

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE
2010

Bakalářská práce

Notch independentní funkce transkripčních faktorů CSL

Mikoláš Teska

Školitel: Doc. RNDr. Petr Folk, CSc

Poděkování patří mému školiteli Doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc za pomoc a cenné rady při psaní této práce.

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: Notch independentní funkce transkripčních faktorů CSL jsem vypracoval sám s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2010

Abstrakt:

Signální dráha Notch hraje zásadní roli při vývoji a během života mnohobuněčných živočichů. CBF1 je prvkem dráhy Notch, který zprostředkovává regulaci cílových genů. Objev proteinů podobných CBF1 v kvasinkách vznesl otázku jejich funkce v jednobuněčných organismech - před vznikem kanonické dráhy Notch. Kvasinkové homology CBF1 jsou konzervovány v oblastech důležitých pro vazbu na DNA a váží CBF1-vazebný element in vitro. CBF1 a příbuzné transkripční faktory v Metazoa (CSL) interagují s mnoha proteiny v Notch-dependentních ale i Notch independentních komplexech. Rovněž receptor Notch má některé funkce CSL-independentní. Práce se zabývá interakčními partnery CSL v Metazoa a jejich homology v kvasinkách s cílem upozornit na možné interakce CBF1 homologů v evolučně ancestrálním kontextu.

Klíčová slova

CSL, Notch pathway, receptor Notch, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, bHLH, CIR, SKIP

Abstract:

Notch pathway plays a critical role during development and life of Metazoan organisms. CBF1 is a component of the Notch pathway that mediates the regulation of target genes. The discovery of CBF1-like proteins in yeast raised the question of their function in unicellular organisms - before the origin of canonical Notch pathway. CBF1-homologs in yeast are conserved in parts that are important for DNA binding and bind to CBF1-binding elements in vitro. CBF1 and related transcription factors in Metazoa (CSL) interact with many proteins in Notch-dependent as well as Notch-independent complexes. The Notch receptor has likewise some CSL-independent functions. This assay reports about interacting partners of CSL in Metazoa along with homologous proteins in yeast with the aim to highlight potential interactions of CBF1-homologs in evolutionary ancestral context.

Key words:

CSL, Notch pathway, Notch receptor, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, bHLH, CIR, SKIP

Obsah

1. Úvod:	6
1.1. Mnohobuněční a signalizace	6
1.2. Signální dráha Notch	7
1.3. Cíl práce	12
2. Evoluční historie signální dráhy Notch	13
3. CSL	15
3.1. Struktura CSL	15
3.2. Funkce CSL	17
4. Signální proteiny které mohou ukazovat na partnery CSL v jednobuněčných organismech před vznikem dráhy Notch	18
4.1. proteiny s doménou bHLH	18
4.1.1 <i>proteiny s doménou bHLH</i> a stavba PTF1 komplexu v Metazoa	18
4.1.2. <i>proteiny s doménou bHLH</i> v kvasinkách	20
4.2. CSL v represorových komplexech	24
4.2.1. CIR	24
4.2.2. Cwf25	25
4.2.3. KyoT2	26
4.2.4. SMRT a SHARP	27
4.2.5. SNW1/SKIP	27
5. CSL-independentní funkce Notch	28
6. Závěr	31
Použitá literatura:	33

1. Úvod:

1.1. Mnohobuněční a signalizace

Všechny organismy procházejí životním cyklem. Základy životního cyklu lze dobře studovat již u jednobuněčných organismů – například tvarovou diferenciaci buněčných částí (*Acetabularia*) nebo určování párovacích typů buněk (*Schizosaccharomyces*). Životní cyklus mnohobuněčných organismů zahrnuje vývoj z jedné zárodečné buňky v dospělý organismus. Pro vývoj mnohobuněčného organismu i pro jeho fungování po celou dobu trvání životního cyklu jsou důležité způsoby, jakými si buňky organismu navzájem předávají signály. Základy mezibuněčné komunikace lze nicméně nalézt již u prvoků vytvářejících kolonie. Diferenciace buněk v rámci kolonie, například u válečů *Volvox*, a rozdělení funkcí mezi jednotlivé buněčné typy jsou pravděpodobně i jedním ze způsobů, jakým mnohobuněčná organizace života vznikala. Dobrymi příklady zásadní role mezibuněčné signalizace pro životní cyklus organismů, které stojí na rozhraní mezi jednobuněčnými a mnohobuněčnými, jsou (1) *Volvox carteri* a (2) *Dictyostelium discoideum*.

Kolonie buněk *Volvox carteri* vzniká z buňky určené k reprodukci, a to většinou uvnitř existující kolonie, ze které se posléze nová kolonie oddělí. Postupně se reprodukční buňka namnoží na velký počet, okolo 2000 buněk. Ty během vzniku diferencují na dva typy: (1) somatické buňky, které se starají o pohyb v závislosti na fototaxi, (2) reprodukční buňky (gonidie) které se po vzniku odlišují od buněk somatických. Poměr zastoupení obou typů buněk je asi 2000 somatických ku 16 reprodukčním. *Volvox carteri* se tedy podobá mnohobuněčným svou buněčnou diferenciací při tvorbě kolonií (Schmitt, 2003).

Dictyostelium discoideum vytváří mnohobuněčný útvar, který je ale na rozdíl od *Volvox carteri* tvořen stejným typem buněk. *Dictyostelium discoideum* při dostatku živin žije jako populace samostatných améb. Při vyčerpání živin z okolí mají améby dvě možnosti. Jednou z možností je, že vytvoří makrospóry pohlavním dělením. Druhou možností je, že pomocí chemotaxe cAMP se nakumuluje velké množství buněk do agregátu. V tomto agregátu tvoří buňky rozdílné buněčné typy, podle toho v jaké fázi buněčného cyklu do něj vstoupily. Agregát z buněk pak po určitou dobu migruje, než narazí na správné podmínky, s dostatkem světla, k další fázi životního cyklu. Poté vytvoří stonek s plodnicí, která nese spóry (Dallon a

Othmer, 1997). Spóry se pak z plodnice uvolňují a jsou rozneseny do okolí. Toto je tedy příklad vzniku mnohobuněčné organizace jiným způsobem než u válečů. V tomto případě vytvoří agregát původně nezávisle žijící buňky v reakci na změnu životních podmínek.

U Metazoa získala signalizace mezi buňkami novou roli. Tou je řízení diferenciací zárodečné buňky v rozdílné buněčné a tkáňové typy. Přesná a koordinovaná kontrola proliferace a diferenciací je pro vývoj mnohobuněčných organismů nepostradatelná. Přitom méně než dvacet základních typů signálních drah zabezpečuje vývojový proces i u těch evolučně nejvyšších organismů. Mezi těmito typy drah pak má nejdůležitější roli sedm z nich. Jsou to signální dráhy či spíše sítě (1) Wnt (odvozeno od **W**ingless a **I**nt), kde ligand Wnt ovlivňuje prostřednictvím receptoru Frizzled stabilitu β -catenin a jeho prostřednictvím aktivitu transkripčního faktoru TCF; (2) TGF β (**T**ransforming **G**rowth **F**actor beta) kde se ligand váže na oligomer transmembránových serinových kináz a reguluje funkci transkripčních faktorů rodiny Smad; (3) Hedgehog, kde ligand Hedgehog prostřednictvím receptoru Patched ovlivňuje způsob modifikace proteinu Ci a tím represi či aktivaci cílových genů; (4) růstových faktorů, které vazbou indukují oligomerizaci receptorových tyrozinových kináz; (5) cytokinů, signalizujících pomocí kináz JAK a transkripčních faktorů STAT (**J**anus **K**inase / **S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription); (6) jaderných receptorů pro hormony, kde malé hydrofobní molekuly hormonů a metabolitů procházejí plasmatickou membránou a váží se na intracelulární receptory a transkripční faktory zároveň; a (7) Notch, kde vazba ligandu spouští odštěpení adaptorové molekuly, která následně mění vlastnosti transkripčního faktoru RBPJ κ v jádře (Gerhart, 1998). Těchto sedm drah zabezpečuje většinu signalizací buňka-buňka při ontogenezi organismu.

1.2. Signální dráha Notch

1) Role signální dráhy Notch

První mutantní alela Notch byla objevena Dextrem v octomilce na začátku dvacátého století, zároveň bylo popsáno haploinsuficientní vrubování křídel, které dalo genu a posléze i celé dráze jméno. Následně byl identifikován neurogenní fenotyp, kdy buňky změny buněčný typ při diferenciaci a místo epidermální tkáně vznikne tkáň nervová (pro přehled Fiuza and

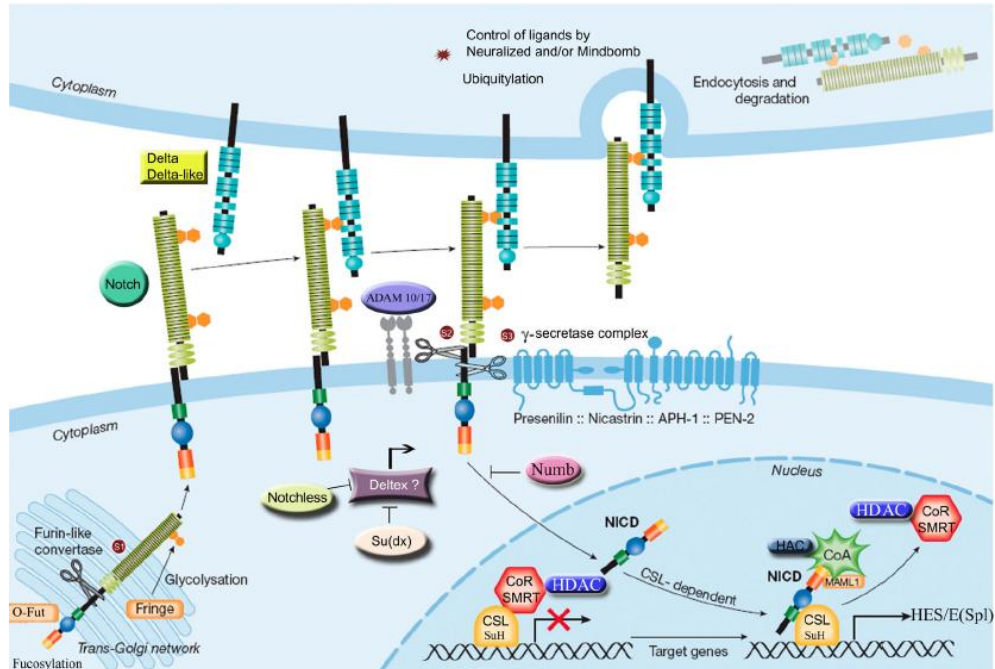
Ariaz, 2007). Role signální dráhy Notch objevené na experimentálních modelech, lze zhruba dělit do 3 skupin – všechny souvisejí se signalizací mezi sousedními buňkami: laterální inhibice, formování rozhraní a určení osudu buněčné linie (pro přehled Bray, 1998).

Laterální inhibice je děj, který vede k selekci jedné buňky ve skupině rovnocenných prekurzorů. Probíhá u buněčných linií, které mají alespoň dvě alternativy následné diferenciaci. Typickým příkladem laterální inhibice je formování neuroblastů u hmyzu. Pokud je signalizace Notch defektní, vyvine se příliš mnoho neuroblastů. Ty vznikají z neuroektodermálních buněk při embryogenezi. Každý neuroblast vznikne ze skupiny neuroektodermálních buněk s rovnocenným potenciálem k diferenciaci. Pokud je signalizace Notch defektní, vyvine se příliš mnoho neuroblastů. Každá z těchto neuroektodermálních buněk obsahuje geny nutné k diferenciaci v neuroblasty, mezi něž patří mimo jiné geny komplexu *ac/sc* (*achaete-scute*) neurogenní diferenciací dráhy. Geny komplexu *ac/sc* podporují tvorbu proteinu Delta. Delta je ligandem receptoru signální dráhy Notch. Signalizace Notch vede u zmíněných neuroektodermálních buněk k potlačení exprese genů komplexu *ac/sc*. Takto vede zvýšená exprese genů komplexu *ac/sc* k diferenciaci dané buňky a zároveň k potlačení exprese těchto genů, pomocí aktivace dráhy Notch v okolních buňkách produkovaným ligandem Delta. Na počátku mají neuroektodermální buňky v dané oblasti určitou hladinu exprese genů komplexu *ac/sc* a syntetizují patřičné množství ligandu Delta. Tak aktivují okolním buňkám signální dráhu Notch, a tím v nich snižují expresi genů komplexu *ac/sc*. Takové buňky poté exprimují méně proteinu Delta. To snižuje schopnost těchto buněk aktivovat dráhu Notch v okolních buňkách. Z této kompetice v produkci ligandu Delta a následném snižování exprese *ac/sc* v okolních buňkách vzejde jedna buňka která utlumí expresi genů komplexu *ac/sc* ve všech ostatních buňkách v dané oblasti. Z takové buňky vznikne následně neuroblast. Ostatní buňky buď zůstanou v nediferenciovaném stádiu, nebo přijmou epidermální buněčnou linii (Skeath a Thor, 2003). V tomto případě signalizace Notch blokuje rozhodnutí pro diferenciaci v nervovou tkáň.

Další výraznou funkcí je formování rozhraní mezi dvěma skupinami buněk. Známé jsou mechanismy u dorsálně-ventrálního (D/V) rozhraní imaginálního disku křídla *Drosophila*, z nichž část tvoří dále popsané procesy. Signalizace Notch je aktivována na rozhraní mezi dvěma oblastmi buněk. Rozhraní vznikne tak, že buňky dorsální části exprimují ligand receptoru Notch - *Serrate* (*Ser*) a protein *Fringe*. *Fringe* zabraňuje signalizaci pomocí *Ser*

přes receptor Notch a zároveň aktivuje vazbu druhého ligandu Delta na receptor Notch. Delta je produkován pouze ventrálními buňkami. Ligand Ser působí na buňky ventrální části podél rozhraní. V buňkách dorsální části podél rozhraní podporuje protein Fringe aktivaci signalizace Notch ligandem Delta, který produkují buňky ventrální části. Zároveň působí v buňkách podél rozhraní pozitivní zpětná vazba. Buňky s aktivovanou signalizací Notch exprimují více příslušného ligandu. Signalizace Notch je takto zprostředkována na D/V rozhraní. V tomto případě má aktivní signalizace Notch indukční funkci, která utvoří z buněk na rozhraní organizační centrum, které je zodpovědné za růst a tvarování podél D/V osy (Kim et al., 1995).

Třetím typickým příkladem funkce signalizace Notch je rozhodování o odlišném osudu buněk. To je vidět například na vývoji sensorického orgánu u *Drosophila*. Z buněčných prekurzorů sensorických orgánů vzniknou za normálních okolností čtyři buňky: pochva, pouzdro, gliová buňka, neuron. Vznik čtyř specifických buněk z jedné buňky prekurzoru je dán třemi asymetrickými děleními, kde signalizace Notch vede k odlišným buněčným liniím dceřiných buněk. K tomu napomáhá mechanismus, kdy pouze jedna ze dvou vzniklých buněk je schopna přenosu signálu z receptoru Notch do jádra. K inhibici přenosu signálu slouží protein Numb, který inhibuje aktivitu receptoru Notch. Při prvním dělení se Numb rozmístí specificky tak, aby byl ve výsledné cytoplasmě pouze jedné z buněk. Po rozdělení produkují dceřiné buňky ligand Delta. Jedna z buněk reaguje na vazbu Delta na receptor Notch aktivní signalizací Notch, následkem čehož si osvojí buněčný osud (a). Ta buňka, která zdělila protein Numb má reprimovanou signalizaci Notch a osvojí si buněčný osud (b) Tak vzniknou dvě buněčné větve (a,b). Při dalším dělení z větve (a) vznikne neuron a gliová buňka. Z větve b pak vznikne pochva a pouzdro (Bray, 1998).



Obr. 1: Funkční organizace signální dráhy Notch. Přehled prvků signální dráhy Notch a jejich vzájemné interakce. Jak bylo popsáno v části 1.2. Signální dráha Notch. S1-S3 zobrazují proteolytická štěpení. Převzato z (Gazave et al., 2009).

2) Funkční organizace signální dráhy Notch

Procesy zprostředkovávající funkce dráhy Notch lze rozdělit do několika bloků. Dráhu jsem rozdělil na několik částí mezi nimiž interagují jednotlivé prvky signální dráhy.

A) Vazba ligandu na receptor

Základním principem signalizace Notch je přenos signálu od vysílající buňky k buňce přijímající a jeho následné zpracování. Buňky vysílají signál dráze Notch v okolních buňkách pomocí ligandů z rodiny DSL (**D**elta/**S**errate/**L**ag-2), což jsou transmembránové proteiny. V některých případech mohou být buňkou i vylučovány. Jsou známy dva hlavní typy (Delta a Serrate). Charakteristickou doménou těchto ligandů je doména DSL (**D**elta/**S**errate/**L**ag-2), která je umístěna na N-konci proteinu. Doména DSL je stěžejní pro interakci s receptorem Notch. Vedle ní je variabilní počet ankyrinových opakování. Pro typ ligandu Serrate platí, že má zhruba dvojnásobný počet ankyrinových opakování, a také že má navíc doménu bohatou na cystein (CR; Cysteine Rich). Ta se nachází u plasmatické membrány. Vedle standardních receptorů existují i některé atypické, které se mohou lišit

strukturou, nebo například aktivní sekrecí místo upoutání na membráně (D'Souza et al., 2008). Při signalizaci se ligand naváže na receptor Notch. Notch je protein, který má přibližně 300 kDa. Jednou prochází přes membránu. Receptor Notch je syntetizován v Golgiho aparátu jako neaktivní prekurzor. V Golgiho aparátu dochází k prvnímu proteolytickému štěpení, které je katalyzováno proteinem Furin. Zároveň dochází k posttranslačním úpravám. Zmíněné štěpení vede ke vzniku dvou částí, které jsou poté zasazeny společně do membrány jako heterodimer (Logeat et al., 1998). Extracellulární část NECD (**N**otch **E**xtra**C**ellular **D**omain) je tvořena 10 až 36 opakujícími se úseky podobnými EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor) doméně s připojenými třemi opakováními LN (**L**eu-**A**sn) sekvence. Na tuto část se při signalizaci váže ligand ze signalizující buňky. Intracellulární část NICD (**N**otch **I**ntra**C**ellular **D**omain) je tvořena směrem od transmembránové oblasti postupně RAM částí (**R**BPJ **A**sociated **M**olecule), která interaguje s CSL, pak několika ankyrinovými opakováními, z nichž první má silně rozvolněnou strukturu do té doby, než se NICD naváže v jádře do komplexu s CSL. Na C konci je ještě jaderná lokalizační sekvence, transkripční doména a PEST sekvence hrající roli v ubiquitylaci.

B) Proteolýza receptoru

Navázání ligandu na receptor Notch indukuje sérii dvou proteolytických štěpení molekuly receptoru. První proteolytické štěpení, pravděpodobně umožněné změnou konformace receptoru následkem navázání ligandu, probíhá těsně za vnější stranou membrány. Toto štěpení je katalyzováno enzymem z rodiny metalloproteáz ADAM (**A** **D**isintegrin **A**nd **M**etalloproteinase). Dochází k odštěpení extracellulární části receptoru NECD. V návaznosti na první štěpení receptoru je umožněno druhé proteolytické štěpení, probíhající intramembránově. To je katalyzováno enzymatickým komplexem „ γ -secretase“, obsahujícím mimo jiné presenilin (Mumm a Kopan, 2000). Dochází k odštěpení NICD od receptoru na vnitřní straně buňky těsně za membránou.

C) Aktivační/reprimující komplex transkripčního faktoru CSL

Po přemístění NICD do jádra interaguje transkripčním faktorem CSL a dochází k tvorbě komplexu aktivujícího transkripci cílených genů. V takovém komplexu je kromě CSL a NICD přítomen MAML a opět SKIP, jemuž je přisuzována role při proměně z jednoho

komplexu na druhý (Zhou et al., 2000). Další součástí komplexu, Mastermind, je protein z rodiny koaktivátorů transkripce „**Mastermind-like** (MAML). Pomáhá stabilizovat trojčlenný komplex CSL/SKIP/MAML, který pak váže acetyltransferázu p300. Komplex navázaný na DNA následně přispívá k aktivaci transkripce regulovaných genů (Wu et al., 2002). CSL tvoří reprimující komplex v jádře pokud neinteraguje s NICD. Takový komplex brání transkripci regulovaných genů lokálními změnami stavby chromatinu. CSL-reprimující komplex je tvořen proteiny SKIP (**S**ki **I**nteracting **P**rotein), SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors), SHARP (SMRT and HDAC associated repressor protein), CIR (CBF1 interacting corepressor) a některými dalšími proteiny, včetně HDAC (histon deacetylase). Právě HDAC deacetylací histonů reprimuje tvorbu transkripčního komplexu RNA polymerázy. Více informací o reprimujícím komplexu a jeho složkách lze nalézt v části 5.

D) Degradace aktivačního komplexu CSL

NICD v komplexu s CSL a MAML nemá dlouhou životnost, přibližně 45 min. Pomocí MAML je vyvázána kináza CDK8, která fosforyluje NICD. Tato fosforylace v oblasti PEST vede k interakci s ubiquitinligásou Sel10 a následné degradaci NICD (Fryer et al., 2004). Poté se opět na CSL utvoří reprimující komplex.

CSL je klíčovým prvkem signalizace Notch na úrovni regulace transkripce a může být jak represorem tak aktivátorem.

1.3. Cíl práce

V kvasince *Schizosaccharomyces pombe* byly objeveny proteiny Cbf11 a Cbf12, které jsou podobné CSL v Metazoa. Dále budu mluvit o těchto proteinech jako o proteinech CSL v kvasinkách, a to zejména kvůli homologii v klíčových DNA vazebných doménách. Uvedený objev nastolil otázku: jakou roli hrály CSL proteiny u evolučně starších organismů ještě před vznikem mnohobuněčnosti. U Metazoa se CSL podílí klíčovou rolí na aktivaci i represi genů regulovaných signální dráhou Notch. Ale jaká role jim patří v organismech bez vyvinuté dráhy Notch a které proteiny se na těchto funkcích podílejí? U kvasinky působí dva zástupci rodiny CSL antagonisticky. Cbf11 podporuje a Cbf12 reprimuje adhezivitu buněk a

produkcí extracelulárního materiálu. Dále u nich byl zjištěn vliv na mitózu a koordinaci jaderného a buněčného dělení (Převorovský et al., 2009). Molekulární detaily jejich fungování ale dosud čekají na objasnění. Pro pochopení vzniku dráhy Notch jsou důležité i Notch-independentní funkce CSL v Metazoa. Souvisejí s funkcemi, které měly (mají) CSL proteiny v jednobuněčných organismech? Tato práce má za cíl poskytnout přehled metazoálních interakčních partnerů CSL se zřetelem na ty, které mají homology v kvasince *S. pombe*.

2. Evoluční historie signální dráhy Notch

Dráha Notch je spojena s evolucí mnohobuněčnosti u živočichů. Některé její složky se objevují už u jednobuněčných organismů, ale větší část proteinů, podílejících se na signalizaci Notch, se nachází až u Metazoa (Tab1). U živočišných hub (Porifera) lze již nalézt stěžejní prvky signalizace Notch včetně receptoru Notch a jeho ligandu Delta, chybí zde nicméně Mastermind, SMRT, Numb a Furin. U *Oscarella carmela*, zástupce Porifera, byly nalezeny homology téměř všech stěžejních komponent sedmi nejdůležitějších vývojových drah, které byly zmíněny v úvodu (Nichols et al., 2006). U dalšího zástupce Porifera, kterým je *Amphimedon queenslandica*, byla studována signalizace Notch. Během vývoje jedince exprimovala skupina buněk pod epitelem receptor Notch, ligand amqDelta1, CSL, proneurální bHLH gen AmqbHLH1 a další součásti dráhy Notch. Buňky, které pak migrovaly do epithelu larvy, exprimovaly AmqDelta1 a daly vzniknout předpokládaným sensorickým buňkám (Richards et al., 2008). U kmene Porifera řídí dráha Notch vznik sensorických buněk. U Cnidaria, blízkých předků trojlistých, jsou některé prvky Notch dráhy blíže trojlistým než dvojlistým. Z (Tab.1) je vidět, že v rámci Bilateria jsou komponenty Notch dráhy, až na výjimky, konzervovány. Výraznou výjimkou se zdá být Mastermind, který se našel u *Nematostella vectensis*, ale chybí u prvoústých kromě *Aedes aegypti* a u druhoústých se objevuje až u *Branchiostoma floridae*. Toto mizení a znovu objevování lze vysvětlit například genovou ztrátou. Zdánlivá absence MAML u některých zástupců může být také následkem toho, že Mastermind se v rámci Trojlistých velmi liší v DNA sekvenci. Je tedy možné, že použité metody nedokázaly u určitých genomů Mastermind identifikovat. Cnidaria patří mezi nejjednodušší mnohobuněčné organismy. U zástupce Cnidaria *Hydra vulgaris* byla ukázána aktivní signalizace Notch, a to pomocí inhibitoru presenilinu DAPT

(N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). Při jeho aplikaci neprobíhalo štěpení receptoru Notch a tudíž nebylo NICD detekováno v jádře. U *Hydra vulgaris* signalizace Notch indukuje diferenciaci nematoblastů v nematocyty a diferenciaci prekursorů oocytů ve zralé oocyty (Käsbauer et al., 2007). Protein CSL se nalézá u všech zkoumaných zástupců mnohobuněčných, Choanoflagellata a některých skupin hub. U zástupců všech těchto skupin se nalézá rovněž i E3 ubiquitin-ligáza *Nedd4/su(dx)*. Ta je negativním regulátorem dráhy Notch (Sakata et al., 2004). Také se u všech zkoumaných mnohobuněčných, Choanoflagellata, některých hub a navíc u rostlin, byl nalezen protein *Notchless*, který reguluje dráhu Notch interakcí s NICD (Royet et al., 1998). *Notchless* má rovněž vliv na biogenezi ribozomů u rostlin (Chantha et al., 2007). Zastoupení komponent signální dráhy Notch u organismů odvozených od předchůdců Metazoa naznačuje, že některé interakční bloky signální dráhy mohly existovat už v předchůdcích Metazoa. K rozvoji signální dráhy Notch došlo u Bilateria. Postupně se do dráhy začleňovaly další regulační součásti jako je SMRT, Fringe a další. Ještě později se objevily Mastermind a SMRT.

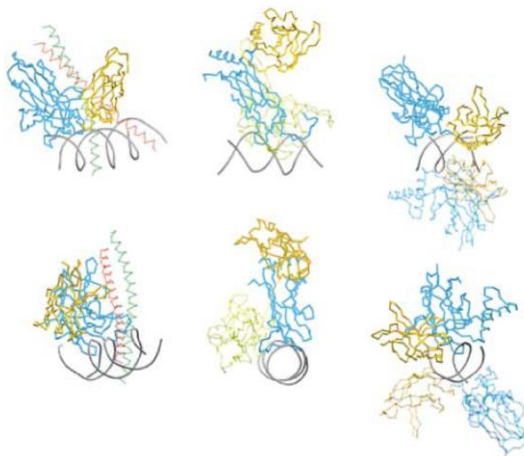
	OPISTHOKONTA																							
	METAZOA																	CHOANO		FUNGI		MICROSPOROZOA		
	Bilateria										Cnidaria			Ctenophora		Placozoa		Porifera			Dikarya		Unikaryonidae	
	Deuterostomia					Protostomia													Asco	Basidio				
	Hsa	Gga	Xtr	Dre	Bfl	Cin	Spu	Aae	Hro	Lgi	Cel	Nve	Hma	Mle	Ppi	Tad	Oca	Aqu	Monosiga	Spo	Scs	Uma	Ecu	
Notch													*	*										
Delta													*	*										
O-fut													*	*										
Fringe													*	*		*								
furin													*	*										
TACE=Adam17													*	*										
Kuzbanian=Adam10													*	*										
Presenilin													*	*										
Nicastrin													*	*										
APH1													*	*										
Pen2													*	*										
Su(H)													*	*										
Mastermind (Co-A)													*	*		*								
SMRT (Co-R)													*	*		*								
Numb													*	*		*								
HES/HEY													*	*		*								
Strawberry notch													*	*		*								
Neuralized													*	*		*								
Mindbomb													*	*		*								
Deltex													*	*		*								
Nedd4 /sudx													*	*		*								
Notchless													*	*		*								

Tab.1: Přehled zastoupení komponent dráhy Notch v evoluci. Představuje průřez eukaryotické říše na 23 zástupcích. Sestaven na základě analýzy známých částí genomu. A sestaven pomocí nástroje BLAST a hledání homologních proteinů. Černá pole značí silné homologie, šedá částečně a hvězdičky vyjadřují nedostatečná data. Přeřazeno a upraveno z (Gazave et al., 2009).

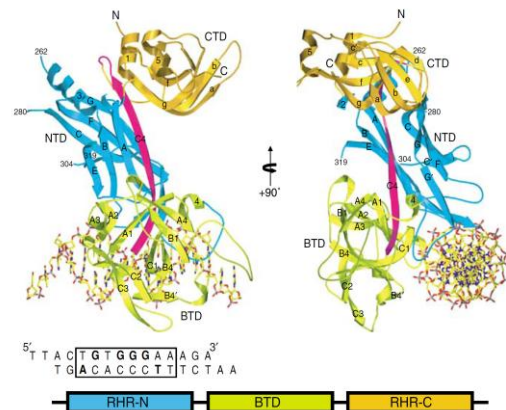
3. CSL

3.1. Struktura CSL

Transkripční faktor CSL je DNA vazebným prvkem dráhy Notch konzervovaným od kvasinek po člověka. Je tvořen třemi integrovanými doménami. N-koncovou doménou (RHR-N), β -trefoil(trojlist) doménou (BTD) a C-koncovou doménou (RHR-C). RHR-N a RHR-C jsou oblasti homologií s Rel (RHR - **Rel Homology Region**), které se podobají doménám u Rel, NF- κ B nebo NFAT (Chen et al., 1998; Ghosh et al., 1995). Na rozdíl od těchto proteinů je však mezi RHR domény vložena BTD, která interaguje s malým žlábkem DNA. RHR-N interaguje s velkým žlábkem DNA podobně jako Rel proteiny, ale RHR-C neinteraguje s DNA vůbec (viz obr.2), což je důležitý rozdíl mezi transkripčními faktory CSL a Rel (Wilson a Kovall, 2006).



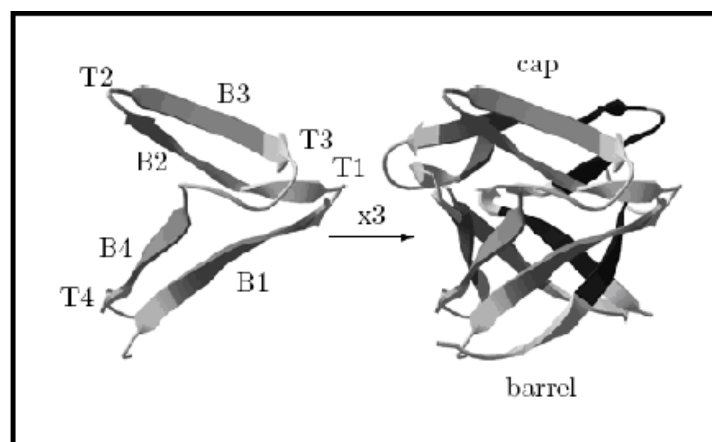
Obr.2: Tři rozdílné příklady vazby proteinu RHR na DNA. NFAT/Fos-Jun/DNA (1A02) struktura je vlevo, vpravo je p52 homodimer-DNA struktura a uprostřed je CSL-DNA struktura. RHR-N je modře, RHR-C je oranžovou. Ve všech případech je RHR-N ve stejné orientaci vůči DNA. RHR-C má ve všech případech různou pozici a u CSL-DNA se nepodílí na vazbě s DNA. Převzato z (Kovall a Hendrickson, 2004).



Obr.3: Struktura CSL. RHR-N je modře, BTD žlutě a RHR-C je oranžově. Smyčka C4 (fialově), která vede od BTD přes RHR-N na RHR-C zvyšuje integritu proteinu CSL jako celku tím, že se podílí na strukturách beta skládaných listů všech tří domén. Převzato z (Kovall a Hendrickson, 2004).

Beta-trefoil doména vložená mezi dvě RHR domény je hlavní odlišností CSL od jiných proteinů s RHR doménami. BTD je tvořena beta-soudkem s víkem, který má trojitou symetrii

tak jako u dalších proteinů které jsou touto doménou vybaveny; interleukinů a cytokinů (Murzin et al., 1992). Tento beta-barel je tvořen čtyřmi vlákny (B1-B4) ve trojitém opakování (viz. Obr. 4). Přitom vlákna B1 a B4 se podílejí na stěnách barelu a B2 a B3 tvoří víko (Graves et al., 1990). U BTM domény v CSL chybí druhá dvojice B2 a B3 v sekvenci. Tyto vlákna B2 a B3 se normálně podílejí na struktuře víka beta-barelu. Při jejich absenci je tudíž odhalena nepolární oblast. Tato nepolární kapsa je vcelku konzervovaná v rámci homologů CSL. Další odlišností BTM od jiných beta-trefoil domén jsou různé změny na smyčkách mezi řetězci. Z těch se zdá být nejvýznamnější ta změna, jež spojuje B4 první čtveřice s B1 druhé čtveřice. Je v podstatě rovnoběžná s DNA a míří směrem od proteinu (Kovall a Hendrickson, 2004). Mutace v oblasti této smyčky tlumily vazbu korepresoru CIR (CBF1 interacting corepresor) a došlo k snížení reprimující funkce CSL reprimujícího komplexu (Hsieh et al., 1999). O tom více v části o reprimujícím komplexu CSL. Co se týče vazby NICD na CSL, byla detekována interakce RAM s doménou BTM někde u nepolární oblasti odhalené nepřítomností B2 a B3 z druhé čtveřice smyček. Zdá se, že primární interakce je mezi motivem $\Phi W\Phi P$ (Φ je hydrofobní AK), který leží uvnitř RAM domény, a hydrofobní kapsou na BTM. Tomu nasvědčuje i podobný motiv-WWPP, u EBNA-2, který se pravděpodobně váže na stejném místě. EBNA-2 je transkripční aktivátor, který hraje stěžejní roli v imortalizaci primárních B-lymfocytů. Neváže se přímo na DNA, ale váže se na DNA-vazebný CSL protein RBPJ (Ling and Hayward, 1995).



Obr.4: Struktura BTM domény. Je tvořena trojitým opakováním motivu, tvořeného čtyřmi vlákny (B1,B2,B3,B4).

Vpravo je vidět že spodní část tvoří Beta-barel a horní část tvoří víko. Převzato z (McDonnell et al., 2006).

3.2. Funkce CSL

A) Notch-dependentní aktivační/reprimující funkce CSL

CSL tvoří v nepřítomnosti NICD komplex, který potlačuje transkripci cílových genů. Komplex mohou tvořit různé proteiny. Mezi hlavní patří SKIP, SMRT, CIR, KyoT2, SHARP a různé typy histon-deacetyláz a dalších součástí remodelujících chromatin (více v 5. části). Naproti tomu při vazbě NICD se tvoří aktivační komplex CSL-NICD-MAML na který se váží další proteiny modifikující chromatin jako je histonacetyltransferasa p300. Celý komplex pak umožňuje iniciaci transkripce regulovaných genů (pro přehled Borggreffe and Oswald, 2009). CSL tudíž slouží jako faktor transkripce aktivující nebo potlačující, a to v závislosti na navázaných proteinech tvořících příslušný komplex. Důležitou roli v tomto procesu hraje protein SKIP, u kterého byla ukázána interakce jak s prvky reprimujícího komplexu jako je SMRT, tak s NICD který navozuje stavbu aktivujícího komplexu, ale vždy výlučně jen s jedním z nich. To naznačuje, že by SKIP mohl napomáhat při výměně partnerů transkripčního faktoru CSL (Zhou et al, 2000). Zmíněná dvojí funkce CSL zvyšuje citlivost buňky na signalizaci Notch. Geny jsou přepisovány pouze při aktivní Notch signalizaci, což vede k větší amplitudě projevu signalizace.

B) Notch-independentní funkce CSL

Vzhledem k vysoce specifické a důležité funkci proteinů CSL v rámci signalizace Notch je velmi zajímavý objev CSL homologních proteinů (Cbf11 a Cbf12) u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* a dalších Ascomycetes (Prevorovsky et al., 2007). Homology CSL byly nalezeny i u zástupce Basidiomycetes; *Ustilago maydis*. V těchto jednobuněčných organismech se nenachází signální dráha Notch, a tudíž musejí CSL zastávat jinou funkci, která je nezávislá na Notch. CSL zastává některé Notch nezávislé funkce i v Metazoa. Například může aktivně regulovat svoji vlastní transkripci, a to independentně na NICD při vývoji mechanoreceptorů u *Drosophila* (Barolo et al., 2000). CSL je také vyžadován v komplexu s bHLH komplexem PTF1 u vývoje exokrinní tkáně slinivky břišní a také u vývoje specifických populací GABA-ergických neuronů (Beres et al., 2006; Hori et al., 2008). Nalezené proteiny CSL v *S. pombe* mají určité funkce, během nichž pravděpodobně interagují s dalšími proteiny. Je možné že některá z těchto funkcí je rekapitulována v

evolučně novějších Metazoa nebo se mohla konzervovat některá specifická interakce. Existence Notch-independentních funkcí transkripčních faktorů CSL v Metazoa nabízí možnost, že právě některá z interakcí CSL při těchto Notch-independentních funkcích je odkazem funkce CSL v jednobuněčných organismech.

4. Signální proteiny které mohou ukazovat na partnery CSL v jednobuněčných organismech před vznikem dráhy Notch

4.1. proteiny s doménou bHLH

4.1.1 proteiny s doménou bHLH a stavba PTF1 komplexu v Metazoa

V mnohobuněčných organismech byla identifikována interakce proteinu CSL s komplexem PTF1, podílejícím se na vývoji pankreas. Tento komplex je konzervován od octomilky po člověka. Tvoří jej heterotrimer DNA-vazebných proteinů; protein Ptf1a/p48 a kofaktor HEB/Tcf12, přičemž oba patří do bHLH rodiny transkripčních faktorů (Rose et al., 2001). Třetím proteinem v komplexu je CSL.

Proteiny rodiny bHLH jsou široce rozšířenou rodinou transkripčních faktorů. Mají vliv na vývoj a růst buněk, diferenciaci a apoptozu. První poznané a nejlépe prozkoumané jsou c-Myc a Myo-D. Na nich byla popsána struktura a charakterizována role domény „bazická oblast-helix-smyčka-helix“ (bHLH) při dimerizaci a vazbě na DNA. Aby se mohly vázat na DNA, musejí tyto transkripční faktory dimerizovat interakcí amfipatických helixů (HLH). Výsledkem dimerizace je apozice bazických oblastí. Tak je utvořen DNA-vazebný povrch, který interaguje s DNA sekvencí 5'-CANNTG-3' (Ferré-D'Amaré et al., 1993). V případě PTF1 komplexu je vazebná sekvence bipartitní. Je tvořena (a) sekvencí tzv. E-boxu 5'-CACCTG-3', na kterou se váží proteiny Ptf1a a Tcf12, a (b) sekvencí tzv. TC-boxu 5'-TTTCCA-3', na kterou se váže transkripční faktor CSL. U savců se vyskytují dva typy proteinů rodiny CSL, a to více rozšířený RBPJ a tkáňově specifický RBPL. Při aktivaci PTF1

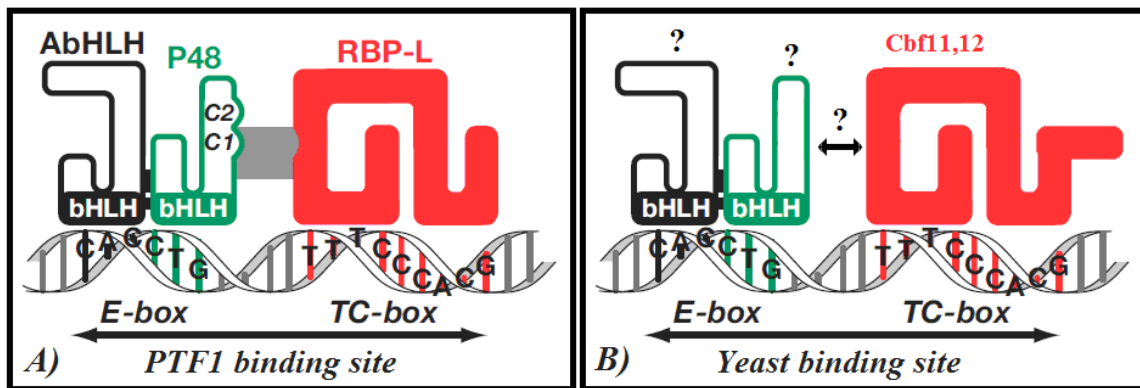
komplexu hraje jak se zdá zásadní roli RBPL. Sekvence E-boxu a TC-boxu jsou od sebe vzdáleny jednu nebo dvě obrátky DNA šroubovice. Vazba komplexu je přísně specifická a naruší jí bodová mutace v E-boxu nebo dvě mutace v TC-boxu. Také ji naruší změna vzdálenosti obou vazebných motivů na DNA o více než půl otáčky. Vazba samotného heterodimeru Ptf1a-Tcf12 není narušena mutací v TC-boxu, zatímco při vazbě komplexu CSL-Ptf1a-Tcf12 takovou mutací narušena je. To ukazuje na změnu vazebných vlastností heterodimeru Ptf1a-Tcf12 po navázání proteinu CSL. Přítomnost CSL v ternárním komplexu je nezbytná pro vysokou hladinu transkripce regulovaných genů. K vazbě CSL na Ptf1a je zapotřebí dvou motivů na Ptf1a vzdálených přibližně 17 aminokyselin. Tyto motivy jsou konzervovány od hmyzu až po člověka. Prvním motivem je sekvence HSLSW (C1), druhým WTPEDPR (C2). Při pokusech s mutacemi v sekvencích C1 a C2, zejména na pozicích W280 (C1) a W298 (C2), se ukázalo, že mutace v C1 mají silný vliv na vazbu RBPL a naopak mutace v C2 mají vliv na vazbu RBPJ. Při pokusech s mutacemi tryptofanu W280 a W298 se ukázal silný vliv na vazbu RBPJ, ale zanedbatelný vliv na vazbu RBPL. Na vazbu RBPL měly vliv mutace mimo úseky C1 a C2, a to (kromě hmyzu) konzervované aminokyseliny N246 a L273. To ukazuje na to, že oblast, která se podílí na vazbě s RBPL, je mnohem širší (Beres a kol, 2006). C2 je také zajímavý svou podobností s hydrofobní sekvencí v oblasti RAM u NICD. Z toho lze usuzovat, že C2 by se mohl vázat přímo do nepolární kapsy na doméně BTB proteinu CSL. Podobný motiv se nachází v sekvenci HAIRLESS, KYO-T2, NFATc4 a EBNA2.

P48	294	I	R	T	A	K	V	W	T	P	E	D	P	R	K	309
Notch1	1761	R	Q	H	G	Q	L	W	F	P	E	G	F	K		1775
NFATc4	218	R	A	S	P	R	P	W	T	P	E	D	P	W	S	233
Hairless	53	L	S	T	P	D	S	W	L	P	P	G	F	P	Q	68
KyoT2	298		V	K	A	P	V	W	W	P	M	K	D	N	P	312
								Φ	W	Φ	P					

Tab.2: **CSL-vazebné sekvence.** Sekvence některých interakčních partnerů (vyjma NFATc4) transkripčních faktorů CSL v oblasti motivu C2, důležitého pro vazbu – konsensus je ΦWΦP (Φ je hydrofobní AK). Převzato z (Beres et al., 2006).

4.1.2. proteiny s doménou bHLH v kvasinkách

Proteiny rodiny bHLH se podílejí na významné Notch-independentní funkci CSL v rámci vývoje slinivky od hmyzu po člověka. V rámci této funkce interaguje CSL přímo s proteinem Ptf1a z rodiny transkripčních faktorů bHLH. Tato funkce CSL je konzervována od hmyzu po člověka. Vzhledem k informacím o transkripčním faktoru z rodiny bHLH jako potencionálním funkčním partneru CSL, lze uvažovat o interakci CSL s proteiny z rodiny bHLH transkripčních faktorů v jednobuněčných organismech.



Obr.5: Model interakce proteinů CSL a proteinů rodiny bHLH v mnohobuněčných živočiších a v kvasinkách. A) Interakce bHLH proteinu Ptf1a s RBP-L a celková vazba na DNA.. B) Hypotetická interakce Cbf11,12 s bHLH proteiny v kvasinkách (Pho4, Ino2, Ino4, Cbf1, Rtg1, Rtg3, Sgc1, Hms1, Phd1, Esc1, Sre1,Sre2). Převzato a pro potřeby upraveno (Beres et al., 2006).

Transkripční faktory rodiny bHLH hrají důležitou roli v regulaci genové exprese mnoha genů různých biologických drah v eukaryotních organismech. Vzhledem k méně pokročilé analýze genomu *Schisosaccharomyces pombe* než genomu *Saccharomyces cerevisiae* je proteinů z rodiny bHLH více známo v rámci genomu *S. cerevisiae*. Lze však předpokládat, že většina z genů obsahujících doménu bHLH v *S. cerevisiae* popsanych v části (A) má homologní geny v genomu *S. pombe*. V (A) jsou popsány proteiny z rodiny bHLH v *S. cerevisiae*. V (B) jsou pak popsány proteiny z rodiny bHLH nalezené v *S. pombe*.

A) Proteiny z rodiny bHLH v *S. cerevisiae*

Pho4 byl prvním identifikovaným transkripčním faktorem z rodiny bHLH v *S. cerevisiae* (Berben et al., 1990). Pho4 se váže jako homodimer na sekvenci 5'-CACGTG-3',

kerou lze nalézt v oblasti promotoru některých genů, jejichž produkty se starají o využívání fosfátu. Pho4 funguje jako transkripční aktivátor v závislosti na stupni své fosforylace. Při dostatku anorganického fosfátu je Pho4 hyperfosforylován, poté je exportován z jádra. Když je anorganický fosfát vypotřebován, dojde k defosforylaci Pho4 a ten je poté opět transportován do jádra, kde aktivuje transkripci PHO5 a dalších genů potřebných k využití fosfátu (Robinson et al., 2000).

Ino2 a **Ino4** jsou transkripční faktory, které dereprimují a aktivují expresi genů pro biosyntézu fosfolipidů, jako je INO1. INO1 je inositol-1-fosfátsyasa. Ino2 a Ino4 dereprimací příslušných genů reagují na vyčerpání inositolu v buňce. Kmeny s mutacemi v Ino2 a Ino4 jsou auxotrofní na inositol. Studie ukázaly, že Ino4 dimerizuje s Ino2, který nese doménu aktivující transkripci (Schwank et al., 1995). Mechanismus dereprese genů pro biosyntézu fosfolipidů není ještě plně odhalen. Přesto byly identifikovány některé proteiny, které se na regulaci pravděpodobně podílejí. Jednou z proteinů, které vystupují v regulaci biosyntézy fosfolipidů, je Sin3, nesoucí funkci negativního regulátoru (Hudak et al., 1994). Kvasinkový Sin3 je homologem proteinu Sin3 u mnohobuněčných živočichů. Ten byl detekován v reprimujícím komplexu CSL. Dvě sekvence UAS_{ino} (upstream activation site) před oblastí promotoru genu INO1 ovlivňují působení SIN3 na expresi INO1 (Slekar a Henry, 1995). To naznačuje možnost interakce Sin3 s dimerem proteinů bHLH Ino2-Ino4, které se váží na sekvenci UAS_{ino}. Je nicméně otevřena i možnost, že Sin3 interaguje s UAS_{ino} jiným způsobem.

Gen **CBF1** (Centromere-binding factor 1) kóduje protein, u kterého byla zaznamenána vazba na úsek centroméry 5'-RTCACRTG-3'. Tento úsek se nazývá CDEI (Centromere DNA element I) (Moller et al., 1990). Delece genu CBF1 nebo odstranění CDEI vedlo ke stejným defektům ve funkci centromery při meióze a mitóze. Vazebný element CBF1 5'-CACRTG-3' se kromě centromery nalézá také v promotorové oblasti některých genů, jako jsou geny MET-biosytetické dráhy methioninu. Delece genu CBF1 způsobuje auxotrofii na methionin (Kent et al., 2004).

Rtg1 a **Rtg3** regulují expresi genu CIT2 a dalších genů podílejících se na Retrográdní dráze. Retrográdní dráha je signální dráha zprostředkávající komunikaci mezi mitochondriemi a jádrem za fyziologicky normálních i abnormálních podmínek. Signalizace

Retrográdní dráhou je schopna změnit exprese specifických jaderných genů, a to v reakci na defekt mitochondrií. Pomocí těchto genů je buňka schopna upravit metabolismus. Jedním z cílových proteinů Retrográdní dráhy je gen CIT2. Exprese CIT2 je mnohonásobně vyšší u buněk se sníženou schopností respirace (Liao et al., 1991). Rtg1 a Rtg3 tvoří heterodimér který se váže na UAS různých genů včetně CIT2. Vazebná sekvence komplexu Rtg1-Rtg3, kde transkripční doménu nese Rtg3, je odlišná od jiných bHLH proteinů. Tvoří ji takzvaný R-Box, což je sekvence 5'GTCAC-3'. Regulace Rtg1-Rtg3 komplexu probíhá také subcellulární lokalizací v závislosti na stavu fosforylace Rtg3. (Pro přehled Liu a Butow, 2006).

O řadě dalších faktorů jsou přístupné jen dílčí informace:

Sgc1 pozitivně reguluje transkripci většiny glykolytických genů v *S. cerevisiae*. Sgc1 je také vyžadován pro růst v mediu, kde je glukóza zdrojem uhlíku. Je pravděpodobné, že Sgc1 se váže na obvyklou sekvenci E-boxu (Nishi et al., 1995).

Hms1 je podobný rodině transkripčních faktorů Myc. Zvýšená exprese tohoto genu vede k filamentárnímu růstu (Lorenz a Heitman, 1999).

Phd1 (Pseudohyphal determinant) je transkripční faktor, jehož zvýšená exprese vede k výraznému pseudohyphálnímu růstu u diploidů. Na mediu s nízkým obsahem dusíku je indukována zvýšená exprese PHD1 (Gimeno a Fink, 1994).

B) Proteiny z rodiny bHLH v *S. pombe*

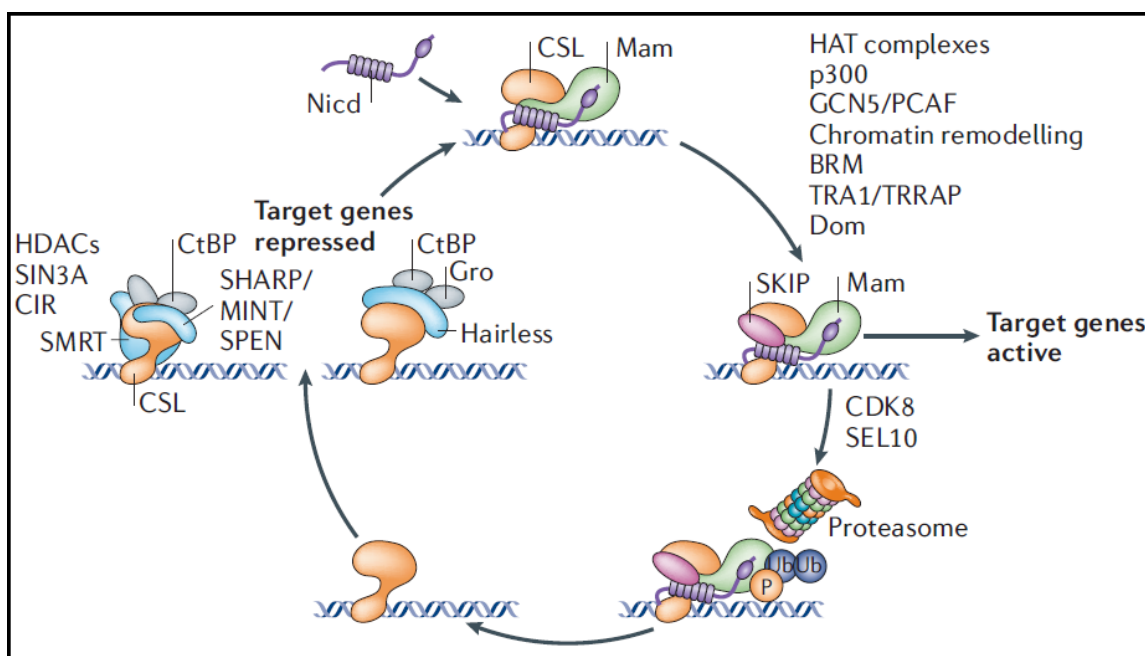
Přes nižší stupeň analýzy genomu *S. pombe* než *S. cerevisiae* byly některé proteiny z rodiny bHLH v *S. pombe* detekovány. Pomocí databáze jsem našel tyto proteiny vykazující bHLH doménu.

SPAC3F10.12c, hypotetický transkripční faktor, který je homolog proteinu Cbf1 u *S. cerevisiae*, který má vliv na funkci centromery a váže se poblíž promotoru genů MET. V obou případech se váže na sekvenci CACGTG (Kent et al., 2004). Více napsáno výše viz. Cbf1.

Esc1 (SPAC56F8.16) je transkripční faktor, který se podílí na sexuální diferenciaci na základě nedostatku dusíku v mediu. Specificky se jedná o odpověď na snížení cAMP, který je jedním z mediátorů signálu nedostatku dusíku. U mutantů s kompletně vyřazenou funkcí genu *Esc1* byla pozorována snížená schopnost konjugace (Benton et al., 1993).

Sre1 (**S**terol **r**egulatory **e**lement) (SPBC19C2.09) a **Sre2** (SPBC354.05c) jsou homology savčího proteinu SREBP-1a (Sterol Regulatory Element Binding Protein). SREBP jsou součástí signální dráhy udržující rovnováhu lipidů v buňce (Rawson, 2003). *Sre1* a *Sre2* fungují velmi podobně u *S. pombe*. Jde o proteiny s dvěma transmembránovými oblastmi, což naznačuje vazbu v membráně ER (**E**ndoplasmatické **R**etikulum), obdobně jako u SREBP. Dalším proteinem objeveným v *S. pombe* je *Scp1*, což je homolog savčího SCAP (SREBP Cleavage Activating Protein). Tento protein má u savců doménu interagující se SREBP, dále transmembránovou doménu a také obsahuje doménu SSD (**S**terol **S**ensing **D**omain). SCAP tvoří v membráně ER komplex se SREBP. Při dostatku sterolu v buňce je komplex blokován proteinem Insig z ER (Yang et al., 2002). Homolog Insig-1 byl nalezen v *S. pombe*. I přes nízkou celkovou identitu sekvence (21%) mají oba proteiny podobnou délku a předpovězenou strukturu (Hughes et al., 2005). Při nedostatku sterolu je komplex uvolněn z membrány ER pomocí SCAP a je přepraven do Golgiho aparátu. Tam dojde k dvěma proteolytickým štěpením a výsledný aktivní N-konec SREBP putuje do jádra, kde funguje jako transkripční faktor pro aktivaci genů syntézy sterolových produktů (Rawson, 2003). Při zkoumání funkce *Sre1* a *Scp1* v *S. pombe* byly ukázány analogie funkcí s těmi v savcích. Zajímavé bylo zjištění, že mutanty s kompletně vyřazenou funkcí genů *Sre1* a *Scp1* nerostly v prostředí o nízké koncentraci kyslíku. Při bližším zkoumání se ukázalo, že *Sre1* reguluje transkripci genů, mezi nimiž některé vyžadují kyslík pro svůj reakční mechanismus a dva jsou vyžadovány pro přechod od aerobního metabolismu k anaerobnímu. Tato zjištění poukazují na funkci *Sre1* nejen jako dráhy monitorující obsah sterolu ale také jako dráhy regulující adaptaci na hypoxii. Detekce hypoxie spočívá pravděpodobně ve snížené produkci sterolu při nedostatku kyslíku (Hughes et al., 2005).

4.2. CSL v represorových komplexech



Obr.6: Schéma dynamiky komplexů vybudovaných na DNA vazebném faktoru CSL. Na tomto obrázku je znázorněna stavba aktivačního komplexu (CSL, NICD, Mam, SKIP a další složky). Ten je poté degradován pomocí CDK8, SEL10. Na transkripčním faktoru CSL je poté vystavěn reprimující komplex (CSL, SMRT, CIR, SHARP a další složky). Převzato z (Bray, 2006).

4.2.1. CIR

CIR (CBF1 interacting corepressor) vystupuje v regulaci transkripce a v sestřihu pre-mRNA (Hsieh et al., 1999, Maita et al., 2005). Byl nalezen při dvoj hybridní analýze interakčních partnerů CBF1. Analýzou exprese RNA byla zjištěna přítomnost v mnoha tkáních. Tak jako u CBF1 byla nejvýraznější exprese pozorována v srdci, slinivce břišní a kosterním svalstvu. Bylo ukázáno, že CIR má represivní funkci, která není zprostředkována ani kompeticí o vazbu na DNA, ani destabilizací komplexu iniciace transkripce, ale pomocí dalšího proteinu modifikujícího chromatin. Tím je HDAC2 (**histondeacetyl**asa), která katalyzuje deacetylaci lyzinu na histonech. Při pokusech s dvouhybridním systémem CBF1 a HDAC2 se neukázala přímá interakce. Když byl ale pokus opakován na konstruktu CBF1-CIR, interakce s HDAC2 se objevila. HDAC2 není rekrutován přímo pomocí CIR, ale spíše přes známou složku deacetylačních komplexů, proteinem SAP30 (Sin3 asociated protein). Jak napovídá jméno tohoto proteinu, vyskytuje se většinou ještě s proteinem mSin3, dalšími SAP proteiny, HDAC

1,2 a histon-vazebnými proteiny (Hsieh et al., 1999). Tyto složky spolu tvoří deacetylační komplex. Do jaké míry je tento komplex přítomen u CSL-CIR-SAP30 zbývá ještě prozkoumat, ale pro SAP30 byla v dvojhybridním systému nalezena silná interakce s CIR. Je rovněž možné, že se CIR spolu s HDAC nalézá i v jiných represorových komplexech, než jen v komplexu s transkripčním faktorem CSL.

4.2.2. Cwf25

Protein Cwf25 (Complexed With Cdc-Five protein) byl identifikován na základě proteomické analýzy komplexu CDC5/NTC v kvasinkách *S. pombe* a *S. cerevisiae* (Ohi et al., 2002). Zajímá nás je homologie na N konci proteinu Cwf25 s tzv. N-koncovou doménou CIR. Vzhledem k tomu, že pro interakci CIR a CSL je klíčových prvních 121 AK proteinu CIR (Hsieh et al., 1999), je pravděpodobné, že oblast interakce s CSL leží právě v tomto N-koncovém regionu CIR.

Když Hsieh a spolupracovníci hledali mutanty CSL s potlačenou represorovou aktivitou, tudíž nevážící CIR, našli tyto mutace (233–235 EEF za AAA, 249–251 KLV za AAA). V této oblasti jsou si sekvence CSL *S. pombe* a u živočichů podobné. Pokud by tedy byly obě oblasti, jak vazebná na Cwf25, tak vázající na CSL v *S. pombe* zachovány, je tu možnost interakce Cwf25 s proteiny CSL v *S. pombe*. Na základě interakce s proteiny purifikovanými s komplexem Cdc5/NTC je Cwf25 připisována role v sestřihu. Cdc5 byl objeven v *S. pombe* při pátrání po mutantech s defektem v buněčném cyklu. V pozdějších studiích se ukázalo, že Cdc5 je vyžadován u pre-mRNA sestřihu (Burns et al., 1999). Oblast na C-konci proteinu CIR obsahuje dvě domény: (BA)- bohatou na bazický lysin a kyselý serin a druhou doménu (RS), která je tvořena opakováním dipeptidu arginin-serin. Tyto oblasti jsou považovány za klíčové pro protein-protein interakci v rodině proteinů SR. SR je široká rodina proteinů, které mají (RS) doménu bohatou na serin. Podílejí se na pre-mRNA sestřihu i alternativní sestřihu (Pro přehled Long a Caceres, 2009). Oblast u C-konce CIR je důležitá pro interakci s PAP-1, což je protein u něhož byla rovněž ukázána role v pre-mRNA sestřihu. U PAP-1 byla dokumentována slabá interakce přímo se splicesomem (Maita et al., 2005). Ve stejné studii byla také nalezena interakce CIR s U2AF³⁵. Cwf25 sdílí homologii s N-koncovou doménou CIR a zároveň se zdá, že oba proteiny hrají roli v sestřihu pre-mRNA.

4.2.3. KyoT2

Protein KyoT, také nazývaný SLIM (**S**keletal muscle **LIM**-protein), byl objeven při dvoj-hybridním prohledávání cDNA knihovny u myši jako interakční partner RBPJ (Taniguchi et al., 1998). Patří do rodiny Lim proteinů, které se vyznačují tzv. doménou LIM tvořenou dvěma motivy zinkových prstů. Obecně se předpokládá, že domény LIM zprostředkovávají protein-protein interakci (Feuerstein et al., 1994). Proteiny Lim se dělí na dvě třídy: proteiny LIM-only obsahující pouze domény LIM a proteiny LIM-homeodomain, které nesou ještě DNA vazebnou homeodoménu. Proteiny LIM se mimo jiné podílejí na regulaci transkripce, a to buď vazbou na DNA vazebný protein a zprostředkováním vazby dalších transkripčních faktorů, nebo přímou vazbou na DNA přes homeodoménu a následným vyvazováním transkripčních faktorů .

KyoT je LIM-only protein, který má nejméně 2 sestřihové varianty. První je KyoT1, která ovlivňuje syntetické procesy v kosterních svalech (Loughna et al., 2000). KyoT1 s RBPJ interaguje v dvoj-hybridním systému pouze velmi slabě. Druhá varianta, nazývaná KyoT2, vznikne vystřížením intronu a zároveň dojde ke změně čtecího rámce na C-konci. Předpokládá se, že v C-koncové části leží hlavní oblast interakce s RBPJ. Na druhou stranu vzhledem k slabé interakci KyoT1 s RBPJ, přičemž KyoT1 nemá díky posunu čtecího rámce onu C-koncovou oblast, lze usoudit, že na interakci se nepodílí pouze C-koncová oblast. Za motiv klíčový pro vazbu je považována sekvence WWPM (Taniguchi et al., 1998), která se nachází v C-koncové oblasti KyoT2. Je podobná klíčovému motivu některých interakčních partnerů (viz Tab.2 výše). Z počátku se zdálo, že KyoT2 reprimuje transkripci Notch genů pouze kompeticí o vazebnou sekvenci aktivátorů. Později však byla identifikována interakce s proteinem RING1, který byl dříve identifikován jako represor transkripce (Satijn et al., 1997). Ukázalo se, že pomocí RING1 reprimuje KyoT2 transkripci za tvorby komplexu RBPJ-KyoT2-RING1. Snížená exprese byla ukázána i u RBPJ-V16, což je konstitutivně aktivující forma RBPJ (Qin et al., 2004). To naznačuje, že mechanismus represe netkví pouze v blokování vazebné sekvence aktivujících faktorů, ale také ve využití sekundárních faktorů. RING1 může rekrutovat PcG (**P**olycomb **G**roup) komplex, který zneprístupňuje vybrané oblasti chromatinu (Satijn et al., 1997). Jak se ukázalo, KyoT2 může nejen

vyvazovat klíčovou aktivační oblast na proteinu, ale pomocí LIM domén může vyvazovat další faktory, které mění strukturu lokálního chromatinu.

4.2.4. SMRT a SHARP

SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) byl identifikován Chenem a Evansem v roce 1995 jako korepresor receptorů pro kyseliny retinovou a thyroïdní hormon. Brzy poté byla odhalena příbuznost s N-CoR (Nuclear receptor CoRepressor) (Chen et al., 1996). Vedle role, kterou SMRT hraje v koregulaci jaderných hormonálních receptorů, se ukázalo, že SMRT se také podílí na reprimujícím komplexu CSL. Váže se do něj a vyvazuje HDAC1 (Kao et al., 1998). Takový komplex je pak schopen regulace chromatinu v dané oblasti. V roce 2002 byl identifikován SHARP (SMRT and HDAC associated repressor protein) jako nová součást represivního komplexu CSL (Oswald et al., 2002). Později byly identifikovány dva proteiny CtBP (C-terminal Binding Protein) a CtIP (CtBP Interacting Protein) a bylo ukázáno, že jsou nezbytné pro správnou funkci reprimujícího komplexu (Oswald et al., 2005).

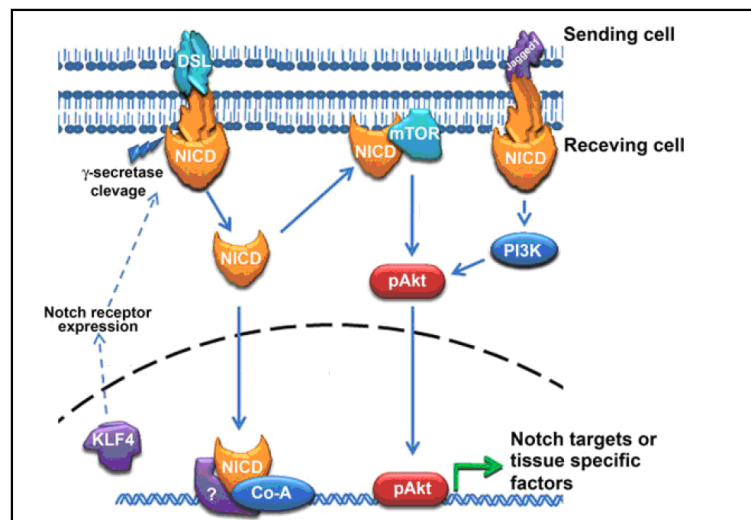
4.2.5. SNW1/SKIP

Důležitým proteinem, který propojuje mnoho složek jak signalizace Notch tak i dalších dějů v buňkách, je SNW1/SKIP (Ski interacting protein), dále jako SKIP. Ovlivňuje zejména transkripci a sestřih. SKIP byl identifikován Dahlem a spol. při hledání interakčních partnerů onkogenního proteinu v-Ski (Dahl et al., 1998). Jeho sekvence se ukázala být vysoce konzervována v rámci Metazoa i jednobuněčných. Našel se také homologní protein v *S. cerevisiae*. Později byl SKIP identifikován jako protein interagující s CBF1. Když byl zkoumán vliv SKIP na expresi reportérového genu s vazebným místem pro GAL4 pomocí GAL4-SKIP konstruktů, ukázalo se, že SKIP potlačuje expresi. Tento úbytek exprese byl srovnatelný s použitím GAL4-CBF1 konstruktů (Zhou et al., 2000). Z dalších proteinů komplexu na CSL byla ukázána interakce mezi SKIP a SMRT. Použitím mutace CBF1(EEF233AAA), která ruší interakci CBF1 se SMRT, bylo ukázáno, že SKIP interaguje s CBF1 nezávisle na SMRT. Z důvodu zkoumání možných způsobů přestavby reprimujícího komplexu CBF1 na komplex aktivační při interakci s NICD byla podrobena zkoumání možná

interakce SKIP a NICD. Pomocí dvou-hybridního systému v HeLa buňkách byla ukázána interakce těchto dvou proteinů. K určení, zda je tato interakce nezávislá na účasti CBF1, byl vytvořen konstrukt, ve kterém měl NICD odstraněnou RAM doménu. NICD bez RAM domény interagovalo s proteinem SKIP. Interakce SKIP a NICD je tedy nezávislá na CBF1. Bylo zjištěno, že interakce SKIP a NICD vyžaduje čtvrté ankyrinové opakování ve struktuře NICD. Význam SKIP pro Notch regulaci se ukázal při pokusu na diferenciaci myoblastů v myotuby. Když byly buňky vystaveny komplementární mRNA SKIP, nebyly schopné projít diferenciací v myotuby. To odpovídá konstantní aktivaci CSL pomocí NICD. Nedošlo tedy k přebudování aktivačního komplexu CSL na reprimující komplex. To ukázalo na nutnou přítomnost SKIP při přebudování aktivačního komplexu CSL na komplex reprimující.

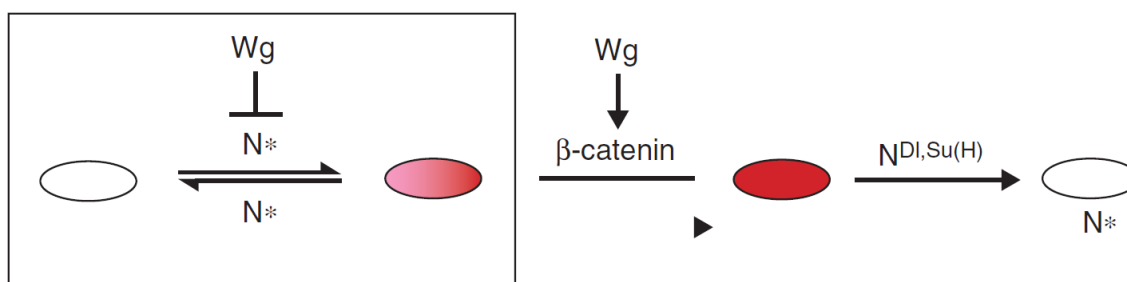
5. CSL-independentní funkce Notch

Jak bylo popsáno výše, protein CSL má jak Notch závislé, tak Notch nezávislé funkce. Vystává otázka jak je to s druhým podstatným prvkem signální dráhy Notch, kterým je receptor Notch. Zda má vedle interakce s transkripčním faktorem CSL ještě jiné funkce. Zda interaguje s proteiny, které nejsou součástí dráhy Notch. Ukázalo se, že receptor Notch má CSL-independentní funkce. To je zajímavé z hlediska evoluce dráhy Notch.



Obr.7: CSL-independentní signalizace Notch a interakce s příslušnými faktory. Zleva doprava jsou znázorněny: vliv KLF4 na expresi receptoru Notch, interakce NICD s potencionálním transkripčním faktorem odlišným od CSL, interakce NICD s mTOR a aktivace pAkt. Potencionální interakce receptoru Notch a PI3K aktivující pAkt. Převzato ze (Sanalkumar et al.,2010).

Při srovnání mutantních fenotypů u *Drosophila* byl pozorován výraznější projev delece genu receptoru Notch než tomu bylo u delece ligandu Delta, CSL nebo E(Spl). To ukázalo na to, že vliv receptoru Notch přesahuje funkce závislé na CSL. Jinak by mutanta Notch měla shodný fenotyp s mutantou CSL. Další důkaz CSL-independtní signalizace Notch byl přinesen pomocí dvou rozdílných typů mutant. Oba zablokovaly vývoj prekursoru senzoričského orgánu (PSO). Mutace $I(1)^N^B$ v LNR motivu receptoru Notch nebránila první úvodní fázi vývoje PSO, kdy byly vybrány buňky exprimující geny komplexu Achaete-scute. Poté však nedošlo k vývoji PSO z důvodu příliš intenzivní signalizace Notch. Tuto mutaci lze kompenzovat vyřazením funkce proteinu CSL. U druhého typu mutace (A_{X59d} , A_{XM1} , *Microchaetae defective* (*Mcd*)) nebyl vývoj ani zahájen; nedocházelo k expresi genů komplexu Achaete-scute. Tento typ mutanty tedy nebylo možné kompenzovat vyřazením funkce CSL. Uvedená CSL-independentní signalizace má vliv na volbu buněčné linie (Martinez Arias et al., 2002).



Obr. 8: **Proces rozhodování o buněčné diferenciaci u neurálních/mesodermálních prekursorů.** U *Drosophila melanogaster* lze rozdělit diferenciaci u neurálních/mesodermálních prekursorů do dvou částí. Nejprve je na základě vnitřních a vnějších podnětů a signálů iniciována exprese genů komplexu Achaete-scute (v rámečku; značeno různými odstíny červené). Tato exprese nicméně není stabilní a je antagonizována **CSL-independentní** signalizací Notch (N^*). Tato signalizace je v některých buňkách zablokována pomocí signální dráhy Wnt, což u nich vede ke stabilizaci exprese komplexu Achaete-scute (prostřednictvím kanonické dráhy Wnt/ β -catenin). Počet buněk, které takto diferencují (značeno červenou), je ale přísně omezen následně indukovanou - a **CSL-dependentní** - signalizací Notch, vlivem které je v sousedních buňkách restaurován stav před zahájením diferenciace (symbolicky vyznačeno bílou). Převzato a upraveno z (Martinez Arias et al., 2002).

U savců byl zkoumán CSL-independentní vliv receptoru Notch na myogenní diferenciaci. Byly sestrojeny mutanty *CDN1* a *CDC1N*, kde první je tvořena úsekem z NICD od ankyrinových opakování po PEST sekvenci a druhá mutanta je tvořena pouze ankyrinovými

opakováními se třemi HA epitopy na konci. Takovéto mutanty neinteragují s CBF1, protože postrádají RAM doménu, která je zodpovědná za interakci s CSL. Stejně tak nezvyšují expresi bHLH proteinu HES-1, který blokuje myogenní konverzi fibroblastů při CSL-dependentní signalizaci Notch. Tyto mutanty úspěšně zabránily diferenciaci v testovaných buňkách C2C12. Tato zjištění poukázala na alternativní dráhu receptoru Notch (viz obr. 7), kdy pravděpodobně interaguje s odlišným transkripčním faktorem v jádře než jsou CSL (Shawber et al, 1996). Tato zjištění ukazují, že CSL-independentní signalizace receptoru Notch brání buňkám v diferenciaci (Martinez Arias et al., 2002).

CSL-independentní signalizace Notch má také vliv na jiný podstatný proces v buňce, kterým je buněčná smrt/přežití při nedostatku živin a na základě vnějších signálů. mTOR (**M**ammalian **t**arget **o**f **r**apamycin) je evolučně konzervovaný protein s proteinkinasovou doménou. mTOR dráha reguluje mnohé procesy v buňce v závislosti na stavu živin: buněčný růst, proliferaci, pohyb, přežití a sytému proteinů (Hay a Sonenberg, 2004). Ukázalo se, že NICD může integrovat s mTOR a Rictor (**R**apamycin **i**ndependent **c**ompanion of **m**TOR); Rictor interaguje s mTOR. Takto vzniklý komplex NICD-mTOR-Rictor aktivuje kinázu Akt (viz Obr.7). Akt může fosforylací pozitivně regulovat funkci mTOR a zároveň se podílí na antiapoptotické kaskádě blokující buněčnou smrt. CSL-dependentní signální dráha Notch nemá vliv na tuto dráhu (Perumalsamy et al., 2009).

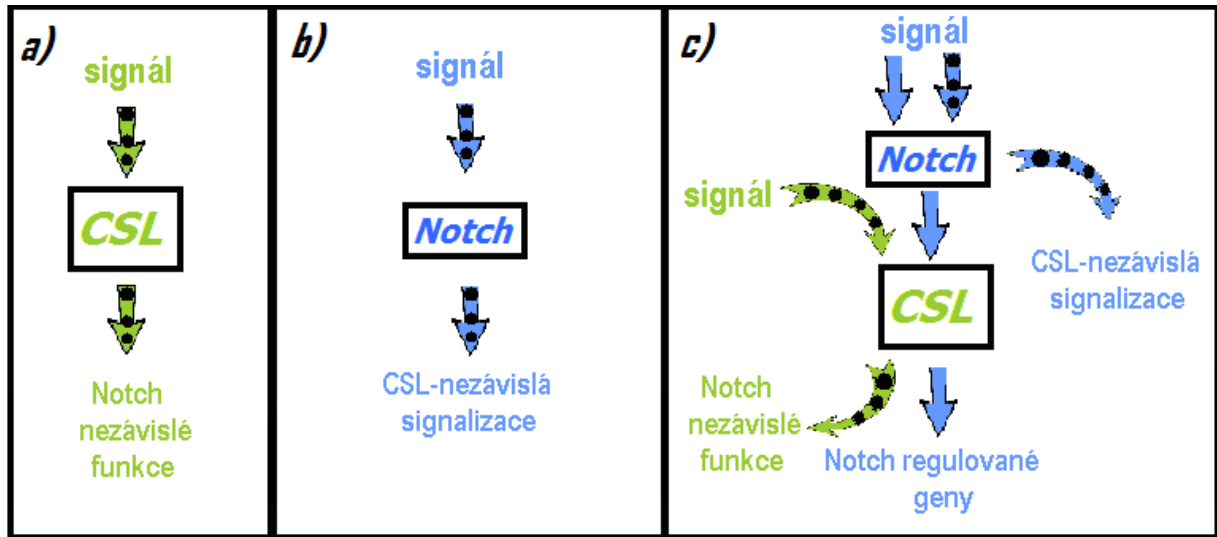
Signalizace Notch nezávislá na CSL má vliv na mnohé buněčné pochody jako jsou diferenciaci, apoptózu a transformaci buněčné linie v nádorovou (Sanalkumar et al.,2010).

6. Závěr

Proteiny z rodiny CSL, které hrají ústřední roli v regulaci genové exprese pomocí signální dráhy Notch, byly identifikovány v kvasinkách *S. pombe* a *U. maydis*. Kvasinky jsou jednobuněčné organismy, které nemají funkční signální dráhu Notch a neobsahují ani většinu z jejích komponent. Vystává tedy otázka jakou roli hrály proteiny CSL před tím, než se staly součástí signální dráhy Notch. Odpověď na tuto otázku není dosud známa. Je možné, že molekulární interakce proteinů CSL, které probíhají v kvasinkách, se v nějaké formě dochovaly i v mnohobuněčných organismech. V Metazoa byly identifikovány některé funkce proteinů CSL, které jsou nezávislé na signalizaci Notch. CSL je například součástí komplexu PTF1, který vystupuje v genové regulaci při vývoji exokrinní části slinivky břišní. V tomto komplexu interaguje s transkripčním faktorem p48, který obsahuje doménu bHLH. Kromě proteinů z rodiny bHLH interagují CSL také s adaptorem KyoT2, který se prostřednictvím domény LIM angažuje v řadě protein-proteinových interakcí. Po navázání KyoT2 na CSL se vytvoří reprimující komplex regulující transkripci v dané oblasti DNA. Analogické typy interakcí jsou možné i v kvasinkách. Pozůstatkem ancestrálních interakcí proteinů CSL v jednobuněčných organismech mohou být i interakce v rámci reprimujícího komplexu CSL, vytvářeného v regulačních oblastech Notch-regulovaných genů před příchodem signálu NICD. Z tohoto hlediska jsou zajímavými komponentami represivních CSL-komplexů například SNW1, homolog SKIP, nebo Cwf25, který má oblast homologní s CSL-interagujícím úsekem CIR.

Interakce CSL s vazebnými partnery v Metazoa se v mnoha případech odehrává na povrchu hydrofobní kapsy domény BTB. Na tuto oblast se váží NICD, KyoT2, p48 a virový protein EBNA2. Tyto proteiny se váží pomocí struktury s charakteristickým hydrofobním motivem, $\Phi W \Phi P$ (Φ je hydrofobní aminokyselina). I přes některé společné vlastnosti interakcí CSL s proteiny se nezdá příliš pravděpodobné že by zmiňované charakteristiky interakčních oblastí CSL a interakčních partnerů CSL byly konzervovány už od kvasinek.

Vedle CSL má alternativní funkce i membránový receptor Notch. Například se předpokládá, že by NICD mohla interagovat s jiným transkripčním faktorem v jádře než s CSL. Další funkcí je interakce s mTOR komplexem, který reguluje buněčnou smrt. NICD vytvoří komplex s mTOR a Rictor, který aktivuje Akt kinázu. Ta může pozitivně regulovat mTOR a podílí se na antiapoptotické dráze.



Obr.9: Schéma možné evoluce signální dráhy Notch. a) Notch-independentní funkce CSL v jednobuněčných organismech. b) CSL-independentní signalizace receptoru Notch. c) Plně šipky znázorňují kanonickou dráhu Notch. Tečkované šipky znázorňují alternativní funkce transkripčního faktoru CSL a receptoru Notch, které existují souběžně s dráhou Notch v Metazoa.

Jak Notch-independentní funkce proteinů CSL, tak CSL-independentní funkce receptorů Notch ukazují na samostatné role dvou signálních systémů. Tyto dnes nalézané „nekanonické“ funkce mohou být pozůstatkem nezávislých drah, které evolučně předcházely vzniku signalizace Notch (viz Obr. 9). Velký význam pro poznání vzniku kanonické dráhy Notch by mělo mít zjištění funkce proteinů CSL v kvasinkách. Tato práce se pokouší poskytnout přehled Notch-independentních interakcí proteinů CSL v Metazoa. Některé z nich mohou být analogické interakcím CSL, které fungují v kvasinkách.

Použitá literatura:

- Barolo S, Walker RG, Polyakov AD, Freschi G, Keil T, Posakony JW** (2000) A notch-independent activity of suppressor of hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell*. 103(6): 957-69.
- Benton BK, Reid MS, Okayama H** (1993) A *Schizosaccharomyces pombe* gene that promotes sexual differentiation encodes a helix-loop-helix protein with homology to MyoD. *EMBO J*. 12(1): 135-143.
- Beres TM, Masui T, Swift GH, Shi L, Henke RM, MacDonald RJ** (2006) PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol Cell Biol*. 26(1): 117-30.
- Berben G, Legrain M, Gilliquet V, Hilger F** (1990) The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast*. 6(5): 451-4.
- Borggreve T, Oswald F** (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*. 66(10): 1631-46.
- Bray SJ** (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(9): 678-89.
- Bray SJ** (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(9): 678-89.
- Bray S** (1998) Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 9(6): 591-7.
- Burns CG, Ohi R, Krainer AR, Gould KL** (1999) Evidence that Myb-related CDC5 proteins are required for pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(24):13789-13794.
- Dahl R, Wani B, Hayman MJ** (1998) The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene*. 16(12): 1579-1586.
- Dallon JC, Othmer HG** (1997) A discrete cell model with adaptive signalling for aggregation of *Dictyostelium discoideum*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 352(1351): 391-417.
- D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G** (2008) The many facets of Notch ligands. *Oncogene*. 27(38): 5148-67.
- Ferré-D'Amaré AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK** (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature*. 363(6424): 38-45.

Feuerstein R, Wang X, Song D, Cooke NE, Liebhaber SA (1994) The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(22):10655-10659.

Fiúza UM, Arias AM (2007) Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol.* 194(3):459-74.

Fryer CJ, White JB, Jones KA (2004) Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell.* 16(4): 509-20.

Gazave E, Lapébie P, Richards GS, Brunet F, Ereskovsky AV, Degnan BM, Borchiellini C, Vervoort M, Renard E (2009) Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol.* 9: 249.

Gerhart J (1999) 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology.* 60(4): 226-39.

Ghosh G, van Duyne G, Ghosh S, Sigler PB (1995) Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature.* 373(6512): 303-10.

Gimeno CJ, Fink GR (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol.* 14(3): 2100-2012.

Graves BJ, Hatada MH, Hendrickson WA, Miller JK, Madison VS, Satow Y (1990) Structure of interleukin 1 alpha at 2.7-A resolution. *Biochemistry.* 29(11): 2679-84.

Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18(16): 1926-1945.

Hori K, Cholewa-Waclaw J, Nakada Y, Glasgow SM, Masui T, Henke RM, Wildner H, Martarelli B, Beres TM, Epstein JA, Magnuson MA, Macdonald RJ, Birchmeier C, Johnson JE (2008) A nonclassical bHLH Rbpj transcription factor complex is required for specification of GABAergic neurons independent of Notch signaling. *Genes Dev.* 22(2): 166-78.

Hsieh JJ, Zhou S, Chen L, Young DB, Hayward SD (1999) CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(1): 23-8.

Hudak KA, Lopes JM, Henry SA (1994) A pleiotropic phospholipid biosynthetic regulatory mutation in *Saccharomyces cerevisiae* is allelic to *sin3* (*sdi1*, *ume4*, *rpd1*). *Genetics.* 136(2): 475-83.

- Hughes AL, Todd BL, Espenshade PJ** (2005) SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell*. 120(6): 831-842.
- Chantha SC, Tebbji F, Matton DP** (2007) From the notch signaling pathway to ribosome biogenesis. *Plant Signal Behav*. 2(3): 168-70.
- Chen JD, Umesono K, Evans RM** (1996) SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(15): 7567-7571.
- Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC** (1998) Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature*. 392(6671): 42-8.
- Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T** (1998) A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev*. 12(15): 2269-2277.
- Käsbauer T, Towb P, Alexandrova O, David CN, Dall'armi E, Staudigl A, Stiening B, Böttger A** (2007) The Notch signaling pathway in the cnidarian Hydra. *Dev Biol*. 303(1): 376-90.
- Kent NA, Eibert SM, Mellor J** (2004) Cbf1p is required for chromatin remodeling at promoter-proximal CACGTG motifs in yeast. *J Biol Chem*. 279(26): 27116-23.
- Kim J, Irvine KD, Carroll SB** (1995) Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing Drosophila wing. *Cell*. 82(5): 795-802.
- Kovall RA, Hendrickson WA** (2004) Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J*. 23(17): 3441-51.
- Liao XS, Small WC, Srere PA, Butow RA** 1991 Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 11(1): 38-46.
- Ling PD, Hayward SD** (1995) Contribution of conserved amino acids in mediating the interaction between EBNA2 and CBF1/RBPJk. *J Virol*. 69(3): 1944-50.
- Liu Z, Butow RA** (2006) Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet*. 40: 159-185.
- Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israël A** (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(14): 8108-12.
- Long JC, Caceres JF** (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J*. 417(1):15-27.

- Lorenz MC, Heitman J** (1998) Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics*. 150(4): 1443-1457.
- Loughna PT, Mason P, Bayol S, Brownson C** (2000) The LIM-domain protein FHL1 (SLIM 1) exhibits functional regulation in skeletal muscle. *Mol Cell Biol Res Commun*. 3(3): 136-140.
- Maita H, Kitaura H, Ariga H, Iguchi-Ariga SM** (2005) CIR, a corepressor of CBF1, binds to PAP-1 and effects alternative splicing. *Exp Cell Res*. 303(2): 375-387.
- Martinez Arias A, Zecchini V, Brennan K** (2002) CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev*. 12(5): 524-533.
- McDonnell AV, Menke M, Palmer N, King J, Cowen L, Berger B** (2006) Fold recognition and accurate sequence-structure alignment of sequences directing beta-sheet proteins. *Proteins*. 63(4): 976-85.
- Mellor J, Jiang W, Funk M, Rathjen J, Barnes CA, Hinz T, Hegemann JH, Philippsen P** (1990) CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters. *EMBO J*. 9(12): 4017-26.
- Mumm JS, Kopan R** (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*. 228(2):
- Murzin AG, Lesk AM, Chothia C** (1992) beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *J Mol Biol*. 223(2):531-43.
151-65.
- Nichols SA, Dirks W, Pearse JS, King N** (2006) Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(33): 12451-6.
- Nishi K, Park CS, Pepper AE, Eichinger G, Innis MA, Holland MJ** (1995) The GCR1 requirement for yeast glycolytic gene expression is suppressed by dominant mutations in the SGC1 gene, which encodes a novel basic-helix-loop-helix protein. *Mol Cell Biol*. 15(5): 2646-2653.
- Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL** (2002) Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol*. 22(7): 2011-2024.

Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knöchel W, Liptay S, Schmid RM (2002) SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J.* 21(20): 5417-5426.

Oswald F, Winkler M, Cao Y, Astrahantseff K, Bourteele S, Knöchel W, Borggreffe T (2005) RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol.* 25(23): 10379-10390.

Perumalsamy LR, Nagala M, Banerjee P, Sarin A (2009) A hierarchical cascade activated by non-canonical Notch signaling and the mTOR-Rictor complex regulates neglect-induced death in mammalian cells. *Cell Death Differ.* 16(6): 879-889.

Prevorovský M, Grousl T, Stanurová J, Rynes J, Nellen W, Půta F, 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(8): 1533-47.

Prevorovský M, Půta F, Folk P (2007) Fungal CSL transcription factors. *BMC Genomics.* 8:233.

Qin H, Wang J, Liang Y, Taniguchi Y, Tanigaki K, Han H (2004) RING1 inhibits transactivation of RBP-J by Notch through interaction with LIM protein KyoT2. *Nucleic Acids Res.* 32(4): 1492-1501.

Rawson RB (2003) The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(8): 631-640.

Richards GS, Simionato E, Perron M, Adamska M, Vervoort M, Degnan BM (2008) Sponge genes provide new insight into the evolutionary origin of the neurogenic circuit. *Curr Biol.* 18(15): 1156-61.

Robinson KA, Koepke JI, Kharodawala M, Lopes JM (2000) A network of yeast basic helix-loop-helix interactions. *Nucleic Acids Res.* 28(22): 4460-6.

Rose SD, Swift GH, Peyton MJ, Hammer RE, MacDonald RJ (2001) The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *J Biol Chem.* 276(47): 44018-26.

Royet J, Bouwmeester T, Cohen SM (1998) Notchless encodes a novel WD40-repeat-containing protein that modulates Notch signaling activity. *EMBO J.* 17(24): 7351-60.

Sakata T, Sakaguchi H, Tsuda L, Higashitani A, Aigaki T, Matsuno K, Hayashi S (2004) *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol.* 14(24): 2228-36.

- Sanalkumar R, Dhanesh SB, James J** (2010) Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell Mol Life Sci.* [Epub ahead of print]
- Satijn DP, Gunster MJ, van der Vlag J, Hamer KM, Schul W, Alkema MJ, Saurin AJ, Freemont PS, van Driel R, Otte AP** (1997) RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol.* 17(7):4105-4113.
- Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bögler O, Hayward D, Weinmaster G** (1996) Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development.* 122(12): 3765-3773.
- Schmitt R** (2003) Differentiation of germinal and somatic cells in *Volvox carteri*. *Curr Opin Microbiol.* 6(6): 608-13.
- Schwank S, Ebbert R, Rautenstrauss K, Schweizer E, Schüller HJ** (1995) Yeast transcriptional activator INO2 interacts as an Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix heteromeric complex with the inositol/choline-responsive element necessary for expression of phospholipid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23(2): 230-7.
- Skeath JB, Thor S** (2003) Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol.* 13(1): 8-15.
- Slekar KH, Henry SA** (1995) SIN3 works through two different promoter elements to regulate INO1 gene expression in yeast. *Nucleic Acids Res.* 23(11): 1964-9.
- Taniguchi Y, Furukawa T, Tun T, Han H, Honjo T** (1998) LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with the RBP-J DNA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 18(1): 644-654.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS** (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 110(4): 489-500.
- Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD** (2000) SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol.* 20(7): 2400-10.
- Wilson JJ, Kovall RA** (2006) Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell.* 124(5): 985-96.
- Wu L, Sun T, Kobayashi K, Gao P, Griffin JD** (2002) Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol.* 22(21): 7688-700.