

ABSTRAKT

Proteiny Cbf11 a Cbf12, patřící do rodiny transkripčních faktorů CSL, jsou u poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* zapojeny v široké škále buněčných procesů – mj. regulují buněčnou adhezi a podílejí se na udržování integrity genomu. V rámci celého genomu jsme již dříve identifikovali cílové lokusy, kam se proteiny CSL váží *in vivo*. Mnoho z cílových míst neobsahuje konsenzuální CSL-vazebný element. Patrně existují různé režimy vazby proteinů Cbf11/12 na DNA a doposud nebylo známo, s jakou biologickou funkcí je způsob vazby na DNA spojen.

Pro účely studia DNA-vazebných módů proteinů CSL jsme v rámci tohoto projektu pracovali na zavedení DNA-vazebné mutace (DBM), která způsobuje ztrátu schopnosti proteinů CSL se vázat na kanonický motiv *in vitro*, do chromozomálního lokusu genů *cbf11* a *cbf12*. S použitím „*ura4* selekčního systému“ jsme úspěšně zkonstruovali kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP, tj. kmeny bez/s DBM v otevřeném čtecím rámci Cbf12, ve kterých je navíc protein Cbf12 C-terminálně značen TAP-tagem a obsahuje intaktní oblast 3'UTR. Nově jsme v naší laboratoři zavedli CRISPR/Cas9 systém, s využitím kterého se nám podařilo připravit kmen Cbf11-TAP. S konstrukcí kmene Cbf11DBM-TAP jsme prozatím neuspěli, nicméně v rámci práce diskutujeme možné optimalizace konstrukčního postupu, které by mohly vést ke zdárnému výsledku. Na základě výsledků získaných metodou omývacího testu jsme zjistili, že pro proces regulace buněčné adheze je potřeba zachovat funkční DNA-vazebnou doménu proteinu Cbf12. Tyto výsledky korelují s daty z vazebné studie, kde jsme sledovali vazbu Cbf12 vs. Cbf12DBM *in vivo* do promotorových oblastí genů *cbf12*, *gsf2* a *pfl7*, které se regulace buněčné adheze účastní. Naše výsledky dále ukazují, že schopnost kanonické přímé vazby proteinu Cbf12 na DNA není vyžadována pro zachování role proteinu Cbf12 v procesu udržování integrity genomu. Mutace DBM je užitečný nástroj k objasnění DNA-vazebných módů proteinů CSL v kvasince *S. pombe*.

Klíčová slova:

Schizosaccharomyces pombe, transkripční faktor, proteiny CSL, Cbf12, vazba na DNA, DNA-vazebná mutace (DBM), adheze, genotoxický stres