

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Vendula Čečmanová**

**Proteinová rodina eIF4E studovaná v lidských tkáňových liniích**  
Protein family eIF4E studied in human cell lines

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Tomáš Mašek Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

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

V Praze, 15.8.2016

.....  
Vendula Čečmanová

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Maškovi Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a trpělivost. Dále Mgr. Silvii Mrvové, konzultantce této práce, za ochotu, se kterou mi byla vždy nápomocna při řešení odborných problémů, a v neposlední řadě celému kolektivu Laboratoře biochemie RNA za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

## **Abstrakt:**

Protein eIF4E patří mezi důležité eukaryotické translační iniciační faktory, jelikož zprostředkovává vazbu na 5'konec mRNA, tzv. čepičku. U člověka se nachází tři zástupci této proteinové rodiny, konkrétně eIF4E1, eIF4E2 a eIF4E3. Vedle iniciace translace se eIF4E1 účastní například exportu vybraných mRNA do cytoplazmy. Regulace tohoto proteinu z velké části probíhá prostřednictvím mTOR signální dráhy, přičemž poruchy v regulaci vedou ke zvýšené proliferaci buněk, což může vyústit ve vznik nádorového bujení. eIF4E2 hraje roli v regulaci translace během embryogeneze a zprostředkovává translaci za hypoxie. Úloha eIF4E3 je dosud opředena tajemstvím. Některé studie naznačují jeho tumor-supresorový potenciál, zatím však nebyl nikdy studován lidský eIF4E3. Velký potenciál naší práce tedy spočívá ve skutečnosti, že všechny eIF4E proteiny se kterými pracujeme jsou lidské. Na základě našich výsledků víme, že endogenní množství eIF4E3 v buňce je vyšší než se dosud myslelo, což je jeden z důvodů, proč by tento protein rozhodně neměl uniknout vědecké pozornosti.

Ve své práci jsem porovnávala fyziologické parametry buněk s nadprodukovanými eIF4E proteiny po aplikaci inhibitorů mTOR kinázy. Zjistila jsem, že nejúčinnějším inhibitorem ve všech testovaných buněčných kulturách je PP-242, který se váže, na rozdíl od jiných, přímo do aktivního místa mTOR kinázy.

Vytvořila jsem konstrukty eIF4E s 3xC FLAG fúzí a následně pozorovala zda eIF4E3 lokalizuje s P-bodies a stresovými granulemi. Podařilo se mi jednoznačně potvrdit, že eIF4E3 nelokalizuje do P-bodies, což je v souladu s našimi předchozími poznatky získanými s GFP fúzovanými eIF4E proteiny.

**Klíčová slova:** eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3, mTOR, stresové granule, P-bodies, polyzomy, Rapamycin, PP-242, Resazurin, translace

**Abstract:**

The eIF4E is an important eukaryotic translation initiation factor, because of its ability to bind cap at 5' end of mRNA. There are three members of this protein family found in humans: eIF4E1, eIF4E2 and eIF4E3. eIF4E1 also plays role in export of some mRNA from nucleus to cytoplasm. This protein is mostly regulated by mTOR signaling pathway and malfunctions in regulation leads to increased cell proliferation and thus tumorigenesis. eIF4E2 plays a role in regulating of translation during embryogenesis and it is known to mediate translation in terms of hypoxia. Role of eIF4E3 is so far shrouded in mystery. Some studies suggest it might be able to suppress tumor growth, but no studies have been done on human eIF4E3. Big potential of our work is, that all proteins we work with, are human. Based on our results, the endogenous amount of eIF4E3 protein is higher than it was thought. This is one of the reasons, why this protein should not escape our attention.

In my diploma thesis, I have studied physiological characteristics of cell cultures overexpressing eIF4E proteins after mTOR inhibition treatment. I have realized that the most efficient inhibitor in all tested cell cultures is PP-242, which binds directly into active site of mTOR kinase.

I have cloned 3xC FLAG tagged eIF4Es constructs and used them to describe subcellular localization of eIF4E3 in respect to P-bodies and stress granules. I confirmed that eIF4E3 does not localize to P-bodies which is in agreement with our previous observations using eIF4E proteins fused with GFP

**Keywords:** eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3, mTOR, stress granules, P-bodies, polysomes, Rapamycin, PP-242, Resazurin, translation

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	10
<b>1 Úvod</b> .....	12
<b>2 Přehled literatury</b> .....	13
2.1 Translace .....	13
2.2 Iniclace translace u eukaryot.....	15
2.3 eIF4E a jeho regulace.....	18
2.4 Propojení iniciace translace s mTOR dráhou.....	20
2.5 Funkce eIF4E .....	24
2.6 Rodina eukaryotických iniciačních translačních faktorů eIF4E.....	28
2.6.1 Octomilka a její iniciační faktory.....	29
2.6.2 Hád'átko a jeho iniciační faktory.....	29
2.6.3 Lidské iniciační faktory eIF4E.....	30
2.6.4 Lokalizace eIF4E proteinů v P-bodies a stresových granulích .....	39
<b>3 Cíle práce</b> .....	42
<b>4 Materiál a metody</b> .....	43
4.1 Materiál .....	43
4.1.1 Chemikálie .....	43
4.1.2 Roztoky .....	44
4.1.3 Komerční pufrý a roztoky nezahrnuté v soupravách.....	45
4.1.4 Protilátky .....	46
4.1.5 Plazmidy.....	46
4.1.6 Buněčné linie.....	47
4.1.7 Enzymy .....	47
4.1.8 Kultivace buněčných linií .....	48
4.1.9 Bakteriální kmeny .....	48
4.1.10 Bakteriální kultivační média .....	48
4.1.11 Komerční soupravy .....	48
4.1.12 Oligonukleotidy.....	49
4.1.13 Specifické laboratorní přístroje .....	49
4.2 Metody .....	50
4.2.1 Kultivace bakterií.....	50

4.2.2	Skladování bakteriálních kmenů .....	50
4.2.3	Práce s tkáňovými kulturami.....	50
4.2.4	Tvorba FRT stabilní linie .....	51
4.2.5	Transfekce plazmidu do buněk Hek293 a U2OS pomocí polyetyleniminu (PEI) .....	52
4.2.6	Transfekce plazmidů do buněk U2OS pomocí Lipofectaminu® 2000.....	52
4.2.7	Vyvolání stresových podmínek.....	53
4.2.8	Fixace buněk paraformaldehydem .....	53
4.2.9	Křivky umírání měřené pomocí Resazurinu .....	54
4.2.10	„Minipreparace“ plazmidů z buněk <i>E. coli</i> .....	55
4.2.11	„Midipreparace“ plazmidů z buněk <i>E. coli</i> .....	55
4.2.12	Izolace plazmidu z buněk <i>E. coli</i> pomocí komerční soupravy.....	57
4.2.13	Izolace plazmidu pFRT/lacZeo2 .....	57
4.2.14	Purifikace naštěpeného plazmidu pFRT/lacZeo2 .....	57
4.2.15	PCR jednotlivých pEGFP plazmidů.....	58
4.2.16	PCR TOPO plazmidů s inzertem .....	58
4.2.17	PCR pro ověření klonovaných eIF4E proteinů .....	59
4.2.18	Agarózová elektroforéza DNA.....	60
4.2.19	Štěpení restrikčními enzymy – klonování.....	60
4.2.20	Ověření TOPO plazmidů.....	61
4.2.21	Ověření klonů.....	61
4.2.22	Restrikce pFRT/lacZeo plazmidu .....	61
4.2.23	Ligace.....	62
4.2.24	Izolace DNA z agarózového gelu.....	62
4.2.25	Vkládání do TOPO vektoru – „TOPO klonování“ .....	62
4.2.26	Sekvenování .....	63
4.2.27	Transformace buněk <i>E. coli</i> elektroporací .....	63
4.2.28	Tvorba bakteriálních konzerv.....	63
4.2.29	Izolace RNA.....	63
4.2.30	Agarózová denaturační elektroforéza RNA (podle Mašek <i>et al.</i> 2005).....	64
4.2.31	Měření koncentrace nukleových kyselin.....	65
4.2.32	Reverzní transkripce.....	65
4.2.33	Real-time PCR .....	66
4.2.34	Srážení proteinů v polyzomálních profilech pomocí TCA .....	66



4.2.35	Příprava buněčných lyzátů .....	67
4.2.36	Western blotting metodou „wet“ a „semi-dry“ .....	68
4.2.37	Chemiluminiscenční detekce .....	70
4.2.38	Barvení polyakrylamidových gelů .....	71
4.2.39	Odstranění protilátek z již analyzované Western blot membrány („stripování“).....	71
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>72</b>
5.1	Ověření množství endogenních a nadprodukovaných eIF4E proteinů a jejich mRNA. ....	72
5.2	Křivky umírání měřené pomocí Resazurinu: .....	75
5.3	Analýza polyzomálních profilů pomocí metody Western blot .....	83
5.4	Klonování.....	90
5.5	Tvorba stabilních linií: .....	97
5.6	Mikroskopie: .....	100
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Souhrn</b> .....	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>117</b>

## Seznam zkratek

<b>Zkratka</b>	<b>Anglický název</b>	<b>Český název</b>
<b>ADP</b>	Adenosine diphosphate	Adenosin difosfát
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate	Adenosin trifosfát
<b>cDNA</b>	Complementary DNA	Komplementární DNA
<b>DAPI</b>		4',6-diamidin-2-fenylindol
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Double distilled water	Demineralizovaná voda
<b>DLBCL</b>	Diffuse large B-cell lymphoma	
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTP</b>	Deoxyribonucleoside triphosphate	Deoxyribonukleosid trifosfát
<b>eEF</b>	Eukaryotic elongating factor	
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor	Epidermální růstový hormon
<b>eIF</b>	Eukaryotic initiation factor	Eukaryotický iniciační faktor
<b>eRF</b>	Eukaryotic release factor	
<b>EST</b>	Expressed sequence tag	
<b>FRT</b>	Flippase recognition target	
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate	Guanosin difosfát
<b>GEF</b>	Guanine exchange factor	Faktor nahrazující guanosin
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein	
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate	Guanosin trifosfát
<b>kDa</b>	kilo Dalton	
<b>miRNA</b>	Micro RNA	Mikro RNA
<b>mRNA</b>	Messenger RNA	Mediátorová RNA
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline	
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
<b>rRNA</b>	Ribosomal RNA	Ribozomální RNA
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA	Malé interferující RNA

<b>TRN</b>		RNáza A
<b>tRNA</b>	Transfer RNA	Transferová RNA
<b>UTR</b>	Untranslated region	Nepřekládaná oblast
<b>VPg</b>	Viral protein genome-linked	

V seznamu nejsou uvedeny zkratky, které jsem vysvětlila v textu, jsou v něm použity jen jednou nebo jsou všeobecně známé, jako například chemické sloučeniny. Zkratky, které v českém překladu znějí krkolomně jsem ponechala pouze v anglickém znění.

# 1 Úvod

Eukaryotický translační iniciační faktor eIF4E je znám nejen pro svoji schopnost vázat čepičku, nacházející se na 5'konci mRNA a tím se účastnit iniciace translace, ale hraje velkou úlohu v mnoha dalších buněčných procesech. Mezi ně patří například export vybraných transkriptů z jádra do cytoplazmy. Je také spojován se vznikem malignitu člověka, jelikož jeho zvýšené množství bylo popsáno u nejednoho typu nádoru. Mechanismus, jakým toho dosahuje, je založen na zvýšení translace některých mRNA proto-onkogenů, na zvýšení jejich transportu do cytoplazmy, popřípadě na propojení obou dějů.

U člověka se tento kanonický eIF4E protein označuje eIF4E1, jelikož byly popsány další dva proteiny této rodiny, eIF4E2 a eIF4E3. Jejich funkce není zatím zcela objasněna. eIF4E2 se pravděpodobně účastní translace za hypoxie, jeho analog u octomilky napomáhá distribuci maternálních mRNA v rámci embrya. Faktor eIF4E3 je nejméně studovaným zástupcem a jeho role není dosud známá. Spekuluje se o jeho tumor-supresorovém potenciálu, avšak všechny studie, které byly provedeny, se zaměřily na myší protein eIF4E3. V laboratoři disponujeme stabilními liniemi, které nesou všechny tři eIF4E zástupce a naší nespornou výhodou je, že všechny tyto proteiny jsou lidského původu.

V první části práce jsem se zaměřila na zavedení nové metodiky do laboratoře, díky níž bychom byli schopni charakterizovat fyziologické a růstové parametry jednotlivých stabilních linií produkujících eIF4E proteiny s N-terminální GFP fúzí. Zajímalo nás srovnání buněčných kultur při nadprodukci jednotlivých eIF4E proteinů. Zároveň jsem chtěla porovnat endogenní a nadprodukované množství eIF4E proteinů a mRNA v buněčných liniích.

V druhé části jsem si dala za cíl naklonovat eIF4E proteiny, které ponesou na svém C-terminálním konci 3x FLAG fúzí. S těmito konstrukty jsem chtěla, pomocí mikroskopie, otestovat lokalizaci dvou eIF4E3 variant s P-bodies, což jsou degradační tělíška, a se stresovými granulemi. Tímto tématem se v laboratoři dlouhodobě zabýváme a mé výsledky získané s novými konstrukty by měly ověřit předchozí výsledky pořízené s GFP fúzovanými proteiny.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Translace

Když Francis Crick v roce 1958 postuloval tzv. Centrální dogma molekulární biologie, sestávalo toto ze tří částí: replikace, transkripce a translace. Přesto, že se časem jeho definice poněkud rozšířila, tyto tři mechanismy zůstávají uhlíčovými kameny našeho poznání o tom, jak dochází k toku informací v buňkách všeho živého na naší planetě. Replikace umí zajistit množení genetické informace na úrovni DNA tak, aby ji bylo možné předat dalším generacím buněk. Transkripce umí tuto informaci přepsat do molekuly RNA, translace je potom proces, kdy dochází na základě pořadí bází v mediátorové RNA (mRNA) a pravidel genetického kódu, k tvorbě proteinů – základních biopolymerů, ze kterých je celá buňka, tkáň a organismus složen.

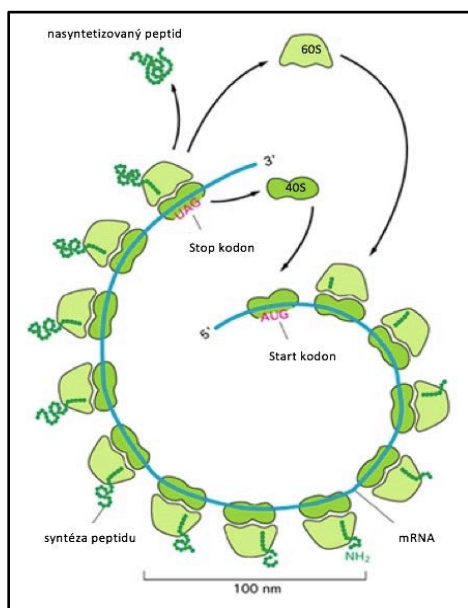
U prokaryot není translace časově a prostorově oddělena od transkripce, u eukaryot k tomuto oddělení dochází díky přítomnosti jádra, v němž probíhá transkripce a translace se potom odehrává v cytoplasmě. Princip je však u všech organismů stejný: mRNA, která nese genetickou informaci o podobě finálního proteinu se na ribozomu (který obsahuje ribozomální RNA - rRNA) přeloží (prostřednictvím transferové RNA - tRNA) do sekvence polypeptidu.

Translace je rozdělena do tří fází:

**Iniciace:** zde dochází ke složení iniciačního bílkovinného komplexu na mRNA, což umožní nasednutí ribozomu a připojení iniciační tRNA, která nese první aminokyselinu na stavbu proteinu. Tohoto procesu se účastní celá řada iniciačních translačních faktorů, o kterých bude pojednáno níže.

**Elongace:** během ní dochází k samotné syntéze polypeptidového řetězce. Elongační faktory u eukaryot, zapojené v tomto procesu jsou tři. Zaprvé eEF1A, který přináší aminoacyl-tRNA k ribozomu. Zadruhé eEF1B, který funguje jako GEF faktor eEF1A a zatřetí eEF2, který nese navázané GTP a po jeho hydrolýze dojde k posunu mRNA na malé podjednotce ribozomu o jeden kodon. eEF2 následně uvolní A místo.

**Terminace:** zde se rozpadá celý komplex mRNA/ribosom a vytvořený polypeptid je uvolněn do cytoplazmy k dalšímu zpracování. Dochází k tomu v momentě, kdy ribosom narazí na některý ze tří terminačních kodonů (UAG, UAA a UGA). Terminace se neobejde bez terminačních faktorů, těmi jsou u eukaryot eRF1 a eRF3. Tyto dva proteiny jsou na sebe navázány, eRF3 nese GTP. Jakmile komplex usedne do A místa (toto místo je volné, jelikož terminačním kodonům neodpovídá žádná aminoacyl-tRNA) přemění se GTP na GDP a eRF3 se odpojí od eRF1, který obsadil A místo. Dále následuje navázání ABCE1 nesoucího ATP na eRF1, což vede k odpojení nasyntetizovaného peptidu z ribozomu. Nyní může následovat recyklace ribozomu. K tomu dochází díky hydrolýze ATP na ADP. Jakmile proběhne tento krok, všechny doposud ribozomem spojené komponenty se od sebe oddělí, ribosom samotný se rozpadne na malou a velkou podjednotku a malá podjednotka může okamžitě sloužit k navázání eIF faktorů, klidně na stejné molekule mRNA, čímž vznikají tzv. polyzomy nebo také polyzomální komplexy (**Obrázek 1**).



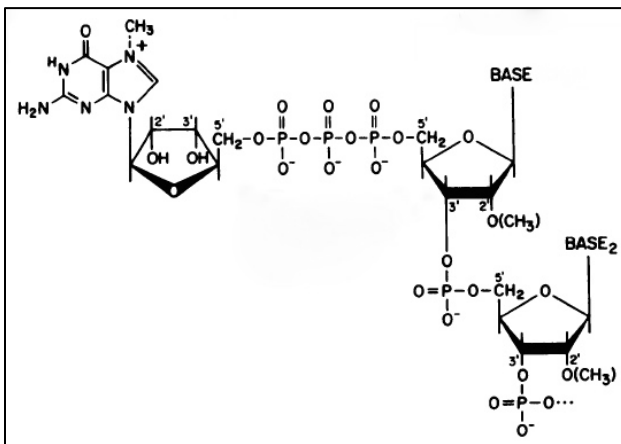
**Obrázek 1: Polyzomální komplexy na mRNA.**

Obrázek zobrazuje polyzomální komplexy na mRNA. V horní části obrázku je vidět rozpad jednoho ribozomu, který právě narazil na stop kodon a jeho bezprostřední složení na start kodonu téže molekuly.

(Upraveno podle: <http://humanbiologylab.pbworks.com>).

## 2.2 Iniciace translace u eukaryot

Iniciace translace je klíčová fáze z hlediska regulace, což je logické, jelikož je to samotný začátek translace a účastní se jí velké množství molekul. Oproti dvěma následujícím fázím zahrnuje nejvíce regulačních faktorů, které jsou cílem signálních kaskád. Prvním krokem iniciace translace je tvorba tzv. ternárního komplexu. Ternární komplex je tvořen Met-tRNA<sub>i</sub> a iniciačním faktorem eIF2, který nese GTP. Tento komplex se potom napojuje na malou podjednotku ribozomu (u eukaryot 40S). Navázáním eIF1, eIF1A, eIF5 a velkého vícepodjednotkového komplexu eIF3, dojde k vytvoření tzv. preiniciačního komplexu 43S. eIF1 a eIF1A jsou malé proteiny, které se vážou přímo na malou podjednotku ribozomu a tím způsobují konformační změny 40S podjednotky, což urychluje vazbu ternárního komplexu na 40S. Ten se poté váže na mRNA. Zde je důležité, že se váže vždy na 5'konec mRNA. Pro samotné nasednutí 43S komplexu na 5'konec mRNA je nezbytná struktura na jejím konci nazývaná (<sup>7</sup>methylguanosinová) čepička (**Obrázek 2**).



**Obrázek 2:** <sup>7</sup>methylguanosinová čepička připojená přes tři fosfátové zbytky k dalším bázím, které nesou každá jednu methylovou skupinu (upraveno podle: <http://www.projects.science.uu.nl>, červenec 2016). Tento typ čepičky je nejčastější u vyšších organismů.

Čepička je rozpoznávána iniciačními faktory třídy eIF4, konkrétně u člověka jsou to eIF4B, eIF4H a eIF4F. EIF4F je protein tvořen z faktorů eIF4A, eIF4E, eIF4G. eIF4A je RNA helikáza, která umí rozvolnit případné sekundární struktury na mRNA a vytvořit prostor pro nasednutí ribozomu. eIF4B pravděpodobně stimuluje helikázovou aktivitu eIF4A. eIF4G je velký protein, který funguje jako lešení pro ostatní faktory eIF4F komplexu a zároveň se prostřednictvím jeho vazby s ostatními faktory eIF připojuje preiniciační komplex k mRNA.

Další funkcí eIF4G je propojení 5' konce mRNA s jejím 3' koncem do podoby smyčky. To je zajištěno asociací eIF4G s proteiny PABP (polyA binding protein) navázanými na poly-A sekvenci na 3' konci mRNA. eIF4E přímo interaguje s čepičkou.

Jakmile je vytvořen komplex 43S-mRNA, dochází ke skenování mRNA ribozomem, dokud ten nenalezne iniciační kodón, tím je většinou AUG, který je komplementární k antikodonu nesenému Met-tRNA<sub>i</sub>, jež je v ideálním případě součástí sekvence Kozakové. Z toho vyplývá, že první zařazenou aminokyselinou v peptidovém řetězci je vždy methionin. V momentě, kdy je nalezen iniciační kodon, je Met-tRNA<sub>i</sub> umístěna díky interakci kodon-antikodon do P místa malé podjednotky ribozomu.

Na malé podjednotce ribozomu se nachází tři strukturně a funkčně definovaná místa pro tRNA. Místo A (aminoacylové), kam se váže nová tRNA nesoucí aminokyselinu odpovídající kodonu v A místě. Uprostřed je P (peptidylové) místo, na němž dochází k zahájení translace, jelikož se v tomto místě nachází AUG kodon, během elongace se na tRNA, nacházející se v tomto místě, tvoří polypeptid. Poslední je E místo (z anglického exit), kudy opouští deacylovaná tRNA, která již nemá připojenou aminokyselinu, ribozom.

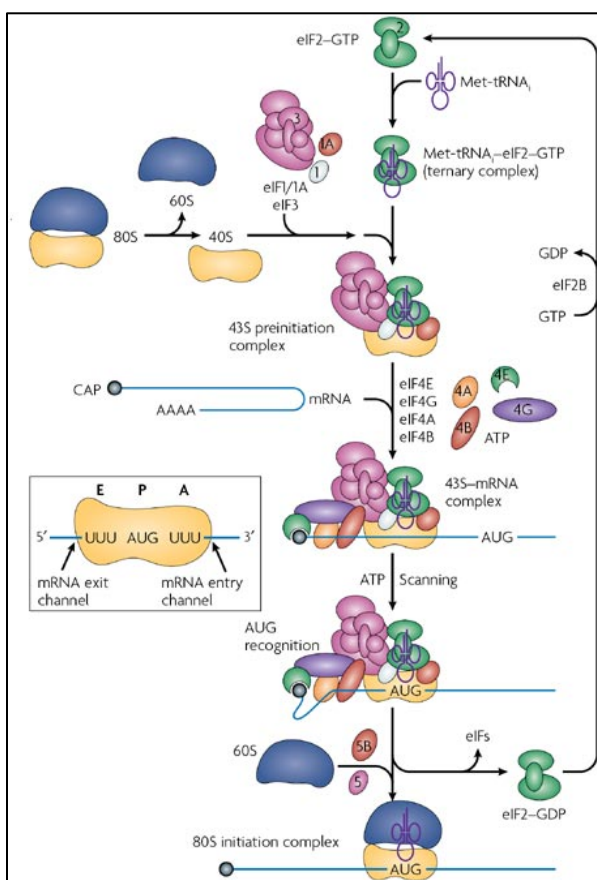
Skenování je umožněno díky otevřené konformaci preiniciačního komplexu. Za to jsou zodpovědné faktory eIF1 a eIF1A. eIF1A se váže do A místa na 40S podjednotce ribozomu svou centrální doménou, svými dlouhými N- a C-terminálními doménami se zase váže do P místa, což zabraňuje iniciátorové tRNA se do něj plně navázat, do doby, než bude nalezen vyhovující start kodon. Když k tomu dojde, tak se eIF1A z P místa uvolní a tRNA se do něj plně naváže. eIF1 se váže do blízkosti P místa, avšak na rozpoznávání start kodonu nemá pravděpodobně žádný vliv. Nicméně svou C-terminální doménou je v kontaktu s C-terminální doménou eIF1A.

Po rozpoznání kodonu dojde ke konformační změně v preiniciačním komplexu, což vede k odloučení obou těchto domén od sebe, následuje uvolnění eIF1 z preiniciačního komplexu.

Na toto odpojení navazuje hydrolýza GTP, připojeného na eIF2, na GDP. To je realizováno díky eIF5, který funguje jako GAP pro eIF2 a zároveň se pravděpodobně účastní rozpoznávání správného start kodonu. Po hydrolýze GTP vzniká uzavřený preiniciační komplex 48S. Vazba eIF1 je tedy rozhodující pro to, zda bude nebo nebude pokračovat skenování mRNA. Po odpojení eIF1 jeho místo na ribozomu zaujme právě eIF5. Tyto dva proteiny jsou strukturně velmi podobné a tato změna pozice eIF5 upevní nově vzniklou uzavřenou konformaci preiniciačního komplexu.



Tím, že je na eIF2 navázáno jen GDP se sníží jeho afinita k Met-tRNA<sub>i</sub> a tento faktor disociuje z 48S komplexu. To vede k zapojení eIF5B, což je „spojovací“ faktor, který spojí malou podjednotku s velkou 60S podjednotkou ribozomu. eIF5B nese GTP. Interakcí mezi eIF5B a eIF1A, dojde k jeho navázání na 48S komplex a eIF5B potom z této pozice zprostředkuje propojení obou podjednotek. Následuje hydrolýza GTP, což stimuluje odpojení nejdříve eIF5B a následně také eIF1A eIF5. Tím vznikne složený ribozom 80S, končí iniciace a začíná elongační fáze. Pro celou iniciaci jsou tedy spotřebovány dvě molekuly GTP. Recyklaci eIF2-GDP na eIF2-GTP provádí eIF2B (**Obrázek 3**) (shrnutí například v: Lorsch a Dever 2010; Hinnebusch a Lorsch 2012; Hinnebusch 2014).



**Obrázek 3: Iniciace translace.**

Schéma iniciace translace. V rámečku zobrazená místa E,P a A malé podjednotky ribozomu.

(Převzato z: Fraser a Doudna (2007)).

*Nyní se podíváme podrobně na translační iniciační faktor eIF4E, nejprve z pohledu jeho regulace pomocí vazebných partnerů a následně na jeho funkci a strukturu u eukaryot a především u člověka. Protein eIF4E je velice hojně studovaný a bylo u něj pozorováno mnoho funkcí, proto popis zde uvedený není zdaleka kompletní. Nešlo mi však o detailní rešerši jednoho proteinu, nýbrž o jeho zasazení do širší problematiky, kterou se zabývám v praktické části své práce.*

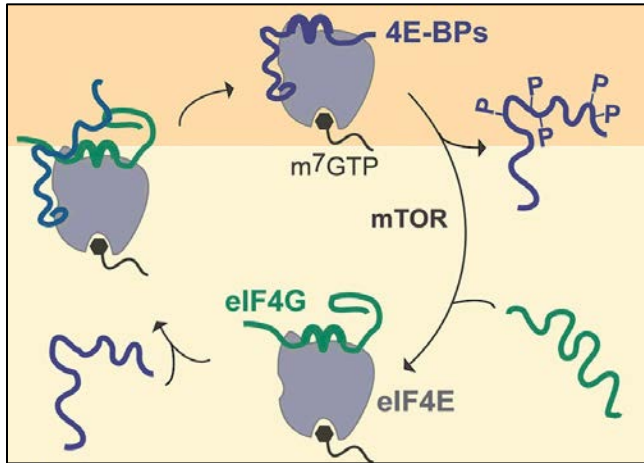
Jak již bylo řečeno, translační iniciační faktor eIF4E je zodpovědný za bezprostřední vazbu na <sup>7</sup>methylguanosinovou čepičku, která se nachází na 5' konci mRNA. Tento protein je zpravidla nezbytný pro translaci u velké většiny eukaryot a je to také nejméně zastoupený faktor z rodiny eIF4, tudíž jeho přítomnost je jedním z limitujících faktorů pro translaci závislou na čepičce (Mader a Sonenberg 1995; Duncan *et al.* 1997).

### **2.3 eIF4E a jeho regulace**

Kontrola translace mRNA je spojena s růstem buňky, proliferací, průchodem buněčným cyklem, či diferenciací. Jelikož jedním z limitních kroků v iniciaci translace je množství eIF4E a jeho vazba na čepičku, je regulace translace spojována s tímto faktorem. Pokud se zvýší exprese eIF4E, dojde k porušení homeostázi, což v několika experimentech vedlo k rakovinnému bujení (shrnuje Mamane *et al.* 2004).

Hlavní regulace proteinu eIF4E probíhá prostřednictvím eIF4G a 4E-BP (eIF4E-binding protein). Ty oba obsahují stejný vazebný motiv:  $\alpha$ -helix s konzervovanou sekvencí YX<sub>4</sub>L $\Phi$  (Y = tyrosin, X<sub>4</sub> = jakékoliv 4 aminokyseliny, L = leucin,  $\Phi$  = hydrofobní aminokyselina) (Mader *et al.* 1995) a kompetují o stejné hydrofobní vazebné místo na dorzální straně eIF4E. Jakmile je eIF4E navázán na čepičku, dojde k jeho konformační změně a na toto vazebné místo se může navázat eIF4G, dojde ke složení celého iniciačního komplexu a k následné translaci (Gross *et al.* 2003), je-li však eIF4E ve vazbě s 4E-BP, tak není schopen vázat čepičku. 4E-BP tedy působí jako reversibilní represor translace (Pause *et al.* 1994).

U obratlovců se nacházejí tři proteiny 4E-BP: 4E-BP1, 4E-BP2 a 4E-BP3, které jsou strukturně a sekvenčně podobné a pravděpodobně se mohou v buňce navzájem zastoupit (Poulin *et al.* 1998). Tento předpoklad je však založen spíše na strukturní podobnosti jednotlivých proteinů 4E-BP, jelikož nejvíce prostudovaný je jen 4E-BP1, o ostatních dvou zatím nejsou známy takto podrobné informace. Díky své roli v represi translace, kdy 4E-BP1 inhibuje proliferaci buněk, je tento protein považován za tumor-supresorový (Gingras *et al.* 1999). Vazebné místo 4E-BP proteinů na eIF4E je rozsáhlejší než u eIF4G a jejich regulace probíhá pomocí fosforylace. V hypofosforylovaném stavu se 4E-BP naváže na boční stranu eIF4E ve chvíli, kdy je eIF4G stále připojeno na jeho dorzální straně, potom dojde ke kompetici o toto místo mezi 4E-BP a eIF4G. K odpojení 4E-BP od eIF4E je potřebná dvou kroková fosforylace. Nejprve jsou fosforylovány threoniny na pozici 37 a 46, což odpovídá umístění v blízkosti  $\alpha$ -helixu připojeného na dorzální stranu, jakmile k tomu dojde, mohou být fosforylovány threoniny na pozici 70 a serin na pozici 65, což jsou aminokyseliny, které jsou součástí vazby na boční straně eIF4E. Tato dvou kroková fosforylace umožní jednak disociaci od eIF4E, a zároveň uvolnění místa pro eIF4G a je zprostředkována mTOR (mammalian Target of Rapamycin) signální dráhou (**Obrázek 4**). Druhá vlna fosforylace může být spuštěna vnějším stimulem (hormony, růstové faktory) (Gingras *et al.* 2001; Peter *et al.* 2015). Tyto vnější podněty, indukují, prostřednictvím mTOR dráhy, fosforylaci 4E-BP což vede k vyvázání eIF4E z vazby na 4E-BP. Tím se odkrývá potenciál pro onkogenní funkci eIF4E (Gingras *et al.* 1999).



**Obrázek 4: Kompetice eIF4G a 4E-BP o vazbu na eIF4E.**

Schéma kompetice mezi eIF4G (zelená) a 4E-BP (modrá) o vazbu na eIF4E (šedá, naznačená vazba na čepičku).

Po fosforylaci 4E-BP pomocí mTOR dojde k vazbě eIF4G na dorzální stranu eIF4E, nefosforylovaný 4E-BP se nejprve naváže na boční stranu eIF4E v přítomnosti eIF4G a potom s ním kompetuje o vazbu na dorzální straně proteinu eIF4E (Upraveno podle Peter *et al.* 2015).

## 2.4 Propojení iniciace translace s mTOR dráhou

*Signální dráha kinázy mTOR je velice komplexní, má vliv na velké množství buněčných procesů a její popis by si jistě zasloužil samostatnou literární rešerši. Jelikož jsem se inhibicí této dráhy zabývala pouze v jedné části své diplomové práce, shrnuji zde poznatky relevantní pro pochopení propojení této dráhy s iniciací translace, respektive s eIF4E.*

mTOR je serin/threoninová kináza, jejíž název je zkratka z anglického mammalian target of rapamycin. Jak je z názvu kinázy patrné, její inhibice probíhá skrze Rapamycin, což je metabolit bakterie *Streptomyces hygroscopicus*, jehož potenciální léčebné účinky byly zkoumány nejprve na kvasinkách, kde se přišlo na to, že u *Saccharomyces cerevisiae* inhibuje serin/threoninovou kinázu o velikosti 290 kDa, která byla díky tomu pojmenovaná jako “Rapamycinový terč” (Heitman *et al.* 1991).

Díky této nalezené souvislosti byla funkce mTORu zkoumána pomocí Rapamycinu. Jelikož nekontrolovaný růst (zde například z důvodu porušení správného fungování mTOR dráhy, a tím translace) vede ke vzniku rakoviny, aplikace Rapamycinu a jeho derivátů, ne překvapivě, vede k potlačení vzniku některých typů nádorů (například Vignot *et al.* 2005).

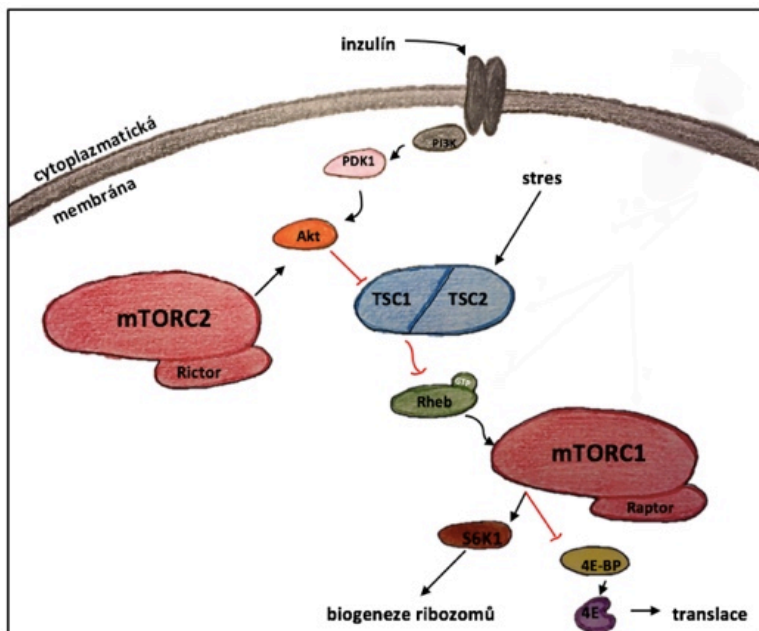
mTOR signální dráha je úzce spojována právě s iniciací translace, jelikož mTOR kináza fosforyluje 4E-BP, čímž dochází k uvolnění vazby s eIF4E a ten se tímto může účastnit iniciace translace. Serin/threoninová kináza mTOR je katalytickou složkou dvou strukturně a funkčně odlišných proteinových komplexů, a to mTOR komplexu 1 (dále mTORC1) a mTOR komplexu 2 (dále mTORC2). Právě mTORC1 je zodpovědný za fosforylaci 4E-BP (Schalm *et al.* 2003). Přišlo se na to, že mTORC1 je zapojen v biogenezi ribozomů, kontrole translace, buněčného dělení, proliferace a samotného přežití buňky, to vše v závislosti na přístupu živin, růstových faktorů a hormonů. Pokud má buňka dostatek živin, mTOR je aktivní, což vede ke zvýšené translaci a tím k růstu buňky. Součástí mTORC1 je vedle mTOR ještě například velký, 150 kDa těžký protein Raptor (Regulatory-associated protein of mTOR). Tyto dva proteiny spolu čile interagují. U mTORC2 bylo také pozorováno ovlivnění pomocí růstových faktorů, nikoliv však jeho senzitivita vůči změnám ve složení a přístupu živin. mTORC2 je zodpovědný za kontrolu aktinového cytoskeletu (Jacinto *et al.* 2004). Součástí mTORC2 komplexu je také například Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR) (shrnutí v Wullshleger *et al.* 2006).

Upstream regulace mTOR signálních drah tedy probíhá prostřednictvím růstových faktorů, energie, ale také stresu. Na růstové faktory odpovídá mTOR prostřednictvím signální dráhy PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza). Vazba insulínu nebo insulin-like růstových faktorů na jejich receptory vede k následnému rekrutování PI3K k vnitřní straně těchto membránových receptorů. PI3K poté konvertuje PIP2 (fosfatidylinositol-4,5-fosfát) v cytoplazmatické membráně na PIP3 (fosfatidylinositol-3,4,5-fosfát). PIP3 rekrutuje zároveň PDK1 a Akt do blízkosti membrány, což vede k fosforylaci a aktivaci Akt prostřednictvím PDK1. S touto dráhou je mTOR propojen prostřednictvím proteinů hamartin a tuberin (které jsou označovány také jako TSC1 a TSC2 z anglického tuberose sclerosis). TSC1 a TSC2 potom jako heterodimer negativně regulují mTORC1 tím, že fungují jako GAP pro GTPázu Rheb, tato GTPáza se potom přímo váže na mTOR (shrnutí v Wullshleger *et al.* 2006).

K růstu buňky je potřebná energie, zde bylo opět pozorováno propojení s mTOR dráhou a to prostřednictvím kinázy AMPK (AMP-activated protein kinase), která při nedostatku energie fosforyluje TSC2, což vede k inhibici mTORC1 (Inoki *et al.* 2003). Nedostatek energie je vlastně určitý druh stresu pro buňku. Na stres buňka reaguje zastavením nebo alespoň omezením všech energeticky náročných procesů, které nejsou nezbytné pro její aktuální přežití. mTOR hraje roli také v odpovědi na několik dalších situací, vyvolávajících stres, například na hypoxii (signál je opět zprostředkován TSC1 a TSC2 proteiny) nebo poškození DNA (přes p53) (Hay a Sonenberg 2004).

Downstream potom mTOR reguluje translaci, jak již bylo popsáno, jelikož fosforyluje 4E-BP a S6K1 (kináza ribozomálního proteinu S6). Zde se projevuje role Raptoru, který slouží jako adaptor mezi mTOREM a jeho substráty, prostřednictvím konzervované C-terminální domény 4E-BP a N-terminální domény S6K1 (Schalm a Blenis 2002). Raptor je také klíčem k pochopení reakce mTORC1 na Rapamycin na rozdíl od mTORC2, jelikož Oshiro *et al.* (2004) přišli na to, že Rapamycin rozbíjí vazbu mTOR/Raptor a tím nemohou být 4E-BP a S6K1 fosforylovány. Upstream signály, jako například množství živin mají na tuto vazbu zásadní vliv. Mezi další pochody v buňce, které jsou regulovány pomocí mTOR jsou například transkripce a biogeneze ribozomů, což probíhá právě skrze S6K1, jelikož tato serin/threoninová kináza fosforyluje S6 protein, který je součástí malé podjednotky ribozomu (Willschleger *et al.* 2006) a eIF4B, který jako aktivátor eIF4A urychluje skenování (Holz *et al.* 2005).

Co se týče propojení mTORC1 a mTORC2, to existuje prostřednictvím Akt. Už víme, že Akt je fosforylován PDK1 prostřednictvím růstových faktorů, aby ale mohl ovlivnit TSC2, je pro plnou aktivitu nutná ještě další fosforylace pomocí mTORC2. Akt tedy slouží jako pojítka mezi mTORC1 a mTORC2 (**Obrázek 5**). (Sarbasov *et al.* 2005).



**Obrázek 5: mTOR signální dráha.**

Na obrázku je zobrazena část mTOR dráhy, které byla popsána v textu. mTORC1 a mTORC2 (červeně), jejichž součástí je Raptor, respektive Rictor, Akt, jež propojuje oba komplexy (oranžově), TSC1/TSC2 (modře) který je mezičlánkem mezi mTORC1 a upstream signály, jimiž jsou například inzulin a stres. Z „downstream“ substrátů mTORC1 je zde zobrazen S6K1 (hnědá), který se podílí na kontrole biogeneze ribozomů a fosforylaci eIF4B a 4E-BP (žlutě), který přes eIF4E (fialově) kontroluje translaci.

A právě tohoto propojení obou drah využívají tzv. inhibitory druhé generace mTOR, které vazbou přímo do aktivního ATP vazebného místa kinázové domény mTOR inhibují oba komplexy, mTORC1 i mTORC2. Jejich zástupcem je například PP-242. Tento inhibitor byl objeven v roce 2008 (Apsel *et al.* 2008). Bylo zjištěno, že díky svým vlastnostem inhibovat oba komplexy tato látka mnohem lépe zastavuje proliferaci a translaci závislou na čepičce, než Rapamycin, jelikož PP-242 inhibuje fosforylaci 4E-BP mnohem účinněji a zároveň, v porovnání s Rapamycinem, zvyšuje vazbu mezi 4E-BP1 a eIF4E (Feldman *et al.* 2009). Co se týče inhibitorů eIF4E prostřednictvím mTOR dráhy, jedním z nejvíce používaných je antivirotikum Ribavirin, který se využívá jako léčivo proti viru HCV a některých leukemických onemocnění (například Kókény *et al.* 2009), a to díky své schopnosti potlačit proliferaci buněk prostřednictvím inhibice translace. Váže se totiž do funkčního místa eIF4E, jelikož strukturně napodobuje čepičku (Kentsis *et al.* 2004). Ribavirin navíc celkově snižuje fosforylaci celé PI3K/Akt/mTOR dráhy a 4E-BP (Shi *et al.* 2015). Všechny tyto tři inhibitory jsem testovala v praktické části své diplomové práce.

## 2.5 Funkce eIF4E

Vedle kanonické role eIF4E, kterou je vazba čepičky mRNA, bylo u eIF4E popsáno mnoho dalších funkcí. Většinu jich propojuje tzv. teorie RNA regulonů. RNA regulony poprvé popsali Keene a Tenenbaum (2002). Ty jsou založeny na skutečnosti, že zatímco prokaryota mají všechny geny, které kódují související proteiny organizované v rámci operonů a navíc mají transkripci a translaci časově a místně neoddělenou, daří se jim regulovat množství mRNA potřebné ve správné míře, na správném místě a ve správném čase. Tato potřeba však zůstává i u eukaryot. Teorie regulonů, což by se vlastně dalo chápat jako takové postranskripční operony eukaryot, je založena na faktu, že mnoho eukaryotických proteinů se váže na specifický okruh mRNA, jelikož tyto spolu sdílejí stejný sekvenční a strukturní motiv pro vazbu takových proteinů, ale třeba i miRNA. To umožňuje koordinovaně regulovat zpracování mRNA a reagovat na změny uvnitř i vně buňky. Tento motiv byl pojmenován „USER code“ a nachází se v 5' a 3' UTR oblastech. Takových USER codes může mít jedna mRNA několik v rámci obou svých UTR oblastí, což umožňuje variabilitu tohoto systému a jeho „ladění“ podle aktuálních potřeb, jelikož jednu mRNA může takto regulovat více proteinů nebo miRNA. Zároveň o jedno místo mohou soupeřit dva a více proteinů a podle jejich aktuálního zastoupení v buňce dojde k tomu či onomu zpracování mRNA (Keene a Tenenbaum 2002).

eIF4E regulon je založen na pozorování, že eIF4E dokáže zaprvé některé mRNA transportovat do cytoplazmy a zvýšení tohoto transportu nevede vždy ke zvýšení translace, zadruhé, že u některých mRNA dokáže zvýšit translaci, ale ne export do cytoplazmy a zatřetí, že u některých dokáže obojí. Tyto jednotlivé funkce potom záleží právě na USER codes jednotlivých transkriptů (**Obrázek 6**) (Culjkovic *et al.* 2007). Aby ale mohlo dojít k exportu mRNA do cytoplazmy pomocí eIF4E, musí se tento nejprve nacházet v jádře.



A opravdu, až 30 % eIF4E v rámci buňky se nachází v jádře (Lejbkowitz *et al.* 1992). Export je zajištěn pomocí 4E-transporter (nebo 4E-T) proteinu, který obsahuje NLS signál pro translokaci do jádra. 4E-T se napojuje na eIF4E prostřednictvím stejné vazebné domény jako eIF4G a 4E-BP (YX<sub>4</sub>LΦ). Pomocí tohoto spojení se eIF4E dostane do jádra, a to klasickou cestou zprostředkovanou importiny  $\alpha$  a  $\beta$ . Díky tomu, že 4E-T okupuje na povrchu eIF4E místo jeho ostatních vazebných partnerů, není možné, aby se eIF4E dostal do jádra v doprovodu některého z nich. Skutečnost, že se eIF4E musí nejdříve napojit na 4E-T, než bude transportován do jádra je, zdá se, z důvodu regulace jeho distribuce napříč buňkou (Dostie *et al.* 2000).

Zajímavé je, že stejná skupina o několik let později pozorovala v jádře také 4E-BP (také až 30 % jeho celkového množství v buňce), takže regulace eIF4E probíhá pomocí tohoto proteinu i v jádře. To pravděpodobně znamená, že eIF4E je navázáno v cytoplazmě na 4E-T, přeneseno do jádra, tam se jeho určitá frakce od 4E-T odpojí a na eIF4E se mohou navázat jiní jeho vazební partneři, ovšem pochopitelně jen ti, kteří se také právě nacházejí v jádře (Rong *et al.* 2008). Co se týče samotné lokalizace eIF4E v rámci jádra, tak za normálních podmínek byl protein pozorován jak v jednotlivých malých kruhových tělískách, tak difúzně rozptýlen bez jakékoliv organizace po celém jádře. Když se eIF4E nacházel ve formě tělísek a byl do jádra přidán analog čepičky, tak došlo k rozpadu na difúzní stádium. Z tohoto pozorování vyplývá, že přítomnost mRNA s čepičkou bude hrát klíčovou roli ve funkci eIF4E v rámci buněčného jádra. Naopak eIF4E nebyl pozorován v jadérku nebo v Cajal bodies (Cohen *et al.* 2001).

Když tedy máme eIF4E v jádře, může se účastnit transportu mRNA zpět do cytoplazmy. USER code takových transkriptů se označuje jako 4E-SE (4E sensitivity element). Jedná se o specifický sekvenční element se specifickou sekundární strukturou jejich 3'UTR oblastí, která je zhruba 50 nukleotidů dlouhá. Tyto transkripty kódují například proteiny Cyklinu D1, c-Myc (Culjkovic *et al.* 2005, 2006), což jsou známé proto-onkogeny. Pokud dojde k navýšení exprese eIF4E, dojde také k navýšení koncentrace Cyklinu D1 (Rousseau *et al.* 1996), který kontroluje přechod z G1 do S fáze, v cytoplazmě, což vede k transformaci buněk na buňky některých akutních a chronických myeloidních leukémií (Topisirovic *et al.* 2003). U této skupiny transkriptů nedochází k přímému ovlivnění síly translace.

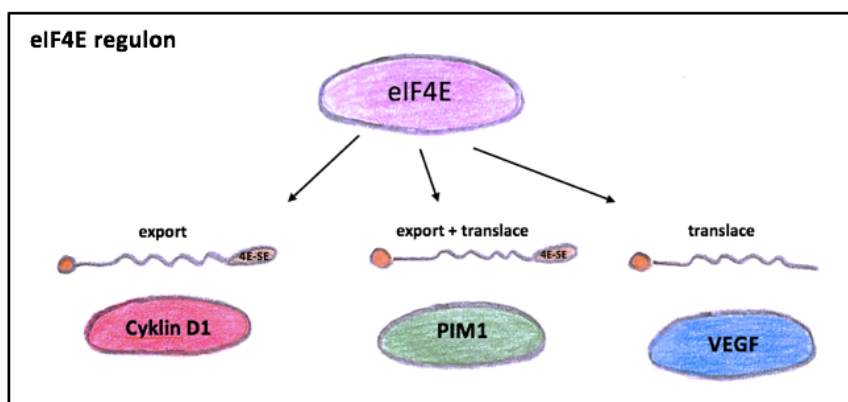
Druhou skupinou transkriptů, ovlivněných zvýšením produkce eIF4E, jsou ty, u kterých dochází jak k navýšení transportu do cytoplazmy, tak k navýšení translace. Do této skupiny patří například protein PIM1 (serin/threoninová kináza, proto-onkogen) (Culjkovic *et al.* 2007; Hoover *et al.* 2007).

Třetí skupinou jsou transkripty, které nemají 4E-SE element na 3' konci mRNA a tudíž nejsou exportovány do cytoplazmy pomocí eIF4E. Zástupcem zde může být VEGF (vascular endothelial growth factor) (Culjkovic *et al.* 2006). Za mechanismus, jakým dochází ke zvýšení jeho translace, je zodpovědná oblast na jeho 5' konci. Transkripty, které mají kratší a méně komplikované 5'UTR jsou s větší úspěšností obsazené proteiny eIF4F komplexu, například proto, že nepotřebují helikázovou aktivitu, jež v tomto komplexu poskytuje eIF4A. Jestliže však dojde ke zvýšení produkce eIF4E, mohou být translatovány i geny, které mají vysoce strukturované, GC bohaté, dlouhé 5'UTR. Příkladem takového genu je právě onkogen VEGF, jež se uplatňuje v angiogenezi. Zvýšení jeho produkce vede k progresi tumoru, jelikož angiogeneze je známá podmínka pro růst tumoru a pro tvoření metastáz (přehledně shrnuto například v Mamame *et al.* 2004). Bylo také potvrzeno, že když se zvýší exprese eIF4E, tak se přednostně translatují právě mRNA proteinů s onkogenním potenciálem (Culjkovic *et al.* 2005, 2006).

Ze zmíněných poznatků je tedy zřejmé, že aby byly mRNA senzitivní vůči eIF4E, potřebují specifickou sekvenci a její strukturní uspořádání na jednom či na obou svých koncích, tedy jak na 5'UTR pro samotnou translaci, tak 4E-SE na 3'UTR pro export do cytoplazmy (Osborne a Borden 2015). Pro úplnost je potřeba zmínit, že 4E-SE může být rozpoznáváno i jinými proteiny a naopak eIF4E rozpoznává i jiné USER codes než 4E-SE, což ještě rozšiřuje představu o regulaci exprese pomocí eIF4E a složitých interakcích v rámci buňky (Culjkovic *et al.* 2007).

Vedle nelichotivého propojení eIF4E se vznikem tumoru (jeho zvýšená exprese byla potvrzena v několika druzích rakovin, například: prsu, močového měchýře, plic, prostaty, gastrointestinálního traktu, hlavy a krku (například v Dua *et al.* 2001; Mamame *et al.* 2004), byl faktor eIF4E nedávno spojen také se vznikem autismu. Neves-Pereira *et al.* (2009) pozorovali translokaci mezi dlouhým raménkem 4. a dlouhým raménkem 5. chromozomu, která byla častá u pacientů, kteří trpí poruchou autistického spektra. Tato přestavba vede ke tvorbě alternativního transkriptu eIF4E, konkrétně zde tímto mechanismem vzniká bodová mutace na pozici -25 v promotoru *eIF4E*. Zároveň vedle této přestavby byla u chlapců s autismem pozorována i posunová mutace ve formě inserce cytosinu, taktéž do oblasti promotoru. Jedná se sice zatím pouze o genetickou asociaci, nicméně by jistě bylo zajímavé prozkoumat, jakou, a zda vůbec, zde hraje eIF4E funkční roli.

Za zmínku jistě stojí i fakt, že eIF4E je schopen iniciovat translaci i u transkriptů bez čepičky. Jedná se o virové mRNA. Takové viry (+ RNA viry) mají na svém 5' konci VPg protein, který se buďto váže přímo do místa, kde se váže čepička, sem patří některé rostlinné potyviry, například virus mozaiky hrachu (Dreher a Miller 2006), nebo na místo jiné, což se týká savčích kalicivirů. U druhé skupiny není bohužel známo, kam se tedy VPg přesně váže (Chaudhry *et al.* 2006). V obou případech virus tímhle mechanismem rekrutuje translační aparát hostitelské buňky na úkor přepisu její vlastní mRNA.



**Obrázek 6: eIF4E regulon.**

Na obrázku je zobrazen eIF4E regulon podle návrhu Culjkovic *et al.* (2007). Od eIF4E (fialově) vedou tři šipky k jednotlivým proteinům, které zastupují tři úrovně regulace pomocí eIF4E. Jsou zde zobrazeny jednotlivé mRNA, na 5' konci mají čepičku (oranžově) a na 3' konci mají mRNA (které jsou pomocí eIF4E exportovány z jádra), 4E-SE element (hnědě), který je USER codem u těchto transkriptů.

## 2.6 Rodina eukaryotických iniciačních translačních faktorů eIF4E

Díky dostupnosti sekvenčních dat Joshi *et al.* (2005) identifikovali proteiny zodpovědné za vazbu na čepičku u 230 druhů organismů a rozčlenili je do tří základních skupin. Jelikož se ukázalo, že některé organismy mají více zástupců iniciačních translačních faktorů, musel být nějak odlišen kanonický eIF4E od těch, které mají v organismu třeba jen místně nebo časově oddělenou funkci. U obratlovců označujeme tento základní eIF4E jako eIF4E1. Z evolučního hlediska pravděpodobně došlo k duplikaci původního genu a následnému rozrůznění těchto duplikovaných genů.

První skupina (u člověka eIF4E1) se nachází u všech eukaryot a je definována dvěma tryptofany (Trp56 a Trp102 u člověka – detailně později) v místě vazby čepičky. Druhá skupina se nachází pouze u živočichů, zelených rostlin a hub (u člověka eIF4E2, dříve označován jako 4EHP nebo 4E-LP) a liší se od první skupiny nahrazením tryptofanu na pozici 56 jinou aromatickou aminokyselinou (tyrosin, fenylalanin). Třetí skupina se nachází pouze u strunatců (u člověka označovaná eIF4E3). Vyznačuje se tím, že obsahuje v místě vazby čepičky většinou pouze jednu aromatickou aminokyselinu, druhou aminokyselinou je cystein (opět za Trp56) (Joshi *et al.* 2005).

*Jelikož se počet a funkce jednotlivých iniciačních faktorů eIF4E u různých eukaryotických organismů liší, následuje nyní pro ilustraci jejich stručný popis u klasických modelových organismů *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*.*

### 2.6.1 Octomilka a její iniciační faktory

Jak již bylo řečeno, některé vyšší organismy mají více zástupců translačních iniciačních faktorů, které jsou schopny vázat čepičku. U modelového organismu *Drosophila melanogaster* jich bylo popsáno hned osm, ty jsou kódovány sedmi geny: *eIF4E1,2* (kódující dva proteiny eIF4E1 a eIF4E2 díky alternativnímu sestřihu), *eIF4E3*, *eIF4E4*, *eIF4E5*, *eIF4E6*, *eIF4E7* a *eIF4E8*. Většina těchto genů leží na chromozomu 3L vedle sebe a vznikly tedy pravděpodobně genovou duplikací (Hernández *et al.* 2005). eIF4E1 a eIF4E2 spadají podle Joshi *et al.* (2005) do první skupiny, eIF4E8 do druhé skupiny. U ostatních faktorů octomilky toto členění není známo.

Z pohledu vývoje *D. melanogaster* jsou po celý životní cyklus exprimovány geny *eIF4E1* a *eIF4E2*. *EIF4E3-7* jsou exprimovány až od třetího larválního stádia, mRNA genu *eIF4E8* byla detekována pouze v brzkém embryonálním vývoji, poté je exprese *eIF4E8* velice nízká. Co se však týče vazby na čepičku v embryonálním stádiu, tak ta byla potvrzena pouze u eIF4E1, což znamená, že translace v této etapě vývoje je zprostředkována pouze pomocí eIF4E1 a ostatní proteiny mají v tomto období pravděpodobně jinou funkci. EIF4E1 je tedy klíčový pro translaci maternálních mRNA (Hernández *et al.* 2005).

EIF4E1, eIF4E2 a eIF4E4 jsou schopny vázat eIF4G s vysokou afinitou, eIF4E3, eIF4E5 a eIF4E7 s nižší afinitou a zbylé dva jej neváží vůbec. To stejné platí o vazbě na 4E-BP. Malou zajímavostí je, že eIF4E-7 je nejdelším proteinem ze všech prozatím identifikovaných eIF4E u všech organismů (Hernández *et al.* 2005).

### 2.6.2 Hád'átko a jeho iniciační faktory

U *Caenorhabditis elegans*, dalšího klasického modelového organismu, bylo popsáno pět variant eukaryotických iniciačních faktorů asociovaných s čepičkou (IFE1-IFE5).

Podle Joshi *et al.* (2005) spadají IFE1, IFE2, IFE3 a IFE5 do první skupiny, IFE4 do skupiny druhé. *C.elegans* má několik odlišností od klasické eukaryotické translace. První z nich je přítomnost dvou typů čepiček, klasické <sup>7</sup> methylguanosenové (MMG) a trimethylguanosenové (TMG). Vznik TMG je způsoben přítomností dalšího specifického mechanismu, kterým je tzv. *trans*-sestřih (podrobnosti například v Blumenthal a Steward (1997)).

IFE3 je analogem lidského eIF4E1 a váže se na MMG, stejně tak IFE4 váže pouze tuto variantu čepičky, IFE1 a IFE2, IFE5 vážou obě varianty a mohou tedy přepisovat mRNA, které vznikly *trans*-sestřihem. Knock-down genu *ife3* pomocí RNA interference je pro takového jedince letální, stejně jako současné umlčení všech tří genů, jejichž produkty jsou zodpovědné za translaci TMG transkriptů. Z toho vyplývá, že IFE3 a alespoň jeden z trojice IFE1, IFE2 a IFE5 jsou nezbytné pro správný vývoj jedince. IFE4 pravděpodobně nehraje významnou funkci ve vývinu hád'átka a podle sekvenční analýzy je více podobný lidskému eIF4E2 než ostatním iniciačním faktorům u *C.elegans*, což jen potvrzuje jeho zařazení do druhé skupiny, tak jak to navrhnul Joshi *et al.* (2005). (Jankowska *et al.* 1998; Keiper *et al.* 1999).

### 2.6.3 Lidské iniciační faktory eIF4E

#### eIF4E1

*Všechny výše zmíněné poznatky o funkci eIF4E, se u člověka vztahují právě na eIF4E1. Proto v tomto oddíle budu u eIF4E1 popisovat pouze konkrétní strukturu vazby na čepičku, která slouží jako porovnání pro oba ostatní zástupce rodiny eIF4E.*

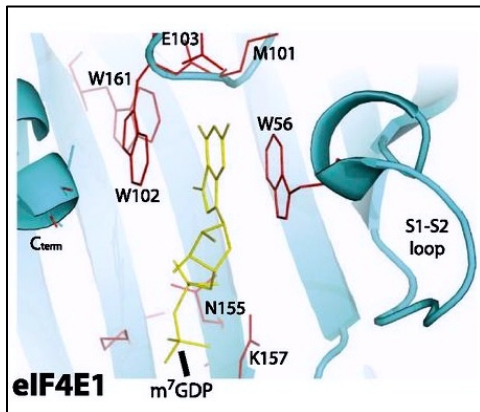
#### Struktura eIF4E1

Lidský protein eIF4E1 je 217 aminokyselin dlouhý a 25 kDa těžký (<http://www.uniprot.org>, červen 2016). Gen *eIF4E1* leží na dlouhém raménku chromozomu 4 (Jones *et al.* 1997).

Struktura eIF4E1 v oblasti vazby na čepičku je konzervovaná u všech eukaryot. Analýza 3D struktury eIF4E1 byla provedena u *S. cerevisiae* (Matsuo *et al.* 1997), myši (Marcotrigiano *et al.* 1997) a člověka (Tomoo *et al.* 2002). Jádro eIF4E, které se váže na čepičku, se skládá z  $\beta$ -listu, obsahujícího osm antiparalelních řetězců, a tří  $\alpha$ -helixů, které tento  $\beta$ -list obklopují a dohromady tvoří strukturu podobnou tvaru baseballové rukavice. Uvnitř této struktury se nachází dva tryptofany (u člověka je to Trp56 a Trp102), které mezi sebou drží guanin, jež je součástí čepičky (**Obrázky 7 a 8**). Vazba mezi tryptofany a guaninem je

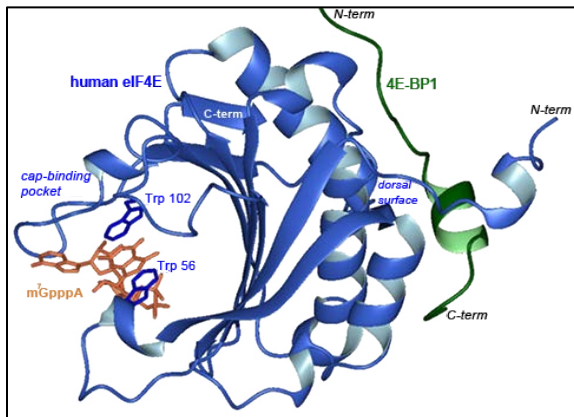
zprostředkována pomocí  $\pi$ - $\pi$  interakcí. Tato interakce mezi tryptofany, což jsou aromatické aminokyseliny, a čepičkou se nazývá tzv. aromatický sendvič.

Vazba je dále stabilizována vznikem vodíkových můstků mezi guaninem a glutaminem (u člověka Glu103). Třetí tryptofan je potom (u člověka Trp166) potřebný k rozpoznání  $N^7$ -methylové skupiny na čepičce, tato vazba je realizována pomocí vodíkových můstků a van der Waalsových sil. Nejvyšší exprese *eIF4E1* u myši byla zaznamenána ve varlatelych (shrnuto v Joshi *et al.* 2004).



**Obrázek 7: Aromatický sendvič u lidského eIF4E1.**

Na obrázku jsou zobrazeny oba tryptofany (W56 a W102, červeně), čepička (žlutě), Glu103 (E103, červeně), v pozadí je struktura  $\beta$ -listu. (Převzato z Osborne *et al.* (2004)).



**Obrázek 8: eIF4E1.**

Krystalografická struktura lidského proteinu eIF4E1 (modře) s navázanou čepičkou (oranžově) a 4E-BP1 (zeleně). Tryptofany 56 a 102 se nacházejí v těsné blízkosti čepičky. (Převzato z <http://atlasgeneticsoncology.org>).

## eIF4E2

### Struktura eIF4E2

Jedná se o gen ležící na dlouhém raménku chromozomu 2 (Rom *et al.* 1998). Protein, který kóduje tento lidský gen se skládá z 245 aminokyselin a jeho váha je 28,3 kDa (<http://www.uniprot.org>, červen 2016). eIF4E2 je popsán pouze u živočichů.

Také eIF4E2 rozpoznává čepičku. Pro tento proces využívá, stejně jako eIF4E1 aromatické aminokyseliny. Rozdíl mezi oběma proteiny je u tryptofanu na pozici 56, kde tento je nahrazen u eIF4E2 tyrosinem na pozici 58, zbytek aminokyselin nezbytných k navázání čepičky je v sekvenci eIF4E2 zachován. Obecný tvar a struktura, co se týče rozložení  $\beta$ -listů a  $\alpha$ -helixů, popsané u eIF4E1, zůstává nezměněna (Rom *et al.* 1998; Joshi *et al.* 2004). Přesto eIF4E2 váže čepičku s nižší afinitou než eIF4E1, a to 30 – 100x (Zuberek *et al.* 2007).

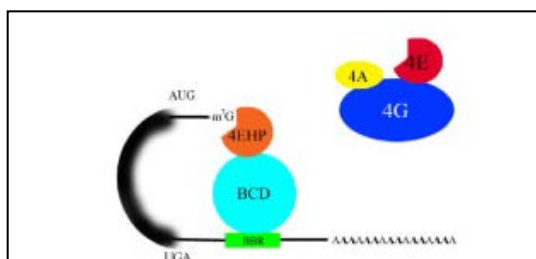
Zastoupení eIF4E2 v jednotlivých tkáních sledoval Joshi *et al.* (2004) u myši, kde největší množství mRNA bylo detekováno ve varlatech, nejmenší potom ve svalstvu. EIF4E2 se za fyziologických podmínek nachází v buňkách v menším množství než eIF4E1, avšak jeho zvýšená produkce byla popsána u některých metastazujících nádorů (Ramaswamy *et al.* 2003; Joshi *et al.* 2004). eIF4E2 se neváže na eIF4G, jelikož postrádá některé aminokyseliny, potřebné k této interakci, zároveň však u eIF4E2 funguje vazba na 4E-BP, která je ale nižší než u eIF4E1 (Joshi *et al.* 2004).

### Role eIF4E2 v translaci

U *Drosophila melanogaster* byl popsán mechanismus, jakým dochází k represi translace prostřednictvím homologu lidského eIF4E2. Maternální gen *caudal* je důležitým ve vývoji embrya u octomilky, protein Caudal má napříč embryem gradientní distribuci, kde je přítomen hlavně v posteriorní části embrya a směrem k anteriorní části jeho množství klesá, čímž se podílí na určení předozadní osy embrya. Zjistilo se, že za absenci Caudal proteinu v hlavové části může právě eIF4E2. eIF4E2 a eIF4E1 spolu kompetují o vazbu na čepičku, jelikož však eIF4E2 neváže eIF4G, nedojde k sestavení celého iniciačního komplexu, ale naopak k navázání proteinu Bicoid, který spojuje eIF4E2 a 3' konce Caudal mRNA, což vede k represi translace (**Obrázek 9**). *Bicoid* je rovněž maternální gen, protein Bicoid se naopak nachází hlavně v hlavové části (Cho *et al.* 2005).



Stejná skupina přišla následně se zjištěním, že také distribuce dalšího proteinu Hunchback, který kóduje maternální gen *hunchback*, je ovlivněna prostřednictvím eIF4E2, zde je však distribuce opačná, tedy Hunchback se nachází hlavně v anteriorní části embrya a směrem k zadní části jeho množství klesá. V tomto případě se na eIF4E2 váže protein Brat, avšak jak dále mechanismus inhibice probíhá není jasné, jelikož Brat neinteraguje s 3' koncem mRNA. Je tedy zřejmé, že předozadní orientace embrya je určena prostřednictvím eIF4E2. Je to krásný důkaz, jak může být kontrolován vývoj v době, kdy neprobíhá transkripce a všechna mRNA v embryu je maternálního původu. Jelikož eIF4E2 se nachází u všech živočichů, autoři spekulují o tom, že tento mechanismus určení orientace těla by se mohlo nacházet napříč živočišnou říší (Cho *et al.* 2006).



**Obrázek 9: eIF4E2 inhibuje translaci.**

Na obrázku je zobrazena *caudal* mRNA, kde se na její 5' konec váže eIF4E2 (zde pod starším názvem 4EHP) a na 3' konec se prostřednictvím vazby na eIF4E2 naváže Bicoid. Tento stav je výsledkem kompetice mezi eIF4E1 a eIF4E2. Vazbou eIF4E2 dojde k inhibici translace (převzato z Cho *et al.* 2005).

### eIF4E2 a hypoxie

Vedle role eIF4E2 v translaci, respektive inhibici translace, během embryonálního vývoje, byla popsána také jeho role v translaci během hypoxie. Hypoxie je stav, kdy je buňka, potažmo organismus vystaven nízké koncentraci kyslíku, a při němž dochází k celkovému poklesu translace, jelikož buňka v těchto nepříznivých podmínkách šetří energii (Liu a Simon 2004). Hypoxie byla popsána jako nedílná součást vývoje a růstu tumoru, jelikož kyslík je schopen prostupovat jen deseti vrstvami buněk, avšak v případě tumoru, kde jich je mnohem více, je velká část buněk bez přístupu dostatečného množství kyslíku (Harris 2002).

Pokles translace je zprostředkován mTOR dráhou, kdy mTOR nefosforyluje 4E-BP a tím pádem 4E-BP vyvazuje eIF4E1. Nicméně určitá úroveň translace musí probíhat i za hypoxie. To je částečně obstaráno pomocí IRES (internal ribosome entry sites), což jsou, specifické struktury na 5' konci mRNA, kde může docházet k iniciaci translace. Jedná se o translaci, která není závislá na čepičce a tím pádem nepotřebuje eIF4E (Young *et al.* 2008).

Další mechanismus translace v průběhu hypoxie je zprostředkován právě pomocí eIF4E2. Ten v komplexu HIF-2 $\alpha$ -RBM4-eIF4E2 zajišťuje translaci specifických mRNA, které mají na 3' konci tzv. rHRE místa (RNA hypoxia response element). HIF-2 $\alpha$  je jeden z transkripčních faktorů (hypoxia inducing factor 2 $\alpha$ ), které pomáhají v buňce udržovat homeostázu během hypoxie. RBM4 (RNA-binding motif protein 4) je protein, který se účastní kontroly translace. RBM4 se váže na rHRE místa na 3' konci, rekrutuje HIF2 $\alpha$  a tím dojde k cirkularizaci mRNA a vazbě eIF4E2. Bylo doloženo, že komplex HIF-2 $\alpha$ -RBM4-eIF4E2 dále váže také eIF4A. Dochází tedy k přepnutí translace, zprostředkované eIF4E1 na translaci založenou na eIF4E2, pomocí hypoxie. eIF4E2, stejně jako eIF4E1 váže 4E-BP, ale jak již bylo řečeno, tato vazba je slabší než u eIF4E1. Mezi mRNA, které jsou tímto způsobem přepisovány patří například EGFR (epidermal growth factor) nebo IGF1R (insulin growth factor 1R), která jsou oba spojeny se vznikem rakoviny, jelikož jejich nadprodukce vede ke zvýšené proliferaci buněk. Podobně také translace během hypoxie, která je zprostředkována pomocí IRES vede ke zvýšení produkce VEGF, který je známý tím, že zajišťuje angiogenezi v tumoru. Zdá se tedy, že mechanismus, kterým se buňka vypořádává s nedostatkem kyslíku, umně využily procesy vedoucí ke vzniku a růstu tumoru ve svůj prospěch. eIF4E2 tedy nejen zprostředkovává translaci během náročných podmínek, ale je také nezbytný ke vzniku zhoubného rakovinného bujení (Young *et al.* 2008; Uniacke *et al.* 2012; Uniacke *et al.* 2014).

## eIF4E3

### Struktura eIF4E3

Třetí z rodiny lidských iniciačních translačních faktorů 4E je eIF4E3.

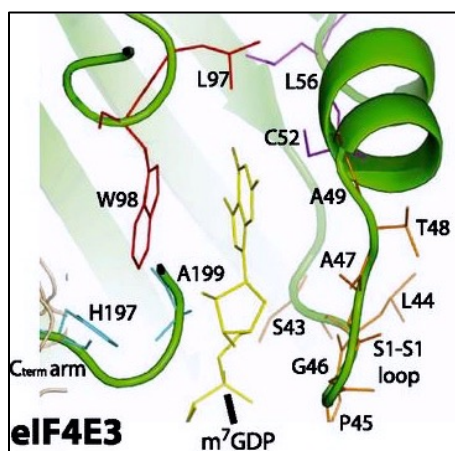
Je to 224 aminokyselin dlouhý a 24 kDa těžký protein. Gen *eIF4E3* se nachází na malém raménku chromozomu 3. Jeho isoforma (dále v práci označovaná jako eIF4E3\_B) je jen 118 aminokyselin dlouhá a má 13kDa. Jelikož tato forma postrádá N-koncové aminokyseliny, které se účastní vazby na čepičku, nebyly o její funkci z literatury zatím žádné skutečnosti.

U myši (*Mus musculus*) je protein složen z 207 aminokyselin a váží 22,8 kDa. Gen *eIF4E3* se u myši nachází na chromozomu 6 (<http://www.uniprot.org>, červen 2016; <http://www.informatics.jax.org>, červen 2016). Tento gen (a jeho orthology) se nachází pouze u strunatců (Joshi *et al.* 2004).

První analýzu struktury eIF4E3 a jeho vazby na čepičku provedl Osborne *et al.* (2013), přičemž studie byla provedena s použitím rekombinantního myšního proteinu. Podobná analýza zatím nebyla publikována u lidského eIF4E3.

Pokud porovnáme obecnou strukturu eIF4E3 s ostatními členy proteinové rodiny eIF4E, tak ta je poměrně konzervovaná. eIF4E3 si zachovává strukturu centrálního  $\beta$ -listu obklopeného třemi  $\alpha$ -helixy. Nabývá také typického tvaru baseballové rukavice. Za jediný drobný strukturální rozdíl lze považovat jednu otočku  $\alpha$ -helixu na N-terminálním konci navíc. EIF4E3 má však specifický způsob vazby na čepičku v porovnání s eIF4E1 a eIF4E2 (**Obrázek 10**). Místo typického sendviče dvou aromatických aminokyselin Trp56 a Trp102, což (jak již bylo zmíněno) jsou hlavní místa interakce eIF4E1 a eIF4E2 s čepičkou, má eIF4E3 Trp98 (odpovídající Trp102 u lidského eIF4E1) a Cys52 (odpovídající Trp56 u lidského eIF4E1). Obě aminokyseliny interagují se stejnými partnery jako jejich ekvivalenty u eIF4E1, tedy Trp98 s  $m^7$ GDP, a to i ve stejném rozsahu jako Trp102, Cys52 s purinovým kruhem a methylovou skupinou, síla interakce je však podstatně menší. To může být také jeden z důvodů, proč se u eIF4E3 nachází ještě přídatná vazba na čepičku v oblasti S1-S2 smyčky  $\beta$ -listu (součástí je i Cys52, Trp56 u eIF4E1 se nachází také v oblasti této smyčky) a C-terminálního konce.

Tyto přídavné vazby nejsou u eIF4E1 a eIF4E2 nejen z důvodu silnější vazby v tzv. aromatickém sendviči, ale také proto, že aminokyseliny, které se podílejí na dalších vazbách nejsou u těchto iniciačních faktorů konzervovány. Dá se tedy soudit, že u eIF4E3 se jedná o kompenzaci nízké vazby z důvodu chybějící aromatické aminokyseliny. Celková afinita eIF4E3 k čepičce je v porovnání s eIF4E1 10 – 40x nižší (Joshi *et al.* 2004; Osborne *et al.* 2013).



**Obrázek 10. : Detail vazby eIF4E3 s čepičkou.**

Čepička zobrazena žlutou barvou, Trp98 červeně (W98), Cys52 fialově (C52), S1-S2 smyčka (S1-S2 loop; vpravo dole), C-terminální doména (C<sub>term</sub> arm; vlevo dole). (Převzato z Osborne *et al.* (2014)).

### Funkce eIF4E3

Co se týče funkce eIF4E3, tento protein pravděpodobně nevzniká ve všech lidských tkáních. Joshi *et al.* (2004) jej popsali v myších svalech (kosterních i svalech srdce), slezině a játrech. Osborne *et al.* (2013) jej pozorovali v hematopoetických buňkách (buňky akutní myeloidní leukémie), kde byly eIF4E1 i eIF4E3 přítomny a také byly oba navázány na čepičku. Autoři zde spekulují o tom, že oba proteiny spolu v buňce kompetují o tuto vazbu. Zároveň se eIF4E3, stejně jako eIF4E1, nachází jak v jádře, tak v cytoplazmě. Je však možné, že detekce pouze v některých tkáních je způsobena celkově nízkou expresí mRNA pro eIF4E3 oproti eIF4E1, a ne tím, že by se v těchto tkáních nenacházela vůbec (Joshi *et al.* 2004).

Porovnáním transkriptů, které se váží na eIF4E1 a eIF4E3, bylo zjištěno, že zvýšená produkce eIF4E3 vede k poklesu exprese některých genů jejichž transport nebo translace je závislá na eIF4E1. Jednalo se o již několikrát zmíněné geny kódující VEGF, c-Myc a Cyklin D1, jež jsou klasicky spojovány se zvýšenou proliferací a vznikem rakoviny. Zajímavé bylo také zjištění, že eIF4E3 neváže eIF4G (pravděpodobně kvůli odlišnosti v N-terminální oblasti popsané výše). Na základě těchto poznatků se zdálo, že eIF4E3 není přímo zapojeno do translace, ale naopak formuje neaktivní komplexy, které vyvazují volné mRNA, které potom není možno translatovat za pomoci eIF4E1. Tímto mechanismem by mohl *eIF4E3* fungovat jako potenciální tumor-supresorový gen (Osborne *et al.* 2013). Tento koncept byl však vyvrácen o rok později, když ve své publikaci (Landon *et al.* 2014) studovali vazbu dalších iniciačních translačních faktorů podrobněji u lymfomu DLBCL, a ukázalo se, že eIF4E3 naopak váže eIF4G. Zároveň v této studii popsali vzájemný vztah mezi eIF4E1 a eIF4E3 pomocí regulace kináz MNK 1 a 2, tyto kinázy fosforylují eIF4E1 na serinu 209 a tím umocňují jeho vazbu na eIF4G, eIF4E3 tento odpovídající serin na pozici 209 postrádá (Pyronnet *et al.* 1999; Osborne *et al.* 2013) Vazba eIF4E3 nejen na eIF4G, ale i na PABP byla potvrzená také v naší laboratoři, zároveň krátká varianta, jak se předpokládalo, neváže eIF4G, ani PABP (Frydryšková *et al.* 2016, přijato k recenznímu řízení).

Pokud tedy autoři použili inhibitor kináz MNK, nedošlo k fosforylaci eIF4E1, v důsledku čehož eIF4E1 vázal čepičku slabě. Tato inhibice zároveň umožnila navázání eIF4E3 na čepičku, síla vazby se zvýšila a došlo také k celkovému navýšení množství proteinu. Po provedení polyzomální frakcionace bylo potvrzeno, že eIF4E3 je translačně aktivní (Landon *et al.* 2014; Frydryšková *et al.* 2016, přijato k recenznímu řízení). Zdá se tedy, že kinázy MNK by mohly být součástí regulační dráhy přepínající mezi translací pomocí eIF4E1 a eIF4E3. Dalším rozdílem mezi eIF4E1 a eIF4E3 jsou odlišné sekvenční motivy v 5'UTR oblastech transkriptů, jejichž translace probíhá pomocí těchto iniciačních faktorů. Je možné, že tímto způsobem (vedle odlišného zastoupení v tkáních) probíhá kompetice o transkripty mezi eIF4E1 a eIF4E3 *in vivo* (Landon *et al.* 2014). Joshi *et al.* (2004) popsali, že se na eIF4E3 neváže protein 4E-BP, což také naznačuje odlišnou regulaci eIF4E3 oproti eIF4E1. Analýza eIF4E3 transkriptomu odhalila jeho významnou roli v modulaci některých miRNA díky snížení tvorby proteinu DICER1. eIF4E3 také ovlivňuje RNA specifickou adenosin deaminázu (ADAR), ta je zapojena v editaci RNA (Landon *et al.* 2014). Přesto, že původní hypotéza o zapojení eIF4E3 v potlačení rakovinného bujení se nepotvrdila, jeho tumor-supresorový potenciál však zůstává, jelikož zvýšená produkce eIF4E3 brání extrémní proliferaci buněk snížením eIF4E1 transkriptů, tyto ale zároveň zůstávají životaschopné, jelikož u nich probíhá translace (Landon *et al.* 2014). Myšlenku dále potvrzuje fakt, že *eIF4E3* se neexprimuje v některých typech rakoviny (Volpon *et al.* 2013).

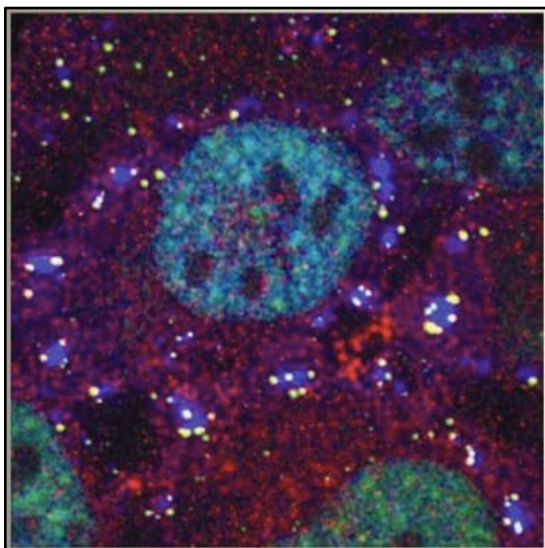
*Jelikož jsem v praktické části práce sledovala, mimo jiné, lokalizaci eIF4E proteinů v rámci buňky, především v P-bodies a stresových granulích, zaměřím se teď na tuto problematiku i teoreticky.*

#### **2.6.4 Lokalizace eIF4E proteinů v P-bodies a stresových granulích**

P-bodies (processing bodies) a stresové granule (SG) jsou dva typy cytoplazmatických tělísek, které jsou tvořeny hlavně RNA a proteiny, nemají membránu a jejich zastoupení v buňce je proměnlivé v čase. V současné době se zdá, že tyto dva typy tělísek jsou spolu prostorově a funkčně propojeny a sdílí jednotlivé mRNA, a také některé proteiny. Zároveň však jejich existence není vzájemně podmíněna a mohou vznikat a fungovat nezávisle na sobě

**(Obrázek 11).** V obou těchto těliscích byl detekován eIF4E 1

(Cougot *et al.* 2004; Kedersha *et al.* 2005).



**Obrázek 11: Stresové granule a P-bodies.**

Na obrázku jsou zobrazeny lidské rakovinné buňky prostaty, které byly vystaveny oxidativnímu stresu. Modře je jádro, fialově SG a žlutě P-bodies. Na obrázku je vidět jak spolu v mnoha případech obě tělíska sousedí a předpokládá se, že spolu mohou sdílet některé proteiny a RNA (převzato z Anderson a Kedersha 2002).

Degradace mRNA je nedílnou součástí udržování homeostázi v buňkách. mRNA, která je již nepotřebná nebo je poškozená je určena k degradaci. Nejčastěji používanou degradační dráhou v rámci eukaryot je 3'-5' degradace pomocí exozomu. Další možností je degradace 5'-3', která zahrnuje „decapping“ mRNA. K tomu slouží Dcp1 a Dcp2 enzymy, které jsou schopné z mRNA odstranit čepičku (Beelman *et al.* 1996). Jak ale víme, čepička je v jádře velice dobře chráněna komplexem eIF4 faktorů. Tento komplex je tedy potřeba nejprve odstranit. Podle studie Ferraiuolo *et al.* (2005) k tomu dochází v P-bodies. Jejich součástí jsou mimo jiné právě Dcp enzymy, ale i 4E-T a eIF4E1 (Steth a Parker 2003; Andrei *et al.* 2005; Ferraiuolo *et al.* 2005). Autorům se podařilo potvrdit, že 4E-T se na eIF4E1 váže nejen při exportu do jádra, ale také v P-bodies, kam eIF4E1 bez doprovodu tohoto svého vazebného proteinu nelokalizuje. To tedy nabízí teorii, že 4E-T se v cytoplasmě naváže na eIF4E1, místo eIF4G, rozruší tím celý iniciační komplex, jelikož eIF4G dojde k přerušení cirkularizace PABP, a přeruší tak translaci. Poté lokalizuje eIF4E1 s 4E-T v doprovodu příslušné mRNA do P-bodies, kde dojde za pomoci enzymů k odstranění čepičky a k degradaci mRNA pomocí 5'-3' degradační dráhy. Tato teorie byla potvrzena pokusem, při němž byl proveden knock-down 4E-T pomocí siRNA, mRNA v cytoplasmě tak byly rázem celkově stabilnější.

Následně byl eIF4E1 pozorován také ve stresových granulích. To jsou útvary v cytoplasmě, které vznikají ve chvíli, kdy je buňka vystavená nějakému stresovému faktoru, například teplotnímu šoku nebo oxidativnímu stresu. Vytvoření SG zpravidla předchází fosforylace eIF2 $\alpha$ , což vede ke snížení dostupnosti ternárního komplexu a tím ke snížení celkové translace. Součástí SG je také eIF3 (jeho podjednotka eIF3B se používá jako marker SG v mikroskopii), eIF4G a PABP. Během stresových podmínek buňka přepisuje hlavně „housekeeping“ geny, které jsou potom schraňovány v SG. Ve stresových granulích nedochází k degradaci mRNA, ale k jejímu uložení pro případ obnovení příznivých podmínek, proto je zde také mRNA provázána dalšími iniciačními faktory (Kedersha a Anderson 2002; Kedersha *et al.* 2005).

K tvrzení, že SG a P-bodies spolu komunikují vedlo několik pozorování, nejprve to vizuální, tedy mikroskopické, kde byla tato tělíska zachycena jak leží v těsné blízkosti (zároveň také byla pozorována odděleně). Oxidativní stres vyvolává vznik obou typů tělísek, a také některé proteiny byly nalezeny v obou (například eIF4E).



Dále se fúze obou tělísek dá vyvolat zvýšenou expresí proteinů spojených s degradací mRNA (například TTP protein), ty se nacházejí tedy jak v P-bodies, tak v SG. Je tedy možné, že část mRNA, která je schraňována v SG a už nebude dále využita, je přesunuta do P-bodies.

A nakonec, po aplikaci cyklohexamidu došlo k rozpadu obou typů tělísek, což vede k závěru, že jejich biogeneze je spjata s rozpadem polyzomů, a tedy zastavením translace (Kedersha *et al.* 2005).

Přesto, že eIF4E2 je schopen vázat 4E-T, nebyl lokalizován ve stresových granulích za oxidativního stresu (Kubacka *et al.* 2013). Další informace o eIF4E2 a eIF4E3 a jejich lokalizaci v SG a P-bodies nebyly dosud známy, proto jsme se na toto téma zaměřili v naší laboratoři. Podařilo se zjistit, že zatímco eIF4E1 lokalizuje do SG a P-bodies za teplotního i oxidativního stresu, eIF4E2 se nachází v SG a P-bodies pouze za teplotního šoku. Po vyvolání oxidativního stresu se eIF4E2 nenachází v SG, ale pouze v P-bodies. Záleží tedy na typu stresových podmínek. eIF4E3\_A, tedy jeho dlouhá varianta, lokalizuje do stresových granulí za obou typů zmíněných stresových podmínek, avšak v P-bodies nebyla detekována vůbec. Co se týče krátké varianty eIF4E3\_B, ta nebyla detekována ani v jednom typu tělísek, za žádných testovaných podmínek (**Tabulka 1**). Všechny eIF4E proteiny, které se nacházeli v P-bodies, se v nich nacházeli jak po vyvolání stresu, tak za normálních klidových podmínek. To, že se eIF4E3\_A nachází pouze ve stresových granulích vede k zamyšlení nad funkcí tohoto proteinu. Je možné, že eIF4E3\_A zabezpečuje v buňce jakousi bazální hodnotu translace vybraných transkriptů, které musí být produkovány za všech podmínek, a proto není kontrolován interakcí s 4E-BP. Tomu by nasvědčovalo také jeho nízké zastoupení v buňce oproti eIF4E1 za běžných podmínek. Jeho nepřítomnost v P-bodies vede k závěru, že se eIF4E3\_A neúčastní represe a degradace mRNA (Frydryšková *et al.* 2016, přijato k recenznímu řízení).

		eIF4E1	eIF4E2	eIF4E3_A	eIF4E3_B
P-bodies	oxidativní stres	✓	✓	×	×
	teplotní šok	✓	✓	×	×
SG	oxidativní stres	✓	×	✓	×
	teplotní šok	✓	✓	✓	×

**Tabulka 1: zastoupení jednotlivých eIF4E proteinů v rámci SG a P-bodies po vystavení buněk dvěma druhům stresových podmínek.** ((Kedersha *et al.* 2005; Kubacka *et al.* 2013; Frydryšková *et al.* 2016, přijato k recenznímu řízení).

### 3 Cíle práce

Cílem práce bylo provést některé dílčí experimenty a zavést nové metody, jež pomohou rozšířit možnosti zkoumání eIF4E proteinů v naší laboratoři. Z toho důvodu práce neobsahuje jedno ucelené téma, ale je rozdělena do několika jednotlivých pokusů, které spolu bezprostředně nesouvisí. U každého z nich je vysvětleno, k čemu který z nich sloužil.

- A.** Práce se stabilními liniemi obsahujícími konstrukty eIF4E s N-terminální GFP fúzí
  1. Ověření množství endogenních a nadprodukovaných proteinů eIF4E a jejich mRNA
  2. Stanovení efektu nadprodukce eIF4E proteinů na růst kultur
  3. Sledování distribuce eIF4E1 napříč polyzomálními profily
  
- B.** Práce s konstrukty eIF4E s C-terminální 3x FLAG fúzí
  1. Tvorba těchto konstruktů a ověření jejich funkčnosti
  2. Výroba stabilních linií pro účely mikroskopie
  3. Mikroskopické pozorování případné distribuce eIF4E3 proteinů ve stresových granulích a P-bodies

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Aceton (*Lach-Ner*); agar (*Serva, Sigma*); agaróza (*Serva*); akrylamid (*Serva*); ampicilin (*Sigma*), APS (persíran amonný) (*Serva*); arzeničitán sodný (*Fluka*);  $\beta$ -merkptoethanol (*Sigma*); BSA (bovinní sérový albumin) (*Serva*); bromfenolová modř (*MERCK*); citronan sodný (*Chemapol*); *Coomassie Brilliant Blue G-250* (*Serva*); DAPI (*Sigma*); ddH<sub>2</sub>O (deionizovaná voda); deoxycholát sodný (*Sigma*); DMSO (*Sigma*); EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) (*Serva*); ethanol (*chemický sklad PŘF UK*); ethidium bromid (*Sigma*); fenol (*MERCK, Sigma*); formaldehyd (*Sigma*); formamid (*Sigma*); glycerol (*Sigma*); glycin (*Serva*); GUITC (guanidintiokyanát) (*ICN*); chloroform (*Lachema*); izoamylalkohol (*Lachema*); izopropanol (*Penta*); KAc (octan draselný) (*Sigma*); kanamycin (*Spofa*); kyselina octová (*Lach-Ner*); kyselina trichloroctová (*Lach-Ner*); kyselina p-kumarová (*Sigma*); Lipofectamin<sup>®</sup>2000 (*Invitrogen*); luminol (*Sigma*); MgCl<sub>2</sub> (chlorid hořečnatý) (*Sigma*); methanol (*Lachema*); NaAc (octan sodný) (*Sigma*); NaCl (chlorid sodný) (*Lachema*); NaOH (hydroxid sodný) (*Lachema*); N,N'-methylbisakrylamid (*Serva*); NP-40 (*Thermo Fischer Scientific*); Mounting medium (*Invitrogen*); paraformaldehyd (*Sigma*); PBS (*Lonza*); PEI (polyethylenimin) (*Sigma*); peroxid vodíku (*Sigma*); PP-242 (*SelleckChem*); Rapamycin (*SelleckChem*); Resazurin (*Sigma*); Ribavirin (*Sigma, SelleckChem*); SDS (dodecylsíran sodný) (*Serva*); Sunar Complex 1 (*Hero*); TCEP (tris(2-chlorethyl)-fosfát) (*Thermo Fischer Scientific*); TEMED (N,N,N',N',-tetramethylethylendiamin) (*Serva*); trypsin (*Gibco*<sup>®</sup>); Tris (*Serva*); Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan chlorid) (*Serva*); Triton X-100 (*Serva*); Tween 20 (*Sigma*); Zeocin<sup>™</sup> (*InvivoGen*).

#### 4.1.2 Roztoky

**50x TAE pufr:** 24,2% (w/v) Tris-HCl; 5,7% (v/v) HCl; 10% (v/v) 0,5M EDTA-NaOH (pH 8)

**STET:** 10% (v/v) sacharóza; 50mM Tris-HCl (pH 8); 50mM EDTA-NaOH (pH 8);

1% (v/v) Triton X-100

**2 x SLB pufr:** 800  $\mu$ l 5x Laemmli pufru; 300  $\mu$ l Complete Mini (rozpuštěno v ddH<sub>2</sub>O);

200 $\mu$ l 1M tris (pH 8,5); 70  $\mu$ l TCEP; 600  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O; 30  $\mu$ l  $\beta$ -merkapt ethanolu

(finální koncentrace 1,47 %)

**ITG:** 4M GUITC; 25mM citronan sodný; 0,5% (v/v) sacharóza

**TE:** 10mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA

Akrylamid + N,N'-metylenbisakrylamid, přefiltrovat

**6x vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu:** 10mM Tris-HCl (pH 7,6);

0,03% (w/v) bromfenolová modř; 0,03% (w/v) xylenová modř; 60% (v/v) glycerol;

60mM EDTA-NaOH

**6x vzorkový pufr pro SDS-PAGE:** 53,8% (v/v) 4x tris-HCl/SDS (pH 6,8);

38,5% (v/v) glycerol; 7,6% (v/v)  $\beta$ -merkapt ethanol; 270mM SDS; 0,57mM bromfenolová modř

**Blotovací roztok:** 20% (v/v) methanol; 0,29% (w/v) glycin; 0,58% (w/v) Tris;

0,037% (w/v) SDS

**Blokovací roztok:** 1x TBS; 0,5% (v/v) Tween 20; 5% (w/v) Sunar Complex 1

**Blokační roztok:** 0,25% (w/v) želatina; 0,25% BSA v PBST

**Fixační roztok (WB):** 25% (v/v) izopropanol; 10% (v/v) kyselina octová

**Fixační roztok (mikroskopie):** 3% (v/v) paraformaldehyd v PBS

**Odmývací roztok:** 1x TBS; 0,5% Tween 20

**PBST:** 0,05% (v/v) Tween 20 v PBS

**Permeabilizační roztok:** 0,5% (v/v) Triton X-100 v PBST

**Převrstvovací pufr pH 8,8:** 0,375M Tris-HCl (pH 8); 10mM EDTA-NaOH

**Ripa pufr:** 50mM Tris-HCl (pH 8); 150mM NaCl; 1% (v/v) NP-40;

0,5% (w/v) deoxycholát sodný; 0,1% (v/v) SDS; doplnit ddH<sub>2</sub>O do 100 ml

**Roztok I (izolace plazmidové DNA):** 25mM Tris-HCl (pH 8); 10mM EDTA-NaOH

**Roztok II (izolace plazmidové DNA):** 1% (w/v) SDS; 0,2M NaOH

**Roztok III (izolace plazmidové DNA):** 3M KAc; 11,5% (v/v) kyselina octová

**Roztok Coomassie blue:** 10% (v/v) kyselina octová;

0,006% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*

**Roztok DAPI:** 400 $\mu$ l DAPI (1 mg/ml); 9,6 ml 50% ethanol (v/v) (rozpuštěný ve vodě)

**Roztok kyseliny p-kumarové:** 93,5mM kyselina p-kumarová v DMSO

**Roztok luminolu:** 250mM luminol v DMSO

#### 4.1.3 Komerční pufrы a roztoky nezahrnuté v soupravách

dNTPs: 10mM dATP; 10mM dGTP; 10mM dCTP; 10mM dTTP (Fermentas)

10x koncentrovaný pufr pro T4 ligázu (Fermentas)

10x koncentrovaný pufr pro Taq polymerázu (Fermentas)

10x koncentrovaný pufr pro restriční endonukleázy Orange (Fermentas)

10x koncentrovaný pufr pro restriční endonukleázy Red (Fermentas)

10x koncentrovaný pufr pro restriční endonukleázu ScaI (Fermentas)

10 x koncentrovaný pufr pro restriční endonukleázu EcoRI (Fermentas)

5x koncentrovaný pufr pro RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific)

6x koncentrovaný nanášecí pufr pro RNA agarózovou elektroforézu: DNA loading  
Dye (Fermentas)

FastStart PCR Master (Roche)

LightCycler® 480 Probes Master (Roche)

2x koncentrovaný FastStart PCR Master (Roche)

Complete mini (with EDTA) (Roche)

#### 4.1.4 Protilátky

	název	typ	původ	ředění	použití	výrobce
primární	anti-FLAG <sup>®</sup>	monoklonální	myší, IgG <sub>1</sub>	1:100	mikroskopie	Sigma
	anti-GFP	monoklonální	myší, IgG <sub>2a</sub>	1:4000	WB	Santa Cruz
	anti-DDX6	polyklonální	králíčí, IgG	1:500	mikroskopie	Bethyl
	anti-eEIF3B	polyklonální	králíčí	1:500	mikroskopie	Santa Cruz
	anti-eIF4E1	monoklonální	myší	1:1000	WB	Abgent
sekundární	GW182 (cy3)	monoklonální	myší, IgG <sub>1</sub>	1:500	mikroskopie	Abcam
	GW182 (cy5)	polyklonální	králíčí, IgG	1:500	mikroskopie	Santa Cruz
	anti-mouse	polyklonální	kozí, IgG-HRP	1:5000	WB	Santa Cruz

Tabulka 2: Použité protilátky v této práci.

#### 4.1.5 Plazmidy

Název plazmidu	Zdroj
pFRT/ <i>lacZeo2</i>	Invitrogen
pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen
pCDNA_FTR_TO_3xC_FLAG (SV 445)	Laboratoř biochemie RNA
pEGFP_4E1	Laboratoř biochemie RNA
pEGFP_4E2	Laboratoř biochemie RNA
pEGFP_4E3-long	Laboratoř biochemie RNA
pEGFP_4E3	Laboratoř biochemie RNA
pCR4TOPO_4E1	Tato práce
pCR4TOPO_4E2	Tato práce
pCR4 TOPO_4E3A	Tato práce
pCR4 TOPO_4E3B	Tato práce
pCDNA_4E1_3Cflag	Tato práce
pCDNA_4E2_3Cflag	Tato práce
pCDNA_4E3A_3Cflag	Tato práce
pCDNA_4E3B_3Cflag	Tato práce

Tabulka 3: Použité plazmidy v této práci.

#### 4.1.6 Buněčné linie

Pro více informací o charakteristice jednotlivých linií v databázi ATCC Human Cell lines ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

Název linie	původ
Hek293 Flp-In T-REX	Adherentní lidské ledvinové embryonální buňky (nekomerční zdroj)
Hek293 Flp-In T-REX eIF4E1-GFP	Stabilní linie nesoucí eIF4E1 s GFP N-terminální fúzí, Laboratoř biochemie RNA
Hek293 Flp-In T-REX eIF4E2-GFP	Stabilní linie nesoucí eIF4E2 s GFP N-terminální fúzí, Laboratoř biochemie RNA
Hek293 Flp-In T-REX eIF4E3_A-GFP	Stabilní linie nesoucí eIF4E3_A s GFP N-terminální fúzí, Laboratoř biochemie RNA
Hek293 Flp-In T-REX eIF4E3_B-GFP	Stabilní linie nesoucí eIF4E3_B s GFP N-terminální fúzí, Laboratoř biochemie RNA
U2OS	Adherentní buňky lidského osteosarkomu (nekomerční zdroj)
U2OS (n x FRT)	Buňky obsahující více FRT míst (nekomerční zdroj)

**Tabulka 4: Použité buněčné linie v této práci.**

#### 4.1.7 Enzymy

Lysozym 500 U/mg (Serva)

Taq polymeráza 2,5 U/μl (Fermentas)

RiboLock RNase Inhibitor 40 U/μl (Fischer Scientific)

RevertAid Reverse Transcriptase 200 U/μl (Thermo Fischer Scientific)

Restrikční endonukleázy 10 U/μl (všechny Fermentas)

T4 DNA ligáza 5 U/μl (Fermentas)

TRN ribonukleáza A: 58 U/mg (Sigma)

#### 4.1.8 Kultivace buněčných linií

Médium: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose) (Sigma) – přidat GIBCO™ Antibiotic-Antimycotic (100x koncentrovaný) (Invitrogen), FBS (finální koncentrace v médiu 10%)

Zamrazovací médium: DMEM, FBS (finální koncentrace v médiu 20%), DMSO (finální koncentrace v médiu 10%)

Zeocin™ (100mg/ml)

Opti-MEM® - médium používané při transfekci (Gibco®)

#### 4.1.9 Bakteriální kmeny

*Escherichia coli* XL-1 Blue: endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44  
F' [::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) (Stratagene)

#### 4.1.10 Bakteriální kultivační média

Tekutá média: TY médium: 1,6% pepton; 1% kvasničný autolyzát; 0,5% NaCl; pH 7 upraveno pomocí NaOH. V případě média s antibiotiky přidáno 50 µg/ml ampicilinu nebo 50 µg/ml kanamycinu.

Agarové půdy: TY médium + 2% agar, případně antibiotikum ve stejném množství jako pro tekutá média.

#### 4.1.11 Komerční soupravy

FavorPrep™ Endotoxin Free Plasmid DNA Extraction Midi Kit

DNA Clean and Concentrator™ - 5 Kit (The Epigenetics company™)

QUIAGEN® Plasmid Mini Kit (100)

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

TOPO TA Cloning® kit for Sequencing (Invitrogen)



#### 4.1.12 Oligonukleotidy

název	sekvence	použití
Surf_up	CTCAGAGTGGGGCCTATGTG	Real-time PCR
Surf_rev	CCTGGGAACGAACCCTCTAT	Real-time PCR
Surf1_sonda	TCACTCCCTTCCACTGCACCGAC	Real-time PCR
4E1_sonda	CCTTAAAAAGTGAGTAGTCACAGCCAGGCAT	Real-time PCR
4E2_sonda	TAGTTGTACTGCAGGGGATGCTCTGCCGGT	Real-time PCR
4E3_sonda	CCCAAAGTGGTCGCCTCTCTCCTCTCATTA	Real-time PCR
4E1_forward	AAGCAAACCTGCGGCTGATCTC	Real-time PCR
4E1_reverse	CATCTTCCCACATAGGCTCAATACC	Real-time PCR
4E2_forward	CGAGACAAGAATCAGAGCAGTAGCAAG	Real-time PCR
4E2_reverse	GAAAAACCATGAGGTCCTCTTGGGG	Real-time PCR
4E3_forward	AATATCCCTCCTGTGACTAGCCTGC	Real-time PCR
4E3_reverse	CTCCTCTCATTACGTTTCCCAC	Real-time PCR
4E3_B_Acc65I_forward	AAGGTACCATGAGAGGAGAGAGGCGA	klonování
4E3_B_NotI_reverse	AAGCGGCCGCGTGTTTTCCACGTCCACC	klonování
4E3_A_Acc65I_forward	TAGGTACCATGGCGCTGCCCCCG	klonování
4E1_Acc65I_forward	TAGGTACCTATGGCGACTGTGCAACC	klonování
4E1_NotI_reverse	AAGCGGCCGCAACAACAACCTATTTTTAGTGGT	klonování
4E2_Acc65I_forward	TAGGTACCATGAACAACAAGTTCGACGC	klonování
4E2_NotI_reverse	AAGCGGCCGCTGGCACATTCAACCGCG	klonování

**Tabulka 5: Použité oligonukleotidy v této práci.**

V tabulce se nachází všechny použité oligonukleotidy. Jestliže se jednalo o sondu použitou při real-time PCR, je slovo „sonda“ součástí názvu oligonukleotidu, v opačném případě se jedná o PCR primery. Do tabulky nejsou zahrnuty obecně známé a používané primery (T3, T7, BGH, CMV), jelikož jejich sekvence je dobře známá a dá se bez problému vyhledat.

#### 4.1.13 Specifické laboratorní přístroje

GenePulser Xcell™ (kapacita přístroje je 25  $\mu$ F) (Bio-Rad)

LightCycler® 480-II (Roche)

NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific™)

VarioScan (Thermo Fischer Scientific™)

ImageQuant™ Las 4000 (GE Healthcare)

Fluorescenční mikroskop Olympus IX81, software Cell-R

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Kultivace bakterií**

Kultivace bakteriálních kmenů probíhala na agarových plotnách v termostatu při teplotě 37 °C nebo v tekutém médiu na třepačce v Erlenmayerových baňkách za stejné teploty.

### **4.2.2 Skladování bakteriálních kmenů**

Krátkodobě se bakteriální kmeny skladovaly při 4 °C na agarových plotnách. Kompetentní buňky pro transformaci byly skladovány při -80 °C.

### **4.2.3 Práce s tkáňovými kulturami**

Tkáňové kultury byly kultivované v termostatu s přívodem oxidu uhličitého (5 %) při teplotě 37 °C v kultivačních Petriho miskách. Linie rostly v médiu DMEM s přidaným FBS a antibiotiky.

### **Pasážování**

Pasážování probíhalo zpravidla dvakrát týdně, následovně:

- Odpipetovat staré médium
- Promýt opatrně PBS
- Aplikovat 0,05% trypsin pro porušení mezibuněčných spojů (na misku o průměru 6 cm pipetovat 300 µl, na 10cm misku pipetovat 1,2 ml)
- Buňky vrátit do termostatu a počkat, než začne trypsin působit (cca 10 min)
- Doplnit objem média podle velikosti Petriho misek (5 ml celkem v 6cm misce, 10ml celkem v 10cm misce)
- Ode dna odlepené shluky buněk pipetou rozdělit od sebe a přenést 1 ml buněčné suspenze do 4 ml nového média na nové 6cm misce (= ředění 1:5)

## **Příprava zásobní konzervy**

- Po pasážování přepipetovat buňky v médiu do plastové zkumavky a centrifugovat po dobu 10 min při 30x g
- Odsát supernatant
- Přidat mrazicí směs (20 % FBS; 10 % DMSO; doplnit médiem do požadovaného objemu)
- Resuspendovat buňky a rozpipetovat do konzerv
- Postupně ochlazovat pomocí soupravy Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers
- Uchovávat v tanku s tekutým dusíkem

### **4.2.4 Tvorba FRT stabilní linie**

Stabilní linie je taková buněčná linie, která exprimuje gen našeho zájmu bez nutnosti opakované transfekce. Děje se tak díky místně specifické rekombinaci, ke které dochází mezi genem našeho zájmu a plazmidem, který je k tomuto účelu určen. Pro tvorbu stabilní linie jsme zvolili systém Flp-In™ od společnosti Invitrogen.

Prvním krokem v tvorbě stabilní buněčné linie je vytvoření stabilní linie pomocí vektoru pFRT/lacZeo2, který nese gen pro rezistenci na Zeocin™,  $\beta$ -galaktosidázu a FRT místo (ve kterém poté dochází k rekombinaci s genem našeho zájmu). Rezistence na Zeocin™ slouží k následné selekci buněk, jež byly úspěšně transfekovány.

Nejdříve se tedy vnáší plazmid pFRT/lacZeo2 do buněk, ze kterých chceme stabilní linii vytvořit, my jsme se rozhodli pro buňky U2OS, což jsou buňky osteosarkomu. Vytvořit nejdříve stabilní linii, která ponese FRT místo jsme se rozhodli, jelikož jsme zjistili, že U2OS linie, kterou v laboratoři máme, obsahuje více FRT míst a způsobuje tak problémy při expresi genů. U2OS linie jsou vhodnější k mikroskopování než Hek293.

#### **4.2.5 Transfekce plazmidu do buněk Hek293 a U2OS pomocí polyethyleniminu (PEI)**

- Před samotnou transfekcí nechat buňky narůst do konfluency cca 80 %
- 60 µl PEI smíchat s 0,94 ml PBS a nechat vytemperovat na pokojovou teplotu
- DNA (1,5; 6 a 17 µg/ml) důkladně promíchat a také nechat vytemperovat na pokojovou teplotu
- Smíchat požadované množství DNA s PBS
- Do směsi přidat roztok PEI, důkladně promíchat
- Nechat stát 20 minut při pokojové teplotě (vytvoří se komplex PEI s DNA)
- Opatrně nakapat směs na buňky
- Inkubovat 16 hodin, poté vyměnit médium
- Za dalších cca 24 hodin přidat Zeocin™ v koncentraci 400 µg/ml
- Vyměňovat médium se Zeocinem™ každé tři dny

Po cca dvou a třech týdnech se vyselektují pozitivní klony, které jsou rezistentní na Zeocin™.

#### **4.2.6 Transfekce plazmidů do buněk U2OS pomocí Lipofectaminu® 2000**

Před transfekcí vyset buňky do konfluency cca 40 % na misky o průměru 35 mm, ve kterých jsou vložena krycí skla, která byla sterilizována v ethanolu a následně opálena nad kahanem.

- Smíchat 2,5 µg DNA s 150 µl média Opti-MEM (to je určené pro kultivaci se sníženým obsahem séra)
- Smíchat 7,5 µl Lipofectaminu® 2000 se 150 µl Opti-MEM
- Obě směsi spolu důkladně promíchat a inkubovat 5 -10 min při pokojové teplotě
- Opatrně nakapat na buňky

Po transfekci se buňky nechají narůst do druhého dne.

#### 4.2.7 Vyvolání stresových podmínek

S buněčnými kulturami, které slouží jako kontrolní a nebudou tedy podrobeny stresovým podmínkám, pokračujeme až od bodu 4.2.8

Teplotní šok:

- Předehřát médium na cca 42 °C
- Aplikovat na buňky a buňky položit na vyhřátý bloček (48 °C), inkubovat 1 hodinu

V naší laboratoři proběhla optimalizace tohoto postupu, takže víme, že 48 °C bločku odpovídá 42 °C média, a že při této teplotě se s největší účinností tvoří stresové granule.

Oxidační stres:

- Odsát médium a vyměnit jej za médium s 1mM arzeničitanem sodným
- Inkubovat při 37 °C 1 hodinu

#### 4.2.8 Fixace buněk paraformaldehydem

- Odsát médium a buňky promýt temperovaným PBS na 37 °C

Všechny ostatní roztoky používat vychlazené na 4 °C.

- Buňky fixovat 3% paraformaldehydem v PBS a kývat na kývačce 20 min
- Permeabilizovat roztokem 0,5% Tritonu X 100 v PBST, nakapat na buňky, kývat v ruce a odsát
- 3x 10 min promýt v PBST
- Blokovat v blokačním roztoku, kývat 30 – 45 min
- Primární protilátku ředit podle pokynů výrobce do blokačního roztoku (celkový objem cca 60 µl)

- Směs s primární protilátkou nanést na parafilmem pokrytou 10cm misku a kapku s protilátkou přiklopit sklíčkem stranou, na které jsou buňky
- Nechat působit protilátku přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce
- Druhý den opět 3x 10 min promýt v PBST
- Sekundární protilátku ředit do blokačního roztoku a nechat působit 45 min při pokojové teplotě ve vlhké komůrce
- 2x 10 min promýt v PBST
- 1x promýt PBS do kterého bylo přidáno DAPI 1:500 a 10 min kývat na kývačce
- Promýt 1x v ddH<sub>2</sub>O
- Aplikovat Mounting médium – pokud je zamrzlé, je potřeba jej nejméně dvě hodiny nechat rozmraznout při pokojové teplotě – kapku na podložní sklo a přiklopit krycím sklem stranou s buňkami
- Preparáty uchovávat v lednici a co nejdříve zpracovat mikroskopicky

Mikroskopické zpracování preparátů proběhlo na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 a byl použit software Cell-R.

#### **4.2.9 Křivky umírání měřené pomocí Resazurinu**

Na buňky Hek239 Flp-In T-REX a Hek239 Flp-In T-REX GFP-eIF4E, které jsem kultivovala za podmínek popsanych v kapitole 4.2.3, o konfluenci cca 50 % jsem aplikovala inhibitory, které jsem ředila do finálních koncentrací v DMSO:

Ribavirin: 1; 15; 50; 100; 200 $\mu$ M

Rapamycin: 0,5; 1; 5; 10; 20 $\mu$ M

PP-242: 0,5; 1; 5; 10; 20 $\mu$ M

Následně jsem po 24, 48, 72 a 96 hodinách přidala Resazurin do finální koncentrace 5  $\mu$ g/ml.

Čtyři hodiny po přidání Resazurinu byly vzorky měřeny pomocí přístroje VarioScan (Thermo Fischer Scientific). Jako kontrola byly použity buňky bez přidání inhibitorů a s 0,1% DMSO.

Podrobný popis provedení experimentu uvádím v kapitole Výsledky (5.2).

#### 4.2.10 „Minipreparace“ plazmidů z buněk *E. coli*

- Bakteriální kulturu nechat narůst na agarových půdách s médiem 2x TY, obsahující příslušné selekční antibiotikum přes noc v termostatu při teplotě 37 °C
- Druhý den sterilním párátkem přenést bakteriální kulturu do 400 µl roztoku STET, přidat 5 µl 5% (w/v) lysozymu a důkladně resuspendovat
- Inkubovat cca 5 min v termobloku vyhřátém na 95 °C
- Nechat vychladnout 5 – 10 min při pokojové teplotě
- Centrifugovat 10 min/18 000g při pokojové teplotě
- Opatrně odstranit pelet párátkem
- Přidat 400 µl izopropanolu
- Inkubovat nejméně 30 min při teplotě – 20 °C
- Centrifugovat 15 min/18 000g při pokojové teplotě
- Odstranit supernatant a sediment resuspendovat v 1 ml 70% (v/v) ethanolu
- Centrifugovat 10 min/18 000g při pokojové teplotě
- Odstranit supernatant
- Pelet vysušit v termostatu při teplotě 37 °C
- Vysušený pelet rozpustit v 30 µl TE pufru
- 5 µl vzorku analyzovat elektroforeticky
- 

#### 4.2.11 „Midipreparace“ plazmidů z buněk *E. coli*

- Bakteriální kulturu, která obsahuje příslušný plazmid, nechat narůst v cca 30 až 50 ml média 2x TY, obsahujícího příslušné selekční antibiotikum přes noc při 37 °C
- Druhý den centrifugovat 10 min/2 500g při pokojové teplotě
- Odstranit supernatant
- Pelet důkladně resuspendovat ve 2 ml roztoku TEG, vortexovat
- Přidat 4 ml roztoku II, opatrně promíchat a inkubovat 5 min při pokojové teplotě
- Přidat 3 ml 3M roztoku KAc, opatrně promíchat, inkubovat 20 min na ledu
- Centrifugovat 20 min/2 500g, 4 °C

- Supernatant přefiltrovat přes gázu, přidat 0,7 objemu izopropanolu, důkladně promíchat a inkubovat 10 min na ledu
- Centrifugovat 20 min/2 500g, 4 °C
- Odstranit supernatant
- Pelet resuspendovat ve 3 ml 70% (v/v) ethanolu
- Centrifugovat 5 min/2 500g, pokojová teplota
- Důkladně odstranit supernatant
- Pelet vysušit v termostatu při 37 °C
- Vysušený pelet resuspendovat v 500 µl TE pufru, přidat 10 µl TRN a hodinu inkubovat v termostatu při 37 °C
- Přidat 500 µl fenolu, důkladně promíchat
- Centrifugovat 5 min/18 000g, pokojová teplota
- Odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 250 µl fenolu a 250 µl chloroformu, důkladně promíchat
- Centrifugovat 5 min/18 000g, pokojová teplota
- Opakovat předchozí 2 kroky dokud nezmizí bílá mezifáze tvořená zbytky proteinů
- Odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 500 µl chloroformu, důkladně promíchat
- Centrifugovat 5 min/18 000g, pokojová teplota
- Odebrat vrchní vodnou fázi a přidat k ní 0,1 objemu 3 M NaAc a 2,5 objemu 96% (v/v) ethanolu, vychlazeného na 4 °C
- Inkubovat přes noc při -20 °C
- Druhý den centrifugovat 20 min/18 000g, pokojová teplota
- Odstranit supernatant, přidat 1 ml 70% (v/v) ethanolu, důkladně promíchat
- Centrifugovat 10 min/18 000g, pokojová teplota
- Odstranit supernatant
- Pelet vysušit v termostatu při 37 °C
- Rozpustit ve 100 – 300 µl TE pufru (podle objemu peletu)
- Vzorke elektroforeticky analyzovat



#### **4.2.12 Izolace plazmidu z buněk *E. coli* pomocí komerční soupravy**

Izolace proběhla pomocí komerční soupravy QUIAGEN® Plasmid Mini Kit (100) podle návodu výrobce.

#### **4.2.13 Izolace plazmidu pFRT/lacZeo2**

Izolace proběhla pomocí komerční soupravy FavorPrep™ Endotoxin Free Plasmid DNA Extraction Midi Kit podle návodu.

#### **4.2.14 Purifikace naštěpeného plazmidu pFRT/lacZeo2**

Purifikace proběhla pomocí komerční soupravy DNA Clean and Concentrator™ - 5 Kit (The Epigenetics company™), podle návodu výrobce.

#### 4.2.15 PCR jednotlivých pEGFP plazmidů

##### Reakční směs pro PCR:

chemikálie	Množství (μl)
ddH <sub>2</sub> O	6,8
2x Fast start PCR Master	12,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,2
primery (10μM)	1+1
100% DMSO	1,25
pEGFP plazmid	1

##### Průběh PCR reakce:

Teplota (°C)	Čas	
94	6 min	} 4 x
94	30 s	
56	20 s	
72	1 min	} 24 x
95	20 s	
63	20 s	
72	1 min	
72	5 min	
4	∞	

#### 4.2.16 PCR TOPO plazmidů s inzertem

##### Reakční směs pro PCR:

chemikálie	Množství (μl)
ddH <sub>2</sub> O	12,5
10x Puf <sub>r</sub> (+MgCl <sub>2</sub> )	2,5
Taq polymeráza (2,5 U/μl)	0,5
Primery (10μM)	1+1
dNTPs (10 mM)	0,5
plazmid	1

**Průběh PCR reakce:**

Teplota (°C)	Čas
94	2 min
94	20 s
56	30 s
72	30 s
72	5 min
4	∞

} 24 x

**4.2.17 PCR pro ověření klonovaných eIF4E proteinů****Reakční směs pro PCR:**

chemikálie	Množství (μl)
ddH <sub>2</sub> O	13,5
10x Pufr (+MgCl <sub>2</sub> )	2,0
Taq polymeráza (2,5 U/μl)	0,5
Primery CMV + BGH (10μM)	1+1
dNTPs (10 mM)	0,5
Plazmid (300 x ředěný)	1,5

**Průběh reakce:**

Teplota (°C)	Čas
94	2 min
94	20 s
56	30 s
72	70 s
72	5 min
4	∞

} 24 x

#### **4.2.18 Agarózová elektroforéza DNA**

Příprava gelu: Navázat agarózu podle požadované výsledné koncentrace a rozpustit v TAE pufru. Po vychladnutí na cca 60 °C nalít do vaničky, přidat ethidium bromid (výsledná koncentrace cca 0,175 µg/ml) , zasunout hřeben a nechat ztuhnout při laboratorní teplotě. Vaničku poté vložit do elektroforetického přístroje a přelít TAE puftrem.

- Nanést vzorky smíchané s 1 µl nanášecího pufru
- Zapojit zdroj napětí: 6 V/cm na cca hodinu
- Vyfotografovat a vyhodnotit výsledky

#### **4.2.19 Štěpení restričními enzymy – klonování**

Pro klonování byl použit následující protokol štěpení: jednotlivé plazmidy byly naštěpeny restričními enzymy NotI a Acc65I po dobu 6 hod, reakce byla namíchána do celkového objemu 40 µl následovně:

- 22 µl ddH<sub>2</sub>O
- 8 µl plazmidu nebo PCR produktu
- 4 µl 10x pufru Orange (Fermentas)
- 4 µl enzymu NotI (10 U/µl)
- 2 µl enzymu Acc65I (10 U/µl)

#### 4.2.20 Ověření TOPO plazmidů

Pro ověření správnosti TOPO klonování jsem použila restriční enzymy EcoRI (ten je součástí TOPO vektoru) a NotI a Acc65I, které jsou součástí mnou očekávaného zaklonovaného segmentu. Restriční reakce probíhala 2 hodiny a byla namíchána do celkového objemu 20  $\mu$ l následovně:

- 13,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- 4  $\mu$ l plazmidu
- 2  $\mu$ l jednotlivých pufrů k enzymům (10x) (Fermentas)
- 0,5  $\mu$ l příslušného enzymu (10 U/ $\mu$ l)

#### 4.2.21 Ověření klonů

Pro ověření správnosti jednotlivých naklonovaných plazmidů jsem zvolila restriční enzymy XhoI a HindIII, reakce probíhala přes noc ve 20  $\mu$ l a byla namíchána následovně:

- 12,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- 5  $\mu$ l plazmidu
- 2  $\mu$ l 10x Red pufru (Fermentas)
- 0,3  $\mu$ l od obou enzymů (10 U/ $\mu$ l)

#### 4.2.22 Restrikce pFRT/lacZeo plazmidu

Na výrobu stabilních linií nesoucích FTR místo byl použit komerční plazmid pFRT/lacZeo, který jsem štěpila restričním enzymem ScaI, jelikož je jedním z doporučených enzymů k linearizaci tohoto plazmidu. Restrikce probíhala v objemu 40  $\mu$ l po dobu tří hodin následovně:

- 25,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- 7,5  $\mu$ l plazmidu (4400 ng/ $\mu$ l)
- 4  $\mu$ l 10x ScaI pufru (Fermentas)
- 3  $\mu$  enzymu ScaI (10 U/ $\mu$ l)

#### 4.2.23 Ligace

Ligační směs namíchat do objemu 20  $\mu$ l: 2  $\mu$ l 10x ligačního pufru, 1  $\mu$ l T4 DNA ligáza, množství naštěpeného vektoru a inzertu odhadnutého podle elektroforézy (v poměru 1:3) a směs doplnit do 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Inkubovat 16 hodin při 16 °C, následně 10 min při 65 °C, zchladit. Jako negativní kontrola byl použit pouze naštěpený vektor pCDNA\_FTR\_TO\_3xC\_FLAG SV445. Ligační směs byla míchána následovně:

Chemikálie (množství v $\mu$ l)	SV445	SV445 +eIF4E1	SV445 +eIF4E2	SV445 +eIF4E3_A	SV445 +eIF4E3_B
ddH <sub>2</sub> O	6	1	4	0	3
vektor	10	10	10	10	10
inzert	0	5	3	7	3
Pufř (10x)	2	2	2	2	2
Ligáza (5 U/ $\mu$ l)	1	1	1	1	1

#### 4.2.24 Izolace DNA z agarózového gelu

Po vyřezání úseku obsahujícího DNA z agarózového gelu provést izolaci pomocí komerční soupravy High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Stejnou soupravu použít pro přečištění PCR reakce.

#### 4.2.25 Vkládání do TOPO vektoru – „TOPO klonování“

Vložení do TOPO vektoru probíhalo pomocí soupravy TOPO TA Cloning® Kit For Sequencing (Invitrogen™)

- Požadovanou sekvenci DNA namnožit PCR reakcí
- S 3  $\mu$ l PCR směsi provést agarózovou elektroforézu, pro ověření
- 3  $\mu$ l PCR směsi smíchat s 1  $\mu$ l roztoku solí ze soupravy, přidat 1  $\mu$ l TOPO vektoru a 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- Inkubovat 20 - 30 min při laboratorní teplotě a dále skladovat při -20 °C

#### 4.2.26 Sekvenování

Smíchat 250 ng DNA, 1+1  $\mu$ l primerů T3 a T7 (10mM), doplnit do 8 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

Samotné sekvenování bylo provedeno v Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK, Viničná 7.

#### 4.2.27 Transformace buněk *E. coli* elektroporací

Ve vychlazené elektroporační kyvetě (vzdálenost elektrod 2 mm) smíchat 1 -10  $\mu$ l DNA podle koncentrace s 50  $\mu$ l buněčné suspenze kompetentních buněk *E. Coli*. Obě komponenty udržovat před smícháním na ledě. Následně aplikovat pulz o napětí 2,5 kV a odporu 200  $\Omega$ . Bezprostředně po pulzu přenést směs do 600  $\mu$ l TY média, které bylo přehřáto na 37 °C. Následně provést kultivaci při 37 °C na horizontální třepačce po dobu cca 50 min. Po kultivaci vyset buňky na agarovou plotnu s příslušným selekčním antibiotikem.

#### 4.2.28 Tvorba bakteriálních konzerv

Bakterie smíchat s 50% glycerolem v poměru 1:1 do celkového objemu 1,5 ml. Tuto směs uchovávat při - 80°C.

#### 4.2.29 Izolace RNA

- Z buněk adherentní kultury odsát médium a promýt PBS
- Smíchat 500  $\mu$ l ITG s  $\beta$ -merkaptoethanolem (na 1 ml ITG 7,2  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu) a nanést na buňky
- Nechat chvíli lyzovat a lyzát přepipetovat do 1,5ml mikrozkuřavky
- vortexovat
- Přidat 150  $\mu$ l 2M octanu sodného (pH 4)
- vortexovat

- Přidat 500  $\mu$ l fenolu
- vortexovat 1-2 min
- Přidat 350  $\mu$ l chloroformu s 1% (v/v) izoamylalkoholem
- vortexovat 2-3 min
- Centrifugovat při 4°C po dobu 20 min při nejvyšších otáčkách
- Opatrně odebrat horní fázi do nové 1,5ml mikrozkušavky
- Přidat stejné množství vychlazeného izopropanolu
- Nechat srážet DNA při -20 °C po dobu minimálně 20 min
- Centrifugovat ve vychlazené centrifuze na 4°C po dobu 20 min při nejvyšších otáčkách
- Odsát supernatant
- Přidat 1 ml vychlazeného 75% ethanolu
- Centrifugovat při 4°C po dobu 5 min, 8 500x g
- Ethanol odsát a promytí zopakovat
- Odsát opatrně ethanol a pelet sušit na vzduchu (cca 10 min)
- Rozpustit v 15 – 30  $\mu$ l vody bez RNAáz podle velikosti peletu
- Změřit obsah RNA na NanoDrop 1000
- Skladovat při -70 °C

#### 4.2.30 Agarózová denaturační elektroforéza RNA (podle Mašek *et al.* 2005)

Příprava gelu: 1,5 % agaróza (rozpustit v 1x TAE puftru), po vychladnutí na cca 60 °C nalít do vaničky, zasunout hřeben a nechat zatuhnout při laboratorní teplotě. Vaničku poté vložit do elektroforetického přístroje a přelít 1x TEA pufrem.

- Smíchat 2-7  $\mu$ l vzorku izolované RNA s 8  $\mu$ l formamidu a 2  $\mu$ l nanášecí barvy (1,5  $\mu$ l
- 6x DNA Loading Dye (Fermentas) + 0,5  $\mu$ l ethidium bromidu o koncentraci 5 mg/ml)
- Směs denaturovat při 65 °C po dobu 10 min
- Nechat zchladit na ledu po dobu 5 min
- Nanést vzorky do jamek v gelu a zapojit zdroj napětí: 6 V/cm , cca 45 min
- Vyfotografovat a vyhodnotit výsledky



#### 4.2.31 Měření koncentrace nukleových kyselin

Koncentrace RNA a DNA byla měřena na přístroji NanoDrop 1000 v objemech 1 – 1,5  $\mu$ l. Pro potřeby běžné práce s DNA bylo množství odhadnuto podle výsledků elektroforézy.

#### 4.2.32 Reverzní transkripce

Příprava hybridizační směsi primeru s mRNA:

- ddH<sub>2</sub>O + RNA – smíchat tak, aby vzorek obsahoval 3  $\mu$ g RNA a celkový objem byl 20  $\mu$ l
- 2  $\mu$ l oligo(dT) (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)
- Směs inkubovat 5 min při 70 °C, poté zchladit 5 min na ledu
- Namíchat zbytek reakce:

3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

8  $\mu$ l pufru (5x)

4  $\mu$ l dNTP (10mM)

1  $\mu$ l RiboLock (40 U/ $\mu$ l)

2  $\mu$ l RevertAid (200 U/ $\mu$ l) – přidat do každého vzorku zvlášť

} Namíchat na počet vzorků

**Průběh reakce:**

Teplota (°C)	čas
37	60 s
42	90 s
72	10 min
4	$\infty$

#### 4.2.33 Real-time PCR

##### Složení reakce:

3,46  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

5  $\mu$ l LightCycler® 480 Probes Master (2x)

0,5  $\mu$ M každého primeru (reverse + forward na každý gen) (10 $\mu$ M)

0,04  $\mu$ l TaqMan sondy (10 $\mu$ M)

2,5  $\mu$ l cDNA

V případě ředících řad je objem cDNA 1  $\mu$ l (rozdíl doplněn ddH<sub>2</sub>O). Koncentrace primerů a sond byla spočítána pomocí protokolu k premixu LightCycler® 480 Probes Master.

##### Průběh reakce:

Teplota (°C)	čas
95	7 min
95	10 s
60	70 s
72	1 s
40	30 s

} 44 x

Analýza byla vyhotovena pomocí softwaru k LightCycler® 480.

#### 4.2.34 Srážení proteinů v polyzomálních profilech pomocí TCA

- Buněčný lyzát nechat rozmraznout na ledu a přidat TCA do finální koncentrace 10 %
- Důkladně promíchat a nechat srážet přes noc při 4°C
- Centrifugovat 20 min/15 000g, 4 °C
- Opatrně odebrat supernatant
- K peletu přidat 200  $\mu$ l vychlazeného acetonu, důkladně promíchat
- Inkubovat 15 min na ledu
- Centrifugovat 10 min/15 000g, 4°C

- Opatrně odsát supernatant
- Pelet nechat schnout cca 15 min při 37 °C
- Resuspendovat ve 2x SLB (ohřátém na 80 °C), proporcionálně k velikosti peletu
  - pro rotor SW 55 postupovat následovně: frakci 1 rozpustit v 50 µl, ostatní frakce ve 30 µl, v případě, že výsledná barva směsi není modrá, ale zelená, přidat 10 µl 1M Tris pH 8,5 k frakci 1 a 5 µl k ostatním frakcím, což by mělo vést ke zmodrání směsi.
- Poté umístit vzorky do termobloku vyhřátého na 80 °C po dobu 10 min a průběžně se snažit rozpustit sraženinu špičkou pipety
- Vzorky uchovávat v – 20 °C

#### **4.2.35 Příprava buněčných lyzátů**

- Z plně konfluentních buněk odsát médium a promýt PBS
- Přidat lyzační RIPA pufr
- Nechat inkubovat 15 min na ledu
- Umocnit rozrušení buněk průběžným pipetováním
- Přepipetovat do 1,5ml mikrozkušavky
- Sonikovat 4 x 30 s po každých 30 s vždy minuta prodleva, při amplitudě 60
- Přidat 25 µl vzorkového pufru, rozpustit a inkubovat 5 min při 100 °C
- Vychladnout 15 min na ledu
- Nanášet na gel nebo uchovávat při – 20 °C

#### 4.2.36 Western blotting metodou „wet“ a „semi-dry“

##### **Příprava polyakrylamidového dělicího gelu**

Na 12% gel smíchat (množství cca na 2 gely):

- 6 ml 30% akrylamidu/0,8% bisakrylamidu
- 3,75 ml 4x Tris-HCl/SDS (pH 8,8)
- 5,25 ml H<sub>2</sub>O
- 75 µl 10% (w/v) APS
- 15 µl TEMEDu

APS a TEMED přidat jako poslední a poté rychle nanést mezi skla, převrstvit převrstvovacím roztokem a nechat cca 30 min polymerizovat. Poté vylít převrstvovací roztok, dosušit důkladně filtračním papírem a přelít zaostřovacím gelem.

##### **Příprava zaostřovacího gelu**

- 0,65 ml 30% akrylamidu/0,8% bisakrylamidu
- 1,25 ml 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8
- 3,05 ml ddH<sub>2</sub>O
- 37,5 µl APS
- 7,5 µl TEMEDu

APS a TEMED opět přidat jako poslední, směs nanést na dělicí gel, vložit hřeben a nechat cca 20 – 30 min tuhnout. Gely je možné uchovat několik dní ve vlhkém prostředí při 4 °C.

##### **Elektroforéza**

Z gelu vysunout opatrně hřeben, vložit skla do elektroforetického přístroje, nalít dostatečné množství 1x SDS-PAGE pufru. Poté je možné jamky promýt pufrům pomocí pipety. Nanést vzorky na gel, zapojit zdroj napětí: 150 V po dobu cca 80 – 100 min.

## Western blot

- Odstranit zaostřovací gel od dělicího, dělicí gel inkubovat v blotovacím roztoku cca 20 min
- Nachystat si PVDF membránu (poréznost 0,2  $\mu\text{m}$  Immun-Blot® PVDF Membrane (BIO-RAD)):  
ustříhnout membránu ve velikosti odpovídající velikosti dělicího gelu, opatrně pinzetou ji přenést do vaničky s methanolem a chvíli s ní třepat (kvůli smáčivosti membrány), poté přenést membránu pinzetou do vody a nechat na kývačce po dobu cca 5-10 min (tento krok slouží k ověření smáčivosti membrány) a následně membránu přenést do blotovacího roztoku a na třepačce inkubovat cca 30 min
- Nachystat si 6 ks filtračního papíru (Whattmann® 3MM) na jeden gel, jednotlivě všechny namočit v blotovacím roztoku

„Semi-dry“:

- Na blotovací přístroj naskládat tři filtrační papíry, dělicí gel, PVDF (polyvinylchlorid) membránu a opět tři filtrační papíry
- Zapojit do zdroje napětí: 200 mA, 20 V, 80 min

„wet“:

- Do blotovacího přístroje opět vložit „sendvič“ (3x filtrační papír, dělicí gel, PVDF membrána, 3x filtrační papír), spolu s chladicí vložkou a magnetickým míchátkem
- Aparaturu dolít po rysku blotovacím roztokem a postavit na míchačku
- Zapojit zdroj napětí: 100 V, 60 min

Dále už je postup obou metod stejný.

- Rozebrat blotovací přístroj, tužkou označit stranu membrány, na které jsou proteiny
- Gel dát ve vaničce třepat na třepačku na 30 - 50 min do fixačního roztoku
- Membránu ponořit do vaničky s blokovacím roztokem a inkubovat 50 min
- Membránu inkubovat přes noc při 4 °C s primární protilátkou ředěnou v blokovacím roztoku
- Druhý den promýt membránu 4 x 10 min v blokovacím roztoku
- Inkubovat 2 -3 hodiny v sekundární protilátce ředěné v blokovacím roztoku
- Promýt 3x v odmyvacím roztoku
- Analyzovat chemiluminiscenčně

#### 4.2.37 Chemiluminiscenční detekce

- Namíchat vyvolávací roztoky (množství na 3-4 membrány):
  - 1) 4,5 ml ddH<sub>2</sub>O; 0,5 ml 1M Tris-HCl pH 8,5; 3μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - 2) 4,5 ml ddH<sub>2</sub>O; 0,5 ml 1M Tris-HCl pH 8,5; 22 μl kyseliny p-kumarové; 50 μl luminolu
- Těsně před použitím oba roztoky smíchat a ihned nanést na membránu tak, aby byla celá pokrytá
- Membránu vložit do Eurofolie, tlustým fixem označit proteiny standardu molekulových hmotností
- Eurofólii vložit do přístroje ImageQuant<sup>TM</sup> LAS 4000 (GE Healthcare)
- Nastavit chemiluminiscenční režim přístroje pomocí připojeného počítače
- Zvolit režim citlivosti, rozlišení a času snímání s ohledem na intenzitu signálu
- Snímat pozici standardu molekulových hmotností
- Snímky uložit a vyhodnotit

#### 4.2.38 Barvení polyakrylamidových gelů

Barvení probíhalo pomocí *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

Po inkubaci gelu ve fixačním roztoku, gel dále inkubovat přes noc v roztoku *Coomassie Brilliant Blue* na třepačce. Druhý den promývat ddH<sub>2</sub>O na kývačce při pokojové teplotě do odbarvení gelu. Pro jeho uchování vložit do Eurofólie, naskenovat a uložit do počítače (případně vysušit).

#### 4.2.39 Odstranění protilátek z již analyzované Western blot membrány („stripování“)

- Připravit 40 ml stripovacího roztoku (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 + 2,05 % (w/v) SDS + 0,75 % (v/v) β-merkaptoethanolu)
- Inkubovat membránu s roztokem 30 min ve vodní lázni o teplotě 50 °C
- Oplachovat opatrně cca 60 min pod tekoucí vodou
- Oplachovat 2x 10 min v ddH<sub>2</sub>O
- Inkubovat v cca 50 min v blokovacím roztoku
- Dále pokračovat metodu Western blot inkubováním přes noc v primární protilátce.

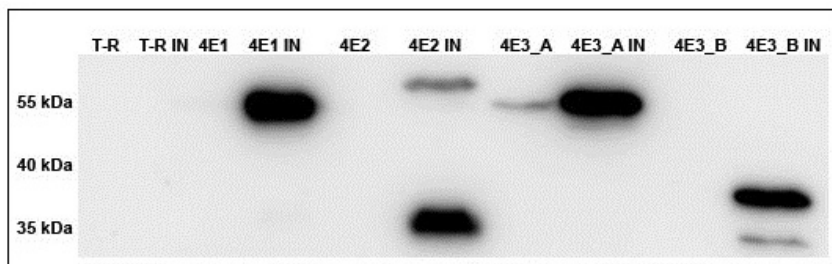
## 5 Výsledky

### 5.1 Ověření množství endogenních a nadprodukovaných eIF4E proteinů a jejich mRNA.

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, zda nadprodukce eIF4E proteinů ve stabilních inducibilních liniích Hek293 Flp-In T-REX pomocí tetracyklinu funguje a může tedy být použit pro další experimenty. Následně jsem chtěla zjistit rozdíl mezi množstvím endogenní a nadprodukované mRNA jednotlivých *eIF4E* v těchto buňkách.

Pro přehlednost budu dále v této práci jednotlivé buňky Hek293 Flp-In T-REX označovat jako GFP-eIF4E1, GFP-eIF4E2, GFP-eIF4E3\_A a GFP-eIF4E3\_B. Hek293 Flp-In T-REX bez vloženého inzertu ve FRT místě budu označovat pouze jako T-REX. K názvu buněk kultivovaných v přítomnosti tetracyklinu bude vždy připojena přípona „IN“.

Nejprve jsem tedy pasážovala buňky vždy s přidavkem a zároveň bez přidání tetracyklinu v koncentraci 1 µg/µl po dobu 48 hodin a následně jsem v buněčných lyzátech detekovala příslušné eIF4E proteiny. To jsem uskutečnila metodou Western blot s primární protilátkou proti GFP, jelikož stabilní linie nesly GFP-eIF4E konstrukty (4.2.26). Podařilo se mi ověřit, že indukce tetracyklinem skutečně vede k výrazné produkci proteinů eIF4E a současně, že zvolené kultivační podmínky nevedou k náhodné kontaminaci tetracyklinem, například z telecího séra (**Obrázek12**).

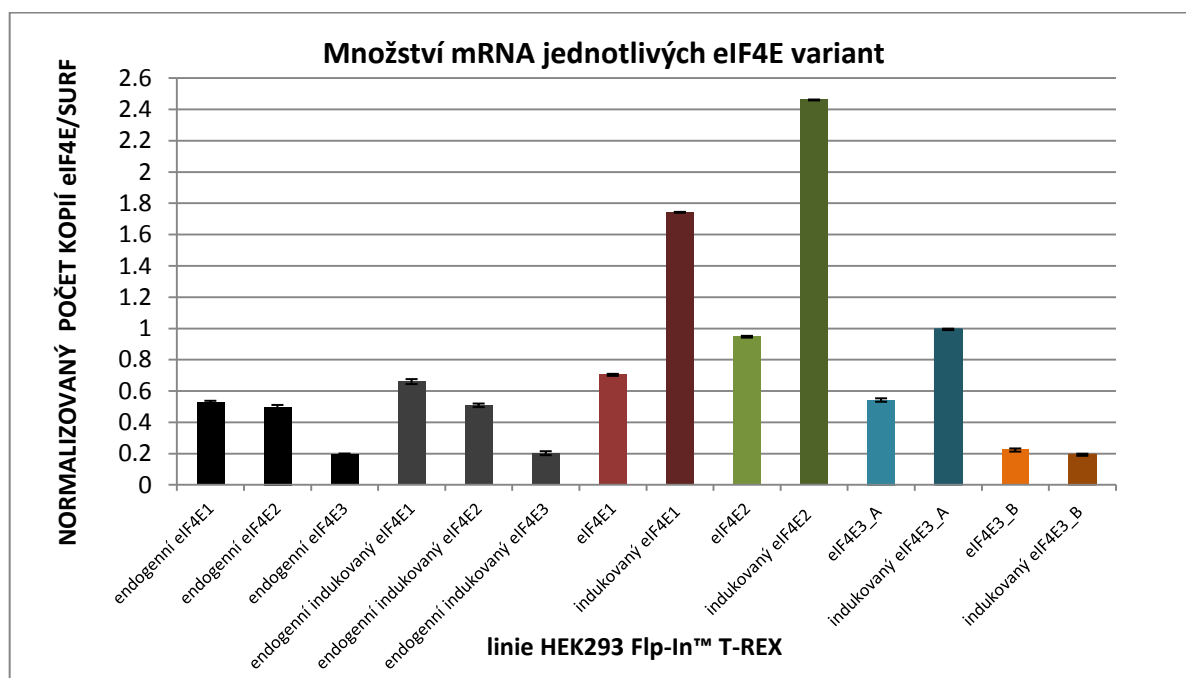


**Obrázek 12: Western blot s (ne)indukovanými proteiny**

Na obrázku jsou postupně zobrazeny oblasti, kde byly naneseny vzorky, vždy nejdříve bez indukce a následně po indukci tetracyklinem. V prvních dvou řadách je negativní kontrola ve formě T-REX linie, která nenesou konstrukty, jež by bylo možné indukovat, a tudíž by neměla exprimovat GFP ani v případě jejich indukce tetracyklinem. Následuje GFP-eIF4E1, GFP-eIF4E2, GFP-eIF4E3\_A a GFP-eIF4E3\_B. IN značí indukovanou variantu vzorku. Vlevo je zobrazena velikost jednotlivých proužků. GFP-eIF4E2 kromě proteinu o předpokládané délce vykazovalo silný pruh kolem 35 kDa, pravděpodobně z důvodu rozpadu proteinu. U GFP-eIF4E3\_A bez indukce je patrný slabý proužek, který zde vznikl přelitím části vzorku ze sousední jamky.



Druhým cílem bylo zjistit množství mRNA pro eIF4E proteiny v buňkách, které byly použity pro výše popsany Western blot pomocí real-time PCR. Nejprve jsem z buněk izolovala RNA (4.2.29) a poté jsem provedla reverzní transkripci (4.2.32) za účelem vytvoření cDNA, která byla použita pro PCR reakci. K určování hladiny transkriptů jsem použila přístroj LightCycler<sup>®</sup>480, který k této metodě v laboratoři používáme a amplifikační protokol pro detekci *eIF4E* mRNA pro něj byl již optimalizován. Jako referenční gen jsem zvolila gen *surf*. U všech genů *eIF4E* a *surf* jsem zhotovila standartní ředící řady, pro zjištění počtu kopií. Jako templát byly použity pCR<sup>®</sup>4 TOPO<sup>®</sup> vektory s vloženými amplikony. Použité primery byly navrženy v naší laboratoři již dříve. K detekci jsem použila systém TaqMan sond (4.1.12). Získané Cp hodnoty pro *eIF4E* mRNA a *surf* byly převedeny na počet kopií a poté spolu vyděleny, abych získala normalizovaný počet kopií *eIF4E* (**Obrázek 13**).



**Obrázek 13: Množství mRNA jednotlivých eIF4E variant.**

Na obrázku je zobrazen počet kopií mRNA, který je vždy normalizován k referenčnímu genu *surf*. Černě jsou sloupce, kde množství mRNA odpovídá endogennímu množství v buňkách T-REX. Šedě jsou pak použity jako kontrola tytéž buňky, které byly vystaveny působení tetracyklinu. Barevně jsou buňky HEK293 Flp-In T-REX s vloženými eIF4E konstrukty s GFP. Světlým odstínem je vždy neindukovaná a tmavým indukovaná varianta stejných buněk. Směrodatné odchylky jsou vypočteny z technických triplikátu.

Nejprve jsem chtěla zjistit endogenní množství mRNA pro jednotlivé eIF4E varianty. Přičemž to je téměř stejné jak pro eIF4E, tak pro eIF4E2. Jelikož primery, kterými disponujeme jsou navrženy na obě varianty eIF4E3 zároveň, není možné na úrovni endogenní mRNA měřené v T-REX buňkách jejich množství odlišit. Nicméně eIF4E3 rozhodně není v buňce zastoupen v zanedbatelné míře.

Účinnost indukce byla i zde potvrzena. Dále se ukázalo, že určitá míra indukce probíhá i u buněk, ke kterým nebyl přidán tetracyklin. Výsledek je tedy nutné brát v potaz při porovnávání výsledků indukovaných a neindukovaných linií. Naproti tomu, se eIF4E3\_B nepodařilo indukovat vůbec. Jelikož jsem měla opakované problémy s izolací RNA, nepodařilo se mi již pokus zopakovat. Nemůžeme tak tedy potvrdit, zda k indukci u eIF4E3\_B opravdu nedochází nebo zda se v tomto případě jednalo pouze o technickou chybu. Mírný rozdíl je patrný mezi indukovanou a neindukovanou T-REX linií pro *eIF4E1*. V této linii však k indukci docházet nemůže. Pro přesné výsledky by bylo potřeba experiment minimálně jednou zopakovat.

## 5.2 Křivky umírání měřené pomocí Resazurinu:

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat růstové a fyziologické parametry buněčných kultur po aplikaci inhibitorů Ribavirinu, Rapamycinu a PP-242. Pro tento účel jsme zvolili Resazurin, který je díky aktivitě živých buněk redukován z modré formy na růžovou (vzniká Resofuryl) a monitoruje tak růst buněčných kultur a fyziologický status buněk. Redukci Resazurinu je možné zaznamenávat fluorescenčně nebo spektrofotometricky.

Jelikož jsme tuto chemikálii v laboratoři dříve nepoužívali, bylo nejprve nutné vymyslet návrh experimentu, konkrétně tedy stanovit, po jak dlouhou dobu budeme buňky sledovat, při jakých koncentracích budeme inhibitory k buňkám přidávat a jakým způsobem budeme měřit redukci Resazurinu.

Nejprve jsme provedli rozsáhlou rešerši a na základě literatury a návodů výrobce jednotlivých inhibitorů jsme stanovili koncentrace, které bude vhodné používat (**Tabulka 6**). S těmi jsem provedla optimalizaci na leukemických liniích a předběžné pokusy na buňkách

Hek293 Flp-In T-REX. Jelikož se inhibitory rozpouštěli v DMSO a ke kulturám se přidávaly 1000x naředěné, tak bylo 0,1 % DMSO používáno jako kontrola (Solvent Control).

inhibitor	koncentrace ( $\mu\text{M}$ )				
Ribavirin	1	15	50	100	200
Rapamycin	0,5	1	5	10	20
PP-242	0,5	1	5	10	20

**Tabulka 6: Koncentrace použitých inhibitorů.**

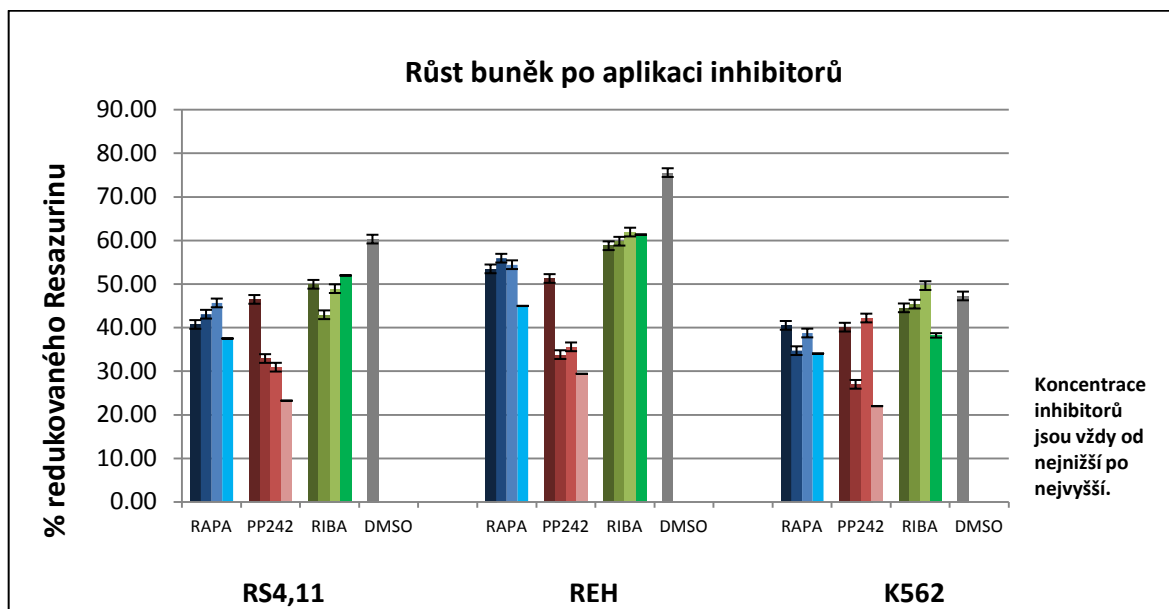
V tabulce jsou uvedeny používané koncentrace inhibitorů v této práci. Červeně jsou ty, které byly dodatečně doplněny u pokusů s adherentními buňkami. Ostatní koncentrace byly použity u leukemických i adherentních buněk.

Zavedení této metody v laboratoři bylo primárně kvůli jejímu využití při studiu leukemických buněčných linií. Z tohoto důvodu jsem na nich provedla pilotní experimenty.

Ze začátku jsme výsledky měřili spektrofotometricky. Buňky leukemických linií jsem vždy spočítala pomocí Bürkerovy komůrky a naředila na množství 1 milion buněk na 1 mililitr média.

Poté jsem je kultivovala v 96 jamkové destičce se čtyřmi koncentracemi inhibitorů (**Tabulka 6**) po dobu 24 hodin a po této době k nim přidala Resazurin. Měření probíhalo v triplicátech pro jednotlivé koncentrace inhibitorů. Redukci Resazurinu jsem měřila po 3 a poté 4 hodinách a nakonec následující den (cca 16 hodin).

Zjistili jsme, že nejlepší doba odečítání výsledků je po 4 hodinách, jelikož po 3 hodinách nebyly rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi dostatečně patrné a po 16 hodinách došlo ke sjednocení výsledků ve všech jamkách destičky nezávisle na typu buněčné kultury a inhibitoru. Nejúčinnějším inhibitorem u všech testovaných buněk byl PP-242, Rapamycin ani Ribavirin nevykazovali na růst kultur velký vliv. Jelikož práce s leukemickými liniemi nebyla předmětem této diplomové práce, jsou níže pro ilustraci uvedeny výsledky pouze z jednoho měření (**Obrázek 14**). Z toho důvodu nejsou v metodách popsány podmínky a postup jejich kultivace a buněčné linie nejsou uvedeny ani v seznamu materiálu.



**Obrázek 14: Růst buněk po aplikaci inhibitorů.**

Obrázek zobrazuje tři leukemické linie RS4,11 (akutní lymfoblastická leukémie); REH (akutní lymfoblastická leukémie) a K562 (chronická myeloidní leukémie, fúze BCR-ABL1) a jejich růst po působení třemi druhy inhibitorů (Rapamycin, PP-242, Ribavirin) ve čtyřech koncentracích. Jednotlivé koncentrace jsou vždy uspořádány od nejnižší po nejvyšší používanou (**Tabulka 6**). Jako kontrola bylo zvoleno 0,1% DMSO. Na ose y jsou procenta redukovaného Resazurinu, čím více procent, tím je v suspenzi více živých buněk. Směrodatné odchylky jsou počítány z triplicátů.

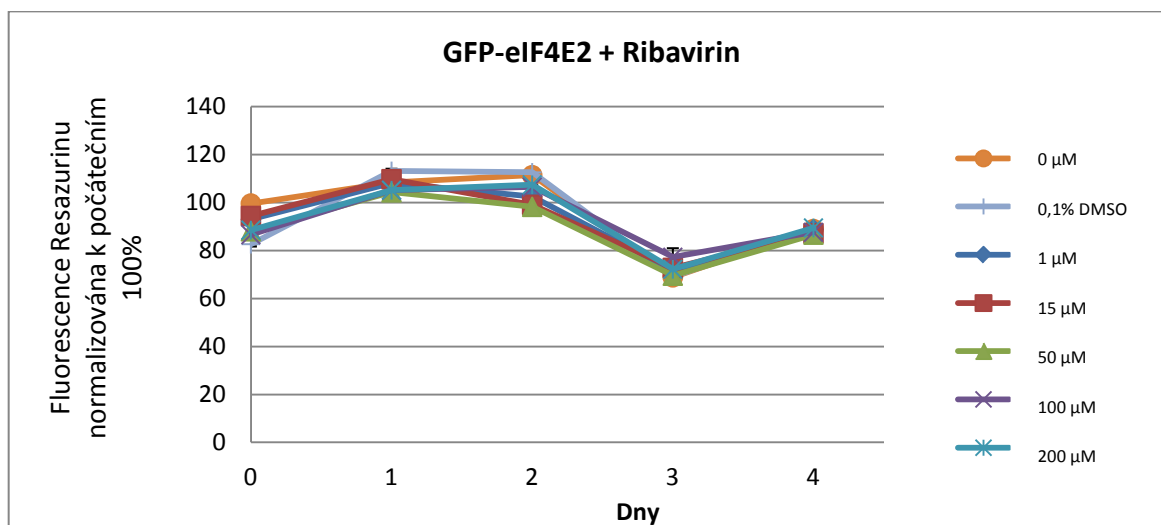
Následně bylo nutné metodiku přepracovat pro použití inducibilní buněčné linie Hek293 Flp-In T-REX s eIF4E konstrukty, které nesly N-terminální GFP fúzi. Tyto buňky byly pasážovány ve dvou variantách, indukované tetracyklinem, a tudíž exprimující příslušné proteiny, a bez indukce, tudíž s endogenním množstvím proteinů. Mým záměrem bylo porovnat, jak na inhibitory reagují linie, u kterých byla pomocí tetracyklinu vyvolána exprese jednotlivých eIF4E proteinů. Chtěli jsme též porovnat indukované a neindukované buňky se stejným eIF4E proteinem a také eIF4E varianty mezi sebou.

Hlavním rozdílem, a také kamenem úrazu byl fakt, že tyto buňky jsou, na rozdíl od leukemických, adherentní. Nedají se tedy přesně spočítat pomocí Bürkerovy komůrky a počítání po trypsinizaci není v tomto případě vhodné. Po několika pokusech jsem došla k finálnímu řešení, tedy že buňky po pasáži nechám dva dny růst a poté začnu provádět měření. Tím jsem dosáhla vždy přibližně stejné konfluencí (cca 50 – 60%).

Další modifikací bylo prodloužení doby působení inhibitorů a počet jejich koncentrací. Na rozdíl od pokusu s leukemickými liniemi jsem nyní sledovala buňky po dobu pěti dní (první den bez inhibitoru a následující 4 dny s inhibitory) a každý den jsem prováděla měření po 4 hodinách inkubace s Resazurinem. Výsledkem jsou tedy křivky umírání. Počet koncentrací jednotlivých inhibitorů jsme zvýšili ze čtyř na pět (**Tabulka 6**), což nám umožnilo přesnější stanovení hodnoty IC50. Ta udává dávku léčiva s 50% vlivem na testovaný materiál, v našem případě dávku, která zabije 50 % buněk a vypočítává se právě z křivek umírání.

Rozhodli jsme se, že výsledky tohoto experimentu budeme měřit fluorescenčně na přístroji VarioScan (ThermoFischer Scientific), z důvodu lepší manipulace s naměřenými hodnotami. Zde nastal další problém, jelikož destičky na tento typ měření jsou celé černé a nebylo by tak možné ověřovat konfluenci buněk pomocí světelného mikroskopu. Navrhla jsem tedy systém, kdy jsem buňky vysela na 24 jamkovou destičku v duplikátu, celý postup aplikace inhibitorů a Resazurinu provedla na těchto destičkách a po uplynutí inkubace s Resazurinem jsem z každé jamky pipetovala ještě technický triplikát na 96 jamkovou černou destičku. Z každého měření tedy vyšlo 6 hodnot k jednomu vzorku. Takto jsem celý pokus opakovala u linií GFP-eIF4E2, GFP-eIF4E3\_A a GFP-eIF4E3\_B třikrát, u T-REX dvakrát a u GFP-eIF4E1 z časových důvodů již pouze jednou (eIF4E1 jsem netestovala na Ribavirin). Jako kontrolu jsem použila buňky bez inhibitorů a buňky s 0,1% DMSO. Pro určení pozadí a následnou normalizaci bylo vždy měřeno také samostatné médium.

Nezávislé opakování jednotlivých experimentů by mělo v ideálním případě přinést stejné výsledky. Kvůli výše zmíněným problémům s počítáním buněk tomu tak vždy bohužel nebylo. Jednotné výsledky vykazovalo pouze působení Ribavirinem, který neměl žádný efekt na růst buněk, a to u všech testovaných buněčných linií (**Obrázek 15**). Tento výsledek byl ve shodě s výsledky z leukemických linií. Z tohoto důvodu jsem u něj nepočítala IC50.



**Obrázek 15: Křivka umírání linie GFP-eIF4E2 po působení Ribavirinu.**

Na obrázku je znázorněna křivka umírání zaznamenávaná v průběhu pěti dní pro buněčnou linii eIF4E2-GFP po působení Ribavirinem, data jsou sloučena ze tří opakování. Jednotlivé křivky odpovídají pěti koncentracím Ribavirinu a dvěma kontrolám. Data jsou normalizovaná k počátečním 100 % po odečtení fluorescence samotného média. Měření probíhalo 5 dnů, přičemž den 0 je bez přidání Ribavirinu. Stejný průběh měly i křivky ostatních linií. Směrodatné odchylky jsou vypočteny ze všech opakování.

U výsledků, kde byly rozdíly největší nebo v daném pokusu nereagovaly buňky na inhibitor, jsem IC<sub>50</sub> počítala z těch, které reagovali nejlépe. Tam, kde to naopak možné bylo, jsem sloučila všechna získaná data. V ideálním případě by se hodnota IC<sub>50</sub> měla pohybovat v rozmezí koncentrací inhibitorů, které jsem použila. U některých linií, které nevykazovaly téměř žádnou reakci na jejich působení, dosahovala tato hodnota velice vysokých čísel a vysoké směrodatné odchylky (**Tabulka 7**). Pro přehlednost jsem vytvořila také graf (**Obrázek 16**) do kterého jsem zanesla jen ty hodnoty, kde byl pozorován prokazatelný vliv inhibitoru. IC<sub>50</sub> jsem určila pro 96 hodin, jelikož po této době byl patrný u většiny linií největší nebo alespoň nějaký vliv inhibitorů. U linií GFP-eIF4E1 reagovaly buňky na inhibitory nejdříve, proto jsem u nich IC<sub>50</sub> počítala také po 48 a 72 hodinách (**Obrázek 17**).

Zajímalo nás, zda a jak se od sebe liší indukované a neindukované linie. Při prvním pohledu na růstové křivky se zdálo, že zde žádný rozdíl není, avšak po vypočtení hodnoty IC<sub>50</sub> se ukázalo, že u PP-242 jsou neindukované varianty buněk u všech linií po 96 hodinách citlivější. Největší rozdíl byl u GFP-eIF4E2, kde u indukovaných buněk bylo IC<sub>50</sub> nejvyšší ze všech měřených buněčných linií.

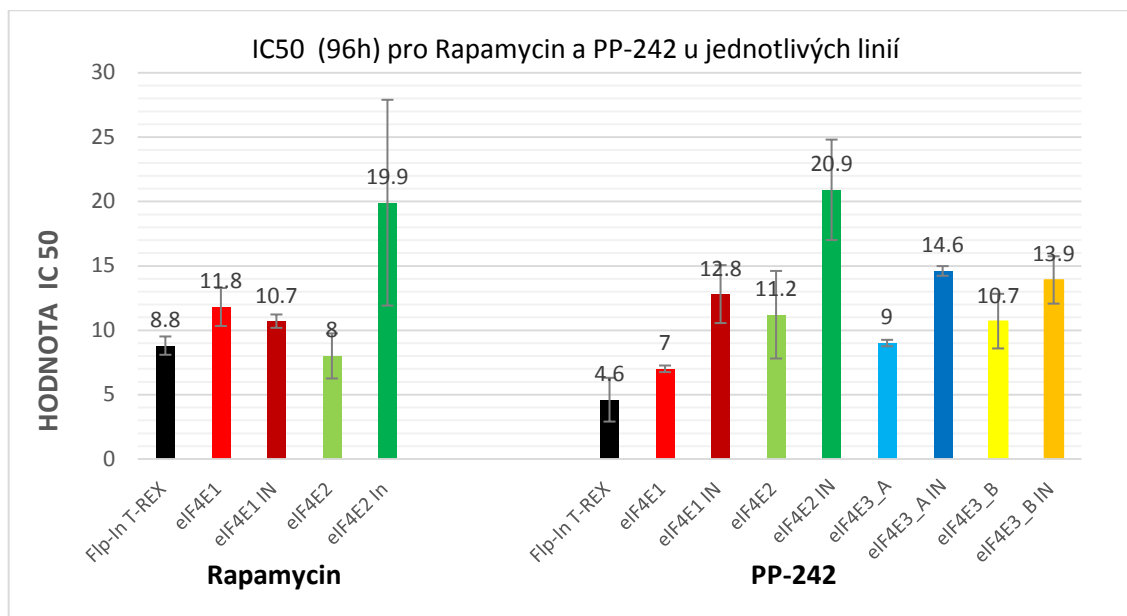
PP-242 byl jediný inhibitor, na jehož působení reagovaly všechny buněčné linie. Při porovnání IC<sub>50</sub> v časech 48, 72 a 96 hodin u GFP-eIF4E1 se však ukázalo, že rozdíly mezi indukovanou a neindukovanou variantou tolik patrné nejsou. Pravděpodobně se tedy tato rozdílná reakce ustanovuje až mezi 72 a 96 hodinami.

Rapamycin vykazoval u buněk T-REX, a obou variant GFP-eIF4E1 a GFP-eIF4E2 výsledky pouze ve dvou nejvyšších koncentracích. Buňky GFP-eIF4E3\_A a GFP-eIF4E3\_B (indukované i neindukované) na něj nereagovaly vůbec, dokonce ve dvou opakováních ze tří rostly lépe než buňky bez inhibitoru (**Obrázek 18**). Jelikož se většina hodnot IC<sub>50</sub> pohybuje okolo 10 – 20  $\mu$ l, vybrala jsem tyto dvě koncentrace a porovnála růstové křivky všech linií (**Obrázek 19**). Jejich průběh potvrzuje výsledky získané pomocí výpočtu IC<sub>50</sub>, tedy, že nejméně rostly buňky, GFP-eIF4E1. Je na nich patrné střídání křivek indukované a neindukované varianty během experimentu, které ukázal výpočet IC<sub>50</sub>. Nejlépe rostly indukované buňky GFP-eIF4E2. Zároveň všechny linie s vloženými *eIF4E* geny rostou lépe než T-REX buňky. Tento výsledek, a také skutečnost, že nebyly očekávané rozdíly mezi indukovanou a neindukovanou variantou téže linie, by se dal vysvětlit stopovou kontaminací neindukovaných buněk tetracyklinem, který může být obsažen například v séru.

Buněčná linie	Rapamycin		PP-242	
	IC50 (μM) (96 hodin)	Směrodatná odchylka (μM)	IC50 (μM) (96 hodin)	Směrodatná odchylka (μM)
T-REX	8,7	0,7	4,6	1,7
eIF4E1	11,8	1,4	7,0	0,3
eIF4E1 IN	10,7	0,5	12,8	2,3
eIF4E2	8,0	1,75	11,2	3,4
eIF4E2 IN	19,9	7,9	20,9	3,9
eIF4E3_A	164,9	134,4	9,0	0,3
eIF4E3_A IN	365,4	420,6	14,6	0,4
eIF4E3_B	428,9	629,5	10,7	2,1
eIF4E3_B IN	276,2	200,5	13,9	1,84

**Tabulka 7: Hodnoty IC50 po 96 hodinách pro všechny linie u Rapamycinu a PP-242.**

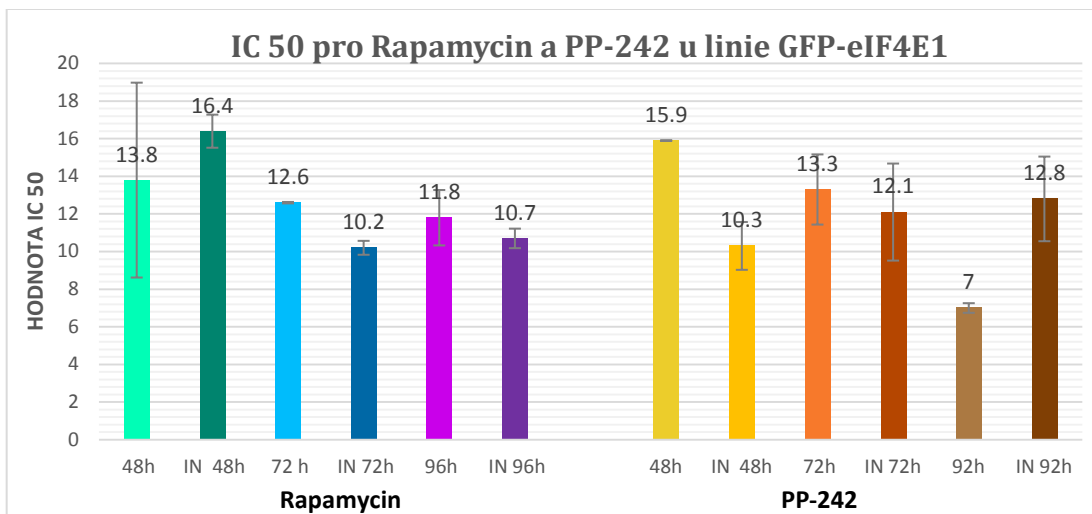
Tabulka zobrazuje hodnoty IC50. U buněk, které nereagovali na Rapamycin byla data nehodnotitelná (červeně).



**Obrázek 16: Hodnoty IC50 spočítané pro Rapamycin a PP-242 po 96 hodinách.**

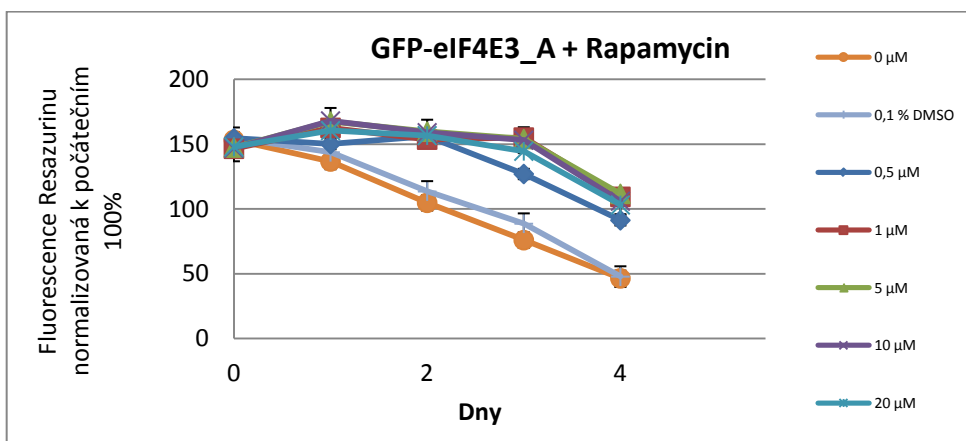
Na obrázku jsou hodnoty IC50 po 96 hodinách působení inhibitorů. Je zde patrné, že indukovaná exprese příslušného eIF4E proteinu vykazuje vyšší IC50 pro PP-242, než neindukovaná korespondující linie. Všechny neindukované buňky jsou odolnější než T-REX. U Rapamycinu už takto jednoznačné výsledky nejsou. Směrodatné odchylky jsou vypočteny ze všech biologických opakování.





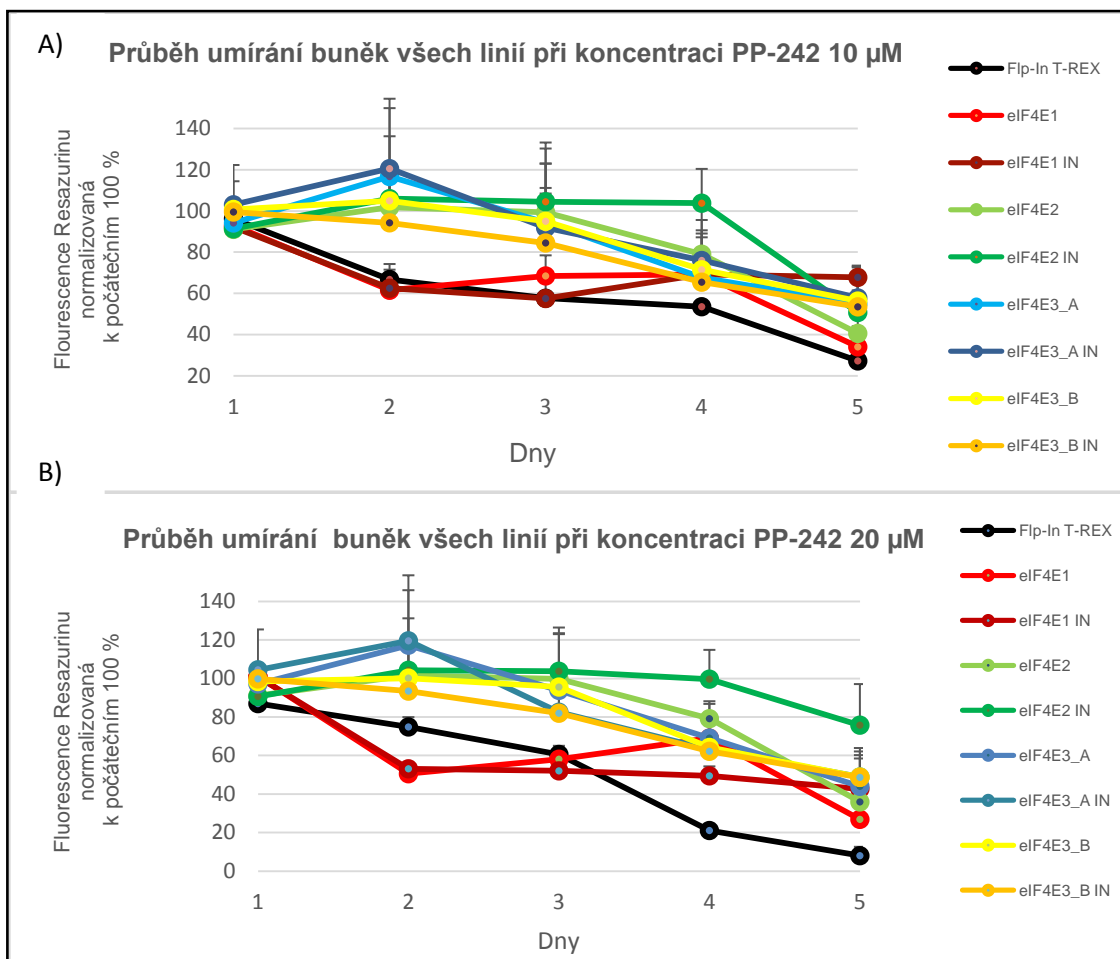
**Obrázek 17: Hodnoty IC<sub>50</sub> spočítané pro Rapamycin a PP-242 u eIF4E1.**

Na obrázku jsou hodnoty IC<sub>50</sub> po 48, 72 a 96 hodinách působení inhibitorů. Je zřejmé, že trend pozorovaný na **Obrázku 16**, tedy vyšší citlivost na PP-242 u indukované linie, se ustanovuje až po 96 hodinách působení. Do té doby jsou výsledky indukovaných a neindukovaných buněk spíše opačné. Rapamycin opět vykazuje nejasné výsledky. Směrodatné odchylky jsou vypočteny ze všech biologických opakování.



**Obrázek 18: Křivka umírání linie eIF4E3A-GFP po působení Rapamycinu.**

Na obrázku je znázorněna křivka umírání zaznamenávaná v průběhu pěti dní pro buněčnou linii Hek293 Flp-In T-REX GFP-eIF4E3A po působení Rapamycinem, data jsou sloučena ze dvou opakování. Jednotlivé křivky odpovídají pěti koncentracím Rapamycinu a dvěma kontrolám. Data jsou normalizovaná k počátečním 100 % po odečtení fluorescence samotného média. Měření probíhalo 5 dnů. Den 0 je bez přidání Rapamycinu. Směrodatné odchylky jsou vypočteny ze dvou nezávislých opakování, tedy ze 4 grafů.



**Obrázek 19: Růst linií při 10 $\mu$ M (A) a 20 $\mu$ M (B) koncentraci PP-242.**

V grafech A) a B) je zobrazen průběh růstových křivek po dobu pěti dnů při 10 $\mu$ M a 20 $\mu$ M koncentracích PP-242. Linie T-REX rostla nejhůře, následovány oběma variantami linie eIF4E1. Nejlépe se daří kultuře eIF4E2. Směrodatné odchylky jsou vypočteny ze všech opakování jednotlivých pokusů.

Experiment ukázal, že Ribavirin při zvolených koncentracích nijak neovlivňuje růst mnou testovaných buněčných linií. Rapamycin jednoznačně ovlivňoval růst T-REX a obou variant GFP-eIF4E1. Jeho vliv byl u těchto buněk patrný již druhý den po přidání inhibitorů. GFP-eIF4E2 vykazovaly odpověď jen na dvě nejvyšší koncentrace Rapamycinu a to vždy až mezi třetím a čtvrtým dnem experimentu. GFP-eIF4E3\_A a GFP-eIF4E3\_B po aplikaci všech koncentrací Rapamycinu rostly lépe než kontrolní buňky. Jediným inhibitorem, který měl vliv na růst všech buněk byl PP-242. U něj byl po 96 hodinách zaznamenán rozdíl mezi indukovanými a neindukovanými buňkami, přičemž indukované snesly vyšší dávky PP-242. V porovnání jednotlivých linií rostly nejlépe GFP-eIF4E2 IN a nejhůře obě varianty GFP-eIF4E1.

### 5.3 Analýza polyzomálních profilů pomocí metody Western blot

Mým úkolem bylo zpracovat vzorky z polyzomálních profilů, které provedl můj školitel, pomocí metody Western blot. Frakcionace byla provedena s inducibilní stabilní buněčnou linií Hek293 Flp-In T-REX, která exprimovala GFP-eIF4E1 (N-terminální fúze). Zároveň byla provedena frakcionace se stejnou buněčnou linií, která exprimovala pouze GFP. Polyzomální analýza byla provedena při čtyřech různých koncentracích KCl v sacharózovém gradientu pro každou linii. Konkrétně se jednalo o koncentrace 62,5mM, 100mM, 140mM a 200mM koncentraci KCl. Při každé koncentraci byl detekován konstrukt GFP-eIF4E1 a samotné GFP. Frakcí bylo odebráno 10 až 11 po 0,5 ml. Pro Western blot bylo použito prvních 9 frakcí.

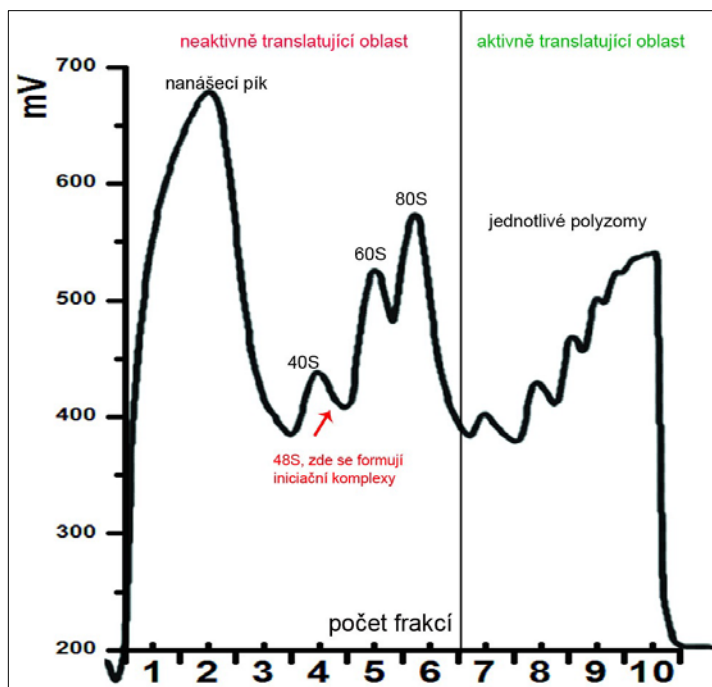
Se vzorky připravenými podle protokolu 4.2.35 jsem provedla Western blot (4.2.36), kde jsem použila následující protilátky: u vzorků, kde byl nadprodukován fúzní protein GFP-eIF4E1, jsem použila jako primární protilátku anti-eIF4E1, u vzorků s nadprodukováným proteinem GFP, jsem nejprve provedla detekci pomocí protilátky anti-eIF4E1 a následně membrány „stripovala“ a provedla stanovení samotného GFP, kde jsem jako primární protilátku použila anti-GFP.

Cílem pokusů bylo nejprve optimalizovat podmínky, při kterých bude vhodné provádět detekci GFP-eIF4E1 a eIF4E1 v pozdějších experimentech. Konkrétně se jednalo o zjištění vhodné koncentrace KCl v gradientu, aby nedocházelo k nespecifické asociaci detekovaných proteinů s translačními komplexy. Koncentrace KCl v tomto případě slouží jako jeden z parametrů ovlivňujících rozložení analyzovaných bílkovin v polyzomálních profilech.

Druhým cílem bylo zjistit, zda při expresi GFP-eIF4E1 nedochází k navázání na translační komplexy pouze prostřednictvím GFP části proteinu.

Zatřetí jsme se pokusili zjistit, jak ovlivňuje N-terminální fúze vlastnosti eIF4E1 jako translačního iniciačního faktoru, jinými slovy, zda bude jeho distribuce v polyzomálním profilu porovnatelná s endogenním proteinem.

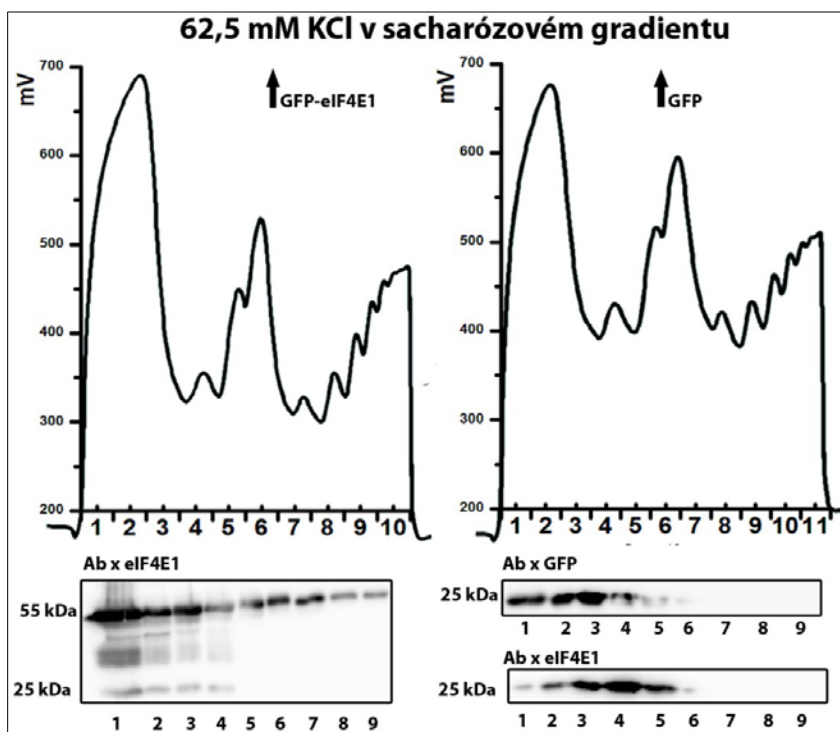
Závěrem tedy lze konstatovat, že níže popisované pokusy měly za úkol ověřit, zda GFP fúze neovlivňuje vlastnosti eIF4E1 proteinu. V případě, že by k ovlivnění docházelo, jsem připravila druhou variantu fúzního proteinu, založenou na použití C-koncové fúze eIF4E1 s FLAG epitopem (popsáno v kapitole 5.3).



**Obrázek 20: Polyzomální profil**

Průběh polyzomálního profilu s vyznačením jednotlivých frakcí a popisem jednotlivých píků. Šipka označuje místo, kde dochází ke zformování iniciačních komplexů (48S). Svislá čára odděluje „netranslatující“ část profilu od aktivně translatující (zde jsou polyzomy). Na ose X je zobrazen počet jednotlivých frakcí a to, jakou část profilu reprezentují. Na ose y je uvedeno napětí, které koresponduje s absorbcí jednotlivých frakcí.

Na obrázku (**Obrázek 20**) je zobrazen vzorový průběh polyzomální frakcionace. Frakce 1. – 6. se považuje za „netranslatující“ část profilu. Je zde zobrazen nanášecí pik, dále frakce obsahující malou podjednotku ribozomu (40S), velkou podjednotku ribozomu (60S) a složený ribozom (80S). Šipkou je vyznačena oblast, které zhruba odpovídá poloze 48S iniciačních komplexů. Část vymezená frakcemi 7-10 představuje translatující oblast a odpovídá různě velkým polyzomům.

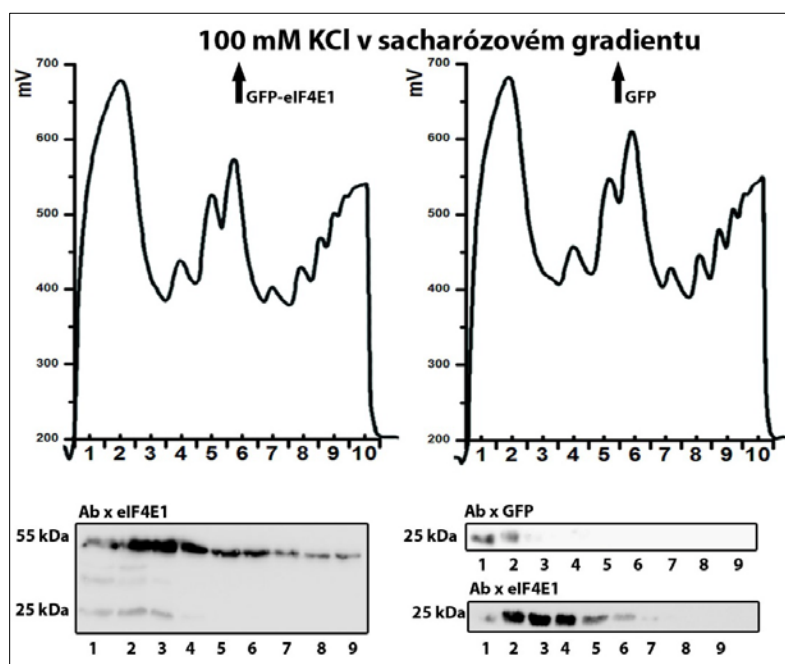


**Obrázek 21: 65,2 mM koncentrace KCl v sacharózovém gradientu – polyzomální profil a Western blot.**

Na levé polovině obrázku je polyzomální profil z buněk s exprimovaným GFP-eIF4E1. Na obrázku Western blotu jsou patrné proužky o velikosti 55 kDa, což odpovídá GFP-eIF4E1, a o velikosti 25 kDa, což odpovídá velikosti endogenního eIF4E1 proteinu. V pravé části obrázku je polyzomální profil z buněk exprimujících GFP. Pod ním jsou fotky ze dvou samostatných Western blotů. Horní fotka představuje detekci GFP, velikost odpovídá velikosti proteinu, spodní fotka je detekce endogenního eIF4E1, velikost opět odpovídá. Všechna čísla označují jednotlivé frakce. Všechny následující obrázky (**Obrázek 22, 23 a 24**) mají stejné uspořádání.

Při 62,5mM koncentraci KCl (**Obrázek 21**) je patrná přítomnost proteinu GFP-eIF4E1 (55 kDa) ve všech testovaných frakcích, jejich intenzita zhruba odpovídá velikosti příslušných píků polyzomálního profilu. Ve frakci 1 – 3 je intenzivní (nanášecí pík), poté signál klesá a v oblasti tvoření 80S ribozomu je již signál opět silný. Se zvyšujícím se množstvím mRNA na ribozomu signál opět postupně klesá. V oblasti 25 kDa je patrný pruh ve frakcích 1 až 4. Ty pravděpodobně odpovídají endogennímu eIF4E1 proteinu. Jiným vysvětlením tohoto jevu by mohlo být, že se jedná o štěp z fúzního proteinu, nicméně v tom případě by intenzita proužků v oblasti 25 kDa odpovídala intenzitě odpovídajících proužků v oblasti 55 kDa, což není pravda (např. frakce 7 a 8). Můžeme tedy předpokládat, že proužky, které se objevují v oblasti 25 kDa, jsou opravdu endogenní eIF4E1.

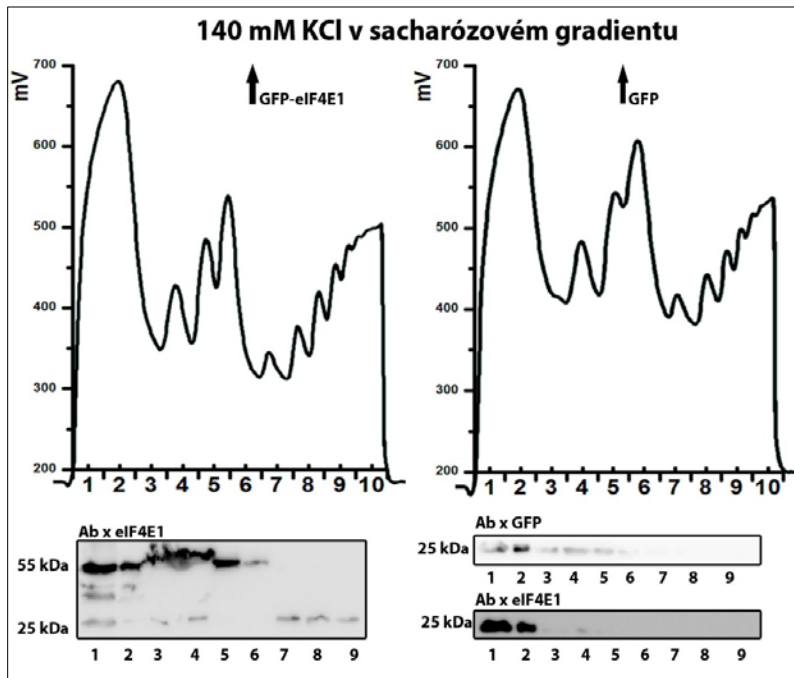
Z tohoto porovnání se zdá, že nadprodukovaný GFP-eIF4E1 vytěsňuje svou endogenní variantu. V situaci, kde je exprimován pouze GFP, je zastoupen pouze ve frakcích, kde ještě neprobíhá aktivní translace, což ukazuje na fakt, že GFP protein nijak zásadně neovlivňuje zastoupení eIF4E1 v polyzomálních profilech. Co se týče endogenního eIF4E1, je v tomto případě vidět, jeho zastoupení ve více frakcích a ve větší intenzitě, než endogenní protein ve vzorku s GFP fúzí. Slabší signál endogenního eIF4E1, u vzorků s nadprodukovaným GFP, je vidět ve frakci 1 a 2, což bylo způsobeno špatnou rozpustností TCA-izolovaných vzorků v nanášecím pufru.



**Obrázek 22:** 100 mM koncentrace KCl v sacharózovém gradientu – polyzomální profil a Western blot.

Uspořádání obrázku je totožné s **Obrázekem 21**.

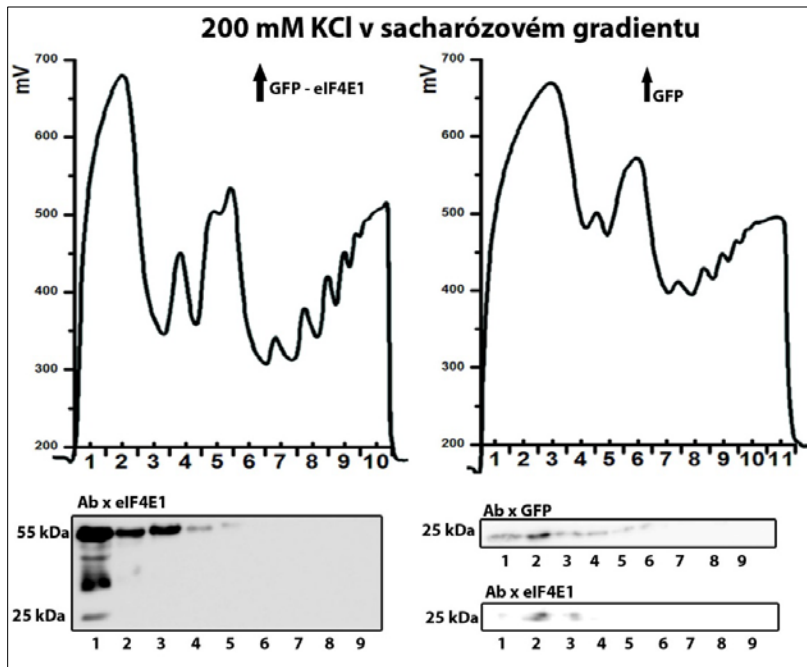
Při 100mM koncentraci KCl (**Obrázek 22**) je opět GFP-eIF4E1 zastoupen ve všech testovaných frakcích, endogenní eIF4E1 je v tomto vzorku přítomno jen ve třech z nich. Opět zde předpokládám, že proužky v oblasti 25 kDa jsou opravdu endogenní eIF4E. GFP je zastoupeno ještě méně u vzorků, kde došlo k nadprodukci samotného GFP (dvě frakce v porovnání až se šesti v případě koncentrace 62,5mM KCl). Endogenní eIF4E1 se zde naopak vyskytuje v o jednu více frakcích než v předchozí koncentraci. Je zde vidět slabší signál v první frakci u GFP vzorků, což je zřejmě opět způsobeno horší rozpustností tohoto vzorku.



**Obrázek 23:** 140 mM koncentrace KCl v sacharózovém gradientu – polyzomální profil a Western blot.

Uspořádání obrázku je totožné s **Obrázkem 21**.

Při 140mM koncentraci KCl (**Obrázek 23**) je již vidět, že distribuce GFP-eIF4E1 nezasahuje do těžkých polyzomů jako v předchozích případech. To je jednoznačný výsledek zvýšené koncentrace soli. Naopak endogenní eIF4E1 je zastoupen dokonce i ve frakcích 7, 8 a 9. Proč však nebyl detekován ve všech frakcích, a proč také nedochází k jeho nižšímu zastoupení jako u GFP-eIF4E1, není jasné. GFP je opět zastoupeno jen ve vzorcích z neaktivní translace. Endogenní eIF4E1 u vzorků s GFP se vyskytuje také v méně frakcích než v předchozích případech, což potvrzuje očekávaný výsledek při vysoké koncentraci KCl. Oproti předchozím koncentracím je rozpad ribozomů již také patrný na samotném průběhu křivky, kde je vidět zvýšené množství malé a velké podjednotky ribozomu vzhledem k 80S ribozomu.



**Obrázek 24.: 200 mM koncentrace KCl v sacharózovém gradientu – polyzomální profil a Western blot.**  
 Uspořádání obrázku je totožné s **Obrázkem 21**.

Při 200mM koncentraci KCl (**Obrázek 24**) je fúzní protein GFP-eIF4E1 zastoupen v ještě méně frakcích než u 140mM KCl. Stejně tak endogenní eIF4E1 je zde zastoupen pouze v prvním vzorku. U nadprodukovaného GFP je toto detekováno opět jen v neaktivní translaci, i když ve více frakcích než u koncentrace 100mM KCl, a ve stejném množství frakcí (6) jako u zbylých koncentrací. Endogenní eIF4E1 je, stejně jako v předchozím případě, detekováno v méně vzorcích. I zde je patrné, že zastoupení samostatných podjednotek ribozomu, se oproti 80S ribozomu, zvyšuje. V případě zvýšeného GFP od sebe píky pro 60S a 80S již nejdou rozpoznat.

Souhrnně tyto výsledky prokazují několik skutečností. V první řadě se dá soudit, že GFP fúze nijak zásadně neovlivňuje zastoupení eIF4E1 v profilech. To je patrné zejména z **Obrázků 21 a 22**, kde je GFP-eIF4E1 fúzní protein ve více frakcích, než samotné GFP. Dále můžeme říci, že nadprodukované GFP-eIF4E1 možná vytěsňuje endogenní eIF4E1 z translačních komplexů. To je patrné na všech vzorcích, jelikož endogenní eIF4E1 je vždy zastoupeno v menším počtu frakcí než fúzní eIF4E1 (kromě nevysvětleného případu koncentrace 140mM KCl), a zároveň je jeho signál vždy slabší. Dalším důkazem této kompetice je větší detekované množství endogenního eIF4E1 ve vzorcích s nadprodukovaným GFP (opět kromě 140mM KCl).



U koncentrací 140mM a 200mM bylo jasně patrné menší zastoupení eIF4E1 ve frakcích oproti dvěma nižším koncentracím. To se nedotklo GFP samotného, což potvrzuje, že nedochází k navázání eIF4E1 na polyzomální profily jen díky přítomnosti GFP. Tomu odpovídaly i průběhy jednotlivých křivek.

Co se týče nejvhodnější koncentrace pro další provedení polyzomálních frakcionací a následných detekcí eIF4E proteinů, tak se jako nejideálnější jeví 100mM koncentrace KCl. Je to především proto, že endogenní eIF4E1 ve vzorcích s GFP je detekováno nejvíce ze všech koncentrací a je zde přítomno v iniciačních komplexech a zároveň je fúzní GFP distribuováno po celém profilu. Experiment by však bylo ideální zopakovat vícekrát, především kvůli nejasným výsledkům u koncentrace 140mM, avšak časová náročnost polyzomální frakcionace neumožnila vytvořit více vzorků a z jedné frakcionace stačilo jeho množství pouze na jeden pokus.

## 5.4 Klonování

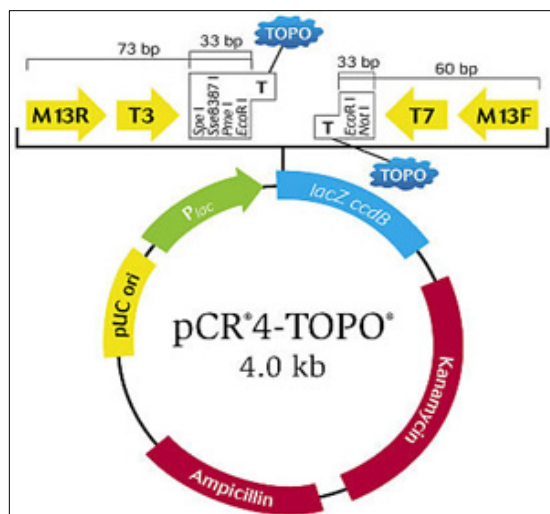
Cílem experimentu bylo vložit jednotlivé zástupce lidských eIF4E genů do vektorů určených pro transientní expresi, a alternativně rekombinaci, do genomu v podobě C-terminalní fúze s FLAG značkou (3xFLAG).

V naší laboratoři máme stabilní buněčné linie, které exprimují eIF4E proteiny a mají N-terminální fúzi v podobě GFP proteinu. Jelikož GFP protein je sám o sobě poměrně velký, potřebovali jsme jako kontrolu k některým experimentům fúzi ve formě menší značky a rozhodli jsme se ji umístit na druhý konec eIF4E proteinů. Jednotlivé inzerty byly vyštěpeny z plazmidů, které jsem obdržela od svého školitele:

- pEGFP\_4E1 → eIF4E1
- pEGFP\_4E2 → eIF4E2
- pEGFP\_4E3-long → eIF4E3\_A
- pEGFP\_4E3 → eIF4E3\_B

Jako vektor pro jednotlivé inzerty sloužil plazmid pcDNA5/FRT-TO 3xFLAG-C SV445, ten jsem izolovala z bakterií (4.2.12). Plazmid SV445 byl naštěpen restričními enzymy NotI a Acc65I po dobu 6 hod, objem reakce byl 40  $\mu$ l (4.2.19). Správnost restrikce jsem poté zkontrolovala elektroforeticky (4.2.18).

Dále jsem provedla PCR jednotlivých pEGFP plazmidů (4.2.15) s použitím klonovacích primerů pro jednotlivé *eIF4E* geny (4.1.12) Tyto primery pro vytvoření fúzí byly nasyntetizovány tak, aby nesly restriční místa Acc65I a NotI. Ta byla, po dvou neúspěšných pokusech s jinými restričními místy, určena jako vhodná pro klonování, ale pEGFP plazmidy je nenesou. Získané PCR produkty jsem ověřila pomocí agarózové elektroforézy (4.2.18) a vložila do pCR<sup>®</sup> 4 TOPO<sup>®</sup> vektoru (Invitrogen) (**Obrázek 25**) (4.2.25).



**Obrázek 25: Vektor pCR4 TOPO™ (Invitrogen).**

PCR produkty jednotlivých eIF4E proteinů byly vloženy do pCR4 TOPO™ vektoru. (Převzato z [www.invitrogen.cz](http://www.invitrogen.cz))

„TOPO klonování“ bylo zvoleno z toho důvodu, že se mi dvakrát nepodařilo PCR amplikony příslušných *eIF4E* genů vložit do vektorového plazmidu přímo. Nicméně nakonec se mi to podařilo u *eIF4E1* a *eIF4E3\_A*. Přesto jsem pro jistotu „TOPO klonování“ provedla u všech *eIF4E* genů. Vytvořila jsem tak plazmidy pCR4 TOPO\_4E1, pCR4 TOPO\_4E2, pCR4 TOPO\_4E3A, pCR4 TOPO\_4E3B.

Ze získané směsi naklonovaných TOPO plazmidů nesoucích *eIF4E2* a *eIF4E3\_B* jsem 3,5 µl vložila elektroporací (4.2.27) do kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue. Ty jsem vysela na misky s ampicilinem. Následující den jsem vybrané kolonie přečárkovala na misky s kamamycinem a z nich opět na misky s ampicilinem. Z jednotlivých klonů jsem tzv. minipreparací (4.2.10) izolovala plazmidovou DNA. Plazmidy jsem ověřila pomocí PCR s klonovacími primery pro příslušné geny (4.2.17) provedla jsem restrikci pomocí EcoRI, NotI a Acc65I (4.2.21) a plazmidy jsem nechala také sekvenovat s použitím primerů T3 a T7 (4.2.26). Všechny tři kroky potvrdily správnost testovaných konstruktů a absenci jakýchkoliv mutací. TOPO plazmidy nesoucí geny *eIF4E2* a *eIF4E3\_B* jsem použila pro klonování výsledných 3xC-FLAG-eIF4E plazmidů.

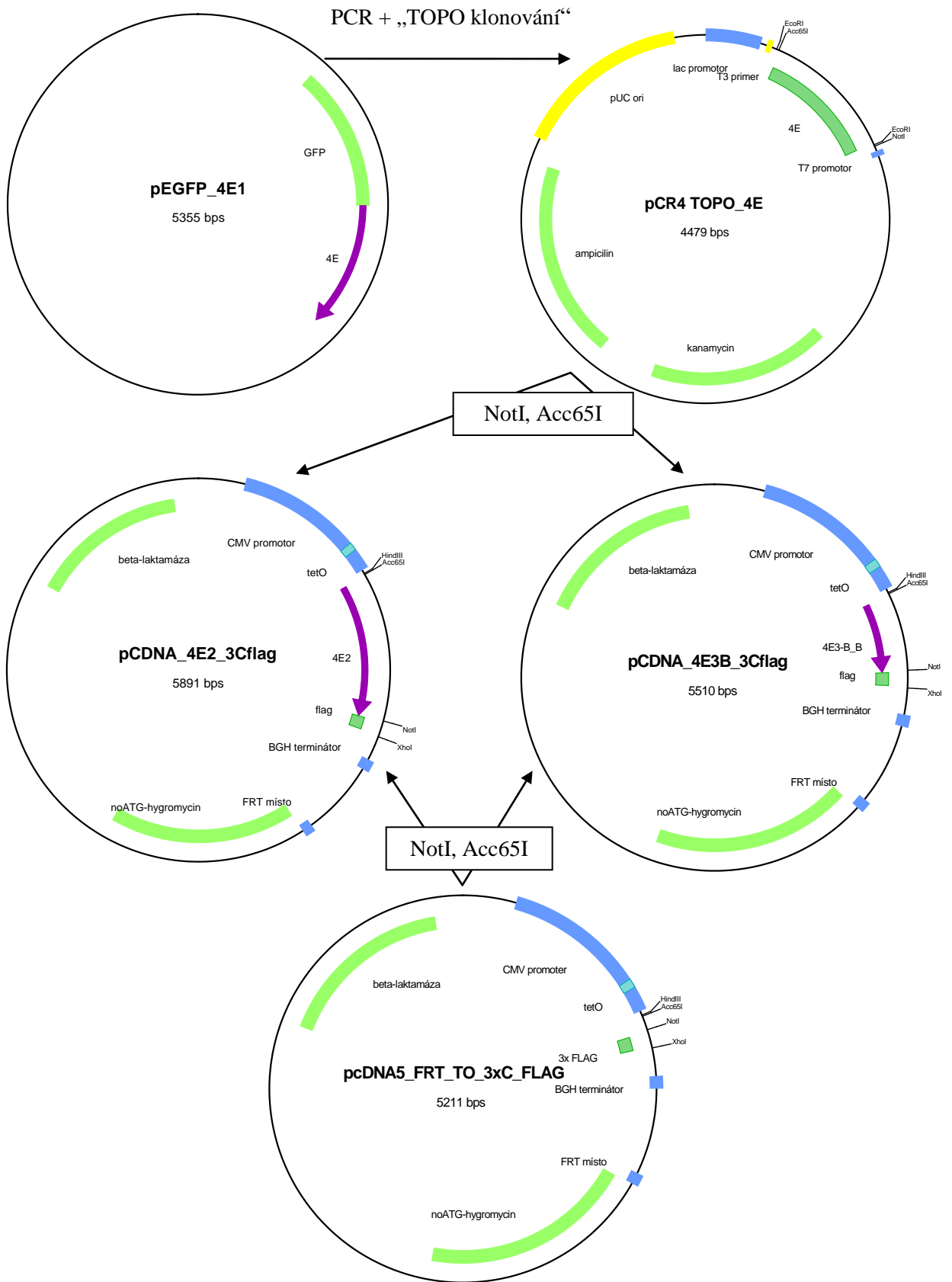
U *eIF4E1* a *eIF4E3\_A* jsem provedla PCR reakci pEGFP\_4E1, pEGFP\_4E2, pEGFP\_4E3-long a pEGFP\_4E3 plazmidů (4.2.15). Produkty PCR reakce jsem přečistila (4.2.24).

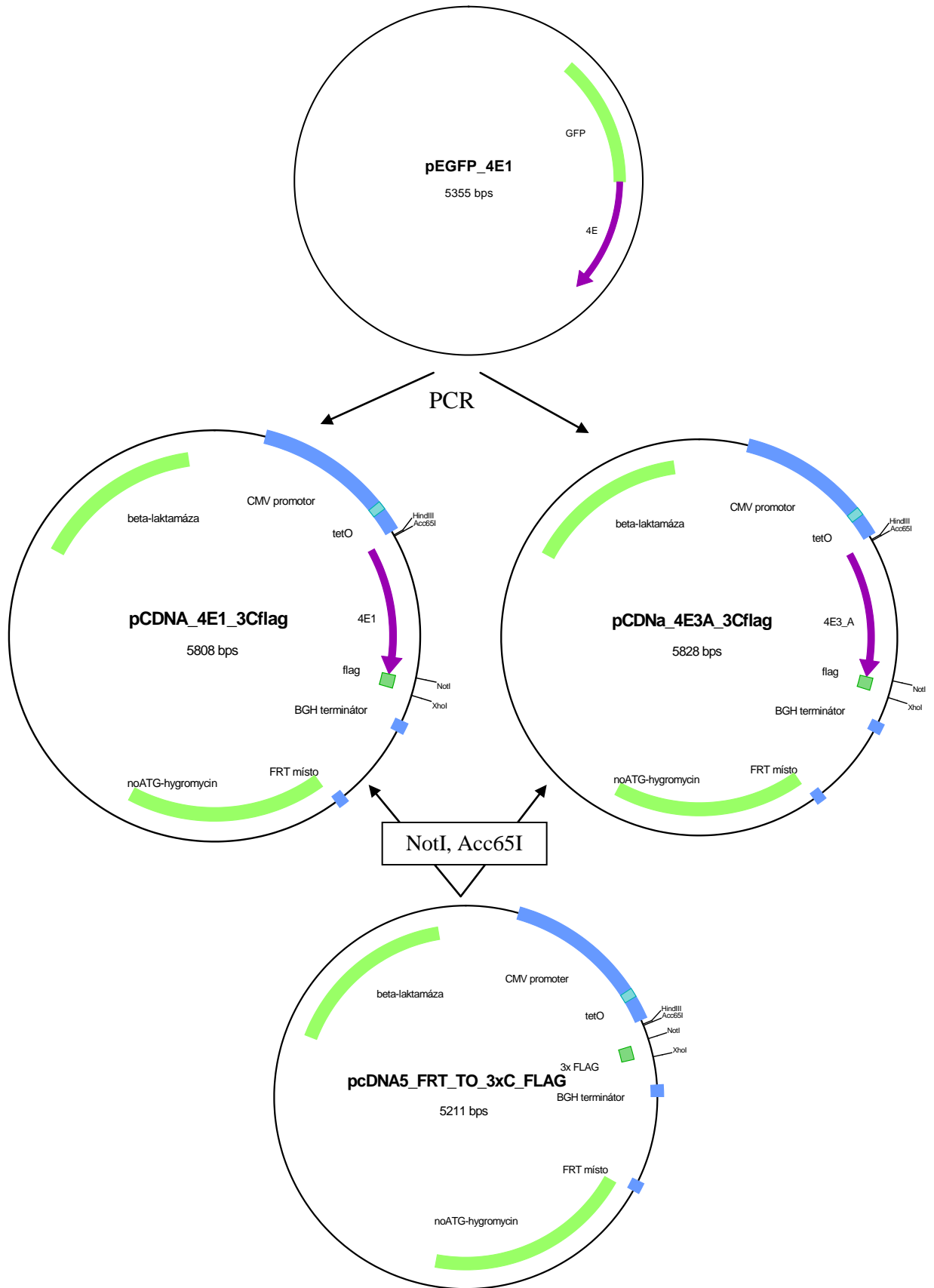
TOPO plazmidy i PCR produkty jsem štěpila restričními enzymy NotI a Acc65I (4.2.19) a celý objem reakce jsem nanasla na agarózový gel. Po proběhnutí elektroforézy jsem produkt vyřezala a izolovala z gelu pomocí komerční soupravy (4.2.24). S takto nachystanými *eIF4E1* a *eIF4E3\_A* inzerty jsem provedla ligaci.

Ligace probíhala 16 hodin při 16 °C (4.2.23). Pro ligaci jsem připravila i negativní kontrolu ve formě naštěpeného prázdného vektoru. Ligační směs jsem vnesla do kompetentních bakterií *E. coli* XL-1 Blue pomocí elektroporace (4.2.27). Bakteriální klony jsem vysela na agarózové plotny s ampicilinovým médiem, u vybraných klonů jsem izolovala plazmid pomocí minipreparace (4.2.10) a provedla ověření pomocí restrikce s restričními enzymy XhoI a HindIII (4.2.21) a pomocí PCR s primery CMV a BGH (4.2.17) Dále používané konstrukty byly sekvenovány (4.2.27). Sekvence potvrdila, že vytvoření jednotlivých vektorů bylo úspěšné (**Obrázek 26**). Z bakteriálních kolonií pozitivních klonů jsem vytvořila zásobní bakteriální konzervy (4.2.29).

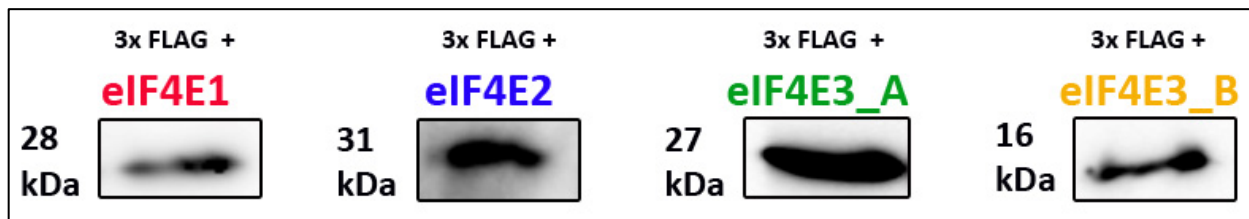
#### **Obrázek 26: Schéma přípravy konstruktů pCDNA\_4E\_3Cflag.**

Na následujících dvou stranách je zobrazeno schéma přípravy konstruktů pCDNA\_4E\_3Cflag. Plazmidy jsou tvořeny kostrou plazmidu pCDNA\_FTR\_TO\_3xC\_FLAG. Plazmidy obsahují jednotlivé *eIF4E* geny, které nesou C-terminální fúzi 3x FLAG. Plazmidy pCDNA\_4E2\_3Cflag a pCDNA\_4E3B\_3Cflag byly vytvořeny pomocí „TOPO klonování“. Nejprve byly plazmidy pEGFP\_4E2 a pEGFP\_4E3 vloženy do vektoru pCR4<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup>, ten byl naštěpen restričními enzymy NotI a Acc65I a ligován spolu s vektorem pCDNA\_FTR\_TO\_3xC\_FLAG, který byl rovněž štěpen pomocí NotI a Acc65I. Druhé schéma zobrazuje přípravu plazmidů pCDNA\_4E1\_3Cflag a pCDNA\_4E3A\_3Cflag. V tomto případě byla provedena PCR plazmidů pEGFP\_4E1 a pEGFP\_4E3-long a opět restrikce pCDNA\_FTR\_TO\_3xC\_FLAG pomocí NotI a Acc65I. Na mapách konstruktů jsou zobrazena ještě restriční místa, která sloužila k ověření správnosti klonování (XhoI, HindIII a EcoRI). Plazmid pEGFP\_4E1 zde slouží jako ilustrační, vždy byl použit plazmid s příslušným *eIF4E* genem. Mapa pEGFP\_4E1 zároveň nese pouze vyznačenou oblast s konstruktem GFP-eIF4E1. Na vektoru pCR4 TOPO\_4E je vyznačen vložený *eIF4E* gen, zde opět pro ilustraci jen jeden s „anonymním“ *eIF4E*. Na mapách plazmidů jsou pro přehlednost zobrazeny jen ty geny a restriční místa, která jsou pro tento experiment a jejich funkčnost důležitá.





Dále jsem chtěla zjistit, zda plasmidy, pokud budou vneseny do buněk, budou produkovat fúzané proteiny eIF4E. Pozitivní bakteriální klony jsem tedy zaočkovala do tekutého média (4.2.1), poté je izolovala (4.2.12) a změřila koncentraci jednotlivých plazmidů (4.2.31). Plasmidy jsem na základě zjištěné koncentrace naředila na koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a transfekovala do buněk HEK293 (4.2.5). Ověření transfekce jsem provedla pomocí metody Western blot s protilátkou anti-FLAG (4.2.35 a 4.2.36) (**Obrázek 27**).



**Obrázek 27: Ověření transfekce pomocí Western blot.**

Na obrázku jsou vidět všechny čtyři eIF4E proteiny ve fúzi s 3x FLAG na C-terminálním konci. Velikost 3x FLAG proteinu je 3 kDa, velikost eIF4E1 je 25 kDa, eIF4E2 je 28,3 kDa, eIF4E3\_A je 24 kDa a eIF4E3\_B je 13 kDa.

Název plazmidu	Vektor/ restrikční enzymy	Původ inzertu/ metoda přípravy/ restrikční enzymy	Metoda ověření	Kódovaný produkt
pCR4TOPO_4E1	pCR4 <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> ( <i>ScaI</i> – linearizace)	pEGFP_4E1 PCR fragment	<i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i> , PCR, sekvenace	eIF4E1
pCR4TOPO_4E2	pCR4 <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> ( <i>ScaI</i> – linearizace)	pEGFP_4E2 PCR fragment	<i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i> , sekvenace, PCR	eIF4E2
pCR4 TOPO_4E3A	pCR4 <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> ( <i>ScaI</i> – linearizace)	pEGFP_4E3-long PCR fragment	<i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i> , PCR, sekvenace	eIF4E3A
pCR4 TOPO_4E3B	pCR4 <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> ( <i>ScaI</i> – linearizace)	pEGFP_4E3 PCR fragment	<i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i> , PCR, sekvenace	eIF4E3B
pCDNA_4E1_3Cflag	pCDNA_FTR_TO_3xC_FLAG <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	pEGFP_4E1 PCR fragment <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	<i>XhoI</i> , <i>HindIII</i> , PCR, sekvenace	3xC FLAG -eIF4E1
pCDNA_4E2_3Cflag	pCDNA_FTR_TO_3xC_FLAG <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	pEGFP_4E2 pCR4 TOPO_4E2 <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	<i>XhoI</i> , <i>HindIII</i> , PCR, sekvenace	3xC FLAG -eIF4E2
pCDNA_4E3A_3Cflag	pCDNA_FTR_TO_3xC_FLAG <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	pEGFP_4E3-long PCR fragment <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	<i>XhoI</i> , <i>HindIII</i> , PCR, sekvenace	3xC FLAG -eIF4E3A
pCDNA_4E3B_3Cflag	pCDNA_FTR_TO_3xC_FLAG <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	pEGFP_4E3 pCR4 TOPO_4E3B <i>NotI</i> , <i>Acc65I</i>	<i>XhoI</i> , <i>HindIII</i> , PCR, sekvenace	3xC FLAG -eIF4E3B

**Tabulka 8: Plazmidové konstrukty vytvořené v této práci.**

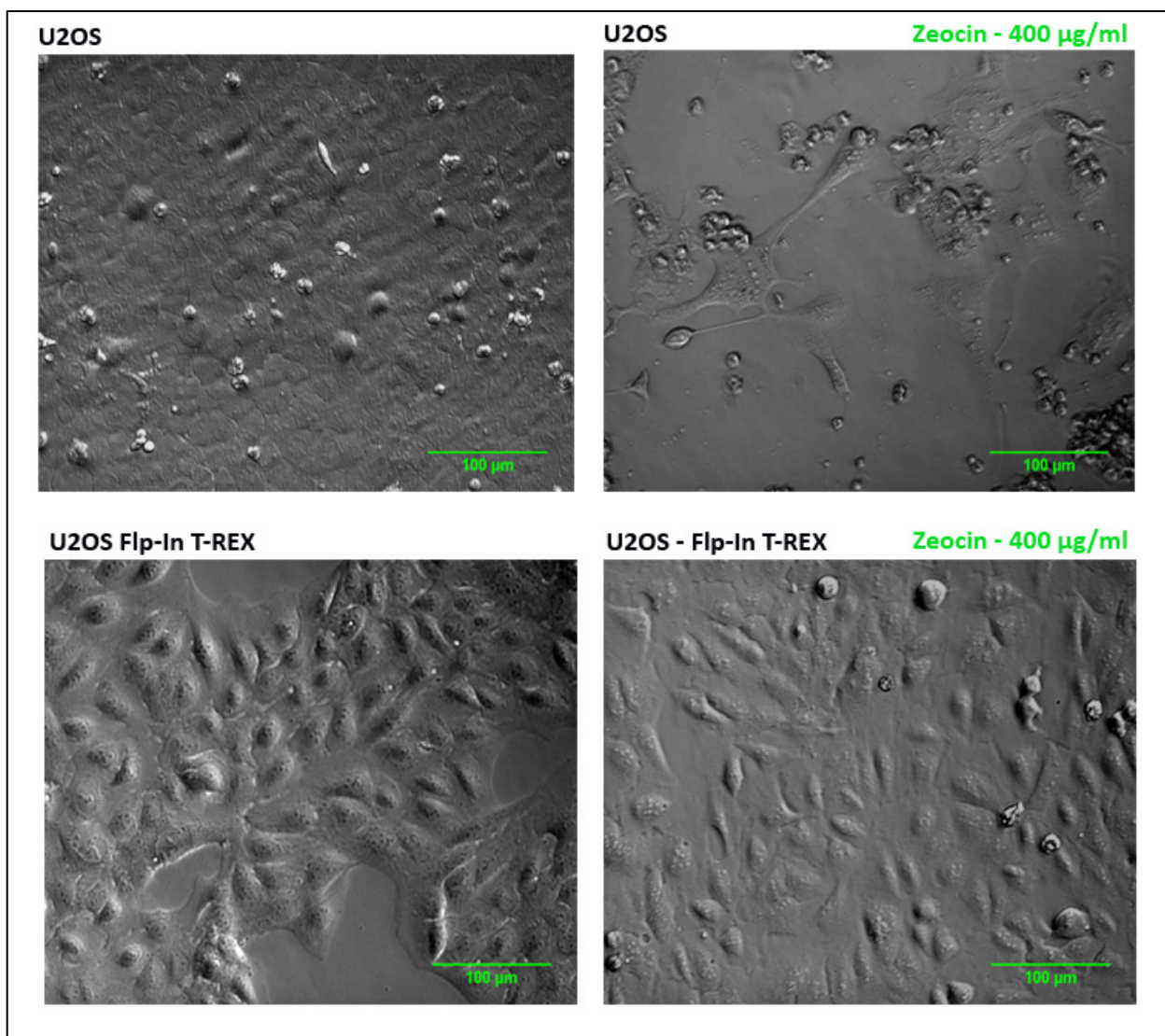
V první části tabulky jsou konstrukty vytvořené „TOPO klonováním“, ty jsem vyrobila, abych je následně mohla použít pro klonování plazmidů pCDNA\_4E3\_3Cflag, které jsou zobrazeny v dolní části tabulky. Nakonec k tomuto účelu byly použity pouze pCR4 TOPO\_4E2 a pCR4 TOPO\_4E3B. Restrikční enzymy jsou zde pro lepší přehlednost psány kurzívou.



## 5.5 Tvorba stabilních linií:

Cílem tohoto pokusu bylo vytvořit stabilní buněčnou linii U2OS Flp-In, která ponese FRT místo. V laboratoři už jednou takovou linií, kterou jsme obdrželi z nekomerčních zdrojů z Dánska, disponujeme. Nicméně když se z nich, pomocí rekombinace ve FRT místě, vytvořili stabilní linie nesoucí různé, námi studované geny, docházelo k problémům s expresí vložených konstruktů. Po analyzování tohoto problému se zjistilo, že důvodem těchto problémů je přítomnost více než jednoho FRT místa u těchto buněk. Mým cílem bylo vytvořit linie nové, které budou obsahovat pouze jedno FRT místo, a tím zajišťovat stálou a neměnnou expresi vložených konstruktů. Tyto buňky by později mohly být použity k vytvoření stabilních buněčných linií nesoucích například mnou naklonované plazmidy 3xC FLAG-eIF4E.

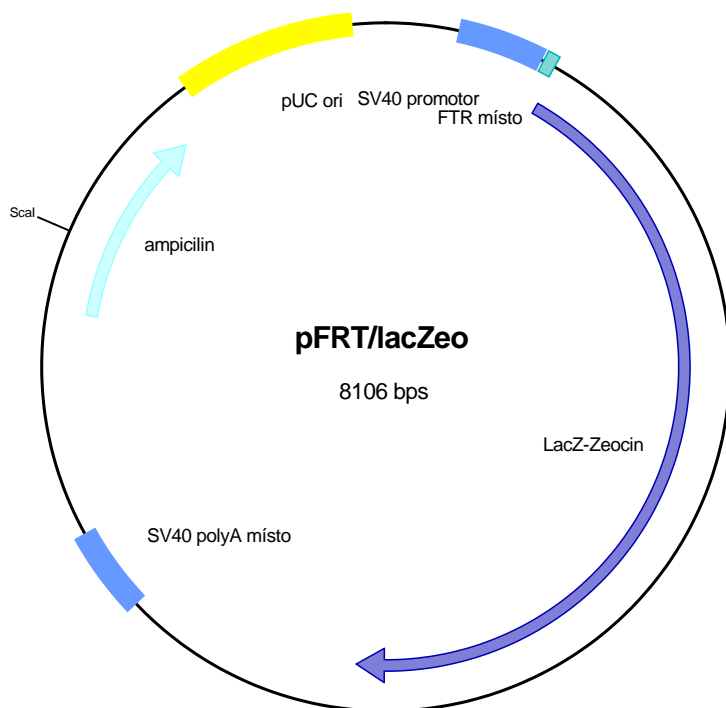
K tomuto účelu jsem použila plazmid Flp-In T-REX pFRT/*lacZeo2* (Invitrogen), který v sobě nese rezistenci na Zeocin™. Nejprve jsem tedy otestovala buňky U2OS na citlivost vůči Zeocinu™, na několik koncentrací doporučených v návodu výrobce, abych si byla jistá, že netransfekované buňky a buňky, kde neproběhla rekombinace, uhynou. Naopak rekombinované buňky tuto koncentraci přežijí. Zeocin™ jsem přidala do média a dva dny po přidání jsem pořídila fotografie pomocí světelného mikroskopu. Jako kontrolu jsem zvolila námi dosud používanou stabilní buněčnou linii, U2OS Flp-In T-REX, nesoucí několik FRT míst. Potvrdilo se, že tyto buňky jsou opravdu rezistentní a ostatní buňky umíraly. Nakonec jsme vybrali koncentraci 400 µg/ml, která se nám jevila jako optimální (**Obrázek 28**).



**Obrázek 28: Reakce buněk na působení Zeocinu™.**

Na obrázku jsou v horní řadě buňky U2OS, vlevo plně narostlé, kultivované standardně, vpravo dva dny po přidání Zeocinu™. V dolní řadě jsou námi dosud používané buňky U2OS Flp-In T-REX s integrovaným FRT místem, opět vlevo za standartní kultivace a vpravo po působení antibiotika. Je patrné, že buňky bez FRT místa umírají, kdežto buňky s FRT místem, při této koncentraci antibiotika, rostou bez problémů. Zvětšení je 20x, měřítko je 100 µm.

Následovala izolace plazmidu pFTR/lacZeo2 (Invitrogen) (4.2.13) a změření jeho koncentrace (4.2.31). Dále jsem plazmid štěpila pomocí restrikčního enzymu ScaI, který je dle návodu výrobce jeden z doporučených k linearizaci plazmidu (4.2.22) (**Obrázek 29**), reakci jsem přečistila (4.2.14), opět jsem změřila jeho koncentraci (4.2.31) a takto upravený plazmid jsem vnesla do buněk U2OS (4.2.5). Pokus jsem zopakovala třikrát, při různých koncentracích plazmidu, konkrétně 1,5 µg/ml, 6 µg/ml a 17 µg/ml, a tyto koncentrace jsem vyzkoušela také ve vzájemných kombinacích s různou konfluencí buněk (v rozsahu 30 – 80% konfluence). Vždy jsem nechala buňky růst s médiem se Zeocinem™ a po dobu tří týdnů jsem toto médium pravidelně, dvakrát až třikrát týdně, měnila a buňky sledovala ve světelném mikroskopu. Průběh byl vždy stejný, buňky postupně umíraly, přičemž se neobjevily žádné, které by byly rezistentní a začali tvořit kolonie. Z tohoto důvodu, a také kvůli časové náročnosti, jsme se rozhodli experiment již neopakovat.



**Obrázek 29: plazmid pFTR/lacZeo (Invitrogen).**

Mapa plazmidu pFTR/lacZeo podle popisu výrobce s vyznačeným restrikčním místem ScaI, které slouží k linearizaci plazmidu.

## 5.6 Mikroskopie:

Cílem mikroskopické části práce bylo ověřit buněčnou lokalizaci eIF4E3\_A a eIF4E3\_B s SG a P-bodies, stanovenou v naší laboratoři již dříve pomocí GFP N-terminálních fúzí eIF4E proteinů. Pro eIF4E1 a eIF4E2 byla lokalizace ověřena pomocí nepřímé fluorescence. Tento způsob ověření však nemohl být zopakován pro eIF4E3\_A a eIF4E3\_B, jelikož se nepodařilo sehnat fungující protilátku proti těmto proteinům. Využila jsem tedy mnou naklonovaných konstruktů eIF4E3\_A a eIF4E3\_B s 3x FLAG fúzí na C-terminálním konci a provedla ověření dříve zjištěných poznatků. Zároveň nás zajímalo, zda může mít na jejich lokalizaci nějaký vliv umístění fúzovaného proteinu (C-/N-terminální fúze) a jeho velikost (GFP/3xFLAG).

Protože se mi nepovedlo vytvořit stabilní buněčné linie, použila jsem k experimentům buňky linie U2OS transfekované příslušnými konstrukty (4.2.6). Tyto buňky jsem druhý den po transfekci vystavila dvěma druhům stresových podmínek, konkrétně teplotnímu šoku (42 °C) a oxidativnímu stresu (arzeničitan sodný) (4.2.7). Jsou to běžně používané podmínky, které vyvolávají tvorbu SG. Jako kontrolu jsem použila buňky, které byly kultivovány za standartních podmínek, při 37 °C.

Jelikož je v naší v laboratoři tento experiment prováděn s proteiny, které nesou fluorescenční značení v podobě GFP fúze, je možné s protilátkami, kterými disponujeme, P-bodies i SG sledovat zároveň, na jednom preparátu. Já jsem však musela použít ke značení eIF4E3 proteinů protilátku anti-FLAG, což zapříčinilo, že naše sada primárních a sekundárních protilátek a fluoroforů byla pro tento experiment nekompatibilní. Proto jsem nejprve provedla pokus s protilátkou anti-DDX6, proteinem běžně používaným jako marker P-bodies, a poté další experiment s protilátkou proti eIF3B, markerem stresových granulí (4.2.8).

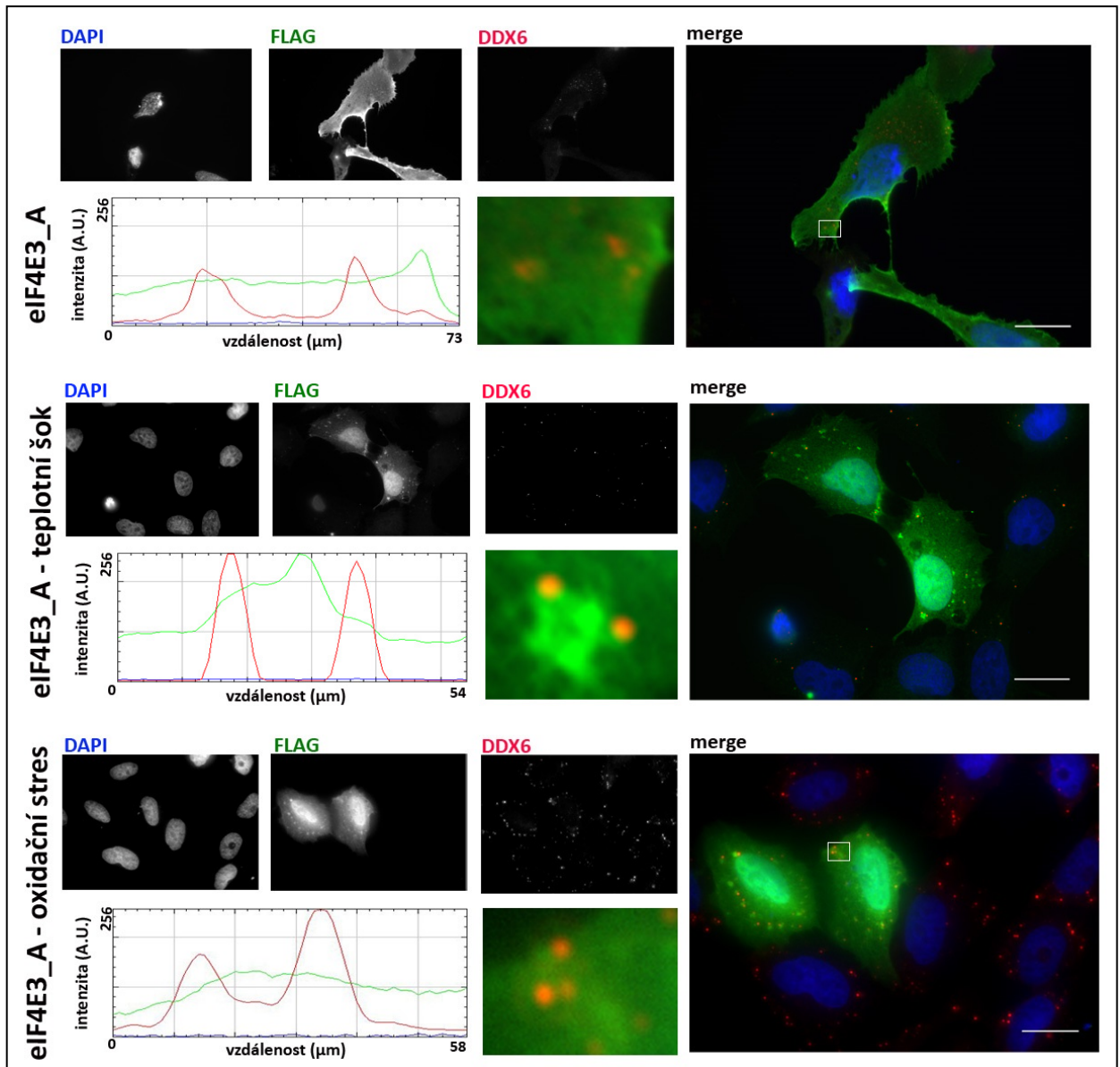
Lokalizace eIF4E3\_A a eIF4E3\_B s P-bodies byla ověřena třemi nezávislými experimenty. Lokalizace s SG byla provedena jen v jednom experimentu, jelikož jsme se potýkali s několika nefunkčními protilátkami proti eIF3B. Z každého preparátu jsem pořídila průměrně 7-10 fotografií. K jejich vyhodnocení jsem použila program Fiji ImageJ, ve kterém je k určení lokalizace přímo plug-in, který umožňuje nakreslit přímku napříč oblastí, která má být analyzována, a poté v této oblasti vyhodnotí intenzitu jednotlivých barevných kanálů. Pokud by docházelo k lokalizaci eIF4E3 proteinů do P-bodies a SG, obě spektra by se překrývala a měla by píky se stejným průběhem, tedy ve stejném místě a o přibližně stejné hodnotě.

Takto jsem vždy vyhodnotila všechna tělíska, která se v buňkách v rámci jedné fotografie nacházela. Tímto způsobem jsem postupovala u všech pořízených fotografií ze všech vyhotovených preparátů. Jelikož se ve většině případů výsledky všech vyhodnocených vzorků shodovaly, použila jsem vždy pro ilustraci jednu analyzovanou fotografii.

Nejprve jsem tedy chtěla zjistit, zda eIF4E3\_A a eIF4E3\_B lokalizují do P-bodies. V drtivé většině případů nedocházelo k žádnému překryvu křivek ani u jednoho proteinu. V několika málo případech se píky překrývali, avšak zde je nutné mít na zřeteli, že snímky nebyly pořízeny konfokálním mikroskopem. Překryv tudíž může znamenat pouze náhodnou lokalizaci P-bodies a eIF4E3 proteinů nad sebou v rámci 3D prostoru buňky. Protože jsem ve většině případů lokalizaci eIF4E3 do P-bodies nepozorovala, lze říci, že eIF4E3\_A a eIF4E3\_B nejsou součástí těchto degradačních tělísek. Nepozorovala jsem také žádný rozdíl v lokalizaci eIF4E3, mezi buňkami vystavenými stresovým podmínkám a těmi, které byly kultivovány za běžných podmínek (**Obrázky 30, 31**). Jediné, co bylo při prozkoumání všech fotografií patrné je to, že P-bodies se ve větší míře vyskytovaly ve stresovaných buňkách oproti buňkám „normálním“, a že jejich zastoupení bylo vždy o něco vyšší v netrasfekovaných oproti transfekovaným buňkám v rámci jedné fotografie. Nicméně tyto poznatky jsem učinila pouze běžným pozorováním a nijak jsem je nekvantifikovala, tudíž z nich nelze vyvozovat obecně platné závěry.

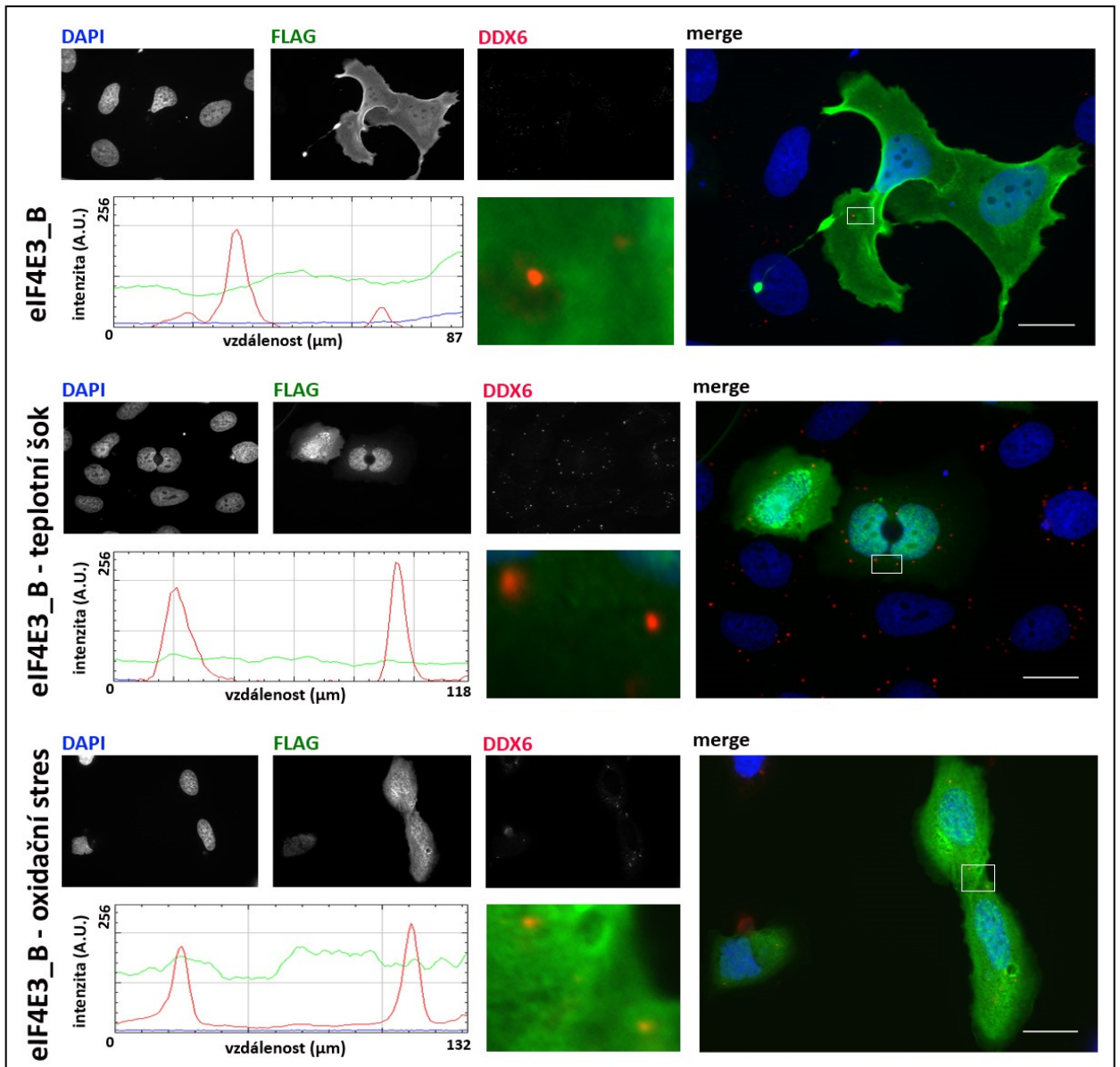
Dále nás zajímalo, zda eIF4E3\_A lokalizuje se stresovými granulemi. Zde se mi podařilo potvrdit jasnou lokalizaci eIF4E3\_A s SG u buněk, které byly vystaveny působení arzenitu. Křivky eIF4E3\_A a eIF3B se krásně překrývaly ve všech případech. Ke stejnému závěru lze dojít, když se podíváme na jednotlivé kanály. Uvidíme SG na fotografii s protilátkou anti-FLAG, tak na stejných místech na fotografii s protilátkou eIF3B. Problém nastal u preparátu, kde jsem se pokusila vyvolat teplotní šok. Ani u jedné buňky se nepodařilo lokalizaci spolehlivě prokázat. Na zde použité fotografii je zobrazeno jediné spektrum, u kterého se mi podařilo zachytit případnou lokalizaci eIF4E3\_A a SG (**Obrázek 32**).

Naopak u eIF4E3\_B bylo u všech buněk naprosto jednoznačné, že nelokalizuje do SG ani při teplotním šoku, ani při oxidačním stresu (**Obrázek 33**).



**Obrázek 30: Lokalizace eIF4E3\_A a P-bodies.**

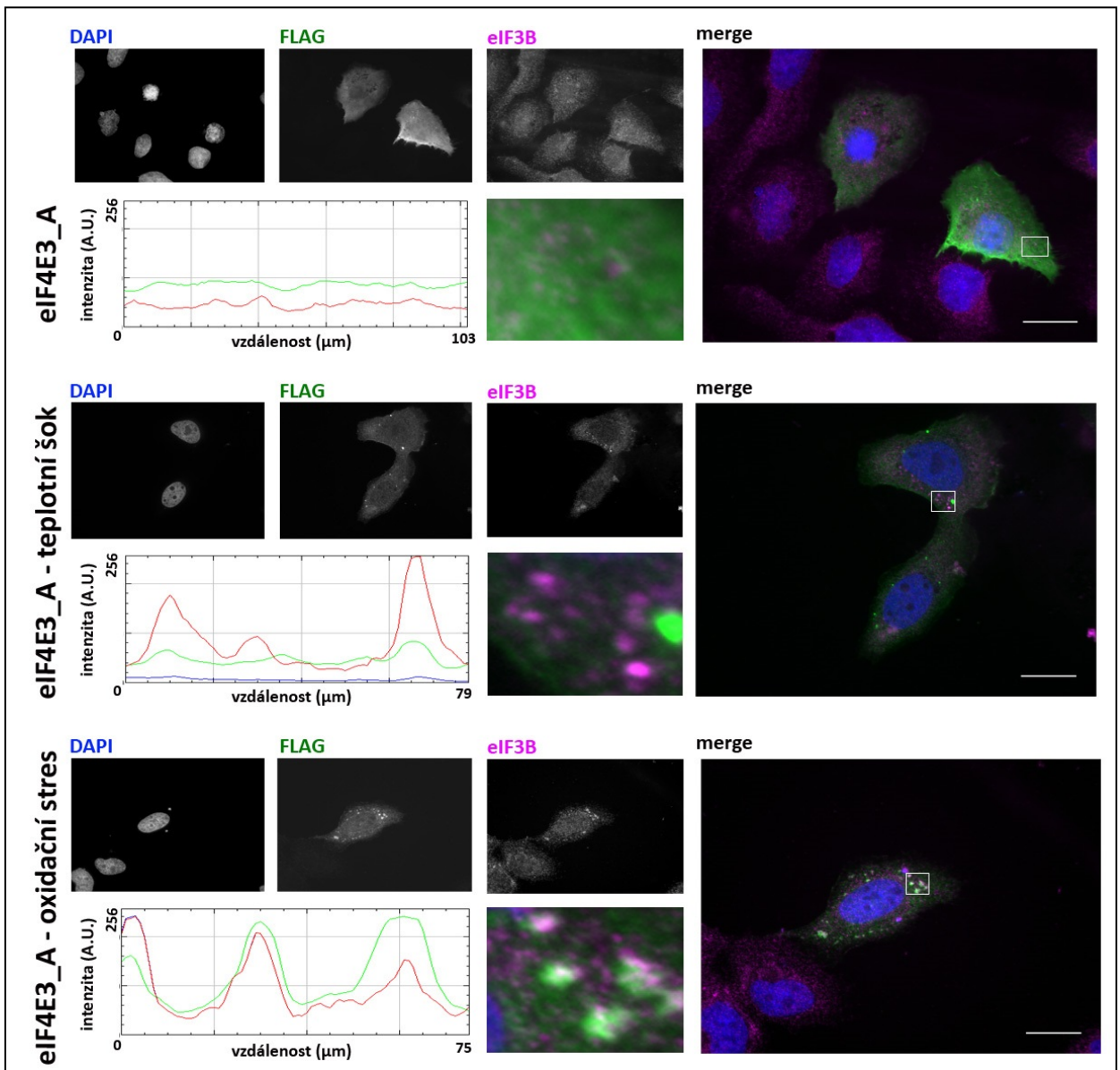
Na obrázku je zobrazena lokalizace eIF4E3\_A a P-bodies za všech testovaných podmínek. Jednotlivé obrázky jsou vždy uspořádány stejně: fotka vlevo nahoře zobrazuje jádra buněk nabarvené DAPI, vedle jsou buňky, které se povedlo transfekovat proteinem eIF4E3\_A, a tudíž jsou značeny protilátkou anti-FLAG. Následuje fotka P-bodies, které byly barveny protilátkou DDX6. Vpravo jsou pak všechny tři snímky sloučeny do jednoho a jsou jim přiřazeny barvy (merge). Modře jsou jádra, zeleně eIF4E3\_A a červeně P-bodies. V dolní řadě uprostřed je výřez a vedle něj průběh RGB intenzity hodnocen v tomto výřezu. Na ose x je vzdálenost v  $\mu\text{m}$ , tedy jak velký byl hodnocený úsek, na y ose je intenzita. Obrázky jsou vždy seřazeny v pořadí: běžně kultivované buňky, buňky vystavené teplotnímu šoku a buňky vystavené oxidačnímu stresu. Měřítka je 20  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 31: Lokalizace eIF4E3\_B a P-bodies.**

Na obrázku je zobrazena lokalizace eIF4E3\_B a P-bodies za všech testovaných podmínek. Uspořádání stejné jako u Obrázku 30. Měřítka je 20 μm.

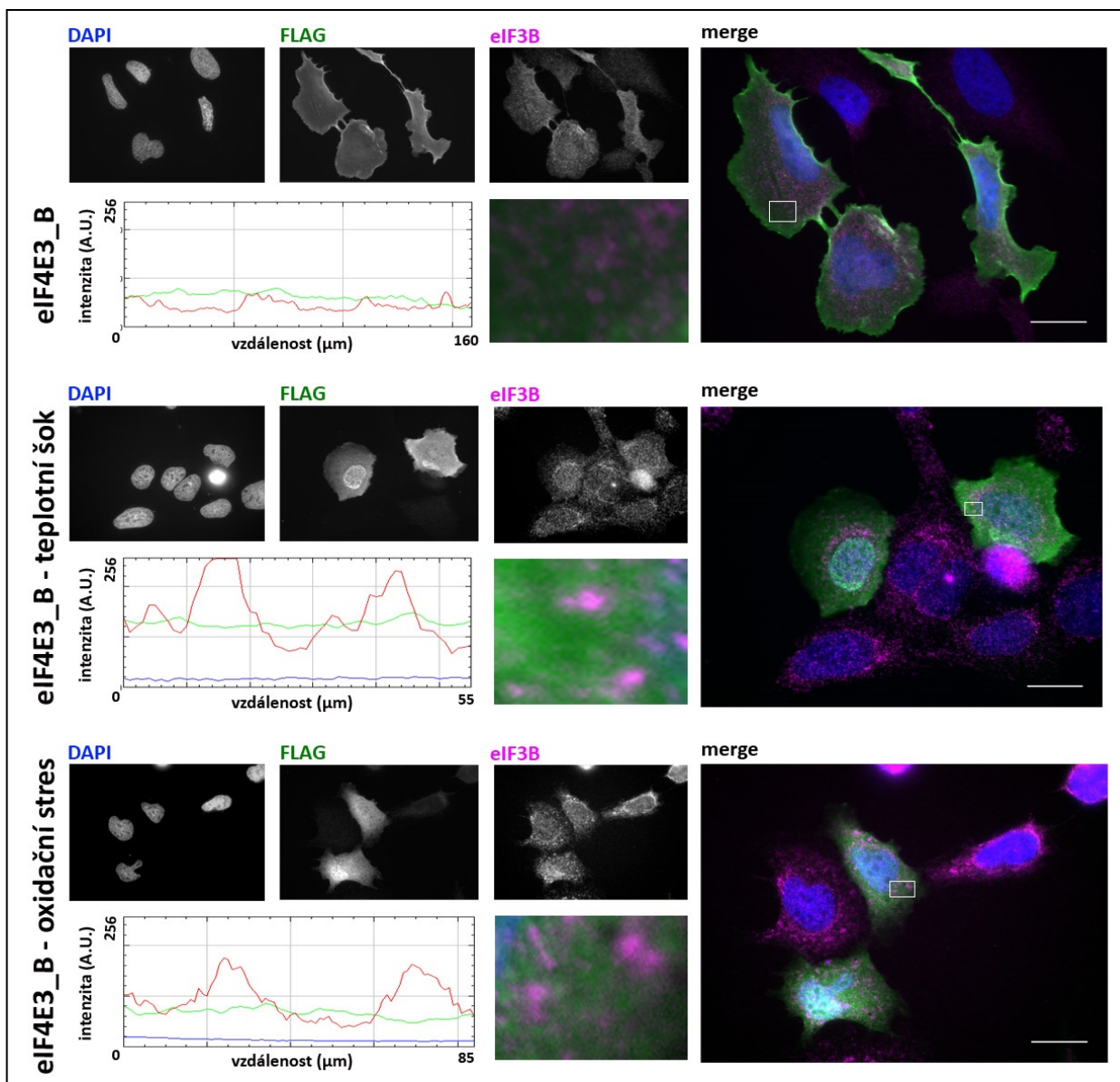




**Obrázek 32: Lokalizace eIF4E3\_A a SG.**

Na obrázku je zobrazena lokalizace eIF4E3\_A a SG za všech testovaných podmínek. Uspořádání je stejné jako u **Obrázku 30**, zde jsou však buňky barveny protilátkou anti-eIF3B, namísto DDX6. Měřítko je 20 μm.



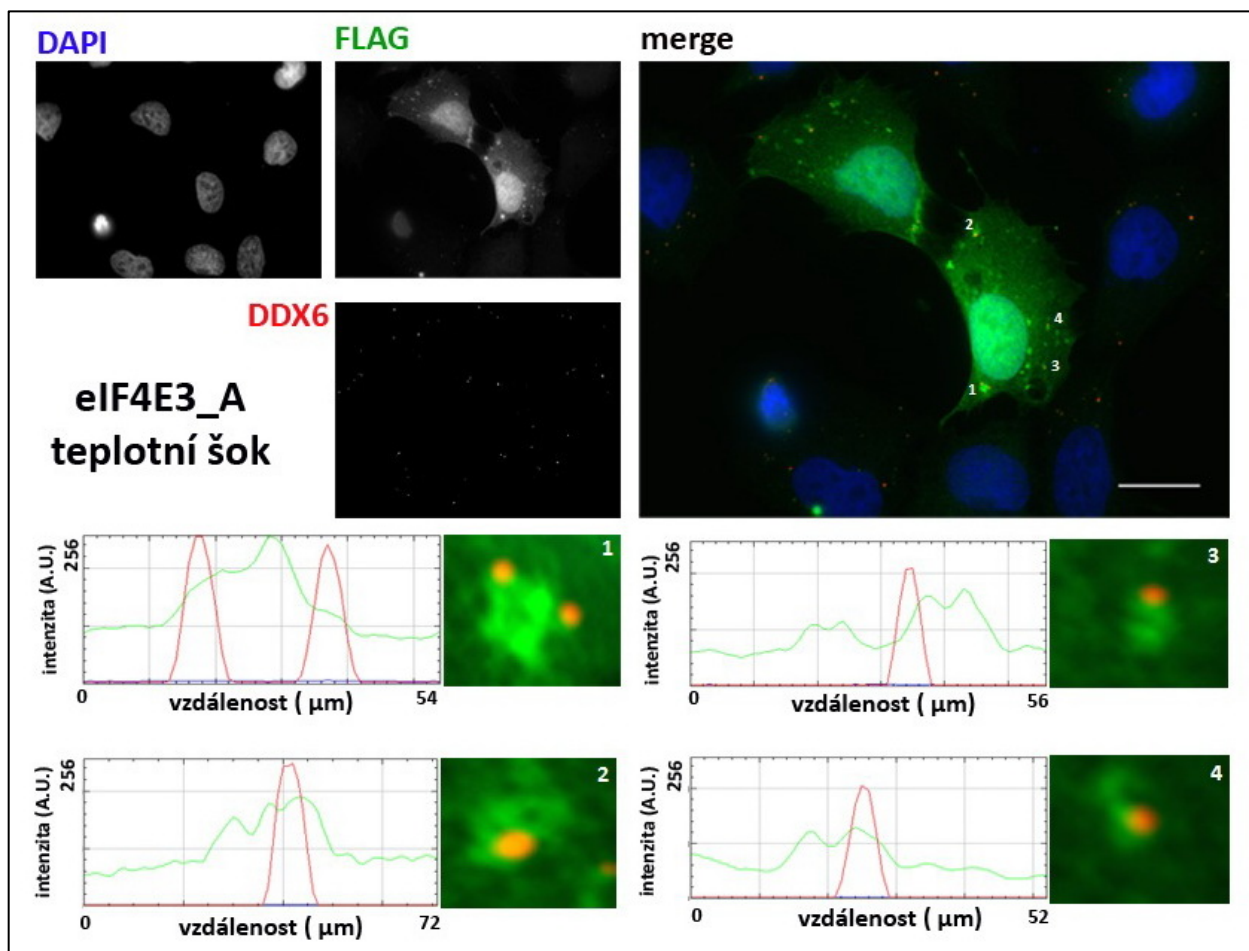


**Obrázek 33: Lokalizace eIF4E3\_B a SG.**

Na obrázku je zobrazena lokalizace eIF4E3\_B a SG za všech testovaných podmínek. Uspořádání je stejné jako u **Obrázku 30**, zde jsou však buňky barveny protilátkou anti-eIF3B, namísto DDX6. Měřítko je 20  $\mu\text{m}$ .

Co se týče kolokalizace SG s P-bodies, tak je dokázáno (viz. 2.6.4), že spolu mohou v některých případech kolokalizovat. Vzhledem k tomu, že jsem nemohla použít na jeden preparát tři různé protilátky, tedy udělat preparáty, kde bych označila eIF4E3, SG i P-bodies, nemohla jsem tento fakt přímo doložit. Jelikož se však v naší laboratoři tímto tématem zabýváme, mohla jsem, s velkou pravděpodobností, určit vznik SG, i bez jejich označení protilátkou.

U všech pořízených fotografií bylo možné pozorovat, že velké množství P-bodies skutečně s SG kolokalizují. Na obrázku (**Obrázek 34**) je vidět, jak jsou P-bodies v těsném sousedství s velkými granulemi, které jsou s velkou pravděpodobností SG. Kolokalizaci potvrzuje i průběh jednotlivých barevných signálů, kdy vrchol červeného signálu pro P-bodies je vždy v sousedství nebo se mírně překrývá s vrcholem zeleného signálu. I když jsem zde tento fenomén demonstrovala na několika místech v rámci jedné fotografie, pozorovala jsem jej u všech pořízených snímků.



**Obrázek: Kolokalizace SG (eIF4E3\_A) a P-bodies.**

Na obrázku je zobrazena kolokalizace SG a P-bodies. Fotka vlevo nahoře zobrazuje jádra buněk nabarvené DAPI, vedle jsou buňky, které se povedlo transfekovat proteinem eIF4E3\_A, a tudíž jsou obarvené protilátkou anti-FLAG. Pod tím je fotka P-bodies, které byly barveny protilátkou DDX6. Vpravo jsou potom všechny tři snímky sloučeny do jednoho a jsou jim přiřazeny barvy (merge). Modře jsou jádra, zeleně eIF4E3\_A a červeně P-bodies. Jednotlivé výřezy jsou potom zobrazeny ve dvou spodních řadách označeny čísly, která odpovídají číslům na merge obrázku. Výřezy jsou vždy doplněny o analýzu této oblasti. Je zde vidět, že P-bodies jak vizuálně, tak podle měření RGB intenzity kolokalizují s SG. Měřítka je 20 µm.

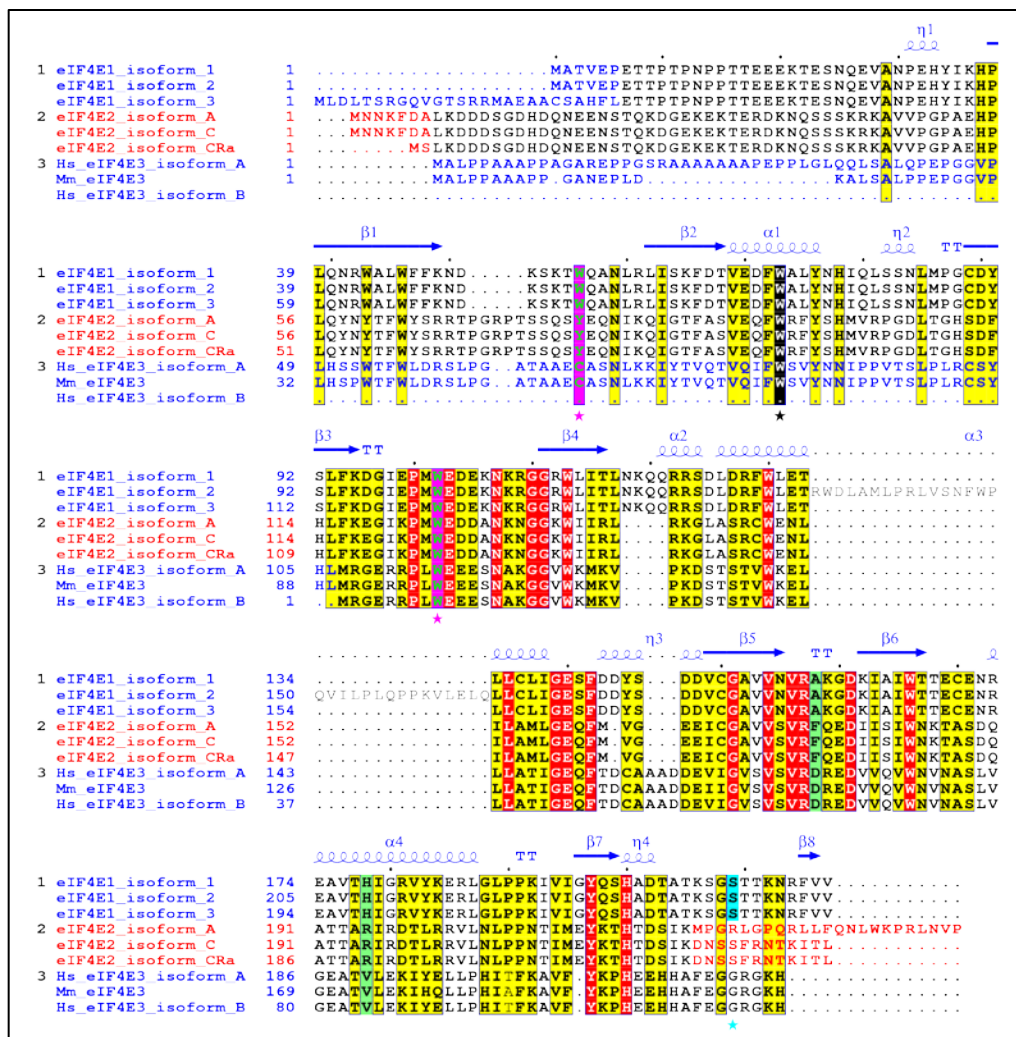
## 6 Diskuze

Prvním okruhem mého diplomového studia byla práce se stabilními buněčnými liniemi Hek293 Flp-In T-REX, které nesou inducibilní konstrukt *eIF4E* genů s fúzovaným GFP na N-terminálním konci. Tyto linie byly vytvořeny v naší laboratoři a jsou používány ke studiu proteinové rodiny eIF4E. Do této rodiny patří kanonický eIF4E1, dále eIF4E2 a nakonec eIF4E3, který byl dosud velice málo studován. My pracujeme se dvěma transkripčními variantami proteinu eIF4E3, tzv. dlouhou, označovanou v této práci jako eIF4E3\_A, a krátkou, označovanou jako eIF4E3\_B. Této variantě chybí N-koncová část proteinu a první z důležitých aminokyselin, která se účastní vazby na čepičku (u eIF4E1 odpovídá Trp56) (**Obrázek 35**). Z toho vyplývá, že eIF4E3\_B by neměl být schopen vázat čepičku, avšak experimentálně toto zatím nebylo ověřeno.

Nejprve jsem se zaměřila na stanovení endogenní hladiny mRNA jednotlivých eIF4E zástupců v buňkách Hek293 Flp-In T-REX. Kubacka *et al.* (2013) provedli experiment, kde porovnávali hladinu eIF4E1 a eIF4E2 v buňce, na základě intenzity signálu, který získali metodou Western blot. Tímto přístupem jim vyšel poměr 5:1 až 8:1 mezi eIF4E1 a eIF4E2 v Hek293 buněčné linii. Já jsem se rozhodla pro kvantifikaci jejich mRNA metodu real-time PCR. Došla jsem k závěru, že endogenní hladina mRNA eIF4E1 a eIF4E2 byla v tomto pokusu téměř stejná. Při podobných kvantifikacích eIF4E1 a eIF4E2 mRNA v dalších tkáňových liniích (ale i v Hek293) provedených v naší laboratoři jsme zjistili, že poměr obou uvedených eIF4E proteinů se pohybuje od 1 do 10. Toto pozorování tedy souhlasí se zde popsáním experimentem. Dále je nutné mít na zřeteli, že Kubacka *et al.* (2013) kvantifikovali množství proteinu, ne mRNA. Hladina eIF4E3 byla v porovnání s eIF4E1 a eIF4E2 cca 2,5x nižší, což je však stále poměrně významné množství. Tento výsledek je v rozporu s proteomickými studiemi, které vykazují zanedbatelné množství eIF4E3 v rámci buňky. Na tyto studie se odkazují i Kubacka *et al.* (2013) a považují tedy tento protein za nedůležitý pro studium. Také na úrovni mRNA je eIF4E3 obtížně detekovatelný, zvláště pak co se týče izolace celistvých cDNA. Například z lidského materiálu byla izolována pouze jedna cDNA a dva zkrácené EST klony, které dokazují přítomnost sestřihové varianty 1, která kóduje isoformu A.

Nápadná absence dostupných cDNA sekvencí pro variantu 1 může být způsobena tím že 5' terminální exon varianty 1 je extrémně GC bohatý, a tudíž může systematicky unikat při syntéze cDNA z důvodu zastavení reverzní transkriptázy na strukturovaných sekvencích. eIF4E3 také může vykazovat tkáňovou či vývojovou specifitu nebo např. závislost na fázi buněčného cyklu. Tyto studie však nebyly dosud uskutečněny u člověka, ani u myši vyjma pionýrské studie, kterou provedli Joshi *et al.* (2005). Zároveň, jak jsme se přesvědčili, pro eIF4E3 neexistuje spolehlivě fungující protilátka, tudíž je k detekci tohoto genu a jeho mRNA nejvhodnější mnou zvolená metoda real-time PCR. Na základě získaných výsledků můžeme říci, že eIF4E2 může být, vzhledem ke svému množství, pro buňku důležitější než se myslelo. Současně by byla škoda nezabývat se eIF4E3, jelikož jeho množství v buňce se taktéž jeví větší než se dosud zdálo. Musíme však mít na zřeteli, že jsem kvůli problémům s izolací RNA tento pokus provedla jen jednou a je nutné jej zopakovat.

Dále jsem chtěla zjistit, zda a jak se mezi sebou liší hladina transkriptů u indukované a neindukované varianty Hek293 Flp-In T-REX GFP-eIF4E buněk. Toto porovnání jsem opět provedla pomocí real-time PCR, současně s určováním endogenní hladiny mRNA. K indukci jsem použila tetracyklin, jelikož konstrukty nesené těmito buněčnými liniemi obsahují tetracyklinový inducibilní operátor. Zjistila jsem, že k navýšení množství transkriptu dochází i u buněk, ke kterým tetracyklin přidán nebyl a to i přesto, že jsem si při jeho přidávání k buňkám dávala na případnou kontaminaci pozor a buňky jsem vždy pasážovala odděleně. U western-blot analýzy byla potvrzena jen exprese proteinů u záměrně indukovaných buněk. Jelikož experimenty byly prováděny současně, nemůže být na vině rozdíl v jejich kultivaci.



**Obrázek 35: Alignment lidských proteinů eIF4E1, eIF4E2 and eIF4E3 and jejich proteinových izoform.**

Na obrázku jsou zobrazeny všechny eIF4E proteinové varianty, se kterými v naší laboratoři pracujeme. U eIF4E3 je zobrazena také myší varianta proteinu, jelikož s ní byly provedeny všechny dosud publikované experimenty. V této práci jsem používala izoformu 1 u eIF4E1, izoformu A u eIF4E2 a izoformu A a B u eIF4E3. Žluté a červené rámečky zobrazují shodu a identitu aminokyselin. Využití alternativních exonů, které kódují rozdílné N- a C- terminální konce jsou zobrazeny červeným a modrým písmem. Aminokyseliny, které vážou čepičku (Trp56 a Trp102 u eIF4E1) a jim odpovídající aminokyseliny u eIF4E2 a eIF4E3, jsou zvýrazněny zeleně ve fialovém rámečku a označeny fialovou hvězdičkou. Konzervovaný tryptofan (Trp73 u eIF4E1) je označen černým rámečkem s bílým písmem a označen černou hvězdičkou. Ser209 u eIF4E1 je v tyrkysovém rámečku a označen tyrkysovou hvězdičkou. Nad jednotlivými sekvencemi je zobrazena sekundární struktura odpovídajícího úseku aminokyselin (Frydryšková *et al.* 2016, přijato k recenznímu řízení).

S těmito poznatky jsem stanovovala růstové a fyziologické parametry jednotlivých buněčných kultur Hek293 Flp-In T-REX pomocí aplikace Resazurinu. Resazurin zaznamenává aktivitu mitochondrií v buňkách, jelikož mění barvu, pokud je redukován. Buňky jsem testovala vždy v indukované a neindukované variantě a působila na ně třemi druhy inhibitorů.

Po proběhnutí všech opakování jsem se pokusila spočítat IC<sub>50</sub> pro jednotlivé inhibitory a jednotlivé buněčné linie. Prvním inhibitorem byl Ribavirin, který je používán jako antivirotikum k léčbě viru HCV a zároveň u něj bylo zjištěno, že strukturně napodobuje čepičku a může tímto způsobem interferovat s přirozenou funkcí čepičky. Tyto pokusy byly provedeny na leukemických liniích (Kentsis *et al.* 2004). Já jsem však žádný efekt na růst buněk nepozorovala ani u jedné z testovaných linií, přesto, že by Ribavirin měl působit již při nejnižší koncentraci z pěti mnou použitých. To lze vysvětlit několika způsoby. V prvé řadě, jsou buňky HEK293 bezesporu odlišné od leukemických buněk. Nicméně podobné výsledky vykazovaly také některé leukemické linie, jež jsme testovali. Westman *et al.* (2005) testovali Ribavirin na HeLa buněčné linii a nepozorovali schopnost mimikovat čepičku ani při použití milimolárních koncentrací. Toto pozorování je ve shodě s mými výsledky. Pro linii K562 (akutní myeloidní leukemie), která se běžně používá pro testování toxicity, byla stanovena IC<sub>50</sub> Ribavirinu po 48 hod kultivace na 15  $\mu$ M (Kökény *et al.* 2009). I u nás v laboratoři jsme při počátečních pokusech použily K562 pro porovnání našich výsledků s literaturou a zjistili jsme, že naše linie K562 na Ribavirin téměř nereaguje. Tento problém jsme se snažili vyřešit koupí inhibitoru od jiného výrobce, ačkoliv ve výše zmíněném pokusu jsme použili Ribavirin dodaný od Sigma Aldrich, stejně jako autoři studie. Ani nové balení inhibitoru od SelleckChem však nezměnilo citlivost K562 k inhibitoru. Tyto informace uvádím na tomto místě, abych ilustrovala obecné problémy při práci s literárními zdroji ohledně pokusů s nízkomolárními inhibitory, protože reproducibilita pokusů je často ovlivněna konkrétním „lotem“ testované látky a konkrétními linií (tzn. i buňky linie K562 se mohou lišit v různých laboratořích, např. získanou rezistencí na testované látky).



Dalším testovaným inhibitorem byl Rapamycin. Ten působí jako inhibitor vazby mezi mTOR kinázou a proteinem Raptor (Oshiro *et al.* 2004). Na Rapamycin nejlépe reagovali linie GFP-eIF4E, a to jak indukované, tak neindukované. Zaznamenanou odpověď vykazovaly také GFP-eIF4E2, ale až po delším působení. U této linie byl vidět rozdíl mezi indukovanou a neindukovanou variantou. Výsledky naznačují, že jakmile je navýšen eIF4E2, tak kultura odolává působení inhibitorů. Stejně reagovaly indukované linie GFP-eIF4E2 na inhibici pomocí PP-242. Tato pozorování by odpovídala zjištěním zaznamenaným u hypoxie, že při vyřazení eIF4E1 pomocí inhibice mTOR dráhy, kterou inhibuje mimo jiné právě hypoxie, přebírá eIF4E2 roli proteinu, jenž váže čepičku. To vede k translaci některých proto-onkogenních genů (například EGFR) a tím k větší proliferaci buněk (Uniacke *et al.* 2012). Webová stránka [www.selleckchem.com](http://www.selleckchem.com), která zaznamenává veškerou literaturu o použitých inhibitech udává, že Rapamycin při působení například na mozkové nádorové buňky bylo stanoveno IC50 v rozpětí od 2 nM až po více jak 25 μM (Hayato *et al.* 2005). Má měření vykazovala u T-REX buněk hodnotu IC50 (96h) 8,7 μM. U všech ostatních se potom pohybovalo v rozpětí mezi 8 až 20 μM. Nejedná se tedy o nijak nestandardní číslo. Můžeme jej brát jako relevantní výsledek, přesto že je jisté, že vedle mTOR kinázy dochází při této koncentraci pravděpodobně i k inhibici jiných kináz. Na PP-242, inhibitoru mTOR kinázy, který inhibuje jak mTORC1, tak mTORC2 komplex, nejvíce odpovídaly buněčné linie T-REX a GFP-eIF4E1. PP-242 působí jako inhibitor mTOR kinázy (IC50 8nM), při vyšších koncentracích inhibuje například fosforylaci S6 (prostřednictvím S6K1) nebo Akt. Při 200nM koncentraci působí jako spouštěč apoptózy a při koncentracích 0 – 1 μM vykazovaly buňky rakoviny tlustého střeva úmrtnost v závislosti na jeho dávce. Měřením IC50 pro T-REX buňky jsem dostala hodnotu IC50 (96h) 4,6. Všechny ostatní buňky ji měly vyšší. Tento rozpor v dávce může být zapříčiněn především nedokonalým načasováním experimentu. Nicméně můžeme z mých výsledků vysledovat obecný trend, tedy že PP-242 nejvíce negativně ovlivňuje růst buněk, díky tomu, že inhibuje jak mTORC1, tak mTORC2 a má silný proapoptotický účinek. Zajímavé výsledky vykazovaly linie s nadprodukovaným eIF4E3\_A a eIF4E3\_B. Nepozorovala jsem rozdíl mezi oběma liniemi navzájem, ani mezi jejich indukovanými a neindukovanými variantami. Všechny tyto varianty buněk nereagovali ani na jeden použitý inhibitor.

Po aplikaci PP-242 a v jednom pokusu i po aplikaci Rapamycinu dokonce inhibované buňky rostly lépe než kontrolní buňky bez inhibitorů a s 0,1% DMSO. Tyto výsledky naznačují, že po nadprodukci eIF4E3 a po inhibici eIF4E1 prostřednictvím mTOR, dochází k většímu růstu buněk než pokud je nadprodukován eIF4E1 bez inhibice. Buňky T-REX, které neexprimují žádný protein ve zvýšené míře, reagovali jak na Rapamycin, tak na PP-242 nejvíce ze všech testovaných. Jelikož jsem buňky testovala až při dosažené konfluenci přes 50%, nemohla jsem sledovat růst kultur od počátku, takže jsem spíše zaznamenávala nárůst do 100% konfluence a potom pomalý úhyn buněk. Kultury, které reagovali na inhibici jen mírně „povyrostly“ a poté začaly umírat rychleji, v porovnání s těmi, které na inhibici nereagovali. Proto, abychom mohly porovnat rychlost růstu mezi jednotlivými liniemi, musela bych buňky inhibovat již při konfluenci kolem 10 až 20 %. Takto pozměněný experiment provedla následně kolegyně v laboratoři. Problémem jednoznačné interpretace výsledků je také fakt, že se jednotlivá opakování pokusu od sebe, až na výjimky, lišily. Této odlišnosti způsobené nepřesným odhadem počtu buněk jsem se chtěla vyhnout tím, že z každého pokusu budu mít šest hodnot a každý pokus provedu ve třech opakováních. Předpoklad byl, že jednotlivé rozdíly v experimentech se při takto velkém počtu hodnot podaří statisticky vyhodnotit. K tomu však ne vždy došlo. Skutečnost, že se od sebe většinou indukované a neindukované kultury nelišily může být způsobena kontaminací séra tetracyklinem. Tento experiment je třeba brát jako pilotní, zjistila jsem veškerá úskalí, která nás mohou při testování růstu a fyziologických parametrů buněk potkat. Můžeme se také zamyslet nad tím, zda ještě neupravit koncentraci některých inhibitorů. Již nyní můžeme říci, že nejvíce zpomaluje umírání nadprodukce eIF4E2 a nejméně potom nadprodukce eIF4E1. Výsledky s eIF4E3 potřebují bližší zkoumání a případná další opakování experimentů. Přesto se mi podařilo metodu i přes četná úskalí v laboratoři etablovat a nyní je již pevnou součástí metodického rámce, který můžeme využívat.

Poslední experiment, který jsem provedla s buněčnými liniemi Hek293 Flp-In T-REX, byla série Western blotů, jakožto vyhodnocení distribuce GFP značených eIF4E proteinů v polyzomálních profilech. Snažili jsme se optimalizovat koncentraci KCl v sacharózovém gradientu tak, abychom docílili specifické asociace iniciačních faktorů s translačními komplexy. Testovali jsme 4 koncentrace KCl a jako nejlepší se ukázalo 100mM při testování eIF4E1.



Obecně platí, že pokud se někdo rozhodne pro polyzomální frakcionaci, je potřeba dobře volit koncentraci soli, jelikož ta se liší v závislosti na typu soli, kterou použijeme, tak například Kedersha *et al.* (2002) používají při polyzomální frakcionaci 140mM KCl, Yogeve *et al.* (2013) 2M LiCl a Yang *et al.* (2006) 5mM MgCl<sub>2</sub>. Proto je dobré vždy optimalizovat podmínky, které nejvíce vyhovují našemu experimentu před jeho samotným započítím. Jelikož jsme si nebyli jisti, zda GFP fúze s eIF4E proteiny nezpůsobuje jejich přítomnost v polyzomálních profilech nespecifickou asociací skrze samotný GFP, provedli jsme také polyzomální frakcionaci stabilní linie produkující samotný GFP protein. Ověřila jsem, že GFP nemá vliv na distribuci eIF4E1 v polyzomálním profilu. Tím jsme se ujistili, že můžeme dále provádět polyzomální profily s buňkami Hek293 Flp-In T-REX GFP-eIF4E1 při koncentraci 100 mM KCL v sacharózovém gradientu.

Druhá část mé laboratorní práce se zaměřovala na tvorbu konstruktů, u kterých budou eIF4E proteiny značeny mnohem menší 3x FLAG fúzí. GFP protein je velký téměř 27 kDa, kdežto 3x FLAG fúze je velká pouze 3 kDa. Tyto konstrukty měly vyřešit případné problémy s některými metodami, u kterých se používalo GFP značení a zároveň rozšířit možnosti studování eIF4E proteinů v naší laboratoři. Po několika problémech se mi podařilo naklonovat potřebné konstrukty, které byly následně zahrnuty do některých experimentů mých kolegů. Další cíl byl, vytvořit s těmito plazmidy stabilní buněčné linie. Ty slouží k dlouhodobé a stabilní expresi proteinů a jako takové jsou ke studiu vhodnější než pouze dočasně transfekované buňky. Rozhodli jsem se, že stabilní linie vytvoříme z buněk U2OS, které jsou například k mikroskopickým experimentům vhodnější než buňky Hek293. Nejdříve bylo však nutné vrátit se o krok zpět a vytvořit buněčné linie, které ponesou FRT rekombinační místo. V tomto místě potom probíhá místně specifická rekombinace s plazmidem, který nese gen našeho zájmu. Nejdříve bych tedy vytvořila linii s FTR místem a poté by se do takové linie vnesly konstrukty značené FLAGem. I přes trojí opakování experimentu se mi však nepodařilo stabilní linii vytvořit. Tento pokus zároveň se mnou zkoušela kolegyně v laboratoři na jiných tkáňových liniích. Po prvotních nezdarech se jí podařilo stabilní linie vytvořit pravděpodobně díky tomu, že vyměnila transfekční činidlo. Místo polyethyleniminu použila Lipofectamine<sup>®</sup> 2000.

To ukazuje, že každý krok tvorby stabilních linií, tedy i volba transfekčního činidla, může ovlivnit konečný výsledek.

Vytvořené plazmidy s FLAG fúzí jsem využila v mikroskopických pokusech. Buňky jsem transfekovala plazmidy eIF4E\_3Cflag a působila na ně stresovými podmínkami. Tento pokus sloužil k ověření lokalizace eIF4E proteinů s P-bodies a stresovými granulemi (SG). Tímto tématem se zabývá kolegyně v laboratoři dlouhodobě a její práce vyústila po několika neúspěšných pokusech v publikaci, která je v současnosti v druhém kole recenzního řízení.

Při práci na publikaci se ukázalo, že oponenti kritizují plnou zastupitelnost GFP fúzovaných eIF4E proteinů s jejich endogenními formami, i přesto, že alespoň v případě eIF4E1 tyto fúzované proteiny byly několikrát použity v lokalizačních studiích a publikovány ve vysoce hodnocených časopisech. Ačkoliv se podařilo výtky oponentů uspokojit, rozhodli jsme se přesto ověřit vliv GFP na lokalizaci 4E proteinů. V případě eIF4E1 a eIF4E2 jsme použili příslušných protilátek pro nepřímou fluorescenci. Otestovali jsme též dvě protilátky proti eIF4E3, jejich citlivost a specifita však nebyla dostatečná. Ke slovu se tedy dostaly mé konstrukty. Problémem bylo, že stávající kombinace protilátek a fluoroforů na sekundárních protilátkách je v naší laboratoři používána při pokusech s GFP, tudíž jsem nemohla označit P-bodies a SG na jednom preparátu bez koupě dalších protilátek.

Co se týče lokalizace eIF4E1, Kedersha *et al.* (2005) potvrdili jeho lokalizaci s P-bodies i SG. U eIF4E2 je jeho lokalizace závislá na typu stresových podmínek. Kubacka *et al.* (2013) jej nepozorovali v SG při vystavení buněk oxidativnímu stresu. Pokud jsou však buňky vystavené teplotnímu šoku, eIF4E2 lokalizuje s SG. S P-bodies lokalizuje při obou typech stresových podmínek. V případě eIF4E3\_A bylo zjištěno, že se nenachází v P-bodies, ale při oxidativním stresu i teplotním šoku lokalizuje se stresovými granulemi. Krátká varinta eIF4E3 nelokalizovala s žádným z těchto cytoplazmatických tělísek. Tato odlišná distribuce eIF4E1 a eIF4E3\_A a skutečnost, že se oba dva vážou na eIF4G (Frydryšková *et al.* 2016, přijato k recenznímu řízení) může být ovlivněna jejich odlišnou rolí v rámci buňky, která si zaslouží být hlouběji studována.

Mně se podařilo ověřit výsledky mé kolegyně, že ani eIF4E3\_A ani eIF4E3\_B nelokalizují do P-bodies. Lokalizace těchto proteinů v P-bodies a stresových granulích nebyla nikdy předtím studována, takže naše práce je momentálně jediná, která se jimi zabývá. Dále jsem sledovala jednoznačnou lokalizaci eIF4E3\_A do SG během působení oxidačního stresu. I tento výsledek byl v souladu s pozorováním GFP fúzovaných proteinů. U působení teplotního šoku jsem však nebyla schopna v preparátu nalézt jednoznačný důkaz lokalizace. Mohlo to být způsobeno nedostatečným působením teplotního šoku, jelikož i pozorované SG se netvořily v takové míře jako u oxidačního stresu. Naopak eIF4E3\_B\_3Cflag buňky tvořily jasně zřetelné SG a eIF4E3\_B s nimi ani v jednom případě nelokalizovalo. I toto zjištění bylo potvrzením předchozích pokusů. Všechny mikroskopické výsledky je třeba brát jako předběžné. Hlavním důvodem je, že jsem k jejich získání použila klasický fluorescenční mikroskop. K tomu, aby se dala, především lokalizace, jednoznačně potvrdit, by bylo potřeba preparáty zkoumat ještě pod konfokálním mikroskopem. Jelikož s jeho použitím nemám žádnou zkušenost, provedla jsem pouze předběžné pozorování na fluorescenčním mikroskopu. Pokud by se objevily výrazné nesrovnalosti mezi mými výsledky a výsledky získanými s GFP fúzovanými proteiny, podrobily by se mé preparáty následnému zkoumání v konfokálním mikroskopu. Hlavní rozdíl mezi oběma mikroskopickými technikami je v tom, že konfokální mikroskop umí pořídít řez buňkou. Proto, jestliže se ve fluorescenčním mikroskopu zdá, že spolu nějaké proteiny lokalizují nebo tělíska kolokalizují, musíme vždy myslet na to, že se mohou pouze nacházet nad sebou v rámci buňky. Jedině v případech, kdy jsem pozorovala, že spolu například eIF4E3\_B a SG nebo eIF4E3\_A i eIF4E3\_B, nelokalizují, můžeme tyto výsledky brát jako směrodatné. Pokus s SG jsem bohužel provedla jen jednou, jelikož jsme testovali několik proužků a než se objevila jedna, která byla funkční, nebyl již čas pokus zopakovat.

## 7 Souhrn

- Předběžně jsem určila endogenní množství eIF4E a potvrdila jsem funkčnost indukce konstruktů GFP-eIF4E ve stabilních liniích Hek293 Flp-In T-REX pomocí tetracyklinu.
- Podařilo se mi etablovat metodu měření růstu a fyziologických parametrů buněčných kultur v naší laboratoři.
- Při testování změny fyziologických parametrů buněčných kultur po působení inhibitory jsem zjistila, že inhibice Ribavirinem nemá žádný efekt na mnou používané buněčné linie. Nejúčinnějším inhibitorem byl u všech buněčných linií PP-242 a nejvíce odolné kultury byly ty, jež obsahují GFP-eIF4E3. Nepozorovala jsem výrazný rozdíl mezi indukovanými a neindukovanými variantami buněčných linií.
- Podařilo se mi určit 100mM koncentraci KCl jako optimální pro polyzomální frakcionaci.
- Naklonovala jsem konstrukty nesoucí C-terminální 3x FLAG fúzi s jednotlivými eIF4E.
- Nepodařilo se mi vytvořit stabilní linie.
- Pomocí fluorescenční mikroskopie jsem potvrdila, že proteiny eIF4E3 nelocalizují do P-bodies, pokusy s lokalizací do stresových granulí by bylo vhodné zopakovat pro větší validitu získaných výsledků.

## 8 Seznam použité literatury

- Andrei**, M. A., Ingelfingef, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., Luhrmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*, 11: 717–727.
- Apsel**, B., Blair, J. A., Gonzalez, B. Z., Nazif, T. M., Feldman, M. E., Aizenstein, B., Hoffman, R., Williams, R. L., shokat, K. M., Knight, Z. A. (2008). Targeted polypharmacology: Discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nature Chemical Biology*, 4: 691–699.
- Beelman**, C.A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrandeur, T. E., Hatfield, L., Fortner, D. M., Parker, R. (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature*, 382: 642–646.
- Blumenthal**, T., and Steward, K. (1997). RNA processing and structure. *In* Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., Priess, J. R., (eds): *C. Elegans II* 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 117–145.
- Chaudhry**, Y., Nayak, A., Bordeleau, M.E., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G. J., Roberts, L. O., Goodfellow, I. G. (2006). Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J. Biol. Chem.* 281:25315–25325.
- Cho**, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P., and Sonenberg, N. (2005). A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 121: 411-423.
- Cho**, P. F., Gamberi, C., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Lasko, P., Sonenberg, N. (2006). Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in *Drosophila* Embryos. *Current Biology* 16: 2035–2041.
- Cohen**, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J.M., Strudwick, S., Borden, K.L (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *Embo J*, 20: 4547– 4559.
- Cougot**, N., S. Babajko, B. Seraphin. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.*, 165: 31–40.
- Culjkovic**, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., Borden, K.L.(2005). eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *The Journal of cell biology*, 169: 245–256.
- Culjkovic**, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., Borden, K.L. (2006) eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *The Journal of cell biology*, 175: 415– 426.

- Culjkovic** ,B., Topisirovic, I., Borden, K.L.B. (2007). Controlling Gene Expression through RNA Regulons. The Role of the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E. *Cell Cycle* 6: 65-69.
- Dostie**, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S. A., Sonenberg, N. (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO J.*, 19: 3142–3156.
- Dreher**, T. W., Miller, W.A. (2006). Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* 344:185–197.
- Dua**, K., Williams, T.M., Beretta, L. (2001). Translational control of the proteome: relevance to cancer. *Proteomics*, 1: 1191-1199.
- Duncan**, R., Milburn,S.C., Hershey, J.W. (1987). Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J. Biol. Chem.*, 262: 380–388.
- Feldman**, M. E., Apse, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggero, D., Shokat, K. M. (2009). Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biology*, 7: 371-383.
- Fraser**, C. S., Doudna, J. A. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 29–38.
- Frydryšková**, K., Masek, T., Borcin, K., Mrvova, S., Venturi, V. (2016). Distinct Recruitment of Human eIF4E Isoforms to Processing Bodies and Stress Granules. Přijato k recenznímu řízení.
- Gingras**, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Abersold, R., Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E- BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 13: 1422– 1437.
- Gingras**, A.C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszynska, A., Abersold, R., Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & Development*, 15: 2852–2864.
- Gross**, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E., Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115: 739–750.
- Harris**, A. L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2:38–47.
- Hay**, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 18: 1926–1945.

- Heitman, J., Movva, N. R., Hall, M. N. (1991).** Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253: 905–909 .
- Hernández, G., Altmann, M., Sierra J. M., Urlaub, H., Diez del Corral, R., Schwartz, P., Rivera-Pomar, R. (2005).** Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*. 122: 529–543.
- Hinnebusch, A. G., Lorsch, J. R. (2012).** The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4: 11544-11569.
- Hinnebusch, A.G. (2014).** The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem*, 83: 779–812.
- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., Bledis, J. (2005).** mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events. *Cell*, 123: 569 – 580.
- Hoover, D.S., Wingett, D.G., Zhang, J., Reeves. R., Magnuson, N.S.(1997).** Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E. *Cell Growth Differ.*, 8: 1371-80.
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K. L. (2003).** TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115: 577–590.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M. A., Hall, M. N. (2004)** Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 6: 1122 – 1128.
- Jankowska-Anyszka, M., Lamphear, B. J., Aamodt, E. J., Harrington, T., Darzynkiewicz, E., Stolarski, R., Rhoads, R. E. (1998).** Multiple isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between mono- and trimethylated mRNA cap structures. *J. Biol. Chem.* 273: 10538–10542.
- Jones, R.M., MacDonald ME, Branda J, Altherr MR, Louis DN, Schmidt EV. (1997).** Assignment of the human gene encoding **eukaryotic initiation factor 4E (EIF4E)** to the region q21-25 on chromosome 4. *Somat. Cell Mol. Genet*, 23:221-223.
- Joshi, B., Cameron, A., Jagus, R. (2004).** Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European Journal of Biochemistry*, 271: 2189–2203.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., & Jagus, R. (2005).** Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evolutionary Biology*, 5: 5-48.
- Kedersha, N., Anderson, P. (2002).** Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans.*, 30: 963-9.

- Kedersha, N.,** Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J., & Anderson, P. (2002). Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNA<sup>iMet</sup>)–Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents of Mammalian Stress Granules. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 195–210.
- Kedersha, N.,** Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 169: 871–884.
- Keene, J. D.** Tenenbaum, S. A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol. Cell*, 9: 1161–1167.
- Keiper, B.D.,** Lamphear, B.J., Deshpande, A.M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E.J., Blumenthal, T., Rhoads, R.E., (2000). Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 275: 10590–10596.
- Kentsis, A.,** Topisirovic, I., Culjkovic, B., Shao, L., Borden, K.L. (2004). Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:18105–18110.
- Kökény, S.,** Papp, J., Weber, G., Vaszkó, T., Carmona-Saez, P., Oláh, E. (2009). Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation. *Anticancer Res.*, 29:1971–80.
- Kubacka, D.,** Kamenska, A., Broomhead, H., Minshall, N., Darzynkiewicz, E., Standart, N. (2013). Investigating the Consequences of eIF4E2 (4EHP) Interaction with 4E-Transporter on Its Cellular Distribution in HeLa Cells. *PLoS ONE*, 8.
- Landon, A. L.,** Muniandy, P. A., Shetty, A. C., Lehrmann, E., Volpon, L., Houg, S., Zhang, Y., Dai, B., Peroutka, R., Mazan-Mamczarz, K. *et al.* (2014). MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nature Communications*, 5:5413-5428.
- Leibkowitz, F.,** Goyer, C., Darveau, A., Neron, S., Lemieux, R., Sonenberg, N. (1992). A fraction of the mRNA 5'-cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 9612–9616.
- Liu, L.,** Simon, M. C. (2004). Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol. Ther.*, 3:492–497.
- Lorsch, J. R.,** Dever, T. E. (2010). Molecular View of 43 S Complex Formation and Start Site Selection in Eukaryotic Translation Initiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 21203–21207.
- Mader, S.,** Lee, H., Pause, A., Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 4990–4997.



- Mader**, S., Sonenberg, N. (1995) Cap binding complexes and cellular growth control. *Biochemie*, 77: 40–44.
- Mamane**, Y., Petroulakis, E., Rong, L., Yoshida, K., Ler, L.W., Sonenberg, N.(2004). eIF4E-from translation to transformation. *Oncogene*, 23:3172–3179.
- Marcotrigiano**, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Burley, S. K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5'-cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell*, 89: 951-961.
- Masek**, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., Pospisek, M. (2005) Denaturing RNA electrophoreses in TAE agarose gels. *Anal Biochem.*, 336: 46-50.
- Matsuo**, H., Li, H., McGuire, A. M., Fletcher, C. M., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Wagner, G. (1997).Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat. Struct. Biol.*, 4: 717-724.
- Neves-Pereira**, M., Müller, B., Massie, D., Williams, J. H., O'Brian, P. C., Hughes, A., Shen, S. B., Clair, D. S., Miedzybrodzka, Z. (2009). Dereglulation of EIF4E: a novel mechanism for autism. · *Journal of Medical Genetics*, 46: 759-765.
- Pause**, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donzé, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C .Jr., Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, 371:762-767.
- Peter**, D., Igreja, C., Weber, R., Wohlbold, L., Weiler, C., Ebertsch, L., Weichenrieder, O., Izaurralde, E. (2015). Molecular architecture of 4E-BP translational inhibitors bound to eIF4E. *Mol Cell.*,19:1074-1087.
- Poulin**, F., Gingras, A.C., Olsen, H., Chevalier, S., Sonenberg, N. (1998). 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem.*, 273:14002-14007.
- Pyronnet**, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *The EMBO Journal*, 18: 270–279.
- Osborne**, M. J., Volpon, L., Kornblatt, J. A., Culjkovic-Kraljacic, B., Baguet, A., Borden, K. L. B. (2013). eIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 3877–3882.
- Osborne**, M. J., & Borden, K. L. B. (2015). The eukaryotic translation initiation factor eIF4E in the nucleus: taking the road less traveled. *Immunological Reviews*, 263: 210–223.
- Oshiro**, N., Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., and Yonezawa, K.. (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells*, 9: 359-366.

- Ramaswamy**, S., Ross, K.N., Lander, E.S., Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.*, 33: 49-54.
- Rom**, E., kim, H.C., Gingras, A. C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S. K., Sonenberg, N. (1998). Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 273:13104-13109.
- Rong**, L., Livingstone, M., Sukarieh, R., Petroulakis, E., Gingras, A.-C., Crosby, K., Smith, B., Polakiewicz, R. D., Pelletier, J., Ferraiuolo, m. A., Sonenberg, N. (2008). Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA*, 14: 1318–1327.
- Rousseau**, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., Sonenberg, N. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:1065-1070.
- Sarbassov**, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307: 1098–1101.
- Schalm**, S.S., Blenis, J. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol.*, 12: 632-639.
- Schalm**, S.S., Fingar, D.C., Sabatini, D.M., and Blenis, J. (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr. Biol.*, 13: 797-806.
- Sheth**, U., Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300: 805–808.
- Shi**, F., Len, Y., Gong, Y., Shi, R., Yang, X., Naren, D., & Yan, T. (2015). Ribavirin Inhibits the Activity of mTOR/eIF4E, ERK/Mnk1/eIF4E Signaling Pathway and Synergizes with Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib to Impair Bcr-Abl Mediated Proliferation and Apoptosis in Ph+ Leukemia. *PLoS ONE*, 10: 1371-1387.
- Takeuchi**, H., Kondo, Z., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G. B., Kondo, S. (2005). Synergistic Augmentation of Rapamycin-Induced Autophagy in Malignant Glioma Cells by Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Inhibitors. *Cancer Res. Apr.*, 65: 3336-3346.
- Tomoo**, K., Shen, X., Okabe, K., Nozoe, Y., Fukuhara, S., Morino, S., Ishida, T., Taniguchi, T., Hasegawa, H., Terashima, A., *et al.* (2002). Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P(3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region. *Biochemical Journal*, 362: 539–544.

- Topisirovic, I., Guzman, M. L., McConnell, M. J., Licht, J. D., Culjkovic, B., Neering, S. J., Jordan, C. T., Borden, K. L. B. (2003).** Aberrant Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Dependent mRNA Transport Impedes Hematopoietic Differentiation and Contributes to Leukemogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 8992–9002.
- Uniacke, J., Holterman, C. E., Lachance, G., Franovic, A., Jacob, M. D., Fabian, M. R., Payette, J., Holcik, M., Pause, A., and Lee, S. (2012).** An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature*, 486: 126-129.
- Uniacke, J., Perera, J. K., Lachance, G., Francisco, C. B., Lee, S.(2014).** Cancer cells exploit eIF4E2-directed synthesis of hypoxia response proteins to drive tumor progression. *Cancer Res.*, 74: 1379–1389.
- Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D., Raymond, E. (2005).** mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann. Oncol.*, 16. 525–537.
- Volpon, L., Osborne, M. J., Culjkovic-Kraljacic, B., & Borden, K. L. B. (2013).** eIF4E3, a new actor in mRNA metabolism and tumor suppression. *Cell Cycle*, 12: 1159–1160.
- Westman, B., Beeren, L., Grudzien, E., Stepinsky, J., Worch, R., Zuberek, J., Jemielity, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., Rhoads, R. E., Preiss, T. (2005).** The antiviral drug ribavirin does not mimic the 7-methylguanosine moiety of the mRNA cap structure in vitro. *RNA*,11:1505–1513.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N. (2006).** TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, 124: 471-484.
- Yang, F., Peng, Y., Murray, E. L., Otsuka, Y., Kedersha, N., & Schoenberg, D. R. (2006).** Polysome-Bound Endonuclease PMR1 Is Targeted to Stress Granules via Stress-Specific Binding to TIA-1 . *Molecular and Cellular Biology*, 26: 8803–8813.
- Yogev, O., Williams, V. C., Hinits, Y., & Hughes, S. M. (2013).** eIF4EBP3L Acts as a Gatekeeper of TORC1 In Activity-Dependent Muscle Growth by Specifically Regulating Mef2ca Translational Initiation. *PLoS Biology*, 11.
- Young, R. M., Wang, S.-J., Gordan, J. D., Ji, X., Liebhaber, S. A., & Simon, M. C. (2008).** Hypoxia-mediated Selective mRNA Translation by an Internal Ribosome Entry Site-independent Mechanism . *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 16309–16319.
- Zuberek, J., Kubacka, D., Jablonowska, A., Jemielity, J., Stepinski, J., Sonenberg, N., & Darzynkiewicz, E. (2007).** Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. *RNA*, 13. 691–697.