

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

**Studium role vazebného místa na ribozom R38-K40
u proteinu Rack1 pomocí modelu proteinu Morg1**

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

**Studium role vazebného místa na ribozom R38-K40
u proteinu Rack1 pomocí modelu proteinu Morg1**

**Study of role of the ribosome binding site R38-K40
in Rack1 using the Morg1 protein model**

Autoři: Marina Sokolová

Škola: Gymnázium Jana Nerudy, Hellichova 3, 118 00 Praha 1

Kraj: Hlavní město Praha

Konzultant: Mgr. Věra Chvalová, Mgr. Tomáš Groušl, 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 Praze dne 29. 3. 2022 

Poděkování

Srdečně děkuji Ing. Tomáši Vomastkovi, PhD. za vyhovění mé prosby a mému přijetí na stáž do jeho skupiny Buněčné signalizace na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. Nesmírně si vážím iniciativy založení nového projektu, na kterém jsem se mohla podílet od samého počátku. Největší dík ovšem samozřejmě patří mým školitelům, Mgr. Věře Chvalové a Mgr. Tomáši Groušlovi, PhD. za jejich mimořádnou ochotu a trpělivost, se kterou mně ukazovali základní laboratorní techniky, a také posléze za jejich důvěru během mé samostatné práce. Na závěr bych chtěla vyjádřit vděčnost celé výzkumné skupině za téměř rodinný přístup.

Anotace

Rack1 a Morg1 jsou tzv. „scaffold“ proteiny bez enzymatické aktivity, které váží různé proteiny a napomáhají jim spolu interagovat. Rack1 se váže na 40S podjednotku ribozomu, a to pomocí dvou bazických aminokyselinových zbytků (R38-K40 u *Saccharomyces cerevisiae*, R36-K38 u savčího Rack1). Stejně aminokyselinové zbytky se pravděpodobně podílí i na translokaci Rack1 do stresových granulí. Nicméně esencialita aminokyselin R38-K40 pro vazbu na ribozom a jejich role při přesunu Rack1 do stresových granulí není dosud zcela prokázána. Pro lepší pochopení jejich role jsme vytvořili analogické vazebné místo u strukturně i funkčně podobného proteinu Morg1, čímž vznikla jeho mutantní forma Morg1 S45R. Pro stanovení jeho intracelulární lokalizace za oxidativního stresu a jeho afinity k ribozomu, byl Morg1 S45R imunofluorescenčně označen v modelovém systému MDCK buněk. Jeho kolokalizaci se stresovými granulemi jsme nepozorovali, což naznačuje, že Morg1 S45R se buď neváže na ribozom či váže ve velmi malé míře, anebo že vazba na ribozom není nutná pro přesun do stresových granulí. Souběžně byla pozorována lokalizace wild-type (WT) formy proteinu Morg1. V této práci poprvé prezentujeme převážně jaderné rozložení Morg1 WT v MDCK buňkách. Pro pochopení role tohoto málo probádaného proteinu, byla také provedena jeho delece pomocí CRISPR/Cas9, která ještě nestihla poskytnout ucelené výsledky.

Klíčová slova

Rack1; ribozom; stresové granule; Morg1; scaffoldní proteiny

Annotation

Rack1 and Morg1 are scaffold proteins and their main function is to simplify the interactions between other proteins. Rack1 binds to the ribosome through the pair of amino acids R38-K40 (in *Saccharomyces cerevisiae*; the analogous sequence for mammalian Rack1 is R36-K38), and presumably uses this attachment for its translocation into the stress granules. However, the contribution of R38-K40 to the affinity for the ribosome is questionable and their essentiality for the transduction of Rack1 into stress granules has not been proven yet. To better understand the role of R38-K40 in the binding the Rack1 to the ribosome, we created a mutated protein Morg1 S45R, which contains the analogous binding site. Its ability to bind ribosomes was assessed by monitoring the intracellular localisation of Morg1 S45R in the model of MDCK cells during oxidative stress. We have not observed the shift of Morg1 S45R into stress granules during oxidative stress. This implies that Morg1 either does not bind to the ribosome, or its affinity is too low to be detected, or that the attachment of the Morg1 S45R to the ribosome is not necessary for its transfer to the stress granules. Simultaneously, the localisation of WT Morg1 was monitored. For the very first time, a predominantly nuclear localisation of the Morg1 WT in MDCK cells is shown. Morg1 is not sufficiently explored yet, so to understand its main function in a cell, we have attempted to knock out Morg1 using CRISPR/Cas9, but constructive results are still yet to come.

Keywords

Rack1; ribosome; stress granules; Morg1; scaffold proteins

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretický úvod.....	9
2.1	Scaffoldní proteiny a jejich role v buněčné signalizaci.....	9
2.2	WD-40 rodina proteinů	10
2.3	Rack1	13
2.3.1	Rack1 ve stresových granulích.....	14
2.3.2	Vazba na ribozom a lokalizace Rack1 do stresových granulí	15
2.4	Morg1.....	18
2.4.1	Morg1 a jeho funkce v ERK signalizaci	18
2.4.2	Morg1 a jeho role při hypoxii	20
2.4.3	Další funkce proteinu Morg1	21
2.4.4	Intracelulární lokalizace Morg1	21
3	Hypotéza.....	23
4	Metodika.....	24
4.1	Použitá technika	24
4.2	Použitý biologický materiál	24
4.3	Seznam použitých enzymů.....	24
4.4	Seznam a popis použitých vektorů.....	24
4.5	Seznam použitých oligonukleotidů.....	26
4.6	Seznam použitých protilátek	26
4.7	Použité metody a postup	26
4.7.1	Kultivace buněk a pasáž.....	26
4.7.2	Kryokonzervace	27
4.7.3	Mutageneze Morg1 pomocí PCR.....	27
4.7.4	Purifikace produktů PCR reakce.....	28
4.7.5	Transformace a izolace plazmidu.....	29
4.7.6	Klonování Morg1 S45R do indukibilního vektoru.....	29
4.7.7	Restrikce a ligace gRNA s vektorem PX458	30
4.7.8	Vnesení plazmidů do buněk MDCK (transfekce DNA)	31
4.7.9	Western Blot.....	31
4.7.9.1	Příprava proteinových lyzátů na Western Blot.....	31
4.7.10	Stresování arsenitanem sodným.....	33
4.7.11	Imunofluorescence	33
5	Výsledky.....	35

5.1	Výsledky sekvenace.....	35
5.2	MDCK buněčné linie transformované konstitutivním vektorem pEGFP-C1-mMorg1 WT/S45R nejsou stabilní.....	35
5.3	Klonování úseku Morg1 S45R do inducibilního vektoru pcDNA4-GFP	36
5.4	Výsledky imunofluorescenční mikroskopie a lokalizace Morg1 za stresových a kontrolních podmínek	36
5.4.1	Morg1 WT má převážně jadernou lokalizaci.....	36
5.4.2	Morg1 WT nelocalizuje do stresových granulí.....	37
5.4.3	Mutace S45R nevede k lokalizaci Morg1 do stresových granulí.....	38
5.5	Sledování exprese forem proteinu Morg1 v MDCK buněčných liniích pomocí Western Blot	38
5.6	Ověření delece Morg1 pomocí Western blotu	39
5.6.1	Ověření delece Morg1 pomocí Western Blotu za využití protilátky anti-Morg1 od firmy Upstate	39
5.6.2	Ověření delece Morg1 pomocí Western Blotu za využití králičí protilátky anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific)	40
5.6.3	Ověření delece Morg1 pomocí Western Blotu za využití králičí protilátky anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific) a ověření přítomnosti proteinů ve vzorcích.....	41
6	Diskuse	42
6.1	Inducibilita vektoru stabilizuje transfekovanou buněčnou linii	42
6.2	Morg1 se v MDCK buňkách lokalizuje převážně do jádra.....	43
6.3	Vliv mutace Morg1 S45R na lokalizaci do SG	44
6.4	Sledování exprese forem proteinu Morg1 v MDCK buněčných liniích pomocí Western Blot	46
6.5	Sledování exprese MDCK linií po knock-outu Morg1 pomocí Western Blot.....	47
6.5.1	Sledování exprese MDCK linií po knock-outu Morg1 pomocí Western Blot – I.....	47
6.5.2	Sledování exprese MDCK linií po knock-outu Morg1 pomocí Western Blot – II	48
6.5.3	Sledování exprese MDCK linií po knock-outu Morg1 pomocí Western Blot – III	49
7	Závěr.....	51
8	Použitá literatura.....	52
9	Seznam obrázků	59
10	Seznam tabulek.....	61

1 ÚVOD

Pro intercelulární komunikaci a pro koordinaci vnitřních procesů využívají rostlinné i živočišné buňky specializované kaskády chemických reakcí, které se souhrnně nazývají buněčnou signalizací. Tzv. scaffold proteiny jsou skupina proteinů, jež hrají zásadní roli v buněčné signalizaci. Ačkoli nemají katalytickou funkci, slouží jako platforma pro navázání různých enzymů, což umožňuje jejich vzájemné přiblížení a usnadnění jejich interakce (Hata *et al.*, 2009). Tyto proteiny mohou vázat enzymy ze stejné signální dráhy a zvyšovat tím specifitu této dráhy, nebo naopak propojovat různé signální kaskády a umožňovat jejich dialog (Good, Zalatan a Lim, 2011). Pro tyto proteiny se v anglické literatuře vžilo označení „scaffold protein“ reflektující jejich funkci proteinového lešení. V tomto textu budu tyto proteiny označovat jako scaffoldní.

Proteiny z rodiny WD-40 mají typicky scaffoldní funkci a vytvářejí strukturu nazývanou β -propeler, jež byla tak pojmenována, protože připomíná svým tvarem vrtuli (Chaudhuri, Söding a Lupas, 2008). Tato konformace poskytuje velikou vazebnou plochu, vhodnou pro interakci s několika proteiny naráz. WD-40 proteiny mají současně velmi rigidní strukturu a zároveň jsou velmi flexibilními vazebnými platformami (Stirnemann *et al.*, 2010; Li a Roberts, 2001). Vazebnou flexibilitu jim zaručují dlouhé variabilní úseky v jejich aminokyselinové sekvenci, jež mohou v rámci evoluce mutovat a specializovat se pro interakci s novými vazebnými partnery (Xu a Min, 2011; Chaudhuri, Söding a Lupas, 2008). Proteiny Rack1 a Morg1 jsou oba členy WD-40 rodiny proteinů a sdílejí proto spolu jak strukturní, tak i funkční podobnost. Rack1 je již dlouho známým proteinem (Fong *et al.*, 1986) a účastní se velké řady dějů v buňce jako proliferace, transkripce, proteosyntéza a některých nervových funkcí (Adams *et al.*, 2011). Tato práce se především zaměřuje na vazbu Rack1 na 40S podjednotku ribozomu a mechanismus translokace Rack1 do stresových granulí.

Buněčný stres může být způsoben různými podněty, které vyvolávají většinou jednu ze dvou základních buněčných odpovědí – apoptózu anebo snahu o přežití či adaptaci. Apoptóza je aktivována stresem aktivovanými MAPK kaskádami (*stress-activated MAPK*, SAPK) (Takekawa *et al.*, 2011). Například, po ozáření buňky ionizujícím zářením probíhá navázání kinázy MTK1 na Rack1, což následně aktivuje SAPK kaskádu a indukuje apoptózu (Arimoto *et al.*, 2008).

Naproti tomu, je-li buňka krátkodobě vystavena například oxidativnímu stresu nebo hypoxii, projevuje typicky snahu o přežití. Jedním ze spuštěných procesů je v tento okamžik tvorba stresových granulí (SG) (Takekawa *et al.*, 2011). SG jsou nemebránové organely složené z proteinů a RNA (Riggs *et al.*, 2020). Malé podjednotky ribozomů i Rack1 jsou součástí SG. Rekrutování Rack1 do stresových granulí inhibuje apoptózu spojenou s MTK1. Předpokládá se, že Rack1 je pasivně přenesen do SG díky své vazbě na 40S podjednotku ribozomu (Arimoto *et al.*, 2008). Tato hypotéza ovšem postrádá důkazy a evidence.

Rack1 interaguje s ribozomem prostřednictvím několika vazebných míst (Sengupta *et al.*, 2004). Velká role se přisuzuje páru aminokyselin R38-K40 (toto číslování odpovídá sekvenci Rack1 u *Saccharomyces cerevisiae* a je používáno nejčastěji. V savčí sekvenci Rack1 se

nacházejí tyto aminokyseliny na pozici R36-K38, což je v mnoha studiích přehlíženo. Pro přehlednost bude v této práci využíváno označení R38-K40, podobně jako ve většině odborné literatury). V domnění, že mutace R38D-K40E znemožňuje navázání Rack1 na ribozom, využívá se tato mutovaná forma Rack1 R38D-K40E ke studiu volného Rack1. Tyto dvě aminokyseliny očividně hrají velkou roli ve funkci Rack1, jelikož jejich mutace vede ke znatelným rozdílům ve fenotypu buněk (Kim *et al.*, 2017; Schmitt *et al.*, 2017). Dokonce bylo pozorováno, že vznik stresových granulí nebrání Rack1 R38D-K40E v aktivaci MTK1, že mutovaný Rack1 R38D-K40E je schopný aktivovat MTK1 nehlédě na formaci SG, které běžně brání WT Rack1 (z angl. *wild-type*, tzn. přirozeně vyskytující se) se asociovat s MTK1. Z toho bylo vyvozeno, že mutace R38D-K40E znemožňuje vazbu Rack1 na ribozom a potažmo i jeho lokalizaci do SG (Arimoto *et al.*, 2008). Avšak novější výzkumy prokázaly schopnost Rack1 R38D-K40L se vázat na ribozom, čímž popřely nabídnutou interpretaci (Thompson *et al.*, 2016; Schmitt *et al.*, 2017; Cardenas *et al.*, 2015; Opitz *et al.*, 2017).

Esencialita aminokyselin R38-K40 ve vazbě na ribozom a její role v lokalizaci Rack1 do stresových granulí je tedy kontroverzní. Pokusy o mutaci několika vazebných míst naráz vedly k nestabilním fenotypům a pravděpodobně vytvářely protein s narušenou strukturou (Thompson *et al.*, 2016). Navrhli jsme proto pro studium vazby Rack1 na ribozom odlišný přístup. Místo odstraňování vazebných míst ze sekvence Rack1 jsme se rozhodli je integrovat do podobného proteinu a sledovat jeho afinitu k ribozomům.

Toho jsme docílili mutagenezí proteinu Morg1. Morg1 je, podobně jako Rack1, scaffoldní protein a patří spolu do WD-40 rodiny proteinů (Vomastek *et al.*, 2007). Oproti Rack1 je Morg1 prozatím málo probádaný. Zřejmě působí jako mediátor v několika kaskádách (Vomastek *et al.*, 2007; Hopfer *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2009; Bondeva *et al.*, 2018; Hayase *et al.*, 2013) a lokalizuje signalizační děje do správných buněčných kompartmentů (Vomastek *et al.*, 2007; Hayase *et al.*, 2013; Boggiatto *et al.*, 2014). Z toho důvodu byla u Morg1 pozorována různá intracelulární lokalizace, která se dokonce může v závislosti na buněčném typu a okolních podmínkách lišit (Bondeva *et al.*, 2013). Paralelně ke studiu vazby Rack1 na ribozom je zároveň naším druhým cílem stanovit lokalizaci WT Morg1 v MDCK buněčných liniích.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

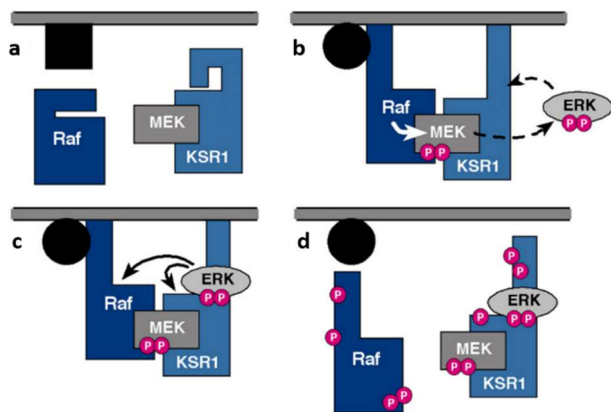
2.1 Scaffoldní proteiny a jejich role v buněčné signalizaci

Na buněčné signalizaci se podílí nespočet různých proteinů a jejich specifické interakce umožňují buňce reagovat na vnější podněty a koordinovat své vnitřní procesy. Odhaduje se, že až 10 % všech savčích proteinů se účastní buněčné signalizace (Good, Zalatan a Lim, 2011). Majíc na vědomí toto obrovské číslo je očividné, že musí existovat neméně komplexní podpůrný systém, který by byl schopný organizovat tuto síť enzymatických interakcí a regulovat transdukcii signálu až po spuštění buněčné odpovědi. Důležitou roli v tomto procesu hrají scaffoldní proteiny.

Scaffoldní proteiny jsou skupinou proteinů, které usnadňují interakce jiných proteinů. Slouží jako vazebné platformy a umožňují přiblížit si navzájem dva či více proteinů (například enzym a substrát) a napomocť jim v jejich funkci (Hata *et al.*, 2009).

Scaffoldní proteiny mohou vázat enzymy a substráty v rámci jedné signální kaskády, čímž zvyšují specifitu této dráhy (Hata *et al.*, 2009; Dhanasekaran *et al.*, 2007) nebo můžou vázat proteiny z různých signálních drah, čímž umožňují různým signálním kaskádám se ovlivňovat a vyvolávat mnohem komplexnější buněčnou odpověď (Loeffler *et al.*, 2017).

Scaffoldní proteiny jsou také schopné lokalizovat proteinové komplexy do žádoucího buněčného kompartmentu (Good, Zalatan a Lim, 2011). Například scaffoldní protein Rack1 propojuje aktivovanou proteinkinázu C (*protein-kinase C*, PKC) s integrinovými receptory, které vážou buňku k extracelulárnímu matrixu (Besson, Wilson a Yong, 2002; Vomastek *et al.*, 2007), a možná i přenáší ribozomy do nových fokálních adhezí (Nielsen, Flygaard a Jenner, 2017), čímž napomáhá buněčné migraci (Nilsson *et al.*, 2004). Scaffoldní proteiny nemusí působit pouze v intercelulárním prostoru, mohou se účastnit i mimobuněčných procesů (Good, Zalatan a Lim, 2011). Scaffoldní proteiny z rodiny MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*) propojují adhezni molekuly, receptory a signální molekuly v mezibuněčných spojích, konkrétním příkladem z MAGUK rodiny může být protein PSD-95, který spojuje neuronové receptory s cytoskeletem a je důležitý pro synaptickou plasticitu v savčím mozku (Funke, Dakoji a Bredt, 2005). Roste počet důkazů, že scaffoldní proteiny nejen usnadňují interakce mezi proteiny, ale hrají i nezanedbatelnou roli v jejich regulaci. Mnohdy jsou to právě scaffoldní proteiny, na co míří regulační mechanismy, a ne na enzymy samotné (Good, Zalatan a Lim, 2011; Malleshaiah *et al.*, 2010). Například scaffoldní protein KSR1 (*kinase suppressor of Ras1*, KSR1) propojuje u savců jednotlivé kinázy v trojstupňové MAPK kaskádě (v tomto případě kináza Raf fosforyluje kinázu MEK, která následně fosforyluje kinázu ERK), přičemž aktivace třetí finální kinázy ERK vede ke zpětné fosforylaci KSR1 a MAPKKK (Raf), což způsobuje jejich disociaci, uvolnění KSR1 z plazmatické membrány a inaktivaci dráhy (obrázek č. 1). KSR1 tudíž nese autoregulační funkci (McKay, Ritt a Morrison, 2009; Good, Zalatan a Lim, 2011).



Obrázek č. 1: Schématické znázornění autoregulačního mechanismu fosforylace scaffoldního proteinu KSR1. (a) Neaktivovaný stav, (b) kináza Raf (MAPKKK) fosforyluje MEK (MAPKK), která následně fosforyluje ERK (MAPK), (c) zpětná fosforylace KSR1 a Raf, (d) disociace scaffoldního proteinu KSR1 a Raf za důsledku fosforylace. Obrázek propůjčen z publikace od McKay, Ritt a Morrison (2009) a upraven pro přehlednost.

Kvůli absenci katalytické funkce, scaffoldní proteiny dlouho zůstávaly nepovšimnuty ve stínu svých vazebných partnerů, jelikož při výzkumu se běžně nejprve usiluje o pochopení samotné reakce a jejího biologického významu, a teprve poté se zkoumá, jak je možné, že reakce probíhají tak specificky, že reagenty se situují na správném místě a že aktivita signalizace je tak precizně regulována (Good, Zalatan a Lim, 2011). Zájem o scaffoldní proteiny byl vyvolán až v 90. letech, kdy byly publikovány první články o multivalentních proteinech a jejich roli v MAPK kaskádách (Chol *et al.*, 1994; Therrien *et al.*, 1996).

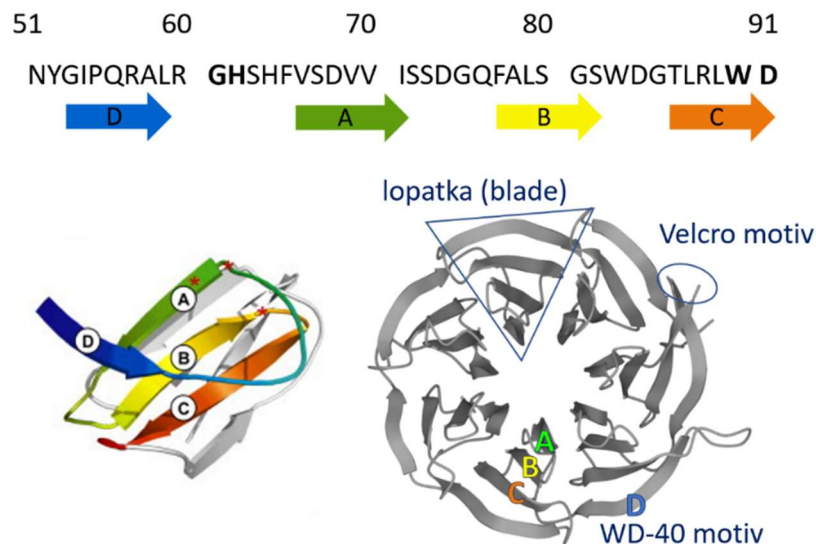
Dnes se tyto proteiny aktivně studují, a dokonce se jim (a dalším procesům jako alternativní mRNA splicing nebo post-translační modifikace) přisvojuje velký význam v evoluci vyšších organismů, jelikož umožnily budovat mnohem komplexnější mechanismy na základě relativně malého množství proteinů (Li a Roberts, 2001). Projekt sekvenování lidského genomu totiž ukázal, že neexistuje přímá spojitost mezi velikostí genomu a výslednou komplexitou organismu. Pro srovnání, lidský genom obsahuje přibližně 20 000 až 25 000 protein-kódujících genů (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) a je pouze dvakrát delší nežli genom octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*, 13 601 protein kódujících genů) (Adams *et al.*, 2000). A přesto je lidský organismus mnohem komplexnější. Není proto náhodou, že se u genomu člověka pozoruje silná expanze genů podílejících se na signalizaci a na její regulaci. Jedna z výrazně rozšířených skupin proteinů v lidském genomu je WD-40 rodina proteinů, jejíž členy jsou typicky scaffoldní proteiny (Li a Roberts, 2001).

2.2 WD-40 rodina proteinů

WD-40 rodina proteinů se vyznačuje opakujícím se motivem, jež byl poprvé zpozorován u β -podjednotky bovinního transducinu (heterotrimerní G-protein) a u jeho kvasinkového (*Saccharomyces cerevisiae*) homologu CDC4. Autoři již tehdy poukázali na typické periodické opakování dipeptidu tryptofan-aspartat (WD), cysteinu a aspartátu (Fong *et al.*, 1986). Souhrnnější definice motivu byla nabídnuta o osm let později Evou Neerovou *et al.* (Neer *et al.*, 1994). Opakující se motiv obsahuje několik konzervovaných segmentů a dva variabilní úseky. Motiv začíná prvním variabilním nekonzervovaným úsekem, jehož délka se může výrazně lišit. Dle definice stanovené v práci Evy Neerové *et al.* smí dosahovat délky až 94 aminokyselin (Neer *et al.*, 1994). Nicméně v pozdějších review se akceptuje i 150 aminokyselin dlouhý první variabilní úsek (Smith *et al.*, 1999). Nejčastěji je však 11-24 aminokyselin dlouhý. Po prvním variabilním úseku následuje konzervovaný dipeptid glycin-histidin (GH), na nějž

navazuje druhý variabilní úsek, který je již mnohem konzervovanější. Je tvořen 23-41 (nejčastěji 27) aminokyselinami a je zakončen konzervovaným dipeptidem tryptofan- aspartát (WD). Úsek od GH po WD (GH-X-WD) se nazývá konzervované jádro WD motivu (Neer *et al.*, 1994). Oba variabilní úseky typicky obsahují mnoho nabitých aminokyselin a prolinu (Van Der Voorn a Ploegh, 1992). Celý motiv průměrně bývá 36-46 aminokyselin dlouhý a vyskytuje se ve WD-40 proteinu 4krát až 8krát (Neer *et al.*, 1994). Motiv není zcela konzervovaný a u některých členů rodiny se mohou vyskytovat odchylky i v konzervovaných místech (Stirnimann *et al.*, 2010). Pro ilustraci byl zvolen v pořadí druhý WD-40 motiv proteinu Rack1, jelikož odpovídá popisu výše (obrázek č. 2).

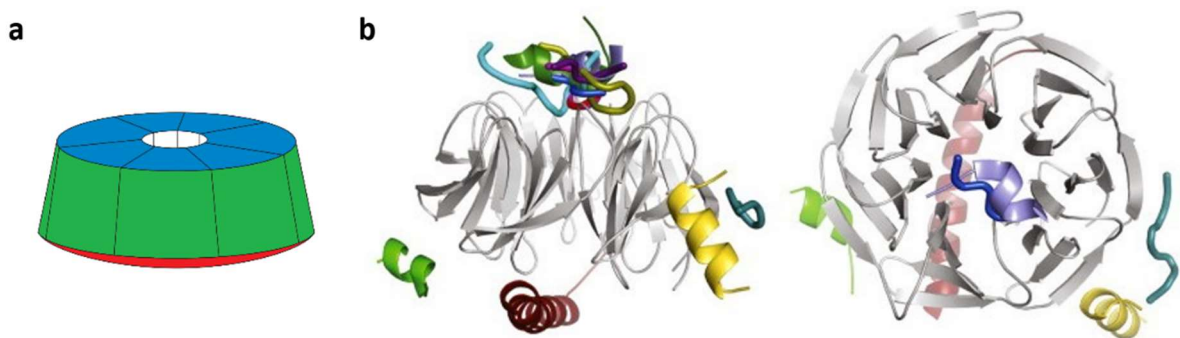
WD-40 proteiny typicky utvářejí strukturu zvanou β -propeler, pro její podobnost vrtuli. β -propelery mohou být složeny ze 4-8 lopatek (anglicky se využívá pojem *blade*), nicméně nejčastěji mají právě 7 lopatek. Každá lopatka je tvořena čtyřmi antiparalelními β -vláknými (anglicky *strand*), která jsou pojmenovaná písmeny od A až po D, směrem z N-konce po C-konec (Chaudhuri, Söding a Lupas, 2008). A-vlákno se nachází nejbližší k centrálnímu průchodu a d-vlákno naopak z vnějšku propojuje jednotlivé lopatky. Opakující se WD-40 motiv začíná přibližně na d-vlákně jedné lopatky a pokračuje na a-, b- a c-vlákně druhé lopatky. D-vlákno je tedy tvořeno prvním variabilním úsekem a spojuje lopatky dohromady. Spojení prvního d-vlákna na N-konci proteinu a posledního c-vlákna na C-konci uzavírá a stabilizuje β -propeler. Toto spojení se nazývá „Velcro motiv“ a je prostředkováno vodíkovými můstky (Xu a Min, 2011; Chaudhuri, Söding a Lupas, 2008; Wall *et al.*, 1995; Stirnimann *et al.*, 2010). Konzervované jádro motivu spolu s dipeptidy GH a WD se nachází na a-, b- a c-vlákněch (Wall *et al.*, 1995).



Obrázek č. 2: Ilustrace WD-40 motivu u lidského proteinu Rack1. V představeném úseku proteinové sekvence jsou vyznačené aminokyseliny tvořící beta-*vlákna* druhého WD-40 motivu od N-konce. Jednotlivá vlákna (a, b, c, d) jsou barevně odlišena jak v aminokyselinové sekvenci, tak v modelované trojrozměrné struktuře Rack1, na které je také zobrazen Velcro motiv, spojující N-konec a C-konec proteinu, a dále jedna ze sedmi lopatek (anglicky se využívá výraz *blade*), tvořících β -propeler. Obrázek na spodní levé straně zobrazuje prostorový detail WD-40 motivu a byl propůjčen z publikace od Strinimanna *et al.* (2010). Aminokyselinová sekvence lidského Rack1 a jeho trojrozměrný model byl vytvořen pomocí internetové stránky www.uniprot.org

Struktura β -propeleru poskytuje WD-40 proteinům užitečné vlastnosti pro jejich scaffoldní funkce. Obecně, struktura proteinů se často výrazně mění v důsledku vazby jiného proteinu či peptidu. Avšak v případě β -propeleru, opakování motivů a symetrické uspořádání lopatek stabilizuje jeho strukturu a brání jeho celkové deformaci (Stirnemann *et al.*, 2010; Li a Roberts, 2001), což pravděpodobně napomáhá WD-40 proteinům současně interagovat s několika vazebnými partnery.

Dále β -propelery disponují velikým vnějším povrchem (obrázek č. 3). Pro své vazebné interakce mohou tedy WD-40 proteiny vyžít horní, spodní i okružní plochu „vrtule“ (Smith *et al.*, 1999; Xu a Min, 2011). Většina proteinových interakcí probíhá v okolí „vstupu“ do centrálního průchodu (Stirnemann *et al.*, 2010), jehož vnitřek je již příliš úzký pro proteinové interakce, ale je možná schopný vázat ionty (Chaudhuri, Söding a Lupas, 2008).



Obrázek č. 3: Znárodnění vazebné plochy WD-40 proteinu. (a) Zjednodušené rozdělení povrchu WD-40 proteinů na horní, spodní a okružní plochu β -propeleru. Obrázek propůjčen z publikace od Smith *et al.* (1999). (b) Profilový a frontální pohled na trojrozměrný model WD-40 proteinu s různými známými peptidovými interakcemi. Nejčastěji se vyskytují na horní ploše β -propeleru v blízkosti centrálního průchodu. Obrázek byl převzat z publikace od Strinimanna *et al.* (2010)

Je pozoruhodné, že sekvence jednotlivých motivů jsou si vždy podobnější v rámci lopatek jednoho proteinu, nežli vůči prostorově odpovídajícím motivům u jiného WD-40 proteinu. Již při objevení prvního WD-40 proteinu byl vyjádřen předpoklad, že mohl vzniknout replikací WD motivu a následně se diferenciovat v průběhu evoluce (Fong *et al.*, 1986). Posléze byly pozorovány WD-40 proteiny s různou mírou podobnosti v sekvenci svých WD motivů, od téměř identických motivů v rámci jednoho proteinu (např. WDR5) až po výrazně odlišené (Rack1), což podporuje tuto teorii. Diferenciace variabilních úseků umožňuje WD-40 proteinům se specializovat a nabývat nových vazebných partnerů. Nízká podobnost mezi jednotlivými motivy v jenom proteinu, spolu s vysokou konzervací sekvence mezi homology, je považována za znak evolučního stáří proteinu (Xu a Min, 2011; Chaudhuri, Söding a Lupas, 2008). Tomuto popisu odpovídá i protein Rack1, který je vysoce konzervovaný napříč svými homology v jiných organismech (Wang, Chen a Zhang, 2003) a sekvence jeho variabilních úseků v jednotlivých WD-motivech se mezi sebou velice liší (Neer *et al.*, 1994). O evolučním stáří Rack1 nevypovídá pouze jeho aminokyslinová sekvence. Rack1 byl dokonce pozorován v zelených řasách *Clamydomonas* (Schloss, 1990), které evolučně vznikly přibližně v období rozdělení eukaryot na rostlinné a živočišné organismy, tudíž zhruba před 0.6 miliardy lety (Morris, 1993). To napovídá, že Rack1 vznikl možná ještě před rozdělením eukaryot na rostliny a živočichy (Neer *et al.*, 1994).

Zároveň jsou známy i WD-40 proteiny (např. WDR5), které projevují velikou vnitřní podobnost a vznikly tedy pravděpodobně později (Xu a Min, 2011). Celkově rodina WD-40 proteinů je velmi stará a je konzervována ve všech eukaryotních organismech. U prokaryot se WD-40 proteiny vyskytují pouze výjimečně (Li a Roberts, 2001; Stirnimann *et al.*, 2010).

Tato práce je zaměřena na konkrétně dva představitele WD-40 rodiny proteinů, na Rack1 a Morg1. Jejich základní charakteristika bude podrobněji představena v následujících kapitolách.

2.3 Rack1

Rack1 (receptor pro aktivovanou protein kinázu 1, *receptor of activated protein C kinase 1*) je člen WD-40 rodiny proteinů. Lidský ortolog Rack1 je složen z 317 aminokyselin a je přibližně 36 kDa hmotný. Lidský gen pro protein Rack1 se nazývá GNB2L1 (*guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2-like 1*), nachází se na 5. chromozomu (5q35.3) a skládá se z 8 exonů a 7 intronů přibližně o 7 kbp (Del Vecchio *et al.*, 2009).

Rack1 je velmi evolučně konzervovaný. Jeho sekvence je konzervována v široké škále organismů od jednoduchých eukaryotických jednobuněčných organismů, přes rostliny, hmyz i savce. Sekvence lidského Rack1 a jeho paralogu u *Drosophila melanogaster* vykazuje 77 % identičnost, u *Arabidopsis thaliana* – 66 %, u *Saccharomyces cerevisiae* – 53 % (Wang, Chen a Zhang, 2003) a u *Tetrahymena thermophila* – 43 %, přičemž největší rozdíly v sekvenci se pozorovaly ve variabilním úseku mezi d-vláknem a a-vláknem na sedmém v pořadí WD-40 motivu (Adams *et al.*, 2011). Rack1 pravděpodobně vznikl ještě před rozdělením eukaryot na rostliny a živočichy (Neer *et al.*, 1994).

U savců je deplece Rack1 embryonálně letální již při stádiu gastrulace (Volta *et al.*, 2012). Knock-out Rack1 u *Drosophila melanogaster* způsobuje larvální letalitu (Kadrmas *et al.*, 2007) a u rostliny *Arabidopsis thaliana* trojitý rack1 (a/b/c) knock-out taktéž způsobil letalitu semen (Guo a Chen, 2008). Rack1 je tedy bezpochyby esenciální pro embryonální vývoj veliké části eukaryot (Nielsen, Flygaard a Jenner, 2017). Avšak u *Saccharomyces cerevisiae* není knock-out Asc1p, ortologu pro lidský Rack1, letální (Gebrasi *et al.*, 2004).

Rack1 byl poprvé izolován z knihovny kuřecí jaterní cDNA a z lidské B-lymphoblastoidní buněčné linie. Izolované sekvence se ukázaly být homologní k již známým členům WD-40 rodiny, konkrétněji k β podjednotkám guanin nukleotid-vážečích proteinů (*guanine nucleotide-binding protein beta subunits*, GP β 1/2) (Guillemot, Billault a Auffray, 1989). Svůj název Rack1 nabyl o několik let později díky studii, ve které byl identifikován jako vazebný partner aktivované protein kinázy C (protein kinase C, PKC) (Ron *et al.*, 1994). V průběhu let se objevilo mnoho dalších vazebných partnerů Rack1. Dnes se o něm ví, že je jako scaffoldní protein zapojen do velkého množství signalizací a základních buněčných dějů jako proliferace, transkripce, proteosyntéza a některé nervové funkce (Adams *et al.*, 2011). Podrobné popsání všech známých funkcí a interakcí, jež Rack1 podstupuje, přesahuje rozsah této práce, která bude proto zaměřena na roli Rack1 ve stresových granulích.

2.3.1 Rack1 ve stresových granulích

Buňka může být vystavená různým typům stresu a buněčná reakce na stres se může v různých případech lišit. Při silném stresu způsobeným například genotoxickými látkami nebo gama-zářením podstupují buňky apoptózu. Tento děj je podporován stresem aktivovanými MAPK signálními dráhami (*stress-activated MAPK*, SAPK). Je-li však působící stres krátkodobý a je vyvolán například hypoxií, virovými infekcemi nebo oxidativním stresem, buňky běžně projevují snahu o adaptaci na stresové podmínky nebo jejich přečkání. V tomto stavu je pro buňky typická formování stresových granulí (SG) (Takekawa *et al.*, 2011).

SG jsou cytoplazmatické nemembránové organely. Jsou složeny z RNA a proteinů. Tvorba stresových granulí začíná pozastavením translace, což je nejčastěji způsobeno fosforylací α -podjednotky eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2 α). Poté probíhá disociace ribozomálních podjednotek a rozpad polyzomů, neboli útvarů složených z několika navazujících ribozomů, které se současně podílejí na translaci jedné molekuly mRNA. K uvolněné mRNA se dále připojují RNA-vážíci proteiny (*RNA-binding protein*, RBP). Součástí SG jsou i samotné translační pre-iniciační komplexy, které jsou také vázány specifickými RBP. Až poté tyto jednotlivé složky SG podléhají procesu nazývanému v angličtině *liquid-liquid phase separation* (LLPS). Jedná se o fázovou separaci kapalin, způsobenou vysokou lokální koncentrací RNA a proteinů, které spolu interagují za vytvoření kondenzovaných útvarů z RNA a bílkovin. Tento proces se často připodobňuje separaci vody a oleje. Uložení specifických proteinů do SG umožňuje rychle a výrazně měnit proteom buňky a dynamicky reagovat na stresové podmínky. Tímto způsobem řídí SG metabolismus RNA během stresu, ovlivňují také signalizaci a fyziologii buněk při stresu (Riggs *et al.*, 2020).

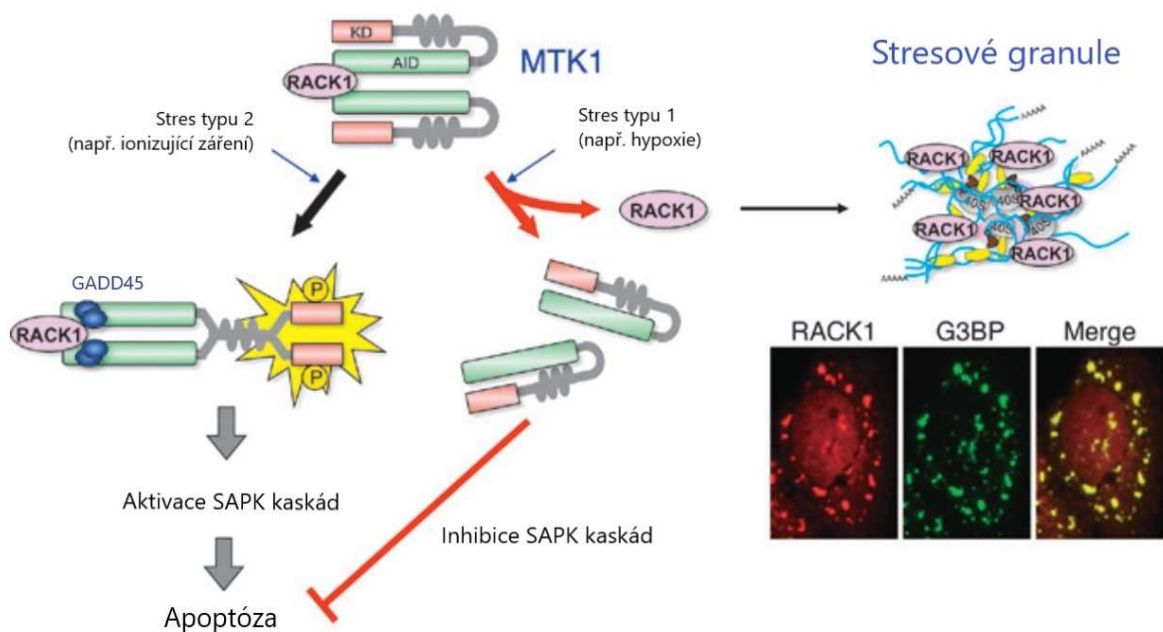
Protein Rack1 je také součástí SG. Volný Rack1 je nezbytný pro aktivaci proteinkinázy MTK1 (MAP three kinase 1) v SAPK signalizacích, což následně vede k stresem vyvolané apoptóze. Translokace Rack1 do SG brání aktivaci kinázy MTK1, a inhibuje apoptózu regulovanou MTK1 (obrázek č. 4) (Arimoto *et al.*, 2008).

Do zmíněných SAPK signalizací patří p38 dráha a JNK dráha, které se řadí do MAPK kaskád. Pro MAPK kaskády je typický třístupňový systém kináz, které zodpovídají za intracelulární přenos signálu. Obecně se tři role kináz v tomto systému se označují jako MAPK kináza kináza (MAPKKK), MAPK kináza, (MAPKK) a MAPK, která již přenáší signál ze cytosolu do jádra. Velké množství MAPKKK umožňuje buňce specificky reagovat na mnoho podnětů a spouštět signalizační kaskádu (Morrison, 2012). Aktivovaný protein MTK1 (MAPKKK) aktivuje MAPKK v SAPK signalizaci, což vede k apoptóze (Matsushita *et al.*, 2020).

Pomocí hmotnostní spektroskopie bylo zjištěno, že Rack1 je jedním z vazebných partnerů MTK1 (Arimoto *et al.*, 2008). Rack1 zodpovídá za aktivaci MTK1 spolu s GADD45 proteiny (GADD45 jsou multifunkční proteiny, jejichž exprese je vyvolávána stresem a podílejí se na řadě funkcí spojených s buněčným stresem, jako například zastavení růstu, oprava DNA a apoptóza). Za absence stresu zůstává MTK1 neaktivní, protože jeho auto-inhibiční doména (AID) na N-konci proteinu inhibuje katalytickou doménu (KD) na C-konci proteinu. V případě stresem indukované exprese proteinů GADD45, vážou se tyto proteiny na N-konec MTK1. To

způsobí disociaci auto-inhibiční domény na N-konci proteinu s katalytickou doménou na C-konci, a navíc zpřístupní dimerizační doménu, jež se nachází mezi nimi (Mita *et al.*, 2002). Aktivace MTK1 je dokončena až vytvořením homodimeru fosforylovaných MTK1 (Takekawa *et al.*, 2011). V této aktivní formě je MTK1 schopen se účastnit SAPK a fosforylovat MAPKK (Matsushita *et al.*, 2020). Role Rack1 v aktivaci MTK1 spočívá ve shlukování dvou (či více) monomerů MTK1 a utváření neaktivních homodimerů MTK1. Tento proces probíhá i za absence stresu a usnadňuje následnou aktivaci MTK1 pomocí GADD45 (Arimoto *et al.*, 2008).

Volný Rack1 tedy podporuje aktivaci MTK1 a SAPK drah. To je potvrzeno experimenty, při nichž deplece Rack1 pomocí krátké vlásečkové RNA selektivně inhibovala aktivaci MTK1. Stejným způsobem je aktivace MTK1 inhibována při formaci stresových granulí, do kterých je Rack1 přenesen z cytosolu (Arimoto *et al.*, 2008; Takekawa *et al.*, 2011). Lokalizace Rack1 do stresových granulí tedy brání aktivaci MTK1 a spuštění apoptózy za mírného stresu (Park *et al.*, 2020; Arimoto *et al.*, 2008; Takekawa *et al.*, 2011).

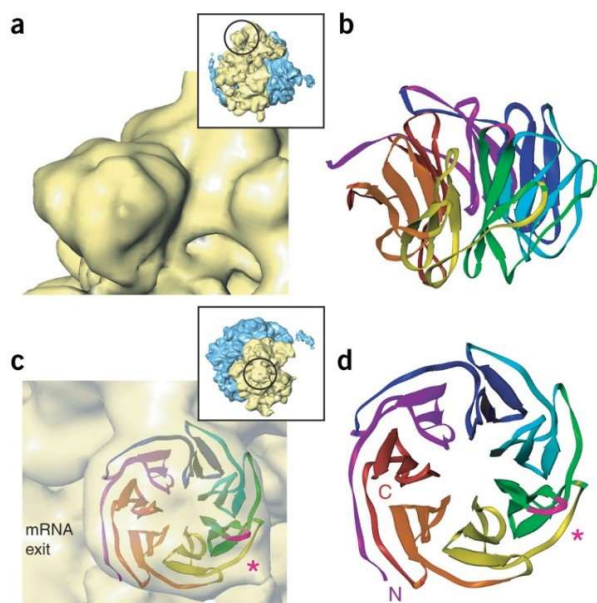


Obrázek č. 4: Mechanismus inhibice apoptózy prostřednictvím translokace Rack1 do stresových granulí. Fluorescenční snímky ukazují na kolokalizaci Rack1 s markerem stresových granulí G3bp za hypoxie. Obrázek byl převzat z publikace Takekawa *et al.* (2011) a přeložen.

Tato funkce stresových granulí je pozorována i u rakovinných buněk, kde je ovšem nežádoucí a zmenšuje efektivitu účinných látek, cílících na aktivaci SAPK a indukci apoptózy. Rychle rostoucí nádory se totiž často nachází v podmínkách hypoxie, v důsledku pomalejšího růstu cév. Hypoxie způsobuje u maligních buněk tvorbu SG, které rekrutují Rack1 a inhibují SAPK kaskády, čímž se inhibuje účinek pro-apoptických léčiv jako etoposid (Takekawa *et al.*, 2011) nebo morusin (Park *et al.*, 2020).

2.3.2 Vazba na ribozom a lokalizace Rack1 do stresových granulí

Předpokládá se, že Rack1 lokalizuje do SG prostřednictvím své vazby na 40S podjednotku ribozomu, jež je součástí SG. Tato hypotéza ovšem prozatím nebyla dostatečně potvrzena.



Obrázek č. 5: Umístění Rack1 na malé 40S ribozomální podjednotce (žlutá). Obrázky porovnávají strukturu ribozomu (a, c) se strukturou Rack1 (b, d). Struktura a lokalizace byla určena pomocí kryoelektronové mikroskopie. Obrázek byl převzat ze studie od Sengupta *et al.* (2004).

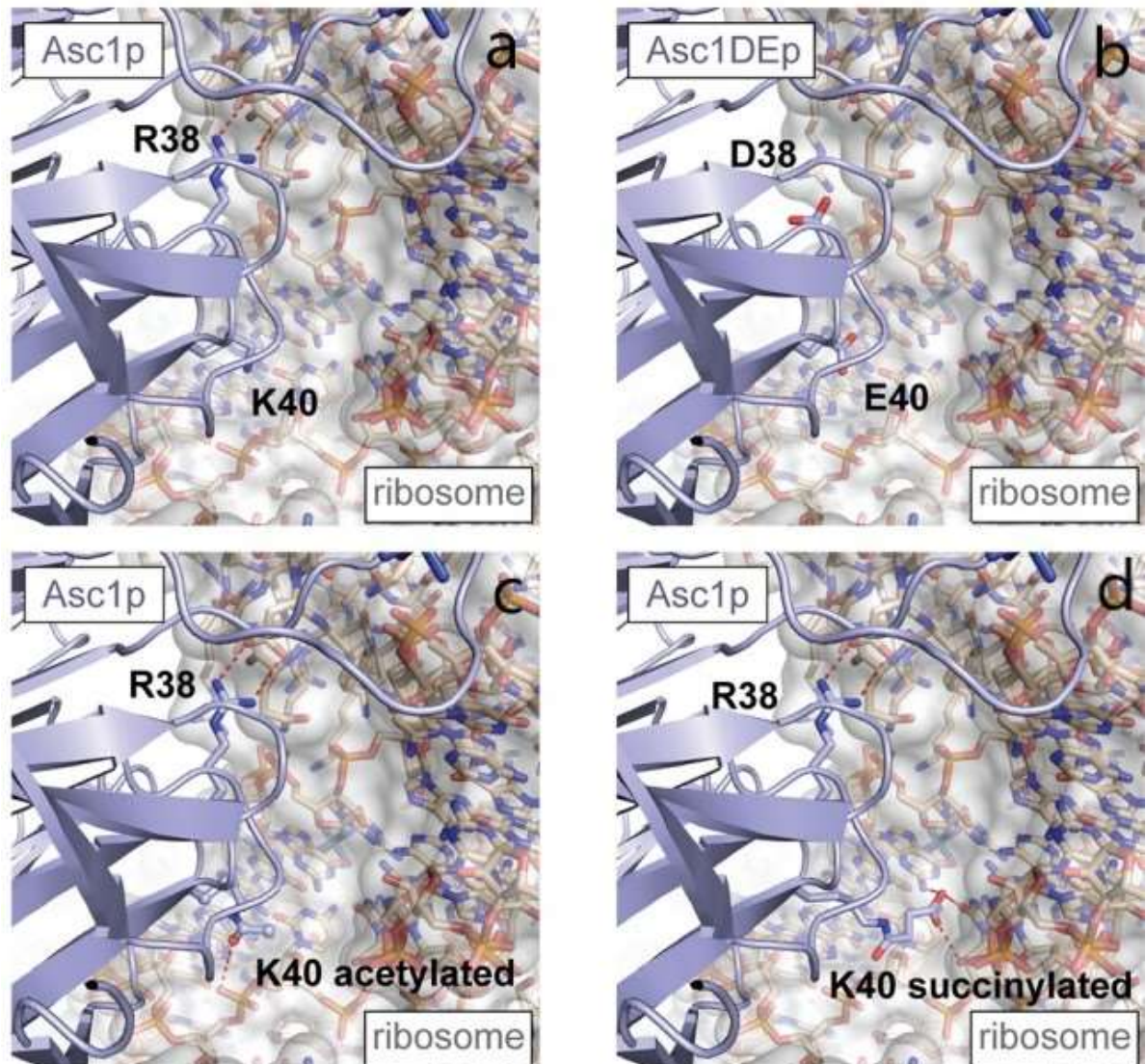
Ribozomální Rack1 lokalizuje na zadní část malé 40S podjednotky ribozomu, poblíž místa výstupu mRNA (obrázek č. 5). Tato pozice na ribozomu je konzervovaná od *Saccharomyces cerevisiae* až po člověka (Coyle, Gilbert a Doudna, 2009) a je zřejmě esenciální pro jeho správnou funkci. Celková plocha dotyku mezi Rack1 a ribozomem dosahuje 1797 Å². Na této ploše má Rack1 několik vazebných míst, které interagují s ribozomálními proteiny a RNA (Nielsen, Flygaard a Jenner, 2017). Největší přínos k celkové afinitě se zdají mít aminokyseliny R38 a K40 (toto číslování odpovídá kvasinkové sekvenci RACK1. U savců se tyto dvě aminokyseliny nachází na pozici R36 a K38, nicméně v literatuře se nejčastěji používá právě označení podle sekvence *Saccharomyces cerevisiae*. V zájmu přehlednosti se toho budu v této práci držet.) (Sengupta *et al.*, 2004). Tyto aminokyseliny interagují převážně s α -helixem2

ribozomálního proteinu eS17. Arginin na pozici 38 v sekvenci Rack1 tvoří vodíkové můstky s aspartátem na pozici 27 v ribozomálním proteinu eS17 (Nielsen, Flygaard a Jenner, 2017). Lysin40 je prostorově ponořen do hloubě ribozomu, avšak je stále příliš daleko od potenciálních vazebných partnerů (nejméně 6 Å). Nicméně, lysin40 může podléhat posttranslačním modifikacím, jako acetylace a sukcinylace, které umožňují tuto vzdálenost překonat. Acetylovaný lysin40 je schopný interagovat s fosfátovým zbytkem ribonukleové báze U1340 a sukcinylovaný lysin40 může interagovat s bázemi A1410 a C1338 (obrázek č. 6) (Schmitt *et al.*, 2017).

Mutace aminokyselin R38-K40 byla proto asociovaná s uvolněním Rack1 z ribozomu. Tato hypotéza byla nejprve potvrzena výzkumy, v nichž mutovaný RACK1 R38D-K40E u *Saccharomyces cerevisiae* neprojevoval žádnou (Sengupta *et al.*, 2004) nebo značně sníženou afinitu k ribozomu (Coyle, Gilbert a Doudna, 2009; Kuroha *et al.*, 2010). Tato mutovaná forma se proto, často využívá pro studium volného Rack1 či vlivu Rack1 na ribozom a translaci (Kim *et al.*, 2017; Schmitt *et al.*, 2017; Gallo *et al.*, 2018). Nápodobně Arimoto *et al.* nepozorovali agregaci RACK1 R38D-K40E do stresových granulí, na základě čehož předpokládají, že vazba Rack1 na 40S podjednotku zodpovídá za translokaci Rack1 do SG.

Nicméně novější práce zpochybňují tyto výsledky. Pro stanovení vazby Rack1 na ribozom využívali předešlé studie ultracentrifugace (Sengupta, *et al.*, 2004; Coyle, Gilbert a Doudna, 2009; Kuroha *et al.*, 2010). Thompson *et al.* poukázali na nedostatky metody, vycházející z rizika disociace ribozomálních proteinů v průběhu centrifugace. Ta může vést k odhalení menšího množství navázaného proteinu nežli množství opravdu navázaného na

ribozom (Valásek *et al.*, 2007). Pro vyvarování se tomuto efektu využili Thompson *et al.* před centrifugací formaldehydový cross-linking. Jejich výsledky naznačují minimální rozdíl mezi Rack1 R38D-K40E a Rack1 WT v jejich afinitě k ribozomu (Thompson *et al.*, 2016). Vazbu Rack1 R38D-K40E na ribozom dále potvrdily i další studie. Je však zřejmě připojen mnohem flexibilněji nežli Rack1 WT. (Schmitt *et al.*, 2017; Cardenas *et al.*, 2015; Opitz *et al.*, 2017). Rozdíly ve fenotypech způsobené mutací Rack1 R38D-K40E jsou tedy nejspíše výsledkem narušení funkce mutovaného Rack1, nikoli jeho disociace od ribozomu (Thompson *et al.*, 2016; Cardenas *et al.*, 2015). Je tedy možné, že nepřesnost nasazení na ribozom omezuje Rack1 v plnění jeho funkcí a vede k rozdílům ve fenotypech mezi R38D-K40E a WT formou.



Obrázek č. 6: Zobrazení interakcí mezi ribozomem a R38-K40 u kvasinkového ortologu Rack1, Asc1p. (a) Arginin38 tvoří vodíkové můstky s ribozomálním proteinem eS17. **(b)** Mutace R38D-K40E (autoři obrázku využívali označení Asc1DEp) narušuje interakci s ribozomem. Acetylace **(c)** a succinylace **(d)** lysinu40 umožňuje jeho interakci s ribozomem. Obrázek byl převzat z publikace od Schmitt *et al.* (2017) a upraven pro přehlednost.

Pokud ale nezpůsobuje mutace R38D-K40E disociaci Rack1 a ribozomu, tak je pozoruhodné, že Arimoto *et al.* nepozorovali translokaci Rack1 R38D-K40E do stresových granulí. Mnoho výsledků poukazuje, že stresové granule inhibují apoptózu (Park *et al.*, 2020; Takahashi *et al.*, 2013; Si *et al.*, 2019). Jedním z předpokládaných mechanismů inhibice je znepřístupnění

proteinu Rack1 a znemožnění aktivace MTK1, mediátoru apoptózy. Mutovaná forma Rack1 R38D-K40E neprojevovala anti-apoptické vlastnosti. Autoři publikace proto dospěli k závěru, že Rack1 lokalizuje do SG prostřednictvím vazby na 40S podjednotku ribozomu a že Rack1 R38D-K40E se na ribozomy nevázal, a tudíž mohl aktivovat MTK1 a spustit apoptózu (Arimoto, 2008). Tato hypotéza je ovšem v rozporu se zmíněnými daty (Thompson *et al.*, 2016; Schmitt *et al.*, 2017; Cardenas *et al.*, 2015; Opitz *et al.*, 2017). Je možné, že větší flexibilita vazby na ribozom umožňuje využít domény, které jsou v případě Rack1 WT nedostupné při navázání na ribozom.

Odstraňování jednotek a sledování reakce biologického systému je základním přístupem v biologickém a biochemickém výzkumu. Nicméně, tento postup nebyl při studiu vazby Rack1 na ribozom prozatím úspěšný. Existují další mutace, které údajně snižují afinitu Rack1 k ribozomu. Dobrým příkladem je mutace D109Y, která podle výsledků ultracentrifugace snižuje afinitu Rack1 k ribozomu dokonce více nežli mutace R38D-K40E (Kuroha *et al.*, 2010). Nicméně, tyto výsledky byly zpochybněny ze stejných důvodů jako u mutace R38D-K40E (Thompson *et al.*, 2016). Při pokusu o sestrojení volných forem Rack1 byla dokonce vytvořena forma s oběma zmíněnými mutacemi Rack1 R38D-K40E-D109Y. Avšak tato forma projevovala velmi nízkou expresi, pravděpodobně za důsledku narušení struktury proteinu (Thompson *et al.*, 2016). V této práci jsme se proto rozhodli využít opačný přístup.

WD-40 proteiny jsou velmi flexibilními scaffoldními proteiny schopné mít mnoho vazebných partnerů (Stirnemann *et al.*, 2010). V rámci své rodiny jsou WD-40 proteiny různě evolučně staré a projevují různou míru konzervace a specializace (Xu a Min, 2011; Chaudhuri, Söding a Lupas, 2008). Uvažovali jsme proto, že namísto odebrání vazebných míst od sekvence Rack1, lze je naopak integrovat do podobného WD-40 proteinu. Pro studium role vazebného místa R38-K40 na lokalizaci Rack1 jsme se proto rozhodli pozorovat WD-40 protein Morg1 S45R, který díky mutaci obsahuje analogické vazebné místo R45-K47.

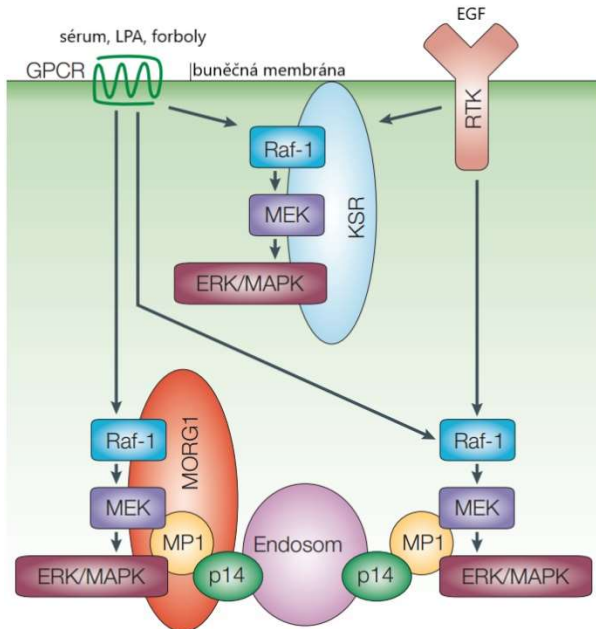
2.4 Morg1

Scaffoldní WD-40 protein Morg1 byl objeven jako vazebný partner MP1, který se podílí na regulaci ERK kaskády (Vomastek *et al.*, 2007). Morg1 je 315 aminokyselin dlouhý, přibližně 34,5 kDa hmotný. Lidský gen pro Morg1 se nachází na 19p13 chromozomu (Lyon *et al.*, 2015). Dle výsledků Northern blotu je kyslí cDNA *Morg1* přibližně 1137 bp dlouhá. Pozorovaná exprese Morg1 se ukázala být velmi silnou ve varlatech a mozku, slabší v srdci, játrech a ledvinách a slabou ve slezině, plicích (Hopfer *et al.*, 2006) a kosterním svalstvu (Vomastek *et al.*, 2007). Dále se také exprese Morg1 našla i lidských neuronech, gliových buňkách a v cévních stěnách (Haase *et al.*, 2009). Homozygotní delece Morg1 u myši je embryonálně letální (10,5. embryonální den) (Hammerschmidt, Loeffler a Wolf, 2009).

2.4.1 Morg1 a jeho funkce v ERK signalizaci

ERK signalizace je jedna z MAPK drah a je aktivovaná různými druhy podnětů, např. cytokiny nebo viry. Signalizace může být spuštěna prostřednictvím aktivace tyrosin-kinázových receptorů, prostřednictvím aktivace PKC nebo receptorů spojených s G-proteinem (*G protein-*

coupled receptors, GPCR) (Guo a Chen, 2020). Nehledě na kontinuální aktivitu ERK a na veliké množství stimulů, na které reaguje, poskytuje buňkám specifické signály, na které jsou poté buňky schopné relevantně biologicky odpovědět. Je známo již několik scaffoldních proteinů, které napomáhají specifitě a regulaci kaskády (Witzel, Maddison a Blüthgen, 2012).



Obrázek č. 7: Schéma přenosu signálu ERK kaskádě a role proteinu MORG1 v ní. Obrázek zobrazuje dvě možnosti aktivace ERK kaskády, pomocí aktivace tyrosin-kinázových receptorů (RTK) a receptorů spojených s G proteinem (GPCR). V obou případech může být signálu usnadněn scaffoldním proteinem KSR, který propojuje jednotlivé kinázy ERK kaskády (Raf-1, MEK a ERK/MAPK), čímž usnadňuje jejich interakci. Natož MORG1 usnadňuje pouze transdukcii signálu vyvolaného aktivací GPCR. Přes vazbu na další scaffoldní proteiny MP1 a p14 je možné přenést celý proteinový komplex na povrch pozdních endosomů. Obrázek byl převzat z publikace od Kolch (2005) a byl následně přeložen.

Jedním z takových scaffoldních proteinů je MP1, který ovšem není typickým scaffoldním proteinem, jelikož je velmi malý (pouze 13,5 kDa) a interaguje pouze se dvěma členy kaskády ERK (Schaeffer *et al.*, 1998; Vomastek *et al.*, 2007). MP1 dále váže protein p14, čímž umožňuje lokalizovat aktivitu ERK do pozdních endosomů (Lunin *et al.*, 2004). Při podrobnějším hledání vazebných partnerů MP1 pomocí kvasinkového hybridního screeningu byl identifikován nový WD-40 protein MORG1. MORG1 propojuje všechny tři stupně MAPK kináz v ERK signalizaci a interaguje, kromě s MP1, také s Raf-1, B-Raf, MEK1/2, ERK1/2. Vytváří spolu s MP1 s kinázami stabilní oligoproteinový komplex, čímž usnadňuje jejich interakci a transdukcii signálu (obrázek č. 7). Jeho vliv na ERK kaskádu se může podle jeho koncentrace lišit. Při snížené expresi MORG1, neuplatňuje se jeho scaffoldní funkce a ERK signalizace je značně oslabená. Mírně zvýšená exprese MORG1 podporuje ERK signalizaci, avšak je-li jeho koncentrace nadměrně vysoká, inhibuje ERK signalizaci, pravděpodobně kvůli kompetitivě jeho molekul a vytváření nefunkčních komplexů. Tímto mechanismem může MORG1 možná regulovat aktivitu ERK signalizace (Vomastek *et al.*, 2007).

Bylo dále zjištěno, že MORG1 podporuje ERK signalizace, pouze specificky aktivovanou přes GPCR. Vliv změny exprese MORG1 na ERK signalizaci byl zaznamenán pouze při ošetření buněk agonisty GPCR, tedy konkrétněji lysofosfatidovou kyselinou (LPA), forbolol, sérem (Vomastek *et al.*, 2007) či angiotensinem II (Bondeva *et al.*, 2012). Nebyl detekován žádný vliv exprese MORG1 na ERK signalizaci spuštěnou pomocí aktivace tyrosinkinázových receptorů (RTK) (receptory pro epidermální růstové faktory (EGF)) (Vomastek *et al.*, 2007).

2.4.2 Morg1 a jeho role při hypoxii

Prozatím nejprozkoumanější funkcí Morg1 je jeho role při hypoxii, při které váže PHD3 (*prolyl hydroxylase domain 3*) a inhibuje HIF (*hypoxia inducible factor*) (Hopfer *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2009; Hammerschmidt, Loeffler a Wolf, 2009; Bondeva *et al.*, 2013; Loeffler a Wolf, 2015; Bondeva *et al.*, 2018). HIF je transkripční faktor, který vzniká při hypoxii heterodimerizací dvou podjednotek HIF- α a HIF- β . Podporuje expresi proteinů, jako například erythropoetin, potřebných pro ochranu a adaptaci před nedostatkem kyslíku. Při normoxii enzym PHD3 hydroxyluje HIF- α , který dále podléhá ubiquitinaci a je degradován v proteazomu. Tímto způsobem PHD3 brání dimerizaci HIF- α s HIF- β a aktivaci transkripčního faktoru HIF. Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému bylo zjištěno, že Morg1 je vazebným parterem a agonistou PHD3 *in vitro* a *in vivo*. Konzervované místo interakce PHD3 s Morg1 se pravděpodobně nachází na horní ploše jedné z lopatek Morg1. Potlačení exprese PHD3 a Morg1 pomocí siRNA signifikantně zvýšilo aktivitu HIF-1. Zvýšená exprese Morg1 je asociovaná se zvýšenou aktivitou a/nebo stabilizací PHD3, což vede ke snížení exprese HIF-1 α (Hopfer *et al.*, 2006).

Nápodobně, byl několikrát pozorován pozitivní vliv snížené exprese Morg1 na stav organismu při hypoxii.

- Heterozygotní myši Morg1 $^{+/-}$, prokazovaly značnou odolnost vůči systematické hypoxii, vyvolanou omezením podílu kyslíku v atmosféře na 10% po dobu 3 dnů (Loeffler a Wolf, 2015).
- Akutní ischemicko-reperfuční poškození ledvin má mírnější průběh u heterozygotních myší Morg1 $^{+/-}$. Oproti WT myši vykazovaly ledviny heterozygotní myší Morg1 $^{+/-}$ za ischemických podmínek vyšší expresi HIF-1 α , HIF-2 α a mRNA erythropoetinu, a naopak oslabení zánětu a redukce prozánětlivých cytokinů (MCP-1, IP-10, MIP-2). Ledviny Morg1 $^{+/-}$ se udržely v lepším celkovém stavu a méně podléhaly apoptóze (Hammerschmidt, Loeffler a Wolf, 2009).
- Exprese Morg1 v bílé mozkové tkáni se snižuje během ischemického poškození, s výjimkou reaktivních astrocytů, které vykazovaly silnou expresi Morg1 (Haase *et al.*, 2009).

Je známo, že Morg1 se spoluúčastní ERK a HIF signalizace. Mimo to, změny v expresi Morg1 zřejmě ovlivňují i NF- κ B signalizaci, regulující zánětlivé procesy. Ošetření WT Morg1 $^{+/+}$ myši lipopolysacharidem zvětšilo počet T-buněk v ledvinách a aktivovalo NF- κ B transkripční faktory. Oproti tomu, Morg1 $^{+/-}$ myš ošetřená stejným způsobem vykazovala výrazně nižší úroveň exprese TNF- α , nižší koncentraci T-buněk v játrech a nižší transkripční aktivitu NF- κ B. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorovaným protizánětlivým účinkem snížené exprese Morg1. Je proto možné, že Morg1 propojuje tyto signální kaskády jako scaffoldní protein (Bondeva *et al.*, 2018). Dalším efektem snížené exprese Morg1 je snížení exprese TGF- β 1. TGF- β 1 je znám pro inhibici exprese PHD2 a následnou akumulaci HIF- α . Přesné mechanismy propojení těchto jevů nejsou ještě známy (Loeffler *et al.*, 2017).

Hypoxické a zánětlivé prostředí může vznikat v důsledku velké řady onemocnění a zhoršovat jejich průběh. Snížená exprese Morgl byla proto navrhnutá jako cílový mechanismus pro terapeutické zlepšení průběhu diabetické neuropatie (Bondeva *et al.*, 2018) a hypoxie ledvin (Loeffler a Wolf, 2015) či mozku (Haase *et al.*, 2009). Adaptace na hypoxii hraje také důležitou roli v tumorigenezi (Jing *et al.*, 2019), pro kterou je také typická zvýšená aktivita ERK signalizace (Guo a Chen, 2020). Morgl se podílí na obou těchto procesech a může proto hrát důležitou roli při tumorigenezi. Tuto hypotézu potvrzuje skutečnost, že zvýšená exprese Morgl podporuje proliferaci maligních buněk při rakovině žaludku a snížená exprese Morgl naopak inhibuje dělení rakovinných buněk (Su *et al.*, 2012).

2.4.3 Další funkce proteinu Morgl

Morgl se také podílí na polarizaci epitelových buněk. Morgl interaguje s proteinem Par6, čímž napomáhá jeho vazbě s atypickou protein kinázou C (aPKC). Dále tento komplex přenáší na apikální stranu epitelové buňky a váže se na membránový protein Crumbs. Tento proces je důležitý pro apiko-bazální polarizaci, jelikož deplece Morgl vedla k uvolnění Par6-aPKC do cytoplazmy, dále také k narušení těsných mezibuněčných spojů *zonulae ocludentes* (anglicky *tight junction*) v jednovrstevném epitelu a narušení formace cyst. Zároveň Morgl pravděpodobně souvisí i s jinými cytoskeletálními ději, poněvadž jeho deplece vedla taktéž k delokalizaci mikrotubulů, basolaterálního markeru beta1-integrinu, a k narušení orientace dělicího vřetenka (Hayase *et al.*, 2013).

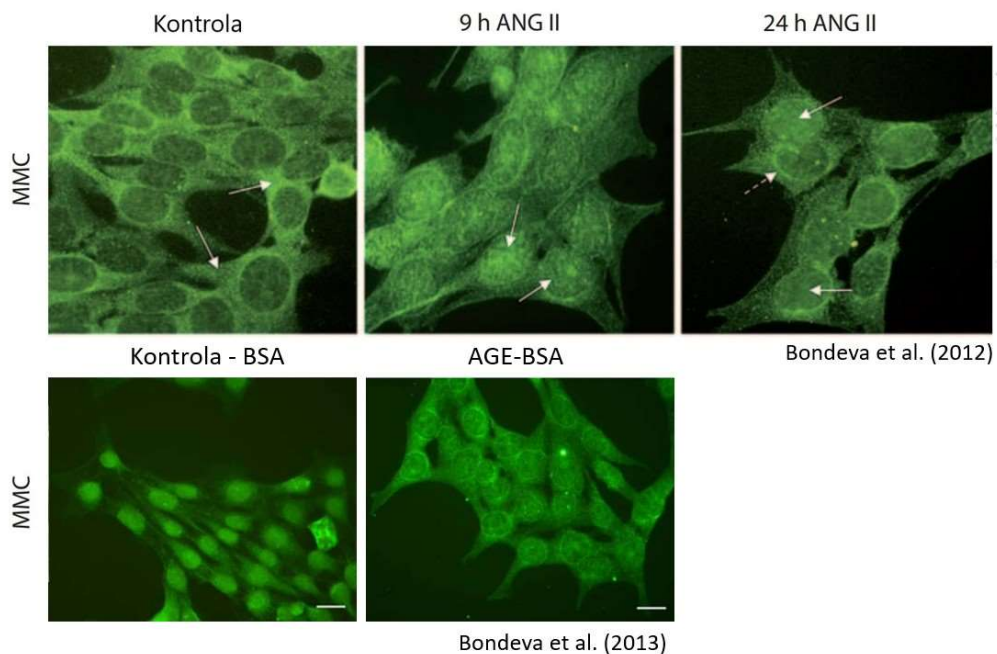
Morgl je multifunkční scaffoldní protein a byl pozorován jeho vztah i k dalším buněčným procesům. Mutace Morgl G127R je pozorována u pacientů s ADHD (Kim *et al.*, 2017). Předpokládá se také jeho role ve vývoji a aktivitě osteoklastů (Lyon *et al.*, 2015). Fluorescenčně značený Morgl byl pozorován ve vezikulárních váčcích (Vomastek *et al.*, 2007). Morgl může spolu se scaffoldními proteiny MP1 a p14 rekrutovat fosforylovaný ERK1/2 na pozdní endosomální váčky a specificky lokalizovat signalizaci (Boggiatto *et al.*, 2014). Morgl byl také detekován v C komplexu spliceozomu, a může se proto teoreticky podílet i na alternativním splicingu (Jurica a Moore, 2002). Navíc, Morgl má pravděpodobně specializované funkce v různých buňkách (Bondeva *et al.*, 2013). Avšak Morgl je stále ještě málo prozkoumaný protein a jeho konkrétní funkce v těchto dějích zůstávají většinou neznámé.

2.4.4 Intracelulární lokalizace Morgl

Nápodobně charakteristická lokalizace a dynamika pohybu Morgl v buňce nejsou zcela pochopeny. Morgl se zřejmě může přesouvat do různých intracelulárních kompartmentů, poněvadž různé publikace popisují různou intracelulární lokalizaci Morgl.

Již bylo zmíněno, že Morgl se může spolu s MP1 a p14 vázat na pozdní endosomy (Boggiatto *et al.*, 2014; Lunin *et al.*, 2004) a možná i na jiné vezikulární váčky (Vomastek *et al.*, 2007). Ve většině publikací se zmiňuje jak jaderná, tak i cytoplazmatická lokalizace Morgl (Bondeva *et al.*, 2012; Bondeva *et al.*, 2013; Hayase *et al.*, 2013; Loeffler *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2012), přičemž převážně byl Morgl pozorován právě v cytoplazmě (Bondeva *et al.*, 2012; Hayase *et al.*, 2013). Podobná lokalizace se pozoruje i u jeho vazebného partnera PHD3

(Hopfer *et al.*, 2006). Exprese a lokalizace MORG1 je zřejmě navíc v jednotlivých buněčných typech specifická. To bylo názorně představené při ošetření myších mesangialních buněk (MMC), proximálních tubulárních buněk (MTC) a podocytů glykovaným bovinním sérem albuminem (Advanced Glycation Endproduct-bovine serum albumine, AGE-BSA), což u MMC způsobilo zvýšení exprese MORG1 a zvýšení enzymatické aktivity PHD3, zatímco u MTC a podocytů byl pozorován opačný efekt. Lokace MORG1 byla u kontrolních MMC buněk a podocytů převážně jaderná, ale z části i cytoplazmatická. Po ošetření AGE-BSA se přesunula velká část proteinu do cytoplazmy (obrázek č. 8). Tento efekt nebyl pozorován u MTC buněk (Bondeva *et al.*, 2013). Avšak toto zajímavé pozorování je trochu kontroverzní, jelikož titíž autoři ve své předešlé publikaci popisovali jinou lokalizaci MORG1 u stejných buněčných linií za téměř stejných podmínek (obrázek č. 8). Jediný rozdíl v metodách kultivace spočíval v tom, že kontrolní linie ve studii z roku 2013 byly navíc ošetřeny BSA (5 mg/1ml), zatímco ve studii z roku 2012 nikoli. Je tedy možné, že BSA má vliv na lokalizaci MORG1, nicméně je zvláštní, že se autoři publikací k této skutečnosti nevyjadřují (Bondeva *et al.*, 2012; Bondeva *et al.*, 2013). Dalším zajímavým pozorováním bylo, že se MORG1 mírně přesouval z cytoplazmy do jádra MMC buněk po ošetření angiotensinem II, mediátorem ledvinových poškození a antagonistou PHD3 (Bondeva *et al.*, 2012). Je tedy zřejmé, že rozložení MORG1 v buňce se může se lišit a měnit. Nicméně lepší pochopení dynamiky pohybu MORG1 v buňce stále vyžaduje podrobnější studium.



Obrázek č. 8: Porovnání lokalizace MORG1 v myších mesangiálních buňkách (MMC) za různých podmínek. V roce 2012 prezentovali Bondeva *et al.* převážně cytoplazmatickou lokalizaci MORG1 v MMC. Poukázali také na částečnou translokaci MORG1 do jádra za důsledku ošetření buněk angiotensinem II (ANG II), mediátorem ledvinových poškození a antagonistou PHD3. Avšak o rok později publikovali autoři článek, ve kterém sledovali vliv glykovaného séra albuminu (AGE-BSA) na lokalizaci MORG1 ve stejných buněčných liniích jako v předešlé studii. Překvapivě, kontrolní linie MMC buněk projevovaly odlišnou lokalizaci v obou experimentech. Jediným rozdílem v metodách kultivace bylo, že v publikaci z roku 2013 byl ke kontrolním liniím přidán BSA. Tatáž dynamika byla pozorována i v podocytech, avšak s méně výraznými rozdíly při přesunu MORG1 mezi jádrem a cytoplazmou. Je tedy možné, že BSA ovlivňuje lokalizaci MORG1, avšak je zvláštní, že autoři se k této skutečnosti nijak nevyjádřili. Obrázky byly přeloženy a upraveny pro přehlednost.

3 HYPOTÉZA

Morg1 WT se nevyskytuje na ribozomech a nepřesouvá se do SG. Naší hypotézou bylo, že mutovaná forma Morg1, která by obsahovala vazebné místo pro 40S podjednotku ribozomu, analogické k R38-K40 u Rack1, by se mohla alespoň částečně vázat na ribozom. Morg1 WT obsahuje lysin na pozici 38, a proto pro vytvoření analogického vazebného místa je dostačující zaměnit serin na pozici 45 za arginin, čímž vznikne mutantní protein Morg1 S45R (obrázek č. 9). Přepokládáme, že případná afinita Morg1 S45R k ribozomu bude nízká za důsledku absence jiných vazebných míst, jež Rack1 obsahuje. Nicméně očekáváme zaznamenat přesun Morg1 S45R do SG, což by potvrdilo jak jeho vazbu na ribozom, tak i esencialitu této vazby pro přesun Rack1 do stresových granulí.

Obrázek č. 9: Porovnání úseků aminokyselinové sekvence Rack1 WT, Morg1 WT a Morg1 S45R. V sekvenci Rack1 WT je tučně vyznačené vazebné místo R38-K40. Morg1 WT již obsahuje lysin na pozici 47 a pro vytvoření analogického vazebného místa na ribozom R45-K47 je dostačující pouze zaměnit serin na pozici 45 za arginin. Tato mutovaná forma je označována jako Morg1 S45R.

				38		40		
Rack1 WT	S	A	S	R	D	K	T	I
				45		47		
Morg1 WT	T	C	G	S	D	K	T	L
Morg1 S45R	T	C	G	R	D	K	T	L

4 METODIKA

4.1 Použitá technika

Pro mutagenezi a amplifikaci plazmidů byl použit přístroj pro polymerázovou řetězovou reakci Biometra Tadvanced, Analytic Jena. Imunofluorescenční snímky byly pořízeny na mikroskopu Olympus BX53 up-right (tzn. neinvertovaný) a pomocí softwarového programu CellSens. Fluorescence živých buněk a úspěšnost transfekce se sledovala na invertovaném mikroskopu Olympus IX51. Autoradiografické filmy na Western Blot byly vyvolány na přístroji Agfa Curix 60.

4.2 Použitý biologický materiál

Experimenty byly prováděné na psích ledvinových epiteliálních buňkách Madin-Darby (z angl. *Madin-Darby Canine Kidney*, MDCK). Transformace vektorů byla provedena v bakterii *Escherichia coli*.

4.3 Seznam použitých enzymů

Tabulka č. 1: Seznam použitých enzymů a jejich výrobce.

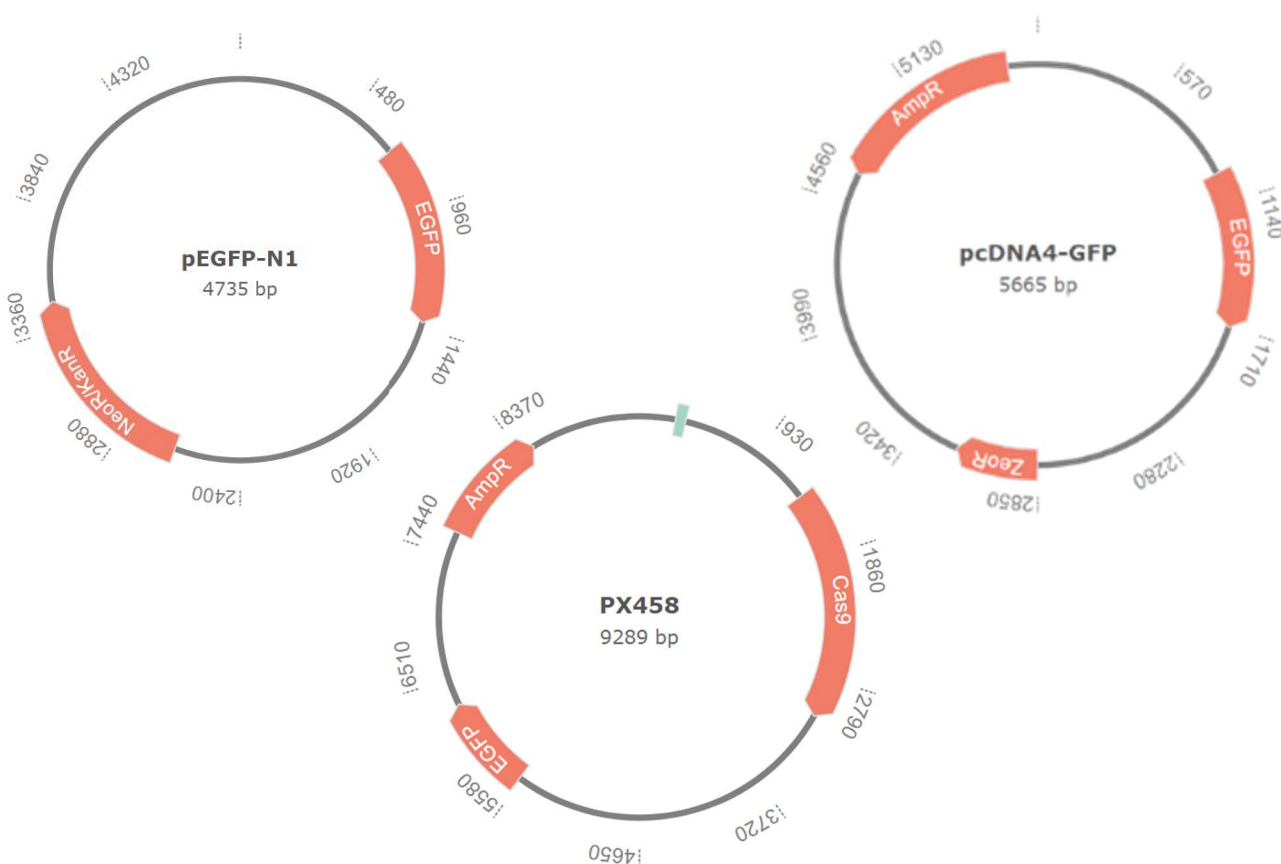
Název	Typ	Výrobce
Trypsin	Proteáza	Biowest
Pfu-X	Polymeráza	Jena Bioscience
HindIII	Restrikční endonukleáza	New England Biolabs
AgeI	Restrikční endonukleáza	New England Biolabs
BpiI	Restrikční endonukleáza	Thermo Scientific
DpnI	Restrikční endonukleáza	New England Biolabs
T4	ligáza	Thermo Scientific

4.4 Seznam a popis použitých vektorů

Pro přípravu MDCK buněčných linií s pozměněnou expresí byly sestrojeny následující plazmidy (tabulka č. 2). Základními vektory byly tři plazmidy bez insertu: pEGFP-N1 s konstitutivní expresí, pcDNA4-GFP s indukibilní expresí a PX458, který byl použit pro knock-out Morg1 prostřednictvím technologie CRISPR/Cas9 (obrázek č. 10). Všechny ostatní použité plazmidy byly sestrojeny insercí potřebné sekvence do těchto vektorů. Výjimkou je plazmid pN1-G3bp1-mCherry, který byl poskytnut Tomášem Groušlem. Plazmidy určené pro delecii Morg1 (PX458 a jeho deriváty) byly zkonstruovány Věrou Chvalovou.

Tabulka č. 2: Seznam použitých plazmidů.

Jméno plazmidu	Exprese	Insert	Buněčná linie vzniklá transfekcí WT MDCK buněk
pEGFP-N1	konstitutivní	-	MDCK-GFP k
pEGFP-C1-mMorg1 WT	konstitutivní	mMorg1	MDCK mMorg1-GFP WT k
pEGFP-C1-mMorg1 S45R	konstitutivní	mMorg1 S45R	MDCK mMorg1-GFP S45R k
pN1-G3bp1-mCherry	konstitutivní	-	MDCK G3bp1-mCh k
pcDNA4-GFP	inducibilní	-	-
pcDNA4-to-mMorg1-GFP WT	inducibilní	mMorg1	MDCK mMorg1-GFP WT i
pcDNA4-to-mMorg1-GFP S45R	inducibilní	mMorg1 S45R	MDCK mMorg1-GFP S45R i
PX458	konstitutivní	-	-
PX458-Morg-gRNA1	konstitutivní	gRNA1	11B6, 11B11, 11C2, 11C4...
PX458-Morg1-gRNA2	konstitutivní	gRNA2	
PX458-Morg1-gRNA5	konstitutivní	gRNA5	



Obrázek č. 10: Grafické znázornění použitých základních plazmidů pEGFP-N1, pcDNA4-GFP a PX458. Všechny tři plazmidy obsahují sekvenci pro GFP (EGFP). U plazmidu PX458 před EGFP leží sekvence pro enzym Cas9 a pro gRNA scaffold (tyrkysově). Dále vektory nesou rezistenci vůči antibiotikům, nezbytnou pro selekci buněk po transfekci či transformaci. Konstitutivní vektor pEGFP-N1 nese rezistenci proti kanamycinu pro bakteriální selekci po transformaci, a selekční oblast neomycin poskytující rezistenci proti geneticinu pro selekci savčích buněk po transfekci (NeoR/KanR). Inducibilní vektor pcDNA4-GFP nese rezistenci proti ampicilinu (AmpR) pro selekci bakteriálních buněk, a proti zeocinu (ZeoR) pro selekci savčích buněk po transfekci. Vektor PX458 obsahuje rezistenci proti ampicilinu, za účelem selekce transformovaných bakterií. Úspěšně transfekované savčí buňky byly v případě vektoru PX458 selektované pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (z angl. Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS) a fluorescence GFP. Obrázek byl vytvořen pomocí programu GenSmart Design (<https://www.genscript.com/gensmart-design/>).

4.5 Seznam použitých oligonukleotidů

Tabulka č. 3: Seznam použitých oligonukleotidů a jejich sekvence.

Označení oligonukleotidů	Sekvence
Morg1 S45R fwd (Eurofins Genomic)	GTGCGGCcGCGATAAAACCC
Morg1 S45R rev (Eurofins Genomic)	GTTTTATCGCgGCCGCACGTC
gRNA1 fwd (Merck)	caccCCCGGAGCTGCCGCAAAAAC
gRNA1 rev (Merck)	aaacGTTTTTGC GGCAGCTCCGGG
gRNA2 fwd (Merck)	caccGCAAAAACGGGTGAAGACCC
gRNA2 rev (Merck)	aaacGGGTCTTCACCCGTTTTTGC
gRNA5 fwd (Merck)	caccACGCTGCTGAGGACGTACAG
gRNA5 rev (Merck)	aaacCTGTACGTCCTCAGCAGCGT
pEGFP-C1-HindIII-fwd (Merck)	CTCAAGCTTTCGAATTCTGC
MorgI-AgeI-rev (Merck)	gctACCGGTaaGCCTGCTCCACCC

4.6 Seznam použitých protilátek

Tabulka č. 4: seznam protilátek používaných při Western blotu (WB) a imunofluorescenčním barvení (IF).

*platí zmíněné ředění, pokud není určeno jinak.

Název primární protilátky	Výrobce	Původní imunizované zvíře	Ředění (WB)	Ředění (IF)
anti-Rack1	Santa Cruz	myš	1:1000	-
anti-GFP	Exbio	králík	1:1000	-
anti-Rsk	Santa Cruz	myš	1:2000	-
anti-G3bp1	Santa Cruz	myš	-	1:50
anti-Morg1	Upstate	králík	1:1000*	1:50
anti-Morg1	Thermo Fisher Scientific	králík	1:1000	-
Název sekundární protilátky	Výrobce	Původní imunizované zvíře	Ředění	
Anti-mouse konjugovaná s HRP	Merck	koza	1:10 000	
Anti-rabbit konjugovaná s HRP	Merck	koza	1: 5 000	
Anti-mouse Alexa Fluor 568	Invitrogen	koza	1:1000	
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen	koza	1:1000	

4.7 Použité metody a postup

4.7.1 Kultivace buněk a pasáž

MDCK buněčné linie byly kultivovány v termostatu (37 °C, 5 % CO₂) ve DMEM médiu (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Merck, dále pouze „médiu“ není-li určeno jinak) obohaceném o 10% FBS (fetal bovine serum; Gibco). Linie byly při inkubaci přisedlé k plastovým Petriho miskám, nebo k 96 jamkové mikrotitrační destičce v případě, že byly separovány pomocí FACS. Po nárůstu kolonie s konfluencí přesahující 80 % byla linie pasážována. Pro pasáž byly buňky nejprve zbaveny media a propláchnuty v předeřátém PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH=7,3), ve kterém byly buňky poté inkubovány až do jejich zakulacení (přibližně 8 min), způsobenému rozvolněním

mezibuněčných spojů. Poté byl PBS nahrazen trypsinem (0,05% trypsin v PBS v kyselině ethylendiamintetraoctové, EDTA) o desetinu objemu misky. Trypsin působil na buňky, dokud se neodpoutaly od povrchu Petriho misky (7-12 min). V ten okamžik byl trypsin inhibován přidáním čerstvého média. Buňky v suspenzi byly naředěny na potřebnou koncentraci a vysety na novou Petriho misku. Potřebná doba pro inkubaci buněk s PBS a trypsinem byla pro každou linii individuální a zvyšovala se, pokud buňky byly již dlouho přisedlé k podkladu. Pro zamezení teplotnímu šoku se dle možnosti omezovala doba pobývání buněk vně termostatu.

4.7.2 Kryokonzervace

V případě potřeby konzervace linie nebyly buňky při pasáži ve finálním kroku naředěny, ale koncentrovány centrifugací (200 g, 3min) a resuspendovány v 1 ml čerstvého média. Kultura se dále smíchala v kryozkumavce s FBS (finální koncentrace 20 %) a DMSO (finální koncentrace 100mM).

Po rozmrazení, pro odstranění DMSO a přebytečného FBS byly buňky rozpuštěny v čerstvém médiu, centrifugovány (200g, 3 min) a resuspendovány v novém přehřátém médiu. Poté byly buňky připravené na vysetí na Petriho misky.

4.7.3 Mutagenese Morg1 pomocí PCR

Pro sestrojení plazmidu nesoucího mutovanou sekvenci *Morg1 S45R* jsme využili polymerázové řetězcové reakce (*polymerase chain reaction*, PCR). Templátem posloužil konstitutivní vektor pEGFP-C1-mMorg1 WT, který obsahuje cDNA kódující myši Morg1.

Byly použity dva primery. Optimální teplota pro nasednutí primeru Morg1 S45R fwd (z anglického *forward* – česky dopředu) na nemutované vlákno odpovídá 61,4 °C, pro již mutované vlákno 64,6 °C. Obdobně, optimální teplotou pro nasednutí primeru Morg1 S45R rev (z anglického *reversed* – zpětný) na nemutovaný řetězec je 62,5 °C a na mutovaný řetězec 65,2 °C. Primery byly zakoupeny u firmy Eurofins Genomic.

Amplifikace mutovaného řetězce byla zprostředkována polymerázou Pfu-X (0,5 U; Jena Bioscience), která je aktivní při 68 °C a syntetizuje nukleotidový řetězec s rychlostí 1000 párů bází za minutu. Vzhledem k délce očekávaného produktu o 5764 párech bází byla pro syntézu řetězce s rezervou zvolena doba 6,5 minut. Reakce probíhala ve vodním roztoku pufru pro polymerázu Pfu-X s rozpuštěnými 2'-deoxyribonukleosid 5'-trifosfáty (dNTP; Fermentas). Přehled složek reakční směsi a jejich objemů, spolu s přehledem použitých teplotních cyklů, jsou zobrazené v tabulkách níže (tabulka č. 5, tabulka č. 6). Celkový objem reakční směsi představoval 20 µl.

Tabulka č. 5: Přehled složek reakční směsi pro PCR mutagenezi a jejich objemy na reakci o 20 μ l.

Složky reakční směsi pro PCR	Objem na jednu reakční směs
pEGFP-C1-mMorg1 WT	0,2 μ l (100 ng)
Morg1 S45R fwd	1 μ l (0,5 μ M)
Morg1 S45R rev	1 μ l (0,5 μ M)
Pfu-X	0,2 μ l
Pfu puf	2 μ l (10x Pfu-X)
dNTP	2 μ l (200 μ M od každého nukleosidu)
H ₂ O	13,6 μ l

Tabulka č. 6: Přehled teplotních cyklů pro PCR mutagenezi.

Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
95 °C	2 min	1
95 °C	20 s	10
61 °C	30 s	
68 °C	6,5 min	
95 °C	20 s	20
64 °C	30 s	
68 °C	6,5 min	
68 °C	10 min	1

4.7.3.1 Příprava gRNA plazmidů pomocí PCR

Za účelem sestavení plazmidů pro metodu CRISPR/Cas9, byly nejprve navrženy a připraveny gRNA. Příprava spočívala v denaturaci navržených oligonukleotidů (gRNA1/2/5) a v jejich následné renaturaci postupným snižováním teploty. Reakční směsi měly objem 50 μ l. Skládaly se ze 2 μ l 100 μ M gRNA1/2/5 fwd a rev (Merck), 5 μ l NEB 2.1. pufru (New England Biolabs) a z vody doplněné do požadovaného objemu reakce. Teplotní režim, za kterého reakce probíhaly, je představen v tabulce níže (tabulka č. 7). gRNA 1/2/5 byly připraveny Věrou Chvalovou.

Tabulka č. 7: Přehled teplotních cyklů pro připojení gRNA oligonukleotidů pomocí PCR.

Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
95 °C	5 min	1
95 °C plynule klesající na 25 °C	70 min	1

4.7.4 Purifikace produktů PCR reakce

Bezprostřední produkty PCR reakce obsahují kromě požadovaného produktu i použité primery, polymerázu, nezreagované dNTP a původní templát. Pro dosažení čistého plazmidu byly produkty reakce purifikovány pomocí „PCR purification kit“ od Quiagen. Postupovalo se dle pokynů výrobce. Pouze gRNA připravené pomocí PCR nebyly purifikovány kitem, jelikož jsou příliš krátké a nezachytí se na membráně.

Přechistění přes kit však neodstraní ze směsi původní templátovou plazmidovou DNA. Přítomnost původního templátu při transformaci by mohla způsobit jeho nežádoucí amplifikaci v některých bakteriálních koloniích a tím i nežádoucí zvýšené množství negativních kolonií. Po purifikaci je proto nezbytné rozštěpit původní templát pomocí DpnI restriktázy od New England Biolabs. Nejprve byly tedy produkty PCR přechistěny přes kit (PCR purification kit; Quiagen). Postupovalo se dle pokynů výrobce. Dále byly do přechistěné DNA (40 μ l) přidán

CutSmart buffer (5 μ l), DpnI restriktáza (0,5 μ l) a voda doplněná do požadovaného objemu reakční směsi (50 μ l). Reakce běžela po dobu 1 h při 37 °C a byla ukončena inaktivací enzymu při 80 °C po dobu 20 min.

4.7.5 Transformace a izolace plazmidu

Pro amplifikaci byly plazmidy transformovány v *Escherichia coli*, které byly vystaveny teplotnímu šoku 42 °C po dobu 2 min, protože během stresových podmínek bakterie ochotněji přijímají exogenní DNA. Před i po teplotním šoku byly buňky udržovány na ledu, transformované bakterie byly následně vysety na misky s LB médiem, agarem a selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc při 37⁰ C. Narostlé jednotlivé bakteriální kolonie byly zaočkovány do 2 ml kapalného LB média obsahující selekční antibiotikum, inkubovány přes noc při 37⁰ C. Při následné izolaci plazmidu se postupovalo se podle doporučeného protokolu kitu „QIAprep Miniprep Kit“ nebo „QIAprep Midiprep Kit“ (Qiagen). Izolované plazmidy byly poslány firmě SeqMe (<https://www.seqme.eu>) na Sangerovo sekvenování pro ověření úspěšnosti mutageneze.

4.7.6 Klonování Morg1 S45R do inducibilního vektoru

V předchozích experimentech bylo zjištěno, že MDCK buněčné linie transfekované vektorem a konstitutivně exprimující Rack1 nebo Morg1, mají tendenci být nestabilní a velmi rychle ztrácejí expresi transgenních proteinů. Tomu lze předejít klonováním genu *Morg1 WT* nebo *Morg1 S45R* (*Morg1 WT/S45R*) do inducibilního vektoru pcDNA4-GFP, a expresi transgenních proteinů indukovat 24h před experimentem pomocí tetracyklinu nebo doxycyklinu.

4.7.6.1 Amplifikace *Morg1 WT* a *Morg1 S45R*

Pro přenesení sekvence *Morg1 WT/S45R* z konstitutivního plazmidu pEGFP-C1-mMorg1 WT/S45R) do inducibilního plazmidu (pcDNA4-GFP), byl gen nejprve amplifikován pomocí metody PCR (viz. 4.7.3). Jako templát posloužily dva konstitutivní vektory pEGFP-C1-mMorg1 WT/S45R. Byly zvoleny dva primery, které ohraničovaly insert z obou stran. Jednalo se o primer pEGFP-C1-HindIII-fwd (Merck) s nasedací teplotou 55,2 °C a primer Morg1-AgeI-rev (Merck) s nasedací teplotou 49,6 °C a 72, 1 °C. Jejich využití způsobilo amplifikaci pouze úseku plazmidu mezi nimi, tedy *Morg1 WT/S45R*. PCR reakce byla připravena a provedena podobně jako při mutagenezi (tabulka č. 8, tabulka č. 9).

Tabulka č. 8: Přehled složek reakční směsi pro amplifikaci insertu z vektoru pomocí PCR a jejich objemy na reakci o 50 μ l.

Složky reakční směsi pro amplifikaci genového úseku	Objem na jednu reakční směs
pEGFP-C1-mMorgI WT/S45R	0,5 μ l (100 ng)
pEGFP-C1-HindIII-fwd	2,5 μ l (0,5 μ M)
MorgI-AgeI-rev	2,5 μ l (0,5 μ M)
Pfu-X	0,5 μ l
Pfu pufr	5 μ l (10x Pfu-X)
dNTP	5 μ l (200 μ M od každého nukleotidu)
H ₂ O	34 μ l

Tabulka č. 9: Přehled teplotních cyklů pro PCR mutagenezi.

Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
95 °C	2 min	1
95 °C	20 s	10
49 °C	30 s	
68 °C	1 min 15 s	
95 °C	20 s	20
55 °C	30 s	
68 °C	1 min 15 s	
68 °C	10 min	1

4.7.6.2 Restrikce insertu a ligace s inducibilním vektorem pcDNA4-GFP

Produkty PCR reakcí byly přečištěné přes kit (PCR purification kit; Qiagen) dle pokynů výrobce a rozpuštěné v elučním pufru od výrobce kitu do objemu o 30 μ l.

Dále se namíchala reakční směs pro naštěpení koncových úseků insertu (*MorgI WT/S45R*), což umožní jeho komplementární navázání na koncové části inducibilního vektoru. Tím se vytvoří cirkulární plazmid. Štěpení je zajištěno restrikčními endonukleázami HindIII a AgeI (New England Biolabs) a probíhalo podle doporučeného protokolu výrobců restriktáz, tudíž alespoň 1 h při 37 °C. Reakce byla poté zastavena inhibicí restriktáz nahříváním na 80 °C po dobu 20 min. Produkt restrikce byl přečištěn přes kit (PCR purification kit; Qiagen), dle pokynů výrobce. Tímto způsobem byly připraveny inserty (*MorgI WT/S45R*, 973 nukleotidů) pro ligaci pomocí T4 ligázy (o aktivitě 5U; Thermo Scientific) do linearizovaného inducibilního vektoru pcDNA4-GFP (5745 nukleotidů). Postupovalo se dle pokynu výrobce ligázy. Ligace běžela 2 hodiny při pokojové teplotě a byla poté přerušena zahříváním směsi na 65 °C po dobu 10 min. Následně byla část směsi (10 μ l) přidána do bakteriální kultury (*E. Coli*). Dále proběhla transformace vektoru, dle již popsaného protokolu popsaného (viz. 4.7.5).

4.7.7 Restrikce a ligace gRNA s vektorem PX458

Sestrojené gRNA (viz. 4.7.3.1) byly vloženy do vektoru PX458, který nese sekvence pro enzym Cas-9, GFP a selekční oblast poskytující transfekovaným buňkám ampicilinovou rezistenci. Pro vložení insertu byl plazmid štěpen podle protokolu přiloženého k použité restriktáze BpiI (Thermo Fisher Scientific). Reakční směs byla inkubována 2h při 37 °C. Restriktáza byla inaktivována v 65 °C po dobu 20 min. Naštěpený linearizovaný vektor byl izolován pomocí kitu (PCR purification kit; Qiagen). Dále byl naštěpený plazmid ligován s gRNA1/2/5

za využití T4 ligázy, opět podle protokolu od výrobců. Ligace probíhala při pokojové teplotě po dobu 2 hodin nebo při 16° C přes noc. Ligáza byla inaktivována při 65° C během 10 min.

4.7.8 Vnesení plazmidů do buněk MDCK (transfekce DNA)

Připravené plazmidy byly zvláště transfekovány do MDCK buněčných linií pomocí Lipofectamine 2000 Invitrogen. Postupovalo se dle pokynů výrobce. Pro selektivní kultivaci buněk transfekovaných konstitutivními plazmidy byl k liniím přidán geneticin (400 µg/ml). Inducibilní linie byly selektovány zeocinem (150 µg/ml). Po selekci by měly přežít pouze transfekované buňky, jelikož přijatý vektor nese sekvenci pro rezistenci proti použitému antibiotiku.

Účinnost transfekce se sledovala na fluorescenčním mikroskopu díky GFP obsaženému ve vektorech. Buněčné linie s inducibilními vektory byly pro vizualizaci indukovány tetracyklinem (1µg/ml) a to 24h před pozorováním. Po mikroskopii byly linie zpasážovány a opět selektovány.

Buňky, které byly transfekované vektorem pX458-Morg1-gRNA1/2/5 nebyly selektovány po transfekci antibiotikem, ale byly jednotlivě separovány pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (z angl. Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS). Metodu bylo možné použít díky přítomnosti genu pro GFP v plazmidu pX458. Každá separovaná transfekovaná buňka založila svou linii.

4.7.9 Western Blot

Western Blot je laboratorní metoda, která umožňuje stanovit expresi vybraného proteinu v buňce. Vzorky proteinových lyzátů se nejprve naředí na stejnou koncentraci, aby bylo možné následně porovnávat relativní množství proteinů v nich. Proteiny ve vzorku jsou poté separovány dle velikosti pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a následně přeneseny na nitrocelulóзовou membránu, na které jsou označeny primárními a sekundárními protilátkami. Sekundární protilátky na sobě nesou enzym křenovou peroxidázu (*horseradish peroxidase*, HRP). Následně jsou používány chemiluminiscenční substráty vyzařující v přítomnosti HRP světlo, které lze zachytit na film, čímž se zajistí vizualizace jednotlivých proteinů. Díky velikostní separaci, jsou proteiny na membráně „v zástupu“. Proto při vizualizaci se protein zobrazuje na filmu jako proužek, pro který se využívá anglický výraz *band*. Band dokazuje přítomnost proteinu v lyzátu, a vypovídá o jeho relativním množství v lyzátu, čímž tedy poskytuje představu i o jeho expresi v buňce.

4.7.9.1 Příprava proteinových lyzátů na Western Blot

Pro sledování proteinové exprese pomocí metody Western Blot byl z buněčné kultury odebrán 1 ml buněk v suspenzi. Odebraná suspenze byla stočena během 3 min při 370g za pokojové teploty. Pelet byl resuspendován ve vychlazeném 120-150 µl RIPA pufru, složeného z 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 1% deoxycholátu sodného, 0,1% sodium dodecylsulfát (SDS) a 1mM EDTA. Výsledné pH RIPA pufru odpovídá 7,3. Je vhodné zvolit nejmenší možný

objem RIPA pufru za účelem dosažení nejvyšší možné koncentrace proteinů, avšak objem musí být dostačující pro pohodlnou následující manipulaci z lyzátem. Po resuspendování z RIPA pufru následovalo stočení po dobu 15 min při 18 000 g, po kterém byl ze dna zkumavky odebrán pelet s DNA. Proteinové lyzáty byly uloženy v -20 °C.

4.7.9.2 Sjedení koncentrace a objemu proteinových lyzátů pro Western Blot

U proteinových lyzátů byla změřena koncentrace pomocí kitu od Pierce BCA Protein Assay Kit. Postupovalo se dle návodu výrobce. Proteinové lyzáty byly dále naředěny na stejnou společnou koncentraci a objem v Laemmli pufru složeného z 50mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glycerolu, 1% β -merkapt ethanolu, 12,5mM EDTA a 0,02% bromfenolové modře. Všechny složky Laemmli pufru byly zakoupeny u firmy Merck. Lyzáty se ředily Laemmli pufrům v poměru 5 dílů lyzátu :1 díl Laemmli pufru. Dále bylo ke každému vzorku přidáno 0,6 μ l 1,4-dithiothreitolu (DTT) na 10 μ l vzorku. Směs se následně vařila po dobu 3 až 5 min ve 100 °C.

4.7.9.3 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát-polyakrylamidová gelová elektroforéza)

Vzorky proteinových lyzátů byly poté separovány podle molekulové hmotnosti pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Jeden plátek gelu byl složen ze dvou typů gelu – gelu separačního a zaostřovacího. Objemy složek gelů jsou určeny v tabulce č. 10. Všechny použité látky byly zakoupeny u firmy Merck.

Tabulka č. 10: Přehled složek separačního a zaostřovacího polyakrylamidového gelu.

10% separační gel o 15 ml		4% zaostřovací gel o 5ml	
Složky gelu	objem	Složky gelu	objem
H ₂ O	6,75 ml	H ₂ O	3,1 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	3,75 ml	1,5M Tris (pH 8,8)	1,25 ml
10% SDS	150 μ l	10% SDS	50 μ l
29% akrylamid, 1% bisakrylamid	5 ml	29% akrylamid, 1% bisakrylamid	650 μ l
TEMED	10 μ l	TEMED	7 μ l
10% APS	50 μ l	10% APS	35 μ l

Na zatuhlé gely byly přeneseny proteinové vzorky a proteinový marker. Elektroforéza běžela v elektroforetickém pufru složeném z 25mM Tris-HCl, 192mM glycinu a 0,1% SDS. Byl nastaven konstantní proud o 15 mA na jeden zaostřovací gel o tloušťce 0,75 mm. Po 20 až 30 minutách vzorky přejdou ze zaostřovacího gelu na gel separační. Po tomto okamžiku lze zvýšit proud na 30 mA na jeden gel. Separace trvá průměrně 40 až 60 min.

4.7.9.4 Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu – blotování

Po separaci proteinů pomocí SDS-PAGE je potřeba je přenést z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu (od Merck, s póry o 0,45 μ m). Z toho důvodu se gel pokrývá nitrocelulózovou membránou a dále se obaluje ve filtračních papírech a porézních vložkách. Vzniká tak několikvrstevný útvar, tzv. *sandwich* složený z porézní vložky, filtračních papírů,

gelu a nitrocelulózkové membrány. Přenos proteinu probíhal v blotovacím zařízení po dobu 90 min při napětí 90-110 V.

4.7.9.5 Blokování

Po ukončení blotování následovala blokace nespecifických či neobsazených míst na membráně pro zvýšení specifity vazby protilátek. Nejdříve byly membrány propláchnuty v 0,05% roztoku Tween 20 v PBS (PBS-T). Dále se membrány 30-60 min za pozvolného třepání blokovaly v 3% roztoku odtučněného mléka (Santa Cruz) v PBS-T. Následně se membrány propláchly PBS-T a rozstříhly na dva kusy, podle velikostí proteinů, které bylo potřebné vizualizovat, tak aby bylo možné jednotlivé části membrány inkubovat zvlášť s rozlišnými protilátkami (tabulka č. 4, 4.6) Pro kontrolu rovnoměrného nanesení proteinových lyzátů na polyakrylamidový gel se použila imunodetekce proteinu Rsk-1, laminu nebo Rack1, jejichž exprese by měla být ve všech vzorcích konstantní.

4.7.9.6 Inkubace s primární, sekundární protilátkou a striping

Membrány byly inkubovány minimálně po dobu 3 h při pokojové teplotě (nebo přes noc při 4 °C) s primárními protilátkami ředěnými v poměru 1:1000, pokud není zmíněno jinak. Pouze primární protilátka anti-Rsk, byla vždy ředěna v poměru 1:2000, kvůli zkušenosti s příliš intenzivním výsledným signálem. Sekundární protilátky byly ředěné v 3% roztoku nízkotučného mléka v PBS-T. Anti-mouse protilátka konjugovaná s HRP byla ředěna v poměru 1:10 000, anti-rabbit protilátka konjugovaná s HRP – v poměru 1:5000. Obě sekundární protilátky byly inkubovány s membránami po dobu 1 h při pokojové teplotě za pozvolného třepání. Následoval cyklus tří proplachování membrán v PBS-T pokaždé po dobu 5-10 min. Na závěr byly membrány propláchnuty v PBS a byl k nim přidán luminogenní substrát (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce), čímž se zcela připravily na vyvolávání v temné komoře.

V případě potřeby odstranit již navázané protilátky, byly membrány 15 min inkubovány s 0,2M NaOH (tzv. *stripping*) a propláchnuty destilovanou vodou. Poté bylo možné membrány opět blokovat a inkubovat s novými protilátkami. Signály byly detekovány na autoradiografických filmech pomocí vyvolávacího přístroje Agfa Curix 60.

4.7.10 Stresování arsenitanem sodným

Pro sledování stresových granulí byly buněčné linie vystavené oxidativnímu stresu, který byl vyvolán přidáním arsenitanu sodného (NaAsO_2 , 0,5mM konečná koncentrace v kultuře). Následně byly použity metody jako fluorescenční mikroskopie nebo Western Blot.

4.7.11 Imunofluorescence

Imunofluorescence je metoda využívaná pro vizualizaci tkání, buněk či buněčných struktur. Spočívá ve specifické vazbě protilátek na epitopy vybraných struktur. Vizualizaci prostředkují fluorochromy, které jsou navázané na protilátky. Pro imunofluorescenční barvení se musí

kultury nejprve zafixovat, což brání rozkladu buňky a zajišťuje zachování její původní morfologie. Následuje permeabilizace membrány, která zpřístupňuje protilátkám průchod k vnitřním buněčným strukturám. Dalším krokem je blokace, která má za účel zvýšit specifitu navázání primární protilátky. Poté již probíhá samotná inkubace s protilátkami a montování preparátu mezi podložní a krycí sklíčko.

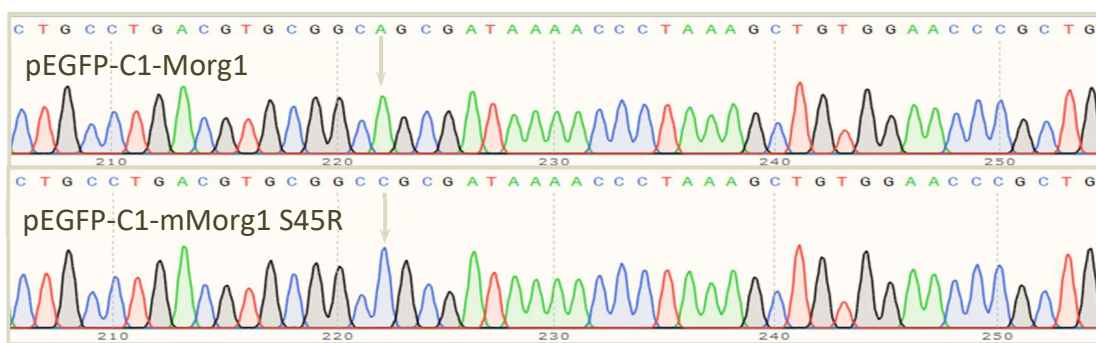
Před imunofluorescenčním barvením byla nejprve připravena krycí sklíčka. K předeheatým krycím sklíčkům ve dvanácti jamkové destičce byl na 30-60 min přidán 1 ml 0,1% roztoku fibronektinu (EDM Milipore) v PBS (1 μ l/ μ g fibronektinu v 1 ml PBS), který umožňuje následující přichycení buněk na sklíčko.

Mezitím proběhla příprava buněčných linií určených k imunofluorescenčnímu barvení. U linií vyžadujících indukci exprese plazmidu či stresování arsenitanem sodným byly tyto kroky provedeny v souladu s již zmiňovaným protokolem (4.7.8, 4.7.10). Dále byly buňky po dobu 15 minut fixovány v PFA (4% roztok paraformaldehydu v 100mM KPO₄, pH 6,5) a poté linie prošly cyklem tří proplachování 1 ml 100mM KPO₄ (pH 6,5). Následně se buněčné membrány permeabilizovaly pomocí 1 ml 1% Tritonu-X100 ve 100mM KPO₄ (pH 6,5) po dobu 10 min při pokojové teplotě. Následoval další cyklus čtyř proplachování 1 ml 1% BSA ve 100mM KPO₄ (dále jen BSA-KPO₄), po kterém preparát zůstal v 1 ml BSA-KPO₄ po dobu minimálně 1 h, za účelem blokace nespecifických epitopů. Poté se linie inkubovaly ve tmě při pokojové teplotě po dobu 2-3 h s primárními protilátkami, naředěnými 1:50 v BSA. Po opláchnutí 1 ml BSA-KPO₄ byly preparáty inkubovány dobu 1 h, opět ve tmě a pokojové teplotě s kozími sekundárními protilátkami anti-mouse a anti-rabbit Alexa Fluor od Invitrogen, ředěnými 1:1000 v BSA. Po dalším cyklu proplachování, složeném ze tří propláchnutí 1 ml BSA-KPO₄, jednoho propláchnutí v 100mM KPO₄ (pH 6,5) a jednoho propláchnutí v destilované vodě, byl preparát nakonec připevněn na podložní sklíčko za použití 5 μ l montovacího média (Vectashield s DAPI, Vector Laboratories) na vzorek. Hrany podložního a krycího sklíčka byly pro udržení vlhkosti preparátu hermeticky izolovány. Sklíčka lze skladovat ve tmě ve 4 °C.

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky sekvenace

Za účelem sestrojení plazmidu pEGFP-C1-mMorg1 S45R, nesoucího myší mutovanou sekvenci pro Morg1 S45R, byla využita PCR reakce (4.7.3). Templátem pro reakci posloužil plazmid pEGFP-C1-mMorg1 WT a mutagenese byla zajištěna specifickými primery Morg1 S45R rev/fwd od Eurofins Genomic. Mutace spočívala v jedno-nukleoidové substituci adeninu za cytosin. Předpokládaným výsledkem byla záměna kodónu pro serin (AGC) na kodón pro arginin (CGC) (obrázek č. 11). Úspěšnost mutagenese byla ověřena, pomocí Sangerova sekvenování, které bylo provedeno firmou SeqMe (<https://www.seqme.eu>).

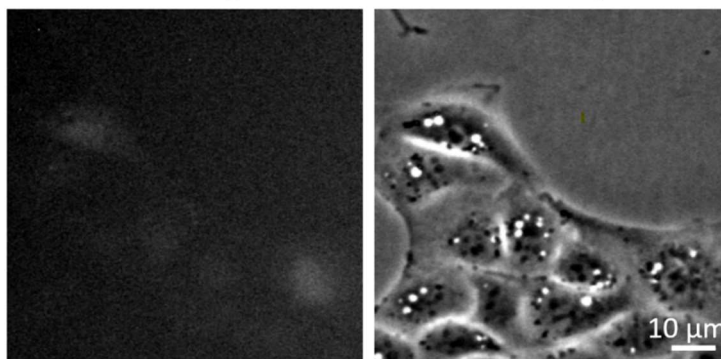


Obrázek č. 11: Grafické znázornění výsledků Sangerova sekvenování. Na horním diagramu je zobrazen úsek vektoru pEGFP-C1-MORG1 obsahující kodón pro S45 (AGC). Na dolním diagramu je zobrazen úsek vektoru pEGFP-C1-mMORG1 S45R obsahující kodón pro R45 (CGC). Mutovaný nukleotid je zvýrazněn šipkou.

5.2 MDCK buněčné linie transformované konstitutivním vektorem pEGFP-C1-mMorg1 WT/S45R nejsou stabilní

Mutagenézí vektoru pEGFP-C1-mMorg1 WT byl připraven vektor pEGFP-C1-mMorg1 S45R. Vektory byly po ověření mutagenese dále amplifikovány pomocí *Escherichia coli*, izolovány a transfekovány do WT MDCK buněk (4.7.4–4.7.8). Další den byla úspěšnost transfekce ověřena pomocí fluorescenční mikroskopie. Nicméně exprese konstitutivního plazmidu pEGFP-C1-mMorg1 WT nebyla stabilní a fluorescenční signál během několika dní vymizel (obrázek č. 12).

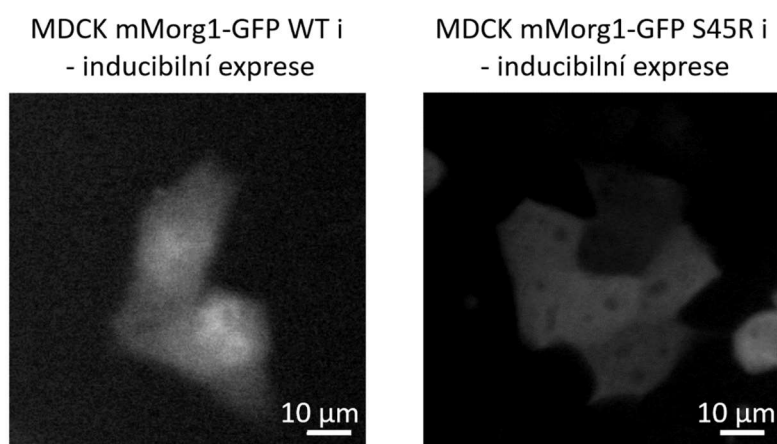
MDCK mMorg1-GFP WT k - konstitutivní exprese



Obrázek č. 12 Ověření exprese Morg1-GFP WT v linii „MDCK mMorg1-GFP WT k“ čili v MDCK buňkách transfekovaných konstitutivním vektorem pEGFP-C1-mMorg1 WT. Den po transfekci linie vykazovala zřetelnou fluorescenci, která ovšem již po čtyřech dnech nebyla detekována. Oba snímky zachycují stejné místo na misce čtyři dny po transfekci linie. Levý snímek byl pořízen pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým polem. Pravý snímek byl pořízen pomocí fázového kontrastu.

5.3 Klonování úseku Morg1 S45R do inducibilního vektoru pcDNA4-GFP

Transfekce MDCK buněk konstitutivními plazmidy pEGFP-C1-mMorg1 WT/S45R nevedla k stabilní expresi Morg1-GFP WT/S45R. Z tohoto důvodu, byly inserty klonovány z konstitutivního vektoru do inducibilního vektoru pcDNA4-GFP (4.7.6). Výsledné vektory byly pojmenovány pcDNA4 mMorg1-GFP WT a pcDNA4 mMorg1-GFP S45R. Tyto inducibilní vektory byly dále transfekovány do WT MDCK buněčné linie. Pro ověření transfekce byly vzniklé buněčné linie („MDCK-Morg1-GFP WT i“ a „MDCK-Morg1-GFP S45R i“) ošetřeny tetracyklinem, což indukovalo expresi vektoru (4.7.8). Expresi fúzaného proteinu Morg1-GFP WT/S45R byla zaznamenána pomocí fluorescenční mikroskopie (obrázek č. 13).



Obrázek č. 13: Ověření exprese Morg1-GFP WT/S45R v „MDCK mMorg1-GFP WT/S45R i“ liniích čili v MDCK buňkách transfekovaných inducibilními vektory pcDNA4-mMorg1-GFP WT/S45R. Obě linie vykazovaly po indukci tetracyklinem zřetelnou fluorescenci, způsobenou expresí Morg1-GFP. Oba snímky byly pořizeny čtyři dny po transfekci pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým zorným polem.

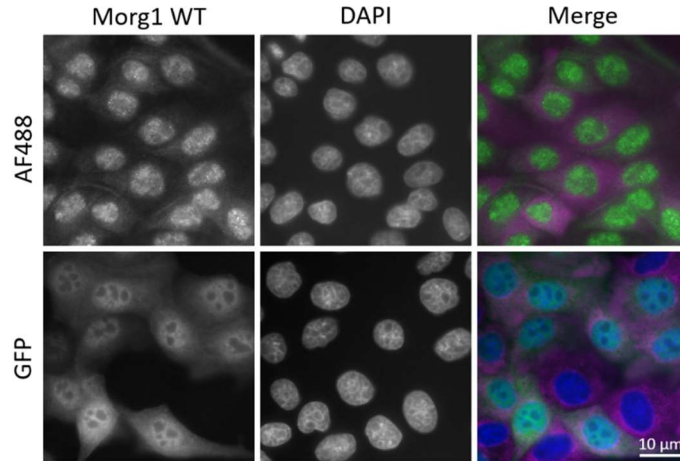
5.4 Výsledky imunofluorescenční mikroskopie a lokalizace Morg1 za stresových a kontrolních podmínek

Za účelem stanovení intracelulární lokalizace Morg1 WT a Morg1 S45R v MDCK buňkách za oxidačního stresu (NaAsO₂) i za kontrolních podmínek (bez vyvolání oxidačního stresu), byla využita fluorescenční mikroskopie. Porovnání lokalizace Morg1 WT/S45R a stresových granulí bylo umožněno fluorescenčním značením markeru stresových granulí, proteinu G3bp1. Ektopické proteiny (exprimované z transfekovaného vektoru) jsou fluorescenčně značené díky fúzi s GFP nebo s mCherry. Endogenní proteiny byly značeny imunofluorescenčně. Všechny sledované linie MDCK buněk byly transfekované. Z toho důvodu je vždy jeden ze dvou sledovaných proteinů značen imunofluorescenčně a druhý pomocí fúze s fluorescenčním proteinem (například ektopický Morg1-GFP a endogenní G3bp1 značený pomocí protilátky Alexa Fluor 568).

5.4.1 Morg1 WT má převážně jadernou lokalizaci

Lokalizace Morg1 WT za kontrolních podmínek se sledovala ve dvou liniích. V linii „MDCK mMorg1-GFP WT i“ byl Morg1-GFP WT vizualizován pomocí fúze s GFP. V linii „MDCK

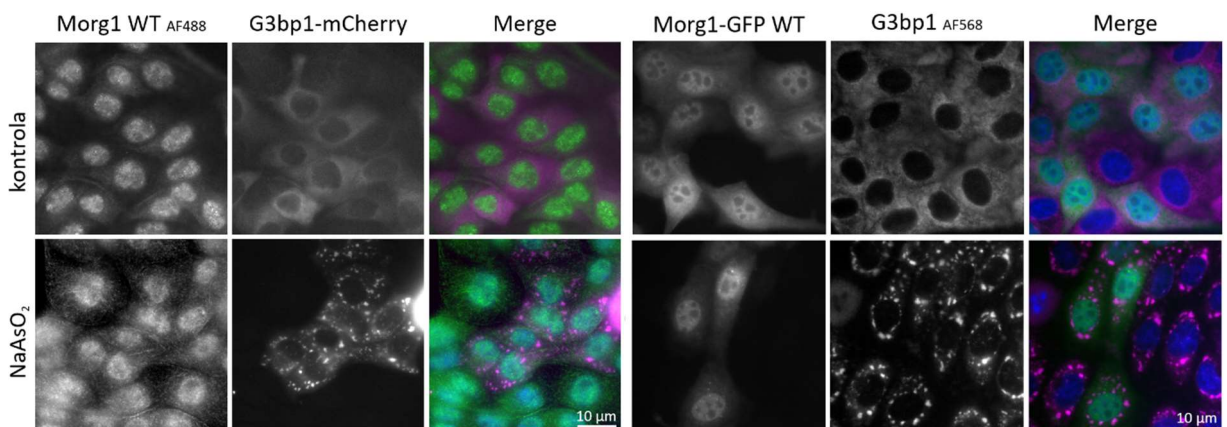
G3bp1-mCh k“ byl Morg1 WT imunofluorescenčně barven pomocí primární protilátky anti-Morg1 od firmy Upstate a sekundární protilátky značené Alexa Fluor 488. V obou liniích jsou jádra značena pomocí DAPI. Ektopický i endogenní Morg1 WT byl lokalizován především v jádře. Z části byl defúzován i v cytosolu, přičemž jeho největší koncentrace zůstávala v okolí jádra (obrázek č. 14).



Obrázek č. 14: Sledování lokalizace endogenního Morg1 WT pomocí králičí primární protilátky anti-Morg1 a myší sekundární protilátky Alexa Fluor 488 (AF488) a ektopického Morg1-GFP WT (GFP). Buněčná jádra jsou označena pomocí DAPI. Sledování probíhalo za kontrolních podmínek. Oba způsoby vizualizace MORG1 WT poukazují na jeho převážně jadernou lokalizaci, s částečným přesahem i do cytosolu. Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým zorným polem.

5.4.2 Morg1 WT nelokalizuje do stresových granulí

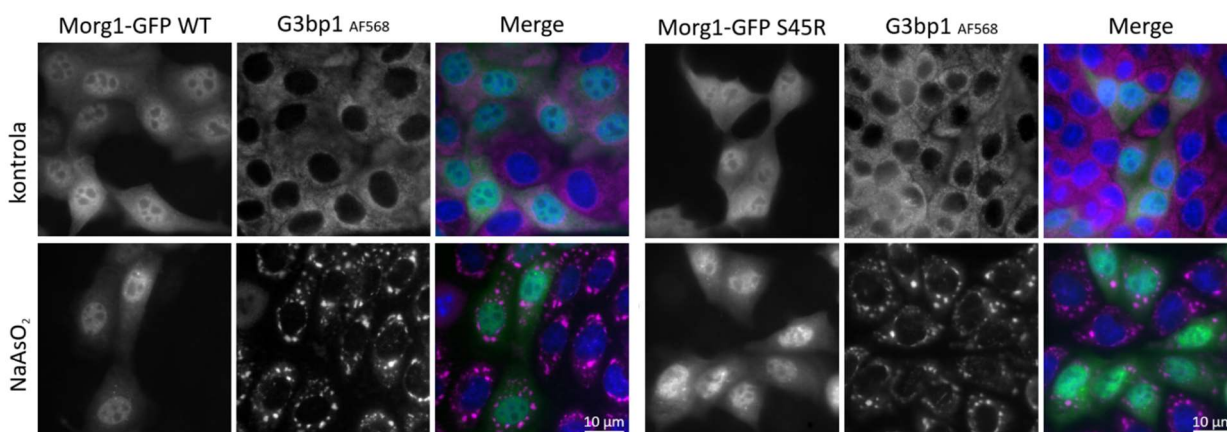
Sledovala se lokalizace Morg1 WT za stresových (0,5mM NaAsO₂, 30 min) i kontrolních podmínek (buňky nebyly vystaveny žádnému stresu). Značení markeru stresových granulí G3bp1 umožnilo porovnat rozmístění Morg1 a SG. Lokalizace Morg1 WT nebyla oxidativním stresem nijak zdatelně ovlivněna. Výsledek se u ektopického Morg1-GFP WT i u endogenního Morg1 WT nelišil (obrázek č. 15).



Obrázek č. 15: Porovnání lokalizace Morg1 WT a G3bp1 za oxidačního stresu (NaAsO₂) i za kontrolních podmínek (kontrola). Ektopický G3bp1-mCherry (v levém panelu) i endogenní G3bp1 značený pomocí primární protilátky anti-Morg1 od firmy Upstate a Alexa Fluor 568 (AF568, panel vpravo) zobrazuje umístění SG. Snímky potvrzují, že Morg1 WT nelokalizuje do SG. Pozorováním endogenního Morg1 značeného protilátkou Alexa Fluor 488 i ektopického Morg1-GFP se dosáhlo stejného výsledku. Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým zorným polem.

5.4.3 Mutace S45R nevede k lokalizaci Morg1 do stresových granulí

Proteiny Morg1 a Rack1 mají velmi podobnou strukturu. Vazebné místo R38-K40 u Rack1 zodpovídá z velké části za jeho schopnost vázat se na ribozom (viz kap. 2.3.2) (Sengupta *et al.*, 2004). Morg1 WT toto vazebné místo neobsahuje a na ribozomech se nevyskytuje, respektive obsahuje pouze lysinový zbytek K47 odpovídající K40 u Rack1. Pro vytvoření analogického vazebného místa R45-K47 byl u Morg1 WT zaměněn serin na pozici 45 za arginin, čímž vznikla mutantní forma Morg1 S45R. Naší hypotézou bylo, že Morg1 S45R by mohl nabýt afinity k ribozomu a přecházet do SG podobně jako Rack1. Byly proto vytvořené MDCK buněčné linie exprimující mutovaný Morg1-GFP S45R. Byla porovnána lokalizace Morg1-GFP S45R a G3bp1 za oxidativního stresu a kontrolních podmínek. Lokalizace mutovaného Morg1-GFP S45R, podobně jako lokalizace Morg1 WT, nebyla oxidačním stresem nijak znatelně ovlivněna (obrázek č. 16).



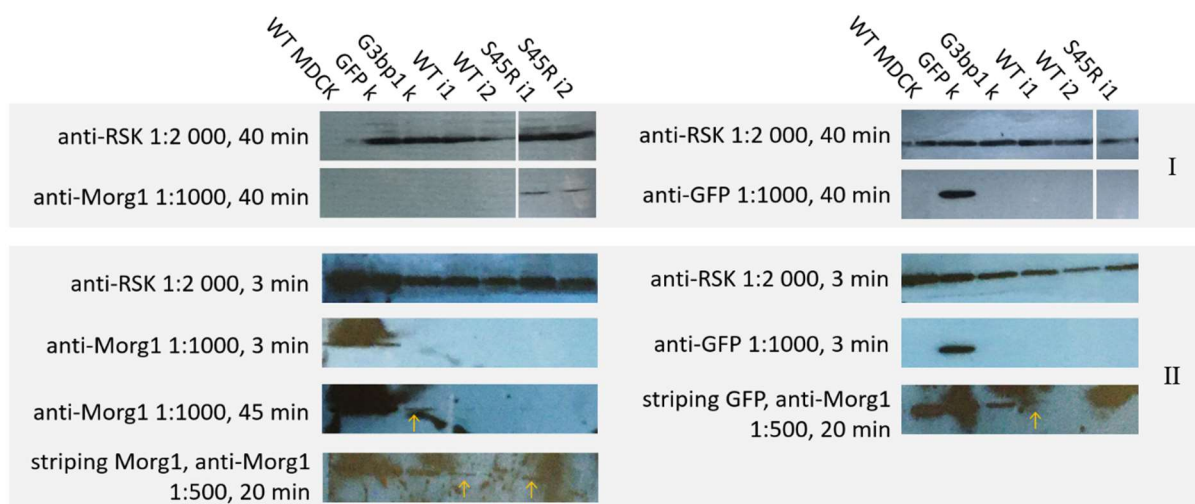
Obrázek č. 16: Porovnání lokalizace ektopického Morg1-GFP WT a Morg1-GFP S45R s markerem stresových granulí G3bp1, značeným pomocí sekundární protilátky Alexa Fluor 568 (AF568), za oxidativního stresu (NaAsO₂) i kontrolních podmínek (kontrola). Mutace nezpůsobila přesun Morg1 S45R do stresových granulí. Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým zorným polem.

5.5 Sledování exprese forem proteinu Morg1 v MDCK buněčných liniích pomocí Western Blot

Po imunofluorescenčním barvení bylo naším cílem ujistit se, že pozorovaná fluorescence opravdu odpovídá expresi zkoumaných proteinů, konkrétněji Morg1-GFP WT nebo Morg1-GFP S45R, nikoli samotného GFP. Z toho důvodu jsme se pokoušeli stanovit expresi fúzovaných i endogenních forem studovaných proteinů. Využívali jsme k tomu techniku Western blot.

Pro analýzu exprese pomocí metody Western Blot byly vybrány stejné linie jako při imunofluorescenčním barvení, a dále také kontrolní linie netransfekovaných WT MDCK buněk. Nejprve byla použita králičí anti-Morg1 protilátka od Upstate, naředěná v poměru 1:1000, jež dokázala vizualizovat expresi Morg1 pouze u dvou vzorků (obrázek č. 17, I). Experiment byl proto replikován (obrázek č. 17, II). Za použití stejné protilátky a stejného ředění, byla přítomnost Morg1 prokázána pouze u dvou vzorků při 3minutové expozici a tří vzorků při 45minutové expozici. Následně byly membrány stripovány a opět inkubovány

s králičí anti-Morg1 protilátkou (Upstate) naředěnou v poměru 1:500. Výsledná membrána sice zobrazovala mnoho nespecifického šumu, ale projevila expresi Morg1 až v 5 liniích (WT MDCK, GFP k, G3bp1 k, WT i1 a S45R i1). Expres GFP byla v obou experimentech prokázána pouze u linie MDCK-GFPk (MDCK linie transformovaná vektorem pEGFP-N1), fúzaný Morg1-GFP nebo Morg1-GFP S45R se nepodařilo vizualizovat.



Obrázek č. 17: Pokus o stanovení exprese Morg1 a GFP pomocí metody Western blot u kontrolní linie netransferovaných WT MDCK buněk (WT MDCK), u linie MDCK-GFPk (GFPk), MDCK-G3bp1k (G3bp1k), MDCK-Morg1-GFPi 1/2 (WT i1/2), MDCK-Morg1-GFP S45Ri 1/2 (S45R i1/2). Vektory obsahující sekvence pro Morg1 nebo Morg1 S45R byly konstruovány v duplikátech, které jsou odlišeny číslicemi 1 a 2. Původní pokus je označen I, jeho replika II. Vizualizovaná exprese Morg1 se v I a II liší. Bandy pro Morg1 jsou v obou experimentech velmi slabé nebo na prahu detekčního limitu, který se podařilo snížit pomocí zvyšování expozice a koncentrace primární protilátky. Nově zobrazené bandy jsou od nespecifických signálů odlišeny žlutou šipkou. Oba experimenty (I, II) prokázaly expresi GFP pouze u linie MDCK-GFP. Byla využita králičí protilátka anti-Morg1 od firmy Upstate.

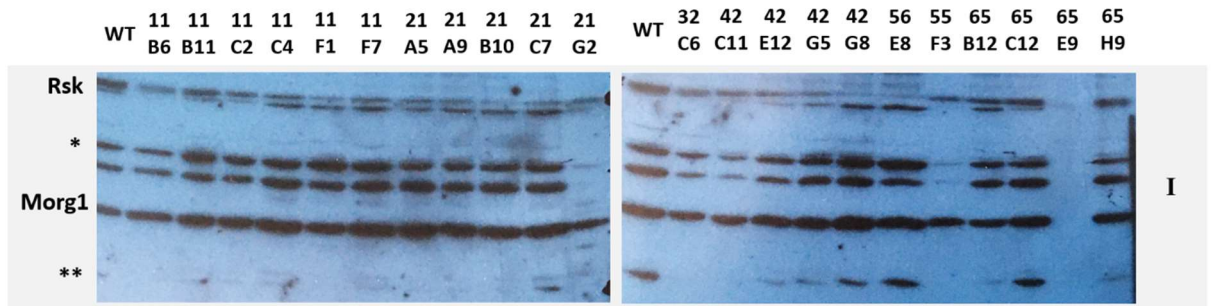
5.6 Ověření delece Morg1 pomocí Western blotu

Pro určení esenciality a lepší pochopení funkce Morg1 v MDCK WT liniích byla provedena delece genu pro Morg1 pomocí technologie CRISPR/Cas9. Buňky, u nichž došlo k úspěšné transfekci, byly rozpoznány a separovány pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (z angl. Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS). Izolované jednotlivé buňky byly poté kultivovány, dokud nevytvorily vlastní buněčné linie. Celkově bylo připraveno přes 100 linií a každá byla nazvaná kódovým označením (11B6, 11B11, 11C2, 11C4 atd.).

5.6.1 Ověření delece Morg1 pomocí Western Blotu za využití protilátky anti-Morg1 od firmy Upstate

Za účelem ověření delece Morg1 bylo vybráno 12 linií, u kterých jsme se pokoušeli specificky vizualizovat expresi proteinu Rsk, jakožto nanáškové kontroly, a Morg1 (obrázek č. 18). Koncentrace proteinových lyzátů byla pečlivě naměřena a sjednocena mezi vzorky pomocí ředění v Laemmli pufru (viz. 4.7.9.2).

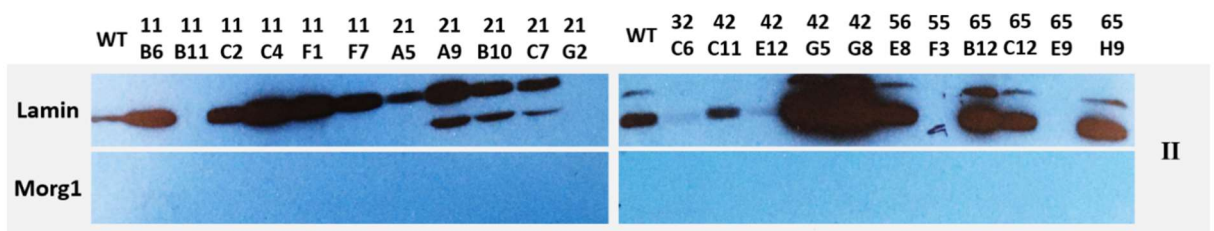
Pozorovali jsme mnoho nespecifických bandů. Bandy, které pravděpodobně odpovídají expresi Rsk a Morg1, dosahovaly u všech vzorků podobné intenzity. Kromě nich se vyskytovaly i neidentifikované bandy, jejichž exprese byla na rozdíl od zdánlivě specifických signálů, velmi nehomogenní. Intenzita nespecifických signálů byla u vzorků WT, 11B6, 32C6, 42C11, 55F3 výrazně slabší a u vzorku 65E9 nebyl pozorován žádný band.



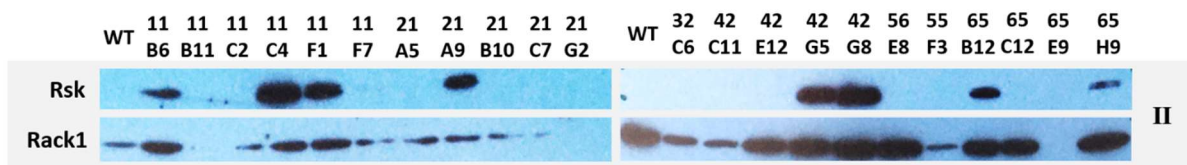
Obrázek č. 18: Sledování exprese Morg1 za účelem určit linie, u nichž došlo ke knock-outu Morg1 (II). Exprese Morg1 a nanáškové kontroly Rsk je napříč vzorky velmi podobná. Byly pozorovány výrazné neidentifikované bandy (*, **), jejichž exprese se napříč vzorky liší. U vzorků WT (WT MDCK linie), 11B6, 32C6, 42C11 a 55F3 byla intenzita neidentifikovaných bandů výrazně nižší. U vzorku 65E9 nebyl zaznamenán žádný band.

5.6.2 Ověření delece Morg1 pomocí Western Blotu za využití králičí protilátky anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific)

Z důvodu nespecifické vazby protilátky anti-Morg1 od firmy Upstate, použité v předchozím experimentu (viz. 5.6.1), byl experiment zopakován s novou králičí protilátkou anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific). Jako nanášková kontrola tentokrát sloužil protein Lamin, pro který je typický dvojitý band. Koncentrace proteinových lyzátů byla pečlivě naměřena a byla následně sjednocena pomocí ředění v Laemmli pufru (viz. 4.7.9.2). I přesto intenzita vizualizované exprese Laminu byla velmi nehomogenní, a některé vzorky neprojevovaly žádnou expresi. Expresi Morg1 se nepodařilo vizualizovat u žádného vzorku (obrázek č. 19, II). Vzhledem k podezřelé expresi Laminu jakožto nanáškové kontroly byly membrány stripovány a označeny primárními protilátkami proti Rsk a Rack1 (obrázek č. 20). Exprese Rsk byla pozorována pouze u čtyř vzorků. Exprese Rack1 poskytla nehomogennější expresi ze všech tří použitých nanáškových kontrol.



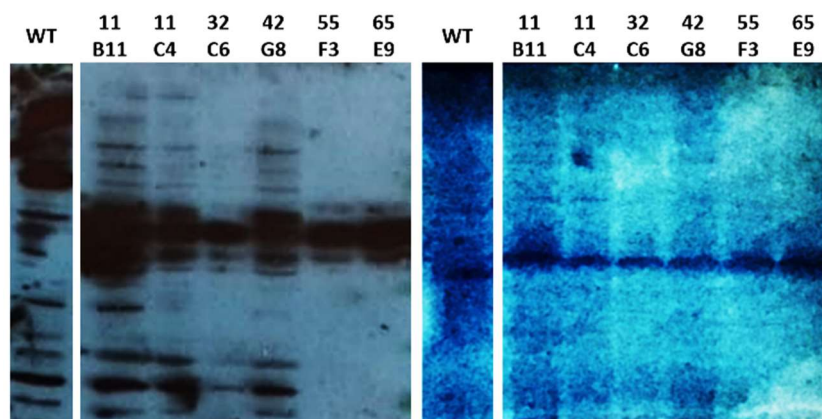
Obrázek č. 19: Sledování exprese Morg1 za účelem určit linie, u nichž došlo ke knock-outu Morg1 (II). Replikace experimentu za využití Laminu jako nanáškové kontroly. Intenzita bandů Laminu je napříč vzorky extrémně odlišná, u vzorků 11B11, 32C6, 42E12, 55F3 a 65E9 nebyly detekovány. Exprese Morg1 nebyla detekovaná u žádného vzorku.



Obrázek č. 20: Sledování exprese *Morg1* za účelem určit linie, u nichž došlo ke knock-outu *Morg1* (II). Membrána byla stripována a následně inkubována s protilátkami proti *Rsk* a *Rack1*, které sloužily jako kontrolní nanáškové kontroly. Exprese *Rsk* se pozorovala pouze u 8 linií. Exprese *Rack1* nebyla pozorována pouze u 3 linií.

5.6.3 Ověření delece *Morg1* pomocí Western Blotu za využití králičí protilátky anti-*Morg1* (Thermo Fisher Scientific) a ověření přítomnosti proteinů ve vzorcích

U vybraných linií byly připravené dva SPS-PAGE gely. Jeden z gelů se nechal přes noc nabarvit v barvivu Coomassie Brilliant Blue, které nespecificky značí všechny proteiny na gelu. Následující den, gel zobrazil v celku rovnoměrné zastoupení proteinů v liniích WT MDCK, 11B11, 11C4, 32C6, 42G8, 55F3, 65E9. Linie 55F3 a 65E9 neprokázaly přítomnost žádných proteinů v nich. Výjimkou byl výrazný pás bandů o velikosti 50 kDa až 70 kDa, který byl pozorovaný u všech vzorků a mohl vzniknout kvůli agregaci proteinů. Zbylý gel byl použit na Western Blot. Exprese *Morg1* byla zobrazena pomocí králičí primární protilátky anti-*Morg1* (Thermo Fisher Scientific). Vzor na autoradiografickém filmu nápadně se podobal vzoru na polyakrylamidovém gelu (obrázek č. 21).



Obrázek č. 21: Ověření specifity protilátky anti-*Morg1* (Thermo Fisher Scientific) a přítomnosti proteinů ve vzorcích. Snímek vpravo zobrazuje výsledky Western blotu za značení pomocí anti-*Morg1* (Thermo Fisher Scientific). Snímek vlevo zobrazuje SDS-PAGE gel po barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue.

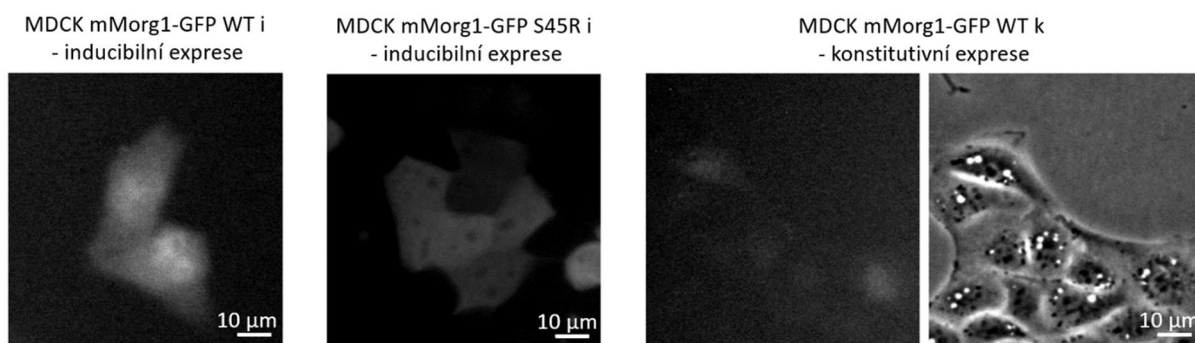
6 DISKUSE

6.1 Inducibilita vektoru stabilizuje transfekovanou buněčnou linii

Výsledkem mutagenese vektoru pEGFP-C1-mMorg1 WT byl vektor pEGFP-C1-mMorg1 S45R. Připravený vektor po ověření mutagenese byl dále amplifikován, izolován a transfekován do MDCK WT buněk, čímž byla připravena linie „MDCK mMorg1-GFP S45R k“ (4.7.4, 4.7.8). Následující den po transfekci byla její účinnost ověřena pomocí fluorescenční mikroskopie. Úspěšná transfekce buněk by způsobila expresi fúzovaných proteinů Morg1-GFP S45R, kterou lze sledovat pomocí zelené fluorescence GFP. Linie „MDCK Morg1-GFP S45R k.“ nejprve projevila očekávanou fluorescenci, která se ovšem v průběhu několika dní vytratila (obrázek č. 22).

Podobný problém byl pozorován i při transfekci WT MDCK buněčných linií konstitutivním vektorem obsahujícím sekvenci pro protein Rack1 (nepublikovaná data Tomáše Groušla a Věry Chvalové). Transfekce plazmidu nesoucího gen pro určitý protein nehledě na to, zda se jedná o Morg1 či Rack1, způsobuje jeho nadbytečnou expresi, jelikož přirozená syntéza tohoto proteinu nebyla narušena. Předpokládáme, že ve výsledku je celková exprese daného proteinu nadměrná a nefyziologická. Snaha MDCK buněk tuto expresi regulovat a ustálit na fyziologických hodnotách může vést k degradaci plazmidu, čímž si vysvětlujeme nestabilní expresi konstitutivních plazmidů.

Linie transformované konstitutivními vektory se ukázaly být nevhodné pro metodu Western Blot i pro imunofluorescenční barvení. To posloužilo příčinou k přeložování *Morg1 WT/S45R* do inducibilního vektoru pcDNA4-GFP. Tak byly sestrojeny plazmidy pcDNA4-to-mMorg1-GFP WT a pcDNA4-to-mMorg1-GFP S45R. Po celou dobu mezi transfekcí a indukcí, zůstávaly linie stabilní. Expresie byla vždy vyvolána 24h před experimentem (viz. 4.7.8). To umožnilo linie zafixovat nebo vytvořit proteinové lyzáty ještě dříve, než byl protein degradován a jeho exprese přerušena.



Obrázek č. 22: Porovnání stability exprese transfekovaných vektorů v MDCK buněčných liniích. Linie „MDCK mMorg1-GFP WT k“, která byla transfekována konstitutivním vektorem pEGFP-C1-mMorg1 WT, nevykazovala po čtyřech dnech žádnou signifikantní fluorescenci. Naproti tomu linie „MDCK mMorg1-GFP WT/S45R i“, které vznikly transfekcí MDCK buněk inducibilními vektory pcDNA4-to-mMorg1-GFP WT/S45R, vykazovaly po své indukci i čtyři dny po transfekci zřetelnou fluorescenci. To naznačuje, že až do indukce zůstává transfekovaná linie stabilní. Stejná tendence byla pozorována u MDCK buněčných linií transfekovaných konstitutivními či inducibilními vektory nesoucími sekvenci pro Rack1. První tři snímky zleva byly pořízeny pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým zorným polem, poslední snímek vpravo byl pořízen pomocí fázového kontrastu.

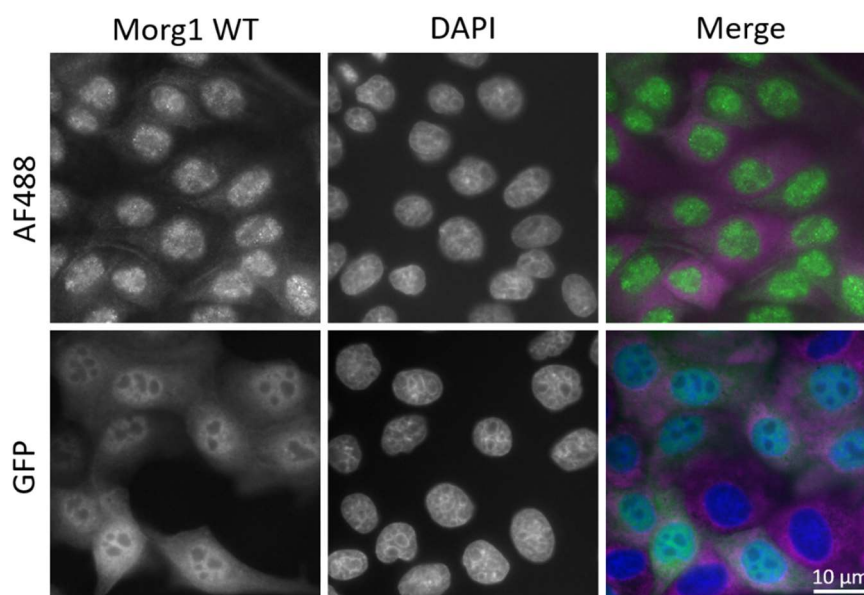
6.2 Morg1 se v MDCK buňkách lokalizuje převážně do jádra

Různé zdroje uvádějí různou lokalizaci Morg1. Morg1 se může vázat na pozdní endozomy (Boggiatto *et al.*, 2014), a možná i na jiné vezikulární váčky (Vomastek *et al.*, 2007). V literatuře se nejčastěji zmiňuje jeho cytoplazmatická a jaderná lokalizace (Su *et al.*, 2012; Bondeva *et al.*, 2012; Bondeva *et al.*, 2013; Hayase *et al.*, 2013; Loeffler *et al.*, 2017), přičemž pokud je zmíněn jejich poměr, téměř vždy převažovala cytoplazmatická lokalizace (Bondeva *et al.*, 2012; Hayase *et al.*, 2013).

Jediné zmínky v literatuře o převážně jaderném Morg1 pocházejí ze dvou publikací od Bondeva *et al.*, ale jejich výsledky jsou těžko interpretovatelné. Při imunofluorescenčním značení Morg1 v myších mesangiálních buňkách (MMC) byl pozorován silný jaderný signál (Bondeva *et al.*, 2013). Nicméně v předchozí studii titíž autoři zaznamenali u stejné buněčné linie převážně cytoplazmatickou lokalizaci Morg1. V obou případech se jednalo o kontrolní linie a jediný rozdíl v metodách kultivace spočíval v přidání BSA (5 mg/ml) ke kontrolní linii MMC z roku 2013 (Bondeva *et al.*, 2012; Bondeva *et al.*, 2013). Je teoreticky možné, že BSA má jakýsi vliv na rozložení Morg1 v buňce, avšak je zvláštní, že se autoři nijak nevyjádřili k této skutečnosti. Hlavním cílem studií bylo sledování vlivu angiotensinu II a glykovaného bovinního séra na lokalizaci Morg1. Autoři dokonce poukazují, že Morg1 se mírně přesouval z cytoplazmy do jádra MMC buněk po ošetření angiotensinem II, mediátorem poškození ledvin a antagonistou PHD3 (Bondeva *et al.*, 2012). Avšak je náročné zhodnotit vliv ANG II a AGE-BSA na umístění Morg1 v buňce, jestliže jeho lokalizace se ve stejné kontrolní linii v různých experimentech lišila. Je tedy zřejmé, že Morg1 mění svou intracelulární lokalizaci, jen příčiny a mechanismy stále zůstávají nejasné. Naším cílem, bylo proto určit lokalizaci Morg1 v MDCK buňkách a porovnat naše výsledky s existujícími evidencemi.

Pro stanovení lokalizace proteinu Morg1 v MDCK buňkách za oxidačního stresu, bylo provedeno imunofluorescenční barvení tří buněčných linií (obrázek č. 23). Z každé linie byly připraveny dva typy preparátů, ze kterých jeden byl vždy před fixací vystaven NaAsO₂ způsobujícím silný oxidativní stres, a druhý preparát byl kontrolní a nebyl vystaven oxidativnímu stresu.

Lokalizace Morg1 WT za kontrolních podmínek se sledovala ve dvou liniích. Ektopický i endogenní Morg1 WT byl lokalizován především v jádře. Zčásti byl přítomen i v cytosolu, přičemž jeho největší koncentrace zůstávala v okolí jádra. Naše pozorování se liší od výsledků Hayase *et al.* (2013), kteří zaznamenali u MDCK buněk převážně cytoplazmatickou lokaci Morg1. Již bylo představeno, že poměr cytoplazmatické a jaderné lokalizace se může měnit, avšak stále není jasné, z jakého důvodu. Naše výsledky ukazují, že oxidativní stres nemá vliv na dynamiku Morg1 v intracelulárním prostoru. Proč se v našem experimentu Morg1 lokalizoval především do jádra, tudíž zůstává otázkou dalšího výzkumu.



Obrázek č. 23: Sledování lokalizace endogenního *Morg1-GFP WT (AF488)* pomocí myší sekundární protilátky *Alexa Fluor 488* a *ektopického Morg1-GFP WT (GFP)*. Buněčná jádra jsou označena pomocí *DAPI*. Oba způsoby vizualizace *MORG1 WT* poukazují na jeho převážně jadernou lokalizaci, s částečným přesahem do cytosolu. Sledování probíhalo za kontrolních podmínek. Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým zorným polem.

6.3 Vliv mutace *Morg1 S45R* na lokalizaci do SG

Proteiny *Morg1* a *Rack1* patří oba do WD-40 rodiny proteinů. Mají velmi podobnou strukturu a slouží jako scaffoldní proteiny. *Rack1* je dlouho známým a dobře prozkoumaným proteinem. Jedna z mnoha známých interakcí, kterou *Rack1* podstupuje je jeho vazba na malou podjednotku ribozomu, čímž ovlivňuje translaci. Ví se také, že se lokalizuje do SG, čímž se předchází aktivaci *MTK1*, mediátoru apoptózy, pro kterou je nezbytná vazba na *Rack1*. Malé podjednotky ribozomů jsou, spolu s jinými součástmi pre-iniciačních komplexů, klíčovými složkami stresových granulí. Předpokládá se proto, že *Rack1* lokalizuje do stresových granulí prostřednictvím své vazby na ribozom. Avšak tento předpoklad prozatím nebyl potvrzen.

Rack1 má několik vazebných míst, jimiž se drží na ribozomu. Důležitá role se přisuzuje páru aminokyselin R38-K40. Jejich mutace R38D-K40E se využívá pro studium volného, čili neribosomálního, *Rack1*. Avšak novější evidence poukazují, že *Rack1 R38D-K40E*, sice poněkud flexibilněji, ale přesto se váže na ribozom. Pro studium volného *Rack1* byly vytvářeny mutantní formy neobsahující vícero vazebných míst. Tyto formy však nebyly stabilní, nejspíše kvůli narušení struktury proteinu (Thompson *et al.*, 2016).

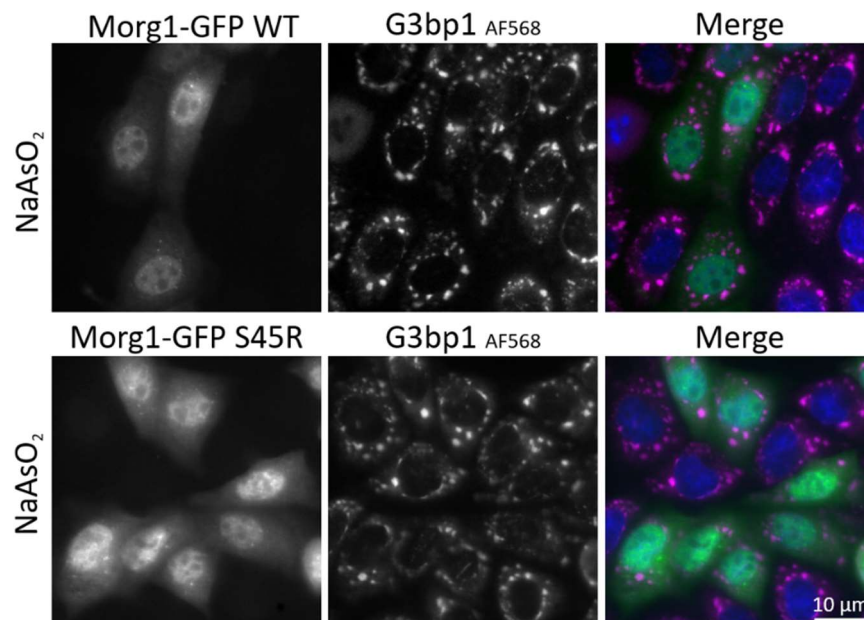
Jelikož odstraňování vazebných míst u *Rack1* není vhodné pro studium jejich role při vazbě na ribozom, rozhodli jsme se tyto vazebná místa naopak integrovat do sekvence jiného proteinu. Modifikovaný *Morg1*, jakožto multifunkční a flexibilní scaffold, který sdílí s jak strukturní, tak a funkční podobnost s *Rack1*, má potenciál být schopný ho v některých jeho funkcích nahradit. Z obou aminokyselin tvořících u *Rack1* vazebné místo na ribozom obsahuje myší *Morg1* přirozeně pouze lysin na pozici K47. Na pozici 45 obsahuje *Morg1* serin, který lze substitucí jednoho nukleotidu mutovat na arginin, čímž se vytvoří analogický vazebný pár k R38-K40 u

Rack1. Zajímalo nás, způsobí-li tato mutace navázání Morg1 S45R na ribozom a translokaci do SG. Tento postup lze opakovat pro různá vazebná místa Rack1 a porovnávat jejich esencialitu při vazbě na ribozom.

Z nepublikovaných dat Tomáše Groušla a Věry Chvalové víme, že Morg1 WT nelokalizuje do SG, což naše pozorování v této práci potvrzuje (obrázek č. 24). Nezaznamenali jsme žádný vliv mutace na lokalizaci Morg1 S45R. Výsledek byl opět u ektopického Morg1-GFP WT i endogenního Morg1 WT stejný. Dále byl sledován vliv mutace Morg1-GFP S45R na jeho subcelulární lokalizaci za stresových i kontrolních podmínek. Signifikantní rozdíl mezi WT Morg1 a Morg1-GFP S45R nebyl detekován.

Tento výsledek neprokazuje, že se Morg1-GFP S45R neváže na malou podjednotku ribozomu. Je možné, že koncentrace Morg1-GFP S45R navázaného na ribozom byla příliš nízká a nacházela se pod limitem detekce fluorescenčního mikroskopu. Tato situace je poměrně pravděpodobná, jelikož SG se vytvářejí pouze v cytoplazmě, zatímco v našem experimentu byla pozorována především jaderná lokalizace Morg1-GFP S45R. Tudíž celková koncentrace cytoplazmatického Morg1-GFP S45R, který by se potenciálně mohl vázat na ribozom, byla velmi nízká.

Plánujeme proto ověřit schopnost Morg1-GFP S45R se vázat na ribozom pomocí analýzy polyzomových profilů a Western blotu. Žádná nebo velmi nízká afinita Morg1-GFP S45R k ribozomu je pravděpodobně výsledkem absence dalších vazebných míst, které umožňují Rack1 interagovat s ribozomem i po mutaci R38D-K40E.



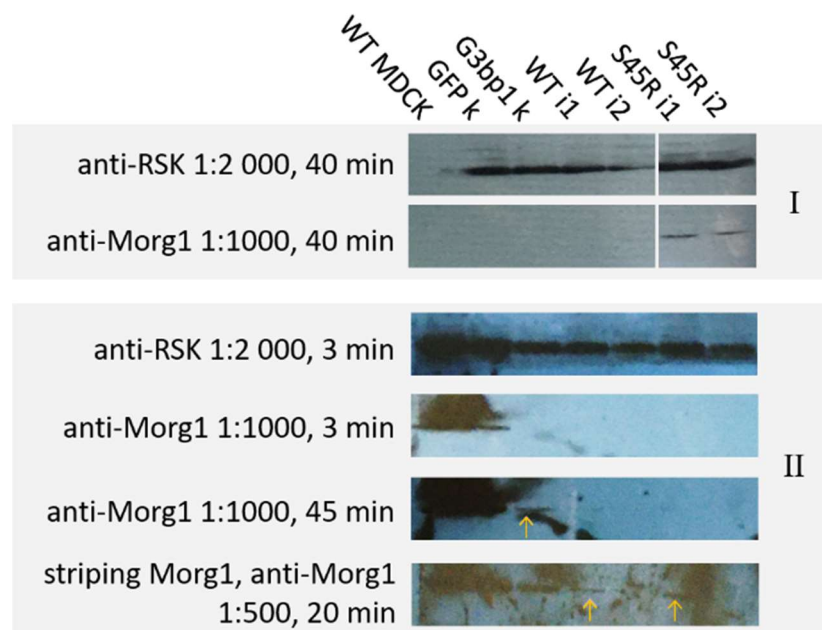
Obrázek č. 24: Porovnání lokalizace Morg1-GFP WT, Morg1-GFP S45R a G3bp1 za oxidačního stresu (NaAsO₂). Endogenní G3bp1 značený pomocí Alexa Fluor 568 (AF568) za stresových podmínek zobrazuje stresové granule. Snímky potvrzují, že Morg1 WT i Morg1 S45R nelokalizují do stresových granulí. Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenční mikroskopie se širokým zorným polem.

6.4 Sledování exprese forem proteinu Morg1 v MDCK buněčných liniích pomocí Western Blot

Po imunofluorescenčním barvení a mikroskopii, bylo naším cílem prokázat, že pozorované výsledky opravdu odpovídají expresi předpokládaných proteinů. Toho jsme se pokoušeli docílit pomocí metody Western blot. Avšak i přes opakování experimentů a změnu protilátky proti Morg1 jsme nedokázali dosáhnout věrohodných výsledků.

Všechny použité linie by měly přirozeně exprimovat endogenní Morg1. Očekávali jsme proto, že budeme pozorovat band pro Morg1 u všech linií, a u linií s transfekovanou sekvencí Morg1-GFP navíc i band pro Morg1-GFP. Avšak podařilo se nám vizualizovat expresi endogenního Morg1 pouze u dvou linií. Expresie GFP byla prokázána pouze u linie MDCK-GFP a nikoli u linií obsahujících Morg1-GFP. Poněvadž tento výsledek je velmi nevěrohodný, byl experiment opakován (II).

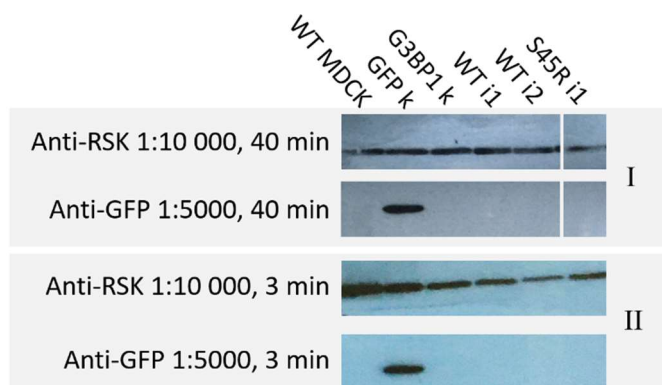
Expresie Morg1 byla tentokrát (II) pozorována u jiných linií nežli v předešlém experimentu (I) (WT MDCK, MDCK-GFP, MDCK-G3BP1). Intenzita signálu byla opět velmi nízká. Byly použity tytéž vzorky, které tedy nemohly způsobit rozdíly v pozorované expresi. Rozdíly ve výsledcích původního experimentu a repliky musely být tudíž způsobeny nízkou kvalitou protilátky. Membrány byly proto stripovány a Morg1 byl znovu označen stejnou protilátkou anti-Morg1 (Upstate), ovšem o dvojnásobné koncentraci. Intenzita bandů se zvýšila a s prodlužující se expozicí, jsme byly schopni detekovat Morg1 i v liniích, v nichž se předtím nezobrazoval. Tyto nové bandy jsou označeny na obrázku označené žlutou šipkou (obrázek č. 25). Ve výsledku byla exprese Morg1 vizualizovaná téměř ve všech liniích. V obou experimentech byly bandy pro Morg1 nejintenzivnější v liniích s nejsilnější nanáškovou kontrolou, tedy v liniích, ve kterých bylo více Morg1 z důvodu jemné nepřesnosti nanesení. Z toho vyvozujeme, že protilátka anti-Morg1 od firmy Upstate není dostatečně účinná.



Obrázek č. 25: Srovnání pozorované exprese Morg1 v původním experimentu (I) a v jeho replikaci (II). V prvním pokusu (I) jsme vybrali proteinové lyzáty z MDCK linií transformovaných vektorem konstitutivním (k) nebo inducibilním (i), obsahujícím Morg1-GFP (WT), Morg1-GFP S45R (S45R) nebo pouze GFP (GFP), a také buňky

transfekované vektorem s *G3bp1* či netransfekované vůbec (WT MDCK). Některé linie byly připravovány v duplikátech (1, 2). Překvapivě, vizualizovaná exprese se v replikovaném experimentu (II) odlišuje od experimentu původního (I). V obou případech, byly bandy pro *Morg1* nejprve zaznamenané u linií s nejsilnějším bandem pro *Rsk*. Prodloužení expozice zřejmě snížilo limit detekce a umožnilo vizualizovat slabší bandy v dalších liniích (žluté šipky). Ačkoli velké množství nespecifického šumu komplikuje interpretaci, po strippingu a zvýšení koncentrace primární protilátky anti-*Morg1* (Upstate) jsme byli schopni detekovat *Morg1* pravděpodobně u všech linií kromě WT i2. Předpokládáme proto, že vazba použitých protilátek proti *Morg1* je velmi neefektivní, což způsobuje slabé výsledné bandy.

Pokus o vizualizaci GFP dopadl v replikovaném experimentu podobně jak v experimentu původním (obrázek č. 26). Pozorované bandy pro GFP byly u vzorku MDCK-GFP poměrně intenzivní, zatímco u linií obsahujících fúzovaný *Morg1*-GFP či *Morg1*-GFP S45R nebyl zpozorován ani náznak slabého bandu. Z toho vyvozujeme, že protilátka proti GFP je sice účinná, ale fúzovaný *Morg1* stericky brání vazbě protilátky na epitop proteinu GFP.



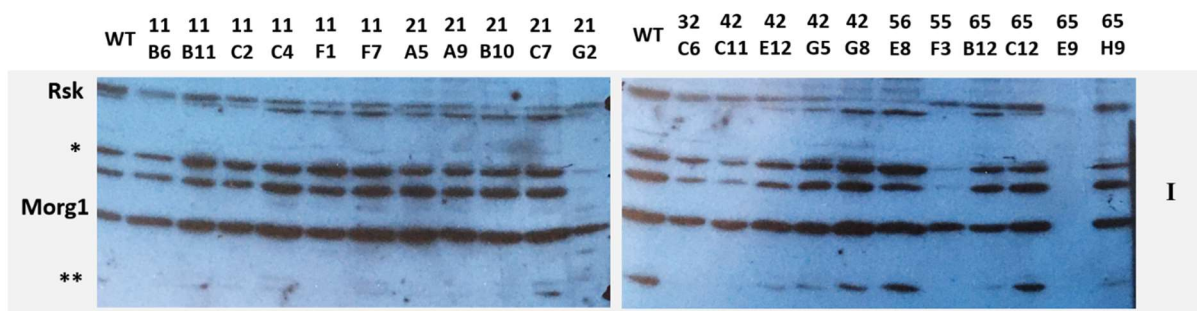
Obrázek č. 26: Porovnání pozorované exprese GFP v původním (I) a v replikovaném experimentu (II). GFP se podařilo vizualizovat pouze u MDCK-GFP (GFP k). U linií obsahujících *Morg1*-GFP (WT i1/2) nebo *Morg1*-GFP S45R (S45R i1) se nepodařilo fúzovaný GFP vizualizovat. Předpokládáme, že fúzovaný *Morg1* stericky brání protilátce navázat se na specifický epitop GFP.

6.5 Sledování exprese MDCK linií po knock-outu *Morg1* pomocí Western Blot

6.5.1 Sledování exprese MDCK linií po knock-outu *Morg1* pomocí Western Blot – I

Za účelem pozorování fenotypu MDCK buněk neexprimujících *Morg1* byl proveden knock-out genu *Morg1* pomocí CRISPR/Cas9. Pro určení linií, u kterých došlo k úspěšné delecí genu pro *Morg1*, bylo využito metody Western Blot. Vybralo se 11 linií, u kterých se očekávala deplece *Morg1*, a kontrolní WT MDCK linie. Jako nanášková kontrola sloužil protein *Rsk*. Pro značení *Morg1* byla použita králičí primární protilátka anti-*Morg1* od firmy Upstate, která v minulých experimentech poskytovala velmi slabé signály.

Tentokrát bylo naopak pozorováno mnoho nespecifických bandů (obrázek č. 27). Předpokládané bandy pro *Rsk* a *Morg1* měli velmi homogenní intenzitu napříč všemi vzorky kromě vzorku „65E9“, ve kterém nebyl v žádném experimentu pozorován žádný protein, ačkoli opakovaně měřená koncentrace pomocí Pierce BCA Protein Assay Kit nenaznačuje žádný rozdíl oproti ostatním vzorkům. Další zvláštností je, že specifické bandy se mezi vzorky příliš nelišily, zatímco intenzita nespecifických bandů byla u vzorků výrazně odlišná.



Obrázek č. 27: Ověřování delece *Morg1* vyvolanou pomocí CRISPR/Cas9. Pro vizualizaci exprese *Morg1* byla využita anti-*Morg1* protilátka od firmy Upstate. Band pro *Morg1* byl zaznamenán u všech linií kromě „65E9“. Byly pozorovány dva pásy nespecifických bandů (* a **). Intenzita exprese *Rsk* a *Morg1* byla u všech vzorků podobná, intenzita nespecifických bandů se naopak lišila.

6.5.2 Sledování exprese MDCK linií po knock-outu *Morg1* pomocí Western Blot – II

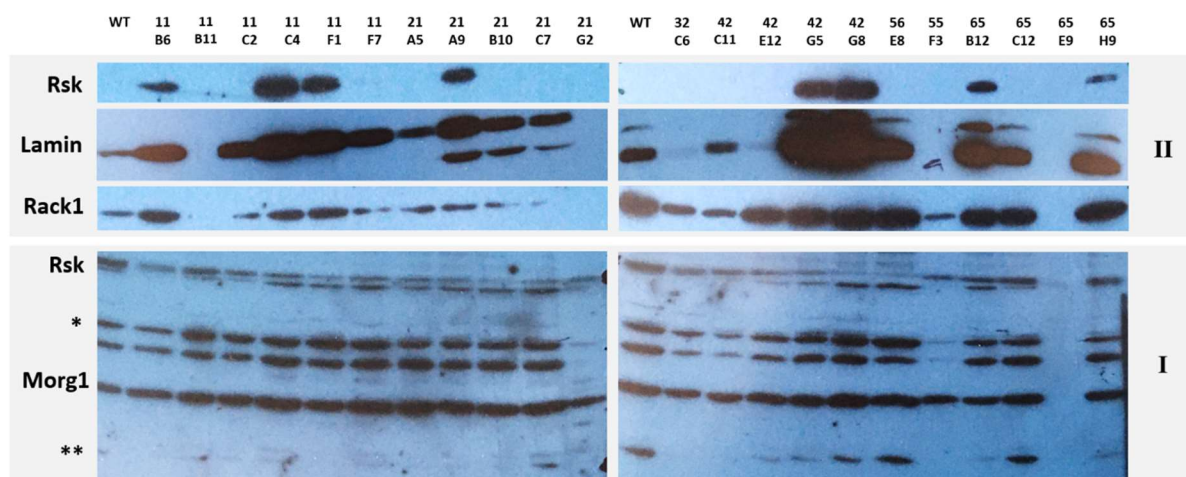
Kvůli nízké specifitě protilátky anti-*Morg1* od firmy Upstate, použité v předchozím experimentu (6.5.1), byl experiment zopakován s protilátkou anti-*Morg1* od firmy Thermo Fisher Scientific. Taktéž byla změněna nanášková kontrola z *Rsk* na Lamin, pro který je typický dvojitý band v rozmezí 60-70 kDa.

Avšak ve výsledku exprese *Morg1* nebyla vůbec detekovaná. Exprese Laminu byla u 15 z 24 vzorků přibližně stejná. Vyskytlo se ale taky 7 vzorků, u kterých byla exprese Laminu velmi nízká, a 2 vzorky u kterých byla exprese výrazně vyšší. Tento výsledek je velmi nepravděpodobný. Před elektroforézou separací SDS-PAGE byla koncentrace proteinových lyzátu vždy pečlivě změřena. Následně byly koncentrace a objem všech vzorků pečlivě sjednoceny (viz. 4.7.9.2). Tloušťka bandů nanáškové kontroly se sice může mírně lišit v případě nerovnoměrného nanesení vzorků na polyakrylamidový gel před elektroforézou, ale pozorované rozdíly v expresi Laminu jsou příliš veliké na to, aby je bylo možné vysvětlit nerovnoměrnou nanáškou. Opakované měření koncentrace také nepoukázalo na změny v koncentracích proteinů.

Tento podezřelý výsledek nás vedl k vyzkoušení i jiných nanáškových kontrol. Membrány byly proto nejprve stripovány a poté inkubovány s primárními proti *Rack1* a *Rsk*. V přechodných experimentech byl protein *Rsk* již použit jako nanášková kontrola a protilátka anti-*Rsk* reagovala velmi specificky, nebo výjimečně tvořila slabé nespecifické řady bandů, jejichž intenzita však korelovala s intenzitou specifického signálu, a byly proto také velmi homogenní. Tentokrát však protilátka proti *Rsk* byla schopná navázat pouze na 4 vzorky. Je důležité podotknout, že tyto čtyři vzorky vykazovaly také nejvýraznější expresi Laminu. Nejvhodnější nanáškovou kontrolou v daném experimentu se ukázal být *Rack1*, jelikož se navázal na největší počet vzorků ze všech ostatních použitých nanáškových kontrol. I přesto jeho exprese nebyla zcela rovnoměrná, a dokonce nebyl vůbec pozorován v „11B11“, „21G2“ a „65E9“. Nicméně v těchto vzorcích se neprokázala exprese žádného proteinu v rámci tohoto experimentu (II). A opět nejvýraznější exprese *Rack1* byla pozorována u stejných vzorků, které vykazovaly i nejsilnější expresi Laminu a *Rsk*.

Výsledky všech nanáškových kontrol byly podobné a relativní intenzita bandů byla specifická pro každý vzorek. Konkrétněji u vzorku „65E12“ na obou membránách nebyla pozorována vůbec žádná exprese. Vzorek „21G2“ také neprojevoval téměř žádnou expresi. Vzorky „32C6“, „42C11“ a „55F3“ zobrazují nižší expresi Rack1 a většinou žádnou expresi Laminu a Rsk, přičemž při prvním experimentu také obsahovaly slabší údajně nespecifické bandy v porovnání s ostatními vzorky. Tato korelace mezi dvěma experimenty naznačuje, že příčina nestandardních výsledků alespoň částečně souvisí s proteinovými lyzáty nebo samotnými liniemi (obrázek č. 28).

Avšak tato korelace má své výjimky. Například rozdíl mezi zobrazenou expresí nanáškových kontrol u vzorku „11C4“ a „21A5“ je v experimentu II velmi silný, ale při prvním experimentu (I) jsme nezaznamenali žádný rozdíl mezi tyto vzorky. Intenzita exprese WT MDCK se ve II experimentu navzájem lišila, ačkoli vzorky byly připraveny stejným způsobem, a dokonce byl použit stejný proteinový lyzáat. Rozdíl v jejich expresi ještě ale není příliš veliký a lze předpokládat, že byl způsoben pouze nerovnoměrným nanesením vzorku. Další výjimky, se nám již nepodařilo vysvětlit. Vzorek „11B6“ projevoval poměrně silné bandy při prvním vyvolávání (I), avšak při zopakování pokusu (II) nebyla v něm pozorována exprese žádného značeného proteinu.



Obrázek č. 28: Porovnání výsledků Western blotu u vzorků s očekávanou delecí Morg1. Na obrázku jsou odlišeny výsledky z prvního experimentu (I) a jeho repliky (II), při které byl nejprve značen protein Lamin, jehož dvě izoformy se typicky zobrazují jako dvojitý band. Poté byla membrána stripována a inkubována s primárními protilátkami proti Rsk a Rack1. V obou experimentech byly použity tytéž proteinové lyzáty.

6.5.3 Sledování exprese MDCK linií po knock-outu Morg1 pomocí Western Blot – III

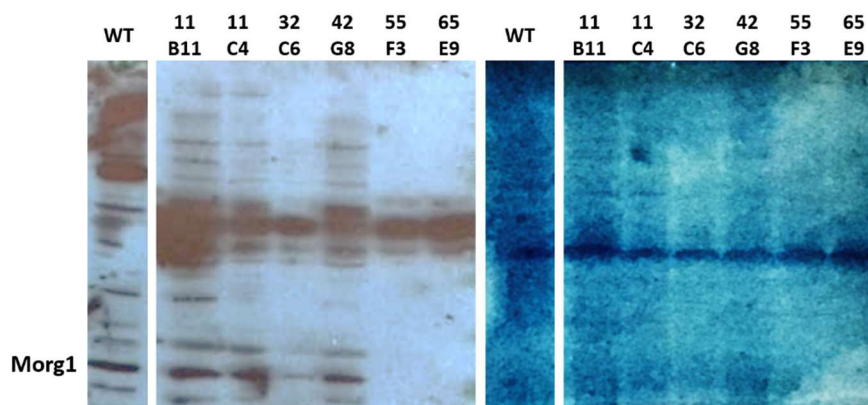
V předešlém experimentu jsme nebyli schopni detekovat Morg1 a všechny tři nanáškové kontroly (Lamin, Rsk, Rack1) naznačovaly nerovnoměrný obsah proteinů, ačkoli koncentrace proteinových lyzáatů byla pokaždé předem naměřena a sjednocena. Zobrazené exprese Laminu, Rsk a Rack1 neposkytly společně jasnou představu o množství proteinového lyzátu ve vzorcích. Následujícím cílem proto bylo stanovit přítomnost a relativní množství proteinů ve vzorcích.

Bylo vybráno 7 linií včetně kontrolní linie WT MDCK. Jejich proteinové lyzáty byly aplikované na dva polyakrylamidové gely, ve kterých byly dále separovány pomocí SDS-PAGE (viz. 4.7.9.3). Poté byl jeden z gelů zpracován dle popsaného protokolu na Western Blot (viz. 4.7.9), a druhý gel se nechal přes noc barvit v barvě Coomassie Brilliant Blue, která se nespecificky váže na všechny proteiny.

Výsledek značení králičí protilátky anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific) byl zcela analogický k nespecifickému barvení všech obsažených proteinů pomocí barvy Coomassie Brilliant Blue (obrázek č. 29). Použitá protilátka je tudíž absolutně nespecifická.

Intenzita vizualizace proteinů v jednotlivých vzorcích odpovídala předchozím experimentům. Vzorky „11C4“ a „42G8“ projevovaly vysoký obsah všech doposud značených proteinů během všech pokusů (I, II, III), naopak vzorky „32C6“, „55F3“ a „65E9“ vykazovaly nízkou expresi napříč všemi experimenty. Jedinou výjimkou byl vzorek „11B11“, u kterého nebyla pozorována žádná exprese Laminu, Rsk a Rack1, ale tentokrát vykazoval nevýraznější expresi srovnatelnou s kontrolní linií WT MDCK. Prozatímni data nám neumožňují navrhnout hypotézu vysvětlující tuto skutečnost.

Na membráně i gelu se zobrazil nápadný silný trojitý band o velikosti 50kDa až 70kDa. Jeho intenzita u vzorků „32C6“, „55F3“ a „65E9“ je přibližně stejná či dokonce vyšší než u ostatních vzorků. U kontrolní MDCK WT linie je výrazně slabší. Mohlo to být způsobeno agregací proteinového lyzátu. V případě agregace proteinů ve vzorku by sledovaný protein Morg1 mohl být součástí velkých agregátů a způsobovat zdánlivě nespecifické barvení protilátky a bandy o velké velikosti. Ačkoli tato hypotéza může být částečně pravdivá, nevysvětluje přítomnost nespecifických bandů o menší velikosti, než je Morg1. Přesto, se dále pokusíme o výměnu DDT, který se používá při přípravě proteinových vzorků na elektroforézní separaci. Narušuje vazby mezi proteiny a zamezuje agregaci.



Obrázek č. 29: Porovnání bandů vizualizovaných protilátkou anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific) pomocí metody Western Blot (vlevo) a barvení polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE barvou Coomassie Brilliant Blue. Výsledek barvení údajně specifickou protilátkou je téměř identický barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue, jež vizualizuje všechny proteiny (vpravo). Výsledky naznačují, že protilátka anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific) není specifická. Na obrázku je označena výška, ve které by se měl vyskytovat Morg1.

7 ZÁVĚR

Jelikož studium vazby Rack1 na ribozom pomocí mutagenese vazebných míst na Rack1 prozatím nebylo příliš úspěšné (Thompson *et al.*, 2016), rozhodli jsme se naopak integrovat jedno z vazebných míst do sekvence proteinu Morg1. Tím vznikla jeho mutovaná forma Morg1 S45R. Nepozorovali jsme vazbu Morg1 S45R na ribozom ani translokaci proteinu do SG. Naše výsledky opět zpochybňují esencialitu vazebného místa R38-K40 u Rack1 a poukazují na důležitou roli dalších ostatních vazebných míst, jimiž Rack1 interaguje s ribozomem. Tato data mohou být velmi zajímavá po opakování experimentu s jinými vazebnými úseky a možná i s jejich kombinací. Pokud by se mutantní formy Morg1 obsahující jiné vazebné sekvence nebo jejich kombinace dokázaly vázat na ribozom, bylo by možné nepřímo určit, které aminokyseliny se podílejí více na afinitě k ribozomu a které méně. Následně by bylo možné sledovat, zda tyto mutantní formy lokalizují do SG a odvodit z toho mechanismus přenosu Rack1 do SG. Vytváření dalších mutantních forem je proto cílem pokračujícího výzkumu.

Poprvé v této práci prezentujeme výraznou jadernou lokalizaci Morg1 v MDCK buňkách s částečným přesahem do cytoplazmy. Předchozí evidence popisovaly převážně cytoplazmatickou lokalizaci Morg1 v MDCK liniích (Hayase *et al.*, 2013). Na myších mesangiálních buňkách již bylo ukázáno, že Morg1 se může v buňce přemisťovat v závislosti na vnějších podnětech (Bondeva *et al.*, 2013). Příčina a mechanismus přenosu Morg1 mezi cytoplazmou a jádrem zůstává předmětem výzkumu. V této práci bylo předvedeno, že oxidativní stres nemá znatelný vliv na intracelulární lokalizaci Morg1.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- ADAMS, David R, Dorit RON a Patrick A KIELY. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Communication and Signaling* [online]. 2011, 9(1) [cit. 2022-03-22]. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/1478-811X-9-22
- ADAMS, Mark D., Susan E. CELNIKER, Robert A. HOLT, et al. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* [online]. 2000, 287(5461), 2185-2195 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.287.5461.2185
- ARIMOTO, Kyoko, Hiroyuki FUKUDA, Shinobu IMAJOH-OHMI, Haruo SAITO a Mutsuhiro TAKEKAWA. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nature Cell Biology* [online]. 2008, 10(11), 1324-1332 [cit. 2022-03-22]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1791
- BESSON, Arnaud, Tammy L. WILSON a V. Wee YONG. The Anchoring Protein RACK1 Links Protein Kinase C ϵ to Integrin β Chains. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, 277(24), 22073-22084 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111644200lo
- BOGGIATTO, Paola M., Pedro A. MARTINEZ, Ashok PULLIKUTH, Douglas E. JONES, Bryan BELLAIRE, Andrew CATLING a Christine PETERSEN. Targeted extracellular signal-regulated kinase activation mediated by *Leishmania amazonensis* requires MP1 scaffold. *Microbes and Infection* [online]. 2014, 16(4), 328-336 [cit. 2022-03-28]. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2013.12.006
- BONDEVA, Tzvetanka, Claudia SCHINDLER, Katrin SCHINDLER a Gunter WOLF. MORG1 $^{+/-}$ mice are protected from histological renal damage and inflammation in a murine model of endotoxemia. *BMC Nephrology* [online]. 2018, 19(1) [cit. 2022-03-28]. ISSN 1471-2369. Dostupné z: doi:10.1186/s12882-018-0826-4
- BONDEVA, Tzvetanka, Juliane HEINZIG, Carola RUHE a Gunter WOLF. Advanced Glycated End-Products Affect HIF-Transcriptional Activity in Renal Cells. *Molecular Endocrinology* [online]. 2013, 27(11), 1918-1933 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0888-8809. Dostupné z: doi:10.1210/me.2013-1036
- BONDEVA, Tzvetanka, Juliane HEINZIG, Sybille FRANKE a Gunter WOLF. Angiotensin II Differentially Regulates Morg1 Expression in Kidney Cells. *American Journal of Nephrology* [online]. 2012, 35(5), 442-455 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1421-9670. Dostupné z: doi:10.1159/000337922
- CARDENAS, Daviel, Charity SYLVESTER, Bo CAO, et al. Disruption of the Putative Ribosome-Binding Motif of a Scaffold Protein Impairs Cytochrome c Oxidase Subunit Expression in *Leishmania major*. *MSphere* [online]. 2019, 4(2), e00644-18 [cit. 2022-03-30]. ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/mSphere.00644-18

CARDENAS, Daviel, Pamela M. CARTER, Catherine S. NATION, Juan C. PIZARRO, Jessie GUIDRY, Ashok AIYAR a Ben L. KELLY. LACK, a RACK1 ortholog, facilitates cytochrome c oxidase subunit expression to promote *L. eishmania* major fitness. *Molecular Microbiology* [online]. 2015, 96(1), 95-109 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.12924

COYLE, Scott M., Wendy V. GILBERT a Jennifer A. DOUDNA. Direct Link between RACK1 Function and Localization at the Ribosome In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2009, 29(6), 1626-1634 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.01718-08

DEL VECCHIO, Igor, Annalisa ZUCCOTTI, Federica PISANO, et al. "Functional mapping of the promoter region of the GNB2L1 human gene coding for RACK1 scaffold protein". *Gene* [online]. 2009, 430(1-2), 17-29 [cit. 2022-03-29]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2008.10.005

DHANASEKARAN, D N, K KASHEF, C M LEE, H XU a E P REDDY. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* [online]. 2007, 26(22), 3185-3202 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1210411

FONG, H K, J B HURLEY, R S HOPKINS, R MIAKE-LYE, M S JOHNSON, R F DOOLITTLE a M I SIMON. Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the CDC4 gene and identification of related mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1986, 83(7), 2162-2166 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.83.7.2162

FUNKE, Lars, Srikanth DAKOJI a David S. BREDT. MEMBRANE-ASSOCIATED GUANYLATE KINASES REGULATE ADHESION AND PLASTICITY AT CELL JUNCTIONS. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2005, 74(1), 219-245 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133339

GALLO, Simone, Sara RICCIARDI, Nicola MANFRINI, et al. RACK1 Specifically Regulates Translation through Its Binding to Ribosomes. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2018, 38(23), e00230-18 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.00230-18

GERBASI, Vincent R., Connie M. WEAVER, Salisha HILL, David B. FRIEDMAN a Andrew J. LINK. Yeast Asc1p and Mammalian RACK1 Are Functionally Orthologous Core 40S Ribosomal Proteins That Repress Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, 24(18), 8276-8287 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.24.18.8276-8287.2004

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. 2022-03-21]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1198701

GUILLEMOT, F, A BILLAULT a C AUFRAY. Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1989, 86(12), 4594-4598 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.86.12.4594

GUO, Jianjun a Jin-Gui CHEN. *RACK1* genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* [online]. 2008, 8(1) [cit. 2022-03-29]. ISSN 1471-2229. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2229-8-108

HAASE, Daniela, Silke KEINER, Christian MAWRIN a Gunter WOLF. Reduced *Morgl* expression in ischemic human brain. *Neuroscience Letters* [online]. 2009, 455(1), 46-50 [cit. 2022-03-28]. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2009.03.048

HAMMERSCHMIDT, Elke, Ivone LOEFFLER a Gunter WOLF. *Morgl* heterozygous mice are protected from acute renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. 2009, 297(5), F1273-F1287 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00204.2009

HATA, Yutaka a Junko IIDA. Scaffold Protein. *BINDER*, Marc D., Nobutaka HIROKAWA a Uwe WINDHORST, ed. *Encyclopedia of Neuroscience* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 3613-3616 [cit. 2022-03-21]. ISBN 978-3-540-23735-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-29678-2_5231

HAYASE, Junya, Sachiko KAMAKURA, Yuko IWAKIRI, Yoshihiro YAMAGUCHI, Tomoko IZAKI, Takashi ITO a Hideki SUMIMOTO. The WD40 protein *Morgl* facilitates *Par6*-*aPKC* binding to *Crb3* for apical identity in epithelial cells. *Journal of Cell Biology* [online]. 2013, 200(5), 635-650 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201208150

HOPFER, Ulrike, Helmut HOPFER, Katarina JABLONSKI, Rolf A.K. STAHL a Gunter WOLF. The Novel WD-repeat Protein *Morgl* Acts as a Molecular Scaffold for Hypoxia-inducible Factor Prolyl Hydroxylase 3 (PHD3). *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2006, 281(13), 8645-8655 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M513751200

CHAUDHURI, Indronil, Johannes SÖDING a Andrei N. LUPAS. Evolution of the β -propeller fold. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. 2008, 71(2), 795-803 [cit. 2022-03-21]. ISSN 08873585. Dostupné z: doi:10.1002/prot.21764

CHOL, Kang-Yell, Brett SATTERBERG, David M. LYONS a Elaine A. ELION. *Ste5* tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* [online]. 1994, 78(3), 499-512 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(94)90427-8

JING, Xinming, Fengming YANG, Chuchu SHAO, Ke WEI, Mengyan XIE, Hua SHEN a Yongqian SHU. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment.

Molecular Cancer [online]. 2019, 18(1) [cit. 2022-03-30]. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-019-1089-9

JURICA, Melissa S a Melissa J MOORE. Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. Methods [online]. 2002, 28(3), 336-345 [cit. 2022-03-30]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/S1046-2023(02)00240-2

KADRMAS, Julie L., Mark A. SMITH, Stephen M. PRONOVOST a Mary C. BECKERLE. Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. Developmental Dynamics [online]. 2007, 236(8), 2207-2215 [cit. 2022-03-29]. ISSN 10588388. Dostupné z: doi:10.1002/dvdy.21217

KIM, Daniel Seung, Amber A. BURT, Jane E. RANCHALIS, et al. Sequencing of sporadic Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) identifies novel and potentially pathogenic de novo variants and excludes overlap with genes associated with autism spectrum disorder. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics [online]. 2017, 174(4), 381-389 [cit. 2022-03-30]. ISSN 15524841. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.b.32527

KOLCH, Walter. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. Nature Reviews Molecular Cell Biology [online]. 2005, 6(11), 827-837 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm1743

KUROHA, Kazushige, Mayuko AKAMATSU, Lyudmila DIMITROVA, Takehiko ITO, Yuki KATO, Katsuhiko SHIRAHIGE a Toshifumi INADA. Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. EMBO reports [online]. 2010, 11(12), 956-961 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1469-221X. Dostupné z: doi:10.1038/embor.2010.169

LI, D. a R. ROBERTS. Human Genome and Diseases: ¶WD-repeat proteins. Cellular and Molecular Life Sciences [online]. 2001, 58(14), 2085-2097 [cit. 2022-03-22]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/PL00000838

LOEFFLER, Ivonne a Gunter WOLF. Morgl heterozygous deficiency ameliorates hypoxia-induced acute renal injury. American Journal of Physiology-Renal Physiology [online]. 2015, 308(6), F511-F521 [cit. 2022-03-21]. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00236.2014

LOEFFLER, Ivonne, Marita LIEBISCH, Christoph DANIEL, Kerstin AMANN a Gunter WOLF. Heterozygosity of mitogen-activated protein kinase organizer 1 ameliorates diabetic nephropathy and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition-like changes in db/db mice. Nephrology Dialysis Transplantation [online]. 2017, 32(12), 2017-2034 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfx202

LUNIN, Vladimir V., Christine MUNGER, John WAGNER, Zheng YE, Miroslaw CYGLER a Michael SACHER. The Structure of the MAPK Scaffold, MP1, Bound to Its Partner, p14.

Journal of Biological Chemistry [online]. 2004, 279(22), 23422-23430 [cit. 2022-03-30]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M401648200

LYON, Sarah M., Darrel WAGGONER, Sara HALBACH, Erik C. THORLAND, Leila KHORASANI a Russell R. REID. Syndromic craniosynostosis associated with microdeletion of chromosome 19p13.12–19p13.2. *Genes & Diseases* [online]. 2015, 2(4), 347-352 [cit. 2022-03-30]. ISSN 23523042. Dostupné z: doi:10.1016/j.gendis.2015.09.001

MALLESHAIAH, Mohan K., Vahid SHAHREZAEI, Peter S. SWAIN a Stephen W. MICHNICK. The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast. *Nature* [online]. 2010, 465(7294), 101-105 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08946

MATSUSHITA, Moe, Takanori NAKAMURA, Hisashi MORIIZUMI, Hiroaki MIKI a Mutsuhiro TAKEKAWA. Stress-responsive MTK1 SAPKKK serves as a redox sensor that mediates delayed and sustained activation of SAPKs by oxidative stress. *Science Advances* [online]. 2020, 6(26) [cit. 2022-03-29]. ISSN 2375-2548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.aay9778

MCKAY, Melissa M., Daniel A. RITT a Deborah K. MORRISON. Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, 106(27), 11022-11027 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0901590106

MITA, Hiroaki, Junichiro TSUTSUI, Mutsuhiro TAKEKAWA, Elizabeth A. WITTEN a Haruo SAITO. Regulation of MTK1/MEKK4 Kinase Activity by Its N-Terminal Autoinhibitory Domain and GADD45 Binding. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2002, 22(13), 4544-4555 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.22.13.4544-4555.2002

MORRIS, S. Conway. The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature* [online]. 1993, 361(6409), 219-225 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/361219a0

MORRISON, D. K. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2012, 4(11), a011254-a011254 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a011254

NEER, Eva J., Carl J. SCHMIDT, Raman NAMBU DRIPAD a Temple F. SMITH. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* [online]. 1994, 371(6495), 297-300 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/371297a0

NIELSEN, Maja Holch, Rasmus Kock FLYGAARD a Lasse Bohl JENNER. Structural analysis of ribosomal RACK1 and its role in translational control. *Cellular Signalling* [online]. 2017, 35, 272-281 [cit. 2022-03-28]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2017.01.026

NILSSON, Jakob, Jayati SENGUPTA, Joachim FRANK a Poul NISSEN. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO reports* [online]. 2004, 5(12), 1137-1141 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1469-221X. Dostupné z: doi:10.1038/sj.embor.7400291

OPITZ, Nadine, Kerstin SCHMITT, Verena HOFER-PRETZ, Bettina NEUMANN, Heike KREBBER, Gerhard H. BRAUS a Oliver VALERIUS. Capturing the Asc1p/Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) Microenvironment at the Head Region of the 40S Ribosome with Quantitative BioID in Yeast. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2017, 16(12), 2199-2218 [cit. 2022-03-28]. ISSN 15359476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M116.066654

PARK, Ye-Jin, Dong Wook CHOI, Sang Woo CHO, Jaeseok HAN, Siyoung YANG a Cheol Yong CHOI. Stress Granule Formation Attenuates RACK1-Mediated Apoptotic Cell Death Induced by Morusin. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, 21(15) [cit. 2022-03-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21155360

RIGGS, Claire L., Nancy KEDERSHA, Pavel IVANOV a Paul ANDERSON. Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. 2020, 133(16) [cit. 2022-03-29]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.242487

RON, D, C H CHEN, J CALDWELL, L JAMIESON, E ORR a D MOCHLY-ROSEN. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1994, 91(3), 839-843 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.3.839

SENGUPTA, Jayati, Jakob NILSSON, Richard GURSKY, Christian M T SPAHN, Poul NISSEN a Joachim FRANK. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2004, 11(10), 957-962 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb822

SCHAEFFER, Hans J., Andrew D. CATLING, Scott T. EBLEN, Lara S. COLLIER, Anke KRAUSS a Michael J. WEBER. MP1: A MEK Binding Partner That Enhances Enzymatic Activation of the MAP Kinase Cascade. *Science* [online]. 1998, 281(5383), 1668-1671 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5383.1668

SCHLOSS, Jeffery A. A *Chlamydomonas* gene encodes a G protein β subunit-like polypeptide. *Molecular and General Genetics MGG* [online]. 1990, 221(3), 443-452 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0026-8925. Dostupné z: doi:10.1007/BF00259410

SCHMITT, Kerstin, Nadine SMOLINSKI, Piotr NEUMANN, Samantha SCHMAUL, Verena HOFER-PRETZ, Gerhard H. BRAUS a Oliver VALERIUS. Asc1p/RACK1 Connects Ribosomes to Eukaryotic Phosphosignaling. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2017, 37(3), e00279-16 [cit. 2022-03-22]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.00279-16

SI, Wenwen, Shanyu YE, Zhenxing REN, et al. MiR 335 promotes stress granule formation to inhibit apoptosis by targeting ROCK2 in acute ischemic stroke. *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 2019 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1107-3756. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2019.4073

SMITH, Temple F, Chrysanthe GAITATZES, Kumkum SAXENA a Eva J NEER. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1999, 24(5), 181-185 [cit. 2022-03-28]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(99)01384-5

STIRNIMANN, Christian U., Evangelia PETSALAKI, Robert B. RUSSELL a Christoph W. MÜLLER. WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2010, 35(10), 565-574 [cit. 2022-03-21]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2010.04.003

SU, Wen-Yu, Jiong-Tang LI, Yun CUI, et al. Bidirectional regulation between WDR83 and its natural antisense transcript DHPS in gastric cancer. *Cell Research* [online]. 2012, 22(9), 1374-1389 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2012.57

TAKAHASHI, Masahiko, Masaya HIGUCHI, Hideaki MATSUKI, Manami YOSHITA, Toshiaki OHSAWA, Masayasu OIE a Masahiro FUJII. Stress Granules Inhibit Apoptosis by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2013, 33(4), 815-829 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.00763-12

THERRIEN, M, N R MICHAUD, G M RUBIN a D K MORRISON. KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes & Development* [online]. 1996, 10(21), 2684-2695 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.10.21.2684

THOMPSON, Mary K, Maria F ROJAS-DURAN, Paritosh GANGARAMANI a Wendy V GILBERT. The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *ELife* [online]. 2016, 5 [cit. 2022-03-30]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.11154

VALÁŠEK, Leos, Bela SZAMECZ, Alan G. HINNEBUSCH a Klaus H. NIELSEN. In Vivo Stabilization of Preinitiation Complexes by Formaldehyde Cross-Linking. *Translation Initiation: Extract Systems and Molecular Genetics* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 163-183 [cit. 2022-03-30]. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780123741912. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(07)29008-1

VAN DER VOORN, Loesje a Hidde L. PLOEGH. The WD-40 repeat. *FEBS Letters* [online]. 1992, 307(2), 131-134 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(92)80751-2

VOLTA, Viviana, Anne BEUGNET, Simone GALLO, et al. RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency.

Cellular and Molecular Life Sciences [online]. 2013, 70(8), 1439-1450 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-012-1215-y

VOMASTEK, Tomas, Marcin P. IWANICKI, Hans-Joerg SCHAEFFER, Adel TARCSAFALVI, J. Thomas PARSONS a Michael J. WEBER. RACK1 Targets the Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway To Link Integrin Engagement with Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2007, 27(23), 8296-8305 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.00598-07

WALL, Mark A., David E. COLEMAN, Ethan LEE, Jorge A. IÑIGUEZ-LLUHI, Bruce A. POSNER, Alfred G. GILMAN a Stephen R. SPRANG. The structure of the G protein heterotrimer $G\alpha 1\beta 1\gamma 2$. *Cell* [online]. 1995, 83(6), 1047-1058 [cit. 2022-03-29]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(95)90220-1

WANG, Shu, Jin-zhong CHEN, Zhen ZHANG, et al. Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK). *Molecular Biology Reports* [online]. 30(1), 53-60 [cit. 2022-03-29]. ISSN 03014851. Dostupné z: doi:10.1023/A:1022212731316

WITZEL, Franziska, Louise MADDISON a Nils BLÜTHGEN. How scaffolds shape MAPK signaling: what we know and opportunities for systems approaches. *Frontiers in Physiology* [online]. 2012, 3 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2012.00475

XU, Chao a Jinrong MIN. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & Cell* [online]. 2011, 2(3), 202-214 [cit. 2022-03-21]. ISSN 1674-800X. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-011-1018-1

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Schématické znázornění autoregulačního mechanismu fosforylace scaffoldního proteinu KSR1.	10
Obrázek č. 2: Ilustrace WD-40 motivu u lidského proteinu Rack1.	11
Obrázek č. 3: Znázornění vazebné plochy WD-40 proteinu.	12
Obrázek č. 4: Mechanismus inhibice apoptózy prostřednictvím translokace Rack1 do stresových granulí.	15
Obrázek č. 5: Umístění Rack1 na malé 40S ribozomální podjednotce (žlutá).	16
Obrázek č. 6: Zobrazení interakcí mezi ribozomem a R38-K40 u kvasinkového ortologu Rack1, Asc1p.	17
Obrázek č. 7: Schéma přenosu signálu ERK kaskádě a role proteinu Morg1 v ní.	19

Obrázek č. 8: Porovnání lokalizace Morg1 v myších mesangiálních buňkách (MMC) za různých podmínek.	22
Obrázek č. 9: Porovnání úseků aminokyselinové sekvence Rack1 WT, Morg1 WT a Morg1 S45R.....	23
Obrázek č. 10: Grafické znázornění použitých základních plazmidů pEGFP-N1, pcDNA4 GFP a PX458.....	25
Obrázek č. 11: Grafické znázornění výsledků Sangerova sekvenování.	35
Obrázek č. 12: Ověření exprese Morg1-GFP WT v linii „MDCK mMorg1-GFP WT k“.....	35
Obrázek č. 13: Ověření exprese Morg1-GFP WT/S45R v „MDCK mMorg1-GFP WT/S45R i“ liniích.	36
Obrázek č. 14: Sledování lokalizace endogenního Morg1 WT pomocí myší sekundární protilátky Alexa Fluor 488 (AF488) a ektopického Morg1-GFP WT (GFP).....	37
Obrázek č. 15: Porovnání lokalizace Morg1 WT a G3bp1 za oxidačního stresu (NaAsO ₂) i za kontrolních podmínek (kontrola).	37
Obrázek č. 16: Porovnání lokalizace ektopického Morg1-GFP WT a Morg1-GFP S45R s markerem stresových granulí G3bp1.....	38
Obrázek č. 17: Pokus o stanovení exprese Morg1 a GFP pomocí metody Western blot u kontrolní linie netransferovaných MDCK buněk (WT MDCK), u linie MDCK-GFPk (GFPk), MDCK-G3bp1k (G3bp1k), MDCK-Morg1-GFPi 1/2 (WT i1/2), MDCK-Morg1-GFP S45Ri 1/2 (S45R i1/2).....	39
Obrázek č. 18: Sledování exprese Morg1 za účelem určit linie, u nichž došlo ke knock-outu Morg1 (II).	40
Obrázek č. 19: Sledování exprese Morg1 za účelem určit linie, u nichž došlo ke knock-outu Morg1 (II).	40
Obrázek č. 20: Sledování exprese Morg1 za účelem určit linie, u nichž došlo ke knock-outu Morg1 (II)..	41
Obrázek č. 21: Ověření specifity protilátky anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific) a přítomnosti proteinů ve vzorcích.....	41
Obrázek č. 22: Porovnání stability exprese transfekovaných vektorů v MDCK buněčných liniích.	42
Obrázek č. 23: Sledování lokalizace endogenního Morg1-GFP WT (AF488) pomocí myší sekundární protilátky Alexa Fluor 488 a ektopického Morg1-GFP WT (GFP).....	44
Obrázek č. 24: Porovnání lokalizace Morg1-GFP WT, Morg1-GFP S45R a G3bp1 za oxidačního stresu (NaAsO ₂).	45

Obrázek č. 25: Srovnání pozorované exprese Morg1 v původním experimentu (I) a v jeho replikaci (II)..	46
Obrázek č. 26: Porovnání pozorované exprese GFP v původním (I) a v replikovaném experimentu (II)..	47
Obrázek č. 27: Ověřování delece Morg1 vyvolanou pomocí CRISPR/Cas9..	48
Obrázek č. 28: Porovnání výsledků Western blotu u vzorků s očekávanou delecí Morg1..	49
Obrázek č. 29: Porovnání bandů vizualizovaných protilátkou anti-Morg1 (Thermo Fisher Scientific) pomocí metody Western Blot (vlevo) a barvení polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE barvou Coomassie Brilliant Blue..	50

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Seznam použitých enzymů a jejich výrobce.	24
Tabulka č. 2: Seznam použitých plazmidů.	25
Tabulka č. 3: Seznam použitých oligonukleotidů a jejich sekvence.	26
Tabulka č. 4: Seznam protilátek používaných při Western blotu (WB) a imunofluorescenčním barvení (IF).	26
Tabulka č. 5: Přehled složek reakční směsi pro PCR mutagenezi a jejich objemy na reakci o 20 μ l.	28
Tabulka č. 6: Přehled teplotních cyklů pro PCR mutagenezi.	28
Tabulka č. 7: Přehled teplotních cyklů pro připojení gRNA oligonukleotidů pomocí PCR.	28
Tabulka č. 8: Přehled složek reakční směsi pro amplifikaci insertu z vektoru pomocí PCR a jejich objemy na reakci o 50 μ l.	30
Tabulka č. 9: Přehled teplotních cyklů pro PCR mutagenezi.	30
Tabulka č. 10: Přehled složek separačního a zaostřovacího polyakrylamidového gelu.	32