

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Veronika Kropáčková

Molekulární podstata interakcí mezi Dishevelled 3 (DVL3) a proteinovým
regulátorem cytokineze 1 (PRC1)

Molecular basis of interactions between Dishevelled 3 (DVL3) and Protein
Regulator Of Cytokinesis 1 (PRC1)

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jan Komárek, Ph.D.

Praha, 2020

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, 10. 8. 2020

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Cyrilovi Bařinkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl. Za trpělivost a pomoc při vypracovávání diplomové práce bych dále ráda poděkovala Mgr. Janu Komárkovi, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře strukturní biologie za vstřícnost a velmi přátelské prostředí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Scaffolding protein Dishevelled (Dvl) je klíčovou součástí Wnt signalizačních kaskád. Podílí se na řadě biologických procesů, kterými jsou například proliferace, diferenciací a migrace buněk, určování buněčné polarity a také obnova kmenových buněk. Je nepostradatelný pro správný vývoj embrya i tkáňovou homeostázu v dospělosti. Proteinový regulátor cytokineze (PRC1) patří mezi proteiny asociované s mikrotubuly. Podílí se na tvorbě centrálního svazku antiparalelních mikrotubulů (tzv. spindle midzone) v průběhu buněčného dělení, který předchází vzniku kontraktálního prstence a je nezbytný pro správný průběh cytokineze.

V naší laboratoři byl PRC1 identifikován jako potenciální interakční partner DVL3. Tato diplomová práce je zaměřena na vymezení interakčního rozhraní mezi DVL3 a PRC1 s využitím TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) mikroskopie. K tomuto účelu byly navrženy, exprimovány a purifikovány přirozeně se vyskytující formy DVL a PRC1 a jejich zkrácené varianty. Bylo zjištěno, že PRC1 interaguje se všemi izoformami DVL a pro interakci mezi PRC1 a DVL3 je nezbytná N-terminální část PRC1 a že na interakci se zřejmě podílí DEP doména DVL3.

Klíčová slova: Dishevelled 3, DVL3, Proteinový regulátor cytokineze 1, PRC1, interakční rozhraní, TIRF mikroskopie

Abstract

Scaffolding protein Disheveled (Dvl) is a key component of Wnt signaling cascades. Dvl participates in a number of biological processes, such as cell proliferation, differentiation and migration, determination of cell polarity, and also stem cell self-renewal. It is therefore indispensable for the correct embryo development and tissue homeostasis in adulthood. The protein regulator of cytokinesis (PRC1) is a microtubule-associated protein. PRC1 is involved in spindle midzone formation during cell division. Spindle midzone precedes the contractile ring assembly and is essential for normal cell cleavage.

In our laboratory, PRC1 was identified as a putative interaction partner of DVL3. This master thesis is focused on delineation of the interaction interface between DVL3 and PRC1 using TIRF microscopy (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy). To this end, full-length DVL and PRC1 proteins together with their truncated variants were designed, expressed and purified. It was discovered that PRC1 interacts with all three DVL isoforms and the N-terminal part of PRC1 is required for the interaction between PRC1 and DVL3. Furthermore, the DEP domain of DVL3 is likely involved in PRC1 interactions.

Key words: Dishevelled 3, DVL3, Protein regulator of cytokinesis 1, PRC1, interaction interface, TIRF microscopy

Obsah

1	Teoretický úvod	1
1.1	Dishevelled (Dvl)	1
1.1.1	Struktura Dvl	1
1.1.2	Zapojení Dvl v kanonické Wnt signalizaci	5
1.1.3	Zapojení Dvl v nekanonické Wnt signalizaci	7
1.1.4	Buněčný cyklus a Wnt signalizace	8
1.2	Proteinový regulátor cytokineze 1 (PRC1)	11
1.2.1	Struktura PRC1	12
1.2.2	Regulace a funkce PRC1 během buněčného cyklu	15
1.2.3	Interakční partneři PRC1	19
1.2.4	Role PRC1 v tumorigenezi a možné zapojení ve Wnt signalizaci ..	21
2	Cíle práce	27
3	Metody	28
3.1	Seznam primerů použitých při klonování	28
3.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
3.3	Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu	30
3.4	Klonování	31
3.4.1	Gateway klonování	31
3.4.2	Klonování pomocí restričních endonukleáz	31
3.5	Transformace <i>E. coli</i> metodou heat-shock	32
3.6	Izolace DNA	32
3.7	Expresce proteinů	33
3.7.1	Expresce proteinů v HEK293 buňkách	34
3.8	SDS-PAGE elektroforéza	35
3.9	Western blotting a imunodetekce proteinů	36
3.10	Purifikace proteinů	36
3.10.1	Purifikace pomocí metaloafinitní chromatografie (NiNTA) a štěpení 3C proteázou	36
3.10.2	Purifikace proteinů obsahující Strep-tag pomocí afinitní chromatografie	37
3.11	TIRF mikroskopické experimenty	38
3.11.1	Polymerizace mikrotubulů	38
3.11.2	Příprava sklíček pro mikroskopické experimenty	38
3.11.3	TIRF mikroskopie	39
4	Výsledky	40

4.1	Klonování.....	40
4.2	Exprese, purifikace a štěpení 3C proteázou	41
4.3	Exprese a purifikace fúzních proteinů GFP-DVL.....	45
4.4	TIRF mikroskopie	47
5	Diskuze.....	52
5.1	PRC1	52
5.2	DVL.....	56
5.3	Možné další zapojení DVL v buněčném cyklu.....	58
5.4	Budoucí cíle	58
6	Závěr	60
7	Přehled použité literatury	61

Seznam použitých zkratek

AMK	Aminokyseliny
APC	Adenomatous polyposis coli
APS	Peroxodisíran amonný
Ase1	Anaphase spindle elongation protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Cdc42	Cell division control protein 42
CDK	Cyklin-dependentní kináza
CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2
CENP-E	Centromere-associated protein E
Cep55	Centrosomal protein of 55kDa
CIN	Chromozomální nestabilita
CK	Kasein kináza
CLASP1	Cytoplasmic-linker associated protein 1
CLIP-170	Cytoplasmatic linker protein-170
C-NAP1	Centrosomal Nek2-associated protein 1
CPC	Chromosome passenger complex
CRIK	Citron-Rho interacting kinase
CXXC5	CXXC-type zinc finger protein 5
CYK-4	Cytokinesis defect-4
Daam1	Dvl associated activator of morphogenesis 1
DDLS	Dediferencovaný liposarkom
DTT	Dithiotreitol
Dvl	Dishevelled
EB1	End-binding protein 1
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EGTA	Kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
FOXP1/2	Forkhead box protein K1/2
GSK-3 β	Glykogen syntáza kináza 3 β
HCC	Hepatocelulární karcinom
HRP	Křenová peroxidáza
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITH	Intratumorální heterogenita
JNK	c-Jun N-terminal kinase

KIF23/MKLP1	Kinesin-like protein 23
Kif4A	Kinesin-4A
Lrp5/6	Low density lipoprotein 5 and 6
MAP	Proteiny asociované s mikrotubuly
MCC	Mitotic checkpoint complex
MgcRacGAP1	Rac-GTPase-activating protein 1
NEK2	NMA-related kinase 2
Nkd	Naked cuticle
NSCLC	Nemalobuněčný karcinom plic
OSCC	Orofaryngeální dlaždicobuněčný karcinom
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PEI	Polyethylenimin
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonová kyselina)
Pk	Prickle
PKC	proteinkináza C
PL	Piperlongumin
PLK1	Polo-like kináza 1
pRb	Retinoblastoma tumor suppressor protein
PRC1	Proteinový regulátor cytokineze 1
PVDF	Polyvinyliden difluorid
RIPK4	Receptor-interacting protein complex 4
SAC	Spindle assembly checkpoint
SDS	Dodecylsulfát sodný
TCF-4	T-cell factor 4
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
β-TrCP	β-transducin repeat containing protein

1 Teoretický úvod

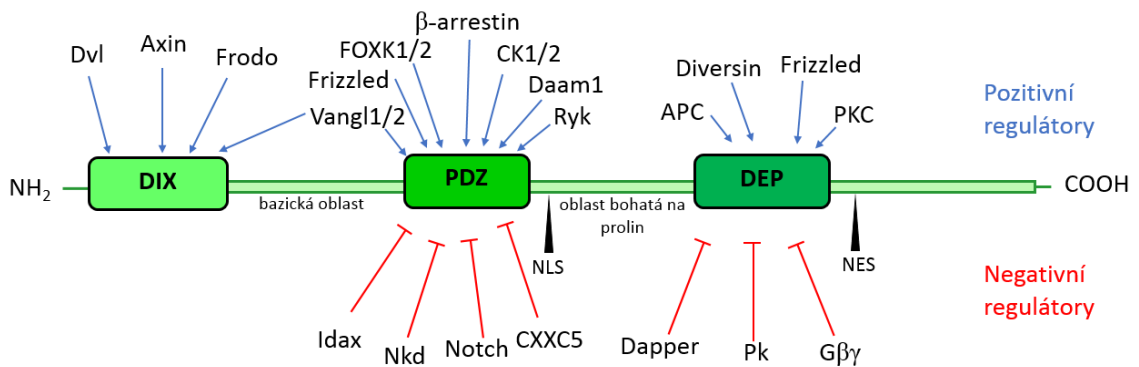
1.1 Dishevelled (Dvl)

Dishevelled, v překladu „rozcuchaný“ je název proteinu, jehož gen byl identifikován u mutantů *Drosophila melanogaster* (Fahmy and Fahmy, 1959). Své jméno dostal na základě pozorování změny fenotypového projevu, která spočívala v neuspořádané orientaci chloupků na těle a křídlech octomilky. Až v roce 1987 bylo zjištěno, že se Dishevelled (u bezobratlých označován jako Dsh) v časném embryonálním vývoji u octomilky podílí na určení polaritě tělních segmentů transdukcí Wnt signálu (Perrimon and Mahowald, 1987). Dishevelled (u obratlovců označován jako Dvl) se také účastní gastrulace u *Xenopus laevis* (Sokol, 1996) a *Danio rerio* (Heisenberg et al., 2000). Identifikovány byly i tři myši (Dvl1, Dvl2, Dvl3) [(Sussman et al., 1994);(Klingensmith et al., 1996);(Tsang et al., 1996)] a tři lidské homology (DVL1, DVL2, DVL3) [(Pizzuti et al., 1996);(Seměnov and Snyder, 1997)]. Domény Dvl jsou evolučně vysoce konzervované a jednotlivé izoformy mají částečně specifické a částečně navzájem zastupitelné funkce (Etheridge *et al.*, 2008).

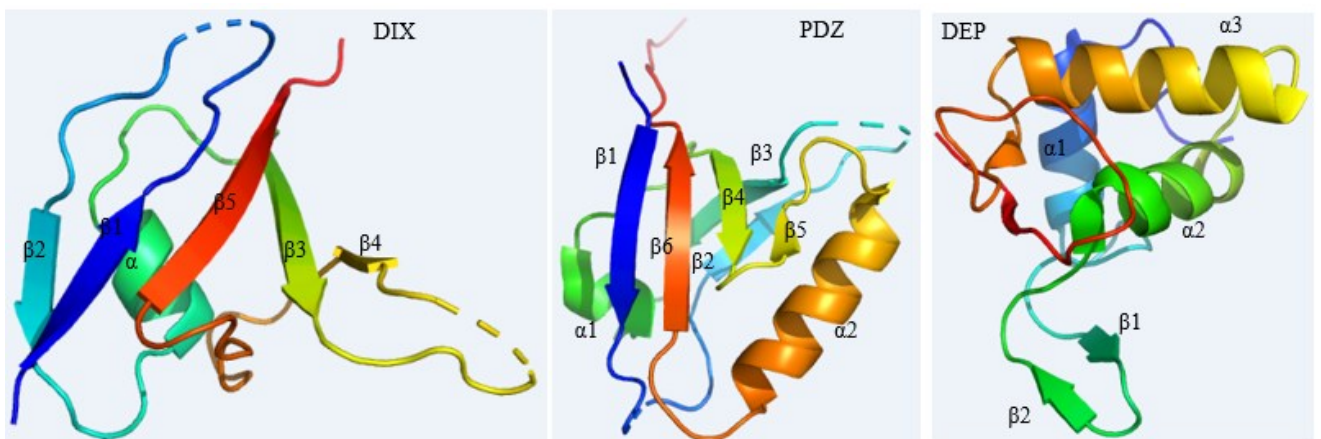
Dvl se jako tzv. scaffolding protein zapojuje do řady biologických procesů a je nezbytnou součástí Wnt signalizace, kde je jeho hlavní úlohou příjem, zpracování a následně předání signálu k dalším efektorům signalizační kaskády. Dvl hraje významnou roli v procesech proliferace, diferenciace a migrace buněk, napomáhá určování buněčné polaritě a obnově kmenových buněk. Podílí se tedy nejen na správném embryonálním vývoji, ale i na udržení tkáňové homeostázy v dospělosti.

1.1.1 Struktura Dvl

Dvl proteiny se skládají zhruba z 600-750 aminokyselin a vždy obsahují tři konzervované domény – DIX, PDZ a DEP s vysokou homologií (Boutros and Mlodzik, 1999), prostřednictvím kterých Dvl interaguje se svými vazebnými partnery (obrázek 1). Jednotlivé domény jsou odděleny dlouhými flexibilními linkery, které obsahují další evolučně konzervované části – bazickou oblast (mezi DIX a PDZ doménou) a oblast bohatou na prolin (mezi PDZ a DEP doménou). Dvl obsahuje také jaderný lokalizační signál (NLS) a jaderný exportní signál (NES) [(Itoh *et al.*, 2005);(Gan *et al.*, 2008)]. Celková struktura Dvl proteinů není známá, ale prostorová struktura jednotlivých domén již byla u některých homologů objasněna (obrázek 2).



Obrázek 1: Doménové uspořádání Dvl proteinu s vyznačenými pozitivními a negativními regulátory.



Obrázek 2: Struktury jednotlivých domén Dvl. DIX a PDZ doména lidského DVL2, pdb kódy 6JCK a 2REY; DEP doména myšího Dvl1, pdb kód 1FSH

1.1.1.1 DIX doména

DIX doména se nachází na N-konci Dvl proteinů a je také součástí Axinu, interakčního partnera Dvl ve Wnt signalizaci, kde se nazývá DAX. V obou případech je doména složena z pěti β -listů a jednoho α -helixu. Tato doména je nezbytná pro kanonickou Wnt signalizační kaskádu, protože umožňuje polymeraci Dvl, která je nutná pro transdukcii signálu. Polymerace je dynamická a reverzibilní. Vytváří se homooligomery DIX-DIX (Schwarz-Romond *et al.*, 2007), DAX-DAX a heterooligomery DIX-DAX v „head to tail“ uspořádání, přičemž afinita DIX-DIX je nejvyšší, následují heterotypické interakce DIX-DAX/DAX-DIX a nejnižší je afinita DAX-DAX (Yamanishi *et al.*, 2019). To je v souladu s hypotézou, že DIX-Dvl polymer interaguje s DAX doménou Axinu, a tím rekrutuje destrukční komplex k Wnt receptorovému komplexu na plazmatické membráně, ale také rozrušuje DAX-Axinové polymery, které jsou nezbytné pro fungování destrukčního komplexu a proteazomální degradaci β -kateninu (Fiedler *et al.*, 2011). Dalším interakčním partnerem DIX-Dvl je

protein Frodo, který pozitivně reguluje Wnt signalizaci v časném embryonálním vývoji *Xenopus laevis* (Gloy, Hikasa and Sokol, 2002).

1.1.1.2 PDZ doména

PDZ doména je běžnou součástí signálních proteinů a často zprostředkovává protein-proteinové interakce s krátkou sekvencí C-konců cílových proteinů. Centrální doména PDZ (Post-synaptic density disc large, and Zonula-occludens-1) Dvl proteinů je složena ze dvou α -helixů a šesti β -listů (Zhang *et al.*, 2009) a účastní se kanonické i nekanonické Wnt signalizace. Je možné, že se PDZ doména podílí i na rozlišování mezi kanonickou a nekanonickou dráhou (Wallingford and Habas, 2005).

PDZ doména Dvl je interakčním místem mnoha proteinů kanonické i nekanonické signální dráhy. Například interaguje s krátkým sekvenčním motivem na C-konci receptoru Frizzled (KTxxxW, kde x je jakákoliv aminokyselina), což umožňuje lokalizaci Dvl na plazmatické membráně, a také přenos Wnt signálu uvnitř buňky (Wong *et al.*, 2003). Proto se PDZ doména Dvl stala atraktivním terapeutickým cílem pro možné zeslabení Wnt signalizace, která je patologicky zesílena u různých typů onemocnění. Například byl syntetizován inhibitor s názvem FJ9, který interaguje s PDZ doménou Dvl a zabraňuje tak interakci Dvl s receptorem Frizzled v lidských nádorových buňkách (Fujii *et al.*, 2007). Další interakční partner PDZ-Dvl, který se podílí na aktivaci Wnt signalizace je například receptor z rodiny tyrosin-kináz Ryk. Ryk se účastní Wnt signalizace při vývoji nervové soustavy. Jako koreceptor pro Frizzled napomáhá vazbě Wnt ligandů a interaguje s Dvl (Lu *et al.*, 2004). Dalšími aktivátory Wnt signalizace interagující s PDZ doménou Dvl jsou kasein kináza 1 a 2 (CK1, CK2) [(Willert *et al.*, 1997);(Klimowski *et al.*, 2006)], β -arrestin (Bryja *et al.*, 2007), Daam1 (Dvl associated activator of morphogenesis 1) (Habas, Kato and He, 2001), FOXK1/2 (Wang *et al.*, 2015) a Vangl1/2 (Torban *et al.*, 2004). Mezi negativní regulátory, které naopak potlačují Wnt signalizaci patří Idax (Hino *et al.*, 2001), Naked cuticle (Nkd) (Wharton *et al.*, 2001), CXXC5 (CXXC-type zinc finger protein 5) [(S. H. Lee *et al.*, 2015);(Lee *et al.*, 2017)] a Notch (Axelrod *et al.*, 1996).

1.1.1.3 DEP doména

C-terminální DEP (Dishevelled Egl-10, pleckstrin) doména Dvl je tvořena třemi α -helixy, β -vlásečkou a dvěma krátkými β -listy. Tato doména figuruje v kanonické i

nekanonické dráze stejně jako PDZ-doména a podílí se také na translokaci Dvl k plazmatické membráně (Pan *et al.*, 2004) a jeho vazbě k transmembránovému receptoru Frizzled (Tauriello *et al.*, 2012). Konkrétně monomery DEP interagují s Frizzled, kde dochází ke zvýšení jejich lokální koncentrace, která vede k dimerizaci DEP. Dimery DEP-Dvl dále propojují a usnadňují tvorbu heteropolymerů DIX-DAX Dvl a Axinu, což je klíčový krok pro stabilizaci β -kateninu (Gammons *et al.*, 2016). DEP doména se také podílí na ubikvitinylaci Frizzled v nepřítomnosti Wnt signálu (Jiang *et al.*, 2015).

Další interakční partneři DEP-Dvl, kteří pozitivně regulují Wnt signalizaci jsou například diversin podílející se na gastrulačních pohybech a formování srdce u *Danio rerio* (Moeller *et al.*, 2006) a APC protein (Adenomatous polyposis coli) regulující dynamiku fokálních adhezí (Matsumoto *et al.*, 2010). Dále také PKC ζ (proteinkináza C) fosforyluje a tím stabilizuje DEP-Dvl (Velázquez, Castañeda-Patlán and Robles-Flores, 2017). A naopak například Prickle (Pk) vazbou DEP-Dvl negativně reguluje PCP dráhu (Jenny *et al.*, 2005). Dalšími negativními regulátory Wnt signalizace jsou podjednotka G proteinu G $\beta\gamma$ a protein Dapper. Jejich interakce s DEP-Dvl napomáhají degradaci Dvl v lysozomu [(Jung *et al.*, 2009);(Zhang *et al.*, 2006)]

1.1.1.4 Další konzervované části Dvl

Mezi jednotlivými doménami Dvl se nachází další dvě evolučně konzervované oblasti. Obě se nachází v blízkosti PDZ domény a pravděpodobně se účastní protein-proteinových interakcí, které tato doména zprostředkovává. Bazická oblast je například zapojena do interakcí PDZ-Dvl s EFX doménou proteinu Nkd (Naked cuticle) v embryonálním vývoji octomilky (Rousset *et al.*, 2001) a oblast bohatá na prolin zřejmě participuje na interakci s proteiny obsahujícími SH3 doménu (Penton, Wodarz and Nusse, 2002). Dvl obsahuje také jaderný lokalizační signál (NLS) a jaderný exportní signál (NES). NLS motiv IxLT (kde x je jakákoliv aminokyselina) leží mezi PDZ a DEP doménou a NES motiv M/LxxLxL se nachází na C-konci za DEP doménou [(Itoh *et al.*, 2005);(Gan *et al.*, 2008)]. Dále se v bazické oblasti a oblasti bohaté na prolin nachází důležitá fosforylační místa.

1.1.1.5 Post-translační modifikace Dvl

Fosforylace je nejprostudovanější a zřejmě nejdůležitější post-translační modifikací Dvl. Dvl je fosforylován množstvím proteinkináz. CK2/PAR1 konstitutivně fosforylují Dvl v bazické oblasti a PDZ doméně. Jedná se o tzv. priming fosforylaci, která po vazbě Wnt ligandu umožňuje fosforylaci prostřednictvím CK1 ϵ , ke které dochází v části PDZ a oblasti bohaté na prolin. Následně Dvl polymeruje, je rekrutován axin, fosforylován LRP5/6 (Low density lipoprotein 5 and 6) až je nakonec spuštěna transkripce řízená TCF-4 (T-cell factor 4). Další fosforylace pomocí CK1 ϵ vyžaduje nestrukturovaný C-konec Dvl a vede k depolymeraci a inaktivaci Dvl. CK1 ϵ tak zřejmě reguluje intracelulární aktivaci a také ukončuje Wnt signalizaci. (Bernatik *et al.*, 2011). Různé proteinkinázy fosforylují Dvl na odlišných specifických místech což může regulovat aktivitu Dvl i v různých signalizačních drahách. Například CK1 ϵ a PAR1 fosforylují a tím aktivují Dvl v kanonické Wnt signalizaci a současně inhibují Dvl-signalizaci účastníci se JNK/PCP signalizace [(Sun *et al.*, 2001);(Cong, Schweizer and Varmus, 2004)]. Fosforylace na C-konci naopak reguluje Dvl negativně, protože inaktivuje kanonickou Wnt signalizaci (Witte *et al.*, 2010). Dalšími kinázami fosforylujícími Dvl jsou NEK2 (NMA-related kinase 2) (Cervenka *et al.*, 2016), RIPK4 (Receptor-interacting protein complex 4) (Huang *et al.*, 2013) a PLK1 (Polo-like kináza 1) (Kikuchi *et al.*, 2010). Dále Dvl také podléhá ubikvitinylaci, což vede k inhibici kanonické Wnt signalizace (Angers *et al.*, 2006). Dalšími post-translačními modifikacemi jsou také metylace a acetylace [(Wu *et al.*, 2012);(Sharma *et al.*, 2019)]

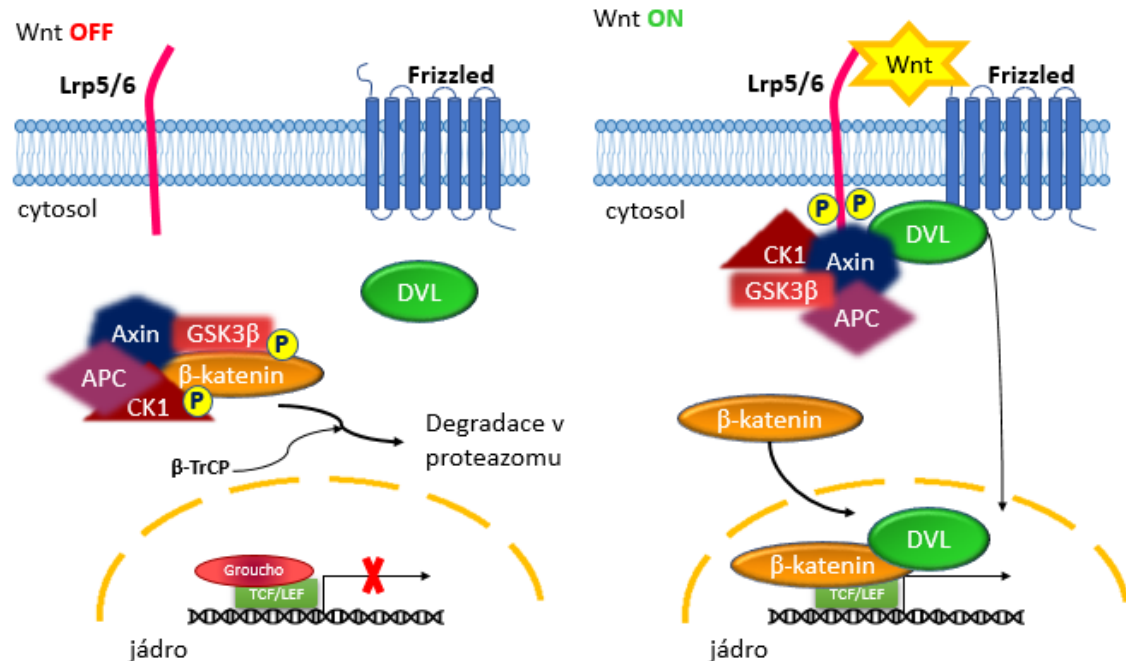
1.1.2 Zapojení Dvl v kanonické Wnt signalizaci

Kanonická Wnt signalizace je první popsanou a nejvíce prostudovanou Wnt signální dráhou. Často se také označuje jako Wnt/ β -katenin signalizační dráha a reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci, tkáňovou homeostázu, obnovu kmenových buněk a embryogenezi. Deregulace v této signalizaci vede k různým onemocněním včetně tumorigeneze (Clevers, 2006).

V nepřítomnosti Wnt ligandu je transkripční koaktivátor β -katenin fosforylován cytoplazmatickým destrukčním komplexem složeným z Axinu, APC (Adenomatous Polyposis Coli), GSK-3 β (glykogen syntáza kináza 3 β) a CK1 α (kasein kináza 1 α) a následně označen k degradaci v proteazomu pomocí β -TrCP (β -transducin repeat containing protein) [(Ikeda *et al.*, 1998);(Kishida *et al.*, 1998)]. Po vazbě Wnt ligandu na

transmembránový receptor Frizzled a koreceptor Lrp5/6 (Low density lipoprotein 5 and 6) dochází k fosforylaci a aktivaci Dvl a jeho vazbě na Frizzled (Bernatik *et al.*, 2014). Poté Dvl oligomerizuje a tím napomáhá shlukování komplexu Frizzled-Lrp5/6 a formování signalozomu. Také rekrutuje Axin k plazmatické membráně (Gammons *et al.*, 2016), čímž dochází k destabilizaci destrukčního komplexu, který není schopen označit β -katenin k degradaci. Zároveň je umožněna fosforylace intracelulární části Lrp5/6 (motiv PPPSPxS) pomocí GSK-3 β a CK1. To zapříčiňuje asociaci Axinu s Lrp5/6, což vede k amplifikaci signálu (Zeng *et al.*, 2008). β -katenin je stabilizován v cytoplazmě a po dosažení určité koncentrace translokuje do jádra, kde asociací s TCF-4 (T-cell factor 4) napomáhá transkripci cílových genů, například *c-myc* a *cyklinu D1* [(He *et al.*, 1998);(Tetsu and McCormick, 1999)].

Dvl také v rámci kanonické Wnt signalizace translokuje do jádra, kde se společně s c-Jun, TCF-4 a β -kateninem podílí na regulaci transkripce. Dvl přímo interaguje s c-Jun a β -kateninem a narušení této interakce vede k potlačení transkripce Wnt cílových genů (Gan *et al.*, 2008). Jadernému transportu Dvl zřejmě napomáhají transkripční faktory FOXK1/2 (Forkhead box protein K1/K2), a tím pozitivně regulují kanonickou Wnt signalizaci (Wang *et al.*, 2015) (obrázek 3).



Obrázek 3: Kanonická Wnt signalizace. V nepřítomnosti Wnt signálu je β -katenin fosforylován CK1 a GSK-3 β v destrukčním komplexu a následně označen E3 ubikvitin ligázou β -TrCP k degradaci v proteazomu. Genová exprese je současně reprimována interakcí TCF-4

s represorem Groucho. Naopak při vazbě Wnt ligandu na receptor Frizzled a koreceptor Lrp5/6 dochází k aktivaci Dvl, destabilizaci destrukčního komplexu, uvolnění β -kateninu a jeho translokaci do jádra, kde spouští expresi cílových genů. Dvl je také lokalizován do jádra buňky, kde se společně s β -kateninem podílí na regulaci genové exprese.

1.1.3 Zapojení Dvl v nekanonické Wnt signalizaci

Stejně jako kanonická Wnt dráha je i nekanonická Wnt dráha aktivována pomocí vazby ligandů z rodiny Wnt na Frizzled. Nedochozí ale k regulaci genové exprese pomocí β -kateninu. Prostřednictvím těchto drah je především regulována buněčná polarita a cytoskelet.

1.1.3.1 Wnt/PCP dráha

Prostřednictvím Wnt/PCP (Planar cell polarity) signalizace dochází hlavně k regulaci polarity epiteliálních buněk ve tkáních. U obratlovců tato dráha řídí například migraci buněk během konvergentní extenze (migrace buněk vedoucí k prodlužování tělní osy) a také organizaci struktur jako stereocilie vnitřního ucha (Montcouquiol *et al.*, 2003) a vlasové folikuly (Guo, Hawkins and Nathans, 2004). U octomilky jsou pomocí PCP dráhy organizována omatidia ve složeném oku a také chloupky na křídlech [(Wong and Adler, 1993);(Theisen *et al.*, 1994)].

Během PCP signalizace se po vazbě Wnt ligandu na Frizzled ustavuje buněčná polarita asymetrickým rozložením komponent Wnt/PCP dráhy. Na distální straně buňky se vyskytuje komplex Frizzled-Dvl-Diego (Diversin – u obratlovců) a na proximální straně se nachází komplex Strabismus (Vangl – u obratlovců)-Prickle (Klein and Mlodzik, 2005). Pomocí Dvl dále dochází k aktivaci dvou na sobě nezávislých drah obsahujících buď GTPázu RhoA nebo Rac1. V případě RhoA interaguje Dvl s Daam1 (Dvl associated activator of morphogenesis 1) a vytváří komplex asociující s RhoA GTPázou, která dále aktivuje kinázu ROCK, což vede k přestavbám aktinového cytoskeletu (Habas, Kato and He, 2001). Při aktivaci Rac1 pomocí Dvl je dále aktivována kináza JNK (c-Jun N-terminal kinase), čímž je regulována buněčná polarita během gastrulace (Habas, Dawid and He, 2003) a také vývoj dendritů (Rosso *et al.*, 2005).

1.1.3.2 Další Wnt signální dráhy

Dvl je součástí dalších Wnt signálních drah. Ve Wnt/ Ca^{2+} signalizaci způsobuje aktivace Dvl zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňce, což dále vede k aktivaci

proteinů citlivých na vápenaté ionty jako například PKC (proteinkináza C) nebo CamKII (Ca^{2+} /kalmmodulin-dependentní proteinkináza II). Následně je regulována genová exprese nebo dochází k remodelaci cytoskeletu (Sheldahl *et al.*, 2003).

Během Wnt/GSK-3 β signalizace Dvl reguluje dynamiku mikrotubulů. Inhibuje kinázu GSK-3 β a aktivuje JNK. To vede ke stabilizaci mikrotubulů pomocí proteinů asociovaných s mikrotubuly – MAP1B a MAP2 [(Krylova, Messenger and Salinas, 2000);(Ciani and Salinas, 2007)].

Dalšími Wnt signalizačními dráhami se zapojením Dvl jsou například Wnt/mTOR, Wnt/RYK a Wnt/ROR2.

1.1.4 Buněčný cyklus a Wnt signalizace

Kanonická Wnt signalizace reguluje buněčnou proliferaci především transkripčními cílovými geny *c-myc* a *cyklinu D1*. *c-myc* patří mezi transkripční faktory a podílí se na růstu buněk a jejich proliferaci. Také se řadí mezi protoonkogeny a často bývá konstitutivně aktivní v tumorigenezi. *c-myc* interaguje s pre-replikativním komplexem a reguluje iniciaci DNA replikace (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). Váže se na specifické úseky DNA, kde napomáhá acetylaci histonů H3 a H4 (Frank *et al.*, 2003) a spouští transkripci genů jejichž produkty dále regulují progresi buněčného cyklu. Během G1 fáze buněčného cyklu cyklin D1 v komplexu s cyklin-dependentními kinázami 4/6 (CDK 4/6) fosforyluje pRb (Retinoblastoma tumor suppressor protein), tím je uvolněn transkripční faktor E2F, který dále reguluje transkripci cyklinů potřebných pro S fázi buněčného cyklu (Ewen *et al.*, 1993).

Wnt signalizace a její jednotlivé komponenty jsou esenciální pro aktivaci transkripce v G1/S fázi buněčného cyklu, a postupně narůstají důkazy i o možné přímé regulaci struktur mitotického aparátu. Dosavadní výsledky ukazují lokalizaci Wnt komponent – β -kateninu, Dvl, Axinu, CK1, GSK-3 β a APC na dělicí vřeténko, centrozom nebo midbody a jejich možné zapojení do regulace progresu buněčného cyklu. [(Kaplan *et al.*, 2004);(Bahmanyar *et al.*, 2008);(Kikuchi *et al.*, 2010);(Cervenka *et al.*, 2016);(Kim *et al.*, 2009);(Hadjihannas, Brückner and Behrens, 2010);(Greer and Rubin, 2011);(Wakefield, Stephens and Tavaré, 2003);(Olmeda *et al.*, 2003)].

Na druhou stranu je možná Wnt signalizace pod kontrolou buněčného cyklu. Cyklin-dependentní kináza 14 (CDK14/PFTK) fosforyluje intracelulární část Lrp5/6

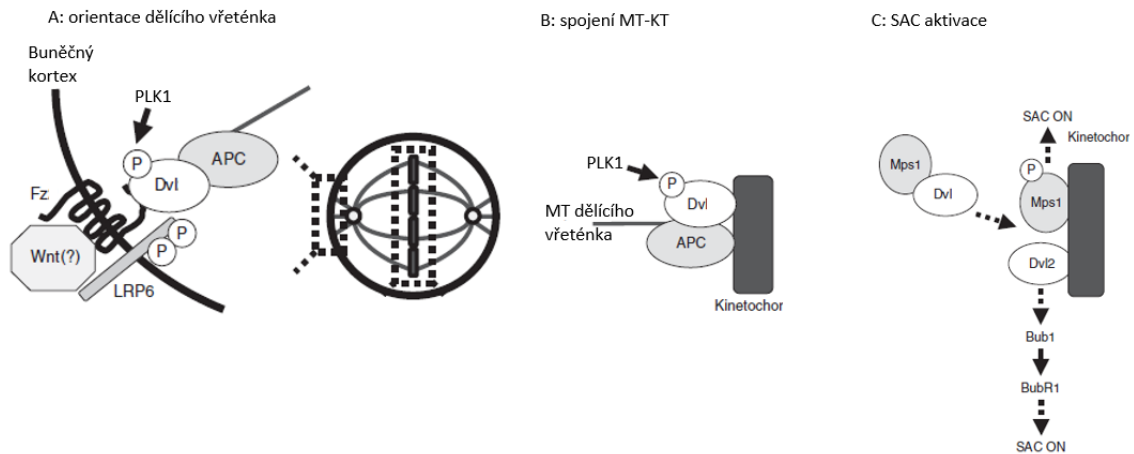
čímž napomáhá další fosforylaci Lrp5/6 pomocí CK1 γ . Vazbu mezi CDK14 a Lrp5/6 zprostředkovává membránově vázaný cyklin Y, jehož exprese je regulována v průběhu buněčného cyklu s nejvyšší hladinou exprese v G2/M fázi. Schopnost Lrp5/6 předávat Wnt signál závisí na jeho fosforylaci, a ta dosahuje maxima právě v G2/M fázi (Davidson *et al.*, 2009). Jedním z možných vysvětlení, proč Wnt signalizace dosahuje maxima během G2/M fáze je tzv. Wnt-dependentní stabilizace proteinů (Wnt-dependent stabilization of proteins – Wnt/STOP). Wnt/STOP stabilizuje proteiny v G2/M fázi buněčného cyklu pomocí inhibice GSK-3 β . GSK-3 β fosforyluje konzervovaný motiv (degron), který se nachází u mnoha proteinů. Takto fosforylované proteiny rozpoznávají různé E3 ubikvitin ligázy, které je označují pro degradaci v proteazomu. Je možné, že ochrana proteinů před degradací a jejich následný zvýšený obsah v buňce je přípravou na buněčné dělení (Acebron *et al.*, 2014).

1.1.4.1 Přímé zapojení proteinu Dvl v buněčném cyklu

Kikuchi *et al.* (2010) navrhují, že by Dvl mohl ovlivňovat progresi buněčného cyklu regulací dělicího vřeténka a SAC (spindle assembly checkpoint). SAC zabraňuje oddělení chromozomů při jejich nesprávném propojení s oběma póly dělicího vřeténka. Proteiny SAC, tj. MCC (Mitotic checkpoint complex) proteiny – Mps1, Mad2, BubR1, Bub1, Cdc20 a další blokuje aktivaci ubikvitin ligázy (APC/C), která je potřebná pro degradaci kohezinu držícího pohromadě sesterské chromatidy.

Dvl se během mitózy koncentruje na pólech dělicího vřeténka a v telofázi je soustředěn do oblasti dělicí rýhy. Také zřejmě asociuje s kinetochory. Dále bylo zjištěno, že PLK1 váže a fosforyluje Dvl. Během mitózy je PLK1 lokalizována na kinetochory a centrozom. PLK1 patří mezi mitotické kinázy a je například zodpovědná za ustavení bipolárního dělicího vřeténka a podílí se na vazbě mikrotubulů ke kinetochorům. Fosforylovaný Dvl se zřejmě společně s Lrp5/6 a Frizzled podílí na udržení správné orientaci dělicího vřeténka, a pokud je Dvl deletován střed dělicího vřeténka se nenachází ve středu buňky. To dále narušuje adhezi buněk po rozdělení (Kikuchi *et al.*, 2010). K takovému fenotypovému projevu obvykle dochází při nedostatečném propojení (+) konců astrálních mikrotubulů s buněčným kortexem, což ovlivňují například proteiny stabilizující (+) konce mikrotubulů (Toyoshima and Nishida, 2007). Dvl také ovlivňuje propojení mikrotubulů dělicího vřeténka s kinetochory. Kikuchi *et al.* (2010) předpokládají, že je Dvl společně s APC zapojen do regulace dynamiky (+) konců

mikrotubulů (obrázek 4). Dále dochází pouze k částečné aktivitě SAC. Dvl během interfáze interaguje s Mps1 nezávisle na PLK1 a také je zodpovědný za lokalizaci Bub1 a BubR1 na kinetochory. Zřejmě se tedy Dvl podílí na aktivaci Mps1 a poté je zapojen do rekrutování Bub1 a BubR1 na kinetochory (obrázek 4) (Kikuchi *et al.*, 2010).

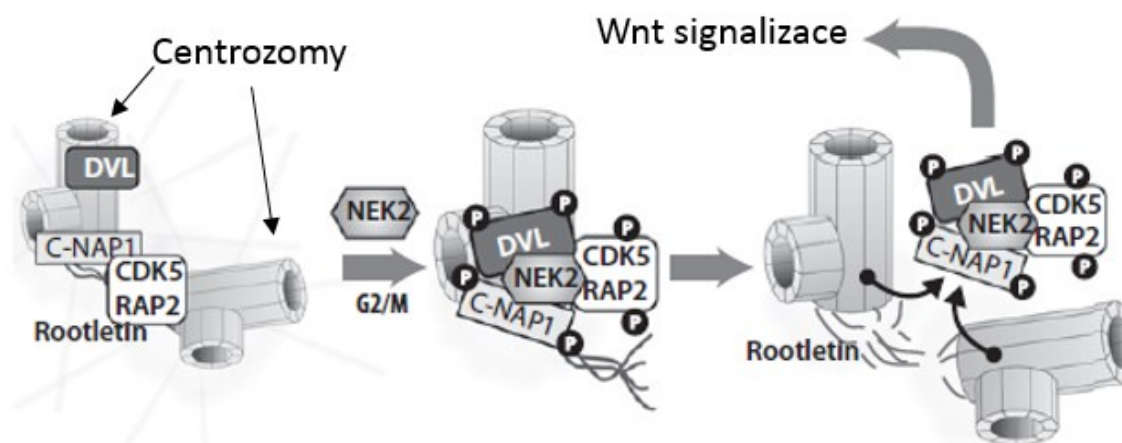


Obrázek 4: Modely přímé regulace progresu buněčného cyklu pomocí Dvl. A: PLK1/Wnt receptor-dependentní orientace dělicího vřeténka B: PLK1-dependentní, Wnt receptor-independentní spojení kinetochorů (KT) s mikrotubuly (MT) a C: PLK1/Wnt receptor-independentní aktivace SAC. Převzato z (Kikuchi *et al.*, 2010)

Další studie zase poukazuje na zapojení Dvl v centrozomálním cyklu. Centrozom je struktura, ze které se formuje dělicí vřeténko a bazální tělísko cilií nebo bičíků. Centrozom je složen z mateřské a dceřiné centrioly obklopené pericentriální matrix. Po buněčném dělení obsahují obě vzniklé dceřiné buňky centrozom se dvěma centriolami. Pro další buněčné dělení musí dojít k duplikaci centrozomu a následně k separaci a rozchodu centrozomů na opačné póly buňky v tzv. centrozomálním cyklu, který je spojený s buněčným cyklem (Tsou and Stearns, 2006).

V G1 fázi jsou zduplikované centrozomy spojeny proteinovým linkrem tvořeným C-NAP1 (centrosomal Nek2-associated protein 1) (Fry *et al.*, 1998), CDK5RAP2 (CDK5 regulatory subunit-associated protein 2) (Barrera *et al.*, 2010) a Rootletinem (Bahe *et al.*, 2005). V G2/M fázi jsou tyto proteiny fosforylovány NEK2 kinázou (NIMA-related kinase 2), což způsobuje rozpad linkru a umožňuje rozchod centrozomů (Mardin *et al.*, 2010). Lokalizace Dvl na centrozomy je zprostředkována přes jeho DIX doménu. Dvl je také substrátem NEK2 a tato kináza zřejmě reguluje i akumulaci a uvolnění Dvl ze struktury centrozomu. Fosforylovaný Dvl interaguje s jednotlivými proteiny linkru a zprostředkovává jeho rozpad, který je nezbytný pro separaci centrozomů. Uvolnění Dvl

z centrozomů řízený NEK2 pravděpodobně dále podporuje Wnt signalizaci (obrázek 5) (Cervenka *et al.*, 2016).



Obrázek 5: Regulace separace centrozomů pomocí Dvl. Fosforylovaný Dvl napomáhá v G2/M fázi buněčného cyklu rozpadu proteinového linkru složeného z C-NAP1, CDK5RAP2 a Rootletinu. Po uvolnění proteinů včetně Dvl dochází k pozitivní regulaci Wnt signalizace. Převzato z (Cervenka *et al.*, 2016)

1.2 Proteinový regulátor cytokineze 1 (PRC1)

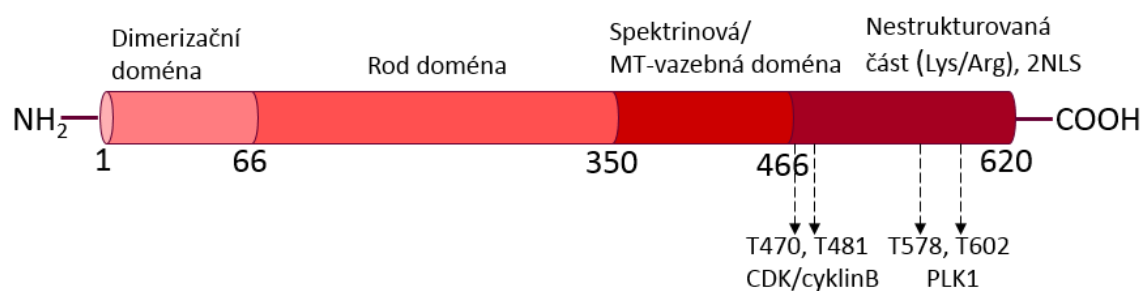
Proteinový regulátor cytokineze 1 (PRC1) patří mezi proteiny asociované s mikrotubuly – tzv. MAP (microtubule associated proteins) proteiny. MAP proteiny se podílejí na regulaci dynamiky a stability mikrotubulů, zprostředkovávají interakce mikrotubulů mezi sebou a také s ostatními buněčnými proteiny. PRC1 se uplatňuje především při cytokinezi, a to u mnoha organismů včetně člověka. PRC1 je evolučně vysoce konzervovaný protein, a proto jeho ortology (nesoucí různé označení) můžeme najít u řady jiných organismů – například u *Saccharomyces cerevisiae* – Anaphase spindle elongation protein (Ase1) (Pellman, 1995), *Caenorhabditis elegans* – SPD-1 (Verbrugghe and White, 2004) nebo u *Drosophila melanogaster* – Fascetto (Verni *et al.*, 2004), a také u rostlin – MAP-65 (Chang-Jie and Sonobe, 1993).

Hlavní funkcí PRC1 je antiparalelní propojování (+) konců polárních mikrotubulů děličího vřeténka v anafázi buněčného cyklu. PRC1 tak vytváří antiparalelní svazky mikrotubulů, které jsou základem pro vznik tzv. spindle midzone. Rekrutuje také ostatní proteiny a proteinové komplexy podílející se na tvorbě spindle midzone a cytokinezi, jako je například centralspindlin (Mollinari *et al.*, 2005) nebo Polo-like kinase 1 (PLK1) (Neef *et al.*, 2007). Spindle midzone předchází tvorbě kontraktilního prstence a předurčuje jeho umístění (Mollinari *et al.*, 2002). Zároveň od sebe udržuje oddělené sesterské chromatidy do dokončení cytokineze (Straight *et al.*, 2003). PRC1 je nezbytný pro buněčné dělení a

jeho deregulace způsobuje defekty v cytokinezi, ty jsou zdrojem chromozomální nestability (CIN) a intratumorální heterogenity (ITH), které mohou být příčinou rozvoje rakoviny (Carter *et al.*, 2006).

1.2.1 Struktura PRC1

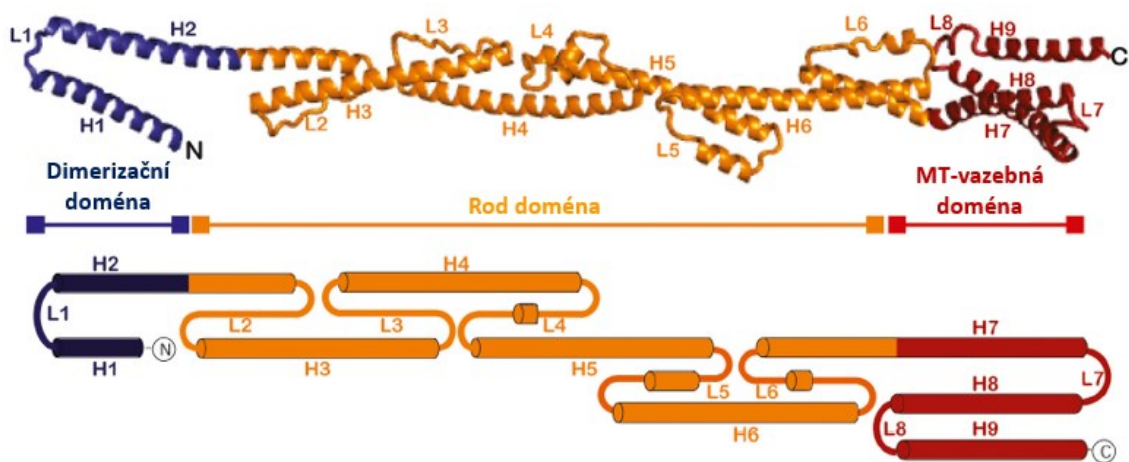
PRC1 je protein složený z 620 aminokyselin (molekulová hmotnost monomeru = 71,6 kDa), které jsou uspořádané do čtyř domén. Konkrétně se jedná o N-koncovou dimerizační doménu, po které následuje tzv. rod doména. V centrální části se nachází doména zodpovědná za vazbu na mikrotubuly, někdy též nazývaná jako spektrinová. V C-koncové části se vyskytuje doména bohatá na lysin a arginin, jejíž součástí jsou také důležité regulační oblasti a nukleární lokalizační signály (obrázek 6) [(Jiang *et al.*, 1998); (Zhu *et al.*, 2006); (Subramanian *et al.*, 2010)].



Obrázek 6: Schématické znázornění domén a regulačních míst PRC1.

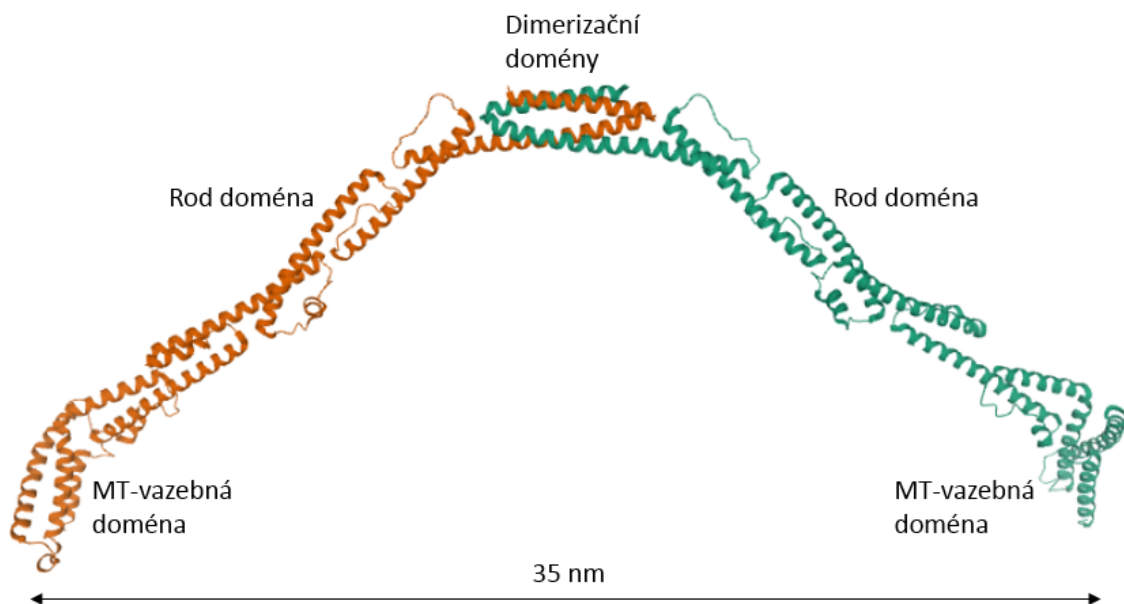
Dřívější práce uváděly, že struktura PRC1 je ze dvou třetin (rezidua 1-465) tvořena převážně α -helixy s coiled-coil motivy, zatímco zbývající třetina PRC1 (rezidua 466-620) se skládá z β -listů a β -ohybů [(Mollinari *et al.*, 2002); (Zhu *et al.*, 2006)]. Později byla také vyřešena krystalová struktura PRC1 bez nestrukturované C-terminální domény (obrázek 7) (Subramanian *et al.*, 2013).

Dimerizační doména tvoří vlásenku ve tvaru písmene „U“ z helixu H1 smyčky L1 a N-terminální poloviny helixu H2 (obrázek 8). Tyto vlásenky obou interagujících protomerů do sebe zapadají tak, že vzniká svazek čtyř helixů a tvoří se tak homodimer PRC1 (Subramanian *et al.*, 2013).



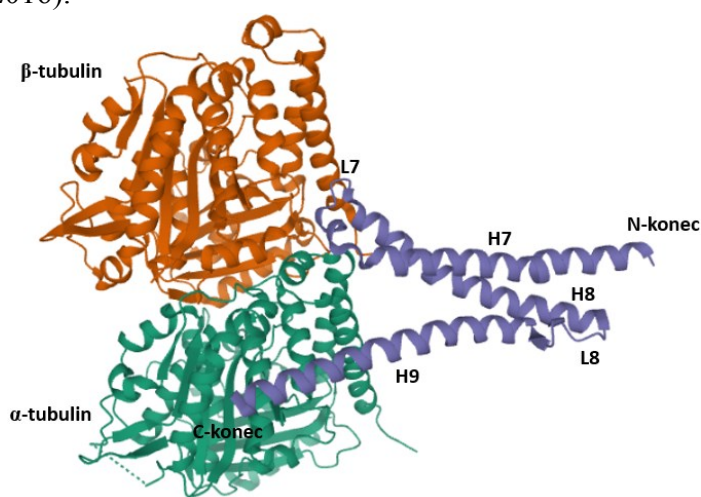
Obrázek 7: Struktura a topologie PRC1(1-465). Modře je znázorněná dimerizační doména (H1-H2), oranžově rod doména (H2-H7) a červeně MT-vazebná doména (H7-H9). V horní části obrázku je zobrazena struktura monomeru PRC1 (1-486) a v dolní části je znázorněn odpovídající topologický diagram PRC1. Převzato z (Subramanian *et al.*, 2013).

Uvedený způsob dimerizace vede k tomu, že jsou C-koncové domény (MT-vazebná a C-terminální doména) obou protomerů orientovány na opačných stranách dimeru PRC1 a zajišťuje, že MT-vazebné domény v jednom a druhém protomeru mají vůči sobě opačnou orientaci a mohou tak vázat mikrotubuly antiparalelně ve vzájemné vzdálenosti 35 nm (obrázek 8) (Subramanian *et al.*, 2010).



Obrázek 8: Krystalová struktura PRC1. Homodimer PRC1 vzniká spojením dimerizačních domén obou protomerů. Jednotlivé dimerizační domény tvoří vlásenku ve tvaru písmene „U“. Tyto vlásenky vzájemně interagují takovým způsobem, že tvoří svazek složený ze čtyř helixů. Protomery PRC1 jsou znázorněny oranžové a zeleně. Převzato z (Subramanian *et al.*, 2013), pdb kód 4L3I.

MT-vazebná doména byla první doménou PRC1 s vyřešenou strukturou. Byla u ní zjištěna výrazná strukturní podobnost se spektrínovou doménou, proto se někdy nazývá též jako spektrínová doména (Subramanian *et al.*, 2010). Spektrínová doména je běžnou součástí proteinů asociujících s aktinovým cytoskeletem (aktinem, spektrínem a dystrofinem), kde ovšem nezprostředkovává vazbu mezi proteinem a cytoskeletem, ale slouží k vymezení vzdálenosti mezi jednotlivými funkčními doménami proteinu, což dále určuje způsob spojování aktinových filament do vyšších celků (Djinovic-Carugo *et al.*, 2002). MT-vazebná doména se skládá ze tří α -helixů (H7-H9), které jsou spojeny dvěma smyčkami (L7 a L8) (obrázky 7 a 8) (Subramanian *et al.*, 2010). Pro vazbu na mikrotubuly je nezbytná smyčka L7 (část 374-384), která je v roztoku s nejvyšší pravděpodobností nestrukturovaná a definované struktury nabývá právě při vazbě na mikrotubuly. Smyčka L7 (aminokyseliny R381 a N380) interaguje s helixem H12 (aminokyseliny D427, N424 a Y435) β -tubulinu a také F378 smyčky L7 PRC1 zapadá do hydrofobní kapsy tvořené V405 a V409 α -tubulinu. Dále pravděpodobně dochází k elektrostatickým interakcím mezi kladně nabitými oblastmi helixů H9 (část 439-456) a H8 (K390, K397 a K401) PRC1 a záporně nabitými částmi $\alpha\beta$ -tubulinu. Je zajímavé, že vazebné místo pro PRC1 se částečně překrývá s vazebnými místy kinesinu-1 a dyneinu na mikrotubulech, což naznačuje jejich možnou kompetici o vazbu na mikrotubuly (Kellogg *et al.*, 2016).

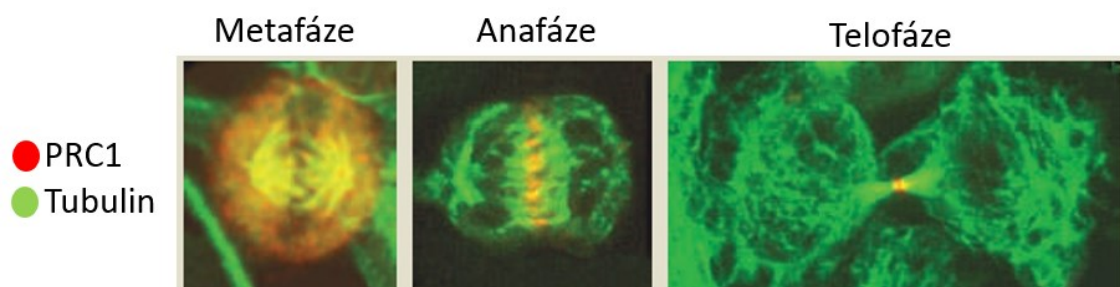


Obrázek 9: Prostorové uspořádání spektrínové domény PRC1 navázané na mikrotubuly určené pomocí kryo-elektronové mikroskopie. Oranžově a zeleně je zobrazena podjednotka mikrotubulů – heterodimer $\alpha\beta$ -tubulinu. Fialově je znázorněná MT-vazebná doména (H7-H9) PRC1. PRC1 interaguje pomocí smyčky L7 s α i β -tubulinem a dále také dochází k elektrostatickým interakcím mezi bazickými regiony helixů H8 a H9 PRC1 a záporně nabitými oblastmi $\alpha\beta$ -tubulinu. Převzato z (Kellogg *et al.*, 2016), pdb kód 5KMG.

C-koncová doména bohatá na Lys a Arg je kladně nabitá a nestrukturovaná. Bylo zjištěno, že PRC1 s C-koncovou doménou dosahuje mnohem vyšší afinity k mikrotubulům než zkrácený konstrukt PRC1 bez C-konce (1-466). Kromě MT-vazebné domény se tedy na interakci s mikrotubuly podílí i C-koncová bazická oblast. Vzhledem k tomu, že nezaujímá žádnou pravidelnou strukturu je obtížné zjistit, jakým způsobem se na vazbě konkrétně podílí. Orientace helixu H9 MT-vazebné domény ukazuje, že by kladně nabitý C-konec mohl vytvářet elektrostatické interakce se záporně nabitým tubulinem v protofilamentu, které se nachází bezprostředně vedle protofilamenta s navázanou MT-vazebnou doménou PRC1. C-konec by tedy mohl mít vliv na skládání a stabilitu mikrotubulů (Kellogg *et al.*, 2016).

1.2.2 Regulace a funkce PRC1 během buněčného cyklu

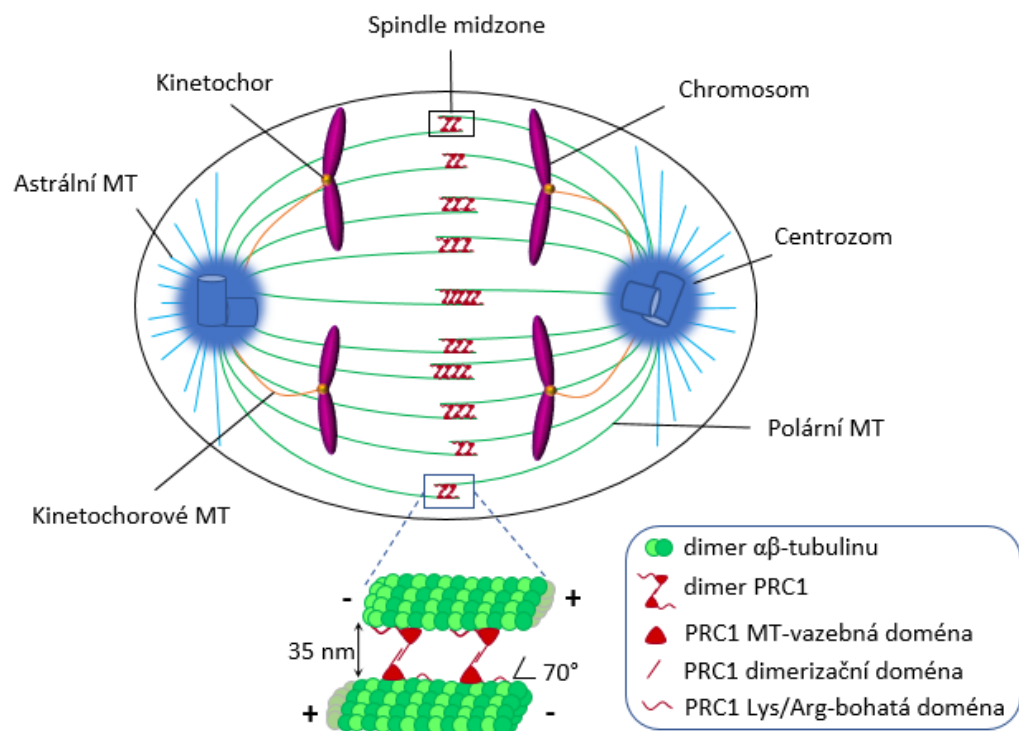
PRC1 byl poprvé identifikován v HeLa buňkách jako substrát pro cyklin dependentní kinázy (CDK), které v komplexu s cykliny regulují progresi buněčného cyklu pomocí fosforylace. Jeho aktivita je tedy pravděpodobně regulována v průběhu buněčného cyklu fosforylací. V G1 fázi je míra exprese PRC1 nízká, zatímco ve fázích S, G2 a M je vysoká a poté zase klesá. PRC1 se vyskytuje v jádře buňky během celé interfáze, v průběhu mitotického dělení interaguje s mikrotubuly dělicího vřetenka čímž vytváří spindle midzone a následně se při cytokinezi nachází i v midbody (Jiang *et al.*, 1998), strukturu vzniklé ze spindle midzone v průběhu dělení buněk (obrázek 10).



Obrázek 10: Lokalizace PRC1 během mitózy. Převzato z (Glotzer, 2009).

V prometafázi a metafázi mitózy je PRC1 pravděpodobně udržován v inaktivním monomerním stavu fosforylací Thr-470 a Thr-481 komplexem CDK1/cyklin B. Fosforylovaný PRC1 interaguje s mikrotubuly dělicího vřetenka, ale nemůže oligomerizovat a tudíž není schopen propojovat mikrotubuly a vytvářet spindle midzone (Zhu *et al.*, 2006). Fosforylace PRC1 brání také jeho interakci s kinesinem Kif4A. PRC1 patří mezi MAP proteiny, které se sice vážou na mikrotubuly, ale nejsou schopné pohybu

po jejich povrchu. Kif4A je interakční partner PRC1, který zprostředkovává jeho pohyb po dělicím vřeténku a lokalizaci na (+) koncích mikrotubulů (Zhu and Jiang, 2005). Děje se tak právě při přechodu z metafáze do anafáze, kdy dochází k degradaci cyklinu B a inaktivaci komplexu CDK1/cyklin B. PRC1 je defosforylován pomocí serin/threoninové proteinfosfatázy 2 – PP2A-B55 (Cundell *et al.*, 2013), asociuje s Kif4A a je přemístěn na (+) konce polárních mikrotubulů dělicího vřeténka, kde propojuje polární mikrotubuly. Tím vzniká antiparalelní svazek mikrotubulů, tj. základ pro spindle midzone, ve kterém jsou (+) konce mikrotubulů propojeny ve vzdálenosti 35 nm (obrázek 11). PRC1 se váže k polárním mikrotubulům prostřednictvím MT-vazebné domény pod úhlem 70° s rod doménou a dimerizační doménou směřující k (-) konci mikrotubulů. Vazebnou afinitu k mikrotubulům zvyšuje také C-konec PRC1. K vzájemné interakci jednotlivých protomerů PRC1 dochází pomocí jejich dimerizačních domén [(Subramanian *et al.*, 2010);(Kellogg *et al.*, 2016)]. Takto vznikající svazek antiparalelních mikrotubulů se pak stává místem lokalizace dalších proteinů nezbytných pro cytokinezi a základem pro spindle midzone.



Obrázek 11: Uspořádání dělicího vřeténka a vznik centrálního svazku antiparalelních mikrotubulů/spindle midzone během anafáze buněčného dělení. Zeleně jsou zde zobrazeny polární mikrotubuly, jejichž (+) konce jsou antiparalelně propojovány pomocí PRC1 uprostřed dělicího vřeténka. V detailu je znázorněno, jakým způsobem ke spojení polárních mikrotubulů pomocí PRC1 dochází. Monomery PRC1 se vážou na mikrotubuly pomocí jejich MT-vazebné domény a domény bohaté na Lys, Arg. Jednotlivé monomery PRC1 interagují pomocí svých dimerizačních domén, a tím dochází k antiparalelnímu propojení (+) konců mikrotubulů ve

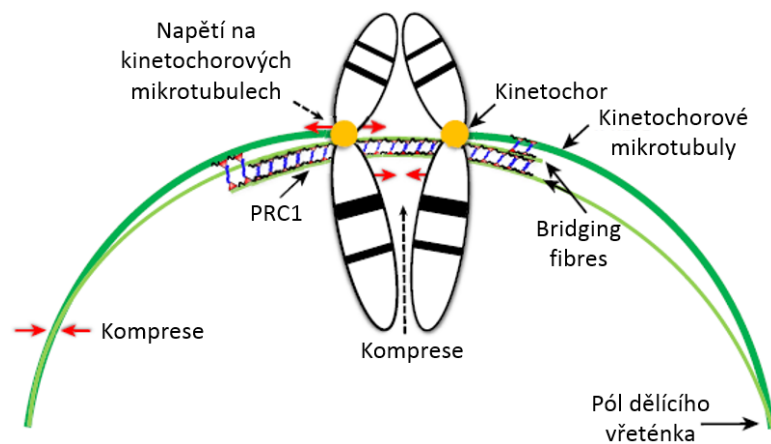
vzdálenosti 35 nm. PRC1 se váže k polárním mikrotubulům prostřednictvím MT-vazebné domény pod úhlem 70° s rod doménou a dimerizační doménou směřující k (-) konci mikrotubulu.

Jedním z takových proteinů je právě Polo-like kinasa 1 (PLK1), která je klíčová také pro formování aktinomyozinového kontraktálního prstence. V anafázi buněčného cyklu PLK1 fosforyluje Thr-578 a Thr-602 PRC1. Interakce PLK1 s PRC1 umožňuje kináze její lokalizaci na spindle midzone, kde se podílí na zahájení cytokineze. Fosforylační místo pro PLK1 se částečně překrývá s fosforylačním místem pro komplex CDK1/cyklin B. Fosforylace komplexem CDK1/cyklin B brání fosforylaci PRC1 pomocí PLK1. To zajišťuje, že nedojde k předčasnému zahájení cytokineze již v prometafázi nebo v metafázi (Neef *et al.*, 2007). V souvislosti s regulací PRC1 během buněčného cyklu byl navrhován i jiný model, podle kterého PRC1 není v profázi a metafázi negativně regulován pomocí komplexu CDK1/cyklin B, ale že dochází k negativní regulaci (během profáze a metafáze) i pozitivní regulaci (během anafáze) pomocí PLK1 (Hu *et al.*, 2012). Regulace pouze pomocí PLK1 ovšem neumožňuje využití vyrovnaného působení proteinfosfatáz a proteinkináz (Cundell *et al.*, 2013). Bylo dokázáno, že se v průběhu mitózy postupně mění poměr mezi proteinkinázami a proteinfosfatázami a různé substráty CDK1 reagují na různou koncentraci proteinfosfatáz a jsou defosforylovány postupně (Bouchoux and Uhlmann, 2011).

PLK1 v anafázi fosforyluje centralspindlin, který poté rekrutuje protein ECT2 [(Petronczki *et al.*, 2007); (Burkard *et al.*, 2009)], což je GEF (Guanine nucleotide exchange factor) katalyzující výměnu GDP za GTP. ECT2 aktivuje malou GTPázu RhoA na plazmatické membráně, ta dále aktivuje formin zajišťující polymeraci aktinu a Rho-asociovanou proteinkinázu ROCK aktivující myozin II, čímž iniciuje tvorbu kontraktálního prstence (Amano *et al.*, 1996). Na regulaci myozinu II se podílí i CIRK (Citron-Rho interacting kinase) fosforylací myozinových lehkých řetězců (Yamashiro *et al.*, 2003) a KIF14 interagující s PRC1 usnadňuje lokalizaci CIRK na midbody (Gruneberg *et al.*, 2006). PLK1 dále fosforyluje a inhibuje Cep55 (Centrosomal protein of 55kDa) a zabraňuje tak předčasnému oddělení dceřiných buněk, které je zajišťováno ESCRT-III komplexem rekrutovaným na midbody pomocí Cep55 až po degradaci PLK1 (Bastos and Barr, 2010).

PRC1 se také pravděpodobně uplatňuje při vyrovnávání napětí mezi sesterskými kinetochory během metafáze. Kinetochorová vlákna mikrotubulů opačných pólů dělicího vřeténka interagují s kinetochory jednotlivých sesterských chromatid, na které je tím

vyvíjen tah. Pro vyrovnání tohoto pnutí jsou sesterská kinetochorová vlákna mikrotubulů propojena dalšími nekinetochorovými mikrotubulovými vlákny tzv. bridging fibres (Kajtez *et al.*, 2016). PRC1 patrně v centrální části dělicího vřeténka propojuje antiparalelní bridging fibers mezi sebou a ty dále s jednotlivými kinetochorovými mikrotubuly. Je tak vyrovnáno napětí a zároveň udržován oblý tvar vřeténka (Polak *et al.*, 2017) (obrázek 12). PRC1 zajišťuje těsné propojení pouze sesterských kinetochorových vláken, a ty se díky tomu v oblasti napojení na chromosomy chovají jako jeden celek a odolávají např. vzájemnému otáčení a zachovávají si společnou strukturu i při působení tahu na jednotlivá kinetochorová vlákna. Sesterské chromatidy jsou tak vzájemně stabilizovány, i když dochází k remodelaci dělicího vřeténka (Suresh, Long and Dumont, 2020). Celý systém je tedy dynamický a zároveň mechanicky odolný.



Obrázek 12: Bridging fibres vyrovnávají během metafáze napětí mezi sesterskými kinetochorovými vlákny. Jednotlivé bridging fibres jsou vzájemně propojené mezi sebou, a také s kinetochorovými mikrotubuly pomocí PRC1. Převzato z (Li *et al.*, 2018).

PRC1 je u savců nezbytný nejen pro mitotické dělení, ale i pro dělení meiotické. Zhou *et al.* (2020) na myším modelu pozorovali vliv PRC1 na meiotickou maturaci oocytů. PRC1 vykazoval během interfáze nízkou hladinu exprese, která se postupně zvyšovala během metafáze a anafáze. Se zvyšováním exprese PRC1 docházelo k jeho lokalizaci v okolí chromosomů a mikrotubulů dělicího vřeténka, kde se koncentroval v oblasti formování spindle midzone. Po oplození a v průběhu časného embryonálního vývoje, v 2-buněčném a 4-buněčném stádiu a také ve stádiu moruly a blastocysty, se PRC1 vyskytoval v jádře během interfáze a vždy po vstupu buněk do mitózy postupně relokalizoval do oblasti vznikajícího spindle midzone. Částečná ztráta PRC1 během maturace oocytů vedla k poškození migrace dělicího vřeténka. Migrace vřeténka z centra buňky ke kortexu je nezbytná pro asymetrické rozdělení cytoplazmy, kterým vzniká sekundární oocyt/ootida a pólové tělísko. Vzniklé pólové tělísko bylo větší, než je

obvyklé a zároveň nedošlo k jeho extruzi. Výsledkem knockdownu PRC1 byla dále aneuploidie a defekty ve složení dělicího vřeténka a v připojení kinetochorových mikrotubulů na kinetochory. Shodné výsledky byly pozorovány při overexpresi PRC1. Pokud byl PRC1 knockdown proveden během embryogeneze bylo vlivem narušeného buněčného dělení poškozeno formování moruly a blastocysty. Blastomery s umlčeným PRC1 nebyly schopny buněčného dělení a bylo u nich pozorováno chybně složené dělicí vřeténko s roztroušenými chromosomy. Tyto výsledky naznačují, že je PRC1 zřejmě nezbytný i v časném embryonálním vývoji (Zhou *et al.*, 2020).

1.2.3 Interakční partneři PRC1

Kinesin-4A (Kif4A)

PRC1 a Kif4A společně kolokalizují na dělicím vřeténku během mitózy i cytokineze (Zhu and Jiang, 2005). Interakci Kif4A a PRC1 napomáhá i fosforylace Kif4A pomocí Aurora kinázy B (Bastos *et al.*, 2013). Kif4A translokuje PRC1 na (+) konce polárních mikrotubulů (Zhu and Jiang, 2005), kde společně formují tzv. end-tags. PRC1-Kif4A end-tags jsou dynamické struktury konstantní délky na (+) koncích mikrotubulů. Komplexy PRC1-Kif4A se na konci vlákna postupně uvolňují, zatímco jsou tam podél mikrotubulů dopravovány další komplexy. Ustáleného stavu je dosaženo, když se počet nově dopravených komplexů na konce mikrotubulů rovná počtu ztracených komplexů v důsledku disociace (Subramanian *et al.*, 2013). V komplexu PRC1-Kif4A interagují N-konec (rezidua 1-303) PRC1, zahrnující dimerizační a většinu rod domény, a C-konec (rezidua 663-1232) Kif4A (Kurasawa *et al.*, 2004).

Centralspindlin

PRC1 v anafázi rekrutuje centralspindlin do středu dělicího vřeténka (Mollinari *et al.*, 2005), kde společně s polárními mikrotubuly a dalšími proteiny (chromosome passenger complex (CPC), PLK1) vytvářejí spindle midzone. Interakce CPC a PLK1 je nezbytná pro mechanickou odolnost dělicího vřeténka vůči kortikálním tažným silám, které vytváří dynein společně s astrálními mikrotubuly (Mishima and Lee, 2015). Centralspindlin je heterotetramer skládající se z dimeru Kinesin-like proteinu 23 (KIF23/MKLP1) a dimeru Rac-GTPase-activating proteinu 1 (MgcRacGAP1/CYK4). MgcRacGAP1 i MKLP1 přímo interagují s PRC1. Pull-down experimenty s celkovým PRC1 i s jeho zkrácenými variantami odhalily, že PRC1 (1-620) a dvě jeho zkrácené N-terminální varianty (1-224 a 1-303) jsou schopné vázat MKLP1 (Kurasawa *et al.*,

2004), což poukazuje na to, že za interakci je zodpovědná dimerizační doména společně s většinou rod domény PRC1. PRC1 také inhibuje MgcRacGAP vazbou s jeho C-terminální GAP doménou (AMK 363-632) a bazickým regionem (125-285) (Ban *et al.*, 2004). MgcRacGAP je GAP (GTPase-activating protein) inaktivující malé Rho-GTPázy, například Cdc42 (Cell division control protein 42), který reguluje stabilitu mikrotubulů (Daub *et al.*, 2001). PRC1 během metafáze inhibuje aktivitu MgcRacGAP vůči Cdc42 a tato inhibice je důležitá pro formování dělicího vřeténka během metafáze (Ban *et al.*, 2004). V případě *C. elegans* je centrální spindlin složen z ZEN-4 a CYK-4 (Cytokinesis defect-4) a zde pravděpodobně dochází k interakci mezi N-terminální částí Ase-1 (1-288) a C-terminální částí CYK-4 (618-681) (K. Y. Lee *et al.*, 2015).

*CEN*tromere-associated Protein E (CENP-E)

CENP-E je protein patřící mezi kinesiny. Během metafáze lokalizuje na kinetochory, kde se účastní uspořádávání chromozomů do ekvatoriální roviny (Wood *et al.*, 1997). Během anafáze PRC1 rekrutuje CENP-E na spindle midzone, kde během cytokineze setrvává a je součástí midbody. Provedené pull-down experimenty naznačují, že se na vazbě mezi PRC1 a CENP-E podílí N-konec PRC1. Konkrétně se k CENP-E vázaly kromě celkového PRC1 i dvě zkrácené N-terminální varianty (1-224 a 1-303) (Kurasawa *et al.*, 2004). CENP-E s PRC1 interaguje svým N-koncem (1-395) a C-koncem (2523-2673) nezávisle na mikrotubulech a dále také motorová aktivita CENP-E přispívá k akumulaci PRC1 ve středu midbody (Ohashi, Ohori and Iwai, 2016).

Cytoplasmic-linker associated protein 1 (CLASP1)

CLASP1 patří mezi proteiny vázající se na (+) konce mikrotubulů. Dále interaguje s proteiny EB1 (end-binding protein 1) a CLIP 170 (cytoplasmic linker protein-170) a podílí se tak na regulaci dynamiky mikrotubulů [(Akhmanova *et al.*, 2001); (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005)]. PRC1 rekrutuje CLASP1 na spindle midzone během anafáze a interakce mezi PRC1 a CLASP1 zřejmě přispívá ke stabilizaci antiparalelních svazků polárních mikrotubulů ve struktuře spindle midzone. Na rozdíl od ostatních uvedených vazebných partnerů CLASP1 interaguje s C-terminální částí PRC1 (438-620) (Liu *et al.*, 2009).

1.2.4 Role PRC1 v tumorigenezi a možné zapojení ve Wnt signalizaci

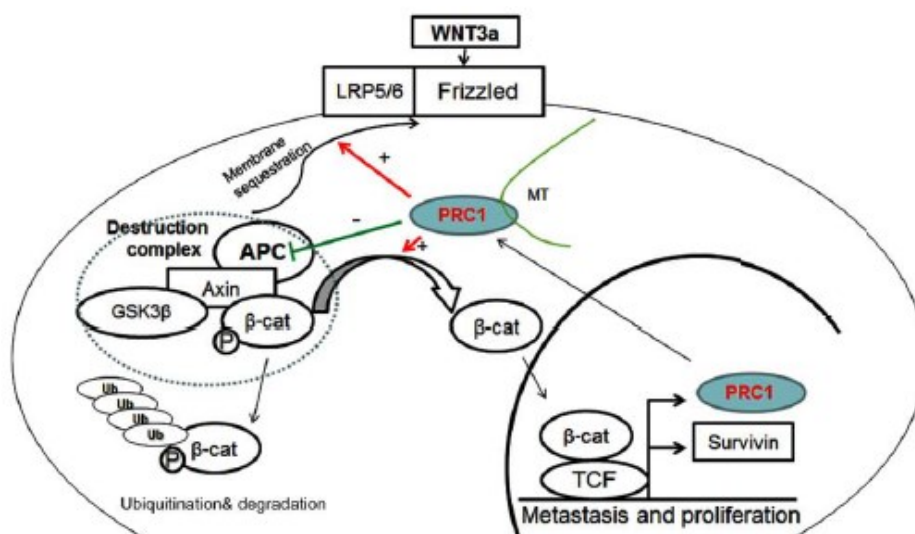
Přesný průběh cytokineze je nezbytný pro správné rozdělení dceřiných buněk a deregulace PRC1 vede k defektům a někdy i k selhání celého procesu. Konkrétně nedostatek PRC1 způsobuje vznik dvoujaderných buněk, které jsou zdrojem další aneuploidie (Zhu *et al.*, 2006). Vzniklé tetraploidní buňky tak mohou být příčinou rozvoje rakoviny stejně jako i zvýšená exprese PRC1. Defekty v cytokinezi vyvolávají chromosomální nestabilitu (CIN) (Potapova, Zhu and Li, 2013), která dále přispívá ke vzniku genetické heterogenity v rámci nádoru (intratumorální heterogenita = ITH), ta je spojena se zvýšenou progresí onemocnění (Maley *et al.*, 2006), a také s rezistencí na léčiva (Lee *et al.*, 2011). V této souvislosti *PRC1* při porovnávání dvanácti souborů dat genové exprese šesti různých rakovinných typů figuroval na druhém místě mezi 10 151 testovanými geny, jejichž overexprese koreluje s vysokou mírou výskytu CIN. (Carter *et al.*, 2006). Abnormální exprese PRC1 byla pozorována u mnoha rakovinných typů, mezi které patří hepatocelulární karcinom (Chen *et al.*, 2016), dále karcinom žaludku (Zhang *et al.*, 2017), plic (Zhan *et al.*, 2017), močového měchýře (Kanehira *et al.*, 2007), prsu (Shimo *et al.*, 2007), prostaty (Luo *et al.*, 2016), slinivky břišní (Nakamura *et al.*, 2004), a také retinoblastom (Liao *et al.*, 2019). Zvýšená exprese PRC1 je v těchto případech spojována s rezistencí na léčiva, opětovným výskytem tumoru, migrací a celkově špatnou prognózou [(Chen *et al.*, 2016); (Luo *et al.*, 2016)]. Po provedeném knockdownu PRC1 je u řady případů sledován pokles proliferace nádorových buněk [(Wolter *et al.*, 2017); (Liao *et al.*, 2019)], inhibice jejich migrace [(Chen *et al.*, 2016); (Zhan *et al.*, 2017)], a také dochází ke snížení rezistence na léčiva (Bu *et al.*, 2020). K deregulaci PRC1 může docházet buď na genové úrovni například v podobě genových amplifikací, delecí a missense mutací, nebo na úrovni transkripční a post-transkripční prostřednictvím narušení regulace signálních drah a miRNA. Jednou ze signálních drah ovlivňujících expresi PRC1 je právě i Wnt signalizace, která je deregulovaná u různých typů rakoviny (Klaus and Birchmeier, 2008).

1.2.4.1 PRC1 a Wnt signalizace

Zvýšená exprese PRC1 v souvislosti s Wnt signální dráhou byla pozorována například u hepatocelulárního karcinomu (HCC). Hepatocelulární karcinom je nejčastějším maligním nádorovým onemocněním jater a řadí se celosvětově mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí vinou rakoviny. Klíčovou roli v kancerogenezi zřejmě hraje

deregulovaná kanonická Wnt signalizace a dále také již zmíněná zvýšená exprese PRC1. U HCC pacientů byla ve spojitosti s touto overexpresí sledována brzká recidiva a celkově špatná prognóza onemocnění. Nejvyšší expresi PRC1 vykazovali pacienti s recidivou kratší než 2 roky, ti měli také značně kratší dobu přežití v porovnání s pacienty s nižší expresí PRC1. Po provedeném knockdownu PRC1 se snížila proliferace HCC buněk, a také došlo k inhibici migrace a celkově ke snížení invazivity HCC buněk. To naznačuje, že se PRC1 podílí i na tvorbě metastáz a tumorigenezi. U tohoto typu nádorového onemocnění pravděpodobně dochází k vzájemnému působení PRC1 a Wnt signalizace, které se předpokládá vzhledem k tomu, že Wnt signalační dráha se mimo jiné uplatňuje v regulaci MT cytoskeletu a MAP by tedy mohly být regulovány pomocí interakce s jednotlivými členy Wnt signalizace.

V případě HCC bylo zjištěno, že ligand Wnt3a spouští v HCC buňkách Wnt signalační kaskádu, kde s pomocí β -kateninu a TCF-4 následně dochází k indukci exprese PRC1 a dalších známých cílových proteinů Wnt signalizace (survivin, cyklin D1). Wnt3a také ovlivňuje distribuci PRC1 v buňce a jeho lokalizaci na mikrotubuly a buněčnou membránu. Zároveň PRC1 pravděpodobně interaguje s destrukčním komplexem a podporuje jeho lokalizaci na buněčnou membránu. Dále suprimuje APC a tím napomáhá stabilizaci β -kateninu před degradací. Může tak vstupovat do jádra buňky a spouštět transkripci cílových genů. Vzniká tak pozitivní zpětná vazba, která podporuje expresi PRC1, další proliferaci a tvorbu metastáz (obrázek 13) (Chen *et al.*, 2016).



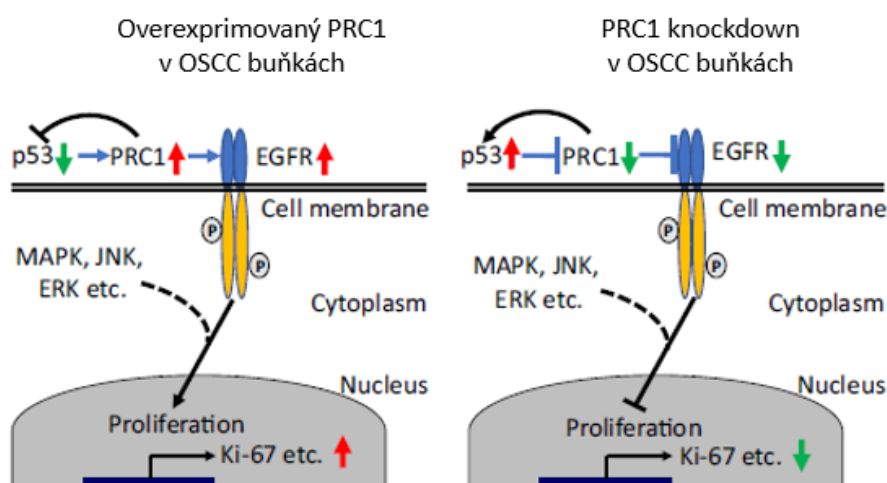
Obrázek 13: Model vzájemného působení PRC1 a Wnt signalizace v HCC buňkách. Ligand Wnt3a spouští Wnt signalační kaskádu vazbou na receptor Frizzled, dochází k inaktivaci destrukčního komplexu a jeho přesunu k plazmatické membráně. Destrukční komplex tak není

schopen fosforylovat β -katenin, který se následně hromadí v cytoplazmě, a poté vstupuje do jádra, kde společně s TCF-4 reguluje transkripci cílových genů včetně PRC1. PRC1 je lokalizován na mikrotubuly a k plazmatické membráně, kde se účastní přechodu destrukčního komplexu k plazmatické membráně, inhibuje funkci APC a tím podporuje stabilizaci β -kateninu v cytoplazmě. Vzniklá pozitivní zpětná vazba napomáhá proliferaci a tvorbě metastáz. Převzato z (Chen et al., 2016).

K podobným výsledkům došli Zhan et al. (2017) v případě nemalobuněčného karcinomu plic (Non-Small Cell Lung Cancer = NSCLC), a také Liao et al. (2019) u retinoblastomu. U NSCLC byla shodně sledována overexprese PRC1 v NSCLC tkáních, která korelovala se vznikem metastáz v mízních uzlinách, a vyskytovala se u pacientů se špatnou prognózou onemocnění. Byl také zkoumán vliv knockdownu PRC1 na NSCLC buňky a bylo zjištěno, že dochází k inhibici proliferace a snížení migrace NSCLC buněk, a to *in vitro* i *in vivo*. Potlačení exprese PRC1 dále vedlo k zastavení progresu buněčného cyklu v G2/M fázi a následně k apoptóze. V této souvislosti byla sledována i upregulace inhibitorů p21 a p27, které brání progresi buněčného cyklu inhibicí cyklin-dependentních kináz. A naopak došlo i k down regulaci cyklinu B1, CDK2 a CDK25C. Byla také pozorována zvýšená míra apoptózy a s tím i snížená exprese antiapoptotických proteinů jako PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) a Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) a zvýšená exprese proapoptotických proteinů Bax a kaspázy 3. Pomocí NGS (Next Generation Sequencing) a bioinformatické analýzy bylo také zjištěno, že v závislosti na knockdownu PRC1 došlo k rozdílné expresi celkově 10 037 genů, z toho nejvíce byla ovlivněna Wnt signalizace. Na úrovni proteinové exprese byl nejvíce deregulovaný ligand Wnt8b a dále také například β -katenin, c-Jun, c-Myc a cyklin D2. β -katenin navíc up reguluje expresi PRC1 (Zhan et al., 2017). Wnt signalizace je deregulovaná i u druhého nejrozšířenějšího nádoru oka – retinoblastomu. Ve studii, která se zabývala vlivem umlčení PRC1 na Wnt signalizaci u buněk retinoblastomu, bylo shodně s předchozími studiemi zjištěno, že exprese PRC1 je zvýšená a to nejvíce v invazivních tkáních retinoblastomu. Při knockdownu PRC1 došlo k inhibici Wnt signalizace a proliferace buněk retinoblastomu a jejich zastavení v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Došlo také k poklesu množství invazivních buněk a k supresi angiogeneze (Liao et al., 2019). Výsledky naznačují, že i u adenokarcinomu plic a retinoblastomu zřejmě dochází k vzájemnému působení PRC1 a Wnt signalizační kaskády. Přesný mechanismus regulace ale zatím nebyl objasněn.

1.2.4.2 Regulace PRC1 pomocí p53

Signální dráha p53 je další, která reguluje expresi PRC1. Jeden z nejdůležitějších tumor supresorových genů - p53 se podílí na udržení homeostázy a brání maligní transformaci zajištěním správného průběhu buněčného dělení. Jako transkripční faktor přímo negativně reguluje expresi potlačením transkripce *PRC1*. Výsledkem této regulace je suprimovaná exprese na úrovni mRNA i proteinu a zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi (Li, Lin and Liu, 2004). Regulace exprese PRC1 pomocí p53 byla sledována i u orofaryngeálního dlaždicobuněčného karcinomu (Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma – OSCC). Zde při inhibici p53 dochází k overexpresi PRC1, která zřejmě suprimuje p53 a zároveň pozitivně reguluje EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor) signalizaci, což vede ke zvýšené proliferaci OSCC buněk. Po provedeném knockdownu PRC1 je p53 up regulován, což vede k další inhibici PRC1 a současně k supresi EGFR signalizace a tím i proliferace OSCC buněk (obrázek 14).



Obrázek 14: Model fungování regulace p53/PRC1/EGFR v OSCC buňkách. Inhibice p53 způsobuje zvýšení exprese PRC, které dále negativně ovlivňuje p53, stimuluje EGFR a tím podporuje proliferaci OSCC buněk. Při knockdownu PRC1 dochází k up regulaci p53, který dále napomáhá inhibici PRC1 a tím přispívá ke snížení proliferace OSCC buněk.

Stejně jako u ostatních studií zabývajících se rolí PRC1 v rámci tumorigenize, byla i zde prokázána vysoká exprese PRC1 v OSCC buňkách související s metastázemi v mízních uzlinách. PRC1 knockdown měl za následek inhibici proliferace se zastavením buněčného cyklu ve fázi G2/M *in vitro* a také inhibici nádorového růstu *in vivo* (Wu *et al.*, 2018). Negativní regulaci PRC1 pomocí p53 potvrdil i Zhang *et al.* (2017) u rakoviny žaludku, kde ektopická exprese p53 vedla k potlačení exprese PRC1. U tohoto karcinomu byla taktéž sledována zvýšená exprese PRC1 a s tím spojená špatná prognóza onemocnění se sníženým přežitím pacientů. Inhibice PRC1 vedla ke snížení migrace a k zastavení

proliferace s následnou apoptózou. Dále bylo zjištěno, že PRC1 je regulován pomocí piperlonguminu (PL) p53-dependentním mechanismem (Zhang *et al.*, 2017). PL je malá molekula izolovaná z rostliny pepře dlouhého, u které bylo zjištěno, že je selektivně toxická pro rakovinné buňky, protože u nich zvyšuje množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Hromadění ROS vede k oxidativnímu stresu a následně k apoptóze (Raj *et al.*, 2011). U žaludečního karcinomu byly testovány dvě buněčné linie, p53 wild-type AGS a p53 mutované HGC27. A bylo zjištěno, že PL selektivně inhibuje expresi PRC1 v buněčné linii AGS, kde současně indukuje expresi p53, ale není schopen snížit expresi PRC1 v buněčné linii HGC27 s mutovaným p53. Knockdown p53 u AGS vyústil v snížení účinku PL inhibovat expresi PRC1, čímž se potvrdil inhibiční mechanismus závislý na p53 (Zhang *et al.*, 2017).

PRC1 může být při rakovině deregulován i na post-transkripční úrovni pomocí mikroRNA (miRNA). Malé nekódující molekuly RNA (miRNA), s délkou 20-24 nukleotidů, inhibují translaci a snižují stabilitu mRNA, a tím regulují proteinovou expresi. miRNA jsou deregulované u mnoha rakovinných typů (Ventura and Jacks, 2009). Bylo zjištěno, že PRC1 je upregulovaný i v případě dediferencovaného liposarkomu (DDLs), kde současně dochází k down regulaci miRNA-143. Obnovení exprese miRNA-143 vede ke snížení exprese PRC1 a zároveň také k inhibici proliferace DDLs buněk a k indukci apoptózy (Ugras *et al.*, 2011). K analogickým závěrům došli i Tang *et al.* (2019) v případě HCC. Zde byla konkrétně pozorována snížená exprese miRNA-194 současně se zvýšenou expresí PRC1. miRNA-194 je přitom schopna specificky vázat PRC1 a při její overexpresi dochází k down regulaci PRC1 současně s inhibicí epiteliálně-mezenchymální transice, tj. procesu během kterého epiteliální buňky získávají vlastnosti (např. migrace a invaze do okolní tkáně) mezenchymálních kmenových buněk, a proliferace inaktivací Wnt signalizace. *In vivo* je také suprimován růst tumoru (Tang *et al.*, 2019). Potenciál mi-RNA by tak mohl být využit při nádorové léčbě.

Dosavadní poznatky o patofyziologii PRC1 v různých nádorových onemocněních se shodují v tom, že dochází k overexpresi PRC1, která vede ke zvýšené proliferaci a migraci rakovinných buněk a také k vyšší invazivitě onemocnění a vzniku metastáz. Často je také u pacientů, vykazujících při nádorovém onemocnění vysokou expresi PRC1, pozorována brzká recidiva a rezistence na léčiva. PRC1 by mohl být využit jako prognostický biomarker. Ať už je PRC1 deregulován na úrovni transkripce nebo pomocí různých signalizačních kaskád či miRNA, ukázal se být nezbytným pro proliferaci

nádorových buněk, a proto by se právě o PRC1 mohlo uvažovat, jako o vhodném potenciálním terapeutickém cíli. Inhibice exprese PRC1 je možná na více úrovních genové exprese, jak bylo již ukázáno v případě piperlonguminu nebo miRNA-194.

2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je vymezení interakčního rozhraní mezi proteiny PRC1 a DVL3 s využitím přirozeně se vyskytujících forem PRC1 a DVL3 a jejich zkrácených variant ve fúzi s fluorescenčními proteiny pro pozorování interakce pomocí TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) mikroskopie. Jednotlivé úkoly diplomové práce jsou uvedeny níže.

- Klonování zkrácených variant PRC1 ve fúzi s fluorescenčním proteinem mRuby
- Klonování jednotlivých izoform DVL ve fúzi s fluorescenčním proteinem GFP
- Exprese a purifikace připravených fúzních proteinů GFP-DVL a zkrácených variant mRuby-PRC1
- Vymezení interakčního rozhraní mezi PRC1 a DVL3 s využitím TIRF mikroskopie

3 Metody

3.1 Seznam primerů použitých při klonování

V tabulce 1 jsou uvedeny primery použité při přípravě konstruktů mRuby-PRC1 a GFP-DVL.

Tabulka 1: Seznam primerů použitých při klonování

Primer	Sekvence (5'-3')	Popis
PRC1-F91-Not I	ataacatgcggccgcaatggaaggagaga caaccatcttgcaac	Přímý primer pro PRC1_91-620 s restričním místem pro Not I
PRC1-F303-Not I	ataacatgcggccgcaatgcagtactggga ccagtgtttatag	Přímý primer pro PRC1_303-620 s restričním místem pro Not I
PRC1-R620-Asc I	aataacatggcgcgccgactggatgttg ttgaattgagg	Zpětný primer pro PRC1_91-620, PRC1_303-620, s restričním místem pro Asc I
PRC1-F67-Not I	gccaataacatgcggccgcaatgaaaagc atatccgtctgcag	Přímý primer pro PRC1_67-620 s restričním místem pro Not I
PRC1-F224-Not I	aataataacatgcggccgcaatgcagctgg aatgcagaaatcac	Přímý primer pro PRC1_224-620 s restričním místem pro Not I
PRC1-F1-64+341-486-Not I	aataacatgcggccgcaatgc	Přímý primer pro PRC1_1-64+341-486 s restričním místem pro Not I
PRC1-R1-64+341-486-Asc I	aataacatggcgcgccacgt	Zpětný primer pro PRC1_1-64+341-486 s restričním místem pro Asc I
PRC1-R486-Asc I	aataataacatggcgcgccacgtgtttgcc cgggtgtattg	Zpětný primer pro PRC1_1-486, PRC1_67-486, PRC1_224-486 s restričním místem pro Asc I
DVL1-F1.PCR-gtw	tcggaacactgtacttccagtctaccatgg cggagaccaagattatctacc	Přímý primer pro DVL1 s restričním místem pro TEV proteázu
DVL1-R1.PCR-gtw	ggggaccactttgtacaagaaagtcgggtt acatgatgtccacgaagaactc	Zpětný primer pro DVL1 s att sekvencí
pE277-F2.PCR-gtw	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctc ggagaacctgtacttcag	Přímý primer pro DVL1 s att sekvencí
mDVL2-F	cgagttctttgtggatgtatgtagccaacttt cttgtaaaagtgg	Přímý primer pro mutagenesi DVL2 (zavedení stop kodonu)
mDVL2-R	ccactttgtacaagaaagttgtacataacat ccacaagaactcg	Zpětný primer pro mutagenesi DVL2 (zavedení stop kodonu)

3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

K amplifikaci genu *DVL1* a zkrácených konstruktů *PRC1* (kódujících PRC1_91-620, PRC1_303-620, PRC1_67-486, PRC1_224-486 a PRC1_1-64+341-486) byla použita PCR. PCR reakce (celkový objem 20 μl) obsahovala 10 μl polymerázového mixu Pfu Ultra II hotstart PCR master mix (Agilent), 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ templátové DNA (vektor pcDNA3.1.(+)-HA-N-*hDVL1* pro *DVL1* a vektor pOCC293-*PRC1_1-620* připravený v laboratoři pro konstrukty *PRC1*) a příslušný přímý a zpětný primer (1 μM). Pokud následovalo řezání fragmentů DNA z gelu byl objem PCR reakce dvojnásobný. PCR reakce probíhala v thermocycleru T100 (BioRad) za podmínek, které jsou uvedeny v tabulce 1. Poté byla provedena elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu a amplifikovaná DNA byla přečištěna pomocí PCR clean up kitu (PCR Clean Up kit, Sigma). V případě *DVL2* byl DNA fragment vyřezán z gelu a extrahován pomocí DNA recovery kitu (Zymoclean Gel DNA recovery kit, Zymo Research). Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop (ThermoFischer Scientific)

Tabulka 2: Podmínky PCR reakce při amplifikaci *DVL1* a fragmentů *PRC1*.

Teplota	Doba trvání
95 °C	2 min
95 °C	30 s
55 °C	30 s
72 °C	50 s-2 min (dle velikosti amplifikované sekvence)
72 °C	2-5 min
4 °C	

25x

Dále byla PCR použita i při mutagenезi *DVL2*, jejíž cílem bylo zavedení stop kodonu na konec genu. Primery pro mutagenезi byly navrženy pomocí QuickChange Primer Design (Agilent). PCR reakce (celkový objem 10 μl) obsahovala 5 μl polymerázového mixu Pfu Ultra II hotstart PCR master mix (Agilent), 30 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ templátové DNA pMM338*DVL2* a příslušný přímý a zpětný primer (4 μM). PCR reakce probíhala za podmínek, které jsou uvedeny v tabulce 3. Poté byla provedena

elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu a templátová DNA byla štěpena pomocí restričního enzymu Dpn I v pufru CutSmart. Štěpící reakce obsahovala 9 μl vzorku po PCR reakci, 1 μl Dpn I ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) a 1,1 μl 10x koncentrovaného pufru CutSmart (New England BioLabs). Štěpení probíhalo 2 hodiny při 37 °C s následnou inaktivací enzymu při 80 °C po dobu 20 min. Následně byla provedena transformace 20 μl XL-1 buněk 1,5 μl směsi po štěpení.

Tabulka 3: Podmínky PCR reakce při mutagenези DVL2.

Teplota	Doba trvání
95 °C	2 min
95 °C	30 s
55 °C	30 s
65 °C	8,5 min
72 °C	20 min
4 °C	

25x

3.3 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

Pro rozdělení DNA podle velikosti byla využívána elektroforéza v agarózovém gelu. Pro vizualizaci DNA byl do 35 ml gelu (0,8% agaróza v TAE pufru) přidán 1 μl barvičky GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). 1 μl analyzované DNA byl smíchán s 0,25 μl nanášecího pufru (0,2% Orange G, 20% glycerol, 60 mM EDTA, pH 8). Jako marker byl použit 1 μl Gene ruler (ThermoFischer Scientific) nebo 1 kb DNA ladder (New England BioLabs). Elektroforéza probíhala v horizontálním uspořádání v TAE (40 mM Tris, 0,1% kyselina octová, 1 mM EDTA, pH 8) pufru při konstantním napětí 90 V po dobu 30 min. Pro vizualizaci DNA bylo použito UV záření (transiluminátor UV-T 20 M/W, Herolab).

V případě následného řezání DNA fragmentu z gelu byly pro vizualizaci DNA do 35 ml gelu přidány 4 μl barvičky Sybr Safe (Invitrogen). 40 μl DNA bylo smícháno s 10 μl 5x koncentrovaného nanášecího pufru (0,2% Orange G, 20% glycerol, 60 mM EDTA, pH 8). DNA fragment byl následně z gelu vyříznut a extrahován pomocí DNA recovery kitu (Zymoclean Gel DNA recovery kit, Zymo Research) dle návodu výrobce.

3.4 Klonování

3.4.1 Gateway klonování

Pomocí Gateway klonování byly připravovány expresní plazmidy pro fúzní proteiny GFP-DVL1, GFP-DVL2. Expresní vektor pro GFP-DVL3 byl připraven dříve v laboratoři. Kódující sekvence lidského *DVL1* a vektor pD221_ *DVL2* byly získány od výzkumné skupiny Vítězslava Bryji z Masarykovy univerzity.

Nejdříve byla vkládaná sekvence DNA opatřena att místy pomocí dvou PCR reakcí se specifickými primery. Následně byla provedena BP reakce v celkovém objemu 8 μ l obsahující 100 ng PCR produktu (inzertu), 100 ng donorového plazmidu pDONR 221 (Invitrogen) a 1,8 μ l Gateway BP klonázy (Invitrogen). Na doplnění celkového objemu reakce byl použit TE pufr (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). Směs byla inkubována při laboratorní teplotě přes noc. Poté byla provedena transformace 1 μ l BP reakce s 20 μ l DH5 α buněk. Plazmidová DNA byla izolována, čímž byl získán vektor pD221 s požadovanou vloženou sekvencí. Úspěšnost reakce byla ověřena Sangerovým sekvenováním (GATC Biotech).

Analogicky byla namíchána LR reakce v celkovém objemu 8 μ l obsahující 100 ng pD221 vektoru, 100 ng expresního plazmidu pMM338 a 1,8 μ l Gateway LR klonázy (Invitrogen). Po transformaci 20 μ l DH5 α buněk 1 μ l LR reakce a izolaci plazmidové DNA byla sekvence získaného expresního plazmidu ověřena Sangerovým sekvenováním (GATC Biotech).

3.4.2 Klonování pomocí restričních endonukleáz

Pomocí restričních endonukleáz byly připravovány expresní plazmidy pro fúzní proteiny mRuby-PRC1 (mRuby-PRC1_91-620, mRuby-PRC1_303-620, mRuby-PRC1_67-486, mRuby-PRC1_224-486 a mRuby-PRC1_1-64+341-486), kde byl jako templát použit plazmid pOCC293 $PRC1_1-620$ připravený dříve v laboratoři. Výjimkou byl konstrukt mRuby-PRC1_1-64+341-486, jehož templátová DNA byla připravena synteticky (GenScript).

Pro štěpení PCR produktu (PRC1_91-620, PRC1_303-620, PRC1_67-486, PRC1_224-486 a PRC1_1-64-linkr-341-486) a vektoru (pOCC293) byl použit 1 μ l enzymu Asc I s aktivitou 10 U $\cdot\mu$ l⁻¹ a 0,5 μ l enzymu Not I s aktivitou 20 U $\cdot\mu$ l⁻¹ (New

England BioLabs). Štěpení probíhalo oběma enzymy zároveň při 37 °C přes noc v 1x CutSmart pufru (New England BioLabs) v celkovém objemu 50 µl (doplněno dH₂O). Inaktivace enzymů probíhala při 80 °C po dobu 20 min. Po přečištění DNA inzertu pomocí Clean up kitu (PCR Clean Up kit, Sigma, USA) byla provedena ligace s defosforylovaným vektorem pOCC293 v molárním poměru 3:1 pomocí Blunt TA ligázy (Thermo Fisher Scientific). Směs byla inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Poté byla ligační směs 4x naředěna v dH₂O a 1,5 µl bylo použito pro transformaci *E.coli* XL-1 buněk. Následně byla provedena izolace DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu (Qiagen). Sekvence získaného expresního vektoru s požadovanou sekvencí byla ověřena Sangerovým sekvenováním (GATC Biotech).

3.5 Transformace *E.coli* metodou heat-shock

100 ng plazmidové DNA bylo smícháno s 20 µl kompetentních buněk DH5α (Library Efficiency DH5α Competent Cells, Invitrogen)/XL-1 (XL1-Blue Supercompetent Cells, Agilent) případně BL21(DE3)RIPL (BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Competent Cells, Invitrogen) a inkubováno na ledu po dobu 30 min. Následně byl proveden heat-shock při 42 °C po dobu 45 s a inkubace na ledu 2 min. Poté bylo přidáno 200 µl S.O.C. média (2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ a 20 mM glukóza, Invitrogen) a buňky byly inkubovány při 37 °C, 600 rpm po dobu 1 hod. Takto transformované buňky byly vysety na Petriho misky s LB agarem a příslušným antibiotikem 50 µg·ml⁻¹ kanamycin (LB/KAN) pro plazmidy pOCC293 a pD221 a 100 µg·ml⁻¹ ampicilin (LB/AMP) pro plazmid pMM338 a inkubovány přes noc při 37 °C. Následující den byly buňky zaočkovány do tekutého LB média s příslušným antibiotikem a kultivovány přes noc při 37 °C a 250 rpm.

3.6 Izolace DNA

Malé množství plazmidové DNA bylo izolováno z 2 ml buněčné kultury DH5α nebo XL-1 buněk v případě mutagenese. Větší množství plazmidové DNA bylo izolováno z 50 ml buněčné kultury. Kultivace probíhala přes noc při 37 °C a 250 rpm a následně byly kultivované buňky zpracovány pomocí QIAprep Spin Miniprep nebo QIAprep Spin Midiprep kitu (Qiagen) dle návodu výrobce. Sekvence plazmidu byla ověřena Sangerovým sekvenováním (GATC Biotech).

3.7 Exprese proteinů

Expresa fúzních proteinů mRuby se zkrácenými variantami PRC1 (mRuby-PRC1_91-620, mRuby-PRC1_303-620, mRuby-PRC1_67-486, mRuby-PRC1_224-486 a mRuby-PRC1_1-64+341-486) probíhala v buňkách BL21(DE3)RIPL.

Pro zjištění optimálních podmínek exprese byla vždy nejdříve testována exprese výše uvedených fúzních proteinů v malém objemu. Optimalizována byla teplota exprese a koncentrace induktoru.

Z agarové misky byla vždy jedna kolonie BL21(DE3) RIPL buněk obsahující příslušný plazmid zaočkována do 4 ml LB/KAN a kultivována přes noc při 37 °C a 250 rpm. Druhý den byly 2 ml inokula přidány do 50 ml LB/KAN média a inkubovány při 37 °C a 220 rpm do optické density 0,5 ($\lambda = 600$ nm). Následně byla kultura rozdělena (4x 10 ml) a exprese byla indukována pomocí 0,2 mM a 0,5 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid). Expresa probíhala při 18 nebo 30 °C podle tabulky 4.

Tabulka 4: Různé podmínky při optimalizaci exprese fúzních proteinů mRuby-PRC1 v BL21(DE3) RIPL buňkách.

	Teplota	Koncentrace IPTG	čas
1.	30 °C	0,2 mM	3 hod
2.	30 °C	0,5 mM	3 hod
3.	18 °C	0,2 mM	přes noc
4.	18 °C	0,5 mM	přes noc

Po skončení exprese byly kultury centrifugovány při 6000 g/15 min/4 °C. Buněčná peleta byla resuspendována (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10% glycerol, pH 8) v poměru 100 μ l pufru na 1 ml buněčné kultury a byly přidány inhibitory proteáz (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche). Buňky byly dezintegrovány pomocí sonikace (Q125 Sonicator, QSonica) 10x15s pulsy, s amplitudou 3 %. Nerozpustné zbytky buněk byly odstraněny pomocí centrifugace při 15 000 g po dobu 15 min při 4 °C.

Pro kontrolu exprese bylo před indukcí exprese a po jejím skončení odebráno po 1 ml buněčné kultury (u vzorků po expresi naředěné na stejnou optickou hustotu, jakou měl vzorek před indukcí). Všechny vzorky byly centrifugovány při 13 000 g po dobu 1 min a poté resuspendovány v 50 μ l 4M močoviny. Dále byly odebrány vzorky rozpustných frakcí (50 μ l) po sonikaci. Všechny vzorky byly před nanesením na gel smíchány s 2x koncentrovaným vzorkovým pufrem (100 mM Tris-HCl, 4% SDS, 12% glycerol, 0,3 mM β -merkaptoethanol, 0,12 mM bromfenolová modř, pH 6,8) v poměru 1:1, denaturovány při 95 °C po dobu 5 min a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Pro expresi fúzních proteinů mRuby-PRC1 ve větším objemu byla z agarové misky vždy jedna kolonie BL21(DE3) RIPL buněk obsahující příslušný plazmid zaočkována do 100 ml LB/KAN a kultivována přes noc při 37 °C a 250 rpm. Druhý den bylo 10 ml inokula přidáno do 500 ml LB/KAN média a inkubováno při 37 °C a 220 rpm do optické density 0,5 ($\lambda = 600$ nm). Následně byla snížena teplota na 18 °C a indukována exprese pomocí 0,2 mM IPTG. Kultura byla inkubována přes noc. Druhý den byla buněčná kultura centrifugována při 6000 g/15 min/4 °C. Buněčná peleta byla resuspendována v 5 ml pufru (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10% glycerol, pH 8) a byly přidány inhibitory proteáz (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche).

3.7.1 Exprese proteinů v HEK293 buňkách

V HEK293 buňkách probíhala exprese fúzních proteinů GFP-DVL1, GFP-DVL2 a GFP-DVL3. Nejdříve byla exprese proteinů otestována v malém objemu a výsledky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a imunodetekce. Až poté byla provedena exprese ve větším objemu.

Pro expresi proteinů v malém objemu byly smíchány 2 μ g expresního vektoru se 44 μ l PBS a 6 μ l 1 mg·ml⁻¹ lineárního polyethyleniminu (PEI) (Polysciences, Inc.). Následně proběhla 10 min inkubace, a poté byla směs přidána k 1 ml kultury HEK293 buněk (4 · 10⁶ buněk·ml⁻¹) v Gibco FreeStyle F17 expresním médiu (ThermoFischer Scientific). Poté proběhla 4-hodinová inkubace při 37 °C, 110 rpm v 5% atmosféře CO₂. Po 4 hodinách byl přidán 1 ml EX-CELL 293 média (Sigma-Aldrich Co.) a následovala 65-hodinová inkubace při shodných podmínkách. Jako kontrola transfekce byly použity buňky bez přidaného plazmidu (negativní kontrola) a buňky transfekované expresním vektorem pMM318*mCherry2*, který kóduje fluorescenční protein mCherry (pozitivní

kontrola transfekce). Po inkubaci byly buňky centrifugovány při 4 °C, 500 g a 5 min. Peleta byla resuspendována v 500 µl PBS s inhibitory proteáz (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche). Buňky byly dezintegrovány pomocí sonikace (Sonikátor 3000, Misonix) 3x20s pulsy, s amplitudou 1,5 %. K buněčnému lyzátu byl přidán 0,1% igepal CA-630 (Sigma-Aldrich Co.) a směs byla inkubována na ledu po dobu 20 min. Pro oddělení buněčného lyzátu byla provedena centrifugace při 15 000 g po dobu 15 min při 4 °C a poté byl odebrán supernatant. Vzorčky buněčného lyzátu a supernatantu byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a pomocí imunodetekce.

Pro expresi proteinů ve větším objemu bylo smícháno 448 µg příslušného expresního vektoru s 9,9 ml PBS a 1,3 ml 1 mg·ml⁻¹ PEI (Polysciences, Inc.). Po 10 min inkubaci byla směs přidána k 224 ml kultury buněk HEK293 (4 · 10⁶ buněk·ml⁻¹) v Gibco FreeStyle F17 expresním médiu (ThermoFischer Scientific). Poté proběhla 4-hodinová inkubace při 37 °C, 110 rpm v 5% atmosféře CO₂. Po 4 hodinách bylo přidáno 224 ml EX CELL 293 média (Sigma-Aldrich Co.) a následovala 65-hodinová inkubace při identických podmínkách. Po inkubaci byly buňky centrifugovány při 4 °C, 500 g a 5 min. Peleta byla resuspendována v 25 ml pufru (100 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol) s inhibitory proteáz (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche) a benzonázou (2 U·ml⁻¹, Novagen).

3.8 SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza byla použita pro dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Gel pro elektroforézu se skládal z 5% koncentračního gelu (5% akrylamid-0,1% bisakrylamid, 0,1% APS, 0,1% TEMED, 125 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 6,8) a 10% nebo 15% separačního gelu (10%/15% akrylamid-0,2%/0,3% bisakrylamid, 0,1% APS, 0,1% TEMED, 125 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,8). Analyzované vzorky byly před nanesením na gel smíchány s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrem (250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 30% glycerol, 0,75 mM β-merkaptoethanol, 0,3 mM bromfenolová modř, pH 6,8) v poměru 4:1 a denaturovány při 95 °C po dobu 5 min v termobloku. Jako standard molekulových hmotností byl použit 1 µl PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). Separace probíhala při konstantním napětí 150 V po dobu jedné a půl hodiny v elektrodovém pufru (25 mM Tris-HCl, 200 mM glycin, 0,1% SDS). Gel byl poté obarven pomocí roztoku Coomassie brilliant blue G-250 (50 mg·l⁻¹ barvička, 3 ml·l⁻¹ kyselina octová) zahřátím v mikrovlnné

troubě po dobu 1,5 min, poté 20 min při laboratorní teplotě a následně odbarven pomocí deionizované vody.

3.9 Western blotting a imunodetekce proteinů

Proteiny rozdělené v SDS-PAGE gelu byly přeneseny na PVDF (polyvinyliden difluorid) membránu pomocí blotovacího zařízení (Trans-blot Turbo Transfer System, BioRad). Přenos probíhal v přenosovém pufru (Western Blot Transfer Buffer, BioRad) při napětí 25 V po dobu 30 min. Poté byla membrána s přenesenými proteiny blokována v 5% mléku (v TBS) při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Následovala 45 min inkubace s protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (anti-His HRP/anti-Strep HRP, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Qiagen) v TBS s 5% mlékem. Následně byla membrána třikrát opláchnuta 5 ml TBS s 0,05% Tween 20. K vyvolání chemiluminiscenční reakce byl použit 1 ml substrátu Luminata Forte (Merck Millipore) a signál byl detekován přístrojem LAS4000 (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare).

3.10 Purifikace proteinů

3.10.1 Purifikace pomocí metaloafinitní chromatografie (NiNTA) a štěpení 3C proteázou

Purifikace fúzních proteinů mRuby-PRC1_91-620, mRuby-PRC1_303-620, mRuby-PRC1_67-486, mRuby-PRC1_224-486 a mRuby-PRC1_1-64-+341-486 pomocí NiNTA chromatografie probíhala s využitím gravitačních kolonek při 4 °C.

Bakteriální buňky byly dezintegrovány pomocí sonikace (Q125 Sonicator, QSonica) 7x15s pulsy, s amplitudou 5 % a byl také přidán lysozym (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Nerozpustné zbytky buněk byly odstraněny pomocí centrifugace při 20 000 g po dobu 15 min při 4 °C. Supernatant byl následně použit pro purifikaci.

Buněčný supernatant byl nanesen na kolonu s 1 ml NiNTA nosiče (NiNTA Superflow, IBA) pre-ekvilibrovaného 50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10% glycerol, pH 8. Nosič byl promyt 2x5 ml ekvilibračního pufru a navázaný protein byl eluován postupně se zvyšující koncentrací imidazolu (40 mM, 70 mM, 90 mM, 140 mM a 250 mM). Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

Frakce obsahující požadovaný protein byly zbaveny imidazolu pomocí dialýzy (MWCO: 3,5 kDa). Vzorky byly dialyzovány proti stonásobnému objemu pufru 50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, pH 8 při 4 °C přes noc. Druhý den byl dialyzační roztok vyměněn a dialýza probíhala ještě dalších 6 hodin při shodných podmínkách. Následně bylo provedeno zakoncentrování proteinu centrifugačním filtrem (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Merck Millipore) s cut-off limitem 10 kDa. His-tag byl štěpen pomocí 3C proteázy (připravené v naší laboratoři). Proteáza byla přidána k proteinu v hmotnostním poměru 1:20 a štěpení probíhalo při 4 °C přes noc. Po štěpení byla provedena centrifugace při 4 °C, 21 000 g. Pro odstranění 3C proteázy a proteinů s neodštěpeným His-tagem byl vzorek nanesen na NiNTA kolonu a inkubován 15 min. Poté byla jímána flow-through frakce proteinu s odštěpeným His-tagem. Frakce obsahující 3C proteázu, odštěpený His-tag a případně protein s neodštěpeným His-tagem byly eluovány 500 µl 200 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0,5 M imidazol, pH 7,5. Výsledky štěpení byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a pomocí imunodetekce. Koncentrace proteinů byly stanoveny spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop (ThermoFischer Scientific).

3.10.2 Purifikace proteinů obsahující Strep-tag pomocí afinitní chromatografie

HEK 293 buňky byly dezintegrovány pomocí sonikace (Sonikátor 3000, Misonix) 3x 20s pulsy, s amplitudou 3-5 %. K buněčnému lyzátu byl přidán 0,1% igepal CA-630 (Sigma Aldrich Co.) a směs byla inkubována na ledu po dobu 20 min. Dále byl přidán NaCl do finální koncentrace 150 mM a směs byla inkubována na ledu po dobu dalších 20 min. Pro oddělení buněčného lyzátu byla provedena centrifugace při 7 200 g po dobu 15 min a při 4 °C. Poté byl odebrán supernatant a byla provedena druhá centrifugace při 40 000 g, 4 °C, 30 min. Supernatant byl následně použit pro purifikaci.

Purifikace fúzních proteinů GFP-DVL1, GFP-DVL2 a GFP-DVL3 se Strep-tagem probíhala při 4 °C s využitím gravitačních kolonek. Supernatant získaný po proteinové expresi byl inkubován s 3 ml Streptactinu (Strep-Tactin Superflow, IBA) promytého ekvilibračním pufrem (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol, pH 8) po dobu 1 hod při 4 °C. Poté byla suspenze nanesena na kolonu a nosič byl promyt 10 ml ekvilibračního pufru, následně 10 ml ekvilibračního pufru s 3 mM ATP a 10 mM MgCl₂ (inkubace na koloně 15 min) a nakonec 10 ml ekvilibračního pufru. Následně byl protein eluován 2x 30 ml elučního pufru (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,

10 mM KCl, 10% glycerol, 3 mM desthiobiotin, pH 8). jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Vypurifikované proteiny byly zakoncentrovány pomocí centrifugačního filtru (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Merck Millipore) s cut-off limitem 30 kDa. Koncentrace proteinů byly stanoveny spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop (ThermoFischer Scientific).

3.11 TIRF mikroskopické experimenty

Při TIRF mikroskopii (Total internal reflection fluorescence microscopy) dochází k excitaci a detekci fluoroforů v tenkých vrstvách vzorku při současném potlačení fluorescence pozadí. Laserové světlo je nasměrováno na rozhraní 2 prostředí tak, že dopadá na mikroskopické sklíčko pod úhlem větším, než je tzv. mezní úhel. To vede k totálnímu odrazu a vzniká tzv. evanescentní vlna. Evanescentní vlna je slabé elektromagnetické pole vzniklé v důsledku totálního odrazu. Excitovány jsou tak pouze fluorofory v hloubce evanescentního pole (100-200 nm) a fluorofory ve větší vzdálenosti od krycího skla excitovány nejsou.

3.11.1 Polymerizace mikrotubulů

Pro TIRF mikroskopické experimenty byl použit tubulin izolovaný z prasečích mozků již dříve v laboratoři dle Ustinova et al. (2020), který byl smíchaný s fluorescenčně značeným tubulinem (Alexa Fluor 647) v poměru 30:1.

Před každým TIRF mikroskopickým experimentem byly připraveny mikrotubuly stabilizované pomocí GMPCPP a taxolu. Nejdříve byl smíchán 2,5 μ M tubulin s 1 mM GMPCPP (Jena Bioscience), a 1 mM $MgCl_2$ v BRB80 pufru (80 mM PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, pH 6,8). Následovala 5-minutová inkubace na ledu, a poté 2-hodinová inkubace v termostatu při 37 °C. Směs byla dále centrifugována při laboratorní teplotě, 14 000 g po dobu 30 min. Peleta byla resuspendována ve 100 μ l pufru BRB80 s 1 μ M taxolem.

3.11.2 Příprava sklíček pro mikroskopické experimenty

Mezi dvě silanizovaná krycí sklíčka (Corning Cover Glass, Sigma-Aldrich Co.), připravené dle Hyman, (1991) v laboratoři, byly vloženy proužky parafilmu, čímž se mezi jednotlivými parafilmy vytvořily kanály o výšce 0,1 mm, šířce 3 mm a délce 18 mm. Do takto připravených kanálů bylo pipetováno 25 μ l protilátky proti β -tubulinu (Sigma-

Aldrich Co., $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v PBS), a následovala inkubace po dobu 10 min. Dále byla provedena 30 min inkubace s $35 \mu\text{l}$ detergentu Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich Co., $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v BRB80), s následným promytím kanálu $35 \mu\text{l}$ pufru BRB80 s $1 \mu\text{M}$ taxolem. Takto připravená sklička s kanály byla následně použita pro TIRF experimenty.

3.11.3 TIRF mikroskopie

Všechny výše uvedené fúzní proteiny byly spolu s dalšími konstrukty mRuby-PRC1 (mRuby-PRC1 1-620; mRuby-PRC1 1-486; mRuby-PRC1 303-486) a GFP-DVL3 (GFP-DVL3 398-496; GFP-DVL3 243-496; GFP-DVL3 243-351), které byly připraveny již dříve v laboratoři, použity pro TIRF mikroskopické experimenty.

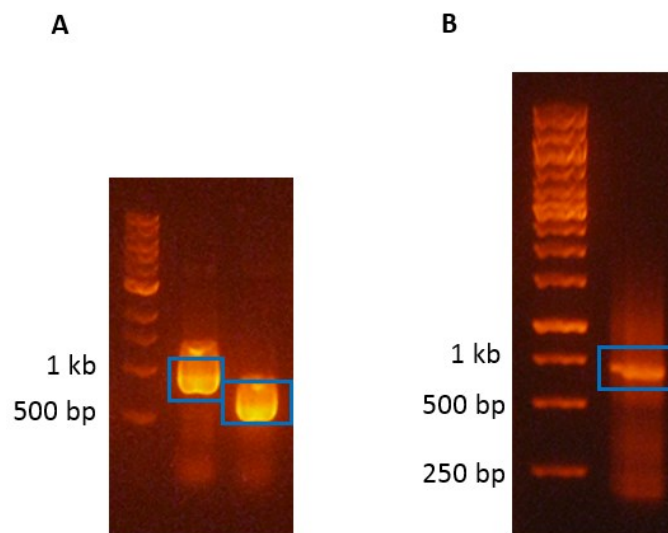
Mikrotubuly byly imobilizovány v kanálech na skličku pomocí protilátek proti β -tubulinu. Vzorky GFP-DVL (200 nM) a mRuby-PRC1 (100 nM) byly smíchány a pipetovány do připravených kanálů v BRB80 pufru s 20 mM D-glukózou, $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ kaseinem, 0,001% detergentem C_{12}E_8 , 10 mM DTT a 1 mM taxolem. Pro stabilizaci fluorescenčního signálu byla dále přidána $110 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ glukóza oxidáza a $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kataláza.

Pro fluorescenční detekci proteinů byl použit mikroskop Nikon Ti-E vybaveným H-TIRF systémem (Nikon). Byl použit 60x imerzní objektiv 1.49NATIRF, Andor iXon Ultra EMCCD kamera (Andor Technology, Belfast) spolu s NIS Elements softwarem (Nikon). Pro vizualizaci GFP-DVL byl konkrétně použit 488 nm excitační laser, pro vizualizaci mRuby-PRC1 – 561 nm excitační laser a pro Alexa Fluor 647-značené mikrotubuly – 640 nm excitační laser. Frekvence snímání obrazu byla jeden snímek za 0,2-0,3 s. Výsledky byly analyzovány pomocí programu ImageJ [(Schindelin *et al.*, 2012);(Rueden *et al.*, 2017)].

4 Výsledky

4.1 Klonování

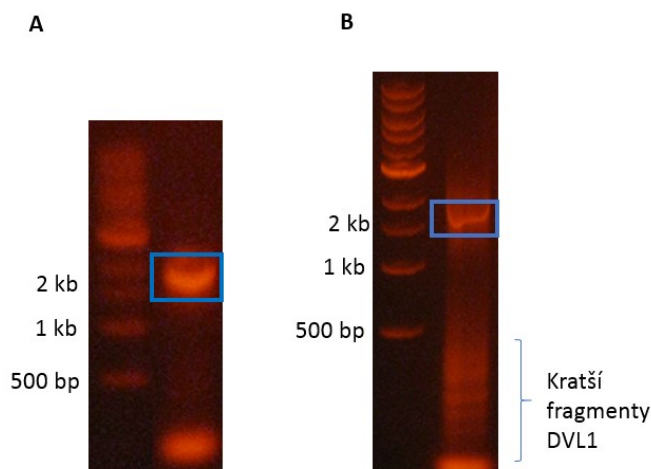
Pomocí restrikčního klonování s využitím restrikčních endonukleáz a ligázy byly připraveny expresní vektory různých zkrácených variant PRC1 ve fúzi s fluorescenčním proteinem mRuby (Tabulka 5). Nejdříve byl požadovaný fragment *PRC1* amplifikován pomocí PCR, kde byl jako templát využit plazmid pOCC293-*PRC1_1-620* připravený v naší laboratoři. Výsledek PCR reakce byl ověřen pomocí elektroforetické analýzy DNA v agarózovém gelu (obrázek 15). PCR produkty byly štěpeny pomocí restrikčních endonukleáz *Asc I* a *Not I* a následně úspěšně ligovány do expresního plazmidu pOCC293. Úspěšnost klonování vektorů byla ověřena Sangerovým sekvenováním (GATC Biotech).



Obrázek 15: Elektroforetická analýza vybraných PCR produktů v agarózovém gelu A: fragmenty *PRC1_67-486* (1260 bp) a *PRC1_224-486* (789 bp), B: *PRC1_1-64+341-486* (714 bp)

Pomocí Gateway klonování byly připraveny expresní vektory pro DVL1 a DVL2 ve fúzi s fluorescenčním proteinem GFP pro expresi v HEK293 buňkách. Nejdříve byla vkládaná sekvence DNA opatřena att místy pomocí dvou PCR reakcí se specifickými primery. Výsledky PCR reakcí byly ověřeny pomocí elektroforetické analýzy DNA v agarózovém gelu (obrázek 16). Během 2. PCR reakce došlo i ke vzniku kratších

nespecifických fragmentů *DVLI* (menších než 500 bp), a proto byl amplifikovaný *DVLI* vyříznut z gelu.



Obrázek 16: Elektroforetická analýza PCR produktů v agarózovém gelu A: 1. PCR reakce *DVLI* (2012 bp). B: 2. PCR reakce *DVLI*.

Následně byla provedena BP reakce a inzert byl pomocí Gateway BP klonázy (Invitrogen) vložen do donorového plazmidu pDONR 221 (Invitrogen). Sekvence vektoru byla ověřena Sangerovým sekvenováním (GATC Biotech). Pomocí LR reakce byla požadovaná sekvence vložena do expresního plazmidu pMM338 a sekvence konstruktů byla rovněž ověřena sekvenováním (GATC Biotech). U konstruktů pMM338_*DVL2* bylo zjištěno, že gen pro *DVL2* není ukončen stop kodonem, proto bylo nutné provést mutagenezi.

Tabulka 5: připravené expresní vektory konstruktů *PRC1* a *DVL*

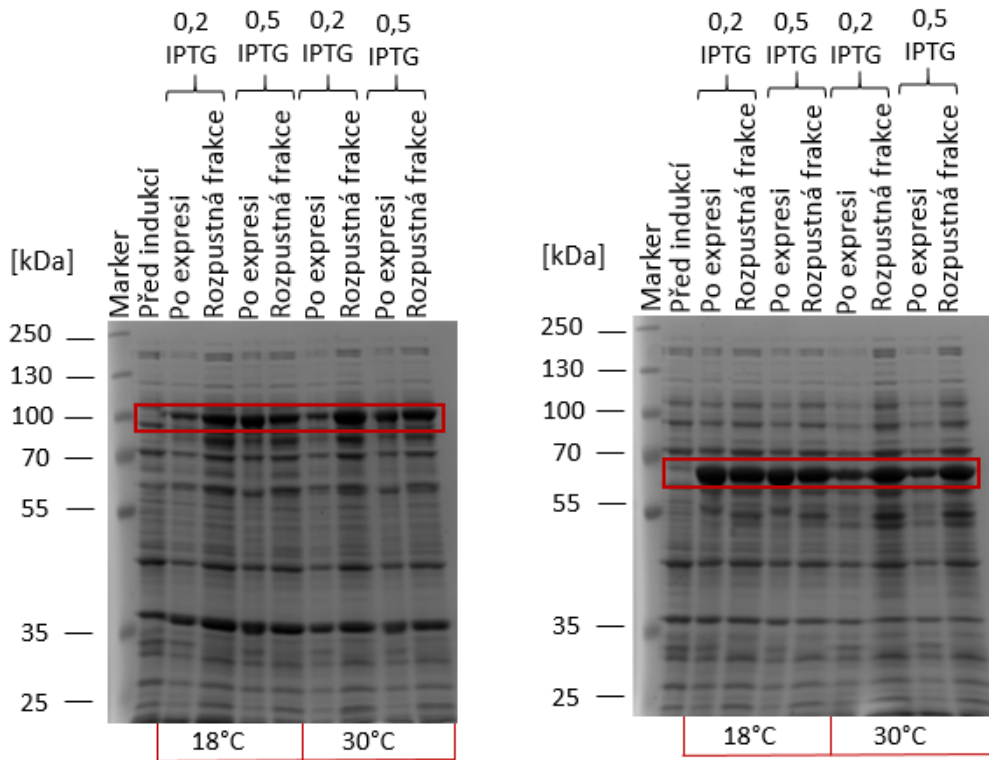
Expresní vektory <i>PRC1</i> konstruktů	Expresní vektory <i>DVL</i> konstruktů
pOCC293- <i>PRC1</i> _91-620	pMM338- <i>DVLI</i>
pOCC293- <i>PRC1</i> _303-620	pMM338- <i>DVL2</i>
pOCC293- <i>PRC1</i> _67-486	
pOCC293- <i>PRC1</i> _224-486	
pOCC293- <i>PRC1</i> _1-64+341-486	

4.2 Exprese, purifikace a štěpení 3C proteázou

Připravené expresní vektory pOCC293-*PRC1* (tabulka 5) byly použity pro produkci fúzních proteinů mRuby-*PRC1*_91-620, mRuby-*PRC1*_303-620, mRuby-*PRC1*_67-486, mRuby-*PRC1*_224-486 a mRuby-*PRC1*_1-64+341-486, která

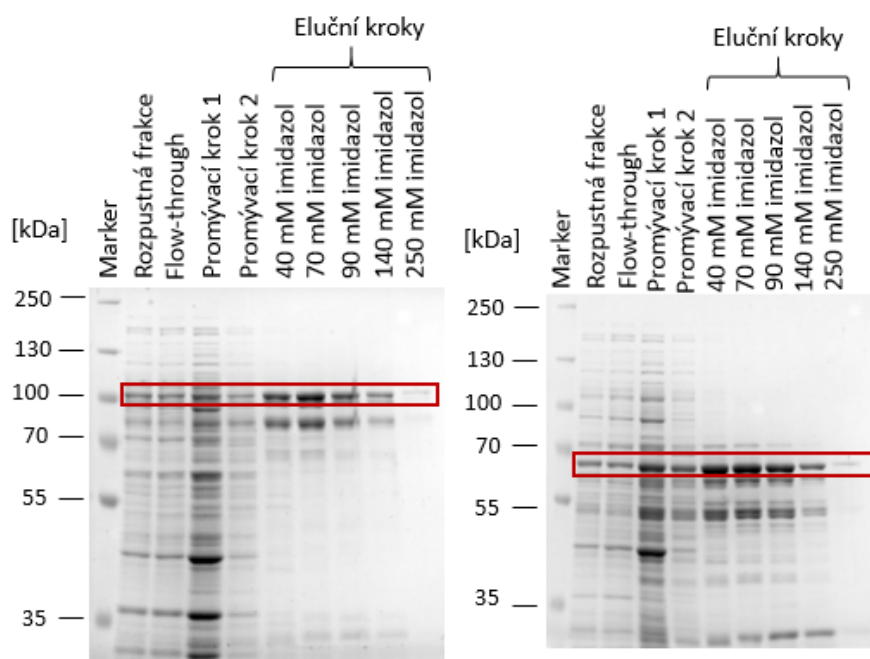
probíhala v buňkách BL21(DE3) RIPL. U všech konstruktů byla optimalizována teplota exprese (18 nebo 30 °C) a koncentrace induktoru (0,2mM a 0,5mM IPTG).

Expres mRuby-PRC1 proteinů byla viditelná pouhým okem, protože buňky byly díky mRuby zbarveny do růžova, což následně potvrdily i výsledky SDS-PAGE. Mezi různými podmínkami exprese nebyly u žádného z připravených mRuby-PRC1 konstruktů pozorovány výraznější rozdíly v produkci rozpustné formy požadovaného proteinu. Pro expresi většího množství proteinů byla na základě výsledků optimalizace zvolena teplota exprese 18 °C a 0,2 mM koncentrace IPTG. Výsledky optimalizace exprese pro dva vybrané konstrukty (mRuby-PRC1_91-620 a mRuby-PRC1_303-620) jsou na obrázku 17.



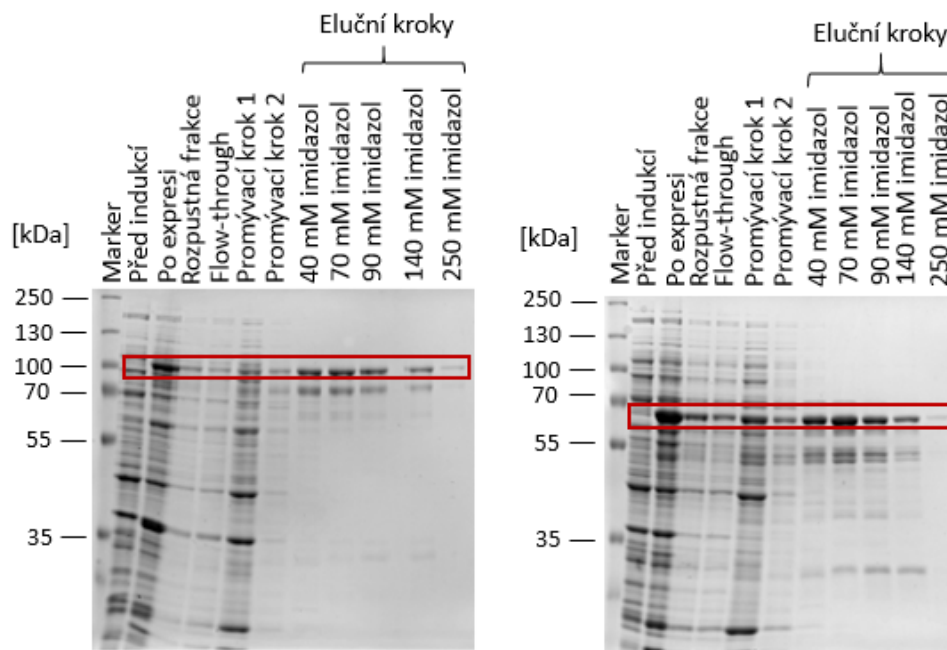
Obrázek 17: Optimalizace exprese mRuby-PRC1_91-620 (91 kDa) a mRuby-PRC1_303-620 (67 kDa). Pro každou kombinaci podmínek (teplota/koncentrace IPTG) byly v průběhu experimentu odebrány tři vzorky. První odpovídá celkovému proteinu před indukcí exprese, druhý celkovému proteinu po expresi a třetí rozpustné frakci proteinů po dezintegraci buněk a odstranění nerozpustných zbytků buněk. Proužky odpovídající požadovaným proteinům jsou zvýrazněny v rámečku. 10% SDS-PAGE gel

Po expresi fúzních proteinů mRuby-PRC1_91-620 a mRuby-PRC1_303-620 v 500ml LB/KAN byly buňky dezintegrované pomocí sonikace 14x15s pulsy, s amplitudou 5 %. Nerozpustné zbytky buněk byly odstraněny pomocí centrifugace při 20 000 g po dobu 30 min při 4 °C. Rozpustná frakce byla následně použita pro NiNTA purifikaci a jednotlivé vzorky frakcí byly zpracovány pro SDS-PAGE elektroforézu. Konstrukty se vážaly na NiNTA kolonu a podařilo se je vypurifikovat. V eluovaných frakcích byly pozorovány i proužky o nižší molekulové hmotnosti, patřící zřejmě degradačním produktům (obrázek 18).



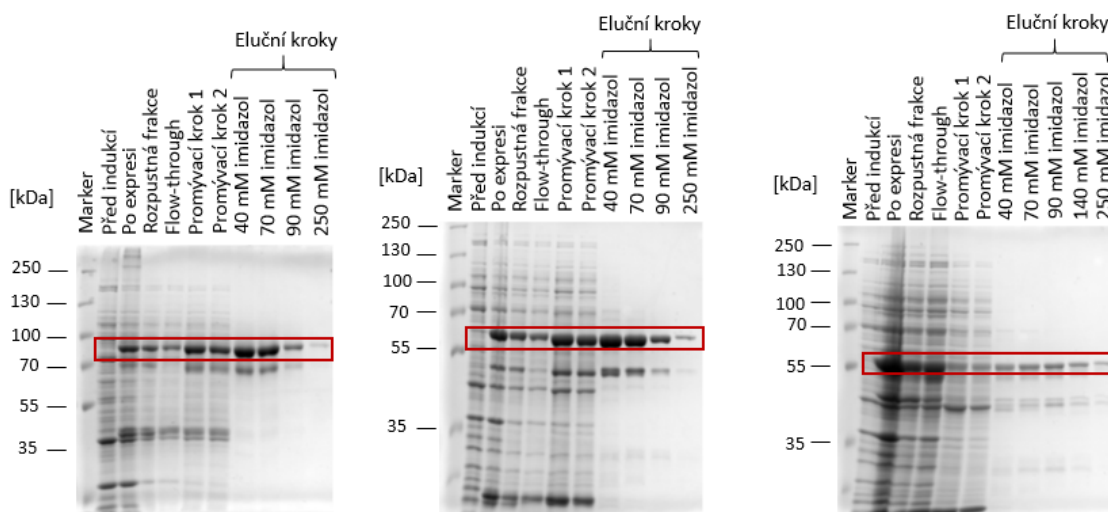
Obrázek 18: NiNTA purifikace mRuby-PRC1_91-620 (91 kDa) a mRuby-PRC1_303-620 (67 kDa). Proužky odpovídající požadovaným proteinům jsou zvýrazněny v rámečku. 10% SDS-PAGE gel

Kvůli částečné degradaci proteinů byly upraveny podmínky zpracování buněk před purifikací. Buňky byly resuspendovány v pufru s dvojnásobným množstvím inhibitorů proteáz. Dále byl zkrácen čas sonikace na 7x 15s pulsů, přidán lysozym $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, a zkrácena byla také doba centrifugace na 15 min, aby byla minimalizována doba, kdy jsou proteiny bezprostředně vystavené působení proteáz. Po celou dobu byl vzorek držen na ledu a purifikace byla prováděna při 4 °C. Jednotlivé vzorky frakcí byly zpracovány pro SDS-PAGE elektroforézu, ze které je patrné, že došlo pouze k mírnému zlepšení, ale výrazněji se degradaci proteinů ovlivnit nepodařilo (obrázek 19). To naznačuje, že k degradaci mohlo docházet ještě před dezintegrací buněk.



Obrázek 19: NiNTA purifikace *mRuby-PRC1_91-620* (91 kDa) a *mRuby-PRC1_303-620* (67 kDa) po úpravě podmínek zpracování buněk před purifikací. Proužky odpovídající požadovaným proteinům jsou zvýrazněny v rámečku. 10% SDS-PAGE gel

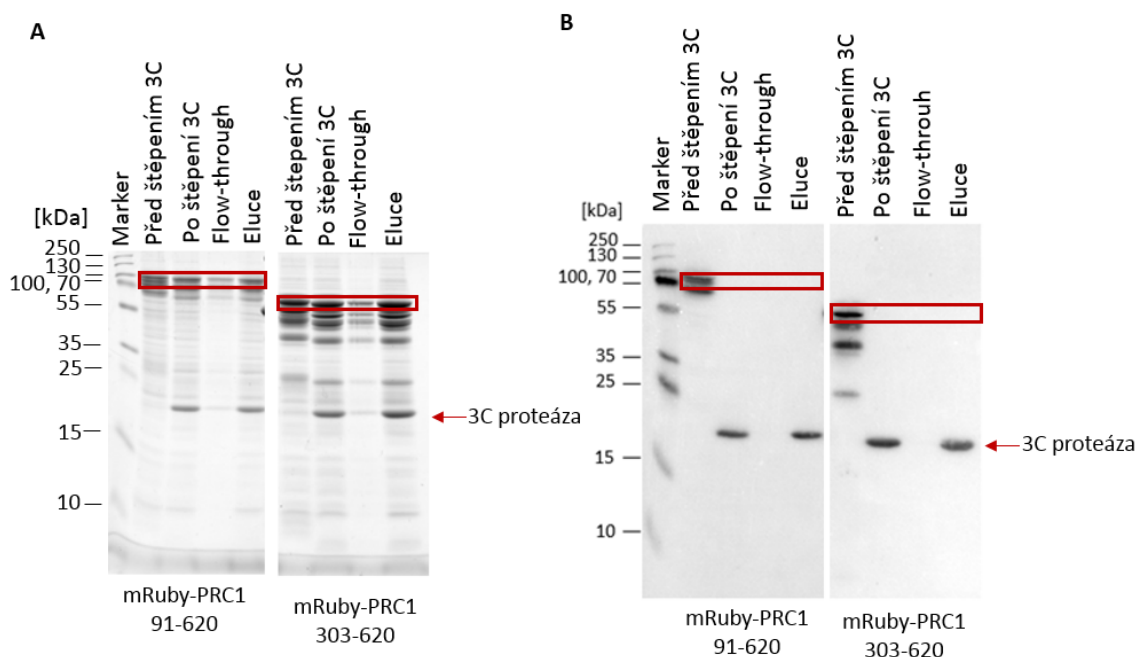
Upravené podmínky byly nicméně zachovány i při produkci dalších *mRuby-PRC1* konstruktů (obrázek 20). Všechny konstrukty se vážaly na NiNTA kolonu a byly úspěšně vypurifikovány.



Obrázek 20: NiNTA purifikace *mRuby-PRC1_67-486* (91 kDa), *mRuby-PRC1_224-486* (60 kDa) a *mRuby-PRC1_1-64+341-486* (56 kDa). Proužky odpovídající požadovaným proteinům jsou zvýrazněny v rámečku. 10% SDS-PAGE gel

Po NiNTA purifikaci byla vybraná frakce zbavena imidazolu pomocí dialýzy. Následně byl protein zakoncentrován a His-tag byl odštěpen 3C proteázou. Pro odstranění

3C proteázy, volného His-tagu a případně proteinů s neodštěpeným His-tagem byla směs nanášena na NiNTA kolonu. Výsledky štěpení byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy, a také pomocí imunodetekce anti-His HRP protilátkou (obrázek 21). Z výsledků Western blottingu vyplývá, že byl His-tag úspěšně a kompletně odštěpen. Na SDS-PAGE gelu jsou patrné proužky odpovídající požadovanému proteinu i ve frakci po eluci imidazolem. Přítomnost proteinu v eluci mohla být případně zapříčiněna nespecifickou vazbou na kolonu nebo precipitací.

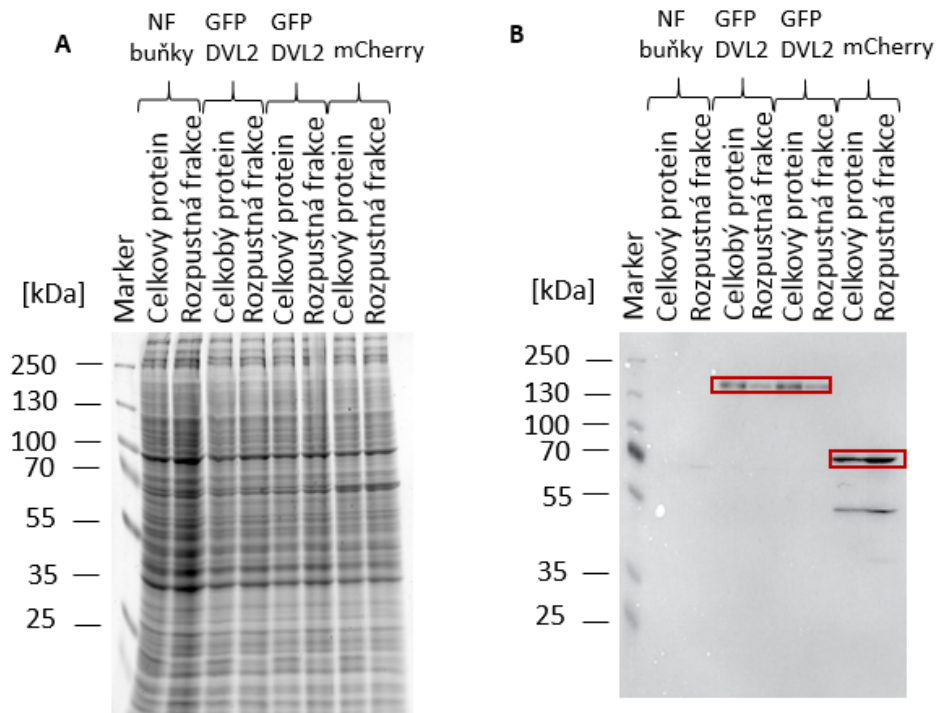


Obrázek 21: Štěpení konstruktů *mRuby-PRC1_91-620* (91 kDa) a *mRuby-PRC1_303-620* (67 kDa) pomocí 3C proteázy (22 kDa). A: SDS-PAGE gel (15%), B: Western blotting s imunodetekcí prostřednictvím anti-His HRP protilátky.

4.3 Exprese a purifikace fúzních proteinů GFP-DVL

Fúzní proteiny GFP-DVL1, GFP-DVL2 a GFP-DVL3 byly pomocí připravených expresních plazmidů *pMM338_DVL* (izolovaných ze dvou různých kolonií) produkovány v HEK293 buňkách. Nejdříve byla exprese otestována v malém objemu. Jako kontrola transfekce byly použity netransfekované buňky a buňky transfekované expresním vektorem (*pMM318-mCherry2*), který kóduje fluorescenční protein mCherry ve fúzi se Strep-HALO-tagem (70 kDa). Vzorčky buněčného lyzátu s celkovým proteinem a rozpustné frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a pomocí Western blottingu s imunodetekcí anti-Strep HRP protilátkou. Správný průběh transfekce byl potvrzen pomocí pozitivní kontroly, produkcí proteinu mCherry, který byl detekován nejen vizuálně – transfekované buňky byly zbarveny do růžova, ale také pomocí Western

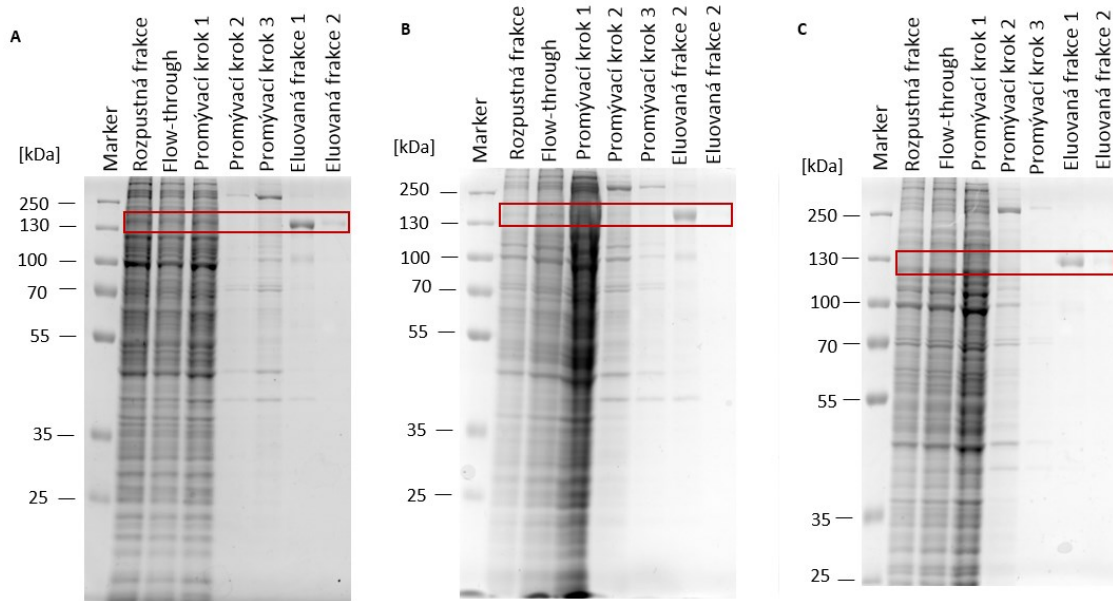
blottingu s imunodetekcí. U netransfekovaných buněk nebyla produkce His-tagovaných proteinů detekována. Exprese GFP-DVL2 v malém objemu kultury je dokumentována na obrázku 22. GFP-DVL2 v SDS-PAGE gelu migruje odlišně od své předpovídané molekulové hmotnosti. Příčinou by mohlo být aminokyselinové složení DVL proteinů nebo také post-translační modifikace.



Obrázek 22: Exprese GFP-DVL2 (113 kDa) v malém objemu kultury. A: SDS-PAGE gel, B: imunodetekce prostřednictvím anti-Strep HRP protilátky. Jako kontrola transfekce byly použity netransfekované buňky (NF buňky) a expresní vektor pro fluorescenční protein Strep-HALO-mCherry (70 kDa). 10% SDS-PAGE gel

Po otestování exprese v malém objemu kultury byly proteiny exprimovány ve 448 ml buněčné kultury. Rozpustné frakce byly následně použity pro afinitní purifikaci na Streptaktinové koloně a jednotlivé vzorky odebíraných frakcí byly zpracovány pro SDS-PAGE elektroforézu. Všechny GFP-DVL konstrukty se pomocí

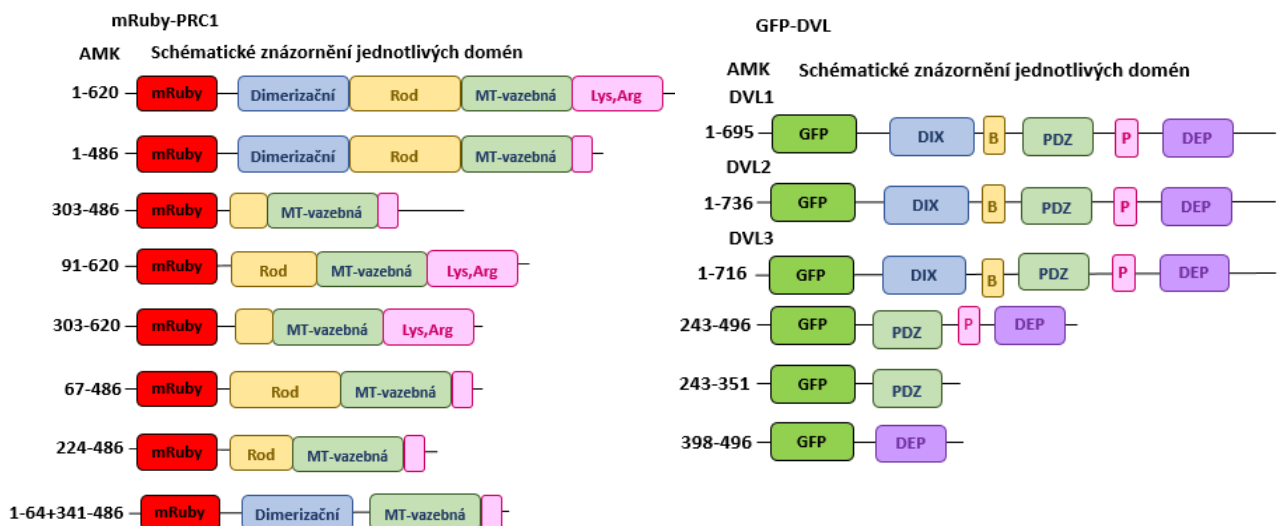
Strep-tagu vázaly na Streptaktinovou kolonu a byly úspěšně purifikovány (obrázek 23).



Obrázek 23: A: Purifikace GFP-DVL1 (108 kDa), B: Purifikace GFP-DVL2 (113 kDa), C: Purifikace GFP-DVL3 (113 kDa), 10% SDS-PAGE gel

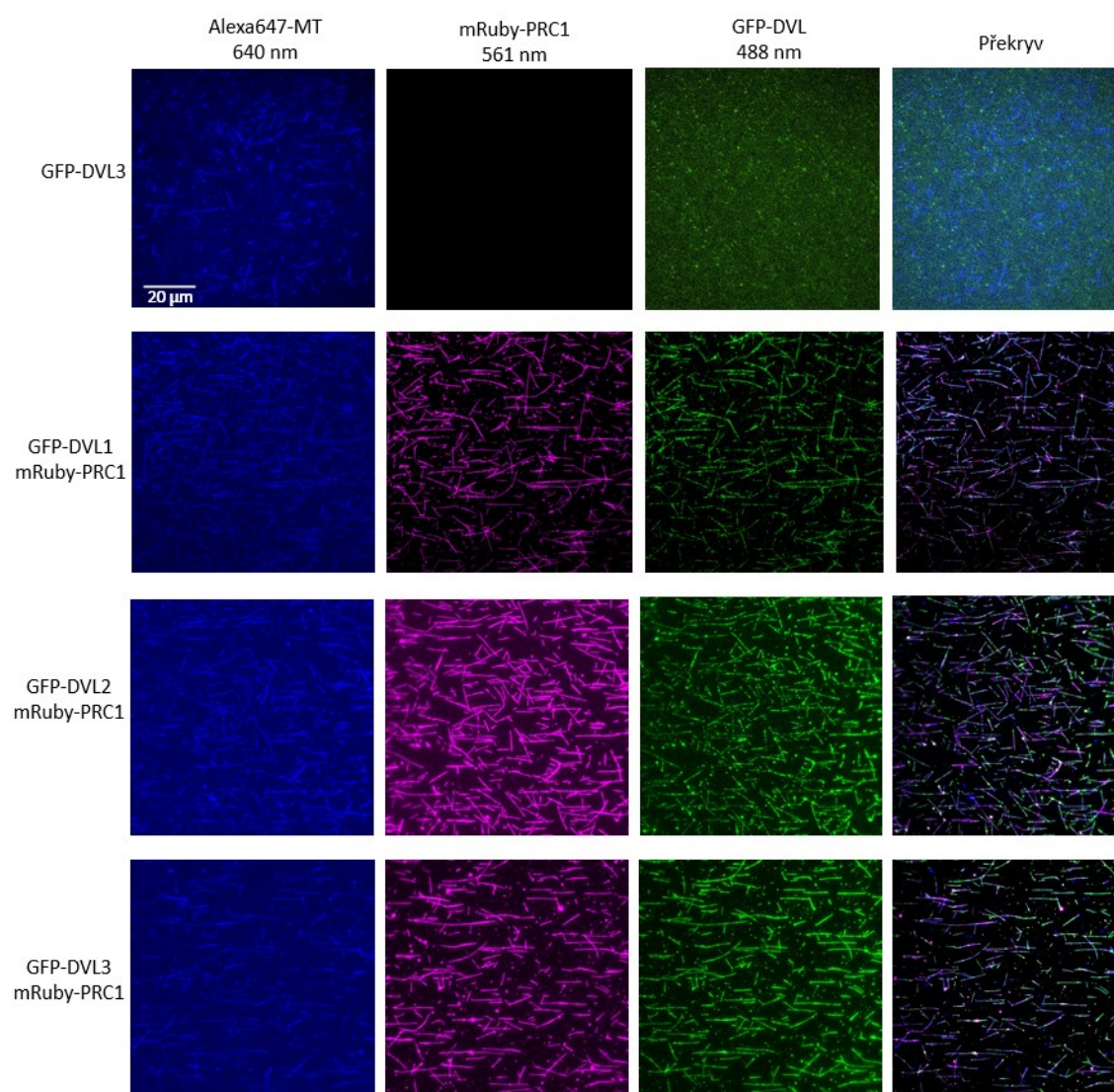
4.4 TIRF mikroskopie

TIRF mikroskopické experimenty byly prováděny s cílem vymezení interakční rozhraní mezi PRC1 a DVL3. K tomu byly využity konstrukty mRuby-PRC1 a GFP-DVL uvedené na obrázku 24.



Obrázek 24: Jednotlivé konstrukty mRuby-PRC1 a GFP-DVL testované pomocí TIRF mikroskopie.

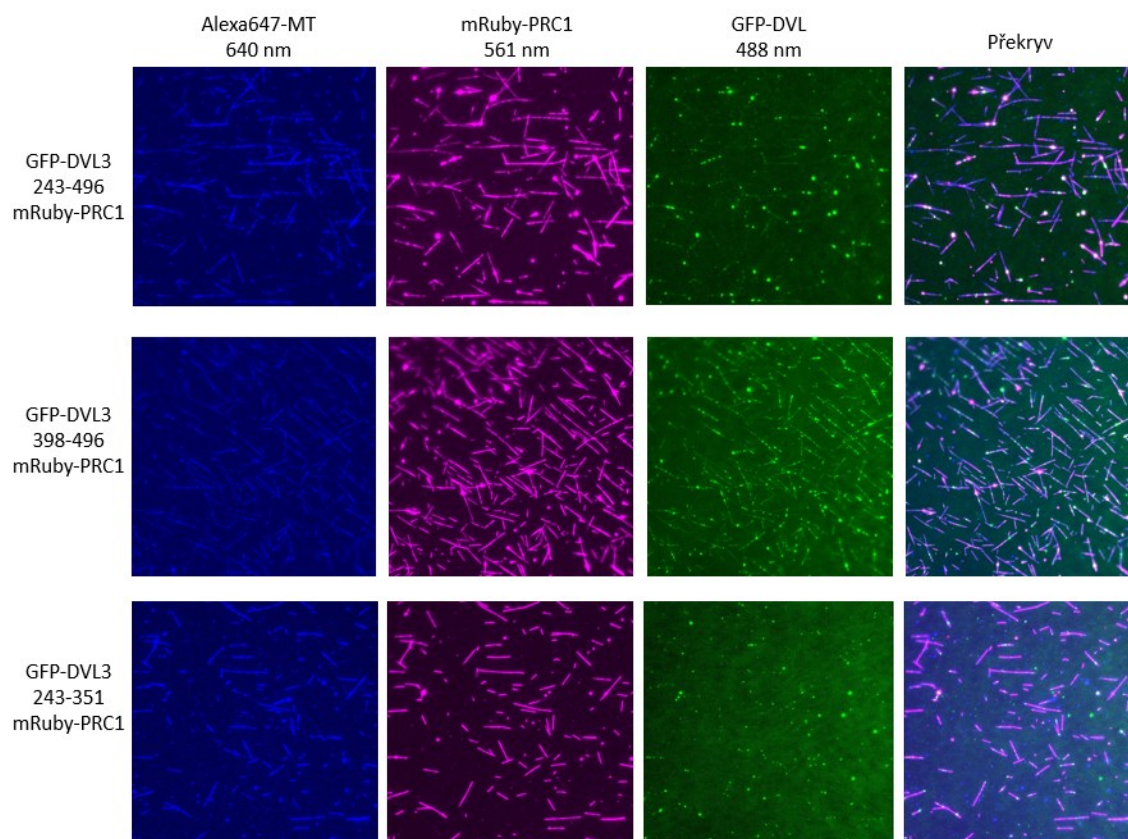
Při TIRF experimentech byla k imobilizovaným mikrotubulům přidávána směs 100 nM mRuby-PRC1 a 200 nM GFP-DVL. Mikrotubuly, značené Alexa647 (excitace 640 nm) jsou znázorněny modře, mRuby-PRC1 konstrukty (excitace 561 nm) jsou označeny fialovou barvou a GFP-DVL konstrukty (excitace 488 nm) jsou zobrazeny zeleně. Dále je zobrazen překryv všech tří kanálů. Jako negativní kontrola byl k imobilizovaným mikrotubulům přidán pouze GFP-DVL3, kde interakce pozorována nebyla. DVL3 tedy není schopen vazby na mikrotubuly bez přítomnosti PRC1. Úspěšně byla testována interakce mezi PRC1 a všemi izoformami DVL. Bylo zjištěno, že DVL1, DVL2 i DVL3 interagují s PRC1 (obrázek 25).



Obrázek 25: Negativní kontrola (GFP-DVL3 a Alexa647-mikrotubuly) a jednotlivé izoformy GFP-DVL a mRuby-PRC1₁₋₆₂₀ testované pomocí TIRF mikroskopie.

Dále byla testována interakce mezi mRuby-PRC1₁₋₆₂₀ a třemi zkrácenými variantami GFP-DVL3. U zkrácené varianty GFP-DVL3₂₄₃₋₄₉₆, odpovídající PDZ

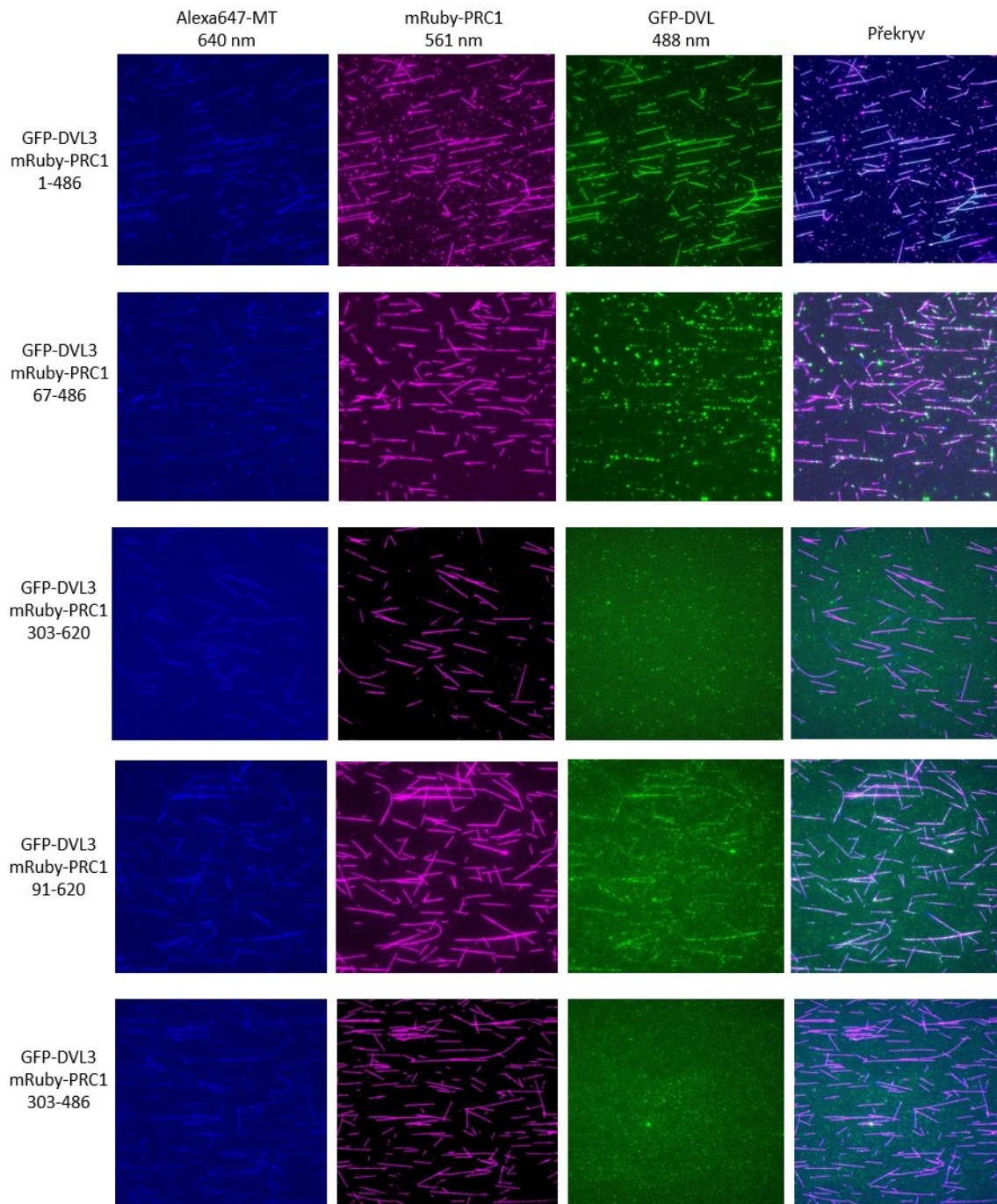
spolu s DEP doménou, byl pozorován velmi slabý signál kopírující mikrotubuly. Silnější signál byl pozorován v případě konstruktů GFP-DVL3_398-496 (DEP doména). Žádný signál nebyl detekován u konstruktů GFP-DVL3_243-351 (PDZ doména) (obrázek 26). Konstrukt GFP-DVL3_1-82 (DIX doména) se nepodařilo připravit v rozpustné formě, a proto nemohl být testován. Z výsledků vyplývá, že na interakci s PRC1 se zřejmě bude podílet část DVL odpovídající DEP doméně. K přesnějšímu vymezení interakčního rozhraní bude ovšem nutná příprava dalších konstruktů GFP-DVL3.

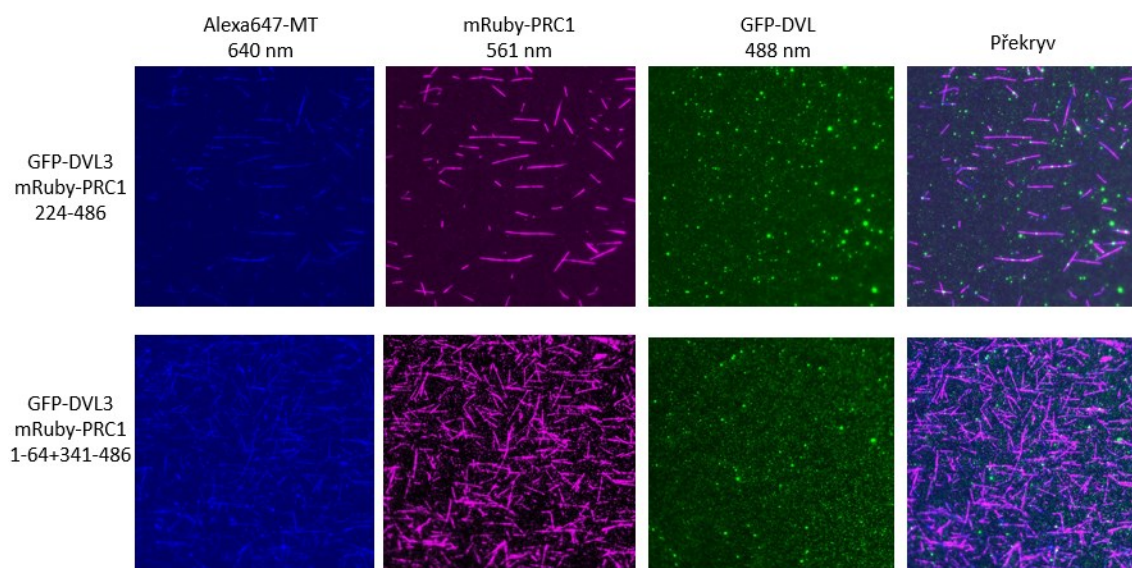


Obrázek 26: Testování interakce mezi zkrácenými variantami GFP-DVL3 a mRuby-PRC1_1-620

Jako poslední byla testována interakce mezi GFP-DVL3 a sedmi zkrácenými variantami mRuby-PRC1. Všechny testované konstrukty mRuby-PRC1 se úspěšně vázaly na mikrotubuly. Interakce byla pozorována mezi GFP-DVL3 a mRuby-PRC1_1-486, což naznačuje, že se na interakci nepodílí C-terminální část PRC1 odpovídající doméně bohaté na Lys a Arg. Velmi nízký signál byl sledován u konstruktů mRuby-PRC1_67-486 a mRuby-PRC1_91-620 naznačující možnou slabou interakci s GFP-DVL3. U dalších testovaných konstruktů mRuby-PRC1_303-620, mRuby-PRC1_224-486, mRuby-PRC1_1-64+341-486 a mRuby-PRC1_303-486 interakce s GFP-DVL3 pozorována nebyla (obrázek 27). Z uvedených výsledků vyplývá,

že za interakci mezi PRC1 a DVL3 je zřejmě zodpovědná N-terminální část PRC1 složená z dimerizační a rod domény.





Obrázek 27: Testování interakce mezi zkrácenými variantami mRuby-PRC1 a GFP-DVL3

5 Diskuze

Scaffolding protein Dishevelled (Dvl) je nezbytnou součástí Wnt signalizačních kaskád při embryonálním vývoji i při udržování tkáňové homeostázy v dospělosti. PRC1 patří mezi proteiny asociované s mikrotubuly a je klíčový pro správný průběh cytokineze. V naší laboratoři byl lidský PRC1 identifikován jako nový interakční partner DVL3 a záměrem této diplomové práce bylo vymezit interakční rozhraní těchto dvou proteinů pomocí TIRF mikroskopie s připravenými fluorescenčními konstrukty obou proteinů. K tomuto účelu se podařilo exprimovat a purifikovat různé varianty mRuby-PRC1 a GFP-DVL, jejichž interakce byla testována.

Metoda TIRF mikroskopie pro sledování interakce mezi PRC1 a DVL3 byla zvolena z důvodu eliminace nescifických protein-proteinových interakcí a interakcí s nosičem, ke kterým by mohlo docházet například při využití metody pull-down. Další výhodou bylo použití velmi nízkých koncentrací proteinů. V této práci byly při TIRF mikroskopických experimentech používány 100 nM mRuby-PRC1 a 200 nM GFP-DVL. Při zvoleném experimentálním uspořádání TIRF mikroskopie byla také kromě interakce mezi GFP-DVL a mRuby-PRC1 paralelně sledována i interakce mRuby-PRC1 konstruktů s mikrotubuly. To sloužilo jako určitá kontrola toho, že připravené konstrukty mRuby-PRC1 jsou funkční a zároveň se tento systém uspořádání experimentu částečně přibližoval uspořádání v buňce.

Naopak nevýhodou při použití TIRF experimentů představoval pufr (jak bude diskutováno dále), který je jednotný pro oba proteiny, a právě PRC1 vyžaduje pufr s nízkým obsahem solí, zatímco konstruktům DVL vyhovuje pufr s vyšším obsahem solí. Další nevýhodou je nutnost přítomnosti MT-vazebné domény u mRuby-PRC1 konstruktů, neboť experimentální uspořádání TIRF mikroskopie vyžaduje vazbu PRC1 na mikrotubuly imobilizované na sklíčku. K tomu muselo být přihlédnuto při návrhu různých zkrácených variant PRC1.

5.1 PRC1

U vzorků mRuby-PRC1₉₁₋₆₂₀ a mRuby-PRC1₃₀₃₋₆₂₀ po purifikaci byly na SDS-PAGE gelu pozorovány proužky o nižších molekulových hmotnostech, než odpovídá molekulovým hmotnostem intaktních proteinů. To značilo vznik degradačních produktů. Toto pozorování je v souladu s literaturou, protože u PRC1 byly produkty

proteolýzy pozorovány již dříve. Subramanian *et al.* (2010) sledovali vznik degradačních produktů u PRC1_341-620 a GFP-PRC1_1-620 v důsledku proteolýzy, a to zejména v oblasti C-konce PRC1. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo také identifikováno jedno konkrétní místo obzvláště citlivé na štěpení proteázami (Asn500), čímž vznikal zkrácený konstrukt GFP-PRC1_1-500 (Subramanian *et al.*, 2010). Toto určité místo se nachází právě také u konstruktů mRuby-PRC1_91-620 a mRuby-PRC1_303-620 připravených v této práci.

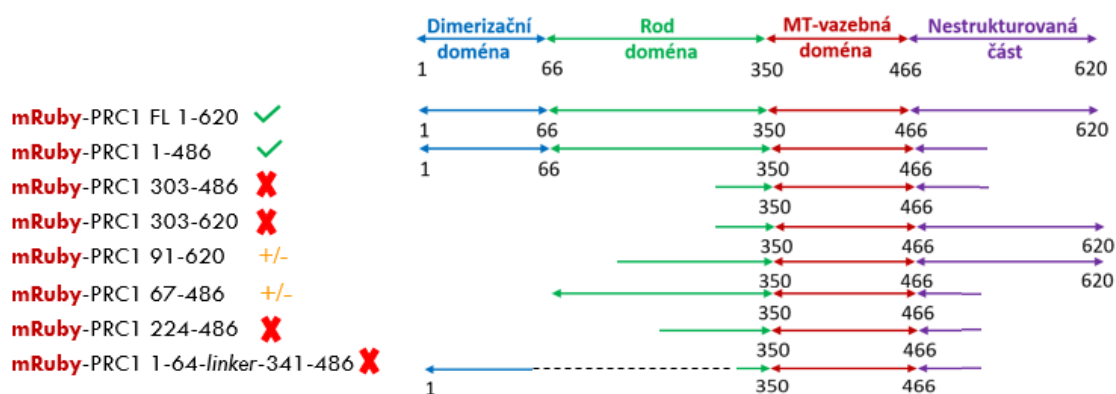
Pro zvýšení stability exprimovaných proteinů byly konstrukty produkovány v buněčných liniích *E. coli* BL21(DE3) RIPL deficientních pro proteázy Lon a OmpT, které patří mezi proteázy běžně se vyskytující u *E. coli* a degradují poškozené nebo abnormální proteiny v cytoplazmě a periplazmatickém prostoru. Vzhledem k tomu, že proteázy mají vyšší aktivitu při vyšších teplotách, probíhala exprese při 18 °C přes noc. Dále byly dodržovány obecné zásady pro práci s proteiny citlivými na proteázy (Ryan and Henahan, 2013). Vzorky byly po skončení exprese a v průběhu purifikace neustále udržovány na ledu a upraveny byly také podmínky pro zpracování buněk po expresi. Buňky byly resuspendovány v pufru s dvojnásobným množstvím inhibitorů proteáz. Dezintegrace buněk byla provedena ve stejný den jako purifikace proteinů. Pro minimalizaci času, kdy je protein bezprostředně v kontaktu s proteázami byl zkrácen čas dezintegrace a byl přidán lysozym (1 mg·ml⁻¹). Doba následné centrifugace byla také o polovinu zkrácena. Žádné výrazné zlepšení při opakované expresi a purifikaci mRuby-PRC1_91-620 a mRuby-PRC1_303-620 ovšem nebylo pozorováno. Zřejmě tedy k degradaci docházelo již před dezintegrací buněk. I tak byly upravené podmínky aplikovány i při produkci dalších konstruktů mRuby-PRC1_67-486, mRuby-PRC1_224-486 a mRuby-PRC1_1-64+341-486. Vznik degradačních produktů byl pozorován u všech připravovaných mRuby-PRC1 konstruktů. I tak ale většinu vzorku (>80 %) po purifikaci představoval intaktní protein. Produkty proteolýzy mohou nicméně snižovat efektivní koncentraci požadovaného proteinu. To by mělo být zohledněno pro využití těchto proteinů při následných experimentech. V případě této práce byly proteiny využity pouze pro TIRF mikroskopii, která byla použita výhradně jako kvalitativní metoda, pomocí níž bylo určeno, zda k interakci mezi připravenými konstrukty dochází nebo ne. Malé snížení efektivní koncentrace proteinu by tedy nemělo mít vliv na závěry této práce.

Různé zkrácené varianty mRuby-PRC1 byly navrženy podle dříve provedených studií zabývajících se strukturou PRC1 a jeho interakcí s mikrotubuly (Subramanian *et al.*, 2010) a kinesinem-4 [(Kurasawa *et al.*, 2004);(Subramanian *et al.*, 2013)], při kterých byly také připravovány zkrácené formy PRC1. Příprava konstruktů probíhala postupně v závislosti na výsledcích TIRF mikroskopických experimentů. Nejdříve byla provedena TIRF mikroskopie s již dříve připravenými konstrukty mRuby-PRC1_1-620, mRuby-PRC1_1-486 a mRuby-PRC1_303-486 a GFP-DVL3. Vazba GFP-DVL3 byla pozorována u mRuby-PRC1_1-620 a mRuby-PRC1_1-486. To naznačovalo, že se na vazbě s DVL3 nepodílí C-terminální doména.

Pro potvrzení hypotézy, že se na interakci mezi PRC1 a DVL3 podílí oblast dimerizační a rod domény bez účasti C-terminální domény bohaté na Lys a Arg byly navrženy a připraveny konstrukty mRuby-PRC1_91-620 a mRuby-PRC1_303-620. V případě mRuby-PRC1_91-620 byl při excitaci 488 nm laserem sledován slabý signál, který kopíroval oblast mikrotubulů, což může naznačovat velmi slabou interakci s DVL3. U mRuby-PRC1_303-620 nebyl pozorován žádný fluorescenční signál, který by značil vazbu DVL3. Konstrukt mRuby-PRC1_91-620, který je složený z převážné části rod domény, MT-vazebné domény a C-terminální domény, zřejmě slabě vázal DVL3. Na vazbě se ovšem s největší pravděpodobností nepodílela C-terminální doména, neboť mRuby-PRC1_303-620 složený pouze z krátkého úseku rod domény, MT-vazebné domény a C-terminální domény nebyl schopen interakce s DVL3.

Další práce se proto zaměřila na N-konec PRC1 a byly připraveny tři další konstrukty mRuby-PRC1 bez C-terminální domény. mRuby-PRC1_67-486 odpovídal rod doméně a MT-vazebné doméně, mRuby-PRC1_224-486 zahrnoval pouze zkrácenou část rod domény spolu s MT-vazebnou doménou a mRuby-PRC1_1-64+341-486 obsahoval pouze dimerizační doménu spojenou s MT-vazebnou doménou krátkým flexibilním linkerem (15 AMK) složeným z třikrát se opakující sekvence GGGGS. U všech konstruktů musela být samozřejmě zachována MT-vazebná doména nezbytná pro vazbu na mikrotubuly. V poslední sérii TIRF experimentů s konstrukty mRuby-PRC1 a GFP-DVL3 byla sledována pouze možná slabá interakce u konstruktu mRuby-PRC1_67-486 podobně jako předtím u mRuby-PRC1_91-620. U mRuby-PRC1_224-486 a mRuby-PRC1_1-64+341-486 nebyla interakce s GFP-DVL3 pozorována. Všechny připravené konstrukty mRuby-PRC1 se úspěšně vázaly na mikrotubuly. Zřetelná interakce s GFP-DVL3 byla sledována jen u mRuby-PRC1_1-486.

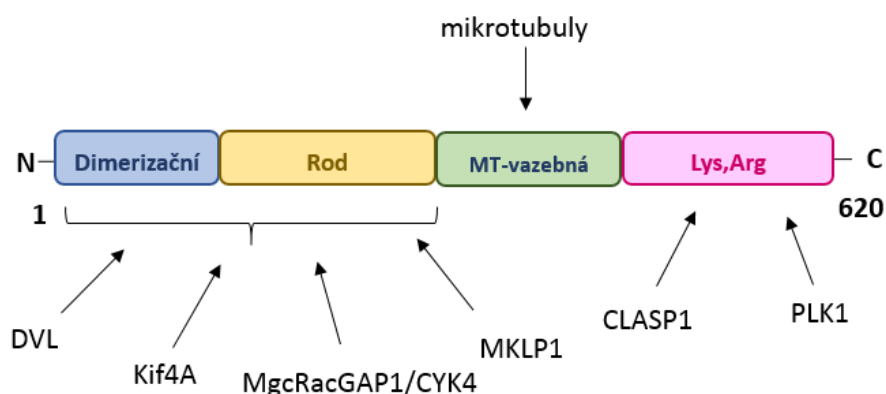
Dva další konstrukty PRC1 obsahující rod doménu vykazovaly slabou interakci s GFP-DVL3 (obrázek 28). Za interakci s DVL3 je tedy s nejvyšší pravděpodobností zodpovědná N-terminální část PRC1.



Obrázek 28: Přehled konstruktů mRuby-PRC1 a výsledky testování interakce s GFP-DVL3.

Podobné výsledky byly zjištěny i při vymezení interakčního rozhraní mezi PRC1 a kinesinem-4 (Kif4A), Kinesin-like proteinu 23 (MKLP1) a Centromere-associated proteinu E (CENP-E). Kurasawa *et al.* 2004 došli pomocí pull-down experimentů spojených s imunodetekcí shodně k závěru, že s Kif4A, MKLP1 i s CENP-E interaguje N-terminální část PRC1. (Kurasawa *et al.*, 2004). V další studii zabývající se též interakcí mezi PRC1 a Kif4A dospěli také ke shodnému závěru, že se na vazbě podílí dimerizační i rod doména. (Subramanian *et al.*, 2013). Odlišné interakční rozhraní bylo naopak identifikováno pro Cytoplasmic-linker associated protein 1 (CLASP1). Na rozdíl od DVL interaguje CLASP1 s C-terminální částí PRC1 (438-620) (Liu *et al.*, 2009).

PRC1 tedy využívá N-terminální část odpovídající dimerizační a rod doméně pro interakci nejen s DVL, ale také s dalšími identifikovanými vazebnými partnery (obrázek 29). Je tedy možné, že mezi těmito proteiny může docházet ke kompetici o vazebné místo na PRC1. Případně mohou proteiny interagovat s N-terminální částí PRC1 současně a vázat se k PRC1 z různých stran. A také může docházet k interakci uvedených proteinů s N-terminální částí PRC1 postupně v různých fázích buněčného cyklu.



Obrázek 29: Interakční rozhraní jednotlivých vazebných partnerů PRC1

5.2 DVL

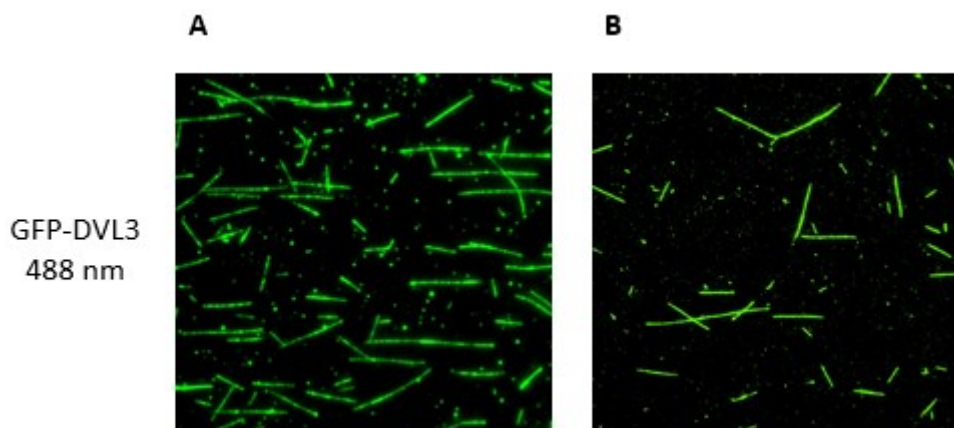
Jelikož jsou jednotlivé domény Dvl vysoce evolučně konzervované a všechny tři savčí homology mají navzájem zastupitelné funkce (Etheridge *et al.*, 2008), byl dále ověřen předpoklad, že všechny izoformy DVL budou vázat PRC1. Interakce PRC1 byla dle očekávání úspěšně testována pro DVL1, DVL2 i DVL3.

Krylova, Messenger and Salinas, 2000 pozorovali kolokalizaci Dvl1 s mikrotubuly axonů a identifikovali PDZ doménu Dvl1 jako část zodpovědnou za stabilizaci mikrotubulů. Dále zjistili, že v dělicích se buňkách chrání exprimovaný Dvl1 mikrotubuly před depolymerizací nokodazolem. Na základě těchto výsledků předpovídali možnou přímou interakci mezi DVL a mikrotubuly, nebo jeho nepřímou asociaci s mikrotubuly prostřednictvím interakce s nějakým proteinem, který mikrotubuly váže. Je možné, že tímto proteinem zprostředkovávajícím vazbu mezi mikrotubuly a Dvl, by mohl být právě PRC1. V této práci přímá vazba DVL3 na mikrotubuly bez přítomnosti PRC1 pozorována nebyla. Byla však pozorována vazba všech tří izoform DVL na mikrotubuly prostřednictvím PRC1.

DVL patří mezi tzv. scaffolding proteiny a má velké množství vazebných partnerů, kteří interagují s jednotlivými doménami. Pro přesnější vymezení interakčního rozhraní mezi PRC1 a DVL3 byly provedeny TIRF mikroskopické experimenty s mRuby-PRC1_1-620 a zkrácenými variantami GFP-DVL3_243-351 a GFP-DVL3_398-496 odpovídajícími doménám PDZ a DEP. Konstrukt GFP-DVL3_1-82 (DIX doména) nebyl testován, protože se ho nepodařilo připravit v rozpustné formě. Dále byl testován konstrukt GFP-DVL3_293-496 odpovídající PDZ doméně spolu s DEP doménou. U GFP-DVL3_243-351 nebyla pozorována žádná interakce s mRuby-PRC1.

Slabý signál naznačující možnou interakci byl sledován u GFP-DVL3_293-496 a nejsilnější signál byl pozorován u GFP-DVL3_398-496. To naznačuje, že by za vazbu k PRC1 mohla být zodpovědná část DVL3 odpovídající DEP doméně. Pro přesnější vymezení interakčního rozhraní bude ovšem nutné připravit další varianty GFP-DVL3, nejen izolované domény, ale i další části obsahující nestrukturované oblasti mezi doménami, protože například PLK1 interaguje s bazickou oblastí mezi PDZ a DEP doménou DVL (Kikuchi *et al.*, 2010).

U všech testovaných konstruktů GFP-DVL byla při TIRF experimentech pozorována v menší míře i tvorba větších kulovitých objektů vykazujících fluorescenční signál v oblasti GFP, za které byly zřejmě zodpovědné drobné agregáty GFP-DVL. Pro jejich odstranění byla u GFP-DVL3 po NiNTA purifikaci provedena gelová permeační chromatografie (data nejsou v diplomové práci uvedena). Dalším purifikačním krokem byly možné agregáty v původním vzorku eliminovány. Nicméně při TIRF mikroskopických experimentech byly stále drobné agregáty GFP-DVL3 pozorovány. To naznačuje, že proteiny agregují vlivem použitého pufru pro TIRF mikroskopii, který byl odlišný od pufru, ve kterém byl protein purifikován. Agregáty GFP-DVL3 byly pozorovány v mnohem menší míře při použití pufru s vyšším obsahem soli (obrázek 30).



Obrázek 30: A: Fluorescenční signál GFP-DVL3 v původním pufru s nízkým obsahem soli (BRB80). B: Fluorescenční signál GFP-DVL3 v pufru s vyšším obsahem soli.

Při použití pufru s vyšší koncentrací soli byla ovšem sledována snížená schopnost PRC1 vázat mikrotubuly, která byla popsána již dříve (Subramanian *et al.*, 2010). Z časových důvodů nebylo složení pufru pro TIRF experimenty optimalizováno. Pro budoucí mikroskopické experimenty by bylo vhodné optimalizovat složení pufru tak, aby nebyla výrazně ovlivněna schopnost PRC1 vázat se na mikrotubuly a zároveň by se předešlo

tvorbě agregátů GFP-DVL, které částečně zvyšují fluorescenční signál pozadí. Tím by bylo možné získat fluorescenční snímky ve vyšší kvalitě.

5.3 Možné další zapojení DVL v buněčném cyklu

Nově identifikovaná interakce mezi klíčovým regulátorem Wnt signalizace DVL a proteinem nezbytným pro buněčné dělení PRC1 je v souladu s hypotézou, že komponenty Wnt signalizace se podílejí na regulaci buněčného cyklu nejen aktivováním transkripce genů nezbytných pro proliferaci, ale i přímou interakcí se strukturami mitotického aparátu.

V této souvislosti bylo již zjištěno, že se DVL uplatňuje při regulaci progresu buněčného cyklu, kde napomáhá správné orientaci dělicího vřeténka, účastní se napojení mikrotubulů dělicího vřeténka na kinetochory a podílí se na regulaci SAC (Spindle assembly checkpoint) (Kikuchi *et al.*, 2010). Dále je DVL také zapojený do regulace centrozomálního cyklu (Cervenka *et al.*, 2016).

Byla dokumentována i spojitost mezi Wnt signalizací a PRC1. U hepatocelulárního karcinomu bylo pozorováno, že Wnt signalizace reguluje expresi PRC1 a jeho lokalizaci na mikrotubulech. A současně PRC1 pravděpodobně interaguje s destrukčním komplexem, podílí se na jeho přesunu k plazmatické membráně, potlačuje funkci APC a tím napomáhá uvolnění β -kateninu (Chen *et al.*, 2016). Tato práce přináší další důkaz o možném propojení PRC1 s Wnt signalizací.

Některé komponenty Wnt signalizace jako například Axin, APC a GSK-3 β asociují s mikrotubuly. Axin a APC zvyšují stabilitu mikrotubulů [(Ciani *et al.*, 2004);(Kita *et al.*, 2006)] a naopak GSK-3 β jejich stabilitu snižuje (Goold, Owen and Gordon-Weeks, 1999). DVL by se mohl prostřednictvím interakce s PRC1 mohl podílet na stabilizaci polárních mikrotubulů, které společně s dalšími proteiny tvoří spindle midzone v anafázi buněčného cyklu.

5.4 Budoucí cíle

Pro další zpřesnění interakčního rozhraní mezi DVL3 a PRC1 bude třeba připravit další zkrácené varianty GFP-DVL3 odpovídající například izolované DIX doméně, a také dalším částem obsahujícím nestrukturované oblasti mezi jednotlivými doménami. Také bude nutné připravit zkrácené varianty mRuby-PRC1 pro přesnější vymezení části

N-konce PRC1 zodpovědné za vazbu na DVL3. Pro tento účel mohou být navrženy například konstrukty se zachovanou dimerizační a MT-vazebnou doménou, s deletovaným různě dlouhým úsekem rod domény pro další TIRF mikroskopické experimenty. Dále by také bylo vhodné optimalizovat složení pufru pro TIRF experimenty, čímž se sníží fluorescenční signál pozadí.

Další experimenty by se měly zaměřit na studium interakce mezi identifikovanými interagujícími doménami DVL3 a PRC1. (např. určení afinity, stechiometrie, kinetiky nebo termodynamiky). Využít lze například termoforézu (MST – Microscale Thermophoresis), pomocí které je možné stanovit hodnotu disociační konstanty (K_d), a tím určit afinitu interakce. Cílem je rovněž krystalizace komplexu DVL3/PRC1 (respektive jejich interagujících domén) a určení struktury pomocí rentgenostrukturní analýzy.

V neposlední řadě by bylo vhodné provést buněčné studie pro objasnění fyziologické úlohy interakce mezi DVL3 a PRC1 *in vivo*.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vymežit interakční rozhraní mezi nově identifikovanými interakčními partnery PRC1 a DVL3 s využitím přirozeně se vyskytujících forem PRC1 a DVL3 a jejich zkrácených variant ve fúzi s fluorescenčními proteiny pomocí TIRF mikroskopie.

K tomuto účelu byly připraveny expresní plazmidy pro různé zkrácené varianty PRC1 ve fúzi s fluorescenčním proteinem mRuby. Dále byly připraveny expresní vektory pro jednotlivé izoformy DVL ve fúzi s fluorescenčním proteinem GFP.

Všechny připravené konstrukty GFP-DVL a mRuby-PRC1 byly úspěšně exprimovány a purifikovány.

Pro vymezení interakčního rozhraní byl TIRF mikroskopickým experimentům podroben PRC1 společně se sedmi zkrácenými variantami, a také všechny tři izoformy DVL společně se třemi zkrácenými variantami. Podařilo se prokázat interakci PRC1 se všemi třemi izoformami DVL. Dále bylo zjištěno, že pro interakci mezi PRC1 a DVL3 je klíčová N-terminální část PRC1 složená z dimerizační a rod domény. Předběžná data z TIRF mikroskopie také naznačují, že se na interakci s PRC1 pravděpodobně podílí DEP doména DVL3.

7 Přehled použité literatury

- Acebron, S. P. *et al.* (2014) 'Mitotic Wnt Signaling Promotes Protein Stabilization and Regulates Cell Size', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.014.
- Akhmanova, A. *et al.* (2001) 'CLASPs are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00288-4.
- Amano, M. *et al.* (1996) 'Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.271.34.20246.
- Angers, S. *et al.* (2006) 'The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt- β -catenin pathway by targeting dishevelled for degradation', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1381.
- Axelrod, J. D. *et al.* (1996) 'Interaction between wingless and notch signaling pathways mediated by dishevelled', *Science*. doi: 10.1126/science.271.5257.1826.
- Bahe, S. *et al.* (2005) 'Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200504107.
- Bahmanyar, S. *et al.* (2008) ' β -catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.1596308.
- Ban, R. *et al.* (2004) 'Human Mitotic Spindle-associated Protein PRC1 Inhibits MgcRacGAP Activity toward Cdc42 during the Metaphase', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M313257200.
- Barrera, J. A. *et al.* (2010) 'CDK5RAP2 regulates centriole engagement and cohesion in mice', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.017.
- Bastos, R. N. *et al.* (2013) 'Aurora B suppresses microtubule dynamics and limits central spindle size by locally activating KIF4A', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201301094.
- Bastos, R. N. and Barr, F. A. (2010) 'Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201008108.
- Bernatik, O. *et al.* (2011) 'Sequential activation and inactivation of dishevelled in the Wnt/ β -catenin pathway by casein kinases', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M110.169870.
- Bernatik, O. *et al.* (2014) 'Functional analysis of dishevelled-3 phosphorylation identifies distinct mechanisms driven by casein kinase 1 ϵ and Frizzled5', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M114.590638.
- Bouchoux, C. and Uhlmann, F. (2011) 'A quantitative model for ordered Cdk substrate dephosphorylation during mitotic exit', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.047.
- Boutros, M. and Mlodzik, M. (1999) 'Dishevelled: At the crossroads of divergent intracellular signaling pathways', *Mechanisms of Development*. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00046-5.
- Bryja, V. *et al.* (2007) ' β -arrestin is a necessary component of Wnt/ β -catenin signaling in vitro and in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0611356104.

- Bu, H. *et al.* (2020) 'Overexpression of PRC1 indicates a poor prognosis in ovarian cancer', *International Journal of Oncology*. doi: 10.3892/ijo.2020.4959.
- Burkard, M. E. *et al.* (2009) 'Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells', *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.1000111.
- Carter, S. L. *et al.* (2006) 'A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng1861.
- Cervenka, I. *et al.* (2016) 'Dishevelled is a NEK2 kinase substrate controlling dynamics of centrosomal linker proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1608783113.
- Chang-Jie, J. and Sonobe, S. (1993) 'Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein', *Journal of Cell Science*.
- Chen, J. *et al.* (2016) 'The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signalling pathway', *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310625.
- Ciani, L. *et al.* (2004) 'A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: Dishevelled signals locally to stabilize microtubules', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200309096.
- Ciani, L. and Salinas, P. C. (2007) 'c-Jun N-terminal kinase (JNK) cooperates with Gsk3 β to regulate Dishevelled-mediated microtubule stability', *BMC Cell Biology*. doi: 10.1186/1471-2121-8-27.
- Clevers, H. (2006) 'Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.018.
- Cong, F., Schweizer, L. and Varmus, H. (2004) 'Casein Kinase I ϵ Modulates the Signaling Specificities of Dishevelled', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.24.5.2000-2011.2004.
- Cundell, M. J. *et al.* (2013) 'The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) Pathway Ensures Cytokinesis follows Chromosome Separation', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.005.
- Daub, H. *et al.* (2001) 'Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.C000635200.
- Davidson, G. *et al.* (2009) 'Cell Cycle Control of Wnt Receptor Activation', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2009.11.006.
- Djinovic-Carugo, K. *et al.* (2002) 'The spectrin repeat: A structural platform for cytoskeletal protein assemblies', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03304-X.
- Dominguez-Sola, D. *et al.* (2007) 'Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc', *Nature*. doi: 10.1038/nature05953.
- Etheridge, S. L. *et al.* (2008) 'Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development', *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1000259.
- Ewen, M. E. *et al.* (1993) 'Functional interactions of the retinoblastoma protein with

- mammalian D-type cyclins', *Cell*. doi: 10.1016/0092-8674(93)90136-E.
- Fahmy, O. G. and Fahmy, M. J. (1959) 'Complementation among the sub-genic mutants in the r-locus of *Drosophila melanogaster*', *Nature*. doi: 10.1038/1841927a0.
- Fiedler, M. *et al.* (2011) 'Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating β -catenin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1017063108.
- Frank, S. R. *et al.* (2003) 'MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin', *EMBO Reports*. doi: 10.1038/sj.embor.embor861.
- Fry, A. M. *et al.* (1998) 'C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.141.7.1563.
- Fujii, N. *et al.* (2007) 'An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses β -catenin-dependent tumor cell growth', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2726.
- Gammons, M. V. *et al.* (2016) 'Wnt Signalosome Assembly by DEP Domain Swapping of Dishevelled', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.026.
- Gan, X. Q. *et al.* (2008) 'Nuclear Dvl, c-Jun, β -catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of β -catenin-TCF interaction', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200710050.
- Glotzer, M. (2009) 'The 3Ms of central spindle assembly: Microtubules, motors and MAPs', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2609.
- Gloy, J., Hikasa, H. and Sokol, S. Y. (2002) 'Frodo interacts with dishevelled to transduce Wnt signals', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb784.
- Goold, R. G., Owen, R. and Gordon-Weeks, P. R. (1999) 'Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones', *Journal of Cell Science*.
- Greer, Y. E. and Rubin, J. S. (2011) 'Casein kinase 1 delta functions at the centrosome to mediate Wnt-3a-dependent neurite outgrowth', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201011111.
- Gruneberg, U. *et al.* (2006) 'KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200511061.
- Guo, N., Hawkins, C. and Nathans, J. (2004) 'Frizzled6 controls hair patterning in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0402802101.
- Habas, R., Dawid, I. B. and He, X. (2003) 'Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.1022203.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X. (2001) 'Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00614-6.
- Hadjihannas, M. V., Brückner, M. and Behrens, J. (2010) 'Conductin/axin2 and Wnt signalling regulates centrosome cohesion', *EMBO Reports*. doi: 10.1038/embor.2010.23.

- He, T. C. *et al.* (1998) 'Identification of c-MYC as a target of the APC pathway', *Science*. doi: 10.1126/science.281.5382.1509.
- Heisenberg, C. P. *et al.* (2000) 'Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation', *Nature*. doi: 10.1038/35011068.
- Hino, S. *et al.* (2001) 'Inhibition of the Wnt Signaling Pathway by Idax, a Novel Dvl-Binding Protein', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.21.1.330-342.2001.
- Hu, C. K. *et al.* (2012) 'Plk1 negatively regulates PRC1 to prevent premature midzone formation before cytokinesis', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E12-01-0058.
- Huang, X. D. *et al.* (2013) 'Phosphorylation of dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling', *Science*. doi: 10.1126/science.1232253.
- Hyman, A. A. (1991) 'Preparation of marked microtubules for the assay of the polarity of microtubule-based motors by fluorescence', in *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.1991.supplement_14.25.
- Ikeda, S. *et al.* (1998) 'Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin', *EMBO Journal*. doi: 10.1093/emboj/17.5.1371.
- Itoh, K. *et al.* (2005) 'Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/ β -catenin signaling', *Journal of Biology*. doi: 10.1186/jbiol20.
- Jenny, A. *et al.* (2005) 'Diego and Prickle regulate frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1271.
- Jiang, W. *et al.* (1998) 'PRC1: A human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80302-0.
- Jiang, X. *et al.* (2015) 'Dishevelled promotes wnt receptor degradation through recruitment of znrf3/rnf43 e3ubiquitin ligases', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.015.
- Jung, H. *et al.* (2009) 'Negative feedback regulation of Wnt signaling by G β γ -mediated reduction of Dishevelled', *Experimental and Molecular Medicine*. doi: 10.3858/emm.2009.41.10.076.
- Kajtez, J. *et al.* (2016) 'Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms10298.
- Kanehira, M. *et al.* (2007) 'Oncogenic role of MPHOSPH1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3748.
- Kaplan, D. D. *et al.* (2004) 'Identification of a Role for β -Catenin in the Establishment of a Bipolar Mitotic Spindle', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.C400035200.
- Kellogg, E. H. *et al.* (2016) 'Near-atomic cryo-EM structure of PRC1 bound to the microtubule', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1609903113.
- Kikuchi, K. *et al.* (2010) 'Dishevelled, a Wnt signalling component, is involved in mitotic progression in cooperation with Plk1', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2010.221.
- Kim, S. M. *et al.* (2009) 'Axin localizes to mitotic spindles and centrosomes in mitotic

- cells', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.01.013.
- Kishida, S. *et al.* (1998) 'Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of β -catenin', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.273.18.10823.
- Kita, K. *et al.* (2006) 'Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E05-06-0498.
- Klaus, A. and Birchmeier, W. (2008) 'Wnt signalling and its impact on development and cancer', *Nature Reviews Cancer*. doi: 10.1038/nrc2389.
- Klein, T. J. and Mlodzik, M. (2005) 'PLANAR CELL POLARIZATION: An Emerging Model Points in the Right Direction', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.132806.
- Klimowski, L. K. *et al.* (2006) 'Site-specific casein kinase 1 ϵ -dependent phosphorylation of Dishevelled modulates β -catenin signaling', *FEBS Journal*. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05462.x.
- Klingensmith, J. *et al.* (1996) 'Conservation of dishevelled structure and function between flies and mice: Isolation and characterization of Dvl2', *Mechanisms of Development*. doi: 10.1016/S0925-4773(96)00549-7.
- Krylova, O., Messenger, M. J. and Salinas, P. C. (2000) 'Dishevelled-1 regulates microtubule stability: A new function mediated by glycogen synthase kinase-3 β ', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.151.1.83.
- Kurasawa, Y. *et al.* (2004) 'Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/sj.emboj.7600347.
- Lee, A. J. X. *et al.* (2011) 'Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3604.
- Lee, I. *et al.* (2017) 'Crystal structure of the PDZ domain of mouse Dishevelled 1 and its interaction with CXXC5', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.023.
- Lee, K. Y. *et al.* (2015) 'Direct interaction between centralspindlin and PRC1 reinforces mechanical resilience of the central spindle', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms8290.
- Lee, S. H. *et al.* (2015) 'The Dishevelled-binding protein CXXC5 negatively regulates cutaneous wound healing', *Journal of Experimental Medicine*. doi: 10.1084/jem.20141601.
- Li, C., Lin, M. and Liu, J. (2004) 'Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis', *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1208114.
- Li, J. *et al.* (2018) 'PRC1: Linking Cytokinesis, Chromosomal Instability, and Cancer Evolution', *Trends in Cancer*. doi: 10.1016/j.trecan.2017.11.002.
- Liao, Y. J. *et al.* (2019) 'PRC1 gene silencing inhibits proliferation, invasion, and angiogenesis of retinoblastoma cells through the inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway', *Journal of Cellular Biochemistry*. doi: 10.1002/jcb.28942.

- Liu, J. *et al.* (2009) 'PRC1 cooperates with CLASP1 to organize central spindle plasticity in mitosis', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M109.009670.
- Lu, W. *et al.* (2004) 'Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.019.
- Luo, H. W. *et al.* (2016) 'Protein regulator of cytokinesis 1 overexpression predicts biochemical recurrence in men with prostate cancer', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. doi: 10.1016/j.biopha.2016.01.004.
- Maley, C. C. *et al.* (2006) 'Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng1768.
- Mardin, B. R. *et al.* (2010) 'Components of the Hippo pathway cooperate with Nek2 kinase to regulate centrosome disjunction', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2120.
- Matsumoto, S. *et al.* (2010) 'Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2010.26.
- Mimori-Kiyosue, Y. *et al.* (2005) 'CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200405094.
- Mishima, M. and Lee, K. Y. (2015) 'Central spindle robustness by PRC1-centralspindlin interaction', *Cell Cycle*. doi: 10.1080/15384101.2015.1093447.
- Moeller, H. *et al.* (2006) 'Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0603808103.
- Mollinari, C. *et al.* (2002) 'PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200111052.
- Mollinari, C. *et al.* (2005) 'Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E04-04-0346.
- Montcouquiol, M. *et al.* (2003) 'Identification of Vangl2 and Scrib1 as planar polarity genes in mammals', *Nature*. doi: 10.1038/nature01618.
- Nakamura, T. *et al.* (2004) 'Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection', *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1207392.
- Neef, R. *et al.* (2007) 'Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1557.
- Ohashi, A., Ohori, M. and Iwai, K. (2016) 'Motor activity of centromere-associated protein-E contributes to its localization at the center of the midbody to regulate cytokinetic abscission', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.13206.
- Olmeda, D. *et al.* (2003) ' β -catenin regulation during the cell cycle: Implications in G2/M and apoptosis', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E03-01-0865.
- Pan, W. J. *et al.* (2004) 'Characterization of function of three domains in dishevelled-1:

- DEP domain is responsible for membrane translocation of dishevelled-1', *Cell Research*. doi: 10.1038/sj.cr.7290232.
- Pellman, D. (1995) 'Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae* [published erratum appears in *J Cell Biol* 1995 Oct;131(2):561]', *The Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.130.6.1373.
- Penton, A., Wodarz, A. and Nusse, R. (2002) 'A mutational analysis of dishevelled in *Drosophila* defines novel domains in the dishevelled protein as well as novel suppressing alleles of axin', *Genetics*.
- Perrimon, N. and Mahowald, A. P. (1987) 'Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*', *Developmental Biology*. doi: 10.1016/0012-1606(87)90061-3.
- Petronczki, M. *et al.* (2007) 'Polo-like Kinase 1 Triggers the Initiation of Cytokinesis in Human Cells by Promoting Recruitment of the RhoGEF Ect2 to the Central Spindle', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.013.
- Pizzuti, A. *et al.* (1996) 'cDNA characterization and chromosomal mapping of two human homologues of the *Drosophila* dishevelled polarity gene', *Human Molecular Genetics*. doi: 10.1093/hmg/5.7.953.
- Polak, B. *et al.* (2017) 'PRC 1-labeled microtubule bundles and kinetochore pairs show one-to-one association in metaphase', *EMBO reports*. doi: 10.15252/embr.201642650.
- Potapova, T. A., Zhu, J. and Li, R. (2013) 'Aneuploidy and chromosomal instability: A vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos', *Cancer and Metastasis Reviews*. doi: 10.1007/s10555-013-9436-6.
- Raj, L. *et al.* (2011) 'Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS', *Nature*. doi: 10.1038/nature10167.
- Rosso, S. B. *et al.* (2005) 'Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development', *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn1374.
- Rousset, R. *et al.* (2001) 'Naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.869201.
- Rueden, C. T. *et al.* (2017) 'ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data', *BMC Bioinformatics*. doi: 10.1186/s12859-017-1934-z.
- Ryan, B. J. and Henahan, G. T. (2013) 'Overview of approaches to preventing and avoiding proteolysis during expression and purification of proteins', *Current Protocols in Protein Science*. doi: 10.1002/0471140864.ps0525s71.
- Schindelin, J. *et al.* (2012) 'Fiji: An open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schwarz-Romond, T. *et al.* (2007) 'The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization', *Nature Structural and Molecular Biology*. doi: 10.1038/nsmb1247.
- Semënov, M. V. and Snyder, M. (1997) 'Human Dishevelled genes constitute a DHR-containing multigene family', *Genomics*. doi: 10.1006/geno.1997.4713.
- Sharma, M. *et al.* (2019) 'Acetylation of conserved DVL-1 lysines regulates its nuclear translocation and binding to gene promoters in triple-negative breast cancer', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-019-52723-3.
- Sheldahl, L. C. *et al.* (2003) 'Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in

- vertebrate embryos', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200211094.
- Shimo, A. *et al.* (2007) 'Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells', *Cancer Science*. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00381.x.
- Sokol, S. Y. (1996) 'Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development', *Current Biology*. doi: 10.1016/S0960-9822(96)00750-6.
- Straight, A. F. *et al.* (2003) 'Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor', *Science*. doi: 10.1126/science.1081412.
- Subramanian, R. *et al.* (2010) 'Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.012.
- Subramanian, R. *et al.* (2013) 'Marking and Measuring Single Microtubules by PRC1 and Kinesin-4', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.051.
- Sun, T. Q. *et al.* (2001) 'PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/35083016.
- Suresh, P., Long, A. F. and Dumont, S. (2020) 'Microneedle manipulation of the mammalian spindle reveals specialized, short-lived reinforcement near chromosomes', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.53807.
- Sussman, D. J. *et al.* (1994) 'Isolation and characterization of a mouse homolog of the drosophila segment polarity gene dishevelled', *Developmental Biology*. doi: 10.1006/dbio.1994.1297.
- Tang, H. *et al.* (2019) 'MicroRNA-194 inhibits cell invasion and migration in hepatocellular carcinoma through PRC1-mediated inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway', *Digestive and Liver Disease*. doi: 10.1016/j.dld.2019.02.012.
- Tauriello, D. V. F. *et al.* (2012) 'Wnt/ β -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1114802109.
- Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) ' β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells', *Nature*. doi: 10.1038/18884.
- Theisen, H. *et al.* (1994) 'Dishevelled is required during wingless signaling to establish both cell polarity and cell identity', *Development*.
- Torban, E. *et al.* (2004) 'Independent mutations in mouse Vangl2 that cause neural tube defects in Looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M408675200.
- Toyoshima, F. and Nishida, E. (2007) 'Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/sj.emboj.7601599.
- Tsang, M. *et al.* (1996) 'Isolation and characterization of mouse Dishevelled-3', *Developmental Dynamics*. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199611)207:3<253::AID-AJA2>3.0.CO;2-G.
- Tsou, M. F. B. and Stearns, T. (2006) 'Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle', *Nature*. doi: 10.1038/nature04985.

- Ugras, S. *et al.* (2011) 'Small RNA sequencing and functional characterization reveals microRNA-143 tumor suppressor activity in liposarcoma', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0890.
- Ustinova, K. *et al.* (2020) 'The disordered N-terminus of HDAC6 is a microtubulebinding domain critical for efficient tubulin deacetylation', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.RA119.011243.
- Velázquez, D. M., Castañeda-Patlán, M. C. and Robles-Flores, M. (2017) 'Dishevelled stability is positively regulated by PKC ζ -mediated phosphorylation induced by Wnt agonists', *Cellular Signalling*. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.03.023.
- Ventura, A. and Jacks, T. (2009) 'MicroRNAs and Cancer: Short RNAs Go a Long Way', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.005.
- Verbrugghe, K. J. C. and White, J. G. (2004) 'SPD-1 is required for the formation of the spindle midzone but is not essential for the completion of cytokinesis in *C. elegans* embryos', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2004.09.055.
- Verni, F. *et al.* (2004) 'Feo, the *Drosophila* homolog of PRC1, is required for central-spindle formation and cytokinesis', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2004.08.054.
- Wakefield, J. G., Stephens, D. J. and Tavaré, J. M. (2003) 'A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.00273.
- Wallingford, J. B. and Habas, R. (2005) 'The developmental biology of Dishevelled: An enigmatic protein governing cell fate and cell polarity', *Development*. doi: 10.1242/dev.02068.
- Wang, W. *et al.* (2015) 'FOXKs promote Wnt/ β -catenin signaling by translocating DVL into the nucleus', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.031.
- Wharton, K. A. *et al.* (2001) 'Vertebrate proteins related to *Drosophila* naked cuticle bind dishevelled and antagonize Wnt signaling', *Developmental Biology*. doi: 10.1006/dbio.2001.0238.
- Willert, K. *et al.* (1997) 'Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled', *EMBO Journal*. doi: 10.1093/emboj/16.11.3089.
- Witte, F. *et al.* (2010) 'Negative regulation of Wnt signaling mediated by CK1-phosphorylated Dishevelled via Ror2', *The FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.09-150615.
- Wolter, P. *et al.* (2017) 'Central spindle proteins and mitotic kinesins are direct transcriptional targets of MuvB, B-MYB and FOXM1 in breast cancer cell lines and are potential targets for therapy', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.14466.
- Wong, H. C. *et al.* (2003) 'Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00427-1.
- Wong, L. L. and Adler, P. N. (1993) 'Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.123.1.209.
- Wood, K. W. *et al.* (1997) 'CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80419-5.
- Wu, C. *et al.* (2012) 'Delicate analysis of post-translational modifications on dishevelled

3', *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/pr300314d.

Wu, F. *et al.* (2018) 'Regulation of proliferation and cell cycle by protein regulator of cytokinesis 1 in oral squamous cell carcinoma', *Cell Death and Disease*. doi: 10.1038/s41419-018-0618-6.

Yamanishi, K. *et al.* (2019) 'High-resolution structure of a y27w mutant of the dishevelled2 dix domain', *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. doi: 10.1107/S2053230X18018290.

Yamashiro, S. *et al.* (2003) 'Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E02-07-0427.

Zeng, X. *et al.* (2008) 'Initiation of Wnt signaling: Control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions', *Development*. doi: 10.1242/dev.013540.

Zhan, P. *et al.* (2017) 'PRC1 contributes to tumorigenesis of lung adenocarcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signaling pathway', *Molecular Cancer*. doi: 10.1186/s12943-017-0682-z.

Zhang, B. *et al.* (2017) 'Elevated PRC1 in gastric carcinoma exerts oncogenic function and is targeted by piperlongumine in a p53-dependent manner', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. doi: 10.1111/jcmm.13063.

Zhang, L. *et al.* (2006) 'Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M600274200.

Zhang, Y. *et al.* (2009) 'Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides', *Nature Chemical Biology*. doi: 10.1038/nchembio.152.

Zhou, C. J. *et al.* (2020) 'Protein Regulator of Cytokinesis 1 (PRC1) Regulates Chromosome Dynamics and Cytoplasmic Division During Mouse Oocyte Meiotic Maturation and Early Embryonic Development', *The FEBS journal*. doi: 10.1111/febs.15458.

Zhu, C. *et al.* (2006) 'Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0506926103.

Zhu, C. and Jiang, W. (2005) 'Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0408438102.