

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Bc. Klára Pospíšilová

Interakční partneři proteinu eIF4E2 v lidských buňkách
Interacting partners of protein eIF4E2 in human cells

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a 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

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli, RNDr. Martinu Pospíškovi, Ph.D, za možnost vypracovat diplomovou práci v jeho laboratoři a za cenné rady, ochotu a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala všem ostatním členům laboratoře biochemie RNA, zejména pak RNDr. Tomáši Maškovi, Ph.D., za pomoc s experimenty a přínosné konzultace.

Abstrakt

Protein eIF4E2 patří do rodiny eukaryotních translačních iniciačních faktorů 4E, za běžných okolností se ale iniciace translace neúčastní. Jeho hlavní úloha spočívá v represi translace specifických mRNA. Přesto se v podmínkách hypoxie eIF4E2 účastní iniciace translace jako podjednotka specifického translačního iniciačního komplexu. Přesný mechanismus působení eIF4E2 ani v jednom z procesů není znám. Jedním ze způsobů, jak roli eIF4E2 v buňce prostudovat, je zjistit, s jakými dalšími proteiny eIF4E2 interaguje. Cílem práce bylo vyhledat pomocí imunoprecipitace následované hmotnostní spektrometrií potenciální interakční partnery eIF4E2 v buňkách linie HEK293. Kromě individuálních proteinů bylo cílem také identifikovat proteinové komplexy, jejichž součástí je v buňkách linie HEK293 faktor eIF4E2. Druhým směrem práce byla příprava systému pro hledání inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3. Hlavním výsledkem práce je nalezení potenciálních nových interakčních partnerů eIF4E2 v lidských buňkách.

Klíčová slova: eIF4E2, interakce, proteinové komplexy, chromatografie, eIF4G

Abstract

Protein eIF4E2 belongs to the family of eukaryotic translation initiation factors 4E, but it does not participate in translation initiation under normal circumstances. Its main role lies in translational repression of specific mRNAs. Nevertheless eIF4E2 takes part in translation initiation as a subunit of a specific translation initiation complex in hypoxic conditions. The exact mechanism in which eIF4E2 takes part in either of these processes is not known. One way to study the role of eIF4E2 in the cell is to find out what other proteins does eIF4E2 interact with. The goal of this work was to seek out potential eIF4E2-interacting partners in the HEK293 cell line using immunoprecipitation followed by mass spectrometry. Apart from finding individual proteins the goal was to identify eIF4E2-containing protein complexes in HEK293 cells. A second line of work was preparation of a system for screening inhibitors of the interaction between eIF4E2 and eIF4G3. The main result is finding potential new eIF4E2-interacting partners in human cells.

Keywords: eIF4E2, interaction, protein complexes, chromatography, eIF4G

Obsah

Abecední seznam zkratk	VII
1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Přehled literatury	3
3.1 Iniciace translace u eukaryot	3
3.2 Protein eIF4E2	4
3.2.1 Struktura proteinu eIF4E2	5
3.2.2 Lokalizace eIF4E2 v buňce	6
3.3 Vazba eIF4E2 na 7-methylguanoinovou čepičku mRNA	6
3.3.1 Struktura vazebního místa pro čepičku s navázaným m ⁷ GTP	7
3.3.2 Změna afinity eIF4E2 k čepičce interakcí s ARIH1	7
3.4 Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny 4E-BP	8
3.5 Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G	9
3.6 Represní komplexy obsahující d4EHP u <i>Drosophila melanogaster</i>	9
3.7 Represní komplexy obsahující eIF4E2 u <i>Mus musculus</i>	10
3.8 Represní komplexy obsahující eIF4E2 v lidských buňkách	11
3.8.1 Interakční partneři eIF4E2 v represních komplexech v lidských buňkách	11
3.8.2 Mechanismus translační represe zprostředkované eIF4E2	13
3.9 Translační iniciační komplexy obsahující eIF4E2	14
3.9.1 Hypoxický eIF4F	14
3.9.2 Translační iniciační komplex threonyl-tRNA syntetázy	16
3.10 Další role eIF4E2	18
3.10.1 Regulace produkce ekdyzonu u <i>Drosophila melanogaster</i>	18
4 Materiál a metody	19
4.1 Materiál	19
4.1.1 Experimentální model	19
4.1.2 Kmeny <i>Escherichia coli</i> používané pro produkci plazmidů	19
4.1.3 Primery pro PCR	19
4.1.4 Protilátky používané v metodě western blot	20
4.2 Metody	20
4.2.1 Kultivace buněčných linií	20
4.2.2 Elektroforéza	20
4.2.3 PCR	21
4.2.4 Elektroporace	22
4.2.5 „Minipreparace“ – izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i>	22
4.2.6 „Midipreparace“ – izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i>	22
4.2.7 Izolace DNA z agarózového gelu	23
4.2.8 Western blot	23
4.2.9 GFP-Trap	23
4.2.10 Příprava buněčných lyzátů	24
4.2.11 Chromatografie na aniontoměniči – pilotní experiment	25
4.2.12 Chromatografie na kationtoměniči – pilotní experiment	25
4.2.13 Chromatografie hydrofobních interakcí – pilotní experiment	25

4.2.14	Střednětlaká proteinová chromatografie na aniontoměniči	26
4.2.15	Střednětlaká proteinová chromatografie na kationtoměniči	26
4.2.16	Střednětlaká gelová permeační chromatografie	27
4.2.17	Odsolování proteinů srážením s TCA	27
4.2.18	Sekvenace	27
4.2.19	Analýza výsledků hmotnostní spektrometrie	27
5	Výsledky	29
5.1	Hledání nových interakčních partnerů eIF4E2	29
5.1.1	Chromatografie na aniontoměniči – pilotní experiment	29
5.1.2	Chromatografie na kationtoměniči – pilotní experiment	30
5.1.3	Chromatografie hydrofobních interakcí – pilotní experiment	32
5.1.4	Střednětlaká proteinová chromatografie na aniontoměniči	35
5.1.5	Střednětlaká proteinová chromatografie na kationtoměniči	38
5.1.6	Střednětlaká gelová permeační chromatografie	40
5.1.7	GFP-Trap s neseparovaným buněčným lyzátem	44
5.1.8	Hmotnostní spektrometrie	44
5.2	Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G	50
5.3	Ověření funkčnosti GFP-Trap systému produkovaného v laboratoři	52
5.4	Příprava systému pro screening inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3	53
5.4.1	Izolace plazmidů eIF4G1-NRL a NRL-empty	54
5.4.2	Izolace plazmidů CRL-empty a CRL-eIF4E1	62
5.4.3	Klonování eIF4G3	69
6	Diskuze	75
6.1	Hledání nových interakčních partnerů eIF4E2	75
6.1.1	Chromatografie	75
6.2	Analýza výsledků hmotnostní spektrometrie	76
6.2.1	Interakční partneři eIF4E2 v neseparovaném vzorku	76
6.2.2	Proteinové komplexy nalezené v neseparovaném lyzátu	78
6.3	Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G	80
6.4	Ověření funkčnosti GFP-Trap systému produkovaného v laboratoři	81
6.5	Příprava systému pro screening inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3	82
6.5.1	Izolace plazmidů	82
6.5.2	Klonování eIF4G3	82
7	Souhrn	84
8	Přílohy	85
	Seznam použité literatury	86

Abecední seznam zkratk

UTR	nepřekládaná oblast
4E-BP1	eIF4E1-vazebný protein 1
4E-BP2	eIF4E1-vazebný protein 2
4E-BP3	eIF4E1-vazebný protein 3
4E-T	transportér eukaryotního translačního iniciačního faktoru 4E1
4EHP	protein homologní k eIF4E1
4ELP	protein podobný eIF4E1
4G3_fr4	fragment genu pro eIF4G3
ANG	angiogenin
ARE	element bohatý na adenylát a uridylát
ARIH1 (HHARI)	E3 ubikvitin protein ligáza 1 Ariadne RBR
Brat	protein mozkového tumoru
BTAf1	faktor 172 asociovaný s TATA-vazebným proteinem
CCR4-NOT	represe uhlikových katabolitů – negativní na TATA postrádajících
CDH-22	kadherin 22
CIA	cytozolické skládání železosírných center
CNOT1	podjednotka 1 transkripčního komplexu CCR4-NOT
CRL	C-koncová doména luciferázy <i>Renilla reniformis</i>
CRL-eIF4E1	plazmid obsahující gen pro eIF4E1 fúzovaný s C-koncovou doménu Rluc
CRL-empty	plazmid obsahující gen pro C-koncovou doménu Rluc
CRL-p65	plazmid obsahující gen pro p65 fúzovaný s C-koncovou doménu Rluc
Crm1	exportin 1
d4EHP	ortholog 4EHP v <i>Drosophila melanogaster</i>
data_All_18	data z hmotností spektrometrie, ve kterých bylo NaN nahrazeno 18 a byly ponechány všechny varianty proteinů
data_All_NaN	data z hmotností spektrometrie, ve kterých nebylo nahrazeno NaN a byly ponechány všechny varianty proteinů
data_One_18	data z hmotností spektrometrie, ve kterých bylo NaN nahrazeno 18 a u nejednoznačných identifikací byl ponechán jen jeden zástupce proteinu
data_One_NaN	data z hmotností spektrometrie, ve kterých nebylo NaN nahrazeno a u nejednoznačných identifikací byl ponechán jen jeden zástupce proteinu
DDX28	DEAD-box helikáza 28
DDX6	DEAD-box helikáza 6
Dusp6	fosfatáza s duální specifitou 6
EGFR	receptor pro epiteliální růstový faktor
eIF	eukaryotní translační iniciační faktor
eIF1	eukaryotní translační iniciační faktor 1
eIF1A	eukaryotní translační iniciační faktor 1A
eIF2	eukaryotní translační iniciační faktor 2
eIF3	eukaryotní translační iniciační faktor 3
eIF4A	eukaryotní translační iniciační faktor 4A
eIF4E1	eukaryotní translační iniciační faktor 4E1
eIF4E1-CRL	plazmid obsahující gen pro eIF4E1 fúzovaný s C-koncovou doménu Rluc
eIF4E2	eukaryotní translační iniciační faktor 4E2
eIF4E-8	eukaryotní translační iniciační faktor 4E-8
EIF4EL3	protein 3 podobný eIF4E
eIF4F	eukaryotní translační iniciační faktor 4F
eIF4F ^H	hypoxický komplex eIF4F

eIF4G1	eukaryotní translační iniciační faktor 4G1
eIF4G1-NRL	plazmid obsahující fragment genu pro eIF4G1 fúzovaný s N-koncovou doménou Rluc
eIF4G3	eukaryotní translační iniciační faktor 4G3
eIF5	eukaryotní translační iniciační faktor 5
eIF5B	eukaryotní translační iniciační faktor 5B
FLUC	plazmid obsahující gen pro světluškovou luciferázu
GFP	zelený fluorescenční protein
GFP-eIF4E2	fúzní protein eIF4E2 s GFP
GIGYF1	GYF protein 1 interagující s Grb10
GIGYF2	GYF protein 2 interagující s Grb10
HAF	buněčná linie odvozená od HEK293 produkující GFP-eIF4E2
HHARI (ARIH1)	lidský homolog octomilčího ariadne
HIF-2 α	hypoxií indukovatelný faktor 2 α
HOPS	homotypická fúze a třídění proteinů
Hoxb4	homeobox B4
CHCHD4	protein 4 obsahující doménu coiled-coil-helix-coiled-coil-helix
IFE-4	eukaryotní translační iniciační faktor 4E-4
IGF1R	receptor pro insulinu podobný růstový faktor 1
IMP1	proteáza mitochondriální vnitřní membrány 1
ISG15	interferonem stimulovaný gen 15
KNTC1	protein 1 asociovaný s kinetochorem
MMXD	MMS19-MIP18-XPB
Mnk1	Ser/Thr protein kináza 1 interagující s MAP kinázou
Mnk2	Ser/Thr protein kináza 2 interagující s MAP kinázou
mTOR	savčí cíl rapamycinu
mTORC1	komplex 1 kinázy mTOR
nCBP	nový protein vázající čepičku
NRL	N-koncová doména luciferázy <i>Renilla reniformis</i>
NRL-eIF4G1	plazmid obsahující fragment genu pro eIF4G1 fúzovaný s N-koncovou doménou Rluc
NRL-empty	plazmid obsahující N-koncovou doménu Rluc
Nup205	nukleoporin 205
PABP	poly(A) vazebný protein
PATL-1	homolog 1 proteinu PAT1
PDCD4	protein 4 programované buněčné smrti
PDGFRA	receptor pro růstový faktor odvozený od destiček α
PNMA2	paraneoplastický antigen Ma2
Prep1	homeobox protein PKNOX1
PTEN	Fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát 3-fosfatáza a protein fosfatáza s duální specifitou
RBM4	RNA-vazebný protein 4
rHRE	element odpovědi na hypoxii na RNA
RING1	velmi zajímavý nový gen 1
RISC	umlčovací komplex indukovaný RNA
Rluc	luciferáza <i>Renilla reniformis</i>
RSV	virus Rousova sarkomu
S6K1	kináza 1 ribozomálního proteinu S6
SKI	„superkiller“
TCA	kyselina trichloroctová

TELO2	protein 2 údržby telomer
TFIIIC-epsilon	podjednotka epsilon obecného transkripčního faktoru IIIC
ThrRS	threonyl-tRNA syntetáza
TNF- α	faktor nekrotizující tumory α
TNRC6A	trinukleotidové repetice obsahující 6A
TNRC6B	trinukleotidové repetice obsahující 6B
TRAFD1	protein 1 obsahující doménu zinkového prstu typu TRAF
TRIM27	protein 27 obsahující tripartitní motiv
TTP	tristetraprolin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
ZNF598	protein 598 se zinkovým prstem

Nejsou uvedeny zkratky používané pouze v legendách k obrázkům. Tyto zkratky jsou vysvětlené v legendách k obrázkům.

1 Úvod

Eukaryotní translační iniciační faktor 4E2 (eIF4E2) se navzdory názvu za běžných okolností iniciace translace neúčastní. Přesto má v buňce nezastupitelnou roli. Absence nebo chybná regulace eIF4E2 vede v *Drosophila melanogaster* a *Mus musculus* k fatálním defektům v ontogenezi a v lidských buňkách je spojena s výskytem revmatoidní artritidy a s metastatickým potenciálem rakovinných buněk. I z těchto důvodů je v posledních letech protein eIF4E2 rozsáhle studován.

Ve srovnání s eIF4E1, kanonickým translačním iniciačním faktorem, je afinita eIF4E2 k čepičce na 5' konci mRNA výrazně nižší. Proto se dlouho předpokládalo, že eIF4E2 funguje pouze jako kompetitivní inhibitor eIF4E1. Později se začaly objevovat důkazy o tom, že je eIF4E2 součástí komplexního procesu translační represe. Kromě toho se ukázalo, že se eIF4E2 též účastní iniciace translace v podmínkách snížené dostupnosti kyslíku. Protein eIF4E2 je tak v buňce součástí dvou zcela protichůdných procesů.

Klíčem k osvětlení jeho role v buňce je nalezení a prozkoumání jeho interakcí s dalšími proteiny a proteinovými komplexy. V minulosti byla většina prací v tomto směru založená na imunoprecipitaci eIF4E2 z celkových buněčných lyzátů. Řada takto nalezených interakčních partnerů se ale může vyskytovat v odlišných proteinových komplexech, ve kterých se účastní rozdílných buněčných procesů. Z těchto důvodů věříme, že je přínosné hledat interakční partnery eIF4E2 a proteinové komplexy, kterých je eIF4E2 součástí, po předchozí částečné separaci buněčného lyzátu.

Skutečnost, že je v buňkách translace v hypoxii iniciována odlišným mechanismem než v normoxii, potenciálně umožňuje inhibovat pouze hypoxický typ translace. To by mohlo mít přímé využití při studiu a léčbě nádorů. Specificita zacílení na hypoxický translační iniciační komplex lze zajistit směrováním inhibitorů na interakci eIF4E2 a eIF4G3, tedy proteiny, které se v kanonickém translačním iniciačním komplexu nevyskytují.

2 Cíle práce

- Provést pilotní experimenty pro separaci proteinových komplexů obsahujících eIF4E2 z lidských buněk a pokusit se separované komplexy identifikovat
- Otestovat schopnost eIF4E2 interagovat s proteiny rodiny eIF4G
- Pokusit se připravit systém pro vyhledávání inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3

3 Přehled literatury

3.1 Iniclace translace u eukaryot

Iniclace translace u eukaryot má 3 hlavní fáze. První fází je přivedení malé 40S ribozomální podjednotky na 5' konec mRNA, druhou fází je skenování mRNA a hledání iniciačního kodónu a v poslední fázi dochází ke spojení obou ribozomálních podjednotek a k zahájení elongace.

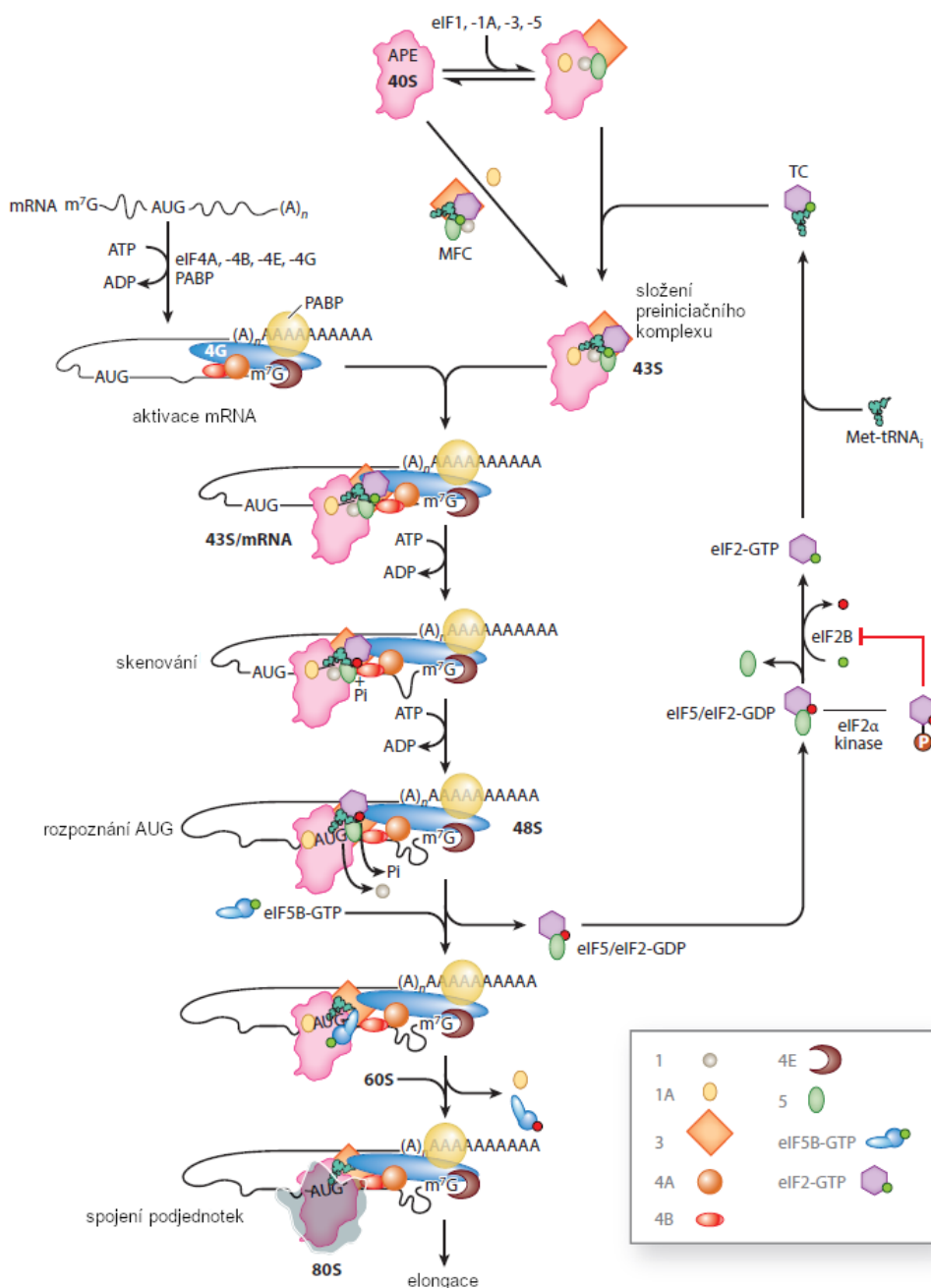
Na rozdíl od bakteriálního ribozomu nemá eukaryotní malá ribozomální podjednotka vlastní afinitu k mRNA. Asociace malé 40S ribozomální podjednotky s mRNA je proto zprostředkována eukaryotními translačními iniciačními faktory (eIF). Aktivace malé ribozomální podjednotky se účastní faktory 1, 1A, 3 a 5. Kromě nich asociuje malá ribozomální podjednotka s ternárním komplexem tvořeným iniciátorovou methionyl-tRNA a s eIF2 v komplexu s GTP. Interakcí 40S ribozomální podjednotky, ternárního komplexu a eIF1, eIF1A, eIF3 a eIF5 vzniká 43S preiniciační komplex (obr. 1).

Na rozpoznání 5' konce mRNA se podílí komplex eIF4F, konkrétně jeho podjednotka eIF4E1 obsahující vazebné místo pro 7-methylguanozinovou čepičku mRNA. Kromě eIF4E1 má eIF4F ještě dvě podjednotky, eIF4G1 a RNA helikázu eIF4A. Faktor 4G1 je strukturální protein zprostředkovávající interakci několika proteinů. V rámci komplexu eIF4F zprostředkovává eIF4G1 interakci eIF4E1 a eIF4A. Tím, že váže poly(A) vazebný protein (PABP), zajišťuje eIF4G1 vznik tzv. uzavřené smyčky na mRNA. Kromě toho asociuje eIF4G1 s eIF3 a umožňuje tak vazbu 43S preiniciačního komplexu na 5' konec mRNA.

Po navázání malé ribozomální podjednotky na mRNA začíná skenování mRNA směrem k 3' konci a hledání iniciačního kodonu. Toho se účastní zejména faktory 1 a 1A. Po rozpoznání iniciačního kodonu dochází k hydrolyze GTP na eIF2, uvolnění fosfátu a disociaci eIF1. Následuje změna konformace ribozomálního komplexu a odpojení se eIF2·GDP. To umožňuje navázání faktoru eIF5B·GTP, který zprostředkovává spojení malé 40S ribozomální podjednotky s velkou 60S ribozomální podjednotkou. Po složení ribozomu dochází k hydrolyze GTP na eIF5B a k disociaci eIF5B·GDP. Následuje také disociace eIF1A. Poté je zahájena elongace.

Velké množství iniciačních faktorů u eukaryot umožňuje rozsáhlou regulaci iniclace translace. Jedním z cílů regulačních mechanismů je eIF4E1. Faktor 4E1 může interagovat s proteiny rodiny 4E-BP, které na eIF4E1 blokují vazebné místo pro eIF4G1 a brání tak složení komplexu eIF4F. V savčích buňkách existují 3 zástupci rodiny 4E-BP – 4E-BP1, 4E-BP2 a 4E-BP3. Jejich aktivita je regulována Ser/Thr kinázou mTOR v komplexu mTORC1. Fosforylace 4E-BP snižuje jejich afinitu k eIF4E1 a podporuje tak translaci.

Kromě interakce s 4E-BP může být eIF4E1 regulován přímo fosforylací na Ser209. To mají na svědomí kinázy Mnk1 a Mnk2. Interakce eIF4E1 s Mnk1/2 je zprostředkována proteinem eIF4G1. Podrobněji je problematika shrnuta v publikacích Hinnebusch a Lorsch, 2012; Hinnebusch, 2014; Roux a Topisirovic, 2018; Shirokikh a Preiss, 2018.



Obrázek 1. Iniciacie translace u eukaryot. Upraveno podle Hinnebusch, 2014.

3.2 Protein eIF4E2

Protein eIF4E2, nazývaný také 4EHP, 4ELP nebo EIF4EL3, patří do proteinové rodiny eukaryotních translačních iniciačních faktorů 4E (dále rodina 4E). V této proteinové rodině se rozlišují tři třídy proteinů. U člověka má každá třída rodiny 4E jednoho zástupce. Kanonický eIF4E1, který je součástí translačního iniciačního komplexu eIF4F, patří do třídy I. Protein eIF4E2, jehož aminokyselinová sekvence je z 30 % shodná a z 60 % podobná sekvenci eIF4E1, je řazen do třídy II (Rom *et al.*, 1998; Tee *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2005). Posledním zástupcem rodiny 4E u člověka je eIF4E3 patřící do třídy III (Joshi *et al.*, 2004, 2005).

Protein eIF4E2 se vyskytuje u všech zástupců říše *Metazoa* (Joshi *et al.*, 2005). Orthologem savčího eIF4E2 u *Drosophila melanogaster* je d4EHP (nazývaný také eIF4E-8), u *Caenorhabditis elegans* je to IFE-4 a u *Arabidopsis thaliana* nCBP. Proteiny rodiny 4E jsou mezi sebou homologní zejména v doméně pro vazbu 7-methylguanozinové čepičky na 5' konci mRNA (Joshi *et al.*, 2004; Rosettani *et al.*, 2007). Jedním ze znaků třídy II je záměna tryptofanu na pozici odpovídající v savčím eIF4E1 Trp56 za jinou hydrofobní aminokyselinu (Joshi *et al.*, 2005). Vysoká konzervovanost aminokyselinové sekvence je u proteinů rodiny 4E patrná také ve vazebném místě pro 4E-BP1 (Rosettani *et al.*, 2007).

Gen pro eIF4E2 se u člověka nachází na chromozomu 2 (Joshi, Cameron a Jagus, 2004). V současnosti je známo 7 hlavních transkripčních variant lišících se zejména ve své C terminální části. Translací transkripční varianty 1 vzniká proteinová izoforma A, která je nejdelší a nejvíce studovanou izoformou eIF4E2 (Mrvova *et al.*, 2018). Isoforma A proteinu eIF4E2 má 245 aminokyselin (Joshi *et al.*, 2004; Mrvova *et al.*, 2018).

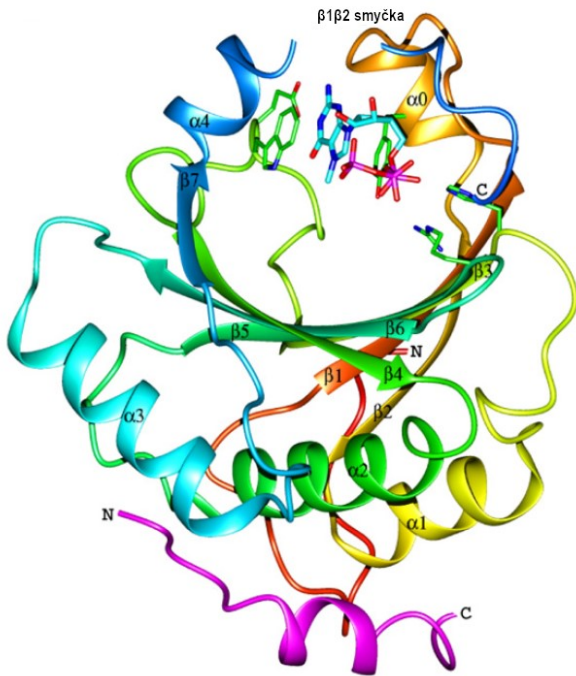
Hladina eIF4E2 v buňkách je standardně zhruba 5-10x nižší než hladina eIF4E1 (Rom *et al.*, 1998; Kubacka *et al.*, 2013). Protein eIF4E2 je produkován ve všech tkáních (Rom *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004). Nejvyšší hladina eIF4E2 je v testes, ledvinách a játrech (Joshi *et al.*, 2004).

Přes vysokou sekvenční homologii s eIF4E1 není možné komplementovat delecii v genu pro eIF4E1 v kvasinkách transfekcí genu pro myši eIF4E2. To může ukazovat na to, že eIF4E2 nemá schopnost interagovat s podjednotkami kvasinkového translačního aparátu (Joshi *et al.*, 2004).

Význam eIF4E2 je ilustrován mimo jiné skutečností, že je *EIF4E2* jedním ze 17 genů, jejichž změněná exprese indikuje metastatický potenciál rakovinných buněk. Stejný vzorec deregulace tohoto souboru genů se vyskytuje u různých druhů rakovinných buněk a lze jej považovat za prediktivní faktor tvorby metastáz. Protein eIF4E2 je v tomto případě produkován ve zvýšené míře (Ramaswamy *et al.*, 2003). U pacientů v pokročilé fázi nemalobuněčného bronchogenního karcinomu léčených paklitaxelem a karboplatinou zhoršuje SNP ve třetím intronu genu pro eIF4E2 prognózu (Sato *et al.*, 2011). K deregulaci eIF4E2 dochází také u revmatoidní artritidy (Afroz *et al.*, 2017).

3.2.1 Struktura proteinu eIF4E2

Trojrozměrná struktura eIF4E2 je velmi podobá struktuře eIF4E1 (Rom *et al.*, 1998; Rosettani *et al.*, 2007). U obou proteinů bývá připodobňována k ruce tvořící z dlaně miskou. V takovém případě by dlaň ruky byla tvořena sedmi β -skládanými listy, k nimž přiléhají z konvexní strany tři α -helixy tvořící hřbet ruky (obr. 2). Nejvíce rozdílů mezi eIF4E1 a eIF4E2 je na N a C koncích proteinů a v $\beta 1\beta 2$ smyčce, která je u eIF4E2 delší a obsahuje navíc helix $\alpha 0$. N ani C konec proteinu není důležitý pro vazbu čepičky. Důležitým rozdílem mezi eIF4E1 a eIF4E2 je také substituce Ser209 v eIF4E1 za Arg229 v eIF4E2, která způsobuje, že eIF4E2 nemůže být regulován kinázami Mnk1/2 (Rosettani *et al.*, 2007).



Obrázek 2. Struktura eIF4E2 s navázaným peptidem odvozeným od 4E-BP1 a s navázaným m⁷GTP. Upraveno podle Rosettani *et al.*, 2007.

3.2.2 Lokalizace eIF4E2 v buňce

Protein eIF4E2 je za standardních podmínek rozmístěn rovnoměrně v cytoplazmě (Kubacka *et al.*, 2013). V jádře se eIF4E2 běžně nevyskytuje (Rom *et al.*, 1998). Přítomnost eIF4E2 v jádře lze ovšem vyvolat přidáním Leptomycinu B, inhibitoru jaderného exportinu Crm1. Mechanismus, jakým se eIF4E2 v takovém případě do jádra dostává, znám není. Tento proces je nezávislý na 4E-T. Naopak přesun eIF4E2 do P bodies je závislý na interakci eIF4E2 s 4E-T (Kubacka *et al.*, 2013). V P bodies se eIF4E2 vyskytuje za standardních podmínek i během teplotního stresu a stresu indukovaného arsenitanem sodným (Kubacka *et al.*, 2013; Frydryskova *et al.*, 2016). Vlivem teplotního šoku se eIF4E2 dostává kromě P bodies také do stresových granulí. Naopak působení arsenitanu sodného přesun eIF4E2 do stresových granulí neindukuje (Frydryskova *et al.*, 2016). Lokalizace eIF4E2 v buňce není ovlivněna inhibicí transkripce (Kubacka *et al.*, 2013).

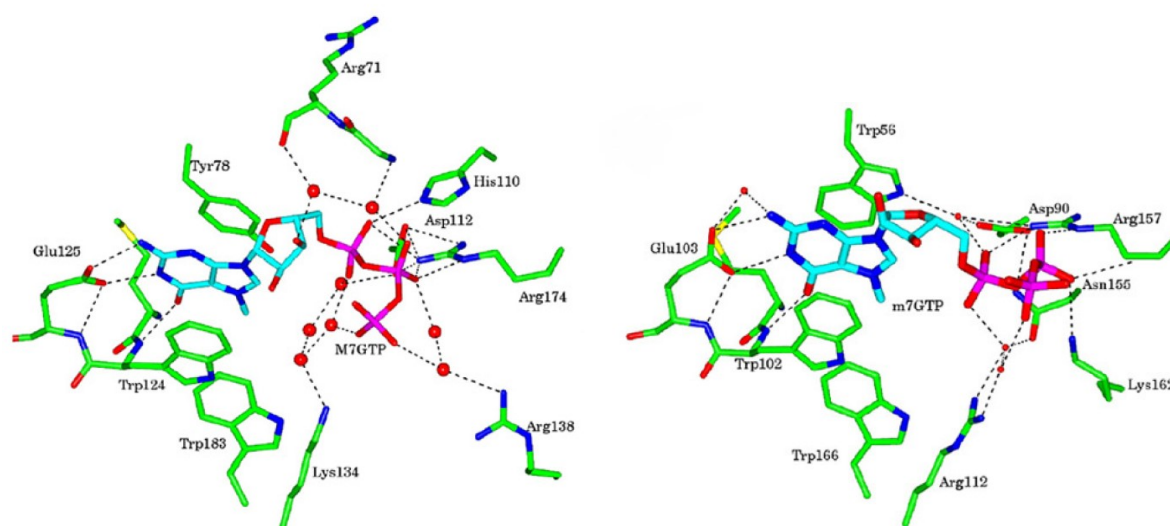
3.3 Vazba eIF4E2 na 7-methylguanovinovou čepičku mRNA

Stejně jako eIF4E1 váže savčí eIF4E2 čepičku na 5' konci mRNA (Rom *et al.*, 1998). Savčí eIF4E2 interaguje také s analogy čepičky (Rom *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004; Tee *et al.*, 2004; Rosettani *et al.*, 2007; Zuberek *et al.*, 2007; Villaescusa *et al.*, 2009). Kromě savčího eIF4E2 váží m⁷GTP také orthology eIF4E2 u *D. melanogaster* a *C. elegans* (Keiper *et al.*, 2000; Stachelska *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Zuberek *et al.*, 2016). Savčí eIF4E2 váže m⁷GTP lépe než m⁷GDP a m⁷GDP lépe než m⁷GMP (Rosettani *et al.*, 2007; Zuberek *et al.*, 2007). Pokud je analog čepičky nemethylovaný, eIF4E2 ho prakticky neváže (Rom *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2005; Rosettani *et al.*, 2007; Zuberek *et al.*, 2007; Villaescusa *et al.*, 2009). Vazba eIF4E2 k analogům čepičky

je výrazně slabší než vazba eIF4E1 ke stejným ligandům (Tee *et al.*, 2004; Rosettani *et al.*, 2007; Zuberek *et al.*, 2007).

3.3.1 Struktura vazebného místa pro čepičku s navázaným m⁷GTP

Struktura vazebného místa pro čepičku s navázaným m⁷GTP je u eIF4E1 a eIF4E2 velmi podobná (Rom *et al.*, 1998; Rosettani *et al.*, 2007; Zuberek *et al.*, 2007). U obou proteinů se m⁷GTP váže do hydrofobní kapsy na konkávní straně proteinu (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Rosettani *et al.*, 2007). V případě eIF4E1 je ve vazebném místě pro čepičku 7-methylguanosa vmezeřen mezi Trp56 a Trp102, kde je stabilizován stohovými π - π interakcemi a vodíkovými můstky s Glu103 (Marcotrigiano *et al.*, 1997). V případě eIF4E2 je architektura vazby velmi podobná. Guaninová skupina je u eIF4E2 vsunuta mezi Tyr78 a Trp124 a je stabilizována vodíkovými můstky s Glu125 (Rom *et al.*, 1998; Rosettani *et al.*, 2007) (obr. 3).



Obrázek 3. Struktura vazebného místa pro čepičku s navázaným m⁷GTP v eIF4E2 (vlevo) a v eIF4E1 (vpravo). Převzato z Rosettani *et al.*, 2007.

Dalo by se předpokládat, že záměna Trp56 za Tyr v eIF4E2 je důvodem pro jeho nízkou afinitu k čepičce, pokud je ale Trp56 v eIF4E1 mutován na tyrosin, vede to dokonce k mírnému zvýšení jeho afinity k čepičce. Příčinu slabé vazby eIF4E2 na čepičku je tedy potřeba hledat jinde. Možným vysvětlením je menší počet přímých vodíkových můstků mezi fosfáty čepičky a okolními aminokyselinami u eIF4E2 oproti eIF4E1 (Zuberek *et al.*, 2007).

3.3.2 Změna afinity eIF4E2 k čepičce interakcí s ARIH1

Afinita eIF4E2 k čepičce mRNA může být modulována interakcí eIF4E2 s dalšími proteiny nebo posttranslačními modifikacemi eIF4E2. Příkladem je ovlivnění afinity eIF4E2 k čepičce modifikací eIF4E2 zprostředkovanou E3 ubikvitin ligázou ARIH1 (HHARI) (Okumura *et al.*, 2007; Von Stechow *et al.*, 2015). Protein ARIH1 s eIF4E2 interaguje skrze svou RING1 doménu a způsobuje ubikvitinylaci nebo ISGylaci eIF4E2 (Tan *et al.*, 2003; Okumura *et al.*, 2007; Von Stechow *et al.*, 2015). V současnosti není známo, jak je aktivita ARIH1 vůči eIF4E2 regulována.

K ubikvitinylaci eIF4E2 enzymem ARIH1 dochází v rámci obrany buňky proti genotoxickému stresu. Ubikvitinylovaný eIF4E2 váže čepičku mRNA s vyšší afinitou, navíc je při genotoxickém stresu stejně jako ARIH1 produkován ve zvýšené míře. To mu zřejmě umožňuje kompetovat o čepičku s eIF4E1 a inhibovat tak translaci. Inhibice translace je pak klíčovým krokem v adaptaci buněk na genotoxický stres (Von Stechow *et al.*, 2015).

Význam ISGylace eIF4E2 v současnosti znám není. Fúze eIF4E2 s ISG15 ovšem zvyšuje schopnost eIF4E2 reprimovat translaci reportérové mRNA. Na míru celkové translace přitom ISGylace eIF4E2 vliv nemá. Uvažuje se proto o tom, že by ISGylace eIF4E2 mohla mít roli v regulaci translace specifických mRNA. K ISGylaci dochází na několika místech na eIF4E2, mezi něž patří přinejmenším Lys121, Lys130, Lys134 a Lys222. ISGylaci dochází ke zvýšení afinity eIF4E2 k čepičce 10-20x (Okumura *et al.*, 2007).

3.4 Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny 4E-BP

Vzhledem ke strukturální podobnosti eIF4E2 s eIF4E1 lze předpokládat, že by eIF4E2 mohl interagovat se stejnými proteiny jako eIF4E1. Jedním z významných interakčních partnerů eIF4E1 je protein 4E-BP1.

Vazebné místo pro 4E-BP1 je u proteinů eIF4E1 a eIF4E2 vysoce konzervované (Rosettani *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2017). Přesto nebyla pomocí metody imunoprecipitace detekována interakce mezi eIF4E2 a 4E-BP1, pokud byly proteiny v buňkách produkovány ve standardním množství (Tee *et al.*, 2004; Uniacke *et al.*, 2012; Peter *et al.*, 2017). Interakci orthologů eIF4E2 a 4E-BP1 se nepodařilo pozorovat ani s využitím kvasinkového dvouhybridního systému u *D. melanogaster* (Hernández *et al.*, 2005). Vzájemná vazba lidských variant eIF4E2 a 4E-BP1 je ovšem pull-down analýzou detekovatelná, pokud je produkce eIF4E2 v buňkách zvýšená (Tee *et al.*, 2004; Peter *et al.*, 2017). Také metoda far-western blot umožňuje pozorovat interakci myšního eIF4E2 s lidským 4E-BP1 (Joshi *et al.*, 2004). Interakce lidského eIF4E2 s peptidem odvozeným od 4E-BP1 byla také pozorována metodou izotermální titrační kalorimetrie. Pomocí rentgenové krystalografie byla nakonec stanovena struktura komplexu eIF4E2 s 4E-BP1 (Rosettani *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2017).

Protein 4E-BP1 interaguje s dorzální oblastí eIF4E2, tedy se stejnou oblastí, se kterou interaguje také na eIF4E1 (Tee *et al.*, 2004; Rosettani *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2017). Vazba 4E-BP1 na eIF4E2 je ale v porovnání s vazbou 4E-BP1 na eIF4E1 výrazně slabší (Tee *et al.*, 2004; Rosettani *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2017). Jedním z důvodů může být to, že při vazbě 4E-BP1 na eIF4E1 tvoří Glu132 na eIF4E1 dva solné můstky s Arg56 na 4E-BP1. V případě eIF4E2 se v odpovídající pozici nachází Asn150, který tvoří pouze jeden vodíkový můstek (Rosettani *et al.*, 2007). Další možné vysvětlení je to, že je na místě odpovídajícím u eIF4E1 Asn77 v eIF4E2 Ser99, který na rozdíl od Asn77 netvoří vazbu s Arg63 na 4E-BP1. Pokud je Ser99 mutován na Asn, afinita eIF4E2 k 4E-BP1 vzrůstá (Peter *et al.*, 2017). Celkově je ale architektura vazby 4E-BP1 na eIF4E2 velmi podobná vazbě 4E-BP1 na eIF4E1 (Rosettani *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2017). Kromě kanonické vazebné sekvence stabilizují interakci eIF4E2 s 4E-BP1 nekanonické motivy na 4E-BP1, které interagují s laterální oblastí eIF4E2 (Peter *et al.*, 2017).

Pokud je syntéza eIF4E2 v lidských embryonálních ledvinných buňkách linie HEK293E uměle navýšena, eIF4E2 a 4E-BP1 spolu interagují. Interakce s eIF4E2 inhibuje u 4E-BP1 bazální a inzulinem indukovanou fosforylaci. Interakce eIF4E2 a 4E-BP1 zabraňuje také fosforylaci S6K1 stimulované inzulinem. Oproti eIF4E1, který v případě, že je produkován ve zvýšené míře, také inhibuje fosforylaci 4E-BP1 a S6K1, je u eIF4E2 nutné výraznější zvýšení jeho hladiny. Je také otázkou, zda k interakci eIF4E2 a 4E-BP1 v buňkách vzhledem k nízké vzájemné afinitě dochází i bez umělého navýšení hladiny eIF4E2 (Tee *et al.*, 2004).

Myši eIF4E2 interaguje kromě 4E-BP1 i s 4E-BP2 a 4E-BP3. Proteiny 4E-BP2 a 4E-BP3 dokonce myši eIF4E2 váže ochotněji než 4E-BP1 (Joshi *et al.*, 2004).

3.5 Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G

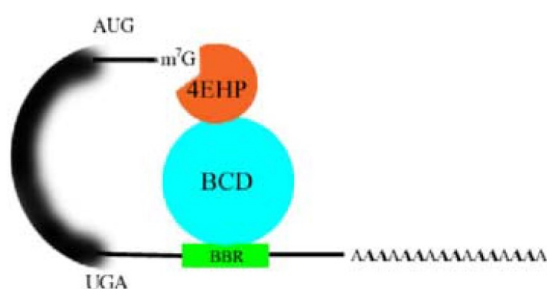
Dalším interakčním partnerem eIF4E1, který by teoreticky mohl interagovat také s eIF4E2, je eIF4G1. V původní práci, která protein eIF4E2 charakterizovala, ovšem autoři zmiňují, že asociaci eIF4E2 s eIF4G1 standardními metodami nedetekovali (Rom *et al.*, 1998). K interakci eIF4E2 s eIF4G1 nedošlo ani *in vitro* mezi myším eIF4E2 a fragmentem lidského eIF4G1 (Joshi *et al.*, 2004). Asociaci endogenních eIF4E2 a eIF4G1 se nepovedlo prokázat pomocí koimunoprecipitace (Tao a Gao, 2015; Ho *et al.*, 2016). V neposlední řadě nekomplementuje myši eIF4E2 ani d4EHP v kvasinkách deletovaný eIF4E1, pro jehož funkci je interakce s eIF4G1 zásadní (Joshi *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005). Protein d4EHP neinteraguje ani s orthologem eIF4G1 v *D. melanogaster* (Zuberek *et al.*, 2016). Rozdílné výsledky přineslo hledání interakčních partnerů eIF4E2 pomocí metody BioID. Principem metody je fúze proteinu našeho zájmu, v tomto případě eIF4E2, s biotinligázou, která modifikuje interakční partnery proteinu našeho zájmu. Biotinylované proteiny jsou následně izolovány afinitní purifikací a charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedním z proteinů, které byly pomocí této metody identifikovány jako potenciální interakční partneři eIF4E2, je právě eIF4G1 (Chapat *et al.*, 2017). S eIF4G3, funkčním homologem eIF4G1, naopak eIF4E2 interaguje (Rosettani *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2016; Chapat *et al.*, 2017).

3.6 Represní komplexy obsahující d4EHP u *Drosophila melanogaster*

Prvním organismem, u kterého byla popsána úloha eIF4E2 v represi translace, byla *D. melanogaster*. Správný vývoj embrya octomilky závisí na gradientní distribuci několika klíčových proteinů. Anterior-posteriorní osa je určena maternálními geny Bicoid a Nanos, které modulují expresi dalších genů. Bicoid je stabilizován na anteriorní straně a jeho koncentrace směrem k posteriorní straně klesá. Jeho působením je na anteriorním konci inhibován protein Caudal. Naopak Nanos je stabilizován na posteriorním konci a jeho koncentrace klesá směrem k anteriorní straně. Nanos způsobuje inhibici proteinu Hunchback na posteriorním konci (Ma *et al.*, 2016).

V případě, že je některý gradient určen chybně, dochází ve vývoji embrya k závažným defektům. Tato situace nastává například pokud v embryu chybí vlivem mutace funkční protein d4EHP.

V embryích s delecí d4EHP není inhibována translace mRNA pro Caudal na anterioru, embrya jsou proto špatně segmentovaná a larvy netvoří kukly. Zkoumání těchto embryí vedlo k objevu translačního represního komplexu sestávajícího z d4EHP a Bicoid. Bicoid zřejmě interaguje s konvexní oblastí d4EHP, jelikož mutace ve vazebném místě pro čepičku nemá na schopnost d4EHP vázat Bicoid vliv. Naopak mutace v oblasti vazby 4E-BP1 interakci d4EHP s Bicoid znemožňuje (Cho *et al.*, 2005). Podle navrženého modelu váže Bicoid mRNA v 3'UTR oblasti. S čepičkou stejné mRNA interaguje d4EHP. To způsobí zacyklení mRNA a inhibici její translace (obr. 4) (Cho *et al.*, 2005). Je možné, že je interakce d4EHP a Bicoid zprostředkována dalším proteinem, který není přítomný ve všech stádiích vývoje octomilky nebo ve všech tkáních, neboť v S2 buňkách k interakci d4EHP a Bicoid nedochází (Ruscica *et al.*, 2019).



Obrázek 4. Schéma komplexu d4EHP s Bicoid. 4EHP homolog eIF4E2 v *D. melanogaster*, BCD Bicoid, BBR vazebné místo pro Bicoid. Převzato z Cho *et al.*, 2005.

Caudal není jediný protein, na jehož expresi má d4EHP vliv. Absence d4EHP v oocytech má za následek porušení gradientu proteinu Hunchback a v důsledku toho výskyt Hunchback na posteriorním konci. Syntéza Hunchback je regulována d4EHP v komplexu s proteinem Brat a skrze něj i s proteiny NRE komplexu. Protein d4EHP i v tomto komplexu váže čepičku mRNA. Není ovšem jisté, jak přesně komplex vypadá a jaký je mechanismus jeho účinku (Cho *et al.*, 2006). Stejně jako v případě Bicoid je možné, že je interakce d4EHP a Brat zprostředkována proteinem, který není přítomen ve všech buněčných liniích (Ruscica *et al.*, 2019).

Dalším z proteinů, jejichž produkci d4EHP reguluje, je Belle. Protein d4EHP interaguje s mRNA pro Belle v jádře nutritivních buněk a v cytoplazmě oocytů a podílí se na restrikci syntézy Belle pouze na posteriorní konec, což je esenciální pro správný vývoj oocytu. Není známo, jakým mechanismem k represii translace mRNA pro Belle dochází (Yarunin *et al.*, 2011).

3.7 Represní komplexy obsahující eIF4E2 u *Mus musculus*

Drosophila melanogaster není jediný organismus, v jehož vývoji se uplatňuje eIF4E2. V myších oocytech interaguje eIF4E2 v cytoplazmě s transkripčním faktorem Prep1. Interakce probíhá přes ⁵⁹YRHPLFPLL⁶⁷ sekvenci na Prep1. Tato sekvence je velmi podobná vazebné sekvenci pro d4EHP na Bicoid. Protein Prep1 váže 3'UTR oblast mRNA pro Hoxb4 a způsobuje inhibici translace této mRNA. V případě, že je Prep1 mutovaný ve vazebné doméně pro eIF4E2, jeho inhibiční aktivita vůči

mRNA pro Hoxb4 poklesne. Z toho autoři vyvozují, že vzniká v myších oocytech represní komplex eIF4E2:Prep1 podobný d4EHP:Bicoid v *D. melanogaster*. Důležitost tohoto komplexu ukazuje skutečnost, že vede delece Prep1 u samic myši ke špatnému vývoji vaječníků a k defektům při tvorbě oocytů (Villaescusa *et al.*, 2009).

3.8 Represní komplexy obsahující eIF4E2 v lidských buňkách

3.8.1 Interakční partneři eIF4E2 v represních komplexech v lidských buňkách

3.8.1.1 GIGYF1 a GIGYF2

Snad nejdůležitějším interakčním partnerem eIF4E2 zúčastněným v represi translace v lidských buňkách je protein GIGYF2. Vazba GIGYF2 na eIF4E2 je přímá, není zprostředkovaná RNA ani dalšími proteiny (Morita *et al.*, 2012; Chapat *et al.*, 2017; Peter *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2018; Tollenaere *et al.*, 2019). Proteiny eIF4E2 a GIGYF2 se navzájem stabilizují. Není také bez zajímavosti, že geny pro eIF4E2 a GIGYF2 se u myši i u lidí nachází na stejném chromozomu ve vzájemné blízkosti, což je často skutečností u shodně regulovaných interakčních partnerů (Morita *et al.*, 2012). K interakci dochází nejen mezi savčími variantami proteinů, ale i mezi orthology eIF4E2 a GIGYF u *D. melanogaster* (Ruscica *et al.*, 2019).

Na GIGYF2 se interakce účastní zejména kanonický motiv YXYX₄LΦ na N konci proteinu (Morita *et al.*, 2012; Peter *et al.*, 2017). Kromě tohoto kanonického motivu se na GYGIF2 nachází ještě nekanonická sekvence a k ní přilehlé pomocné sekvence, které vazbu GIGYF2 na eIF4E2 stabilizují. Kanonický motiv je pro vazbu dostačující *in vitro*, ale s pomocnými sekvencemi je vazba silnější a méně citlivá na mutace v eIF4E2. *In vivo* ovšem kanonický motiv pro vazbu nestačí a pokud se nachází mutace zároveň v nekanonické i v pomocné sekvenci, k interakci eIF4E2 s GIGYF2 nedochází (Peter *et al.*, 2017).

Architektura vazby GIGYF2 na eIF4E2 v řadě ohledů připomíná vazbu 4E-BP1 na eIF4E2. Interakce s GIGYF2 je ale oproti 4E-BP1 proteinem eIF4E2 preferována. GIGYF2 zaujímá konformaci helixu, který se kanonickou vazebnou sekvencí váže na konvexní povrch eIF4E2. Pomocné sekvence pak vazbu stabilizují interakcí s laterální oblastí eIF4E2. Jeden z helixů pomocných sekvencí se nachází blízko vazebného místa pro čepičku, afinitu k analogu čepičky ale jeho vazba na eIF4E2 nijak neovlivňuje (Peter *et al.*, 2017).

Testování schopnosti GIGYF2 vázat přímo RNA přineslo rozporuplné výsledky. Analýzou aminokyselinové sekvence GIGYF2 nebyl objeven žádný RNA-vazebný motiv (Morita *et al.*, 2012). Také „cross-linking“ imunoprecipitace neukázala, že by byl GIGYF2 schopen přímo vázat RNA (Tollenaere *et al.*, 2019). Tyto výsledky vedly k předpokladu, že spolu s eIF4E2 tvoří GIGYF2 větší komplexy s minimálně jedním RNA vazebným proteinem, který umožní navázání 3'UTR oblasti mRNA a zformování podobného komplexu, jako je d4EHP:Bicoid u octomilky. Existuje ovšem i práce, ve které autoři vazbu RNA na GIGYF2 pomocí „cross-linking“ imunoprecipitace detekovali (Ramirez *et al.*, 2018).

Kromě GIGYF2 váže eIF4E2 i jeho homolog GIGYF1 (Morita *et al.*, 2012; Chapat *et al.*, 2017; Peter *et al.*, 2017; Tollenaere *et al.*, 2019). Vazba GIGYF1 na eIF4E2 je ovšem oproti vazbě GIGYF2

slabší (Morita *et al.*, 2012; Peter *et al.*, 2017). Interakce GIGYF1 a GIGYF2 s eIF4E2 se vzájemně vylučuje (Tollenaere *et al.*, 2019).

3.8.1.2 Tristetraprolin

Pomocí imunoprecipitace lze pozorovat interakci eIF4E2 s tristetraprolinem (TTP) (Tao a Gao, 2015; Fu *et al.*, 2016). Nelze ovšem vyloučit, že je interakce TTP s eIF4E2 zprostředkována jiným proteinem. Tímto proteinem by mohl být GIGYF1 nebo GIGYF2.

TTP s GIGYF2 interaguje nezávisle na eIF4E2. V myším TTP se na vazbě s GIGYF2 podílí N-koncová doména, která je vysoce konzervovaná napříč organismy (Fu *et al.*, 2016). S TTP interaguje také GIGYF1, a to skrze GYF doménu (Fu *et al.*, 2016; Tollenaere *et al.*, 2019).

Jelikož je TTP RNA-vazebný protein a je zároveň schopen interakce s GIGYF2, uvažuje se o existenci komplexu eIF4E2:GIGYF2:TTP, ve kterém by po vzoru komplexu d4EHP:Bicoid v *D. melanogaster* eIF4E2 vázal čepičku, TTP interagoval s 3'UTR oblastí mRNA a GIGYF2 sloužil jako můstek mezi eIF4E2 a TTP (Tollenaere *et al.*, 2019).

3.8.1.3 ZNF598

Do GYF domény na GIGYF2 se může vázat také ZNF598 (Morita *et al.*, 2012; Chapat *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2018; Tollenaere *et al.*, 2019). ZNF598 je stejně jako TTP RNA-vazebný protein (Tollenaere *et al.*, 2019). Podobně jako v případě TTP byla postulována existence komplexu eIF4E2:GIGYF2:ZNF598, ve kterém by ZNF598 vázal reprimované mRNA (Morita *et al.*, 2012; Tollenaere *et al.*, 2019). TTP a ZNF598 interagují se stejnou oblastí na proteinech GIGYF, není proto možné, aby s GIGYF interagovaly zároveň. Existence komplexů eIF4E2:GIGYF2:ZNF598 a eIF4E2:GIGYF2:TTP zároveň v buňce se ale nevylučuje (Tollenaere *et al.*, 2019).

3.8.1.4 4E-T

Protein 4E-T je známý interakční partner eIF4E1, kromě něj ovšem váže i eIF4E2 (Morita *et al.*, 2012; Kubacka *et al.*, 2013; Chapat *et al.*, 2017; Peter *et al.*, 2017). Interakce probíhá přes YX₄LL sekvenci na N konci 4E-T (Kubacka *et al.*, 2013; Chapat *et al.*, 2017). Na vazbě se podílí a stabilizují ji další sekvence po směru transkripce na 4E-T (Kubacka *et al.*, 2013). Protein 4E-T váže lépe eIF4E2 než eIF4E1, eIF4E2 dovede vytěsnit eIF4E1 z vazby s 4E-T. Vazba 4E-T zvyšuje afinitu eIF4E2 k čepičce (Chapat *et al.*, 2017). Hladina 4E-T v buňkách je nižší, než hladina eIF4E2 (Kubacka *et al.*, 2013). Na rozdíl od lidského eIF4E2 váže d4EHP homolog 4E-T v *D. melanogaster* jen slabě (Ruscica *et al.*, 2019).

3.8.1.5 Další interakční partneři eIF4E2 zúčastnění v translační represí

Mezi interakční partnery eIF4E2 patří také DDX6 (Chapat *et al.*, 2017). I v tomto případě ovšem nelze vyloučit možnost, že je interakce zprostředkována GIGYF2, neboť přímá vazba eIF4E2 na DDX6 prokázána nebyla. GIGYF2 naopak s DDX6 interaguje přímo skrze konzervovanou MBM doménu (Ramirez *et al.*, 2018; Peter *et al.*, 2019).

Protein eIF4E2 dále interaguje s TNRC6A a TNRC6B, komponenty komplexu RISC (Chapat *et al.*, 2017; Chen a Gao, 2017). V případě TNRC6A se interakce účastní jeho C-koncová doména. Vazba na eIF4E2 je přímá (Chen a Gao, 2017).

Mezi interakční partnery eIF4E2 patří i CNOT1 a PATL-1. V případě CNOT1 se interakce účastní jeho střední doména. Ta ovšem také interaguje s DDX6 a ten dále je schopný vázat 4E-T. Jako v předchozích případech je proto možné, že k interakci eIF4E2 a CNOT1 nedochází přímo, ale zprostředkovaně přes 4E-T a DDX6 (Chapat *et al.*, 2017). Vyloučit nelze ani interakci zprostředkovanou přes GIGYF2, který také patří mezi interakční partnery CNOT1 (Ramirez *et al.*, 2018).

3.8.2 Mechanismus translační represe zprostředkované eIF4E2

Schopnost eIF4E2 interagovat s proteiny, které se účastní represe translace, není jediný indikátor toho, že má eIF4E2 v translační represi svou úlohu. Inhibice eIF4E2 vede v buňkách i v myších tkáních ke zintenzivnění celkové proteosyntézy. Zejména je tento efekt patrný v tkáních mozku a plic. Zintenzivnění translace vybraných mRNA je patrně příčinou toho, že myši bez funkční alely *EIF4E2* umírají krátce po porodu, jsou cyanotické, embrya jsou menší a mají špatně vyvinuté plíce a mozek (Morita *et al.*, 2012). Kromě toho reprimuje eIF4E2 fúzovaný s λ N translaci specifického reportéru obsahujícího BoxB sekvence (Peter *et al.*, 2017; Ruscica *et al.*, 2019).

Je pravděpodobné, že se eIF4E2 účastní více procesů spojených s translační repesí, v současné době ovšem není do detailu prozkoumán vztah mezi těmito procesy ani přesná role eIF4E2 v nich.

Jedním procesů inhibujících translaci, kterých se eIF4E2 účastní, je represe translace zprostředkovaná miRNA. Tento proces preferenčně reguluje mRNA s delším 3'UTR s více vazebnými místy pro miRNA (Jafarnejad *et al.*, 2018). Pro represi translace pomocí miRNA je zřejmě důležitá schopnost eIF4E2 interagovat s proteiny rodiny TNRC6. Delece eIF4E2 totiž snižuje účinnost translační represe zprostředkované TNRC6C (Chapat *et al.*, 2017). Nezbytná je také schopnost eIF4E2 vázat čepičku mRNA (Chen a Gao, 2017).

Translace reportérových mRNA pomocí Let-7, miR-19, miR-19a a miR-17/20a je v případě inhibice eIF4E2 reprimována výrazně méně (Chapat *et al.*, 2017; Chen a Gao, 2017). Snížení množství eIF4E2 přitom nemá žádný vliv na hladinu reportérové mRNA. Z toho lze usoudit, že k represi translace v tomto případě nedochází degradací regulované mRNA (Chen a Gao, 2017). Inhibice eIF4E2 také nemá vliv na polyzomální profil, reportérová mRNA regulovaná *Let7a* se ovšem v nepřítomnosti eIF4E2 nachází v polyzomech ve větším množství. Není bez zajímavosti, že vazba miRNA na mRNA zvyšuje afinitu eIF4E2 k této mRNA (Chen a Gao, 2017). Příkladem proteinů, jejichž exprese je regulována pomocí miRNA a eIF4E2, je IMP1, PDCD4, PTEN a *Dusp6* (Chen a Gao, 2017; Jafarnejad *et al.*, 2018).

Skutečnost, že má inhibice eIF4E2 na expresi IMP1 výraznější efekt než inhibice TNRC6A nebo TNRC6B, ukazuje, že se eIF4E2 účastní více různých mechanismů translační represe (Chen a Gao, 2017). Inhibice eIF4E2 snižuje účinnost i translační represe zprostředkované komplexem CCR4-NOT (Chapat *et al.*, 2017). Komplex CCR4-NOT se spolu s eIF4E2 podílí i na regulaci exprese *Dusp6*.

Klíčový je pro tento proces také protein 4E-T (Jafarnejad *et al.*, 2018). Aby translační represe pomocí eIF4E2 a komplexu CCR4-NOT fungovala, je nutné, aby byl eIF4E2 schopen vázat čepičku mRNA (Chapat *et al.*, 2017).

Další významný mechanismus translační represe zahrnuje eIF4E2 v komplexu s GIGYF2 a potenciálně dalšími proteiny. Inhibice eIF4E2 a inhibice GIGYF2 zvyšuje intenzitu celkové translace v buňkách podobným dílem, což podporuje představu, že se oba proteiny vyskytují v jednom komplexu (Morita *et al.*, 2012). Pro represi specifického reportéru pomocí eIF4E2 je také nutná přítomnost GIGYF2. Hladina reportérové mRNA zůstává stejná (Peter *et al.*, 2017). Protein d4EHP vyžaduje pro svou funkci v translační represi stejně jako savčí eIF4E2 přítomnost GIGYF, na rozdíl od savčích orthologů lze ovšem v případě *D. melanogaster* pozorovat degradaci reportérové mRNA (Ruscica *et al.*, 2019). Savčí GIGYF2 i GIGYF *D. melanogaster* jsou schopny reprimovat translaci mRNA i bez přítomnosti eIF4E2, respektive d4EHP, což studium mechanismu translační represe pomocí komplexu eIF4E2:GIGYF2 komplikuje (Peter *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2018; Ruscica *et al.*, 2019).

Jak bylo zmíněno výše, předpokládá se, že s heterodimerem eIF4E2:GIGYF2 asociují proteiny TTP nebo ZNF598. Represi reportérové mRNA pomocí TTP lze kompetitivně inhibovat nadprodukcí eIF4E2. Také úbytek eIF4E2 má na translační represi zprostředkovanou TTP inhibiční účinek. Z těchto dat lze usoudit, že se eIF4E2 na translační represi zprostředkované TTP podílí (Tao a Gao, 2015). Pro represi pomocí TTP je nutná interakce eIF4E2 a GIGYF2 (Peter *et al.*, 2017, 2019). Kromě toho je nezbytná vazba eIF4E2 na čepičku mRNA (Tao a Gao, 2015; Peter *et al.*, 2017).

Některé endogenní mRNA s ARE sekvencí, u nichž je známo, že jsou regulovány TTP, po delecii eIF4E2 a indukci sérem zvyšují v myších buňkách svou stabilitu, což oproti výše zmíněným experimentům ukazuje, že by eIF4E2 mohl v určitých případech hrát roli nejen v translační represi, ale i v degradaci mRNA (Fu *et al.*, 2016). Není také bez zajímavosti, že TTP usnadňuje vazbu eIF4E2 na specifické cílové mRNA a vyvázání eIF4E1 z vazby na tyto mRNA (Tao a Gao, 2015). Represe pomocí eIF4E2 a TTP je zřejmě mechanismus, kterým je regulována produkce TNF- α v makrofázích (Tao a Gao, 2015). Existuje studie, která pozorovala v translační represi zprostředkované TTP nutnost vazby DDX6 na GIGYF2 (Peter *et al.*, 2019).

O komplexu eIF4E2:GIGYF2:ZNF598 je v současnosti známo pouze to, že spolu proteiny tohoto komplexu mohou interagovat a že se ZNF598 účastní regulace translace mRNA pro proteiny spojené se zánětlivou odpovědí (Tollenaere *et al.*, 2019).

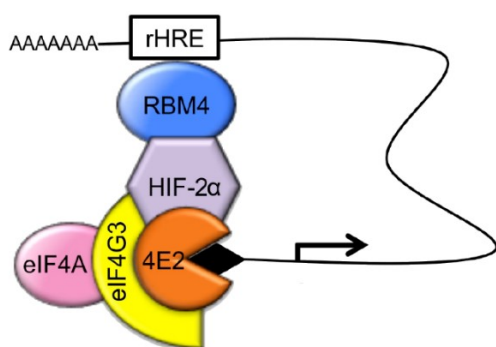
3.9 Translační iniciační komplexy obsahující eIF4E2

3.9.1 Hypoxický eIF4F

Dlouho se myslelo, že je eIF4E2 pouze represor translace, ukazuje se ale, že za specifických podmínek může být eIF4E2 součástí modifikovaného translačního iniciačního komplexu. Děje se tak v případě, že jsou buňky vystaveny hypoxii, tedy snížené dostupnosti kyslíku (Uniacke *et al.*, 2012). V hypoxii dochází mimo jiné k inhibici kinázy mTOR a v důsledku toho k aktivaci 4E-BP1 (Arsham *et al.*, 2003). Iniciací translace tedy nemůže probíhat kanonickým způsobem, pro který je eIF4E1

esenciální. Místo toho vzniká alternativní translační iniciační komplex nazývaný hypoxický eIF4F (eIF4F^H), ve kterém roli eIF4E1 přebírá eIF4E2.

Podle současného modelu má hypoxický translační iniciační komplex 5 podjednotek. Kromě eIF4E2 to jsou proteiny eIF4G3, eIF4A, HIF-2 α a RBM4 (Uniacke *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2016) (obr. 5). Překládaná mRNA je tímto komplexem navázána na dvou místech. Protein eIF4E2 interaguje s čepičkou na 5' konci mRNA a RBM4 se váže do rHRE sekvence v 3'UTR oblasti dané mRNA. Vazba RBM4 na mRNA je nezávislá na koncentraci kyslíku. Interakci eIF4E2 a RBM4 pak zprostředkovává HIF-2 α (Uniacke *et al.*, 2012). Přesná architektura hypoxického eIF4F, ani způsob jeho interakce s ribozomem v současnosti známy nejsou.



Obrázek 5. Schematické zobrazení hypoxického komplexu eIF4F. Upraveno podle Evagelou *et al.*, 2020.

Vazba eIF4E2 na čepičku je v eIF4F^H možná díky skutečnosti, že váže eIF4E2 čepičku v hypoxických podmínkách s vyšší afinitou než v podmínkách normoxických (Timpano a Uniacke, 2016). Přesný mechanismus, jakým se mění afinita eIF4E2 k čepičce, zatím znám není, zdá se ale, že v tom hraje roli protein HIF-2 α . Zvýšení jeho hladiny způsobené úbytkem DDX28 totiž zvyšuje afinitu eIF4E2 k čepičce (Evagelou *et al.*, 2020). Ke stabilizaci HIF-2 α dochází i při klesající dostupnosti kyslíku. Navázání HIF-2 α na eIF4E2 by pak mohlo v eIF4E2 indukovat konformační změny, které by usnadnily navázání čepičky. Hladina eIF4E2 zůstává v hypoxii stejná (Uniacke *et al.*, 2012; Timpano a Uniacke, 2016; Jeong *et al.*, 2019). Existuje ale i studie, která pozorovala mírné zvýšení hladiny eIF4E2 v hypoxii (Yi *et al.*, 2013).

To, že má buňka přinejmenším dva translační iniciační komplexy, z nichž každý má preferenci pro jinou množinu mRNA, umožňuje buňce syntetizovat odlišný proteom podle toho, který z komplexů je v danou chvíli aktivní. Teoreticky lze tedy inhibicí jednoho proteinového komplexu změnit celý translatom, a to v poměrně krátkém časovém horizontu. Není překvapující, že eIF4F^H zprostředkovává translaci zejména mRNA pro proteiny zúčastněné v adaptaci buňky na nedostatek kyslíku, sám je přitom součástí této adaptace. Není také bez zajímavosti, že je hypoxický proteom stejný i při inhibici transkripce, regulace tedy opravdu probíhá až na úrovni iniciace translace (Ho *et al.*, 2016).

Hranice mezi iniciací kanonickým a hypoxickým eIF4F ovšem není ostrá a oba komplexy mohou být aktivní i současně. Konkrétně se ukazuje, že v lidských epiteliálních buňkách renálního proximálního tubulu pěstovaných v kultuře je při koncentraci kyslíku alespoň 8 % hlavním translačním

iniciačním komplexem kanonický eIF4F, od 8 % do 1 % mohou translaci iniciovat oba komplexy a při koncentraci nižší než 1 % je aktivní eIF4F^H. Tyto změny v preferencích translačních iniciačních komplexů jsou reverzibilní. Konkrétní hodnoty hraniční koncentrace kyslíku jsou specifické pro každou buněčnou linii, například u buněk odvozených od kolorektálního karcinomu je hypoxický eIF4F výhradním iniciačním komplexem až do 3 % kyslíku a oba komplexy eIF4F společně iniciují translaci až do koncentrace kyslíku 12 % (Timpano a Uniacke, 2016). Vzhledem k tomu, že se buňky lidského těla za fyziologických podmínek nachází v prostředí s koncentrací kyslíku pouze 1-6 %, je možné, že probíhá iniciace translace hypoxickým eIF4F alespoň v některých lidských tkáních zcela běžně (Timpano a Uniacke, 2016; Stuart *et al.*, 2018).

Jak bylo výše zmíněno, každý komplex preferuje jinou skupinu mRNA. Kanonický eIF4F obsahující eIF4E1 váže preferenčně mRNA s 5' terminální oligopyrimidinovou sekvencí, zatímco hypoxický eIF4F obsahující eIF4E2 váže mRNA s rHRE sekvencí (Thoreen *et al.*, 2012; Uniacke *et al.*, 2012). Tato skutečnost přispívá k tomu, že jsou mRNA v různých podmínkách translatovány s různou účinností. Na základě toho lze mRNA rozdělit do tří skupin. První skupina mRNA je účinně translatována v normoxii a špatně v hypoxii, mRNA druhé skupiny jsou překládány nezávisle na dostupnosti kyslíku a mRNA patřící do třetí skupiny jsou účinně translatovány v hypoxii a neúčinně v normoxii (Ho *et al.*, 2016). Do třetí skupiny patří například mRNA pro EGFR, IGF1R nebo PDGFRA (Uniacke *et al.*, 2012).

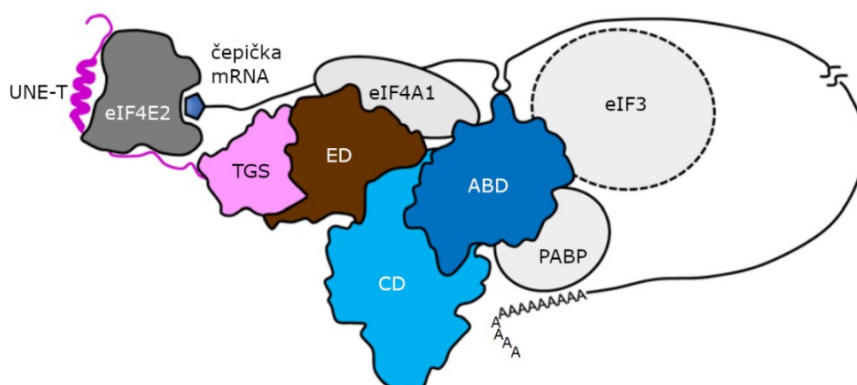
Všechna tato zjištění mají důležité implikace pro léčbu nádorů, neboť se v nich často nachází rozsáhlé hypoxické oblasti. Ve sféroidech tvoří hypoxická oblast až 80-90 % celého útvaru. V této oblasti je stejně jako v buněčných kulturách kanonická translace inhibována a je místo toho iniciována hypoxickým eIF4F (Uniacke *et al.*, 2014). To dělá z eIF4E2 potenciální cíl protinádorové léčby.

Inhibice eIF4E2 pomocí shRNA vede u rakovinných buněk v hypoxii ke snížení viability a schopnosti proliferovat (Uniacke *et al.*, 2014). Také schopnost migrace a invaze je inhibicí eIF4E2 v rakovinných buňkách snížena (Kelly *et al.*, 2018). V neposlední řadě tvoří buňky po aplikaci shRNA proti eIF4E2 menší a špatně zformované sferoidy (Uniacke *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2018). To je zřejmě alespoň z části zapříčiněno snížením exprese CDH-22, jehož mRNA je rozpoznávána eIF4E2 (Kelly *et al.*, 2018). Také tumory vzniklé injekcí rakovinných buněk do myši zmenšují po inhibici eIF4E2 svůj objem. Nevýhodou cílení léčby na eIF4E2 je ovšem skutečnost, že při normoxických podmínkách jsou rakovinné buňky dobře viabilní i s inhibovaným eIF4E2 a snížení schopnosti proliferace po inhibici eIF4E2 v hypoxii se týká i netransformovaných buněk (Uniacke *et al.*, 2014).

3.9.2 Translační iniciační komplex threonyl-tRNA syntetázy

Zdá se, že hypoxický eIF4F není jediným z alternativních eIF4F komplexů. Nedávno byla postulována i existence translačního iniciačního komplexu, ve kterém váže čepičku eIF4E2 a místo eIF4G1 plní strukturní roli v translačním iniciačním komplexu threonyl-tRNA syntetáza (ThrRS) (obr. 6). Pull-down experimenty ukázaly, že ThrRS interaguje kromě eIF4E2 i s eIF4A, s PABP a s podjednotkami B, D, E, F a L komplexu eIF3. ThrRS má tedy stejné interakční partnery jako eIF4G1 v komplexu eIF4F.

Teoreticky by tedy ThrRS mohl eIF4G1 v komplexu eIF4F zastoupit. Interakce ThrRS s eIF4A probíhá přes editační doménu ThrRS a je nezávislá na přítomnosti eIF4E2. Nezávisle na eIF4E2 interaguje ThrRS i s PABP, v tomto případě ovšem přes antikodon-vazebnou doménu.



Obrázek 6. Schéma translačního iniciačního komplexu obsahujícího ThrRS. Růžově, hnědě a modře jsou vyznačeny jednotlivé domény ThrRS, šedě ostatní translační iniciační faktory. UNE-T unikátní extendovaná oblast na N konci ThrRS, TGS doména pojmenována po TRS, GTPáze a SpoT, ED editační doména, CD katalytická doména, ABD antikodon vázající doména. Upraveno podle Jeong *et al.*, 2019.

Vazba eIF4E2 na ThrRS je přímá. Účastní se jí UNE-T oblast v N-terminální doméně ThrRS. Strukturně komplex velmi připomíná heterodimery eIF4E2 s 4E-BP1 nebo eIF4E2 s GIGYF2. Na rozdíl od GIGYF2 ale ThrRS neobsahuje nekanonické a pomocné sekvence, které by vazbu ThrRS na eIF4E2 stabilizovaly. S eIF4E1 ThrRS neinteraguje. Sekvence na eIF4E2 a ThrRS nutné pro vzájemnou interakci jsou konzervované u obratlovců, ne však u bezobratlých. V souladu s touto skutečností je fakt, že je koimunoprecipitace obou proteinů možná u *H. sapiens*, *M. musculus* a *D. rerio*, ne však u *D. melanogaster*, *C. elegans* a *S. pombe*.

To, že k interakci eIF4E2 a ThrRS dochází jen u obratlovců, zřejmě souvisí s funkcí jejich komplexu. ThrRS totiž dokáže vázat řadu mRNA kódujících proteiny, které se účastní vývoje cévního systému, nervové soustavy nebo skeletu, tedy proteiny s funkcemi specifickými pro obratlovce. Komplex obsahující eIF4E2 a ThrRS pozitivně moduluje translaci takovýchto mRNA a tím se podílí na správném vývoji organismu. Inhibice ThrRS nebo eIF4E2 vede k defektům v angiogenezi *in vitro* v systému lidských endoteliálních buněk z pupečnickové žíly i *in vivo* v embryích *D. rerio*.

Příkladem mRNA, se kterými ThrRS interaguje a jejichž expresi ovlivňuje, jsou mRNA pro VEGF a ANG. Místem vazby ThrRS na mRNA pro VEGF je antikodonu podobná smyčka na pozici -167 v 5'UTR oblasti. Na místě odpovídajícím antikodonu je v této smyčce na mRNA pro VEGF triplet UGU, který na tRNA kóduje právě threonin. Mutace v tomto tripletu jsou ThrRS tolerovány, pokud mutace nemění tripletem kódovanou aminokyselinu. Na mRNA pro ANG se antikodonu podobná smyčka interagující s ThrRS nachází na pozici -553.

V současnosti zůstává otázkou, zda se aktivace translace specifických mRNA ve vývoji obratlovců opravdu účastní celý alternativní iniciační komplex, nebo jestli stačí jen eIF4E2 a ThrRS. Také

není zcela jasné, za jakých podmínek eIF4F obsahující ThrRS translaci iniciuje a jak je regulován. Vliv na celkovou translaci v buňce tento komplex za standardních podmínek nemá (Jeong *et al.*, 2019).

3.10 Další role eIF4E2

3.10.1 Regulace produkce ekdyzonu u *Drosophila melanogaster*

Protein d4EHP se neznámým mechanismem účastní syntézy ekdyzonu v larvách *D. melanogaster*. V případě, že v larvách d4EHP chybí, je produkce enzymů zúčastněných v biosyntéze ekdyzonu snižena, předohrudní žláza dorůstá u octomilek menších rozměrů a octomilky mají extrémně zpožděný vývoj, který se zastavuje ve stádiu L2 (Valzania *et al.*, 2016).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Experimentální model

Buněčná linie HEK293 Flp-In™ T-Rex™ s vloženým genem GFP-eIF4E2 (vloženo z plazmidu pCDNA5_FRT_TO_GFP-eIF4E2); v práci nazývaná linie HAF

4.1.2 Kmeny *Escherichia coli* používané pro produkci plazmidů

XL1-Blue: endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44F'[:Tn10 proAB+lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rK-mK+)

DH10B: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL(Str^R) nupG

DH5α: F⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1

DH5α One Shot® TOP10: F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

4.1.3 Primery pro PCR

název primeru	sekvence primeru (5'-3')
Rluc_qPCR_up1	TGATAACTGGTCCGCGAGTGGT
Rluc_qPCR_rev1	ACACCGCGCTACTGGCTCA
Rluc_qPCR_up2	TTGAGCCAGTAGCGCGGTG
Rluc_qPCR_rev2	CCCCAATCATGGCCGACAAAA
RenLuc_5_Seq	CTGCATGTTTTTCTGAATC
RenLuc_3_Seq	GAAGGTGCCAAGAAGTTT
4G_rev	CTATGTCCCGAGCCTCTTCC
T7_rev	GGCTAGCCTATAGTGAGTCGT
4E1_for	AAGCAAACCTGCGGCTGATCTC
4E1_rev	CATCTTCCCACATAGGCTCAATACC
pQE-F	CCCGAAAAGTGCCACCTG
4G3_cDNA_R	TATTCGCTCAGCCTCAGTG
4G3_RL_F	AATACGACTCACTATAGGCTAGCCACCATGTCCTGGAAGCCTACTGATA CTGAAGGTAAGAAGCAGTATGACAGGG*
4G3_RL_R	GCTCCCTCCGCCACCGCTCCCTCCGCCACCAGGTTGCAGGGCAGAGAAT CTGTTTAAACTGGAAG*
4G3_in_F	CTGGAAGCCTACTGATACTG
4G3_in_R	TGGTGTAAGTCTGGTCCTC

* tučně vyznačena část nasedající k plazmidu eIF4G1-NRL

4.1.4 Protilátky používané v metodě western blot

Primární protilátky:

název	původ	výrobce	kód	ředění
anti-GFP	myš	Santa Cruz	SC-9996	1:1000
anti-eIF4G1	myš	Santa Cruz	SC-373892	1:400
anti-eIF4G3	králík	Bethyl Laboratories	A301-768A	1:200

Sekundární protilátky:

název	výrobce	kód	ředění
Goat anti-mouse	Santa Cruz	SC-2005	1:1000
Goat anti-mouse	Gibco	13871-071	1:5000
Goat anti-rabbit	Santa Cruz	SC-2004	1:3000

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace buněčných linií

Buňky byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D6429, Sigma-Aldrich) s přidaným FBS do výsledné koncentrace 10 % při 37 °C v 21% O₂ a 5% CO₂. Buňky byly 2x týdně pasážovány v poměru 1:10.

Postup pasážování: od buněk bylo odebráno médium, buňky byly promyty nahřátým PBS (BE17-516F, Lonza™ BioWhittaker™) a bylo k nim přidáno 0,1 objemu trypsinu (2% trypsin a 2% EDTA v PBS). Buňky byly následně inkubovány v 37 °C dokud se neuvolnily ode dna. K buňkám bylo následně doplněno čerstvé médium nahřáté na 37 °C a 0,1 objemu buněk bylo přeneseno na novou misku k 0,9 objemu čerstvého média.

4.2.2 Elektroforéza

Elektroforéza probíhala v agarózovém gelu (koncentrace specifikována v kapitole Výsledky u jednotlivých experimentů) s ethidium bromidem ve výsledné koncentraci 1,5 %. Pokud není specifikováno jinak, probíhala při napětí 6,8 V/cm v TAE pufru (40 mM Tris; 20 mM kyselina octová; 1 mM EDTA-NaOH pH=8). Před nanesením bylo ke vzorkům přidáno 0,1 objemu 10x koncentrované brom-fenolové modři (400 mM bromfenolová modř; 50 mM Tris-HCl pH=7,5; 60% glycerol).

Používané markery molekulových hmotností: GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Scientific, REF SM0321, LOT 00711858) a GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific, #SM0311, Lot 00208884).

4.2.3 PCR

Složení reakce 1:

- příslušné množství DNA (specifikováno u jednotlivých experimentů)
- pufr pro Taq polymerázu (10 mM Tris-HCl pH=8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ (Roche))
- 0,2 mM dNTPs
- 0,4 μM primery (forward a reverse)
- 5 U Taq polymerázy (Fermentas)

Složení reakce 2:

- příslušné množství DNA (specifikováno u jednotlivých experimentů)
 - cDNA odvozená z buněčné linie HEK293 Flp-InTM T-RexTM pomocí reverzní transkriptázy RevertAidTM (ThermoFisher Scientific) a oligo(T)
- 1x PFU pufr (10x PFU: 200 mM Tris-HCl pH=8,8; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 100 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 1% Triton X-100)
- 1,5 mM MgSO₄
- 0,2 mM dNTPs
- 0,4 μM primery (forward a reverse)
- 2 U PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)

Program PCR_1:

95 °C	3 min	
94 °C	30 s	30 x
58,5 °C	30 s	
72 °C	25 s	
72 °C	5 min	

Program PCR_2:

95 °C	3 min	
95 °C	20 s	5 x
58 °C	30 s	
72 °C	3 min	
95 °C	20 s	30x
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	

4.2.4 Elektroporace

Pokud není uvedeno jinak, byl 1 μ l roztoku plazmidu vnesen do 60 μ l kompetentních buněk *E. coli* příslušného kmene. Elektroporace proběhla v 2 mm kyvetě při 2 500 V, 25 μ F a 200 Ω . Buňky byly následně inkubovány 60 min při 37 °C v 1 ml 2xTYA média (1,6% pepton; 1% kvasničný autolyzát; 0,5% NaCl) a vysety na misky s 2xTYA médiem (2xTY médium + 2% agar) a s ampicilinem v koncentraci 100 μ g/ml. Následně byly buňky inkubovány přes noc při 37 °C. Pro izolaci minipreparací byly vybrané kolonie přečárkovány na novou misku s ampicilinem (100 μ g/ml). Pro izolaci plazmidové DNA midipreparací byly vybrané kolonie přeneseny do 50 ml tekutého 2xTYA média s ampicilinem (100 μ g/ml).

4.2.5 „Minipreparace“ – izolace plazmidové DNA z *E. coli*

Narostlé buňky *E. coli* byly z misky odebrány párátkem a resuspendovány ve 400 μ l STET pufru (10% sacharóza; 50 mM Tris-HCl pH=8; 50 mM EDTA-NaOH pH=8; 1% Triton X-100) s 5 μ l 5% lysozymu (Serva). Následně byl roztok krátce zvortexován a inkubován 2-5 min při 95 °C. Po vychladnutí při laboratorní teplotě byl vzorek centrifugován (16 000x g, 5-10 min), k supernatantu byl přidán 1 objem isopropanolu, vzorek byl zvortexován a inkubován min 30 min v -20 °C. Poté byl vzorek znovu centrifugován (16 000x g, 15 min), pelet promyt 1 ml 70% ethanolu a nechán vyschnout v 37 °C. Suchý pelet byl resuspendován v 40 μ l TE pufru (10 mM Tris-HCl pH=8; 1 mM EDTA-NaOH, pH=8).

4.2.6 „Midipreparace“ – izolace plazmidové DNA z *E. coli*

50 ml kultury *E. coli* v tekutém médiu bylo zcentrifugováno (400x g, 10 min). Pelet byl resuspendován v 2 ml TEG roztoku (25 mM Tris-HCl, pH=8; 10 mM EDTA-NaOH pH=8; 25 mM glukóza). Vzorek byl důkladně zvortexován, následně k němu byly přidány 4 ml roztoku II (2 M NaOH, 1% SDS), vzorek byl opatrně promíchán a inkubován 5 min při laboratorní teplotě. Poté byly přidány 3 ml roztoku 3 M octanu draselného, vzorek byl opatrně promíchán a inkubován 20 min na ledu. V průběhu inkubace byl vzorek několikrát znovu promíchán. Po inkubaci byl vzorek centrifugován (430x g, 20-30 min, 4 °C) a přefiltrován přes dvojitou gázu. K supernatantu bylo přidáno 0,7 objemu isopropanolu, vzorek byl zvortexován a inkubován min 10 min v -20 °C. Následně byl vzorek centrifugován (430x g, 20-30 min, 4 °C) a pelet byl promyt 3 ml 70% ethanolu. Sediment nechán vyschnout při 37 °C. Suchý sediment byl resuspendován v 400 μ l TE pufru (10 mM Tris-HCl pH=8; 1 mM EDTA-NaOH, pH=8) a byl inkubován s 10 μ l TRN (110 mg/ml ribonukleáza A; 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,045 mM NaCl) 60 min při laboratorní teplotě. Následně byl přidán 1 objem fenolu, vzorek byl zvortexován a zcentrifugován (16 000x g, 5 min) a horní fáze byla odebrána do nové zkumavky. Promytí bylo zopakováno s 0,5 objemu fenolu a 0,5 objemu chloroformu tolikrát, aby zmizela mezifáze. Poslední promytí bylo provedeno 1 objemem chloroformu. K odebrané horní fázi bylo přidáno 0,1 objemu 3 M octanu draselného a 2,5 objemu 96% ethanolu a vzorek byl inkubován přes noc v -20 °C. Po inkubaci byl vzorek centrifugován (16 000x g, 20 min). Sediment byl promyt 1 ml 70% ethanolu a ponechán vyschnout při laboratorní

teplotě. Suchý pelet byl resuspendován v 200 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl pH=8; 1 mM EDTA-NaOH, pH=8).

4.2.7 Izolace DNA z agarózového gelu

K izolaci byla použita souprava FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen, FAGCK001-1). Byl dodržen postup doporučený výrobcem.

4.2.8 Western blot

4.2.8.1 Detekce GFP

Pokud není uvedeno jinak, bylo ke vzorkům přidáno 0,5 objemu 6x nanášecího pufru (53,8% 4x Tris-HCl/SDS pH=6,8; 38,5% glycerol; 7,6% β-merkptoethanol; 270 mM SDS; 0,57 mM bromfenolová modř). Následně byly vzorky inkubovány min 5 min v 98 °C. Nanáška činila 20 µl. Proteinová elektroforéza probíhala v 12% polyakrylamidovém gelu v 1xSDS pufru (5xSDS pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS) při napětí 12,5 V/cm. Jako standard molekulových hmotností byl používán Blue Protein Ladder (CEB-P-0110-250, Biosystems). Poté byl gel inkubován min 30 min v blotovacím pufru (20% methanol; 0,29% glycin; 0,58% Tris; 0,037% SDS). PVDF membrána (Biorad) byla namočená na cca 7-12 s do methanolu a také promývána min 30 min v blotovacím pufru. Přenos proteinů na membránu probíhal 80 min při 100 V. Následně byla membrána inkubována min 30 min v blokovacím roztoku (5% Sunar; 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) a poté zatavena do fólie v 1 ml blokovacího roztoku s primární protilátkou. Takto byla inkubována přes noc při 4 °C na otočném zrcadle. Gel byl promýván min 30 min ve fixačním roztoku (25% isopropanol; 10% kyselina octová) a následně inkubován přes noc v roztoku Coomassie (10% kyselina octová; 0,006% Coomassie Brilliant Blue G250).

Druhý den byla membrána promyta 3x po 10 min v promývacím roztoku (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) a inkubována min 30 min v blokovacím roztoku. Následně byla zatavena do fólie v 1 ml blokovacího roztoku se sekundární protilátkou a inkubována min 90 min na otočném zrcadle ve 4 °C. Po skončení inkubace byla membrána promyta 3x po 10 min v promývacím roztoku přenesena na folii, pokapána chemiluminiscenčním roztokem (100 mM Tris-HCl pH=8,5; 0,009% H₂O₂; 0,22% kyselina p-kumarová; 0,5% luminol) a vyfocena.

4.2.8.2 Detekce eIF4E1 a eIF4G3

Pro detekci eIF4G1 a eIF4G3 byla koncentrace polyakrylamidového gelu snížena na 8 % a koncentrace methanolu v blotovacím pufru snížena na 12 %.

4.2.9 GFP-Trap

4.2.9.1 Ověření interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G

Buňky linie HAF byly indukovány 48 h před samotným experimentem tetracyklinem do výsledné koncentrace 1 µg/ml. Pro experiment byly použity konfluentní buňky na 2 miskách o průměru 10 cm. Z misek bylo odsáto médium a buňky byly promyty PBS nahřátým na 37 °C. Poté byly misky přeneseny na led. Na každou misku bylo nanášeno 300 µl lyzačního pufru L3 (10 mM Tris-HCl pH=7,5;

150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,5 % NP-40; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru). Buňky byly následně seškrabány a přeneseny do zkumavky. Buňky byly ponechány 15 min na ledu, v průběhu několikrát promíchány. Poté byly buňky sonikovány na ledu (1 min, 50% amplituda, 5 s on, 15 s off). Následně byl lyzát centrifugován (22 000x g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a znovu centrifugován (22 000x g, 10 min, 4 °C).

GFP-Trap kuličky (GFP-Trap®_A, Chromotek) byly mezitím resuspendovány v zásobním roztoku. 25 µl kuliček bylo odebráno a centrifugováno (2 500x g, 2 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn. Následně byly kuličky promyty 3x 500 µl předchlazeného pufru W (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA).

50 µl lyzátu bylo odebráno pro pozdější analýzu pomocí western blotu a zbytek lyzátu byl přenesen k promytým kuličkám a inkubován 60 min na otočném zařízení v 4 °C. Po inkubaci byl vzorek centrifugován (2 500x g, 2 min, 4 °C). 50 µl supernatantu bylo odebráno pro pozdější analýzu pomocí western blotu, zbytek supernatantu byl odstraněn. Pelet byl resuspendován v 1 ml předchlazeného pufru W, inkubován 5 min na otočném zařízení v 4 °C a centrifugován (2 500x g, 2 min, 4 °C). 50 µl supernatantu bylo odebráno pro pozdější analýzu pomocí western blotu. Stejným způsobem bylo promytí pufrem W zopakováno 3x. Následně byl ke kuličkám doplněn 1 ml pufru W a vše bylo přeneseno do nové zkumavky. Vzorek byl centrifugován (2 500x g, 2 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a kuličky byly analyzovány pomocí western blotu.

4.2.9.2 GFP-Trap s frakcemi z gelové permeační chromatografie pro hmotnostní spektrometrii

Vždy k 5 µl GFP-Trap kuliček (GFP-Trap®_A, Chromotek) bylo přidáno buď 500 µl frakce 9 + 500 µl frakce 10, nebo 500 µl frakce 11 + 500 µl frakce 12, nebo 800 µl frakce 16, nebo 800 µl frakce 17, nebo 800 µl frakce 18, nebo 500 µl frakce 22 + 500 µl frakce 23. Po posledním promytí pufrem W byl od kuliček odebrán supernatant a samotné kuličky byly odeslány do Servisní laboratoře hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké fakulty k analýze. Vše ostatní proběhlo stejně jako při testování interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G (kap. 4.2.10.1).

4.2.9.3 GFP-Trap ověřující účinnost protilátky produkované v laboratoři

Pro prvotní experiment byly použity 4 misky o průměru 10 cm. Všechny byly lyzovány ve stejných 300 µl pufru L3 (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,5% NP-40; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru). K 5 µl kuliček bylo přidáno 450 µl buněčného lyzátu. Vše ostatní proběhlo stejně jako při testování interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G (kap. 4.2.10.1).

Pro testování kapacity kuliček byly použity 2 misky o průměru 10 cm. Obě byly lyzovány ve stejných 300 µl pufru L3. K 5 µl kuliček bylo přidáno 100 µl, 50 µl nebo 20 µl buněčného lyzátu. Vše ostatní proběhlo stejně jako při testování interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G (kap. 4.2.10.1).

4.2.10 Příprava buněčných lyzátů

Buňky linie HAF byly indukovány 48 h před samotným experimentem tetracyklinem do výsledné koncentrace 1 µg/ml. Pro experiment byly použity konfluentní buňky na miskách o průměru

10 cm. Z misek bylo odsáto médium a buňky byly promyty PBS nahřátým na 37 °C. Poté byly misky přeneseny na led. Na miskou bylo nanášeno 300 µl lyzačního pufru L1 (20 mM Tris-HCl pH=7,6; 5% glycerol; 0,5% NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru) nebo L2 (20 mM HEPES-KOH pH=7,6; 5% glycerol; 0,5% NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru). Buňky byly následně seškrabány a přeneseny na další miskou. Z té byly opět buňky seškrabány a přeneseny na další miskou. Z poslední misky byl lyzát přenesen do zkumavky a zamražen v -80 °C.

4.2.11 Chromatografie na aniontoměničích – pilotní experiment

2 g chromatografického média QAE Sephadex® A-50 byly ponechány v 30 ml ddH₂O 2 dny při laboratorní teplotě, aby nabobtnaly. Všechna další práce probíhala při 4 °C. Chromatografická kolonka byla naplněna nabobtnaným médiem do objemu 1 ml. Následně byla promyta 10 objemy ddH₂O ve 3 krocích. Poté byla kolonka promyta 10 objemy 1 M KCl v pufru A (20 mM Tris-HCl pH=7,2; 10% glycerol) a následně 20 objemy 50 mM KCl v pufru A.

Buněčný lyzát v pufru L1 (20 mM Tris-HCl pH=7,6; 5% glycerol; 0,5% NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru) byl mezitím rozmražen na ledu a zcentrifugován (20 000x g, 15 min, 4 °C). 200 µl supernatantu bylo nanášeno na kolonku. To, co se nenavázalo, bylo zachyceno do zkumavky. Následně byl vzorek eluován 6x 200 µl 50 mM KCl v pufru A, 6x 100 mM KCl v pufru A, 6x 250 mM KCl v pufru A, 6x 500 mM KCl v pufru A, 6x 750 mM KCl v pufru A a 6x 1 M KCl v pufru A. Nakonec byla kolonka promyta 20 objemy 1 M KCl v pufru A a 20 objemy ddH₂O.

4.2.12 Chromatografie na kationtoměničích – pilotní experiment

3 g chromatografického média SP-Sephadex® C-25 byly ponechány v 30 ml ddH₂O po 2 dny při laboratorní teplotě, aby nabobtnaly. Všechna další práce probíhala při 4 °C. Chromatografická kolonka byla naplněna nabobtnaným médiem do objemu 1 ml. Následně byla promyta 10 objemy ddH₂O ve 3 krocích. Poté byla kolonka promyta 10 objemy 1 M KCl v pufru B (20 mM HEPES-KOH pH=7,2; 10% glycerol) a následně 20 objemy 50 mM KCl v pufru B.

Buněčný lyzát v pufru L2 (20 mM HEPES-KOH pH=7,6; 5% glycerol; 0,5% NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru) byl mezitím rozmražen na ledu a zcentrifugován (20 000x g, 15 min, 4 °C). 200 µl supernatantu bylo nanášeno na kolonku. To, co se nenavázalo, bylo zachyceno do zkumavky. Následně byl vzorek eluován 8x 200 µl 50 mM KCl v pufru B, 9x 100 mM KCl v pufru B, 9x 250 mM KCl v pufru B, 9x 500 mM KCl v pufru B, 9x 750 mM KCl v pufru B a 9x 1 M KCl v pufru B. Nakonec byla kolonka promyta 20 objemy 1 M KCl v pufru B a 20 objemy ddH₂O.

4.2.13 Chromatografie hydrofobních interakcí – pilotní experiment

1 g chromatografického média Sephadex® LH-20 byl ponechán v 5, 6 ml ddH₂O 3 h při laboratorní teplotě, aby nabobtnal. Všechna další práce probíhala při 4 °C. Chromatografická kolonka byla

naplněna nabobtnaným médiem do objemu 1 ml. Následně byla promyta 10 objemy ddH₂O ve 3 krocích. Poté byla kolonka promyta 10 objemy 1,5 M (NH₄)₂SO₄ v pufru A (20 mM Tris-HCl pH=7,2; 10% glycerol).

Buněčný lyzát v pufru L1 (20 mM Tris-HCl pH=7,6; 5% glycerol; 0,5 % NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru) byl mezitím rozmražen na ledu a zcentrifugován (20 000x g, 15 min, 4 °C). K supernatantu byl přidán (NH₄)₂SO₄ do výsledné koncentrace 1,5 M a vzorek byl inkubován 60 min na ledu. Následně byl vzorek zcentrifugován, 200 µl supernatantu bylo nanášeno na kolonku a pelet byl uchován pro pozdější analýzu pomocí western blotu. To, co se nenavázalo na kolonku, bylo zachyceno do zkumavky. Následně byl vzorek eluován 9x 1 M (NH₄)₂SO₄ v pufru A, 9x 750 mM (NH₄)₂SO₄ v pufru A, 9x 500 mM (NH₄)₂SO₄ v pufru A, 9x 250 mM (NH₄)₂SO₄ v pufru A, 9x 50 mM (NH₄)₂SO₄ v pufru A a samotným pufrům A. Nakonec byla kolonka promyta 20 objemy ddH₂O.

4.2.14 Střednětlaká proteinová chromatografie na aniontoměniči

Kolonka MonoQ® 5/50 GL byla promyta 10 objemy 50 mM KCl v pufru A (20 mM Tris-HCl pH=7,2; 10% glycerol) a následně 10 objemy 1 M KCl v pufru A. Poté byla promývána znovu 50 mM KCl v pufru A, dokud měřené hodnoty absorbance neklesly k nule.

Buněčný lyzát v pufru L1 (20 mM Tris-HCl pH=7,6; 5% glycerol; 0,5% NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru) byl mezitím rozmražen na ledu a 2x zcentrifugován (20 000x g, 15 min, 4 °C). Necelých 300 µl supernatantu bylo nanášeno na kolonku. Prvních 7 frakcí o objemu 1 ml bylo eluováno 50 mM KCl v pufru A. Následně byla kolonka promývána 50 mM KCl v pufru A, dokud měřené hodnoty neklesly k nule. Od 8. frakce byly vzorky eluovány gradientem KCl v pufru A (50 mM – 1 M KCl). Frakce byly jímány po 1 ml. Průtok byl po celou dobu chromatografie 1 ml/min.

4.2.15 Střednětlaká proteinová chromatografie na kationtoměniči

Kolonka HiTrap® SP HP o objemu 1 ml byla promyta 10 objemy pufru B (20 mM HEPES-KOH pH=7,2; 10% glycerol) a následně 10 objemy 1 M KCl v pufru B. Poté byla promývána znovu pufrům B, dokud měřené hodnoty absorbance neklesly k nule.

Buněčný lyzát v pufru L2 (20 mM HEPES-KOH pH=7,6; 5% glycerol; 0,5% NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru) byl mezitím rozmražen na ledu a 2x zcentrifugován (20 000x g, 15 min, 4 °C). Necelých 300 µl supernatantu bylo nanášeno na kolonku. Prvních 5 frakcí o objemu 0,5 ml bylo eluováno pufrům B. Následně byla kolonka promývána pufrům B, dokud měřené hodnoty neklesly k nule. Od 6. frakce byly vzorky eluovány gradientem KCl v pufru B (0 M – 1 M KCl). Frakce byly jímány po 1 ml. Průtok byl po celou dobu chromatografie 1 ml/min.

4.2.16 Střednětlaká gelová permeační chromatografie

Kolonka Superdex® 200 10/300 GL byla promyta 10 objemy 120 mM KCl v pufru B (20 mM HEPES-KOH pH=7,2; 10% glycerol). Buněčný lyzát v pufru L2 (20 mM HEPES-KOH pH=7,6; 5% glycerol; 0,5% NP-40; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 1/2 tablety cOmplete™ Mini rozpuštěné v 750 µl zásobního roztoku na 5 ml pufru) byl mezitím rozmražen na ledu a 2x zcentrifugován (20 000x g, 15 min, 4 °C). Necelých 300 µl supernatantu bylo nanášeno na kolonku. Frakce o objemu 1 ml byly eluovány 120 mM KCl v pufru B. Průtok byl po celou dobu chromatografie 0,6 ml/min.

4.2.17 Odsolování proteinů srážením s TCA

Ke vzorku byla přidána kyselina trichloroctová (TCA) do výsledné koncentrace 20 %. Vzorek byl inkubován na ledu 60 min v případě lyzátu a přes noc v případě frakcí z chromatografie. Po inkubaci byl vzorek zcentrifugován (20 000x g, 10 min, 4 °C) a promyt 1-3x 200 µl předchlazeného 100% acetonu. Pelet byl ponechán při laboratorní teplotě, aby vyschnul, a následně byl resuspendován v 20 µl 6x nanášecího pufru (53,8 % 4x Tris-HCl/SDS pH=6,8; 38,5% glycerol; 7,6% β-merkapt ethanol; 270 mM SDS; 0,57 mM bromfenolová modř).

4.2.18 Sekvence

Složení reakce:

- 3 ng/100 bp plazmidové DNA nebo 5 ng/100 bp fragmentu 4G3_fr4
- 5 pM primer
- celkový objem reakce 8 µl

Reakce odeslána do Servisního pracoviště Přírodovědecké fakulty pro sekvenaci. Výsledky byly zpracovány pomocí nástroje Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.19 Analýza výsledků hmotnostní spektrometrie

4.2.19.1 Neseparovaný lyzát

Data z hmotnostní spektrometrie neseparovaného lyzátu byla zkopírována do 4 souborů. V souboru data_One_NaN byl ve všech případech, kdy nebyl protein jednoznačně identifikován a pro konkrétní skupinu hodnot intenzity proteinu ve vzorcích bylo navrženo více zástupců, ponechán jen jeden náhodně vybraný protein. Pojmy NaN v tomto souboru zůstaly. V souboru data_One_18 byla také ponechána u nejednoznačných identifikací jen jedna varianta. Pojem NaN byl ve všech případech nahrazen číslem 18. V souboru data_All_NaN byly ponechány všechny proteiny, které teoreticky mohly být identifikovány. Kvůli další práci byly rozkopírovány na nové řádky. Hodnota NaN v tomto souboru zůstala. V souboru data_All_NaN byly v seznamu ponechány všechny proteiny, které teoreticky mohly být identifikovány, a NaN bylo nahrazeno číslem 18.

U všech nalezených genů byl z hodnot intenzit v HAF buňkách a v kontrole spočítán medián a z obou mediánů pak odhad nabohacení. Jako hranici signifikantního nabohacení byla stanovena

hodnota 1 (hodnoty intenzity jsou ve tvaru \log_2 , hranice nabohacení je tedy 2x). Byly sestaveny 2 tabulky 10 nejvíce nabohacených proteinů v datech obsahujících NaN a v datech, kde bylo NaN nahrazeno 18.

Všechny 4 soubory byly bioinformaticky analyzovány pomocí nástrojů EnrichR 6.8 (Chen *et al.*, 2013; Kuleshov *et al.*, 2016), GOrilla (Eden *et al.*, 2007, 2009) a David (Huang *et al.*, 2009a, 2009b). Do všech nástrojů byl vložen seznam všech nabohacených proteinů seřazený podle nabohacení od nejvyšší hodnoty. Do nástrojů David a GOrilla byl kromě toho vložen i seznam všech nalezených proteinů jako pozadí. K hledání možných proteinových komplexů byla v rámci EnrichR využita data-báze CORUM, v rámci GOrilla ontologie Component a v rámci David GOTERM_CC_DIRECT v kategorii Gene_Ontology.

Z výsledného seznamu všech možných komplexů byly odstraněny jednoznačně chybné identifikace (např. komplexy vyskytující se u jiných organismů), příliš obecné pojmy s velkým počtem podjednotek (např. „cytoplazma“) a komplexy s p hodnotou větší než 0,05. Zbylé komplexy byly na základě studia literatury rozříděny podle buněčných procesů, kterých se účastní, a komplexy, které byly identifikovány alespoň pomocí dvou nástrojů byly podrobněji prozkoumány.

4.2.19.2 Vzorky z gelové permeační chromatografie

Data z hmotnostní spektrometrie byla rozdělena na soubory data_One a data_All stejně jako u dat ke vzorkům neseparovaného lyzátu (kap. 4.2.20.1). Pro každou frakci byl vytvořen seznam proteinů, které se v ní vyskytují. Pokud bylo u proteinu uvedeno NaN, byl považován za chybějící v daném vzorku.

Bioinformatický nástroj EnrichR byl využit stejně jako u dat ke vzorkům neseparovaného lyzátu. Vložen byl pro každou frakci seznam všech proteinů, které se v ní objevily. V nástroji GOrilla byl využit mód s jedním seznamem proteinů, opět byl vložen pro každou frakci seznam všech proteinů, které v ní byly nalezeny. Stejný seznam dat byl vložen i do nástroje David. Jako pozadí byl použit seznam všech proteinů u člověka, který jako pozadí nabízí přímo nástroj David. Samotné hledání proteinových komplexů a následné zpracování dat proběhlo stejně jako u dat neseparovaného lyzátu (kap. 4.2.20.1).

5 Výsledky

5.1 Hledání nových interakčních partnerů eIF4E2

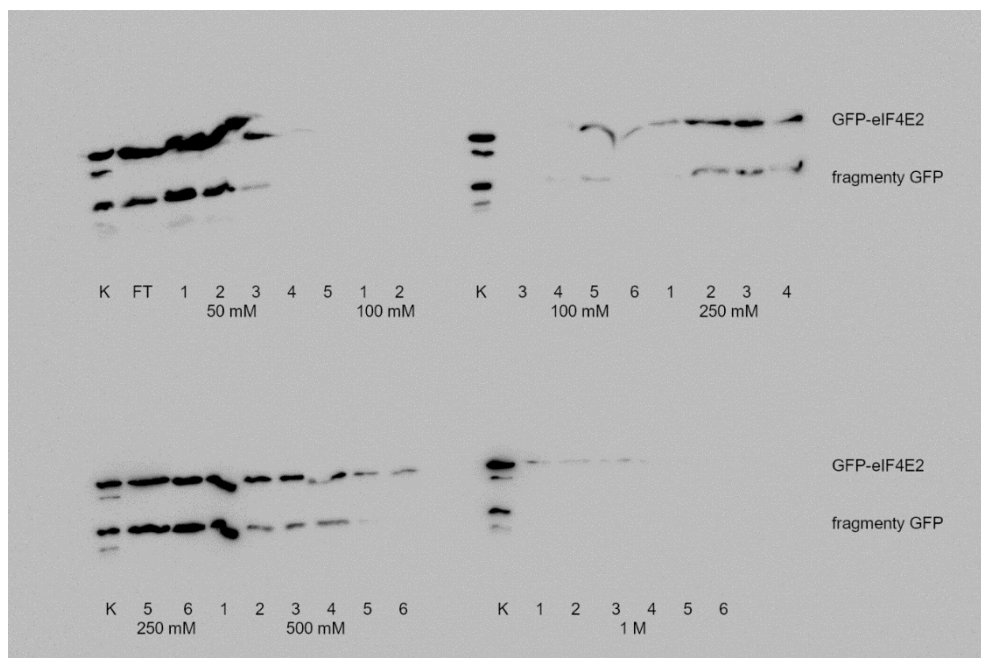
V literatuře jsou pro hledání interakčních partnerů eIF4E2 vesměs využívány metody založené na imunoprecipitaci. Nevýhoda tohoto přístupu je, že jsou všechny komplexy obsahující eIF4E2 purifikovány současně a může dojít ke ztrátě informace o méně abundantních komplexech. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli využít ortogonální přístup a před samotnou imunoprecipitací zařadit separaci buněčného lyzátu pomocí kapalinové chromatografie. Pro usnadnění a urychlení detekce přítomnosti eIF4E2 ve vzorku jsme pro všechny experimenty v této kapitole používali buněčnou linii HAF, což je interní označení pro buňky odvozené od linie HEK293, které produkují fúzní protein GFP-eIF4E2. Tento fúzní protein je v buňkách linie HAF pod kontrolou indukibilního tetracyklinového promotoru.

S izolací proteinových komplexů obsahujících GFP-eIF4E2 jsme neměli předchozí zkušenosti, proto jsme v první řadě provedli pilotní experimenty, jejichž cílem bylo podmínky pro izolaci proteinových komplexů obsahujících GFP-eIF4E2 optimalizovat. V těchto pilotních experimentech jsme se rozhodli otestovat chromatografii na aniontoměniči, chromatografii na kationtoměniči a chromatografii hydrofobních interakcí.

5.1.1 Chromatografie na aniontoměniči – pilotní experiment

Chromatografii jsme prováděli při 4 °C v plastové kolonce o objemu 1 ml na médiu QAE Sephadex® A50. Jako startovací pufr jsme použili pufr A (20 mM Tris-HCl pH=7,2; 10% glycerol), do kterého jsme navíc přidali KCl do výsledné koncentrace 50 mM. Nanášeli jsme 200 µl buněčného lyzátu v pufru L1 a zachytili to, co proteklo (FT). Následně jsme vzorky eluovali vždy 200 µl pufru A se zvyšující se koncentrací KCl. Sebrané frakce jsme analyzovali metodou western blot (obr. 7).

Za podmínek, které jsme použili, se část proteinových komplexů obsahujících GFP-eIF4E2 vůbec nezachytila na kolonku a protekla. Signifikantní množství GFP-eIF4E2 jsme pak detekovali hned v následujících frakcích eluovaných 50 mM KCl. Další signál jsme dostali až v posledních frakcích eluovaných při 100 mM KCl a zejména pak při eluci 250 mM KCl. Po zvýšení koncentrace KCl na 500 mM signál slábně a při eluci 1 M KCl už je signál velmi slabý. To, že jsme zachytili přítomnost GFP-eIF4E2 v různých frakcích eluovaných při různých podmínkách, může ukazovat, že se nám podařilo oddělit různé komplexy nebo skupiny komplexů, které se vážou na chromatografické médium s rozdílnou afinitou. To byl náš záměr, proto jsme v tomto směru pokračovali dále (viz kapitola 5.1.4).

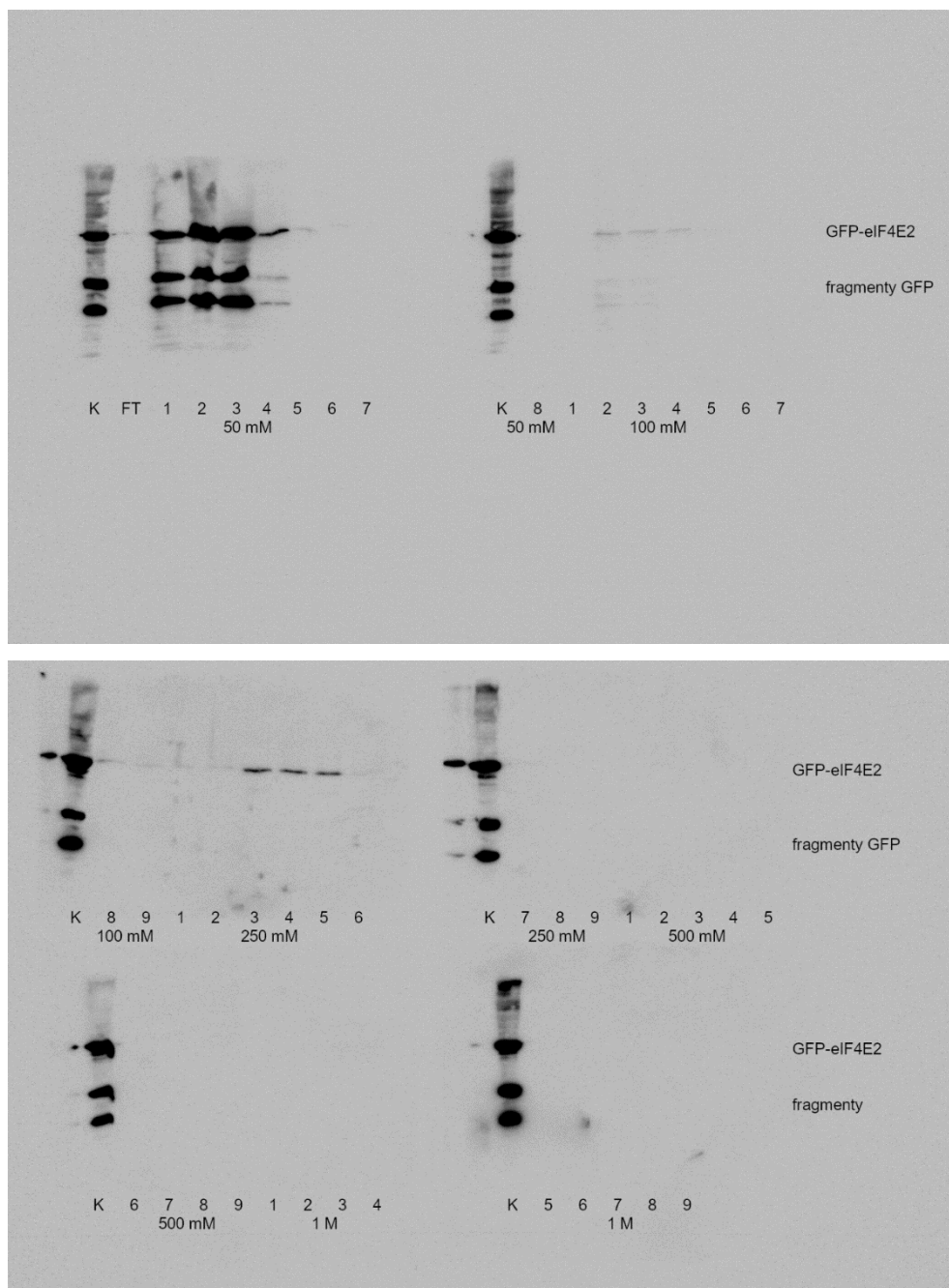


Obrázek 7. Analýza frakcí z chromatografie na aniontoměniči pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (5 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka SC-2005. K kontrola, FT to, co proteklo (flow-through), 1-6 čísla frakcí, 50 mM-1 M koncentrace KCl použité pro eluci.

5.1.2 Chromatografie na kationtoměniči – pilotní experiment

Pro chromatografii na kationtoměniči jsme použili 1 ml plastovou kolonku, kterou jsme předtím naplnili chromatografickým médiem SP-Sephadex® C-25. Před samotnou chromatografií jsme kolonku ekvilibrovali promytím 20 ml 50 mM KCl v pufru B (20 mM HEPES-KOH pH=7,2; 10% glycerol). Na kolonku jsme nanесли 200 μ l lyzátu v pufru L2 a zachytili to, co se nenavázalo. Následně jsme eluovali vzorky postupně se zvyšující koncentrací KCl v pufru B. Celá chromatografie probíhala při 4 °C. Sbírané frakce jsme analyzovali pomocí western blotu na přítomnost GFP-eIF4E2 (obr. 8).

Za použitých podmínek se všechen GFP-eIF4E2 navázal na kolonku a eluoval ve třech vlnách. První výrazný pík jsme pozorovali hned v prvních frakcích při eluci 50 mM KCl. Druhý slabší signál jsme dostali při eluci 100 mM KCl hned v počátečních frakcích po změně koncentrace KCl v elučním pufru. Třetí pík je patrný ve frakcích 3-5 při promývání 250 mM KCl. Chromatografií na kationtoměniči se nám tedy podařilo separovat GFP-eIF4E2 mezi tři píky. Vzhledem k pozitivnímu výsledku jsme pokračovali v separaci lyzátu chromatografií na kationtoměniči za použití střednětlaké proteinové chromatografie (viz kapitola 5.1.5).



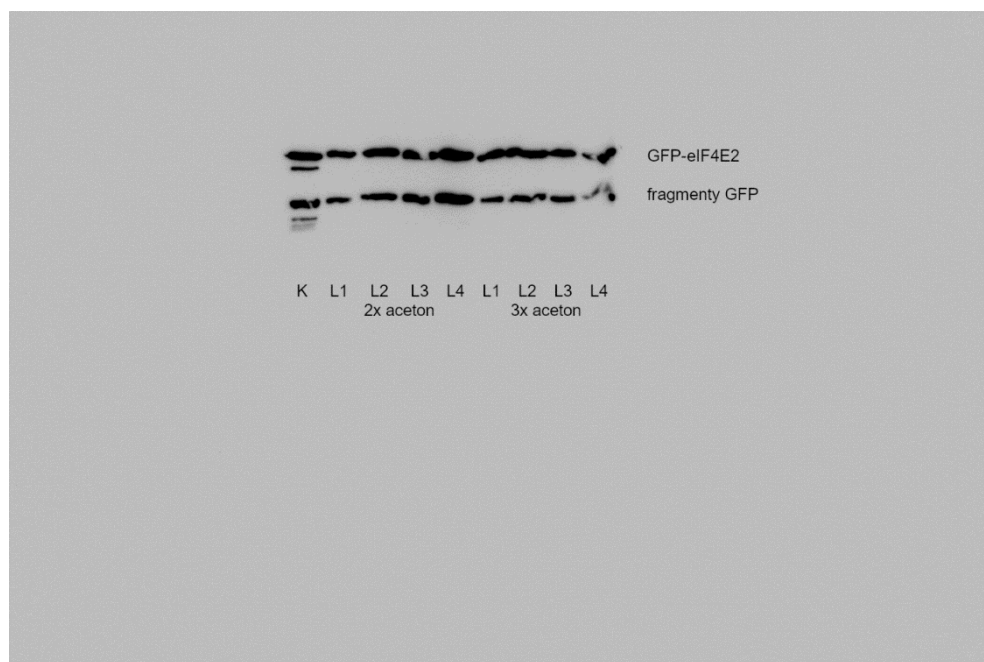
Obrázek 8. Analýza frakcí z chromatografie na kationtoměničích pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (5 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, FT to, co protéklo (flow-through), 1-9 čísla frakcí, 50 mM-1 M koncentrace KCl použité pro eluci.

5.1.2.1 Odsolování vzorků srážením s TCA

Vzhledem k tomu, že proteiny v přítomnosti SDS a draselných iontů precipitují, byla nanáška frakcí s vyšší koncentrací KCl technicky obtížná a mohlo teoreticky dojít ke ztrátě části vzorku. Abychom otestovali, že k tomu nedošlo, rozhodli jsme se vzorky obsahující KCl v koncentraci 250 mM a více odsolit srážením s kyselinou trichloroctovou (TCA).

V první řadě jsme na buněčném lyzátu ověřili, že nedochází během procesu odsolování ke ztrátě vzorku. Do čtyř šarží buněčného lyzátu jsme přidali KCl do koncentrace 1 M a vzorky inkubovali 60 min na ledu s 20% TCA. Následně jsme vzorky promyli buď 2x nebo 3x předchlazeným 100% acetonem.

Po posledním promytí jsme nechali pelet vyschnout při laboratorní teplotě a resuspendovali ho v 6x koncentrovaném nanášecím pufru pro western blot. Vzorky po odsolení v nanášecím pufru neprecipitovaly a šly snadno nanést na gel. Z výsledku western blotu pak není patrný žádný úbytek GFP-eIF4E2 v odsolených vzorcích oproti kontrole a není ani patrný rozdíl mezi tím, když byly vzorky acetonem promyty 2x a 3x (obr. 9).

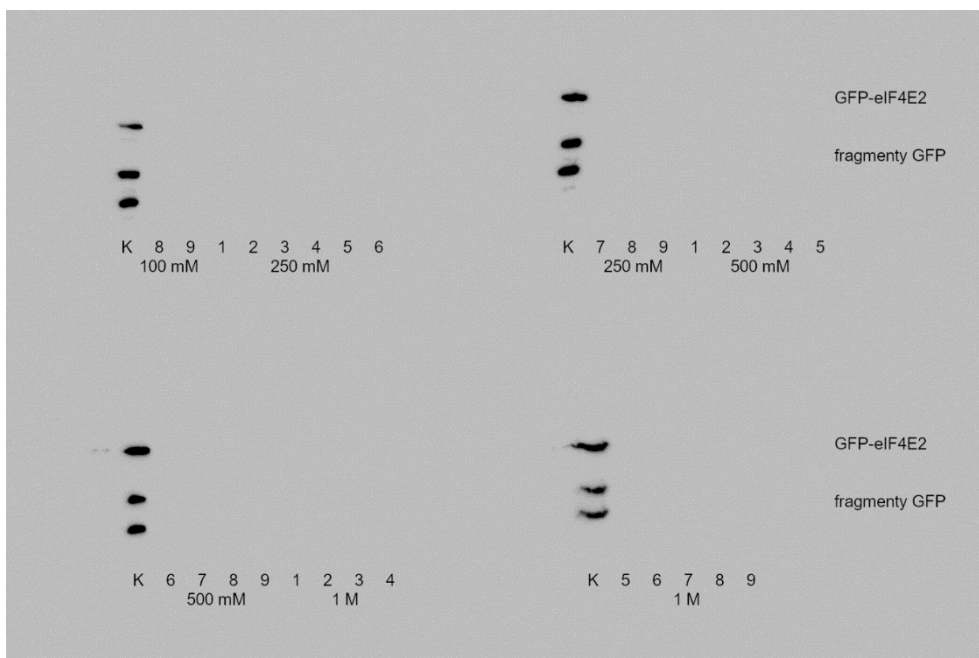


Obrázek 9. Test odsolování vzorků srážením trichloroocetovou kyselinou. Nanáška činila 5 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (5 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka SC-2005. L1-L4 různé šarže buněčného lyzátu.

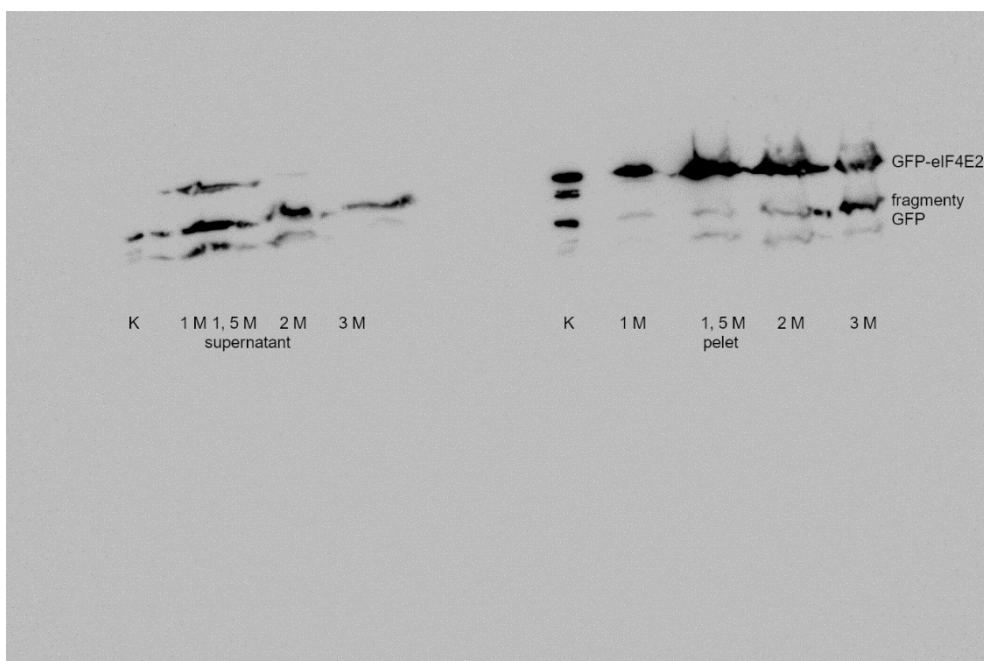
Po otestování účinnosti odsolování vzorků srážením s TCA jsme se rozhodli odsolit vzorky z kationtoměničové chromatografie, které byly eluovány KCl o koncentraci 250 mM a vyšší. 100 μ l frakce jsme inkubovali přes noc s 20% TCA ve 4 °C a následně 2x promyli předchlazeným 100% acetonem. Suchý pelet jsme resuspendovali ve 20 μ l nanášecího pufru a vše analyzovali metodou western blot (obr. 10). Oproti neodsoleným vzorkům jsme nepozorovali žádný signál navíc, naopak jsme tímto způsobem nezachytili pík ve frakcích 3-6 při eluci 250 mM KCl.

5.1.3 Chromatografie hydrofobních interakcí – pilotní experiment

Jelikož se v chromatografii hydrofobních interakcí k eluci proteinů používá síran amonný, který způsobuje precipitaci proteinů, testovali jsme před samotnou chromatografií, v jaké koncentraci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ještě zůstává GFP-eIF4E2 v supernatantu. Lyzát v pufru L1 jsme inkubovali v různých koncentracích $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ po dobu 60 min na ledu, následně zcentrifugovali a supernatant a pelet analyzovali zvlášť metodou western blot (obr. 11). GFP-eIF4E2 precipitoval při všech použitých koncentracích $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, do koncentrace 1,5 M ale zůstalo významné množství GFP-eIF4E2 i v supernatantu. Pro samotnou chromatografii jsme proto jako maximální koncentraci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stanovili 1,5 M.



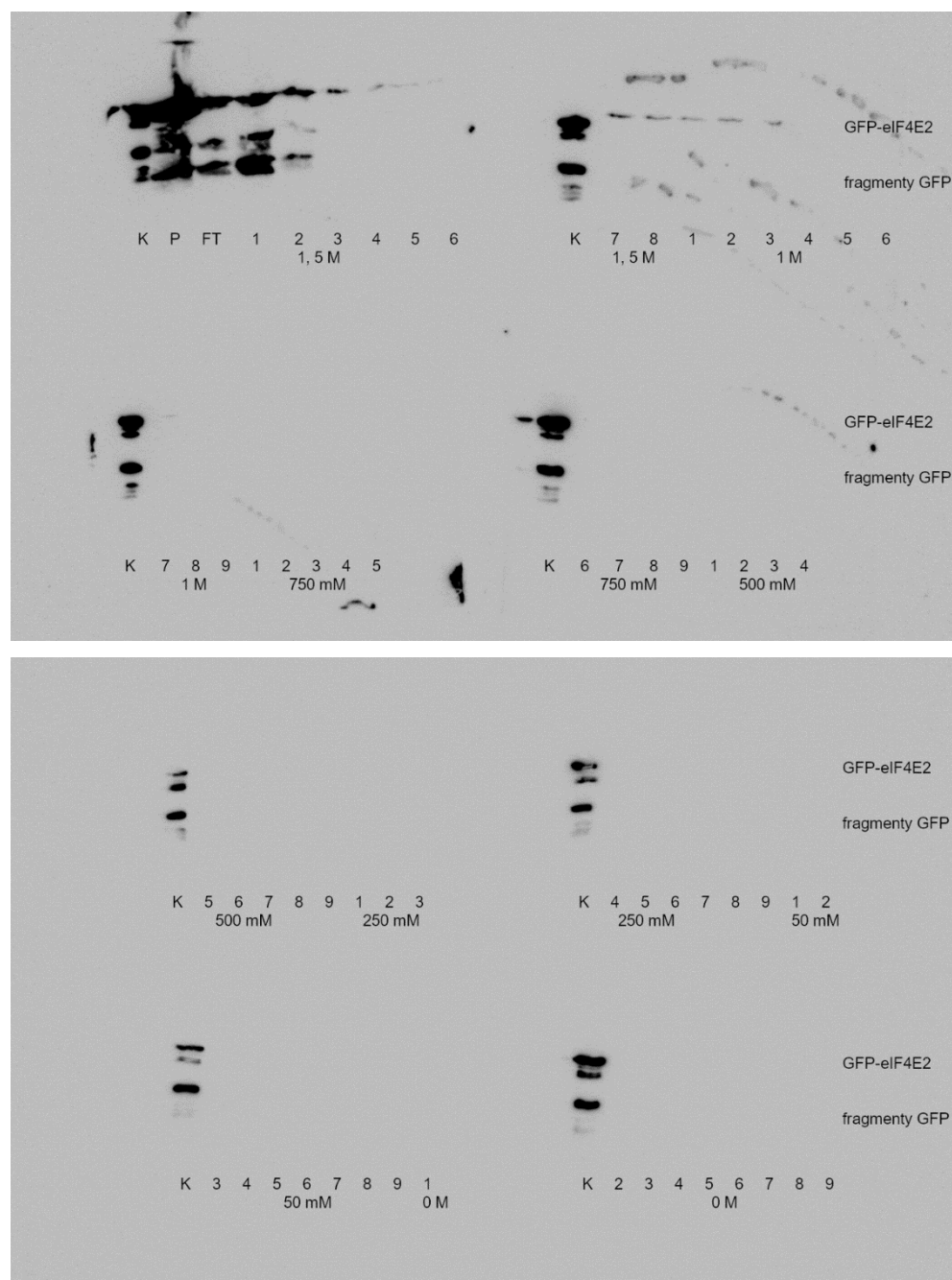
Obrázek 10. Analýza odsolených frakcí z chromatografie na kationtoměničích pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (5 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka SC-2005. K kontrola, 1-9 čísla frakcí, 250 mM-1 M koncentrace KCl použité pro eluci.



Obrázek 11. Analýza srážení proteinů síranem amonným pomocí western blotu. Pelet resuspendován v 20 μ l 6x nanášecího pufru. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola použit celobuněčný lyzát (5 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka SC-2005.

Chromatografii jsme provedli v 1 ml kolonce, kterou jsme předtím naplnili chromatografickým médiem Sephadex® LH-20. Před nanesením lyzátu jsme kolonku ekvilibrovali promytím 10 ml 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v pufru A. Lyzát v pufru L1 jsme před nanesením inkubovali 60 min na ledu s 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Po skončení inkubace jsme lyzát zcentrifugovali a 200 μ l supernatantu nanesli na kolonku. Pelet jsme zatím resuspendovali v 20 μ l 6x nanášecího pufru pro pozdější analýzu metodou western

blot. Frakce jsme eluovali postupně se snižující koncentrací $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v pufru A. K eluci jsme vždy použili 200 μl pufru. Sesbírané frakce jsme analyzovali pomocí metody western blot (obr. 12).



Obrázek 12. Analýza frakcí z chromatografie hydrofobních interakcí pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μl vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (5 μl). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, P pelet, FT to, co proteklo (flow-through), 1-9 čísla frakcí, 1,5 M-0 M koncentrace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ použitá pro eluci.

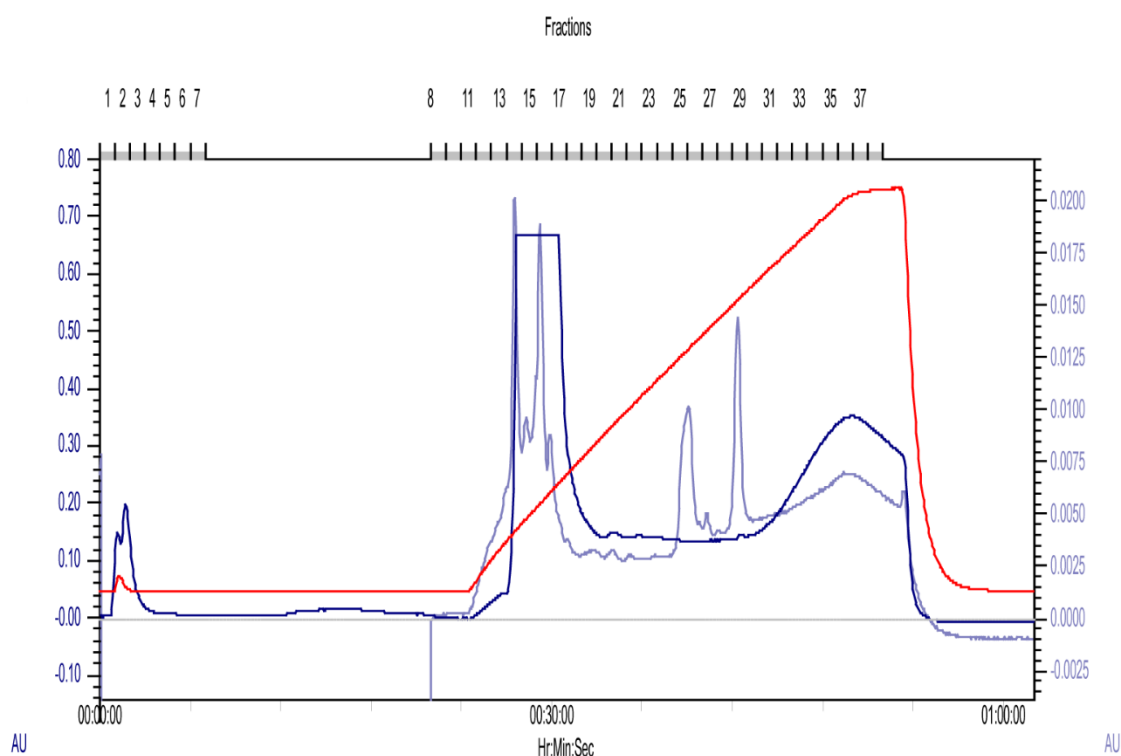
Velké množství GFP-eIF4E2 precipitovalo během inkubace s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do peletu. Významné množství GFP-eIF4E2 také proteklo kolonkou bez toho, aby s ní asociovalo. Komplexy obsahující protein GFP-eIF4E2, které se na kolonku navázaly, pak byly zachyceny zejména v počátečních frakcích při eluci 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Slabý signál jsme dostali také v prvních frakcích po snížení koncentrace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v elučním pufru na 1 M. V předchozích případech při použití iontoměničové chromatografie

se nám podařilo separovat komplexy GFP-eIF4E2 do více píků, v tomto směru jsme proto už dále nepokračovali.

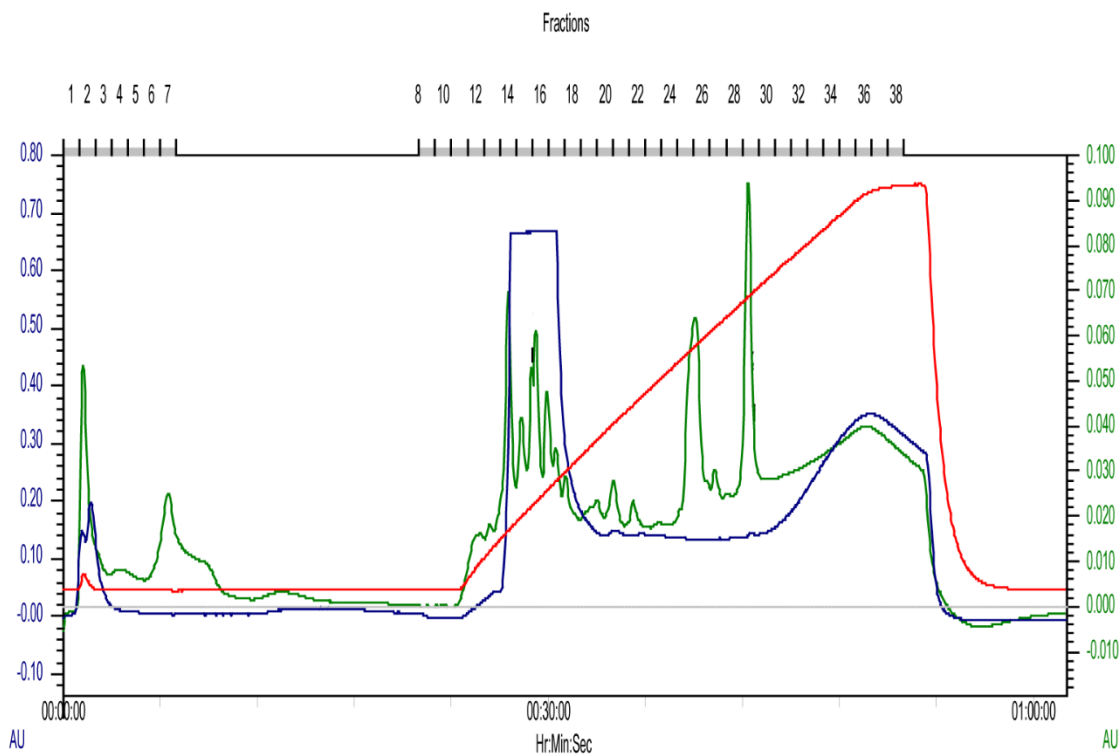
5.1.4 Střednětlaká proteinová chromatografie na aniontoměniči

Na pilotní chromatografii na aniontoměniči (kap 5.1.1) jsme navázali střednětlakou proteinovou chromatografií. Experiment probíhal při laboratorní teplotě. Použili jsme kolonku MonoQ® 5/50 GL, kterou jsme před nanáškou lyzátu ekvilibrovali na 20 mM KCl v pufru A. Nanesli jsme necelých 300 μ l lyzátu. Proteiny jsme eluovali gradientem zvyšující se koncentrace KCl v pufru A. V průběhu chromatografie jsme měřili intenzitu fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm) a absorbanci při 225 nm, 260 nm, 280 nm a 488 nm.

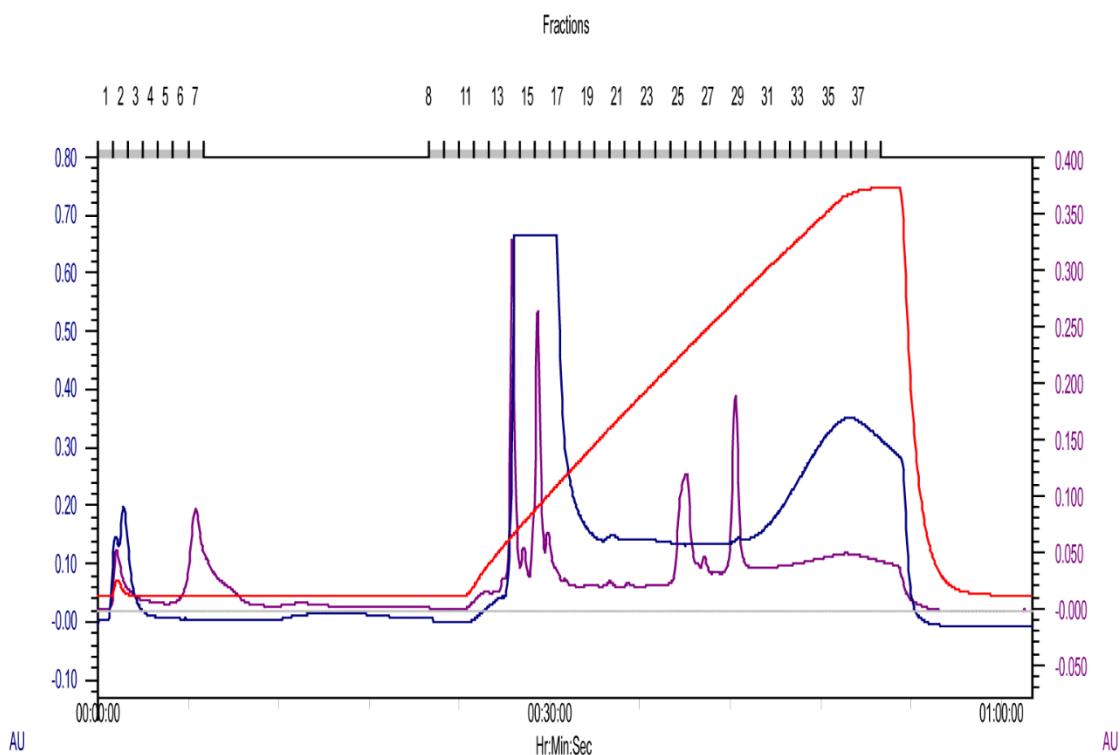
Křivka intenzity fluorescence má tři vrcholy. Jeden malý hned na začátku mezi frakcemi 1-3, jeden mezi frakcemi 13-17 a poslední mezi frakcemi 32-38 (obr. 13). V oblasti druhého a třetího vrcholu fluorescence lze pozorovat i nárůst absorbance při 488 nm (obr. 13) a při 280 nm (obr. 14). Ve frakcích 13-17 a 32-38 lze proto očekávat přítomnost GFP-eIF4E2. Mezi frakcemi 24-28 se nachází další vrchol absorbance při 280 nm (obr. 14), 488 nm (obr. 13) a 260 nm (obr. 15). U intenzity fluorescence zvýšení signálu v těchto frakcích nevidíme. Mohlo by se zde nacházet GFP ve špatně složené formě, které není schopno fluorescence. Vzhledem k nárůstu absorbance při 260 nm by se v oblasti frakcí 24-28 mohly vyskytovat proteiny navázané na nukleové kyseliny (obr. 15).



Obrázek 13. Střednětlaká chromatografie na aniontoměniči. Použita byla kolonka MonoQ® 5/50 GL o objemu 1 ml. Prvních 7 frakcí bylo eluováno 20 mM KCl v pufru A, frakce 8-35 byly eluovány gradientem koncentrace KCl v pufru A (20 mM – 1 M KCl), frakce 36-38 byly eluovány 1 M KCl v pufru A. Objem všech frakcí byl 1 ml. Průtok činil 1 ml/min. Nanáška činila necelých 300 μ l. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm), světle fialově absorbance při 488 nm, červeně konduktivita (průběh odpovídá koncentraci KCl).

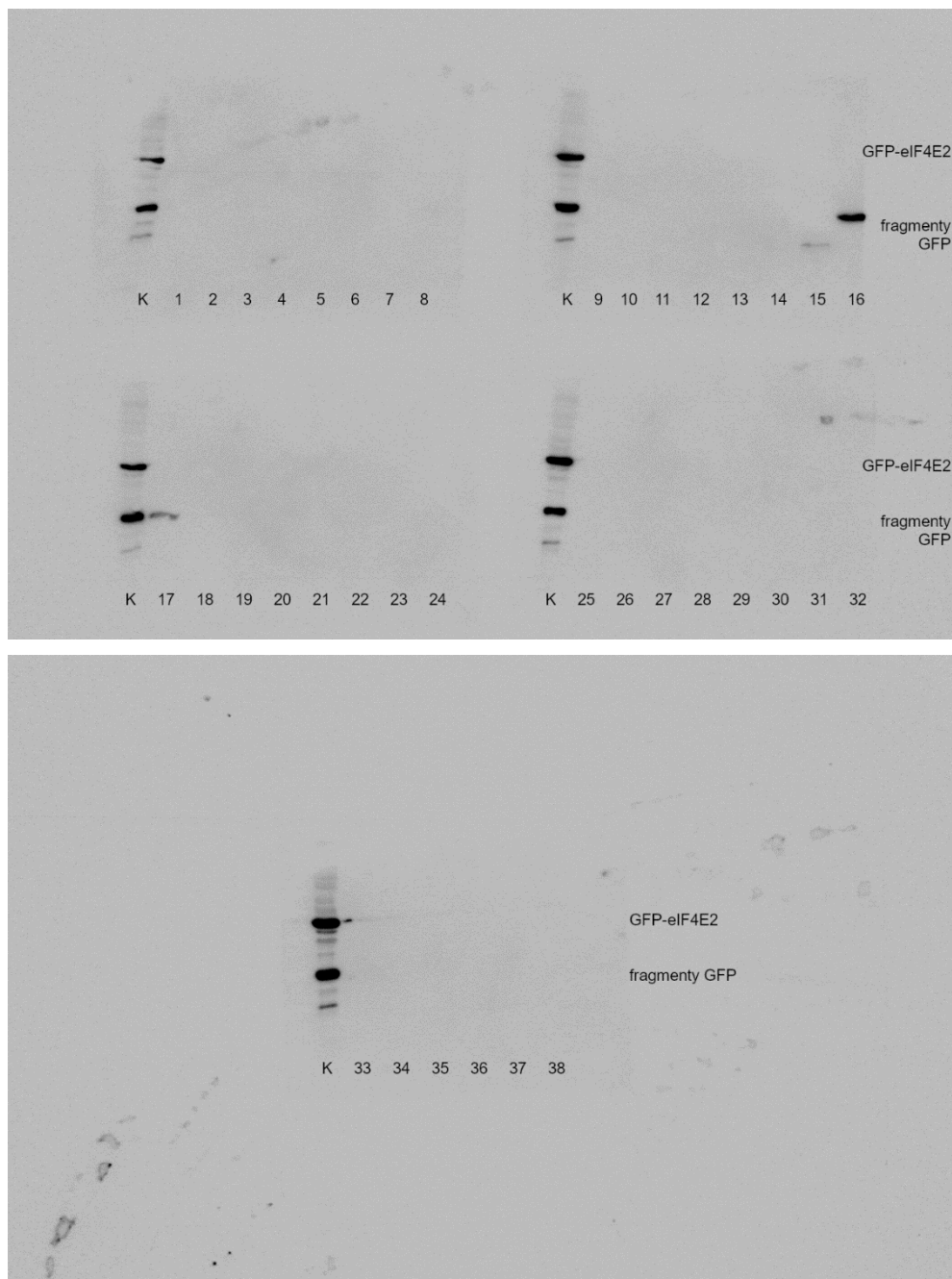


Obrázek 14. Střednětlaká chromatografie na aniontoměničce. Legenda viz obr. 13. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm), zeleně absorbance při 280 nm, červeně konduktivita (průběh odpovídá koncentraci KCl).

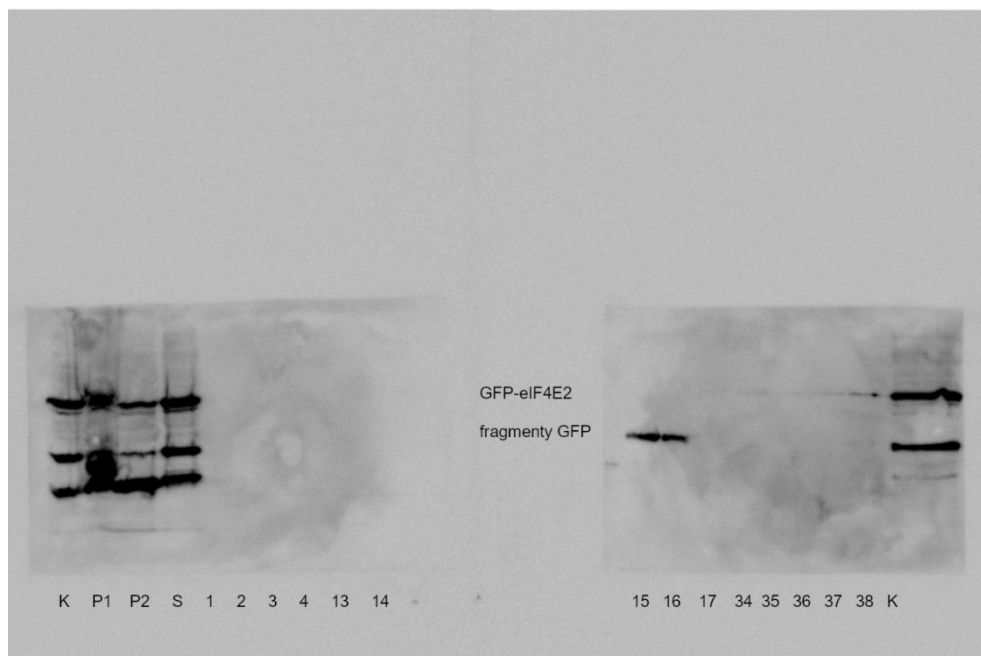


Obrázek 15. Střednětlaká chromatografie na aniontoměničce. Legenda viz obr. 13. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm), tmavě fialově absorbance při 260 nm, červeně konduktivita (průběh odpovídá koncentraci KCl).

Přítomnost GFP-eIF4E2 v sesbíraných frakcích jsme ověřovali metodou western blot (obr. 16). Podařilo se nám detekovat přítomnost fragmentů GFP ve frakcích 15-17, celý fúzní protein GFP-eIF4E2 jsme ale nepozorovali. Vybrané frakce, u kterých jsme očekávali signál na základě chromatogramu, jsme proto analyzovali ještě jednou stejným způsobem (obr. 17). Ve frakcích 15 a 16 jsme opět zaznamenali přítomnost fragmentů GFP. Celý fúzní protein GFP-eIF4E2 se ale ve frakcích nepodařilo detekovat. V tomto směru jsme pak dále nepokračovali.



Obrázek 16. Analýza frakcí ze střednětlaké chromatografie na aniontoměničce pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (5 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, 1-38 čísla frakcí.

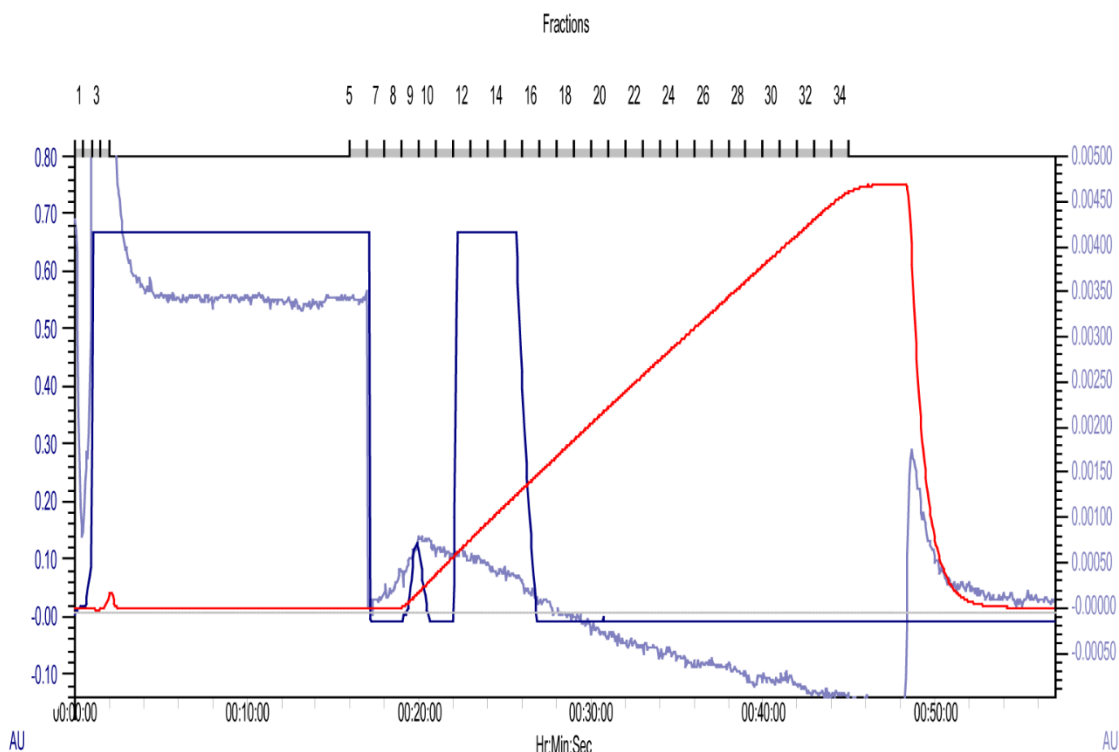


Obrázek 17. Opětovná analýza vybraných frakcí ze střednětlaké chromatografie na aniontoměniči pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (3 μ l). Napětí během elektroforézy 13,3 V/cm. Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, 1-38 čísla frakcí.

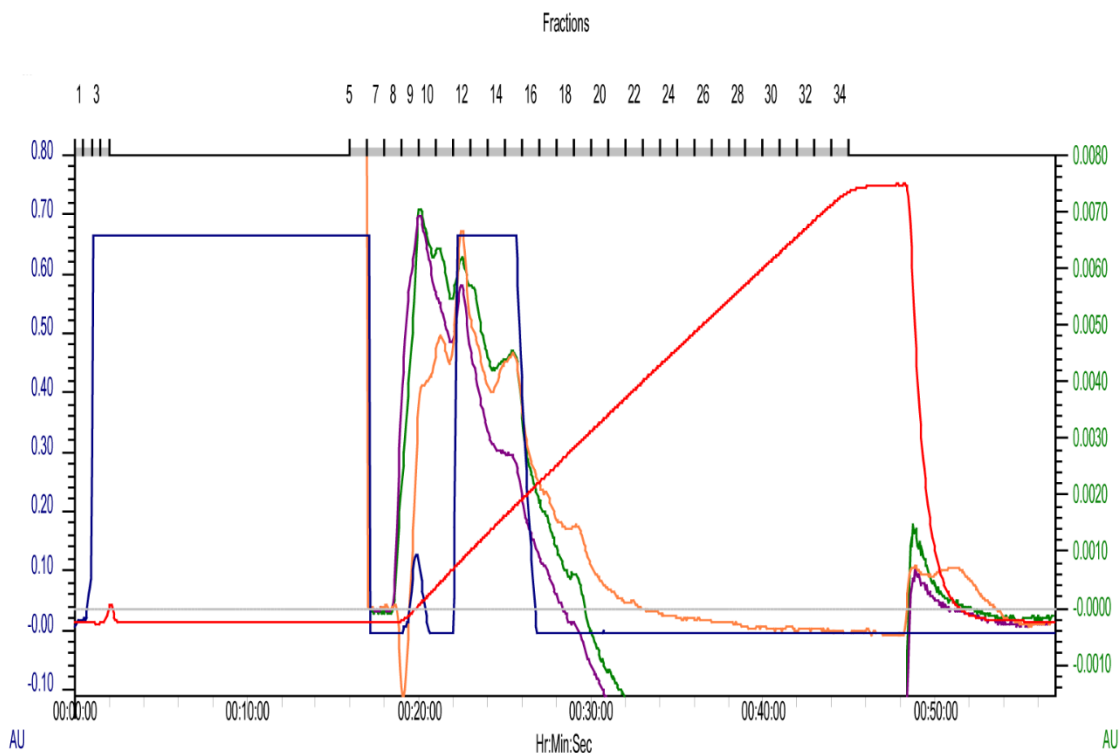
5.1.5 Střednětlaká proteinová chromatografie na kationtoměniči

Pro střednětlakou chromatografii na kationtoměniči jsme použili kolonku HiTrap® SP HP ekvilibrovanou na pufr B. Nanesli jsme necelých 300 μ l. K eluci byl použit gradient zvyšující se koncentrace KCl v pufru B.

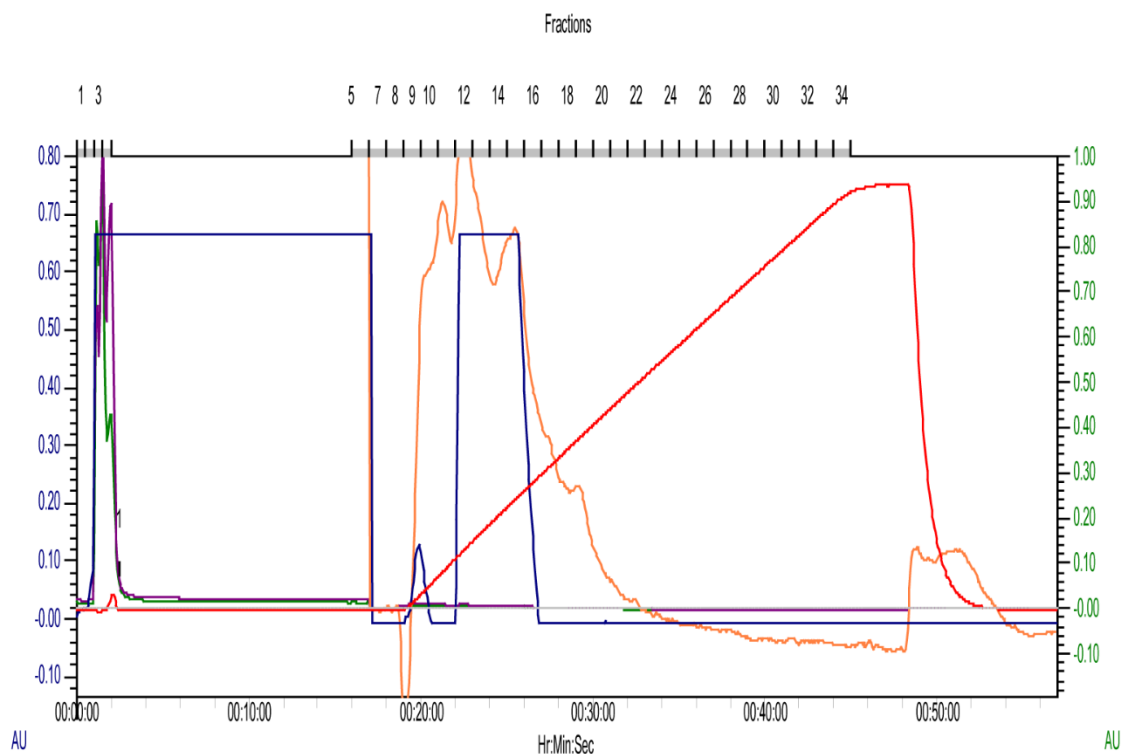
Na chromatogramu jsme zaznamenali 3 vrcholy fluorescence (obr. 18). Absorbance při 488 nm má hlavní vrchol ve frakcích 3-6 a vedlejší ve frakci 9. Ve frakcích 11-15, kde je třetí vrchol fluorescence, intenzita absorbance při 488 nm klesá. Absorbance při 260 nm, 280 nm a 225 nm mají všechny vrchol zhruba v oblasti frakcí 8-12 (obr. 19). Tento vrchol se částečně překrývá s vrcholem fluorescence ve frakcích 11-15. Každá z křivek absorbance se ale pohybuje ve zcela jiných hodnotách. Pokud přiřadíme všem křivkám absorbance stejné rozmezí hodnot na ose y, pík ve frakcích 8-12 u křivek absorbance při 260 nm a 280 nm vůbec nezpozorujeme (obr. 20).



Obrázek 18. Střednětlaká chromatografie na kationtoměničích. Použita kolonka HiTrap® SP HP o objemu 1 ml. První 4 frakce o objemu 1 ml byly eluovány pufrem B, frakce 5-31 byly eluovány gradientem koncentrace KCl v pufru B (0 M-1 M KCl), frakce 32-34 byly eluovány 1 M KCl v pufru B. Objem frakcí 5-34 byl 0,5 ml. Průtok činil 1 ml/min. Nanáška činila necelých 300 μ l. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm), světle fialově absorbance při 488 nm, červeně konduktivita (průběh odpovídá koncentraci KCl).



Obrázek 19. Střednětlaká chromatografie na kationtoměničích. Legenda viz obr. 18. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm), zeleně absorbance při 280 nm (rozmezí osy y 0-0,008 AU), fialově absorbance při 260 nm (rozmezí osy y 0-0,01 AU), oranžově absorbance při 225 nm (rozmezí osy y 0-1,5 AU), červeně konduktivita (průběh odpovídá koncentraci KCl).



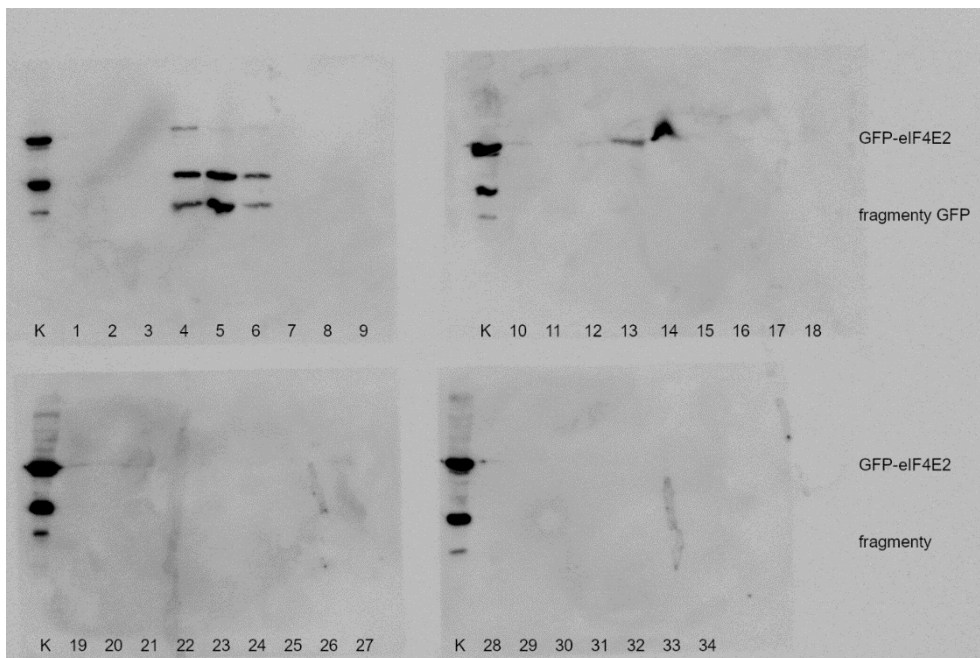
Obrázek 20. Střednětlaká chromatografie na kationtoměničích. Legenda viz obr. 18. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm), zeleně absorbance při 280 nm, fialově absorbance při 260 nm, oranžově absorbance při 225 nm, červeně konduktivita (průběh odpovídá koncentraci KCl). Pro všechny křivky absorbance je rozmezí hodnot na ose y 0-1.

Přítomnost GFP-eIF4E2 ve frakcích jsme ověřili pomocí western blotu (obr. 21). Celý fúzní protein GFP-eIF4E2 jsme detekovali ve frakcích 13-15, ve kterých jsme pozorovali pík fluorescence i na chromatogramu (obr. 18). V těchto frakcích jsme zároveň nepozorovali žádné fragmenty GFP (obr. 21). Ve frakcích 4-7 jsme naopak detekovali zejména fragmenty GFP a slabě i GFP-eIF4E2 (obr. 21). Povedlo se nám tedy oddělit celý fúzní protein GFP-eIF4E2 od jeho fragmentů. Z důvodu nedostatku času jsme dále v tomto směru nepokračovali.

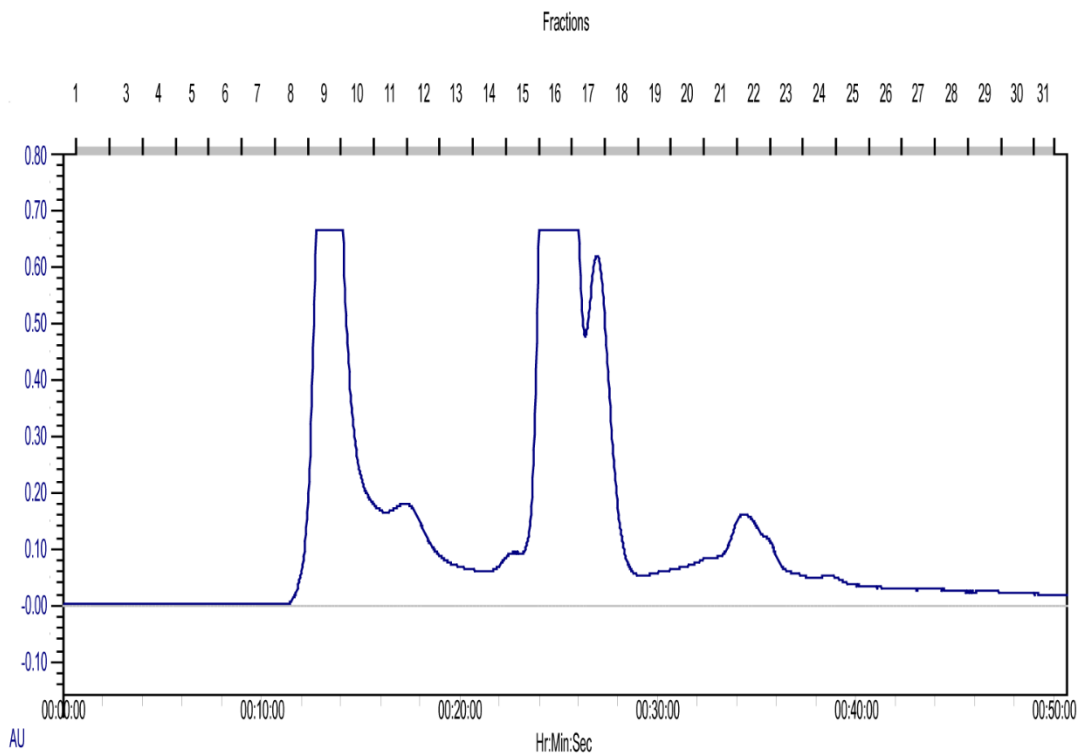
5.1.6 Střednětlaká gelová permeační chromatografie

Kromě chromatografie na iontoměničích jsme se rozhodli vyzkoušet ještě gelovou permeační chromatografií. Použili jsme kolonku Superdex® 200 10/300 GL. Nanáška činila necelých 300 μ l. K eluci jsme použili 120 mM KCl v pufru B.

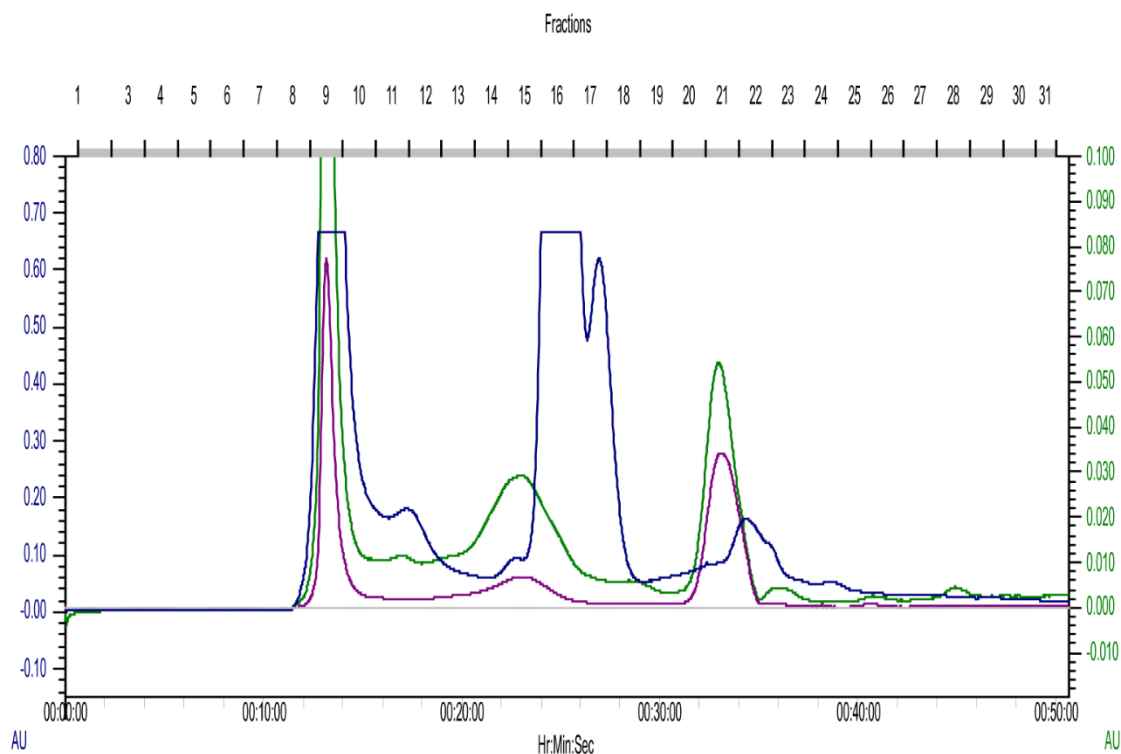
Signál fluorescence má 5 vrcholů (obr. 22). Vrchol ve frakcích 8-9 koresponduje s vrcholem absorbance při 280 nm a 260 nm (obr. 23).



Obrázek 21. Analýza frakcí ze střednětlaké chromatografie na kationtoměničích pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lysát (3 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, 1-34 čísla frakcí.

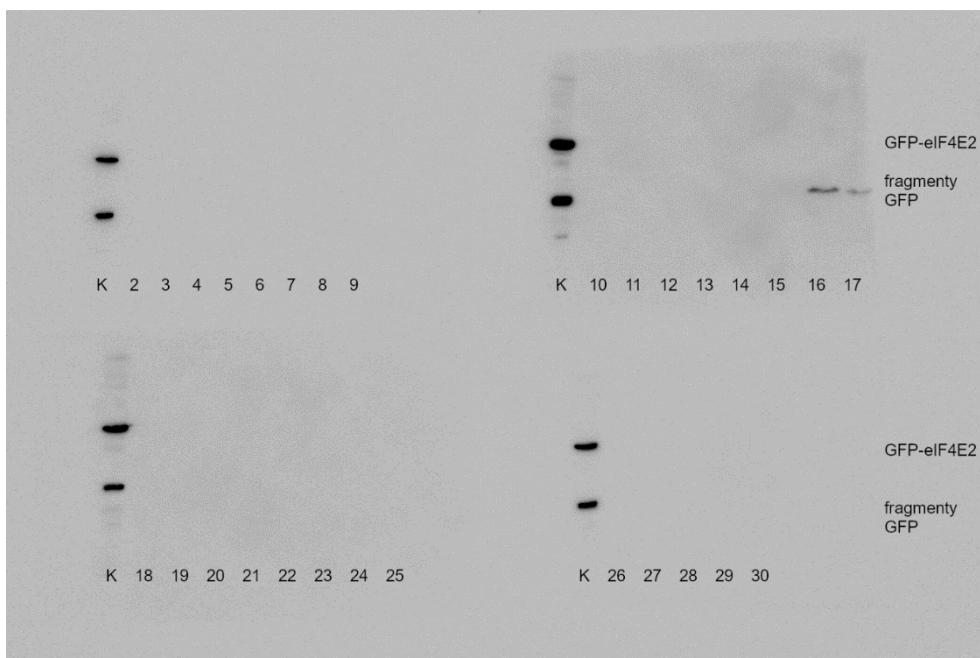


Obrázek 22. Střednětlaká gelová permeační chromatografie. Použita kolonka Superdex® 200 10/300 GL. Frakce o objemu 1 ml eluovány 120 mM KCl v pufru B. Průtok činil 0,6 ml/min. Nanáška činila necelých 300 μ l. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm).

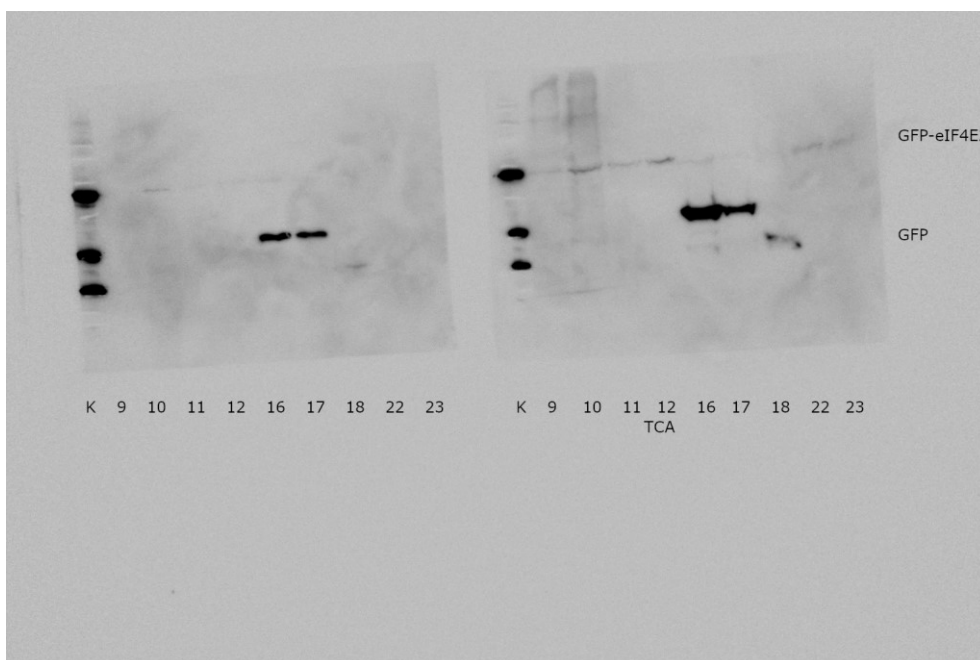


Obrázek 23. Střednětlaká gelová permeační chromatografie. Legenda viz obr. 22. Tmavě modře intenzita fluorescence (excitace při 488 nm, emise při 509 nm), zeleně absorbance při 280 nm, fialově absorbance při 260 nm. Pro všechny křivky absorbance je rozmezí hodnot na ose y 0-0,1.

Přítomnost GFP-eIF4E2 jsme ověřovali pomocí western blotu (obr. 24). Oproti očekávání jsme jediný signál detekovali ve frakcích 16 a 17. Velikostně navíc proužek odpovídal pouze fragmentu GFP, ne celému fúznímu proteinu GFP-eIF4E2. S vybranými frakcemi, v nichž jsme na základě chromatogramu očekávali přítomnost GFP-eIF4E2, jsme proto western blot zopakovali (obr. 25). Při výběru frakcí jsme zohlednili posun zhruba jednu frakci oproti chromatogramu. Každou frakci jsme analyzovali paralelně na dvou gelech. Na jeden gel jsme nanесли stejné vzorky, které jsme použili v předchozím western blotu. Tyto vzorky byly v mezičase zmražené v nanášecím puftru. Na druhý gel jsme nanесли vzorky, které vznikly odsolením frakcí precipitací s TCA.



Obrázek 24. Analýza frakcí ze střednětlaké gelové permeační chromatografie pomocí western blotu. Nanáška činila 20 μ l vzorku, jako kontrola byl použit celobuněčný lysát (3 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, 2-30 čísla frakcí.



Obrázek 25. Opětovná analýza vybraných frakcí ze střednětlaké gelové permeační chromatografie pomocí western blotu. 450 μ l frakcí 9, 10, 11, 12, 22, 23 a 150 μ l frakcí 16, 17 a 18 inkubováno přes noc ve 4 $^{\circ}$ C s 20% TCA a promyto 1x 100% acetonem. Pelet resuspendován ve 20 μ l 6x nanášecího pufru (membrána vpravo). Na druhý gel bylo nanášeno 20 μ l vzorků uchovaných v nanášecím pufru (membrána vlevo). Jako kontrola použit celobuněčný lysát (3 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, 9-23 čísla frakcí.

Ve všech analyzovaných frakcích lze vidět slabý signál indikující přítomnost GFP-eIF4E2, proto jsme rozhodli z těchto frakcí izolovat specificky proteinové komplexy obsahující GFP-eIF4E2 metodou GFP-Trap.

5.1.6.1 GFP-Trap s frakcemi z gelové permeační chromatografie

Frakce, které jsou součástí jednoho píku, jsme v první řadě spojili dohromady. Z frakcí 9 a 10 jsme odebrali po 500 μ l a vytvořili vzorek 9+10 o objemu 1 ml, stejným způsobem jsme spojili dvojici frakcí 11 a 12 a dvojici frakcí 22 a 23. Frakce 16, 17 a 18 jsme ponechali odděleně, abychom zachytili malý pík zhruba ve frakci 18. Tímto způsobem vzniklo 6 vzorků, se kterými jsme provedli metodu GFP-Trap. Výsledné vzorky jsme poslali do servisního pracoviště fakulty k analýze pomocí hmotnostní spektrometrie.

5.1.7 GFP-Trap s neseparovaným buněčným lyzátem

Abychom měli s čím srovnat výsledky hmotnostní spektrometrie vzorků z gelové permeační chromatografie, provedl RNDr. Tomáš Mašek, Ph.D. GFP-Trap přímo z neseparovaných buněčných lyzátů HAF buněk. Experiment byl proveden ve třech paralelách. Jako kontrola byly použity buňky produkující samotný GFP, kontrola byla také provedena ve třech opakováních. Výsledné vzorky z GFP-Trapu byly také odeslány do servisního pracoviště fakulty k analýze pomocí hmotnostní spektrometrie.

5.1.8 Hmotnostní spektrometrie

5.1.8.1 Výsledky hmotnostní spektrometrie GFP-Trapu s neseparovaným lyzátem

Ze servisního pracoviště hmotnostní spektrometrie jsme dostali tabulku se seznamem proteinů zastoupených v našich vzorcích. U každého proteinu byla uvedena intenzita ve třech vzorcích triplikátu GFP-Trapu linie HAF a ve třech vzorcích triplikátu GFP-Trapu z linie produkující samotné GFP, které sloužily jako kontrola.

V některých případech byla intenzita proteinů příliš nízká, než aby šla za daných podmínek přístrojem přesně změřit, přítomnost peptidů ale zaznamenána byla. V takovém případě bylo na místě číselné hodnoty v příslušné buňce uvedeno NaN. Pokud bychom tyto proteiny, u nichž nebyla intenzita přesně naměřena, úplně vyloučili z analýzy, mohli bychom ztratit cenné informace. Na druhou stranu jsme u těchto proteinů nevěděli, jaká byla jejich reálná intenzita a jestli vůbec byly ve všech vzorcích přítomny. Proto jsme se rozhodli pracovat se dvěma sadami dat. V první (data_NaN) jsme nechali nečíselné hodnoty tak, jak byly, a některé proteiny tím pádem vyřadili z analýzy. Ve druhém případě (data_18) jsme se rozhodli NaN nahradit číslem 18. Hodnotu 18 jsme zvolili proto, že nejnižší naměřená hodnota intenzity byla 18,054, použili jsme tedy nejbližší nižší celé číslo. Číslo při horní hranici neměřitelné oblasti jsme zvolili proto, abychom minimalizovali riziko, že uměle zvětšíme pozorovanou míru nabožení proteinů a dostaneme tak falešně pozitivní výsledky. Druhá úprava dat, kterou jsme provedli, byla způsobena faktem, že ne vždy bylo možné na základě zaznamenaných peptidů jednoznačně identifikovat konkrétní protein nebo jeho izoformu. V takovém případě bylo v seznamu místo jednoho proteinu uvedeno pro příslušnou sadu hodnot intenzit více variant proteinu. Opět jsme se pro jistotu rozhodli pracovat se dvěma sadami dat. V jedné sadě (data_One) jsme seznamu proteinů pro každou šestici hodnot intenzity ponechali jen jeden protein ze všech teoreticky možných. V druhé sadě dat (data_All) jsme seznam proteinů rozšířili o všechny, které mohly být teoreticky ve vzorku přítomny. Každému proteinu z jedné skupiny variant jsme přiřadili stejnou šestici hodnot intenzity. Kombinací

obou úprav jsme celkem získali čtyři sady dat (data_One_NaN, data_One_18, data_All_NaN a data_All_18), se kterými jsme dál pracovali.

Ve všech sadách dat jsme z triplikátu intenzit ve vzorku a v kontrole vypočítali medián. V případě souborů data_NaN jsme medián počítali pouze pokud byly pro jeho výpočet k dispozici alespoň dvě číselné hodnoty. Pokud byla intenzita číselně naměřena jen v jednom vzorku z triplikátu, medián byl také označen jako NaN. Odečtením mediánu intenzit v kontrole od mediánu intenzit ve HAF buňkách jsme získali údaj, o kolik se změnilo zastoupení proteinu (tab. P1). Hodnoty intenzity jsou uvedeny jako logaritmus o základu 2, z toho důvodu jsou i hodnoty mediánů a nabohacení uvedeny jako logaritmus o základu 2.

V první řadě jsme se podívali, u kterých 10 proteinů je největší nabohacení v HAF buňkách oproti kontrole. Na pořadí nemá vliv to, jestli použijeme data_All nebo data_One, je ale rozdíl, jestli použijeme data_NaN nebo data_18. Proto máme seznamy dva – s nahrazením NaN hodnotou 18 (tab. 1) a bez nahrazení (tab. 2).

Největší nabohacení je v obou souborech dat pozorováno u eIF4E2. To je očekávatelné, vzhledem k tomu, že GFP-eIF4E2 byl v HAF buňkách nadprodukován a že byl přímo vychytán na protilátku. Mezi dalšími proteiny jsou známí interakční partneři eIF4E2, u kterých je výskyt v horních oblastech tabulky očekávatelný. Mezi tyto proteiny patří GIGYF1, GIGYF2, ZNF598, 4E-T, 4E-BP2 a ARIH1. U proteinů TRIM27, TFIIC, PNMA2, BTAF1, TRAFD1, CHCHD4, TELO2, Nup205 a KNTC1 dosud interakce pozorována nebyla. GIGYF1, TRIM27 a PNMA2 nejsou v tabulce NaN proto, že u nich ani v jednom z kontrolních vzorků nebyla naměřena číselná hodnota intenzity. V případě 4E-BP2, TFIIC-epsilon a BTAF1 nebyla intenzita stanovena ve dvou vzorcích kontroly.

pořadí	název proteinu	nabohacení (log ₂)	Score	Hodnota Q	pozorována interakce s eIF4E2
1	eIF4E2	18,0427	323,310	0	-
2	GIGYF1	12,8734	323,310	0	ano (1-4)
3	4E-T	11,7240	323,310	0	ano (1-3, 5)
4	ZNF598	10,4815	323,310	0	ano (1, 2)
5	4E-BP2	9,9487	39,138	0	ano (6)
6	TRIM27	9,5054	20,212	0	ne
7	GIGYF2	9,4381	323,310	0	ano (1-4, 7)
8	TFIIC-epsilon	8,6151	6,367	0	ne
9	PNMA2	8,0667	42,115	0	ne
10	BTAF1	7,6627	53,176	0	ne

Tabulka 1. Prvních deset proteinů nejvíce nabohacených v HAF buňkách oproti kontrole – data_18. Score skóre představující kvalitu identifikace (maximum 323, 310), hodnota Q pravděpodobnost falešně pozitivní identifikace. Citace: 1 Morita *et al.*, 2012; 2 Chapat *et al.*, 2017; 3 Peter *et al.*, 2017; 4 Tollenaere *et al.*, 2019; 5 Kubacka *et al.*, 2013; 6 Joshi *et al.*, 2004; 7 Ramirez *et al.*, 2018; 8 Tan *et al.*, 2003; 9 Okumura *et al.*, 2007.

pořadí	název proteinu	nabohacení (log ₂)	Score	Hodnota Q	pozorována interakce s eIF4E2
1	eIF4E2	18,0427	323,31	0	-
2	4E-T	11,4446	323,31	0	ano (1-3, 5)
3	ZNF598	10,4815	323,31	0	ano (1, 2)
4	GIGYF2	9,4381	323,31	0	ano (1-4, 7)
5	ARIH1	7,3088	214,71	0	ano (8, 9)
6	TRAFD1	5,6316	33,839	0	ne
7	CHCHD4	5,5774	83,149	0	ne
8	TELO2	5,31675	62,721	0	ne
9	Nup205	5,05405	113,11	0	ne
10	KNTC1	4,33825	73,992	0	ne

Tabulka 2. Prvních deset proteinů nejvíce nabohacených v HAF buňkách oproti kontrole – data_NaN. Score skóre představující kvalitu identifikace (maximum 323, 310), hodnota Q pravděpodobnost falešně pozitivní identifikace. Citace viz tabulka 1.

Dále nás zajímalo, jestli najdeme všechny popsané interakční partnery eIF4E2 v savčích buňkách (tab. 3).

název proteinu	nabohacení (log ₂)	Score	Hodnota Q	citace
4E-BP1	7,4288	19,416	0	1-4
4E-BP2	9,9487	39,138	0	2
4E-BP3	-	-	-	2
4E-T	11,7240	323,310	0	4-7
ARIH1	7,3088	214,710	0	8, 9
CNOT1	1,8440	67,765	0	7
DDX6	0,5057	106,400	0	7
eIF4G3	-0,0765	18,183	0	3, 7, 10
GIGYF1	12,8734	323,310	0	4, 5, 7, 11
GIGYF2	9,4381	323,310	0	4, 5, 7, 11, 12
HIF-2 α	-	-	-	10, 13
PATL-1	-	-	-	7
Prep1	-	-	-	14
ThrRS	2,7902	283, 000	0	15
TNRC6A	-	-	-	7, 16
TNRC6B	-	-	-	7, 16
ZNF598	10,4815	323,310	0	5, 7

Tabulka 3. Známí interakční partneři eIF4E2. Citace: 1 Tee *et al.*, 2004; 2 Joshi *et al.*, 2004; 3 Rosettani *et al.*, 2007; 4 Peter *et al.*, 2017; 5 Morita *et al.*, 2012; 6 Kubacka *et al.*, 2013; 7 Chapat *et al.*, 2017; 8 Tan *et al.*, 2003; 9 Okumura *et al.*, 2007; 10 Ho *et al.*, 2016; 11 Tollenaere *et al.*, 2019; 12 Ramirez *et al.*, 2018; 13 Uniacke *et al.*, 2012; 14 Villaescusa *et al.*, 2009; 15 Jeong *et al.*, 2019; 16 Chen a Gao, 2017.

Většina popsaných interakčních partnerů eIF4E2 je výrazně nabohacená v HAF buňkách oproti kontrole. Proteiny 4E-BP3, HIF-2 α , PATL-1, Prep1 a TNRC6A/B jsme v našem souboru dat vůbec nenašli. V případě DDX6, eIF4G3 a RBM4 není velký rozdíl mezi abundancí v HAF buňkách a v kontrole.

Pro samotné hledání proteinových komplexů nabohacených v HAF buňkách jsme zvolili bioinformatické nástroje EnrichR, GOrilla a David (Eden *et al.*, 2007, 2009, Huang *et al.*, 2009a, 2009b; Chen *et al.*, 2013; Kuleshov *et al.*, 2016). Do EnrichR jsme vkládali seznam všech proteinů, u nichž bylo nabohacení větší nebo rovno 1. Seznam byl seřazen podle nabohacení od největšího po nejmenší. Stejně jsme postupovali pro všechny 4 seznamy proteinů. V rámci EnrichR jsme pro hledání proteinových komplexů použili databázi CORUM. Do nástrojů GOrilla a David jsme vkládali jako „target“ seznam všech proteinů, u nichž bylo nabohacení větší nebo rovno 1, a jako pozadí seznam všech proteinů. Opět jsme postupně vložili všechny 4 sady proteinů. Pro hledání proteinových komplexů v nástroji GOrilla jsme použili ontologii Component. V případě nástroje David jsme využili GOTERM_CC_DIRECT v kategorii Gene_Ontology.

Z dat, která jsme dostali, jsme odstranili nesmyslné výsledky. Jednalo se o komplexy, u nichž bylo uvedeno, že se vyskytují v jiném organismu, než je člověk. Několik takových výsledků jsme dostali pomocí nástroje EnrichR. Smazali jsme také pojmy, které byly příliš obecné (např. „buňka“). Odstranili jsme také výsledky, jejichž p hodnota byla větší než 0,05. Zbylé proteinové komplexy jsme rozřídili do skupin podle toho, jakých procesů se v buňce účastní (tab. P3). Nejvíce zastoupenou kategorií byla „transkripce“ a „regulace transkripce“.

Kromě toho jsme ze zbylých proteinových komplexů vybrali všechny, které byly identifikovány alespoň dvěma bioinformatickými nástroji. Jedná se o anafázi podporující komplex, komplex CCR4-NOT, komplex eIF3, SKI komplex, komplex HOPS, komplex MMXD/CIA a komplex oligosacharyltransferázy (tab. 4, tab. P4).

5.1.8.2 Výsledky hmotnostní spektrometrie vzorků z gelové permeační chromatografie

V případě vzorků GFP-Trapu separovaných frakcí jsme ze Servisního pracoviště hmotnostní spektrometrie dostali tabulku se seznamem proteinů zastoupených v našich vzorcích a s jejich intenzitou v jednotlivých frakcích (tab. P2). V některých případech opět nebyla na základě zaznamenaných peptidů možná jednoznačná identifikace konkrétního proteinu, který se ve vzorku vyskytoval, a v seznamu proteinů byly zmíněny eventuální další varianty. Vytvořili jsme proto dva seznamy dat. V seznamu „One“ jsme v každém případě, kde bylo více možností, ponechali pouze jednoho reprezentativního zástupce. V seznamu „All“ jsme ponechali všechny eventuality a všem přiřadili stejné hodnoty intenzity. Pokud bylo na místo hodnoty intenzity uvedeno NaN, považovali jsme protein za nepřítomný v dané frakci.

Pro nalezení proteinových komplexů jsme opět využili bioinformatické nástroje EnrichR, GOrilla a David obdobným způsobem jako v případě dat ke vzorkům neseparovaného lyzátu. Data jsme také upravili shodným způsobem. Všechny zbylé proteinové komplexy v jednotlivých frakcích jsme opět rozřídili do skupin podle buněčných procesů, kterých se účastní (tab. P3).

název proteinového komplexu	nalezené podjednotky	data	bioinformatický nástroj
anafázi podporující komplex	ANAPC1, ANAPC5, BUB1B, CDC16, CDC23, UBE2S	data_One_18, data_All_18	EnrichR, David
komplex CCR4-NOT	CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT7, RQCD1	data_One_18, data_All_18	GOrilla, David
komplex eIF3	EIF3A, EIF3B, EIF3C, EIF3CL, EIF3D, EIF3E, EIF3F, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF3L	data_One_NaN, data_All_NaN, data_One_18, data_All_18	EnrichR, GOrilla, David
SKI komplex	SKIV2L, TTC37, WDR61	data_One_NaN, data_All_NaN, data_One_18, data_All_18	EnrichR, David
komplex HOPS	HOOK2, VPS16, VPS18, VPS33A	data_One_18, data_All_18	EnrichR, David
komplex MMXD/CIA	CIAO1, FAM96B, MMS19, SLC25A5	data_One_NaN, data_All_NaN, data_One_18, data_All_18	GOrilla, David
komplex oligosacharyltransferázy	DDOST, RPN1, RPN2, STT3A	data_One_NaN, data_All_NaN, data_One_18, data_All_18	EnrichR, David

Tabulka 4. Proteinové komplexy nabohacené v HAF buňkách. V druhém sloupci jsou uvedeny všechny nalezené podjednotky podle všech variant složení komplexu, se kterými nástroje pracují. V předposledním sloupci jsou uvedena data, ve kterých komplex bioinformatické nástroje vyhledaly. V posledním sloupci uvedeny všechny bioinformatické nástroje, které daný komplex vyhledaly.

Ve vzorku separovaného lyzátu bylo nalezeno téměř 6x více proteinových komplexů než ve vzorcích neseparovaného lyzátu. Nejvíce zastoupenou kategorií je „transkripce“ a „regulace transkripce“. Oproti neseparovanému lyzátu jsou ve vzorcích z gelové permeační chromatografie zcela navíc kategorie „degradace proteinů“, „chromatin“ (obsahuje komplexy účastníci se modifikací a remodelace chromatinu), „peroxizom“, „proteazom“, „replikace“, „ribonukleáza“, „ROS (obsahující komplexy zúčastněné v signalizaci oxidativního poškození)“, „rRNA processing“, „signalizace EGFR“, „signalizace PI3K“, „signalizace PKA“, „signalizace, cytoskelet“, „skládání proteinů“, „stresové

granule“, „syntéza nukleotidů“, „telomery“, „tRNA processing“ a „vakuola“. V ostatních kategoriích je ve vzorcích z gelové permeační chromatografie vesměs více různých proteinových komplexů než ve vzorcích neseparovaného lyzátu.

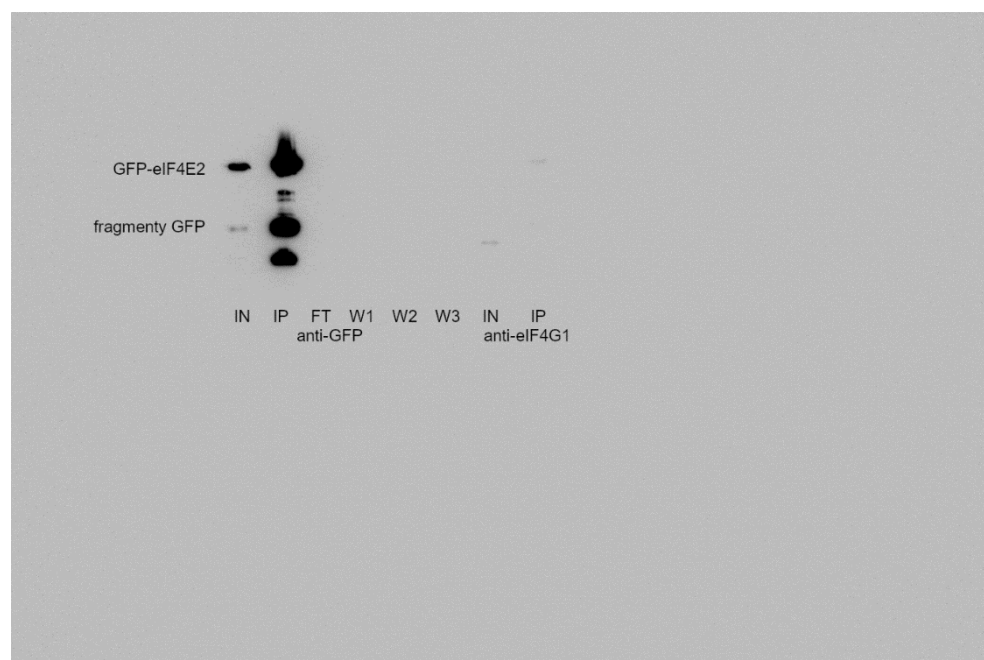
Proteinové komplexy nalezené v neseparovaném buněčném lyzátu jsme následně dohledali i ve vzorcích z gelové permeační chromatografie (tab. 5, tab. P5).

název proteinového komplexu	nalezené podjednotky	frakce	data	bioinformatický nástroj
anafázi podporující komplex	ANAPC1, ANAPC5, ANAPC7, ANAPC16, CDC16, CDC23, CDC27	9+10	data_One, data_All	EnrichR, David
komplex CCR4-NOT	CNOT1, CNOT2, CNOT7, CNOT9, CNOT10, CNOT11, TNKS1BP1	11+12	data_One, data_All	David
komplex eIF3	EIF3A, EIF3B, EIF3C, EIF3CL, EIF3D, EIF3E, EIF3F, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF3K, EIF3L	9+10, 11+12, 16, 17, 18, 22+23	data_One, data_All	EnrichR, Gorilla, David
SKI komplex	SKIV2L, TTC37, WDR61	9+10, 11+12, 22+23	data_One, data_All	EnrichR, David
komplex HOPS	EEA1, RAB5A, VPS16	9+10, 17	data_One, data_All	EnrichR
komplex MMXD/CIA	CIAO1, CIAO2B, CIAO3, ERCC2, MMS19, SLC25A5	9+10, 16, 17	data_One, data_All	David
komplex oligosacharyltransferázy	DAD1, DDOST, RPN1, RPN2, STT3A, STT3B	9+10, 11+12	data_One, data_All	EnrichR, David

Tabulka 5. Vybrané informace o výše popsaných proteinových komplexech ve vzorcích z gelové permeační chromatografie. Uvedeny jsou všechny nalezené podjednotky podle všech variant složení komplexu, se kterými nástroje pracují. V předposledním sloupci uvedena data, ve kterých komplexy bioinformatické nástroje vyhledaly. V posledním sloupci uvedeny všechny bioinformatické nástroje, které daný komplex vyhledaly. Chromatogram viz obr. 22.

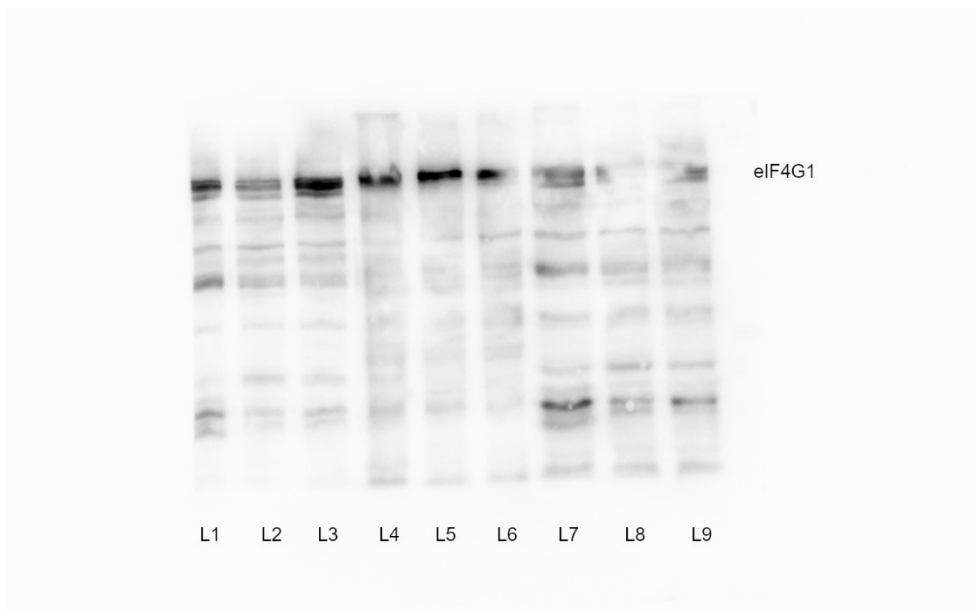
5.2 Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G

Testování schopnosti eIF4E2 interagovat s eIF4G1 přineslo rozporuplné výsledky (viz kap. 3.5). Předchozí experimenty provedené v laboratoři navíc ukazovaly, že by mohlo docházet k interakci mezi eIF4E2 a eIF4G1 a eIF4E2 a eIF4G3, i když se obecně věří, že k vazbě eIF4E2 a eIF4G1 nedochází. Interakce eIF4E2 s eIF4G3 popsána byla. Z toho důvodu jsme se rozhodli potenciální interakci ověřit metodou GFP-Trap. Výsledek imunoprecipitace jsme analyzovali pomocí western blotu (obr. 26). Pro ověření přítomnosti GFP-eIF4E2 ve vzorku jsme na jednu část membrány použili protilátku proti GFP a pro ověření interakce GFP-eIF4E2 s eIF4G1 jsme na druhou část membrány použili protilátku proti eIF4G1.

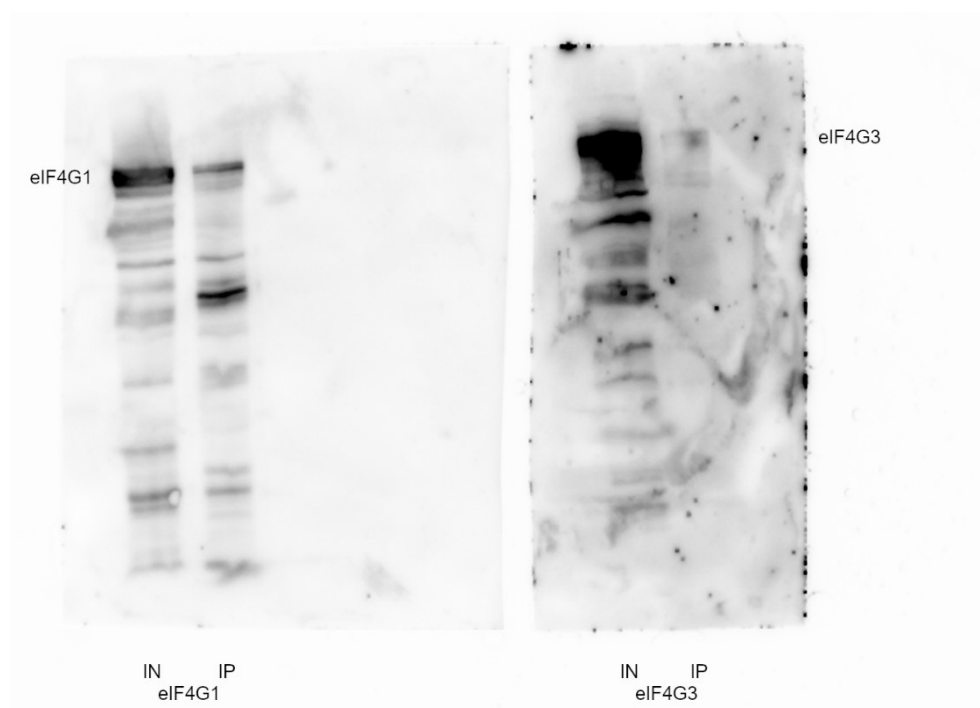


Obrázek 26. Analýza výsledků GFP-Trapu pomocí western blotu. Proteinová elektroforéza probíhala v 10% polyakrylamidovém gelu při napětí 13,3 V/cm. Nanáška činila 8 μ l vzorku. Primární protilátky SC-9996 a SC-373892, sekundární protilátka 13871-071. IN původní lyzát (input), IP imunoprecipitace, FT co proteklo při inkubaci s protilátkou (flow-through), W1-W3 co proteklo při promývání (wash).

Z výsledku western blotu je patrné, že došlo k vycytání GFP-eIF4E2 na kuličky a že došlo k signifikantnímu nabohacení GFP-eIF4E2 na kuličkách oproti původnímu lyzátu. Také je patrné, že se všechen GFP-eIF4E2 navázal na kuličky a nedošlo ke ztrátě GFP-eIF4E2 v některém z kroků promývání. Nezdařilo se nám ale detekovat přítomnost eIF4G1, a to ani v původním lyzátu, kde by eIF4G1 měl být přítomen v dostatečném množství pro účinnou detekci. Problém podle nás mohl být ve velké velikosti eIF4G1, která zabránila přenosu na membránu v dostatečném množství. Proto jsme se rozhodli snížit koncentraci polyakrylamidového gelu na 8 % a zároveň snížit koncentraci methanolu v blotovacím pufu na 12 %. Poté jsme se pokusili takto optimalizovaným western blotem detekovat eIF4G1 v několika šaržích lyzátu buněk linie HAF (obr. 27).



Obrázek 27. Optimalizace western blotu pro detekci eIF4G1. Proteinová elektroforéza probíhala při napětí 13,3 V/cm. Nanáška činila 5 μ l lyzátu. Primární protilátka SC-373892, sekundární protilátka 13871-071. L1-L9 různé šarže buněčného lyzátu.



Obrázek 28. Analýza výsledků GFP-Trapu pomocí western blotu s protilátkami proti eIF4G1 a eIF4G3. Proteinová elektroforéza probíhala při napětí 13,3 V/cm. Nanáška činila 8 μ l vzorku. Vlevo primární protilátka SC-373892 + sekundární protilátka 13871-071. Vpravo primární protilátka A301-768A + sekundární protilátka SC-2004. IN původní lyzát (input), IP imunoprecipitace.

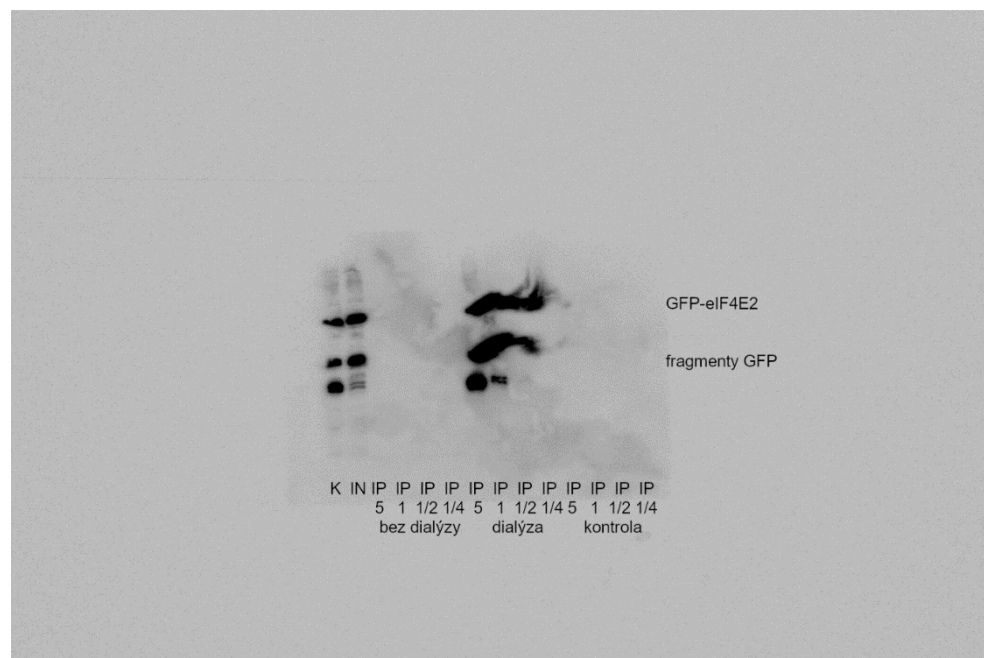
Optimalizace přinesla výsledky a tentokrát se podařilo přítomnost eIF4G1 v lyzátech identifikovat. Western blot se vzorky z GFP-Trapu, které byly mezitím zmrazené v nanášecím puftru, jsme proto zopakovali za použití 8% gelu a blotovacího puftru s 12% methanolem. Přítomnost GFP-eIF4E2 už jsme ověřovat nemuseli, proto jsme na část membrány použili protilátku proti eIF4G1 a na druhou část protilátku proti eIF4G3 (obr. 28). Oba proteiny rodiny eIF4G se podařilo ve vzorku detekovat, porovnáním

množství eIF4G1 nebo eIF4G3 v lyzátu a ve vzorku po imunoprecipitaci se ale nezdá, že by za použitých podmínek eIF4E2 s eIF4G1 nebo s eIF4G3 interagoval.

5.3 Ověření funkčnosti GFP-Trap systému produkovaného v laboratoři

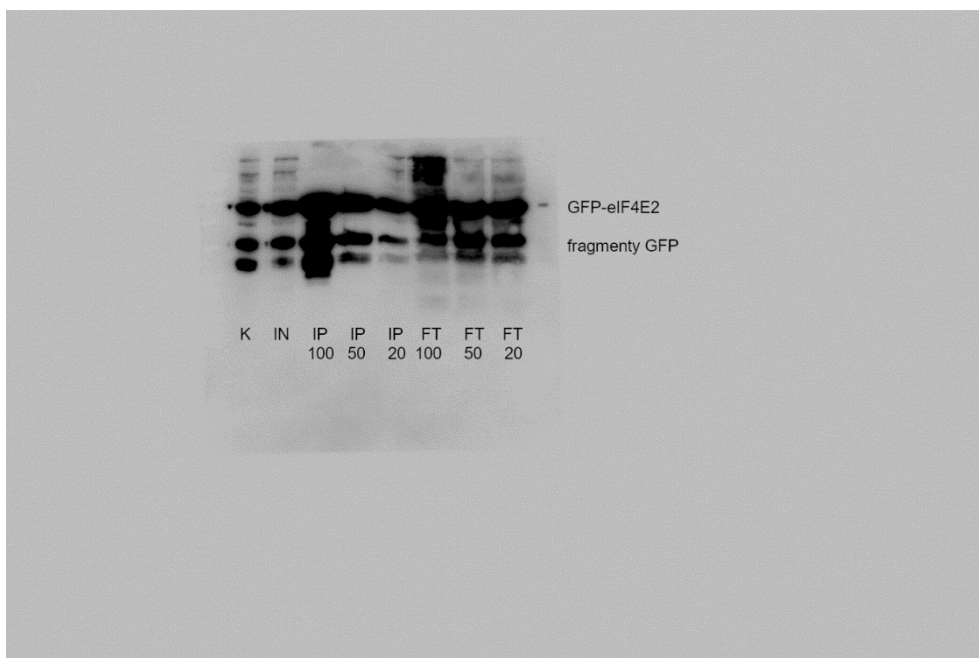
V rámci odborné stáže v naší laboratoři připravila Isabelle Chanemouga systém pro GFP-Trap založený na protilátkách produkovaných v laboratoři. Zbývalo jen otestovat funkčnost připravených GFP-Trap kuliček s protilátkou. Připraveny byly 3 druhy kuliček, „dialyzované kuličky“ připravené podle původního protokolu, „nedialyzované kuličky“ připravené podle modifikovaného protokolu, ve kterém byl krok dialýzy vynechán, a kontrolní kuličky bez protilátky. Se všemi třemi duhy kuliček jsme provedli GFP-Trap a výsledky analyzovali metodou western blot (obr. 29).

Z výsledku western blotu je patrné, že se GFP-eIF4E2 váže na „dialyzované kuličky“ a naopak s „nedialyzovanými kuličkami“ a s kontrolními kuličkami neinteraguje. Kromě samotné interakce je patrné, že došlo v důsledku imunoprecipitace k nabohacení GFP-eIF4E2 ve vzorku oproti původnímu lyzátu.



Obrázek 29. Analýza výsledků GFP-Trapu pomocí western blotu. Proteinová elektroforéza probíhala při napětí 13,3 V/cm. Nanáška činila 5 μ l, 1 μ l, 0,5 μ l a 0,25 μ l pro každý typ kuliček. Jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (3 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, IN původní lyzát (input), IP imunoprecipitace, 5, 1, 1/2, 1/4 objem kuliček v nanášce (μ l).

Po ověření funkčnosti protilátky nás zajímalo, jakou mají kuličky kapacitu. Provedli jsme proto ještě jeden GFP-Trap. Vždy k 5 μ l kuliček jsme přidali 20 μ l, 50 μ l a 100 μ l. Po inkubaci s protilátkou jsme odebrali 50 μ l supernatantu jako kontrolu, že došlo k navázání všeho GFP-eIF4E2 na kuličky (FT). Výsledek imunoprecipitace jsme analyzovali pomocí western blotu (obr. 30).



Obrázek 30. Analýza výsledků GFP-Trapu pomocí western blotu. Nanáška činila 3 μ l IN, 10 μ l IP a 20 μ l FT. Jako kontrola byl použit celobuněčný lyzát (1 μ l). Primární protilátka SC-9996, sekundární protilátka 13871-071. K kontrola, IN původní lyzát (input), IP imunoprecipitace, FT co proteklo (flow-through), 100, 50, 20 objem lyzátu přidaného ke kuličkám (μ l).

Z výsledku western blotu je patrné, že se určité množství GFP-eIF4E2 na kuličky nenavázalo a proteklo. Množství GFP-eIF4E2, které proteklo, se zdá být velmi podobné bez ohledu na to, jaký objem lyzátu byl ke kuličkám přidán. I přes to, že se nezachytil na protilátku všechny GFP-eIF4E2, došlo ve všech případech k signifikantnímu nachytání GFP-eIF4E2 na kuličky. S navyšujícím se objemem lyzátu inkubovaného s kuličkami se navýšilo i množství GFP-eIF4E2 detekované ve vzorku. Zdá se tedy, že ani při přidání 100 μ l lyzátu ke 5 μ l kuliček jsme nevyčerpali plnou kapacitu kuliček.

5.4 Příprava systému pro screening inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3

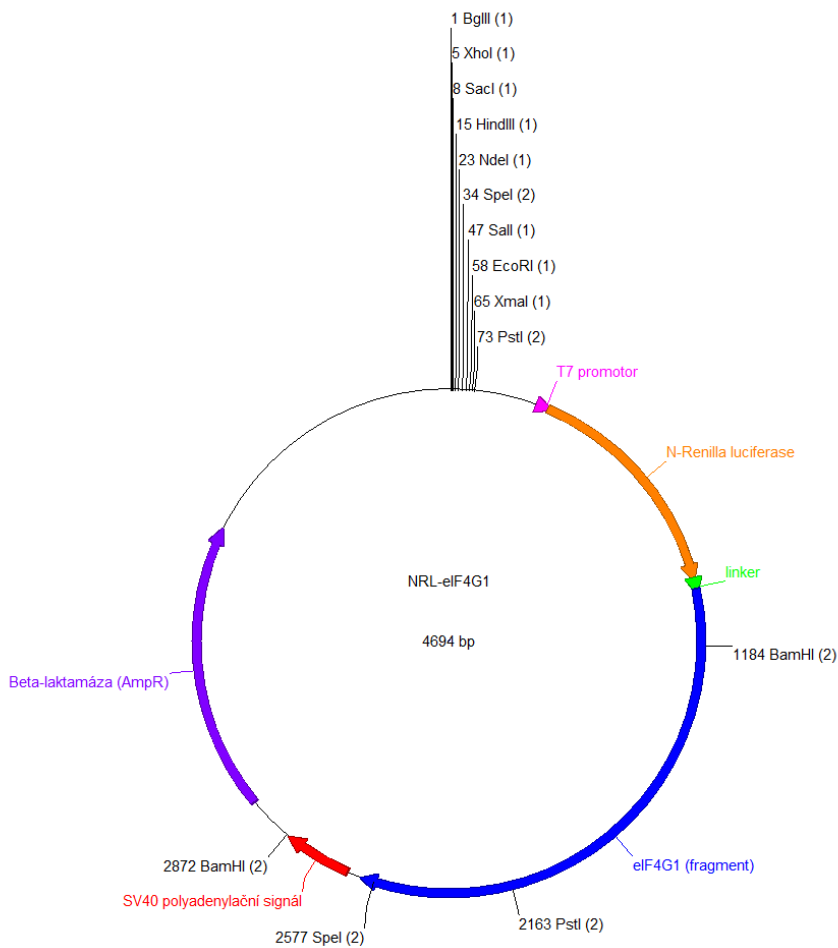
Jedním z hlavních cílů práce bylo pokusit se připravit systém pro screening inhibitorů interakce eIF4E2 a eIF4G3. Rozhodli jsme se použít systém založený na komplementaci rozdělené luciferázy z *Renilla reniformis* (RLuc). Tento systém využívá skutečnosti, že lze RLuc rozdělit na dvě samostatné domény, N-koncovou (NRL) a C-koncovou (CRL), a každou doménu fúzovat s jedním z interakčních partnerů. Pokud dojde k vazbě interakčních partnerů, obě domény RLuc se přiblíží a dojde k bioluminiscenci. Výhoda systému je, že funguje v savčích buňkách a že je možné měřit bioluminiscenci po přidání inhibitoru přímo v buněčném lyzátu (Ashkenazi *et al.*, 2017).

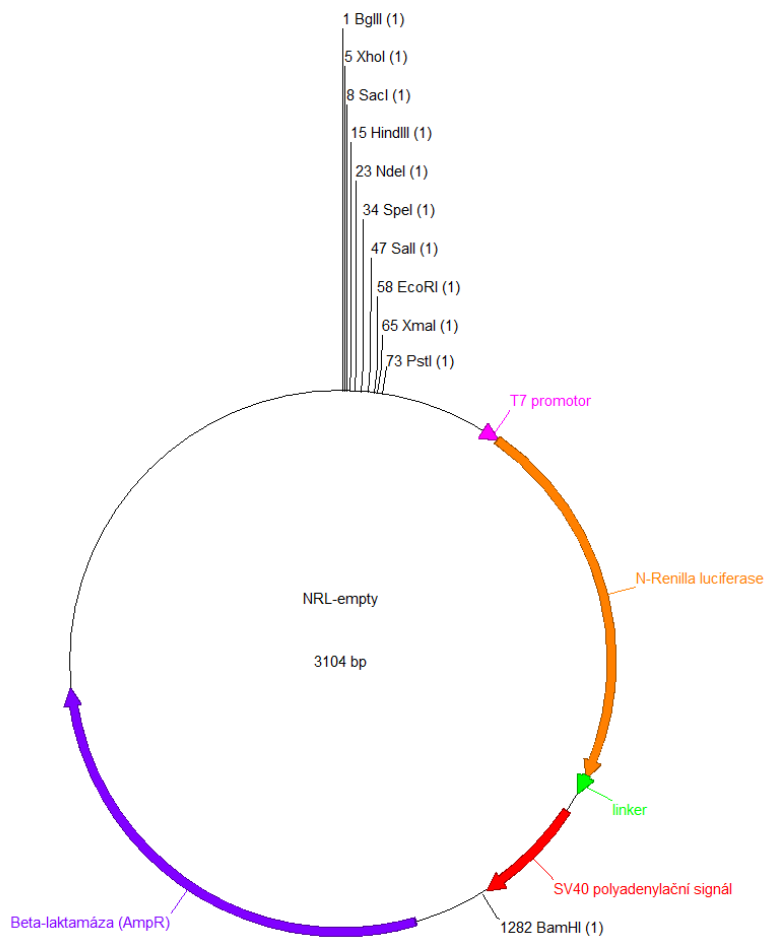
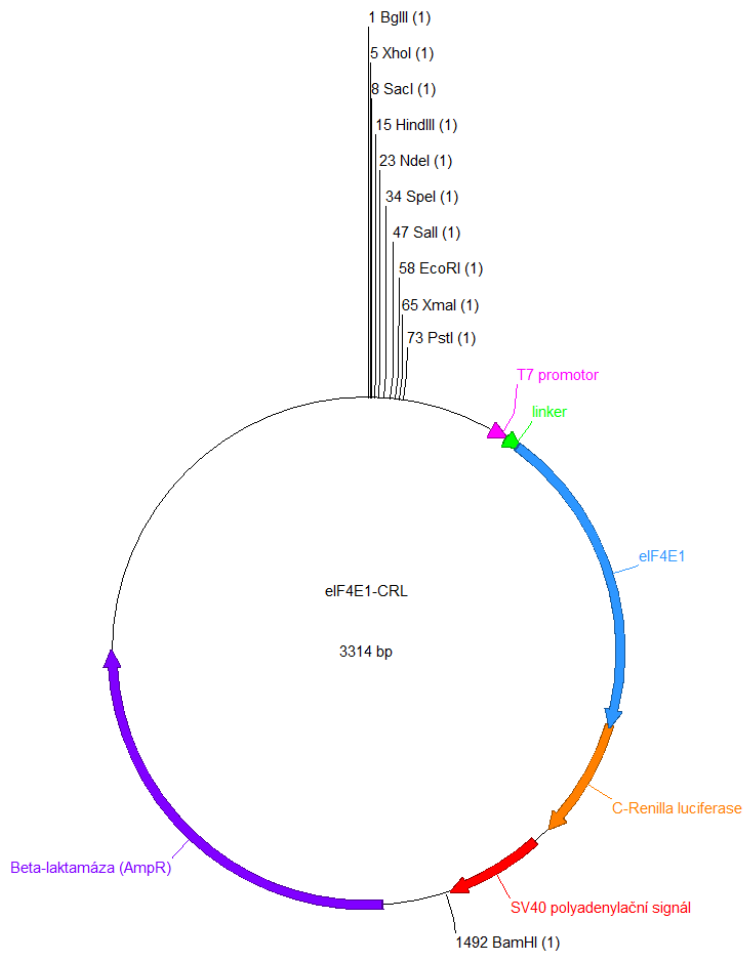
Obdobný systém byl v publikaci Haimov *et al.*, 2018 použit i pro monitorování interakce eIF4G1 s eIF4E1 a eIF1. V rámci tohoto projektu byl vytvořen mimo jiné plazmid, ve kterém je fragment genu pro eIF4G1 fúzovaný s genem pro NRL (plazmid NRL-eIF4G1) a plazmid, ve kterém je gen pro eIF4E1 fúzovaný s genem pro CRL (plazmid eIF4E1-CRL). U těchto plazmidů už bylo otestováno, že spolu produkované fúzní proteiny interagují, proto jsme autory publikace požádali o poskytnutí

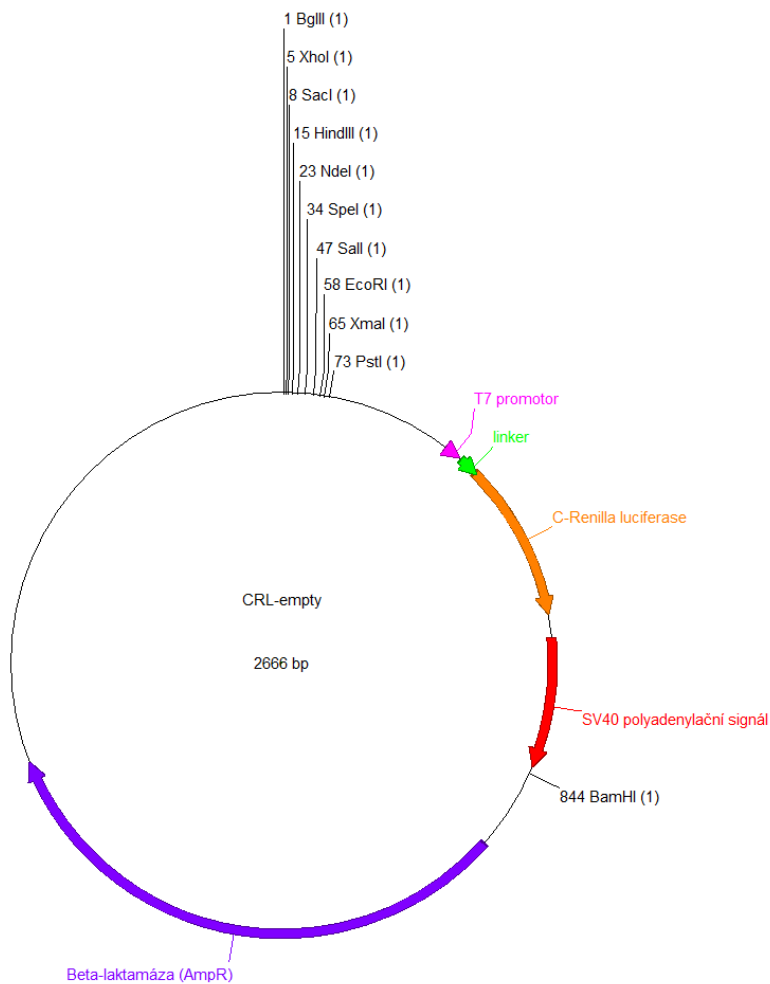
plazmidů. Kromě plazmidů eIF4G1-NRL a eIF4E1-CRL jsme dostali ještě kontrolní plazmidy obsahující pouze jednu doménu luciferázy (NRL-empty a CRL-empty) a plazmid obsahující gen pro světluškovou luciferázu (FLUC).

5.4.1 Izolace plazmidů eIF4G1-NRL a NRL-empty

Na základě informací z protokolu, který jsme dostali spolu s plazmidy, a publikace Haimov *et al.*, 2018 jsme sestavili mapy plazmidů (obr. 31). Pro zjednodušení jsme zatím NRL-eIF4G1 označili jako plazmid A, eIF4E1-CRL jako plazmid B, NRL-empty jako plazmid C, CRL-empty jako plazmid D a FLUC jako plazmid E.



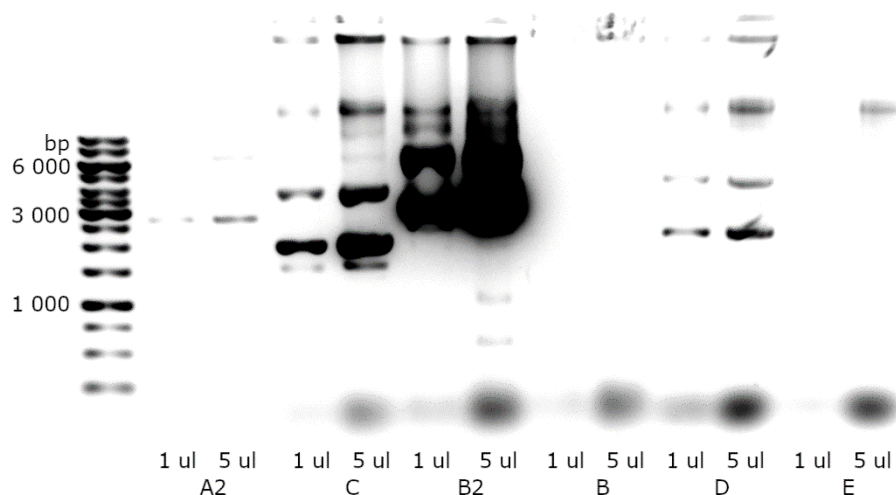




Obrázek 31. Mapy plazmidů sestavené na základě informací z protokolu a z publikace Haimov *et al.*, 2018. Zobrazeny pouze vybrané restriční enzymy.

Plazmidy jsme dostali nakapané na filtračním papíru. Z filtračního papíru jsme proto v oblasti, kam byl nakapán vzorek, sterilně vyrazili kolečko a inkubovali ho 4 h v 20 μ l TE pufru při laboratorní teplotě. Plazmidy jsme poté pomocí elektroporace vnesli do kompetentních buněk *E. coli* kmene XL1-Blue. Z buněk, do kterých byly vneseny plazmidy B, C, D a E, jsme poté vyizolovali plazmidovou DNA metodou midipreparace. Buňky, do kterých byl vnesen plazmid A, nenarostly vůbec a buňky, do kterých byl vnesen plazmid B, narostly jen ve velmi malém množství, proto jsme celý proces izolace plazmidů A a B v bakteriích zopakovali.

Z filtračního papíru jsme tentokrát vyrazili více koleček s plazmidy A a B a inkubovali je přes noc v lednici ve 20 μ l TE pufru. Oba plazmidy jsme potom ve dvou různých koncentracích elektroporací vnesli do kmene XL1-Blue. V jednom případě jsme vnašeli stejně jako poprvé 1 μ l roztoku plazmidu do 60 μ l buněk a ve druhém případě jsme vnesli 5 μ l roztoku plazmidu do 60 μ l buněk. Buňky, do kterých byl vnesen plazmid B, narostly v obou případech. Buňky, do kterých byl vnesen plazmid A, narostly pouze po vnesení 5 μ l plazmidu. Oba plazmidy jsme z buněk izolovali metodou midipreparace. Vzorky z druhé izolace jsme označili jako A2 a B2. Úspěšnost izolace všech plazmidů jsme ověřili pomocí elektroforézy (obr. 32).

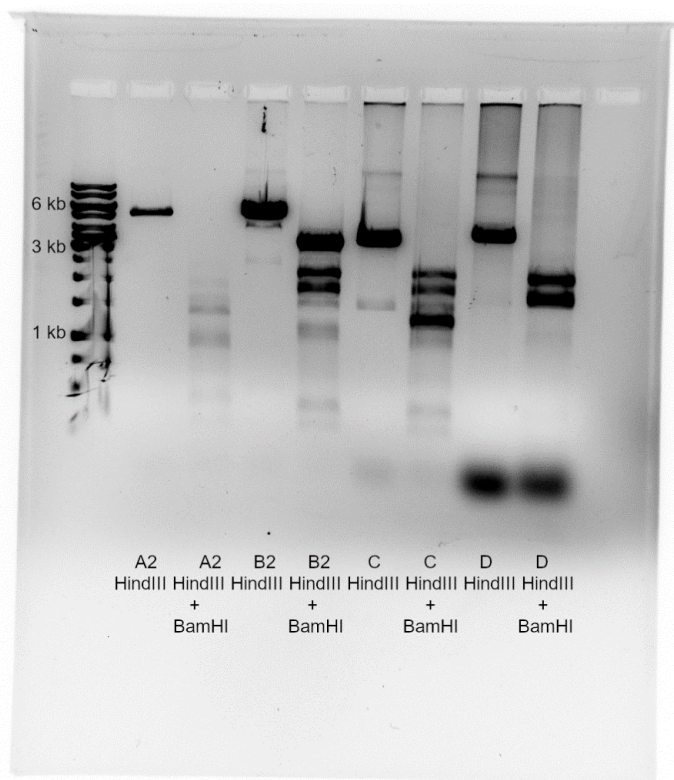


Obrázek 32 Ověření izolace plazmidové DNA z *E. coli* kmene XL1-Blue metodou midipreparace. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, naneseo 1 μ l a 5 μ l roztoku plazmidu. A2 předpokládaný NRL-eIF4G1, C předpokládaný NRL-empty, B2 a B předpokládaný eIF4E1-CRL, D předpokládaný CRL-empty, E předpokládaný FLUC.

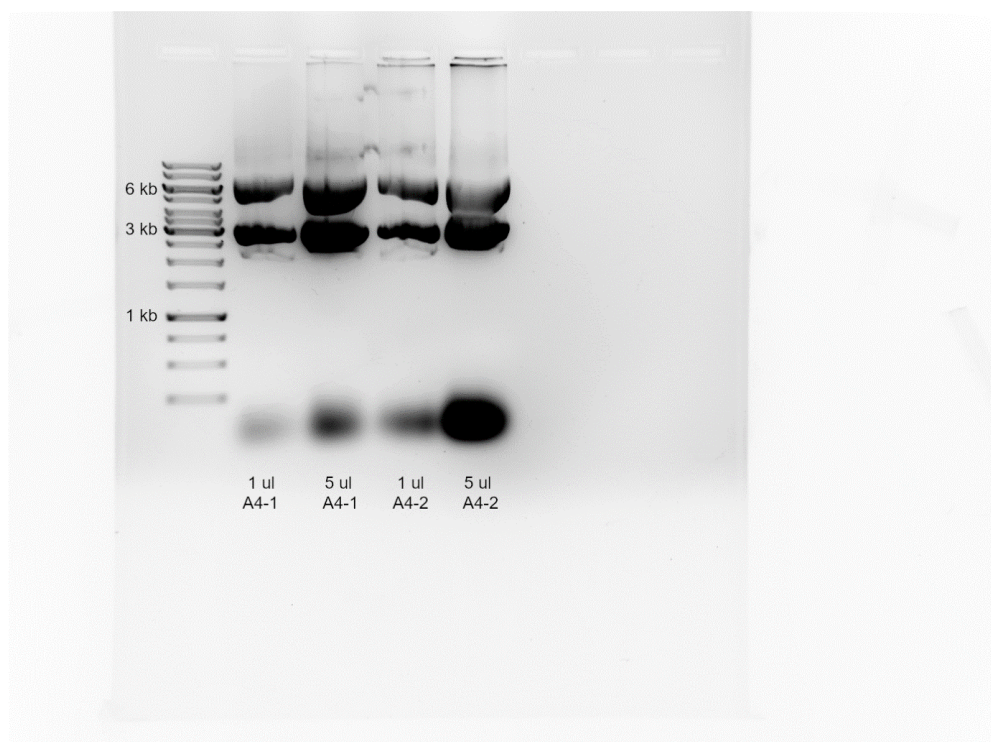
Plazmidy A, B, C a D se všechny podařilo vyizolovat. Plazmid E jsme nevyizolovali, ale vzhledem k tomu, že jsme v laboratoři měli k dispozici jiný plazmid s genem pro světluškovou luciferázu, jsme se o další izolaci tohoto konkrétního plazmidu nepokoušeli. Plazmid B se podařilo izolovat až z druhé elektroporace jako vzorek B2.

Abychom ověřili, že máme izolované správné plazmidy, štěpili jsme všechny vzorky enzymem HindIII v pufru Red a kombinací enzymů HindIII+BamHI v pufru Tango 1x (obr. 33). Na základě informací, co jsme měli, měl enzym HindIII štěpit všechny plazmidy jen v jednom místě a ve všech případech tak měl vzniknout linearizovaný produkt o velikosti 4 694 bp (A2), 3 314 bp (B2), 3 104 bp (C) a 2 666 bp (D). Kombinace enzymů HindIII a BamHI měla štěpit na dvou místech u vzorků B2, C a D a na třech u vzorku A. Z plazmidu A tak měly vzniknout 3 fragmenty o velikosti 1 837 bp, 1 688 bp a 1 169 bp. Z plazmidu B měly vzniknout 2 fragmenty o velikostech 1 837 bp a 1 477 bp. Z plazmidu C měly vzniknout 2 fragmenty o velikostech 1 837 bp a 1 267 bp. Z plazmidu D měly vzniknout 2 fragmenty o velikostech 1 837 bp a 829 bp. Linearizované produkty, které jsme dostali, mají ale všechny výrazně větší velikost, než jsme čekali, a neodpovídá ani počet fragmentů, které jsme dostali.

Účinnost izolace plazmidu A byla velmi nízká, proto jsme zkusili plazmid produkovat znovu za jiných podmínek. Kompetentní buňky kmene DH10B jsme elektroporovali plazmidem A, inkubovali 60 min v 28 °C a vyseli na misky s 2x a s 5x nižší koncentrací ampicilinu. Na miskách nic nenarostlo. Proto jsme zkusili ještě vnést elektroporací plazmid A do kmene DH5 α a do kmene DH5 α One Shot® TOP10. Tentokrát byla elektroporace obou typů buněk účinná. Plazmid jsme z obou typů buněk vyizolovali metodou midipreparace a výsledek ověřili elektroforézou. Vzorky jsme pojmenovali A4-1 (DH5 α) a A4-2 (DH5 α One Shot® TOP10) (obr. 34).

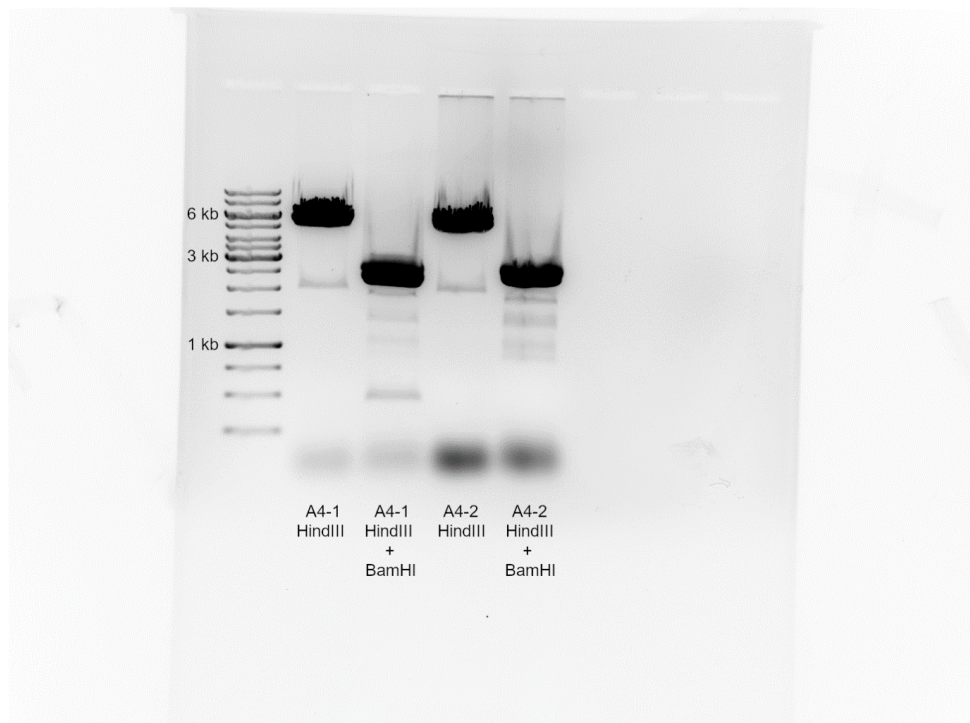


Obrázek 33. Restriční štěpení izolovaných plazmidů enzymem HindIII a kombinací enzymů HindIII a BamHI. 6 μ l roztoku plazmidu A2, 0,25 μ l roztoku plazmidu B2, 1 μ l roztoku plazmidu C a 5 μ l roztoku plazmidu D štěpeno enzymem HindIII v pufru Red a kombinací enzymů HindIII+BamHI v pufru Tango 1x. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, nanášeno 10 μ l reakční směsi. A2 předpokládáný NRL-eIF4G1, B2 předpokládáný eIF4E1-CRL, C předpokládáný NRL-empty, D předpokládáný CRL-empty.



Obrázek 34. Ověření izolace plazmidové DNA z *E. coli* kmene DH5 α a DH5 α One Shot® TOP10 metodou midi-preparace. Elektroforéza v 0,8% gelu, nanášeno 1 μ l a 5 μ l roztoku plazmidu. A4-1 DH5 α , A4-2 DH5 α One Shot® TOP10. Oba vzorky předpokládáný NRL-eIF4G1.

Izolace z obou typů buněk byla úspěšná, proto jsme přistoupili k ověření plazmidů A4-1 a A4-2 restričním štěpením. Štěpili jsme enzymem HindIII a kombinací enzymů HindIII a BamHI. Při štěpení samotným HindIII jsme očekávali jeden fragment o velikosti 4 694 bp, při štěpení HindIII a BamHI zároveň jsme očekávali tři fragmenty o velikostech 1 837 bp, 1 688 bp a 1 169 bp (obr. 35). Linearizovaný produkt měl opět výrazně větší velikost, než jsme čekali, a štěpení na fragmenty také nedopadlo podle očekávání.



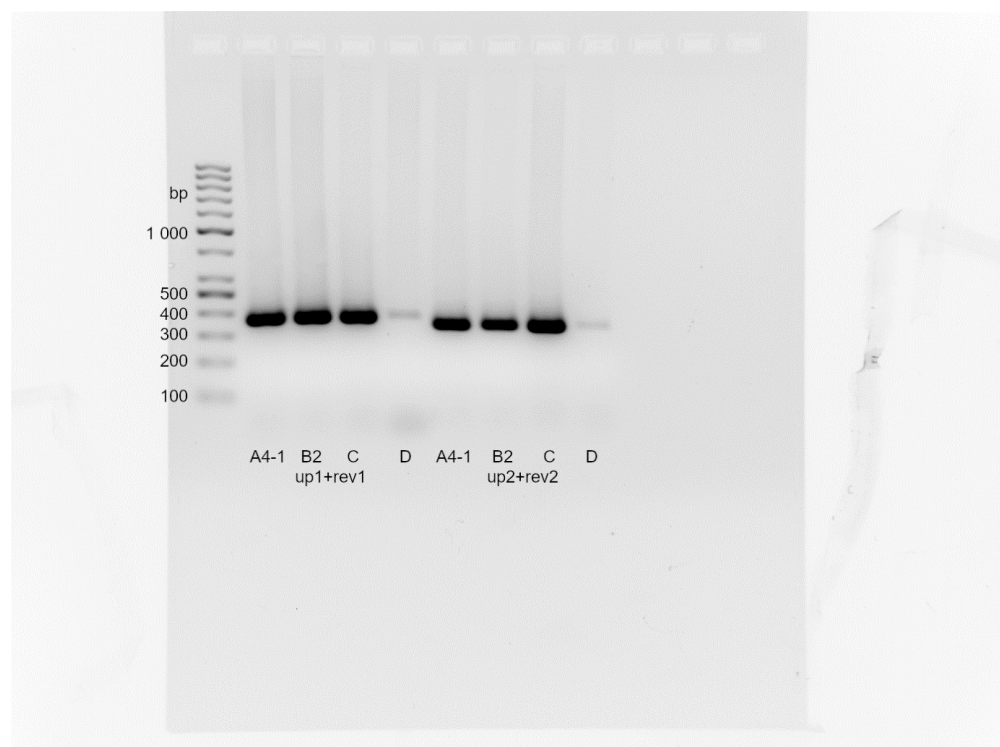
Obrázek 35. Restriční štěpení izolovaných plazmidů enzymem HindIII a kombinací enzymů HindIII a BamHI. 1 μ l roztoku plazmidu A4-1 respektive A4-2 štěpeno enzymem HindIII v pufru Red a kombinací enzymů HindIII+BamHI v pufru Tango 1x. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, nanášeno 10 μ l reakční směsi. A4-1 a A4-2 předpokládáný NRL-eIF4G1.

Přítomnost genu pro Rluc ve vzorcích A4-1, B2, C a D jsme ověřili pomocí PCR (obr. 36). Použili jsme primery Rluc_qPCR_up1 + Rluc_qPCR_rev1 a Rluc_qPCR_up2 + Rluc_qPCR_rev2, které jsme již měli v laboratoři. Obě dvojice primerů nasedají v NRL, vznik produktu jsme proto předpokládali pouze u vzorků A4-1 a C. U obou vzorků ke vzniku produktu došlo, oproti očekávání proběhla reakce také u vzorku B2. U vzorku D je patrný pouze slabý proužek, který je zřejmě důsledkem kontaminace.

Na základě výsledků z restričního štěpení a z PCR jsme usoudili, že máme chybně sestavené mapy plazmidů a zřejmě i špatné plazmidy. Proto jsme se rozhodli plazmidy osekvenovat.

Plazmid A4-1 jsme sekvenovali nejprve primerem RenLuc_5_Seq. Díky tomu jsme zjistili, že je fragment eIF4G1 v plazmidu umístěn proti proudu transkripce od genu pro NRL. Vzhledem k velké velikosti fragmentu eIF4G1 v plazmidu jsme ho nepřesekvenovali celý. Proto jsme navrhli primery 4G_rev a T7_rev a sekvenovali s nimi plazmid A4-1 proti proudu transkripce od genu pro NRL. Tím jsme ověřili celou sekvenci fragmentu eIF4G1 v plazmidu a zjistili, že proti proudu transkripce od genu

pro eIF4G1 obsahuje plazmid sekvenci RSV promotoru. Plazmid A4-1 jsme také sekvenovali primerem Rluc_qPCR_up2, čímž jsme ověřili sekvenci po proudu transkripce od genu pro NRL obsahující SV40 polyadenylační signál a gen pro ampicilinovou rezistenci.



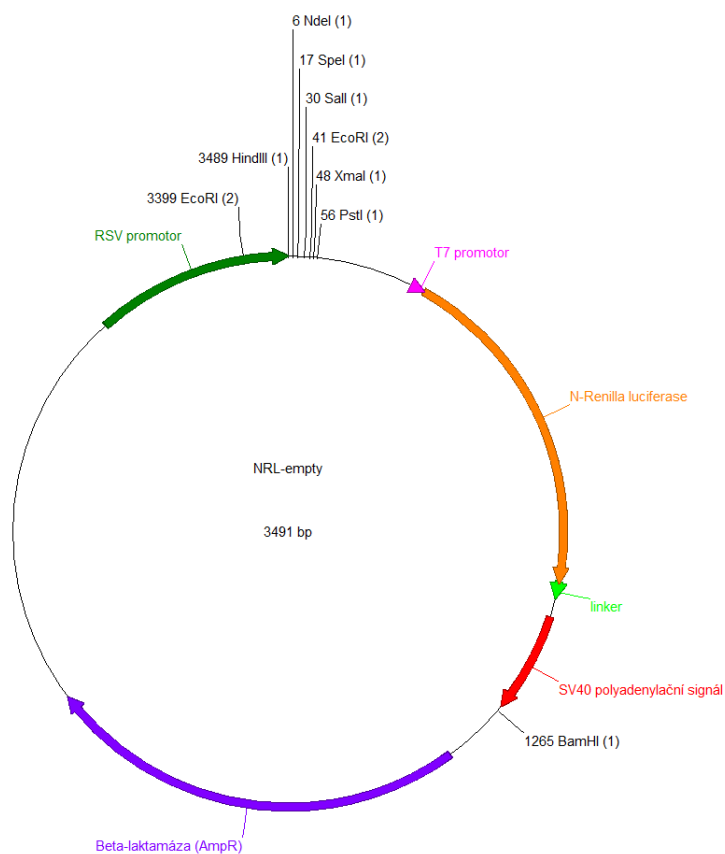
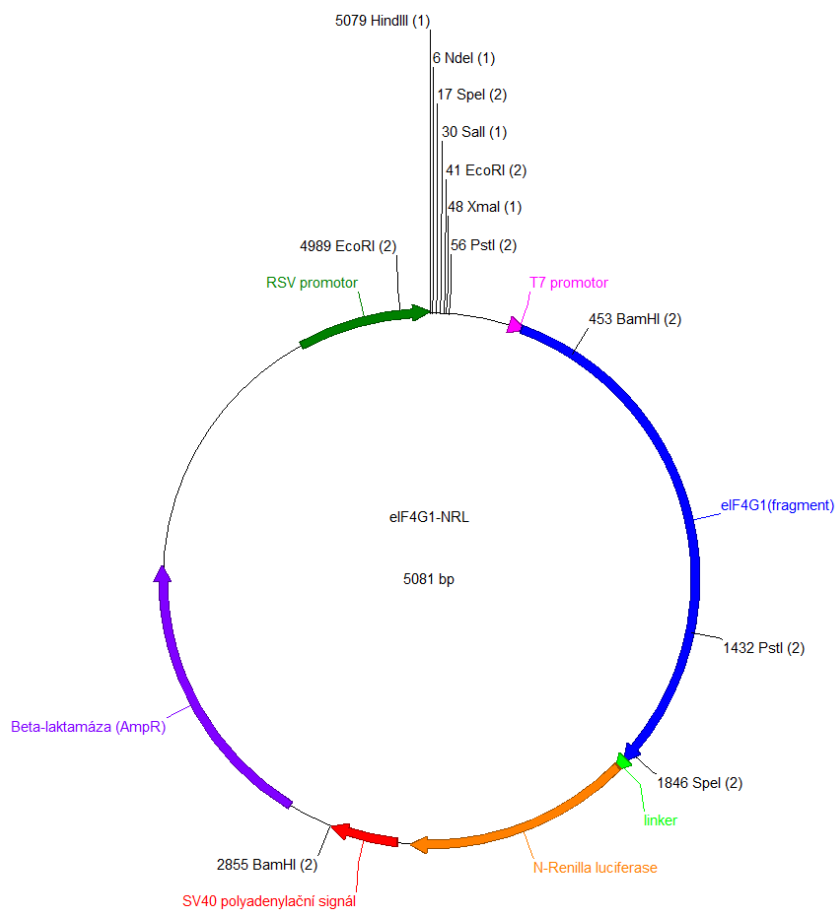
Obrázek 36. Ověření přítomnosti genu pro NRL v plazmidech pomocí PCR. Složení reakce 1 (templát 4,8 ng plazmidu A4-1 / 2,8 ng plazmidu B2 / 9,6 ng plazmidu C / 2,6 ng plazmidu D), program PCR_1. Elektroforéza v 3% agarózovém gelu, naneseo 10 μ l reakční směsi. up1+rev1 reakce s primery Rluc_qPCR_up1 + Rluc_qPCR_rev1, up2+rev2 reakce s primery Rluc_qPCR_up2 + Rluc_qPCR_rev2. A4-1 předpokládaný NRL-eIF4G1, B2 předpokládaný eIF4E1-CRL, C předpokládaný NRL-empty, D předpokládaný CRL-empty.

Plazmid B2 jsme sekvenovali nejprve primerem RenLuc_5_Seq. Díky této sekvenaci jsme zjistili v plazmidu B2 přítomnost RSV promotoru. Následně jsme plazmid B2 sekvenovali primerem Rluc_qPCR_up2. Tím jsme ověřili, že plazmid opravdu místo sekvence genu pro CRL obsahuje sekvenci genu pro NRL, jak jsme předpokládali na základě výsledku PCR. Zjistili jsme také, že gen pro eIF4E1 je umístěn po proudu transkripce od genu pro NRL.

Plazmid C jsme také sekvenovali nejprve primerem RenLuc_5_Seq a pak primerem Rluc_qPCR_up2. Opět jsme díky tomu zjistili přítomnost RSV promotoru. Ověřili jsme také, že po proudu transkripce od genu pro NRL není další gen a že se skutečně jedná o plazmid NRL-empty.

Plazmid D jsme sekvenovali primerem RenLuc_3_Seq. Z výsledku sekvenace jsme zjistili, že máme místo plazmidu CRL-empty plazmid CRL-p65.

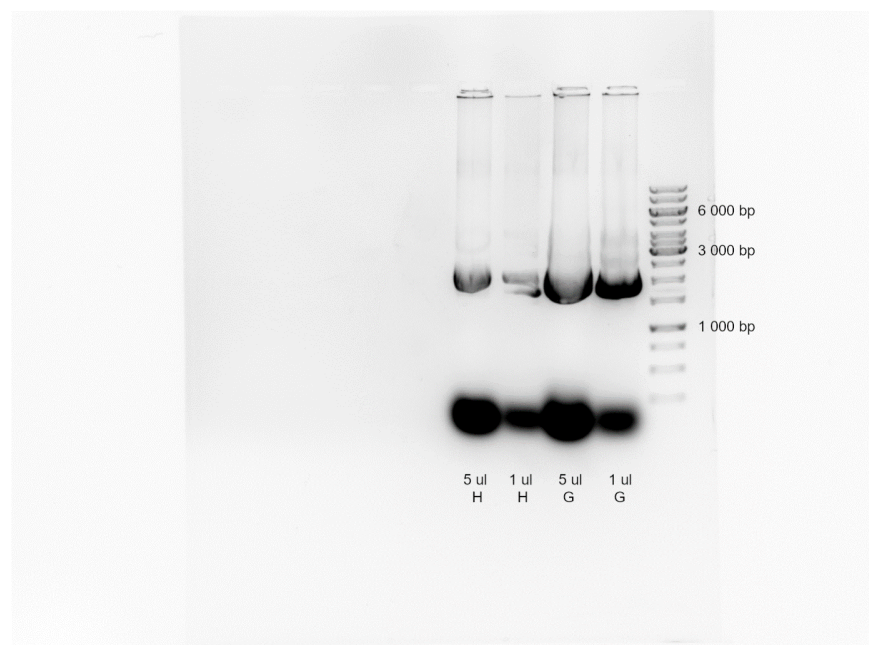
Na základě výsledků sekvenování jsme upravili mapy plazmidů (obr. 37) a kompletní nukleotidovou sekvenci plazmidů (obr. P1 a obr. P3) a požádali autory publikace Haimov *et al.*, 2018 o zaslání správných plazmidů.



Obrázek 37. Mapy plazmidů eIF4G1-NRL a NRL-empty sestavené na základě výsledků sekvenování. Zobrazeny pouze vybrané restrikční enzymy.

5.4.2 Izolace plazmidů CRL-empty a CRL-eIF4E1

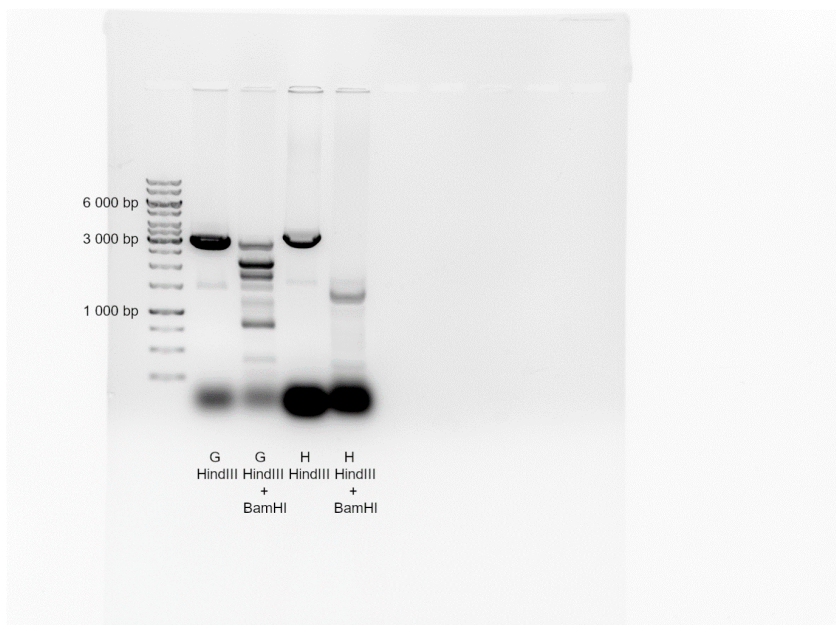
Nově získané plazmidy jsme označili G (CRL-empty) a H (CRL-eIF4E1). Z filtračního papíru, na kterém byly plazmidy nakapány, jsme vyrazili kolečko, inkubovali ho 3 h v 20 μ l TE pufru a elektroporací vnesli do kompetentních buněk kmene DH5 α . Z narostlých buněk jsme izolovali plazmidy metodou midipreparace. Účinnost izolace jsme ověřili elektroforézou (obr. 38).



Obrázek 38. Ověření izolace plazmidové DNA z *E. coli* kmene DH5 α metodou midipreparace. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, naneseo 1 μ l a 5 μ l roztoku plazmidu. H CRL-eIF4E1, G CRL-empty.

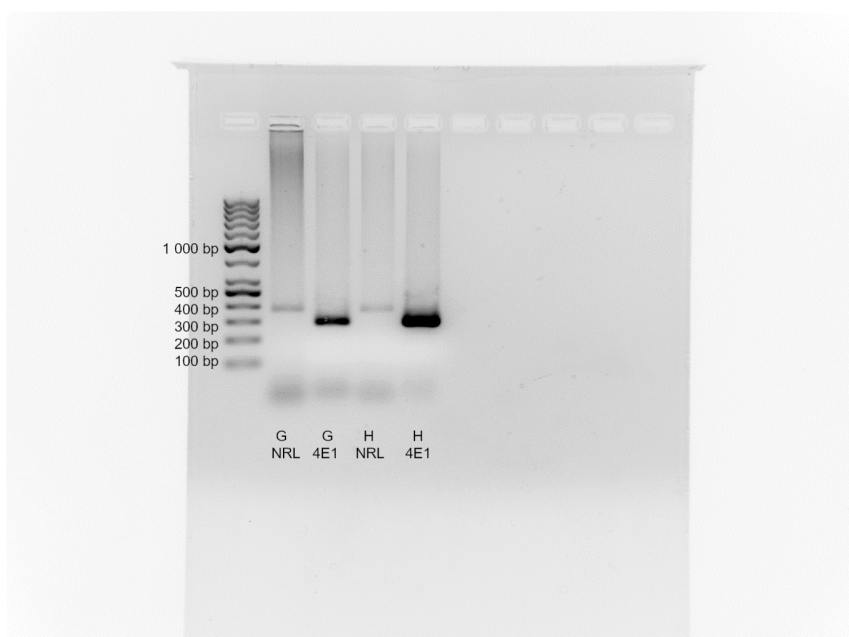
Z výsledku elektroforézy jsme usoudili, že izolace byla úspěšná. To, že máme správné plazmidy, jsme se proto rozhodli ověřit restrikcí štěpením enzymem HindIII a kombinací enzymů HindIII s BamHI (obr. 39). Očekávali jsme, že bude plazmid G štěpením samotným HindIII linearizován na produkt o velikosti 3 053 bp a současným štěpením HindIII a BamHI štěpen na dva fragmenty o velikosti 2 224 bp a 829 bp. V případě plazmidu H jsme očekávali štěpením samotným HindIII vznik jednoho fragmentu o velikosti 3 704 bp a v případě štěpení kombinací HindIII s BamHI vznik dvou fragmentů o velikosti 2 224 bp a 1 480 bp.

Štěpení plazmidu G samotným HindIII dopadlo podle očekávání a dostali jsme linearizovaný produkt o velikosti zhruba 3 kb. Štěpením plazmidu G kombinací enzymů HindIII a BamHI jsme dostali fragmenty o očekávaných velikostech. Kromě nich jsme pozorovali také linearizovaný plazmid vzniklý nekompletním štěpením a několik dalších fragmentů. Štěpením plazmidu H samotným HindIII jsme dostali jeden produkt, jehož molekulová hmotnost se zdá být o něco menší, než jsme čekali u linearizovaného plazmidu H. Štěpením kombinací enzymů HindIII a BamHI jsme dostali pouze jeden fragment o špatné velikosti.



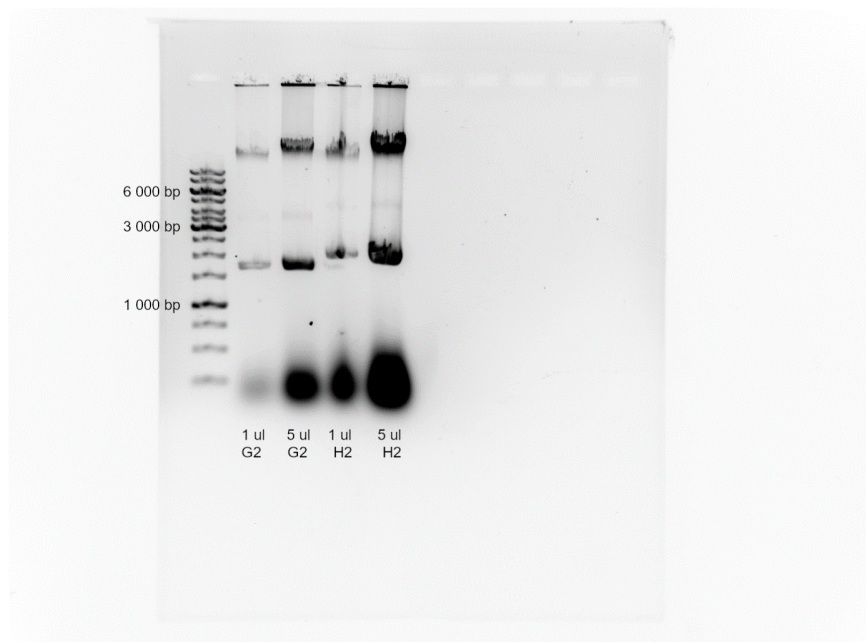
Obrázek 39. Restriční štěpení izolovaných plazmidů enzymem HindIII a kombinací enzymů HindIII a BamHI. 1 μ l roztoku plazmidu G a 5 μ l roztoku plazmidu H štěpeno enzymem HindIII v pufru Red a kombinací enzymů HindIII+BamHI v pufru Tango1x. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, naneseno 10 μ l reakční směsi. G CRL-empty, H CRL-eIF4E1.

Následně jsme otestovali přítomnost genu pro NRL a genu pro eIF4E1 v plazmidech pomocí PCR (obr. 40). Pro detekci NRL jsme použili primery Rluc_qPCR_up1 a Rluc_qPCR_rev1. Pro detekci eIF4E1 jsme použili primery 4E1_for a 4E1_rev.



Obrázek 40. Ověření přítomnosti genu pro NRL a genu pro eIF4E1 v plazmidech pomocí PCR. Složení reakce 1 (templát 4, 1 ng plazmidu G/3, 0 ng plazmidu H), program PCR_1. Elektroforéza v 3% agarózovém gelu, naneseno 10 μ l reakční směsi. NRL reakce s primery Rluc_qPCR_up1 a Rluc_qPCR_rev1, 4E1 reakce s primery 4E1_for a 4E1_rev. G CRL-empty, H CRL-eIF4E1.

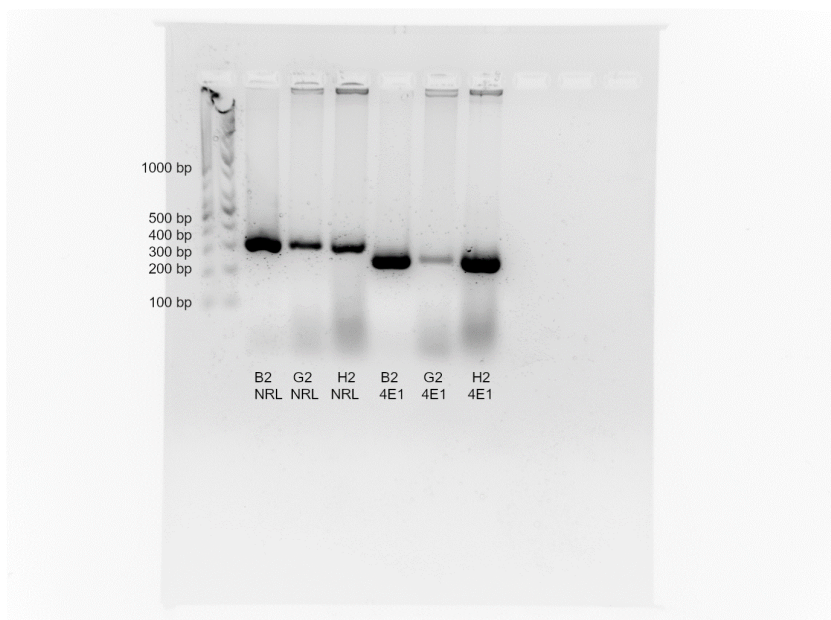
U obou plazmidů došlo k amplifikaci fragmentu ohraničeného primery 4E1_for a 4E1_rev. Pokud by plazmidy ale byly v pořádku, detekovali bychom produkt této reakce jen v případě vzorku H. U obou vzorků je patrný také produkt amplifikace fragmentu ohraničeného primery Rluc_qPCR_up1 a Rluc_gPCR_rev1. Usoudili jsme, že jsou vzorky zřejmě kontaminovány. Z původních misek, které byly dosud uchovány v lednici, jsme proto přečárkovali nové kolonie a izolovali z nich znovu plazmidy metodou minipreparace (obr. 41). Vzorky jsme pojmenovali G2 a H2.



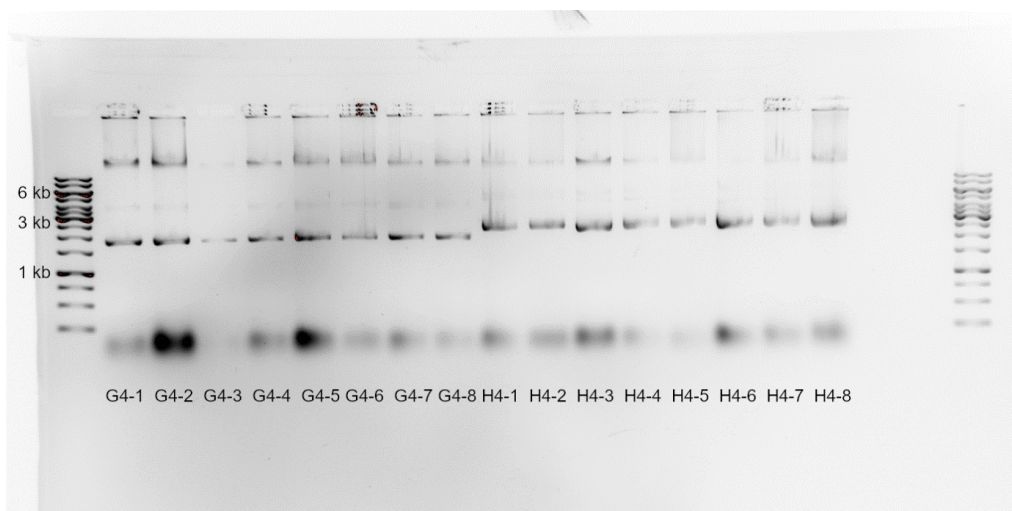
Obrázek 41. Ověření izolace plazmidové DNA z *E. coli* kmene DH5 α metodou minipreparace. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, nanášeno 1 μ l a 5 μ l roztoku plazmidu. G2 CRL-empty, H2 CRL-eIF4E1.

Přítomnost NRL a eIF4E1 v izolovaných plazmidech jsme znovu ověřili pomocí PCR s primery Rluc_qPCR_up1 + Rluc_qPCR_rev1 a s primery 4E1_for + 4E1_rev (obr. 42). Opět došlo u obou vzorků k amplifikaci DNA pomocí primerů Rluc_qPCR_up1 + Rluc_qPCR_rev1 nasedajících v NRL, jejíž sekvenci by plazmidy G2 a H2 neměly obsahovat. Kromě toho se u plazmidu G2 amplifikovalo malé množství fragmentu eIF4E1. Celou izolaci plazmidů jsme proto zopakovali úplně od začátku.

Z filtračního papíru jsme pro každý plazmid znovu vyrazili kolečko a inkubovali ho v 20 μ l TE pufu. 1 μ l roztoku plazmidu jsme následně elektroporací vnesli do 60 μ l kompetentních buněk kmene DH5 α a vyseli na misky s ampicilinem. 8 kolonií pro každý plazmid jsme přečárkovali a z buněk vyizolovali plazmidovou DNA metodou minipreparace. Vzorky jsme označili G4-1 – G4-8 a H4-1 – H4-8. Úspěšnost izolace jsme ověřili elektroforeticky (obr. 43).

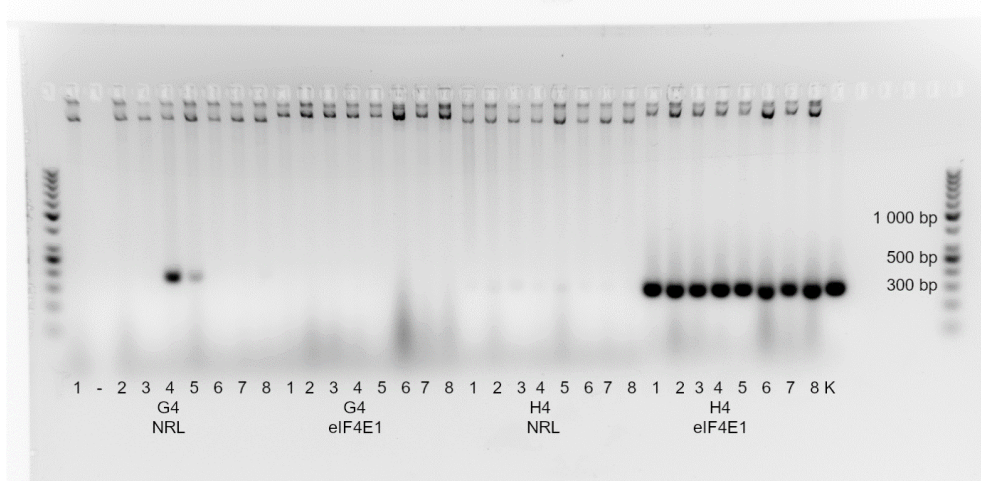


Obrázek 42. Ověření přítomnosti genu pro NRL a genu pro eIF4E1 v plazmidech pomocí PCR. Složení reakce 1 (templát 1 μ l roztoku plazmidu), program PCR_1. Elektroforéza v 3% agarózovém gelu, naneseo 10 μ l reakční směsi. NRL reakce s primery Rluc_qPCR_up1 a Rluc_gPCR_rev1, 4E1 reakce s primery 4E1_for a 4E1_rev. G2 CRL-empty, H2 CRL-eIF4E1.



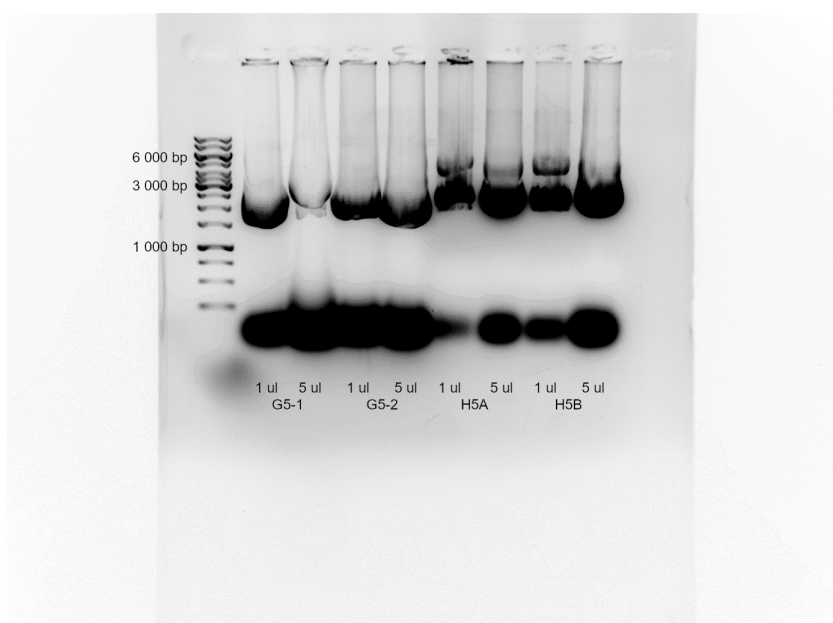
Obrázek 43. Ověření izolace plazmidové DNA z *E. coli* kmene DH5 α metodou minipreparace. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, napětí 8,2 V/cm, naneseo 1 μ l a 5 μ l roztoku plazmidu. G4-1 – G4-8 CRL-empty, H4-1 – H4-8 CRL-eIF4E1.

U všech vyizolovaných plazmidů jsme následně ověřili přítomnost genu pro NRL a genu pro eIF4E1 pomocí PCR s primery Rluc_qPCR_up1 + Rluc_qPCR_rev1 a s primery 4E1_for + 4E1_rev (obr. 44). U vzorků G4-4 a G4-5 došlo ke kontaminaci plazmidem nesoucím gen pro NRL. Velmi slabý proužek indikující kontaminaci NRL je vidět i u vzorků H4-3 a H4-5. Ostatní plazmidy se zdají v pořádku. Plazmidy G4-1, G4-7, H4-2 a H4-4 jsme proto vybrali pro další práci.



Obrázek 44. Ověření přítomnosti genu pro NRL a genu pro eIF4E1 v plazmidech pomocí PCR. Složení reakce 1 (templát 1 μ l roztoku plazmidu), program PCR_1, 27 cyklů. Elektroforéza v 3% agarózovém gelu, naneseo 10 μ l reakční směsi. NRL reakce s primery Rluc_qPCR_up1 a Rluc_gPCR_rev1, eIF4E1 reakce s primery 4E1_for a 4E1_rev. G4-1 – G4-8 CRL-empty, H4-1 – H4-8 CRL-eIF4E1.

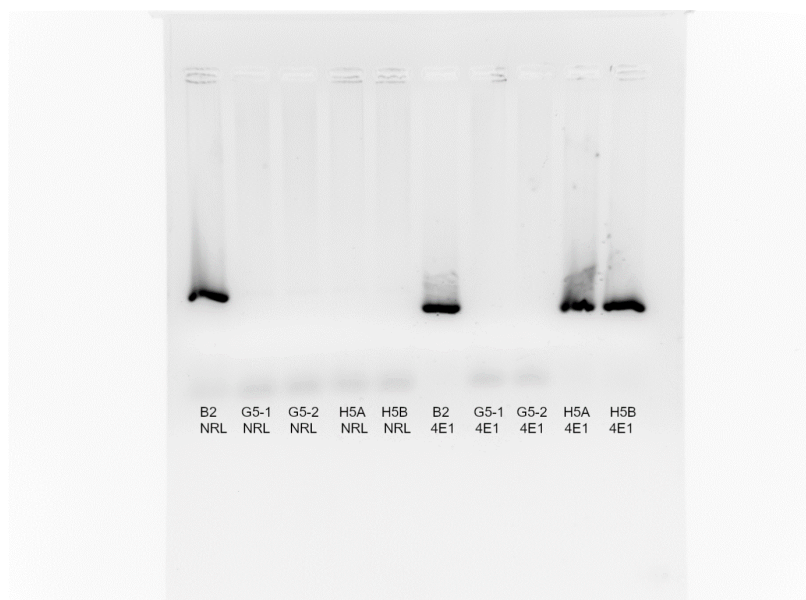
Plazmidy G4-1, G4-7, H4-2 a H4-4 jsme vnesli je do buněk kmene DH5 α a vyizolovali metodou midipreparace. Nově izolované plazmidy jsme pojmenovali G5-1 (vnesení G4-1), G5-2 (vnesení G4-7), H5A a H5B (vnesení H4-2 a H4-4 – během k izolace došlo k promíchání vzorků). Kvalitu izolace jsme ověřili elektroforeticky (obr. 45).



Obrázek 45. Ověření izolace plazmidové DNA z *E. coli* kmene DH5 α metodou midipreparace. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, naneseo 1 μ l a 5 μ l roztoku plazmidu. G4-1 \rightarrow G5-1, G4-7 \rightarrow G5-2 (CRL-empty), H4-2 + H4-4 \rightarrow H5A a H5B (CRL-eIF4E1).

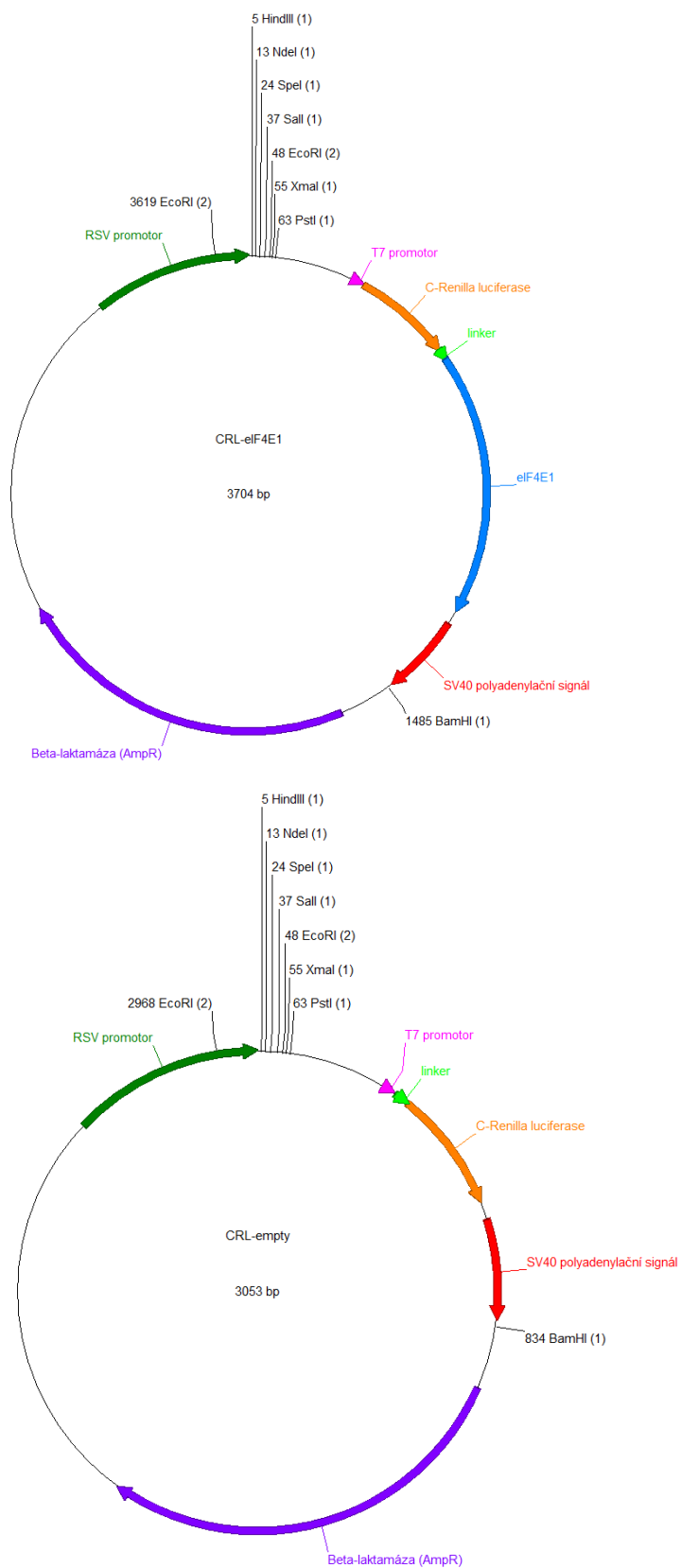
U vyizolovaných plazmidů jsme poté znovu ověřili přítomnost genu pro NRL a genu pro eIF4E1 pomocí PCR s primery Rluc_qPCR_up1 + Rluc_qPCR_rev1 a s primery 4E1_for + 4E1_rev (obr. 46). Přítomnost sekvence NRL jsme podle očekávání zaznamenali pouze ve vzorku B2, který sloužil jako

kontrola. Přítomnost eIF4E1 jsme detekovali ve vzorcích B2, H5A a H5B. Tentokrát nic neindikuje kontaminaci vzorku.



Obrázek 46. Ověření přítomnosti genu pro NRL a genu pro eIF4E1 v plazmidech pomocí PCR. Složení reakce 1 (templát 1 μ l roztoku plazmidu), program PCR_1 27 cyklů. Elektroforéza v 3% agarózovém gelu, nanášeno 10 μ l reakční směsi. NRL reakce s primery Rluc_qPCR_up1 a Rluc_gPCR_rev1, 4E1 reakce s primery 4E1_for a 4E1_rev. B2 NRL-eIF4E1, G5-1 a G5-2 CRL-empty, H5A a H5B CRL-eIF4E1.

Poslední fází ověření kvality vyizolovaných plazmidů byla jejich sekvenace. Vzorky G5-1 a G5-2 jsme sekvenovali primerem pQE-F. Sekvenací jsme ověřili celou sekvenci CRL a většinu sekvence RSV promotoru. Sekvence byla stejná u vzorku G5-1 i u vzorku G5-2. Vzorky H5A a H5B jsme sekvenovali primery 4E1_for a 4E1_rev. Sekvenací jsme ověřili celou sekvenci eIF4E1, CRL a SV40 polyadenylačního signálu a část sekvence RSV promotoru. Díky sekvenaci jsme zjistili, že na pozici 241 genu pro eIF4E1 se v plazmidu H5A nachází cytosin, zatímco v plazmidu H5B je to thymin. V aminokyselinové sekvenci ke změně nedochází, neboť oba tripletty (CTG a TTG) kódují leucin. Porovnáním nukleotidové s databází jsme ale zjistili, že se na této pozici standardně vyskytuje thymin. Porovnáním oproti databázi jsme také zjistili mutace v obou plazmidech na pozicích 237 (C \rightarrow T) a 379 (G \rightarrow A) nukleotidové sekvence genu pro eIF4E1. Záměna na pozici 237 je synonymní. Nachází se ve třetí pozici tripletu kódujícího Ile. Mutace na pozici 379 je missense, způsobuje záměnu Asp za Asn. Na základě sekvence jsme sestavili finální mapu plazmidů eIF4E1-CRL a CRL-empty (obr. 47) a upravili nukleotidovou sekvenci plazmidů (obr. P2 a obr. P4).

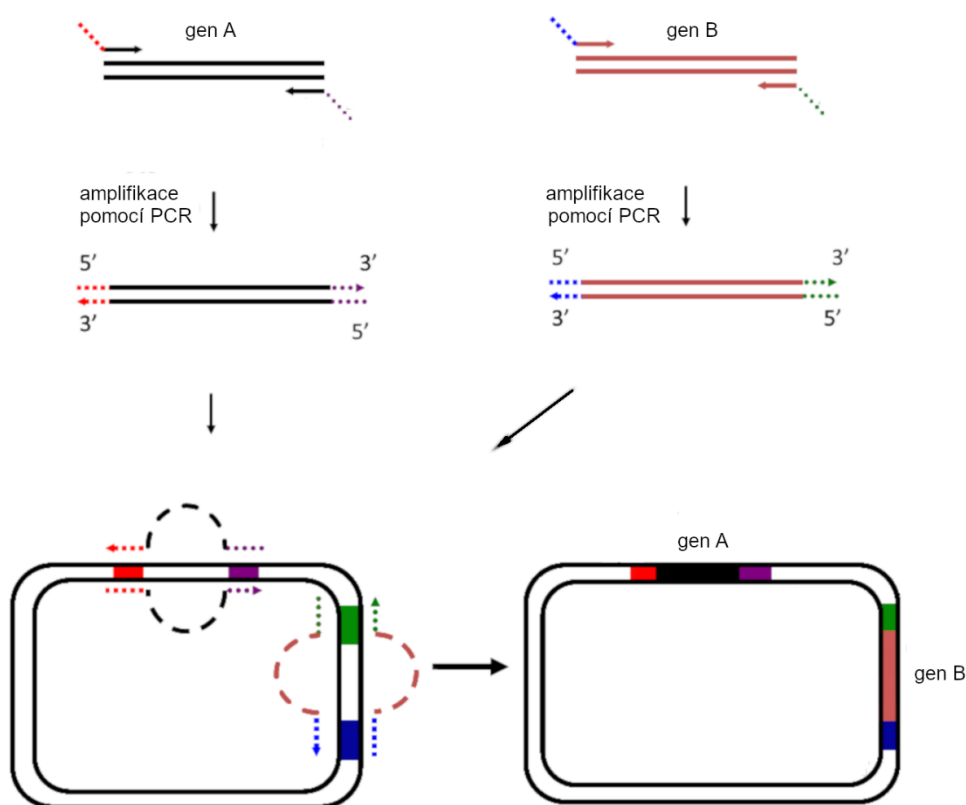


Obrázek 47. Mapa plazmidů CRL-empty a CRL-eIF4E1 sestavená na základě výsledků sekvenování. Zobrazeny pouze vybrané restriční enzymy.

5.4.3 Klonování eIF4G3

Dalším krokem v přípravě systému pro screening inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3 byla výměna genu pro eIF4E1 v plazmidu CRL-eIF4E1 za gen pro eIF4E2 a výměna fragmentu genu pro eIF4G1 v plazmidu eIF4G1-NRL za fragment genu pro eIF4G3.

Pro klonování eIF4G3 a eIF4E2 do plazmidů jsme se rozhodli využít systém Restriction Free Cloning popsaný v publikaci Unger *et al.*, 2010. Tento systém využívá ke klonování nového genu do plazmidu PCR ve dvou krocích. V prvním kroku je gen našeho zájmu amplifikován pomocí primerů, které mají na 5' konci sekvenci komplementární k cílovému plazmidu v místě, kam má být gen vložen. Ve druhém kroku je produkt první reakce použit jako primer pro amplifikaci celého plazmidu pomocí PCR. Tím dojde k produkci plazmidu se specificky vloženým genem našeho zájmu (obr. 48). Původní plazmid je následně degradován působením enzymu DpnI a nově syntetizovaný plazmid je vnesen do bakterií, kde dojde k ligaci plazmidu a jeho další produkci.



Obrázek 48. Schéma Restriction Free Cloning systému. Upraveno podle Unger *et al.*, 2010.

Fragment eIF4G1 v plazmidu eIF4G1-NRL odpovídá aminokyselinám 600-1129 proteinu eIF4G1. Pro odvození odpovídajícího fragmentu eIF4G3 jsme provedli alignment aminokyselinových sekvencí eIF4G1 a eIF4G3 pomocí nástroje ClustalW. Fragment eIF4G3 jsme vybrali tak, aby obsahoval stejné oblasti, jako fragment eIF4G1. Zejména se jedná o eIF4E1-vazebnou oblast (obr. 49).

eIF4G1 1 MNKAPQSTGPPAPSPGLPQPAFPPGQTAPVVFSTPQATQMNTPSQPRQHFYPSRAQPPS
eIF4G3 1 MNSQPQTRSP-----FFQRPQIQ-----PPRATIPN

eIF4G1 61 SAASRVQSAAPARPGPAAHVYFAGSQVMVIPSQ-ISPASQG-AYYIPGQGRS--TYVVP
eIF4G3 27 SSFSIRPGAQTP-----TAVYQANQHIMMVNHLMPMPYPVPOGPOYCIPIQYRHS GPPYVGP

eIF4G1 117 TQOYPVQFGAPG-FYPGASPTTEFG-TYAGAYYPAQGVQOQFPTGVAPT PVLMNQPPQIAPK
eIF4G3 82 PQOYPVQFGPGFFYPGPGGDFPNAYGTPEYPSQPVYQSAPIIVPT---QQQPP--PAK

eIF4G1 175 RERKTI RIRDPNQGGKDITEEIMSG-----ARTASTPTPPQTGGGLEPQAN-----
eIF4G3 137 REKKTIRIRDPNQGGKDITEEIMSGGSRNPTPIGRPTSTPTPPQQLPSQVPEHSPVVY

eIF4G1 220 -----GETPQVAVIVRPD DRSQGAIIADRPGLPGPE-----HSPSESQPSSPSPTPSP
eIF4G3 197 GTVESAHLAASTPVTAASDQKQEEKPKPDPVILKSPSPVLRLLVLSGEKKEQEGQTSETTAI

eIF4G1 269 SPVLEPGSEFN-LAVLSIPGDTMTTIQMSVEESTPIISR-ETGEPYRLS-PEPTPLAEPII
eIF4G3 257 VSIAELPLPSPPTTVSSVARSTIAAPTSSALS S OPIFTTAIDDRCELSSPREDTIPIPSL

eIF4G1 326 EVEVTL SKVP ESEFSSSPLQAPTPLASHTVEIHEPNGMVPSE----DLEPEVESSPELA
eIF4G3 317 TSCTETSDLELPTNENDDDDICKKPCSVAPNDIPLV SSTNLLINEINGVSEKLSATESIVEIV

eIF4G1 382 PPPACFSESPVPIAPTAQPEELLNGAPSPPAVDLSPVSEPEEQAKEVTASMAPPTIPSAT
eIF4G3 377 KQEVLELTLELEILENPPPEMKLECIAP-----ITPSTVPSFPPTPTTPPASPPHTPVIV

eIF4G1 442 PATAPSATSPAQEEEMEEEEEEEGEAGEAEAESEKGGEELLPEESTPI PANLSQNLEA
eIF4G3 433 PAAATTVSSPSAAITVQRVLEEDDESIRTCLEDAKEIQNKIEVEADGQTEEILDSQNLS

eIF4G1 501 ---AAATQVAVSVPKRRRKIKELNK--KEAVGDLLDAFKEANPAVPEVENQPPAGSNP GP
eIF4G3 493 RRSVPVACIAITVPKTKWKPKDRTRTTEMLEAELELKAEEELSIDKVLSEQDKMSQGF

*

eIF4G1 557 ESEGSGVPPRPEEADETWDSKEDKIHNAENIQPGE-----QKYEYKSDQ
eIF4G3 553 HPERDPSDLKVKVAVENGEEAEVVRNGAESVSEGE GIDANSGSTDSSGDGVTFPFK PES

eIF4G1 601 WKPLNLEKKRYDREFFLLGFQFIHASMOKPEGLPHISDVVLDKAN--KTPLRPLDPTRLQ
eIF4G3 613 WKPTDTECKKQYDREFFLLDFQFMPACTQKPEGLPPI SDVVLDKINQKPLMRTLDPRI LP

eIF4G1 659 GINCGPDFTFPSFANLGRITLSTRGPPRGGPGGELPRGPAGLGP RRSQQGPRKEPRKI IAT
eIF4G3 672 ---RGPDFTFPAFADFGROTPGGRGVP-----LLNVGSRRSQPGORREPRKIIT-

eIF4G1 719 VLMTEDIKLNKAEKAWKPS SKRTAADKDRGEEADAGSKTQDLFRFRVRSILNKLT PQMFQQ
eIF4G3 718 VSVKEDVHLKKAENAWKPSQKR-----DSQADDPENIKTQELFRKFRVRSILNKLT PQMFNQ

eIF4G1 779 LMKQVTQLAIDTEERLKGVIDLIFEKAISEPNFSVAYANMCRCLMALKVP TTEKPTVTVN
eIF4G3 773 LMKQVSGLITVDTEERLKGVIDLIFEKAIDEPSFSVAYANMCRCLVTLKVP MADKPGNTVN

eIF4G1 839 FRKLLLNRQKEFEKDKDDDEVFEKKQKEMDEAATAEERGR LKEELEEARDIARRRSLGN
eIF4G3 833 FRKLLLNRQKEFEKDKADDDVFEKKQKELAAASAEERTRLHDELEEKDKARRRSLGN

eIF4G1	899	I KF I G E L F K L K M L T E A I M H D C V V K L L K N H D E E S L E C L C R L L T T I G K D L D F E K A K P R M D O Y
eIF4G3	893	I K F I G E L F K L K M L T E A I M H D C V V K L L K N H D E E S L E C L C R L L T T I G K D L D F E K A K P R M D O Y

eIF4G1	959	F N Q M E K I I K E K T S S R I R F M L Q D V L D L R G S N W V P R R G D Q G P K T I D Q I H K E A E M E H R E H I
eIF4G3	953	F N Q M E K I V K E R K T S S R I R F M L Q D V I D L R L C N W V S R R A D Q G P K T I E Q I H K E A K I E E Q E E Q R

eIF4G1	1019	K V Q Q L M A K G S D K R R G G P P G P P I S R G L P L V D D G G W N T V P I S K G S R P I D T S R L T K I T K P G S I
eIF4G3	1013	K V Q Q L M T K -- E K R R ---- P G V Q R ---- V D E G G W N T V Q G A K N S R V L D P S K F L K I T K P -- T I

eIF4G1	1079	D S N N Q L F A P G G R L S W G K G S S G G S G A K P S D A A S E A A R P A T S T L N R F S A L Q A V P T E S T ---
eIF4G3	1061	D E K I Q L V P K A Q L G S W G K G S S G G A K A S ---- E T D A L R S S A S S L N R F S A L Q P A P S G S T P S T

eIF4G1	1135	---- D N R R V V Q - R S S L S R E R G E K - A G D R G D R L E R S E R G G D R G D R L D R A R T P A T K R S F S K E
eIF4G3	1117	P V E F D S R R T L T S R G S M G R E K N D K P L P S A T A R P N T F M R G G S S K D L L D N Q S Q E E Q R R E M L E T

eIF4G1	1190	V E E R S R E R P S Q P E G L R K A A S L T E D R D R G R D A V K R E A A L P P V S P L K A A L S E E E L E K K S K A I
eIF4G3	1177	V K Q L T G G V D V E R N ----- S T E A E R N K T R E S A K P E I S A M S A H - D K A A L S E E E L E R K S K S I

eIF4G1	1250	I E E Y L H L N D M K E A V Q C V Q E L A S P S L L F I F V R H G V E S T L E R S A I A R E H M G Q L L H Q L L C A G H
eIF4G3	1230	I D E F L H I N D F K E A M Q C V E E L N A Q G L L H V F V R V G V E S T L E R S Q I T R D H M G Q L L Y Q L V Q S E K

eIF4G1	1310	L S T A Q Y Y Q G L Y E I L E L A E D M E I D I P H V W L Y L A E L V T P I L Q E G G V P M G E L F R E I T K P L R P L
eIF4G3	1290	L S K Q D F F K G F S E T L E L A D D M A I D I P H I W L Y L A E L V T P M L K E G G I S M R E L T I E F S K P L L P V

eIF4G1	1370	G K A A S L L L E I L G L L C K S M G P K K V G T L W R E A G L S W K E F L P E G Q D I G A F V A E Q K V E Y T L G E E
eIF4G3	1350	G R A G V L L S E I L H L L C K Q M S H K K V G A L W R E A D L S W K D F L P E G E D V H N E L L E Q K L D F I E S D S

eIF4G1	1429	--- S E A P G Q R A L P S E E L N R Q L E K L L K E G S S N - Q R V F D W I E A N L S E Q Q I V S N T L V R A L M T A
eIF4G3	1410	P C S S E A L S K K E L S A E E L Y K R L E K L I E D K A N D E Q I F D W V E A N L D E I Q M S S P T F L R A L M T A

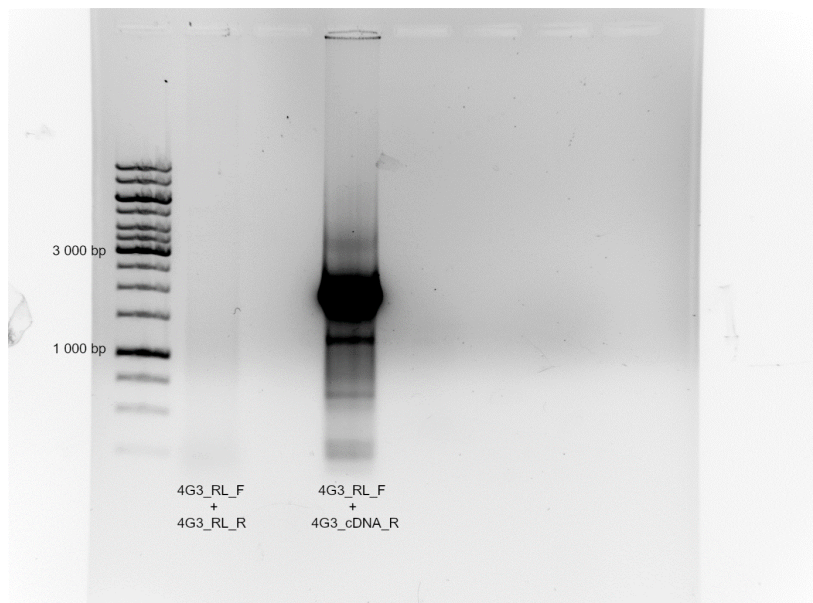
eIF4G1	1486	V C Y S A I I F E T P - L R V D V A V L K A R A K L L Q K Y L - C D E Q K E L Q A L Y A L Q A L V V T L E Q P P N L L R
eIF4G3	1470	V C K A A I I A D S S T F R V D T A V I K Q R V P I L L K Y L D S D T E K E L Q A L Y A L Q A S I V K L D Q P A N L L R

eIF4G1	1544	M F F D A L Y D E D V V K E D A F Y S W E S S K D P A E Q Q G K G V A L K S V T A F F K W L R E A E E E S D H N
eIF4G3	1530	M F F D C L Y D E E V I S E D A F Y K W E S S K D P A E Q N G K G V A L K S V T A F F T W L R E A E E E S E D N

Obrázek 49. Alignment aminokyselinové sekvence eIF4G1 a eIF4G3. Hvězdičkami je označený fragment eIF4G1 respektive eIF4G3 použitý pro klonování. Tučně jsou vyznačeny eIF4E1-vazebné oblasti.

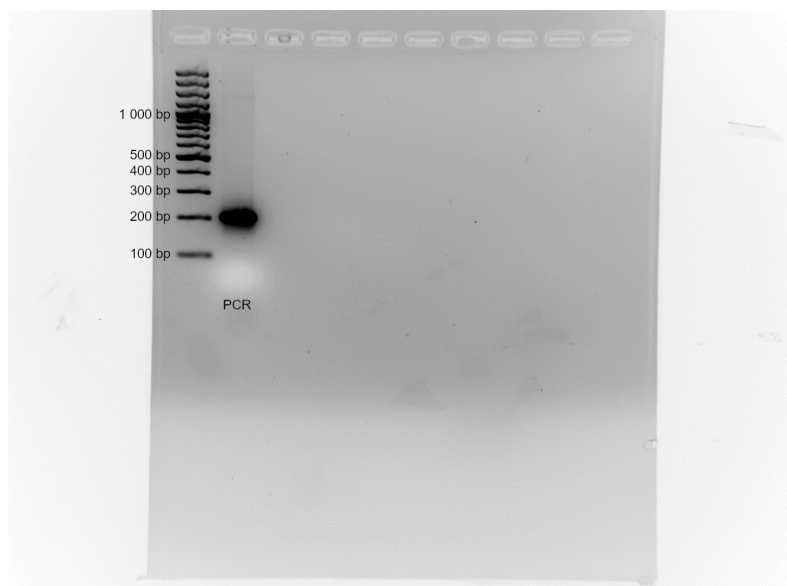
Plazmid s genem pro eIF4G3 se nám nepodařilo sehnat, jako zdroj eIF4G3 jsme proto použili cDNA. Pro amplifikaci fragmentu eIF4G3 s konci upravenými tak, aby nasedaly k cílovému plazmidu eIF4G1-NRL, jsme navrhli primery 4G3_RL_F a 4G3_RL_R. Kromě reakce s primery 4G3_RL_F a 4G3_RL_R jsme zkusili také reakci s primery 4G3_RL_F a 4G3_cDNA_R. 4G3_cDNA_R je primer standardní velikosti nasedající na sekvenci genu pro eIF4G3 zhruba 250 nukleotidů po směru transkripce od našeho požadovaného konce fragmentu. Reakce s primery 4G3_RL_F a 4G3_RL_R neproběhla, ale

amplifikace s primery 4G3_RL_F a 4G3_cDNA_R byla úspěšná (obr. 50). Výsledný produkt jsme pojmenovali 4G3_fr4 a izolovali ho z gelu pomocí komerční soupravy.



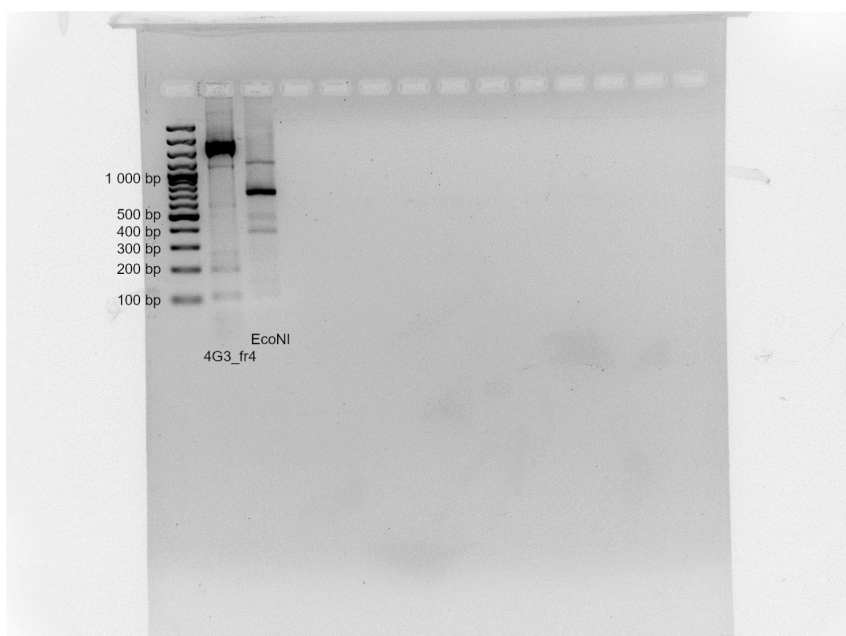
Obrázek 50. Amplifikace fragmentu eIF4G3 pomocí PCR s primery 4G3_RL_F a 4G3_RL_R a s primery 4G3_RL_F a 4G3_cDNA_R. Vlevo složení reakce 2 (templát 8 μ l 5x ředěné cDNA), program PCR_2. Vpravo složení reakce 2 (templát 8 μ l 5x ředěné cDNA), program PCR_2, teplota nasedání primerů 50 °C prvních 5 cyklů a 54 °C zbylých 30 cyklů. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, nanášeno v obou případech 10 μ l reakční směsi.

Pro ověření, že je 4G3_fr4 požadovaný fragment, jsme namíchali PCR reakci s primery 4G3_in_F a 4G3_in_R nasedajícími uvnitř fragmentu eIF4G3 (obr. 51). Reakce proběhla a vznikl produkt o očekávané velikosti.



Obrázek 51. Ověření fragmentu 4G3_fr4 pomocí PCR s primery 4G3_in_F a 4G3_in_R. Složení reakce 1 (templát 1 μ l 200x ředěného roztoku fragmentu 4G3_fr4), program PCR_1, teplota nasedání primerů 57 °C. Elektroforéza v 3% agarózovém gelu, nanášeno 10 μ l reakční směsi.

Fragment 4G3_fr4 jsme také zkontrolovali pomocí restričního štěpení enzymem EcoNI (obr. 52). Očekávali jsme, že dostaneme fragment o velikostech 719 bp, 696 bp a 341 bp. Pro srovnání jsme na gel nanесли také neštěpený fragment 4G3_fr4. Na fotce gelu jsou patrné 4 proužky. Nejsilnější proužek odpovídá velikostně zhruba 700 bp a jedná se tak nejspíš o kombinaci fragmentů o velikostech 719 bp a 696 bp, jejichž vznik jsme očekávali. Nejspodnější proužek odpovídá velikostně očekávanému fragmentu o délce 341 bp. Proužek navrchu je pravděpodobně výsledkem nekompletního štěpení a vznikem fragmentu o velikosti 1 415 bp (719 bp + 696 bp).



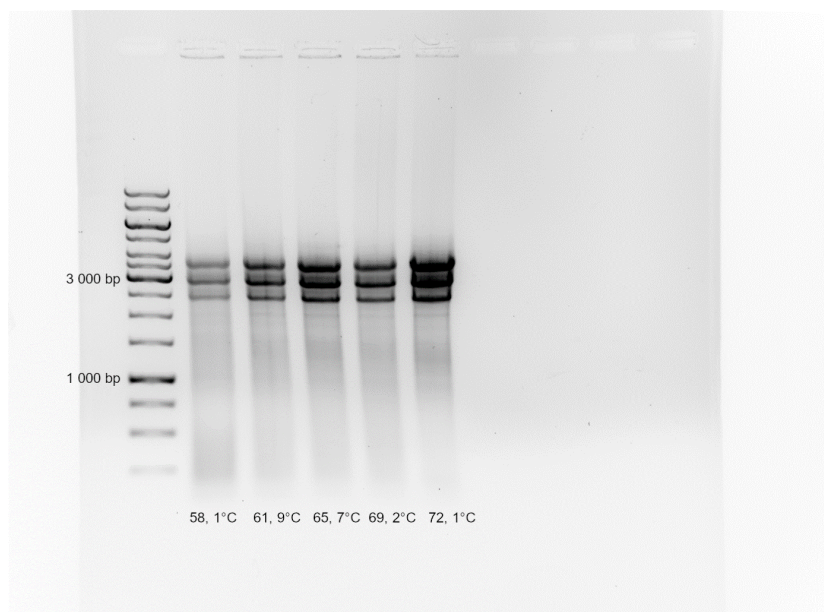
Obrázek 52. Restriční štěpení fragmentu 4G3_fr4 enzymem EcoNI. 2 μ l roztoku fragmentu 4G3_fr4 štěpeno přes noc enzymem EcoNI v pufru Red. Objem reakce 20 μ l. Elektroforéza v 3% agarózovém gelu, naneseo 2 μ l roztoku fragmentu 4G3_fr4 a 20 μ l reakční směsi.

Abychom si byli správností fragmentu 4G3_fr4 opravdu jisti, rozhodli jsme se ho sekvenovat pomocí primerů 4G3_in_F a 4G3_cDNA_R. Sekvenací jsme ověřili, že je 4G3_fr4 opravdu fragment, který jsme chtěli. Zjistili jsme také, že máme v určité části vzorku mutaci na pozici 298 fragmentu eIF4G3. Jedná se o missense mutaci, která způsobuje záměnu Glu na Lys (obr. P5).

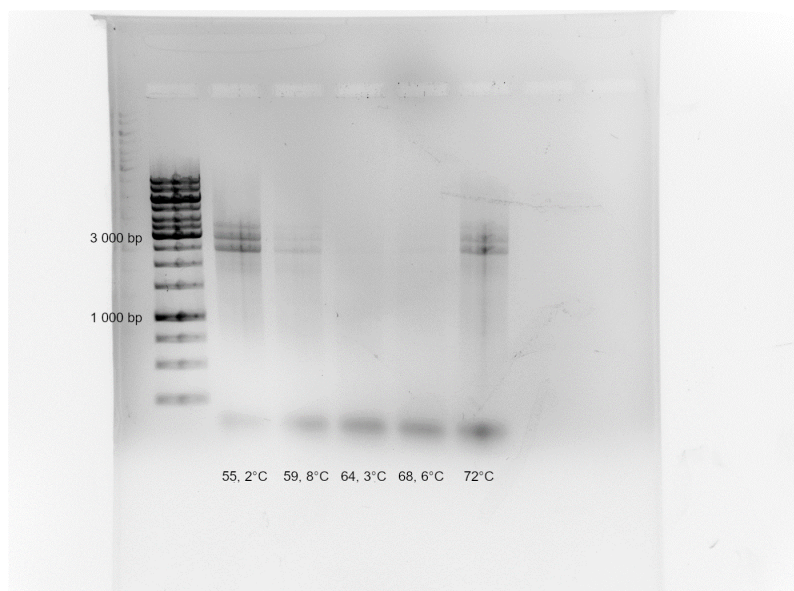
Po ověření fragmentu 4G3_fr4 jsme zkusili amplifikovat z fragmentu 4G3_fr4 finální fragment s upravenými konci pomocí primerů 4G3_RL_F a 4G3_RL_R. Pro nasedání primerů jsme použili gradient teplot. Množství produktu se zvyšovalo se zvyšující se teplotou nasedání primerů (obr. 53). Při všech teplotách jsme ale dostali 3 produkty, které velikostně neodpovídají očekávanému ampliconu.

Vzhledem k velikosti primerů je pravděpodobné, že tvoří primery vlásenky a produkty, které jsme pozorovali, byly výsledkem nespecifické amplifikace z primerů. Abychom riziko vzniku vlásenek minimalizovali, před dalším PCR jsme směs primerů 4G3_RL_F a 4G3_RL_R povařili 5 min ve vodní lázni a následně krátce stočili v předchlazené centrifuze a přidali do reakce. Primery jsme přidávali až naposled. Zkusili jsme také 5 různých teplot nasedání primerů (obr. 54). Reakce ve třech případech téměř neproběhla. Při teplotách nasedání primerů 55,2 $^{\circ}$ C a 72 $^{\circ}$ C reakce proběhla se stejným

výsledkem, jako v předchozím případě, množství produktu ale bylo nižší než v případě, že nebyly primery před přidáním do reakce denaturovány (obr. 53 vs. obr. 54).



Obrázek 53. Amplifikace fragmentu eIF4G3 pomocí PCR s primery 4G3_RL_F a 4G3_RL_R. Složení reakce 2 (templát 1 μ l 200x ředěného roztoku 4G3_fr4), program PCR_2, teplota nasedání primerů prvních 5 cyklů 58,1 °C / 61,9 °C / 65,7 °C / 69,2 °C / 72,1 °C. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, nanášeno 10 μ l reakční směsi.



Obrázek 54. Amplifikace fragmentu eIF4G3 pomocí PCR s primery 4G3_RL_F a 4G3_RL_R. Složení reakce 2 (templát 1 μ l 200x ředěného roztoku 4G3_fr4), program PCR_2, teplota nasedání primerů prvních 5 cyklů 55,2 °C / 59,8 °C / 64,3 °C / 68,6 °C / 72 °C. Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu, nanášeno 10 μ l reakční směsi.

6 Diskuze

6.1 Hledání nových interakčních partnerů eIF4E2

6.1.1 Chromatografie

Cílem chromatografických experimentů bylo separovat jednotlivé proteinové komplexy obsahující GFP-eIF4E2 vyskytující se v buňkách linie HEK293. V první řadě jsme zkusili chromatografii na aniontoměniči, chromatografii na kationtoměniči a chromatografii hydrofobních interakcí. U obou iontoměničových chromatografií se nám podařilo eluovat GFP-eIF4E2 v několika různých frakcích. To mohlo být způsobeno přítomností GFP-eIF4E2 v různých proteinových komplexech vážících se na kolonku s různou afinitou, nebo různými modifikacemi GFP-eIF4E2. Iontoměničovou chromatografií jsme proto zopakovali s využitím střednětlaké proteinové chromatografie.

Střednětlaká chromatografie na aniontoměniči vypadala podle chromatogramu nadějně. Pozorovali jsme 3 vrcholy fluorescence, které mohly znamenat přítomnost GFP-eIF4E2 v příslušných frakcích. Dva z nich dokonce korespondovaly s vrcholy absorpance při 488 nm. Třetí vrchol absorpance při 488 nm může být způsoben GFP, které není schopno fluorescence, ale stále při 488 nm absorbuje.

Pomocí metody western blot se nám nepodařilo detekovat GFP-eIF4E2 ani v jedné z frakcí. Je možné, že jsme eluovali pouze fragmenty GFP a GFP-eIF4E2 zůstal za použitých podmínek navázaný na kolonku. Pokud by to tak bylo, bylo by teoreticky možné ho eluovat vyšší koncentrací KCl. V takovém případě by ale došlo z důvodu vysoké koncentrace solí k rozpadu proteinových komplexů, které jsme chtěli izolovat. Pravděpodobnější vysvětlení je to, že jsme díky chromatografii separovali GFP-eIF4E2 do několika frakcí a v důsledku toho bylo množství GFP-eIF4E2 v jednotlivých vzorcích příliš nízké, než abychom ho za použitých podmínek detekovali. Řešením by bylo zakoncentrovat vzorky srážením s TCA. Z časových důvodů k tomu ale nedošlo. Fragmenty GFP jsou na rozdíl od GFP-eIF4E2 eluovány všechny v podobné frakci, neboť tvoří tolik různých komplexů a není u nich tolik možností modifikací, které by afinitu ke kolonce ovlivnily. Na rozdíl od GFP-eIF4E2 jsme je proto mohli zakoncentrovat a tím získat intenzivní signál pouze ve dvou frakcích. Fragmenty GFP jsme detekovali ve všech experimentech, jak je vidět na fotkách membrán z western blotu.

V případě střednětlaké chromatografie na kationtoměniči se nám podařilo do velké míry zopakovat výsledky z pilotního experimentu. Zdá se, že se GFP-eIF4E2 za použitých podmínek dobře váže na kolonku, následně jsou eluovány jeho fragmenty a celý GFP-eIF4E2 je eluován až ve frakcích 13 a 14. Sice se nám nepodařilo oddělit jednotlivé proteinové komplexy obsahující GFP-eIF4E2, zdá se ale, že by mohla být chromatografie na kationtoměniči použita pro purifikaci GFP-eIF4E2 z buněk linie HEK293. Takto purifikovaný protein by mohl obsahovat správné posttranslační modifikace odrážející aktuální fyziologický stav buňky a mohl by vhodně sloužit k dalším analýzám a biochemickým studiím. Všechny dosavadní biochemické studie zaměřené na měření síly interakce eIF4E2 s analogy čepičky mRNA nebo s fragmentem proteinu eIF4G využívaly bílkoviny produkované v bakteriích.

Při chromatografii hydrofobních interakcí velká část GFP-eIF4E2 precipitovala ještě před nanesením na kolonku. Kdybychom použili nižší počáteční koncentraci síranu amonného, možná bychom zabránili srážení, ale nevytvořili bychom dostatečný gradient. Ta část GFP-eIF4E2, kterou jsme na kolonku nanесли, pak byla z velké části eluována hned v prvních frakcích. Chromatografie hydrofobních interakcí tedy pro naše účely za použitých podmínek není vhodnou metodou.

Nejlepší výsledky jsme dostali za použití střednětlaké gelové permeační chromatografie v médiu Superdex® 200 10/300 GL. GFP-eIF4E2 bylo eluováno do několika frakcí, které mají rozdílné složení proteinů, jak jsme se dozvěděli z výsledků hmotnostní spektrometrie.

Při iontoměničové chromatografii jsme k eluci používali KCl. To mělo nepříjemný důsledek v tom, že se po přidání nanášecího pufru ke vzorku tvořila draselná sůl SDS, která má ve vodě nízkou rozpustnost. Nanesení požadovaného množství vzorku na polyakrylamidový gel pak bylo technicky náročné. U některých experimentů jsme proto vzorky před nanesením na gel odsolili srážením s TCA. V případě vzorků z kationtoměničové chromatografie jsme odsolením nedostali žádnou další informaci. Může to být tím, že jsme použili pro detekci odsolených vzorků jinou sekundární protilátku, o které zpětně víme, že neposkytuje tak intenzivní signál jako ta, kterou jsme použili pro detekci neodsolených vzorků. Nelze také vyloučit, že došlo během promývání acetonem ke ztrátě části vzorku. V případě odsolení vzorků z gelové permeační chromatografie naopak došlo ke zintenzivnění signálu díky zakoncentrování vzorku. Bylo by jistě vhodné precipitovat i ostatní vzorky z chromatografií, vzorky ale velmi rychle degradují, proto už je po delším čase nebylo možné použít.

6.2 Analýza výsledků hmotnostní spektrometrie

6.2.1 Interakční partneri eIF4E2 v neseparovaném vzorku

Většina interakčních partnerů eIF4E2 popsaných v literatuře byla signifikantně nabohacena i v HAF buňkách. Překvapivě jsme v našem vzorku z neseparovaného lyzátu buněk linie HAF vůbec nedetekovali proteiny 4E-BP3, TNRC6A/B a PATL-1. TNRC6A jsme našli ve vzorku separovaného lyzátu ve frakcích 17 a 18. Stejně tak jsme v separovaném lyzátu našli PATL-1 ve frakci 9+10. Z toho, že jsme proteiny nedetekované v neseparovaném buněčném lyzátu našli v lyzátu separovaném, lze usoudit, že nám separace lyzátu umožňuje získat informace i o méně abundantních proteinech. Kromě výše zmíněných interakčních partnerů jsme nereprodukovali ani interakci eIF4E2 s HIF-2 α . To ovšem není příliš překvapivé, neboť k ní dochází v podmínkách snížené dostupnosti kyslíku a my jsme buňky kultivovali za standardních podmínek (Uniacke *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2016). Nepřítomnost proteinu Prep1 v našem souboru proteinů lze vysvětlit tím, že byla interakce eIF4E2 a Prep1 popsána pouze v myších oocytech (Villaescusa *et al.*, 2009). Je možné, že v HEK293 je interakce eIF4E2 s Prep1 příliš slabá, než abychom ji zaznamenali, nebo k ní vůbec nedochází. Proteiny rodiny eIF4G jsme v našem souboru zaznamenali, jejich abundance byla ale podobná ve vzorku i v kontrole (viz níže). Rozdíl v abundanci jsme nezaznamenali ani u proteinu DDX6. V publikaci, která interakci eIF4E2 s DDX6 v buňkách linie HEK293 popsala, je ovšem množství eIF4E2 detekovaného po imunoprecipitaci s endogenním DDX6 velmi malé. Interakce je tedy zřejmě slabá (Chapat *et al.*, 2017).

Významné nabohacení ve vzorku oproti kontrole jsme pozorovali také u několika proteinů, které byly detekovány jako možní interakční partneři eIF4E2 pomocí metody BioID. Jedná se o proteiny eIF3E, eIF3L, importin 8, ASCC3 a IRS4 (Chapat *et al.*, 2017). Proteiny eIF3E a eIF3L jsou podjednotky komplexu eIF3, který jsme v našich datech našli celý (viz níže). IRS4 je součástí signalizace z insulinového receptoru. Mezi nejvíce nabohacenými proteiny se vyskytoval i v dalším experimentu zaměřeném na hledání interakčních partnerů eIF4E2 v buňkách linie HEK293 (Frydrýšková, 2020). V případě importinu 8 a ASCC3, proteinu účastnícího se oprav DNA, jsme další zmínky o interakci s eIF4E2 v literatuře nedohledali. Ostatní proteiny, které byly identifikované jako interakční partneři eIF4E2 pomocí metody BioID, jsme buď ve vzorku nedetekovali vůbec, nebo nebyly signifikantně nabohacené.

Výhodou metody BioID je skutečnost, že k interakci dochází *in vivo* přímo v buňkách a že dovede zachytit i interakce příliš slabé, než aby vydržely celý proces imunoprecipitace. Na druhou stranu může fúze proteinu s biotinligázou změnit jeho konformaci, schopnost interagovat s dalšími interakčními partnery nebo lokalizaci. Z naší zkušenosti s použitím buněk linie HAF jsme žádné změny tohoto charakteru v důsledku fúze eIF4E2 s GFP nezaznamenali, v případě fúze eIF4E2 s biotinligázou ale na základě našich informací změny v chování eIF4E2 jednoznačně vyloučit nelze. Výsledky metody BioID může také zkreslovat nespecifická biotinylace substrátů. Všechny výsledky obou experimentů by proto bylo vhodné validovat specifičtější metodou.

Kromě porovnání našich dat s publikovanými výsledky jsme sestavili dva seznamy našich 10 nejvíce nabohacených proteinů. Seznamy se liší podle toho, jestli jsme v datech z hmotnostní spektrometrie nahradili NaN číslem 18. Například GIGYF1, o kterém víme, že je interakčním partnerem eIF4E2, by z tabulky úplně vypadl, pokud bychom NaN číslem 18 nenahradili. Je tedy vidět, že bychom ztratili důležité informace, kdybychom k nahrazení nepřistoupili. Na druhou stranu můžeme nahrazením NaN číslem 18 zkreslit hodnotu mediánu, zejména pokud jsou zbylé dvě hodnoty triplicátu výrazně vyšší. Proto jsme pracovali i se seznamy dat, kde k nahrazení nedošlo. Toho, že by tato situace nastala, jsme si ale nevšimli. U všech proteinů v seznamech 10 nejvíce nabohacených proteinů je hodnota Q rovna 0, pravděpodobnost chybné identifikace proteinů by tedy měla být velmi nízká. Přesto mají proteiny 4E-BP2, TRIM27, TFIIC-epsilon, PNMA2, BTA1, TRAFD1, CHCHD4, TELO2, Nup205 a KNTC1 hodnotu Score označující kvalitu identifikace méně než poloviční.

V obou seznamech se vyskytly proteiny, které už v literatuře byly popsány jako interakční partneři eIF4E2. Jedná se o GIGYF1/2, 4E-T, ZNF598, 4E-BP2 a ARIH1. Mezi nejvíce nabohacenými proteiny v obou seznamech se vyskytly také proteiny, u kterých interakce dosud pozorována nebyla. Na rozhraní stojí protein TRIM27, u kterého byla interakce s eIF4E2 navržena na základě rozsáhlého studia publikovaných interakcí. Je zajímavé, že byla ve stejné publikaci navržena mimo jiné i interakce TRIM27 s DDX6, potvrzeným interakčním partnerem eIF4E2 (Rolland *et al.*, 2014; Chapat *et al.*, 2017). Námi pozorovaná interakce eIF4E2 s TRIM27 by tak mohla být zprostředkována proteinem DDX6. V případě proteinů TFIIC-epsilon, PNMA2, BTA1, TRAFD1, CHCHD4, TELO2, Nup205 a KNTC1 je možnost interakce s eIF4E2 zcela nová informace. Protein TELO2 interaguje s kinázou mTOR a reguluje její stabilitu (Takai *et al.*, 2007, 2010). Vzhledem k tomu, že mTOR interaguje

s proteiny rodiny 4E-BP, které vážou i eIF4E2, je teoreticky možné, že je interakce eIF4E2 s TELO2 zprostředkována mTOR. U ostatních proteinů se nám podobné souvislosti dohledat nepodařilo.

6.2.2 Proteinové komplexy nalezené v neseparovaném lyzátu

Jako potenciální proteinové komplexy interagující s eIF4E2 jsme identifikovali komplex CCR4-NOT, komplex eIF3, anafázi podporující komplex, Ski komplex, komplex CIA/MMXD, komplex HOPS a komplex oligosacharyltransferázy.

6.2.2.1 CCR4-NOT

Komplex CCR4-NOT jsme našli u neseparovaného lyzátu jen v datech, u kterých bylo NaN nahrazeno 18. To je dáno tím, že nebyla u proteinů CNOT2 a CNOT7 intenzita naměřena ani v jednom vzorku v kontrole a u proteinů CNOT3 a RQCD1 u dvou ze tří vzorků kontroly. Medián intenzit kontrolních vzorků tak v datech, kde k nahrazení nedošlo, nebylo možné pro tyto proteiny spočítat. U všech proteinů ale byla intenzita naměřena alespoň u dvou vzorků buněk HAF, proteiny tedy pravděpodobně byly ve vzorku přítomny. Ve výsledcích hmotnostní spektrometrie vzorků z gelové permeační chromatografie byl komplex CCR4-NOT nalezen pouze ve frakci 11-12.

Komplex CCR4-NOT jsme našli pomocí nástrojů GOrilla a David. Nástroj EnrichR komplex CCR4-NOT v našich datech nenašel. Hodnoty FDR uvedené nástroji GOrilla a David se pohybují v rozmezí 0,03-0,43 v závislosti na bioinformatickém nástroji a na použitém souboru dat. Podle obou nástrojů byl v našich datech nalezen celý komplex CCR4-NOT. Oproti tomu v publikaci Collart, 2016 je jako součást komplexu CCR4-NOT uvedena navíc samotná deadenyláza CNOT6, která v našich datech vůbec není.

To, že jsme mezi potenciálními interakčními partnery eIF4E2 našli komplex CCR4-NOT, je v souladu s literaturou. V minulosti již byla popsána spolupráce eIF4E2 a komplexu CCR4-NOT v translační represi (Chapat *et al.*, 2017; Jafarnejad *et al.*, 2018). Kromě toho byla i pozorována interakce eIF4E2 se strukturální podjednotkou CNOT1 (Chapat *et al.*, 2017).

6.2.2.2 Komplex eIF3

Komplex eIF3 nám jako potenciálního interakčního partnera eIF4E2 v HAF buňkách vyhledaly všechny použité nástroje na základě všech verzí dat. Hodnota FDR se pohybuje v rozmezí $9,9 \cdot 10^{-6}$ -0,11, což jsou nejnižší hodnoty, které jsme pro nalezené komplexy dostali. Komplex eIF3 je přítomen také ve vzorcích z gelové permeační chromatografie.

Jak již bylo zmíněno výše, proteiny eIF3L a eIF3E byly na základě hledání interakčních partnerů eIF4E2 metodou BioID navrženy jako potenciální interakční partneři eIF4E2 (Chapat *et al.*, 2017). Metodou afinitní purifikace byla pozorována také interakce eIF4E2 s podjednotkou eIF3F (Huttlin *et al.*, 2017). V našem souboru dat je z proteinů komplexu eIF3 nejvíce nabohacenou podjednotkou eIF3C. Nalezli jsme ale všech 12 podjednotek, z nichž jsou všechny kromě eIF3K a eIF3M v HAF buňkách signifikantně nabohacené. Všechny 12 podjednotek komplexu eIF3 bylo v HAF buňkách nalezeno i v podobném experimentu zaměřeném na hledání potenciálních interakčních partnerů eIF4E2 v buňkách linie HEK293 (Frydryšková, 2020).

O tom, že eIF4E2 s komplexem eIF3 interaguje, není mnoho pochyb. V současnosti ale není známo, se kterou podjednotkou komplexu eIF3 protein eIF4E2 interaguje, případně jakými proteiny je interakce zprostředkována. Jako jedna z možností se nabízí protein eIF4G3, který interaguje s eIF4E2 i s eIF3 (Gradi *et al.*, 1998; Rosettani *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2016; Chapat *et al.*, 2017). Druhou možností je, že by interakci zprostředkovala ThrRS, která také interaguje s eIF4E2 i s proteiny eIF3B, eIF3D, eIF3F a eIF3L (Jeong *et al.*, 2019).

6.2.2.3 Anafázi podporující komplex

Anafázi podporující komplex našly v našich datech všechny použité bioinformatické nástroje, a to s vysokou spolehlivostí, jelikož se uvedené hodnoty FDR pohybují v rozmezí 0,03-0,12. Anafázi podporující komplex jsme v našich datech našli pouze v případě, že byly v tabulce údaje NaN nahrazeny číslem 18. Je to proto, že nedošlo ani u jednoho z nalezených genů komplexu ke změření intenzity v minimálně 2 vzorcích kontroly a hodnotu mediánu tak pro tyto proteiny nebylo možné spočítat. Anafázi podporující komplex jsme s pomocí nástrojů EnrichR a David našli i ve vzorcích z gelové permeační chromatografie, konkrétně ve frakci 9+10.

Interakce proteinu eIF4E2 s anafázi podporujícím komplexem nebyla v literatuře dosud popsána. Metodou afinitní purifikace byla ovšem pozorována interakce eIF4E2 s CDC16, podjednotkou anafázi podporujícího komplexu (Huttlin *et al.*, 2017). To, že k interakci eIF4E2 a CDC16 opravdu dochází, by v budoucnu bylo vhodné potvrdit nějakým více cíleným experimentem.

6.2.2.4 Ski komplex

Ski komplex jsme našli pomocí nástrojů EnrichR a David. Hodnota FDR je 0,47 pro data_All_NaN a 0,48 pro data_One_NaN. Rozdílná hodnota je dána tím, že je soubor data_All_NaN větší. Náš soubor dat obsahuje všechny proteiny komplexu Ski. Všechny 3 proteiny jsou signifikantně nabohacené. Komplex Ski jsme našli i ve vzorcích z gelové permeační chromatografie.

Jakým způsobem by mohl eIF4E2 interagovat se Ski komplexem není jasné. Ski komplex je ale součástí exozomu, s jehož exonukleázou DIS3L zřejmě eIF4E2 interaguje (Tomecki *et al.*, 2010; Zinder a Lima, 2017). V našem souboru dat je v HAF buňkách protein DIS3L signifikantně nabohacený oproti kontrole. Ve stejných buňkách bylo nabohacení DIS3L pozorováno i v jiném experimentu laboratoře zaměřeném na hledání interakčních partnerů eIF4E2 v buňkách linie HEK293 (Frydryšková, 2020). K interakci eIF4E2 a DIS3L navíc došlo i v obráceném experimentu, kdy byli hledáni interakční partneři DIS3L v buňkách linie HEK293 (Tomecki *et al.*, 2010). Interakce proteinu DIS3L s některým z proteinů Ski komplexů zaznamenána nebyla, teoreticky by ale mohla být interakce Ski komplexu a DIS3L zprostředkována strukturními proteiny exozomu. V našem souboru dat z neseparovaného lyzátu se nachází 4 strukturní proteiny exozomu (EXOSC3, EXOSC4, EXOSC5 a EXOSC6) a protein HBS1L, který zprostředkovává interakci Ski komplexu a exozomu (Zinder a Lima, 2017). Kromě EXOSC4 a HBS1L jsou všechny zmíněné proteiny v HAF buňkách signifikantně nabohacené oproti kontrole.

6.2.2.5 Komplexy CIA a MMXD

Komplex CIA se účastní sestavování železosimých center na proteinech, konkrétně přenosu centra na apoprotein (Netz *et al.*, 2014). Komplex MMXD má stejné složení jako komplex CIA, navíc

do něj ještě patří SLC25A5. V metafázi kolokalizuje MMXD s dělicím vřeténkem. Delece podjednotek MMXD má za následek chyby v dělení chromozomů (Ito *et al.*, 2010). Vzhledem k pestré škále substrátů komplexu CIA se ale objevil i názor, že je tento fenotyp způsoben sekundárně tím, že nefunguje biosyntéza železosírných center, ne přímo působením komplexu MMXD (Netz *et al.*, 2014). Z důvodu velmi podobného složení komplexů CIA a MMXD a pochybností, zda komplex MMXD vůbec existuje, jsme je spojili do jedné kategorie.

Komplexy CIA/MMXD jsme našli pomocí nástrojů David a GOrilla. Hodnota FDR se pohybuje v rozmezí 0,02-0,48. V našem souboru dat máme všechny proteiny, kterými jsou oba komplexy podle použitých bioinformatických nástrojů tvořeny. Všechny proteiny jsou v HAF buňkách oproti kontrole nabohacené. Podle Ito *et al.*, 2010 obsahuje komplex MMXD navíc i protein ERCC2, který naše data neobsahují. Komplex CIA jsme izolovali i pomocí gelové separační chromatografie následované GFP-Trapem. Nachází se ve frakcích 9+10, 16 a 17. Ve frakci 9+10 a 16 je přítomen také MMXD komplex.

Interakce eIF4E2 ani s jedním z proteinů komplexů CIA/MMXD nebyla v minulosti pozorována. Hledáním interakčních partnerů MMS19 pomocí afinitní purifikace byly ale například nalezeny proteiny eIF3K a eIF3M (Stehling *et al.*, 2012). Teoreticky by tedy interakce mohla být zprostředkována komplexem eIF3.

6.2.2.6 Komplex HOPS

Komplex HOPS se účastní fúze endocytických váčků (Balderhaar a Ungermann, 2013). V našem souboru nabohacených genů jsme ho našli pomocí nástrojů EnrichR a David. Hodnota FRD je 0,42 pro data_All_18 a 0,44 pro data_One_18. Každý z nástrojů definuje složení komplexu HOPS jinak, podle každého nástroje jsme proto našli jinak velkou část komplexu. Vzhledem k tomu, že nebyla u proteinů VPS16, VPS18, VPS33A a HOOK2 ani v jednom vzorku kontroly naměřena číselná hodnota intenzity, našli jsme komplex HOPS jen v datech, u nichž bylo NaN nahrazeno číslem 18. Ve vzorcích z gelové permeační chromatografie jsme komplex HOPS našli ve frakcích 9+10 a 17. Není jasné, jak komplex HOPS interaguje s eIF4E2.

6.2.2.7 Komplex oligosacharyltransferázy

Komplex oligosacharyltransferázy jsme našli pomocí nástrojů EnrichR a David na základě všech použitých variant dat. Hodnota FDR je 0,36 pro data_All_NaN a 0,37 pro data_One_NaN. Komplex oligosacharyltransferázy jsme našli i ve vzorcích z gelové permeační chromatografie ve frakcích 9+10 a 11+12. Není zřejmé, jak komplex interaguje s eIF4E2.

6.3 Interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G

Interakci eIF4E2 s eIF4G1 a eIF4G3 jsme testovali zvlášť metodou GFP-Trap. Nejprve se vůbec nezdařilo detekovat eIF4G1 pomocí western blotu. O protilátce jsme přitom věděli, že funguje. Vzhledem k tomu, že má protein eIF4G1 velikost 175 491 Da, mohl být problém s jeho přenosem z gelu na membránu. Snížili jsme proto koncentraci gelu z 10 % na 8 %. Zároveň jsme snížili koncentraci methanolu v blotovacím pufru z 20 % na 12 %, abychom zabránili precipitaci proteinů. Takto modifikovaným postupem se již eIF4G1 a eIF4G3 detekovat zdařilo.

Z výsledku western blotu není patrné, že by došlo v důsledku GFP-Trapu k nabohacení některého z proteinů rodiny eIF4G ve výsledném vzorku oproti původnímu lyzátu. Také v datech získaných hmotnostní spektrometrií GFP-Trapu neseparovaného lyzátu není u proteinů rodiny eIF4G vidět významný rozdíl v abundanci mezi vzorkem a kontrolou. V případě eIF4G1 je skutečnost, že s eIF4E2 neinteraguje, obecně přijímána, neboť se řadou různých metod interakci detekovat nepodařilo (Rom *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004; Tao a Gao, 2015; Ho *et al.*, 2016). Výjimkou je publikace Chapat *et al.*, 2017, ve které autoři pomocí metody BioID identifikovali eIF4G1 jako možného interakčního partnera eIF4E2.

Jednou z metod, která k detekci interakce mezi eIF4E2 a eIF4G1 nevedla, je imunoprecipitace (Tao a Gao, 2015; Ho *et al.*, 2016). Jak bylo zmíněno výše, nevýhodou imunoprecipitace je, že musí být proteinové komplexy dostatečně stabilní, aby se během manipulace se vzorkem nerozpadly. Metoda BioID by naopak měla umožňovat detekovat i velmi slabé nebo krátce trvající interakce mezi proteiny. Z tohoto pohledu by tedy bylo možné rozdílné výsledky vysvětlit tím, že spolu eIF4E2 a eIF4G1 interagují, pouze je interakce velmi slabá a klasickými přístupy je obtížně zachytitelná. Jednalo by se tak o podobnou situaci jako při testování interakce eIF4E2 s 4E-BP1, kdy se také nějaký čas věřilo, že spolu proteiny neinteragují, protože je jejich vazba velmi slabá a bylo náročné ji zachytit. Interakce eIF4E2 s eIF4G1 by ale musela být ještě vzácnější než interakce eIF4E2 s 4E-BP1, neboť interakci s 4E-BP1 lze po navýšení produkce eIF4E2 v buňkách detekovat klasickou imunoprecipitací. Otázkou pak zůstává, jestli tak slabá interakce vůbec může mít biologický význam. Druhou možností je, že se v případě metody BioID jedná o artefakt způsobený například nespecifickou biotinylací a že spolu eIF4E2 a eIF4G1 opravdu neinteragují.

Naopak interakce eIF4E2 s eIF4G3 v minulosti pozorována byla (Rosettani *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2016; Chapat *et al.*, 2017). Disociační konstanta peptidu odvozeného od eIF4G3 je pro vazbu na eIF4E2 asi 100x nižší než pro vazbu stejného peptidu k eIF4E1 a asi 30x nižší než v případě vazby peptidu odvozeného od 4E-BP1 na eIF4E2 (Rosettani *et al.*, 2007). I přes slabou vazbu se podařilo pozorovat interakci eIF4E2 a eIF4G3 pomocí imunoprecipitace. Oproti našemu experimentu použili autoři buněčnou linii U87MG a jiný lyzační pufr (Ho *et al.*, 2016). Je možné, že v linii U87MG dochází k interakci eIF4E2 a eIF4G3 ve větší míře nebo jsou zmíněné proteiny zastoupeny ve větším množství než v HEK293. Nelze vyloučit ani přítomnost posttranslační modifikace nebo jiného proteinu v U87MG, které by interakci eIF4E2 a eIF4G3 usnadňovali nebo zprostředkovali. Také je teoreticky možné, že jsou proteinové komplexy eIF4E2 s eIF4G3 v pufru použitým autory publikace stabilnější než v pufru, který jsme použili my. Protein eIF4G3 byl jako možný interakční partner eIF4E2 nalezen také metodou BioID (Chapat *et al.*, 2017).

6.4 Ověření funkčnosti GFP-Trap systému produkovaného v laboratoři

Povedlo se nám ověřit, že protilátky produkované v laboratoři fungují a lze je použít pro GFP-Trap. Při testování kapacity kuliček s navázanou protilátkou proti GFP stoupalo množství GFP-eIF4E2

nachytaného na protilátku se zvyšujícím se objemem buněčného lyzátu inkubovaného s protilátkou. S objemy, které jsme k danému množství kuliček použili, jsme tedy ještě nenasytili veškerou kapacitu, kterou kuličky mají. Přesto poměrně značná část vzorku ve všech případech protekla. Vzhledem k tomu, že proteklo při všech objemech lyzátu inkubovaného s protilátkou podobné množství GFP-eIF4E2, nebude to způsobeno tím, že by se nemělo GFP-eIF4E2 kam navázat, ale problém bude zřejmě ve schopnosti GFP-eIF4E2 interagovat s protilátkou. Je možné, že se v populaci GFP-eIF4E2 vyskytovala určitá frakce proteinu, která byla špatně sbalená, a tedy neformovala epitop rozpoznávaný protilátkou nebo u ní byl maskován epitop jiným interakčním partnerem či nějakou modifikací.

6.5 Příprava systému pro screening inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3

6.5.1 Izolace plazmidů

Při produkci plazmidů pro použití pro screening inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3 jsme měli zpočátku problémy s produkcí plazmidu eIF4G1-NRL. Vzhledem k tomu, že je eIF4G1-NRL největší z produkovaných plazmidů, a to zejména kvůli velikosti fragmentu genu pro eIF4G1, napadlo nás, že je zřejmě pro bakterie velká zátěž ho produkovat a proto nerostou. Abychom zpomalili rychlost jejich růstu a dali jim více času, snížili jsme teplotu kultivace bakterií z 37 °C na 28 °C. Snížil jsme také koncentraci ampicilinu na 50 µg/ml a 20 µg/ml. Přes tyto modifikace protokolu buňky nenarostly. Nakonec pomohlo používat pro produkci plazmidů kmen DH5α, který po vnesení plazmidů rostl bez problému.

Sekvenací plazmidů jsme objevili mutaci v genu pro eIF4E1 v plazmidu H5A (CRL-eIF4E1) (obr. P2). Mutace se nachází na pozici 241 aminokyselinové sekvence. Oba tripletty (CTG i TTG) odpovídají leucinu, na aminokyselinové sekvenci se tedy mutace neprojeví a pro další použití plazmidu by tato mutace neměla být problém. V obou vzorcích plazmidu CRL-eIF4E1 jsme také našli mutace na pozicích 237 a 379 genu pro eIF4E1. Mutace na pozici 237 je opět synonymní. Mutace na pozici 379 způsobuje záměnu Asp na Asn. Nenachází se ale v oblasti důležité pro vazbu jiného interakčního partnera, a proto by přítomnost mutace pro další použití plazmidu nemusela být problém. V databázi dbSNP jsme nenašli zmínku, že by už byla tato záměna nukleotidů popsána, buď se tedy jedná o nový SNP, nebo se jedná o mutaci (Sherry *et al.*, 2001).

6.5.2 Klonování eIF4G3

Přímo z cDNA se podařilo amplifikovat fragment ohraničený primery 4G3_RL_F a 4G3_cDNA_R (4G3_fr4). Tento fragment jsme ověřili pomocí PCR s primery 4G3_in_F a 4G3_in_R, pomocí restriktivního štěpení a nakonec i pomocí sekvenace. Z toho důvodu jsme si jisti, že se jedná o požadovaný fragment. Fragment 4G3_fr4 je z jedné strany ohraničen přesně v požadovaném místě a nese na sobě i sekvenci komplementární k cílovému plazmidu, což je důležité pro další klonování. Na druhém konci, který vznikl syntézou z primeru 4G3_cDNA_R, ale fragment cílovou sekvencí plazmidu neobsahuje a pro další práci ho bude potřeba upravit (obr. P5).

Sekvenací fragmentu 4G3_fr4 jsme zjistili u určité frakce vzorku mutaci na pozici 298 genu pro eIF4G3, která způsobuje záměnu Glu na Lys. V databázi dbSNP jsme nenašli o této nukleotidové záměně záznam, buď se tedy jedná o nový SNP, nebo o mutaci (Sherry *et al.*, 2001). Mutace se nachází v oblasti pro vazbu eIF3/eIF4A, pro naše účely, kdy chceme pozorovat pouze interakci s eIF4E1, by to ale nemusel být problém.

Z fragmentu 4G3_fr4 jsme zkusili pomocí primerů 4G3_RL_F a 4G3_RL_R amplifikovat cílový fragment, který by měl správně oba konce, nebyli jsme ale úspěšní. Vzhledem k tomu, jak jsou primery dlouhé, je velice pravděpodobné, že tvoří vlásenky a smyčky a polymerace pak probíhá nespecificky. Tvorbu vlásenek jsme se pokusili eliminovat povařením primerů těsně před přidáním do reakce, výsledek byl ale stejný, jako v případě, že jsme primery nedenateurovali. Kromě tvorby vlásenek komplikuje použití primerů i jejich rozdílná teplota tání (66,7 °C a 63,9 °C pro část nasedající ke genu pro eIF4G3), která způsobuje, že nasedají k templátu s rozdílnou účinností.

7 Souhrn

V rámci diplomové práce jsem:

- v buňkách linie HEK293 identifikovala dříve popsané i nové proteinové komplexy obsahující eIF4E2.
 - Z dříve popsaných jsem našla komplex CCR4-NOT a eukaryotní translační iniciační faktor 3 (eIF3).
 - Anafázi podporující komplex, komplex MMXD/CIA, SKI komplex, komplex HOPS a komplex oligosacharyltransferázy navrhuji nově jako komplexy, jejichž součástí by mohl být eIF4E2.
- v buňkách linie HEK293 ověřila řadu již známých interakcí eIF4E2 s buněčnými proteiny.
- našla možné nové interakční partnery eIF4E2.
- otestovala schopnost eIF4E2 interagovat s proteiny rodiny eIF4G v podmínkách normoxie.
- ověřila funkčnost v laboratoři produkovaného systému GFP-Trap.
- charakterizovala plazmidy nutné pro přípravu systému pro vyhledávání inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3.
- připravila cDNA kódující část eIF4G3 použitelnou pro přípravu systému pro vyhledávání inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3.

8 Přílohy

Příloha 1: Výsledky hmotnostní spektrometrie pro vzorky neseparovaného lyzátu (tab. P1)

Příloha 2: Výsledky hmotnostní spektrometrie pro vzorky z gelové permeační chromatografie (tab. P2)

Příloha 3: Všechny proteinové komplexy rozříděné podle buněčných procesů (tab. P3)

Příloha 4: Vybrané proteinové komplexy z vzorků neseparovaného lyzátu (tab. P4)

Příloha 5: Vybrané proteinové komplexy z vzorků z gelové permeační chromatografie (tab. P5)

Příloha 6: Sekvence plazmidů eIF4G1-NRL (obr. P1), CRL-eIF4E1 (obr. P2), NRL-empty (obr. P3), CRL-empty (obr. P4) a sekvence fragmentu 4G3_fr4 (obr. P5)

Seznam použité literatury

* označuje přehledný článek

- Afroz, S. *et al.* (2017) 'A Comprehensive Gene Expression Meta-analysis Identifies Novel Immune Signatures in Rheumatoid Arthritis Patients', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00074.
- Arsham, A. M. *et al.* (2003) 'A Novel Hypoxia-inducible Factor-independent Hypoxic Response Regulating Mammalian Target of Rapamycin and Its Targets', *The Journal of biological chemistry*, 278(32), pp. 29655–29660. doi: 10.1074/jbc.M212770200.
- Ashkenazi, S. *et al.* (2017) 'Effective cell-free drug screening protocol for protein-protein interaction', *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc, 532, pp. 53–59. doi: 10.1016/j.ab.2017.05.030.
- * Balderhaar, H. J. and Ungermann, C. (2013) 'CORVET and HOPS tethering complexes – coordinators of endosome and lysosome fusion', *Journal of Cell Science*, 126, pp. 1307–1316. doi: 10.1242/jcs.107805.
- Chapat, C. *et al.* (2017) 'Cap-binding protein 4EHP effects translation silencing by microRNAs', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), pp. 5425–5430. doi: 10.1073/pnas.1701488114.
- Chen, E. Y. *et al.* (2013) 'Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool', *BMC Bioinformatics*, 14(28).
- Chen, S. and Gao, G. (2017) 'MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs', *Protein & Cell*. Higher Education Press, 8(10), pp. 750–761. doi: 10.1007/s13238-017-0444-0.
- Cho, P. F. *et al.* (2005) 'A New Paradigm for Translational Control: Inhibition via 5'-3' mRNA Tethering by Bicoid and the eIF4E Cognate 4EHP', *Cell*, 121, pp. 411–423. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.024.
- Cho, P. F. *et al.* (2006) 'Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in Drosophila Embryos', *Current Biology*, 16(20), pp. 2035–2041.
- * Collart, M. A. (2016) 'The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression', *WIREs RNA*, 7, pp. 438–454. doi: 10.1002/wrna.1332.
- Eden, E. *et al.* (2007) 'Discovering Motifs in Ranked Lists of DNA Sequences', *PLoS Computational Biology*, 3(3), p. e39. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030039.
- Eden, E. *et al.* (2009) 'GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists', *BMC Bioinformatics*, 10(48). doi: 10.1186/1471-2105-10-48.
- Evagelou, S. L. *et al.* (2020) 'DEAD-box protein family member DDX28 is a negative regulator of HIF-2 α and eIF4E2-directed hypoxic translation', *Molecular and cellular biology*, 40(6), pp. e00610-19.
- Frydrysková, K. *et al.* (2016) 'Distinct recruitment of human eIF4E isoforms to processing bodies and stress granules', *BMC Molecular Biology*. BioMed Central, 17(21), pp. 1–19. doi: 10.1186/s12867-016-0072-x.
- Frydryšková, K. (2020): 'Noncanonical human eIF4Es in and out of the RNA granules'. Dizertační práce, Univerzita Karlova, Praha
- Fu, R. U. I. *et al.* (2016) 'Recruitment of the 4EHP-GYF2 cap-binding complex to tetraproline motifs of tristetraprolin promotes repression and degradation of mRNAs with AU-rich elements', *Rna*, 22, pp. 373–382. doi: 10.1261/rna.054833.115.1994.
- Gradi, A. *et al.* (1998) 'A Novel Functional Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G', *Molecular and cellular biology*, 18(1), pp. 334–342.
- Haimov, O. *et al.* (2018) 'Dynamic Interaction of Eukaryotic Initiation Factor 4G1 (eIF4G1) with eIF4E and eIF1 Underlies Scanning-Dependent and -Independent Translation', *Molecular and Cellular Biology*, 38(18), pp. e00139-18.
- Hernández, G. *et al.* (2005) 'Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in Drosophila', *Mechanisms of Development*, 122, pp. 529–543. doi: 10.1016/j.mod.2004.11.011.
- * Hinnebusch, A. G. (2014) 'The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation', *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), pp. 779–812. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802.
- * Hinnebusch, A. G. and Lorsch, J. R. (2012) 'The mechanism of eukaryotic translation initiation - new insights and challenges', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, pp. 1–25. doi: 10.1101/cshperspect.a011544.

- Ho, J. J. D. *et al.* (2016) ‘Systemic reprogramming of translation efficiencies on oxygen stimulus’, *CellReports*, 14(6), pp. 1293–1300. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.036.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009a) ‘Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists’, *Nucleic Acids Research*, 37(1), pp. 1–13. doi: 10.1093/nar/gkn923.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009b) ‘Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources’, *Nature Protocols*, 4(1). doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- Huttlin, E. L. *et al.* (2017) ‘Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks’, *Nature*, 545(7655), pp. 505–509. doi: 10.1038/nature22366.Architecture.
- Ito, S. *et al.* (2010) ‘MMXD, a TFIID-Independent XPD-MMS19 Protein Complex Involved in Chromosome Segregation’, *Molecular Cell*, 39, pp. 632–640. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.029.
- Jafarnejad, S. M. *et al.* (2018) ‘Translational control of ERK signaling through miRNA/4EHP-directed silencing’, *Elife*, 7, p. e35034.
- Jeong, S. J. *et al.* (2019) ‘A threonyl-tRNA synthetase-mediated translation initiation machinery’, *Nature Communications*. Springer US, 10(1357). doi: 10.1038/s41467-019-09086-0.
- Joshi, B. *et al.* (2005) ‘Phylogenetic analysis of eIF4E-family members’, *BMC Evolutionary Biology*, 5(48). doi: 10.1186/1471-2148-5-48.
- Joshi, B. *et al.* (2004) ‘Characterization of mammalian eIF4E-family members’, *European Journal of Biochemistry*, 271, pp. 2189–2203. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04149.x.
- Keiper, B. D. *et al.* (2000) ‘Functional Characterization of Five eIF4E Isoforms in *Caenorhabditis elegans*’, *The Journal of biological chemistry*, 275(14), pp. 10590–10596.
- Kelly, N. J. *et al.* (2018) ‘Hypoxia activates cadherin-22 synthesis via eIF4E2 to drive cancer cell migration, invasion and adhesion’, *Oncogene*, 37(5), pp. 651–662. doi: 10.1038/onc.2017.372.Hypoxia.
- Kubacka, D. *et al.* (2013) ‘Investigating the Consequences of eIF4E2 (4EHP) Interaction with 4E-Transporter on Its Cellular Distribution in HeLa Cells’, *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0072761.
- Kuleshov, M. V *et al.* (2016) ‘Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update’, *Nucleic Acids Research*, 44. doi: 10.1093/nar/gkw377.
- * Ma, J. *et al.* (2016) ‘Maternal AP determinants in the *Drosophila* oocyte and embryo’, *WIREs Developmental Biology*. doi: 10.1002/wdev.235.
- Marcotrigiano, J. *et al.* (1997) ‘Cocrystal structure of the messenger RNA 5’ cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP’, *Cell*, 89(6), pp. 951–961. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80280-9.
- Morita, M. *et al.* (2012) ‘A Novel 4EHP-GIGYF2 Translational Repressor Complex Is Essential for Mammalian Development’, *Molecular and cellular biology*, 32(17), pp. 3585–3593. doi: 10.1128/MCB.00455-12.
- Mrvova, S. *et al.* (2018) ‘Major splice variants and multiple polyadenylation site utilization in mRNAs encoding human translation initiation factors eIF4E1 and eIF4E3 regulate the translational regulators?’, *Molecular Genetics and Genomics*. Springer Berlin Heidelberg, 293, pp. 167–186. doi: 10.1007/s00438-017-1375-4.
- * Netz, D. J. A. *et al.* (2014) ‘Maturation of cytosolic and nuclear iron – sulfur proteins’, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 24(5), pp. 303–312. doi: 10.1016/j.tcb.2013.11.005.
- Okumura, F. *et al.* (2007) ‘ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP’, *Genes & Development*, 21, pp. 255–260. doi: 10.1101/gad.1521607.The.
- Peter, D. *et al.* (2017) ‘GIGYF1/2 proteins use auxiliary sequences to selectively bind to 4EHP and repress target mRNA expression’, *Genes & Development*, 31, pp. 1147–1161. doi: 10.1101/gad.299420.117.
- Peter, D. *et al.* (2019) ‘Molecular basis for GIGYF–Me31B complex assembly in 4EHP-mediated translational repression’, *Genes & Development*, 33, pp. 1355–1360. doi: 10.1101/gad.329219.119.
- Ramaswamy, S. *et al.* (2003) ‘A molecular signature of metastasis in primary solid tumors’, *Nature Genetics*, 33, pp. 49–54. doi: 10.1038/ng1060.
- Ramirez, C. C. A. *et al.* (2018) ‘4EHP-independent repression of endogenous mRNAs by the RNA-binding protein GIGYF2’, *Nucleic Acids Research*, 46(11), pp. 5792–5808. doi: 10.1093/nar/gky198.
- Rolland, T. *et al.* (2014) ‘A proteome-scale map of the human interactome network A’, *Cell*, 159(5), pp. 1212–1226. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.050.A.
- Rom, E. *et al.* (1998) ‘Cloning and Characterization of 4EHP , a Novel Mammalian eIF4E-related Cap-binding Protein’, *The Journal of biological chemistry*, 273(21), pp. 13104–13109.
- Rosettani, P. *et al.* (2007) ‘Structures of the Human eIF4E Homologous Protein, h4EHP, in its m7GTP-bound

- and Unliganded Forms’, *Journal of Molecular Biology*, 368, pp. 691–705. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.019.
- * Roux, P. P. and Topisirovic, I. (2018) ‘Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation’, *Molecular and cellular biology*, 38(12).
- Ruscica, V. *et al.* (2019) ‘Direct role for the Drosophila GIGYF protein in 4EHP-mediated mRNA repression’, *Nucleic Acids Research*, 47(13), pp. 7035–7048. doi: 10.1093/nar/gkz429.
- Sato, Y. *et al.* (2011) ‘Genome-Wide Association Study on Overall Survival of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients Treated with Carboplatin and Paclitaxel’, *Journal of Thoracic Oncology*. Elsevier, 6(1). doi: 10.1097/JTO.0b013e318200f415.
- Sherry, S. T. *et al.* (2001) ‘dbSNP : the NCBI database of genetic variation’, *Nucleic Acids Research*, 29(1), pp. 308–311.
- * Shirokikh, N. E. and Preiss, T. (2018) ‘Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions’, *WIREs RNA*, 9(e1473), pp. 1–45. doi: 10.1002/wrna.1473.
- Stachelska, A. *et al.* (2002) ‘Interaction of three Caenorhabditis elegans isoforms of translation initiation factor eIF4E with mono- and trimethylated mRNA 5’ cap analogues’, *Acta Biochimica Polonica*, 49(3), pp. 671–682.
- Von Stechow, L. *et al.* (2015) ‘The E3 Ubiquitin Ligase ARIH1 Protects against Genotoxic Stress by Initiating a 4EHP-Mediated mRNA Translation Arrest’, *Molecular and cellular biology*, 35(7), pp. 1254–1268. doi: 10.1128/MCB.01152-14.
- Stehling, O. *et al.* (2012) ‘MMS19 Assembles Iron-Sulfur Proteins Required for DNA Metabolism and Genomic Integrity’, *Science*, 337(195), p. 1212. doi: 10.1126/science.1219723.
- * Stuart, J. A. *et al.* (2018) ‘How Supraphysiological Oxygen Levels in Standard Cell Culture Affect Oxygen-Consuming Reactions’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi, 2018. doi: 10.1155/2018/8238459.
- Takai, H. *et al.* (2007) ‘Tel2 Regulates the Stability of PI3K-Related Protein Kinases’, *Cell*, 131, pp. 1248–1259. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.052.
- Takai, H. *et al.* (2010) ‘Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes’, *Genes & Development*, 24, pp. 2019–2030. doi: 10.1101/gad.1956410.(PI3K)-like.
- Tan, N. G. S. *et al.* (2003) ‘Human homologue of ariadne promotes the ubiquitylation of translation initiation factor 4E homologous protein, 4EHP’, *FEBS letters*, 554, pp. 501–504. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01235-3.
- Tao, X. and Gao, G. (2015) ‘Tristetraprolin Recruits Eukaryotic Initiation Factor 4E2 To Repress Translation of AU-Rich Element-Containing mRNAs’, *Molecular and cellular biology*, 35(22), pp. 3921–3932. doi: 10.1128/MCB.00845-15.Address.
- Tee, A. R. *et al.* (2004) ‘Characterizing the interaction of the mammalian eIF4E-related protein 4EHP with 4E-BP1’, *FEBS letters*, 564, pp. 58–62. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00313-8.
- Thoreen, C. C. *et al.* (2012) ‘A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation’, *Nature*, 485(7396), pp. 109–113. doi: 10.1038/nature11083.A.
- Timpano, S. and Uniacke, J. (2016) ‘Human Cells Cultured under Physiological Oxygen Utilize Two Cap-binding Proteins to recruit Distinct mRNAs for Translation’, *The Journal of biological chemistry*, 291(20), pp. 10772–10782. doi: 10.1074/jbc.M116.717363.
- Tollenaere, M. A. X. *et al.* (2019) ‘GIGYF1/2-Driven Cooperation between ZNF598 and TTP in Posttranscriptional Regulation of Inflammatory Signaling’, *CellReports*. The Author(s), 26, pp. 3511–3521. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.006.
- Tomecki, R. *et al.* (2010) ‘The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L’, *The EMBO Journal*, 29, pp. 2342–2357. doi: 10.1038/emboj.2010.121.
- Unger, T. *et al.* (2010) ‘Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression’, *Journal of Structural Biology*. Elsevier Inc., 172(1), pp. 34–44. doi: 10.1016/j.jsb.2010.06.016.
- Uniacke, J. *et al.* (2012) ‘An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery’, *Nature*, 486(7401), pp. 126–129. doi: 10.1038/nature11055.An.
- Uniacke, J. *et al.* (2014) ‘Cancer Cells Exploit eIF4E2-Directed Synthesis of Hypoxia Response Proteins to Drive Tumor Progression’, *Cancer Research*, 74(5), pp. 1379–1389. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-

13-2278.

- Valzania, L. *et al.* (2016) 'Drosophila 4EHP is essential for the larval-pupal transition and required in the prothoracic gland for ecdysone biosynthesis', *Developmental Biology*. Elsevier, 410, pp. 14–23. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.12.021.
- Villaescusa, J. C. *et al.* (2009) 'Cytoplasmic Prep1 Interacts with 4EHP Inhibiting Hoxb4 Translation', *PLoS ONE*, 4(4). doi: 10.1371/journal.pone.0005213.
- Yarunin, A. *et al.* (2011) 'Patterning of the Drosophila oocyte by a sequential translation repression program involving the d4EHP and Belle translational repressors', *RNA Biology*, 8(5), pp. 904–912. doi: 10.4161/rna.8.5.16325.
- Yi, T. *et al.* (2013) 'Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Promotes Cap-dependent Translation of Selective mRNAs through Up-regulating Initiation Factor eIF4E1 in Breast Cancer Cells under Hypoxia Conditions', *The Journal of biological chemistry*, 288(26), pp. 18732–18742. doi: 10.1074/jbc.M113.471466.
- * Zinder, J. C. and Lima, C. D. (2017) 'Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors', *Genes & Development*, 31, pp. 88–100. doi: 10.1101/gad.294769.116.
- Zuberek, J. *et al.* (2007) 'Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs', *Rna*, 13, pp. 691–697. doi: 10.1261/rna.453107.eIF4E-binding.
- Zuberek, J. *et al.* (2016) 'Diverse cap-binding properties of Drosophila eIF4E isoforms', *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier B.V., pp. 1292–1303. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.015.