

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Bunečná a vývojová biologie



**Bc. Soňa Jakšová**

***Charakterizácia génu *pop-1* u *Caenorhabditis elegans****

***Characterization of the *Caenorhabditis elegans pop-1* gene***

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Vedúci diplomovej práce: Ing. Tomáš Vacík Ph.D

Praha 2018

## POĎAKOVANIE

Poďakovanie patrí vedúcemu tejto diplomovej práce Ing. Tomášovi Vacíkovi za odbornú pomoc a trpezlivosť pri jej vypracovaní.

## ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Čestne vyhlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

.....

## **Abstrakt**

Rozmanitosť ľudského proteómu vychádza zo schopnosti jedného génového lokusu kódovať viacero proteínových izoforiem. Gény *TCF/LEF* produkujú široké spektrum variant, čím rozširujú pole pôsobnosti TCF/LEF proteínov. Transkripčné faktory TCF/LEF regulujú cieľové gény Wnt signálnej dráhy. Diplomová práca využíva modelový organizmus *Caenorhabditis elegans*, u ktorého študuje gén *pop-1*, ortológ *TCF/LEF*. Hybridizačnou metódou Northern blot sme sa pokúsili overiť prítomnosť *pop-1* alternatívnej mRNA. Pomocou kvantitatívnej RT-PCR sme analyzovali hladinu *pop-1* mRNA.

Kľúčové slová:

kanonická Wnt signálna dráha, transkripčné faktory TCF/LEF, *Caenorhabditis elegans*, *pop-1*

## **Abstract**

The human proteom diversity is caused by the ability of a single gene locus to encode more protein isoforms. The TCF/LEF genes produce a broad spectrum of protein variants, which consequently leads to a great functional diversity of the TCF/LEF proteins. The TCF/LEF transcriptional factors regulate the canonical Wnt signaling target genes. In this diploma project we focused on the *Caenorhabditis elegans* gene *pop-1*, the ortholog of the *TCF/LEF* genes. Using the Northern blot analysis we tried to identify alternative isoforms of the *pop-1* mRNA in *C. elegans*. Using quantitative RT-PCR we also analyzed the *pop-1* mRNA levels.

Key words:

canonical Wnt signaling pathway, TCF/LEF transcription factors, *Caenorhabditis elegans*, *pop-1*

# Obsah

<b>1</b>	<b>Kanonická Wnt signálna dráha</b>	<b>6</b>
1.1	Wnt signalizácia: komponentny a prehľad	7
1.2	$\beta$ -katenin vo Wnt signalizácii	9
1.3	Transkripčné faktory TCF/LEF	12
1.3.1	Domény TCF/LEF proteínov	12
1.3.2	Úloha TCF/LEF proteínov v regulácii transkripcie	14
1.3.3	Alternatívne izoformy TCF/LEF	15
1.3.3.1	Dominantne-negatívne izoformy TCF/LEF	16
1.4	Wnt/ $\beta$ -katenin signalizácia u <i>C. elegans</i>	17
1.4.1	<i>pop-1</i> : ortológ TCF/LEF	18
1.4.1.1	Funkcia proteínu POP-1	18
<b>2</b>	<b>Ciele práce</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metódy</b>	<b>21</b>
3.1	Materiál	21
3.2	Metódy	21
3.2.1	Kultivácia <i>C. elegans</i>	21
3.2.1.1	Príprava NGM média	21
3.2.1.2	Očkovanie baktérii	22
3.2.1.3	Pasážovanie <i>C. elegans</i>	22
3.2.2	Synchronizácia populácie <i>C. elegans</i> za účelom získania embryí	22
3.2.3	Izolácia celkovej RNA	23
3.2.3.1	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie RNA	24
3.2.3.2	Kontrola kvality izolovanej RNA	24
3.2.4	Reverzná transkripcia (syntéza cDNA)	24
3.2.5	q-RT-PCR: kvantifikácia expresie <i>pop-1</i>	25
3.2.5.1	Návrh primerov pre q-RT-PCR	26
3.2.5.2	Príprava q-RT-PCR reakcie a prevedenie analýzy	26
3.2.6	Northern blot	27
3.2.6.1	Príprava mRNA z celkovej RNA	27
3.2.6.2	Príprava RNA próby	27
3.2.6.3	Samotná Northern blot analýza	30

<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Analýza expresie vybraných oblastí génu <i>pop-1</i> metódou q-RT-PCR</b>	<b>33</b>
4.1.1	Expresný profil <i>pop-1</i> stanovený pomocou q-RT-PCR u zmesi jedincov <i>C. elegans</i> v rôznych vývinových štádiách <sup>7</sup>	33
4.1.2	Expresný profil <i>pop-1</i> stanovený pomocou q-RT-PCR u <i>C. elegans</i> embryí	34
<b>4.2</b>	<b>Northern blot analýza</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Diskusia</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Použitá literatúra</b>	<b>46</b>

## Zoznam skratiek

5'UTR	5'neprekladaný región
APC	Adenomatous polyposis coli
BCL9	B-cell lymphoma 9
CBP	CREB-binding protein
cDNA	komplementárna DNA
CK1	Kazein kináza 1
CK2	Kazein kináza 2
CRD	Cysteine-rich domain
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
GSK3	Kináza glykogen-syntázy 3
HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase 2
HMG	High-mobility group
JNK2	c-Jun N-terminálna kináza
LEF	Lymphoid enhancer factor
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6
NGM	Nematode growth medium
NLS	Nukleárny lokalizačný signál
ORF	Otvorený čítací rámec
PKA	Proteín kináza A
PKB	Proteín kináza BF
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCF	T-cell factor
TCF/LEF	T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor
TCF7	Transcription Factor 7
TLE	transducin-like enhancer of slip
TSS	Transkripčný štart
WRE	Wnt responsive elements
$\beta$ -TrCP	Beta-transducin repeats-containing protein, podjednotka E3 ubiquitín ligázy

# Úvod

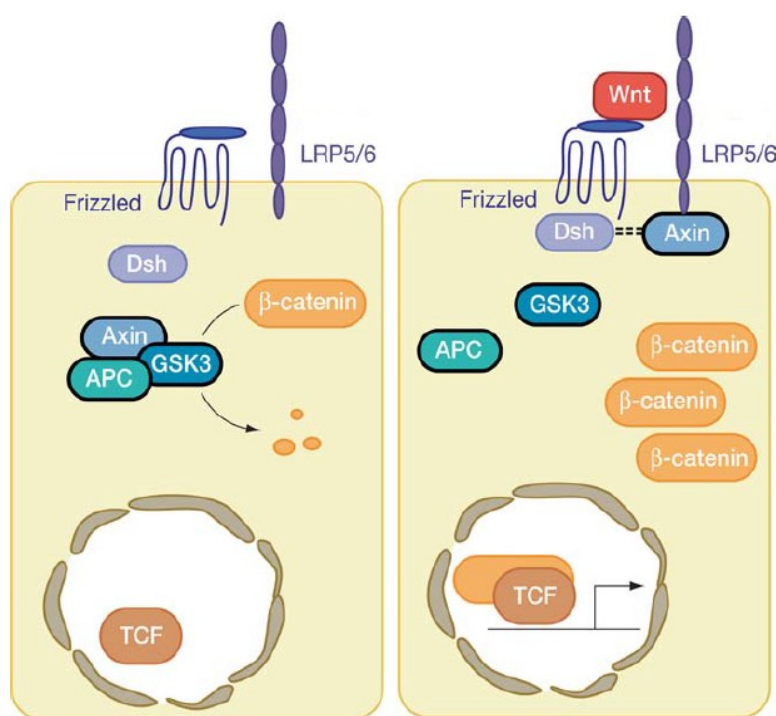
Signalizácia Wnt je evolučne konzervovaná signálna dráha, regulujúca mnoho bunčných procesov u Metazoa. Vnútrobunčné kaskády podmienené Wnt signálmi určujú osud bunky a zároveň bunku v mieste kontaktu polarizujú. Z evolučného hľadiska mohla byť kombinácia týchto dvoch vlastností významným faktorom pri prelomení symetrie a vzniku bunčnej diverzity (Loh, van Amerongen, and Nusse 2016).

Signálna dráha Wnt je jednou z kľúčových signalizácií počas celého života živočíšneho organizmu. V priebehu embryogenézy riadi mnohé vývinové procesy. Má kritickú úlohu pri ustanovení telesných osí embrya a koordinácii procesov organogenézy. V tkanivách dospelých organizmov je nevyhnutná pre udržiavanie homeostázy a regeneráciu tkanív – reguluje sebaobnovu kmeňových buniek (Logan and Nusse 2004). Vývin mnohobunčného organizmu vyžaduje precíznu časo-priestorovú génovú expresiu ako aj expresiu izoform špecifických pre daný typ bunky a tkaniva. Neprimeraná regulácia dráhy Wnt vedie k vývinovým defektom. V dospelom organizme je jej narušená regulácia asociovaná so vznikom a progresiou nádorových ochorení (Mao and Byers 2011).

Diplomová práca zameriava pozornosť na nukleárny efektor dráhy Wnt u modelového organizmu *Caenorhabditis elegans*, transkripčný faktor POP-1. POP-1 je jediným *C. elegans* ortológom štyroch cicavčích transkripčných faktorov sprostredkovávajúcich kanonickú Wnt signalizáciu, TCF/LEF proteínov. Interakciou s jadrovým  $\beta$ -kateninom skrz ich N-koncovú doménu sa TCF/LEF proteíny stávajú transkripčnými aktivátormi a spúšťajú transkripciu cieľových génov Wnt signalizácie (Cadigan and Waterman 2012). Existujú však alternatívne izoformy TCF/LEF proteínov, ktorým N-koncová aktivačná doména chýba a tieto tzv. dominantne negatívne TCF/LEF proteíny nemôžu interagovať s  $\beta$ -kateninom. Nakoľko sú však tieto dominantne negatívne TCF/LEF proteíny stále schopné väzby na promótorov svojich cieľových génov, pôsobia ako silné konštitutívne represory transkripcie týchto génov (Hoppler and Waterman 2014). Existencia dominantne negatívnych TCF/LEF proteínov je významná pre jemné vyladenie transkripčných hladín cieľových génov Wnt signalizácie a/alebo i pre transkripčnú represiu niektorých cieľových génov tejto dráhy i v prítomnosti Wnt ligandov a aktívnej Wnt signálnej dráhy. Z hľadiska veľkého významu Wnt signalizácie ako vo vývoji a fungovaní zdravého organizmu, tak v procese malígnych transformácií, je štúdium a pochopenie regulácie tejto dráhy veľmi dôležité. Identifikácia dominantne negatívnej izoformy POP-1 u *C. elegans* by potvrdila evolučnú konzervovanosť tohto regulačného faktora a bola by základom pre jeho ďalšiu charakterizáciu a štúdium.

# 1 Kanonická Wnt signálna dráha

Počínajúc väzbou Wnt ligandu na povrch bunky, prenáša kanonická dráha Wnt signál až do jadra, kde reguluje génovú expresiu. Centrálnou molekulou tejto signalizácie je mediátorová molekula  $\beta$ -katenin. Nekanonická Wnt signalizácia, známa ako dráha planárnej polarity je od  $\beta$ -kateninu nezávislá. Dobre popísaná je i nekanonická Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  signalizácia. Spoločným prvkom týchto dráh, ako názov napovedá, sú proteíny Wnt a prostredníctvom ďalších spoločných komponent sa tieto dráhy vzájomne ovplyvňujú.



**Obr. 1 Kanonická Wnt signálna dráha**

*Vľavo:* V bunkách, ktoré nie sú vystavené Wnt signálom, je  $\beta$ -katenin degradovaný prostredníctvom interakcie s proteínmi Axin, APC a proteínovou kinázou GSK3. *Vpravo:* Wnt ligandy viažu Frizzled/LRP receptorový komplex na bunčnom povrchu. Následne je signál prenášaný na proteín Dishevelled a Axin. Výsledkom udalostí na membráne je zastavenie degradácie  $\beta$ -kateninu a jeho hromadenie v cytoplazme.  $\beta$ -katenin po vstupe do jadra tvorí komplex s transkripčnými faktormi TCF/LEF a aktivuje transkripciu cieľových génov. Prevzaté od Logan and Nusse 2004



## 1.1 Wnt signalizácia: komponentny a prehľad

Gény kódujúce kľúčové komponenty kanonickej Wnt dráhy je možné nájsť i u morskej hubky *Amphimedon queenslandica*<sup>1</sup> (Porifera) (Adamska et al. 2010).

Sekretované Wnt ligandy pôsobia ako parakrinné a autokrinné signály. Sú to proteíny charakteristické vysokým počtom konzervovaných cysteínov, nesúce lipidovú modifikáciu – palmitát. Ich hydrofóbna povaha neumožňuje voľný pohyb v extracelulárnom prostredí (Clevers, Loh, and Nusse 2014). U cicavcov je však možný transport i na väčšie vzdialenosti, kedy sú Wnt ligandy spolu s inými morfogénmi transportované ako súčasť lipoproteínových častí s vysokou hustotou (HDL) (Neumann et al. 2009). Rodina ľudských génov kódujúca ligandy Wnt pozostáva z 19 členov. Kanonickej Wnt/ $\beta$ -katenin signálnej dráhy sa zúčastňujú *Wnt2*, *Wnt2b*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt8* (Tortelote et al. 2017).

Wnt ligandy sú na povrchu bunky s vysokou afinitou viazané receptorom Frizzled. Väzbu umožňuje na cysteín bohatá doména CRD na N-terminálnom konci receptoru. Frizzled má sedem transmembránových domén a C-terminálnu doménu orientovanú intracelulárne. Naviazaný ligand väzbou premostňuje receptor Frizzled s koreceptorom LRP5/6. Vytvára sa tak trimérny komplex, ktorý prostredníctvom cytoplazmatických domén rekrutuje ďalších členov signalizácie (MacDonald and He 2012).

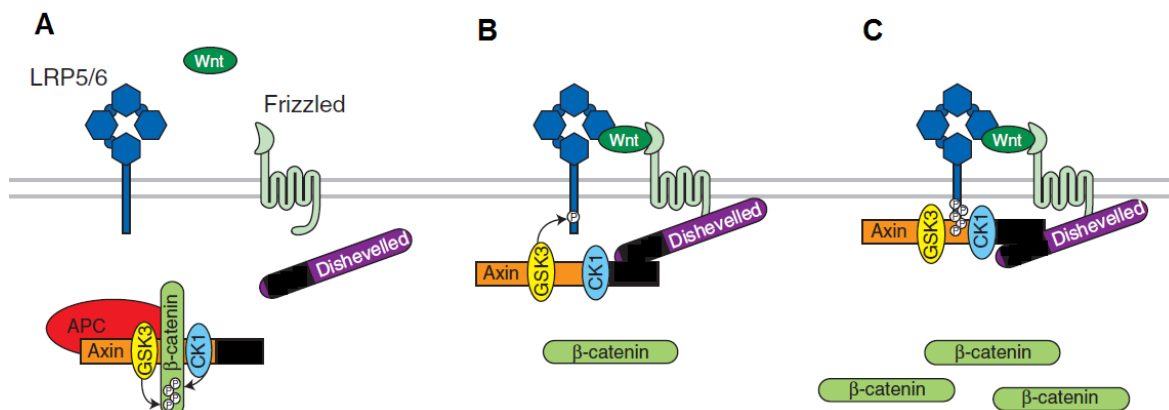
Na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány dochádza k interakcii medzi receptorom Frizzled a adaptorovým proteínom Dishevelled (Obr. 2). Tento adaptor rekrutuje a priamo viaže proteín Axin v komplexe s kinázou GSK3 (kináza glykogén syntázy 3) (Zeng et al. 2017).

Kľúčovou udalosťou, ktorá predchádza prenosu signálu do jadra je stabilizácia a akumulácia voľného cytoplazmatického  $\beta$ -kateninu. Bunky postrádajúce Wnt stimuly majú aktívny tzv. deštrukčný komplex smerujúci  $\beta$ -katenin k degradácii. Wnt stimuly majú na deštrukčný komplex dvojaký efekt – rekrutujú ho k cytoplazmatickej membráne, ovplyvňujú jeho zostavovanie, resp. rozpad (Schaefer et al. 2018).

Súčasťou deštrukčného komplexu sú proteíny Axin a APC (Adenomatous polyposis coli), spolu s kinázami GSK3 a CK1 (kasein kináza 1). Platforma vytvorená Axinom a APC je nevyhnutná pre asociáciu  $\beta$ -kateninu s týmito kinázami. Fosforyláciou sa na N-terminálnom konci  $\beta$ -kateninu tvorí väzobné miesto pre  $\beta$ -TrCP – podjednotku E3 ubiquitín ligázy. Viacnásobna ubiquitinácia smeruje  $\beta$ -kateninu do proteazómu, kde dochádza k jeho degradácii. (Kimelman and Xu 2006)

---

<sup>1</sup> Genóm *A.queenslandica* nesie gény pre Wnt ligandy, Frizzled, Lrp5/6, Dishevelled, Axin, APC, GSK3,  $\beta$ -katenin, TCF



**Obr. 2 Model aktivácie dráhy Wnt a prenosu signálu prostredníctvom stabilizácie cytoplazmatického β-kateninu**

A/ Absencia Wnt ligandov má za následok fosforyláciu (destabilizáciu) β-kateninu kinázami CK1 a GSK3. B/ Interakcia Wnt ligandu s receptorom Frizzled a koreceptorom LRP5/6 vedie k translokácii komplexu Axin-GSK3-CK1 k cytoplazmatickej membráne. Väzbu komplexu k receptoru umožňuje proteín Dishevelled. C/ Kinázy GSK3 a CK1 fosforylujú intracelulárnu doménu LRP5/6 a tým vytvárajú motív pre väzbu komplexu Axin-GSK3-CK1. Vyviazanie tohto komplexu na membráne vedie k inhibícii jeho aktivity a k zvýšeniu hladiny cytoplazmatického β-kateninu. Prevzaté a upravené od MacDonald and He 2012

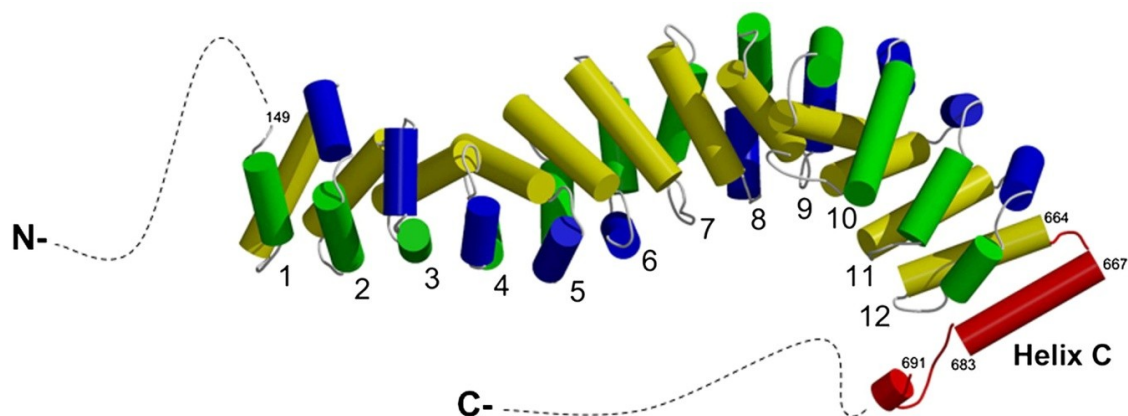
Klasický model objasňujúci aktiváciu Wnt signálnej dráhy (Obr. 2) je založený najmä na biochemických analýzach. Podľa tohto modelu dochádza k inaktivácii deštruktívneho komplexu prostredníctvom interakcie s receptorovým komplexom Frizzled-LRP5/6. Podľa výsledkov skupiny Stamos et al. 2014 môže fosforylovaná cytoplazmatická doména LRP6 priamo inhibovať kinázovú aktivitu GSK3 kinázy.

Novší „endozomálny“ model rozširuje model klasický. Po tom, čo je deštruktívny komplex rekrutovaný k membráne, dochádza k endocytóze a internalizácii celého multiproteínového komplexu do endozomálnych vezikúl. Vezikuly splyvajú do multivezikulárnych teliesok, v ktorých sú komponenty deštruktívneho komplexu oddelené od cytoplazmatického prostredia – tým sa zamedzí fosforylácii a degradácii β-kateninu (MacDonald and He 2012; Tortelote et al. 2017).

Okrem toho, skupina Bilic et al. v roku 2007 predstavila model tzv. „LRP signalozómu“. Použitím techniky live cell imaging pozorovali, že Wnt stimulácia indukuje na cytoplazmatickej membráne vznik štruktúry o veľkosti ribozómu. LRP signalozóm vzniká oligomerizáciou proteínu Dishevelled spolu s receptorovým komplexom a členmi deštruktívneho komplexu.

## 1.2 $\beta$ -katenin vo Wnt signalizácii

Štruktúrne je  $\beta$ -katenin veľmi zaujímavý proteín (Obr. 3) s veľkou centrálnou oblasťou tvorenou 12 kópiami aminokyselinovej sekvencie známej ako „armadillo repeat“ (repeat = angl. opakovanie). Každá repetícia pozostáva z troch helixov, ktoré dohromady vytvárajú super-helikálnu štruktúru s pozdĺžnym pozitívne nabitým žliabkom (Huber, Nelson, and Weis 1997).



**Obr. 3 Štruktúra  $\beta$ -kateninu**

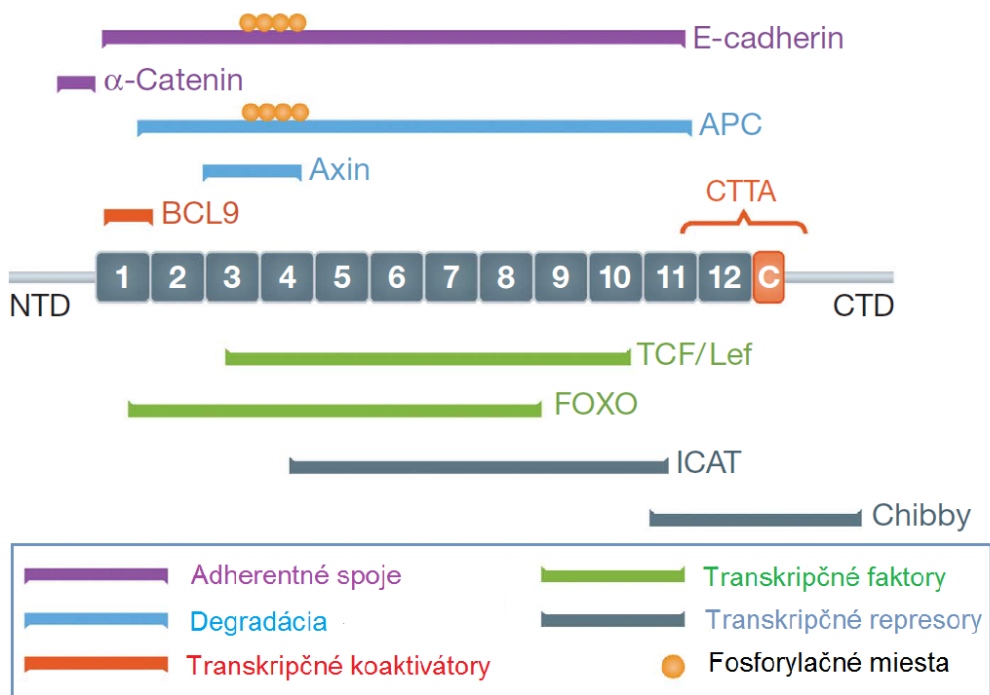
Číslami 1 až 12 sú označené jednotlivé armadillo repetície. Každá repetícia pozostáva z troch helixov znázornených zelenou, žltou a modrou farbou (výnimkou je repetícia 7, zložená z helixov dvoch). Červenou je zobrazený helix C. Prerušovanú líniu predstavuje štruktúrne flexibilná N- a C-terminálna oblasť. Prevzaté od Gottardi and Mark 2008

Rigidná centrálna oblasť nesie väzobné miesta pre mnoho interakčných partnerov, vrátane TCF/LEF transkripčných faktorov a proteínov deštruktívneho komplexu (APC a Axin) (Graham et al. 2000).

Biochemické a kryštalografické analýzy ukazujú, že sa väzobné miesta viacerých interakčných proteínov v centrálnej oblasti  $\beta$ -kateninu prekrývajú – nemôžu byť viazané súčasne. Príkladom je väzobné miesto pre BCL9 (B-cell lymphoma 9), ktoré je v tesnej blízkosti väzobného miesta pre  $\alpha$ -katenin (Obr. 4). Ich väzba sa vzájomne vylučuje. BCL9 je významným transkripčným koaktivátorom a zároveň prepája  $\beta$ -katenin s nukleárnym proteínom Pygopus, ktorý rekrutuje komplex BCL9/ $\beta$ -katenin do jadra (Valenta, Hausmann, and Basler 2012).

Okrem úlohy transkripčného aktivátora, je  $\beta$ -katenin súčasťou adherentných spojov. V komplexe s kadherinovým receptorom umožňuje fyzické prepojenie susedných buniek a prostredníctvom  $\alpha$ -kateninu asociuje s proteínmi cytoskeletu (Nelson and Nusse 2004). Existujú dôkazy, že  $\beta$ -katenin uvoľnený z adherentných spojov je po nahromadení v cytoplazme a v jadre schopný aktivovať transkripciu Wnt cieľových génov. K uvoľneniu z väzby s E-kadherinom môže

dôjsť za určitých podmienok pri iniciácii epiteliálno-mezenchymálneho prechodu<sup>2</sup>. Zároveň sa Wnt/ $\beta$ -katenin signálna dráha podieľa na regulácii tohto procesu. Epiteliálno-mezenchymálny prechod bunky podstupujú ako počas embryogenézy, tak pri invázii nádorových buniek a vzniku metastáz (Heuberger and Birchmeier 2010) .



#### Obr. 4 $\beta$ -katenin a interakční partneri

V centrálnej časti schémy je zobrazený  $\beta$ -katenin s 12 armadillo repetíciami, helixom C, N-terminálnou doménou (NTD) a C-terminálnou doménou (CTD). Farebné pásy označujú väzobné miesta jednotlivých interakčných partnerov a ich rozsah. Farebne sú tieto proteíny rozdelené do funkčných skupín, ktoré sú popísané v dolnej časti schémy. Skratkou CTTA (C-terminálne transkripčné aktivátory) je označená oblasť kritická pre väzbu mnohých komplexov podporujúcich  $\beta$ -kateninom sprostredkovanú transkripciu (chromatín-remodelujúce komplexy, proteíny pre-iniciačného komplexu transkripčnej mašínérie). Prevzaté a upravené od Valenta, Hausmann, and Basler 2012

Proteín ICAT má inhibičný efekt na transkripčnú aktivitu  $\beta$ -kateninu, pretože väzbou na  $\beta$ -katenin blokuje asociáciu s TCF/LEF transkripčnými faktormi. Miesta ich väzby sa vzájomne prekrývajú (Daniels and Weis 2002).

Aktivita, stabilita a lokalizácia  $\beta$ -kateninu je regulovaná post-translačnými modifikáciami. Vo všeobecnosti je možné tvrdiť, že fosforylácia na N-terminálnom konci smeruje  $\beta$ -katenin

<sup>2</sup> Epiteliálno-mezenchymálny prechod (EMT, epithelial to mesenchymal transition) je biologický program, pri ktorom polarizované epitelové bunky nadobúdajú mezenchymálny fenotyp a migračné vlastnosti

k degradácii, zatiaľ čo fosforylácia určitých miest na C-terminálnom konci vedie k jeho stabilizácii a ovplyvňuje akumuláciu v jadre (Tab. 1 ). C-terminálnu fosforyláciu prevádzajú PKA (Proteín kináza A), PKB/AKT (Proteín kináza B) a JNK2 (c-Jun N-terminálna kináza) (Gao, Xiao, and Hu 2014).

**Tab. 1 Fosforylácia  $\beta$ -kateninu serin/treonin kinázami.** Prevzaté a upravené od Valenta, Hausmann, and Basler 2012

KINÁZA	MIESTO FOSFORYLÁCIE	FUNKCIA	REFERENCIE
<b>CK1</b>	Ser45	Degradácia, priming pre GSK3	Liu et al. 2002
<b>GSK3</b>	Ser33, Ser37	Degradácia, modifikácia nevyhnutná pre rozpoznanie $\beta$ -TrCP	Liu et al. 1999
<b>JNK2</b>	Ser191	Transport do jadra	Wu et al. 2008
<b>CK2</b>	Thr393	Zvýšenie stability	Song et al. 2003
<b>PKB/AKT</b>	Ser552	Zvýšenie transkripčnej aktivity	Fang et al. 2007

Hoci je nukleárna lokalizácia  $\beta$ -kateninu rozhodujúcim faktorom v odpovedi na Wnt signály, molekulárny mechanizmus importu cez jadrový obal ostáva nejasný. Dlhodobo známym faktom je, že  $\beta$ -katenin nenesie nukleárny lokalizačný signál (NLS) a vstup do jadra je nezávislý od importin-transportného systému (Fagotto, Glück, and Gumbiner 1998).

Významnými interakčnými partnermi  $\beta$ -kateninu pôsobiacimi v jadre sú proteíny CBP (CREB-binding protein) a p300. Priamou väzbou viažu jeho C-koncovú časť. CBP/p300 disponujú acetyltransferázovou aktivitou – acetylácia histónov vedie k relaxácii chromatinu (Wolf et al. 2002). I samotný  $\beta$ -katenin môže byť cieľom acetylácie – acetylovaný lyzín 345 zvyšuje jeho afinitu k TCF7L2 (Lévy et al. 2004). Podľa štúdie skupiny Hoffmeyer et al. z roku 2017 je  $\beta$ -katenin v embryonálnych kmeňových bunkách modifikovaný na lyzíne 49 buď acetyláciou alebo trimetyláciou.  $\beta$ -katenin acetylovaný acetyltransferázou CBP pôsobí počas diferenciácie mezodermálnych buniek ako transkripčný koaktivátor. Trimetylovaný  $\beta$ -katenin môže pri diferenciácii neuronálnych buniek pôsobiť ako transkripčný represor.

V jadre je  $\beta$ -katenin regulovaný prostredníctvom lyzínových demetyláz KDM2A/B. Demetylácia má za následok jeho export z jadra (Lu et al. 2015).

### 1.3 Transkripčné faktory TCF/LEF

TCF/LEF (T cell factor/Lymphoid enhancer factor) proteíny sú transkripčné faktory regulujúce cieľové gény v závislosti na aktivite kanonickej Wnt signálnej dráhy. Ich funkcia spočíva v aktivácii transkripcie v prípade, že sú viazané  $\beta$ -kateninom, zatiaľ čo v komplexe s korepresormi pôsobia ako transkripčné represory.

Pomenovanie „T cell factor“ a „Lymphoid enhancer factor“ je historické. Vzniklo pri objavení týchto transkripčných regulátorov v imunitných bunkách. Dnes je známe, že majú dôležitú regulačnú úlohu takmer vo všetkých tkanivách.

Genómy stavovcov nesú rodinu génov kódovaných v štyroch lokusoch. V literatúre sa možno stretnúť s dvojakou nomenklatúrou: *TCF7 (TCF1)*, *TCF7L1 (TCF3)*, *TCF7L2 (TCF4)*. U väčšiny bezstavovcov bol identifikovaný gén jeden (Cadigan and Waterman 2012). Predpokladá sa, že paralógy vznikli pri celo-genómových duplikáciách v raných dobách vývoja stavovcov (Hoppler and Waterman 2014). Knock-down štúdie u *Xenopus laevis* a knock-out experimenty u myši svedčia o tom, že každý zo štyroch členov rodiny má individuálnu funkciu, ktorá je ostatnými členmi nenahraditeľná (Klingel et al. 2012).

Medzi cieľové gény TCF/LEF patria: gény regulujúce bunecný cyklus a proliferáciu (*cyklin D*, *c-myc*, *c-jun*), bunecnú adhéziu a migráciu, neuronálnu diferenciáciu a funkcie mozgu. Taktiež gény pre TCF/LEF a ďalšie komponenty Wnt signalizácie (Axin, Frizzled a LRP) sú regulované samotnou Wnt signálnou dráhou. Približne 100-členný zoznam cieľových génov zhromaždila domovská stránka Wnt ([wnt.stanford.edu](http://wnt.stanford.edu)). Zaujímavým poznatkom je, že TCF7L1 sa viaže na promotory rovnakých génov ako transkripčné faktory Oct4, Sox2 a Nanog – kľúčové regulátory sebaobnovy a pluripotencie kmeňových buniek (Yi et al. 2012). Dôležitou evolučne konzervovanou vlastnosťou génov *TCF/LEF* (na výnimku *TCF7L1*) je prítomnosť väzobných miest pre TCF/LEF proteíny v ich promótorových oblastiach, čím je sprostredkovaná spätná väzba a vzájomná súhra medzi nimi (Cadigan and Waterman 2012; Hatzis et al. 2008; Koenig et al. 2008).

#### 1.3.1 Domény TCF/LEF proteínov

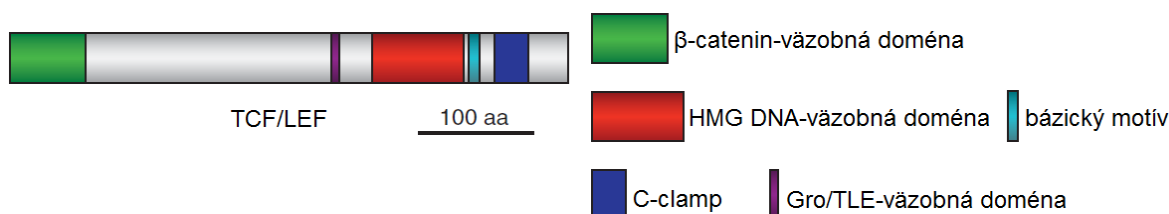
Proteíny TCF/LEF zdieľajú u stavovcov i bezstavovcov spoločné štruktúrne i funkčné vlastnosti. Samé osebe transkripčnou aktivitou nedisponujú ale slúžia ako platforma viažuca koaktivátory a chromátin-remodelujúce komplexy (Mao and Byers 2011).

N-terminálne je lokalizovaná  $\beta$ -katenin-väzobná doména (1-50 aminokyselín). Medzi ortológmi zdieľa približne ~60% sekvenčnú identitu. Pomerne málo štruktúrované TCF/LEF proteíny vytvárajú väzbu s pozitívne nabitými aminokyselinami v centrálnej oblasti  $\beta$ -kateninu (Graham et al. 2000).

HMG (High mobility group) je konzervovaná DNA-väzobná doména, ktorá s vysokou afinitou viaže „Wnt responzívne elementy“ (WRE) v promótorových, a iných regulačných oblastiach cieľových génov. Rozpoznáva nukleotidovú sekvenciu 5'-CCTTTGWW-3' (W = A alebo T) v malom žliabku DNA. Charakteristikou HMG domény je schopnosť ohýbania DNA v mieste väzby, čím dochádza k formovaniu slučiek a priblíženiu i vzdialených regulačných oblastí génov. Krátky bázičný motív lokalizovaný N-terminálne za HMG doménou zvyšuje afinitu k DNA vďaka kontaktu so záporne nabitou fosfátovou kostrou (Giese and Grosschedl 1991) a zároveň slúži ako silný nukleárny lokalizačný signál (Prieve et al. 1998).

Ortológy TCF/LEF proteínov u *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* a niektoré izoformy u stavovcov obsahujú prídavnú DNA-väzobnú doménu, známu ako C-clamp (clamp = angl. svorka). Špecificky rozpoznáva „pomocnú“ sekvenciu, ktorá môže byť lokalizovaná v rôznej vzdialenosti a orientácii vzhľadom k WRE (Atcha et al. 2007). Prítomnosť tejto domény umožňuje cieleňie k určitým génovým lokusom (napr. génom regulujúcim prechod bunecným cyklom) a zvyšuje silu väzby k DNA (Hoverter et al. 2014).

Krátky motív v centrálnej oblasti TCF/LEF predstavuje doménu esenciálnu pre asociáciu s korepresormi rodiny Groucho/Transducin-like enhancer of split (Gro/TLE).



### Obr. 5 Funkčné domény TCF/LEF proteínov

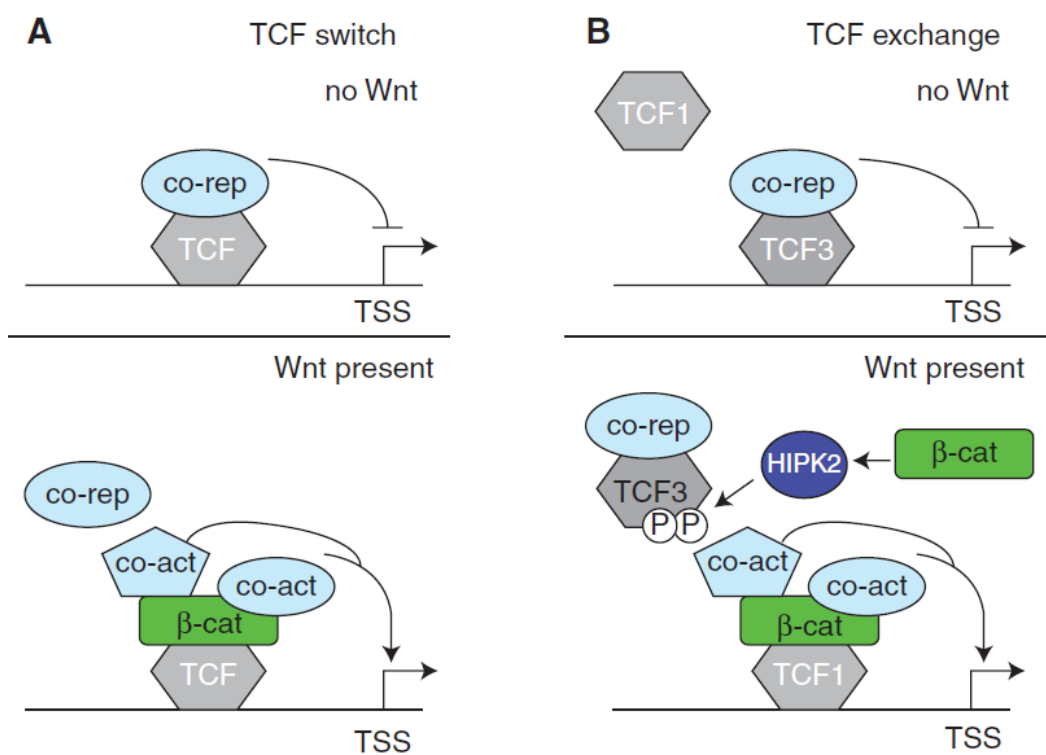
Schéma znázorňuje lokalizáciu evolučne konzervovaných domén TCF/LEF proteínov. Zobrazené domény boli identifikované u: *A. queenslandica* (okrem Gro/TLE-väzobnej domény), *C. elegans*, *D. melanogaster*, ľudských TCF/LEF (veľká množstvo izoforiem s rôznou skladbou domén). Prevzaté a upravené od Cadigan and Waterman 2012

Variabilnejšia menej konzervovaná kontext-dependetná regulačná doména je lokalizovaná medzi  $\beta$ -katenin-väzobnou doménou a doménou HMG. Disponuje vysokou štruktúrnou flexibilitou a obsahuje fosforylačné miesta pre Nemo-like kinázu (NLK) a HIPK2 (Homeodomain interacting protein kinase 2). U stavovcov je oblasť kódujúca túto doménu cieľom alternatívneho zstrihu. Kompozícia exónov v tejto oblasti závisí od stupňa diferenciácie a typu bunky/tkaniva (Mao and Byers 2011).

### 1.3.2 Úloha TCF/LEF proteínov v regulácii transkripcie

Všeobecne platí, že absencia Wnt stimulov má za následok asociáciu TCF/LEF s korepresormi rodiny Gro/TLE a transkripcia cieľových génov je utišená. U bunky stimulovanej, TCF/LEF prechádzajú z funkcie transkripčného represora do úlohy aktivátora transkripcie. Aktivácia je sprostredkovaná väzbou  $\beta$ -kateninu, ktorý sa hromadí v jadre.  $\beta$ -katenin rekrutuje komplex ďalších koaktivátorov a chromaín-remodelujúcich proteínov.

Nové poznatky tento model obohacujú. Platí, že LEF1 pôsobí na transkripciu cieľových génov prevažne aktivačne, TCF7L1 inhibične. TCF7 a TCF7L2 môžu pôsobiť ako aktivátory ale tiež ako represory (Mao and Byers 2011).



#### Obr. 6 TCF/LEF v úlohe transkripčného aktivátora/represora

**A/ Hore:** Absencia Wnt ligandov – TCF rekrutuje k cieľovým génom korepresory – transkripcia je utišená. **Dole:** Po stimulácii, vytvára  $\beta$ -katenin komplex s TCF.  $\beta$ -katenin nahradí (alebo inaktivuje) korepresory a prostredníctvom C-terminálnej a N-terminálnej domény rekrutuje koaktivátory – transkripcia je aktivovaná. Tento model je označovaný ako transkripčný „switch“.

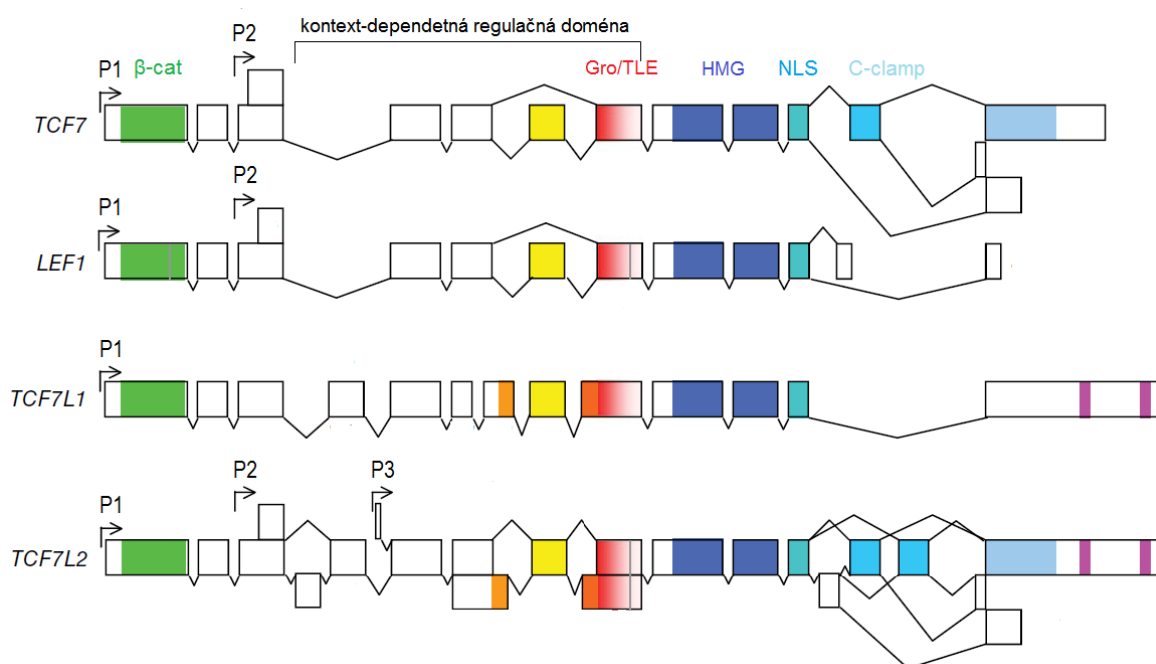
**B/ Hore:** U stavovcov sa predpokladá model „výmeny TCF/LEF“. Schéma vyobrazuje TCF3 (=TCFL1) v úlohe represora. **Dole:** Wnt stimulácia vedie k fosforylácii TCF3, ktorý sa uvoľní z regulačných oblastí cieľových génov. Je nahradený TCF1 (= TCF7) v komplexe s  $\beta$ -kateninom a ďalšími koaktivátormi, ktoré spúšťajú transkripciu cieľových génov. Prevzaté a upravené od Cadigan and Waterman 2012



Post-translačné modifikácie majú dôležitú úlohu v regulácii aktivity faktorov TCF/LEF. Fosforylácia LEF1, TCF7L1 a TCF7L2 kinázou HIPK2 (Homeodomain-interacting protein kinase 2) v oblasti HMG domény spôsobuje narušenie väzby s molekulou DNA (Hikasa and Sokol 2011). Podobne fosforylácia TCF7L2 a LEF1 kinázou NLK znižuje ich afinitu k promótorom cieľových génov (Ishitani, Ninomiya-tsuji, and Matsumoto 2003). Táto fosforylácia je prvým krokom, ktorý predchádza ubiquitinácii a degradácii proteínov TCF/LEF v proteazóme (Yamada et al. 2006).

### 1.3.3 Alternatívne izofomy TCF/LEF

Gény *TCF/LEF* produkujú veľké množstvo transkripčných variant, ktoré vznikajú vďaka alternatívnym promótorom a alternatívnemu zostrihu. Cieľom alternatívneho zostrihu sú najmä exóny kódujúce kontext-dependentnú regulačnú doménu a C-terminálny koniec. Pôsobením alternatívnych promótorov lokalizovaných v intrónových oblastiach *LEF1*, *TCF7* a *TCF7L2* vznikajú transkripty skrátené na 5'konci (Mao and Byers 2011).



**Obr. 7 Štruktúra exónov *TCF/LEF***

Schéma zobrazuje kompozíciu exónov génov *TCF7*, *LEF1*, *TCF7L1* a *TCF7L2*. Farebne sú vyznačené dôležité funkčné domény v týchto exónoch kódované. Alternatívne promótory (P1, P2, P3) a alternatívny zostrih umožňujú vznik rôzne špecializovaných proteínových izoforiem. β-cat: β-katenin-väzobná doména; Gro/TLE-väzobná doména, HMG DNA-väzobná doména; NLS: nukleárny lokalizačný signál; C-clamp. Prevzaté a upravené od Hoppler and Waterman 2014

### 1.3.3.1 Dominantne-negatívne izoformy TCF/LEF

U troch členov rodiny TCF/LEF boli identifikované prirodzene sa vyskytujúce proteínové izoformy so skráteným N-terminálnym koncom. Dominantne-negatívne izoformy postrádajú  $\beta$ -katenin-väzobnú doménu, ktorá je kódovaná v prvom exóne. Disponujú schopnosťou vstupovať do jadra, viazať regulačné elementy cieľových génov a interagovať s korepresormi. Neschopnosť viazať transkripčný aktivátor  $\beta$ -katenin má za následok, že i napriek Wnt signalizovaniu pôsobia na cieľové gény ako konštitutívny represor (Vacik and Lemke 2011).

*LEF1* lokus obsahuje dva identifikované promótoxy. Prvý produkuje mRNA, ktorá v 5'UTR (5' neprekladaný región) kóduje IRES element<sup>3</sup> a dáva vznik plno-dĺžkovej forme proteínu (Jimenez et al. 2005). Pôsobením promótoru 2 lokalizovaného v druhom intróne vzniká N-terminálne skrátená izoforma LEF1 postrádajúca  $\beta$ -katenin-väzobnú doménu (Li et al. 2006; Yokoyama et al. 2010). Podobne ako *LEF1*, lokus *TCF7* nesie dva promótoxy, ktoré dávajú vznik plno-dĺžkovej a skrátenej proteínovej izoforme (van de Wetering et al. 1996).

Gén *TCF7L2* produkuje okrem izoformy v plnej dĺžke viaceru izoforiem skrátených. Alternatívna mRNA transkribovaná z promótoru v intróne 1 je podobná ako v prípade *LEF1* a *TCF7* (Cadigan and Waterman 2012). Tretí identifikovaný promótor je lokalizovaný v intróne 5 (Vacik, Stubbs, and Lemke 2011). Táto rozsiahla intrónová oblasť okrem iného kóduje alternatívny polyadenylačný signál, vďaka ktorému vzniká izoforma skrátená na C'konci – nesie  $\beta$ -katenin-väzobnú doménu ale doména HMG u nej chýba (Locke et al. 2011).

Využívanie alternatívnych promótorov je možné korelovať so stavom bunky – plno-dĺžkové varianty TCF7 a LEF1 prevládajú u buniek proliferujúcich, N-terminálne skrátené varianty u buniek diferencujúcich a u tých, kde došlo k zástave bunecného cyklu (Mao and Byers 2011).

Dominantne-negatívna izoforma TCF7 je exprimovaná v zdravých bunkách kolorektálneho tkaniva, kde pôsobí ako tumor-supresor. V bunkách kolorektálneho karcinómu chýba a prevláda expresia plno-dĺžkových variant (Najdi et al. 2009)

---

<sup>3</sup> IRES element - internal ribosome entry site, vnútorné miesto pre vstup ribozómu, pôvodom z vírusov, umožňujúce začiatok translácie

## 1.4 Wnt/ $\beta$ -katenin signalizácia u *C. elegans*

Kapitola pojednáva o spoločných a rozdielnych črtách Wnt/ $\beta$ -katenin signálnej dráhy u nematody *Caenorhabditis elegans*. Pozornosť je venovaná hlavne  $\beta$ -kateninu a transkripčnému faktoru POP-1 – ortológu proteínov TCF/LEF.

Wnt signálna dráha reguluje u *C. elegans* mnohé vývinové procesy počas embryonálneho a larválneho štádia – migráciu, polarizáciu a diferenciáciu buniek, navádzanie axónových výbežkov a synaptogenézu, u dospelých jedincov proces podobný sebaobnove kmeňových buniek (Jackson and Eisenmann 2012). Wnt/ $\beta$ -katenin signalizácia je kľúčovým regulátorom asymetrického delenia a s ním spojenej špecifikácie osudu bunecných línií (Phillips and Kimble 2014).

Genóm *C. elegans* obsahuje gény pre členov signálnej dráhy Wnt, ktoré boli popísané v predchádzajúcej podkapitole. V porovnaní s génovou rodinou *TCF/LEF* u stavovcov, je ortológny gén *pop-1* u *C. elegans* kódovaný lokusom jedným.

**Tab. 2 Komponenty signálnej dráhy Wnt u *C. elegans*.** Prevzaté a upravené od Jackson and Eisenmann 2012

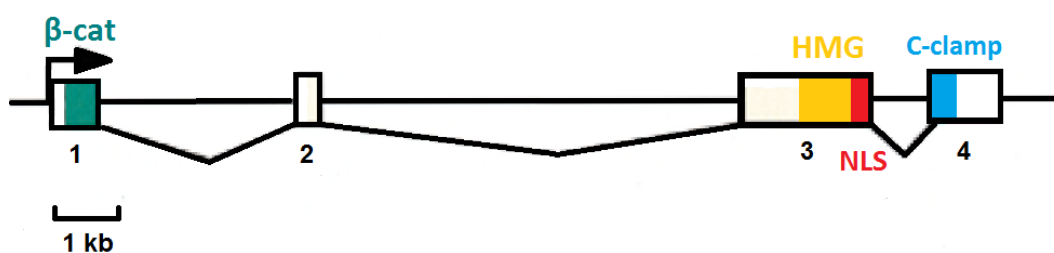
KOMPONENT	ORTOLÓG U <i>C. ELEGANS</i>
<b>Wnt ligandy</b>	EGL-20, LIN-44, MOM-2, CWN-1, CWN-2
<b>Frizzled</b>	LIN-17, MOM-5, MIG-1, CFZ-2
<b>LRP5/6</b>	?
<b>Dishevelled</b>	MIG-5, DSH-1, DSH-2
<b>GSK3</b>	GSK-3
<b>CK1</b>	KIN-19
<b>Axin</b>	PRY-1, AXL-1
<b>APC</b>	APR-1
<b><math>\beta</math>-TrCP</b>	LIN-23
<b><math>\beta</math>-katenin</b>	HMP-2, BAR-1, SYS-1, WRM-1
<b>TCF/LEF</b>	POP-1
<b>Groucho/TLE</b>	UNC-37

Unikátnym znakom je prítomnosť štyroch génov pre štyri rôzne špecializované paralógy  $\beta$ -kateninu. Všetky vykazujú nízku sekvenčnú aminokyselinovú identitu oproti  $\beta$ -kateninu ľudskému. **HMP-2** s najvyššou ~30% identitou je v komplexe s kadherinom (HMP-1) súčasťou adherentných spojov. **BAR-1** je transkripčným koaktivátorom. Stereoskopicky je najviac podobný  $\beta$ -kateninu vyšších organizmov, nesie 12 armadillo repetícií. Obsahuje N-terminálne lokalizovanú POP-1-väzobnú doménu a fosforylačné miesta pre GSK3 a CK1. **WRM-1** interaguje

s kinázou LIT-1 (NLK), ktorá fosforyluje POP-1 a zodpovedá za jeho export z jadra (Korswagen, Herman, and Clevers 2000). **SYS-1** s najnižšou ~10% sekvenčnou identitou vykazuje na základe kryštalografických štúdií pomerne vysokú podobnosť s  $\beta$ -kateninom stavovcov. Podobne ako BAR-1 aktivuje v komplexe s POP-1 transkripciu cieľových génov (Kidd et al. 2005; J. Liu et al. 2008).

#### 1.4.1 *pop-1*: ortológ TCF/LEF

Gén *pop-1* (posterior pharynx-defective) je u *C. elegans* lokalizovaný na prvom chromozóme a obsahuje štyri exóny. Prvý exón, podobne ako u génov *TCF/LEF* vyšších organizmov, kóduje  $\beta$ -katenin-väzobnú doménu (výnimkou je *Pangolin* u *D. melanogaster*, ktorý kóduje  $\beta$ -katenin-väzobnú doménu v exóne 3). Doména HMG a NLS je u *C. elegans* lokalizovaná v exóne 3. Exón 4 nesie sekvenciu pre C-clamp (Atcha et al. 2007; Hovanes, Li, and Waterman 2000). Oblasť medzi  $\beta$ -katenin-väzobnou doménou a doménou HMG zahŕňajúca exón 2 a časť exónu 3 je miestom, kde je proteín POP-1 fosforylovaný kinázou LIT-1 (Robertson et al. 2011).



**Obr. 8** Gén *pop-1* u *C. elegans* s číselne označenými exónmi a farebne znázornenými doménami.  $\beta$ -cat:  $\beta$ -katenin-väzobná doména; HMG: HMG DNA-väzobná doména; NLS: nukleárny lokalizačný signál; C-clamp. Prevzaté a upravené od Hovanes, Li, and Waterman 2000

##### 1.4.1.1 Funkcia proteínu POP-1

POP-1 – podobne ako TCF/LEF proteíny – má funkciu transkripčného faktora, ktorý reguluje transkripciu cieľových génov v odpovedi na aktivitu signálnej dráhy Wnt.

V skorých štádiách embryogenézy je *pop-1* kritickým regulátorom špecifikácie mezodermálnych/endodermálnych prekursorových buniek (Lin, Thompson, and Priess 1995). Asymetrická distribúcia proteínu POP-1 v jadre určuje antero-posteriálnu orientáciu deliacich sa buniek a tým prispieva k ustanoveniu antero-posteriálnej osi embrya. (Lin, Hill, and Priess 1998). Za asymetrickú distribúciu POP-1 v dcérskych bunkách zodpovedá aktivita  $\beta$ -kateninu/WRM-1 a kinázy LIT-1, ktorá v odpovedi na Wnt stimuláciu fosforyluje POP-1 na štyroch serínoch (S106,

S108, S117 a S126) a treonine (T119). Fosforylácia esenciálna pre väzbu proteínu 14-3-3/PAR5 nasledovanú exportom POP-1 z jadra (Lo et al. 2004; Mizumoto and Sawa 2007; Robertson et al. 2011). Nízka nukleárna koncentrácia proteínu POP-1 a vysoká koncentrácia stabilizovaného  $\beta$ -kateninu/SYS-1 má v prípade posteriórnej dcérskej bunky za následok aktiváciu transkripcie cieľových génov. Naopak, v anteriálnej dcérskej bunke, kde je koncentrácia POP-1 vysoká a SYS-1 nízka, je transkripcia cieľových génov prostredníctvom represorovej aktivity POP-1 utíšená (Phillips and Kimble 2014).

Počas larválneho vývinu sa POP-1 zúčastňuje kontroly migrácie a diferenciacie neuronálnych prekursorov (Herman 1999).

## 2 Ciele práce

Diplomový projekt pracuje s hypotézou existencie alternatívnej izoformy u transkripčného faktora POP-1 - *C. elegans* ortológu ľudských TCF/LEF proteínov. Hlavným cieľom diplomovej práce je pokúsiť sa o identifikáciu *pop-1* mRNA izoformy s využitím molekulárno-biologických metód.

1. Synchronizácia populácie *C. elegans*.
2. Stanovenie miery expresie vybraných oblastí génu *pop-1* s využitím kvantitatívnej RT-PCR v reálnom čase. Porovnanie expresného profilu u rôznych vývinových štádií.
3. Identifikácia alternatívnej mRNA izoformy *pop-1* pomocou Northern blot analýzy.
4. Sledovať vplyv alternatívnej izoformy proteínu POP-1 na aktivitu reportérového génu.

## 3 Materiál a metódy

### 3.1 Materiál

Modelový organizmus *Caenorhabditis elegans* je neparazitický druh červa z kmeňa Nematoda. Má priehľadné telo v dospelosti dlhé asi 1 mm. Životný cyklus trvá približne tri dni a prechádza štyrmi larválnymi štádiami (L1 – L4). Väčšinu populácie tvoria hermafrodity, len malé percento samci. Má kompaktný génom, ktorého sekvencia je známa už 20 rokov. Diplomový projekt pracuje s divokým typom *C. elegans* označovaným ako N2.

Bakteriálny kmeň *Escherichia coli* OP50 je v laboratórnych podmienkach štandardne používaný ako zdroj potravy pre *C. elegans*.

### 3.2 Metódy

#### 3.2.1 Kultivácia *C. elegans*

V laboratórnych podmienkach je možné *C. elegans* kultivovať na Petriho miskách s pevným médiom. NGM (Nematode growth medium) poskytuje živnú pôdu pre rast baktérií, ktorými sa *C. elegans* živí a zároveň je prostredím pre jeho normálny vývin a rozmnožovanie. Pre účel dlhodobej kultivácie *C. elegans* bol použitý kmeň *E. coli* OP50. Ten je defektný v syntéze uracilu. Množstvo uracilu je v médiu limitované. Týmto spôsobom sa predchádza prerastaniu bakteriálnej kultúry v médiu (Brenner 1974). Životný cyklus *C. elegans* trvá pri optimálnej teplote 20 °C približne tri dni. Znížením teploty za účelom dlhodobej kultivácie je možné spomalenie životného cyklu.

##### 3.2.1.1 Príprava NGM média

Na prípravu 1 litra NGM média (40 Petriho misiek s priemerom 10 cm) bol pripravený základ z 3 g NaCl; 2,5 g Pepton; 1 l destilovanej H<sub>2</sub>O. Na 250 ml základu sme použili 4,25 g agaru. Médium bolo sterilizované v autokláve. Po ochladení na 55 °C sme pridali:

250 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>

250 µl 1 M MgSO<sub>4</sub>

250 µl cholesterol (5mg/ml 96% etanolu)

6,25 ml 1 M K-P pufru (21,66 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,12 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 ml H<sub>2</sub>O).

Všetky roztoky prešli sterilizáciou. Pripravené médium bolo rozdelené do 10 Petriho misiek. Médium sa pri laboratórnej teplote sušilo 2 – 3 dni.

### 3.2.1.2 Očkovanie baktérii

Kmeň *E. coli* OP50 skladovaný pri -80 °C. Sterilnou špičkou bola bakteriálna kultúra prenesená do 10 ml LB média a inkubovaná cez noc pri 37 °C pri 200 rpm s prístupom kyslíka. Nasledujúci deň sme 150 µl LB média s bakteriálnou kultúrou naočkovali na 10 Petriho misiek. Kultúra bola pri laboratórnej teplote kultivovaná jeden, maximálne dva dni.

### 3.2.1.3 Pasážovanie *C. elegans*

Pasážovanie spočívalo v prenesení malého kusu (0,5 x 0,5 cm) média nesúceho živých jedincov na nové médium s naočkovanou bakteriálnou kultúrou. Pasáže boli prevádzané približne po 8 – 12 dňoch. Kultivačná teplota bola stanovená na 16 °C.

## 3.2.2 Synchronizácia populácie *C. elegans* za účelom získania embryí

Za účelom štúdia RNA výhradne u skorých štádií *C. elegans* boli použitím protokolu „Synchronizácia pomocou bleaching“ získané embryá. Princíp synchronizácie spočíva vo vysokej odolnosti embryonálneho puzdra voči bleaching roztok. zatiaľ čo telá lariev a dospelých jedincov sú jeho pôsobením narušené.

Bleaching roztok (15 ml): 3,75 ml 1M NaOH

8,25 ml H<sub>2</sub>O

3,0 ml SAVO

M9 pufor: 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O do 1 litra; sterilizované

Červy boli prenesené na dostatočný počet Petriho misiek s naočkovanou bakteriálnou kultúrou OP50. Na miskách rástli 2 dni pri 20 °C alebo 3 dni pri 16 °C až do štádia gravidných dospelcov.

Použitím 5 ml M9 roztoku na jednu Petriho misku boli červy prenesené do 15 ml falcon skúmavky (použili sme dva Petriho misky na jednu falcon skúmavku) a centrifugované 1 min. pri rcf 3000 xg.



K peletu bol pridaný bleaching roztok, ktorý pôsobil 3 – 4 min. (stav bol kontrolovaný pod lupou). Pridaním 10 ml M9 bolo pôsobenie bleaching roztoku zastavené. Nasledovala okamžitá centrifugácia 1 min. pri  $rcf$  3000 x g a odstránenie bleaching/M9 roztoku.

V ďalšom kroku bol pelet premytý 10 ml M9, resuspendovaný a centrifugovaný 1 min. pri  $rcf$  3000 xg. Tento krok bol ešte raz zopakovaný.

Získané embryá boli zmrazené v tekutom dusíku a uskladnené pri  $-80$  °C. Následne boli použité k izolácii celkovej RNA.

### 3.2.3 Izolácia celkovej RNA

Celková RNA zo *C. elegans* bola izolovaná použitím TRIzol (Invitrogen™ TRIzol™ Reagent; Thermo Fisher Scientific). Tento protokol bol použitý na prípravu RNA zo zmesnej populácie jedincov a tiež z embryí získaných synchronizáciu.

Zmesná populácia bola prenesená z Petriho misky do 1,5 ml skúmavky použitím 2 ml M9 pufri (časť sa vpila do média) a následne centrifugovaná 3 min. pri  $rcf$  1500 x g. M9 bol odstránený. Vzorka červov bola prečistená od prítomných baktérií 3 krát opakovaným premytím pomocou 1 ml M9 s následnou centrifugáciou (3 min.,  $rcf$  1500 x g). Supernatant bol odstránený a pelet bol 3 – 5 min. sušený.

Pred samotnou izoláciou boli vzorky homogenizované. Homogenizácia je nevyhnutný krok potrebný pre rozrušenie pevnej kutikuly na povrchu tela červa. Po rozmrazení vzoriek a pridaní 1 ml TRIzolu boli vzorky homogenizované opakovaným zamrazovaním v tekutom dusíku a následným ohrievaním na 37 °C. Čas zamrazovania bol 1 min. 30 s. a čas pri 37 °C bol 4 min. 30 s. Homogenizácia prebiehala v ôsmich cykloch.

Po homogenizácii nasledovalo päť opakovaní: 30 s. vortex a 30 s. inkubácia pri laboratórnej teplote, kedy by malo dochádzať k rozvoľneniu komplexov RNA-proteíny.

Pri izolácii RNA je nutné pracovať v digestore a minimalizovať prítomnosť RNáz. Po pridaní 200  $\mu$ l chloroformu, 15 s. vortex a 2 min. inkubácii pri laboratórnej teplote boli vzorky centrifugované pri 4 °C, 21 300 x g, 10 min. Supernatant bol premiestnený do novej skúmavky. K vzorke bolo pridaných 500  $\mu$ l TRIzolu a 200  $\mu$ l chloroformu. Nasledoval 15 s. vortex, 2 min. inkubácia pri laboratórnej teplote a centrifugácia pri 4 °C, 21 300 x g, 10 min. Supernatant bol premiestnený do novej skúmavky a k vzorke bol pridaný rovnaký objem (600 – 700  $\mu$ l) izopropanolu. Po 10 min. inkubácii pri laboratórnej teplote a centrifugácii pri 4 °C, 21 300 x g, 20 min. bol získaný pelet precipitovanej RNA. Ten bol resuspendovaný v 1 ml 75% etanolu a vzorka bola centrifugovaná pri 4 °C, 21 300 x g, 5 min. Po centrifugácii bol všetok etanol odstránený a pelet bol sušený 2 min. Podľa množstva peletu bolo pridané približne rovnaké množstvo (obvykle

20 µl) superčistej H<sub>2</sub>O. RNA bola na ľade inkubovaná 10 min. a následne bola stanovená jej koncentrácia.

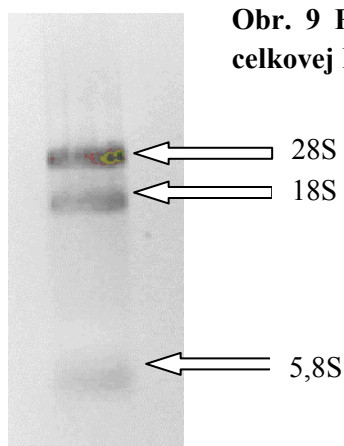
### 3.2.3.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie RNA

Množstvo izolovanej celkovej RNA bolo kvantifikované spektrofotometricky použitím prístroja Eppendorf BioPhotometer D30. Pri meraní bolo možné zistiť i čistotu RNA z pomeru absorbancia nukleových kyselín pri 260 nm/absorbancia proteínov pri 280 nm. Výsledná hodnota tohto pomeru do 2,0 vypovedá o dostatočne čistej RNA. Vzorky RNA boli skladované pri -80 °C.

### 3.2.3.2 Kontrola kvality izolovanej RNA

RNA je citlivá na pôsobenie všadeprítomných RNáz. Integrita RNA bola overená použitím elektroforézy na 1 % agarózovom gély (1 g agarózy v 100 ml 1xTBE). Ako detekčné činidlo bol použitý ethidium bromid. 1 µg RNA bol zmiešaný s 5 µl nanášacieho pufru DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific). RNA bola pri napätí 100V elektroforeticky separovaná a detegovaná v UV transluminátore.

Charakteristickým znakom nedegradovanej RNA je prítomnosť vysokého pomeru 18S a 28S ribozomálnej RNA (Obr. 9).



**Obr. 9** Príklad gélovej elektroforézy celkovej RNA izolovanej zo *C. elegans*

### 3.2.4 Reverzná transkripcia (syntéza cDNA)

Celková RNA izolovaná zo zmesnej populácie a z embryí bola pomocou reverznej transkripcie prepísaná do sekvencie komplementárnej DNA (cDNA). K tomu sme použili

SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). K syntéze cDNA boli použité náhodné hexamery. Reakcie prebiehali v prístroji MJ Mini™ Thermal Cycler (BioRad).

**Tab. 3** Primer mix

REAGENCIE	OBJEM
<b>Celková RNA</b>	Prepočet na 1 µg
<b>10 mM dNTP</b>	0,5 µl
<b>Random Hexamers (50 ng/µl)</b>	0,5 µl
<b>Ultračistá H<sub>2</sub>O</b>	Dopočítať do celkového objemu reakcie 6,5 µl
<b>Inkubácia pri 65 °C 5 min. (denaturácia); na ľad</b>	

**Tab. 4** SuperScript mix

REAGENCIE	OBJEM
<b>5x First Strand Buffer</b>	2 µl
<b>0,1 M DTT</b>	0,5 µl
<b>RNaseOUT (40 U/µl)</b>	0,5 µl
<b>SuperScript III (200 U/µl)</b>	0,5 µl
<b>celkový objem 3,5 µl bol pridaný k primer mixu</b>	
<b>25 °C 10 min. (nasadnutie primerov); 50 °C 60 min (syntéza cDNA); 70 °C 15 min (terminálna reakcia); na ľad</b>	
<b>cDNA bola rozpustená v 40 µl ultračistej H<sub>2</sub>O a uložená do -80 °C</b>	

### 3.2.5 q-RT-PCR: kvantifikácia expresie *pop-1*

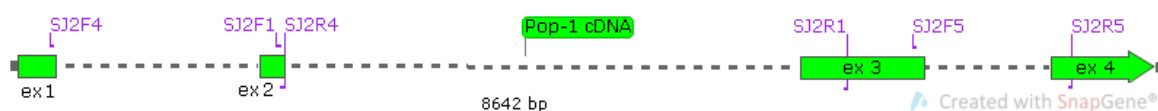
Kvantitatívna RT-PCR v reálnom čase (q-RT-PCR) je nástroj pre kvantifikáciu génovej expresie sledovaných génov na úrovni mRNA (konvertovanej do cDNA). Metóda je založená na meraní intenzity fluorescenčného signálu emitovaného flouorchromom, počas amplifikácie cieľovej sekvencie. Zaznamenaná fluorescencia odráža množstvo amplikónov a tým množstvo templátovej DNA.

### 3.2.5.1 Návrh primerov pre q-RT-PCR

Využitím online nástrojov sme navrhli tri páry primerov (Tab. 5). Bola overená ich špecifita, prevedená predikcia tvorby vláseniiek a primer-dimérov.

**Tab. 5** Primery pre q-RT-PCR

1	FORWARD	3-TAGACGGTGCCGGTCGAA-5	ex 1	SJ2F4
	REVERSE	3-GAGGCATAAACATGGGTAAAGCA-5	ex 2	SJ2R4
2	FORWARD	3-GATACTCGGCAGCTGCTTTACC-5	ex 2	SJ2F1
	REVERSE	3-GCATGTATGGTGGCATTC-5	ex 3	SJ2R1
3	FORWARD	3-GCGGGAAAATTATGCGGTTA-5	ex 3	SJ2F5
	REVERSE	3-CACTTCTTCTCCGCTTGCAG-5	ex 4	SJ2R5



**Obr. 10** Schéma zobrazuje lokalizáciu primerov v sekvencii cDNA génu *pop-1*

Hladinu expresie *pop-1* sme vzťahovali k referenčným génom *pmp-3* a *Y4SF10D.4*, ktorých expresia by mala byť za každých podmienok rovnaká.

**Tab. 6** Referenčné gény

<i>pmp-3</i>		
FORWARD	5-GGATGATGGTGTGCGGATTA-3	ex 6
REVERSE	5-GCCAGCAAACATTCTGAAGAAG-3	ex 7
<i>Y4SF10D.4</i>		
FORWARD	5-CAAGCGTCGGAACAGGAATC-3	ex 2
REVERSE	5-GCCAGGGAAGATGAGGCAAT-3	ex 3

### 3.2.5.2 Príprava q-RT-PCR reakcie a prevedenie analýzy

Reakčný mix bol pripravený v celkom objeme 10  $\mu$ l: 5  $\mu$ l PowerUp™ SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific); 1  $\mu$ l forward+reverse primer (2,5  $\mu$ M) 0,5  $\mu$ l cDNA a 3,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. K analózi sme prístroj CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad).

### 3.2.6 Northern blot

Northern blot je hybridizačná metóda, ktorá sa využíva k analýze génovej expresie na úrovni mRNA. Molekuly mRNA tvoria iba časť celkovej RNA. Majú rôznu dĺžku a pri elektroforetickej separácii celkovej RNA nie sú rozpoznateľné. Pomocou tejto techniky je možné vizualizovať pruh konkrétnej mRNA študovaného génu (Kuthan 2009).

#### 3.2.6.1 Príprava mRNA z celkovej RNA

K separácii mRNA bol použitý GenElute™ mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Princíp separácie spočíval vo väzbe poly(A) konca mRNA na oligo(dT) polystyrénové guľičky s následným viackrokovým premývaním.

#### 3.2.6.2 Príprava RNA próby

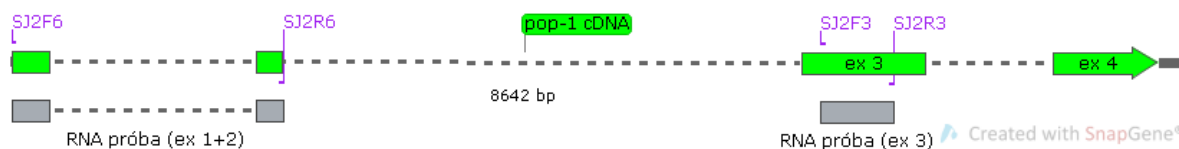
Pomocou *in vitro* transkripcie boli pripravené dve biotínom značené antisense RNA próby. Tomuto kroku predchádzala PCR amplifikácia zvoleného úseku cDNA študovaného génu *pop-1*.

##### i) Amplifikačná reakcia

S využitím primerov z Tab. 7 boli amplifikované dva vybrané úseky génu *pop-1* (Obr. 11). Reverse primery boli doplnené o sekvenciu T7 promótoru, ktorá je v ďalšom kroku – pri *in vitro* transkripcii rozpoznaná T7 RNA polymerázou. Próba 1 bola navrhnutá v oblasti exónu 1 – 2, próba 2 v exóne 3.

**Tab. 7 Primery navrhnuté na prípravu RNA próby.** Reverse primery obsahujú vyznačenú sekvenciu T7 promótoru a sú doplnené o „GCGCG“ sekvenciu, ktorá zlepšuje nasadenie T7 RNA polymerázy

1	FORWARD	5-ATGATGGCCGACGAAGAGCTCG-3	exon 1	SJ2F6
	REVERSE	5-GCGCG-TAATACGACTCACTATAGGG- TGGATTCATAAATAGAGGCATAAACAT-3	exon 2	SJ2R6
2	FORWARD	5-GTCCTGTCTATGGAGCAGCAATC-3	exon 3	SJ2F3
	REVERSE	5-GCGCG-TAATACGACTCACTATAGGG- TCATGCCACCTCTTTCCAAGCTC-3	exon 3	SJ2R3



**Obr. 11** Schéma zobrazuje lokalizáciu primerov navrhnutých pre Northern blot

Na amplifikáciu zvoleného úseku cDNA bola použitá vysoko procesívna DNA polymeráza Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific).

**Tab. 8** PCR reakcia pre amplifikáciu zvoleného úseku cDNA

REAGENCIE	OBJEM
<b>Phusion Hot Start II DNA Polymerase</b>	0,5 µl
<b>10 µM dNTP</b>	1 µl
<b>5x Phusion HF Buffer</b>	10 µl
<b>100 µM Forward Primer</b>	0,25 µl
<b>100 µM Reverse Primer</b>	0,25 µl
<b>cDNA</b>	1 µl
<b>Ultračistá H<sub>2</sub>O</b>	37 µl
<b>Touchdown PCR</b>	

Touchdown PCR je metóda, kde v priebehu cyklov dochádza k znižovaniu teploty. Tým je možné zvýšiť špecifickosť primerov pre cieľovú sekvenciu a získať tak väčší výtlačok požadovaného amplikónu. Priebeh Touchdown PCR:

98 °C 2 min.      úvodná denaturácia

{ 98 °C 10 s  
 72 °C 2x; 70 °C 4x; 68 °C 6x; 66 °C 35x; 10 s  
 72 °C 20 s

72 °C 5 min.      záverečné dosyntetizovanie amplikónov

Produkt PCR bol po 50  $\mu$ l (+ 5  $\mu$ l nanášacieho purfu) nanosený na 1,5 % agarózový gél. Elektroforéza prebiehala pri 100V. Dĺžka amplikónov bola porovnaná s veľkostným markerom GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; (Thermo Fisher Scientific).

DNA bola z gélu vyrezaná a následne extrahovaná použitím kitu MinElute Gel Extraction (QIAGEN). Extrakcia prebiehala s využitím špeciálnych centrifugačných kolónkových skúmaviek a sady pufrov na prečistenie DNA. Následne bola zmeraná koncentrácia a čistota extrahovanej DNA.

## ii) *In vitro* transkripcia

Ďalším krokom v príprave Northern próby bola *in vitro* transkripcia, kedy bola z amplifikovanej DNA pripravená biotínom značená antisense RNA próba. K reakcii bola použitá T7 RNA Polymerase (Sigma-Aldrich). Táto RNA polymeráza využíva k syntéze RNA T7 promótor lokalizovaný v reverse primery a do vznikajúce reťazca inkorporuje UTP nukleotidy značené biotínom. K tomu bol použitý Biotin RNA labeling mix (Sigma-Aldrich).

**Tab. 9** Reakcia pre *in vitro* transkripciu

REAGENCIE	OBJEM
<b>T7 RNA Polymerase (20 U/<math>\mu</math>l)</b>	1 $\mu$ l
<b>10x T7 RNA Pol Buf</b>	1 $\mu$ l
<b>10x Biotin RNA labeling mix</b>	1 $\mu$ l
<b>RNase OUT (40 U/<math>\mu</math>l)</b>	0,25 $\mu$ l
<b>DNA produkt 1.PCR reakcie</b>	Prepočet na 250 ng
<b>Ultračistá H<sub>2</sub>O</b>	Dopočítať do celkového objemu 10 $\mu$ l
<b>37 °C 2 hod.</b>	
<b>RNA<sup>biotin</sup> bola rozpustená v 90 <math>\mu</math>l ultračistej H<sub>2</sub>O</b>	

Získaná RNA<sup>biotin</sup> bola prečistená použitím RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN). Ten umožňuje koncentrovať a vyčistiť RNA od reagensov a vzoriek z predchádzajúcich krokov. K purifikácii sa využíva sada centrifugačných kolónkových skúmaviek, špeciálnych pufrov a etanol.

Následne bola zmeraná koncentrácia RNA a vzorky boli nanosené na 2% agarózový gél za účelom overenie veľkosti pripravenej RNA<sup>biotin</sup> próby. Ako veľkostný marker bol použitý GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; (Thermo Fisher Scientific).

### 3.2.6.3 Samotná Northern blot analýza

Po príprave RNA<sup>biotin</sup> próby a separácii mRNA bola prevedená samotná Northern blot analýza, ktorá pozostávala z niekoľkých krokov: elektroforéza RNA, prenos RNA na membránu, prehybridizácia a hybridizácia so sondou, premývanie a vyvolanie filmu. K tomu bol použitý NorthernMax kit (Ambion).

#### i) Elektroforéza

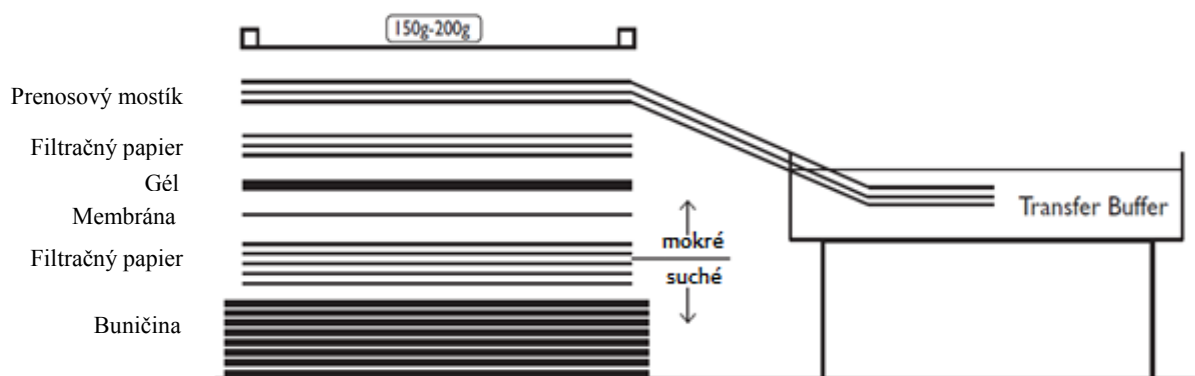
Pri príprave gélu je nutné používať sklo ošetrené proti RNázam a pracovať v digestore. Všetky použité reagensie boli súčasťou kitu NorthernMax. Denaturačný gél s hrúbkou 0,6 cm bol pripravený z 0,6 g Agarose-LE a 54 ml utračistej H<sub>2</sub>O. Po ochladení agarózy na 55 °C, bolo pridaných 6 ml 10x Denaturing Gel Buffer. Na elektroforézu bol pripravený pufráčny roztok z 50 ml MOPS Gel Running Buffer a 450 ml utračistej H<sub>2</sub>O.

**Príprava vzoriek RNA:** 2 µg mRNA boli zmiešané s trojnásobným objemom Formaldehyde Load Dye. Vzorky boli inkubované 10 min. pri 70 °C (denaturácia sekundárnych štruktúr) a hneď uložené na ľad.

RNA bola nanesená na gél. Ako veľkostný marker bol použitý RiboReady™ Color 1kb RNA ladder (VWR). Elektroforéza prebiehala pri napätí 100V približne 2 – 3 hod.

#### ii) Prenos (blot) RNA z gélu na membránu

Princíp prenosu spočíva v pôsobení kapilárnych síl kvapaliny (Transfer Buffer) smerom ku kladne nabitej membráne. K tomuto účelu bola použitá nylonový membrána Zeta Probe Blotting membrane (BioRad). Podľa schémy (Obr. 12) bola zostavená aparátúra, ktorá prenos umožnila. Prenos prebiehal 2 hod.



**Obr. 12 Aparatúra pre prenos RNA z gélu na membránu**

Aparatúra bola zložená (smerom zdola hore): 3 cm vrstva buničiny, 3 suché a 2 mokré filtračné papiere, membrána, gél, 3 mokré filtračné papiere, mostík z troch vrstiev mokrého filtračného papiera, ktorý bol ponorený do transfer pufru. Spodná časť aparatúry (od membrány dole) bola od prostredia oddelená fóliou, aby sa predišlo odparovaniu.



Membrána bola opláchnutá v MOPS puffri a tým prečistená od zvyškov gélu. RNA bola na membráne fixovaná pomocou UV žiarenia (254 nm).

### **iii) Prehybridizácia a hybridizácia**

Membrána bola v prvom kroku prehybridizovaná s ULTRAhyb® Buffer 30 min. pri 68 °C. Ďalším krokom bola samotná hybridizácia. 0,7 µl RNA próby bolo rozpustenej v 500 µl ULTRAhyb® Buffer a membránu sme nechali so sondou hybridizovať cez noc pri 68 °C.

### **iv) Premývanie**

Pomocou Low Stringency Wash Solution #1, High Stringency Wash Solution #2 sme v niekoľkých premývacích krokoch odmyli nešpecificky viazanú próbu. Membrána bola inkubovaná s blokovacím pufrom a konjugátom (Streptavidin), ktorý je s vysokou afinitou nešpecificky viazaný biotínom. Následne bola membrána viacnásobne premývaná.

Membrána bola vložená X-ray kazety, kde bola inkubovaná s chemoluminiscenčným substrátom Luminol/Enhancer Solution Stable Peroxide.

### **v) Vyvolanie filmu**

Film bol vyvolávaný pri 10, 5, 2 a 1 minútovej expozícii.

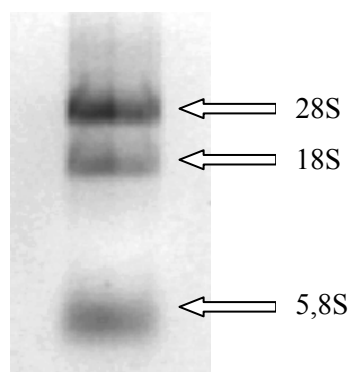
## 4 Výsledky

V tejto diplomovej práci sme sa pokúsili o identifikáciu alternatívnej mRNA izoformy génu *pop-1* u modelového organizmu *Caenorhabditis elegans*. Zdrojovou informáciou bola celková RNA izolovaná z embryí a zo zmesi jedincov v rôznych vývinových štádiách (embryá, larvy L1 – L4, dospelce). Embryá boli získané metódou synchronizácie. Jednalo sa o embryá v štádiu intrauterinného vývinu, časť mohli tvoriť i vajíčka neoplodnené.

Hlavným cieľom našej práce bolo overiť, či je u *pop-1* exprimovaná okrem mRNA v plnej dĺžke, i iná mRNA s dĺžkou odlišnou. S týmto zámerom sme uskutočnili niekoľko analýz. Pomocou metódy kvantitatívnej PCR v reálnom čase sme merali hladinu expície vybraných oblastí génu *pop-1*. Technikou Northern blot s využitím dvoch hybridizačných sond sme sa pokúsili zistiť, či je možné vizualizovať okrem mRNA transkriptu s plnou dĺžkou i transkript skrátený.

### Izolácia celkovej RNA z *C. elegans*

Východiskovou molekulou pre všetky analýzy tejto diplomovej práce bola RNA izolovaná z embryí a zo zmesnej vzorky jedincov.



**Obr. 13 Celková RNA izolovaná zo *C. elegans***

Na obrázku sú vyznačené pruhy ribozomálnej RNA, ktorej množstvo v celkovej RNA prevažuje

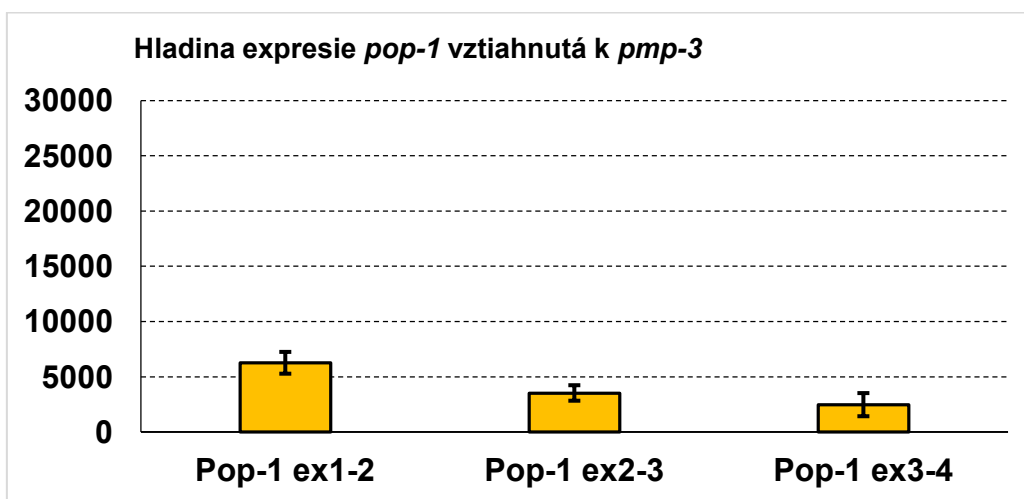
### Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie RNA

Koncentrácia izolovanej celkovej RNA sa pohybovala medzi 700 – 1100 ng/μl. Čistota RNA stanovená z pomeru absorbanie nukleových kyselín a proteínov  $A_{260}/A_{280}$  bola v priemere 1,88.

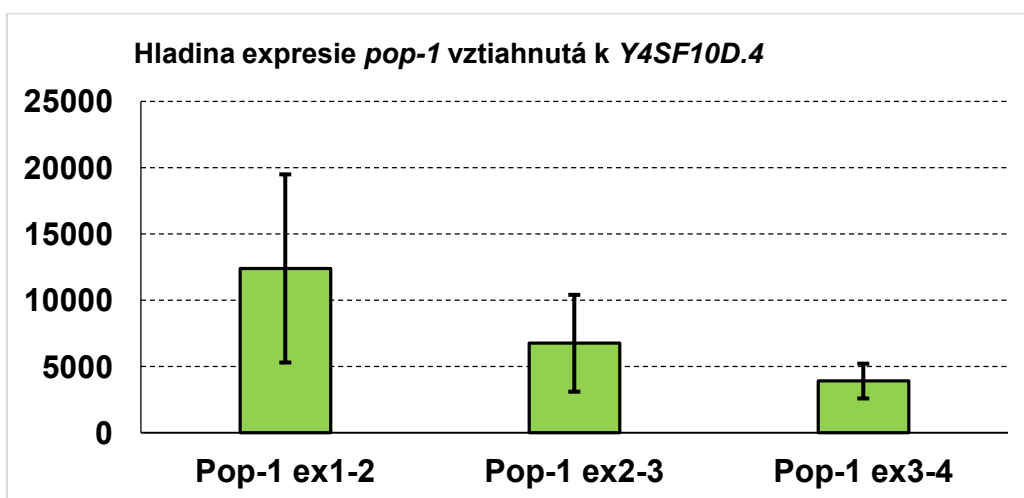
## 4.1 Analýza expresie vybraných oblastí génu *pop-1* metódou q-RT-PCR

Využitím techniky q-RT-PCR sme sledovali mieru expresie troch oblastí génu *pop-1*. Prvý pár primerov bol navrhnutý tak, aby amplifikovali úsek zahŕňajúci časť exónu 1 a 2; druhý pár amplifikoval časť exónu 2 a 3, tretí pár oblasť exónu 3 a 4 (Obr. 10). Výsledky (Graf 1 – 4) ukazujú expresný profil týchto oblastí vzťahnuté k expresii referenčných génov *pmp-3* a *Y4SF10D.4*. Merania boli prevádzané na vzorke jedincov v rôznych štádiách vývinu (Graf 1 a 2) a na vzorke embryí v rannom vývinovom štádiu (Graf 3 a 4).

### 4.1.1 Expresný profil *pop-1* stanovený pomocou q-RT-PCR u zmesi jedincov *C. elegans* v rôznych vývinových štádiách<sup>7</sup>

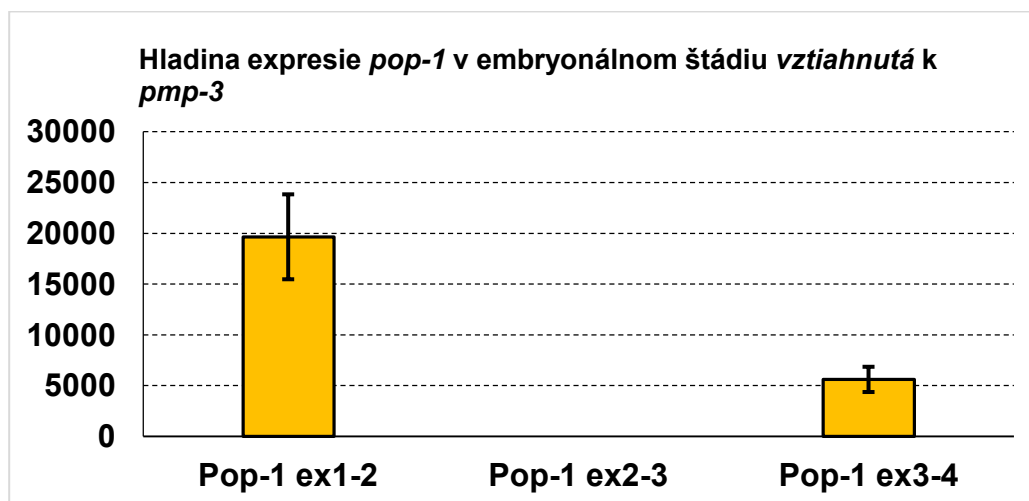


Graf 1

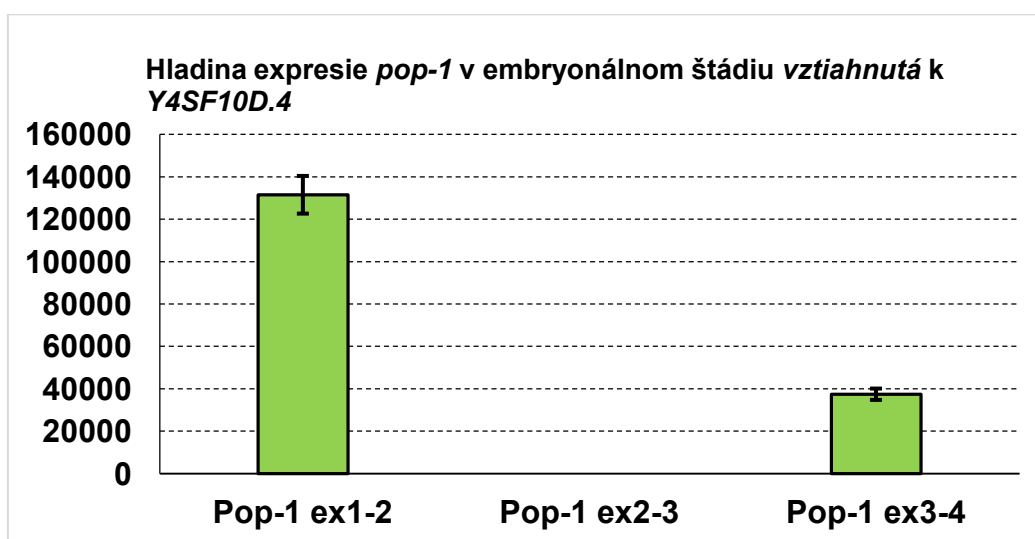


Graf 2

#### 4.1.2 Expresný profil *pop-1* stanovený pomocou q-RT-PCR u *C. elegans* embryí



Graf 3



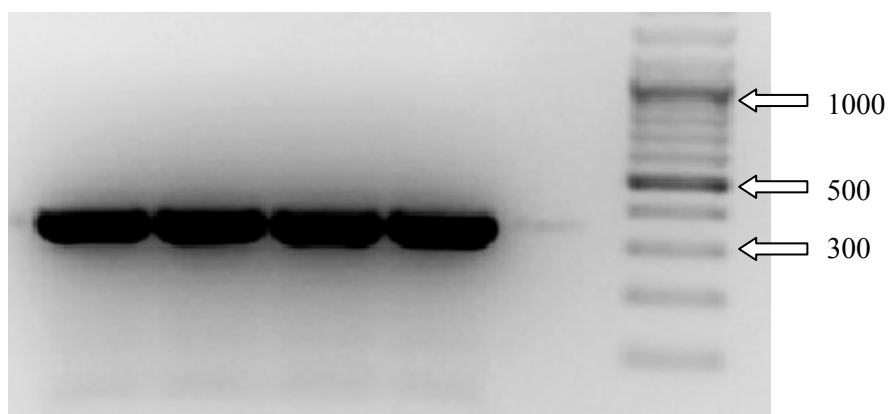
Graf 4

Výsledky q-RT-PCR ukazujú v akej miere bola u skúmaných vzoriek exprimovaná *pop-1* mRNA. Hladina expresie jednotlivých oblastí (ex1-2, ex2-3, ex3-4) má klesajúci charakter, čo napovedá o tom, že u skúmaných vzoriek nie je prítomná mRNA izoforma, ktorá by bola skrátaná na 5'konci. Práve naopak, mohlo by sa jednať o mRNA s variantnou dĺžkou 3'konca.

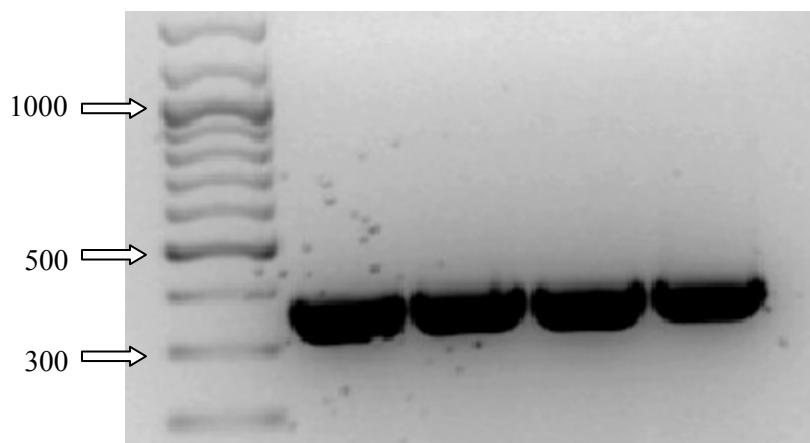
Hladina expresie *pop-1* mRNA stanovená u embryí (Graf 3 a 4) nemusí byť relevantná, pretože analýzu sa nám podarilo uskutočniť len raz a mohlo dôjsť k chybe merania. Avšak, podľa získaných dát existuje možnosť, že je u embryí *C. elegans* v skorých štádiách vývinu prítomná mRNA izoforma, u ktorej oblasť s miestom väzby aspoň jedného z páru primerov, chýba (Obr. 10, Tab. 5). To môže vysvetliť absenciu mRNA s oblasťou ex2-3, ktorú sme u vzorky z embryí stanovili. Pre získanie hodnoverného výsledku je potrebné meranie opakovať.

## 4.2 Northern blot analýza

Hybridizačnou metódou Northern blot sme sa pokúsili overiť prítomnosť alternatívneho mRNA transkriptu génu *pop-1*. Myšlienkou experimentu bolo zobrazit' dva prúžky, v prípade, že je u *pop-1* prítomný okrem transkriptu s plnou dĺžkou i mRNA transkript kratší. Na tento účel boli navrhnuté dva hybridizačné sondy – antisense RNA značené biotínom. Próby boli pripravené počiatočnou amplifikáciou vybraného úseku cDNA, následne boli amplikóny použité ako templát pre syntézu antisense RNA.



**Obr. 14 Príprava próby 1:** amplifikácia cDNA v exóne 1 – 2



**Obr. 15 Príprava próby 2:** amplifikácia cDNA v exóne 3

cDNA bola z gélu extrahovaná a bola stanovená jej koncentrácia:

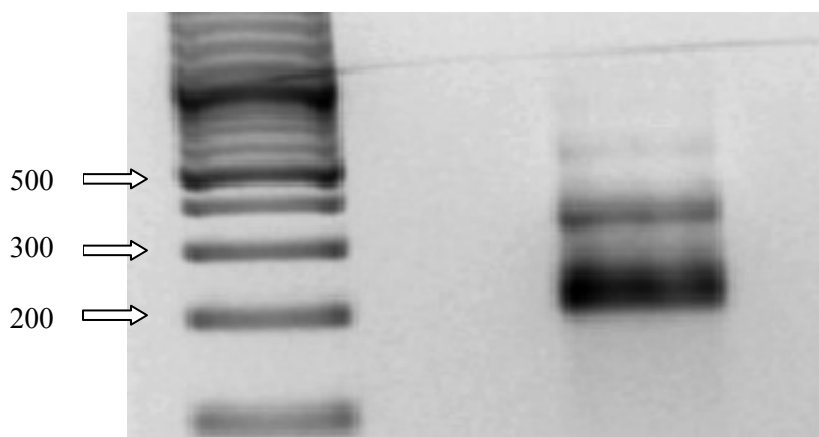
próba 1     $c = 429 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $A_{260}/A_{280} = 1,79$

próba 2     $c = 298 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $A_{260}/A_{280} = 1,83$

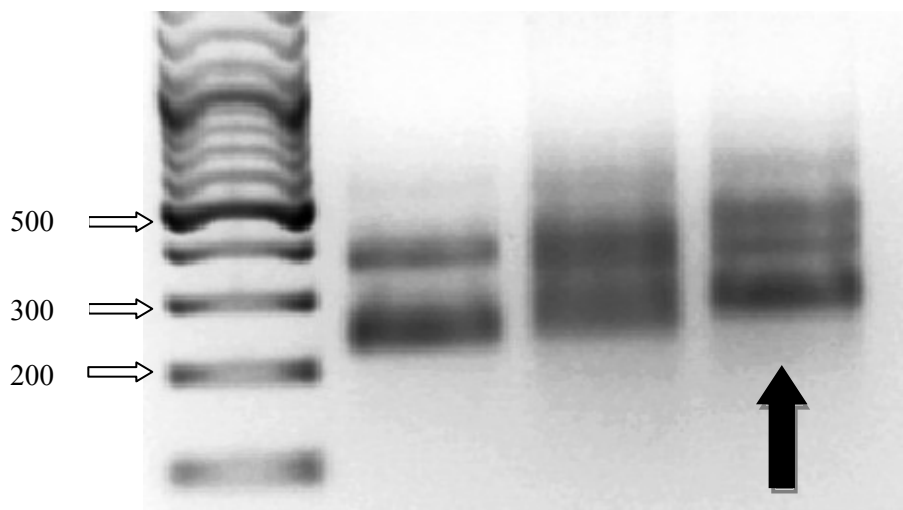
Amplifikovaná cDNA bola v ďalšom kroku pomocou *in vitro* transkripcie prepísaná do sekvencie antisense RNA so značenými UTP nukleotidmi. K transkripcii bol použitý T7 promótor lokalizovaný v reverse primery, ktorý umožnil T7 RNA polymeráze syntézu antisense RNA reťazca. Následne bola RNA prečistená a bola stanovená jej koncentrácia:

próba 1  $c = 183 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $A_{260}/A_{280} = 1,92$

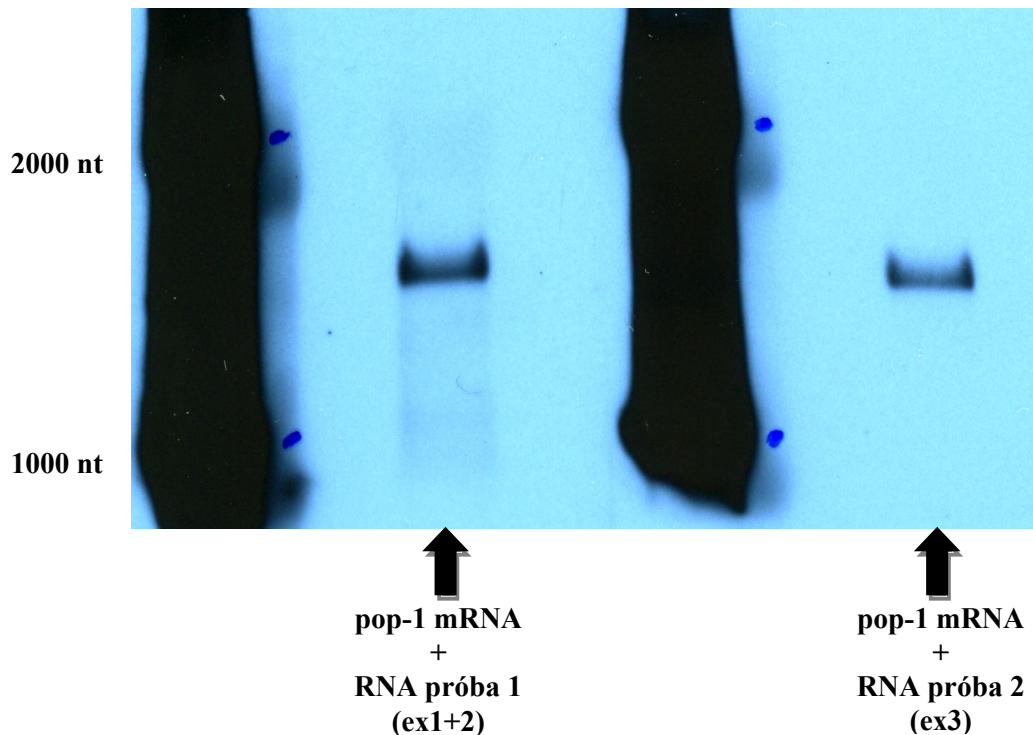
próba 2  $c = 166 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $A_{260}/A_{280} = 2,0$



**Obr. 16** Antisense RNA<sup>BIOTIN</sup> **próba 1** pripravená pomocou *in vitro* transkripcie.



**Obr. 17** Antisense RNA<sup>BIOTIN</sup> **próba 2** (vyznačená šípkou) pripravená pomocou *in vitro* transkripcie.



**Obr. 18** Výsledok Northern blot analýzy. Šípkami vyznačené pruhy zobrazujú *pop-1* mRNA označenú hybridizačnými próbami 1 a 2.

Využitím metódy Northern blot sme zobrazili *pop-1* mRNA označenú dvomi rôznymi hybridizačnými sondami. Próby boli vytvorené pomocou *in vitro* transkripce ako antisense vlákna špecifické pre vybrané oblasti *pop-1* mRNA. Próba 1 bola navrhnutá tak, aby viazala *pop-1* mRNA v oblasti exónu 1 a 2. Próba 2 bola špecifická pre časť exónu 3 (Obr. 11). Výsledok analýzy (Obr. 18) v oboch prípadoch (využitím próby 1 a próby 2) zobrazuje jeden zreteľný pruh zodpovedajúci známemu transkriptu *pop-1* (W10C8.2) s dĺžkou 1549 nukletidov. Ak by bolo u vzorky prítomné dostatočné množstvo transkriptu s rozdielnou dĺžkou a zároveň obsahujúce oblasti viazané próbami, bolo by možné pozorovať pruhy dva. Na základe výsledku nami prevedenej analýzy, môžeme konštatovať, že u skúmanej vzorky – zmes jedincov *C. elegans* v rôznych vývinových štádiách, nie je prítomná mRNA, ktorá by sa dĺžkou výrazne odlišovala od známej mRNA s plnou dĺžkou. Množstvo alternatívneho transkriptu však môže byť natoľko nízke, že ho nie je možné touto metódou detegovať. Ďalšou možnosťou je, že dĺžkou sa alternatívna mRNA od tej plno-dĺžkovej odlišuje len v malej miere, ktorú nie je možné pomocou Northern blot metódy vizualizovať. Jednou z možností, ktorá by vysvetľovala tento výsledok je, že došlo k nešpecifickému vyviazaniu mRNA na použitý veľkostný marker, ktorý na Obr. 18 dáva príliš silný signál. Nedostatočné množstvo mRNA, spôsobené jej vyviazaním na veľkostný marker by mohlo byť dôvodom, prečo hľadaná alternatívna mRNA (vyskytujúca sa pravdepodobne v minoritnom množstve) nebola detegovaná. Analýza bola opakovaná tri krát s podobným výsledkom.

## 5 Diskusia

Signálna dráha Wnt sa podieľa na regulácii mnohých vývinových procesov. V dospelosti je v ľudskom organizme dôležitým regulátorom sebaobnovy kmeňových buniek (Clevers, Loh, and Nusse 2014) a tiež zabezpečuje základné funkcie mozgu (Oliva, Vargas, and Inestrosa 2013).

Fakt, že cieľovými génmi dráhy Wnt sú mnohé regulátory proliferácie a migrácie buniek, je jedným z dôvodov, prečo je dráha Wnt tak intenzívne študovaná. Jej neprimeraná aktivita môže mať významnú rolu pri vzniku a progresii nádorových ochorení.

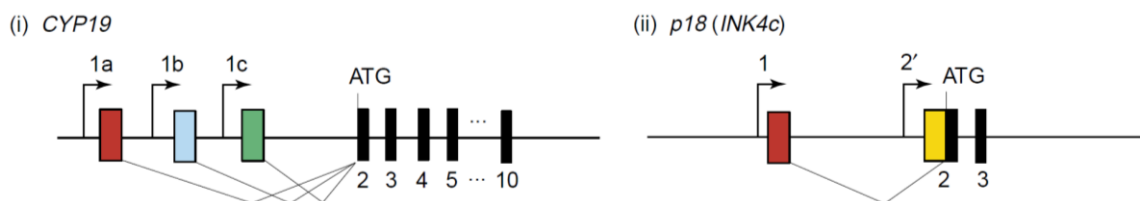
Komponenty dráhy Wnt sú kódované evolučne konzervovanými génmi. Základné princípy signalizácie Wnt je možné pozorovať ako u organizmov nižších, tak u stavovcov a človeka. Kanonická dráha Wnt je na povrchu bunky aktivovaná Wnt ligandmi. Ich väzba k receptoru vedie k udalostiam, ktoré vypnú aktivitu  $\beta$ -katenin-deštrukčného komplexu. Stabilný  $\beta$ -katenin vstupuje do jadra, kde pôsobí ako transkripčný aktivátor. K regulačným sekvenciám cieľových génov sa viaže prostredníctvom proteínov TCF/LEF (Logan and Nusse 2004). Mechanizmus aktivácie transkripcie cieľových génov dráhy Wnt u nižších organizmov prebieha ako transkripčný „switch“, kedy transkripčný faktor TCF prechádza po väzbe  $\beta$ -kateninu z funkcie represora do úlohy aktivátora transkripcie. (Cadigan and Waterman 2012)

Rodina štyroch génov *TCFL/LEF* u stavovcov dáva vznik funkčne špecializovaným proteínom, u ktorých je mechanizmus transkripčnej aktivácie/represie o niečo komplikovanejší. TCF7L1 je podľa doterajších poznatkov spájaný s úlohou transkripčného represora, LEF1 s funkciou aktivátora. TCF7 a TCF7L2 majú dvojaký efekt. Okrem toho, každý z členov génovej rodiny produkuje široké spektrum transkripčných variant (výnimkou je TCF7L1, ktorý je na varianty chudobný). Pôsobením alternatívnych promótorov (na úrovni transkripcie) a následkom alternatívneho zostrihu pre-mRNA (post-transkripčný mechanizmus), sú vznikajúce proteínové izoformy schopné špecializovať svoju funkciu a to v závislosti od kontextu – typu bunky/tkaniva a vývinového stupňa (Mao and Byers 2011).

Predpokladá sa, že takmer polovica ľudských proteín-kódujúcich génov obsahuje viacero promótorov (Davuluri et al. 2008; Pal et al. 2011). Alternatívne promótory produkujú z jedného génového lokusu rôzne transkripty v závislosti od typu tkaniva a vývinového štádia organizmu. U proteín-kódujúcich génov môže mať transkripcia z alternatívneho promótoru niekoľko funkčných následkov:

- (a) Vznikajú mRNA varianty, ktoré obsahujú alternatívny iniciálny exón, avšak zdieľajú ten istý translačný štart (ATG) a otvorený čítací rámec (ORF). Kódujú identický proteín, ale odlišujú sa 5' neprekľadanou oblasťou (5'UTR), čo vplýva na stabilitu transkriptu a efektivitu translácie (Davuluri et al. 2008).

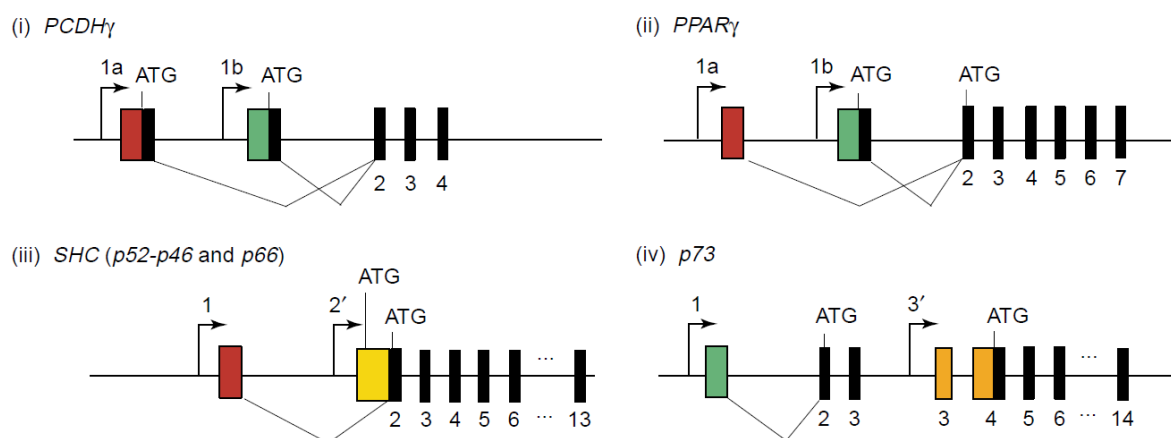




**Obr. 19 Alternatívne promotory produkujúce transkripty s rozdielnou 5'UTR**

Na príklade génov *CYP19* a *p18 (INK4c)* schéma zobrazuje promotory (reprezentované šípkami), ktoré dávajú vznik variantným mRNA. Alternatívne mRNA obsahujú odlišný iniciálny exón (farebný box) a spoločné kódujúce exóny (čierné boxy). Ako ATG je označený začiatok translácie, ktorý je spoločný pre všetky transkripty – výsledný proteín vzniká v nezmenenej forme. Prevzaté a upravené od Landry, Mager, and Wilhelm 2003

(b) Pôsobením alternatívnych promótorov môžu vznikať transkripty, ktorých 5' exóny obsahujú alternatívny translačný štart, kódujúce proteínovú izoformu s variantným N-koncom (Obr. 20 i, ii, iii). V inom prípade, ak je promótor lokalizovaný v intrónovej oblasti, vznikajú izoformy N-terminálne skrátene (Obr. 20 iv) (Landry, Mager, and Wilhelm 2003).



**Obr. 20 Variantné mRNA vznikajúce pôsobením alternatívnych promótorov kódujúce proteínové izoformy**

Na príklade troch rôznych génov (i, ii, iii) schéma zobrazuje alternatívne promotory, ktoré dávajú vznik variantným mRNA s odlišným 5' iniciálnym exónom (farebný box) nesúcim alternatívny translačný štart (ATG). Výsledný proteín nesie rozdielny N-terminálny koniec. V prípade génu *p73* sa transkripcia spúšťa z alternatívneho promótoru, ktorý je lokalizovaný v intróne – vzniká tak proteínová izoforma N-terminálne skrátene. Prevzaté a upravené od Landry, Mager, and Wilhelm 2003

Ludské a myšie gény *TCF/LEF* produkujú vďaka alternatívnym promótorom mRNA izoformy kódujúce proteíny so skrátеныm N-terminálnom koncom (Hoppler and Waterman 2014). V prípade *LEF1* a *TCF7* je tento promótor lokalizovaný v oblasti druhého intrónu (Li et al. 2006; van de Wetering et al. 1996). Vyvážená expresia týchto izoformiem je nevyhnutná pre zachovanie funkcie zdravého tkaniva (Najdi et al. 2009). Alternatívny promótor *TCF7L2* v exóne 5 u *Xenopus* a myši dáva vznik izoforme, ktorá má v embryonálnom vývine nezastupiteľnú úlohu, a to najmä pri vývine mozgu (Vacik, Stubbs, and Lemke 2011). Absencia prinajmenšom prvého exónu má na štruktúru výsledného proteínu značný funkčný dopad. Gény *TCF/LEF* kódujú v prvom exóne doménu pre väzbu  $\beta$ -kateninu. Podobne ako ich plno-dĺžkové formy, sú tieto skrátené proteíny schopné viazať regulačné oblasti cieľových génov a asociovať s korepresormi. Neprítomnosť  $\beta$ -katenin-väzobnej domény má za následok, že takáto izoforma pôsobí ako konštitutívny represor i napriek aktívnemu Wnt signalizovaniu. Dominantne negatívne izoformy TCF/LEF sú dôležitými transkripčnými regulátormi zdravo vyvíjajúceho sa organizmu. Na druhej strane, ich neprimeraná aktivita je asociovaná s vývinovými defektmi a nádorovými ochoreniami (Najdi et al. 2009).

Dobre preštudovaným príkladom transkripčného faktora, ktorý vďaka intrónovému promótoru produkuje izoformu s dominantne negatívnou funkciou, je gén *p53* (ako aj gény *p63* a *p73*). Významnú úlohu tohto promótoru zdôrazňuje fakt, že je konzervovaný od *D. melanogaster* po človeka (Bourdon et al. 2005) V roku 2002 bola u *D. melanogaster* skupinou Henriksen et al. popísaná N-terminálne skrátená izoforma transkripčného faktora STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), ktorá má v skorých štádiách embryogenézy úlohu transkripčného represora. N-terminálnej doméne proteínu STAT u vyšších organizmov (podobne ako u *D. melanogaster*) sa pripisuje viacero funkcií – oligomerizácia, stabilizácia väzby k DNA, interakcia s regulačnými proteínmi, nukleárna translokácia. STAT ortológ u *C. elegans* a *Dictyostelium*<sup>4</sup>, N-terminálna doména úplne chýba. V prípade proteínu STAT u *Dictyostelium* absentuje i C-koncová transaktivačná doména. Wang and Levy 2006 usudzujú, že sa pôvodne jednalo o proteíny s represívnou funkciou, ktoré počas evolúcie nadobudli domény umožňujúce aktiváciu transkripcie cieľových génov.

Komplexitu transkriptómu okrem spomínaných mechanizmov (pôsobenie alternatívnych promótorov, alternatívny zostrih a alternatívna iniciácia translácie) rozširuje proces alternatívnej polyadenylácie. Tento post-transkripčný mechanizmus využíva alternatívny polyadenylačný signál a dáva vznik transkripčným variantám s rôznou dĺžkou 3'konca. Všetky spomínané procesy sú navzájom veľmi úzko prepojené (de Klerk and 't Hoen 2015). Zaujímavým príkladom je proteínová izoforma produkovaná génom *TCF7L2*, ktorá vzniká vďaka alternatívnemu

---

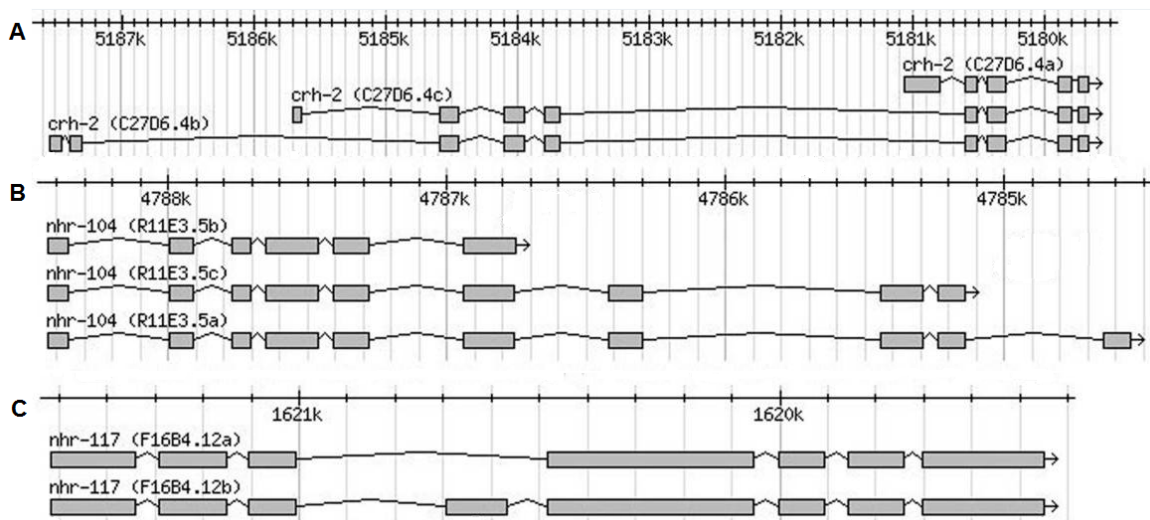
<sup>4</sup> *Dictyostelium discoideum* je druh améby, používaný ako modelový organizmus, ktorý nesie znaky jednobunecných a zároveň mnohobunecných organizmov

polyadenylačnému signálu v intróne 4. Výsledný proteín nesie N-terminálne lokalizovanú  $\beta$ -katenin-väzobnú doménu, ale nedisponuje doménou HMG a nie je schopný väzby k molekule DNA. Predpokladá sa, že táto izoforma môže mať úlohu pri vyvážovaní voľného  $\beta$ -kateninu (Locke et al. 2011).

Mechanizmus alternatívnej polyadenylácie je v súčasnosti študovaný a v značnej miere využívaný takisto u *C. elegans*, kde je expresia alternatívnych poly(A) izoformiem spájaná s tkanivovou špecificitou (Blazie et al. 2017)

Génová expresia a spracovávanie mRNA u *C. elegans* sa vyznačuje pár vlastnosťami, ktorými sa tento organizmus odlišuje od mnohých iných Metazoa. 1. Niektoré gény sú exprimované v spoločnom operóne. 2. Podstatná časť mRNA podstupuje proces *trans*-zostrihu (Choi and Newman 2006). *Trans*-zostrih je proces, pri ktorom je zostrihovaný 5' koniec pre-mRNA a následne je nahradený jednou z 22 SL1 sekvencií. Mechanizmus *trans*-zostrihu je úzko prepojený so zostrihom intrónov. U približne 30% génov *trans*-zostrih neprebíha. Zvyšná časť génov je organizovaná v klastroch, podobných bakteriálnym operónom. Tieto gény podstupujú *trans*-zostrih so sekvenciou SL2. Gény v spoločnom klastri sú transkribované zo spoločného promótoru, pričom jeden operón môže obsahovať 2 až 8 génov. Ide primárne o gény nevyhnutné pre funkciu mitochondrií a gény transkripčnej, translačnej a zostrihovej mašinerie (Blumenthal 2005). Pri práci s organizmom *C. elegans* je potrebné tieto fakty zohľadniť.

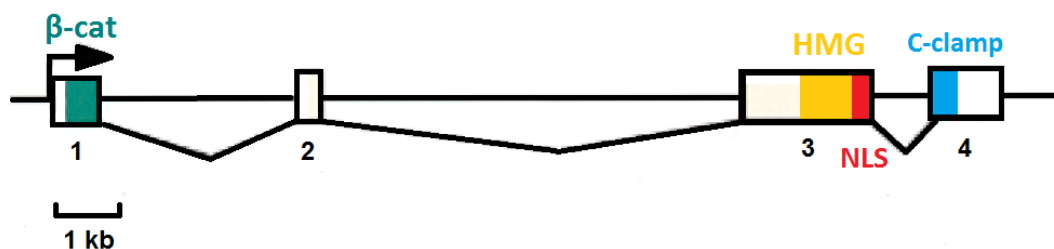
Na základe analýz expresných paternov skupina Craig et al. zdôrazňuje, že približne 200 génov pre transkripčné faktory u *C. elegans* anotovaných do roku 2013 vo WormBase kóduje prinajmenšom dve rôzne izoformy. Z toho, 50 identifikovaných génov obsahuje alternatívne transkripčné štarty, 23 génov alternatívne transkripčné konce, 35 génov, u ktorých má úlohu alternatívny zostrih a 34 génov využívajúcich kombinácie týchto mechanizmov.



**Obr. 21** Príklady ilustrujúce spôsoby vzniku transkripčných variant pre gény kódujúce transkripčné faktory u *C. elegans*

**A/** Alternatívne transkripty s unikátnym iniciálnym exónom *crh-2* génu. **B/** Transkripčné varianty *nhr-104* so skráteným 3' koncom. **C/** Zalečlenenie alternatívneho exónu u *nhr-117*. Schéma zobrazuje výsledky analýz expresných paternov, zdrojom použitých dát je databáza WormBase. Prevzaté a upravené od Craig et al. 2013

V tomto diplomovom projekte sme sa pokúsili o identifikáciu alternatívnej mRNA izoformy génu *pop-1* u *Caenorhabditis elegans*. POP-1 je jediným ortológom ľudských transkripčných faktorov TCF/LEF. Štruktúra génu *pop-1* je pomerne jednoduchá. Kódujúcu časť tvoria 4 exóny. V prvom exóne je kódovaná  $\beta$ -katenin-väzobná doména. V treťom exóne je lokalizovaná sekvencia pre doménu HMG nasledovaná nukleárnym lokalizačným signálom. Štvrtý exón kóduje doménu C-clamp. Oblasť zahŕňajúca exón 2 a časť exónu 3 kóduje miesta, kde je proteín POP-1 regulovaný prostredníctvom fosforylácie (Robertson et al. 2011).



**Obr. 22** Štruktúra génu *pop-1* s vyznačenými exómni a funkčnými doménami. Prevzaté a upravené od Hovanes, Li, and Waterman 2000.

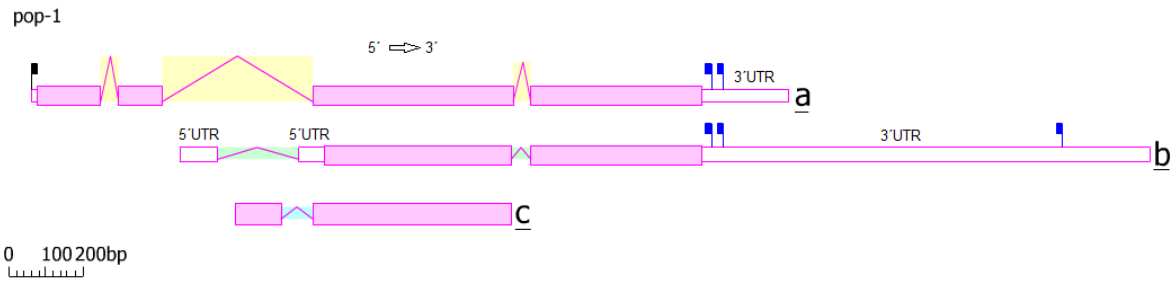
Tento gén kóduje proteín POP-1, ktorý plní úlohu transkripčného faktora v závislosti od aktivity Wnt signálnej dráhy. Má zásadnú úlohu v najrannejších štádiách embryogenézy, kde sa

jeho asymetrická distribúcia podieľa na ustanovení antero-posteriálnej osi embrya . (Lin, Hill, and Priess 1998). Rozhodujúcim faktorom, ktorý vplyva na transkripčnú aktivitu proteínu POP-1 je jeho koncentrácia v jadre. Ako aktivátor transkripcie cieľových génov pôsobí pri nízkej koncentrácii, v prítomnosti vysokej hladiny  $\beta$ -kateninu/SYS-1, ktorý sa následkom Wnt stimulácie hromadí v jadre. V opačnom prípade, kedy je jeho koncentrácia vysoká a SYS-1 nízka, pôsobí ako transkripčný represor (Phillips and Kimble 2014). Jedným z mechanizmov, ktorý zodpovedá za znižovanie hladiny POP-1 v jadre je fosforylácia sprostredkovaná kinázou LIT-1 nasledovaná jeho exportom z jadra (Lo et al. 2004). Počas absencie Wnt signálov je POP-1 vo väzbe s korepresormi Gro/TLE a génova expresia cieľových génov je inhibovaná (Kidd et al. 2005; J. Liu et al. 2008).

Existencia dominantne-negatívnej izoformy proteínu POP-1 by rozširovala jeho regulačný potenciál, podobne ako je to v prípade faktorov TCF/LEF u vyšších organizmov a potvrdila by jeho potenciálnu evolučnú konzervovanosť.

Pomocou nástroja DIOPT Ortholog Prediction (<https://www.flyrnai.org/diopt>) sme zistili, že najväčšiu podobnosť k *pop-1* má *TCF7L2*. Táto informácia zodpovedá i poznatkom experimentálnym. Robertson et al. 2011 pozorovali, že *TCF7L2* je univerzálnym členom rodiny TCF/LEF – ako jediný je schopný zvrátiť POP-1-deficientný fenotyp počas prvých asymetrických delení mezodermálnych/endodermálnych prekursorových buniek u *C. elegans*. *TCF7L2* je intenzívne študovaným členom génovej rodiny *TCF/LEF*. Za široké pole pôsobnosti proteínu *TCF7L2* zodpovedá veľké množstvo proteínových izoformiem. V závislosti od kontextu, lokus *TCF7L2* exprimuje vďaka trom promótorom variabilné pre-mRNA s odlišnou dĺžkou 5'konca, ktoré následne podstupujú alternatívny zostrih. Uplatňuje sa tu tiež alternatívna polyadenylácia, ktorá tvorí transkripty s rôznou dĺžkou 3'konca (Cadigan and Waterman 2012). Tieto mechanizmy produkujúce alternatívne izoformy u vyšších organizmov, sú taktiež využívané organizmom *C. elegans* (Blazie et al. 2017; Choi and Newman 2006). Na základe tejto informácie by sa dalo predpokladať, že i gén *pop-1* môže dávať vznik proteínovej izoforme s pozmenenou funkciou a/alebo špecifitou k cieľovým génom.

Databáza WormBase predikuje existenciu jednej *pop-1* mRNA (W10C8.2), ale na základe dát spracovaných pomocou AceView programu s využitím *C. elegans* cDNA sekvencií z GenBank, dbEST (Expressed Sequence Tags database), Trace (Archive) a SRA (Sequence Read Archive), sa u *pop-1* predpokladá existencia prinajmenšom dvoch alternatívnych mRNA.



**Obr. 22 Transkripčné varianty *pop-1* predikované využitím programu AceView**

Varianta **a** nesie následkom *trans*-zostrihu na 5'konci SL1 sekvenciu. Modrou značkou sú znázornené alternatívne polyadenylačné signály. U varianty **b** sa predpokladá prítomnosť alternatívneho promótoru a možnosť vzniku proteínovej izoformy. Sekvencia varianty **c** je neúplná s nízkou pravdepodobnosťou pre vznik proteínu. Diagram bol získaný z webovej stránky <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/> (Thierry-mieg and Thierry-mieg 2006)

Na základe prezentovaného diagramu a doplňujúcich dát z AceView, je možné vziať v úvahu existenciu alternatívnej transkripčnej varianty *pop-1*, ktorá doposiaľ nebola experimentálne potvrdená. Varianta **a** zobrazená v diagrame zodpovedá známej mRNA W10C8.2. z databázy WormBase, ktorá dáva vznik proteínu POP-1. Varianta **b** môže predstavovať alternatívnu mRNA, u ktorej chýba exón 1 a exón 2. U tohto transkriptu sa predpokladá, že vzniká transkripciou z alternatívneho promótoru a môže dávať vznik proteínovej izoforme, ktorá postráda doménu pre intreakciu s  $\beta$ -kateninom.

Pre overenie existencie alternatívnej izoformy proteínu POP-1 sme zvolili postup, ktorý by mohol potvrdiť prítomnosť alternatívnej *pop-1* mRNA. Ako zdrojovú informáciu sme použili celkovú RNA izolovanú zo zmesi rôznych vývinových štádií *C. elegans*. Metódou Northern blot pomocou hybridizácie s RNA sondou sme detegovali *pop-1* mRNA, ale nepotvrdili sme prítomnosť alternatívneho mRNA transkriptu, ktorý by sa dĺžkou fragmetu odlišoval od známej mRNA. Dĺžka známeho transkriptu W10C8.2., ktorú sme overili pomocou databázy WormBase je 1549 nt. Pruh zobrazený Northern blot analýzou (Obr. 18) približne zodpovedá tomuto údaju. Využitím q-RT-PCR sme kvantifikovali hladinu expresie génu *pop-1*. K tejto analýze sme využili vzorky RNA z embryí a zo zmesi jedincov v rôznych vývinových štádiách. Výsledok u vzorky zmiešaných štádií ukazuje, že hladina expresie oblasti ex1–2 je v porovnaní s oblasťou ex2–3 vyššia, čo vylučuje naše predpoklady, že u *pop-1* existuje 5'skrátený mRNA transkript, podobne ako u génov *TCF/LEF*, ktorý by dával vznik proteínu bez  $\beta$ -katenin interakčnej domény. Naopak, naše výsledky ukazujú, že by sa mohlo jednať o mRNA izoformu skrátenu na 3'konci, pretože relatívna hladina mRNA v poradí ex1–2, ex2–3, ex3–4 klesá. V prípade vzniku proteínu, by skrátenu C-koniec mohol mať za následok absenciu domény C-clamp, podobne ako je to v prípade proteínu LEF1 a TCF7L1 (Obr. 7). Takáto izoforma by mohla mať odlišnú špecificitu k cieľovým génom. Výsledok q-RT-PCR u embryí naznačuje, že mRNA, ktorá nesie oblasť ex2 – 3 (miesto, kde na

transkript nasadá aspoň jeden z páru primerov) nie je vo vzorke exprimovaná. Keďže bola táto analýza prevedená len raz, výsledok nemusí byť relevantný. Z grafov je možné vypočítať, že relatívna hladina expície *pop-1* nameraná u embryí je mnohonásobne vyššia ako u vzorky v rôznych štádiách, z čoho je možné usúdiť, že transkripčný faktor POP-1 je významný regulátor vyvíjajúceho sa embrya.

Jedným z cieľov diplomovej práce, ktorý sa nám nepodarilo splniť, bolo sledovanie vplyvu alternatívnej izoformy POP-1 na aktivitu reportérového génu. Táto analýza nebola prevedená, pretože existencia tejto izoformy nebola nami a ani inými štúdiami potvrdená. Avšak, v roku 2002 bol skupinou Maduro, Lin, and Rothman vytvorený proteín POP-1 skrátenej o  $\beta$ -katenin interakčnú doménu. Pomocou luciferázovej eseje bol potvrdený silný inhibičný efekt na aktivitu reportérového génu. N-terminálne skrátenej proteín POP-1 je v súčasnosti využívaný ako nástroj pri štúdiu rôznych regulačných mechanizmov (Murgan et al. 2015; Shetty et al. 2005).

## 6 Použitá literatura

- Adamska, M et al. 2010. "Structure and Expression of Conserved Wnt Pathway Components in the Demosponge Amphimedon Queenslandica." *Evolution & Development* 12(5): 494–518.
- Atcha, FA et al. 2007. "A Unique DNA Binding Domain Converts T-Cell Factors into Strong Wnt Effectors." *Molecular and Cellular Biology* 27(23): 8352–63.
- Bilic, J et al. 2007. "Wnt Induces LRP6 Signalingosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation." *Science* 316(5831): 1619–22.
- Blazie, SM et al. 2017. "Alternative Polyadenylation Directs Tissue-Specific MiRNA Targeting in Caenorhabditis Elegans." *Genetics* 206(2): 757–74.
- Blumenthal, T. 2005. "Trans-Splicing and Operons." In *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, , 1–9.
- Bourdon, JC et al. 2005. "P53 Isoforms Can Regulate P53 Transcriptional Activity." *Genes & Development* 19(18): 2122–37.
- Brenner, S. 1974. "THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS." *Genetics* 77: 71–94.
- Cadigan, KM, and ML Waterman. 2012. "TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(11): a007906.
- Choi, J, and AP Newman. 2006. "A Two-Promoter System of Gene Expression in C. Elegans." *Developmental Biology* 296(2): 537–44.
- Clevers, H, KM Loh, and R Nusse. 2014. "An Integral Program for Tissue Renewal and Regeneration: Wnt Signaling and Stem Cell Control." *Science* 346(6205): 1248012.
- Craig, HL et al. 2013. "The Significance of Alternative Transcripts for Caenorhabditis Elegans Transcription Factor Genes , Based on Expression Pattern Analysis." *BMC Genomics* 14(249): 2–20.
- Daniels, DL, and WI Weis. 2002. "ICAT Inhibits  $\beta$ -Catenin Binding to Tcf/Lef-Family Transcription Factors and the General Coactivator P300 Using Independent Structural Modules." *Molecular Cell* 10(3): 573–84.
- Davuluri, RV et al. 2008. "The Functional Consequences of Alternative Promoter Use in Mammalian Genomes." *Trends in Genetics* 24(4): 167–77.
- Fagotto, F, U Glück, and BM Gumbiner. 1998. "Nuclear Localization Signal-Independent and Importin/Karyopherin-Independent Nuclear Import of  $\beta$ -Catenin." *Current Biology* 8(4): 181–90.
- Fang, D et al. 2007. "Phosphorylation of  $\beta$ -Catenin by AKT Promotes  $\beta$ -Catenin Transcriptional Activity." *Journal of Biological Chemistry* 282(15): 11221–29.
- Gao, C, G Xiao, and J Hu. 2014. "Regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling by Posttranslational Modifications." *Cell & Bioscience* 4(1): 1–20.



- Giese, K, and R Grosschedl. 1991. "DNA-Binding Properties of the HMG Domain of the Lymphoid-Specific Transcriptional Regulator LEF-1." *Genes & Development* 5(12B): 2567–78.
- Gottardi, CJ, and P Mark. 2008. "Terminal Regions of  $\beta$ -Catenin Come into View." *Structure*. 16(3): 336–338.
- Graham, TA et al. 2000. "Crystal Structure of a  $\beta$ -Catenin/Tcf Complex." *Cell* 103(6): 885–96.
- Hatzis, P et al. 2008. "Genome-Wide Pattern of TCF7L2/TCF4 Chromatin Occupancy in Colorectal Cancer Cells." *Molecular and Cellular Biology* 28(8): 2732–44.
- Henriksen, MA, A Betz, MV Fuccillo, and JE Darnell. 2002. "Negative Regulation of STAT92E by an N-Terminally Truncated STAT Protein Derived from an Alternative Promoter Site." *Genes & Development* 16(18): 2379–89.
- Herman, MA. 1999. "C. Elegans POP-1/TCF Functions in a Canonical Wnt Pathway That Controls Cell Migration and in a Noncanonical Wnt Pathway That Controls Cell Polarity." *Development* 128(4): 581–90.
- Heuberger, J, and W Birchmeier. 2010. "Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(2): a002915.
- Hikasa, H, and SY Sokol. 2011. "Phosphorylation of TCF Proteins by Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2." *Journal of Biological Chemistry* 286(14): 12093–100.
- Hoffmeyer, K et al. 2017. "Trimethylation and Acetylation of  $\beta$ -Catenin at Lysine 49 Represent Key Elements in ESC Pluripotency." *Cell Reports* 18(12): 2815–24.
- Hoppler, S, and ML Waterman. 2014. "Evolutionary Diversification of Vertebrate TCF/LEF Structure, Function, and Regulation." In *Wnt Signaling in Development and Disease: Molecular Mechanisms and Biological Functions*, , 225–37.
- Hovanes, K, TWH Li, and ML Waterman. 2000. "The Human LEF-1 Gene Contains a Promoter Preferentially Active in Lymphocytes and Encodes Multiple Isoforms Derived from Alternative Splicing." *Nucleic Acids Research* 28(9): 1994–2003.
- Hoverter, NP et al. 2014. "The TCF C-Clamp DNA Binding Domain Expands the Wnt Transcriptome via Alternative Target Recognition." *Nucleic Acids Research* 42(22): 13615–32.
- Huber, AH, WJ Nelson, and WI Weis. 1997. "Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of  $\beta$ -Catenin." *Cell* 90(5): 871–82.
- Ishitani, T, J Ninomiya-tsuji, and K Matsumoto. 2003. "Regulation of Lymphoid Enhancer Factor 1/T-Cell Factor by Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Nemo-Like Kinase-Dependent Phosphorylation in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 23(4): 1379–89.

- Jackson, BM, and DM Eisenmann. 2012. “ $\beta$ -Catenin-Dependent Wnt Signaling in *C. elegans*: Teaching an Old Dog a New Trick.” *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(8): a007948.
- Jimenez, J, GM Jang, BL Semler, and ML Waterman. 2005. “An Internal Ribosome Entry Site Mediates Translation of Lymphoid Enhancer Factor-1.” *RNA* 11(9): 1385–99.
- Kidd, AR et al. 2005. “A  $\beta$ -Catenin Identified by Functional Rather Than Sequence Criteria and Its Role in Wnt/MAPK Signaling.” *Cell* 121(5): 761–72.
- Kimelman, D, and W Xu. 2006. “ $\beta$ -Catenin Destruction Complex: Insights and Questions from a Structural Perspective.” *Oncogene* 25(57): 7482–91.
- de Klerk, E, and PAC 't Hoen. 2015. “Alternative mRNA Transcription, Processing, and Translation: Insights from RNA Sequencing.” *Trends in Genetics* 31(3): 128–39.
- Klingel, S et al. 2012. “Subfunctionalization and Neofunctionalization of Vertebrate Lef/Tcf Transcription Factors.” *Developmental Biology* 368(1): 44–53.
- Koenig, SF et al. 2008. “Autoregulation of XTcf-4 Depends on a Lef/Tcf Site on the XTcf-4 Promoter.” *Genesis* 46(2): 81–86.
- Korswagen, HC, MA Herman, and HC Clevers. 2000. “Distinct  $\beta$ -Catenins Mediate Adhesion and Signaling Functions in *C. elegans*.” *Nature* 406(6795): 527–32.
- Kuthan, M. 2009. “Hybridizační Metody Studia Nukleových Kyselin s Rozvojem Metod Analýzy Nukleových Kyselin a Jejich Běžným Používáním.” *Živa* 1: 44–45.
- Landry, JR, DL Mager, and BT Wilhelm. 2003. “Complex Controls: The Role of Alternative Promoters in Mammalian Genomes.” *Trends in Genetics* 19(11): 640–48.
- Lévy, L et al. 2004. “Acetylation of  $\beta$ -Catenin by P300 Regulates  $\beta$ -Catenin–Tcf4 Interaction.” *Molecular and Cellular Biology* 24(8): 3404–14.
- Li, TWH et al. 2006. “Wnt Activation and Alternative Promoter Repression of LEF1 in Colon Cancer.” *Molecular and Cellular Biology* 26(14): 5284–99.
- Lin, R, RJ Hill, and JR Priess. 1998. “POP-1 and Anterior–Posterior Fate Decisions in *C. elegans* Embryos.” *Cell* 92(2): 229–39.
- Lin, R, S Thompson, and JR Priess. 1995. “Pop-1 Encodes an HMG Box Protein Required for the Specification of a Mesoderm Precursor in Early *C. elegans* Embryos.” *Cell* 83(4): 599–609.
- Liu, C et al. 1999. “ $\beta$ -Trec Couples  $\beta$ -Catenin Phosphorylation-Degradation and Regulates *Xenopus* Axis Formation.” *Cell* 96(11): 6273–78.
- Liu, C, Y Li, M Semenov, and X He. 2002. “Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism.” *Cell* 108(6): 837–47.
- Liu, J et al. 2008. “The *C. elegans* SYS-1 Protein Is a Bona Fide  $\beta$ -Catenin.” *Developmental Cell* 14(5): 751–61.

- Lo, MC et al. 2004. "Phosphorylation by the  $\beta$ -Catenin/MAPK Complex Promotes 14-3-3-Mediated Nuclear Export of TCF/POP-1 in Signal-Responsive Cells in *C. Elegans*." *Cell* 117(1): 95–106.
- Locke, JM, GDS Xavier, GA Rutter, and LW Harries. 2011. "An Alternative Polyadenylation Signal in TCF7L2 Generates Isoforms That Inhibit T Cell Factor/Lymphoid-Enhancer Factor (TCF/LEF)-Dependent Target Genes." *Diabetologia* 54(12): 3078–82.
- Logan, CY, and R Nusse. 2004. "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20(1): 781–810.
- Loh, KM, R van Amerongen, and R Nusse. 2016. "Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals." *Developmental Cell* 38(6): 643–55.
- Lu, L et al. 2015. "Kdm2A/B Lysine Demethylases Regulate Canonical Wnt Signaling by Modulating the Stability of Nuclear  $\beta$ -Catenin." *Developmental Cell* 33(6): 660–74.
- MacDonald, BT, and X He. 2012. "Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(12): a007880.
- Maduro, MF, R Lin, and JH Rothman. 2002. "Dynamics of a Developmental Switch: Recursive Intracellular and Intranuclear Redistribution of *Caenorhabditis Elegans* POP-1 Parallels Wnt-Inhibited Transcriptional Repression." *Developmental Biology* 248(1): 128–42.
- Mao, CD, and SW Byers. 2011. "Cell-Context Dependent TCF/LEF Expression and Function: Alternative Tales of Repression, de-Repression and Activation Potentials." *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 21(3): 207–36.
- Mizumoto, K, and H Sawa. 2007. "Two  $\beta$ -s or Not Two  $\beta$ -S: Regulation of Asymmetric Division by  $\beta$ -Catenin." *TRENDS in Cell Biology* 17(10): 465–73.
- Murgan, S et al. 2015. "Atypical Transcriptional Activation by TCF via a Zic Transcription Factor in *C. Elegans* Neuronal Precursors." *Developmental Cell* 33(6): 737–45.
- Najdi, R et al. 2009. "A Wnt-Kinase Network Alters Nuclear Localization of TCF-1 in Colon Cancer." *Analytical Chemistry* 25(4): 368–79.
- Nelson, WJ, and R Nusse. 2004. "Convergence of Wnt,  $\beta$ -Catenin, and Cadherin Pathways." *Science* 303(5663): 1483–87.
- Neumann, S et al. 2009. "Mammalian Wnt3a Is Released on Lipoprotein Particles." *Traffic* 10(3): 334–43.
- Oliva, CA, JY Vargas, and NC Inestrosa. 2013. "Wnts in Adult Brain: From Synaptic Plasticity to Cognitive Deficiencies." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7(224): 1–16.
- Pal, S et al. 2011. "Alternative Transcription Exceeds Alternative Splicing in Generating the Transcriptome Diversity of Cerebellar Development." *Genome Research* 21(8): 1260–72.
- Phillips, BT, and J Kimble. 2014. "A New Look at TCF and  $\beta$ -Catenin through the Lens of a Divergent *C. Elegans* Wnt Pathway." *Developmental Cell* 17(1): 27–34.

- Prieve, MG, KL Guttridge, J Munguia, and ML Waterman. 1998. "Differential Importin- $\alpha$  Recognition and Nuclear Transport by Nuclear Localization Signals within the High-Mobility-Group DNA Binding Domains of Lymphoid Enhancer Factor 1 and T-Cell Factor 1." *Molecular and Cellular Biology* 18(8): 4819–32.
- Robertson, S et al. 2011. "Functional Analyses of Vertebrate TCF Proteins in *C. Elegans* Embryos." *Developmental Biology* 355(1): 115–23.
- Schaefer, KN et al. 2018. "Supramolecular Assembly of the Beta-Catenin Destruction Complex and the Effect of Wnt Signaling on Its Localization, Molecular Size, and Activity in Vivo." *PLoS Genetics* 14(4): 1–44.
- Shetty, P, MC Lo, SM Robertson, and R Lin. 2005. "C. Elegans TCF Protein, POP-1, Converts from Repressor to Activator as a Result of Wnt-Induced Lowering of Nuclear Levels." *Developmental Biology* 285(2): 584–92.
- Song, DH et al. 2003. "CK2 Phosphorylation of the Armadillo Repeat Region of  $\beta$ -Catenin Potentiates Wnt Signaling." *Journal of Biological Chemistry* 278(26): 24018–25.
- Stamos, JL et al. 2014. "Structural Basis of GSK-3 Inhibition by N-Terminal Phosphorylation and by the Wnt Receptor LRP6." *eLife* 3: 1–22.
- Thierry-mieg, D, and J Thierry-mieg. 2006. "AceView: A Comprehensive CDNA-Supported Gene and Transcripts Annotation." *Genome biology* 7(S1): 1–14.
- Tortelote, GG, RR Reis, FD Almeida, and J Garcia. 2017. "Complexity of the Wnt / $\beta$ -Catenin Pathway: Searching for an Activation Model." *Cellular Signalling* 40: 30–43.
- Vacik, T, and G Lemke. 2011. "Dominant-Negative Isoforms of Tcf/Lef Proteins in Development and Disease." *Cell Cycle* 10(24): 4199–4200.
- Vacik, T, JL Stubbs, and G Lemke. 2011. "A Novel Mechanism for the Transcriptional Regulation of Wnt Signaling in Development." *Genes & Development* 25(17): 1783–95.
- Valenta, T, G Hausmann, and K Basler. 2012. "The Many Faces and Functions of  $\beta$ -Catenin." *EMBO Journal* 31(12): 2714–36.
- van de Wetering, M, J Castrop, V Korinek, and H Clevers. 1996. "Extensive Alternative Splicing and Dual Promoter Usage Generate Tcf-1 Protein Isoforms with Differential Transcription Control Properties." *Molecular and Cellular Biology* 16(3): 745–52.
- Wolf, D et al. 2002. "Acetylation of  $\beta$ -Catenin by CREB-Binding Protein (CBP)." *Journal of Biological Chemistry* 277(28): 25562–67.
- Wu, X et al. 2008. "Rac1 Activation and Subsequent  $\beta$ -Catenin Phosphorylation Controls Nuclear Localization of  $\beta$ -Catenin during Canonical Wnt Signaling." *Cell* 133(2): 340–53.
- Yamada, M et al. 2006. "NARF, an Nemo-like Kinase (NLK)-Associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF)." *Journal of Biological Chemistry* 281(30): 20749–60.
- Yi, F et al. 2012. "Opposing Effects of Tcf3 and Tcf1 Control Wnt-Stimulation of Embryonic Stem

- Cell Self Renewal.” *Nature Cell Biology* 13(7): 762–70.
- Yokoyama, NN, KT Pate, S Sprowl, and ML Waterman. 2010. “A Role for YY1 in Repression of Dominant Negative LEF-1 Expression in Colon Cancer.” *Nucleic Acids Research* 38(19): 6375–88.
- Zeng, X et al. 2017. “Initiation of Wnt Signaling: Control of Wnt Coreceptor Lrp6 Phosphorylation/Activation via Frizzled, Dishevelled and Axin Functions.” *Development* 135(2): 367–75.