

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: BIOCHEMIE

Studijní obor: BIOCHEMIE



Lucie Peclinovská

Studium a podjednotky lidského translačního iniciačního faktoru 3 (eIF3) metodou RNA interference

RNAi of the a subunit of human translation initiation factor 3 (eIF3)

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Školitel: Mgr. Leoš Valášek, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 15.5.2012

.....

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat školiteli Mgr. Leošovi Valáškoví PhD., za to, že mi umožnil pracovat na tomto projektu v Laboratoři Regulace Genové Expresce a za trpělivý a přívětivý přístup během vedení celé experimentální práce. Děkuji studentce doktorského studia Susan Wagner, za její ochotu a pomoc při řešení experimentálních problémů. Moje poděkování dále náleží všem ostatním členům laboratoře. Jmenovitě pak, Petře Beznoskové, Lucii Cuchalové, Slávce Gunišové, Anně Hermannové, Tomášovi Koubovi, Olze Krýdové, Vandě Munzarové a v neposlední řadě Vladěce Vlčkové, za všechny jejich rady a vytváření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych velice ráda poděkovala Prof. Marii Stiborové, DrSc., za její obětavost, vstřícnost a čas, který věnovala korektuře této práce.

Poslední, avšak neméně důležité poděkování, bych ráda věnovala celé mojí rodině za jejich vlídnou podporu nejen v průběhu experimentální práce a jejího sepisování, ale i po celou dobu mého studia.

Abstract

Translation initiation is the first step of protein synthesis that captures the flow of gene expression pathway in all living organisms. The advantage of regulation of gene expression at the level of translation initiation is that it allows for more rapid changes in the proteome and serves as the rate limiting step under certain conditions such as stress. This process is masterminded by many initiation factors. One of them, a multisubunit eukaryotic initiation factor 3 (eIF3), is a very efficient player in this field taking a part in the most of the initiation steps. The largest subunit of the eIF3 complex is called eIF3a p170 and TIF32 in mammals and yeast, respectively, and at least in yeast, it was shown to represent an essential constituent of the translational machinery. This work is based on all that has been learned about the eIF3a roles in translation initiation in the model organism of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in effort to examine the degree of the functional conservation with its human ortholog. This is achieved by the RNAi-mediated knock-down of eIF3a in HeLa and HEK cell lines followed by variety of well established assays to monitor translational status of eIF3a depleted cells. In the first part, I describe optimization of the RNA interference protocol with respect to the choice and concentrations of a transfection reagent as well as the actual siRNAs. In the second part, I focus on investigating the effect of the eIF3a down-regulation on i) cell viability using the MTT assay; ii) the rate of global protein synthesis by ³⁵S-methionin incorporation and iii) formation of polysome profiles.

Key words: translation initiation, eIF3, the a subunit of eIF3 (p170 / eIF3a), RNAi method

(In Czech)

Abstrakt

Iniciace translace je klíčovým krokem proteosyntézy, který umožňuje regulaci genové exprese. Regulace na úrovni přepisu mRNA je nejrychlejším možným mechanismem. Celý proces je ovlivňován mnoha iniciačními faktory. Jedním z eukaryotických iniciačních faktorů, který participuje na celé řadě procesů během iniciace translace je eIF3. Za jeho velice efektivní, a pro iniciaci translace nezbytnou, alespoň v kvasinkách, byla označena největší podjednotka p170, též nazývaná eIF3a. Tato práce si klade za cíl, utvořit komplexní náhled na eIF3a, přičemž hodlá vycházet z poznatků nabytých sledováním této podjednotky v *Saccharomyces cerevisiae*. Snížení exprese eIF3a, které umožňuje pozorovat vliv této podjednotky pomocí různých experimentů v porovnání s kontrolní skupinou, je "navozeno" metodou RNA interference. Na eIF3a je zde nahlíženo z pohledu i) životaschopnosti buněk metodou využívající 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyl-tetrazolium bromid (MTT testu) ; ii) sleduje se vliv podjednotky na celkovou expresi proteinu inkorporací ³⁵S-methioninu a iii) v neposlední řadě je v této práci ukázán vliv snížené exprese eIF3a na tvorbu polysomů.

Klíčová slova: iniciace translace, eIF3, podjednotka eIF3a nebo p170, RNA interference

1	<u>OBSAH</u>	
2	PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATE	8
3	ÚVOD	10
3.1	Iniciace translace	10
3.2	Iniciace translace eukaryot závislá na 7-methylguanosinové čepičce	11
3.3	Eukaryotický iniciační faktor 3	15
3.4	Největší podjednotka největšího iniciačního faktoru: savčí eIF3a	17
4	CÍL PRÁCE	20
5	MATERIÁL A METODY	21
5.1	Laboratorní vybavení:	21
5.2	Chemikálie	22
5.3	Roztoky	24
5.4	Metody	25
5.4.1	Udržování buněčných linií a práce s nimi	25
5.4.2	Popis metody vedoucí k transfekci buněk siRNA	27
5.4.3	Extrakce buněčného obsahu	28
5.4.4	Elektroforéza s použitím polyakrylamidového gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	28
5.4.5	Metoda "Western blot"	29
5.4.6	Sledování životaschopnosti (viability) buněk experimentem využívajícím 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT test)	32
5.4.7	Inkorporace ³⁵ S-methioninu do syntetizovaných proteinů	33
5.4.8	Příprava vzorků a spektrofotometrické měření polysomových profilů buněk HeLa	35
6	VÝSLEDKY	37
6.1	Vliv transfekce buněk siRNA na syntézu proteinu eIF3a	37
6.2	Pozorování změn v životaschopnosti buněk s "deplecí" eIF3a v porovnání s kontrolní skupinou metodou MTT testu	38
6.3	Sledování průběhu syntézy proteinů v buňkách s "deplecí" eIF3a metodou inkorporace ³⁵ S-methioninu	44
6.4	Polysomový profil buněk s "deplecí" eIF3a	45

7	DISKUSE	47
8	ZÁVĚR	50
9	LITERÁRNÍ PŘEHLED	51

2 PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATE

40-80S	ribozomální komponenty
DMEM	kultivační médium (Dulbecco/Vogt Modified Eagle's minimal essential Medium)
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
eIF 3(a-j)	podjednotky eukaryotického iniciačního faktoru 3 a-j
eIF(1-5)	eukaryotické iniciační faktory
eRF	eukaryotické uvolňovací faktory
GEF	guanin-nukleotidový výměnný faktor
IGEPAL	komerční název pro 2-(2-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy)ethanol
IRES	vnitřní ribozomální vstupní místa
Met-tRNA ^{Met}	Methionyl-tRNA
MFC	multifaktoriální komplex
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromid
ntRNA	krátká RNA nekomplementární k použitým vláknům mRNA
PBS	(z angl. Phosphate-Buffered Saline) fosfátový pufr s 0,15 M NaCl
PIC	pre-iniciační komplex
P-místo	peptidylové vazebné místo ribozomu
PMSF	fenylmethylsulfonyl-fluorid
ptr-TC	preterminační komplex
REI	reiniciace

RNAi	RNA interference
RPS	ribosomální protein
SD sekvence	Shine-Dalgarnova sekvence
SDS PAGE	elektroforéza s použitím polyakrylamidového gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného
siRNA	krátká interferující RNA
TBS	(z angl. Tris-Buffered Saline) pufr
TC	ternární komplex
TG	(z angl. Tris-glycine) pufr
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	nepřekládaná část mRNA
β -ME	β -merkptoethanol

3 ÚVOD

Proteosyntéza je velice komplexní proces, který sestává z vlastní syntézy proteinů a který je závislý i na procesu transkripce. Vzhledem k vysoké důležitosti načasování vzniku produktů proteosyntézy, proteinů, a přesnosti jejich syntézy, podléhá celý proces přísné regulaci. Regulace genové exprese samozřejmě nastává na více úrovních, ale ta, probíhající na úrovni translace již existující mRNA, je nejrychlejším způsobem, jak okamžitě ovlivnit množství vytvořeného proteinu a navíc přesně rozlišit mezi geny předurčenými ke zvýšení či snížení exprese na tzv. genově specifické úrovni. Správné fungování mechanismu regulace na úrovni translace je zásadní pro vývoj a diferenciaci buněk, při odpovědi na stres, při stárnutí, či vývoji nemocí. Ze všech kroků translace, tedy z iniciace, elongace, terminace a následné recyklace ribozomálních podjednotek, je iniciace translace krokem nejvíce ovlivňujícím regulaci syntézy proteinů a je tedy zároveň i krokem limitujícím rychlost této syntézy. Jako přehledný zdroj informací, shrnující základní poznatky o regulaci iniciace translace, je vhodný např. přehledný článek G. A. Hinnebusche et al. [1]. Přestože je celý proces translace předmětem studia mnoha vědeckých skupin, jak je ukázáno mimo jiné v této práci, není zcela objasněn, což svědčí o jeho komplexnosti. Ačkoliv jsou již jeho kroky dobře popsány, je ještě mnoho neobjasněných míst, která čekají na molekulárněbiologické, či biochemické vysvětlení.

3.1 Iniciace translace

Translace je proces zachovaný napříč všemi třemi doménami života. Prokaryotická (Archea a Eubakteria) translace a její jednotlivé fáze se výrazně liší od eukaryotické a to nejen na úrovni mechanismu, ale již ve stavbě základních komponent. V porovnání s prokaryotickým ribozomem (70S) složeným z malé podjednotky (30S) a z velké podjednotky (50S), je eukaryotický ribozom (80S) větší, složený z malé podjednotky (40S), obsahující 18S rRNA a 33 translačních ribozomálních proteinů, a velké podjednotky (60S) skládající se z ~3600-5000 nukleotidů a z ~45-49 proteinů [2].

Další rozdíly lze pozorovat na úrovni iniciačních faktorů. Eukaryotická translace je výrazně bohatší na iniciační faktory. Oproti třem prokaryotickým iniciačním faktorům, kontroluje eukaryotickou iniciaci kolem třinácti faktorů.

I v rozpoznávání iniciačního kodonu můžeme pozorovat nejnápadnější rozdíly v iniciaci translace. V prokaryotickém ribozomu je na 3' konci 16S rRNA tzv. anti Shine-Dalgarno sekvence (antiSD sekvence), která zajišťuje vazbu na komplementární SD sekvenci na mRNA, která předchází iniciačnímu kodonu. Tím napomáhá vyhledání startovního kodonu. Velmi zřídka se u domény Archaea vyskytuje ještě jednodušší mechanismus, který umožňuje začít translaci i přes absenci SD sekvence na mRNA [3]. Eukaryotický ribozom anti-SD sekvenci neobsahuje, malá podjednotka (40S) eukaryotického ribozomu "nasedá" společně s příslušnými pomocnými proteiny zvanými iniciační faktory na 5' nepřekládaný konec (UTR; z angl. UnTranslated Region) mRNA a "skenuje" směrem k jejímu 3' konci, než najde většinou první kodon AUG. Zmíněný postup je nejčastějším mechanismem iniciace translace u eukaryot, ale samozřejmě i v tomto případě existují i alternativní mechanismy. Tyto se liší třeba na úrovni jednotlivých organismů. Kupříkladu virová mRNA obchází tradiční "skenování" využitím vnitřních ribozomálních vstupních míst (IRES; z angl. Internal Ribosomal Entry Sites) [4]. Jelikož je celá tato práce zaměřená na klasický eukaryotický mechanismus iniciace, využívající "skenování" a iniciační faktory, bude dále diskutován jen tento způsob.

3.2 Iniacie translace eukaryot závislá na 7-methylguanositinové čepičce

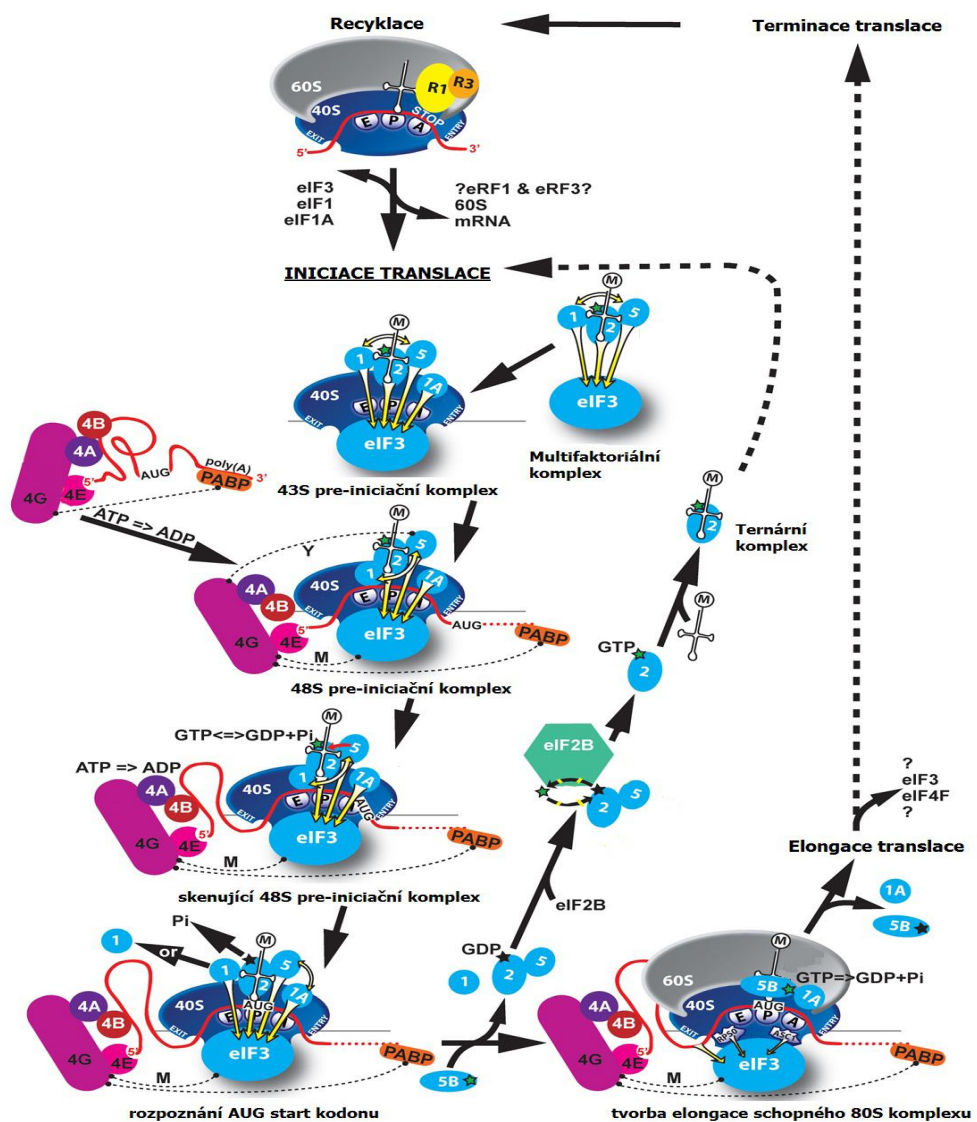
Celá iniciace translace je sled reakcí řízených iniciačními faktory, vedoucí k vyhledání iniciačního kodonu a sestavení komplexu 80S schopného elongace. Ze všech možných úhlů pohledu, jako je třeba popis čistě funkčních vlastností iniciačních faktorů, je v této práci uplatněn ten nejčastější, to jest chronologický popis iniciace translace.

Pro přehlednost je před komplexním popisem iniciace translace vhodné uvést nejprve stručné shrnutí procesů, ke kterým postupně dochází, a ilustrovat tento proces obrázkem nezjednodušené verze celého mechanismu v kvasinkách (obr 1), kde je nejlépe prostudován. Samotná iniciace translace je proces začínající spojením malé ribozomální podjednotky (40S), ternárního komplexu (viz níže) a několika iniciačních faktorů, čímž vzniká pre-iniciační komplex (43S) (43S PIC; z angl. Pre-Initiation Complex). Ten se dále, po navázání mRNA, mění na pre-iniciační komplex (48S) (48S PIC; z angl. Pre-Initiation Complex), který ve směru od 5' konce k 3' konci mRNA hledá většinou první iniciační kodon AUG. V rámci jeho nalezení dochází k úplné komplementární vazbě mezi anti-

kodonem tRNA a kodonem AUG mRNA, což vyvolá důležitou konformační změnu s následným navázáním velké ribozomální podjednotky (60S).

V tomto místě, vytvořením ribozomu schopného elongace (80S), je ukončen proces iniciace translace, který je bezprostředně následován právě elongací.

Ve skutečnosti jsou všechny výše zmíněné kroky daleko komplikovanější a vyžadují naprosto dokonalou synchronizaci všech vstupujících a vystupujících komponent, jak je podrobně popsáno níže.



Obr. 1 Schéma iniciace translace v *Saccharomyces cerevisiae*. Detailní pohled na všechny důležité kroky iniciace translace a náznak osudu ostatních komponent v dalších fázích translace, probíhající v eukaryotickém organismu kvasinek (upraveno dle Valášek, L.S. (2012) Ribozoomin' – Translation Initiation from the Perspective of the ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs). *Curr Protein Pept Sci.*, přijato do tisku).

Pro iniciaci translace jako takovou je potřeba malá a velká ribozomální podjednotka, iniciační faktory, iniciační methionyl-tRNA ($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$), ale i energie ve formě GTP. Proteosyntéza je dějem cyklickým a vše zmíněné je získáváno recyklací po právě dokončené translaci, tedy poslední částí terminace. Jak bylo ukázáno v *S. cerevisiae*, vzájemná vazba eukaryotických iniciačních faktorů 1, 3 a 5 (eIF1, eIF3 a eIF5) s ternárním komplexem (TC; z angl. Ternary Complex), který je tvořen eukaryotickým iniciačním faktorem 2 (eIF2) vázaným na methylovanou methionyl-tRNA a GTP, dá vzniknout multifaktoriálnímu komplexu (MFC; z angl. MultiFactor Complex) [5]. Nedávno byla nezávislá přítomnost MFC na menší ribozomální podjednotce (40S) potvrzena i v buňkách HeLa [6]. Vazba MFC a podjednotky (40S) dává vzniknout 43S PIC. V kvasinkovém modelu byl sledován vliv vazby MFC na změnu konfigurace menší ribozomální podjednotky (40S), čímž dochází k zpřístupnění vstupního místa pro mRNA [7]. Dále přichází na řadu eukaryotické iniciační faktory 4F a 4B (eIF4F a eIF4B), které započnou s rozvolňováním sekundárních struktur přirozeně vytvořených na 5' UTR konci mRNA v blízkosti 7-methylguanosinové čepičky. Tím se umožní její navázání na 43S PIC. Faktor eIF4F se skládá ze tří podjednotek – eIF4E, G a A. eIF4E zajišťuje navázání na čepičku. Eukaryotický iniciační faktor 4G (eIF4G) slouží nejen jako tzv. "lešení" (z angl. scaffold) pro navázání všech komponent eIF4F komplexu, ale navíc interaguje ještě s proteinem vázajícím poly(A) konec mRNA (PABP; z angl. Poly(A)Binding Protein) a eIF3 (který se váže jen na savčí eIF4G) [8]. eIF4A působí jako helikáza, která ve spolupráci s eIF4B, rozvolňuje mRNA od jejího 5' konce [9]. Držení mRNA v 43S PIC je zprostředkováno hned dvojím způsobem. Jednak je mRNA držena přes již zmíněný eIF4E, který v savčím modelu interaguje se 7-methylguanosinovou čepičkou, a dále dochází k vazbě mezi PABP, a 3' koncem, který je bohatý na obsah adenosinu. Již zmíněný eIF3 interaguje s komplexem tvořeným eIF4F-mRNA, což je pravděpodobně pravým vazebným místem mRNA na 43S. U savců není vyloučeno, že k vazbě mezi eIF3 a komplexem eIF4F dochází přes eIF4G. Po dokončení navázání se 43PIC mění na 48S PIC.

Úspěšným zformováním 48S PIC se zahájí "skenování" příslušné mRNA od 5' UTR, celý tento proces je však z hlediska mechanismu stále velkou neznámou. Z některých výzkumů uskutečněných s kvasinkami je patrné, že se na podpoře posouvání 48S PIC podílí i eIF3 [10]. GTP, obsažený v TC, je během "skenování" částečně hydrolyzován na eIF2 za pomoci eIF5, ale nedochází zde ještě k uvolnění anorganického fosfátu. Až v tom okamžiku, kdy se 48S PIC, a v něm na ribozomálním P-místě čekající $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$,

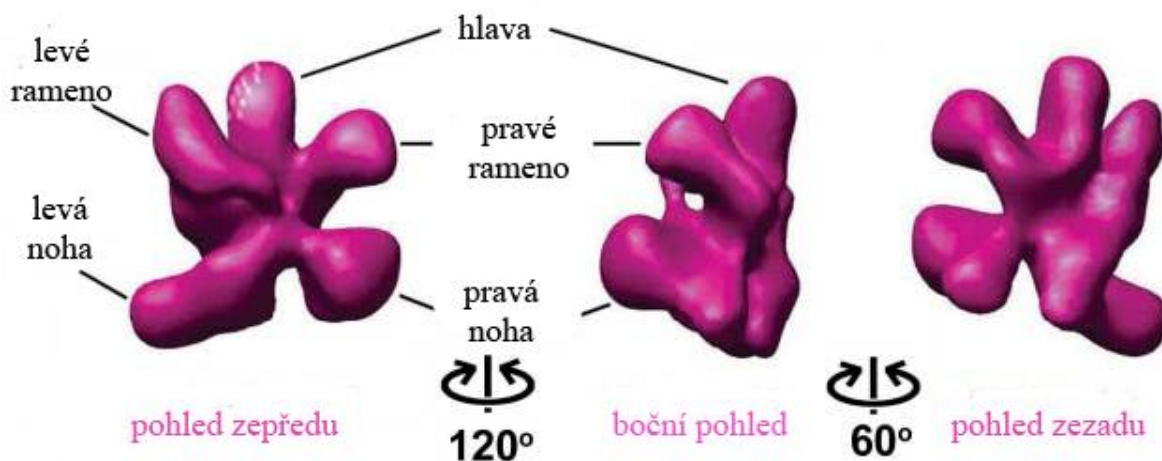
komplementárně naváže na kodonový triplet AUG, dojde nejprve k uvolnění eIF1, což zároveň umožní uvolnění anorganického fosfátu [11]. Vzhledem k důmyslnému mechanismu kontroly ukončení procesu "skenování" se často v souvislosti s tímto momentem hovoří o kontrolním bodu (z angl. check-point) a zároveň je eIF1 označován za strážce správného komplementárního spárování kodonu s antikodonem.

S ohledem na komplexnost celého procesu je nasnadě, že byt' s velmi malou frekvencí, tu a tam dojde k mylnému rozpoznání iniciačního kodonu a to nejčastěji u těch kodonů, které jsou tzv. blízce příbuzné (z angl. near-cognate); jako jsou například UUG, AUU, atd. Někdy tyto kodony zcela záměrně slouží jako začátek syntézy proteinů. Zajímavý je v tomto případě fakt, že ačkoliv je iniciační kodon jiný než AUG, první tRNA, určující první aminokyselinu proteinu, je vždy Met-tRNA_i^{Met} [12]. Což znamená, že každý jiný začátek než na AUG vyžaduje neúplné párování bazí, mezi kodonem a anti-kodonem v místě P. Dokončení "skenování", ale zdaleka není koncem iniciačního procesu.

Odpoutání eIF1 a anorganického fosfátu vede ke konformační změně ribozomální podjednotky pravděpodobně zpět do její původní podoby, což zajistí zastavení "skenování" s AUG v místě P, neboť ribozom pevně semkne mRNA v místě určeném pro vazbu mRNA zvaném "mRNA-vazebný-kanál", čímž znemožní další posunování ve směru 5' => 3'. Následná vazba větší ribozomální podjednotky (60S) na 48S PIC, medovaná eIF5B s navázaným GTP vede k uvolnění většiny iniciačních faktorů, dle dosavadního výzkumu s výjimkou eIF1A a eIF3 [13]. Finální hydrolyza GTP na eIF5B po správném vytvoření všech "mezi-podjednotkových mostů" (interakcí) mezi 40S a 60S pak umožní uvolnění eIF5B spolu s eIF1A. Tyto skutečnosti vedou ke konečnému vytvoření ribozomu (80S). Iniclace je dokončena a nastává neméně složitý proces elongace, během jehož začátku je velmi pravděpodobně stále přítomen poslední iniciační faktor - eIF3. Pro nový počátek iniciačního kroku translace je nutné obnovit TC a to přeměnou eIF2-GDP opět na eIF2-GTP pomocí eIF2B, který je schopný vyměnit guaninové nukleotidy (GEF, z angl. Guanin nucleotide Exchange Factor) a provést recyklaci post-terminačního komplexu (80S).

3.3 Eukaryotický iniciační faktor 3

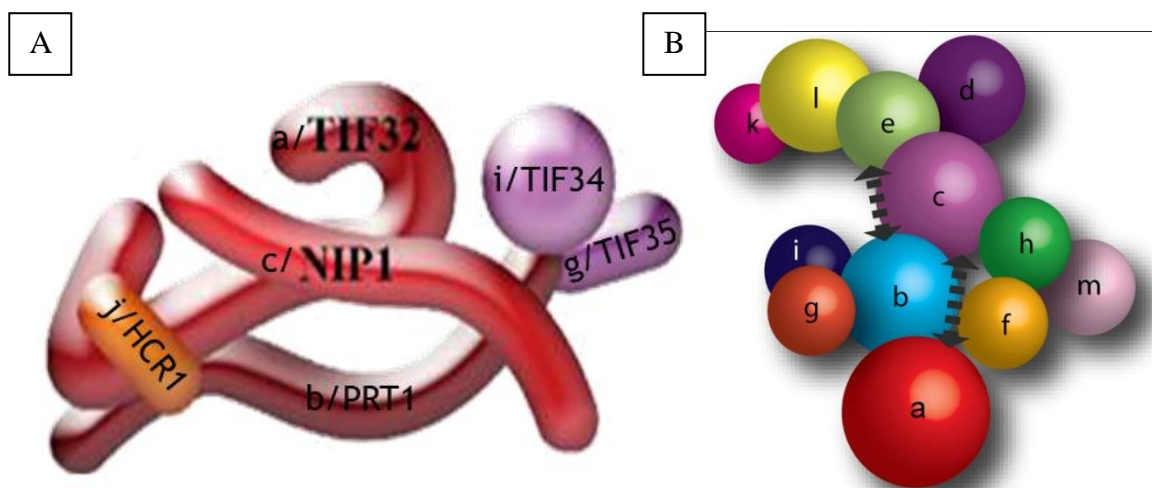
Jak již vyplývá z předchozího textu, mezi všemi iniciačními faktory vyniká svou naprostou multifunkčností eIF3. Přestože se se studiem největšího iniciačního faktoru započalo již dříve, prodělal výzkum eIF3 renesanci asi před patnácti lety, kdy se opět dostal do středu zájmu. Mnoho funkčních studií eIF3 pochází z kvasinek, ale máme již k dispozici i první strukturní modely savčího eIF3 (obr. 2).



Obr. 2 Struktura savčího eIF3 Kryo-elektronovou mikroskopií. Jedná se o model savčího eIF3 s rozlišením 30Å (upraveno dle [14])

Zatímco kvasinkový eIF3 obsahuje 5 esenciálních podjednotek (a/TIF32, b/PRT1, c/NIP1, i/TIF34 a g/TIF35) [15] a jednu podjednotku vedlejší (j/HCR1) (obr. 3, A), jeho savčí verze obsahuje podjednotek 13, označených od eIF3a do eIF3m (obr. 3, B). Přesné složení a vzájemné "mezi-podjednotkové" interakce kvasinkového faktoru jsou již známy [16], kolem savčího eIF3 je stále ještě mnoho otazníků, vzhledem k rozličným publikovaným výsledkům studia jeho složení a struktury. Jedna vědecká skupina popsala na základě hmotnostní spektrofotometrie existenci tří modulů eIF3, z nichž jeden, sestaven z podjednotek a, b, i a g, zhruba odpovídá funkčnímu jádru eIF3 kvasinek [17]. Oproti tomu jiný výzkum označil za jádro lidského eIF3 i evolučně nezachované podjednotky, tedy k původním a, b, c, přidal ještě nezachované e, f a h [18]. Je zřejmé, že nejasnosti kolem přesného složení savčího eIF3 vytváří značný prostor pro další bádání.

Z funkčního hlediska je eIF3 nezastupitelným nejen při iniciaci translace, ale rovněž v rámci post-translačních recyklačních procesů [19], ale současně také během velice specializovaného procesu tzv. reiniciace (viz níže) [20].



Obr. 3 A) Kvasinkový eIF3. Model vzájemných interakcí jednotlivých podjednotek kvasinkového eIF3 (upraveno dle [21]). **B) Savčí eIF3.** Naznačení všech 12 podjednotek a jejich interakcí, bez vedlejší j podjednotky (upraveno podle [17]).

Z pohledu iniciace translace je eIF3 využíván hned v několika krocích. Zprv se podílí na prevenci předčasného navázání velké ribozomální podjednotky na menší podjednotku (40S), čímž vytváří prostor pro tvorbu 43S PIC. Dnes je již známo, že mu ve výkonu této funkce pomáhají další iniciační faktory jako eIF1, eIF1A a dále TC [22].

Zadruhé podporuje tvorbu 43S PIC, pomáhá navázat TC s podporou eIF1 a eIF1A na podjednotku 40S [23]. Vzhledem k tomu, že u kvasinek byl izolován MFC složený z eIF3, eIF1, eIF5 a TC, který se vyskytuje v cytoplasmě i bez přímého napojení na podjednotku 40S, je velice pravděpodobné, že vytvoření MFC předchází a usnadňuje tvorbu 43S PIC [24].

Ačkoliv zatím není žádný přímý důkaz o tom, že by vazba eIF3 na eIF4G byla nezbytná pro navázání mRNA na 43S PIC v savčích buňkách, je prokázáno, že eIF3 interaguje s komplexem tvořeným eIF4F-mRNA, a je tedy možné, že právě tato interakce je využívána pro navázání 43S PIC na mRNA [25]. Dokonce se zdá, že eIF3 přímo interaguje s mRNA, díky své schopnosti vázat mRNA [26]. V každém případě minimálně v kvasinkách je eIF3 klíčovým faktorem vazby mRNA na 48S PIC. Jednou z dalších funkcí eIF3 je participace při "skenovacích" procesech, které jsou pravděpodobně stimulovány hlavně faktory eIF1 a

eIF1A. Mutace kvasinkových podjednotek i/TIF34 a g/TIF35 negativně ovlivňuje rychlost s jakou ribozom "skenuje" mRNA a rovněž schopnost 48S PIC rozvolnit sekundární struktury vytvořené v oblasti 5' UTR.

Neméně významnou úlohou eIF3 je participace na rozpoznání iniciačního kodonu AUG. Z hlediska správného rozpoznání startovního kodonu se ukázala jako významná většina podjednotek eIF3, jmenovitě pak c/NIP1, j/HCR1, b/PRT1, a/TIF32. Mutace v jakékoliv ze zmíněných podjednotek vedou ke zvýšení "započetí" translace na kodonech podobných iniciačnímu kodonu AUG, popřípadě ke snížení iniciace na samotném AUG (z angl. leaky scanning). K iniciaci tak může dojít na jiném než prvním AUG ve směru od čepičky nebo na zcela jiném tripletu. Oba chybné začátky vedou k záměně "čtecího rámce", v jejímž důsledku nezřídka kdy dochází k "výrobě" naprosto nepoužitelného, někdy i toxického proteinu [21].

Konečně, jak už bylo řečeno výše, eukaryotický iniciační faktor 3 pomáhá při recyklaci komponent ribozomu (80S) po terminaci translace a usnadňuje jejich disociaci [27]. Tento pokus byl proveden pouze *in vitro*. Post-translační preterminační komplex (pre-TC; z angl. pre-Termination Complex) byl, stejně jako eukaryotické uvolňující faktory (eRF; z angl. Releas Factor) a eIF, izolován a purifikován z králičích retikulocytů. Vytvořily se reakční směsi pre-TC s různým poměrem eRF a eIF a po proběhnutí reakcí byl sledován efekt na pre-TC. Ukázalo se, že pouze vzorky obsahující eIF3 obsahovaly ~40% disociovaných podjednotek. To je jasným důkazem, že se eIF3 podílí i na recyklačních procesech.

Pro úplnost je vhodné zmínit, že eIF3 je zahrnut i v některých signalizačních drahách, stejně jako v regulaci buněčného cyklu [28], což nebude dále diskutováno, vzhledem k zaměření práce na iniciaci translace.

3.4 Největší podjednotka největšího iniciačního faktoru: savčí eIF3a

TIF32, p150, p167, p170, p180, p185, EIF3S10, eIF3-theta, eIF3a - všechny tyto zkratky označují jeden jediný protein, to jest největší podjednotku eukaryotického iniciačního faktoru 3. Gen lidského eIF3 leží na pozici 10q 26. chromosomu [29] a jím kódovaný protein se zdá být složen ze dvou hlavních částí. První doména je složená z motivu zvaného PCI (z angl. Proteasome, COP9 signalosome, Initiation factor), která je společná pro několik podjednotek proteasomu, signalosomu COP9 a právě eIF3. Nachází se na C-

konci a její funkcí je zřejmě interakce s ostatními podjednotkami eIF3, případně dalšími proteiny eukaryotických iniciačních faktorů. Druhou částí je spektrinová repetice [30], která ve většině případů zodpovídá za navazování na membránové struktury, což vedlo k zahájení zkoumání i této možné vlastnosti eIF3a. Na rozdíl od lidského eIF3, v kvasinkách víme mnohé o vazbách, jak na C-konec, tak i na N-konec proteinu a/TIF32. Interakce mezi a/TIF32 a zbylými podjednotkami kvasinkového eIF3 byly studovány a přinesly následující výsledky. a/TIF32 interaguje s b/PRT1 [31], c/NIP1 [32] a s j/HCR1 [33]. Co se týká vazby na ribozom (40S), na C-konci interaguje a/TIF32 s 18S rRNA a ribozomem. K dalším interakcím na C-konci dochází mezi proteinovou malou podjednotkou RPS2 a 3, a na N-konci dochází k vazbě s RPS0A. eIF3a je jedním z hlavních faktorů silné vazby celého komplexu eIF3 na podjednotku 40S.

Rozpoznání dvou odlišných interakčních míst směřovalo k podrobnějšímu studiu distribuce eIF3a v buňce. Z výzkumu vyplynulo, že distribuce eIF3a je následující, zhruba 20% je přítomno ve formě membránové a zbytek, tedy až 80% je cytosolární typ. Hlavním rozdílem dvou různých forem eIF3a je fakt, že cytosolární podjednotka je fosforylovaná v serinových a treoninových oblastech, ale membránová forma se vyskytuje výlučně nefosforylovaná [34]. Inspirujeme-li se vším, co doposud víme o funkci fosforylace v souvislosti s vlastnostmi jiných iniciačních faktorů, kupříkladu eIF2 α [35], je nasnadě, že i fosforylace na různých místech v eIF3a povede k možné variabilitě jejího fungování. Proto si tato schopnost žádá další zkoumání.

S každou z uvedených forem se pojí i specifické funkce. Kromě iniciace translace se eIF3a zdá být zahrnuta v procesech regulace buněčného cyklu, diferenciaci buněk, při tvorbě stresových granulí a v neposlední řadě se ukazuje její přítomnost v určitých stádiích nádorových procesů. V tomto ohledu se prozatímní výsledky různých laboratoří rozcházejí. Například jedna skupina tvrdí, že eIF3a se přímo podílí na vývoji nádorových onemocnění [30]. Vyskytují se ale i vědecké práce poukazující na možný vliv eIF3a na zbrzdění již započatých nádorových procesů [36]. Otázka, zda je eIF3a přímo zahrnuta ve vývoji nádorového bujení, či zda se vyskytuje jen jako sekundární prvek, i přes první pokusy, stále čeká na své zodpovězení.

Za zajímavý lze označit proces zvaný reiniciace (REI). Jde o genově specifický proces závislý na okolním prostředí buňky, respektive na stresových faktorech. REI je popsána za použití kvasinkového genu GCN4, který obsahuje v sekvenci před vlastním genem čtyři otevřené "čtecí rámce" (ORF; z angl. Open Reading Frame) [37]. Jedná se o velice

speciální druh "započetí" translace ihned po dokončení přepisu určitých "ORFů". Nejefektivnějším se ukázal být ORF1, po jeho přečtení zůstává mRNA sevřená v ribozomu, který pokračuje ve "skenování" a při dostatečném množství TC se tento naváže na setrvávající ribozom a to mu umožní začít s iniciací na startovním kodonu na jednom z dalších "ORFů". Situace je zcela odlišná v případě, kdy jsou buňky vystaveny nedostatku aminokyselin. Vyvolaný stres způsobí nedostatek TC. Deficience TC neumožní tak rychlou aktivaci ribozomu, setrvávajícího na mRNA, a ten zvolna putuje k iniciačnímu kodonu funkčního genu. V momentě, kdy se dostane za ORF4 a dojde k navázání TC, spustí se translace vlastního genu GCN4. Během celého procesu se ukázal být, mimo jiné, velmi důležitým a/TIF32, který interaguje s 5' koncem ORF1[38]. Vzájemná interakce je považována za stabilizační prvek ribozomální podjednotky 40S [13].

Vliv a/TIF32 na iniciaci translace, homologu lidského eIF3a v *S. cerevisiae*, byl důkladně studován a bylo prokázáno, že je zcela esenciální složkou tohoto procesu [39]. Ve vztahu ke globálnímu úkolu vědy v tomto oboru, to jest upevnění lidského zdraví účinnější léčbou, je dalším přirozeným krokem využít naše znalosti získané ze studia kvasinkového modelu pro studium komplikovanější, vývojově vyšší formy eIF3a, a to konkrétně její lidské varianty, a jejího úkolu v rámci iniciace translace. Některé skupiny vědců, na jejichž práce již bylo poukázáno např. [6][8][17], se již nějaký čas těmto složitějším formám věnují, většinou studiím myší, králíčí, či lidské podjednotky eIF3a. Prozatímní výsledky vědecké činnosti v tomto oboru budou uvedeny v kontextu s diskusí výsledků dosažených a prezentovaných v této práci.

4 CÍL PRÁCE

Veškeré dostupné informace o iniciaci translace pocházející z kvasinek jasně ukazují, že a/TIF32 neboli eIF3a, je kritickou složkou eukaryotického iniciačního faktoru eIF3. Funkční vlastnosti a/TIF32 jsou nezastupitelné, alespoň co se kvasinek jako modelového organismu týče, hned pro několik kroků iniciační dráhy. Proto je pochopitelně zajímavé srovnání všech již nabytých znalostí z naší práce s kvasinkami, například [21][38][40][13][41][33], s vývojově vyššími organismy, kterými jsou savci a v jejich popředí člověk. Má eIF3a vůbec nějakou úlohu v lidské iniciaci translace? Pokud ano, což je téměř jisté, je její funkce zachována v plném rozsahu a může být nazývána "nezastupitelnou" pro tento proces? Jaká je její struktura? Jaké umožňuje interakce s ostatními podjednotkami či mRNA? Nemluvě o snaze objasnit neméně složitý reiniciační proces.

Je tedy ještě mnoho bílých míst na mapě iniciace translace a lidské eIF3a.

Tato práce si proto klade za cíl začít s podrobným zkoumáním úlohy eukaryotického iniciačního faktoru 3 při translaci v lidských buňkách. Hlavním prostředníkem poznání je na počátku zvolena metoda "RNA interference", která sníženou expresí eIF3a, umožní porovnat z různých pohledů stav buněk, u kterých "běží" vše za normálních podmínek s těmi, které mají nedostatek eIF3a.

Za první velice důležitou metu lze proto považovat samotné účinné navození snížení exprese eIF3a.

Hlavními vytyčenými cíly této práce je tedy zmapovat, zda má eIF3a vliv na životaschopnost buněk, a pokud ano, zaměřit se na velmi pravděpodobnou souvislost s narušením hladkého průběhu iniciace translace. Z toho vyplývá, že následujícím úkolem bude například zjistit, zda v buňkách s defektem v expresi eIF3a translace probíhá, či nikoliv. Celkový translační proces bude z hlediska iniciace translace zkoumán analýzou tzv. polysomových profilů.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Laboratorní vybavení:

Beckman Coulter Allegra® X-15R Centrifuga, rotor SX 4750A

Beckman Coulter DU®530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer

Beckman Coulter optima™L-90K Ultracentrifuga, rotor SW 41

BioComp Gradient Master

Bio-Rad Criterion Cell

Bio-Rad Mini-Sub Cell GT Cell

Bio-Rad PowerPac Basic power supply

Bio-Rad PowerPac HC power supply

Bio-Rad PowerPac Universal power supply

Bio-Rad Wide-Sub Cell GT Cell

Biosam Multi-spin

Biosan Bio 3D Multi

Biosan Centrifuga/vortex Multi Spin MSC-300

Biosan Mini Rocker MR-1

Biosan Multi RS-60 Rotator

Brandel BR-188 Density Gradient Fractionation System

Eppendorf Centrifuge 5414D

Eppendorf Thermomixer Comfort

Eppendorf centrifuga 5702

Foxy Jr. UA-6 UV/VIS detector

Labnet Spectrafuga 24D

Marienfeld profesional 0,100 mm sklíčko s počítacími komůrkami

Nüve bath nb20 vodní lázeň

Sanyo CO₂ inkubátor 37°C, 5%CO₂

Scientific Industries Vortex genie 2

Syngene G:BOX iChemi detektor chviluminiscence

Telstar Bio-II-A flowbox

Thermo Scientific NANO DROP 200 spektrofotometr

TECAN Sunrise spektrofotometr

5.2 Chemikálie

2-(2-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy)ethanol (IGEPAL) (Sigma)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) (Sigma)

BCS - Biodegradable counting scintillant (Amersham Bioscience)

Bradford 5X Protein assay (Bio-Rad)

Criterion TGXTM, 4-20% Tris-HCl, 1mm, 12+2 Well Comb, 45 µl (Bio-Rad)

Cyklohexamid (Sigma)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma)

DMEM-High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine (z angl. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's minimal essential Medium) (PAA: The cell culture company)

Dodecylsulfát sodný (SDS), roztok 20% (Sigma)

EasyTagTM Methionine-L-[³⁵S] 1175Ci/mmol (PerkinElmer)

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) -free Complete Protease Inhibitor Mix tablety (Roche)

Ethidium bromide (Serva)

Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (Serva)

Fosfátový pufr s 0,15 M NaCl (PBS ředěný 10x) (Bio-Rad)

Instanční odtučněné mléko "Instant nonfet dry milk" (Nestlé)

INTERFERin™ (Polyplus transfection)

Leupeptin (Sigma)

Methanol (Lach-ner)

ON-TARGET plus SMART pool, human eIF3a (Thermo scientific)

PBS fosfátový pufr s 0,15M NaCl (PAA:The cell culture company)

Pepstatin (Sigma)

Primární protilátky: α -Tubulin, eIF3b, eIF3j a RPS14 (Santa Cruz), eIF3a (Cell Signaling)

Pufr s Tris (TBS ředěný 10x) (Bio-Rad)

Sacharóza (Fluka)

Sekundární protilátky: ECL™ Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep) 1ml

ECL™ Anti-rabbit IgG, HRP-linked whole antibody (from donkey)
(GE Healthcare)

siRNA interferující a neinterferující (Thermo science)

Substrát pro křenovou peroxidázu (kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate) (Thermo Scientific)

TBS pufr (z angl. Tris-Buffered Saline)

Telecí sérum (FBS; z angl. Fetal Bovine Serum) (PAA: The cell culture company)

Trichloroctová kyselina 14,3g/10ml

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Serva)

Tris-Glycinový pufr desetkrát ředěný (10x ředěný TG) (Bio-Rad)

Triton X-100 (Sigma)

Trypsin (PAA:The cell culture company)

Tween 20 (Sigma)

β -Mercaptoethanol (Sigma)

5.3 Roztoky

Z komerčně dodávaných chemikálií se v laboratoři vyskytují následující roztoky, používané v experimentech, připravené laborantkou:

"nanášecí" pufr s dodecylsulfátem sodným (SDS) pro elektroforézu 6x ředěný: 3,3 ml 1 M Tris (pH 7,5); 6 ml glycerol; 1,2 g SDS; 150 μ l β -ME, bromofenolová modři.

pufr A: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM KCl; 10 mM MgCl₂

pufr B: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 45% sacharóza

pufr C: (lyze buněk): 25 ml pufru A; 5 mM NaF; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 μ g/ml Aprotinin; 1 μ g/ml Leupeptin; 1 μ g/ml Pepstatin; 1 tableta "Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix"

pufr k "blotování" : 700 ml dH₂O; 200 ml methanol; 100 ml 10X ředěného TG

pufr k promývání membrán TBS-T pufr: TBS pufr; 0,1% Tween 20

pufr pro elektroforézu (SDS-PAGE pufr) : TG; 0.1% SDS

roztok 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu pro MTT test: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium v PBS 5 mg/ml

roztok pro rozpuštění formazanových krystalů při MTT testu (test životaschopnosti buněk využívající 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid): Isopropanal, 0,1% IGEPAL pH 4,5; 4 mM HCl

5.4 Metody

5.4.1 Udržování buněčných linií a práce s nimi

Buněčná linie HEK (z angl. Human Embryonic Kidney), přesněji HEK293T, je buněčnou linií odvozenou z lidských embryonálních buněk ledvin. Upravení na "nesmrtelnou" linii proběhlo v laboratoři doktora Franka Grahama [42], který infikováním buněk adenovirem, navodil inserci 4-5 kilobází virové genetické informace do lidského genomu. Číslo 293 za zkratkou pochází ze zvyku doktora Grahama, číslovat si experimenty. Buněčná linie je jen semi-adherentní, což značně ovlivňuje protokoly všech experimentů.

Buněčná line HeLa (název pochází z prvních dvou písmen jména a příjmení ženy, ze které byl odebrán vzorek tkáně rakoviny děložního čípku) je jednou z nejpoužívanějších buněčných linií v laboratořích, pocházející z nádoru děložního čípku. Byla to právě tato buněčná linie, která jako první umožnila experimenty *in vitro*. Proto většina informací o buněčném cyklu, proliferaci a diferenciaci pochází právě z této buněčné linie, hojně využívané i přes svou poněkud kontroverzní minulost [43]. Vzhledem ke své velmi dobré adhezi, je práce s buněčnou linií snadnější, než s buněčnou linií HEK.

Buněčné linie, na kterých je tato práce provedena pocházejí od jiných vědeckých skupin Akademie věd ČR. Linie je možné uchovávat v tekutém dusíku a rozmrazit je v případě potřeby. Udržování linií vyžaduje box s laminárním prouděním vzduchu. Nutné je dodržovat sterilní prostředí a používat rukavice na veškerou práci.

Příprava buněk k práci:

Ve vodní lázni jsme nechali 15 min. ohřát médium (DMEM+10%FBS) při 37 °C. Po uplynutí 15-ti minut jsme pipetovali 20 ml předeřhátého média do kultivační láhve (75 cm²). Vyndali jsme zmrazený vzorek buněk z tekutého dusíku a dali jej do vodní lázně

mající 37 °C. Ihned po rozezhřátí jsme buňky pipetovali do připravené kultivační láhve s médiem.

"Pasážování" buněk a příprava určitého počtu buněk k experimentům:

Do vodní lázně při 37 °C jsme dali na 15 min. ohřát fosfátový pufr s NaCl (PBS) a kultivační médium (médium DMEM) s 10% telecího séra (FBS), (viz Materiál a metody kapitola 5.2). Po uplynutí 15-ti minut jsme nejprve odsáli médium z kultivační lahve s buňkami a dále do ní pipetovali 8 ml ohřátého PBS, a odsáli jej. Tímto způsobem jsme buňky omyli a postup zopakovali ještě jednou. Do kultivační láhve s buňkami jsme pipetovali příslušný objem 0,25% trypsinu tak, aby pokryl dno nádoby, ve které je tkáňová kultura (2 ml do 75 cm² kultivační láhve).

Dále se protokol odvíjí dle účelu, zda jde o "pasážování", či o přípravu přesného množství buněk:

ad1. "Pasážování": V případě, kdy bylo dno výchozí kultivační lahve pokryto buňkami ze 100 %, jsme pipetovali z kultivační láhve s buňkami uvolněnými z povrchu trypsinem 200 µl buněk do nové kultivační láhve s 25 ml předeřátého média.

ad2. Příprava přesného množství buněk: Poté co se buňky po přidání trypsinu "zakulatily" a uvolnily z povrchu, jsme je pipetovali do zkumavky s 20 ml předeřátého kultivačního média (DMEM) s 10% telecím sérem. Pomocí pipety (nasávání a odsávání buněk s roztokem) jsme směs homogenizovali. Z vytvořené suspenze jsme pipetovali 10 µl na mikroskopické sklíčko s počítací komůrkou a pod mikroskopem spočítali množství buněk. Dále jsme ze zkumavky s 20 ml media s buňkami pipetovali objem, odpovídající počtu buněk potřebných k experimentu, do nádoby vhodné pro experiment. Vždy byl dodržen konečný objem média dle kultivační nádoby, viz tabulka 1.

Tab. 1 Přehled finálních objemů pro kultivaci buněčných linií v rozdílných kultivačních nádobách

kultivační nádoba	kulty. Láhev 75 cm ²	kulty. miska 15 ml	6-jamková destička	24-jamková destička
objem média (ml)	20	14	2 / jamku	0,5 /jamku

5.4.2 Popis metody vedoucí k transfekci buněk siRNA

Chceme-li sledovat vliv snížení exprese eIF3a na fyziologický stav buněk, je nutné nejprve tuto sníženou expresi buňkám "navodit". K tomuto účelu bylo využito metody interference krátkých interferujících RNA (siRNA; z angl. Short Interfering RNA). Tato metoda je založená na schopnosti malých úseků RNA komplementárně se vázat na cílovou část již existujících mRNA, a tu tímto "odsoudit" k rozštěpení v místech navázání. Ačkoliv jsou známá obecná doporučení, jak transfekční "mix" připravit, je nutné si pro každou siRNA a podmínky, které jsou použity (jako například v jakém kultivačním nádobí a jaký počet buněk je určen k transfekci) ověřit funkčnost "mixu". To se provádí metodou "Western blot", který je popsán níže. Samotné hledání podmínek transfekce je poměrně zdoluhavý, leč nevyhnutelný proces. Po stanovení podmínek jsou tyto používány pro transfekci buněk při každém experimentu. Jako negativní kontrola se využívá siRNA, která neobsahuje žádné komplementární úseky (ntRNA; z angl. Non Targeting RNA), s použitou mRNA. Pro všechny experimenty je v každém případě prováděna kontrola, zda opravdu došlo ke snížení hladiny eIF3a proteinu a to opět metodou "Western blotu".

Příprava transfekčního roztoku:

Do dvou zkumavek, každá pro jednu siRNA, jsme pipetovali všechny chemikálie v závislosti na použité kultivační nádobě, viz tabulka 2. Vždy bylo dodrženo, že byl interferin přidán až jako poslední. Po přípravě "mixu" jsme jej nechali stát při laboratorní teplotě 10 min.

Vlastní transfekce buněk:

Do připravených kultivačních nádob s buňkami (viz výše) jsme po kapkách pipetovali příslušný objem transfekčního "mixu" (viz tabulka 2) a celé lehce zamíchali. Následující den po transfekci jsme přidali stejný objem média, jak je uvedeno v tabulce 2, ve sloupci médium/jamku, dle použité kultivační nádoby.

Tab. 2 Pipetovací schéma k přípravě transfekčního mixu

kultivační nádoba	počáteční objem nádoby (ml)	objem komponent transfekčního mixu (μl)		koncentrace siRNA (nM)	
		médium/jamku = objem "mixu" do buněk	INTERFERin	buňky HeLa	buňky HEK
6-jamková destička	0,5	200	11	1	10
24-jamková destička	2	100	2	1	10
15ml kultiv. miska	14	1000	75	5	---

5.4.3 Extrakce buněčného obsahu

Nejprve jsme dvakrát promyli buňky v kultivační nádobě 8 ml fosfátového pufru s NaCl (PBS) (viz kapitola 5.2). Poté jsme pipetovali takové množství PBS, aby překrývalo tkáňovou kulturu. Pomocí stěrky jsme seškrábali buňky z povrchu kultivační nádoby a centrifugovali 5 min. při 2000 rpm při 4°C. Slili jsme supernatant a pipetovali 30 μl lyzačního pufru C (viz kapitola 5.3) s 1% Triton-X-100 (objem pufru je závislý na množství pelety a je možné jej navýšit). Buňky jsme nechali stát s pufrům při laboratorní teplotě 15 min., za občasného promíchání pomocí vortexu. Dále jsme centrifugovali při 13500 rpm po dobu 10 min. při 4°C. Supernatant byl extraktem buněčného obsahu. V případě, kdy s buněčným extraktem nebylo ihned pracováno, byl tento prudce zmrazen tekutým dusíkem a uložen při -80°C.

5.4.4 Elektroforéza s použitím polyakrylamidového gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Na rozdíl od nativní elektroforézy, kde jsou bílkoviny separovány dle svého náboje v elektrickém poli, dochází v případě SDS-PAGE (z angl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) k udělení záporného náboje všem bílkovinám detergentem SDS. Putování záporně nabitých bílkoviny porézním gelem je tudíž ovlivněno pouze jejich molekulovou hmotností.

Protokol SDS-PAGE :

1) Příprava vzorků

Po extrakci buněčného obsahu jsme v něm stanovili množství proteinu využitím metody Bradfordové [44]. K 1 ml roztoku činidla dle Bradfordové jsme pipetovali 1 μ l buněčného extraktu. Vzniklý roztok jsme důkladně promíchali a měřili absorbanci při 595 nm. Dále jsme připravili z každého buněčného extraktu dva 20 μ l vzorky obsahující 30 a 60 μ g proteinu. Toho bylo docíleno pipetováním odpovídajícího množství buněčného extraktu, dle naměřených hodnot absorbance, k destilované vodě tak, aby ve výsledku bylo v mikrozkuhavce 20 μ l. K takto připraveným vzorkům jsme pipetovali 6 μ l "nanášecího" pufru pro SDS-PAGE. Vzorky jsme nechali v "termo-bločku" 5 min. při 95°C. Vzorky byly připraveny buď k okamžitému nanášení na gel, nebo bylo možné je uchovat při -20°C k pozdějšímu užití. V druhém případě je nutné je před nanášením opětovně ohřát v "termo-bločku", viz výše.

2) Vlastní elektroforéza

Komerčně dodávaný gel, jsme vyjmuli z ochranného pouzdra, vyndali hřebínek a odstranili ochrannou fólii. Gel v plastové formě jsme omyli destilovanou vodou a vsunuli jej do cely pro SDS-PAGE, kterou jsme nejprve napustili Tris-glycinovým pufrem o pH 8,3 (viz kapitola 5.2) s 0,1% SDS (viz kapitola 5.3.) Stejným pufrem jsme "napustili" i horní část plastové formy na gel. Připravené vzorky jsme nanесли do jamek tak, že jsme do první a poslední jamky pipetovali marker (nejlépe tak, že do první 10 μ l a do poslední 5 μ l, pro snadnou orientaci při pozdější manipulaci s gelem). Uzavřenou celu jsme připojili ke zdroji a nechali "proběhnout" elektroforézu při 200 V. Elektroforézu jsme ukončili v momentě, kdy čelo nanesených vzorků dosáhlo spodní hranice gelu. Ten jsme pak vyjmuli z cely a omyli destilovanou vodou. Rozlomili jsme plastovou formu na gel a ten ořízli po obvodu. Gel je po elektroforéze využit v následující metodě "Western blot".

5.4.5 Metoda "Western blot"

Metoda je určena k ověření přítomnosti proteinu interakcí se specifickou protilátkou. Jelikož jsou v gelu obsaženy jen proteiny se záporným nábojem, je možné je po vertikální elektroforéze přenést horizontálním způsobem z gelu na nitrocelulosovou membránu,

působením kladně nabitě anody. Membránu s přenesenými proteiny je nutné "zablokovat" proti navázání dalších nežádoucích proteinů přidáním nějakého levného proteinu, který se naváže na místa, kde zatím není žádný protein. Toto vede k dosažení lepších výsledků při měření. "Zablokovaná" membrána je dále rozdělena na části dle velikosti očekávaných proteinů a tyto jsou zataveny do fólie s primární protilátkou proti detekovanému proteinu. Po inkubaci s primární protilátkou jsou všechny pruhy omyty a dále inkubovány v sekundární protilátce, která je specifická proti primárním protilátkám pocházejícím ze stejného organismu a je konjugována s peroxidázou. Přidáním substrátu enzymu peroxidázy dochází k chemické reakci vedoucí k produktu, který vykazuje chemiluminiscenci, již je možné detekovat. Detekce probíhá v komoře G:boxu. G:box obsahuje kameru, která je schopná detekovat vyzářenou energii chemiluminiscencí. Hodnota stanovené chemiluminiscence je pak přímo úměrná množství detekovaného proteinu. Ke kvantifikaci proteinu (viz níže) slouží příslušné programy jako image J, nebo Quantiti One. V této práci byla veškerá kvantifikace proteinu prováděna programem Quantiti One (1-D Analysis Software, Life Science Research: Bio-Rad)

Kvantifikace proteinů:

Pro kontrolu sjednocení "nanášky" proteinů byl použit α -tubulin, jehož hladina se nemění, a tudíž se dá použít jako normalizační protein. K němu byla vztahována množství eIF3a v buněčném obsahu s navozenou "deplecí" eIF3a a množství eIF3a buněčného obsahu z kontrolní skupiny. Takto normalizovaná množství eIF3a byla mezi sebou porovnána pro získání přehledu o účinnosti transfekce.

Protokol metody "Western blotting":

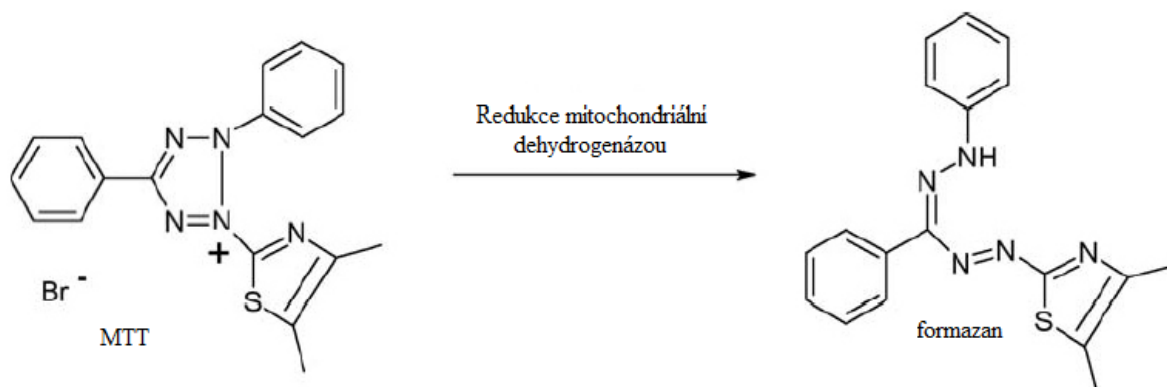
Pufr na "blotování" (viz kapitola 5.3) jsme nalili do dvou misek. Do jedné jsme ponořili čtyři "blotovací" houby a do druhé membránu se dvěma filtračními papíry Whatman. Celá "blotovací" aparatura se skládá z elektrod, dvou mřížek a dále ze čtyř "blotovacích" hub. Sestavení "blotovací" aparatury je následující. Na dno plastové nádoby k "blotování" jsme umístili kovovou desku, sloužící jako katoda, dále mřížku a na ní dvě houby nasáklé "blotovacím" pufrům. Gel pocházející z SDS elektroforézy jsme opatrně přenesli na filtrační papír Whatman. Ten jsme umístili na již z poloviny sestavený "blotovací" aparát, gelem vzhůru. Gel jsme převrstvili membránou, bubliny vzniklé mezi gelem a membránou jsme odstranili válečkem. Membránu jsme převrstvili druhým filtračním papírem Whatman

a odstranili bubliny stejně jako v předchozím kroku. Dále jsme sestavili druhou polovinu "blotovací" cely. Prozatímní aparaturu s gelem, membránou a filtračními papíry jsme překryli dvěma "blotovacími" houbami, dolili "blotovací" pufr po okraj cely, poté jsme přidali mřížku a navrch celého aparátu jsme umístili druhou kovovou desku, sloužící jako anoda, s ochranným plexisklem. Celý systém jsme zasunuli do plastového obalu blotovací cely. Tu jsme připojili ke zdroji elektrického proudu a nechali 1,5 hod. běžet při 25 V a cca 2 A při 4°C. Rozebrali jsme aparaturu a membránu vložili do misky s 5% roztokem odtučněného mléka s TBS-T (viz kapitola 5.3) a nechali hodinu třepat. Po uplynutí jedné hodiny jsme membránu vyjmuli a vložili ji do ochranné fólie. Membránu jsme horizontálně nařezali na části tak, aby každý proužek obsahoval očekávaný protein. Informaci, kam byl očekávaný protein unesen, jsme zjistili pomocí markeru. Části membrány jsme vyndali z fólie a označili je. Každou část jsme pak zataвили do fólie a přidali příslušnou primární protilátku. Před zatavením jsme odstranili případné bubliny. Části membrán jsme nechali třepat přes noc při 4°C. Následující den jsme vyndali membrány z fólie do roztoku TBS-T (primární protilátky jsme, pro pozdější použití, vrátili do zkumavek, které uchováváme při -20°C). Membrány jsme nechali třepat dvakrát po 10 min v TBS-T. Dále jsme slili TBS-T a přidali roztok TBS-T se sekundární protilátkou zředěnou v poměru 10000:1, pro celkový objem 10, či 50ml v závislosti na počtu proužků. V sekundární protilátce jsme membránu nechali třepat 1 hod.. Následovalo promytí třikrát 5 min. v TBS-T. Poté jsme části membrány poskládali na fólii tak, aby vytvořily původní membránu. Smíchali jsme "vyvolávací" roztoky, obsahující substrát ECS (z angl. Enhanced Chemiluminiscent Substrate), z "kitu" (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate). Roztok jsme rovnoměrně pipetovali na sestavenou membránu a nechali 1 min. působit. Uzavřenou fólii jsme dali vyvolat do G-boxu (viz úvod této kapitoly) při expozičních časech 1, 3, 7, 21 s a dále 1, 3, 7, 14 min. K nastaveným časům se vždy přičítal čas předchozí expozice. Vyvolání poskytlo digitalizovaný obrázek detekovaného kvanta energie, které je přímo úměrné množství proteinu, čímž umožňuje jeho kvantifikaci (viz předchozí kapitola).

5.4.6 Sledování životaschopnosti (viability) buněk experimentem využívajícím 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT test)

Princip metody spočívá v redukci 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) na formazan (obr. 4). Zatímco MTT je žlutá, ve vodě rozpustná sloučenina, redukovaná forma této látky má výrazně fialové zbarvení a je ve vodě nerozpustná. K redukci dochází při buněčném dýchání, v mitochondriích, mitochondriální dehydrogenázou z čehož plyne, že tohoto procesu jsou schopné jen živé buňky. Intenzita fialového zbarvení je přímo úměrná počtu živých buněk a k jejímu přesnému stanovení se využívá spektrofotometrické měření. Formazan tvoří krystalky, které poškodí integritu buňky, dojde tedy během experimentu k jejich likvidaci a není možné je dále používat.

Celý průběh experimentu je následující. "Zaočkuje" se přesný počet buněk, následný den se provede jejich transfekce, jak siRNA pro snížení genové exprese a podjednotky, tak i negativní kontrolou v podobě krátkých neinterferujících RNA. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) je rozpuštěna v PBS (viz kapitola 5.3) a roztok se pipetuje do buněk. Po inkubaci provádíme vlastní spektrofotometrické stanovení. Dodržování stejných podmínek každý den umožňuje pozorovat jednak rozdíl v počtu živých buněk u obou transfekovaných skupin, ale navíc ještě i porovnání celkové buněčné proliferace srovnáním absorbance roztoku formazanu v jamkách destičky při 595 nm.



Obr. 4 Schéma reakce vzniku formazanu. Reakce prezentuje proces odehrávající se v mitochondriích, kde je při buněčném dýchání žlutý MTT převeden na fialový formazan, který je spektrofotometricky stanovitelný a přímo úměrný množství životaschopných buněk.

Protokol MTT testu:

Odsáli jsme médium z jamek 24-jamkové destičky s buňkami. Připravili jsme si směs pro MTT test. Ta se skládá z 5 objemových dílů kultivačního média (DMEM) a 1 objemového

dílu roztoku určenému pro MTT test (viz kapitola 5.3). Objem směsi jsme připravili tak, aby odpovídal počtu "zaočkovaných" jamek 200 μ l směsi/jamku. K buňkám jsme pak pipetovali 200 μ l směsi. Inkubovali jsme 3,5 hod. v inkubátoru při 37°C. Následující postup se lišil podle použité buněčné linie:

Pro buněčnou linii HeLa: Odsáli jsme směs kultivačního média s 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidem rozpuštěným ve fosfátovém pufru (viz kapitola 5.3). Buňky jsme omyli 10 ml fosfátového pufru (PBS). K omytým přisedlým buňkám jsme pipetovali 200 μ l MTT detergentu (viz kapitola 5.3).

Pro HEK buněčnou linii: Pipetováním jsme převedli celý obsah jamky s buňkami do mikrozkušavky a centrifugovali 5 min. při 2000 rpm za 4 °C. Opatrně jsme odstranili supernatant a promyli peletu 200 μ l 1xPBS. Opět jsme centrifugovali za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a k peletě jsme přidali 200 μ l MTT detergentu (viz kapitola 5.3).

Následoval postup společný oběma liniím. Jednotlivé vzorky jsme pipetovali do jamek 96-jamkové destičky s plochým dnem jamek, která je vhodná k spektrofotometrickému stanovení roztoku formazanu. Proměřili jsme absorbanci roztoku formazanu v jednotlivých jamkách spektrofotometrem Sunrise od firmy TECAN při vlnové délce 595 nm.

5.4.7 Inkorporace ^{35}S -methioninu do syntetizovaných proteinů

Dalším krokem našich výzkumů bylo stanovit změnu množství syntetizovaných proteinů v buňkách po transfekci v porovnání s kontrolní skupinou buněk. K tomuto účelu jsme využili inkorporaci značeného methioninu do nově vznikajících proteinů. Pokud MTT test odhalí odumírání buněk s "deplecí" eIF3a, je třeba zjistit podstatu snížení životaschopnosti. Inkorporace ^{35}S -methioninu podává první informaci o možné souvislosti eIF3a s regulací translace. V principu zde jde o vystavení buněk nedostatku methioninu, což způsobí pozvolné zastavení translace, přidáním média se značeným methioninem začnou buňky okamžitě syntetizovat protein. Pak už jen stačí oddělit od sebe vzniklé proteiny a zbývající značený methionin, který nebyl do proteinu "zabudován". Toho je docíleno vysrážením proteinů. Dále se pracuje pouze s precipitovanými proteiny, a tedy se vyhodnocuje materiál, ve kterém je množství značeného methioninu úměrné množství proteinu.

Pro práci s radioaktivitou je nutné absolvovat kurz. Vždy je nutné dodržovat veškeré legislativní předpisy pro práci s radioaktivním materiálem. Likvidace pevného i kapalného materiálu, který přišel do styku s radioaktivitou, se provádí dle zákonných norem. ^{35}S je β zářič s poločasem rozpadu 87 dní, jde o zářič, k jeho odstínění slouží tenká vrstva plexiskla. K přenosu materiálu, kupříkladu k měření celkového množství značeného proteinu, je možné vzorky umístit do speciálního uzavíratelného plexisklového boxu. Během práce se značeným methioninem je nejvíce riziková inhalační intoxikace a dále pak přímý kontakt s pokožkou. Proto je vhodné provádět práci v místnosti s klimatizací, nebo pokud je to možné, přímo v digestoři. Používání rukavic je samozřejmostí. Takovými předpisy jsme se drželi i v našich experimentech.

Vlastní měření bylo prováděno pracovníky laboratoře radiometrického oddělení Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Likvidace radioaktivního odpadu byla prováděna tamtéž.

Protokol inkorporace ^{35}S -methioninu:

Odsáli jsme kultivační médium z jamek s buňkami a pipetovali do prázdných jamek 200 μl kultivačního média DMEM bez methioninu. Jelikož médium neobsahuje ani glutamin, bylo nutné jej přidat. Glutamin byl pipetován do média tak, aby jeho finální koncentrace byla 33 mM. Buňky s médiem bez obsahu methioninu jsme inkubovali 2 hodiny v inkubátoru při 37 °C. Po inkubaci jsme odsáli médium a pipetovali do jamek s buňkami 50 μl "mixu" média bez methioninu s ^{35}S -methioninem, do finální koncentrace 2 $\mu\text{Ci}/100$ μl . Následovala inkubace 1,5 hodiny. Po inkubaci jsme provedli extrakci buněčného obsahu, jak je popsáno v kapitole 5.4.3. Metodou dle Bradfordové [44] jsme zjistili množství proteinu v jednotlivých buněčných extraktech. Dle zjištěných hodnot jsme připravili vzorky o stejné koncentraci proteinu, které jsme doplnili pufrům C (viz kapitola 5.3) do 50 μl . Ke každému vzorku jsme pipetovali 110 μl destilované vody a dále 40 μl kyseliny trichloroctové. Vzorky jsme promíchali a nechali inkubovat přes noc při 4 °C. Následující den jsme směs centrifugovali 5 min. při 14000 rpm při 4 °C. Peletu jsme promyli třikrát 1 ml ledově vychlazeného acetonu. Po promytí jsme peletu vysušili v "termo-bločku" při 95 °C. Pro rozpuštění pelety jsme k ní pipetovali 500 μl destilované vody a mícháním, za použití vortexu, jsme peletu rozpustili. Bylo-li to potřeba, byly vzorky zahřívány, aby došlo k úplnému rozpuštění pelety. Dále jsme do zkumavek určených k měření radioaktivity dávkovali 10 ml scintilačního roztoku a přidali k němu

obsah mikrozkupek s rozpuštěnou peletou. Vše jsme důkladně uzavřeli a předali pracovníkům radiometrického oddělení, kteří provedli vlastní měření a likvidaci radioaktivního materiálu.

5.4.8 Příprava vzorků a spektrofotometrické měření polysomových profilů buněk HeLa

Tento experiment se používá, pokud výsledky inkorporace ^{35}S -methionin prokážou vliv "deplece" eIF3a na syntézu proteinů. Pak je třeba se "podívat" na celkové rozložení volných ribozomálních podjednotek, ribozomů (80S) a polyribosomů v rámci "polysomového profilu". Díky gradientové centrifugaci je lze snadno oddělit a dále je detekovat pomocí UV průtokové spektrofotometrie. Vzhledem k nutnosti použití většího množství materiálu z buněčných lyzátů, je potřeba přejít ke kultivaci ve větších objemech a tedy i najít nové podmínky pro transfekci buněk siRNA. Po ní následuje vždy již zmíněná extrakce buněčného obsahu. V případě sledování polysomů, je důležité změnit protokol extrakce buněčného obsahu. Ribozomy se nenacházejí nejen ve formě malé podjednotky (40S), velké podjednotky (60S), nebo komplexního ribozomu (80S), ale samozřejmě se na jednom vlákně mRNA vyskytuje i více ribozomů s navázaným, různě dlouhým proteinem. Jelikož chceme pozorovat všechny formy, je nutné zachovat všechny ribozomy ve stavu, ve které se právě nacházejí. V opačném případě "doběhnou" všechny do konce translace a jde rozlišit jen jejich základní stavy. Proto se před a během extrakce buněčného obsahu přidává cyklohexamid, který "zastaví" proteosyntézu. Získaný buněčný extrakt je podroben ultracentrifugaci v sacharózovém gradientu 5-45% sacharózy. Po "ustálení" frakcí v gradientu ultracentrifugací, je tento měřen průtokovým UV spektrofotometrem. Výstupem experimentu je graf znázorňující frakce různých forem ribozomů.

Protokol experimentu:

1) Extrakce buněčného obsahu s cyklohexamidem

Do kultivační nádoby s buňkami jsme přidali roztok cyklohexamidu tak, aby finální koncentrace byla 100 $\mu\text{g/ml}$. Poté jsme médium s cyklohexamidem odsáli a buňky promyli dvakrát 10 ml roztoku PBS s cyklohexamidem, který je připraven tak, aby finální koncentrace cyklohexamidu byla 100 $\mu\text{g/ml}$. Dále jsme postupovali jako při klasické

extrakci buněčného obsahu (viz kapitola 5.4.3), jen se k peletě po první centrifugaci přidá pufr C s cyklohexamidem o koncentraci 100 µg/ml.

2) Příprava gradientu na přístroji "Gradient Master"

Nejprve jsme sestavili aparaturu "Gradient Masteru". Připravili jsme 5% roztok sacharózy. Pro 4 vzorky buněčných extraktů jsme použili následující chemikálie: 24 ml pufru A, 3ml 45% pufr B, 27 µl 1M DDT (viz kapitola 5.3). Označili jsme vždy polovinu zkumavky určené ke tvorbě gradientu a umístili je do "Gradient Masteru". Pipetovali jsme nejprve 5% roztok sacharózy po naznačenou rysku, tedy přesně do poloviny zkumavky. Ponořili jsme jehlu dávkovače až na dno gradientové zkumavky s 5% roztokem a dávkovačem přidali 45% pufr B až k hornímu okraji. Koncentrovanější roztok sacharózy vytlačí ten méně koncentrovaný vzhůru a sám zůstane v dolní polovině. Důležité je zabránit vzniku bublin v gradientu, které by mohly vést ke zkreslení výsledku. Zkumavky jsme uzavřeli zátkami. V připravených zkumavkách vznikne gradient centrifugací po spuštění "Gradient Masteru". Po ustavení gradientu jsme zkumavky vyvážili a nechali stát přes noc při 4 °C. Se sacharózovými gradienty je nutné zacházet opatrně, aby nedošlo k narušení vrstev gradientu, což jsme vždy prováděli.

3) Ultracentrifugace

Kyvety s vytvořeným gradientem jsme důkladně vyvážili. Gradient jsme převrstvili extraktem buněčného obsahu a v ultracentrifuze při vakuu centrifugovali při 39000 rpm 2.5 hod. při 4 °C.

4) UV spektrofotometrie na "Foxy JR"

Pro spektrofotometrické stanovení obsahu polysomů v jednotlivých frakcích gradientu se využívá uspořádání mechanického dávkovače, UV spektrofotometru, zapisovacího zařízení a kolektoru jednotlivých frakcí. V našem případě jsme zkumavku po ultracentrifugaci upevnili do aparatury dávkovače. Dno zkumavky jsme propíchlí jehlou aparatury dávkovače. Po spuštění dávkovače se zkumavka začne ode dna plnit 80% roztokem sacharózy. Ten postupně vytlačuje jednotlivé frakce vzhůru k UV spektrofotometru. UV spektrofotometr měří absorbanci jednotlivých frakcí při 260 nm ta je zaznamenávána zapisovacím zařízením. Jelikož není další práce s frakcemi součástí metody, nevyžívá se zde kolektoru frakcí. Výstupem metody je tedy graf (viz obr. 9 a 10).

6 VÝSLEDKY

6.1 Vliv transfekce buněk siRNA na syntézu proteinu eIF3a

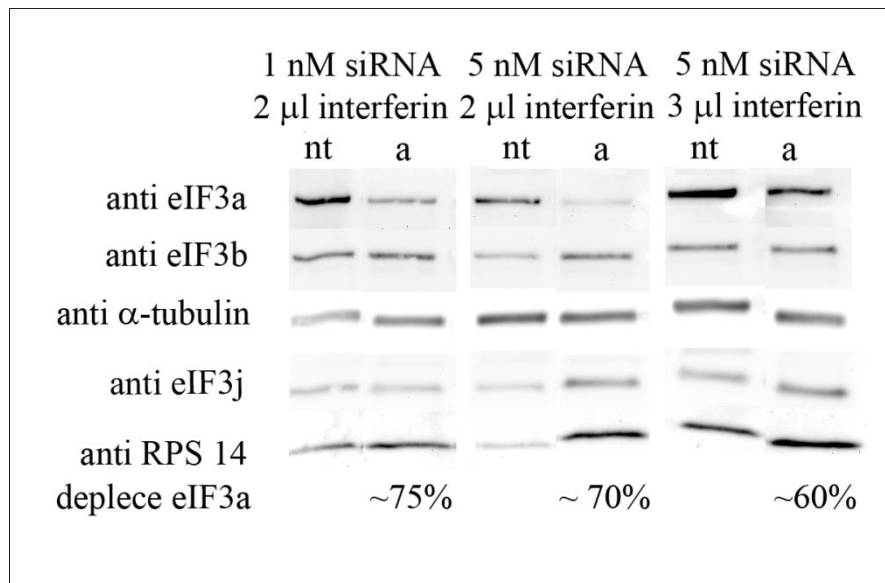
Pro navození "deplece" eIF3a v buněčných liniích byla zvolena metoda RNAi, která využívá krátkých interferujících úseků RNA komplementárních k mRNA. Vzájemná vazba způsobí rozštěpení dvouvláknové RNA a tím je zamezeno jejímu přepisu. V praxi to znamená, že jsou porovnávány hladiny eIF3a v obou skupinách buněk. Jednak v těch, ve kterých dochází k interferenci a následné "depleci" eIF3a, a dále i v buňkách transfekovaných siRNA neschopné interference. Krátká vlákna RNA, která neinterferují, slouží jako negativní kontrola.

Pro buněčnou linii HEK, bylo do 24-jamkové destičky "zaočkováno" po 28000 buňkách/jamku. Ke stanovení podmínek transfekce buněk byla použita následující koncentrace siRNA, 1, 5 a 20 nM, pro oba druhy siRNA a objemy interferinu pro každou z koncentrací siRNA vždy pro 2 a 3 μ l.

Pro buněčnou linii HeLa byly zvolené podmínky pro stejný počet buněk ve shodné kultivační destičce: 1 nM, 5 nM a 10 nM siRNA; přičemž každá z koncentrací byla použita dvakrát, jednou se 2 μ l a podruhé se 3 μ l interferinu.

Po transfekci buněk 100 μ l transfekčního "mixu" bylo druhý den přidáno 500 μ l média předeřátého na 37 °C. Třetí den od transfekce byla provedena extrakce buněčného obsahu, který byl podroben elektroforéze za použití polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS, "Western blotu" a následnému vyvolání v G-boxu. "Komora" G-boxu obsahuje kameru, která detekuje vyzářenou energii způsobenou chemiluminiscencí. G-box je připojen k počítači a jako výstup získáme digitální obrázek membrány. Ten obsahuje informaci o intenzitě měřeného signálu chemiluminiscenčního produktu enzymové reakce křenové peroxidázy se substrátem. Po obdržení digitálního obrázku membrány (obr. 5), byl tento kvantifikován pomocí programu Quantiti one. α -tubulin byl využit pro sjednocení "nanášky" proteinů a bylo k němu vztaženo množství stanoveného eIF3a.

Jako dostačující podmínky transfekce pro buněčnou linii HeLa byly určeny 1 nM siRNA a 2 μ l interferinu, "navozující depleci" kolem 75%. Buněčná linie HEK byla ve všech následujících experimentech transfekována za použití 10 nM siRNA a 3 μ l interferinu při zhruba stejné "depleci" (obr. 5)



Obr. 5 Elektroforeogram buněčného extraktu buněk HeLa získaný elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s SDS a následným "Western blotem". "Western blotting" byl proveden se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou a následovně digitalizaci vyvolané membrány. Je možné pozorovat snížení eIF3a při všech použitých podmínkách, nt značí kontrolní skupinu buněk transfekovanou neinterferujícími úseky RNA. Označení sloupce písmenem a je pak pro buňky s "deplecí" eIF3a.

6.2 Pozorování změn v životaschopnosti buněk s "deplecí" eIF3a v porovnání s kontrolní skupinou metodou MTT testu

MTT test umožňuje sledovat životaschopnost buněk. Je založen na schopnosti živých buněk přeměnit roztok MTT v PBS na formazan. Fialové zbarvení formazanu umožňuje jeho spektrofotometrické stanovení. Absorbance měřená při 595 nm je pak přímo úměrná množství živých buněk. Porovnáním buněk s "deplecí" eIF3a s kontrolní skupinou buněk je možné sledovat vliv "deplece" eIF3a na "viabilitu" buněk.

Vzhledem k odlišnému charakteru obou testovaných buněčných linií nebylo možné dodržovat naprosto stejný protokol, ale v zásadních a experiment ovlivňujících krocích byl dodržen stejný postup.

Pro experiment bylo připraveno pět 24-jamkových destiček zaočkovaných po 5, 10, 24, 20 a 16 jamkách. První 24-jamková destička nebyla transfekována a sloužila ke stanovení přesnosti "zaočkování" buněk. Buňky v jamkách zbylých destiček byly transfekovány po 5, 12, 10 a 8 jamkách/destičku siRNA proti eIF3a. Zbylé buňky byly transfekovány

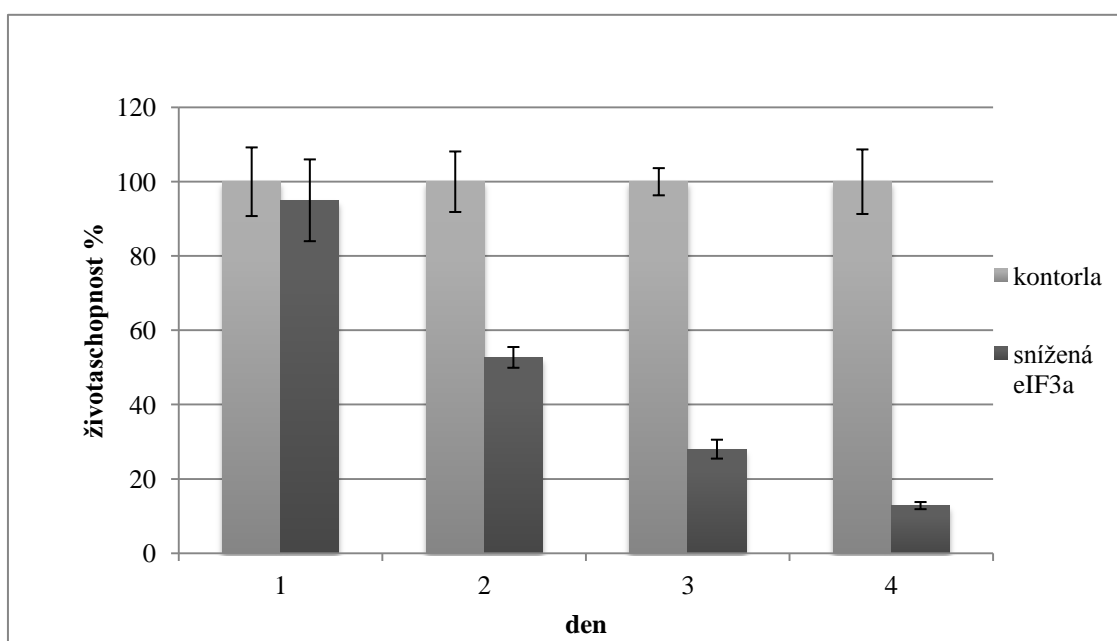
ntRNA. Pro vlastní experiment bylo použito každý den pět paralelních vzorků od každé siRNA a zbylé transfekované buňky byly použity pro kontrolu snížení exprese eIF3a v porovnání ke kontrole.

V samotném experimentu bylo použito 20000 buněk (počet buněk/1 jamku 24-jamkové destičky) v den transfekce. Pro buněčnou linii HeLa "proběhla" transfekce 1 nM siRNA a 2 μ l interferinu, pro buněčnou linii HEK 10 nM siRNA a 3 μ l interferinu. V experimentu bylo použito pět paralelních vzorků od každé siRNA na každý den a experiment byl prováděn po dobu čtyř dnů. Celý čtyřdenní experiment byl opakován třikrát. Je důležité zdůraznit, že se od sebe výsledky jednotlivých čtyřdenních experimentů takřka nelišily, a proto byl vybrán jen jeden ze tří experimentů, který je zde prezentován. Výsledky zbylých dvou experimentů nejsou v této práci uvedeny. Vzhledem k pěti paralelním měřením s každou siRNA, která probíhala každý den, bylo nutné výsledky statisticky zpracovat. To bylo provedeno na hladině významnosti 95%. Výsledky jsou ukázány v tabulkách 3 a 4. Pro větší názornost jsou zde ještě uvedeny grafy (obr. 6-9), ukazující stejné výsledky.

Tab. 3 Přehled průběhu sledování životaschopnosti buněk HeLa, s "deplecí" eIF3a a kontrolní skupiny. Shrnutí statisticky zpracovaných výsledků MTT testu. Množství v % znázorňuje množství životaschopných buněk HeLa s "deplecí" eIF3a v porovnání s množstvím životaschopných buněk kontrolní skupiny, které bylo považováno za 100%. Celková absorbance při 595 nm pak informuje o celkovém počtu životaschopných buněk.

		množství životaschopných buněk (%)	směrodatná odchylka (%)	absorbance při 595 nm = množství životaschopných buněk	"deplece" eIF3a (%)
den 1.	"deplece" eIF3a	95,0	11,59	0,12 \pm 0,02	---
	kontrola	100	9,24	0,12 \pm 0,01	---
den 2.	"deplece" eIF3a	52,7	5,31	0,22 \pm 0,02	41
	kontrola	100	8,15	0,42 \pm 0,04	---
den 3.	"deplece" eIF3a	28,0	9,08	0,16 \pm 0,02	22
	kontrola	100	3,66	0,58 \pm 0,02	---
den 4.	"deplece" eIF3a	12,8	7,48	0,18 \pm 0,02	25
	kontrola	100	8,68	1,44 \pm 0,14	---

Pro úplnost je třeba doplnit, že byla provedena kontrola, aby se odhalily případné rozdíly v "zaočkování", které by mohly "zkreslit" výsledek. Měření bylo provedeno na "netransfekovaných" buňkách v den transfekce zbylých buněk. Den transfekce je uveden v grafech (obr. 7 a 9) a označen jako den 0. Kontrola přesnosti "zaočkování" ukázala odchylku rovnu zhruba 10% pro buněčnou linii HeLa. Absorbance roztoku formazanu při 595 nm buněk HeLa v tento den byla zjištěna na 0,049. Buněčná linie HEK byla "zaočkována" s přesností 9% a v den 0 byla její absorbance roztoku formazanu stanovena při 595 nm na 0,070. Odchylky v "zaočkování" se neukázaly být určujícími pro výsledky jednotlivých měření, a proto bylo možné je zanedbat.

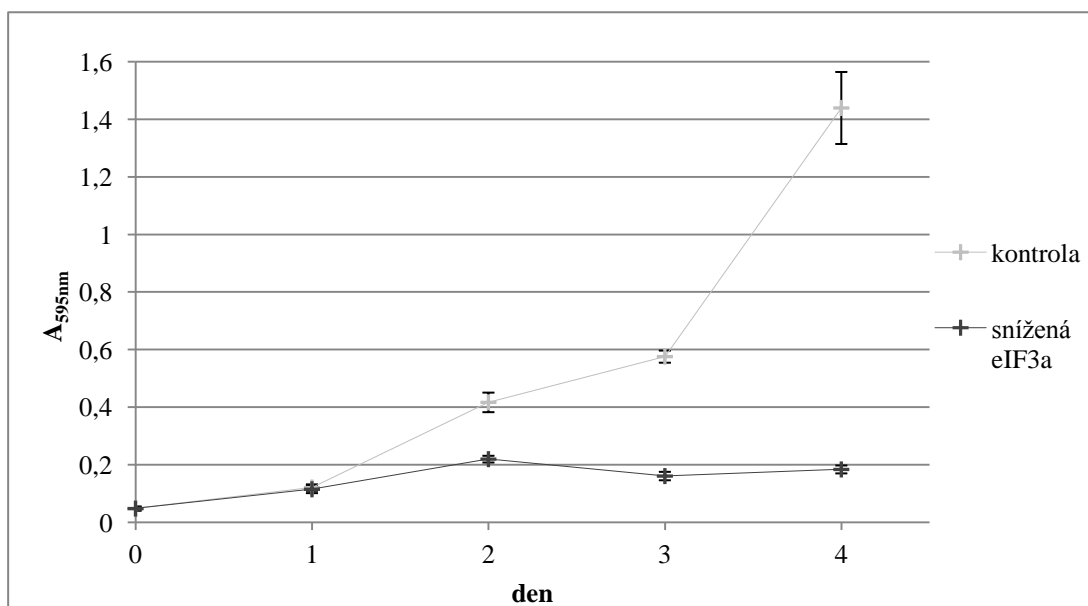


Obr. 6 Přehled životaschopnosti buněk HeLa s "deplecí" eIF3a ve srovnání s kontrolní skupinou. Kontrolní skupina zde představuje sto procent životaschopných buněk, ke kterým je vztaženo množství životaschopných buněk, u nichž došlo ke snížení exprese pomocí RNAi, v průběhu prvních čtyřech dní od transfekce.

Z výsledků uvedených na obrázku 6 vyplývá, že počet životaschopných buněk HeLa signifikantně klesá a čtvrtý den, kdy je hladina eIF3a na 25% normálního stavu, zůstává v jamkách pouhých ~12,8% životaschopných buněk oproti kontrolní skupině buněk.

Zatímco předchozí obrázek 6 uvádí rozdíl v životaschopnosti jen jako procentuální zastoupení životaschopných buněk s "deplecí" eIF3a v porovnání ke kontrolní skupině, následující obrázek 7 informuje o průběhu růstu počtu životaschopných buněk. Kontrolní

buněčná linie HeLa nevykazuje 24 hodinový interval na zdvojení množství kultury (obr. 7). V prvních dnech po "zaočkování" rostou buňky pomaleji a naopak po 3. dnu dojde k rychlému nárůstu počtu buněk. Vzorky s "deplecí" eIF3a nejsou jednoznačně schopny proliferace a jejich celkové množství se během čtyř dní od transfekce dostane maximálně na dvojnásobné množství a to druhý den a dále se množství snižuje, jak buňky postupně odumírají (obr. 7). Vedle výše zmíněných experimentů byl udělán pokus, zda jsou buňky schopné překonat vliv nedostatečné exprese eIF3a a dostat se opět do stavu, kdy mohou proliferovat jako kontrolní skupina (výsledky nejsou v této práci prezentovány). Výsledky takového experimentu ukázaly, že množství buněk 6. den po transfekci se nelišilo od 4. dne, což vede k závěru, že buňky nedokážou překonat vliv transfekce v prvních šesti dnech. Byť nelze vyloučit, že po ještě delší inkubaci by alespoň k částečnému obnovení životaschopnosti mohlo dojít, ze zjištěných výsledků se zdá, že ztráta eIF3a je proces ireverzibilní s fatálními důsledky pro sledované buňky.



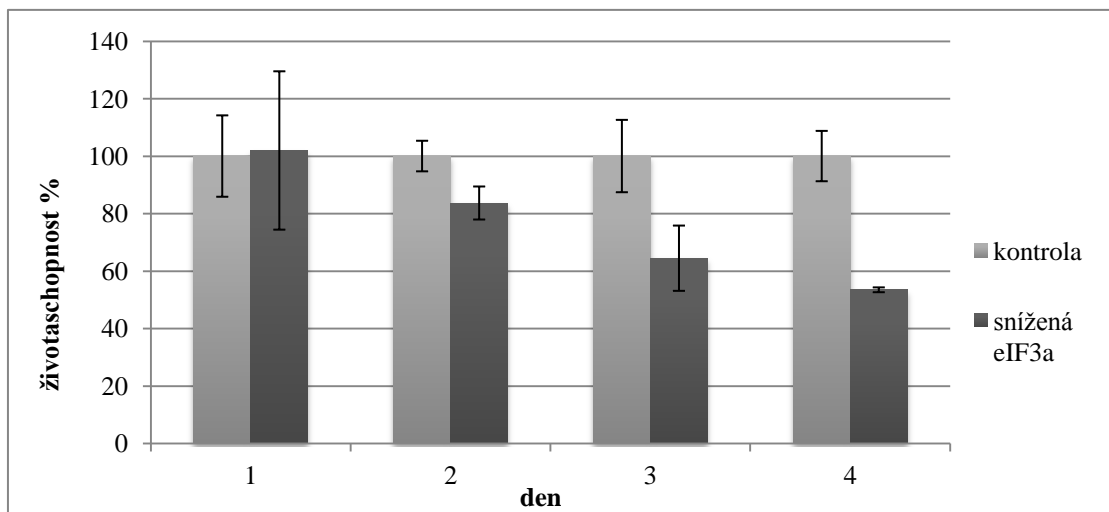
Obr. 7 Množství životaschopných buněk HeLa a to jak "depletovaných" eIF3a, tak kontrolní skupiny, sledovaných spektrálně. Zjištěná absorbance (při 595 nm) formazanu (osa y), je přímo úměrná množství životaschopných buněk.

Tab. 4 Životaschopnost buněčné linie HEK, buněk s "deplecí" eIF3a a buněk kontrolních. Množství v % reprezentuje životaschopné buňky s "deplecí" eIF3a vztažené ke 100% kontrolní skupiny (průměr pěti paralelních experimentů). Tabulka neobsahuje informace o "depleci" eIF3a 1. den po transfekci, jelikož očekáváme efekt až od 2. dne po transfekci.

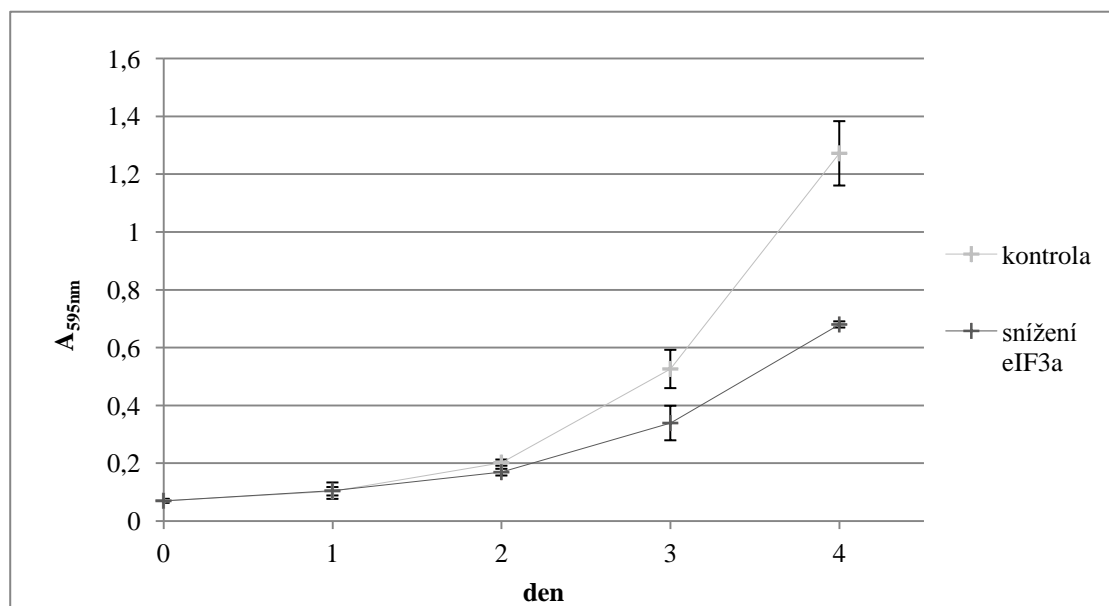
		množství životaschopných buněk (%)	směrodatná odchylka (%)	celková absorbance při 595 nm = množství životaschopných buněk	"deplece" eIF3a (%)
den 1.	"deplece" eIF3a	101,9	27,03	0,11 ± 0,03	---
	kontrola	100	14,16	0,10 ± 0,02	---
den 2.	"deplece" eIF3a	83,7	6,87	0,17 ± 0,01	32
	kontrola	100	5,32	0,20 ± 0,01	---
den 3.	"deplece" eIF3a	64,4	17,36	0,34 ± 0,07	21
	kontrola	100	12,59	0,53 ± 0,09	---
den 4.	"deplece" eIF3a	53,5	1,57	0,68 ± 0,02	18
	kontrola	100	8,76	1,27 ± 0,13	---

Při použití buněčné linie HEK lze pozorovat obdobný efekt, jako v linii HeLa (obr. 8). V buněčné linii HEK je snížení životaschopnosti buněk každý den v průměru jen o 16%. V případě buněčné linie HeLa dochází k radikálnímu, 52,7% snížení hned druhý den po transfekci (obr. 8).

Buněčná linie HEK vykazovala zcela odlišný trend životaschopnosti těchto buněk (obr. 9). Množení kontrolní skupiny buněk takřka odpovídalo zdvojení během 24 hodin. Stanovení životaschopnosti buněk s "deplecí" eIF3a ukázalo pomalejší nástup vlivu transfekce. Schopnost proliferace buněk se začala výrazněji lišit až od 3. dne po transfekci. Rozdíl mezi skupinami s "deplecí" eIF3a a kontrolou je sice markantní, ale podíváme-li se na celkové množství životaschopných buněk s "deplecí" eIF3a, je možné pozorovat, že byly tyto buňky schopné dosáhnout šestinásobku "zaočkovaného" množství za 4 dny. Je pozoruhodné, že na rozdíl od buněk HeLa nevede "deplece" eIF3a v buňkách HEK k absolutnímu bloku proliferace, nýbrž pouze ke snížení její četnosti. Vzhledem k tomu, že hladina "deplece" eIF3a v obou liniích je srovnatelná, z těchto výsledků vyplývá, že nepostradatelnost eIF3a, kterou vidíme v buňkách HeLa, je v buňkách HEK kompenzována pravděpodobně expresí nějakého jiného nám dosud neznámého proteinu, jenž je schopný ztrátu eIF3a částečně nahradit.



Obr. 8 Porovnání životaschopnosti buněčné linie HEK, která má navozenou "depleci" eIF3a, s kontrolní skupinou buněk. Za sto procent je zde bráno množství kontrolní skupiny buněk, ke kterému je vztaženo množství životaschopných buněk se sníženou expresí, v průběhu prvních čtyřech dní od transfekce.



Obr. 9 MTT test buněčné linie HEK ukazující celkové množství životaschopných buněk. Celkové množství životaschopných buněk reprezentované absorbcí při 595 nm formazanu, pro buňky s "deplecí" eIF3a a pro kontrolní skupinu buněk.

6.3 Sledování průběhu syntézy proteinů v buňkách s "deplecí" eIF3a metodou inkorporace ³⁵S-methioninu

Hlavním cílem bakalářské práce bylo zjistit, co se v buňkách s "deplecí" eIF3a stane ve vztahu k účinnosti translace. Předchozí experiment ukázal, že "deplece" eIF3a má na rozdíl od buněk HEK fatální důsledky na růst buněk HeLa. Vzhledem k účelu naší práce je tak buněčná linie HeLa vhodnější pro další experimenty. Následující výsledky byly tedy získány již pouze s touto buněčnou linií.

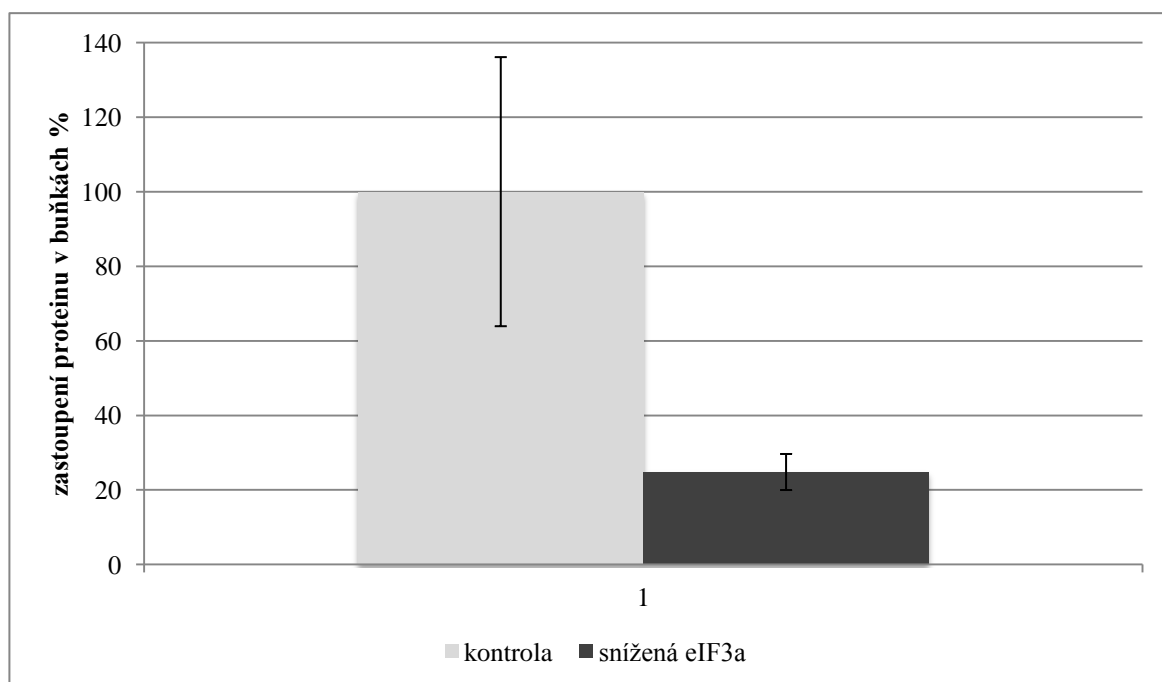
Inkorporace ³⁵S-methioninu využívá methioninu s radioaktivním izotopem síry ke "značení" nově vznikajících proteinů. Díky této vlastnosti je možné sledovat celkový výtěžek exprese proteinů detekcí radioaktivity. Rozdíl v množství syntetizovaných proteinů je možné sledovat porovnáním zjištěných hodnot z kontrolní skupiny buněk s buňkami s "deplecí" eIF3a.

Pro experiment bylo připraveno 2 x 5 jamek, každá obsahující 14000 buněk. Pro každou siRNA bylo tedy celkem použito 5 paralelních vzorků. Jako vzorky pro kontrolu účinnosti transfekce byly "zaočkovány" 2 x 3 jamky obsahující též 14000 buněk.

Buňky byly transfekovány a na základě výsledků MTT testu byla inkorporace značeného methioninu měřena druhý den po transfekci, kdy je transfekce již patrná a zároveň je možné získat co největší množství proteinu pro experiment. Současně jsme se chtěli vyhnout sekundárním efektům v buňkách, které příliš dlouho neproliferují. Příprava vzorku k měření probíhala přesně dle návodu uvedenému v části kapitole 5.4. V každém experimentu bylo obdrženo 5 nezávislých vzorků od každé siRNA. Výsledky 5 paralelních měření byly zpracovány na hladině významnosti 95%. Vlastní měření bylo provedeno pracovníky laboratoře radiometrie Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Experiment byl proveden celkem dvakrát, přičemž obdržené výsledky byly prakticky totožné a ty, u kterých bylo dosaženo nižší směrodatné odchylky, jsou prezentovány v grafu (obr. 10).

Na snížení hladiny eIF3a na pouhých 20% reagovaly buňky poklesem celkového množství vytvořeného proteinu o významných 80% (obr. 10), což vede k závěru, že "deplece" eIF3a vede k zásadnímu zpomalení genové exprese v buňkách minimálně na úrovni translace. Vzhledem k náročnosti provedení celého protokolu vzniká při závěrečném měření poměrně velká chyba, patrná obzvláště u kontrolních buněk (obr. 10.), která je velmi pravděpodobně způsobena násobným promýváním. Proto je nutné

prezentovat dosažené výsledky s ohledem na statistické zpracování, nicméně i s přihlédnutím k oné chybě, je jasně patrné značné zpomalení proteosyntézy.



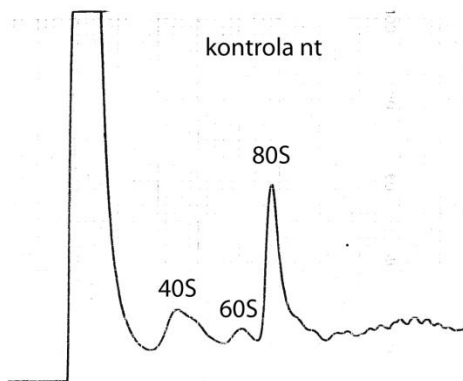
Obr. 10 Hladina celkové exprese proteinů v buněčné linii HeLa. Po inkorporaci ^{35}S -methioninu byla hladina proteinů v kontrolní skupině považována za 100% a k ní bylo vztaheno množství exprese proteinů v buňkách s "navozenou" sníženou expresí eIF3a.

6.4 Polysomový profil buněk s "deplecí" eIF3a.

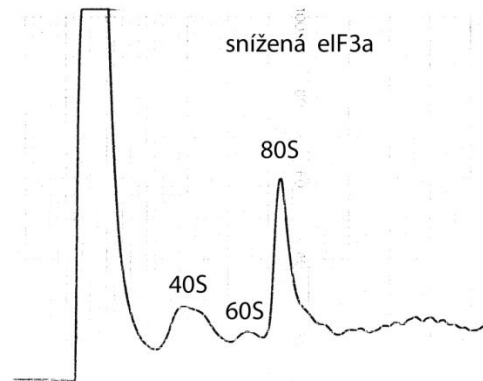
Pokles genové exprese buněk s "deplecí" eIF3a jasně poukázal na probíhající změny v translačních procesech v "depletovaných" buňkách. Jelikož jde zatím jen o velice hrubý pohled, je snaha zaměřit se co nejvíce na iniciaci translace. Za tímto účelem byla použita metoda sledující profil polysomů v buňkách HeLa. Experiment byl prováděn pro "zastavení" probíhající proteosyntézy pomocí cyklohexamidu. Různá stádia stavu ribozomů se pak pomocí gradientové centrifugace rozdělí do jednotlivých frakcí podle velikosti. Tyto frakce jsou dále spektrofotometricky detekovány.

Pro experiment bylo "zaočkováno" 6 milionů buněk určených k transfekci eIF3a siRNA ve čtyřech 15 ml kultivačních miskách, a dále dvě "plata" po 3 milionech buněk kontrolní

skupiny. Transfekce buněk byla provedena 5 nM siRNA a 75 μ l interferinu (kapitola 5.4.2.; tabulka 2). Experiment byl proveden přesně dle popisu v kapitole 5.4.7, zatím pouze v jednom, pilotním provedení.



Obr. 11 Polysomový profil kontrolní skupiny buněk HeLa. Z průběhu grafu vyplývá, že kromě základních komponent ribozomu (formy malé (40S), velké (60S) podjednotky a komplexního ribozomu (80S)), nebyl získán profil dalších forem.



Obr. 12 Polysomový profil buněk HeLa s "deplecí" eIF3a proteinu.

Polysomový profil takřka nevykazuje přítomnost jiných forem ribozomu než základních (podjednotky 40S a 60S a dále pak 80S ribozom).

Úroveň eIF3a v buňkách klesla pouze na 60% a výsledek polysomového profilu (obr. 11) nevykazují žádný rozdíl v zastoupení složek ribozomu, v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 12). S ohledem na výsledky předchozího experimentu a fakt, že studujeme translační iniciační faktor, je nanejvýš pravděpodobné, že je příčinou tohoto výsledku nedostatečná "deplece" eIF3a.

Navíc je třeba zmínit, že pro obě skupiny buněk, nejsou patrné polysomové profily jiných, než základních forem ribozomu a jeho podjednotek (množství polysomů je nezvykle malé). Přidání cyklohexamidu je klíčovým krokem celého experimentu. Pro získání lepších výsledků je možné upravit protokol. Krokem, který ovlivňuje vizualizaci polysomových profilů, je přidání cyklohexamidu do buněk. Je tedy možné navýšit jeho koncentraci v průběhu přípravy buněčného extraktu. Takový experiment je plánován pro další výzkumy v naší laboratoři.

7 DISKUSE

Jako základ pro celou práci, prováděnou v rámci bakalářské práce, byly použity poznatky výzkumu prováděného s eIF3a v kvasinkách, které dokazovaly, že a/TIF32 je esenciálním pro iniciaci translace. Hlavní snahou bylo pomocí série experimentů vytvořit první "náhled" na funkčnost eIF3a v lidské buněčné linii, který by se stal základním stavebním kamenem pro výzkum této podjednotky se zaměřením na iniciaci translace. Buňky s "deplecí" eIF3a byly podrobeny MTT testu, sledujícímu životaschopnost buněk. Dále byla sledovaná celková efektivita genové exprese inkorporací ³⁵S-methioninu. Pro sledování translačního procesu byly v pilotních pokusech sledovány polysomové profily.

Hledání podmínek transfekce ukázalo velký rozdíl mezi charakterem buněčných linií HEK a HeLa. U buněčné linie HEK bylo třeba užít vyšších koncentrací siRNA, a to dokonce desetkrát, oproti buňkám HeLa, pro navození stejné úrovně snížení exprese eIF3a. To pochopitelně vede k otázce, co rozdíl způsobuje. Jednou z příčin by mohla být rozdílná hladina mRNA kódující eIF3a, proti které je siRNA namířená. Pro práci s oběma liniemi by do budoucna bylo vhodné stanovit hladinu mRNA pro eIF3 třeba pomocí "Real-time PCR". Usoudíme-li že možným důvodem může být odlišný expresní profil obou linií, nelze vyloučit, že buněčná linie HeLa by za fyziologických podmínek mohla obsahovat menší množství eIF3a, než buňky HEK. To by mohlo vysvětlovat, proč buňky HeLa reagují na sníženou expresí eIF3a rychlejšími a výraznějšími změnami.

Kromě této skutečnosti, nebo možná právě na jejím základě, se objevily rozdíly hned v prvním experimentu sledujícím životaschopnost buněk. Zdá se, že odpověď buněčné linie HeLa na vystavení snížení podjednotky eIF3a je markantnější a buňky nejen že zpomalí svůj růst, jak je vidět i v buněčné linie HEK, ale po dosažení určité úrovně snížení eIF3a podjednotky dokonce dochází k úplnému zastavení růstu. Při zhruba stejné úrovni účinnosti transfekce dosahuje po 4. dni po transfekci počet životaschopných buněk linie HeLa pouhých 12% ve srovnání s kontrolou, zatímco přežívajících buněk HEK je kolem 50%.

Důležitým bodem hodným diskuse, vedle značně se lišící účinné dávky siRNA, je tedy i fakt, že stejné snížení eIF3a vede k jinému efektu v obou buněčných liniích. Jelikož jsou obě linie ve vědeckých laboratořích velice využívány, nabízí se otázka, zda k rozdílnosti výsledků vedla pouze rozdílná fyziologická hladina mRNA pro eIF3a a jí kódovaného proteinu v buňce mezi oběma liniemi, nebo zda se minimálně ve vztahu k dílčím krokům

translace a její regulace obě linie zásadně liší. Vzhledem k tomu, že savčí eIF3 obsahuje více než 2x tolik podjednotek ve srovnání s jeho kvasinkovým funkčním homologem, se všeobecně předpokládá, že některé funkce eIF3 v iniciaci translace jsou u vyšších eukaryont "dublované". Lze si tak představit, že v buňkách k tomuto "dublování" skutečně může docházet, zatímco buňky HeLa mají v dané oblasti nějaký problém, nebo tak prostě nejsou z nějakého, doposud neznámého důvodu "nastaveny". Další variantou pochopitelně je, že buňky HEK mají volně "spustitelný záchranný mechanismus", který je schopen alespoň částečně nahrazovat výpadky základního mechanismu translace, do jisté míry nezávislé na eIF3a. V každém případě je třeba důkladně rozlišovat výsledky pocházející z těchto linií, být obezřetní při jejich výkladu a nezobecňovat vzhledem k lidskému organismu. Optimální, ba přímo nutné, bude minimálně zjistit, jak se liší hladina mRNA a proteinu eIF3a v obou liniích mezi sebou před transfekcí. Časem je možno rovněž zkusit kombinovat siRNA proti eIF3a s siRNA proti jiným podjednotkám eIF3, které samy o sobě nemají silně negativní účinek na buněčnou proliferaci v HEK (zda nějaké takové existují zatím nevíme, ale intenzivně na tomto tématu pracujeme), a hledat takové kombinace, které povedou k úplné zástavě růstu. To by nám mohlo napovědět, která(é) podjednotka(y) pracuje(í) v úzkém spojení s eIF3a.

Pro účely analýzy efektu "deplece" eIF3a byla nadále za vhodnější zvolena buněčná linie HeLa, ve které způsobila "deplece" fatální efekt na životaschopnost.

Inkorporace radioaktivního methioninu je hojně využívanou metodou, která si získala svou popularitu především svou jednoduchostí a přímočarostí, kdy je značený methionin velice rychle zabudováván do nově vznikajících proteinů. Více než 80%-ní snížení tvorby celkového proteinu (obr. 10) jasně hovoří ve prospěch přímé a důležité účasti eIF3a v procesu translace. Inkorporace ³⁵S-methioninu do vznikajících proteinů nedává odpověď na otázku, na které úrovni translace k tomuto bloku dochází, zda v rámci iniciace, jak lze předpokládat, nebo později. Tam je zapotřebí zvát polysomový profil, který se zatím z technického důvodu nepodařilo zdárně obdržet (obr. 11 a 12). Rovněž nelze říci, zda je tento efekt přímým účinkem ztráty eIF3a ze zbylého stále soudržného komplexu eIF3, popřípadě nepřímým efektem rozpadu či zásadní změnou charakteru tohoto komplexu. Odpověď na tuto otázku nám dají až další experimenty jako například "ko-immunoprecipitace" komplexu eIF3 z kontrolních buněk "depletovaných" pro eIF3a, které již probíhají. Je nutné zmínit, že se naše výsledky v tomto bodě rozcházejí s již publikovanými výsledky práce vědecké skupiny Z. Dong et al. [45]. Ta ve své práci

ukazuje snížení exprese proteinů v HeLa buněčné linii, za použití nikoli eIF3a-specifických siRNA, ale komplementárních úseků cDNA k zamezení exprese eIF3a, o pouhých 15-20%. Dále se rozchází s prací J. Chaudhuri et al. [46], která sice označila eIF3a za součást základní kostry eIF3, ale nepozorovala žádný vliv absence této podjednotky na formování pre-iniciačních komplexů či na tvorbu ribozomu (80S). Rozlišné výsledky posledně uvedené skupiny mohou být způsobeny tím, že zmíněný výzkum byl prováděn s purifikovaným eIF3 z králíčích retikulocytů, tedy ve značně omezeném systému *in vitro*. Porovnání výsledků systémů *in vitro* s *in vivo* není vždy přímočaré a mnohdy se výsledky značně liší (příkladem je třeba studie Nielsen et al. [10]).

Pro mnoho dalších experimentů, jakým je například "ko-imunoprecipitace", je zapotřebí pracovat s výrazně větším množstvím buněk. Podmínky transfekce pro větší objemy kultivačních nádob a vyšší počet buněk se však zatím nedaří zdárně optimalizovat. Maximální úroveň "deplece" eIF3a dosažená v tomto větším uspořádání byla nedostačujících 60%. Nedostačujících proto, neboť výsledky polysomového profilu ukazují, že "deplece" na tuto úroveň nevyvolává žádný efekt (i když zcela jistě to tvrdit nelze, neboť provedení tohoto experimentu mělo další technické nedostatky, jež jsou uvedeny výše), zatímco jasný výsledek z inkorporace methioninu jednoznačně naznačuje, že se polysomový profil bude velmi významně lišit mezi "depletovanými" buňkami a kontrolou. Jelikož z výsledků MTT testu životaschopnosti víme, že ~41%-ní "deplece" eIF3a se už začíná projevovat na množství životaschopných buněk (~50% ztráta), naší snahou je dostat se alespoň na tuto úroveň "deplece" po transfekci. Pak bude možné lépe interpretovat obdržené výsledky, a navíc s větší dávkou jistoty.

8 ZÁVĚR

Iniciace translace je komplexním procesem, který je řízen celou řadou iniciačních faktorů. Velice důležitým je pak eukaryotický iniciační faktor 3, který hraje roli hned v několika významných krocích translace, jako je tvorba 43S PIC, tedy zprostředkování navázání TC na podjednotku 40S, navázání mRNA na ribozom, stimulace "skenování" 48S PIC a rozpoznání iniciačního kodonu AUG. Z mnoha dostupných prací na pučících kvasinkách a původních studiích na savčích buňkách máme důkazy o tom, že velice významnou součástí eIF3 je největší podjednotka, eIF3a/TIF32. Důležitost této podjednotky pro účinnost proteosyntézy byla v této práci zkoumána za použití dvou lidských buněčných linií několika experimenty a to okamžitě po navození eIF3a "deplece" metodou RNAi.

Získané výsledky jsou následující:

- 1) Metoda RNA interference (siRNA firmy Thermo Science) se ukázala být jako velice vhodný nástroj pro snížení exprese eIF3a jak v buňkách HeLa, tak v buněčné línii HEK. S použitím koncentrací siRNA 1 nM pro buňky HeLa a 10 nM pro buňky HEK, se nám podařilo snížit hladinu eIF3a až na 20% v obou buněčných liniích.
- 2) Životaschopnost buněk s "navozenou deplecí" podjednotky eIF3a klesá po čtvrtém dni v buňkách HEK na 50% a v buňkách HeLa až na 12%.
- 3) Hladina všech celkově syntetizovaných proteinů v buňkách HeLa po ztrátě více než 80% proteinu eIF3a vykazuje dramatický pokles v syntéze proteinů až na 20% ve srovnání s kontrolní skupinou buněk.

Úplným závěrem tedy mohu konstatovat, že tato práce dosáhla vytyčených cílů a je dle mého názoru dobrým základem pro další podrobnější studium eIF3a. Jak jsem již uvedla výše, momentálně pracujeme na optimalizaci metody imunoprecipitace za účelem zjištění, co se děje s komplexem eIF3 po "depleci" eIF3a ve vztahu k jeho soudržnosti. Dále plánujeme testovat tvorbu 43S a 48S PIC stanovením přítomnosti eIF3 a dalších iniciačních faktorů na malé ribozomální podjednotce za podmínek "deplece" eIF3a metodou gradientové centrifugace. Dalším důležitým krokem výzkumu bude i hlubší pozorování interakce eIF3a s ostatními podjednotkami eIF3. V neposlední řadě "stojí" za podrobnější prozkoumání translační mechanismus reiniciace syntézy proteinů v lidských buňkách.

9 LITERÁRNÍ PŘEHLED

- [1] Sonenberg N., and Hinnebusch A. G., 2009, "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets.," *Cell*, 136(4), pp. 731-45.
- [2] Spahn C. M., Beckmann R., and Eswar N., 2001, "Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions.," *Cell*, 107(3), pp. 373-86.
- [3] Ma J., Campbell A., and Karlin S., 2002, "Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures.," *Journal of bacteriology*, 184(20), pp. 5733-45.
- [4] Cullen B. R., 2009, "Viral RNAs: lessons from the enemy.," *Cell*, 136(4), pp. 592-7.
- [5] Sokabe M., Fraser C. S., and Hershey J. W. B., 2012, "The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNA_i binding to the 40S ribosomal subunit.," *Nucleic acids research*, 40(2), pp. 905-13.
- [6] Gilbert R. J. C., Gordiyenko Y., von der Haar T., Sonnen A. F.-P., Hofmann G., Nardelli M., Stuart D. I., and McCarthy J. E. G., 2007, "Reconfiguration of yeast 40S ribosomal subunit domains by the translation initiation multifactor complex.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), pp. 5788-93.
- [7] Passmore L. a, Schmeing T. M., Maag D., Applefield D. J., Acker M. G., Algire M. A., Lorsch J. R., and Ramakrishnan V., 2007, "The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome.," *Molecular cell*, 26(1), pp. 41-50.
- [8] Marintchev A., and Wagner G., 2004, "Translation initiation: structures, mechanisms and evolution.," *Quarterly reviews of biophysics*, 37(3-4), pp. 197-284.
- [9] Pestova T. V., and Kolupaeva V. G., 2002, "The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection.," *Genes & development*, 16(22), pp. 2906-22.
- [10] Nielsen K. H., Szamecz B., Valásek L., Jivotovskaya A., Shin B.-S., and Hinnebusch A. G., 2004, "Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control.," *The EMBO journal*, 23(5), pp. 1166-77.
- [11] Cheung Y.-N., Maag D., Mitchell S. F., Fekete C. A., Algire M. A., Takacs J. E., Shirokikh N., Pestova T., Lorsch J. R., and Hinnebusch A. G., 2007, "Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo.," *Genes & development*, 21(10), pp. 1217-30.

- [12] Yoon H. J., and Donahue T. F., 1992, "The *suil* suppressor locus in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a translation factor that functions during tRNA(iMet) recognition of the start codon.," *Molecular and cellular biology*, 12(1), pp. 248-60.
- [13] Szamecz B., Rutkai E., Cuchalová L., Munzarová V., Herrmannová A., Nielsen K. H., Burela L., Hinnebusch A. G., and Valásek L., 2008, "eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA.," *Genes & development*, 22(17), pp. 2414-25.
- [14] Siridechadilok B., Fraser C. S., Hall R. J., Doudna J. a, and Nogales E., 2005, "Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis.," *Science (New York, N.Y.)*, 310(5753), pp. 1513-5.
- [15] Asano K., Kinzy T. G., Merrick W. C., and Hershey J. W., 1997, "Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3.," *The Journal of biological chemistry*, 272(2), pp. 1101-9.
- [16] Phan L., Zhang X., Asano K., Anderson J., Vornlocher H. P., Greenberg J. R., Qin J., and Hinnebusch A. G., 1998, "Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5.," *Molecular and cellular biology*, 18(8), pp. 4935-46.
- [17] Zhou M., Sandercock A. M., Fraser C. S., Ridlova G., Stephens E., Schenauer M. R., Yokoi-Fong T., Barsky D., Leary J. A., Hershey J. W., Doudna J. A., and Robinson C. V., 2008, "Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), pp. 18139-44.
- [18] Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S., and Imataka H., 2007, "Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3.," *The EMBO journal*, 26(14), pp. 3373-83.
- [19] Kolupaeva V. G., Unbehaun A., Lomakin I. B., Hellen C. U. T., and Pestova T. V., 2005, "Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association.," *RNA (New York, N.Y.)*, 11(4), pp. 470-86.
- [20] Park H. S., Himmelbach A., Browning K. S., Hohn T., and Ryabova L. A., 2001, "A plant viral 'reinitiation' factor interacts with the host translational machinery.," *Cell*, 106(6), pp. 723-33.
- [21] Valásek L., Nielsen K. H., Zhang F., Fekete C. A., and Hinnebusch A. G., 2004, "Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection.," *Molecular and cellular biology*, 24(21), pp. 9437-55.

- [22] Majumdar R., Bandyopadhyay A., and Maitra U., 2003, "Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex.," *The Journal of biological chemistry*, 278(8), pp. 6580-7.
- [23] Chaudhuri J., Chowdhury D., and Maitra U., 1999, "Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex.," *The Journal of biological chemistry*, 274(25), pp. 17975-80.
- [24] Asano K., 2000, "A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA^{Met} is an important translation initiation intermediate in vivo.," *Genes & Development*, 14(19), pp. 2534-2546.
- [25] Lamphear B. J., Kirchweger R., Skern T., and Rhoads R. E., 1995, "Mapping of Functional Domains in Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4G (eIF4G) with Picornaviral Proteases," *Biochemistry*, 270(37), pp. 21975-21983.
- [26] Asano K., Vornlocher H. P., Richter-Cook N. J., Merrick W. C., Hinnebusch A. G., and Hershey J. W., 1997, "Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly.," *The Journal of biological chemistry*, 272(43), pp. 27042-52.
- [27] Pisarev A. V., Kolupaeva V. G., Yusupov M. M., Hellen C. U. T., and Pestova T. V., 2008, "Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes.," *The EMBO journal*, 27(11), pp. 1609-21.
- [28] Dong Z., Liu Z., and Cui P., 2009, "Role of eIF3a in regulating cell cycle progression.," *Experimental cell research*, 315(11), pp. 1889-94.
- [29] Ensinger C., Obrist P., and Mikuz G., 1998, "Assignment1 of the p150 subunit of the eukaryotic initiation factor 3A gene (EIF3A) to human chromosome band 10q26 by in situ hybridisation.," *Cytogenetics and cell genetics*, 83(1-2), pp. 74-5.
- [30] Pincheira R., Chen Q., and Zhang J. T., 2001, "Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers.," *British journal of cancer*, 84(11), pp. 1520-7.
- [31] Valásek L., Trachsel H., Hasek J., and Ruis H., 1998, "Rpg1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the largest subunit of mammalian translation initiation factor 3, is required for translational activity.," *The Journal of biological chemistry*, 273(33), pp. 21253-60.
- [32] Asano K., Phan L., Anderson J., and Hinnebusch A. G., 1998, "Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast *Saccharomyces cerevisiae*.," *The Journal of biological chemistry*, 273(29), pp. 18573-85.
- [33] Valásek L., Hasek J., Trachsel H., Imre E. M., and Ruis H., 1999, "The *Saccharomyces cerevisiae* HCR1 gene encoding a homologue of the p35 subunit of human translation initiation factor 3 (eIF3) is a high copy suppressor of a

- temperature-sensitive mutation in the Rpg1p subunit of yeast eIF3.," *The Journal of biological chemistry*, 274(39), pp. 27567-72.
- [34] Pincheira R., Chen Q., Huang Z., and Zhang J. T., 2001, "Two subcellular localizations of eIF3 p170 and its interaction with membrane-bound microfilaments: implications for alternative functions of p170.," *European journal of cell biology*, 80(6), pp. 410-8.
- [35] Hershey J. W., 1989, "Protein phosphorylation controls translation rates.," *The Journal of biological chemistry*, 264(35), pp. 20823-6.
- [36] Dellas A., Torhorst J., Bachmann F., Bänziger R., Schultheiss E., and Burger M. M., 1998, "Expression of p150 in cervical neoplasia and its potential value in predicting survival.," *Cancer*, 83(7), pp. 1376-83.
- [37] Kozak M., 2005, "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes.," *Gene*, 361, pp. 13-37.
- [38] Cuchalová L., Kouba T., Herrmannová A., Dányi I., Chiu W.-L., and Valásek L., 2010, "The RNA recognition motif of eukaryotic translation initiation factor 3g (eIF3g) is required for resumption of scanning of posttermination ribosomes for reinitiation on GCN4 and together with eIF3i stimulates linear scanning.," *Molecular and cellular biology*, 30(19), pp. 4671-86.
- [39] Chiu W.-L., Wagner S., and Herrmannová A., 2010, "The C-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 3a (eIF3a) promotes mRNA recruitment, scanning, and, together with eIF3j and the eIF3b RNA recognition motif, selection of AUG start codons.," *Molecular and cellular biology*, 30(18), pp. 4415-34.
- [40] Munzarová V., Pánek J., Gunišová S., Dányi I., Szamecz B., and Valásek L. S., 2011, "Translation reinitiation relies on the interaction between eIF3a/TIF32 and progressively folded cis-acting mRNA elements preceding short uORFs.," *PLoS genetics*, 7(7), p. e1002137.
- [41] Valásek L., Mathew A. A., Shin B.-S., Nielsen K. H., Szamecz B., and Hinnebusch A. G., 2003, "The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo.," *Genes & development*, 17(6), pp. 786-99.
- [42] Shaw G., Morse S., Ararat M., and Graham F. L., 2002, "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(8), pp. 869-71.
- [43] Masters J. R., 2002, "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly.," *Nature reviews. Cancer*, 2(4), pp. 315-9.

- [44] Bradford M. M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248-54.
- [45] Dong Z., and Zhang J.-T., 2003, "EIF3 p170, a mediator of mimosine effect on protein synthesis and cell cycle progression.," *Molecular biology of the cell*, 14(9), pp. 3942-51.
- [46] Chaudhuri J., Chakrabarti A., and Maitra U., 1997, "Biochemical characterization of mammalian translation initiation factor 3 (eIF3). Molecular cloning reveals that p110 subunit is the mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* protein Prt1.," *The Journal of biological chemistry*, 272(49), pp. 30975-83.