

Zvoľujem k zapožičaniu mojej diplomovej práce k študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevziaté údaje je vypožičiavateľ povinný korektne ocitovať.

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

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



Bc. Patrik Lettrich

Translačné iniciačné faktory proteínovej rodiny 4E a ich vplyv na reguláciu génovej expresie
4E translation initiation factors and their influence on regulation of gene expression

Diplomová práca

Školiteľ: RNDr. Tomáš Mašek, PhD.

Praha, 2021

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 26. 4. 2021

.....

Podpis

Pod'akovanie

Chcel by som veľmi poďakovať môjmu školiteľovi RNDr. Tomášovi Maškovi, PhD. za cenné rady a pomoc pri vypracovávaní tejto práce ako aj pri experimentálnej praxi. Tiež by som sa chcel poďakovať aj RNDr. Martinovi Pospíškovi, PhD., ktorý vedie Laboratórium Biochémie RNA za možnosť vypracovávať diplomovú prácu na jeho pracovisku a vždy príjemné pracovné prostredie. V neposlednom rade ďakujem aj svojej rodine a blízkym, ktorí ma po celú dobu štúdia neustále podporovali.

Abstrakt

Translácia predstavuje jeden z najdôležitejších procesov odohrávajúcich sa v bunke. To je dôvodom, prečo je častým terčom rôznych regulácií. Obzvlášť dôležitú úlohu pre regulačné procesy je jej iniciačná fáza. Ku iniciácii translácie dochádza väčšinou po rozpoznaní a špecifickej väzbe kanonického eukaryotického iniciačného faktoru 4E1 (eIF4E1) na metylguanozínovú čiapočku prítomnú na 5' konci väčšiny eukaryotických mRNA. Rodina translačných iniciačných faktorov 4E však obsahuje ďalších dvoch členov – eIF4E2 a eIF4E3. Tieto dva proteíny tiež disponujú funkčnou schopnosťou viazať čiapočku mRNA, čo ich predurčuje k regulačným funkciám v súvislosti s transláciou. Proteín eIF4E2 je známy ako translačný represor vo vývojových procesoch a podieľa sa aj na umlčovaní génov sprostredkovanom miRNA. Existujú dôkazy o tom, že je schopný iniciovať transláciu v hypoxických podmienkach, čo je v zhode s jeho dokladovanými funkciami v hypoxických nádorových bunkách. Biologické úlohy proteínu eIF4E3 sú podstatne menej preskúmané. Táto práca podáva obraz o fungovaní všetkých troch translačných iniciačných faktorov s využitím bunkových línií s ich nadprodukciou alebo naopak deléciou. Experimentálne dáta potvrdili úlohu eIF4E2 v regulácii vývojových procesov. Bunkové línie s deléciou eIF4E2 a eIF4E3 boli charakterizované na základe vplyvu rôznych kultivačných podmienok na ich rastové schopnosti.

Kľúčové slová:

iniciace translace; eIF4E1; eIF4E2; 4E-HP; eIF4E3; hypoxická translace; translační represe

Abstract

The translation represents one of the most crucial processes in the cell. That is why it is often targeted by various regulations. Its initiation phase has a particularly important role in regulatory processes. Initiation of translation usually starts by recognition and binding of canonical eukaryotic initiation factor 4E1 (eIF4E1) to the methylguanosine cap present on the 5' end of the majority of eukaryotic mRNA. The family of 4E translation initiation factors contains two more members – eIF4E2 and eIF4E3. Those two proteins can bind cap structure as well which predetermines it to function in the regulation of translation. Protein eIF4E2 is well known for being a translational repressor in development processes and it takes part in specific miRNA-dependent silencing. It was proven to be able to initiate translation in hypoxia which is consistent with its proposed role in hypoxic tumor cells. The biological roles of the protein eIF4E3 are much less understood. This thesis propounds the picture of the overall functions of all discussed translation initiation factors using cell lines with their overexpression or deletion. Experimental data confirmed the role of the eIF4E2 in the regulation of developmental processes. Cell lines with deleted eIF4E2 and eIF4E3 were characterized based on the influence of various cultivation conditions on their growth.

Key words:

translation initiation; eIF4E1; eIF4E2; 4E-HP; eIF4E3, translational silencing, hypoxic translation, translation repression

Obsah

Zoznam skratiek:	8
1 Úvod	14
1.1 Vlastná práca a jej zasadenie do kontextu práce v laboratóriu	15
2 Ciele práce:	16
3 Prehľad literatúry	17
3.1 Iniciácia translácie závislá na 5' 7-metylguanozínovej čiapočke mRNA	17
3.2 Proteínová rodina eukaryotických translačných iniciačných faktorov 4E	18
3.3 Translačný iniciačný faktor eIF4E1	21
3.4 Translačný iniciačný faktor eIF4E2	22
3.4.1 Väzba eIF4E2 na 7-metylguanozínovú čiapočku mRNA	23
3.4.2 Interakcia eIF4E2 s eIF4G a 4E-BP1	25
3.4.3 Funkcia eIF4E2 vo vývojových procesoch cicavcov	26
3.4.4 Úloha eIF4E2 v hypoxickej translácii	28
3.4.5 Úloha eIF4E2 v ľudských bunkách počas rôznych stresových podmienok	31
3.4.6 Účasť eIF4E2 v translačnej represii sprostredkovanej microRNA	32
3.5 Translačný iniciačný faktor eIF4E3	35
3.5.1 Biologické funkcie eIF4E3	36
4 Materiál	38
4.1 Chemikálie	38
4.2 Roztoky a pufre	38
4.3 Enzýmy	39
4.4 PCR premixy	39
4.5 PCR primery	40
4.6 Štandardy molekulových hmotností (DNA a RNA markery)	40
4.7 Kultivačné médiá pre ľudské tkanivové kultúry	40
4.8 Ľudské tkanivové bunkové línie	41
4.8.1 Detailnejšie informácie o používaných bunkových líniách	41
4.9 Sekvenčné dáta	43
4.10 Laboratórne prístroje	44

5	Metódy	45
5.1	Kultivácia buniek tkanivových kultúr.....	45
5.2	Izolácia RNA z ľudských tkanivových bunkových kultúr	45
5.3	Denaturačná RNA elektroforéza.....	46
5.4	Ošetrovanie RNA pomocou DNázy I.....	46
5.5	RT-qPCR	47
5.6	Reverzná transkripcia	48
5.7	Príprava riediacich radov cDNA pre stanovenie efficiency použitých primerov	48
5.8	Dizajnovanie špecifických primerov	49
5.9	Analýza výsledkov qPCR	49
5.10	Štatistické vyhodnotenie dát.....	50
6	Výsledky.....	51
6.1	Validácia výsledkov RNA-seq pomocou RT-qPCR:.....	51
6.1.1	Výber génov na validáciu výsledkov RNA-seq	51
6.1.2	Optimalizácia RT-qPCR	56
6.1.3	Navrhovanie špecifických primerov na set kandidátnych génov určených na validáciu RNA-seq pomocou RT-qPCR	57
6.1.4	qPCR experimenty na validáciu výsledkov RNA-seq.....	62
6.1.5	Porovnanie výsledkov qPCR s výsledkami RNA-seq	63
6.1.6	Kvantifikácia transkriptov rodiny 4E.....	71
6.2	Analýza obohatenia génovej sady (GSEA)	72
6.2.1	Analýza obohatenia génovej sady s použitím dát z RNA-seq.....	72
6.2.2	Analýza obohatenia génovej sady s použitím dát z RIP-seq.....	76
6.3	Charakterizácia bunkových línií.....	85
6.3.1	Charakterizácia bunkových línií HEK-293 a delečných mutantov (eIF4E2Δ a eIF4E3Δ)	85
6.3.2	Optimalizácia kultivačných podmienok.....	86
6.3.3	Určovanie rastových schopností bunkových línií pomocou resazurínu	91
6.3.4	Závislosť rastových schopností bunkových línií na kultivačných podmienkach	93
7	Diskusia.....	96
8	Súhrn	101
9	Zoznam použitej literatúry	102

Zoznam skratiek:

FRT	Flp recombinase target
TO	tetracyklínový operátor
GUSB	glucuronidase beta
SURF1	cytochrome c oxidase assembly factor
4E-BP	4E-väzbový proteín
4E-BP1	4E-väzbový proteín, izoforma 1
4EHP	homologický proteín (4E homologous protein)
4E-T	4E-transporter
ALDEx2	Analysis of differential expresion
ANOS1	anosmin 1
ANOVA	Analysis of variance
Arg	skratka pre aminokyselinu arginín
ARIH1	Ariadne RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (HHARI)
Asn	skratka pre aminokyselinu asparagín
BR	biologický replikát
CBS	cystathionine beta-synthase
CCR4-NOT	<i>CCR4</i> (carbon catabolite repressor 4)- <i>NOT</i> (Negative on TATA) complex
CDK2	Cyklín dependentná kináza 2
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CEBPE	CCAAT enhancer binding protein epsilon
CNOT1	CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 1
CoCl ₂	Chlorid kobaltnatý
CP	cisplatina (cisplatin)
Da	dalton (jednotka hmotnosti)
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytidin trifosfát
DDR2	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2
DDX6	DEAD-box helicase 6

dGTP	Deoxyguanosin trifosfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
dTTP	Deoxythymidin trifosfát
<i>DUSP6</i>	dual specificity phosphatase 6 (mRNA)
DUSP6	dual specificity phosphatase 6 (proteín)
eIF	eukaryotický iniciačný faktor (eukaryotic initiation factor)
eIF1	eukaryotický iniciačný faktor 1
eIF1A	eukaryotický iniciačný faktor 1A
eIF2	eukaryotický iniciačný faktor 2
eIF4A	eukaryotický iniciačný faktor 4A
eIF4E	eukaryotický iniciačný faktor 4E (rodina proteínov)
eIF4E1	eukaryotický iniciačný faktor 4E1
eIF4E2	eukaryotický iniciačný faktor 4E2
<i>EIF4E2</i>	gén pre eukaryotický iniciačný faktor 4E2
eIF4E2 Δ	delícia eukaryotického iniciačného faktoru 4E2
eIF4E3	eukaryotický iniciačný faktor 4E3
eIF4E3_A	eukaryotický iniciačný faktor 4E3 izoforma A
eIF4E3_B	eukaryotický iniciačný faktor 4E3 izoforma B
eIF4E3 Δ	delícia eukaryotického iniciačného faktoru 4E3
eIF4F	eukaryotický iniciačný faktor 4F (komplex proteínov)
eIF4F ^H	eukaryotický iniciačný faktor 4F ^H (komplex proteínov funkčný v hypoxii)
eIF4G	eukaryotický iniciačný faktor 4G
eIF4G1	eukaryotický iniciačný faktor 4G, izoforma 1
eIF4G2	eukaryotický iniciačný faktor 4G, izoforma 2
eIF4G3	eukaryotický iniciačný faktor 4G, izoforma 3
eIF5B	eukaryotický iniciačný faktor 5B
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2

EtBr	Etídium bromid
FA	Formamid
FBS	Fetálne bovinné sérum
FC	Fold Change
FDR	false discovery rate
FPKM	fragments pre kilobase per million
GDP	guanozín difosfát
GFP	Green fluorescent protein
GIGYF1	GRB10-interacting GYF protein 1
GIGYF2	GRB10-interacting GYF protein 2
Glu	glukóza
GO	Geneontology (databáza)
GSEA	Analýza obohatenia génovej sady
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1
GTP	guanozín trifosfát
GUSB	glucuronidase beta
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
HIF-2 α	hypoxia-inducible factor 2 α
His	skratka pre aminokyselinu histidín
<i>Hoxb4</i>	gén pre homeobox b4 proteín
Hoxb4	homeobox b4 proteín
Hoxb8	homeobox b8 proteín
<i>Hoxb4</i>	gén pre homeobox b8 proteín
HRPTEC	<i>Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell</i>
HSPB1	heat shock protein family B (small) member 1
Ile	skratka pre aminokyselinu izoleucín
ISG15	interferon-stimulated gene 15
K _{as}	asociačná konštanta (veľičina)

Kb	kilobáza (špecifická jednotka dĺžky sekvencie nukleovej kyseliny; 10^3 báz)
kDa	kilodalton (jednotka hmotnosti; 10^3 Da)
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Leu	skratka pre aminokyselinu leucín
LPA	lineárny polyakrylamid
Lys	skratka pre aminokyselinu lyzín
m ⁷ G	7-metylguanozín
m ⁷ GTP	7-metylguanozíntrifosfát
MAFP2	microfibril associated protein 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kináza
Met	skratka pre aminokyselinu metionín
MFC	multifaktorový komplex (multifactor complex)
miRISC	miRNA-induced silencing complex
Mnk1/2	MAP Kinase-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1/2
mRNP	ribonukleoproteín obsahujúci mRNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OGD	oxygen glucose depletion
ORF	otvorený čítací rámec (open reading frame)
PABP	proteín viažuci polyadenylovaný koniec mRNA (polyA-binding protein)
PATL-1	homológ 1proteínu PAT1 (Protein PAT1 homolog 1)
Phe	skratka pre aminokyselinu fenylalanín
PIC	preiniciačný komplex (preinitiation complex)
PK	per cento konfluencie
PK12	per cento konfluencie 12
PK8	per cento konfluencie 8
Prep1	PBX/Knotted 1 Homeobox protein

Pro	skratka pre aminokyselinu prolín
P-telieska	processing bodies
PTCHD1	patched domain containing 1
qPCR	kvantitatívny polymerázová reťazová reakcia
RAF	skupina serín/treonín-špecifických proteín kináz
RAS	malé GTPázy
RBM4	RNA-binding protein 4
rHRE	hypoxia-inducible response element (špecifické sekvencie mRNA)
RIP	RNA imunoprecipitácia
S6K	ribosomal protein S6 kinase
S6K1	ribosomal protein S6 kinase beta-1
Ser	skratka pre aminokyselinu serín
SFRP2	secreted frizzled related protein 2
SLC7A3	solute carrier family 7 member 3
SPARC	secreted protein acidic and cysteine rich
SURF1	cytochrome c oxidase assembly facto
t. j.	to jest
TAE	<i>tris-acetátový pufor + EDTA</i>
T _e	translačná efektivita
TE	tris pufor + EDTA
T _m	teplota topenia (melting temperature)
TNRC6A	Trinucleotide Repeat Containing 6A
TNRC6B	Trinucleotide Repeat Containing 6B
TR	technický replikát
T-REx	Tetracyklínom regulovaná expresia
Trp	skratka pre aminokyselinu tryptofán
TV	transkripčný variant
Tyr	skratka pre aminokyselinu tyrozín
UTR	netranslatovaná oblasť (untranslated region) mRNA

Val	skratka pre aminokyselinu valín
Wt	divoký typ (wild type)
YBX2	Y-box binding protein 2
ZNF532	zinc finger protein 532

1 Úvod

Schopnosť eukaryotických buniek rozoznávať rôzne informácie zo svojho okolia či vlastného vnútra a primerane na ne reagovať je kľúčovým predpokladom ich dlhodobého fungovania v organizme. Fyziologické procesy v bunkách sú prakticky vždy regulované na úrovni génovej expície a táto príležitosť sa vyskytuje ktorejkoľvek jej fáze od transkripcie až po transláciu či posttranslačné modifikácie proteínov. Vzhľadom k potrebe bunky aktívne a pohotovo odpovedať na zmeny v okolí je dobrou a relatívne rýchlou možnosťou regulácia translácie. Kvôli značnej energetickej náročnosti samotnej translácie je pre bunku najvýhodnejšie regulovať jej iniciáciu. Tá je zabezpečovaná celou radou translačných iniciačných faktorov, ktoré v konečnom dôsledku sprostredkujú nasadenie ribozómu spolu s iniciačnou tRNA (Met-tRNA_i) na mRNA a nasleduje elongačná fáza translácie.

Iniciácia translácie je u eukaryotických organizmov zabezpečovaná väčšinou mechanizmom využívajúcim väzbu 5' 7-metylguanozínovej čiapočky, ktorá sa vyskytuje u väčšiny mRNA. Táto štruktúra je typicky rozpoznávaná a viazaná eukaryotickým iniciačným faktorom 4E1 (eIF4E1). Tento proteín následne interaguje s eIF4G a ten zas s niektorými ďalšími komponentmi translačného aparátu bunky, čo nakoniec vedie k translácii naviazanej mRNA. Kanonický eIF4E1 však nie je jediným proteínom, ktorý je schopný viazať čiapočku mRNA. Proteínová rodina eukaryotických iniciačných faktorov 4E obsahuje u človeka okrem eIF4E1 aj nekanonické paralógy eIF4E2 a eIF4E3. Ukazuje sa, že tieto proteíny majú významné regulačné funkcie, či dokonca hrajú úlohu v špecifickej nekanonickej translácii. Keďže tieto proteíny ovplyvňujú tak zásadný proces ako je translácia, nie je prekvapením, že v rôznych kontextoch vystupujú medzi iným ako onkogény alebo naopak tumor supresory. Členovia proteínovej rodiny eIF4E sú evolučne konzervované naprieč mnohými fylogenetickými skupinami a ich homológy boli identifikované a študované v rôznych organizmoch. V tejto práci sme sa však zameriavali predovšetkým na ľudských zástupcov týchto proteínov – prevažne eIF4E2 a eIF4E3.

1.1 Vlastná práca a jej zasadenie do kontextu práce v laboratóriu

Diplomová práca nadväzuje tematicky aj materiálne na predošlú výskumnú činnosť Laboratória biochémie RNA na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Karlovej v Prahe. Riešených bolo niekoľko úloh, ktoré ďalej dopĺňali a rozširovali už prebiehajúce projekty, prípadne stavali na dátach, ktoré boli k dispozícii z minulosti. Takými dátami boli napríklad tie pochádzajúce zo sekvenovania RNA, ktoré prebehlo pred mojim príchodom do laboratória. Sekvenačné dáta som mal k dispozícii v takej podobe, ako ich popisujem v kapitole Materiál. Mojou prvou úlohou bolo výsledky sekvenovania validovať pomocou nezávislej metódy. Na základe sekvenačných dát bolo vybraných niekoľko transkriptov so špecifickou expresiou a hladina týchto transkriptov bola stanovená pomocou RT-qPCR. Následne boli výsledky porovnané.

S použitím sekvenačných dát bola následne zrealizovaná analýza obohatenia génovej sady (GSEA) aby sa identifikovali kategórie významne diferencially exprimovaných génov s ich potenciálnym presahom do známych alebo nových biologických funkcií eIF4E1, eIF4E2 a eIF4E3.

Používané bunkové línie boli v laboratóriu vytvorené už pred mojim príchodom. Ich tvorba je podrobnejšie popísaná v kapitole Materiál. Kľúčové je, že sa jedná o línie odvodené od rodičovskej HEK-293 (Flp-In, T-REx), z ktorých sa každá vyznačuje špecificky zvýšenou expresiou jedného zo študovaných proteínov eIF4E alebo jeho absenciou. Tieto línie boli používané na spomínané RT-qPCR validačné experimenty a následne pri sledovaní vplyvu rôznych kultivačných podmienok (ako napríklad hypoxia, hladovanie na glukózu a sérum v médiu) na ich rastové schopnosti.

2 Ciele práce:

Hlavným cieľom práce bolo skúmať translačné iniciačné faktory proteínovej rodiny 4E a ich vplyv na reguláciu génovej expresie.

Čiastkové ciele:

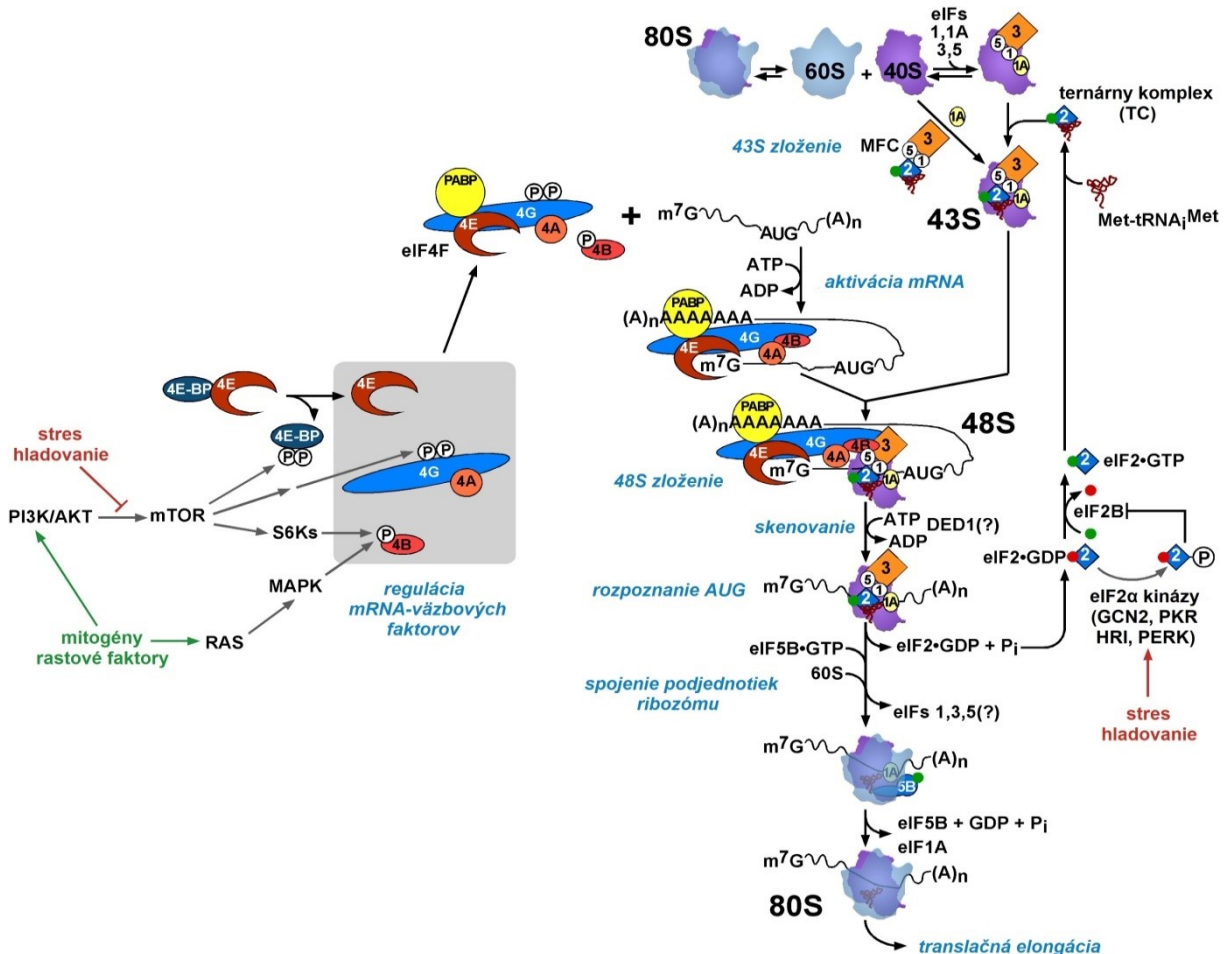
- Vytvoriť set génov na validačné experimenty
- Navrhnuť špecifické páry primerov na vybrané gény určené na validáciu RNA sekvenovania
- **Validovať výsledky RNA sekvenovania pomocou nezávislej metódy RT-qPCR**
- Overiť reproducibilitu výsledkov validácie pomocou nezávislých biologických opakovaní
- Kvantifikovať hladiny transkriptov translačných iniciačných faktorov proteínovej rodiny 4E v sledovaných bunkových líniiach
- **Zrealizovať Analýzu obohatenia génovej sady (GSEA) dvoch typov sekvenačných dát**
- Identifikovať limitujúce podmienky kultivácie, pri ktorých sú študované bunkové línie schopné rastu
- **Charakterizovať bunkové línie s deléciou eIF4E2 a eIF4E3 na základe vplyvu rôznych kultivačných podmienok na ich rastové schopnosti**

3 Prehľad literatúry

3.1 Iniciácia translácie závislá na 5' 7-metylguanozínovej čiapočke mRNA

Translácia mRNA začína jej rozpoznaním zložkami translačného iniciačného aparátu bunky, následným zostavením iniciačného komplexu a nakoniec nasadením ribozómu na mRNA. Tento proces je zabezpečovaný a regulovaný celou radou rôznych proteínov, ktoré sa súhrnne nazývajú translačné iniciačné faktory (Obrázok 1).

Obrázok 1. Eukaryotická iniciácia translácie závislá na čiapočke mRNA a jej regulácia. Schéma popisuje iniciačnú fázu translácie spolu s jednotlivými translačnými iniciačnými faktormi, ktoré sa na nej podieľajú a regulujú ju. Znárodné sú tiež externé signalizačné faktory modulujúce funkciu konkrétnych súčastí translačného iniciačného aparátu (dráhy spúšťané rastovými faktormi a stresmi). V pravej časti obrázka sú zobrazené regulačné dráhy ovplyvňujúce zostavenie komplexu eIF4F (eIF4E1:eIF4G:eIF4A). Ľavá horná časť popisuje zostavenie preiniciačného komplexu (43S PIC) zloženého z malej ribozomálnej podjednotky (40S), ternárneho komplexu (eIF2:GTP:Met-tRNA_i) a faktorov eIF1, eIF1A, eIF3 a eIF5. U kvasiniek sa z translačných iniciačných faktorov a ternárneho komplexu vytvára multifaktorový komplex (MFC). Väzba eIF4E2 (eIF4F) na 7-metylguanozínovú (m⁷G) čiapočku mRNA v súčinnosti s PABP viazaným na polyadenylovaný koniec mRNA a eIF4F spôsobí cirkularizáciu mRNA a tým sa aktivuje. Nasleduje naviazanie 43S PIC na eIF4F za vzniku 48S komplexu a skenovanie mRNA. Po rozpoznaní vhodnej AUG sekvencie sa z komplexu uvoľní eIF2:GDP a následné naviazanie eIF5B:GTP spolu s veľkou ribozomálnou podjednotkou (60S) spôsobí uvoľnenie ďalších proteínov z komplexu - eIF4E1, eIF3 a eIF5. Ďalšie uvoľnenie eIF5B, GDP a eIF1A umožní kompletnému 80S ribozómu pokračovať v elongačnej fáze translácie. (Upravené podľa Sonenberg a Hinnebusch, 2007)



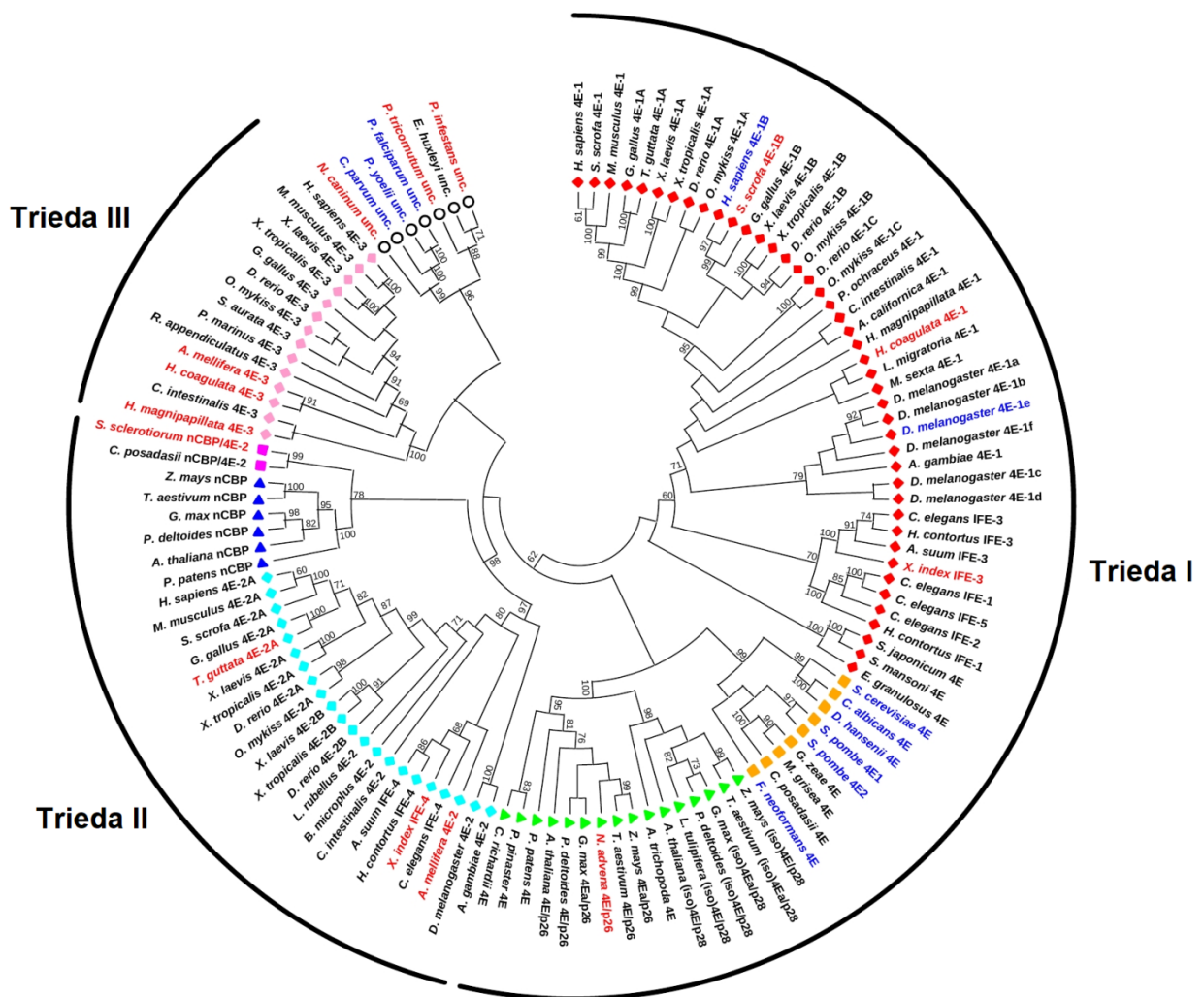
Prvým krokom v eukaryotickej iniciácii translácie je obvykle nasadenie komplexu proteínov eIF4F na mRNA a jej aktivácia. Je známa aj iniciácia translácie nezávislá na čiapočke mRNA (Gunnery, Mäivali a Mathews, 1997), väčšina eukaryotických mRNA však s komplexom eIF4F interaguje pomocou svojej 5' 7-metylguanozínovej (m^7G) čiapočky, ktorú viaže proteín eIF4E1 a pomocou polyadenylovaného 3' konca viažúceho sa na PABP. Proteín eIF4G interaguje s RNA helikázou eIF4A a eIF4E1, čo spolu vytvára komplex eIF4F. Väzba PABP na komplex eIF4F spôsobí, že sa mRNA cirkularizuje a v podobe takejto tzv. uzavretej slučky je pripravená na iniciáciu translácie. Ternárny komplex tvorený eIF2 s naviazaným GTP a iniciačnou tRNA nabitou metionínom (Met-tRNA_i) interaguje s malou ribozomálnou podjednotkou a ďalšími translačnými iniciačnými faktormi (eIF1, eIF1A, eIF3 a eIF5). Spolu tvoria 43S preiniciačný komplex (43S PIC). eIF4G prostredníctvom svojich interakcií so 43S PIC sprostredkúva asociáciu malej ribozomálnej podjednotky s aktivovanou mRNA, čoho výsledkom je vznik 48S komplexu. Daná mRNA je následne skenovaná v smere 5' – 3' až do momentu, kedy je rozpoznaný iniciačný kodón AUG a komplex sa zastaví. Zmeny vo vnútornom usporiadaní zložiek komplexu vyvolajú disociáciu eIF1 a eIF2 vo väzbe s GDP. Väzba eIF5B s naviazaným GTP umožňuje asociáciu komplexu s veľkou ribozomálnou podjednotkou za uvoľnenia ďalších faktorov (eIF3 a eIF5). Hydrolýza GTP na eIF5B vedie ku jeho disociácii od vzniknutého 80S ribozómu spolu s eIF1A. Translácia ďalej prechádza do elongačnej fázy. (Sonenberg a Hinnebusch, 2009; Hinnebusch a Lorsch, 2012; Shirokikh a Preiss, 2018)

3.2 Proteínová rodina eukaryotických translačných iniciačných faktorov 4E

Zatiaľ čo funkcia a regulácia kanonického eukaryotického iniciačného faktoru 4E1 (eIF4E1) je známa a pomerne rozsiahlo skúmaná, biologické úlohy jeho paralógov sú stále predmetom mnohých nejasností. Popri prototypickom proteíne eIF4E1, ktorého množstvo je v bunkách najväčšie, sa u človeka vyskytujú ďalší dvaja členovia proteínovej rodiny eukaryotických iniciačných faktorov 4E, konkrétne eIF4E2 a eIF4E3. Všetky proteíny rodiny eIF4E sa vyznačujú schopnosťou viazať 7-metylguanozínovú čiapočku mRNA (Joshi, Cameron a Jagus, 2004). Ako sa postupne ukázalo, funkcia týchto nekanonických proteínov spočíva pravdepodobne v špecifickej translácii, prípadne jej regulácii (napríklad: Rhoads, 2009; Landon *et al.*, 2014; Chen a Gao, 2017; Melanson, Timpano a Uniacke, 2017).

Dohromady bolo pomocou fylogenetickej analýzy identifikovaných 411 členov rodiny eIF4E pri použití genómových sekvenčných dát z 230 druhov organizmov. Na základe evolučnej príbuznosti translačných iniciačných faktorov rodiny 4E a znej vyplývajúcich konzervovaných molekulárnych charakteristík boli pre účely klasifikácie a funkčného rozdelenia vytvorené tri triedy (Obrázok 2, Tabuľka 1) (Joshi *et al.*, 2005).

Obrázok 2. Radiálny kladogram znázorňujúci vzťahy medzi vybranými členmi rodiny eIF4E z viacerých druhov. Schematické znázornenie vzťahov medzi proteínmi eIF4E získané pomocou porovnania sekvencií konzervovaných centrálnych oblastí proteínov. Názvy organizmov a proteínov vyznačené čiernou farbou poukazujú na to, že celá sekvencia konzervovanej oblasti konkrétneho člena rodiny eIF4E by mohla byť predpovedaná na základe konsenzuálnych sekvenčných dát cDNA. Červená farba značí opak. Modrá zas informuje o tom, že genómové sekvenčné dáta boli použité na overenie alebo stanovenie nukleotidovej sekvencie, ktorá reprezentuje centrálnu oblasť daného proteínu. Značka a jej farba pri každom reprezentovanom proteíne má vzťah ku taxonomickej ríši (kosoštvorec – *Metazoa*, štvorec – *Fungi*, trojuholník – *Viridiplantae*, kruh – *Protista*) a podskupine do ktorej daný proteín patrí (červená – živočíšne eIF4E-I a IFE-3-like; zlatá – hubové eIF4E-like; zelená – rastlinné eIF4E a eIF(iso)4E-like; zelenomodrá – živočíšne eIF4E-2-like; modrá – rastlinné nCBP-like; fialová – hubové nCBP/eIF4E-2-like; ružová – živočíšne eIF4E-3-like; biela – atypické proteíny rodiny eIF4E u niektorých jednobunkovcov). Na obrázku sú vyznačené skupiny proteínov, ktoré patria do jednotlivých Tried I – III. Na vetvách kladogramu sú uvedené len „bootstrapové“ hodnoty, ktoré sú väčšie ako 60 %. (Upravené podľa Joshi *et al.*, 2005)



Proteín eIF4E1 a jeho homológy sú zaradené do Triedy I. Proteíny patriace do tejto triedy boli identifikované u všetkých sledovaných eukaryotických organizmov, čo je konzistentné s predpokladom, že eukaryotické iniciačné faktory považované za kanonické sú členmi práve tejto triedy. Vzájomná sekvenčná identita týchto proteínov je približne 35 – 40 % a podobnosť asi 60 – 65 %. Typickým rysom zástupcov Triedy I je prítomnosť zvyšku aminokyseliny tryptofán na pozíciách zodpovedajúcich Trp43 a Trp56 ľudského proteínu eIF4E1 (Tabuľka 1). Proteíny zaradené do Triedy II (u človeka zástupca eIF4E2) sú charakteristické nahradením Trp43 a Trp56 v ľudskom eIF4E1 za Tyr/Phe/Leu a Tyr/Phe (Tabuľka 1). Ich vzájomná sekvenčná identita je zhruba 50 % a podobnosť cca 70 – 80 %. S členmi Triedy I vykazujú asi 30 – 35% identitu a 60 – 65% podobnosť (Joshi *et al.*, 2005). Proteíny Triedy II boli identifikované u organizmov patriacich do taxónov *Metazoa*, *Viridiplantae* a *Fungi* (Joshi, Cameron a Jagus, 2004; Joshi *et al.*, 2005). Posledná Trieda III sa vyznačuje nahradením Trp56 (podľa ľudského eIF4E1) za zvyšok aminokyseliny cysteín u *Vertebrata*, prípadne tyrozín u iných taxónov (Tabuľka 1). Ľudským zástupcom tejto triedy je eIF4E3 a jeho homológy sa vyskytujú u *Metazoa*, predovšetkým *Chordata*. Sekvenčná identita proteínov Triedy III v porovnaní s proteínmi Triedy I a II je zhruba 25 – 30 % a podobnosť bola stanovená na približne 45 – 55 % (Joshi *et al.*, 2005).

Tabuľka 1. Zámény aminokyselín charakteristické pre jednotlivé triedy členov proteínovej rodiny eukaryotických iniciačných faktorov 4E. Pre rozlíšenie proteínov a ich zaradenie do jednotlivých tried (Trieda I, II a III) sú kľúčové aminokyselinové zvyšky na príslušných pozíciách 43 a 56 podľa ľudského eIF4E1 (Trp43 a Trp56). Aminokyselinové zbytky v proteínoch jednotlivých tried nahrádzajú Trp na ekvivalentných pozíciách vzhľadom ku eIF4E1. Trp – tryptofán, Tyr – tyrozín, Phe – fenylalanín, Leu – leucín, Cys – cysteín (podľa Joshi *et al.*, 2005).

eIF4E1	Trieda I	Trieda II	Trieda III
Trp43	Trp	Tyr/Phe/Leu	Trp
Trp56	Trp	Tyr/Phe	Cys/Tyr

Je známe, že nekanonické proteíny rodiny eIF4E majú rôzne funkcie u rôznych organizmov. U *D. melanogaster* má napríklad homológ eIF4E2 (d4EHP) úlohu v rôznych vývojových procesoch (napríklad: Cho *et al.*, 2005, 2006; Weidmann a Goldstrohm, 2012; Valzania *et al.*, 2016), u *C. elegans* ovplyvňuje IFE-4 medzi iným kladenie vajíčok (Dinkova *et al.*, 2005), u myši bola pozorovaná translačná represia mRNA transkripčného faktoru Hoxb4 pomocou eIF4E2 (Villaescusa *et al.*, 2009) a dokonca u *A. thaliana* sa zdá, že homológ ľudského eIF4E2 nazývaný v tomto prípade nCBP by mohol byť aspoň čiastočne schopný nahradiť kanonický faktor a iniciovať transláciu (Ruud *et al.*, 1998), alebo u neho napríklad existuje podozrenie, že ovplyvňuje šírenie vírusov medzi bunkami (Keima *et al.*, 2017). Táto práca sa však ďalej zaoberá proteínmi rodiny eIF4E predovšetkým u človeka.

3.3 Translačný iniciačný faktor eIF4E1

Gén pre ľudský translačný iniciačný faktor eIF4E1 je lokalizovaný na chromozóme 4 s presnejšou cytogenetickou pozíciou 4q23. Jeho genomická pozícia bola určená na NC_000004.12 (98879276..98929133) (online zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1977>; Apríl 2021). Produktom tohto génu je proteín s dĺžkou 217 aminokyselín a hmotnosťou 25 kDa (online zdroj: <https://www.uniprot.org/uniprot/P06730>; Apríl 2021).

Proteín eIF4E1 je známy tým, že je jedným z faktorov, ktoré zabezpečujú kanonickú dráhu iniciácie translácie. Táto funkcia je umožnená vďaka jeho schopnosti viazať sa na 5' 7-metylguanozínovú čiapočku mRNA a ďalej proteín eIF4G, ktorý slúži ako akési „lešenie“ pre väzbu ostatných translačných iniciačných faktorov. Najvýznamnejšia regulácia translačnej aktivity eIF4E1 je zabezpečená prostredníctvom jeho reverzibilnej interakcie s inhibítorom translácie, proteínom 4E-BP (Joshi, Cameron a Jagus, 2004). Tento proteín rovnako ako eIF4G obsahuje 4E-väzbovú doménu s konsenzuálnou sekvenciou Y-x-x-x-x-L-Φ (pričom x referuje ku ľubovoľnému aminokyselínovému zvyšku a Φ reprezentuje Leu/Met/Phe) (Mader *et al.*, 1995; Altmann *et al.*, 1997). To poukazuje na myšlienku, že dochádza ku kompetícii medzi eIF4G a 4E-BP o väzbu na eIF4E1. Zatiaľ čo väzba eIF4G na eIF4E1 umožňuje iniciovať transláciu (Gross *et al.*, 2003), naviazanie 4E-BP zabráni jeho asociácii s eIF4G a translácia je blokována (Pause *et al.*, 1994). Okrem očakávateľnej cytoplazmatickej lokalizácie eIF4E1 bol jeho výskyt potvrdený aj v jadre (Lejbkowitz *et al.*, 1992; Strudwick a Borden, 2002), kde hrá úlohu v nukleárnom exporte (Culjkovic *et al.*, 2005).

Z biologickej funkcie eIF4E1 vyplýva, že pôsobí stimulačne na celkovú transláciu. Má teda podporný vplyv na metabolizmus buniek, ich rast a proliferáciu. To znamená, že je nepostrádateľný pre bunky s vysokou metabolickou aktivitou. Konzistentne s tým bola popísaná aj jeho úloha v rakovinových bunkách. Nadprodukcia eIF4E1 je napríklad schopná u buniek vyvolať malígnu transformáciu (Lazaris-Karatzas, Montine a Sonenberg, 1990). Jeho zvýšené hladiny boli navyše identifikované v rôznych tumoroch a v tejto súvislosti bola popísaná aj úloha eIF4E1 v metastatickej progresii (Graff a Zimmer, 2003; Ramaswamy *et al.*, 2003). Proteín eIF4E1 teda môžeme považovať za klinicky významný protoonkogén s diagnostickým potenciálom (Mamane *et al.*, 2004).

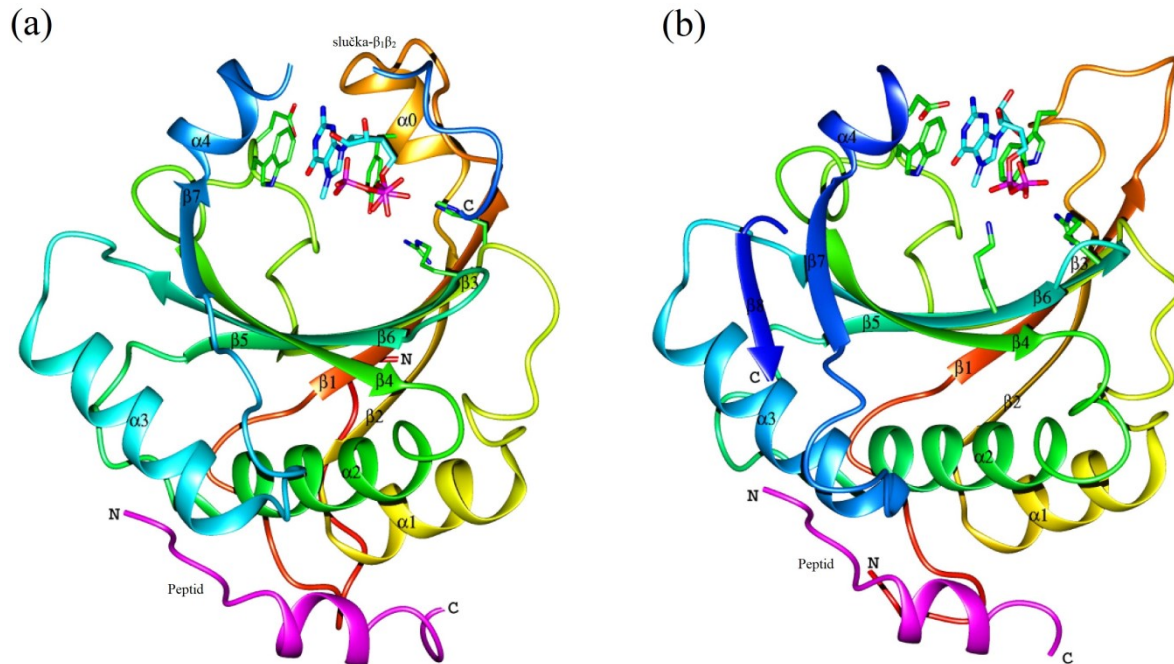
Podrobný popis eIF4E1 by bol nad rámec tejto práce, preto je uvedený len stručný prehľad. Ďalšie informácie sú dostupné napr. v týchto prehľadových článkoch: Raught a Gingras (1999); Batool, Aashaq a Andrabi (2019); Volpon, Osborne a Borden (2019).

3.4 Translačný iniciačný faktor eIF4E2

Ľudský eukaryotický iniciačný faktor 4E2 má gén umiestnený na chromozóme 2 a jeho cytogenetická pozícia bola stanovená na 2q37.1 (Morita *et al.*, 2012). Poloha génu v genóme človeka je NC_000002.12 (232550689..232583644) (online zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9470>; Apríl 2021). cDNA knižnica folikulárnych buniek človeka obsahuje klon eIF4E2 s dĺžkou 989 bp, ktorého ORF (otvorený čítací rámec) kóduje sekvenciu 245 aminokyselinových zvyškov s hmotnosťou proteínového produktu približne 28 kDa a hodnotou pI 8,9. V porovnaní s eIF4E1 vykazuje popisovaný proteín sekvenčnú identitu 30 % a podobnosť 60 % (Rom *et al.*, 1998). Podľa analýzy tkanivovej distribúcie mRNA *EIF4E2* u myši bolo nájdených viacero variantov týchto mRNA. Najvyšší obsah *EIF4E2* mRNA v podobe 1,3 a 1,5kb variantov bol v bunkách semenníkov. Variant veľký 1,1 kb mal univerzálny výskyt vo všetkých tkanivách. Množstvo mRNA stanovené v ďalších myších tkanivách postupne klesalo v poradí: slezina, priečne pruhované svaly, pľúca, srdce a mozog (Joshi, Cameron a Jagus, 2004). *EIF4E2* mRNA u človeka má 7 transkripčných variantov (TV). Produkty týchto transkriptov (TV) sa líšia variabilným C-koncom v dôsledku prítomnosti rôznych exónov v mRNA po alternatívnom zostrihu. Ďalšie rozdiely medzi TV sú spojené s rôznymi 3' UTR, prípadne alternatívnym zostrihom na 5' konci mRNA (napr. TV_CRA_a). Proteínová izoforma A je najdlhšia izoforma proteínu eIF4E2 a jedná sa o translačný produkt TV_1 s kanonickým polyadenylačným signálom a bez exónu 8. Izoformy B, C a D sú kódované transkripčnými variantmi 2, 3 a 4 s dvoma polyadenylačnými signálmi a exónom 8. Pre TV_1 bolo použitím nástroja BLAST identifikovaných 141 EST, čo predstavuje menší počet ako 173 EST pre exón 8 (patriaci ostatným sledovaným TV). To mení predošlý pohľad na izoformu A, ku ktorej sa v literatúre pristupovalo ako ku referenčnej. Poukazuje to totiž na fakt, že ostatné TV (a v dôsledku pravdepodobne aj ostatné izoformy) sú zastúpené viac ako TV_1, ktorej produkt predstavoval „štandardný“ proteín eIF4E2. Tento záver je obzvlášť dôležitý vzhľadom k tomu, že odlišné C konce jednotlivých izoformiem by mohli sprostredkovať iné funkcie a regulácie proteínu eIF4E2 (Mrvová *et al.*, 2018).

Tvar proteínu eIF4E2 do veľkej miery pripomína eIF4E1 a podobá sa na pokrčenú dlaň (Marcotrigiano *et al.*, 1997). Podľa kryštalografického modelu štruktúry fragmentu ľudského eIF4E2 je tento proteín zložený z troch približne paralelných α -helixov okolo siedmich antiparalelných β -listov (Obrázok 3) (Rosettani *et al.*, 2007).

Obrázok 3. Porovnanie modelov štruktúry ľudského proteínu eIF4E2 a eIF4E1. (a) Reprézentácia priestorovej štruktúry eIF4E2 (fragment Lys45 – Phe234). Farebná škála odráža sekvenciu aminokyselinových zvyškov proteínu – od červeného N-konca až po modrý C-koniec. Purpurovou farbou je vyznačený fragment ľudského proteínu 4E-BP1 (Arg51 – Val67) s 4E-väzbovou doménou. Nukleotidový ligand m^7GTP je znázornený zelenomodrou farbou. Aminokyselinové zvyšky, ktoré interagujú s ligandom pomocou vodíkových mostíkov (Glu125, His110 a Arg174) alebo ligand medzi sebou stabilizujú pomocou stohovacej interakcie (Tyr78 a Trp124) majú uhlíkové atómy vyznačené zelenou farbou. (b) Schematická reprezentácia ľudského proteínu eIF4E1 interagujúceho s fragmentom 4E-BP1 a m^7GTP identickým s tým použitým v (a). Použitie farieb v (b) bolo identické ako v prípade (a). (Upravené podľa Rosettani *et al.*, 2007)



Množstvo proteínu eIF4E2 v bunkách HeLa a HEK-293 je cca 5 – 10 krát menej než eIF4E1 (Rom *et al.*, 1998; Kubacka *et al.*, 2013). Pôvodná predstava cytoplazmatického výskytu eIF4E2 (Rom *et al.*, 1998) bola ďalej doplnená o experimentálne doklady o jeho prítomnosti v jadre počas inhibície exportu z jadra (Kubacka *et al.*, 2013). V závislosti na rôznych stresových podmienkach sa zrejme stáva súčasťou P-teliesok a stresových granúl, kde však jeho presná funkcia nie je známa (Kubacka *et al.*, 2013; Frydryskova *et al.*, 2016).

3.4.1 Väzba eIF4E2 na 7-metylguanozínovú čiapočku mRNA

Na 5' konci skoro všetkých eukaryotických mRNA sa nachádza 7-metylguanozínová čiapočka (Shatkin, 1976; Salditt-Georgieff *et al.*, 1980). Práve túto štruktúru je schopný rozpoznať a špecificky naviazať proteín eIF4E2 (Rom *et al.*, 1998). Väzba je sprostredkovaná špecifickou interakciou m^7G čiapočky a aminokyselinových zvyškov umiestnených vo

väzbovej kapse proteínu eIF4E2 tvorenej jeho konkávnym povrchom (Obrázok 3). V interakcii sú zainteresované predovšetkým zvyšky aromatických aminokyselín Tyr78 a Trp124 (v ľudskom proteíne eIF4E1 sa jedná o príslušné zvyšky Trp56 a Trp102), ktoré viažu m^7G medzi seba pomocou tzv. stohovacej interakcie. Doplňujúce interakcie sprostredkujú pomocou vodíkových mostíkov zvyšky aminokyselín: Trp124, Glu125 (väzba s guanínom), Arg71 (väzba s ribózou), His110, Asp112 (väzba α -fosfátu), Arg174, Gly70 (väzba β -fosfátu) a Arg138 (väzba γ -fosfátu) (Rosettani *et al.*, 2007).

Vytvoreniu väzbového miesta na eIF4E2 pravdepodobne predchádza samotná väzba proteínu s čiapočkou. Kryštálová štruktúra proteínu s nenaviazaným analógom čiapočky m^7GTP totiž nezobrazuje časť $\beta_1\beta_2$ -slučky (Pro72-Glu79) s Tyr78 kľúčovým pre danú interakciu, čo zrejme znamená, že slučka je v tomto stave flexibilná. Trp124 má za daných okolností tiež pozmenenú orientáciu v porovnaní s m^7GTP -viazaným eIF4E2. Zmeny polohy a orientácie boli popísané aj u niektorých ďalších zvyškov aminokyselín, konkrétne Ser220 a Ile221. Naopak, ďalšie aminokyselinové zvyšky podieľajúce sa na väzbe analógu čiapočky (Glu125, Arg174 a His110) mali štruktúru stabilnú bez ohľadu na väzbu m^7GTP . Na základe týchto výsledkov bol vytvorený model postupnej väzby 7-metylguanozínovej čiapočky na eIF4E2 – počiatočné interakcie sa vytvoria s fosfátovými skupinami, potom sa vodíkové mostíky naviažu na m^7G a na záver väzbu definitívne stabilizuje stohovacia interakcia zložením príslušných aromatických skupín aminokyselinových zvyškov okolo m^7G (Rosettani *et al.*, 2007).

Proteín eIF4E2 sa na rôzne analógy čiapočky viaže rôzne efektívne, má pre ne rôznu afinitu (Zuberek *et al.*, 2007). Nižšia efektivita väzby eIF4E na m^7GTP -Sepharózu bola popísaná v práci (Tee, Tee a Blenis, 2004). Asociačná konštanta (K_{as}) pre interakciu ľudského eIF4E2 a m^7GTP mala cca 100-krát menšiu hodnotu oproti eIF4E1 a táto hodnota bola približne 30-krát menšia pri použití analógu čiapočky $m^7GpppG/A/C$ (Zuberek *et al.*, 2007). Dôvodom vzniknutých rozdielov medzi afinitou eIF4E1 a eIF4E2 môže byť negatívny efekt dlhšej slučky v mieste väzby m^7GTP u eIF4E2 a tým vyvolané štruktúrne zmeny (Rosettani *et al.*, 2007). Špecifita väzby eIF4E2 na analóg čiapočky vykazuje menšiu závislosť na 7-metylácií daného analógu v porovnaní s eIF4E1 (Zuberek *et al.*, 2007). Väzbová aktivita eIF4E2 pre čiapočku môže byť modulovaná posttranslačnými modifikáciami. Jednu z takých modifikácií eIF4E2 zabezpečuje proteín ARIH1 (označovaný tiež ako HHARI), ktorý pôsobí ako ligáza pre ISG15 a súčasne aj ubiquitin (Tan *et al.*, 2003; Okumura, Zou a Zhang, 2007; von Stechow *et al.*, 2015). Naviazanie ISG15 (tzv. ISGylácia) na aminokyselinové zvyšky

Lys134 a Lys222 zvyšuje schopnosť eIF4E2 viazať m⁷G čiapočku. Tento výsledok podporuje aj experiment v ktorom bol proteín eIF4E2 fúzovaný s ISG15, čím bola napodobená ISGylácia. V dôsledku toho sa jeho väzbová aktivita zvýšila 10- až 20-krát (v závislosti na tom, či došlo k N- alebo C-terminálnej fúzii) (Okumura, Zou a Zhang, 2007). Ďalšou možnosťou ako dochádza ku zvýšeniu afinity eIF4E2 ku m⁷G čiapočke je jeho kooperatívna väzba s ďalším proteínom. Popísaná bola napríklad asociácia eIF4E2 s 4E-T, čo vyústilo do cca 4-krát väčšej schopnosti eIF4E2 viazať čiapočku (Chapat *et al.*, 2017). Zdá sa, že nízka koncentrácia kyslíka (hypoxia) v bunkách má tiež podporný vplyv na viazanie m⁷GTP analógu čiapočky proteínom eIF4E2 (Uniacke *et al.*, 2012; Timpano a Uniacke, 2016; Timpano *et al.*, 2016). To pravdepodobne poukazuje na jeho funkciu v reakcii buniek na hypoxiu (viď kapitolu 3.4.4 – Úloha eIF4E2 v hypoxickej translácii).

3.4.2 Interakcia eIF4E2 s eIF4G a 4E-BP1

Vzhľadom k tomu, že proteín eIF4E2 je na úrovni sekvencie aj priestorovej štruktúry podobný eIF4E1, vznikla myšlienka, že by tiež mohol interagovať s eukaryotickým translačným iniciačným faktorom 4G (eIF4G). Tento proteín totiž disponuje 4E-väzbovým sekvenčným motívom (popisovaný už v kapitole 3.3. Translačný iniciačný faktor eIF4E1), ktorý je štandardne využívaný pre interakciu s eIF4E1 (Mader *et al.*, 1995; Altmann *et al.*, 1997). Niektoré práce takúto interakciu nepreukázali (Rom *et al.*, 1998; Joshi, Cameron a Jagus, 2004; Tao a Gao, 2015). Výsledky iných experimentov zas naznačili, že by mohlo dochádzať aspoň ku slabšej (viac ako 100-násobne slabšej v porovnaní s eIF4E1), ale reálnej väzbe medzi eIF4E2 a izoformou eIF4G2 (Rosettani *et al.*, 2007). Práca skúmajúca transláciu v podmienkach hypoxie identifikovala komplex obsahujúci medzi inými eIF4E2 a eIF4G3 (Ho *et al.*, 2016), ale na základe toho nie je jednoznačné, či sa jednalo o priamu interakciu medzi týmito dvoma proteínmi.

Interakcia proteínu 4E-BP1 s eIF4E2 je podložená mnohými experimentálnymi dátami (Joshi, Cameron a Jagus, 2004; Tee, Tee a Blenis, 2004; Rosettani *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2017). Je zabezpečená prostredníctvom 4E-väzbovej domény patriacej 4E-BP1, ktorej sekvenčný konsenzus je zhodný s tým, ktorý nájdeme u eIF4G (Mader *et al.*, 1995; Altmann *et al.*, 1997; Rosettani *et al.*, 2007). Štruktúrna analýza komplexu eIF4E2:4E-BP1 odhalila okrem kanonických α -helikálnych motívov 4E-BP1 ďalšie prispievajúce ku tejto väzbe.

Najväčší podiel na konzervovaných interakciách tohto komplexu majú zvyšky aminokyselín Tyr54, Leu59 a Met60 zodpovedajúce Y, L a Φ v 4E-väzbovej sekvencii Y-x-x-x-L- Φ proteínu 4E-BP1. V porovnaní s eIF4E1 je afinita 4E-BP1 ku eIF4E2 znížená približne 10-násobne. Dôvodom daného poklesu afinity je pravdepodobne zámena jedného zvyšku aminokyseliny Asn77 u eIF4E1 (priama interakcia s Arg63 proteínu 4E-BP1) za Ser99 u eIF4E2, čo bolo následne podporené aj experimentom s mutovaným proteínom eIF4E2, pričom došlo ku zvýšeniu jeho afinity až na úroveň eIF4E1 (Peter *et al.*, 2017).

Zvýšená hladina eIF4E2 je evidentne spojená s poklesom inzulínom stimulovanej regulačnej fosforylácie 4E-BP1. Takáto zmena úrovne fosforylácie nebola pozorovaná pokiaľ bol použitý mutovaný 4E-BP1 neschopný viazať eIF4E2. Podobný dôsledok mal aj opačný experiment, v ktorom bol analogicky použitý mutovaný eIF4E2 neschopný viazať 4E-BP1. Vypadá to teda tak, že priama interakcia 4E-BP1 s eIF4E2 je kľúčová pre zníženie jeho fosforylácie (Tee, Tee a Blenis, 2004). Efekt zabránenia asociácie 4E-BP1 a eIF4E1 indukovaný inzulínom (Pause *et al.*, 1994) sa u eIF4E2 pravdepodobne neuplatňuje kvôli znemožneniu regulačnej fosforylácie. Inzulínom stimulovaná aktivácia ribozomálnej S6 proteín kinázy (S6K1) bola inhibovaná zvýšenou hladinou eIF4E2, avšak nie u jeho mutovaného variantu (neschopného interakcie s 4E-BP1). Komplex eIF4E2:4E-BP1 má teda zrejme úlohu v tvorbe popísanej negatívnej spätnej väzby, ktorá kontroluje regulačnú dráhu vedúcu k 4E-BP1 a S6K1 (Tee, Tee a Blenis, 2004). Obdobná spätná väzba bola popísaná aj pri zvýšení hladiny eIF4E1 (Khaleghpour *et al.*, 1999). Na kompenzáciu menšieho negatívneho ovplyvnenia fosforylácie 4E-BP1 v dôsledku slabšej väzby eIF4E2 na 4E-BP1 proti eIF4E1 je nutné použiť vyššiu hladinu eIF4E2 (Tee, Tee and Blenis, 2004).

3.4.3 Funkcia eIF4E2 vo vývojových procesoch cicavcov

V myších primárnych oocytoch bola pozorovaná cytoplazmatická kolokalizácia proteínu Prep1 a eIF4E2 (Villaescusa *et al.*, 2004, 2009). U *D. melanogaster* je známy špecifický sekvenčný motív využívaný na vytvorenie väzby s homológom eIF4E2. Na základe prítomnosti podobného motívu v proteíne Prep1 bola predpovedaná jeho interakcia s myším eIF4E2, ktorá bola následne aj experimentálne potvrdená (Cho *et al.*, 2005; Villaescusa *et al.*, 2009). Proteíny Prep1 ani eIF4E2 nevykazujú prítomnosť v polyzómových frakciách, čo značí, že sa pravdepodobne nezúčastňujú aktívnej translácie. Zaujímavou

vlastnosťou Prep1 je jeho schopnosť viazať *Hoxb4* a *Hoxb8* mRNA. Pokiaľ sa v oocytoch zvýši množstvo transkripčného faktoru Hoxb4, dôsledkom je výrazné spomalenie ich embryonálneho vývoja. Prep1 viaže špecificky 3'UTR oblasť *Hoxb4* mRNA a podieľa sa na translačnej represii tejto mRNA aj umelo pripravených reportérových mRNA konštruktov obsahujúcich danú 3'UTR sekvenciu. Predpokladá sa, že Prep1 funguje ako translačný represor kvôli interakcii s eIF4E2, čo spôsobí fyzické priblíženie eIF4E2 ku regulovanej mRNA a jeho následné naviazanie na 7-metylguanozínovu čiapočku. Neschopnosť eIF4E2 viazať eIF4G a prostredníctvom neho aj ďalšie komponenty translačného iniciačného aparátu zrejme znemožňuje transláciu naviazaných mRNA. Sekvenčný motív špecifický pre väzbu eIF4E2 sa okrem Prep1 vyskytuje v konzervovanom stave aj u ďalších členov proteínovej rodiny TALE. To by mohlo potenciálne znamenať, že by s eIF4E2 mohli interagovať aj ďalšie proteíny a podobným mechanizmom represie by mohli byť regulované aj ďalšie špecifické mRNA (Villaescusa *et al.*, 2009).

Významnými interakčnými partnermi eIF4E2 u človeka sa zdajú byť proteíny GIGYF1 a GIGYF2. Asociácia týchto proteínov je sprostredkovaná špecifickým sekvenčným konzervovaným motívom na N-konci GIGYF1 aj GIGYF2. Väzba analógu čiapočky m^7GDP na eIF4E2 neprekážala jeho interakcii s GIGYF2 (Morita *et al.*, 2012). Okrem kanonických motívov GIGYF1/2 prispievajú k väzbe s eIF4E2 aj motívy nekanonické, ktoré zvyšujú afinitu tejto interakcie 20 – 30-krát a pomocné sekvencie ešte 30 – 40-krát nad rámec toho. Je možné, že interakcia eIF4E2 s GIGYF2 by mohla zvýšiť schopnosť eIF4E2 viazať sa na čiapočku mRNA a udeliť mu tak v porovnaní s eIF4E1 kompetitívnu výhodu (Peter *et al.*, 2017). Špecifické umlčanie expresie eIF4E2 vyvolalo zníženie hladiny GIGYF2 a zároveň po umlčaní expresie GIGYF2 klesla zas hladina eIF4E2, akoby boli dané proteíny na sebe nejakým spôsobom závislé. Efekt nezávislého odstránenia eIF4E2 a GIGYF2 (pomocou RNAi) na zvýšenie celkovej hladiny translácie približne o 30 % bol u oboch proteínov zhodný – vyvstáva teda otázka, ktorý z nich v tomto kontexte predstavuje translačný represor (Morita *et al.*, 2012). Odpoveďou môže byť aj to, že vlastnou represnou aktivitou disponujú obidva proteíny. U proteínov GIGYF1/2 bola táto schopnosť popísaná v práci Peter *et al.* (2017) a u GIGYF2 bola potvrdená represia cieľových transkriptov nezávislá na eIF4E2 aj v práci Amaya Ramirez *et al.* (2018). Nedávno bola tiež odhalená špecifická represia translácie poškodených mRNA sprostredkovaná GIGYF2 a eIF4E2 (Hickey *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2020). Zvýšenie celkovej hladiny translácie u myší spolu so znížením hladiny GIGYF2 bolo vyvolané delečnou mutáciou génu pre eIF4E2. Takto mutované embryá vykazovali fatálne

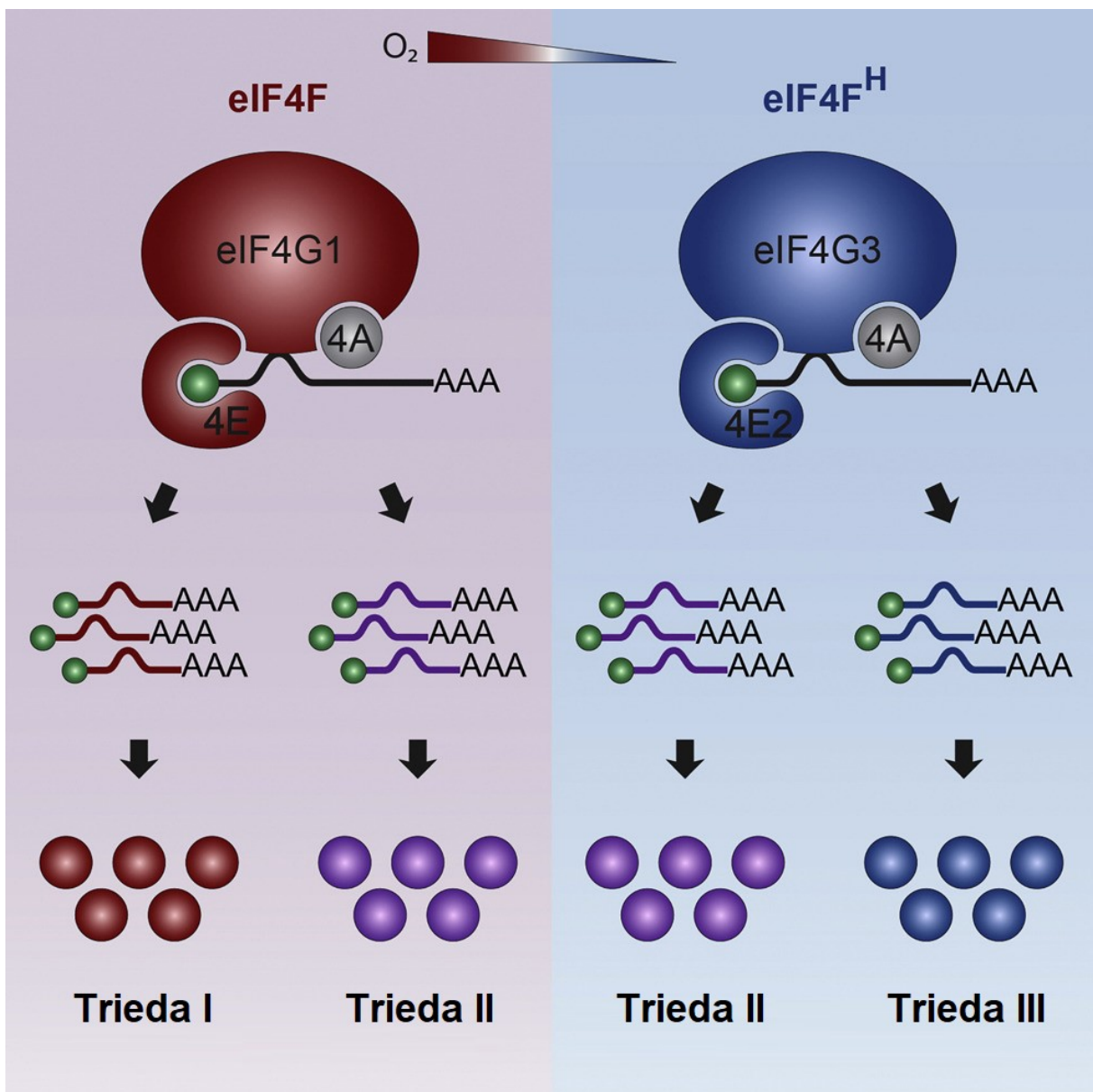
vývojové defekty (postihujúce hlavne mozog, pľúca a celkovú telesnú hmotnosť) a umierali po pár hodinách po pôrode. Úloha eIF4E2 vo vývoji myších embryí je teda evidentne dôležitá (Morita *et al.*, 2012). Existuje aj náznak toho, že by sa komplex eIF4E2:GIGYF2 mohol podieľať na degradácii určitých špecifických mRNA (Fu *et al.*, 2016).

3.4.4 Úloha eIF4E2 v hypoxickej translácii

Nízka koncentrácia kyslíka predstavuje pre bunky isté stresové podmienky a tie musia na ne adekvátne reagovať. Hypoxia (1% [O₂]) vyvoláva zmeny aj na úrovni expície rôznych faktorov, ktoré bunkám pomáhajú vyrovnať sa so vzniknutou stresovou situáciou. Typická je aktivácia proteínov rodiny hypoxiou indukovaných faktorov (HIF) (Wang *et al.*, 1995; Semenza, 1999; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Wiesener *et al.*, 2002; Kaelin a Ratcliffe, 2008). Pri kultivácii buniek v podmienkach hypoxie vzniká regulačný komplex RBM4:HIF-2 α (Uniacke *et al.*, 2012). mRNA obsahujúce vo svojej 3'UTR sekvenciu rHRE sú viazané proteínom RBM4, ktorý má úlohu v translačnej regulácii (Lin, Hsu a Tarn, 2007; Lin a Tarn, 2009). Komplex RBM4:HIF-2 α bol doplnený o ďalší proteín interagujúci s ním, eIF4E2. Keď bol z komplexu odstránený eIF4E2, mRNA s rHRE nepodliehali aktívnej translácii, nakoľko sa nevyskytovali v polyzómových frakciách. To vedie k hypotéze, že komplex HIF-2 α :RBM4:eIF4E2 sa podieľa na iniciácii translácie počas hypoxie namiesto kanonického komplexu s eIF4E1. Odstránenie HIF-2 α vyvolalo zníženie množstva eIF4E2 v polyzómoch počas hypoxických podmienok, takže HIF-2 α by v uvažovanom komplexe mohol reprezentovať akýsi senzor hypoxie. Aktívna translácia sprostredkovaná „hypoxickým iniciačným komplexom“ je podmienená prítomnosťou zložky viažucej čiapočku mRNA – eIF4E2. Hladina translácie mRNA so sekvenciou rHRE bola po znížení hladiny eIF4E1 znížená len v normoxii (21% [O₂]). Zníženie hladiny eIF4E2 zas vyvolalo pokles translácie daných mRNA len v hypoxii. Predstavený model translačného iniciačného komplexu funguje tak, že na základe aktuálnej koncentrácie kyslíka „meranej“ pomocou HIF-2 α určuje, ktorý faktor viažuci čiapočku mRNA (v normoxii eIF4E1 a v hypoxii eIF4E2) bude súčasťou komplexu a bude tak prispievať ku translácii produktov špecifických pre dané podmienky (Uniacke *et al.*, 2012). Postulovanie existencie alternatívneho hypoxického komplexu označeného eIF4F^H je podmienené tým, že zníženie hladiny komponentov kanonického eIF4F negatívne ovplyvnilo hladinu globálnej translácie len v normoxii, nie však v podmienkach hypoxie. V tejto súvislosti bol identifikovaný ďalší interakčný partner komplexu

eIF4E2:eIF4A (z predošlej práce Uniacke *et al.*, 2012), proteín eIF4G3, ktorý doplnil diskutovaný hypoxický model. Pre iniciáciu translácie pri rôznych koncentráciách kyslíka máme dva komplexy: eIF4F v normoxii – eIF4E1:eIF4G1:eIF4A a eIF4F^H v hypoxii – eIF4E1:eIF4G1:eIF4A (Obrázok 4). Existenciu eIF4F^H komplexu podporuje aj pozorovanie, že umlčanie komponentov tohto komplexu vedie k zníženiu celkovej translácie v hypoxii, ale nie v normoxických podmienkach (Ho *et al.*, 2016). V súvislosti s reguláciou hypoxickej translácie bol identifikovaný jej negatívny regulátor DDX28 (Evagelou *et al.*, 2020).

Obrázok 4. Alternatívne modely komplexu eIF4F v závislosti na koncentrácii kyslíka. Schematické znázornenie zloženia komplexu eIF4F v podmienkach normoxickej a hypoxickej translácie. Ľavá strana obrázku reprezentuje kanonický komplex v podmienkach vysokej koncentrácie kyslíka. Pravá strana naopak zobrazuje alternatívny komplex eIF4F^H iniciujúci transláciu pri nízkej koncentrácii kyslíka. Rôzne komplexy uprednostňujú rôzne skupiny translatovaných mRNA (Trieda I – III). Trieda I obsahuje mRNA translatované v normoxii. Trieda II zahŕňa mRNA, ktorých expresia je nezávislá na koncentrácii kyslíka. Trieda III reprezentuje mRNA translatované špecificky počas hypoxie. (Upravené podľa Ho *et al.*, 2016)



Zmeny koncentrácie kyslíka vedú len k malým zmenám hladiny eIF4E1 a eIF4E2, takže významnú úlohu pre ich funkcie zrejme zohrávajú posttranslačné regulácie (Timpano a Uniacke, 2016). Na základe stanovenej translačnej efektivity (T_e) jednotlivých mRNA v rôznych koncentráciách kyslíka a účasti konkrétnych čiapočku viažucich faktorov boli vytvorené tri triedy mRNA (Obrázok 4). Trieda I reprezentuje skupinu približne 25 % mRNA, ktorých translácia je závislá na prítomnosti eIF4E1. Ich T_e je vysoká v normoxických a nízka v hypoxických podmienkach. Zhruba 60 % mRNA je zaradených do Triedy II. Tieto transkripty sú citlivé na absenciu eIF4E1 aj eIF4E2 a v súvislosti s T_e neexistuje závislosť na konkrétnych kyslíkových podmienkach. Trieda III obsahuje asi 15 % mRNA závislých na translácii sprostredkovanej pomocou eIF4E2. T_e týchto transkriptov je zvýšená v hypoxii. mRNA patriace do Triedy I a II majú schopnosť byť translatované v normoxii a mRNA Triedy II a III sú schopné hypoxickej translácie. Existuje predpoklad, že by sa mohli nájsť nejaké diferenciálne molekulárne charakteristiky jednotlivých mRNA, ktoré ich predurčujú na osud v niektorej z popísaných Tried (Ho *et al.*, 2016).

Pri štúdiu ľudských bunkových línií sa tieto obvykle kultivujú pri 21% koncentrácii kyslíka (normoxia). Skutočné fyziologické kyslíkové podmienky sú však značne odlišné a majú bližšie skôr ku hypoxii (1% koncentrácia O_2). Z týchto dôvodov bol vytvorený termín fyzioxia s intervalom kyslíkovej koncentrácie 1 – 11 % (Carreau *et al.*, 2011). Podľa experimentov z polyzómovými profilmi sa proteín eIF4E2 najviac podieľal na aktívnej translácii pri <1% [O_2]; eIF4E1 zas pri >8% [O_2]. Interval fyziologických hodnôt 1 – 8% [O_2] (fyzioxia) sa vyznačoval súčasnou aktivitou obidvoch proteínov. Voľba medzi transláciou sprostredkovanou eIF4E1 alebo eIF4E2 je dynamická a dochádza k nej operatívne na základe aktuálnej koncentrácie kyslíka (Timpano a Uniacke, 2016).

3.4.4.1 Funkcia eIF4E2 vo fyziológii nádorových buniek

Existuje podozrenie na súvis medzi eIF4E2 na metastatickým potenciálom primárnych pevných nádorov. Vyššia hladina expzie génu *EIF4E2* bola identifikovaná napríklad v metastázach adenokarcinómov (Ramaswamy *et al.*, 2003) a môže byť použitá ako prognostický faktor pri uveálnom melanóme (Yang, Gu a Wu, 2021).

Obsah *eIF4E2* mRNA v bunkách rakoviny prsníka vzrástol v dôsledku hypoxického prostredia 1,8-krát a množstvo proteínu sa zväčšilo 1,2-krát. HIF-1 α však na reguláciu

množstva *eIF4E2* mRNA vplyv nemá (Yi *et al.*, 2013). Rakovinové bunky vystavené hypoxii prepínajú vďaka HIF-2 α na *eIF4E2* závislú transláciu (Uniacke *et al.*, 2012, 2014). Vo vnútri nádorov často vzniká hypoxické prostredie, oksyložené býva len bezprostredné okolie ciev a prípadne povrch nádoru (Franko a Sutherland, 1979; Whiteside, 2008). Proteín *eIF4E2* sa v nádorových bunkách podieľa na aktívnej hypoxickej translácii. Je dokonca možné, že iniciuje väčšinu proteosyntetickej aktivity rakovinových buniek v oblastiach hypoxie. To z neho robí zaujímavý cieľ potenciálnej protinádorovej terapie. Zníženie expzie *eIF4E2* v nádoroch nemalo žiadny výrazný efekt v prípade normoxie, avšak pri hypoxii došlo k výraznému zníženiu hladiny globálnej translácie a obmedzeniu proliferácie zakončenému apoptózou alebo aspoň limitáciou rozrastania buniek. Medzi ďalšie dôsledky patrí napríklad zmenšenie nádorov a redukcia vzniku hypoxických oblastí. Obnovenie expzie *eIF4E2* v podmienkach s nízkou koncentráciou kyslíka vyvolalo proliferáciu, rast nádorov, zastavenie apoptotického procesu a tvorbu hypoxického jadra nádorov. Zdá sa, že *eIF4E2* má v rakovinových bunkách funkciu predovšetkým v hypoxickej translácii bez ohľadu na konkrétny typ a ďalšie vlastnosti nádoru (Uniacke *et al.*, 2014).

Keď bola hladina proteínu *eIF4E2* v bunkách adenokarcinómu prsníka a glioblastómu redukovaná, zmenšila sa migračná schopnosť nádorových buniek, invazivita sa tiež redukovala a nádory sa fragmentovali. Opätovné zvýšenie množstva *eIF4E2* obnovilo pôvodný stav nádoru a došlo k jeho progresii (Kelly *et al.*, 2018). Proteín *eIF4E2* v hypoxickom prostredí nádorov teda vystupuje ako významný faktor všeobecne zhoršujúci prognózu nádorového ochorenia.

3.4.5 Úloha *eIF4E2* v ľudských bunkách počas rôznych stresových podmienok

Ako už bolo popisované v predchádzajúcom texte, ISGyláciu a regulačnú modifikáciu *eIF4E2* ubiquitínom (zrejme nie ako signál pre degradáciu) zabezpečuje ubiquitin-ligáza ARIH1 (Tan *et al.*, 2003; Okumura, Zou and Zhang, 2007; von Stechow *et al.*, 2015). Redukcia jej hladiny má vplyv na zhoršenie reakcie buniek na genotoxický stres navodený cisplatinou a celková životaschopnosť buniek sa v takej situácii zníži. ARIH1 má významnú funkciu pri ochranných procesoch súvisiacich s následkami poškodenia genetickej informácie a jej množstvo sa zvyšuje ako súčasť reakcie buniek na genotoxický stres. Zvýšená lokalizácia ARIH1 v jadre a jeho okolí (pravdepodobne v ribozómoch) nastáva pri indukcii

genotoxického stresu po expozícii buniek radiácii či cisplatine. V tejto situácii sprostredkúva ARIH1 mono- a di-ubiquitináciu (regulačné modifikácie) eIF4E2, čím pravdepodobne dochádza ku zvýšeniu väzbovej schopnosti eIF4E2 pre čiapočku mRNA a následnej kompetícii o túto väzbu s eIF4E1 sprevádzanú blokovaním iniciácie translácie. Bránenie v apoptóze bunky vyvolanej poškodením jej DNA (genotoxickým stresom) je zrejme sprostredkované ARIH1-závislým inhibičným vplyvom posttranslačne modifikovaného (ubiquitínovaného) eIF4E2 na translačnú iniciáciu (von Stechow *et al.*, 2015).

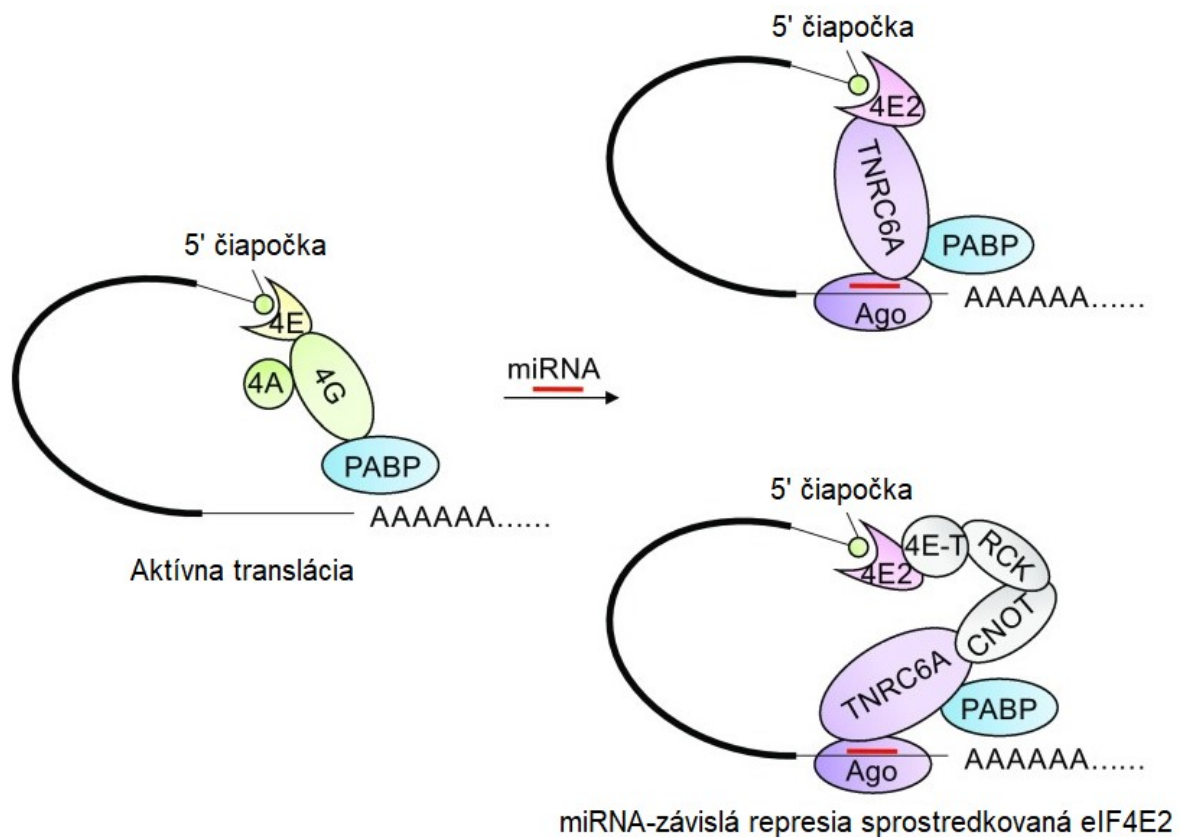
V cytoplazme buniek sa nachádzajú agregáty kolokalizovaných mRNA, miRNA, RNA-väzbových proteínov a enzýmov zúčastnených v degradačných procesoch mRNA alebo v represii translácie. Tieto štruktúry sa nazývajú P-telieska (z anglického „Processing bodies“) (Eulalio, Behm-Ansmant a Izaurralde, 2007; Parker a Sheth, 2007; Kulkarni, Ozgur a Stoecklin, 2010). Ďalšími cytoplazmatickými štruktúrami v podobe zhlukov mRNA a proteínov sú tzv. stresové granule. Vytvárajú sa v súvislosti s pôsobením stresu v bunkách a je pre ne častá asociácia s P-telieskami (Buchan a Parker, 2009; Protter a Parker, 2016; Mahboubi a Stochaj, 2017). Oxidatívny stres vzniknutý v dôsledku vystavenia buniek pôsobeniu arzenidu sodného vyvolal lokalizáciu eIF4E2 do P-teliesok, avšak nie do stresových granúl. Proteín eIF4E2 teda nie je esenciálny pre tvorbu stresových granúl. Pri teplotách 39,5 – 42,7 °C (tepelný šok) sa vytvorili stresové granule a pri teplote 41,7 °C bol proteín eIF4E2 pozorovaný v nich aj v P-telieskach (Frydryskova *et al.*, 2016).

3.4.6 Účasť eIF4E2 v translačnej represii sprostredkovanej microRNA

V súvislosti s represnou aktivitou miRNA zabezpečovanou komplexom miRISC bolo identifikovaných niekoľko proteínov: CNOT1, PATL-1, DDX6, TNRC6A a TNRC6B (Jonas a Izaurralde, 2015). Komplex CCR4-NOT obsahuje podjednotku CNOT1. Deadenylázová aktivita tohto komplexu hrá úlohu v miRISC-závislej degradácii mRNA (Ito *et al.*, 2011; Wahle a Winkler, 2013). Asociácia niektorých komponentov miRISC komplexu a ďalších proteínov (4E-T, CCR4-NOT, DDX6) s PATL-1 bola tiež zaznamenaná v niektorých prácach (Haas *et al.*, 2010; Marnef a Standart, 2010; Kamenska *et al.*, 2016). Interakcia s eIF4E2 bola preukázaná u CNOT1, PATL-1, 4E-T a DDX6. Toto pozorovanie poukazuje na možnú spojitosť eIF4E2 so špecifickým umlčováním génov prostredníctvom degradačného aparátu využívajúceho komplexy miRISC a CCR4-NOT (Chapat *et al.*, 2017). Metóda BioID (Roux

et al., 2012; Roux, Kim a Burke, 2013) odhalila interakciu eIF4E2 s (medzi inými) ďalšími významnými zložkami komplexu miRISC, konkrétne TNRC6A a TNRC6B (Chapat *et al.*, 2017). Asociácia eIF4E2 s TNRC6A a TNRC6B bola následne experimentálne potvrdená. Proteín eIF4E2 sa podieľa na translačnej represii sprostredkovejanej miRNA (Obrázok 5), nehrá však úlohu v degradácii mRNA (Chen a Gao, 2017).

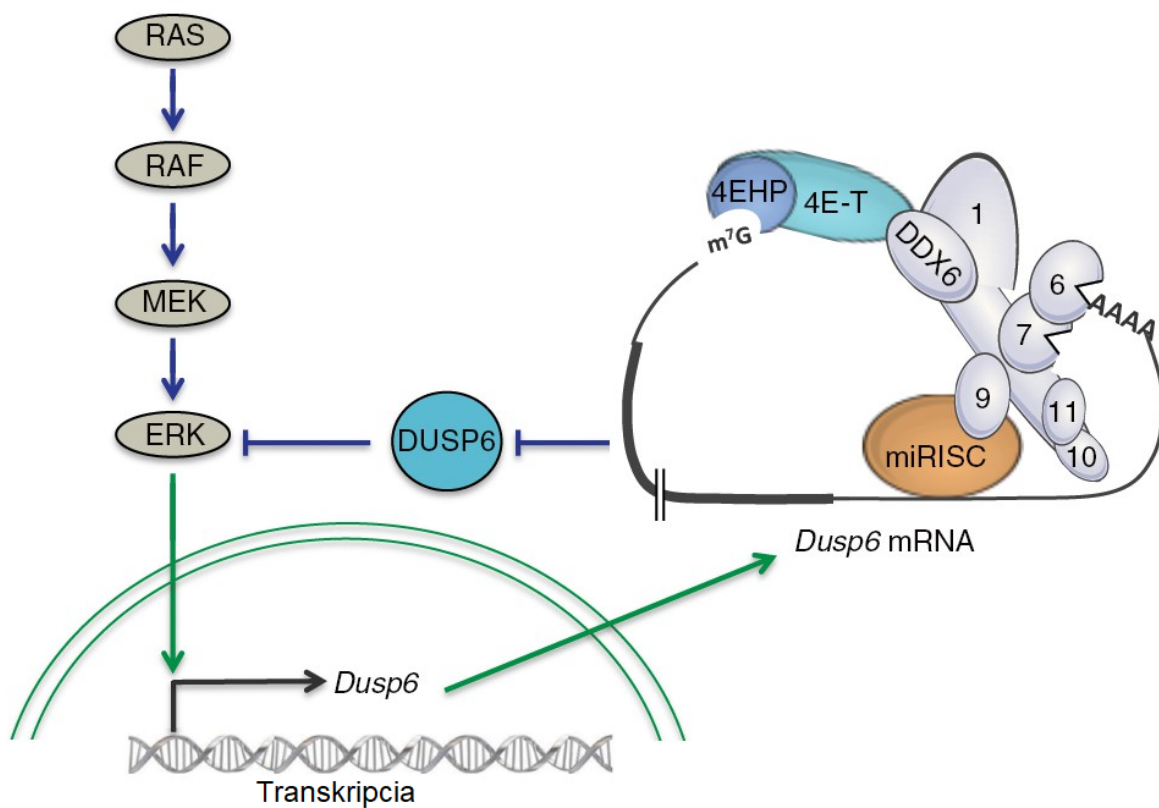
Obrázok 5. Modely translačnej represie sprostredkovejanej miRNA. Obrázok znázorňuje dva alternatívne modely miRNA-závislej represie translácie, ktoré sa v zásade líšia len predpokladaným zložením zúčastneného komplexu. Cieľená miRNA sa pomocou špecifickej sekvencie viaže na 3'UTR regulovanej mRNA. Komplex proteínov sprostredkúva súčasnú väzbu eIF4E2 na 5' čiapočku danej mRNA, čím je blokovaná kanonická iniciácia translácie. (Upravené podľa Chen a Gao, 2017)



Represná aktivita eIF4E2 je závislá na dĺžke 3'UTR (v menšej miere aj 5'UTR) regulovaných mRNA, čo súvisí s väčšími možnosťami pre väzbu špecifických miRNA. Jednou z najviac translačne reprimovaných mRNA (mechanizmom využívajúcim eIF4E2) bol transkript génu *DUSP6*, ktorý kóduje fosfatázu DUSP6 (MKP-3). Biologická funkcia tohto proteínu spočíva v špecifickej defosforylácii ERK1/2, čo je súčasť signálnej dráhy mitogénom aktivovanej proteín kinázy (MAPK). Hladina fosfatázy DUSP6 je prostredníctvom eIF4E2 regulovaná na úrovni iniciácie translácie jej mRNA. Špecifická represia *DUSP6* mRNA využíva komplex miRNA:CCR4-NOT:4E-T:eIF4E2, ktorý 3'UTR tejto mRNA viaže

pomocou miRNA na 5' m⁷G čiapočku pomocou eIF4E2. Produkt reprimovanej *DUSP6* mRNA sa za popísaných okolností netvorí a svojou fosfatázovou aktivitou nie je schopný defosforylovať kinázu ERK1/2 a tá sa v dôsledku toho vyskytuje v aktívnom fosforylovanom stave (Obrázok 6) (Jafarnejad *et al.*, 2018).

Obrázok 6. Model regulácie signálnej dráhy MAPK/ERK závislý na miRNA. Obrázok popisuje navrhovaný mechanizmus represie translácie *DUSP6* mRNA. Fosforylovaná kináza ERK stimuluje transkripciu génu pre svoju vlastnú fosfatázu *DUSP6*. Tá za normálnych okolností defosforyláciou inaktivuje kinázu ERK. Pokiaľ je však pomocou miRNA rozpoznaná špecifická sekvencia na 3'UTR transkriptu pre *DUSP6*, dochádza ku zostaveniu komplexu miRISC a CCR4-NOT, ktorý obsahuje eIF4E2 (4EHP). Iniciácia translácie *DUSP6* mRNA je inhibovaná práve väzbou eIF4E2 na jej 5' m⁷G čiapočku. Absencia fosfatázy *DUSP6* znamená, že kináza ERK zostane fosforylovaná a teda aktívna. (Upravené podľa Jafarnejad *et al.*, 2018)



Proteín eIF4E2 reprimuje transláciu mRNA pre IFN- β mechanizmom umlčania translácie sprostredkovaným miRNA. eIF4E2 sa tak priamo podieľa na regulácii molekulárnej odpovedi na prítomnosť vírusovej infekcie v bunkách (Zhang *et al.*, 2021).

3.5 Translačný iniciačný faktor eIF4E3

Eukaryotický iniciačný faktor 4E3 je podstatne menej preskúmaný v porovnaní s ostatnými dvoma členmi proteínovej rodiny 4E u človeka. Znalosti o jeho biologických funkciách sú zatiaľ pomerne limitované.

Gén pre ľudský eIF4E3 sa nachádza na chromozóme 3 s cytogenetickou pozíciou 3q13. Jeho genomická lokalizácia je NC_000003.12 (71675414..71754773) (online zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/317649>; Apríl 2021). Boli identifikované dve proteínové izoformy: variant s dĺžkou 224 aminokyselinových zvyškov (24, 4 kDa) a variant dlhý 118 aminokyselinových zvyškov (13,3 kDa) (online zdroj: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8N5X7>).

Zrejme prvá zmienka o eukaryotickom iniciačnom faktore 4E3 pochádza z práce Joshi, Cameron a Jagus (2004). Tento proteín bol v uvedenej práci študovaný u myši, ale jedná sa o fylogeneticky najbližší podrobnejšie študovaný homológ ľudského eIF4E3. Na úrovni sekvencie aminokyselinových zvyškov sa vyznačuje 25% identitou s myšim eIF4E2 a ľudským homológom eIF4E1. Oblasť His37 – His200 (podľa ľudského eIF4E1) je evolučne konzervovaná. Aminokyselinový zvyšok zodpovedajúci Trp56 v ľudskom eIF4E1 je v eIF4E3 nahradený Cys. Ostatné dôležité Trp zvyšky sú konzervované. S eIF4E2 má eIF4E3 spoločný motív (Ser/Thr)-Val-x-x-Phe-Trp (x značí akúkoľvek aminokyselinu, jedná sa o úsek zodpovedajúci aminokyselinovým zvyškom ľudského eIF4E1 s pozíciou 68 - 73), ktorý vytvára potenciál na väzbu s eIF4G a 4E-BP – variácie motívu umožňujú rozlišovať medzi týmito proteínmi a na základe nich viazať špecificky len jeden z nich. Proteín eIF4E3 je schopný viazať eIF4G, avšak nie 4E-BP (Joshi, Cameron a Jagus, 2004). Keď ale zjídeme do detailov, zistíme, že existujú dva transkripčné varianty eIF4E3 – dlhšia eIF4E3_A a kratšia eIF4E3_B. Izoforma eIF4E3_A viaže eIF4G1, eIF4G3 a PABP1. U izoformy eIF4E3_B interakcia s eIF4G preukázaná nebola (Frydryskova *et al.*, 2016).

Jeho väzba na m⁷G čiapočku mRNA je slabšia ako v prípade eIF4E1. Výsledky pôvodných experimentov naznačovali, že eIF4E3 nemá príliš dobrú schopnosť rozlišovať medzi metylovaným a nemetylovaným guanozínovým analógom čiapočky (Joshi, Cameron a Jagus, 2004). Novšie experimenty však dokladujú, že ku danej diskriminácii dochádza a afinita eIF4E3 pre m⁷G analóg čiapočky mRNA je približne 1000-krát vyššia oproti G analógu a cca 40-krát nižšia v porovnaní s afinitou eIF4E1 pre m⁷G analóg, takže približne

rovnaká ako u eIF4E2 a m⁷G analógu. Je možné, že väzba ďalších faktorov na eIF4E3 je schopná zvýšiť jeho afinitu pre m⁷G čiapočku (Osborne *et al.*, 2013; Volpon *et al.*, 2013). Proteín eIF4E3 viaže čiapočku mRNA atypickým spôsobom odlišným od ostatných dvoch paralógov (eIF4E1 a eIF4E3). Guanínová časť totiž nie je obklopená aromatickými časťami zvyškov aminokyselín v podobe akéhosi sendviču, ale ku stohovacej interakcii guanínu dochádza len s jedným Trp a ostatné interakcie sú zabezpečené substituovaným Cys a ďalšími rezíduami. Jedná sa teda o nový spôsob rozpoznania a špecifickej väzby čiapočky mRNA, ktorý je porovnateľne efektívny ako ten kanonický (Osborne *et al.*, 2013).

3.5.1 Biologické funkcie eIF4E3

Asi najvýznamnejšia funkcia popísaná u eIF4E3 je jeho tumor supresorová aktivita závislá na väzbe m⁷G čiapočky (Osborne *et al.*, 2013; Volpon *et al.*, 2013). Zníženie množstva eIF4E3 v bunkách alebo jeho absencia je spojená s rakovinovým fenotypom (Shi *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). Naopak, zvýšenie hladiny eIF4E3 vyvolalo represiu onkogénnej transformácie (Osborne *et al.*, 2013; Volpon *et al.*, 2013). Avšak eIF4E3 je tiež schopný indukovať expresiu napr. protoonkogénu c-Myc a pri jeho hyperaktivácii bol pozorovaný príspevok ku malígnej transformácii buniek, proliferácii a blokovaniu apoptózy (Abdelfattah *et al.*, 2018), takže výlučná úloha eIF4E3 v represii nádorov nie je zas tak jednoznačná ako sa najskôr zdalo.

Proteín eIF4E3 je pravdepodobne schopný iniciovať transláciu mRNA podobne ako kanonický eIF4E1, čo podporuje aj jeho schopnosť viazať eIF4G. Pre tieto účely zrejme dochádza ku zostaveniu alternatívneho komplexu eIF4F, ktorý zabezpečuje transláciu určitej podskupiny mRNA, čo vyúsťuje do špecifického translátomu (rozdielneho expresného profilu). Podrobnosti o takejto selekcii mRNA nie sú známe, ale na 5'UTR mRNA, ktoré sú najviac regulované proteínmi eIF4E1 a eIF4E3, boli identifikované špecifické motívy pre každý translačný iniciačný faktor zvlášť (Landon *et al.*, 2014). Na základe predpokladanej funkcie dvoch iniciačných faktorov schopných spúšťať transláciu (eIF4E1 a eIF4E3) je predikovaná existencia celkovo ôsmich alternatívnych komplexov eIF4F (Robert *et al.*, 2020).

Kináza MNK reguluje translačnú aktivitu eIF4E1 a od jej aktivity závisí, či dôjde ku alternatívnej iniciácii translácie prostredníctvom eIF4E3 alebo nie. Absencia kinázovej aktivity MNK na eIF4E1 spôsobí jeho nedostatočnú fosforyláciu na Ser209. To vedie ku

zníženiu aktivity eIF4E1 a zvýšeniu hladiny eIF4E3. V takej situácii môže dochádzať ku translácii špecifickej skupiny mRNA regulovanej práve prostredníctvom eIF4E3. Translácia kinázy MNK2 je regulovaná proteínom eIF4E1 a translácia jej cieľov (napr. PCNA a CDK2) podlieha regulácii eIF4E3 (Landon *et al.*, 2014).

Množstvo eIF4E3 v bunkách je obvykle výrazne nižšie ako eIF4E1 aj eIF4E2 (Joshi, Cameron a Jagus, 2004). Proteín eIF4E3 vykazuje cytoplazmatickú a jadrovú lokalizáciu s čím súvisí aj jeho inhibičný efekt na ciele translácie proteínu eIF4E1 ako aj ciele jeho mRNA exportu (Volpon *et al.*, 2013). Hladina proteínu eIF4E3 na rozdiel od eIF4E1 a eIF4E2 v hypoxických podmienkach klesla (Yi *et al.*, 2013). Počas pôsobenia stresových podmienok (tepelný šok a arzenidový stres) na bunky bola pozorovaná lokalizácia izoformy eIF4E3_A do stresových granúl ale nie do P-teliesok. Izoforma eIF4E3_B nebola identifikovaná v stresových granulách ani P-telieskach (Frydryskova *et al.*, 2016).

4 Materiál

4.1 Chemikálie

Etídium bromid – EtBr (Sigma)

Formamid (Sigma)

Chloroform (Lach:ner)

Octan sodný (Sigma)

Tetracyklín (Sigma)

dNTP – zmes dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Biotechrabbit)

Etanol (Lach:ner)

Izopropanol (Lach:ner)

CoCl₂ (Lachema)

DMSO (Sigma)

Resazurín (Sigma)

Agaróza (Serva)

4.2 Roztoky a pufre

TURBO DNase Buffer (Thermo Scientific)

5× Reaction Buffer for RT (Thermo Scientific)

RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific)

GenElute™-LPA (Sigma)

TE (Thermo Scientific)

TAE (Thermo Scientific)

TRI Reagent[®] (Sigma)

Glukóza (Gibco)

2× RNA Loading Dye (Thermo Scientific)

6× DNA Loading Dye (Thermo Scientific)

4.3 Enzýmy

TURBO[™] DNase (INVITROGEN)

RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific)

Trypsín (Gibco)

4.4 PCR premixy

LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche)

4.5 PCR primery

oligo(dT) primery (Thermo Scientific)

primery pre eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3, GUSB a SURF1 (Generi biotech) – Tabuľka 2

Tabuľka 2. Zoznam primerov. Uvedené sú konkrétne sekvencie primerov („F“ – forward, „R“ – reverse) a dĺžky PCR amplikónov. Jedná sa o primery, ktoré nie sú v Tabuľke 6 (kapitola 6.1.3), ale v práci boli použité.

názov génu	forward/reverse	sekvencia primeru (5'->3')	dĺžka amplikónu [bp]
SURF1	F	CTCAGAGTGGGGCCTATGTG	86
	R	CCTGGGAACGAACCTCTAT	
GUSB	F	CGCCCTGCCTATCTGTATTC	91
	R	TCCCCACAGGGAGTGTGTAG	
eIF4E1	F	AAGCAAACCTGCGGCTGATCTC	144
	R	CATCTTCCCACATAGGCTCAATACC	
eIF4E2	F	CGAGACAAGAATCAGAGCAGTAGCAAG	104
	R	GGGGTTCTCCTGGAGTACCAAAAAG	
eIF4E3	F	AATATCCCTCCTGTGACTAGCCTGC	102
	R	GCCACCCTTTCATTACTCTCCTC	

ostatné primery z validácie (Generi biotech)

- Tabuľka 6 (kapitola 6.1.3)

4.6 Štandardy molekulových hmotností (DNA a RNA markery)

GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)

GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

4.7 Kultivačné médiá pre ľudské tkanivové kultúry

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose (SIGMA)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium – bez glukózy (GIBCO)

FBS (Biochrom)

4.8 Ľudské tkanivové bunkové línie

Experimenty zahŕňali prácu so siedmimi tkanivovými bunkovými líniami typu HEK-293, ktoré sa líšili indukovateľnou nadexpresiou jednotlivých eukaryotických translačných iniciačných faktorov 4E, prípadne ich absenciou. Jedna línia bola rodičovská a ostatné boli od nej odvodené. Je treba podotknúť, že jednotlivé línie s nadexpresiou konkrétnych translačných iniciačných faktorov 4E obsahovali zároveň aj všetky ostatné vlastné faktory 4E.

HEK-293 (Flp-In, T-REx) – rodičovská línia odvodená od buniek ľudských nadobličiek, Flp-In systém pre generovanie bunkových línií so stabilnou expresiou, tetracyklínom indukovaná expresia (promótor citlivý na tetracyklín)

eIF4E1 – tetracyklínom indukovateľná nadexpresia eIF4E1, N-terminálna fúzia GFP

eIF4E2 – tetracyklínom indukovateľná nadexpresia eIF4E2, N-terminálna fúzia GFP

eIF4E3_A – tetracyklínom indukovateľná nadexpresia dlhej varianty eIF4E3 (eIF4E3_A), N-terminálna fúzia GFP

eIF4E3_B – tetracyklínom indukovateľná nadexpresia krátkej varianty eIF4E3 (eIF4E3_B), N-terminálna fúzia GFP

eIF4E2Δ – delécia eIF4E2 (CRISPR/Cas9), N-terminálna fúzia GFP

eIF4E3Δ – delécia eIF4E3 (CRISPR/Cas9), N-terminálna fúzia GFP

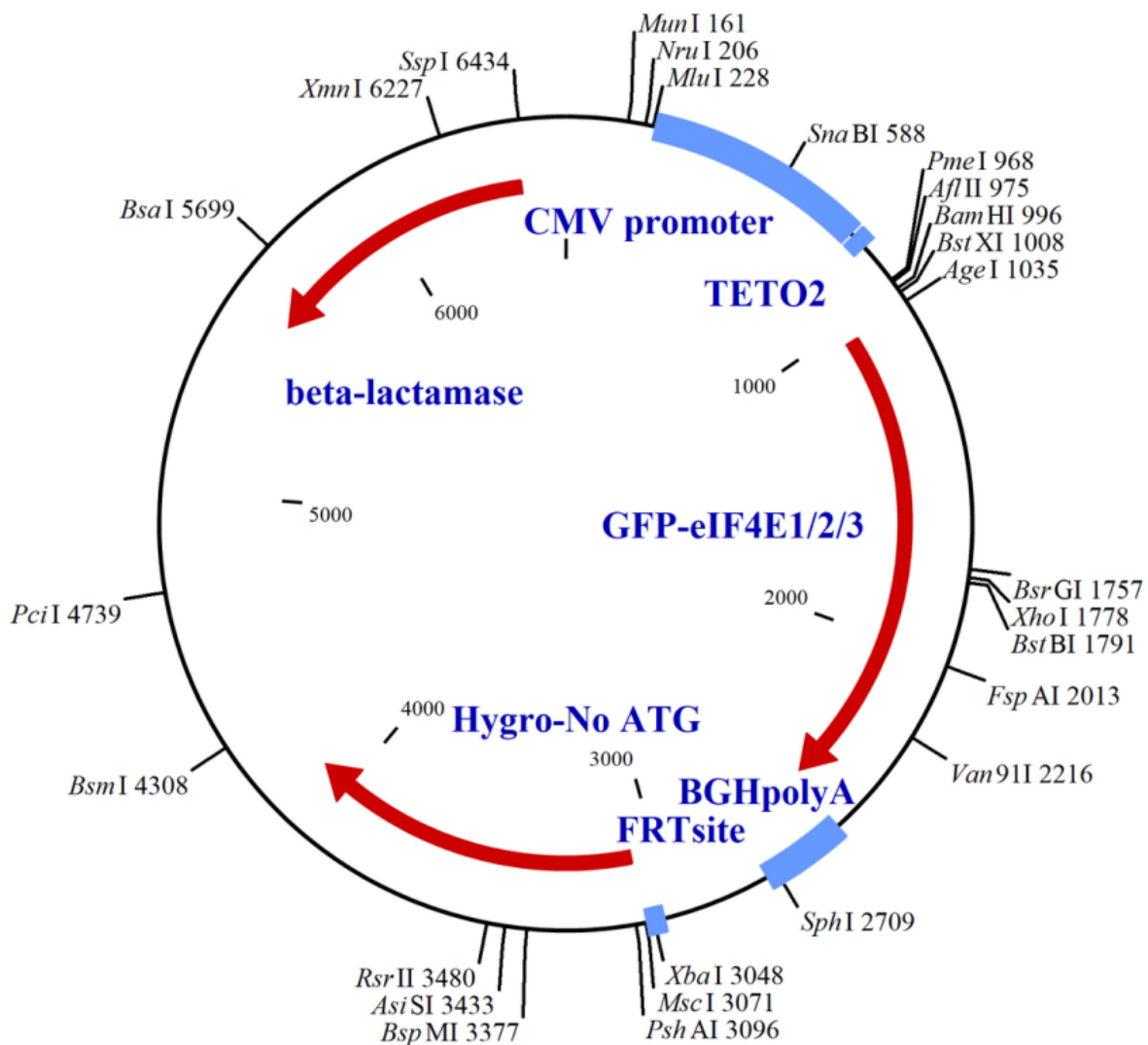
4.8.1 Detailnejšie informácie o používaných bunkových líniah

Bunkové línie používané v práci boli v laboratóriu k dispozícii z minulosti. Základom pre tieto línie boli bunky HEK-293 obsahujúce Flp-In™ systém (vytvorené podľa manuálu od spoločnosti Invitrogen: Flp-In™ system, Verzia C, 021402, 25-0306, katalógové číslo: K6010-01, K6010-01) spolu s tetracyklínovým operátorom. Tieto bunky HEK-293 (Flp-In, T-REx) sú rodičovská línia, od ktorej boli odvodené ďalšie bunkové línie s inducibilnou expresiou jednotlivých eukaryotických iniciačných faktorov 4E: eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3_A a eIF4E3_B. Uvedené línie boli pripravené z HEK-293 (Flp-In, T-REx) transfekciou a špecifickou integráciou plazmidu pCDNA5-FRT-TO (t. j. pCDNA5 s FRT

miestom a tetracyklínovým operátorom, Obrázok 7) do genómu buniek pomocou FRT miesta a Flp rekombinázy. Použitý plazmid obsahoval vždy len jeden z génov pre eIF4E1/eIF4E2/eIF4E3_A/eIF4E3_B s N-terminálnou fúziou s GFP (Obrázok 7). Takto pripravené línie boli štyri a každá mala tetracyklínom inkukované zvýšenie hladiny jedného z proteínov eIF4E.

Okrem týchto línií boli využívané aj línie s deléciou eIF4E2 a eIF4E3 (označené eIF4E2 Δ a eIF4E3 Δ). Tieto línie boli pripravené pomocou metódy CRISPR/Cas9.

Obrázok 7. Mapa plazmidu pCDNA5-FRT-TO. Plazmid obsahuje medzi iným FRT miesto a tetracyklínový operátor. Modrou farbou sú vyznačené sekvencie so špeciálnymi funkciami. Červená farba reprezentuje kódované gény: gén pre β -laktamázu, gén pre rezistenciu na Hygromycín a gén pre jeden z eIF4E proteínov s N-terminálnou fúziou GFP.



4.9 Sekvenačné dáta

V práci boli používané dva typy sekvenačných dát získané sekvenovaním RNA rôznych vzoriek:

a. RNA sekvenovanie celkového transkriptómu mRNA (3'-poly(A) RNA, **RNA-seq**)

Na sekvenovanie bolo pripravených všetkých sedem bunkových línií popísaných v kapitole 4.8 – Ľudské tkanivové bunkové línie. Celková RNA bola izolovaná v troch opakovaniach pre každú bunkovú líniu a ošetrovaná DNázou I. Pomocou oligo(dT) primerov hybridizujúcich s polyadenylovanými 3' koncami (mRNA) bola reverznou transkripciou prevedená do cDNA a sekvenovaná pomocou RNA-seq. Sekvenačné dáta boli ďalej používané v podobe hodnôt FPKM (skratka z pôvodného „fragments per kilobase per million“) alebo ďalej vyhodnotené pomocou ANOVA-like Analýzy Diferenciálnej Expresie (ALDEx2) (Fernandes *et al.*, 2013) a následne filtrované. Kvôli väčšej prehľadnosti a lepšiemu rozlíšeniu dvoch typov dát referujem k tomuto datasetu ďalej v práci všeobecne ako ku „**dátam z RNA-seq**“ (vždy so špecifikáciou, či sa jedná o dáta typu RNA-seq/FPKM alebo dáta RNA-seq/ALDEx2).

b. RNA sekvenovanie imunoprecipitovanej RNA (**RIP-seq**)

Na sekvenovanie bolo pripravených päť bunkových línií – rodičovská línia HEK-293 (Flp-In, T-REx) a línie s nadexpresiou eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3_A a eIF4E3_B. Nadexprimované eukaryotické translačné iniciačné faktory 4E v nich boli prítomné ako proteíny s N-terminálnou fúziou GFP. Pomocou týchto fúznych proteínov bola RNA viažuca sa na ne imunoprecipitovaná (Metóda nazývaná GFP-trap, bližšie informácie dostupné online: <https://www.chromotek.com/products/detail/product-detail/gfp-trap-agarose/>; Apríl 2021), izolovaná v troch opakovaniach, reverznou transkripciou prepísaná do cDNA a sekvenovaná pomocou RNA-seq. Sekvenačné dáta boli vyhodnotené pomocou ANOVA-like Analýzy Diferenciálnej Expresie (ALDEx2) (Fernandes *et al.*, 2013) a následne filtrované. Takto získaný dataset označujem ďalej v práci ako „**RIP-seq**“.

Vyššie popísané spracovanie sekvenačných dát nebolo súčasťou tejto diplomovej práce. Ako bolo spomenuté už v kapitole Úvod, dáta mi boli poskytnuté v takejto forme a v práci boli len ďalej spracovávané.

4.10 Laboratórne prístroje

LightCycler[®] 480 - II (Roche)

Nanodrop[®] Spectrophotometer ND-1000

Hypoxický inkubátor (Panasonic)

Countess[™] II Automated Cell Counter (Invitrogen)

Doštičkový reader CLARIOstar (BMG Labtech)

5 Metódy

5.1 Kultivácia buniek tkanivových kultúr

Bunky HEK-293 (Flp-In, T-REx) boli kultivované podľa manuálu od spoločnosti Invitrogen (Growth and Maintenance of the Flp-In T-REx Cell Line: Verzia B, 111201, 25-0369, katalógové číslo: R708-07)

5.2 Izolácia RNA z ľudských tkanivových bunkových kultúr

Postup izolácie RNA (pre dve 6cm kultivačné misky):

1. Konfluentné kultúry boli 2× premyté PBS a následne bol PBS dôkladne odsatý
2. Lýza pomocou TRIzol Reagent – 1 ml na 6cm miskú
3. Pridanie 150 µl octanu sodného (2M), vortex
4. Pridanie 350 µl chloroformu, vortex 5 min
5. Centrifugácia 20 min, 15 000 RCF, 4 °C
6. Odoberanie maximálne 500 µl vodnej fázy a spojenie objemov identických vzoriek
7. Pridanie izopropanolu (-20 °C): 1 – 1,2-násobok spojených objemov vodnej fázy z kroku 6.
8. Zrážanie minimálne 1 h pri teplote -20 °C
9. Centrifugácia: 25 min, 16 000 RCF, 4 °C
10. Odoberanie supernatantu, pridanie 1 ml 75% etanolu (-20 °C), vortex (krátko)
11. Centrifugácia: 5 min, 17 000 RCF, 4 °C
12. Odoberanie supernatantu, pridanie 1 ml 75% etanolu (-20 °C), vortex (krátko)
13. Centrifugácia: 10 min, 17 000 RCF, 4 °C
14. Dôkladné odoberanie supernatantu
15. Vysušenie peletu
16. Rozpustenie vo vhodnom množstve ddH₂O

Vzorky RNA boli následne zmerané na Nanodrope a ďalej skladované pri teplote -80 °C.

5.3 Denaturačná RNA elektroforéza

Príprava vzoriek RNA na elektroforézu:

RNA	cca 5 µg
EtBr	1 µl
2× loading dye	2 µl
formamid	doplniť do 20 µl (cca 50 – 60 %)

Zmes sa dôkladne premiešala, potom sa denaturovala 10 min pri 65 °C a následne chladila 2 – 3 min na ľade. Nakoniec boli vzorky prenesené na 1,2% géľ. Elektroforéza prebiehala 10 min pri napätí 100 V a následne 80 V až do ukončenia.

5.4 Ošetrovanie RNA pomocou DNázy I

Postup DNázovania a následnej izolácie RNA:

1. 25 µg RNA bolo doplnených ddH₂O do 130 µl
2. Pridanie 15 µl 10×Turbo DNase pufru
3. Pridanie 5 µl Turbo DNase I
4. Inkubácia v cykléri: 55 min, 37 °C
5. Pridanie 1 ml TRIzol Reagent
6. Pridanie 350 µl chloroformu, vortex 5 min
7. Centrifugácia 20 min, 15 000 RCF, 4 °C
8. Odobranie 750 µl vodnej fázy
9. Pridanie izopropanolu (-20 °C): 1 – 1,2-násobok objemu vodnej fázy z kroku 8.
10. Pridanie 1 µl LPA
11. Zopakovanie postupu izolácie RNA z časti 5.2. – kroky 8. – 16.

Vzorky RNA boli následne skladované pri teplote -80 °C.

5.5 RT-qPCR

	objem [μ l]	výsledná koncentrácia
2x LightCycler [®] 480 SYBR Green Master (Roche)	5	1×
primery (2,5 μ M) – zmes forward + reverse	2	0,5 μ M
cDNA*	2	
ddH ₂ O	1	

*cDNA bola pripravená reverznou transkripciou vzoriek vyizolovanej RNA, ktorej postup je popísaný v časti 5.2.

Vzorky boli nanášané na 384-jamkovú qPCR doštičku v triplikátoch po 10 μ l.

Program qPCR:

Počet cyklov	Teplota [°C]	Čas [min:s]	Rýchlosť zmeny teploty [°C/s]	Proces
1x	95	05:00	4,8	denaturácia
45x	95	00:12	4,8	amplifikácia, meranie fluorescencie
	60	00:15	2,5	
	72	00:12	4,8	
1x	97	00:10	4,6	stanovenie krivky topenia
	65	01:00	2,5	
	97		0,11	
1x	40	01:00	2,5	

Reakcia prebiehala v prístroji LightCycler[®] 480 - II (Roche).

5.6 Reverzná transkripcia

Príprava reakčnej zmesi:

RNA	cca 5 µg
oligo dT primery (0,5 µg/µl)	1 µl
ddH ₂ O	doplniť do 15 µl

Zmes bola premiešaná a umiestnená na dobu 5 min do bločku s teplotou 70 °C. Následne bola 2 – 3 minúty chladená na ľade a ďalšia práca so vzorkami pokračovala na ľade.

Ku zmesi boli pridané ďalšie zložky reakcie:

	objem [µl]
ddH ₂ O	10
5× RT Buffer	8
dNTPs (10mM)	4
RiboLock	1
Reverzná transkriptáza (RevertAid H Minus)	2

Takto pripravená zmes bola dôkladne premiešaná a umiestnená do cykléra. Reakcia prebiehala pri podmienkach daných nastaveným programom:

Teplota	Čas
25 °C	držať do manuálneho spustenia
25 °C	10 min
37 °C	5 min
42 °C	1 h 15 min
70 °C	10 min
4 °C	držať do manuálneho vypnutia
Viečko: 70 °C	

Následne boli vzorky cDNA skladované pri teplote -80 °C.

5.7 Príprava riediacich radov cDNA pre stanovenie účinnosti použitých primerov

cDNA bola po reverznej transkripcii postupne nariedená pomocou ddH₂O 5×, 50×, 500×, 5 000×, 50 000× a 500 000×. Každé riedenie bolo uchovávané v samostatnej skúmavke a skladované pri teplote -80 °C.

5.8 Dizajnovanie špecifických primerov

Primery boli dizajnované pomocou online nástroja Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) s použitím Refseq mRNA databázy u človeka. Vyhľadávané boli primery s teplotou topenia (T_m) optimálne 62,2 °C (min 61, max 63,5 °C). Ďalej bol na ne kladený nárok, aby prechádzali cez exón-exón rozhranie (3'-presah 2 – 4 nukleotidy) a aby boli dostatočne špecifické, t. j. bez iných potenciálnych produktov. Teplota T_m navrhnutých primerov bola kontrolovaná pomocou online nástroja OligoCalc (Kibbe, 2007), konkrétne T_m odhadnutá pre primery v prítomnosti určitej koncentrácie solí (originálne „salt adjusted“). Ďalej bola snaha dodržať minimálne rozdiely v T_m jednotlivých párov primerov medzi sebou aj navzájom, aby bolo možné používať na všetky následné qPCR analýzy zhodný program. Kontrolovaná bola aj potenciálna tvorba homodimérov, heterodimérov a vlásieniek tvorených navrhnutými primermi a to pomocou online nástroja OligoAnalyzer od Integrated DNA Technologies (dostupné na: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>, Apríl 2021).

5.9 Analýza výsledkov qPCR

Pre analýzu dát z qPCR experimentov bol použitý software: LightCycler® 480 verzia 1.5.1.62 (Roche).

Typ analýzy: Advanced relative quantification

Dáta boli normalizované ku referenčným génom: SURF1, GUSB

Ďalšie parametre analýzy sú zobrazené na Obrázku 8

Obrázok 8. Nastavenia pre analýzu relatívnej kvantifikácie. Analýza prebiehala pomocou softvéru LightCycler® 480, verzia 1.5.1.62 (Roche), odkiaľ táto snímka pochádza. Na obrázku sú vyznačené podrobné nastavenia parametrov zvolené pre analýzu.

The screenshot displays the 'Create new analysis' dialog box in the LightCycler 480 software. The settings are as follows:

- Abs Quant Type:** Abs Quant/2nd Derivative Max. Sensitivity: High Sensitivity, High Confidence. Abs Quant/Fit Points.
- Subordinate Abs Quant Analysis:** Create by Target Name (Create one analysis for each target name). Create by Filter Combination (Create one analysis for each filter combination).
- Reference Analysis:** Create In-Run, Select External (with a menu icon).
- Pairing Rule:** One To One, All To All, All To Mean, Mean To All.
- Default Standard Curve Settings:** When there are no In-Run standards for a target name: always use efficiency, allow external standards with matching target name.

At the bottom right, there are two icons: a checkmark in a circle and an 'X' in a circle.

5.10 Štatistické vyhodnotenie dát

Program: NCSS 9

Štatistická analýza: ANOVA

Štatistický test: Kruskal-Wallisov Test pre Mnohonásobné Porovnanie Z-hodnôt
(Dunnov test)

Hladina významnosti: 0,05 a 0,01

6 Výsledky

6.1 Validácia výsledkov RNA-seq pomocou RT-qPCR:

Cieľom tejto časti práce bolo overiť expresiu vybraných génov použitím nezávislej metodiky RT-qPCR a validovať tak výsledky získané RNA-sekvenovaním transkriptómu (mRNA, konkrétne 3'-poly(A) RNA) rodičovskej bunkovej línie HEK-293 (Flp-In, T-REx) a línií odvodенých od nej. Kandidátne transkripty génov pre validáciu boli vybrané podľa dát z RNA-seq a to na základe ich nízkej alebo naopak vysokej miery expresie, predovšetkým expresie špecifickej v rámci osekvenovaných bunkových línií. Pre takto vybrané gény boli následne navrhnuté špecifické páry primerov a tie boli testované pomocou qPCR. Gény, ktorých qPCR reakcia prebiehala optimálne, vytvorili set pre validačné experimenty. Z rodičovskej aj z nej odvodенých bunkových línií bola pripravená cDNA v niekoľkých opakovaniach – jedno technické (3. TR⁺ – fyzicky identická vzorka s tou sekvenovanou) a päť biologických (1.BR⁺, 2.BR⁺, 3.BR⁺, 1.BR⁻, 2.BR⁻). cDNA bola použitá v qPCR experimentoch a takto získané dáta o sete génov boli porovnané s dátami o zhodných génoch získanými metódou RNA-seq.

6.1.1 Výber génov na validáciu výsledkov RNA-seq

Dáta z RNA-seq/ALDEx2 (podľa kapitoly Materiál – kapitola 4.9 Sekvenačné dáta, a.) boli filtrované podľa určitých kritérií. Následne boli vyselektované gény, ktoré sa v takto filtrovaných datasetoch opakovali u viacerých bunkových línií. Z týchto génov boli ďalej vybrané tie, ktorých expresný profil naprieč rôznymi líniami vykazoval špecifické rysy a súčasne bolo preferované, aby boli prítomné aj v identicky ošetrených dátach získaných sekvenovaním imunoprecipitovanej RNA (RIP-seq) [<https://www.chromotek.com/products/detail/product-detail/gfp-trap-agarose/>, Apríl 2021]. Týmto spôsobom bolo vytypovaných celkovo 14 génov.

6.1.1.1 Kritériá výberu génov v postupných krokoch (zužovanie výberu)

- Dáta z RNA-seq celkovej 3'-poly(A) RNA boli filtrované s podmienkami $\log_2FC^* > 1$ a < -1

Sekvenačné dáta z RNA-seq/ALDEx2 boli osobitne pre každú zo sledovaných bunkových línií zoradené podľa hodnôt \log_2FC od najväčšej po najmenšiu. Následne boli vybrané len tie gény, ktorých hodnota \log_2FC u konkrétnej línie bola buď väčšia ako 1 alebo naopak menšia ako -1 (pre každú podmienku bolo súčasne vybraných maximálne 20 génov s najvyššou a/alebo najnižšou hodnotou \log_2FC).

* v práci sú používané jednotky s pôvodným označením, ktoré je možné bežne nájsť v literatúre – FC = „Fold Change“; \log_2FC vyjadruje logaritmovaný pomer vzhľadom ku kontrolnej línii, v tomto prípade rodičovskej línii HEK-293 (Flp-In, T-REx)

- Transkripty génov boli vybrané na základe špecifickej expresie u jednotlivých sekvenovaných bunkových línií

Z génov selektovaných v predchádzajúcom kroku boli vybrané tie s výraznými odchýlkami v expresii medzi jednotlivými bunkovými líniami. Niektoré kandidátne gény boli vybrané na základe toho, že napr. vykazovali špecificky odlišnú expresiu u jednej z línií, prípadne miera expresie nejakým spôsobom charakteristicky odlišovala dve konkrétne línie (Tabuľka 3). Obrázky 9 – 11 reprezentujú príklady troch takýchto transkriptov. U transkriptu SFRP2 je napríklad možné všimnúť si, že jeho hladina v jednotlivých líniách vzhľadom ku rodičovskej línii stúpa a klesá striedavo medzi nimi. Špeciálne zaujímavý je tiež rozdiel medzi líniami s nadexpresiou dlhej a krátkej varianty proteínu eIF4E3 (eIF4E3_A a eIF4E3_B). Transkript SPARC zas vykazuje charakteristické zníženie svojej hladiny len v línii s nadexpresiou eIF4E1 a CEBPE má hladinu expresie výrazne zníženú vo všetkých líniách okrem tej s nadexpresiou eIF4E3_B. Týmto spôsobom bolo vybraných spolu 11 génov (Tabuľka 4).

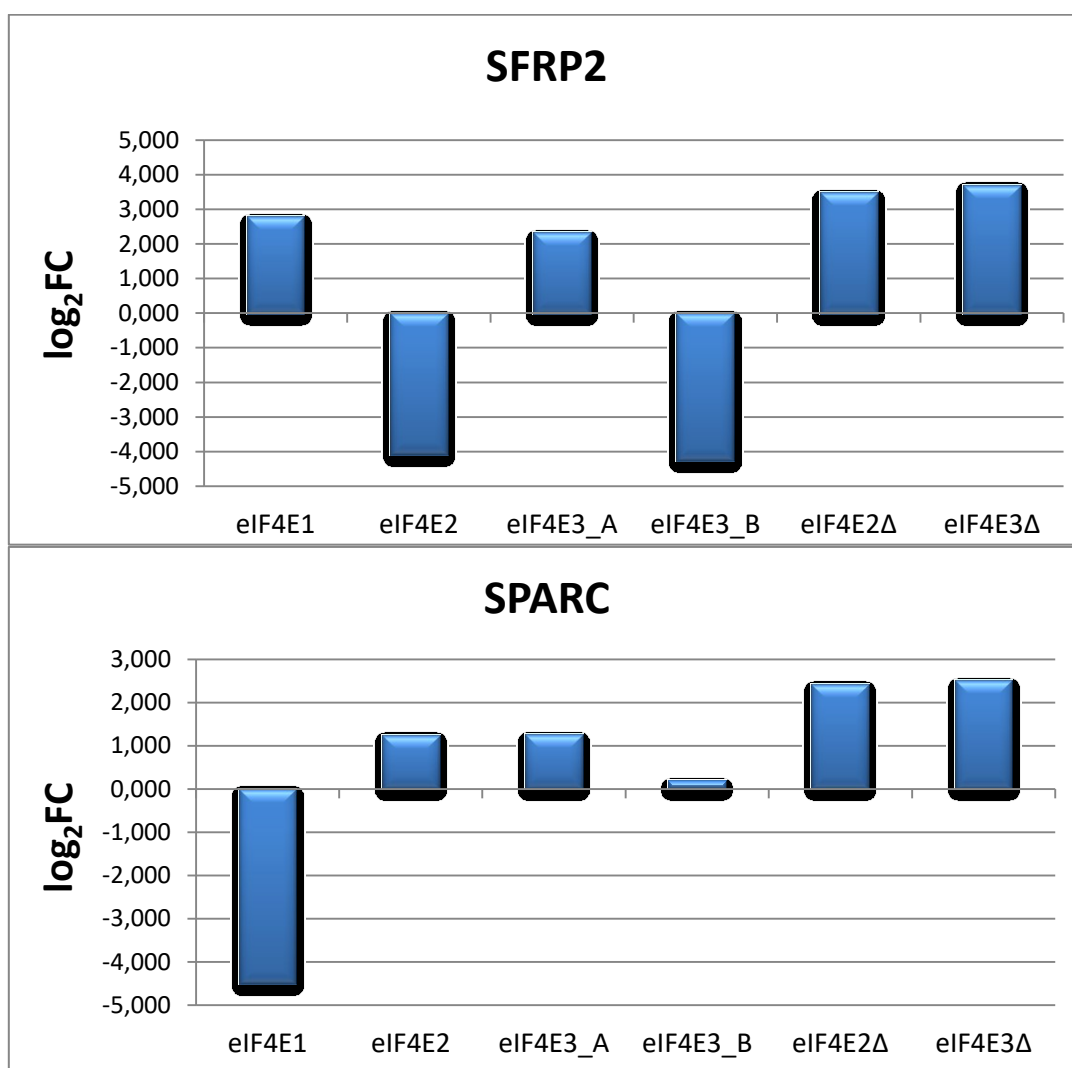
Tabuľka 3. Zoznam vytipovaných transkriptov pre validáciu výsledkov RNA-seq. Poradie génov odráža ich relatívnu zmenu miery expresie v jednotlivých modifikovaných bunkových líniách oproti rodičovskej HEK-293 (Flp-In, T-REx). Farebne sú zvýraznené gény, ktorých miera expresie má špecifický priebeh v rámci viacerých porovnávaných línií. „+“ – zvýšená expresia; „-“ – znížená expresia.

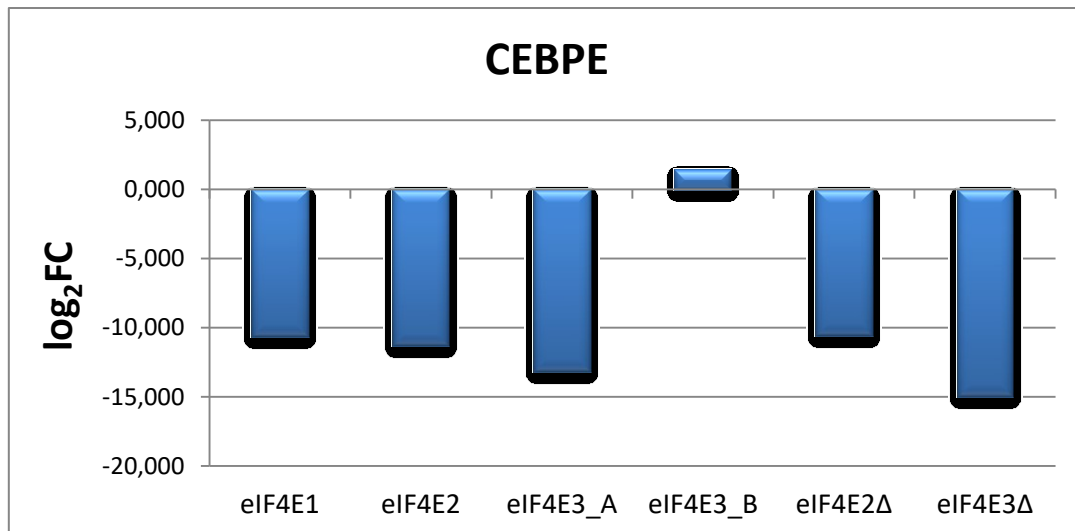
	eIF4E1	eIF4E2	eIF4E3_A	eIF4E3_B	eIF4E2Δ	eIF4E3Δ
+	EIF4E	EIF4E2	EIF4E3	EIF4E3	HSPA1A	HSPA1A
	SFRP2	CELSR3	SFRP2	SLC7A3	SLC7A3	SLC7A3
	DDR2	SPARC	MGAT2	APOE	ZNF532	ZNF532
	OAS3	INPP5D	GSTP1	AHRR	PLAGL1	REC8
	RTN1	THBS4	FBXL15	HIST2H2AA3	PRSS8	PLAGL1
	MMP2		INPP5D	MGAT2	PTCHD1	PRSS8
	ZNF532		SELENOM	PRSS8	REC8	PTCHD1
	UBE2L6		SPARC	EHBP1L1	YBX2	SFRP2
	SCIN		BEGAIN	CEBPE	HLA-DOA	HLA-DOA
	TSPAN11		APOE	ZNF219	SFRP2	YBX2
	HLA-DRB5		YBX2	U2AF1	TMEM132B	ULK2
	IFITM3		TSPAN11	NAPRT	MID1IP1	PIEZO2
	ALDH1L2		ADAP1	EPPK1	NEFL	NEFL
	OSMR		COMTD1	SLC22A17	TMSB4X	GSTT2B
	LAYN		C1QL1	PHYHD1	ULK2	GSTP1
	GSTO2		ZNF503	PANX2	GSTT2B	TMEM132B
	TSPO		UBE2QL1	HIST2H4A	CA2	SPARC
	CDH1		ARSA	ALDH1L2	LAMC2	CALCB
				SFRP5	GSTP1	CCDC146
				ULK2	PIEZO2	ATL3
-	NRN1	RNF135	GLB1L3	AMOT	ZNF331	ZNF331
	SQLE	TCIRG1	BST2	ZNF177	ZNF91	ZNF91
	NRIP1	C2CD2	TTC3	ENPP2	CPPED1	FP565260.1
	TXNIP	SEMA4G	MORC3	ZNF155	ZNF136	ZNF100
	SAPCD1	U2AF1	MYC	PCDH19	EPHA3	ZNF160
	HIST1H2BK	TSPAN11	EDA	ADAMTS1	ZNF28	ZNF468
	PRSS8	AMOT	DOPEY2	AC011511.4	ATP2B3	ZNF888
	HIST1H2BJ	CBS	SIM2	ZNF227	ZNF83	ZNF440
	KHDC1	TSHZ2	VPS26C	SPIN3	MUC16	EPHA3
	HIST1H1C	ULK2	SERPINF1	DDR2	ZNF471	ZNF83
	CBS	MCTP2	RBP7	CSRP1	ZNF888	ZNF471
	U2AF1	YBX2	P2RX5	GSTP1	ZNF440	ZNF28
	KCNQ5	SLC7A3	CBS	PTCHD1	ZNF160	ZNF700
	PTCHD1	SFRP2	SMYD3	ZNF532	CEBPE	MUC16
	PCDH19	PCDH19	PCDH19	SFRP2	ZNF43	CD99
	SLC7A3	KCNJ12	AMOT	MFAP2	ZNF677	ZNF43
	SPARC	GPR173	ZNF532		CD99	ANOS1
	CD109	FP565260.1	SLC7A3		ZNF468	ZNF677
	FP565260.1	CEBPE	FP565260.1		ANOS1	ZNF239
	CEBPE	GSTP1	CEBPE		ZNF700	CEBPE

Tabuľka 4. Zoznam vybraných transkriptov pre validáciu sekvenovania pomocou RT-qPCR. \log_2FC jednotlivých zvýraznených transkriptov (z Tabuľky 3) pre sekvenované bunkové línie. CPM – „counts per million“; FDR – „false discovery rate“.

gén	eIF4E1	eIF4E2	eIF4E3_A	eIF4E3_B	eIF4E2Δ	eIF4E3Δ	log CPM	FDR
SFRP2	2,797	-4,085	2,334	-4,256	3,489	3,708	3,048	3,30E-14
PTCHD1	-1,779	-0,373	-0,228	-2,016	4,795	3,876	3,561	1,03E-15
YBX2	0,205	-2,489	1,149	0,545	3,794	3,486	3,529	2,71E-09
GSTP1	0,683	-11,597	1,459	-1,993	2,603	2,682	5,998	1,60E-14
ANOS1	-0,026	0,009	0,086	-0,602	-11,938	-12,625	5,009	3,84E-17
SPARC	-4,508	1,252	1,257	0,196	2,431	2,512	4,266	3,35E-13
DDR2	2,104	-0,679	-0,821	-1,362	-2,272	-2,121	3,808	1,11E-08
SLC7A3	-4,375	-4,011	-5,658	4,131	5,644	5,509	3,311	3,74E-15
ZNF532	1,263	-0,741	-4,300	-4,029	5,213	5,223	3,889	1,48E-18
APOE	0,588	-0,032	1,200	2,374	2,090	2,272	4,384	4,27E-05
CEBPE	-10,659	-11,302	-13,179	1,476	-10,575	-14,959	5,134	1,20E-16

Obrázky 9 – 11. Príklady špecifického priebehu zmien expresie vybraných kandidátnych transkriptov. Množstvo transkriptov troch reprezentatívnych génov (SFRP2, SPARC, CEBPE) v sekvenovaných bunkových líniách je graficky demonštrované ako logaritmovaný pomer zmeny miery expresie ku rodičovskej línii HEK-293 (Flp-In, T-REx).





- Zoznam kandidátnych génov bol doplnený o ďalšie na základe porovnania dát z RNA-seq/ALDEx2 s dátami z RIP-seq (viď kapitolu **4.9 Sekvenačné dáta**)

Výber génov z pôvodných sekvenačných dát bol zúžený dvoma rôznymi spôsobmi:

1. Výber porovnaním selektovaného zoznamu génov z RNA-seq a kompletného zoznamu génov z RIP-seq a filtráciou ich prieniku

Zoznam génov z RNA-seq získaných postupom opísaným v predchádzajúcom texte (selektovaný zoznam génov – Tabuľka 3) bol porovnaný s kompletným datasetom z RIP-seq. V zúženom výbere boli gény, ktoré sa nachádzali v oboch týchto datasetoch.

2. Výber porovnaním kompletného zoznamu génov z RNA-seq/ALDEx2 a selektovaného zoznamu génov z RIP-seq a filtráciou ich prieniku

Kompletný dataset RNA-seq/ALDEx2 bol porovnaný s datasetom RIP-seq, ktorý bol ďalej filtrovaný s rôznymi kritériami pre jednotlivé kovarianty vždy tak, aby výsledný počet génov spoločných pre obidva datasety bol okolo 10 najviac diferencielne exprimovaných na každú bunkovú líniu.

Na základe týchto dvoch popísaných výberov bol zoznam kandidátnych génov na validáciu RNA-seq doplnený o ďalšie tri gény, ktorých expresia bola nejakým spôsobom výraznejšie dištinktívna medzi jednotlivými sekvenovanými bunkovými líniami (Tabuľka 5).

Tabuľka 5. Zoznam vybraných transkriptov dopĺňujúcich set génov pre validáciu pomocou RT-qPCR. \log_2FC vybraných transkriptov pre sekvenované bunkové línie. CPM – „counts per million“; FDR – „false discovery rate“.

gen	eIF4E1	eIF4E2	eIF4E3_A	eIF4E3_B	eIF4E2 Δ	eIF4E3 Δ	log CPM	FDR
CBS	-1,659	-1,703	-1,807	0,917	0,625	-1,423	5,615	1,63E-11
MFAP2	0,453	0,207	0,360	-7,587	0,521	0,827	4,509	2,53E-13
HSPB1	0,198	0,209	-0,150	0,985	2,120	2,418	5,943	3,39E-08

6.1.2 Optimalizácia RT-qPCR

V tejto časti práce bolo potrebné stanoviť, ktoré transkripty zo setu kandidátnych génov budú definitívne použité na RT-qPCR experimenty určené na validáciu RNA-seq. Z jednotlivých bunkových línií bola vyizolovaná RNA a z nej bola 3'-poly(A) RNA pomocou reverznej transkripcie prevedená na cDNA. Na jednotlivé gény boli navrhnuté páry primerov a následne testované pomocou qPCR. V prípade, že sa primery v daných reakčných podmienkach ukázali ako špecifické a reakcia prebehla optimálne, dané gény boli použité na validačné experimenty, v opačnom prípade boli gény zo setu kandidátnych génov vylúčené.

6.1.3 Navrhovanie špecifických primerov na set kandidátnych génov určených na validáciu RNA-seq pomocou RT-qPCR

Na všetkých 14 génov vybraných na validáciu RNA-seq boli navrhnuté páry špecifických primerov* (5.8 Dizajnovanie špecifických primerov). Tabuľka 6 obsahuje konkrétne detaily o týchto primeroch.

Tabuľka 6. Zoznam primerov použitých vo validačných experimentoch. Pre každý gén je uvedené číslo „RefSeq accession number“, ktoré referuje ku konkrétnemu variantu transkriptu dohľadateľného v databáze RefSeq podľa NCBI. Ďalej sú uvedené konkrétne sekvencie primerov („F“ – forward, „R“ – reverse), ich teoretické teploty topenia (T_m) vypočítané podľa online nástroja OligoCalc (Kibbe, 2007) a dĺžky PCR amplikónov.

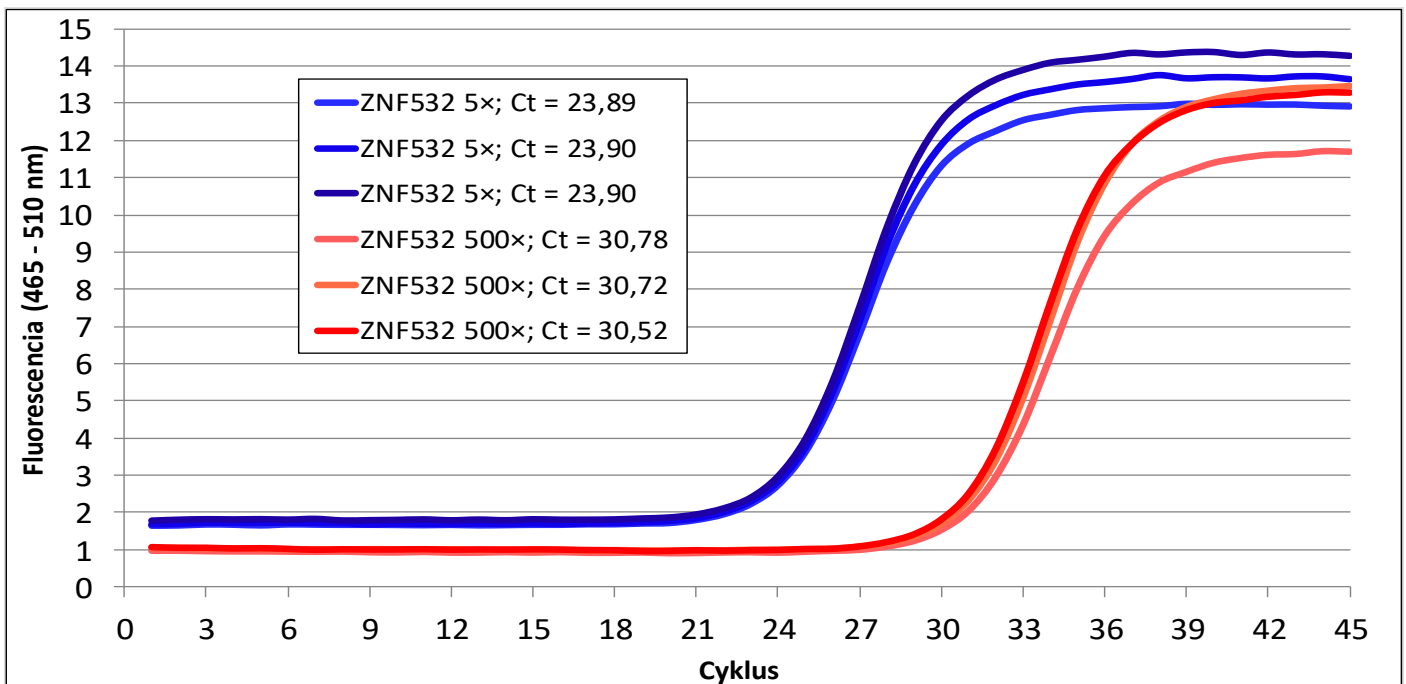
názov génu	RefSeq accession number	forward/ reverse	sekvencia primeru (5'->3')	T_m [°C] (OligoCalc)	dĺžka amplikónu [bp]
SFRP2	NM_003013.2	F	CAGCCACCGAGGAAGCTCCA	64,6	199
		R	TCGGACACACCGTTCAGCTTGT	64,2	
PTCHD1	NM_173495.2	F	TCCCTTTCGTCATGCTAGGTCA	62,1	206
		R	CCTGGCTGCCTCAATGTTCG	62,5	
YBX2	NM_015982.3	F	GCAGCAGCCTATAGAGGGCA	62,5	208
		R	GGAACCATCAGCGGGACCTT	62,5	
GSTP1	NM_000852.3	F	CTCACTCAAAGCCTCCTGCC	62,5	125
		R	GGTCCTTCCCATAGAGCCCAA	63,2	
ANOS1	NM_000216.3	F	CCACAGACGAGCGAGTTCAAC	63,2	147
		R	CTGGTGGGGCAGATGGATCTT	63,2	
SPARC	NM_003118.3	F	CATTGGCGAGTTTGAGAAGGTGT	62,9	168
		R	AGCTCAGAGTCCAGGCAAGG	62,5	
DDR2	NM_001014796.2	F	CCGTCATGGGAAACAGGTGC	62,5	118
		R	GGAGTGGTCGGTGACTIONGAA	62,5	
SLC7A3	NM_001048164.2	F	GGAGTTGCAGGAGGAGGCAAT	63,2	145
		R	AGCAGTCAGCAGGACAGCAAG	63,2	
ZNF532	NM_018181.5	F	AGTGTACGCCTGCTCGCACT	62,5	104
		R	GGTCAGGGTCCTTGATGCCA	62,5	
CEBPE	NM_001805.3	F	CTGCGCGTTCTCAAGGCC	63,6	134
		R	ACTGCCTTCTTGCCCTTGTGTAA	63,2	
HSPB1	NM_001540.5	F	TGGCGCGTGTCCCTGGATG	63,6	97
		R	GCTCCTCGTGCTTGCCGGT	63,6	
CBS	NM_000071.2	F	GAAGGGTCCATCCTCGCAGA	62,5	124
		R	ACCACTTGTCCACCACCGTC	62,5	
MFAP2	NM_017459.2	F	CTCCGCCGTGTGTACGTCATT	63,2	88
		R	CCCGACAGAGGTCAGCTCG	63,6	
APOE*	NM_001302688.2	F	GCGTTGCTGGTCACATTCCT	60,5	150
		R	GCGCAGGTAATCCCAAAGC	60,5	

* tieto primery som nedizajnoval – boli k dispozícii v laboratóriu z predchádzajúcich experimentov

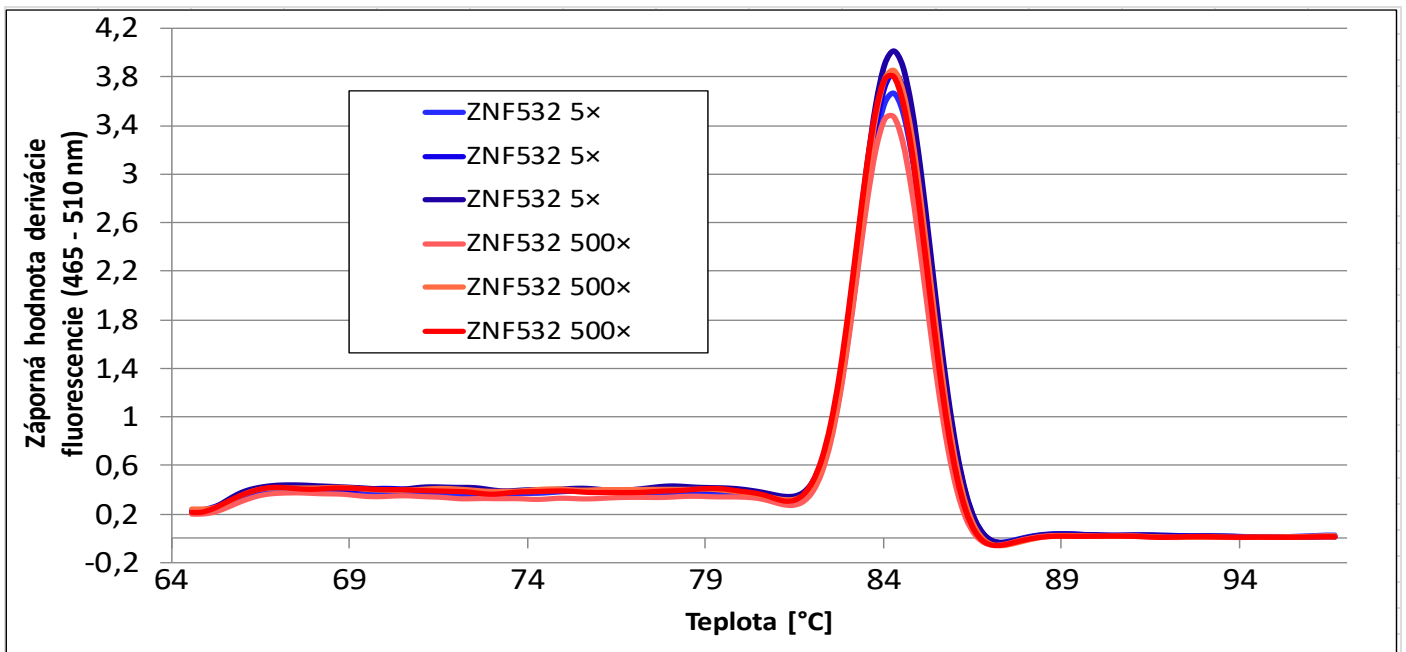
6.1.3.1 Testovanie primerov pomocou qPCR a elektroforézy

Navrhnuté páry primerov boli otestované pomocou qPCR. Vhodnosť navrhnutých párov primerov pre validačné experimenty bola testovaná systematicky. U každého amplikónu bola meraná Ct vždy v sérii piatich riedení. Tie mali podobu riediacich radov vzniknutých nariadením vzoriek po reverznej transkripcii, konkrétne šlo o riedenia 5×, 50×, 500×, 5000× a 50000×. Na základe toho boli stanovené hodnoty účinnosti pre každý pár primerov. Špecifita produktu PCR bola testovaná pomocou kriviek topenia (Obrázky 13, 15, 17). Produkty qPCR boli tiež analyzované pomocou agarózovej elektroforézy (Obrázky 14, 16). Tieto pokusy prebehli u všetkých navrhnutých párov primerov. Na validačné experimenty boli použité len tie transkripty génov, u ktorých bola v testovacích pokusoch za použitia zodpovedajúcich primerov jasne preukázaná špecifita a dostatočná účinnosť amplifikácie. Pre ilustráciu tejto časti práce uvádzam jeden reprezentatívny príklad, kde testovanie prebehlo úspešne – transkript ZNF532 (Obrázky 12 – 14). Optimálna reakcia sa prejavila náležitým rozdielom hodnôt Ct pre rôzne riedenia (posunom amplifikačných kriviek), krivky topenia pre zhodné transkripty dosahovali vrchol v rovnakej teplote T_m a na elektroforéze sa amplikóny zobrazovali ako jeden prúžok s očakávanou veľkosťou. Takto podobne sa správali typické amplifikačné produkty, ktoré boli použité na validačné experimenty. Transkripty SFRP2 a PTCHD1 predstavujú naopak dva príklady, kde optimálna reakcia zrejme s dôvodu nedostatočnej špecifity navrhnutých primerov dosiahnutá nebola (Obrázky 15 - 17).

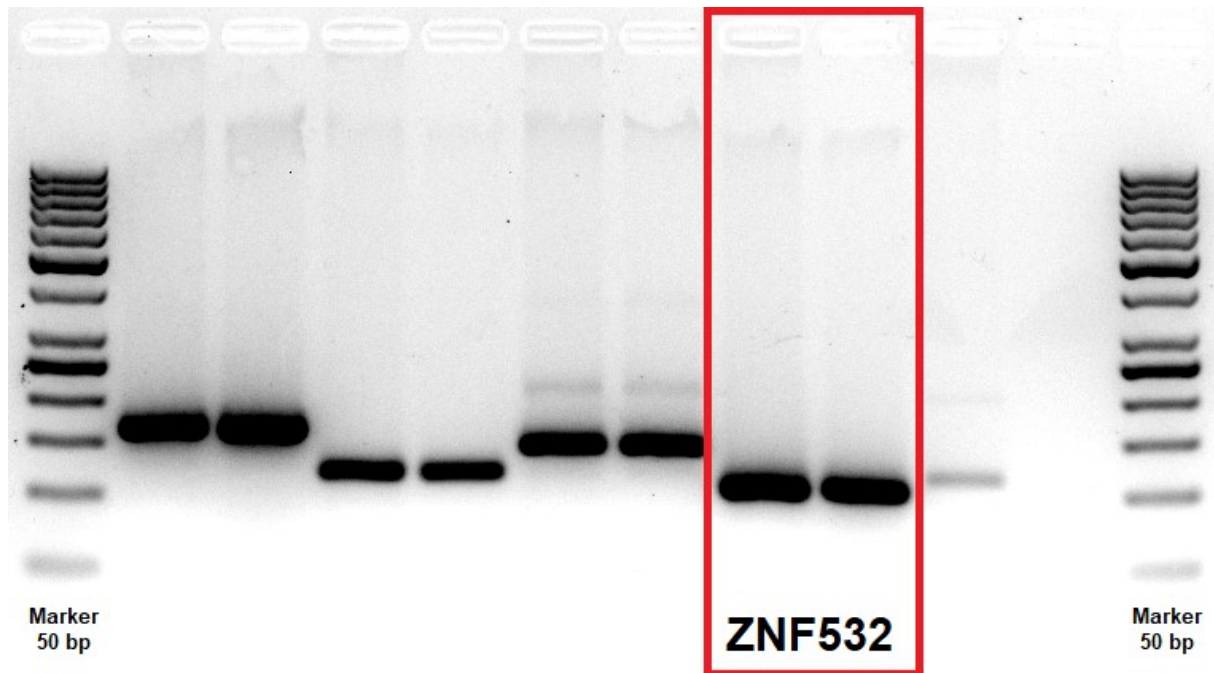
Graf 12. Amplifikačné krivky amplikónu ZNF532. Vzorky boli po reverznej transkripcii nariedené 5× a 500× a každá vzorka bola v triplicate. Podľa amplifikačných kriviek to vypadá, že qPCR prebehla v poriadku a došlo k amplifikácii produktov génu ZNF532 vo všetkých vzorkách. Výsledky súhlasia aj s očakávaním, že k amplifikácii došlo u rôznych koncentrácií cDNA v rôznych cykloch.



Graf 13. Krivky topenia produktov RT-qPCR zo vzoriek amplikónu ZNF532. Graf zobrazuje identické vzorky ako tie znázornené v predchádzajúcom Obrázku 12. Podľa kriviek topenia sa zdá, že PCR pre gén ZNF532 prebehla optimálne a navrhnuté primery sú špecifické, nakoľko to vypadá, že sa v produkte reakcie vo všetkých vzorkách nachádza len jeden amplikón s jedinou teplotou topenia (T_m).

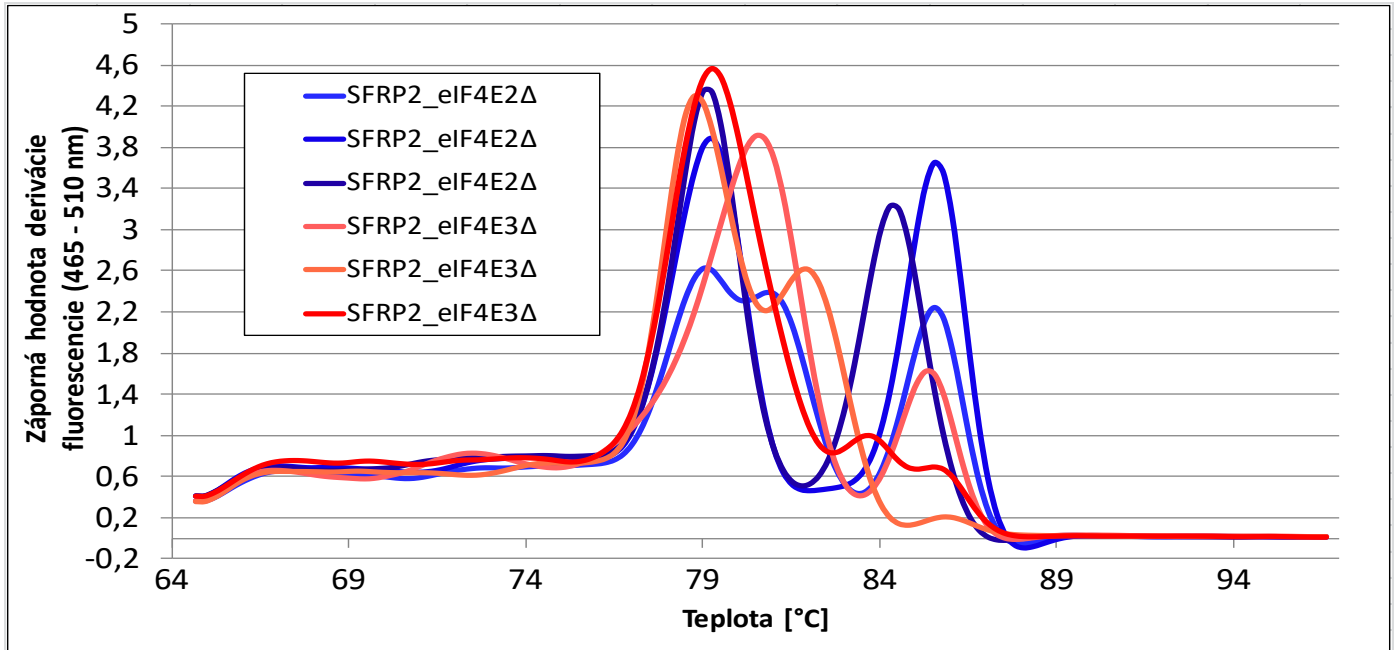


Obrázok 14. Príklad elektroforetickej separácie produktov RT-qPCR. Produkt reakcie pre gén ZNF532 je v červenom rámečku. Dĺžka ampikónu presne zodpovedá predpokladanej dĺžke. Súčasne bola reakcia qPCR špecifická a súhlasí s výsledkom analýzy krivky topenia pre produkty ZNF532 (Graf 13). Na tomto géli boli súčasne analyzované výsledky qPCR pre viaceré gény, zľava: SPARC, DDR2, SLC7A3, ZNF532 a CEBPE (vzorky pre každý gén vždy v páre – vzorky riedené po reverznej transkripcii 5× a 500×). U všetkých vzoriek boli výsledky v poriadku a zodpovedali očakávaniu s výnimkou génu pre CEBPE, kde priebeh reakcie nebol optimálny.

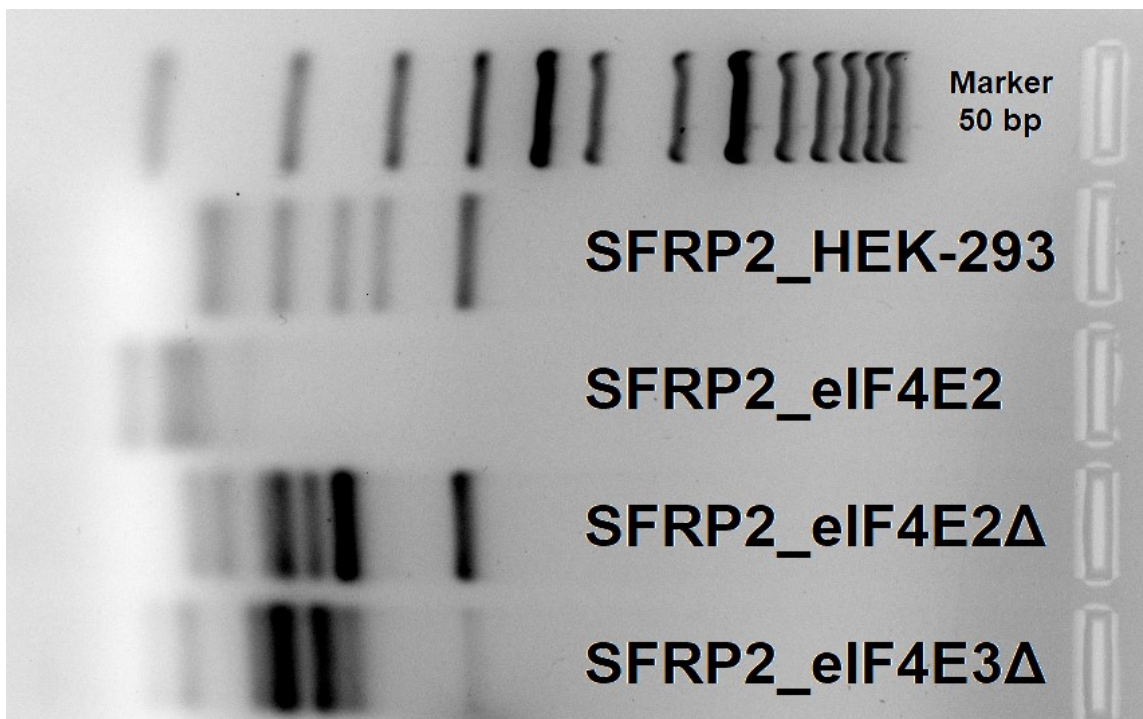


Gény (páry primerov na kvantifikáciu ich mRNA), ktorých qPCR opakovane neprebíhala optimálne boli z validačných experimentov vylúčené. Takýmito génmi boli SFRP2 (Obrázky 15 a 16) a PTCHD1 (Obrázok 17). Celkový počet génov použitých na validáciu RNA-seq bol nakoniec 12, konkrétne: YBX2, GSTP1, ANOS1, SPARC, DDR2, SLC7A3, ZNF532, CEBPE, HSPB1, CBS, MAFP2, APOE.

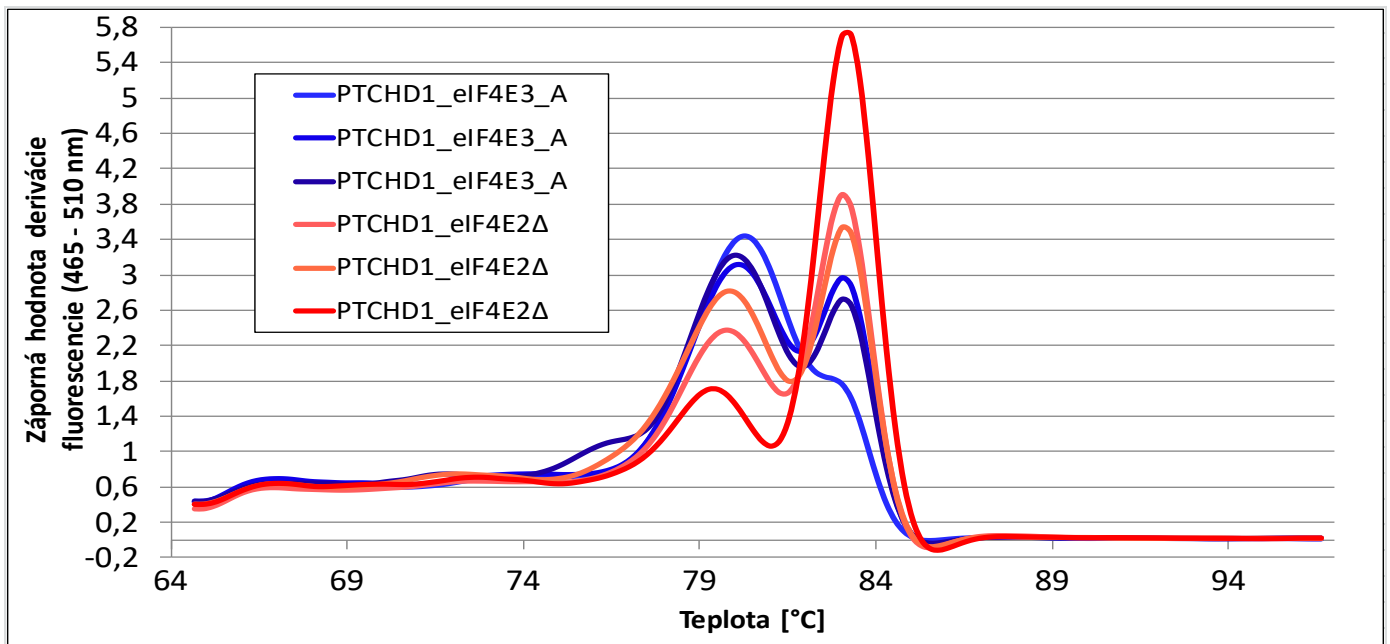
Graf 15. Krivky topenia produktov RT-qPCR zo vzoriek amplikónu SFRP2. V grafe sú znázornené vzorky pochádzajúce z RT-qPCR experimentu. Vybrané sú dve vzorky v triplikátoch. Vzorky sa líšia použitou templátovou cDNA pripravenou z mRNA dvoch bunkových línií – eIF4E2 Δ a eIF4E3 Δ . Z kriviek topenia je zrejmé, že reakcia neprebehla optimálne a v jej priebehu vznikli nešpecifické produkty s rôznou teplotou topenia (T_m).



Obrázok 16. Príklad elektroforetickej separácie produktov RT-qPCR. Na obrázku sú produkty reakcie pre gén SFRP2 pochádzajúce zo vzoriek líšiacich sa prítomnosťou štyroch rôznych cDNA pripravených reverznou transkripciou mRNA z bunkových línií HEK-293 (Flp-In, T-REx), eIF4E2, eIF4E2 Δ a eIF4E3 Δ . Elektroforetogram potvrdzuje predošlé výsledky analýzy kriviek topenia (Graf 15) poukazujúce na suboptimálny priebeh qPCR za vzniku nešpecifických produktov pri použití primerov pre SFRP2.



Graf 17. Krivky topenia produktov RT-qPCR zo vzoriek amplikónu PTCHD1. V grafe sú znázornené vzorky pochádzajúce z RT-qPCR experimentu. Vybrané sú dve vzorky v triplikátoch. Vzorky sa líšia použitou templátovou cDNA pripravenou z mRNA dvoch bunkových línií – eIF4E3_A a eIF4E2Δ. Z kriviek topenia je zrejmé, že reakcia neprebehla optimálne a v jej priebehu vznikli nešpecifické produkty s rôznou teplotou topenia (T_m).



6.1.4 qPCR experimenty na validáciu výsledkov RNA-seq

Validácia výsledkov RNA-seq pomocou RT-qPCR prebiehala s použitím cDNA priprevených z rôznych typov vzoriek:

1. Technické opakovanie s indukovanou expresiou eIF4E-fúzných génov

Hladina expresie všetkých vybraných transkriptov bola zmeraná pomocou qPCR vo vzorkách cDNA, ktoré boli fyzicky sekvenované metódou RNA-seq a to vo všetkých siedmich bunkových líniách. Konkrétne sa jednalo o biologický replikát 3, ktorý ďalej uvádzam ako typ vzorky **3.TR+** (ako 3. technický replikát, „+“ – označenie toho, že sekvenované línie boli kultivované v prítomnosti tetracyklínu, ktorý indukuje expresiu eIF4E-fúzných génov). Vzorky 3.TR+ zodpovedajú výsledkom RNA-sekvenovania vzoriek označených ako batch3 a boli použité na vlastnú technickú validáciu RNA-seq.

2. Nezávislé biologické opakovania s indukovanou expresiou eIF4E-fúzných génov

V tomto prípade bola hladina expresie všetkých vybraných transkriptov stanovená pomocou qPCR v troch nezávislých opakovaniach. Vzorky cDNA boli zo všetkých siedmich bunkových línií nezávisle pripravené tri krát – **1.BR+**, **2.BR+** a **3.BR+** (kde číslo označuje konkrétne opakovanie, „BR“ znamená biologický replikát a „+“ označuje prítomnosť tetracyklínu v médiu počas kultivácie bunkových línií a indukciu expresie eIF4E-fúzných génov). Biologické opakovania poslúžili na posúdenie reproducibility výsledkov technickej validácie pomocou RT-qPCR pri použití rovnakých bunkových línií, z ktorých bola cDNA pripravená nezávisle.

3. Nezávislé biologické opakovania bez indukovanej expresie eIF4E-fúzných génov

Tiež boli pripravené vzorky cDNA v dvoch nezávislých opakovaniach zo všetkých siedmich bunkových línií – **1.BR-** a **2.BR-** (číslo reprezentuje poradie prípravy konkrétneho opakovania, „BR“ znamená biologický replikát a „-“ označuje absenciu indukcie eIF4E-fúzných génov tetracyklínom počas kultivácie bunkových línií). Pomocou qPCR bola aj v nich zmeraná hladina expresie vybraných génov na úrovni transkriptov. Tieto vzorky slúžili ako kontrola transkripčného expresného profilu jednotlivých génov v sledovaných bunkových líniách bez ovplyvnenia rôznou hladinou produktov eIF4E-fúzných génov.

Celkovo bolo zrealizovaných šesť sérií RT-qPCR experimentov (jedno technické a 3 + 2 biologické opakovania), v ktorých bola zisťovaná hladina expresie dvanástich génov v siedmich bunkových líniách.

6.1.5 Porovnanie výsledkov qPCR s výsledkami RNA-seq

Dáta z RNA-seq pochádzajúce zo sekvenovania transkriptómu (3'-poly(A) RNA) boli pre validačné experimenty použité v podobe hodnôt FPKM (RNA-seq/FPKM podľa kapitoly 4.9 Sekvenačné dáta, a.). Z hodnôt FPKM jednotlivých transkriptov boli vydelením priemernou hodnotou FPKM referenčných transkriptov SURF1 a GUSB vypočítané relatívne hodnoty. Cieľom toho bolo získanie hodnôt svojou povahou porovnateľných s tými získanými pomocou qPCR, ktoré sú z princípu relatívnej kvantifikácie typovo identické. Pre porovnanie

qPCR dát reprezentujúcich relatívnu hladinu transkriptov v jednotlivých bunkových líniách normalizovanú ku rodičovskej línii HEK-293 (Flp-In, T-REx) bola použitá ekvivalentná normalizácia relatívnych hodnôt FPKM, t. j. ich podiel ku relatívnym hodnotám FPKM transkriptov z rodičovskej línii. Jednoducho, výsledkom qPCR analýzy boli pre každý sledovaný transkript dva typy hodnôt – relatívna (podiel ku referenčným transkriptom) a normalizovaná (podiel relatívnej hodnoty ku relatívnej hodnote hladiny daného transkriptu v rodičovskej línii). Dáta z RNA-seq boli následne upravené tak, aby boli svojou povahou ekvivalentné ako tie z qPCR a teda navzájom porovnateľné.

Experimentálne dáta získané pomocou RT-qPCR boli porovnané so sekvenačnými dátami RNA-seq v dvoch fázach. Najskôr boli so sekvenačnými dátami porovnané dáta z qPCR z technického opakovania 3.TR+ (technická validácia). Na zistenie miery reprodukovateľnosti výsledkov nezávislých experimentov boli následne porovnané dáta z RNA-seq so všetkými biologickými opakovaniami získané pomocou RT-qPCR (validácia pomocou nezávislých biologických opakovaní).

6.1.5.1 Technická validácia výsledkov RNA-seq pomocou RT-qPCR

Pre účely technickej validácie boli porovnávané dáta z 3.TR+ v podobe zmien hladín transkriptov v jednotlivých bunkových líniách vzhľadom ku rodičovskej línii získané nezávisle pomocou dvoch metód – RT-qPCR a RNA-seq (Obrázky 18 – 41: červené stĺpce).

Pri prezeraní grafov je potrebné uvedomiť si, že kľúčové je všímať si trendov expresie a nie absolútnych hodnôt zmien hladín transkriptov medzi jednotlivými bunkovými líniami. To sa môže graficky prejaviť ako zdanlivé „posunutie“ osi x hore alebo dolu medzi jednotlivými typmi analýz (t. j. RNA-seq a qPCR), avšak vždy konzistentne pre všetky línie v danom type analýzy. Počas interpretácie validácie je tiež dobré myslieť na to, že použité metódy analýzy majú rôzny dynamický rozsah, takže nemožno očakávať rovnaké hodnoty.

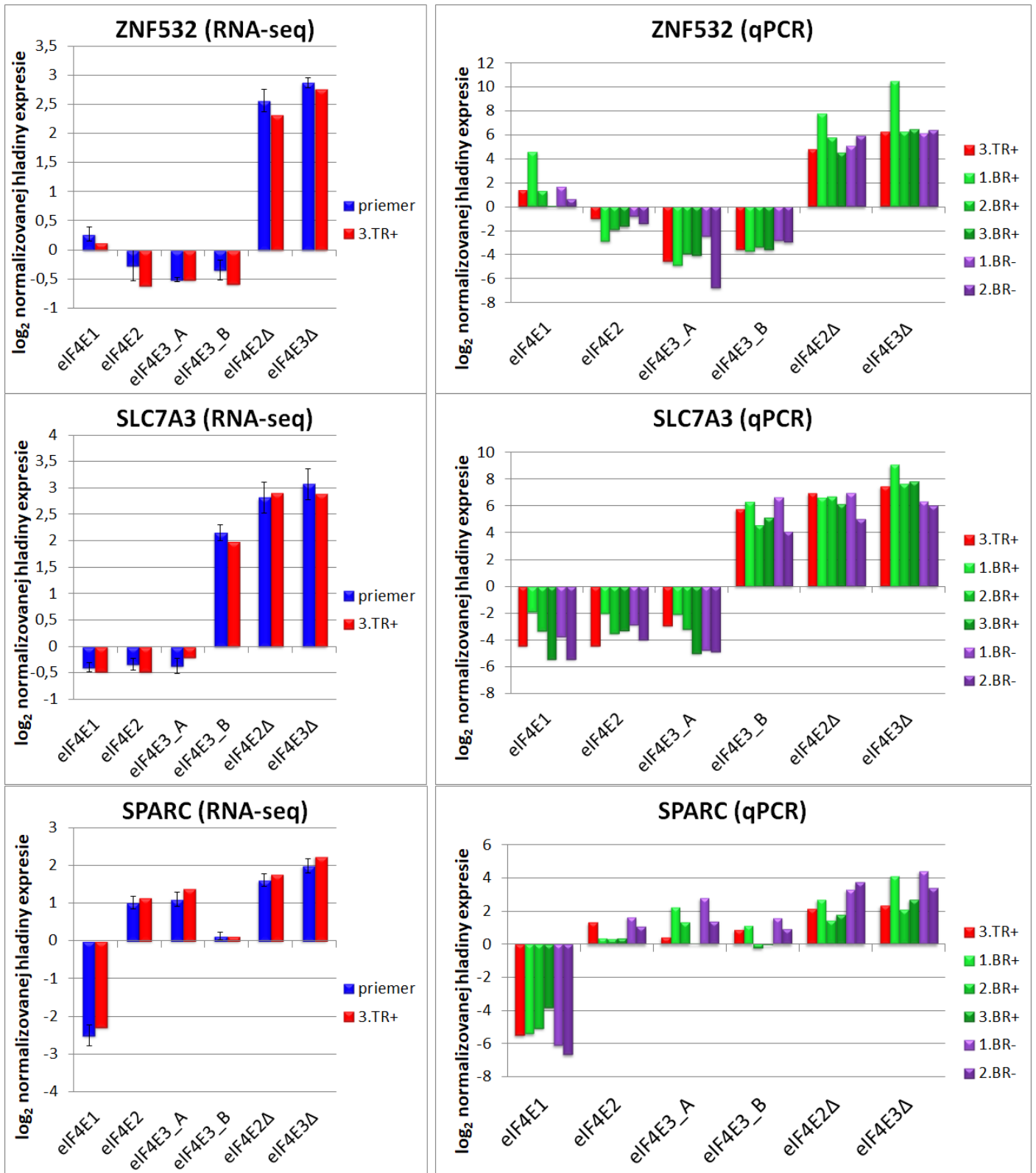
Všeobecne je možné zhodnotiť, že expresné profily naprieč porovnávanými bunkovými líniami vo vzorkách 3.TR+ sa u väčšiny sledovaných transkriptov v základných rysoch zachovávajú medzi dvoma použitými metódami. Technickú validáciu výsledkov RNA-seq teda môžeme považovať za úspešnú.

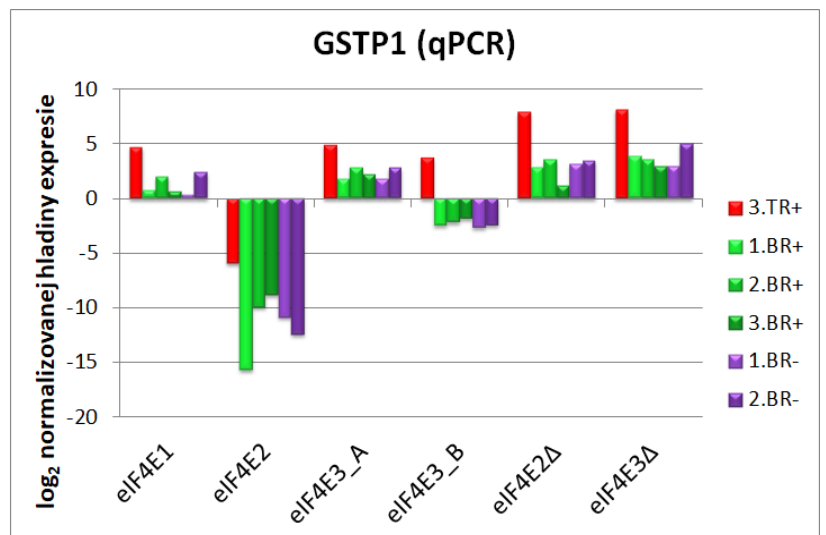
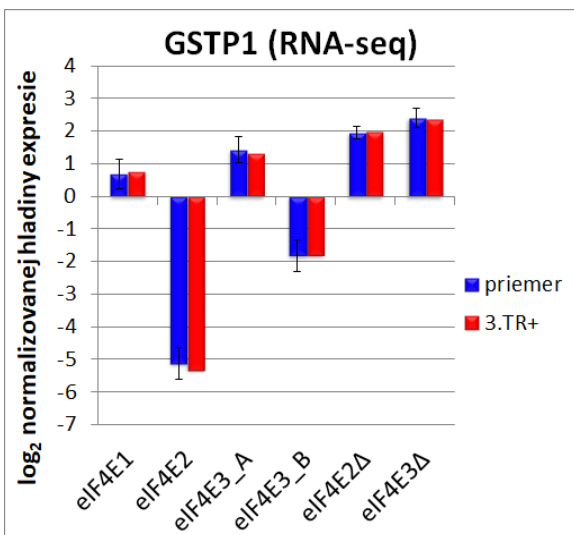
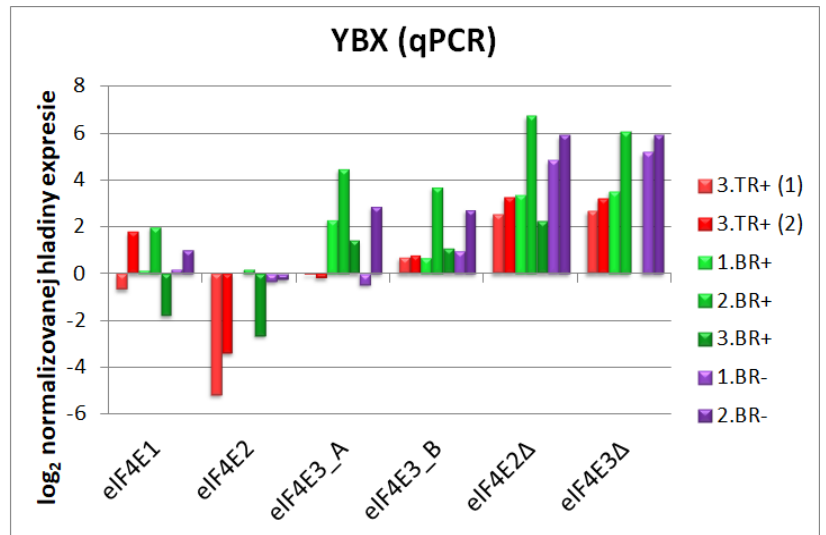
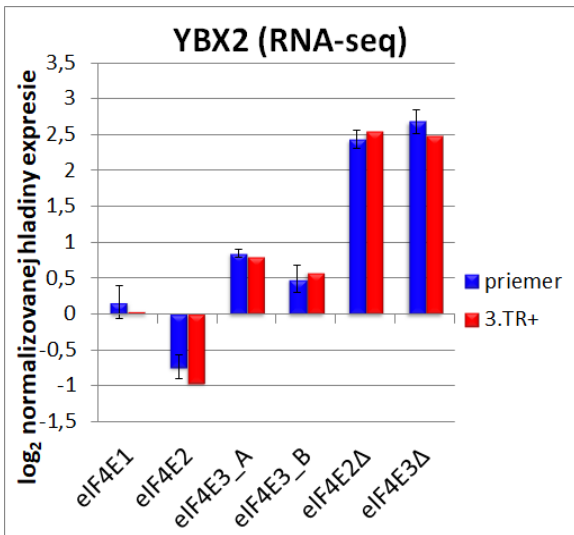
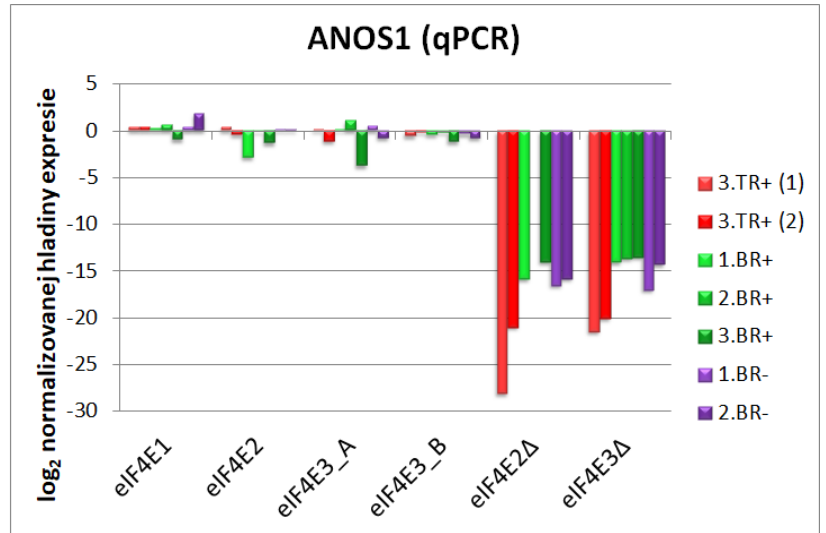
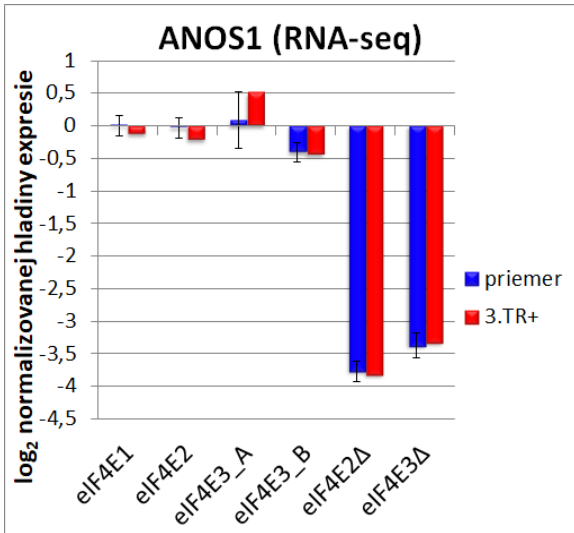
6.1.5.2 RT-qPCR validácia výsledkov RNA-seq pomocou nezávislých biologických opakovaní

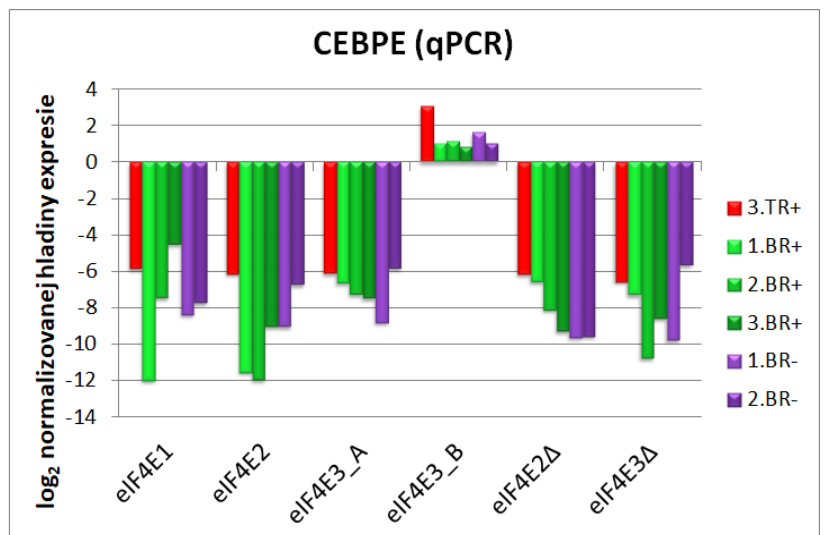
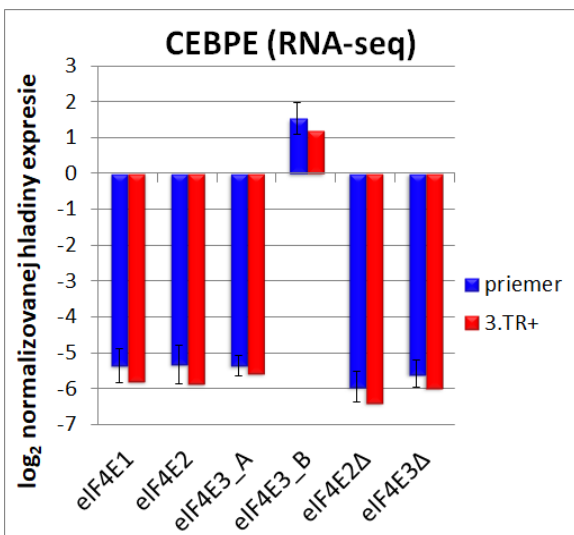
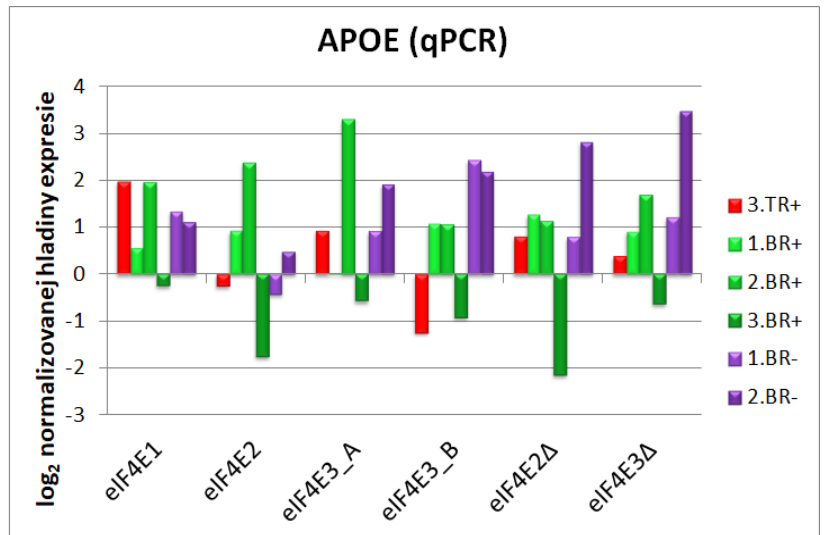
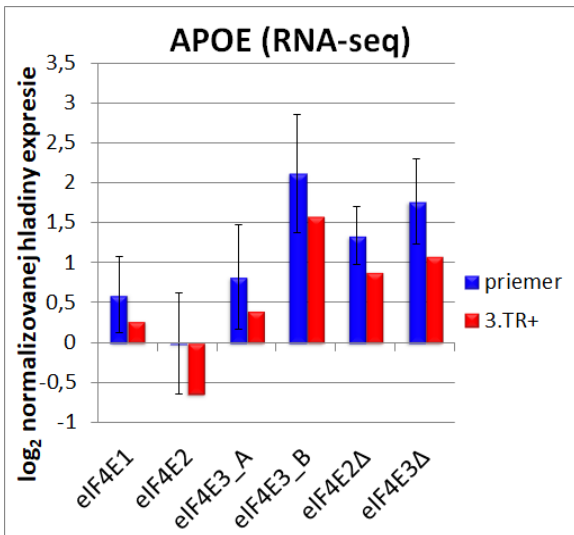
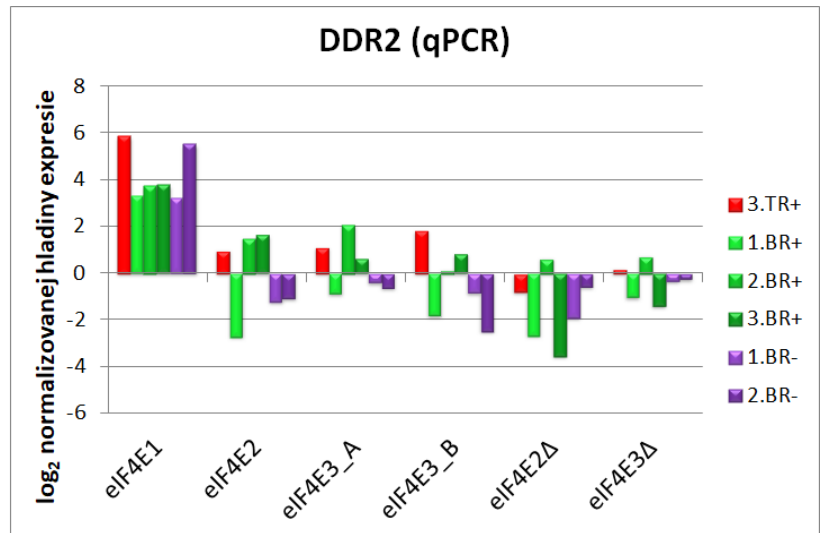
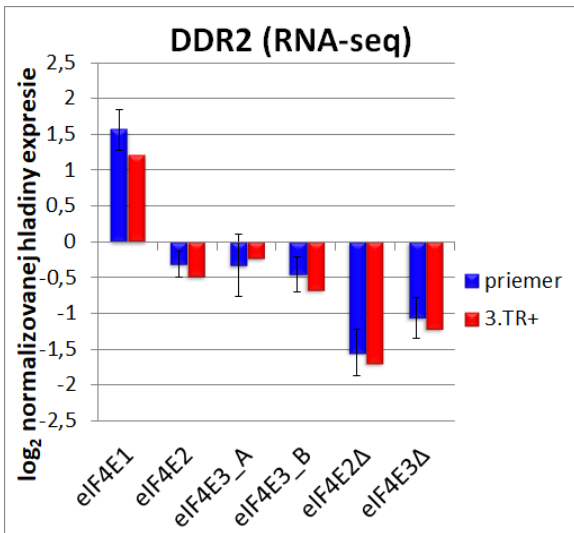
Obrázky 18 – 41 predstavujú paralelné porovnanie expresných profilov jednotlivých transkriptov naprieč sledovanými bunkovými líniami. Konkrétne sa jedná o zmeny normalizovanej hladiny transkriptov v jednotlivých bunkových líniah oproti rodičovskej. Na rozdiel od technickej validácie, táto časť práce bola zameraná na porovnávanie výsledkov RNA-seq so vzorkami biologických opakovaní (1.BR+, 2.BR+, 3.BR+, 1.BR- a 2.BR-) analyzovaných pomocou qPCR. Napriek očakávaným rozdielom v hladine expresie medzi indukovanými (BR+) a neindukovanými (BR-) biologickými opakovaniami, tento efekt pozorovaný nebol, alebo nebol zvlášť výrazný. Dôvodom mohla byť prítomnosť dostatočného množstva kontaminácie v podobe indukujúceho tetracyklínu v pracovnom prostredí. Vylúčiť nemôžeme ani možnosť, že medzi modifikovanou hladinou translačných iniciačných faktorov eIF4E a zmenou hladín konkrétnych transkriptov v skutočnosti nie je rozdiel a pozorovaná difereenciálna expresia je len artefakt vzniknutý v dôsledku klonálnej selekcie bunkových línii pri ich odvodzovaní. Nezávislé indukované biologické opakovania (BR+) zas boli v analýze zahrnuté, aby sa zistilo či vôbec a prípadne do akej miery sú výsledky sekvenovania (RNA-seq) reprodukovateľné. Vo väčšine prípadov sú zmeny hladiny transkriptov určené pomocou qPCR vo vzorkách BR+ podobné ako v 3.TR+, aj keď je medzi biologickými opakovaniami prítomná pomerne značná variabilita. Výsledky RNA-seq boli teda pomocou RT-qPCR validované aj pri použití nezávislých biologických opakovaní.

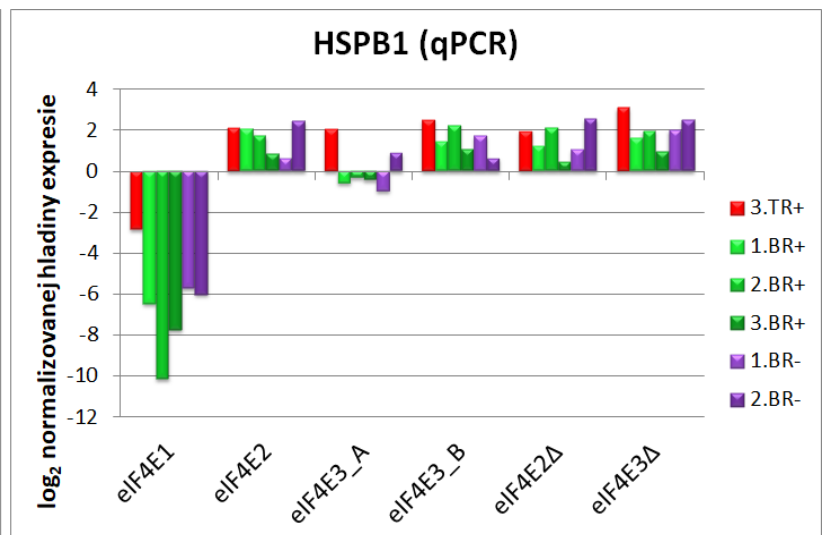
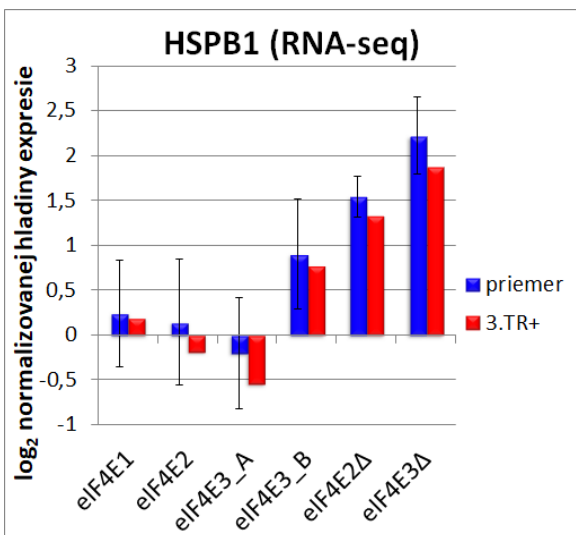
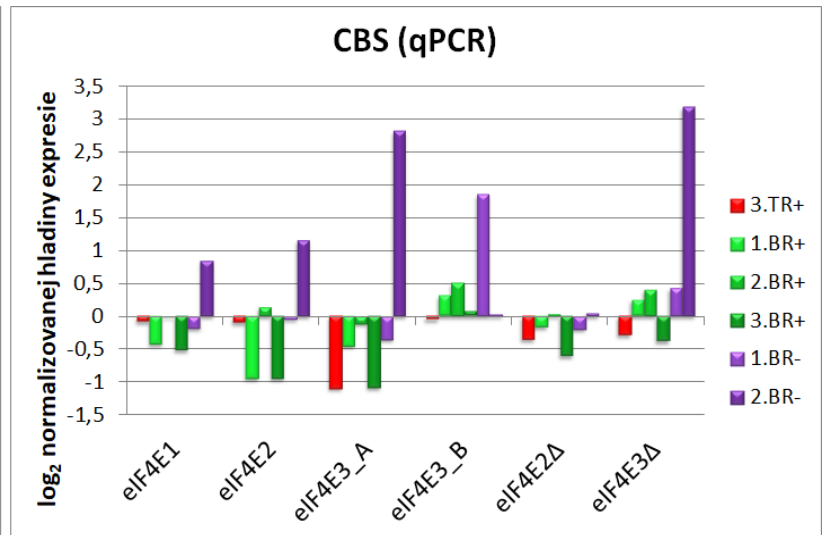
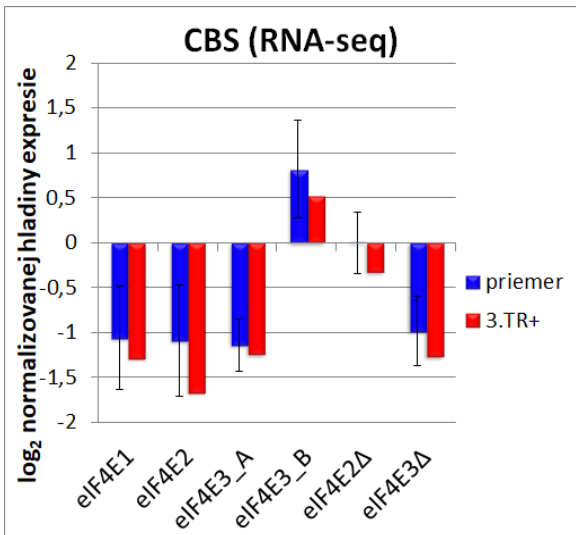
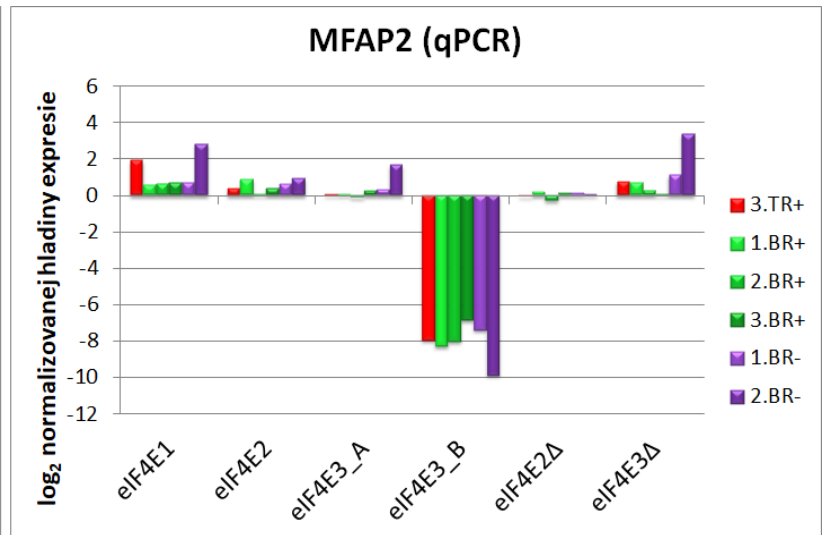
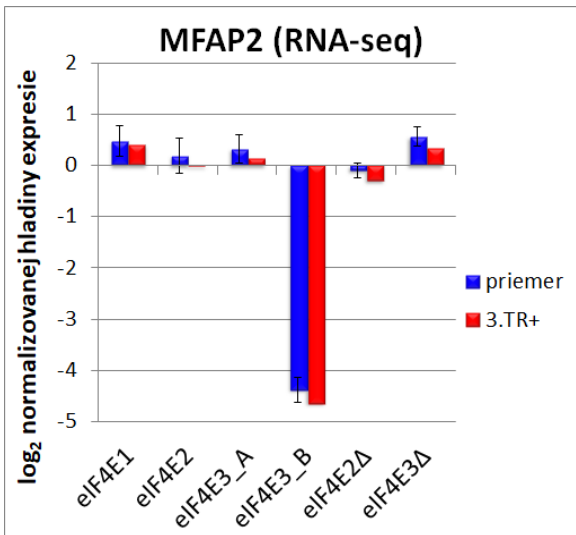
Druhé porovnanie spolu so štatistickým vyhodnotením (podľa kapitoly Metódy – 5.10 Štatistické vyhodnotenie dát) bolo urobené pomocou relatívnych hladín transkriptov získaných pomocou RT-qPCR a relatívnych hladín transkriptov po ekvivalentnej úprave dát z RNA-seq/FPKM (Obrázok 42 – 65). Expresné profily transkriptov v tomto porovnaní tiež vykazovali podobný priebeh medzi metódami, čo podporuje úspešnosť validácie. Štatistická analýza ukázala, že dáta získané pomocou RNA-seq sú spoľahlivejšie. Smerodatné odchýlky tiež potvrdzujú, že tieto dáta sú menej variabilné.

Obrázky 18 – 41. Porovnanie RNA-seq a qPCR. Na ľavej strane sú normalizované dáta z RNA-seq/FPKM (podľa kapitoly 4.9 Sekvenačné dáta, a.), ktoré sú reprezentované ako priemerné hodnoty z troch opakovaní so smerodatnými odchýlkami a samostatne tretie technické opakovanie indukované tetracyklínom (3.TR+). Vpravo sú zas príslušné normalizované dáta z qPCR v šiestich opakovaníach (3.TR+, 1.BR+, 2.BR+, 3.BR+, 1.BR- a 2.BR-) pre každú bunkovú líniu. Expresia jednotlivých transkriptov je v oboch prípadoch reprezentovaná ako \log_2 normalizovanej zmeny hladiny v jednotlivých bunkových líniách v porovnaní s rodičovskou líniou.

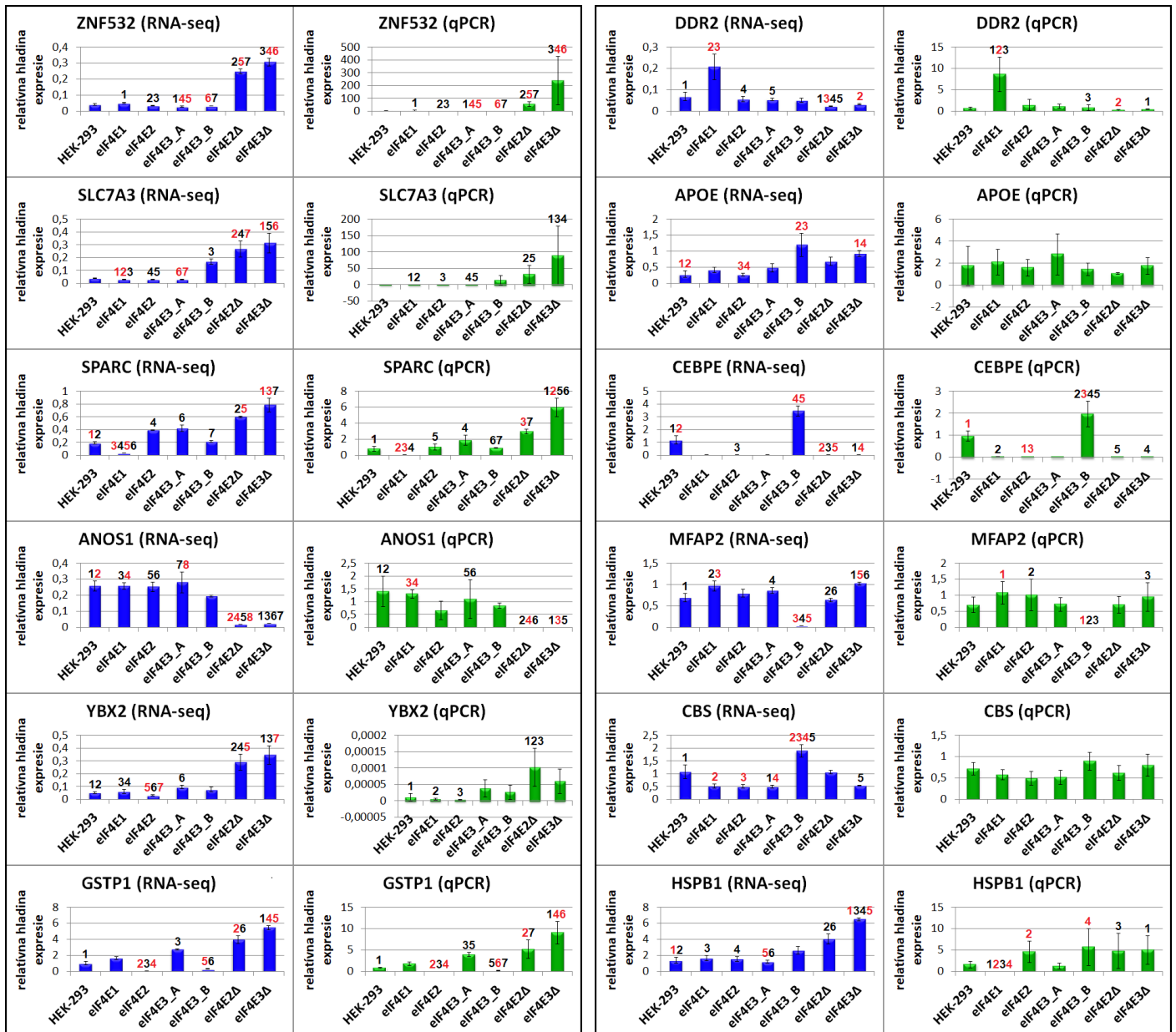








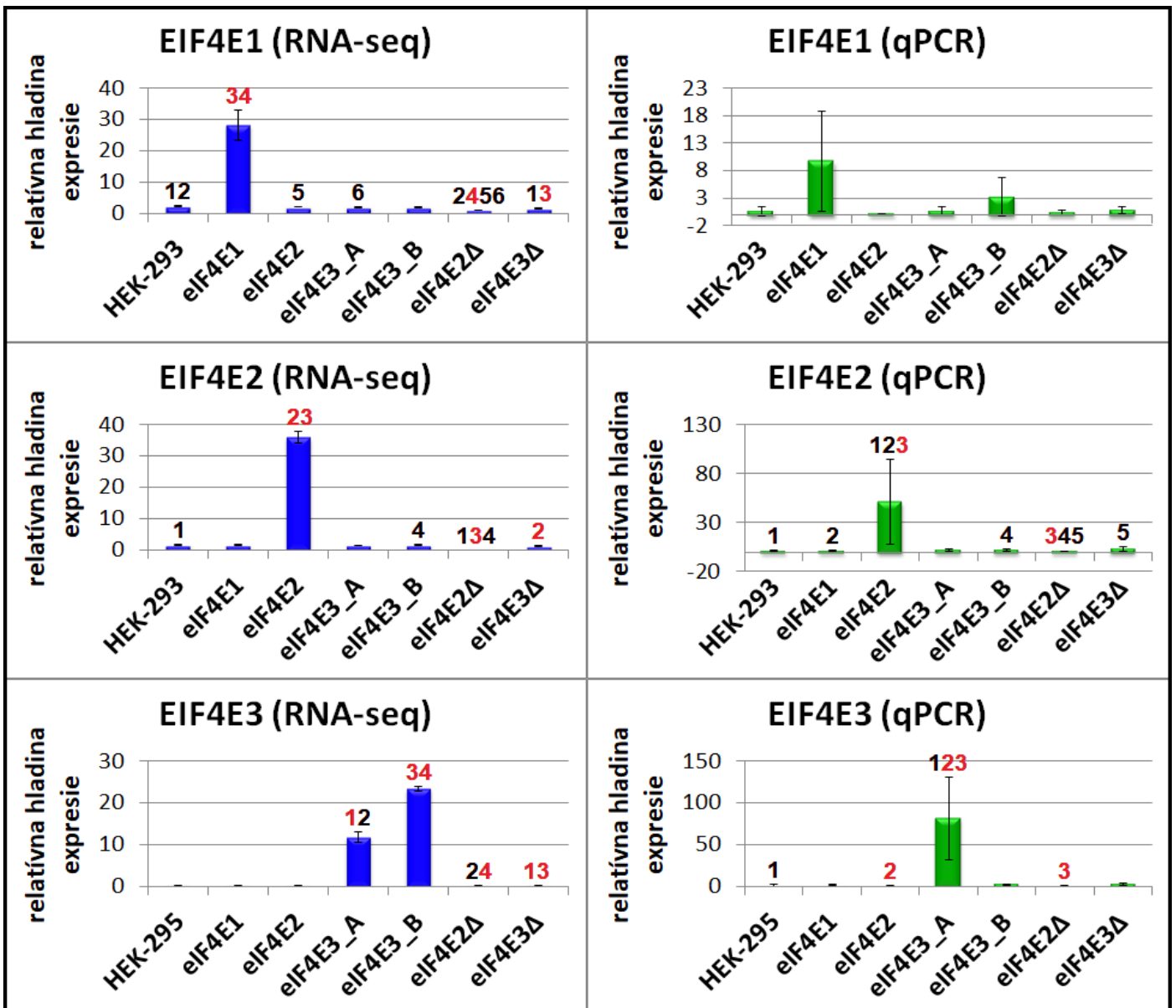
Obrázky 42 – 65. Zdôraznenie štatisticky významných rozdielov v expresii transkriptov medzi sledovanými bunkovými líniami na základe výsledkov RNA-seq a qPCR. Paralelne sú zobrazené dvojice dát získaných analýzou RNA-seq a qPCR. Hladiny transkriptov v prípade qPCR predstavujú relatívne hodnoty expície a pre RNA-seq analogicky ošetrené relatívne hodnoty FPKM. Obidva typy dát boli vytvorené spriemerovaním pôvodných hodnôt troch replikátov a chybové úsečky predstavujú smerodajné odchýlky. Zhodné čísla nad stĺpcami dát v rámci grafu reprezentujú štatisticky významné rozdiely hladiny transkriptu medzi danými dvojicami bunkových línii. Čierne čísla znamenajú, že rozdiel je významný na hladine 0,05 a červené značia hladinu významnosti 0,01.



6.1.6 Kvantifikácia transkriptov rodiny 4E

Množstvo transkriptov translačných iniciačných faktorov 4E v jednotlivých bunkových líniiach bolo určované použitím RT-qPCR a dát RNA-seq/FPKM (Obrázky 66 – 71). Špecifická nadexpresia členov proteínovej rodiny 4E bola na úrovni ich transkriptov overená nezávisle pomocou RT-qPCR aj RNA-seq. Jediný faktor, ktorého transkript nebol potvrdený výsledkami RT-qPCR (na rozdiel od RNA-seq) bol EIF4E3_B.

Obrázky 66 – 71. Kvantifikácia transkriptov proteínovej rodiny 4E pomocou RNA-seq a qPCR. Paralelne sú zobrazené dvojice dát získaných analýzou RNA-seq a qPCR. Hladiny transkriptov faktorov 4E v prípade qPCR predstavujú relatívne hodnoty exprese a pre RNA-seq analogicky ošetrené relatívne hodnoty FPKM. Obidva typy dát boli vytvorené spriemerovaním pôvodných hodnôt troch replikátov a chybové úsečky predstavujú smerodajné odchýlky. Zhodné čísla nad stĺpcami dát v rámci grafu reprezentujú štatisticky významné rozdiely hladiny transkriptu 4E medzi danými dvojicami bunkových línii. Čierne čísla znamenajú, že rozdiel je významný na hladine 0,05 a červené značia hladinu významnosti 0,01.



6.2 Analýza obohatenia génovej sady (GSEA)

Analýza obohatenia génovej sady (GSEA) bola použitá na vyhodnotenie sekvenačných dát a identifikáciu funkčných kategórií podľa génov, ktoré vykazujú diferenciálnu expresiu medzi rodičovskou bunkovou líniou a líniami od nej odvodenými. Základná myšlienka GSEA spočíva v tom, že na základe zoznamu génov (transkriptov) vytvorí určitý biologický obraz v podobe ovplyvnených kategórií. Zoznamy transkriptov s príslušnými relatívnymi hodnotami odrážajúcimi zmeny ich hladiny medzi bunkovými líniami (originálne v literatúre označované ako „ranked list“) sa používajú na vytvorenie kategórií, s ktorými sú dané gény podľa známych dát asociované. Identifikované kategórie je ďalej možné interpretovať na základe toho, či sú ich gény v sekvenačných dátach z bunkových línii viac alebo menej zastúpené oproti dátam z rodičovskej línie.

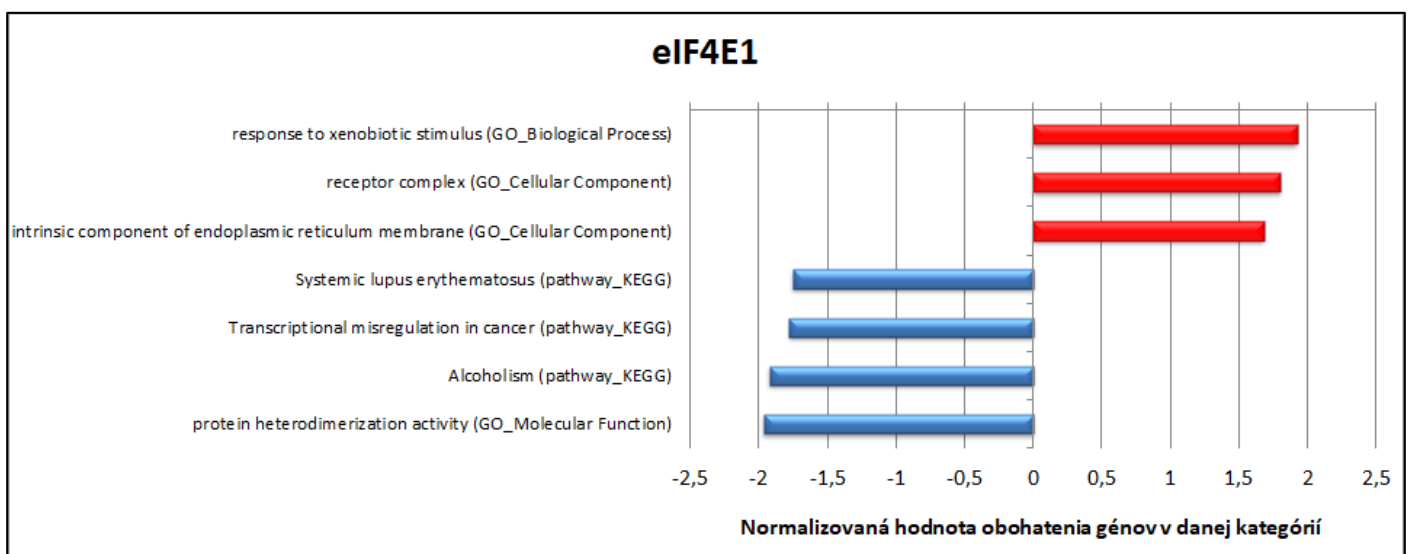
6.2.1 Analýza obohatenia génovej sady s použitím dát z RNA-seq

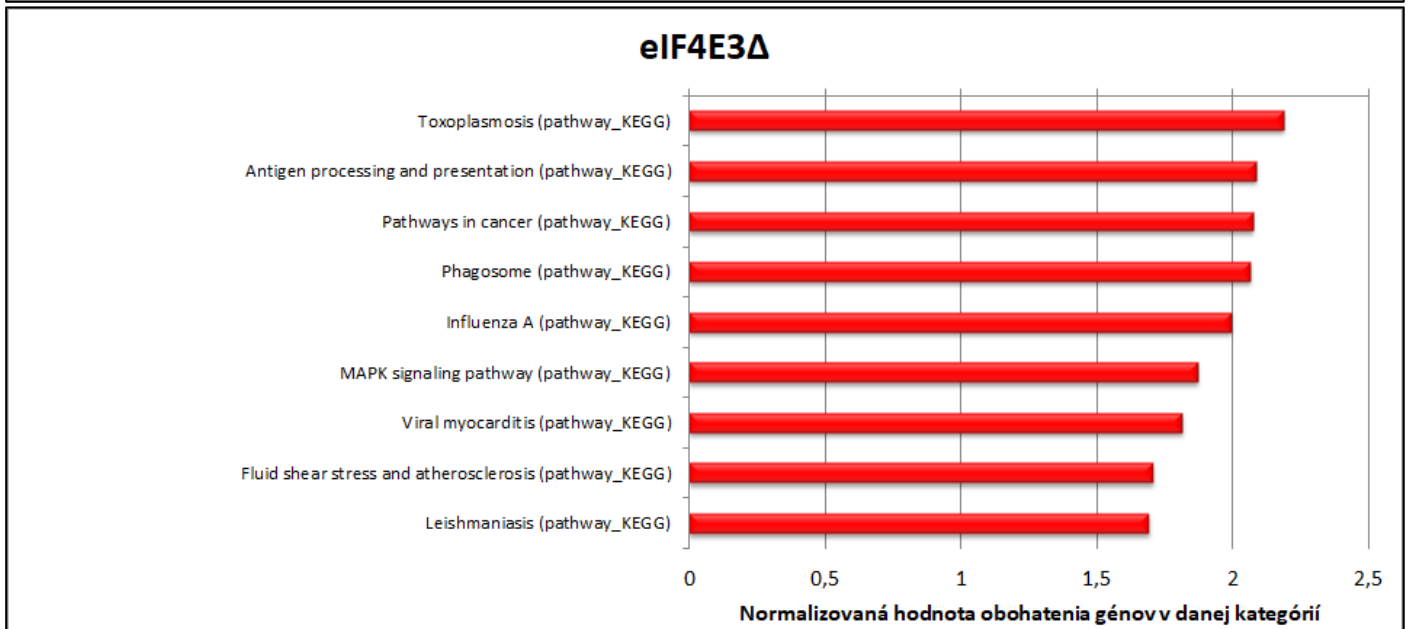
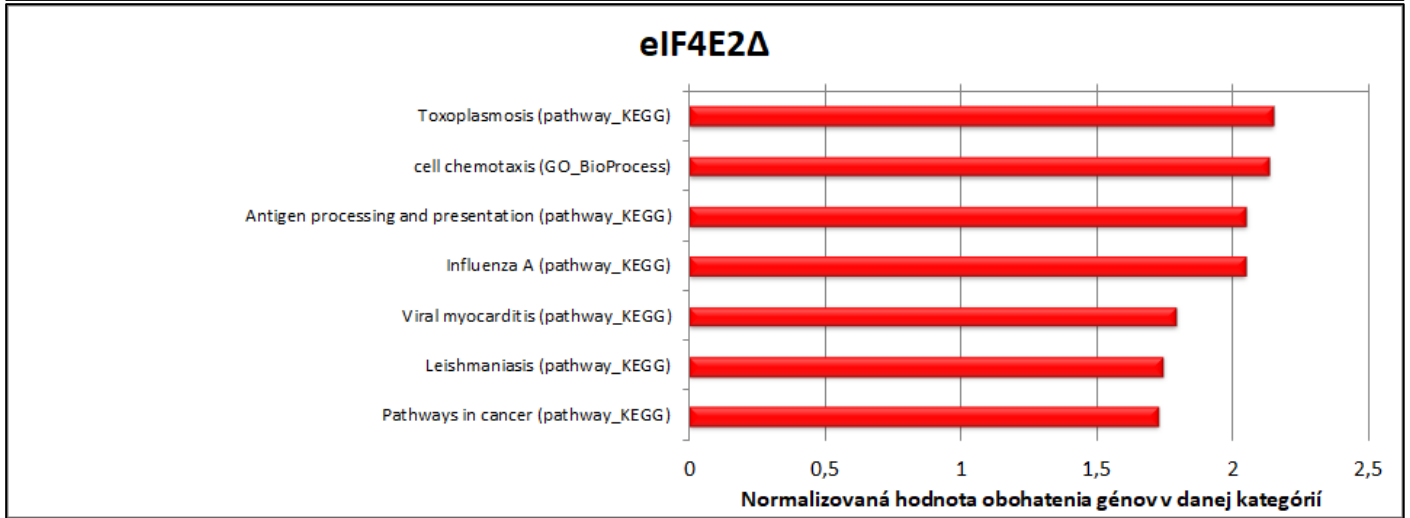
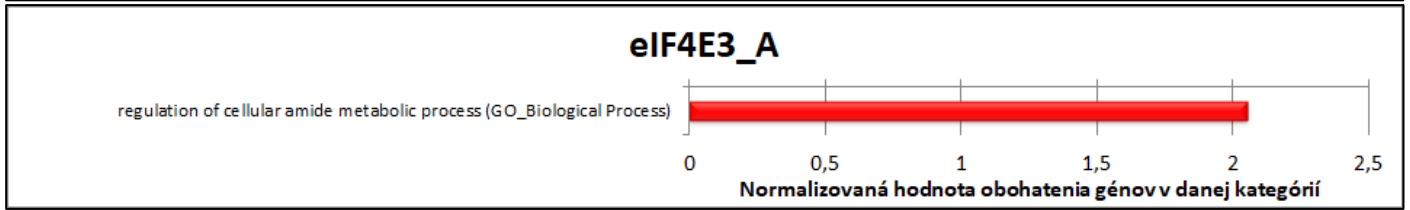
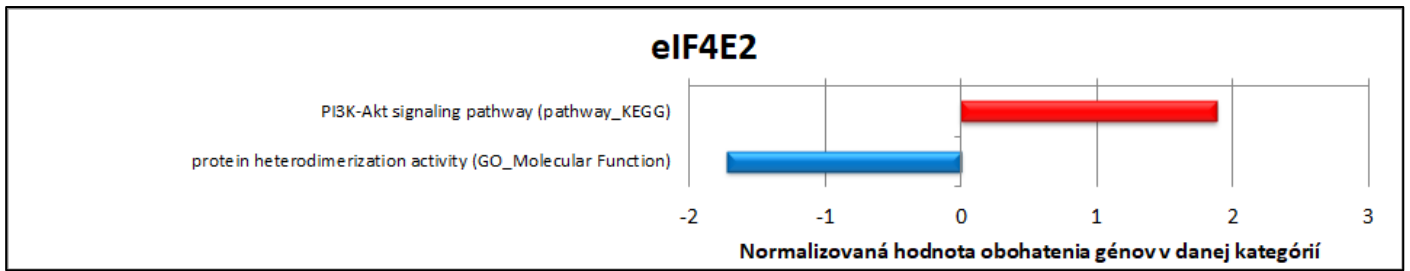
Pre analýzu boli použité sekvenačné dáta z celkovej 3'-poly(A)RNA (RNA-seq/ALDEx2 – vid' Materiál, 4.9 Sekvenačné dáta, a.) všetkých siedmich bunkových línii. Tieto dáta boli získané a vyhodnotené troma rôznymi spôsobmi: **1.)** zmena hladiny transkriptov génov v bunkových líniiach eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3_A, eIF4E3_B, eIF4E2Δ a eIF4E3Δ v porovnaní s rodičovskou líniou HEK-293 (Flp-In, T-REx) (Obrázky 72 – 76); **2.)** zmena hladiny transkriptov v bunkových líniiach eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3_A a eIF4E3_B v porovnaní s rodičovskou líniou HEK-293 (Flp-In, T-REx) (Obrázky 72 – 76); **3.)** zmena hladiny transkriptov v bunkových líniiach eIF4E2Δ a eIF4E3Δ v porovnaní s rodičovskou líniou HEK-293 (Flp-In, T-REx) (Obrázky 72 – 76). Výsledkom boli zoznamy transkriptov génov tvorené dvoma stĺpcami – v prvom názov génu a v druhom príslušná hodnota \log_2FC . Takéto zoznamy boli následne vložené do online analytického nástroja WebGestalt (Liao *et al.*, 2019) a pomocou metódy Analýza obohatenia génovej sady (GSEA) boli dáta analyzované. Použité funkčné databázy boli: „geneontology“ (GO), kde boli postupne analyzované databázy Biologický proces, Bunkový komponent a Molekulárna funkcia; „pathway“, kde sa pre analýzu použila databáza KEGG. Táto analýza pracovala so štatisticky významne diferenciálne exprimovanými transkriptami génov (v jednotlivých sledovaných bunkových líniiach vzhľadom ku rodičovskej línii) a na základe nich vytvorila určité funkčné kategórie,

ktorých hodnoty FDR („false discovery rate“) nepresiahli 0,1. Táto hodnota bola zvolená ako rozumný kompromis medzi získaním dostatočného množstva dát a selekciou na ich spoľahlivosť aj podľa príslušných p hodnôt. To, že GSEA vytvorila na základe vstupných dát jednotlivé kategórie znamená, že dané kategórie sú pravdepodobne nejakým spôsobom ovplyvnené a to vytvára predpoklad výskytu funkčných rozdielov medzi porovnávanými bunkovými líniami. K týmto kategóriám je vždy priradená hodnota skóre obohatenia (v literatúre obvykle označovaná ako „enrichment score“). Táto hodnota je vždy buď kladná alebo záporná, čo poukazuje na to, že transkripty génov asociované s konkrétnou kategóriou sú v sledovanej bunkovej línii oproti rodičovskej obohatené alebo naopak.

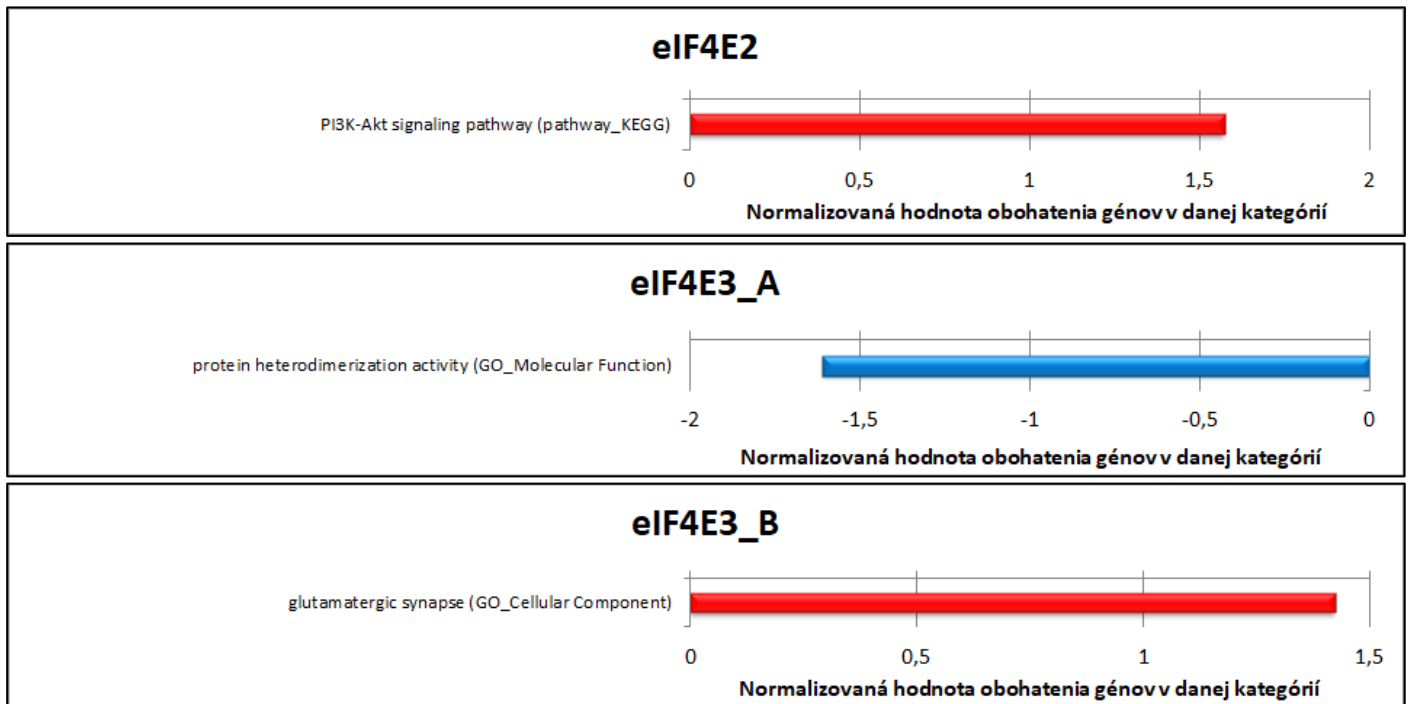
Kompletné výsledky GSEA je možné nájsť v podobe tabuliek programu Excel v Prílohe 1. Všeobecne je možné zhodnotiť, že identifikované kategórie (Obrázky 72 - 81) priamo nesúviseli so známymi funkciami translačných iniciačných faktorov 4E. Týchto kategórií však bolo málo. Tento výsledok nie je prekvapujúci vzhľadom k tomu, že neexistuje žiadny zrejmy dôvod, prečo by malo špecifické zvýšenie hladiny alebo absencia sledovaných faktorov 4E v jednotlivých bunkových líniiach nejakým konkrétnym a očakávateľným spôsobom zásadne ovplyvňovať celkový transkriptom línii.

Obrázky 72 – 76. Kategórie génov identifikované pomocou GSEA u jednotlivých eukaryotických iniciačných faktorov 4E po porovnaní všetkých bunkových línii s rodičovskou líniiou. Vstupné dáta pre analýzu boli vyhodnotené spôsobom 1. popísaným v texte. Grafy znázorňujú výsledky GSEA v podobe kategórií génov a ich príslušných normalizovaných hodnôt obohatenia (normalized enrichment score). Kladné hodnoty sú vyobrazené červenou a záporné modrou farbou. Vľavo sa nachádzajú korešpondujúce kategórie a v zátvorke vždy databázy z ktorých dané kategórie pochádzajú. Názvy kategórií aj databáz sú uvádzané v pôvodnom anglickom znení.

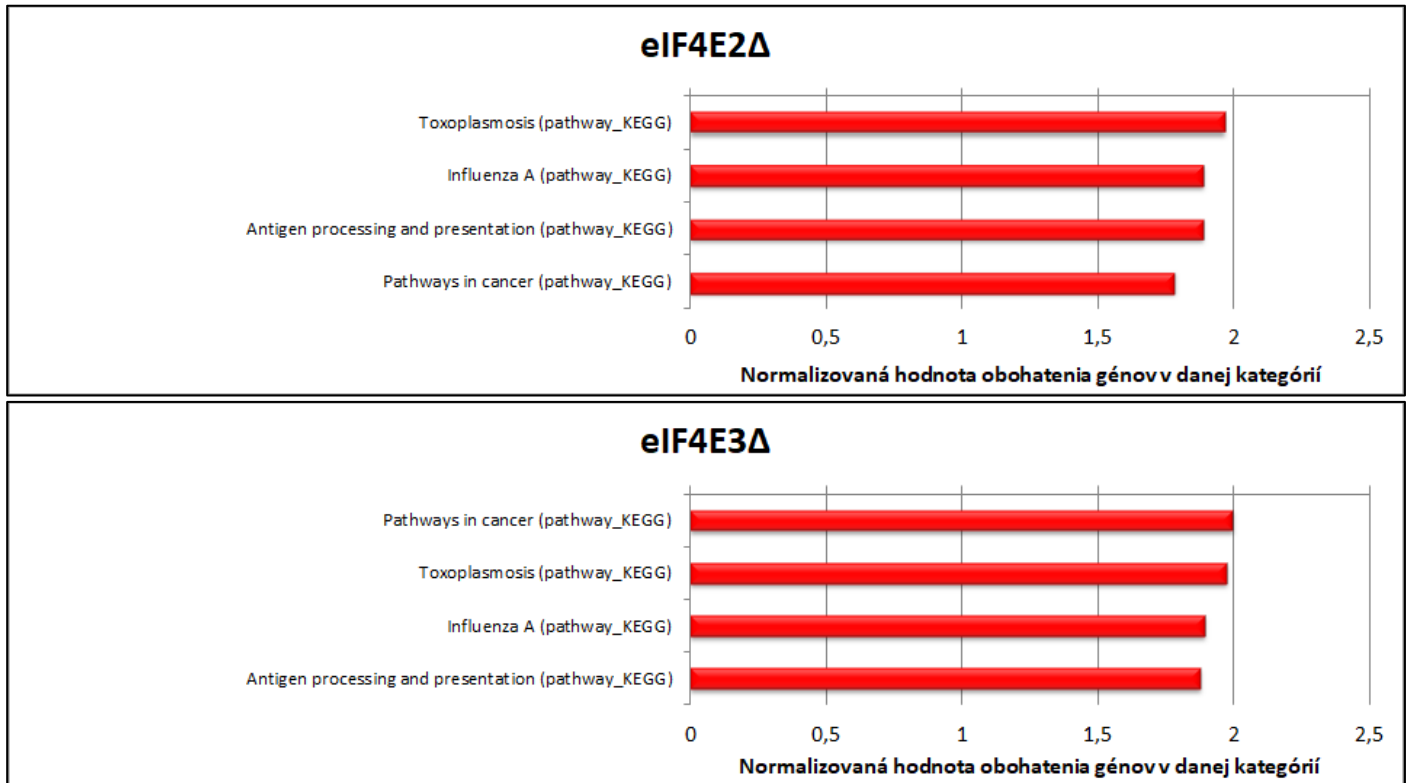




Obrázky 77 – 79. Kategórie génov identifikované pomocou GSEA u jednotlivých eukaryotických iniciačných faktorov 4E po porovnaní bunkových línií eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3_A a eIF4E3_B s rodičovskou líniou. Vstupné dáta pre analýzu boli vyhodnotené spôsobom 2. popísaným v texte. Grafy znázorňujú výsledky GSEA v podobe kategórií génov a ich príslušných normalizovaných hodnôt obohatenia (normalized enrichment score). Kladné hodnoty sú vyobrazené červenou a záporné modrou farbou. Vľavo sa nachádzajú korešpondujúce kategórie a v zátvorke vždy databázy z ktorých dané kategórie pochádzajú. Názvy kategórií aj databáz sú uvádzané v pôvodnom anglickom znení.



Obrázky 80 a 81. Kategórie génov identifikované pomocou GSEA u jednotlivých eukaryotických iniciačných faktorov 4E po porovnaní bunkových línií eIF4E2Δ a eIF4E3Δ s rodičovskou líniou. Vstupné dáta pre analýzu boli vyhodnotené spôsobom 3. popísaným v texte. Grafy znázorňujú výsledky GSEA v podobe kategórií génov a ich príslušných normalizovaných hodnôt obohatenia (normalized enrichment score). Vľavo sa nachádzajú korešpondujúce kategórie a v zátvorke vždy databázy z ktorých dané kategórie pochádzajú. Názvy kategórií aj databáz sú uvádzané v pôvodnom anglickom znení.



6.2.2 Analýza obohatenia génovej sady s použitím dát z RIP-seq

Postup a princípy analýzy boli v zásade zhodné s tými popísanými v predchádzajúcej kapitole (6.2.1) s tým, že vstupné dáta v tomto prípade pochádzali zo sekvenovania imunoprecipitovanej RNA (RIP-seq). Sledované boli len dôsledky zmien hladiny imunoprecipitovaných transkriptov v bunkových líniách eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3_A a eIF4E3_B v porovnaní s rodičovskou líniou HEK-293 (Flp-In, T-REx). Pomocou GSEA identifikované funkčné kategórie boli vytvorené na základe rozdielov hladín transkriptov imunoprecipitovaných pomocou jednotlivých eukaryotických translačných iniciačných faktorov 4E v jednotlivých líniách oproti rodičovskej línii. Diferenciálna hladina konkrétneho transkriptu môže znamenať, že daný transkript vykazuje špecificky zvýšenú alebo špecificky zníženú schopnosť viazať sa na konkrétny translačný iniciačný faktor 4E. Identifikované funkčné kategórie by teda mohli odhaľovať funkčný vzťah medzi jednotlivými translačnými iniciačnými faktormi a ich biologickými funkciami.

Tabuľky 7 – 21 znázorňujú identifikované kategórie génov pre jednotlivé bunkové línie a funkčné databázy zoradené podľa normalizovanej hodnoty obohatenia (normalized enrichment score). Celkové množstvo kategórií je príliš veľké a presahuje možnosti kompletnej prezentácie dát v tejto diplomovej práci. Z tohto dôvodu boli dáta ďalej filtrované podľa normalizovaných hodnôt obohatenia na > 2 a < -2 . Takéto najvýraznejšie obohatené kategórie sú ďalej prezentované v podobe tabuliek. Kompletné výsledky GSEA sú dostupné v Prílohe 2. Kategórie génov, ktoré boli obohatené v imunoprecipitovanej RNA viazanej na jednotlivé translačné iniciačné faktory 4E, súviseli v niektorých prípadoch so známymi funkciami týchto faktorov. Ďalšie kategórie by zas mohli naznačovať spojitost' členov proteínovej rodiny 4E s novými biologicky relevantnými funkciami.

Tabuľky 7 - 10. Kategórie z jednotlivých databáz identifikované pomocou GSEA u eIF4E1. Prezentované dáta boli získané s použitím databáz „geneontology“ (GO), konkrétne Biologický proces, Bunkový komponent a Molekulárna funkcia; a ďalej databázy „pathway“ – KEGG. Tabuľky obsahujú výsledky GSEA zoradené podľa normalizovanej hodnoty obohatenia a filtrované na túto hodnotu väčšiu ako 2 a menšiu ako -2. Kategórie s významne obohatenými génmi sú zvýraznené ružovou farbou a kategórie s nižším zastúpením génov modrou farbou. Zelenou farbou sú podfarbené hodnoty FDR < 0,01.

kategória (GO_Biologický proces)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
cytochrome complex assembly	2,698	0	0,00051398
protein localization to endoplasmic reticulum	2,366	0	0,00025699
mitochondrial respiratory chain complex assembly	2,357	0	0,00034266
translational initiation	2,061	0	0,01400606
establishment of protein localization to membrane	2,058	0	0,01171883
peripheral nervous system development	-2,002	0,00404858	0,03607996
regulation of neuron projection development	-2,010	0	0,03501146
endoderm development	-2,032	0	0,03114
hindbrain development	-2,035	0	0,03115958
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	-2,035	0	0,03182132
regulation of chromosome organization	-2,060	0	0,02808143
nucleus localization	-2,089	0,00325733	0,02297627
spinal cord development	-2,092	0	0,02330645
amyloid-beta clearance	-2,113	0	0,02143921
sensory system development	-2,114	0	0,0216547
beta-catenin-TCF complex assembly	-2,144	0	0,01860919
regulation of developmental growth	-2,150	0	0,0190447
myeloid cell differentiation	-2,156	0	0,01861469
movement in environment of other organism involved in symbiotic interaction	-2,170	0	0,01724049
response to interleukin-7	-2,226	0,0034965	0,01199311
semaphorin-plexin signaling pathway	-2,232	0	0,011837
respiratory system development	-2,234	0	0,01223157
dendrite development	-2,254	0	0,01091206
neuron projection organization	-2,308	0	0,00733413
stem cell differentiation	-2,342	0	0,00511207
extracellular regulation of signal transduction	-2,356	0	0,00479077
microtubule cytoskeleton organization involved in mitosis	-2,384	0	0,00444376
rhythmic process	-2,448	0	0,00280541
cell-substrate adhesion	-2,451	0	0,00278101
protein autophosphorylation	-2,466	0	0,0027544
response to BMP	-2,485	0	0,00240463
regulation of cell morphogenesis	-2,544	0	0,00151492
morphogenesis of an epithelium	-2,556	0	0,00159465
bone development	-2,576	0	0,00130919
hematopoietic progenitor cell differentiation	-2,609	0	0,00079211
neural tube development	-2,625	0	0,00063122
spindle organization	-2,628	0	0,0006733
synapse organization	-2,643	0	0,00048093
neuron migration	-2,646	0	0,00051792
intermediate filament-based process	-2,661	0	0,00028054
tube formation	-2,664	0	0,00030604
gliogenesis	-2,668	0	0,00033665
regulation of synapse structure or activity	-2,713	0	0
axon development	-2,778	0	0
epithelial cell development	-2,796	0	0
extracellular structure organization	-2,805	0	0
developmental growth involved in morphogenesis	-2,821	0	0
artery development	-3,045	0	0
neuron projection guidance	-3,085	0	0
cell junction organization	-3,104	0	0
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	-3,155	0	0

kategória (GO_Bunkový komponent)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
ribosome	2,516	0	0
mitochondrial inner membrane	2,310	0	0,000241
mitochondrial protein complex	2,263	0	0,000482
cytosolic part	2,198	0	0,000724
mitochondrial membrane part	2,107	0	0,001544
cytoplasmic region	-2,027	0	0,013007
nuclear chromatin	-2,029	0	0,013692
microtubule	-2,093	0	0,00916
Schaffer collateral - CA1 synapse	-2,094	0,00729927	0,009483
basolateral plasma membrane	-2,114	0	0,008473
cell leading edge	-2,122	0	0,008549
vacuolar lumen	-2,122	0	0,00916
nuclear periphery	-2,219	0	0,006201
neuronal cell body	-2,289	0	0,00458
pigment granule	-2,315	0	0,003331
lateral plasma membrane	-2,325	0,00796813	0,003664
site of polarized growth	-2,387	0	0,003257
myelin sheath	-2,400	0	0,003664
extracellular matrix	-2,511	0	0,001047
collagen trimer	-2,585	0	0,001221
actin cytoskeleton	-2,608	0	0,001466
endoplasmic reticulum lumen	-2,712	0	0,000916
receptor complex	-2,727	0	0,001221
cell-cell junction	-2,914	0	0
ATPase complex	-2,934	0	0

kategória (GO_Molekulárna funkcia)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
structural constituent of ribosome	2,656	0	0
electron transfer activity	2,168	0	0,001931
protein C-terminus binding	-2,002	0	0,024364
histone deacetylase binding	-2,013	0,00680272	0,023554
molecular adaptor activity	-2,049	0	0,019703
ADP binding	-2,077	0,00367647	0,015775
growth factor binding	-2,091	0	0,015005
chromatin DNA binding	-2,113	0	0,013171
ankyrin binding	-2,139	0	0,010558
SMAD binding	-2,163	0,00492611	0,010018
insulin receptor binding	-2,172	0	0,009913
tau protein binding	-2,206	0	0,008222
motor activity	-2,219	0	0,008364
lipoprotein particle receptor binding	-2,242	0	0,006741
receptor inhibitor activity	-2,328	0	0,003186
calmodulin binding	-2,421	0	0,001601
phosphatidylinositol 3-kinase binding	-2,441	0	0,001735
transmembrane receptor protein kinase activity	-2,481	0	0,001081
double-stranded RNA binding	-2,491	0	0,000595
ligase activity	-2,527	0	0
proteoglycan binding	-2,602	0	0
structural constituent of cytoskeleton	-2,809	0	0
histone binding	-2,888	0	0
actin binding	-3,184	0	0
extracellular matrix structural constituent	-3,285	0	0
cell adhesion molecule binding	-3,313	0	0
ATPase activity	-3,692	0	0
helicase activity	-3,966	0	0

kategória (pathway_KEGG)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
Ribosome	2,556	0	0
Oxidative phosphorylation	2,114	0	0,005097634
Thyroid hormone signaling pathway	-2,017	0,005714286	0,029617251
Pancreatic secretion	-2,031	0,003460208	0,028683521
Amoebiasis	-2,058	0,007380074	0,025694494
Glycolysis / Gluconeogenesis	-2,107	0	0,019254957
Adherens junction	-2,135	0	0,017480025
Type II diabetes mellitus	-2,137	0,003584229	0,018565386
Carbon metabolism	-2,178	0	0,014177204
Leukocyte transendothelial migration	-2,252	0	0,008243031
cGMP-PKG signaling pathway	-2,357	0	0,003713077
Focal adhesion	-2,500	0	0,001392404
Lysine degradation	-2,554	0	0,000954791
Biosynthesis of amino acids	-2,556	0	0,001113923
MicroRNAs in cancer	-2,594	0	0,001336708
Proteoglycans in cancer	-2,632	0	0,001113923
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	-2,680	0	0,000742615
Protein digestion and absorption	-2,889	0	0,001113923
ECM-receptor interaction	-3,078	0	0

Tabuľky 11 – 14. Kategórie z jednotlivých databáz identifikované pomocou GSEA u eIF4E2. Prezentované dáta boli získané s použitím databáz „geneontology“ (GO), konkrétne Biologický proces, Bunkový komponent a Molekulárna funkcia; a ďalej databázy „pathway“ – KEGG. Tabuľky obsahujú výsledky GSEA zoradené podľa normalizovanej hodnoty obohatenia a filtrované na túto hodnotu väčšiu ako 2 a menšiu ako -2. Kategórie s významne obohatenými génmi sú zvýraznené ružovou farbou a kategórie s nižším zastúpením génov modrou farbou. Zelenou farbou sú podfarbené hodnoty FDR < 0,01.

kategória (GO_Biologický proces)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
embryonic organ development	2,423	0	0
pattern specification process	2,333	0	0
embryonic skeletal system development	2,293	0	0
cell fate commitment	2,067	0	0,004031
dicarboxylic acid metabolic process	-2,014	0	0,006504
transcription by RNA polymerase III	-2,018	0	0,006684
nucleoside monophosphate metabolic process	-2,036	0	0,005667
mitochondrial respiratory chain complex assembly	-2,057	0	0,00482
post-translational protein modification	-2,070	0	0,004345
cellular modified amino acid metabolic process	-2,094	0	0,003002
generation of precursor metabolites and energy	-2,114	0	0,002104
NADH dehydrogenase complex assembly	-2,122	0	0,001878
cofactor catabolic process	-2,123	0	0,002066
nucleoside triphosphate metabolic process	-2,152	0	0,001658
cellular amino acid metabolic process	-2,158	0	0,001722
drug catabolic process	-2,180	0	0,000656
ribonucleotide metabolic process	-2,224	0	0,000191
antibiotic metabolic process	-2,231	0	0,00023
mitochondrial gene expression	-2,270	0	0,000287
granulocyte activation	-2,295	0	0
neutrophil mediated immunity	-2,307	0	0
tRNA metabolic process	-2,331	0	0

kategória (GO_Bunkový komponent)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
transcription factor complex	2,008	0	0,006921
ribosome	-2,039	0	0,001527
pigment granule	-2,043	0	0,001636
primary lysosome	-2,050	0	0,001762
vesicle lumen	-2,059	0	0,001789
myelin sheath	-2,104	0	0,001041
vacuolar lumen	-2,152	0	0,000573
peptidase complex	-2,216	0	0,000477
ficolin-1-rich granule	-2,359	0	0
NADH dehydrogenase complex	-2,437	0	0
mitochondrial matrix	-2,488	0	0
oxidoreductase complex	-2,519	0	0
mitochondrial inner membrane	-2,572	0	0
respiratory chain	-2,595	0	0
mitochondrial protein complex	-2,641	0	0
mitochondrial membrane part	-2,651	0	0

kategória (GO_Molekulárna funkcia)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II-specific	2,511	0	0
DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific	2,262	0	0
transcription corepressor activity	2,158	0	0,000537
catalytic activity, acting on RNA	-2,016	0	0,003637
metal cluster binding	-2,019	0	0,004041
exopeptidase activity	-2,033	0	0,003919
oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	-2,101	0	0,001254
electron transfer activity	-2,139	0	0,001254
lyase activity	-2,183	0	0,000753
ligase activity	-2,186	0	0,000941
threonine-type peptidase activity	-2,218	0	0,000418
cofactor binding	-2,293	0	0
oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H	-2,381	0	0

kategória (pathway_KEGG)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
FoxO signaling pathway	2,200	0	0
MAPK signaling pathway	2,075	0	0,003941
Retrograde endocannabinoid signaling	-2,059	0	0,002963
Lysosome	-2,086	0,00236967	0,001935
Thermogenesis	-2,124	0	0,001019
Huntington disease	-2,153	0	0,000891
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	-2,178	0	0,000873
Carbon metabolism	-2,226	0	0,00017
Alzheimer disease	-2,432	0	0
Proteasome	-2,490	0	0
Oxidative phosphorylation	-2,601	0	0
Parkinson disease	-2,642	0	0
Metabolic pathways	-2,692	0	0

Tabuľky 15 – 18. Kategórie z jednotlivých databáz identifikované pomocou GSEA u eIF4E3_A. Prezentované dáta boli získané s použitím databáz „geneontology“ (GO), konkrétne Biologický proces, Bunkový komponent a Molekulárna funkcia; a ďalej databázy „pathway“ – KEGG. Tabuľky obsahujú výsledky GSEA zoradené podľa normalizovanej hodnoty obohatenia a filtrované na túto hodnotu väčšiu ako 2 a menšiu ako -2. Kategórie s významne obohatenými génmi sú zvýraznené ružovou farbou a kategórie s nižším zastúpením génov modrou farbou. Zelenou farbou sú podfarbené hodnoty FDR < 0,01.

kategória (GO_Biologický proces)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
regulation of protein stability	-2,003	0	0,016287
nucleobase metabolic process	-2,005	0,005	0,016249
macrophage activation	-2,024	0,00487805	0,014023
regulation of multi-organism process	-2,031	0	0,013354
movement in environment of other organism involved in symbiotic interaction	-2,039	0,00514139	0,012276
toxin transport	-2,040	0,00278552	0,012333
organophosphate catabolic process	-2,041	0	0,012526
response to leukemia inhibitory factor	-2,055	0	0,011005
negative regulation of catabolic process	-2,055	0	0,011225
post-translational protein modification	-2,055	0	0,011454
artery development	-2,065	0	0,011019
organic acid biosynthetic process	-2,077	0	0,00973
antibiotic metabolic process	-2,078	0	0,009791
multi-multicellular organism process	-2,078	0	0,010009
regulation of plasma lipoprotein particle levels	-2,078	0	0,010184
regulation of cellular amide metabolic process	-2,080	0	0,010313
nucleotide phosphorylation	-2,081	0	0,010504
amyloid-beta clearance	-2,086	0	0,010253
phagocytosis	-2,090	0	0,010163
ribose phosphate biosynthetic process	-2,104	0	0,008943
purine-containing compound biosynthetic process	-2,119	0	0,008023
interaction with symbiont	-2,121	0	0,008115
regulation of DNA metabolic process	-2,124	0	0,008148
protein folding	-2,134	0	0,007787
ribonucleoprotein complex subunit organization	-2,148	0	0,006793
immune response-regulating signaling pathway	-2,150	0	0,006859
regulation of protein catabolic process	-2,156	0	0,006713
RNA localization	-2,161	0	0,006408
gliogenesis	-2,170	0	0,005851
chaperone-mediated protein complex assembly	-2,192	0,00262467	0,005097
DNA biosynthetic process	-2,199	0	0,005114
response to antineoplastic agent	-2,220	0	0,004277
response to ammonium ion	-2,229	0	0,004086
DNA replication	-2,241	0	0,003788
DNA conformation change	-2,246	0	0,003465
ephrin receptor signaling pathway	-2,248	0	0,003515
protein localization to chromosome	-2,252	0	0,003465
microtubule cytoskeleton organization involved in mitosis	-2,274	0	0,00297
cell recognition	-2,294	0	0,002656
tricarboxylic acid metabolic process	-2,298	0	0,002674
ribonucleoprotein complex biogenesis	-2,305	0	0,002566
protein localization to nucleus	-2,308	0	0,002717
receptor-mediated endocytosis	-2,315	0	0,002887
cellular amino acid metabolic process	-2,317	0	0,00308
anatomical structure homeostasis	-2,341	0	0,00231
response to alkaloid	-2,373	0	0,00231
pyridine-containing compound metabolic process	-2,404	0	0,001732
regulation of chromosome organization	-2,407	0	0,00168
extracellular structure organization	-2,415	0	0,001848
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	-2,421	0	0,002053
neutrophil mediated immunity	-2,523	0	0,000577
pyruvate metabolic process	-2,525	0	0,00066
spindle organization	-2,544	0	0,00077
response to anesthetic	-2,555	0	0,000924
cell junction organization	-2,596	0	0,000577
granulocyte activation	-2,617	0	0,00077
telomere organization	-2,704	0	0
carbohydrate catabolic process	-2,742	0	0

kategória (GO_Bunkový komponent)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
site of polarized growth	-2,014	0	0,006193
cell leading edge	-2,017	0	0,006341
primary lysosome	-2,024	0,0039526	0,006218
lateral plasma membrane	-2,032	0	0,005986
glutamatergic synapse	-2,061	0	0,004915
tethering complex	-2,070	0,0086957	0,004603
endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment	-2,079	0	0,004262
nuclear envelope	-2,100	0	0,003297
nuclear speck	-2,107	0	0,003347
coated membrane	-2,164	0	0,001963
microtubule	-2,170	0	0,00194
contractile fiber	-2,192	0	0,001325
ATPase complex	-2,247	0	0,000628
membrane region	-2,284	0	0,000673
neuronal cell body	-2,382	0	0,000362
actin cytoskeleton	-2,383	0	0,000393
nuclear periphery	-2,385	0	0,000428
chaperone complex	-2,401	0	0,000236
ficolin-1-rich granule	-2,454	0	0,000262
cell-substrate junction	-2,578	0	0
endoplasmic reticulum lumen	-2,603	0	0
extracellular matrix	-2,611	0	0
cell-cell junction	-2,617	0	0
vacuolar lumen	-2,789	0	0
pigment granule	-2,894	0	0
vesicle lumen	-3,151	0	0
myelin sheath	-3,557	0	0

kategória (Molekulárna funkcia)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
molecular adaptor activity	-2,011	0,00333333	0,011141
calmodulin binding	-2,021	0,00304878	0,010898
mRNA binding	-2,044	0	0,009258
catalytic activity, acting on DNA	-2,045	0	0,009577
ADP binding	-2,055	0,00265957	0,009105
proteoglycan binding	-2,059	0	0,009289
translation factor activity, RNA binding	-2,073	0	0,008211
cell adhesion mediator activity	-2,099	0,00257069	0,006798
histone deacetylase binding	-2,119	0	0,005441
carbohydrate kinase activity	-2,125	0	0,005677
tau protein binding	-2,132	0	0,00537
oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	-2,157	0	0,004639
protease binding	-2,161	0	0,004767
exopeptidase activity	-2,174	0	0,004363
hormone binding	-2,186	0	0,004376
single-stranded DNA binding	-2,238	0	0,002316
amide binding	-2,239	0	0,002461
unfolded protein binding	-2,269	0	0,002073
ribonucleoprotein complex binding	-2,362	0	0,000888
ubiquitin-like protein ligase binding	-2,405	0	0,000638
motor activity	-2,426	0	0,000691
actin binding	-2,446	0	0,000377
catalytic activity, acting on RNA	-2,449	0	0,000415
histone binding	-2,464	0	0,000461
structural constituent of cytoskeleton	-2,528	0	0,000259
double-stranded RNA binding	-2,598	0	0
tRNA binding	-2,604	0	0
extracellular matrix structural constituent	-2,705	0	0
ligase activity	-3,143	0	0
cell adhesion molecule binding	-3,413	0	0
helicase activity	-3,553	0	0
ATPase activity	-3,772	0	0

kategória (pathway_KEGG)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
Pathogenic Escherichia coli infection	-2,037	0,00573066	0,014534
Fructose and mannose metabolism	-2,061	0,00507614	0,013402
Propanoate metabolism	-2,062	0,00248139	0,013923
Tight junction	-2,065	0	0,014414
Antigen processing and presentation	-2,127	0	0,00971
Amoebiasis	-2,148	0,00259067	0,007911
Cysteine and methionine metabolism	-2,167	0	0,006653
Focal adhesion	-2,170	0	0,007207
Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	-2,175	0	0,00731
Protein processing in endoplasmic reticulum	-2,190	0	0,006524
Central carbon metabolism in cancer	-2,224	0	0,005563
Leukocyte transendothelial migration	-2,243	0	0,004931
Protein digestion and absorption	-2,260	0	0,004552
ECM-receptor interaction	-2,327	0	0,002782
Citrate cycle (TCA cycle)	-2,350	0	0,002731
Glycolysis / Gluconeogenesis	-2,549	0	0
Biosynthesis of amino acids	-2,694	0	0
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	-2,805	0	0
Carbon metabolism	-2,832	0	0

Tabuľky 19 – 21. Kategórie z jednotlivých databáz identifikované pomocou GSEA u eIF4E3_B.

Prezentované dáta boli získané s použitím databáz „geneontology“ (GO), konkrétne Biologický proces, Bunkový komponent a Molekulárna funkcia; a ďalej databázy „pathway“ – KEGG. Tabuľky obsahujú výsledky GSEA zoradené podľa normalizovanej hodnoty obohatenia a filtrované na túto hodnotu väčšiu ako 2 a menšiu ako -2. Kategórie s významne obohatenými génmi sú zvýraznené ružovou farbou a kategórie s nižším zastúpením génov modrou farbou. Zelenou farbou sú podfarbené hodnoty FDR < 0,01.

kategória (GO_Biologický proces)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
gliogenesis	-2,160	0	0,00304
neuron projection guidance	-2,225	0	0,002432

kategória (GO_Bunkový komponent)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
protein-DNA complex	2,113	0	0,002748

kategória (GO_Molekulárna funkcia)	normalizovaná hodnota obohatenia	p hodnota	FDR
anion transmembrane transporter activity	-2,145	0	0,003862

6.3 Charakterizácia bunkových línií

6.3.1 Charakterizácia bunkových línií HEK-293 a delečných mutantov (eIF4E2Δ a eIF4E3Δ)

V prvej časti tejto práce bol skúmaný vplyv hypoxie (1% O₂) na bunkové línie u ktorých bol deletovaný gén pre eIF4E2 a eIF4E3. eIF4E2 je charakterizovaný ako proteín, ktorý sa zúčastňuje sprostredkovaniu tzv. hypoxickej translácie (viď kapitolu 3.4.4 Úloha eIF4E2 v hypoxickej translácii, Prehľad literatúry). Funkcia proteínu eIF4E3 nie je dodnes úplne pochopená. Zatiaľ nebola študovaná jeho úloha v zvládaní hypoxického stresu, preto sme využili možnosti novo vytvorenej delečnej línie a zaradili ju do týchto experimentov.

Nástup hypoxického prostredia v cytosole buniek vyvoláva signálnu odpoveď, pre ktorú je typická stabilizácia transkripčného faktoru HIF-1α. Ten funguje ako hlavný induktor transkripcie mRNA pre hypoxickú odpoveď bunky. Translácia mnohých týchto transkriptov je sprostredkovaná pomocou komplexu HIF-2α:RBM4:eIF4E2:eIF4G3. Dôležité však je, že indukcia HIF-1α a hypoxickej translácie nastáva len za veľmi nízkych koncentrácií dostupného kyslíka v kultivačnej atmosfére (cca 1 – 2 %). Je dôležité poznamenať, že vyššie popísaná regulácia takto funguje v bunkách (HRPTEC), ktorých metabolizmus je závislý na oxidatívnej fosforylácii a teda na dostupnosti kyslíka.

Naše delečné línie boli však odvodené od línie HEK-293, ktorá má aktívnejšiu dráhu klasickej glykolýzy. Pre navodenie kultivačnej atmosféry 1% O₂ bol použitý hypoxický inkubátor od firmy Panasonic, kde je požadovaná koncentrácia kyslíka udržiavaná pomocou pumpovania dusíka do inkubačnej komory. Bola vykonaná celá rada kontrolných pokusov, aby sme sa uistili, že sme naozaj schopní dosiahnuť takto nízku koncentráciu kyslíka. Nástup hypoxie bol monitorovaný pomocou detekcie HIF-1α v bunkových lyzátach, avšak jeho prítomnosť bola detekovaná len v niektorých prípadoch. Napriek tomu, že v literatúre je popísaná indukcia HIF-1α v líni HEK-293, neboli sme schopní reproducibilne a opakovane tento proteín detekovať. Preto sme začali testovať kombinovaný vplyv zníženej koncentrácie glukózy a/alebo séra (FBS) a hypoxických podmienok. Tento postup je v literatúre nazývaný OGD (z originálneho „oxygen glucose depletion“) (Yuan *et al.*, 2011). OGD sa používa u vybraných bunkových línií ako model srdcovej ischémie, stavu, ktorý tiež vyvoláva indukciu HIF-1α.

Tento text mal za úlohu vysvetliť čitateľovi účel pokusov, ktorých výsledky sú popísané v tejto kapitole.

6.3.2 Optimalizácia kultivačných podmienok

Vzhľadom k tomu, že naše delečné línie boli pripravené odvodením od HEK-293 bola snaha nájsť takú kombináciu kultivačných podmienok, kde by sme mohli pozorovať prípadný fenotypický vplyv absencie proteínu eIF4E2 alebo eIF4E3 za hypoxických podmienok. Mojou prvou úlohou teda bolo nájsť najnižšie možné koncentrácie glukózy a séra (FBS) v médiu (a ich kombinácie), ktoré výrazným spôsobom nelimitujú rastové vlastnosti testovaných línií a tieto podmienky následne kombinovať so zavedením hypoxie.

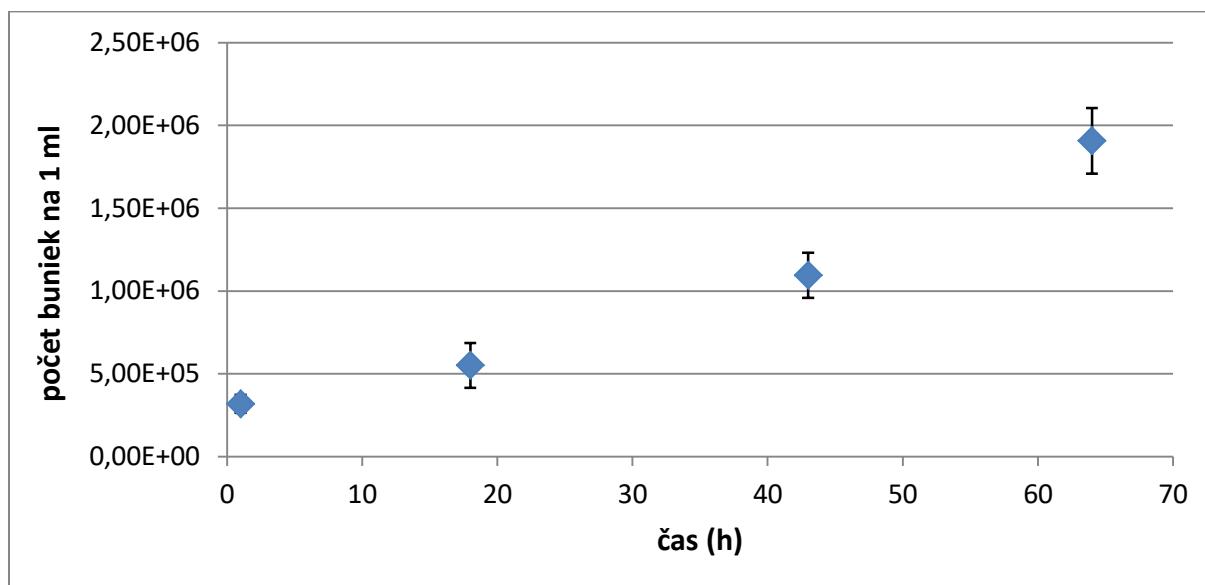
6.3.2.1 Experimenty s automatickým počítateľom buniek (Countess™ II Automated Cell Counter)

Pomocou automatizovaného počítania živých a mŕtvych buniek (Tabuľka 22) bola stanovená rastová krivka bunkovej línie HEK-293 (Obrázok 82). Podmienky kultivácie buniek zahŕňali koncentráciu glukózy 4,5 g/l, 10 % FBS a 21% koncentráciu kyslíka.

Tabuľka 22. Údaje pre stanovenie rastovej krivky bunkovej línie HEK-293 (Flp-in, T-REx). Bunky boli kultivované v 6cm miskách pre bunkové kultúry, všetky so zhodnou počiatočnou konfluenciou (odhad plochy dna kultivačnej misky pokrytej bunkami ku celkovej ploche podľa pozorovania pod mikroskopom) po pasážovaní. V každom časovom bode boli pomocou zariadenia na automatizované počítanie buniek Countess II zmerané koncentrácie živých a mŕtvych buniek vo vzorkách zo štyroch biologických opakovaní.

opakovanie	čas (h)	počet živých buniek na 1 ml	počet mŕtvych buniek na 1 ml	% živých buniek	konfluencia buniek na miske
rep1	1	3,64E+05	1,76E+04	95	10%
rep2	1	2,29E+05	1,17E+04	95	10%
rep3	1	3,58E+05	2,35E+04	94	10%
rep4	1	3,23E+05	1,17E+04	97	10%
rep1	18	7,68E+05	2,93E+04	96	20%
rep2	18	3,99E+05	4,69E+04	89	20%
rep3	18	5,40E+05	2,93E+04	95	20%
rep4	18	4,99E+05	3,52E+04	93	20%
rep1	43	1,03E+06	2,35E+04	98	70%
rep2	43	1,03E+06	4,11E+04	96	70%
rep3	43	1,33E+06	1,17E+04	99	70%
rep4	43	9,91E+05	4,96E+04	95	70%
rep1	64	1,97E+06	1,76E+04	99	95%
rep2	64	1,60E+06	2,35E+04	99	95%
rep3	64	2,15E+06	1,41E+05	94	95%
rep4	64	1,91E+06	1,76E+04	99	95%

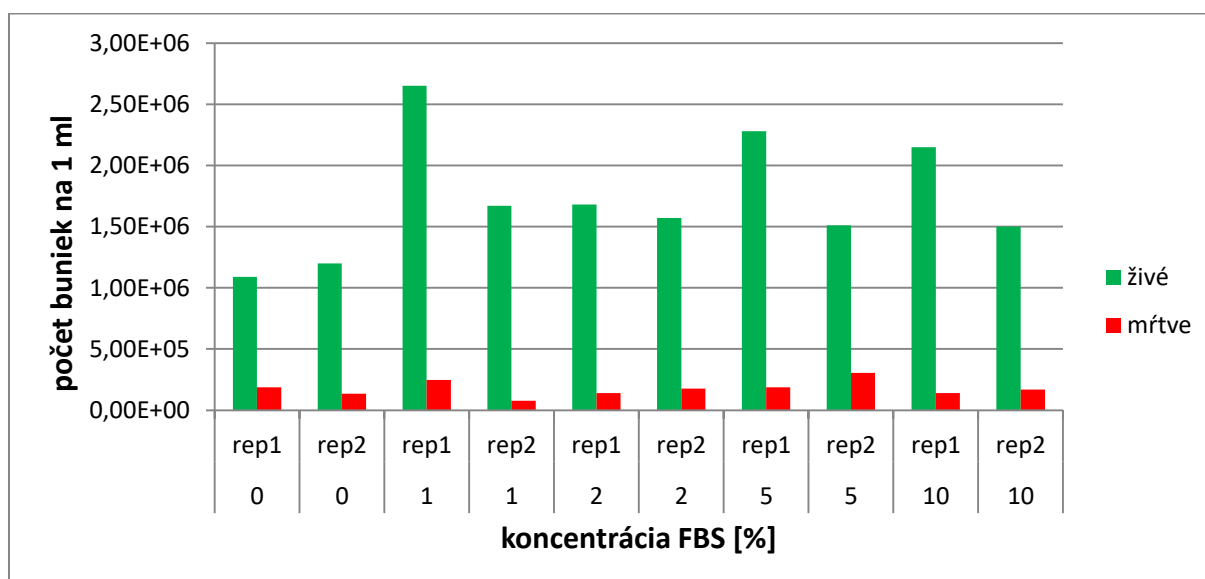
Obrázok 82. Rastová krivka živých buniek línie HEK-293 (Flp-in, T-REx). Graf reprezentuje počet buniek na 1 ml média ako funkciu času. Na stanovenie rastovej krivky boli použité priemerné hodnoty vždy zo štyroch vzoriek pre každý časový bod – zdrojové dáta sú uvedené v tabuľke 22 (použité boli údaje o počtoch živých buniek).



Pre účely odhadu limitne akceptovateľných podmienok bola zmeraná životaschopnosť buniek HEK-293 pri rôznych koncentráciách látok v médiu po 24 hodinách (Obrázky 83 a 84). Súčasne bola pozorovaná morfológia buniek pri daných podmienkach. Tieto pozorovania však treba brať s rezervou, nakoľko sa jedná o subjektívne hodnotenie a mali by len dokresľovať obraz získaný objektívnymi meraniami.

- Vplyv koncentrácie FBS v médiu (koncentrácia glukózy bola vždy 4,5 g/l)

Obrázok 83. Vplyv koncentrácie FBS v kultivačnom médiu na životaschopnosť buniek HEK-293 (Flp-in, T-REx). Pre každú koncentráciu FBS boli zmerané vzorky dvoch biologických opakovaní (rep1, rep2). Koncentrácia glukózy bola vo všetkých vzorkách 4,5 g/l.

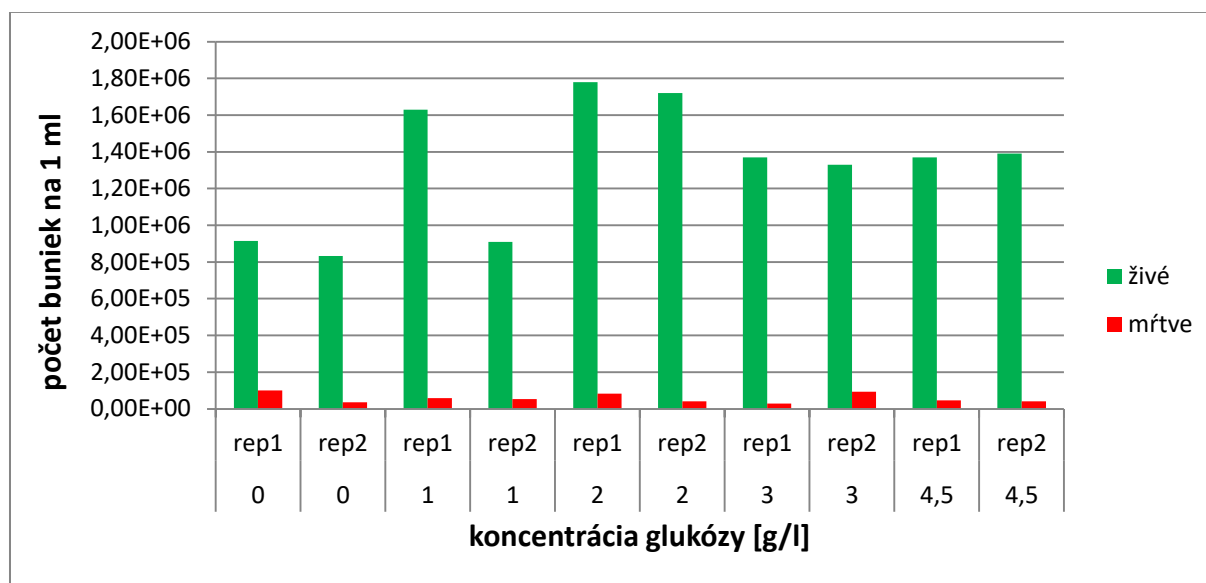


Mikroskopické pozorovanie fenotypu buniek pri rôznych koncentráciách glukózy:

5 a 10 % FBS	štandardná morfológia, konfluencia > 95 %
2 % FBS	okrúhle bunky, viac výbežkov, tvorba sieťovitej štruktúry (väčšie „oká“), konfluencia 70 %
1 % FBS	morfologicky podobné ako pri 2 % FBS, konfluencia 50 %
0 % FBS	tesné nahromadenie buniek (strapce), bunky nevypadajú dobre, konfluencia 30 %

- Vplyv koncentrácie glukózy v médiu (koncentrácia FBS bola vždy 10 %)

Obrázok 84. Vplyv koncentrácie glukózy v kultivačnom médiu na životaschopnosť buniek HEK-293 (Flp-in T-REx). Pre každú koncentráciu glukózy boli zmerané vzorky dvoch biologických opakovaní (rep1, rep2). Koncentrácia FBS bola vo všetkých vzorkách 10 %.



Mikroskopické pozorovanie fenotypu buniek pri rôznych koncentráciách glukózy:

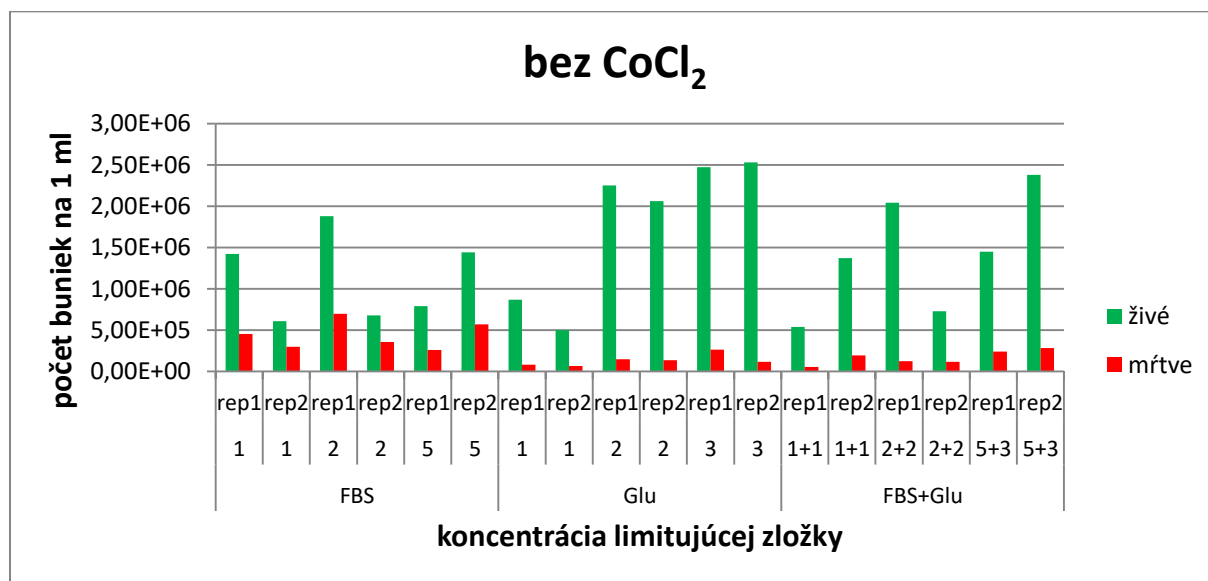
3 a 4,5 g/l glukózy	štandardná morfológia, konfluencia 95 %
2 g/l glukózy	štandardná morfológia, konfluencia 85 – 90 %
1 g/l glukózy	štandardná morfológia, konfluencia 80 %
0 g/l glukózy	konfluencia 50 %

Pridanie CoCl_2 do média napodobňuje niektoré efekty hypoxie (Muñoz-Sánchez a Chánez-Cárdenas, 2019). Experimenty s napodobňovaním bunkovej odpovedi na nízku koncentráciu dostupného kyslíka boli použité na predbežné vyhodnotenie vplyvu kultivačných podmienok (Tabuľka 23a) na fenotyp buniek počas navodenej „hypoxie“ (Obrázky 85 - 87).

Tabuľka 23a. Podmienky kultivácie bunkových línií. Zobrazené sú použité koncentrácie glukózy, FBS a CoCl_2 .

Koncentrácia glukózy (g/l)	1	2	3
Koncentrácia FBS (%)	1	2	5
Koncentrácia CoCl_2 (μM)	0	200	

Obrázok 85. Vplyv koncentrácie glukózy, FBS a ich kombinácii v kultivačnom médiu na životaschopnosť buniek HEK-293 (Flp-in T-REx) bez hypoxie napodobovanej CoCl_2 . Pre každú koncentráciu glukózy (Glu), FBS a ich kombináciu (FBS+Glu) boli zmerané vzorky dvoch biologických opakovaní (rep1, rep2). Koncentrácie jednotlivých zložiek sú uvedené v Tabuľke 23a. Pokiaľ sú v tabuľke uvedené koncentrácie zložiek v niektorej vzorke napr. ako „5+3“, prvé číslo znamená, že kultivačná koncentrácia FBS bola 5 % a druhé číslo reprezentuje hodnotu koncentrácie glukózy 3 g/l.



Mikroskopické pozorovanie fenotypu buniek pri rôznych koncentráciách FBS a glukózy bez pridaného CoCl_2 :

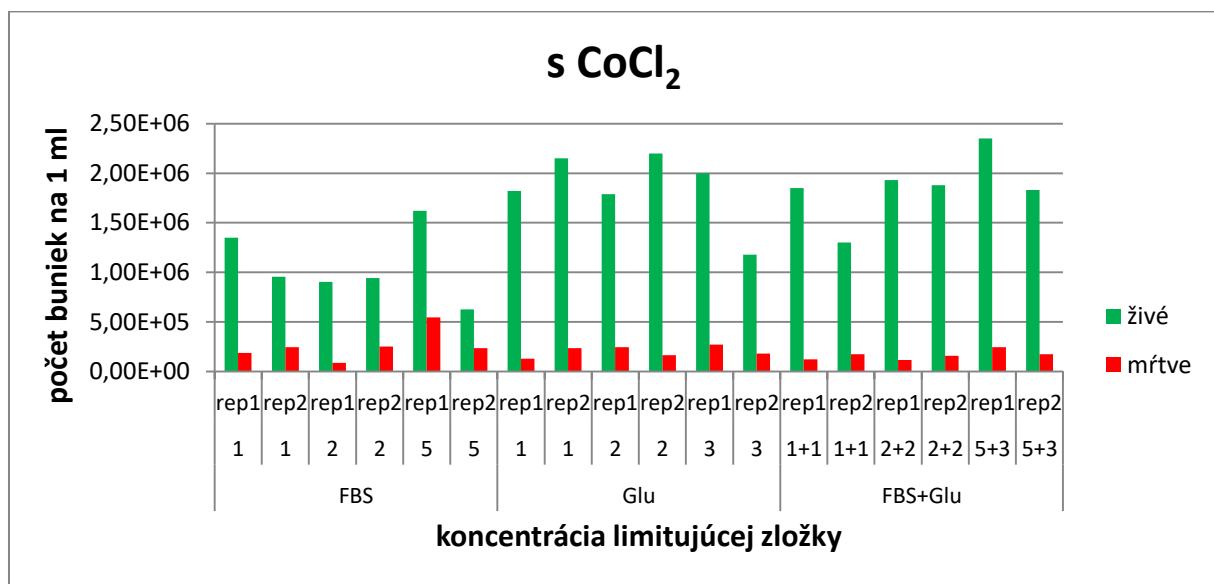
2 a 5 % FBS štandardná morfológia

1 % FBS zlé kultúry (odmyté bunky, príliš sa nedržia na miske)

2 a 3 g/l glukózy štandardná morfológia

1 g/l glukózy	menej buniek
FBS+Glu – 2+2 a 5+3	štandardná morfológia
FBS+Glu – 1+1	tvorba sieťovitej štruktúry

Obrázok 86. Vplyv koncentrácie glukózy, FBS a ich kombinácii v kultivačnom médiu na životaschopnosť buniek HEK-293 (Flp-in T-REx) s hypoxiou napodobovanou CoCl_2 . Pre každú koncentráciu glukózy (Glu), FBS a ich kombináciu (FBS+Glu) boli zmerané vzorky dvoch biologických opakovaní (rep1, rep2). Koncentrácie jednotlivých zložiek sú uvedené v Tabuľke 23b. Pokiaľ sú v tabuľke uvedené koncentrácie zložiek v niektorej vzorke napr. ako „5+3“, prvé číslo znamená, že kultivačná koncentrácia FBS bola 5 % a druhé číslo reprezentuje hodnotu koncentrácie glukózy 3 g/l.



Mikroskopické pozorovanie fenotypu buniek pri rôznych koncentráciách FBS a glukózy s pridaným CoCl_2 :

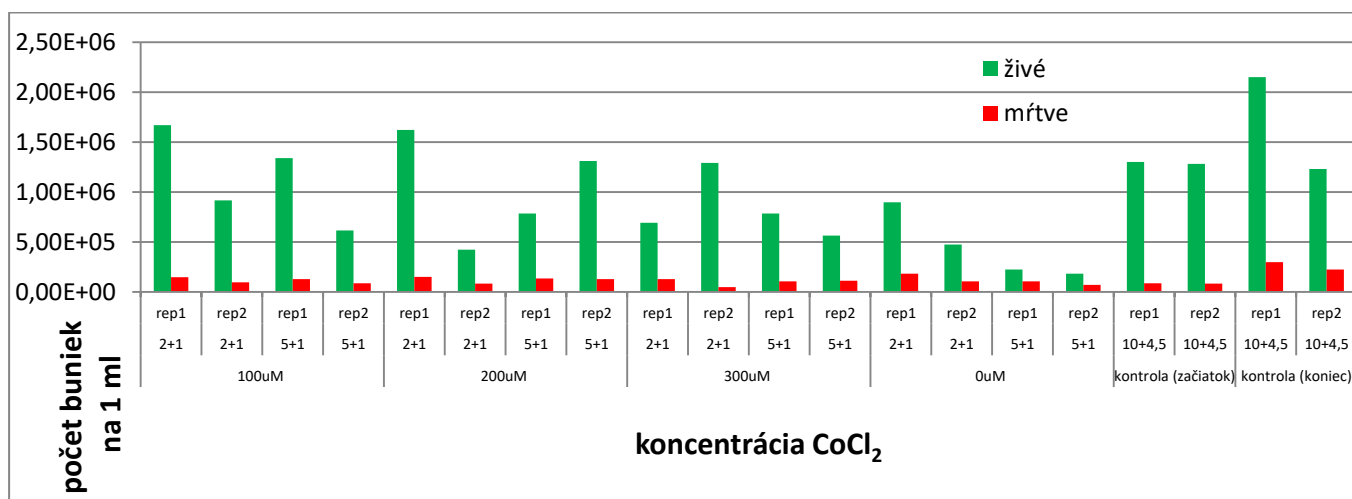
FBS	podobné ako misky bez CoCl_2
glukóza	podobné ako misky bez CoCl_2
FBS+Glu – 5+3	štandardné bunky
FBS+Glu – 2+2	podobná „sieť“ ako v prípade 1+1
FBS+Glu – 1+1	tvorba sieťovitej štruktúry

V prípade glukózy bola na základe meraní a pozorovaní vybraná ako limitujúca koncentrácia 1 g/l. Ďalej bol ešte experimentálne porovnaný efekt rôznych koncentrácií CoCl_2 na životaschopnosť buniek.

Tabuľka 23b. Podmienky kultivácie bunkových línií. Zobrazené sú použité koncentrácie glukózy, FBS a CoCl₂.

Koncentrácia glukózy (g/l)	1	4,5		
Koncentrácia FBS (%)	2	5	10	
Koncentrácia CoCl ₂ (μM)	0	100	200	300

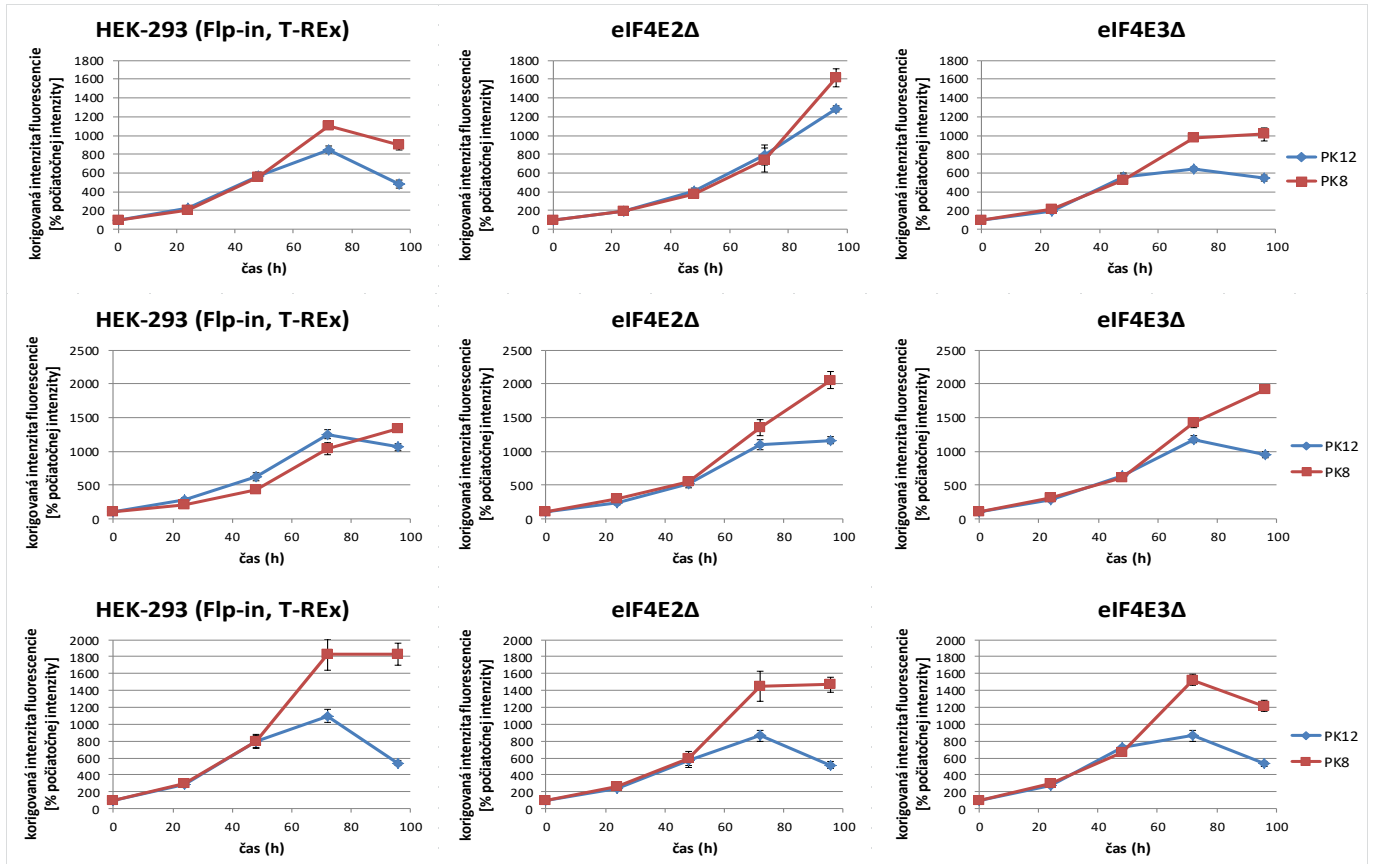
Obrázok 87. Vplyv koncentrácie CoCl₂ na životaschopnosť buniek HEK-293 (Flp-in T-REx) pri rôznych kultivačných podmienkach. Pre každú kombináciu koncentrácií FBS a glukózy boli zmerané vzorky dvoch biologických opakovaní (rep1, rep2). Koncentrácie jednotlivých zložiek sú uvedené v Tabuľke 23b. Pokiaľ je tabuľke uvedená kombinácia koncentrácií zložiek v niektorej vzorke napr. ako „2+1“, prvé číslo znamená, že kultivačná koncentrácia FBS bola 2 % a druhé číslo reprezentuje hodnotu koncentrácie glukózy 1 g/l. Vzorky označené ako „kontrola“ boli vzorky kultivované bez CoCl₂ pri dostatku FBS (10 %) a glukózy (4,5 g/l). Tieto kontrolné vzorky boli odobrané na začiatku a na konci merania, ktoré zabralo nejaký čas.



6.3.3 Určovanie rastových schopností bunkových línií pomocou resazurínu

Nasledujúce experimenty stanovovali pomocou merania fluorescencie resazurínu (resorufínu) rastové krivky bunkových línií HEK-293 a odvodených delečných mutantov v rôznych kultivačných podmienkach (Obrázky 88 – 96). Variabilná počas kultivácie bola koncentrácia kyslíka a koncentrácia glukózy. V každom prípade bola používaná koncentrácia FBS 10 %. Najskôr boli stanovené rastové krivky troch bunkových línií: HEK-293 (Flp-In, TREX), HEK-293 s deléciou génu pre eIF4E2 (eIF4E2Δ) a HEK-293 s deléciou génu pre eIF4E3 (eIF4E3Δ). Krivky boli merané pre každú líniu trikrát, vždy v dvoch riedeniach pri poslednej pasáži (bunková suspenzia : médium = 1:7 a 1:11 = PK12 a PK8). Kultivácia prebiehala pri koncentrácii glukózy v médiu 4,5 g/l a normoxii v inkubátore (21% O₂). Každý deň bola vymieňaná cca polovica média (70 μl / 1 jamka, 96-jamková doštička) za čerstvé.

Obrázky 88 – 96. Rastové krivky troch bunkových línií. Sledované bunkové línie boli: HEK-293 (Flp-in, T-REx); eIF4E2Δ – bunková línia s deléciou génu pre eIF4E2 odvodená od HEK-293; eIF4E3Δ – bunková línia s deléciou génu pre eIF4E3 odvodená od HEK-293. Namerané hodnoty fluorescence boli korigované na pozadie (blank) a prepočítané na počiatočnú intenzitu 100 %. PK označuje počiatočnú konfluenciu buniek v percentách – jedná sa o približnú veľkosť plochy dna kultivačnej misky pokrytej bunkami ku celkovej ploche na začiatku kultivácie. Hodnoty PK12 a PK8 sú približné a sú dané prepočtom množstva buniek v novej miske po pasážovaní. Každý dátový bod grafov je získaný spriemerovaním hodnôt z oktaplikátu, chybové úsečky reprezentujú príslušné smerodajné odchýlky.

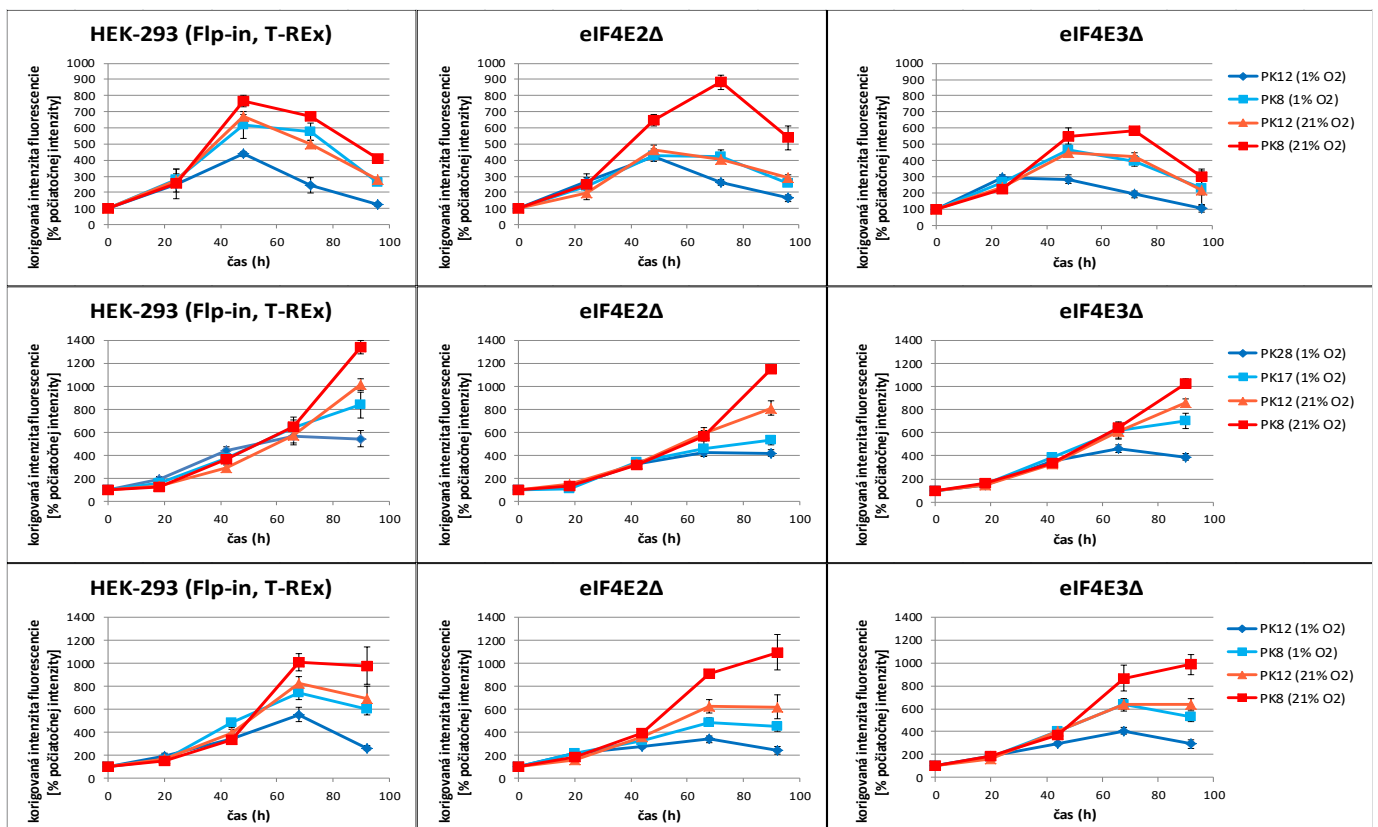


6.3.4 Závislosť rastových schopností bunkových línií na kultivačných podmienkach

- Vplyv kultivačnej koncentrácie kyslíka

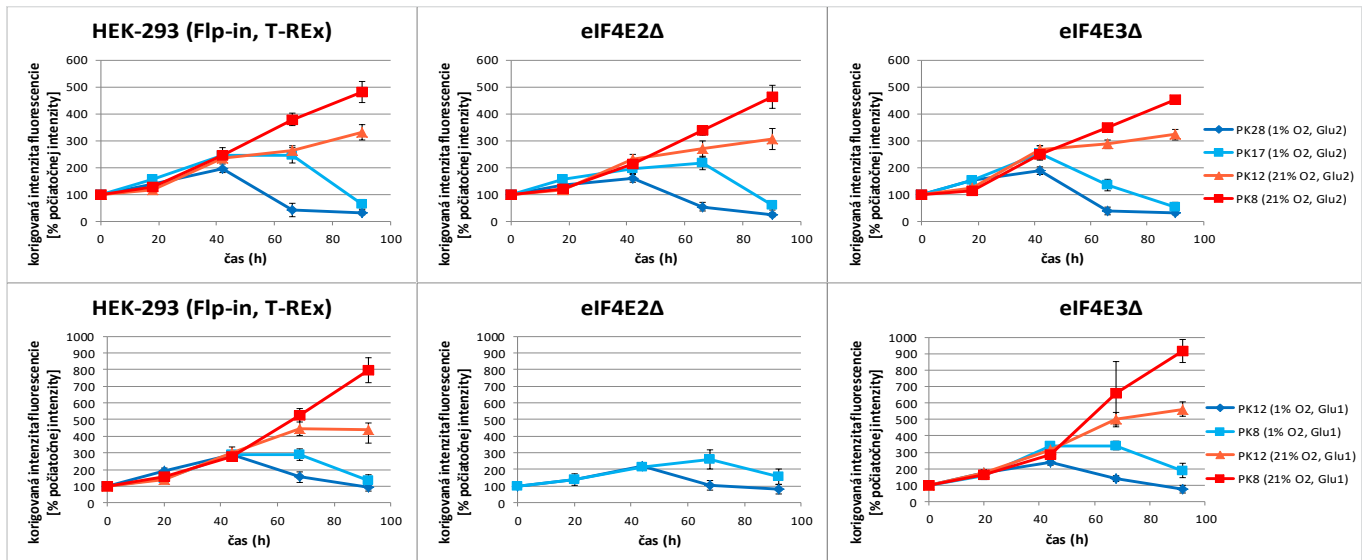
V tomto prípade bol stanovovaný vplyv hypoxie (1 % O₂) a normoxie (21 % O₂) pri koncentrácii glukózy 4,5 g/l na rast a metabolizmus bunkových línií HEK-293 (Flp-In, T-REx), eIF4E2Δ a eIF4E3Δ (Obrázky 97 – 105). Médium nebolo vymieňané za čerstvé po celú dobu kultivácie, po pridaní resazurínu prebiehala kultivácia 4 h v normoxii a fluorescencia resazurínu bola meraná až následne.

Obrázky 97 – 105. Vplyv kultivačnej koncentrácie kyslíka na rast bunkových línií. Sledované bunkové línie boli: HEK-293 (Flp-in, T-REx); eIF4E2Δ – bunková línia s deléciou génu pre eIF4E2 odvodená od HEK-293; eIF4E3Δ – bunková línia s deléciou génu pre eIF4E3 odvodená od HEK-293. Namerané hodnoty fluorescencie boli korigované na pozadie (blank) a prepočítané na počiatočnú intenzitu 100 %. PK – počiatočná konfluencia buniek v percentách. Médium všetkých kultúr obsahovalo 10 % FBS a 4,5 g/l glukózy. U jednotlivých vzoriek sa líšila koncentrácia kyslíka – 21 % O₂ (normoxia) a 1 % O₂ (hypoxia) – a počiatočná konfluencia buniek (PK) na začiatku kultivácie. Každý dátový bod grafov je získaný spriemerovaním hodnôt z oktaplikátu, chybové úsečky reprezentujú príslušné smerodajné odchýlky.



Ďalej boli porovnané rastové schopnosti študovaných bunkových línií v hypoxii a normoxii za súčasného hladovania na glukózu pri jej koncentrácií zníženej na 1 a 2 g/l (Obrázky 106 – 111). Cieľom bola možnosť porovnať tieto dáta s predošlými výsledkami získanými počas kultivácie v dostatku glukózy a určiť tak vplyv koncentrácie glukózy na rast buniek v hypoxii a normoxii.

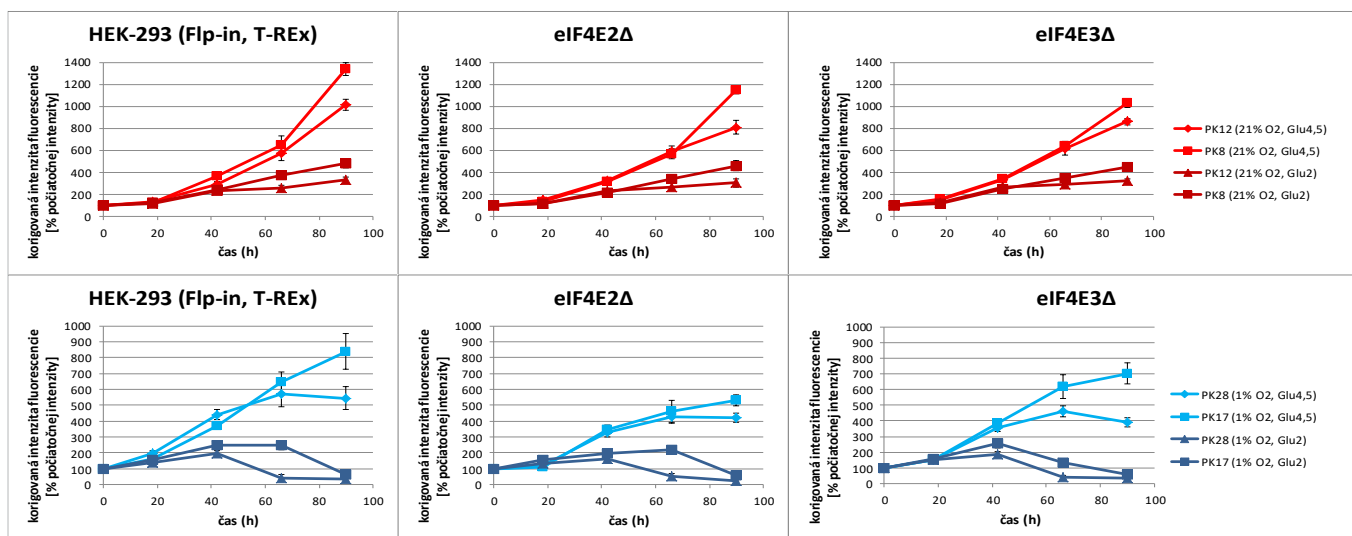
Obrázky 106 – 111. Vplyv kultivačnej koncentrácie kyslíka na rast bunkových línií počas hladovania na glukózu. Sledované bunkové línie boli: HEK-293 (Flp-in, T-REx); eIF4E2Δ – bunková línia s deléciou génu pre eIF4E2 odvodená od HEK-293; eIF4E3Δ – bunková línia s deléciou génu pre eIF4E3 odvodená od HEK-293. Namerané hodnoty fluorescence boli korigované na pozadie (blank) a prepočítané na počiatočnú intenzitu 100 %. PK – počiatočná konfluencia buniek v percentách. U jednotlivých vzoriek sa líšila koncentrácia kyslíka – 21 % O₂ (normoxia) a 1 % O₂ (hypoxia) – a počiatočná konfluencia buniek (PK) na začiatku kultivácie. Glu2 označuje koncentráciu glukózy v kultivačnom médiu 2 g/l (Glu1 analogicky). Každý dátový bod grafov je získaný sprimerovaním hodnôt z oktaplikátu, chybové úsečky reprezentujú príslušné smerodajné odchýlky.



- Vplyv kombinácie kultivačnej koncentrácie kyslíka a glukózy

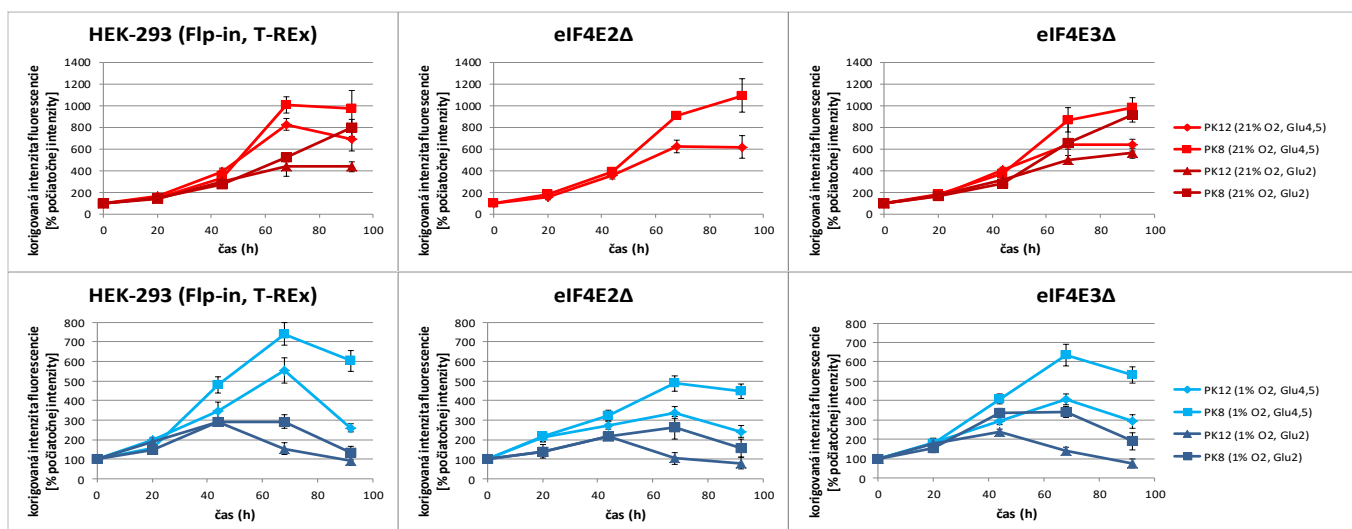
V tomto prípade bol stanovovaný vplyv hypoxie (1 % O₂) a normoxie (21 % O₂) pri koncentrácii glukózy 4,5 a 2 g/l na rast a metabolizmus bunkových línií HEK-293 (Flp-In, T-REx), eIF4E2Δ a eIF4E3Δ (Obrázky 112 – 117). Polovica média bola vymieňaná za čerstvé vždy pred pridaním resazurínu. Kultivácia prebiehala 4 h v normoxii a fluorescence resazurínu bola meraná až následne.

Obrázky 112 – 117. Vplyv rôznej kultivačnej koncentrácie kyslíka a glukózy v médiu na rast bunkových línií. U jednotlivých vzoriek sa líšila koncentrácia kyslíka – 21 % O₂ (normoxia) a 1 % O₂ (hypoxia) – a počiatková konfluencia buniek (PK) na začiatku kultivácie. Glu_{4,5} označuje koncentráciu glukózy v kultivačnom médiu 4,5 g/l (Glu₂ analogicky). Každý dátový bod grafov je získaný spriemerovaním hodnôt z oktaplikátu, chybové úsečky reprezentujú príslušné smerodajné odchýlky.



Ďalej bol porovnaný vplyv rôznej koncentrácie kyslíka na rast a metabolizmus bunkových línií aj pri koncentrácii glukózy 1 g/l (Obrázky 118 - 123). Polovica média bola vymieňaná za čerstvé vždy pred pridaním resazurínu. Kultivácia prebiehala 4 h v normoxii a fluorescencia resazurínu bola meraná až následne.

Obrázky 118 – 123. Vplyv rôznej kultivačnej koncentrácie kyslíka a glukózy v médiu na rast bunkových línií. U jednotlivých vzoriek sa líšila koncentrácia kyslíka – 21 % O₂ (normoxia) a 1 % O₂ (hypoxia) – a počiatková konfluencia buniek (PK) na začiatku kultivácie. Glu_{4,5} označuje koncentráciu glukózy v kultivačnom médiu 4,5 g/l (Glu₂ analogicky). Každý dátový bod grafov je získaný spriemerovaním hodnôt z oktaplikátu, chybové úsečky reprezentujú príslušné smerodajné odchýlky.



7 Diskusia

Gény (transkripty) vybrané na validáciu sekvenaných dát z RNA-seq boli vytipované základe špecifického expresného profilu naprieč študovanými bunkovými líniami. Proces selekcie zahŕňal postupné zužovanie výberu génov pomocou filtrácie a porovnávania jednotlivých génov podľa rôznych kritérií. Výberu kandidátnych génov na validačné experimenty bola venovaná značná pozornosť, pretože existuje dôvodné podozrenie, že špecifické zmeny hladín transkriptov týchto génov v dôsledku zmien množstva prítomných proteínov eIF4E, by mohli mať biologickú relevanciu. Výrazný nárast alebo naopak pokles hladiny konkrétneho transkriptu ako reakcia bunky na zmenu hladiny niektorého zo študovaných proteínov rodiny eIF4E by mohol naznačovať nejakú špecifickú funkčnú asociáciu medzi nimi. Navyše, pokiaľ bola podobná alebo práve opačná zmena množstva nejakého transkriptu pozorovaná u viacerých bunkových línii, mohlo by sa začať uvažovať napríklad nad tým, že rôzne eukaryotické iniciačné faktory 4E ovplyvňujú daný transkript podobným alebo naopak rozdielnym spôsobom. Na druhú stranu treba zväžiť aj možnosť, že pozorované zmeny expresie by nemuseli byť nutne odrazom nejakej špecifickej regulácie sprostredkovej niektórou z nadexprimovaných alebo deletovaných proteínov eIF4E, ale že môže ísť jednoducho len o akúsi charakteristiku bunkových línii sekundárne získanú klonálnou selekciou pri ich vytváraní.

Cieľom procesu selekcie génov bolo všeobecne vybrať také gény, ktoré by mohli byť zaujímavým predmetom ďalšieho skúmania. Vzhľadom k tomu, že finálny výber génov neobsahoval také, u ktorých nejaký špeciálny funkčný vzťah s eIF4E proteínmi bol už skôr popísaný v literatúre a nebolo sa od čoho odraziť, tieto gény ďalej študované neboli. Do budúca ale stále predstavujú potenciálne zaujímavé výskumné ciele s možnosťou odhaliť nové regulačné funkcie členov rodiny eIF4E.

Napriek značnému množstvu energie venovanej tomuto procesu výberu len niekoľkých génov, je treba mať na pamäti, že pre technickú validáciu nemá spôsob výberu génov zas tak zásadný význam v kontexte tejto práce.

Validačné experimenty boli vyhodnotené paralelným grafickým porovnaním dát z RNA-seq a výsledkov z qPCR validačných experimentov. Okrem evidentných a očakávaných rozdielov, ako je napríklad rôzna škála osí porovnávaných grafov, môžeme zhodnotiť, že výsledky RNA-seq boli úspešne validované pomocou RT-qPCR. Pozorované

rozdiely v rozsahu dát sú spôsobené tým, že sa jedná o rôzne nezávislé metódy, ktoré majú rôzny dynamický rozsah. Preto je pri interpretácii výsledkov vhodnejšie než sledovať absolútne hodnoty, sledovať radšej relatívne rozdiely v expresii konkrétnych transkriptov medzi jednotlivými bunkovými líniami pre každú metódu zvlášť a porovnávať až všeobecné trendy expresie naprieč líniami. Takto dospejeme k záveru, že vzhľadom k nejakej prijateľnej miere variability, sú dáta získané sekvenovaním RNA v zásade obdobné dátam z qPCR a teda spoľahlivé. Variabilita qPCR dát z biologických opakovaní bola podľa očakávania prítomná v pomerne veľkej miere, obvykle však len v podobe jedného výrazne odlišnej vzorky. Nakoľko takéto odchylné opakovanie nebolo vo všetkých pozorovaných prípadoch rovnaké, ťažko povedať či ide o dôsledok nejakej prirodzenej biologickej variability medzi jednotlivými opakovaniami, alebo rozdiely vznikli ako náhodné metodické nepresnosti. Reproducibilita týchto dát pri použití nezávislých biologických opakovaní je teda otázna, ale až na pár popisovaných výrazne odchylených vzoriek sú dáta väčšinou konzistentné. Čo sa týka rozdielov medzi indukovanými a neindukovanými biologickými opakovaniami, vo väčšine prípadov sú pozorované rozdiely v hladinách jednotlivých transkriptov malé alebo prakticky žiadne. To môže znamenať v zásade dve veci: 1.) nejakým spôsobom došlo k indukcii všetkých biologických opakovaní napr. kontamináciou pracovného prostredia či kultivačných médií indukujúcim tetracyklínom, alebo 2.) prípadná indukcia spôsobuje špecifické zvýšenie hladiny konkrétneho proteínu eIF4E, ale nie je nutnosťou, aby táto zmena nejakým zásadným spôsobom menila aj hladiny pozorovaných transkriptov, nakoľko takáto regulácia u nich zatiaľ popísaná nebola – môže sa len jednať o molekulárnu expresnú charakteristiku danej línie nezávislú na hladine proteínov eIF4E.

V súvislosti s kvantifikáciou transkriptov eIF4E1, eIF4E2 a eIF4E3 boli spočiatku používané fluorescenčné TaqMan hybridizačné sondy a RT-qPCR. Výsledky tejto analýzy v práci nie sú zahrnuté, nakoľko tieto systémy nefungovali optimálne a uprednostnená bola kvantifikácia proteínov rodiny eIF4E klasickým RT-qPCR so špecifickými primermi.

Analýza obohatenia génovej sady (GSEA) bola skúšaná aj použitím nástroja Enrichr (Kuleshov *et al.*, 2016). Výsledky však neboli príliš výpovedné možno práve z dôvodu použitia jednoduchého zoznamu diferencielne exprimovaných génov. Na rozdiel od toho nástroj WebGestalt (Liao *et al.*, 2019) využíva zoznam génov s príslušnými hodnotami zmien hladín jednotlivých génov a výsledky boli relevantnejšie.

Výsledky GSEA predstavujú z hľadiska interpretácie asi najzaujímavejšiu časť práce. Každý môže na základe svojho odborného zamerania nájsť v dátach rôzne možné biologicky relevantné asociácie.

K výsledkom GSEA pri použití dát z RNA-seq je potrebné pristupovať opatrne. Diferenciálna expresia transkriptov génov a na základe toho pomocou GSEA vytipované funkčné kategórie nemuseli byť nutne dôsledkom zvýšenia hladiny alebo deléciou konkrétnych translačných iniciačných faktorov 4E v jednotlivých bunkových líniiach. Je možné, že aspoň niektoré gény boli diferenciálne exprimované nezávisle na biologickej funkcii členov proteínovej rodiny 4E a jedná sa len o akýsi „transkripčný genetický podpis“ jednotlivých línii vzniknutý v dôsledku metodiky ich vytvárania spojenej s klonálnou selekciou čistých línii. Všeobecne ale GSEA dát z RNA-seq neposkytuje príliš veľa cenných informácií.

GSEA s použitím sekvenačných dát z RIP-seq bola informačne podstatne bohatšia. V prípade nadprodukcie eIF4E1 bola napríklad identifikovaná očakávaná obohatená kategória: translačná iniciácia (GO_Biologický proces). Z menej evidentných ďalej napr. gény spojené s mitochondriami a mitochondriálnymi ribozómami. Bunkové dýchanie bude zrejme pozitívne regulované eIF4E1. Špecificky nízke množstvo transkriptov imunoprecipitovaných s eIF4E1 bolo zaznamenané pre gény spojené s nervovými procesmi a nervovými bunkami, ďalej boli podobne ovplyvnené aj kategórie génov hrajúcich úlohu vo vývojových procesoch.

V práci boli síce používané sekvenačné dáta spracované metódou ALDEx2, ale možno by stálo za zváženie zopakovať analýzu s dátami vyhodnotenými nejakou v podobných kontextoch etablovanejšou metódou akou je napríklad DESeq (Anders a Huber, 2010).

Pre bunkovú líniu s nadexpresiou eIF4E2 boli medzi kategóriami nabohatených génov predovšetkým tie súvisiace s vývojovými procesmi. Konkrétne sa v týchto kategóriách vyskytovali napr. gény rodín HOX a FOX. Tento výsledok je zaujímavý aj preto, že úloha homológov ľudského proteínu eIF4E2 v regulácii vývoja bola už v minulosti popísaná u rôznych organizmov: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, dokonca aj u *Arabidopsis thaliana*. U cicavcov bol vplyv eIF4E2 na procesy súvisiace s vývojom skúmaný a potvrdený u myši a na úrovni interagujúcich proteínov aj v odvodených ľudských bunkách HeLa. eIF4E2 v týchto príkladoch vystupuje väčšinou ako translačný represor. To znamená, že u nabohatených transkriptov imunoprecipitovaných s ním môžeme zrejme

očakávať podobnú funkciu. Vypadá to teda tak, že proteín eIF4E2 vykazuje špecifickú preferenciu pre transkripty asociované s vývojom organizmu a pravdepodobne sprostredkováva ich translačnú represiu. Nabohatenie *Hox* mRNA (*Hoxb4* a *Hoxb8*) môže znamenať, že imunoprecipitovaný eIF4E2 neviaže preferenčne nejakú mRNA, ale interaguje s proteínmi, ktoré už špecifickú väzbu daných mRNA zabezpečujú. V tomto prípade by sa mohlo jednať napr. o nejaký ľudský ekvivalent myšieho Prep1, u ktorého bol podobný efekt popísaný. Rodina proteínov TALE, kam patrí aj Prep1 obsahuje konzervovanú väzbovú sekvenciu pre eIF4E2 - možná interakcia a represia (Villaescusa *et al.*, 2009).

Je tiež potrebné dať si pozor na interpretáciu toho, že eIF4E2 asocjuje s transkriptami viac, neznamená to podporu translácie, ale pravdepodobne pravý opak – je to translačný represor. Podľa výsledkov GSEA z RIP-seq dát proteín eIF4E2 asocjuje preferenčne s deacetylázami. Ku degradácii viazaných mRNA však zrejme nedochádza, nakoľko by sa tento rozdiel prejavil vo výsledkoch GSEA z dát RNA-seq.

Príklad špecificky nižšej väzby transkriptov s eIF4E3 podľa GSEA z dát RIP-seq sú napr. gény pre aminoacyl-tRNA syntetázy. Pozor však na ich funkciu. Tá totiž zďaleka nemusí byť len tá kanonická, ale v tomto kontexte sa môžu prejavovať aj nekanonické aktivity aminoacyl-tRNA syntetáz.

Všeobecne môžeme konštatovať, že výsledky realizovanej GSEA sú kvalitné, nakoľko kategórie obohatených génov mali príslušné p hodnoty malé, často dokonca až 0. Znamená to, že tieto dáta o niečom jednoznačne vypovedajú a vytvárajú rozumný biologický obraz o funkciách proteínov rodiny eIF4E.

Pri realizácii experimentov s kultiváciou bunkových línií s nízkou koncentráciou FBS (séra) v médiu bola pozorovaná nízka adhézna schopnosť buniek ku dnu kultivačnej nádoby. Dôvodom je pravdepodobne nedostatok fibronektínu, zložky kritickej pre túto adhéziu v médiu, nakoľko táto zložka je prítomná práve v limitujúcom FBS. Pozorovaná tvorba akejsi sieťovitej štruktúry v bunkových kultúrach pri hladovaní na sérum môže byť dôsledkom tejto straty schopnosti efektívne adherovať na dno kultivačnej nádoby a bunky sa kumulujú skôr na seba navzájom.

Pokusy s cieľom identifikovať podmienky, pri ktorých sú podmienky kultivácie pre bunky ešte akceptovateľné ale už limitujúce boli najskôr realizované pomocou automatického počítania buniek prístrojom Countess II. Vzhľadom k nízkej reproducibilite tejto metodiky

a značne nespoľahlivým dátam týmto spôsobom získaným, boli ďalšie experimenty realizované pomocou merania metabolickej aktivity buniek prostredníctvom fluorescencie resazurínu. Táto metodika sa ukázala byť vhodnejšou pre podobné analýzy s možnosťou konštrukcie rastových kriviek bunkových línií v rôznych kultivačných podmienkach a ich porovnaní. Všeobecne sú z porovnávaní grafov závislostí rastových kriviek na alternovaných podmienkach kultivácie evidentné predovšetkým očakávané efekty ako: 1.) zníženie koncentrácie kyslíka (ustanovenie hypoxie) vedie ku brzdeniu rastu; 2.) nižšia koncentrácia glukózy má za následok taktiež brzdenie rastu; 3.) kombinácia predošlých dvoch v podobe kumulácie efektov. Výrazné rozdiely medzi jednotlivými bunkovými líniami som nebol schopný identifikovať. Aby boli pozorované nejaké výraznejšie rozdiely (v prípade, že fyziologicky vôbec existujú), bolo by ďalej potrebné podobné experimenty zopakovať, alebo preskúmať nazbierané dáta nejakými objektívnymi metódami analýzy rastových schopností sledovaných buniek.

V literatúre sa uvádza kľúčová úloha proteínu eIF4E2 v bunkovej translácii v línii HRPTEC počas hypoxie (Uniacke *et al.*, 2012). Naša bunková línia s deléciou eIF4E2 odvodená od HEK-293 (Flp-In, T-REx) však bola schopná v hypoxii rásť len o trochu horšie (pokiaľ vôbec) oproti rodičovskej línii, takže je otázka, ako je to s nutnosťou hypoxickej translácie závislej na eIF4E2. Interpretácia môže byť taká, že buď úloha eIF4E2 v bunkách počas hypoxie nie je zas tak významná a jeho absencia v takýchto podmienkach nie je pre bunky fatálna všeobecne, alebo je v mechanizme hypoxickej translácie u rôznych sledovaných buniek rozdiel. V takom prípade by bolo otázkou, ktorý model predstavuje väčšinový a všeobecnejší obraz o translácii v hypoxii.

8 Súhrn

V práci boli študované translačné iniciačné faktory proteínovej rodiny 4E a ich vplyv na reguláciu génovej expzie.

- V prvej časti práce bol vytvorený set génov určený na následné validačné experimenty
- Na vybrané gény boli nadizajnované špecifické páry primerov
- Pomocou nezávislej metódy RT-qPCR boli validované výsledky RNA sekvenovania
- Reproducibilita výsledkov validácie RNA sekvenovania bola overená pomocou nezávislých biologických opakovaní
- Hladiny transkriptov patriacich členom proteínovej rodiny eIF4E boli v skúmaných bunkových línách kvantifikované
- Pre dva typy sekvenačných dát bola urobená Analýza obohatenia génovej sady
- Limitné podmienky kultivácie, pri ktorých boli študované bunkové línie schopné rastu boli identifikované
- Bunkové línie s deléciou eIF4E2 a eIF4E3 boli charakterizované na základe vplyvu rôznych kultivačných podmienok na ich rastové schopnosti

9 Zoznam použitej literatúry

- Abdelfattah, N. *et al.* (2018) 'MiR-584-5p potentiates vincristine and radiation response by inducing spindle defects and DNA damage in medulloblastoma', *Nature Communications*. Springer US, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-06808-8.
- Altmann, M. *et al.* (1997) 'A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E', *EMBO Journal*, 16(5), pp. 1114–1121. doi: 10.1093/emboj/16.5.1114.
- Amaya Ramirez, C. C. *et al.* (2018) '4EHP-independent repression of endogenous mRNAs by the RNA-binding protein GIGYF2', *Nucleic acids research*. 2018/03/15. Oxford University Press, 46(11), pp. 5792–5808. doi: 10.1093/nar/gky198.
- Anders, S. and Huber, W. (2010) 'Differential expression analysis for sequence count data', *Genome Biology*, 11(10), p. R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106.
- Batool, A., Aashaq, S. and Andrabi, K. I. (2019) 'Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E): A recap of the cap-binding protein.', *Journal of cellular biochemistry*. United States, 120(9), pp. 14201–14212. doi: 10.1002/jcb.28851.
- Buchan, J. R. and Parker, R. (2009) 'Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation', *Molecular Cell*. Cell Press, 36(6), pp. 932–941. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2009.11.020.
- Carreau, A. *et al.* (2011) 'Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), pp. 1239–1253. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
- 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, S. and Gao, G. (2017) 'MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs', *Protein and 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(3), 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. doi: 10.1016/j.cub.2006.08.093.
- Culjkovic, B. *et al.* (2005) 'eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR.', *The Journal of cell biology*, 169(2), pp. 245–256. doi: 10.1083/jcb.200501019.
- Dinkova, T. D. *et al.* (2005) 'Translation of a Small Subset of Caenorhabditis elegans mRNAs Is Dependent on a Specific Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Isoform Translation of a Small Subset of Caenorhabditis elegans mRNAs Is Dependent on a Specific Eukaryotic Translation In', *Molecular and cellular biology*, 25(1), pp. 100–113. doi: 10.1128/MCB.25.1.100.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. and Izaurralde, E. (2007) 'P bodies: At the crossroads of post-transcriptional pathways', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), pp. 9–22. doi: 10.1038/nrm2080.
- Evagelou, S. L. *et al.* (2020) 'DEAD Box Protein Family Member DDX28 Is a Negative Regulator of Hypoxia-Inducible Factor 2 α - and Eukaryotic Initiation Factor 4E2-Directed Hypoxic Translation.', *Molecular and cellular biology*, 40(6). doi: 10.1128/MCB.00610-19.
- Fernandes, A. D. *et al.* (2013) 'ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq', *PLoS ONE*, 8(6). doi: 10.1371/journal.pone.0067019.
- Franco, A. J. and Sutherland, R. M. (1979) 'Oxygen Diffusion Distance and Development of Necrosis in Multicell Spheroids', *Radiation Research*. The Radiation Research Society, 79(3), pp. 439–453. doi: 10.2307/3575173.

- Frydryskova, K. *et al.* (2016) 'Distinct recruitment of human eIF4E isoforms to processing bodies and stress granules', *BMC Molecular Biology*. BioMed Central, 17(1), pp. 1–19. doi: 10.1186/s12867-016-0072-x.
- Fu, R. *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(3), pp. 373–382. doi: 10.1261/rna.054833.115.
- Graff, J. R. and Zimmer, S. G. (2003) 'Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs.', *Clinical & experimental metastasis*. Netherlands, 20(3), pp. 265–273. doi: 10.1023/a:1022943419011.
- Gross, J. D. *et al.* (2003) 'Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E.', *Cell*. United States, 115(6), pp. 739–750. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00975-9.
- Gunnery, S., Mäivali, U. and Mathews, M. B. (1997) 'Translation of an uncapped mRNA involves scanning.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 272(34), pp. 21642–21646. doi: 10.1074/jbc.272.34.21642.
- Haas, G. *et al.* (2010) 'HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa', *Journal of Cell Biology*, 189(2), pp. 289–302. doi: 10.1083/jcb.200910141.
- Hickey, K. L. *et al.* (2020) 'Article GIGYF2 and 4EHP Inhibit Translation Initiation of Defective Messenger RNAs to Assist Ribosome-Associated Quality Control | Article GIGYF2 and 4EHP Inhibit Translation Initiation of Defective Messenger RNAs to Assist Ribosome-Associated Quality Control', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 79(6), pp. 950-962.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2020.07.007.
- Hinnebusch, A. G. and Lorsch, J. R. (2012) 'The mechanism of eukaryotic translation initiation - new insights and challenges.pdf', *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', *Cell Reports*. Elsevier Ltd, 14(6), pp. 1293–1300. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.036.
- Ito, K. *et al.* (2011) 'The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability', *Protein and Cell*, 2(9), pp. 755–763. doi: 10.1007/s13238-011-1092-4.
- Ivan, M. *et al.* (2001) 'HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing', *Science*, 292(5516), pp. 464 LP – 468. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/292/5516/464.abstract>.
- Jaakkola, P. *et al.* (2001) 'Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation', *Science*, 292(5516), pp. 468 LP – 472. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/292/5516/468.abstract>.
- Jafarnejad, S. M. *et al.* (2018) 'Translational control of ERK signaling through miRNA/4EHP-directed silencing', *eLife*, 7, pp. 1–18. doi: 10.7554/eLife.35034.
- Jonas, S. and Izaurralde, E. (2015) 'Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 16(7), pp. 421–433. doi: 10.1038/nrg3965.
- Joshi, B. *et al.* (2005) 'Phylogenetic analysis of eIF4E-family members', *BMC Evolutionary Biology*, 5, pp. 1–20. doi: 10.1186/1471-2148-5-48.
- Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R. (2004) 'Characterization of mammalian eIF4E-family members', *European Journal of Biochemistry*, 271(11), pp. 2189–2203. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04149.x.
- Kaelin, W. G. and Ratcliffe, P. J. (2008) 'Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway', *Molecular Cell*. Cell Press, 30(4), pp. 393–402. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2008.04.009.
- Kamenska, A. *et al.* (2016) 'The DDX6-4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly', *Nucleic Acids Research*, 44(13), pp. 6318–6334. doi: 10.1093/nar/gkw565.

- Keima, T. *et al.* (2017) 'Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in *Arabidopsis thaliana*', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(October 2016), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep39678.
- Kelly, N. J. *et al.* (2018) 'Hypoxia activates cadherin-22 synthesis via eIF4E2 to drive cancer cell migration, invasion and adhesion', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 37(5), pp. 651–662. doi: 10.1038/onc.2017.372.
- Khaleghpour, K. *et al.* (1999) 'Translational homeostasis: eukaryotic translation initiation factor 4E control of 4E-binding protein 1 and p70 S6 kinase activities.', *Molecular and cellular biology*, 19(6), pp. 4302–4310. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10330171&retmode=ref&cmd=prlink&format=pubmed>
- Kibbe, W. A. (2007) 'OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator', *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), pp. 43–46. doi: 10.1093/nar/gkm234.
- 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), pp. 1–14. 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(W1), pp. W90–7. doi: 10.1093/nar/gkw377.
- Kulkarni, M., Ozgur, S. and Stoecklin, G. (2010) 'On track with P-bodies', *Biochemical Society Transactions*, 38(1), pp. 242–251. doi: 10.1042/BST0380242.
- Landon, A. L. *et al.* (2014) 'MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5(May), pp. 1–15. doi: 10.1038/ncomms6413.
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S. and Sonenberg, N. (1990) 'Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap.', *Nature*. England, 345(6275), pp. 544–547. doi: 10.1038/345544a0.
- Lejbkiewicz, F. *et al.* (1992) 'A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), pp. 9612 LP – 9616. doi: 10.1073/pnas.89.20.9612.
- Liao, Y. *et al.* (2019) 'WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 47(May), pp. 199–205. doi: 10.1093/nar/gkz401.
- Lin, J.-C., Hsu, M. and Tarn, W.-Y. (2007) 'Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(7), pp. 2235–40. doi: 10.1073/pnas.0611015104.
- Lin, J.-C. and Tarn, W.-Y. (2009) 'RNA-binding motif protein 4 translocates to cytoplasmic granules and suppresses translation via argonaute2 during muscle cell differentiation.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 284(50), pp. 34658–65. doi: 10.1074/jbc.M109.032946.
- Mader, S. *et al.* (1995) 'The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 15(9), pp. 4990–7. doi: 10.1128/MCB.15.9.4990.
- Mahboubi, H. and Stochaj, U. (2017) 'Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 1863(4), pp. 884–895. doi: 10.1016/J.BBADIS.2016.12.022.
- Mamane, Y. *et al.* (2004) 'eIF4E--from translation to transformation.', *Oncogene*. England, 23(18), pp. 3172–3179. doi: 10.1038/sj.onc.1207549.
- Marcotrigiano, J. *et al.* (1997) 'Cocrystal Structure of the Messenger RNA 5' Cap-Binding Protein (eIF4E) Bound to 7-methyl-GDP', *Cell*. Cell Press, 89(6), pp. 951–961. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80280-9.

- Marnef, A. and Standart, N. (2010) 'Pat1 proteins: a life in translation, translation repression and mRNA decay', *Biochemical Society Transactions*, 38(6), pp. 1602–1607. doi: 10.1042/BST0381602.
- Melanson, G., Timpano, S. and Uniacke, J. (2017) 'The eIF4E2-Directed Hypoxic Cap-Dependent Translation Machinery Reveals Novel Therapeutic Potential for Cancer Treatment.', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, p. 6098107. doi: 10.1155/2017/6098107.
- 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.
- Mrvová, 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(1), pp. 167–186. doi: 10.1007/s00438-017-1375-4.
- Muñoz-Sánchez, J. and Chánez-Cárdenas, M. E. (2019) 'The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model.', *Journal of applied toxicology : JAT*. England, 39(4), pp. 556–570. doi: 10.1002/jat.3749.
- Okumura, F., Zou, W. and Zhang, D. E. (2007) 'ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP', *Genes and Development*, 21(3), pp. 255–260. doi: 10.1101/gad.1521607.
- Osborne, M. J. *et al.* (2013) 'EIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), pp. 3877–3882. doi: 10.1073/pnas.1216862110.
- Parker, R. and Sheth, U. (2007) 'P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation', *Molecular Cell*. Cell Press, 25(5), pp. 635–646. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.02.011.
- Pause, A. *et al.* (1994) 'Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function', *Nature*, pp. 762–767. doi: 10.1038/371762a0.
- Peter, D. *et al.* (2017) 'GIGYF1/2 proteins use auxiliary sequences to selectively bind to 4EHP and repress target mRNA expression', *Genes and Development*, 31(11), pp. 1147–1161. doi: 10.1101/gad.299420.117.
- Protter, D. S. W. and Parker, R. (2016) 'Principles and Properties of Stress Granules', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 26(9), pp. 668–679. doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.004.
- Ramaswamy, S. *et al.* (2003) 'A molecular signature of metastasis in primary solid tumors', *Nature Genetics*, 33(1), pp. 49–54. doi: 10.1038/ng1060.
- Raught, B. and Gingras, A. C. (1999) 'eIF4E activity is regulated at multiple levels.', *The international journal of biochemistry & cell biology*. Netherlands, 31(1), pp. 43–57. doi: 10.1016/s1357-2725(98)00131-9.
- Rhoads, R. E. (2009) 'EIF4E: New family members, new binding partners, new roles', *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), pp. 16711–16715. doi: 10.1074/jbc.R900002200.
- Robert, F. *et al.* (2020) 'RNA-tethering assay and eIF4G:eIF4A obligate dimer design uncovers multiple eIF4F functional complexes', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 48(15), pp. 8562–8575. doi: 10.1093/nar/gkaa646.
- Rom, E. *et al.* (1998) 'Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein', *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(3), pp. 691–705. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.019.
- Roux, K. J. *et al.* (2012) 'A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells', *Journal of Cell Biology*, 196(6), pp. 801–810. doi: 10.1083/jcb.201112098.
- Roux, K. J., Kim, D. I. and Burke, B. (2013) 'BioID: A screen for protein-protein interactions', *Current Protocols in Protein Science*, (SUPPL.74), pp. 1–14. doi: 10.1002/0471140864.ps1923s74.
- Ruud, K. a *et al.* (1998) 'Identification and Characterization of a Novel Cap-binding Protein from Arabidopsis thaliana', *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), pp. 10325–10330. doi: 10.1074/jbc.273.17.10325.

- Salditt-Georgieff, M. *et al.* (1980) 'The addition of 5' cap structures occurs early in hnRNA synthesis and prematurely terminated molecules are capped', *Cell*. Cell Press, 19(1), pp. 69–78. doi: 10.1016/0092-8674(80)90389-X.
- Semenza, G. L. (1999) 'Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.', *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), pp. 551–578. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.551.
- Shatkin, A. J. (1976) 'Capping of eucaryotic mRNAs', *Cell*. Cell Press, 9(4), pp. 645–653. doi: 10.1016/0092-8674(76)90128-8.
- Shi, T. *et al.* (2010) 'cDNA microarray gene expression profiling of hedgehog signaling pathway inhibition in human colon cancer cells.', *PLoS one*, 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013054.
- Shirokikh, N. E. and Preiss, T. (2018) 'Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions', *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, (November 2017), pp. 1–45. doi: 10.1002/wrna.1473.
- Sinha, N. K. *et al.* (2020) 'EDF1 coordinates cellular responses to ribosome collisions.', *eLife*, 9. doi: 10.7554/eLife.58828.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. (2007) 'New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease', *Molecular Cell*. Cell Press, 28(5), pp. 721–729. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.11.018.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. (2009) 'Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets', *Cell*. Elsevier Inc., 136(4), pp. 731–745. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.042.
- 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.
- Strudwick, S. and Borden, K. L. B. (2002) 'The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus.', *Differentiation; research in biological diversity*. England, 70(1), pp. 10–22. doi: 10.1046/j.1432-0436.2002.700102.x.
- 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(3), 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.
- Tee, A. R., Tee, J. A. and Blenis, J. (2004) 'Characterizing the interaction of the mammalian eIF4E-related protein 4EHP with 4E-BP1', *FEBS Letters*, 564(1–2), pp. 58–62. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00313-8.
- Timpano, S. *et al.* (2016) 'Analysis of Cap-binding Proteins in Human Cells Exposed to Physiological Oxygen Conditions', *Journal of Visualized Experiments*, (118). doi: 10.3791/55112.
- Timpano, S. and Uniacke, J. (2016) 'Human cells cultured under physiological oxygen utilize two cap-binding proteins to recruit distinct mRNAs for translation', *Journal of Biological Chemistry*, 291(20), pp. 10772–10782. doi: 10.1074/jbc.M116.717363.
- Uniacke, J. *et al.* (2012) 'An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery', *Nature*. Nature Publishing Group, 486(7401), pp. 126–129. doi: 10.1038/nature11055.
- 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(1), pp. 14–23. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.12.021.

- Villaescusa, J. C. *et al.* (2004) 'Expression of Hox cofactor genes during mouse ovarian follicular development and oocyte maturation', *Gene*. Elsevier, 330, pp. 1–7. doi: 10.1016/J.GENE.2004.01.024.
- Villaescusa, J. C. *et al.* (2009) 'Cytoplasmic Prep1 interacts with 4EHP inhibiting Hoxb4 translation', *PLoS ONE*, 4(4). doi: 10.1371/journal.pone.0005213.
- Volpon, L. *et al.* (2013) 'EIF4E3, a new actor in mRNA metabolism and tumor suppression', *Cell Cycle*, 12(8), pp. 1159–1160. doi: 10.4161/cc.24566.
- Volpon, L., Osborne, M. J. and Borden, K. L. B. (2019) 'Biochemical and Structural Insights into the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E.', *Current protein & peptide science*. United Arab Emirates, 20(6), pp. 525–535. doi: 10.2174/1389203720666190110142438.
- Wahle, E. and Winkler, G. S. (2013) 'RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4–Not and Pan2–Pan3 complexes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier, 1829(6–7), pp. 561–570. doi: 10.1016/J.BBAGRM.2013.01.003.
- Wang, G. L. *et al.* (1995) 'Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 92(12), pp. 5510–4. doi: 10.1073/PNAS.92.12.5510.
- Wang, K. *et al.* (2019) 'Integrated Bioinformatics Analysis the Function of RNA Binding Proteins (RBPs) and Their Prognostic Value in Breast Cancer', *Frontiers in Pharmacology*, 10(March), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphar.2019.00140.
- Weidmann, C. A. and Goldstrohm, A. C. (2012) 'Drosophila Pumilio Protein Contains Multiple Autonomous Repression Domains That Regulate mRNAs Independently of Nanos and Brain Tumor', *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), pp. 527–540. doi: 10.1128/MCB.06052-11.
- Whiteside, T. L. (2008) 'The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth', *Oncogene*. Macmillan Publishers Limited, 27, p. 5904. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.271>.
- Wiesener, M. S. *et al.* (2002) 'Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs.', *The FASEB journal*, 17(2), pp. 1–22. doi: 10.1096/fj.02-0445fje.
- Yang, B., Gu, A. and Wu, Y. (2021) 'High EIF4E2 expression is an independent prognostic risk factor for poor overall survival and recurrence-free survival in uveal melanoma.', *Experimental eye research*. England, 206, p. 108558. doi: 10.1016/j.exer.2021.108558.
- Ye, J. *et al.* (2012) 'Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.', *BMC bioinformatics*, 13, p. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- 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', *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), pp. 18732–18742. doi: 10.1074/jbc.M113.471466.
- Yuan, H. *et al.* (2011) 'Donepezil attenuated oxygen-glucose deprivation insult by blocking Kv2.1 potassium channels.', *European journal of pharmacology*. Netherlands, 657(1–3), pp. 76–83. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.01.054.
- Zhang, X. *et al.* (2021) 'microRNA-induced translational control of antiviral immunity by the cap-binding protein 4EHP.', *Molecular cell*. United States, 81(6), pp. 1187–1199.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.01.030.
- Zuberek, J. *et al.* (2007) 'Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs', *Rna*, 13(5), pp. 691–697. doi: 10.1261/rna.453107.