

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Příprava experimentálního systému pro analýzu kináz CK1 α a CK1 α -like *in vitro* a jeho využití pro určení substrátové specificity těchto kináz

Darja Klementová
Jihomoravský kraj

Brno 2022

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Příprava experimentálního systému pro analýzu kináz CK1 α a CK1 α -like *in vitro* a jeho využití pro určení substrátové specificity těchto kináz

Development of an experimental system for *in vitro* analysis of the kinases CK1 α and CK1 α -like and its application to determine the substrate specificity of these kinases

Autoři: Darja Klementová

Škola: Gymnázium P. Křížkovského s uměleckou profilací, s. r. o.,
Kristenova 27, 624 00

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: prof. Mgr. Vítězslav Bryja, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 27. 2. 2022

Darja Klementová

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala **prof. Mgr. Vítězslavu Bryjovi, Ph.D.** za umožnění práce na tomto projektu a otevření nových možností pro můj další výzkum. Dále bych chtěla poděkovat laboratoři **prof. Richarda Štefla, Ph.D.** a laboratoři **Konstantinose Tripsianese, Ph.D.** za vytvoření podmínek pro vykonání některých experimentů. Za pomoc a podporu při práci v laboratoři děkuji **doc. Sara Bologne** a **Mgr. Tomáši Gybel'ovi**.

Mé poděkování patří také vedení a pedagogickému sboru Gymnázia P. Křížkovského s uměleckou profilací za umožnění individuálního vzdělávacího plánu. Jmenovitě bych chtěla poděkovat panu řediteli **MgA. Martinu Hrochovi, Ph.D.** a za velkou psychickou podporu mé třídní učitelce **Mgr. Haně Konečné**.

Na závěr bych chtěla nejvíce poděkovat **Mgr. Marku Šebestovi, Ph.D.** za veškerou péči a vstřícnost při vzniku této práce a za otevření nových obzorů v oblasti vědy, a to nejen přírodní.

Anotace

Jedním z nejrozšířenějších způsobů přenosu signálu v buňkách je fosforylace katalyzovaná enzymy kinázami. Významná buněčná signalizační dráha Wnt/ β -katenin je regulována kinázami z rodiny CK1, přičemž *in vivo* byla pozorována značná rozmanitost v substrátové specifitě jednotlivých isoform CK1. Konkrétní mechanismus, který k odlišné substrátové specifitě vede, dosud nebyl objasněn. Tato práce se zabývá přípravou a využitím experimentálního systému pro determinaci substrátové specifity *in vitro* isoform CK1 α a CK1 α -like v rámci Wnt/ β -katenin signalizační dráhy. Protože deregulace Wnt/ β -katenin signalizační dráhy způsobená narušením CK1 α může vést k rozvoji myelodysplastického syndromu (MDS) a akutní myeloidní leukémie (AML), je získávání nových poznatků o CK1 α esenciální pro zlepšení léčby těchto závažných hematologických onemocnění. Výsledky mé práce ukazují, že *in vitro* fungují CK1 α a CK1 α -like ve srovnání s testovanou isoformou CK1 ϵ redundantně a vykazují shodnou substrátovou specifitu vůči proteinům, které v realitě nefosforylují. Z mých zjištění vyplývá, že substrátová specifita kináz je *in vivo* ovlivněna jinými, externími vlivy, nikoliv vlastnostmi kináz samotných. Tento text je zároveň první publikací zabývající se doposud neznámou isoformou CK1 α -like, jíž jsem pomocí biochemických analýz identifikovala jako katalyticky aktivní kinázu s potenciálním vlivem na Wnt/ β -katenin signalizační dráhu.

Klíčová slova

akutní myeloidní leukémie, kasein kináza 1, myelodysplastický syndrom, substrátová specifita, Wnt/ β -katenin signalizace

Annotation

One of the most common ways of signal transduction in cells is phosphorylation catalyzed by enzymes called kinases. Significant cell-signaling pathway Wnt/ β -catenin is regulated by kinases from the CK1 family, with considerable diversity in the substrate specificity of the individual CK1 isoforms observed *in vivo*. The specific mechanism that leads to different substrate specificity has not yet been elucidated. This work focuses on the development and use of an experimental system for determining the substrate specificity *in vitro* of isoforms CK1 α and CK1 α -like in the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Since the deregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway due to CK1 α disruption may result in the development of myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), gaining new knowledge about CK1 α is essential for the improvement of the current treatment of these haematological disorders. The results of my work show that the function of CK1 α and CK1 α -like *in vitro* is redundant in comparison with tested isoform CK1 ϵ and that the kinases show the same substrate specificity for proteins that are not phosphorylated by them *in vivo*. My findings suggest that the substrate specificity of kinases is determined *in vivo* by other,

external influences, and not by the properties of the kinases themselves. This text is also the first publication dealing with the hitherto unknown CK1 α -like isoform, which I identified as a catalytically active kinase using biochemical analyses with a potential effect on the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords

acute myeloid leukemia, casein kinase 1, myelodysplastic syndrome, substrate specificity, Wnt/ β -catenin signaling

Seznam zkratek

| | |
|--------------------|--|
| aa | <i>amino acids</i> , aminokyseliny |
| 5q | dlouhé rameno chromozomu 5 |
| 13q | dlouhé rameno chromozomu 13 |
| 26S proteazom | proteazom se sedimentačním koeficientem 26 |
| ADP | <i>adenosine diphosphate</i> , adenosindifosfát |
| AML | <i>acute myeloid leukemia</i> , akutní myeloidní leukemie |
| APC | <i>Adenomatous polyposis coli</i> , scaffoldový protein |
| APS | <i>ammonium persulfate</i> , peroxodisíran amonný |
| Asp | aminokyselina aspartát (třípísmenná zkratka) |
| ATP | <i>adenosine triphosphate</i> , adenosintrifosfát |
| Axin | <i>Axis inhibition</i> , scaffoldový protein |
| BM | <i>bone marrow</i> , kostní dřeň |
| β -TrCP | <i>β-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i> , podjednotka |
| CK1 | <i>casein kinase 1</i> , rodina kasein kináz 1 |
| CK1 α -like | <i>casein kinase 1 α-like</i> , kasein kináza 1 α -like |
| CK1 α | <i>casein kinase 1 α</i> , kasein kináza 1 α |
| CK1 ϵ | <i>casein kinase 1 ϵ</i> , kasein kináza 1 ϵ |
| CK1 γ 1 | <i>casein kinase 1 γ-1</i> , kasein kináza 1 γ -1 |
| CK1 δ | <i>casein kinase 1 δ</i> , kasein kináza 1 δ |
| CSNK1A1 | gen pro expresi lidského proteinu CK1 α |
| CSNK1A1L | gen pro expresi lidského proteinu CK1 α -like |
| del(5q) | delece chromozomu 5q |
| del(5q) MDS | MDS spojený s del(5q) |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| dCTP | deoxycytidin trifosfát |
| dGTP | deoxyguanosin trifosfát |
| dNTP | deoxynukleosid trifosfát |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina |
| DTT | dithiotreitol |
| Dvl | <i>Dishevelled</i> , scaffoldový protein |
| EDTA | kyselina ethylendiaminotetraoctová |
| FAM83 | <i>Family with sequence similarity 83</i> , proteinová rodina |
| FAM83F | <i>Family with sequence similarity 83 F</i> , protein z rodiny FAM83 |
| FAM83G | <i>Family with sequence similarity 83 G</i> , protein z rodiny FAM83 |
| FL | <i>full length</i> , standardní verze proteinu |
| Fzd | <i>Frizzled</i> , proteinový receptor |
| GLIPR1 | <i>Glioma pathogenesis-related protein 1</i> , protein |
| Glu | aminokyselina glutamát (třípísmenná zkratka) |
| GSK-3 β | <i>Glycogen synthase kinase-3β</i> , kináza |
| GST | <i>glutathione s-transferase</i> , afinitní štítek |
| His ₆ | <i>polyhistidine-tag</i> , afinitní štítek |

| | |
|-----------------------|---|
| HPCs | <i>hematopoietic progenitor cells</i> , hematopoetické progenitorové buňky |
| HSCs | <i>hematopoietic stem cells</i> , hematopoetické kmenové buňky |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , peroxidáza z kořene křenu selského |
| IPTG | izopropyl β -D-1-tiogalaktopyranozid |
| KO | <i>knockout</i> , buněčná linie s vyřazeným genem |
| LB | Luria-Bertani médium |
| LIC | <i>Ligation Independent Cloning</i> , ligace nezávislá na klonování |
| Lrp5/6 | <i>LDL receptor-related protein 5/6</i> , proteinový koreceptor |
| Lys | aminokyselina lysin (třípísmenná zkratka) |
| MBP | <i>maltose-binding protein</i> , afinitní štítek |
| MDS | <i>myelodysplastic syndrome</i> , myelodysplastický syndrom |
| MSCs | <i>myeloid stem cells</i> , myeloidní kmenové buňky |
| NLS | <i>nuclear localization signal</i> , jaderný lokalizační signál |
| PB | <i>peripheral blood</i> , periferní krev |
| PCP | <i>Planar Cell Polarity</i> , nekanonická Wnt dráha |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce |
| pDNA | plazmidová DNA |
| pSer | aminokyselina fosfo-serin |
| PVDF | polyvinyliden difluorid |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , ribonukleová kyselina |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> , dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza v SDS gelu |
| Ser | aminokyselina serin (třípísmenná zkratka) |
| shRNA | <i>short hairpin RNA</i> , krátká vlásenková RNA |
| TCF/LEF | <i>T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor</i> , transkripční faktory |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin |
| Thr | aminokyselina threonin (třípísmenná zkratka) |
| tMDS | <i>therapy related MDS</i> , sekundární MDS |
| Wnt | <i>Wingless-related integration site</i> , skupina signalizačních drah |
| Wnt/Ca ²⁺ | <i>Wingless-related integration site/Ca²⁺</i> , nekanonická Wnt dráha |
| Wnt/ β -katenin | <i>Wingless-related integration site/β-catenin</i> , kanonická Wnt dráha |
| WT | <i>wild type</i> , v přírodě běžný |

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 11 |
| 2 | Teoretická část | 12 |
| 2.1 | Buněčná signalizace | 12 |
| 2.1.1 | Příjem signálu | 13 |
| 2.1.2 | Transdukce signálu | 13 |
| 2.2 | Fosforylace | 14 |
| 2.3 | Wnt/ β -katenin signalizační dráha..... | 15 |
| 2.3.1 | Wnt-off..... | 16 |
| 2.3.2 | Wnt-on | 17 |
| 2.4 | Kasein kináza 1 alfa | 18 |
| 2.4.1 | Isoformy CK1 α | 18 |
| 2.4.2 | Struktura..... | 18 |
| 2.4.3 | Substrátová specificita | 20 |
| 2.4.4 | Regulace aktivity | 20 |
| 2.5 | Kasein kináza 1 alfa-like | 21 |
| 2.6 | CK1 α a vybraná hematologická onemocnění | 21 |
| 2.6.1 | CK1 α a myelodysplastický syndrom | 21 |
| 2.6.2 | CK1 α a akutní myeloidní leukémie | 23 |
| 2.6.3 | Inhibice CK1 α v MDS a AML | 23 |
| 3 | Cíle práce | 25 |
| 4 | Materiály | 26 |
| 4.1 | Chemikálie | 26 |
| 4.2 | Pufry, roztoky a média | 26 |
| 4.3 | Enzymy | 27 |
| 4.4 | Kity pro práci s DNA | 28 |
| 4.5 | Markery | 28 |
| 4.6 | Templáty | 28 |
| 4.7 | Primery | 29 |
| 4.8 | Vektory..... | 30 |
| 4.9 | Bakteriální kmeny | 30 |
| 4.10 | Hmyzí buňky | 30 |
| 4.11 | Antibiotika..... | 31 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.12 | Inhibitory proteáz | 31 |
| 4.13 | Protilátky | 31 |
| 4.14 | Přístroje..... | 31 |
| 4.15 | Použité počítačové programy | 33 |
| 5 | Metody | 35 |
| 5.1 | Diferenciální centrifugace | 35 |
| 5.2 | PCR | 35 |
| 5.3 | Gelová elektroforéza | 37 |
| 5.3.1 | Agarózová elektroforéza | 37 |
| 5.3.2 | SDS-PAGE | 38 |
| 5.4 | Chemická transformace bakterií <i>E. coli</i> | 38 |
| 5.5 | Klonování nezávislé na ligaci | 39 |
| 5.6 | Exprese proteinů v hmyzích buňkách | 40 |
| 5.6.1 | Transpozice do bakmidu | 40 |
| 5.6.2 | Generace viru v <i>Sf9</i> hmyzích buňkách | 40 |
| 5.6.3 | Exprese v Hi5 buňkách | 41 |
| 5.7 | Exprese proteinů v bakteriích..... | 41 |
| 5.8 | Purifikace proteinů z hmyzích buněk..... | 42 |
| 5.8.1 | Lýza buněk..... | 43 |
| 5.8.2 | Afinitní chromatografie | 43 |
| 5.8.3 | Gelová filtrace..... | 43 |
| 5.9 | Purifikace proteinů z bakteriálních buněk..... | 43 |
| 5.9.1 | Lýza buněk..... | 43 |
| 5.9.2 | Afinitní chromatografie | 44 |
| 5.9.3 | Gelová filtrace..... | 44 |
| 5.10 | Western blot..... | 44 |
| 5.11 | Autofosforylační analýza..... | 45 |
| 5.12 | Kinázová analýza..... | 45 |
| 6 | Výsledky | 46 |
| 6.1 | Mutageneze CK1 α a CK1 α -like | 46 |
| 6.2 | Příprava rekombinantních plazmidů | 47 |
| 6.3 | Purifikace proteinů | 50 |
| 6.3.1 | Purifikace proteinů z hmyzích buněk | 50 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.3.2 | Purifikace proteinů z bakteriálních buněk | 53 |
| 6.4 | Autofosforylační analýza | 54 |
| 6.5 | Kinázová analýza | 55 |
| 7 | Diskuze | 58 |
| 7.1 | Charakterizace CK1 α -like | 58 |
| 7.2 | Substrátová specificita CK1 α a CK1 α -like | 58 |
| 7.3 | Isoformy CK1 α | 59 |
| 8 | Závěr | 60 |
| 9 | Přínos práce..... | 61 |
| 10 | Použitá literatura | 62 |
| 11 | Seznam tabulek a obrázků | 70 |

1 ÚVOD

Stejně jako my, lidé, spolu v každodenním životě jednáme, musí spolu komunikovat buňky tvořící naše tkáň. Je ale samozřejmé, že buňky nemají k dispozici mluvu, gesta a mimiku. Informace mezi sebou si buňky posílají chemicky, ve formě různých signálních molekul. Souhrnně se tento komunikační systém nazývá buněčná signalizace. Pod tímto poměrně širokým pojmem se skrývá nespočet tzv. signálních drah, speciálních souborů proteinů zodpovídajících za přenos určitého signálu a jeho následné zpracování vhodnou buňkou.

Přenos signálu v buňce probíhá různými mechanismy. Tím nejčastějším je fosforylace, kterou zprostředkovává skupina enzymů zvaná kinázy. Fosforylace spočívá v navázání fosfátové skupiny PO_4^{3-} kinázou na jiný protein, její tzv. proteinový substrát. Úprava proteinu fosforylací vede ke změně jeho vlastností a tím otevírá další průběh signalizační dráhy.

Tato práce se zabývá kinázou $\text{CK1}\alpha$, která je jedním z klíčových regulátorů významné buněčné signalizační dráhy Wnt/ β -katenin. Součástí práce je také charakterizace takřka nepopsané příbuzné kinázy $\text{CK1}\alpha$ -like. Mým hlavním objektem zájmu je určení substrátové specifity $\text{CK1}\alpha$ a $\text{CK1}\alpha$ -like v rámci Wnt/ β -katenin signalizační dráhy *in vitro*. Pro determinaci substrátové specifity těchto kináz jsem využila mnou připravený experimentální systém. Protože deregulace Wnt/ β -katenin dráhy způsobená špatně fungující $\text{CK1}\alpha$ může vést k rozvoji dvou závažných hematologických onemocnění, myelodysplastického syndromu a akutní myeloidní leukémie, výsledky mé práce přispívají k poznání fungování $\text{CK1}\alpha$ a potenciálnímu využití nových znalostí pro cílenější léčbu těchto onemocnění pomocí inovativních inhibitorů $\text{CK1}\alpha$.

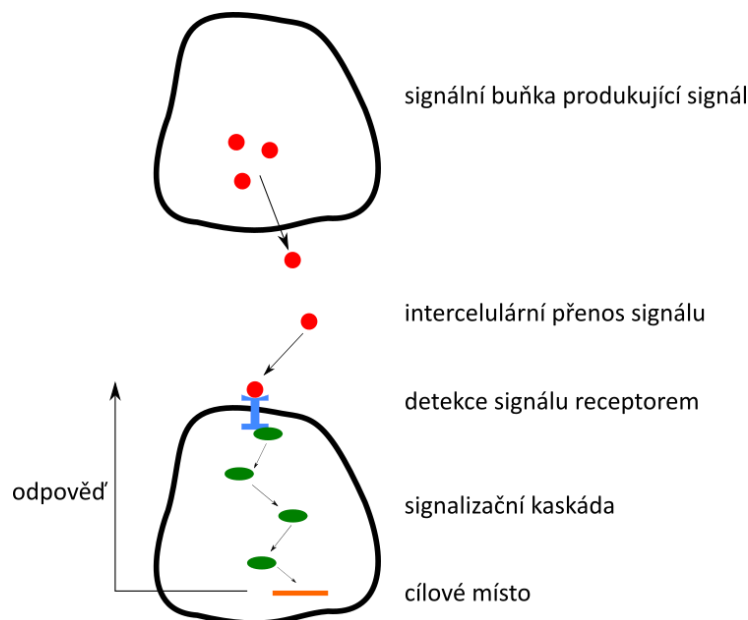
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčná signalizace

Komplexní platforma buněk tvořících jednotlivé tkáně mnohobuněčných organismů musí pro zajištění správných tělesných funkcí postupovat koordinovaně. Vzájemnou synchronizaci a komunikaci buněk umožňuje tzv. buněčná signalizace [1]. Buňky si mezi sebou přeposílají chemické signály, které jednak zaznamenávají, a jednak zpracovávají evolučně konzervovanými mechanismy, pro něž se vžil souhrnné označení signalizační dráhy. Každá dráha detekuje vždy určitý typ signálu a transportuje jej uvnitř buňky unikátní kaskádou signalizačních proteinů. Výsledkem přenosu signálu do cílového místa je odpověď buňky na přijatý impulz [2].

Buněčná signalizace ovlivňuje prakticky všechny aspekty buněčné struktury a funkce. Má efekt na růst, diferenciaci a morfologii buněk, včetně intermediárních metabolických dějů a programů genové exprese. Významně reguluje také buněčnou proliferaci a dělení. Uplatnění nachází signalizace mj. i v pohybu buňky, ať už náhodném (motilita) či orientovaném (migrace) [3].

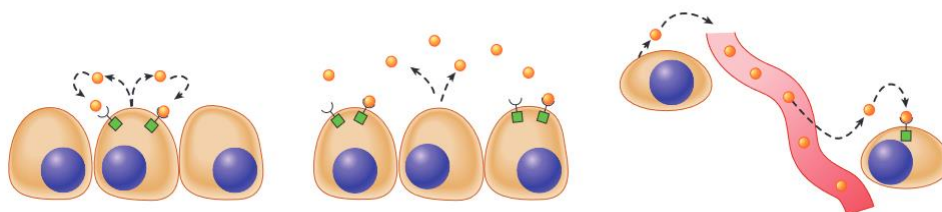
Vzhledem k úzkému vztahu mezi signalizačními dráhami a kontrolou buněčného dělení je studium signalizace naprosto zásadní pro porozumění vývoje zhoubných nádorových onemocnění [1, 4].



Obrázek 1: Grafické schéma buněčné signalizace. Signální buňka uvolňuje do vnějšího prostředí signál (červeně). Receptor buňky (modře), pro kterou je přenášena informace určena, detekuje signál a spouští signalizační kaskádu. Proteiny kaskády (zeleně) signál transportují do cílového místa (oranžově) indukujícího buněčnou odpověď. Vytvořeno v programu Inkscape, ver. 1.0.1.

2.1.1 Příjem signálu

Pomyslným poslem informací mezi buňkami jsou signální molekuly. Jedná se o ligandy (tj. obecné označení pro látky vázající se na jiné biomolekuly) různého chemického charakteru (peptidy, hormony, neurotransmitery aj.) [5]. Signál pro komunikaci produkují signální buňky po stimulaci externím spouštěčem v podobě sensorického vjemu, elektrického impulzu nebo signálu z jiné dráhy. Uvnitř signální buňky dochází k biosyntéze, přechodnému uchování a následnému uvolnění signální molekuly do vnějšího prostředí exocytózou [3]. Signál se transportuje k cílové buňce buď na krátké vzdálenosti (parakrinní signalizace), nebo vzdálenosti delší prostřednictvím krevního oběhu (endokrinní signalizace). Ve výjimečných případech je producentem i příjemcem signálu totožná buňka (autokrinní signalizace) [1].



Obrázek 2: Autokrinní, parakrinní a endokrinní buněčná signalizace (převzato z Karp, 2013).

Pro správný průběh signalizace je záhodno zajistit vliv signálu pouze na příslušnou skupinu buněk. Selektivita buňky je podmíněna přítomností receptoru interagujícího výlučně s patřičným signálem. Receptorové proteiny se nachází uvnitř buňky, nebo jsou prezentovány na povrchu (tzn. zabudované v cytoplazmatické membráně) [6]. Druhé zmiňované se uplatňují u hydrofilních signálních molekul, jež nemohou membránou projít. Umožňují tak spuštění signalizační dráhy bez přímého průniku signálu do buňky. Signál se váže na extracelulární část receptoru. Po detekci signálu pozměňuje receptor konformaci své intracelulární části a tím nabývá schopnosti interagovat s molekulami příslušné dráhy. Receptor tudíž slouží jako převodník původně mezibuněčného signálu na vnitrobuněčný [2].

2.1.2 Transdukce signálu

Signalizační kaskády fyzicky přenášejí signál z bodu přijetí do buněčného aparátu vytvářejícího odpověď. Jedná se v podstatě o štafetové řetězce vnitrobuněčných molekul, které na sebe v přenosu signálu navazují. Během transportu se k prezentaci stejné informace užívají různé druhy signálu. V kritických bodech signalizační dráhy se signál tzv. transdukuje, tedy přeměňuje z jedné formy na druhou.

Komponenty kaskády jsou pro transfer signálu aktivovány rozličnými mechanismy, např. kovalentními modifikacemi, vazbou s interakčním partnerem, změnou konformace a

ukotvením na membránu. Nejfrekventovanějším mechanismem transdukce signálu je fosforylace [3]. Tomuto významnému jevu se budu věnovat dále v textu (viz 2.2.).

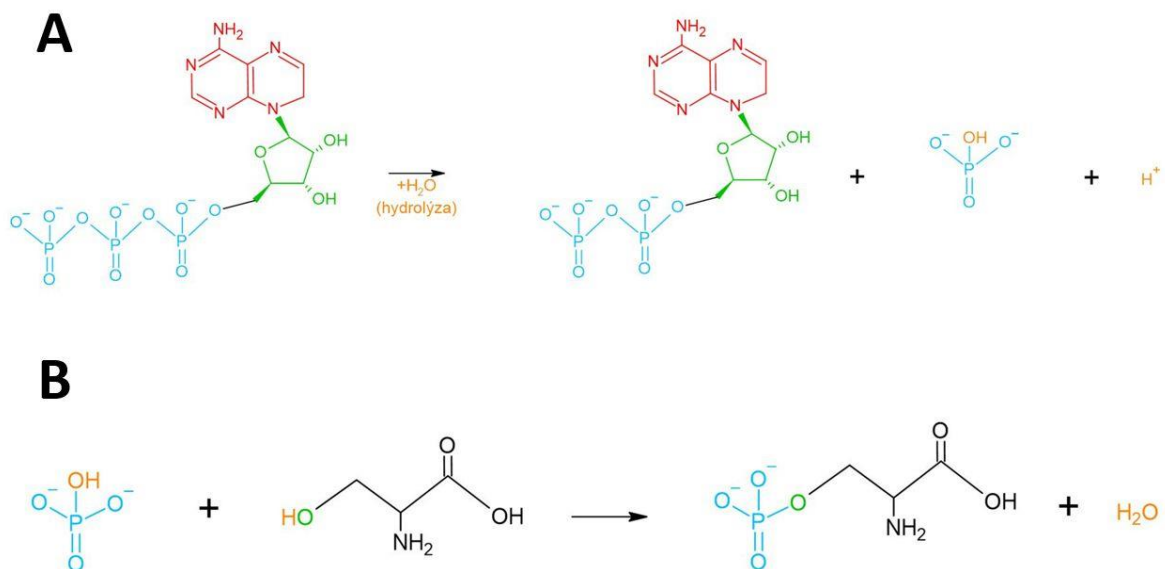
Poté, co se signál dostane do cílového místa své působnosti, buňka vytváří odpověď jakožto zpětnou vazbu na zprostředkovanou informaci.

2.2 Fosforylace

Fosforylace je modifikací proteinů spočívající v kovalentním navázání fosfátové skupiny PO_4^{3-} na proteinový substrát (tj. obecně označení pro molekulu ovlivňovanou enzymem). Více než dvě třetiny lidského proteomu (>20000 proteinů) jsou fosforylovány a odhaduje se, že počet proteinů zčásti ovlivňovaných fosforylací dosahuje až 90 % [7, 8].

Silně negativní fosfátové skupiny mění tvorbou vodíkových vazeb a solných můstků se sousedními rezidui konformaci proteinu a tím indukují změny jeho katalytických a/nebo vazebných vlastností. Fosforylací některých enzymů dokonce dochází k úplné aktivaci, nebo naopak zastavení funkce [8, 9].

Fosforylací proteinového substrátu katalyzují enzymy zvané kinázy. Fosfát pro reakci je získáván ze zdrojové molekuly adenosintrifosfátu (ATP, *a*denosine *t*riphosphate). Kináza odštěpuje z ATP koncový γ -fosfát hydrolýzou vysokoenergetické fosfoanhydridové vazby mezi β - a γ - fosfáty za vzniku adenosindifosfátu (ADP, *a*denosine *d*iphosphate) [8]. Následně kináza esterifikuje volnou fosfátovou skupinu na cílovou aminokyselinu v substrátu. Nejčastěji fosforylovanými aminokyselinami jsou serin, threonin a tyrosin, u kterých se fosfát váže na kyslík hydroxylové -OH skupiny v postranním řetězci [7].



Obrázek 3: (A) Rovnice hydrolýzy ATP. Kináza odštěpuje od molekuly ATP koncový γ -fosfát za vzniku molekuly ADP. (B) Rovnice fosforylace aminokyseliny serin (kyselina L-2-amino-3-hydroxypropanová). Po

odštěpení vodíku ze skupiny -OH v serinu nabývá atom kyslíku (zeleně) záporný náboj. Kyslík provádí nukleofilní útok na -OH skupinu ve fosfátu a nahrazuje ji za vzniku fosfo-serinu a H₂O. Vytvořeno v programu ChemSketch, ver. 14.00, FREE.

Fosforylace je modifikací reverzibilní (tj. vratnou). Reakcí opačnou, při které se fosfát od substrátu naopak odštěpuje, je defosforylace katalyzovaná enzymy fosfatázami [8].

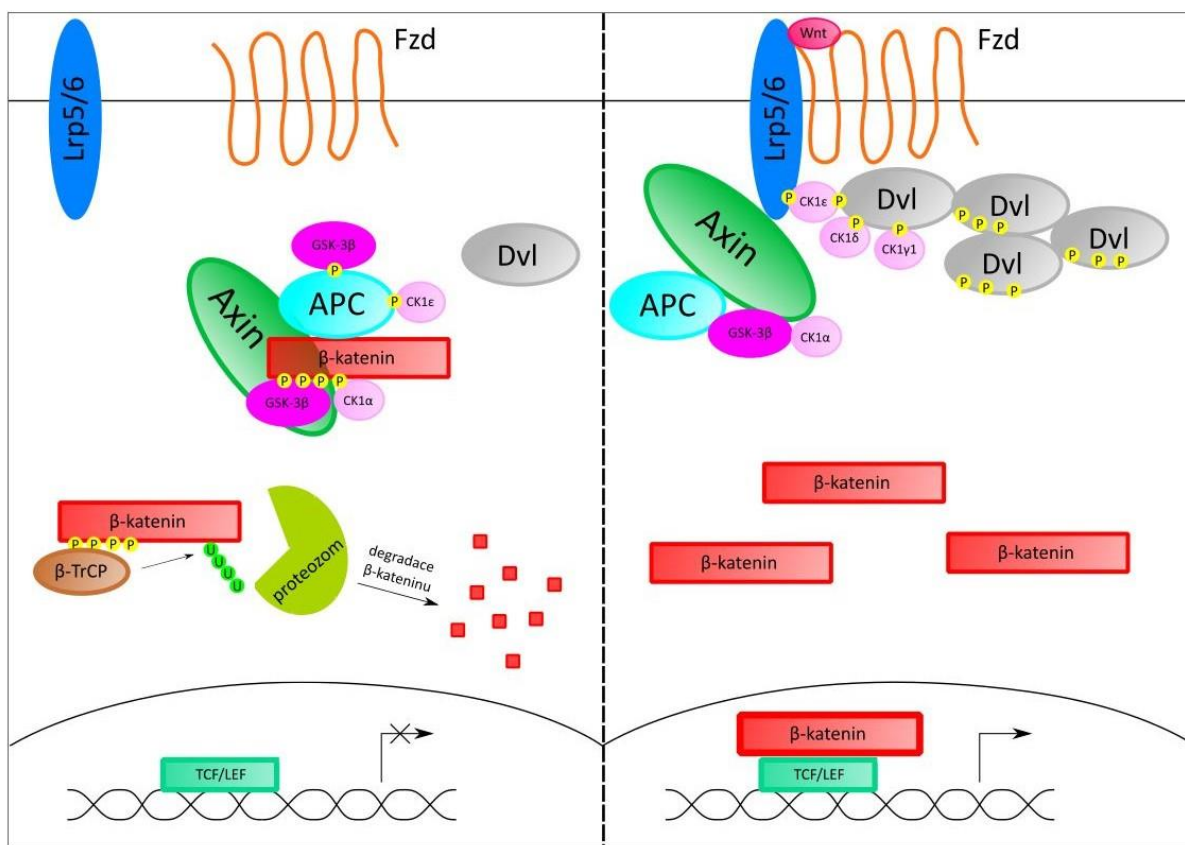
Jednou z mnoha drah, při níž je fosforylace klíčovým mechanismem transdukce signálu, je Wnt/ β -katenin signalizační dráha, na kterou se zaměřuje tato práce.

2.3 Wnt/ β -katenin signalizační dráha

Vysoce konzervované dráhy Wnt (Wingless-related integration site) přenáší do buněčného jádra signál pro spuštění transkripce jimi kontrolovaných cílových genů [10]. Dle kompartmentů intracelulárních signálních kaskád rozlišujeme dva typy Wnt drah [11], kanonickou Wnt/ β -katenin a dráhy nekanonické, neboli na β -kateninu nezávislé, mezi jejichž zástupce patří mj. PCP (Planar Cell Polarity) a Wnt/Ca²⁺ [12].

Tato práce se zabývá v současnosti nejzkoumanější [13] Wnt/ β -katenin signalizací, která hraje důležitou roli v buněčných procesech souvisejících s embryogenezí, vývojem nezralých buněk a udržením homeostázy (tj. soubor mechanismů zajišťujících stabilní prostředí uvnitř organismu) [14]. Uvnitř samotných buněk ovlivňuje tato signální dráha celou řadu dějů, např. proliferaci, diferenciaci, apoptózu a migraci [15].

Princip Wnt/ β -katenin signalizační dráhy tkví v řízené akumulaci β -kateninu, centrálního mediátoru signálu, v cytoplazmě a jeho následné lokalizaci do jádra, kde spouští transkripci cílových genů. Když je Wnt/ β -katenin dráha inaktivní (stav Wnt-off), cytoplazmatický β -katenin je příčiněním multiproteinového destrukčního komplexu degradován. V okamžiku detekce signálního ligandu Wnt povrchovým receptorem se dráha aktivuje (stav Wnt-on) a zastavuje činnost destrukčního komplexu, takže se neporušený β -katenin stává nositelem signálu a putuje do jádra [16].



Obrázek 4: Grafické schéma Wnt/β-katenin signalizační dráhy v inaktivním stavu Wnt-off (vlevo) a aktivním stavu Wnt-on (vpravo). Vytvořeno v programu Inkscape, ver. 1.0.1.

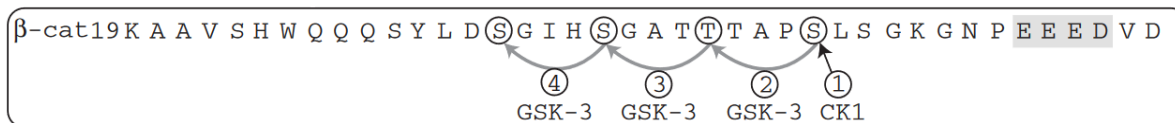
2.3.1 Wnt-off

V inaktivním stavu Wnt/β-katenin dráhy je β-katenin neustále degradován destrukčním komplexem sestávajícím z proteinů Axin (*A*xin *i*nhibition), APC (*A*denomatous *p*olyposis *c*oli), kináz CK1α (*c*asein *k*inase *1* α) a GSK-3β (*G*lycogen *s*ynthase *k*inase-*3*β) a E3-ubikvitin ligázy [16]. Kinázy komplexu vytváří fosforylací konkrétních reziduí v β-kateninu místa pro identifikaci ligázou. Po zaznamenání fosforylace ligáza chemicky označí β-katenin pro následnou degradaci proteazomem [17].

Axin plní v destruktozomu funkci scaffoldového („lešení tvořícího“) proteinu, soustřeďuje na sebe ostatní součásti destrukčního komplexu pro následné interakce [16]. Ve své sekvenci nese místa pro specifické navázání GSK-3β, CK1α a β-kateninu. Protože je samotná vazba mezi Axinem a β-kateninem relativně slabá, stabilizuje se celý komplex rekrutováním scaffoldového proteinu APC na β-katenin, přičemž celkovou afinitu APC vůči β-kateninu zvyšují fosforylace kinázami GSK-3β a CK1ε (*c*asein *k*inase *1* ε) [17].

Klíčový proces fosforylace β-kateninu je zprostředkován kinázami CK1α a GSK-3β. Modifikaci fosfátem podstupují čtyři rezidua ve směru od C-konce k N-konci. Řetězec fosforylačních reakcí spouští iniciální fosforylace Ser⁴⁵ kinázou CK1α, která β-katenin identifikuje jako svůj substrát díky konzervované sekvenci EEED (podrobně viz 2.4.3.). Na

prvotní fosforylaci posléze navazují fosforylace Thr⁴¹, Ser³⁷ a Ser³³ katalyzované GSK3-β [18].



Obrázek 5: Úsek sekvence proteinu β-katenin s vyznačenými fosforylovanými rezidui. Fosforylace Ser⁴⁵ CK1α spouští další tři fosforylační reakce GSK-3β rezidui Thr⁴¹, Ser³⁷ a Ser³³. Šedě je zvýrazněn acidický klastr EEED rozpoznávaný CK1α (převzato z Stamos a Weis, 2013).

Krátký peptid zahrnující fosfo-seriny pSer³³ a pSer³⁷ v β-kateninu je vazebným místem pro β-TrCP (*β-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) podjednotku E3 ubikvitin ligázového komplexu [19]. Připojená ligáza β-katenin upravuje navázáním malých proteinů ubikvitinů (tzv. ubikvitinaci). Ubikvitinaci rozeznává 26S proteazom, který β-katenin posléze proteolyticky degraduje [20].

2.3.2 Wnt-on

Přenos signálu extracelulárním prostorem zprostředkovávají ligandy z rodiny Wnt. Tyto hydrofobní glykolipoproteiny jsou vždy do vnějšího prostředí sekretovány v sekrečních váčcích, nikoliv ve volné formě [21].

Wnt ligandy jsou detekovány receptory z rodiny Fzd (*Frizzled*) [22]. Protein Fzd je tvořen jediným polypeptidovým řetězcem, který sedmkrát prochází cytoplazmatickou membránou (je tzv. sedmkrát transmembránový) [23]. Wnt ligand se váže na extracelulární část Fzd, což vede ke změně konformace intracelulární části receptoru Fzd. Tato změna umožňuje navázání lipoproteinového koreceptoru Lrp5/6 (*LDL receptor-related protein 5/6*) a tím vznik trimerického komplexu Wnt-Fzd-Lrp5/6 [21].

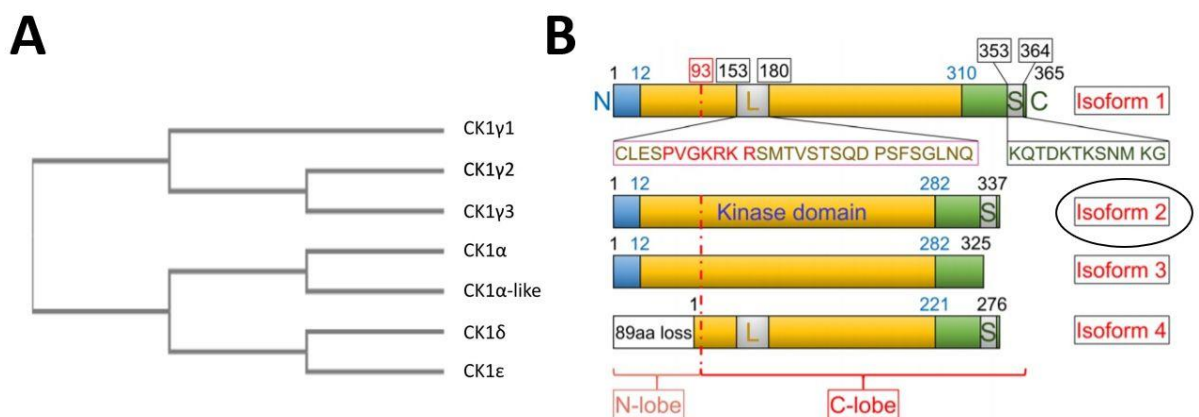
Signál mezi Wnt-Fzd-Lrp5/6 komplexem a dalšími komponenty Wnt/β-catenin dráhy přenáší scaffoldový protein Dvl (*Dishevelled*) [24, 25]. Konkrétně se Dvl váže z cytosolové strany na intracelulární část receptoru Fzd [26]. Dvl je fosforylován kinázami CK1γ1 (*casein kinase 1 γ-1*), CK1δ (*casein kinase 1 δ*) a CK1ε [27]. Po fosforylaci specifických serinových rezidui začínají molekuly Dvl polymerizovat [28]. Shluky polymerizovaného Dvl přitahují z cytoplazmatického prostoru scaffold Axin [29]. Protože Dvl vykazuje vůči Axinu vysokou afinitu, Axin se lokalizuje v blízkosti Dvl u cytoplazmatické membrány, kde se rekrutuje na receptor Lrp5/6 fosforylovaný kinázou CK1ε. Bez přítomnosti Axinu se nedokáže vytvořit destrukční komplex a nedegradovaný β-katenin proniká jadernými póry do jádra. β-katenin se v jádře postupně kumuluje a asociací s transkripčními faktory TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*) aktivuje expresi cílových genů [30].

2.4 Kasein kináza 1 alfa

Kasein kináza 1 alfa (CK1 α , *c*asein *k*inase *1* α) je jednou ze sedmi (viz Obrázek 6) isoformem monomerních kináz rodiny CK1 se serin/threoninovou kinázovou aktivitou [31]. Gen pro expresi CK1 α u lidí, CSNK1A1, se nachází na 32. pozici dlouhého ramene 5. chromozomu (5q32) [32]. Název kinázy je odvozen od schopnosti fosforylovat mléčný kasein *in vitro*, je však třeba poznamenat, že kasein není fyziologickým substrátem CK1 α [33].

2.4.1 Isoformy CK1 α

Gen CSNK1A1 může alternativními přepisy dát vzniknout čtyřem transkriptům (viz Obrázek 6). Varianty se od sebe navzájem liší přítomností nebo absencí dvou unikátních sekvencí, inzertu L (*l*ong) a inzertu S (*s*hort) [34]. Inzert L o délce 28 aminokyselin v kinázové doméně je unikátní pro obratlovce (*Vertebrata*) a obsahuje konzervovaný jaderný lokalizační signál (NLS, *n*uclear *l*ocalization *s*ignal) PVGKRKR, který navádí CK1 α do jádra. Inzert S je krátkou sekvencí na C-konci kinázy s 12 aminokyselinami. Jako kanonická byla zvolena v lidském těle převládající isoforma 2 o délce 337 aminokyselin s obsahem inzertu S [35].



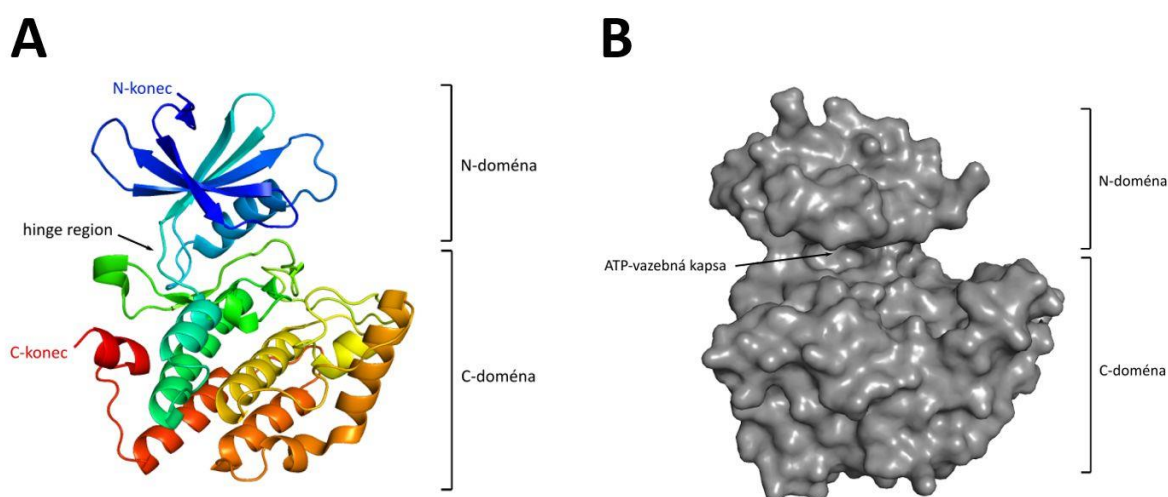
Obrázek 6: (A) Fylogenetický strom isoformem kináz z rodiny CK1 vyskytujících se u člověka. Vytvořeno v programu Simple Phylogeny. (B) Grafické znázornění jednotlivých isoformem CK1 α . Hlavním rozdílem mezi isoformami je přítomnost inzertu L v kinázové doméně (oranžově) a inzertu S na C-konci (zeleně). Isoforma 4 je navíc charakteristická ztrátou prvních 89 aminokyselin (aa, *a*mino *a*cids). Kanonická isoforma 2 je zakroužkovaná černě (převzato z Jiang et al., 2018, upraveno).

2.4.2 Struktura

Charakteristickým rysem proteinkináz, CK1 α nevyjímaje, je tzv. dvojlaločný tvar [36]. Pomyslnými „laloky“ jsou myšleny dvě funkční a samostatně konformované jednotky, které tvoří kinázy, menší N-doména a větší C-doména. Obě domény spojuje flexibilní oblast ohybu

molekuly (hinge region), jež spoluvytváří vazebnou kapsu pro molekulu ATP [37]. Aby se mohl ATP připojit k hydrofobní vazebné kapse, vytváří komplex s dvěma kationty Mg^{2+} , které neutralizují záporný náboj trifosfátu [38].

Většina sekvence CK1 α zahrnuje katalytickou oblast (též kinázová doména, *core*) pro vázání ATP a substrátu. Rezidua katalytické oblasti jsou vysoce konzervovaná napříč isoformami CK1 v eukaryotách (51-98 %) [39].



Obrázek 7: (A) Zobrazení struktury CK1 α v módu *cartoon*. (B) Zobrazení struktury CK1 α v módu *surface*. Upraveno v programu PyMOL, ver. 2.5.2. (PDB: 5FQD) (data převzata z Petzold, Fischer a Thomä, 2016).

Konzervovaná rezidua N-domény tvoří vazebnou kapsu pro ATP. Na úrovni sekundární struktury se N-doména skládá z pěti antiparalelních β -listů¹ (β 1- β 5) a jednoho dlouhého α -helixu² [40]. β -listy β 1 a β 2 spojuje speciální na glycin bohatá konzervovaná P-smyčka (*P-loop*) s konzervovaným motivem GXGXXG sloužící k optimální lokalizaci ATP. Poblíž P-smyčky se na β -listu β 3 nachází naprosto klíčový invariantní Lys⁴⁶, který zachycením α - a β -fosfátu ATP stereochemicky orientuje γ -fosfát ke štěpení. Správná pozice Lys⁴⁶ je zajištěna nekovalentním solným můstkem s Glu⁶⁰ ve středu dlouhého α -helixu [40, 41].

Šroubovicová C-doména zodpovídá především za vázání substrátu. Částečně přispívá také k orientaci Mg^{2+} -ATP komplexu. Je tvořena čtyřmi β -listy a desíti α -helixy [40]. Katalytická smyčka (*catalytic loop*) mezi β 6 a β 7 listy obsahuje důležitou konzervovanou sekvenci H¹³⁴RD¹³⁶. Aminokyselina Asp¹³⁶ uvolňuje vodík z hydroxylové skupiny v substrátu pro nukleofilní útok kyslíku na fosfát [40, 41]. Kov vázající smyčka (též Aktivační smyčka, *activation loop*) obsahuje konzervovanou sekvenci D¹⁵⁶FG¹⁵⁸. Karboxylová skupina

¹ β -listy (též β -skládané listy nebo β -hřebeny) jsou sekundární struktury proteinů vzniklé spojením dvou protisměrně orientovaných polypeptidových vláken inter-vláknovou vodíkovou vazbou mezi atomem kyslíku jednoho vlákna a atomem dusíku vlákna druhého.

² α -helixy jsou pravotočivé sekundární struktury s intra-vláknovou vodíkovou vazbou mezi atomem kyslíku jedné aminokyseliny a atomem vodíku aminokyseliny protilehlé.

aminokyseliny Asp¹⁵⁶ interaguje s hořečnatým iontem Mg²⁺ pro správné nasměrování molekuly ATP [41].

Přesný mechanismus vázání substrátu doposud nebyl objasněn. Pravděpodobně ke specificitě kinázy přispívá bazická vazebná kapsa K²²⁹KQK²³² interagující s kanonickými pre-fosforylovanými a acidickými substráty (více viz 2.4.3.) [42].

2.4.3 Substrátová specificita

Specificita kinázy je dána schopností rozeznat v substrátu konsenzuální rezidua v blízkosti fosforylačního místa [43]. CK1 α obecně upřednostňuje substráty s pre-fosforylovanými nebo acidickými rezidui. Cílové reziduum CK1 α fosforyluje v kanonických motivech pS/pT-X-X-S/T, resp. D/E-X-X-S/T (pS = fosfo-serin, pT = fosfo-threonin, X = libovolná aminokyselina, D = aspartát, E = glutamát; tučně vyznačeno cílové reziduum) [44, 45].

Nicméně CK1 α nezřídka fosforyluje substráty, které se z kanonického schématu vymykají. Unikátní je fosforylace serinu v motivu SLS β -kateninu, který CK1 α rozpoznává díky acidickému klastru EEED, jenž sekvenci SLS v β -kateninu předchází [46].

2.4.4 Regulace aktivity

Aktivitu CK1 α zajišťují vnější faktory i autonomní mechanismy kinázy samotné [47]. Již v kapitole o Wnt/ β -katenin signalizaci byla implicitně naznačena regulace kinázové aktivity interakcí s jinými proteiny a subcelulární lokalizací. Mezi typické interakční partnery patří rozličné scaffoldové proteiny, které koordinují vhodné postavení CK1 α v rámci proteinového komplexu. Přiblížením kinázy k cílovému substrátu zároveň zvyšují její interakční účinnost [48].

V rámci Wnt/ β -katenin signalizační dráhy lokalizují CK1 α proteiny z rodiny FAM83 (*F*amily with sequence similarity *83*), FAM83F na cytoplazmatickou membránu a FAM83G na cytoplazmatickou membránu a do jádra [49, 50]. Dalším důležitým regulátorem umístění CK1 α je GLIPR1 (*G*lioma *p*athogenesis-*r*elated protein *1*), jenž kinázu redistribuuje z Golgiho aparátu do cytoplazmy a transportuje do místa formování destrukčního komplexu [51].

Zajímavá je schopnost kináz fosforylovat nejen substráty, ale také samy sebe. Hovoříme o tzv. autofosforylaci, jíž kináza inhibuje vlastní katalytickou aktivitu. U kináz CK1 jsou autofosforylovány specifické aminokyseliny na C-konci. Vzniklé sekvence s fosfo-peptidy kináza identifikuje jako rozpoznávací motivy a následně na tento „pseudosubstrát“ zacílí. Vazebná oblast kinázové domény je tak namísto pravého substrátu zablokována autofosforylovanými segmenty CK1. V sekvenci všech čtyř isoform CK1 α jsou k

autofosforylaci určena rezidua Ser³¹¹, Ser³¹², Thr³²¹ a Thr³²³. V případě kanonické isoformy 2 jsou navíc autofosforylovány Thr³²⁷ a Ser³³² v inzertu S [52].

2.5 Kasein kináza 1 alfa-like

Kasein kináza 1 alfa-like (CK1α-like, *casein kinase 1 α-like*) vykazuje vysokou homologii vůči CK1α. Kóduje ji gen CSNK1A1L na 13q13.3 chromozomu (zdroj: NCBI Gene database [78]). Protože je tento protein v literatuře takřka nepopsán, tato práce by měla být jedna z prvních funkčních analýz CK1α-like. Přestože neexistuje krystalová studie CK1α-like, na základě srovnání sekvencí můžeme předpokládat, že významné regulační oblasti CK1α se nachází na stejných pozicích i u CK1α-like. Podobně jako CK1α je zřejmě součástí Wnt/β-katenin dráhy a má serin/threoninovou aktivitu.

| | | | |
|-----------|---------------------|--|-----|
| CK1α | MASSSGSKAEFIVGGK | YKLV RKIGSGSFGDIYLAINITNGEEVAVKLESQKARHPQLLYE | 60 |
| CK1α-like | MTNNSGSKAELVVGGK | YKLV RKIGSGSFGDVYLGITTTNGEDVAVKLESQVVKHPQLLYE | 60 |
| | | *:..*****:*****:*. * . ****:*****.:***** | |
| CK1α | | SKLYKILQGGVGIPHIRWYGQEKDYNVLMDDLGPSLEDLNFNCSRRFTMKTVLMMLADQM | 120 |
| CK1α-like | | SKLYTILQGGVGIPMHHWYGQEKDNNVLMDDLGPSLEDLNFNCSRRFTMKTVLMMLADQM | 120 |
| | | ****.*****:***** ***** | |
| CK1α | | ISRIEYVHTKNFIHRDIKPDNFLMGI GRHCNKLF LIDFGLAKKYRDNRTQRH I PYREDKN | 180 |
| CK1α-like | | ISRIEYVHTKNFLHRDIKPDNFLMGTGRHCNKLF LIDFGLAKKYRDNRTQRH I PYREDKH | 180 |
| | | *****:***** ***** | |
| CK1α | | LTGTARYASINAHLGIEQSRDDMESLG YVLMYFNRTSLPWQGLKAATKKQYEKISEKK | 240 |
| CK1α-like | | LIGTVRYASINAHLGIEQSRDDMESLG YVFM YFNRTSLPWQGLRAMTKKQYEKISEKK | 240 |
| | | * * *.*****:*****:***** | |
| CK1α | | MSTPVEVLCKGFPAEFAMYLN YCRGLRFEEAPDYMYLRQLFRILFRTL NHQYDYTFDWTM | 300 |
| CK1α-like | | MSTPVEVLCKGFPAEFAMYLN YCRGLRFEEVPDYMYLRQLFRILFRTL NHQYDYTFDWTM | 300 |
| | | *****.***** | |
| CK1α | LKQKAAQQAASSSGGQQAQ | TPTGKQTDKTKSNMKG F | 337 |
| CK1α-like | LKQKAAQQAASSSGGQQAQ | TQTGKQTEKNKNNVKDN | 337 |
| | | *****:*. * .*:* | |

Obrázek 8: Srovnání kanonické sekvence CK1α a CK1α-like. CK1α-like je vůči CK1α homolonní z 91 %. Zeleně jsou vyznačeny katalytické oblasti obou kináz. Vytvořeno v programu Clustal Omega.

2.6 CK1α a vybraná hematologická onemocnění

2.6.1 CK1α a myelodysplastický syndrom

Myelodysplastický syndrom (MDS) je souhrnným označením pro rozmanité spektrum klonálních chorob charakteristických refrakterní cypopenií v kostní dřeni (BM, *b*one *m*arrow) a periferní krvi (PB, *p*eripheral *b*lood), morfologickou dysplazií BM a oslabenou hematopoézou (krvetvorbou) [53]. Navzdory společnému počátku všech typů MDS v hematopoetických kmenových buňkách (HSCs, *h*ematopoietic *s*tem *c*ells) a

hematopoetických progenitorových buňkách (HPCs, *hematopoietic progenitor cells*) se z biologického, genetického i klinického hlediska jedná o značně heterogenní skupinu chorob [54]. Roční počet nově diagnostikovaných případů činí cca 3-4 na 100 000 jedinců s mediánem věku diagnózy 71 let [55, 56]. Onemocnění MDS zároveň zvyšuje riziko progresu akutní myeloidní leukémie (AML), která je později diagnostikována přibližně u 30 % všech pacientů trpících MDS [57]. Hlavními příčinami primární (*de novo*) MDS jsou samovolné genetické alterace. Méně frekventovaná sekundární t-MDS (*therapy related MDS*) bývá vedlejším účinkem cytotoxické chemoterapie nebo vystavení radiaci [57, 58].

Syndrom začíná deregulací hematopoetické diferenciací vlivem prvotních alterací v HSCs a HPCs myeloidní i lymfoidní linie. Zatímco zralejší formy hematopoézy zanikají, mutované nedostatečně diferenciované krevní elementy prochází zvýšenou proliferací. Následkem klonálního množení defektních buněk se MDS-podporující mutace postupně v genomu kumulují [57, 59].

Jednou z nejčastějších cytogenetických abnormalit MDS je delecí chromozomu 5q. Pro pacienty s touto genetickou alterací byla vyčleněna samostatná skupina MDS del(5q), jinak zvaná také 5q-syndrom, se specifickým fenotypem [57, 60]. Mnohé geny, které delecí 5q ztrácí jednu alelu v lokusu, se dostávají do stavu tzv. haploinsuficience, kdy heterozygotní delecí zredukováná exprese proteinu kódovaného dotýčným genem nestačí k vykonávání normální funkce. Jinými slovy lze haploinsuficenci genu vysvětlit jako potřebu dvou WT (tj. v přírodě běžných, *wild type*) alel pro projevení správného fenotypu [61]. Zvláště závažná je haploinsuficience tumor supresorových genů, jež může vyústit až v tumorigenezi [62].

V del(5q) MDS podstupuje heterozygotní delecí tumor supresorový gen CSNK1A1. Studie Schneider et al. [63] na myších modelech s různě podmíněnou inaktivací CSNK1A1 ukázala, že jak v homozygotní (inaktivace obou alel), tak v heterozygotní (inaktivace jedné alely) KO (*knockout*) linii je zvýšená hladina β -kateninu hematopoetických a stromálních buněk. Homozygotní KO CSNK1A1 (CSNK1A1^{-/-}) vedl k rapidní letalitě 5-17 dní od vyjmutí genu následkem indukované apoptózy HSCs. Zároveň byly patrné poklesy krevních buněk v PB a selhání BM. Haploinsuficientní CSNK1A1^{+/-} se naopak projeví hyperproliferačí defektních HSCs.

Výše zmíněné výsledky naznačují, že haploinsuficience zcitlivuje CK1 α vůči inhibici. V praxi to znamená, že inhibicí CK1 α v haploinsuficientních buňkách se fenotyp přibližuje ke kompletní ablací kinázové aktivity v homozygotních KO, a tudíž indukované apoptóze. Naopak normální buňky s oběma alelami CSNK1A1 by inhibicí začaly vykazovat fenotyp podobný buňkám haploinsuficientním, zvýšenou proliferací a hlavně minimálně ovlivněnou apoptózou [63].

2.6.2 CK1 α a akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je agresivní klonální nádorové onemocnění hematopoézy. Jedná se o nejčastější akutní leukémii u dospělých a tvoří necelou třetinu všech diagnostikovaných leukémií [64]. Ve většině případů se objevuje jako *de novo* malignita původně zdravých pacientů [65]. Majorita případů AML je následkem samovolné genetické alterace. Charakter mutace má vliv na průběh a závažnost onemocnění, např. u pacientů s del(5q) je vyšší riziko selhání léčby a smrti. Mezi rizikové sekundární faktory, které mohou přispět k rozvoji AML, jsou řazeny již přítomná hematologická onemocnění (např. MDS) či chemoterapie [64, 65].

Při AML jsou postiženy kmenové buňky myeloidní linie (MSCs, *myeloid stem cells*), ze kterých se za normálních podmínek diferenciují erytrocyty, trombocyty, granulocyty a monocyty. Počátkem nemoci na molekulové úrovni jsou chromozomálních abnormality a genové mutace narušující diferenciaci myeloidních blastů. Genetické alterace dále způsobují klonální proliferaci dysfunkčních MSCs a jejich akumulaci v BM a PB, přičemž hlavním diagnostickým kritériem je přítomnost >20 % myeloblastů v BM nebo PB [64].

Screeningem shRNA (*short hairpin RNA*) v myších leukemických buňkách MLL-AF9 byl jako jeden z hlavních genů esenciálních pro leukemické buňky identifikován CSNK1A1 [66]. Inhibicí CK1 α pomocí cíleně navržených shRNA snižujících expresi CSNK1A1 došlo v průběhu dvou týdnů od aplikace KO buněk do subletálně ozářených myši k 15x až 40x vyšší depleci leukemických buněk v BM a slezině ve srovnání s buňkami obsahujícími kontrolní shRNA. Důležitým je, že přežití normálních HSCs a HPCs nebylo KO CSNK1A1 ovlivněno [54, 67].

2.6.3 Inhibice CK1 α v MDS a AML

V klinické praxi se již poměrně rozšířeně používá imunomodulátor lenalidomid (Revlimid), jeden z prvních léků s potvrzenou vlastností podpory E3 ubikvitin ligázy v ubikvitinaci a degradaci specifických substrátů, např. CK1 α [68]. Lenalidomid indukuje degradaci CK1 α úpravou vazebných vlastností E3 ubikvitin ligázového komplexu CUL4–RBX1–DDB1–CRBN (zkráceně CRL4^{CRBN}). Interakční povrch komplexu pro CK1 α vzniká navázáním lenalidomidu na komponent CRBN (protein cereblon) zaměřující příslušné substráty k degradaci [69]. Lenalidomid prokázal účinek proti 5q-syndromu inhibicí proliferace MDS buněčné linie [70] a růstu del(5q) kmenových buněk [71][72].

V preklinickém stádiu je ATP-kompetitivní (tzn. blokující ATP-vazebnou kapsu kinázy) inhibitor D4476 [54]. Ošetření myeloidních progenitorových buněk s heterozygotní delecí CSNK1A1 tímto inhibitorem zvýšilo jejich apoptózu [63]. *In vivo* zase D4476 způsobil selektivní depleci haploinsuficientních HSCs a HPCs v kostní dřeni. Případné vedlejší účinky D4476 byly vyvráceny experimentem na heterozygotních myších CSNK1A1^{-/+}, u kterých nebyla dvěma histologickými analýzami (po 6 a po 10 měsících) odhalena jakákoliv změna v

integritě orgánu ani změna počtu krevních elementů. Zároveň byl prokázán anti-leukemický efekt D4476 v AML. Inhibitor D4476 cíleně způsobil apoptózu haploinsuficientních leukemických buněk s minimálním vlivem na normální zdravé HSCs a HPCs [67].

Jako velmi slibné se jeví inhibitory A-série ze třídy pyrazol-pyrimidinových scaffoldových molekul [73]. Do 1. fáze klinického hodnocení se zaměřením na relabující/refrakterní AML a vysoce rizikový MDS vstoupil nedávno inhibitor A-51 (BTX-A51) [74]. Součástí publikace týmu Minzel et al. byla také v pořadí druhá, a zatím poslední, krystalografická studie CK1 α demonstrující interakci CK1 α s inhibitorem A86 (PDB ID: 6GZD) [73].

Do dnešního dne stále nebyla objevena látka, jež by dokázala selektivně cílit na CK1 α [32, 63]. Výzvou pro další výzkum proto zůstává vyvinutí inhibitorů specifických přímo vůči CK1 α a vhodných pro použití *in vivo*.

3 CÍLE PRÁCE

Enzymy kinázy patří mezi důležité regulátory buněčné signalizace. Narušení buněčných drah, jež je spjato s mnohými onemocněními, bývá v mnoha případech způsobeno nestandardním chováním kináz. Pochopení funkce kináz v rámci signalizačních drah je proto mimořádně nadějnou cestou k vyvinutí a následné aplikaci léků inhibující tyto abnormálně se projevující kinázy v klinické praxi.

Cílem této práce bylo připravit systém pro charakterizaci kináz CK1 α a CK1 α -like v signalizační dráze Wnt/ β -katenin. Vytvořený experimentální systém byl také prakticky využit pro determinaci substrátové specifity CK1 α a CK1 α -like *in vitro* vůči klíčovým přenašečům signálu ve výše zmíněné dráze, především vůči proteinu β -kateninu, jehož fosforylace kinázou CK1 α v *in vivo* modelech byla již v minulosti potvrzena.

Pro dosažení stanoveného cíle bylo nutné splnit tyto úkoly:

- připravit vhodné nástroje pro získání kináz CK1 α a CK1 α -like
- purifikovat kinázy CK1 α a CK1 α -like
- připravit vhodné nástroje pro získání proteinového substrátu β -katenin
- purifikovat proteinový substrát β -katenin
- testovat schopnost autofosforylace purifikovaných kináz
- determinovat substrátovou specifitu CK1 α a CK1 α -like *in vitro*

4 MATERIÁLY

4.1 Chemikálie

Tabulka 1: Seznam použitých chemikálií

| Výrobce | Chemikálie |
|---------------------|---|
| Applichem | isopropanol; dithiotreitol (DTT); dimethylsulfoxid (DMSO); glycerol; chlorid sodný (NaCl); <i>tris</i> (hydroxymethyl)aminomethane (Tris); imidazol; izopropyl β -D-1-tiogalaktopyranozid (IPTG); akrylamid; N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED); dodecylsírán sodný (SDS); peroxodisírán amonný (APS); agaróza; kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA); hydroxid sodný (NaOH); adenosintrifosfát (ATP); chlorid hořečnatý (MgCl ₂), polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána |
| Invitrogen | barvivo DNA SYBR® Safe |
| Merci | kyselina octová |
| Millipore | chemiluminiscentní HRP substrát Immobilon Western |
| New England BioLabs | 6x nanášecí barva, fialová; 5x Q5® buffer; 5x Q5® enhancer; 10x Buffer 2.1; 2x OneTaq® QuickLoad® Master Mix |
| Qiagen | Ni-NTA kuličky |
| Schülke | chloramin |
| Sigma-Aldrich | dNTP; dCTP; Insect GeneJuice® Transfection Reagent; FBS |
| ThermoFischer | Sf-900™ II SFM médium, Express Five medium, glutamin |

4.2 Pufry, roztoky a média

Tabulka 2: Seznam použitých pufřů, roztoků a médií

| Název | Složení |
|----------------------|--|
| 10x TBE | 900 mM Tris-Cl; 900 mM kyselina boritá (H ₃ BO ₃); 20 mM EDTA |
| LB kultivační médium | 2,5% LB |

| | |
|--|---|
| Pevné LB-agarové médium | 4% směs LB-agar; ATB (1:1000) |
| 4x SDS nanášecí pufr | 0,25 M Tris-HCl, pH 6.8; 8% SDS; 35% glycerol; 0,4% bromfenolová modř; 0,4 mM β -merkaptoethanol |
| 10x SDS | 500 mM Tris-Cl; 3,8 M glycin; 1% SDS |
| Roztok A pro barvení SDS gelů | 25% isopropanol; 10% kyselina octová; 0,05% coomassie brilantní modř R-250 |
| Odbarvovací roztok pro SDS gely | 10% kyselina octová, 30% methanol |
| Lyzační pufr pro purifikaci proteinů z hmyzích buněk (pufr L1) | 50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 500 mM NaCl; 10% (v/v) glycerol; 10 mM imidazol, pH 8.0; 1 mM DTT; 0,4% (v/v) Triton X-100 |
| Lyzační pufr pro purifikaci proteinů z bakteriálních buněk (pufr L2) | 50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 500 mM NaCl; 10 mM imidazol, pH 8.0; 1 mM DTT |
| Mycí pufr pro purifikaci (pufr W) | 50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 500 mM NaCl; 10 mM imidazol, pH 8.0; 1 mM DTT |
| Eluční pufr pro purifikaci (pufr E) | složení jako pufr W s přidáním imidazolem do koncentrace 500 mM |
| pufr SEC | 25 mM Tris-Cl, pH 7.5; 250 mM NaCl; 1 mM DTT |
| Pufr pro autofosforylační analýzu (pufr A) | 50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 25 mM ATP; 35 mM $MgCl_2$ |
| 1x PBS | 137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,7 mM KH_2PO_4 |
| 2x Laemmliho pufr | 125 mM Tris-Cl, pH 6.8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkaptoethanol; 0,004% bromfenolová modř |

4.3 Enzymy

Tabulka 3: Seznam použitých enzymů

| Název enzymu | Výrobce |
|------------------------------|---------------------|
| Q5® DNA polymeráza | New England BioLabs |
| restrikční enzym <i>DpnI</i> | New England BioLabs |
| T4 DNA polymeráza | New England BioLabs |

| | |
|--------------------------------------|---------------|
| endonukleáza benzonáza | Sigma-Aldrich |
| lysozym (z kuřecího vaječného bílku) | Sigma-Aldrich |

4.4 Kity pro práci s DNA

Tabulka 4: Seznam použitých kitů pro práci s DNA.

| Název kitu | Výrobce |
|--|---------------|
| QIAquick (MinElute) PCR Purification Kit | Qiagen |
| QIAquick (MinElute) Gel Extraction Kit | Qiagen |
| GenElute™ Plasmid Miniprep Kit | Sigma-Aldrich |

4.5 Markery

Tabulka 5: Seznam použitých markerů

| Název markeru | Hmotnosti fragmentů | Výrobce |
|---|--|---------------|
| DNA Ladder Mix 100 - 5000 | 100; 150; 200; 300; 400; 500 (x2); 600; 700; 800; 900; 1000; 1500; 2000; 2500; 3000; 4000; 5000 (v bp) | Applichem |
| SigmaMarker™ wide range | 6,5; 14,2; 20; 24; 29; 36; 45; 55; 66; 97; 116; 200 (v kDa) | Sigma-Aldrich |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | 10; 15; 25; 35; 55; 70; 100; 130; 250 (v kDa) | ThermoFischer |

4.6 Templáty

Tabulka 6: Seznam použitých templátů

| Templát | Zdroj |
|--------------------|--------------|
| CK1 α | Tomáš Gybel* |
| CK1 α -like | |
| β -katenin | |

4.7 Primery

Tabulka 7: Seznam použitých primerů

| Název | Sekvence (směr 5'→3') | Primer pro | Zdroj |
|-----------|--|-------------------------------------|------------|
| pRMS532_F | TACTTCCAATCCAATGCAATGGCGAGTAGCAGCGGC | CK1 α | Tato práce |
| pRMS533_R | TTATCCACTTCCAATGTTATTATTAGAAACCTTTCATGTTACTCTTG | CK1 α | Tato práce |
| pRMS536_F | AACGGCGAGGAAGTGGCAGTGAGGCTAGAATCTCAGAAGGCCAGG | CK1 α ^{K46R} | Tato práce |
| pRMS537_R | CCTGGCCTTCTGAGATTCTAGCCTCACTGCCACTTCTCGCCGTT | CK1 α ^{K46R} | Tato práce |
| pRMS538_F | ACAAAGAATTTTATACACAGAAACATTAACCAGATAACTTCC | CK1 α ^{D136N} | Tato práce |
| pRMS539_R | TAGGAAGTTATCTGGTTTAATGTTTCTGTGTATAAAATTCTT | CK1 α ^{D136N} | Tato práce |
| pRMS534_F | TACTTCCAATCCAATGCAATGACAAACAACAGCGGCT | CK1 α -like | Tato práce |
| pRMS535_R | TTATCCACTTCCAATGTTATTATTAGTTATCTTTCACATTATTCTTGTTT | CK1 α -like | Tato práce |
| pRMS540_F | ACCAACGGCGAGGAAGTAGCAGTGAGGCTGGAATCTCAGAAGGTC | CK1 α -like ^{K46R} | Tato práce |
| pRMS541_R | GACCTTCTGAGATTCCAGCCTCACTGCTACTTCTCGCCGTTGGT | CK1 α -like ^{K46R} | Tato práce |
| pRMS542_F | ACAAAGAATTTTCTACACCGAAACATTAACCAGATAACTTCC | CK1 α -like ^{D136N} | Tato práce |
| pRMS543_R | CAGGAAGTTATCTGGTTTAATGTTTTCGGTGTAGAAAATTCTT | CK1 α -like ^{D136N} | Tato práce |
| FB_F | CCTATAACTATTCCGGATTATTCATACCGTC | univerzální | - |
| FB_R | CAGGTTTCAGGGGGAGGTGTG | univerzální | - |
| M13/pUC_F | CCCAGTCACGACGTTGTAACAACG | univerzální | - |
| M13/pUC_R | AGCGGATAACAATTTTCACACAGG | univerzální | - |
| T7_F | TAATACGACTCACTATAGGG | univerzální | - |
| T7_R | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | univerzální | - |
| pRMS583_F | TACTTCCAATCCAATGCAGCTACTCAAGCTGATTTGATG | β -katenin FL | Tato práce |
| pRMS584_R | TTATCCACTTCCAATGTTATTATTACAGGTCAGTATCAAACCAG | β -katenin FL | Tato práce |
| pRMS585_F | TACTTCCAATCCAATGCACATGCAGTTGTAACCTTGATTAAC | β -katenin 134-671 | Tato práce |
| pRMS586_R | TTATCCACTTCCAATGTTATTATTTCTTGTAATCTTGTGGCTTGT | β -katenin 134-671 | Tato práce |
| pRMS587_F | CGTACCATGCAGAATACAAATGA | β -katenin sekvenační | Tato práce |
| pRMS589_R | AAAGATGGCCAGTAAGCCCT | β -katenin sekvenační | Tato práce |
| pRMS588_F | CCTGTGCAGCTGGAATTCTT | β -katenin | Tato práce |
| pGEX 5' F | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG | univerzální | - |
| MBP_F | GA.TGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG | univerzální | - |

4.8 Vektory

Tabulka 8: Seznam použitých vektorů

| Název | Připojené štítky a sekvence | Zdroj |
|-------|-------------------------------|------------------|
| 438-B | His ₆ -TEV | Scott Gradia Lab |
| 2B-T | His ₆ -TEV | Scott Gradia Lab |
| 2G-T | His ₆ -GST-TEV | Scott Gradia Lab |
| 2C-T | His ₆ -MBP-N10-TEV | Scott Gradia Lab |

4.9 Bakteriální kmeny

Tabulka 9: Seznam použitých bakteriálních kmenů

| Kmen | Genotyp | Rezistence | Zdroj |
|---|---|---------------------------|------------|
| <i>E. coli</i> DH5a | F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_K⁺</i>), λ ⁻ | - | Stratagene |
| <i>E. coli</i> DH10Bac | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG/bMON14272/pMON7124</i> | kanamycin; tetracyklin | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> BL21 derivát Rosetta1(DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm lon</i> (DE3) pRARE (Cam ^R) | chloramfenikol | Stratagene |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)-RIPL | F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) [<i>malB</i> ⁺]K-12(λ S)(Cam ^R) | chloramfenikol | Stratagene |

4.10 Hmyzí buňky

Tabulka 10: Seznam použitých hmyzích buněk

| Název | Druh | Výrobce |
|-------|------------------------------|------------|
| Sf9 | <i>Spodoptera frugiperda</i> | Invitrogen |
| Hi5™ | <i>Trichoplusia ni</i> | Invitrogen |

4.11 Antibiotika

Tabulka 11: Seznam použitých antibiotik

| Výrobce | Antibiotikum | Rozpouštědlo |
|-----------|----------------|------------------|
| Applichem | ampicilin | H ₂ O |
| | gentamycin | H ₂ O |
| | chloramfenikol | ethanol |
| | kanamycin | H ₂ O |
| | tetracyklin | ethanol |

4.12 Inhibitory proteáz

Tabulka 12: Seznam použitých inhibitorů proteáz

| Výrobce | Inhibitor | Rozpouštědlo |
|-----------|------------|------------------|
| Applichem | aprotinin | 1xPBS |
| | benzamidin | H ₂ O |
| | leupeptin | H ₂ O |
| | pepstatin | methanol |

4.13 Protilátky

Tabulka 13: Seznam použitých protilátek

| Výrobce | Protilátka |
|----------------|--|
| Cell Signaling | Phospho- β -Catenin (Ser45) Antibody #9564 |
| Sigma-Aldrich | Anti-Rabbit IgG (A6667) |

4.14 Přístroje

Tabulka 14: Seznam použitých přístrojů

| Výrobce | Přístroje |
|---------|-----------|
|---------|-----------|

| | |
|--------------------------|---|
| Eppendorf | centrifuga 5415 R; centrifuga 5910 R; centrifuga 5702 R; centrifuga MiniSpin Plus; termomixer Comfort; termomixer Compact |
| Sigma | centrifuga 6-16KS |
| Thermo Scientific | centrifuga Sorvall Evolution RC Superspeed; NanoDrop ND-1000 spektrofotometr |
| Liebherr | kombinovaná chladnička Comfort; kombinovaná chladnička G 5216; chladnička FKS 3602 |
| New Brunswick Scientific | mraznička Ultra Low Temperature U570 Premium; orbitální třepačka Innova 2150 |
| Sanyo | mraznička Ultra Low Temperature MDF 392 |
| Bioer | termocykler XP verze 1.0 z roku 2012 |
| Labnet | AccuBlock Digital Dry Bath D1100 |
| Scientific Industries | Vortex-Genie 2 |
| Stuart | 3D gyratory rocker SSM3; míchačka SB 161 |
| IKA | míchačka RCT basic |
| Biosan | minirotátor Bio RS-24 |
| Infors | orbitální třepačka Multitron Standard 230 V z roku 2012 |
| P-lab | laboratorní mikrovlnná trouba |
| Denver Instrument | váha Denver Instrument S-4001; váha Denver Instrument S-234 |
| Invitrogen | Safe Imager Blue-Light Transil |
| Cytiva | dokumentační zařízení Amersham Imager 600 |
| BioTech | systém pro úpravu vody GenPure UV/UF – TKA |
| Sonics | sonikátor Ultrasonic VC 505 |
| Qsonica | sonda pro sonikaci 220 V |

| | |
|---------------------|--|
| Elma | ultrasonic cleaning device Elmasonic S40 |
| Integra Biosciences | Pipetboy |
| Kaiser | prosvětlovací pult Prolite Basic 2 HF 30*21 cm |
| Lauda | digitální orbitální třepačka GFL 3017 |
| Consort | napájecí zdroj EV231 |
| Vilber | dokumentační zařízení Fusion SL |

4.15 Použité počítačové programy

Tabulka 15: Seznam použitých počítačových programů

| Název | Odkaz |
|--|---|
| ACDLabs ChemSketch v14.00 FREE | https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/index.php |
| BLAST: Basic Local Alignment Search Tool | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| Clustal Omega | https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ |
| EMBOSS Needle | https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ |
| ExPasy Translate Tool | https://web.expasy.org/translate/ |
| Inkscape 1.0.1. | https://inkscape.org/ |
| IrfanView 4.58 | https://www.irfanview.com/ |
| Microsoft Excel 2019 | https://office.live.com/start/Excel.aspx |
| Microsoft PowerPoint 2019 | https://office.live.com/start/PowerPoint.aspx |
| Microsoft Word 2019 | https://office.live.com/start/Word.aspx |
| OligoAnalyzer Tool | https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer |
| Sequence Massager | http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massager.htm |

| | |
|---------------------------|---|
| Simple Phylogeny | https://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/simple_phylogeny/ |
| SnapGene Viewer 5.2.4. | https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/ |

5 METODY

5.1 Diferenciální centrifugace

Rozpustné a nerozpustné frakce v kapalném prostředí jsou rozdělovány centrifugací. Jednotlivé složky směsi uvede do pohybu odstředivá síla vzniklá velmi rychlými otáčkami v rotoru centrifugy. Rychlost sedimentace částic se odvíjí od jejich tvaru, hustoty, hmotnosti a velikosti.

5.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, *p*olymerase *c*hain *r*eaction) je technika množení DNA *in vitro* bez nutnosti potřebný genetický materiál inkorporovat do plazmidu bakterie a ten dále klonovat. Jedno vlákno DNA je syntetizováno termostabilní DNA polymerázou podle templátové DNA za přítomnosti syntetických primerů o délce 17 až 28 nukleotidů. Polymeráza prodlužuje tyto primery o nukleotidy přidané v rámci mixu deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP).

Principem reakce je vystavení nukleové kyseliny cyklicky se opakujícím prudkým změnám teploty v termocykleru. Při teplotě 95 °C se vložený templát denaturuje, tzn. přeruší se vodíkové vazby mezi oběma vlákny, která se tímto oddělí. Poté se teplota sníží tak, aby mohlo dojít k navázání primerů (annealing) na jednotlivá vlákna, které DNA polymeráza následně prodlužuje na 3'-konci (elongace).

Tabulka 16: Parametry použitých PCR programů

| Název PCR | krok | teplota (v °C) | čas | počet cyklů |
|--|----------------------|----------------|------------|-------------|
| PCR místně cílené mutagenese CK1 α ^{K46R} , CK1 α ^{D136N} , CK1 α -like ^{K46R} a CK1 α -like ^{D136N} | počáteční denaturace | 95 | 1 min | 19x |
| | denaturace | 94 | 30 s | |
| | annealing | 55 | 30 s | |
| | extenze | 72 | 3 min 30 s | |
| | finální extenze | 72 | 5 min | |
| amplifikační PCR fragmentů CK1a, CK1 α ^{K46R} , CK1 α ^{D136N} , CK1a-like a CK1 α -like ^{K46R} | počáteční denaturace | 95 | 1 min | 35x |
| | denaturace | 94 | 30 s | |
| | annealing | 55 | 30 s | |

| | | | | |
|---|----------------------|----|------------|-----|
| | extenze | 72 | 45 s | |
| | finální extenze | 72 | 3 min | |
| amplifikační PCR fragmentů β -katenin FL a β -katenin ¹³⁴⁻⁶⁷¹ | počáteční denaturace | 95 | 1 min | 35x |
| | denaturace | 94 | 30 s | |
| | annealing | 55 | 30 s | |
| | extenze | 72 | 1 min 15 s | |
| | finální extenze | 72 | 3 min | |
| koloniová PCR DH5 α 438B-CK1 α , 438B-CK1 ^{K46R} , 438B-CK1 α ^{D136N} , 438B-CK1 α -like a 438B-CK1 α -like ^{K46R} , 2BT- β -katenin a 2BT- β -katenin ¹³⁴⁻⁶⁷¹ | počáteční denaturace | 95 | 10 min | 35x |
| | denaturace | 94 | 30 s | |
| | annealing | 55 | 30 s | |
| | extenze | 72 | 1 min 15 s | |
| | finální extenze | 72 | 5 min | |
| koloniová PCR DH5 α 2GT- β -katenin a 2CT- β -katenin | počáteční denaturace | 95 | 10 min | 35x |
| | denaturace | 94 | 30 s | |
| | annealing | 55 | 30 s | |
| | extenze | 72 | 1 min 40 s | |
| | finální extenze | 72 | 5 min | |
| koloniová PCR DH10Bac (amplifikace genu LacZ) 438B-CK1 α , 438B-CK1 ^{K46R} , 438B-CK1 α ^{D136N} , 438B-CK1 α -like a 438B-CK1 α -like ^{K46R} | počáteční denaturace | 95 | 10 min | 35x |
| | denaturace | 94 | 30 s | |
| | annealing | 55 | 30 s | |
| | extenze | 72 | 30 s | |
| | finální extenze | 72 | 5 min | |
| koloniová PCR DH10Bac 438B-CK1 α , 438B-CK1 ^{K46R} , 438B-CK1 α ^{D136N} , 438B-CK1 α -like a 438B-CK1 α -like ^{K46R} | počáteční denaturace | 95 | 10 min | 35x |
| | denaturace | 94 | 30 s | |

| | | | | |
|--|-----------------|----|-------|--|
| | annealing | 55 | 30 s | |
| | extenze | 72 | 2 min | |
| | finální extenze | 72 | 5 min | |

5.3 Gelová elektroforéza

K identifikaci jednotlivých DNA, RNA a proteinů je třeba rozdělit heterogenní směs biologického materiálu dle jasně určených kritérií. Jedním ze způsobů je gelová elektroforéza založená na principu rozdílných mobilit nukleových kyselin a proteinů odvíjejících se od jejich odlišných velikostí.

Při elektroforéze se fragmenty genetického materiálu pohybují působením stálého elektrického proudu skrze polymer (gel). Protože jsou DNA i RNA tvořeny kostrou negativně nabitých fosfátů, mají záporný náboj a proto se pohybují po gelu směrem ke kladně nabitě anodě. U proteinů náboj závisí na chemických vlastnostech peptidového řetězce a může být jak kladný, tak záporný. Z toho důvodu se proteiny před samotnou elektroforézou podrobují ošetření aniontovým detergentem SDS (sodium dodecyl sulphate), jenž přiřadí proteinu náboj záporný.

Molekuly s vyšší molekulovou hmotností se gelem pohybují pomaleji než molekuly s molekulovou hmotností nižší. Po skončení elektroforézy se velikost diferenciovaných vzorků zjišťuje srovnáním s referenčními, komerčně vyráběnými hmotnostními standardy (tzv. markery).

5.3.1 Agarózová elektroforéza

Agaróza je lineární polysacharid β -D-galaktopyranózy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranózy spojených glykosidovou vazbou. Zpravidla používáme elektroforézu na agarózovém gelu pro separaci DNA a RNA o délce cca 50-20 000 bp dle jejich velikosti a náboje. Směr migrace fragmentů je horizontální.

Při přípravě 0,8% gelu se agaróza ve formě prášku smíchala s 1x koncentrovaným pufrem TBE (Tris-borát-EDTA) a rozpustila jeho ohřátím. Do směsi mírně vychladnuté tak, aby byla stále tekutá, bylo přidáno vizualizační barvivo SYBR®-SAFE. Agarózový roztok se nalil do elektroforetických aparatur s vloženými hřebínky, díky kterým se po utužení gelu v chladu (4 °C) zformovaly jamky pro nanesení vzorků. Vzorky v gelu byly separovány elektroforézou při stálém proudu 100 V po dobu 45 minut.

5.3.2 SDS-PAGE

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) separuje proteiny o hmotnosti 5-250 000 Da. Na rozdíl od agarózové elektroforetické metody poskytuje lepší rozlišení a jednotlivé makromolekuly rozlišuje pouze dle velikosti. Směr migrace fragmentů je vertikální.

Gel tvoří pevně zesíťovaný polyakrylamid vzniklý polymerizací akrylamidu a bis-akrylamidu (N,N'-metylen-bis-akrylamid). Polymerizaci iniciuje zásaditý N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED), jehož úlohou je katalyzovat rozkladnou reakci persíranu amonného (APS). Molekula APS přijímá jeden volný elektron a disociuje na SO_4^{-2} a volný radikál SO_4^- . Nestabilní a reaktivní nepárový elektron radikálu „zaútočí“ na dvojnou vazbu $\text{C}=\text{C}$ v molekule akrylamidu. Zánikem násobné vazby začne přebývat jeden volný elektron, jenž dá na akrylamidu vzniknout radikálu CH^- . Radikál CH^- opět působí na dvojnou vazbu jiné molekuly akrylamidu a celá polymerizační reakce řetězově pokračuje.

Záporně nabitý dodecylsulfát sodný (SDS) funguje jako detergent, vázající se v poměru 1:2 na aminokyselinové zbytky peptidového řetězce. Tím je zajištěn, bez ohledu na původní náboj, pohyb proteinu směrem k anodě.

Polyakrylamidový gel se skládá ze dvou částí, zaostřovacího gelu a dělicího gelu. Zaostřovací úsek v horní třetině gelu má velké póry. Skrze něj tudíž proteiny migrují volně. Pohyb fragmentů se zastavuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu. Migrace skrze dělicí část s malými póry začíná u všech proteinů stejně, čímž se zajistí rozdělení pouze dle velikosti. V této práci byly SDS-PAGE běženy při stálém proudu 215 V po dobu 45 minut.

V této práci jsem používala gely o koncentraci dělicího gelu 8%, 10%, 12 % a 15 %. Poměry složek v zaostřovacím gelu jsou uniformní.

5.4 Chemická transformace bakterií *E. coli*

Jednou z mnoha metod přenosu DNA do bakterií je chemická transformace. Plazmidová DNA se do buněk dostává narušením buněčné stěny a cytoplazmatické membrány teplotním šokem (*heat shock*), tedy vystavením kompetentních bakterií na krátkou dobu vysoké teplotě, standardně 42 °C.

Chemické kompetentnosti bakterie nabývají opracováním buněčné stěny kationty těžkých kovů (např. Cs^+).

Objem 100 μl kompetentních bakterií *E. coli* byl v poměru 50:1 smíchán s pDNA a po dobu 30 minut inkubován na ledu. Teplotní šok trvající 45 sekund byl prováděn v suchém termobloku o teplotě 42 °C. Po skončení teplotního šoku se vzorky vrátily na led a inkubovaly 2 minuty.

Regenerace bakterií po teplotním šoku spočívala v dodání 1 ml LB média a následné hodinové inkubaci při 37 °C.

Po regeneraci byla bakteriální suspenze nanášena na Petriho misku s pevným LB agarovým médiem a adekvátním ATB a inkubována při 37 °C přes noc.

5.5 Klonování nezávislé na ligaci

Systém LIC (Ligation Independent Cloning) s sebou přinesl mimořádné rozšíření variability klonovatelných míst v genech. Ve srovnání s tradičními metodami klonování umožňuje LIC klonovat jakýkoliv fragment genu bez ohledu na přítomnost restričních míst.

Pro účely LIC se užívá T4 DNA polymeráza s 3'→5' exonukleázovou aktivitou. T4 DNA polymeráza má schopnost navázat se na jedno vlákno DNA a postupně z něj v směru 3'→5' odstraňovat nukleotidy. Exonukleázová aktivita T4 DNA polymerázy je zastavena, jakmile se na místo odstraněného nukleotidu okamžitě zařadí nukleotid nový.

Při LIC je gen našeho zájmu (tzn. inzert) vložen do vektoru spárováním komplementárních přečnávajících konců vláken. Inzert i vektor jsou před spojením opracovány T4 DNA polymerázou, která odstraňuje na jednom z jejich vláken krátký úsek nukleotidu (10-12 bp). Aktivita polymerázy je zastavena zařazením nového cytosinu (v rámci dCTP přidaného do reakčního mixu inzertu), nebo nového guaninu (v rámci dGTP přidaného do reakčního mixu vektoru). Ošetřený inzert a ošetřený vektor se párují právě prostřednictvím vytvořených komplementárních dlouhých přečnávajících konců.

Templátová pDNA (o koncentraci 20 ng/μl) s genem našeho zájmu byla dle vloženého páru primerů (každý o koncentraci 0,2 μM) amplifikována PCR reakcí s Q5 polymerázou za přítomnosti 5x Q5® pufru a 0,2 μM dNTP. Produkt amplifikace byl v případě proteinů určených k expresi v hmyzích buňkách ošetřen restričním enzymem *DpnI*, který degraduje již nepotřebný templát, a purifikován QIAquick PCR Purification Kitem, nebo v případě proteinů určených k expresi v bakteriálních buňkách extrahován přímo z gelu QIAquick Gel Extraction Kitem. Získaný amplifikovaný inzert byl ošetřen T4 DNA polymerázou za přítomnosti 2,5 mM dCTP, 5 mM DTT a 1x NEB 2.1 pufru (inkubace – 22 °C, 30 minut; teplotní inaktivace – 70 °C, 25 minut). Následně se ošetřený inzert smíchal s ošetřeným vektorem v poměru 1:1 (proteiny určené k expresi v hmyzích buňkách), nebo 9:1 (proteiny určené k expresi v bakteriálních buňkách) a inkuboval na laboratorní teplotě 5-10 minut, za účelem spárování přečnávajících konců vektoru a k nim komplementárních přečnávajících konců inzertu.

Směs inzertu s vektorem byla transformována do 100 μl kompetentních DH5α buněk. Regenerační LB médium a agarové Petriho misky obsahovaly ampicilin (100 μg/ml).

Koloniová PCR mi umožnila rozlišit mezi rekombinantními a prázdnými plazmidy. Kolonie z Petriho misky byly testovány v reakcích s primery FB_F a FB_R (v případě vektoru 438-B), T7F a T7R (v případě vektoru 2B-T), nebo pRMS588_F a T7R (v případě vektorů 2G-T a 2C-T). Dále reakce obsahovaly OneTaq® QuickLoad® Master Mix a 3% DMSO. Dva pozitivní klony s rekombinantním plazmidem byly inokulovány do 11 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml). Následující den jsem plazmidy z kultury izolovala kitem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit. Výsledné plazmidy byly sekvenovány z každého konce zvlášť patřičnou sadou primerů (viz 4.7).

5.6 Exprese proteinů v hmyzích buňkách

5.6.1 Transpozice do bakmidu

Purifikované pDNA obsahující CK1 α , CK1 α ^{K46R}, CK1 α ^{D136N}, CK1 α -like a CK1 α -like^{K46R} v 438-B vektoru byly transformovány do DH10Bac kompetentních bakterií obsahujících pomocný plazmid s geny pro rezistenci vůči tetracyklinu a prázdný bakmid s genem pro rezistenci vůči kanamycinu a segment DNA kódující LacZ α peptid. Plazmid o množství 150 ng byl transformován do 100 µl DH10Bac. Regenerační LB médium a agarové Petriho misky obsahovaly gentamycin (7 µg/ml), tetracyklin (10 µg/ml) a kanamycin (50 µg/ml). V Petriho miskách bylo přítomné také chromogenní činidlo Bluo-gal (100 µg/ml) a IPTG (40 µg/ml).

Pomocí mechanismu *blue/white* bakteriální selekce byly po 48 hodinách kultivace identifikovány předpokládané úspěšně transponované bakteriální kolonie. LacZ gen v lac operonu kóduje enzym β -galaktozidázu, jenž rozkládá laktózu. Pokud je do této oblasti úspěšně začleněn náš gen, dochází k inaktivaci LacZ genu, a tudíž celé proteosyntézy β -galaktozidázy. Chromogenní činidlo Bluo-gal není v buňkách rozkládáno a proto rekombinantní kolonie zůstávají bílé. V opačném případě je β -galaktozidáza syntetizována a může tak dojít k hydrolyze chromogenního substrátu Bluo-gal a jeho následné dimerizaci v nerozpustné modré barvivo. Kolonie obsahující bakmid bez inzertu byly tudíž zabarveny do modra.

Bílé rekombinantní kolonie jsem testovala koloniovou PCR se dvěma sety primerů: 1) M13F + M13R a 2) FP vloženého genu + M13R. Úspěšně transponované klony vytvořily produkt pouze u druhé zmiňované dvojice primerů.

Dva vybrané rekombinantní klony byly inokulovány do 10 ml LB média s gentamycinem (7 µg/ml), tetracyklinem (10 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml)

5.6.2 Generace viru v Sf9 hmyzích buňkách

Tento proces je rozdělen do tří kroků. Kroky 2 a 3 byly provedeny Markem Šebestou.

Izolace bakmidu

Buněčná kultura v objemu 4 ml byla resuspendována v 200 μ l resuspendačního pufru. Lýza buněk 200 μ l lyzačního pufru trvala 2-3 minuty. K ukončení lýzy došlo v okamžiku přidání 350 μ l neutralizačního pufru. Po pětiminutové inkubaci na ledu byly kultury centrifugovány (16000xg, 10 minut, 4 °C). Separovaný supernatant byl v objemu 600 μ l přelit do nové zkumavky a opět centrifugován (16000xg, 10 minut, 4 °C). Do odebraných 450 μ l vzorků bylo přidáno 450 μ l předchlazeného isopropanolu za účelem vysrážet z tekutiny veškeré nukleové kyseliny a po patnácti minutách byla suspenze centrifugována (16000xg, 10 minut, 4 °C). Tentokrát byl supernatant odstraněn a usazený pelet přemyt 750 μ l 70% ethanolu a centrifugován (16000xg, 10 minut, 4 °C). Vzniklý pelet v 100 μ l 70% ethanolu byl přenesen k dalším pracovním procedurám do laminárního *flow boxu*.

Transfekce bakmidu do Sf9 buněk

Hmyzí buňky Sf9 byly dvakrát promyty predehřátým SF900II médiem (100xg, 3 min, RT) a resuspendovány ve stejném médiu do finální koncentrace 1×10^6 buněk/ml. Buněčná kultura byla přenesena do kultivační destičky v objemu 2 ml na jednu jamku. Buňky se poté nechaly 15 minut adherovat na dno jamek. Sf9 buňky byly následně transfekovány do 10 μ l bakmidu rozpuštěného ve sterilním 10 mM Tris-Cl s pH 8,0 a před transfekcí 15 minut inkubovaného v transfekčním činidle.

Generace P₁ viru

Sf9 buňky o objemu 50 ml (hustota $1,5-2,0 \times 10^6$ buněk/ml) byly infikovány 500 μ l P₀ viru a inkubovány 72 hodin při teplotě 27 °C. Poté byla buněčná kultura centrifugována (800xg, 5-10 minut, pokojová teplota). Odebraný supernatant poté prošel 0,22 μ M filtrem. P₁ virus byl uchován ve tmě při 4 °C.

5.6.3 Exprese v Hi5 buňkách

Hi5 hmyzí buňky (300 ml) o hustotě $1,5 \times 10^6$ buněk/ml byly infikovány 3 ml P₁ viru obsahujícího zvláště CK1 α , CK1 α ^{K46R}, CK1 α ^{D136N}, CK1 α -like a CK1 α -like^{K46R}. Po 48 hodinách byly buňky stočeny (800xg, 15 minut, 4 °C) a promyty 30 ml 1x koncentrovaného PBS. Pelety byly uchovány při -80 °C do okamžiku purifikace.

5.7 Exprese proteinů v bakteriích

Konstrukty 2BT- β -katenin FL, 2BT- β -katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹, 2GT- β -katenin FL a 2CT- β -katenin FL byly zvláště transformovány do kompetentních *E. coli* Rosetta1(DE3) (750 ng plazmidu na 100 μ l buněk) a do *E. coli* BL21(DE3)-RIPL (1500 ng na 100 μ l buněk). Petriho misky, na

kteře byly transformované bakterie nanoseny, obsahovaly ampicilin (100 µg/ml) a chloramfenikol (35 µg/ml).

Jeden klon z kařké Petriho misky byl inokulován do 100 ml 1x LB média s ampicilem (100 µg/ml) a chloramfenikolem (17,5 µg/ml) a kultivován přes noc za stálého míchání při teplotě 37 °C. Jakmile optická hustota (OD, *optical density*) dosáhla hodnoty přibližně 0.6, 25 ml z nočních kultur bylo inokulováno do 2 (v případě kultury Rosetta1(DE3)) nebo 4 (BL21) litrů nového 1x LB média s ampicilem (100 µg/ml) a chloramfenikolem (17,5 µg/ml). Směs byla inkubována tři hodiny při teplotě 37 °C a poté přemístěna do 4 °C místnosti, kde se po přidání 0,5 mM IPTG inkubovala dalších 30 minut.

Po dvou byly kultury centrifugovány (6000 rpm, 8 min, 15 °C). Pelety bakterií se resuspendovaly stálým mícháním v 30 ml 1x PBS při teplotě 16 °C. Vzniklá suspenze byla opět centrifugována (4818 rcf, 15 min, 4 °C). Pelety byly uchovány při -80 °C do okamřiku purifikace.

5.8 Purifikace proteinů z hmyzích buněk

Metody purifikace proteinů vedou k separaci jednoho konkrétního proteinu nebo proteinového komplexu od ostatního buněčného materiálu. Základními kroky, jeř k získání proteinu vedou, jsou lýza buněk a chromatografie. Postupy purifikace proteinu/proteinového komplexu se vřdy vybírají s ohledem na jeho velikost, rozpustnost a stabilitu. Metoda purifikace byla průběžně optimalizována s ohledem na podmínky v laboratoři.

Jako metoda lýzy buněk byla zvolena sonikace. Při ní generátor tzv. sonikátoru produkuje střídavý proud krátkých elektrických pulzů. Elektrická energie putuje do konvertoru, v němž se mění na energii mechanickou v podobě vysokofrekvenčních zvukových vln. Přímó do buněčné kultury je vložena sonda zprostředkovávající zvukové vibrace. Dodaná energie zvukových vln se projevuje kavitací - vznikem a následnou implozí mikroskopických vzduchových bublin v kapalině. „Vybuchující“ bubliny způsobují ničení ochranných vrstev buněk, díky čemuž se protein našeho zájmu dostává z intracelulárního prostoru do vnější tekutiny. V ideálním případě se protein v tekutině rozpustí, takže v dalších krocích purifikace pracuje se solubilní proteinovou frakcí.

Afinitní chromatografie spočívá v navázání proteinu na imobilizovaný ligand připojený k pórovité a chemicky inertní matici. Schopnost interakce s ligandem propůjčuje proteinu tzv. štítek, krátká sekvence afinitní vůči ligandu. Po specifickém navázání proteinu se pomocí mycího pufru vymyjí ostatní nenavázané prvky. Následně se protein uvolní aplikací elučního pufru, který náhle výrazně mění pH a přerušuje vazbu mezi proteinem a ligandem.

Gelová filtrace (SEC, *size-exclusion chromatography*) rozděljuje izolované proteiny dle velikosti a tvaru. Eluce z afinitní chromatografie následně projde kolonou s kuličkami hydratované porézní látky. Čím menří je molekula, tím pomaleji bude kolonou procházet,

protože se bude zachytávat do gelové matrice v kuličkách. Gelové kolony se komerčně vyrábí z mnoha typů materiálů, v této práci jsem užila dextran-agarózové kolony Superdex.

5.8.1 Lýza buněk

Pelety hmyzích buněk Hi5 byly resuspendovány v 35 ml pufru L1 s čerstvě přidanými inhibitory proteáz leupeptinem, aprotininem, pepstatinem a benzamidinem a 2,5 μ l DNA a RNA štěpící nukleázy benzonáza. Poté byly buněčné suspenze 5 minut inkubovány při teplotě 4 °C a následně sonikovány velkou sondou při amplitudě 40 % s nastavením cyklů zapnuto – 5 sekund a vypnuto – 1 minuta s celkovou dobou sonikace 10 vteřin. Nakonec byly vzniklé lyzáty rozděleny centrifugací (20000xg, 45 minut, 4 °C) na usazený pelet zbytků buněk a supernatant s rozpuštěným proteinem.

5.8.2 Afinity chromatografie

Supernatanty se odebraly a inkubovaly s 1,5 ml Ni^{2+} kuliček ekvilibrovaných pufrům W. Směs supernatantu s kuličkami se po 10 minutách přelila do připravené kolony. Kolona byla po průchodu supernatantu (*flow-through*) čtyřikrát promyta pufrům W. Proteiny navázané na matrix kolony byly třikrát eluovány 4 ml pufru E.

5.8.3 Gelová filtrace

V centrifugační kyvetě Vivaspin 20 (30.000 MWCO) se první a druhá eluce smíchaly a zakoncentrovaly do <1 ml. Na kolonu Superdex S-75 (25 ml) ekvilibrovanou v pufru SEC byla aplikována koncentrovaná eluce. Po gelové filtraci v přístroji ÄKTA FPLC byly pomocí dat z chromatografie identifikovány frakce obsahující protein. Odpovídající frakce byly smíchány a zakoncentrovány do <200 μ l v centrifugační kyvetě Vivaspin 6 (30.000 MWCO).

Před zmrazením byl do roztoku s proteinem přidán glycerol (výsledná koncentrace 10 %). Protein byl rozdělen do alikvót po 10 μ l, šokově zmrazen v tekutém dusíku a uskladněn na -80 °C.

5.9 Purifikace proteinů z bakteriálních buněk

5.9.1 Lýza buněk

Pelety bakteriálních buněk *E. coli* BL21(DE3)-RIPL byly resuspendovány v 50 ml pufru L2 s čerstvě přidanými inhibitory proteáz leupeptinem, aprotininem, pepstatinem a

benzamidinem. Dále byl do suspenze přidán kuřecí lysozym o finální koncentrací 10 mg/ml. Poté byly buněčné suspenze 5 minut inkubovány při teplotě 4 °C a následně sonikovány velkou sondou při amplitudě 40 % s nastavením cyklů zapnuto – 1 sekunda a vypnuto – 5 sekund s celkovou dobou sonikace 10 minut. Nakonec byly vzniklé lyzáty rozděleny centrifugací (20000xg, 30 minut, 4 °C) na usazený pelet zbytků buněk a supernatant s rozpuštěným proteinem.

5.9.2 Afinity chromatografie

Supernatanty se odebraly a aplikovaly na 2 ml Ni²⁺ kuliček ekvilibrovaných pufrům W. Kolona byla po průchodu supernatantu (*flow-through*) pětkrát promyta pufrům W. Proteiny navázané na matrix kolony byly třikrát eluovány 6 ml (2BT-β-katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹)/4 ml (2GT-β-katenin FL a 2CT-β-katenin) pufru E.

5.9.3 Gelová filtrace

V centrifugační kyvetě Vivaspin 20 (100.000 MWCO) se první a druhá eluce smíchaly a zakoncentrovaly do < 5 ml. Na kolonu Superdex S-75 (125 ml) ekvilibrovanou v pufru SEC byla aplikována koncentrovaná eluce. Po gelové filtraci v přístroji ÄKTA FPLC byly pomocí dat z chromatografie identifikovány frakce obsahující protein. Odpovídající frakce byly smíchány a zakoncentrovány do < 750 μl (2BT-β-katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹)/240 μl (2GT-β-katenin FL a 2CT-β-katenin) v centrifugační kyvetě Vivaspin 20 (100.000 MWCO).

Před zmrazením byl do roztoku s proteinem přidán glycerol (výsledná koncentrace 10 %). Protein byl rozdělen do alikvót po 20 μl (2BT-β-katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹)/10 μl (2GT-β-katenin FL a 2CT-β-katenin), šokově zmrazen v tekutém dusíku a uskladněn na -80 °C.

5.10 Western blot

Metodou Western blot (též imunoblot) jsem detekovala proteiny aplikací specifických protilátek. Vzorky proteinů se rozdělily na SDS gelu, z něhož byly následně převedeny elektrickým proudem na PVDF (*polyvinyliden difluorid*) membránu aktivovanou v methanolu. Po transferu byla membrána 1 hodinu blokována v 5% roztoku odtučněného mléka (přípraveného rozpuštěním 5 g práškového odtučněného mléka v 100 ml 1x TBS pufru). Membrána s navázanými proteiny se dále inkubovala přes noc při teplotě 4 °C v 5% roztoku odtučněného mléka s primární protilátkou, která se specificky váže na svůj antigen v podobě sledovaného proteinu. Následující den byly membrány zbaveny nenavázaných zbytků primárních protilátek promytím třikrát 10 minut v 1x TBS pufru. Protože jsou proteiny samy o sobě „neviditelné“, tedy nemají schopnost emitovat světlo, je třeba membrány

inkubovat v sekundárních protilátkách komplementárních vůči protilátkám primárním a konjugovaných s emitujícím agentem HRP (*horseradish peroxidase*) – peroxidázou získávanou z kořene křene selského (*Armoracia rusticana*). Membrány byly v 5% roztoku odtučněného mléka se sekundárními protilátkami inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě a posléze třikrát 5 minut promyty 1x TBS pufrem.

Emitace navázaného HRP byla zahájena nanesením roztoku chemiluminiscentního HRP substrátu Immobilon Western. Výsledná luminiscence proteinů byla zdokumentována na přístroji Fusion SL.

5.11 Autofosforylační analýza

Úlohou této metody bylo monitorovat autofosforylaci serinových a threoninových reziduí purifikovaných kináz. Reakce o objemu 20 μ l obsahovaly vždy přibližně 1 ng kinázy a pufr A. Od každé kinázy jsem vytvořila dvě kondice, jednu s 2,5 mM ATP (v mixu společně s 3,5 mM $MgCl_2$) a druhou kontrolní bez ATP. Inkubace vzorků při teplotě 37 °C trvala 1 hodinu a ukončilo ji přidání 10 μ l 4x SDS nanášecího pufru.

5.12 Kinázová analýza

Stěžejním experimentem mého projektu byla kvalitativní analýza substrátové specificity jednotlivých kináz. Detekována byla formace proteinového substrátu fosforylovaného kinázou *in vitro*.

Reakce o objemu 20 μ l obsahovaly kinázu se substrátem v poměru 1:40. Výsledná koncentrace kinázy činila 0,25 μ M, substrátu 10 μ M. Mezi další složky reakčního mixu patřily pufr SEC, 1 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ a 1 mM EDTA. Součástí sady reakcí byla také negativní kontrola v podobě vzorku pouze se substrátem bez přítomnosti kinázy.

Fosforylaci substrátu kinázou jsem otestovala ve dvou časových intervalech: 1 hodina a přes noc. Po uplynutí dané doby byly reakce zastaveny přidáním 2x Laemmliho pufru v poměru 1:1 (tj. 20 μ l).

6 VÝSLEDKY

6.1 Mutageneze CK1 α a CK1 α -like

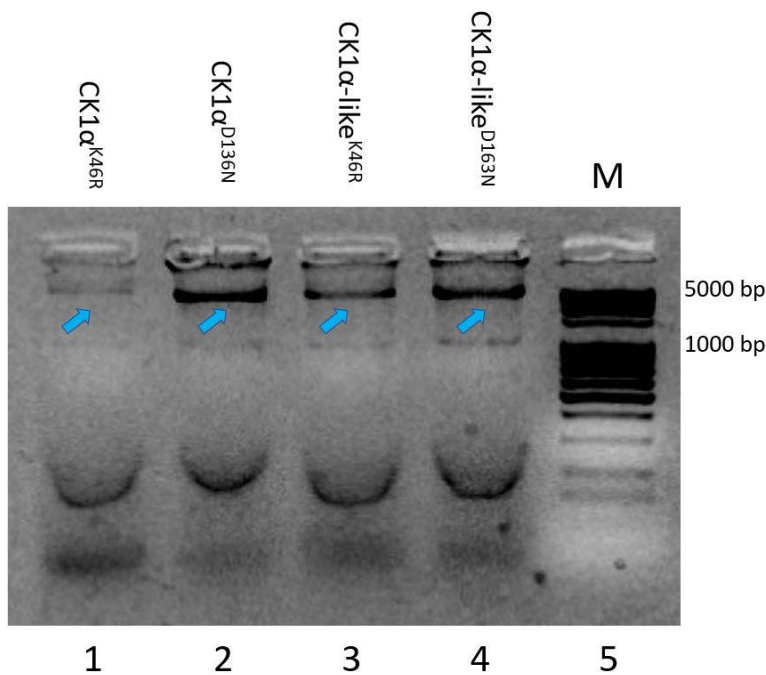
Aby bylo možné aktivitu CK1 α a CK1 α -like exaktně doložit, vytvořila jsem kontrolní katalyticky inaktivní kinázy. Ke generaci mutantních variant byly navrženy čtyři páry primerů, při jejichž designu jsme vycházeli ze znalosti aminokyselin klíčových pro chování kináz. Místně řízenou mutagenezí byly do kodonu pro Lys⁴⁶ (vázající ATP) a do kodonu pro Asp¹³⁶ (zprostředkovávající navázání fosfátu na proteinový substrát) uvedeny bodové mutace. Substitucí jednoho nukleotidu v daném kodonu byly aminokyseliny regulující fosforylaci proteinového substrátu zaměněny za aminokyseliny jiné, které zmíněné funkce postrádají.

Aminokyseliny Lys⁴⁶ a Asp¹³⁶ jsou jak v CK1 α , tak v CK1 α -like kódovány totožnými kodony, proto bylo při designu mutantních variant obou kináz postupováno stejně. Výsledný návrh zahrnoval čtyři páry primerů, přičemž každý pár odpovídal jedné z mutantních verzí CK1 α ^{K46R}, CK1 α ^{D136N}, CK1 α -like^{K46R} nebo CK1 α -like^{D136N}.

| | | | |
|--------------------------|-----|---|-----|
| CK1 α | 101 | CGATCAACATCACCAACGGCGAGGAAGTGGCAGTGAAGCTAGAATCTCAG | 150 |
| | | . | |
| CK1 α _K46R | 101 | CGATCAACATCACCAACGGCGAGGAAGTGGCAGTGAAGCTAGAATCTCAG | 150 |
| | | . | |
| CK1 α | 401 | ACAGAGACATTAAACCAGATAAAGTTCCTAATGGGTATTGGGCGTCACTGT | 450 |
| | | . | |
| CK1 α _D136N | 401 | ACAGAAACATTAAACCAGATAAAGTTCCTAATGGGTATTGGGCGTCACTGT | 450 |
| | | . | |
| CK1 α -like | 101 | GCATCACCACCACCAACGGCGAGGAAGTAGCAGTGAAGCTGGAATCTCAG | 150 |
| | | . | |
| CK1 α -like_K46R | 101 | GCATCACCACCACCAACGGCGAGGAAGTAGCAGTGAAGCTGGAATCTCAG | 150 |
| | | . | |
| CK1 α -like | 401 | ACCGAGACATTAAACCAGATAAAGTTCCTGATGGGTACTGGGCGTCACTGT | 450 |
| | | . | |
| CK1 α -like_D136N | 401 | ACCGAAACATTAAACCAGATAAAGTTCCTGATGGGTACTGGGCGTCACTGT | 450 |
| | | . | |

Obrázek 9: Návrh mutantních kináz CK1 α ^{K46R}, CK1 α ^{D136N}, CK1 α -like^{K46R} a CK1 α -like^{D136N}. Bodové mutace (červeně) byly uvedeny do kodonů pro Lys⁴⁶ a Asp¹³⁶ (žlutě).

Reakce místně řízené mutageneze obsahovaly vždy podle žádané mutace určitý templát o koncentraci 150 ng/ μ l a jeden ze čtyř párů navržených primerů. Dále byly do reakce přidány Q5 polymeráza, dNTP a reakční pufr 5x Q5® buffer. Po PCR reakci místně řízené mutageneze byly produkty ošetřeny 1 μ l restričního enzymu *DpnI* při 37 °C po dobu 1 hodiny. Objem 10 μ l z každé reakce byl transformován do 100 μ l kompetentních bakterií DH5 α . Bakterie byly následně kultivovány při 37 °C přes noc.



Obrázek 10: PCR místně řízené mutagenese. Reakce byly analyzovány elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu. Produkty jsou označeny modrou šipkou.

Následující den jsem vybrala tři bakteriální kolonie a inokulovala je do 11 ml LB média s ampicilinem. Po izolaci plazmidu z těchto bakteriálních kultur byla přítomnost žádané mutace verifikována sekvenováním. Plazmidy obsahující požadovanou mutaci byly použity jako templáty pro klonování mutantních verzí do vektoru 438-B.

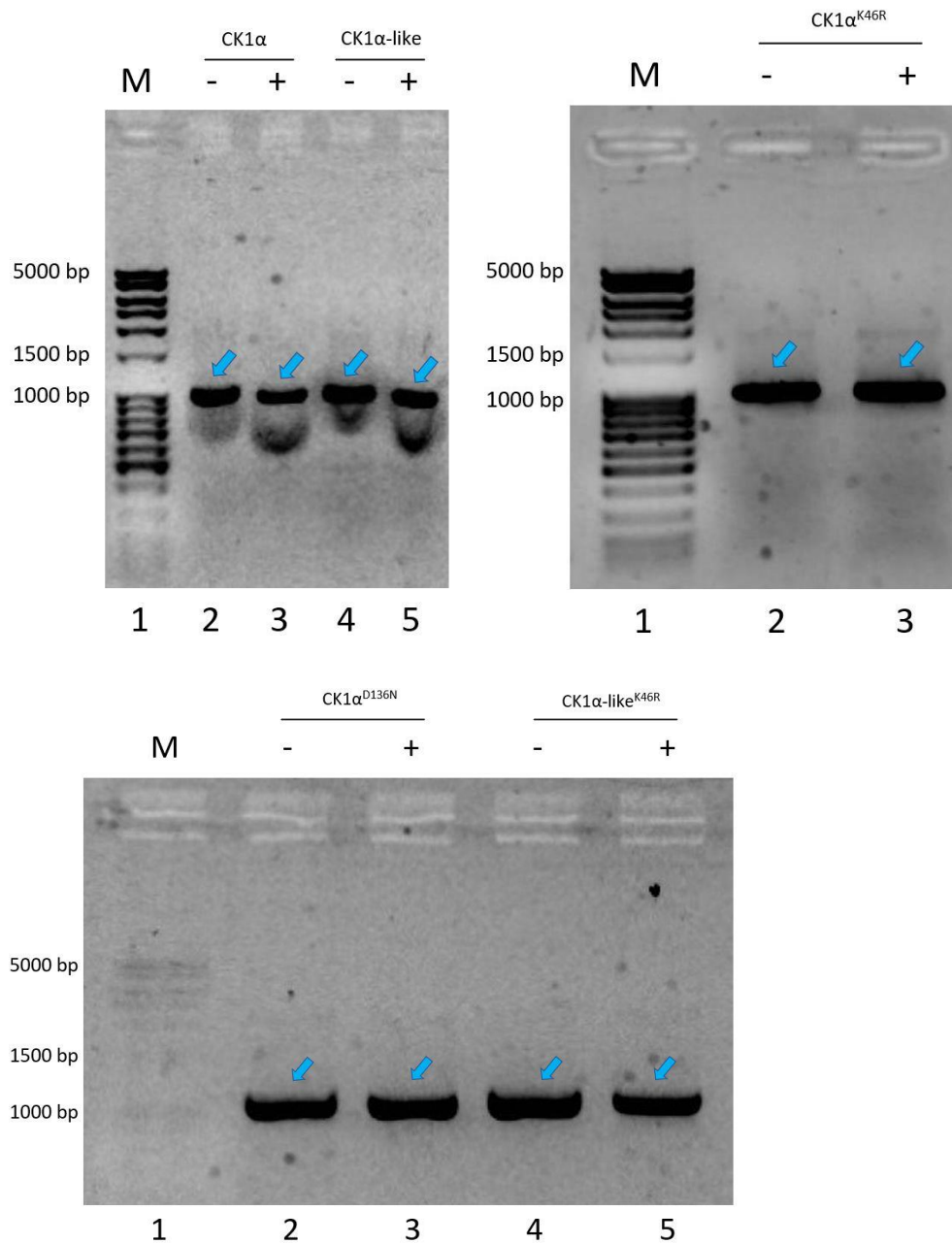
Na základě výsledků ze sekvenování plazmidů (provedeného externí laboratoří) jsem zjistila, že bylo dosaženo vygenerování mutantních variant $CK1\alpha^{K46R}$, $CK1\alpha^{D136N}$ a $CK1\alpha\text{-like}^{K46R}$. Pokus o uvedení bodové mutace D136N do genu pro $CK1\alpha\text{-like}$ bohužel nebyl i přes opakované snahy úspěšný.

6.2 Příprava rekombinantních plazmidů

Rekombinantní plazmidy pro expresi proteinů byly vytvořeny metodou LIC (podrobně viz 5.5.).

Geny pro $CK1\alpha$, $CK1\alpha^{K46R}$, $CK1\alpha^{D136N}$, $CK1\alpha\text{-like}$ a $CK1\alpha\text{-like}^{K46R}$ byly klonovány do vektoru 438-B s His_6 štítkem. Vektor 2B-T (taktéž s His_6 štítkem) byl zvolen pro proteiny β -katenin FL (full length, tzn. standardní verze proteinu) a zkrácenou verzi β -katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹ určené k expresi v bakteriálních buňkách. Po provedení neúspěšné purifikace konstruktů 2BT- β -katenin FL bylo třeba zopakovat přípravu rekombinantního plazmidu β -kateninu FL, tentokrát s vektory 2G-T (s His_6 a GST štítkem) a 2C-T (s His_6 a MBP štítkem).

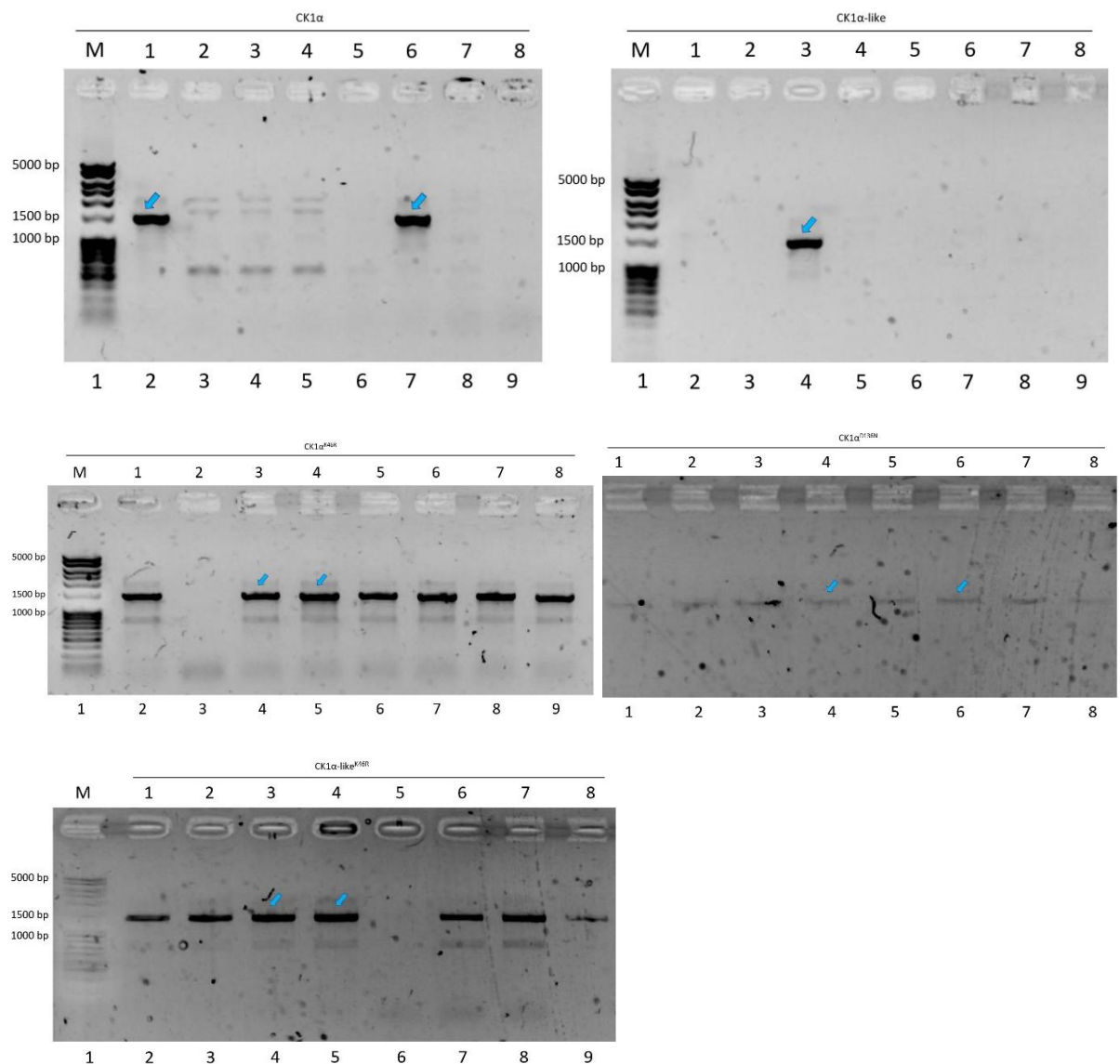
Nejprve byla provedena amplifikační PCR. Od každého genu byly vytvořeny dvě reakce, jedna s enhancerem a druhá bez. Přítomnost enhanceru neměla na konečný výsledek amplifikační PCR žádný vliv.



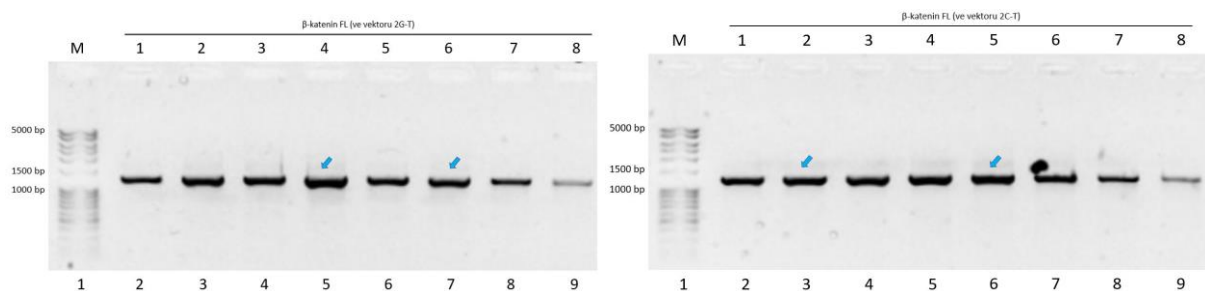
Obrázek 11: Amplifikační PCR genů CK1α, CK1α-like, CK1α^{K46R}, CK1α^{D136N} a CK1α-like^{K46R}. Reakce byly analyzovány elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu. Produkty jsou označeny modrou šipkou. Znaménka nad gelem symbolizují přítomnost (+), anebo naopak absenci (-) enhanceru.

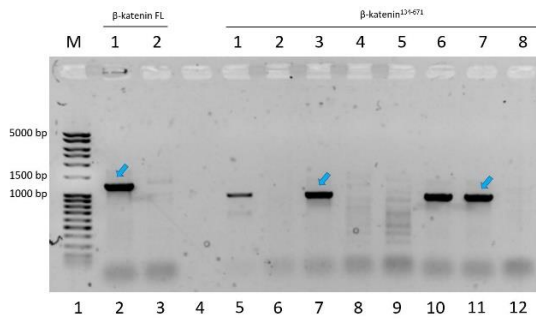
Produkty PCR ošetřené restrikcí enzymem *DpnI* a purifikované QIA quick PCR Purification Kitem byly dále opracovány T4 DNA polymerázou. Upravený inzert byl smíchan s vektorem (taktéž upraveným T4 DNA polymerázou). Směs inzertu a vektoru byla transformována do 100 μl DH5α kompetentních bakterií dle protokolu pro chemickou transformaci do *E. coli* (podrobně viz 5.4.).

Prázdné a rekombinantní kolonie bakterií jsem mezi sebou rozlišila koloniovou PCR. Jako templát v reakcích byl použit biologický materiál přímo z bakteriálních kolonií. Primery byly do reakcí přidány dle daného konstruktů.



Obrázek 12: Koloniová PCR plazmidů 438B-CK1 α , 438B-CK1 α -like, 438B-CK1 α ^{K46R}, 438B-CK1 α ^{D136N} a 438B-CK1 α -like^{K46R}. Reakce byly analyzovány elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu. Vybrané kolonie jsou označeny modrou šipkou.





Obrázek 13: Koloniová PCR plazmidů 2GT-β-katenin FL, 2CT-β-katenin FL, 2BT-β-katenin FL a 2BT-β-katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹. Reakce byly analyzovány elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu. Vybrané kolonie jsou označeny modrou šipkou.

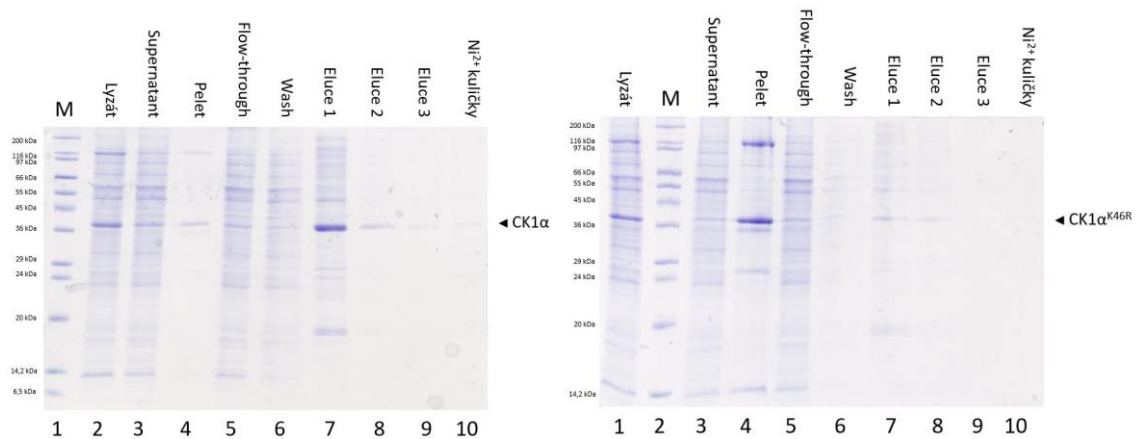
Dle elektroforetické analýzy jsem vybrala dvě bakteriální kolonie a inokulovala je do 10 ml LB média s ampicilinem. Po izolaci plazmidu z těchto bakteriálních kultur byla izolovaná pDNA verifikována sekvenováním. Klony se správnou sekvencí byly použity v dalším postupu k expresi (podrobně viz 5.6 a 5.7) a purifikaci (podrobně viz 5.8 a 5.9) proteinů.

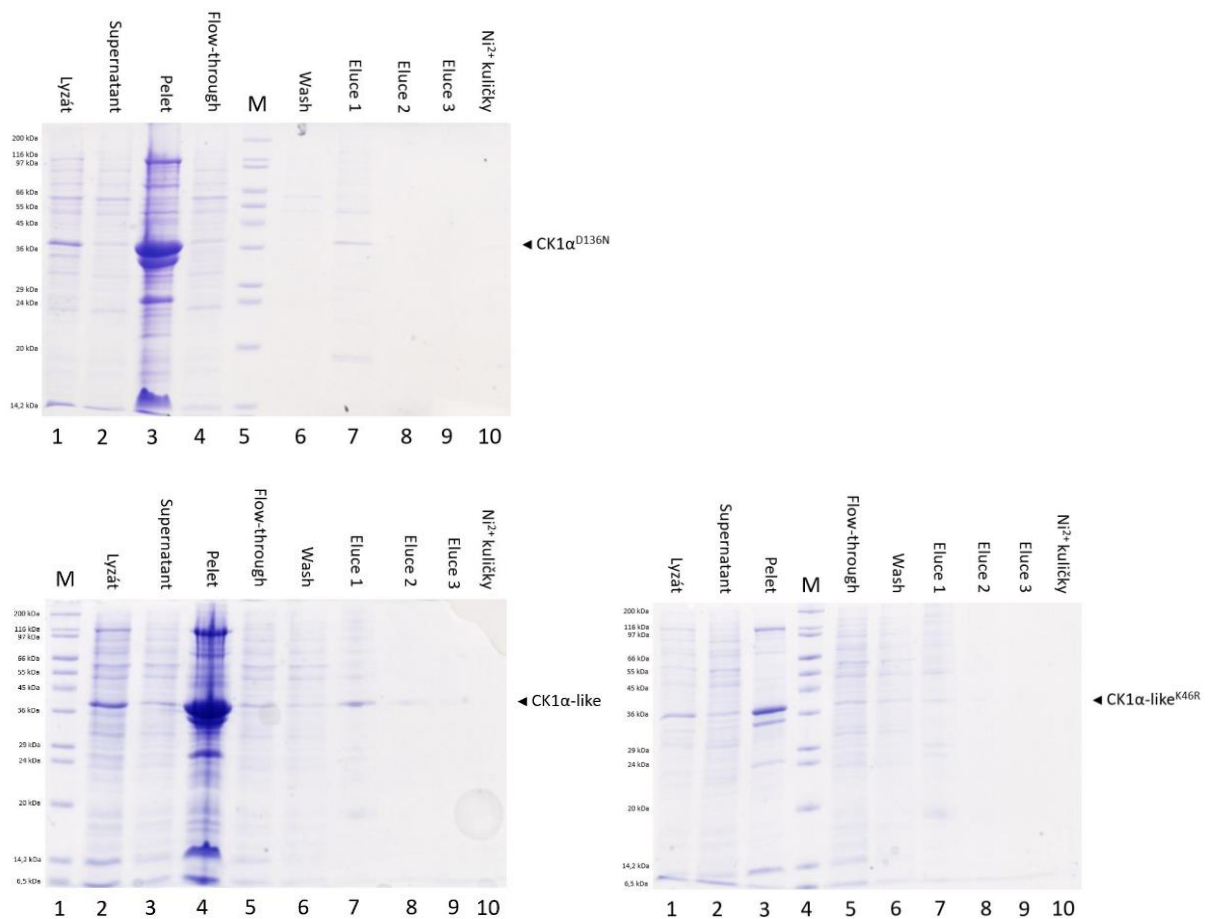
6.3 Purifikace proteinů

6.3.1 Purifikace proteinů z hmyzích buněk

Při purifikaci proteinů z hmyzích buněk jsem postupovala dle optimalizovaného protokolu (podrobně viz 5.8.).

V průběhu afinitní chromatografie byly průběžně odebírány vzorky frakcí z jednotlivých kroků. Následná analýza odebraných frakcí prostřednictvím SDS-PAGE mi umožnila rozpoznat, zdali byl protein natolik solubilní, aby po centrifugaci lyzátu zůstal rozpuštěný v supernatantu a mohl být následně eluován z niklových kuliček. Na SDS gelu jsem si proto všimla především množství proteinu ve frakcích "Eluce 1", "Eluce 2" a "Eluce 3".

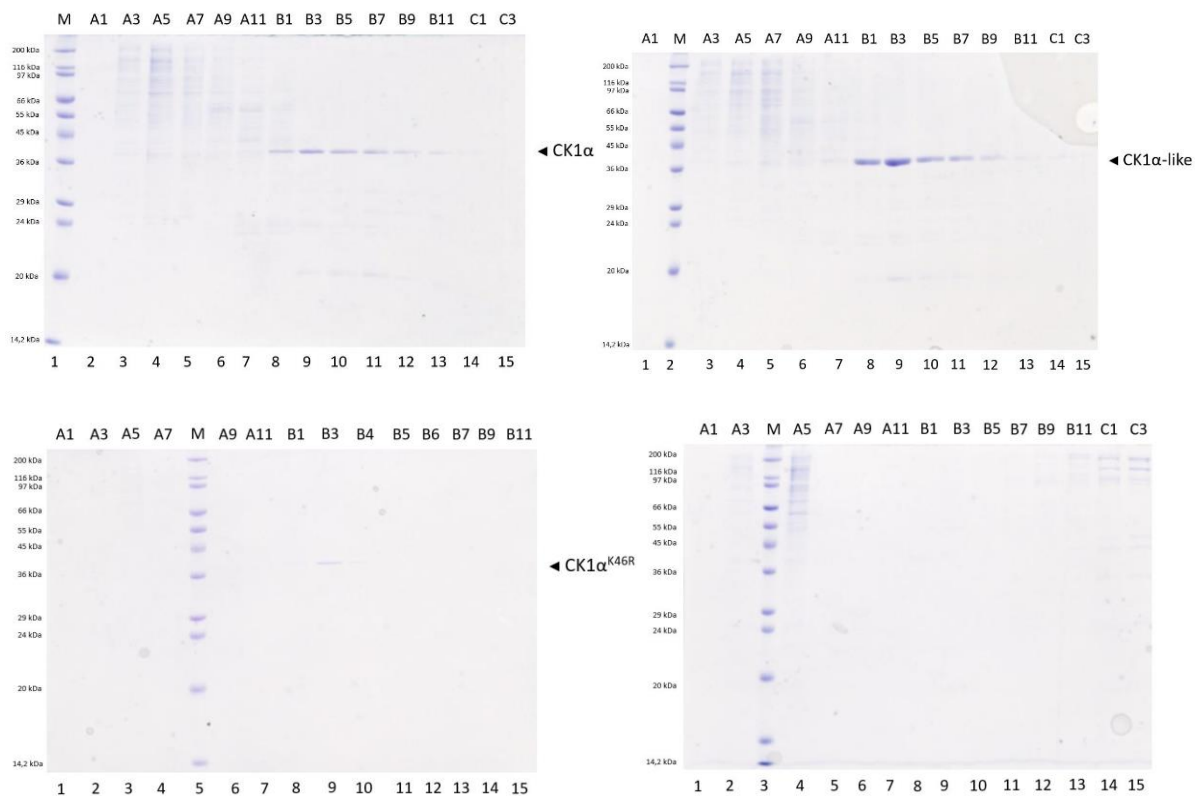




Obrázek 14: Afinitní chromatografie proteinů CK1 α , CK1 α^{K46R} , CK1 α^{D136N} , CK1 α -like a CK1 α -like^{K46R}. Frakce byly analyzovány SDS-PAGE v 15% SDS gelu. Veškeré proteiny obsahovaly His₆ štítek.

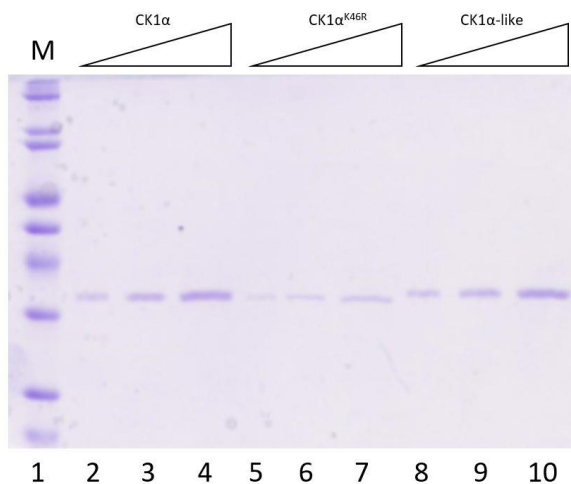
V průběhu purifikace jsem se potýkala s problémem nízké rozpustnosti kináz. S výjimkou CK1 α bylo větší množství proteinů obsaženo v nerozpustné frakci buněčného peletu. Nejmarkantnější byla nízká rozpustnost mutantu CK1 α -like^{K46R}. Z důvodu nedostatečného výtěžku nebylo dále s purifikací CK1 α -like^{K46R} pokračováno.

První a druhá eluce proteinů CK1 α , CK1 α^{K46R} , CK1 α^{D136N} a CK1 α -like byly smíchány, koncentrovány a aplikovány na kolónu Superdex S-75. Po skončení gelové filtrace jsem na základě počítačem vyhodnocených dat vybrala frakce s předpokládanou přítomností proteinu a ty dále analyzovala SDS-PAGE. Frakce s patrnou přítomností proteinů jsem koncentrovala a zamrazila na -80 °C.



Obrázek 15: Gelová filtrace proteinů CK1 α , CK1 α^{K46R} , CK1 α^{D136N} a CK1 α -like. Frakce byly analyzovány SDS-PAGE v 15% SDS gelu.

Na přiložených gelech je vidět, že gelová filtrace CK1 α^{D136N} nebyla úspěšná. Optimalizovaným postupem se mi podařilo úspěšně purifikovat proteiny CK1 α , CK1 α^{K46R} a CK1 α -like (všechny s His₆ štítkem).

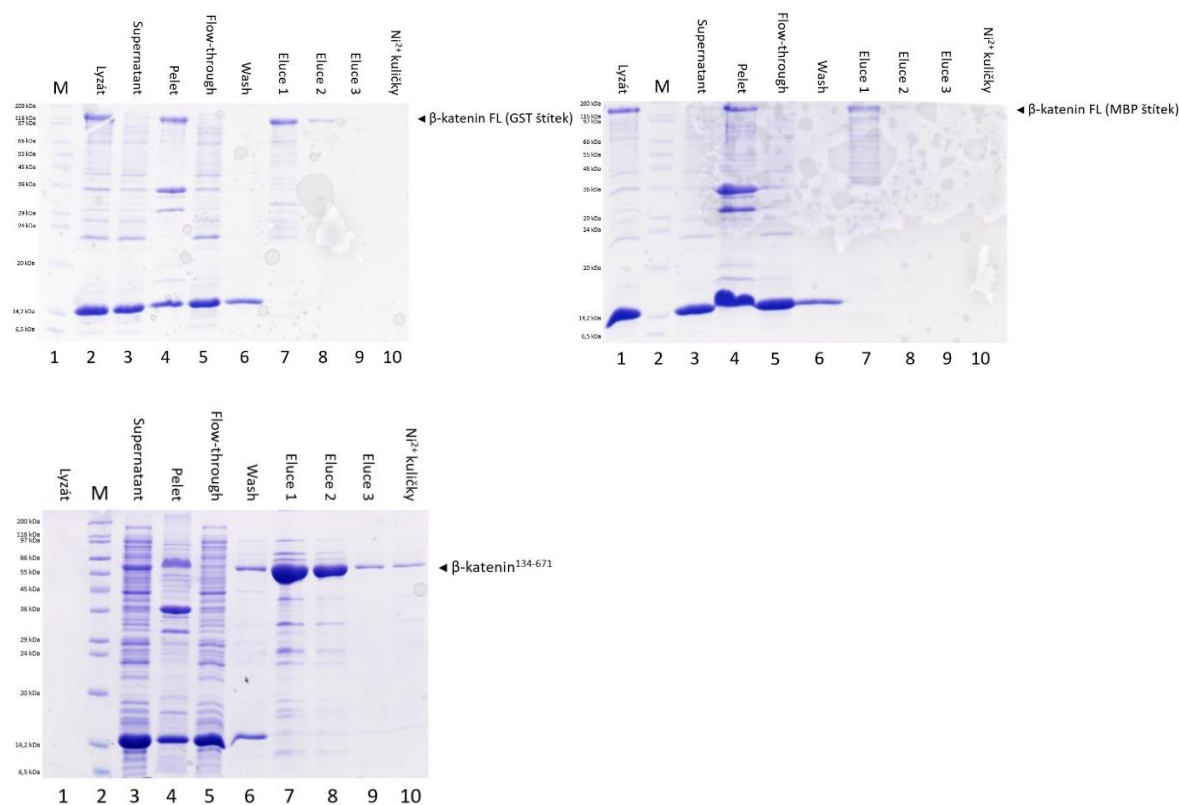


Obrázek 16: Purifikované proteiny CK1 α , CK1 α^{K46R} a CK1 α -like. Reakce při stoupajícím množství proteinu byly analyzovány SDS-PAGE v 15% SDS gelu.

6.3.2 Purifikace proteinů z bakteriálních buněk

Při purifikaci proteinů z bakteriálních buněk jsem postupovala dle optimalizovaného protokolu (podrobně viz 5.9).

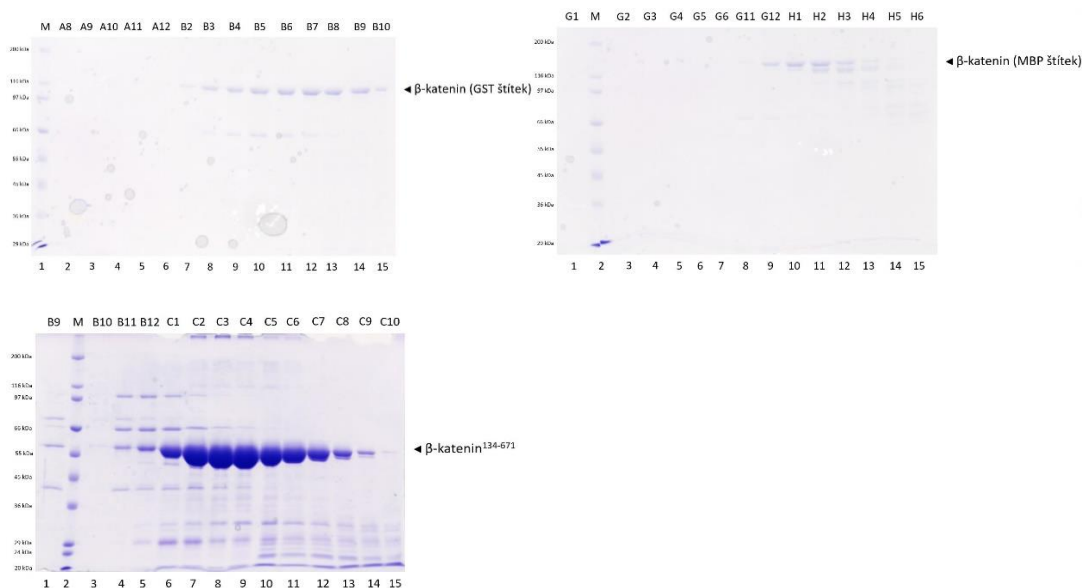
Stejně jako při purifikaci proteinů z hmyzích buněk i v průběhu této afinitní chromatografie byly průběžně odebírány a následně analyzovány vzorky frakcí z jednotlivých kroků.



Obrázek 17: Afinitní chromatografie proteinů β-katenin FL (s GST štítkem), β-katenin FL (s MBP štítkem) a β-katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹ (s His₆ štítkem). Frakce byly analyzovány SDS-PAGE v 10% SDS gelu.

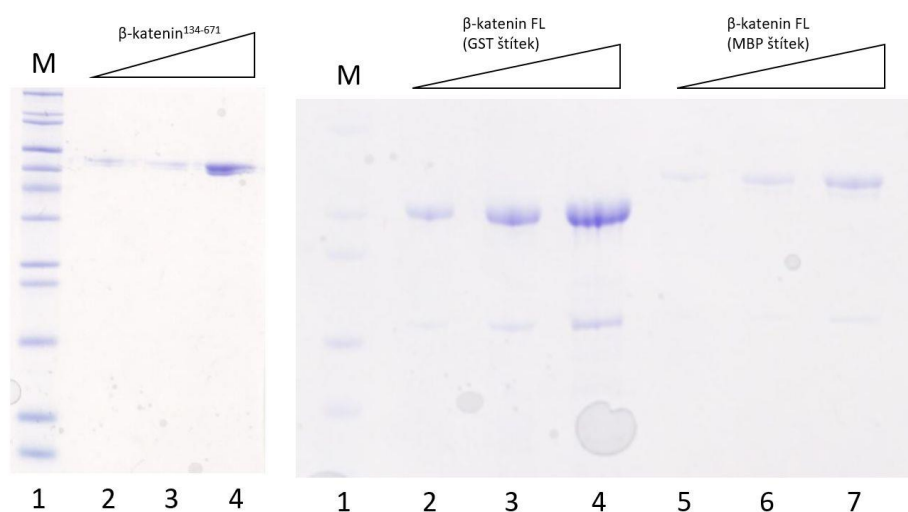
Nejprve byly provedeny pokusy o purifikaci konstruktů 2BT-β-katenin FL a 2BT-β-katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹, první zmiňovaný protein se nicméně purifikovat nezdařilo. Proto byly navrženy dva nové konstrukty proteinu β-katenin FL, konkrétně 2GT-β-katenin FL (s GST štítkem) a 2CT-β-katenin FL (s MBP štítkem). Afinitní chromatografie nových konstruktů β-kateninu FL byly již úspěšné.

První a druhá eluce proteinů 2GT-β-katenin FL, 2CT-β-katenin FL a 2BT-β-katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹ byly koncentrovány a aplikovány na kolónu Superdex S-75. Po skončení gelové filtrace jsem na základě počítačem vyhodnocených dat vybrala frakce s předpokládanou přítomností proteinu a ty dále analyzovala SDS-PAGE. Frakce s patrnou přítomností proteinu jsem koncentrovala a zamrazila na -80 °C.



Obrázek 18: Gelová filtrace proteinů β -katenin FL s GST štítkem, β -katenin FL s MBP štítkem a β -katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹ s His₆ štítkem. Frakce byly analyzovány SDS-PAGE v 10% gelu.

Optimalizovaným postupem se mi podařilo úspěšně purifikovat proteiny β -katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹ (s His₆ štítkem), β -katenin FL (s GST štítkem) a β -katenin FL (s MBP štítkem).

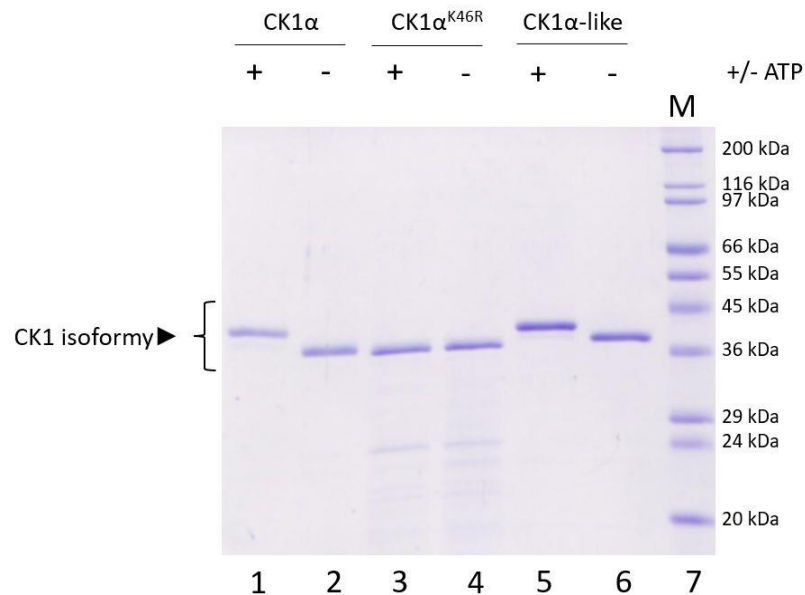


Obrázek 19: Purifikované proteiny β -katenin¹³⁴⁻⁶⁷¹, β -katenin FL (s GST štítkem) a β -katenin FL (s MBP štítkem). Reakce při stoupajícím množství proteinu byly analyzovány SDS-PAGE v 15% SDS gelu.

6.4 Autofosforylační analýza

Schopnost CK1 α a CK1 α -like provádět autofosforylaci byla otestována autofosforylační analýzou. Pro srovnání byla do experimentu zahrnuta mutantní verze CK1 α ^{K46R}. Od každé kinázy byly vždy vytvořeny dvě reakce, jedna s ATP a druhá kontrolní bez ATP.

Základním předpokladem tohoto experimentu bylo, že CK1 α , jak již bylo ukázáno v minulosti, bude provádět autofosforylaci, zatímco mutant CK1 α^{K46R} nebude autofosforylace schopen z důvodu záměrného narušení ATP-vazebné kapsy. Protože tato práce je první, která se podrobně zabývá CK1 α -like, nad potenciálním výstupem autofosforylační analýzy této kinázy se dalo pouze polemizovat.



Obrázek 20: Výsledky autofosforylační analýzy. Reakce byly analyzovány SDS-PAGE v 12% SDS gelu. Znaménka nad gelem značí přítomnost (+), nebo naopak absenci (-) ATP.

Na gelu si lze povšimnout, že přidání ATP do reakcí s CK1 α a CK1 α -like způsobilo posun výsledného produktu ve srovnání s kontrolními reakcemi bez ATP. Navázáním fosfátu se snižuje elektroforetická mobilita kinázy. U CK1 α^{K46R} se tento posun neprojevil, čímž byla potvrzena nutnost normální ATP-vazebné kapsy pro provedení autofosforylace.

Díky autofosforylační analýze jsem prokázala status CK1 α -like jakožto katalyticky aktivní isoformy kináz z rodiny CK1.

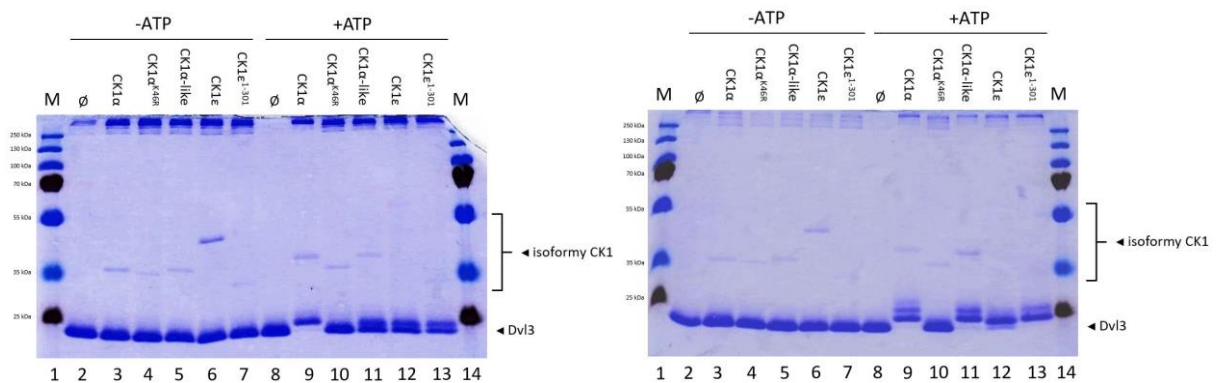
6.5 Kinázová analýza

Substrátovou specifitu CK1 α a CK1 α -like jsem determinovala metodou kinázové analýzy. Obě dvě isoformy jsem srovnala s kinázou CK1 ϵ , jež také reguluje Wnt/ β -katenin signalizační dráhu. V *in vivo* modelech bylo pozorováno, že CK1 α fosforyluje signální protein β -katenin a CK1 ϵ fosforyluje signální protein Dvl3, jeden ze tří paralogů proteinu Dvl. V této práci jsem testovala substrátovou specifitu těchto kináz vůči proteinovým substrátům β -katenin a Dvl3 *in vitro*. Zároveň byla testována substrátová specifita CK1 α -like, přičemž její proteinové substráty nejsou dodnes známé.

Fosforylaci substrátu kinázou jsem testovala ve dvou časových intervalech: 1 hodina a přes noc. Testovanými kinázami byly mnou purifikované CK1 α , mutantní CK1 α^{K46R} a CK1 α -like a také CK1 ϵ a zkrácená verze CK1 ϵ^{1-301} poskytnuté laboratoří Konstantina Tripsianese, Ph.D. Substráty měly podobu proteinu β -katenin FL (GST štítek) a zkrácenou verzi proteinu Dvl3²⁴³⁻⁴⁹⁶ zahrnující aktivní domény tohoto proteinu, které jsou *in vivo* fosforylovány CK1 ϵ .

Reakce se substrátem Dvl3 byly provedeny vždy ve dvou podmínkách, jedné s ATP a druhé kontrolní bez ATP. Jak lze vidět na přiložených SDS gelech, v reakcích bez ATP k fosforylaci Dvl3 nedošlo, což potvrzuje, že fosforylace je závislá na ATP. Fosforylace je podmíněna přítomností kinázy, protože v negativních kontrolách se substrátem bez kinázy k fosforylaci Dvl3 nedochází, bez ohledu na přidání ATP.

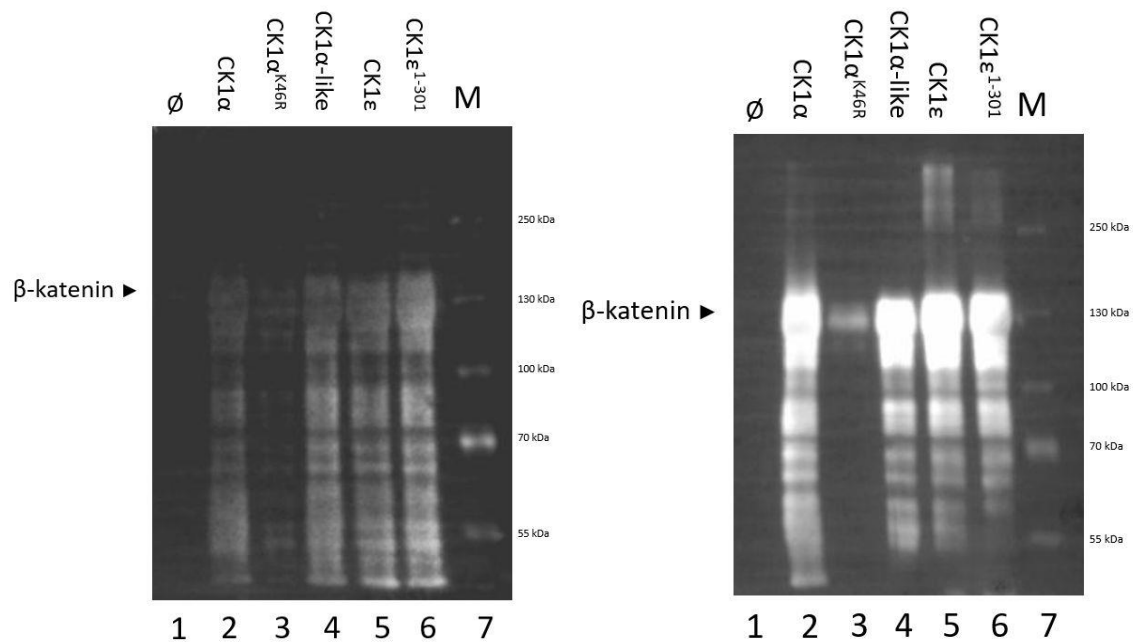
Výsledky kinázové analýzy ukazují, že Dvl3 je *in vitro* fosforylován kinázami CK1 α , CK1 α -like, CK1 ϵ a CK1 ϵ^{1-301} . Co je zajímavé, dle gelů lze usoudit, že Dvl3 je *in vitro* více fosforylován CK1 α než CK1 ϵ . Fosforylovaný produkt se nezformoval u kontrolní katalyticky inaktivní CK1 α^{K46R} .



Obrázek 21: Kinázová analýza se substrátem Dvl3 v časových intervalech 1 hodina (vlevo) a přes noc (vpravo). Reakce byly separovány SDS-PAGE v 15% SDS gelu. Symbol Ø značí negativní kontrolu v podobě reakce se substrátem bez přítomnosti kinázy.

Reakce se substrátem β -katenin byly provedeny za přítomnosti ATP. Při analýze výsledků bylo postupováno odlišně, než při reakcích s Dvl3. Po separování vzorků v 8% SDS gelu byla provedena metoda Western blot (podrobně viz 5.10.). Fosforylovaný β -katenin byl detekován protilátkou Phospho- β -Catenin (Ser45) zaznamenávající fosforylaci aminokyseliny Ser⁴⁵, kterou *in vitro* fosforyluje CK1 α .

Fosforylovaný β -katenin byl detekován v reakcích s kinázami CK1 α , CK1 α -like, CK1 ϵ a CK1 ϵ^{1-301} . Míra fosforylace β -kateninu jednotlivými kinázami je poměrně stejná. U negativní kontroly k fosforylaci β -kateninu nedošlo. Menší reziduální fosforylace, pozorovaná ve vzorku s katalyticky inaktivní CK1 α^{K46R} , je pravděpodobně způsobena vyšším množstvím substrátu nebo aplikací většího množství detekující protilátky, nejedná se však o výsledek CK1 α^{K46R} .



Obrázek 22: Kinázová analýza se substrátem β -katenin v časových intervalech 1 hodina (vlevo) a přes noc (vpravo). Na obrázku je snímek z detekce fosforylovaného β -kateninu metodou Western blot. Symbol \emptyset značí negativní kontrolu v podobě reakce se substrátem bez přítomnosti kinázy.

7 DISKUZE

Cílem této práce bylo připravit experimentální systém pro determinaci substrátové specifity kináz CK1 α a CK1 α -like. Výstupem projektu byl test schopnosti autofosforylace purifikovaných kináz a analýza jejich substrátové specifity vůči proteinům β -katenin a Dvl3, které jsou klíčovými signálními molekulami Wnt/ β -katenin signalizační dráhy.

7.1 Charakterizace CK1 α -like

V této práci přináším vůbec první informace o charakteru kinázy CK1 α -like. Autofosforylační analýzou jsem ukázala, že CK1 α -like je katalyticky aktivní kinázou s funkční ATP-vazebnou kapsou. Zároveň jsem díky kinázové analýze zjistila, že CK1 α -like je schopná fosforylovat proteiny β -katenin a Dvl3 *in vitro*. Lze předpokládat, že CK1 α -like má vliv na regulaci Wnt/ β -katenin signalizační dráhy, což otevírá prostor pro nové analýzy CK1 α -like *in vitro* i *in vivo*.

7.2 Substrátová specifita CK1 α a CK1 α -like

Substrátovou specifitu CK1 α a CK1 α -like vůči proteinům β -katenin a Dvl3 jsem srovnala s kinázou CK1 ϵ . V *in vivo* modelech byly pozorovány odlišné role CK1 α a CK1 ϵ v signalizační dráze Wnt/ β -katenin. CK1 α , která je součástí β -katenin-destrukčního komplexu, fosforyluje protein β -katenin na aminokyselině Ser⁴⁵. CK1 ϵ fosforyluje proteiny Dvl. Otázka, co způsobuje odlišné substrátové preference těchto kináz, však dosud zodpovězena nebyla. Jednou z hypotéz bylo, že odlišná substrátová specifita CK1 α a CK1 ϵ je způsobena rozdíly v kinázách samotných, resp. interakcí kináza-substrát, kdy vlastnosti kináz CK1 α a CK1 ϵ jim umožňují fosforylovat pouze určitý substrát, tedy CK1 α fosforylovat pouze β -katenin a CK1 ϵ fosforylovat pouze Dvl.

Aplikací mého experimentálního systému jsem zjistila, že preference CK1 α a CK1 ϵ *in vitro* se vůči substrátům β -katenin a Dvl3 neliší. Obě dvě kinázy jsou schopné fosforylovat oba zmíněné substráty, což platí také pro CK1 α -like. Tímto jsem ukázala, že CK1 α , CK1 α -like a CK1 ϵ jsou *in vitro* redundantní. Samotná interakce kináza-substrát tedy není tím, co způsobuje odlišnou substrátovou specifitu kináz CK1 α a CK1 ϵ *in vivo*. Preference substrátu je podmíněná nějakými externími činiteli přítomnými v buňce.

Teorií, co navádí CK1 α a CK1 ϵ k jejich substrátům v buňce, je více. Může se jednat například o různé scaffoldové proteiny, které přitahují pouze určitou kinázu. V souvislosti s fosforylací β -kateninu se jako možný interakční partner pro CK1 α nabízí scaffoldový protein Axin. Nicméně analýzou vazebných míst Axinu bylo odhaleno, že s tímto proteinem interaguje i CK1 ϵ [75].

Další možnou teorií je subcelulární lokalizace jinými proteiny tak, aby CK1 α zůstala

v cytoplazmě a CK1 ϵ se přiblížila k cytoplazmatické membráně, kde následně fosforyluje proteiny Dvl. Potenciálním pokračováním výzkumu by tudíž mohla být identifikace proteinů navádějících kinázy *in vivo*.

Můžeme se také domnívat, že substrátová specificita kináz ve Wnt/ β -katenin signální dráze je regulována fosforylací a defosforylací kináz samotných. Fosforylace studovaných kináz na jejich C-konci, ať už jinou kinázou, anebo sebou, má inhibiční účinky [76]. Je tedy možné, že CK1 α a CK1 ϵ jsou v průběhu Wnt/ β -katenin signální dráhy podrobovány různým fosforylacím a defosforylacím, čímž je regulována fosforylační aktivita kináz vůči substrátům. Blíže by tento myšlenkový konstrukt mohl být validován studiem interakce kináz s enzymy fosfatázami, které katalyzují defosforylací. Kromě fosforylace se na regulaci substrátové specificity kináz mohou podílet i další proteinové modifikace. Bylo zjištěno, že CK1 α je např. v rámci jiné buněčné signální dráhy, p53, upravována tzv. nedylací, tedy navázáním malého ubikvitinu-podobného proteinu NEDD8 [77]. Proto by se další výzkum mohl vydat cestou identifikace přesných proteinových modifikací regulujících aktivitu kináz ve Wnt/ β -katenin signální dráze.

7.3 Isoformy CK1 α

V mé práci jsem se zaměřila výhradně na kanonickou isoformu kinázy CK1 α , isoformu 2. V současné literatuře se autoři zmiňují o čtyřech isoformách CK1 α (viz 2.4.1.). Databáze gnomAD [79] však uvádí 11 možných variant alternativního přepisu genu CSNK1A1. Charakterizovat jednotlivé isoformy blíže v rámci Wnt/ β -katenin signální dráhy by mohlo být tématem navazujícího projektu.

8 ZÁVĚR

Kinázy jsou důležitými regulátory mnoha buněčných signalizačních drah, jejichž deregulace může vést k rozvoji závažných onemocnění. V mé práci jsem se zaměřila na charakterizaci kináz CK1 α a CK1 α -like v rámci signalizační dráhy Wnt/ β -katenin.

Cílem této práce bylo připravit vhodný experimentální systém a použít jej pro determinaci substrátové specificity CK1 α a CK1 α -like *in vitro*. V přípravné fázi jsem optimalizovala expresi a purifikaci kináz CK1 α , CK1 α -like a proteinu β -katenin, jenž je substrátem kinázy CK1 α *in vivo*. Metodou kinázové analýzy jsem testovala *in vitro* substrátovou specificitu CK1 α a CK1 α -like vůči proteinům β -katenin a Dvl3 ve srovnání s kinázou CK1 ϵ , jejímž fyziologickým substrátem je Dvl3. Mé výsledky ukazují, že *in vitro* fungují CK1 α , CK1 α -like a CK1 ϵ redundantně, tedy že *in vitro* jsou tyto kinázy schopné fosforylovat jak β -katenin, tak Dvl3. Tímto jsem došla k závěru, že substrátová specificita kináz *in vivo* nepochází z nich samotných, ale je ovlivněna externím činitelem v buňce.

Tato práce je zároveň první publikací popisující CK1 α -like. Na základě mých výsledků lze říci, že CK1 α -like je katalyticky aktivní kinázou se schopností fosforylovat β -katenin a Dvl3 *in vitro*.

Výzvou pro můj další výzkum je identifikovat činitele v buňce ovlivňující substrátovou specificitu CK1 α a CK1 α -like *in vivo*. Dále bych chtěla blíže objasnit roli CK1 α -like ve Wnt/ β -katenin signalizační dráze a upřesnit tak současnou představu o fungování této signalizační dráhy. Výsledky této práce přispívají k pochopení biologie kináz CK1 α a CK1 α -like s cílem zlepšit léčbu onemocnění myelodysplastický syndrom a akutní myeloidní leukémie inovativními inhibitory těchto kináz.

9 PŘÍNOS PRÁCE

Výsledky této práce jsou součástí plánované publikace laboratoře prof. Mgr. Vítězslava Bryji, Ph.D., která bude zveřejněna v impaktovaném zahraničním periodiku *Frontiers in Molecular Biosciences*.

V listopadu 2021 jsem se na základě mých výsledků stala součástí projektového týmu spolupracujícího s laboratoří prof. Stefana Knappa na Univerzitě Johanna Wolfganga Goetheho ve Frankfurtu. Cílem tohoto projektu je vytvořit v pořadí třetí krystalovou strukturu kinázy CK1 α v komplexu s inhibitory vyvíjenými laboratoří mého konzultanta prof. Mgr. Vítězslava Bryji, Ph.D.

10 POUŽITÁ LITERATURA

1. KARP, Gerald. *Cell and Molecular Biology*. 7. vyd. Wiley-VCH, 2013. ISBN 978-1118301791
2. ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK, přeložil Bohumil BOUZEK, přeložil Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-2-0.
3. KRAUSS, Gerhard. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 4. vyd. Wiley-VCH, 2008. ISBN 978-3527313976.
4. MARTIN, G. Steven. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell* [online]. 2003, **4**(3), 167-174 [cit. 2022-02-13]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/S1535-6108(03)00216-2
5. NAIR, Arathi, Prashant CHAUHAN, Bhaskar SAHA a Katharina F. KUBATZKY. Conceptual Evolution of Cell Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(13) [cit. 2022-02-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20133292
6. PURVES, Dale, George J. AUGUSTINE, David FITZPATRICK, et al.. Neuroscience. 2nd edition. *Sinauer Associates* [online]. 2001, [cit. 2022-02-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>
7. ARDITO, Fatima, Michele GIULIANI, Donatella PERRONE, Giuseppe TROIANO a Lorenzo Lo MUZIO. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 2017, **40**(2), 271-280 [cit. 2022-01-26]. ISSN 1107-3756. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2017.3036
8. SEOK, Seung-Hyeon. Structural Insights into Protein Regulation by Phosphorylation and Substrate Recognition of Protein Kinases/Phosphatases. *Life* [online]. 2021, **11**(9) [cit. 2022-01-25]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life11090957
9. ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
10. LI, Vivian S.W., Ser Sue NG, Paul J. BOERSEMA, et al. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* [online]. 2012, **149**(6), 1245-1256 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.05.002
11. GRAINGER, S. a Karl WILLERT. Mechanisms of Wnt signaling and control. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* [online]. 2018, **10**(5) [cit. 2022-01-26]. ISSN 19395094. Dostupné z: doi:10.1002/wsbm.1422
12. KRISHNAMURTHY, Nithya a Razelle KURZROCK. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews* [online]. 2018, **62**, 50-60 [cit. 2022-02-28]. ISSN 03057372. Dostupné z: doi:10.1016/j.ctrv.2017.11.002

13. ANTHONY, Christin C., David J. ROBBINS, Yashi AHMED a Ethan LEE. Nuclear Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling: It's a Complex Situation. *Genes* [online]. 2020, **11**(8) [cit. 2022-01-27]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11080886
14. STEINHART, Zachary a Stephane ANGERS. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development* [online]. 2018, **145**(11) [cit. 2022-01-27]. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.146589
15. PAI, Sachin Gopalkrishna, Benedito A. CARNEIRO, Jose Mauricio MOTA, et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 2017, **10**(1) [cit. 2022-01-27]. ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-017-0471-6
16. NUSSE, Roel a Hans CLEVERS. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* [online]. 2017, **169**(6), 985-999 [cit. 2022-01-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.05.016
17. STAMOS, J. L. a W. I. WEIS. The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, **5**(1), a007898-a007898 [cit. 2022-01-26]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a007898
18. LIU, Chunming, Yiming LI, Mikhail SEMENOV, et al. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* [online]. 2002, **108**(6), 837-847 [cit. 2022-01-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(02)00685-2
19. FUCHS, Serge Y, Vladimir S SPIEGELMAN a K G SURESH KUMAR. The many faces of β -TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* [online]. 2004, **23**(11), 2028-2036 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1207389
20. VOGES, D., P. ZWICKL a W. BAUMEISTER. The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1999, **68**(1), 1015-1068 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.1015
21. MIKELS, A J a R NUSSE. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* [online]. 2006, **25**(57), 7461-7468 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1210053
22. ACDONALD, Bryan T., Keiko TAMAI a Xi HE. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* [online]. 2009, **17**(1), 9-26 [cit. 2022-01-26]. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016
23. ZENG, Chui-Mian, Zhe CHEN a Li FU. Frizzled Receptors as Potential Therapeutic Targets in Human Cancers. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(5) [cit. 2022-01-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19051543
24. PACLÍKOVÁ, Petra, Tomasz Witold RADASZKIEWICZ, David POTĚŠIL, Jakub HARNOŠ, Zbyněk ZDRÁHAL a Vítězslav BRYJA. Roles of individual human Dishevelled paralogs in the Wnt signalling pathways. *Cellular Signalling* [online]. 2021, **85** [cit. 2022-01-26]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2021.110058

25. ZENG, Xin, He HUANG, Keiko TAMAI, et al. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* [online]. 2008, **135**(2), 367-375 [cit. 2022-01-26]. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.013540
26. WONG, Hing-C., Audrey BOURDELAS, Anke KRAUSS, et al. Direct Binding of the PDZ Domain of Dishevelled to a Conserved Internal Sequence in the C-Terminal Region of Frizzled. *Molecular Cell* [online]. 2003, **12**(5), 1251-1260 [cit. 2022-01-26]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(03)00427-1
27. PRICE, Mary Ann. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes & Development* [online]. 2006, **20**(4), 399-410 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1394306
28. AXELROD, Jeffrey D., Jeffrey R. MILLER, Joshua M. SHULMAN, Randall T. MOON a Norbert PERRIMON. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes & Development* [online]. 1998, **12**(16), 2610-2622 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.12.16.2610
29. KIKUCHI, A. Roles of Axin in the Wnt Signalling Pathway. *Cellular Signalling* [online]. **11**(11), 777-788 [cit. 2022-01-27]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/S0898-6568(99)00054-6
30. CADIGAN, K. M. a M. L. WATERMAN. TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2012, **4**(11), a007906-a007906 [cit. 2022-01-26]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a007906
31. KNIPPSCHILD, Uwe, Andreas GOCHT, Sonja WOLFF, Nadine HUBER, Jürgen LÖHLER a Martin STÖTER. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling* [online]. 2005, **17**(6), 675-689 [cit. 2022-01-25]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2004.12.011
32. JIANG, Shaojie, Miaofeng ZHANG, Jihong SUN a Xiaoming YANG. Casein kinase 1 α : biological mechanisms and theranostic potential. *Cell Communication and Signaling* [online]. 2018, **16**(1) [cit. 2022-01-25]. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/s12964-018-0236-z
33. VENERANDO, Andrea, Maria RUZZENE a Lorenzo A. PINNA. Casein kinase: the triple meaning of a misnomer. *Biochemical Journal* [online]. 2014, **460**(2), 141-156 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20140178
34. FU, Zheng, Tapati CHAKRABORTI, Silas MORSE, Gudrun S. BENNETT a Gerry SHAW. Four Casein Kinase I Isoforms Are Differentially Partitioned between Nucleus and Cytoplasm. *Experimental Cell Research* [online]. 2001, **269**(2), 275-286 [cit. 2022-01-26]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.2001.5324
35. BURZIO, Veronica, Marcelo ANTONELLI, Catherine C. ALLENDE a Jorge E. ALLENDE. Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1 α from zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2002, **86**(4), 805-814 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.10263

36. VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
37. MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Přeložil Bohuslav MATOUŠ. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
38. KANELLOPOULOU, Chryssa, Alex B. GEORGE, Evan MASUTANI, et al. Mg²⁺ regulation of kinase signaling and immune function. *Journal of Experimental Medicine* [online]. 2019, **216**(8), 1828-1842 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20181970
39. GYBEL', T. *Utilizing CRISPR/Cas9 technology for the functional characterization of casein kinase I isoforms in the Wnt signaling pathway* [online]. Brno, 2019 [cit. 2022-01-25]. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Ústav experimentální biologie. V. Bryja.
40. BOSSEMEYER, Dirk. Protein kinases - structure and function. *FEBS Letters* [online]. 1995, **369**(1), 57-61 [cit. 2022-01-26]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(95)00580-3
41. MCCLENDON, C. L., A. P. KORNEV, M. K. GILSON a S. S. TAYLOR. Dynamic architecture of a protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2014, **111**(43), E4623-E4631 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1418402111
42. BUSTOS, Victor H., Oriano MARIN, Flavio MEGGIO, Luca CESARO, Catherine C. ALLENDE, Jorge E. ALLENDE a Lorenzo A. PINNA. Generation of protein kinase Ck1 α mutants which discriminate between canonical and non-canonical substrates. *Biochemical Journal* [online]. 2005, **391**(2), 417-424 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20050717
43. ENDICOTT, Jane A., Martin E.M. NOBLE a Louise N. JOHNSON. The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2012, **81**(1), 587-613 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-052410-090317
44. FLOTOW, H., P. R. GRAVES, A. Q. WANG, C. J. FIOL, R. W. ROESKE a P. J. ROACH. Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J Biol Chem* [online]. 1990, **265**(24), 14264-9 [cit. 2022-01-28]. PMID 2117608. Dostupné z: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(18\)77295-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(18)77295-5)
45. FLOTOW, H. a P. J. ROACH. Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J Biol Chem* [online]. 1991, **266**(6), 3724-7 [cit. 2022-01-28]. PMID 1995625. Dostupné z: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(19\)67854-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(19)67854-3)
46. MARIN, O., V. H. BUSTOS, L. CESARO, et al. A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase I in β -catenin may play a role in casein kinase I targeting of important signaling proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, **100**(18), 10193-10200 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1733909100
47. FULCHER, Luke J. a Gopal P. SAPKOTA. Functions and regulation of the serine/threonine protein kinase CK1 family: moving beyond promiscuity. *Biochemical*

- Journal* [online]. 2020, **477**(23), 4603-4621 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20200506
48. GOOD, Matthew C., Jesse G. ZALATAN a Wendell A. LIM. Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information. *Science* [online]. 2011, **332**(6030), 680-686 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1198701
 49. DUNBAR, Karen, Rebecca A JONES, Kevin DINGWELL, Thomas J MACARTNEY, James C SMITH a Gopal P SAPKOTA. FAM83F regulates canonical Wnt signalling through an interaction with CK1 α . *Life Science Alliance* [online]. 2020, **4**(2) [cit. 2022-01-26]. ISSN 2575-1077. Dostupné z: doi:10.26508/lsa.202000805
 50. DUNBAR, Karen, Thomas J MACARTNEY a Gopal P SAPKOTA. IMiDs induce FAM83F degradation via an interaction with CK1 α to attenuate Wnt signalling. *Life Science Alliance* [online]. 2020, **4**(2) [cit. 2022-01-26]. ISSN 2575-1077. Dostupné z: doi:10.26508/lsa.202000804
 51. LI, Likun, Chengzhen REN, Guang YANG, et al. GLIPR1 Suppresses Prostate Cancer Development through Targeted Oncoprotein Destruction. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(24), 7694-7704 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1714
 52. BUDINI, Mauricio, Germaine JACOB, Ana JEDLICKI, Carolina PÉREZ, Catherine C. ALLENDE a Jorge E. ALLENDE. Autophosphorylation of carboxy-terminal residues inhibits the activity of protein kinase CK1 α . *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2009, **106**(3), 399-408 [cit. 2022-01-25]. ISSN 07302312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.22019
 53. HASSERJIAN, Robert P. Myelodysplastic Syndrome Updated. *Pathobiology* [online]. 2019, **86**(1), 7-13 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1015-2008. Dostupné z: doi:10.1159/000489702
 54. JANOVSKÁ, Pavlína, Emmanuel NORMANT, Hari MISKIN a Vítězslav BRYJA. Targeting Casein Kinase 1 (CK1) in Hematological Cancers. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(23) [cit. 2022-01-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21239026
 55. NEUKIRCHEN, Judith, Wilma M. SCHOONEN, Corinna STRUPP, Norbert GATTERMANN, Carlo AUL, Rainer HAAS a Ulrich GERMING. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leukemia Research* [online]. 2011, **35**(12), 1591-1596 [cit. 2022-01-28]. ISSN 01452126. Dostupné z: doi:10.1016/j.leukres.2011.06.001
 56. MORENO BERGGREN, Daniel, Yasin FOLKVALJON, Marie ENGVALL, et al. Prognostic scoring systems for myelodysplastic syndromes (MDS) in a population-based setting: a report from the Swedish MDS register. *British Journal of Haematology* [online]. 2018, **181**(5), 614-627 [cit. 2022-01-28]. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1111/bjh.15243
 57. HELLSTRÖM-LINDBERG, Eva, Magnus TOBIASSON a Peter GREENBERG. Myelodysplastic syndromes: moving towards personalized management.

- Haematologica [online]. 2020, 105(7), 1765-1779 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2020.248955
58. KUENDGEN, A., M. NOMDEDEU, H. TUECHLER, et al. Therapy-related myelodysplastic syndromes deserve specific diagnostic sub-classification and risk-stratification—an approach to classification of patients with t-MDS. *Leukemia* [online]. 2021, **35**(3), 835-849 [cit. 2022-01-28]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-020-0917-7
 59. ELIAS, H K, C SCHINKE, S BHATTACHARYYA, B WILL, A VERMA a U STEIDL. Stem cell origin of myelodysplastic syndromes. *Oncogene* [online]. 2014, **33**(44), 5139-5150 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2013.520
 60. ARBER, Daniel A., Attilio ORAZI, Robert HASSERJIAN, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [online]. 2016, 127(20), 2391-2405 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-03-643544
 61. LI, Liping, Yue SHENG, Wenshu LI, et al. B-Catenin Is a Candidate Therapeutic Target for Myeloid Neoplasms with del(5q). *Cancer Research* [online]. 2017, **77**(15), 4116-4126 [cit. 2022-01-28]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0202
 62. INOUE, K. a E. A. FRY. Haploinsufficient tumor suppressor genes. *Adv Med Biol* [online]. 2017, **118**, 83-122 [cit. 2022-01-29]. PMID 28680740. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/28680740/>
 63. SCHNEIDER, Rebekka K., Vera ADEMÀ, Dirk HECKL, et al. Role of Casein Kinase 1A1 in the Biology and Targeted Therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell* [online]. 2014, **26**(4), 509-520 [cit. 2022-01-27]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2014.08.001
 64. PELCOVITS, Ari a Rabin NIROULA. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* [online]. 2020, 103(3), 38-40 [cit. 2022-01-28]. PMID 32236160. Dostupné z: <http://rimed.org/rimedicaljournal/2020/04/2020-04-38-hem-onc-pelcovits.pdf>
 65. DE KOUCHKOVSKY, I a M ABDUL-HAY. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer Journal* [online]. 2016, **6**(7), e441-e441 [cit. 2022-01-27]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2016.50
 66. MILLER, Peter G., Fatima AL-SHAHROUR, Kimberly A. HARTWELL, et al. *In Vivo* RNAi Screening Identifies a Leukemia-Specific Dependence on Integrin Beta 3 Signaling. *Cancer Cell* [online]. 2013, **24**(1), 45-58 [cit. 2022-02-14]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2013.05.004
 67. JÄRÅS, Marcus, Peter G. MILLER, Lisa P. CHU, et al. Csnk1a1 inhibition has p53-dependent therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia. *Journal of Experimental Medicine* [online]. 2014, **211**(4), 605-612 [cit. 2022-01-28]. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20131033
 68. KRÖNKE, Jan, Emma C. FINK, Paul W. HOLLENBACH, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1α in del(5q) MDS. *Nature* [online]. 2015, **523**(7559), 183-188 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature14610

69. PETZOLD, Georg, Eric S. FISCHER a Nicolas H. THOMÄ. Structural basis of lenalidomide-induced CK1 α degradation by the CRL4CRBN ubiquitin ligase. *Nature* [online]. 2016, **532**(7597), 127-130 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature16979
70. MATSUOKA, A, A TOCHIGI, M KISHIMOTO, et al. Lenalidomide induces cell death in an MDS-derived cell line with deletion of chromosome 5q by inhibition of cytokinesis. *Leukemia* [online]. 2010, **24**(4), 748-755 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2009.296
71. PELLAGATTI, A., M. JADERSTEN, A.-M. FORSBLOM, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(27), 11406-11411 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0610477104
72. XIE, Chun-Hong, Min WEI, Fei-Yan YANG, Fu-Zhen WU, Lei CHEN, Jian-Kun WANG, Qin LIU a Jin-Xiong HUANG. Efficacy and safety of lenalidomide for the treatment of acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Management and Research* [online]. 2018, **10**, 3637-3648 [cit. 2022-02-14]. ISSN 1179-1322. Dostupné z: doi:10.2147/CMAR.S168610
73. MINZEL, Waleed, Avanthika VENKATACHALAM, Avner FINK, et al. Small Molecules Co-targeting CK1 α and the Transcriptional Kinases CDK7/9 Control AML in Preclinical Models. *Cell* [online]. 2018, **175**(1), 171-185.e25 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2018.07.045
74. CHAPPAQUA, N.Y. *BioTheryX Announces the Initiation of Patient Dosing in a First-in-Man Phase 1 Clinical Trial of BTX-A51* [online]. 16.1.2020 [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://biotheryx.com/biotheryx-announces-the-initiation-of-patient-dosing-in-a-first-in-man-phase-1-clinical-trial-of-btx-a51/>
75. HARNOŠ, Jakub, Jan RYNEŠ, Pavlína VÍŠKOVÁ, Silvie FOLDYNOVÁ-TRANTÍRKOVÁ, Lola BAJARD-EŠNER, Lukáš TRANTÍREK a Vítězslav BRYJA. Analysis of binding interfaces of the human scaffold protein AXIN1 by peptide microarrays. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2018, 293(42), 16337-16347 [cit. 2022-02-25]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA118.005127
76. CULLATI, Sierra, Jun-Song CHEN a Kathy GOULD. Autophosphorylation of the CK1 kinase domain regulates enzyme activity and function. *The FASEB Journal* [online]. 2020, **34**(S1), 1-1 [cit. 2022-02-28]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.2020.34.s1.05808
77. HUART, Anne-Sophie, Nicola J. MACLAINE, Vikram NARAYAN, Ted R. HUPP a Ramón CAMPOS-OLIVAS. Exploiting the MDM2-CK1 α Protein-Protein Interface to Develop Novel Biologics That Induce UBL-Kinase-Modification and Inhibit Cell Growth. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(8) [cit. 2022-02-28]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0043391
78. Gene [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2004, [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

79. KARCZEWSKI, Konrad J., Laurent C. FRANCIOLI, Grace TIAO, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* [online]. 2020, 581(7809), 434-443 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2308-7

11 SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Seznam použitých chemikálií | 26 |
| Tabulka 2: Seznam použitých pufrů, roztoků a médií | 26 |
| Tabulka 3: Seznam použitých enzymů | 27 |
| Tabulka 4: Seznam použitých kitů pro práci s DNA. | 28 |
| Tabulka 5: Seznam použitých markerů | 28 |
| Tabulka 6: Seznam použitých templátů | 28 |
| Tabulka 7: Seznam použitých primerů | 29 |
| Tabulka 8: Seznam použitých vektorů | 30 |
| Tabulka 9: Seznam použitých bakteriálních kmenů | 30 |
| Tabulka 10: Seznam použitých hmyzích buněk | 30 |
| Tabulka 11: Seznam použitých antibiotik | 31 |
| Tabulka 12: Seznam použitých inhibitorů proteáz | 31 |
| Tabulka 13: Seznam použitých protilátek | 31 |
| Tabulka 14: Seznam použitých přístrojů | 31 |
| Tabulka 15: Seznam použitých počítačových programů | 33 |
| Tabulka 16: Parametry použitých PCR programů | 35 |
| | |
| Obrázek 1: Grafické schéma buněčné signalizace | 12 |
| Obrázek 2: Autokrinní, parakrinní a endokrinní buněčná signalizace | 13 |
| Obrázek 3: (A) Rovnice hydrolýzy ATP. (B) Rovnice fosforylace aminokyseliny serin (kyselina L-2-amino-3-hydroxypropanová) | 14 |
| Obrázek 4: Grafické schéma Wnt/ β -katenin signalizační dráhy v inaktivním stavu Wnt-off a aktivním stavu Wnt-on | 16 |
| Obrázek 5: Úsek sekvence proteinu β -katenin s vyznačenými fosforylovanými rezidui | 17 |
| Obrázek 6: (A) Fylogenetický strom isoformů kináz z rodiny CK1 vyskytujících se u člověka. Vytvořeno v programu Simple Phylogeny. (B) Grafické znázornění jednotlivých isoformů CK1 α | 18 |
| Obrázek 7: (A) Zobrazení struktury CK1 α v módu <i>cartoon</i> . (B) Zobrazení struktury CK1 α v módu <i>surface</i> | 19 |
| Obrázek 8: Srovnání kanonické sekvence CK1 α a CK1 α -like | 21 |
| Obrázek 9: Návrh mutantních kináz CK1 α^{K46R} , CK1 α^{D136N} , CK1 α -like K46R a CK1 α -like D136N | 46 |
| Obrázek 10: PCR místně řízené mutagenese | 47 |
| Obrázek 11: Amplifikační PCR genů CK1 α , CK1 α -like, CK1 α^{K46R} , CK1 α^{D136N} a CK1 α -like K46R | 48 |
| Obrázek 12: Koloniová PCR plazmidů 438B-CK1 α , 438B-CK1 α -like, 438B-CK1 α^{K46R} , 438B-CK1 α^{D136N} a 438B-CK1 α -like K46R | 49 |
| Obrázek 13: Koloniová PCR plazmidů 2BT- β -katenin FL, 2BT- β -katenin $^{134-671}$, 2GT- β -katenin FL a 2CT- β -katenin FL | 50 |
| Obrázek 14: Afinitní chromatografie proteinů CK1 α , CK1 α^{K46R} , CK1 α^{D136N} , CK1 α -like a CK1 α -like K46R | 51 |

| | |
|--|----|
| Obrázek 15: Gelová filtrace proteinů CK1 α , CK1 α^{K46R} , CK1 α^{D136N} a CK1 α -like..... | 52 |
| Obrázek 16: Purifikované proteiny CK1 α , CK1 α^{K46R} a CK1 α -like | 52 |
| Obrázek 17: Afinity chromatografie proteinů β -katenin FL (s GST štítkem), β -katenin FL (s MBP štítkem) a β -katenin ¹³⁴⁻⁶⁷¹ (s His ₆ štítkem)..... | 53 |
| Obrázek 18: Gelová filtrace proteinů β -katenin FL s GST štítkem, β -katenin FL s MBP štítkem a β -katenin ¹³⁴⁻⁶⁷¹ s His ₆ štítkem | 54 |
| Obrázek 19: Purifikované proteiny β -katenin ¹³⁴⁻⁶⁷¹ , β -katenin FL (s GST štítkem) a β -katenin FL (s MBP štítkem) | 54 |
| Obrázek 20: Výsledky autofosforylační analýzy..... | 55 |
| Obrázek 21: Kinázová analýza se substrátem Dvl3 v časových intervalech 1 hodina a přes noc | 56 |
| Obrázek 22: Kinázová analýza se substrátem β -katenin v časových intervalech 1 hodina a přes noc..... | 57 |