

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Identifikace
interaktomu lidských
uridylyltransferáz
v buňce**

Bakalářská práce

MARKÉTA NEČASOVÁ

Vedoucí práce: prof. Mgr. Štěpánka Vaňáčová, Ph.D.

Ústav biochemie
Program PŘF B-BIC Biochemie

Brno 2022

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Markéta Nečasová
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav biochemie

Název práce: Identifikace interaktomu lidských uridylyltransferáz v buňce

Studijní program: PŘF B-BIC Biochemie

Vedoucí práce: prof. Mgr. Štěpánka Vaňáčková, Ph.D.

Rok: 2022

Počet stran: 103

Klíčová slova: TENT, TUT, posttranskripční modifikace, TUT4, TUT7, uridylace, proteinové interaktomy

Bibliographic record

Author: Markéta Nečasová
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Identification of the in cellulo interactions of human uridylyltransferases

Degree Programme: PŘF B-BIC Biochemistry

Supervisor: prof. Mgr. Štěpánka Vaňáčková, Ph.D.

Year: 2022

Number of Pages: 103

Keywords: TENT, TUT, post-transcriptional modifications, TUT4, TUT7, uridylation, protein interactions

Abstrakt

Posttranskripční modifikace RNA jsou důležitou součástí metabolických drah či dozrávání RNA. Jednou z těchto modifikací je uridylace 3'konce prováděná terminálními uridylyltransferázami (TUT) z proteinové nadrodiny TENT. U lidí byli identifikováni tři zástupci TUTáz – TUT1, TUT4 a TUT7. U zástupců TUT4 a TUT7 byla potvrzena kooperace s proteinovými partnery, kteří tím získávají schopnost regulace enzymatické aktivity těchto TUTáz. Doposud byli popsáni pouze dva interakční partneři Lin28A a MOV10. Cílem práce byla příprava expresních konstruktů pro TUT4 a TUT7 a jejich testy, které budou následně sloužit pro studium interakcí v buňce.

Abstract

Post-transcriptional modifications of RNA are part of metabolic pathways and maturation of RNA. One of these modifications is uridylation of 3' end of RNA performed by terminal uridylyltransferases (TUTs) from TENT protein superfamily. There are three representatives of TUTases identified in human – TUT1, TUT4 and TUT7. TUT4 and TUT7 has been confirmed to cooperate with protein partners, who thus gain the ability of regulation enzymatic activity of these TUTases. Until today there are described only two interaction partners Lin28A and MOV10. The aim of this work was preparation of expression constructs for TUT4 and TUT7 and their testing, so they can be used for farther studies of interactions in cell.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2021/2022

Ústav:	Ústav biochemie
Studentka:	Markéta Nečasová
Program:	Biochemie
Specializace:	Biochemie

Ředitel ústavu PŘF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Identifikace interaktomu lidských uridylyltransferáz v buňce
Název práce anglicky:	Identification of the in cellulo interactions of human uridylyltransferases
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Terminální uridylyltransferázy (TUTázy) patří do širší rodiny terminálních nukleotidyltransferáz. V lidském genomu jsou kódovány nejméně tři terminální TUTázy a dosud byla jejich role spojena s regulací dozrávání zárodečných buněk, buněčné diferenciaci a rozvojem některých rakovinných bujení. Dosud není známo, jak přesně rozpoznávají rozdílné substráty RNA a jak jsou regulovány.

Cílem této práce bude odhalení interakčních proteinových partnerů pomocí metody proximity labeling (tzv. BioID). Studentka připraví expresní konstrukty TUT4 a TUT7 s fúzí s tahem domény BirA. Otestuje jejich expresi v lidských tkáňových liniích HEK293T-Rex, připraví stabilní linie s indukovatelnou expresí a provede první testy biotinylace. Pokud nedojde k opětnému uzavření kampusu pro studenty, provede i samotné experimenty BioID na něž naváže kvantitativní analýza biotinylovaných proteinů pomocí MS-MS.

Literatura: A tale of non-canonical tails: gene regulation by post-transcriptional RNA tailing. Yu S, Kim VN. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020 doi: 10.1038/s41580-020-0246-8.

Function and Regulation of Human Terminal Uridylyltransferases. Yashiro Y, Tomita K. Front Genet. 2018 doi: 10.3389/fgene.2018.00538. eCollection 2018.

Proximity labeling and other novel mass spectrometric approaches for spatiotemporal protein dynamics. Pino L, Schilling B. Expert Rev Proteomics. 2021 doi:10.1080/14789450.2021.1976149.

Spatiotemporally-resolved mapping of RNA binding proteins Qin W, et al. Nat Commun. 2021 doi: 10.1038/s41467-021-25259-2."

Vedoucí práce:	prof. Mgr. Štěpánka Vaňáčová, Ph.D.
Datum zadání práce:	13. 9. 2021
V Brně dne:	9. 5. 2022

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Markéta Nečasová, 12. 4. 2022
prof. Mgr. Štěpánka Vaňáčová, Ph.D., 21. 4. 2022
RNDr. Jitka Kašparovská, Ph.D., 26. 4. 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 17. května 2022

.....
Markéta Nečasová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Mgr. Štěpánce Vaňáčové, Ph.D., která mi dala příležitost k vypracování závěrečné práce v její laboratoři, za její vedení a užitečné rady během experimentální práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Feketové, Ph.D. za její vedení v počátcích mé práce v laboratoři a Mgr. Anně Hřčkové, za trpělivou pomoc při závěrečných experimentech a psaní práce. Velké díky patří taktéž všem členům výzkumné skupiny Kontrola kvality RNA, kteří mi byli během práce oporou.

Obsah

Seznam obrázků	17
Seznam tabulek	19
Seznam pojmů a zkratk	20
Seznam příloh	21
1 Úvod	23
2 TENT a posttranskripční modifikace	24
2.1 Obecná charakteristika TENT	24
2.2 PAP – poly(A) polymerázy.....	24
2.2.1 TENT2.....	25
2.2.2 TENT4.....	26
2.2.3 TENT5.....	26
2.2.4 TENT5A.....	26
2.2.5 TENT5B.....	26
2.2.6 TENT5C.....	27
2.2.7 TENT5D	27
2.2.8 TENT6.....	27
2.3 TUT – terminální uridylyltransferázy	28
2.3.1 TENT1, také TUT1, U6 TUT	29
2.3.2 TUT4 a TUT7.....	30
3 miRNA	31
3.1 miRNA rodina let-7.....	32
4 TUT4 a TUT7 v procesu miRNA dozrávání	34
4.1 Lin28.....	35
4.1.1 Zapojení Lin28 v onkogenezi	36
4.1.2 Role Lin28 v buněčné diferenciaci	37
4.2 MOV10.....	38
4.3 TIFA.....	38

5	Teoretický úvod k metodám	40
5.1	Proximity labeling.....	40
6	Hypotéza a cíle práce	41
7	METODY	42
7.1	Plasmidy	42
7.1.1	Příprava konstruktů pcDNA5 pro expresi TUT4 a TUT7	42
7.1.2	3xHA-miniTurbo-NSL_pCDNA3.....	43
7.1.3	Primery	44
7.1.4	Markery pro gelovou elektroforézu.....	44
7.2	Příprava insertu – miniTurboID.....	44
7.2.1	Namnožení vektoru a jeho izolace	44
7.2.2	Izolace plasmidové DNA.....	45
7.2.3	Design primerů	45
7.2.4	PCR miniTurboID	46
7.2.5	Gelová elektroforéza.....	47
7.2.6	Izolace DNA z gelu	48
7.2.7	Restrikční štěpení miniTurboID.....	49
7.3	Příprava vektorů	49
7.3.1	Transformace vektorů	49
7.3.2	Restrikční štěpení vektorů	50
7.4	Ligace.....	51
7.4.1	Screening bakteriálních kolonií pomocí PCR.....	52
7.4.2	Midi-prep TUT7	53
7.4.3	Tranzientní transfekce TUT7	54
7.4.4	Příprava proteinového lyzátu pro SDS-PAGE z kultury lidských buněk.....	55
7.4.5	SDS-PAGE	55
7.4.6	Western Blot	56
7.5	Test biotinylační aktivity	59
7.5.1	SDS-PAGE a western blot.....	59
7.5.2	Odstranění protilátek z PVDF membrány	59

7.6	Příprava kontrolního expresního konstruktů	61
7.6.1	PCR miniTurboID	61
7.6.2	Štěpení miniTurboID	62
7.6.3	Štěpení pcDNA5-FRT-TO-N-FPH	63
7.6.4	Ligace a kontrola ligace V623 a miniTurboID.....	63
8	VÝSLEDKY	65
8.1	Příprava konstruktů pro expresi TUT4 a TUT7	65
8.1.1	miniTurboID	65
8.2	Ověření a ligace miniTurboID a plasmidů.....	67
8.3	Testování exprese TUT7.....	71
8.4	Ověření exprese a biotinylační aktivity miniTurboID - TUT4 a miniTurboID - TUT7	73
8.4.1	Biotinylační testy a ověření exprese TUT4 a TUT7 protilátkou Flag-Tag 74	
8.4.2	Biotinylační testy a ověření exprese TUT4, TUT7 a kontrolního konstruktů specifickými protilátkami.....	75
8.5	Kontrolní konstrukt V623 s miniTurboID.....	81
8.5.1	Screening bakteriálních kolonií pomocí PCR.....	82
9	Závěr	83
	Použité zdroje	85
Příloha A	Sekvence V569-TUT4-miniTurboID	98
Příloha B	Sekvence V867-TUT7-miniTurboID	101

Seznam obrázků

Obrázek 1 – biogeneze miRNA. RISC: RNA-indukovaný tišící komplex; Ago: Argonaute proteinová rodina. (upraveno dle 67).....	32
Obrázek 2 - proces úpravy pre-miRNA proteiny TUT4 a TUT7 se zapojením Lin28 (upraveno dle (10)).....	35
Obrázek 3 - Schéma vlivu exprese Lin28 na let-7 a expresi Ras proteinu a jejich vlivu na buněčné procesy (upraveno y 74).....	37
Obrázek 4 - mapa plasmidu V867 s TUT7.....	43
Obrázek 5 - mapa plasmidu 3x HA-miniTurbo-NSL_pCDNA3.....	43
Obrázek 6 - schéma experimentů s jednotlivými membránami.....	60
Obrázek 7 - mapa vektoru pcDNA5 s vloženou TUT4 a miniTurboID.....	65
Obrázek 8 - mapa vektoru pcDNA5 s vloženou TUT7 a miniTurboID.....	66
Obrázek 9 -ověření purifikace DNA na 1 % agarózovém gelu. Zleva 1 kb marker, vektory V569 a B867 o velikosti 10 000bp, 100 bp marker a miniTurboID pro každý konstrukt o velikosti 770bp.....	68
Obrázek 10 - primery užívané při PCR kolonií transformovaných s TUT4 konstruktem, modrý text znázorňuje sestřiženou sekvenci miniTurboID, červený text sestřiženou sekvenci TUT4, žlutě podbarvené jsou pak primery se šipkami znázorňujícími směr syntézy nového vlákna DNA.....	68
Obrázek 11 - primery užívané při PCR kolonií transformovaných s TUT7 konstruktem, modrý text znázorňuje sestřiženou sekvenci miniTurboID, červený text sestřiženou sekvenci TUT4, žlutě podbarvené jsou pak primery se šipkami znázorňujícími směr syntézy nového vlákna DNA.....	69
Obrázek 12 – screening kolonií s TUT4 konstruktem pomocí PCR. Nalevo 1 kb marker, následuje 10 testovaných kolonií a negativní kontrola K. Pozorujeme 3 vzorky o správné velikosti produktu 3300 bp.....	69
Obrázek 13 – screening kolonií s TUT7 konstruktem pomocí PCR. Nalevo 100 bp marker, následuje 10 testovaných kolonií a negativní kontrola K. Pozorujeme 3 vzorky o správné velikosti produktu 1500 bp.....	69
Obrázek 14 -Ověření exprese TUT7 z TUT7 konstruktů pomocí western blotu. Zleva neindukovaný (DOX-) a indukovaný (DOX+) vzorek s protilátkou na Flag-Tag, následně velikosti dle markeru a indukovaný a neindukovaný vzorek s protilátkou na TUT7. Signál byl detekován po 5minutové expozici.....	71
Obrázek 15 – Ověření exprese TUT7 z TUT7 konstruktů pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na TUT7. Zleva vidíme vzorek z neindukovaných buněk (DOX-) po 10minutové biotinylní, dále doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylní, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylní a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylní. Signál byl detekován po 30 s expozici.....	74
Obrázek 16 – Ověření exprese TUT4 z TUT4 konstruktů pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na TUT7. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po	

- 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 10minutové expozici.75
- Obrázek 17 - Ověření exprese tubulinu z TUT4 konstruktů pomocí western blotu. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 2minutové expozici.....76
- Obrázek 18 - Ověření exprese TUT7 v TUT7 konstruktů pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na TUT7. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 2s expozici.....77
- Obrázek 19 - Ověření exprese tubulinu v TUT7 konstruktů pomocí western blotu. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci.....77
- Obrázek 20- Ověření exprese miniTurboID v konstruktů negativní kontroly pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na 3x HA. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 2minutové expozici.78
- Obrázek 21 - Ověření exprese tubulinu v TUT7 konstruktů negativní kontroly pomocí western blotu. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 2minutové expozici.....78
- Obrázek 22 - Ověření biotinylnační aktivity v konstruktech TUT4, TUT7 i konstruktů negativní kontroly pomocí western blotu po inkubaci se Streptavidin – HRP. První čtveřice je pro TUT4 konstrukt, druhá pro TUT7 konstrukt a třetí pro negativní kontrolu. Zleva vidíme vždy čtveřici vzorků – první je vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a poslední je indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 10minutové expozici.79
- Obrázek 23 - kontrolní elektroforéza štěpeného vektoru V623 o velikosti 5250 bp a štěpeného miniTurboID o velikosti 770 bp81
- Obrázek 24 – screening kolonií pomocí PCR ligace V623 s miniTurboID, nalevo 1 kb marker následovaný 8 testovanými koloniemi a negativní kontrolou.....82

Seznam tabulek

Tabulka 1 - přehled primerů pro amplifikaci genu miniTurboID pomocí PCR	46
Tabulka 2 - složení jedné PCR reakce	47
Tabulka 3 - podmínky pro miniTurboID připravované pro ligaci s vektorem obsahující TUT4	47
Tabulka 4 - podmínky pro miniTurboID připravované pro ligaci s vektorem obsahující TUT7	47
Tabulka 5 - složení jedné štěpící reakce	49
Tabulka 6 - složení jedné štěpící reakce pro TUT4 konstrukt.....	50
Tabulka 7 - složení jedné štěpící reakce pro TUT7 konstrukt.....	51
Tabulka 8 - složení ligační reakce o objemu 10 μ l	51
Tabulka 9 - primery používané pro sekvenaci TUT4 konstrukt	53
Tabulka 10 - primery používané při sekvenaci TUT7 konstrukt.....	53
Tabulka 11 - přehled primárních protilátek, jejich původců a výrobců.....	58
Tabulka 12 - přehled původců sekundárních protilátek, jejich ředění a výrobců.....	58
Tabulka 13 - primery použité při amplifikaci genu pro miniTurboID metodou PCR ..	61
Tabulka 14 - složení jedné PCR reakce.....	61
Tabulka 15 - průběh a parametry reakce	62
Tabulka 16 - složení jedné štěpné reakce miniTurboID	62
Tabulka 17 - složení jedné štěpné reakce vektoru V623	63
Tabulka 18 - složení ligačních reakcí	63
Tabulka 19 - primery užití při PCR kolonií transformovaných s ligační reakcí	64
Tabulka 20 - primery užití při sekvenaci konstrukt	64
Tabulka 21 - přehled koncentrací po amplifikaci genu miniTurboID metodou PCR ...	66
Tabulka 22 - přehled koncentrací po štěpení amplifikonu miniTurboID	67
Tabulka 23 - přehled koncentrací plasmidů DNA izolované po bakteriální transformaci	67
Tabulka 24 - přehled koncentrací plasmidů po štěpící reakci	67
Tabulka 25 - přehled koncentrací vzorků izolované DNA	70
Tabulka 26 - přehled koncentrací DNA ve formě Midi-prepu	70
Tabulka 27 - přehled koncentrací proteinů měřené metodou dle Bradfordové	71
Tabulka 28 - přehled koncentrací proteinu u jednotlivých vzorků, čas vždy reprezentuje bod, ve kterém byly buňky po přidání biotinu posbírány	73
Tabulka 29 - přehled velikostí jednotlivých vzorků	73
Tabulka 30 - koncentrace miniTurboID po amplifikaci metodou PCR a izolaci.....	81
Tabulka 31 - přehled koncentrací vektoru V623 a miniTurboID po štěpící reakci	81
Tabulka 32 - přehled koncentrací vybraných vzorků po izolaci DNA.....	82
Tabulka 33 - koncentrace vzorku 8 připraveného ve formě Midi-prepu	82

Seznam pojmů a zkratk

TENT	- terminální nukleotidyltransferáza
TUT	- terminální uridylyltransferáza
PAP	- poly(A) polymeráza
RRM	- RNA rozpoznávající motiv
snRNA	- malá jaderná RNA
miRNA	- microRNA
RISC	- „RNA-induced silencing complex“
ZKD	- „zinc knuckle“ doména
CSD	- „cold-shock“ doména
LB	- Luria-Bertani
BSA	- hovězí sérový albumin
DMEM	- „Dulbecco Modified Eagle Medium“

Seznam příloh

Přílohy v textu

Příloha A	Sekvence V569-TUT4-miniTurboID	98
Příloha B	Sekvence V867-TUT7-miniTurboID	101

1 Úvod

U většiny eukaryotických RNA dochází k posttranskripčním modifikacím na jejich 3' konci. Skrze tyto modifikace může být regulován metabolismus RNA a jeho zásadní děje, jako je dozrávání RNA, či naopak její degradace, nebo stabilita a funkce RNA. Během posledních let jsou objevovány proteiny za tyto modifikace zodpovědné – terminální nukleotidyltransferázy (TENT) patřící do nadrodiny polymerázy β (1), celkem jich bylo popsáno 11. Dle substrátové specifity je pak můžeme rozdělit na poly(A) polymerázy (PAP) a na terminální uridylyltransferázy (TUT). PAP zajišťují adenylaci různých RNA substrátů, v závislosti na typu se pak může jednat o monoadenylaci nebo o polyadenylaci. TUT mají schopnost uridylylace RNA. Hrají klíčovou roli při metabolismu RNA. Mohou svou činností zajistit dozrávání RNA nebo ji předurčit k degradaci (2). Uridylace také ovlivňuje onkogenezi či diferenciaci buněk (3). TUT mohou uridylylaci provádět buďto samostatně nebo k ní využít kooperace s proteinovými partnery (4). Práce má za cíl poskytnout přehled o aktuálních poznatcích o terminálních nukleotidyltransferázách, především pak terminálních uridylyltransferázách a pokroku ve výzkumu jejich interaktomů.

V experimentální části se práce zaměřuje na přípravu expresních konstruktů s TUT4 a TUT7, které mohou napomoci při identifikaci nových proteinových interaktomů těchto TUTáz.

2 TENT a posttranskripční modifikace

2.1 Obecná charakteristika TENT

Terminální nukleotidyltransferázy, ve zkratce TENT, jsou rodinou proteinů patřící do nadrodiny DNA polymerázy β a jsou schopné posttranskripčně upravovat 3' konce RNA přidáváním netemplátových nukleotidů, odkud také vznikl jejich název.

Tuto schopnost mají díky své katalytické doméně, jejíž vlastnosti a strukturu sdílí s proteiny napříč nadrodinou DNA polymerázy β , kam se kromě TENT proteinů řadí i kanonické poly(A) polymerázy (PAP) (1). Společnou strukturu katalytické domény tvoří konzervovaná nukleotidyltransferázová doména (NTD) a doména odvozená od kanonické poly(A) polymerázy (*z angl. PAP-associated domain*) (2).

Podíváme-li se blíže na strukturu domén, najdeme v NTD triádu konzervovaných aspartátů, které jsou pro katalytickou funkci domény nezbytné, jelikož v aktivním místě enzymu váží dva ionty kovu a napomáhají tak vazbě nukleotidů (5). Zvláštností zůstává, že kromě TENT1 (=TUT1, U6) postrádají terminální nukleotidyltransferázy specifický motiv rozpoznávající RNA (RRM), na rozdíl od kanonických poly(A) polymeráz, které jej mají (6).

Během posledních let bylo postupně identifikováno a popsáno 11 lidských terminálních nukleotidyltransferáz. Na základě jejich substrátové specifity je pak můžeme rozdělit na nekanonické PAP, které vykazují preference vůči ATP a na terminální uridylyltransferázy (TUT), které preferují UTP.

První skupina zahrnuje nekanonické jaderné poly(A)polymerázy, které jsou odpovědné za polyadenylaci mRNA a dalších produktů transkripce RNA polymerázy II. Do druhé skupiny se řadí TUTázy schopné rozpoznávat různé RNA substráty. Patří sem také ostatní nukleotidyltransferázy, které se podílejí na posttranskripčních modifikacích, jako je například adenylace, cytidylace, guanylace. Poslední, třetí, skupina pak zahrnuje enzymy se schopností přidání sekvence – CCA, které napomáhají dozrávání tRNA (8).

Zmíněné modifikace mohou významně ovlivňovat či regulovat mnohé buněčné procesy, jako je například genová exprese (9,10).

2.2 PAP – poly(A) polymerázy

Existence polyA polymeráz přišla s objevem cytoplazmatické polyadenylace, která byla poprvé pozorována u organismu *C. elegans* (11). Polyadenylační aktivita byla následně spojena s aktivitou TENT2. Další nekanonické PAP byly identifikovány jako nekanonické na základě podobnosti právě s TENT2 (11). Organizace domén odpovídá příslušnosti k nadrodině TENT, nalezneme zde tedy NTD, která je u PAP konzervovaná,

doménu odvozenou od kanonických PAP, a v neposlední řadě katalyticky významnou trojici aspartátů (5).

Z rodiny PAP u člověka najdeme zástupce TENT2, TENT4A, TENT4B, TENT5 a také mitochondriální poly(A) RNA polymerázu TENT6, jinak zvanou MTPAP. Všichni tito zástupci patří mezi nekanonické PAP a vykazují adenylační aktivitu. TENT4A a TENT4B z tohoto seznamu mírně vystupují, jelikož není jejich specifita zcela jasně vymezena (13). Mohou tak vystupovat jako PAP, ale zároveň i jako TUT. Podobná aktivita byla pozorována i u TENT1, která preferovaně vystupuje jako TUT, ale za podmínek oxidativního stresu mění svoje preference na UTP, jak ukázaly *in vitro* testy v buněčných esejích (14). Její aktivita je však stále velmi kontroverzní, jelikož vykazuje daleko větší afinitu k UTP, než ATP (15).

Funkce jednotlivých zástupců PAP jsou velmi různorodé a v několika následujících podkapitolách budou postupně představeny.

2.2.1 TENT2

TENT2 je první ze zástupců této rodiny. Jde o nekanonickou PAP u savců lokalizovanou v cytoplazmě i jádře (16). Poprvé byla její polyadenylační aktivita pozorována u oocytů *Xenopus laevis* (12). Později se prokázala její přítomnost u organismů *C. Elegans*, kde se nachází její homolog GLD2 (11), a *D. Melanogaster* (2) a nakonec i u savců, jako první u člověka a myši (12), kde však stále není její funkce dostatečně popsána. Po četných výzkumech na nižších organismech, jako jsou výše zmíněné, jí byla přisouzena role stabilizátora mRNA, který napomáhá translaci a reguluje ji. Tato schopnost se ukázala být důležitou součástí mnoha biologických procesů. Byla prokázána regulace rané embryogeneze a gametogeneze, kde hraje roli ve zpracování maternálního transkriptomu (17,18). Vedle těchto dějů byla regulace genové exprese polyadenylací pozorována i při synaptické plasticitě, která hraje důležitou roli při tvorbě dlouhodobé paměti (19,20). Kromě mRNA může regulovat stabilitu a funkci také miRNA. U té může vykazovat monoadenylační nebo oligoadenylační aktivitu, přičemž důsledky obou jevů se značně liší. Monoadenylací se zvyšuje stabilita molekuly, zatímco oligoadenylace ji označuje k degradaci (11,15). TENT2 také vykazuje homologii k TUT4 a TUT7, což by poukazovalo na jeho uridylační schopnosti. Existují předpoklady, že uridylace pre-miRNA, konkrétně pre-let-7, v lidských buňkách může být prováděna alternativně proteinem TENT2 (21,22). Zatímco z lidských buněk byl izolován TENT2 s uridylovanou pre-let-7 (23), při experimentech s využitím *E.coli* se však aktivita změnila zpět v adenylační. Výsledkem těchto experimentů bylo konstatování, že TENT2 je tedy po právu zařazen mezi PAP, nicméně může vykazovat i uridylační činnost (21).

2.2.2 TENT4

TENT4 zástupce má dvě isoformy – TENT4A a TENT4B. Jedná se o homology proteinů Trf4p a Trf5p, které jsou součástí TRAMP komplexu v kvasinkách (118). Ten má různou adenylační aktivitu v závislosti na RNA substrátu, jehož osud je pak touto různorodou činností ovlivněn (24). Oba tyto proteiny jsou primárně jaderné (25), avšak TENT4A byl nalezen také v cytoplazmě. (26) Zajímavostí u obou zástupců je, že při adenylaci nepřidávají na konce mRNA striktně pouze adenosiny. V řetězcích, které tvoří se objevují také residua ostatních bazí s preferencí ke guanosinu. Tato residua by mohla vést ke zpomalení deadenylace (13). TENT4A je v člověku dále exprimován ve dvou isoformách lišících se ve své N – terminální oblasti. Rozlišujeme tak TENT4A short (S) a TENT4A long (L). Zatímco TENT4A (L) se vyskytuje v jádře, inaktivní TENT4A (S) se lokalizuje i do cytoplazmy (26). Úloha TENT4A však není významně studována, jelikož se, na rozdíl od svého homologu TENT4B, nezapojuje do lidského TRAMP komplexu (27).

2.2.3 TENT5

U savců TENT5 rodina sestává ze čtyř evolučně konzervovaných a sekvenčně podobných homologů – TENT5A, TENT5B, TENT5C a TENT5D. Celá rodina TENT5 je tvořena nekanonickými PAP, jejichž zástupci se v různých počtech vyskytují u všech savců a jsou lokalizovány v cytoplazmě i v jádře (28). Ačkoli proběhly bioinformatické analýzy, jejich funkce nebyly do dnešního dne uspokojivě popsány, avšak díky známé struktuře TENT5B je známo, že TENT5 sdílí důležité katalytické domény, díky kterým je můžeme identifikovat jako nukleotidyltransferázy (30,103).

2.2.4 TENT5A

TENT5A je strukturně zatím popsán velmi spoře. Nedávno bylo postulováno, že spolu se svým homologem TENT5C hrají roli v polyadenylaci mRNA genů kódujících proteiny, které se objevují během procesu mineralizace kostí (104). Je také ve zvýšené míře exprimován v embryonálních tkáních, i tkáních dospělých jedinců myší, které podléhají mineralizaci, což opět poukazuje na jeho funkci ve správné tvorbě kostí (105). Přesný mechanismus jeho působení však zůstává otázkou.

2.2.5 TENT5B

Jak bylo zmíněno výše, poměrně nedávno byla rozluštěna struktura homologa TENT5B v organismu *Xenopus tropicalis* (31), která posloužila jako modelová struktura proteinů TENT5 a díky které je předpokládáno, že proteiny z této rodiny sdílí katalytickou doménu i preferenci substrátu (30). Bylo zjištěno, že substrátově TENT5B cílí na RNA bohaté na adenosiny v blízkosti jejich 3' konce, což napovídá tomu, že

TENT5 proteiny pracují již na polyadenylovaných mRNA (30,31). Byla také specifikována lokalizace TENT5B, a to v jádře i cytoplazmě. Je velmi důležitý pro buněčnou viabilitu lidských embryonálních buněk. Jeho zvýšená exprese byla detekována v lidských embryonálních buňkách, naopak jeho úbytek nastal při procesu diferenciaci buněk. Knock-out tohoto proteinu v lidských embryonálních kmenových buňkách byl letální, knock-down vyvolával apoptózu a inhiboval proteosyntézu (31). TENT5B je spojován s mnohočetným myelomem, kde je jeho nižší exprese dávana do souvislosti s nižší šancí přežití (30).

2.2.6 TENT5C

TENT5C je spojován s vývojem rakoviny. Výrazně nižší exprese byla zaznamenána v hepatocelulárním karcinomu, zatímco v normální jaterní tkáni byla hladina TENT5C vyšší (32). Podobné výsledky vykazovaly i karcinomy plic (33) či trávicího traktu (34). Důležitou roli má pravděpodobně i při mnohočetném myelomu. Při utišení genu pro TENT5C došlo k expresi proteinu WT a tím ke zvýšení proliferace. Byla také pozorována zvýšená produkce tohoto proteinu při aktivaci primárních splenocytů. Tyto poznatky ukazují na jeho onko – supresorový efekt (35).

2.2.7 TENT5D

TENT5D zůstává prozatím nejméně popsáným proteinem z rodiny TENT5. Silná poyladenylační aktivita u něj byla prokázána pouze in vitro (30). Nicméně se ukázalo, že je nadměrně exprimován v mozgovém kortexu myší, u kterých byla pozorována porucha chování připomínající poruchu autistického spektra, je proto s touto poruchou asociován (36). U člověka byla objevena přítomnost protilátek proti TENT5D, a to výhradně v plazmě lidí s diagnostikovanou rakovinou plic nebo varlat. Stává se tak potenciálním terapeutickým cílem u těchto onemocnění (37).

2.2.8 TENT6

TENT6 neboli MTPAP je zástupce rodiny TENT proteinů identifikovaný v mitochondriích (38). Zatímco v rostlinách a prokaryotických organismech má označení mitochondriální mRNA polyA koncem za následek degradaci a jedná se tak o destabilizační modifikaci, v eukaryotických organismech dovytváří chybějící UAA stop kodon a regulují tak translaci (39,40). Do jaké míry přispívá stabilizaci u eukaryot zůstává nejednoznačné (41). Nedostatek MTPAP pak vedl ke snížení hladiny a narušení maturace tRNA^{Tyr} a tRNA^{Cys}, což napovídá tomu, že polyadenylace může mít vliv i na dozrávání a stabilitu specifických mitochondriálních tRNA (42).

2.3 TUT – terminální uridylyltransferázy

Uridylace je po adenylaci druhým z typů posttranskripční editace RNA, a zároveň se jedná o druhou nejčastější modifikaci. Jde o proces, kdy se na konec 3' RNA připojuje od jednoho až po 20 a více uridinů (2). Počet přidaných uridinů pak závisí na typu RNA substrátu a jeho dalším osudu v RNA metabolismu, jelikož právě počet přidaných uridinů určuje, co se substrátem bude dále dít. Může tak být regulována genová exprese, dozrávání kódující i nekódující RNA, ale také může docházet ke změnám její stability či biologické funkce. Tyto změny mají pak vliv na metabolismus RNA a jsou spojovány s četnými onemocněními (7).

Proces uridylace byl poprvé pozorován u rostlin, studovaným modelem byl *Arabidopsis thaliana*, neboli Huseníček rolní (43). V průběhu let byla pak uridylace pozorována v mnoha eukaryotních organismech, jako jsou například trypanozomy (44), houby (45) či savci (46). U rodu *Saccharomyces cerevisiae* bylo naopak pozorováno snížená uridylační aktivita (7). Stejně tak byla pozorována i na různých RNA substrátech, mezi nimiž najdeme mRNA, fragmenty mRNA, snRNA, miRNA či jejich prekurzory (9). Strůjci tohoto netemplátového procesu RNA uridylace jsou pak enzymy zvané terminální uridylyltransferázy, zkráceně TUTázy.

Jak bylo řečeno výše, TUTázy patří do nadrodiny DNA polymerázy β . Tomu odpovídá i povaha jejich katalytické domény, která je tvořena, stejně jako u ostatních TENT, nukleotidyltransferázovou doménou a doménou odvozenou od poly(A)polymerázy. Tato doména se následně vyvinula do podoby, kdy přednostně váže uridintrifosfát (UTP), namísto adenosintrifosfátu (ATP) (7).

V současné době jsou potvrzená TUTázová aktivita u tří členů rodiny TENT – TUT1, TUT4 a TUT7, které se od sebe více či méně liší. Prvním zásadním rozdílem je lokalizace. Zatímco TUT1 je jaderný protein (47), TUT4 a TUT7 jsou lokalizovány v cytoplazmě (48). Tato rozličná lokalizace tak pro jednotlivé TUTázy určuje i rozdílné RNA substráty. Zároveň, jak bylo zmíněno v kapitole *Obecná charakteristika TENT*, TUT1 má jako jediná specifický RNA motiv, který TUT4 i TUT7 postrádají. I sekvenčně se TUTázy pomyslně rozdělují na TUT1 a TUT4 s TUT7, jelikož TUT4 a TUT7 jsou si sekvenčně velice podobné a předpokládá se, že TUT7 se vyvinula po boku TUT4 jako její homolog, zatímco TUT1 je od zbylých dvou sekvenčně odlišná (49).

Podíváme-li se na samotný proces uridylace, její následny podléhají vícero faktorům a velice záleží na typu substrátu a přítomnosti interagujících proteinů. Podle těchto faktorů je pak molekula uridylována buďto jednotlivými uridiny nebo dochází k polyuridylaci. Tyto rozdílné jevy se pak promítají do průběhu mnoha biologických procesů u vyšších organismů, mezi které patří diferenciaci a vývoj zárodečných buněk či imunitní odpověď vůči infekcím (3). Dále například embryonální vývoj, kdy je původní uridylovaná mRNA degradována a nahrazena syntetizovaným zigotickým transkriptem (50). Během dozrávání oocytů jsou uridylovány a následně degradovány některé maternální transkripty, jejichž zánik je nutný pro správný průběh dozrávání

(15). Skrze destabilizaci mRNA uridyací dochází také k regulaci translace (51). Zároveň hraje roli ve správném průběhu spermatogeneze (52). S degradací uridylované mRNA je také spojována apoptóza, degradace na základě uridylyce by mohla být totiž jedním z prvních příznaků zahájení buněčné smrti (53). Uridylace probíhá hojně také na prekurzorech miRNA, konkrétně u rodiny miRNA let-7, kde jsou upravovány pre-let-7 pre-miRNA a na základě délky polyU konce jsou degradovány nebo označeny k dozrání. Pozorována byla i uridylyce histonové mRNA či ncRNA. Na těchto příkladech je vidět, že substráty pro uridylyci mohou být opravdu různorodé, stejně jako jejich zapojení do rozličných biologických procesů.

2.3.1 TENT1, také TUT1, U6 TUT

TENT1 je mezi obratlovci protein evolučně vysoce konzervovaný a najdeme ho ve všech typech lidských tkání (2). Struktura TENT1 byla popsána jako první z proteinů TUT ve vyšších eukaryotických organismech. Jak bylo zmíněno v kapitole *Obecná charakteristika TENT i Obecná charakteristika TUT*, TENT1 jako jediný z rodiny těchto proteinů má typický RNA rozpoznávací motiv. Ten se nachází na jako N – terminálním konci spolu s motivy zinkových prstů, následuje doména pro vazbu RNA (RNA-binding domain) asociovaná s kinázou (KA-1) a na C – terminálním konci je signální sekvence pro jadernou lokalizaci (47,15).

Hlavní úlohou TENT1 je uridylyce U6 snRNA, tedy malé jaderné RNA (54).

U6 snRNA je vysoce konzervovaná RNA ze skupiny malých RNA nacházejících se v eukaryotických spliceozomech, což jsou ribonukleoproteinové komplexy zodpovědné za sestřih pre-mRNA (9,55). Pro jejich správnou funkci jsou nezbytné právě malé RNA, jako je zmiňovaná U6 snRNA. Kromě ní se ve spliceozomech vyskytují navíc ještě U1, U2, U4 a U5 snRNA. U6 snRNA v lidském organismu jako vznikající transkript obsahuje na svém konci 3' sekvenci čtyř uridinů. Tyto uridiny fungují jako terminační sekvence pro RNA polymerázu III, kterou je U6 snRNA přepisována. Po dokončení přepisu přichází La protein se schopností se vázat na polyU konec a zajistit tak stabilitu vznikající snRNA. Pro další vývoj dozrávání jsou nutné dvě opačné reakce. V dalším kroku La protein odstupuje, aby se na konec 3' se čtyřmi uridiny mohlo připojit dalších 16 uridinů do celkové délky polyU konce 20 uridinů (55). Tuto oligouridylyci katalyzuje zmiňovaná TENT1. Pro stabilizaci je však následně nutné, aby byl polyU konec zkrácen. Děje se tak prostřednictvím 3'-5' exonukleázové aktivity proteinu USB1 (Mpn1), který zkrátí polyU konec na pouhých pět uridinů. Protein USB1 zároveň katalyzuje tvorbu cyklického fosfátu na posledním z uridinů. Vzniká tak konec s 2', 3'-cyklickým fosfátem, který zajistí stabilitu zralé snRNA (56,55,57). Kdyby k této stabilizační úpravě nedošlo, byl by konec 3' adenylován a degradován (56).

Průběh tohoto dozrávání se mírně liší v případě kvasinek, kde jsou uridiny na konec 3' přidávány již během samotné transkripce a na konci je RNA buďto ukončena

cyklickým fosfátem, stejně jako je tomu u člověka, nebo hydroxylovou funkční skupinou (57).

Kromě vysoké afinity k UTP, díky které je TENT1 schopen uridylylace, má také afinitu k ATP, ale o něco nižší. TENT1 se tak stává proteinem s poměrně kontroverzní schopností zastávat také funkci jaderné PAP. Pro preferenci ATP jako substrátu však potřebuje speciální podmínky v podobě oxidativního stresu. Cílovou RNA je zde specifická mRNA, která hraje roli v procesu oxidativního stresu. Ta je následně TENT1 polyadenylována za účasti proteinu PIPKI α a celý proces reguluje protein PtdIns4,5P2 (58).

2.3.2 TUT4 a TUT7

V kapitole Obecné charakteristiky TUT bylo zmíněno, že TUT4 a TUT7 jsou si po strukturální i sekvenční stránce velice podobné. I z pohledu velikosti jsou si oba proteiny blízké – TUT4 má 185 kDa, TUT7 171 kDa.

Doménové uspořádání obou TUTáz je také velice podobné. Obsahují čtyři domény zinkových prstů, tři aspartáty a NTD domény, podobně jako ostatní zástupci nadrodiny TENT.

Zapojují se při uridylylaci různorodých substrátů, jako bylo naznačeno v kapitole u terminálních uridylyltransferázách obecně. Obě se tedy podílí na uridylylaci mRNA, která byla u rostlin a savců pozorována na zcela či částečně deadenylovaných 3' koncích mRNA. Oligouridylylace takových mRNA pak vedla k jejich rychlejší degradaci (51).

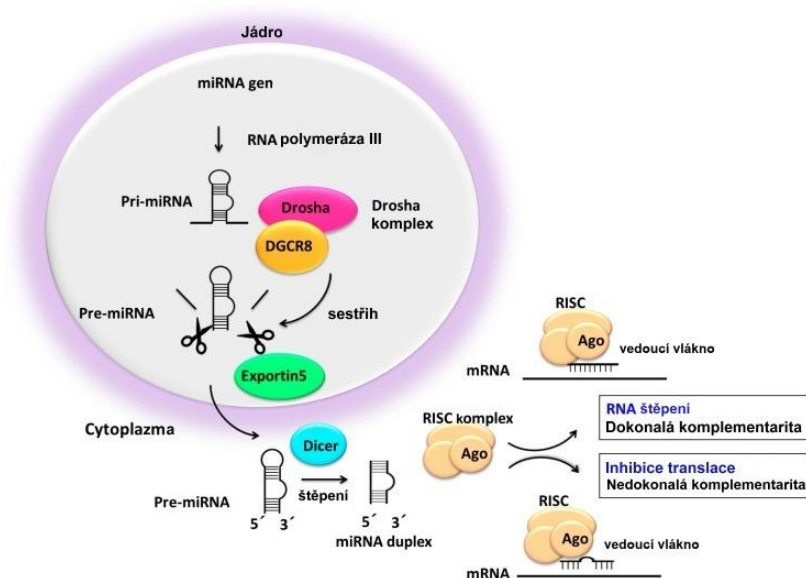
TUT7 také katalyzuje uridylylaci histonové mRNA. Většina histonová mRNA je závislá na replikaci DNA, to znamená, že po konci replikace probíhající během S – fáze buněčného cyklu je nutné co nejdříve zastavení její exprese. Důležitou součástí tohoto procesu je degradace vzniklé histonové mRNA, která se realizována právě díky zásahu TUT7 a jejímu přidání uridinů (59,60). Zajímavostí je, že některé výzkumy poukázaly i na stabilizační funkci uridylylace, a to v případě přidání pouze 1 či 2 uridinů. Zajistí se tak totiž správná délka histonové mRNA pro její funkci (61).

Oba homology jsou také hojně zkoumány v souvislosti s důležitou rolí v metabolismu miRNA, která přispívá k regulaci mnohých biologických procesů, jak bude popsáno níže.

3 miRNA

miRNA, zkráceně z microRNA, jsou malé nekódující fragmenty RNA o délce menší než 25 nukleotidů. Zastávají funkci negativních regulátorů mRNA neboli tzv. „gene silencers“. Po dozrání jedno vlákno miRNA vytvoří součást tzv. RISC komplex (z *angl. induced silencing complex*), který komplementárně nasedá na nepřekládanou oblast mRNA, tzv. UTR (z *angl. untranslated region*), kde negativně reguluje její translaci jako inhibitor translace nebo destabilizátor mRNA a tím i genovou expresi a proteosyntézu (62,63).

Zrání miRNA má dva kroky. V prvním stádiu je pri-miRNA vyprodukovaná v jádře pomocí RNA polymerázy II a prodloužena RNA polymerázou III. Tato pri-miRNA je následně štěpena jadernou RNázou III, zvanou Drosha. Produktem štěpení je prekurzor miRNA, nazývaný pre-miRNA. Pre-miRNA je následně transportována do cytoplazmy prostřednictvím komplexu Exportin5/Ran GTP, kde Ran GTP vystupuje jako kofaktor (64). V cytoplazmě je pre-miRNA dále štěpena proteinem Dicer s endoribonukleázovou aktivitou a navázána na Ago protein. Kromě kooperujícího Ago2 proteinu s Dicerem spolupracují ještě 2 proteinoví partneři – PACT (z *angl. protein activator of RNA-regulated protein kinase*) (65) a TRBP (z *angl. human immunodeficiency virus (HIV-1) transactivating response (TAR) RNA-binding protein*) (66), jejichž přítomnost je pro funkci Diceru esenciální. Touto finální úpravou vzniká zralá miRNA. Jedno z vláken takto vzniklé miRNA se následně typicky odděluje a spolu s proteiny Ago a Dicer tvoří RISC komplex. RISC komplex se poté účastní jevu zvaného RNA interference, během kterého je regulována genová exprese buďto inhibicí translace a destabilizací mRNA, v případě nedokonalé komplementarity vlákna miRNA k mRNA vláknu, nebo sestřihem a degradací mRNA v případě dokonalé komplementarity (62,63). Celý proces demonstruje schéma níže (obr.1).



Obrázek 1 – biogeneze miRNA. RISC: RNA-indukovaný tišící komplex; Ago: Argonaute proteinová rodina. (upraveno dle 67)

3.1 miRNA rodina let-7

let-7 rodina miRNA je studována v souvislosti s TUTázami a jejich uridylační aktivitou, jelikož je to právě tato miRNA, jejíž dozrávání TUTázy zásadně ovlivňují.

miRNA let-7 byla poprvé pozorována u rodu hád'átek (68,69), následně potvrzená u mnoha organismů včetně člověka (70). Je vysoce konzervovaná a předpokládá se, že hraje významnou roli během vývoje kmenových buněk a během jejich diferenciaci (71). Také ovlivňuje proliferaci a viabilitu buněk, čímž ovlivňuje i rakovinné bujení. Při výzkumu karcinomu plic bylo pozorováno snížené množství let-7, což poukazuje na její možný supresorový efekt vůči onkogenezi (72).

V této souvislosti byla prokázána také spojitost mezi expresí proteinu Ras a hladinou let-7. mRNA protoonkogenu Ras má totiž část své sekvence komplementární k sekvenci miRNA let-7. RISC komplex s vláknem let-7 se tedy může navázat na UTR sekvenci tohoto onkogenu, utlumit jeho expresi a snížit tak riziko vzniku nádoru zvýšenou proliferací, kterou RAS způsobuje. Snížené množství let-7 tedy zvyšuje riziko onkogeneze, zatímco jeho vyšší hladina zabezpečuje buněčný cyklus, angiogenezi a buněčnou adhezi (73,74).

Jak je popsáno níže v kapitole *TUT4 a TUT7 v procesu miRNA dozrávání*, aby byla let-7 degradována, musí do procesu dozrávání zasáhnout proteinový partner TUTázy, který jejím prostřednictvím zapříčiní škodlivé snížení množství let-7 (75). Z toho

důvodu se na TUT proteiny začalo pohlížet jako na možné terapeutické cíle (76). Středem zájmu jsou malé interagující molekuly, které by mohly mít na TUTázy inhibiční efekt. In vitro bylo nalezeno mnoho potenciálních inhibitorů, ne všechny však uspěly i při testech v buňkách. Slibným zástupcem se stal hydrát aurothioglukózy, který projevila inhibiční schopnost vůči uridylyčnické aktivitě TUT4. Tato látka navíc byla již klinicky použita při léčbě revmatoidní artritidy (76). Kromě toho byly také pozorovány důkazy jejího supresorového vlivu na rozvoj karcinomu plic (77). Stává se tak potenciálním kandidátem pro léčbu rakoviny.

4 TUT4 a TUT7 v procesu miRNA dozrání

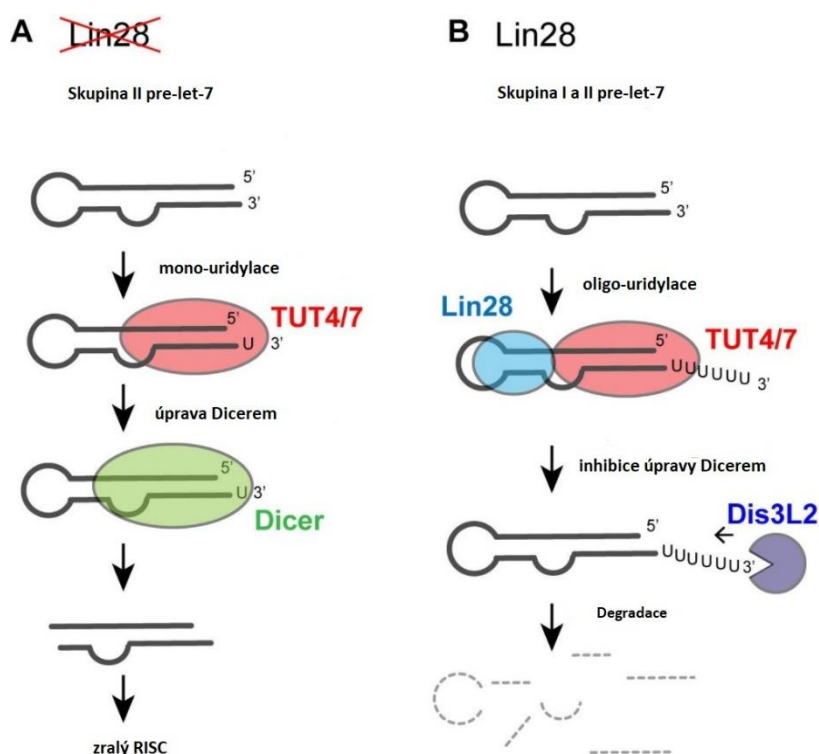
Během dozrání miRNA, které je popsáno výše v samostatné kapitole, se do procesu zapojuje vícero regulačních proteinů. Mezi ty se řadí i zmiňované terminální uridylyltransferázy, které do dozrání zasahují v průběhu úprav pre-miRNA pre-let-7, což je prekurzor miRNA z rodiny let-7. Během této fáze mohou TUTázy vstoupit do procesu, a ještě před úpravou Dicerem určit, zdali bude daná molekula dále upravována nebo degradována. TUT tak činí rozličnou uridylační aktivitou. Mohou vykazovat aktivitu jak monouridylační (23), tak oligouridylační. Charakter uridylační činnosti pak závisí na přítomnosti či absenci proteinového partnera a na počtu nukleotidů přesahujících na 3'konci pre-let-7 (78).

Prekurzory let-7 se dělí na dvě skupiny označované I a II. U skupiny I nalezneme na 3'konci přesah o délce 2 nukleotidů. U skupiny II tvoří tento přesah pouze jeden nukleotid (23).

Monouridylace probíhá na pre-let-7 ze skupiny II, tedy s přesahem 1 nukleotidu na 3'konci a je realizována bez účasti proteinových partnerů. TUT má tak schopnost přidat pouze jeden uridin na 3' konec a poté ztrácí svoji aktivitu. Uridinem označená pre-let-7 dále pokračuje k úpravám proteinem Dicer a zapojuje se to zmiňovaného komplexu RISC, který může regulovat translaci (23,78).

Naopak oligouridylylace probíhá za účasti proteinového partnera a na substrátech ze skupiny I i II, TUTáza tak přidává více uridinů a označuje molekulu k degradaci (79,78), která probíhá prostřednictvím proteinu s exonukleázovou aktivitou DIS3L2 (75).

Celý proces schematicky popisuje obrázek níže, kde je proteinovým partnerem Lin28. Lin28 se stal prvním a prozatím nejlépe popsáním proteinovým partnerem TUTáz. Identifikace interaktomů TUTáz, kteří regulují jejich enzymatickou aktivitu je velice unikátní záležitost, i proto na byla tato práce na jejich hledání zaměřena.



Obrázek 2 - proces úpravy pre-miRNA proteiny TUT4 a TUT7 se zapojením Lin28 (upraveno dle (10))

Je dobré zmínit, že absenci TUTáz může částečně kompenzovat činnost TENT2, který má smíšenou substrátovou specifitu, jak je popsáno v jeho samostatné kapitole (15).

4.1 Lin28

Postupem času se daří odhalovat ony zmiňované proteinové partnery, které činnost TUTáz ovlivňují.

Prvním z nich je Lin28 objevený v *C.elegans* (4), který se vyskytuje ve dvou homolozích – Lin28A a Lin28B (4). Na jeho N-terminálním konci najdeme cold-shock domain (CSD), na jeho C-terminálním konci pak zinkový prst (ZKD). Obě domény jsou kódovány paralelně v obou homolozích LIN28A a LIN28B a zároveň jsou obě tyto domény zahrnuty v procesu rozeznávání substrátu (80,81). Ukázalo se, že kromě specifity k pre-let-7 může LIN28 interagovat i s pri-let-7, tedy ve stavu před zásahem Drosha proteinu. Byly také provedeny studie poukazující na to, že Lin28 je schopný interakce i s mnohými mRNA transkripty a může tak hrát roli v regulaci translace a sestřihu (82,83,84). Kooperace probíhá jak s TUT4, tak s TUT7.

Byla také pozorována vyšší afinita CSD k substrátu pre-let-7, než jakou vykazuje ZKD. CSD se váže na vlásenku substrátu, zatímco ZKD interaguje s GGAG motivem ve

vypoulené části pre-let-7. Tvoří se tak komplex Lin28:pre-let7. S tím pak interaguje N – terminální konec TUTáz, na kterém se nachází modul pro interakci s Lin28 (85,48). Kromě toho se také váže na GGAGA motivy ve vlásenkách cílových mRNA (48,84).

Přestože Lin28A a Lin28B sdílí velkou část struktury i podobnou aktivitu, mechanismus jejich působení na let-7 je rozdílný. Rozdíly začínají již v lokalizaci, kdy Lin28A je přednostně cytoplazmatický protein a Lin28B se zdržuje spíše v jádře díky přítomnosti domény pro jadernou lokalizaci. Na základě tohoto rozdílného umístění se liší princip vlivu na metabolismus miRNA. Jak bylo popsáno výše, než se pre-miRNA dostane z jádra, je upravována Drosha komplexem ještě ve své pri-miRNA podobě. Na ni se váže Lin28B a blokuje úpravu zmíněným komplexem. Nedojde tak ani k úpravě pre-miRNA a jedná se tak o mechanismus nezávislý na TUT proteinech (86).

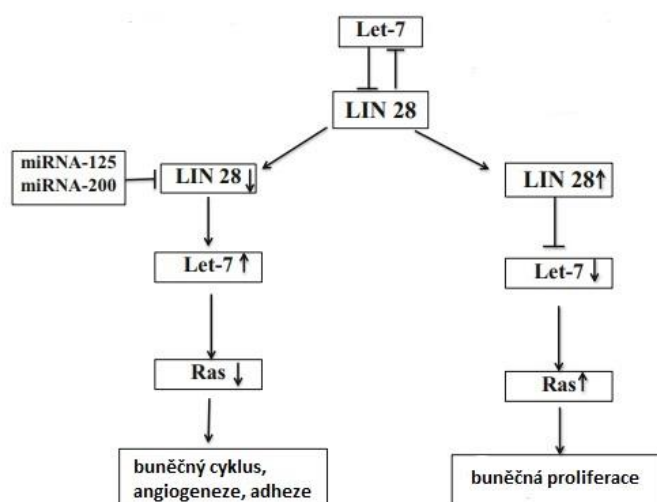
Lin28A využívá naproti svému homologu mechanismy na TUT proteinech závislých. Je to právě tento homolog, který se váže přímo na pre-let-7, konkrétně na její GGAG motiv, jak je popsáno výše. Lin28A vstupuje do procesu až po úpravě proteinem Drosha, kdy se pre-miRNA dostává do cytoplazmy (86). Svoji vazbou vytvoří podmínky pro oligouridylyaci, která následně inhibuje úpravu Dicer proteinem. Na konci pre-let-7 tak zůstává polyU konec, který je velmi preferovaným cílem zmiňované exonukleázy DIS3L2 (87).

4.1.1 Zapojení Lin28 v onkogenezi

U obou homologů byla objevena souvislost mezi jejich zapojením do procesu uridylyace a onkogenezi. Jak je popsáno výše v kapitole o rodině miRNA let-7, u mnohých případů nádorů byla pozorována její snížená exprese, za kterou je zodpovědný právě Lin28, který následně dále usnadňuje buněčnou transformaci a onkogenezi. Let-7 má supresorový efekt vůči onkogenům díky zapojení do RISC komplexu popisovaného výše a její snížená hladina tedy směřuje k vyšší pravděpodobnosti vzniku nádoru. Během snížení množství let-7 byla zároveň v nádorech detekována zvýšená exprese a aktivace Lin28. Toto pozorování dokazuje korelaci mezi jeho expresí a hladinou let-7 a tedy i jeho vliv na dozrávání let-7. Dojde-li však k opětovnému přísunu let-7 ektopickou expresí v již transformované buňce, je tento efekt zvrácen a vznikající let-7 inhibuje další expresi Lin28 (86,88).

Je-li Lin28 exprimován, dochází tedy k degradaci let-7, což vede ke zvýšení buněčné proliferace. Naopak útlumem Lin28 vyšší hladinou let-7 je zapříčiněn buněčný cyklus (74). Jev je vyobrazen na schématu (Obr.3).

Na schématu můžeme kromě miRNA let-7 povšimnout i vlivu miRNA-125 a miRNA-200. Jedná se totiž o dvě další rodiny miRNA, které se při rakovině vyskytují v buňkách



Obrázek 3 - Schéma vlivu exprese Lin28 na let-7 a expresi Ras proteinu a jejich vlivu na buněčné procesy (upraveno y 74)

ve sníženém množství a také disponují schopností inhibice exprese Lin28 (74).

Při diagnostice byla pozorována horší prognóza se zvyšující se expresí Lin28, zatímco jeho redukce zpomalila růst nádoru. Tento protein se tak stává vhodným terapeutickým cílem pro léčbu rakoviny (89). V nedávné době byly zkoumány také malé molekuly derivátů pyrrolinu inhibující Lin28, z nichž nejslibnější C902 vykazoval pozitivní výsledky i v testech na lidských nádorových buňkách (JAR cells), kde jasně zvýšil expresi let-7 (80). Ukazuje se tedy, že malé molekuly mohou mít v souvislosti s blokací Lin28 velký terapeutický potenciál.

4.1.2 Role Lin28 v buněčné diferenciaci

Při výzkumu indukovaných pluripotentních kmenových buněk bylo zjištěno, že se Lin28 zapojuje spolu se třemi dalšími faktory, OCT4, NENOG a SOX2, do přeměny somatických buněk na nediferencované kmenové buňky a zachovává tak jejich pluripotenci (90,86). Rychlost těchto přeměn navíc korelovala se vzrůstající buněčnou proliferací (106). Předpokládá se tak, že rychlost se pravděpodobně zvyšuje navozením buněčné proliferace právě proteinem Lin28 (107). Během výše zmiňované studie se povedlo s přispěvkem Lin28 ze somatických buněk vytvořit indukované

pluripotentní buňky se všemi charakteristickými znaky embryonálních kmenových buněk, které by mohly v podobě stabilních linií sloužit pro další výzkum na poli transplantační medicíny nebo vývoje léčiv (90).

4.2 MOV10

Potenciálním proteinovým partnerem TUT4 i TUT7 je MOV10 helikáza. Ta se zapojuje při transpozici LINE-1 (91).

LINE - 1, také L1, jsou třídou I transpozonů, tzv. retrotranspozony. Retrotranspozony jsou typem transpozonů vyskytujících se běžně v sekvenci DNA. Jejich transpozice probíhá přepisem do RNA, která je pak reverzní transkripce přeložena zpět do DNA v cílovém místě. Fungují na principu „zkopírovat a uložit“, což znamená, že se daná sekvence zreplikuje. LINE (*z angl. long interspersed nuclear elements*) jsou pak typem autonomních non - LTR (*z angl. long terminal repeat*) retrotranspozonů. Autonomní v tomto případě znamená, že ve své sekvenci kódují proteiny potřebné pro realizaci retrotranspozice. LINE - 1 představují 17 % lidského genomu (92).

TUT4 a TUT7 se v retrotranspozici zapojují přidáváním uridinů na konec 3' L1 retrotranspozonů, což má, dle předpokladů, za následek jejich degradaci. Umlčení TUTáz v buňce způsobilo navýšení retrotranspozice oproti kontrole bez TUTáz i stavu, kdy TUTázy přítomny byly. Prokázal se tak redukující charakter uridylace na retrotranspozici L1 (91). Tento fenomén byl zkoumán i u TUT1 a dalších příslušníků rodiny TENT, ačkoli TENT2, TENT4B a TENT5C, nicméně u žádného se nepotvrdil (91). Byl také pozorován nárůst uridylace L1 mRNA v lidských buňkách s nadměrnou expresí TUT4, TUT7 a MOV10. Vliv přítomnosti uridinů na samotnou retrotranspozici však není zatím zcela jasný. Předpokládá se, že právě uridylace zastává hlavní regulační roli retrotranspozice L1 v savčích buňkách, jelikož je možná ve všech typech buněk, ve kterých k retrotranspozici L1 dochází (91).

Protein L1 - ORF1p má ochrannou funkci zabraňující uridylaci L1 mRNA. Jelikož MOV10 funguje jako helikáza, předpokládalo se, že by mohla narušovat tuto ochrannou funkci a usnadňovat tak TUT proteinům jejich činnost. Výsledky experimentů prokázaly schopnost MOV10 blokovat ochranný efekt L1 - ORF1p a tím podpořily hypotézu o spolupráci MOV10 a TUT4/7. Přímé prokázání spolupráce těchto proteinů však stále chybí (91).

4.3 TIFA

TIFA byl identifikován v roce 2003 jako protein interagující s TRAF6 v kvasinkách (93). Později byl izolován i ze savčích buněk jako protein interagující s TRAF2 (94).

Jako TRAF se označuje skupina cytokinů vystupujících jako faktory nádorové nekrózy. Jsou produkovány makrofágy v rámci imunitní odpovědi. Makrofágy jsou například stimulovány lipopolysacharidy (zkráceně LPS) obsaženými v membránách gramnegativních bakterií (95). Vazbou mezi TIFA a TRAF6 se aktivuje TAK1, který je spojován s apoptózou a IKK enzymový komplex zapojující se v odpovědi na zánět (96,97).

Mechanismy regulace interakcí TIFA a TRAF však nejsou zcela jasné. Ve snaze odhalit interagující proteiny zapojené do regulace byly provedeny experimenty s LPS – stimulovanými makrofágy v lidských buňkách. Mezi nalezenými proteiny se objevila i TUT4, která je zajímavá z důvodu přítomnosti zinkových prstů na N – terminálním konci, jako je tomu u již identifikovaných molekul interagujících s TRAF6. Zvláštností bylo nalezení dvou homologů TUT4, jeden o délce 60 kDa, druhý o délce 200 kDa. Byly proto pojmenovány TUT4S (short) a TUT4L (long) (95).

Expresí TUT4 byla bez další stimulace pozorována výhradně v jádře, zatímco po aplikaci LPS se objevila i v cytoplasmě, kde byla pozorována 1/3 z celkového množství TUT4L. Byla také potvrzena interakce mezi TUT4 a TIFA faktorem. Další výsledky ukázaly, že vazba TUT4 na TIFA podléhá regulaci pomocí LPS (95). Vzhledem k tomu, že je mezi těmito proteiny potvrzená možnost interakce, nelze vyloučit, že by se i TIFA mohla zařadit na seznam potenciálních proteinových partnerů TUT4.

5 Teoretický úvod k metodám

5.1 Proximity labeling

Proximity labeling metody se stávají možnou alternativou imunoprecipitačních metod značení proteinů pro pozdější charakterizace (98). Principem je vytvoření konstruktů obsahujícím doménu pro enzym se schopností přidávat vybranou molekulu na proteiny a sekvenci proteinu zájmu. Mezi současně využívané enzymy patří například APEX (z *angl. ascorbic acid peroxidase*) (99), APEX2 (100) nebo ligáza izolovaná z *E.coli* pojmenovaná BioID (101).

Při samotných experimentech je pak většinou nutno dodat substrát. Současně hojně používaná je BioID doména, kde je značící molekulou biotin. S postupem času bylo vytvořeno několik variant domén pro biotinylyaci s různou náročností na podmínky či rozdílnými rychlostmi biotinylace. Mezi tyto alternativy se řadí BioID2, což je ligáza izolovaná z *Aquifex aeolicus*, a následně TurboID a miniTurboID, které kombinují netoxické chování BioID a vysokou efektivitu APEXu (98). Zatímco starší typy vyžadovaly kromě přídatku biotinu také přídavek H₂O₂, novějším modelům, jako je zmiňované TurboID a miniTurboID, již postačuje pouze přídavek biotinu. Následně lze využít afinitu biotinu ke streptavidinu a značené proteiny tak pomocí něj izolovat z lyzátu a použít k dalším analýzám (102). V této práci je používána varianta miniTurboID. Ta disponuje oproti starším modelům značně zvýšenou rychlostí. Z 18 hodin potřebných u experimentů s doménou BioID byla nutná reakční doba pro miniTurboID snížena na 10 minut. Také byla snížena potřebná koncentrace biotinu (98).

6 Hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Činnost lidských terminálních uridylyltransferáz je regulována proteinovými partnery.

Cíl práce: identifikace proteinových partnerů TUTáz

Dílčí cíle práce:

- Příprava expresních konstruktů s TUT4 nebo TUT7 a doménou miniTurboID
- Testy exprese v lidských buněčných liniích
- Biotinylační testy
- Příprava stabilních buněčných linií
- Biotinylační experimenty s následnou analýzou značených proteinů MS

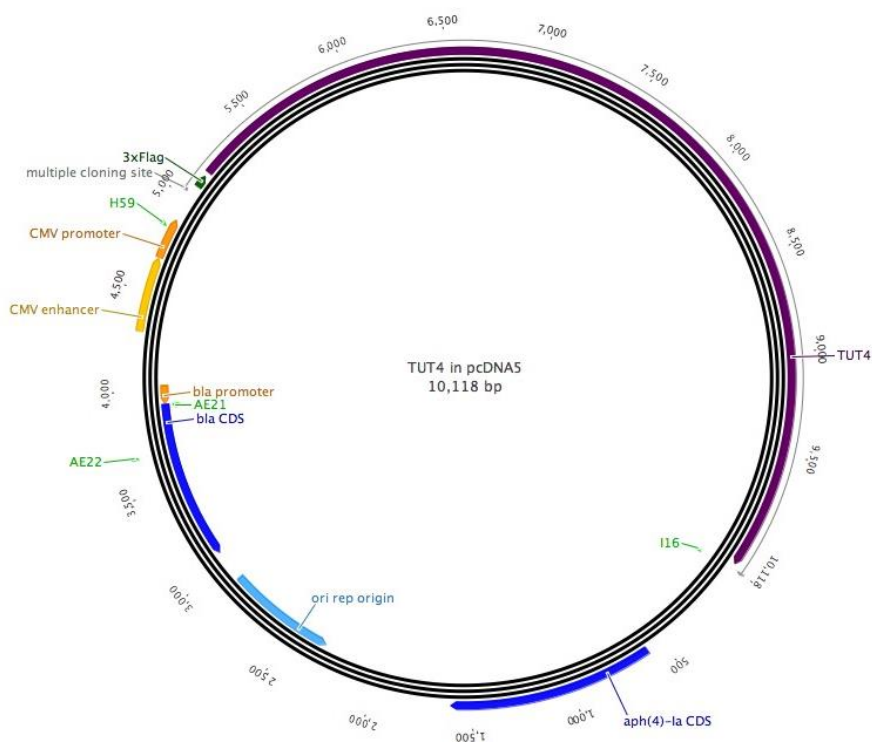
7 METODY

7.1 Plasmidy

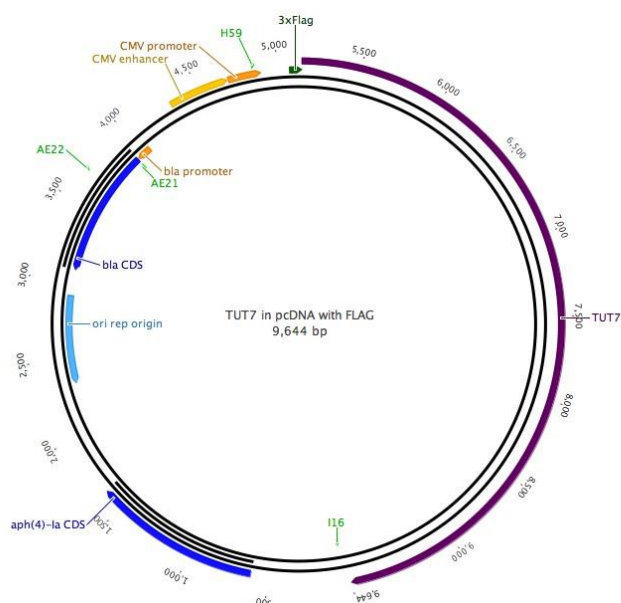
7.1.1 Příprava konstruktů pcDNA5 pro expresi TUT4 a TUT7

Pro expresi TUáz v lidských buňkách jsme zvolili pcDNA5. Jedná se o expresní vektor pro lidské buňky s rezistencí k antibiotiku Ampicilin a Hygromycin B. Obsahuje také klonovací místos řadou sekvencí rozpoznávaných restrikčními enzymy. Vyskytují se zde dva promotory, a to CMV a T7.

Plasmidy pocházely z databáze RNA laboratoře a staly se výchozími konstrukty pro mou experimentální práci. Níže jsou vykresleny mapy plasmidů vyhotovené pomocí programu *Genious*.



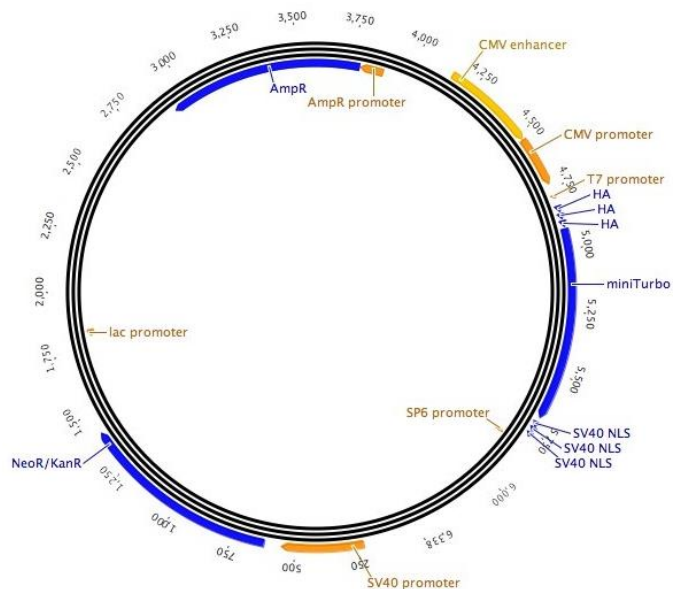
Obrázek 3 - mapa plasmidu V569 s TUT4



Obrázek 4 - mapa plasmidu V867 s TUT7

7.1.2 3xHA-miniTurbo-NSL_pCDNA3

3x HA-miniTurbo-NSL_pCDNA3 byl dán darem od Alice Ting (*Addgene plasmid # 107172*, <http://n2t.net/addgene:107172>, RRID:Addgene_107172).



Obrázek 5 - mapa plasmidu 3x HA-miniTurbo-NSL_pCDNA3

Obsahuje rezistenci na Ampicilin. Důležitým prvkem je zde miniTurboID, které zajišťuje značení proteinů biotinylací. (98) Tento vektor se stal mým druhým výchozím konstruktem.

7.1.3 Primery

Veškeré používané roztoky primerů byly 10 μ M.

Tabulka 1 tvoří přehled primerů používaných při amplifikaci genu pro miniTurboID pomocí PCR. Tyto primery jsou navrženy tak, aby na oba konce ampikonu přidávaly restriční místo *NotI*, které byla později použito pro ligaci do plasmidu pcDNA5 s TUT4/7.

V práci užívané primery používané během experimentů pochází od firmy *Eurofins Scientific*.

7.1.4 Markery pro gelovou elektroforézu

V této práci jsou používány markery pro gelovou elektroforézu 1 kb a 100 bp, oba od společnosti *Applichem*.

7.2 Příprava insertu – miniTurboID

7.2.1 Namnožení vektoru a jeho izolace

Jelikož byl vektor dodán ve formě kultury s bakteriemi *E.coli* obsahujícími tento vektor, bylo nejprve nutné přeočkovat kulturu na Petriho misky s LB (dle *Luria-Bertani*) agarem a Ampicilinem, aby bylo možno získat jednotlivé kolonie a z nich vyizolovat DNA.

1. Špičkou pipety bylo odebráno malé množství kultury ze zásobní lahvičky a křížovým roztěrem byla nanesena na Petriho misku LB s agarem a Ampicilinem.
2. Statická kultivace probíhala na 37 °C přes noc.
3. Po kultivaci byly připraveny 50 ml uzavíratelné falkony o objemu 50 ml, kam bylo napipetováno 5 ml LB média a 5 μ l Ampicilinu o koncentraci 50 mg/ml (*Appli-Chem, Německo*).
4. Špičkou pipety byly následně sbírány jednotlivé kolonie, a i se špičkou jednotlivě vloženy do připravených zkumavek s LB médiem a Ampicilinem.
5. Proběhla druhá kultivace za stálého třepání při 37 °C přes noc.

Po kultivaci následovala izolace DNA z buněk.

7.2.2 Izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA z bakteriálních buněk po kultivaci v tekutém LB médiu byla provedena pomocí GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (*Sigma – Aldrich s.r.o., USA*). Principem je lýze buněk, denaturace DNA – i plasmidové, i genomové – následná renaturace pouze plasmidové DNA, očištění od proteinů, lipidů a solí.

1. Bylo stočeno 1200 μl buněk při 13 000 g po dobu 1 minuty. Supernatant byl odlit.
2. K peletu bylo přidáno 200 μl pufru s obsahem RNáz. Roztok byl vortexován do úplného rozmíchání peletu.
Pufř byl složen z 50mM Tris.Cl s pH=8, 10mM EDTA a RNáz o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$.
3. Dále bylo přidáno 200 μl lyzačního roztoku, směs byla jemně promíchána a ponechána 3 minuty stát. Došlo k lýzi buněk.
4. Bylo přidáno 350 μl neutralizačního roztoku, došlo k vysrážení DNA a proteinů.
5. Směs byla stočena při 13 000 g po dobu 15 minut. Plasmidová DNA zůstává v solubilní části supernatantu.
6. Zbylá tekutina byla přepipetována do kolonky pro přečištění.
7. Kolonka byla stočena při 13 000 g po dobu 1 minuty. Stočený roztok byl odlit.
8. Bylo přidáno 500 μl doplňkového čistícího roztoku. Kolonka byla stočena při 13 000 g po dobu 1 minuty. Supernatant byl odlit.
9. Dále bylo přidáno 750 μl čistícího roztoku. Opět byla kolonka stočena při 13 000 g po dobu 1 minuty. Po odlití supernatantu byla kolonka stočena ještě jednou bez přidání dalších roztoků, aby došlo ke stočení zbytkových roztoků v kolonce.
10. Kolonka byla přemístěna do čisté zkumavky a pro eluci bylo přidáno 50 μl vody o teplotě 50 °C.
11. Kolonka byla stočena při 13 000 g po dobu 1 minuty.

Kontrolní měření koncentrace bylo provedeno pomocí spektrofometru Eppendorf BioSpectrometer Fluorescenc (*Sigma – Aldrich s.r.o.*).

Vyizolovaná DNA byla také poslána na sekvenaci do firmy SeqMe, aby byla ověřena správnost sekvence miniTurboID, se kterou se bude dále pracovat. Sekvenační směs se skládá z 500 ng plasmidové DNA, dále 25 pmol každého primeru a roztok se doplňuje do 10 μl vodou. Plasmid je pak osekvenován dle zvolené metody. Pro tuto práci bylo využíváno Sangerova metoda.

7.2.3 Design primerů

Primery jsou krátké úseky DNA, tzv. oligonukleotidy, využívané při replikaci DNA nebo sekvenaci. Jejich délka se pohybuje mezi 18 a 30 nukleotidy, přičemž je vhodné volit takové délky a zastoupení jednotlivých nukleotidů, aby si byly hybridizační teploty co nejbližší. Zatímco GC páry teplotu zvyšují, AT páry ji mohou o něco snížit.

K restričnímu místu navíc přidáváme několik nukleotidů navíc pro efektivní pozdější štěpení.

7.2.4 PCR miniTurboID

Metoda PCR, z anglického *polymerase chain reaction*, je metoda, díky níž lze zmnožit vybrané úseky DNA za pomoci primerů. V rámci metody dochází k denuraci dvouvláknové DNA při 94 °C–98 °C dle zvolené polymerázy a následném nasedání těchto primerů na nespecifické místo dle komplementarity za jejich hybridizační teploty. Slouží jako počátek pro syntézu komplementárního vlákna DNA polymerázou. Zdvojené vlákno se od sebe opět oddělí, dojde k nasednutí primerů a syntéze komplementárního vlákna. Dosáhneme tak zmnožení vybraného úseku, a to v počtu 2^n , kde n je počet opakování. Díky primerům lze také konce, na které nasedají, modifikovat – například na ně přidat restriční místo.

Pro klonování do vybraných vektorů s TUTázami bylo nutné nejprve získat samotné miniTurbo z plasmidu, který ho obsahoval. Toho bylo docíleno právě pomocí metody PCR a vhodných primerů.

Tabulka 1 - přehled primerů pro amplifikaci genu miniTurboID pomocí PCR

Název	Sekvence
TUT4_NotI_fwd	TTGCGGCCGCAATCCCGCTGCTGAA
TUT4_NotI_rev_3	TTGCGGCCGCAACCTTTTCGGCAGACCG
TUT7_NotI_fwd	TTGCGGCCGCATCCCGCTGCTGAA
TUT7_NotI_rev	TTGCGGCCGCACTTTTCGGCAGAC

Zároveň těmito primery bylo na 3' a 5' konec genu miniTurboID přidáno restriční místo *NotI*, pomocí kterého bude miniTurboID následně ligováno.

Pro reakci byla použita *iProof™ High-Fidelity* polymeráza o koncentraci 2U/μl s příslušným puřem (*BioRad, USA*). Tato polymeráza byla zvolena pro svoji vysokou rychlost a nízkou chybovost, což jsou velmi žádoucí vlastnosti v případě, že se s namnoženým úsekem DNA bude dále pracovat. Do reakční směsi byla dále přidána templátová DNA, primery, dNTP a H₂O do celkového objemu 20 μl dle rozpisu v tabulce níže. Reakce pak probíhala v termocyklerech C1000 (*BioRad, USA*). Jednotlivé kroky reakce byly nastaveny dle protokolu pro použití *iProof polymerázy* a dle potřeb užitých primerů (Tabulka 1). Výsledným produktem je miniTurboID o délce 770 bp s restričními místy *NotI* na obou koncích.

Tabulka 2 - složení jedné PCR reakce

Látka	Množství
templátová DNA	35,6 ng
iProof polymeráza	0,4 U
iProof pol. pufr	4 μ l
dNTP 20 μ M	0,4 μ l
primer TUT4_NotI_fwd	0,5 μ l
primer TUT4_NotI_rev_3	0,5 μ l
H ₂ O	13,4 μ l
Celkový objem reakce	20 μ l

Reakce následně proběhla v termocykleru za těchto podmínek:

Tabulka 3 - podmínky pro miniTurboID připravované pro ligaci s vektorem obsahující TUT4

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Iniciace denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Nasedání primerů	68	30 s	29
Elongace	72	30 s	
Konečná extenze	72	5 min.	1

Tabulka 4 - podmínky pro miniTurboID připravované pro ligaci s vektorem obsahující TUT7

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Iniciace denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Nasedání primerů	65	30 s	29
Elongace	72	30 s	
Konečná extenze	72	5 min.	1

7.2.5 Gelová elektroforéza

Ověřovacím krokem po PCR byla gelová elektroforéza na agarózovém gelu, kdy byla zjišťována úspěšnost PCR a velikost produktu.

1. Byl připraven roztok agarózy (*Sigma – Aldrich s.r.o.*) z 1 g agarózy a 100 ml TBE pufru o výsledné koncentraci 1 %.
2. Tento roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě po dobu cca 2 minut, dokud se agaróza plně nerozpustila v pufru.
3. Mezitím byla připravena forma na gel.
4. Roztok byl nalit do formy, následně bylo přidáno 7 μ l SYBR-SAFE (Invitrogen) a vložen hřebínek tvořící jamky pro vzorky.
5. Poté byl rozmražen 100bp marker a 6x koncentrovaný nanášecí pufr.
6. 20 μ l PCR produktu bylo smíchán s 3,4 μ l nanášecím pufrem, pomocí něhož byly vzorky aplikovány na gel.
7. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforézové vany, přelit TBE pufrem a byl vyjmut hřebínek.
8. Do jamek bylo napipetováno 5 μ l markeru a celý objem PCR produktu s nanášecím pufrem.
9. Elektroforéza probíhala při 90 V.

7.2.6 Izolace DNA z gelu

Elektroforézou byla ověřena správná velikost PCR produktu a pro další kroky bylo nutné DNA z gelu vyzolovat. Na to byl použit *MinElute Gel Purification Kit* (Qiagen). DNA byla eluována do 20 μ l H₂O.

1. DNA byla vyříznuta z gelu a zvážena na analytických vahách.
2. Ke gelu bylo přidáno adekvátní množství QG pufru dle váhy vzorku. Objem pufru je v μ l 3trojnásobek hmotnosti v miligramech – tedy na 100 mg připadá 300 μ l pufru.
3. Gel v pufru byl zahříván na 50 °C po dobu 10 minut a pravidelně vortexován.
4. Bylo přidáno adekvátní množství isopropylalkoholu, opět dle váhy vzorku. Objem v μ l se rovná hmotnosti vzorku v miligramech.
5. Roztok byl přepipetován na připravené kolonky.
6. Roztok byl stočen při 13000 g, po dobu 1 minuty.
7. Stočený roztok byl vylit a na kolonku bylo napipetováno 750 μ l PE pufru.
8. Roztok byl stočen při 13000 g, po dobu 1 minuty.
9. Stočený roztok byl vylit a stočení proběhlo na sucho ještě jednou.
10. Kolonka byla přemístěna do čisté zkumavky.
11. Bylo napipetováno 20 μ l H₂O.
12. Roztok byl stočen při 13000 g, po dobu 1 minuty.

7.2.7 Restrikční štěpení miniTurboID

Restrikční štěpení je běžně užívaná metoda molekulární biologie. Využívá specifické enzymy – restrikční endonukleázy – které jsou schopné rozpoznat určité sekvence DNA a štěpit ji.

Pro pozdější ligaci pomocí *NotI* restrikčního místa, se sekvencí *GCGGCCGC*, bylo třeba vyizolovaný PCR produkt naštěpit restrikčním enzymem. *NotI* se řadí mezi Fast Digest enzymy, které se vyznačují vysokou rychlostí štěpení. Jako pufr byl pro reakce použit *10x Fast Digest Buffer (ThermoFisher Scientific)*, který je kompatibilní s většinou restrikčních enzymů, včetně *NotI (ThermoFisher Scientific)*.

Tabulka 5 - složení jedné štěpící reakce

Látka	Množství
PCR produkt	606 ng
<i>NotI</i>	1 μ l
Fast Digest Buffer	3 μ l
H ₂ O	23 μ l
Celkový objem	30 μ l

Reakce probíhala při 37 °C po dobu 60 minut.

Produkt štěpení byl zkontrolován pomocí gelové elektroforézy při 1 % koncentraci gelu. Následně byla DNA z gelu vyizolována a eluce proběhla do 50 μ l H₂O.

Koncentrace této DNA byla poté ověřena spektrofotometricky a srovnáním na gelu s markerem.

Takto připravený fragment byl použit do ligace s vektory s TUTázami.

7.3 Příprava vektorů

7.3.1 Transformace vektorů

Expresní vektory s TUTázami byly nejprve namnoženy pomocí bakteriální transformace. Transformace je metoda využívající kompetentnost bakteriálních buněk přijímat cizí DNA – tedy DNA, kterou chceme namnožit. Buňky po rozmrazení vystavíme vyšší teplotě, při které se stane jejich membrána prostupná pro cizí vektor. Následnou regenerací se vitalita buněk obnoví a fungují dál.

1. Na ledu bylo rozmrazeno 50 μ l kompetentních bakteriálních buněk *E. Coli* TOP10.

2. K 25 μ l buňkám byl přidán 1 μ l daného vektoru. V případě V569 to bylo 200 ng a v případě V867 611 ng. Takto vytvořená směs se inkubovala 15 minut na ledu.
3. Následoval tepelný šok na 42 °C po dobu 45 s, tzv. tepelný šok.
4. Buňky byly 2 minuty chlazeny na ledu. Poté bylo přidáno 500 μ l LB média.
5. Buňky s médiem pak byly inkubovány při 37 °C, kde regenerovaly po dobu 1 hodiny.
6. Mezitím byly připraveny LB misky s agarem a Ampicilinem.
7. Po uběhnutí jedné hodiny bylo napipetováno 50 μ l buněk v LB médiu na misku a rovnoměrně rozprostřeno po misce pomocí kuliček. Zbytek buněk poté byly stoučeny při 13000 g po dobu jedné minuty, byl odlit supernatant a ve zbylých cca 70 μ l byl rozpipetován vytvořený pelet. Ten byl rozetřen na druhou misku.
8. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu asi 16 hodin.
9. Po transformaci byly vybrané kolonie zaočkovány do 5 ml tekutého LB média s 5 μ l Ampicilinu o koncentraci 50 mg/ml a namnoženy při 37 °C přes noc.
10. Po namnožení byla DNA izolována pomocí *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* a koncentrace byla změřena spektrofotometricky.

7.3.2 Restrikční štěpení vektorů

Aby mohlo být miniTurboID úspěšně zaligováno do vybraných vektorů, musí být i vektory naštěpeny stejným restrikčním enzymem. Jelikož se jedná o ligaci, kde se využívá pouze jedno restrikční místo, je nutné na konci štěpící reakce přidat alkalickou fosfatázu, která defosforyluje štěpené konce a zajistí, že se nezcirkularizují.

Tabulka 6 - složení jedné štěpící reakce pro TUT4 konstrukt

Látka	Množství
Vektor V569	704,8 ng
NotI	1 μ l
Fast Digest Buffer	3 μ l
H ₂ O	24 μ l
Celkový objem	30 μ l

Tabulka 7 - složení jedné štěpící reakce pro TUT7 konstrukt

Látka	Množství
Vektor V867	695,7 ng
NotI	1 μ l
Fast Digest Buffer	3 μ l
H ₂ O	24,5 μ l
Celkový objem	30 μ l

Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby byla do reakční směsi přidána alkalická fosfatáza *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (*ThermoFisher Scientific*). Za stejné teploty probíhala reakce ještě následujících 15 minut. Poté byla alkalická fosfatáza inhibována 5 minutami na 75 °C.

Produkt reakce byl následně ověřen gelovou elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu. Elektroforéza probíhala při 85 V.

Vektory byly z gelu vyizolovány pomocí kitu *MinElute Gel Extraction Kit* (*Qiagen*). Eluce proběhla do 50 μ l ddH₂O a koncentrace byla ověřena spektrofotometricky.

Kromě ověření koncentrace proběhla navíc kontrolní bakteriální transformace, která využila předpokladu, že naštěpené vektory nejsou schopny transformace a tudíž nenarostou. 3 μ l izolované DNA, které v případě V569 odpovídaly 1057,2 ng a v případě V867 1391,4 ng, byly tedy transformovány v 50 μ l kompetentních buněk, za užití 600 μ l LB média. 50 μ l bylo pak nanášeno na Petriho misky s LB agarem a Ampicilinem. Sledován byl počet narostlých kolonií.

7.4 Ligace

Ligační reakce byla namí chána dle rozpisu v Tabulce 8. T4 DNA ligáza o koncentraci 400 000 U/ml i příslušný pufr pochází z firmy NEB.

Tabulka 8 - složení ligační reakce o objemu 10 μ l

Látka	Směs TUT4 poměr 1:3	Směs TUT4 poměr 1:6	Směs TUT7 konstrukt
vektor	50 ng	50 ng	70,5 ng
miniTurboID	11 ng	22 ng	27 ng
T4 DNA Ligase	400 U	400 U	400 U
T4 DNA ligase buffer	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	3,6 μ l	2,9 μ l	0 μ l
Celkový objem	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Reakce probíhala při 16 °C přes noc. 3 µl ligační směsi byly následně transformovány do 50 µl kompetentních buněk Top10 *E.coli*. Bylo použito 600 µl LB média a na Petriho misky s LB agarem a Ampicilinem bylo nanášeno 50 µl. Kultivace probíhala staticky při 37 °C přes noc.

7.4.1 Screening bakteriálních kolonií pomocí PCR

Vybrané kolonie byly z misky přeneseny do 30 µl sterilní vody.

Ze suspenze každé z kolonií byl také odebrán vždy 1 µl a přenesen na Petriho misky s LB agarem a Ampicilinem. Tyto misky byly staticky kultivovány při 37 °C přes noc a sloužily jako záložní kultury.

Ze zbylé suspenze byly pak prováděn kontrolní screening kolonií pomocí PCR. Tato metoda je velmi podobná klasické PCR, templátová DNA je však ze zmiňované suspenze. Reakční směs obsahuje DNA, primery, dNTP, polymerázu a její příslušný pufr a vodu. Primery opět za specifické teploty nasedají na vlákna DNA, kde napomáhají DNA polymeráze k syntéze komplementárního vlákna. Pomocí této metody lze selektovat pozitivní kolonie, ve kterých se nachází správně zaligovaný konstrukt.

Bohužel ani po mnoha optimalizujících krocích nebyly nalezeny vhodné podmínky pro úspěšný průběh reakce a dosažení kýžených výsledků.

Proto byl 1 µl od každé buněčné suspenze přidán do 5 ml LB média s 5 µl Ampicilinu o koncentraci 50mg/ml a opět kultivován za stálého třepání při 37 °C přes noc, aby mohl být poté izolován *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* a poslán na sekvenaci do firmy SeqMe, kde byla ověřena přítomnost, orientace i správnost sekvence miniTurboID. K sekvenaci byly použity následující primery v Tabulkách 10 a 11.

Tabulka 9 - primery používané pro sekvenaci TUT4 konstruktů

Název	Sekvence
CMV_fwd	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
hsZ11_SeqR1	GGCAGCATTACTTTACATG
miniTurbo seq primer_fwd	AATAGACCCGTGAAGCTGAT
miniTurbo seq primer_rev	TGATATTCTGCAATGCAAGCAT
hsZ11_SeqR1	GGCAGCATTACTTTACATG
Z11_SeqF1	TCGAGATCAAAGTCATTGC
Z11_SeqF2	TTGACACCTGAGCAGAGGC
Z11_SeqF3	AGTTCCTGTTGTGGTGTGC
Z11_SeqF4	TGGAGGAATATGTCATATG
Z11_SeqF5	CTGCTACCTCTTGCAACTGC
Z11_SeqF6	CTATAACTACTGCCAAAGTGC
Z11_SeqF7	TGGCAGAGAAGCTGAGTAC
Z11_SeqF8	TGATCCCAGCATCATCTTTGC
TUT7 seq C	ATGATTCCCTCTGATGAAGAG
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Tabulka 10 - primery používané při sekvenaci TUT7 konstruktů

Název	Sekvence
CMV_fwd	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
hsZ11_SeqR1	GGCAGCATTACTTTACATG
miniTurbo seq primer_fwd	AATAGACCCGTGAAGCTGAT
miniTurbo seq primer_rev	TGATATTCTGCAATGCAAGCAT
TUT7 seq frag1a	TGAATCCATTGCATTTGCCCA
TUT7 seq frag1b	CATTGAAAAAGATGTTGTGAT
TUT7 seq C	ATGATTCCCTCTGATGAAGAG
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

7.4.2 Midi-prep TUT7

Další dílčím krokem byla transfekce do buněčné linie Hek293T-Rex FlpIN (*dále Hek293*). Pro tu bylo však nutné získat DNA čistější a ve větší koncentraci. Na to byla využita příprava MIDI-prepu z kolonií ze záložních kultur, které byly připraveny po bakteriální transformaci ligace.

1. Do Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml bylo přidáno 50 ml LB média a 50 μ l Ampicilinu o koncentraci 50 mg/ml.
2. Špička pipety byla jemně otřena o buněčnou kolonii a vložena do baňky se směsí.
3. Proběhla kultivace za stálého třepání při 37 °C přes noc.
4. Po kultivaci byl obsah baněk přelit do 50 ml zkumavek a stočen na centrifuze při rychlosti 3000 g, teplotě 4 °C po dobu 30 minut.
5. Supernatant byl odlit a stočené buňky byly rozpipetovány v 8 ml S1 resuspendačního pufru.
6. Bylo přidáno 8 ml S2 pufru, čímž se docílila lýze buněk. Směs byla inkubována 3 minuty při laboratorní teplotě.
7. Bylo přidáno 8 ml S3 pufru, který neutralizoval reakci a zastavil lýzu buněk. Inkubace probíhala 5 minut při 4 °C. Následovala centrifugace při 12000 g, teplotě 4 °C po dobu 10 minut.
8. Během centrifugace byla připravena aparatura s nálevkou s filtračním papírem, pod ni byla umístěna kolona, do které bylo přidáno 2,5 ml N2 pufru. Ten prokapal kolonou do připravené kádinky na odpad.
9. Supernatant byl nalit na nálevku s filtračním papírem a ponechána k prokapání přes kolonu, na které se zachytila izolovaná DNA.
10. Po prokapání veškeré tekutiny bylo do kolony přidáno 12 ml N3 pufru, který slouží jako čistící. Ten byl také ponechán k prokapání do kádinky.
11. Pod kolonu byla umístěna 15 ml zkumavka a do kolony poté bylo přidáno 5 ml elučního N5 pufru vyhřátého na 55 °C. Opět se vyčkalo, než celý objem pufru odkape do připravené zkumavky, kam se s ním dostala i izolovaná DNA.
12. Bylo přidáno 3, ml isopropanolu, vzorek byl zvortexován a stočen na centrifuze při 15000 g, teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Vzniklý supernatant byl odpipetován.
13. Následně byly přidány 2 ml 70 % ethanolu a vzorek byl opět centrifugován při 15000 g, při teplotě 22 °C po dobu 10 minut. Supernatant byl odpipetován.
14. Zkumavka byla vložena mezi papírové utěrky a ponechána ve vyschnutí zbylého ethanolu. Poté byla DNA rozpuštěna v 50 μ l vody.
15. Na 10 x zředěném vzorku byla fotometricky ověřena koncentrace.

7.4.3 Tranzientní transfekce TUT7

Pomocí tranzientní transfekce mohla být ověřena funkčnost konstruktů a možnost indukce exprese TUTáz. Jelikož byl konstrukt s TUT7 hotov dříve než TUT4, byly na něm testy exprese provedeny separátně.

Na rozdíl od transfekce na stabilní linii zde není konstrukt vkládán do genomu, ale pouze do buňky. Připravený konstrukt byl tedy transfekován do buněk Hek293 a indukován doxycyklinem dle následujícího postupu.

1. Byly připraveny buňky Hek293 s konfluencí zhruba 70 % v 2 ml DMEM média.

2. Byla vytvořena směs obsahující 1,5 µg konstruktů, dále 3 µl Turbofect reagentu, který zajistí obalení DNA a její endocytózu. Poslední složkou je 300 µl DMEM média.
3. Takto připravená směs je následně zvortexována po dobu 15 vteřin a ponechána při pokojové teplotě 15 minut.
4. Po uplynutí této doby je směs přidána na misku s připravenými buňkami.
5. Byl přidán doxycyklin (*AppliChem, Německo*) v konečné koncentraci 200 µg/ml, což odpovídalo 0,45 µl roztoku s koncentrací 1 mg/ml.
6. Inkubace probíhala po dobu 24 h při 37 °C.
7. Po inkubaci bylo médium odsáto a buňky promyty 1 ml PBS vyhřátého na 37 °C, které odstraňuje zbytky média. To bylo také odsáto.
8. Následně proběhl sběr buněk do 700 µl studeného PBS o teplotě 4 °C do nové zkumavky.
9. Zkumavka s buňkami byla stočena při 4 °C při 200 g po dobu 7 minut.
10. Vzniklý supernatant byl odsát a pelet byl uchováván na ledu.

7.4.4 Příprava proteinového lyzátu pro SDS-PAGE z kultury lidských buněk

11. 2,3 ml kultury Hek293 bylo sklizeno do 700 µl PBS o teplotě 4 °C.
12. Pro lyzi bylo přidáno 135 µl lyzačního pufru (100 mM NaCl, 1 % Triton-X a 50 mM TRIS o pH = 7,4) a 15 µl miniComplete roztoku (*Roche Life Sciences Products*), který funguje jako inhibitor proteáz. Směs byla rozmíchána a inkubována 30 minut na ledu.
13. Následně byly odstraněny nesolubilní frakce centrifugací při 4 °C a 11 000 g po dobu 10 minut. Supernatant, ve kterém se nachází proteiny byl přenesen do čisté zkumavky.
14. Koncentrace byla změřena metodou podle Bradfordové. Rovnice pro výpočet koncentrace z absorbance byla stanovena kalibrační řadou roztoků BSA: $y = 0,0573x + 0,1$.

7.4.5 SDS-PAGE

Protože se v získaném roztoku nachází více proteinů, je třeba protein zájmu odlišit. K tomu byla využita proteinová elektroforéza, SDS-PAGE, kde byly jednotlivé proteiny separovány dle velikosti. Princip je stejný jako při elektroforéze DNA. Rozdílem je, že v případě proteinů se využívá SDS pufru, který, kromě denaturace také obalí různě nabitě proteiny záporně nabitým obalem. Eliminuje se tak riziko rozdělení podle náboje a zajistí, že se budou proteiny dělit především dle velikosti. Gel pro tento typ elektroforézy je polyakrylamidový a má dvě části o různých koncentracích. Horní nanášecí část má nižší koncentraci, spodní rozdělovací část vyšší.

1. Byl připraven separační gel o 9 % koncentraci a nalit do připravené formy. Než dojde k zatuhnutí byl přelit isopropylalkoholem.
2. Po zatuhnutí byl připraven nanášecí gel o 5 % koncentraci, který byl po odlití isopropanolu nalit na spodní gel. Byl přidán hřebínek.
3. Po zatuhnutí mohl být hřebínek vyjmut a gel byl přelit SDS pufrem.
4. Ke vzorkům byl přidán 4x SDS nanášecí pufr (*AppliChem, Německo*), aby byl vzorek obarven a snáze klesl ke dnu jamky. Následně byly pipetovány na gel.

Samotná elektroforéza následně probíhala při 120 V po dobu 2 hodin. Byl použit Protein Marker VI (*Applichem*).

7.4.6 Western Blot

Poté byly rozdělené proteiny metodou wet blot přeneseny z gelu na PVDF membránu, kde dále probíhá interakce s protilátkami. Pro přenesení bylo nutné sestavit sandwichovou aparaturu. Před sestavením aparatury byla membrána aktivována ve 100% methanolu, následně opláchnuta vodou promyta v Towbin pufru (25mM Tris, 192mM glycin, 20 % methanol, pH=8,6).

7.4.6.1 Sestavení sandwichové aparatury

Sandwichová aparatura sestává z gelů s proteiny, filtračního papíru, PVDF membrány a houbiček. První vrstvu tvoří houba namočená v Towbin pufru, na kterou je položen filtrační papír, následuje PVDF membrána a gel. Z druhé strany gelu je dán další filtrační papír, a nakonec druhá houba namočená v Towbin pufru. Celý sandwich byl poté uzavřen v aparatuře XCell SureLock Mini-Cell and XCell II Blot Module (*Invitrogen*). Transfer probíhal přes noc při 20 V.

7.4.6.2 Blokování

Vzhledem k tomu, že by se na membránu mohly nespecificky vázat protilátky, bylo nejprve zapotřebí zablokovat ji mlékem. K tomu byl použit 5 % roztok mléka v PBS-T, kdy ke každé části membrány bylo přidáno 5 ml roztoku. Za stálého otáčení tak byly membrány blokovány 1 hodinu při laboratorní teplotě.

7.4.6.3 Inkubace s primárními protilátkami

Následně přišla na řadu primární protilátka. Byla použita specifická protilátka pro TUT7 a díky přítomnosti FLAG sekvence v konstruktu bylo možné použít i protilátku na FLAG. Kontrolní látkou byl tubulin, který byl zvolen pro svoji stabilní expresi v buňce. Membrána byla tedy rozdělena na tři části, každá část pro jednu protilátku. Přehled protilátek, jejich původců, ředění a výrobců je zapsán v tabulce níže. Původce primární protilátky je následně důležitý pro výběr sekundární protilátky.

Tabulka 11 - přehled primárních protilátek, jejich původců a výrobců

Protilátka	Ředící poměr	Původce	Výrobce
α – TUT4	1:5000	koza	Imgenex
α – TUT7	1:1000	králík	Sigma – Aldrich s.r.o.
α – TUB	1:5000	myš	Sigma – Aldrich s.r.o.
α – HA	1:1000	králík	Santa Cruz Biotechnology
Streptavidin – HRP	1:10000		ThermoFisher
α – Flag	1:2500	myš	Sigma – Aldrich s.r.o.

1. Ke každé části membrány bylo přidáno 5 ml mléka s příslušnou protilátkou.
2. Inkubace probíhala za stálého otáčení 2 hodiny při laboratorní teplotě.

7.4.6.4 Promývání

3. Membrány byly omyty PBS – T roztokem s koncentrací Tweenu 0,05 mM, 3x vždy po dobu 10 minut. Po 10 minutách byl roztok vždy vyměněn.

7.4.6.5 Inkubace se sekundárními protilátkami

4. Membrány byly dány do nového mléka s příslušnou sekundární protilátkou.
5. Inkubace probíhala za stálého otáčení 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Tabulka 12 - přehled původců sekundárních protilátek, jejich ředění a výrobců

Původce sekundární protilátky	Ředící poměr	Výrobce
králík	1:3000	Promega Corporation
myš	1:5000	Promega Corporation
koza	1:5000	Santa Cruz Biotechnology

7.4.6.6 Promývání

6. Membrány byly opět omyty PBS – T roztokem 3x po dobu 10 minut.

Pro vizualizaci byly membrány inkubovány s *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (ThermoFisher) a signál byl detekován na film (*Cytiva*).

7.5 Test biotinylační aktivity

Po dokončení obou konstruktů byla provedena tranzientní transfekce do připravených Hek293 buněk dle stejného protokolu jako při tranzientní transfekci TUT7. Doxycyklin byl však přidán do poloviční koncentrace, tedy 100 µg/ml.

1. Byl vytvořen MasterMix pro 3 plasmidy, sestávající z 37,5 µl Turbofect reagentu a 3750 µl media bez FBS. Ten byl následně rozpipetován na třetiny.
2. Do každé třetiny bylo přidáno 6,3 µg plasmidové DNA.
3. Každá třetina byla rozpipetována do 4 jamek na six-wellu.
4. Do tří jamek z každé čtveřice bylo přidáno odpovídající množství doxycyklinu – 1 µl doxycyklinu na 1 ml DMEM média. Konečná koncentrace odpovídala 100 µg/ml.
5. Kultivace probíhala staticky při 37 °C po dobu 12 hodin.
6. Po uplynutí této doby byl do každé jamky přidán biotin do finální koncentrace 50 µM a buňky byly sklizeny po 5, 10 a 20 minutách do 1ml studeného PBS.
7. Následovalo měření koncentrace dle Bradfordové s rovnicí pro výpočet koncentrace $y = 0,0573x + 0,1$.

7.5.1 SDS-PAGE a western blot

Pro proteinovou elektroforézu byl využit komerční gradientový gel (*Invitrogen*). Byly připraveny 2 gely. Jeden se vzorky obsahujícími 10 µg proteinu pro testy biotinylace, druhý obsahující 20 µg proteinu pro testy specifickými protilátkami. Před nanesením byly vzorky smíchány s 4x SDS nanášecím pufrem. Pro 10 µg bylo nanášeno 6,5 µl, pro 20 µg bylo nanášeno 13 µl. Elektroforéza probíhala při 120 V po dobu 2 hodin. Poté byly proteiny přeneseny na PVDF membránu opět metodou wet blot, která byla následně blokována ve 20 ml 5 % mléka po dobu 1 hodiny a vystavena působení specifické primární protilátky a následně sekundární protilátky. K vyvolání vzorků TUT4, TUT7 a tubulinu byl k tomu použit set *Pierce ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher)*. Kvůli problematickému vyvolávání protilátky na 3xHA byl pro vyvolání této části membrány využit set *Amersham ECL Western Blotting Detectin Reagent (Cytiva)* vykazující vyšší citlivost. Délky expozice činily 2, 5, 10 minut a 2 a 5 vteřin.

7.5.2 Odstranění protilátek z PVDF membrány

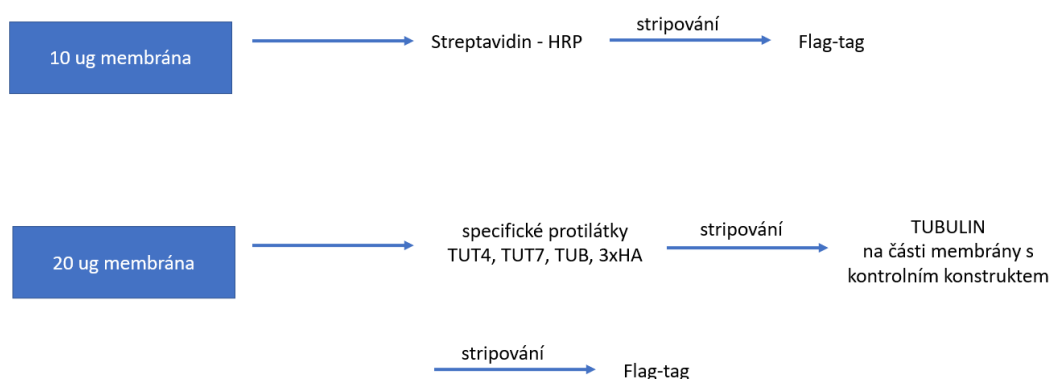
Na část 20 µg membrány s kontrolním konstruktem byla kromě protilátky na 3xHA aplikována i protilátka na tubulin. Protože jsou však velikostně velmi blízko sebe, bylo nutné aplikovat protilátky postupně. Jak je popsáno výše, prvně byla aplikována protilátka na 3x HA. Po vyvolání musela být tato část membrány stripována – očištěna od protilátek pro aplikaci protilátky na tubulin. Byla tak promyta v PBS – T, stripována

ve stripovacím pufru (*ThermoFisher*) 15 minut, opět promyta 2x po dobu 5 minut v PBS – T. Blokování probíhalo ve 20 ml 5 % mléka po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Odtamtud byla membrána přesunuta do 5 ml 5 % mléka s primární protilátkou na tubulin, kde se za stálého otáčení inkubovala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla opět promyta v PBS – T, a to 3x po 10 minutách. Následně byla dána do 5 ml 5 % mléka se sekundární protilátkou, kde byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Opět byla promyta v PBS – T, 3x po 10 minutách a vyvolána na film za použití *Pierce ECL Western Blotting Substrate*. Délky expozice činily 1,2,5 minut a 10 vteřin.

Membrána s 20 µg proteinu byla po vyvolání také stripována, aby mohla být použita pro opakovaný pokus se Streptavidin – HRP. Membrána byla tedy 2x promyta po 5 minutách v PBS a následně za stálého otáčení inkubována 15 minut ve stripovacím pufru. Poté byla opět 2x promyta v PBS. Blokování probíhalo v 20 ml 5 % BSA po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla membrána dána do 5 ml 5 % BSA s 0,5µl Streptavidin – HRP, kde za stálého otáčení zůstala přes noc při 4°C. Druhý den byla promyta PBS a vyvolána na film setem *Pierce ECL Western Blotting Substrate*. Délky expozice činily 5, 10 a 15 minut.

Stripováním prošla také membrána s 10 µg. Bylo třeba ještě ověřit expresi miniTurboID pomocí protilátky na Flag-Taq, který je v konstruktech zabudován. Membrána tedy prošla stejným stripovacím procesem jako výše popsaná část membrány pro tubulin. Byla blokována mlékem, v primární protilátce byla inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě, byla promyta v PBS – T, v sekundární protilátce byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Vyvolání proběhlo s užitím setu *Amersham ECL Western Blotting Detectin Reagent*, stejně jako u protilátky na 3x HA. Délky expozice činily 1, 3, 5 minut a 5, 10 a 30 vteřin.

Pro lepší přehled je zde připojeno schéma experimentů s membránami.



Obrázek 6 - schéma experimentů s jednotlivými membránami

7.6 Příprava kontrolního expresního konstruktů

Aby mohla být ověřena biotinylace, je zapotřebí kontrolního expresního konstruktů, kde se nachází domény pro miniTurboID, ale již v něm není sekvence TUTázy. Pro tyto účely posloužil vektor *pcDNA5-FRT-TO-N-FPH* z laboratorní databáze, V623, o velikosti 5250 bp, do kterého bylo klonováno miniTurboID přes dvě restrikční místa – *BamHI* a *NotI*.

7.6.1 PCR miniTurboID

Na oba konce miniTurba bylo opět nutné přidat vybraná restrikční místa, čehož bylo dosaženo vhodnými primery. Nastavení thermocyklu je popsáno v tabulce níže. Souběžně bylo připraveno 6 stejných reakcí.

Tabulka 13 - primery použité při amplifikaci genu pro miniTurboID metodou PCR

Název	Sekvence
miniTurboID_BamHI_fwd	TTGGATCCATCCCGCTGCTGAACG
TUT4_NotI_rev_3	TTGCGGCCGCAACCTTTTCGGCAGACCG

Tabulka 14 - složení jedné PCR reakce

Látka	Množství
templátová DNA	35,6 ng
iProof polymeráza	0,4 U
iProof pol. pufr	4 µl
dNTP 20µM	0,4 µl
miniTurboID_BamHI_fwd	0,5 µl
primer TUT4_NotI_rev_3	0,5 µl
H ₂ O	13,4 µl
Celkový objem reakce	20 µl

Tabulka 15 - průběh a parametry reakce

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Iniciace denaturace	98	30s	1
Denaturace	98	10s	
Nasedání primerů	60	30s	29
Elongace	72	1 min.	
Konečná extenze	72	5 min.	1

Zmnožení a délka amplifikonu byla následně ověřena gelovou elektroforézou na 1 % agarózovém gelu, která probíhala při 85 V. Použita na ni byla jedna reakce. Zbylý objem byl purifikován pomocí *QIAquick PCR Purification Kitu*.

7.6.2 Štěpení miniTurboID

Po izolaci pomocí *QIAquick PCR Purification Kitu* byl amplifikon naštěpen zvolenými restrikčními enzymy.

Tabulka 16 - složení jedné štěpné reakce miniTurboID

Látka	Množství
PCR produkt	560,8 ng
BamHI	1 μ l
NotI	1 μ l
Fast Digest Buffer	3 μ l
H ₂ O	21 μ l
Celkový objem	30 μ l

Reakce probíhala při 37 °C po dobu 1 h. Velikost byla opět ověřena gelovou elektroforézou. Použit byl 1 % agarózový gel, který jel 50 minut při 85 V.

Naštěpená DNA byla následně izolována z gelu za použití *MinElute Gel Extraction Kit*, koncentrace byla změřena spektrofotometricky. Takto připravený fragment bylo možno použít pro ligaci.

7.6.3 Štěpení pcDNA5-FRT-TO-N-FPH

Stejně jako fragment byl i vektor štěpen stejnými restrikcími enzymy *BamHI* a *NotI*.

Tabulka 17 - složení jedné štěpné reakce vektoru V623

Látka	Množství
vektor V623	711 ng
BamHI	1 μ l
NotI	1 μ l
Fast Digest Buffer	3 μ l
H ₂ O	23,5 μ l
Celkový objem	30 μ l

Štěpení probíhalo při 37 °C po dobu 1 h. Poté proběhla gelová elektroforéza na 1 % gelu, ze kterého byl vektor vyřezán a izolován *MinElute Gel Purification Kitem*. Koncentrace byla opět změřena fotometricky.

Pro potvrzení velikostí i koncentrací byla provedena kontrolní gelová elektroforéza na 1 % agarózovém gelu, která probíhala při 85 V po dobu 50 minut. Byly pipetovány 2 μ l vektoru V623 vedle 2 a 5 μ l fragmentu miniTurboID.

7.6.4 Ligace a kontrola ligace V623 a miniTurboID

Po vypočtení vhodných množství DNA byly pipetovány dvě ligační reakce – jedna o poměru vektoru a fragmentu 1:3 a druhá 1:6. Reakce probíhala při 16 °C přes noc.

Tabulka 18 - složení ligačních reakcí

Látka	Poměr 1:3	Poměr 1:6
vektor	49,8 ng	49,8 ng
miniTurboID	22 ng	43,5 ng
T4 DNA Ligase	400 U	400 U
T4 DNA ligase buffer	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	3,18 μ l	1,25 μ l
Celkový objem	10 μ l	10 μ l

METODY

Po skončení reakce byla reakce uchovávána při teplotě -20 °C. Poté byly 4 µl vzorku transformovány do 50 µl bakteriálních Top10 buněk. Bylo přidáno 600 µl LB média. Kultivace probíhala staticky na LB agaru s Ampicilinem při 37 °C přes noc.

Po kultivaci proběhla PCR vybraných kolonií, která odhalila pozitivní klony – tedy klony se zaligovaným fragmentem. Použity byly primery *miniTurbo seq primer_fwd* a *Hygro Rev5*. Špičkou bylo odebráno malé množství z narostlé kolonie a rozpipetováno ve 30 µl H₂O. MasterMix byl vytvořen z 5 µl RedTaq mixu, 3,5 µl H₂O, 0,25 µl od každého primeru a 1 µl suspenze transformovaných buněk.

Tabulka 19 - primery užívané při PCR kolonií transformovaných s ligační reakcí

Název	Sekvence
Hygro Rev5	CCAATGTCAAGCACTTCCGG
miniTurbo seq primer_fwd	AATAGACCCGTGAAGCTGAT

Tři vybraní zástupci byli kultivováni v 5 ml LB média s 5 µl Ampicilinu o koncentraci 50 mg/ml pro následnou izolaci DNA pomocí *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*. Dva vzorky byly následně poslány na sekvenaci do firmy SeqMe s primery *CMV_fwd* a *miniTurbo seq primer_fwd*, aby byla ověřena správnost sekvence.

Tabulka 20 - primery užívané při sekvenaci konstruktů

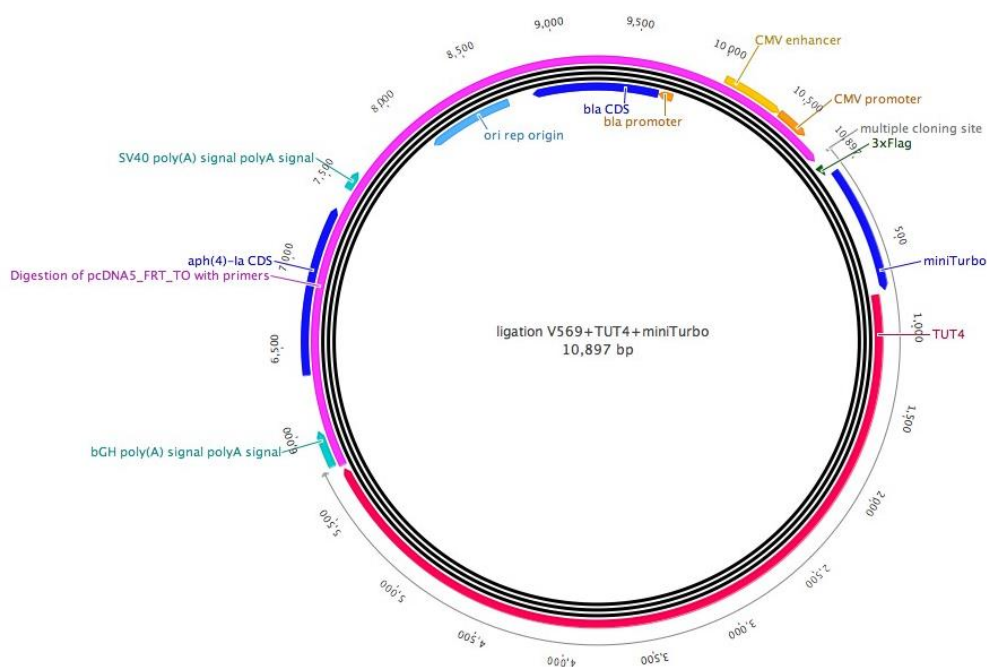
Název	Sekvence
CMV_fwd	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
miniTurbo seq primer_fwd	AATAGACCCGTGAAGCTGAT

8 VÝSLEDKY

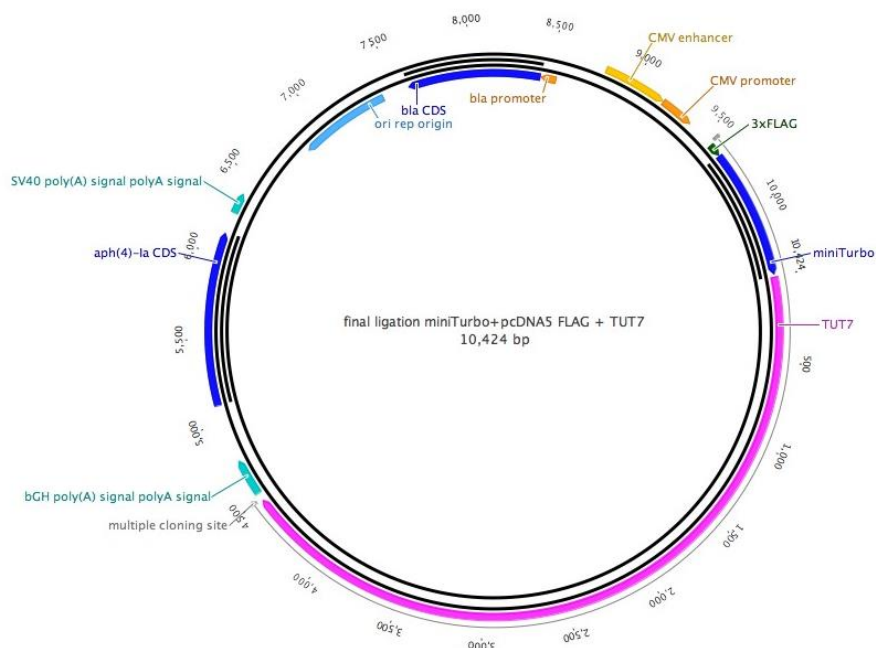
8.1 Příprava konstruktů pro expresi TUT4 a TUT7

8.1.1 miniTurboID

Cílem klonování bylo vložení domény pro biotinylation s názvem miniTurboID do plazmidového vektoru pcDNA5, který obsahoval sekvenci proteinu TUT4 nebo TUT7. Klonování u obou vektorů bylo navrženo s využitím restrikčního místa *NotI*, které bylo také přidáno na konce vkládaného fragmentu, aby byly při ligaci kompatibilní. Níže jsou vyobrazeny mapy výsledných vektorů programem Genious.



Obrázek 7 - mapa vektoru pcDNA5 s vloženou TUT4 a miniTurboID



Obrázek 8 - mapa vektoru pcDNA5 s vloženou TUT7 a miniTurboID

Podle této strategie byly taky navrženy primery pro PCR. Výsledné fragmenty tak měly velikost cca 770 párů bazí (*zkráceně bp*), která byla ověřena gelovou elektroforézou.

Zbývající většinový objem byl izolován pomocí *PCR Purification Kitu (Qiagen)*. Níže je uvedena tabulka s fotometrickým měřením koncentrace takto získaného vzorku.

Tabulka 21 - přehled koncentrací po amplifikaci genu miniTurboID metodou PCR

vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
miniTurboID pro TUT4	202,01	1,73	2,17
miniTurboID pro TUT7	184,03	1,73	2,18

Izolovaná DNA byla dále štěpena *NotI* restrikním enzymem, velikost se tak snížila pouze o jednotky bazí. Tato změna není na gelu detekovatelná, ověřována byla tedy opět velikost 770 párů bazí, tedy velikost samotného miniTurboID. Zároveň bylo ověřeno, že ve fragmentu není další *NotI* místo, které by bylo štěpeno. Fragmenty byly opět vyříznuty a izolovány. Níže je opět uvedena tabulka se změřenými koncentracemi.

Takto připravený fragment mohl být použit do ligace, jelikož bylo dosaženo dostatečných koncentrací DNA i její čistoty, jak po PCR, tak po štěpení. Kromě spektrofotometrického ověření proběhlo navíc ověření elektroforeticky, což nám poskytlo jistotu pro další používání fragmentu.

Tabulka 22 - přehled koncentrací po štěpení amplifikonu miniTurboID

vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
miniTurboID pro TUT4	15,5	1,4	0,08
miniTurboID pro TUT7	9	1,7	0,03

Plasmid V569 s TUT4 i plasmid V867 s TUT7 byly připravovány stejným postupem. Oba plasmidy byly nejprve transformovány do buněk TOP10 *E.Coli* pro získání většího množství. Po jejich izolaci byly změřeny spektrofotometricky výsledné koncentrace, které jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 23 - přehled koncentrací plasmidů DNA izolované po bakteriální transformaci

vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
V569	352,4	2,3	1,8
V867	463,8	2,3	1,8

Následovalo štěpení *NotI* restriktčním enzymem, po kterém byla použita navíc alkalická fosfatáza, která defosforylovala štěpené konce a plasmid se tak nemohl recirkularizovat. Pro ověření velikosti byla využita gelová elektroforéza, kde očekávaná velikost V569 byla 10122 párů bazí a V867 9648 párů bazí. Elektroforézou jsme zároveň ověřili, že se v plasmidu nachází pouze jedno *NotI* místo. DNA fragmenty byly opět vyříznuty a izolovány, koncentrace byla změřena spektrofotometricky.

Tabulka 24 - přehled koncentrací plasmidů po štěpící reakci

vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
V569	13,23	2,1	0,03
V867	14,1	1,4	0,05

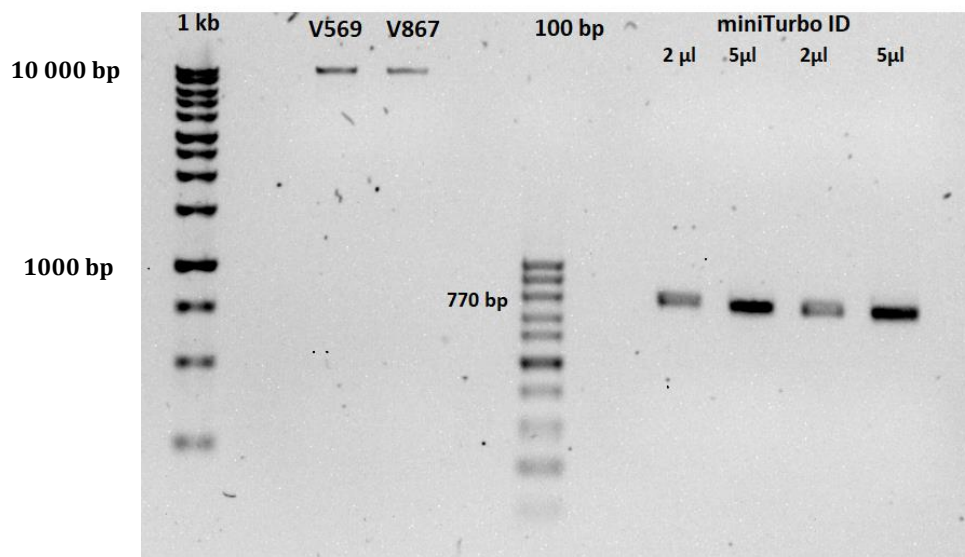
8.2 Ověření a ligace miniTurboID a plasmidů

Pro porovnání měřených koncentrací byly navíc fragmenty i plasmidy nanесeny na gel a elektroforeticky separovány vedle sebe ve stejných objemech – 2 μl od každého fragmentu i plasmidu a 5 μl od každého fragmentu. Byla tak ověřena nezměněná velikost po izolaci po štěpení i měřené koncentrace. Po této kontrole bylo možno

VÝSLEDKY

prohlásit i přípravu plasmidů za úspěšnou. Plasmidy byly izolovány i štěpeny do dostatečné koncentrace pro další využití.

Následovala samotná ligace fragmentů a plasmidů. Ligace TUT4 konstrukt byla z důvodu své problematičnosti provedena v poměru vektoru a fragmentu 1:3 i 1:6.



Obrázek 9 - ověření purifikace DNA na 1 % agarózovém gelu. Zleva 1 kb marker, vektory V569 a B867 o velikosti 10 000bp, 100 bp marker a miniTurboID pro každý konstrukt o velikosti 770bp

Následně byla ligační reakce transformována v TOP10 *E.Coli*. Po proběhnutí kultivace byly ověřovány jednotlivé kolonie pomocí PCR na přítomnost zaligovaného fragmentu a také na jeho správnou orientaci. Jelikož bylo použito pouze jedno restriční místo, s 50 % pravděpodobností mohl být fragment zaligován i naopak. Byl proto zvolen primer nasedající v sekvenci miniTurboID a primer nasedající v plasmidu, jak je zobrazeno na schématu níže. Velikosti amplifikovaných fragmentů byly opět ověřeny gelovou elektroforézou. V případě TUT4 konstrukt to bylo 3300bp a TUT7 konstrukt 1500bp.

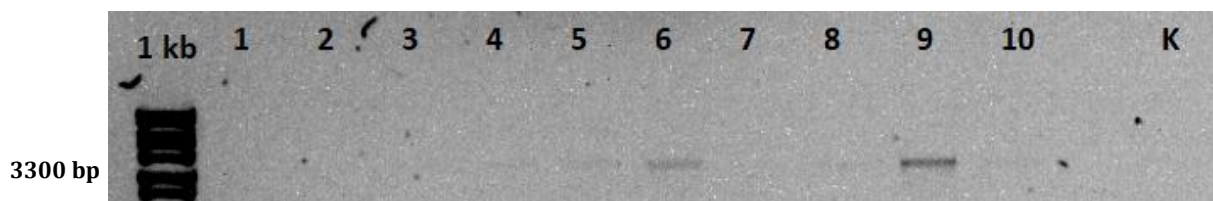


Obrázek 10 - primery užití při PCR kolonií transformovaných s TUT4 konstruktem, modrý text znázorňuje sestřiženou sekvenci miniTurboID, červený text sestřiženou sekvenci TUT4, žlutě podbarvené jsou pak primery se šipkami znázorňujícími směr syntézy nového vlákna DNA

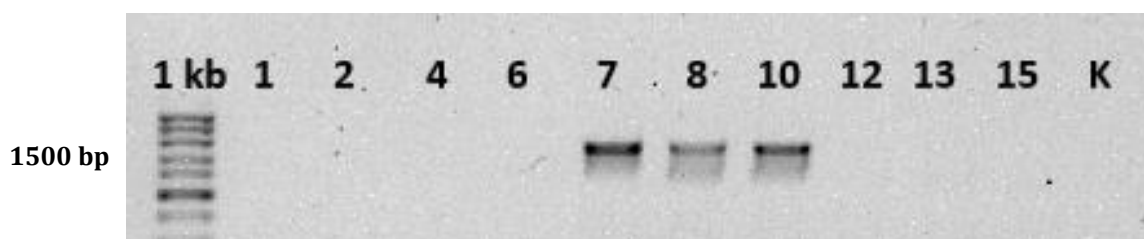


Obrázek 11 - primery užívané při PCR kolonií transformovaných s TUT7 konstruktem, modrý text znázorňuje sestřiženou sekvenci mini-TurboID, červený text sestřiženou sekvencí TUT4, žlutě podbarvené jsou pak primery se šipkami znázorňujícími směr syntézy nového vlákna DNA

Celkově bylo otestováno 10 kolonií TUT4 konstruktů, z čehož u třech byl pozorován produkt o správné velikosti. U TUT7 konstruktů bylo testováno 10 kolonií, z čehož u třech byl pozorován produkt o správné velikosti. Vybrané kolonie byly namnoženy na izolaci a poté z nich byla DNA izolována. Koncentrace byla změřena fotometricky (viz. Tabulka). Vzorke všech kolonií byly také poslány na sekvenaci do firmy SeqMe, která potvrdila správnost sekvence. Pro transfekci na stabilní linii a pro tranzientní transfekci byl zvolen na základě sekvence u TUT4 konstruktů klon 9 a u TUT7 konstruktů klon 10.



Obrázek 12 – screening kolonií s TUT4 konstruktem pomocí PCR. Nalevo 1 kb marker, následuje 10 testovaných kolonií a negativní kontrola K. Pozorujeme 3 vzorky o správné velikosti produktu 3300 bp.



Obrázek 13 – screening kolonií s TUT7 konstruktem pomocí PCR. Nalevo 100 bp marker, následuje 10 testovaných kolonií a negativní kontrola K. Pozorujeme 3 vzorky o správné velikosti produktu 1500 bp.

Tabulka 25 - přehled koncentrací vzorků izolované DNA

vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
TUT4 - 5	72,1	1,74	1,63
TUT4 - 6	56,25	1,33	1,65
TUT4 - 9	309,39	1,78	2,32
TUT7 - 1	675,61	1,79	2,22
TUT7 - 7	186,8	1,79	2,1
TUT7 - 8	148,6	1,73	1,9
TUT7 - 10	495,93	1,8	2,3

Klony vybrané pro transfekce se následně znovu namnožily v bakteriálních buňkách a DNA byla izolována znovu pomocí reagensů popsaných v kapitole Metody v podkapitole Midi-prep, tentokrát ve větší koncentraci a čistotě. Vzorky byly opět měřeny spektrofotometricky.

Tabulka 26 - přehled koncentrací DNA ve formě Midi-prepu

vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
TUT4 - 9	1249,6	1,7	2,12
TUT7 - 10	2052,2	1,78	2,38

Při hledání kolonií se správně zaligovaným konstruktem byl pozorován spíše nižší podíl pozitivních kolonií. Statistický předpoklad říká, že by správně zaligovaných fragmentů měla být polovina. Avšak nebyly otestovány všechny kolonie, je zde tedy možnost, že vynechané byly právě ty se správným konstruktem. Většina pozitivních kolonií však vykazovala po izolaci vysoké koncentrace DNA v uspokojivé čistotě. Z této řady mírně vybočují vzorky TUT4 - 5 a TUT4 - 6, které byly koncentračně níže. Odpovídá tomu i intenzita těchto vzorků na gelu, kdy jsou viditelně slabší, než vzorek TUT4 - 9. Je tedy možné, že se v těchto koloniích vyskytovalo méně DNA nebo mohlo dojít k chybě během přípravy mini-prepu – počet zaočkovaných bakterií mohl být nižší, voda na eluci mohla mít nižší teplotu apod. Koncentrace Midi – prepů vybraných vzorků byly izolovány v dostatečném množství i čistotě

8.3 Testování exprese TUT7

Jestli byl konstrukt správně připraven ukázaly testy indukované exprese zkoumaných proteinů TUT4 a TUT7 fúzovaných s miniTurboID doménou vyvolenou doxycyklinem. Negativní kontrolou byl vzorek buněk neindukované doxycyklinem, značené DOX -. Jelikož byl konstrukt s TUT7 připraven dříve, než TUT4, proběhly na něm testy exprese odděleně. Ty proběhly po tranzientní transfekci buněk Hek293. Buňky z tranzientní transfekce byly sesbírány, zlyzovány a změřeny metodou dle Bradfordové.

Tabulka 27 - přehled koncentrací proteinů měřené metodou dle Bradfordové

vzorek	c (ng/μl)
TUT7 s DOX	14,01
TUT7 bez DOX	10,45

Expresе TUTáz byla následně ověřena pomocí western blotu se specifickými protilátkami na fúzní tag Flag a TUT7. Očekávaná velikost endogenní TUT7 byla 171 kDa, TUT7 s Flag-Tagem a miniTurboID 202 kDa.

Na části filmu s protilátkou na Flag-Tag pozorujeme slabý signál u vzorku z buněk bez indukce doxycyklinem (DOX-), který však velikostně odpovídá fúzovanému produktu. Mohlo by se jednat o kontaminaci vedlejším vzorkem či o nanášecí chybu. Variantou také zůstává indukci nekontrolovatelná exprese. U vzorku z buněk indukovaných doxycyklinem (DOX+) nelze plně rozlišit jednotlivé signály, avšak signál v horní části by mohl odpovídat Flag-TUT7. Signály níže pak mohou být opět rozpadové produkty.

Samostatné testování tranzientní transfekce TUT7 konstruktů tedy poukázalo na jeho funkčnost.



Obrázek 14 -Ověření exprese TUT7 z TUT7 konstruktů pomocí western blotu. Zleva neindukovaný (DOX-) a indukovaný (DOX+) vzorek s protilátkou na Flag-Tag, následně velikosti dle markeru a indukovaný a neindukovaný vzorek s protilátkou na TUT7. Signál byl detekován po 5minutové expozici.

Na pravé části filmu lze vidět vzorky inkubané s protilátkou na TUT7. Pozorujeme velmi slabý signál ve vzorku bez indukce, který svojí velikostí odpovídá endogenní TUT7. Vrchní signál u indukovaného vzorku odpovídá velikosti TUT7 fúzované s Flag-Tagem a miniTurboID. Signály pod ním mohou odpovídat opět endogenní TUT7 či rozpadovým produktům.

Na membráně inkubované s protilátkou na Flag-Tag opět pozorujeme slabý signál u neindukovaného vzorku, který však velikostně odpovídá fúzovanému produktu. Mohlo by se jednat o kontaminaci vedlejším vzorkem či o nanášecí chybu. Variantou také zůstává indukci nekontrolovatelná exprese. U indukovaného vzorku nelze plně rozlišit jednotlivé signály, avšak signál v horní části by mohl odpovídat Flag-TUT7. Signály níže pak mohou být opět rozpadové produkty.

Samostatné testování tranzientní transfekce TUT7 konstruktů tedy poukázalo na jeho funkčnost.

8.4 Ověření exprese a biotinylační aktivity miniTurboID - TUT4 a miniTurboID - TUT7

Tabulka 28 - přehled koncentrací proteinu u jednotlivých vzorků, čas vždy reprezentuje bod, ve kterém byly buňky po přidání biotinu posbírány

konstrukt	vzorek	c (µg/µl)
TUT4	DOX-, 10 min.	2,64
	DOX+, 5 min.	2,77
	DOX+, 10 min.	3,94
	DOX+, 20 min.	3,75
TUT7	DOX-, 10 min.	1,76
	DOX+, 5 min.	2,01
	DOX+, 10 min.	3,26
	DOX+, 20 min.	0,52
kontrola	DOX-, 10 min.	1,5
	DOX+, 5 min.	0,23
	DOX+, 10 min.	1,43
	DOX+, 20 min.	2,11

Po dokončení konstruktu s TUT4 byly oba konstrukty opět podrobeny tranzientní transfekci. Tentokrát vedle ověření exprese TUTáz proběhly i první testy biotinylace, které jsou blíže popsány v kapitole Metody. Po přidání biotinu byly buňky sbírány ve třech časových bodech – 5, 10 a 20 minut.

Všechny vzorky byly vyvolány na film.

Tabulka 29 - přehled velikostí jednotlivých vzorků

Sekvence	Velikost v kDa
Flag – miniTurboID – TUT4	217
Flag – miniTurboID – TUT7	203
β – tubulin	52
3x HA – miniTurboID	37

Pro experimenty byly připraveny dvě membrány s odlišným množstvím proteinu – 10 µg a 20 µg – podle potřeb primárních protilátek.

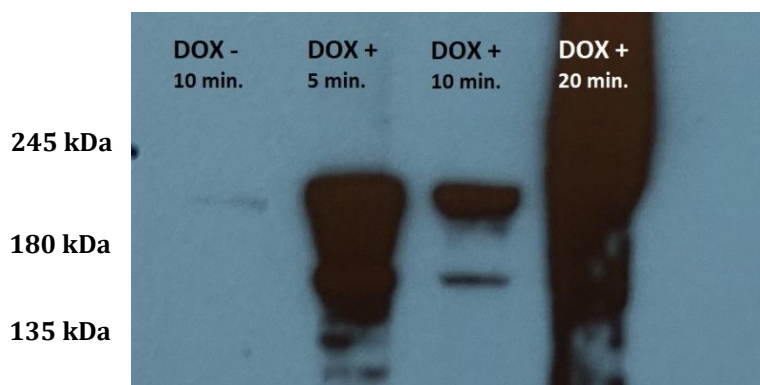
8.4.1 Biotinylační testy a ověření exprese TUT4 a TUT7 protilátkou Flag-Tag

Membrána s 10 μg byla prvně inkubována se Streptavidin – HRP. Bohužel ani po delších expozicích nevznikl na filmu žádný signál. Byl použit Streptavidin – HRP (*ThermoFisher*), který již nese HRP doménu, není proto nutné použití sekundární protilátky.

Membrána s 10 μg proteinu byla následně podrobena stripování, aby na ni mohla být aplikována protilátka na Flag – Tag a mohla tak být ověřena exprese konstruktů.

U TUT4 konstruktů nebyl zaznamenán žádný signál.

Na části membrány s TUT7 konstruktem byl pozorován slabý signál u neindukovaného vzorku, který však odpovídá očekávané velikosti. Mohlo tedy dojít k nanášecí chybě nebo ke kontaminaci při nanášení vzorků na separační gel. U indukovaných vzorků je již signál velmi dobře patrný. U 10minutového vzorku pozorujeme více signálů, včetně toho o očekávané velikosti, což poukazuje na funkčnost konstruktů. Pozorujeme také signál o velikosti endogenní TUT7. V neindukovaném vzorku je opět vidět endogenní TUT7. Okolní signály mohou být způsobeny nespecifičností protilátky na TUT7 či nedokonalým blokováním membrány, může se jednat také o rozpadové produkty. V případě 20minutové biotinylace pozorujeme souvislý signál, který může indikovat kontaminaci vzorků DNA. Taková kontaminace způsobí během gelové elektroforézy narušení elektrického pole a nesprávnou migraci a separaci proteinů v důsledku čehož později vzniká souvislý signál na filmu. Experiment tedy opět potvrdil expresi konstruktů TUT7.

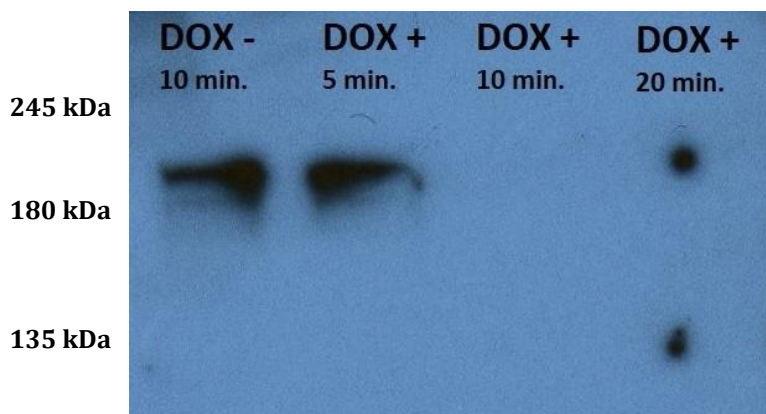


Obrázek 15 – Ověření exprese TUT7 z TUT7 konstruktů pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na TUT7. Zleva vidíme vzorek z neindukovaných buněk (DOX-) po 10minutové biotinylaci, dále doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylaci. Signál byl detekován po 30 s expozici.

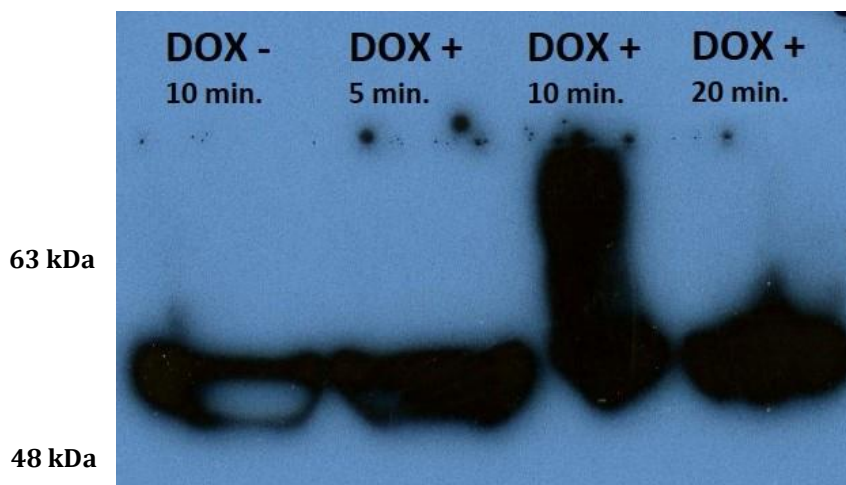
8.4.2 Biotinylační testy a ověření exprese TUT4, TUT7 a kontrolního konstruktu specifickými protilátkami

Membrána s nanesenými 20 µg proteinu byla inkubována se specifickými protilátkami na TUT4, TUT7, tubulin a 3xHA. Protilátky byly aplikovány vždy pouze na tu část membrány, kde byl očekáván odpovídající signál. Protilátka na TUT4 byla tedy nanesena na část membrány s TUT4 konstruktem, protilátka na TUT7 byla nanesena na část membrány s TUT7 konstruktem, protilátka na tubulin byla nanesena na spodní část membrány kvůli svojí menší velikosti a protilátka na 3xHA byla nanesena na část membrány s negativní kontrolou. Následující experimenty vykazovaly již různorodější škálu výsledků. U testů se specifickou protilátkou na TUT4 byl pozorován signál odpovídající TUT4 fúzované s Flag-Tagem a miniTurboID u neindukovaného vzorku a u vzorku s 5minutovou biotinylací. Příčinou signálu u neindukovaného vzorku mohla být nanášecí chyba nebo exprese endogenní TUT4. Testy se Streptavidin – HRP a protilátkou na Flag-Tag však ukázaly, že problém byl v nízké aktivitě miniTurboID.

Jako nanášecí kontrola byl zvolen tubulin pro svoji stabilní expresi v buňce. Signály získané ze vzorků inkubovaných s protilátkou na tubulin vykazují podobnou intenzitu i velikost. Lze tedy říci, že naneseno bylo zhruba stejné množství od každého vzorku.

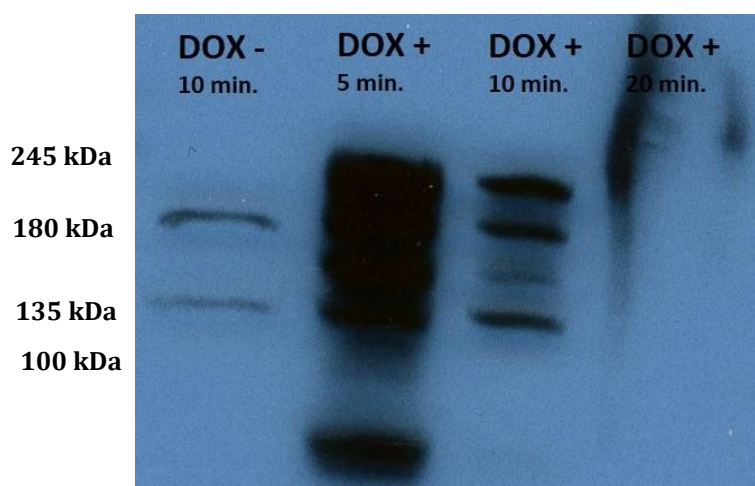


Obrázek 16 – Ověření exprese TUT4 z TUT4 konstruktů pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na TUT7. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylací, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylací a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylací. Signál byl detekován po 10minutové expozici.



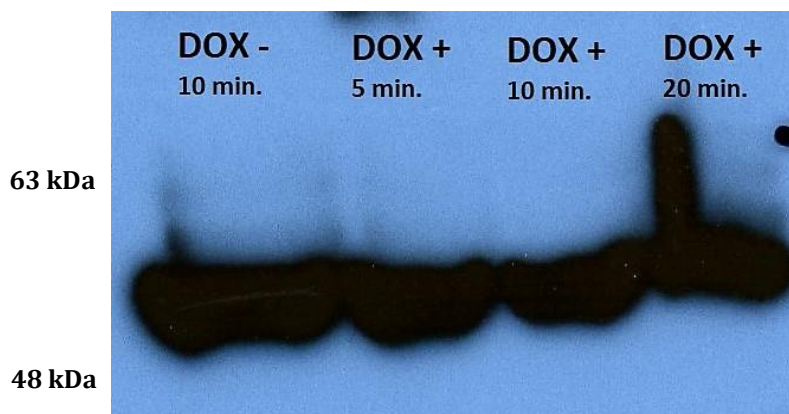
Obrázek 17 - Ověření exprese tubulinu z TUT4 konstruktů pomocí western blotu. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylaci. Signál byl detekován po 2minutové expozici.

U neindukovaného vzorku TUT7 konstruktů je patrný signál endogenní TUT7 a pravděpodobně její rozpadový produkt. 5 ti i 10minutový vzorek vytvořil signál ve velikosti odpovídající fúzovanému produktu, avšak v okolí se nachází větší množství nespecifických signálů, které mohou být důsledkem, stejně, jak je popsáno výše, nespecifičností protilátky nebo přítomností rozpadových produktů. 20minutová biotinylace nepřinesla žádné konkrétní výsledky. Bohužel kvůli souvislému signálu u 20minutového vzorku s protilátkou na Flag-Tag nejsme schopni ověřit příčinu. Jako nanášecí kontrola je zde opět tubulin s velice podobnými signály u všech vzorků. I zde byla tedy kontrola v pořádku.



Obrázek 18 - Ověření exprese TUT7 v TUT7 konstruktu pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na TUT7.

Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 2s expozici.

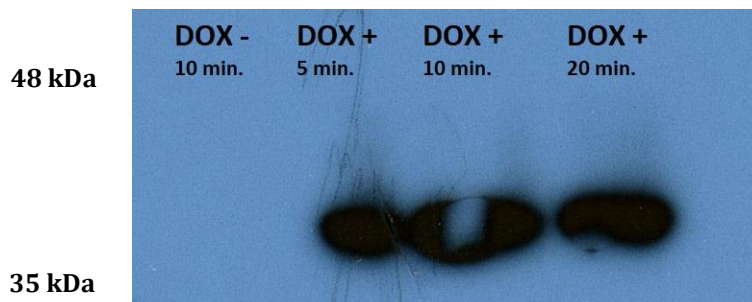


Obrázek 19 - Ověření exprese tubulinu v TUT7 konstruktu pomocí western blotu. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci.

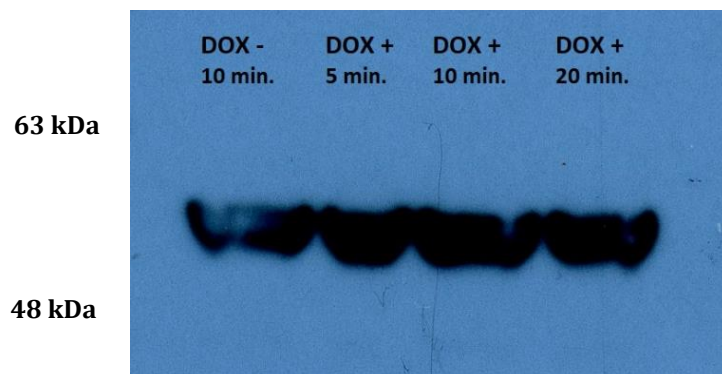
Na filmu můžeme pozorovat signály podobné intenzity u všech vzorků TUT4 i TUT7 konstruktů o korektní velikosti 50 kDa. Mírně odlišnými vzorky jsou TUT4 DOX+ 10

minut a TUT7 DOX+ 20 minut, kde pozorujeme menší souvislý signál. Mohlo by se opět jednat o kontaminaci DNA vzhledem k tomu, že u ostatních vzorků tento souvislý signál není.

Kontrolní konstrukt inkubovaný s protilátkou na 3x HA vykazoval odpovídající signály o velikosti 37,2 kDa, u neindukovaného vzorku signál chyběl. Lze tedy usoudit, že je konstrukt správně připraven a ani při tranzientní transfekci nedochází k samovolné expresi kontrolního konstruktů.



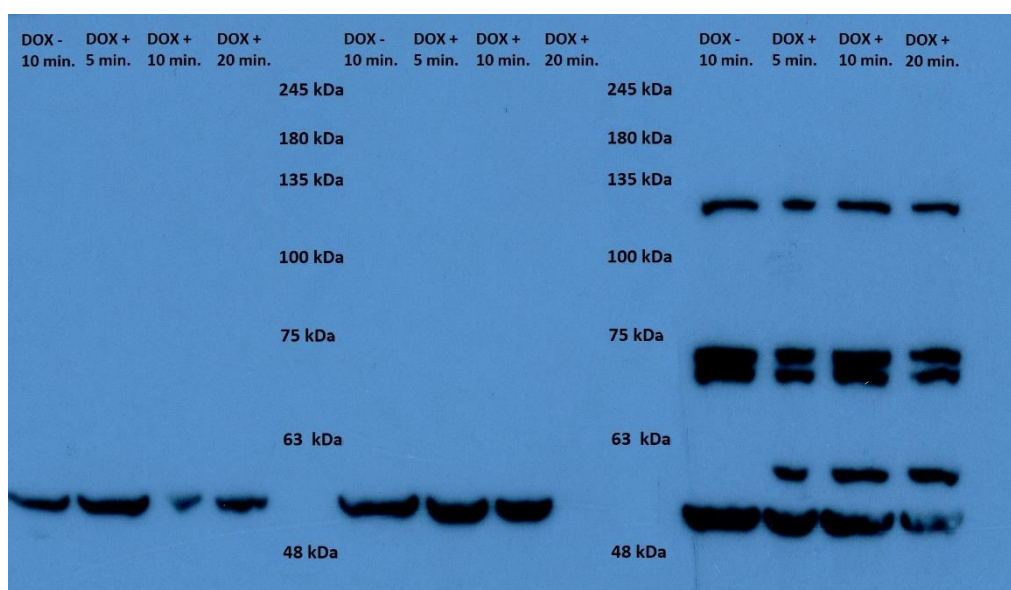
Obrázek 20- Ověření exprese miniTurboID v konstruktů negativní kontroly pomocí western blotu po inkubaci s protilátkou na 3x HA. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 2minutové expozici.



Obrázek 21 - Ověření exprese tubulinu v TUT7 konstruktů negativní kontroly pomocí western blotu. Zleva vidíme vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylnaci, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylnaci a indukovaný vzorek po 20minutové biotinylnaci. Signál byl detekován po 2minutové expozici.

Protože důvodem neúspěchu experimentu se Streptavidin – HRP u 10 μ g membrány mohlo být nízké množství naneseného proteinu, byla membrána s 20 μ g stripována, tedy očištěna od protilátek, a vystavena působení Streptavidin – HRP stejně, jako membrána s 10 μ g. Bohužel ani tentokrát nebyly pozorovány žádné očekávané signály u TUT4 ani TUT7 konstruktů. Jediný signál zde poskytoval tubulin.

U kontrolního konstruktů bylo pozorováno více signálů. Kromě tubulinu byly na filmu také nespecifické signály, které mohou v budoucnu posloužit při vyhodnocování biotinylačních experimentů jako negativní kontrola.



Obrázek 22 - Ověření biotinylační aktivity v konstruktech TUT4, TUT7 i konstruktu negativní kontroly pomocí western blotu po inkubaci se Streptavidin – HRP. První čtveřice je pro TUT4 konstrukt, druhá pro TUT7 konstrukt a třetí pro negativní kontrolu. Zleva vidíme vždy čtveřici vzorků – první je vzorek z buněk neindukovaných doxycyklinem (DOX-), následuje doxycyklinem indukovaný vzorek (DOX+) po 5minutové biotinylacii, indukovaný vzorek po 10minutové biotinylacii a poslední je indukovaný vzorek po 20minutové biotinylacii. Signál byl detekován po 10minutové expozici.

Obecně lze tedy říct, že jako slibný se jeví TUT7 konstrukt. Špatné či žádné signály kteréhokoli vzorku po vyvolání mohly být způsobeny více faktory. První příčinou mohl být nedostatek proteinového materiálu, jelikož buňky nebyly před tranzientní transfekcí dostatečně narostlé. Samotná transfekce má také nízkou účinnost, mohlo se tedy jednat o kombinaci faktoru nízkého počtu buněk a nízké účinnosti transfekce. Jelikož byly tyto experimenty prováděny až ke konci práce a v časové tísní, byly parametry navrženy na základě článku autorů domény miniTurboID. Optimalizaci jistě vyžaduje i koncentrace přidávaného biotinu a čas jeho působení. Při případném

opakování experimentu bych vyzkoušela více různých koncentrací biotinu. Při tomto pokusu byl přidán biotin k dosažení 50 μM finální koncentrace, jelikož western bloty poukázaly na nízkou aktivitu miniTurboID, mohla by pomoci vyšší koncentrace biotinu. Ze stejného předpokladu bych vycházela také u volby času působení biotinu, který by mohl být navýšen, aby byla slabší činnost miniTurboID pozorovatelná. V článku autorů miniTurboID je při 10minutovém intervalu působení 50 μM biotinu vidět na membráně inkubované se Streptavidin – HRP pouze slabý signál. Taktéž relativní biotinylační aktivita se pohybuje velice nízko až do intervalu 6 hodin, kdy intenzivně vzroste. Všechny tyto faktory napovídají použití delšího času pro působení biotinu. Důležitým bodem by byl také optimální nárůst buněk pro transfekci. Nakonec je také třeba zmínit, že negativní kontrola použitá ve zmiňovaných experimentech nebyla zcela ideální. Jedná se o konstrukt s vklonovaným miniTurboID, ovšem místo Flag – Tagu v něm byl 3x HA Tag. Pro prvotní experimenty, navíc v časové tísní, byla tato kontrola však postačující. Navazující experimenty již budou mít k dispozici vhodnější konstrukt s miniTurboID a Flag – Tagem, který byl během práce také konstruován, avšak nebyl dokončen včas.

8.5 Kontrolní konstrukt V623 s miniTurboID

Jako kontrolní konstrukt byl vytvořen vektor, ve kterém se nenacházela TUTáza, ale pouze doména miniTurboID a 3x HA Tag.

Gen pro miniTurboID byl tedy namnožen metodou PCR, při které byly na jeho konce přidány i restrikční místa *BamHI* a *NotI*. Po PCR byla DNA izolována pomocí *PCR Purification Kitu* a koncentrace ověřena spektrofotometricky.

Tabulka 30 - koncentrace miniTurboID po amplifikaci metodou PCR a izolaci

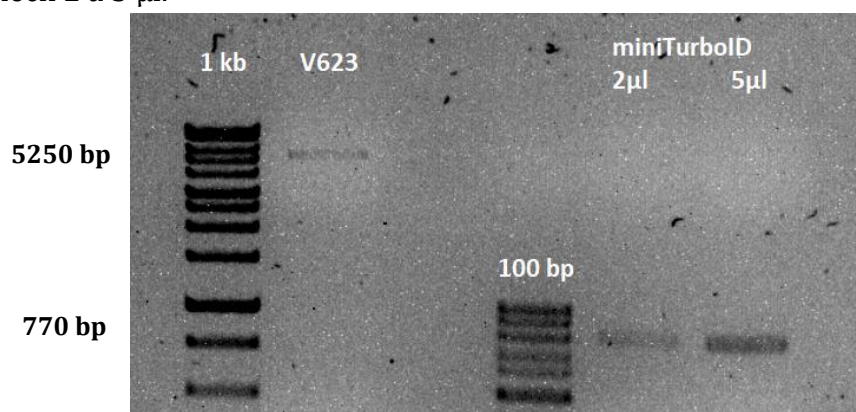
vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
miniTurboID	140,2	1,8	2,2

Poté bylo miniTurboID spolu s vektorem V623 štěpeno vybranými restrikčními enzymy. Velikost byla ověřena gelovou elektroforézou. Z tohoto gelu byla DNA vyříznuta a izolována. Koncentrace byly následně opět měřeny spektrofotometricky.

Tabulka 31 - přehled koncentrací vektoru V623 a miniTurboID po štěpící reakci

vzorek	c (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
V623	17,49	1,41	0,04
miniTurboID	11,17	1,36	0,03

Kromě fotometrického stanovení byla koncentrace po izolaci zkontrolována i gelovou elektroforézou. Vektoru V623 byly nanášeny 2 μl, miniTurboID bylo nanášeno v objemech 2 a 5 μl.

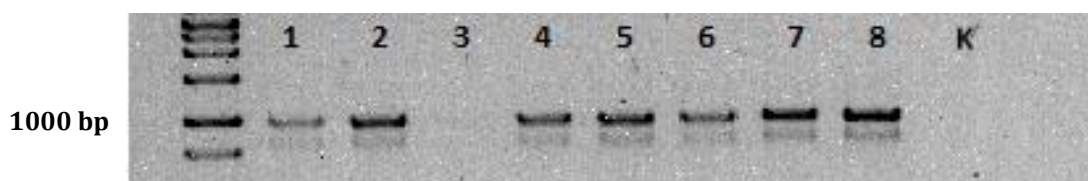


Obrázek 23 - kontrolní elektroforéza štěpeného vektoru V623 o velikosti 5250 bp a štěpeného miniTurboID o velikosti 770 bp

8.5.1 Screening bakteriálních kolonií pomocí PCR

Zkontrolované fragmenty byly připraveny pro ligační reakci, která byla následně transformována do bakteriálních buněk, ze kterých proběhla PCR kolonií pro nalezení kolonií se správně zaligovaným fragmentem. Otestováno bylo 8 kolonií, byly využity dvě teploty pro nasedání primerů – 55 °C a 58 °C, jako úspěšnější byla vyhodnocena teplota 55 °C. Očekávaná velikost produktu při gelové elektroforéze byla 1000 párů bazí. Úspěšnost ligace byla většinová, navíc byly optimalizovány parametry PCR kolonií pro vybrané primery.

Vybrané pozitivní kolonie byly namnoženy a DNA z nich izolována. Koncentrace byla změřena spektrofotometricky.



Obrázek 24 – screening kolonií pomocí PCR ligace V623 s miniTurboID, nalevo 1 kb marker následovaný 8 testovanými koloniemi a negativní kontrolou

Tabulka 32 - přehled koncentrací vybraných vzorků po izolaci DNA

vzorek	c (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
4	348,92	1,75	2,07
6	236,61	1,54	1,67
8	409,85	1,48	1,61

Tyto vzorky byly poslány na sekvenaci a na jejím základě byl vzorek 8 namnožen na izolaci DNA ve vyšší koncentraci a čistotě. Opět byla koncentrace měřena spektrofotometricky a na jejím základě bylo konstatováno, že se konstrukt podařilo izolovat v dostatečné koncentraci i kvalitě.

Tabulka 33 - koncentrace vzorku 8 připraveného ve formě Midi-prepu

vzorek	c (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
8	3006	1,7	2,19

9 Závěr

Tato práce se zaměřuje na terminální uridylyltransferázy a regulaci jejich činnosti proteinovými partnery. Cílem práce byla příprava konstruktů pro experimenty, které měly za cíl identifikaci nových proteinových partnerů.

Během práce byly úspěšně připraven expresní konstrukt pro TUT7 s doménou pro biotinylation miniTurboID. Konstrukt ro expresi miniTurboID-TUT4 byl připraven, ale předběžné experimenty odhalily problém s expresí. Částečně byla rozpracována příprava konstruktů pro negativní kontrolu s miniTurboID.

Proběhly testy exprese konstruktů s TUT4 a TUT7 v Hek293 buněčné linii, na základě, kterých byla potvrzena funkčnost TUT7 konstruktů. Byly provedeny biotinylační testy obou konstruktů, které neprokázaly biotinylační aktivitu v tranzientním provedení.

Proběhly také pokusy o přípravu stabilních buněčných linií TUT7 konstruktů, které byly bohužel neúspěšné.

Z časových důvodů nebyly provedeny biotinylační experimenty pro získání značených proteinů a jejich následnou analýzu.

Použité zdroje

1. Martin G, Keller W. RNA-specific ribonucleotidyl transferases. *RNA*. 2007 Nov;13(11):1834-49. doi: 10.1261/rna.652807. Epub 2007 Sep 13. PMID: 17872511; PMCID: PMC2040100.
2. Warkocki Z, Liudkovska V, Gewartowska O, Mroczek S, Dziembowski A. Terminal nucleotidyl transferases (TENTs) in mammalian RNA metabolism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018 Nov 5;373(1762):20180162. doi: 10.1098/rstb.2018.0162. PMID: 30397099; PMCID: PMC6232586.
3. Dagmar Zigáčková and Štěpánka Vaňáčková „The role of 3' end uridylation in RNA metabolism and cellular physiology“, *Phil. Trans. R. Soc. B3732018017120180171*<http://doi.org/10.1098/rstb.2018.0171>
4. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1984 Oct 26;226(4673):409-16. doi: 10.1126/science.6494891. PMID: 6494891.
5. Martin G, Keller W, Doublie S. Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *EMBO J*. 2000 Aug 15;19(16):4193-203. doi: 10.1093/emboj/19.16.4193. PMID: 10944102; PMCID: PMC302044.
6. Trippe R, Guschina E, Hossbach M, Urlaub H, Lührmann R, Benecke BJ. Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase. *RNA*. 2006 Aug;12(8):1494-504. doi: 10.1261/rna.87706. Epub 2006 Jun 21. PMID: 16790842; PMCID: PMC1524887.
7. De Almeida C, Scheer H, Zuber H, Gagliardi D. RNA uridylation: a key post-transcriptional modification shaping the coding and noncoding transcriptome. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018 Jan;9(1). doi: 10.1002/wrna.1440. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28984054.
8. Dupasquier M, Kim S, Halkidis K, Gamper H, Hou YM. tRNA integrity is a prerequisite for rapid CCA addition: implication for quality control. *J Mol Biol*. 2008 Jun 6;379(3):579-88. doi: 10.1016/j.jmb.2008.04.005. Epub 2008 Apr 8. PMID: 18466919; PMCID: PMC2430420.
9. Song J, Song J, Mo B, Chen X. Uridylation and adenylation of RNAs. *Sci China Life Sci*. 2015 Nov;58(11):1057-66. doi: 10.1007/s11427-015-4954-9. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26563174; PMCID: PMC5089844.
10. Yashiro Y, Tomita K. Function and Regulation of Human Terminal Uridylyltransferases. *Front Genet*. 2018 Nov 12;9:538. doi: 10.3389/fgene.2018.00538. PMID: 30483311; PMCID: PMC6240794.
11. Wang L, Eckmann CR, Kadyk LC, Wickens M, Kimble J. A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2002 Sep 19;419(6904):312-6. doi: 10.1038/nature01039. PMID: 12239571.

12. Kwak JE, Wang L, Ballantyne S, Kimble J, Wickens M. Mammalian GLD-2 homologs are poly(A) polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4407-12. doi: 10.1073/pnas.0400779101. PMID: 15070731; PMCID: PMC384760.
13. Lim J, Kim D, Lee YS, Ha M, Lee M, Yeo J, Chang H, Song J, Ahn K, Kim VN. Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation. *Science*. 2018 Aug 17;361(6403):701-704. doi: 10.1126/science.aam5794. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30026317.
14. Mellman DL, Gonzales ML, Song C, Barlow CA, Wang P, Kendzierski C, Anderson RA. A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):1013-7. doi: 10.1038/nature06666. PMID: 18288197.
15. Yu S, Kim VN. A tale of non-canonical tails: gene regulation by post-transcriptional RNA tailing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Sep;21(9):542-556. doi: 10.1038/s41580-020-0246-8. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32483315.
16. Nakanishi T, Kubota H, Ishibashi N, Kumagai S, Watanabe H, Yamashita M, Kashiwabara S, Miyado K, Baba T. Possible role of mouse poly(A) polymerase mGLD-2 during oocyte maturation. *Dev Biol*. 2006 Jan 1;289(1):115-26. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.10.017. Epub 2005 Dec 2. PMID: 16325797.
17. Cui J, Sartain CV, Pleiss JA, Wolfner MF. Cytoplasmic polyadenylation is a major mRNA regulator during oogenesis and egg activation in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2013 Nov 1;383(1):121-31. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.08.013. Epub 2013 Aug 23. PMID: 23978535; PMCID: PMC3821703.
18. Kashiwabara S, Nakanishi T, Kimura M, Baba T. Non-canonical poly(A) polymerase in mammalian gametogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Apr;1779(4):230-8. doi: 10.1016/j.bbagr.2008.01.004. Epub 2008 Feb 12. PMID: 18294465.
19. Kwak JE, Drier E, Barbee SA, Ramaswami M, Yin JC, Wickens M. GLD2 poly(A) polymerase is required for long-term memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 23;105(38):14644-9. doi: 10.1073/pnas.0803185105. Epub 2008 Sep 9. PMID: 18780789; PMCID: PMC2567210.
20. Rouhana L, Wang L, Buter N, Kwak JE, Schiltz CA, Gonzalez T, Kelley AE, Landry CF, Wickens M. Vertebrate GLD2 poly(A) polymerases in the germline and the brain. *RNA*. 2005 Jul;11(7):1117-30. doi: 10.1261/rna.2630205. PMID: 15987818; PMCID: PMC1370796.
21. Chung CZ, Jo DH, Heinemann IU. Nucleotide specificity of the human terminal nucleotidyltransferase Gld2 (TUT2). *RNA*. 2016 Aug;22(8):1239-49. doi: 10.1261/rna.056077.116. Epub 2016 Jun 9. PMID: 27284165; PMCID: PMC4931116.
22. D'Ambrogio A, Gu W, Udagawa T, Mello CC, Richter JD. Specific miRNA stabilization by Gld2-catalyzed monoadenylation. *Cell Rep*. 2012 Dec 27;2(6):1537-45.

- doi: 10.1016/j.celrep.2012.10.023. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23200856; PMCID: PMC3534910.
23. Heo I, Ha M, Lim J, Yoon MJ, Park JE, Kwon SC, Chang H, Kim VN. Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell*. 2012 Oct 26;151(3):521-32. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.022. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23063654.
 24. Vanáčová S, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, Langen H, Keith G, Keller W. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol*. 2005 Jun;3(6):e189. doi: 10.1371/journal.pbio.0030189. Epub 2005 Apr 19. PMID: 15828860; PMCID: PMC1079787.
 25. Haracska L, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. Trf4 and Trf5 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* exhibit poly(A) RNA polymerase activity but no DNA polymerase activity. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(22):10183-9. doi: 10.1128/MCB.25.22.10183-10189.2005. PMID: 16260630; PMCID: PMC1280283.
 26. Ogami K, Cho R, Hoshino S. Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the non-canonical poly(A) polymerase PAPD7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Mar 1;432(1):135-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.072. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23376078.
 27. Lubas M, Christensen MS, Kristiansen MS, Domanski M, Falkenby LG, Lykke-Andersen S, Andersen JS, Dziembowski A, Jensen TH. Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. *Mol Cell*. 2011 Aug 19;43(4):624-37. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.028. PMID: 21855801.
 28. Kuchta K, Muszewska A, Knizewski L, Steczkiewicz K, Wyrwicz LS, Pawlowski K, Rychlewski L, Ginalski K. FAM46 proteins are novel eukaryotic non-canonical poly(A) polymerases. *Nucleic Acids Res*. 2016 May 5;44(8):3534-48. doi: 10.1093/nar/gkw222. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27060136; PMCID: PMC4857005.
 29. Kazazian K, Haffani Y, Ng D, Lee CMM, Johnston W, Kim M, Xu R, Pacholzyk K, Zih FS, Tan J, Smrke A, Pollett A, Wu HS, Swallow CJ. FAM46C/TENT5C functions as a tumor suppressor through inhibition of Plk4 activity. *Commun Biol*. 2020 Aug 17;3(1):448. doi: 10.1038/s42003-020-01161-3. PMID: 32807875; PMCID: PMC7431843.
 30. Liudkovska V, Dziembowski A. Functions and mechanisms of RNA tailing by metazoan terminal nucleotidyltransferases. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021 Mar;12(2):e1622. doi: 10.1002/wrna.1622. Epub 2020 Jul 22. PMID: 33145994; PMCID: PMC7988573.
 31. Hu JL, Liang H, Zhang H, Yang MZ, Sun W, Zhang P, Luo L, Feng JX, Bai H, Liu F, Zhang T, Yang JY, Gao Q, Long Y, Ma XY, Chen Y, Zhong Q, Yu B, Liao S, Wang Y, Zhao Y, Zeng MS, Cao N, Wang J, Chen W, Yang HT, Gao S. FAM46B is a prokaryotic-like cytoplasmic poly(A) polymerase essential in human embryonic stem cells.

- Nucleic Acids Res. 2020 Mar 18;48(5):2733-2748. doi: 10.1093/nar/gkaa049. PMID: 32009146; PMCID: PMC7049688.
32. Zhang QY, Yue XQ, Jiang YP, Han T, Xin HL. FAM46C is critical for the anti-proliferation and pro-apoptotic effects of norcantharidin in hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep.* 2017 Mar 24;7(1):396. doi: 10.1038/s41598-017-00313-6. Erratum in: *Sci Rep.* 2017 Dec 11;7(1):17576. PMID: 28341836; PMCID: PMC5428258.
33. Xia E, Kanematsu S, Suenaga Y, Elzawahry A, Kondo H, Otsuka N, Moriya Y, Iizasa T, Kato M, Yoshino I, Yokoi S. MicroRNA induction by copy number gain is associated with poor outcome in squamous cell carcinoma of the lung. *Sci Rep.* 2018 Oct 18;8(1):15363. doi: 10.1038/s41598-018-33696-1. PMID: 30337605; PMCID: PMC6194131.
34. Tanaka H, Kanda M, Shimizu D, Tanaka C, Kobayashi D, Hayashi M, Iwata N, Yamada S, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Fujiwara M, Niwa Y, Kodera Y. FAM46C Serves as a Predictor of Hepatic Recurrence in Patients with Resectable Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2017 Oct;24(11):3438-3445. doi: 10.1245/s10434-016-5636-y. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27770343.
35. Mroczek S, Chlebowska J, Kuliński TM, Gewartowska O, Gruchota J, Cysewski D, Liudkovska V, Borsuk E, Nowis D, Dziembowski A. The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2017 Sep 20;8(1):619. doi: 10.1038/s41467-017-00578-5. PMID: 28931820; PMCID: PMC5606997.
36. Hamilton SM, Spencer CM, Harrison WR, Yuva-Paylor LA, Graham DF, Daza RA, Hevner RF, Overbeek PA, Paylor R. Multiple autism-like behaviors in a novel transgenic mouse model. *Behav Brain Res.* 2011 Mar 17;218(1):29-41. doi: 10.1016/j.bbr.2010.11.026. Epub 2010 Nov 17. PMID: 21093492; PMCID: PMC3022332.
37. Bettoni F, Filho FC, Grosso DM, Galante PA, Parmigiani RB, Geraldo MV, Henriques-Silva F, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Soares FA, Brentani HP, Simpson AJ, de Souza SJ, Camargo AA. Identification of FAM46D as a novel cancer/testis antigen using EST data and serological analysis. *Genomics.* 2009 Sep;94(3):153-60. doi: 10.1016/j.ygeno.2009.06.001. Epub 2009 Jun 18. PMID: 19540335.
38. Tomecki R, Dmochowska A, Gewartowski K, Dziembowski A, Stepień PP. Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Res.* 2004 Nov 16;32(20):6001-14. doi: 10.1093/nar/gkh923. PMID: 15547249; PMCID: PMC534615.
39. Nagaike T, Suzuki T, Katoh T, Ueda T. Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *J Biol Chem.* 2005 May 20;280(20):19721-7. doi: 10.1074/jbc.M500804200. Epub 2005 Mar 14. PMID: 15769737.

40. Bratic A, Clemente P, Calvo-Garrido J, Maffezzini C, Felser A, Wibom R, Wedell A, Freyer C, Wredenberg A. Mitochondrial Polyadenylation Is a One-Step Process Required for mRNA Integrity and tRNA Maturation. *PLoS Genet.* 2016 May 13;12(5):e1006028. doi: 10.1371/journal.pgen.1006028. PMID: 27176048; PMCID: PMC4866704.
41. Chang JH, Tong L. Mitochondrial poly(A) polymerase and polyadenylation. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep-Oct;1819(9-10):992-7. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.10.012. Epub 2011 Dec 7. PMID: 22172994; PMCID: PMC3307840.
42. Bratic A, Clemente P, Calvo-Garrido J, Maffezzini C, Felser A, Wibom R, Wedell A, Freyer C, Wredenberg A. Mitochondrial Polyadenylation Is a One-Step Process Required for mRNA Integrity and tRNA Maturation. *PLoS Genet.* 2016 May 13;12(5):e1006028. doi: 10.1371/journal.pgen.1006028. PMID: 27176048; PMCID: PMC4866704.
43. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2005 Aug 23;15(16):1501-7. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.029. PMID: 16111943; PMCID: PMC5127709.
44. Blum B, Bakalara N, Simpson L. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell.* 1990 Jan 26;60(2):189-98. doi: 10.1016/0092-8674(90)90735-w. PMID: 1688737.
45. Morozov IY, Jones MG, Razak AA, Rigden DJ, Caddick MX. CUCU modification of mRNA promotes decapping and transcript degradation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol.* 2010 Jan;30(2):460-9. doi: 10.1128/MCB.00997-09. Epub 2009 Nov 9. PMID: 19901075; PMCID: PMC2798463.
46. Jones MR, Blahna MT, Kozłowski E, Matsuura KY, Ferrari JD, Morris SA, Powers JT, Daley GQ, Quinton LJ, Mizgerd JP. *Zcchc11* uridylates mature miRNAs to enhance neonatal IGF-1 expression, growth, and survival. *PLoS Genet.* 2012;8(11):e1003105. doi: 10.1371/journal.pgen.1003105. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23209448; PMCID: PMC3510031.
47. Kim J, Tsuruta F, Okajima T, Yano S, Sato B, Chiba T. *KLHL7* promotes TUT1 ubiquitination associated with nucleolar integrity: Implications for retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Dec 9;494(1-2):220-226. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.049. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29032201.
48. Heo I, Joo C., Kim Y. K., Ha M., Yoon M. J., Cho J., et al. . (2009). *TUT4* in concert with *Lin28* suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 138, 696–708. 10.1016/j.cell.2009.08.002
49. Modepalli V, Moran Y. Evolution of miRNA Tailing by 3' Terminal Uridylyl Transferases in Metazoa. *Genome Biol Evol.* 2017 Jun 1;9(6):1547-1560. doi: 10.1093/gbe/evx106. PMID: 28633361; PMCID: PMC5509036.

50. Chang H, Yeo J, Kim JG, Kim H, Lim J, Lee M, Kim HH, Ohk J, Jeon HY, Lee H, Jung H, Kim KW, Kim VN. Terminal Uridylyltransferases Execute Programmed Clearance of Maternal Transcriptome in Vertebrate Embryos. *Mol Cell*. 2018 Apr 5;70(1):72-82.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.03.004. PMID: 29625039.
51. Lim J, Ha M, Chang H, Kwon SC, Simanshu DK, Patel DJ, Kim VN. Uridylation by TUT4 and TUT7 marks mRNA for degradation. *Cell*. 2014 Dec 4;159(6):1365-76. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.055. PMID: 25480299; PMCID: PMC4720960.
52. Morgan M, Kabayama Y, Much C, Ivanova I, Di Giacomo M, Auchynnikava T, Monahan JM, Vitsios DM, Vasiliauskaitė L, Comazzetto S, Rappsilber J, Allshire RC, Porse BT, Enright AJ, O'Carroll D. A programmed wave of uridylation-primed mRNA degradation is essential for meiotic progression and mammalian spermatogenesis. *Cell Res*. 2019 Mar;29(3):221-232. doi: 10.1038/s41422-018-0128-1. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30617251; PMCID: PMC6420129.
53. Thomas MP, Liu X, Whangbo J, McCrossan G, Sanborn KB, Basar E, Walch M, Lieberman J. Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. *Cell Rep*. 2015 May 19;11(7):1079-89. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.026. Epub 2015 May 7. PMID: 25959823; PMCID: PMC4862650.
54. Trippe R, Sandrock B, Benecke BJ. A highly specific terminal uridylyl transferase modifies the 3'-end of U6 small nuclear RNA. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jul 1;26(13):3119-26. doi: 10.1093/nar/26.13.3119. PMID: 9628908; PMCID: PMC147682.
55. Menezes MR, Balzeau J, Hagan JP. 3' RNA Uridylation in Epitranscriptomics, Gene Regulation, and Disease. *Front Mol Biosci*. 2018 Jul 13;5:61. doi: 10.3389/fmolb.2018.00061. PMID: 30057901; PMCID: PMC6053540.
56. Didychuk AL, Montemayor EJ, Carrocci TJ, DeLaitsch AT, Lucarelli SE, Westler WM, Brow DA, Hoskins AA, Butcher SE. *Usb1* controls U6 snRNP assembly through evolutionarily divergent cyclic phosphodiesterase activities. *Nat Commun*. 2017 Sep 8;8(1):497. doi: 10.1038/s41467-017-00484-w. PMID: 28887445; PMCID: PMC5591277.
57. Mroczek S, Krwawicz J, Kutner J, Lazniewski M, Kuciński I, Ginalski K, Dziembowski A. *C16orf57*, a gene mutated in poikiloderma with neutropenia, encodes a putative phosphodiesterase responsible for the U6 snRNA 3' end modification. *Genes Dev*. 2012 Sep 1;26(17):1911-25. doi: 10.1101/gad.193169.112. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22899009; PMCID: PMC3435495.
58. Gonzales ML, Mellman DL, Anderson RA. CKIalpha is associated with and phosphorylates star-PAP and is also required for expression of select star-PAP target messenger RNAs. *J Biol Chem*. 2008 May 2;283(18):12665-73. doi: 10.1074/jbc.M800656200. Epub 2008 Feb 27. PMID: 18305108; PMCID: PMC2431003.

59. Marzluff WF, Koreski KP. Birth and Death of Histone mRNAs. *Trends Genet.* 2017 Oct;33(10):745-759. doi: 10.1016/j.tig.2017.07.014. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28867047; PMCID: PMC5645032.
60. Mullen TE, Marzluff WF. Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev.* 2008 Jan 1;22(1):50-65. doi: 10.1101/gad.1622708. PMID: 18172165; PMCID: PMC2151014.
61. Meaux SA, Holmquist CE, Marzluff WF. Role of oligouridylation in normal metabolism and regulated degradation of mammalian histone mRNAs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018 Nov 5;373(1762):20180170. doi: 10.1098/rstb.2018.0170. PMID: 30397106; PMCID: PMC6232589.
62. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003 Jun;21(6):635-7. doi: 10.1038/nbt831. Epub 2003 May 18. PMID: 12754523.
63. Lai EC. microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Curr Biol.* 2003 Dec 2;13(23):R925-36. doi: 10.1016/j.cub.2003.11.017. PMID: 14654021.
64. Brownawell AM, Macara IG. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol.* 2002 Jan 7;156(1):53-64. doi: 10.1083/jcb.200110082. Epub 2002 Jan 3. PMID: 11777942; PMCID: PMC2173575.
65. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 2006 Feb 8;25(3):522-32. doi: 10.1038/sj.emboj.7600942. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16424907; PMCID: PMC1383527. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):740-4. doi: 10.1038/nature03868. Epub 2005 Jun 22. PMID: 15973356; PMCID: PMC2944926.
66. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):740-4. doi: 10.1038/nature03868. Epub 2005 Jun 22. PMID: 15973356; PMCID: PMC2944926.
67. Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P, Corchete LA, Quwaider D, Rojas EA, Hertero AB, Gutiérrez NC. Factors Regulating microRNA Expression and Function in Multiple Myeloma. *Noncoding RNA.* 2019 Jan 16;5(1):9. doi: 10.3390/ncrna5010009. PMID: 30654527; PMCID: PMC6468559.
68. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.

69. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855-62. doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4. PMID: 8252622.
70. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86-9. doi: 10.1038/35040556. PMID: 11081512.
71. Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, Strehle M, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R. Post-transcriptional regulation of the *let-7* microRNA during neural cell specification. *FASEB J*. 2007 Feb;21(2):415-26. doi: 10.1096/fj.06-6130com. Epub 2006 Dec 13. Retraction in: *FASEB J*. 2021 Dec;35(12):e22027. PMID: 17167072.
72. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3753-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0637. PMID: 15172979.
73. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635-47. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014. PMID: 15766527.
74. Masood N, Basharat Z, Khan T, Yasmin A. Entangling Relation of Micro RNA-*let-7*, miRNA-200 and miRNA-125 with Various Cancers. *Pathol Oncol Res*. 2017 Oct;23(4):707-715. doi: 10.1007/s12253-016-0184-0. Epub 2017 Jan 9. Erratum in: *Pathol Oncol Res*. 2017 Apr 29;:. Basharat, Zarrin [added]; Khan, Tabeer [added]. PMID: 28070818.
75. Ustianenko D, Hrossova D, Potesil D, Chalupnikova K, Hrazdilova K, Pachernik J, Cetkovska K, Uldrijan S, Zdrahal Z, Vanacova S. Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylylated precursors of *let-7* miRNAs. *RNA*. 2013 Dec;19(12):1632-8. doi: 10.1261/rna.040055.113. Epub 2013 Oct 18. PMID: 24141620; PMCID: PMC3884668.
76. Lin S, Gregory RI. Identification of small molecule inhibitors of Zcchc11 TUTase activity. *RNA Biol*. 2015;12(8):792-800. doi: 10.1080/15476286.2015.1058478. PMID: 26114892; PMCID: PMC4615740.
77. Stallings-Mann M, Jamieson L, Regala RP, Weems C, Murray NR, Fields AP. A novel small-molecule inhibitor of protein kinase Ciota blocks transformed growth of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1767-74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3405. PMID: 16452237.
78. Kim B, Ha M, Loeff L, Chang H, Simanshu DK, Li S, Fareh M, Patel DJ, Joo C, Kim VN. TUT7 controls the fate of precursor microRNAs by using three different uridylation mechanisms. *EMBO J*. 2015 Jul 2;34(13):1801-15. doi:

- 10.15252/embj.201590931. Epub 2015 May 15. PMID: 25979828; PMCID: PMC4516432.
79. Hagan JP, Piskounova E, Gregory RI. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Oct;16(10):1021-5. doi: 10.1038/nsmb.1676. Epub 2009 Aug 27. PMID: 19713958; PMCID: PMC2758923.
80. Borgelt L, Li F, Hommen P, Lampe P, Hwang J, Goebel GL, Sievers S, Wu P. Trisubstituted Pyrrolinones as Small-Molecule Inhibitors Disrupting the Protein-RNA Interaction of LIN28 and Let-7. *ACS Med Chem Lett.* 2021 Mar 1;12(6):893-898. doi: 10.1021/acsmchemlett.0c00546. PMID: 34136077; PMCID: PMC8201479.
81. Ustianenko D, Chiu HS, Treiber T, Weyn-Vanhentenryck SM, Treiber N, Meister G, Sumazin P, Zhang C. LIN28 Selectively Modulates a Subclass of Let-7 MicroRNAs. *Mol Cell.* 2018 Jul 19;71(2):271-283.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.029. PMID: 30029005; PMCID: PMC6238216.
82. Graf R, Munschauer M, Mastrobuoni G, Mayr F, Heinemann U, Kempa S, Rajewsky N, Landthaler M. Identification of LIN28B-bound mRNAs reveals features of target recognition and regulation. *RNA Biol.* 2013 Jul;10(7):1146-59. doi: 10.4161/rna.25194. Epub 2013 May 29. PMID: 23770886; PMCID: PMC3849162.
83. Hafner M, Max KE, Bandaru P, Morozov P, Gerstberger S, Brown M, Molina H, Tuschl T. Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition. *RNA.* 2013 May;19(5):613-26. doi: 10.1261/rna.036491.112. Epub 2013 Mar 12. PMID: 23481595; PMCID: PMC3677277.
84. Wilbert ML, Huelga SC, Kapeli K, Stark TJ, Liang TY, Chen SX, Yan BY, Nathanson JL, Hutt KR, Lovci MT, Kazan H, Vu AQ, Massirer KB, Morris Q, Hoon S, Yeo GW. LIN28 binds messenger RNAs at GGAGA motifs and regulates splicing factor abundance. *Mol Cell.* 2012 Oct 26;48(2):195-206. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.004. Epub 2012 Sep 6. PMID: 22959275; PMCID: PMC3483422.
85. Yamashita S, Nagaike T, Tomita K. Crystal structure of the Lin28-interacting module of human terminal uridylyltransferase that regulates let-7 expression. *Nat Commun.* 2019 Apr 29;10(1):1960. doi: 10.1038/s41467-019-09966-5. PMID: 31036859; PMCID: PMC6488673.
86. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, Iliopoulos D, Gregory RI. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell.* 2011 Nov 23;147(5):1066-79. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.039. PMID: 22118463; PMCID: PMC3227872.
87. Malecki M, Viegas SC, Carneiro T, Golik P, Dressaire C, Ferreira MG, Arraiano CM. The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *EMBO J.* 2013 Jul 3;32(13):1842-54. doi: 10.1038/emboj.2013.63. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23503588; PMCID: PMC3981172.

88. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, O'Sullivan M, Lu J, Phillips LA, Lockhart VL, Shah SP, Tanwar PS, Mermel CH, Beroukhim R, Azam M, Teixeira J, Meyerson M, Hughes TP, Llovet JM, Radich J, Mullighan CG, Golub TR, Sorensen PH, Daley GQ. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet.* 2009 Jul;41(7):843-8. doi: 10.1038/ng.392. Epub 2009 May 31. PMID: 19483683; PMCID: PMC2757943.
89. Shrivastava G, Aljabali AA, Shahcheraghi SH, Lotfi M, Shastri MD, Shukla SD, Chellappan DK, Jha NK, Anand K, Dureja H, Pabari RM, Mishra V, Almutary AG, Alnuqaydan AM, Charbe N, Prasher P, Negi P, Goyal R, Dua K, Gupta G, Serrano-Aroca Á, Bahar B, Barh D, Panda PK, Takayama K, Lundstorm K, McCarron P, Bakshi H, Tambuwala MM. Targeting LIN28: a new hope in prostate cancer theranostics. *Future Oncol.* 2021 Oct;17(29):3873-3880. doi: 10.2217/fo-2021-0247. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34263659.
90. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1917-20. doi: 10.1126/science.1151526. Epub 2007 Nov 20. PMID: 18029452.
91. Warkocki Z, Krawczyk PS, Adamska D, Bijata K, Garcia-Perez JL, Dziembowski A. Uridylation by TUT4/7 Restricts Retrotransposition of Human LINE-1s. *Cell.* 2018 Sep 6;174(6):1537-1548.e29. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.022. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30122351; PMCID: PMC6191937.
92. Ardeljan D, Taylor MS, Ting DT, Burns KH. The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. *Clin Chem.* 2017 Apr;63(4):816-822. doi: 10.1373/clinchem.2016.257444. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28188229; PMCID: PMC6177209.
93. Takatsuna H, Kato H, Gohda J, Akiyama T, Moriya A, Okamoto Y, Yamagata Y, Otsuka M, Umezawa K, Semba K, Inoue J. Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003 Apr 4;278(14):12144-50. doi: 10.1074/jbc.M300720200. Epub 2003 Feb 3. PMID: 12566447.
94. Kanamori M, Suzuki H, Saito R, Muramatsu M, Hayashizaki Y. T2BP, a novel TRAF2 binding protein, can activate NF-kappaB and AP-1 without TNF stimulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 25;290(3):1108-13. doi: 10.1006/bbrc.2001.6315. PMID: 11798190.
95. Minoda Y, Saeki K, Aki D, Takaki H, Sanada T, Koga K, Kobayashi T, Takaesu G, Yoshimura A. A novel Zinc finger protein, ZCCHC11, interacts with TIFA and modulates TLR signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jun 9;344(3):1023-30. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.04.006. Epub 2006 Apr 19. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Feb 23;353(4):1121. PMID: 16643855.

96. Mihaly SR, Ninomiya-Tsuji J, Morioka S. TAK1 control of cell death. *Cell Death Differ.* 2014 Nov;21(11):1667-76. doi: 10.1038/cdd.2014.123. Epub 2014 Aug 22. PMID: 25146924; PMCID: PMC4211365.
97. Ea CK, Sun L, Inoue J, Chen ZJ. TIFA activates IkappaB kinase (IKK) by promoting oligomerization and ubiquitination of TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 26;101(43):15318-23. doi: 10.1073/pnas.0404132101. Epub 2004 Oct 18. PMID: 15492226; PMCID: PMC524439.
98. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL, Perrimon N, Ting AY. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol.* 2018 Oct;36(9):880-887. doi: 10.1038/nbt.4201. Epub 2018 Aug 20. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2020 Jan;38(1):108. PMID: 30125270; PMCID: PMC6126969.
99. Han Y, Branon TC, Martell JD, Boassa D, Shechner D, Ellisman MH, Ting A. Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chem Biol.* 2019 Apr 19;14(4):619-635. doi: 10.1021/acscchembio.8b00919. Epub 2019 Mar 8. Erratum in: *ACS Chem Biol.* 2019 Dec 20;14(12):2942. PMID: 30848125; PMCID: PMC6548188.
100. Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mootha VK, Ting AY. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods.* 2015 Jan;12(1):51-4. doi: 10.1038/nmeth.3179. Epub 2014 Nov 24. PMID: 25419960; PMCID: PMC4296904.
101. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2012 Mar 19;196(6):801-10. doi: 10.1083/jcb.201112098. Epub 2012 Mar 12. PMID: 22412018; PMCID: PMC3308701.
102. Pino L, Schilling B. Proximity labeling and other novel mass spectrometric approaches for spatiotemporal protein dynamics. *Expert Rev Proteomics.* 2021 Sep;18(9):757-765. doi: 10.1080/14789450.2021.1976149. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34496693; PMCID: PMC8650568.
103. Kuchta K, Knizewski L, Wyrwicz LS, Rychlewski L, Ginalska K. Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res.* 2009 Dec;37(22):7701-14. doi: 10.1093/nar/gkp854. PMID: 19833706; PMCID: PMC2794190.
104. Gewartowska O, Aranaz-Novaliches G, Krawczyk PS, Mroczek S, Kusio-Kobińska M, Tarkowski B, Spoutil F, Benada O, Kofroňová O, Szwedziak P, Cysewski D, Gruchota J, Szpila M, Chlebowski A, Sedlacek R, Prochazka J, Dziembowski A. Cytoplasmic polyadenylation by TENT5A is required for proper bone formation. *Cell Rep.* 2021 Apr 20;35(3):109015. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109015. PMID: 33882302.
105. Diener S, Bayer S, Sabrautzki S, Wieland T, Mentrup B, Przemeck GK, Rathkolb B, Graf E, Hans W, Fuchs H, Horsch M, Schwarzmayer T, Wolf E, Klopocki E, Jakob F,

- Strom TM, Hrabě de Angelis M, Lorenz-Depiereux B. Exome sequencing identifies a nonsense mutation in *Fam46a* associated with bone abnormalities in a new mouse model for skeletal dysplasia. *Mamm Genome*. 2016 Apr;27(3-4):111-21. doi: 10.1007/s00335-016-9619-x. Epub 2016 Jan 23. PMID: 26803617.
106. Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*. 2009 Dec 3;462(7273):595-601. doi: 10.1038/nature08592. Epub 2009 Nov 8. PMID: 19898493; PMCID: PMC2789972.
107. Thornton JE, Gregory RI. How does *Lin28 let-7* control development and disease? *Trends Cell Biol*. 2012 Sep;22(9):474-82. doi: 10.1016/j.tcb.2012.06.001. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22784697; PMCID: PMC3432650.
108. Tummala R, Nadiminty N, Lou W, Zhu Y, Gandour-Edwards R, Chen HW, Evans CP, Gao AC. *Lin28* promotes growth of prostate cancer cells and activates the androgen receptor. *Am J Pathol*. 2013 Jul;183(1):288-95. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.03.011. PMID: 23790802; PMCID: PMC3702743.
109. Wang L, Eckmann CR, Kadyk LC, Wickens M, Kimble J. A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2002 Sep 19;419(6904):312-6. doi: 10.1038/nature01039. PMID: 12239571.
110. Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):338-42. doi: 10.1038/nature02872. PMID: 15372040.
111. Fiedler M, Rossmanith W, Wahle E, Rammelt C. Mitochondrial poly(A) polymerase is involved in tRNA repair. *Nucleic Acids Res*. 2015 Nov 16;43(20):9937-49. doi: 10.1093/nar/gkv891. Epub 2015 Sep 9. PMID: 26354863; PMCID: PMC4787750.
112. Schuster G, Stern D. RNA polyadenylation and decay in mitochondria and chloroplasts. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2009;85:393-422. doi: 10.1016/S0079-6603(08)00810-6. PMID: 19215778.
113. Jedynak-Slyvka M, Jabczynska A, Szczesny RJ. Human Mitochondrial RNA Processing and Modifications: Overview. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 27;22(15):7999. doi: 10.3390/ijms22157999. PMID: 34360765; PMCID: PMC8348895.
114. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Lainé S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep*. 2005 Oct;6(10):961-7. doi: 10.1038/sj.embor.7400509. PMID: 16142218; PMCID: PMC1369185.
115. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003 Dec 15;17(24):3011-6. doi: 10.1101/gad.1158803. Epub 2003 Dec 17. PMID: 14681208; PMCID: PMC305252.
116. Koscianska E, Starega-Roslan J, Krzyzosiak WJ. The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PLoS One*. 2011;6(12):e28548. doi:

- 10.1371/journal.pone.0028548. Epub 2011 Dec 6. PMID: 22163034; PMCID: PMC3232248.
117. Yamashita S, Takagi Y, Nagaike T, Tomita K. Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase. *Nat Commun.* 2017 Jun 7;8:15788. doi: 10.1038/ncomms15788. PMID: 28589955; PMCID: PMC5467268. Dreyfus M, Régnier P. The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell.* 2002 Nov 27;111(5):611-3. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01137-6. PMID: 12464173.
118. LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, Tollervey D. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell.* 2005 Jun 3;121(5):713-24. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.029. PMID: 15935758.

Příloha A Sekvence V569-TUT4-miniTurboID

Legenda: miniTurboID
3x FLAG
NotI
TUT4
Start codon
Stop codon

ATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGAG
ATGACAAGCTTGGCGCCGAATCCCGCTGCTGAACGCTAAACAGATTCTGGGACAGCTGGA
CGGCGGGAGCGTGGCAGTCCTGCCTGTGGTCGACTCCACCAATCAGTACCTGCTGGATCGA
ATCGGCGAGCTGAAGAGTGGGGATGCTTGCATTGCAGAATATCAGCAGGCAGGGAGAGGA
AGCAGAGGGAGGAAATGGTTCTCTCCTTTTGGAGCTAACCTGTACCTGAGTATGTTTTGG
CGCCTGAAGCGGGGACCAGCAGCAATCGGCCTGGCCCCGGTCATCGGAATTGTCATGGCAG
AAGCGCTGCGAAAGCTGGGAGCAGACAAGGTGCGAGTCAAATGGCCCAATGACCTGTATC
TGCAGGATAGAAAGCTGGCAGGCATCCTGGTGGAGCTGGCCGGAATAACAGGGCGATGCTG
CACAGATCGTCATTGGCGCCGGGATTAACGTGGCTATGAGGCGCCTGGAGGAAAGCGTGG
TCAATCAGGGCTGGATCACACTGCAGGAAGCAGGGATTAACCTGGACAGGAATACTCTGG
CCGCTATGCTGATCCGAGAGCTGCGGGCAGCCCTGGAAGTGTTCGAGCAGGAAGGCCTGGC
TCCATATCTGTACGGTGGGAGAAGCTGGATAACTTCATCAATAGACCCGTGAAGCTGATC
ATTGGGGACAAAGAGATTTTCGGGATTAGCCGGGGGATTGATAAACAGGGAGCCCTGCTG
CTGGAACAGGACGGAGTTATCAAACCCTGGATGGGCGGAGAAATCAGTCTGCGGTCTGCC
GAAAAGGTTGGCGCCGAATTCGATTATGGAAGAGTCTAAAACCTTAAAAAGTGAAAAT
CATGAACCAAAGAAGAATGTTATTTGTGAAGAAAGCAAAGCAGTTCAAGTTATAGGTAAT
CAAACATTGAAAGCTAGAAATGATAAATCCGTAAAAGAAATTGAGAACAGCTCTCCAAAT
AGGAATAGTAGTAAAAAAATAAGCAAAATGATATTTGTATAGAAAAAACAGAAGTTAA
ATCATGTAAAGTAAATGCTGCCAACCTTCCAGGTCCTAAAGATTTGGGGTTAGTCCTTCGA
GATCAAAGTCATTGCAAAGCAAAAAAATTTCTAATTCACCAGTGAAAGCCGAAAAGGCA
ACCATTTACAGGCAAAATCAGAAAAGGCAACCAGTTTACAGGCAAAAGCAGAAAAATCA
CCAAAGTCACCTAATTCAGTGAAAGCAGAAAAAGCATCCAGTTATCAGATGAAGTCAGAA
AAAGTACCAAGTTCACCAGCAGAAGCAGAAAAGGGACCCAGTTTACTGTTGAAAGACATG
AGACAGAAGACAGAATTACAACAGATTGGAAAAAAAATTTCCAAGCTCCTTTACTTCTGTG
GACAAAGTGAATATTGAAGCTGTAGGGGGAGAAAAATGTGCTCTGCAAAACTCACCACGA
TCTCAGAAGCAACAGACATGTACAGATAATACTGGTGATTCTGATGATAGTGCTTCAGGA
ATTGAAGACGTATCGGACGATTTAAGTAAAATGAAGAATGATGAATCTAATAAAGAAAA
TTCTTCAGAGATGGACTACTTAGAAAAATGCCACTGTGATAGATGAATCTGCATTGACACC
TGAGCAGAGGCTGGGGTTGAAACAAGCAGAAGAACGCTTAGAAAGAGATCACATCTTTTCG
ACTTGAAAAACGATCACCAGAATATACCAATTGTCTGGTATCTATGCAAACTTTGCTTAAT

TCACATTGAAAATATCCAGGGGGCTCATAAACATATAAAGGAGAAACGACATAAGAAAA
TATTTTGGAAAAACAAGAAGAAAGTGAGCTTCGTTCTCTGCCACCTCCTTCCCCTGCCAC
TTGGCTGCTTTAAGTGTTCAGTCATTGAATTAGCAAAAGAACATGGAATAACAGATGAT
GACCTCAGAGTCCGTCAGGAAATTGTGGAGGAAATGTCAAAGTTATAACGACATTTTTA
CCAGAATGTTCACTTAGGTTGTATGGCTCATCTCTGACTAGATTTGCTCTGAAAAGTAGT
GATGTTAATATAGATATAAAATTTCTCCCAAGATGAATCATCCAGATCTTCTGATAAAA
GTA CT TGGGATTTTAAAGAAAAATGTATTATATGTAGATGTGGAATCTGATTTTTCACGCT
AAAGTTCCTGTTGTGGTGTGCAGAGATCGAAAAAGTGGTTTACTTTGTAGAGTGAGTGCA
GGAAACGATATGGCATGTCTCACTACTGATTTACTTACTGCCCTTGGCAAAATAGAACCTG
TCTTTATTCCCTTGGTGTAGCCTTTCGCTACTGGGCTAAGTTGTGCTATATTGACTCCCA
AACTGATGGTGGAAATCCCTTCTTACTGTTTTGCTTTAATGGTGATGTTTTTTCTACAACAG
AGAAAACCCCTCTTCTTCTTGCTTACTTGGAAAGTTGGATTGAAGGCTTTGACCCAAAA
GAATGGATGACTTTCAGCTGAAGGGCATAGTAGAAGAGAAGTTTGTGAAGTGGGAATGTA
ATTCAAGTAGTGCAACTGAGAAAACTCAATTGCTGAGGAAAACAAAGCTAAGGCAGACC
AACCAAAAGATGATACCAAGAAGACAGAAACAGACAACCAAAGTAATGCCATGAAGGAAA
AACATGGCAAATCTCCTTTAGCATTGGAAACACCAAATCGGGTATCCTTGGGACAGTTAT
GGTTAGAGCTGCTTAAATTCTACACACTGGATTTTGTCTTGGAGGAATATGTCATATGTG
TACGGATACAAGATATTTTAAACAAGAGAAAAATAAAAACTGGCCTAAAAGGCGAATAGCCA
TTGAAGATCCATTTTTCAGTCAAGAGGAATGTTGCACGGAGCTTAAACAGCCAGCTGGTTT
ACGAATATGTTGTGGAGAGATTTAGGGCAGCTTATCGGTATTTTGCCTGTCCTCAGACGA
AGGGTGGAAATAAGTCTACAGTGGATTTCAAGAAAAGAGAGAAGGGGAAAATAAGCAAT
AAGAAACCAGTCAAGTCGAACAATATGGCAACCAATGGTTGTATTCTGCTTGGGGAAACC
ACAGAAAAAATAAATGCAGAAAGAGAGCAACCTGTTCAATGTGATGAAATGGACTGTACA
TCACAGAGATGTATTATTGACAACAACAATTTGTTGGTAAATGAACTAGATTTTGTCTGAC
CACGGACAGGACTCTTCATCTCTTTCTACCAGCAAAAGCAGTGAAATAGAGCCAAAATTA
GATAAGAAACAAGATGATTTAGCGCTTCAGAAACTTGTTTAAAAAAGAGCTCAGCCAA
TGTAATTGCATTGATTTGTCTAAGTGCCTGACCCAGATAAATCTACTGGAACAGACTGC
AGGTCAAATTTAGAAACGGAGAGTTCACATCAGAGTGTGTGCACCGACACATCTGCTACC
TCTTGCAACTGCAAAGCTACAGAAGATGCTTCTGACCTTAATGATGATGATAACCTCCCA
CCCAGGAATTATATTATGTGTTTGATAAGTTTATTTTAACTCTGGCAAGCCACCAACGAT
AGTATGCAGCATCTGCAAAAAGGATGGCCATTCAAAGAATGATTGCCAGAGGATTTTAG
GAAAATTGATTTAAAACCTCTACCACCAATGACAAACCGATTTCCGGGAAATACTTGATTT
AGTATGTAAAAGATGTTTTGATGAGTTATCACCACCTTGTCTGAACAACACAACAGGGA
GCAAATTTAATTGGCTTGGAAAAGTTTATTCAAAAAGAATATGATGAAAAGGCAAGGTT
GTGCTTATTTGGCTCTTCTAAGAATGGATTTGGATTTTCGTGATAGTGATCTGGATATTTG
TATGACCCTGGAAGGCCATGAAAATGCAGAGAAATTAATTTGTAAGGAAATAATTGAAAA
TTTGGCAAAAATTCTTAAGAGACATCCAGGTTTAAAGAAACATTTTGCCTATAACTACTGC
CAAAGTGCCTATAGTAAAATTTGAACACAGGCGAAGTGGGTTAGAAGGCGATATCAGTTT
ATATAATACGTTGGCTCAACATAACACAAGAATGCTAGCTACTTATGCAGCTATTGATCC
TAGAGTGCAGTATTTGGGATATACTATGAAAGTGTGTTGCTAAGCGATGTGACATTTGGGA
TGCTTCCAGGGGAAGTTTATCTTCATATGCATATATCCTTATGGTGCTGTACTTTCTGCAG

CAGAGAAAGCCACCTGTTATCCCAGTTCTACAAGAGATCTTTGATGGAAAACAGATTCCA
CAGAGAATGGTTGATGGATGGAATGCTTTCTTCTTTGATAAAAACAGAAGAACTGAAAAAG
CGTTTACCTTCACTTGGAAGAACACAGAATCATTAGGGGAGCTTTGGCTGGGACTGCTTC
GTTTCTATACTGAAGAGTTTGATTCAAGGAATATGTAATTAGCATTTCGGCAGAAAAAGC
TGTTGACAACCTTTTGAGAAGCAGTGGACTTCCAAGTGCATTGCAATTGAAGACCCTTTTG
ACTTGAATCATAACCTTGGTGCTGGAGTTCCAGAAAAATGACCAATTTTCATCATGAAAG
CATTTATCAATGGAAGGAAACTTTTTGGTACCCCTTTTTATCCACTCATTGGCAGAGAAGC
TGAGTACTTCTTTGATTCCAGAGTATTAACAGATGGAGAAGCTGGCTCCCAATGATAGATG
TTGCCGTGTGTGTGGAAAAATAGGCCACTACATGAAAGACTGCCCTAAAAGGAAAAGTTT
ACTGTTTAGACTAAAGAAGAAAGACAGTGAAGAAGAGAAGGAAGGGAATGAAGAAGAGA
AAGATTCCCGAGATGTTCTTGACCCCGAGACCTCCACGATACTCGAGACTTTAGAGACCC
GAGAGACCTCAGATGTTTTATATGTGGAGATGCTGGACATGTACGAAGGGAGTGCCGAGA
GGTCAAGCTGGCCCGTCAGAGGAATAGCAGTGTGGCAGCAGCCCAGCTGGTCCGCAACCTT
GTAAATGCTCAACAGGCGGCTGGTTCAGCTCAGCAACAGGGTGATCAGTCCATAAGGACT
AGACAGTCATCAGAATGTTCTGAATCACCATCTTATTCTCCTCAGCCTCAGCCATTTCCAC
AGAACTCTTCCCAGTCAGCTGCTATTACTCAGCCTTCATCTCAGCCAGGATCCCAACCTAA
GCTTGGCCCACCTCAGCAGGGAGCCCAACCTCCCCATCAGGTCCAGATGCCACTGTATAAC
TTTCCCAGTCACCACCAGCTCAGTATTCTCCCATGCACAATATGGGATTGTTGCCAATGC
ACCCTCTCCAGATCCCTGCCCCGTCCTGGCCCATCCATGGCCCAGTGATCCACTCTGCACCA
GGCAGTGCCCCAGCAATATTGGCCTAAATGATCCCAGCATCATCTTTGCACAGCCTGCTG
CCAGACCTGTGGCAATCCCTAACACGTCTCACGATGGACACTGGCCCCGTA CTGTGGCTCC
AAATCCCTGGTAAACAGTGGTGCAGTGGGGAATTCAGAGCCAGGCTTTCGAGGACTGAC
TCCTCCAATTCCTTGGGAACATGCACCGCGTCCCCATTTCCCCCTTGTCCAGCTTCGTGGC
CTTATGGTTTGCATCAAACTTCATGCATCAGGGAAATGCCCGATTCCAGCCCAACAAACC
TTTCTATACTCAAGACAGATGTGCCACCCGTCGGTGTAGAGAGCGTTGTCCCCACCCACCA
AGAGGAAACGTGTCGGAGTAA

Příloha B Sekvence V867-TUT7-miniTurboID

Legenda: miniTurboID
 3x FLAG
 NotI
 TUT7
 Start codon
 Stop codon

ATGGACTACAAGGACCACGACGGTGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGAC
 GACGACAAGTGGCGCCGCATCCCGCTGCTGAACGCTAAACAGATTCTGGGACAGCTGGACG
 GCGGGAGCGTGGCAGTCCTGCCTGTGGTCGACTCCACCAATCAGTACCTGCTGGATCGAAT
 CGGCGAGCTGAAGAGTGGGGATGCTTGCATTGCAGAATATCAGCAGGCAGGGAGAGGAAG
 CAGAGGGAGGAAATGGTTCTCTCCTTTTGGAGCTAACCTGTACCTGAGTATGTTTTGGCGC
 CTGAAGCGGGGACCAGCAGCAATCGGCCGGGCCCGGTCATCGGAATTGTCATGGCAGAAG
 CGCTGCGAAAGCTGGGAGCAGACAAGGTGCGAGTCAAATGGCCCAATGACCTGTATCTGC
 AGGATAGAAAGCTGGCAGGCATCCTGGTGGAGCTGGCCGGAATAACAGGCGATGCTGCAC
 AGATCGTCATTGGCGCCGGGATTAACGTGGCTATGAGGCGCGTGGAGGAAAGCGTGGTCA
 ATCAGGGCTGGATCACACTGCAGGAAGCAGGGATTAACCTGGACAGGAATACTCTGGCCG
 CTATGCTGATCCGAGAGCTGCGGGCAGCCCTGGAAGTGTTCGAGCAGGAAGGCCTGGCTCC
 ATATCTGTCACGGTGGGAGAAGCTGGATAACTTCATCAATAGACCCGTGAAGCTGATCAT
 TGGGGACAAAGAGATTTTCGGGATTAGCCGGGGGATTGATAAACAGGGAGCCCTGCTGCT
 GGAACAGGACGGAGTTATCAAACCCTGGATGGGCGGAGAAATCAGTCTGCGGTCTGCCGA
 AAAGTGGCGCCGCGGAGATACAGCAAAACCTTATTTTCGTGAAGCGCACTAAAGACCGGGG
 GACTATGGATGATGATGACTTCAGAAGGGGTCACCCCAACAAGATTATTTAATAATAGA
 TGACCATGCTAAAGGCCATGGCAGTAAAATGGAAGGGCCTTCAAAAAAGAAGATAAC
 ACCAGGGAATATGGGAATACCCCAAGAAAGGACCATGTGCTGTTTCCAGCAATCCATAT
 GCATTTAAAAACCAATCTACAGTCAACCCGCTTGGATGAATGACAGCCACAAAGATCAG
 AGTAAGAGATGGCTGTCTGATGAACATACTGGTAATTCAGACAACCTGGAGAGAATTCAAA
 CCTGGACCTAGAATTCCTGTTATAAACCGACAAAGAAAAGACTCCTTTCAAGAAAATGAA
 GATGGTTATAGGTGGCAAGACACAAGAGGCTGCAGAAGTGAAGACGACTGTTTCATAAA
 GACCTAACAAAGCCTAGAAACCACGTCAGAAATGGAAGCAGGAAGTCCTGAAAACAAGAAG
 CAGAGGTCCAGACCTAGGAAGCCACGGAAGACTAGAAATGAGGAAAATGAGCAGGATGGA
 GACTTGGAAAGGCCCTGTGATCGATGAGTCTGTACTTTCAACGAAGGAGCTGCTAGGCTTAC
 AGCAGGCTGAGGAGAGACTGAAGAGAGACTGCATTGACAGGCTAAAAAGGCGACCACGAA
 ACTACCCTACAGCAAAGTACACCTGCAGACTCTGTGATGTTTTAATTGAATCCATTGCATT
 TGCCCATAAAGCATATCAAGGAAAAGAGGCACAAGAAAAACATTAAGGAGAAGCAAGAGGA
 AGAGTTGCTCACTACGTTACCCCAACACCCCTCCAGATAAATGCAGTTGGCATTGCC
 ATTGACAAAGTGGTACAGGAATTTGGCTTACACAATGAGAAGTGGAAACAGAGGCTGGAA

ATTAAACGTATCATGGAAAATGTGTTCCAACACAAGTTACCAGATTGTTCCCTAAGATTA
TATGGGTCATCCTGTAGCAGATTGGGTTTCAAAAATTCGGATGTAAACATTGACATCCAG
TTTCCAGCCATTATGTCTCAGCCAGATGTCTCTTACTTGTTCAAGAATGTTTAAAGAACA
GTGACTCCTTTATTGATGTTGATGCAGACTTCCATGCTAGGGTGCCAGTGGTGGTGTGCAG
AGAAAAGCAAAGTGGTCTTCTGTGTAAAGTGAGCGCAGGAAATGAAAATGCTTGTCTGAC
AACAAAGCATTAACTGCCCTTGGAAAAC TAGAACC AAAGCTGGTTCCTTTGGTGATTGC
ATTTAGGTACTGGGCAAAGCTTTCAGTATAGATCGCCCTGAAGAAGGAGGTCTGCCACC
TTATGTGTTTGCCTGATGGCCATTTTCTTTCTTCAGCAGAGGAAAGAACCCTTTTGCCT
GTATATCTAGGATCATGGATTGAAGGATTCTCATTAAAGCAAAC TAGGGAATTTCAACCTT
CAAGACATTGAAAAAGATGTTGTGATCTGGGAACATACTGACAGTGCTGCAGGGGACACA
GGCATAACAAAAGAAGAGGCACCAAGAGAAACGCCGATTA AAAGGGGACAGGTGTCATTA
ATATTGGATGTGAAACACCAGCCTTCAGTACCAGTTGGGCAGCTCTGGGTGGAATTGCTGC
GGTCTATGCTTTAGAATTTAATTTGGCTGATTTAGTGATAAGTATTCGTGTCAAAGAAT
TGGTATCTCGGGAATTGAAGGATTGGCCAAAAAGCGCATTGCCATTGAAGATCCCTACTC
TGTTAAAAGAAATGTGGCAAGAACCCTAAATAGTCAACCTGTGTTTGAATATATACTTCA
TTGTTTAAAGGACAACATACAAGTATTTGCTCTTCCACACAAAATTACAAAATCCAGCCTT
CTAAAGCCTCTGAATGCAATTACATGTATTTCAGAACATTCTAAAGAAGTAATAAATCAT
CATCCAGATGTACAAAACAAAAGATGATAAGCTCAAAAACCTCAGTTTTGGCCCAAGGTCCT
GGTGCTACCAGTTCAGCTGCAAATACCTGTAAGGTACAGCCACTTACTCTTAAAGAGACTG
CTGAAAGTTTTGGAAGCCCACCAAAAAGAAGAAATGGGAAATGAACACATCAGTGTCCACC
CTGAAAACCTCAGACTGTATCCAAGCAGATGTTAACTCTGATGATTACAAGGGTGATAAAG
TATACCATCCAGAAACAGGAAGGAAAAACGAGAAAGAGAAAGTTGGAAGGAAGGGCAAG
CATCTGTTGACTGTTGATCAGAAACGTGGAGAGCATGTTGTCTGTGGCAGCACACGTAAT
AATGAGTCAGAGAGCACTTTGGATTTAGAAGGCTTCCAAAATCCCACAGCTAAAGAGTGT
GAGGGACTTGCCACTTTAGATAACAAGGCTGATCTTGATGGAGAAAGTACAGAAGGTA
GAGGAACTAGAAGACTCTCTAAACCACTTTACCCACTCAGTACAGGGCCAGACATCAGAA
ATGATTCCCTCTGATGAAGAGGAGGAGGACGACGAAGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAACCT
AGGCTCACCATTAACCAAAGGGAAGATGAAGATGGCATGGCTAATGAAGATGAGTTAGAC
AACACCTACACTGGGTCAGGGGATGAGGACGCCCTATCTGAAGAGGATGATGAGTTAGGC
GAAGCTGCTAAGTATGAAGACGTGAAAAGATGTGGAAAACATGTAGAAAAGAGCTCTCCTA
GTGGAACCTAATAAAAATAAGTCTCAAGGAAGAAAATGTATGTGAAGAAAAAAATTCACCT
GTGGATCAGTCTGATTTTTTTTATGAATTCAGTAACTTATCTTCACCAAAGGCAAGTCTC
CTACGGTAGTGTGCAGCTTATGCAAACGAGAGGGTCATCTAAAGAAGGACTGTCTGAAG
ACTTCAAAAAGAAATCCAGCTAGAACCTCTGCCACCATTAACACCCAAGTTTTTAAATATCTT
AGATCAAGTCTGTATCCAGTGTTATAAGGATTTTTCTCCAACAATTATAGAAGATCAGGC
TCGTGAACATATTCGGCAAAACCTAGAAAGTTTCATAAGACAGGACTTTCAGGAACTAA
ATTGAGCCTGTTTGGCTCCTCAAAAATGGATTTGGGTTCAAACAGAGTGACCTTGACGTC
TGTATGACAATTAATGGACTTGAAACTGCTGAGGGATTGGACTGTGTCAGAACTATTGAA
GAATTAGCAAGAGTCTCAGAAAACATTCAGGTCTGAGAAACATCTTACCTATTACAACA
GCAAAGGTGCCAATTGTGAAGTCTTCCATTTGAGAAGTGGTCTGGAAGTAGATATCAGT
TTGTATAACACATTGGCCCTTCATAACACAAGGCTTTTATCTGCTTATTCCGCCATTGATC

CCAGAGTGAAGTATTTGTGCTATACCATGAAAGTATTTACAAAGATGTGTGATATTGGTG
ATGCATCTAGAGGCAGCTTATCATCGTATGCATATACTCTTATGGTGCTATATTTTCTCCA
GCAGAGGAATCCACCAGTCATTCCTGTCTTCAAGAGATATACAAAGGTGAAAAGAAACC
TGAAATATTTGTTGATGGCTGGAATATTTATTTTTTTGATCAAATAGATGAACTGCCTAC
CTATTGGTCAGAATGTGGAAAAAATACAGAATCTGTTGGGCAGTTATGGTTGGGCCTTCT
TCGTTTCTACACAGAGGAATTTGATTTTAAAGAACATGTTATTAGCATCAGGAGAAAAAG
TCTGCTTACAACTTTTAAGAAACAGTGGACCTCAAATACATTGTTATTGAAGATCCCTT
TGATTTGAATCATAATCTTGGAGCTGGATTATCAAGGAAAATGACAAATTTTATAATGAA
GGCTTTTATCAATGGTAGAAGAGTATTTGGTATTCCTGTCAAGGGATTTCCAAAGGACTA
CCCCTCAAAAATGGAATACTTTTTTGATCCAGATGTGTAACTGAAGGAGAGCTGGCCCCA
AATGATAGATGTTGTCGAATTTGTGGAAAAATCGGACACTTCATGAAGGACTGTCCTATG
AGGAGAAAAGTAAGACGGCGGCGAGATCAGGAAGATGCCCTGAACCAAAGATACCCTGAG
AACAAAGGAAAAAAGAAGCAAAGAGGACAAAGAAATTCACAACAAGTACACAGAAAGGA
GGTGTCAACAAAAGAAGATAAGCCCATACAGTGCACACCTCAGAAAGCCAAGCCAATGCG
GGCAGCTGCTGACCTGGGGAGGGAGAAGATCCTCAGGCCACCAGTAGAAAAATGGAAGAG
ACAGGATGACAAAGACTTAAGAGAAAAACGTTGTTTTATTTGTGGAAGAGAAGGGCACAT
TAAAAAGGAATGCCACAGTTTAAAGGCTCTTCAGGTAGCCTTTCAGTAAATATATGAC
TCAGGAAAAGCCTCAGCGAAGAGGACCCAGCAGGAATCATGA