

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Kryštof Bašus

Vizualizace RNA a její translace v savčím oocytu
Visualization of RNA and its translation in mammalian oocyte

Bakalářská práce

Školitelka: Ing. Anna Tětková

Praha, 2018

Děkuji své školitelce Ing. Anně Tětkové za cenné rady, odborné konzultace a nekonečnou trpělivost. Rád bych touto cestou také poděkoval všem dalším členům Laboratoře biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk ÚŽFG AV ČR, v.v.i. Děkuji také své přítelkyni, mamince a zbytku rodiny za jejich podporu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26. 4. 2018

Abstrakt

Translace je jeden ze základních biologických procesů. Předpokládá se, že lokalizace mRNA a její translace v určitý čas a na konkrétních místech hraje roli při mnoha buněčných procesech. Savčí oocyt se po dosažení své plné velikosti stává transkripčně inaktivním a využívá pouze RNA nasyntetizované a uložené v raných fázích vývoje. Regulace syntézy proteinů na úrovni translace je tedy klíčová pro správné dokončení meiotického zrání oocytů a při časném vývoji embryí.

Pro monitorování buněčné fyziologie je nutné umět vizualizovat a sledovat konkrétní molekuly a procesy na úrovni jednotlivých buněk. To je umožněno vývojem světelné mikroskopie a fluorescenčních sond, které se specificky váží na určité orgány, buněčné struktury, proteiny nebo jiné molekuly. V této práci popisují vybrané metody vizualizace RNA, globální translace i translace specifických transkriptů a hotových proteinů. Metody, kterými se tato práce zabývá jsou RNA FISH, vizualizace translace pomocí analogů methioninu, FUNCAT, SUnSET, FIAsH, ReAsH, TRICK, SINAPS, FUNCAT-PLA, PURO-PLA.

Klíčová slova: Translace, RNA, Protein, Vizualizace, Oocyt

Abstract

Translation is one of the fundamental biological processes. It is assumed that the localization of mRNA and its translation in a certain time and at specific locations plays a role in many cellular processes. The mammalian oocyte becomes transcriptionally inactive when it reaches its full size and utilizes only RNA that has been synthesized and stored in the early stages of development. Thus the regulation of protein synthesis at the translational level is critical for the correct completion of meiotic maturation of oocytes and early development of embryos.

To monitor cellular physiology, it is necessary to be able to visualize and monitor specific molecules and processes at single cell level. This is enabled by the development of light microscopy and fluorescence probes that specifically bind to certain organelles, cellular structures, proteins or other molecules. In this thesis I describe selected methods of visualization of RNA, global translation as well as translation of specific transcripts, and proteins. The methods that this thesis describes are RNA FISH, visualization of translation using methionin analogs, FUNCAT, SUnSET, FIAsH, ReAsH, TRICK, SINAPS, FUNCAT-PLA, PURO-PLA.

Key words: Translation, RNA, Protein, Visualization, Oocyte

OBSAH

1	Úvod	1
2	Translace v eukaryotické buňce	2
3	Genová exprese v savčím oocytu	5
3.1	Translace v savčím oocytu	6
3.1.1	<i>Regulace translace v savčím oocytu</i>	6
4	Vizualizace buněk	8
5	Vizualizace RNA v oocytu	10
6	Vizualizace celkové translace	12
6.1	Analogy methioninu	12
6.2	SUnSET	14
6.3	FUNCAT	14
7	Vizualizace translace specifických transkriptů	16
7.1	FIAsH/ReAsH	16
7.2	TRICK	17
7.3	SINAPS	19
7.4	FUNCAT-PLA / PURO-PLA	21
8	Závěr	23
9	Seznam použitých zkratk	24
10	Seznam literatury	26

1 Úvod

Proteosyntéza je proces složený z dvou za sebou jdoucích částí. V první části dochází k přepisu (transkripci) genetické informace zapsané v DNA do mRNA. V té druhé pak dochází k překladu (translaci) kódu z řetězce mRNA a tvorbě proteinů. Narozdíl od tohoto procesu v prokaryotické buňce, ve které translace přímo navazuje na transkripci, je v eukaryotické buňce translace probíhající v cytoplasmě odělena od transkripce, která probíhá v jádře. V eukaryotických buňkách může tedy docházet k post-transkripční regulaci genové exprese na úrovni translace, což umožňuje buňce rychle reagovat na změnu prostředí nebo jiné podněty bez nutnosti tvořit novou mRNA. Regulace translace se uplatňuje hlavně při kontrole diferenciaci, buněčného růstu a vývoje.

V období růstu se savčí oocyty vyznačují mnohonásobným zvětšením svého objemu, při kterém dochází k intenzivní transkripci, translaci a ukládání nasyntetizovaných proteinů, mRNA a dalších makromolekul. Po přechodu z růstové fáze do fáze meiotického zrání se jádro oocytu stává transkripčně inaktivním a správné dokončení meiozy a časný embryonální vývoj mají na starost již nasyntetizované mateřské RNA.

Rozdílná lokalizace různých mRNA je zapotřebí pro specifikaci buněčných linií v časném stádiu embrya nebo k vytvoření morfogenních gradientů v oocytu např. u *Xenopus laevis*. Aby bylo možné určit místa lokalizace mRNA a probíhající translace, byly vyvinuty vizualizační metody, které umožňují více pochopit časovou a místní organizaci buňky a celkově její fyziologii. Současné metody vizualizace umožňují fluorescenčně označit a pozorovat i více různých molekul současně, což pomáhá k dokreslení povědomí o dynamice exprese mRNA a lokalizace translace v buňce.

2 Translace v eukaryotické buňce

Procesem zvaným translací chápeme překlad genetické informace zahrnuté v sekvenci nukleotidů tzv. messenger RNA (mRNA) do sekvence jednotlivých aminokyselin proteinu (Chekulaeva a Landthaler, 2016). Translace v eukaryotické buňce se od prokaryotické odlišuje v mnoha ohledech, např. se odehrává na 80S ribosomech, eukaryotní mRNA je monocistronní, celý proces translací je pomalejší a translací je prostorově oddělena od transkripce pomocí jaderné membrány (Kozak, 1999).

Na rozdíl od přepisu DNA do mRNA mají mezi sebou postranní řetězce aminokyselin a purinové nebo pyrimidinové báze velice malou, případně žádnou afinitu. Než jsou aminokyseliny inkorporovány do proteinu, jsou nesené na transferové RNA (tRNA), která je schopna přiřadit jednu z 21 proteinogenních aminokyselin do rostoucího polypeptidového řetězce podle pořadí tripletů bazí na mRNA zvaných kodony (Jackson *et al.*, 2010).

Celý tento proces se děje na ribosomu. Ribosom koordinuje správné rozpoznání kodonů každou tRNA a katalyzuje peptidovou vazbu mezi rostoucím polypeptidovým řetězcem a aminokyselinou připojenou na dané tRNA (Wilson a Cate, 2012).

Jednovláknová nukleová kyselina mRNA vzniká během transkripce DNA a následně slouží jako vzor při syntéze proteinů. Úseky na mRNA kódující proteiny, jsou složeny z kontinuální, nepřekrývající se řady kodonů, tzv. otevřeného čtecího rámce (Open-Reading Frame; ORF). Začátek a konec ORF se liší od začátku a konce mRNA, ORF je totiž jen výsek z celkové délky mRNA. První a poslední kodon ORF jsou známé jako "start" a "stop" kodon (Venters a Pugh, 2009).

Transkripce vzniká nejprve tzv. primární transkript (pre-mRNA; precursor mRNA), který musí být před jeho translací upraven. Jednou z úprav je přidání 5' čepičky (m^7Gppp), která chrání mRNA před degradací enzymy a je klíčová pro iniciaci translací. Druhou posttranskripční úpravou je přidání 100 - 250 adeninových nukleotidů (tzv. poly(A) konce) na 3' konec mRNA. Poly(A) konec je důležitý zejména pro stabilizaci pre-mRNA, mRNA a její translaci. Z pre-mRNA se dále musejí vystříhnout nekódující úseky (introny) a kódující úseky (exony) jsou slepeny dohromady (De Conti *et al.*, 2013).

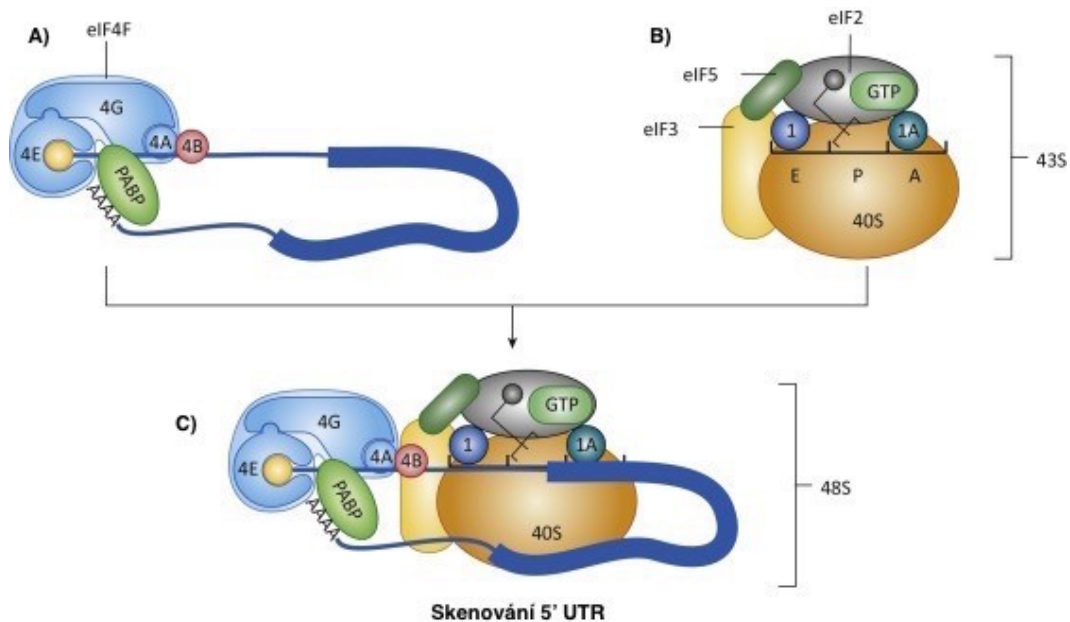
Molekuly tRNA slouží jako adaptory mezi kodony a aminokyselinami, které určují. Je mnoho typů tRNA molekul, ale každá váže konkrétní aminokyselinu a každá rozpoznává jeden

nebo více kompatibilních kodonů. Vazba aminokyselin na tRNA je zprostředkována enzymy aminoacyl tRNA syntetázami (Hopper *et al.*, 2010).

Ribosomy (80S) jsou komplexní struktury, které se pohybují po mRNA a katalyzují skládání aminokyselin do polypeptidového řetězce. Jsou složeny z RNA nazývané ribosomální RNA (rRNA) a ribosomálních proteinů. Ribosom se dělí na velkou a malou podjednotku. Velká podjednotka (60S) obsahuje "peptidyl transferasové centrum", které formuje peptidovou vazbu. Malá podjednotka (40S) obsahuje "dekódovací centrum", ve kterém tRNA mohou dešifrovat kodony mRNA (Frank, 2003; Wilson a Cate, 2012).

Proces translace v eukaryotické buňce můžeme rozdělit na tři na sebe navazující části: iniciace, elongace, terminace.

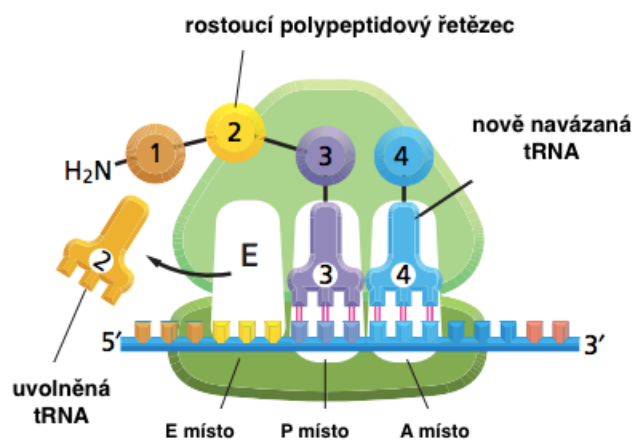
Iniciace translace začíná navázáním iniciační tRNA, vázající molekulu methioninu (Met-tRNA_i), na malou podjednotku ribosomu. Tento proces zprostředkovávají dva GTP-vázající proteiny: eukaryotický iniciační faktor 2 a 5B (eIF2 a eIF5B). eIF5B-GTP napomáhá rekrutaci komplexu eIF2-GTP a Met-tRNA_i na malou podjednotku ribosomu. Společně pak tyto dva proteiny umístí Met-tRNA_i na budoucí P místo malé podjednotky, což vede k vytvoření 43S pre-iniciačního komplexu (Obr. 1). 43S pre-iniciační komplex rozpoznává nejprve 5' čepičkovou strukturu mRNA. To je zprostředkováno komplexem eIF4F, složeným ze tří podjednotek (Obr. 1). Jedna z nich se váže přímo na 5' čepičkovou strukturu, zbylé dvě nespecificky na přidruženou mRNA. V tu chvíli je mRNA aktivována. Tento komplex je následně doplněn o eIF4B, který aktivuje RNA helikázu v jedné z podjednotek eIF4F. RNA helikáza rozvolní všechny sekundární struktury, jelikož 5' konec mRNA nesmí pro správné navázání na malou podjednotku ribosomu žádné obsahovat. Po následném navázání 5' koncem RNA na 40S podjednotku se začne celý komplex pohybovat po mRNA ve směru 5' → 3', dokud nenarazí na start kodon (v naprosté většině AUG), který je rozpoznán správným spárováním s antikodonem iniciační tRNA. Následně se uvolní eIF2, navázané na iniciační tRNA a eIF3, bránící přisednutí velké podjednotky ribosomu a to vede k vytvoření iniciačního komplexu 48S. 60S podjednotka se naváže na tento komplex a Met-tRNA_i je umístěn na P místo budoucího 80S iniciačního komplexu. Dochází k hydrolýze vazby eIF5B-GTP a uvolnění eIF5B. Tím dojde k vytvoření iniciačního komplexu 80S a ribosom je připraven vytvořit první peptidickou vazbu (Jackson *et al.*, 2010).



Obr. 1 Vytvoření iniciačního komplexu 48S. A) eIF4E (4E) podjednotka komplexu eIF4F se naváže na 5' čepičku mRNA a ta je vazbou eIF4G (4G) podjednotky s Poly(A) vázajícím proteinem (PABP; Poly(A)-binding protein) cirkularizována. B) Iniciační komplex 43S vzniká po spojení eIF1 (1), eIF1A (1A) a eIF3 navázaných na 40S ribosomální podjednotce s eIF2-GTP a eIF5. C) 43S iniciační komplex začne skenovat cirkularizovanou mRNA ve směru 5' → 3' než rozpozná iniciační kodon (Chu *et al.*, 2016; upraveno)

Elongační fázi tvoří 3 části: 1) Správné přiřazení aminoacyl-tRNA vůči kodonu na A místě ribosomu (Obr. 2) 2) Je vytvořena peptidická vazba mezi aminoacyl-tRNA na A místě a peptidovým řetězcem; 3) Výsledná peptidyl-tRNA a její přidružený kodon jsou posunuty o jeden triplet bazí dál, na P místo, čímž se A místo uvolní pro další aminoacyl-tRNA (Chu *et al.*, 2016)..

Terminace translace nastává vstupem jednoho ze tří stop kodonů na A místo. Ty jsou

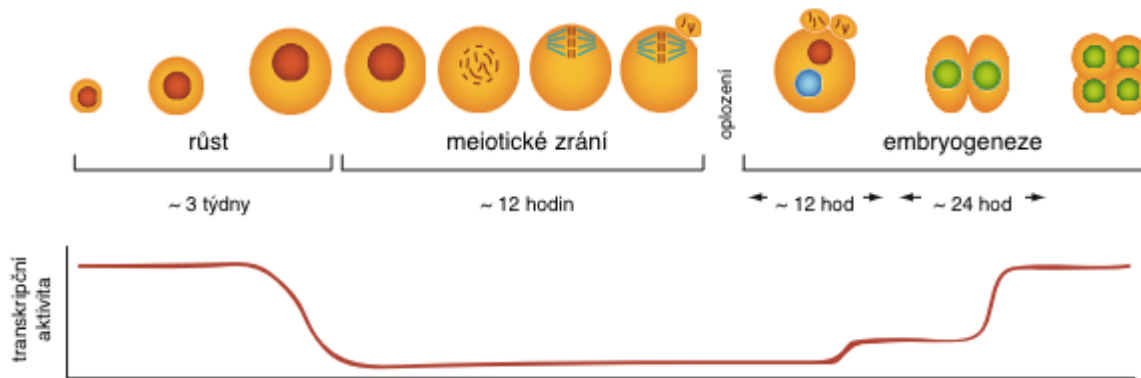


Obr. 2 Schéma eukaryotického ribosomu. Nově navázaná tRNA se váže na A místo, zatímco se z E místa uvolňuje již "použitá" tRNA (Alberts *et al.*, 2008; upraveno)

rozpoznány “uvolňovacími faktory” (RFs; release factors). Uvolňovací faktor I. třídy (eRF1) rozpoznává stop kodon a spouští hydrolýzu peptidového řetězce z tRNA na P místě. Následně musí být eRF1 z ribosomu odstraněn pomocí uvolňovacího faktoru II. třídy (eRF3). Po uvolnění polypeptidového řetězce a uvolňovacích faktorů musí být z ribosomu odstraněna ještě tRNA a mRNA a samotný ribosom se musí rozdělit na velkou a malou podjednotku. Dohromady nazýváme tyto události “recyklace ribozomů” (Dever a Green, 2012).

3 Genová exprese v savčím oocytu

Samičí pohlavní buňky, oocyty, jsou tvořeny v prenatálním vývoji jedince, kdy se primordiální zárodečné buňky diferencují v oogonie a následně v oocyty, které vstupují do meiózy (Wassarman a Albertini, 1994). Nicméně meióza je v oocytech pozastavena v profázi I, a to až do puberty. Před tím, než je meióza obnovena, oocyty rostou. V období růstu jsou oocyty transkripčně aktivní a akumulují makromolekuly jako jsou RNA a proteiny, což je nezbytné pro nabytí meiotické a vývojové kompetence, tj. schopností dokončit meiózu a preimplantační vývoj (De La Fuente *et al.*, 2004; Eppig & Schroeder, 1989). Jakmile oocyty dosáhnou své plné velikosti, transkripční aktivita se zastaví, a tak zůstává celou dobu meiotického zrání, při oplození a aktivaci oocytu, až do chvíle časně embryogeneze (Obr. 3) (Clarke, 2012). Stádium opětovné aktivace transkripce se u různých živočichů liší. U myši je to fáze 2buněčného embrya, u člověka 4buněčného a u skotu 8-16buněčného (Clarke, 2012; Susor a Kubelka, 2017). Vzhledem k absenci transkripce závisí dokončení meiózy a časný embryonální vývoj výhradně na mateřské RNA nasyntetizované a uložené v období růstu (Curtis *et al.*, 1995; Susor a Kubelka, 2017).



Obr. 3 Transkripční aktivita v průběhu zrání myších oocytů, jejich oplození a rané embryogeneze. (Clarke, 2012; upraveno)

3.1 Translace v savčím oocytu

Z výše uvedeného je zřejmé, že kromě mRNA, které jsou translatovány krátce po své syntéze, obsahuje transkriptom oocytu také stabilní maternální mRNA, které jsou skladovány a translatovány teprve ve správném stádiu pozdní oogeneze nebo časně embryogeneze. Podle Piqué *et al.* (2008) dosahuje tato část ve stabilní formě skladovaných a translačně neaktivních molekul mRNA až 30 %. Kromě toho v raném embryonálním vývoji musí být maternální mRNA degradována, aby mohla kontrolu nad dalším vývojem převzít nově nasyntetizovaná embryonální mRNA (Clarke, 2012).

3.1.1 Regulace translace v savčím oocytu

Regulace lokalizace mRNA uvnitř oocytu a její translace je klíčový mechanismus kontroly genové exprese (Susor *et al.*, 2016). Některé mechanismy regulace se objevují i v elongační fázi translace, avšak klíčovou roli celého procesu hraje její iniciace. Ta je ovlivněna “cis-acting” elementy nacházejícími se převážně na 5' a 3' nepřekládaných oblastech (5' UTR a 3' UTR; untranslated regions) maternální mRNA a “trans-acting” faktory na ně navázanými (Hershey *et al.*, 1996).

Jeden z nejznámějších mechanismů represe translace funguje pomocí cytoplasmatického polyadenylačního elementu (CPE). Tato na uracil bohatá sekvence nukleotidů (UUUUA(A)U) se nalézá na 3' UTR (Fox *et al.*, 1989; Huarte *et al.*, 1992). Popisovaný mechanismus regulace translace (nejen) v savčím oocytu je nazýván cytoplasmatická polyadenylace. Ta umožňuje časově a prostorově specifickou translaci nejdůležitějších signálních molekul při meiotickém cyklu (Stebbins-Boaz *et al.*, 1996). Cytoplasmatickou polyadenylaci některých maternálních mRNA regulují proteiny vázající se na CPE (CPEBs, CPE binding proteins). Při vývoji oocytů hraje důležitou roli fosforylace a degradace proteinu CPEB1 (Karabinova *et al.*, 2011).

Hlavním účastníkem mechanismu regulace iniciace translace přes 5' UTR je komplex vázající čepičkovou strukturu, který je nezbytně důležitý pro iniciaci cap-dependentní (na čepičce závislé) translace. Zásadní roli při této iniciaci hraje eukaryotický iniciační faktor 4E (eIF4E), který je nepostradatelnou součástí eukaryotického iniciačního komplexu 4F (eIF4F) a který specificky rozeznává čepičku (m⁷GpppN) na mRNA (Pyronnet, 2000). Komplex eIF4F kromě eIF4E obsahuje další dvě podjednotky: eIF4A – helikáza, která rozvolňuje sekundární struktury mRNA; a eIF4G1 – propojující protein zodpovědný za celistvost eIF4F komplexu (Mader *et al.*, 1995; Sonenberg a Gingras, 1998; Susor a Kubelka, 2017). Aktivita eIF4E je regulována na několika úrovních: transkripcí, fosforylací a translačními represory (Sonenberg a Gingras, 1998). Dostupnost eIF4E při iniciaci translace (jeho navázání na eIF4G a následná tvorba komplexu eIF4F) je ovlivněna především vazbou k translačním represorům 4E-BPs (eIF4E vázající proteiny) (Pyronnet, 2000; Scheper *et al.*, 2001). Pokud je protein 4E-BP1 (nejvíce studovaný protein z této rodiny) hypofosforylovaný, blokuje na eIF4E vazebné místo pro eIF4G, tím utváření funkčního eIF4F komplexu a translace je potlačena. V opačném případě se hyperfosforylovaný 4E-BP1 uvolní z eIF4E a ten je volný pro tvorbu iniciačního komplexu eIF4F (Mader *et al.*, 1995).

4 Vizualizace buněk

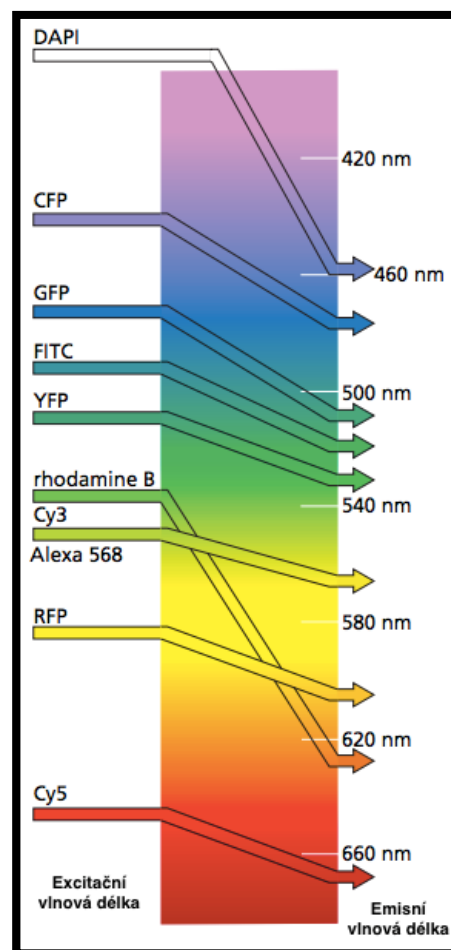
Světelná mikroskopie je v dnešní době klíčovou metodou buněčné biologie. Pomocí světelné mikroskopie můžeme pozorovat nejen buňky, ale díky pestré škále fluorescenčních sond můžeme značit a následně vizualizovat např. organely, nukleové kyseliny nebo proteiny (Thorn, 2016). Nejjednodušší a nejrozšířenější mikroskopickou metodou je metoda světelného pole (brightfield microscopy), při které jsou světelný zdroj a objektiv na opačné straně pozorovaného vzorku, který je zobrazen absorbcí, rozptylem nebo odrazem procházejícího světla. Většina buněk je průhledná a tenká, tudíž neabsorbují mnoho světla a pro jejich pozorování je nutné použít např. fázový kontrast, což způsobuje, že buňky vypadají tmavé na světlém pozadí (Murphy a Davidson, 2012).

Při zkoumání buněčné fyziologie hraje hlavní roli fluorescenční mikroskopie. Ta využívá fluorescenční barviva - fluorofory, což jsou molekuly absorbující světelnou energii (fotony) o určité vlnové délce a vyzařují světelnou energii o větší vlnové délce (Obr. 4) (Sanderson *et al.*, 2014). Zájmové molekuly můžeme označit geneticky kódovaným fluorescenčním proteinem nebo navázáním fluorescenčně značené sondy a pozorovat zároveň více molekul označených různými fluorofory. Jednou z hlavních metod zavedení fluorescenční značky je imunofluorescenční barvení, při kterém je zavedena fluorescenčně označená protilátka proti konkrétnímu proteinu. Běžně se využívá primární protilátka, která rozpozná zájmový protein a fluorescenčně označená sekundární protilátka, která se váže na protilátku primární (Thorn, 2016). Barviva typicky využívaná při imunofluorescenci jsou např. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), které značí DNA; zelená barviva Alexa 488 nebo fluorescein; červená barviva Cy3, rhodamine nebo Alexa 568. Jednou z nejvýznamějších fluorescenčních značek je zelený fluorescenční protein (GFP; green fluorescent protein), který byl izolován z medúzy *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962). GFP je relativně snadno integrovatelný do genomu pozorovaného organismu, což z něj dělá široce využívanou fluorescenční značku. Bylo vyrobeno několik mutací GFP jako modrá Y66H, tyrkysová Y66W nebo žlutá T203Y (Lippincott-Schwartz a Patterson, 2003). Další fluorescenční proteiny jsou např. mCherry, mRuby2 nebo TagRFP-T (Day a Davidson, 2009).

Dalším důležitým nástrojem pozorování vnitrobuněčných, ale i povrchových struktur je elektronová mikroskopie. Prvním ze dvou základních typů je transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Ta se využívá k vizualizaci usmrčených buněk, které se nejprve zafixují, dehy-

dratují, bleskově zmrazí a zanesou do plastu, který usnadňuje nařezání buněk. Následně se imunologicky nebo pomocí uranylacetátu obarví a poté nařezou na velmi tenké řezy. Skrze vzorek se pustí paprsek elektronů, který je vzorkem absorbován a rozptýlen, čímž vznikne kontrast a obraz. Díky velmi nízkým vlnovým délkám dosahuje TEM rozlišení až v řádu desetin nanometru (Winey *et al.*, 2014). Druhým typem je skenovací elektronová mikroskopie (SEM), která se využívá převážně k vizualizaci povrchu. Při této metodě mikroskopie je povrch vzorku skenován přesně zaměřeným paprskem elektronů a současně jsou detekovány zpětně odražené elektrony nebo sekundární elektrony, což jsou elektrony vyzářené po dopadu primárních elektronů na povrch vzorku. Signál sekundárních elektronů silně závisí na orientaci povrchu, což vytváří obraz topografie povrchu (Denk a Horstmann, 2004).

Ačkoliv jsou v této kapitole popsány různé mikroskopické metody, dále se tato práce zabývá metodami založenými výhradně na fluorescenčním značení a práci s fluorescenčním mikroskopem.



Obr. 4 Fluorescenční sondy. Foton vyzářovaný fluorescenční molekulou má vždy nižší energii (větší vlnovou délku), než foton molekulou absorbovaný (Alberts *et al.*, 2008; upraveno).

5 Vizualizace RNA v oocyty

Lokalizace mRNA a její lokální translace jsou důležité funkce mnoha biologických procesů jako jsou asymetrické dělení buňky, embryonální vývoj nebo vytvoření gradientu morfogenů v oocyty *Xenopus laevis* (Medioni *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2006).

Vizualizace jednotlivých molekul RNA pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH; Fluorescent *in situ* hybridization) umožňuje získat informace o lokalizaci a hojnosti mRNA v jednotlivých buňkách (Querido *et al.*, 2017). Tato metoda zahrnuje čtyři kroky: 1) příprava a syntéza oligonukleotidových sond k přiléhajícím sekvencím na mRNA; 2) připojení fluorochromů na specifická místa každé oligonukleotidové sondy; 3) pořízení digitálních obrázků napříč pozorovanou buňkou; 4) zpracování těchto obrázků (Femino *et al.*, 1998). Snímky vytvořené pomocí FISH metody jsou složeny ze světelných bodů o různé intenzitě vyplývající právě z hybridizace sond a fluorescenčního šumu pozadí, který se musí při následné analýze odstranit (Femino *et al.*, 1998). K nastavení prahu intenzity, který z obrazu a následné analýzy vyřadí signály autofluorescence či šumu pozadí, se používají matematické digitální metody jako je nezávislá analýza komponentů (Hyvärinen a Oja, 1997; Levsky a Singer, 2003).

Aby se dosáhlo dostatečné intenzity fluorescence, je při tvorbě FISH sond detekujících neopakující se sekvence na mRNA typické kombinovat 4-7 sond specifických pro různé oblasti na mRNA (Femino *et al.*, 1998; Querido *et al.*, 2017). Sondy složené z oligonukleotidů dlouhých 50 nukleotidů obsahují 4-5 amino-upravených C6 zbytků thymidinu (Femino *et al.*, 1998). Tyto sondy pro RNA FISH jsou označeny fluoresceinem, digoxigeninem nebo barvivu Cy3 a Cy5. Zvolení vhodného barviva závisí hlavně na typu experimentu a mikroskopu, kterým se bude obraz zpracovávat, a také na správné kombinaci více RNA sond nebo kombinaci FISH a imunofluorescenční metody (Femino *et al.*, 1998). Klasická oligonukleotidová sonda sestávající z 5 sond, každá označená 5 fluorescenčními molekulami, označí RNA 25 fluorofory (Querido *et al.*, 2017). Technika zvyšující počet fluoroforů na RNA využívá 24-48 krátkých oligonukleotidů navržených tak, aby specificky hybridizovaly po celé délce RNA molekuly s podobnou afinitou (Raj *et al.*, 2008). Využití většího počtu sond zvyšuje pravděpodobnost detekování všech molekul RNA (Querido *et al.*, 2017).

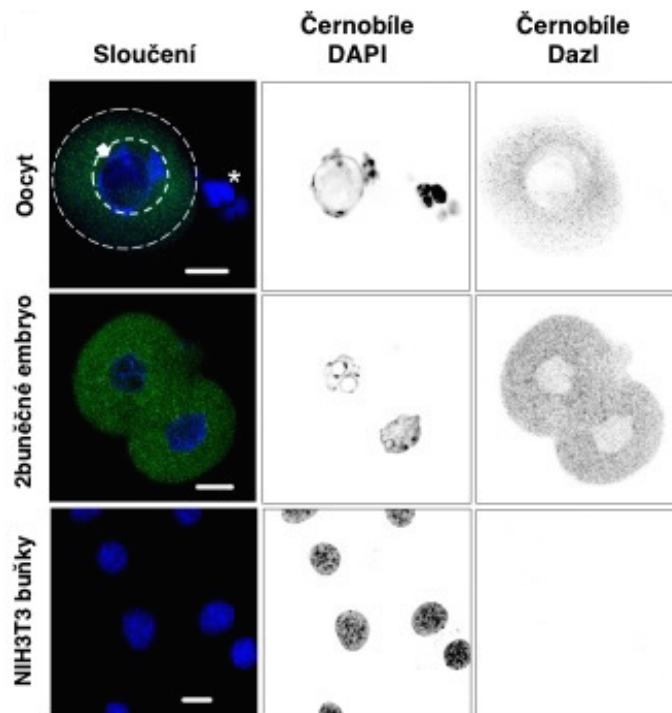
Raj *et al.* (2008) dokázali současně detekovat 3 různé mRNA v jedné buňce. Navrhli sondy specifické pro mRNA kódující geny FKBP5, PTGS2 a FAM105A v lidských nádorových buňkách A549 a následně tyto sondy spárovali se spektrálně odlišnými fluorofory Cy5, Alexa 594 a TMR.

Po provedení FISH se všemi třemi sondami najednou, byla ve třech odlišných fluorescenčních kanálech viditelná jednotlivá nepřekrývající se místa, každé odpovídající jedné z mRNA (Raj *et al.*, 2008). V dnešní době je na trhu široké spektrum FISH systémů. Některé kladou důraz na specifitu sond a jiné se více zaměřují na amplifikaci signálu (Querido *et al.*, 2017).

Sada Stellaris FISH sond se skládá z vícero samostatně označených 30-48 oligonukleotidů. Velký počet sond snižuje pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků, jelikož signál je detekovatelný pouze pokud jsou na mRNA navázány desítky sond. Stellaris FISH sondy mohou být označeny různými barvami, čímž umožňují detekci různých mRNA současně. Počet detekovatelných mRNA je limitován pouze využívanou sadou mikroskopických filtrů a schopností opticky rozeznat rozdílné signály (Orjalo *et al.*, 2011).

RNAscope metodou lze detekovat až 4 cílové geny při použití chromogenních značek v klasickém světelném mikroskopu a při použití fluorescenčních značek ve fluorescenčním mikroskopu. Ke zlepšení poměru signálu k šumu navrhli sadu sond hybridizujících s cílovou molekulou RNA. Každá sonda obsahuje oblast dlouhou 18-25 bazí, která je komplementární k cílové RNA, nekódující sekvenci a 14 bazí dlouhou koncovou sekvenci. Dvojice cílových sond, každá obsahující rozdílnou koncovou sekvenci, hybridizují s cílovým regionem (~50 bazí). Region na RNA molekule dlouhý 1000 bazí je označen přibližně 20 páry cílových sond, což může následně vést k 8 tisícům fluorescenčních označení každé cílové molekuly RNA. Je velice nepravděpodobné, že by se dvě sousedící sondy nespecificky hybridizovaly s molekulou RNA, která nebyla předmětem zájmu, a tudíž tato metoda zajišťuje vysokou kontrolu šumu pozadí (Wang *et al.*, 2012).

Pomocí metody FISH detekující jednotlivé molekuly RNA (smRNA FISH; single molecule RNA FISH) určili Jansova *et al.* (2018) umístění specifických mRNA a lncRNA (dlouhé nekódující RNA; long non-coding RNA) v oocytech, 2buněčných embryích a myších embryonálních fibroblastech. smRNA FISH metodou stanovili lokalizaci různých mRNA, např. Dazl (Deleted in azoospermia-like; Obr. 5) nebo β -aktin a Neat2 (Nuclear-Enriched Abundant Transcript).



Obr. 5 Lokalizace mRNA Dazl v myším oocytu, 2buněčném embryu a myších embryonálních fibroblastech (NIH3T3). Dazl zeleně, chromatin modře; černobílé obrázky znázorňují jednotlivé kanály. Měřítko 20 μm (Jansova *et al.*, 2018, upraveno).

6 Vizualizace celkové translace

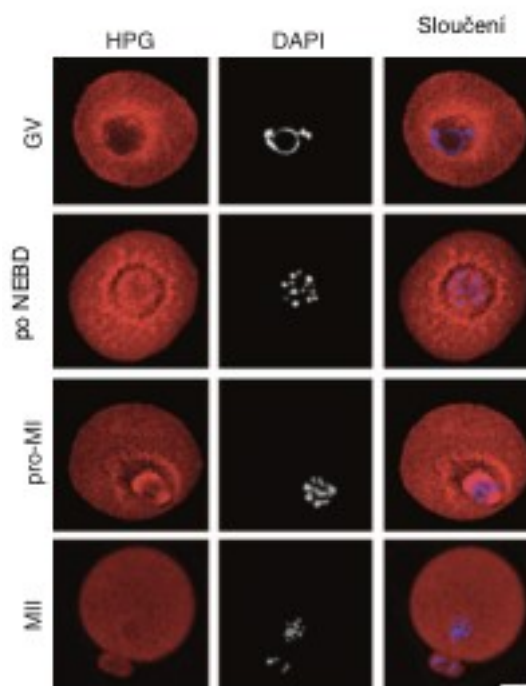
Označování proteinů fluorescenčními značkami umožnilo lépe porozumět různým biologickým procesům uvnitř buňky (Dieck *et al.*, 2012). Typ a množství buňkou nasyntetizovaných proteinů jsou klíčovými parametry fyziologického stavu buňky (Liu *et al.*, 2012). Syntéza proteinů často není úměrná množství mRNA v buňce a to převážně kvůli časté regulaci translace (Sonenberg a Hinnebusch, 2009).

6.1 Analogy methioninu

Jednou z metod vizualizace celkové translace je inkorporace analogů methioninu (Met) do vznikajícího peptidového řetězce. K tomuto účelu jsou využívány analogy jako azidohomalanin (AHA) nebo homoproparglycin (HPG) (Beatty *et al.*, 2006). Buňky dávají přednost methioninu před jeho analogy, takže jejich inkorporace musí probíhat v médiu bez Met (Beatty *et al.*,

2006). Po inkorporaci analogů methioninu, vytvářejí buňky proteiny po celé délce označené AHA nebo HPG místo původního polypeptidového řetězce (Liu *et al.*, 2012). K detekci proteinů označených analogem methioninu slouží azid/alkyn fluorescenční barviva jako 3-azido-7-hydroxykumarin (Beatty *et al.*, 2006), která po jejich přidání vedou k chemoselektivní reakci mezi HPG/AHA a azid/alkyn fluorescenčním barvivem, a umožňují tak vizualizaci modifikovaných proteinů.

Susor *et al.* (2015) analyzovali proteosyntézu v myším oocyty pomocí HPG. Vystavili oocyty HPG po dobu 30 minut a následné pozorování prokázalo translační aktivitu převážně kolem jádra (tzv. zárodečný váček, germinal vesicle, GV) oocyty (Obr. 6). Po rozpadu jaderné membrány (NEBD; nuclear envelope breakdown) byla aktivní translace detekována na dvou odlišných místech od sebe oddělených prostorem se sníženým signálem HPG. První místo, označované jako translační hot-spot, bylo v bezprostřední blízkosti chromosomů (CTA; chromosomal translational area) a druhé v oblasti endoplazmatického retikula obklopujícího vznikající meiotické vřeténko (PTA; perispindular area) (Obr. 6). Tyto translační oblasti přetrvávají v myším oocyty až do prometafáze I (pro-MI) a po vydělení prvního pólového tělíska (metafáze II, MII) se vytrácejí (Susor *et al.*, 2015; Obr. 6).



Obr. 6 *In situ* translace v oocytech ve fázích GV, NEBD, pro-MI a MII. HPG červeně; chromatin/chromozomy modře (Susor *et al.*, 2015; upraveno).

6.2 SUnSET

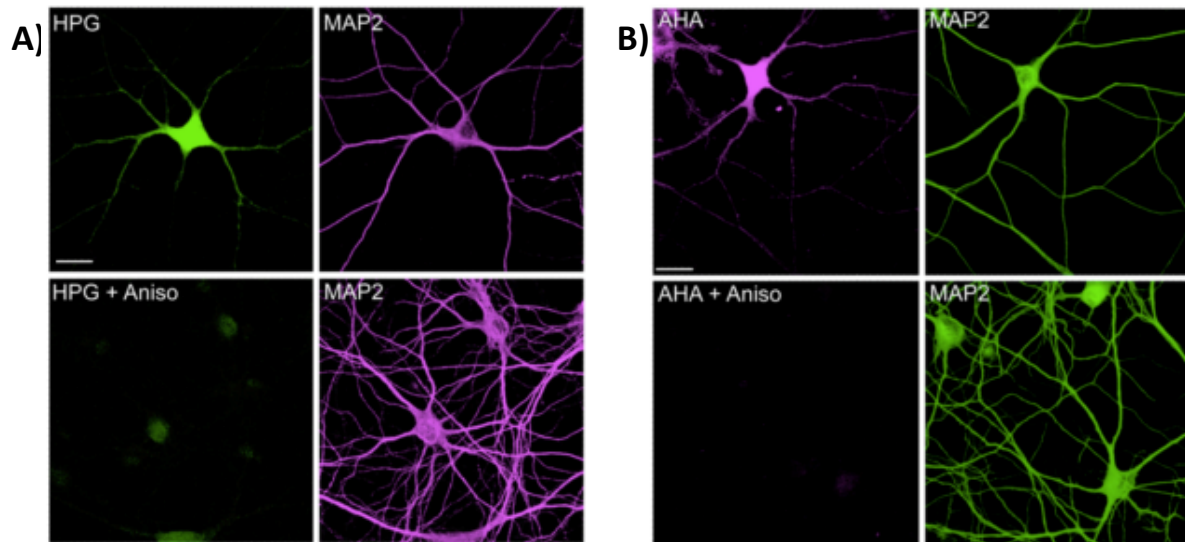
Puromycin je nucleosidové antibiotikum, produkované bakterií *Streptomyces alboniger* a strukturní analog aminoacyl tRNA, který je začleněn do vznikajícího polypeptidového řetězce a zabraňuje elongaci (Pestka, 1971). Na rozdíl od aminoacyl-tRNA obsahuje puromycin nehydrolyzovatelnou amidovou vazbu a jeho navázání na rostoucí peptidový řetězec brání vytvoření peptidové vazby s další aminoacyl-tRNA. To vede k ukončení elongace a uvolnění zkráceného peptidového řetězce z ribosomu (Goodman a Hornberger, 2013). Schmidt *et al.* (2009) vyvinuli metodu detekce nově vznikajících peptidových řetězců (SUnSET; surface sensing of translation), založenou na imunodetekci puromycinu pomocí jeho monoklonálních protilátek. Tato metoda umožňuje stanovit hodnotu translační aktivity pomocí imunofluorescence v jednotlivých buňkách nebo průtokovou cytometrií v heterogenních populacích buněk. Buňky inkubované s puromycinem ošetřili různými činidly ovlivňujícími translaci mRNA a následně skenovali na konfokálním mikroskopu. Buňky ošetřené cykloheximidem a arsenitem sodným vykazovaly dramaticky sníženou intenzitu fluorescence (Schmidt *et al.*, 2009).

Na podobném principu je založena metoda ribopuromycilace (RPM), založena na ribosomem katalyzované puromycilaci vznikajících řetězců imobilizovaných pomocí cycloheximidu (CHX) nebo emetinu. Tyto inhibitory elongace pozastaví translaci a následuje detekce puromycilovaných s ribosomem spojených řetězců specifickými monoklonálními protilátkami proti puromycinu. Výhodou této metody je, že detekuje pouze řetězce připojené k ribosomu v průběhu translace a vynechává již hotové polypeptidy (David *et al.*, 2012).

6.3 FUNCAT

Tato metoda vizualizace nově syntetizovaných proteinů navazuje na metodu kvantifikace translace zvanou BONCAT (BioOrthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging) (Dieterich *et al.*, 2006). Při této metodě je azid-nesoucí amino kyselina azidohomoalanin (AHA) začleněna do nově syntetizovaného proteinu na místo methioninu a následně označena mědí katalyzovanou cykloadicí azidu s alkynem (CuAAC; copper-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition), kvůli konečnému rozpoznání proteinů označených AHA hmotnostní spektrometrií (Dieterich *et al.*, 2010).

Na principu technologie BONCAT vyvinuli Dieterich *et al.* (2010) metodu FUNCAT (Fluorescent Non-Canonical Amino acid Tagging), umožňující označení a vizualizaci širokého spektra nově syntetizovaných proteinů. Vytvořili dvě odlišné fluorescenční značky TRA (TexasRed-PEO₂-Alkyne) a FLA (5'carboxyfluorescein-PEO₈-Azid), které se pomocí tzv. "click chemistry" (způsob biokonjugace substrátů ke specifickým biomolekulám; Moses a Moorhouse, 2007) navážou na proteiny nesoucí AHA/HPG. Inkubace primárních neuronů hipokampu s AHA nebo HPG vedla k označení nově nasyntetizovaných proteinů s podobným efektem u AHA i HPG (Obr. 7). Dramatické snížení fluorescenčního signálu po přidání inhibitoru proteosyntézy anisomycinu (Obr. 7) dokazuje, že tato metoda označuje nově syntetizované proteiny s vysokou specifitou (Dieterich *et al.*, 2010).

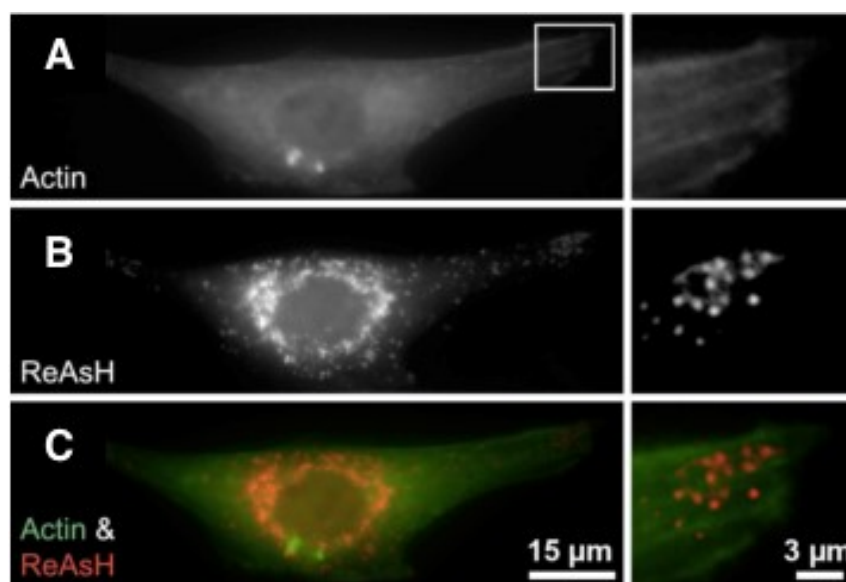


Obr. 7 Vizualizace nově nasyntetizovaných proteinů v primárních neuronech hipokampu. A) Neurony inkubované s HPG + označeny TRA fluorescenční značkou (zelená) a imunocytochemicky zbarveny dendritickým markerem MAP2 (růžová); měřítko 20 μm . B) Neurony inkubované s AHA + označeny FLA fluorescenční značkou (růžová) a imunocytochemicky zbarveny dendritickým markerem MAP2 (zelená); měřítko 20 μm (Dieterich *et al.*, 2010, upraveno).

7 Vizualizace translace specifických transkriptů

7.1 FIAsh/ReAsH

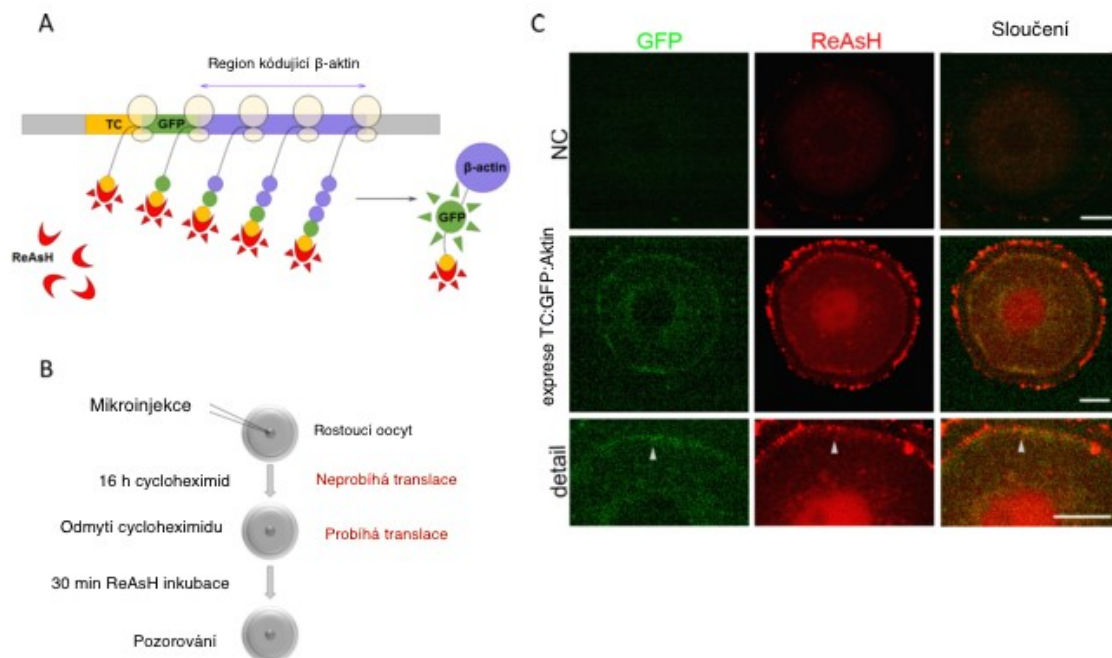
Rodriguez *et al.* (2006) navrhli metodu vizualizace translace mRNA pro β -aktin v živých buňkách linie C2C12. Místa vznikajících polypeptidových řetězců detekovali barvivy FIAsh (fluorescein arsenical hairpin) a ReAsH (resorufin arsenical hairpin) (Obr. 8). Před sekvencí v plazmidu, kódující β -aktin, se vloží sekvence pro tetracystein (TC tag), která asociuje s barvivy FIAsh a ReAsH (Rodriguez *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002). V tomto případě byla k určení translačních míst β -aktinu na N konec mRNA vložena tetracysteinová značka (CCPGCC) následovaná doménou zeleného fluorescenčního proteinu (GFP; green fluorescent protein) a β -aktin kódující sekvencí (Rodriguez *et al.*, 2006).



Obr. 8 ReAsH značení translačních míst β -aktinu. A) Značení již hotového GFP- β -aktinu (černobíle). B) Místa probíhající translace se silným signálem ReAsH (černobíle). C) Sloučení kanálu ReAsH (červený) a GFP- β -aktinu (zelený) (Rodriguez *et al.*, 2006; upraveno).

Jansova *et al.* (2018) použili metodu ReAsH k detekci *in situ* translace transkriptu pro β -aktin v oocyty (Obr. 9A). Plazmid kódující sekvenci β -aktinu s tetracysteinem a GFP doména byly injektovány do transkripčně aktivních oocytů v přítomnosti cycloheximidu (CHX, inhibitor syntézy proteinů) (Obr. 9B) a následně byla translace řízeně spuštěna po dobu 30 minut. Translace mRNA pro β -aktin byla pozorována u kortexu oocyty, kde byly lokalizovány ReAsH představující

místa *in situ* translace β -aktinu a GFP znázorňující již hotové proteiny (Obr. 9C). Intenzita fluorescence ReAsH a GFP na kortexu oocyty byla v porovnání s jinými místy v buňce nebo s negativní kontrolou sedmkrát větší.

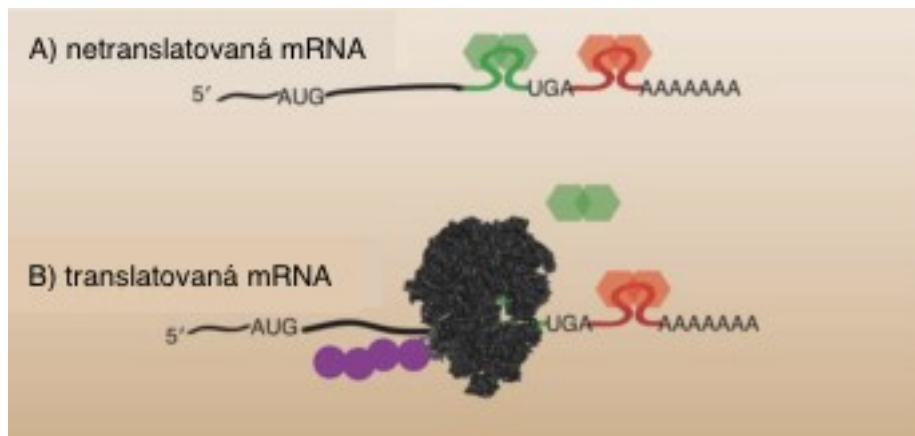


Obr. 9 Vizualizace translace mRNA pro B-aktin v živých oocytech. A) Schéma TC (tetracystein) - GFP (green fluorescent protein) - B-aktin konstruktů a detekce translace. B) Schéma experimentálních postupů při detekci translace B-aktinu v živých oocytech. C) Oocyty injektovány plazmidem TC GFP B-aktin a negativní kontroly (NC). ReAsH značí tetracysteinovou značku nově translatovaného B-aktinu (červený); GFP byl použitý jako marker plně translatovaného B-aktinu (zelený); šipky značí probíhající translaci RNA pro B-aktin; měřítko 10 μ m (Jansova *et al.*, 2018; upraveno)

7.2 TRICK

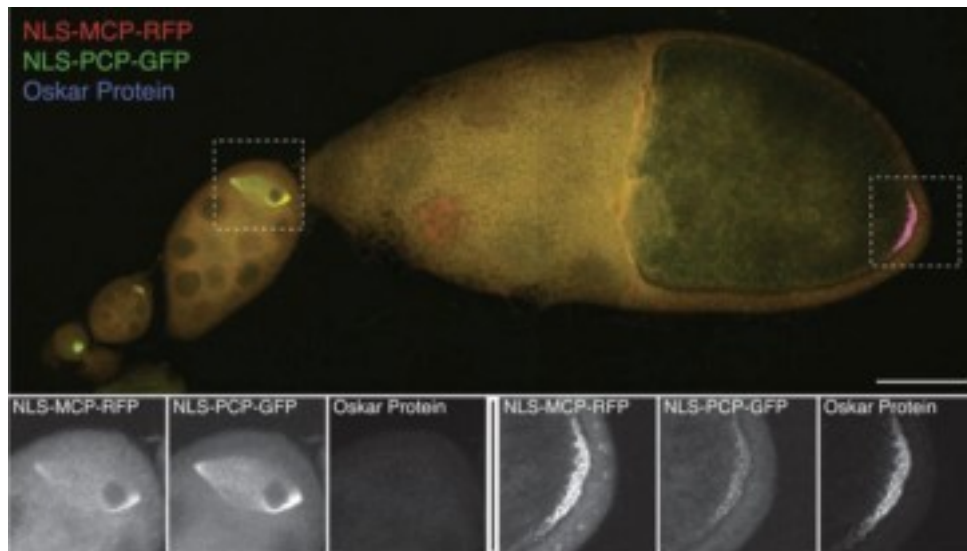
Během prvního kola translace musí ribozom odstranit z mRNA proteiny na ní navázané (Ishigaki *et al.*, 2001). Halstead *et al.* (2015) vytvořili biosenzor založený na tomto procesu, díky kterému jsou schopni zkoumat lokalizaci a načasování translace jednotlivých molekul mRNA. Pro označení transkriptu jsou používány systémy založené na obalových proteinech bakteriofágů, jejichž sekvence vytvářejí vlásenky. Halstead *et al.* (2015) využili obalové proteiny MS2 a PP7, každý spojený se spektrálně rozdílným fluorescenčním proteinem (FP): MS2-RFP (červený FP) a PP7-GFP (zelený FP) (Obr. 10). Pro označení kódující sekvence použili PP7-GFP a pro 3' UTR MS2-RFP. Pokud mRNA není translatována, je označena oběma fluorescenčními barvivy

(GFP i RFP), a výsledné sloučení obou fluorescenčních kanálů produkuje žlutý signál. V první fázi translace dojde ovšem k oddělení GFP z transkriptu, čímž vznikne translatovaná mRNA označená pouze RFP navázaným na vlásenku na 3' UTR (Obr. 10). Odtud pochází název metody “vizualizace translace RNA odstraněním obalového proteinu” (TRICK; translating RNA imaging by coat protein knock-off) (Halstead *et al.*, 2015). K obalovým proteinům, které byly spojené s fluorescenčním proteinem, byla přidána ještě jaderná lokalizační sekvence (NLS; nuclear localization sequence). Vzhledem k tomu, že v jádře byl detekován RFP i GFP a po prvním kole translace byl v cytoplasmě viditelný pouze signál RFP, konstatovali Halstead *et al.* (2015), že translace pozorované mRNA probíhá výhradně v cytoplasmě.



Obr. 10 Schéma vizualizace translace pomocí TRICK. A) Netranslatovaná mRNA je označena GFP (zelený) i RFP (červený). B) Při translaci je GFP (zelený) z transkriptu oddělen a mRNA je označena pouze RFP (červený). Růžově znázorněn rostoucí polypeptidový řetězec (Halstead *et al.*, 2015; upraveno).

Lokalizovaná exprese Oskar proteinu v posteriorní části oocyty *Drosophily melanogaster* je klíčová pro pro správné modelování těla a tvorbu zárodečných buněk (Ephrussi a Lehmann, 1992). Pro monitorování translace tohoto proteinu vytvořili Halstead *et al.* (2015) osk-TRICK mRNA. Do kódující části konstrukt, který obsahoval šest MS2 vlásenkových sekvencí na 3'UTR, vložili 12x PP7 vlásenkovou sekvenci. V raném stádiu oocyty byla osk-TRICK mRNA označena RFP i GFP, což společně s absencí Oskar proteinu naznačuje represi translace (Obr. 11). V pozdější fázi vývoje oocyty byla intenzita GFP na zadní straně oocyty viditelně snížena a Oskar protein byl pomocí imunofluorescence detekován (Obr. 11), což znamená, že byla aktivována translace tohoto proteinu a GFP byl z mRNA odstraněn (Halstead *et al.*, 2015).



Obr. 11 Aktivace translace mRNA kódující Oskar protein. V oocyty ve stádiu č. 7 (detail - první tři šedé rámečky vlevo, každý znázorňující konkrétní kanál) je přítomný RFP (červený) i GFP (zelený), zatímco Oskar protein (modrý) není detekovatelný. V oocyty ve stádiu č. 10 (detail – 3 šedé rámečky vpravo, každý znázorňující konkrétní kanál) je Oskar protein (modrý) přítomen, zatímco intenzita GFP (zelený) signálu klesá, jelikož byl během translace odstraněn; měřítko 50 μm (Halstead *et al.*, 2015).

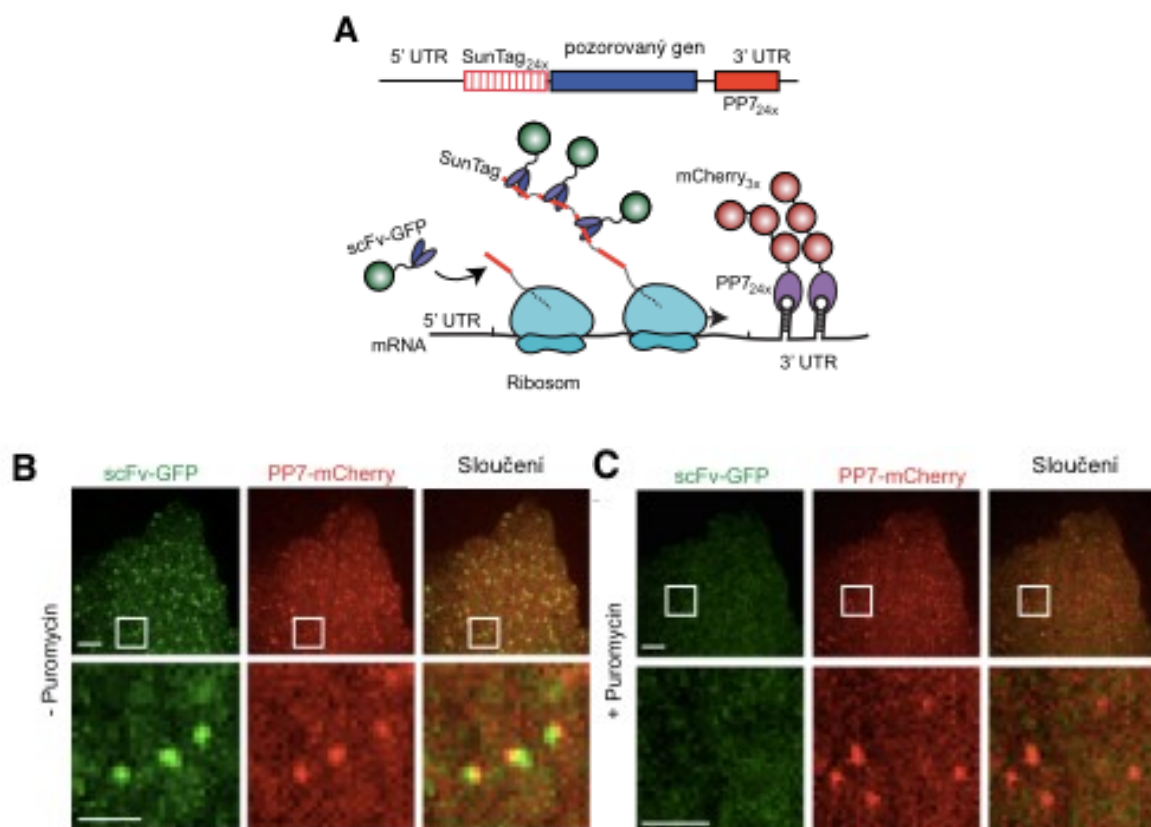
7.3 SINAPS

Metoda vizualizace jednotlivých molekul vznikajících peptidů (SINAPS; single-molecule imaging of nascent peptides) je založena na technologii zvýšení signálu fluorescence, umožňující označení tvořících se peptidů a vizualizaci translace v živých buňkách (Chekulaeva a Landthaler, 2016).

Signály v mnoha biologických procesech mohou být zesíleny navázáním vícero kopií regulačních proteinů na pozorované místo. Tanenbaum *et al.* (2014) navrhli opakující se peptidovou řadu nazvanou SunTag, která je schopna navázat protilátky, které jsou spojené s fluorescenčním proteinem. Dokázali, že SunTag je schopen navázat až 24 kopií GFP a tím umožňuje dlouhodobé pozorování jednotlivých molekul proteinů v živých buňkách s několikanásobnou intenzitou fluorescence.

Pomocí systému SunTag (Tanenbaum *et al.*, 2014) ko-transfekovali Yan *et al.* (2016) lidské buňky linie U2OS dvěma konstrukty: první obsahoval řadu 24 SunTag peptidů následovanou požadovaným genem; druhý obsahoval sekvenci pro protilátku označenou GFP (scFv-GFP), která se s vysokou afinitou váže na SunTag peptid (Obr. 12A). Současně byla tato mRNA na 3'UTR fluorescenčně označena zavedením 24 kopií krátkých vlásenkových sekvencí, na které se s vysokou afinitou váže obalový protein PP7 spojený se 3 kopiemi fluorescenční barvy

mCherry (PP7-mCherry) (Obr. 12A). Protein PP7 byl použit pro navázání mRNA k plasmatické membráně buňky a tedy usnadnění pozorování translace ve 2D obraze. V průběhu translace se na SunTag peptid ihned po vynoření z ribosomu navázaly již fluorescentní scFv-GFP (Obr. 12A). Pozorování ukázalo cca 10-50 velmi jasných, společně se vyskytujících zelených a červených fluorescenčních bodů (Obr. 12B). Po přidání inhibitoru translace (puromycinu), který odděluje polypeptidy a ribosomy od mRNA, jasné body zmizely (Obr. 12C). To naznačuje, že se jednalo o místa probíhající translace s vícero ribosomy napojenými na mRNA. Slabé fluorescenční body nebyly přidáním puromycinu ovlivněny, což s největší pravděpodobností znamená, že reprezentovaly již nasyntetizované proteiny odpojené od ribosomu (Yan *et al.*, 2016). Dle dostupných informací tuto metodu na oocytech zatím nikdo neprovedl.



Obr. 12 Vizualizace translace jednotlivých molekul mRNA pomocí fluorescenčního značení tvořícího se řetězce. A) Schéma značení polypeptidového řetězce pomocí SunTag systému a značení mRNA. B-C) U2OS buňky exprimující scFv-GFP (zelený) a PP7-mCherry (červený) před (B) a po (C) oddělení ribosomů od mRNA přidáním puromycinu (Yan *et al.*, 2016; upraveno).

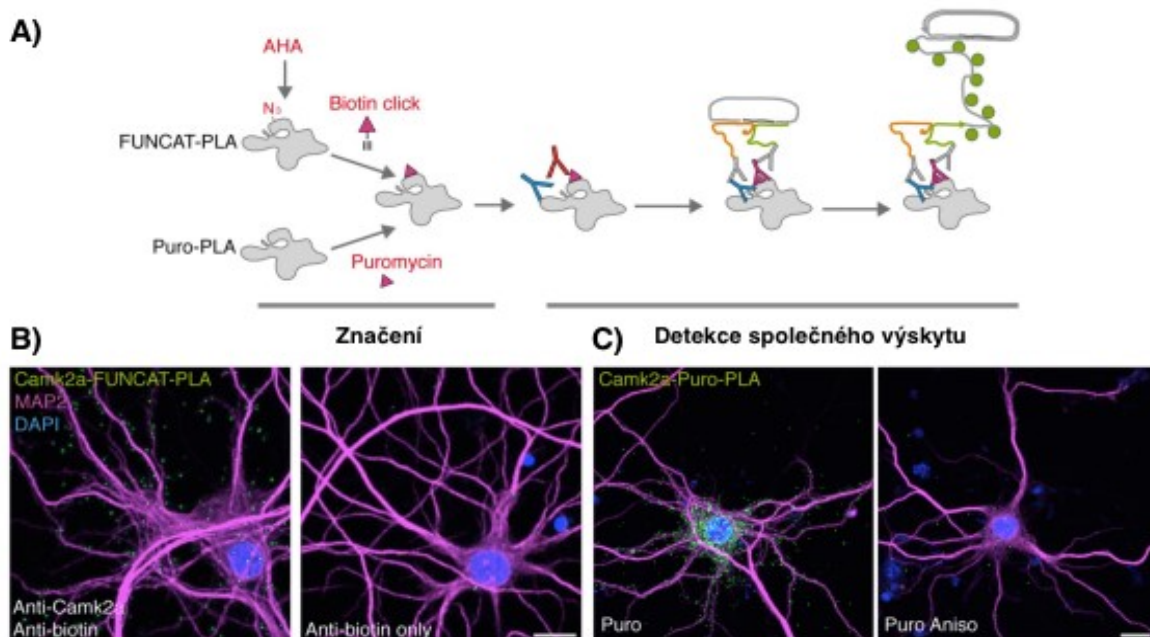
7.4 FUNCAT-PLA / PURO-PLA

Pomocí “click chemistry” mohou být označené, nově nasyntetizované proteiny vizualizovány *in situ* za použití fluorescenčních značek (FUNCAT; fluorescence non-canonical amino acid tagging) (Dieterich *et al.*, 2010) nebo puromycinu a protilátek proti němu (David *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2009).

Aby se dal endogenní protein vizualizovat *in situ*, vytvořili tom Dieck *et al.*, (2015) metodu vizualizace proteinů na základě jejich vzájemné vzdálenosti (PLA; proximity ligation assay), která detekuje prostorovou shodu dvou protilátek. První protilátka detekuje nově syntetizovaný protein označený metodou FUNCAT nebo puromycilací a druhá určuje specifický epitop sledovaného proteinu (POI; protein of interest) (Obr. 13a).

V průběhu translace je při FUNCAT metodě azidohomoalanin (AHA) začleněn místo methioninu do nově syntetizovaného proteinu a vizualizován za použití biotinové značky a anti-biotinové protilátky. Nově syntetizované proteiny se dají také vizualizovat ošetřením puromycinem, který ukončí translaci a odstřihne protein, který je následně rozpoznán protilátkou proti puromycinu. Aby se dal určit konkrétní specifický protein, jsou používány rozdílné sekundární protilátky spojené s různými oligonukleotidy (sondy PLA^{plus} a PLA^{minus}). Když jsou tyto dvě sondy ve vzájemné blízkosti, podporují tvorbu kruhové formace, následně amplifikované metodou tzv. “rolling circle amplification”. Konečná vizualizace *in situ* probíhá pomocí fluorescenčně značených sond, komplementárních k amplifikovaným sekvencím (Obr. 13a) (tom Dieck *et al.*, 2015).

FUNCAT-PLA i PURO-PLA metody byly paralelně použity při vizualizaci distribuce nově syntetizovaných Camk2 (kalcium/kalmodulin-dependentní protein kináza 2; calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2) proteinů v neuronech hipokampu potkana. Obě metody vedly ke stejným závěrům, signál nově syntetizovaného proteinu Camk2 byl přítomný jak v soma, tak v dendritech neuronu (Obr. 13b,c). Hlavním rozdílem byl počet detekovaných částic metodou FUNCAT-PLA a PURO-PLA (Obr. 13b,c), způsobený rozdílem v požadovaných délkách inkubace. K dosažení signálu PURO-PLA metodou stačí buňky inkubovat v řádu sekund až minut, ale k detekování podobného FUNCAT-PLA signálu je zapotřebí inkubace v řádu hodin. Porovnání FUNCAT-PLA a PURO-PLA signálu po identickém času značení, kdy před značením AHA byl na krátkou dobu znemožněn přístup k methioninu, ukázalo přibližně 10x silnější signál u metody PURO-PLA (tom Dieck *et al.*, 2015).



Obr. 13 Značení konkrétních nově syntetizovaných proteinů pomocí FUNCAT-PLA a PURO-PLA. A) Schéma metod FUNCAT-PLA a PURO-PLA. Do nově syntetizovaných proteinů jsou zaneseny AHA nebo puromycin. Rozpoznání "nově nasyntetizované" značky (biotin nebo puromycin; růžový trojúhelník) její protilátkou (červené Y) a rozpoznání zájmového proteinu specifickou protilátkou (modré Y) dokazuje blízkou vzdálenost když jsou PLA^{minus} a PLA^{plus} oligonukleotidy (žlutá a šedivá smyčka), spojené se sekundární protilátkou (šedivé Y), dostatečně blízko pro tvorbu kruhové formace, která se následně amplifikuje. Signál je zesílen navázáním fluorescenčních sond právě na amplifikovanou sekvenci (zelené kruhy). B) FUNCAT-PLA signál (zelený) nově nasyntetizovaných Camk2 proteinů v neuronech hipokampu (vlevo); kontrola bez anti-Camk2 protilátky (vpravo); DAPI (modrá); MAP2 (růžová); měřítko 15 μm . C) PURO-PLA signál (zelený) nově nasyntetizovaných Camk2 proteinů v neuronech hipokampu (vlevo); neurony označovány s inhibitory proteosyntézy anisomycinem (vpravo); DAPI (modrá); MAP2 (růžová); měřítko 15 μm (tom Dieck *et al.*, 2015; upraveno)

8 Závěr

Tato práce shrnuje principy metody RNA FISH, vizualizující molekuly RNA za použití fluorescenčně značených oligonukleotidových sond. Dále principy vizualizace globální translace pomocí metody SUNSET, která využívá puromycin nebo principy metod pracujících s analogy methioninu. Další popisované metody vizualizují specifické transkripty. Využívají např. uměle vložené sekvence do sledovaného transkriptu, obalové proteiny bakteriofága nebo peptidovou řadu SunTag. I když se v posledním desetiletí výzkum zaměřený na vizualizaci translace značně rozrostl, jen malá část se zabývá konkrétně vizualizací translace v oocytu. To je s největší pravděpodobností proto, že s umlčenou transkripcí během meiotického zrání není savčí oocyt schopný transkribovat sekvence, které jsou mu uměle nabízeny v podobě plazmidu. Dalším důvodem může být to, že mikroinjekování do oocytu je komplikovanější způsob vkládání plazmidu než jeho prostá transfekce, která se dá použít u buněk jiných typů. Jelikož se ukazuje, že místně a časově ohraničená translace hraje roli při správném meiotickém zrání i u savčích oocytů, je důležité zkoumat translaci na modelových buňkách, jako jsou myší nebo prasečí oocyty. Znalosti získané tímto pozorováním mohou být následně aplikovány i na lidský oocyt a využity např. v rámci asistované reprodukce. S neustále se zdokonalujícími vizualizačními přístroji a designováním nových fluorescenčních sond budou určitě také přibývat další metody, kterými bude možné sledovat fyziologické procesy v buňce.

9 Seznam použitých zkratk

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

mRNA – messengerová RNA

tRNA – transferová RNA

rRNA – ribosomální RNA

pre-mRNA – primární mRNA

ORF – otevřený čtecí rámeček

GTP – guanosintrifosfát

eIF4F – eukaryotický iniciační faktor 4F, čepičku vázající komplex

eIF2, eIF5B, eIF4B, eIF3 – eukaryotické iniciační faktory

eIF4E, eIF4G, eIF4A – eukaryotické iniciační faktory, podjednotky eIF4F

eRF1, eRF3 – eukaryotické uvolňovací faktory

5' UTR – 5' nepřekládaný úsek

3' UTR – 3' nepřekládaný úsek

CPE – cytoplasmatický polyadenylační element

CPEBs – proteiny vázající se na CPE

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

smRNA – jednomolekulová RNA

Met – methionin

AHA – azidohomoalanin

HPG – homoproparglycin

GV – zárodečný váček; stádium zárodečného váčku

NEBD – rozpad jaderné membrány; stádium rozpadu jaderné membrány

CTA – chromosomal translational area

PTA – perispindular area

BONCAT – BioOrthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging

CuAAC – mědí katalyzovaná cykloadice azidu s alkynem

FUNCAT – Fluorescent Non-Canonical Amino acid Tagging

TRA – fluorescenční značka TexasRed-PEO₂-Alkyne

FLA – fluorescenční značka 5'carboxyfluorescein-PEO₈-Azid
SUnSET – surface sensing of translation
RPM – ribopuromycilace
CHX – cycloheximid
FIAsH – fluorescein arsenical hairpin
ReAsH –resorufin arsenical hairpin
TC – tetracystein
GFP – zelený fluorescenční protein
RFP – červený fluorescenční protein
MS2 – obalový protein
PP7 – obalový protein
FP – fluorescenční protein
TRICK – translating RNA imaging by coat protein knock-off
NLS – jaderná lokalizační sekvence
SINAPS – single-molecule imaging of nascent peptides
PLA – proximity ligation assay
Camk2 – kalcium/kalmodulin-dependentní protein kináza 2
TEM – transmisní elektronový mikroskop
SEM – skenovací elektronový mikroskop

10 Seznam literatury

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & And Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell. Amino Acids* (Vol. 54). [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C)
- Beatty, K. E., Liu, J. C., Xie, F., Dieterich, D. C., Schuman, E. M., Wang, Q., & Tirrell, D. A. (2006). Fluorescence visualization of newly synthesized proteins in mammalian cells. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(44), 7364–7367. <https://doi.org/10.1002/anie.200602114>
- Clarke, H. J. (2012). Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. *Results and Problems in Cell Differentiation*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30406-4-1>
- Curtis, D., Lehmann, R., & Zamore, P. D. (1995). Translational Regulation in Development, 81, 171–178.
- David, A., Dolan, B. P., Hickman, H. D., Knowlton, J. J., Clavarino, G., Pierre, P., ... Yewdell, J. W. (2012). Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *Journal of Cell Biology*, 197(1), 45–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112145>
- Day, R. N., & Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Online*. <https://doi.org/10.1039/b901966a>.The
- De Conti, L., Baralle, M., & Buratti, E. (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.1140>
- De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Burns, K. H., Adashi, E. Y., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function, 275, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.028>
- Denk, W., & Horstmann, H. (2004). Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329>
- Dever, T. E., & Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>
- Dieck, S. T., Müller, A., Nehring, A., Hinz, F. I., Bartnik, I., Schuman, E. M., & Dieterich, D. C.

- (2012). Metabolic labeling with noncanonical amino acids and visualization by chemoselective fluorescent tagging. *Current Protocols in Cell Biology*, 1(SUPPL.56). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0711s56>
- Dieterich, D. C., Hodas, J. J. L., Gouzer, G., Shadrin, I. Y., Ngo T, J., Triller, A., ... Schuman, E. M. (2010). In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *In Situ*, 13(7), 897–905. <https://doi.org/10.1038/nn.2580>.In
- Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A., & Schuman, E. M. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), 9482–9487. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601637103>
- Ephrussi, A., & Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature*, 358(6385), 387–392. <https://doi.org/10.1038/358387a0>
- Eppig, J. J., & Schroeder, A. C. (1989). Capacity of Mouse Oocytes from Preantral Follicles to Undergo Embryogenesis and Development to Live Young after Growth, Maturation, and Fertilization in Vitro. *Biology of Reproduction*, 41(2), 268–276. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.2.268>
- Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K., & Singer, R. H. (1998). Visualization of Single RNA Transcripts in Situ - Femino wt al. 1998, 280(April), 585–590.
- Fox, C. A., Sheets, M. D., & Wickens, M. P. (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: Distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUUAU. *Genes and Development*, 3(12 B), 2151–2162. <https://doi.org/10.1101/gad.3.12b.2151>
- Frank, J. (2003). Toward an understanding of the structural basis of translation. *Genome Biology*, 4(12). <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-12-237>
- Goodman, C. A., & Hornberger, T. A. (2013). Measuring protein synthesis with SUNSET: A valid alternative to traditional techniques? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 41(2), 107–115. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182798a95>
- Halstead, J. M., Lionnet, T., Wilbertz, J. H., Wippich, F., Ephrussi, A., Singer, R. H., & Chao, J. A. (2015). An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals, 347(6228). <https://doi.org/10.1126/science.aaa3380>.An
- Hershey, J., Asano, K., Naranda, T., Vornlocher, H., Hanachi, P., & Merrick, W. (1996). Conservation and diversity in the structure of translation initiation factor eIF3 from humans

- and yeast, 903–907.
- Hopper, A. K., Pai, D. A., & Engelke, D. R. (2010). Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.053>
- Huarte, J., Stutz, A., O'Connell, M. L., Gubler, P., Belin, D., Darrow, A. L., ... Vassalli, J. D. (1992). Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. *Cell*, *69*(6), 1021–1030. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90620-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90620-R)
- Hyvärinen, A., & Oja, E. (1997). A Fast Fixed-Point Algorithm for Independent Component Analysis. *Neural Computation*, *9*(7), 1483–1492. <https://doi.org/10.1162/neco.1997.9.7.1483>
- Chekulaeva, M., & Landthaler, M. (2016). Eyes on Translation. *Molecular Cell*, *63*(6), 918–925. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.031>
- Chu, J., Cargnello, M., Topisirovic, I., & Pelletier, J. (2016). Translation Initiation Factors: Reprogramming Protein Synthesis in Cancer. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.06.005>
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., & Maquat, L. E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, *106*(5), 607–617. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00475-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00475-5)
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jansova, D., Tetkova, A., Koncicka, M., Kubelka, M., & Susor, A. (2018). Localization of RNA and translation in the mammalian oocyte and embryo. *PLoS ONE*, *13*(3), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192544>
- Karabinova, P., Kubelka, M., & Susor, A. (2011). Proteasomal degradation of ubiquitinated proteins in oocyte meiosis and fertilization in mammals. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1235-1>
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00210-3)
- Levsky, J. M., & Singer, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, *116*(14), 2833–2838. <https://doi.org/10.1242/jcs.00633>
- Lippincott-Schwartz, J., & Patterson, G. H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(April), 87–91.

<https://doi.org/10.1126/science.1082520>

- Liu, J., Xu, Y., Stoleru, D., & Salic, A. (2012). Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(2), 413–418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111561108>
- Mader, S., Lee, H. A. N., Pause, A., & Sonenberg, N. (1995). The Translation Initiation Factor eIF-4E Binds to a Common Motif Shared by the Translation Factor eIF-4 and the Translational Repressors 4E-Binding Proteins, *15*(9), 4990–4997.
- Medioni, C., Mowry, K., & Besse, F. (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development*, *139*(18), 3263–3276. <https://doi.org/10.1242/dev.078626>
- Moses, J. E., & Moorhouse, A. D. (2007). The growing applications of click chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, *36*(8), 1249–1262. <https://doi.org/10.1039/B613014N>
- Murphy, D. B., & Davidson, M. W. (2012). *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging: Second Edition*. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118382905>
- Orjalo, A., Johansson, H. E., & Ruth, J. L. (2011). Stellaris fluorescence in situ hybridization (FISH) probes: A powerful tool for mRNA detection. *Nature Methods*, *8*(10), i–ii. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.349>
- Pestka, S. (1971). Inhibitors of Ribosome Functions. *Annual Review of Microbiology*, *25*(1), 487–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.25.100171.002415>
- Piqué, M., Lopéz, J. M., Foissac, S., Guigó, R., & Méndez, R. (2008). A Combinatorial Code for CPE-Mediated Translational Control, 434–448. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.038>
- Pyronnet, S. (2000). Phosphorylation of the Cap-Binding Protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1, *60*(0), 1237–1243.
- Querido, E., Dekakra-Bellili, L., & Chartrand, P. (2017). RNA fluorescence in situ hybridization for high-content screening. *Methods*, *126*, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.07.005>
- Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A., & Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Cell*, *5*(1), 877–879. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1253>
- Rodriguez, A. J., Shenoy, S. M., Singer, R. H., & Condeelis, J. (2006). Visualization of mRNA translation in living cells. *Journal of Cell Biology*, *175*(1), 67–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512137>

- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocol*, (10), 36. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>. Fluorescence
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3), 223–239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>
- Scheper, G. C., Morrice, N. A., Kleijn, M., & Proud, C. G. (2001). The Mitogen-Activated Protein Kinase Signal-Integrating Kinase Mnk2 Is a Eukaryotic Initiation Factor 4E Kinase with High Levels of Basal Activity in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 743–754. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.743-754.2001>
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., & Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods*, 6(4), 275–277. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1314>
- Sonenberg, N., & Gingras, A. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth, 268–275.
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4), 731–745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- Stebbins-Boaz, B., Hake, L. E., & Richter, J. D. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *The EMBO Journal*, 15(10), 2582–2592. <https://doi.org/10.1093/emboj/15/10/2582>
- Susor, A., Jansova, D., Anger, M., & Kubelka, M. (2016). Translation in the mammalian oocyte in space and time. *Cell and Tissue Research*, 363(1), 69–84. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2269-6>
- Susor, A., Jansova, D., Cerna, R., Danylevska, A., Anger, M., Toralova, T., ... Kubelka, M. (2015). Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway. *Nature Communications*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms7078>
- Susor, A., & Kubelka, M. (2017). *Oocytes - Translational Regulation in the Mammalian Oocyte* (Vol. 63). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6>
- Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S., & Vale, R. D. (2014). A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 159(3), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>

- Thorn, K. (2016). A quick guide to light microscopy in cell biology. *Molecular Biology of the Cell*, 27(2), 219–222. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0088>
- tom Dieck, S., Kochen, L., Hanus, C., Bartnik, I., Nassim-Assir, B., Merk, K., ... Schuman, E. M. (2015). Direct visualization of identified and newly synthesized proteins in situ. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3663-1>. Progestin
- Venters, B. J., & Pugh, B. F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2–3), 117–141. <https://doi.org/10.1080/10409230902858785>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., ... Luo, Y. (2012). RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wilson, D. N., & Cate, J. H. D. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011536>
- Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H. (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 25(3), 319–323. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0863>
- Yan, X., Hoek, T. A., Vale, R. D., & Tanenbaum, M. E. (2016). Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules in Vivo. *Cell*, 165(4), 976–989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.034>
- Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., & Tsien, R. Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), 906–918. <https://doi.org/10.1038/nrm976>