

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

**Katedra buněčné biologie**



**DNA vazebné vlastnosti proteinů rodiny CSL  
ve *Schizosaccharomyces pombe***

**DNA-binding properties of the CSL proteins of  
*Schizosaccharomyces pombe***

Diplomová práce

Martina Ptáčková

2010

Školitel: Doc. František Půta, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele a s použitím citované literatury.

Září 2010

Martina Ptáčková

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli Doc. Františku Půtovi, CSc., vedoucímu laboratoře Doc. Petru Folkovi, CSc. a RNDr. Martinu Převorovskému, PhD. za trpělivý přístup a cenné rady, které mi ochotně poskytovali, kdykoli jsem potřebovala. Velký dík patří také ostatním členům laboratoře, zejména Mgr. Janě Staňurové, za podporu a pomoc.

Projekt, jehož je tato diplomová práce součástí, byl podporován Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze, grantem číslo 92009 z roku 2009 a výzkumnými projekty číslo MSM0021620858 a LC07032 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Zvláštní poděkování náleží mé rodině a Tomášovi za jejich lásku, pomoc a víru ve mně.

# Abstrakt

Transkripční faktory rodiny CSL (CBF1/RBP-Jκ/Suppressor of Hairless/Lag-1) jsou jako výkonná složka signální kaskády Notch podstatné pro mnohé vývojové procesy metazoálních organismů, ale mohou působit také nezávisle na Notch. V nedávné době byla jejich přítomnost prokázána v houbových organismech, které postrádají signalizaci Notch a také většinu známých metazoálních interakčních partnerů. Proteiny CSL jednobuněčné kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*, Cbf11 a Cbf12, byly experimentálně určeny jako neesenciální jaderné transkripční faktory, které antagonistickým způsobem regulují buněčnou adhezi, produkci extracelulárního materiálu, morfologii kolonií, septaci a oddělování dceřiných buněk, koordinaci jaderného a buněčného dělení a udržování ploidie. Responzivní geny těchto faktorů dosud nejsou známy. V této práci byly predikovány geny *S. pombe*, jejichž promotorové oblasti představují možné přímé cíle pro vazbu proteinů Cbf. Vazba proteinů Cbf11, Cbf12 a také zkráceniny Cbf12ΔN na vazebné elementy pro faktory CSL obsažené v regulačních oblastech vybraných genů *S. pombe* byla testována *in vitro* metodou EMSA a následně v případě proteinu Cbf11 *in vivo* metodou ChIP. Proteiny Cbf11 a Cbf12ΔN sekvenčně specificky rozpoznávají vazebné elementy *in vitro*, ale jejich afinita, stejně tak jako jejich vazebné preference se v rámci testovaných sekvencí liší. U proteinu Cbf12 vazba na DNA prokázána nebyla, v čemž může hrát roli amino-terminální doména proteinu. Výsledky získané *in vitro* nevylučují naši hypotézu, že proteiny Cbf11 a Cbf12 váží promotory responzivních genů *S. pombe in vivo* a v závislosti na kontextu působí jako negativní a/nebo pozitivní regulátory jejich transkripce, avšak vazba Cbf11 na vybrané promotorové oblasti genů *in vivo* nebyla za daných podmínek prokázána.

## **Klíčová slova:**

proteiny CSL, vazba na DNA, *Schizosaccharomyces pombe*, signalizace Notch, CSL-responzivní geny, kompetice vazby, DNA sondy, regulace transkripce

# Abstract

As the effector component of the Notch signaling pathway the transcription factors of the CSL family (CBF1/RBP-J $\kappa$ /Suppressor of Hairless/Lag-1) are essential for many developmental processes in metazoan organisms, but they can function also independently of Notch. Recently, their presence was proved in fungal organisms lacking the Notch pathway as well as most of the known metazoan interacting partners. Cbf11 and Cbf12, the CSL proteins of the unicellular yeast *Schizosaccharomyces pombe*, were determined experimentally as non-essential nuclear transcription factors, which regulate cell adhesion, extracellular material production, colony morphology, septation and daughter cell separation, coordination of nuclear and cell division, and ploidy maintenance in an antagonistic way. The responsive genes of these factors are not known yet. In this study, genes of *S. pombe*, whose promoter regions represent potential direct targets for the Cbf proteins binding, were predicted. The binding of the Cbf11 and Cbf12 proteins, and of a truncated version Cbf12 $\Delta$ N to CSL response elements contained in the regulatory regions of selected *S. pombe* genes was tested *in vitro* by EMSA, and consequently, in the case of the Cbf11 protein, also *in vivo* by ChIP. Cbf11 and Cbf12 $\Delta$ N recognize specifically the response elements *in vitro*, but their affinity as well as their binding preferences differ among the sequences tested. The Cbf12 protein was not shown to bind to DNA, which might be an effect of the presence of the amino-terminal domain. The results obtained *in vitro* do not exclude our hypothesis that the Cbf11 and Cbf12 proteins bind the promoters of *S. pombe* responsive genes *in vivo* and, depending on context, act as negative and/or positive regulators of their transcription, however the binding of Cbf11 to selected gene promoter regions *in vivo* was not proved under the conditions used.

## Key words:

CSL proteins, binding on DNA, *Schizosaccharomyces pombe*, Notch pathway, CSL responsive genes, binding competition, DNA probes, regulation of transcription

# Obsah

<b>Poděkování.....</b>	<b>3</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Obsah.....</b>	<b>6</b>
<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>12</b>
2.1. Proteiny CSL a signální dráha Notch.....	12
2.2. Proteiny CSL.....	14
2.3. Struktura proteinů CSL .....	15
2.3.1. Metazoální proteiny CSL.....	15
2.3.2. Fungální proteiny CSL.....	17
2.4. DNA vazebné vlastnosti metazoálních proteinů CSL.....	20
2.4.1. Cílové geny metazoálních proteinů CSL .....	21
2.5. Proteiny CSL <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	22
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>26</b>
3.1. Použité mikroorganismy a jejich kultivace .....	26
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.1.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	26
3.1.3. Kultivace mikroorganismů.....	26
3.1.4. Transformace.....	28
3.2. Techniky manipulace s proteiny .....	30
3.2.1. Příprava buněčných lyzátů <i>S. pombe</i> .....	30
3.2.2. Měření koncentrace proteinu.....	31
3.2.3. SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů.....	32
3.2.4. Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	33
3.2.5. Western blot .....	34
3.2.6. Imunodetekce proteinů.....	34
3.3. Techniky manipulace s DNA .....	36
3.3.1. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu .....	36

3.3.2. Izolace plasmidové DNA z <i>E. coli</i> alkalickou metodou .....	36
3.3.3. Izolace chromozomální DNA z <i>S. pombe</i> .....	38
3.3.4. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	39
3.3.5. Zatupení 3' konců Klenowovým fragmentem .....	40
3.3.6. Ligace tupých konců DNA v roztoku .....	40
3.3.7. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu.....	40
3.3.8. Plasmidy .....	42
3.4. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	43
3.4.1. Příprava DNA sond a jejich radioaktivní značení.....	43
3.4.2. TBE polyakrylamidová elektroforéza .....	44
3.5. ChIP (Chromatinová imunoprecipitace) .....	46
3.5.1. Fixace a rozbíjení buněk .....	46
3.5.2. Sonikace a analýza chromatinu .....	46
3.5.3. Imunoprecipitace.....	47
3.5.4. PCR a qPCR.....	49
3.5.4.1. PCR .....	49
3.5.4.2. qPCR .....	50
3.6. Bioinformatické nástroje a software .....	51
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>53</b>
4.1. Identifikace CSL-responzivních genů <i>S. pombe in silico</i> .....	53
4.1.1. Bioinformatická predikce vazebných míst pro faktory CSL v genomu <i>S. pombe</i> .....	53
4.1.2. Selekce genů pro <i>in vitro</i> testování vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 .....	54
4.2. Konstrukce zkrácené varianty proteinu Cbf12.....	58
4.3. Testování DNA vazebných vlastností proteinů CSL <i>S. pombe in vitro</i> .....	59
4.3.1. Vazba proteinů Cbf na referenční RBP sondu .....	59
4.3.2. Identifikace vazby Cbf11 a Cbf12ΔN na sekvence <i>S. pombe</i> .....	61
4.3.2.1. Kompetice vazby proteinu Cbf11 .....	62
4.3.2.2. Kompetice vazby proteinu Cbf12ΔN.....	65
4.3.3. Denzitometrické vyhodnocení kompetičních experimentů.....	67
4.4. Vazba proteinu Cbf11 do regulačních oblastí genů <i>in vivo</i> .....	69
4.4.1. Optimalizace metody ChIP .....	70
4.4.1.1. Lyze buněk a fragmentace DNA.....	70

4.4.1.2. Imunoprecipitace a kvantitativní PCR .....	71
4.4.2. Vyhodnocení ChIP .....	74
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>76</b>
5.1. Rodina proteinů CSL v <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	76
5.2. Vazebné vlastnosti proteinů CSL <i>S. pombe in vitro</i> .....	77
5.3. Vazebné vlastnosti proteinu Cbf11 <i>in vivo</i> .....	79
5.4. Biologický význam proteinů CSL v <i>S. pombe</i> .....	80
<b>6. Shrnutí .....</b>	<b>83</b>
<b>7. Seznam literatury .....</b>	<b>84</b>
<b>8. Přílohy .....</b>	<b>94</b>



## Seznam zkratek

BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
bHIH	bazický helix-loop-helix
BSA	hovězí sérový albumin
BTD	$\beta$ -trefoil doména
CBF1	C-promoter binding factor
CBP	CREB-binding protein
CESR	stresová odpověď (core environmental stress response)
CIR	CBF1-interacting repressor
ClonNAT	nourseothricin
CTD	karboxy-terminální doména
DMF	dimethylformamid
(d)NTP	(deoxy)ribonukleosidtrifosfát (směs dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DTT	dithiothreitol
EBNA2	jaderný antigen 2 viru Epstein-Barrové
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermal growth factor
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
G418	geneticin
HA	hemaglutinin
HDAC 1/2	histon deacetylázový komplex
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HERP	HES-related repressor protein
HES	Hairy/Enhancer of Split
ChIP	chromatinová imunoprecipitace
KSHV	herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem
NBT	nitroblue tetrazolium
NICD	intracelulární část receptoru Notch
NTD	amino-terminální doména
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyetylen glykol

qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RBP-J $\kappa$	recombination signal binding protein J $\kappa$
RBP-L	RBP-J $\kappa$ -like
RHR	Rel-homology region
SDS	dodecylsulfát sodný
SKIP	Ski-interacting protein
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid receptors
Su(H)	Suppressor of Hairless
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
WCE	whole cell extract
WT	divoký typ (wild type)
$\Phi$	hydrofóbní aminokyselina

# 1. Úvod

Proteiny rodiny CSL (CBF1/RBP-Jκ/Suppressor of Hairless/Lag-1) byly popsány jako transkripční faktory působící v metazoálních organismech v rámci signální dráhy Notch i mimo ni, které regulují klíčové vývojové procesy (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). V nedávné době byly tyto faktory považované za striktně metazoální objeveny také v několika houbových organismech (Převorovský et al., 2007). Dva paralogy proteinů CSL, Cbf11 a Cbf12, se vyskytují také v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*, která je využívána jako model pro studium eukaryotických organismů na úrovni jedné buňky. Tyto kvasinkové proteiny sdílejí stejnou doménovou strukturu a jsou schopny specificky rozpoznávat CSL-vazebný element jako metazoální proteiny a experimentálně tak bylo ověřeno, že skutečně náleží do rodiny proteinů CSL (Převorovský et al., 2009). Zajímavé je, že v houbových organismech není přítomna signalizace Notch a existuje hypotéza, která pokládá funkci proteinů CSL jako DNA vazebných transkripčních faktorů nezávislých na signální kaskádě Notch za ancestrální. Studování proteinů CSL v těchto organismech může pomoci pochopení jejich Notch-nezávislé funkce v metazoích (Gazave et al., 2009; Převorovský et al., 2007).

Responzivní geny proteinů CSL v *S. pombe* nejsou dosud známy, proto cílem této práce je predikovat vazebná místa pro proteiny CSL v regulačních oblastech genů *S. pombe* a *in silico* tak identifikovat CSL-responzivní geny. Dalším cílem byla *in vitro* charakterizace vazebných preferencí proteinu Cbf11 *S. pombe* a na základě výsledků pak *in vivo* ověření vazby proteinu Cbf11 do promotorů vybraných kvasinkových genů metodou chromatinové imunoprecipitace. Jelikož pro protein Cbf12 nebyla pozorována vazba na DNA, byla testování schopnosti vazby DNA podrobena jeho deleční varianta Cbf12ΔN včetně následného testování vazebných preferencí této zkráceniny.

## 2. Literární přehled

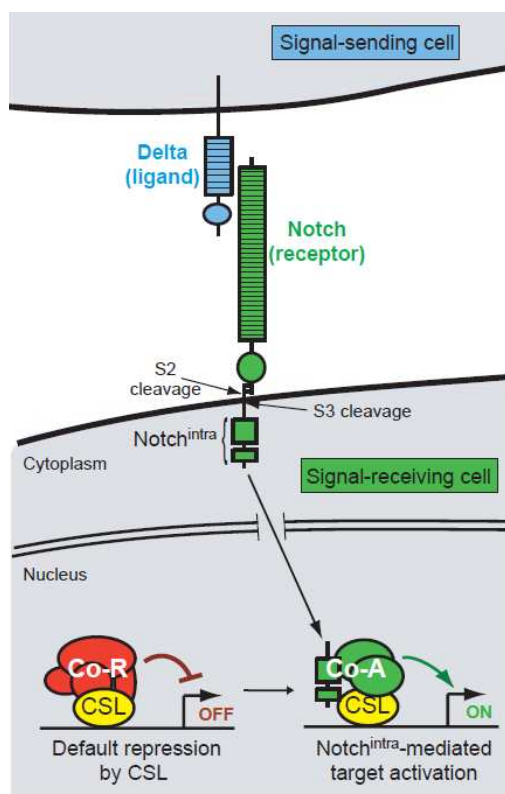
### 2.1. Proteiny CSL a signální dráha Notch

Proteiny rodiny CSL, pojmenované po savčím proteinu CBF1 (RBP-J $\kappa$ ) a proteinech Suppressor of Hairless *Drosophila melanogaster* a Lag-1 *Caenorhabditis elegans*, představují výkonnou složku signální dráhy Notch, kde působí jako transkripční faktory aktivující nebo reprimující expresi responzivních genů v závislosti na interakčních partnerech (Bray a Furriols, 2001; Lai, 2002; Pursglove a Mackay, 2005). Tato signalizace je evolučně konzervovanou komunikací mezi sousedními buňkami a reguluje mnoho vývojových procesů v metazoích (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Notch receptor je cca 300 kDa transmembránový protein jedenkrátě přecházející přes plasmatickou membránu, jehož extracelulární část je tvořena 29-36 EGF repetice (epidermal growth factor) a menší intracelulární doména zvaná NICD sestává ze 7 ankyrinových repetice, dvou jaderných lokalizačních signálů, dvou transaktivačních domén a C-koncové sekvence PEST/OPA regulující stabilitu proteinu (Kurooka et al., 1998; Lubman et al., 2004). Extracelulární část receptoru rozeznává ligand typu DSL (pojmenovaný po ortholozích savce Delta, *Drosophila melanogaster* Serrate a *Caenorhabditis elegans* Lag-2), což je také transmembránový protein exponovaný na vnější straně membrány sousední buňky. Po vazbě ligandu na receptor dojde ke dvěma proteolytickým štěpením receptoru Notch. Z membrány se tak uvolní NICD, která se translokuje do jádra (Obr. 2.1). V jádře je na promotorech cílových genů navázán transkripční faktor rodiny CSL v komplexu s proteinem SNW/SKIP a korepresory SMRT/NCOR, CIR, HDAC1/2 a dalšími a blokuje tak transkripci těchto genů (Folk et al., 2004; Hsieh et al., 1999; Zhou et al., 2000a). NICD nahradí korepresorový komplex SMRT/NCOR na faktoru CSL, čímž způsobí derepresi, a interakcí s koaktivátory Mastermind/Lag-3 a CBP/p300 histonacetyl-transferázami je spuštěna exprese cílových genů (Petcherski a Kimble, 2000; Wu et al., 2002; Obr. 2.2).

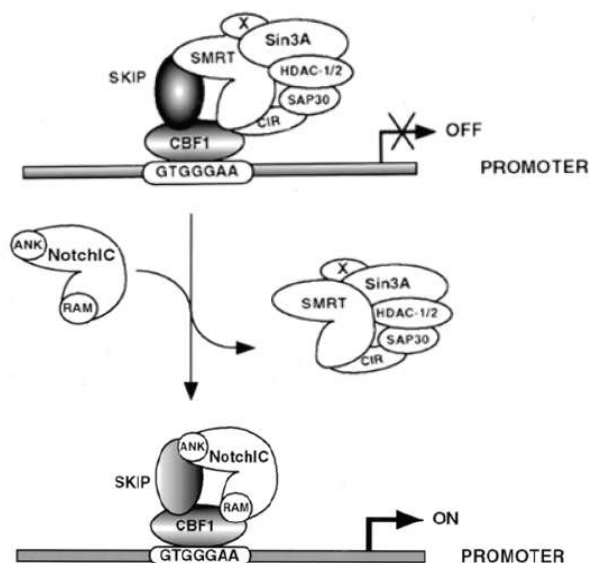
Signální dráha Notch reguluje mnoho vývojových procesů v závislosti na kontextu, jako například somitogenezi, specifikaci nervové a svalové tkáně, diferenciaci imunitního systému a další (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; De La Pompa et al., 1997; Laky a Fowlkes, 2008; Maillard et al., 2003; Weinmaster a Kintner, 2003). Mutace nebo nerovnováhy v regulaci komponent Notch dráhy jsou u člověka spojeny

se závažnými onemocněními jako akutní lymfoblastická leukémie T-buněk, rakovina prostaty, cervikální karcinom, různé kardiovaskulární poruchy a další (Gridley, 2003; High a Epstein, 2008; Miele et al., 2006; Weng a Aster, 2004). Je zřejmé, že experimentální zásahy do Notch dráhy vedou k pleiotropním vývojovým defektům a delece Notch nebo CSL vede ke smrti v embryonální fázi vývoje (Oka et al., 1995). Notch dráha je také využívána některými viry, jejichž regulační proteiny nejsou samy schopné vazby na DNA a imitují funkci NICD tak, že maskují represní doménu proteinů CSL, a tím aktivují příslušné geny zajišťující replikační cyklus viru. Jde například o virus Epstein-Barrové, adenovirus nebo herpetický virus asociovaný s Kaposiho sarkomem (Hayward, 2004; Hsieh et al., 1996; Liang et al., 2002; Zhao et al., 1996). Přímými protein-protein interakcemi intracelulárních komponent může být Notch dráha propojena s jinými signalizacemi, například s TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ; Blokzijl et al., 2003).

Notch signalizace může fungovat také nezávisle na proteinech CSL (Arias et al., 2002) a rovněž proteiny CSL nejsou omezeny pouze na Notch signalizaci (Barolo et al., 2000; Beres et al., 2006; Koelzer a Klein, 2003; Masui et al., 2007).



**Obr. 2.1** Schematické znázornění signální dráhy Notch (převzato z Lai, 2004). Co-R – korepresorový komplex, Co-A – koaktivátorový komplex.



**Obr. 2.2** – Schéma interakcí proteinu CSL s korepresorovým a koaktivačním komplexem (upraveno a převzato z Zhou et al., 2000a; Zhou et al., 2000b).

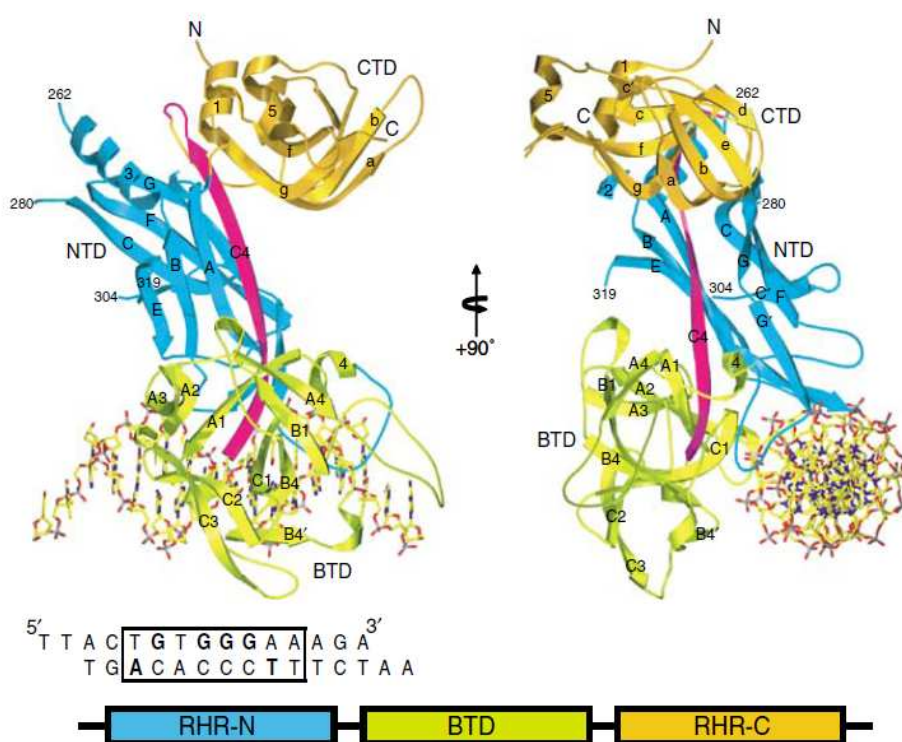
## 2.2. Proteiny CSL

Proteiny této rodiny jsou evolučně konzervované od jednobuněčných organismů po člověka. Donedávna byly považované za výlučně metazoální, ale přítomnost genů CSL byla objevena i u houbových organismů (Převorovský et al., 2007). U většiny obratlovců fungují dva paralogy proteinů CSL – CBF/RBP-J $\kappa$  zapojený v signalizační dráze Notch a RBP-L, který je exprimovaný pouze v některých tkáních, podílí se na vývoji pankreatu a jeho funkce nesouvisí s Notch signalizací (Beres et al., 2006; Masui et al., 2007; Minoguchi et al., 1997). V říši hub se proteiny CSL vyskytují v organismech řazených do taxonů Ascomycetes, Zygomycetes a Basidiomycetes a tvoří dvě odlišné třídy, F1 a F2. V každém organismu byly nalezeny dva paralogy těchto proteinů, každý patřící do jiné třídy. Výjimkou je *Rhizopus oryzae*, jehož genom nese sedm genů CSL, *Phycomyces blakesleeanus* s pěti paralogy a *Postia placenta* se třemi. Je však možné, že s rostoucím počtem sekvenovaných genomů bude organismů s více proteiny CSL přibývat (Převorovský et al., 2007). Proteiny rodiny CSL v houbových organismech jsou zajímavé zejména z evolučního hlediska, protože v těchto organismech není přítomna signální dráha Notch ani většina známých metazoálních interakčních partnerů proteinů CSL.

## 2.3. Struktura proteinů CSL

### 2.3.1. Metazoální proteiny CSL

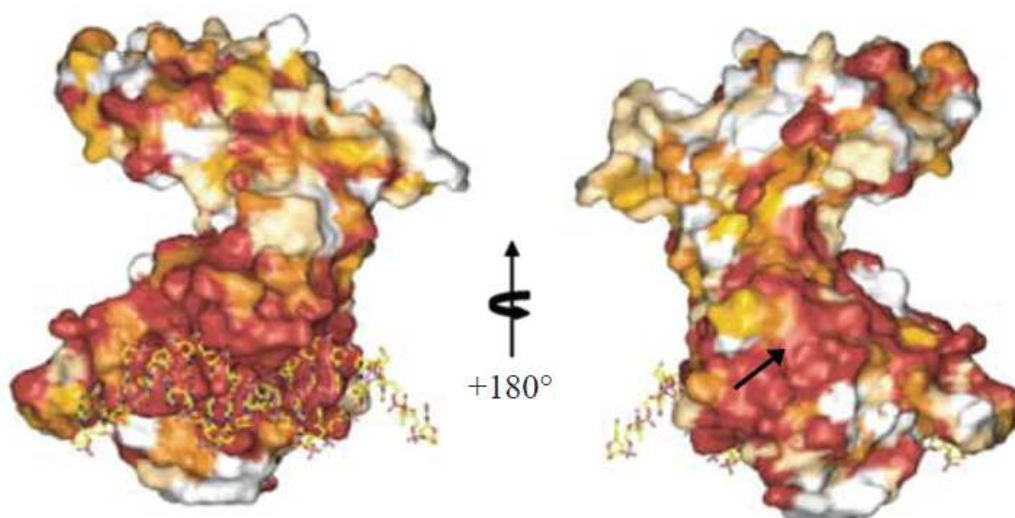
Model terciární struktury metazoálních proteinů CSL byl vytvořen na základě studie krystalových struktur proteinu Lag-1 *Caenorhabditis elegans* (Kovall a Hendrickson, 2004; Wilson a Kovall, 2006). Protein je utvářen třemi jasně odlišnými doménami, které jsou propojené strukturou  $\beta$ -listu (Obr. 2.3). N-terminální (NTD) a C-terminální (CTD) doména svojí strukturou připomínají dvoudoménové transkripční faktory rodiny Rel, proto jsou označovány jako RHR-N a RHR-C (Rel-homology region). Na rozhraní těchto dvou domén je v proteinech CSL vložena BTD ( $\beta$ -trefoil) doména strukturovaná jako  $\beta$ -barel.



**Obr. 2.3** Stuhkový model komplexu proteinu CSL *C. elegans* Lag-1 s DNA. Zobrazena také doménová organizace (převzato z Kovall a Hendrickson, 2004).

Vazba na DNA je zajišťována N-terminální a  $\beta$ -trefoil doménou, která je navíc zodpovědná za interakce s koregulátory jako NICD, SMRT/NCoR a CIR. Vazebná a interakční oblast proteinu je vysoce konzervována (Obr. 2.4). Díky struktuře otevřeného  $\beta$ -barelu je na povrchu centrální části BTD exponovaná hydrofóbní kapsa. Na N-konci NICD byl identifikován nepolární  $\Phi W\Phi P$  tetrapeptidový motiv,

který interaguje s hydrofóbní kapsou ( $\Phi$  značí hydrofóbní aminokyselinu; Kovall a Hendrickson, 2004). Tento motiv využívají i některé virové proteiny k interakci s CSL, například EBNA2 viru Epstein-Barrové (Fuchs et al., 2001; Ling a Hayward, 1995). Korepresory SMRT/NCoR nebo CIR nemají sekvenci podobnou nepolárnímu motivu a neinteragují s totožnou oblastí jako NICD, ale váží se do místa těsně sousedícího s nepolární kapsou BTB (Hsieh et al., 1999; Kovall a Hendrickson, 2004). C-terminální doména je oproti NTD a BTB nestrukturovaná, méně konzervovaná, a o její funkci se soudí, že přispívá k vazbě na DNA pouze nepřímo stabilizací terciárního uspořádání (Kovall, 2008; Kovall a Hendrickson, 2004), slabě váže ankyrinové repetice NICD (Tani et al., 2001) a může se podílet na Notch-nezávislé regulaci transkripce (Tang a Kadesch, 2001).



**Obr. 2.4** Sekvenční konzervovanost proteinu CSL namapovaná na povrchu molekuly pomocí gradientu barev. Tmavě červená, oranžová, žlutá a bílá představuje oblast s absolutní identitou, vysokou a průměrnou podobností a nekonzervovanou oblast. Oblast kontaktu proteinu s DNA je zcela konzervovaná, hydrofóbní kapsa označená šipkou je také vysoce konzervovaná (upraveno a převzato z Kovall a Hendrickson, 2004).

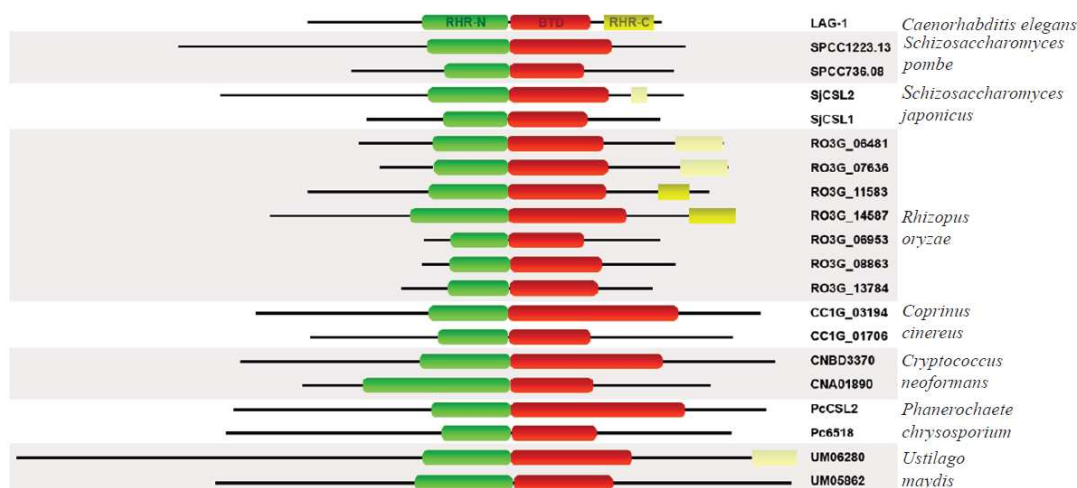
V aminokyselinové sekvenci RBP-J $\kappa$  byl nalezen motiv podobný katalytické doméně místně specifických rekombináz integrázové rodiny a spekovalo se o účasti RBP-J $\kappa$  v rekombinaci imunoglobulinového genu (Kawaichi et al., 1992; Matsunami et al., 1989). Na proteinu CSL *D. melanogaster*, Su(H), se ukázalo, že sekvenční podobnost s integrázovou doménou nemá *in vivo* žádný funkční význam při rekombinaci (Schweisguth et al., 1994). Jelikož integrázový motiv obsahuje skupinu negativně nabitých aminokyselin, což je charakteristické pro transaktivní domény



transkripčních faktorů, existuje možnost, že tato část proteinu RBP-J $\kappa$  funguje jako transaktivací doména (Chung et al., 1994).

### 2.3.2. Fungální proteiny CSL

U proteinů CSL v houbových organismech je zachována stejná doménová architektura jako u metazoálních proteinů. NTD a BTD jsou jasně identifikovatelné, CTD, která je u metazoálních proteinů málo konzervovaná, je výrazně divergovaná (Obr. 2.5). Jednotlivé domény a také N-koncové sekvence jsou oproti metazoálním výrazně prodloužené. Aminokyseliny nutné k vazbě na DNA jsou ve struktuře NTD a BTD fungálních proteinů CSL absolutně zachované, zato oblasti zprostředkávající u metazoálních proteinů interakce s koaktivátory a korepresory konzervované nejsou, přestože potenciál formovat hydrofóbní kapsu zůstal zachován (Obr. 2.6 a Převorovský et al., 2007).



**Obr. 2.5** Doménová organizace proteinů CSL u hub. Černé linky doplňují délku příslušného proteinu. Struktura Lag-1 *C. elegans* pro srovnání v horní části obrázku (Kovall a Hendrickson, 2004). NTD zobrazena zeleně, BTD červeně a CTD žlutě (světle žlutá pro nízkou signifikanci) (převzato z Převorovský et al., 2007).

000000000000

210 220 230 240 250 260 270 280 290

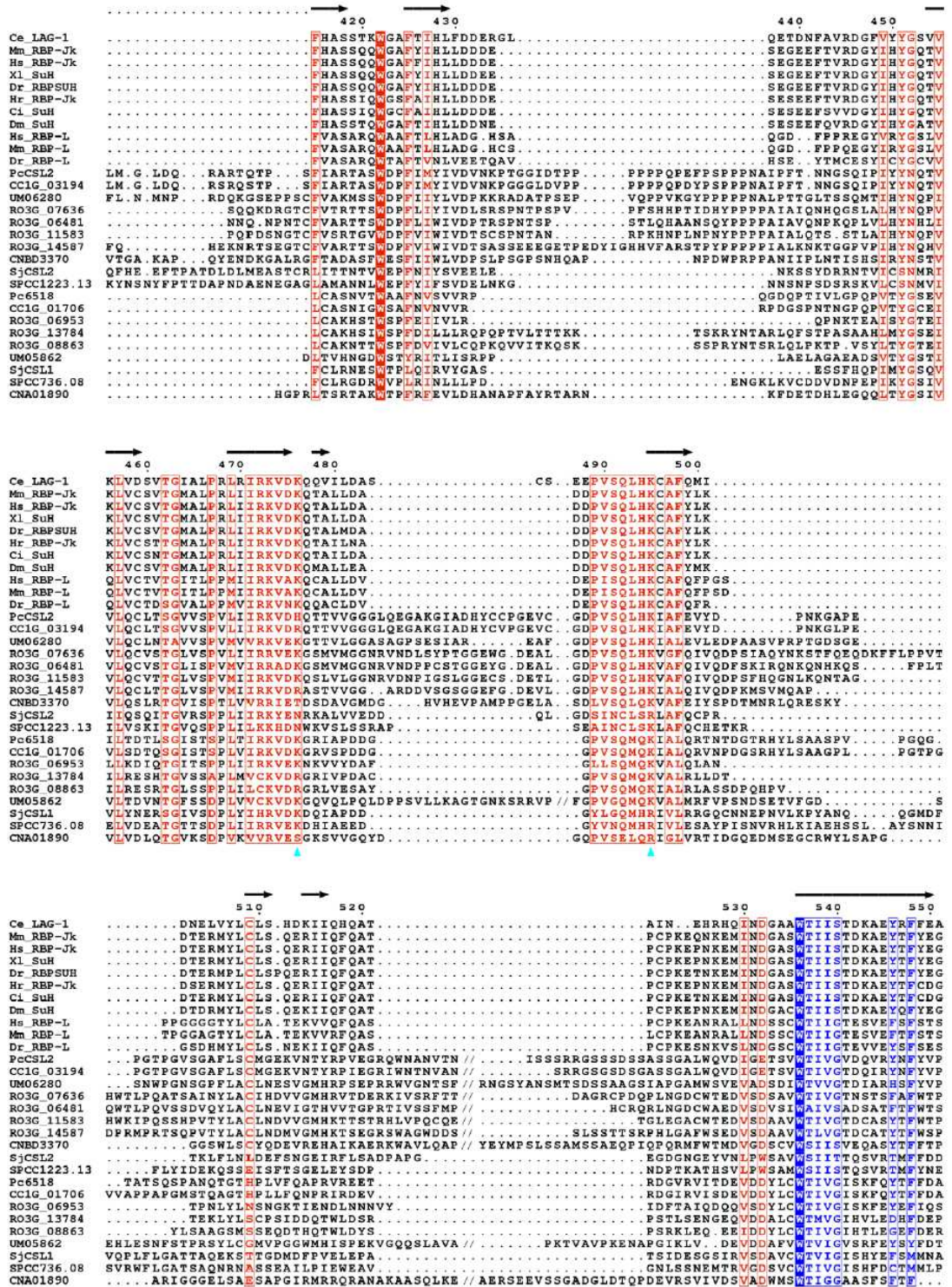
Ce\_LAG-1 KEKYEVCVLSIFHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGQGWKLLKDRVAQLYKTLKA . . . . . SAQKDAAIENDPFIHQATQLVAYI  
Mm\_RBP-Jk KERGDQTVLILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWKXKKE . . . . . QMERDGCSESQESQPCAFI  
Hs\_RBP-Jk KERGDQTVLILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWKXKKE . . . . . QMERDGCSESQESQPCAFI  
Xl\_SuH KERGDQTVLILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWKXKKE . . . . . QMERDGCSESQESQPCAFI  
Dr\_RRPSUH KERGDQTVLILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWKXKKE . . . . . QMERDGCSESQESQPCAFI  
Hr\_RBP-Jk RERNDQTVLILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWKXKKE . . . . . TLEADQAEAEQVHAFI  
Cl\_SuH KDFNDQTVLILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWKXKKE . . . . . LLEEESSEEAQGLHAFI  
Dm\_SuH RERNDNVIVILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRRYE . . . . . EMLOQGESEGGQAGLQAFI  
Hs\_RBP-L QQQCQETVILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . QDQAQAGETGATVCGYM  
Mm\_RBP-L QQRCQETVILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . QDQAQAGETGATVCGYM  
Dr\_RBP-L QFRPDQSVTILHAKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . QFKASGLNESACRIFGYM  
PcCSL2 LAFGERTVIVMSKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . RCEEPKLCPPRVVVSISGEPAPQEGSIE  
CCIG\_03194 LAFGERTVIVMSKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . RGEEPKLAAPPVVVVSISGEPAPQEGSIE  
Pc6518 LGIGERNVIMTVRVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . RGEEPKLAAPPVVVVSISGEPAPQEGSIE  
RO3G\_07636 . . . . . GKKLITILSKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . HFNPLTIQISGKPLSHQGTID  
RO3G\_06481 . . . . . DERKILITILSKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . HFNPLTIQISGKPLSHQGTID  
RO3G\_11583 . . . . . PGERTIMILSKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . HFNPLTIQISGKPLSHQGTID  
RO3G\_14587 . . . . . TQIGERTVIVLTSKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . P SLEKIDLLAPKLVTSISGEPSTQAGVLE  
CNBD3370 LAFGERLIVMSKVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . GCPVSPQLPVRINISITGQAVKDSIIS  
SjCSL2 HPELLCAMKVPFMSLQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . IIANAAADDPNLKTSETP  
SPCC1223.13 NCCHLSAFYLCMPSLQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . LKISAGTLEDKDNPKFAKNI  
Pc6518 KPIPMTTVICLHAAVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . QFSMTVVVSIGGKSPFQR  
CCIG\_01706 RVPVMTVICLHAAVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . SLSMAVVSSETGERSPEOK  
RO3G\_06953 SFKQPNKVCYHAAVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . MISMIMNENNAQLER  
RO3G\_13784 RAKKTSKMTVCYHAAVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . LLSMILCED.OGLLEQR  
RO3G\_08863 KLKRSKVVVCYHAAVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . ELMSILCED.NDILEQR  
UM05862 SKTKMTTIRCSHAAVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . AATLLTFLSSDPPEDQCRV  
SjCSL1 QANKLVTISYQASVAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . FSVOLAITNQQGHSNVQS  
SPCC736.08 KPSQVTVSRRSSVIAQKSYGNERRRFFCPFFPCYDLDGSGGWRRVRF . . . . . FRKTSISIMNFQGCSPQIS  
CNA01890 NSRRFTLEVWPTFEGASGKRRMINDPFIIRLGGPASCISISSITMVSVSPN . . . . . ITQVPAICAPTHMGAPFOITP

300 310 320 330 340 350

Ce\_LAG-1 GIGSDTSERQQLDFSTGKVRHFG . . . . . DQRQDPNIYDYCAAKTLYISDSD . . . . . YFDLNAQFYFGCG . . . . .  
Mm\_RBP-Jk GIGNSDQEMQQLNLEG . . . . . KNYCTAKTLYISDSD . . . . . HFMLSVKMFYGN . . . . .  
Hs\_RBP-Jk GIGNSDQEMQQLNLEG . . . . . KNYCTAKTLYISDSD . . . . . HFMLSVKMFYGN . . . . .  
Xl\_SuH GIGNSDQEMQQLNLEG . . . . . KNYCTAKTLYISDSD . . . . . HFMLSVKMFYGN . . . . .  
Dr\_RRPSUH GIGNSDQEMQQLNLEG . . . . . KNFCTAKTLYISDSD . . . . . HFMLSVKMFYGN . . . . .  
Hr\_RBP-Jk GIGSDQEMQQLNLDG . . . . . KNFCTAKTLYISDSD . . . . . HFMLCVKMFYGC . . . . .  
Cl\_SuH GIGSSQEMQQLHLDG . . . . . KNFCTAKTLYISDSD . . . . . HFMLNVMKFFGGGG . . . . .  
Dm\_SuH GIGSSDQDMQQLDLNG . . . . . KQYCAAKTLYISDSD . . . . . HFMLSVKMFYGN . . . . .  
Hs\_RBP-L GLDGASGSATETQKLN . . . . . FEQOPDRFGCAKTYISDSD . . . . . HFRLLRLLVLRGG . . . . .  
Mm\_RBP-L GLDGASGSAPETQKLN . . . . . FEQOPDRFGCAKTYISDSD . . . . . HFRLLRLLVLRGG . . . . .  
Dr\_RBP-L GLDSSNDPRTDSFKLS . . . . . FEQTDKMFACAKTYISDSD . . . . . HFRLLRLLVLRGG . . . . .  
PcCSL2 WTSATGKAFDVSDFPTGTT . . . . . YIGRCVQKQLPISDSD . . . . . EKRRKVEALVKIMAFSADDEPE . . . . .  
CCIG\_03194 WTSSSGKSPDVTDFPSEGT . . . . . YIGRCVQKQLPISDSD . . . . . EKRRKVEALVKIMAFSADDEPE . . . . .  
UM06280 WASSSGRLIDVGNPSSAMA . . . . . ISGRGKQLPISDSD . . . . . EKRRRVEALVKISVPGSSPMDR . . . . .  
RO3G\_07636 WYKDGMLDQPSAVLLANQGSN . . . . . LIGNCVSKQLHVSAD . . . . . EKRRKAOVQVVEIRSGGOTP . . . . .  
RO3G\_06481 WYKEGTLNGHIAATYASQDI . . . . . LVGNCISKQLHVSAD . . . . . EKRRKAOVQVVEIRSGGOTP . . . . .  
RO3G\_11583 WQSSGNIID . . . . . HNAQK . . . . . VGRKCTLAKQLHVSAD . . . . . EKRRKVEALVKISVPGSSPMDR . . . . .  
RO3G\_14587 WYVYGSATVGQTGQIKPKPKPESTRSRPSSSRHPADAYSNERQELLAAGKSVSKHLYHDAD . . . . . EKRRRVEALVKISVPGSSPMDR . . . . .  
CNBD3370 WTDLNGKNMDEKASTQGVKIDDD . . . . . FFTGVSAGKMLHVSAD . . . . . EKRRRVEALVKISVPGSSPMDR . . . . .  
SjCSL2 TFFTSSSSDANTLLSLGQVKLDPLE . . . . . QQSQSPFIWANTVKTLYISG . . . . . KGDHNTYGRSTLQVH . . . . . VRTP . . . . .  
SPCC1223.13 FYFNADGALISPETDIAKSTYLNPNY . . . . . ENTNFDSPFVWGNALLKTYISG . . . . . ENTFNFDSPFVWGNALLKTYISG . . . . . SVQSK . . . . .  
Pc6518 APIDHNL . . . . . ASFFLHVGTGA . . . . . KSKSPQLSLNITEPSPPTADGESP . . . . .  
CCIG\_01706 ATIDNMV . . . . . SSFRLHVGTGA . . . . . KAKSPQLSLDIAEPSPPTADGESP . . . . .  
RO3G\_06953 TLDDESK . . . . . KSKGFKLNM . . . . . KSKGFKLNM . . . . .  
RO3G\_13784 AILDENQR . . . . . GSFRLHVGTGA . . . . . KAKQFKLQNLQPE . . . . .  
RO3G\_08863 TALDEHS . . . . . GSFRLHVGTGA . . . . . KAKQFKLQNLQPE . . . . .  
UM05862 SLVVRGDTDEYFSNENAVLDG . . . . . RLKTKMRLVYVPTG . . . . . RSKSFRQLQLNLLRSLGSLPHLPIF . . . . .  
SjCSL1 ENFAERQS . . . . . VAFRLHVS . . . . . AAKAKSFLNLIDVIS . . . . .  
SPCC736.08 EEXTQGCC . . . . . MIFRLHVS . . . . . AAKSKNLRLSMDMS . . . . .  
CNA01890 HLGTPGVDEKRRERREQKLRITAAALNAGFAATLPRNRNATDKLDRITLTKDGLTF . . . . . GSKMFKLELKIYAEPTKGLSSPS

360 370 380 390 400 410

Ce\_LAG-1 MEIGGFVSRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . TDCKYLCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Mm\_RBP-Jk DDIGVFLSKRIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Hs\_RBP-Jk DDIGVFLSKRIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Xl\_SuH DDIGVFLSKRIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Dr\_RRPSUH ADIGVFLSKRIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Hr\_RBP-Jk LEVGFNSRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Cl\_SuH ADVGQFSSKRIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Dm\_SuH HDIGVFNRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCIASGTRVAFNRLRSQTVSTRYLHVEGNA . . . . .  
Hs\_RBP-L RELGTFNSRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . TD . . . . . LCISGSKVSNRLRSQTVSTRYLSVEDGA . . . . .  
Mm\_RBP-L QELGTFNSRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . TD . . . . . LCISGSKVSNRLRSQTVSTRYLSVEDGA . . . . .  
Dr\_RBP-L QELGTFNSRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . AD . . . . . LCISGSKVSNRLRSQTVSTRYLSVEDGA . . . . .  
PcCSL2 RVIGTFNSRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . LE . . . . . LCINHGSTISFRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
CCIG\_03194 RILGTFNSRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . LE . . . . . LCINHGSTISFRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
UM06280 RLLGTFNSRRKIKVSKPKRQKSLKN . . . . . TE . . . . . LCVNHGVSIFRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
RO3G\_07636 . . . . . LGIFHSKPIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . MD . . . . . LCIHGTTVAFNRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
RO3G\_06481 . . . . . LGTFNSKPIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . ME . . . . . LCIHGTTVAFNRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
RO3G\_11583 . . . . . LGTFNSKPIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . ME . . . . . LCIHGTTVAFNRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
RO3G\_14587 . . . . . LGTFNSKPIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . ME . . . . . LCIHGTTVAFNRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
CNBD3370 . . . . . LGTFNSKPIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . ME . . . . . LCIHGTTVAFNRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
SjCSL2 GSAKG . . . . . TLSDVTNDNVFPIESKDIKLSKPKRQKSLKN . . . . . GE . . . . . LTIHGTVAFNRRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
SPCC1223.13 . . . . . KRIITNDKLRIGVSKPKRQKSLKN . . . . . SD . . . . . LTIHGTVAFNRRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
Pc6518 . . . . . TKYFKLENLRIGVSKPKRQKSLKN . . . . . SD . . . . . MSIRHGDCVCFNRRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
CCIG\_01706 . . . . . TVPGRLPWASFDAPVTI . . . . . SKPKRQKSLKN . . . . . SCILAGGPVSFNRLRSQTVSTRYLGVSSGLD . . . . .  
RO3G\_06953 . . . . . TSANGRVWATPDSAPVTI . . . . . SKPKRQKSLKN . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .  
RO3G\_13784 . . . . . DALFYNSPISISKPKRQKSLKN . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .  
RO3G\_08863 . . . . . DESPLATLKPITISKPKRQKSLKN . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .  
UM05862 . . . . . SSFASFLKPIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .  
SjCSL1 . . . . . SPILKK . . . . . VLRSRPLKLAWSFESAPVTI . . . . . SKPKRQKSLKN . . . . . TAKP . . . . . R . . . . . CE . . . . . LNVQKMSIS . . . . .  
SPCC736.08 . . . . . SSD . . . . . DVLAQVTPKPIKVKSKPKRQKSLKN . . . . . GSKN . . . . . RVSN . . . . . STLMSGAI . . . . .  
CNA01890 . . . . . NVNNQLSHLVTSSISISKPKRQKSLKN . . . . . GSKL . . . . . KISN . . . . . ITRLSGVS . . . . .  
TQDFA . . . . . ITQATTEQPLGSLGPIRISKPKRQKSLKN . . . . . TSKT . . . . . RSLA . . . . . ICFFRDSV . . . . .



**Obr. 2.6** Evoluční konzervovanost DNA vazebné oblasti. Srovnání funkčních a vybraných metazoálních sekvencí proteinů CSL ukazuje vysokou konzervovanost v oblasti nutné pro vazbu DNA. Absolutně konzervované aminokyselinové zbytky jsou zobrazeny inverzně, pozice s vysokou podobností jsou orámované. Barvy reprezentují jednotlivé domény – zelená pro NTD, červená pro BTD a modrá pro  $\beta$ C4 linker spojující všechny tři domény proteinů CSL. Červený trojúhelník pod srovnáním vyznačuje aminokyselinu potřebnou pro sekvencně specifickou vazbu na DNA, modrý trojúhelník ukazuje na místa

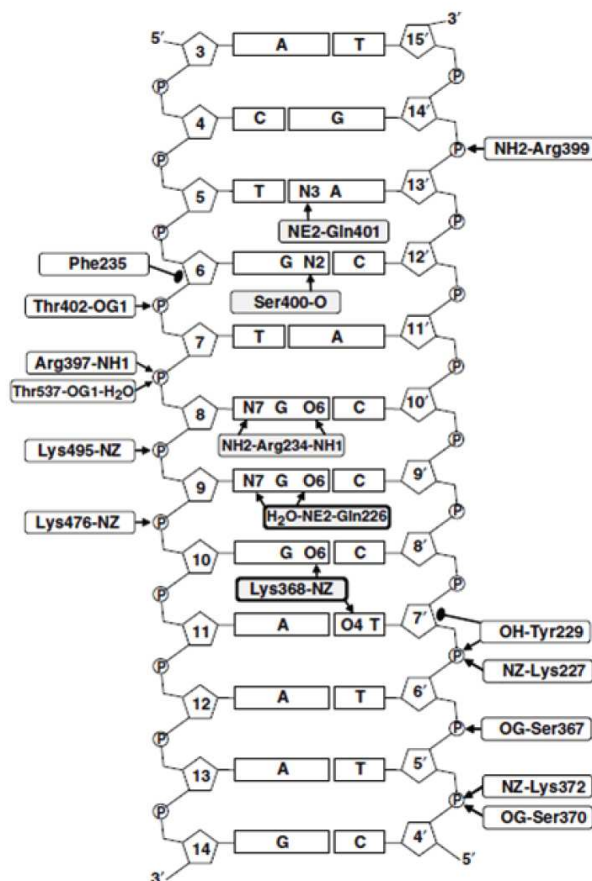
kontaktů s cukr-fosfátovou kostrou DNA. Číslování aminokyselin a sekundární struktury zobrazené nad srovnáním odpovídají Lag-1 *C. elegans* (Kovall a Hendrickson, 2004). Na obrázku je uvedena pouze vybraná část srovnání, úseky dlouhých inzertů jsou vynechány (označeno „/“) (převzato z Převorovský et al., 2007).

## 2.4. DNA vazebné vlastnosti metazoálních proteinů CSL

Proteiny CSL byly původně identifikovány jako faktory vážící imunoglobulinovou rekombinační signální sekvenci J $\kappa$  (recombination signal binding protein, RBP-J $\kappa$ ), kde rozeznávaly vazebný motiv obsahující heptamer CACTGTG a nonamer GGTTTTTGT oddělený sekvencí 12-23 bp (Hamaguchi et al., 1989). Jiná studie prokázala, že se savčí protein rodiny CSL váže na promotor C v genomu viru Epstein-Barrové (C-promoter binding factor 1, CBF1) a že CBF1 a RBP-J $\kappa$  je tentýž protein (Henkel et al., 1994). Výše uvedený vazebný motiv CACTGTG se ukázal být artefaktem vzniklým zavedením BamHI místa vedle heptamerové sekvence (Henkel et al., 1994; Matsunami et al., 1989; Tun et al., 1994) a další analýzy odhalily kanonický CSL-vazebný motiv GTG<sup>G</sup>/<sub>A</sub>GAA spolu s dalšími motivy jako TGGGAAA, TGGGAAAGAA, CATGGGAAA (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). Paralog RBP-L zřejmě rozeznává stejné sekvence jako CBF1/RBP-J $\kappa$  (Beres et al., 2006). Nové vazebné místo složené z několika motivů a rozeznávané trimerním komplexem PTF1, kterého se účastní buď CBF1/RBP-J $\kappa$  nebo RBP-L v Notch-nezávislém modu, bylo objeveno v promotorech několika genů kódujících trávicí enzymy a faktory regulující expresi genů při vývoji pankreatu (Beres et al., 2006; Miyatsuka et al., 2007).

Bylo prokázáno, že myší RBP-J $\kappa$  se na DNA váže jako monomer (Chung et al., 1994), ale zdá se, že význam má také kooperativní vazba proteinů CSL s jinými faktory, a tudíž záleží na přesné architektuře cílových vazebných sekvencí (Miyatsuka et al., 2007). Kontakt s DNA zprostředkují pouze domény NTD a BTD proteinů CSL. Obě společně spolu s mezidoménovým spojením vytváří rozsáhlý elektropozitivní a vysoce konzervovaný povrch reagující s DNA. Proteiny CSL rozeznávají responzivní vazebné místo díky kombinaci kontaktu s velkým a malým žlábkem DNA, čímž je dosaženo vazby s vysokou specifitou. NTD kontaktuje velký žlábek DNA skrze aminokyselinové zbytky Arg234, Lys368 a Gln226 a zajišťuje specifitu k části 5'-G<sub>8</sub>GGA-3' vazebného elementu. BTD je spojena s malým

žlábkem DNA přes Gln401 a karbonylovou skupinu Ser400, které zprostředkovávají vazbu s nukleotidovým párem na pozici 5-13' a s guanosem na pozici 6 v DNA. Nespecifické kontakty s cukr-fosfátovou kostrou DNA v úseku cca 11 bp zajišťuje BTD (Obr. 2.7 a Kovall a Hendrickson, 2004).



**Obr. 2.7** Schematické zobrazení všech protein-DNA interakcí v komplexu CSL-DNA. Specifické interakce s nukleotidovými bázemi DNA jsou v rámečku s šedým pozadím, nespecifické interakce v rámečku s bílým pozadím. Vodíkové nebo solné můstky označeny šipkou, van der Waalsovy interakce kolečkem (převzato z Kovall a Hendrickson, 2004).

### 2.4.1. Cílové geny metazoálních proteinů CSL

Většina cílových genů proteinů CSL byla identifikována v souvislosti s Notch dráhou. Mezi primární cíle patří proteinové rodiny HES (Hairy/Enhancer of Split) a HERP (HES-related repressor protein), což jsou bazické represory transkripce typu helix-loop-helix (bHLH). Jejich exprese je spuštěna interakcí intracelulární části receptoru Notch s proteinem CSL navázaným na promotoru těchto represorů, které následně negativně ovlivňují expresi svých cílových genů, například tkáňově

specifických transkripčních faktorů (Bailey a Posakony, 1995; Chen et al., 1997; Ishibashi et al., 1995; Iso et al., 2002; Lecourtois a Schweisguth, 1995; Ohsako et al., 1994; Van Doren et al., 1994). Další cíle Notch dráhy byly určeny na základě změny hladiny exprese při regulaci Notch dráhou nebo na základě vazby proteinů CSL do jejich promotorových sekvencí. Jsou to například MHC třídy I, interleukin 6,  $\beta$ -globin, ERBB2, NK- $\kappa$ B2, cyklin D, NRARP a další (Chen, Fischer, et al., 1997; Kannabiran et al., 1997; Lam a Bresnick, 1998; Lamar et al., 2001; Oswald et al., 1998, Plaisance et al., 1997; Ronchini a Capobianco, 2001; Shirakata et al., 1996)

## **2.5. Proteiny CSL *Schizosaccharomyces pombe***

*Schizosaccharomyces pombe*, jednobuněčná poltivá kvasinka patřící do kmene Ascomycota, je využívána jako modelový organismus eukaryotického systému. Jelikož náleží do vývojově starší skupiny kvasinek, které mají blíže ke společnému předku hub a živočichů, a je na základě molekulárních charakteristik bližší vyšším eukaryotům více než vzdáleně příbuzná pučící kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, slouží ke studiu buněčného cyklu a jeho regulace, buněčného růstu a polarity, replikace a oprav DNA, chromatinové architektury a dynamiky a ke studiu genové exprese na úrovni jediné buňky (Egel, 2004). Genom velký 12,5 Mbp nesoucí přibližně 5000 genů byl kompletně sekvenován (Wood et al., 2002).

V *S. pombe* byly nalezeny dva paralogy proteinů CSL – Cbf11 (SPCC736.08) z třídy F1 a Cbf12 (SPCC1223.13) řazený k třídě F2 (Převorovský et al., 2007). Jedná se o neesenční transkripční faktory difuzně lokalizované v jádře buňky, ale vyloučené z jadérka. Cbf11 je konstitutivně exprimován ve všech fázích růstu buněčné kultury narozdíl od Cbf12, jehož exprese vzrůstá při vstupu do stacionární fáze a v meióze (Převorovský et al., 2009). Exprese Cbf12 je zvýšená také při působení oxidativního stresu (Chen et al., 2008) nebo ionizujícího záření (Watson et al., 2004). Buňky s delecí *cbf11*<sup>+</sup> ( $\Delta cbf11$  a  $\Delta cbf11\Delta cbf12$  kmen) vykazují zhoršený růst v 19°C (tzv. chladovou senzitivitu) oproti buňkám s delecí *cbf12*<sup>+</sup> a WT buňkám. Pomocí konstrukce růstových křivek delečních mutantů bylo zjištěno, že zatímco  $\Delta cbf12$  buňky rostou při normální kultivační teplotě 30°C srovnatelně jako kontrolní WT buňky,  $\Delta cbf11$  rostou pomaleji. Tento fenotyp byl potencován delecí *cbf12*<sup>+</sup>, protože buňky  $\Delta cbf11\Delta cbf12$  vykazovaly ještě další zhoršení růstu oproti  $\Delta cbf11$ . Tento syntetický efekt naznačuje možnou interakci mezi proteiny Cbf11 a Cbf12. Růstové

defekty v  $\Delta cbf11\Delta cbf12$  buňkách mohou být suprimovány nadprodukcí  $cbf11^+$  z plasmidu. Nadprodukce  $cbf12^+$  z plasmidu se naproti tomu zdá být pro tyto buňky toxická. Delece  $cbf11^+$  je spojena kromě růstových defektů také se změnou morfologií kolonií. U buněk s touto delecí (opět kmeny  $\Delta cbf11$  a  $\Delta cbf11\Delta cbf12$ ) byl pozorován „shiny“ fenotyp, který je způsoben nadprodukcí extracelulárního materiálu obsahujícího hydrofóbní a světlo odrážející/lámající složky na povrch makrokolonie při růstu na bohatém médiu. Také tento fenotyp může být zvrácen mírnou nadprodukcí  $cbf11^+$  při expresi z plasmidu. Dále vykazovaly kolonie těchto buněk nepravidelný tvar s tmavě červenými sektory při růstu na médiu obohaceném phloxinem B a na okraji kolonií byl pozorován „shiny“ efekt. V *S. pombe* je tmavě červené zbarvení při použití phloxinu B typické pro diploidní kolonie (Forsburg, 2003). Sektorování u buněk  $\Delta cbf11\Delta cbf12$  vymizelo při nadprodukcí  $cbf11^+$  z plasmidu. Běžně se v exponenciálně rostoucích kulturách poltivých kvasinek buňky vyskytují v G<sub>2</sub> fázi a při zjišťování obsahu DNA průtokovou cytometrií (FACS, fluorescence-activated cell sorting) je detekován pro haploidní buňky jeden vrchol 2C a pro diploidní buňky jeden vrchol 4C (Sazer a Sherwood, 1990). Pomocí FACS bylo zjištěno, že v kulturách buněk  $\Delta cbf11$  a  $\Delta cbf11\Delta cbf12$  se objevuje frakce buněk s obsahem DNA větším než 2C. Kultivací buněk  $\Delta cbf11\Delta cbf12$  zvláště ze světlého a tmavého sektoru kolonie při barvení phloxinem B se ukázalo, že posun k vyššímu obsahu DNA je stabilní. Obsah DNA buněk v kultuře  $\Delta cbf12$  odpovídal WT buňkám, ale při nadprodukcí proteinu Cbf12 ve WT kmeni byla také detekována frakce pravděpodobně diploidních buněk, takže se zdá, že oba paralogy antagonisticky ovlivňují udržování ploidie (zpracováno dle Převorovský et al., 2009).

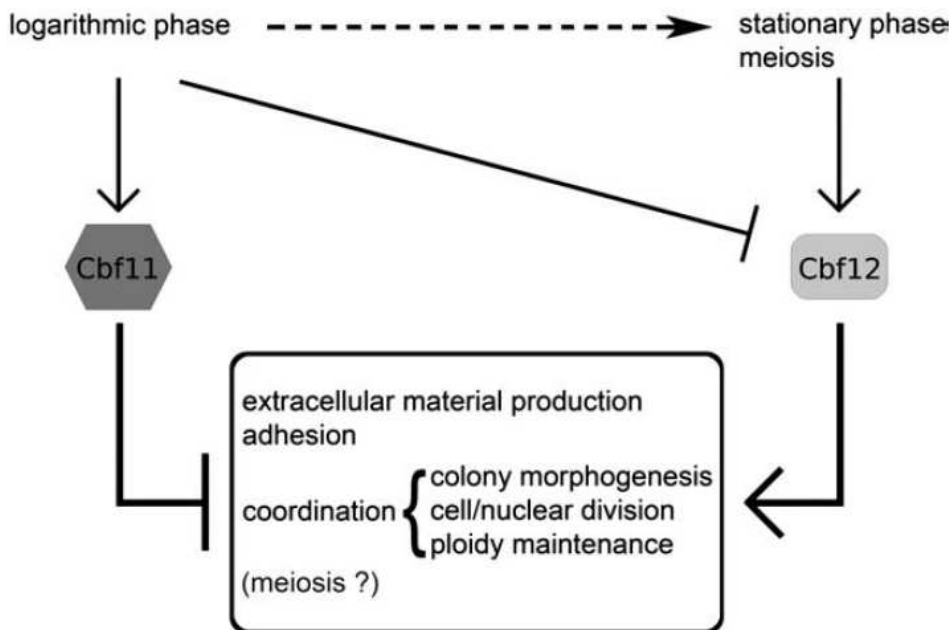
Buňky s delecí  $cbf12^+$  (kmeny  $\Delta cbf12$  a  $\Delta cbf11\Delta cbf12$ ) vykazují sníženou adhezi k agarovým plotnám, která může být obnovena nadprodukcí  $cbf12^+$  z plasmidu. Zbytková adheze kmene  $\Delta cbf11\Delta cbf12$  je překvapivě kompletně ztracena při nadprodukcí  $cbf11^+$  z plasmidu. U kmene  $\Delta cbf11$  byla dokonce pozorována větší adheze než u kontrolního WT kmene a toto zvýšení bylo opět potlačeno zavedením  $cbf11^+$ . Při kultivaci v tekutých médiích byla u kmene  $\Delta cbf11$  zjištěna flokulace ve stacionární fázi růstu kultury. Flokulace je makroskopicky viditelná formace buněčných agregátů (Straver et al., 1993) a za fyziologických podmínek je to stresová odpověď s cílem uniknout nepříznivým podmínkám jako je například vyčerpání živin, k němuž dochází ve stacionární fázi růstu (Verstrepen a Klis, 2006). Nadprodukcí  $cbf11^+$  byla flokulace kmene  $\Delta cbf11$  opět zrušena. Pokud byl

nadprodukován *cbf12*<sup>+</sup> ve WT kmeni, flokulace se objevila už v logaritmické fázi růstu kultury a agregace buněk byla silně potencována expresí Cbf12 v *Δcbf11* kmeni. Zatímco v *S. cerevisiae* je flokulace většinou závislá na manóze (Miki et al., 1982), pro *S. pombe* bylo zjištěno, že flokulace je zprostředkována galaktozylovými zbytky na povrchu buňky (Tanaka et al., 1999). Bylo potvrzeno, že flokulace zprostředkovaná Cbf12 je také galaktóza-dependentního typu. Z uvedeného vyplývá, že adheze je také ovlivňována oběma proteiny CSL *S. pombe*, a to protichůdným působením. Protein Cbf11 se chová jako negativní a Cbf12 jako pozitivní regulátor buněčné adheze (zpracováno dle Převorovský et al., 2009).

Delece *cbf11*<sup>+</sup> nebo nadprodukce *cbf12*<sup>+</sup> vede u menší frakce buněk k pleiotropním defektům způsobeným chybnou regulací buněčného a/nebo jaderného dělení. Žádné aberace nebyly pozorovány u kontrolních WT buněk a jen velmi málo u buněk *Δcbf12* kmene. Mezi nalezené aberace patří velká heterogenita ve velikosti a tvaru buňky, septační defekty (tzv. sep fenotyp; Grallert et al., 1999) zahrnující tvorbu vícečetných sept v jedné buňce, mutantní strukturu septa, neoddělení dceřině buňky po vytvoření septa nebo pseudohyfální (často multipolární) růst. Delece *cbf11*<sup>+</sup> je spojena s tzv. cut fenotypem (cell untimely torn; Hirano et al., 1986; Saitoh et al., 1996), kdy nedostatečná koordinace mezi jaderným a buněčným dělením vede k tomu, že se nedokončí M fáze buněčného cyklu a septum se vytvoří předčasně skrze jádro, které se ještě zcela nerozdělilo. Ukazuje se, že také pro koordinaci těchto procesů je důležitá správná rovnováha mezi proteiny CSL (zpracováno dle Převorovský et al., 2009). Shrnutí procesů regulovaných pomocí proteinů Cbf11 a Cbf12 je uvedeno na Obr. 2.8.

Proteiny CSL se navzájem odlišují i při vazbě na DNA – Cbf11 je schopný vysoce specificky a přímo vázat kanonický CSL-responzivní element podobně jako metazoální proteiny rodiny CSL, zato pro Cbf12 vazba na DNA pozorována nebyla (Převorovský et al., 2009).





**Obr. 2.8** Model fungování proteinů CSL v *S. pombe*. V logaritmické fázi růstu vegetativních buněk je Cbf11 navázán na promotory CSL-responzivních genů obsahující  $GTG^G/A$ GAA element a reprimuje jejich expresi. Expresce Cbf12 je za těchto podmínek na nízké úrovni a nemůže překonat efekt Cbf11. Při vstupu do stacionární fáze růstu buněk nebo během meiózy stoupá hladina proteinu Cbf12 a ten aktivuje cílové proteiny například zrušením efektu Cbf11 nebo jeho odstraněním z příslušných promotorů. Cílové geny jsou pravděpodobně organizovány do několika skupin, které se liší ve schopnosti reagovat na Cbf11/Cbf12, a jsou zahrnuty v procesech jako produkce extracelulárního materiálu, buněčná adheze, udržování morfologie kolonií, koordinace jaderného a buněčného dělení, udržování ploidie a meióza. Aby nedošlo k narušení výše zmíněných procesů, je důležité udržování rovnováhy mezi aktivitami proteinů Cbf11 a Cbf12 (převzato z Převorovský et al., 2009).

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Použité mikroorganismy a jejich kultivace

#### 3.1.1. *Escherichia coli*

Kmen DH5 $\alpha$  F  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1*  
*hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\lambda$*

#### 3.1.2. *Schizosaccharomyces pombe*

Tab. 3.1 Použité kmeny *S. pombe*.

Kmen	Genotyp	Zdroj
PN559	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>	(Decottignies et al., 2003)
CBF11 KO	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 <math>\Delta</math>cbf11::kan<sup>r</sup></i>	(Decottignies et al., 2003)
MP09	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 <math>\Delta</math>cbf11::kan<sup>r</sup> <math>\Delta</math>cbf12::pCloneNatI<sup>-</sup></i>	(Převorovský et al., 2009)
MP26	<i>h<sup>+</sup> cbf11-3HA::natMX6</i>	Dr. Převorovský, nepublikováno
JB644B	<i>h<sup>-</sup> yox1-3HA::kanR</i>	(Aligianni et al., 2009)

#### 3.1.3. Kultivace mikroorganismů

Kultivační média připravovat z deionizované vody upravené v přístroji Watrex filtry Rovapur 100 a Ultrapur (dále označována jako MP H<sub>2</sub>O) a sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C.

V případě kultivace organismů na pevných médiích zaočkovat Petriho misky s příslušným médiem mikrobiologickou kličkou nebo sterilním párátkem a uložit do termostatu. Běžná kultivační teplota je pro *E. coli* 37°C a pro *S. pombe* 30°C. Narostlé kultury lze skladovat v lednici při 10°C po dobu maximálně tří týdnů, poté je třeba kulturu přenést na novou plotnu. Jeden klon buněk lze pasážovat maximálně dva měsíce, pak je nutné rozmrazit nový klon z glycerolové konzervy uchovávané v mrazicím boxu -80°C (viz dále).

Kultivace buněk v tekutých médiích provádět ve sterilních Erlenmayerových baňkách, které lze naplnit médiem do 1/10 až 1/5 celkového objemu baňky. Po

zaočkování mikroorganismy aerobně kultivovat na rotační třepačce při otáčkách 180-220 rpm v příslušné kultivační teplotě. Nárůst kultury sledovat na spektrofotometru (Specol 20,  $\lambda = 595$  nm) proti sterilnímu médiu jako blanku. Při optické denzitě větší než 0,5 je potřeba vzorek ředit, protože měření mimo lineární rozsah spektrofotometru by bylo zkresleno chybou.

#### **Bakteriální kultivační média:**

**LB**            10g/l    Universalpepton M66 (Merck)  
                  5g/l     yeast extract (Formedium Ltd)  
                  5g/l     NaCl (Penta)

**2x LB**        20g/l    Universalpepton M66 (Merck)  
(superLB)    10g/l    yeast extract (Formedium Ltd)  
                  5g/l     NaCl (Penta)

**ŽA**            40g/l    Živný agar č. 2 (Imuna)

V případě potřeby přidat do médií (při cca 55°C) selekční antibiotikum ampicilin (Biotika) na výslednou koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **Média pro *S. pombe*:**

**YES**           0,5%    yeast extract (Formedium Ltd)  
                  3%      glukóza (Sigma)  
                  0,025% SP supplements (Formedium Ltd)

Glukózu i yeast extract klávkovat odděleně a poté smíchat na uvedené výsledné koncentrace. Po zchlazení přidat ampicilin (Biotika) na výslednou koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Pevné médium připravit přidáním 2% agaru. Pro selekci přidat antibiotika G418 (100  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) a/nebo ClonNAT (90  $\mu\text{g/ml}$ , Werner Bioagents).

**MB**            11,3g/l MB broth without AA (Formedium)

Médium po klávkování doplnit aminokyselinami L-adenin, L-leucin a L-uracilem na výslednou koncentraci 0,2 mg/ml a thiaminem na výslednou

koncentraci 5 µg/ml podle potřeby. Ampicilin přidat na výslednou koncentraci 100 µg/ml. Pevné médium připravit přidáním 3% agaru.

#### **Glycerolové konzervy *S. pombe***

- Suspenzi buněk ve vhodném typu tekutého média kultivovat 2 dny na rotační třepačce.
- K alikvotu buněčné suspenze přidat 60% sterilní glycerol v poměru 1:1 a šetrně promíchat.
- Inkubovat 20 min. na ledu, poté přemístit do mrazáku -80°C.
- Při výsevu z glycerolových konzerv seškrábnout sterilním párátkem vrstvu zmrzlých buněk a rozetřít na Petriho misku s vhodným typem pevného média. Pracovat rychle a nenechat konzervu rozmraznout.
- Pokud se kulturu nedaří oživit, mohlo dojít k sedimentaci buněk v konzervě. Je tedy nutné konzervu rozmrazit a promíchat.
- Testovat fenotyp narostlých buněk na selekčním médiu.

#### **Roztoky:**

**60% (v/v) glycerol (Sigma)**

### **3.1.4. Transformace**

#### **Transformace *E. coli* elektroporací**

- Do 0,5 ml mikrozkušavky s 0,5–5 µl roztoku plasmidové DNA v MP H<sub>2</sub>O/TE pufru nebo s ligační směsí (obsahujícím 5 pg-0,5 µg DNA) přidat na ledu 30-50 µl elektrokompetentních buněk *E. coli*.
- Obsah mikrozkušavky převést na dno vychlazené 0,2 cm elektroporační kyvety (Biorad), na generátoru pulzu přístroje Gene Pulser Apparatus (Biorad) nastavit hodnoty kapacitance 25 µF, napětí 2,5 kV a odpor 200 Ω a po vložení kyvety do přístroje aplikovat puls, který v optimálním případě dosáhne 4-5 ms.
- Obsah kyvety okamžitě resuspendovat do 1 ml LB média s 0,5% glukózou, převést do skleněné zkumavky a kulturu inkubovat 30 min. na třepačce při 37°C a 180 rpm.

- Na plotny s požadovaným typem média obsahujícím příslušné selekční antibiotikum (ampicilin; 100 µg/ml; Biotika) vysít 20 a 200 µl kultury, plotny inkubovat v termostatu při 37°C přes noc.

### **Transformace *S. pombe* lithium acetátovou metodou**

Upraveno podle Bähler et al., 1998; Morita a Takegawa, 2004; Van Driessche et al., 2005

- Recipientní buňky čerstvě narostlé na pevném médiu sterilně seškrábnout z plotny a resuspendovat v reakční směsi obsahující 74 µl 50% PEG-4000 (Sigma), 7 µl 1M LiAc (Sigma) a 7 µl 10x TE.
- 3 µl ssDNA (salmon sperm DNA, 10mg/ml, Sigma) denaturovat při 95°C 10 min., poté ochladit na ledu.
- Do reakční směsi přidat 1-5 µl plasmidové DNA (>100 ng) a 2 µl čerstvě zdenaturované ssDNA. Směs promíchat překlápěním a inkubovat při 30°C po dobu 60 min.
- Aplikovat tepelný šok 42°C, 15 min. Poté nechat směs vychladnout při pokojové teplotě.
- Směs vysít na selekční MB plotny s thiaminem a inkubovat v termostatu při 30°C 3-5 dní.

#### **Roztoky:**

**50% (w/v) PEG-4000**

**1M LiAc**

**10x TE**      100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7,5

všechny roztoky sterilizovat autoklávováním

## 3.2. Techniky manipulace s proteiny

### 3.2.1. Příprava buněčných lyzátů *S. pombe*

#### 1. den (odpoledne)

- Sterilně zaočkovat buňky čerstvě narostlé na pevném médiu do tekutého média a aerobně kultivovat ve 30°C při 200 rpm do dosažení optické hustoty 1 (buňky s plasmidy řady pREP42/41, které exprimují proteiny pod promotorem regulovaným thiaminem, vyžadují kultivaci alespoň 19 hodin, aby došlo ke spuštění exprese proteinů).

#### 2. den

- Do lyzačního pufru 1 bezprostředně před použitím přidat 1/500 objemu 1M DTT a 1/100 objemu směsi proteázových inhibitorů FY (Serva), chladit na ledu.
- Kulturu buněk ochladit 5-10 min. na ledu, převést do centrifugační zkumavky (Falcon) a usadit buňky centrifugací (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 5 000 rpm, 3 min., 4°C).
- Sediment buněk resuspendovat v nadbytku STOP pufru<sup>1</sup>, který způsobí metabolickou inhibici buněk, a opět centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 5 000 rpm, 3 min., 4°C).
- Sediment resuspendovat v malém množství STOP pufru, aby se buňky daly převést do 1,5 ml mikrozukavky a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18; 5 000 rpm, 3 min., 4°C).
- Celou proceduru provádět na ledu.
- Kónickou část čisté mikrozukavky naplnit skleněnými kuličkami<sup>2</sup> (425-600 µm, Sigma) a vychladit na ledu.
- Sediment buněk resuspendovat ve 40 µl lyzačního pufru 1 s DTT a FY a převést na kuličky. Rozbít buňky vortexováním 4 min. při 0-4°C.
- Přidat 600 µl lyzačního pufru 1 (+DTT+FY), pipetováním promíchat.
- Sterilní jehlou 26G nahřátou nad kahanem propíchnout dno mikrozukavky a vložit ji do čisté mikrozukavky zbavené víčka. Obě mikrozukavky vložit do

---

<sup>1</sup> Objem volit dle velikosti sedimentu (cca 2-3 ml na 15 ml kultury)

<sup>2</sup> Kuličky ponechat přes noc v 0.1M HCl, potom promýt MP H<sub>2</sub>O do neutrální reakce a osušit.

centrifugační zkumavky a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 1 000 rpm, 1 min., 4°C).

- Původní mikrozukavky s kuličkami odstranit, rozbité buňky převést do nové mikrozukavky a centrifugovat 20 000 g, 20 min., 4°C. Supernatant (tj. buněčný lyzát) odebrat do čisté zkumavky, zamrazit (v tekutém dusíku) a skladovat v -80°C.

#### **Roztoky:**

**Lyzační pufr 1**      25 mM HEPES (pH 7,6), 0,1 mM EDTA (pH 8), 150 mM KCl, 0,1% Triton X100, 25% glycerol, 1M urea; pH 7,6  
pH upravit pomocí KOH, sterilizovat klávováním

**STOP pufr**            150 mM NaCl, 50 mM NaF, 25 mM HEPES, 1 mM NaN<sub>3</sub>;  
pH 8

### **3.2.2. Měření koncentrace proteinu pomocí DC Protein Assay (Bio-Rad)**

- Příprava standardů:

V = 50 µl

	koncentrace BSA	BSA (2 mg/ml) (Bio-Rad)	lyzační pufr 1	MP H <sub>2</sub> O
S1	0,2 mg/ml	5 µl	5 µl	40 µl
S2	0,6 mg/ml	15 µl	5 µl	30 µl
S3	1,2 mg/ml	30 µl	5 µl	15 µl
S4	1,8 mg/ml	45 µl	5 µl	-
blank	-	-	5 µl	45 µl

vzorek buněčného lyzátu 5 µl + 45 µl MP H<sub>2</sub>O

- Na každý ml roztoku A přidat 20 µl roztoku S, pokud jsou ve vzorku detergenty.
- 125 µl směsi A+S přidat k 25 µl standardů a vzorků, vortexovat a krátce centrifugovat.
- Přidat 1 ml roztoku B a ihned vortexovat. Inkubovat 15 min.
- Na spektrofotometru (UV-1650 PC Shimadzu) při  $\lambda = 750$  nm odečítat absorbanci standardů a vzorků.

- Zkonstruovat křivku závislosti absorbance na známé koncentraci BSA standardů, zobrazit lineární regresní přímku a pomocí její rovnice odečíst koncentraci vzorků (při výpočtu zohlednit desetinásobné ředění vzorků).
- Buněčný lyzát naředit na požadovanou koncentraci lyzačním pufrům 1.

### 3.2.3. SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů

Využita aparatura Mini-ProteanIII (Bio-Rad)

- Aparaturu pro nalévání gelů sestavit podle návodu výrobce.
- Připravit separační polyakrylamidový gel požadované koncentrace (pro jeden gel 0,75 mm):

<b>výsledná koncentrace akrylamidového gelu</b>	<b>AA/BIS (ml)</b>	<b>4xTris-HCl/SDS pH 8,8 (ml)</b>	<b>MP H<sub>2</sub>O (ml)</b>
7,5%	1,25	1,25	2,5
10%	1,67	1,25	2,08
12%	2,0	1,25	1,75

- Před nanesením přidat 16,5  $\mu$ l čerstvě rozpuštěného 10% (w/v) APS (persulfát amonný, Sigma) a 3,4  $\mu$ l TEMED (Bio-Rad). Rychle plnit mezi skla aparatury a převrstvit isopropanolem. Nechat polymerovat.
- Odstranit vrstvu isopropanolu, připravit zaostřovací gel dle rozpisu:

<b>AA/BIS (ml)</b>	<b>4x Tris-HCl/SDS pH 6,8 (ml)</b>	<b>MP H<sub>2</sub>O (ml)</b>
0,325	0,625	1,55

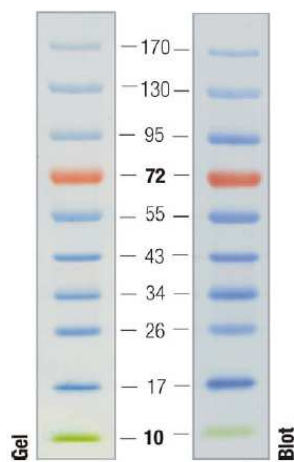
- Před nanesením doplnit 12,5  $\mu$ l 10% (w/v) APS a 2,5  $\mu$ l TEMED. Navrstvit na separační gel a vsadit hřebínek modelující jamky.
- Po polymeraci hřebínek odstranit, skla s gelem sestavit do aparatury pro vlastní vertikální elektroforézu a zalít 1x SDS elektrodočím pufrům.
- Proteinový vzorek (buněčný lyzát) smíchat s 1M DTT a Laemmli pufrům (na 10  $\mu$ l vzorku přidat 0,6  $\mu$ l 1M DTT a 2  $\mu$ l 5x Laemmli pufru). Vzorek denaturovat 10 min. v 90°C, centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 10 000 rpm, 2 min., 20°C) a umístit na led (nebo hned nanášet na gel).
- Skleněnou pipetou (Hamilton) nanést vzorky a standard velikosti proteinů (Obr. 3.1) do jamek, aparaturu připojit ke zdroji energie a aplikovat 20 mA na každý gel.



- Po rozdělení proteinů v gelu aparaturu rozebrat a proteiny buď zviditelnit barvením (3.2.4.) nebo přenést na nitrocelulózovou membránu metodou Western blot (3.2.5.).

#### Roztoky:

<b>AA/BIS</b>	30% akrylamid (Sigma), 0,8% (w/v) N,N'-metylenbisakrylamidu (Merck) přefiltrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat v temnu při 4°C (doba skladování je omezena)
<b>4x Tris-HCl/SDS</b>	1,5 M Tris, 0,4% SDS; pH 8,8 pH upravit pomocí HCl přefiltrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat při 4°C
<b>4x Tris-HCl/SDS</b>	0,5 M Tris, 0,4% SDS; pH 6,8 pH upravit pomocí HCl přefiltrovat, skladovat při 4°C
<b>5x SDS pufr</b>	125 mM Tris, 950 mM glycin, 0,5% SDS; pH 8,3



4-20% Tris-glycine SDS-PAGE

**Obr. 3.1** Standard velikostí proteinu (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, kDa, #SM0671, Fermentas).

#### 3.2.4. Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu

- Gel barvit v Petriho misce v barvicím roztoku cca 30 min.
- Přenést gel do odbarvovacího roztoku a za stálého míchání nechat odbarvit přes noc. Několikrát vyměnit odbarvovací roztok.

**Roztoky:**

**Barvicí roztok** 20% methanol, 0,117% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad), 0,051% (v/v) Bismarck Brown R (Sigma-Aldrich), 7% kys. octová v H<sub>2</sub>O

**Odbarvovací roztok** 7% kys. octová, 5% methanol

**3.2.5. Western blot**

Využita aparatura Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad)

- Rozevřený blotovací klip umístit černou stranou do Petriho misky a zalít přenosovým pufrem. Do klipu vložit těsnící houbičku a filtrační papír Whatman 3 mm stejné velikosti. Vše pod hladinou přenosového pufru.
- Polyakrylamidový gel zbavený zaostřovacího gelu umístit na filtrační papír, přiložit navlhčenou nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad) a na membránu vložit další filtrační papír a těsnící houbičku.
- Důkladně vytlačit vzduchové bubliny mezi jednotlivými vrstvami, blotovací klip uzavřít a celý blotovací sendvič vložit do aparatury spolu s vaničkou s ledem. Celý prostor přenosové aparatury zalít vychlazených přenosovým pufrem. Aparaturu umístit na magnetickou míchačku, připojit ke zdroji napětí a za stálého míchání aplikovat 100 V. Zhruba v polovině přenosu (po cca 50 min.) vyměnit vaničku s ledem, aby bylo zajištěno chlazení aparatury.
- Po 1,5-2 hod. aparaturu odpojit od zdroje a rozebrat. Proteiny na membráně detekovat protilátkami (3.2.6.), gel lze obarvit (3.2.4.).

**Roztoky:**

**Přenosový pufr** 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol; pH 8,05

**3.2.6. Imunodetekce proteinů**

- Nitrocelulózovou membránu po western blotu omýt 5 min. v TBS.
- Připravit cca 30 ml 3% odtučněného sušeného mléka (Laktino) v TTBS. Membránu blokovat ve cca 20 ml 3% mléka ve 37°C, 30 min. za stálého míchání. Celý povrch membrány musí být ponořený.
- Po blokování zatavit membránu do folie spolu s 3 ml 3% mléka a příslušnou primární protilátkou ve vhodném ředění (Tab. 3.2). Inkubovat na překlopné třepečce ve 4°C přes noc.

- Primární protilátku slít, membránu opláchnout 3x 5 min. v TTBS.
- Membránu zatavit do folie s 4 ml 3% mléka v TTBS a sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou ve vhodném ředění (Tab. 3.3). Inkubovat 1 hod. při pokojové teplotě na překlopné třepačce.
- Slít sekundární protilátku a membránu opláchnout 3x 5 min. v TTBS. Poté omýt 1x 5 min. v TBS.
- Při použití sekundární protilátky konjugované s peroxidázou ponořit membránu do luminogenních substrátů (Amersham), vložit do folie a luminiscenci zaznamenat na přístroji LAS-4000 (Fujifilm) nebo na fotografický film.
- Při použití sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou, ekvilibrovat membránu 5 min. v AP pufru (cca 0,2 ml pufru na 1 cm<sup>2</sup> membrány). Do čistého AP pufru přidat 1/2000 objemu 1M MgCl<sub>2</sub> a 1/100 objemu substrátů A a B (Bio-Rad), které v přítomnosti alkalické fosfatázy tvoří nerozpustnou sraženinu. Do roztoku vložit membránu a inkubovat ve tmě, dokud není signál na membráně dostatečně intenzivní (alespoň přes noc).

#### Roztoky:

<b>TBS</b>	20 mM Tris, 500 mM NaCl; pH 7,5 pH upravit pomocí HCl
<b>TTBS</b>	TBS s 0,05% Tween 20 (Serva)
<b>AP pufr</b>	100 mM Tris-HCl; pH 9,5
<b>substrát A</b>	30 mg NBT (nitroblue tetrazolium) v 70% DMF (dimethylformamid), 100x koncentrovaný
<b>substrát B</b>	15 mg BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) v H <sub>2</sub> O, 100x koncentrovaný

**Tab. 3.2** Seznam použitých primárních protilátek.

Jméno, specifita	Ředění	Výrobce
His•Tag antibody (myší monoklonální)	1: 2 000	Novagen (70796)
anti HA.11, purifikovaná (myší monoklonální)	1: 1 000	Covance (MMS-101-P)

**Tab. 3.3** Seznam použitých sekundárních protilátek.

Jméno, specifita	Ředění	Výrobce
goat anti-mouse IgG-HRP	1:10 000	Santa Cruz Biotechnology (sc-2031)
goat anti-mouse IgG-AP conjugate, IgG (H+L)	1: 2 000	Bio-Rad (170-6520)

### 3.3. Techniky manipulace s DNA

#### 3.3.1. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí kitu NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel)

- Skalpelem vyříznout fragment DNA z agarózového gelu, přenést do mikrozkušavky a zvážit.
- Na každých 100 mg gelu s fragmentem DNA přidat 200 µl pufru NT (při vyšší hustotě agarózy než 2% přidat 400 µl pufru NT).
- Inkubovat při 50°C dokud se gel nerozpustí (cca 5-10 min.) a během inkubace vzorek každé 2-3 min. krátce vortexovat.
- Kolonku z kitu umístit do sběrací 2 ml zkumavky, převést vzorek a centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C). Roztok ze sběrné zkumavky odstranit a opět umístit kolonku.
- Přidat 600 µl pufru NT3 a opět centrifugovat jako v předchozím bodě a odstranit roztok ze sběrné zkumavky.
- Kolonku umístit do sběrací zkumavky a centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 2 min., 20°C), aby se kvantitativně odstranil ethanol obsažený v pufru NT3.
- Kolonku přemístit do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, nanést 25-50 µl elučního pufru NE (nebo MP H<sub>2</sub>O) předeřátého na 70°C a inkubovat 1 min. při pokojové teplotě. Centrifugovat (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 1 min., 20°C).

#### 3.3.2. Izolace plasmidové DNA z *E. coli* alkalickou metodou

Upraveno podle Birnboim a Doly, 1979

##### 1. den (odpoledne)

- Zaočkovat klon *E. coli* nesoucí příslušný plasmid na plotnu s vhodným typem média (ŽA) a selekčním antibiotikem (ampicilin, 100 µg/ml, Biotika). Kultivovat ve 37°C přes noc.

##### 2. den (odpoledne)

- Jednou dobře oddělenou bakteriální kolonií zaočkovat 10-50 ml tekutého média (LB médium) s 100 µg/ml ampicilinu (Biotika) v 50-250 ml Erlenmayerově baňce. Aerobně kultivovat na třepačce ve 37°C při 180 rpm přes noc (min. 16 hod.).

### 3. den (ráno)

- Kulturu ochladit na ledu 5-10 min., převést do centrifugační zkumavky (50 ml Falcon) a usadit buňky centrifugací (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 4 400 rpm, 10 min., 4°C).
- Sediment dokonale resuspendovat ve 3 ml (pro miniprep 300 µl)<sup>3</sup> vychlazeného roztoku I a zvortexovat.
- Zkumavku vyjmout z ledové lázně, přidat 6 ml (600 µl) zahřátého roztoku II a promíchat. Inkubovat 5 min. při pokojové teplotě. Buňky zlyžují, suspenze se projasní a výrazně stoupne viskozita.
- Zkumavku opět umístit do ledové lázně, přidat 4,5 ml (450 µl) vychlazeného roztoku III, promíchat a inkubovat v ledu 15 min. V roztoku se utvoří bílá sraženina.
- Směs převést do polypropylénových zkumavek (lehce promíchat) a usadit sraženinu centrifugací (Jouan MR22i, rotor AM 38.15; 13 000 rpm, 20 min., 4°C).
- Supernatant převést do kalibrované zkumavky (15 ml Falcon), odečíst objem supernatantu a dokonale smísit s 0,6 objemu isopropanolu, ihned centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 4 000 rpm, 6 min., 20°C).
- Supernatant slít, sediment krátce osušit a rozpustit v 300 µl MP H<sub>2</sub>O, převést do 1,5 ml mikrozukavky a odečíst objem.
- Dokonale smísit se stejným objemem 10M LiCl a inkubovat 20 min. při -80°C.
- Vytvořenou sraženinu usadit centrifugací (Jouan MR 22i, rotor AM 38.15; 15 000 rpm, 5 min., 4°C), supernatant převést do čisté mikrozukavky a odečíst objem.
- Plasmidovou DNA vysrážet stejným objemem 96% ethanolu, inkubovat 20 min. při -80°C.
- Sraženinu usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20; 13 000 rpm, 5 min., 20°C), supernatant slít, sediment 2-3x opláchnout 1 ml 70% ethanolu a vysušit při pokojové teplotě nebo krátce v termostatu při 37°C.
- Sediment rozpustit podle velikosti v 100-200 µl MP H<sub>2</sub>O nebo TE pufru (pH 8,0). Množství a kvalitu izolace plasmidové DNA určit elektroforeticky.

---

<sup>3</sup> objem roztoku I volit podle výchozího objemu kultury s přihlédnutím k nárůstu kultury následovně: 0,5-1 ml při 10ml kultury, 2-4 ml při 50ml kultury, 4-8 ml při 200ml kultury. Roztoku II přidat 2x a roztoku III 1,5x více než roztoku I.

**Roztoky:**

<b>roztok I (TEG)</b>	25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza
<b>roztok II</b>	1% SDS, 0,2M NaOH
<b>roztok III</b>	3M octan draselný (KAc), 2M kys. octová; pH 4,8-5,4

**3.3.3. Izolace chromozomální DNA z *S. pombe***

Upraveno podle Hoffman a Winston, 1987

**1. den (odpoledne)**

- Buňky čerstvě narostlé na pevném médiu sterilně zaočkovat do 10-20 ml tekutého média a aerobně kultivovat ve 30°C při 200 rpm přes noc (do dosažení optické hustoty 3).

**2.den**

- Pracovat na ledu.
- Kulturu převést do centrifugační zkumavky a buňky usadit centrifugací (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 3 000 rpm, 5 min., 4°C). Slít supernatant, buňky resuspendovat v 0,5 ml MP H<sub>2</sub>O a převést do mikrozukavky.
- Centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 5 000 rpm, 3 min., 4°C), supernatant slít a zkumavku krátce vortexovat, aby se pelet resuspendoval ve zbývající tekutině.
- Přidat 0,2 ml lyzačního roztoku a 0,2 ml směsi pufovaného fenolu: chloroformu: isoamylalkoholu v poměru 25:24:1 (pH 7,9) a 0,3 g skleněných kuliček<sup>4</sup> (425-600 µm, Sigma).
- Vortexovat 3-4 min., poté přidat 0,2 ml TE (pH 8,0).
- Centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 15 000 rpm, 5 min., 4°C), odebrat horní vodnou fázi do čisté mikrozukavky. Přidat 1 ml 96% ethanolu, promíchat převrácením zkumavky a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 15 000 rpm, 5 min., 4°C).
- Sediment resuspendovat v 0,4 ml TE a přidat 3 µl RNázy A (10 mg/ml). Inkubovat ve 37°C, 5 min.

---

<sup>4</sup> Kuličky ponechat přes noc v 0.1M HCl, potom promýt MP H<sub>2</sub>O do neutrální reakce a osušit.

- Přidat 10  $\mu\text{l}$  4M acetátu amonného a 1 ml 96% ethanolu, promíchat překlápěním, nechat precipitovat 1 hod. při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 15 000 rpm, 5 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ), sediment opláchnout 1 ml 70% ethanolu a nakonec resuspendovat do 50  $\mu\text{l}$  MP  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Roztoky:**

**lyzační roztok**                      2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA

**Fenol: chloroform: isoamylalkohol**                      25: 24: 1; pH 7,9

**4M acetát amonný**

### 3.3.4. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- V mikrozkušavce připravit reakční směs:

vzorek DNA v $\text{H}_2\text{O}/\text{TE}$ pufru	x $\mu\text{l}$ (0,1-4 $\mu\text{g}$ DNA)
10x restrikční pufr	2,0 $\mu\text{l}$
deionizovaná MP $\text{H}_2\text{O}$	doplňěk do celkového objemu reakce 20 $\mu\text{l}$
restrikční endonukleáza	1-10 U enzymu/ $\mu\text{g}$ DNA

Typ restrikčního pufru, přidání BSA, teplota a doba štěpení se řídí použitými enzymy (Tab. 3.4) a doporučením výrobce.

- Inkubovat 1-4 hod. při optimální teplotě štěpení. Reakci zastavit přidáním vzorkového pufru, ochlazením směsi na  $-20^{\circ}\text{C}$ , tepelnou inaktivací 20 min. při  $65^{\circ}\text{C}$  nebo případně DNA přesrážet pomocí glykogenu (Fermentas, výsledná koncentrace 0,05-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 1/10 objemu 3M NaAc a 2,5 objemu 96% etanolu.
- Množství a kvalitu naštěpené DNA ověřit elektroforeticky.

**Tab. 3.4** Použité restrikční endonukleázy.

Enzym	Výrobce
<i>Sal</i> I (10 U/ $\mu\text{l}$ )	Fermentas
<i>Nde</i> I (10 U/ $\mu\text{l}$ )	Fermentas
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu\text{l}$ )	Fermentas

### 3.3.5. Zatupení 3' konců Klenowovým fragmentem

- V mikrozkuhavce připravit reakční směs:

DNA v MP H <sub>2</sub> O/TE pufru	x µl (0,1-4 µg DNA)
10x reakční pufr (Fermentas)	2,0 µl
2mM dNTP mix	0,5 µl (0,05 mM výsledná koncentrace)
MP H <sub>2</sub> O	doplněk do celkového objemu
	reakce 20 µl
Klenowův fragment LC (10 U/µl, Fermentas)	1-5 U enzymu
- Směs inkubovat 10 min. ve 37°C, inaktivovat reakci zahřátím na 70°C 10 min. nebo DNA přesrážet.

### 3.3.6. Ligace tupých konců DNA v roztoku

- Namíchat následující směs:

DNA v MP H <sub>2</sub> O/TE pufru	x µl (10-100 µg DNA)
10x reakční pufr (Fermentas)	2,0 µl
50% PEG-4000	2,0 µl
MP H <sub>2</sub> O	doplněk do celkového objemu
	reakce 20 µl
T4 DNA ligáza (1 U/µl, Fermentas)	1-2 U enzymu
- Ligace tupých konců DNA je méně účinná než ligace fragmentů s komplementárními konci, proto je přidáván PEG, aby se zvýšila pravděpodobnost přiblížení konců DNA.
- Ligační směs umístit do vodní lázně pokojové teploty, uložit do lednice a nechat ligovat přes noc.

### 3.3.7. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

- Elektroforézu DNA vzorků provádět v aparatuře pro horizontální gelovou elektroforézu v pufru 1x TAE. Používaná délka gelů 6-10 cm, tloušťka 3-5 mm, vzdálenost elektrod 14 cm.
- Používat agarózu SeaKem LE (FMC) v koncentracích 0,8-2,5% v závislosti na velikosti dělených DNA fragmentů.



- Do jamek o rozměrech 4-15 x 1 mm nanášet 5–50 µl vzorku (10 ng–2 µg DNA) s 1/5 objemu vzorkového pufru, dále pak 3-10 µl vzorku standardu velikostí fragmentů (Obr. 3.2).
- Používat dělicí napětí v rozmezí 0,3-10 V/cm. DNA barvit v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 5-10 min. Gely fotografovat v procházejícím UV záření s červeným/UV-filtrem (digitální fotoaparát Panasonic DMC-F27). Snímky exponovat 2,5-4 s.
- Pro účely izolace DNA fragmentů z gelu je výhodné zviditelnění fragmentů pomocí krystalové violeti, kdy nehrozí poškození DNA UV zářením. K rozehráté agaróze přidat krystalovou violet (2mg/ml, Invitrogen) v poměru 8 µl na 10 ml agarózy, místo vzorkového pufru použít 6x CVLD (crystal violet loading dye, Invitrogen).

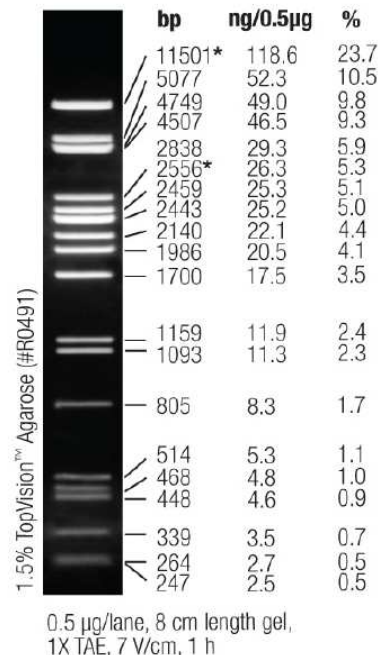
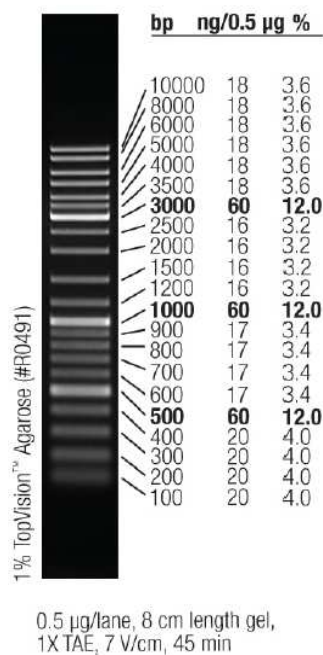
### Roztoky:

**1x TAE** 40 mM Tris, 20mM ledová kyselina octová, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA;  
pH 8,5

**6x vzorkový pufr** 0,06% bromfenolová modř, 60% glycerol, 60 mM EDTA

**GeneRuler™ DNA Ladder Mix**  
(DNA kb, #SM0331, MBI Fermentas)

**λPstI (0,5µg/10µl)**  
(DNA kb, #SM0361, MBI Fermentas)



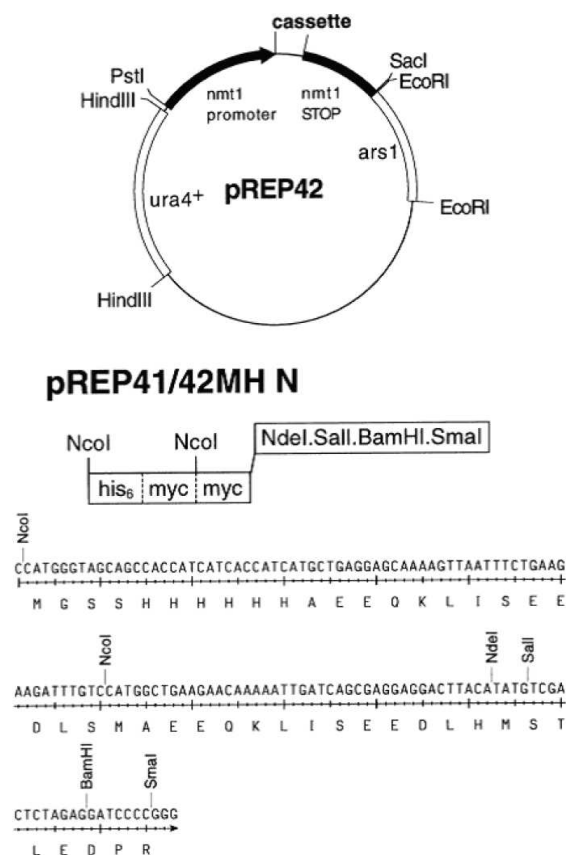
**Obr. 3.2** Standardy velikostí a množství DNA fragmentů.

### 3.3.8. Plasmidy

V této práci byly použity plasmidy uvedené v Tab. 3.5 a Obr. 3.3. Mapy plasmidů byly modifikovány s použitím nástroje Clone Manager 4 (Scientific and Educational Software).

**Tab. 3.5** Přehled použitých plasmidů.

Jméno	Vektor	Velikost v kb (celkově/insert)	Popis	Metoda klonování
	pREP42MHN	8396/-		
pMP32	pREP42MHN	11289/2893	expresse MycHis-Cbf12 v <i>S. pombe</i>	<i>NdeI/BglII</i> do <i>NdeI/BamHI</i>
pJR08	pREP42MHN	10246/1850	expresse MycHis-Cbf11 v <i>S. pombe</i>	<i>NdeI/BamHI</i>
pMaP01	pREP42MHN	10107/1711	expresse MycHis-Cbf12ΔN v <i>S. pombe</i>	vyštěpen fragment <i>SalI/NdeI</i>



**Obr. 3.3** Vektor pREP42MHN použitý pro thiaminem regulovanou expresi N-terminálně značených proteinů *S. pombe* (Craven et al., 1998).

### 3.4. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Příprava buněčných lyzátů pro EMSA experimenty je uvedena v 3.2.1. Používaná celková proteinová koncentrace byla 4,23 mg/ml.

#### 3.4.1. Příprava DNA sond a jejich radioaktivní značení

- Všechny DNA oligonukleotidové sondy (Přílohy, Tab. 8.2) naředit na koncentraci 100  $\mu$ M jako zásobní.
- Smíchat alikvot příslušných dvojic DNA sond v poměru 1:1 na výslednou koncentraci 5  $\mu$ M směsi.
- Dvojice DNA sond zahřát na 90°C, 5 min a nechat vychladnout na pokojovou teplotu (cca 1 hod.). Alikvot směsi dvojřetězcových DNA sond naředit na výslednou koncentraci 0,5  $\mu$ M pro kompetiční experimenty.

- Pro radioaktivní značení DNA sond připravit následující reakční směs:

dsDNA sonda (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
10x pufr A	2 $\mu$ l
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (4 500Ci/mmol, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	6 $\mu$ l
MP H <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l
T4 polynukleotid kináza (10 U/ $\mu$ l, Fermentas)	1 $\mu$ l

- Reakční směs zamíchat a krátce centrifugovat, inkubovat v 37°C, 45 min.
- Doplnit do 100  $\mu$ l ekvilibračním pufrem nebo vodou.
- Purifikovat na kolonce NICK Column (G-50 DNA Grade, Amersham):
  - o Z kolonky slít uchovávací roztok a opláchnout cca 1 ml ekvilibračního pufru.
  - o Odstranit spodní krytku kolonky, ekvilibrovat 3 ml ekvilibračního pufru (pufr musí protéct gelem kolonky).
  - o Nanést celý objem reakční směsi a přidat 400  $\mu$ l ekvilibračního pufru.
  - o Pod kolonku umístit mikrozkuhavku a radioaktivně značenou DNA sondu eluovat z kolonky přidáním 400  $\mu$ l ekvilibračního pufru. Objem eluované sondy je cca 400  $\mu$ l, tj cca 0,5 ng/ $\mu$ l. Uchovávat v -20°C.

#### Roztoky:

**Ekvilibrační pufr** 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 7,5  
pH upravit pomocí HCl

### 3.4.2. TBE polyakrylamidová elektroforéza

- Sestavit aparaturu pro nalévání gelu o velikosti 16 x 20 x 0,3 cm.
- Smíchat 40 ml premixu 5% gelu se 125  $\mu$ l 20% APS a 130  $\mu$ l TEMED. Zamíchat, ihned nalít mezi skla, vsadit hřebínek a nechat polymerovat.
- Připravit vzorky dle Tab. 3.6, zamíchat, krátce centrifugovat a inkubovat 20 min. na ledu (0-4°C).
- Odstranit hřebínek, skla s gelem upevnit do aparatury pro nativní vertikální polyakrylamidovou elektroforézu a rezervoáry naplnit 0,5x TBE pufrém tak, aby byly ponořeny elektrody a naplněny i jamky.
- Do vzorků přidat 1/4 objemu 5x Loading Dye, zamíchat, krátce centrifugovat a celý objem pipetou nanést do jamky.
- Aparaturu připojit ke zdroji napětí a nastavit výkon na 3W. Až se linie bromfenolové modři přiblíží ke spodnímu okraji gelu (po cca 3-4 hod.), odpojit od zdroje a rozebrat aparaturu.
- Gel přenést na filtrační papír, zatavit do folie, zářením exponovat 15-24 hod. Kodak storage phosphor screen (Kodak) a vizualizovat na přístroji Molecular Imager FX pomocí programu Quantity One 4.6.5 (Biorad).

#### Roztoky:

<b>premix 5% gelu</b>	62,5 ml 40% AA/BIS premix (výsledná koncentrace 5%), 25 ml 10x TBE (výsledná koncentrace 0,5x), 25 ml glycerol (výsledná koncentrace 5% ), 387,5 ml MP H <sub>2</sub> O
<b>10x TBE</b>	54 g Tris base, 27,5 g kys.boritá, 20 ml 0,5M EDTA, doplnit do 500 ml MP H <sub>2</sub> O
<b>10x shift pufr</b>	250 mM HEPES (pH 7,6), 340 mM KCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>5x Loading Dye</b>	70% glycerol v TBE, 0,1% bromfenolová modř, 0,1% xylen cyanol

**Tab. 3.6** (A, B) Rozpis reagensií jednotlivých vzorků pro kompetiční EMSA experiment. Uspořádání uvedeno pro jeden libovolný neznačený kompetitor (sloupec 3, 4) v nadbytku 5x a 20x (A), respektive 100x a 500x (B), vůči značené referenční sondě. Sloupec 1 představuje vzorek bez kompetice (100% vazby proteinu na referenční sondu), sloupec 2 slouží pro odečtení pozadí při denzitometrickém vyhodnocování experimentu. Kompetice neznačenou referenční sondou (sloupec 5, 6) je používána jako kontrola (kompetice sama sebou). Uspořádání nekompetičních experimentů dle sloupce 1.

**A** Reakční směs:

Značená referenční sonda (0,5 ng/μl)	4 μl
ssDNA (10 μg/μl)	2 μl
10x shift pufr	3,3 μl

	1	2	3 5x	4 20x	5 referenční sonda, 5x	6 referenční sonda, 20x
reakční směs (μl)	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3
lyzační pufr 1 (μl)	4	24	3	-	3	-
buněčný lyzát (μl)	20	-	20	20	20	20
kompetitor 0,5 μM (μl)	-	-	1	4	1	4

**B** Reakční směs:

Značená referenční sonda (0,5 ng/μl)	4 μl
ssDNA (10 μg/μl)	2 μl
10x shift pufr	4 μl

	1	2	3 100x	4 500x	5 referenční sonda, 100x	6 RBP sonda, 500x
reakční směs (μl)	10	10	10	10	10	10
lyzační pufr 1 (μl)	10	30	8	-	8	-
buněčný lyzát (μl)	20	-	20	20	20	20
kompetitor 5 μM (μl)	-	-	2	10	2	10

## 3.5. ChIP (Chromatinová imunoprecipitace)

### 3.5.1. Fixace a rozbíjení buněk

#### 1. den (odpoledne)

- Sterilně zaočkovat čerstvě narostlé buňky do 50 ml tekutého média, kultivovat ve 30°C přes noc do optické denzity 1 (tzn. 50 OD buněk).

#### 2. den

- V digestoři za stálého míchání přidat 1,35 ml 37% formaldehydu (Sigma, výsledná koncentrace 1%) a fixovat buňky 10 min. při pokojové teplotě.
- Přidat 2,5 ml 2,5M glycinu, inkubovat 10 min. při pokojové teplotě za stálého míchání v digestoři. Kulturu převést do centrifugační zkumavky (Falcon, 50 ml) a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 3 000 rpm, 3 min., 20°C).
- Sediment buněk promýt 40 ml sterilní MP H<sub>2</sub>O. Slít supernatant. Sediment lze v tomto bodě zamrazit v tekutém dusíku a skladovat při -80°C.
- Dále pracovat na ledu. Resuspendovat sediment v 1 ml vychlazené MP H<sub>2</sub>O, převést do menší zkumavky (Falcon, 15 ml). Centrifugovat (Jouan MR22i, rotor SWM 180.5; 2 000 rpm, 4 min., 4°C), slít supernatant.
- Pelet resuspendovat v 3 ml vychlazeného lyzačního pufru 2 s 1/100 objemu 1M DTT a 1/100 objemu směsi inhibitorů FY (Serva). Suspenzi převést do vychlazeného válce přístroje French press (Thermo Electron Corporation) a tlakem 18 000 psi buňky rozbít.
- Jímaný buněčný lyzát centrifugovat 20 000 g, 5 min., 4°C. Supernatant slít, pelet omýt 600 µl lyzačního pufru 2 s DTT a FY a znovu centrifugovat. Pokračovat sonikací (3.5.2.).

#### Roztoky:

**Lyzační pufr 2**      50 mM HEPES (pH 7,6), 1mM EDTA (pH 8), 150 mM NaCl,  
1% triton X-100, 0,1% NaDoc; pH 7,6  
pH upravit pomocí NaOH

### 3.5.2. Sonikace a analýza chromatinu

- Sediment resuspendovat ve 4 ml vychlazeného lyzačního pufru 2 s DTT a FY. Vzorek sonikovat na sonikátoru (Bandelin Sonopuls, 40% amplituda) při 4°C ve 30 s intervalech s 1 min. chlazení na ledu mezi intervaly. Dobu sonikování je

nezbytné zjistit empiricky z odběrů během sonikace a jejich následné elektroforetické analýzy (viz níže). Průbu sonikátoru umístit do vzorku tak, aby se omezilo pění vzorku.

- Vzorek po sonikaci centrifugovat 20 000 g, 5 min., 4°C, supernatant (tj. solubilní chromatin; WCE whole cell extract) odebrat do čisté zkumavky, zamrazit v tekutém dusíku a skladovat při -80°C nebo pokračovat imunoprecipitací (3.5.3.).
- Fragmentaci DNA analyzovat elektroforeticky z alikvotu (200 µl) solubilního chromatinu:
  - o Do alikvotu přidat 100 µg Proteinázy K (Roche) a dekarboxylátovat v 65°C přes noc.
  - o Znovu přidat 100 µg Proteinázy K, inkubovat 2 hod. při 55°C.
  - o Přidat 2,5 µg RNázy, inkubovat 1 hod. při 37°C.
  - o Přidat 400 µl směsi pufovaného fenolu: chloroformu: isoamylalkoholu v poměru 25:24:1 (pH 7,9), vortexovat 30 s a centrifugovat 16 000 g, 10 min. při pokojové teplotě. Do čisté mikrozkuavky odebrat horní vodnou fázi.
  - o Přidat 400 µl chloroformu, vortexovat 30 s, centrifugovat 16 000 g, 10 min. při pokojové teplotě a odebrat horní fázi.
  - o DNA vysrážet v přítomnosti glykogenu (Fermentas, výsledná koncentrace 0,05-1 µg/µl), 1/10 objemu 3M NaAc, 2,5 objemu 96% ethanolu), rozpustit do 10 µl MP H<sub>2</sub>O. Analyzovat na 1% agarózovém gelu.

### 3.5.3. Imunoprecipitace

#### 1. den

- Změřit celkovou proteinovou koncentraci solubilního chromatinu (WCE whole cell extract) pomocí DC Protein Assay (Bio-Rad, 3.2.2.) a v případě potřeby naředit lyzačním pufrům 2 na koncentraci 2 mg/ml.
- Příprava sepharosy:
  - nProteinA sepharosu (GE Healthcare) promýt nadbytkem lyzačního pufru 2 a centrifugovat 4 000 g, 1 min., 4°C.
  - A Polovinu sepharosy připravit jako 25% suspenzi v lyzačním pufru 2 na odstranění nespecifit ze vzorku solubilního chromatinu (tzv. preclear).

B Polovinu sepharosy resuspendovat v nadbytku lyzačního pufru 2 s BSA (MP Biomedicals, výsledná koncentrace 1 mg/ml) a ssDNA (Sigma, výsledná koncentrace 0,3 mg/ml) pro saturaci matrice pro imunoprecipitaci.

- K 1 ml solubilního chromatinu přidat 80 µl 25% suspenze sepharosy (A) a inkubovat 2 hod. ve 4°C za stálého míchání (tzv. preclear). Sepharosu (B) taktéž inkubovat 2 hod. ve 4°C za stálého míchání (saturace matrice). Alikvot solubilního chromatinu (20 µl tj. 1/50 objemu vzorku pro imunoprecipitaci) uchovat jako kontrolu (tzv. input, vzorek před imunoprecipitací).
- Vzorek i sepharosy (B) centrifugovat 1 min., 4 000 g. Sepharosu (B) připravit jako 25% suspenzi v lyzačním pufru 2 s BSA a ssDNA.
- Ze vzorku přenést 900 µl supernatantu zbaveného nespecifit do čisté mikrozkušavky, přidat 5 µg specifické protilátky proti proteinovému epitopu (HA-tag antibody - ChIP Grade, Abcam, ab9110) a 80 µl 25% suspenze saturované matrice (B). Inkubovat ve 4°C za stálého míchání přes noc.

## **2. den**

- Centrifugovat 4 000 g, 1 min. Promýt 2x lyzačním pufrům 2, 4x Szak IP pufrům a opět 2x lyzačním pufrům 2. Vždy přidat 1 ml pufru, míchat 5 min ve 4°C a centrifugovat 1 min., 4 000 g.
- Promýt 2x TE pufrům bez 5 min. inkubace.
- Po posledním promytí odsát TE pufr na 100 µl podle rysky na mikrozkušavce, přidat 200 µl Talianidis elučního pufru. 40 µl elučního pufru přidat také do kontrolního vzorku (inputu).
- Inkubovat 10 min. v 65°C, centrifugovat 1 min., 4 000 g.
- Odebrat 247 µl supernatantu nad kuličkami sepharosy do čisté zkušavky (tzv. output) a přidat 13 µl 4M NaCl (výsledná koncentrace 200 mM). Do inputu přidat 3 µl 4M NaCl.
- Dekroslinkovat inkubací v 65°C přes noc.

## **3. den**

- Kontrolní vzorek inputu doplnit lyzačním pufrům 2 na 260 µl a dále zpracovávat oba vzorky stejně.
- Přidat 20 µg Proteinázy K (Roche), inkubovat 30 min. při 55°C.



- Přidat 300 µl směsi fenol: chloroform: isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,9), vortexovat 30 s, centrifugovat 16 000 g, 10 min. při pokojové teplotě a odebrat horní fázi.
- Přidat 300 µl směsi chloroform: isoamylalkohol v poměru 24:1, vortexovat 30 s, centrifugovat 16 000 g, 10 min. při pokojové teplotě a odebrat horní fázi.
- DNA vysrážet v přítomnosti glykogenu (Fermentas, výsledná koncentrace 0,05-1 µg/µl) pomocí 1/10 objemu 3M NaAc a 2,5 objemu 96% ethanolu. Rozpustit do 20 µl MP H<sub>2</sub>O a čistotu a koncentraci izolované DNA změřit na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer device (Thermo Scientific).

#### **Roztoky:**

<b>Szak IP pufr</b>	100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM LiCl, 1% v/v Nonidet P-40, 1% w/v NaDoc; pH 8,5
<b>Talianidis eluční pufr</b>	70 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 1,5% w/v SDS
<b>TE pufr</b>	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA

### **3.5.4. PCR a qPCR**

Klasická PCR byla využita pro ověřování specifity primerů (Tab. 3.7), qPCR pro určení účinnosti amplifikace jednotlivých párů primerů a pro analýzu vzorku po imunoprecipitaci a kontrolního vzorku (input, WCE).

#### **3.5.4.1. PCR**

- Pracovat na ledu, připravit reakční směs (celkový objem reakce 10 µl):
 

dNTP (4x 2,5 mM)	0,8 µl (výsledná koncentrace 4x 0,2 mM)
primer F (10 µM)	0,5 µl (výsledná koncentrace 0,5 µM)
primer R (10 µM)	0,5 µl (výsledná koncentrace 0,5 µM)
10x pufr bez Mg <sup>2+</sup>	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2 µl (výsledná koncentrace 3 mM)
chromozomální DNA	1 µl (10 pg – 1 µg)
MP H <sub>2</sub> O	4 µl (doplňek do výsledného objemu)
- Pro všechny testované páry primerů smíchat reakční směsi (bez primerů), přidat 0,5 µl Taq polymerázy (Fermentas, 5 U/µl) na 100 µl směsi, rozdělit po 9 µl do 0,2 ml mikrozkušavek a přidat příslušné páry primerů.
- Namíchat negativní kontrolu bez chromozomální DNA pro odhalení kontaminací.

- Reakce inkubovat v PCR cycleru Peltier PTC-200 gradient thermal cycler (MJ Research) podle programu 95°C 5 min, 30x (95°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 30 s).
- Produkty PCR analyzovat elektroforeticky.

### 3.5.4.2. qPCR

- Namíchat reakční směs (celkový objem reakce je 25 µl) :
 

2x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)	12,5 µl
primer F (5 µM)	1,5 µl (výsledná koncentrace 0,3 µM)
primer R (5 µM)	1,5 µl (výsledná koncentrace 0,3 µM)
templátová DNA	1 µl
MP H <sub>2</sub> O	8,5 µl
- Pro každý pár primerů připravit reakce v triplikátech a zvláště namíchat negativní kontrolu bez templátové DNA.
- qPCR byla prováděna na iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) s programem 95°C 3 min, 40x (95°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 30 s, 72°C 15 s). Výstupní data byla analyzována v iQ<sup>TM</sup>5 Optical System Software (Bio-Rad).
- Míra nabohacení amplifikovaných úseků DNA je vyjádřena jako procento množství DNA amplifikované z kontrolního vzorku (input, WCE) podle rovnice dle Livak a Schmittgen, 2001:

$$\% \text{ WCE} = \frac{2^{-Ct} \text{ vzorek po IP (output)}}{2^{-Ct} \text{ kontrolní vzorek (input)}} \times 100$$

**Tab. 3.7** Seznam použitých oligonukleotidových primerů. Sekvence byly navrženy pomocí programu GeneRunner 3.04 (Hastings Software) a jsou uvedeny v orientaci 5'-3'. Dodány firmami BioTez a KRD. F – forward, R – reverse.

<b>Jméno</b>	<b>Sekvence</b>
vht1-F	TTTATGAAATTTTCGCAACG
vht1-R	TTCAAAAGTTTAGACGCCTC
mvp17-F	AGACTTATTCACAACGATGC
mvp17-R	AAGACGAAACAAGACAATCA
alp21-F	ATAGAAGCCCTAACCATTC
alp21-R	AGTGCGGTAAAACTTTTGTG
ste6-F	TCAATTGAAGCTGGTTAATG
ste6-R	ATCATGCCACCTATAAACT
c6f12-F	TTAACATTTCCGGTGACTTGG
c6f12-R	TCATAAGACGTCAATGCTTG
c4h3-F	TCGACAATCTATTCATTCCG
c4h3-R	ACGAAATCCTGGATTACGAG
mug147-F	TCACTTTCAATTGCCTTAAC
mug147-R	AAACAAGTAGTGTGCGAAAT
c1306-F	TCCAGATTCTTCAAGCTAAA
c1306-R	AGCTGAGCTTATTCAATCCT
cdc22-F	ACTTAAAGTTCGGATGACGCGACG
cdc22-R	GTTTGTAAGGTGGTAAATACCGGG
c1306-2-F	AGCTTCAATCTGATCCACAG
c1306-2-R	AGGAAAGGATAATGTCCGAG

### 3.6. Bioinformatické nástroje a software

- Seznam všech chromozomálních genů byl získán v databázi *S. pombe* GeneDB pomocí nástroje Complex/Boolean Query s využitím možnosti „Genes on a specific chromosome“.
- Vyhledání 5' intergenových sekvencí všech genů bylo provedeno pomocí nástroje List Download v databázi GeneDB s nastavením možnosti Sequence type for FASTA option na „Intergenic Sequence (5')“ a počtem bází „To next CDS/RNA“.
- Pořadí nukleotidů intergenových sekvencí bylo obráceno (revertováno do směru 3'-5') nástrojem RevSeq, aby bylo usnadněno vyhledávání vazebných míst proteinů CSL nejbližších ORF genu.
- Nástroj ESPSearch byl použit k identifikaci vazebných elementů v intergenových sekvencích genů *S. pombe*.
- Selektce genů pro testování vazebných vlastností proteinů CSL byla provedena na základě srovnání sekvencí vytvořeného programem ClustalW se standardním

nastavením kromě kolonky „Matrix“, kde byla zvolena možnost „id“. Fylogenetický strom byl vygenerován v tomtéž programu metodou neighbour-joining (Saitou a Nei, 1987).

- Grafická reprezentace pozic v sekvencích, které Cbf11 rozpoznává s vyšší afinitou, byla vytvořena nástrojem WebLogo.
- Analýza biologických procesů, kterých se účastní geny predikované jako cílové geny proteinů CSL, byla provedena nástrojem GOEAST (Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit).
- Přehled bioinformatických nástrojů a softwaru je uveden v Tab. 3.8.

**Tab. 3.8** Použité databáze a bioinformatické nástroje.

<b>Jméno</b>	<b>Popis, URL, zdroj</b>
GeneDB	Genomová databáze <i>S. pombe</i> , anotace a bioinformatické nástroje <a href="http://old.genedb.org/genedb/pombe/">http://old.genedb.org/genedb/pombe/</a> (Aslett a Wood, 2006; Hertz-Fowler et al., 2004; Wood et al., 2002)
RevSeq	Bioinformatické analýzy <a href="http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py?form=revseq">http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py?form=revseq</a> (Néron et al., 2009)
ESPSearch	Vyhledávání sekvenčních motivů <a href="http://web.chemistry.gatech.edu/~doyle/espsearch/">http://web.chemistry.gatech.edu/~doyle/espsearch/</a> (Watt a Doyle, 2005)
ClustalW	Sekvenční srovnání <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a> (Chenna et al., 2003)
WebLogo	Sekvenční logo na základě srovnání sekvencí <a href="http://weblogo.berkeley.edu/">http://weblogo.berkeley.edu/</a> (Crooks et al., 2004)
GOEAST	Signifikance výskytu anotace genu v souboru genů <a href="http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/advance.php">http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/advance.php</a> (Zheng a Wang, 2008)

## 4. Výsledky

### 4.1. Identifikace CSL-responzivních genů *S. pombe* *in silico*

Jeden z kvasinkových transkripčních faktorů rodiny CSL, Cbf11, je schopen *in vitro* specificky rozeznávat vazebné elementy v promotorech CSL-responzivních genů jiných organismů. Pro Cbf12 se totéž prokázat nepodařilo (Převorovský et al., 2009) a také nejsou známé cílové geny těchto faktorů v *Schizosaccharomyces pombe*. *In silico* predikce CSL-responzivních genů v genomu *Schizosaccharomyces pombe* je tak prvním krokem k odhalení genů, které jsou proteiny Cbf přímo řízeny. Predikce předcházela testování vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 na elementy obsažené v promotorech těchto genů *in vitro*.

#### 4.1.1. Bioinformatická predikce vazebných míst pro faktory CSL v genomu *S. pombe*

Prvním krokem analýzy výskytu vazebných míst pro faktory CSL v promotorech genů *S. pombe* bylo vyhledání 5' nekódující intergenové sekvence všech chromozomálních genů. Mitochondriální geny nebyly uvažovány, protože oba transkripční faktory jsou difuzně lokalizovány pouze v jádře buňky (Převorovský et al., 2009). Pomocí nástroje Complex/Boolean Query databáze GeneDB (3.6.) bylo ke dni 22.10.2006 nalezeno celkem 5448 genů. 5' nekódující intergenové sekvence všech genů byly vyhledávány automaticky nástrojem List Download databáze GeneDB (3.6.) nebo při kolizním postavení genů manuálně podle databázových údajů jednotlivých genů (tj. v případech, kdy došlo k překryvu intergenové sekvence s ORF jiného genu). Pro 24 genů tyto sekvence neexistují, neboť ORF jednoho genu okamžitě navazuje na ORF genu následujícího.

Pro identifikaci vazebných elementů pro faktory CSL v 5' nekódujících intergenových sekvencích bylo nezbytné tyto sekvence revertovat nástrojem Revseq (tj. obrátit pořadí nukleotidů; Néron et al., 2009), což usnadnilo vyhledávání vazebných míst od 3' konce intergenové sekvence, tedy od místa nejbližší počátku ORF genu. Předpokládáme totiž, že transkripce genu bude s větší pravděpodobností řízena z míst bližších ORF než z těch vzdálenějších. Hranice, kde je výskyt

vazebného elementu považován za signifikantní, byla arbitrárně určena na 800 nukleotidů od počátku ORF (Rustici et al., 2007).

Vyhledávané vazebné sekvence pro proteiny CSL pochází z literárních zdrojů nebo byly navrženy na základě předchozích experimentálních výsledků a pro identifikaci v intergenových sekvencích musí být také revertované. Shrnutí jsou v Tab. 4.1.

**Tab. 4.1** Sekvence vazebných elementů pro faktory CSL ve směru 5'-3', R = A/G.

Sekvence	Zdroj
CGTGGGAA	(Tun et al., 1994)
GTGAGAA	(Liang a Ganem, 2004)
TGGGAAAGAA	(Dou et al., 1994)
CGTGRGAAA	tato práce
GTGGGAA	tato práce

Identifikace vazebných míst v intergenových sekvencích byla provedena s použitím programu ESPSearch (Watt a Doyle, 2005), následná selekce výskytu vazebného elementu do 800 nukleotidů od 3' konce intergenové sekvence pomocí Microsoft Excel. Výsledkem je seznam genů, jejichž nekódující intergenová sekvence obsahuje alespoň jeden vazebný element umístěný do 800 nukleotidů od 3' konce této sekvence. Takových genů je v genomu *S. pombe* 566.

#### **4.1.2. Selekcce genů pro *in vitro* testování vazby proteinů Cbf11 a Cbf12**

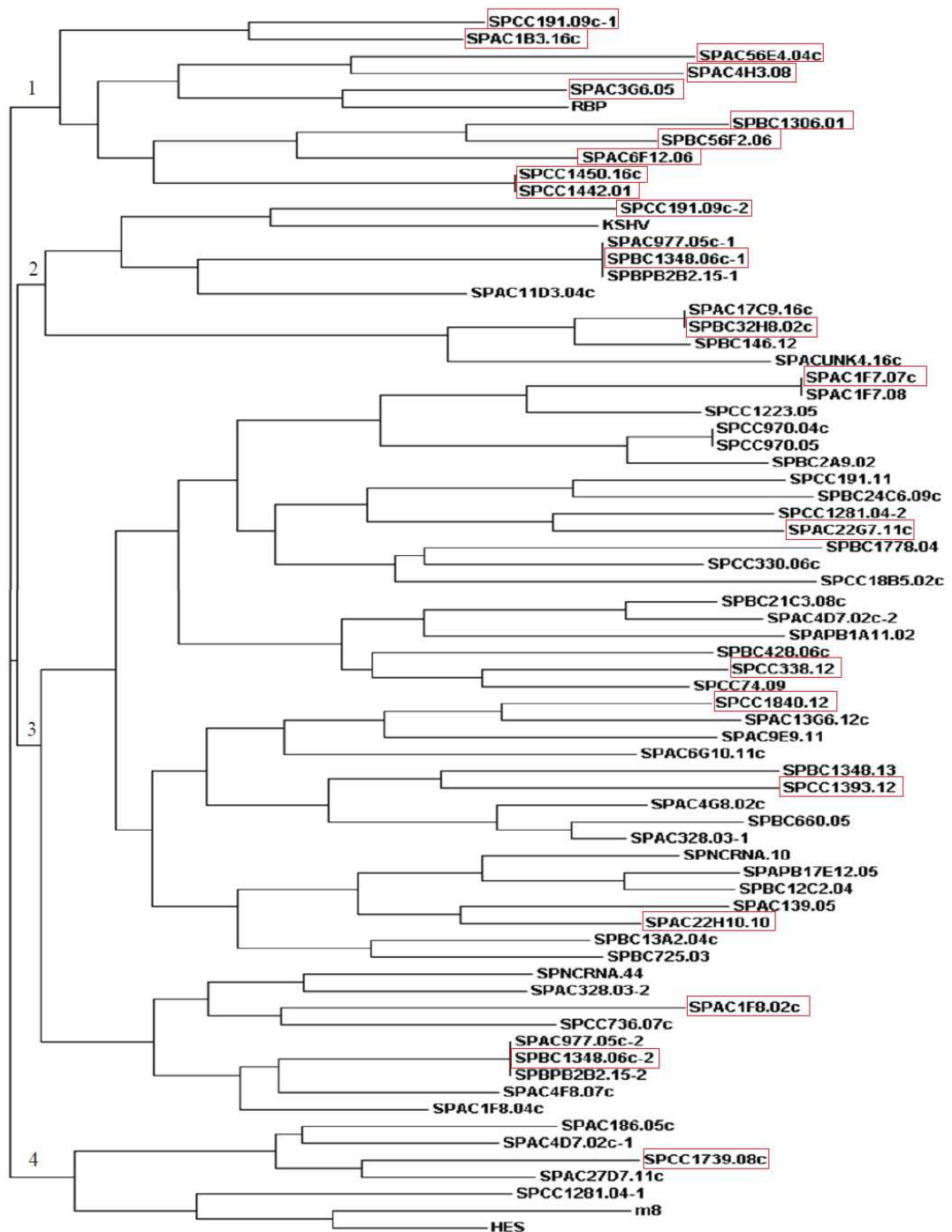
Sestava genů s vazebným místem v oblasti do 800 nukleotidů od 3' konce intergenové sekvence byla porovnána se souborem genů, jejichž hladina mRNA byla oproti kontrolním buňkám divokého kmene alespoň 2x snížena nebo zvýšena v buňkách, kde jsou proteiny Cbf nadprodukovány nebo chybí. Tento soubor genů byl získán technikou microarray, provedenou Dr. Martinem Převorovským ve spolupráci s laboratoří Prof. Jürga Bählera, University College London. Průnikem těchto dvou panelů genů byl sestaven seznam 61 genů s vazebným místem pro proteiny Cbf v intergenové sekvenci a zároveň změněnou expresí v buňkách manipulovaných v *cbf11*<sup>+</sup> nebo *cbf12*<sup>+</sup>. Jde o geny potenciálně přímo regulované proteiny Cbf a tedy kandidátní geny pro testování vazby proteinů Cbf *in vitro*. Jejich přehled je uveden v Tab. 8.1 v kapitole Přílohy.

Kvůli počtu kandidátních genů byla pro experimentální práci provedena jejich další selekce. Pomocí nástroje ClustalW (Chenna et al., 2003) bylo vytvořeno srovnání třináctinukleotidových sekvencí sestávajících z vlastního vazebného elementu a okolních 1-3 nukleotidů na každé straně elementu tak, že došlo k zarovnání sekvencí podle invariantních pozic T<sub>5</sub>G<sub>6</sub> každého vazebného elementu všech 61 kandidátních genů. Do srovnání byly zahrnuty také sekvence m8 odvozené z genu m8 *D. melanogaster* (Chung et al., 1994), RBP a HES z myších genů RBP-Jk a HES-1 (Oswald et al., 1998) a sekvence KSHV z genu K14/vGPCR herpesviru asociovaného s Kaposiho sarkomem (Liang a Ganem, 2004), které použil Dr. Převorovský (Převorovský et al., 2009; Obr. 4.1). Nástrojem ClustalW byl ze srovnání sekvencí metodou neighbour-joining (Saitou a Nei, 1987) vygenerován fylogenetický strom vazebných sekvencí, z něhož byly vybrány geny pro *in vitro* testování vazby proteinů Cbf do regulačních oblastí genů *S. pombe* (Obr. 4.2).

SPCC191.09c-2	TATGTGAGAAACA- 13	SPBC1348.06c-2	CTAGTGGGAAAAAC- 13
KSHV	GGCGTGAGAAACA- 13	SPBFB2B2.15-2	CTAGTGGGAAAAAC- 13
SPAC977.05c-1	TGGGTGGGAAACC- 13	SPAC4F8.07c	CAAGTGGGAAAAAA- 13
SPBC1348.06c-1	TGGGTGGGAAACC- 13	SPAC1F8.04c	ATAGTGGGAAAAAA- 13
SPBFB2B2.15-1	TGGGTGGGAAACC- 13	SPAC1F7.07c	CAGGTGAGAAGAT- 13
SPAC11D3.04c	AGAGTGGGAAACA- 13	SPAC1F7.08	CAGGTGAGAAGAT- 13
SPAC17C9.16c	-CAATGGGAAAGAA 13	SPCC1223.05	CAGGTGAGAAAAAC- 13
SPBC32H8.02c	-CAATGGGAAAGAA 13	SPCC970.04c	ACGGTGAGAAAAAC- 13
SPBC146.12	-CATTGGGAAAGAA 13	SPCC970.05	ACGGTGAGAAAAAC- 13
SPACUNK4.16c	-GGATGGGAAAGAA 13	SPBC2A9.02	ACGGTGAGAATAC- 13
SPCC191.09c-1	CTTGTGGGAAATA- 13	SPCC191.11	TTGGTGAGAATAG- 13
SPAC1B3.16c	ATCGTGGGAAATA- 13	SPBC24C6.09c	TTGGTGAGAATTC- 13
SPAC56E4.04c	TGCCGTGGGAACTC- 13	SPCC1281.04-2	TTGGTGAGAATTA- 13
SPAC4H3.08	AGCGTGGGAAACGG- 13	SPAC22G7.11c	TACGTGAGAATGA- 13
SPAC3G6.05	GGCGTGGGAAATG- 13	SPBC1778.04	CACGTGAGAACTT- 13
RBP	GCCGTGGGAAATT- 13	SPCC330.06c	TAGGTGAGAAATT- 13
SPBC1306.01	ACCGTGAGAAAGAA- 13	SPCC18B5.02c	AAGGTGGGAAATTT- 13
SPBC56F2.06	ATCGTGAGAAATA- 13	SPBC21C3.08c	TGTGTGAGAATTC- 13
SPAC6F12.06	AGCGTGAGAAAG- 13	SPAC4D7.02c-2	TGTGTGAGAATCC- 13
SPCC1450.16c	TCCGTGGGAAAAA- 13	SPAPB1A11.02	TCTGTGAGAATGA- 13
SPCC1442.01	TCCGTGGGAAAAA- 13	SPCC338.12	TGAGTGAGAATGA- 13
SPAC186.05c	GATGTGGGAAAC- 13	SPCC74.09	TGAGTGAGAATAT- 13
SPAC4D7.02c-1	AATGTGAGAAAC- 13	SPBC428.06c	AGTGTGAGAATAT- 13
SPCC1739.08c	ATTGTGGGAAAGAC- 13	SPCC1840.12	ATAGTGAGAATTC- 13
SPAC27D7.11c	AGTGTGGGAAAC- 13	SPAC13G6.12c	ATAGTGAGAATCA- 13
m8	ACTGTGGGAAACGG- 13	SPAC9E9.11	ATAGTGAGAAGAT- 13
HES	ACTGTGGGAAAGA- 13	SPAC6G10.11c	ATTGTGAGAAATG- 13
SPCC1281.04-1	CGTGTGGGAAAGG- 13	SPBC1348.13	GCAGTGAGAAGGG- 13
SPNCRNA.44	GAAGTGGGAAAT- 13	SPCC1393.12	GCAGTGGGAAAGTA- 13
SPAC328.03-2	GCAGTGGGAAAG- 13	SPBC660.05	GTAGTGAGAAGTA- 13
SPAC1F8.02c	TTAGTGGGAAACAT- 13	SPAC328.03-1	GTAGTGAGAAATA- 13
SPCC736.07c	TCAGTGAGAAAT- 13	SPAC4G8.02c	GTAGTGAGAAATT- 13
SPAC977.05c-2	CTAGTGGGAAAAAC- 13	SPAPB17E12.05	AAAGTGAGAACGC- 13
SPBC1348.06c-2	CTAGTGGGAAAAAC- 13	SPBC12C2.04	AAAGTGAGAACGT- 13
SPBFB2B2.15-2	CTAGTGGGAAAAAC- 13	SPNCRNA.10	AAAGTGAGAATGA- 13
SPAC4F8.07c	CAAGTGGGAAAAAA- 13	SPAC139.05	AAAGTGGGAAAGGA- 13
SPAC1F8.04c	ATAGTGGGAAAAAA- 13	SPAC22H10.10	AACGTGGGAAAGA- 13
SPAC1F7.07c	CAGGTGAGAAGAT- 13	SPBC13A2.04c	AGAGTGAGAAAGG- 13
SPAC1F7.08	CAGGTGAGAAGAT- 13	SPBC725.03	AAAGTGAGAAATG- 13
	** ***		** ***

**Obr. 4.1** Srovnání všech vazebných elementů 61 kandidátních genů a genu m8 *D. melanogaster* (Chung et al., 1994), myších genů RBP-Jk a HES-1 (Oswald et al., 1998) a genu K14/vGPCR herpesviru asociovaného s Kaposiho sarkomem (Liang a Ganem, 2004) vytvořený programem ClustalW (Chenna et al., 2003). Hvězdičky pod srovnáním sekvencí vyznačují invariantní pozice nukleotidů.





**Obr. 4.2** Fylogenetický strom vazebných sekvencí 61 kandidátních genů a genu m8 *D. melanogaster* (Chung et al., 1994), myších genů RBP-Jk a HES-1 (Oswald et al., 1998) a genu K14/vGPCR herpesviru asociovaného s Kaposiho sarkomem (Liang a Ganem, 2004) vygenerovaný ze srovnání těchto sekvencí metodou neighbour-joining (Saitou a Nei, 1987) pomocí nástroje ClustalW (Chenna et al., 2003).

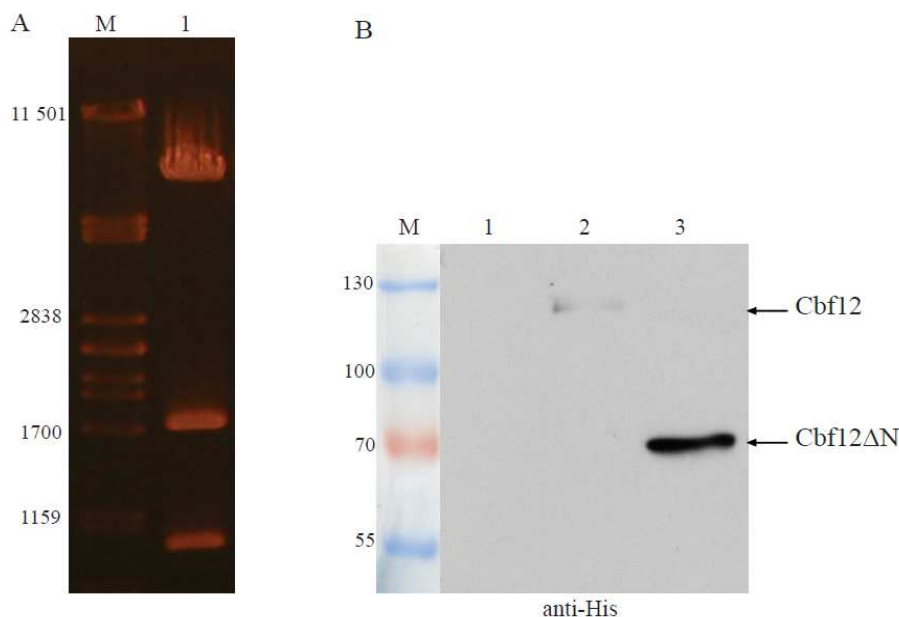
Na základě předchozích prací Dr. Převorovského se sekvencemi odvozenými z promotorů savčích genů, které obsahovaly vazebný element CGTGGGAAA a se kterými dosahoval nejlepších výsledků při testování vazby proteinů Cbf *in vitro*, byly z fylogramu přednostně vybrány geny s tímto vazebným elementem v jejich regulační oblasti. Jmenovitě to jsou geny SPAC3G6.05 (*mvp17*<sup>+</sup>), SPAC22H10.10 (*alp21*<sup>+</sup>), SPCC1442.01 (*ste6*<sup>+</sup>), SPAC1B3.16c (*vht1*<sup>+</sup>) a SPCC1450.16c, které se vyskytují zejména v první ze 4 velkých větví fylogenetického stromu. Z ostatních tří větví fylogramu bylo vybráno dalších 9 kandidátních genů (10 vazebných sekvencí, v 5' intergenové oblasti genu SPBC1348.06c jsou 2 vazebné elementy) tak, aby pokrývaly většinu větví fylogramu a hladina jejich exprese v buňkách manipulovaných v genech *cbf11*<sup>+</sup> a *cbf12*<sup>+</sup> vykazovala proti kontrole největší změnu v rámci skupiny kandidátních genů dané větve fylogramu. Jmenovitě jde o geny SPBC1348.06c, SPBC32H8.02c (*pi021*<sup>+</sup>), SPAC1F7.07c (*fip1*<sup>+</sup>), SPAC22G7.11c, SPCC338.12, SPCC1840.12, SPCC1393.12, SPAC1F8.02c, SPCC1739.08c. Vzhledem k výsledkům EMSA experimentů (4.3.2.) se sekvencemi těchto genů byly dalšími kandidáty pro *in vitro* experimenty zvoleny geny, jejichž elementy byly na fylogramu nejbližší genům s CGTGGGAAA elementem v regulační oblasti, konkrétně SPCC191.09c (*gst1*<sup>+</sup>) se dvěma vazebnými elementy v regulační oblasti, SPAC56E4.04c (*cut6*<sup>+</sup>), SPAC4H3.08, SPBC1306.01c, SPBC56F2.06 (*mug147*<sup>+</sup>) a SPAC6F12.06.

## 4.2. Konstrukce zkrácené varianty proteinu Cbf12

Proteinu Cbf12, narozdíl od Cbf11, doposud nebyla prokázána schopnost vázat DNA (Převorovský et al., 2009). Amino-terminální doména (NTD) proteinu Cbf12, který je tvořen celkem 963 aminokyselinami, je nápadně delší než u proteinu Cbf11 složeného z 613 aminokyselin (Obr. 2.5 a Převorovský et al., 2007). Navíc obsahuje velký počet cílů pro posttranslační modifikace, zejména fosforylace (nepublikovaný výsledek), a proto byl připraven konstrukt amino-terminálně HisMyc značeného proteinu Cbf12 zkráceného od N-konce o 393 aminokyselinových zbytků. Tato zkrácenina byla nazvána Cbf12ΔN.

Plasmid pMP32 nesoucí ORF genu *cbf12*<sup>+</sup> (vektor pREP42MHN) byl rozštěpen dvojicí restrikčních endonukleáz Sall, NdeI. Fragменты DNA byly rozděleny pomocí agarózové elektroforézy, úsek o velikosti 10 107 bp byl izolován z gelu a zatupen

Klenowovým fragmentem. Ligací tupých konců T4 DNA ligázou byl fragment opět cirkularizován a označen pMaP01. Tímto plasmidem byly transformovány bakterie *E. coli*, z několika nezávislých kolonií byla plasmidová DNA vyizolována a restriktivně ověřena. Poté byl plasmid vnesen do buněk *S. pombe* a inducibilní produkce N-koncově značeného proteinu Cbf12ΔN byla ověřena western blotem (Obr. 4.3).



**Obr. 4.3** Ověření plasmidu pMaP01. (A) Restrikce plasmidu pMaP01 endonukleázou HindIII - 7329, 1758, 1023 bp (sloupec 1). Fragmentsy separovány v 1% agarózovém gelu v TAE. (B) Western blot proteinu HisMyc-Cbf12ΔN, jehož exprese z plasmidu MaP01 je indukovaná nedostatkem thiaminu v médiu. Lyzát z buněk divokého kmene (WT, sloupec 1) jako negativní kontrola, lyzát WT buněk transformovaných plasmidem pMP32 (HisMyc-Cbf12, sloupec 2) jako pozitivní kontrola značení. Analyzovaný lyzát WT buněk transformovaných plasmidem pMaP01 (HisMyc-Cbf12ΔN) ve sloupci 3. Detekce anti-His protilátkou.

## 4.3. Testování DNA vazebných vlastností proteinů CSL

### *S. pombe in vitro*

#### 4.3.1. Vazba proteinů Cbf na referenční RBP sondu

Fungální proteiny CSL, včetně kvasinkových Cbf11 a Cbf12, obsahují všechny aminokyselinové zbytky a motivy potřebné pro sekvenčně specifickou vazbu na DNA (Obr. 2.6 a Převorovský et al., 2007). Přímá sekvenčně specifická

a koncentračně závislá vazba proteinu Cbf11 na dvojřetězcové oligonukleotidové DNA sondy obsahující konsensus vazebného místa pro faktory CSL ( $\text{GTG}^{\text{G}}/\text{A}^{\text{GAA}}$ ; Tun et al., 1994), odvozené ze savčích (RBP-Jk, Hes-1), hmyzích (m8) a virových (K14/vGPCR) promotorů CSL-responzivních genů, byla experimentálně potvrzena *in vitro*. Vazbu Cbf12 se prokázat nepodařilo (Převorovský et al., 2009).

Cílem tohoto experimentu bylo analyzovat schopnost vazby proteinů Cbf11, Cbf12 a také Cbf12 $\Delta$ N do regulačních oblastí těch genů *S. pombe*, které byly *in silico* predikované jako potenciálně Cbf-responzivní. Využita byla metoda EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), popsaná v kapitole 3.4. (spolu s postupem přípravy buněčných lyzátů a DNA sond).

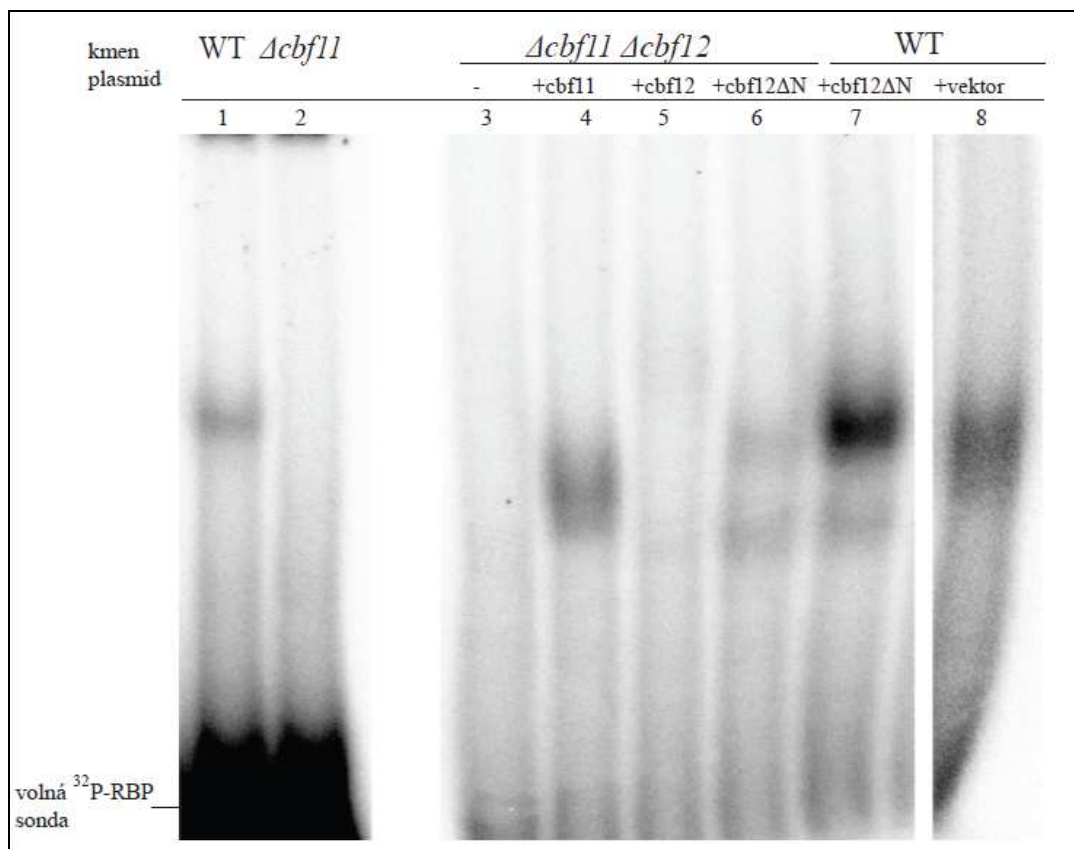
Nejprve byla testována vazba proteinů Cbf k RBP sondě odvozené z promotoru myšího genu RBP-Jk (Oswald et al., 1998). Tato sonda byla již vyzkoušena Dr. Převorovským. Jelikož se Cbf11 na tuto sondu vázal nejsilněji, je zde používána jako referenční. Jak je zřejmé z Obr. 4.4, silná vazebná aktivita byla detekována v lyzátu z buněk divokého kmene (WT, kmen PN559) a také v lyzátu z buněk  $\Delta\text{cbf11}\Delta\text{cbf12}$  (kmen MP09) exprimujících Cbf11 z plasmidu. Tato aktivita je kompletně ztracena v lyzátu z buněk  $\Delta\text{cbf11}$ . EMSA experimenty s Cbf11 heterologně exprimovaným v *E. coli* potvrdily, že jde skutečně o vazbu proteinu Cbf11 (Převorovský et al., 2009). Jelikož se jedná o nativní elektroforézu, kde komplexy migrují gelem podle velikosti svého celkového náboje, velikosti a tvaru molekuly, a jelikož je protein Cbf11 exprimovaný z plasmidu N-koncově HisMyc značený, pozice jeho signálu na gelu se liší v porovnání se signálem z WT buněk. Pro protein Cbf12 o plné délce exprimovaný z plasmidu v buňkách  $\Delta\text{cbf11}\Delta\text{cbf12}$  nebyla dle očekávání žádná aktivita pozorována, avšak protein Cbf12 $\Delta$ N vykazuje stabilní silný signál jak v lyzátu buněk  $\Delta\text{cbf11}\Delta\text{cbf12}$ , tak i ve WT buňkách.

A

ACAAGGGCCGTGGGAAATTCCTAAGCCTC

RBP

B



**Obr. 4.4** Vazba proteinů Cbf na vazebný element pro proteiny CSL. (A) Sekvence RBP sondy (sense řetězec) použité v EMSA experimentu. (B) Cbf11 a Cbf12 vykazují rozdíly při vazbě na DNA. Silná vazba byla detekována v extraktu WT buněk (sloupec 1, 8) stejně tak v extraktu *Δcbf11Δcbf12* buněk exprimujících Cbf11 z plasmidu (sloupec 4). Tato vazebná aktivita není detekována v lyzátu buněk *Δcbf11* (sloupec 2) a je připisována proteinu Cbf11. Pro Cbf12 produkovaný z plasmidu v buňkách *Δcbf11Δcbf12* vazebná aktivita nebyla detekována (sloupec 5) narozdíl od Cbf12ΔN, který vykazuje silný stabilní signál (sloupec 6, 7). Vzorky děleny v 5% polyakrylamidovém gelu.

#### 4.3.2. Identifikace vazby Cbf11 a Cbf12ΔN na sekvence *S. pombe*

Pro určení afinity vazby proteinu Cbf11 a Cbf12ΔN k vybraným regulačním oblastem genů *S. pombe*, byla zvolena nepřímá kompetiční metoda. Vazba proteinů CSL na DNA je sekvenčně specifická, a tudíž může být kompetována nadbytkem jiné (neznačené) DNA sekvence. Míra poklesu detekovaného signálu pak vyjadřuje míru afinity proteinu k neznačenému kompetitoru. V následujících experimentech je radioaktivně (<sup>32</sup>P) značená jen referenční RBP sonda a jako neznačené kompetitory byly použity sekvence z regulačních oblastí vybraných genů (4.1.2. a souhrn sekvencí v Tab. 4.2). Značení jen jedné sondy usnadňuje i následné vyhodnocení

afinity proteinu k jednotlivým neznačeným kompetičním DNA sondám, protože nedochází ke kolísání intenzity signálu díky různé účinnosti značící reakce pro různé sondy.

**Tab. 4.2** Sekvence regulačních oblastí genů *S. pombe* s vazebným elementem pro proteiny CSL použité v kompetičních EMSA experimentech (pouze sense řetězec).

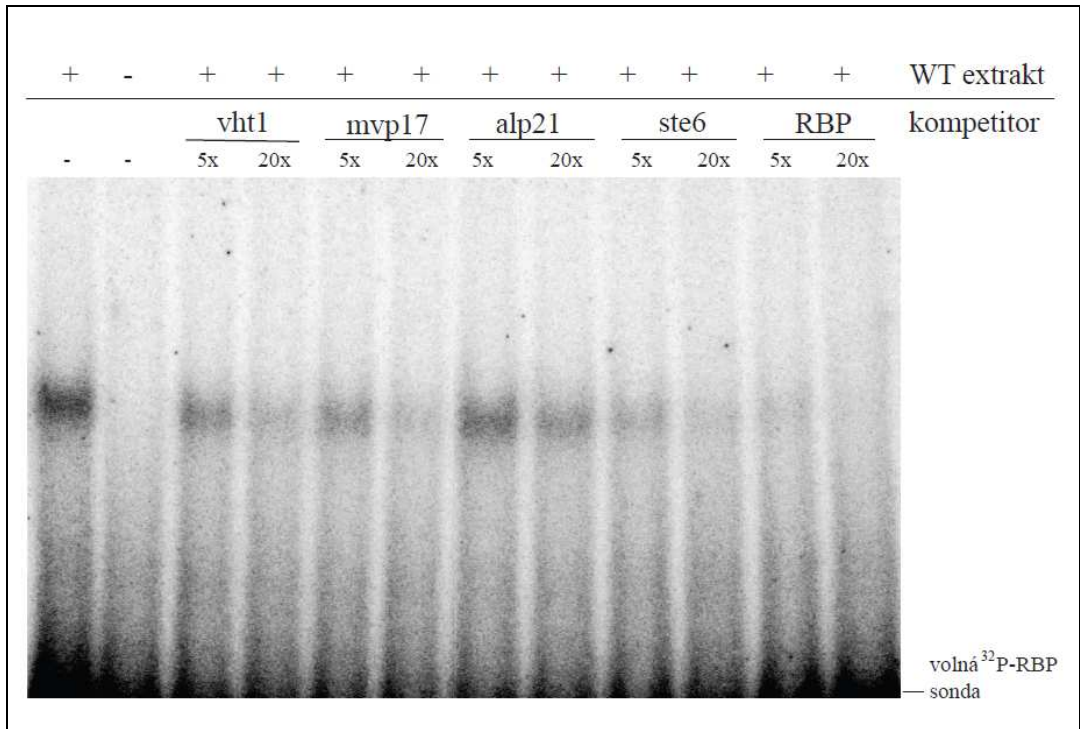
Gen	Sekvence
<i>vht1</i> <sup>+</sup>	ATCGCTTAGAT <b>CGTGGGAAA</b> TATATGGAAG
<i>mvp17</i> <sup>+</sup>	CAAATTCGGG <b>CGTGGGAAA</b> TGTTTTGGGCG
<i>alp21</i> <sup>+</sup>	TATTAATCAAC <b>CGTGGGAAA</b> GAAAATGGATT
<i>ste6</i> <sup>+</sup> <sup>5</sup>	CGATTACATC <b>CGTGGGAAA</b> AAACATTTGTT
SPBC1348.06c - 1	GATAACAATGG <b>GTGGGAA</b> ACCGCAAATTTT
SPBC1348.06c - 2	GTTATTGACTAG <b>TGGGAAA</b> ACCACGTTACC
<i>pi021</i> <sup>+</sup>	AAGTGAACAAT <b>TGGGAAAGA</b> ACGAGAATTGC
<i>fip1</i> <sup>+</sup>	ACATATAGGCAG <b>GTGAGAA</b> GATTTTTCGAA
SPAC22G7.11c	TGCTACTTTAC <b>GTGAGAA</b> TGAAATATAGAC
SPCC338.12	ATAGGCGGTTGAG <b>TGAGAA</b> TGAAATTGAGA
SPCC1840.12	CAAATTCAAATAG <b>TGAGAA</b> TTGATCTGTTA
SPCC1393.12	TATATAGAGCAG <b>TGGGAA</b> GTAGAAGTGAGC
SPAC1F8.02c	CATCAATCTTAG <b>TGGGAA</b> CATAAGAAGTTA
SPCC1739.08c	CCCATTCAAATT <b>GTGGGAA</b> GACGGTGGTGT
<i>gst1</i> <sup>+</sup> - 1	GTATAATCCTT <b>TGGGAAA</b> TAAACGTATGC
<i>gst1</i> <sup>+</sup> - 2	TAAATTGATAT <b>GTGAGAA</b> ACAAAACCTCCGT
<i>cut6</i> <sup>+</sup>	AAAGTTGGATG <b>CGTGGGAA</b> CTCAAAAACAC
SPAC4H3.08	AGTACTAGAAG <b>CGTGGGAA</b> CGGTGTTCCGC
SPBC1306.01c	TCATAAAAAC <b>CGTGGGAA</b> GAAATTAGAAAAA
<i>mug147</i> <sup>+</sup>	TGATAAAGAATC <b>GTGAGAA</b> TAAGGCAATTG
SPAC6F12.06	ATGCAGAAAAG <b>CGTGGGAAA</b> AGTATAAGAT

#### 4.3.2.1. Kompetice vazby proteinu Cbf11

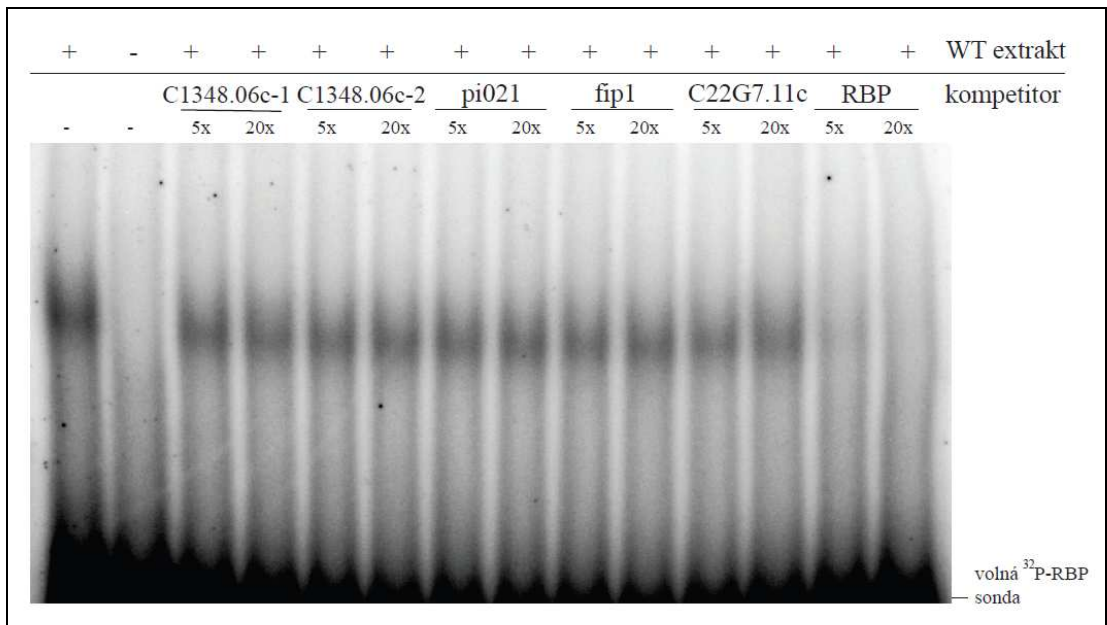
Pro tyto kompetiční EMSA experimenty byl použit nativní lyzát z WT buněk, kde detekujeme vazbu proteinu Cbf11. Pro testování afinity proteinu Cbf11 k neznačeným kompetujícím sekvencím bylo použito 5x a 20x více těchto kompetitorů než značené RBP sondy. Kompetice byly provedeny pro všech 21 sekvencí z regulačních oblastí vytipovaných genů (Tab. 4.2 a Obr. 4.5).

<sup>5</sup> geny *ste6*<sup>+</sup> a SPCC1450.16c mají společný divergentní promotor, sekvence je dále uváděna pouze pod názvem *ste6*

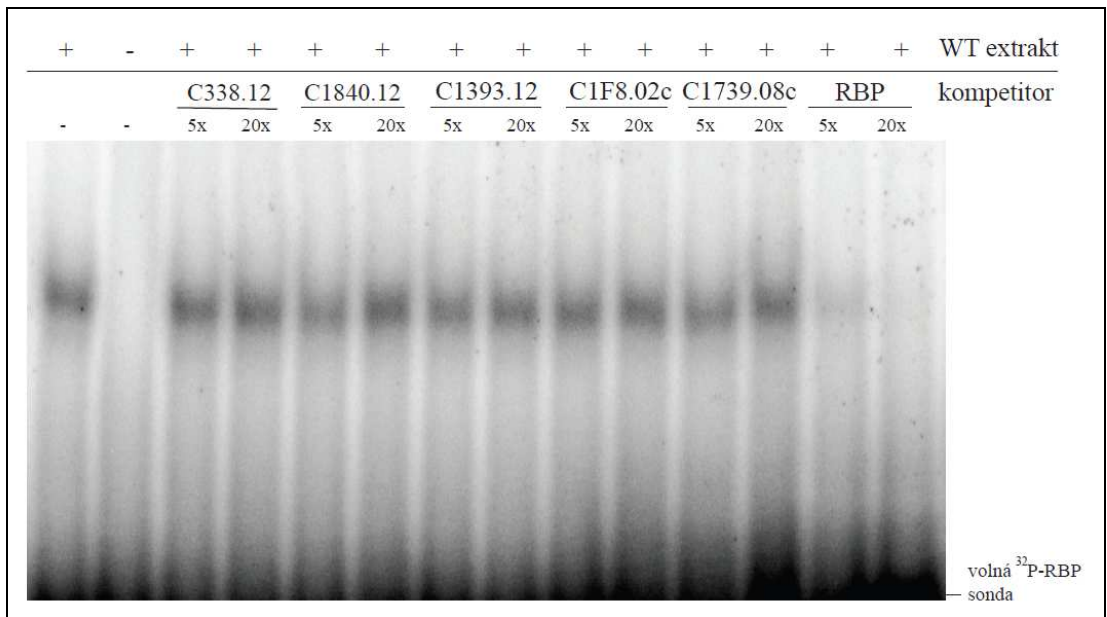
A



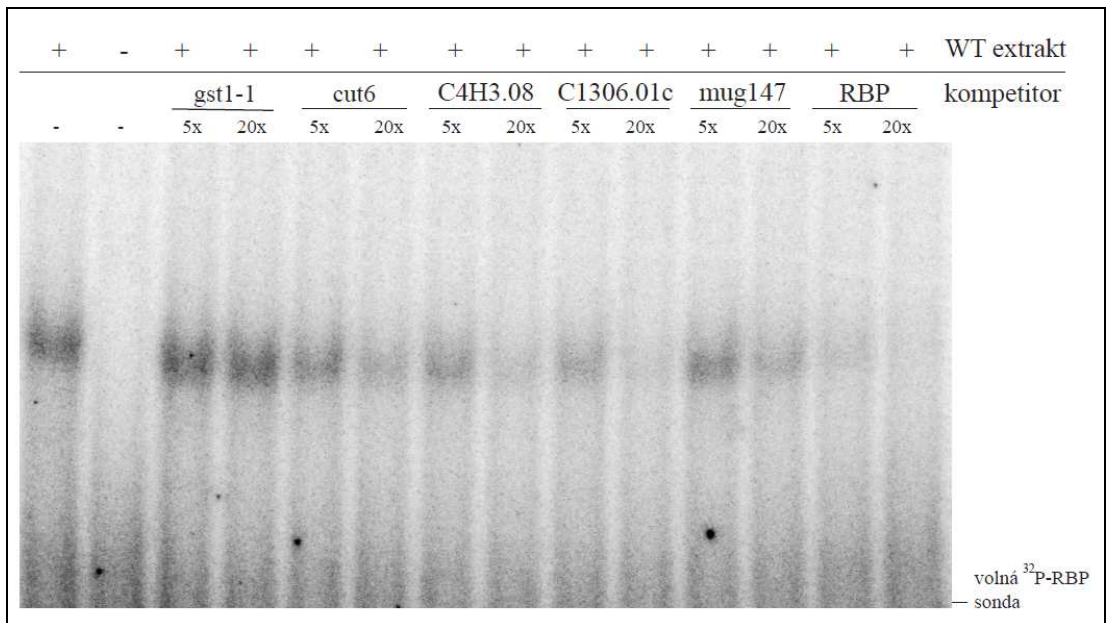
B



C

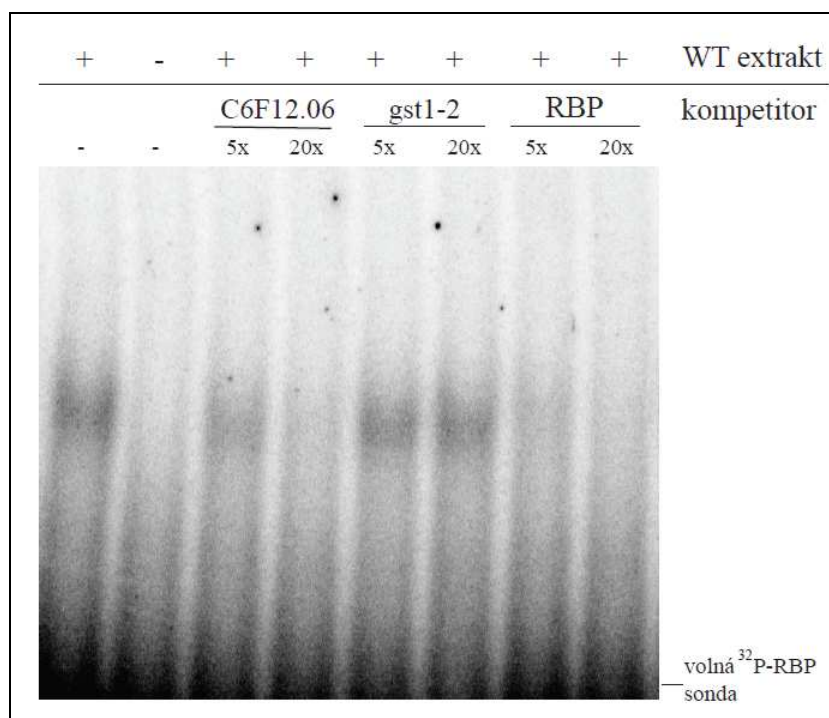


D





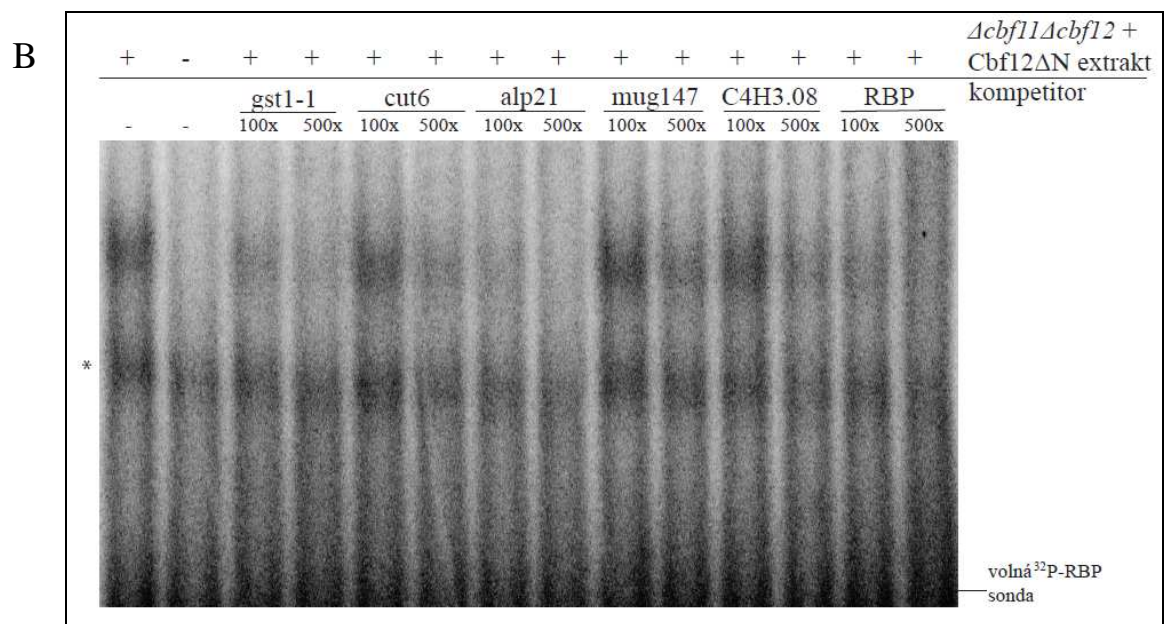
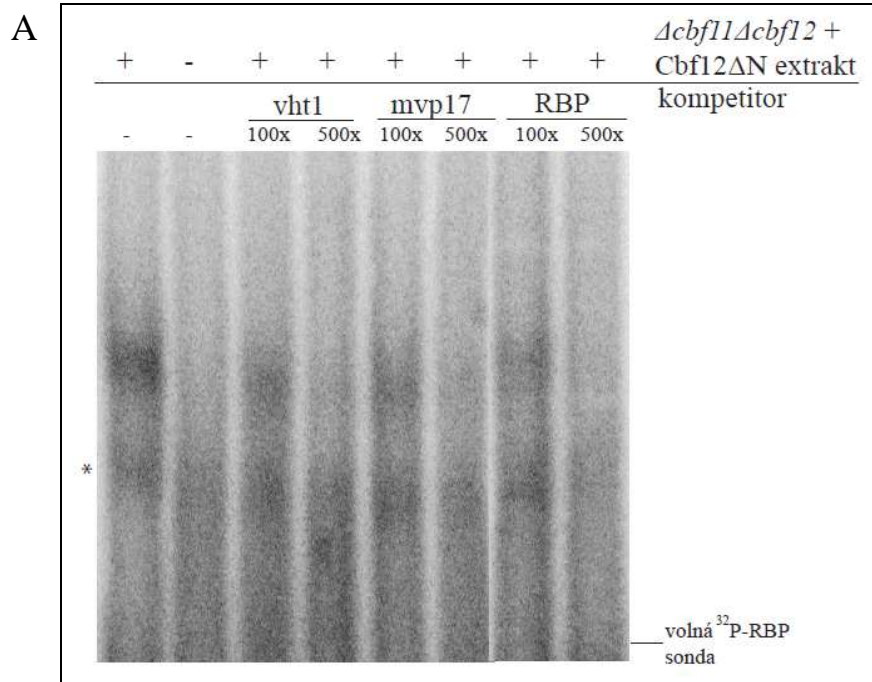
E

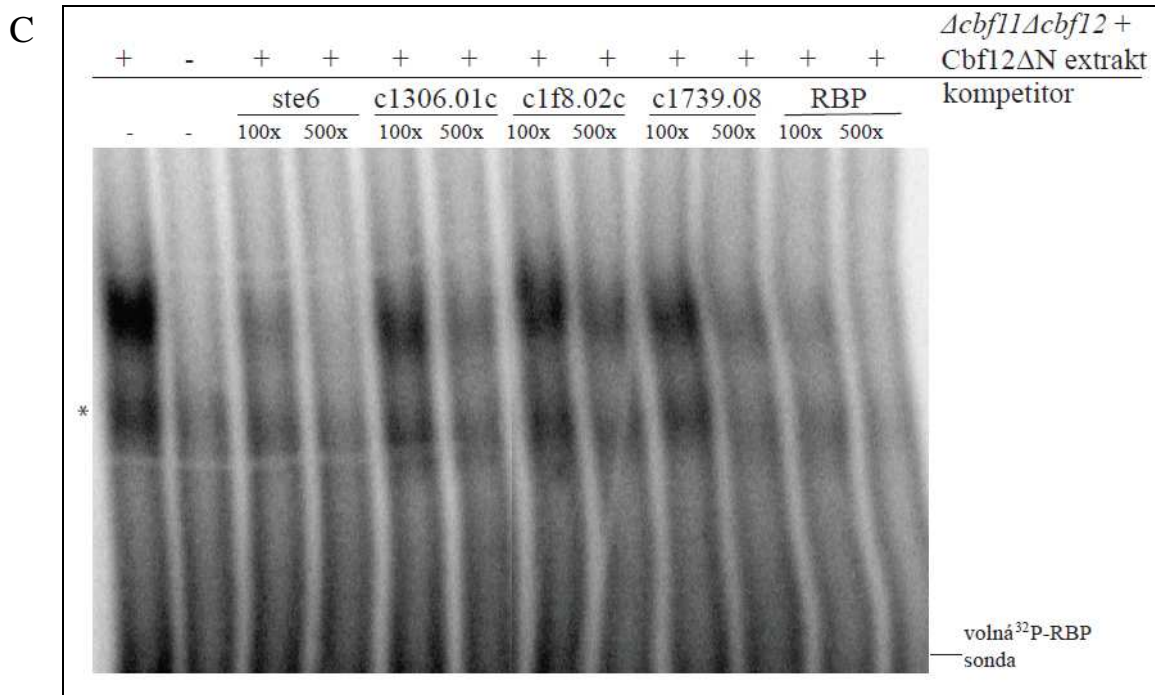


**Obr. 4.5 (A-E)** Kompetiční analýza pro protein Cbf11. Vybrané neznačené sondy odvozené z promotorů *S. pombe* byly použity v nadbytku 5x a 20x oproti radioaktivně značené (<sup>32</sup>P) RBP sondě jako kompetitory v EMSA experimentech provedených s lyzátem WT buněk. První sloupec gelu představuje signál bez kompetice (100% vazby proteinu na značenou RBP sondu), druhý sloupec gelu slouží pro odečtení pozadí při denzitometrickém vyhodnocování experimentu. Kompetice neznačenou RBP sondou je používána jako kontrola (kompetice sama sebou). Vzorokly děleny na 5 % polyakrylamidovém gelu.

#### 4.3.2.2. Kompetice vazby proteinu Cbf12ΔN

Nativní lyzát pro tyto pokusy byl připraven z buněk  $\Delta cbf11 \Delta cbf12$  s expresí proteinu Cbf12ΔN z plasmidu. Neznačené kompetitory byly přidány v nadbytku 100x a 500x vůči RBP sondě. Z celkových 21 vazebných sekvencí bylo k testování afinity proteinu Cbf12ΔN vybráno 11 DNA sond tak, aby pokrývaly rozsah síly vazby zjištěný na základě kompetic vazby proteinu Cbf11 (Obr. 4.7 A). Kompetiční experimenty pro Cbf12ΔN jsou dokumentovány na Obr. 4.6.



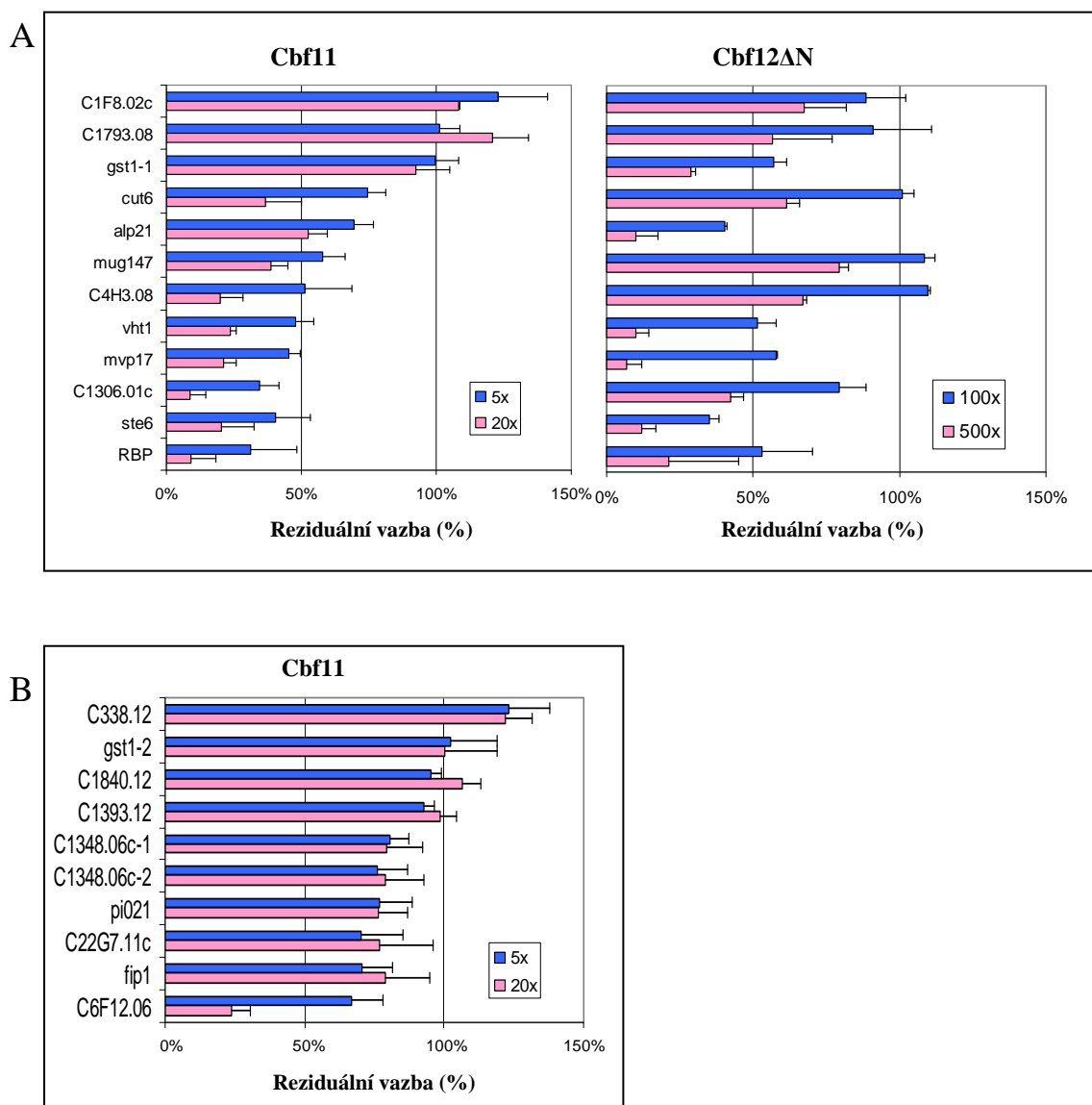


**Obr. 4.6** (A,B,C) Kompetice vazby proteinu Cbf12ΔN exprimovaného z plasmidu v buňkách *Δcbf11Δcbf12*. Neznačené kompetiční sekvence odvozené z regulačních oblastí genů *S. pombe* byly použity v nadbytku 100x a 500x oproti radioaktivně značené (<sup>32</sup>P) RBP sondě. Uspořádání experimentu je stejné jako u Obr. 4.5, tedy sloupec 1 představuje nekompetovaný signál vazby proteinu k RBP sondě, sloupec 2 bez lyzátu je určený pro odečtení pozadí při denzitometrickém vyhodnocení. Kompetice neznačenou RBP sondou slouží jako kontrola (kompetice sama sebou). Denzitometricky vyhodnocován byl band pozičně výše, protože nižší band (označen hvězdičkou) se objevuje i ve sloupci bez lyzátu (sloupec 2) a zřejmě jde o signál nespecifický. Vzorky děleny na 5% polyakrylamidovém gelu.

### 4.3.3. Denzitometrické vyhodnocení kompetičních experimentů

Kompetice neznačené DNA vazebné sekvence se značenou RBP sondou o vazbu proteinů Cbf se projeví poklesem intenzity signálu a na gelu po rozdělení detekujeme zbytkovou vazbu proteinu Cbf na RBP sondu (Obr. 4.5 a Obr. 4.6). Reziduální vazba byla denzitometricky kvantifikována programem ImageQuant TL (verze 7.0, GE Healthcare). Hodnota relativní zbytkové vazby pro konkrétní kompetitor je vyjádřena jako poměr signálu získaného v přítomnosti kompetitoru ku signálu kontrolnímu bez kompetice (tj. první sloupec Obr. 4.5 a Obr. 4.6, signál bez kompetice představuje maximální (100%) vazbu proteinu Cbf na značenou RBP sondu). Od obou signálů je však nejprve odečten nespecifický signál radioaktivního pozadí, k čemuž slouží

druhý sloupec Obr. 4.5 a Obr. 4.6. Nízká zbytková vazba pro určitý kompetitor znamená silnou kompetici touto neznačenou sekvencí a tedy silnou vazbu proteinu Cbf k této neznačené sondě. Reziduální vazby všech kompetitorů testovaných pro Cbf11 a pro Cbf12ΔN jsou uvedeny v Obr. 4.7.



**Obr. 4.7** (A,B) Denzitometrické vyhodnocení zbytkové vazby pro jednotlivé kompetitory. Průměr ze 2-3 opakování. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

Z výsledků vyplývá, že protein Cbf12ΔN se specificky váže na CSL element a že zvolené sekvence z promotorů *S. pombe* rozeznává s celkově nižší afinitou než Cbf11. Oba proteiny mají odlišné vazebné preference v rámci CSL elementů, protože trend vazby na jednotlivé sondy se u nich liší.

#### 4.4. Vazba proteinu Cbf11 do regulačních oblastí genů *in vivo*

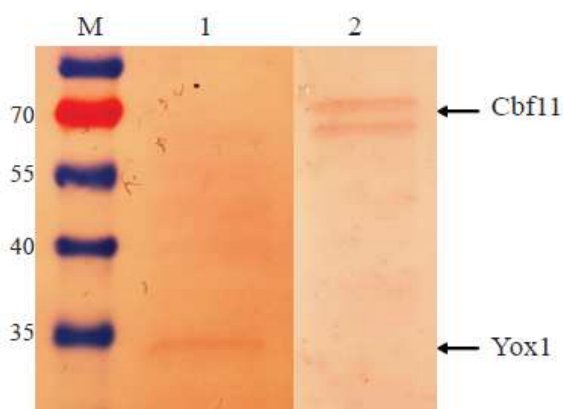
Metodou EMSA bylo *in vitro* ověřeno, že protein Cbf11 specificky rozeznává vazebná místa nacházející se v 5' intergenových oblastech kvasinkových genů (Obr. 4.5). Tyto geny byly *in silico* predikovány jako potenciální přímé cíle proteinů Cbf (4.1.2.). K ověření, zda se Cbf11 váže na regulační sekvence těchto genů *in vivo*, byla zvolena metoda chromatinové imunoprecipitace (ChIP; 3.5.). Metoda spočívá v tom, že se v buňkách reverzibilně kovalentně propojí protein a DNA pomocí kroslinkujícího činidla (formaldehyd). Buňky jsou poté lyzovány a chromatin fragmentován na kratší úseky. Následuje precipitace komplexu protein-DNA specifickou protilátkou proti proteinovému epitopu. Po imunoprecipitaci jsou kovalentní vazby zrušeny, DNA extrahována a pomocí PCR kvantifikována.

K testování byly vybrány geny, jejichž sekvence použité v EMSA experimentech vykazovaly v průměru všech opakování alespoň 70% reziduální vazbu, tzn. alespoň 30% kompetici pro pětinašobný, respektive 50% zbytkovou vazbu (50% kompetici) pro dvacetinašobný nadbytek kompetitoru. Toto kritérium bylo stanoveno empiricky. Jde o geny *vht1*<sup>+</sup>, *mvp17*<sup>+</sup>, *ste6*<sup>+</sup>, *alp21*<sup>+</sup>, SPAC4H3.08, SPBC1306.01c, SPAC6F12.06 a *mug147*<sup>+</sup> (Tab. 4.3)

**Tab. 4.3** Geny vybrané pro testování vazby proteinu Cbf11 *in vivo*.

Gen	Charakteristika produktu	Citace
<i>vht1</i> <sup>+</sup>	Vht1, přenašeč vitamínu H	(Stolz, 2003)
<i>mvp17</i> <sup>+</sup>	protein 1 rodiny Mvp17/PMP22	(Aslett a Wood, 2006; Chen et al., 2003)
<i>alp21</i> <sup>+</sup>	kofaktor E chaperonu specifického pro tubulin	(Grishchuk a McIntosh, 1999; Radcliffe et al., 1999)
<i>ste6</i> <sup>+</sup>	Ste6, guanyl nukleotidový výměnný faktor	(Bourne et al., 1991; Sipiczki, 1988)
SPAC4H3.08	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza (predikce)	(Aslett a Wood, 2006)
SPBC1306.01c	mitochondriální translační elongační faktor G	(Aslett a Wood, 2006)
<i>mug147</i> <sup>+</sup>	neznámá funkce, exprese zvýšená v meióze	(Martín-Castellanos et al., 2005)
SPAC6F12.06	Rdi1, inhibitor disociace Rho GDP (predikce)	(Aslett a Wood, 2006)

Aby bylo možné sledovat vazbu proteinu Cbf11 v nativní koncentraci, byl Dr. Převorovským zkonstruován kmen *S. pombe*, ve kterém je v chromozomu na 3' konci ORF *cbf11*<sup>+</sup> připojena sekvence kódující 3HA epitop (MP26; 3.1.2.). Jako pozitivní kontrola metody ChIP byl využit kmen JB644B (3.1.2. a Aligianni et al., 2009) produkující transkripční faktor Yox1-3HA, který se specificky váže na promotor genu *cdc22*<sup>+</sup> (SPAC1F7.05). Produkce obou proteinů byla ověřena imunochemicky (Obr. 4.8). Jako negativní kontrola ChIP posloužily WT buňky.

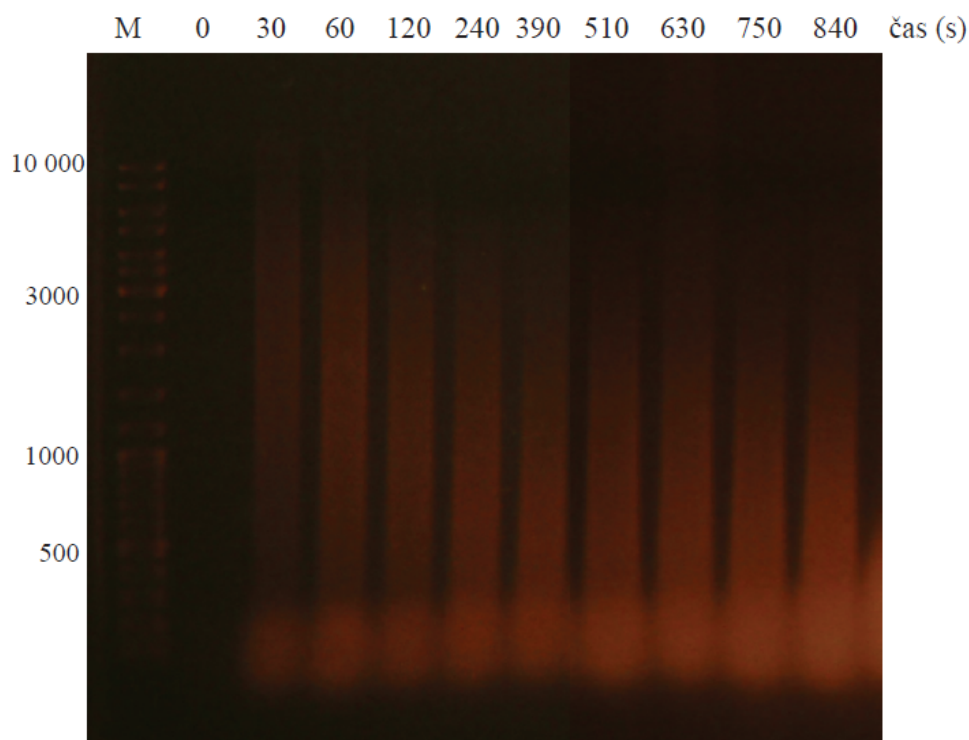


**Obr. 4.8** Ověření produkce HA-tagovaných proteinů Yox1 (sloupec 1) a Cbf11 (sloupec 2) western blotem. Dva bandy ve sloupci 2 představují dvě izoformy proteinu Cbf11. Buněčné lyzáty byly děleny na 12% polyakrylamidovém gelu.

#### 4.4.1. Optimalizace metody ChIP

##### 4.4.1.1. Lyze buněk a fragmentace DNA

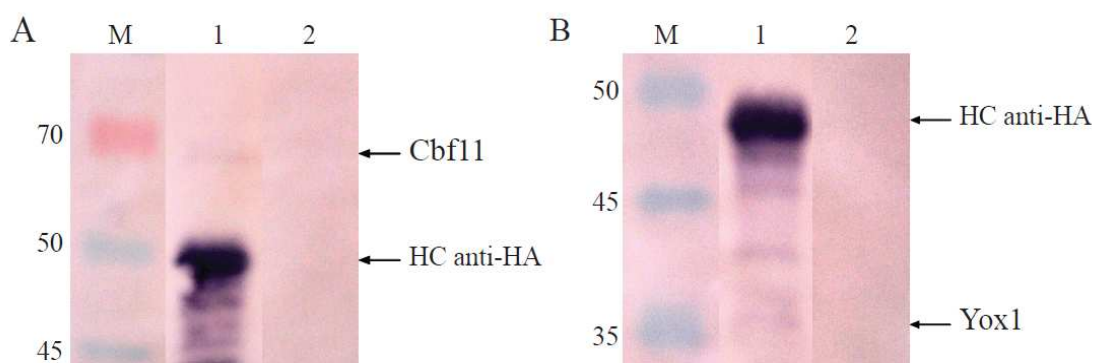
Fixování interakce Cbf11 s jeho cílovými místy na DNA pomocí formaldehydu a metodika rozbíjení buněk je uvedena v 3.5.1. Chromatin pak byl fragmentován mechanicky sonikací tak, aby se výsledná velikost fragmentů DNA pohybovala majoritně v rozsahu 200 – 1 000 bp (Obr. 4.9) a aby bylo dosaženo solubilizace vzniklých fragmentů chromatinu.



**Obr. 4.9** Optimalizace sonikace DNA. Chromatin byl sonikován 0-840 sekund, DNA po dekroslinkování a izolaci dělena na 1% agarózovém gelu a zviditelněna ethidium bromidem.

#### 4.4.1.2. Imunoprecipitace a kvantitativní PCR

Precipitace komplexu Cbf11-DNA byla provedena anti-HA protilátkou a protein A sepharosou jako maticí (3.5.3.). Zda je protilátka schopna v tomto kroslinkovaném komplexu vázat HA tag, bylo analyzováno western blotem (Obr. 4.10).

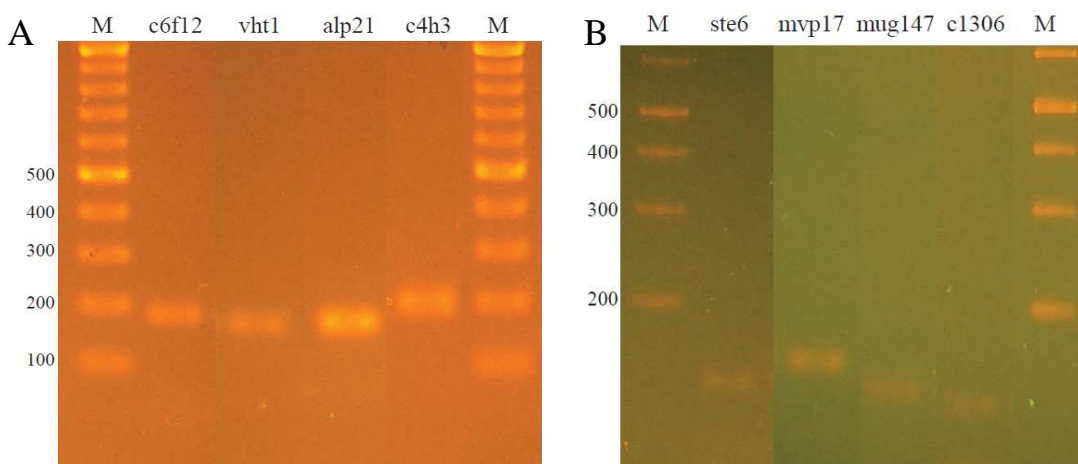


**Obr. 4.10** (A,B) Imunoprecipitace a western blot komplexu protein-DNA z kroslinkovaných buněk. Precipitát (sloupec 1) a stejný alikvot vzorku po imunoprecipitaci (tj. supernatant po centrifugaci sepharosových kuliček s navázanými komplexy protilátka-protein-DNA, sloupec 2) sloužící jako negativní kontrola rozděleny na 7,5 % (A) a 10% (B) polyakrylamidovém gelu.

Silný band cca 50kDa je těžký řetězec anti-HA protilátky. Signály označené šipkami jsou ve sloupci 1 viditelné na originálu membrány.

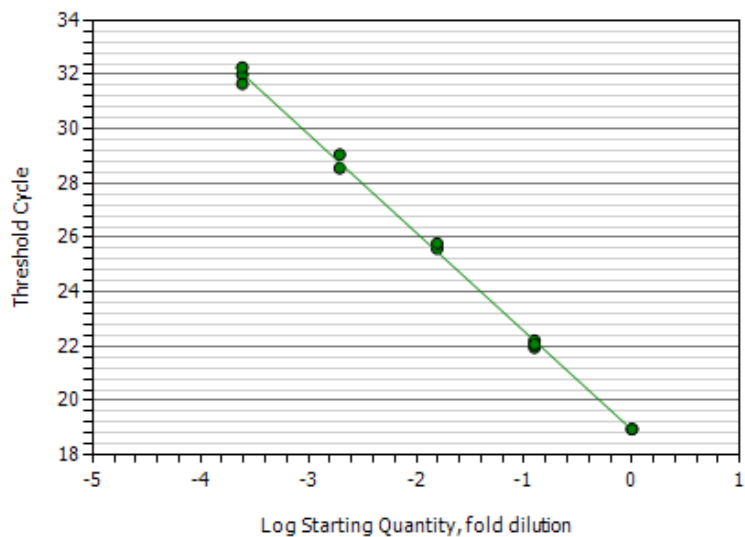
Pro následnou qPCR (3.5.4.2.) byly navrženy a testovány primery z promotorových sekvencí vybraných genů (Tab. 3.7) tak, aby byl amplifikován ~200 bp úsek DNA nesoucí vazebný element pro proteiny CSL přibližně uprostřed amplikonu. Jako kontrolní byl navržen pár primerů označený c1306-2, který amplifikuje úsek kandidátního genu SPBC1306.01c mimo vazebné místo blíže k počátku translace.

Primery testovala Mgr. Jana Staňurová nejprve klasickou PCR (3.5.4.1.), aby ověřila jejich specifitu (Obr. 4.11), posléze qPCR, aby určila účinnost amplifikace pro jednotlivé geny. Ta musí být pro všechny podobná a blízká 100% (Livak a Schmittgen, 2001). Analýza účinnosti PCR amplifikace pro všechny páry primerů byla provedena s chromozomální DNA WT buněk jako matricí, a to v rozsahu koncentrací odpovídající osmi řádům. Pro všechna ředění cílové DNA musí být účinnost podobná (Livak a Schmittgen, 2001; Obr. 4.12). Nález jednoho maxima křivky melting analýzy potvrdil amplifikaci pouze jediného PCR produktu. Nežádoucí krátké nespecifické amplikony, které by byly zobrazeny dalšími vrcholy křivek v oblasti 50-70°C, nebyly detekovány (Obr. 4.13).

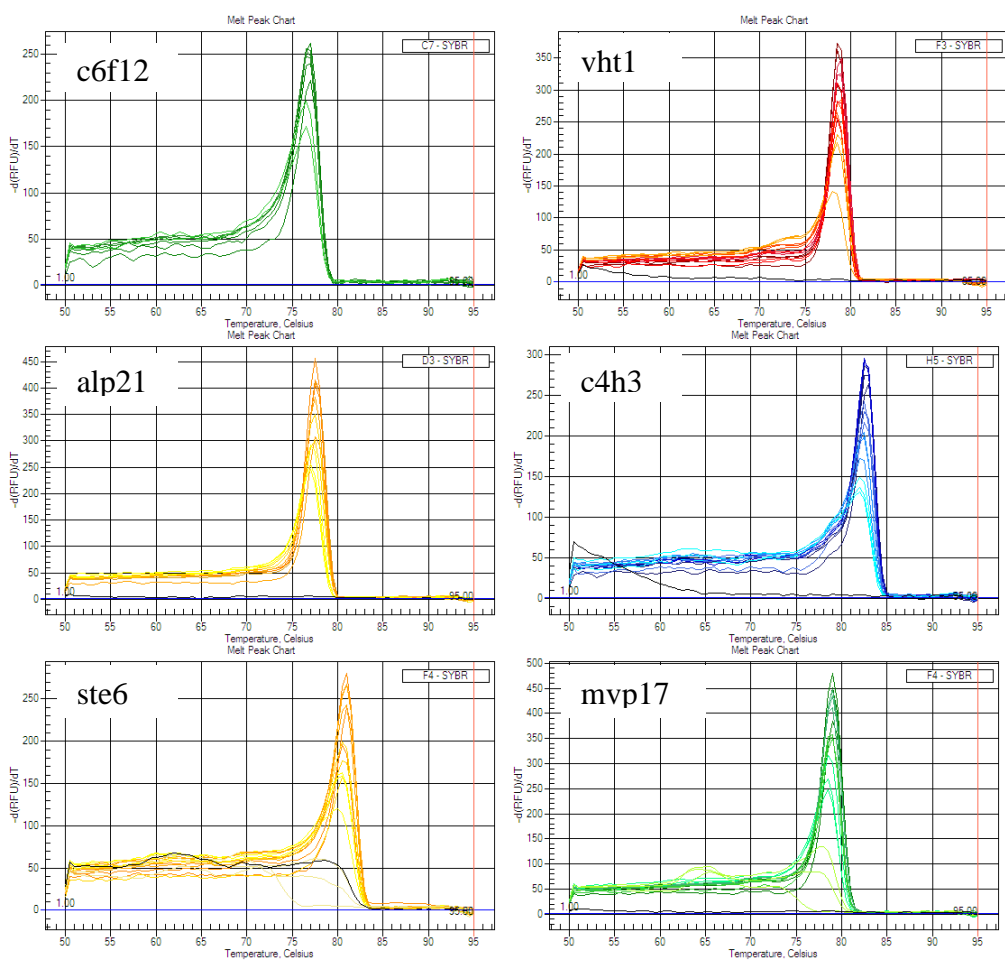


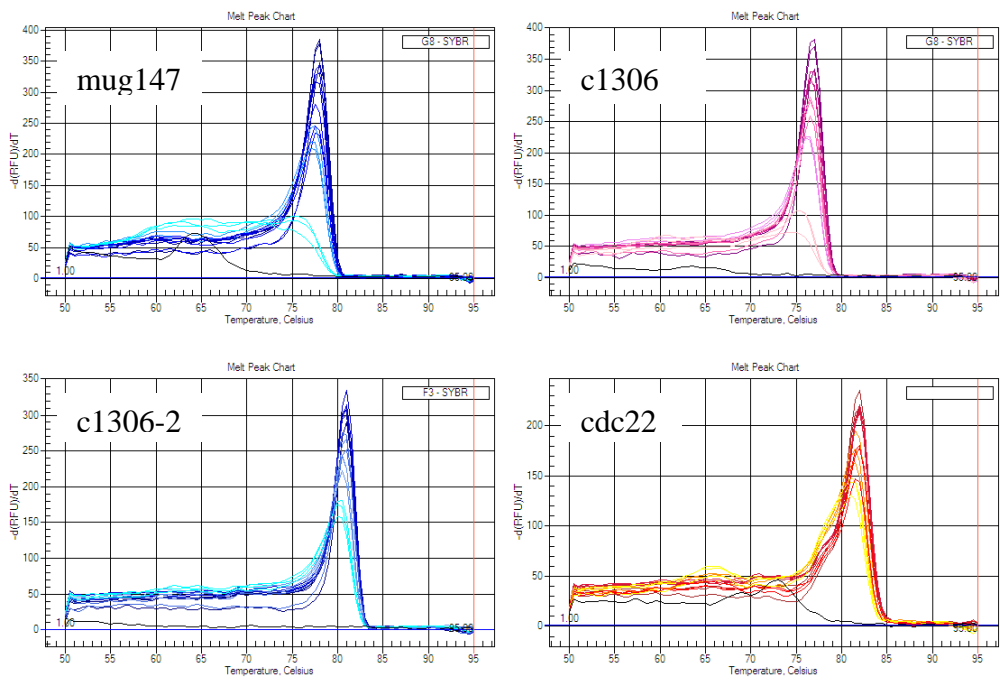
**Obr. 4.11** Ověření specifity primerů. PCR produkty separovány na 1% (A) a 2% (B) agarózovém gelu. Primery *cdc22* a *c1306-2* byly testovány pouze qPCR.





**Obr. 4.12** Příklad lineárního rozsahu účinnosti PCR amplifikace pro alp21. Graf ukazuje, že účinnost amplifikace je pro všechna ředění cílové DNA podobná.

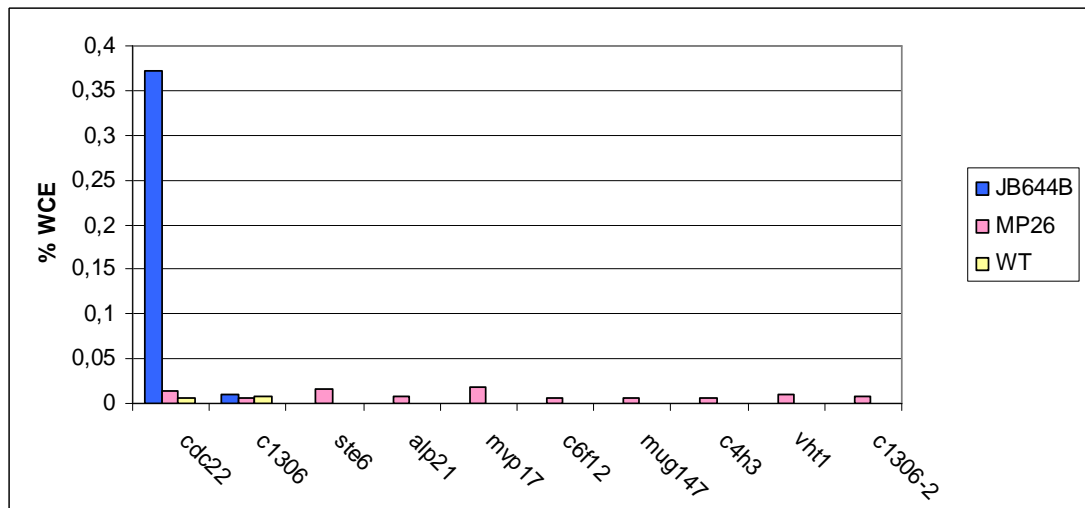




**Obr. 4.13** Melting analýza potvrzující jediným flourescenčním vrcholem přítomnost jediného PCR produktu pro všechny páry primerů. Nežádoucí krátké nespecifické amplikony nejsou detekovány.

#### 4.4.2. Vyhodnocení ChIP

Nabohacení úseku DNA purifikovaného v imunoprecipitačním kroku, které by indikovalo vazbu Cbf11 na vazebné místo tohoto úseku DNA, bylo kvantifikováno pomocí qPCR. Míra nabohacení DNA produktu byla vyjádřena jako procento z množství DNA amplifikované z kontrolního vzorku imunoprecipitace (tj. input, WCE (whole cell extrakt); Obr. 4.14) pro každý pár primerů.



**Obr. 4.14** Sloupcový graf signálů amplifikovaných promotorových fragmentů vyjádřený jako procento signálu buněčného extraktu (WCE). Signály ukázány pro buňky JB644B produkující Yox1-3HA, buňky MP26 exprimující Cbf11-3HA a WT buňky, kde není žádný protein tagován. Poslední sloupec grafu představuje signál kontrolního nespecifického přímeru c1306-2.

Ze získaných dat vyplývá, že sekvence obsahující vazebné místo pro proteiny Cbf dávají podobný signál jako nespecifické sekvence bez vazebného místa. Za daných podmínek tedy vazba proteinu Cbf11 na vazebná místa promotorů genů *S. pombe in vivo* detekována.

## 5. Diskuze

### 5.1. Rodina proteinů CSL v *Schizosaccharomyces pombe*

Současné porozumění fungování proteinů rodiny CSL se odvíjí zejména od metazoálních modelových organismů a většinou je založeno na studiích týkajících se signální dráhy Notch (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Bray a Furriols, 2001; Lai, 2002; Pursglove a Mackay, 2005). V metazoích však byla rovněž objevena dosud plně neobjasněná aktivita proteinů CSL nezávislá na signalizaci Notch (Barolo et al., 2000; Beres et al., 2006; Kaspar a Klein, 2006; Koelzer a Klein, 2003; Masui et al., 2007). V nedávné době byly prokázány proteiny CSL v několika houbových organismech evolučně vzdálených metazoím, kterým chybí podstatné komponenty dráhy Notch a většina jejich známých interakčních partnerů. Z dosavadních bioinformatických i experimentálních dat vyplývá, že jak metazoální, tak obě třídy fungálních proteinů CSL sdílejí ancestrální funkci regulovat expresi genů, ačkoli signály a procesy, které proteiny CSL interpretují a řídí, se pravděpodobně odlišují (Převorovský et al., 2007; Převorovský et al., 2009).

V kvasince *Schizosaccharomyces pombe* byly zkoumány dva zástupci rodiny CSL, *cbf11*<sup>+</sup> a *cbf12*<sup>+</sup>, a pro určení jejich funkce byly v předchozích studiích zjišťovány expresní profily, biochemické vlastnosti jejich proteinových produktů, fenotypy související s delecí nebo nadprodukcí těchto genů a další. Na základě těchto výsledků byla postulována hypotéza fungování proteinů CSL v *S. pombe* jako antagonistických transkripčních faktorů, které regulují několik procesů (2.5. a Obr. 2.8) buď přímo nebo regulací dalších transkripčních faktorů podobně jako je tomu u živočichů (Iso et al., 2003; Převorovský et al., 2009).

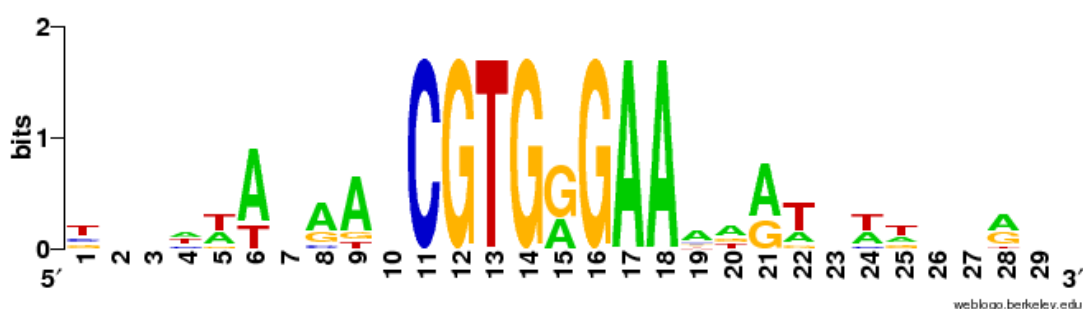
Bylo potvrzeno, že protein Cbf11 je schopný sekvenčně specificky vázat metazoální sekvence obsahující vazebný element pro faktory CSL, zatímco pro protein Cbf12 vazba na DNA nalezena nebyla (Převorovský et al., 2009). Cílové geny těchto kvasinkových faktorů dosud známé nejsou, a proto se tato práce soustředí na predikci jejich vazebných míst v regulačních sekvencích genů *S. pombe in silico* a na studium DNA vazebných vlastností *in vitro* a *in vivo*.

## 5.2. Vazebné vlastnosti proteinů CSL *S. pombe* *in vitro*

Metodou EMSA, která je založena na rozdílu rychlosti migrace komplexu proteinu specificky navázaného na DNA a samotné značené DNA sekvence v elektrickém poli, byl reprodukován experiment testující vazbu proteinů Cbf11 a Cbf12 na sondu RBP odvozenou z promotoru myšního genu RBP-J $\kappa$  (Oswald et al., 1998). Dle očekávání v případě proteinu Cbf11 byla detekována sekvenčně specifická vazba, v případě proteinu Cbf12 však nikoli. N-terminální doména proteinu Cbf12 je výrazně delší než je tomu u Cbf11, vykazuje nízkou míru komplexity, zřejmě není strukturována a obsahuje mnoho potenciálních fosforylačních míst (Beltrao et al., 2009; Dr. Převorovský, osobní sdělení). Byla vyslovena hypotéza, že extenzivní N-terminální doména či její část by mohla být příčinou neschopnosti proteinu Cbf12 vázat se na DNA. Lze si představit například sterickou zábranu vazby nebo inhibiční působení potenciálních posttranslačních modifikací. Ve prospěch této hypotézy hovoří výsledky experimentů s deleční variantou Cbf12 $\Delta$ N zkrácenou z N-konce o 393 aminokyselin. Protein Cbf12 $\Delta$ N je totiž narozdíl od Cbf12 schopen specificky vázat RBP sondu (4.3.1.). Protein Cbf12 se zdá být za fyziologických podmínek posttranslačně proteolyticky modifikován a je možné, že Cbf12 $\Delta$ N modeluje některé degradační produkty (Dr. Převorovský, nepublikovaný výsledek).

V genomu *S. pombe* bylo predikováno 61 genů, v jejichž regulačních oblastech se do 800 nukleotidů od počátku ORF genu vyskytuje potenciální vazebné místo pro faktory CSL a zároveň exprese takového genu je změněna v buňkách manipulovaných v genech *cbf11*<sup>+</sup> a *cbf12*<sup>+</sup> (tj. při delecii nebo nadprodukcii Cbf11/12). Z nich bylo pro testování vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 $\Delta$ N do regulačních oblastí genů *S. pombe* *in vitro* vybráno 20 genů (4.1.2.). Podle konkrétních sekvencí těchto genů byly navrženy dvojřetězcové oligonukleotidové DNA sondy tak, aby vazebné místo leželo přibližně uprostřed (Přílohy, Tab. 8.2). Afinita vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 $\Delta$ N na vybrané navržené sondy byla zjišťována EMSA experimenty v kompetičním uspořádání, ve kterých tyto sondy soutěží s radioaktivně označenou RBP sondou o vazbu proteinů. V případě, že dojde ke specifické vazbě proteinu na neznačenou kompetiční sondu, intenzita signálu odpovídající komplexu protein-radioaktivně značená RBP sonda poklesne. Pokud je afinita proteinu ke kompetující sondě nízká, je k poklesu signálu výše zmíněného komplexu potřeba většího nadbytku této sondy. Z denzitometrického vyhodnocení

těchto signálů vyplývá, že Cbf11 váže sekvence *S. pombe* s různou afinitou, a že tedy kromě vlastního vazebného místa pro faktory CSL mají na vazbu proteinu vliv i sekvence obklopující toto místo. Vliv sekvencí okolo vazebného elementu na afinitu vazby byl prokázán také pro savčí proteiny CSL (Christensen et al., 1996; Tun et al., 1994). Pro sekvence, které Cbf11 rozpoznává s vyšší afinitou (tj. splňují stanovené kritérium alespoň 30% kompetice pro pětinasobný a nejméně 50% kompetice pro dvacetinasobný nadbytek kompetitoru; 4.4.), je typický výskyt A/T nukleotidových párů v oblastech přilehlých k vlastnímu vazebnému motivu, tedy na pozicích 4-9 a 19-25 (Obr 5.1).



**Obr. 5.1** Grafická vizualizace pozic v sekvencích preferenčně rozpoznávaných proteinem Cbf11 v kompetičních EMSA experimentech. Sekvenční logo bylo vytvořeno nástrojem WebLogo (Crooks et al., 2004) ze sekvencí, pro které byla zjištěna alespoň 30% kompetice pro pětinasobný a nejméně 50% kompetice pro dvacetinasobný nadbytek kompetitoru.

Cbf12ΔN váže všechny kompetiční sekvence *S. pombe* a také savčí RBP sondu s nižší afinitou než Cbf11. To může indikovat suboptimální podmínky k vazbě proteinu. Zkrácením N-terminální domény mohlo dojít například k narušení správné konformace proteinu, která je nutná k vazbě na DNA, nebo ke změně dynamiky vazby a podobně. V rámci námi testovaných sekvencí má Cbf12ΔN zřejmě odlišné vazebné preference než Cbf11, protože kompetice jednotlivých DNA sond se neshodují (Obr. 4.7 A). Sekvence DNA sond byly odvozeny z genů, jejichž exprese je změněná v buňkách manipulovaných v genech *cbf11*<sup>+</sup> a *cbf12*<sup>+</sup> v exponenciální fázi růstu buněčné kultury. Jelikož hladina proteinu Cbf12 v buňce stoupá mimo jiné ve stacionární fázi růstu kultury, microarray experimenty z buněk s delecí nebo nadprodukcí Cbf12 ze stacionární růstové fáze by mohly odhalit jiné responzivní geny, jejichž regulační oblast může obsahovat sekvenci, kterou bude protein Cbf12, respektive Cbf12ΔN, vázat lépe.

Poznatky o vazebných schopnostech proteinů Cbf11, Cbf12 a Cbf12ΔN získané *in vitro* nejsou v rozporu s hypotézou, že Cbf11 funguje jako negativní a Cbf12 jako pozitivní regulátor stejných procesů. Negativní regulace způsobená proteinem Cbf11 je možná přirozený stav mnoha CSL-responzivních genů v *S. pombe* a Cbf12 pozitivně reguluje buněčné procesy ve specifickém kontextu, například ve stacionární fázi růstu buněk nebo meióze (Převorovský et al., 2009). Toto uspořádání velmi připomíná fungování proteinů CSL v metazoích, kde reprimují a v závislosti na kontextu aktivují transkripci cílových genů, což je doprovázeno změnami složení interakčních partnerů (Hsieh et al., 1996; Zhou et al., 2000b). V houbových organismech může být tato regulace zajišťována dvěma proteiny s funkcí buď represoru nebo aktivátoru namísto jednoho proteinu s obojakou funkcí.

Otázkou zůstává mechanismus působení těchto dvou faktorů na úrovni vazby DNA. Zda je efekt Cbf12 vyvolán vazbou na jinou sekvenci a působí proti aktivitě Cbf11, nebo zda dojde k nahrazení Cbf11 na promotoru cílového genu například po stimulaci vazebné aktivity proteinu Cbf12, v čemž by mohla hrát svoji úlohu již zmiňovaná N-terminální doména. Nejasné také zatím zůstává, zda se proteiny Cbf váží na DNA skutečně jako monomery, popřípadě jsou-li Cbf11 a Cbf12 v komplexu při vazbě na DNA nebo zda za určitých podmínek nedochází k nějakým zpětnovazebným smyčkám mezi Cbf11, Cbf12 a případně dalšími faktory, ať už na úrovni regulace transkripce nebo na proteinové úrovni.

### **5.3. Vazebné vlastnosti proteinu Cbf11 *in vivo***

Geny, které byly predikovány jako potenciální přímé cíle proteinů CSL v *S. pombe* a jejichž sekvence odvozené z regulačních oblastí těchto genů protein Cbf11 rozeznává s vyšší afinitou, byly zvoleny pro ověření vazby tohoto proteinu *in vivo* metodou chromatinové imunoprecipitace (ChIP; 4.4.). Z vyhodnocení dat získaných qPCR je zřejmé, že vazba Cbf11 na promotorovou oblast žádného z testovaných genů nebyla za daných podmínek *in vivo* detekována, avšak vazba transkripčního faktoru Yox1 na jemu příslušný element v promotoru genu *cdc22*<sup>+</sup> byla prokázána (Obr. 4.14 a Aligianni et al., 2009). Úspěšné zopakování kontrolního, dříve publikovaného výsledku, svědčí o zvládnutí experimentu po technické stránce. Problém vazby Cbf11 může být v nastavených podmínkách imunoprecipitačního kroku, protože jak je vidět z Obr. 4.10, anti-HA protilátka poskytuje nízký výtěžek,

je-li použita k precipitaci proteinu Cbf11 z kroslinkovaných buněk. Imunoprecipitace z nekroslinkovaných buněk dokazuje, že HA tag je na nativním proteinu protilátce přístupný (nepublikovaný výsledek) a je tedy možné, že kroslinkovaný chromatin může blokovat HA tag na proteinu Cbf11 pro vazbu protilátky. Proti tomuto vysvětlení svědčí skutečnost, že výtěžek precipitace transkripčního faktoru Yox1, který se specificky vázal na promotor genu *cdc22*<sup>+</sup>, byl v kroslinkovaných buňkách podobně slabý jako výtěžek Cbf11 (Obr. 4.10). Vybrané geny *S. pombe* také nemusí představovat vazebné cíle proteinu Cbf11, protože detekce silné vazby na DNA sondy odvozené ze sekvencí těchto genů *in vitro* nutně neznamená skutečnou vazbu *in vivo*. Je však možné, že samotná vazba proteinu Cbf11 na promotorové oblasti cílových genů je například příliš dynamická nebo vyžaduje nějaký stimulus a zvolenou metodou nemusí být zachycena. Pro savčí model bylo dokázáno, že vazba proteinů CSL na DNA je spíše dynamický než statický proces a ne všechna vazebná místa jsou vždy obsazena faktory CSL. Z tohoto pohledu se navedení proteinů CSL na cílové geny díky kooperativním interakcím jeví jako důležitý mechanismus regulace (Krejčí a Bray, 2007; Nam et al., 2007; Neves et al., 2007). Samotná vazba je popsána jako funkce teploty, koncentrací solí a pH. Zejména ke koncentraci solí je vazba senzitivní, protože iontové interakce velkou měrou přispívají k interakci proteinu CSL s DNA (Obr. 2.7 a Friedmann a Kovall, 2010). Pokud není problém v precipitačním kroku, mezi další metody, které připadají v úvahu pro zkoumání interakce proteinu s DNA *in vivo*, patří například chromatinová imunoprecipitace spojená se sekvenací precipitovaných fragmentů DNA (ChIP-Seq, Johnson et al., 2007) nebo chromatinová imunoprecipitace následovaná technikou microarray (ChIP-chip, Buck a Lieb, 2004), které umožňují určit spektrum vazebných míst daného proteinu v rámci celého genomu *in vivo* bez předchozí znalosti kandidátních genů a vazebného elementu.

#### **5.4. Biologický význam proteinů CSL v *S. pombe***

Cílem celého projektu zkoumajícího proteiny CSL v houbových organismech je určit biologický proces, kterého se tyto faktory účastní. Experimentálně bylo zjištěno, že proteiny Cbf regulují buněčnou adhezi, koordinují buněčné a jaderné dělení a další procesy (Obr. 2.8 a Převorovský et al., 2009). V genomu *S. pombe* bylo 61 genů predikováno jako potenciální přímé cíle proteinů Cbf. Jejich regulační oblast



obsahuje vazebné místo pro faktory CSL do 800 nukleotidů od počátku ORF genu a zároveň je exprese těchto genů změněna v buňkách s delecí nebo nadprodukcí proteinů Cbf11/12. Pomocí programu GOEAST (Zheng a Wang, 2008) byly predikované geny přiřazeny k jednotlivým procesům na základě anotací v databázi GeneDB *S. pombe* (Tab. 5.1).

**Tab. 5.1** Shrnutí biologických procesů, kterých se účastní geny vhodné pro testování vazby proteinů Cbf do jejich promotorové oblasti. Údaje získány pomocí nástroje GOEAST (Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit; Zheng a Wang, 2008).

Biologický proces	Geny
buněčná odpověď na stres	gst1, SPCC1281.04, SPBC12C2.04, SPAC139.05, SPCC1393.12, SPCC1739.08c, SPAC22G7.11c, SPBC24C6.09c, SPBC2A9.02, SPCC338.12, SPAC4D7.02c, SPAC4H3.08, mug147, SPBC660.05, SPBC725.03, plr1, SPCC330.06c, tps1, SPAC1F8.04c, SPBC1348.06c, SPAC27D7.11c, SPACUNK4.16c, SPAC3G6.05
transport, asimilace a homeostáze iontů železa	fip1, fio1
transport peptidů	SPCC1840.12, SPBC13A2.04c
metabolismus vitamínu B6	SPCC1281.04, plr1
katabolismus karboxylových kyselin	SPAC139.05, SPAC4H3.08, car2
metabolismus sacharidů	SPBC24C6.09c, SPAC4D7.02c, tps1, inv1, chs1, SPACUNK4.16c, hxx2
katabolismus lipidů	SPAC4H3.08, SPCC1450.16c
buněčná odpověď na peroxid vodíku	SPCC330.06c
transport biotinu	vht1
pozitivní regulace metabolismu fosfátu	mob2
posttranslační směrování proteinu k membráně	sss1
metabolismus ethanolu	SPAC3G6.05
post-chaperoninová dráha skládání tubulinu	alp21

V rámci 61 predikovaných potenciálních cílových genů proteinů CSL lze vyzorovat pouze jediný proces společný většímu počtu genů. 23 kandidátních genů se účastní odpovědi buňky na stresové podmínky. Jde zejména o geny stresové

odpovědi (CESR geny, core environmental stress response), jejichž exprese se spouští mimo jiné také ve stacionární fázi růstu buněčné kultury nebo při meióze (Chen et al., 2003). Hladina mRNA těchto genů byla výrazně změněna hlavně v buňkách s delecí *cbf11*<sup>+</sup> a buňkách nadprodukcujícími *cbf12*<sup>+</sup> (Převorovský, 2008). To je v souladu s teorií, že Cbf11 může působit v logaritmické fázi růstu kultury jako negativní regulátor a Cbf12, který je exprimován při vstupu do stacionární fáze, jako pozitivní regulátor cílových genů (Obr. 2.8 a Převorovský et al., 2009).

## 6. Shrnutí

- Z celkového počtu 5448 chromozomálních genů *S. pombe* byly 5' intergenové sekvence vyhledány pro 5424 z nich, pro zbývajících 24 genů tyto sekvence neexistují, protože ORF jednoho genu navazuje na ORF genu následujícího.
- Z literárních zdrojů byly sumarizovány vazebné elementy pro faktory CSL.
- Výskyt vazebných míst pro faktory CSL byl zkoumán ve všech intergenových sekvencích a bylo selektováno 566 genů, v jejichž regulační oblasti se vazebný element pro proteiny CSL vyskytuje do 800 nukleotidů od počátku ORF genu.
- Na základě porovnání s výsledky transkriptomických analýz z buněk manipulovaných v genech *cbf11*<sup>+</sup> a *cbf12*<sup>+</sup> byl získán seznam 61 genů, které jsou potenciálně přímo řízeny proteiny Cbf. Z tohoto seznamu bylo vybráno 20 genů, z jejichž promotorových sekvencí byly navrženy oligonukleotidové DNA sondy pro testování vazby proteinů Cbf *in vitro*.
- Byl konstruován plasmid nesoucí protein Cbf12 zkrácený od N-konce o 393 aminokyselin (Cbf12ΔN).
- Byla reprodukována sekvenčně specifická vazba proteinu Cbf11 na DNA sekvenci z promotoru myšního genu RBP-Jκ a byla prokázána vazba proteinu Cbf12ΔN na tuto DNA sondu.
- Metodou EMSA byla *in vitro* testována vazba proteinů Cbf11 a Cbf12ΔN na vybrané sekvence DNA sond odvozené z promotorů genů *S. pombe*. Cbf12ΔN váže tyto sekvence celkově s nižší afinitou než Cbf11 a v rámci testovaných DNA sekvencí má odlišné vazebné preference.
- Geny, jejichž regulační sekvence rozeznává Cbf11 s nejvyšší afinitou, byly použity pro testování vazby proteinu Cbf11 *in vivo* metodou chromatinové imunoprecipitace. Ačkoli pro žádný z těchto genů nebyla vazba prokázána, metodika ChIP byla úspěšně zavedena na kontrolním systému Yox1- promotor *cdc22*<sup>+</sup>.

## 7. Seznam literatury

Aligianni, S., Lackner, D. H., Klier, S., Rustici, G. a Wilhelm, B. T. (2009). The fission yeast homeodomain protein Yox1p binds to MBF and confines MBF-dependent cell-cycle transcription to G1-S via negative feedback. *PLoS Genetics* **5**, e1000626.

Arias, A. M., Zecchini, V. a Brennan, K. (2002). CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev* **12**, 524-533.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. a Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.

Aslett, M. a Wood, V. (2006). Gene Ontology annotation status of the fission yeast genome: preliminary coverage approaches 100 %. *Yeast* **23**, 913-919.

Bailey, A. M. a Posakony, J. W. (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, R. G., Polyanovsky, A. D., Freschi, G., Keil, T. a Posakony, J. W. (2000). A Notch-independent activity of Suppressor of Hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**, 957-969.

Beltrao, P., Trinidad, J. C., Fiedler, D., Roguev, A., Lim, W. A., Shokat, K. M., Burlingame, A. L. a Krogan, N. J. (2009). Evolution of phosphoregulation: comparison of phosphorylation patterns across yeast species. *PLoS Biol* **7**, e1000134.

Beres, T. M., Masui, T., Swift, G. H., Shi, L., Henke, R. M. a MacDonald, R. J. (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.

Birnboim, H. C. a Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

Blokzijl, A., Dahlgvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U. a Ibáñez, C. F. (2003). Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol* **163**, 723-728.

Bourne, H. R., Sanders, D. A. a McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.

Bray, S. a Furriols, M. (2001). Notch pathway: making sense of Suppressor of Hairless. *Curr Biol* **11**, 217-221.

Buck, M. J. a Lieb, J. D. (2004). ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* **83**, 349 - 360.

Bähler, J., Wu, J., Longtine, M., Shah, N. G., McKenzie, A., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. a Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-951.

Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. a Bähler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**, 214-229.

Chen, D., Wilkinson, C. R., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N. a Bähler, J. (2008). Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 308 -317.

Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M. W., Feder, J. N., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. a Ball, D. W. (1997). Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: A hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5355-5360.

Chen, Y., Fischer, W. H. a Gill, G. N. (1997). Regulation of the ERBB-2 promoter by RBPJk and NOTCH. *J Biol Chem* **272**, 14110 -14114.

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. a Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**, 3497-3500.

Christensen, S., Kodoyianni, V., Bosenberg, M., Friedman, L. a Kimble, J. (1996). Lag-1, a gene required for lin-12 and glp-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). *Development* **122**, 1373-1383.

Chung, C. N., Hamaguchi, Y., Honjo, T. a 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.

Craven, R. A., Griffiths, D. J., Sheldrick, K. S., Randall, R. E., Hagan, I. M. a Carr, A. M. (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **221**, 59-68.

Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. a Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188-1190.

De La Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. a Conlon, R. A. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-1148.

Decottignies, A., Sanchez-Perez, I. a Nurse, P. (2003). Schizosaccharomyces pombe essential genes: a pilot study. *Genome Res* **13**, 399-406.

Dou, S., Zeng, X., Cortes, P., Erdjument-bromage, H., Tempst, P., Honjo, T. a Vales, L. D. (1994). The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **14**, 3310-3319.

Egel, R. (2004). The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe - genetics, genomics and beyond. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Folk, P., Puta, F. a Skružný, M. (2004). Transcriptional coregulator SNW / SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *CMLS* **61**, 629-640.

Forsburg, S. L. (2003). S. pombe strain maintenance and media. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 13**, Unit 13.15.

Friedmann, D. R. a Kovall, R. A. (2010). Thermodynamic and structural insights into CSL-DNA complexes. *Protein Sci* **19**, 34-46.

Fuchs, K. P., Bommer, G., Dumont, E., Christoph, B., Vidal, M., Kremmer, E. a Kempkes, B. (2001). Mutational analysis of the J recombination signal sequence binding protein (RBP-J)/Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) and RBP-J/Notch interaction. *Eur J Biochem* **268**, 4639-4646.

Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G. S., Brunet, F., Ereskovsky, A. V., Degnan, B. M., Borchiellini, C., Vervoort, M. a Renard, E. (2009). Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol* **9**, 249-276.

Grallert, A., Grallert, B., Zilahi, E., Szilagyi, Z. a Sipiczki, M. (1999). Eleven novel sep genes of Schizosaccharomyces pombe required for efficient cell separation and sexual differentiation. *Yeast* **15**, 669-686.

Gridley, T. (2003). Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* **12**, 9-13.

Grishchuk, E. L. a McIntosh, J. R. (1999). Sto1p, a fission yeast protein similar to tubulin folding Cofactor E, plays an essential role in mitotic microtubule assembly. *J Cell Sci* **112**, 1979-1988.

Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Yamamoto, Y. a Honjo, T. (1989). Purification and characterization of a protein that binds to the recombination signal sequence of the immunoglobulin Jk segment. *Nucleic Acids Res* **17**, 9015-9026.

Hayward, S. D. (2004). Viral interactions with the Notch pathway. *Semin Cancer Biol* **14**, 387-396.

Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, D. S. a Peterson, M. G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein Jk. *Science* **256**, 92-95.

Hertz-Fowler, C., Peacock, C. S., Wood, V., Aslett, M., Kerhornou, A., Mooney, P., Tivey, A., Berriman, M., Hall, N., Rutherford, K., Parkhill, J., Ivens, A. C., Rajandream, M. a Barrell, B. (2004). GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res* **32**, D339-43.

High, F. A. a Epstein, J. A. (2008). The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet* **9**, 49-61.

Hirano, T., Funahashi, S., Uemura, T. a Yanagida, M. (1986). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cut mutants that block nuclear division but not cytokinesis. *EMBO Journal* **5**, 2973 -2979.

Hoffman, C. S. a Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.

Hsieh, J. J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M. G. a Hayward, S. D. (1996). Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* **16**, 952-959.

Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B. a Hayward, D. S. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 23-28.

Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. a Guillemot, F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* **9**, 3136-3148.

Iso, T., Chung, G., Hamamori, Y. a Kedes, L. (2002). HERP1 is a cell type-specific primary target of Notch. *J Biol Chem* **277**, 6598 -6607.

Iso, T., Kedes, L. a Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* **194**, 237-255.

Johnson, D. S., Mortazavi, A., Myers, R. M. a Wold, B. (2007). Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* **316**, 1497-1502.

Kannabiran, C., Zeng, X. a Vales, L. D. (1997). The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) regulates interleukin-6 gene expression. *Mol Cell Biol* **17**, 1-9.

Kaspar, M. a Klein, T. (2006). Functional analysis of murine CBF1 during *Drosophila* development. *Dev Dyn* **235**, 918 -927.

Kawaichi, M., Oka, C., Shibayama, S., Koromilas, A. E., Matsunami, N., Hamaguchi, Y. a Honjo, T. (1992). Genomic organization of mouse Jk recombination signal binding protein (RBP-Jk) gene. *J Biol Chem* **267**, 4016-4022.

- Koelzer, S. a 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.
- Kovall, R. A. a Hendrickson, W. A. (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J* **23**, 3441-3451.
- Kovall, R. A. (2008). More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. *Oncogene* **27**, 5099-5109.
- Krejčí, A. a Bray, S. (2007). Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev* **21**, 1322-1327.
- Kurooka, H., Kuroda, K. a Honjo, T. (1998). Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse Notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res* **26**, 5448-5455.
- Lai, E. C. (2002). Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* **3**, 840-845.
- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-973.
- Laky, K. a Fowlkes, B. J. (2008). Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr Opin Immunol* **20**, 197-202.
- Lam, L. T. a Bresnick, E. H. (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.
- Lamar, E., Deblandre, G., Wettstein, D., Gawantka, V., Pollet, N., Niehrs, C. a Kintner, C. (2001). Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* **15**, 1885-1899.
- Lecourtois, M. a Schweisguth, F. (1995). The neurogenic Suppressor of Hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the Enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* **9**, 2598-2608.
- Lee, S. H., Wang, X. a Dejong, J. (2000). Functional interactions between an atypical NF- $\kappa$ B site from the rat CYP2B1 promoter and the transcriptional repressor RBP-J $\kappa$ /CBF1. *Nucleic Acids Res* **28**, 2091-2098.
- Liang, Y. a Ganem, D. (2004). RBP-J (CSL) is essential for activation of the K14/vGPCR promoter of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus by the lytic switch protein RTA. *J Virol* **78**, 6818-6826.
- Liang, Y., Chang, J., Lynch, S. J., Liang, Y., Chang, J., Lynch, S. J., Lukac, D. M. a Ganem, D. (2002). The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-J $\kappa$  (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16**, 1977-1989.



Ling, P. D. a Hayward, S. D. (1995). Contribution of conserved amino acids in mediating the interaction between EBNA2 and CBF1/RBPJk. *J Virol* **69**, 1944-1950.

Livak, K. J. a Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402-408.

Lubman, O. Y., Korolev, S. V. a Kopan, R. (2004). Anchoring Notch genetics and biochemistry: structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol Cell* **13**, 619-626.

Maillard, I., Adler, S. H. a Pear, W. S. (2003). Notch and the immune system. *Immunity* **19**, 781-791.

Martín-Castellanos, C., Blanco, M., Rozalén, A. E., Pérez-Hidalgo, L., García, A. I., Conde, F., Mata, J., Ellermeier, C., Davis, L., San-Segundo, P., Smith, G. R. a Moreno, S. (2005). A large-scale screen in *S. pombe* identifies seven novel genes required for critical meiotic events. *Curr Biol* **15**, 2056-2062.

Masui, T., Long, Q., Beres, T. M., Magnuson, M. A. a MacDonald, R. J. (2007). Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes Dev* **21**, 2629-2643.

Matsunami, N., Hamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Kuze, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Kawaichi, M. a Honjo, T. (1989). A protein binding to the Jk recombination sequence of immunoglobulin genes contains a sequence related to the integrase motif. *Nature* **342**, 934-937.

Miele, L., Golde, T. a Osborne, B. (2006). Notch signaling in cancer. *Curr Mol Med* **6**, 905-918.

Miki, B. L., Poon, N. H., James, A. P. a Seligy, V. L. (1982). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **150**, 878-89.

Minoguchi, S., Taniguchi, Y., Kato, H., Okazaki, T., Strobl, L. J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G. W. a Honjo, T. (1997). RBP-L, a transcription factor related to RBP-Jk. *Mol Cell Biol* **17**, 2679-2687.

Miyatsuka, T., Matsuoka, T., Shiraiwa, T., Yamamoto, T., Kojima, I. a 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. a 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.

Morita, T. a Takegawa, K. (2004). A simple and efficient procedure for transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **21**, 613-617.

Nam, Y., Sliz, P., Pear, W. S., Aster, J. C. a Blacklow, S. C. (2007). Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 12103-2108.

Neves, A., English, K. a Priess, J. R. (2007). Notch-GATA synergy promotes endoderm-specific expression of ref-1 in *C. elegans*. *Development* **134**, 4459-4468.

Néron, B., Ménager, H., Maufrais, C., Joly, N., Maupetit, J., Letort, S., Carrere, S., Tuffery, P. a Letondal, C. (2009). Mobyle: a new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics* **25**, 3005-3011.

Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. a Caudy, M. (1994). Hairy function as a DNA-binding helix- loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev* **8**, 2743-2755.

Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W. a Honjo, T. (1995). Disruption of the mouse RBP-Jk gene results in early embryonic death. *Development* **121**, 3291-3301.

Oswald, F., Liptay, S., Adler, G. a Schmid, R. M. (1998). NF-kB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jk. *Mol Cell Biol* **18**, 2077-2088.

Petcherski, A. G. a Kimble, J. (2000). LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature* **405**, 364-368.

Plaisance, S., Berghe, W. V., Boone, E., Fiers, W. a Haegeman, G. (1997). Recombination signal sequence binding protein Jk is constitutively bound to the NF-kB site of the interleukin-6 promoter and acts as a negative regulatory factor. *Mol Cell Biol* **17**, 3733-3743.

Pursglove, S. E. a Mackay, J. P. (2005). CSL: a notch above the rest. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2472-2477.

Převorovský, M. (2008). CSL proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. Dizertační práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze.

Převorovský, M., Groušl, T., Staňurová, J., Ryneš, J., Nellen, W., Půta, F. a 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. a Folk, P. (2007). Fungal CSL transcription factors. *BMC Genomics* **8**, 233-245.

Radcliffe, P. A., Hirata, D., Vardy, L. a Toda, T. (1999). Functional dissection and hierarchy of tubulin-folding cofactor homologues in fission yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 2987-3001.

Ronchini, C. a Capobianco, A. J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol* **21**, 5925-5934.

Rustici, G., Bakel, H. V., Lackner, D. H., Holstege, F. C., Wijmenga, C., Bähler, J. a 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.

Saitoh, S., Takahashi, K., Nabeshima, K., Yamashita, Y., Nakaseko, Y., Hirata, A. a Yanagida, M. (1996). Aberrant mitosis in fission yeast mutants defective in fatty acid synthetase and acetyl CoA carboxylase. *J Cell Biol* **134**, 949-961.

Saitou, N. a Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Sazer, S. a Sherwood, S. W. (1990). Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* **97**, 509-16.

Schweisguth, F., Nero, P. a Posakony, J. W. (1994). The sequence similarity of the Drosophila Suppressor of Hairless protein to the integrase domain has no functional significance in vivo. *Dev Biol* **166**, 812-814.

Shirakata, Y., Shuman, J. D. a Coligan, J. E. (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.

Sipiczki, M. (1988). The role of sterility genes (ste and aff) in the initiation of sexual development in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Gen Genet* **213**, 529-534.

Stolz, J. (2003). Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from Schizosaccharomyces pombe. *Yeast* **20**, 221-231.

Straver, M. H., Kijne, J. W. a Smit, G. (1993). Cause and control of flocculation in yeast. *Trends Biotechnol* **11**, 228-232.

Tanaka, N., Awai, A., Bhuiyan, M. S., Fujita, K., Fukui, H. a Takegawa, K. (1999). Cell surface galactosylation is essential for nonsexual flocculation in Schizosaccharomyces pombe. *J Bacteriol* **181**, 1356-1359.

Tang, Z. a Kadesch, T. (2001). Identification of a novel activation domain in the Notch-responsive transcription factor CSL. *Nucleic Acids Res* **29**, 2284-2291.

Tani, S., Kurooka, H., Aoki, T., Hashimoto, N. a Honjo, T. (2001). The N- and C-terminal regions of RBP-J interact with the ankyrin repeats of Notch1 RAMIC to activate transcription. *Nucleic Acids Res* **29**, 1373-1380.

Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T. a Kawaichi, M. (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-Jk. *Nucleic Acids Res* **22**, 965-971.

Van Doren, M., Bailey, A. M., Esnayra, J., Ede, K. a Posakony, J. W. (1994). Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Dev* **8**, 2729-2742.

Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A. M. a Vandenhaute, J. (2005). Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* **22**, 1061-1068.

Verstrepen, K. J. a Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**, 5-15.

Watson, A., Mata, J., Bähler, J., Carr, A. a Humphrey, T. (2004). Global gene expression responses of fission yeast to ionizing radiation. *Mol Biol Cell* **15**, 851- 860.

Watt, T. J. a Doyle, D. F. (2005). ESPSearch: a program for finding exact sequences and patterns in DNA, RNA, or protein. *Biotechniques* **38**, 109-115.

Weinmaster, G. a Kintner, C. (2003). Modulation of Notch signaling during somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 367-395.

Weng, A. P. a Aster, J. C. (2004). Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin GenetDev* **14**, 48-54.

Wilson, J. J. a Kovall, R. A. (2006). Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell* **124**, 985-996.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Fritzc, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dréano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G. a Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-879.

Wu, L., Sun, T., Kobayashi, K., Gao, P. a Griffin, J. D. (2002). Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol* **22**, 7688-7700.

Zhao, B., Marshall, D. R. a Sample, C. E. (1996). A conserved domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigens 3A and 3C binds to a discrete domain of Jk. *J Virol* **70**, 4228-4236.

Zheng, Q. a Wang, X. (2008). GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* **36**, W358-63.

Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L. a Hayward, S. D. (2000). A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol* **74**, 1939-4197.

Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L. I., Miyamoto, A., Weinmaster, G. a Hayward, S. D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC to facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol* **20**, 2400-2410.

## 8. Přílohy

**Tab. 8.1** Geny vhodné pro testování vazby proteinů CSL *S. pombe* *in vitro*. Jejich sekvence obsahuje vazebný element pro proteiny Cbf do 800 nukleotidů od 3' konce intergenové sekvence a zároveň hladina exprese těchto genů je signifikantně změněná v buňkách, kde proteiny CSL chybí nebo jsou nadprodukovány.

Systematický název	Triviální název	Vazebný element	Pozice od 3' konce intergenové oblasti
SPCC191.09c	gst1	GTGGGAA GTGAGAA	455 783
SPAC1F7.07c	fip1	GTGAGAA	680
SPNCRNA.44	prl44	GTGGGAA	357
SPCC1840.12		GTGAGAA	301
SPAC1F8.02c		GTGGGAA	586
SPCC1281.04		GTGAGAA GTGGGAA	53 270
SPBC12C2.04		GTGAGAA	366
SPAC139.05		GTGGGAA	31
SPCC1393.12		GTGGGAA	250
SPCC1739.08c		GTGGGAA	616
SPCC18B5.02c		GTGGGAA	284
SPAC22G7.11c		GTGAGAA	378
SPBC24C6.09c		GTGAGAA	336
SPBC2A9.02		GTGAGAA	588
SPCC338.12		GTGAGAA	467
SPAC4D7.02c		GTGAGAA	542, 575
SPAC4H3.08		CGTGGGAA	267
SPBC56F2.06	mug147	GTGAGAA	326
SPBC660.05		GTGAGAA	57
SPBC725.03		GTGAGAA	551
SPCC74.09	mug24	GTGAGAA	32
SPAC1F7.08	fio1	GTGAGAA	463
SPAC9E9.11	plr1	GTGAGAA	564
SPCC330.06c		GTGAGAA	634
SPAC328.03	tps1	GTGGGAA GTGAGAA	641 771
SPAC1F8.04c		GTGGGAA	306
SPCC736.07c		GTGAGAA	354
SPBC32H8.02c	pi021	TGGGAAAGAA	135
SPAC977.05c		GTGGGAA	230, 404
SPBC1348.06c		GTGGGAA	234, 408
SPAC1B3.16c	vht1	CGTGGGAAA	351
SPBC21C3.08c	car2	GTGAGAA	328
SPBPB2B2.15		GTGGGAA	234, 408
SPAC56E4.04c	cut6	CGTGGGAA	22
SPBC1306.01c		GTGAGAA	576

SPAC186.05c		GTGGGAA	338
SPNCRNA.10	prl10	GTGAGAA	69
SPBC1348.13		GTGAGAA	170
SPAC6F12.06		CGTGRGAAA	236
SPCC1450.16c		CGTGGGAAA	259
SPCC191.11	inv1	GTGAGAA	227
SPAPB1A11.02		GTGAGAA	108
SPAC27D7.11c		GTGGGAA	694
SPAC17C9.16c		TGGGAAAGAA	759
SPBC13A2.04c		GTGAGAA	388
SPAC13G6.12c	chs1	GTGAGAA	95
SPCC1223.05c		GTGAGAA	391
SPCC970.04c	mob2	GTGAGAA	428
SPAPB17E12.05		GTGAGAA	720
SPACUNK4.16c		TGGGAAAGAA	626
SPBC428.06c	rxt2	GTGAGAA	365
SPBC146.12	coq6	TGGGAAAGAA	155
SPBC1778.04		GTGAGAA	544
SPAC6G10.11c		GTGAGAA	166
SPCC970.05		GTGAGAA	750
SPAC11D3.04c		GTGGGAA	33
SPAC4F8.07c	hvk2	GTGGGAA	54
SPAC4G8.02c	sss1	GTGAGAA	671
SPAC3G6.05	mvp17	CGTGGGAAA	643
SPAC22H10.10	alp21	CGTGGGAAA	19
SPCC1442.01	ste6	CGTGGGAAA	789

**Tab. 8.2** Seznam použitých oligonukleotidů. Orientace sekvencí v 5'-3' směru. Sondy dodány firmami BioTez a IDT. RBP sonda odvozena z promotoru myšního genu RBP-Jκ (Oswald et al., 1998). F – forward, R – reverse.

DNA sonda	Sekvence
vht1-F	CTTCCATATATTTCCACGATCTAAGCGAT
vht1-R	ATCGCTTAGATCGTGGGAAATATATGGAAG
mvp17-F	CAAATTCGGGCGTGGGAAATGTTTGGGCG
mvp17-R	CGCCAAAACATTTCCACGCCCGAATTTG
alp21-F	AATCCATTTTCTTTCCACGTTGATTAATA
alp21-R	TATTAATCAACGTGGGAAAGAAAATGGATT
ste6-F	CGATTACATCCGTGGGAAAAAACATTTGTT
ste6-R	AACAAATGTTTTTTCCACGATGTAATCG
SPBC1348.06c –F1	GATAACAATGGGTGGGAAACCGCAATTTT
SPBC1348.06c –R1	AAAATTTGCGGTTTTCCACCCATTGTTATC
SPBC1348.06c –F2	GTTATTGACTAGTGGGAAACCACGTTACC
SPBC1348.06c –R2	GGTAACGTGGTTTTTCCACTAGTCAATAAC
pi021-F	GCAATTCTCGTTCTTTCCCATTTGTTCACTT
pi021-R	AAGTGAACAATGGGAAAGAACGAGAAATTGC
fip1-F	TTCGCAAAATCTTCTCACCTGCCTATATGT
fip1-R	ACATATAGGCAGGTGAGAAGATTTTGCAGAA

SPAC22G7.11c-F	TGCTACTTTTACGTGAGAATGAAATATAGAC
SPAC22G7.11c-R	GTCTATATTTTCATTCTCACGTAAAAGTAGCA
SPCC338.12-F	TCTCAATTTTCATTCTCACTCAACCGCCTAT
SPCC338.12-R	ATAGGCGGTTGAGTGAGAATGAAATTGAGA
SPCC1840.12-F	TAACAGATCAATTCTCACTATTTGAATTTG
SPCC1840.12-R	CAAATTCAAATAGTGAGAATTGATCTGTTA
SPCC1393.12-F	TATATAGAGCAGTGGGAAGTAGAAGTGAGC
SPCC1393.12-R	GCTCACTTCTACTTCCCCTGCTCTATATA
SPAC1F8.02c-F	CATCAATCTTAGTGGGAACATAAGAAGTTA
SPAC1F8.02c-R	TAACTTCTTATGTTCCCCTAAGATTGATG
SPCC1739.08c-F	ACACCACCGTCTTCCCACAATTTGAATGGG
SPCC1739.08c-R	CCCATTCAAATTTGTGGGAAGACGGTGGTGT
gst-F1	GCATACGTTTATTTCCCAACAAGGATTATAC
gst-R1	GTATAATCCTTGTGGGAAATAAACGTATGC
gst-F2	TAAATTTGATATGTGAGAAAACAAAACCTCCGT
gst-R2	ACGGAGTTTTGTTTCTCACATATCAATTTA
cut6-F	AAAGTTGGATGCGTGGGAACCAAAAACAC
cut6-R	GTGTTTTTTGAGTTCCCACGCATCCAACCTTT
SPAC4H3.08-F	GCGGAACACCGTCCCACGCTTCTAGTACT
SPAC4H3.08-R	AGTACTAGAAGCGTGGGAACGGTGTTCGCGC
SPBC1306.01c-F	TCATAAAAAACCGTGAGAAGAATTAGAAAAA
SPBC1306.01c-R	TTTTTCTAATTCTTCTCACGGTTTTTATGA
mug147-F	CAATTGCCTTATTCTCACGATTCTTTATCA
mug147-R	TGATAAAGAATCGTGAGAATAAGGCAATTG
SPAC6F12.06-F	ATCTTATACTTTTCTCACGCTTTTCTGCAT
SPAC6F12.06-R	ATGCAGAAAAGCGTGAGAAAAGTATAAGAT
RBP-F	ACAAGGGCCGTGGGAAATTTCTTAAGCCTC
RBP-R	GAGGCTTAGGAAATTTCCCACGGCCCTTGT