

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Martina Oravcová

Transkripční faktory CSL a jejich role v kvasince
Schizosaccharomyces pombe

Transcription factors CSL and their role in the yeast
Schizosaccharomyces pombe

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 7. 2014

Martina Oravcová

Poděkování

Studium proteinů CSL a jejich funkcí v kvasince *Schizosaccharomyces pombe* je týmovým projektem. Přestože jsem většinu experimentů uvedených v této práci prováděla sama, práce obsahuje i výsledky dalších členů týmu, které přispívají k lepšímu pochopení práce. Experimenty provedené ostatními poskytly předběžné výsledky, z nichž vychází moje vlastní experimenty, a u některých z nich jsem asistovala alespoň v roli supervizora.

Ráda bych poděkovala mému školiteli RNDr. Martinu Převorovskému, Ph.D. za odborné vedení, trpělivý přístup a podporu. Dále děkuji Doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. a vedoucímu laboratoře Doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. za cenné rady. Děkuji také současným i bývalým členům Laboratoře regulace genové exprese za vytvoření přátelské atmosféry.

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze, granty č. 92009 a 640413, a projektem SVV Univerzity Karlovy v Praze. Finanční podporu poskytla také Grantová agentura ČR (grant P305/12/P040) a Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy (výzkumné projekty MSM0021620858 a LC07032). Děkuji rovněž za finance poskytnuté Fondem mobility Univerzity Karlovy v Praze.

Nejvíce bych chtěla poděkovat mé rodině a především Tomášovi za důvěru, lásku a podporu po celou dobu.

Obsah

Poděkování	3
Obsah	4
Seznam použitých zkratk.....	8
Abstrakt.....	10
Abstract	11
Úvod.....	12
Cíle práce	13
1. Literární přehled.....	14
1.1. Signální dráha Notch.....	14
1.2. Proteiny CSL.....	16
1.2.1. Fylogeneze rodiny proteinů CSL.....	16
1.2.2. Struktura proteinů CSL.....	18
1.2.2.1. Nestrukturované N-konce proteinů CSL	21
1.2.3. Vazba na DNA.....	21
1.3. Proteiny CSL <i>S. pombe</i>	23
1.3.1. Kvasinka <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	23
1.3.2. Cbf11 a Cbf12	23
1.4. Buněčný cyklus <i>S. pombe</i> a jeho regulace	26
1.4.1. Synchronizace buněk v určité fázi buněčného cyklu.....	27
1.4.2. Metody experimentálního monitorování průběhu buněčného cyklu.....	28
2. Materiál a metody.....	30
2.1. Mikroorganismy a jejich kultivace.....	30
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> – kultivace a transformace.....	30
2.1.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	30

2.1.2.1. Kultivace, transformace a exprese proteinů	30
2.1.2.2. Křížení a sporulace	31
2.1.2.3. Synchronizace.....	32
2.2. Techniky manipulace s proteiny	34
2.2.1. Příprava buněčných lyzátů.....	34
2.2.1.1. Nativní lyzát	34
2.2.1.2. Měření koncentrace proteinu	34
2.2.1.3. Denaturovaný extrakt	34
2.2.2. SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)	35
2.2.3. Western blot a imunodetekce	35
2.2.4. Aktivita β -galaktosidázy – ONPG assay	36
2.2.5. Chromatinová imunoprecipitace (ChIP).....	36
2.3. Techniky manipulace s nukleovými kyselinami	38
2.3.1. Izolace a purifikace DNA	38
2.3.1.1. Izolace chromozomální DNA <i>S. pombe</i>	38
2.3.1.2. Izolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i>	39
2.3.1.3. Purifikace DNA	40
2.3.2. Enzymy modifikující DNA	40
2.3.3. Izolace a purifikace RNA	40
2.3.4. Reverzní transkripce	40
2.3.5. Agarozová elektroforéza DNA	41
2.3.6. PCR a kvantitativní PCR	41
2.3.6.1. PCR.....	41
2.3.6.2. qPCR.....	42
2.3.7. Plasmidy	43

2.3.8. DNA microarray	45
2.3.9. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	45
2.3.10. Průtoková cytometrie	47
2.4. Mikroskopie	47
2.5. Bioinformatické nástroje a software	48
2.5.1. Databáze a webové nástroje	48
2.5.2. Software	48
3. Výsledky	49
3.1. Lokalizace proteinů CSL a jejich mutantních variant	49
3.1.1. Mutantní varianty proteinů Cbf11 a Cbf12	49
3.1.1.1. Příprava konstruktů Cbf12(395-465) a jeho lokalizace	51
3.2. Vazba proteinu Cbf12 na DNA <i>in vitro</i>	53
3.3. Proteiny CSL regulují expresi reportérového genu	56
3.3.1. Vazba Cbf11 na CSL-responzivní element reportérového plasmidu <i>in vivo</i>	58
3.4. Exprese proteinu Cbf11 závisí na kultivačních	61
3.5. Vazba proteinů CSL na DNA <i>in vivo</i>	63
3.5.1. Lokalizace vazby Cbf12 <i>in vivo</i> v rámci vybraných sekvencí	67
3.5.1.1. Lokalizace vazby Cbf12 <i>in vitro</i>	69
3.6. Vazba proteinů CSL na DNA <i>in vivo</i> II	74
3.7. Cbf11 reguluje genovou expresi během S fáze/cytokineze buněčného cyklu	77
3.8. Vliv Cbf11 na vazbu Cbf12 na DNA <i>in vivo</i>	83
4. Diskuse	86
4.1. Proteiny CSL <i>S. pombe</i> jsou transkripční faktory	86
4.1.1. Vliv N-konce proteinů CSL na subcelulární lokalizaci a vazbu na DNA	86

4.1.2. Regulace genové exprese proteiny CSL	88
4.2. Vliv kultivačních podmínek na expresi proteinu Cbf11	90
4.3. Hledání cílových genů proteinů CSL	91
4.3.1. Role Cbf11 v průběhu buněčného cyklu	93
4.4. Antagonismus proteinů CSL	95
4.5. Další funkce paralogů CSL v <i>S. pombe</i>	97
4.6. Funkce proteinů CSL v říši Metazoa a <i>S. pombe</i>	98
5. Shrnutí	99
6. Seznam literatury	101
7. Přílohy	114

Seznam použitých zkratek

bp	base pair/ pár bazí
BCIP	bromo-chloro-indolyl phosphate/ bromo-chloro-indolyl fosfát
BSA	bovine serum albumin/ hovězí sérový albumin
BTD	beta-trefoil domain/ beta-trojlistková doména
bHLH	basic Helix-loop-Helix/ bazický Helix-smyčka-Helix
CBF1	C-promoter binding factor 1/ faktor 1 vážící promotor C
CTD	carboxy-terminal domain/C-terminální doména
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole/ 4',6-diamidin-2-fenylindol
DBM	DNA-binding mutant/ DNA-vazebný mutant
DSL	Delta/Serrate/LAG-2
DTT	dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence/ zesílená chemiluminiscence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid/ etylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermal growth factor/ epidermální růstový faktor
EMM	Edinburgh minimal media/ Edinburské minimální médium
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FACS	fluorescence-assisted cell sorter/ průtokový cytometr
EGFP	enhanced green fluorescent protein/ vylepšený zelený fluorescenční protein
HA	hemagglutinin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid/ 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HERP	HES-related repressor protein/ represorový protein příbuzný s HES
HES	Hairy/Enhancer of Split
ChIP	chromatin immunoprecipitation/chromatinová imunoprecipitace
LB	lysogeny broth/ lysogenní medium
LAG-1	lin-12 and glp-1
MAP	mitogen-activated protein/ mitogenem aktivovaný protein
MPF	mitosis promoting factor/ mitózu podporující faktor
NBT	nitroblue tetrazolium

NICD	Notch intracellular domain/ intracelulární doména receptoru Notch
NLS	nuclear localization signal/ jaderný lokalizační signál
NTD	amino-terminal domain/ N-terminální doména
OD	optical density/ optická denzita
ORF	open reading frame/ otevřený čtecí rámec
ONPG	ortho-nitrophenyl- β -galactoside/ ortho-nitrofenyl- β -galaktosid
PCR	polymerase chain reaction/ polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylene glycol/ polyetylen glykol
PEST	proline (P), glutamic acid (E), serine (S), threonine (T)/ prolin, kyselina glutamová, serin, threonin
qPCR	quantitative polymerase chain reaction/ kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction/ reverzní transkripce-kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RAM	RBP-J associate molecule/ molekula asociovaná s RBP-J
RBP-J κ	recombination signal binding protein J κ / protein vážící rekombinační signální sekvenci J κ
RBP-L	RBP-J κ -like/ podobný RBP-J κ
RHR	Rel homology region/ oblast homologní s Rel
rpm	revolutions per minute/ otáčky za minutu
RSA	random spore analysis/ analýza náhodně vybraných spor
SDS	sodium dodecyl sulphate/ dodecylsírán sodný
Su(H)	Suppressor of Hairless
ssDNA	salmon sperm DNA/ DNA z lososího mlíčí
TAP	tandem affinity purification/ tandemová afinitní purifikace
TAE	tris-acetate-EDTA/ tris-acetát-EDTA
TBE	tris-borate-EDTA/ tris-borát-EDTA
TCA	trichloroacetic acid/ trichloroctová kyselina
WT	wild type/ divoký typ
YES	yeast extract, supplements/ kvasničný extrakt se suplementy

Abstrakt

Proteiny rodiny CSL (C_{BF}1/RBP-J κ /Suppressor of Hairless/LAG-1) působí v organismech říše Metazoa jako efekторы signální dráhy Notch. V rámci této signalizace fungují jako represory nebo aktivátory transkripce genů a ovlivňují mnoho vývojových procesů. Metazoální proteiny CSL mohou regulovat expresi genů také nezávisle na Notch. Funkce proteinů CSL nezávislé na Notch by mohly být evolučně původní a pro buňku a organismus mohou být neméně důležité jako funkce dependentní na Notch. Přítomnost proteinů CSL byla zjištěna i u některých organismů říše Fungi, které postrádají komponenty signální dráhy Notch a většinu známých metazoálních interakčních partnerů proteinů CSL.

Paralogy CSL poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*, *cbf11* a *cbf12*, jsou neesenciální geny kódující proteiny lokalizované v jádře buňky. Oba se antagonistickým způsobem zapojují do regulace procesů jako například koordinace jaderného a buněčného dělení a průchodu buněčným cyklem, udržování ploidie, adhezivity buněk a dalších. V této práci jsme prokázali, že oba paralogy CSL mají schopnost sekvenčně specificky vázat kanonický CSL-responzivní element DNA *in vitro* a Cbf11 také *in vivo*. Oba proteiny mohou aktivovat genovou expresi *in vivo*, a vykonávat tak funkci transkripčních faktorů. Pomocí metody CHIP-chip jsme analyzovali vazbu proteinů CSL v rámci celého genomu *S. pombe in vivo*. Zjistili jsme, že se proteiny CSL váží jak v intergenových, tak i v kódujících oblastech. Dále jsme studovali dynamiku vazby Cbf11 na DNA v průběhu buněčného cyklu a zjistili jsme, že Cbf11 se v S fázi/cytokinezi váže do promotorů několika periodicky exprimovaných genů a přímo reguluje jejich expresi. Produkty těchto genů regulovaných proteinem Cbf11 se účastní prevence katastrofické mitózy.

Klíčová slova: proteiny CSL, *Schizosaccharomyces pombe*, transkripční faktor, vazba na DNA, buněčný cyklus, regulace exprese genů

Abstract

Proteins of the CSL family (C_BF1/RBP-J κ /S_Uppressor of Hairless/L_AG-1) act as effectors of the Notch signalling pathway in metazoan organisms. They function as repressors or activators of gene transcription in the framework of this pathway and influence many developmental processes. Metazoan CSL proteins can regulate gene expression Notch-independently as well. Notch-independent functions of CSL proteins might be evolutionarily ancestral and in cells and organisms may be important equally as Notch-dependent functions. Presence of CSL proteins was identified in several fungal species, organisms lacking the Notch signalling pathway components and most of known metazoan interacting partners of CSL proteins.

CSL paralogs of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *cbf11* and *cbf12*, are non-essential genes encoding proteins localized in the nucleus of the cell. They exert antagonistic effects on regulation of processes like coordination of nuclear and cellular division and cell cycle progression, ploidy maintenance, cell adhesion and other. In this study, we have proved that both CSL paralogs are able to sequence-specifically bind the CSL-response element DNA *in vitro* and Cbf11 *in vivo* as well. Both proteins could activate gene expression *in vivo* and perform the function of transcription factors. Using the ChIP-chip method, we have analysed the binding of CSL proteins in the whole genome of *S. pombe in vivo*. We have discovered that CSL proteins bind to intergenic as well as coding regions. Next, we have studied the dynamics of Cbf11 binding to DNA during the cell cycle and we have discovered that Cbf11 binds S phase/cytokinesis-specifically the promoter regions of a subset of periodically expressed genes and directly regulates their expression. The products of these genes regulated by Cbf11 are important to prevent catastrophic mitosis.

Key words: CSL proteins, *Schizosaccharomyces pombe*, transcription factor, DNA binding, cell cycle, gene expression regulation

Úvod

Studium signální dráhy Notch a transkripčních faktorů CSL patří k významným tématům buněčné biologie a medicíny. Porozumění mezibuněčným interakcím, které signální dráha Notch zprostředkovává, je nezbytné pro pochopení ontogeneze a jejích abnormalit, i pro hledání cílů při léčbě lidských onemocnění, například rakoviny (Lai, 2004; Weng a Aster, 2004). Funkce proteinů CSL v metazoálních organismech není dosud uspokojivě objasněna, především funkce v regulaci transkripce nezávislé na Notch (Beres et al., 2006; Masui et al., 2007).

Proteiny rodiny CSL jsou evolučně starší než dráha Notch. Zatímco dráha Notch vznikla v průběhu evoluce říše Metazoa (Bilateria), proteiny CSL byly objeveny v organismech říše Fungi, která se v evoluci oddělila dříve (Gazave et al., 2009; Převorovský et al., 2007; Hedges, 2002). Studium proteinů CSL v houbových organismech, kde chybí kromě dráhy Notch i většina ostatních dosud popsáných metazoálních interakčních partnerů, nabízí možnost zkoumat proteiny CSL bez kontextu signalizace Notch, což může přispět k poznání jejich funkcí nezávislých na Notch v Metazoa.

V Laboratoři regulace genové exprese na Katedře buněčné biologie studujeme proteiny CSL poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Tato jednobuněčná kvasinka je využívána jako model eukaryotických organismů, pro jehož studium bylo vyvinuto mnoho molekulárně-genetických nástrojů, které umožňují relativně snadnou manipulaci genomu. V této práci jsme se zabývali rolí proteinů Cbf11 a Cbf12 *S. pombe* jako transkripčních faktorů regulujících expresi genů, na úrovni celého genomu jsme zkoumali jejich vazbu na DNA *in vivo* a také *in vitro*, a snažili se identifikovat CSL-responzivní geny. Studovali jsme také úlohu proteinů CSL v rámci buněčného cyklu *S. pombe*.

Cíle práce

- I. Zjistit, zda proteiny CSL kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* fungují jako transkripční faktory.
- II. Identifikovat místa vazby proteinů CSL v genomu *S. pombe*.
- III. Popsat dynamiku vazby proteinu Cbf11 na DNA v rámci buněčného cyklu *S. pombe*.

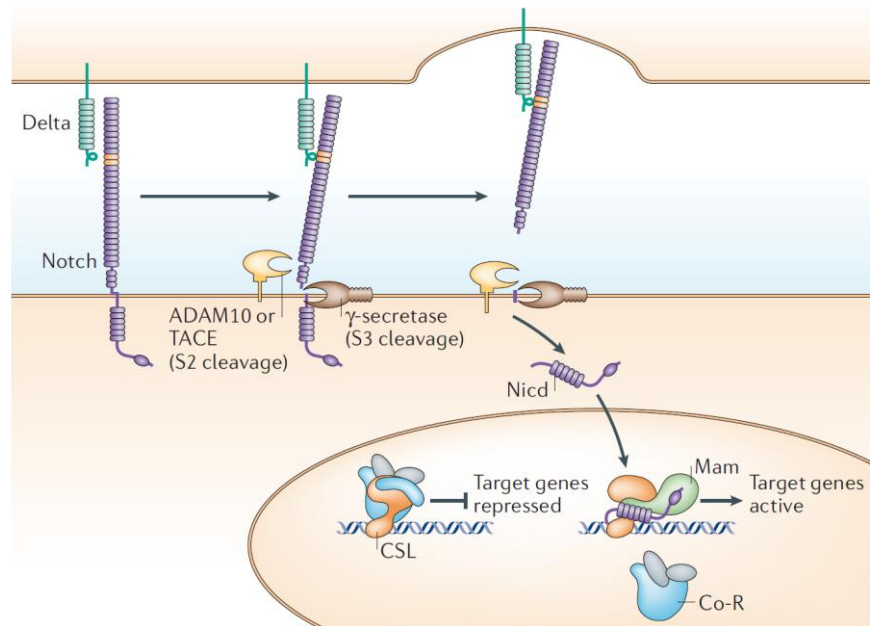
1. Literární přehled

1.1. Signální dráha Notch

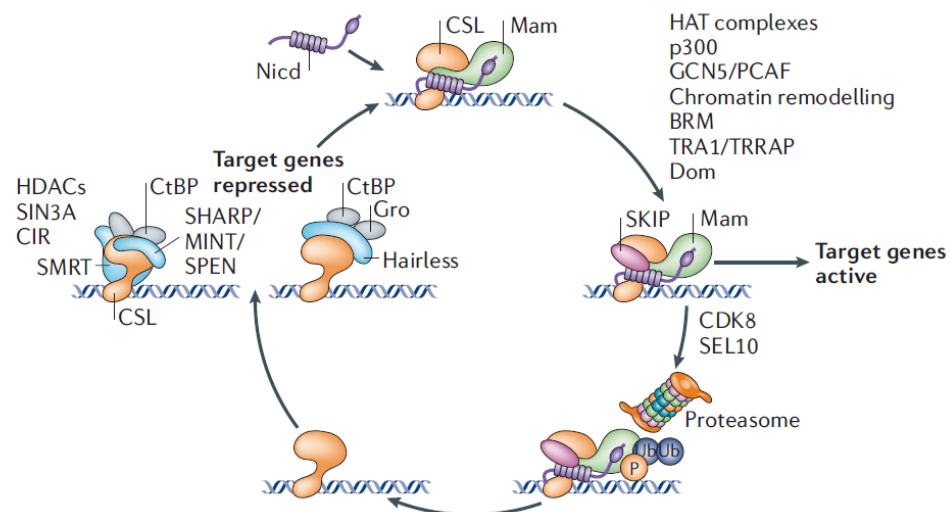
Dráha Notch je evolučně vysoce konzervovaný mechanismus signalizace operující mezi sousedními buňkami v metazoálních organismech. Přestože je intracelulární přenos signálu dráhou Notch pozoruhodně jednoduchý a nezahrnuje žádnou amplifikaci signálu, je tato signalizace nepostradatelná při embryonálním vývoji, specifikaci různých typů buněk a tkání a při dalších vývojových procesech (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Tanigaki a Honjo, 2007). Poruchy v dráze Notch vedou k mnoha závažným onemocněním včetně rakoviny (Radtke a Raj, 2003). Receptor Notch je transmembránový protein, jehož extracelulární část, sestávající z 10-36 repetitivních EGF, je přes linker spojena s částí transmembránovou a intracelulární. Počet repetitivních EGF se liší mezi organismy i mezi paralogy téhož organismu. Intracelulární část proteinu Notch (NICD) se skládá z RAM domény, šesti ankyrinových repetitivních a C-terminální PEST domény. Obsahuje dva jaderné lokalizační signály (NLS; Lubman et al., 2004; Bray, 2006). K zahájení signalizace dochází vně buňky, když se na extracelulární část receptoru Notch naváže ligand DSL (ortolog Delta, Serrate, Lag-2) přítomný na membráně sousední buňky. Po navázání ligandu dojde ke dvěma následným proteolytickým štěpením receptoru. První štěpení odstraňuje extracelulární část receptoru, výsledkem druhého štěpení je uvolnění NICD (Kopan a Ilagan, 2009; Espinoza et al., 2013). Díky NLS se intracelulární část translokuje do buněčného jádra, kde spolu s DNA-vazebným proteinem CSL a koaktivátorem Mastermind vytvoří ternární komplex. Ten společně s dalšími koaktivátory spustí transkripci cílových genů (Petcherski a Kimble, 2000; Wu et al., 2000; Nam et al., 2006; Wilson a Kovall, 2006; Kurooka a Honjo, 2000; Obr. 1.1). Následně je NICD fosforylována, ubiquitinylována a degradována, což vede k disociaci komplexu (Fryer et al., 2002). Bez přítomnosti NICD interaguje protein CSL s korepresory a reprimuje transkripci genů (Kao et al., 1998; Oswald et al., 2005; Hsieh et al., 1999; Zhou et al., 2000; Obr. 1.2). Mezi cíle dráhy Notch patří především geny kódující proteiny rodiny HES (Hairy/Enhancer of Split) a HERP (HES-related repressor protein), což jsou represory transkripce typu helix-loop-helix (bHLH; Bailey a Posakony, 1995; Iso et al., 2002).

Dráhu Notch je možné regulovat na několika úrovních, např. změnami v hladinách mRNA ligandu a receptoru, změnou lokalizace proteinů v buňce nebo jejich posttranslačními modifikacemi (Bray, 2006).

Kromě popsané signalizace skrze proteiny CSL může dráha Notch fungovat i nezávisle na nich (Arias et al., 2002).



Obr. 1.1 Schéma signální dráhy Notch. Převzato z Bray, 2006. Mam – Mastermind, CoR – korepresorový komplex.



Obr. 1.2. Dynamika komplexů proteinu CSL v jádře buňky ovlivňující transkripci genů. Převzato z Bray, 2006.

1.2. Proteiny CSL

Jak vyplývá z textu kapitoly 1.1., proteiny CSL (CBF1/RBP- κ /Su(H)/LAG-1) hrají klíčovou roli efektoru signální dráhy Notch. Na základě kontextu a interakce s koregulatorovými komplexy reprimují nebo aktivují transkripci cílových genů. Je však známo, že proteiny CSL mají také funkce nezávislé na signalizaci Notch, které nejsou dosud plně objasněny (Koelzer a Klein, 2003; Barolo et al., 2000; Beres et al., 2006; Johnson a MacDonald, 2011). Navíc bylo prokázáno, že proteiny CSL se vyskytují u evolučně starších organismů, u nichž není signální dráha Notch přítomna (Převorovský et al., 2007).

1.2.1. Fylogeneze rodiny proteinů CSL

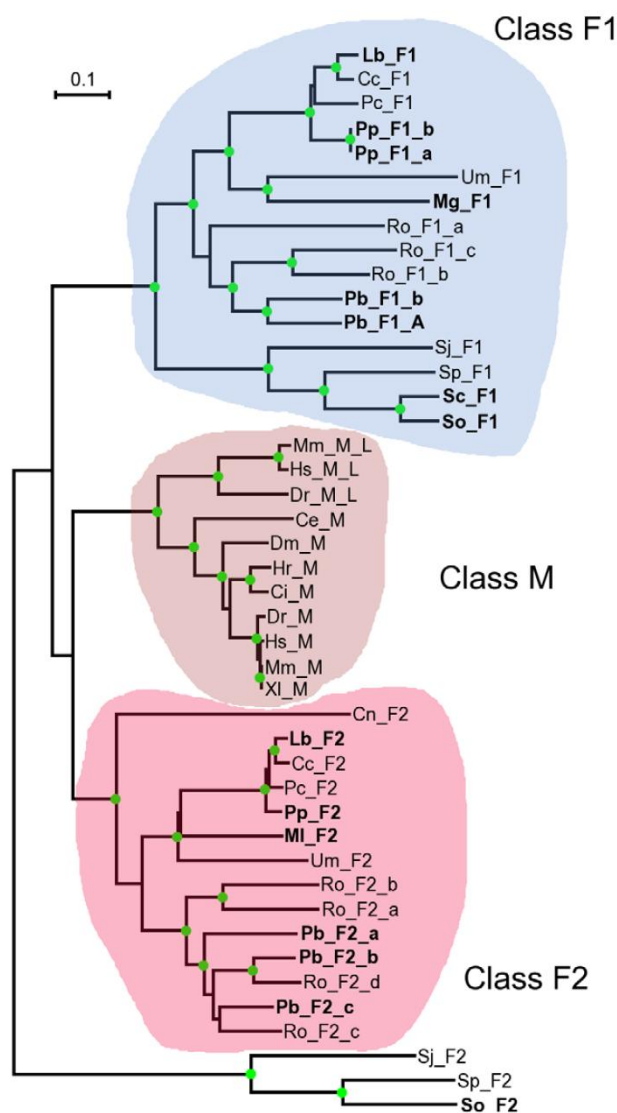
Po dlouhou dobu byly proteiny CSL považovány za regulátory čistě metazoální (Artavanis-Tsakonas et al., 1999), posléze však byly objeveny i u několika druhů houbových organismů, konkrétně v odděleních Ascomycota (pododdělení Taphrinomycotina), Zygomycota a Basidiomycota. Překvapivě žádný zástupce rodiny CSL nebyl identifikován v pododdělení Saccharomycotina (včetně *Saccharomyces cerevisiae*). U organismů všech těchto houbových taxonů signalizace Notch chybí.

Nálezy proteinů CSL v těchto organismech podporují hypotézu, že gen CSL se objevil v evoluci nezávisle na signalizaci Notch, a to u společného předka živočichů a hub. Tím lze vysvětlit skutečnost, že se proteiny CSL nevyskytují u rostlin a protozoí, které se oddělily v evoluci dříve (Převorovský et al., 2007; Hedges, 2002).

Typicky se v genomu houbových organismů vyskytují dva paralogy proteinů CSL, přičemž každý náleží do jedné ze dvou tříd, F1 nebo F2 (Obr. 1.3). Existují i výjimky, kdy bylo v jednom organismu nalezeno více paralogů CSL, například 7 v genomu *Rhizopus oryzae* (Převorovský et al., 2007).

Metazoální proteiny CSL tvoří koherentní skupinu, ve které lze rovněž identifikovat dvě podskupiny – RBP- κ a RBP-L. Oba proteiny fungují u obratlovců jako transkripční regulátory, ale liší se spektrem jejich interakčních partnerů, signály, na které odpovídají, expresí a také DNA-vazebnými preferencemi *in vivo*. Signalizace Notch se účastní pouze protein RBP- κ , zatímco RBP-L se podílí na vývoji pankreatu a jeho funkce nesouvisí s Notch (Beres et al., 2006; Minoguchi et al., 1997). Fungální proteiny z tříd F1 a F2 mohou fungovat v analogickém uspořádání,

tj. mohou se lišit jejich cílové geny nebo mohou reagovat odlišně na signály z prostředí.

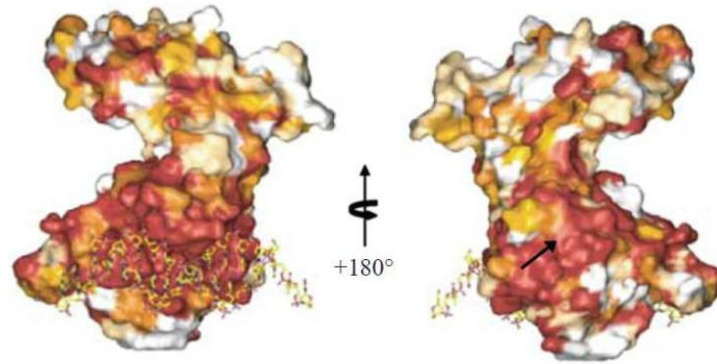


Obř. 1.3 Fylogenetický strom proteinů CSL z následujících organismů. *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *S. octosporus* (So), *S. japonicus* (Sj) a *S. cryophilus* (Sc) patří do pododdělení Taphrinomycotina. *Coprinus cinereus* (Cc), *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Laccaria bicolor* (Lb), *Malassezia globosa* (Mg), *Melampsora laricispopulina* (MI), *Phanerochaete chrysosporium* (Pc), *Ustilago maydis* (Um), *Postia placenta* (Pp) náleží do oddělení Basidiomycota. Zygomycota zastupuje *Rhizopus oryzae* (Ro) a *Phycomyces blakesleeanus* (Pb). Metazoální sekvence pocházejí z člověka (Hs), myši (Mm), *Danio rerio* (Dr), *Xenopus laevis* (XI), *Ciona intestinalis* (Ci), *Halocynthia roretzi* (Hr), *Drosophila melanogaster* (Dm) and *Caenorhabditis elegans* (Ce). Paralogy jsou označeny malými písmeny, jednotlivé třídy proteinů CSL barevně (F1 modrá, F2 růžová, M hnědá). Měřítko zobrazuje počet aminokyselinových záměn na pozici. Převzato z Převorovský et al., 2011.

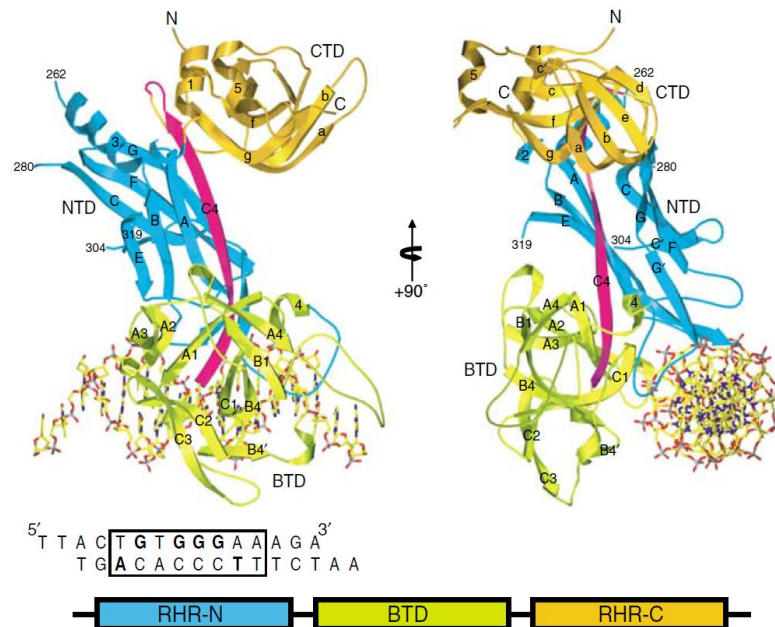
1.2.2. Struktura proteinů CSL

Proteiny CSL u metazoi jsou evolučně velmi konzervované (Obr. 1.4); mezi proteinem lidským a *D. melanogaster* je 84% sekvenční identita (Kovall a Hendrickson, 2004). Terciární struktura proteinů CSL byla určena na základě krystalových struktur metazoálních proteinů, ať už v komplexech s DNA nebo s dalšími interakčními partnery (Kovall a Hendrickson, 2004; Nam et al., 2006; Wilson a Kovall, 2006; Friedmann et al., 2008). Protein je složen ze tří jasně odlišených domén, N-terminální domény (NTD), C-terminální domény (CTD) a mezi nimi vložené beta-trefoil domény (BTD; Obr. 1.5). NTD a CTD jsou tvořeny hlavně β -listy a strukturně jsou podobné RHR-N a RHR-C doménám proteinové rodiny Rel. Zatímco u proteinů Rel zprostředkovávají kontakt s DNA obě domény (Ghosh et al., 1995), u proteinů CSL se doména CTD vůbec na DNA neváže (Kovall a Hendrickson, 2004). Bez vazby interakčních partnerů je CTD neuspořádaná a je pravděpodobné, že po navázání koaktivátorů stabilizuje ternární komplex (Kovall a Hendrickson, 2004). Spekuluje se také, že se účastní funkcí nezávislých na Notch (Tang a Kadesch, 2001).

Doména BTD, která také přispívá ke kontaktům s DNA (viz 1.2.3.), sestává převážně z β -listů a strukturně připomíná otevřený β -barel. Její součástí je dlouhý β -list C4, který tvoří centrální organizační strukturu a spojuje všechny tři domény. Navíc N-terminální helix α 1 je součástí CTD, takže výsledná doménová architektura je poměrně komplexní se specifickými kontakty mezi doménami (Kovall a Hendrickson, 2004). Jelikož struktura β -barelu domény BTD postrádá víčko (chybí β B2 a β B3), došlo u proteinů CSL k vytvoření hydrofobní kapsy. Na N-konci intracelulární části receptoru Notch byl identifikován nepolární peptidový motiv, který interaguje s touto hydrofobní kapsou (Hsieh a Hayward, 1995; Kovall a Hendrickson, 2004). V BTD jsou však i další místa a struktury, kam se váží interakční partneři, zejména korepresory, u kterých se nevyskytuje identifikovaný nepolární peptidový motiv (Kao et al., 1998; Hsieh et al., 1999; Johnson et al., 2010; Kurth et al., 2011).



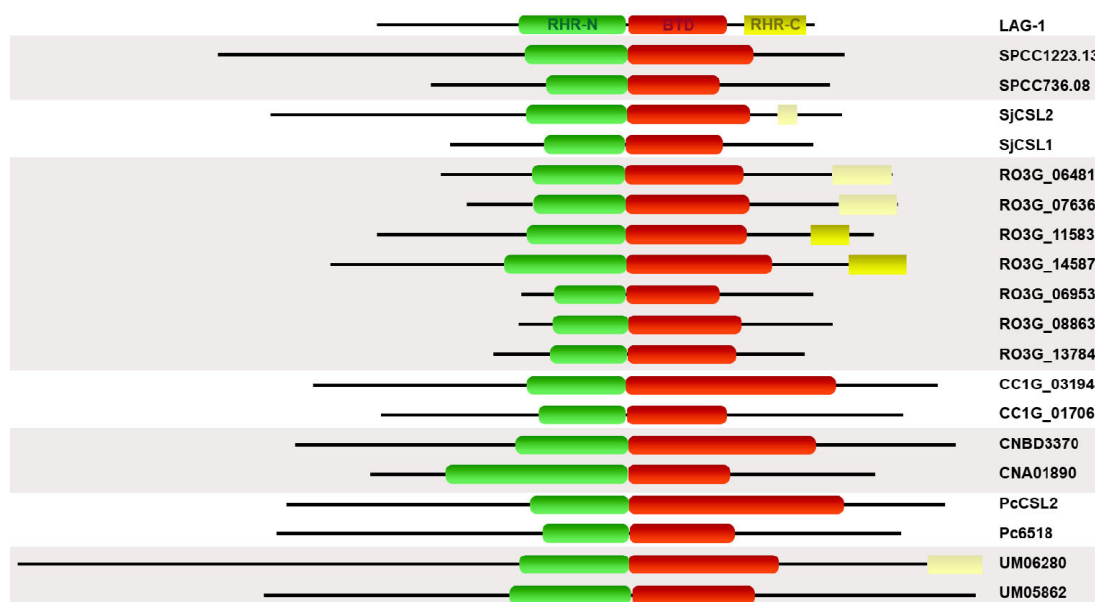
Obr. 1.4 Sekvenční konzervovanost proteinu CSL mapovaná na povrch molekuly proteinu CSL LAG-1. Podobnost je ilustrována pomocí barevného gradientu, kde tmavě červená představuje absolutní identitu a bílá nekonzervovanou oblast. Místo kontaktu s DNA a hydrofobní kapsa (označená šipkou) jsou vysoce konzervované. Upraveno a převzato z Kovall a Hendrickson, 2004.



Obr. 1.5 Model proteinu rodiny CSL LAG-1 *C. elegans* v komplexu s DNA. Znázorněny jsou jednotlivé domény a také CSL-vazebný motiv. Převzato z Kovall a Hendrickson, 2004.

Z fylogenetické studie (Obr. 1.3) lze vyčíst, že míra divergence je u fungálních proteinů vyšší než u proteinů metazoálních. Nicméně také u fungálních proteinů CSL byly identifikovány domény NTD a BTD a je zachován i linker β C4, což naznačuje, že uspořádání domén je konzervované (Obr. 1.6; Převorovský et al., 2007). Doména CTD je u metazoi méně konzervovaná v porovnání s NTD a BTD. U fungálních proteinů je konzervovanost ještě nižší a CTD byla rozpoznána jen u několika proteinů (viz Obr. 1.6). Sekvence BTD domény, které u metazoi vytváří místa

sloužící k interakci s koregulátory, nejsou u houbových proteinů zachovány. Nicméně potenciál vytvořit hydrofobní kapsu, která u metazoi interaguje s nepolárním peptidovým motivem interaktorů, zůstal zachován (Převorovský et al., 2007).



Obr. 1.6 Organizace domén fungálních proteinů CSL. Černá linka znázorňuje sekvenci proteinu a barevně jsou vyznačeny domény – NTD zeleně, BTB červeně a CTD žlutě (světle žlutá označuje nízkou signifikanci). Pro srovnání je nakreslena struktura proteinu LAG-1 *C. elegans*. Houbové proteiny jsou z organismů *S. pombe*, *S. japonicus*, *R. oryzae*, *C. cinereus*, *C. neoformans*, *P. chrysosporium*, *U. maydis*. Převzato z Převorovský et al., 2007.

Kromě tří definovaných domén jsou na koncích proteinů CSL oblasti, které jsou málo konzervované a jejichž prostorové uspořádání není známé (Wilson a Kovall, 2006; Nam et al., 2006). U houbových proteinů jsou tyto oblasti výrazně prodloužené, zejména na N-konci proteinu, a i u blízce příbuzných druhů velmi divergované. V těchto částech proteinů nebyly nalezeny žádné domény a ani sekundární struktury (Převorovský et al., 2007; Převorovský et al., 2011). Přesto jsou tyto oblasti zřejmě důležité pro funkci proteinů CSL, jinak by pravděpodobně byly v evoluci ztraceny (Warringer a Blomberg, 2006).

1.2.2.1. Nestrukturované N-konce proteinů CSL

N-terminální konce fungálních proteinů CSL jsou oblasti s malou komplexitou, pravděpodobně postrádající stabilní strukturu (Převorovský et al., 2011). Neuspořádané oblasti jsou velmi často přístupné mnoha interakcím díky konformační flexibilitě, a mohou sloužit jako místa fosforylace a proteolýzy (Iakoucheva et al., 2004; Tompa et al., 2007). Také jsou spojovány s regulačními procesy jako transkripce, přenos signálů, kontrola buněčného cyklu nebo diferenciací (Vavouri et al., 2009; Gsponer et al., 2008; Dunker et al., 2008; Ward et al., 2004).

V sekvencích N-konců proteinů CSL bylo v porovnání s jádrem proteinu (NTD a BTD) a C-koncovou oblastí nalezeno *in silico* vyšší zastoupení aminokyseliny serin, která může sloužit jako substrát pro protein kinázy. Stejně tak jsou N-konce nabohaceny o motivy PEST, což jsou sekvence bohaté na aminokyseliny prolin, kyselinu glutamovou, serin a threonin (Převorovský et al., 2011). Motivы PEST jsou v závislosti na podmínkách signálem pro degradaci proteinů (Rechsteiner a Rogers, 1996), preferenčně jsou situovány v neuspořádaných oblastech a souvisí s regulačními procesy (Singh et al., 2006).

V N-terminální části proteinů CSL se tedy nacházejí dva typy regulačních motivů a tudíž se N-konce proteinů potencionálně mohou podílet na regulaci funkce CSL. Navíc díky predikované neuspořádanosti mohou interagovat s širokým spektrem partnerů, a mohou integrovat signály z různých signálních drah.

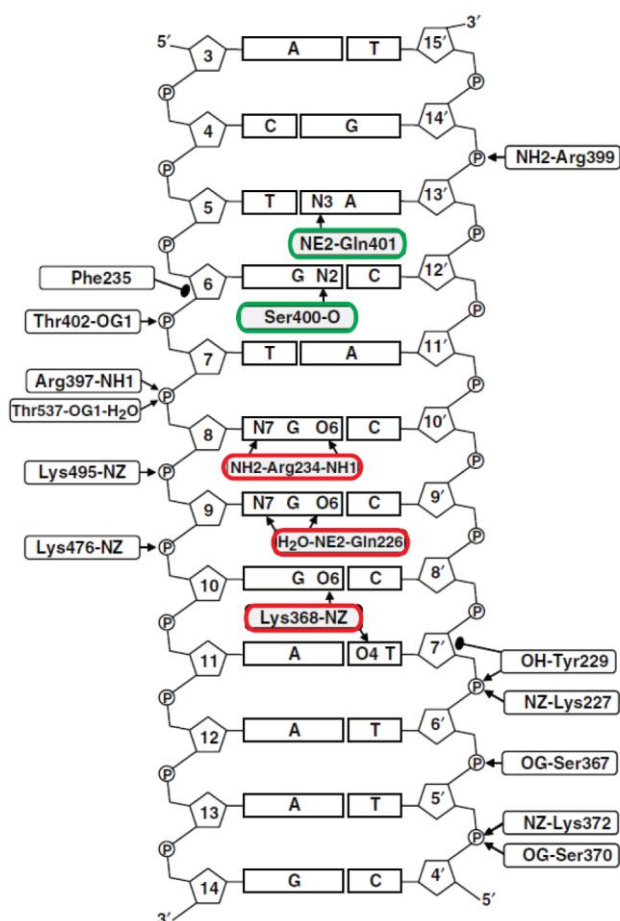
1.2.3. Vazba na DNA

Části domén NTD a BTD vytvářejí elektropozitivní povrch, který specificky interaguje s DNA. Doména NTD se váže do velkého žlábků DNA a doména BTD do malého žlábků (Kovall a Hendrickson, 2004). Doména CTD se na DNA neváže, ale přesto je pro vazbu nezbytná, protože stabilizuje terciární uspořádání, a nepřímou tak přispívá k vazbě na DNA (Chung et al., 1994; Roehl et al., 1996; Nam et al., 2003).

Kombinace vazby do malého a velkého žlábků DNA přispívá k těsnosti vazby a ke specifitě. Protein se však váže na DNA také pomocí sekvencně nespecifických vazeb, přičemž zabírá úsek dlouhý 11 bp. Navázání proteinu způsobí lokální změny v konformaci DNA, které vedou k rozšíření velkého žlábků a částečně i žlábků malého. Celkově však DNA zůstává v konformaci B (Kovall a Hendrickson, 2004).

Zástupce rodiny CSL, protein LAG-1, se specificky váže na sekvenci 5'-TGTGGGAA-3' a další sekvenčně nespecifické interakce oblast kontaktu rozšiřují (Obr. 1.7; Kovall a Hendrickson, 2004). NTD váže sekvenci 5'-GGGA-3' zmíněného vazebného elementu, a to aminokyselinovými zbytky Arg234, Lys368 a Gln226. BTD se váže zbytky Gln401 a Ser400.

Kromě kanonického vazebného motivu GTG^G/A GAA jsou známy další motivy, které proteiny CSL rozpoznávají: TGGGAAA, TGGGAAAGAA nebo CATGGGAA (Barolo et al., 2000; Dou et al., 1994; Lam a Bresnick, 1998; Lee et al., 2000; Morel a Schweisguth, 2000; Oswald et al., 1998; Shirakata et al., 1996; Tun et al., 1994).



Obr. 1.7 Schématické znázornění všech interakcí proteinu LAG-1 s DNA. Specifické interakce bází DNA s NTD jsou označeny červeně, s BTD zeleně. Ostatní interakce jsou sekvenčně nespecifické. Interakce přes vodíkové nebo solné můstky je zakreslena šipkou, Van der Waalsovy interakce kolečkem. Převzato z Kovall a Hendrickson, 2004.

Bylo ukázáno, že myší protein RBP-Jκ se na DNA váže jako monomer (Chung et al., 1994), ale zdá se, že svoji roli hraje také kooperativní vazba proteinů CSL s jinými faktory a že záleží na přesné architektuře vazebných míst (Miyatsuka et al., 2007).

V sekvencích fungálních proteinů byly nalezeny všechny aminokyseliny, které jsou nutné k sekvencně specifické vazbě metazoálních proteinů CSL na DNA, absolutně konzervované (Převorovský et al., 2007).

1.3. Proteiny CSL *S. pombe*

1.3.1. Kvasinka *Schizosaccharomyces pombe*

Poltivá kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* patří k populárním modelovým organismům. Jednobuněčná houba patřící do oddělení Ascomycota je využívána zejména ke studiu buněčného cyklu a jeho regulace, replikace a oprav DNA, chromatinové architektury a dynamiky, buněčného růstu a polarity, a také ke studiu genové exprese (Egel, 2004; Rhind et al., 2011). Z fylogenetických a molekulárních dat vyplývá, že kvasinka *S. pombe* patří do evolučně starší větve oddělení Ascomycota a má blíže ke společnému předku hub a metazoí než rod *Saccharomyces* (Sipiczki, 1989). Některé další charakteristiky, jako například vyšší počet genů s introny, delší intergenové oblasti, rozšířené a odlišně fungující centromerické oblasti, ukazují větší podobnost s vyššími eukaryoty než s pučící kvasinkou *S. cerevisiae* (Käufer a Potashkin, 2000; Wood et al., 2002)

Genom *S. pombe* byl sekvenován a sestává z 12,5 Mb unikátních sekvencí distribuovaných na tři chromozomy. Dále se v genomu vyskytují repetitivní sekvence ribozomální DNA, centromerické a telomerické oblasti a celková velikost genomu je tedy 13,8 Mb. Kvasinka nese zhruba 5 000 genů kódujících proteinové produkty (Wood et al., 2002).

1.3.2. Cbf11 a Cbf12

V *S. pombe* byly identifikovány dva paralogy proteinů CSL pojmenované Cbf11 (SPCC736.08) a Cbf12 (SPCC1223.13). Protein Cbf11 náleží do třídy F1, zatímco Cbf12 do třídy F2 (Převorovský et al., 2007). Geny CSL jsou u *S. pombe* neesenciální a jejich produkty lokalizují do jádra buňky. Protein Cbf11 je exprimován konstantně během všech fází růstu buněčné kultury, v případě Cbf12 dochází ke zvýšení hladiny mRNA ve stacionární fázi růstu (Převorovský et al., 2009). Expresce Cbf12 se zvyšuje také v meióze a za podmínek ionizujícího záření (Převorovský et al., 2009; Watson et al., 2004).

V sekvencích obou proteinů Cbf11 a Cbf12 jsou zachovány aminokyselinové zbytky, které jsou u metazoálních proteinů potřebné pro vazbu DNA. Bylo ověřeno, že protein Cbf11 sekvenčně specificky rozpoznává kanonický CSL-vazebný element $\text{GTG}^{\text{G}}/\text{A}^{\text{A}}\text{GAA}$ *in vitro* a váže se na něj přímo. Vazba Cbf12 na DNA nebyla detekována. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo v proteinu Cbf12 identifikováno 19 fosforylačních míst, z toho 16 v N-terminální části proteinu. Vazba na kanonický CSL-vazebný element byla detekována pouze pro Cbf12(Δ 1-394), jemuž chybí převážná většina N-koncové nestrukturované části proteinu a obsahuje jen 6 z 19 doposud nalezených fosforylačních míst. N-konec proteinu zřejmě negativně ovlivňuje vazbu na DNA. Vazba Cbf12(Δ 1-394) je sekvenčně specifická, ale kanonický CSL-vazebný motiv DNA váže s nižší afinitou než Cbf11 (Převorovský et al., 2009; Ptáčková, 2010; Převorovský et al., 2011).

Buňky s delecí genu *cbf11* nebo *cbf12* jsou viabilní, a zatímco deletanti *cbf12* vykazují normální buněčnou morfologii, buňky s delecí *cbf11* mají změněný tvar (Hayles et al., 2013; Kim et al., 2010; Decottignies et al., 2003). Ektopická nadprodukce obou proteinů vede k mírnému prodloužení buněk oproti kontrole a fitness buněk je lehce snížena (Vachon et al., 2013). Delece *cbf11* se projevuje také zhoršením růstu na pevných médiích v 19°C a 25°C v porovnání s buňkami WT nebo Δ *cbf12* (tzv. chladová senzitivita). Kultivací buněk s jednotlivými delecemi a delecí dvojitou ve 30°C se zjistilo, že zatímco Δ *cbf12* rostou srovnatelně jako WT, buňky Δ *cbf11* rostou pomaleji. Protein Cbf11 ovlivňuje také morfologii celých kolonií. U kolonií buněk Δ *cbf11* a Δ *cbf11* Δ *cbf12* kultivovaných na bohatém mediu byla na povrchu kolonií zaznamenána vrstva extracelulárního materiálu, která obsahuje hydrofobní a reflexní sloučeniny (tzv. fenotyp „shiny“). Změny byly pozorovány i ve tvaru kolonií. Buňky Δ *cbf12* a WT tvoří pravidelné kruhové kolonie, zatímco u buněk Δ *cbf11* a Δ *cbf11* Δ *cbf12* se objevují defekty a tvarové nepravidlosti (Převorovský et al., 2009).

Některé procesy regulují proteiny CSL antagonistickým způsobem. Například adhezivitu buněk k podkladu a k dalším buňkám, tzv. flokulaci. Flokulace je definována jako reverzibilní agregace buněk do makroskopicky viditelných útvarů (Straver et al., 1993). Flokulovaly buňky s delecí *cbf11* nebo nadprodukcí Cbf12 a kombinací obojího byl efekt dále potencován. Protein Cbf11 tedy proces flokulace ovlivňuje negativně a Cbf12 pozitivně (Převorovský et al., 2009). Zdá se, že zejména protein Cbf12 funguje v rámci složitější regulační sítě řídící flokulaci. Cbf12 totiž

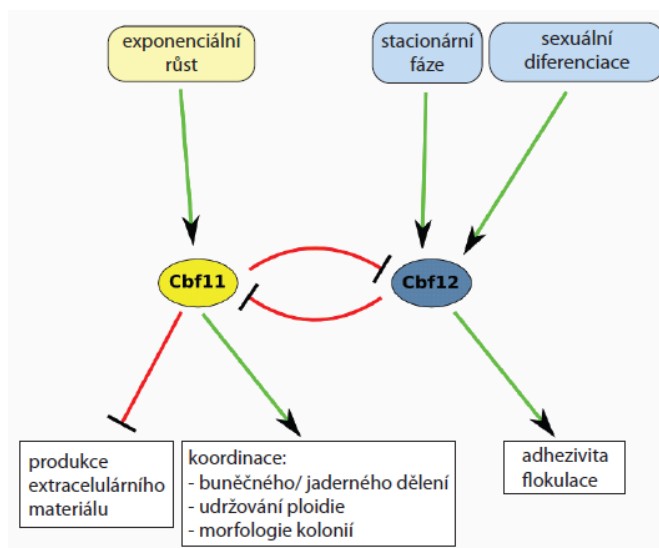
přímo aktivuje transkripci genů potřebných pro flokulaci, zejména dominantního flokulinu Gsf2 (Kwon et al., 2012). Sám Cbf12 je regulován RNA-vazebným proteinem Zfs1, který negativně ovlivňuje akumulaci mRNA *cbf12*, a brání tak spuštění flokulace jako následku nadprodukce Cbf12 (Wells et al., 2012).

Mutanti v genech CSL vykazují fenotypy spojené s průchodem buňky buněčným cyklem. Za normálních podmínek se většina buněk v exponenciálně rostoucí kultuře nachází v G2 fázi buněčného cyklu. Pokud se pomocí průtokové cytometrie (FACS) měří obsah DNA v těchto buňkách, je detekována unimodální distribuce s maximem v 2C v případě haploidních buněk a 4C u buněk diploidních (Sazer a Sherwood, 1990). Haploidní buňky nesoucí delecí *cbf11* nebo $\Delta cbf11 \Delta cbf12$ však obsahují i frakci buněk s obsahem DNA větším než 2C. Tato frakce se objevuje i při nadprodukci Cbf12, a tudíž oba proteiny jsou zahrnuty do udržování ploidie genomu a působí protichůdně (Převorovský et al., 2009). Dále byly v těchto buňkách ($\Delta cbf11$, $\Delta cbf11 \Delta cbf12$, nadprodukce Cbf12) pozorovány defekty septace jako například tvorba vícečetných sept v jedné buňce, aberantní struktura septa nebo pseudohyfální růst (Převorovský et al., 2009; Vachon et al., 2013). Souhrnně se tyto defekty označují jako fenotyp sep (Grallert et al., 1999). S delecí *cbf11* je spojen i tzv. fenotyp cut (cell untimely torn; Hirano et al., 1986), kdy ještě před rozdělením jádra a dokončením mitózy dojde k předčasnému vytvoření septa skrze jádro. U buněk s nadprodukcí *cbf12* se fenotyp cut téměř nevyskytoval (Převorovský et al., 2009). Také délka buněk před mitózou, což je u *S. pombe* charakteristický znak, je zkrácena v případě deletantů *cbf11* (Převorovský, Oravcová, publikace v přípravě).

Pro oba geny CSL bylo do dnešní doby identifikováno několik epistatických interakcí. Dokumentována byla syntetická negativní interakce delece *cbf11* s delecemi genů kohezivního komplexu (*eso1*, *mis4*), který udržuje spojené sesterské chromatidy od replikace DNA do separace chromatid na pomezí metafáze a anafáze mitotického dělení (Chen et al., 2012). Delece *cbf12* interaguje pozitivně i negativně s delecemi genů kódujících proteiny modifikující histony (*set1*, *swd1*, *prw1*), remodelující chromatin (*fft3*), účastníci se meiózy (*rem*, *dad3*), oprav DNA (*rad2*) a transkripce (*rpa12*; všechny interakce dle Ryan et al., 2012).

Fyzická interakce byla popsána pro protein Zfs1, který interaguje s mRNA *cbf12* (Wells et al., 2012). V případě Cbf11 bylo identifikováno více než 300 potenciálních interaktorů účastnících se zejména kontroly transkripce, úprav RNA a remodelace chromatinu (Pancaldi et al., 2012).

Výše popsané fenotypy související s manipulacemi v genech *cbf11* a *cbf12* jsou shrnuty v Obr. 1.8.



Obr. 1.8 Schéma fungování proteinů Cbf11 a Cbf12 v *S. pombe*. Převzato a upraveno z Převorovský et al., 2009.

1.4. Buněčný cyklus *S. pombe* a jeho regulace

Buňky *S. pombe* jsou haploidní během převážné části jejich životního cyklu a množí se asexuálně mitotickým dělením. Výsledkem příčného přehrádečného dělení jsou dvě identické dceřiné buňky. Buněčný cyklus se rozděluje do čtyř fází – G1, S, G2, M. Na rozdíl od *S. cerevisiae* tráví buňka *S. pombe* zhruba 70% doby trvání cyklu v G2 fázi. Typickým znakem je tzv. uzavřená mitóza. Během M fáze, kdy dochází ke kondenzaci chromozomů, jejich separaci a formování dvou oddělených jader, zůstává jaderná membrána intaktní. Fáze G1 je u buněk WT za standardních kultivačních podmínek velmi krátká, fáze G2 je především růstová. Během S fáze se replikuje genetická informace (Gómez a Forsburg, 2004; Forsburg a Rhind, 2006).

Další zvláštností tohoto modelového organismu je také to, že jaderný a buněčný cyklus neprobíhají synchronně. Po mitóze vstoupí jádra do G1 fáze dalšího buněčného cyklu a teprve na pomezí G1/S se začíná formovat dělicí septum. K cytokinezi dojde až během S fáze a oddělené buňky se již nacházejí v rané G2 fázi (Gómez a Forsburg, 2004).

V podmínkách hladovění na glukózu přejdou haploidní buňky z mitotického cyklu do stacionární fáze, přičemž mitotický cyklus opouští v G2 fázi. Pokud kultura trpí

nedostatkem dusíku, vstupuje do klidového stavu (quiescence) z G1 (Costello et al., 1986). Alternativně mohou buňky zahájit proces sexuální diference, je-li k dispozici partner opačného párovacího typu (plus/minus). V tom případě dojde ke konjugaci a fúzi jader. Vzniklá diploidní buňka většinou ihned projde meiózou, přičemž vytvoří vřecko obsahující čtyři dormantní haploidní spory. Ke konjugaci dochází zejména za nedostatku zdrojů dusíku (Egel, 2004).

Progrese buněčným cyklem je velmi přísně regulována. Majoritní kontrolní bod leží na pomezí fází G2/M a brání vstupu do mitózy před dokončením replikace DNA. Vstup do mitózy závisí na aktivitě komplexu MPF (mitosis promoting factor). Komplex se skládá z katalytické kinázové podjednotky kódované genem *cdc2* (cyklin-dependentní kináza Cdk1) a regulační podjednotky cyklin B (Nurse, 1990). Cyklin B je kódován genem *cdc13* (Hagan et al., 1988). Aktivita komplexu MPF kolísá v průběhu buněčného cyklu. Během interfáze je komplex fosforylován kinázami Wee1 a Mik1, a tak udržován neaktivní (Gould a Nurse, 1989). Když buňka splní všechny předpoklady pro vstup do mitózy, fosfatáza Cdc25 odstraní fosfáty z komplexu MPF, tím ho aktivuje a buňka vstoupí do M fáze (Forsburg a Nurse, 1991; Nurse, 1990; Perry a Kornbluth, 2007). Aktivita Cdc2 je vyžadována také pro začátek replikace DNA v S fázi a nefunkční Cdc2 vede k zastavení buněčného cyklu v G1/S i G2/M (Forsburg a Nurse, 1991).

1.4.1. Synchronizace buněk v určité fázi buněčného cyklu

Buňky *S. pombe* koordinují růst a průchod buněčným cyklem. Během exponenciální fáze růstu kultury mají dceřiné buňky po cytokinezi stejnou velikost a před vstupem do dalšího buněčného dělení ji zdvojnásobí. Buňky se prodlužují apikálně a délka buňky přesně koreluje s jednotlivými fázemi buněčného cyklu (Gómez a Forsburg, 2004; Forsburg a Rhind, 2006). Synchronizace buněk v konkrétní fázi buněčného cyklu je užitečným nástrojem pro studium exprese genů a funkcí proteinů v různých fázích cyklu. Synchronizace probíhá na základě dvou odlišných principů – selekce nebo indukce tj. zastavení v dané fázi cyklu.

Selekce v tomto případě znamená výběr buněk uniformní velikosti, které se tudíž nacházejí ve stejné fázi buněčného cyklu. Tohoto principu využívají metody centrifugační elutriace (Creanor a Mitchison, 1979) a centrifugace v laktózovém gradientu (Edwards a Carr, 1997). Výhodou obou metod je, že buňky mají jen velmi

málo narušenou fyziologií, nicméně obě metody vyžadují náročné vybavení a výtěžek buněk nacházejících se v požadované fázi buněčného cyklu je malý. Navíc mutanty, které způsobují změnu délky buněk či heterogenitu v morfologii buněk, je obtížné těmito metodami synchronizovat, protože spoléhají na selekci na základě velikosti buněk (Walker, 1999).

Metody indukované synchronizace zahrnují blokování buněk v určitých bodech buněčného cyklu. K tomu lze využít mutanty v genech řídících průchod cyklem, chemické látky nebo hladovění kultury na dusík. Teplotně senzitivní mutanty tzv. *cdc* genů (*cell division cycle*) v nepermissivní teplotě zastaví průchod cyklem v jeho určité fázi, a po návratu do teploty permissivní buňky prochází následnými fázemi cyklu synchronně (Nurse, 1975; Nurse et al., 1976; Fantes a Nurse, 1978). Často se používají mutanty v genech *cdc10* a *cdc22* pro blok v G1 fázi (Iino a Yamamoto, 1997; Dickinson, 1981), *cdc21* pro S fázi (Nasmyth a Nurse, 1981), *cdc25* pro G2 (Millar et al., 1992) a *nuc2* pro zastavení v anafázi M fáze (Hirano et al., 1988). Při použití chemických látek k blokování buněčného cyklu pozorujeme synchronizovaný průchod následnými fázemi cyklu po odmytí dané chemikálie. Hydroxyurea inhibuje replikaci DNA a způsobuje zastavení cyklu na počátku S fáze (Slater, 1973; Enoch et al., 1992). Na rozdíl od *S. cerevisiae* je použití mikrotubulových jedů jako například thiabendazol, benomyl nebo nocodazol pro blokování cyklu v mitóze u *S. pombe* problematické. Blokování v M fázi není příliš efektivní a některé látky blokují buňky už v G2 fázi a zabraňují vstupu do mitózy (Alfa et al., 1990). Nevýhodou indukovaného zastavení buněčného cyklu je výraznější zásah do fyziologie buněk.

Synchronizace buněk lze dosáhnout také hladověním buněčné kultury na dusík, které zastaví buňky v G1 fázi. Popsána byla také metoda synchronizace pomocí feromonu (P faktor), ale ta je využitelná jen v případě specifického genetického pozadí buněk (Stern a Nurse, 1997). Oba způsoby synchronizace však ovlivňují mnoho aspektů metabolismu buňky.

1.4.2. Metody experimentálního monitorování průběhu buněčného cyklu

Ověřit, že se buňky nacházejí v požadované fázi buněčného cyklu, lze kombinací několika přístupů. Etapa buněčného cyklu může být určena morfologií jádra nebo i dělicího vřeténka, obsahu DNA v buňkách, přítomností septa.

Pomocí fluorescenční mikroskopie lze dobře pozorovat jadernou morfologii. Tvar, pozice a počet jader v buňce jsou dobrým indikátorem fáze buněčného cyklu. Kromě jadra lze pomocí fluorescenčních barviv a proteinů vizualizovat také například septum a mikrotubuly (Toda et al., 1981). Stanovení obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie patří ke klasickým metodám monitorování průchodu buněčným cyklem (Carlson et al., 1997; Knutsen et al., 2011).

Průběh synchronizačního experimentu lze v reálném čase sledovat pomocí tzv. septačního indexu kultury. Stanovení frakce buněk s kompletním septem, ale před začátkem invaginace plasmatické membrány, určuje míru synchronicity. Výskyt septa může být také použit jako morfologický ukazatel S fáze díky vzájemnému posunu jaderného a buněčného cyklu (viz 1.4; Forsburg a Rhind, 2006; Gómez a Forsburg, 2004). Kromě septačního indexu lze stanovit také binukleární index, což je počet buněk, které prošly mitózou, ale ještě se u nich nevytvořilo septum (Knutsen et al., 2011).

2. Materiál a metody

2.1. Mikroorganismy a jejich kultivace

2.1.1. *Escherichia coli* – kultivace a transformace

Bakteriální buňky jsme kultivovali v tekutém mediu LB (10 g/l pepton, 5 g/l kvasniční extrakt, 5 g/l NaCl) nebo v mediu super LB (20 g/l pepton, 10 g/l kvasniční extrakt, 5 g/l NaCl) při 37°C. Pevná media jsme připravili z živného agaru č. 2 (Imuna, 40 g/l). Pokud bylo potřeba přidat ampicilin (Biotika), jeho výsledná koncentrace byla 100 µg/ml.

Transformace buněk plasmidy jsme provedli elektroporací pomocí přístroje Gene Pulser Apparatus (Biorad) při nastavení hodnot kapacitance 25 F, napětí 2,5 kV a odporu 200 Ω. Pro dlouhodobé uchování transformovaných buněk jsme připravili glycerolové konzervy s výslednou koncentrací glycerolu 15% (Sigma) a skladovali v -80°C.

Tab. 2.1 Použitý kmen *E. coli*.

Kmen DH5α F⁻ ϕ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1*
hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*

2.1.2. *Schizosaccharomyces pombe*

2.1.2.1. Kultivace, transformace a exprese proteinů

Kmeny *S. pombe* (Tab. 2.2) jsme kultivovali v bohatém mediu YES (0,5% kvasniční extrakt, 3% glukóza, 0,025% SP suplementy (Formedium)) nebo v minimálním mediu EMM (12,3 g/l EMM broth without dextrose (Formedium), 2% glukóza). Pevná media jsme vytvořili přidáním 2% (YES) nebo 3% (EMM) agaru (Oxoid). Podle potřeby jsme do medií přidávali aminokyseliny, báze a vitamíny v následujících koncentracích: L-leucin, L-adenin a L-uracil 0,2 mg/ml, thiamin 5 µg/ml. Do medií jsme vždy přidávali také ampicilin (Biotika, 100 µg/ml).

Antibiotika pro účely selekce jsme přidávali v množství: G418 (Sigma) 100 µg/ml a ClonNAT (Werner Bioagents) 90 µg/ml. Standardně jsme buňky kultivovali při 30°C a optickou denzitu kultury měřili na přístroji Spekol 20 při $\lambda = 595$ nm.

Pro dlouhodobé skladování kvasinkových kmenů jsme buňky uchovávali v 30% glycerolu (Sigma) v -80°C. Před každým experimentem jsme buňky rozmrazili čerstvě bez několikanásobného pasážování na pevných mediích.

Transformaci buněk *S. pombe* plasmidy jsme prováděli lithium acetátovou metodou upravenou podle (Bähler et al., 1998; Morita a Takegawa, 2004; Van Driessche et al., 2005). Recipientní buňky jsme resuspendovali v reakční směsi 74 µl 50% PEG-4000 (Sigma), 7 µl 1 M LiAc (Sigma), 7 µl 10x TE (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) a přidali 1-5 µl plasmidové DNA (>100 ng) a 2 µl čerstvě denaturované ssDNA (salmon sperm DNA, 10 mg/ml). Směs jsme inkubovali 60 min ve 30°C, poté 15 min ve 42°C, nechali vychladnout na pokojovou teplotu a vyseli na selekční EMM plotnu. Nárůst transformovaných buněk lze očekávat po 3-5 dnech inkubace v příslušné teplotě.

Expresi genů kódujících značené proteiny jsme indukovali z plasmidů řady pREP (Craven et al., 1998; 2.3.7.). Tyto plasmidy obsahují promotor genu *nmt1*, který je regulovatelný přítomností thiaminu v kultivačním mediu (Maundrell, 1990). Exprese proteinů pod tímto promotorem se spouští v podmínkách bez thiaminu. Pro dosažení reprodukcibilní exprese proteinů jsme postupovali tak, že jsme medium s thiaminem zaočkovali buňkami prekultivovanými na pevném mediu s thiaminem. Buňky jsme v tekutém mediu kultivovali po několik generací do dosažení rané exponenciální fáze ($OD_{595} = 0,3$). Poté jsme alikvot kultury potřebný k naředění do konečného objemu na $OD_{595} = 0,05-0,07$ dvakrát promyli mediem bez thiaminu (centrifugace 3 000 rpm, 2 min, pokojová teplota) a resuspendovali do výsledného objemu média bez thiaminu. Buňky jsme sbírali po 20-22 hod, jelikož tato doba je nutná k metabolizování zbývajících intracelulárního thiaminu buňkami.

2.1.2.2. Křížení a sporulace

Křížení kmenů *S. pombe* s odlišným párovacím typem jsme prováděli na pevném mediu ME (3% malt extrakt (Oxoid), 2% agar, L-adenin, L-uracil, L-leucin, ampicilin; pH upraveno pomocí NaOH na 5,5). Oba kmeny jsme ve vysoké koncentraci buněk smísili přímo na plotně a inkubovali v teplotě nižší než 30°C. Při

vyšší teplotě je konjugace silně redukována. Po 2-3 dnech inkubace jsou formována vřecka, v případě některých mutantních kmenů později.

Genetická analýza produktů křížení je možná dvěma způsoby. Prvním z nich je tetradová analýza, kdy se pomocí mikromanipulátoru (Singer Instruments) separují jednotlivá vřecka, inkubují se 5 hod ve 37°C (nebo přes noc ve 20°C), aby stěna vřecek praskla a uvolnily se jednotlivé spory. Ty se opět pomocí mikromanipulátoru prostorově oddělí a inkubují ve vhodné teplotě, aby vyklíčily a utvořily kolonie. Kolonii s požadovaným genotypem identifikujeme kultivací na selekčních plotnách.

Druhým způsobem genetické analýzy je analýza náhodných spor (RSA), která umožňuje získání většího množství spor. Biomasu po 3-5 dnech křížení resuspendujeme do 300 μ l enzymu β -glukuronidázy (Sigma, 100x koncentrovaný roztok) a inkubujeme přes noc ve 37°C. Enzym rozštěpí buněčnou stěnu vegetativních buněk nebo stěnu vřecek, pouze spory zůstanou intaktní. Na selekční plotnu pak vysíváme zhruba 100 spor (množství vyšetých spor upravujeme podle očekávané frekvence vzniku požadovaných produktů meiózy).

Párovací typ kříženců jsme ověřovali pomocí colony PCR (2.3.6.1.) s využitím primerů mt1, mm a mp (převzato a upraveno z Alessio et al., 2003; viz Tab. 7.1 v příloze).

2.1.2.3. Synchronizace

Zastavení v určité fázi buněčného cyklu a synchronizovaný průchod buněk buněčným cyklem jsme prováděli pomocí termosenzitivní alely genu *cdc25* (Fantès, 1979). V permissivní teplotě 25°C jsou buňky *cdc25-22* mírně prodloužené oproti WT, ale v restriktivní teplotě 36°C zastaví buněčný cyklus v pozdní G2 fázi (Millar et al., 1992). Buňky kultivované v permissivní teplotě na $OD_{595} = 0,3-0,4$ jsme synchronizovali 4 hod ve 36°C, aby se vzhledem k délce buněčného cyklu všechny buňky dostaly do G2 fáze. Následně jsme v ledové lázni kulturu rychle zchladili na 25°C a dále kultivovali v této teplotě. Rapidní ochlazení kultury je pro synchronizovaný průchod buněčným cyklem zásadní. V intervalech 10-30 min od zchlazení jsme odebírali alikvoty buněk a pomocí mikroskopie monitorovali průchod buněčným cyklem sledováním septačního indexu (SI), který představuje procento buněk se septem. Pokud se v buňce objeví septum, je za normálních podmínek jádro buňky už v S fázi dalšího buněčného cyklu (Gómez a Forsburg, 2004), a výskyt septa tedy koreluje s S fází buněčného cyklu. Vrchol septace lze očekávat po 90-120 min

od zchlazení. Touto metodou lze dobře pozorovat průchod dvěma za sebou jdoucími cykly, poté už se synchronicita kultury ztrácí.

Tab. 2.2 Použité kmeny *S. pombe*.

Kmen	Genotyp	Zdroj
PN559	<i>h⁻ ura4-D18 leu1-32 ade6-M216</i>	(Decottignies et al., 2003)
JB23	<i>h⁻ cdc25-22</i>	Jürg Bähler
JB32	<i>h⁺</i>	Jürg Bähler
CBF11KO	<i>h⁻ Δcbf11::kanR ura4-D18 leu1-32 ade6-M216</i>	(Převorovský et al., 2009)
MP03	<i>h⁻ Δcbf12::natR ura4-D18 leu1-32 ade6-M216</i>	(Převorovský et al., 2009)
MP06	<i>h⁺ Δcbf11::kanR ura4-D18 leu1-32 ade6-M210</i>	(Převorovský et al., 2009)
MP09	<i>h⁻ Δcbf11::kanR Δcbf12::natR ura4-D18 leu1-32 ade6-M210</i>	(Převorovský et al., 2009)
MP15	<i>h⁻ cbf11-ctap4::natR ura4-D18 leu1-32 ade6-M216</i>	(Oravcová et al., 2013)
MP17	<i>h⁻ cbf12-ctap4::natR ura4-D18 leu1-32 ade6-M216</i>	(Převorovský et al., 2011)
MP19	<i>h⁺ cbf11-ctap4::natR</i>	Dr. Převorovský, nepublikováno
MP20	<i>h⁺ cbf12-ctap4::natR</i>	(Převorovský et al., 2011; JB796)
MP25	<i>h⁺ Δcbf11::kanR Δcbf12::natR</i>	Dr. Převorovský, nepublikováno
MP26	<i>h⁺ cbf11-3HA::natMX6</i>	Dr. Převorovský, nepublikováno
MP27	<i>h⁺ cbf12-3HA::natMX6</i>	(Převorovský et al., 2011)
MP61	<i>h⁻ Δcbf11::kanR cdc25-22</i>	Dr. Převorovský, nepublikováno
MP63	<i>h⁻ cbf11-ctap4::natR cdc25-22</i>	Dr. Převorovský, nepublikováno
MaP36	<i>h⁺ cbf12-ctap4::natR Δcbf11::kanR ura4-D18 leu1-32 ade6-M216</i>	tato práce

2.2. Techniky manipulace s proteiny

2.2.1. Příprava buněčných lyzátů

2.2.1.1. Nativní lyzát

Při přípravě nativního buněčného extraktu postupujeme tak, že buněčnou kulturu zchladíme na ledu a promyjeme STOP pufrem (150 mM NaCl, 50 mM NaF, 25 mM HEPES, 1 mM NaN₃, pH 8) při 5 000 rpm, 3 min, 4°C. Následně buňky resuspendované v 40 µl lyzačního pufru LB (25 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 150 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 25% glycerol, 1 M urea, pH 7,6), 2 mM DTT a směsi proteázových inhibitorů FY (Serva, 1/100 objemu lyzačního pufru) rozbijeme skleněnými kuličkami (Sigma, 425-600 µm) v homogenizátoru FastPrep24 (MP biomedical) při nastavení přístroje na rychlost 5,5 po dobu 3x 20 s. Do směsi přidáme 600 µl LB+FY+DTT (snížením objemu lze výsledný buněčný lyzát zakonzentrovat) a odstraníme skleněné kuličky. Kuliček se zbavíme tak, že dno zkumavky propíchneme jehlou o průměru menším než je rozměr kuliček a centrifugováním (1 000 rpm, 2min, 4°C) buněčný homogenizát přemístíme do nové zkumavky. Homogenizát centrifugujeme 20 000 g, 20 min, 4°C. Supernatant představující nativní lyzát lze skladovat v -80°C.

2.2.1.2. Měření koncentrace proteinu

Koncentraci proteinů v nativních extraktech jsme stanovovali spektrofotometricky při 750 nm s využitím kitu DC Protein Assay (Bio-Rad). Postupovali jsme podle protokolu doporučeného výrobcem pro vzorky obsahující detergenty. Kalibrační křivku standardů jsme konstruovali pro každé měření koncentrace proteinů. Jako standard jsme použili BSA (Bio-Rad, 2 mg/ml) v rozsahu 0,2 – 1,5 mg/ml a vzorky jsme měřili 10x ředěné. Směs vody a pufru LB (2.2.1.1.) jsme připravili jako „blank“.

2.2.1.3. Denaturovaný extrakt

Buněčnou kulturu sklídíme centrifugací (3 000 rpm, 5 min, 4°C) a buňky promyjeme ve STOP pufru (2.2.1.1.; 6 000 rpm, 5 min, 4°C). Sediment buněk resuspendujeme do 100 µl čerstvě připravené směsi 1,85 M NaOH a 7% β-merkapt ethanolu a vortexujeme 2 min při 4°C. Poté přidáme 100 µl 50% trichloroctové kyseliny (TCA) a inkubujeme 5 min na ledu. Směs centrifugujeme (12 000 rpm, 2 min, 0°C),

supernatant odstraníme, sediment resuspendujeme do 500 µl 1 M Tris a opět centrifugujeme. Sediment rozpustíme do 100 µl 2x Laemmli pufru (0,112 M Tris, pH 6,8, 12% glycerol (v/v), 3,42% SDS, 0,002% bromfenolová modř) o teplotě 80°C. Při této teplotě inkubujeme vzorek 20 min, zchladíme na ledu a centrifugujeme při pokojové teplotě 12 000 rpm, 3 min. Supernatant lze skladovat v -80°C.

2.2.2. SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)

Separaci proteinů v denaturujících podmínkách jsme prováděli v 7,5% akrylamidovém gelu na aparatuře Mini-Protean 3 (Bio-Rad) v Tris-glycinovém pufrovém systému. Do proteinových vzorků jsme před nanesením na gel přidali DTT na výslednou koncentraci 60 mM, v případě nativních lyzátů i Laemmli pufr (2.2.1.3.), a vzorky denaturovali 10 min při 95°C. Po inkubaci jsme centrifugací odstranili případné sraženiny. Jako standard molekulových velikostí jsme použili PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, #SM0671). Gely jsme barvili v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) podle instrukcí výrobce. Jako odbarvovací roztok jsme použili směs kyseliny octové (7%) a methanolu (5%).

2.2.3. Western blot a imunodetekce

Proteiny separované dle velikosti jsme z gelu přenesli na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad) s využitím Mini Trans-Blot systému (Bio-Rad) při 100 V po dobu 2 hod. Povrch membrány jsme poté blokovali inkubací v 3% odtučněném mléku (Bio-Rad). Dále jsme blot inkubovali s primární a příslušnou sekundární protilátkou (Tab. 2.3 a Tab. 2.4). Signál jsme na membráně vyvíjeli buď pomocí reakce alkalické fosfatázy (substráty BCIP a NBT, Bio-Rad), nebo s využitím ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham) podle protokolu od výrobce.

Tab. 2.3 Použité primární protilátky.

Protilátka	Ředění	Výrobce
anti-GFP antibody (Alkaline Phosphatase)	1:2 000	Abcam, ab6661
His•Tag antibody	1:1 000	Novagen, 70796
HA.11 clone 16B12 monoclonal antibody	1:1 000	Covance, MMS-101P
TAP Tag Antibody	1:1 000	Thermo Scientific, CAB1001
TAP-tag Antibody	1:1 000	GenScript, A00683
Monoclonal anti-PSTAIR	1:8 000	Sigma, P7962

Tab. 2.4 Použité sekundární protilátky.

Protilátka	Ředění	Výrobce
goat anti-mouse IgG-HRP	1:2 000	Santa Cruz Biotechnology, sc-2031
goat anti-rabbit IgG-HRP	1:2 000	Santa Cruz Biotechnology, sc-2030
goat anti-mouse IgG-AP conjugate	1:2 000	Bio-Rad, 170-6520
goat anti-rabbit IgG-AP conjugate	1:2 000	Bio-Rad, 170-6518

2.2.4. Aktivita β -galaktosidázy – ONPG assay

Kmeny nesoucí plasmidy, ze kterých se exprimuje reportérový gen kódující enzym β -galaktosidázu, jsme kultivovali v minimálním mediu s příslušnými suplementy do střední exponenciální fáze a sklízeli centrifugací (4 000 rpm, 3 min, 20°C). Buňky jsme promyli Z-pufrem (60 mM Na₂HPO₄.12H₂O; 40 mM NaH₂PO₄.2H₂O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄.7H₂O; pH 7) a do Z-pufru také resuspendovali. Přidali jsme 1 μ l β -merkptoethanolu na 300 μ l buněčné suspenze a skleněné kuličky (Sigma, 425-600 μ m). Na přístroji FastPrep24 (MP biomedical) jsme buňky rozbili při rychlosti 5,5 po dobu 3x 20s. V supernatantu jsme změřili koncentraci proteinů pomocí přístroje NanoDrop2000 (Thermo Scientific). Supernatant jsme podle potřeby naředili, aby celková koncentrace proteinů v buněčném lyzátu byla mezi jednotlivými vzorky srovnatelná. K lyzátu jsme přidali čerstvě připravený roztok ortho-nitrophenyl- β -D-galactosidu (ONPG, Sigma) na konečnou koncentraci 0,47 mg/ml a reakci inkubovali za stálého třepání ve 30°C. Reakci jsme zastavili přidáním 250 μ l 1 M Na₂CO₃, centrifugovali 13 000 g, 3 min při pokojové teplotě, abychom odstranili buněčnou debris, a aktivitu β -galaktosidázy stanovili spektrofotometricky při 420 nm. Před prvním měřením je nutné stanovit takovou koncentraci buněčných lyzátů v reakci a dobu inkubace, abychom se pohybovali v lineárním rozsahu reakce a nikoli už v oblasti saturace.

2.2.5. Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

Pro ChIP jsme kultivovali kmeny *S. pombe* ve vhodném mediu v objemu 50 ml na OD₅₉₅ = 0,6, což odpovídá 1,2x10⁷ buněk/ml. Vazbu proteinů na DNA jsme fixovali přidáním formaldehydu na výslednou koncentraci 1% po dobu 30 min a reakci jsme zastavili přidáním 0,125 M glycinu a inkubací 10 min. Buňky jsme propláchli destilovanou vodou (3 000 rpm, 3 min, pokojová teplota) a v případě potřeby skladovali v -80°C po dobu maximálně dvou měsíců. Buněčný pelet jsme

resuspendovali do 400 μ l lyzačního pufru LB2 (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% deoxycholát sodný, pH 7,6) s čerstvě přidaným koktejlem proteázových inhibitorů FY (Serva, 1/100 objemu). Za pomoci skleněných kuliček (Sigma, 425-600 μ m) jsme buňky rozbili na FastPrep24 (MP biomedical) při rychlosti 5,5 a intervalu 13 s. Počet rozbíjecích cyklů je třeba optimalizovat tak, aby bylo rozbito cca 70% buněk. Množství nerozbitých buněk jsme počítali na Bürkerově komůrce. Po rozbití buněk jsme odstranili skleněné kuličky (2.2.1.1.), lyzát centrifugovali (20 000 g, 10 min, 4°C) a promyli 600 μ l LB2+FY. Poté jsme sediment resuspendovali do 300 μ l LB2+FY a sonikovali v sonikační lázni Bioruptor (Diagenode) při teplotě 4°C a nastavení 20x (30 s zapnuto, 30 s vypnuto) na vysoký výkon tak, aby se výsledné fragmenty DNA velikostně pohybovaly okolo 200 bp. Sonikovaný materiál jsme centrifugovali (20 000 g, 10 min, 4°C) a odebrali supernatant představující solubilní chromatin. Na spektrofotometru NanoDrop2000 (Thermo Scientific) jsme změřili koncentraci proteinů proti vodě a podle potřeby upravili koncentraci mezi jednotlivými vzorky pomocí LB2+FY. Do samotné precipitace jsme použili 100-150 μ l solubilního chromatinu o celkové koncentraci proteinu 75-100 mg/ml doplněného do objemu 200 μ l roztokem LB2+FY. Alikvot 30 μ l jsme odebrali jako input. Vlastní imunoprecipitace se odlišuje pro proteiny značené HA a TAP tagem. V případě HA tagu se postup mění také podle použité matrice.

Pokud jsme jako matici použili protein A sepharosu (GE Healthcare, kat. č. 17-5280-01), postup imunoprecipitace byl následující: 15 μ l alikvot protein A sepharosy 3x promyté v LB2 pufru s 0,5 mg/ml BSA jsme inkubovali s chromatinem 1 hod, 4°C za stálého míchání, abychom se zbavili materiálu, který se váže na matici nespecificky. Matici jsme odstranili a chromatin inkubovali s 2,5 μ g anti-HA protilátky (Abcam, ab9110) 1 hod, 4°C. Následně jsme přidali 20 μ l promyté protein A sepharosy a inkubovali 3 hod při 4°C.

Při použití magnetických kuliček protein A dynabeads (Invitrogen, kat.č. 100.02D), jsme nejprve inkubovali lyzát s anti-HA protilátkou 4 hod, 4°C a následně 30 min s 35 μ l magnetických kuliček 3x promytých LB2 pufrem.

V případě TAP tagu stačilo smíchat lyzát s 30 μ l IgG dynabeads magnetickými kuličkami (Invitrogen, kat. č. 110.41) 3x promytými v 0,5% BSA v LB2 pufru a inkubovat při 4°C přes noc.

K izolaci precipitovaného materiálu lze také použít dva odlišné způsoby. V prvním případě jsme matrici promývali postupně dvakrát LB2 pufrem, dvakrát lysis500 pufrem (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% deoxycholát sodný, pH 7,6), dvakrát LiCl/NP-40 pufrem (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholát sodný, pH 8), a jednou TE pufrem (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Nakonec jsme precipitovaný materiál z matrice eluovali dvakrát do 100 µl elučního pufru (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, pH 8), vždy s inkubací 10 min při 95°C. Do inputu jsme přidali 170 µl TES pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, pH 8) a dále zpracovávali stejně jako IP.

Následovalo odstranění vazby mezi DNA a proteiny (přes noc při 65°C), inkubace s RNázou A (1 hod, 37°C; Thermo Scientific) a Proteinázou K (2 hod, 55°C; Roche). Samotnou DNA jsme pak izolovali pomocí fenol-chloroformové extrakce a precipitace acetátem sodným a ethanolem v přítomnosti glykogenu.

Rychlejší metodu izolace precipitované DNA představuje použití Chelexu 100 (Bio-Rad, kat. č. 142-1253). Matrici jsme šestkrát promyli IP pufrem (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,5% Nonidet P-40, pH 7,5) a resuspendovali do 10% Chelexu 100. Inkubovali jsme 10 min při 95°C, dále s Proteinázou K (30 min, 55°C, 1 000 rpm) a znovu 10 min, 95°C. Centrifugovali 12 000 rpm, 1 min při pokojové teplotě a v supernatantu byla precipitovaná DNA.

Množství a čistotu izolované DNA jsme stanovili spektrofotometricky (NanoDrop2000; Thermo Scientific) a dále analyzovali pomocí qPCR (viz 2.3.6.2) nebo DNA microarray (viz 2.3.8).

2.3. Techniky manipulace s nukleovými kyselinami

2.3.1. Izolace a purifikace DNA

2.3.1.1. Izolace chromozomální DNA *S. pombe*

Protokol jsme upravili na základě práce (Hoffman a Winston, 1987). Buňky narostlé do saturace jsme sklidili centrifugací (3 000 rpm, 3 min, 4°C) a pelet promyli destilovanou vodou. K buňkám jsme přidali 200 µl lyzačního roztoku (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), 200 µl směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1, pH 7,9) a 0,3 g skleněných kuliček (Sigma, 425-600 µm). Buňky jsme drtili ve FastPrep24 (MP biomedical) 2x 20 sec

při rychlosti 5. Přidali jsme 200 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), centrifugovali a odebrali vodnou fázi. K té jsme přidali 1 ml 96% ethanolu a centrifugovali. Pelet jsme resuspendovali v 400 µl TE pufru, přidali 3 µl RNázy A (Thermo Scientific) a inkubovali 5 min ve 37°C. Poté jsme DNA precipitovali pomocí 10 µl 4 M acetátu amonného a 1 ml 96% ethanolu. Precipitovanou DNA jsme rozpustili do vody a koncentraci stanovili na NanoDrop2000 (ThermoScientific).

Metodu rychlé izolace chromozomální DNA pro účely PCR jsme převzali z práce (Lõoke et al., 2011). Takto izolovanou DNA jsme používali jako alternativu místo celých buněk pro colony PCR.

2.3.1.2. Izolace plasmidové DNA z *E. coli*

Pokud jsme potřebovali izolovat množství plasmidu z většího objemu kultury, využili jsme metodu alkalické lyze podle (Birnboim a Doly, 1979). Bakteriální kulturu kultivovanou v příslušném mediu jsme centrifugovali (4 400 rpm, 10 min, 4°C), sediment resuspendovali v X ml roztoku I (25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza), a přidali 2X ml roztoku II (1% SDS, 0,2 M NaOH). Inkubovali jsme 5 min v pokojové teplotě, aby buňky zlyzovaly. Následně jsme přidali 1,5X ml roztoku III (3 M octan draselný, 2 M kys. octová; pH 4,8-5,4) a inkubovali 15 min. Objem X jsme volili podle výchozího objemu bakteriální kultury: 0,5-1 ml při 10 ml kultury, 2-4 ml při 50 ml kultury a 4-8 ml při 200 ml kultury. Směs jsme centrifugovali, supernatant jsme smísili s 0,6 objemu isopropanolu a opět centrifugovali. Sediment jsme rozpustili ve vodě, přidali stejný objem 10 M LiCl, inkubovali 20 min v -80°C a precipitované proteiny odstranili centrifugací (15 000 rpm, 5 min, 4°C). Plasmidovou DNA ze supernatantu jsme vysráželi stejným objemem 96% ethanolu.

Z kultury do objemu 2 ml jsme plasmidy izolovali pomocí kitu NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Tento kit jsme používali i pro purifikaci plasmidové DNA před sekvenací.

Izolované plasmidy jsme vždy ověřovali restrikcí štěpením a elektroforetickou analýzou.

2.3.1.3. Purifikace DNA

Fragmenty DNA jsme z agarozového gelu izolovali pomocí kitu NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel). Tento kit jsme používali také pro přečišťování fragmentů DNA po PCR reakci a dalších enzymatických reakcích.

K purifikaci DNA jsme alternativně používali postup precipitace DNA pomocí 3 M octanu sodného a 96% ethanolu. V případě malého množství DNA v reakci nebo krátkých fragmentů DNA jsme jako koprecipitans přidali glykogen ve výsledné koncentraci 0,05-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.3.2. Enzymy modifikující DNA

Enzymy uvedené v Tab. 2.5 jsme používali podle pokynů výrobce. Klonování fragmentů DNA do vektorů jsme prováděli s využitím T4 DNA ligázy.

Radioaktivně značené DNA próby jsme připravili pomocí T4 polynukleotid kinázy a γ - ^{32}P -ATP (4500 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$). Volné radioaktivní nukleotidy jsme odstranili purifikací na kolonce NICK Columns (G-50 DNA Grade, Amersham).

Tab. 2.5 Použité enzymy modifikující DNA.

Enzym	Výrobce
restrikční endonukleázy <i>NdeI, SmaI, EcoRI, HindIII</i>	Thermo Scientific
T4 DNA ligáza	Thermo Scientific
T4 polynukleotid kináza	Thermo Scientific

2.3.3. Izolace a purifikace RNA

Celkovou RNA jsme z buněk *S. pombe* izolovali kitem MasterPureTM Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) podle instrukcí výrobce. Optimálnímu množství buněk pro izolaci odpovídá 1-1,5 ml kultury. Čistotu a koncentraci izolované RNA jsme stanovili na NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

2.3.4. Reverzní transkripce

Reverzní transkripci jsme prováděli s využitím kitu RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) dle pokynů výrobce. Do reakce jsme vložili 2 μg RNA a jako primery jsme použili náhodné hexanukleotidy. Ze vzorku s nejvyšším množstvím izolované RNA jsme připravovali „no RT“ kontrolu, tj. reakci bez přidání

reverzní transkriptázy. Tato kontrola ukazuje na přítomnost kontaminující DNA ve vzorku.

2.3.5. Agarozová elektroforéza DNA

Fragmenty DNA jsme separovali na 1-2,5% agarozovém gelu (SeaKem LE Agarose, Cambrex) v 1x TAE pufrovém systému (40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 2 mM EDTA, pH 8,5). Aplikovali jsme napětí 3-10 V/cm. Gely jsme barvili v ethidium bromidu (ca 0,5 µg/ml) a fotografovali v procházejícím UV záření.

Do vzorků jsme přidávali vzorkový pufr 6x Orange Loading Dye (Thermo Scientific, kat. č. R0631) nebo 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, kat. č. R0611). Jako standardy velikostí a množství fragmentů DNA jsme nanášeli GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, kat. č. SM0331), GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM0371) nebo GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM0311).

2.3.6. PCR a kvantitativní PCR

2.3.6.1. PCR

Do PCR reakcí jsme přidávali primery (viz přílohy Tab. 7.1) ve výsledné koncentraci 0,5-1 µM a Mg²⁺ jsme používali v koncentraci 2,5-3 mM. V případě ověřování primerů pro qPCR jsme primery dodávali v koncentraci 0,3 µM a 4 mM Mg²⁺. Enzym Taq DNA polymerase (Thermo Scientific) jsme přidávali do reakcí dle instrukcí výrobce. PCR reakce jsme inkubovali v přístroji Peltier PTC-200 gradient thermal cycler (MJ Research) nebo Veriti cycler (Applied Biosystems). Použité programy jsou uvedené v Tab. 2.6.

PCR produkty vložené do vektorů jsme sekvenovali, abychom vyloučili přítomnost mutací.

Tab. 2.6 Přehled použitých programů PCR.

Program PCR	Aplikace
95°C 5 min, 25/35x (94°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 1 min), 72°C 5 min	Cbf12(395-465) z genomické DNA (25 cyklů); colony PCR (35 cyklů); 3.1.1.1.
95°C 1 min, 30/35x (95°C 15 sec, 60°C 30 sec, 72°C 20 sec), 72°C 2 min	ověřování primerů (30 cyklů); příprava práb na EMSA (35 cyklů; 3.5.1.1.)

95°C 5 min, 35x (94°C 30 sec, 54°C 30 sec, 72°C 1 min), 72°C 5 min	ověření nepřítomnosti <i>cbf11</i> (3.8.)
95°C 5 min, 35x (94°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 1 min), 72°C 5 min	určení párovacího typu

2.3.6.2. qPCR

Reakce kvantitativní PCR jsme pouštěli na přístroji Light Cycler LC480 (Roche) v 384 jamkových destičkách. Reakce o objemu 10 µl se skládaly z MESA GREEN qPCR Master Mix Plus for SYBR® Assay No Rox (Eurogentec), primerů v koncentraci 0,3 µM, templátové DNA a vody. V případě DNA z chromatinové imunoprecipitace jsme do reakcí dávali celkem 20 ng, v případě cDNA jsme přidávali 0,01 µl z reakce reverzní transkripce (2.3.4.). Všechny reakce jsme prováděli v triplikátech.

Program přístroje jsme volili následující: 95°C 5 min, 40x (95°C 15 sec, 60°C 30 sec, 72°C 20 sec).

Primery uvedené v příloze v Tab. 7.1 jsme vždy testovali nejprve na genomické DNA v koncentracích v rozsahu 5-6 řádů. Účinnost amplifikace pro daný pár primerů stanovenou na základě standardní křivky jsme poté používali ve výpočtech. Pokud jsme jako templát používali cDNA, stanovili jsme účinnost amplifikace páru primerů také na tomto templátu. Pouze páry primerů s účinností v rozmezí 95-105% jsme používali pro další měření.

Relativní kvantitu konkrétního úseku DNA nebo cDNA jsme stanovili komparativní metodou $\Delta\Delta C_p$ s korekcí účinnosti (Pfaffl, 2001). Postupovali jsme podle následující rovnice:

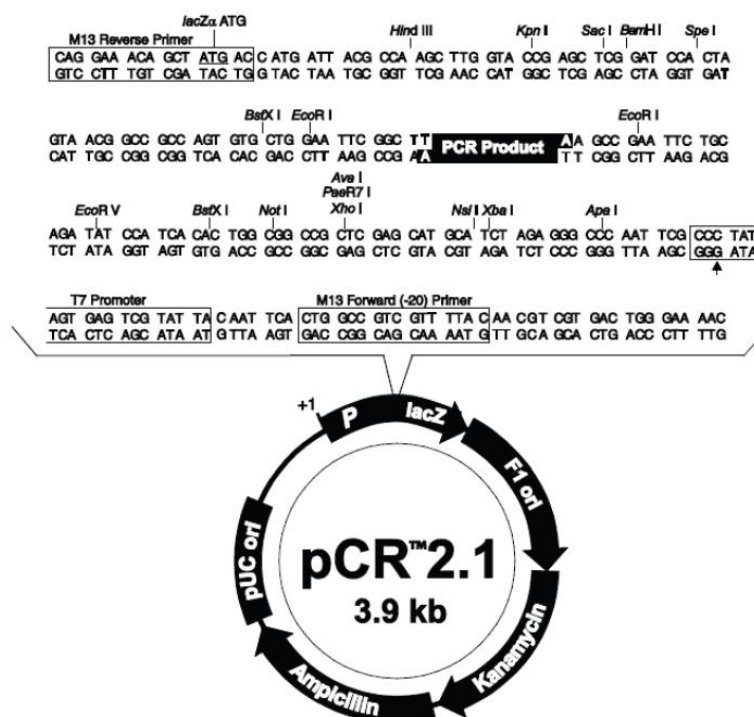
$$\text{relativní kvantita} = \frac{\left[\frac{E_{REF}^{C_{P_{REF}}}}{E_{GenX}^{C_{P_{GenX}}}} \right] A}{\left[\frac{E_{REF}^{C_{P_{REF}}}}{E_{Ctrl}^{C_{P_{Ctrl}}}} \right] B}$$

V dané rovnici E představuje účinnost amplifikace páru primerů, Cp (crossing point) relativní míru koncentrace amplifikované DNA ve vzorku, REF (reference) endogenní kontrolu. Do části A se dosadí hodnoty pro testovaný pár primerů (GenX), do části B hodnoty kontrolního páru primerů (Ctrl, tzv. kalibrátor).

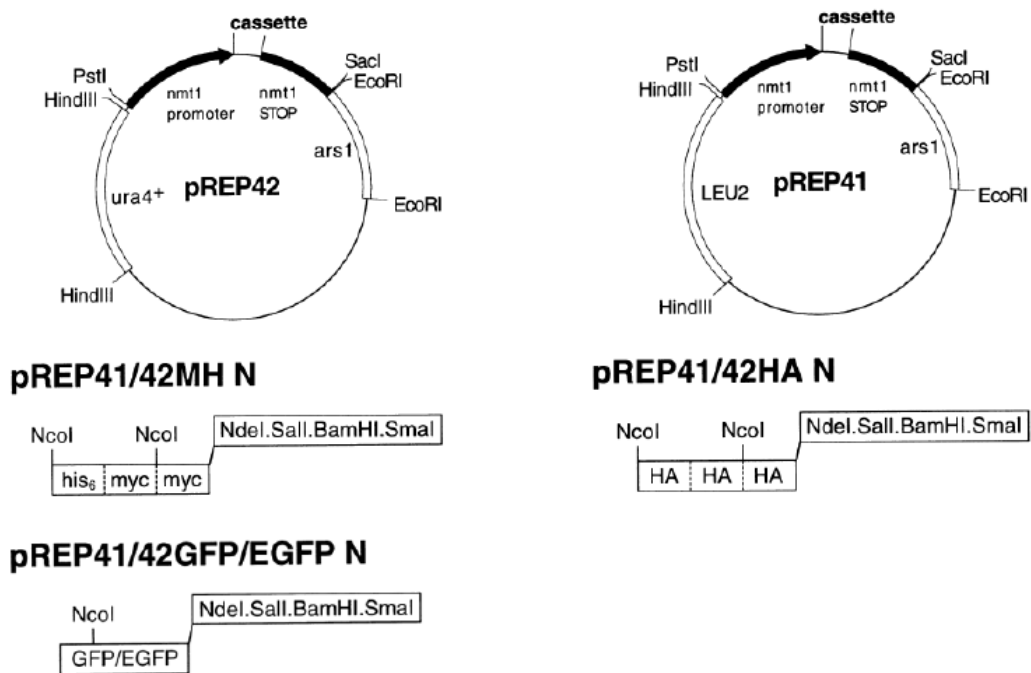
Výsledky chromatinové imunoprecipitace jsme vyjádřili buď jako % inputu (ΔC_p , použita pouze část A rovnice, kde REF = input) nebo jako nabohacení vůči kontrolnímu úseku ($\Delta \Delta C_p$, REF = příslušný input). Při měření exprese genů jsme využili jen část A rovnice, kde REF představuje *act1*.

2.3.7. Plasmidy

V této práci jsme používali následující vektory (Obr. 2.1, Obr. 2.2) a plasmidy (Tab. 2.7).



Obr. 2.1 Vektor pCR[®] 2.1 z kitu TA Cloning (Invitrogen).



Obř. 2.2 Vektory řerie pREP41/42 pro thiaminem kontrolovanou expřesi N-koncově značených proteinů v *S. pombe* (Craven et al., 1998).

Tab. 2.7 Plasmidy vytvořené nebo použité v této práci.

Jméno	Vektor	Popis	Zdroj/metoda klonování
pJR10	pREP42EGFPN	Cbf11 cDNA, bez intronu	(Oravcová et al., 2013)
pMP66	pREP42EGFPN	Cbf11DBM (R318H)	(Oravcová et al., 2013)
pMT02	pREP42EGFPN	Cbf11(Δ 1-172)	(Oravcová et al., 2013)
pMP34	pREP42EGFPN	Cbf12	(Převorovský et al., 2009)
pMT15	pREP42EGFPN	Cbf12DBM (R644H)	(Oravcová et al., 2013)
pMP67	pREP42EGFPN	Cbf12(Δ 1-394)	(Oravcová et al., 2013)
pMT04	pREP42EGFPN	Cbf12(Δ 1-465)	(Oravcová et al., 2013)
pMaP05	pREP42EGFPN	Cbf12(395-465)	<i>NdeI/SmaI</i>
pMaP04	pCR2.1	Cbf12(395-465)	TA cloning (Invitrogen)
pMaP01	pREP42MHN	Cbf12(Δ 1-394)	(Převorovský et al., 2011)
pJR07	pREP41HAN	Cbf11 cDNA, bez intronu	(Oravcová et al., 2013)
pMP64	pREP41HAN	Cbf11DBM (R318H)	(Oravcová et al., 2013)
pMP31	pREP41HAN	Cbf12	(Oravcová et al., 2013)
pMT09	pREP41HAN	Cbf12DBM (R644H)	(Oravcová et al., 2013)
pMP74	pREP42EGFPN	β -galaktosidázový reportér pod kontrolou minimálního promotoru se 3 elementy RBP (sense-sense-antisense)	(Oravcová et al., 2013)
pMP88	pREP42EGFPN	β -galaktosidázový reportér pod kontrolou minimálního promotoru se 3 elementy DEL2 (sense-sense-sense)	(Oravcová et al., 2013)

2.3.8. DNA microarray

Chromatinovou imunoprecipitaci následovanou kvantifikací na DNA microarray (ChIP-chip) jsme využili k hledání vazebných míst proteinů CSL v genomu *S. pombe in vivo*. Precipitovaný materiál DNA (viz 2.2.5) jsme amplifikovali pomocí random PCR (Bernstein et al., 2004). 500 ng amplifikované DNA z inputu a IP jsme označili inkorporací Cy-3 nebo Cy-5 dCTP s využitím kitu DNA Bioprime labelling system (Invitrogen) a purifikovali na kolonce (Invitrogen, PureLink PCR purification kit). Hybridizaci a promývání microarray jsme provedli podle doporučení výrobce. Použili jsme 4x44K *S. pombe* Genome ChIP-on-chip Microarray (Agilent). Jedna microarray obsahuje 44 tisíc prób dlouhých 60 nukleotidů, které pokrývají cca 85% nerepetitivního genomu *S. pombe*, přičemž próby jsou od sebe vzdáleny přibližně 290 bp. Abychom získali intenzitu fluorescenčního signálu všech prób, scanovali jsme microarray na scanneru GenePix 4000B s rozlišením 5 μ m. Následnou normalizaci a analýzu dat jsme prováděli ve statistickém prostředí R (www.R-project.org). Pro jednotlivé próby jsme spočítali poměr IP/input a poměr signálů namapovali na genom. Hledání signifikantních signálů vazby proteinů CSL na DNA jsme provedli pomocí programu ChIPOTle (Buck et al., 2005) s nastavením peak height cutoff 1, window 800 bp, step size 200 bp.

2.3.9. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Pro sledování interakce proteinu a DNA *in vitro* jsme používali nativní lyzáty z buněk *S. pombe* (viz 2.2.1.1). Dvouřetězcové DNA próby jsme nechali nasyntetizovat nebo připravili pomocí PCR amplifikace a precipitace v přítomnosti glykogenu. Následně jsme je terminálně označili pomocí γ -³²P-ATP (viz 2.3.2). Použité próby jsou uvedeny v Tab. 2.8.

Reakční směs jsme připravili ze 2 ng radioaktivně značené próby, shift pufru (25 mM HEPES, 34 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,6) a 20 ng sonikované ssDNA (salmon sperm DNA). Směs jsme přidali k nativnímu lyzátu (až 230 μ g), případně jsme dodali neznačený kompetitor (až 1 μ g) a inkubovali 20 min na ledu. Takto připravené vzorky jsme separovali na nativním 5% polyakrylamidovém gelu v 0,5x TBE pufru (44,5 mM Tris, 44,5 mM kys.boritá, 1 mM EDTA, pH 8) při 3 W po dobu několika hodin. Gely jsme vizualizovali pomocí expoziční kazety Kodak K (Kodak) a přístroje Molecular Imager PhorosFX (Bio-Rad).

Pro supershiftové experimenty jsme připravili nativní lyzáty bez DTT a ty jsme po dobu 1 hod inkubovali na ledu s 1 µg protilátky anti-GFP (Invitrogen, kat. č. A-11120) nebo s 1 µg protilátky anti-TAP (GenScript, A00683). Poté jsme přidali reakční směs a inkubovali 20 min před separací na gelu.

Tab. 2.8 Sekvence DNA prób použitých v experimentech EMSA. Sekvence jsou uvedené v 5'- 3'směru, F – forward, R – reverse. U prób ze sekvencí identifikovaných metodou ChIP-chip, které jsme získali pomocí PCR, jsou v tabulce uvedeny kombinace primerů (Tab. 7.1) použitých pro PCR.

Próba	Sekvence	Popis
RBP-F	ACAAGGGCCGTGGGAAATTCCTAAGCCTC	myší promotor RBP-Jκ (Oswald et al., 1998)
RBP-R	GAGGCTTAGGAAATTCACGGCCCTTGT	myší promotor RBP-Jκ (Oswald et al., 1998)
DEL-F	ATAATCCGGGCCCAACAAACAGAAACGGCC	odvozeno z KSHV próby, mutované místo pro proteiny CSL (Převorovský et al., 2009)
DEL-R	GGCCGTTTCTGTTTGTGGGCCCGGATTAT	odvozeno z KSHV próby, mutované místo pro proteiny CSL (Převorovský et al., 2009)
DEL2-F	CTAGACAAGGGCCCCAGCAAATTCCTAAGCCTC	odvozeno z RBP próby, mutované místo pro proteiny CSL, <i>NheI</i> přesahy
DEL2-R	CTAGGAGGCTTAGGAAATTTGCTGGGGCCCTTGT	odvozeno z RBP próby, mutované místo pro proteiny CSL, <i>NheI</i> přesahy
C1450.16c-F	ACAAATGTTTTTTCCACGGATGTAATCGT	promotor genu <i>ptl1</i> ⁺
C1450.16c-R	ACGATTACATCCGTGGGAAAAACATTTGT	promotor genu <i>ptl1</i> ⁺
ste6-F	CGATTACATCCGTGGGAAAAACATTTGTT	promotor genu <i>ste6</i> ⁺
ste6-R	AACAAATGTTTTTTCCACGGATGTAATCG	promotor genu <i>ste6</i> ⁺
c1739.08-F	ACACCACCGTCTTCCCACAATTTGAATGGG	promotor genu SPCC1739.08c

c1739.08-R	CCCATTCAAATTGTGGGAAGACGGTGGTGT	promotor genu SPCC1739.08c
c1f8.02c-F	CATCAATCTTAGTGGGAACATAAGAAGTTA	promotor genu SPAC1F8.02c
c1f8.02c-R	TAACCTTCTTATGTTCCCACTAAGATTGATG	promotor genu SPAC1F8.02c
amplikon C	mp100, mp101	
amplikon D	map37, map38	
amplikon C-D	mp100, map38	
amplikon J	mp108, mp109	
amplikon K	map74, map75	
amplikon J-K	mp108, map75	
amplikon O	map55, map56	
amplikon P	map13, map14	
amplikon O-P	map55, map14	

2.3.10. Průtoková cytometrie

Příprava buněk na mikroskopii probíhala podle (Sazer a Sherwood, 1990). Buňky jsme fixovali 70% ethanolem, rehydratovali v 50 mM citrátu sodném a inkubovali s RNázou A (Thermo Scientific). Nakonec jsme přidali propidium jodid na finální koncentraci 2 µg/ml a před měřením buňky sonikovali 3 min ve vodní lázni Teson 10 (Tesla). Obsah DNA jsme měřili na přístroji Becton Dickinson LSR II vždy na 10 000 buňkách pro každý vzorek. Data jsme analyzovali pomocí softwaru DiVa (BD Biosciences) nebo WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute).

2.4. Mikroskopie

Živé buňky exprimující proteiny značené EGFP jsme imobilizovali na sklíčku slabou vrstvou agarózového gelu a pozorovali pod fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81 s využitím cell^R 2.6 softwaru (Olympus).

2.5. Bioinformatické nástroje a software

2.5.1. Databáze a webové nástroje

Sekvence *S. pombe* jsme získali z databáze Pombase (www.pombase.org; Wood et al., 2011; Wood et al., 2002).

Primery pro PCR a qPCR jsme navrhovali s pomocí PrimerQuest a Oligo Analyzer 3.1 (IDT SciTools). Unikátní výskyt sekvence primeru jsme ověřovali pomocí algoritmu BLAST (NCBI).

Alignmenty sekvencí, zejména při kontrole plasmidů sekvenací, jsme vytvářeli v nástroji ClustalW2 (Larkin et al., 2007).

Pro výpočet molekulové hmotnosti úseku DNA jsme zvolili nástroj DNA/RNA/Protein Molecular Weight Calculator (Current Protocols).

2.5.2. Software

In silico klonování a manipulace DNA jsme prováděli v programu Clone Manager 9 (Scientific and Educational Software).

Pro navrhování primerů, vyhledávání kratších úseků v sekvencích a překladu do sekvence aminokyselin jsme využili Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Inc.).

Sekvenační chromatogramy jsme prohlíželi v programu Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd).

Gely snímané pomocí Molecular Imager PharoFX (Bio-Rad) jsme zobrazovali v softwaru Quantity One 4.6.5 (Bio-Rad) a denzitometrické vyhodnocení radioaktivně značených gelů jsme provedli v programu Image Quant TL (GE Life Sciences).

3. Výsledky

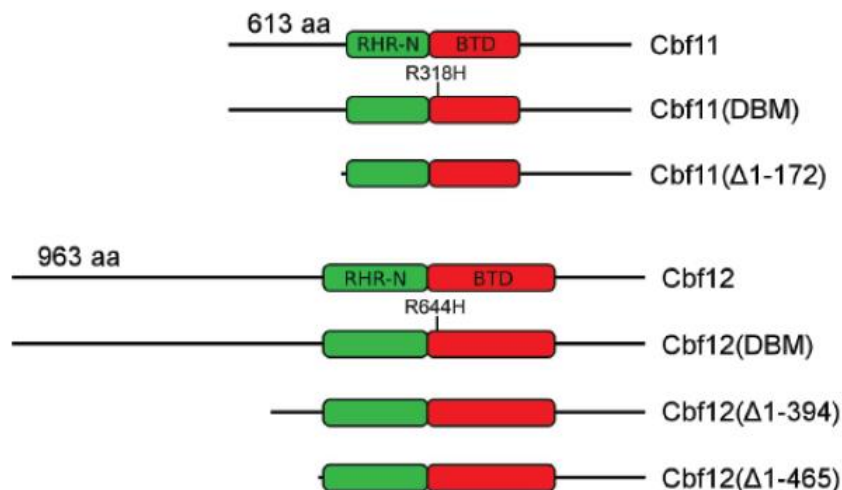
3.1. Lokalizace proteinů CSL a jejich mutantních variant

N-terminální část proteinů CSL v *S. pombe* má zřejmě funkční význam. Tento úsek proteinu pravděpodobně postrádá stabilní terciární strukturu, obsahuje několik potenciálních regulačních motivů, například fosforylační místa, a negativně ovlivňuje vazbu na DNA *in vitro* v případě proteinu Cbf12 (Převorovský et al., 2011). Abychom zjistili více informací o roli této N-koncové části, vytvořili jsme několik delečních variant proteinů Cbf11 a Cbf12. Zkoumali jsme také další varianty proteinů CSL.

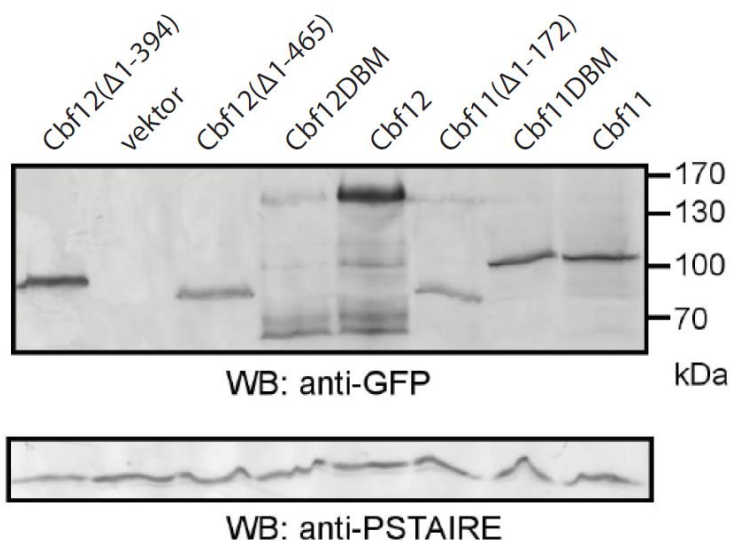
3.1.1. Mutantní varianty proteinů Cbf11 a Cbf12

Deleční varianty genů kódujících proteiny Cbf11 a Cbf12, jimž byla odstraněna celá N-terminální část před RHR-N doménou, vytvořil Mgr. Mikoláš Teska v rámci svého diplomového projektu (Cbf11(Δ 1-172) a Cbf12(Δ 1-465); Teska, 2012). Zkráceninu Cbf12(Δ 1-394), které je ponechána menšina N-terminální části proteinu, jsem připravila během magisterského studia (Ptáčková, 2010). Dr. Převorovský a Mgr. Teska provedli přípravu proteinů Cbf11 a Cbf12 s bodovou mutací v DNA vazebné doméně (DBM), která způsobuje ztrátu schopnosti proteinu vázat se na DNA. Tato mutace je analogická mutaci v myším proteinu rodiny CSL (RBP-J κ) a jde o záměnu argininu za histidin v konzervované BTD doméně (Chung et al., 1994). V případě Cbf11 je záměna na pozici R318H a pro Cbf12 jde o R644H (Teska, 2012). Schéma konstruktů je znázorněno na Obr. 3.1.

Aby bylo možné vizualizovat lokalizaci proteinů v buňce, vložili jsme všechny konstrukty proteinů CSL do vektoru pREP42EGFPN (Craven et al., 1998) pro N-terminální značení fluorescenční značkou EGFP. Exprese genů z těchto plasmidů je řízena středně silným promotorem *nmt1*, regulovatelným přítomností thiaminu v mediu. Produkce proteinů byla ověřena pomocí western blotu (Obr. 3.2).



Obr. 3.1 Schématické zobrazení mutantních variant proteinů CSL. Zeleně je vyznačena amino-terminální RHR-N doména (Rel homology region), červeně beta trefoil doména (BTB). Zakreslena je také pozice bodové mutace v doméně BTB ovlivňující DNA-vazebnou aktivitu. Schéma vytvořil Dr. Martin Převorovský.

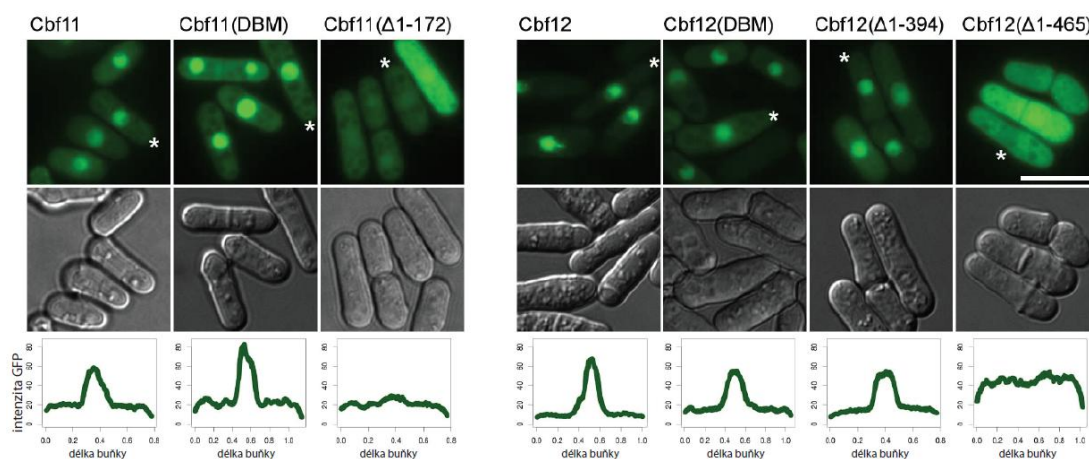


Obr. 3.2 Ověření produkce N-koncově EGFP-tagovaných proteinů western blotem. Buněčné lyzáty byly děleny na 7,5% polyakrylamidovém gelu. Western blot s protilátkou anti-PSTAIRE detekující Cdc2 slouží jako kontrola nanášky.

Dr. Převorovský prokázal, že proteiny Cbf11 a Cbf12 o plné délce se vyskytují v buněčném jádře (Převorovský et al., 2009). Abychom zjistili, zda je buněčná lokalizace ovlivněna odstraněním N-terminální části, provedli jsme mikroskopické pozorování EGFP-tagovaných proteinů CSL. Jak je patrné z Obr. 3.3, u proteinů Cbf11(Δ1-172) a Cbf12(Δ1-465) vedla delece N-terminální části k lokalizaci v celé

buňce včetně jádra. Zajímavé je, že protein Cbf12(Δ 1-394), kde je ponechána část N-terminální sekvence, zůstává lokalizován pouze v jádře.

Bodová mutace v DNA vazebné doméně nemá vliv na stabilitu (viz Obr. 3.2) ani na lokalizaci proteinu v buňce (Obr. 3.3).



Obr. 3.3 Lokalizace EGFP-tagovaných variant proteinů CSL v buňce. V horním panelu je zobrazena fluorescence EGFP, ve středním panelu Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC). V grafech dolního panelu je vynesena intenzita fluorescenčního signálu EGFP v podélné ose buňky, která je v horním panelu označena *. Měřítko představuje 10 μ m. Provedení experimentu Dr. Převorovský a Mgr. Teska.

3.1.1.1. Příprava konstruktů Cbf12(395-465) a jeho lokalizace

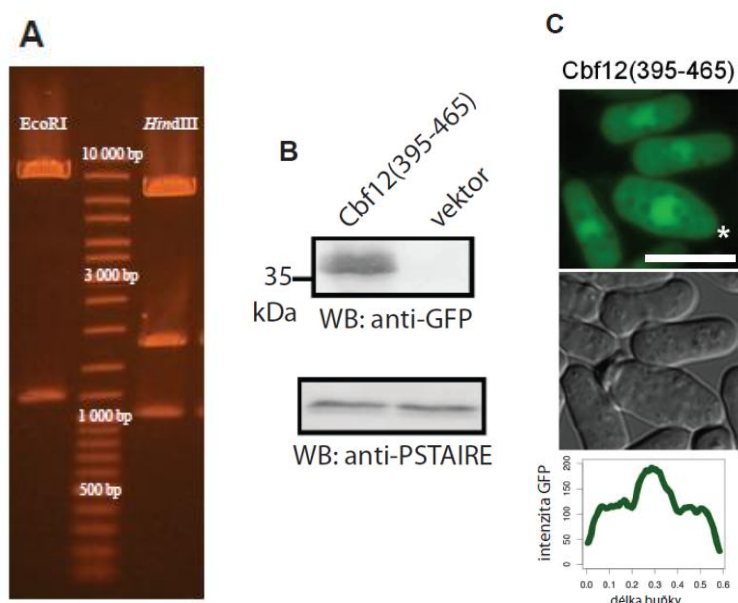
Úsek proteinu Cbf12 mezi aminokyselinami 395-465 významně ovlivňuje lokalizaci proteinu Cbf12 v buňce. Z toho důvodu jsme se rozhodli připravit konstrukt EGFP-Cbf12(395-465) a ověřit, že tato sekvence je sama o sobě dostatečná pro jadernou lokalizaci a zřejmě obsahuje jaderný lokalizační signál.

Z genomické DNA *S. pombe* jsme metodou PCR namnožili požadovaný úsek Cbf12 s pomocí primerů, kde jsou na okraje sekvence komplementární k úseku Cbf12 vložena restrikční místa *Nde*I (forward primer) a *Sma*I (reverse primer). Reverse primer musí před sekvencí pro budoucí restrikční místo *Sma*I obsahovat terminační kodón, a je také třeba zachovat čtecí rámec v celém výsledném konstruktě tak, aby translací vznikl fúzní produkt EGFP-Cbf12(395-465).

Produkt PCR odpovídající velikosti jsme klonovali do vektoru pCR2.1 pomocí TA cloning kitu a T4 DNA ligázy. Produkty ligace jsme transformovali bakterie *E. coli* a v několika nezávislých koloniích jsme provedli ověření přítomnosti inzertu pomocí

colony PCR. Z pozitivních kolonií jsme vyzolovali plasmid a sekvenací vyloučili výskyt mutací v inzertu Cbf12(395-465). Plasmid jsme označili pMaP04.

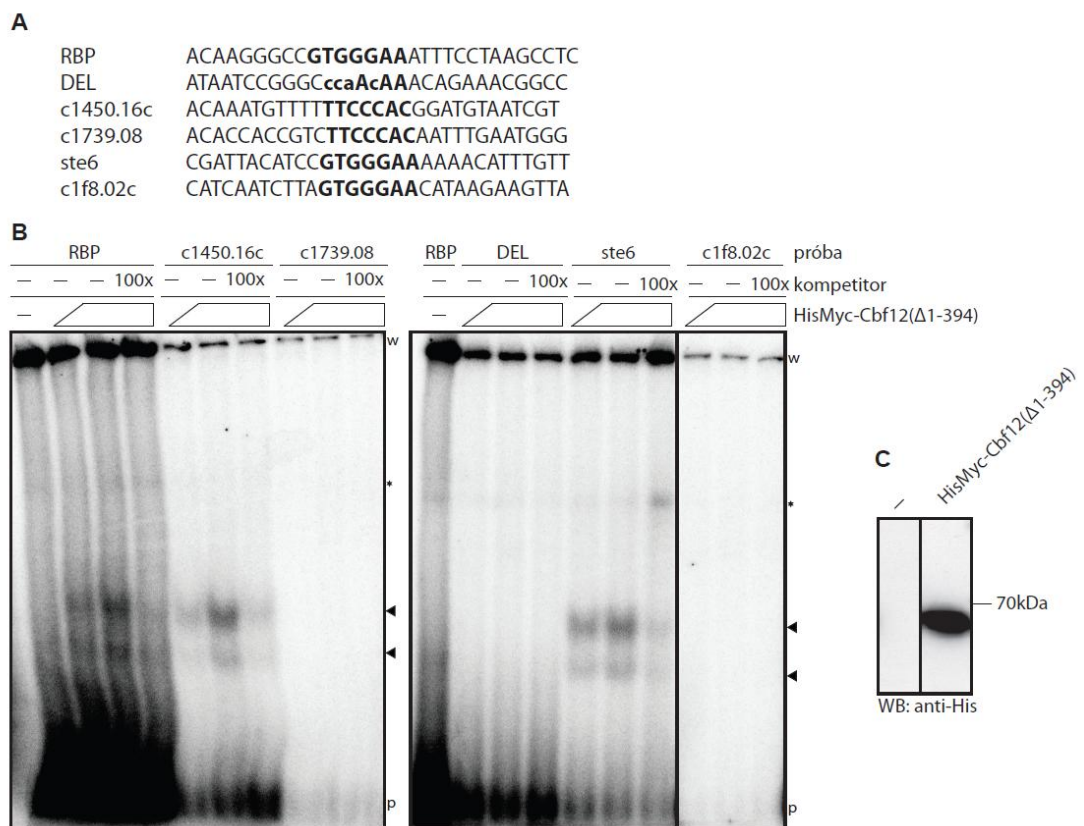
Cílový vektor pREP42EGFP a plasmid pMaP04 obsahující inzert Cbf12(395-465) jsme štěpili restrikními endonukleázami *NdeI* a *SmaI*. Požadované fragmenty jsme extrahovali z agarózového gelu a ligovali T4 DNA ligázou. Produkty ligace jsme vložili do buněk *E.coli* a inzert Cbf12(395-465) opět ověřili pomocí colony PCR, sekvenace a také restrikně pomocí endonukleáz *EcoRI* a *HindIII* (Obr. 3.4). Výsledný plasmid pREP42EGFP-Cbf12(395-465) nese označení pMaP05. Plasmid pMaP05 jsme vnesli do buněk *S. pombe* ($\Delta cbf11 \Delta cbf12$) a produkci N-koncově značeného proteinu Cbf12(395-465) jsme ověřili western blotem. Zároveň jsme provedli mikroskopii fluorescenční značky EGFP, abychom určili lokalizaci tohoto proteinu (Obr. 3.4).



Obr. 3.4 (A) Restrikní ověření plasmidu pMaP05. Očekávané velikosti fragmentů po štěpení endonukleázou *EcoRI* byly 8019 bp a 1200 bp, po štěpení enzymem *HindIII* 6438 bp, 1758 bp a 1023 bp. Fragmenty DNA jsme separovali na 1% agarózovém gelu, jako standard velikostí jsme použili GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). (B) Ověření produkce EGFP-Cbf12(395-465) western blotem. 7,5% polyakrylamidový gel, detekce anti-PSTAIRE protilátkou použita jako kontrola nanášky. (C) Lokalizace EGFP-Cbf12(395-465) v buňce (horní panel); Nomarského diferencíální interferenční kontrast (DIC; střední panel). Intenzita signálu EGFP v podélné ose buňky označené v horním panelu * (dolní panel). Měřítka představuje 10 μ m.

3.2. Vazba proteinu Cbf12 na DNA *in vitro*

Pro protein Cbf11 jsme prokázali přímou a specifickou vazbu na kanonický CSL-responzivní element (próba RBP) *in vitro*. V případě Cbf12 o plné délce se toto nepodařilo a vazbu na DNA jsme pozorovali pouze pro deleční mutantu Cbf12(Δ 1-394). Vazbu na sekvence z genomu *S. pombe* jsme zkoumali pouze nepřímou metodou pomocí neznačeného kompetitoru (Převorovský et al., 2009; Ptáčková, 2010). Proto jsme testovali vazbu zkráceniny Cbf12 na úseky z promotorových oblastí vybraných genů *S. pombe*, které jsou přímo radioaktivně značené γ - 32 P (Obr. 3.5).



Obr. 3.5 Vazba Cbf12(Δ 1-394) na úseky z promotorových oblastí genů *S. pombe* obsahujících CSL-responzivní element. (A) Sekvence prób použitých v experimentu EMSA v orientaci 5'-3'. Tučně je vyznačen CSL-vazebný element, u próby DEL jsou malými písmeny zaznamenány mutace. (B) Zvyšující se množství lyzátu z buněk $\Delta cbf11 \Delta cbf12$ exprimujících zkráceninu Cbf12 z plasmidu bylo inkubováno s radioaktivně značenými próbami a s neznačeným kompetitorem (ve stonásobném nadbytku oproti značené próbě). Na próby RBP, c1450.16c a ste6 se protein váže, na próby c1739.08 a c1f8.02c nikoli. Próba DEL, která obsahuje mutované kanonické CSL-vazebné místo je použita jako kontrolní. Symbolem * je označen nespecifický signál, který je přítomný také ve sloupci bez buněčného lyzátu, symbol ▲ označuje specifický signál vazby Cbf12(Δ 1-394). w = jamky, p = volná radioaktivní próba.

(C) Ověření produkce proteinu Cbf12(Δ 1-394) z plasmidu. Jako kontrola je použit lyzát z buněk Δ cbf11 Δ cbf12.

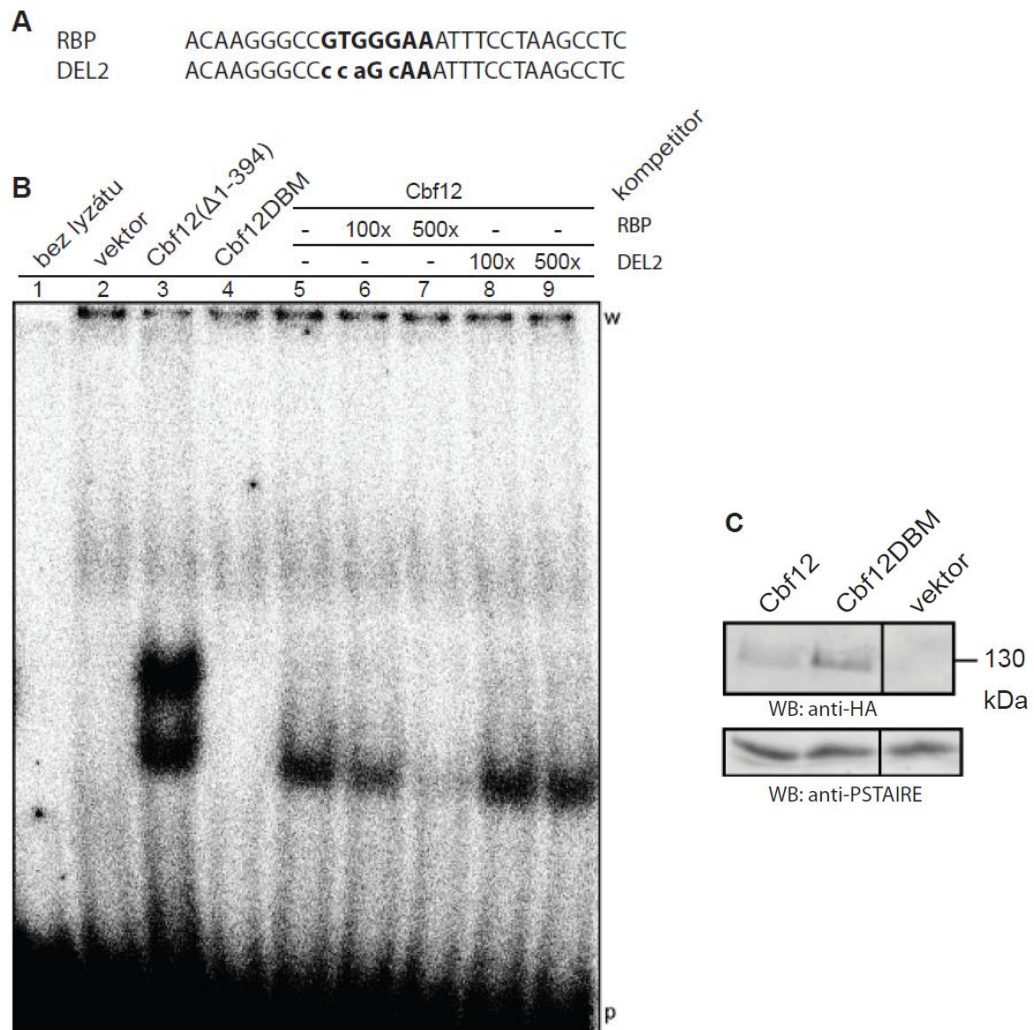
Aminokyselinové zbytky metazoálních proteinů CSL nutné pro sekvenčně-specifickou vazbu na DNA jsou plně konzervovány jak u Cbf11, tak i u Cbf12 (Kovall a Hendrickson, 2004; Převorovský et al., 2007). Důvodů, proč nedetekujeme vazbu Cbf12 na DNA, může být více. Jedním z možných vysvětlení může být, že stávající podmínky *in vitro* jsou pro vazbu proteinu Cbf12 o plné délce suboptimální.

Abychom tuto možnost potvrdili nebo vyvrátili, testovali jsme vazbu Cbf12 na DNA za použití zvýšeného množství buněčného lyzátu (2,7x více než obvykle) z buněk Δ cbf11 Δ cbf12 produkujících z plasmidu Cbf12 o plné délce. V takto upraveném experimentu jsme signál vazby Cbf12 na próbu RBP obsahující kanonický CSL-responzivní element detekovali, jak je patrné z Obr. 3.6 (sloupec 5). Tato vazba je kompetovatelná nadbytkem neznačené próby RBP, nikoli však nadbytkem próby DEL2, jejíž CSL-vazebný element je mutovaný. Próba DEL2 je odvozena od próby RBP, zatímco próba DEL použitá v Obr. 3.5 je nepříbuzná próbě RBP (Převorovský et al., 2009). Mutace CSL elementu jsou u obou prób, DEL i DEL2, stejné. V případě proteinu Cbf12 se tedy také jedná o sekvenčně specifickou vazbu na DNA, která má však v porovnání s vazbou Cbf11 nižší afinitu k próbě RBP (vazba Cbf11 je kompetovatelná neznačeným kompetitorem v nadbytku 5x - 20x, zatímco vazba Cbf12 100 - 500x).

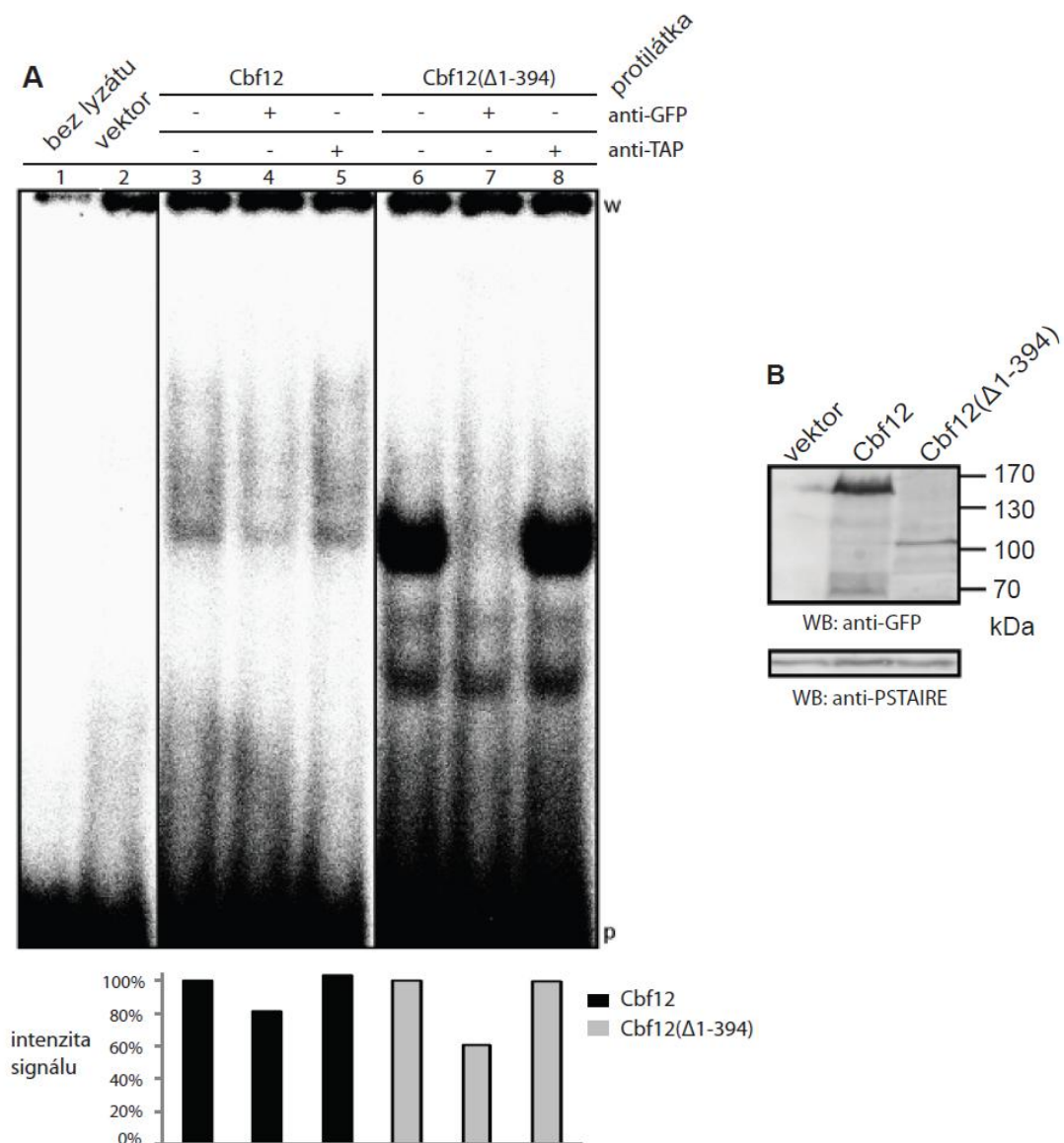
S cílem ujistit se, že jde skutečně o vazbu celého proteinu Cbf12 a ne pouze produktu jeho proteolytického štěpení, provedli jsme supershift s proteiny Cbf12 a Cbf12(Δ 1-394), oběma značenými na N-konci EGFP-tagem (Obr. 3.7). V případě Cbf12(Δ 1-394) jsme detekovali celkem tři signály různé intenzity, což může odrážet posttranslační modifikace nebo produkty proteolýzy (sloupce 6, 7, 8 Obr. 3.7). Po přidání anti-GFP protilátky se sice nevytvořil supershiftový komplex protein:DNA:protilátka, ale došlo k zablokování tvorby největšího komplexu protein:DNA. Přidání irelevantní anti-TAP protilátky nemělo na formování komplexů žádný vliv. Z toho vyplývá, že majoritní komplex protein:DNA vyžaduje přítomnost N-konce proteinu EGFP-Cbf12(Δ 1-394).

Ve sloupcích s lyzáty z buněk Δ cbf11 Δ cbf12 nadprodukujících Cbf12 lze identifikovat několik signálů, které však nejsou jasně ohraničené (jde spíše o tzv.

„smír“, sloupce 3, 4, 5 Obr. 3.7). Intenzita těchto signálů je také reprodukcibilně snížena po přidání anti-GFP protilátky, z čehož lze usoudit, že N-konec proteinu EGFP-Cbf12 je v těchto komplexech přítomen.



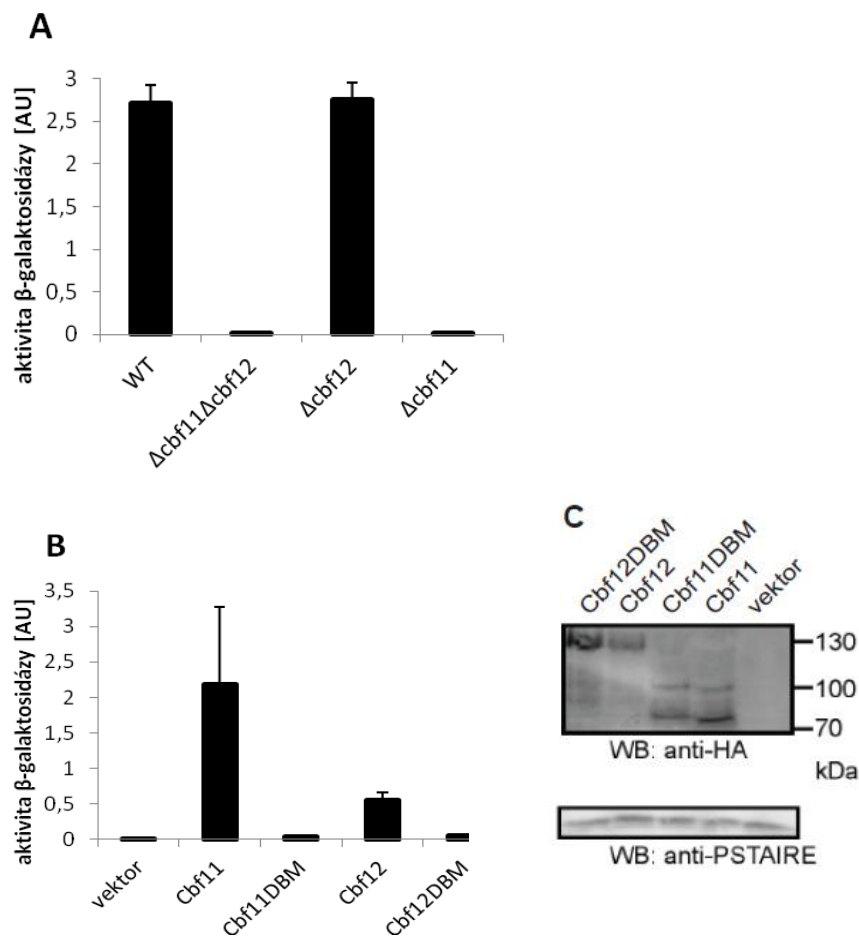
Obr. 3.6 Slabá, avšak sekvenčně specifická vazba proteinu Cbf12 o plné délce byla detekována pro próbu RBP. (A) Sekvence prób RBP a DEL2 se zvýrazněným CSL-vazebným místem, resp. jeho mutacemi. (B) Vazba Cbf12 je kompetovatelná nadbytkem neznačené próby RBP (sloupce 6, 7) na rozdíl od kompetice mutovanou próbou DEL2 (sloupce 8, 9). Lyzát z buněk $\Delta cbf11 \Delta cbf12$ nadprodukcujících HisMyc-Cbf12(Δ 1-394), je přidán v množství 84,6 μ g/ reakci pro srovnání (sloupec 3). Ostatní lyzáty jsou v množství 230 μ g/ reakci. Žádný signál vazby není pozorován pro Cbf12DBM (sloupec 4). w označuje jamky, p volnou próbu. (C) Western blot HA-tagovaných variant proteinů CSL včetně kontroly nanášky (7,5% polyakrylamidový gel).



Obr. 3.7 (A) Supershift EGFP-tagovaných variant proteinu Cbf12. Pro Cbf12 o plné délce a zkráceninu Cbf12(Δ 1-394) se po přidání anti-GFP protilátky blokuje tvorba komplexu proteinu a DNA (sloupce 4, 7). Přidání irelevantní anti-TAP protilátky nemá žádný efekt (sloupce 5, 8). V grafu je zobrazeno denzitometrické vyhodnocení jednotlivých signálů. w = jamky, p = volná próba. (B) Ověření produkce proteinů značených EGFP. Jako kontrola nanášky slouží detekce protilátkou anti-PSTAIRES (7,5% polyakrylamidový gel).

3.3. Proteiny CSL regulují expresi reportérového genu

Skutečnost, že proteiny Cbf11 a Cbf12 mohou aktivovat expresi reportérového genu, byla zatím pozorována pouze v heterologním systému *S. cerevisiae* (Převorovský et al., 2009). Dosud není známo, zda proteiny CSL aktivují expresi také v autologním systému *S. pombe*. Abychom toto mohli testovat, vytvořil Dr. Převorovský plasmidy, ve kterých je reportérový gen *lacZ*, kódující β -galaktosidázu, pod kontrolou



Obr. 3.9 (A) Aktivita β -galaktosidázy z reportérového plasmidu s próbou RBP v buňkách WT a v buňkách nesoucích delecí genů CSL. (B) Aktivita β -galaktosidázy v buňkách $\Delta cbf11 \Delta cbf12$ nesoucích reportérový plasmid s próbou RBP a plasmid s příslušným proteinem CSL. Grafy (A, B) představují průměr ze tří biologických opakování + směrodatná odchylka. (C) Produkce N-terminálně HA-tagovaných proteinů exprimovaných z plasmidu ověřena western blotem (7,5% polyakrylamidový gel).

3.3.1. Vazba Cbf11 na CSL-responzivní element reportérového plasmidu *in vivo*

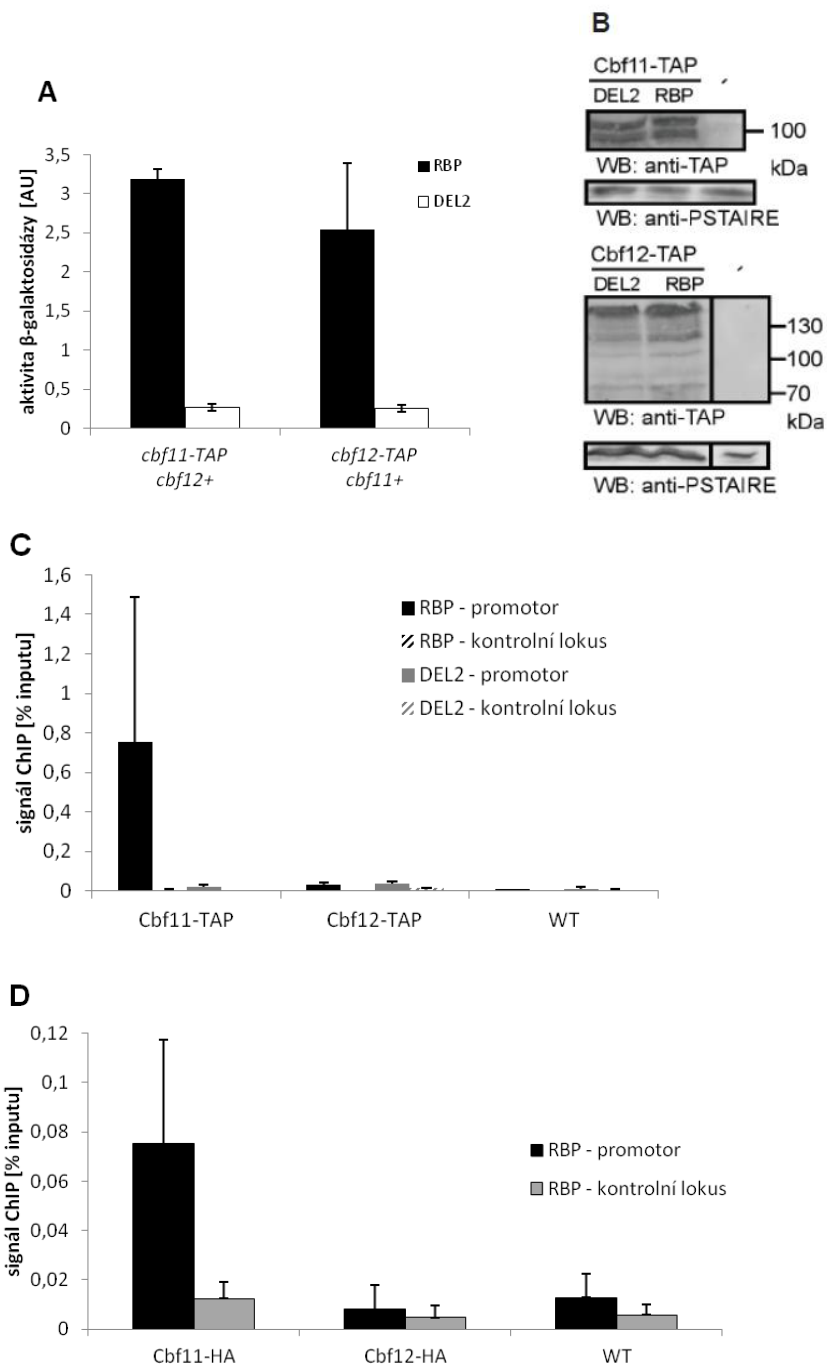
Abychom ověřili, že se proteiny CSL fyzicky váží na promotorový úsek reportérového plasmidu obsahujícího CSL-vazebný element, provedli jsme chromatinovou imunoprecipitaci (ChIP). K precipitaci jsme využili buňky, které mají v chromozomu na 3'- konci genu pro protein Cbf11 a Cbf12 připojenou sekvenci značky TAP. Produkce fúzních proteinů je tedy řízena přirozeným promotorem.

Nejprve jsme potvrdili, že oba kmeny aktivují expresi reportérového genu s próbou RBP podobně jako kmen WT (aktivace závisí na Cbf11, viz Obr. 3.9 A). Žádnou

aktivaci jsme podle očekávání nepozorovali v případě reportéru s próbou DEL2 (Obr. 3.10 A).

Výsledky experimentu ChIP jsou v souladu s výsledky studie s reportérovými plasmidy. Silnou vazbu Cbf11 *in vivo* jsme detekovali na reportér s próbou RBP, zatímco na reportér s próbou DEL2, obsahující mutovaný CSL-vazebný element, se protein nevázal. Žádnou vazbu Cbf11 jsme v přítomnosti RBP i DEL2 reportérového plasmidu nepozorovali na kontrolní genomický lokus (chr1_1928274-1928359; Obr. 3.10 C). Kontrolní lokus představuje úsek, kde nebyla detekována vazba proteinů CSL *in vivo* (viz 3.5). Pro Cbf12 jsme vazbu na reportérový plasmid nezaznamenali (Obr. 3.10 C), což také koreluje s výsledky měření aktivity β -galaktosidázy.

Ačkoli při nadprodukci proteinů CSL dokázal také protein Cbf12 do určité míry aktivovat transkripci (viz Obr. 3.9 B), nebyli jsme schopni získat signál vazby Cbf12 na CSL-vazebný element v reportéru s próbou RBP. Nutno podotknout, že ChIP signály z buněk nadprodukcujících N-terminálně HA-tagované proteiny CSL byly obecně oproti očekávání velmi nízké (Obr. 3.10 D).



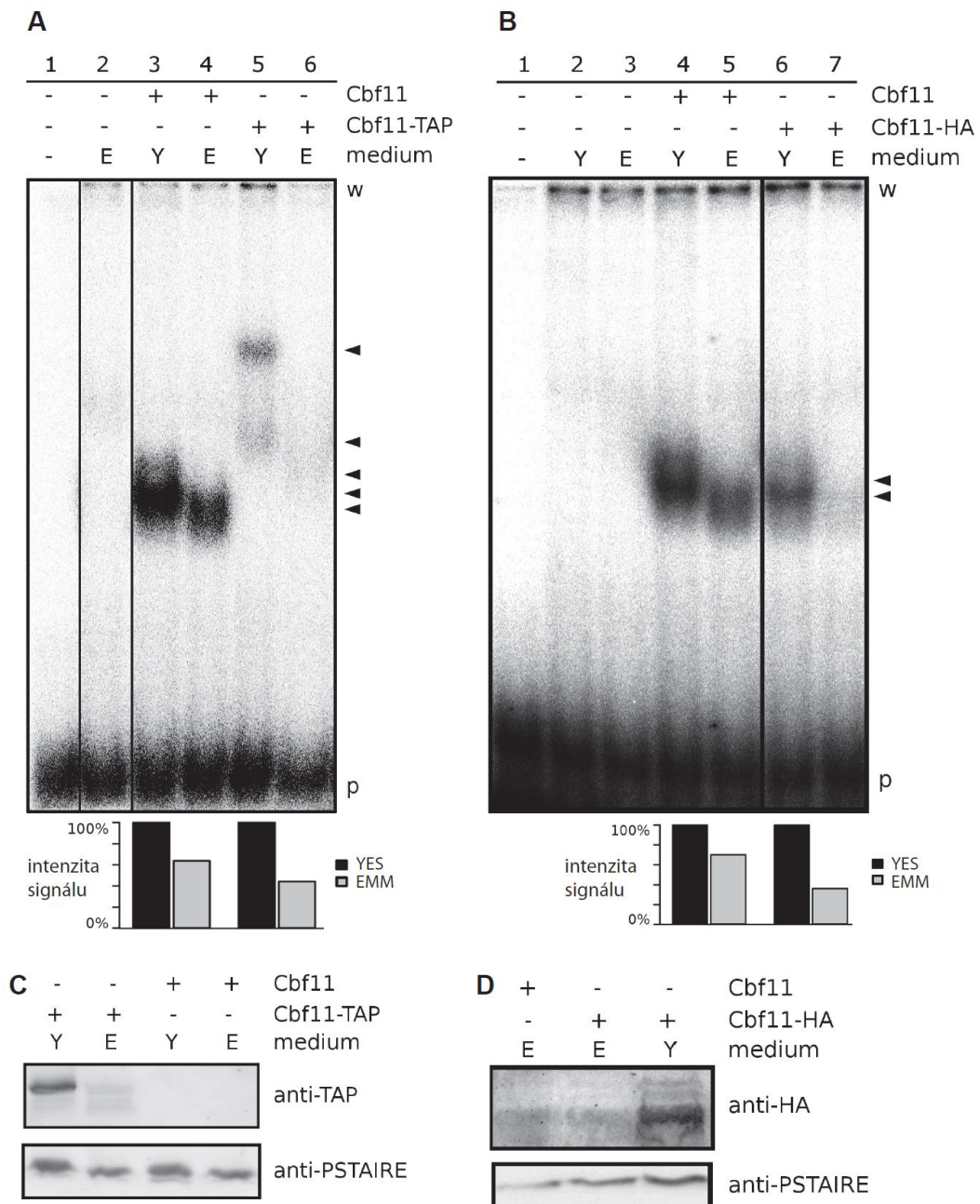
Obr. 3.10 (A) Aktivita β -galaktosidázy v kmenech produkujících z chromozomu C-terminálně značené proteiny Cbf11-TAP nebo Cbf12-TAP. Oba kmeny vykazují aktivaci reportéru s próbou RBP podobně jako kmen WT, zatímco z reportéru obsahujícího mutovanou pröbu DEL2 není exprese aktivována. (B) Western blot ověření exprese fúzních proteinů CSL použitých v (A), 7,5% polyakrylamidový gel. Detekce anti-PSTAIRE protilátkou jako kontrola nanášky (C) Chromatinová imunoprecipitace z kmenů popsáných v bodech (A) a (B). Cbf11 se silně váže na promotor reportéru s pröbou RBP, nikoli na promotor reportéru s pröbou DEL2 nebo chromozomální kontrolní lokus. Cbf12 nebyl detekován ani na jedné ze sekvencí. Sloupce grafu představují průměrné hodnoty + směrodatná odchylka z nejméně tří biologických opakování. (D) Chromatinová imunoprecipitace z kmenů popsáných

v Obr. 3.9 (B), (C) nadprodukcující N-terminálně HA-značené proteiny CSL z plasmidu. Graf zobrazuje průměrné hodnoty + směrodatná odchylka ze tří biologických opakování.

3.4. Exprese proteinu Cbf11 závisí na kultivačních podmínkách

Dr. Převorovský sledoval změny v expresi všech genů pomocí metody DNA microarray v kmeni *Δcbf11*. Genů se změněnou expresí v porovnání s WT bylo podstatně méně, pokud byly buňky kultivovány v minimálním mediu EMM, než v případě kultivace v bohatém mediu YES (Převorovský, nepublikované výsledky). Z toho usuzujeme, že aktivita Cbf11 může být závislá na růstových podmínkách.

Abychom tuto hypotézu ověřili, kultivovali jsme buňky WT v mediu EMM a YES. Z exponenciálně rostoucích buněk jsme připravili extrakt a provedli experiment EMSA s proubou RBP. Pozorovali jsme výrazné snížení DNA-vazebné aktivity proteinu Cbf11 v minimálním mediu EMM. Pomocí kmenů s chromozomálně TAP- nebo HA-značenou alelou *cbf11* jsme testovali hladinu proteinu Cbf11 také western blotem. V souladu s výsledky experimentu EMSA jsme zaznamenali v buňkách kultivovaných v EMM dramatický pokles hladiny proteinu Cbf11 (Obr. 3.11). Na western blotech jsme detekovali několik izoform Cbf11 a jejich relativní zastoupení se lišilo u buněk kultivovaných v EMM a YES.

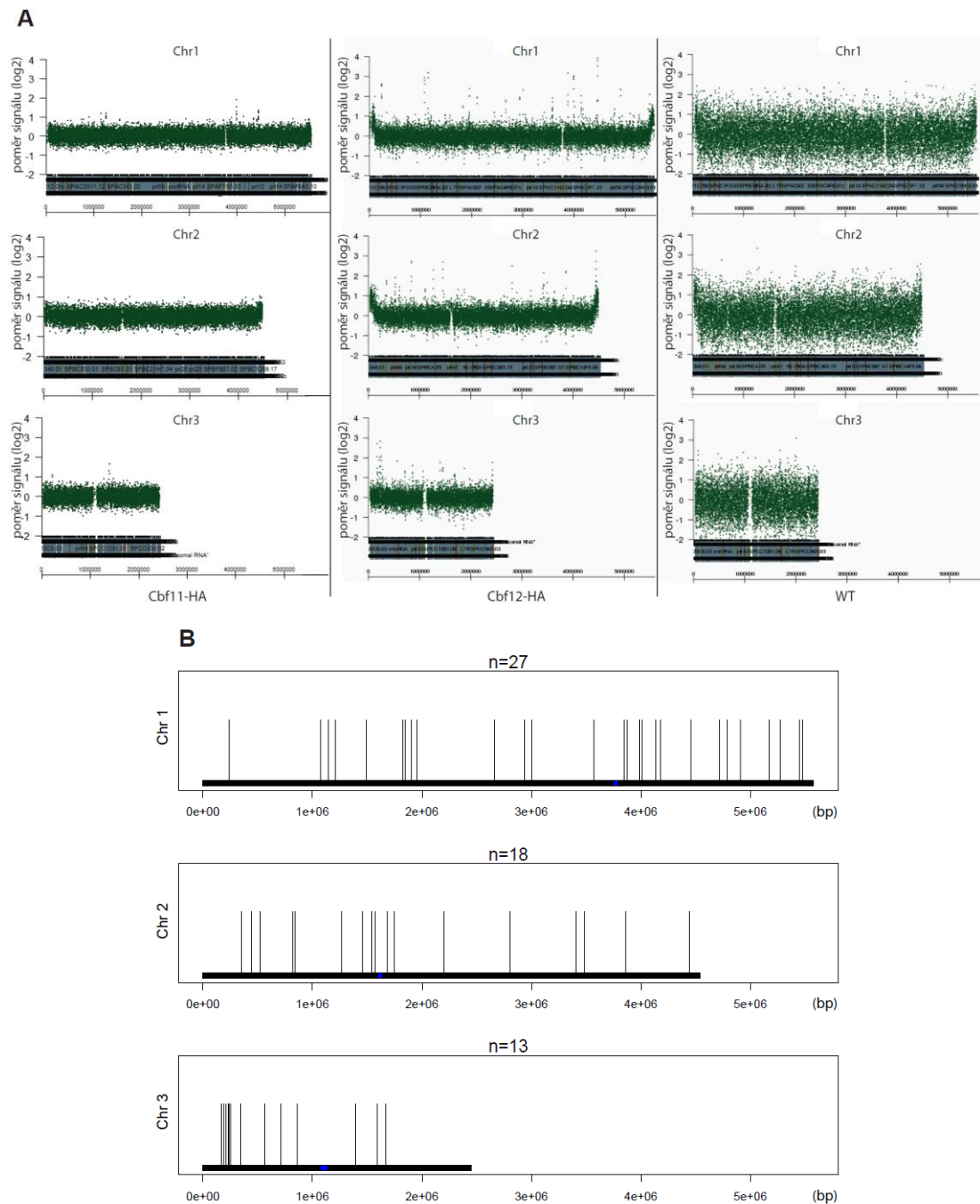


Obr. 3.11 Vliv kultivace v mediu EMM nebo YES na vazbu proteinu Cbf11 na próbu RBP. DNA-vazebná aktivita Cbf11 je o 40-60% nižší při kultivaci v mediu EMM v porovnání s komplexním mediem YES. (A) Sloupec 1: bez lyzátu, sloupec 2: extrakt z *Δcbf11 Δcbf12* buněk; sloupce 3-4: WT; sloupce 5-6: exprese chromozomálně značeného proteinu Cbf11-TAP. Šipky označují pozici komplexu Cbf11:DNA. E = EMM; Y = YES; w = jamky; p = volná próba. Sloupcový graf zobrazuje denzitometrickou kvantifikaci signálů v odpovídajících sloupcích. (B) Sloupec 1: bez lyzátu, sloupce 2-3: lyzát z *Δcbf11 Δcbf12*, sloupce 4-5: WT; sloupce 6-7: exprese chromozomálně HA-tagované verze Cbf11. (C, D) Western blot extraktů použitých v panelu A, resp. B. Množství proteinu Cbf11 je sníženo v extraktech z buněk kultivovaných v mediu EMM v porovnání s YES. Detekce anti-PSTAIRE protilátkou použita jako kontrola nanášky (7,5% gel).

3.5. Vazba proteinů CSL na DNA *in vivo*

Doposud provedené experimenty potvrdily, že proteiny CSL *S. pombe* fungují jako transkripční faktory. Cílová místa v genomu, kam se tyto proteiny váží, však prozatím nejsou objasněna.

Ve spolupráci s laboratoří prof. Bählera v Londýně jsme zkoumali vazbu proteinů Cbf11 a Cbf12 na DNA *in vivo* v rámci celého genomu. Využili jsme techniku chromatinové imunoprecipitace následované kvantifikací na microarray (Agilent), tzv. ChIP-chip. Pro imunoprecipitaci jsme použili kmeny s TAP-tagovanými proteiny CSL v kombinaci s IgG sepharosou, a také HA-tagované proteiny precipitované pomocí a-HA protilátky a protein A sepharosy. Exprese genů kódujících C-terminálně značené fúzní proteiny CSL byla řízena přirozeným promotorem. V případě TAP-tagovaných proteinů se nepodařilo identifikovat signály vazby proteinů CSL, zřejmě kvůli přílišnému množství nespecifit. Nepomohla ani dvoukroková purifikace proteinů pomocí IgG sepharosy a kalmodulinových kuliček – výtěžek precipitovaného materiálu byl velmi malý, přestože jsme třikrát zvýšili vstupní množství buněk. Nadále jsme tedy pracovali pouze s proteiny značenými HA epitopem a provedli jsme celkem dvě biologická opakování ChIP-chip. Jak je patrné z Obr. 3.12, specifické signály vazby na DNA jsme získali v případě obou proteinů CSL, nicméně pro Cbf11 bylo signálu méně. Získaná data jsme analyzovali pomocí nástroje ChIPOTle (Buck et al., 2005) a identifikovali úseky, kam by se proteiny CSL mohly vázat. V rámci identifikovaných míst jsme našli 58 úseků, kam jsme v obou biologických opakováních detekovali vazbu obou proteinů CSL.



Obr. 3.12 (A) Signály vazby HA-tagovaných proteinů CSL *in vivo* získaných metodou ChIP-chip (data z jednoho biologického opakování). Na ose y je vyneseno poměr precipitovaného materiálu k celkové DNA (IP/input, \log_2) pro jednotlivé próby na sklíčku pro microarray pokrývající chromozomy *S. pombe*. (B) Pozice míst na chromozomech, kam se pravděpodobně váží oba proteiny CSL. Modře je vyznačena pozice centromer.

Mezi kandidátními lokusy se nevyskytují pouze sekvence z regulačních oblastí genů, které jsme studovali doposud (Ptáčková, 2010; Převorovský et al., 2011), ale také sekvence z kódujících úseků. Všechny kandidátní sekvence navíc neobsahují

definovaný CSL-vazebný element. Ukázalo se také, že zejména vazba Cbf12 koreluje s výskytem počátků replikace (ori; analyzoval Dr. Převorovský).

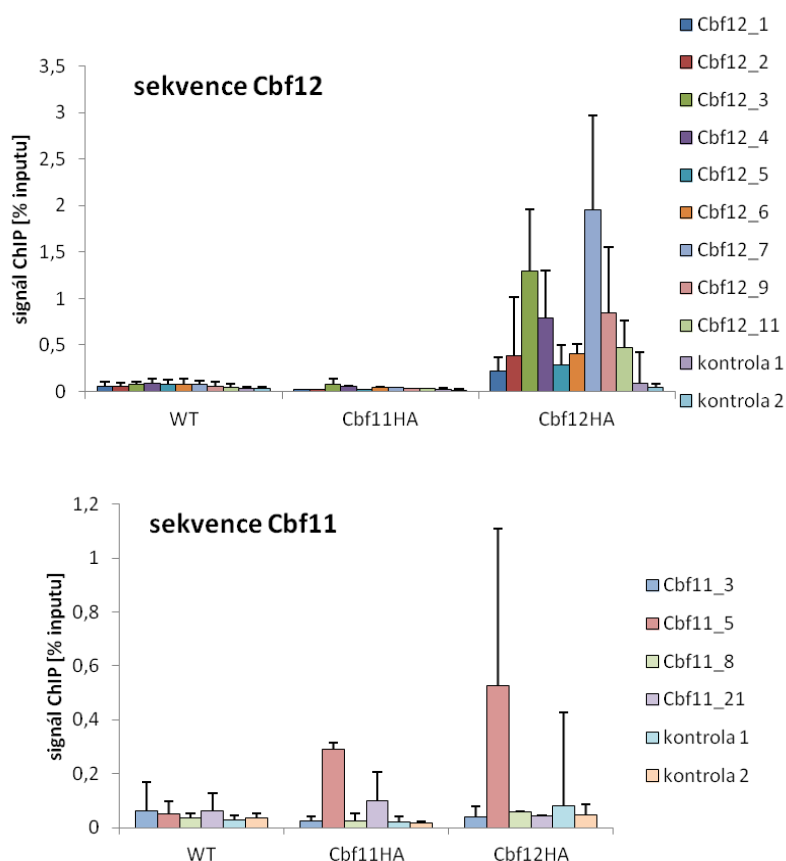
Pro nezávislé ověření vazby proteinů CSL *in vivo* chromatinovou imunoprecipitací a následnou kvantifikací pomocí qPCR jsme vybrali 9 sekvencí pro Cbf12 a 4 sekvence pro Cbf11. Vybírali jsme ze seznamu identifikovaných vazebných úseků seřazených sestupně podle síly signálu získaného metodou ChIP-chip. Číslice v označení vybraných sekvencí označuje pozici v seznamu vazebných sekvencí. Lokusy Cbf12_1 a Cbf12_2 se vyskytují také v seznamu sekvencí pro Cbf11, a sice na 1. resp. 15. místě. Proto jsme pro všechny vybrané sekvence ověřovali vazbu proteinu Cbf11 i Cbf12. Vybraní kandidáti odráží variabilitu sekvencí – viz Tab. 3.1 a příloha Obr. 7.1.

Tab. 3.1 Sekvence identifikované metodou ChIP-chip vybrané pro nezávislé ověření. Číslice v označení sekvence označuje pořadí v seznamu ChIP-chip podle poměru IP/input. chr = chromozom; začátek a konec = koordináty sekvence; ORF1 upstream/ORF2 downstream = nejbližší otevřený čtecí rámec před/za sekvencí (může se vyskytovat v rámci sekvence); element = počet CSL-vazebných elementů v sekvenci definovaných jako GTG^A/_GGAA; ori/ORF = přítomnost počátku replikace/otevřeného čtecího rámce v sekvenci.

Sekvence Cbf12									
označení	chr	začátek	konec	ORF1 upstream	ORF2 downstream	délka (bp)	element	ori	ORF
Cbf12_1	1	3991000	3993800	SPAPB15E9.02c	SPAPB15E9.02c	2800	2	✓	✓
Cbf12_2	1	4455400	4458400	SPAC9E9.09c	SPAC9E9.10c	3000	2	✓	
Cbf12_3	1	1077400	1079000	SPAC1A6.04c	SPAC1A6.05c	1600			
Cbf12_4	2	4442000	4444200	SPNCRNA.117	SPBC8E4.02c	2200	1	✓	✓
Cbf12_5	1	238000	240400	prl03	SPAC806.04c	2400		✓	
Cbf12_6	1	1150000	1151000	SPAC56F8.13	SPAC56F8.14c	1000	1		✓
Cbf12_7	2	841200	842600	SPBC36.02c	SPBC36.03c	1400	3	✓	
Cbf12_9	2	1454800	1456000	SPBC32H8.02c	SPBC32H8.03	1200	1		
Cbf12_11	1	1954600	1955800	SPAC3H1.10	SPAC3H1.11	1200		✓	
Sekvence Cbf11									
Cbf11_3	2	4451000	4453200	SPBP4G3.02	SPBP4G3.03	2200		✓	✓
Cbf11_5	3	1396000	1397400	SPCC1281.06c	SPCC1281.07c	1400	3	✓	
Cbf11_8	2	3814200	3815400	SPBTRNATYR.04	SPBC21C3.11	1200			✓
Cbf11_21	1	1253000	1254200	SPAC56E4.04c	SPAC56E4.05	1200	1		

Vzhledem k rozlišení metody ChIP-chip s daným typem microarray, které činí 290 bp, přesahuje délka kandidátních sekvencí 1 000 bp. Primery pro qPCR jsme proto navrhli na středy vybraných sekvencí, kde je signál ChIP-chip nejvyšší. Navrhli jsme také dva kontrolní páry primerů na sekvence, kde nebyla metodou ChIP-chip detekována vazba proteinů CSL (kontrola 1: chr2_2409606-2409739; kontrola 2: chr1_1928274-1928359; viz Obr. 7.1).

Výsledky ChIP-qPCR ukazují, že nabohacení vazby Cbf12 *in vivo* oproti kontrolním úsekům jsme získali ve všech 9 případech, i když pro Cbf12_1, Cbf12_2 a Cbf12_5 je nabohacení menší než 10x. Naopak pro Cbf11 jsme vazbu detekovali jenom pro sekvence Cbf11_5 a Cbf11_21, pro ostatní je nabohacení vazby oproti kontrole méně než 2x. V případě sekvence Cbf11_5 jsme dokonce vyšší vazbu pozorovali pro Cbf12 (Obr. 3.13).

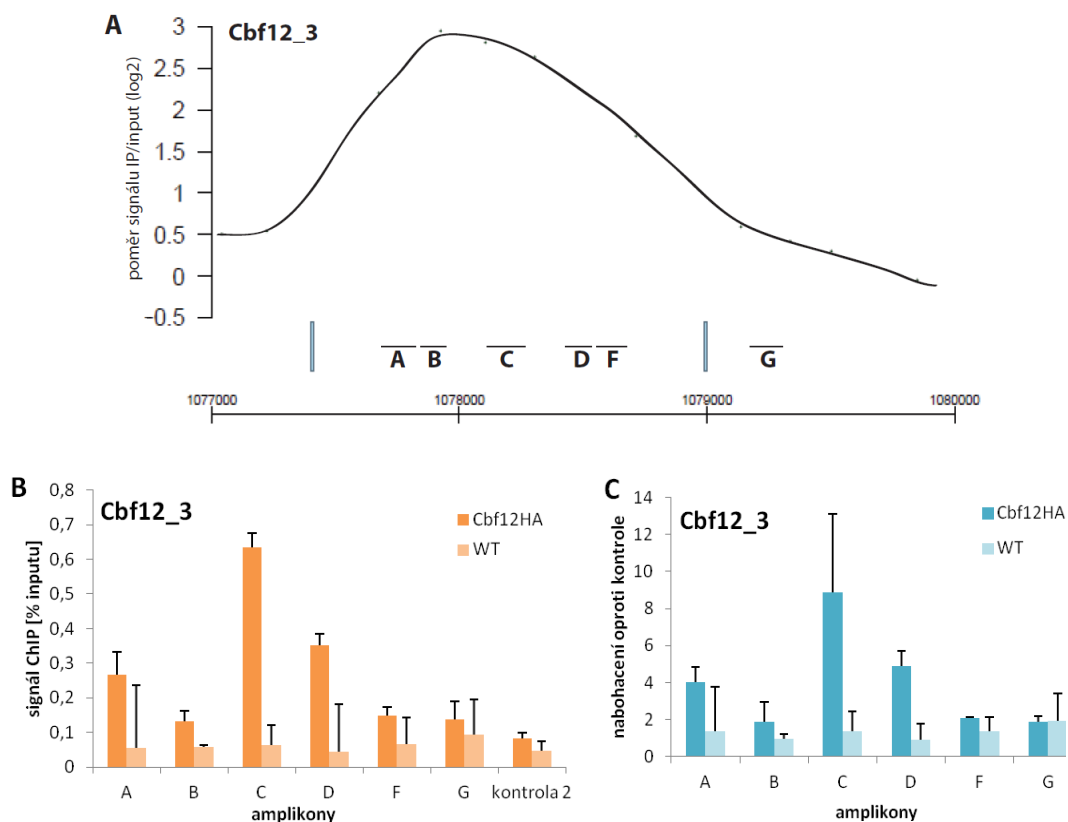


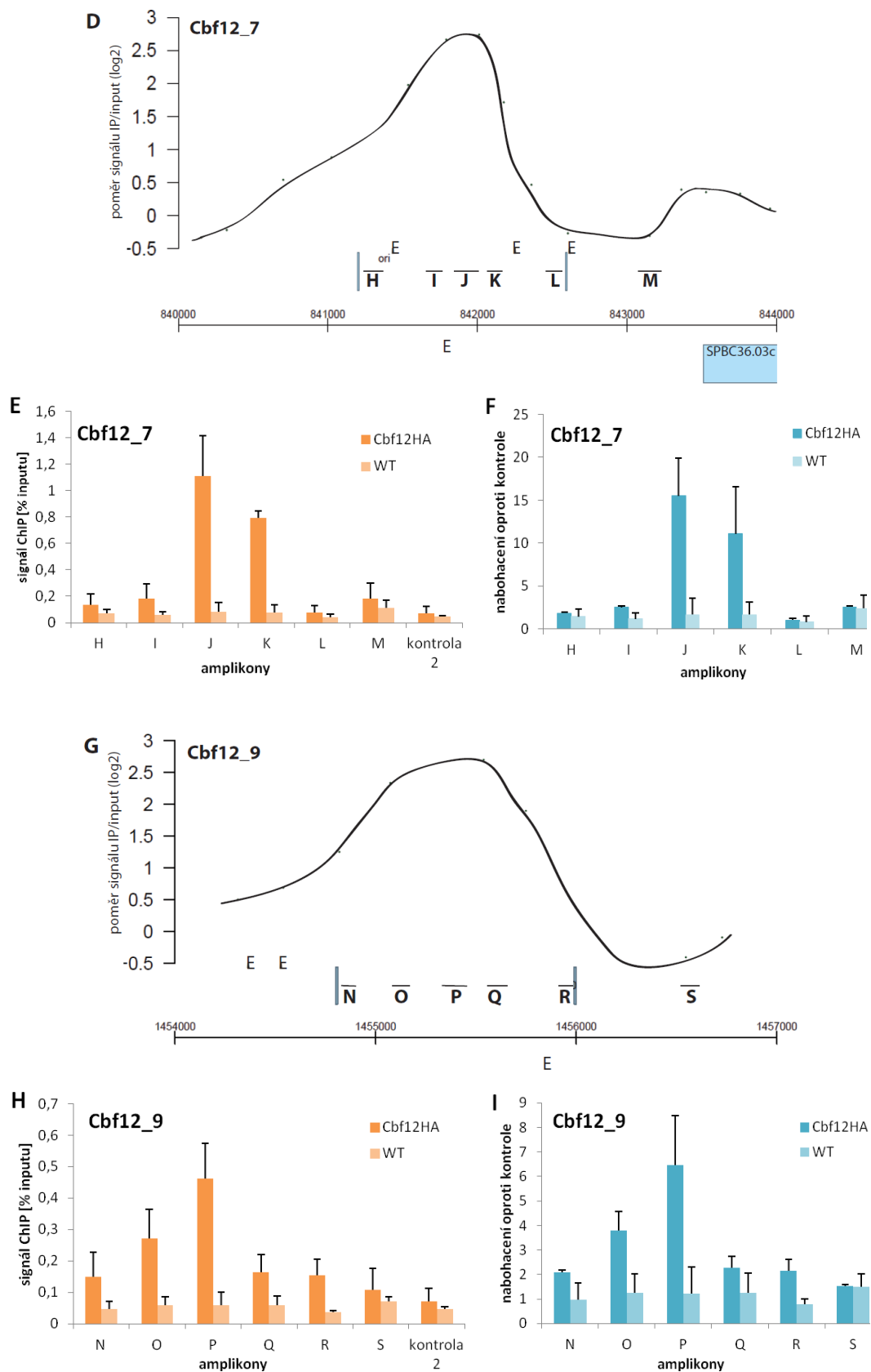
Obr. 3.13 Ověření sekvencí, kam se pravděpodobně váží proteiny CSL *in vivo*, metodou ChIP-qPCR. Amplifikovány byly středy vybraných sekvencí a míra nabohacení centrálních úseků je vyjádřena jako procento signálu celkové DNA (input). Signály jsou ukázány pro netagovaný kmen WT a také chromozomálně

HA-značené proteiny Cbf11 a Cbf12. Oblasti bez ChIP-chip signálu slouží jako kontroly. Průměr ze dvou biologických opakování + směrodatná odchylka.

3.5.1. Lokalizace vazby Cbf12 *in vivo* v rámci vybraných sekvencí

V dalších experimentech jsme se soustředili především na vazbu proteinu Cbf12, jelikož pro Cbf11 se nám nepodařilo spolehlivě ověřit vazbu na sekvence získané metodou ChIP-chip. Ověřením centrálních úseků kandidátních sekvencí jsme nezískali úplný přehled, kam přesně a popřípadě kolikrát se protein Cbf12 váže v rámci daného lokusu. Zaměřili jsme se tedy na přesnější lokalizaci vazby proteinu Cbf12. Jelikož ne všechny lokusy obsahují kanonický CSL-vazebný element a optimální vazebná sekvence Cbf12 není známá (viz 3.2), navrhli jsme amplikony podél daných lokusů a také přilehlých oblastí. Testováním vazby Cbf12 na tyto amplikony můžeme rozlišit, zda se Cbf12 váže *in vivo* i na jiná místa v rámci lokusu než je centrální úsek. Pro další testování jsme vybrali 3 kandidáty verifikované ChIP-qPCR, kde bylo nabohacení centrálního úseku vůči kontrolnímu úseku nejvyšší, tj. sekvence Cbf12_3, Cbf12_7, Cbf12_9. Pomocí ChIP-qPCR jsme poté sledovali vazbu Cbf12-HA v rámci vybraných sekvencí (Obr. 3.14).





Obr. 3.14 (A, D, G) Zobrazení ChIP-chip signálů vazby proteinu Cbf12 na DNA *in vivo*. Svislé úsečky ohraničují lokus identifikovaný programem ChIPOTle (Buck et al., 2005); poměr signálu IP/input > 1). Úsečky označené písmeny A-S představují amplicony navržené podél daných sekvencí. Písmenem E je udána pozice

CSL-responzivního elementu. V oranžovém grafu (B, E, H) je vyneseno ChIP-qPCR signál vazby Cbf12 na jednotlivých amplikonech jako procento celkové DNA (input). Hodnoty po normalizaci na kontrolní lokus (kontrola 2), kde nebyla detekována vazba proteinů CSL pomocí ChIP-chip (viz Obr. 7.1), jsou zobrazeny v modrém grafu (C, F, I). Průměr ze dvou biologických opakování + směrodatné odchylky.

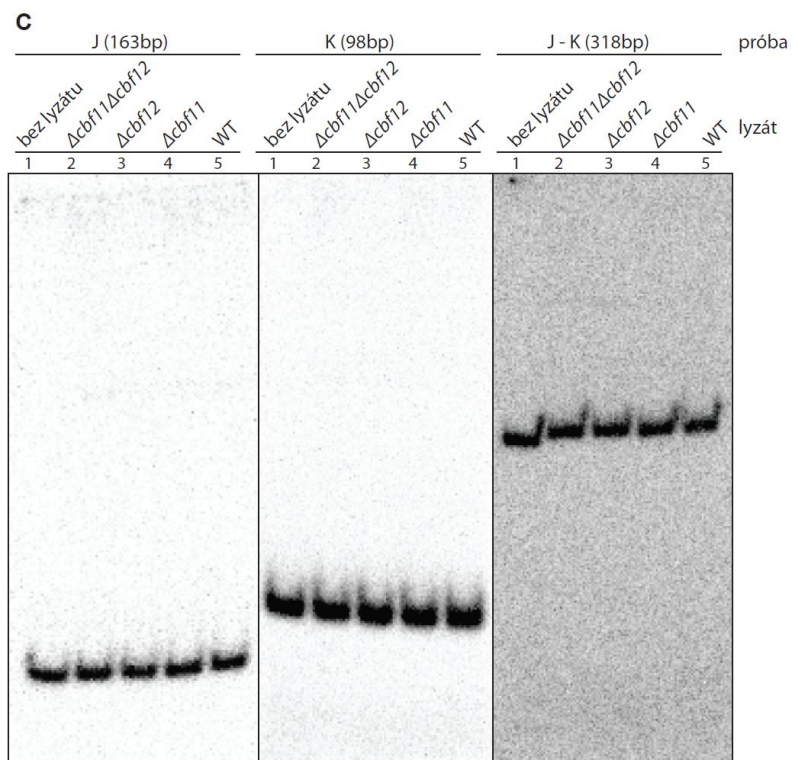
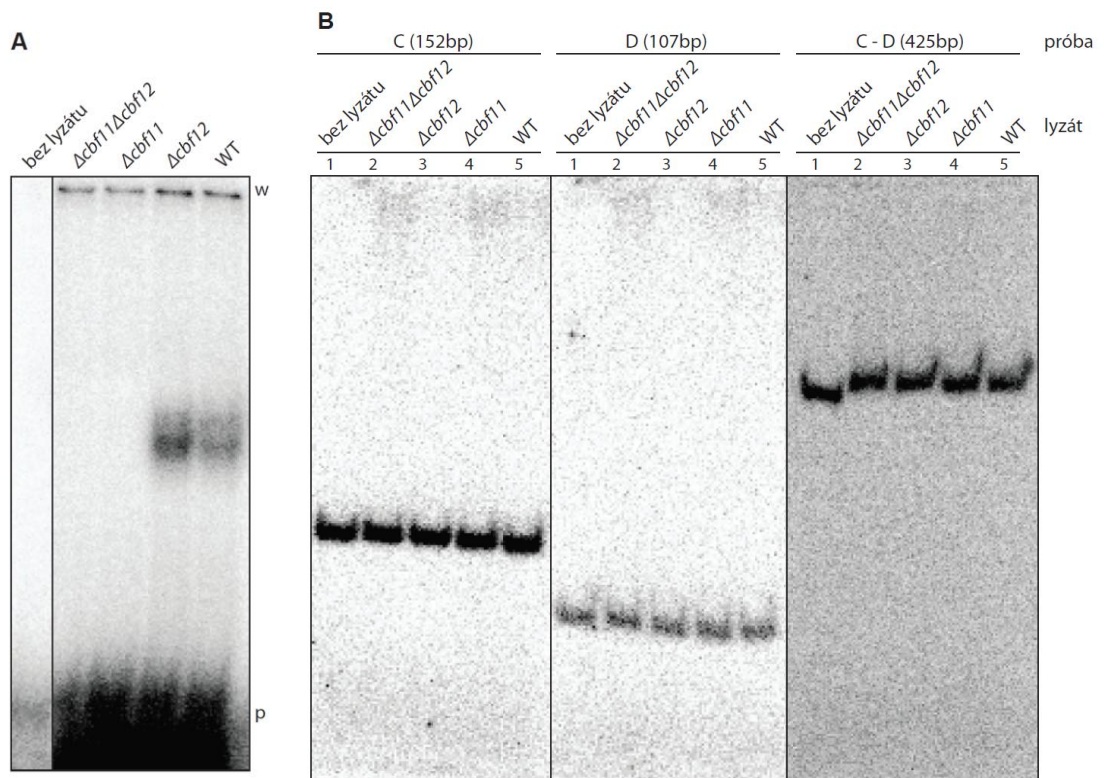
3.5.1.1. Lokalizace vazby Cbf12 *in vitro*

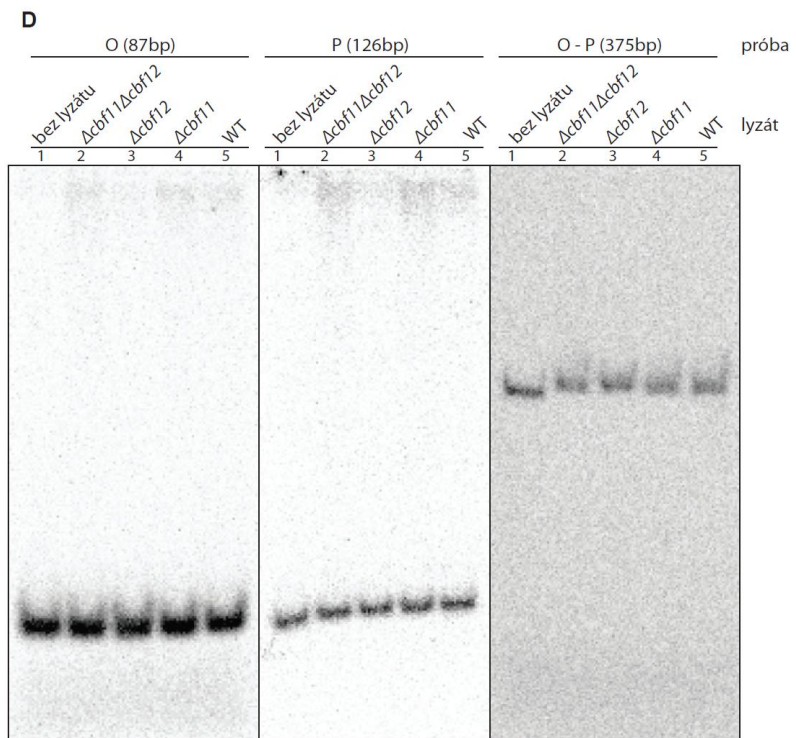
Úseky s nejvyšším nabohacením vazby Cbf12 v rámci sekvencí identifikovaných metodou ChIP-chip jsme dále použili na ověření vazby *in vitro* pomocí metody EMSA. Doposud jsme *in vitro* testovali sekvence z promotorů *S. pombe* vytipované predikcí *in silico* a na tyto sekvence jsme pozorovali vazbu Cbf12 po odstranění jeho N-terminální části (Cbf12(Δ 1-394)), a to pouze s nižší afinitou než v případě Cbf11 (Ptáčková, 2010; Převorovský et al., 2011). Je možné, že tyto sekvence nebyly optimální pro vazbu Cbf12, a proto jsme testovali vazbu Cbf12 na sekvence získané celogenomovým přístupem.

Pro testování vazby *in vitro* jsme pro sekvenci Cbf12_3 použili úseky C a D, pro Cbf12_7 úseky J, K a pro Cbf12_9 úseky označené O a P (Obr. 3.14). Abychom s větší přesností zjistili, kam se protein Cbf12 váže, připravili jsme próby odpovídající jednotlivým úsekům (C, D, J, K, O, P) a také próby pokrývající oba sousedící úseky včetně sekvence mezi nimi (C-D, J-K, O-P). Pokud bychom totiž detekovali vazbu na sekvenci pokrývající oba sousedící úseky, ale nikoli na úseky samotné, znamenalo by to, že se protein Cbf12 váže na sekvenci mezi tyto úseky. Próby jsme připravili pomocí PCR z chromozomální DNA kmene WT a následně precipitovali produkt PCR v přítomnosti glykogenu. Množství DNA odpovídající 5 μ M jsme radioaktivně označili γ -³²P.

Nejprve jsme pro experiment EMSA použili extrakty z kmenů Δ cbf11 Δ cbf12, Δ cbf11, Δ cbf12, WT. Vazbu proteinů CSL jsme ověřili na próbě RBP (Obr. 3.15 A), abychom se ujistili o kvalitě lyzátů. V souladu s očekáváním jsme signál vazby pozorovali v případě lyzátů z buněk Δ cbf12 a WT; jedná se tedy o vazbu proteinu Cbf11. Vazbu proteinu Cbf12 jsme na próbu RBP detekovali jen při jeho nadprodukcii a vyšším množství lyzátu v experimentu (viz 3.2).

V lyzátech jsme testovali vazbu proteinů CSL na próby ze sekvencí Cbf12_3, Cbf12_7 a Cbf12_9 (Obr. 3.15 B, C, D).

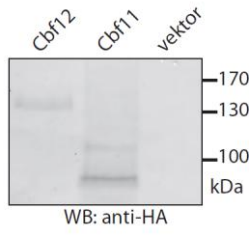
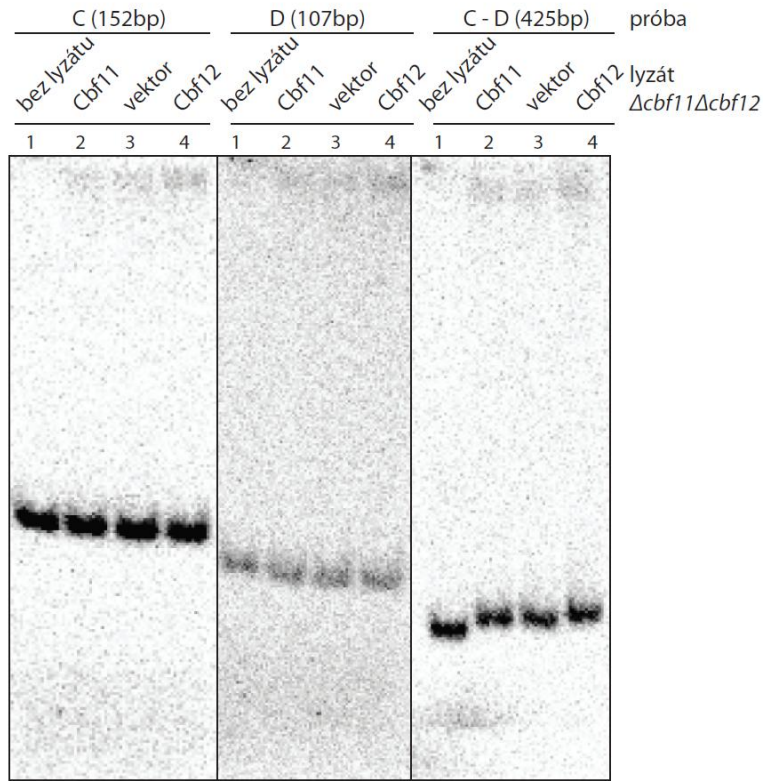
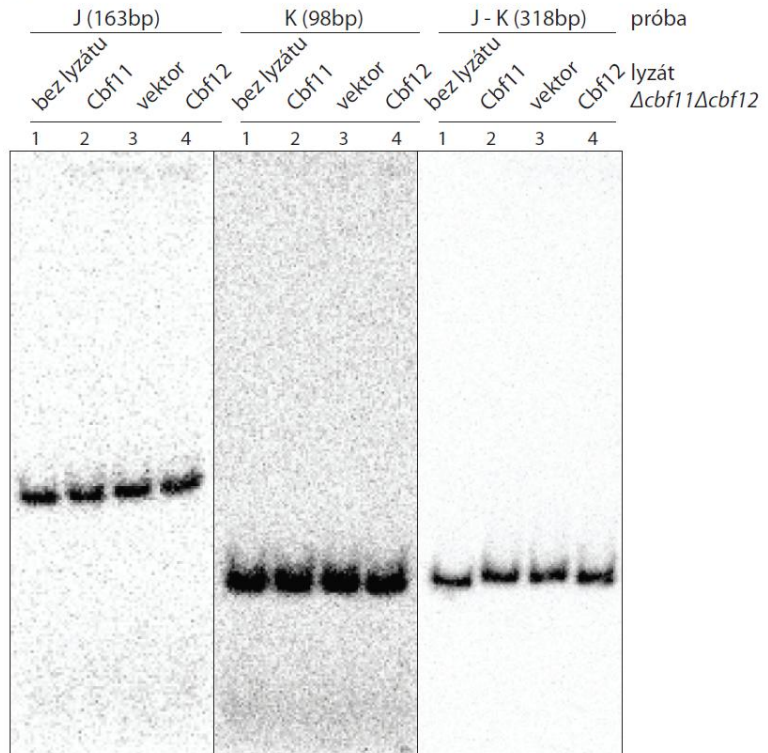


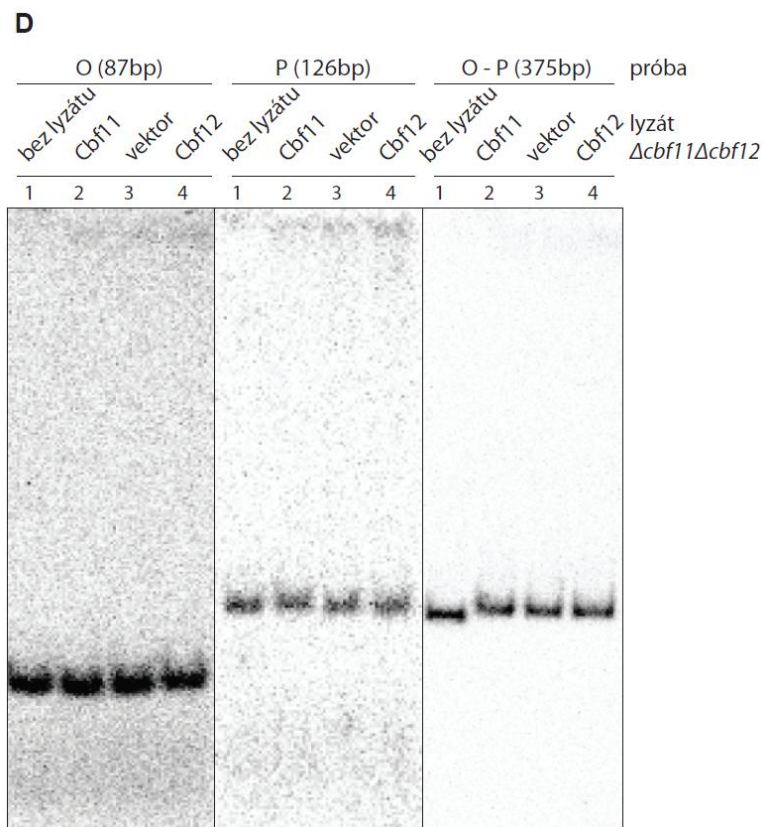


Obr. 3.15 (A) Experiment EMSA s próbou RBP a lyzáty z kmene WT a kmenů s delecí jednoho nebo obou genů CSL. w = jamky; p = volná próba. (B, C, D) Vazba proteinů CSL z lyzátů z panelu (A) na próby ze sekvencí Cbf12_3 (B), Cbf12_7 (C) a Cbf12_9 (D). Pozice volných prób na jednotlivých obrázcích není proporční (doba separace na 5% polyakrylamidovém gelu se pro jednotlivé próby liší).

Pro žádný lyzát a žádnou próbu ze sekvencí *S. pombe* jsme nedetkovali signál, který by odpovídal komplexu protein CSL:DNA (sloupce 2, 3, 4, 5 Obr. 3.15). Posun signálu ve sloupcích 2-5 oproti sloupci bez lyzátu (sloupec 1) v případě dlouhých prób C-D, J-K, O-P může být způsoben vytvořením nukleozomu nebo navinutím DNA na jiné proteiny.

Rozhodli jsme se dále použít lyzáty z buněk $\Delta cbf11 \Delta cbf12$ nadprodukcujících proteiny CSL z plasmidu (Obr. 3.16).

A**B****C**

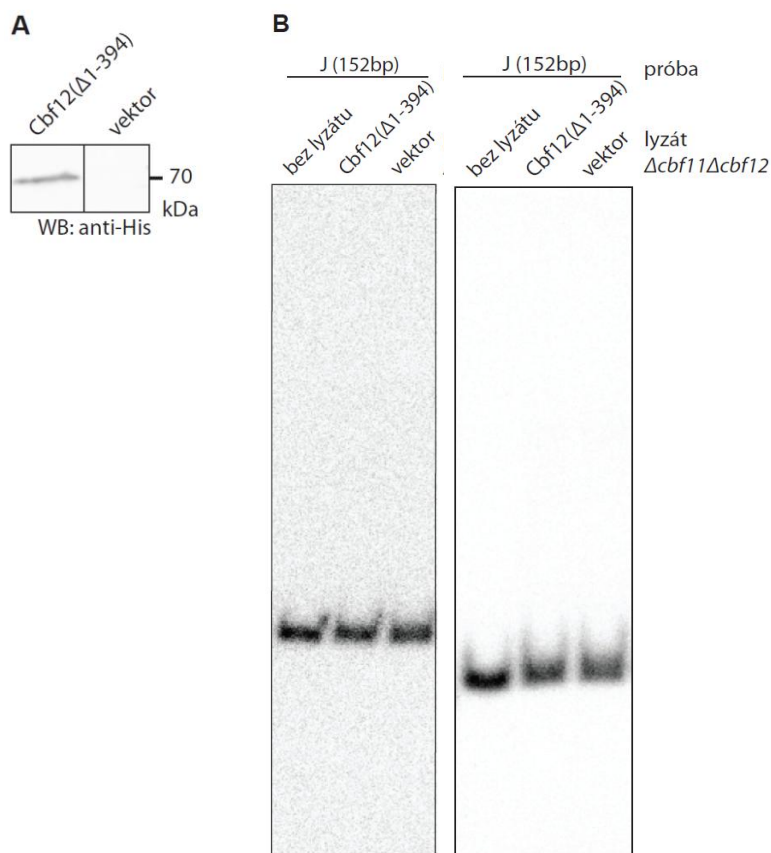


Obr. 3.16 (A) Western blot ověření nadprodukce HA-tagovaných proteinů Cbf11 a Cbf12. (B, C, D) Test vazby HA-tagovaných proteinů CSL nadprodukovaných z plasmidu v buňkách $\Delta cbf11 \Delta cbf12$ na próby ze sekvencí Cbf12_3 (B), Cbf12_7 (C), Cbf12_9 (D). Pozice signálů volné próby nejsou vzájemně porovnatelné, protože doba separace se liší. Pro dělení byl použit 5% polyakrylamidový gel.

Pro žádnou próbu jsme nezaznamenali posun signálu ve sloupcích s lyzáty obsahující proteiny CSL (sloupce 2, 4 v Obr. 3.16) vůči sloupci s prázdným vektorem (sloupec 3 Obr. 3.16). Dlouhé próby mohou tvořit nukleozomy, díky nimž je signál na gelu výše ve sloupcích s lyzáty (sloupce 2, 3, 4 Obr. 3.16) oproti sloupci bez lyzátu (sloupec 1 Obr. 3.16).

V případě proteinu Cbf12 má jeho N-terminální část negativní vliv na vazbu na DNA (Převorovský et al., 2011). Z tohoto důvodu jsme pro experiment EMSA použili lyzát z buněk $\Delta cbf11 \Delta cbf12$ exprimujících z plasmidu fuzní protein His-Cbf12($\Delta 1-394$). Vazbu jsme testovali pouze na próbě označené písmenem J ze sekvence Cbf12_7, protože při ChIP-qPCR ověření jsme pro tento úsek naměřili nejvyšší nabození vazby Cbf12 oproti kontrolnímu úseku (viz Obr. 3.14). Ani tentokrát jsme nedetekovali signál náležící komplexu protein CSL:DNA (Obr. 3.17).

Z provedených experimentů vyplývá, že protein Cbf12 se nepodařilo detailněji lokalizovat při jeho vazbě na DNA *in vitro*.



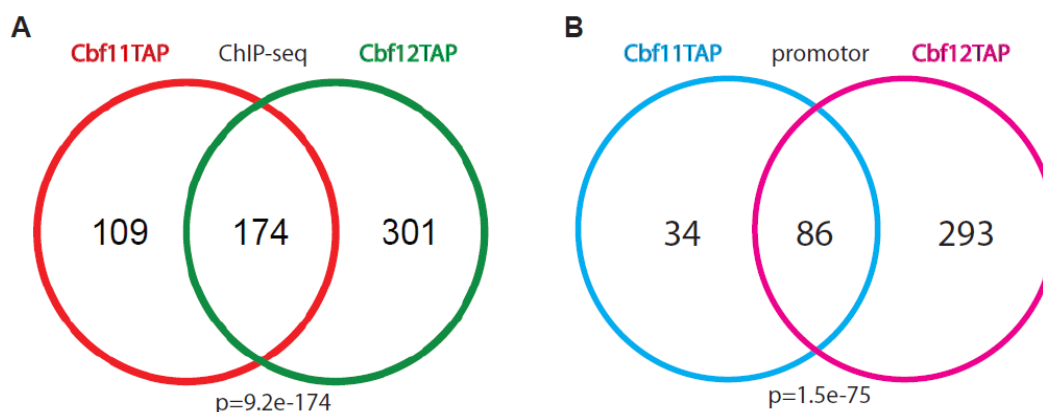
Obr. 3.17 (A) Potvrzení produkce His-Cbf12(Δ1-394) v buňkách $\Delta cbf11 \Delta cbf12$. (B) Vazba Cbf12(Δ1-394) na úsek J ze sekvence Cbf12_7 *in vitro*. Vlevo vzorky děleny na 5% polyakrylamidovém gelu, vpravo na 4%.

3.6. Vazba proteinů CSL na DNA *in vivo* II

Pomocí metody ChIP-chip jsme pro Cbf11 získali v porovnání s Cbf12 méně kandidátních míst, kam se pravděpodobně váží proteiny CSL *in vivo* a na vybrané sekvenční se nám nepodařilo vazbu Cbf11 ověřit metodou ChIP-qPCR. Rozhodli jsme se proto, že budeme pokračovat v mapování cílových míst proteinů CSL v rámci celého genomu *S. pombe* jinou metodou.

Dr. Převorovský provedl v laboratoři Prof. Bählera chromatinovou imunoprecipitaci chromozomálně TAP-tagovaných proteinů Cbf11 a Cbf12 následovanou sekvenováním precipitovaného materiálu (ChIP-seq). Pro experiment byly použity buňky kultivované v mediu YES. Jelikož šlo o nesynchronizované kultury, většina buněk se nacházela v G2 fázi buněčného cyklu, protože G2 fáze představuje u *S. pombe* 70-80% doby trvání buněčného cyklu (Gómez a Forsburg, 2004).

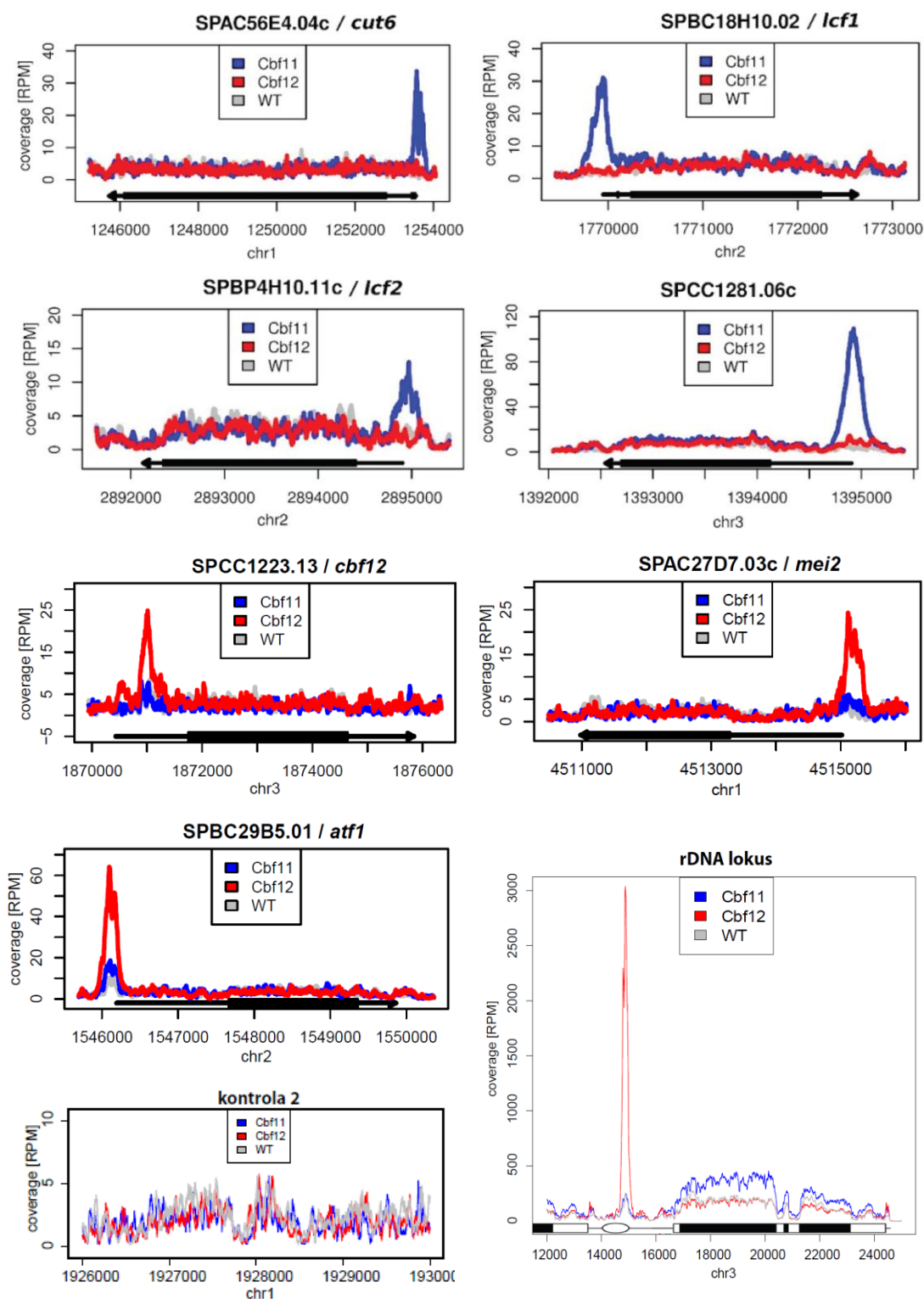
Z analýzy dat vyplynulo, že vazebná místa proteinů CSL se vyskytují v intergenových i kódujících oblastech genů. ChIP-seq signály vyskytující se v promotorových oblastech genů jsme našli ve 120 genech pro Cbf11 a 379 genech pro Cbf12. Seznamy lokusů vázaných oběma proteiny se částečně překrývají (Obr. 3.18).



Obr. 3.18 Schéma zobrazující částečný překryv míst s ChIP-seq signálem vazby proteinů Cbf11 a Cbf12. V diagramu (A) jsou uvedena všechna místa identifikovaná v kódujících i intergenových oblastech, (B) místa v promotorových oblastech genů (analyzoval Dr. Převorovský).

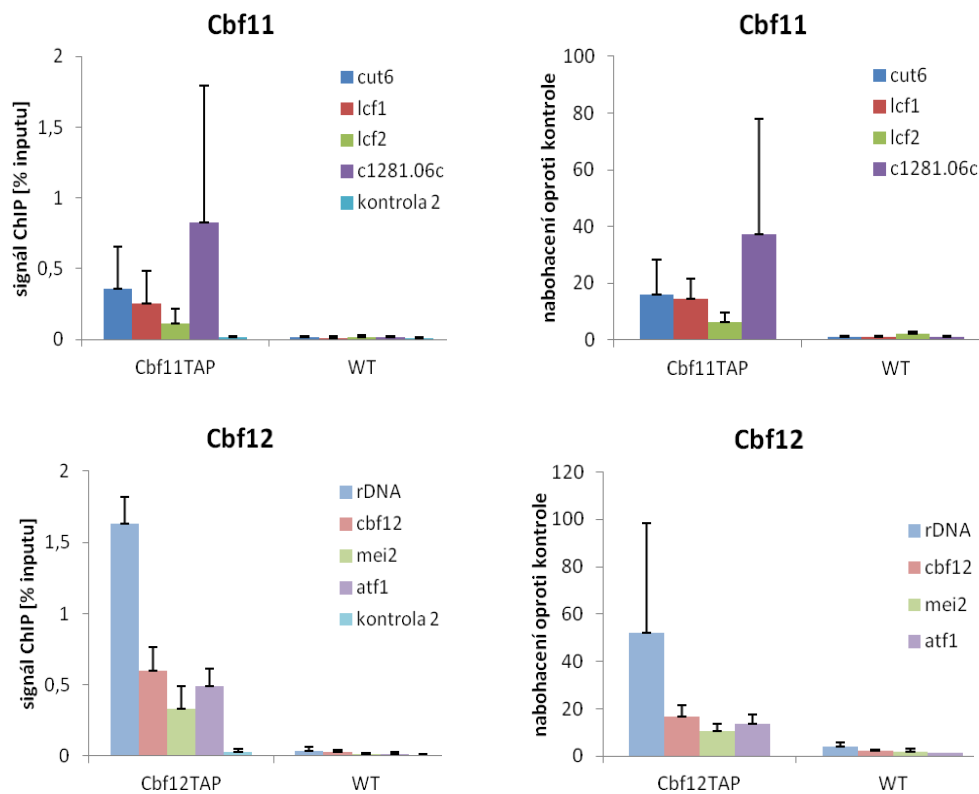
Několik genů, do jejichž promotorových oblastí se podle ChIP-seq váží proteiny CSL *in vivo*, jsme ověřili nezávisle metodou ChIP-qPCR. Pro Cbf11 jsme vybrali geny *cut6*, *lcf1*, *lcf2* a SPCC1281.06c. Produkty těchto genů se účastní lipidového metabolismu (Saitoh et al., 1996; Fujita et al., 2007; Wood et al., 2002). Pro Cbf12 jsme vybrali oblast rDNA kódující ribozomální RNA a geny *cbf12*, *mei2* a *atf1* (Obr. 3.19). Protein Mei2 je RNA-vazebný protein účastnící se meiózy a Atf1 působí jako transkripční faktor při odpovědi na stres (Yamashita et al., 1998 ; Chen et al., 2003). Metoda ChIP-seq poskytuje rozlišení na jednotlivé nukleotidy, a proto jsme měli přesnou představu o tom, kde je vrchol signálu vazby proteinů CSL. Páry primerů pro qPCR jsme umístili tak, aby výsledný amplicon obsahoval střed tohoto vrcholu. V genomu *S. pombe* se vyskytuje přibližně 150 repetitivních rDNA, přičemž v současné době je známa kompletní sekvence tří repetitivních a dvou dalších částečně. Dvě z kompletních repetitivních se nacházejí na levém raménku chromozomu 3 a jedna na pravém. Primery pro ověření vazby proteinů CSL na rDNA jsme navrhli na oblast absolutně konzervovanou mezi sekvenovanými rDNA repetitivními. Jako kontrolu pro všechny geny jsme využili úsek, kde nebyl detekován signál vazby CSL proteinů metodou ChIP-chip ani ChIP-seq (kontrola 2, viz 3.5). Jak vyplývá z Obr. 3.20,

nabohacení signálu ChIP vůči kontrolnímu úseku jsme naměřili na všech testovaných sekvencích. Výsledky ChIP-qPCR dobře korelují s ChIP-seq.



Obr. 3.19 Zobrazení pokrytí promotorů vybraných genů signálem ChIP-seq pro proteiny Cbf11-TAP, Cbf12-TAP a WT. Na ose y je vyneseno pokrytí míst jednotlivými sekvenačními čteními (RPM = reads per million per nucleotide). Nad

osou x je obdélníkem zobrazena kódující oblast. V případě rDNA představují černé obdélníky geny rRNA a oválem je znázorněn počátek replikace (ori).



Obr. 3.20 ChIP-qPCR ověření vazby proteinů Cbf11-TAP, Cbf12-TAP *in vivo* na vybrané promotorové oblasti genů. Kmen WT slouží jako kontrola. Amplikony pro qPCR leží pod vrcholem signálu vazby proteinů CSL detekovaným metodou ChIP-seq. V případě rDNA lokusu je signál vyšší, protože je detekováno více kopií repetice rDNA. Vlevo je ChIP-qPCR signál vyneseno jako procento celkové DNA (input), vpravo po normalizaci na kontrolní úsek. Průměr ze dvou biologických opakování + směrodatné odchylky.

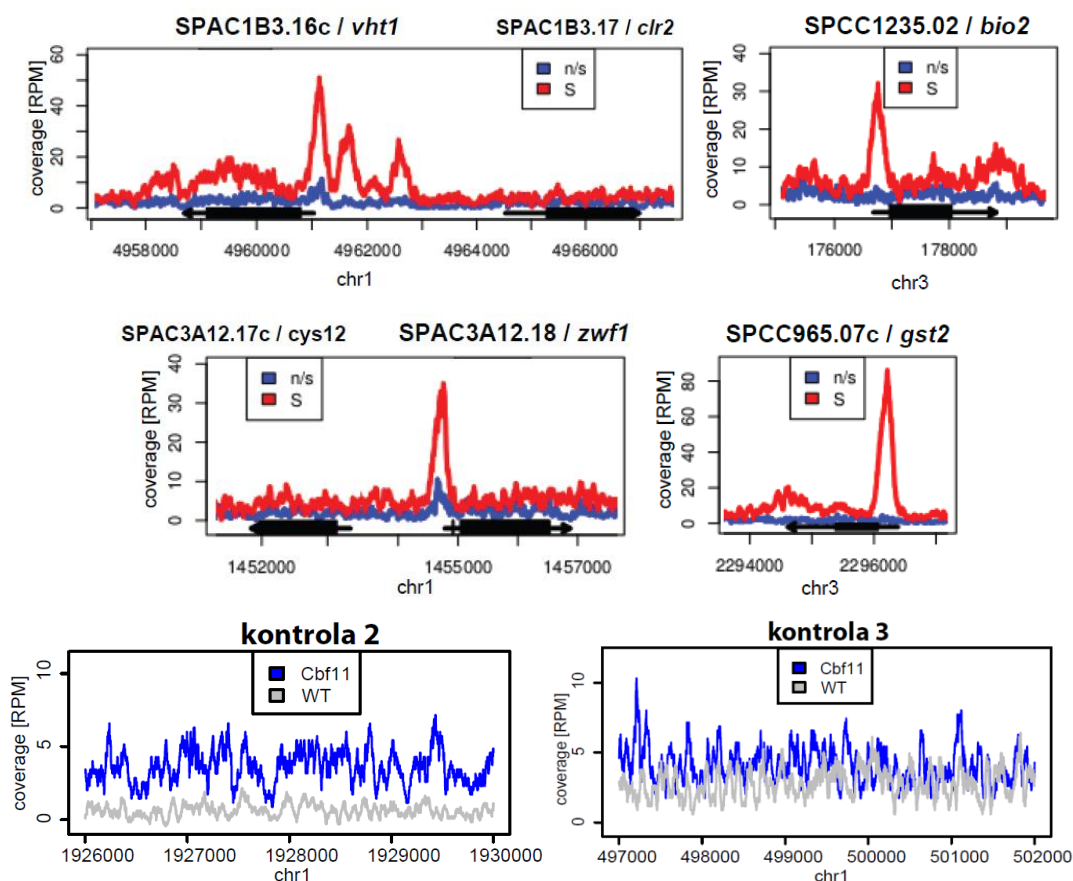
3.7. Cbf11 reguluje genovou expresi během S fáze/cytokineze buněčného cyklu

Pokud jsou v buňkách manipulovány hladiny proteinů CSL (delece *cbf11* nebo nadprodukce Cbf12), objevují se defekty buněčného cyklu jako porucha septace a koordinace jaderného a buněčného dělení (fenotyp *cut*; Převorovský et al., 2009). Podle výsledků DNA microarray proteiny CSL regulují expresi genů periodicky exprimovaných během buněčného cyklu (Převorovský, Oravcová et al., publikace v přípravě). Rozhodli jsme se proto testovat, zda je tato regulace způsobena vazbou proteinů CSL pouze v určité fázi buněčného cyklu.

Abychom postihli změny na celém genomu, provedli jsme ChIP-seq z buněk synchronizovaných v S fázi/cytokinezi pomocí termosenzitivní mutanty v genu *cdc25-22*. V nepermissivní teplotě tato mutace působí zastavení buněčného cyklu v G2 fázi. Po přemístění kultury zpět do permissivní teploty projdou buňky synchronně buněčným cyklem (tzv. block/release experiment).

U většiny míst, na nichž jsme technikou ChIP-seq identifikovali vazbu proteinu Cbf11 v nesynchronizovaných buňkách, jsme detekovali vazbu i v buňkách v S fázi, navíc často silnější. Nicméně jsme našli i místa, kde jsme vazbu Cbf11 detekovali pouze v buňkách v S fázi/cytokinezi. Naopak pro Cbf12 jsme identifikovali místa, kam se protein v S fázi, na rozdíl od nesynchronizovaných buněk, nevázal (Převorovský, Oravcová et al., publikace v přípravě). Dále jsme se však soustředili na protein Cbf11.

Abychom blíže prozkoumali dynamiku vazby proteinu Cbf11 během buněčného cyklu, zablokovali jsme buňky v G2 fázi pomocí alely *cdc25-22* a po opětovném spuštění buněčného cyklu jsme v časových intervalech analyzovali buňky pomocí ChIP-qPCR. Vazbu Cbf11 jsme měřili na 4 promotorech s S fázně specifickým ChIP-seq signálem. Jde o geny *bio2* a *vht1*, které se účastní biosyntézy a transportu biotinu (vitamin H; Stolz, 2003; Phalip et al., 1999), a geny stresové odpovědi *zwf1* a *gst2* (Nogae a Johnston, 1990; Cho et al., 2002; viz Obr. 3.21). Expres těchto genů je regulována proteinem Cbf11 – hladina *vht1* a *bio2* je snížena v kmeni $\Delta cbf11$, zatímco hladiny *zwf1* a *gst2* jsou zvýšeny (Tab. 3.2). Geny *vht1* a *gst2* navíc patří mezi periodicky exprimované geny (Oliva et al., 2005; Peng et al., 2005; Rustici et al., 2007; Marguerat et al., 2006). Gen *bio2* byl jako periodicky exprimovaný označen v jedné studii (Oliva et al., 2005). Do analýzy jsme zahrnuli také gen *cut6*, do jehož promotoru se Cbf11 detekovatelně váže i v nesynchronizovaných buňkách (viz Obr. 3.19) a pozitivně reguluje jeho expresi. Ve studii (Peng et al., 2005) byl *cut6* zařazen mezi periodicky exprimované geny. Jako negativní kontrolu jsme použili úsek bez vazby proteinů CSL označený jako kontrola 2 (chr1_1928274-1928359) a navrhli jsme ještě další kontrolní lokus (kontrola 3: chr1_499187-499310).



Obr. 3.21 Signál ChIP-seq pro Cbf11 v promotorech několika vybraných genů. Data ze dvou biologických opakování (sloučená sekvenční čtení) z nesynchronizovaných (n/s) buněk a buněk v S fázi buněčného cyklu. Osa y představuje pokrytí míst jednotlivými sekvenčními čteními (RPM = reads per million per nucleotide). Nad osou x je zobrazena anotace genů, kde obdélník představuje kódující oblast. Pro kontroly 2, 3 je zobrazen signál ChIP-seq z buněk Cbf11-TAP a WT v S fázi.

Tab. 3.2 Přehled genů vybraných pro zkoumání dynamiky vazby Cbf11 v průběhu buněčného cyklu. Periodicita byla určena podle (Marguerat et al., 2006).

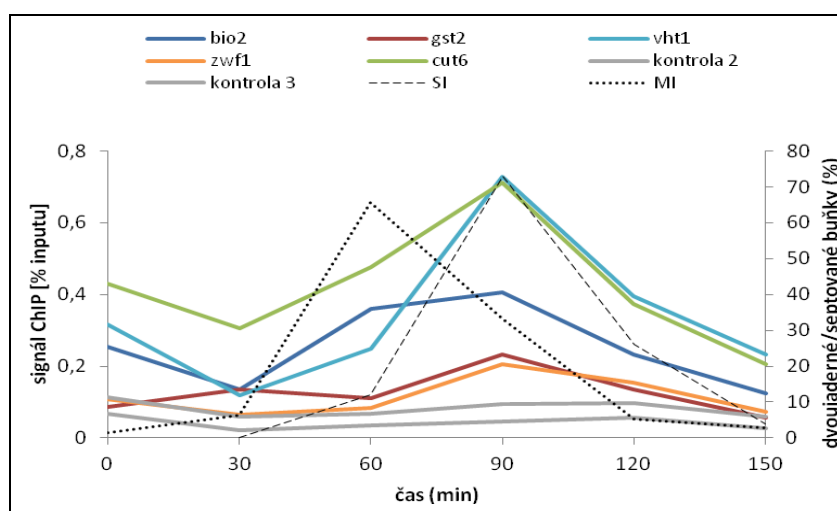
gen	jméno	Popis	regulace proteinem Cbf11	periodicita
SPCC1235.02	<i>bio2</i>	biotin syntáza	pozitivní	✗
SPCC965.07c	<i>gst2</i>	glutathion S-transferáza	negativní	✓
SPAC1B3.16c	<i>vht1</i>	vitamin H transportér	pozitivní	✓
SPAC3A12.18	<i>zwf1</i>	glukóza-6-fosfát 1-dehydrogenáza (predikce)	negativní	✗
SPAC56E4.04c	<i>cut6</i>	acetyl-CoA/biotin karboxyláza	pozitivní	✗

Jak je ukázáno v Obr. 3.22, Cbf11 se váže do promotorů všech pěti genů, ale ne na kontrolní lokusy. Promotory genů *zwf1* a *gst2* jsou vázány slabě, zatímco do promotorů *vht1*, *bio2* a *cut6* se Cbf11 váže silně. Maximum signálu vazby Cbf11

v čase se shoduje s vrcholem křivky septačního indexu. Za normálních podmínek koreluje tvorba septa s S fází buněčného cyklu, což znamená, že Cbf11 interaguje s DNA v S fázi a/nebo v cytokinezi.

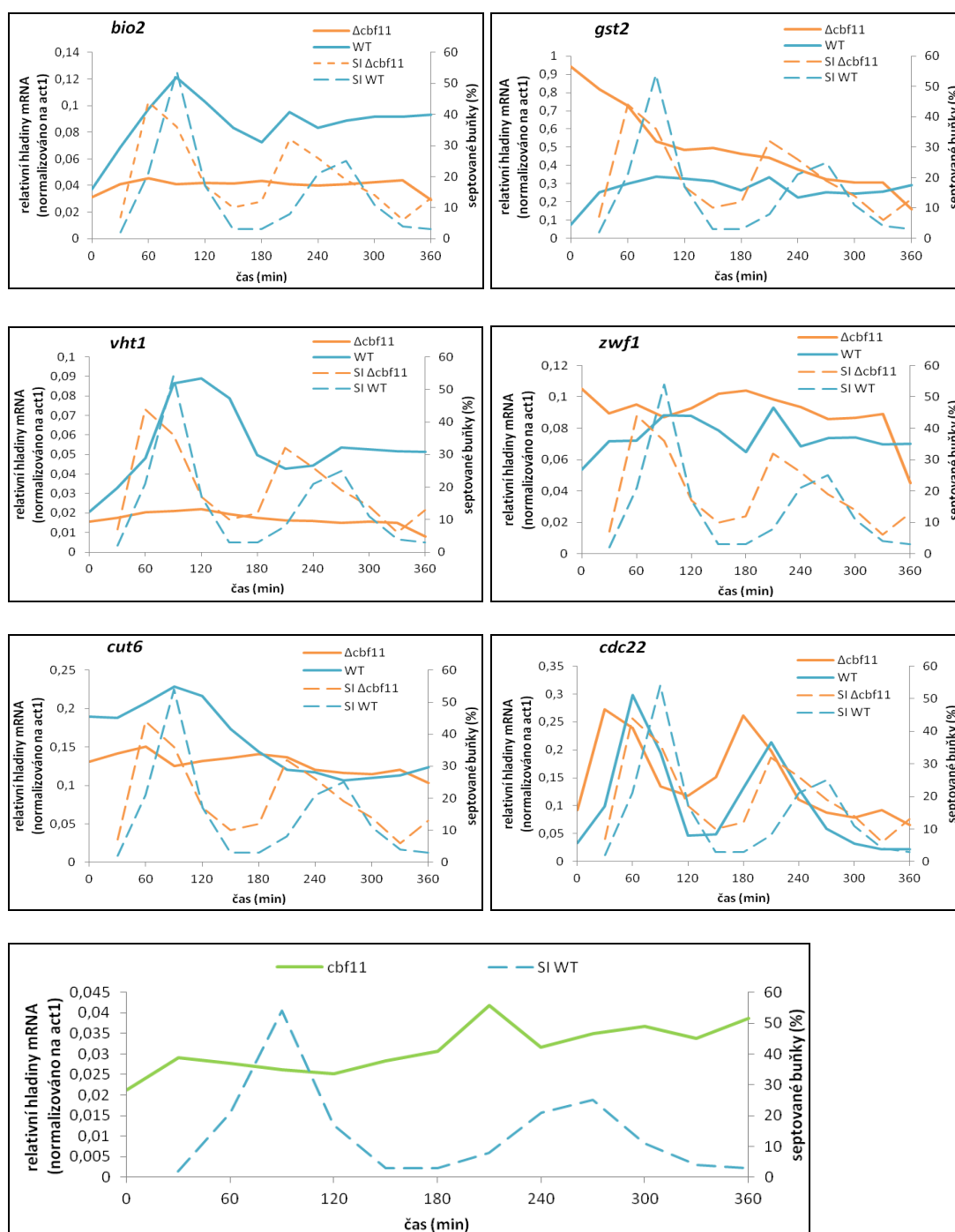
U vybraných genů jsme také měřili hladiny mRNA, abychom zjistili, jak Cbf11 tyto geny reguluje. mRNA genů jsme stanovili pomocí RT-qPCR v buňkách *Δcbf11* a WT, které synchronně procházely dvěma buněčnými cykly (Obr. 3.23). Expresi genů jsme normalizovali na expresi genu *act1*, která je stabilní v průběhu buněčného cyklu (Woolcock et al., 2011). Jako kontrolu s cyklující expresí jsme zvolili gen *cdc22*, jehož exprese kulminuje na rozhraní G1/S (Fernandez Sarabia et al., 1993).

Hladina mRNA genů *zwf1* a *gst2* byla zvýšena v buňkách *Δcbf11* zastavených v G2 fázi, poté v průběhu buněčného cyklu klesala na úroveň buněk WT a nebylo patrné periodické chování exprese. Naproti tomu exprese *bio2* a *vht1* je v buňkách WT periodická s vrcholem v S fázi nebo v rané G2 fázi. Také pro gen *cut6* je patrný náznak cyklující hladiny mRNA. Pokud se však v buňkách deletuje *cbf11*, hladina mRNA *vht1*, *bio2* a *cut6* je snížena a periodicita exprese je ztracena. Exprese samotného Cbf11 zůstává během buněčného cyklu beze změny. Kromě sledování septačního indexu jsme k monitorování průchodu buněčným cyklem použili také průtokovou cytometrii, přičemž jsme měřili obsah DNA v jednotlivých časových bodech (Obr. 3.24).



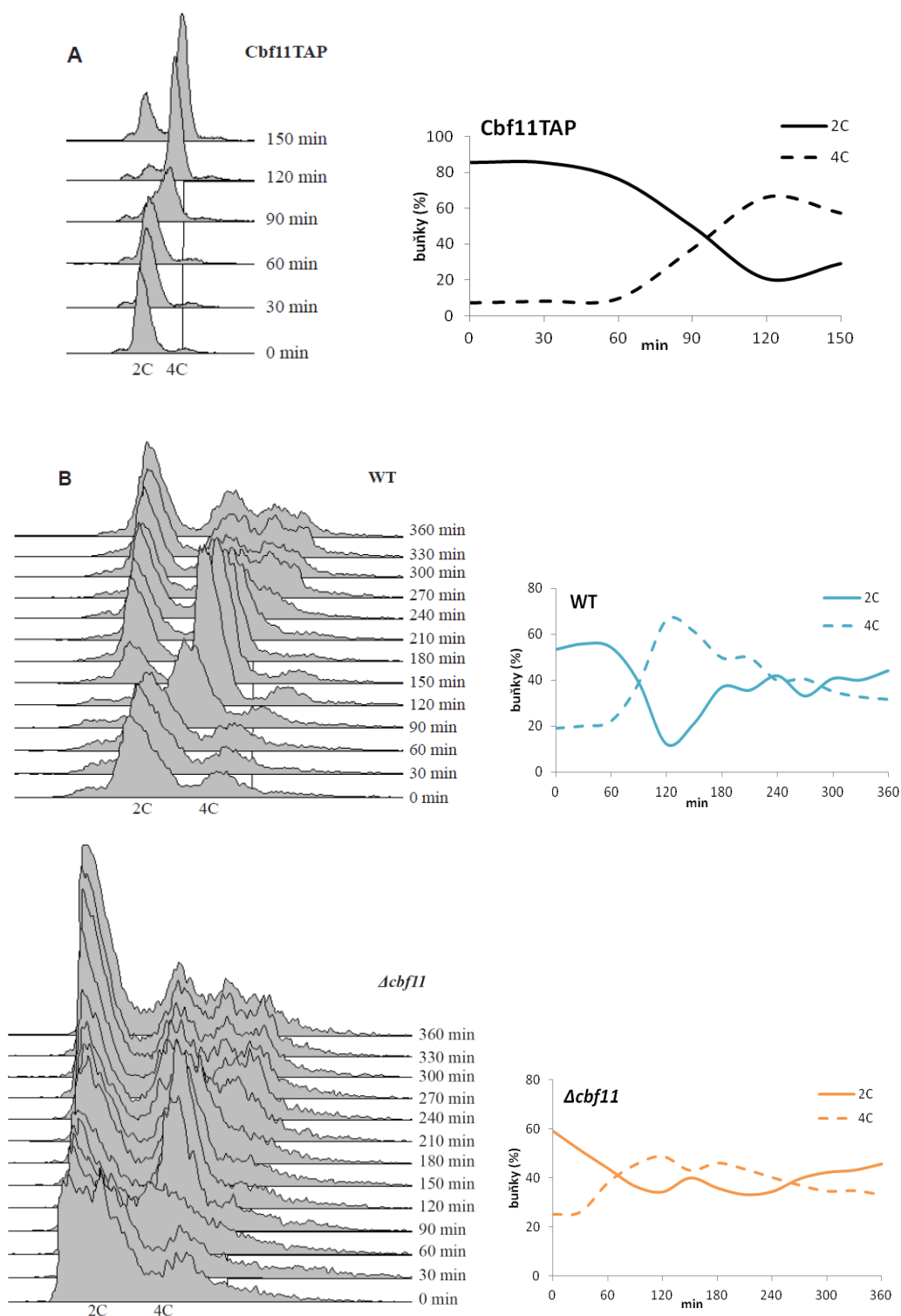
Obr. 3.22 Buňky exprimující TAP-tagovaný Cbf11 byly synchronizovány pomocí termosenzitivní alely genu *cdc25-22*. Po 30 min intervalech od přemístění do permissivní teploty byly odebírány alikvoty, buňky byly fixovány formaldehydem a vazba Cbf11 analyzována pomocí ChIP-qPCR. Do všech pěti studovaných promotorových oblastí se Cbf11 váže. Na kontrolní úseky vazba detekována nebyla.

Maximum vazby Cbf11 koreluje s výskytem septa. Septační index (SI) vyjadřuje procento buněk se septem, mitotický index (MI) ilustruje procento dvoujaderných buněk před vytvořením septa.



Obr. 3.23 Profil exprese genů *bio2*, *gst2*, *vht1*, *zwf1*, *cut6*, *cdc22* a *cbf11* v průběhu buněčného cyklu. WT a $\Delta cbf11$ buňky byly synchronizovány pomocí *cdc25-22* a alikvoty buněk odebrány po 30 min intervalech. Exprese genů byla stanovena pomocí RT-qPCR. Gen *cdc22* byl použit jako cyklující kontrola, protože je periodicky exprimován a maximum exprese se vyskytuje na rozhraní fází G1/S.

Expres samotného genu *cbf11* ve WT buňkách se v průběhu buněčného cyklu nemění (poslední panel).



Obr. 3.24 Monitorování průchodu buněk Cbf11-TAP, $\Delta cbf11$ a WT buněčným cyklem pomocí průtokové cytometrie. Sledován obsah DNA jako fluorescence propidium jodidu. V čase 0 min jsou buňky zastaveny v G2 fázi s duplikovaným haploidním genomem (2C). Obsah DNA osciluje mezi 2C a 4C díky vzájemnému

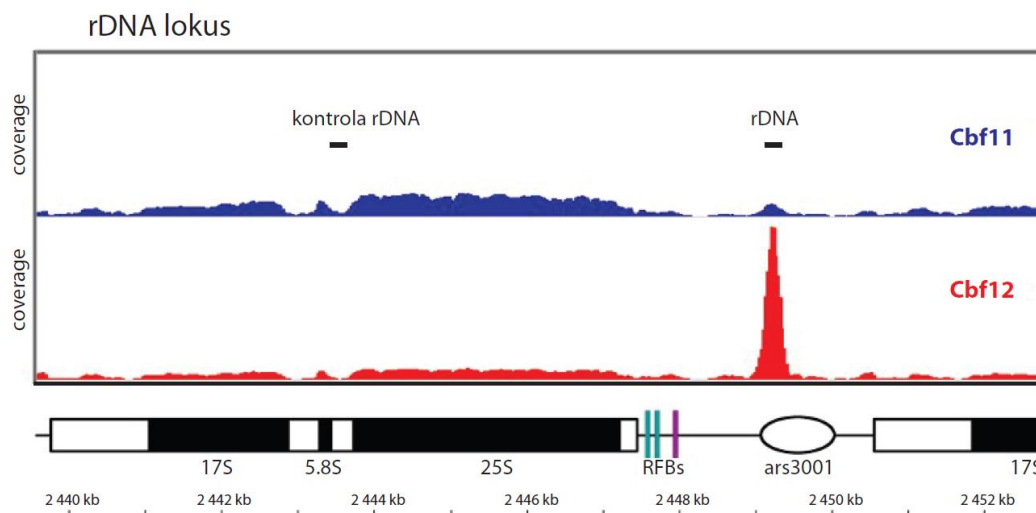
posunu jaderného a buněčného cyklu, kdy jádra buněk před cytokinezí jsou už v S fázi dalšího cyklu. Procento buněk s obsahem DNA 2C a 4C je vyneseno v grafech. (A) Buňky Cbf11-TAP použité na sledování vazby Cbf11 na DNA, (B) buňky WT a $\Delta cbf11$ synchronizované pro sledování exprese genů v průběhu buněčného cyklu.

3.8. Vliv Cbf11 na vazbu Cbf12 na DNA *in vivo*

Proteiny Cbf11 a Cbf12 antagonisticky ovlivňují několik procesů v buňce a působí také na sebe navzájem (Převorovský et al., 2009 a nepublikovaná data). Mechanismus vzájemného ovlivňování proteinů CSL není dosud známý. Antagonismus proteinů CSL se může projevovat kompeticí o interakční partnery, proteiny zajišťující posttranslační modifikace nebo vazebná místa na DNA. Rozhodli jsme se detailněji prozkoumat vliv interakce obou proteinů na úrovni vazby na DNA. Zaznamenali jsme totiž fenotyp spojený s delecí *cbf11*, přestože se na příslušný lokus váže *in vivo* protein Cbf12. V populaci buněk $\Delta cbf11$ se vyskytují klony s různě velkým chromozomem III pravděpodobně kvůli různému počtu kopií rDNA. Lze dedukovat, že delece *cbf11* má zřejmě vliv na stabilitu repetitivní rDNA. V kmeni s delecí *cbf12* jsme tento fenotyp nepozorovali (Převorovský, nepublikovaná data). Toto zjištění je překvapivé, neboť silnou vazbu na lokus rDNA jsme dříve detekovali v případě proteinu Cbf12 a nikoli Cbf11 (Obr. 3.19). Položili jsme si tedy otázku, zda se změní síla vazby proteinu Cbf12 na DNA v nepřítomnosti Cbf11.

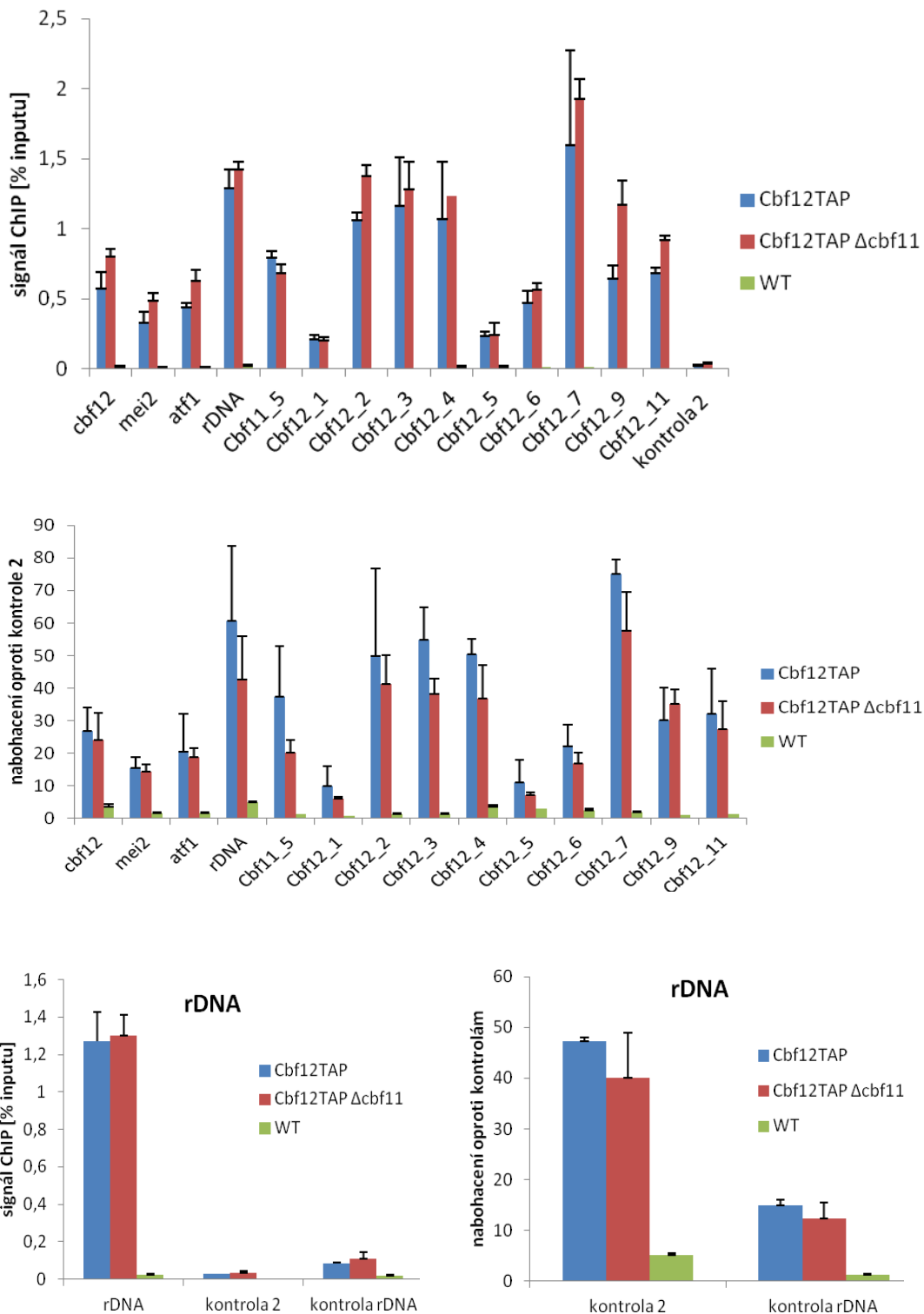
Provedli jsme proto chromatinovou imunoprecipitaci proteinu Cbf12-TAP z kmenů *cbf12TAP* $\Delta cbf11$, *cbf12TAP* a WT. Kmen *cbf12TAP* $\Delta cbf11$ jsme připravili křížením a nepřítomnost *cbf11* jsme ověřili pomocí PCR.

Pomocí qPCR jsme analyzovali vazbu Cbf12-TAP na rDNA, ale také všechny ostatní dosud testované lokusy s výskytem vazby Cbf12. Jako kontrolní lokus jsme použili kontrolu 2 (chr1_1928274-1928359). Pro rDNA lokus není tato kontrola vhodná, protože se narozdíl od rDNA vyskytuje v genomu pouze v jedné kopii. V závislosti na genotypu se ale mění počet kopií rDNA, a pokud chceme sledovat změnu vazby Cbf12, je potřeba kontrolní úsek, jehož počet kopií se také mění spolu s počtem kopií rDNA. Kontrolu pro rDNA jsme tedy umístili do rDNA lokusu tam, kde není podle ChIP-seq signál vazby proteinů CSL (Obr. 3.25).



Obr. 3.25 ChIP-seq signál vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 na rDNA repetici na pravém raménku chromozomu 3. Pozice úseků použitých pro qPCR jsou zobrazeny vodorovnými úsečkami. RFBs – bariéry replikace (replication forks barrier), ars3001 – počátek replikace (autonomously replicating sequence).

Jak ilustruje obrázek Obr. 3.26, vazba proteinu Cbf12 na DNA *in vivo* zůstává v přítomnosti i absenci Cbf11 beze změny. Protein Cbf11 tedy na daných lokusech vazbu Cbf12 na DNA neovlivňuje.



Obr. 3.26 Analýza vazby proteinu Cbf12 *in vivo* v kmenech s/bez *cbf11*. Ve dvou menších grafech jsou zvlášť vyneseny hodnoty pro rDNA lokus. Ve všech grafech je zobrazen průměr ze dvou biologických opakování + směrodatné odchylky, v grafech s daty pro rDNA jsou vyneseny technické replikáty s příslušnými kontrolami.

4. Diskuse

4.1. Proteiny CSL *S. pombe* jsou transkripční faktory

Transkripční faktory rodiny CSL patří mezi klíčové regulátory vývoje metazoálních organismů. V závislosti na kontextu fungují jako aktivátory nebo represory genové exprese v rámci signální dráhy Notch, mohou však fungovat i mimo tuto signalizaci (Pursglove a Mackay, 2005; Bray, 2006; Ehebauer et al., 2006; Minoguchi et al., 1997; Barolo et al., 2000). V našich předchozích studiích jsme identifikovali proteiny patřící do rodiny CSL u několika druhů organismů z říše Fungi (Převorovský et al., 2007; Převorovský et al., 2011).

V poltivé kvasince *Schizosaccharomyces pombe* jsme zkoumali paralogy Cbf11 a Cbf12. Oba proteiny se antagonisticky uplatňují v koordinaci procesů buněčného cyklu a adheze buněk. U obou byla prokázána schopnost aktivovat genovou expresi v heterologním reportérovém systému *S. cerevisiae*. Pro Cbf11 byla pozorována sekvenčně-specifická DNA-vazebná aktivita *in vitro*, velmi podobná jako u metazoálních proteinů CSL (Převorovský et al., 2009). Navzdory tomu nebylo doposud jasné, zda proteiny Cbf11 a Cbf12 fungují jako transkripční faktory.

4.1.1. Vliv N-konce proteinů CSL na subcelulární lokalizaci a vazbu na DNA

Naše předchozí studie ukázaly, že dlouhé N-koncové části proteinů CSL *S. pombe*, nacházející se před definovanými doménami, vykazují nízkou míru sekvenční komplexity, jsou nejspíše strukturně neuspořádané a jsou v nich nabohaceny regulační motivy, jako například sekvence PEST nebo fosforylační místa. S cílem zjistit funkci těchto částí proteinů jsme zkonstruovali mutantní varianty genů produkujících proteiny CSL, které jsou zkrácené z N-konce; v případě Cbf11 jsme odstranili úsek 1-172 aminokyselin, v případě Cbf12 úsek 1-465 aminokyselin. Studií DNA-vazebných vlastností mutantních variant proteinů CSL *in vitro* jsme ukázali, že odstranění celé N-terminální části proteinu působí neschopnost proteinů Cbf11 a Cbf12 vázat kanonický CSL-vazebný motiv DNA. V rámci konstrukce N-terminálně zkrácených proteinů CSL byl odstraněn i helix $\alpha 1$, který je však podle krystalografických dat metazoálního proteinu LAG-1 součástí CTD (Kovall a

Hendrickson, 2004). Odstranění helixu $\alpha 1$ tak mohlo způsobit narušení terciárního uspořádání proteinů CSL a nemožnost vazby na DNA (Teska, 2012). Odebrání N-terminální části však nevyvolalo nestabilitu a degradaci proteinů, jelikož metodou western blot jsme detekovali proteiny odpovídající molekulové hmotnosti a v množství srovnatelném s ostatními variantami CSL (Teska, 2012; Obr. 3.2) a zkrácené proteiny jsou tedy intaktní.

Proteiny CSL plné délky jsou oba lokalizovány v jádře buňky (Převorovský et al., 2009). Odstranění kompletní N-terminální části proteinu vyústilo v dramatickou změnu lokalizace a proteiny Cbf11($\Delta 1-172$) a Cbf12($\Delta 1-465$) byly rozptýleny rovnoměrně v celé buňce. Překvapivé bylo, že pokud jsme protein Cbf12 zkrátali pouze o aminokyseliny 1-394, a tudíž část N-konce byla ponechána, protein si zachoval svoji jadernou lokalizaci. Samotný konstrukt Cbf12(395-465) byl také akumulován převážně v jádře buňky (Obr. 3.3, Obr. 3.4). Z uvedeného vyvozujeme, že největší podíl na jaderné lokalizaci proteinů CSL má N-terminální část proteinů, v případě Cbf12 je lokalizace podmíněna zejména úsekem mezi aminokyselinovými zbytky 395-465. Tento úsek Cbf12 není konzervován mezi paralogy CSL *S. pombe*, ani mezi dalšími fungálními proteiny CSL (Převorovský et al., 2011). Vzhledem k tomu, že odstranění N-terminální sekvence vedlo k rovnoměrné celobuněčné lokalizaci (včetně jádra), na jaderné lokalizaci nejspíše participují i další části proteinů CSL. Pomocí bioinformatických nástrojů PredictProtein (Rost et al., 2004), NLStradamus (Nguyen Ba et al., 2009) a cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009) jsme vyhledávali potenciální jaderné lokalizační signály (NLS) v sekvencích Cbf11 a Cbf12. Nalezli jsme jediný monopartitní NLS v N-koncové sekvenci Cbf11 mezi aminokyselinami 121-130 (analyzoval Dr. Převorovský).

Cbf11 *in vitro* specificky rozpoznává kanonický CSL-vazebný element v próbě RBP odvozené z promotoru myšího genu RBP-J κ a váže se na něj přímo. V případě Cbf12 o plné délce jsme v předchozích experimentech vazbu na kanonický CSL-responzivní element nezaznamenali. DNA-vazebnou aktivitu jsme pozorovali pro Cbf12($\Delta 1-394$), avšak s nižší afinitou než v případě Cbf11 (Převorovský et al., 2009; Ptáčková, 2010). Vedle metazoálních sekvencí jsme prokázali vazbu Cbf12($\Delta 1-394$) *in vitro* také na sekvence odvozené z promotorových oblastí genů *S. pombe* obsahující CSL-vazebný element (Obr. 3.5). Důvodů, proč se nám nepodařilo detekovat vazbu nezkráceného Cbf12 na DNA, mohlo být více. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo v proteinu Cbf12 identifikováno 19 míst fosforylace,

z toho 16 v N-terminální části proteinu. Zkrácená varianta Cbf12(Δ 1-394) obsahuje pouze 6 z 19 doposud identifikovaných míst fosforylace. Dále bylo zjištěno, že v nativních extraktech se kromě proteinu Cbf12 o plné délce objevují i kratší fragmenty. Přítomnost fragmentace naznačuje, že je protein proteolyticky štěpen (viz například Obr. 3.2). Žebříček fragmentů proteinu Cbf12 jsme pozorovali pro proteiny značené na N-konci, a je proto nepravděpodobné, že by se další fragmenty objevovaly díky využití alternativních počátků translace. Vyloučit můžeme i alternativní sestřih, protože transkript *cbf12* neobsahuje intron. Ze srovnání dat pro C- a N-koncově značené proteiny Cbf12 vyplynulo, že místa předpokládaného štěpení se nachází v N-terminální části proteinu. Formulovali jsme proto hypotézu, že N-konec proteinu Cbf12 zřejmě negativně ovlivňuje vazbu na DNA a *in vivo* je vyžadována proteolýza Cbf12, aby byl protein schopen vazby na DNA (Převorovský et al., 2011). V úvahu připadá i možnost, že podmínky experimentu *in vitro* nejsou pro vazbu intaktního Cbf12 plně vyhovující. Z tohoto důvodu jsme zvýšili množství Cbf12 v reakci experimentu EMSA a skutečně jsme na próbu RBP detekovali sekvenčně specifickou vazbu Cbf12. Následujícími experimenty jsme potvrdili, že detekované komplexy proteinu Cbf12 a DNA obsahují N-koncovou oblast proteinu Cbf12 (Obr. 3.6, Obr. 3.7). Detekovaný signál tudíž odpovídá buď Cbf12 o plné délce nebo jeho části vzniklé proteolytickým štěpením, avšak s intaktní N-terminální oblastí. Z toho vyplývá, že je Cbf12 o plné délce schopen vazby na DNA *in vitro* a důvod proteolýzy proteinu zůstává zatím nejasný.

V porovnání s Cbf11 má Cbf12 k próbě RBP nízkou afinitu. Na vině mohou být podmínky nastavené v našich experimentech EMSA *in vitro*, nicméně ani dalšími metodami se nepodařilo detekovat vazbu Cbf12 na tento element *in vivo* (viz 4.1.2.). Z výsledků vyplývá, že oba proteiny CSL *S. pombe*, Cbf11 i Cbf12, jsou schopny specificky rozpoznávat kanonický CSL-responzivní element na DNA *in vitro*, k detekci vazby Cbf12 je však třeba vyšší množství proteinu.

4.1.2. Regulace genové exprese proteiny CSL

Pomocí reportérového genu kódujícího enzym EGFP- β -galaktosidázu jsme sledovali regulaci genové exprese a zjistili jsme, že protein Cbf11 v nativních podmínkách exprese reportérového genu aktivuje (Obr. 3.9). S využitím ChIP-qPCR jsme *in vivo* dokumentovali fyzickou přítomnost proteinu Cbf11 v promotorové oblasti

reportérového genu, která obsahovala CSL-vazebný element (próba RBP), zatímco do promotoru s mutovaným elementem se Cbf11 nevázal (próba DEL2; Obr. 3.10 C). Z těchto výsledků můžeme vyvodit, že za podmínek fyziologické koncentrace se Cbf11 chová jako sekvenčně-specifický DNA-vazebný aktivátor transkripce. Protein Cbf12 spouštěl expresi reportéru, pouze pokud byl Cbf12 nadprodukován, a i tak exprese reportéru nedosahovala takové míry jako v případě Cbf11 (Obr. 3.9 B). Přesto můžeme vyvodit, že protein Cbf12 je schopen fungovat jako aktivátor transkripce. Zvolený reportérový systém neumožňuje testovat represi transkripce, a tudíž nemůžeme vyloučit možnost, že Cbf12 může za určitých podmínek zastávat roli represoru. Považujeme to však za méně pravděpodobné, jelikož data z dalších experimentů, například microarray, naznačují funkci Cbf12 jako aktivátoru transkripce.

Při testování vazby nadprodukovaných HA-tagovaných proteinů CSL na próbu RBP v promotorové oblasti reportéru *in vivo* jsme oproti očekávání získali metodou ChIP pouze velmi slabé signály (Obr. 3.10 D). Slabý signál jsme detekovali i při nadprodukcí Cbf11, u kterého jsme při nativní koncentraci Cbf11 vazbu *in vivo* na próbu RBP v reportérovém plasmidu metodou ChIP potvrdili (Obr. 3.10 C). Na základě experimentu s nadprodukovanými proteiny CSL tedy není možné vyvozovat žádné závěry o vazbě Cbf12 na promotorovou oblast reportéru *in vivo*. Neúspěch imunoprecipitace nadprodukovaných proteinů CSL může být způsoben například proteolýzou N-konců značených HA-tagem, přestože jsme nadprodukované proteiny CSL prostřednictvím této značky detekovali pomocí western blotu (Obr. 3.9 C). Hemaglutininový epitop také nemusí být, tak jak byl námi k proteinům CSL připojen, přístupný pro vazbu anti-HA protilátky v kontextu nativního chromatinu, na rozdíl od denaturujících podmínek western blotu.

CSL-responzivní element v próbě RBP, přítomný v regulační oblasti reportérového plasmidu, může představovat místo, které Cbf12 váže s nízkou afinitou. To může být důvod, proč se na próbu RBP Cbf12 ve fyziologické koncentraci váže *in vitro* slabě a *in vivo* nedochází k aktivaci transkripce reportéru. Další možností je, že navzdory schopnosti vazby na DNA může být Cbf12 *in vivo* v kontaktu s DNA nepřímo jako součást proteinového komplexu, který obsahuje jiný DNA-vazebný protein (Gordán et al., 2009). Pokud by se tento DNA-vazebný interakční partner vázal na jiný než kanonický CSL-responzivní element, nemohli bychom tuto vazbu testovat pomocí stávajícího reportérového plasmidu. Popsané možnosti chování proteinů CSL,

zejména Cbf12, se vzájemně nepopírají a mohou se různě uplatňovat na konkrétních endogenních cílových lokusech proteinů CSL v genomu *S. pombe in vivo*.

Díky mutantním variantám Cbf11DBM a Cbf12DBM, které nejsou schopny vazby na DNA (Teska, 2012), jsme zjistili, že vazebné aktivity metazoálních a fungálních proteinů závisí na stejných aminokyselinových zbytcích v doméně BTD. Lze tedy předpokládat, že mechanismus vazby na DNA je u těchto evolučně vzdálených organismů konzervovaný. DBM varianty proteinů CSL nedokážou indukovat transkripci reportérového genu, a tudíž vazba na próbu RBP reportérového plasmidu je zde nutnou podmínkou pro regulaci genové exprese. Nevíme však, je-li vazba na DNA nutná pro všechny funkce proteinů CSL, například v regulaci buněčného cyklu nebo adhezivity. Na zodpovězení těchto otázek dobře poslouží vytvořené DBM varianty proteinů CSL, u nichž je kompromitována vazba na DNA, avšak buněčná lokalizace a stabilita proteinu jsou srovnatelné s nemutovanými proteiny CSL.

Naše výsledky potvrzují, že proteiny Cbf11 a Cbf12 *S. pombe* jsou schopné fungovat jako transkripční faktory a jsou právem zařazeny do rodiny CSL. Zároveň naše data podporují hypotézu o evolučním původu rodiny CSL u společného předka říší Metazoa a Fungi (Převorovský et al., 2007; Gazave et al., 2009).

4.2. Vliv kultivačních podmínek na expresi proteinu Cbf11

Pomocí expresní microarray bylo zjištěno, že podmínky kultivace mají vliv na expresi genů. V případě kultivace exponenciálně rostoucích buněk $\Delta cbf11$ v minimálním mediu EMM byla při porovnání s buňkami WT zjištěna alespoň 2x vyšší exprese u 17 genů, zatímco při kultivaci v bohatém mediu YES u 125 genů (Převorovský, Oravcová et al., publikace v přípravě). Současně jsme zjistili, že hladina samotného proteinu Cbf11 je výrazně nižší, pokud se buňky kultivují v mediu EMM. Cbf11 jsme detekovali ve více izoformách, jejichž relativní zastoupení se lišilo podle použitého media (Obr. 3.11). Přítomnost několika izoform může naznačovat, že v závislosti na typu media mohou být regulovány například posttranslační modifikace proteinu Cbf11 nebo se může měnit využití alternativních počátků translace. Primární transkript genu *cbf11* obsahuje krátký intron, a proto by mohlo docházet k alternativnímu sestřihu transkriptu, avšak tento proces není u *S. pombe* příliš známý (Awan et al., 2013). Rozdíl mezi kultivačními médii jsme pozorovali také u některých fenotypů závislých na nepřítomnosti Cbf11. U buněk

Δcbf11 byla zjištěna heterogenita ve velikosti a tvaru buněk, defekty septace a fenotyp cut (Převorovský et al., 2009). Pokud se buňky *Δcbf11* kultivují v mediu YES, byla u exponenciálně rostoucích buněk navíc pozorována dekonzenzovaná, fragmentovaná nebo nerovnoměrně segregovaná DNA. Při kultivaci v EMM se však objevovalo jenom velmi málo defektů v buněčné morfologii nebo stavu DNA, a také frekvence výskytu fenotypu cut byla v tomto mediu výrazně snížena (Převorovský, nepublikováno). Komplexní medium YES založené na kvasničním extraktu není na rozdíl od media EMM přesně definováno a obě media se odlišují mimo jiné obsahem živin a vitaminů (Moreno et al., 1991). Je možné, že podmínky jako například zdroj dusíku, množství glukózy, osmolarita, pH a další, nebo jejich kombinace, mohou ovlivňovat roli Cbf11 při regulaci událostí buněčného cyklu.

Kultivací v EMM se prodlužuje generační doba buněk WT oproti kultivaci v YES zhruba o 30 minut. Tento rozdíl může buňkám kultivovaným v mediu EMM poskytnout více prostoru k vypořádání se s problémy vzniklými v průběhu buněčného cyklu. Dostupnost živin má velký vliv na růst a dělení buněk (Fantès a Nurse, 1977; Pluskal et al., 2011). Medium EMM obsahuje nižší koncentraci glukózy než YES. Z těchto důvodů jsme prováděli experimenty s kultivací v mediu YES ve snížené teplotě, nebo při nižší koncentraci glukózy. Snížení teploty kultivace v mediu YES nebo množství glukózy v YES způsobuje u buněk WT prodloužení generační doby, u buněk *Δcbf11* však nebyla pozorována změna v délce generační doby ani snížení frekvence výskytu fenotypu cut. Další experimenty taktéž nepotvrdily vliv pH kultivačního média na defekty spojené s absencí Cbf11 (Převorovský, Zach, nepublikováno). Z dosavadních experimentů tedy zatím vyplývá jen to, že přítomnost proteinu Cbf11 je za některých růstových podmínek (např. minimální medium) pro buňku patrně méně důležitá než za podmínek jiných (bohaté komplexní médium).

4.3. Hledání cílových genů proteinů CSL

S cílem identifikovat responzivní geny transkripčních faktorů CSL jsme hledali místa vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 *in vivo*, a to v celém genomu *S. pombe* metodou ChIP-chip. Identifikovali jsme heterogenní množinu vazebných míst. Vedle míst lokalizovaných v intergenových oblastech jsme vazbu proteinů CSL detekovali také v rámci kódujících sekvencí. Kanonický CSL-responzivní element GTG^A/_GGAA,

který je s vysokou afinitou rozpoznáván proteinem Cbf11, nebyl na všech identifikovaných místech vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 přítomen. Pro ověření vazby pomocí metody ChIP-qPCR jsme proto vybrali sekvence tak, abychom postihli všechny typy lokusů identifikovaných metodou ChIP-chip. Zatímco v případě Cbf12 jsme potvrdili, že se protein na vybrané sekvence z genomu *S. pombe in vivo* váže, pro Cbf11 se nepodařilo vazbu spolehlivě reprodukovat (Obr. 3.13). Vazbu Cbf12 *in vivo* jsme poté přesněji lokalizovali v rámci tří lokusů (Obr. 3.14). Kanonický CSL-vazebný element a také sekvence odvozené z dosud testovaných promotorových oblastí genů *S. pombe*, mohou představovat nízkoafinní cíle pro vazbu Cbf12. Sekvence vytipované na základě celogenomových metod mohou být místy, ke kterým se Cbf12 váže s vyšší afinitou. Z toho důvodu jsme testovali vazbu Cbf12 *in vitro* metodou EMSA na ty sekvence, u nichž jsme metodou ChIP-chip identifikovali nejsilnější vazbu. Pomocí metody EMSA se však vazbu Cbf12 ani Cbf11 na sekvence identifikované technikou ChIP-chip detekovat nepodařilo, a to ani při nadprodukci proteinů CSL (Obr. 3.15, Obr. 3.16, Obr. 3.17). Aby bylo možné detekovat vazbu proteinu Cbf12 a popřípadě identifikovat ideální vazebný element, bylo by zřejmě nutné podmínky *in vitro* experimentů dále optimalizovat. Obtíže může způsobovat i délka radioaktivních prób, jelikož doposud jsme vazbu proteinů CSL testovali pouze na krátkých 30 bp próbách, zatímco próby ze sekvencí nalezených metodou ChIP se délkou pohybují v rozmezí 87 – 425 bp. Optimalizovat by bylo vhodné také množství proteinů CSL v experimentu EMSA, minimálně v případě proteinu Cbf12. Jak ukázaly pokusy s próbou RBP, koncentrace lyzátu obsahujícího Cbf12 má pro detekci vazby Cbf12 *in vitro* klíčový význam (viz 4.1.1). V hledání vazebných míst proteinů CSL jsme pokračovali metodou ChIP-seq. Podobně jako v případě ChIP-chip jsme vazbu proteinů CSL detekovali jak v intergenových, tak i v kódujících oblastech. Pro Cbf11 byla míra účinnosti precipitace celkově nižší než pro Cbf12. To může být následek slabé nebo transientní vazby proteinu Cbf11 na DNA, alternativně může být DNA-vazebná aktivita proteinu omezena na určitou fázi buněčného cyklu. Mezi množinou lokusů, na které se váže protein Cbf11, a množinou lokusů vázanými proteinem Cbf12 byl nalezen malý, avšak signifikantní překryv. Jelikož se pomocí ChIP-seq z exponenciálně rostoucích buněk nesynchronizovaných v konkrétní fázi buněčného cyklu měří průměrný signál vazby v populaci asynchronních buněk, není možné rozlišit, zda se oba proteiny CSL na stejný promotor váží ve stejném čase a v téže buňce, nebo zda

se váží v buňkách nacházejících se v odlišných fázích buněčného cyklu. Vazbu proteinů Cbf11 a Cbf12 *in vivo* na několika vybraných promotorových oblastech jsme nezávisle ověřili pomocí ChIP-qPCR. Pro Cbf12 byla publikována vazebná místa identifikovaná metodou ChIP-chip (Kwon et al., 2012), která se signifikantně překrývají s místy, která jsme našli pomocí ChIP-seq (analyzoval Dr. Převorovský). Vazbu Cbf11 *in vivo* jsme pozorovali v promotorových oblastech několika genů metabolismu lipidů (Obr. 3.19, Obr. 3.20). Expze těchto genů je snížena v buňkách *Δcbf11* v porovnání s WT. Navíc buňky s delecí *cbf11* produkují na povrch kolonií silnou vrstvu hydrofobního materiálu, která způsobuje tzv. fenotyp „shiny“ (Převorovský et al., 2009). Tato pozorování indikují, že protein Cbf11 pravděpodobně působí jako přímý transkripční regulátor těchto genů a nejspíše hraje roli v metabolismu lipidů.

Porovnáním dat expresních microarray a ChIP-seq se zjistilo, že pouze u malé části genů, jejichž expze se mění při absenci nebo naopak nadprodukcii proteinů CSL, se proteiny CSL do promotorové oblasti takových genů váží. To naznačuje, že mnohé změny v hladinách transkriptů genů jsou způsobeny nepřímo, například skrze regulační kaskády podobně jako u metazoálních proteinů CSL (Iso et al., 2003). V souladu s touto hypotézou zahrnují cíle vazby proteinů CSL geny kódující regulátory jako například transkripční faktory, RNA-vazebné proteiny, kinázy a fosfatázy. Některé z těchto cílů hrají roli v regulaci buněčného cyklu a mohly by tedy zodpovídat za fenotypy pozorované při manipulaci s geny CSL (Převorovský, Oravcová et al., publikace v přípravě).

4.3.1. Role Cbf11 v průběhu buněčného cyklu

V odpovědi na manipulaci s hladinami proteinů CSL jsou reprimovány nebo indukovány geny, které v případě buněk WT *S. pombe* vykazují periodickou expzi v průběhu buněčného cyklu. Jde například o gen *cgs1* kódující regulační podjednotku protein kinázy A, která za podmínek nedostatku glukózy inhibuje katalytickou podjednotku Pka1 (Gupta et al., 2011). Dalším příkladem je gen *srk1*, jehož proteinový produkt je kináza aktivovaná stresovou MAP kinázou Sty1, která negativně reguluje přechod G2/M mitotického cyklu (Smith et al., 2002; López-Avilés et al., 2005). Celkem se jedná o 81 periodicky exprimovaných genů. Jak jsme zjistili technikou ChIP-seq, do promotorů některých z těchto genů se váží proteiny

CSL (Převorovský, Oravcová et al., publikace v přípravě). Testovali jsme, zda je vazba proteinu Cbf11 omezená na určitou fázi buněčného cyklu. Pro testování jsme vybrali geny, jejichž exprese je ovlivněna delecí *cbf11*, přičemž některé z vybraných genů jsou řazeny ke genům exprimovaným periodicky v průběhu buněčného cyklu (Marguerat et al., 2006). Pomocí ChIP-qPCR a RT-qPCR jsme s využitím synchronizace prostřednictvím termosenzitivní mutanty v genu *cdc25* zjistili, že Cbf11 funguje jako aktivátor specifický pro S fázi a/nebo cytokinezi, přičemž expresi několika periodicky exprimovaných genů reguluje pravděpodobně skrze přímou vazbu do jejich promotorových oblastí (Obr. 3.22, Obr. 3.23). Ze získaných dat nelze rozlišit, zda se Cbf11 uplatňuje v S fázi nebo cytokinezi, jelikož oba procesy v použitých kultivačních podmínkách časově korelují (Nasmyth et al., 1979; Carlson et al., 1999; Gómez a Forsburg, 2004). Synchronizace buněčné kultury skrze termosenzitivní mutaci v genu *cdc25* zastavuje buněčný cyklus v G2 fázi. Pro zkoumání role Cbf11 v S fázi by bylo vhodnější blokovat kulturu v G1 fázi cyklu. Z tohoto důvodu jsme z několika zdrojů získali kmeny s různými termosenzitivními mutacemi v genu *cdc10*. Gen *cdc10* patří mezi geny „startu“, což je kontrolní bod, který reguluje přechod mezi G1 a S fází (Aves et al., 1985; Lowndes et al., 1992). Pomocí těchto mutant jsme zastavili progresi buněčným cyklem v restriktivní teplotě, ale buňky z neznámého důvodu po přemístění do teploty permissivní, i přes opakované pokusy, nepokračovaly v průchodu cyklem. Zamýšlený experiment jsme tedy nemohli provést.

Synchronnost průchodu buněčným cyklem jsme monitorovali s využitím průtokové cytometrie (FACS). Zde je třeba poznamenat, že obsah DNA v haploidních buňkách osciluje během cyklu mezi 2C a 4C, jelikož po rozdělení jader v mitóze proběhne duplikace DNA (S fáze), a teprve poté je dokončena cytokineze, při níž dojde k separaci dceřiných buněk. Zjistili jsme, že FACS profil buněk $\Delta cbf11$ a WT se liší. V průběhu synchronního postupu fázemi buněčného cyklu narůstá u $\Delta cbf11$ frakce buněk s obsahem DNA vyšším než 4C (Obr. 3.24). To může být způsobeno defekty v septaci a oddělení dceřiných buněk nebo problémy s integritou genomu, kterou jsme v těchto buňkách pozorovali (viz 4.2.).

Protein Cbf11 je během buněčného cyklu exprimován konstitutivně, ačkoli expresi některých genů aktivuje pouze v konkrétní fázi buněčného cyklu. Podobná charakteristika byla popsána i u dalších transkripčních faktorů, například Sep1. Ten reguluje expresi periodicky exprimovaných genů nutných pro septaci, např. *cdc15*,

ale sám periodicky exprimovaný není (Fankhauser et al., 1995; Rustici et al., 2004). Specifita proteinu Cbf11 ke konkrétním promotorům v určitém čase může být regulována pomocí dalších faktorů, například prostřednictvím posttranslačních modifikací. Jak už bylo uvedeno výše, Cbf11 se vyskytuje ve více izoformách, které mohou odrážet modifikace proteinu (4.2.). Exprese responzivních genů, které Cbf11 aktivuje během S fáze/cytokineze, může být reprimována v dalších fázích buněčného cyklu jinými proteiny, nebo místa vazby Cbf11 v jejich promotorových oblastech mohou být mimo S fázi/cytokinezi blokována.

Zjistili jsme, že Cbf11 rozpoznává kanonický CSL-vazebný element v promotoru genu *cut6* a pozitivně reguluje expresi tohoto genu. Produktem genu *cut6* je acetyl-CoA/biotin karboxyláza, enzym účastnící se biosyntézy mastných kyselin, který se rovněž angažuje v koordinaci jaderného a buněčného dělení. Mutace v genu *cut6* totiž způsobuje aberantní mitózu vedoucí k fenotypu cut (Saitoh et al., 1996). Pro funkci proteinu Cut6 je jako kofaktor nezbytný biotin. Geny pro syntázu biotinu a membránový transportér biotinu (*bio2* a *vht1*) jsou, jak jsme ukázali, aktivovány proteinem Cbf11, který se váže do jejich promotorů, přičemž vazebný profil Cbf11 v průběhu buněčného cyklu je podobný jako v případě promotoru genu *cut6* (Obr. 3.22, Obr. 3.23). Je možné, že v buňkách $\Delta cbf11$ je snížena hladina biotinu, což negativně ovlivňuje funkci Cut6. Předpokládáme proto, že fenotyp cut pozorovaný v buňkách s delecí *cbf11* je alespoň částečně způsobený změnami v expresi genů *bio2*, *vht1* a *cut6* a aktivitě jejich proteinových produktů. Mechanismus této regulace jsme zatím plně neobjasnili. Shrňme-li, proteiny CSL regulují transkripci periodicky exprimovaných genů, z nichž některé jsou důležité pro průchod buněčným cyklem.

4.4. Antagonismus proteinů CSL

Nejvíce fenotypových změn pozorovaných při manipulaci s geny CSL *S. pombe* je asociováno s delecí *cbf11* a nadprodukcí *cbf12*. Analýza těchto fenotypů naznačuje, že proteiny Cbf11 a Cbf12 fungují antagonistickým způsobem (Převorovský et al., 2009).

Protichůdné působení proteinů Cbf11 a Cbf12 lze pozorovat už na úrovni transkriptomu. V případě nadprodukce *cbf11* bylo nalezeno velmi málo genů se změněnou expresí v porovnání s kontrolními buňkami transformovanými tzv. prázdným plasmidem. Stejně tak se exprese měnila u malého počtu genů,

srovnáváme-li deletanty *cbf12* a buňky divokého typu. Výsledky expresních microarray z buněk s delecí *cbf12* nebo nadprodukcí *cbf11* jsou v souladu s faktem, že v případě takto manipulovaných buněk jsme našli velmi málo nebo žádné fenotypové projevy. Naopak mnoho genů vykazuje změnu exprese, pokud je deletován gen *cbf11* nebo nadprodukován *cbf12*. Navíc je mezi geny, jejichž exprese je v buňkách s nadprodukcí Cbf12 nebo absencí Cbf11 zvýšená vůči příslušné kontrole, signifikantní překryv (Převorovský, Oravcová et al., publikace v přípravě). Jak je zmíněno výše, mezi místy identifikovanými metodou ChIP-seq, na která se váží proteiny Cbf11 a Cbf12 *in vivo*, je malý avšak signifikantní překryv (viz. 4.3; Převorovský, Oravcová et al., publikace v přípravě). Společný set cílových genů je v souladu s hypotézou antagonistické regulace transkripce.

Pomocí TAP purifikace proteinů CSL a hmotnostní spektrometrie koprecipitovaných proteinů jsme identifikovali jejich potenciální interakční partnery. Množiny interaktorů Cbf11 a Cbf12 se významně překrývají, avšak proteiny CSL spolu neinteragují. To naznačuje, že paralogy CSL mohou kompetovat o stejné proteiny resp. proteinové komplexy. Mechanismus antagonistické regulace však zůstává doposud neznámý. Na základě popsaných fenotypů a expresních dat předpokládáme, že v daném okamžiku převládne jeden z paralogů CSL. Zda je tato dominance způsobena vzájemně neslučitelnou vazbou proteinů CSL na DNA, posttranslačními modifikacemi jednoho nebo obou paralogů, například v závislosti na růstových podmínkách, kompeticí o proteinové partnery nebo jiným regulačním mechanismem, bude předmětem dalších experimentů. V pilotním experimentu jsme testovali vliv proteinu Cbf11 na vazbu Cbf12 na DNA *in vivo*. Na testovaných lokusech jsme však nezaznamenali změnu vazby Cbf12 v přítomnosti oproti absenci Cbf11 (Obr. 3.26). Delece *cbf11* však má zřejmě vliv na Cbf12 na úrovni proteinu i mRNA. Nativní protein Cbf12 je pravděpodobně proteolyzován (viz 4.1.1) a delece *cbf11* způsobila stabilizaci proteinu Cbf12 o plné délce. V buňkách $\Delta cbf11$ je hladina mRNA *cbf12* vyšší v porovnání s buňkami WT (Tvarůžková, Daněk, nepublikováno).

Většinu fenotypů, které jsme u buněk pozorovali, jsou spojené s delecí *cbf11* nebo nadprodukcí *cbf12*. Fenotypy dvojitého deletanta se velmi podobají fenotypům v kmeni $\Delta cbf11$, s výjimkou adhezivity, a je tedy pravděpodobné, že defekty při nadprodukcí *cbf12* způsobuje protein Cbf11. Z toho důvodu by v dalších experimentech bylo vhodné zkoumat vazbu proteinu Cbf11 na DNA za současné nadprodukce Cbf12 pomocí ChIP-qPCR a také hladinu proteinu Cbf11 a jeho

posttranslační modifikace pomocí techniky western blot. Jelikož paralogy CSL částečně sdílí interakční partnery, nadprodukce Cbf12 může způsobit jejich vyvázání, a tedy nedostatek pro interakci s Cbf11. Při plánování modifikovaného experimentu je třeba zohlednit, že fenotypy asociované s Cbf11 se liší v závislosti na kultivačním mediu. Nadprodukce Cbf12 dosahujeme expresí z plasmidů pREP41/42 nesoucí také geny *leu2* nebo *ura4* (Obr. 2.2), sloužící pro udržení plasmidu v buňkách, které jsou na leucin nebo uracil dependentní. Buňky s takovými plasmidy je nutno kultivovat v minimálním mediu EMM bez leucinu/uracilu. V minimálním mediu EMM je však redukován výskyt fenotypových projevů souvisejících s nepřítomností Cbf11, a sice defekty v buněčné a jaderné morfologii a také fenotyp cut. Z toho důvodu nelze protein Cbf12 jednoduše nadprodukovat z plasmidů řady pREP41/42 v minimálním mediu EMM a je třeba volit jiný přístup k nadprodukci Cbf12. Alternativou by bylo použití plasmidů nesoucích geny pro rezistenci na antibiotika, která by bylo možné přidat do media YES (Ahn et al., 2013). Bylo by také možné přímo v genomu *S. pombe* nahradit přirozený promotor genu *cbf12* arteficiálně regulovatelným promotorem, například promotorem genu *urg1*, který spouští expresi řízeného genu v přítomnosti uracilu (Watt et al., 2008).

4.5. Další funkce paralogů CSL v *S. pombe*

Potvrdili jsme, že proteiny CSL *S. pombe*, Cbf11 a Cbf12, vykonávají funkci transkripčních faktorů. Některé z cílových genů regulovaných proteiny CSL jsou nezbytné pro progresi buněčným cyklem a předcházení katastrofické mitóze. Ukázalo se také, že proteiny CSL zřejmě hrají důležitou roli v odpovědi na oxidativní stres. V buňkách manipulovaných v genech CSL microarray studie odhalily změnu v expresi genů obecné stresové odpovědi, tzv. CESR genů, a také genů, jejichž produkty se účastní odpovědi na oxidativní stres. Například *ctt1*, kódující katalázu (Mutoh et al., 1999), nebo *gst2*, jehož produktem je enzym glutathion-S-transferáza (Cho et al., 2002; Převorovský, nepublikováno). Dále jsme zjistil, že buňky $\Delta cbf11$ vykazují zvýšenou odolnost na peroxid vodíku (Převorovský, Tvarůžková, nepublikováno). Konkrétní úloha paralogů CSL v podmínkách oxidativního stresu je v současné době v laboratoři intenzivně studována.

Proteiny CSL jsou nejspíše zapojeny také do udržování integrity DNA a regulace struktury chromatinu. Mezi interakčními partnery proteinů CSL byl nalezen protein

Sap1, což je esenciální DNA-vazebný protein účastnící se replikace DNA, udržování integrity a segregace chromozomů, stability rDNA (Mejía-Ramírez et al., 2005; Zaratiegui et al., 2011; De Lahondés et al., 2003; Noguchi a Noguchi, 2007). Pro protein Reb1, který má podobné funkce jako Sap1, bylo ukázáno, že ovlivňuje jadernou organizaci na dlouhé vzdálenosti prostřednictvím chromatinových interakcí (Singh et al., 2010; Jakociunas et al., 2013). Podobná funkce byla navržena i pro protein Sap1, a také pro savčí CSL (Bastia a Singh, 2011; Lake et al., 2014). Fenotypové analýzy ukázaly funkční propojení Cbf11 a Reb1, a také změnu ve vazbě Sap1 a Reb1 na DNA v nepřítomnosti Cbf11 (Převorovský, nepublikováno). Z uvedeného vyplývá, že proteiny CSL jsou v buňkách *S. pombe* zapojeny do mnoha regulačních procesů a vyvážená hladina proteinů Cbf11 a Cbf12 brání vzniku pleiotropních defektů.

4.6. Funkce proteinů CSL v říši Metazoa a *S. pombe*

U proteinů CSL *S. pombe* je zachováno uspořádání domén jako u metazoálních proteinů a oblasti proteinu, zodpovědné za vazbu na DNA metazoálních proteinů, jsou u proteinů *S. pombe* vysoce konzervovány (Převorovský et al., 2007). Prokázali jsme, že kvasinkové proteiny CSL jsou schopné sekvenčně-specifické vazby na DNA a mechanismus vazby je s velkou pravděpodobností zachovaný mezi Fungi a Metazoa (Teska, 2012; Oravcová et al., 2013). Přinesli jsme důkazy, že paralogy Cbf11 a Cbf12 jsou transkripčními faktory a zřejmě fungují jako aktivátory transkripce genů. Spektrum procesů, které proteiny CSL *S. pombe* ovlivňují, je poměrně široké, podobně jako u metazoálních proteinů. To zřejmě souvisí s faktem, že mezi responzivními geny kvasinkových paralogů CSL bylo nalezeno mnoho regulačních genů kódujících další transkripční faktory, kinázy a fosfatázy a další. Z uvedených charakteristik vyplývá možnost, že mezi proteiny CSL říši Fungi a Metazoa je zachována také jistá funkční podobnost. Proteiny CSL kvasinky *S. pombe* by tedy mohly sloužit jako model, zejména pro dosud nejasné funkce proteinů CSL nezávislé na signalizaci Notch v mnohobuněčných organismech.

5. Shrnutí

V rámci této dizertační práce jsme učinili následující prioritní nálezy:

- Proteiny CSL *S. pombe* jsou lokalizovány do jádra buňky; pro jadernou lokalizaci proteinů je potřeba nestrukturovaná N-terminální část. V případě proteinu Cbf12 je za jadernou lokalizaci majoritně zodpovědný úsek mezi aminokyselinami 395-465.
- Oba proteiny CSL *S. pombe* mají schopnost aktivovat transkripci genů *in vivo*. V případě reportéru s CSL-vazebným elementem v promotorové oblasti je vazba na DNA nutnou podmínkou k aktivaci genové exprese.
- Cbf11 funguje jako transkripční aktivátor specifický pro S fázi a/nebo cytokinezi regulující expresi několika periodicky exprimovaných genů. Některé z těchto genů řídí progresi buněčným cyklem a uplatňují se v prevenci katastrofické mitózy. Protein Cbf11 se pravděpodobně přímo váže do jejich promotorových oblastí *in vivo*.
- Cbf11 i Cbf12 jsou schopny specificky rozpoznávat CSL-vazebný element na DNA *in vitro*. Vazba Cbf12 je detekována při 2,7x vyšší koncentraci proteinu ve srovnání s Cbf11.
- DNA-vazebná aktivita metazoálních a fungálních proteinů CSL pravděpodobně závisí na stejných aminokyselinových zbytcích. V případě jedné aminokyseliny (arginin na pozici 318 proteinu Cbf11 a 644 proteinu Cbf12, které jsou analogické argininu 218 proteinu RBP-Jκ) jsme tuto závislost ověřili experimentálně
- Proteiny CSL *S. pombe* váží *in vivo* heterogenní skupinu cílových lokusů. Místa vazby se nacházejí v intergenových i kódujících úsecích DNA.

- Vazbu Cbf12 *in vivo* jsme blíže lokalizovali v rámci tří lokusů identifikovaných technikou ChIP-chip. Další upřesnění místa vazby Cbf12 *in vitro* na tyto sekvence pomocí metody EMSA se nepodařilo.
- Vazba proteinu Cbf11 byla *in vivo* detekována v promotoru genů metabolismu lipidů *cut6*, *lcf1*, *lcf2* a SPCC1281.06c. Protein Cbf12 se váže do oblasti rDNA, do svého vlastního promotoru a do promotoru genů *atf1* a *mei2*.
- Nepřítomnost proteinu Cbf11 nemá *in vivo* vliv na vazbu proteinu Cbf12 na DNA na místech, která jsme testovali.
- Exprese Cbf11 je v průběhu buněčného cyklu konstantní.
- Složení kultivačních medií má vliv na expresi proteinu Cbf11. Úloha Cbf11 je za některých kultivačních podmínek zřejmě pro buňky méně důležitá.

6. Seznam literatury

- Ahn J, Won M, Kyun M-L, Kim YS, Jung C-R, Im D-S, Song K-B, and Chung K-S. 2013. Development of episomal vectors carrying a nourseothricin-resistance marker for use in minimal media for *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **30**: 219-227.
- Alessio CD, Trombetta ES, and Parodi AJ. 2003. Nucleoside Diphosphatase and Glycosyltransferase Activities Can Localize to Different Subcellular Compartments in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **278**: 22379-22387.
- Alfa CE, Ducommun B, Beach D, and Hyams JS. 1990. Distinct nuclear and spindle pole body populations of cyclin-cdc2 in fission yeast. *Nature* **347**: 680-682.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, and Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770-776.
- Aves SJ, Durkacz BW, Carr A, and Nurse P. 1985. Cloning, sequencing and transcriptional control of the *Schizosaccharomyces pombe cdc10* "start" gene. *EMBO J* **4**: 457-463.
- Awan AR, Manfredo A, and Pleiss JA. 2013. Lariat sequencing in a unicellular yeast identifies regulated alternative splicing of exons that are evolutionarily conserved with humans. *PNAS* **110**: 12762-12767.
- Bailey AM, and Posakony JW. 1995. Suppressor of Hairless directly activates transcription of Enhancer of split Complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* **9**: 2609-2622.
- Barolo S, Walker RG, Polyakov AD, Freschi G, Keil T, and Posakony JW. 2000. A Notch-independent activity of Suppressor of Hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**: 957-969.
- Bastia D, and Singh SK. 2011. "Chromosome kissing" and modulation of replication termination. *BioArchitecture* **1**: 24-28.
- Beres TM, Masui T, Swift GH, Shi L, Henke RM, and MacDonald RJ. 2006. PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol Cell Biol* **26**: 117-130.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Liu CL, and Schreiber SL. 2004. The use of chromatin immunoprecipitation assays in genome-wide analyses of histone modifications. *Methods Enzymol* **376**: 349-360.
- Birnboim HC, and Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

- Bray SJ. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 678-689.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, and Israël A. 2000. A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-Metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**: 207-216.
- Buck MJ, Nobel AB, and Lieb JD. 2005. ChIPOTle: a user-friendly tool for the analysis of ChIP-chip data. *Genome Biol* **6**: R97.
- Bähler J, Wu J-Q, Longtine M, Shah NG, McKenzie A, Steever AB, Wach A, Philippsen P, and Pringle JR. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951.
- Carlson CR, Grallert B, Stokke T, and Boye E. 1999. Regulation of the start of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **112**: 939-946.
- Carlson C, Grallert B, Bernander R, Stokke T, and Boye E. 1997. Measurement of nuclear DNA content in fission yeast by flow cytometry. *Yeast* **13**: 1329-35.
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, and Bähler J. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**: 214-229.
- Chen Z, McCrosky S, Guo W, Li H, and Gerton JL. 2012. A Genetic Screen to Discover Pathways Affecting Cohesin Function in *Schizosaccharomyces pombe* Identifies Chromatin Effectors. *G3 (Bethesda)* **2**: 1161-1168.
- Cho Y-W, Park E-H, Fuchs JA, and Lim C-J. 2002. A second stress-inducible glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* **1574**: 399-402.
- Chung CN, Hamaguchi Y, Honjo T, and Kawaichi M. 1994. Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-Jκ. *Nucleic Acids Res* **22**: 2938-2944.
- Costello G, Rodgers L, and Beach D. 1986. Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Curr Genet* **11**: 119-125.
- Craven RA, Griffiths DJF, Sheldrick KS, Randall RE, Hagan IM, and Carr AM. 1998. Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **221**: 59-68.
- Creanor J, and Mitchison JM. 1979. Reduction of Perturbations in Leucine Incorporation in Synchronous Cultures of *Schizosaccharomyces pombe* Made by Elutriation. *J Gen Microbiol* 385-388.

- De Lahondés R, Ribes V, and Arcangioli B. 2003. Fission Yeast Sap1 Protein Is Essential for Chromosome Stability. *Eukaryot Cell* **2**: 910-921.
- Decottignies A, Sanchez-Perez I, and Nurse P. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* essential genes: a pilot study. *Genome Res* **13**: 399-406.
- Dickinson JR. 1981. The *cdc22* mutation in *Schizosaccharomyces pombe* is a temperature-sensitive defect in nucleoside diphosphokinase. *Eur J Biochem* **119**: 341 - 345.
- Dou S, Zeng X, Cortes P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Honjo T, and Vales LD. 1994. The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **14**: 3310-3319.
- Dunker AK, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Yang JY, Chen JW, Vacic V, Obradovic Z, and Uversky VN. 2008. The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC genomics* **9**: S1.
- Edwards RJ, and Carr AM. 1997. Analysis of radiation-sensitive mutants of fission yeast. *Methods Enzymol* **283**: 471-94.
- Egel R (Ed). 2004. The molecular biology of *Schizosaccharomyces pombe* - genetics, genomics and beyond. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Ehebauer M, Hayward P, and Martinez-Arias A. Notch signaling pathway. *Sci STKE* **2006**: cm7.
- Enoch T, Carr AM, and Nurse P. 1992. Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev* **6**: 2035-2046.
- Espinoza I, Pochanpally R, Xing F, Watabe K, and Miele L. 2013. Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotargets Ther* **6**: 1249-1259.
- Fankhauser C, Reymond A, Cerutti L, Utzig S, Hofmann K, and Simanis V. 1995. The *S. pombe cdc15* Gene Is a Key Element in the Reorganization of F-Actin at Mitosis. *Cell* **82**: 435-444.
- Fantes P. 1979. Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature* **279**: 428-30.
- Fantes PA, and Nurse P. 1978. Control of the timing of cell division in fission yeast. Cell size mutants reveal a second control pathway. *Exp Cell Res* **115**: 317-29.
- Fantes P, and Nurse P. 1977. Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp Cell Res Cell* **107**: 377-86.
- Fernandez Sarabia M, McInerney C, Harris P, Gordon C, and Fantes P. 1993. The cell cycle genes *cdc22+* and *suc22+* of the fission yeast *Schizosaccharomyces*

- pombe* encode the large and small subunits of ribonucleotide reductase. *Mol Gen Genet* **238**: 241-51.
- Forsburg SL, and Nurse P. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 227-56.
- Forsburg SL, and Rhind N. 2006. Basic methods for fission yeast. *Yeast* **23**: 173-183.
- Friedmann DR, Wilson JJ, and Kovall RA. 2008. RAM-induced Allostery Facilitates Assembly of a Notch Pathway Active Transcription Complex. *J Biol Chem* **283**: 14781-14791.
- Fryer CJ, Lamar E, Turbachova I, Kintner C, and Jones KA. 2002. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* **16**: 1397-1411.
- Fujita Y, Mita S, Ohtsuka H, and Aiba H. 2007. Identification of a Fatty Acyl-CoA Synthetase Gene, *lcf2+*, Which Affects Viability after Entry into the Stationary Phase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 3041-3047.
- Gazave E, Lapébie P, Richards GS, Brunet F, Ereskovsky AV, Degnan BM, Borchiellini C, Vervoort M, and Renard E. 2009. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol* **9**: 249-276.
- Ghosh G, Duyne GV, Ghosh S, and Sigler PB. 1995. Structure of NF-kappaB p50 homodimer bound to a kappaB site. *Nature* **373**: 303-310.
- Gordân R, Hartemink AJ, and Bulyk ML. 2009. Distinguishing direct versus indirect transcription factor – DNA interactions. *Genome Res* **19**: 2090-2100.
- Gould KL, and Nurse P. 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**: 39-45.
- Grallert A, Grallert B, Zilahi E, Szilagyi Z, and Sipiczki M. 1999. Eleven novel *sep* genes of *Schizosaccharomyces pombe* required for efficient cell separation and sexual differentiation. *Yeast* **15**: 669-686.
- Gsponer J, Futschik ME, Teichmann SA, and Babu MM. 2008. Tight regulation of unstructured proteins: from transcript synthesis to protein degradation. *Science* **322**: 1365-1368.
- Gupta DR, Paul SK, Oowatari Y, Matsuo Y, and Kawamukai M. 2011. Complex Formation, Phosphorylation, and Localization of Protein Kinase A of *Schizosaccharomyces pombe* upon Glucose Starvation. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 1456-1465.
- Gómez EB, and Forsburg SL. 2004. Analysis of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Cell Cycle. *Methods Mol Biol* **241**: 93-111.

- Hagan I, Hayles J, and Nurse P. 1988. Cloning and sequencing of the cyclin-related *cdc13+* gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis. *J Cell Sci* **91**: 587-596.
- Hayles J, Wood V, Jeffery L, Hoe K-L, Kim D-U, Park H-O, Salas-Pino S, Heichinger C, and Nurse P. 2013. A genome-wide resource of cell cycle and cell shape genes of fission yeast. *Open Biol.* **3**: 130053.
- Hedges SB. 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* **3**: 838-849.
- Hirano T, Funahashi S, Uemura T, and Yanagida M. 1986. Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cut mutants that block nuclear division but not cytokinesis. *EMBO J* **5**: 2973 -2979.
- Hirano T, Hiraoka Y, and Yanagida M. 1988. A temperature-sensitive mutation of the *Schizosaccharomyces pombe* gene *nuc2+* that encodes a nuclear scaffold-like protein blocks spindle elongation in mitotic anaphase. *J Cell Biol* **106**: 1171-1183.
- Hoffman CS, and Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-72.
- Hsieh JJD, and Hayward SD. 1995. Masking of the CBF1/RBPJk transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* **268**: 560-563.
- Hsieh JJD, Zhou S, Chen L, Young DB, and Hayward DS. 1999. CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 23-28.
- Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, Obradovic Z, and Dunker AK. 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res* **32**: 1037-1049.
- Iino Y, and Yamamoto M. 1997. The *Schizosaccharomyces pombe cdc6* gene encodes the catalytic subunit of DNA polymerase delta. *Mol Gen Genet* **254**: 93-7.
- Iso T, Chung G, Hamamori Y, and Kedes L. 2002. HERP1 is a cell type-specific primary target of Notch. *J Biol Chem* **277**: 6598 -6607.
- Iso T, Kedes L, and Hamamori Y. 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* **194**: 237-255.
- Jakociunas T, Jordö MD, Mebarek MA, Bünner CM, Verhein-Hansen J, Oddershede LB, and Thon G. 2013. Subnuclear relocalization and silencing of a chromosomal region by an ectopic ribosomal DNA repeat. *PNAS* **110**: E4465–E4473.

- Johnson JE, and MacDonald RJ. 2011. Notch-independent functions of CSL. *Curr Top Dev Biol* **97**: 55-74.
- Johnson SE, Ilagan MXG, and Barrick D. 2010. Thermodynamic Analysis of the CSL•Notch Interaction: distribution of binding energy of the Notch RAM region to the CSL β -trefoil domain and the mode of competition with the viral transactivator EBNA2. *J Biol Chem* **285**: 6681-6692.
- Kao H-Y, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, and Kadesch T. 1998. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* **2**: 2269-2277.
- Kim D-U, Hayles J, Kim D, Wood V, Park H-O, Won M, Yoo H-S, Duhig T, Nam M, Palmer G, et al. 2010. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* **28**: 617-623.
- Knutsen JHJ, Rein ID, Rothe C, Stokke T, Grallert B, and Boye E. 2011. Cell-Cycle Analysis of Fission Yeast Cells by Flow Cytometry. *PLoS One* **6**: e17175.
- Koelzer S, and Klein T. 2003. A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*. *Development* **130**: 1973-1988.
- Kopan R, and Ilagan M X G. 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* **137**: 216-233.
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, and Yanagawa H. 2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *PNAS* **106**: 10171-10176.
- Kovall RA, and Hendrickson WA. 2004. Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J* **23**: 3441-3451.
- Kurooka H, and Honjo T. 2000. Functional Interaction between the Mouse Notch1 Intracellular Region and Histone Acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* **275**: 17211-17220.
- Kurth P, Preiss A, Kovall RA, and Maier D. 2011. Molecular Analysis of the Notch Repressor-Complex in *Drosophila*: Characterization of Potential Hairless Binding Sites on Suppressor of Hairless. *PLoS one* **6**: e27986.
- Kwon E-JG, Laderoute A, Chatfield-Reed K, Vachon L, Karagiannis J, and Chua G. 2012. Deciphering the Transcriptional-Regulatory Network of Flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biol* **8**: e1003104.
- Käufer NF, and Potashkin J. 2000. Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res* **28**: 3003-3010.

- Lai EC. 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**: 965-973.
- Lake RJ, Tsai P-F, Choi I, Won K-J, and Fan H-Y. 2014. RBPJ, the Major Transcriptional Effector of Notch Signaling, Remains Associated with Chromatin throughout Mitosis, Suggesting a Role in Mitotic Bookmarking. *PLoS Genetics* **10**: e1004204.
- Lam LT, and Bresnick EH. 1998. Identity of the beta-globin locus control region binding protein HS2NF5 as the mammalian homolog of the Notch-regulated transcription factor Suppressor of Hairless. *J Biol Chem* **273**: 24223-24231.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Lee SH, Wang X-l, and DeJong J. 2000. Functional interactions between an atypical NF- κ B site from the rat CYP2B1 promoter and the transcriptional repressor RBP-J κ / CBF1. *Nucleic Acids Res* **28**: 2091-2098.
- Lenglez S, Hermand D, and Decottignies A. 2010. Genome-wide mapping of nuclear mitochondrial DNA sequences links DNA replication origins to chromosomal double-strand break formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome res* **20**: 1250-61.
- Lowndes NF, McInerny CJ, Johnson AL, Fantes PA, and Johnston LH. 1992. Control of DNA Synthesis Genes in Fission Yeast by the Cell-Cycle Gene *cdc10+*. *Nature* **355**: 449-453.
- Lubman OY, Korolev SV, and Kopan R. 2004. Anchoring Notch genetics and biochemistry: structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol Cell* **13**: 619-626.
- López-Avilés S, Grande M, González M, Helgesen A-L, Alemany V, Sanchez-Piris M, Bachs O, Millar Jonathan B A, Aligue R, Ridgeway T, et al. 2005. Inactivation of the Cdc25 Phosphatase by the Stress-Activated Srk1 Kinase in Fission Yeast. *Moll Cell* **17**: 49-59.
- Lõoke M, Kristjuhan K, and Kristjuhan A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* **50**: 325-328.
- Marguerat Samuel, Jensen TS, Lichtenberg UD, Wilhelm BT, Jensen LJ, and Bähler J. 2006. The more the merrier: comparative analysis of microarray studies on cell cycle-regulated genes in fission yeast. *Yeast* **23**: 261-277.
- Martinez Arias A, Zecchini V, and Brennan K. 2002. CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev* **12**: 524-533.

- Masui T, Long Q, Beres TM, Magnuson MA, and MacDonald RJ. 2007. Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes Dev* **21**: 2629-2643.
- Maundrell K. 1990. *nmt1* of fission yeast. *J Biol Chem* **265**: 10857-10864.
- Mejía-Ramírez E, Sánchez-Gorostiaga A, Krimer DB, Schwartzman JB, and Hernández P. 2005. The Mating Type Switch-Activating Protein Sap1 Is Required for Replication Fork Arrest at the rRNA Genes of Fission Yeast. *Mol Cell Biol* **25**: 8755-8761.
- Millar J B A, Lenaers G, and Russell P. 1992. Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *EMBO J* **11**: 4933-4941.
- Millar J B A, Russell P, Dixon JE, and Guan KL. 1992. Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast. *EMBO Journal* **11**: 4943 - 4952.
- Minoguchi S, Taniguchi Y, Kato H, Okazaki T, Strobl LJ, Zimmer-Strobl U, Bornkamm GW, and Honjo T. 1997. RBP-L, a transcription factor related to RBP-Jκ. *Mol Cell Biol* **17**: 2679-2687.
- Miyatsuka T, Matsuoka T-a, Shiraiwa T, Yamamoto T, Kojima I, and Kaneto H. 2007. Ptf1a and RBP-J cooperate in activating *Pdx1* gene expression through binding to Area III. *Biochem Biophys Res Commun* **362**: 905-909.
- Morel V, and Schweisguth F. 2000. Repression by Suppressor of Hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **14**: 377-388.
- Moreno S, Klar A, and Nurse P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823.
- Morita T, and Takegawa K. 2004. A simple and efficient procedure for transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **21**: 613-617.
- Mutoh N, Nakagawa CW, and Yamada K. 1999. The role of catalase in hydrogen peroxide resistance in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol* **45**: 125-129.
- Nam Y, Sliz P, Song L, Aster JC, and Blacklow SC. 2006. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* **124**: 973-983.
- Nam Y, Weng AP, Aster JC, and Blacklow SC. 2003. Structural Requirements for Assembly of the CSL•Intracellular Notch1•Mastermind-like 1 Transcriptional Activation Complex. *J Biol Chem* **278**: 21232-21239.

- Nasmyth K, and Nurse P. 1981. Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **182**: 119-24.
- Nasmyth K, Nurse P, and Fraser R. 1979. The effect of cell mass on the cell cycle timing and duration of S-phase in fission yeast. *J Cell Sci* **39**: 215-33.
- Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, and Moses AM. 2009. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**: 202.
- Nogae I, and Johnston M. 1990. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene* **96**: 161-169.
- Noguchi C, and Noguchi E. 2007. Sap1 promotes the association of the replication fork protection complex with chromatin and is involved in the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **175**: 553-566.
- Nurse P. 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**: 547-51.
- Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**: 503-508.
- Nurse P, Thuriaux P, and Nasmyth K. 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **146**: 167-78.
- Oliva A, Rosebrock A, Ferrezuelo F, Pyne S, Chen H, Skiena S, Fitcher B, and Leatherwood J. 2005. The Cell Cycle-Regulated Genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biol* **3**: e225.
- Oravcová M, Teska M, Půta F, Folk P, and Převorovský M. 2013. Fission Yeast CSL Proteins Function as Transcription Factors. *PloS one* **8**: e59435.
- Oswald F, Liptay S, Adler G, and Schmid RM. 1998. NF-kB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jk. *Mol Cell Biol* **18**: 2077-2088.
- Oswald F, Winkler M, Cao Y, Astrahantseff K, Bourteele S, Knöchel W, and Borggreffe T. 2005. RBP-Jk/SHARP Recruits CtIP/CtBP Corepressors To Silence Notch Target Genes. *Mol Cell Biol* **25**: 10379-10390.
- Pancaldi V, Sarac ÖS, Rallis C, McLean JR, Převorovský M, Gould K, Beyer A, and Bähler J. 2012. Predicting the Fission Yeast Protein Interaction Network. *G3 (Bethesda)* **2**: 453-467.
- Peng X, Karuturi RKM, Miller LD, Lin K, Jia Y, Kondu P, Wang L, Wong L-S, Liu ET, Balasubramanian MK, et al. 2005. Identification of Cell Cycle-regulated Genes in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* **16**: 1026 -1042.

- Perry JA, and Kornbluth S. 2007. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div* **2**.
- Petcherski AG, and Kimble J. 2000. Mastermind is a putative activator for Notch. *Curr Biol* **10**: 471-473.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: 16-21.
- Phalip V, Lemoine Y, and Jeltsch J-M. 1999. Cloning of *Schizosaccharomyces pombe bio2* by Heterologous Complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* Mutant. *Curr Microbiol* **39**: 348-350.
- Pluskal T, Hayashi T, Saitoh S, Fujisawa A, and Yanagida M. 2011. Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast. *FEBS Journal* **278**: 1299-1315.
- Ptáčková M. 2010. DNA vazebné vlastnosti proteinů rodiny CSL ve *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita v Praze.
- Pursglove SE, and Mackay JP. 2005. CSL: a notch above the rest. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2472-2477.
- Převorovský M, Atkinson SR, Ptáčková M, McLean JR, Gould K, Folk P, Půta F, and Bähler J. 2011. N-Termini of Fungal CSL Transcription Factors Are Disordered, Enriched in Regulatory Motifs and Inhibit DNA Binding in Fission Yeast. *PloS One* **6**: e23650.
- Převorovský M, Groušl T, Staňurová J, Ryneš J, Nellen W, Půta F, and Folk P. 2009. Cbf11 and Cbf12, the fission yeast CSL proteins, play opposing roles in cell adhesion and coordination of cell and nuclear division. *Exp Cell Res* **315**: 1533-1547.
- Převorovský M, Půta F, and Folk P. 2007. Fungal CSL transcription factors. *BMC Genomics* **8**: 233-245.
- Radtke F, and Raj K. 2003. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* **3**: 756-767.
- Rechsteiner M, and Rogers SW. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS* **21**: 267-271.
- Rhind N, Chen Z, Yassour M, Thompson DA, Haas BJ, Habib N, Wapinski I, Roy S, Lin MF, Heiman DI, et al. 2011. Comparative Functional Genomics of the Fission Yeasts. *Science* **332**: 930-936.
- Roehl H, Bosenberg M, Brelloch R, and Kimble J. 1996. Roles of the RAM and ANK domains in signaling by the *C. elegans* GLP-1 receptor. *EMBO J* **15**: 7002-7012.

- Rost B, Yachdav G, and Liu J. 2004. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **32**: W321-326.
- Rustici G, Bakel HV, Lackner DH, Holstege FC, Wijmenga C, Bähler J, and Brazma A. 2007. Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Genome Biol* **8**: R73.
- Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lió P, Penkett CJ, Burns G, Hayles J, Brazma A, Nurse P, and Bähler J. 2004. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* **36**: 809-817.
- Ryan CJ, Roguev A, Patrick K, Xu J, Jahari H, Tong Z, Beltrao P, Shales M, Qu H, Collins SR, et al. 2012. Hierarchical modularity and the evolution of genetic interactomes across species. *Mol Cell* **46**: 691-704.
- Saitoh S, Takahashi K, Nabeshima K, Yamashita Y, Nakaseko Y, Hirata A, and Yanagida M. 1996. Aberrant mitosis in fission yeast mutants defective in fatty acid synthetase and acetyl CoA carboxylase. *J Cell Biol* **134**: 949-961.
- Sazer S, and Sherwood SW. 1990. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* **97**: 509-16.
- Shirakata Y, Shuman JD, and Coligan JE. 1996. Purification of a novel MHC class I element binding activity from thymus nuclear extracts reveals that thymic RBP-Jk/CBF1 binds to NF-kB-like elements. *J Immunol* **156**: 4672-4679.
- Singh GP, Ganapathi M, Sandhu KS, and Dash D. 2006. Intrinsic Unstructuredness and Abundance of PEST Motifs in Eukaryotic Proteomes. *Proteins* **62**: 309 - 315.
- Singh SK, Sabatinos S, Forsburg S, and Bastia D. 2010. Regulation of Replication Termination in *Schizosaccharomyces pombe* by Reb1 Protein-Mediated Action at a Distance. *Cell* **142**: 868-878.
- Sipiczki M. 1989. Taxonomy and phylogenesis. In: Nasim A, Young P, Johnson BF (eds) Molecular biology of the fission yeast. *Academic Press, San Diego* 431-452.
- Slater ML. 1973. Effect of Reversible Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis on the Yeast Cell Cycle. *J Bacteriol* **113**: 263-270.
- Smith DA, Toone WM, Chen D, Bähler J, Jones N, Morgan BA, and Quinn J. 2002. The *Srk1* Protein Kinase Is a Target for the *Sty1* Stress-activated MAPK in Fission Yeast. *J Biol Chem* **277**: 33411-33421.
- Stern B, and Nurse P. 1997. Fission yeast pheromone blocks S-phase by inhibiting the G1 cyclin B – p34 *cdc2* kinase. *EMBO J* **16**: 534-544.

- Stolz J. 2003. Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **20**: 221-231.
- Straver MH, Kijne JW, and Smit G. 1993. Cause and control of flocculation in yeast. *Trends Biotechnol* **11**: 228-232.
- Tang Z, and Kadesch T. 2001. Identification of a novel activation domain in the Notch-responsive transcription factor CSL. *Nucleic Acids Res* **29**: 2284-2291.
- Tanigaki K, and Honjo T. 2007. Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol* **8**: 451-457.
- Teska M. 2012. Properties of DNA-binding mutations of CSL proteins. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze.
- Toda T, Yamamoto M, and Yanagida M. 1981. Sequential alterations in the nuclear chromatin region during mitosis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: video fluorescence microscopy of synchronously growing wild-type and cold-sensitive cdc mutants by using a DNA-binding fluorescent probe. *J Cell Sci* **52**: 271-287.
- Tompa P, Prilusky J, Silman I, and Sussman JL. 2007. Structural disorder serves as a weak signal for intracellular protein degradation. *Proteins* **71**: 903-909.
- Tun T, Hamaguchi Y, Matsunami N, Furukawa T, Honjo T, and Kawaichi M. 1994. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-Jk. *Nucleic Acids Res* **22**: 965-971.
- Vachon L, Wood J, Kwon E-JG, Laderoute A, Chatfield-Reed K, Karagiannis J, and Chua G. 2013. Functional Characterization of Fission Yeast Transcription Factors by Overexpression Analysis. *Genetics* **194**: 873-884.
- Van Driessche B, Tafforeau L, Hentges P, Carr AM, and Vandenhoute J. 2005. Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* **22**: 1061-1068.
- Vavouri T, Semple JJ, Garcia-Verdugo R, and Lehner B. 2009. Intrinsic Protein Disorder and Interaction Promiscuity Are Widely Associated with Dosage Sensitivity. *Cell* **138**: 198-208.
- Walker GM. 1999. Synchronization of yeast cell populations. *Methods Cell Sci* **21**: 87-93.
- Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, and Jones DT. 2004. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J Mol Biol* **337**: 635-645.
- Warringer J, and Blomberg A. 2006. Evolutionary constraints on yeast protein size. *BMC Evol Biol* **6**: 61.

- Watson A, Mata J, Bähler J, Carr A, and Humphrey T. 2004. Global gene expression responses of fission yeast to ionizing radiation. *Mol Biol Cell* **15**: 851- 860.
- Watt S, Mata J, López-Maury L, Marguerat S, Burns G, and Bähler J. 2008. urg1: A Uracil-Regulatable Promoter System for Fission Yeast with Short Induction and Repression Times. *PLoS one* **3**: e1428.
- Wells ML, Huang W, Li L, Gerrish KE, Fargo DC, Ozsolak F, and Blackshear PJ. 2012. Post-Transcriptional Regulation of Cell-Cell Interaction Protein-Encoding Transcripts by Zfs1p in *S. pombe*. *Mol Cell Biol* **32**: 4206-14.
- Weng AP, and Aster JC. 2004. Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin GenetDev* **14**: 48-54.
- Wilson JJ, and Kovall RA. 2006. Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell* **124**: 985-996.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-879.
- Wood V, Harris MA, Mcdowall MD, Rutherford K, Vaughan BW, Staines DM, Aslett M, Lock A, Kersey PJ, and Oliver SG. 2011. PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Res* 1-5.
- Woolcock KJ, Gaidatzis D, Punga T, and Bühler M. 2011. Dicer associates with chromatin to repress genome activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 94-99.
- Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, and Griffin JD. 2000. MAML1, a human homologue of *Drosophila* Mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* **26**: 484-9.
- Yamashita A, Watanabe Y, Nukina N, and Yamamoto M. 1998. RNA-Assisted Nuclear Transport of the Meiotic Regulator Mei2p in Fission Yeast. *Cell* **95**: 115-123.
- Zaratiegui M, Vaughn MW, Irvine DV, Goto D, Watt S, Bähler Jürg, Arcangioli B, and Martienssen RA. 2011. CENP-B preserves genome integrity at replication forks paused by retrotransposon LTR. *Nature* **469**: 112-115.
- Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, and Hayward SD. 2000. SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC to facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol* **20**: 2400-2410.

7. Přílohy

Seznam příloh:

- A.1** Seznam primerů použitých v této práci (Tab. 7.1).
- A.2** Místa vazby Cbf11 nebo Cbf12 na úsecích genomu *S. pombe* identifikovaná metodou ChIP-chip a vybraná pro nezávislé ověření pomocí ChIP-qPCR (Obr. 7.1).

Dokumenty na přiloženém CD

B.1 Publikace ve formátu PDF

Publikace 1

Převorovský M., Atkinson S. R., Ptáčková M., McLean J. R., Gould K., Folk P., Půta F., Bähler J.

N-Termini of Fungal CSL Transcription Factors Are Disordered, Enriched in Regulatory Motifs and Inhibit DNA Binding in Fission Yeast.

PLoS One 2011, 6(8): e23650

Podíl autorky: Martina Oravcová přispěla k experimentální části práce a provedla experimenty uvedené v Obr. 4 C, D.

Publikace 2

Oravcová M., Teska M., Půta F., Folk P., Převorovský M.

Fission Yeast CSL Proteins Function as Transcription Factors.

PLoS One 2013, 8(3): e59435

Podíl autorky: Martina Oravcová se podílela na plánování všech experimentů a jejich provedení, na analýze dat a přispěla k sepsání publikace.

B.2 Kopie dizertační práce ve formátu PDF

B.3 Autoreferát dizertační práce v českém a anglickém jazyce

B.4 Životopis autorky této práce

Prohlášení autora odpovědného za publikace

Prohlašuji, že podíl Martiny Oravcové na publikacích Převorovský et al., 2011 a Oravcová et al., 2013 uvedený v kapitole 7 dizertační práce, je pravdivý.

V Praze 1. 7. 2014

RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.

A.1

Tab. 7.1 Přehled použitých primerů. Primery jsme navrhovali pomocí nástrojů Primer Quest, Oligo Analyzer 3.1 (IDT SciTools) a softwaru Gene Runner 3.04 (Hastings Software). Syntézu jsme objednávali u firmy KRD. fw – forward primer, rev – reverse primer.

Primer	Sekvence 5'-3'	Použití
map120	AAACATATGGACGGAGGATCCA TGATTCC	konstrukce Cbf12(395-465), fw
map105	ACCCGGGCTATGACAAAACATA CTGAATCC	konstrukce Cbf12(395-465), rev
map92	AGAGAAAGAATGCTGAGTAGA	reportérové plasmidy, ChIP-qPCR, fw
map93	TACAAATCCCCTGGCTATA	reportérové plasmidy, ChIP-qPCR, rev
mp86	AAGCAAAGACAAAACGATCA	kontrola 1, ChIP-qPCR, fw
mp87	AAACTGGCGTAACTTTTCAA	kontrola 1, ChIP-qPCR, rev
mp88	AGCTGCTAGACACCTTCAAA	kontrola 2, ChIP-qPCR, fw
mp89	CCTACGGTCAAGAGAAAAC	kontrola 2, ChIP-qPCR, rev
map78	CGGTAAATTGATACGCCC	kontrola 3, ChIP-qPCR, fw
map79	GACATCCCGACAATACATC	kontrola 3, ChIP-qPCR, rev
map01	TGATGATGGTATGGGAGTTT	Cbf12_1, ChIP-qPCR, fw
map02	CGTTCATTTTCGCTACTTTG	Cbf12_1, ChIP-qPCR, rev
mp84	TCGCCATAAAGCAGAGAATA	Cbf12_2, ChIP-qPCR, fw
mp85	TTCATTTGCTTTGCTCAACT	Cbf12_2, ChIP-qPCR, rev
mp100	AGTATCCGCTCAAAAGTTTG	Cbf12_3 (úsek C), ChIP-qPCR, fw
mp101	GCGAAAATTTTCTTGCTCTT	Cbf12_3 (úsek C), ChIP-qPCR, rev
map09	GAACATTCTGCTCGGTACCT	Cbf12_4, ChIP-qPCR, fw
map10	TGCTTCCACTTCCATTAAC	Cbf12_4, ChIP-qPCR, rev
map11	GCGATTGTTTGATTTGTTTG	Cbf12_5, ChIP-qPCR, fw
map12	CGAAAAGAACGATAGCAATG	Cbf12_5, ChIP-qPCR, rev
mp106	ATATGTGCTTGCCGGATT	Cbf12_6, ChIP-qPCR, fw
mp107	TCCACTCTTCTTTCCCTTTC	Cbf12_6, ChIP-qPCR, rev

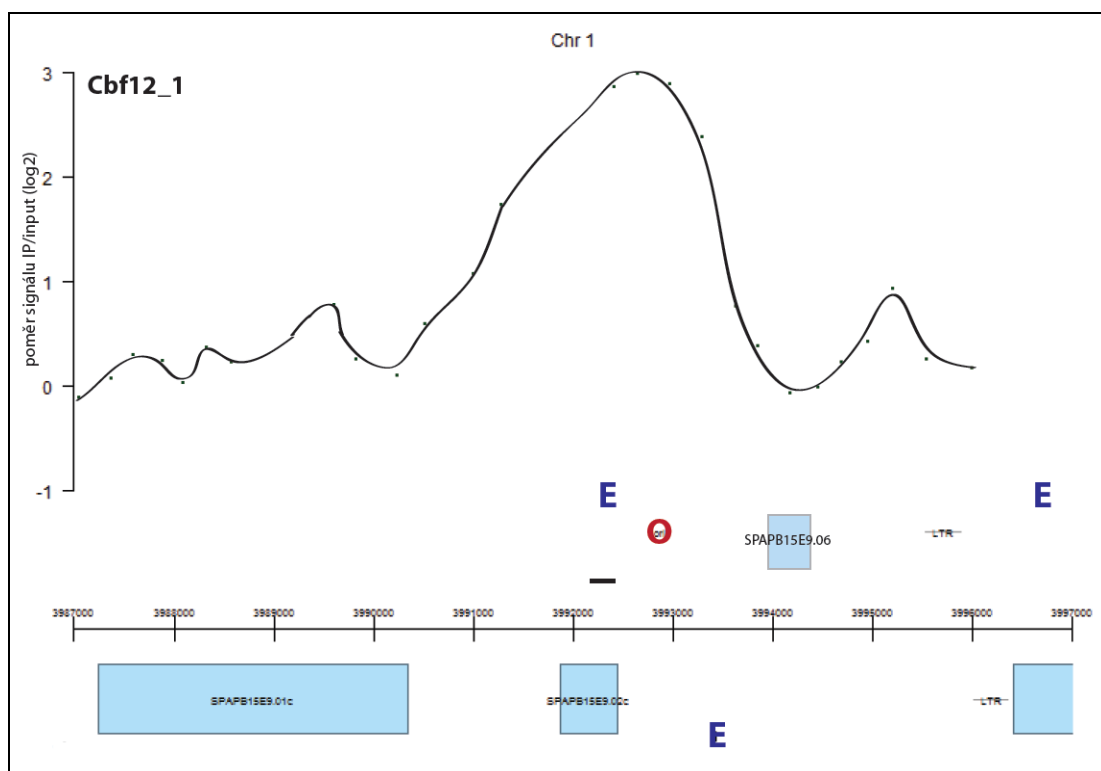
mp108	GCATGAACAAAACCTAAACG	Cbf12_7 (úsek J), ChIP-qPCR, fw
mp109	AATCTCCCTTCTCGTTCCTT	Cbf12_7 (úsek J), ChIP-qPCR, rev
map13	AATGATATGCGGTTGTTGTT	Cbf12_9 (úsek P), ChIP-qPCR, fw
map14	ACTCTTTTCACCTCCGATTC	Cbf12_9 (úsek P), ChIP-qPCR, rev
map15	GAGAGAGAAAGCGCAAATTT	Cbf12_11, ChIP-qPCR, fw
map16	GCTGGACAGGCAATTACTTT	Cbf12_11, ChIP-qPCR, rev
map29	ACTACATAACTAGGATTTTCGCA	Cbf11_3, ChIP-qPCR, fw
map30	TCTCATATTTGCTCTTTGCATC	Cbf11_3, ChIP-qPCR, rev
map17	TAAAGTAGCCCTCCACCAAT	Cbf11_5, ChIP-qPCR, fw
map18	GCCGTTATCAATGAGTCTGT	Cbf11_5, ChIP-qPCR, rev
map21	GCAAAGAATTGGGAGTGTATC	Cbf11_8, ChIP-qPCR, fw
map22	CGCAAATGTTATCAATTGG	Cbf11_8, ChIP-qPCR, rev
map19	CACGCATCCAACTTTTCTAA	Cbf11_21, ChIP-qPCR, fw
map20	ACCCACGAACAACCTACC	Cbf11_21, ChIP-qPCR, rev
map67	CCACAATCTTGACAGAATCC	Cbf12_3, úsek A, ChIP-qPCR, fw
map68	CCCCTATTACTCCAGTTGC	Cbf12_3, úsek A, ChIP-qPCR, rev
map35	CCACAAGAAAGGATGGGA	Cbf12_3, úsek B, ChIP-qPCR, fw
map36	GACCAGCGGTAGTATAGAAG	Cbf12_3, úsek B, ChIP-qPCR, rev
map37	TCTATTCGCCGTCATTCG	Cbf12_3, úsek D, ChIP-qPCR, fw
map38	AACTTGGAAGGTTAGCCC	Cbf12_3, úsek D, ChIP-qPCR, rev
map69	GTGGAGTACATTTAGGCTCG	Cbf12_3, úsek F, ChIP-qPCR, fw
map70	TTTCCTCGCATAACACGTC	Cbf12_3, úsek F, ChIP-qPCR, rev
map71	TGACCACCATCGTAACAG	Cbf12_3, úsek G, ChIP-qPCR, fw
map72	GGCTATTCATACCGATTGC	Cbf12_3, úsek G, ChIP-qPCR, rev
map43	TGCCTTATTGTCGCTGAT	Cbf12_7, úsek H, ChIP-qPCR, fw
map44	GACACGATGTTGTTTGCC	Cbf12_7, úsek H, ChIP-qPCR, rev
map73	GCTGCATATACTACTCCAC	Cbf12_7, úsek I, ChIP-qPCR, fw
map46	TACTGCGATCCACCATTC	Cbf12_7, úsek I, ChIP-qPCR, rev

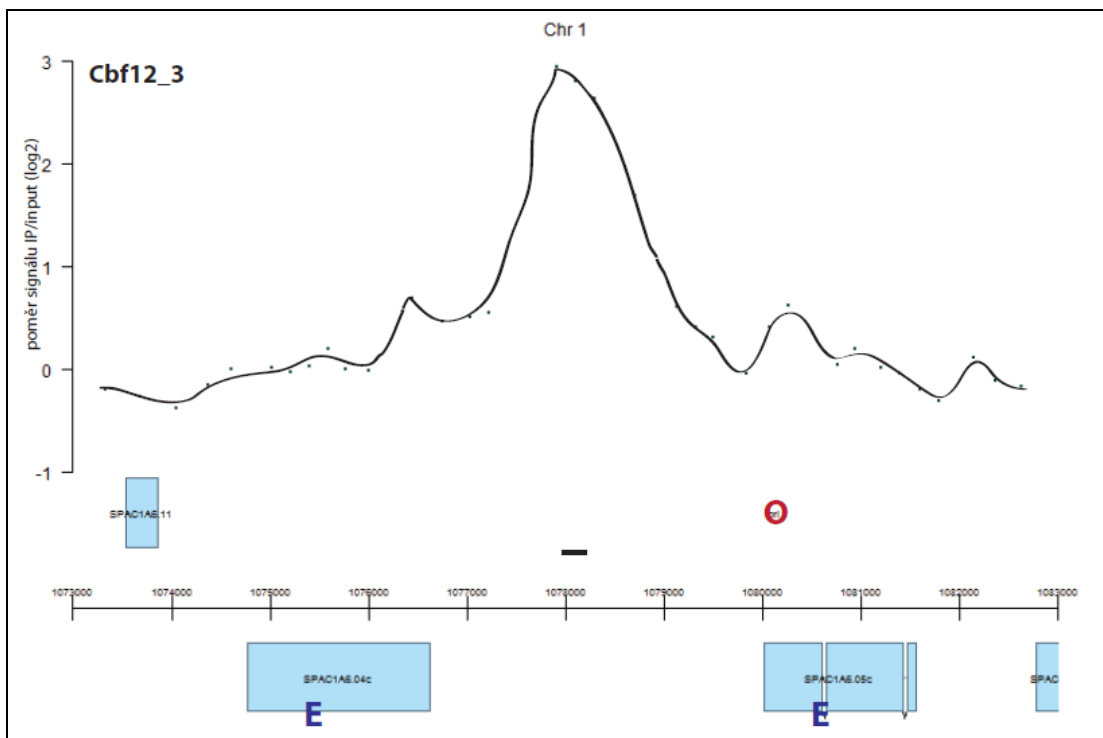
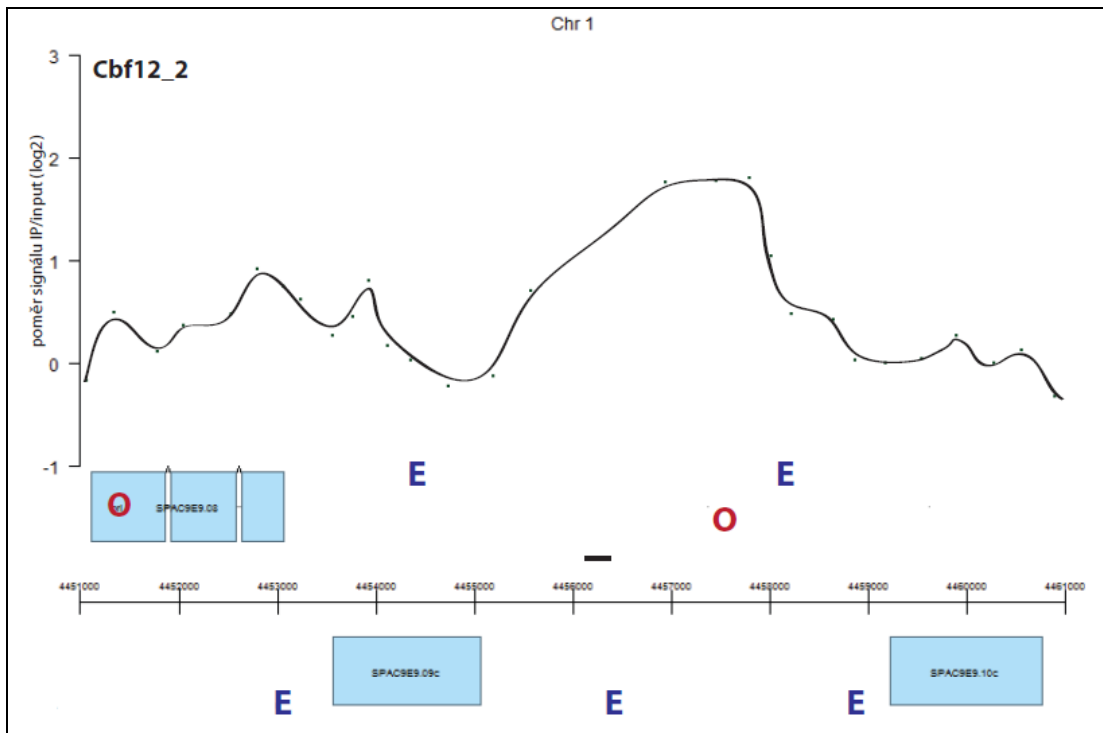
map74	CGAGAGGCGTTTCCATAA	Cbf12_7, úsek K, ChIP-qPCR, fw
map75	CGTCCTTCAATCCTACATCC	Cbf12_7, úsek K, ChIP-qPCR, rev
map49	AGCAACGCTAGTACAGTC	Cbf12_7, úsek L, ChIP-qPCR, fw
map50	TCGTAAAGAACCACACACC	Cbf12_7, úsek L, ChIP-qPCR, rev
map51	CATCATTGACTATGGATGCT	Cbf12_7, úsek M, ChIP-qPCR, fw
map52	GTGTCTCCCACATTCCTAT	Cbf12_7, úsek M, ChIP-qPCR, rev
map53	TAGCGTAATCTAGTGGACTG	Cbf12_9, úsek N, ChIP-qPCR, fw
map54	CATTTTAACACACCACCCTC	Cbf12_9, úsek N, ChIP-qPCR, rev
map55	GTCTCTTCTCCATCCCTCTA	Cbf12_9, úsek O, ChIP-qPCR, fw
map56	CGTAGCAGTGGATAGCAA	Cbf12_9, úsek O, ChIP-qPCR, rev
map57	ACTCATCTTTCACCCACC	Cbf12_9, úsek Q, ChIP-qPCR, fw
map58	CCTCATTTTCGTCACAATCG	Cbf12_9, úsek Q, ChIP-qPCR, rev
map59	CCTTTCCCACCAGAATAGAG	Cbf12_9, úsek R, ChIP-qPCR, fw
map60	TCCCTAGTAACCCATCCA	Cbf12_9, úsek R, ChIP-qPCR, rev
map61	CCTTCTCAAACCTTGCTTCC	Cbf12_9, úsek S, ChIP-qPCR, fw
map62	GATGGAGGATCGAAATGAGT	Cbf12_9, úsek S, ChIP-qPCR, rev
map96	TTGCTACAGGAAGAGGAAG	<i>cut6</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map97	TAGAAAAGTTGGATGCGTG	<i>cut6</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map98	CATTTCCCTTGCCAATCTGT	<i>lcf1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map99	GTGTTTAGCGAGCATTATGT	<i>lcf1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map100	GTGGGTACTGTCACAAAAT	<i>lcf2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map101	GCAACCGAATAGCAAGTC	<i>lcf2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map102	CTAAGATGACGGACAAGCA	SPCC1281.06c, ChIP-qPCR, fw
map103	CGTAAACCCTAACCTAAGTTG	SPCC1281.06c, ChIP-qPCR, rev
map76	AAACCAAACACTTGAGCC	rDNA, ChIP-qPCR, fw
map77	GGGTGTAAAGATGAGTCTGG	rDNA, ChIP-qPCR, rev
map142	GGTTTTACCACTTTGTTTGATA	kontrola rDNA, ChIP-qPCR, fw
map143	TAGTCCTACCTGATTTGAGG	kontrola rDNA, ChIP-qPCR, rev

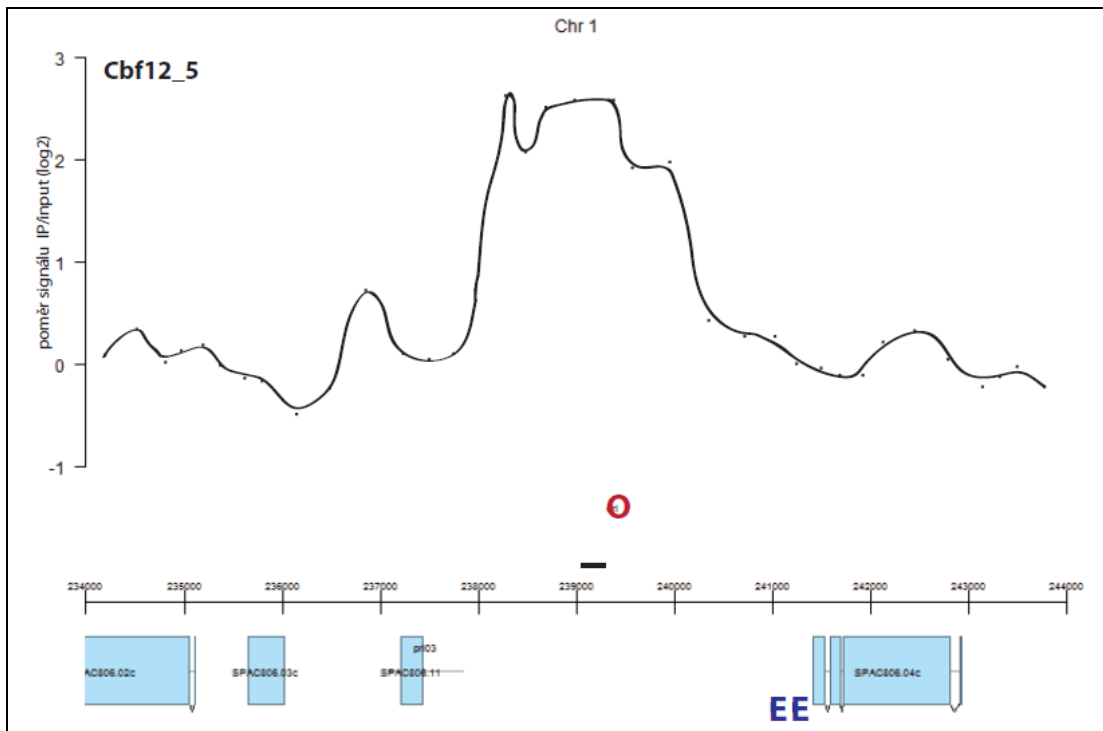
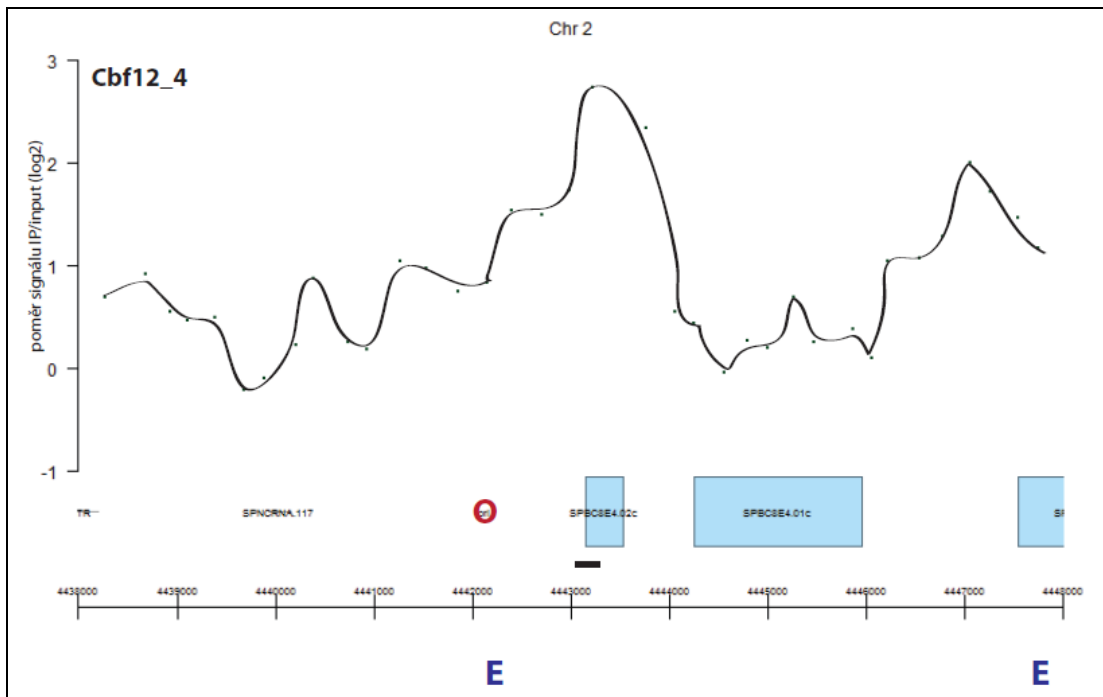
map82	CTTCGCAAGCTCAAAAGTC	<i>cbf12</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map83	GTGACATTCGAGACTCACTT	<i>cbf12</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map84	CGACCGATTTCTTTGTTCC	<i>mei2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map85	ACTGTTAGGCATTTACTGTG	<i>mei2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map90	GTATCGTCTTGCTCGGTT	<i>atf1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map91	CCACACTTCCACCTGTTT	<i>atf1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map132	ATCGCTTACATCCATCTTTT	<i>bio2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map133	TGCTTATTCCAACCTTTCAGC	<i>bio2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map134	CGTATTACTGAGTGCTTATGT	<i>gst2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map135	TGATTCACTGTAAAAACCCAC	<i>gst2</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map136	CTCGTCAAATCACGGTATCT	<i>vht1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map137	CTATTTCTGAGCGAAGTTTATTC	<i>vht1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map138	AAGGTTGAAATGGCGTC	<i>zwf1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, fw
map139	AAAGCGGGTAGAATGTTG	<i>zwf1</i> ⁺ , ChIP-qPCR, rev
map144	ATCTTCCCGCTACAATACC	<i>bio2</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
map145	GTGCTTCCTTTAGCCTTTG	<i>bio2</i> ⁺ , RT-qPCR, rev
map146	TGGAAGAGTACCTACTTTAGTT	<i>gst2</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
map147	CAGGGTCATCAAAGGATAATG	<i>gst2</i> ⁺ , RT-qPCR, rev
map148	GTCGCTTAGCTCGTTTATTC	<i>vht1</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
map149	CGCTTACCAACATTCATCTC	<i>vht1</i> ⁺ , RT-qPCR, rev
map150	TGGATATTGGCAAGGTAGAG	<i>zwf1</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
map151	CTGGCTGAACACGGATTA	<i>zwf1</i> ⁺ , RT-qPCR, rev
map152	TTCTTCTCCAGGCTCTTATC	<i>cut6</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
map153	CAATCCACCATCAGTCAAAG	<i>cut6</i> ⁺ , RT-qPCR, rev
map154	CGAGCAATGGACCTTCTT	<i>cdc22</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
map155	CACGGTTCTCCTTCTCATAC	<i>cdc22</i> ⁺ , RT-qPCR, rev
map175	AACCCATCAGCGAAGAATA	<i>cbf11</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
map176	CCAGAGAAAGCCGTAAGT	<i>cbf11</i> ⁺ , RT-qPCR, rev

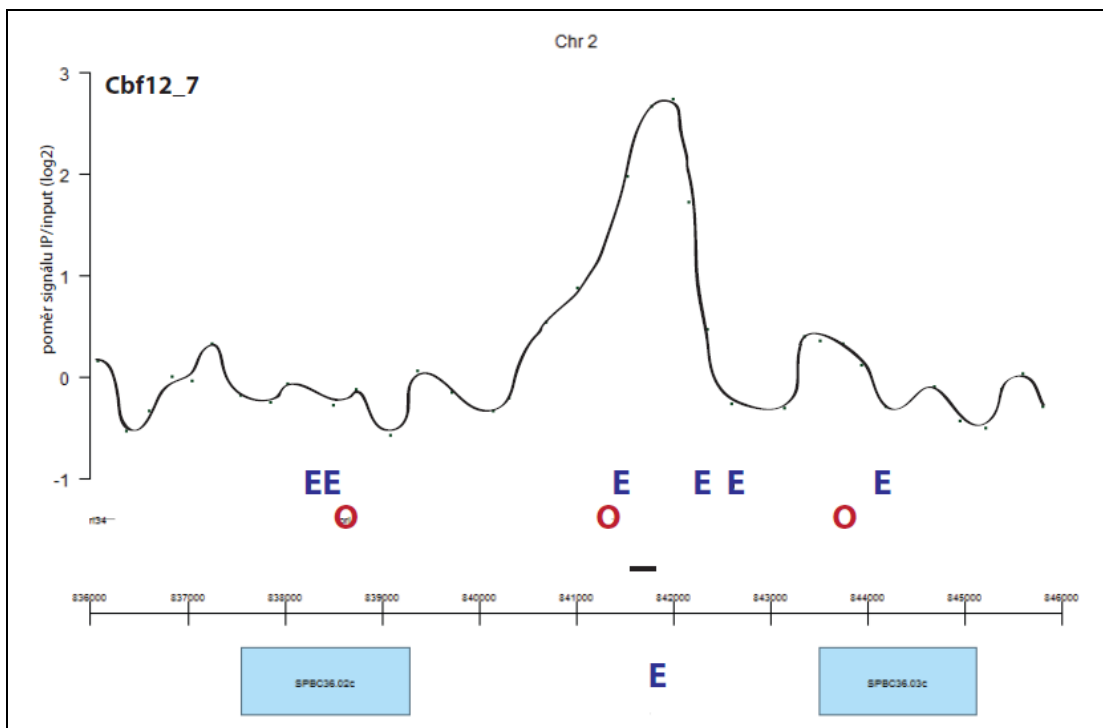
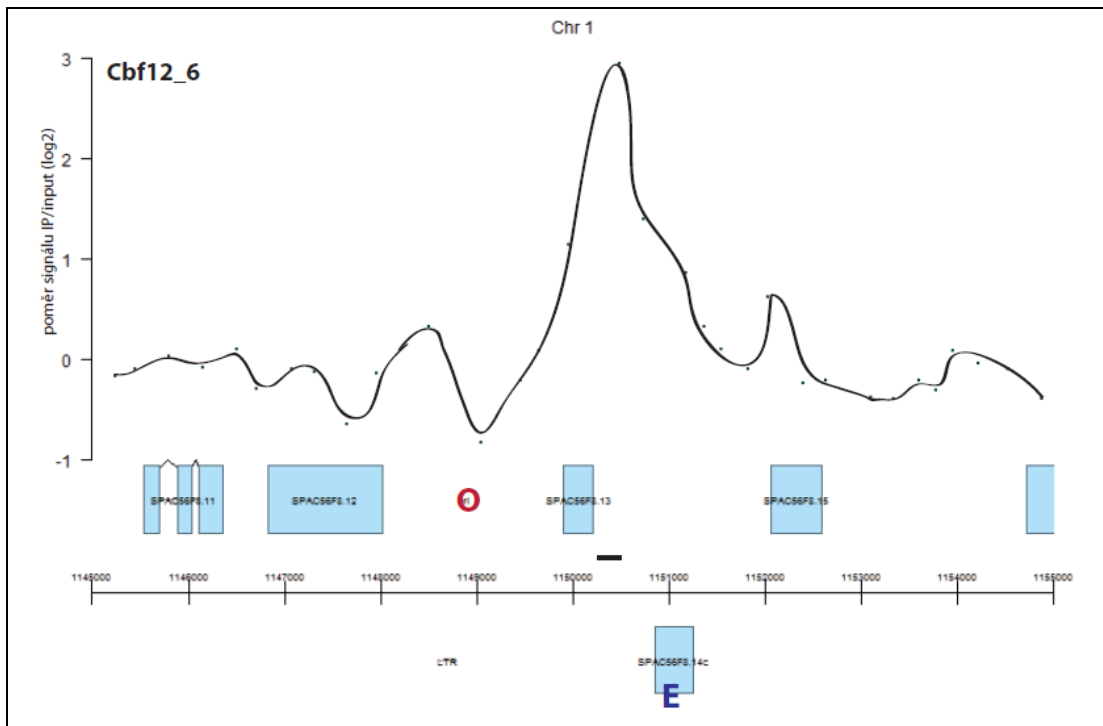
mp137	TCCTCATGCTATCATGCGTCTT	<i>act1</i> ⁺ , RT-qPCR, fw
mp138	CCACGCTCCATGAGAATCTTC	<i>act1</i> ⁺ , RT-qPCR, rev
mt1	AGAAGAGAGAGTAGTTGAAG	detekce párovacího typu, univerzální rev
mp	GGTAGTCATCGGTCTTCC	detekce párovacího typu, h ⁺ , fw
mm	TACGTTCACTAGACGTAGTG	detekce párovacího typu, h ⁻ , fw
mp27	TATGCTGGACTATAGTGGGC	<i>cbf11</i> ověření KO - sekvence ORF, fw
mp28	GATACAGCAACTCCTCCCG	<i>cbf11</i> ověření KO, univerzální rev
kan-rev	AATGCTGGTCGCTATACTGC	ověřovací primer pro KanMX6 delece, fw

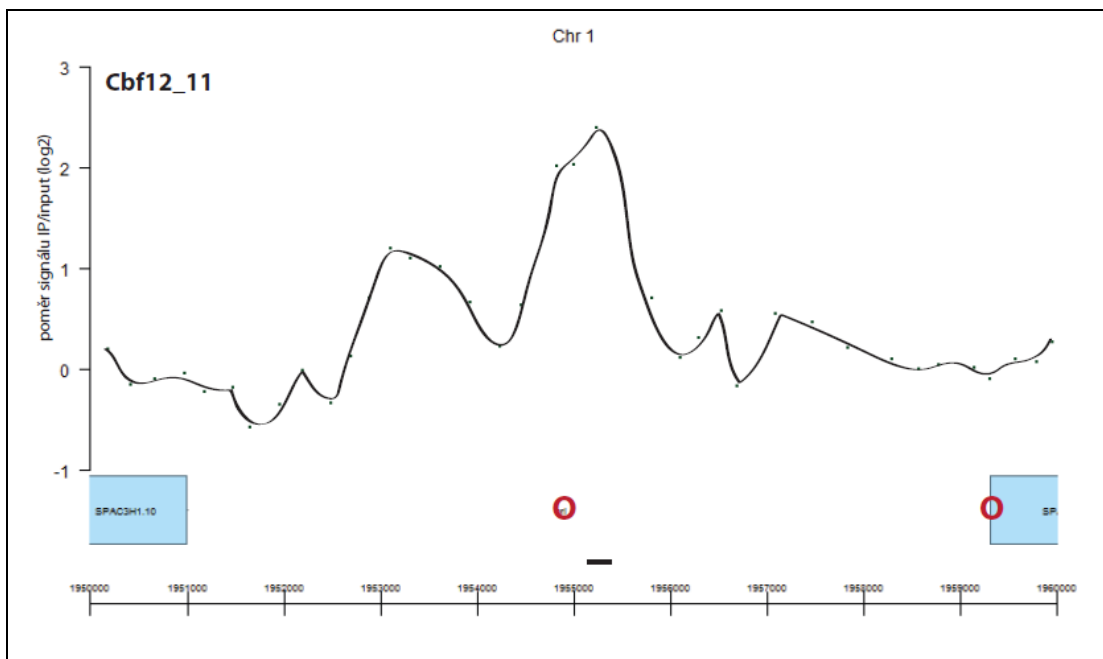
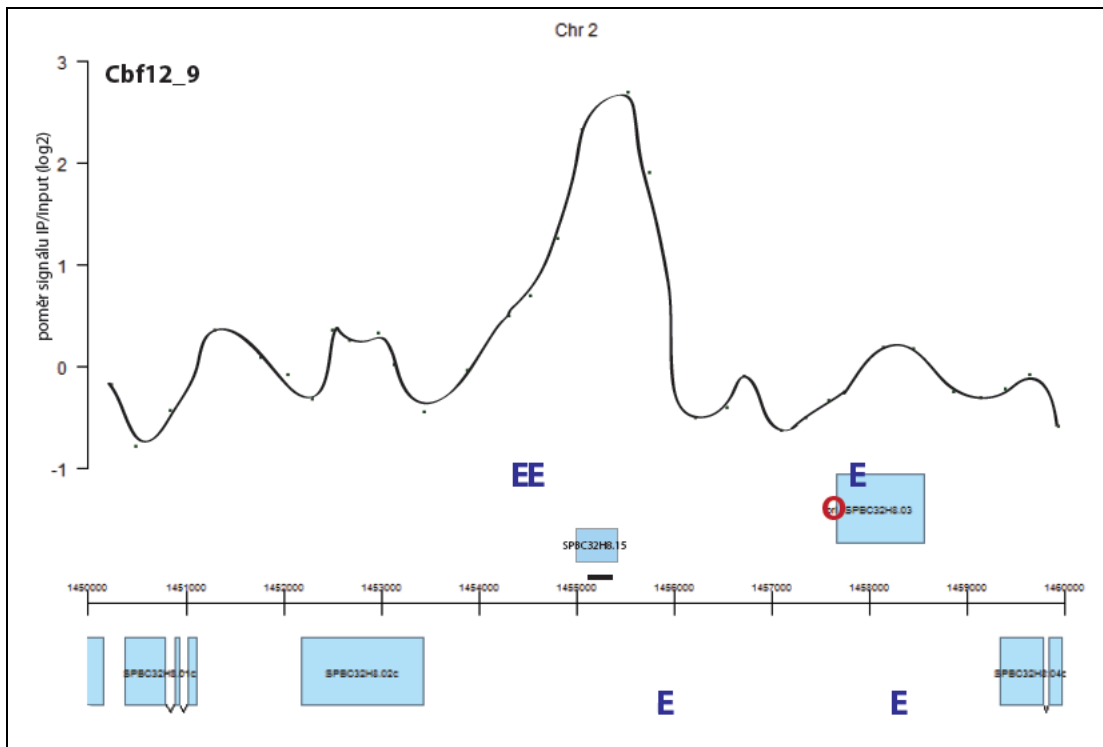
A.2

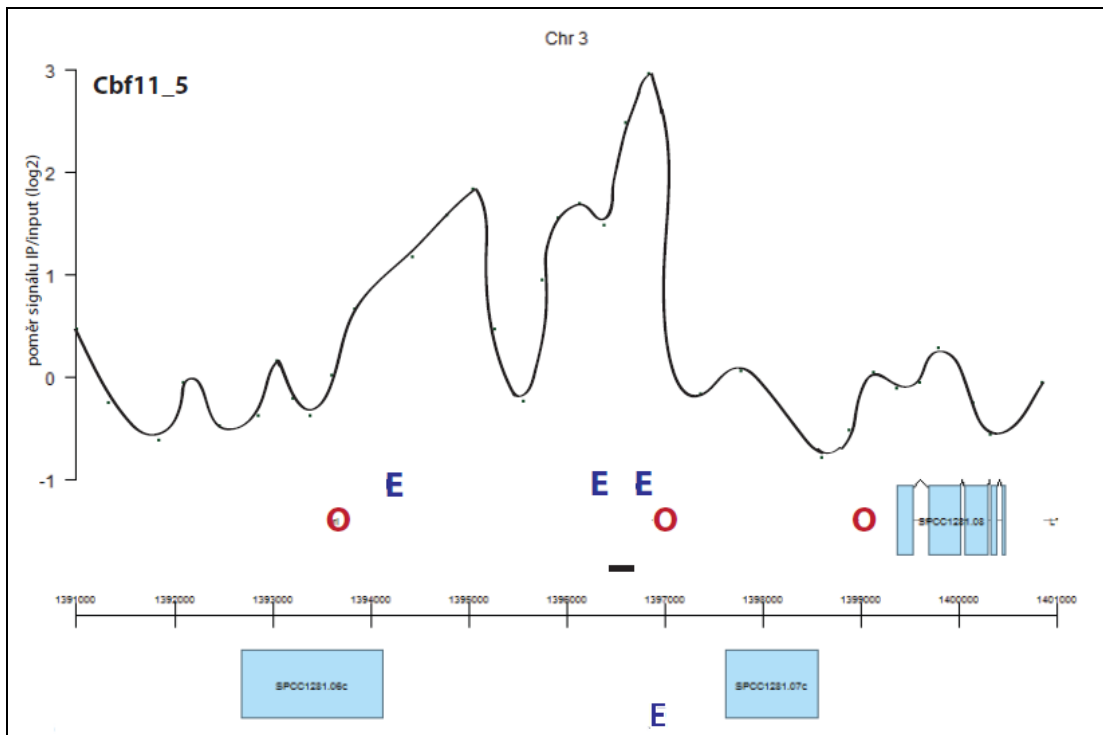
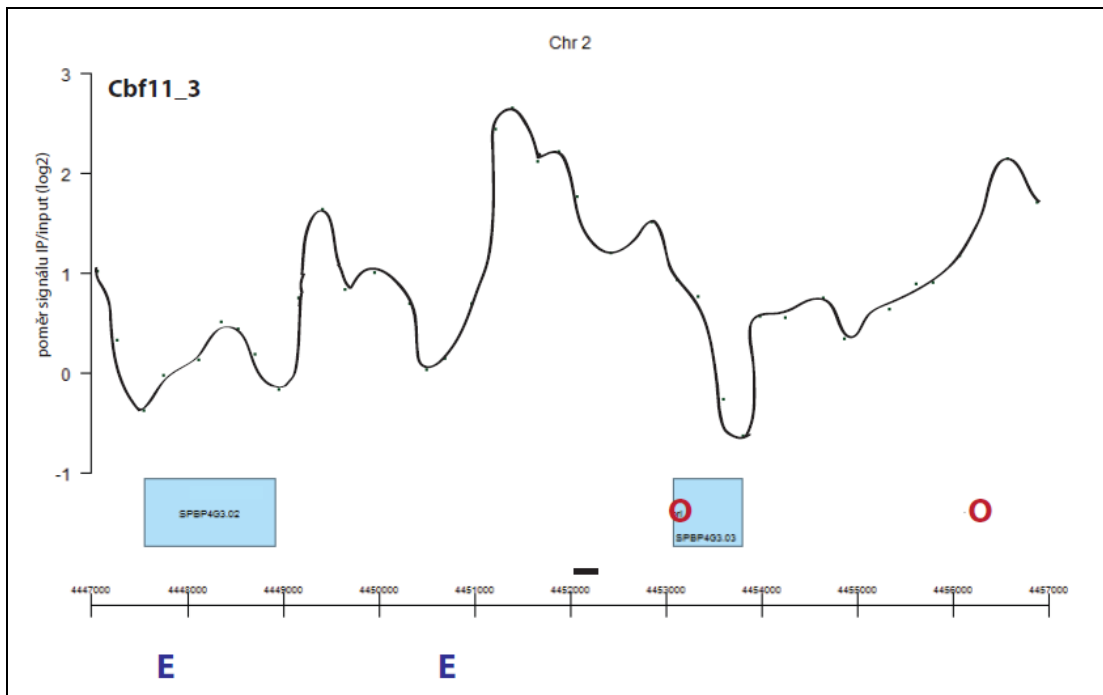


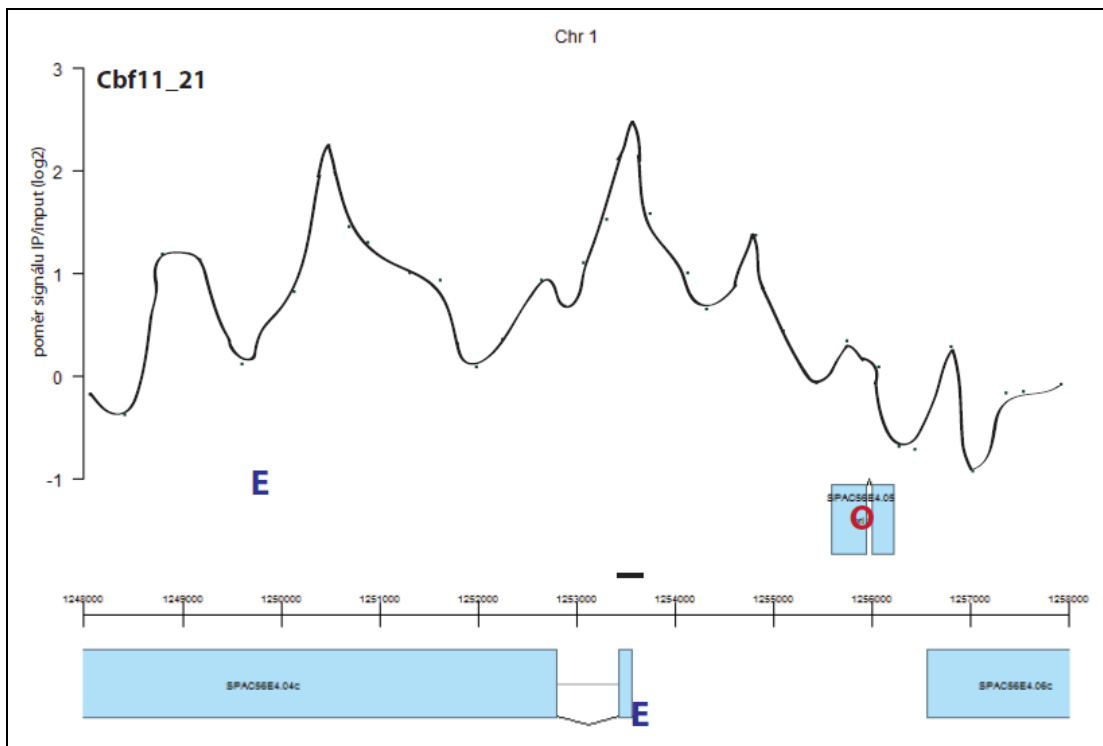
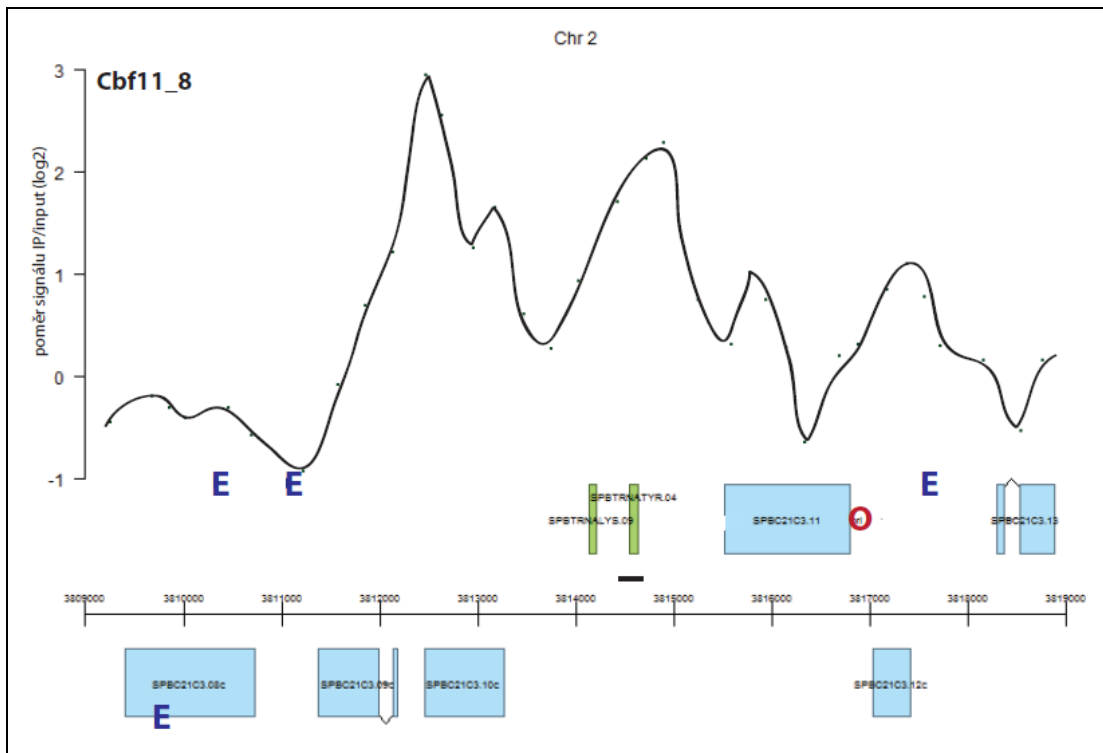


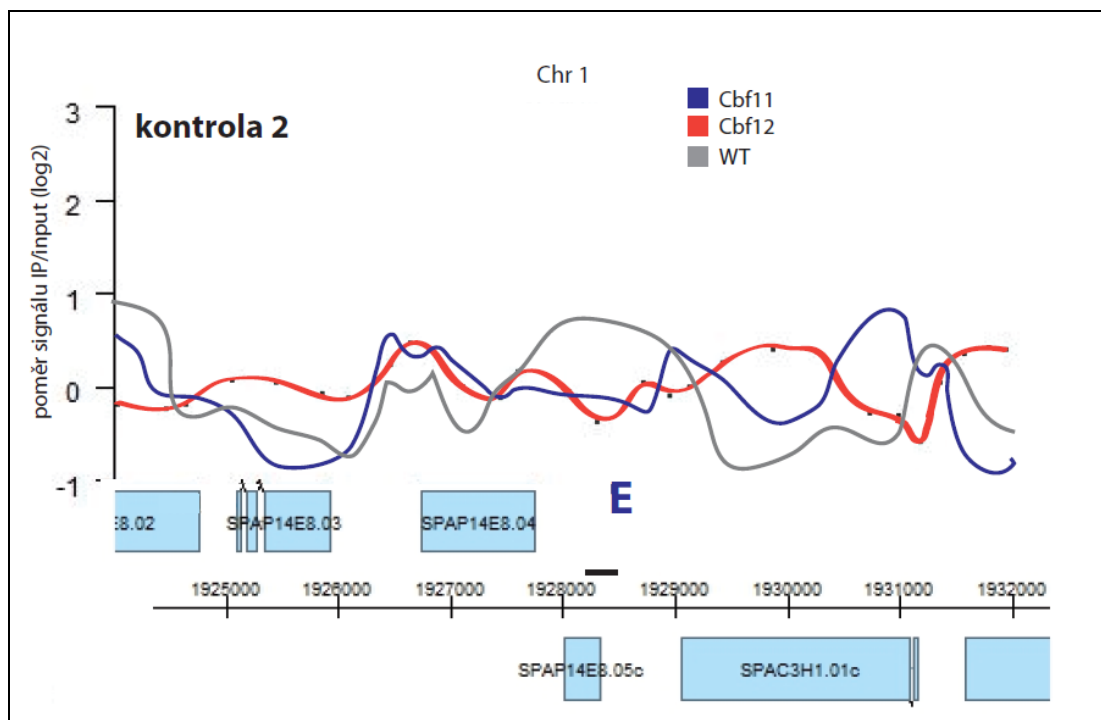
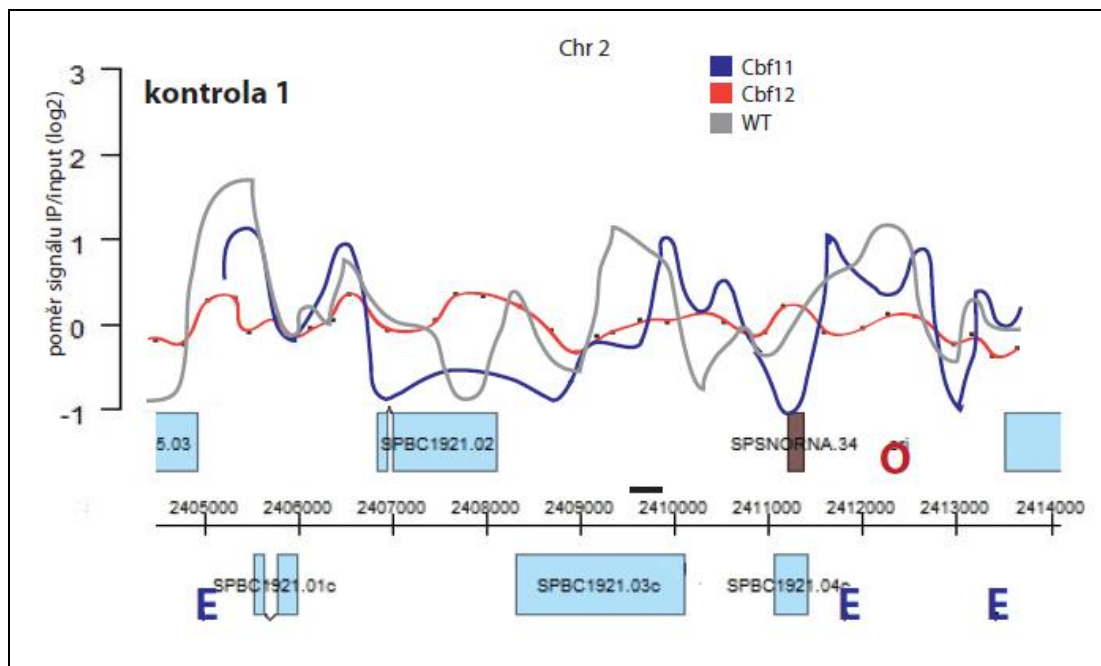












Obr. 7.1 ChIP-chip signály vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 do genomu *S. pombe*. Na ose x je znázorněna anotace lokusu, E = CSL-responzivní DNA vazebný element, O = počátek replikace. Krátká černá přímka nad osou x zobrazuje pozici ampliconu pod vrcholem vazby použitého na nezávislé ověření vazby proteinů CSL pomocí ChIP-qPCR (Obr. 3.13).