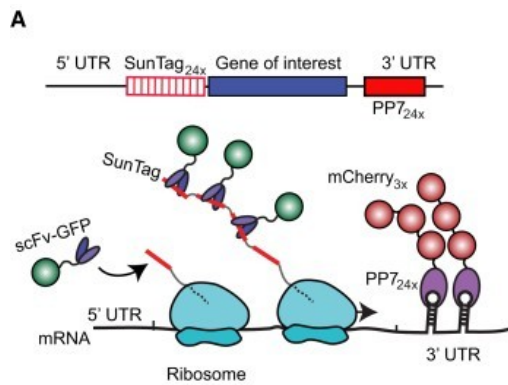
2019). mRNA jsou posléze izolovány pomocí streptavidinu, purifikovány a na závěr identifikovány vysokopřechodnou sekvenací (Fazal et al., 2019). Zásadní výhodou této metody je prostorové rozlišení s přesností na nanometry a použití permeabilních molekul biotin-fenolu k zachování buněčné integrity.

V dnešní technologicky vyspělé době je také možné předpovídat lokalizaci mRNA *in silico*. Vědecký výzkum přináší stále nové a inovované systémy, které jsou na základě analýzy dat a strojového učení schopné predikovat subcelulární výskyt jednotlivých transkriptů. K takovým prediktorům patří například MSLP (Musleh et al., 2023) nebo DeepmRNALoc (S. Wang et al., 2023). Většina experimentálních metod je zdlouhavá nebo finančně náročná, a prediktory tak nabízí alternativní způsob studia lokalizace.

3.3 Detekce lokalizované translace

TRICK se stal jednou z prvních technik, která umožnila pozorování časoprostorové dynamiky translace. Jde o metodu, kdy reportérové transkripty obsahující PP7 vlásenky na konci kódující sekvence a MS2 vlásenky v 3'UTR jsou vloženy do buněk stabilně exprimujících fluorescenčně značené PCP a MCP (viz kapitola 3.2) (Halstead et al., 2015). Barevně odlišené obalové proteiny interagují s příslušnými vlásenkami na mRNA a v závislosti na jejich kombinaci dochází k emisi světelného signálu o odpovídající vlnové délce. Během první translace jsou PCP odstraněny z transkriptu ribozomem, a translatované mRNA tak fluoreskují pouze v barvě MCP proteinu (Halstead et al., 2015). Tímto způsobem lze tedy pozorovat časoprostorový průběh první translace.

K zobrazení lokalizace jednotlivých molekul proteinů v živých buňkách byl vyvinut SunTag systém (Tanenbaum et al., 2014). Jedná se o krátké peptidové sekvence fungující jako epitopy, na které se s vysokou specifitou a afinitou váží protilátky, v tomto případě jednořetězcové variabilní fragmenty (scFv) fúzané s fluorescentním proteinem, např. sfGFP (Tanenbaum et al., 2014). K dosažení optimální intenzity fluorescence se SunTag obvykle používá ve 24 kopiích (Tanenbaum et al., 2014). Krátce po zavedení SunTagu byla vyvinuta další metoda, která umožnila pozorování lokalizované translace a translační dynamiky daného transkriptu v rámci jedné buňky. Princip spočívá v transfekci buněk reportérovou mRNA, která na začátku otevřeného čtecího rámce nese 24 kopií SunTagu a jejíž 3'UTR oblast současně obsahuje sérii PP7 vlásenek. Do buněk jsou zároveň vpraveny reportéry kódující scFv a PCP fúzané s odlišnými fluorescenčními proteiny (viz Obrázek 5) (Yan et al., 2016). V cytozolu interagují s PP7 vlásenkami reportérových mRNA PP7 obalové proteiny, díky nimž je možné sledovat lokalizaci transkriptů v buňce. Avšak ve chvíli, kdy se nasyntetizují N-terminální konce proteinů a na SunTag epitopy se naváží scFv, lze simultánně pozorovat jak subcelulární distribuci mRNA, tak i dynamiku a efektivitu translace studovaného transkriptu (Yan et al., 2016).



Obrázek 5: Vizualizace lokalizované translace. Horní část obrázku znázorňuje reportérovou mRNA, která byla modifikována přidáním 24 kopií epitopu SunTag do 5' nepřekládané oblasti (5'UTR) a vložením série 24 kopií RNA vlásenky PP7 do 3' nepřekládané oblasti (3'UTR). Společně s tímto geneticky upraveným transkriptem byl do buňky transfekován reportér exprimující jednořetězcové variabilní fragmenty (scFv) fúzované se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) a PP7 obalové proteiny fúzované s 3 molekulami červeného fluorescenčního proteinu mCherry. Na spodním obrázku pak lze pozorovat ribozom translatující reportérovou mRNA, na jejíchž PP7 vlásenkách jsou navázané PP7 obalové proteiny. Na nově syntetizované SunTag epitopy nascentního proteinu se zároveň váží jednotlivé scFv-GFP, což umožňuje simultánní vizualizaci mRNA i kódovaného proteinu. Převzato z (Yan et al., 2016).

Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se pokusila přehledně shrnout aktuální informace o transportu a lokalizované translaci v savčích buňkách, kde jsem se zaměřila zejména na nemembránové organely a specifické cytozolické oblasti. Tyto kompartmenty však nejsou obvyklým předmětem výzkumů a literární zdroje jsou tak relativně omezené. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla v některých pasážích zmínit informace ze studií provedených na organismech z jiných taxonomických skupin, které jsou z mého pohledu významné a mohly by vést k odhalení či porozumění analogických procesů u savců.

Náhodné pozorování až vyvinutí vysokopružných technologií vedlo v průběhu let k objevu lokalizačních vzorců mnoha transkriptů. Dnes se pro zobrazení jednotlivých molekul transkriptů běžně používá metoda smFISH, která umožňuje velmi přesnou detekci subcelulární lokalizace ve fixovaných buňkách (Raj et al., 2008). Naopak pozorování v živých buňkách nabízí pohled na dynamiku transkriptů reálném čase. V tomto ohledu mají dle mého názoru velký potenciál vizualizační techniky založené na detekci endogenních mRNA pomocí katalyticky umlčených Cas13 proteinů, neboť nevyžadují použití reportérových variant studovaných mRNA (Yang et al., 2019). V souhru dnes díky všem těmto technologiím a postupům víme, jak fungují některé transportní mechanismy a jaké faktory se jich účastní.

Jedna z nejznámějších lokalizací probíhá prostřednictvím SRP-dráhy, která je hlavním mechanismem ko-translačního transportu proteinů do ER. Zásadním poznatkem však je, že asociace mRNA s membránou ER nemusí probíhat pouze touto klasickou cestou. Příkladem nevšedního způsobu je mRNA *Dia1*, která se dostává do cílové destinace skrze vazbu na GTPázu RhoA (G. Liao et al., 2011). Studie zaměřené na lokalizaci a transport mRNA v nemembránových organelách rovněž vedly k zajímavým poznatkům. V cytozolu najdeme kromě P-bodies a SG také granula tvořená téměř výhradně jedním druhem mRNA. Recentní výzkum ukázal, že tyto struktury označované jako ohniska jsou pravděpodobně translačními továrnami, které podporují lokální produkci specifických proteinů (Chouaib et al., 2020). Nicméně ne vždy tomu tak musí být, což dokazují granula obsahující mRNA *Ctnnb1*. Podrobná analýza ukázala, že součástí těchto agregátů jsou i proteinové komponenty destrukčního komplexu, které ko-translačně degradují nově syntetizovaný β -catenin (Chouaib et al., 2020). Funkce těchto ohnisek je tak zřejmě regulačního charakteru a spočívá v udržení nízké hladiny β -catenin v cytozolu. Nejen tento případ tedy dokazuje, že lokalizaci mRNA lze považovat za mezistupeň genové exprese s regulační funkcí. Lokalizace je rovněž jednou z možností, jak determinovat interakční partnery kódovaného proteinu. Tento scénář lze pozorovat u mRNA *Net*, kdy translace v perinukleárním prostoru favorizuje vazbu importinu $\beta 1$, zatímco exprese na periférii podporuje asociaci s proteinem CASK (Gasparski et al., 2023). Lokalizace mRNA má rovněž vliv na celkový průběh řady buněčných procesů, ke kterým patří i migrace v extracelulárním prostoru. Takový případ lze demonstrovat na buňkách karcinomu prsu, kde delokalizace mRNA *Rab13* způsobuje narušenou schopnost migrace (Moissoglu et al., 2020).

Je tak jistě pochopitelné, že další studium lokalizace mRNA a definování obecných principů bude přínosem nejen v klasické molekulární a buněčné biologii, ale získané poznatky budou použitelné i v medicíně, kde by mohly přispět k zavedení nových léčebných postupů zejména pak u nádorových onemocnění.

Reference

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D. B. T., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y., & Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13a. *Nature*, *550*(7675), 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
- Armas, P., Coux, G., Weiner, A. M. J., & Calcaterra, N. B. (2021). What's new about CNBP? Divergent functions and activities for a conserved nucleic acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1865*(11), 129996. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129996>
- Bergalet, J., Patel, D., Legendre, F., Lapointe, C., Bouvrette, L. P. B., Chin, A., Blanchette, M., Kwon, E., & Lécuyer, E. (2020). Inter-dependent Centrosomal Co-localization of the cen and ik2 cis-Natural Antisense mRNAs in *Drosophila*. *Cell Reports*, *30*(10), 3339-3352.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.047>
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H., & Long, R. M. (1998). Localization of ASH1 mRNA Particles in Living Yeast. *Molecular Cell*, *2*(4), 437–445. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80143-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80143-4)
- Böhl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., & Jansen, R.-P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *The EMBO Journal*, *19*(20), 5514. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.20.5514>
- Bond, J., Roberts, E., Mochida, G. H., Hampshire, D. J., Scott, S., Askham, J. M., Springell, K., Mahadevan, M., Crow, Y. J., Markham, A. F., Walsh, C. A., & Woods, C. G. (2002). ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nature Genetics*, *32*(2), 316–320. <https://doi.org/10.1038/ng995>
- Bouhedda, F., Fam, K. T., Collot, M., Autour, A., Marzi, S., Klymchenko, A., & Ryckelynck, M. (2020). A dimerization-based fluorogenic dye-aptamer module for RNA imaging in live cells. *Nature chemical biology*, *16*(1), 69–76. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0381-8>
- Burton, J. L., Burns, M. E., Gatti, E., Augustine, G. J., & De Camilli, P. (1994). Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily. *The EMBO Journal*, *13*(23), 5547–5558. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06892.x>
- Cawte, A. D., Unrau, P. J., & Rueda, D. S. (2020). Live cell imaging of single RNA molecules with fluorogenic Mango II arrays. *Nature Communications*, *11*, 1283. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14932-7>
- Cui, X. A., Zhang, H., & Palazzo, A. F. (2012). P180 Promotes the Ribosome-Independent Localization of a Subset of mRNA to the Endoplasmic Reticulum. *PLOS Biology*, *10*(5), e1001336. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001336>
- Das, S., Vera, M., Gandin, V., Singer, R. H., & Tutucci, E. (2021). Intracellular mRNA transport and localized translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *22*(7), 483. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00356-8>
- Dermit, M., Dodel, M., Lee, F. C. Y., Azman, M. S., Schwenzer, H., Jones, J. L., Blagden, S. P., Ule, J., & Mardakheh, F. K. (2020). Subcellular mRNA Localization Regulates Ribosome Biogenesis in Migrating Cells. *Developmental Cell*, *55*(3), 298-313.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.006>

- Deshler, J. O., Hightett, M. I., & Schnapp, B. J. (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera Protein and the Endoplasmic Reticulum. *Science*, 276(5315), 1128–1131. <https://doi.org/10.1126/science.276.5315.1128>
- Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X., & Bullock, S. L. (2009). Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes & Development*, 23(13), 1546. <https://doi.org/10.1101/gad.531009>
- Dubash, A. D., Guilluy, C., Srougi, M. C., Boulter, E., BurrIDGE, K., & García-Mata, R. (2011). The Small GTPase RhoA Localizes to the Nucleus and Is Activated by Net1 and DNA Damage Signals. *PLoS ONE*, 6(2), e17380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017380>
- Fang, J., Tian, W., Quintanilla, M. A., Beach, J. R., & Lerit, D. A. (2024). The PCM scaffold enables RNA localization to centrosomes. *bioRxiv*, 2024.01.13.575509. <https://doi.org/10.1101/2024.01.13.575509>
- Fazal, F. M., Han, S., Parker, K. R., Kaewsapsak, P., Xu, J., Boettiger, A. N., Chang, H. Y., & Ting, A. Y. (2019). Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq. *Cell*, 178(2), 473–490.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.027>
- Filonov, G. S., Moon, J. D., Svensen, N., & Jaffrey, S. R. (2014). Broccoli: Rapid Selection of an RNA Mimic of Green Fluorescent Protein by Fluorescence-Based Selection and Directed Evolution. *Journal of the American Chemical Society*, 136(46), 16299–16308. <https://doi.org/10.1021/ja508478x>
- Gaglio, T., Saredi, A., & Compton, D. A. (1995). NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *The Journal of Cell Biology*, 131(3), 693–708. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.693>
- Gao, J., Schatton, D., Martinelli, P., Hansen, H., Pla-Martin, D., Barth, E., Becker, C., Altmueller, J., Frommolt, P., Sardiello, M., & Rugarli, E. I. (2014). CLUH regulates mitochondrial biogenesis by binding mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *The Journal of Cell Biology*, 207(2), 213–223. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403129>
- Gaspar, I., Wippich, F., & Ephrussi, A. (2017). Enzymatic production of single-molecule FISH and RNA capture probes. *RNA*, 23(10), 1582–1591. <https://doi.org/10.1261/rna.061184.117>
- Gasparski, A. N., Moissoglu, K., Pallikkuth, S., Meydan, S., Guydosh, N. R., & Mili, S. (2023). mRNA Location and Translation Rate Determine Protein Targeting to Dual Destinations. *Molecular cell*, 83(15), 2726–2738.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.06.036>
- Gehrke, S., Wu, Z., Klinkenberg, M., Sun, Y., Auburger, G., Guo, S., & Lu, B. (2015). PINK1 and Parkin Control Localized Translation of Respiratory Chain Component mRNAs on Mitochondria Outer Membrane. *Cell metabolism*, 21(1), 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.007>
- Halstead, J. M., Lionnet, T., Wilbertz, J. H., Wippich, F., Ephrussi, A., Singer, R. H., & Chao, J. A. (2015). An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6228), 1367–1671. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3380>
- Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Hohn, H., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D., & Turley, E. (1992). Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *The Journal of Cell Biology*, 117(6), 1343–1350. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.6.1343>

- Hocine, S., Raymond, P., Zenklusen, D., Chao, J. A., & Singer, R. H. (2013). Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nature methods*, *10*(2), 119–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2305>
- Hoogenraad, C. C., Wulf, P., Schiefermeier, N., Stepanova, T., Galjart, N., Small, Jv., Grosveld, F., Zeeuw, C. I. de, & Akhmanova, A. (2003). Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *The EMBO Journal*, *22*(22), 6004. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg592>
- Hsu, J. C.-C., Reid, D. W., Hoffman, A. M., Sarkar, D., & Nicchitta, C. V. (2018). Oncoprotein AEG-1 is an endoplasmic reticulum RNA-binding protein whose interactome is enriched in organelle resident protein-encoding mRNAs. *RNA*, *24*(5), 688–703. <https://doi.org/10.1261/rna.063313.117>
- Chao, J. A., Patskovsky, Y., Almo, S. C., & Singer, R. H. (2008). Structural basis for the coevolution of a viral RNA–protein complex. *Nature structural & molecular biology*, *15*(1), 103–105. <https://doi.org/10.1038/nsmb1327>
- Chen, S., & Collart, M. A. (2024). Membrane-associated mRNAs: A Post-transcriptional Pathway for Fine-tuning Gene Expression. *Journal of Molecular Biology*, *436*(11), 168579. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168579>
- Child, J. R., Hofler, A. C., Chen, Q., Yang, B. H., Kristofich, J., Zheng, T., Hannigan, M. M., Elles, A. L., Reid, D. W., & Nicchitta, C. V. (2023). Examining SRP pathway function in mRNA localization to the endoplasmic reticulum. *RNA*, *29*(11), 1703–1724. <https://doi.org/10.1261/rna.079643.123>
- Chouaib, R., Safieddine, A., Pichon, X., Imbert, A., Kwon, O. S., Samacoits, A., Traboulsi, A.-M., Robert, M.-C., Tsanov, N., Coleno, E., Poser, I., Zimmer, C., Hyman, A., Hir, H. L., Zibara, K., Peter, M., Mueller, F., Walter, T., & Bertrand, E. (2020). A Dual Protein-mRNA Localization Screen Reveals Compartmentalized Translation and Widespread Co-translational RNA Targeting. *Developmental Cell*, *54*(6), 773–791.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.010>
- Ioannou, M. S., & McPherson, P. S. (2016). Regulation of Cancer Cell Behavior by the Small GTPase Rab13. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(19), 9929–9937. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.715193>
- Jansova, D., Tetkova, A., Koncicka, M., Kubelka, M., & Susor, A. (2018). Localization of RNA and translation in the mammalian oocyte and embryo. *PLoS ONE*, *13*(3), e0192544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192544>
- Jeffery, W. R., Tomlinson, C. R., & Brodeur, R. D. (1983). Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Developmental Biology*, *99*(2), 408–417. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90290-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90290-7)
- Kalitsis, P., Earle, E., Fowler, K. J., & Choo, K. A. (2000). Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes & Development*, *14*(18), 2277. <https://doi.org/10.1101/gad.827500>
- Laggerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E.-M., Ostareck-Lederer, A., & Fischer, U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Human Molecular Genetics*, *10*(4), 329–338. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.4.329>
- Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., & Ting, A. Y. (2015). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proteomics. *Nature methods*, *12*(1), 51–54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>

- Lawo, S., Hasegan, M., Gupta, G. D., & Pelletier, L. (2012). Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nature Cell Biology*, *14*(11), 1148–1158. <https://doi.org/10.1038/ncb2591>
- Lawrence, J. B., & Singer, R. H. (1986). Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell*, *45*(3), 407–415. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90326-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90326-0)
- Li, X., Kim, H., Litke, J. L., Wu, J., & Jaffrey, S. R. (2020). Fluorophore-promoted RNA folding and photostability enable imaging of single Broccoli-tagged mRNAs in live mammalian cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *59*(11), 4511–4518. <https://doi.org/10.1002/anie.201914576>
- Liao, G., Ma, X., & Liu, G. (2011). An RNA-zipcode-independent mechanism that localizes Dial mRNA to the perinuclear ER through interactions between Dial nascent peptide and Rho-GTP. *Journal of Cell Science*, *124*(4), 589–599. <https://doi.org/10.1242/jcs.072421>
- Liao, Y.-C., Fernandopulle, M. S., Wang, G., Choi, H., Hao, L., Drerup, C. M., Patel, R., Qamar, S., Nixon-Abell, J., Shen, Y., Meadows, W., Vendruscolo, M., Knowles, T. P. J., Nelson, M., Czekalska, M. A., Musteikyte, G., Gachechiladze, M. A., Stephens, C. A., Pasolli, H. A., ... Ward, M. E. (2019). RNA Granules Hitchhike on Lysosomes for Long-Distance Transport, Using Annexin A11 as a Molecular Tether. *Cell*, *179*(1), 147-164.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.050>
- Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., & Wood, K. V. (2008). HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chemical Biology*, *3*(6), 373–382. <https://doi.org/10.1021/cb800025k>
- Mili, S., Moissoglu, K., & Macara, I. G. (2008). Genome-Wide Screen Identifies Localized RNAs Anchored At Cell Protrusions Through Microtubules And APC. *Nature*, *453*(7191), 115–119. <https://doi.org/10.1038/nature06888>
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E., & Mayford, M. (2002). Disruption of Dendritic Translation of CaMKII α Impairs Stabilization of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Neuron*, *36*(3), 507–519. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00978-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00978-9)
- Miyashiro, K. Y., Beckel-Mitchener, A., Purk, T. P., Becker, K. G., Barret, T., Liu, L., Carbonetto, S., Weiler, I. J., Greenough, W. T., & Eberwine, J. (2003). RNA Cargoes Associating with FMRP Reveal Deficits in Cellular Functioning in Fmr1 Null Mice. *Neuron*, *37*(3), 417–431. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00034-5)
- Mogensen, M. M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., & Bornens, M. (2000). Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: The role of ninein. *Journal of Cell Science*, *113*(17), 3013–3023. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3013>
- Moissoglu, K., Stueland, M., Gasparski, A. N., Wang, T., Jenkins, L. M., Hastings, M. L., & Mili, S. (2020). RNA localization and co-translational interactions control RAB13 GTPase function and cell migration. *The EMBO Journal*, *39*(21), e104958. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104958>
- Moissoglu, K., Wang, T., Gasparski, A. N., Stueland, M., Paine, E. L., Jenkins, L., & Mili, S. (2024). *A KIF1C-CNBP motor-adaptor complex for trafficking mRNAs to cell protrusions*. <https://doi.org/10.1101/2024.06.26.600878>

- Moissoglu, K., Yasuda, K., Wang, T., Chrisafis, G., & Mili, S. (2019). Translational regulation of protrusion-localized RNAs involves silencing and clustering after transport. *eLife*, *8*, e44752. <https://doi.org/10.7554/eLife.44752>
- Moor, A. E., Golan, M., Massasa, E. E., Lemze, D., Weizman, T., Shenhav, R., Baydatch, S., Mizrahi, O., Winkler, R., Golani, O., Stern-Ginossar, N., & Itzkovitz, S. (2017). Global mRNA polarization regulates translation efficiency in the intestinal epithelium. *Science (New York, N.Y.)*, *357*(6357), 1299–1303. <https://doi.org/10.1126/science.aan2399>
- Moriarty, R. A., Mili, S., & Stroka, K. M. (2022). RNA localization in confined cells depends on cellular mechanical activity and contributes to confined migration. *iScience*, *25*(2), 103845. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103845>
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(7), 3046. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.3046>
- Musleh, S., Islam, M. T., Qureshi, R., Alajez, N. M., & Alam, T. (2023). MSLP: mRNA subcellular localization predictor based on machine learning techniques. *BMC Bioinformatics*, *24*, 109. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05232-0>
- Norris, M. L., & Mendell, J. T. (2023). Localization of Kif1c mRNA to cell protrusions dictates binding partner specificity of the encoded protein. *Genes & Development*, *37*(5–6), 191–203. <https://doi.org/10.1101/gad.350320.122>
- Ozawa, M., Baribault, H., & Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *The EMBO Journal*, *8*(6), 1711. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03563.x>
- Paige, J. S., Wu, K., & Jaffrey, S. R. (2011). RNA mimics of green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6042), 642–646. <https://doi.org/10.1126/science.1207339>
- Pascual, R., Segura-Morales, C., Omerzu, M., Bellora, N., Belloc, E., Castellazzi, C. L., Reina, O., Eyra, E., Maurice, M. M., Millanes-Romero, A., & Méndez, R. (2021). mRNA spindle localization and mitotic translational regulation by CPEB1 and CPEB4. *RNA*, *27*(3), 291–302. <https://doi.org/10.1261/ma.077552.120>
- Pichon, X., Moissoglu, K., Coleno, E., Wang, T., Imbert, A., Robert, M.-C., Peter, M., Chouaib, R., Walter, T., Mueller, F., Zibara, K., Bertrand, E., & Mili, S. (2021). The kinesin KIF1C transports APC-dependent mRNAs to cell protrusions. *RNA*, *27*(12), 1528–1544. <https://doi.org/10.1261/ma.078576.120>
- Raj, A., Bogaard, P. van den, Rifkin, S. A., Oudenaarden, A. van, & Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature Methods*, *5*(10), 877. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1253>
- Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2020). Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *Journal of Cell Science*, *133*(16), jcs242487. <https://doi.org/10.1242/jcs.242487>
- Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E. H., Taneja, K. L., & Singer, R. H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(4), 2158–2165. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC232064/>

- Ryder, P. V., Fang, J., & Lerit, D. A. (2020). Centrocortin RNA localization to centrosomes is regulated by FMRP and facilitates error-free mitosis. *Journal of Cell Biology*, 219(12), e202004101. <https://doi.org/10.1083/jcb.202004101>
- Safieddine, A., Coleno, E., Salloum, S., Imbert, A., Traboulsi, A.-M., Kwon, O. S., Lionneton, F., Georget, V., Robert, M.-C., Gostan, T., Lecellier, C.-H., Chouaib, R., Pichon, X., Le Hir, H., Zibara, K., Mueller, F., Walter, T., Peter, M., & Bertrand, E. (2021). A choreography of centrosomal mRNAs reveals a conserved localization mechanism involving active polysome transport. *Nature Communications*, 12, 1352. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21585-7>
- Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourden, L., Le Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., & Jacq, C. (2008). Yeast Mitochondrial Biogenesis: A Role for the PUF RNA-Binding Protein Puf3p in mRNA Localization. *PLoS ONE*, 3(6), e2293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002293>
- Semotok, J. L., Cooperstock, R. L., Pinder, B. D., Vari, H. K., Lipshitz, H. D., & Smibert, C. A. (2005). Smaug Recruits the CCR4/POP2/NOT Deadenylation Complex to Trigger Maternal Transcript Localization in the Early Drosophila Embryo. *Current Biology*, 15(4), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.048>
- Sepulveda, G., Antkowiak, M., Brust-Mascher, I., Mahe, K., Ou, T., Castro, N. M., Christensen, L. N., Cheung, L., Jiang, X., Yoon, D., Huang, B., & Jao, L.-E. (2018). Co-translational protein targeting facilitates centrosomal recruitment of PCNT during centrosome maturation in vertebrates. *eLife*, 7, e34959. <https://doi.org/10.7554/eLife.34959>
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. Red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>
- Sharma, S., & Fazal, F. M. (2024). Localization of RNAs to the mitochondria—Mechanisms and functions. *RNA*, 30(6), 597–608. <https://doi.org/10.1261/ma.079999.124>
- Shestakova, E. A., Singer, R. H., & Condeelis, J. (2001). The physiological significance of β -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7045. <https://doi.org/10.1073/pnas.121146098>
- Singer, R. H., & Ward, D. C. (1982). Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinylated nucleotide analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(23), 7331. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.23.7331>
- Smibert, C. A., Wilson, J. E., Kerr, K., & Macdonald, P. M. (1996). Smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo. *Genes & Development*, 10(20), 2600–2609. <https://doi.org/10.1101/gad.10.20.2600>
- Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), a007898. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>
- Strome, S., & Wood, W. B. (1982). Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(5), 1558. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.5.1558>

- Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S., & Vale, R. D. (2014). A protein tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, *159*(3), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
- Tsanov, N., Samacoits, A., Chouaib, R., Traboulsi, A.-M., Gostan, T., Weber, C., Zimmer, C., Zibara, K., Walter, T., Peter, M., Bertrand, E., & Mueller, F. (2016). smiFISH and FISH-quant – a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Research*, *44*(22), e165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw784>
- Wang, C., & Lehmann, R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*, *66*(4), 637–647. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90110-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90110-K)
- Wang, S., Shen, Z., Liu, T., Long, W., Jiang, L., & Peng, S. (2023). DeepmRNALoc: A Novel Predictor of Eukaryotic mRNA Subcellular Localization Based on Deep Learning. *Molecules*, *28*(5), 2284. <https://doi.org/10.3390/molecules28052284>
- Wang, T., Hamilla, S., Cam, M., Aranda-Espinoza, H., & Mili, S. (2017). Extracellular matrix stiffness and cell contractility control RNA localization to promote cell migration. *Nature Communications*, *8*, 896. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00884-y>
- Wu, H., Zhou, J., Zhu, T., Cohen, I., & Dichtenberg, J. (2020). A kinesin adapter directly mediates dendritic mRNA localization during neural development in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *295*(19), 6605–6628. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005616>
- Wu, J., Zaccara, S., Khuperkar, D., Kim, H., Tanenbaum, M. E., & Jaffrey, S. R. (2019). Live imaging of mRNA using RNA-stabilized fluorogenic proteins. *Nature methods*, *16*(9), 862–865. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0531-7>
- Yan, X., Hoek, T. A., Vale, R. D., & Tanenbaum, M. E. (2016). Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell*, *165*(4), 976–989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.034>
- Yang, L.-Z., Gao, B.-Q., Huang, Y., Wang, Y., Yang, L., & Chen, L.-L. (2022). Multi-color RNA imaging with CRISPR-Cas13b systems in living cells. *Cell Insight*, *1*(4), 100044. <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2022.100044>
- Yang, L.-Z., Wang, Y., Li, S.-Q., Yao, R.-W., Luan, P.-F., Wu, H., Carmichael, G. G., & Chen, L.-L. (2019). Dynamic Imaging of RNA in Living Cells by CRISPR-Cas13 Systems. *Molecular Cell*, *76*(6), 981-997.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.024>
- Zaessinger, S., Busseau, I., & Simonelig, M. (2006). Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development*, *133*(22), 4573–4583. <https://doi.org/10.1242/dev.02649>
- Zein-Sabatto, H., Brockett, J. S., Jin, L., Husbands, C. A., Lee, J., Fang, J., Buehler, J., Bullock, S. L., & Lerit, D. A. (2024). Centrocortin potentiates co-translational localization of its mRNA to the centrosome via dynein. *bioRxiv*, 2024.08.09.607365. <https://doi.org/10.1101/2024.08.09.607365>