

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Anna Jordáková

Charakterizace vazby transkripčních faktorů CSL na DNA v kvasince
Schizosaccharomyces pombe

Characterization of DNA binding of CSL transcription factors in fission yeast

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze, 24. 7. 2017

Anna Jordáková

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Martinu Převorovskému, Ph.D. za odborné vedení diplomového projektu a za všechny cenné rady, které mi poskytl. Děkuji za trpělivý přístup, podporu a povzbuzení, což pro mě bylo velmi důležité zejména při sepisování této práce.

Děkuji Martině Oravcové, se kterou jsem mohla ze začátku svého působení v laboratoři spolupracovat. Mé poděkování patří i všem členům laboratoře za vytváření přátelského pracovního prostředí.

Děkuji také své rodině a Lukášovi, kteří mi jsou velkou oporou a drží mě i v těžších chvílích nad vodou. Kamarádům moc děkuji za povzbuzení.

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

ABSTRACT

Cbf11 and Cbf12 proteins, the members of the CSL transcription factors family, are involved in a wide range of cellular processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* – among other things they regulate cell adhesion and they have also been implicated in maintenance of genome integrity. At the level of the whole genome we previously identified target loci bound by CSL proteins *in vivo*. Many of them do not contain any consensus CSL-binding element. There are probably different DNA binding modes of the Cbf11/12 proteins and it has not been known what specific biological function is associated with the particular way of DNA binding.

For the purpose of studying CSL DNA binding modes we have worked in this project on the implementation of the DNA binding mutation (DBM), which prevents direct DNA binding of CSL proteins to canonical motif *in vitro*, into the chromosomal locus of the *cbf11* and *cbf12* genes. Using the “*ura4* selection system” we have successfully constructed the scar-less Cbf12-TAP and Cbf12DBM-TAP knock-ins, i.e. the strains without/with DBM in the open reading frame of Cbf12 where Cbf12 is C-terminally TAP-tagged and contains the intact 3’UTR. In our laboratory we have established the CRISPR/Cas9 system by which we have been able to prepare the Cbf11-TAP strain. We have failed to construct the Cbf11DBM-TAP strain, but we discuss some possible optimizations of the construction process that could lead to a successful result. Based on the results obtained by the washing assay we have found out that the functional DNA binding domain of the Cbf12 is necessary for the regulation of cell adhesion. These results correlate with the data from binding study where we observed the binding of Cbf12 vs. Cbf12DBM *in vivo* to the promoter regions of the *cbf12*, *gsf2* and *pf17* genes involved in the regulation of cell adhesion. Our results further show that the ability of canonical direct DNA binding of Cbf12 is not required for the role of Cbf12 protein in the process of maintaining genome integrity. DBM mutation is a useful tool to elucidate DNA binding modes of CSL proteins in *S. pombe*.

Keywords:

Schizosaccharomyces pombe, transcription factor, CSL proteins, Cbf12, DNA binding, DNA binding mutation (DBM), adhesion, genotoxic stress

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Abstrakt | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Obsah..... | 6 |
| Seznam použitých zkratk | 10 |
| 1 Úvod | 13 |
| 2 Cíle práce | 15 |
| 3 Literární přehled..... | 16 |
| 3.1 Proteiny rodiny CSL..... | 16 |
| 3.1.1 Proteiny CSL u živočichů – obecná charakteristika a jejich funkce | 16 |
| 3.1.1.1 Signální dráha Notch..... | 16 |
| 3.1.1.2 Funkce proteinů CSL nezávislé na signalizaci Notch | 17 |
| 3.1.2 Proteiny CSL u <i>Schizosaccharomyces pombe</i> – obecná charakteristika a jejich funkce | 17 |
| 3.1.2.1 Funkce proteinů CSL v <i>S. pombe</i> | 18 |
| 3.1.2.1.1 Proteiny CSL a jejich vliv na růst buněčné kultury | 19 |
| 3.1.2.1.2 Proteiny CSL a jejich vliv na morfologii buněk a kolonií | 19 |
| 3.1.2.1.3 Proteiny CSL a regulace průchodu buněčným cyklem..... | 19 |
| 3.1.2.1.4 Role proteinů CSL v regulaci buněčné adheze | 20 |
| 3.1.2.1.5 Proteiny CSL a jejich účast v odpovědi na oxidativní stres..... | 20 |
| 3.1.2.1.6 Role proteinů CSL v udržování integrity genomu | 21 |
| 3.1.2.1.7 Protein Cbf11 a regulace stavu chromatinu | 21 |
| 3.1.2.1.8 Protein Cbf11 a metabolismus lipidů..... | 22 |
| 3.1.3 Struktura proteinů CSL | 22 |
| 3.1.3.1 Struktura živočišných proteinů CSL | 22 |
| 3.1.3.2 Struktura houbových proteinů CSL v porovnání s živočišnými zástupci..... | 24 |
| 3.1.4 Vazba proteinů CSL na DNA | 25 |
| 3.1.4.1 Vazba živočišných proteinů CSL na DNA..... | 25 |
| 3.1.4.2 Vazba proteinů CSL na DNA u <i>S. pombe</i> | 27 |
| 3.1.5 Cbf12 – fyzické a genetické interakce | 28 |
| 3.1.5.1 Protein Zfs1 a regulace stability mRNA <i>cbf12</i> | 28 |
| 3.1.5.2 Genetické interakce genu <i>cbf12</i> | 29 |
| 3.2 Agregace kvasinkových buněk | 31 |
| 3.2.1 Flokulace a adhezivita u <i>S. pombe</i> | 31 |
| 3.3 Poškození DNA u <i>S. pombe</i> | 34 |
| 3.3.1 Studium poškození DNA u <i>S. pombe</i> | 35 |
| 4 Materiál a metody | 38 |
| 4.1 Mikroorganismy | 38 |
| 4.1.1 Kultivace mikroorganismů..... | 38 |
| 4.1.1.1 Přehled použitých mikroorganismů..... | 38 |
| 4.1.1.2 Kultivační média a roztoky | 39 |
| 4.1.2 Křížení kmenů <i>S. pombe</i> | 40 |
| 4.1.3 Měření růstové křivky kmenů <i>S. pombe</i> | 41 |
| 4.1.4 Příprava kryoprezervovaných buněk <i>S. pombe</i> synchronizovaných v G1 fázi buněčného cyklu – určeno pro editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9..... | 41 |
| 4.1.5 Synchronizace buněk <i>S. pombe</i> v G2 fázi buněčného cyklu..... | 42 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 4.2 | Transformace mikroorganismů..... | 43 |
| 4.2.1 | Transformace <i>E. coli</i> elektroporací..... | 43 |
| 4.2.2 | Vysoce efektivní transformace <i>S. pombe</i> | 43 |
| 4.2.2.1 | Vysoce efektivní transformace <i>S. pombe</i> – metoda I..... | 43 |
| 4.2.2.2 | Vysoce efektivní transformace <i>S. pombe</i> – metoda II..... | 44 |
| 4.2.3 | Rychlá transformace <i>S. pombe</i> | 45 |
| 4.2.4 | Transformace kryoprezervovaných buněk <i>S. pombe</i> synchronizovaných v G1 fázi buněčného cyklu – editace genomu pomocí CRISPR/Cas9..... | 45 |
| 4.3 | Techniky manipulace s nukleovými kyselinami..... | 46 |
| 4.3.1 | Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> | 46 |
| 4.3.1.1 | Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> – metoda I..... | 46 |
| 4.3.1.2 | Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> – metoda II..... | 47 |
| 4.3.2 | Izolace chromozomální DNA z <i>S. pombe</i> | 47 |
| 4.3.2.1 | Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí..... | 47 |
| 4.3.2.2 | Izolace DNA chelexem..... | 48 |
| 4.3.2.3 | Rychlá izolace DNA..... | 49 |
| 4.3.3 | Izolace RNA z <i>S. pombe</i> a reverzní transkripce..... | 49 |
| 4.3.4 | Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 50 |
| 4.3.4.1 | Standardní PCR..... | 50 |
| 4.3.4.2 | Kvantitativní PCR (qPCR)..... | 51 |
| 4.3.4.2.1 | Určení specifity a amplifikační účinnosti nově navržených primerů pro qPCR..... | 52 |
| 4.3.4.2.2 | ChIP-qPCR – analýza chromatinové imunoprecipitace..... | 53 |
| 4.3.4.2.3 | RT-qPCR – relativní kvantifikace cDNA..... | 53 |
| 4.3.4.3 | Přehled použitých primerů..... | 54 |
| 4.3.5 | Plazmidy..... | 57 |
| 4.3.6 | Štěpení restrikčními endonukleázami..... | 57 |
| 4.3.6.1 | Ověřování plazmidové DNA a štěpení plazmidů pro účely transformace..... | 58 |
| 4.3.6.2 | Štěpení PCR produktu přímo po amplifikaci..... | 58 |
| 4.3.7 | Elektroforéza DNA v agarózovém gelu..... | 59 |
| 4.3.8 | Izolace DNA z gelu..... | 60 |
| 4.3.9 | Purifikace DNA..... | 60 |
| 4.3.9.1 | Purifikace DNA přesrážením..... | 60 |
| 4.3.9.2 | Purifikace PCR produktů pomocí NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up..... | 61 |
| 4.3.9.3 | Purifikace PCR produktů k editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9 podle (Rodríguez-López <i>et al.</i> 2016)..... | 61 |
| 4.3.10 | Fosfatázování linearizovaného plazmidu..... | 61 |
| 4.3.11 | Fosforylace 5'-konců DNA..... | 61 |
| 4.3.11.1 | Fosforylace duplexu oligonukleotidů a PCR produktu..... | 61 |
| 4.3.11.2 | Fosforylace 5'-konců PCR produktů k editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9 podle (Rodríguez-López <i>et al.</i> 2016)..... | 62 |
| 4.3.12 | Ligace DNA..... | 62 |
| 4.3.12.1 | Ligace fragmentů DNA s kohezními konci..... | 62 |
| 4.3.12.2 | Ligace tupých konců..... | 63 |
| 4.3.12.3 | Ligace tupých konců k editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9 podle (Rodríguez-López <i>et al.</i> 2016)..... | 63 |
| 4.4 | Techniky manipulace s proteiny..... | 63 |
| 4.4.1 | Příprava nativních buněčných lyzátů <i>S. pombe</i> | 63 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.4.2 | Příprava denaturovaných proteinových extraktů z <i>S. pombe</i> | 64 |
| 4.4.3 | SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE) | 65 |
| 4.4.4 | Western blot a imunodetekce proteinů | 66 |
| 4.5 | ChIP (chromatinová imunoprecipitace) | 68 |
| 4.5.1 | Kultivace buněk a jejich fixace | 68 |
| 4.5.2 | Příprava chromatinového extraktu | 68 |
| 4.5.3 | Chromatinová imunoprecipitace proteinů značených TAP-tagem | 69 |
| 4.5.4 | Izolace precipitovaného materiálu | 69 |
| 4.5.4.1 | Promývání magnetických kuliček a izolace DNA chelexem | 70 |
| 4.5.4.2 | Promývání magnetických kuliček a izolace DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce | 70 |
| 4.5.5 | Zpracování vzorků za účelem stanovení přítomnosti TAP-tagem značeného proteinu v různých frakcích odebraných během ChIP | 71 |
| 4.6 | „Spot test“ – studium citlivosti na camptothecin (CPT) | 72 |
| 4.7 | Omývací test – studium adhezivity | 72 |
| 4.8 | Hledání vazebného motivu ve vybraných cílových sekvencích proteinu Cbf12 | 72 |
| 4.9 | Bioinformatické nástroje a software | 73 |
| 5 | Výsledky | 75 |
| 5.1 | Konstrukce kmenů za účelem studia režimu vazby proteinů CSL na DNA | 75 |
| 5.1.1 | Dvoukrokový integrační systém využívající markerový gen <i>ura4</i> | 76 |
| 5.1.2 | Konstrukce kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP | 77 |
| 5.1.2.1 | Konstrukce kmene Cbf12-TAP | 77 |
| 5.1.2.2 | Konstrukce kmene Cbf12DBM-TAP | 78 |
| 5.1.2.2.1 | Přístup I – analogie konstrukce Cbf12-TAP – neúspěšný přístup | 78 |
| 5.1.2.2.2 | Přístup II – změna podmínek transformace – neúspěšný přístup | 79 |
| 5.1.2.2.3 | Přístup III – optimalizace parametrů transformace a následné selekce – úspěšný přístup | 79 |
| 5.1.2.3 | Vytvoření prototrofních variant kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP | 82 |
| 5.1.3 | Konstrukce kmenů Cbf11-TAP a Cbf11DBM-TAP | 84 |
| 5.1.3.1 | Využití „ <i>ura4</i> selekčního systému“ pro konstrukci kmenů Cbf11-TAP a Cbf11DBM-TAP | 84 |
| 5.1.3.1.1 | Přístup I – analogie konstrukce Cbf12DBM-TAP – neúspěšný přístup | 84 |
| 5.1.3.1.2 | Přístup II – komplementace <i>cbf11</i> – neúspěšný přístup | 85 |
| 5.1.3.2 | Využití systému CRISPR/Cas9 pro konstrukci kmenů Cbf11-TAP a Cbf11DBM-TAP | 85 |
| 5.1.3.2.1 | Vyzkoušení systému CRISPR/Cas9 | 86 |
| 5.1.3.2.2 | Přístup I – výchozí kmen o genotypu <i>cbf11::ura4⁺</i> – neúspěšný přístup | 87 |
| 5.1.3.2.3 | Přístup II – výchozí kmen o genotypu <i>cbf11-TAP-natMX6</i> – úspěšná konstrukce kmene Cbf11-TAP | 91 |
| 5.2 | Fenotypizace vytvořených kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP | 96 |
| 5.2.1 | Vliv DBM varianty proteinu Cbf12 na rychlost růstu kultury | 96 |
| 5.2.2 | Vliv DBM varianty proteinu Cbf12 na buněčnou adhezi | 97 |
| 5.2.3 | Vliv DBM varianty proteinu Cbf12 na proces udržování integrity genomu | 98 |
| 5.3 | Studium vazby Cbf12 a jeho DBM varianty na DNA <i>in vivo</i> | 99 |
| 5.3.1 | Využití auxotrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP pro studium vazby Cbf12/Cbf12DBM na DNA | 100 |
| 5.3.2 | Využití prototrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP pro studium vazby Cbf12/Cbf12DBM na DNA | 101 |
| 5.3.2.1 | Time-course CHIP-qPCR | 101 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 5.4 | Ověřování funkčnosti metody ChIP-qPCR..... | 104 |
| 5.5 | Dílčí experimenty týkající se role Cbf1 1 v regulaci exprese vybraných genů v průběhu buněčného cyklu a funkčního propojení mezi Cbf1 1 a Cut6 | 107 |
| 5.5.1 | Vazba proteinu Cbf1 1 na promotorové oblasti genů <i>cut6</i> , <i>vht1</i> a <i>bio2</i> v rámci buněčného cyklu | 107 |
| 5.5.2 | Vliv proteinu Cbf1 1 na hladinu transkriptu genů <i>cut6</i> , <i>vht1</i> a <i>bio2</i> v průběhu buněčného cyklu | 108 |
| 5.5.3 | Vliv nadprodukce Cut6 na rychlost růstu kmene $\Delta cbf11$ | 110 |
| 6 | Diskuze | 112 |
| 6.1 | Konstrukce kmenů za účelem studia režimu vazby proteinů CSL na DNA | 112 |
| 6.2 | Fenotypizace vytvořených kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP | 116 |
| 6.3 | Studium vazby Cbf12 a jeho DBM varianty na DNA <i>in vivo</i> | 117 |
| 7 | Shrnutí | 120 |
| 8 | Přehled citované literatury | 123 |
| 9 | Přílohy | 130 |
| 9.1 | Konstrukce kmene Cbf12-TAP pomocí „ <i>ura4</i> selekčního systému“ (Dr. Oravcová) | 130 |
| 9.1.1 | První krok integrace – konstrukce kmene o genotypu <i>cbf12::ura4⁺</i> | 130 |
| 9.1.2 | Druhý krok integrace – konstrukce kmene Cbf12-TAP | 130 |
| 9.2 | Konstrukce kmene o genotypu <i>cbf11::ura4⁺</i> (Dr. Oravcová) | 131 |
| 9.3 | Navržení cílové sekvence pro CRISPR/Cas9 v otevřeném čtecím rámci genu <i>ura4</i> | 131 |
| 9.4 | Navržení cílových sekvencí pro CRISPR/Cas9 v kazetě <i>natMX6</i> | 132 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|------------------------|--|
| 5-FOA | kyselina 5-fluoroorotová |
| A | L-adenin / adenin |
| aa | aminokyselina |
| AA | akrylamid |
| amp | ampicilin |
| APS | persulfát amonný |
| ARE | „AU-rich elements“ |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BIS | N,N'-metylenbisakrylamid |
| bp | pár bází |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| BTD | β-trefoil doména |
| C | cytosin |
| Cas9 | „CRISPR associated protein 9“ |
| CBF1 | „C-promoter Binding Factor 1“ |
| cDNA | „complementary DNA“ |
| CESR geny | geny obecné stresové odpovědi |
| CPT | camptothecin |
| CRISPR | „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ |
| CSL | CBF1/RBP-Jκ/Su(H)/Lag-1 |
| C _T | „threshold cycle“ |
| CTD | C-terminální doména |
| „cut“ | „cell untimely torn“ |
| DBM | „DNA binding mutation“, DNA-vazebná mutace |
| DEPC | dietylpyrokarbonát |
| diH ₂ O | deionizovaná voda |
| DMSO | dimetylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | deoxyribonukleotidtrifosfát |
| DSB | dvouřetězcový zlom |
| DTT | dithiotreitol |
| E | amplifikační účinnost primerů |
| EDTA | etylendiamintetraoctová kyselina |
| E-MAP | „epistatic miniarray profile“ |
| EMM | „Edinburgh minimal media“ |
| EMSA | „electrophoretic mobility shift assay“ |
| fwd | „forward“ |
| G | guanin |
| GAR/GAM | kozí protilátka rozpoznávající králičí/myší protilátky |
| gDNA | genomická DNA |
| HA | hemaglutinin |
| HDR | „homology directed repair“ |
| HEPES | 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonová kyselina |
| HIF | „hypoxia-inducible factors“ |
| HRP | křenová peroxidáza |
| HU | hydroxyurea |
| ChIP | chromatinová imunoprecipitace |
| ChIP _{fenol} | po ChIP využita k izolaci precipitovaného materiálu fenol-chloroformová extrakce |
| ChIP _{chelex} | po ChIP využít k izolaci precipitovaného materiálu chelex |
| ChIP-chip | ChIP následovaná kvantifikací na microarray |
| ChIP-qPCR | ChIP následovaná kvantifikací pomocí qPCR |
| ChIP-seq | ChIP následovaná sekvenováním precipitovaného materiálu |
| IgG | imunoglobulin G |
| IGV | „Integrative Genomics Viewer“ |
| IN | input |
| InR | inzulinový receptor |
| INSM1 | „insulinoma-associated antigen-1“ |
| IP pufr | promývací pufr |

| | |
|-------------------------|---|
| IP | imunoprecipitát |
| L | L-leucin |
| Lag-1 | „Lin-12 and Glp-1 phenotype“ |
| LB pufr | lyzační pufr |
| LB | bakteriální kultivační médium |
| LB _{ChIP} pufr | lyzační pufr pro ChIP |
| LiAc | octan lithný |
| MAM | Mastermind |
| MBF | „MCB-binding factor“ |
| ME | sladový extrakt |
| MMS | metylmetsulfonát |
| mRNA | madiátorová RNA |
| NAT | sekvence kódující nourseothricinacetyltransferázu |
| NHEJ | „non-homologous end joining“ |
| NICD | intracelulární doména proteinu Notch |
| NTC | kontrolní beztemplátová reakce |
| NTD | N-terminální doména |
| OD | optická denzita |
| ORF | otevřený čtecí rámeček |
| OUT | output |
| PAGE | polyakrylamidová gelová elektroforéza |
| PAM | „protospacer adjacent motif“ |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PEG | polyethylenglykol |
| PMG | „Pombe Minimal Glutamate“ |
| PNK | T4 polynukleotidkináza |
| qPCR | kvantitativní PCR |
| RACK1 | „receptor of activated C kinase 1“ |
| RAM | „RBP-J associated molecule“ |
| RBP-J κ | „Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J region“ |
| RBP-L | „RBP-J κ -like“ |
| rev | „reverse“ |
| RHR | „Rel-homology region“ |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| rpm | otáčky za minutu |
| RT | reverzní transkripce / reverzní transkriptáza |
| RT-qPCR | reverzní transkripce s následnou kvantifikací pomocí qPCR |
| SD-N | médium bez zdroje dusíku („ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast nitrogen base without amino acids and without ammonium sulphate“) |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| „sep“ | defekty v septaci |
| sgRNA | „single guide RNA“ |
| SI | septační index |
| SREBP-1A | „sterol regulatory element binding protein 1A“ |
| ssDNA | „salmon sperm DNA“ |
| Su(H) | „Suppressor of Hairless“ |
| T | tymin / doba zdvojení |
| TAE | tris-acetát-EDTA |
| TAP | tandemová afinitní purifikace |
| TBS | Tris-pufrovaný fyziologický roztok |
| TCA | trichloroctová kyselina |
| TE pufr | Tris-EDTA |
| TEF _P | TEF promotorová sekvence |
| TEF _T | TEF terminátorové sekvence |
| TEMED | tetrametyletylendiamin |
| TES pufr | Tris-EDTA-SDS |
| TF | transkripční faktor |
| Top1 | topoizomeráza I |
| Tris | tris(hydroxymetyl)aminometan |
| TTBS | Tween-TBS |

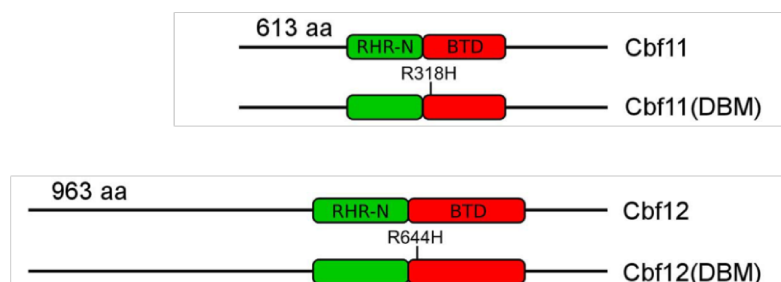
| | |
|-----------|--------------------------------------|
| TTP | tristetraprolin |
| TZF | tandemový CCCH motiv zinkového prstu |
| U | L-uracil / uracil |
| UTR | nepřekládaná oblast |
| UV | ultrafialový |
| WB | western blot |
| WCE | „whole cell extract“ |
| <i>wt</i> | divoký typ |
| Y | C nebo T / tyrozin |
| YES | „yeast extract with supplements“ |

1 ÚVOD

V naší laboratoři zkoumáme role transkripčních faktorů rodiny CSL, proteinů Cbf11 a Cbf12, v poltivé kvasince *Schizosaccharomyces pombe*. Zmíněné proteiny jsou důležité pro regulaci průchodu buněčným cyklem a regulaci buněčné adheze (Převorovský *et al.* 2009). Uplatňují se mj. také v odpovědi na oxidativní stres (Tvarůžková 2015; Daněk 2015) a v procesu udržování integrity genomu (Dr. Převorovský, nepublikovaná data).

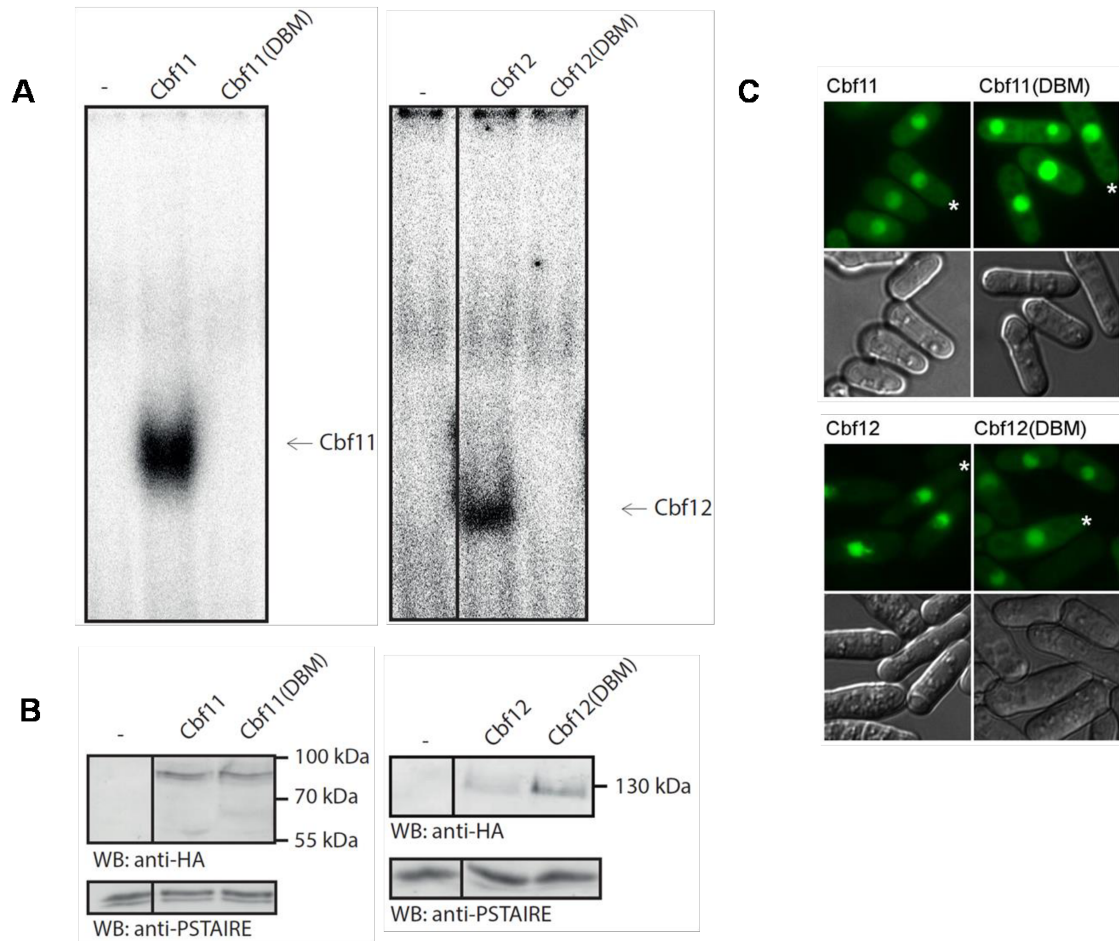
Na úrovni celého genomu byly technikou chromatinové imunoprecipitace následovanou sekvenováním precipitovaného materiálu (ChIP-seq) identifikovány lokusy, kam se proteiny Cbf11 a Cbf12 váží *in vivo* (Převorovský *et al.* 2015). Z analýzy dat vyplynulo, že mnoho z cílových míst neobsahuje kanonický CSL-vazebný element. Tyto výsledky vedly k předpokladu, že existují různé módy vazby proteinů CSL na DNA. Rozhodli jsme se tedy režim vazby na DNA podrobněji studovat.

Vazba proteinů CSL na DNA je zprostředkována skrze N-terminální doménu (NTD nebo RHR-N) a β -trefoil doménu (BTD) (Kovall & Hendrickson 2004). Substituce konzervovaného argininu za histidin (R218H) v BTD myšího proteinu RBP- $\text{J}\kappa$ z rodiny CSL způsobuje dramatické snížení DNA-vazebné aktivity proteinu *in vitro* (Chung *et al.* 1994). Pro účely studia režimu vazby proteinů Cbf11 a Cbf12 na DNA byly v naší laboratoři vytvořeny plazmidové konstrukty s analogickou substitucí R318H, respektive R644H (Oravcová *et al.* 2013). Vnesenou bodovou mutací v doméně BTD označujeme jako DBM („DNA binding mutation“; Obr. 1).



Obr. 1: Schematické znázornění proteinů Cbf11 a Cbf12 a jejich DBM variant. Cbf11(DBM): 2nukleotidová záměna (GG→AT; 953. – 954. nukleotid v sekvenci otevřeného čtecího rámce (ORF) genu *cbf11*) vede k substituci konzervovaného argininu na pozici 318 za histidin (R318H). Cbf12(DBM): 4nukleotidová záměna (CAGA→TCAC; 1929. – 1932. nukleotid v sekvenci ORF genu *cbf12*) vede k substituci konzervovaného argininu na pozici 644 za histidin (R644H). N-terminální doména (RHR-N) znázorněna zeleně, β -trefoil doména (BTD) červeně; aa = aminokyselina. Schéma převzato a upraveno z (Oravcová *et al.* 2013).

Zmíněná aminokyselinová záměna způsobuje neschopnost proteinů Cbf11/12 se *in vitro* vázat na kanonický CSL-vazebný element GTG(G/A)GAA, nicméně stabilita proteinů, ani jejich jaderná lokalizace není ovlivněna (Obr. 2; Oravcová *et al.* 2013). Zavedení mutace DBM přímo do chromozomálního lokusu genů *cbf11* a *cbf12* by mohlo posloužit jako nástroj k objasnění DNA-vazebných módů proteinů CSL v kvasince *S. pombe*.



Obr. 2: Vliv DBM na DNA-vazebnou aktivitu proteinů CSL a na jejich stabilitu a buněčnou lokalizaci. (A) Proteiny Cbf11(DBM) a Cbf12(DBM) postrádají DNA-vazebnou aktivitu *in vitro* (metoda EMSA – „electrophoretic mobility shift assay“). **(B)** Cbf11/12(DBM) nevykazují sníženou expresi v porovnání s jejich nemutovaným protějškem (metoda western blot). **(C)** Proteiny CSL a jejich DBM varianty lokalizují do jádra. Ve všech případech jsou proteiny exprimovány z plazmidu. Upraveno podle (Oravcová *et al.* 2013).

2 CÍLE PRÁCE

V rámci této diplomové práce si klademe za cíl zjistit, s jakými biologickými procesy, které jsou regulovány proteiny CSL, je spojen konkrétní režim vazby na DNA u poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Za tímto účelem je potřeba:

- vytvořit kmeny,
 - ve kterých by byla/nebyla přítomna mutace DBM přímo v chromozomálním lokusu genů *cbf11* a *cbf12*
 - které by zároveň obsahovaly C-terminálně značený protein Cbf11/Cbf12 (TAP-tag)
 - a které by rovněž měly zachovánu intaktní oblast *cbf11/cbf12* 3'UTR

- vytvořené kmeny fenotypizovat

- charakterizovat způsob vazby proteinu Cbf11/12 *in vivo* na vybrané cílové lokusy

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Proteiny rodiny CSL

3.1.1 Proteiny CSL u živočichů – obecná charakteristika a jejich funkce

Proteiny CSL (CBF1/RBP-Jκ/Su(H)/Lag-1) tvoří rodinu konzervovaných transkripčních faktorů. Jsou zkoumány zejména u živočichů pro svou roli v signální dráze Notch, kde fungují jako efektorové molekuly schopné regulovat expresi genů podléhajících této signalizaci (Pursglove & Mackay 2005). Mezi nejčastěji studované zástupce rodiny CSL z říše Metazoa patří proteiny CBF1 („C-promoter Binding Factor 1“; *Homo sapiens*), RBP-Jκ („Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J region“; *Mus musculus*), Su(H) („Suppressor of Hairless“; *Drosophila melanogaster*) a Lag-1 („Lin-12 and Glp-1 phenotype“; *Caenorhabditis elegans*).

U většiny živočichů se nachází pouze jeden protein z rodiny CSL, nicméně u obratlovců byl popsán druhý paralog – protein RBP-L („RBP-Jκ-like“). Tento slouží jako konstitutivní transkripční aktivátor a hraje roli při vývoji pankreatu. Funkce proteinu RBP-L je nezávislá na signalizaci Notch (Minoguchi *et al.* 1997; Beres *et al.* 2006).

3.1.1.1 Signální dráha Notch

Signální dráha Notch představuje evolučně konzervovaný mechanismus mezibuněčné komunikace, který je nepostradatelný pro ontogenetický vývoj živočichů. Uplatňuje se v regulaci mnoha aspektů metazoálního embryonálního vývoje i během obnovy tkání (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1999; Bray 2006; Hori *et al.* 2013). Ovlivňuje například proces proliferace (VanDussen *et al.* 2012), diferenciace (Nguyen *et al.* 2006; Noisa *et al.* 2014) a apoptózy (Yang *et al.* 2004). Nesprávná regulace nebo defekty v signalizaci vedou k mnoha lidským onemocněním, od vývojových syndromů až po rakovinu (Louvi & Artavanis-Tsakonas 2012; Penton *et al.* 2012).

K aktivaci signální dráhy Notch dochází poté, co se na transmembránový receptor Notch naváže ligand, který se nachází na membráně sousední buňky. Tato aktivace vede k proteolytickým štěpením receptoru a k translokaci intracelulární domény proteinu Notch (NICD) z plazmatické membrány do jádra, kde se naváže na

protein CSL. Proteiny CSL mohou fungovat jako transkripční represory, nebo aktivátory – v závislosti na tom, zda se vyskytují v komplexu s represorovými, či aktivátorovými proteiny. V nepřítomnosti NICD asociují proteiny CSL s korepresorovým komplexem a brání tak transkripci responzivních genů. Vazba NICD na protein CSL zapříčiní uvolnění korepresorů a umožní navázání transkripčního aktivátoru Mastermind (MAM) na binární komplex CSL-NICD. Vytvoření ternárního komplexu CSL-NICD-MAM vede k vazbě dalších koaktivátorů a k transkripční aktivaci cílových genů (Hori *et al.* 2013).

3.1.1.2 Funkce proteinů CSL nezávislé na signalizaci Notch

Proteiny CSL jsou nejlépe prostudovány s ohledem na jejich roli v signální dráze Notch. V literatuře se však objevují i příklady funkcí proteinů CSL, které nejsou na signalizaci Notch závislé.

Bylo prokázáno, že Notch-independentní funkce proteinu Su(H) je důležitá pro správný vznik mechanosenzorické štětiny u *D. melanogaster*. V tomto případě se protein Su(H) uplatňuje jako transkripční aktivátor (Barolo *et al.* 2000). Naopak během embryonálního vývoje drozofily je pro vznik mezektodermálních buněk důležitá represní role proteinu Su(H) (Morel & Schweisguth 2000).

U savčího proteinu RBP-J κ byly popsány další role nezávislé na signalizaci Notch. RBP-J κ vytváří komplex s transkripčním faktorem typu helix–loop–helix, s proteinem Ptf1a. Společně se podílí na regulaci vývoje pankreatu (Masui *et al.* 2007) a jsou nepostradatelné pro vznik inhibičních neuronů ve vyvíjející se míše (Hori *et al.* 2008). Nedávno byla prokázána role proteinu RBP-J κ v procesu angiogeneze v myokardu, kde se podílí na regulaci exprese angiogenních faktorů – RBP-J κ se váže na proteiny HIF („hypoxia-inducible factors“), čímž dochází k inhibici jejich aktivity a k represi procesu angiogeneze (Díaz-Trelles *et al.* 2016).

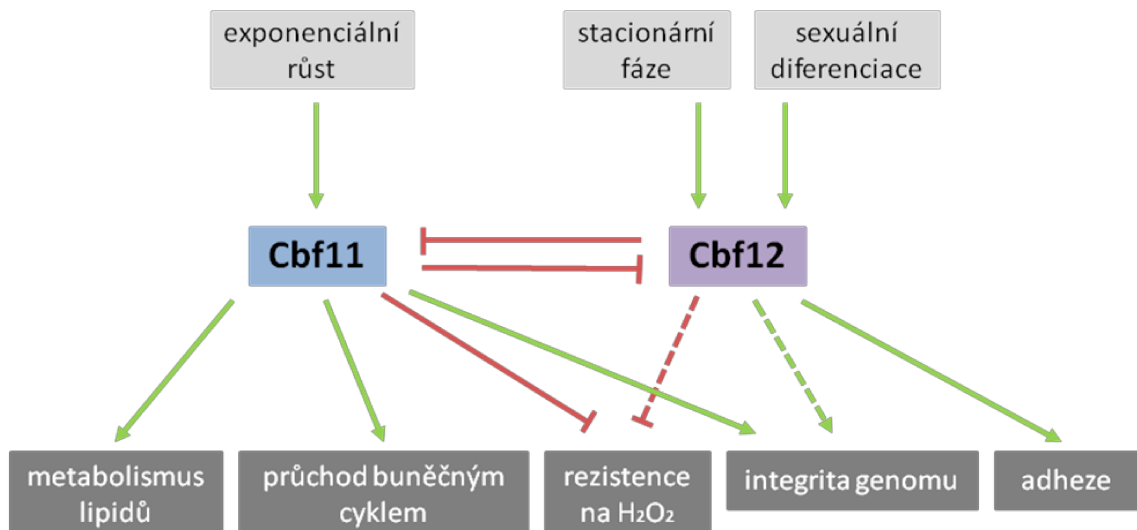
3.1.2 Proteiny CSL u *Schizosaccharomyces pombe* – obecná charakteristika a jejich funkce

Přítomnost proteinů rodiny CSL není omezena na živočichy. Nenacházejí se sice u rostlin a některých nižších eukaryot, nicméně geny kódující proteiny CSL byly identifikovány u řady houbových organismů, mj. v genomu poltivé kvasinky *S. pombe* (Převorovský *et al.* 2007). Zde jsou proteiny CSL reprezentovány dvěma paralogy –

proteinem Cbf11 a Cbf12. Byly pojmenovány na základě podobnosti se savčím proteinem CBF1. Protein Cbf11 náleží do třídy F1 houbových proteinů CSL, protein Cbf12 spadá do třídy F2 (Převorovský *et al.* 2007; Převorovský *et al.* 2009). Exprese genů kódujících proteiny CSL je obecně nízká, přičemž během exponenciálního růstu kultury v bohatém médiu je hladina mRNA genu *cbf12* nižší než hladina mRNA *cbf11*. Zatímco exprese genu *cbf11* je v průběhu růstu buněčné kultury prakticky konstantní, exprese genu *cbf12* vykazuje variabilnější profil. Maximum hladiny mRNA genu *cbf12* pozorujeme ve stacionární fázi a v meióze (Převorovský *et al.* 2009). Oba proteiny CSL jsou za normálních růstových podmínek neesenciální, nicméně jejich přítomnost je pro správné fungování buněk *S. pombe* velmi důležitá.

3.1.2.1 Funkce proteinů CSL v *S. pombe*

Transkripční faktory Cbf11 a Cbf12 jsou zapojeny v mnoha regulačních procesech (Obr. 3). Pozměněná dóze genů kódujících proteiny CSL vede k pleiotropním defektům, které budou podrobněji popsány v následujících podkapitolách. Defekty spojené s delecí genu *cbf11* jsou často pozorovány i u kmenů s nadprodukovaným genem *cbf12*, což poukazuje na doposud plně neobjasněnou antagonistickou roli proteinů CSL v mnoha buněčných procesech. Protichůdné chování proteinů Cbf11/12 je v souladu s expresními studiemi, kde je pozorován antagonismus mezi paralogy již na úrovni transkriptomu (Převorovský *et al.* 2009; Převorovský *et al.* 2015).



Obr. 3: Funkce proteinů Cbf11 a Cbf12 u *S. pombe*. Schéma upraveno podle Dr. Převorovského.

3.1.2.1.1 *Proteiny CSL a jejich vliv na růst buněčné kultury*

Na základě fenotypové analýzy kmenů postrádajících gen *cbf11*, *cbf12*, či oba paralogní geny bylo prokázáno, že rychlost růstu v bohatém médiu je negativně ovlivněna absencí proteinu Cbf11 a nikoli proteinu Cbf12. Kmen s delecí genu *cbf12* roste srovnatelně s kmenem divokého typu (*wt*). U kmene, ve kterém chybí gen kódující protein Cbf11, dochází ke zpomalení růstu oproti *wt*. Vliv delece genu *cbf11* na růst kultury je potencován při kultivaci buněk v 19°C, kdy pozorujeme ještě výraznější zhoršení růstu – tzv. chladová senzitivita (Převorovský *et al.* 2009).

3.1.2.1.2 *Proteiny CSL a jejich vliv na morfologii buněk a kolonií*

Morfologie buněk s chybějícím genem *cbf11* nebo s nadprodukcí genu *cbf12* je do značné míry narušena – pozorujeme řadu defektů ve tvaru a velikosti buněk. Delece genu *cbf12* není s těmito buněčnými defekty spojena (Převorovský *et al.* 2009; Hayles *et al.* 2013). U buněk divokého typu a buněk s delecí genu *cbf12* pozorujeme pravidelný tvar a hladký povrch kolonií, zatímco delece genu *cbf11* vede na bohatém médiu k vytvoření kolonií nepravidelného tvaru, jejichž povrch je zvrásněný. Kolonie jsou lesklé, což je způsobeno produkcí extracelulárního materiálu, který obsahuje hydrofobní a reflexní složky (Převorovský *et al.* 2009).

3.1.2.1.3 *Proteiny CSL a regulace průchodu buněčným cyklem*

Proteiny CSL jsou důležité pro správný průchod buněčným cyklem. Při ektopické nadprodukcí proteinu Cbf11/Cbf12 dochází ke snížení fitness buněk a buňky jsou mírně prodlouženy (Vachon *et al.* 2013). U buněk s absencí proteinu Cbf11 nebo nadprodukcí proteinu Cbf12 pozorujeme defekty v septaci (tzv. „sep“ fenotyp) – v jedné buňce se tvoří několik sept a struktura sept bývá často aberantní. Proteiny CSL se také podílejí na udržování genomové ploidie, jelikož v důsledku delece genu *cbf11*, respektive nadprodukce genu *cbf12* je zvýšena míra samovolného vzniku diploidních buněk (Převorovský *et al.* 2009). Nepřítomnost proteinu Cbf11 je spojena se zmenšením délky septovaných buněk (Převorovský *et al.* 2015). U kmenů postrádajících gen *cbf11* dochází také k nesprávné koordinaci buněčného a jaderného dělení – k tzv. „cut“ fenotypu („cell untimely torn“), kdy je buněčné jádro přeškrveno formujícím se septem (Převorovský *et al.* 2009; Převorovský *et al.* 2015). Bylo prokázáno, že protein Cbf11 funguje jako transkripční aktivátor genů, které jsou nepostradatelné pro koordinaci

bunčného a jaderného dělení a které tudíž zabraňují katastrofické mitóze (Převorovský *et al.* 2016).

3.1.2.1.4 Role proteinů CSL v regulaci buněčné adheze

Buněčná adheze/flokulace je extenzivně studovaný fenomén. Proteiny CSL se antagonisticky podílejí na její regulaci a jsou součástí komplexnější regulační sítě (3.2.1). Buňky postrádající protein Cbf12 ztrácí schopnost adherovat k agaru; tento fenotyp nebyl pozorován u buněk postrádajících druhého paraloga. Kmen $\Delta cbf11$ dokonce vykazuje zvýšenou adhezi k agaru oproti *wt*. Pokud chybí protein Cbf11 nebo pokud je nadprodukován protein Cbf12, dochází v tekuté kultuře k flokulaci buněk. Cbf12 tedy hraje roli jako pozitivní regulátor buněčné adheze, Cbf11 jako regulátor negativní (Převorovský *et al.* 2009). Na základě genomických dat bylo zjištěno, že protein Cbf12 aktivuje transkripci genů nutných pro flokulaci (Kwon *et al.* 2012).

Flokulace je ve své podstatě projev společenského chování. Kvasinky se shlukují, aby lépe čelily stresovým podmínkám. Byla vyslovena hypotéza, že transkripční faktory rodiny CSL vznikly jako regulátory této primitivní formy mezibuněčné komunikace a až později se u živočichů staly součástí signální dráhy Notch (Kwon *et al.* 2012).

3.1.2.1.5 Proteiny CSL a jejich účast v odpovědi na oxidativní stres

Transkriptomická data ukázala, že v buňkách s delecí genů kódujících proteiny CSL, popřípadě v buňkách s nadprodukcí proteinů CSL dochází ke změnám v expresi tzv. CESR genů (genů obecné stresové odpovědi) a genů účastnících se odpovědi na oxidativní stres (Převorovský *et al.* 2015). Buňky postrádající gen *cbf11/12* vykazují rezistenci k vysokým dávkám peroxidu vodíku (akutní působení stresoru, 50mM H₂O₂ 100 min), přičemž markantnější rezistence je dosaženo při delecí *cbf11* (Dr. Převorovský, nepublikováno). Pokud jsou buňky $\Delta cbf11$ a $\Delta cbf12$ vystaveny chronickému oxidativnímu stresu (1,5mM H₂O₂ přítomný v pevném médiu), rezistenci vykazuje pouze kmen postrádající gen *cbf11*. Absence proteinu Cbf11 také vede k nadprodukcí genů odpovědi na oxidativní stres. Protein Cbf11 tedy funguje jako negativní regulátor v odpovědi na oxidativní stres (Tvarůžková 2015; Daněk 2015).

3.1.2.1.6 Role proteinů CSL v udržování integrity genomu

Kromě již dříve zmíněné narušené morfologie buněk a defektů buněčného dělení vykazují buňky s deletovaným genem *cbf11* i četné jaderné defekty, které indikují problémy s udržováním genomové integrity. Nejedná se pouze o „cut“ fenotyp; chromatin je často fragmentovaný či dekonenzovaný a celková morfologie jádra je abnormální (Převorovský *et al.* 2009; Převorovský *et al.* 2015). S absencí proteinu Cbf11 je dále spojena senzitivita buněk na camptothecin (CPT), který způsobuje dvouřetězcové zlomy DNA (3.3.1). Buňky $\Delta cbf12$ jsou také citlivé na přítomnost CPT v médiu (Dr. Převorovský, nepublikováno). Oba proteiny rodiny CSL tedy přispívají k udržování integrity genomu, ačkoli mechanismus jejich působení není doposud objasněn.

V genomu *S. pombe* se nachází přibližně 150 repetitivních rDNA kódujících ribozomální RNA. Oblast rDNA je lokalizována do subtelomerických částí ramének chromozomu III a v rámci jádra je soustředěna do oblasti jadérka. Je známo, že lokus rDNA vykazuje větší nestabilitu v porovnání se zbytkem genomu (Kobayashi 2014). Z pilotních studií vyplývá, že protein Cbf11 je vyžadován pro udržení stability rDNA. V oblasti jadérka byl u buněk $\Delta cbf11$ zaznamenán zvýšený výskyt dvouřetězcových zlomů DNA a také delece genu *cbf11* vede ke snížení počtu kopií rDNA (Dr. Převorovský, nepublikováno). Mezi fyzickými interakčními partnery proteinu Cbf11 byly nalezeny proteiny Sap1 a Reb1, které se mj. podílí na organizaci chromatinu a na udržování stability rDNA (de Lahondès *et al.* 2003; Singh *et al.* 2010; Bastia & Singh 2011). Dále byla pozorována změna vazby proteinů Sap1 a Reb1 na některých lokusech DNA v případě absence genu *cbf11* (Dr. Oravcová, nepublikováno). Z uvedeného vyplývá, že protein Cbf11 je pravděpodobně zapojen do regulace struktury chromatinu.

3.1.2.1.7 Protein Cbf11 a regulace stavu chromatinu

Data z naší laboratoře dále ukazují na funkci proteinu Cbf11 v regulaci stavu chromatinu a segregace chromozomů. Buňky bez přítomnosti proteinu Cbf11 vykazují narušenou tvorbu heterochromatinu v oblasti centromery a jsou vysoce citlivé na mikrotubulární jed thiabendazol (Dr. Převorovský, nepublikováno).

3.1.2.1.8 Protein Cbf11 a metabolismus lipidů

Byla popsána role proteinu Cbf11 v regulaci metabolismu lipidů. V populaci buněk postrádajících gen *cbf11* dochází k dramatickému snížení počtu lipidových kapének, které slouží u poltivé kvasinky jako zásobní zdroj lipidů. Na základě studia exprese bylo dále prokázáno, že u buněk bez proteinu Cbf11 je snížená hladina mRNA některých genů lipidového metabolismu. Vazebné studie *in vitro* poukázaly na možnou roli proteinu Cbf11 jako přímého aktivátoru transkripce studovaných genů metabolismu lipidů (Převorovský *et al.* 2015). Pro gen *cut6*, který kóduje acetyl-CoA-karboxylázu, byla tato role proteinu Cbf11 potvrzena (Převorovský *et al.* 2016).

3.1.3 Struktura proteinů CSL

3.1.3.1 Struktura živočišných proteinů CSL

Živočišné proteiny CSL jsou vysoce konzervované v rámci evoluce, což dokazuje procento sekvenční identity proteinů mezi různými organismy. Protein CSL u *D. melanogaster* a jeho myší protějšek vykazují 69% sekvenční identitu; porovnáme-li sekvence proteinů CSL mezi *D. melanogaster* a člověkem, činí sekvenční identita 72 % (Pursglove & Mackay 2005).

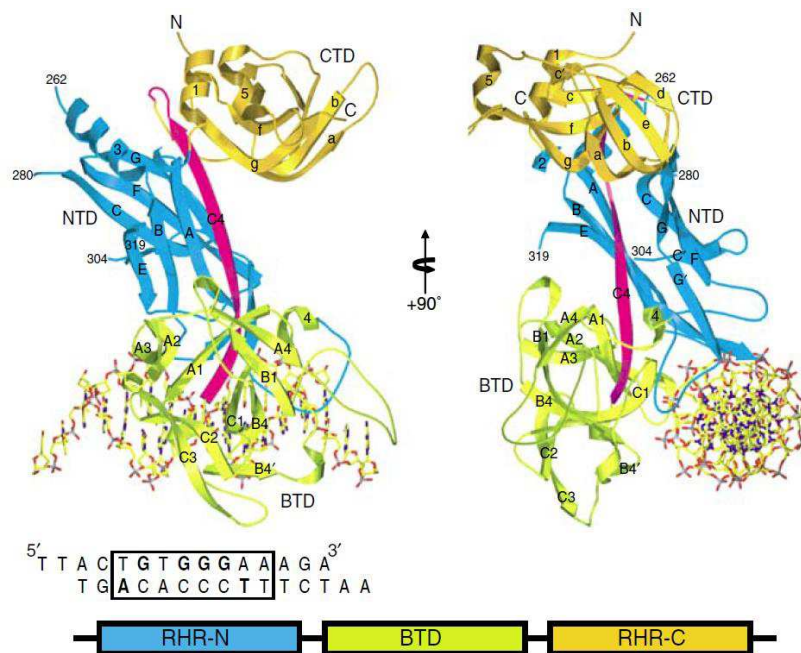
Terciární struktura proteinů CSL byla určena na základě krystalografických studií (Wilson & Kovall 2006; Kovall & Hendrickson 2004; Nam *et al.* 2006; Friedmann *et al.* 2008). Konzervovaná oblast proteinů CSL je tvořena přibližně 420 aminokyselinami a skládá se ze tří jasně odlišených domén – N-terminální domény, β -trefoil domény a C-terminální domény. Tento vysoce konzervovaný centrální region je obklopen sekvenčně nekonzervovanými N- a C-terminálními oblastmi, které dle sekvenční analýzy postrádají jakoukoli sekundární strukturu, jejich délka je druhově specifická a nacházíme v jejich sekvenci regiony s nízkou komplexitou. Studie popisující prostorové uspořádání proteinů CSL jsou tudíž zaměřeny pouze na výše zmíněnou konzervovanou oblast, tzv. „core“, které je tvořeno převážně β -listy (Kovall & Blacklow 2010).

N-terminální doména (NTD) a C-terminální doména (CTD) jsou strukturně podobné doménám transkripčních faktorů z rodiny Rel; bývají proto také označovány jako RHR-N, respektive RHR-C („Rel-homology region“). Stejně jako domény proteinů Rel jsou i Rel-like domény NTD a CTD tvořeny sedmi centrálními β -řetězci, nicméně v jejich vzájemném prostorovém uspořádání pozorujeme rozdíly. Rozdíly nacházíme i ve

způsobu vazby na DNA (3.1.4.1). Orientace domény NTD proteinu CSL a domény RHR-N proteinu Rel je vůči DNA obdobná, zatímco doména CTD je u proteinů CSL, na rozdíl od proteinů Rel, od molekuly DNA úplně odvrácena (Kovall & Hendrickson 2004). Doména CTD vykazuje nižší sekvenční konzervovanost v porovnání s doménou NTD. Bylo prokázáno, že na doménu CTD se po aktivaci signální dráhy Notch váže NICD skrze své ankyrinové repetice (Wilson & Kovall 2006).

Mezi doménami NTD a CTD je vnořena doména, kterou proteiny z rodiny Rel postrádají. Jedná se o β -trefoil doménu (BTD), jejíž název je odvozen od struktury popsané u cytokinů (Murzin *et al.* 1992). Od struktury β -trefoil foldu, která je tvořena trojnásobně symetrickým uzavřeným β -barelem tvořeným 12 β -řetězci, se však částečně odlišuje. Doména BTD u proteinů CSL postrádá 2 β -řetězce vytvářející u klasického β -trefoil foldu jakési víčko a vytváří tedy strukturu otevřeného β -barelu. Absence víčka vede k vytvoření konzervované hydrofobní kapsy, která je místem interakce domény BTD s NICD. Do této nepolární kapsy se totiž váže skrze svůj hydrofobní tetrapeptidový motiv doména RAM („RBP-J associated molecule“), která se nachází na N-konci NICD (Wilson & Kovall 2006; Kovall & Hendrickson 2004). Na povrch domény BTD byla dále namapována místa, která jsou styčnými body domény BTD s interakčními partnery proteinů CSL, zejména s jejich korepresory (Kovall & Hendrickson 2004). Doména BTD se dále liší od typické β -trefoilové struktury v délce některých β -řetězců a i jejich vzájemné propojení je odlišné.

β -list C4 je pokračováním domény BTD a spojuje všechny tři výše popsané domény do jednoho kompaktního útvaru (Obr. 4). Je tedy centrální organizační strukturou, která významně přispívá k formování komplexní doménové architektury proteinů CSL (Kovall & Hendrickson 2004).



Obr. 4: Terciární struktura proteinu CSL v komplexu s DNA. Na obrázku je zachyceno prostorové uspořádání domén proteinu Lag-1 (*C. elegans*). Doména NTD (RHR-N) je znázorněna modře, doména BTD zeleně a doména CTD (RHR-C) oranžově. β -list C4 je znázorněn růžově. Pro určení terciární struktury CSL byla konzervovaná oblast proteinu Lag-1 ko-krytalizována s fragmentem DNA. Pod modelem struktury proteinu je uveden duplex DNA použitý pro krystalografickou analýzu; konsenzuální DNA-vazebná sekvence proteinů CSL je orámována. Převzato z (Kovall & Hendrickson 2004).

3.1.3.2 Struktura houbových proteinů CSL v porovnání s živočišnými zástupci

Domény NTD a BTD, včetně β -listu C4, jsou konzervovány i u houbových organismů. Aminokyselinové zbytky v doméně BTD, skrz které je u živočichů zprostředkován kontakt proteinu CSL s koaktivátory/korepresory, však nejsou u hub zachovány. Doména CTD vykazuje ještě nižší konzervovanost než u živočišných CSL a kvůli sekvenční divergenci byla identifikována jen u několika zástupců fungálních proteinů; u proteinů Cbf11 a Cbf12 kvasinky *S. pombe* rozpoznána nebyla. Sekvence houbových proteinů CSL tříd F1 i F2 jsou delší než sekvence jejich metazoálních protějšků, což je dáno prodlouženými nestrukturovanými N-konci a četnými aminokyselinovými insercemi (Převorovský *et al.* 2007).

U houbových proteinů zaujímá N-koncová část průměrně 21,4 % (třída F1) a 34,3 % (třída F2) celkové délky proteinu, zatímco u živočichů jen 12,8 %. Poměr délek N-terminálních sekvencí tříd F1 a F2 je u hub konzervovaný. N-konec houbových proteinů vykazuje velmi nízkou konzervovanost a vyskytují se v něm oblasti s nízkou komplexitou. V N-terminálních oblastech byly nalezeny dva typy regulačních sekvencí – fosforylační místa a tzv. PEST motivy. Nestrukturované N-konce hrají důležitou roli v regulaci proteinů CSL (Převorovský *et al.* 2011). Bylo například zjištěno, že proteiny

Cbf11/12 vyžadují N-terminální sekvence pro svou jadernou lokalizaci (Oravcová *et al.* 2013). N-koncová oblast proteinu Cbf12 negativně ovlivňuje vazbu proteinu na DNA (Převorovský *et al.* 2011).

3.1.4 Vazba proteinů CSL na DNA

3.1.4.1 Vazba živočišných proteinů CSL na DNA

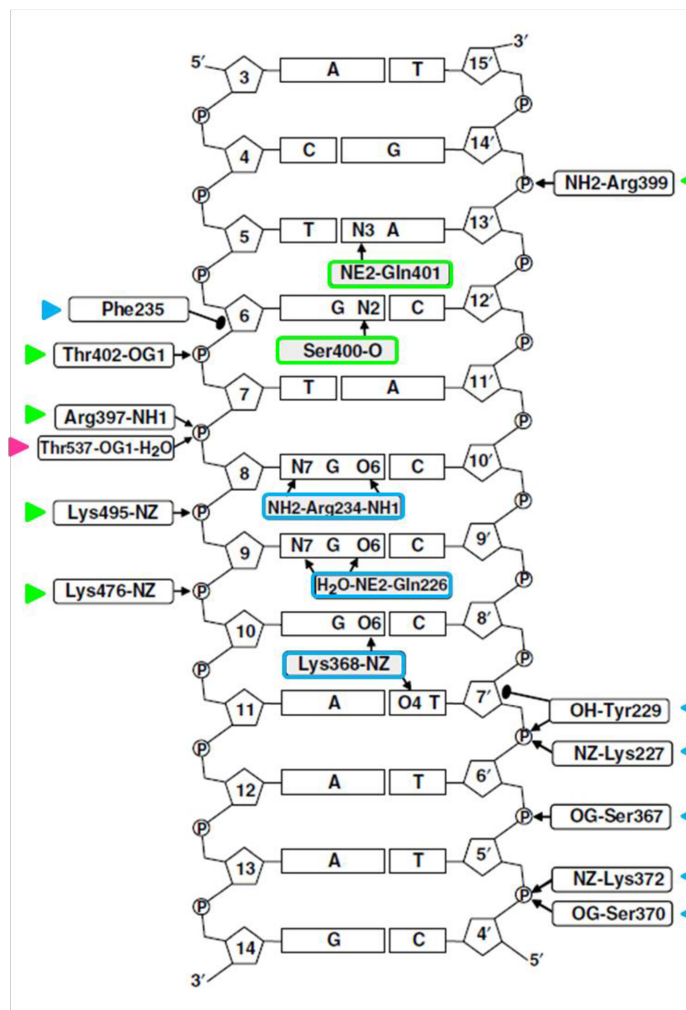
Proteiny CSL se váží na konsenzuální sekvenci YGTGGGAA (Tun *et al.* 1994; Del Bianco *et al.* 2010). Tuto sekvenci váží preferenčně, jsou však schopné rozeznávat i další nekanonické vazebné motivy (Barolo *et al.* 2000; Friedmann & Kovall 2010). Čtyři nukleotidy, které jsou v konsenzuální sekvenci podtržené, jsou téměř invariantní mezi jednotlivými vazebnými motivy, zatímco změna nukleotidů ve zbylých čtyřech pozicích vazebné sekvence je v určitých případech tolerována (Del Bianco *et al.* 2010).

Zatímco u proteinů rodiny Rel je za přímou vazbu na DNA zodpovědná doména NTD a CTD (Ghosh *et al.* 1995), u proteinů CSL je přímý kontakt s DNA zprostředkován skrze domény NTD a BTD (Kovall & Hendrickson 2004). Doména CTD nemá u CSL analogickou funkci jako u strukturně podobných proteinů Rel. Pro DNA-vazebnou aktivitu proteinů CSL je sice CTD nepostradatelná (Chung *et al.* 1994; Nam *et al.* 2003), podílí se na ní ale spíše nepřímě. Stabilizuje totiž terciární strukturu proteinů CSL, což nezanedbatelně přispívá k vazbě proteinu na DNA (Kovall & Hendrickson 2004).

Proteiny rodiny Rel se na DNA váží jako homodimery, popřípadě jako heterodimery. U proteinů CSL však bylo prokázáno, že DNA váží ve formě monomerů (Chung *et al.* 1994; Nam *et al.* 2003). Ukázalo se, že na vazbu na DNA má velký vliv přesná architektura vazebných míst a že celkově je proces vazby mnohem dynamičtější, než se původně myslelo. Roli hrají i různé další faktory/proteiny, které zprostředkovávají kooperativní vazbu proteinů CSL na cílová místa (Kovall & Blacklow 2010).

Interakce proteinu CSL s DNA byly určeny na základě krystalové struktury proteinu Lag-1 navázaného na konsenzuální vazebnou sekvenci (Obr. 4). Kontakt mezi CSL a DNA je zprostředkován skrze konzervované aminokyselinové zbytky, které se podílí jak na sekvencně specifických, tak nespecifických interakcích (Kovall & Hendrickson 2004). Domény NTD, BTD a oblast mezi nimi vytvářejí extenzivní elektro pozitivní povrch, který umožňuje kontakt proteinu CSL s DNA (Kovall & Hendrickson 2004). NTD se skrze β -vlásečku váže do velkého žlábků DNA a

specificky rozpoznává část konsenzuální vazebné sekvence, konkrétně sekvenci GGGA. BTD se skrze vlásenku váže do malého žlábků DNA a specificky rozpoznává první část kanonického vazebného místa, sekvenci YG. Jak již je zmíněno výše, vedle sekvenčně specifických kontaktů s DNA se na vazbě proteinu CSL k DNA podílí i kontakty sekvenčně nespecifické, kterých je většina; jedná se o interakce s deoxyribózofosfátovou kostrou molekuly DNA (Obr. 5). Vazba proteinu na DNA způsobí lokální ohnutí molekuly DNA; duplex DNA však zůstává v konformaci B. Mírné deformace molekuly DNA slouží k rozšíření velkého a malého žlábků DNA (Kovall & Hendrickson 2004).

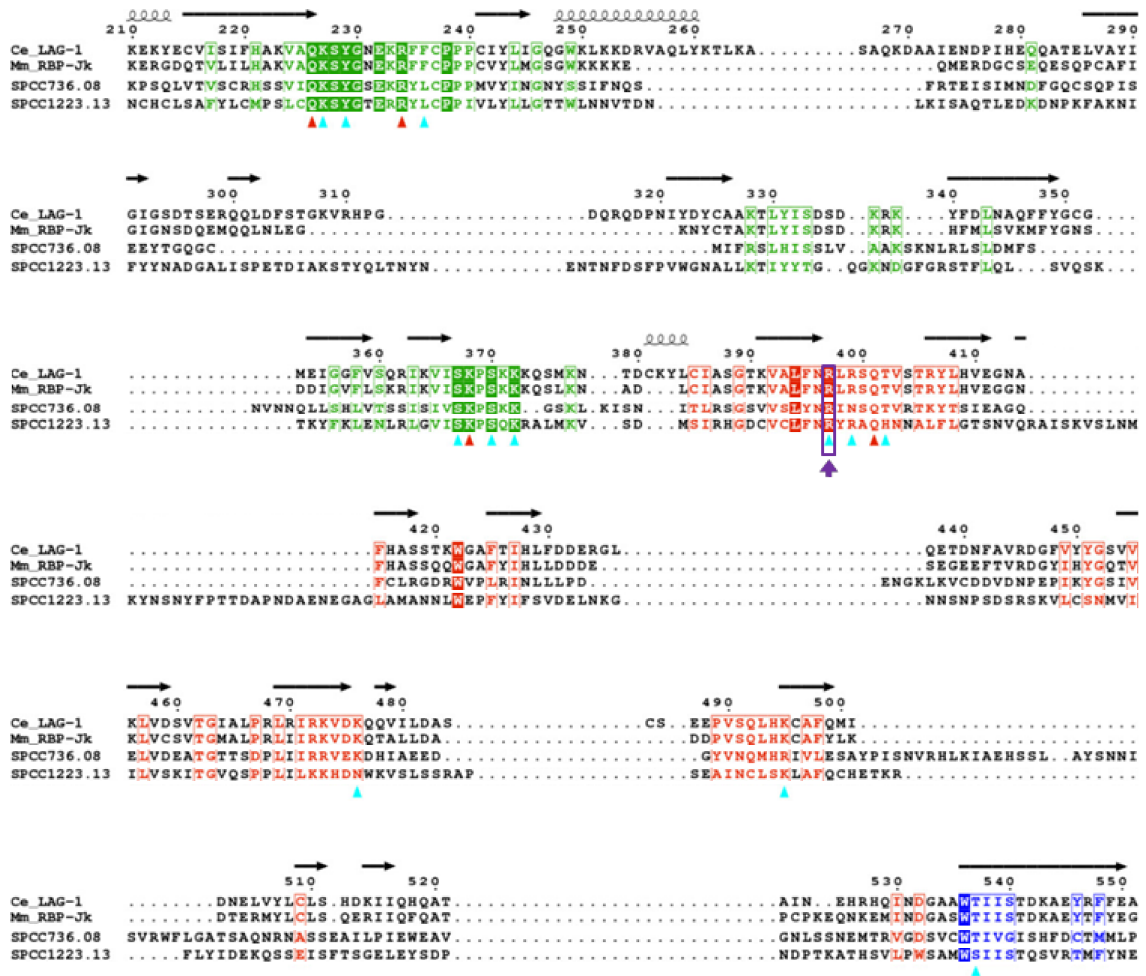


Obr. 5: Interakce proteinu CSL s DNA. Znázorněno na proteinu Lag-1 a vazebné sekvenci ACTGTGGGAAAG (konsenzuální motiv podtržen). Specifické interakce NTD s bázemi DNA jsou orámovány modře, specifické interakce BTD s bázemi DNA zeleně. Sekvenčně nespecifické interakce (n. i.) s deoxyribózovou kostrou DNA jsou označeny barevným trojúhelníkem – modrý trojúhelník znázorňuje n. i. zprostředkované skrze NTD, zelený trojúhelník n. i. zprostředkované skrze BTD a růžový trojúhelník označuje n. i. skrze β -list C4. Interakce přes vodíkové/solné můstky jsou znázorněny černou šipkou, Van der Waalsovy interakce oválkem. Schéma upraveno podle (Kovall & Hendrickson 2004).

3.1.4.2 Vazba proteinů CSL na DNA u *S. pombe*

Aminokyselinové zbytky odpovídající za kontakt proteinů rodiny CSL s DNA jsou konzervovány i u houbových organismů (Převorovský *et al.* 2007). Proteiny Cbf11 a Cbf12 jsou schopny specificky rozeznávat kanonický vazebný element GTG(G/A)GAA *in vitro*, nicméně afinita proteinu Cbf12 o plné délce je pro tuto vazebnou sekvenci podstatně nižší v porovnání s druhým paralogem (Převorovský *et al.* 2009; Převorovský *et al.* 2011; Oravcová *et al.* 2013). Protein Cbf12 je oproti proteinu Cbf11 mnohem náchylnější k proteolytickému štěpení. Bylo prokázáno, že vazba proteinu Cbf12 na DNA *in vitro* je inhibována jeho N-terminální sekvencí (Převorovský *et al.* 2011). Oba paralogy CSL *S. pombe* mají schopnost aktivovat transkripci genů *in vivo*, nicméně vazba proteinů na konsenzuální vazebnou sekvenci byla *in vivo* potvrzena pouze pro protein Cbf11 (Oravcová *et al.* 2013).

V naší laboratoři jsme potvrdili závislost DNA-vazebné aktivity proteinů Cbf11 a Cbf12 na konzervovaném aminokyselinovém zbytku v doméně BTB (viz kapitola 1; Oravcová *et al.* 2013). Mechanismus vazby živočišných proteinů CSL na DNA je tedy pravděpodobně zachován i u fylogeneticky vzdálených houbových organismů. Na Obr. 6 je zachyceno porovnání sekvencí konzervované DNA-vazebné oblasti vybraných živočišných proteinů CSL a proteinů CSL kvasinky *S. pombe*.



Obr. 6: Porovnání sekvencí konzervované DNA-vazebné oblasti proteinů CSL. Znáznorněno u proteinů: Lag-1 *C. elegans* (Ce_LAG-1), RBP-Jk *M. musculus* (Mm_RBP-Jk), Cbf11 *S. pombe* (SPCC736.08) a Cbf12 *S. pombe* (SPCC1223.13). Příslušnost jednotlivých aminokyselinových zbytků k doméně NTD je označena zeleně, doméně BTD červeně a k β -listu C4 modře. Absolutně konzervované aminokyseliny jsou zobrazeny inverzně, pozice s vysokou podobností jsou orámované (zeleně/červeně/modře). Aminokyselinové zbytky, které odpovídají za sekvenčně specifickou vazbu proteinu CSL na DNA, jsou označeny symbolem červeného trojúhelníku; sekvenčně nespecifické interakce proteinů CSL s DNA jsou označeny symbolem tyrkysového trojúhelníku. Číslování aminokyselin a sekundární struktury zobrazené nad srovnáním odpovídají proteinu Lag-1 *C. elegans* (Kovall & Hendrickson 2004). Aminokyselinový zbytek v doméně BTD, který je fialově orámován a je označen fialovou šipkou, je potřeba pro DNA-vazebnou aktivitu proteinů Cbf11 a Cbf12 *in vitro* (Oravcová *et al.* 2013). Argininu v pozici 397 proteinu Lag-1 odpovídá konzervovaný arginin v pozici 218 proteinu RBP-Jk, arginin 318 proteinu Cbf11 a arginin 644 proteinu Cbf12; tento aminokyselinový zbytek je substituován za histidin v konstruktech Cbf11(DBM)/Cbf12(DBM) (viz kapitola 1). Schéma je převzato a upraveno z (Převorovský *et al.* 2007).

3.1.5 Cbf12 – fyzické a genetické interakce

3.1.5.1 Protein *Zfs1* a regulace stability mRNA *cbf12*

Pro regulaci stability mRNA jsou důležité sekvence nacházející se v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) transkriptu, které jsou bohaté na nukleotidy AU a bývají označovány jako ARE („AU-rich elements“). Tyto vazebné sekvence jsou rozpoznávány RNA-vazebnými proteiny, které zprostředkovávají kontakt cílové mRNA

s degradační mašinerií (Chen *et al.* 2001; Pérez-Ortín *et al.* 2013). Příkladem takovýchto RNA-vazebných proteinů, které se vážou na cílové molekuly mRNA a způsobují tak jejich destabilizaci, jsou zástupci tristetraprolinové (TTP) proteinové rodiny (Brooks & Blackshear 2014). Proteiny náležející k rodině TTP obsahují ve své struktuře tandemový CCCH motiv zinkového prstu (tzv. doména TZF), skrze který rozeznávají vazebnou sekvenci UUAUUUAUU v oblasti 3'UTR cílového transkriptu. Pro vazebnou afinitu je nezbytná centrální oblast vazebné sekvence – heptamer UAUUUUAU (Worthington *et al.* 2002; Lai *et al.* 2002; Lai *et al.* 2005). Protein Zfs1 je jediný zástupce tristetraprolinové proteinové rodiny u *S. pombe* (Kanoh *et al.* 1995). Gen *zfs1* je u poltivé kvasinky vyžadován pro proces konjugace a sporulace (Kanoh *et al.* 1995), je zahrnut v procesu koordinace mitózy a septace buněk (Beltraminelli *et al.* 1999) a funguje také jako jeden z negativních regulátorů vstupu do mitózy (Navarro & Nurse 2012). Kromě účasti ve zmíněných procesech hraje protein Zfs1 roli i v regulaci buněčné adheze. Byla identifikována fyzická interakce proteinu Zfs1 s mRNA genu *cbf12*. V oblasti 3'UTR transkriptu *cbf12* bylo nalezeno šest vazebných motivů UAUUUUAU postačujících pro vazbu proteinů rodiny TTP. Bylo potvrzeno, že se protein Zfs1 přímo váže do oblasti 3'UTR transkriptu *cbf12* a způsobuje jeho destabilizaci. Bylo ověřeno, že absence genu *zfs1* vede u buněk k flokulaci; příčinou je zejména akumulace transkriptu *cbf12*. Pokud není v buňce přítomen ani gen *zfs1*, ani *cbf12*, nepozorujeme u buněk flokulační fenotyp (Wells *et al.* 2012).

3.1.5.2 Genetické interakce genu *cbf12*

Genetické interakce představují biologický fenomén, kdy projev jedné mutace je ovlivněn přítomností další mutace. Na základě studia genetických interakcí můžeme identifikovat funkčně příbuzné geny, predikovat biochemické dráhy či proteinové komplexy a objasnit tak základní funkce a děje v buňce. Genetické interakce mezi dvěma lokusy jsou stanoveny na základě porovnání fenotypu jednotlivých jednoduchých mutantů s fenotypem dvojitého mutantu. U kvasinek se mezi jednotlivými mutanty nejčastěji porovnává schopnost jejich růstu, která je odvozená od velikosti vytvořených kolonií (tzv. fitness). Genetické interakce se dělí do tří kategorií: negativní, pozitivní a neutrální. Za negativní (též synergické) považujeme takové genetické interakce, kdy fenotyp dvojitého mutantu je horší než prostá kombinace fenotypů jednoduchých mutantů (tzv. multiplikativní model). Negativní interakce jsou nejčastěji interpretovány jako funkce obou genů v paralelních drahách, které jsou

v případě jednoduchých mutantů částečně zastupitelné. Negativní interakce mohou ale také odrážet funkci genů v jedné dráze, kdy kombinace mutací v obou genech způsobí dramatické snížení signalizačního/metabolického toku, což vede ke zhoršenému fenotypovému projevu. Pozitivní interakce, které se v buňkách vyskytují méně často než interakce negativní, se též nazývají epistatické. U pozitivních interakcí vykazuje dvojitý mutant mírnější fenotyp, než který je podle multiplikativního modelu očekáván. Pozitivní genetické interakce mohou odrážet funkci genů v jednom proteinovém komplexu nebo jedné signální dráze, kde funkce jednoho genu často reprimuje funkci genu druhého. Neutrální interakce představují případ, kdy se dva studované geny vzájemně neovlivňují a neúčastní se stejných procesů; fenotyp dvojitého mutantu odpovídá očekávání (Dixon *et al.* 2009; Beltrao *et al.* 2010).

V roce 2012 byla publikována tzv. E-MAP („epistatic miniarray profile“) – celogenomová mapa genetických interakcí pro *S. pombe* (Ryan *et al.* 2012). Pro gen *cbf12* bylo identifikováno několik genetických interakcí. Delece genu *cbf12* negativně/pozitivně interaguje s delecemi genů uvedených v Tab. 1.

Tab. 1: Genetické interakce delece *cbf12* s delecemi dalších genů. Interakce a interakční skóre podle (Ryan *et al.* 2012).

| interakce | název genu | produkt genu | proces | interakční skóre |
|-----------|--------------|--|-----------------------|------------------|
| negativní | <i>prw1</i> | podjednotka histondeacetylázového komplexu Clr6 | histonové modifikace | -5,55 |
| | <i>fft3</i> | helikáza z rodiny SMARCAD1 | remodelace chromatinu | -3,45 |
| | <i>rpa12</i> | podjednotka komplexu DNA-dependentní RNA polymerázy I | transkripce | -3,44 |
| | <i>dad3</i> | podjednotka komplexu DASH | segregace chromozomů | -2,46 |
| | <i>rad2</i> | endonukleáza z rodiny FEN-1 | opravy DNA | -2,44 |
| pozitivní | <i>swd1</i> | podjednotka histonmethyltransferázového komplexu Set1C | histonové modifikace | 1,81 |
| | <i>rem1</i> | cyklin specifický pro meiózu | meióza | 1,98 |
| | <i>set1</i> | H3K4 methyltransferáza | histonové modifikace | 2,05 |

Kromě zmíněných genetických interakcí byly pro gen *cbf12* popsány ještě dvě fenotypové suprese. Nadprodukce *cbf12* vede k flokulaci buněk, nicméně tento fenotyp nepozorujeme u kmene, kde je gen *cbf12* nadprodukován a zároveň chybí gen kódující dominantní flokulin Gsf2 (Kwon *et al.* 2012). Druhým případem suprese flokulačního fenotypu je fenomén popsáný v předchozí kapitole (3.1.5.1). K flokulaci buněk způsobené nepřítomností genu *zfs1* nedochází při současné delecí *cbf12* (Wells *et al.* 2012).

3.2 Agregace kvasinkových buněk

Schopnost kvasinkových buněk přilnout jedna k druhé či jejich schopnost adherovat k podkladu je klíčová pro řadu procesů, a proto je extenzivně studována. Přilnavost buněk je zprostředkována skrze tzv. aglutininy/adheziny/flokuliny, povrchové proteiny, které „čnící“ z buněčné stěny kvasinek a váží specifické aminokyselinové nebo cukerné zbytky (Verstrepen & Klis 2006).

Na začátku sexuální reprodukce pučící kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a poltivé kvasinky *S. pombe* dochází ke konjugaci. Pro průběh konjugace je nutná mezibuněčná adhezivita; buňky opačného párovacího typu se rozpoznají, skrze vazbu mezi sexuálními aglutininy k sobě přilnou a fúzí (Vallejo *et al.* 2013). U *S. pombe* byly identifikovány dva proteiny zprostředkující sexuální agregaci – protein Mam3 je specifický pro párovací typ h⁻ a protein Map4 pro párovací typ h⁺ (Mata & Bähler 2006; Sharifmoghadam *et al.* 2010).

Adhezivní vlastnosti kvasinek také umožňují tvorbu specializovaných struktur, tzv. biofilmů. Ty poskytují buňkám ochranu v nepříznivých podmínkách a u patogenních kvasinek (např. *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*) jsou klíčové pro infikování hostitelského organismu a pro virulenci (Mendes-Giannini *et al.* 2005; Verstrepen & Klis 2006).

Jedním z nejstudovanějších typů buněčné agregace je fenomén flokulace. Flokulace je asexuální reverzibilní proces, který vede k vytvoření buněčných shluků (vloček) a na který bývá nahlíženo jako na ochranný mechanismus umožňující přežití kvasinkových buněk v nepříznivých podmínkách, např. při nedostatku živin. Flokulace má obrovský význam ve vinařství nebo v pivovarském průmyslu, kde umožňuje snadné a efektivní odstranění kvasinkových buněk v procesu přípravy piva. Dále se procesu flokulace využívá při produkci bioetanolu a při bioremediaci odpadních vod obsahujících těžké kovy (Soares 2011; Vallejo *et al.* 2013).

3.2.1 Flokulace a adhezivita u *S. pombe*

Flokulace *S. pombe* závisí na přítomnosti iontů Ca²⁺ a je zprostředkována skrze interakci flokulinů na povrchu jedné buňky s galaktosylovými zbytky nacházejícími se v buněčné stěně druhé buňky (Tanaka *et al.* 1999). Je regulována komplexní sítí

transkripčních faktorů, které ovlivňují zaprvé expresi genů kódujících flokuliny a zadruhé expresi genů kódujících enzymy remodelace buněčné stěny (Obr. 7).

Hlavními transkripčními regulátory flokulace jsou proteiny Mbx2 a Gsf1 (též zvaný Rfl1). Protein Mbx2 patří do rodiny transkripčních faktorů s konzervovanou MADS box doménou a původně byl identifikován pro svou roli v syntéze složek buněčné stěny (Andreishcheva *et al.* 2004). Transkripční faktor Mbx2 funguje jako aktivátor flokulace a ovlivňuje transkripci genů kódujících flokuliny – *gsf2*, *pfl2*, *pfl3*, *pfl4*, *pfl5*, *pfl6*, *pfl7*, *pfl8 (fta5)* a *pfl9* (Matsuzawa *et al.* 2012; Kwon *et al.* 2012). První zmíněný gen kóduje protein Gsf2, dominantní flokulin, na kterém je proces flokulace závislý a jehož N-terminální oblast je důležitá pro rozpoznání a vazbu galaktosylového zbytku glykoproteinu sousední buňky (Kwon *et al.* 2012; Matsuzawa *et al.* 2011). Exprese tohoto flokulinu je nepostradatelná také pro adhezivitu a filamentární růst (Matsuzawa *et al.* 2011). Mbx2 reguluje i některé enzymy remodelace buněčné stěny (Kwon *et al.* 2012). Protein Gsf1 funguje jako negativní transkripční regulátor, který ovlivňuje expresi genů kódujících flokuliny. Bylo prokázáno, že přímo reprimuje expresi dominantního flokulinu Gsf2, čímž dochází k inhibici procesu flokulace (Kwon *et al.* 2012; Matsuzawa *et al.* 2013).

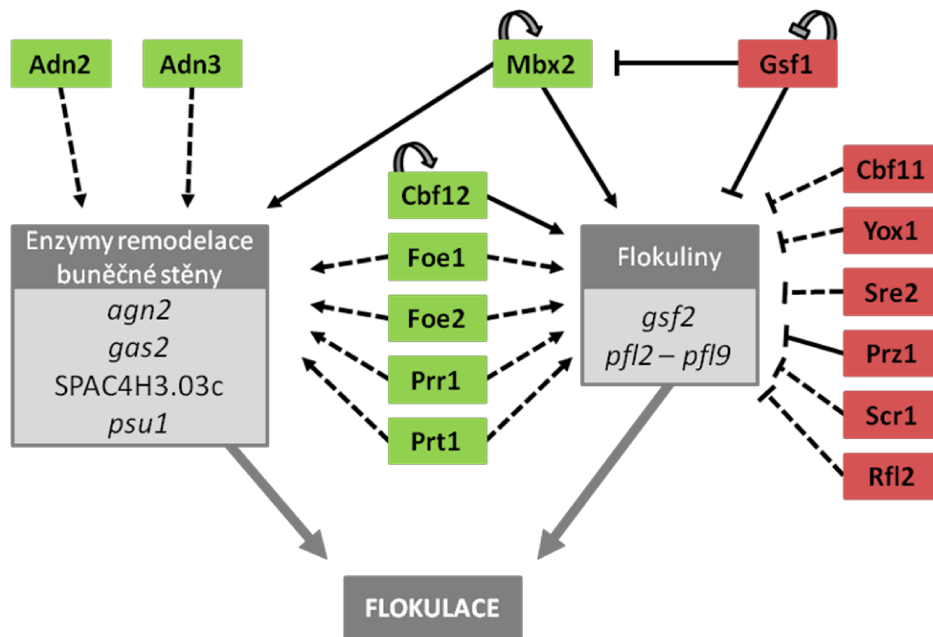
Na regulaci flokulace se mimo proteiny Mbx2 a Gsf1 podílí i mnoho dalších transkripčních faktorů. Jak již bylo popsáno dříve, protein Cbf12 hraje roli jako pozitivní regulátor buněčné adheze/flokulace, kdežto protein Cbf11 funguje jako regulátor negativní (Převorovský *et al.* 2009). Na základě transkriptomických dat byly identifikovány cílové geny obou proteinů CSL, které zahrnují některé geny kódující flokuliny, včetně genu *gsf2* pro dominantní flokulin. Protein Cbf12 aktivuje transkripci genů *gsf2* a *pfl7* (Kwon *et al.* 2012). Spekuluje se, že i protein Cbf11 by mohl mít analogickou funkci přímého regulátoru flokulace skrze represi genu *gsf2*. V promotorové oblasti genu *gsf2* bylo nalezeno několik vazebných motivů, které jsou blízce příbuzné konsenzuální vazebné sekvenci proteinů CSL, a je tudíž možné, že regulace flokulace probíhá skrze kompetitivní vazbu proteinů Cbf11/12 na tyto cílové sekvence (Kwon *et al.* 2012). Dle ChIP-seq dat z naší laboratoře se do promotoru genu *gsf2* váží oba proteiny rodiny CSL, u Cbf11 však byl zaznamenán mnohem menší vazebný signál oproti Cbf12 (Převorovský *et al.* 2015).

Mezi další pozitivní regulátory buněčné adheze a flokulace patří transkripční faktory Adn2 a Adn3, přičemž proces flokulace regulují skrze geny kódující enzymy

remodelace buněčné stěny (Dodgson *et al.* 2009; Kwon *et al.* 2012). Proteiny Adn2/Adn3 se také účastní regulace buněčné separace (Kwon *et al.* 2012).

Na inhibici flokulace nezávislé na proteinech Mbx2 a Cbf12 se podílí transkripční faktory Sre2 a Yox1 (Kwon *et al.* 2012). Funkce proteinu Sre2, homologa lidského proteinu SREBP-1A („sterol regulatory element binding protein 1A“), není mimo regulaci flokulace doposud plně objasněna (Hughes *et al.* 2005). Protein Yox1 se podílí na regulaci periodické genové exprese v průběhu buněčného cyklu *S. pombe*. Yox1 funguje v negativní regulační smyčce, kde reprimuje transkripci cílových genů komplexu MBF („MCB-binding factor“) během pozdní S fáze (Aligianni *et al.* 2009; Caetano *et al.* 2011). Protein Prz1 byl vedle svých rolí v odpovědi na zvýšenou intracelulární hladinu iontů Ca^{2+} a v biosyntéze buněčné stěny, kde funguje jako pozitivní transkripční regulátor, identifikován jako další negativní regulátor flokulace (Hirayama *et al.* 2003; Chatfield-Reed *et al.* 2016). Prz1 reprimuje expresi flokulinů *gsf2* a *pfl3* a také genu *cbf12* (Chatfield-Reed *et al.* 2016).

V laboratoři Dr. Gordona Chuy nedávno popsali roli dalších transkripčních faktorů v regulaci flokulace. Pozitivní regulační role byla popsána u transkripčních faktorů Foe1, Foe2, Prr1 a Prt1. Nadprodukce zmíněných proteinů vede ke zvýšení hladiny transkriptů některých genů kódujících flokuliny a enzymy remodelace buněčné stěny (Dr. Chua, nepublikovaná data; „The 9th International Fission Yeast Meeting“, Banff, Kanada, 14. – 19. 5. 2017). Protein Prr1 také hraje roli v odpovědi na oxidační a osmotický stres (Ohmiya *et al.* 1999; Greenall *et al.* 2002), protein Prt1 se účastní procesu „multidrug resistance“ (Kawashima *et al.* 2012). Transkripční faktory Scr1 a Rfl2 byly objeveny jako nové represory flokulace, jelikož kmeny s delecí genů *scr1* a *rfl2* vykazovaly konstitutivní flokulaci a zvýšenou hladinu mRNA genů pro flokuliny. Protein Scr1 se kromě role v regulaci flokulace účastní i odpovědi na zvýšenou extracelulární hladinu glukózy (Saitoh *et al.* 2015). Flokulační fenotyp je u nově identifikovaných aktivátorů/represorů flokulace také závislý na dominantním flokulinu Gsf2 stejně jako v případě dříve nalezených regulátorů (Dr. Chua, nepublikovaná data; „The 9th International Fission Yeast Meeting“, Banff, Kanada, 14. – 19. 5. 2017).

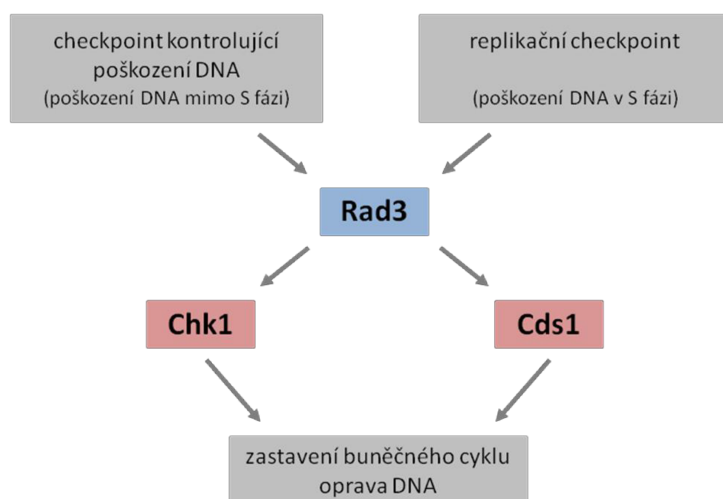


Obr. 7: Schéma transkripční regulace flokulace u *S. pombe*. Pozitivní regulátory flokulace jsou znázorněny zeleně, negativní regulátory červeně. Ve schématu jsou uvedeny vztahy mezi jednotlivými transkripčními faktory (TF) a jejich cílovými geny – flokuliny, popřípadě enzymy remodelace buněčné stěny (detailněji viz hlavní text). Nepřerušovaná čára = pravděpodobně přímá aktivace/represe cílových genů (nebo alespoň některých z nich), odvozeno na základě transkriptomických dat (expresní microarray) a vazebných studií (ChIP-chip). Přerušovaná čára = vztah mezi TF a jeho cílovými geny určen na základě transkriptomických studií. U proteinů Mbx2, Cbf12 a Gsf1 byla popsána autoregulační smyčka (Kwon *et al.* 2012). Schéma bylo upraveno podle (Kwon *et al.* 2012) a doplněno podle (Chatfield-Reed *et al.* 2016) a dat prezentovaných na konferenci (Dr. Chua, nepublikovaná data; „The 9th International Fission Yeast Meeting“, Banff, Kanada, 14. – 19. 5. 2017).

3.3 Poškození DNA u *S. pombe*

Buněčný cyklus zahrnuje procesy replikace DNA, jaderného a buněčného dělení a vede k produkci dvou dceřiných buněk z jedné mateřské buňky. Pro správný průchod fázemi buněčného cyklu je potřeba, aby byly jednotlivé události přísně kontrolovány a regulovány. V rámci buněčného cyklu existuje několik kontrolních bodů, tzv. checkpointů, které ověřují, zda došlo k úspěšnému dokončení všech procesů probíhajících v dané fázi a tedy zda může buňka postoupit do další fáze buněčného cyklu (Hartwell & Weinert 1989). Důležitou funkcí mnoha kontrolních bodů je dohled nad poškozením DNA. Buňky dohlížejí na proces replikace DNA během S fáze, aby zajistily správné dokončení zdvojení genetického materiálu – hovoříme o tzv. replikačním checkpointu. Stav DNA je však monitorován i mimo S fázi v průběhu celého buněčného cyklu; zde se jedná o tzv. checkpoint kontrolující poškození DNA. Pokud je detekováno poškození genetického materiálu, dochází k pozastavení progresu buněčného cyklu a k podpoře oprav poškození DNA. Rozsáhlé poškození genetického materiálu může vést ke spuštění programované buněčné smrti (Nyberg *et al.* 2002).

Omezení progrese buněčného cyklu je u *S. pombe* dosaženo prostřednictvím konzervované kinázy Rad3, která je ortologem savčí kinázy ATR. Kináza Rad3 fosforyluje a tím aktivuje checkpointové efektorové kinázy Chk1 a Cds1 (u savců Chk1, resp. Chk2), které dále fosforylují mnoho cílových proteinů (Rhind & Russell 2000). Kináza Chk1 je zahrnuta v checkpointu kontrolujícím poškození DNA (Walworth *et al.* 1993; Walworth & Bernardis 1996), zatímco kináza Cds1 se specificky účastní replikačního checkpointu (Murakami & Okayama 1995). Schematické znázornění dvou výše zmíněných kontrolních bodů u *S. pombe* je zachyceno na Obr. 8. Obě efektorové kinázy fosforylací inhibují fosfatázu Cdc25, jejíž aktivita je vyžadována pro přechod do M fáze buněčného cyklu; inhibicí Cdc25 tedy dochází k zastavení vstupu do mitózy (Furnari *et al.* 1999). Také negativní regulátor buněčného cyklu – kináza Mik1 – je ovlivňován prostřednictvím obou checkpointových drah, což přispívá k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi (Rhind & Russell 2001).



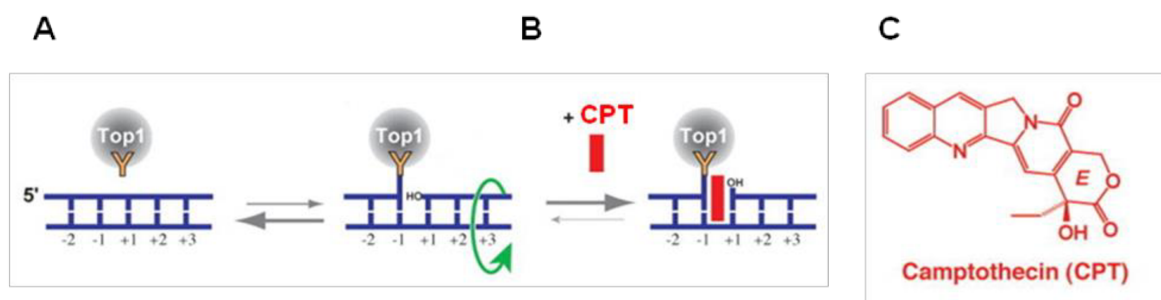
Obr. 8: Dohled nad poškozením DNA u *S. pombe*. Schéma upraveno podle (Noguchi *et al.* 2009).

3.3.1 Studium poškození DNA u *S. pombe*

Kvasinka *S. pombe* je hojně využívána pro studium buněčné odpovědi na poškození genetického materiálu. V laboratorních podmínkách se používá několik činidel poškozujících DNA (Petersen & Russell 2016).

V rámci své diplomové práce využívám rostlinný alkaloid camptothecin (CPT) jako látku způsobující genotoxický stres, a proto se mu v této kapitole věnuji nejpodrobněji. Camptothecin funguje jako inhibitor topoizomerázy I. Činností topoizomerázy I (Top1) dochází k uvolňování pozitivních i negativních nadobrátek

DNA, které vznikají v průběhu replikace DNA a transkripce (Obr. 9A). Topoizomeráza I hraje roli i při opravách DNA a remodelaci chromatinu. Bylo prokázáno, že u kvasinky *S. pombe* není enzym Top1 esenciální (Uemura & Yanagida 1984) a že funguje v procesu regulace transkripce (Durand-Dubief *et al.* 2010). Camptothecin specificky poškozují DNA, aniž by ovlivňoval další biomolekuly. CPT stabilizuje kovalentně navázaný komplex Top1-DNA a brání tak opětovnému spojení přerušeno vlákna DNA (Obr. 9B, C; Hsiang *et al.* 1985). Genotoxický efekt CPT se projeví zejména v S fázi buněčného cyklu (Hsiang *et al.* 1989; Tsao *et al.* 1993). V průběhu replikace DNA dojde ke kolizi replikační vidlice s komplexem Top1-DNA-CPT, což vede ke konverzi jednořetězcových zlomů DNA, které vznikly činností Top1, do zlomů dvouřetězcových. CPT také vyvolává u *S. pombe* aktivaci kinázy Chk1 (Wan *et al.* 1999). Při studiu poškození DNA u *S. pombe* se obvykle používá koncentrace CPT 0,1–10 μM .



Obr. 9: Topoizomeráza I a její inhibitor camptothecin. (A) Top1 se naváže na dvouřetězcovou molekulu DNA a způsobí vytvoření jednořetězcového zlomu. Katalytický tyrozin (Y) enzymu Top1 je přechodně kovalentně navázan na 3'-konec přerušeno vlákna DNA. Dochází k rotaci volného 5'-konce přerušeno vlákna DNA okolo vlákna intaktního. Volná 5'-OH skupina atakuje kovalentní meziprodukt a dojde k opětovnému vytvoření fosfodiesterové vazby ve štěpeném vláknu DNA. Torzní napětí DNA je uvolněno a nadobrátky jsou relaxovány. (B) Komplex Top1-DNA je stabilizován pomocí CPT, čímž je zabráněno opětovnému vytvoření fosfodiesterové vazby. (C) Struktura CPT. Obrázek je upraven podle (Pommier *et al.* 2006).

Další látky způsobující genotoxický stres jsou v tomto odstavci citovány s ohledem na jejich použití u kvasinky *S. pombe*. K produkci dvouřetězcových zlomů se často využívá γ záření (Watson *et al.* 2003). Antibiotikum bleomycin (2,5–5 mU/ml), případně phleomycin, může sloužit jako náhrada za ionizační záření (Baber-Furnari *et al.* 2000; Rhind & Russell 2001). Přesný mechanismus účinku není doposud plně objasněn, nicméně se udává, že k poškození DNA dochází vlivem produkce volných radikálů v blízkosti molekuly DNA. Za účelem poškození genetického materiálu mohou být buňky vystaveny ultrafialovému záření (50–300 J/m^2 ; $\lambda = 254 \text{ nm}$), které mj. způsobuje vznik dimerů thyminu (Morishita *et al.* 2002). Alkylační látka

metylmetsulfonát (MMS) metyluje zejména guanin (7-metylguanin) a adenin (3-metyladenin). Modifikované báze způsobují nesprávné párování a zapříčiňují zastavení/kolaps replikační vidlice (Lundin *et al.* 2005; Kanamitsu & Ikeda 2011). Inhibitor ribonukleotidreduktázy – hydroxyurea (HU) – bývá používán jako další látka poškozující DNA. HU způsobuje depleci deoxyribonukleotidů a tím pádem blokáci buněk v S fázi buněčného cyklu. Působením HU může také docházet k tvorbě zlomů DNA (Enoch *et al.* 1992).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Mikroorganismy

4.1.1 Kultivace mikroorganismů

Mikroorganismy kultivujeme na pevném médiu (agarových plotnách) v termostatu, nebo v tekutém médiu na orbitální třepačce (180 rpm) ve sterilních Erlenmayerových baňkách, které plníme médiem do 1/10 až 1/5 celkového objemu baňky.

Bakteriální kultury kultivujeme v médiu LB při teplotě 37°C. Kvasinkové kmeny kultivujeme buď v komplexním médiu (YES – „yeast extract with supplements“), nebo v médiu minimálním (EMM – „Edinburgh minimal media“; PMG – „Pombe Minimal Glutamate“), do kterého v případě práce s auxotrofními kmeny přidáváme potřebné aminokyseliny a báze. Standardní kultivační teplota pro *S. pombe* je 32°C; pracujeme-li však s termosenzitivními kmeny, kultivujeme buňky při teplotě 25°C. Růst kultury sledujeme měřením optické denzity (OD; $\lambda = 600$ nm) na přístroji WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter (Biochrom).

Krátkodobě můžeme kultury na pevném médiu skladovat ve 4–8°C (maximálně však 3–4 týdny). Pro dlouhodobé uskladnění připravujeme z tekutých kultur následujícím způsobem glycerolové konzervy. Bakteriální kultury kultivujeme přes noc, kvasinkové přes 2 noci do stacionární fáze. V 1,5ml řádně popsané mikrozkuhavce smísíme 500 μ l kultury a 500 μ l sterilního 60% glycerolu (Tab. 6), směs inkubujeme 20 minut na ledu a konzervu skladujeme v -80°C.

4.1.1.1 Přehled použitých mikroorganismů

V Tab. 2 je uveden použitý kmen bakterie *Escherichia coli*, v Tab. 3 jsou zaznamenány použité kmeny poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*.

Tab. 2: Použitý kmen *Escherichia coli*

| kmen | genotyp |
|--------------|---|
| DH5 α | F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ - |

Tab. 3: Použité kmeny *Schizosaccharomyces pombe*

| kmen | genotyp | zdroj |
|--------|---|----------------------------------|
| JB23 | <i>h⁻cdc25-22</i> | Jürg Bähler |
| JB32 | <i>h⁺</i> | Jürg Bähler |
| JB710 | <i>h⁻ura4-D18</i> | Juan Mata |
| MaP178 | <i>h⁻cbf12::ura4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Martina Oravcová, 9.1.1 |
| MaP179 | <i>h⁻cbf12::ura4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Martina Oravcová, 9.1.1 |
| MaP180 | <i>h⁻cbf11::ura4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Martina Oravcová, 9.2 |
| MaP183 | <i>h⁻cbf12-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Martina Oravcová, 9.1.2 |
| MaP184 | <i>h⁻cbf12-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Martina Oravcová, 9.1.2 |
| MaP185 | <i>h⁻cbf12-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Martina Oravcová, 9.1.2 |
| MaP186 | <i>h⁻cbf12(R644H)-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MaP187 | <i>h⁻cbf12(R644H)-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MaP188 | <i>h⁻cbf12(R644H)-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MaP199 | <i>h⁻cbf11::ura4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216 + pJR07</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MP15 | <i>h⁻cbf11-ctap4::natR, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | (Oravcová <i>et al.</i> 2013) |
| MP19 | <i>h⁺cbf11-ctap4::natR</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2015) |
| MP20 | <i>h⁺cbf12-ctap4::natR</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2011) |
| MP21 | <i>h⁺Δcbf12::natR</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2015) |
| MP44 | <i>h⁺Δcbf11::kanR</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2015) |
| MP61 | <i>h⁻Δcbf11::kanR, cdc25-22</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP63 | <i>h⁻cbf11-ctap4::natR, cdc25-22</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP518 | <i>h⁺cbf12(R644H)-ctap</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MP519 | <i>h⁺cbf12(R644H)-ctap</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MP540 | <i>h⁺cbf12-ctap</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MP541 | <i>h⁻cbf12-ctap</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MP550 | <i>h⁺natMX6-Padh1-3HA:cut6</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP551 | <i>h⁺natMX6-Padh1-3HA:cut6</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP552 | <i>h⁺natMX6-Padh1-3HA:cut6</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP553 | <i>h⁺Δcbf11::kanR natMX6-Padh1-3HA:cut6</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP555 | <i>h⁺Δcbf11::kanR natMX6-Padh1-3HA:cut6</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP556 | <i>h⁺Δcbf11::kanR natMX6-Padh1-3HA:cut6</i> | (Převorovský <i>et al.</i> 2016) |
| MP571 | <i>h⁻cbf11-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| MP574 | <i>h⁻cbf11-ctap4, ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Anna Jordáková, tato práce |
| PN559 | <i>h⁻ura4-D18, leu1-32, ade6-M216</i> | Paul Nurse |

4.1.1.2 Kultivační média a roztoky

Jednotlivé pevné složky kultivačních médií (Tab. 4, Tab. 5) rozpouštíme v deionizované vodě (diH₂O) a sterilizujeme v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut. Pokud připravujeme tekutá média, nepřidáváme bakteriologický agar. Zvlášť připravujeme sterilní zásobní roztoky glukózy, aminokyselin a bází (Tab. 6), které přidáváme do vysterilizovaných médií. Antibiotika či selekční chemikálie (Tab. 7) přidáváme do vychladlých médií.

Tab. 4: Bakteriální kultivační médium LB

| název | složka | koncentrace | zdroj |
|-------|--------------------|-------------|-----------|
| LB | pepton | 10 g/l | Merck |
| | kvasinkový extrakt | 5 g/l | Formedium |
| | NaCl | 5 g/l | Penta |
| | ampicilin | 100 µg/ml | Biotika |

Tab. 5: Kvasinková kultivační média

| název | složka | koncentrace | zdroj |
|-------|------------------------------|-------------|--------------------------|
| YES | kvasinkový extrakt | 5 g/l | Formedium |
| | SP suplementy | 0,25 g/l | Formedium |
| | glukóza | 30 g/l | Sigma-Aldrich |
| | agar | 20 g/l | Oxoid |
| EMM | „EMM broth without dextrose“ | 12,3 g/l | Formedium |
| | glukóza | 20 g/l | Sigma-Aldrich |
| | agar | 30 g/l | Oxoid |
| PMG | „PMG powder“ | 30,52 g/l | Sunrise Science Products |
| | agar | 40 g/l | Oxoid |

Tab. 6: Roztoky glukózy, glycerolu, aminokyselin a bází

| název | koncentrace zásobního roztoku | výsledná koncentrace | zdroj |
|--------------|-------------------------------|----------------------|---------------|
| glukóza | 200 g/l (20%) | 20 g/l (2%) | Sigma-Aldrich |
| glycerol | 60% (v/v) | 30% | Sigma-Aldrich |
| L-leucin (L) | 20 mg/ml (100x) | 0,2 mg/ml | Sigma-Aldrich |
| L-adenin (A) | 10 mg/ml (50x) | 0,2 mg/ml | Sigma-Aldrich |
| L-uracil (U) | 5 mg/ml (25x) | 0,2 mg/ml | Sigma-Aldrich |

Tab. 7: Antibiotika a selekční chemikálie

| název | zkratka | koncentrace zásobního roztoku | použitá výsledná koncentrace | zdroj |
|----------------------------|---------|-------------------------------|------------------------------|---------------|
| ampicilin | amp | 100 mg/ml | 100 µg/ml | Biotika |
| camptothecin* | CPT | 10 mM | 6 µM | Sigma-Aldrich |
| kyselina 5-fluoroorotová** | 5-FOA | - | 1 g/l | Biogen |

* při přípravě ploten obsahujících camptothecin rozpouštíme CPT v DMSO (dimetylsulfoxid), přičemž výsledná koncentrace DMSO v plotnách je 1%

** před přidáním do média: 5-FOA rozpustíme v diH₂O, sterilizujeme filtrací a vytemperujeme na 50°C

4.1.2 Křížení kmenů *S. pombe*

V mikrozkuhavce obsahující 30 µl sterilní diH₂O smícháme trochu čerstvě narostlé biomasy obou kmenů *S. pombe*, které chceme zkřížit a které se liší párovacím typem (párovací typ h⁺ a h⁻). Suspenzi dobře promícháme a ve formě kapky převedeme na pevné médium ME (Tab. 8). Po 2–3 dnech inkubace při 25°C mikroskopicky zkontrolujeme (invertovaný mikroskop Olympus CK2), zda se vytvořila vřecka obsahující čtyři spory. Sterilní špičkou nabereme trochu biomasy ze středu narostlé kolonie a resuspendujeme ji v mikrozkuhavce ve 300 µl roztoku β-glukuronidázy (Sigma-Aldrich; 100x koncentrovaný zásobní roztok sterilizovaný filtrací). Suspenzi inkubujeme přes noc při 37°C. Dochází k degradaci buněčné stěny vegetativních buněk a stěny vřecek. Spory zůstanou neporušené a můžeme je takto skladovat v lednici po dobu až několika týdnů. Koncentraci spor v roztoku určujeme mikroskopicky v Bürkerově komůrce. Na příslušnou selekční plotnu vyséváme 50–100 spor požadovaného genotypu. Plotnu s vyšetými spory inkubujeme v termostatu, dokud nevyrostou jednotlivé monokolonie, jejichž genotyp ověřujeme pomocí PCR.

Tab. 8: Složení média ME

| název | složka/poznámka | koncentrace | zdroj |
|-------|---|-------------|---------------|
| ME | sladový extrakt (ME) | 30 g/l | Oxoid |
| | agar | 20 g/l | Oxoid |
| | L-leucin | 0,2 mg/ml | Sigma-Aldrich |
| | L-adenin | 0,2 mg/ml | Sigma-Aldrich |
| | L-uracil | 0,2 mg/ml | Sigma-Aldrich |
| | pH 5,5 (upraveno pomocí NaOH před přidáním agaru) | | |

4.1.3 Měření růstové křivky kmenů *S. pombe*

Ráno zaočkujeme požadovanými kmeny *S. pombe* 10 ml média YES. Kultivujeme alespoň 7 hodin na orbitální třepačce (180 rpm). Do každé komůrky 12jamkové mikrotitrační destičky dááme 1,4 ml kultury o OD 0,1 (tedy 0,14 OD buněk; OD 0,1 ~ $8 \cdot 10^5$ buněk/ml). Destičku s kulturami umístíme do přístroje Varioskan Flash (Thermo Scientific), ve kterém inkubujeme kultury 20–24 hodin při 32°C za současného třepání (180 rpm, rozkmit 20 mm), přičemž každých 10 minut je měřena optická denzita kultur ($\lambda = 600$ nm). Ze získaných dat zkonstruujeme růstové křivky (Microsoft Office Excel 2007, XY bodový graf: osa $x =$ čas, osa $y = \log_2$ OD). Z intervalu, ve kterém rostly kultury exponenciálně, vypočítáme následujícím způsobem jejich dobu zdvojení (T). Vytvoříme graf zachycující pouze exponenciální růst kultury, zobrazíme v něm lineární spojnicí trendu a z její rovnice (1) jsme již schopni dobu zdvojení dopočítat (2).

$$(1) \quad y = kx + q$$

$$(2) \quad T = 1/k$$

4.1.4 Příprava kryoprezervovaných buněk *S. pombe* synchronizovaných v G1 fázi buněčného cyklu – určeno pro editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9

Protokol je upraven podle (Rodríguez-López *et al.* 2016). Kmen MP15 kultivujeme ve 100 ml média EMM+A+L+U do exponenciální fáze růstu na OD 1. Kulturu převedeme do sterilní zkumavky a centrifugujeme (1800 g, 3 min, pokojová teplota). Odstraníme supernatant a buněčný pelet promyjeme 100 ml média bez zdroje dusíku (SD-N; Tab. 9). Opět centrifugujeme (1800 g, 3 min, pokojová teplota). Sediment buněk resuspendujeme do 100 ml média SD-N a kulturu převedeme do sterilní Erlenmayerovy baňky. Na orbitální třepačce inkubujeme kulturu 2 hodiny při 25°C. Po uplynutí dvou hodin mikroskopicky zkontrolujeme (invertovaný mikroskop Olympus CK2), zda došlo ke zmenšení a zakulacení buněk vlivem hladovění na dusík.

Poté kulturu zchladíme 15 min na ledu a i nadále ji udržujeme při 4°C. Kulturu převedeme do sterilní zkumavky a buňky usadíme centrifugací (1600 g, 5 min, 4°C). Pelet resuspendujeme v 80 ml studené sterilní diH₂O a znovu centrifugujeme. Promývání buněk vodou ještě dvakrát zopakujeme. Po třetím promytí resuspendujeme sediment buněk v 1 ml vychlazené směsi glycerolu a octanu lithného (500 µl 60% glycerolu + 500 µl 0,1M LiAc, pH 4,9). Suspenzi buněk rozdělíme po 50 µl do 1,5ml sterilních zkumavek. Alikvóty umístíme na 2 min na led, a poté skladujeme v -80°C až po dobu dvou měsíců. Každý alikvót slouží pro jednu transformační reakci.

Tab. 9: Složení média SD-N

| název | složka | koncentrace | zdroj |
|-------|--|-------------|---------------|
| SD-N* | „ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast nitrogen base without amino acids and without ammonium sulphate“ | 1,9 g/l | Formedium |
| | glukóza | 20 g/l | Sigma-Aldrich |

*Pro účely hladovění na dusík bylo jako médium bez zdroje dusíku využito médium určené primárně pro kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.5 Synchronizace buněk *S. pombe* v G2 fázi buněčného cyklu

Zastavení buněk *S. pombe* v G2 fázi buněčného cyklu provádíme pomocí termosenzitivní alely *cdc25-22* (Nurse *et al.* 1976; Fantes 1979). Buňky kultivujeme v permissivní teplotě 25°C do exponenciální fáze růstu na OD 1. Připravíme si vodní lázeň o teplotě 45–50°C, ve které kulturu ohřejeme na 36°C. Při této restriktivní teplotě buňky kultivujeme 4 hodiny. Dochází k synchronizaci buněk; buněčný cyklus je zastaven v pozdní G2 fázi („block“; Millar, Russell, *et al.* 1992; Millar, Lenaers, *et al.* 1992). Kulturu rychle zchladíme v ledové lázni na 25°C a dále ji kultivujeme v této permissivní teplotě. Buňky jsou synchronně vypuštěny zpět do buněčného cyklu („release“). Každých 30 minut po zchlazení kultury na 25°C odebíráme alikvoty buněk pro následné analýzy pomocí ChIP-qPCR, případně RT-qPCR. První odběr (tj. čas 0) provádíme neprodleně po zchlazení kultury na 25°C; buňky se ještě nacházejí v G2 fázi buněčného cyklu. V případě následné analýzy vzorků pomocí ChIP-qPCR, odebíráme 50ml alikvoty kultury, které dále zpracujeme podle protokolu 0. V případě analýzy pomocí RT-qPCR odebíráme 2 ml kultury, které zpracujeme podle protokolu 4.3.3. V jednotlivých časových bodech zároveň mikroskopicky sledujeme průchod kultury buněčným cyklem. Stanovujeme tzv. septační index (SI), který představuje procento buněk se septem. Za běžných kultivačních podmínek koreluje výskyt septa s S fází (Gómez & Forsburg 2004). Septační index dosahuje maxima v 90. až 120. minutě po

„release“. Pro účely stanovení SI postačí odebrat 50–100 μl kultury. Vzorek krátce centrifugujeme, odebereme přibližně polovinu supernatantu a ve zbytku tekutiny buňky resuspendujeme. Na podložní sklíčko nanášíme 3–5 μl suspenze a mikroskopujeme. Využíváme invertovaný mikroskop Olympus CK2 (zvětšení 400x). Vždy počítáme 100 buněk a určíme, kolik z nich bylo septovaných.

4.2 Transformace mikroorganismů

4.2.1 Transformace *E. coli* elektroporací

Na ledu necháme pozvolna rozmraznout elektrokompetentní buňky *E. coli* (kmen DH5 α). V 1,5ml vychlazené mikrokumavce smícháme 40 μl buněk se

- 2 μl ligační směsi,
- nebo s 1 μg plazmidové DNA,
- nebo s 1,5 μl PCR směsi.

Suspenzi převedeme do předchlazených elektroporačních kyvet (šířka štěrby 2 mm; Cell Projects). Pro elektroporaci využíváme přístroj Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad), na kterém nastavíme tyto hodnoty: kapacitance 25 μF , napětí 2,5 kV, odpor 200 Ω . Okamžitě po aplikaci elektrického pulzu přidáme k obsahu kyvety 1 ml média LB s 0,5% glukózou a směs převedeme zpět do 1,5ml mikrokumavky. Inkubujeme 1 hodinu při 37°C, a poté vyséváme na selekční plotny LB+amp, které inkubujeme v termostatu při 37°C přes noc. Z několika nezávislých klonů narostlých na selekční plotně vyizolujeme plazmidy, které ověřujeme restrikcí štěpením, případně sekvenací.

4.2.2 Vysoce efektivní transformace *S. pombe*

Používali jsme dva protokoly pro vysoce efektivní transformaci *S. pombe* (4.2.2.1 a 4.2.2.2) a od každého protokolu jsme vyzkoušeli více variant. Uvádím zde proto protokoly obecné a přesné parametry transformace a případné odchylky od obecného postupu jsou zaznamenány v bodech ve Výsledcích.

4.2.2.1 Vysoce efektivní transformace *S. pombe* – metoda I

Protokol je upraven podle (Bähler *et al.* 1998). Pro účely transformace kultivujeme kmeny *S. pombe* v 10 ml příslušného média do exponenciální fáze růstu na

OD 0,3–2,0 (pro kmen divokého typu platí, že OD $1 \sim 8 \cdot 10^6$ buněk/ml). Kulturu převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a buňky usadíme centrifugací (1000 g, 3 min, pokojová teplota). Buněčný pelet promyjeme 10 ml sterilní diH₂O a směs centrifugujeme (1000 g, 3 min, pokojová teplota). Sediment buněk resuspendujeme do 1 ml sterilní diH₂O, převedeme do 1,5ml mikrozkuavky a znovu centrifugujeme (1000 g, 3 min, pokojová teplota). Buňky resuspendujeme v 1 ml čerstvě připraveného roztoku LiAc/TE, centrifugujeme (1000 g, 3 min, pokojová teplota) a vzniklý sediment buněk resuspendujeme do 100 µl směsi LiAc/TE. Ke 100 µl suspenze přidáme 1–3 µg transformující DNA a 2 µl předem denaturované (10 min při 95°C, poté zchladit na ledu) ssDNA (salmon sperm DNA; 10 mg/ml; Sigma-Aldrich). Směs inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě. Přidáme 260 µl směsi 40% PEG/LiAc/TE, jemně promícháme a inkubujeme 30–60 minut při 30°C. Přidáme 43 µl DMSO, promícháme a inkubujeme 5 minut ve 42°C. Suspenzi necháme vychladnout při pokojové teplotě, buňky usadíme centrifugací (3000 g, 3 min, pokojová teplota) a odebereme ½ objemu supernatantu (cca 200 µl). Sedimentované buňky resuspendujeme ve zbytkovém objemu a vysejeme na neselekční agarovou plotnu. Inkubujeme jeden den v termostatu, a poté přetiskneme na selekční médium. Typicky po 3–5 dnech inkubace pozorujeme nárůst jednotlivých monoklonií.

Roztoky a pufr:

| | |
|---------------------------------|---|
| 10x LiAc | 1M octan lithný (LiAc); pH 7,5 |
| 10x TE pufr | 0,1M Tris-HCl, 10mM EDTA; pH 7,5 |
| směs LiAc/TE (1 reakce) | 120 µl 10x LiAc, 120 µl 10x TE pufr, 960 µl sterilní diH ₂ O |
| směs 40% PEG/LiAc/TE (1 reakce) | 240 µl 50% PEG 4000, 30 µl 10x LiAc, 30 µl 10x TE pufr |

4.2.2.2 Vysoce efektivní transformace *S. pombe* – metoda II

Protokol vychází ze základní metody podle (Okazaki *et al.* 1990). Kmeny *S. pombe* kultivujeme v 10 ml příslušného média do exponenciální fáze růstu. Kulturu převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a buňky usadíme centrifugací (1650 g, 5 min, pokojová teplota). Buněčný pelet promyjeme 10 ml sterilní diH₂O a směs centrifugujeme (1650 g, 5 min, pokojová teplota). Sediment buněk resuspendujeme do 100 µl 0,1M octanu lithného (LiAc; pH 4,9), převedeme do 1,5ml mikrozkuavky a inkubujeme 1 hodinu při 32°C. K 100 µl suspenze přidáme 3–30 µg transformující plazmidové DNA rozpuštěné v 15 µl TE pufru. Směs jemně promícháme, přidáme 290

μl 50% (w/v) PEG-4000 zahřátého na 32°C a hodinu inkubujeme ve 32°C. Vzorke umístíme na 15 minut do 43°C, a poté necháme suspenzi 10 minut chladnout při pokojové teplotě. Buňky usadíme centrifugací (2300 g, 5 min, pokojová teplota) a odebereme ½ objemu supernatantu (cca 200 μl). Sedimentované buňky resuspendujeme ve zbytkovém objemu a vysejeme na neselekční agarovou plotnu. Inkubujeme 24 hodin v termostatu, a poté přetiskneme na selekční pevné médium. Cyklus 24hodinové inkubace a následného přetiskání na selekční médium opakujeme 1–3x. Plotny po přetiskání dále inkubujeme a typicky po 3–5 dnech pozorujeme nárůst jednotlivých monoklonií.

Roztoky a pufr:

1x LiAc 0,1M octan lithný; pH 4,9
10x TE pufr 0,1M Tris-HCl, 10mM EDTA; pH 7,5

4.2.3 Rychlá transformace *S. pombe*

Protokol je upraven podle (Morita & Takegawa 2004). Sterilní špičkou nabere trochu čerstvě narostlých recipientních buněk a biomasu resuspendujeme v transformační směsi. Přidáme 1 μg plazmidové DNA a 2 μl nosičové ssDNA (10 mg/ml; Sigma-Aldrich), kterou jsme předem denaturovali 10 min při 95°C. Směs jemně promícháme. Inkubujeme 1 hodinu při 30°C, a poté 15 min při 42°C. Suspenzi necháme vychladnout a vysejeme na příslušné selekční médium.

Roztoky a pufr:

LiAc 1M octan lithný; pH 7,5
10x TE pufr 0,1M Tris-HCl; 10mM EDTA; pH 7,5
transformační směs (1 reakce) 74 μl 50% PEG-4000, 7 μl 1M LiAc, 7 μl 10x TE pufru

4.2.4 Transformace kryoprezervovaných buněk *S. pombe* synchronizovaných v G1 fázi buněčného cyklu – editace genomu pomocí CRISPR/Cas9

Postup je upraven podle (Rodríguez-López *et al.* 2016). Jeden 50μl alikvot kryoprezervovaných synchronizovaných buněk (kmen MP15; 4.1.4) necháme rozmraznout po dobu 2 min při 40°C. Přidáme následující položky:

- 2 μg plazmidu nesoucího Cas9 a příslušnou sgRNA (pMP134/136/138),

- 10 µg plazmidové DNA sloužící jako templát pro homologní rekombinaci (pMaP27/pMaP11, štěpeno SalI a EcoO109I, cca 5 µg rekombinogenní oblasti),
- 2 µl ssDNA (10 mg/ml; Sigma-Aldrich), kterou jsme předem denaturovali 10 min při 95°C
- 145 µl 50% PEG-4000.

Směs jemně promícháme a inkubujeme 15 min při 43°C. Buňky usadíme centrifugací (1600 g, 3 min, pokojová teplota) a resuspendujeme je v 1 ml směsi neselekčního média SD-N a média EMM+A+L+U (900 µl SD-N + 100 µl EMM+A+L+U). Suspenzi buněk inkubujeme bez třepání 16 hodin při 25°C, a poté centrifugujeme (1600 g, 3 min, pokojová teplota). Odstraníme supernatant a buňky resuspendujeme ve 100 µl selekčního média EMM+A+L. Suspenzi vysejeme na selekční plotnu EMM+A+L, kterou inkubujeme 7 dní v termostatu při 32°C. Monokolonie narostlé na selekční plotně přečárujeme na neselekční médium YES. Pro přečárování vybíráme nejmenší monokolonie – právě ty jsou dle (Rodríguez-López *et al.* 2016) nejpravděpodobnějšími integranty.

4.3 Techniky manipulace s nukleovými kyselinami

4.3.1 Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

4.3.1.1 Izolace plazmidové DNA z *E. coli* – metoda I

Pokud potřebujeme izolovat plazmidovou DNA z většího objemu kultury, využijeme metodu alkalické lyze upravenou dle (Birnboim & Doly 1979). Večer před izolací zaočkujeme 50 ml média LB+amp jednou bakteriální monokolonií. Buňky kultivujeme přes noc na orbitální třepačce (180 rpm). Narostlou bakteriální kulturu ráno převedeme do 50ml centrifugační zkumavky a zchladíme ji 5–10 minut na ledu. Buňky usadíme centrifugací (3200 g, 10 min, 4°C) a sediment dokonale resuspendujeme ve 3 ml vychlazeného roztoku I. Přidáme 6 ml roztoku II, směs promícháme a inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě. Buňky lyzují, suspenze se projasní a stoupne její viskozita. Přidáme 4,5 ml vychlazeného roztoku III, promícháme a inkubujeme dalších 15 minut na ledu; objevuje se bílá sraženina. Směs centrifugujeme (3200 g, 10 min, 4°C), supernatant převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a smísíme s 0,6 objemu izopropanolu. Ihned centrifugujeme (3200 g, 5 min, 4°C). Supernatant slijeme, sediment necháme cca 5 minut proschnout, poté jej rozpustíme ve 300 µl diH₂O a celou směs převedeme do 1,5ml mikrozukavky. Přidáme stejný objem 10M LiCl a inkubujeme 20

minut v -80°C . Vysrážené proteiny usadíme centrifugací (20000 g, 5 min, 4°C), supernatant převedeme do nové 1,5ml mikrozkušavky a plasmidovou DNA vysrážíme stejným objemem 96% etanolu. Směs inkubujeme 20 minut v -80°C . Sraženinu usadíme centrifugací (15700 g, 5 min, 4°C), supernatant odstraníme. Sediment opláchneme 1 ml 70% etanolu a opakujeme centrifugaci (15700 g, 5 min, 4°C). Důkladně odstraníme supernatant, při pokojové teplotě necháme sediment proschnout a rozpustíme ho do 100 μl diH_2O . Izolovanou plasmidovou DNA vždy ověříme restrikcí štěpením a elektroforetickou analýzou, pomocí které můžeme odhadnout i množství vyizolované DNA (typicky kolem 1–2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Roztoky:

Roztok I 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza

Roztok II 1% SDS (dodecylsírán sodný), 0,2M NaOH

Roztok III 3M octan draselný, 2M kys. octová; pH 4,8-5,4

4.3.1.2 Izolace plasmidové DNA z *E. coli* – metoda II

Pokud si vystačíme s menším výtěžkem, izolujeme plasmidovou DNA z menšího objemu kultury a používáme pro její izolaci komerčně dostupný kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Večer před izolací zaočkujeme 3 ml média LB+amp jednou bakteriální monokolonií. Buňky kultivujeme přes noc na orbitální třepačce (180 rpm). Při izolaci plasmidové DNA postupujeme přesně podle protokolu přiloženého ke kitu (Standard protocol: Isolation of plasmid DNA from *E. coli* with NucleoSpin® Plasmid). Koncentraci izolované plasmidové DNA určujeme spektrofotometricky přístrojem NanoDrop2000 (Thermo Scientific) – pohybuje se kolem 200 $\text{ng}/\mu\text{l}$ – a její kvalitu ověřujeme elektroforeticky v agarózovém gelu.

4.3.2 Izolace chromozomální DNA z *S. pombe*

4.3.2.1 Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakcí

Protokol je upraven podle (Hoffman & Winston 1987). Večer před izolací zaočkujeme požadovaným kmenem *S. pombe* 10 ml příslušného média. Buňky kultivujeme přes noc na orbitální třepačce (180 rpm). Ráno narostlou kulturu převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a buňky usadíme centrifugací (1650 g, 3 min, 4°C). Sediment buněk resuspendujeme v 0,5 ml vychlazené diH_2O a směs převedeme do 1,5ml mikrozkušavky. Buňky znovu usadíme centrifugací (2300 g, 3

min, 4°C), supernatant odstraníme a sediment buněk resuspendujeme ve 200 µl lyzačního roztoku. Směs převedeme do vychlazených šroubovacích 2ml mikrozkušavek naplněných do ¼ skleněnými kuličkami (425–600 µm, Sigma-Aldrich) mytými v HCl a ke vzorkům přidáme v digestoři 200 µl směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1, pH 7,9; Sigma-Aldrich). Buňky rozbíjíme v homogenizátoru FastPrep24 (MP biomedical), na kterém nastavíme následující parametry: rychlost 5 m/s, čas 2x 20 s. Přidáme 200 µl TE pufru a vzorky centrifugujeme (20000 g, 5 min, 4°C). Vodnou fázi převedeme do nové zkumavky a přidáme k ní 1 ml vychlazeného 96% etanolu. Promícháme překlápěním a vzorky centrifugujeme (20000 g, 5 min, 4°C). Buněčný pelet resuspendujeme ve 400 µl TE pufru, přidáme 3 µl RNázy A (10 mg/ml; Thermo Scientific) a inkubujeme 5 minut ve 37°C. Ke směsi přidáme 10 µl 4M octanu amonného a 1 ml 96% etanolu. Promícháme překlápěním a DNA necháme precipitovat 60 minut v -20°C. Vzorky poté centrifugujeme (20000 g, 5 min, 4°C), odstraníme supernatant a pelet opláchneme 1 ml 70% etanolu. Vzorky centrifugujeme (20000 g, 2 min, 4°C). Etanol důkladně odstraníme, pelet necháme vysušit 5–10 minut při pokojové teplotě a rozpustíme ho do 100 µl diH₂O. Koncentraci DNA stanovíme spektrofotometricky na přístroji NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

Roztoky a pufr:

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

TE pufr 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8

4.3.2.2 Izolace DNA chelexem

Večer před izolací DNA zaočkujeme požadovaným kmenem *S. pombe* 10 ml příslušného média a buňky kultivujeme přes noc na orbitální třepačce (180 rpm). Ráno narostlou kulturu převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a buňky usadíme centrifugací (1650 g, 3 min, 4°C). Sediment buněk resuspendujeme v 0,5 ml vychlazené diH₂O a směs převedeme do 1,5ml mikrozkušavky. Buňky znovu usadíme centrifugací (2300 g, 3 min, 4°C), supernatant odstraníme a sediment buněk resuspendujeme ve 200 µl lyzačního roztoku. Směs převedeme do vychlazených šroubovacích 2ml mikrozkušavek naplněných do ¼ skleněnými kuličkami (425–600 µm, Sigma-Aldrich) mytými v HCl. Buňky rozbíjíme v homogenizátoru FastPrep24 (MP biomedical) při rychlosti 5 m/s po dobu 2x 20 s. Víčko a dno zkumavky propíchneme horkou jehlou,

zkumavku zasadíme do 1,5ml mikrozukavky s ustřiženým víčkem a celý komplex vložíme do 50ml centrifugační zkumavky. Centrifugací (730 g, 1 min, 4°C) přemístíme buněčný lyzát do spodní mikrozukavky bez víčka. Lyzát převedeme do nové 1,5ml mikrozukavky, přidáme 100 µl 10% roztoku Chelexu 100 (Bio-Rad) a inkubujeme 10 minut při 95°C. Vzorke centrifugujeme (13400 g, 1 min, pokojová teplota) a vrchních 200 µl převedeme do nové mikrozukavky. Koncentraci DNA stanovíme spektrofotometricky na přístroji NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

Roztoky a pufr:

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

TE pufr 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8

4.3.2.3 Rychlá izolace DNA

Pro účely rutinního ověřování pomocí PCR postačí genomická DNA izolovaná rychlou metodou upravenou dle (Løoke *et al.* 2011). Sterilní špičkou nabere malé množství buněk rostoucích na agarové plotně ne déle než 3 dny. Biomasu resuspendujeme ve 100 µl 0,2M octanu lithného obsahujícího 1% SDS. Vzorke inkubujeme 5 minut při 70°C. Přidáme 300 µl 96% etanolu, promícháme a centrifugujeme (15000 g, 3 min, pokojová teplota). Supernatant odlijeme, pelet opláchneme 500 µl 70% etanolu a znovu centrifugujeme (15000 g, 3 min, pokojová teplota). Důkladně se zbavíme etanolu a pelet resuspendujeme do 100 µl diH₂O. Zbytky buněk usadíme centrifugací (15000 g, 20 s, pokojová teplota) a supernatant obsahující DNA převedeme do nové mikrozukavky. Do PCR používáme 1–5 µl.

4.3.3 Izolace RNA z *S. pombe* a reverzní transkripce

Pro účely izolace celkové RNA z *S. pombe* odebereme 2 ml kultury narostlé do exponenciální fáze růstu. Buňke usadíme centrifugací (1000 g, 2 min, pokojová teplota), odstraníme supernatant a buněčný pelet zamrazíme v tekutém dusíku. Vzorke skladujeme v -80°C.

Při práci používáme výhradně plastový materiál ošetřený proti RNázám – před použitím 3x sterilizován v autoklávu. Deionizovanou vodu ošetřujeme pomocí DEPC (dietylpyrokarbonát; Sigma-Aldrich) – směs 1 ml DEPC na 1 l diH₂O inkubujeme přes noc v digestoři a následně deaktivujeme DEPC sterilizací v autoklávu. Pracujeme na místě určeném pouze pro práci s RNA.

Izolaci celkové RNA provádíme s využitím komerčně dostupného kitu MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies). Postupujeme přesně podle protokolu poskytnutého výrobcem (včetně části B – Odstranění kontaminující DNA). Čistotu a koncentraci vyizolované RNA stanovíme na přístroji NanoDrop2000 (Thermo Scientific). Pro účely měření koncentrace izolovanou RNA 4x naředíme. Vzorky skladujeme v -80°C.

Reverzní transkripci (RT) provádíme pomocí kitu RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) podle pokynů výrobce. Do reakce dáváme 2 µg celkové RNA a používáme náhodné hexanukleotidy. Ze vzorku s nejvyšším množstvím izolované RNA, a tudíž ze vzorku s potenciálně největším množstvím kontaminující DNA, připravíme tzv. „no RT“ kontrolu; jedná se o reakci bez přidání reverzní transkriptázy. Produktem reverzní transkripce je cDNA („complementary DNA“). Vzorky cDNA 100x naředíme a analyzujeme pomocí kvantitativní PCR (4.3.4.2). Na základě hodnot C_T („threshold cycle“) naměřených u „no RT“ kontroly odhalíme případnou přítomnost kontaminující DNA ve vzorku.

4.3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

4.3.4.1 Standardní PCR

Standardní PCR využíváme pro genotypizaci kmenů *S. pombe*, pro amplifikaci fragmentů DNA pro účely klonování, případně pro ověřování nově navržených primerů pro kvantitativní PCR. Reakční směs připravujeme na ledu v 0,2ml mikrokumávkách podle rozpisu uvedeného v Tab. 10. V Tab. 11 jsou zaznamenány používané DNA polymerázy a reakční pufrы. Pro každou reakční směs, která obsahuje rozdílný pár primerů, připravujeme kontrolní beztemplátovou reakci (NTC). Reakce probíhá podle příslušného PCR programu (Tab. 12) v thermocyclerech PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research), Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies) nebo Biometra TAdvanced Thermal Cycler (Biometra). PCR produkty analyzujeme elektroforeticky v agarózovém gelu.

Tab. 10: Složení reakční směsi pro PCR

| složky | Rutinní PCR (amplifikace fragmentů DNA do 3 kb) | High-fidelity PCR (amplifikace fragmentů DNA nad 3 kb)* |
|--------------------|--|--|
| primery | 0,5 µM každý | 0,5 µM každý |
| dNTP | 0,2 mM každý | 0,2 mM každý |
| reakční pufr | 1x koncentrovaný | 1x koncentrovaný |
| MgCl ₂ | 3 mM | - |
| DNA | 10 pg – 1 µg | 1 ng |
| DNA polymeráza | 0,4 U (0,075 µl) Taq/BIOTAQ | 0,5 U (0,25 µl) Q5 |
| diH ₂ O | doplněno do 20 µl | doplněno do 25 µl |

*optimalizace podmínek podle (Rodríguez-López *et al.* 2016): do reakční směsi přidat DMSO na finální koncentraci 2% (tj. 0,5 µl do celkového objemu 25 µl); uchovávat alikvóty pMZ374 (templátová DNA) o koncentraci 1 ng/µl v -80°C a do PCR reakce nepoužívat alikvót, který již byl rozmrazovaný

Tab. 11: Seznam používaných DNA polymeráz a reakčních pufrů

| DNA polymeráza | reakční pufr | výrobce |
|---|---|---------------------|
| BIOTAQ DNA Polymerase, 5 units/µl | 10x NH ₄ Reaction Buffer | Bioline |
| Taq DNA Polymerase, recombinant, 5 units/µl | 10x Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄ | Thermo Scientific |
| Q5® High-Fidelity Polymerase, 2 units/µl | 5x Q5® Reaction Buffer | New England Biolabs |

Tab. 12: Přehled PCR programů

| Rutinní PCR | | A) genotypizace kmenů / příprava vzorků pro sekvenaci | | B) ověřování nově navržených primerů pro qPCR | |
|-------------|----------------------|---|-------------------|---|------------|
| 1. | počáteční denaturace | 1x | 95°C 5 min | 1x | 95°C 5 min |
| 2. | denaturace | 35x | 95°C 30 s | 40x | 95°C 15 s |
| | nasedání primerů | | 48-57°C 30 s | | 60°C 30 s |
| | extenze | | 72°C 30 s/0,5 kbp | | 72°C 20 s |
| 3. | finální extenze | 1x | 72°C 5 min | - | - |

| High-fidelity PCR | | C) podle doporučení New England Biolabs | | D) podle (Rodríguez-López <i>et al.</i> 2016) | |
|-------------------|----------------------|---|-----------------|---|-----------------|
| 1. | počáteční denaturace | 1x | 98°C 30 s | 1x | 98°C 2 min |
| 2. | denaturace | 30x | 98°C 10 s | 25x | 98°C 10 s |
| | nasedání primerů | | 72°C 20 s | | 60°C 30 s |
| | extenze | | 72°C 40 s/1 kbp | | 72°C 30 s/1 kbp |
| 3. | finální extenze | 1x | 72°C 2 min | 1x | 72°C 5 min |

4.3.4.2 Kvantitativní PCR (qPCR)

Kvantitativní PCR využíváme pro analýzu chromatinové imunoprecipitace (ChIP-qPCR), pro relativní kvantifikaci cDNA (RT-qPCR) a také pro určení specifity a amplifikační účinnosti nově navržených primerů pro qPCR.

Po celou dobu přípravy reakční směsi pracujeme na ledu. Jedna reakce má celkový objem 10 µl a obsahuje:

- 5 µl MESA GREEN qPCR Master Mix Plus for SYBR® Assay No Rox (dále „master mix“; Eurogentec),
- 0,6 µl primerů (0,3 µl každého z nich; zásobní koncentrace 10µM),
- 4,4 µl templátové DNA rozpuštěné v diH₂O (konkrétní množství viz dále).

Podle počtu reakcí připravíme premix sestávající z „master mixu“ a konkrétního páru primerů. Směs promícháme a pomocí dávkovače (Eppendorf Xplorer®) pipetujeme po 5,6 µl do 384jamkové destičky (Roche). Do každé jamky přidáme pomocí dávkovače (Gilson) 4,4 µl směsi templátové DNA a deionizované vody; v případě analýzy vzorků po ChIP (ChIP-qPCR) dáváme do reakce 4,4 µl DNA naředěné na koncentraci 4,5 ng/µl (tj. 19,8 ng DNA), v případě analýzy exprese (RT-qPCR) přidáváme 4,4 µl 100x naředěné cDNA. Všechny reakce provádíme v triplicátech. Pro každý pár primerů připravíme navíc kontrolní reakci bez templátové DNA (NTC). Destičku zalepíme fólií, reakční směsi promícháme s využitím vortexu, a poté centrifugujeme (1500 g, 3 min, pokojová teplota). K analýze využíváme přístroj LightCycler® 480 Instrument II (Roche) s nastaveným programem:

| | |
|---------------|---|
| preinkubace | 95°C 5 min |
| amplifikace | 40x (95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 20 s) |
| analýza táním | 95°C 5 min, 50°C 1 min, poté teplota zvyšována až na 97°C (0,11°C/s) a kontinuálně odečítána fluorescence |

Primární analýzu dat provádíme pomocí LightCycler® 480 Software Version 1.5 (Roche). Pro každý triplicát spočítáme průměrnou hodnotu C_T („threshold cycle“) a směrodatnou odchylku. Je-li hodnota směrodatné odchylky větší než 0,2, vyloučíme reakci s odlehlou hodnotou C_T z analýzy.

4.3.4.2.1 Určení specifity a amplifikační účinnosti nově navržených primerů pro qPCR

Nově navržené primery pro qPCR je nutné nejprve otestovat – ověřit jejich specifitu pro daný lokus a určit jejich amplifikační účinnost. Pokud jsou primery navrženy pro analýzu ChIP-qPCR, testujeme je na genomické DNA (gDNA); pokud jsou určeny pro analýzu RT-qPCR, využíváme pro jejich testování cDNA. Pro testování primerů využíváme koncentrace templátové DNA v rozsahu 6 řádů (standard S1 – S6): vzorek gDNA naředíme na koncentraci 100 ng/µl (S1) a provedeme desítkovou ředící řadu (S2 – S6), vzorek cDNA neředíme (S1) a rovnou provedeme desítkovou ředící řadu (S2 – S6).

Specifita primerů je potvrzena/vyvrácena analýzou tání (tzv. melting analýzou), která odhalí počet různých produktů v jedné reakci (1 produkt = specifický pár primerů, více produktů = pár primerů je nespecifický).

Účinnost amplifikace je stanovena pro daný pár primerů na základě standardní křivky. Pro měření používáme páry primerů s účinnostmi v rozmezí 95–105%. Účinnost amplifikace posléze zohledňujeme ve výpočtech.

4.3.4.2.2 ChIP-qPCR – analýza chromatinové imunoprecipitace

Výsledky chromatinové imunoprecipitace (4.5) vyjadřujeme buď jako procento inputu, nebo jako nabození vazebné události oproti kontrolnímu úseku.

Procento inputu vypočítáme s využitím následující rovnice:

$$\% \text{ inputu} = E^{-\Delta C_T} = \frac{E^{C_T(\text{průměr IN})}}{E^{C_T(\text{průměr OUT})}}$$

Nabození vazby oproti kontrolnímu lokusu vypočítáme podle rovnice:

$$\text{nabození} = \frac{\% \text{ inputu}_{\text{testovaný lokus}}}{\% \text{ inputu}_{\text{kontrolní lokus}}} = \frac{E^{-\Delta C_T(\text{testovaný lokus})}}{E^{-\Delta C_T(\text{kontrolní lokus})}}$$

V daných rovnicích představuje E účinnost amplifikace konkrétního páru primerů, C_T počáteční koncentraci amplifikované DNA ve vzorku, průměr IN/OUT průměrnou hodnotu C_T vypočítanou pro každý triplikát daného vzorku input/output. Jako kontrolní lokus využíváme takový úsek DNA, kam se studovaný protein neváže (pro proteiny CSL – intergenový lokus „M40“, případně ORF genu *act1*).

4.3.4.2.3 RT-qPCR – relativní kvantifikace cDNA

Relativní kvantifikaci cDNA, tedy relativní hladinu mRNA ve vzorku, určíme podle rovnice:

$$\text{relativní hladina mRNA} = \frac{E^{C_T(\text{act1})}}{E^{C_T(\text{genX})}}$$

kde E je opět účinnost amplifikace použitého páru primerů a C_T vyjadřuje počáteční koncentraci amplifikované DNA (průměrná hodnota pro každý triplikát). Hladinu mRNA testovaného genu (*genX*) normalizujeme na hladinu mRNA kontrolního genu (zde *act1*).

4.3.4.3 Přehled použitých primerů

V Tab. 13 je uveden seznam primerů, které byly použity pro genotypizaci kmenů *S. pombe*, případně pro sekvenaci. V Tab. 14 je uveden přehled použitých kombinací primerů pro výše zmíněné účely. Seznam oligonukleotidů použitých při konstrukci plazmidů pro CRISPR/Cas9 je uveden v Tab. 15. V Tab. 16 jsou zaznamenány primery využitě pro CHIP-qPCR, v Tab. 17 pak pro RT-qPCR.

Tab. 13: Seznam primerů použitých pro genotypizaci/sekvenaci. fwd = „forward“, rev = „reverse“, ORF = otevřený čtecí rámeček, UTR = nepřekládaná oblast

| primer | sekvence (5'-3') | popis/použití | orientace |
|--------|---|---|-----------|
| chkF | ACCATATTGGAGCACAACAC | <i>cbf12</i> ORF | rev |
| chkR | TGCGTTTGTATTCAATCAC | <i>cbf12</i> ORF – nasedání na DBM | fwd |
| MaP117 | AAACCACATTTATGGCACTG GGTTTGCAAATGATG | BstXI + <i>cbf12</i> 3'ORF | fwd |
| MaP126 | TGCGTTTGTATTCAACAGA | <i>cbf12</i> ORF – nasedání na <i>wt</i> sekvenci v místě DBM | fwd |
| MaP127 | ATGTATGTAGATGAATGTAA | <i>ura4</i> | fwd |
| MaP169 | AAAAAGCTAAATGATGCT | TAP-tag | fwd |
| MaP171 | CGAGTATATGCTTGTACT | <i>cbf12</i> ORF | fwd |
| MaP191 | CTTCAGTTAAGTTAGGTAAG | TAP-tag | rev |
| MaP198 | AAACTGATTTCACTAGATTG | <i>cbf12</i> ORF | rev |
| MaP199 | CCAAACGGATATAATAGATT | <i>cbf12</i> 5'UTR | fwd |
| MM | TACGTTTCAGTAGACGTAGTG | detekce párovacího typu, h ⁻ | fwd |
| MP | GGTAGTCATCGGTCTTCC | detekce párovacího typu, h ⁺ | fwd |
| MP28 | GATACAGCAACTCCTCCCG | <i>cbf11</i> 3'UTR | rev |
| MP31 | TGTGCAGATTGGATGGC | <i>cbf12</i> ORF | fwd |
| MP32 | AAATCAATCCCCTCCACG | <i>cbf12</i> 3'UTR | rev |
| MP63 | CCTAGTCAGCTGGTAACAG | <i>cbf11</i> ORF | fwd |
| MP64 | TCTAATACCACTATTCCGTC | <i>cbf12</i> ORF | fwd |
| MP65 | AATCTTTATCCACATCG | <i>cbf12</i> ORF | fwd |
| MP66 | AGAAACGTGCACTGATG | <i>cbf12</i> ORF | fwd |
| MP67 | TCAGTTTCACTTCAGGTG | <i>cbf12</i> ORF | fwd |
| MP68 | ACGAACAGAATCAGACG | <i>cbf12</i> ORF | rev |
| MP69 | TAAATATGGCTCCATCG | <i>cbf11</i> ORF | fwd |
| MP70 | TTCGAGAACATGTCCAG | <i>cbf11</i> ORF | rev |
| MP76 | TCGATAAGTTGTTTTAAAGG | „upstream“ <i>cbf11</i> 5'UTR | fwd |
| MT1 | AGAAGAGAGAGTAGTTGAAG | detekce párovacího typu, h ⁺ /h ⁻ | rev |
| M13F | GTAAAACGACGGCCAGT | univerzální sekvenační primer | fwd |

Pozn. 1: pro sekvenaci lokusu *cbf12/cbf12DBM-TAP* byly použity primery MaP169, MaP171, MaP198, MP64, MP65, MP66, MP67, MP68

Pozn. 2: pro sekvenaci lokusu *cbf11-TAP* byly použity primery MaP169, MP63, MP69, MP70, MP76

Tab. 14: Použité kombinace primerů. bp = pár bází, T_a = použitá nasedací teplota primerů při PCR

| kombinace primerů | použití | amplikon (bp) | T _a |
|--------------------|---|---------------|----------------|
| MaP127+MP31+MP32 | testování přítomnosti <i>cbf12</i> vs. <i>cbf12::ura4</i> | 844 vs. 658 | 53°C |
| MaP127+MaP117+MP32 | testování přítomnosti <i>cbf12::ura4</i> vs. <i>cbf12-TAP</i> | 658 vs. 1756 | 53°C |
| MaP169+MP32 | detekce <i>cbf12-TAP</i> a <i>cbf12DBM-TAP</i> | 750 | 54°C |
| MaP127+MP32 | detekce <i>cbf12::ura4</i> | 658 | 48°C |
| MaP126+chkF | ověřování nepřítomnosti DBM v <i>cbf12</i> | 287 | 53°C |
| chkR+chkF | ověřování přítomnosti DBM v <i>cbf12</i> | 287 | 53°C |
| MaP171+MP32 | testování přítomnosti <i>cbf12</i> vs. <i>cbf12-TAP</i> | 741 vs. 1629 | 54°C |
| MM+MP+MT1 | určování párovacího typu h ⁺ vs. h ⁻ | 987 vs. 729 | 54°C |
| MaP127+MP28 | detekce <i>cbf11::ura4</i> | 408 | 51°C |
| MaP169+MaP191 | ověřování přítomnosti TAP-tagu | 103 | 51°C |
| MaP169+MP28 | detekce <i>cbf11-TAP</i> a <i>cbf11DBM-TAP</i> | 500 | 51°C |
| MaP199+MaP198 | amplifikace pro účely sekvenace lokusu <i>cbf12/cbf12DBM-TAP</i> ; část 1 | 2440 | 53°C |
| MP66+MP32 | amplifikace pro účely sekvenace lokusu <i>cbf12/cbf12DBM-TAP</i> ; část 2 | 2507 | 53°C |
| MP76+MP70 | amplifikace pro účely sekvenace lokusu <i>cbf11-TAP</i> ; část 1 | 1343 | 57°C |
| MP63+MP28 | amplifikace pro účely sekvenace lokusu <i>cbf11-TAP</i> ; část 2 | 2549 | 57°C |

Tab. 15: Seznam oligonukleotidů použitých pro klonování sgRNA do plazmidu pMZ374. V sekvenci oligonukleotidu je malými písmeny označen překryv se sekvencí pMZ374.

| název | sekvence (5'-3') | popis |
|-------|---|---|
| AJ01 | GACACATATTGACGTTGTGCGgt | sgRNA proti <i>ura4</i> ORF; fwd |
| AJ02 | CGACAACGTCAATATGTGTCtt | sgRNA proti <i>ura4</i> ORF; rev |
| AJ03 | GACGTTGTCGgttttagagctagaatagcaagttaaaataa | polovina sgRNA proti <i>ura4</i> ; fwd |
| AJ04 | AATATGTGTCtcttcggtacaggttatgtttttggcaaca | polovina sgRNA proti <i>ura4</i> ; rev |
| AJ05 | GTCTTGACGTGCGCAGCTCAgtttagagctagaatagc | sgRNA proti TEF _P ; fwd |
| AJ06 | TGAGCTGCGCACGTCAAGACtcttcggtacaggttatg | sgRNA proti TEF _P ; rev |
| AJ07 | GAGGTCGCCCCGGAGCACCGgttttagagctagaatagc | sgRNA proti NAT; fwd |
| AJ08 | CGGTGCTCCGGGGCGACCTCtcttcggtacaggttatg | sgRNA proti NAT; rev |
| AJ09 | CGTCAATCGTATGTGAATGCgttttagagctagaatagc | sgRNA proti TEF _T ; fwd |
| AJ10 | GCATTCACATACGATTGACGtcttcggtacaggttatg | sgRNA proti TEF _T ; rev |
| AJ11 | GCGCAGCTCAgtttagagctagaatagcaagttaaaataa | polovina sgRNA proti TEF _P ; fwd |
| AJ12 | ACGTCAAGACtcttcggtacaggttatgtttttggcaaca | polovina sgRNA proti TEF _P ; rev |
| AJ13 | CGGAGCACCGgttttagagctagaatagcaagttaaaataa | polovina sgRNA proti NAT; fwd |
| AJ14 | GGGCGACCTCtcttcggtacaggttatgtttttggcaaca | polovina sgRNA proti NAT; rev |
| AJ15 | ATGTGAATGCgttttagagctagaatagcaagttaaaataa | polovina sgRNA proti TEF _T ; fwd |
| AJ16 | ACGATTGACGtcttcggtacaggttatgtttttggcaaca | polovina sgRNA proti TEF _T ; rev |

Tab. 16: Seznam primerů použitých pro analýzu ChIP-qPCR. bp = velikost amplikonu v párech bazí, E = amplifikační účinnost primerů (stanovená na gDNA)

| název lokusu | primer | sekvence (5'-3') | koordináty amplikonu | bp | E |
|---------------------------------|--------|------------------------|---|-----|-------|
| <i>cbf12</i> | MaP82 | CTTCGCAAGCTCAAAAGTC | chr3: 1870883-1871047 | 165 | 1,865 |
| | MaP83 | GTGACATTCGAGACTCACTT | | | |
| <i>mei2</i> | MaP84 | CGACCGATTTCTTTGTTCC | chr1: 4515087-4515193 | 107 | 1,922 |
| | MaP85 | ACTGTTAGGCATTTACTGTG | | | |
| <i>atf1</i> | MaP90 | GTATCGTCTTGCTCGGTT | chr2: 1546066-1546198 | 133 | 1,963 |
| | MaP91 | CCACACTTCCACCTGTTT | | | |
| <i>wtf11</i> | MaP17 | TAAAGTAGCCCTCCACCAAT | chr3: 1396630-1396773 | 144 | 2,026 |
| | MaP18 | GCCGTTATCAATGAGTCTGT | | | |
| <i>atd1</i> | MP84 | TCGCCATAAAGCAGAGAATA | chr1: 4456289-4456367 | 79 | 2,03 |
| | MP85 | TTCATTTGCTTTGCTCAACT | | | |
| <i>plb1</i> | MP100 | AGTATCCGCTCAAAAGTTTG | chr1: 1078113-1078264 | 152 | 2,021 |
| | MP101 | GCGAAAATTTTCTTGCTCTT | | | |
| <i>SPBC36.02c</i> | MP108 | GCATGAACAAAACCTAAACG | chr2: 841844-842006 | 163 | 1,999 |
| | MP109 | AATCTCCCTTCTCGTTCCTT | | | |
| <i>hsr1</i> | MaP15 | GAGAGAGAAAGCGCAAATTT | chr1: 1955176-1955299 | 125 | 2,072 |
| | MaP16 | GCTGGACAGGCAATTACTTT | | | |
| <i>nep2</i> | MaP13 | AATGATATGCGGTTGTTGTT | chr2: 1455330-1455455 | 126 | 2,09 |
| | MaP14 | ACTTTTTACCTCCGATTC | | | |
| <i>SPBC8E4.02c</i> | MaP09 | GAACATTCTGCTCGGTACCT | chr2: 4443081-4443197 | 118 | 1,997 |
| | MaP10 | TGCTTCCACTTCCATTAAAC | | | |
| <i>mug115</i> | MP106 | ATATGTGCTTGCCGGATT | chr1: 1150438-1150576 | 139 | 1,89 |
| | MP107 | TCCACTCTTCTTCCCTTTC | | | |
| <i>rDNA</i> | MaP76 | AAACCAAACACTTGAGCC | chr3: 3894-4036; 14764-14906; 2449238-2449380 | 143 | 1,906 |
| | MaP77 | GGGTGTAAAGATGAGTCTGG | | | |
| <i>gsf2</i> | AJ21 | TGACATCATCCTTCCACTC | chr3: 967576-967677 | 102 | 2,157 |
| | AJ22 | TCGGTAATCCTTGACCAAT | | | |
| <i>pfl7</i> | AJ23 | GCTTTCGTTAGCACCAATC | chr2: 120453-120564 | 112 | 2,14 |
| | AJ24 | GCCATCATTTCCTTACACTAAA | | | |
| <i>cut6</i> | MaP96 | TTGCTACAGGAAGAGGAAG | chr1: 1253522-1253603 | 82 | 1,954 |
| | MaP97 | TAGAAAAGTTGGATGCGTG | | | |
| <i>ole1</i> | MaP102 | CTAAGATGACGGACAAGCA | chr3: 1394867-1394962 | 96 | 1,975 |
| | MaP103 | CGTAAACCCTAACCTAAGTTG | | | |
| <i>lcf1</i> | MaP98 | CATTTCTTGCCAATCTGT | chr2: 1769832-1769958 | 127 | 1,954 |
| | MaP99 | GTGTTTAGCGAGCATTATGT | | | |
| <i>act1</i> | MP137 | TCCTCATGCTATCATGCGTCTT | chr2: 1476764-1476687 | 78 | 1,933 |
| | MP138 | CCACGCTCCATGAGAATCTTC | | | |
| <i>intergenový lokus „M40“*</i> | MaP78 | CGGTAAATTGATACGCC | chr1: 499187-499310 | 124 | 1,937 |
| | MaP79 | GACATCCCACCAATACATC | | | |

*interní označení, nejedná se o oficiální název lokusu v genomu *S. pombe*

Tab. 17: Seznam primerů použitých pro analýzu RT-qPCR. Amplifikační účinnost primerů (E) byla určena na cDNA.

| gen | primery | sekvence (5'-3') | amplikon (bp) | E |
|--------------|---------|------------------------|---------------|-------|
| <i>cut6</i> | MaP152 | TTCTTCTCCAGGCTCTTATC | 82 | 2,034 |
| | MaP153 | CAATCCACCATCAGTCAAAG | | |
| <i>vht1</i> | MaP148 | GTCGCTTAGCTCGTTTATTC | 129 | 2,021 |
| | MaP149 | CGCTTACCAACATTCATCTC | | |
| <i>bio2</i> | MaP144 | ATCTTCCCGCTACAATACC | 96 | 2,011 |
| | MaP145 | GTGCTTCCTTTAGCCTTTG | | |
| <i>cdc22</i> | MaP154 | CGAGCAATGGACCTTCTT | 104 | 1,994 |
| | MaP155 | CACGGTTCTCCTTCTCATAC | | |
| <i>act1</i> | MP137 | TCCTCATGCTATCATGCGTCTT | 78 | 1,950 |
| | MP138 | CCACGCTCCATGAGAATCTTC | | |

4.3.5 Plazmidy

V Tab. 18 jsou uvedeny plazmidy, které byly použity nebo vytvořeny v rámci této práce.

Tab. 18: Seznam plazmidů

| název | vektor/rodič. plazmid | popis | zdroj |
|--------|-----------------------|---|-------------------------------|
| pJR07 | pREP41HAN | <i>cbf11</i> cDNA, bez intronu | (Oravcová <i>et al.</i> 2013) |
| pMaP07 | pUC19 | <i>cbf11</i> 3'ORF + <i>ura4</i> + <i>cbf11</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP09 | pUC19 | <i>cbf11</i> 3'ORF s DBM + HA-tag + <i>cbf11</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP11 | pUC19 | <i>cbf11</i> 3'ORF s DBM + TAP-tag + <i>cbf11</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP21 | pUC19 | <i>cbf12</i> 3'ORF + <i>ura4</i> + <i>cbf12</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP23 | pUC19 | <i>cbf12</i> 3'ORF s DBM + HA-tag + <i>cbf12</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP25 | pUC19 | <i>cbf12</i> 3'ORF s DBM + TAP-tag + <i>cbf12</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP26 | pUC19 | <i>cbf11</i> 3'ORF + HA-tag + <i>cbf11</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP27 | pUC19 | <i>cbf11</i> 3'ORF + TAP-tag + <i>cbf11</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP28 | pUC19 | <i>cbf12</i> 3'ORF + HA-tag + <i>cbf12</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMaP29 | pUC19 | <i>cbf12</i> 3'ORF + TAP-tag + <i>cbf12</i> 3'UTR | Martina Oravcová |
| pMP132 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti <i>ura4</i> | tato práce |
| pMP134 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (TEF _P) | tato práce |
| pMP135 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (NAT) | tato práce |
| pMP136 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (NAT) | tato práce |
| pMP137 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (NAT) | tato práce |
| pMP138 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (TEF _T) | tato práce |
| pMP139 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (TEF _T) | tato práce |
| pMP140 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (TEF _T) | tato práce |
| pMP141 | pMZ374 | Cas9, sgRNA proti natMX6 (TEF _T) | tato práce |
| pMZ288 | pUR19 | Cas9, sgRNA proti <i>ade6</i> | (Jacobs <i>et al.</i> 2014) |
| pMZ374 | pUR19 | Cas9 | (Jacobs <i>et al.</i> 2014) |

Pozn.: přítomnost sgRNA v plazmidech pMP132 a pMP134-141 ověřena sekvenací s využitím primeru M13F

4.3.6 Štěpení restrikčními endonukleázami

V Tab. 19 je uveden seznam restrikčních endonukleáz a restrikčních pufrů použitých v této práci.

Tab. 19: Restrikční endonukleázy a pufrы

| | výrobce |
|---|---------------------|
| restrikční endonukleázy | |
| AlwNI (Cail) | Thermo Scientific |
| BamHI | Thermo Scientific |
| CspCI | New England Biolabs |
| EcoO109I | Thermo Scientific |
| HpaII | Thermo Scientific |
| KasI | Thermo Scientific |
| Sall | Thermo Scientific |
| XhoI | Thermo Scientific |
| restrikční pufrы (10x koncentrované) | |
| CutSmart® | New England Biolabs |
| O | Thermo Scientific |
| Tango | Thermo Scientific |

4.3.6.1 *Ověřování plazmidové DNA a štěpení plazmidů pro účely transformace*

Při výběru restriktivního pufru, určování optimální teploty, při které probíhá štěpení, doby štěpení a způsobu inaktivace restriktáz postupujeme podle doporučení výrobce enzymů. V případě potřeby štěpení více enzymy využíváme online nástroj firmy Thermo Scientific – „Double Digest Calculator“ (odkaz viz 4.9) – kde získáme doporučení optimálních reakčních podmínek pro konkrétní kombinaci enzymů.

Restriktivní směs připravujeme v 1,5ml mikrozkrumavce podle Tab. 20. Restriktivní směs inkubujeme 1–16 hodin při optimální teplotě (typicky 37°C). Po uplynutí doby štěpení zastavíme enzymatickou reakci ochlazením směsi na -20°C, přidáním vzorkového pufru (6x Orange Loading Dye; Thermo Scientific, kat. č. R0631) nebo tepelnou inaktivací (65°C, 20 min). Naštěpené fragmenty DNA můžeme v případě potřeby (např. pro účely transformace) fosfatázovat (4.3.10), nebo zakoncentrovat do menšího objemu (4.3.9.1). Kvalitu naštěpené DNA ověřujeme elektroforeticky v agarózovém gelu.

Tab. 20: Příprava restriktivní směsi

| složka | množství |
|---------------------------------------|---|
| 10x koncentrovaný restriktivní pufr | 1/10, případně 1/5 objemu reakce |
| DNA (rozpuštěná v diH ₂ O) | 0,1-30 µg |
| diH ₂ O | doplněno do výsledného objemu 20-150 µl |
| restriktivní endonukleáza/-ázy | 1-10 U enzymu/µg DNA |

V rámci projektu bylo pro účely transformace štěpeno několik plazmidů. Velikosti fragmentů, kterých bylo dosaženo štěpením konkrétními restriktivními endonukleázami, jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21: Restriktivní štěpení plazmidů pro účely transformace. Fragment obsahující rekombinogenní oblast je podtržený.

| štěpený plazmid | použité restriktivní endonukleázy | očekávaná velikost fragmentů (bp) |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| pMaP07 | SaII, EcoO109I, AlwNI | <u>2353</u> , 1459, 1341 |
| pMaP11 | SaII, EcoO109I | <u>2493</u> , 2800 |
| pMaP21 | SaII, KasI, AlwNI | <u>2740</u> , 1706, 1865 |
| pMaP23 | SaII, KasI, AlwNI | <u>2145</u> , 1706, 1865 |
| pMaP25 | SaII, KasI, AlwNI | <u>2907</u> , 1706, 1865 |
| pMaP25 | SaII, KasI | <u>2907</u> , 3571 |
| pMaP27 | SaII, EcoO109I | <u>2493</u> , 2800 |
| pMaP28 | SaII, KasI, AlwNI | <u>2145</u> , 1706, 1865 |
| pMaP29 | SaII, KasI, AlwNI | <u>2907</u> , 1706, 1865 |

4.3.6.2 *Štěpení PCR produktu přímo po amplifikaci*

Po proběhnutí PCR je možné produkt rovnou štěpit v reakční směsi. V takovém případě postupujeme podle doporučení výrobce dané restriktázy. Na základě Tab. 22

připravíme restriční směs, kterou inkubujeme 1–16 hod ve 37°C. Reakci zastavíme přidáním vzorkového pufru (6x Orange Loading Dye; Thermo Scientific, kat. č. R0631) a výsledek elektroforeticky analyzujeme.

Tab. 22: Štěpení PCR produktu

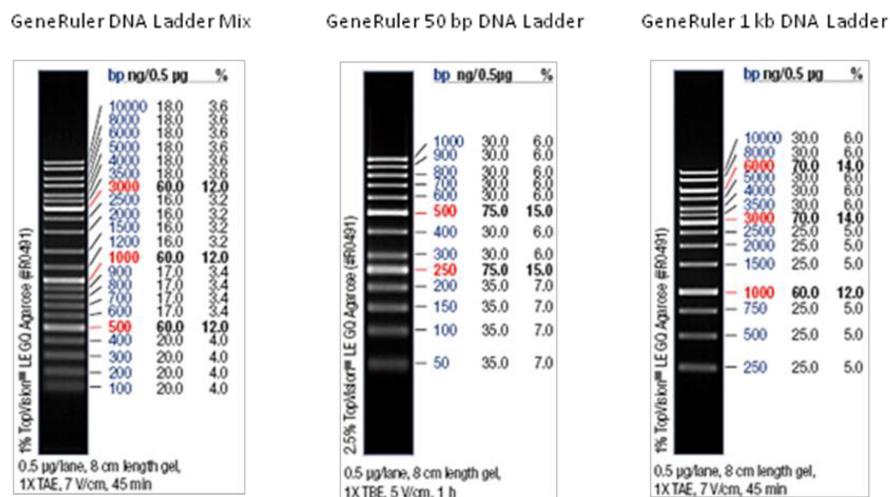
| složka | objem |
|----------------------------------|-------|
| PCR reakce | 10 µl |
| diH ₂ O | 18 µl |
| 10x koncentrovaný restriční pufr | 2 µl |
| restriční endonukleáza | 1 µl |

4.3.7 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Pro separaci fragmentů DNA podle velikosti využíváme aparaturu pro horizontální gelovou elektroforézu Blue Marine 100 a 200 (Serva). V závislosti na velikosti fragmentů DNA používáme 1–2% agarózový gel. Agarózu (SeaKem LE Agarose, Lonza) rozpouštíme v 1x TAE pufru v mikrovlnné troubě. Do jamek v gelu nanášíme vzorek DNA smíchaný s příslušným objemem vzorkového pufru 6x Orange Loading Dye (Thermo Scientific, kat. č. R0631). Jako standardy velikostí a množství fragmentů DNA používáme GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, kat. č. SM0331), GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM0371) nebo GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM0311); na gel nanášíme 6 µl standardu (Obr. 10). Fragments DNA dělíme při napětí 5 V/cm. Gel barvíme v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml; Sigma-Aldrich) po dobu 15–30 min a DNA vizualizujeme pomocí UV lampy (transiluminátor FOTO/UV21, Fotodyne incorporated). Gel fotografujeme digitálním fotoaparátem (Panasonic DMC-F27) s UV filtrem.

Roztoky a pufr:

1x TAE 40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 2 mM EDTA; pH 8,5



Obr. 10: Přehled standardů velikostí a množství fragmentů DNA

4.3.8 Izolace DNA z gelu

Po proběhnutí restriktivního štěpení elektroforeticky rozdělíme získané fragmenty DNA v agarózovém gelu. Při vizualizaci DNA za pomoci UV lampy omezíme osvit UV světlem na co nejkratší dobu. Kousek gelu s fragmentem DNA požadované velikosti vyřízneme skalpelem a zpracujeme ho pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up od firmy Macherey-Nagel. Postupujeme podle přiloženého manuálu (DNA extraction from agarose gels). Množství a kvalitu purifikované DNA ověříme elektroforeticky, případně spektrofotometricky na přístroji NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

4.3.9 Purifikace DNA

4.3.9.1 Purifikace DNA přesrážením

K 20 µl směsi obsahující DNA, kterou chceme purifikovat, přidáme 1 µl glykogenu (20 mg/ml; Thermo Scientific) a směs promícháme. Přidáme 2 µl (= 1/10 objemu výchozí směsi) 3M octanu sodného a směs opět promícháme. Nakonec přidáme 50 µl (= 2,5násobek objemu výchozí směsi) 96% etanolu. Směs promícháme vortexováním a inkubujeme 30–60 minut v -80°C. Směs centrifugujeme (15700 g, 5 min, 4°C), odstraníme supernatant a pelet omyjeme 500 µl 70% etanolu. Vzorek znovu centrifugujeme (15700 g, 5 min, 4°C), důkladně odstraníme supernatant a vysušený pelet (tj. přečištěnou DNA) rozpustíme do požadovaného objemu diH₂O.

4.3.9.2 Purifikace PCR produktů pomocí NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

K purifikaci PCR produktů využíváme komerčně dostupný kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up od firmy Macherey-Nagel. Postupujeme podle pokynů výrobce. Využíváme přiloženého protokolu (PCR clean-up). Množství a kvalitu purifikované DNA ověříme elektroforeticky, případně spektrofotometricky na přístroji NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

4.3.9.3 Purifikace PCR produktů k editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9 podle (Rodríguez-López et al. 2016)

Po amplifikaci fragmentů DNA pomocí PCR přidáme k 20 µl reakční směsi 60 µl 96% etanolu a 6 µl 3M octanu sodného. Inkubujeme 30 min v -20°C. Směs centrifugujeme (20000 g, 20 min, 4°C). Odstraníme supernatant a k peletu přidáme 50 µl 70% etanolu. Směs opět centrifugujeme (20000 g, 10 min, 4°C) a odstraníme supernatant. Pelet necháme proschnout, a poté ho resuspendujeme do 20 µl diH₂O.

4.3.10 Fosfatázování linearizovaného plazmidu

Pro účely transformace štěpíme plazmid restrikcími endonukleázami a následně jej fosfatázujeme. Defosforylací konců fragmentů DNA zabráníme jejich opětovnému spojení (tzv. religaci). Ke 20 µl restrikcí směsi, ve které jsme štěpili 3 µg plazmidu, přidáme 3 µl (3 U) fosfatázy FastAP (Thermo Scientific, kat. č. EF0654). Směs inkubujeme 10 min při 37°C. Fosfatázu, spolu s restriktázami, inaktivujeme inkubací směsi 20 min při 65°C.

4.3.11 Fosforylace 5'-konců DNA

Pro fosforylaci DNA používáme T4 polynukleotidkinázu (PNK) od firmy Thermo Scientific (kat. č. EK0031). Jako reakční pufr používáme spolu s ní dodávaný 10x reakční pufr A, případně ligační pufr (10x T4 DNA ligase buffer), ve kterém PNK také vykazuje 100% aktivitu.

4.3.11.1 Fosforylace duplexu oligonukleotidů a PCR produktu

Reakční směs připravíme podle Tab. 23. Směs inkubujeme 1 hodinu při 37°C. Reakci zastavíme zahřáním směsi na 75°C po dobu 10 min.

Tab. 23: Příprava reakční směsi pro fosforylaci 5'-koců DNA

| složka | množství |
|---|-------------------|
| DNA (duplex oligonukleotidů*, přečištěný PCR produkt) | 1-20 pmol 5'-koců |
| 10x reakční pufr A | 2 µl |
| 10mM ATP | 2 µl |
| PNK | 10 U |
| diH ₂ O | doplněno do 20 µl |

*příprava duplexu oligonukleotidů: jednotlivé oligonukleotidy smícháme v molárním poměru 1:1, inkubujeme 5 min při 90°C, a poté necháme směs vychladnout na pokojovou teplotu

4.3.11.2 Fosforylace 5'-koců PCR produktů k editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9 podle (Rodríguez-López et al. 2016)

Reakční směs připravíme podle Tab. 24 a inkubujeme ji 30 min při 37°C. Kinázu inaktivujeme zahřáním reakční směsi na 65°C po dobu 20 min. Fosforylovanou DNA můžeme skladovat v -20°C.

Tab. 24: Reakční směs pro fosforylaci 5'-koců PCR produktu

| složka | množství |
|-------------------------------------|-------------|
| PCR produkt (přečištěná PCR reakce) | 20 µl |
| 10x ligační pufr | 3 µl |
| PNK | 1 µl (10 U) |
| diH ₂ O | 6 µl |

4.3.12 Ligace DNA

Pro ligaci DNA používáme T4 DNA ligázu a spolu s ní dodávaný ligační pufr (10x T4 DNA ligase buffer) do firmy Thermo Scientific (kat. č. EL0014).

4.3.12.1 Ligace fragmentů DNA s kohezními konci

Řídíme se návodem výrobce ligázy a postupujeme podle protokolu pro ligaci vektoru a inzertu s kohezními konci. Reakční směs připravíme podle Tab. 25. Ligační směs inkubujeme 1 hod při pokojové teplotě, poté ji dáme do vodní lázně pokojové teploty a inkubujeme přes noc v lednici. Reakci zastavíme zahřáním směsi na 65°C po dobu 10 min.

Tab. 25: Reakční směs pro ligaci fragmentů DNA s kohezními konci

| složka | množství |
|----------------------|--|
| linearizovaný vektor | 20-100 ng |
| inzert | v molárním poměru 3:1 vzhledem k vektoru |
| 10x ligační pufr | 2 µl |
| T4 DNA ligáza | 1 U |
| diH ₂ O | doplněno do 20 µl |

4.3.12.2 Ligace tupých konců

Při ligaci fragmentů DNA s tupými konci postupujeme podle upraveného návodu od firmy Thermo Scientific. Ligační směs připravíme podle Tab. 26 a inkubujeme ji nejprve 1 hodinu při pokojové teplotě, a poté přes noc v lednici ve vodní lázni. Ligázu inaktivujeme inkubací směsí po dobu 10 min při 65°C.

Tab. 26: Příprava ligační směsi pro ligaci tupých konců

| složka | množství |
|---|-------------------|
| fosforylovaný vektor amplifikovaný pomocí PCR | 0,5-1 µg |
| 10x ligační pufr | 2 µl |
| 50% PEG-4000 | 2 µl |
| T4 DNA ligáza | 5 U |
| diH ₂ O | doplněno do 20 µl |

4.3.12.3 Ligace tupých konců k editaci genomu pomocí CRISPR/Cas9 podle (Rodríguez-López et al. 2016)

Reakční směs připravíme podle Tab. 27 a necháme ligovat 16 hodin při teplotě 16°C. Ligační směs můžeme poté skladovat v -20°C.

Tab. 27: Reakční směs pro ligaci tupých konců

| složka | množství | poznámka |
|---|----------|----------------------------------|
| fosforylovaný vektor amplifikovaný pomocí PCR | 8 µl | 8 µl z 20 µl fosforylační reakce |
| 10x ligační pufr | 1 µl | |
| T4 DNA ligáza | 1 µl | 5 U |

4.4 Techniky manipulace s proteiny

4.4.1 Příprava nativních buněčných lyzátů *S. pombe*

10 ml exponenciálně rostoucí kultury *S. pombe* převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a zchladíme na ledu. Přípravu nativních lyzátů dále provádíme na ledu. Buňky usadíme centrifugací (3200 g, 3 min, 4°C) a resuspendujeme je do 2 ml STOP pufru; dochází k metabolické inhibici. Buňky znovu centrifugujeme (3200 g, 3 min, 4°C), sediment resuspendujeme v 1 ml STOP pufru a suspenzi převedeme do 1,5ml mikrozukavky. Po další centrifugaci (2300 g, 3 min, 4°C) odstraníme supernatant a buněčný pelet dále zpracováváme nebo jej můžeme zamrazit v -80°C pro pozdější použití.

Sediment buněk resuspendujeme do 100 µl čerstvě připraveného lyzačního pufru LB se směsí proteázových inhibitorů FY (Serva, 1/100 objemu lyzačního pufru) a suspenzi převedeme do vychlazených šroubovacích 2ml mikrozukavek naplněných do

¼ skleněnými kuličkami (425–600 µm, Sigma-Aldrich) mytými v HCl. Buňky rozbijeme v homogenizátoru FastPrep24 (MP biomedical); provádíme 3 rozbíjecí cykly (parametry přístroje: rychlost 5,5 m/s, čas 20 s). Po dokončení rozbíjení buněk následujícím způsobem odstraníme skleněné kuličky. Víčko a dno zkumavky propíchneme horkou jehlou o průměru menším než je rozměr kuliček, zkumavku zasadíme do 1,5ml mikrozkušavky s ustřiženým víčkem a celý komplex vložíme do 50ml centrifugační zkumavky. Centrifugováním (730 g, 2 min, 4°C) přemístíme lyzát do spodní zkumavky, odtud ho převedeme do nové mikrozkušavky a suspenzi centrifugujeme (20000 g, 20 min, 4°C). Supernatant představující nativní lyzát skladujeme v -80°C.

Roztoky a pufr:

STOP pufr 150mM NaCl, 50mM NaF, 25mM HEPES, 1mM NaN₃; pH 8

LB pufr: 25mM HEPES, 0,1mM EDTA, 150mM KCl, 0,1% Triton X-100, 25% glycerol, 1M urea; pH 7,6

4.4.2 Příprava denaturovaných proteinových extraktů z *S. pombe*

10 ml exponenciálně rostoucí kultury *S. pombe* převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a kulturu zchladíme na ledu. Na ledu pracujeme po celou dobu přípravy lyzátů. Buňky usadíme centrifugací (1650 g, 5 min, 4°C), resuspendujeme je do 1 ml vychlazeného STOP pufru (dochází k metabolické inhibici) a směs převedeme do 1,5ml mikrozkušavky. Buňky usadíme centrifugací (3300 g, 5 min, 4°C), dokonale odstraníme supernatant a sediment buněk zamrazíme v -80°C po dobu 20 minut. Buňky resuspendujeme do 100 µl čerstvě připravené směsi NaOH+β-merkaptóetanol (1,85M NaOH a 7% β-merkaptóetanol). Suspenzi převedeme do vychlazené šroubovací 2ml mikrozkušavky naplněné do ¼ skleněnými kuličkami (425–600 µm, Sigma-Aldrich) mytými v HCl. Buňky rozbijeme v homogenizátoru FastPrep24 (MP biomedical); provádíme 3 rozbíjecí cykly (parametry přístroje: rychlost 5,5 m/s, čas 20 s). Po dokončení rozbíjení buněk přidáme ke vzorku 100 µl 50% trichloroctové kyseliny (TCA) a inkubujeme 5 min na ledu. Suspenzi centrifugujeme (13400 g, 2 min, 4°C), odstraníme supernatant a sediment resuspendujeme do 500 µl 1M Tris. Vzorek opět centrifugujeme (13400 g, 2 min, 4°C) a sediment resuspendujeme do 100 µl 2x Laemmli pufru předehřátého na 80°C. Suspenzi inkubujeme 20 min při 80°C, poté

vzorek zchladíme na ledu a centrifugujeme (13400 g, 3 min, pokojová teplota). Supernatant odebereme do nové mikrozkušavky a skladujeme v -80°C.

Roztoky a pufrы:

| | |
|--------------------------------|---|
| NaOH+β-merkaptóetanol (100 μl) | 93 μl 2M NaOH, 7 μl β-merkaptóetanol |
| 2x Laemmli pufr | 0,112M Tris-HCl (pH 6,8), 12% glycerol (v/v), 3,42% SDS, 0,002% bromfenolová modř |

4.4.3 SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)

Pro metodu SDS-PAGE používáme aparaturu Mini-Protean 3 (Bio-Rad). K separaci proteinů dochází v 7,5% polyakrylamidovém gelu (tloušťka 0,75 mm) v Tris-glycinovém pufrovém systému.

Sestavíme aparaturu pro nalévání gelů. Podle rozpisu si nejprve připravíme v 15ml zkumavce separační gel (Tab. 28), kterým ze 2/3 naplníme prostor mezi skly. Separací gel převrstvíme 1 ml izopropanolu a necháme zpolymerovat. Připravíme si v 15ml zkumavce zaostřovací gel (Tab. 28). Důkladně odstraníme izopropanol a na separační gel nanese gel zaostřovací. Vsadíme hřebínek a gel necháme ztuhnout. Hřebínek vyjmeme, sestavíme elektroforetickou aparaturu, jejíž vnitřní prostor zalijeme 1x koncentrovaným elektrodoým SDS pufrém.

Tab. 28: Rozpis pro přípravu jednoho 7,5% polyakrylamidového gelu o tloušťce 0,75 mm.

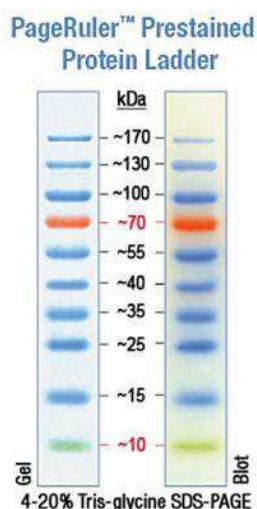
| složka | separační gel | zaostřovací gel |
|---|---------------|-----------------|
| diH ₂ O | 2,5 ml | 1,55 ml |
| AA/BIS | 1,25 ml | 0,325 ml |
| 4x Tris-HCl/SDS; pH 8,8 | 1,25 ml | - |
| 4x Tris-HCl/SDS; pH 6,8 | - | 0,625 ml |
| TEMED (tetrametyletylendiamin; Bio-Rad) | 3,4 μl | 2,5 μl |
| 10% (w/v) APS (persulfát amonný; Sigma) | 16,5 μl | 12,5 μl |

Vzorky musíme před nanesením na gel následujícím způsobem zpracovat: k 10 μl proteinového lyzátu přidáme 0,6 μl 1M DTT (dithiotreitol), v případě nativních lyzátoů přidáme ještě 2 μl 6x koncentrovaného Laemmli pufru; vzorky denaturujeme 10 minut při 95°C. Takto připravené vzorky nanese mikrostríkačkou Hamilton na gel. Jako standard molekulových velikostí používáme PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM0671; Obr. 11). Aparaturu připojíme ke zdroji energie, na každý gel aplikujeme proud o velikosti 20 mA a proteiny necháme elektroforeticky rozdělit.

Po provedení metody western blot vizualizujeme v gelu proteiny nepřenesené na nitrocelulózovou membránu. Gel barvíme v Petriho misce v barvicím roztoku. Asi po jedné hodině barvení přeneseme gel do odbarvovacího roztoku a za stálého míchání (třepačka, 150 rpm) jej odbarvujeme přes noc.

Roztoky a pufrы:

| | |
|-------------------------|---|
| AA/BIS: | 30% akrylamid (Sigma-Aldrich), 0,8% (w/v) N,N'-metylenbisakrylamid (Merck), přefiltrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat při 4°C |
| 4x Tris-HCl/SDS; pH 8,8 | 1,5M Tris, 0,4% SDS; přefiltrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat při 4°C |
| 4x Tris-HCl/SDS; pH 6,8 | 1,5M Tris, 0,4% SDS; přefiltrovat přes 0,45 µl filtr, skladovat při 4°C |
| 6x Laemmli pufr | 0,336M Tris (pH 6,8), 10,26% (w/v) SDS, 36% (v/v) glycerol, 0,006% bromfenolová modř |
| 5x SDS pufr: | 125mM Tris, 950mM glycin, 0,5% SDS; pH 8,3 |
| barvicí roztok: | 20% metanol, 0,117% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad), 0,051% (v/v) Bismarck Brown R (Sigma-Aldrich), 7% kys. octová |
| odbarvovací roztok: | 7% kys. octová, 5% metanol |



Obr. 11: Standard molekulových velikostí proteinů

4.4.4 Western blot a imunodetekce proteinů

Elektroforeticky rozdělené proteiny je nutno převést z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu. K tomuto účelu používáme aparaturu Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad). Pod hladinou přenosového pufru sestavíme tzv. blotovací sendvič – v blotovacím klipu na sobě naskládaná těsnící houbička, filtrační papír (Whatman 3

mm), separační gel, nitrocelulózová membrána (Bio-Rad), filtrační papír, těsnící houbička. Sendvič, vaničku ledu zajišťující chlazení celé soustavy a míchadlo umístíme do aparatury, jejíž vnitřní prostor zalijeme přenosovým pufrem. Takto připravenou aparaturu umístíme na magnetickou míchačku, připojíme ke zdroji energie a po dobu 2 hodin aplikujeme napětí 100 V. Dochází k přenosu proteinů na membránu.

Membránu 5 minut omýváme v roztoku TBS, a pak ji při 37°C alespoň 30 minut blokuje v 3% mléku (Bio-Rad) rozpuštěném v TTBS. Po blokaci membránu zatavíme do folie spolu s 2–3 ml 3% mléka a s primární protilátkou v příslušném ředění (Tab. 29); inkubujeme přes noc ve 4°C na překlopné třepačce. Membránu 3x po dobu 5 minut opláchneme vychlazeným roztokem TTBS. Takto promytou membránu inkubujeme 1 hodinu při pokojové teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Tab. 29), kterou vhodně naředíme v 3% mléce. Po inkubaci membránu 3x propláchneme v roztoku TTBS a jednou v roztoku TBS; promývání trvá vždy 5 minut. Membránu osušíme a vložíme ji do chemiluminiscenčních substrátů ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham) smíchaných v poměru 1:1 (0,5 ml:0,5 ml na 1 membránu). V tomto vyvíjecím roztoku membránu inkubujeme 5 minut. K detekci chemiluminiscence využíváme přístroj LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Roztoky a pufrы:

| | |
|----------------|--|
| přenosový pufr | 25mM Tris, 192mM glycin, 20% metanol; pH 8 |
| TBS | 20mM Tris, 500mM NaCl; pH 7,5 |
| TTBS | TBS s 0,05% Tween 20 (Serva) |

Tab. 29: Seznam primárních a sekundárních protilátek

| | název | popis | ředění | výrobce | kat. č. |
|------------|-----------|---|---------|--------------------------|---------|
| primární | anti-TAP | králičí polyklonální, rozpoznává TAP-tag | 1:800 | Thermo Scientific | CAB1001 |
| | anti-TAP | králičí polyklonální, rozpoznává TAP-tag | 1:800 | GenScript | A00683 |
| | anti-Cdc2 | myší monoklonální, rozpoznává tzv. motiv PSTAIR | 1:80000 | Sigma-Aldrich | P7962 |
| sekundární | GAR-HRP | kozí protilátka rozpoznávající králičí protilátky (GAR), konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) | 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology | sc-2030 |
| | GAM-HRP | kozí protilátka rozpoznávající myší protilátky (GAM), konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) | 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology | sc-2031 |

4.5 ChIP (chromatinová imunoprecipitace)

4.5.1 Kultivace buněk a jejich fixace

Pro chromatinovou imunoprecipitaci kultivujeme kmeny *S. pombe* v 50 ml příslušného média do exponenciální fáze růstu na OD 1 (pokud není uvedeno jinak). Narostlou kulturu přemístíme na třepačku do digestoře, přidáme 1,35 ml 37% roztoku formaldehydu (výsledná koncentrace je 1%; Sigma-Aldrich) a za stálého třepání (150 rpm) inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě; dochází k reverzibilní fixaci. Po uplynulých 30 minutách přidáme 2,5 ml 2,5M glycinu (výsledná koncentrace je 0,125M) a za stálého míchání inkubujeme při pokojové teplotě dalších 10 minut. Poté kulturu převedeme do 50ml centrifugační zkumavky a buňky usadíme centrifugací (1650 g, 3 min, pokojová teplota). Sediment buněk promyjeme 40 ml destilované vody a znovu centrifugujeme (1650 g, 3 min, pokojová teplota). Pelet resuspendujeme v 1 ml destilované vody, převedeme do 2ml mikrozkušavky a fixované buňky usadíme centrifugací (840 g, 3 min, pokojová teplota). Sediment buněk skladujeme v -80°C po dobu až dvou měsíců.

4.5.2 Příprava chromatinového extraktu

Po celou dobu pracujeme na ledu a používáme i vychlazené roztoky. Nejprve si připravíme lyzační pufr LB_{CHIP} s čerstvě přidaným koktejlem proteázových inhibitorů FY (1/100 celkového objemu; Serva), které však nesmí být rozpuštěny déle než 4 týdny. Na jeden vzorek potřebujeme 1,6 ml roztoku LB_{CHIP}+FY. Sediment fixovaných buněk resuspendujeme ve 370 μ l LB_{CHIP}+FY. Suspenzi převedeme do vychlazených šroubovacích 2ml mikrozkušavek naplněných do ¼ skleněnými kuličkami mytými v HCl. Buňky rozbíjíme v homogenizátoru FastPrep24 (MP biomedical), na kterém nastavíme následující parametry: rychlost 5,5 m/s, čas 13 s. Provádíme 3 rozbíjecí cykly, mezi kterými dodržujeme 5minutové pauzy, během nichž dáváme vzorky na led. Účinnost rozbíjení buněk určíme mikroskopicky v Bürkerově komůrce a v případě, že je rozbito méně než 70 % buněk, navýšíme počet rozbíjecích cyklů. Po dokončení rozbíjení buněk odstraníme skleněné kuličky. Víčko a dno zkumavky propíchneme horkou jehlou o průměru menším než je rozměr kuliček, zkumavku zasadíme do 1,5ml mikrozkušavky s ustřiženým víčkem a celý komplex vložíme do 50ml centrifugační zkumavky. Centrifugací (730 g, 1 min, 4°C) přemístíme buněčný lyzát do spodní

mikrozkumavky bez víčka. Kuličky promyjeme 100 μ l LB_{ChIP}+FY a znovu centrifugujeme (730 g, 1 min, 4°C). Buněčný lyzát převedeme do nové 1,5ml mikrozkumavky a centrifugujeme (20000 g, 10 min, 4°C). Sediment resuspendujeme v 600 μ l LB_{ChIP}+FY a centrifugujeme (20000 g, 10 min, 4°C). Sediment znovu důkladně resuspendujeme v LB_{ChIP}+FY, tentokrát však ve 270 μ l. Takto připravený vzorek sonikujeme v sonikační lázni Bioruptor (Diagenode) při teplotě 4°C a nastavení 20x (30 s ON, 30 s OFF) na vysoký výkon. Sonikovaný materiál centrifugujeme (20000 g, 10 min, 4°C) a supernatant představující solubilní chromatin převedeme do nové 1,5ml mikrozkumavky. Na spektrofotometru NanoDrop2000 (Thermo Scientific) změříme koncentraci proteinů oproti vodě (metoda „Protein A 280“ – měření absorbance při $\lambda = 280$ nm). V nové mikrozkumavce smícháme takový objem solubilního chromatinu, který odpovídá množství 10 mg celkového proteinu, a objem doplníme do 200 μ l pomocí LB_{ChIP}+FY. Z takto normalizovaných vzorků odebereme 30 μ l jako tzv. input (IN)/„whole cell extract“ (WCE), který skladujeme přes noc v -20°C. Zbýlých 170 μ l použijeme pro samotnou imunoprecipitaci.

4.5.3 Chromatinová imunoprecipitace proteinů značených TAP-tagem

30 μ l magnetických kuliček potažených IgG (Pan Mouse IgG coated Dynabeads®, Invitrogen, kat. č. 110.41) 3x promyjeme 1 ml vychlazeného blokovacího roztoku (0,5% roztok BSA v pufru LB_{ChIP}); při promývání používáme magnetický stojánek. K promytým magnetickým kuličkám přidáme 170 μ l normalizovaného chromatinového extraktu a vzorky, označené jako output (OUT)/imunoprecipitát (IP), inkubujeme přes noc na rotačním kolotoči při 4°C. Dochází k precipitaci TAP-tagem označených proteinů.

4.5.4 Izolace precipitovaného materiálu

K izolaci precipitovaného materiálu můžeme využít dva způsoby popsané v následujících dvou podkapitolách. V kapitole Výsledky je vždy uvedeno, zda jsme po vlastní ChIP využili k izolaci precipitovaného materiálu chelex (ChIP_{chelex}; 4.5.4.1), nebo fenol-chloroformovou extrakci (ChIP_{fenol}; 4.5.4.2).

Množství a čistotu izolované DNA stanovíme spektrofotometricky na přístroji NanoDrop2000 (Thermo Scientific). Výtěžek DNA z inputů se většinou pohybuje

kolem 800 ng/ μ l, z outputů kolem 20 ng/ μ l. Izolovanou DNA naředíme diH₂O na koncentraci 4,5 ng/ μ l a analyzujeme pomocí qPCR (4.3.4.2).

4.5.4.1 Promývání magnetických kuliček a izolace DNA chelexem

Magnetické kuličky šestkrát promyjeme 1 ml IP pufru; používáme magnetický stojánek. Po posledním promytí důkladně odstraníme promývací pufr. K promývaným magnetickým kuličkám a k inputům přidáme 100 μ l 10% roztoku Chelexu 100 (Bio-Rad). Vzorky 10 s intenzivně promícháváme, a poté je inkubujeme 10 minut při 95°C. Po vychladnutí směsi přidáme ke vzorkům 1 μ l proteinázy K (20 mg/ml; Roche), promícháme a inkubujeme 30 minut při 55°C v třepacím termobločku (1000 rpm). Vzorky povaříme 10 minut při 95°C, čímž inaktivujeme proteinázu K. Vzorky centrifugujeme (13400 g, 1 min, pokojová teplota) a vrchních 60 μ l převedeme do nové mikrozkušavky. K sedimentu, který je v případě inputů tvořený chelexem, v případě outputů směsí chelexu a magnetických kuliček, přidáme 120 μ l diH₂O. Směs 10 s intenzivně promícháváme a vzorky centrifugujeme (13400 g, 1 min, pokojová teplota). Vrchních 120 μ l převedeme do mikrozkušavky k předešlým 60 μ l. Získanou izolovanou DNA skladujeme v -80°C.

4.5.4.2 Promývání magnetických kuliček a izolace DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce

Po dokončení imunoprecipitace promýváme magnetické kuličky 700 μ l vychlazených pufrů v následujícím pořadí: 2krát LB_{CHIP} pufr, 2krát LB-500 pufr, 2krát LiCl/NP-40 pufr a 1krát TE pufr; využíváme magnetický stojánek. Po dokončení promývání přidáme k magnetickým kuličkám 200 μ l elučního pufru, k inputům přidáme 170 μ l TES pufru. Vzorky inkubujeme 6 hodin při 65°C v třepacím termobločku (1000 rpm); dochází k odstranění zesíťování (tzv. decrosslink). Po skončení inkubace převedeme tekutinu (tedy decrosslinkovaný materiál) od magnetických kuliček do nové mikrozkušavky a všechny vzorky skladujeme přes noc v -20°C.

Další den přidáme ke všem vzorkům 200 μ l TE pufru a 2,5 μ l RNázy A (0,5 mg/ml; Reanal); vzorky inkubujeme v termobločku 1 hodinu při 37°C. Přidáme 3,5 μ l proteinázy K (20 mg/ml; Roche) a inkubujeme další 2 hodiny při 55°C. Následuje vlastní izolace DNA. Ke vzorkům přidáme 400 μ l směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1; Sigma-Aldrich), intenzivně vortexujeme po

dobu 30 s, a poté centrifugujeme (20000 g, 15 min, 4°C). Do nové 2ml mikrozkušavky opatrně odebereme vrchní vodní vrstvu, přidáme k ní 10 µl glykogenu (20 mg/ml; Thermo Scientific) a směs promícháme. Přidáme 40 µl 3M octanu sodného, promícháme a přidáme 1 ml 96% etanolu. Směs umístíme do -80°C a necháme DNA precipitovat 30–60 minut. Vzorky centrifugujeme (20000 g, 10 min, 4°C) a supernatant odstraníme. Pelet opláchneme 700 µl vychlazeného 70% etanolu a znovu centrifugujeme (20000 g, 10 min, 4°C). Etanol důkladně odstraníme, pelet necháme 5–10 minut vysušit při pokojové teplotě a rozpustíme jej do 50 µl diH₂O.

Roztoky a pufrы:

| | |
|---------------------------------|---|
| lyzační pufr LB _{CHIP} | 50mM HEPES (pH 7,6), 1mM EDTA (pH 8), 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% deoxycholát sodný |
| promývací pufr IP | 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,5% NP-40; pH 7,5 |
| LB-500 pufr | 50mM HEPES, 1mM EDTA, 500mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% deoxycholát sodný; pH 7,6 |
| LiCl/NP-40 pufr | 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 250mM LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholát sodný; pH 8 |
| TE pufr | 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8 |
| eluční pufr | 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1% SDS; pH 8 |
| TES pufr | 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1% SDS; pH 8 |

4.5.5 Zpracování vzorků za účelem stanovení přítomnosti TAP-tagem značeného proteinu v různých frakcích odebraných během ChIP

Odebrané vzorky (Obr. 29) inkubujeme 6 hodin při 65°C. Analyzované vzorky podrobíme metodě precipitace proteinů pomocí kyseliny trichloroctové (TCA). Ke všem vzorkům přidáme takový objem TCA, aby její výsledná koncentrace byla 25%. Vzorky inkubujeme 30 minut na ledu, přičemž každých cca 5 minut vzorky promícháme. Směs centrifugujeme (20000 g, 30 min, 4°C) a supernatant odstraníme. Sediment omyjeme 1 ml vychlazeného acetonu s 0,05M HCl. Vzorky centrifugujeme (20000 g, 5 min, 4°C), odstraníme supernatant a sediment omyjeme 1 ml vychlazeného acetonu. Vzorky opět centrifugujeme (20000 g, 5 min, 4°C). Supernatant důkladně odstraníme. Vysušený pelet rozpustíme do 40 µl LB_{CHIP} pufru s 1x koncentrovaným Laemmli pufrem. Vzorky analyzujeme pomocí metody SDS-PAGE (nanáška 10 µl), western blot a následné imunodetekce proteinů.

4.6 „Spot test“ – studium citlivosti na camptothecin (CPT)

Kmeny *S. pombe* kultivujeme v 10 ml média YES do exponenciální fáze růstu (OD 0,3–1). Do 1,5ml mikrozkušavky odebereme takový objem kultury, který odpovídá OD 0,7; tj. sklízíme 0,7 OD exponenciálně rostoucích buněk. Buňky usadíme centrifugací (1000 g, 3 min, pokojová teplota), odebereme supernatant a buněčný pelet resuspendujeme do 350 μ l média YES. 300 μ l suspenze převedeme do 96jamkové mikrotitrační destičky a následně provedeme 4 ředění desítkovou ředící řadou – 30 μ l suspenze přenášíme vždy do vedlejší jamky, ve které je připraveno 270 μ l média YES. Sterilizovaným aplikátorem, tzv. ježkem (48-pin spotting tool; Sigma-Aldrich), nanášíme buněčnou suspenzi na čerstvě připravené pevné médium YES (kontrola růstu) a médium YES obsahující 6 μ M CPT (studium citlivosti na CPT). Plotny inkubujeme 7 dní v termostatu při teplotě 32°C. Druhý a třetí den po spotování pořídíme snímky ploten (fotoaparát Panasonic DMC-FZ7).

4.7 Omývací test – studium adhezivity

Vlastnímu omývacímu testu předchází příprava vstupního materiálu, tj. příprava pevného média YES s nanesenými příslušnými kmeny *S. pombe* (4.6). Sedmý den po spotování provedeme omývací test. Nastavíme středně silný proud vlažné vody a během testu ho již neměníme. Plotnu umístíme asi 20 cm pod ústí vodovodní baterie a 1 minutu ji rovnoměrně omýváme. Výsledek omývacího testu, stejně jako stav před testem, zdokumentujeme za využití digitálního fotoaparátu (Olympus SP-350) umístěného na mikroskopu (Olympus CK2, zvětšení 40x). Fotíme vždy hranu monokolonie narostlé v posledním ředění.

4.8 Hledání vazebného motivu ve vybraných cílových sekvencích proteinu Cbf12

V programu IGV (Tab. 32) si zobrazíme ChIP-seq data získaná pro protein Cbf12-TAP (Převorovský *et al.* 2015). U vybraných cílových míst proteinu Cbf12 zjistíme koordináty vazebné události, tj. „peaku“ (Tab. 30). Pokud byl „peak“ identifikován nástrojem MACS (platí pro lokusy *cbf12*, *gsf2*, *pfl7*, *atd1*, *nep2*; Zhang *et al.* 2008), pracujeme s koordinátami sekvence celého „peaku“; pokud nebyla vazebná událost rozpoznána nástrojem MACS (platí pro lokusy *mug115* a rDNA), pracujeme se

sekvencí nacházející se přímo pod vizualizovaným „peakem“, tj. „peak“ určíme sami. Sekvenci DNA nelze exportovat z programu IGV; k tomuto účelu využijeme online nástroj Genome Browser, který je dostupný na webových stránkách PomBase (Tab. 31) – zadáme koordináty a vyexportujeme příslušnou sekvenci DNA. Samotné hledání konsenzuálního CSL-vazebného elementu GTG(G/A)GAA, respektive TTC(C/T)CAC provádíme v Microsoft Office Word 2007.

Tab. 30: Koordináty „peaků“ vybraných cílových míst proteinu Cbf12

| název | koordináty |
|---------------|---|
| <i>cbf12</i> | chr3: 1870290-1871741 |
| <i>gsf2</i> | chr3: 967262-967959 |
| <i>pfl7</i> | chr2: 120255-121016 |
| <i>atd1</i> | chr1: 4452714-4458358 |
| <i>nep2</i> | chr2: 1454418-1456294 |
| <i>mug115</i> | chr1: 1150049-1150600 |
| <i>rDNA</i> | chr3: 3800-4200 chr3: 14660-15100 chr3: 2449000-2449480 |

4.9 Bioinformatické nástroje a software

V Tab. 31 jsou zaznamenány použité databáze a webové nástroje. Tab. 32 zachycuje použitý software.

Tab. 31: Databáze a webové nástroje

| název | popis | URL | zdroj |
|------------------------------|---|---|--|
| Clustal Omega | alignments sekvencí, zejména při kontrole sekvenací plazmidů | http://www.ebi.ac.uk/Tools/misa/clustalo/ | EMBL-EBI; (Sievers <i>et al.</i> 2011) |
| DNA Protein sequence cleaner | odstranění přebytečných znaků ze sekvence DNA/proteinu | http://www.cellbiol.com/scripts/cleaner/dna_protein_sequence_cleaner.php | The Bio-Web |
| Double Digest Calculator | doporučení optimálních podmínek pro restriční štěpení | https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html | Thermo Scientific |
| E-CRISP | návrh sgRNA pro CRISPR/Cas9 | http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrisp.html | (Heigwer <i>et al.</i> 2014) |
| Genome Browser | získání sekvence DNA z genomu <i>S. pombe</i> podle koordinát | http://genomebrowser.pombase.org/Schizosaccharomyces_pombe/Info/Index | PomBase |
| NEBcutter V2.0 | nalezení restričních míst | http://nc2.neb.com/NEBcutter2/ | New England Biolabs |

| | | | |
|--------------------------|---|---|---|
| Nucleotide BLAST | ověření unikátního výskytu sekvence primeru | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome | NCBI |
| Oligo Analyzer 3.1 | analýza navržených oligonukleotidů | https://eu.idtdna.com/calc/analyzer | IDT SciTools; (Owczarzy <i>et al.</i> 2008) |
| PomBase | sekvence genů <i>S. pombe</i> | www.pombase.org | (Wood <i>et al.</i> 2002; Wood <i>et al.</i> 2012; McDowall <i>et al.</i> 2015) |
| PrimerQuest | návrh primerů pro PCR a qPCR | https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index | IDT SciTools; (Owczarzy <i>et al.</i> 2008) |
| Protein Molecular Weight | výpočet molekulové hmotnosti proteinu | http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html | Sequence manipulation suite |
| Reverse Complement | konverze sekvence DNA | http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html | Sequence manipulation suite |
| Translate tool | konverze sekvence DNA do sekvence proteinu | http://web.expasy.org/translate/ | ExPASy |
| Gene Expression Viewer | expresní profily genů | http://bahlerweb.cs.ucl.ac.uk/cgi-bin/SPGE/geexview | laboratoř Dr. Bählera, UCL |

Tab. 32: Software

| název | popis | zdroj |
|---------------------------------------|---|--|
| Chromas Lite | prohlížení sekvenačních chromatogramů | Technelysium Pty Ltd |
| ImageQuant LAS-4000 Software | detekce chemiluminiscence | GE Healthcare Life Sciences |
| Integrative Genomics Viewer (IGV) | vizualizace celogenomových sekvenačních dat | (Robinson <i>et al.</i> 2011) |
| LightCycler® 480 Software Version 1.5 | analýza qPCR | Roche |
| SerialCloner 2.1/Clone Manager 9 | vizualizace a manipulace sekvencí DNA | SerialBasic Software/ Scientific and Educational Software |

5 VÝSLEDKY

5.1 Konstrukce kmenů za účelem studia režimu vazby proteinů CSL na DNA

Pro studium vlivu mutace DBM na funkce proteinů CSL a na jejich DNA-vazebné vlastnosti *in vivo* bylo potřeba nejprve zkonstruovat kmeny, ve kterých by mutace DBM byla zavedena přímo do chromozomálního lokusu genů *cbf11* a *cbf12*. Abychom mohli sledovat protein za fyziologických podmínek, tedy exprimovaný pod přirozeným promotorem v jeho přibližně nativní koncentraci, bylo potřeba, aby byla připojena sekvence kódující HA/TAP-tag za 3'-konec otevřeného čtecího rámce (ORF) proteinů CSL ne/obsahujících mutaci DBM a aby zůstala intaktní oblast 3'UTR, skrze kterou může být ovlivňována stabilita transkriptu (Hasan *et al.* 2014). Oblast 3'UTR je nutná pro regulaci stability mRNA genu *cbf12* (Wells *et al.* 2012).

Moje práce byla součástí většího projektu, jehož původním cílem bylo zkonstruovat všechny kmeny uvedené v Tab. 33.

Tab. 33: Přehled kmenů, které měly být původně zkonstruovány.

| požadované kmeny | popis |
|------------------|--|
| Cbf12-HA | HA-tagem označený protein Cbf12 s vlastní intaktní 3'UTR |
| Cbf12DBM-HA | HA-tagem označený protein Cbf12 s mutací DBM a s vlastní intaktní 3'UTR |
| Cbf11-HA | HA-tagem označený protein Cbf11 s vlastní intaktní 3'UTR |
| Cbf11DBM-HA | HA-tagem označený protein Cbf11 s mutací DBM a s vlastní intaktní 3'UTR |
| Cbf12-TAP | TAP-tagem označený protein Cbf12 s vlastní intaktní 3'UTR |
| Cbf12DBM-TAP | TAP-tagem označený protein Cbf12 s mutací DBM a s vlastní intaktní 3'UTR |
| Cbf11-TAP | TAP-tagem označený protein Cbf11 s vlastní intaktní 3'UTR |
| Cbf11DBM-TAP | TAP-tagem označený protein Cbf11 s mutací DBM a s vlastní intaktní 3'UTR |

Dr. Martina Oravcová ještě před mým zapojením se do projektu úspěšně zkonstruovala kmen Cbf12-TAP, nicméně ostatní kmeny se jí vytvořit nepovedlo. Po mém nástupu do laboratoře jsem spolupracovala s Dr. Oravcovou na výrobě požadovaných kmenů. Jelikož příprava kmenů se ukázala být velmi složitou, upustili jsme nakonec od konstrukce kmenů značených HA-tagem a ve svém diplomovém projektu jsem se dále soustředila na konstrukci zbylých kmenů značených TAP-tagem. Ačkoli jsem se potýkala s řadou komplikací, podařilo se mi nakonec vytvořit kmeny Cbf12DBM-TAP a Cbf11-TAP. Přehled úspěšně zkonstruovaných kmenů zachycuje Tab. 34.

Tab. 34: Přehled kmenů, které se podařilo vytvořit.

| zkonstruované kmeny | vytvořila | úspěšná konstrukce popsána v kapitole: |
|---------------------|--------------|--|
| Cbf12-TAP | Dr. Oravcová | 9.1 |
| Cbf12DBM-TAP | AJ | 5.1.2.2.3 |
| Cbf11-TAP | AJ | 5.1.3.2.3 |

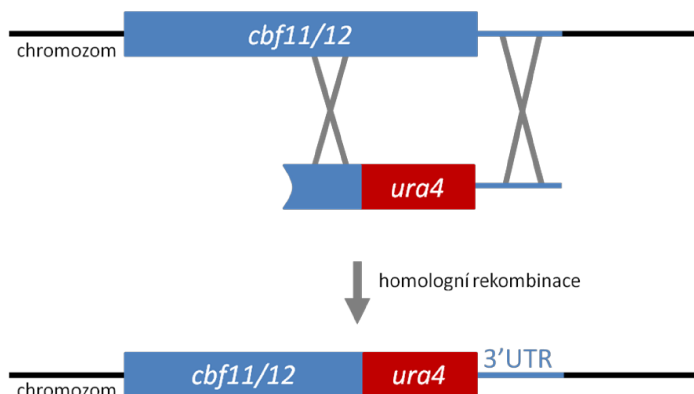
V rámci projektu byla pro účely transformace štěpena řada plazmidů. Očekávané velikosti fragmentů po štěpení konkrétními restrikcími endonukleázami jsou uvedeny v Tab. 21. Pro ověřování konstruovaných kmenů byly využívány různé kombinace primerů; jejich přehled, společně s uvedením velikosti amplikonu, je zachycen v Tab. 14.

5.1.1 Dvoukrokový integrační systém využívající markerový gen *ura4*

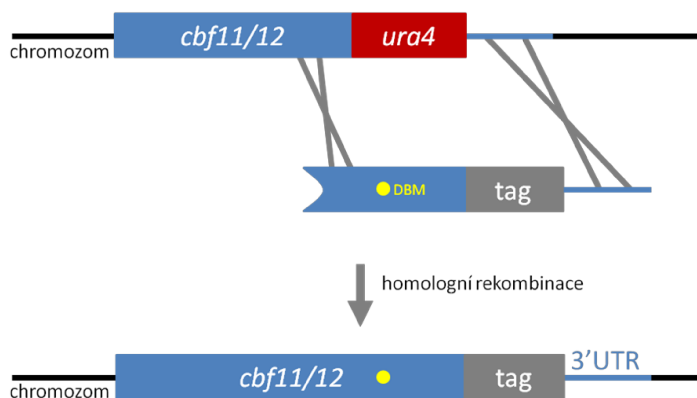
Gen *ura4* kóduje enzym orotin-5'-monofosfátdekarboxylázu, který funguje v dráze syntézy uracilu. U kvasinky *S. pombe* se používá jako markerový gen umožňující jak pozitivní, tak negativní selekci. Na médiu bez uracilu přežijí pouze takové kmeny, jejichž genom kóduje funkční protein Ura4 a jsou si tedy samy schopny syntetizovat uracil (= pozitivní selekce). Negativní selekce s využitím genu *ura4* se dosahuje kultivací buněk v médiu, které obsahuje kyselinu 5-fluoroorotovou (5-FOA). Kyselina 5-fluoroorotová je netoxická látka, která je však v buňkách s funkčním enzymem Ura4 konvertována na pro buňky toxický 5-fluorouracil. Přítomnost 5-fluorouracilu v buňce vede k zablokování buněčného cyklu v S fázi, což má za následek buněčnou smrt. Na médiu s 5-FOA přežijí tedy pouze buňky, které nemají gen *ura4* funkční. Uracil musí být poskytnut v kultivačním médiu.

Pro konstrukci kmenů byl navržen postup vyžadující dva integrační kroky a využívající výše zmíněný markerový gen *ura4*. Hovoříme o tzv. „*ura4* selekčním systému“ (Obr. 12). Tímto přístupem se podařilo zkonstruovat dva z požadovaných kmenů – kmen Cbf12-TAP (Dr. Oravcová) a jeho DBM variantu, kmen Cbf12DBM-TAP.

Krok 1



Krok 2



Obr. 12: „*ura4* selekční systém“. V prvním kroku integrace dojde pomocí homologní rekombinace k nahrazení části otevřeného čtecího rámce proteinu Cbf11/12 markerovým genem *ura4*. Druhým integračním krokem je vnesený markerový gen nahrazen zbylou částí otevřeného čtecího rámce proteinu CSL, ve které je/není přítomna mutace DBM a která je následována sekvencí kódující příslušný tag. Výchozí kmen musí postrádat endogenní *ura4*, aby byla umožněna selekce.

5.1.2 Konstrukce kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP

5.1.2.1 Konstrukce kmene Cbf12-TAP

Konstrukci kmene Cbf12-TAP provedla Dr. Oravcová pomocí dvoukrokové integrace popsané v předchozí kapitole (5.1.1). Jelikož konstrukce tohoto kmene, na kterou navazují ve svém diplomovém projektu, není nikde zdokumentována, popisují ji podrobněji v kapitole 9.1. Po mém nástupu do laboratoře a aktivním zapojením se do projektu jsem vytvořený kmen MaP183 převzala od kolegyně Oravcové. Jeho správnost jsem sama ověřila pomocí PCR (Obr. 13A). Metodou western blot jsem potvrdila, že dochází k expresi TAP-tagem značeného proteinu Cbf12 (Obr. 13C).

5.1.2.2 Konstrukce kmene *Cbf12DBM-TAP*

Dvoukrokovým integračním systémem využívajícím gen *ura4* (5.1.1) se nakonec podařilo vytvořit požadovaný kmen *Cbf12DBM-TAP*. K jeho úspěšnému zkonstruování jsme však museli vyzkoušet více přístupů.

5.1.2.2.1 Přístup I – analogie konstrukce *Cbf12-TAP* – neúspěšný přístup

Dr. Oravcová se analogickým způsobem, který vedl k úspěšné konstrukci kmene *Cbf12-TAP*, pokusila vytvořit i kmen kódující DBM variantu proteinu *Cbf12* (*Cbf12DBM-TAP*). Jednalo se pouze o provedení druhého integračního kroku, jelikož první krok integrace je společný pro oba dva konstrukty (*Cbf12/Cbf12DBM*). Jako templát pro homologní rekombinaci byl použit plazmid *pMaP25*, který obsahuje část sekvence genu *cbf12* s mutací DBM, sekvenci kódující TAP-tag a sekvenci 3'UTR. Tento plazmid byl naštěpen trojicí restrikčních endonukleáz *SalI*, *KasI* a *AlwNI*, a poté byl fosfatázován. Transformace do kmene *MaP178* byla provedena podle protokolu 4.2.2.1 a její parametry byly shodné s parametry uvedenými pro druhý integrační krok při výrobě kmene *Cbf12-TAP* (9.1.2). Pro přehlednost je zopakují:

- kmen *S. pombe* kultivován v médiu YES na OD 2
- transformující DNA – použity 3 µg plazmidu
- neselekční médium – YES
- selekční médium – YES+5-FOA

Mým úkolem bylo ověřit, zda u klonů narostlých na selekčním médiu došlo k homologní rekombinaci a tedy zda se podařilo vyrobit požadovaný kmen. Pomocí metody PCR jsem testovala 56 klonů. Využila jsem pár primerů *MaP169+MP32*. Bohužel ani u jedné z testovaných monoklonií jsem nedetekovala signál značící integraci.

Dr. Oravcová mezitím pracovala na konstrukci kmenů, ve kterých by byl protein *Cbf12/Cbf12DBM* označen HA-tagem (druhý integrační krok – transformace *pMaP28/pMaP23* do kmene *MaP178*). U žádného z klonů nezaznamenala požadovanou integraci. Rozhodli jsme se proto vyzkoušet jiné podmínky transformace.

5.1.2.2.2 *Přístup II – změna podmínek transformace – neúspěšný přístup*

Novou transformační metodu jsme nejprve zkoušeli na přípravě kmene Cbf12DBM-HA. Pokud bychom uspěli, využili bychom analogický přístup pro konstrukci kmene značeného TAP-tagem.

Jako templát pro homologní rekombinaci jsem využila plazmid pMaP23, který obsahuje část sekvence genu *cbf12* s mutací DBM, sekvenci kódující HA-tag a sekvenci 3'UTR. Pro účely transformace jsem ho štěpila restrikcími endonukleázami Sall, KasI a AlwNI, a poté ho fosfatázovala. Pro vlastní transformaci kmene MaP178 jsem využila protokol 4.2.2.2 s následujícími parametry a obměnami:

- kmen *S. pombe* kultivován v médiu EMM+A+L na OD 2,2
- transformující DNA – 3 µg plazmidu; transformace celou směsí, ve které byl vektor štěpen a fosfatázován
- neselekční médium – YES
- selekční médium – YES+5-FOA, 3x přetiskáno

Monokolonie narostlé na selekční plotně YES+5-FOA jsem přečárovala na novou selekční plotnu. Na této však většina klonů nenarostla (98 ze 118 přečárovaných). To bylo v rozporu s faktem, že po transformaci byly klony schopné na selekčním médiu vyrůst. Pouze 20 klonů vykazovalo na nové selekční plotně srovnatelný růst s kontrolním kmenem nekódujícím protein Ura4. Tyto tedy byly potenciálními integranty a byly podrobeny genotypizaci pomocí PCR. S využitím primerů MaP127+MP32 jsem však u všech detekovala přítomnost genu *ura4* v chromozomálním lokusu genu *cbf12*. Zřejmě došlo ke spontánní mutaci genu *ura4*, která vede ke vzniku klonů rezistentních k 5-FOA a jejíž frekvence vzniku je až 60krát vyšší než pravděpodobnost chromozomální integrace (Mudge *et al.* 2012). Tímto přístupem se tedy kmen Cbf12DBM-HA nepodařilo zkonstruovat. Rozhodli jsme se proto transformační metodu dále optimalizovat a najít takové podmínky transformace a následné selekce, které by vedly k úspěšnému zkonstruování kmene Cbf12DBM-TAP.

5.1.2.2.3 *Přístup III – optimalizace parametrů transformace a následné selekce – úspěšný přístup*

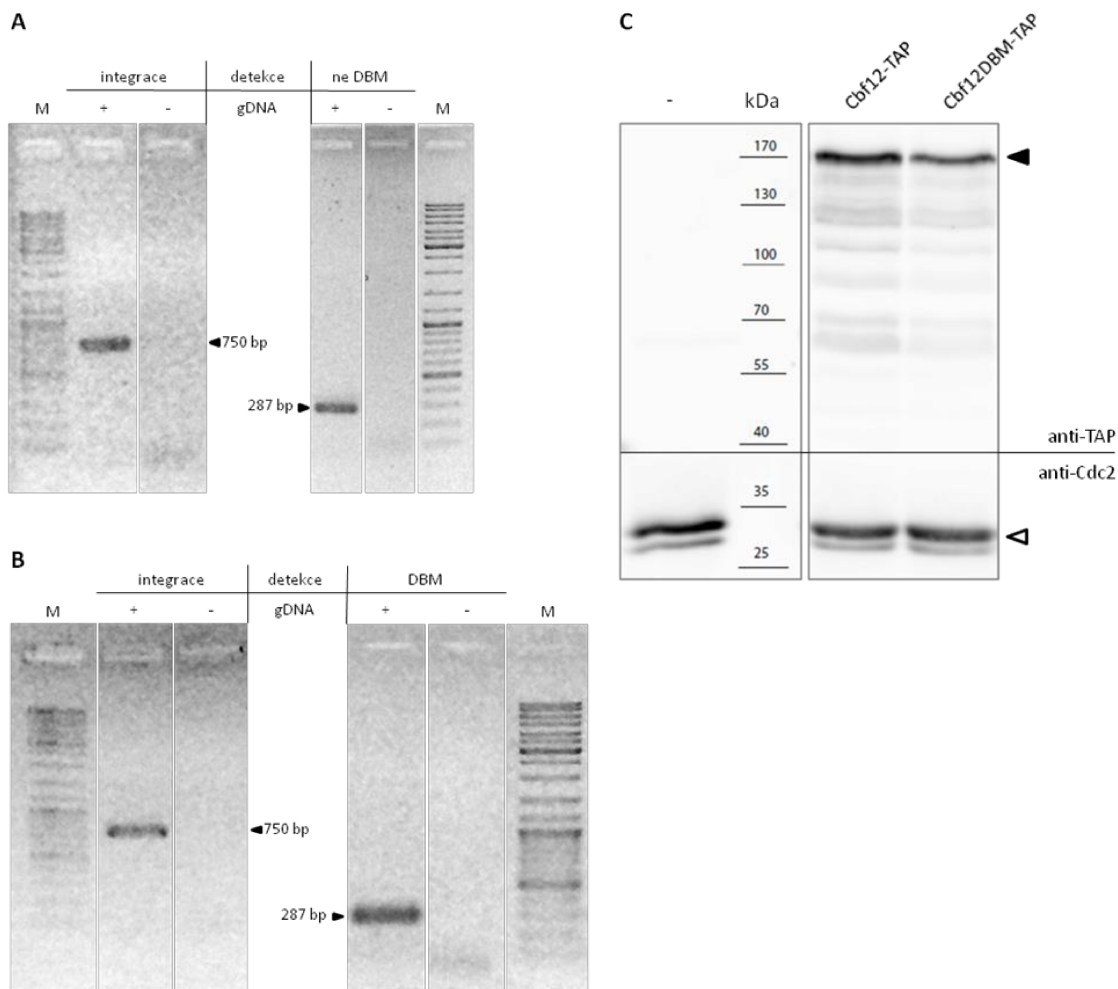
Dosavadními přístupy se kmen Cbf12DBM-TAP připravit nepodařilo. Vyzkoušeli jsme tedy další variantu protokolu 4.2.2.2, jejíž parametry byly následující:

- kmen *S. pombe* kultivován v médiu EMM+A+L na OD 0,75

- transformující DNA – 30 µg štěpeného plazmidu rozpuštěno v 15 µl TE pufru
- neselekční médium – PMG+A+L+U
- selekční médium – PMG+A+L+U+5-FOA, 3x přetiskáno

Jelikož tento postup vedl k úspěšné konstrukci požadovaného kmene, okomentuji ho podrobněji. Doposud jsme pro transformace používali 3 µg naštěpeného a fosfatázovaného plazmidu. Nyní jsme množství transformující DNA navýšili 10krát, tedy na 30 µg. Plazmid pMaP25 jsme pro transformaci štěpili restrikcí Sall a KasI, ale nefosfatázovali jsme jej. Naštěpený plazmid jsme přečistili (4.3.9.1) a přečištěné fragmenty jsme rozpustili do 15 µl TE pufru. Kmen MaP178, do kterého byla posléze provedena transformace, jsme oproti předchozím přístupům kultivovali do ranější fáze exponenciálního růstu (na OD 0,75). Vyzkoušeli jsme také jiné podmínky selekce. Jako neselekční médium jsme použili PMG+A+L+U, jako selekční médium PMG+A+L+U+5-FOA. Buňky na médiu PMG rostou sice pomaleji než na médiu YES nebo EMM, nicméně růst kmenů Ura⁺ a Ura⁻ je vyrovnanější.

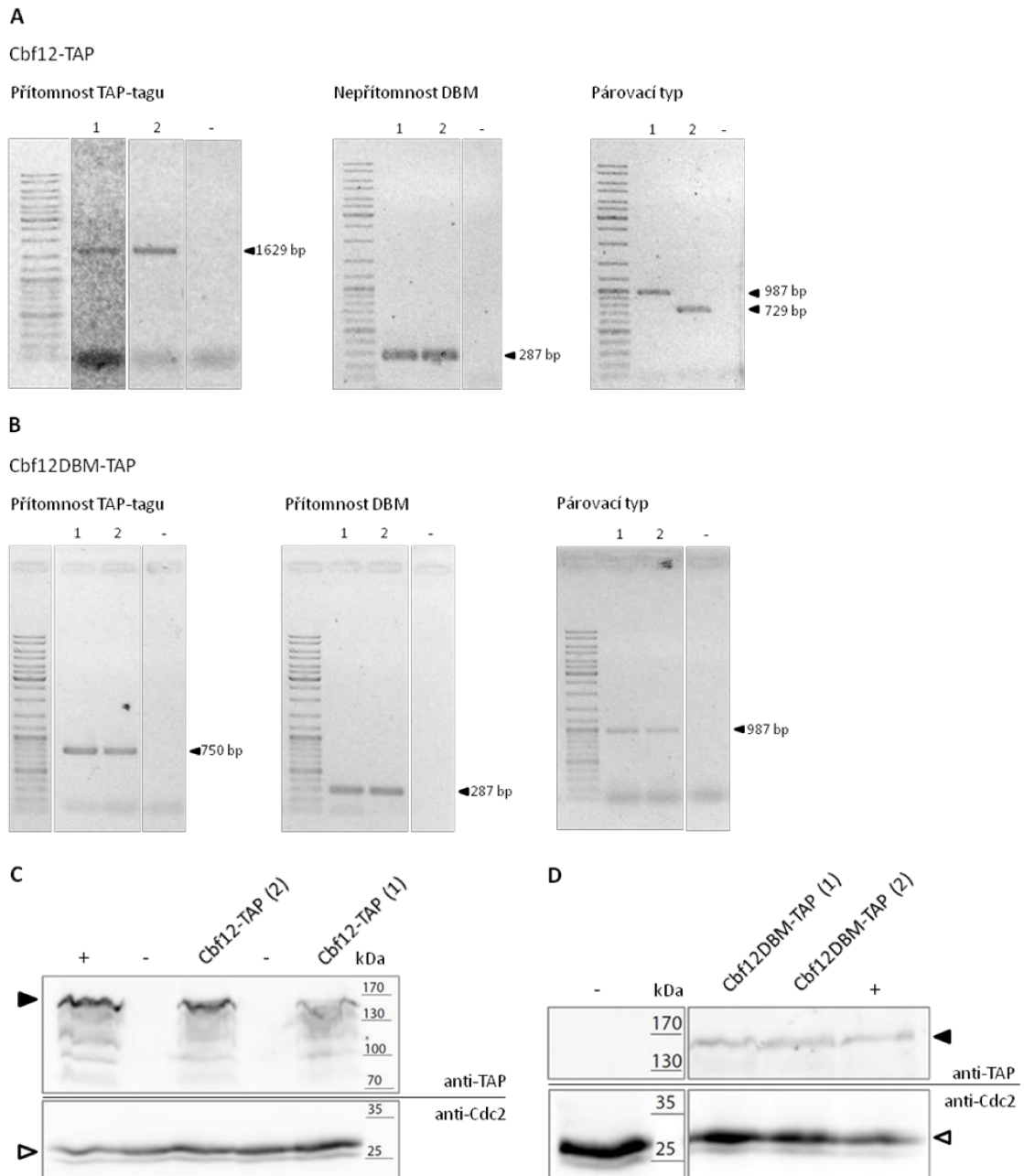
Po transformaci narostlo na selekční plotně pouze 7 monoklonií. Všechny 7 klonů jsem podrobila testování pomocí PCR. Ověřila jsem, že u tří z nich proběhla homologní rekombinace a došlo k integraci templátového fragmentu do chromozomu. Nově vzniklé kmeny byly pojmenovány MaP186, MaP187 a MaP188. Bezchybnost sekvence genu *cbf12* a přítomnost mutace DBM byla u jednoho z klonů ověřena pomocí sekvenace, konkrétně u kmene MaP187. Dále jsem ověřila, že v daném kmeni dochází k expresi proteinu Cbf12DBM-TAP. Ověření pomocí PCR a metody western blot je zdokumentováno v Obr. 13B a C.



Obr. 13: Souhrnné ověření kmenů Cbf12-TAP (MaP183) a Cbf12DBM-TAP (MaP187). (A) Ověření kmene Cbf12-TAP (MaP183) pomocí PCR. S využitím páru primerů MaP169+MP32 jsem potvrdila, že došlo k integraci fragmentu *cbf12-TAP* do chromozomu (detekce – integrace). Očekávaná velikost produktu PCR byla 750 bp. K ověření nepřítomnosti mutace DBM (detekce – ne DBM) jsem využila pár primerů MaP126+chkF. Velikost očekávaného produktu PCR byla 287 bp. Genomická DNA byla z kmene MaP183 izolována fenol-chloroformovou extrakcí. Beztemplátová reakce sloužila jako negativní kontrola (-). Produkty PCR byly elektroforeticky rozděleny v 1,5% agarózovém gelu. Jako standard velikostí (M) byl využit GeneRuler DNA Ladder Mix. (B) Ověření kmene Cbf12DBM-TAP (MaP187) pomocí PCR. Stejně jako v (A) byl k potvrzení integrace do chromozomu (detekce – integrace) využit pár primerů MaP169+MP32, který poskytl produkt o velikosti 750 bp. Přítomnost mutace DBM (detekce – DBM) byla ověřena pomocí páru primerů chkR+chkF. Amplikon o velikosti 287 bp odpovídá očekávání. Genomická DNA byla z kmene MaP187 izolována v prvním případě fenol-chloroformovou extrakcí, ve druhém případě chelexem. Beztemplátová reakce sloužila jako negativní kontrola (-). Produkty PCR byly elektroforeticky rozděleny v 1,5% agarózovém gelu. Jako standard velikostí (M) byl využit GeneRuler DNA Ladder Mix. (C) Ověření exprese proteinu Cbf12-TAP, respektive Cbf12DBM-TAP. Pro experiment byly použity denaturované lyzáty buněk divokého kmene JB32 sloužícího jako negativní kontrola (-) a buněk analyzovaných kmenů MaP183 (Cbf12-TAP), MaP187 (Cbf12DBM-TAP). Pro detekci TAP-tagem označeného proteinu byla využita protilátka anti-TAP (Thermo Scientific). Černá šipka označuje protein o plné velikosti, ostatní proužky jsou degradační produkty tohoto proteinu (standardní výsledek). Protein Cdc2 sloužil jako nanášková kontrola a je označen bílou šipkou (2 proužky = 2 izoformy proteinu).

5.1.2.3 Vytvoření prototrofních variant kmenů *Cbf12-TAP* a *Cbf12DBM-TAP*

Kmeny MaP183 (*Cbf12-TAP*) a MaP187 (*Cbf12DBM-TAP*) jsou auxotrofní na uracil, adenin a leucin. Auxotrofie mohou mít vliv na fyziologii buněk a navíc je možné, že proteiny *Cbf11/Cbf12* jsou nutričně regulovány (6.3). Chtěli jsme proto pracovat s prototrofními kmeny. Pro některé pokusy však byly nejprve využity auxotrofní kmeny *Cbf12-TAP* a *Cbf12DBM-TAP*. Abych se zbavila trojitého auxotrofního pozadí a získala kmeny plně prototrofní, zkřížila jsem kmen MaP183 (h^-), resp. MaP187 (h^-) s kmenem divokého typu JB32 (h^+). Spory jsem vysela na selekční médium EMM. Pomocí PCR jsem u kříženců ověřovala přítomnost TAP-tagem značené sekvence genu *cbf12*, ne/přítomnost mutace DBM a určovala jsem jejich párovací typ. Expresi proteinu *Cbf12-TAP/Cbf12DBM-TAP* jsem ověřovala technikou western blot (WB). Od každého genotypu jsem získala dva nezávislé prototrofní klony. V případě proteinu *Cbf12* bez mutace DBM byly nově vytvořené kmeny pojmenovány jako MP540 a MP541. Klony obsahující mutaci DBM byly označeny jako MP518 a MP519. Ověření pomocí PCR a WB zachycuje Obr. 14.



Obr. 14: Ověření prototrofních kmenů Cbf12-TAP (MP540 a MP541) a Cbf12DBM-TAP (MP518 a MP519). (A) Ověření Cbf12-TAP pomocí PCR. Kmen MP540 je na obrázku označen číslem 1, kmen MP541 číslem 2. Přítomnost sekvence TAP-tagu byla ověřena s použitím páru primerů MaP171+MP32 (amplikon 1629 bp). Pár primerů MaP126+chkF potvrdil nepřítomnost mutace DBM (amplikon 287 bp). Trojprimerový systém MM+MP+MT1 umožnil zjistit párovací typ u testovaných kmenů – MP540 je h⁺ (amplikon 987 bp), MP541 h⁻ (amplikon 729 bp). Genomická DNA byla z obou kmenů izolována fénol-chloroformovou extrakcí. Beztemplátová reakce sloužila jako negativní kontrola (-). Produkty PCR byly separovány v 1% agarózovém gelu. Jako standard velikostí byl využit GeneRuler DNA Ladder Mix. (B) Ověření Cbf12DBM-TAP pomocí PCR. Číslem 1 je na obrázku označen kmen MP518, číslem 2 kmen MP519. Pro prokázání přítomnosti sekvence kódující TAP-tag byl použit pár primerů MaP169+MP32 (amplikon 750 bp). Přítomnost mutace DBM byla ověřena s použitím páru primerů chkR+chkF (amplikon 287 bp). S využitím trojprimerového systému MM+MP+MT1 bylo zjištěno, že párovací typ obou kmenů je h⁺ (amplikon 987 bp). Genomická DNA byla izolována rychlou metodou. Beztemplátová reakce sloužila jako negativní kontrola (-). Produkty PCR byly separovány v 1% agarózovém gelu. Jako standard velikostí byl využit GeneRuler DNA Ladder Mix. (C) Ověření exprese proteinu Cbf12-TAP v kmenech MP540 (označen číslem 1) a MP541 (označen číslem 2). Lyzát buněk divokého kmene JB32 byl použit jako negativní kontrola (-), lyzát buněk MaP183 byl použit jako pozitivní kontrola značení (+). Pro

detekci TAP-tagem označeného proteinu Cbf12 byla využita protilátka anti-TAP (Thermo Scientific). Černá šipka označuje detekovaný protein o plné velikosti. Bílá šipka označuje protein Cdc2, který sloužil jako nanášková kontrola. Ve všech případech byly použity denaturované proteinové extrakty. **(D)** Ověření exprese proteinu Cbf12DBM-TAP v kmenech MP518 (označen číslem 1) a MP519 (označen číslem 2). Jako negativní kontrola (-) byl použit divoký kmen JB32, jako pozitivní kontrola značení (+) kmen MaP187. Pro analýzu byly použity denaturované proteinové extrakty. Pro detekci TAP-tagem označeného proteinu Cbf12DBM byla využita protilátka anti-TAP od firmy GenScript. Černá šipka označuje detekovaný protein o plné velikosti. Bílá šipka označuje protein Cdc2, který sloužil jako nanášková kontrola.

5.1.3 Konstrukce kmenů Cbf11-TAP a Cbf11DBM-TAP

Pro konstrukci kmenů nesoucích TAP-tagem značený protein Cbf11/Cbf11DBM jsme nejprve využívali „*ura4* selekční systém“ (5.1.1), stejně jako v případě přípravy kmenů Cbf12-TAP a jeho DBM varianty. Úspěšné konstrukce kmenů Cbf11-TAP a jeho DBM protějšku jsme však tímto systémem nedosáhli, a proto jsme se uchýlili k využití nového systému – systému CRISPR/Cas9. Po řadě obtíží se nám nakonec podařilo připravit kmen Cbf11-TAP.

5.1.3.1 Využití „*ura4* selekčního systému“ pro konstrukci kmenů Cbf11-TAP a Cbf11DBM-TAP

Ačkoli si konstrukce DBM varianty proteinu Cbf12 vyžádala vyzkoušení více přístupů, nakonec jsme našli vhodné podmínky transformace a následné selekce, které jsme se rozhodli využít i pro konstrukci kmenů Cbf11-TAP, respektive Cbf11DBM-TAP.

5.1.3.1.1 Přístup I – analogie konstrukce Cbf12DBM-TAP – neúspěšný přístup

Pro druhý krok integrace jsem využila kmen MaP180, který vytvořila Dr. Oravcová (9.2). V tomto kmeni je část otevřeného čtecího rámce proteinu Cbf11 nahrazena genem *ura4* (genotyp: *cbf11::ura4⁺*). Podmínky transformace a následné selekce jsem zachovala stejné, jako při úspěšné konstrukci kmene Cbf12DBM-TAP (5.1.2.2.3). Jako templát pro homologní rekombinaci jsem použila plazmid pMaP27, který nese část sekvence genu *cbf11*, sekvenci kódující TAP-tag a sekvenci 3'UTR. Plazmid jsem pro účely transformace štěpila dvojicí restričních endonukleáz SalI a EcoO109I. Kolonie narostlé po transformaci jsem ověřovala pomocí PCR. K testování jsem používala páry primerů MaP127+MP28, MaP169+MaP191 nebo MaP169+MP28. Otestovala jsem 160 monoklonií, ale ani u jedné z nich nedošlo k požadované homologní rekombinaci.

5.1.3.1.2 *Přístup II – komplementace cbf11 – neúspěšný přístup*

Výchozí kmen pro druhý krok integrace (MaP180) postrádá funkční protein Cbf11. Je možné, že jeho nepřítomnost je příčinnou problémů s rekombinací (6.1). Rozhodli jsme se proto gen *cbf11* komplementovat.

Do kmene MaP180 jsem transformovala plazmid pJR07 podle protokolu 4.2.3. Plazmid pJR07 kóduje HA-tagem značený protein Cbf11 a nese gen *LEU2* zajišťující leucinovou prototrofii. Selekcce po transformaci probíhala na médiu EMM+A. Vytvořila jsem tedy kmen, ve kterém je endogenní *cbf11* částečně nahrazen markerovým genem *ura4* a ve kterém se protein Cbf11 produkuje z plazmidu. Tento kmen byl pojmenován MaP199 a použila jsem ho jako výchozí kmen pro druhý integrační krok.

Provedla jsem druhý krok integrace, přičemž parametry transformace a selekce byly opět shodné s parametry uvedenými v kapitole 5.1.2.2.3. Do kmene MaP199 jsem transformovala plazmid pMaP11 štěpený restrikcí endonukleázami SalI a EcoO109I. Plazmid pMaP11 sloužil jako templát pro homologní rekombinaci; v sekvenci genu *cbf11* nese mutaci DBM. Pomocí metody PCR jsem testovala 163 kolonií. Využívala jsem pár primerů MaP127+MP28. U všech testovaných kolonií jsem detekovala přítomnost genu *ura4* v chromozomálním lokusu *cbf11*. Ani komplementace genu *cbf11* tedy nevedla k úspěchu.

5.1.3.2 *Využití systému CRISPR/Cas9 pro konstrukci kmenů Cbf11-TAP a Cbf11DBM-TAP*

Pomocí dvoukrokového integračního systému se nám bohužel nepodařilo vytvořit požadované kmeny. Rozhodli jsme se proto přejít na nový systém – systém CRISPR/Cas9 – který nebyl doposud v naší laboratoři zaveden.

Systém CRISPR/Cas představuje adaptivní imunitní systém bakterií a archeí (Sorek *et al.* 2013). Byly identifikovány tři typy tohoto systému, přičemž metoda CRISPR/Cas9 je odvozena od typu II, který zajišťuje obranu proti invadující DNA u bakterií. Systém CRISPR/Cas9 je v dnešní době hojně využívanou metodou molekulární biologie, jelikož je to nástroj umožňující specifickou a efektivní editaci genomu (Terns & Terns 2014). Technologie je založena na endonukleázové aktivitě proteinu Cas9, který je naváděn pomocí molekuly RNA, tzv. sgRNA („single guide RNA“), na místo své činnosti. Tam dochází k vytvoření dvouřetězcového zlomu (DSB), který může být opraven buď dráhou NHEJ („non-homologous end joining“), nebo v případě přítomnosti vhodného templátu dráhou HDR („homology directed repair“).

Metoda CRISPR/Cas9 se používá u celé řady modelových organismů. U kvasinky *S. pombe* byl však tento systém zaveden teprve nedávno (Jacobs *et al.* 2014).

5.1.3.2.1 Vyzkoušení systému CRISPR/Cas9

Abych ověřila, že v našich laboratorních podmínkách systém CRISPR/Cas9 funguje, rozhodla jsem se ho nejprve vyzkoušet v jednoduchém experimentálním uspořádání. Z repozitáře plazmidů Addgene (Kamens 2015) jsme objednali publikované plazmidy pMZ374 a pMZ288 (Jacobs *et al.* 2014). Oba plazmidy nesou sekvenci kódující endonukleázu Cas9 a plazmid pMZ288 nese navíc sekvenci sgRNA, která cílí enzym Cas9 do genu *ade6*. Do kvasinkového kmene JB710 postrádajícího endogenní *ura4* jsem vnesla pMZ374, respektive pMZ288. Selektce proběhla na základě uracilové prototrofie, jelikož oba plazmidy obsahují markerový gen *ura4*. Postupovala jsem podle protokolu 4.2.2.1 a parametry transformace byly následující:

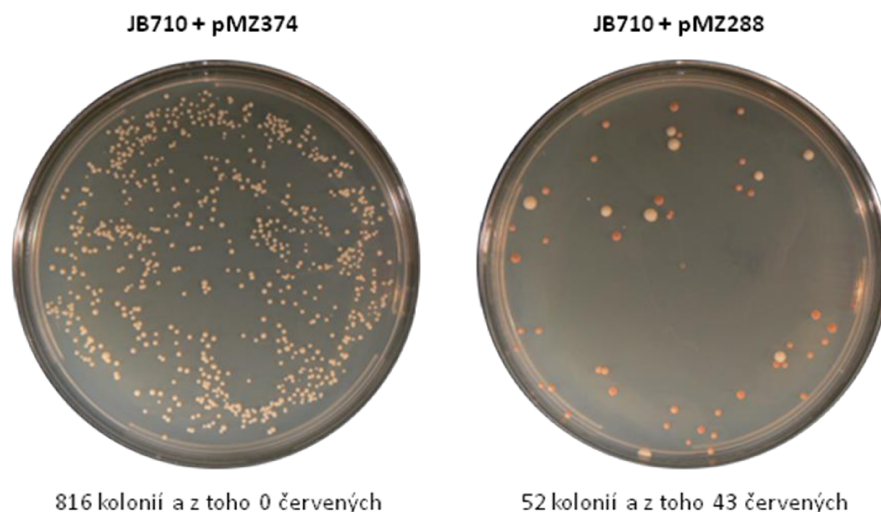
- kmen *S. pombe* kultivován v médiu YES na OD 0,5
- jako transformující DNA použít 1 µg pMZ374, respektive pMZ288
- vyseto rovnou na selekční médium – EMM+A(10 mg/l).

Transformace pMZ374 do JB710 (dále JB710+pMZ374) představovala kontrolní uspořádání, které odráželo úspěšnost transformace. Plazmid pMZ374 je pro buňky „neškodný“ – endonukleáza Cas9 je sice exprimována, nicméně kvůli nepřítomnosti sgRNA není naváděna na cílovou sekvenci v genomu, kde by způsobila dvouřetězcový zlom. V případě transformace pMZ288 do kmene JB710 (dále JB710+pMZ288) je protein Cas9 specificky naváděn pomocí sgRNA do genu *ade6*, kde vytváří DSB. Jelikož jsem buňkám neposkytla žádný templát pro opravu zlomu homologní rekombinací, přežijí jen takové buňky, ve kterých:

- došlo k mutaci cílové sekvence v genomu vlivem činnosti Cas9 a oprav DSB – mutovaná sekvence již není rozeznávána komplexem Cas9-sgRNA a nedochází tedy ke vzniku DSB, který by vedl k buněčné smrti;
- došlo k mutaci v sgRNA, čímž je zabráněno specifické interakci s cílovou sekvencí;
- došlo k mutaci způsobující nefunkčnost endonukleázy Cas9.

Po transformaci pMZ288 do JB710 narostlo na selekční plotně cca 16krát méně monoklonií než v kontrolním uspořádání, přičemž většina z kolonií byla červeně zabarvená (Obr. 15). Snížení počtu narostlých kolonií v případě JB710+pMZ288 oproti

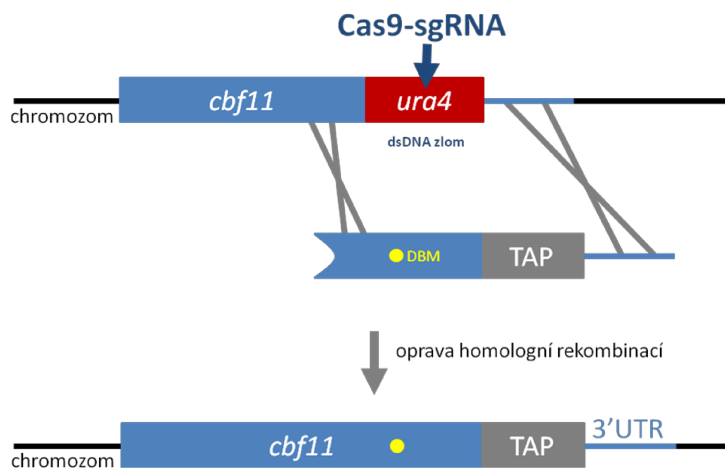
JB710+pMZ374 odráží fakt, že endonukleáza Cas9 svou činností opravdu způsobuje vznik dvouřetězcových zlomů, které v řadě případů vedou k buněčné smrti. Gen *ade6* kóduje enzym fosforibozylaminoimidazolkarboxylázu, který hraje roli v *de novo* syntéze adeninu. Defekty v genu *ade6* vedou k akumulaci intermediátu fosforibozylaminoimidazolu, který je následnou oxidací přeměněn na barevný produkt. Pokud jsou takové buňky kultivovány na médiu s nízkým obsahem adeninu, pozorujeme červeně zabarvené kolonie (Chaudhuri *et al.* 1997). Vzhledem k tomu, že v případě JB710+pMZ288 byla většina narostlých kolonií červená, můžeme tvrdit, že v rámci oprav DSB, které byly specificky vytvářeny činností komplexu Cas9-sgRNA, došlo k mutacím v cílové sekvenci genu *ade6*. Enzym Cas9 byl tedy specificky naváděn do genu *ade6*. Tímto experimentem jsem ověřila, že systém CRISPR/Cas9 v našich laboratorních podmínkách funguje.



Obr. 15: Vyzkoušení systému CRISPR/Cas9. Kmen JB710 byl transformován pMZ374, respektive pMZ288. 100 μ l transformační směsi bylo vyseto na selekční plotnu EMM s malým přídatkem adeninu (10 mg/l). Plotny jsou foceny 8. den inkubace ve 32°C.

5.1.3.2.2 *Přístup I – výchozí kmen o genotypu $cbf11::ura4^+$ – neúspěšný přístup*

Navrhli jsme postup, jakým by bylo možno získat požadované kmeny pomocí systému CRISPR/Cas9 (Obr. 16).



Obr. 16: Schéma konstrukce kmenů Cbf11/Cbf11DBM-TAP metodou CRISPR/Cas9 – přístup I. Gen *ura4* nacházející se v chromozomálním lokusu genu *cbf11* bude za pomoci sgRNA rozpoznán endonukleázou Cas9. Dojde k vytvoření dvouřetězcového zlomu v oblasti genu *ura4*. Pokud buňce poskytneme vhodný templát, zlom bude opraven skrze homologní rekombinaci.

Kmen o genotypu *cbf11::ura4*⁺ jsme již měli vytvořený (MaP180). Pomocí online nástroje E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>) jsem navrhla 20nukleotidovou cílovou sekvenci v genu *ura4*, která má být rozpoznána endonukleázou Cas9 (9.3). Měli jsme k dispozici plazmid pMZ374 kódující endonukleázu Cas9. Do plazmidu tedy zbývalo zaklonovat inzert představující sgRNA proti genu *ura4*.

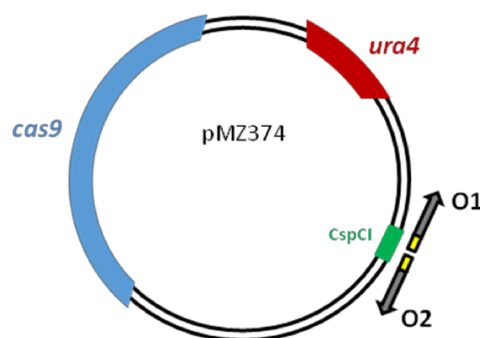
Neúspěšné zaklonování sgRNA proti *ura4*

Připravila jsem fosforylovaný duplex oligonukleotidů AJ01 a AJ02. Tento inzert představující sgRNA proti *ura4* měl být zaklonován do pMZ374. Strategie klonování je založena na restriční endonukleáze CspCI (Jacobs *et al.* 2014). Činností CspCI dojde k vyštěpení 36nukleotidového fragmentu z pMZ374 a do takto otevřeného plazmidu může být zaklonován inzert. Během mé práce na konstrukci plazmidu se však v rámci komunity pracující s *S. pombe* ukázalo, že některé šarže CspCI štěpí neefektivně. Pokusila jsem se vypořádat s touto komplikací. Plazmid pMZ374 jsem podrobila štěpení enzymem CspCI a z gelu jsem izolovala pouze frakci odpovídající naštěpenému plazmidu. Do takto získaného otevřeného plazmidu pMZ374 jsem provedla ligaci inzertu (4.3.12.1) a ligační směsí jsem transformovala *E. coli*. Z několika nezávislých kolonií jsem vyizolovala plazmidovou DNA a restričně ji ověřila. Využila jsem dvojici restričních endonukleáz BamHI a XhoI. Očekávané velikosti fragmentů byly 5487 bp, 3742 bp, 1538 bp a 603 bp. Pokud by nedošlo k zaklonování inzertu, velikost největšího

fragmentu by byla 5501 bp. 14nukleotidový rozdíl velikostí však u takto velkého fragmentu v agarózovém gelu opticky nerozliším. Restrikčním štěpením jsem proto pouze ověřila, že se jedná o plazmidy odvozené od pMZ374. Ne/přítomnost inzertu jsem nechala u 6 klonů ověřit sekvenací. Žádný z klonů však inzert neobsahoval. Je pravděpodobné, že vyzolovaná frakce otevřeného plazmidu obsahovala i molekuly nenaštěpeného plazmidu. Je také možné, že neefektivní činností enzymu CspCI byl plazmid pMZ374 štěpen pouze v jednom restrikčním místě namísto ve dvou, čímž byl sice linearizován, nicméně nemohlo dojít k produktivnímu zaklonování inzertu. Jelikož firma New England Biolabs je jediným poskytovatelem této restrikční endonukleázy, představovala nefunkčnost enzymu velký problém pro všechny, kteří využívali systém CRISPR/Cas9 u *S. pombe* (Rodríguez-López *et al.* 2016).

Úspěšné zaklonování sgRNA proti *ura4*

Bylo nutné obejít problémy spojené s nefunkčností enzymu CspCI a zaklonovat inzert představující sgRNA proti *ura4* do plazmidu pMZ374 alternativním způsobem. Dr. María Rodríguez-López z laboratoře Dr. Jürge Bählera (Research Department of Genetics, Evolution and Environment, University College London, Londýn) pracovala na nové strategii zaklonování sgRNA pomocí PCR. Ohotně nám poskytla informace a my jsme dle jejího návodu novou strategii vyzkoušeli (Obr. 17).



Obr. 17: Klonování sgRNA do pMZ374 pomocí PCR. Nová strategie klonování je založena na amplifikaci plazmidu pMZ374 s využitím oligonukleotidů O1 a O2. Oba oligonukleotidy jsou tvořeny 10 nukleotidy (tj. polovinou) vkládané sekvence sgRNA (vyznačeno žlutě) a 32 nukleotidy komplementárními k sekvenci plazmidu (šedivě) vně CspCI klonovacího místa (zeleně). Restrikční místo CspCI bylo nutné pro původní strategii klonování, v tomto případě je potřeba ho odstranit, aby bylo docíleno produkce funkční sgRNA. Černé soustředné kruhy znázorňují kostru pMZ374, modře je pro ilustraci vyznačena sekvence kódující endonukleázu Cas9, červeně sekvence markerového genu *ura4*.

Sekvenci sgRNA proti genu *ura4* jsem rozdělila do dvou oligonukleotidů – AJ03 a AJ04. S využitím těchto oligonukleotidů jsem amplifikovala celý plazmid pMZ374. PCR produkt jsem přečistila (4.3.9.2) a fosforylovala jeho 5'-konce. Ligací tupých

konců (4.3.12.2) jsem fragment cirkularizovala a transformovala jím *E. coli*. Z 18 klonů jsem vyizolovala plazmidovou DNA; v 6 případech jsem restrikcí štěpením (BamHI+XhoI) potvrdila, že se jedná o plazmidy odvozené od pMZ374. Jak již uvádím výše, restrikcí štěpením nelze prokázat, zda došlo k zaklonování inzertu, to je třeba ověřit sekvenací. U žádného z 6 klonů nebyla sekvenací prokázána přítomnost intaktního inzertu. U všech klonů chybělo v oblasti inzertu vždy několik nukleotidů; pravděpodobně vlivem 5'→3' exonukleázové aktivity polymerázy Q5. Rozhodli jsme se, že s využitím oligonukleotidů AJ03 a AJ04 amplifikujeme namísto plazmidu pMZ374 plazmid, u kterého byla sekvenací prokázána přítomnost téměř celého inzertu. V oblasti inzertu chyběly jen 4 nukleotidy odpovídající 2 nukleotidům z 5'-konce AJ03 a 2 nukleotidům z 5'-konce AJ04. Další postup byl shodný s postupem popsáním pro templát pMZ374. U jednoho klonu z 15 testovaných byla sekvenací ověřena přítomnost intaktního inzertu. Tento plazmid obsahující sgRNA cílenou do genu *ura4* byl označen pMP132.

Neúspěšná konstrukce kmene Cbf11-TAP

Do kmene MaP180 jsem společně transformovala: a) plazmid pMP132 (Cas9, sgRNA proti *ura4*), b) plazmid pMaP27 naštěpený pomocí Sall a EcoO109I (*cbf11-TAP*; templát pro HDR). Postupovala jsem podle metody 4.2.2.1, parametry transformace byly následující:

- kmen *S. pombe* kultivován v médiu YES na OD 0,5
- použít 1 µg pMP132, 30 µg pMaP27
- neselekční médium – PMG+A+L+U
- selekční médium – PMG+A+L+U+FOA, 2x přetiskáno.

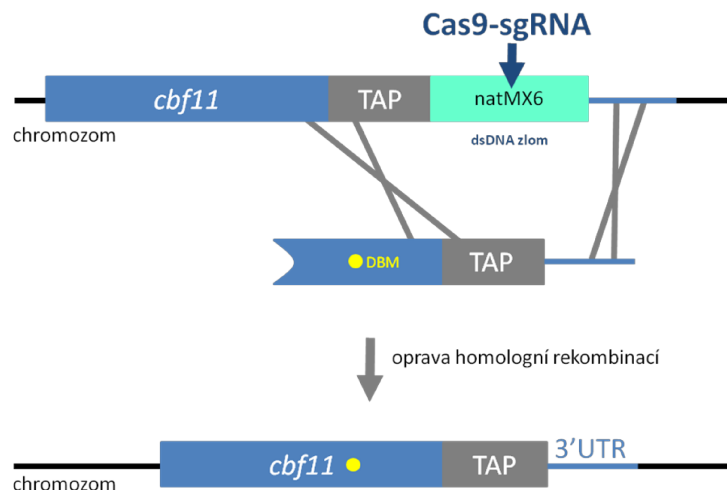
Monokolonie narostlé po transformaci na selekčním médiu jsem podrobila testování pomocí PCR. S využitím primerů MaP127+MP28 a MaP169+MP28 jsem zjistila, že u žádného z testovaných klonů neproběhla integrace homologní rekombinací. Požadovaný kmen se mi připravit nepodařilo.

V průběhu konstrukce se vyskytly pochybnosti o kmeni MaP180, do kterého byla prováděna transformace. Byl totiž schopen růst na médiu s 5-FOA, přestože by měl být Ura⁺. Genotypizací pomocí PCR s použitím primerů MaP127+MP28 jsem znovu ověřila, že se v chromozomálním lokusu genu *cbf11* nachází gen *ura4*. Testovala jsem schopnost růstu kmene na médiu bez uracilu (EMM+A+L). Na tomto médiu buňky

rostly; sice velmi pomalu, ale rostly. Z kmene MaP180 jsem vyselektovala 2 klony, pojmenované MP558 a MP559, které na médiu bez uracilu rostly a které byly genotypu *cbf11::ura4⁺*. Testovala jsem jejich schopnost růstu na médiu s 5-FOA. I tyto klony však rostly v přítomnosti 5-FOA. Vzhledem k faktu, že kmen MaP180 a i klony od něj odvozené vykazovaly rozporuplné chování, museli jsme upustit od tohoto uspořádání experimentu.

5.1.3.2.3 Přístup II – výchozí kmen o genotypu *cbf11-TAP-natMX6* – úspěšná konstrukce kmene *Cbf11-TAP*

Navrhli jsme nový přístup, jakým lze pomocí systému CRISPR/Cas9 získat kmen *Cbf11-TAP*, respektive *Cbf11DBM-TAP* (Obr. 18).



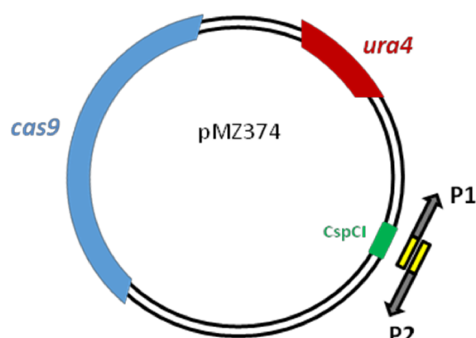
Obr. 18: Schéma konstrukce kmenů *Cbf11/Cbf11DBM-TAP* metodou CRISPR/Cas9 – přístup II. Vycházíme z kmene, ve kterém je za sekvenci genu *cbf11* připojena sekvence kódující TAP-tag a sekvence kazety *natMX6* (*cbf11-TAP-natMX6*). Endonukleázu Cas9 zacílíme s využitím sgRNA do kazety *natMX6*, kde bude její činností vytvořen dvojřetězcový zlom. Poskytneme buňce vhodný templát, podle kterého bude moci být zlom opraven skrze homologní rekombinaci.

Výchozí kmen pro konstrukci jsme měli v laboratoři k dispozici. Jedná se o kmen MP15 nesoucí alelu *cbf11-TAP-natMX6*. Kazeta *natMX6* způsobuje rezistenci kmene vůči antibiotiku nourseothricin. Skládá se ze tří oblastí – TEF promotorové sekvence (TEF_P), sekvence kódující nourseothricinacetyltransferázu (NAT) a TEF terminátorové sekvence (TEF_T). V každé oblasti jsem navrhla cílovou sekvenci, která má být rozpoznána komplexem Cas9-sgRNA (9.4).

Neúspěšné zaklonování sgRNA proti *natMX6*

Způsob klonování sgRNA do plazmidu kódujícího Cas9 podle Dr. Rodríguez-López (Obr. 17) byl sice úspěšný, nicméně málo efektivní. Rozhodli jsme se proto pro

zaklonování sgRNA proti natMX6 do plazmidu pMZ374 vyzkoušet nově popsany postup – viz informace k pMZ374 v repozitáři plazmidů Addgene (https://media.addgene.org/data/plasmids/59/59896/59896-attachment_3qcYwKY_bSG-.pdf; „Rapid single fragment method“). Strategie klonování byla založena na metodě PCR s využitím překrývajících se primerů (Obr. 19).



Obr. 19: Klonování sgRNA do pMZ374 pomocí PCR s využitím překrývajících se primerů. Pro zaklonování sgRNA je potřeba plazmid pMZ374 amplifikovat pomocí PCR s využitím oligonukleotidů P1 a P2. Oba oligonukleotidy jsou tvořeny 20 nukleotidy představujícími celou sekvenci vkládané sgRNA (vyznačeno žlutě) a sekvencí (20 nukleotidů v případě P1, 19 nukleotidů v případě P2) komplementární k sekvenci plazmidu (šedivě) vně CspCI klonovacího místa (zeleně). Na obrázku je dále schematicky znázorněna kostra pMZ374 (černé soustředné kruhy), sekvence kódující Cas9 (modře) a sekvence markerového genu *ura4* (červeně).

Navrhla jsem dvojice oligonukleotidů AJ05+AJ06, AJ07+AJ08 a AJ09+AJ10. Pouze pomocí oligonukleotidů AJ09+AJ10, které obsahovaly sekvenci sgRNA cílenou do oblasti TEF_T, se mi podařilo amplifikovat plazmid pMZ374. PCR směsí jsem rovnou transformovala *E. coli*. Plazmidovou DNA ze čtyř narostlých monoklonií jsem otestovala pomocí restriční štěpení a pomocí sekvenace. Ani u jednoho z klonů nedošlo k zaklonování sgRNA proti TEF_T.

Úspěšné zaklonování sgRNA proti natMX6 a úspěšná konstrukce kmene Cbf11-TAP

Metoda klonování sgRNA s využitím překrývajících se primerů (Obr. 19) se mi neosvědčila. Naštěstí brzy poté byl publikován metodický článek z laboratoře Dr. Bählera popisující efektivní zaklonování sgRNA do plazmidu kódujícího Cas9 (Rodríguez-López *et al.* 2016). Strategie klonování je shodná se mnou již vyzkoušeným přístupem (Obr. 17), nicméně autoři dále optimalizovali podmínky PCR reakce nutné k efektivnějšímu zaklonování sgRNA a také optimalizovali podmínky transformace,

kteře vedly k celkovému zvýšení efektivity systému CRISPR/Cas9 u *S. pombe*. Na základě publikovaného protokolu jsem úspěšně zkonstruovala kmen Cbf11-TAP.

Sekvence představující jednotlivé sgRNA cílené proti kazetě natMX6 jsem rozdělila vždy do dvou oligonukleotidů – AJ11+AJ12 (sgRNA proti TEF_P), AJ13+AJ14 (sgRNA proti NAT) a AJ15+AJ16 (sgRNA proti TEF_T). Každý z oligonukleotidů byl tvořen polovinou sekvence sgRNA a 32 nukleotidy komplementárními k sekvenci plazmidu. Navržených oligonukleotidů jsem využila k amplifikaci plazmidu pMZ374 (složení reakční směsi: viz Tab. 10 – High fidelity PCR; PCR program: viz Tab. 12 – program D). PCR produkty jsem přečistila (4.3.9.3) a fosforylovala jejich 5'-konce (4.3.11.2). Provedla jsem ligaci tupých konců (4.3.12.3) a cirkularizovaným plazmidem jsem transformovala *E. coli*. Z 20 bakteriálních monoklonií jsem vyizolovala plazmidovou DNA a podrobila ji testování. Restrikčními endonukleázami BamHI a XhoI jsem u 12 klonů ověřila, že se jedná o plazmidy odvozené od pMZ374. Přítomnost inzertu, tj. vložené sekvence sgRNA, jsem u těchto 12 klonů nechala ověřit sekvenací. Ze sekvenačních dat vyplynulo, že se podařilo zaklonovat všechny tři druhy sgRNA do plazmidu pMZ374. Přítomnost sgRNA proti TEF_P byla potvrzena u 1 ze 3 sekvenovaných klonů, proti NAT u 3 klonů z 5 sekvenovaných a proti TEF_T u 4 ze 4 sekvenovaných klonů. Plazmid nesoucí sgRNA proti TEF_P je označen pMP134, plazmidy se zaklonovanou sgRNA proti NAT jsou označeny pMP135–7 a plazmidy se zaklonovanou sgRNA proti TEF_T nesou název pMP138–141.

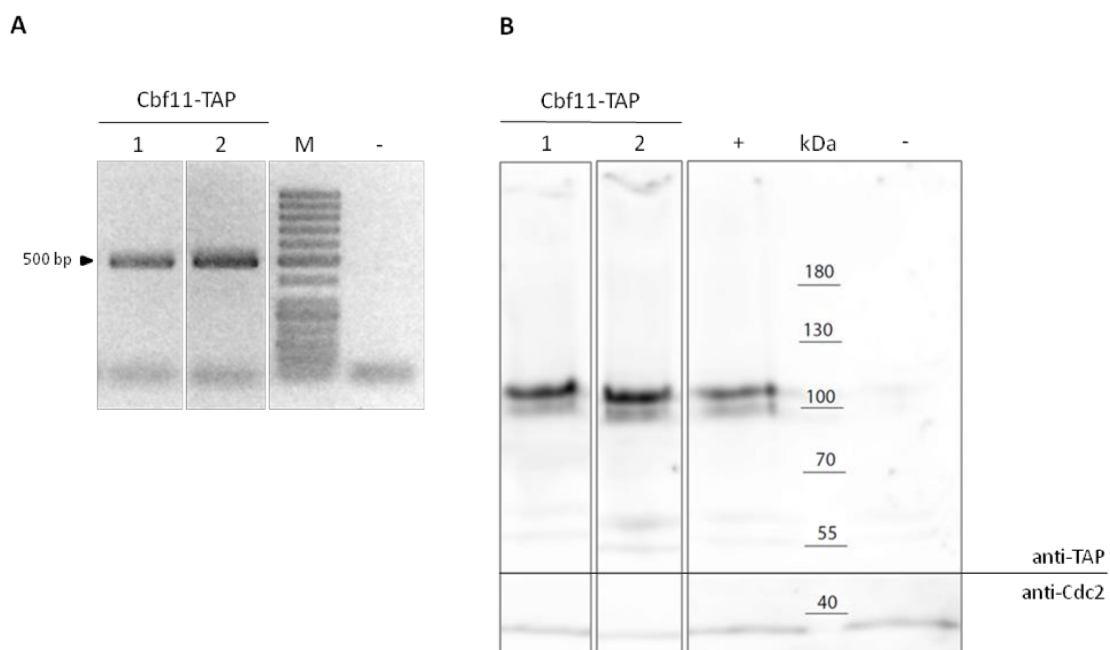
Za běžných kultivačních podmínek se většina exponenciálně rostoucích buněk *S. pombe* nachází v G2 fázi buněčného cyklu s obsahem DNA 2C. Aby tedy došlo k úspěšné editaci genomu metodou CRISPR/Cas9, musí dojít k modifikaci obou dvou kopií DNA. Bylo prokázáno, že k efektivnější editaci genomu dochází v buňkách nacházejících se v G1 fázi, ve kterých je obsah DNA 1C a stačí tedy upravit pouze jednu kopii DNA. Ke zvýšení efektivity celého systému dále přispívá, pokud jsou buňky před vlastní transformací kryoprezervovány (Rodríguez-López *et al.* 2016), jelikož přítomnost kryoprotektivní látky zvyšuje efektivitu transformace (Suga & Hatakeyama 2005).

Kmen MP15 jsem hladověním na dusík synchronizovala v G1 fázi buněčného cyklu a následně jej zamrazila (4.1.4). Do takto připravených buněk jsem společně transformovala:

- plazmid pMP134/pMP136/pMP138 kódující Cas9 a sgRNA proti TEF_P/NAT/TEF_T,

- plazmid pMaP27 naštěpený restrikcí endonukleázami Sall a EcoO109I (*cbf11-TAP*; templát pro HDR).

Postupovala jsem dle protokolu (4.2.4). Expres enzymu Cas9 je pro buňky toxická (Jacobs *et al.* 2014), a proto bylo potřeba monokolonie narostlé po transformaci na selekční plotně přečarovat na neselekční médium YES. Zde dojde ke spontánní ztrátě plazmidu, protože již nepůsobí selekční tlak nutný k jeho udržení. Pro přečarování na neselekční médium jsem vybírala nejmenší monokolonie, jelikož právě ty jsou dle metodického článku nejpravděpodobnějšími integranty (Rodríguez-López *et al.* 2016). U 47 monoklonií jsem pomocí PCR ověřovala, zda došlo k integraci templátového fragmentu do genomu. K tomuto účelu jsem opět zvolila kombinaci primerů MaP169+MP28. V 7 případech jsem detekovala signál integrace (14,9% úspěšnost). Schopnost exprese proteinu Cbf11-TAP jsem potvrdila u šesti ze sedmi testovaných klonů. Bezchybnost sekvence manipulovaného lokusu jsem u dvou klonů ověřila sekvenací. Vytvořené kmeny Cbf11-TAP byly pojmenovány MP571 a MP574 a jejich ověření pomocí PCR a metody western blot zachycuje Obr. 20. Kmen MP571 a MP574 se podařilo připravit s využitím sgRNA cílené do sekvence NAT, respektive TEF_P kazety natMX6.

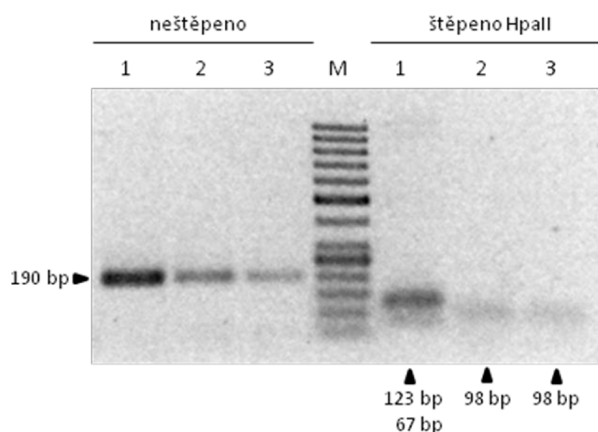


Obr. 20: Ověření kmene Cbf11-TAP. Číslem 1 je označen kmen MP571 a číslem 2 kmen MP574. (A) Ověření pomocí PCR. Beztemplátová reakce sloužila jako negativní kontrola (-). S využitím páru primerů MaP169+MP28 bylo potvrzeno, že došlo k integraci templátového fragmentu do chromozomu (amplikon 500 bp). Genomická DNA byla izolována rychlou metodou. Produkty PCR byly elektroforeticky rozděleny v 2% agarózovém gelu. Jako standard velikostí (M) byl využit GeneRuler 50 bp DNA Ladder.

(B) Ověření pomocí WB. Pro experiment byly použity nativní lyzáty buněk. Kmen divokého typu JB32 sloužil jako negativní kontrola (-), kmen MP15 jako kontrola pozitivní (+). Pro detekci TAP-tagem označeného proteinu Cbf11 byla využita protilátka anti-TAP (Thermo Scientific). Pozorované dva proužky představují dvě izoformy proteinu Cbf11-TAP. Detekce proteinu Cdc2 sloužila jako nanášková kontrola.

Neúspěšná konstrukce kmene Cbf11DBM-TAP

Analogickým způsobem, kterým byl úspěšně připraven kmen Cbf11-TAP, jsem se pokusila zkonstruovat jeho DBM variantu. Do kmene MP15 synchronizovaného v G1 fázi jsem transformovala plazmid pMP134, respektive pMP136; pomocí těchto plazmidů se mi podařilo připravit kmen Cbf11-TAP, a proto jsem je zvolila i v tomto případě. Plazmid pMaP11 naštěpený restrikcími endonukleázami Sall a EcoO109I jsem použila jako templát pro opravu dvouřetězcového zlomu. Kromě sekvencí nutných pro homologní rekombinaci obsahuje mutaci DBM v sekvenci genu *cbf11*. Metodou PCR jsem otestovala 86 monoclonií na přítomnost integrace. K testování jsem opět použila pár primerů MaP169+MP28. Pouze u jedné z monoclonií jsem detekovala signál značící integraci fragmentu *cbf11DBM-TAP* do chromozomu (1,2% úspěšnost). Dále bylo potřeba ověřit, zda je přítomna mutace DBM. Pomocí páru primerů MP53+MP54 jsem amplifikovala oblast, kde by se měla nacházet DBM. PCR produkt jsem štěpila restrikcí endonukleázou HpaII. Přítomnost mutace DBM způsobí zánik jednoho ze dvou restrikcími míst nacházejících se v amplifikovaném úseku. Z elektroforetické analýzy vyplynulo, že testovaný klon neobsahuje mutaci DBM (Obr. 21). K homologní rekombinaci tedy došlo v úseku za výskytem DBM. Kmen Cbf11DBM-TAP se prozatím připravit nepodařilo.



Obr. 21: Ověřování ne/přítomnosti DBM v kandidátním klonu. Vlevo: amplifikace úseku ne/obsahujícího DBM za využití páru primerů MP53+MP54 (amplikon 190 bp). Vpravo: štěpení PCR produktu restrikcí endonukleázou HpaII. Číslem 1 je označen vzorek, který slouží jako pozitivní kontrola – obsahuje DBM (pMaP11). Číslem 2 je označen testovaný vzorek (klon, u kterého byla prokázána integrace templátového fragmentu do chromozomu). Číslem 3 je označen vzorek sloužící jako

negativní kontrola – neobsahuje DBM (MP571). Očekávaná velikost fragmentů po štěpení HpaII v případě přítomnosti DBM – 123 bp, 67 bp; v případě nepřítomnosti DBM – 98 bp, 67 bp, 25 bp. Z elektroforetické analýzy vyplývá, že testovaný klon neobsahuje mutaci DBM. Na gelu vidíme pouze fragment o největší velikosti, tj. 98 bp. PCR produkty a fragmenty po štěpení byly separovány v 2% agarózovém gelu. Jako standard velikostí (M) byl využit GeneRuler 50 bp DNA Ladder.

5.2 Fenotypizace vytvořených kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP

Vytvořené kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP jsme vystavili několika podmínkám a charakterizovali jsme jejich fenotypy. Nejprve jsme studovali rychlost růstu. Poté jsme se zaměřili na proces adhezivity a odpovědi na genotoxický stres, tedy na procesy, ve kterých se protein Cbf12 angažuje. Fenotyp kmene Cbf12DBM-TAP jsme vždy porovnávali s jeho nemutovaným protějškem, dále s kmenem postrádajícím gen *cbf12* ($\Delta cbf12$; MP21) a pro kontrolu i s kmenem divokého typu (*wt*; JB32). Pokud se kmen Cbf12DBM-TAP choval jako kmen s delecí genu *cbf12*, znamenalo to, že fungování proteinu Cbf12 ve studovaném procesu je závislé na intaktní DNA-vazebné doméně a je pravděpodobně podmíněno schopností přímé vazby Cbf12 na kanonický/alternativní motiv v sekvenci DNA. Pokud se naopak kmen Cbf12DBM-TAP choval za studovaných podmínek jako kmen s neporušenou DNA-vazebnou aktivitou, usoudili jsme, že pro tento proces není vyžadována kanonická přímá vazba proteinu Cbf12 na DNA. Protein Cbf12 by zde mohl fungovat jako transkripční faktor rozeznávající cílové sekvence skrze další DNA-vazebné partnery, nebo by vůbec nemusel mít roli transkripčního regulátoru.

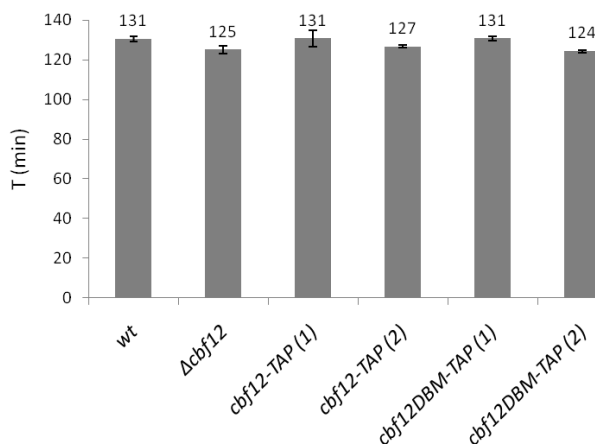
Od genotypu Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP máme k dispozici vždy dva nezávislé prototrofní klony, které jsou dále označovány číslem 1 a 2. Co se týče Cbf12-TAP, číslem 1 je vždy označován klon MP540 a číslem 2 klon MP541. V případě Cbf12DBM-TAP je číslem 1 označován klon MP518 a číslem 2 klon MP519.

5.2.1 Vliv DBM varianty proteinu Cbf12 na rychlost růstu kultury

U zkonstruovaných prototrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP jsme nejprve zkoumali rychlost jejich růstu. Neočekávali jsme, že by rychlost růstu byla ovlivněna vnesením mutace DBM do otevřeného čtecího rámce genu *cbf12*, jelikož ani delece genu *cbf12* nemá negativní dopad na rychlost růstu (Převorovský *et al.* 2009). Tuto hypotézu však bylo potřeba ověřit.

K měření rychlosti růstu kultur jsem využila spektrofotometr Varioskan Flash. Provedla jsem tři nezávislá měření, přičemž každé biologické opakování zahrnovalo

technické duplikáty testovaných kmenů. Z exponenciálního intervalu růstových křivek jsem pro každý kmen vypočítala dobu zdvojení (Obr. 22). Kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP vykazovaly srovnatelnou dobu zdvojení kultury jako kmeny *wt* a Δ *cbf12*. Rychlost růstu tedy není ovlivněna genetickými manipulacemi lokusu genu *cbf12*.

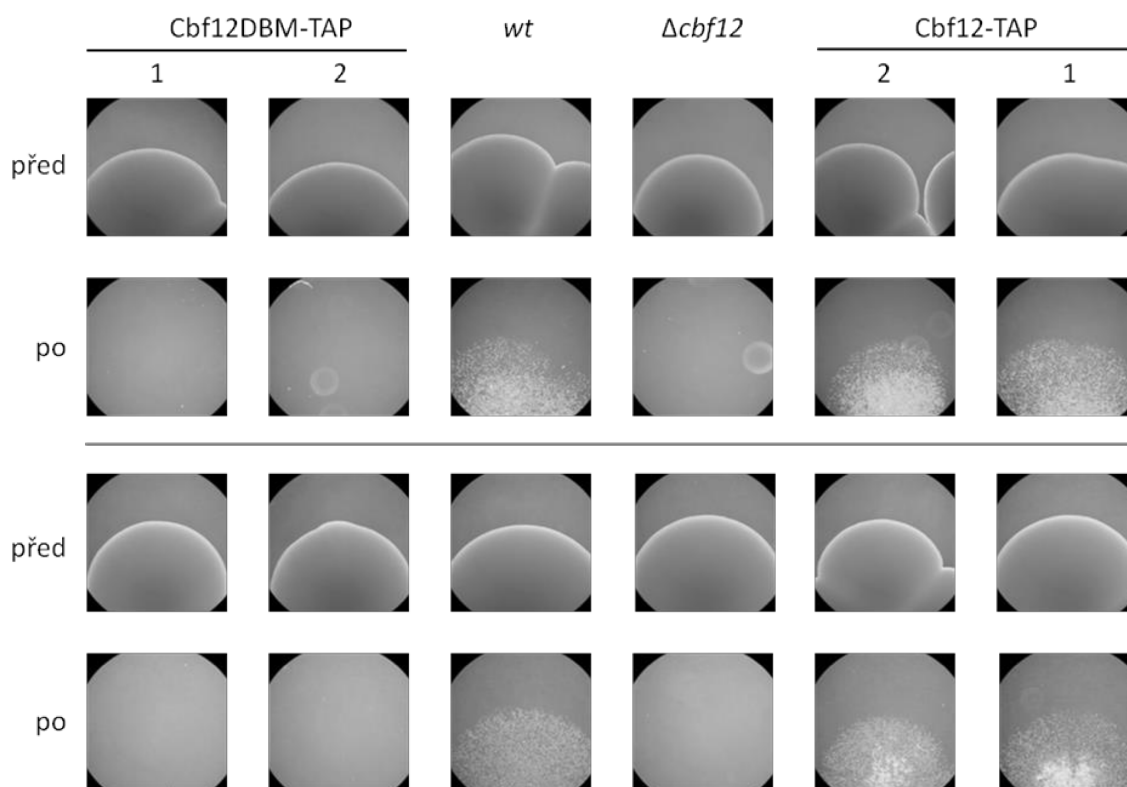


Obr. 22: Doba zdvojení (T) testovaných prototrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP. Uvedené hodnoty jsou průměrem tří biologických opakování \pm směrodatná odchylka.

5.2.2 Vliv DBM varianty proteinu Cbf12 na buněčnou adhezi

Již dříve bylo v naší laboratoři zjištěno, že protein Cbf12 hraje roli jako pozitivní regulátor buněčné adheze. Schopnost buněk přilnout k agaru je narušená u buněk postrádajících gen *cbf12* (Převorovský *et al.* 2009). Zkoumali jsme proto vliv mutace DBM na proces adhezivitu.

Ke studiu buněčné adheze jsem využila tzv. omývací test, kterému byly podrobeny kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP (Obr. 23). Oba zástupci o genotypu Cbf12-TAP se chovali stejně jako kontrolní kmen divokého typu – k částečnému odmytí buněčné masy došlo, ale určitá frakce buněk zůstala přilnutá k agaru. Naopak buňky nesoucí mutaci DBM vykazovaly stejný fenotyp jako buňky postrádající gen *cbf12* – z povrchu pevného média byly odmyty úplně. Pro proces regulace buněčné adheze je tedy vyžadována neporušená DNA-vazebná doména proteinu Cbf12.

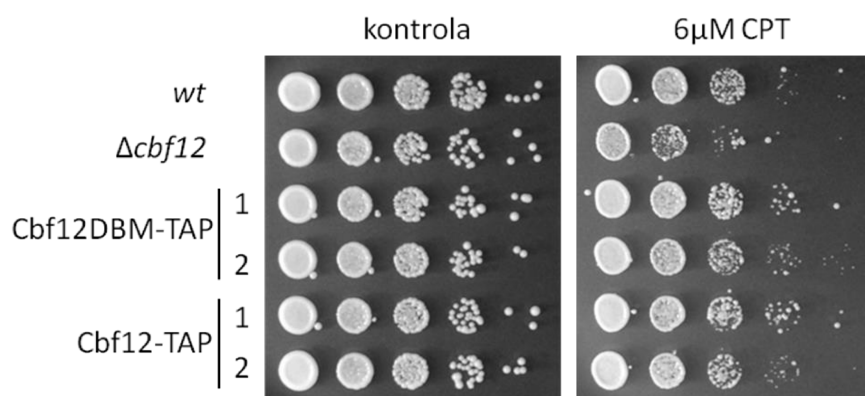


Obr. 23: Studium adhezivitu – omývací test. Obrázek dokumentuje dvě nezávislá opakování (oddělena šedivou čarou). Před = před omytím, po = po omytí. Focena hrana monokolonie; zvětšení 40x.

5.2.3 Vliv DBM varianty proteinu Cbf12 na proces udržování integrity genomu

Camptothecin je inhibitor topoizomerázy I a v konečném důsledku vede k poškození DNA (3.3.1). V naší laboratoři bylo prokázáno, že buňky s deletovaným genem *cbf12* jsou senzitivní na přítomnost CPT v médiu (Dr. Převorovský, nepublikovaná data). Protein Cbf12 tedy funguje v dráze odpovědi na genotoxický stres a podílí se na udržování integrity genomu. Otázkou bylo, zda je tato role podmíněna nemutovanou DNA-vazebnou doménou proteinu Cbf12.

Pro účely studia citlivosti kmenů na camptothecin jsem využila metodu „spot test“. Z experimentu vyplynulo, že na rozdíl od kmene Δ *cbf12*, u kterého pozorujeme snížený nárůst buněk v přítomnosti CPT, kmeny Cbf12-TAP i Cbf12DBM-TAP rostou srovnatelně s kmenem divokého typu. Přítomnost mutace DBM v proteinu Cbf12 nezapříčinila senzitivitu buněk na CPT (Obr. 24). V procesu odpovědi na genotoxický stres tudíž není potřeba, aby byla zachována schopnost kanonické přímé vazby proteinu Cbf12 na DNA.



Obr. 24: Studium citlivosti na CPT. Testované kmeny byly aplikovány v desítkové ředící řadě na médium YES (kontrola), respektive YES+6µM CPT (6µM CPT). Snímek ploten byl pořízen 3. den inkubace ve 32°C. Na obrázku je zachyceno jedno ze tří nezávislých opakování.

5.3 Studium vazby Cbf12 a jeho DBM varianty na DNA *in vivo*

V naší laboratoři byly již dříve identifikovány cílové lokusy, kam se proteiny CSL váží *in vivo*. K mapování vazebných oblastí bylo využito techniky chromatinové imunoprecipitace následované kvantifikací na microarray (ChIP-chip; Oravcová 2014), popřípadě následované sekvenováním precipitovaného materiálu (ChIP-seq; Převorovský *et al.* 2015).

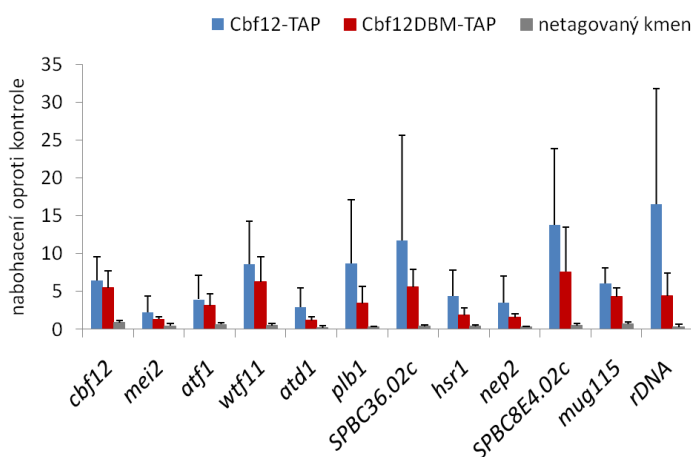
V rámci mého diplomového projektu jsme chtěli zkoumat *in vivo* vazbu proteinu Cbf12, respektive Cbf12DBM na konkrétní cílová místa. Pro vazebnou analýzu jsme se rozhodli využít metodu ChIP-qPCR, tj. techniku chromatinové imunoprecipitace a následné kvantifikace pomocí qPCR. Touto metodou Dr. Oravcová v rámci své dizertační práce nezávisle ověřovala vazbu proteinů CSL na některé cílové lokusy, které byly identifikovány pomocí celogenomových přístupů (Oravcová 2014). Cílové sekvence vybrané pro analýzu vazby Cbf12 vs. Cbf12DBM metodou ChIP-qPCR jsou uvedeny v Tab. 35.

Tab. 35: Seznam míst vybraných pro studium vazby proteinu Cbf12/Cbf12DBM na DNA metodou ChIP-qPCR. Pro analýzu byly vybrány některé vazebné úseky, které byly identifikovány metodou ChIP-chip a/nebo ChIP-seq a které byly následně vybrány pro nezávislé ověření metodou ChIP-qPCR (Oravcová 2014). Název sekvence je, kromě oblasti rDNA, odvozen od nejbližšího ORF.

| název cílové sekvence | název uvedený v (Oravcová 2014) | lokality |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| <i>cbf12</i> | | promotorová oblast genu <i>cbf12</i> |
| <i>mei2</i> | | promotorová oblast genu <i>mei2</i> |
| <i>atf1</i> | | promotorová oblast genu <i>atf1</i> |
| <i>wtf11</i> | cbf11_5 | promotorová oblast genu <i>wtf11</i> |
| <i>atd1</i> | cbf12_2 | promotorová oblast genu <i>atd1</i> |
| <i>plb1</i> | cbf12_3 | promotorová oblast genu <i>plb1</i> |
| <i>SPBC36.02c</i> | cbf12_7 | promotorová oblast genu SPBC36.02c |
| <i>hsr1</i> | cbf12_11 | promotorová oblast genu <i>hsr1</i> |
| <i>nep2</i> | cbf12_9 | promotorová oblast genu <i>nep2</i> |
| <i>SPBC8E4.02c</i> | cbf12_4 | 5'UTR/ORF genu SPBC8E4.02c |
| <i>mug115</i> | cbf12_6 | 3'UTR genu <i>mug115</i> |
| <i>rDNA</i> | | ribozomální DNA |

5.3.1 Využití auxotrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP pro studium vazby Cbf12/Cbf12DBM na DNA

Nejprve jsem pracovala s kmeny MaP183 a MaP187, tedy s kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP vytvořenými v trojitém auxotrofním pozadí. Provedla jsem čtyři biologická opakování experimentu ChIP-qPCR (ChIP_{chelex}). Testovala jsem vazbu proteinu Cbf12/Cbf12DBM na vybrané cílové lokusy (Tab. 35). V případě proteinu Cbf12DBM jsem zaznamenala nižší míru vazby na všech testovaných lokusech v porovnání s mírou vazby jeho nemutovaného protějšku (Obr. 25). Mezi jednotlivými biologickými opakováními panovala značná nekonzistentnost co do výše absolutních hodnot detekovaného signálu, což vysvětluje veliké směrodatné odchylky.



Obr. 25: ChIP-qPCR ověření vazby proteinů Cbf12 a jeho DBM varianty *in vivo* na vybrané cílové sekvence. Graf zachycuje hodnoty ChIP-qPCR signálu po normalizaci na kontrolní lokus (intergenový lokus „M40“), kde pomocí celogenomových přístupů nebyla detekována vazba proteinů CSL. Pro experiment byly využity kmeny MaP183 (Cbf12-TAP), MaP187 (Cbf12DBM-TAP) a JB32 (netagovaný kmen). Kmen JB32, ve kterém není protein Cbf12 značen TAP-tagem, sloužil jako negativní kontrola. Průměr ze čtyř biologických opakování + směrodatné odchylky.

V literatuře se objevují zmínky o negativních vlivech auxotrofních mutací (6.3). Kmeny s narušeným metabolismem některých bází (adenin, uracil) a aminokyselin (leucin) mohou vykazovat fenotypy, které u jedinců bez auxotrofií nejsou pozorovány. Aby byl eliminován vliv auxotrofie a aby nebyla narušena celková fyziologie buňky, rozhodli jsme se pro studium vazby dále využít kmeny vytvořené v plně prototrofním pozadí.

5.3.2 Využití prototrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP pro studium vazby Cbf12/Cbf12DBM na DNA

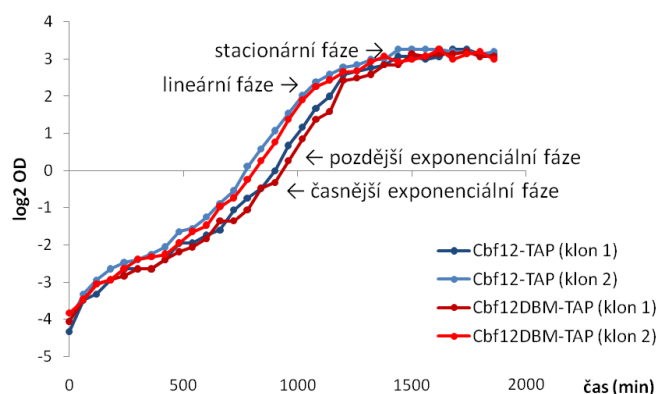
S prototrofními kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP jsem provedla dvě biologická opakování experimentu ChIP-qPCR (ChIP_{chelex}). Stejně jako v případě práce s kmeny auxotrofními (5.3.1) jsem testovala vazbu proteinu Cbf12/Cbf12DBM na vybraná cílová místa (Tab. 35). Na všech sledovaných lokusech jsem detekovala nízký vazebný signál i v případě nemutované varianty proteinu Cbf12. Hodnoty signálu se pohybovaly na úrovni negativních kontrol.

Usoudili jsme, že příčinou neúspěchu by mohla být buď nefunkčnost metody ChIP-qPCR, nebo nevhodně zvolené podmínky experimentu. Pochybnosti o funkčnosti metody ChIP-qPCR vyzvaly i z experimentu nesouvisejícího s mým diplomovým projektem, na kterém jsem v té době také pracovala (5.5.1). Rozhodli jsme se tedy nejprve funkčnost metody ChIP-qPCR prověřit. Z rozsáhlého ověřování vyplynulo, že metoda ChIP-qPCR funguje, přičemž spolehlivějších výsledků je dosaženo, pokud je materiál po chromatinové imunoprecipitaci izolován fenol-chloroformovou extrakcí namísto chelexem (5.4). Pro další ChIP-qPCR experimenty jsme proto volili způsob izolace DNA pomocí fenolu. Bylo tedy nutné optimalizovat přípravu buněk pro ChIP a nalézt takové podmínky, při kterých bychom detekovali dostatečně silný signál vazby a při kterých bychom byli schopni zaznamenat případný rozdíl ve vazbě proteinu Cbf12 a jeho DBM varianty na sledovaných cílových místech.

5.3.2.1 Time-course ChIP-qPCR

Expresa proteinu Cbf12 je zvýšená ve stacionární fázi růstu (Převorovský *et al.* 2009) a nás zajímalo, zda se protein Cbf12 bude v průběhu růstu kultury vázat na sledované lokusy s vyšší intenzitou. Nejprve jsem u obou prototrofních kmenů Cbf12-TAP (MP540, MP541) a Cbf12DBM-TAP (MP518, MP519) změřila růstovou křivku.

Měla jsem sice k dispozici naměřená data ze spektrofotometru Varioskan Flash (5.2.1), nicméně růst kultur se může lišit, pokud jsou kultury kultivovány v běžných laboratorních podmínkách, tj. na orbitální třepače v Erlenmayerových baňkách ve větším množství kultivačního média. Cílem bylo vytipovat body na růstové křivce, ve kterých bychom sklízeli buňky pro následnou chromatinovou imunoprecipitaci spojenou s qPCR (time-course ChIP-qPCR). Pro analýzu jsme vybrali body odpovídající časnější fázi exponenciálního růstu (OD 0,7), pozdější fázi exponenciálního růstu (OD 2), lineární fázi (OD 6) a stacionární fázi růstu (OD 8-9, po zastavení růstu kultury; Obr. 26).



Obr. 26: Růstová křivka prototrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP. V grafu jsou vyznačeny vytipované body pro time-course ChIP-qPCR.

Provedla jsem pilotní time-course ChIP-qPCR experiment (ChIP_{fenol}), pro který jsem využila pouze jeden klon o genotypu Cbf12-TAP (klon 1, MP540). Sledovala jsem vazbu proteinu Cbf12 do čtyř již dříve testovaných oblastí – *cbf12*, *plb1*, *SPBC8E4.02c*, *rDNA*. Z analýzy dat vyplynulo, že na lokusech *cbf12* a *plb1* dosáhl signál vazby proteinu Cbf12 nejvyšších hodnot ve stacionární fázi a na lokusech *rDNA* a *SPBC8E4.02c* v pozdější exponenciální fázi růstu. Míra vazby se tedy zdá být závislá na konkrétní testované oblasti a na fázi růstu kultury, ve které jsou buňky sklizeny pro ChIP.

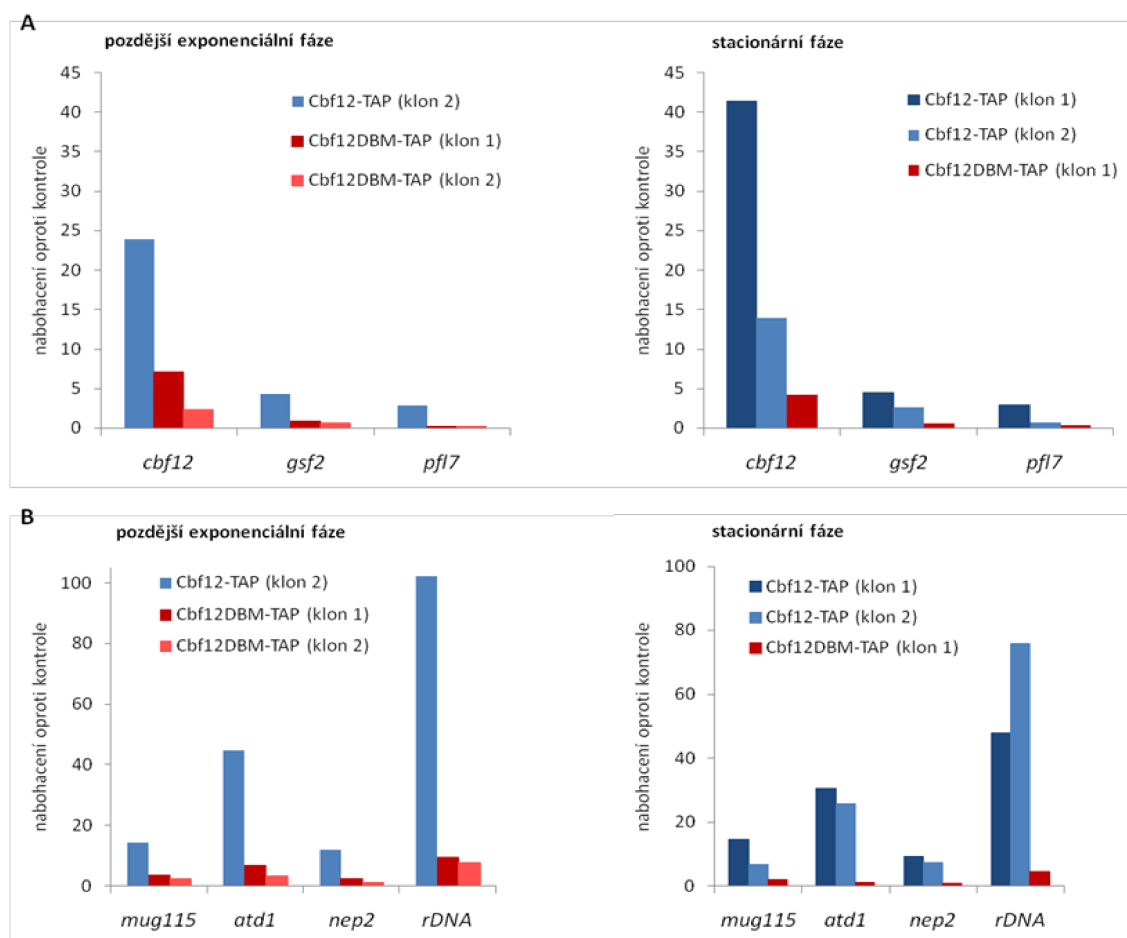
Vazbu proteinu Cbf12/Cbf12DBM jsme se rozhodli studovat v pozdější exponenciální a stacionární fázi růstu na užším spektru cílových míst. Zaměřili jsme se na studium vazby do promotorových oblastí genů, jejichž produkty souvisejí s regulací buněčné adhezivity, a dále pak do oblastí, které by mohly souviset s procesem udržování integrity genomu a odpovědi na genotoxický stres. Zajímalo nás, jak bude vazebná studie korelovat s fenotypy pozorovanými na buněčné úrovni (5.2.2, 5.2.3).

Vybrala jsem cílová místa pro následné studium vazby (Tab. 36). Na základě literatury jsem jako lokusy spojené s buněčnou adhezivitou zvolila promotorové oblasti genů *cbf12*, *gsf2* a *pfl7*. Bylo prokázáno, že geny pro dominantní flokulin Gsf2 a flokulin Pfl7 jsou transkripčně aktivovány proteinem Cbf12 (Kwon *et al.* 2012). Do promotorových oblastí genů *gsf2* a *pfl7* jsem navrhla páry primerů (AJ21+AJ22, respektive AJ23+AJ24), které jsem validovala a stanovila jejich amplifikační účinnost. Z doposud testovaných cílových míst proteinu Cbf12 (Tab. 35) jsem vybírala taková, u kterých je možné, že souvisejí s odpovědí na genotoxický stres. Zvolila jsem regulační oblasti genů *mug115*, *atd1* a *nep2*. Produkty vybraných genů by mohly souviset s udržováním integrity genomu, jelikož kmeny postrádající jednotlivé geny *mug115/atd1/nep2* vykazují citlivost k látkám způsobujícím genotoxický stres (Nguyen *et al.* 2016; Tay *et al.* 2013; Pan *et al.* 2012; Mojardín *et al.* 2015). Pro vazebnou analýzu jsem dále vybrala oblast rDNA. Spekuluje se, že oblast rDNA by mohla mít roli senzoru poškození DNA (Kobayashi 2008; Lewinska *et al.* 2010).

Tab. 36: Přehled sekvencí vybraných pro analýzu vazby proteinu Cbf12/Cbf12DBM. Senzitivita = senzitivita deletanta příslušného genu k látkám způsobujícím genotoxický stres (HU = hydroxyurea, MMS = metylmetansulfonát).

| | název | systematický název | produkt | senzitivita |
|-------------------|---------------|--------------------|---|----------------------------------|
| adheze | <i>cbf12</i> | SPCC1223.13 | transkripční faktor Cbf12 | |
| | <i>gsf2</i> | SPCC1742.01 | dominantní flokulin Gsf2 | |
| | <i>pfl7</i> | SPBC359.04c | flokulin Pfl7 | |
| genotoxický stres | <i>atd1</i> | SPAC9E9.09c | predikovaná aldehyddehydrogenáza Atd1 | cisplatina, doxorubicin, HU, MMS |
| | <i>nep2</i> | SPBC32H8.02c | NEDD8 proteáza Nep2 | 5-fluorouracil |
| | <i>mug115</i> | SPAC56F8.14c | protein Mug115 specifický pro <i>S. pombe</i> | HU, MMS |
| | <i>rDNA</i> | | ribozomální RNA | |

Z důvodu nedostatku času jsem provedla pouze jedno biologické opakování experimentu time-course ChIP-qPCR (ChIP_{fenol}). Pracovala jsem již s oběma kmeny o genotypu Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP, které jsem kultivovala do pozdější fáze exponenciálního růstu (OD 2) a do stacionární fáze (OD 9). Na všech testovaných lokusech a v obou růstových fázích jsem zaznamenala vyšší signál vazby u proteinu Cbf12 oproti proteinu Cbf12 s mutací DBM (Obr. 27). Jelikož jsem experiment již nezopakovala, nemohu z něj učinit žádný definitivní závěr. Do budoucna je potřeba případně provést experiment znovu.



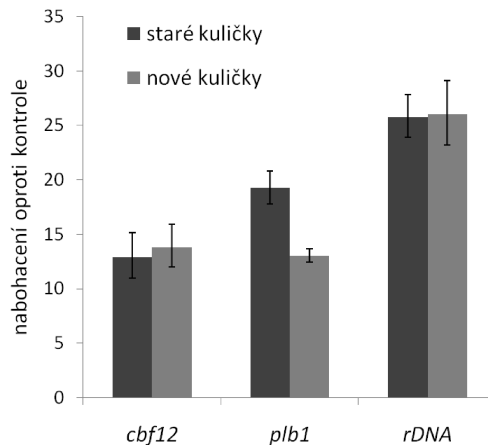
Obr. 27: Time-course ChIP-qPCR. Ověření vazby proteinu Cbf12-TAP a jeho DBM protějšku na vybraná cílová místa. Testování vazby na lokusech spojených (A) s adhezivitou, (B) potenciálně s genotoxickým stresem. V průběhu zpracování vzorků jsem bohužel o dva z nich přišla, a proto je analýza provedena jen pro jeden klon genotypu Cbf12-TAP sklízený v pozdější exponenciální fázi růstu a jeden klon genotypu Cbf12DBM-TAP ve stacionární fázi. Hodnoty ChIP-qPCR signálu jsou vyneseny po normalizaci na kontrolní úsek (intergenová oblast „M40“), kam se proteiny CSL neváží. Jedná se pouze o jedno biologické opakování.

5.4 Ověřování funkčnosti metody ChIP-qPCR

Během studia vazby proteinů Cbf12/Cbf12DBM na DNA (5.3.2) a během mé práce na revizi článku (5.5.1) se vyskytly pochybnosti o fungování metody ChIP-qPCR v našich laboratorních podmínkách. Bylo nutné funkčnost metody prověřit a případně přijít na to, co zapříčiňuje nízký signál vazby proteinů CSL na testované lokusy. Pro testování jsme zvolili kmeny MP19 (*cbf11-ctap4::natR*, h^+) a MP20 (*cbf12-ctap4::natR*, h^+), u kterých v minulosti fungovala chromatinová imunoprecipitace TAP-tagem značených proteinů Cbf11, respektive Cbf12.

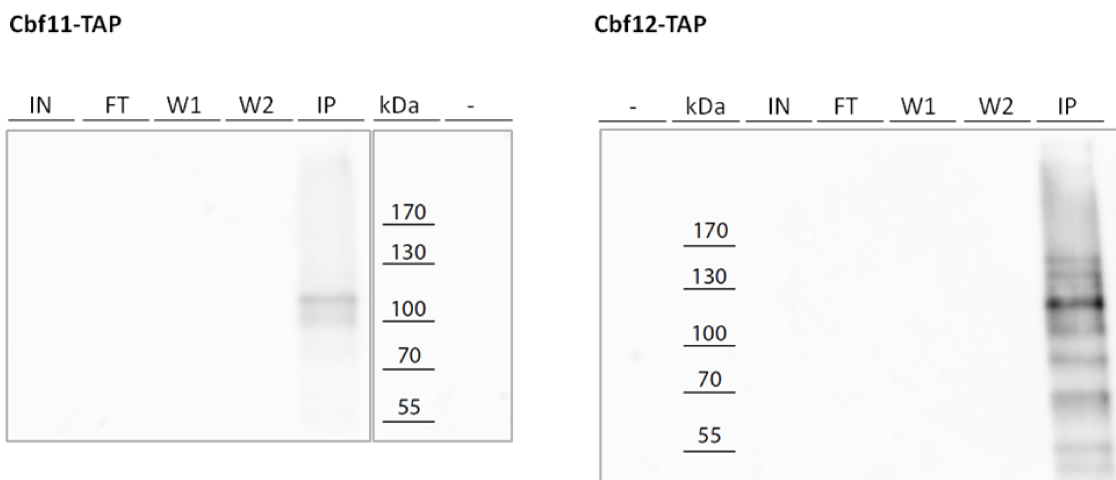
Měli jsme podezření, že příčinou problémů jsou nově zakoupené magnetické kuličky potažené IgG, které slouží k precipitaci proteinů značených TAP-tagem (Pan Mouse IgG coated Dynabeads®, Invitrogen, kat. č. 110.41). Nejprve jsem tedy provedla

experiment ChIP-qPCR (ChIP_{chelex}) s využitím doposud používaných („starých“, šarže 154304400) a nově zakoupených („nových“, šarže 00417922) magnetických kuliček. Sledovala jsem vazbu proteinu Cbf12 do promotorových oblastí genů *cbf12* a *plb1* a do oblasti *rDNA*. Výsledky ukázaly, že k nabohacení vazby Cbf12 na testovaných lokusech dochází s použitím obou druhů kuliček (Obr. 28).



Obr. 28: ChIP-qPCR – porovnání starých a nových magnetických kuliček. Vazba proteinu Cbf12 (MP20) byla detekována na všech třech testovaných lokusech (*cbf12*, *plb1*, *rDNA*) v případě použití obou druhů magnetických kuliček. Výsledky ChIP-qPCR jsou vyneseny po normalizaci na kontrolní lokus „M40“. Graf zachycuje průměr technického triplikátu ± směrodatné odchylky.

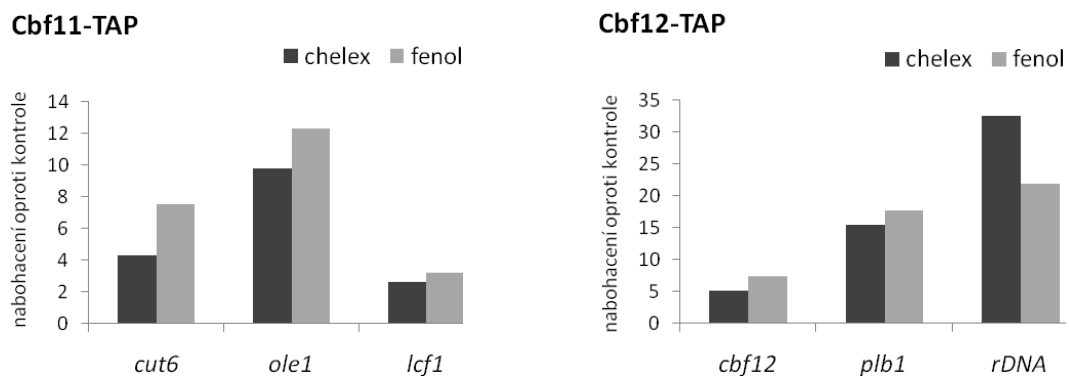
V dalším kroku jsme se rozhodli prověřit, zda dochází k efektivní chromatinové imunoprecipitaci. Chtěli jsme zjistit, kde případně v průběhu zpracování vzorků dochází ke ztrátě precipitovaného proteinu. K tomuto účelu jsem využila techniku western blot s následnou imunodetekcí proteinů. Stanovovala jsem ne/přítomnost TAP-tagem značeného proteinu Cbf11/12 v různých frakcích ChIP. Prokázala jsem, že chromatinová imunoprecipitace pro oba testované proteiny funguje (Obr. 29).



Obr. 29: ChIP – analýza pomocí techniky western blot. Stanovení ne/přítomnosti proteinu Cbf11/12-TAP bylo prováděno u následujících vzorků: input (IN), flow-through (FT; materiál, který se nenavázal

na matici), wash 1 (W1; první promytí matrice IP pufrem), wash 2 (W2; druhé promytí matrice IP pufrem), precipitát (IP; materiál, který se navázal na matici). Jednotlivé odebrané frakce byly zpracovány podle protokolu 4.5.5. Následně byla provedena metoda SDS-PAGE, western blot a imunodetekce proteinů Cbf11/12-TAP. Pro detekci byla využita protilátka anti-TAP (Thermo Scientific). Jako negativní kontrola (-) byl použit input z divokého kmene JB32, který neobsahuje TAP-tagem značený protein Cbf11/12. V precipitátu byla prokázána přítomnost proteinu Cbf11-TAP (2 proužky = 2 izofomy proteinu) a Cbf12-TAP (více proužků = degradační produkty proteinu; standardní výsledek). Přítomnost proteinů nebyla detekována v inputech; koncentrace detekovaného proteinu ve vzorku byla zřejmě nízká.

Doposud jsme po proběhnutí chromatinové imunoprecipitace postupovali podle protokolu využívajícího pro izolaci precipitovaného materiálu chelex (ChIP_{chelex}). Abychom zjistili, zda k potížím nedochází v průběhu tohoto kroku, rozhodli jsme se vyzkoušet alternativní způsob zpracovávání vzorků po ChIP, při kterém je k izolaci DNA využita fenol-chloroformová extrakce (ChIP_{fenol}). S využitím metody qPCR jsem sledovala vazbu proteinu Cbf11 do promotorových oblastí genů *cut6*, *ole1* a *lcf1*, vazbu Cbf12 do promotorových oblastí genů *cbf12* a *plb1* a do oblasti *rDNA*. Na testovaných lokusech jsem detekovala nabohacení vazby proteinu Cbf11/12 v případě izolace DNA chelexem i fenolem (Obr. 30). Zjistila jsem tedy, že oba přístupy izolace precipitovaného materiálu fungují. Izolace DNA s využitím chelexu však nebyla vždy spolehlivá, jelikož nejednou selhala následná kvantifikace pomocí qPCR. Pro další experimenty jsme proto volili zpracovávání imunoprecipitovaného materiálu fenolizací.



Obr. 30: ChIP-qPCR – porovnání izolace DNA chelexem vs. fenolem. Vazba proteinu Cbf11, respektive Cbf12 byla detekována na všech třech testovaných lokusech v případě využití chelexu i fenolu. Data jsou vynesena po normalizaci na kontrolní lokus „M40“. Graf zachycuje jedno provedení experimentu.

5.5 Dílčí experimenty týkající se role Cbf11 v regulaci exprese vybraných genů v průběhu buněčného cyklu a funkčního propojení mezi Cbf11 a Cut6

V rámci svého magisterského studia jsem se podílela na několika experimentech spojených s revizí článku pro časopis *Cell Cycle*. Výsledky popsané v následujících třech kapitolách jsou součástí publikace (Převorovský *et al.* 2016).

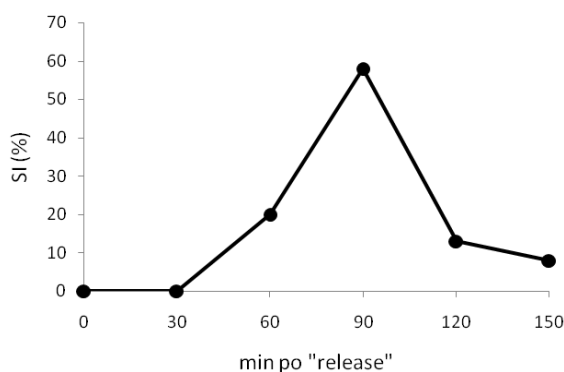
5.5.1 Vazba proteinu Cbf11 na promotorové oblasti genů *cut6*, *vht1* a *bio2* v rámci buněčného cyklu

Proteiny CSL ovlivňují expresi několika genů, které jsou periodicky exprimovány během průchodu buněčným cyklem. Do promotorových oblastí některých z nich byla navíc metodou ChIP-seq identifikována vazba Cbf11/12 (Převorovský *et al.* 2015). Dalším předmětem studia v naší laboratoři bylo, zda je regulace prostřednictvím proteinů CSL podmíněna jejich vazbou na DNA pouze v určité fázi buněčného cyklu, přičemž ve středu zájmu byl protein Cbf11.

Dr. Převorovský a Dr. Oravcová zjistili, že vazba proteinu Cbf11 do promotorových oblastí genů *cut6*, *vht1* a *bio2* dosahuje maxima v S fázi buněčného cyklu a/nebo v cytokinezi (Oravcová 2014). U uvedených genů se předpokládalo, že jsou periodicky exprimovány. Nutno podotknout, že během práce na revizi článku vyšlo najevo, že transkripce genů *cut6*, *vht1* a *bio2* pravděpodobně není regulována v závislosti na buněčném cyklu (viz dále a Převorovský *et al.* 2016). Gen *cut6* kóduje enzym acetyl-CoA/biotin karboxylázu, který se účastní biosyntézy mastných kyselin. Je také důležitý pro koordinaci jaderného a buněčného dělení, jelikož mutace v genu *cut6* vede k mitotickému defektu popsanému i u $\Delta cbf11$ – k fenotypu „cut“ (Saitoh *et al.* 1996; Převorovský *et al.* 2009). Produktem genů *vht1* a *bio2* je membránový transportér biotinu, respektive enzym biotinsyntáza (Stolz 2003; Phalip *et al.* 1999). Mým úkolem bylo pro účely publikace zopakovat experiment Dr. Oravcové popisující dynamiku vazby proteinu Cbf11 na zmíněné promotorové oblasti genů *cut6*, *vht1* a *bio2* během průchodu kultury buněčným cyklem (Oravcová 2014).

Provedla jsem synchronizaci buněk exprimujících protein Cbf11-TAP v G2 fázi buněčného cyklu prostřednictvím termosenzitivní mutanty v genu *cdc25* (mutace *cdc25-22*; 4.1.5). Pro experiment jsem využila kmen MP63. Jednalo se o tzv. block/release

experiment. Buňky byly nejprve zastaveny v G2 fázi buněčného cyklu („block“), a poté byly opět do cyklu vypuštěny („release“), přičemž následnými fázemi buněčného cyklu procházely synchronně (Obr. 31). V jednotlivých časových bodech průchodu buněčným cyklem jsem metodou ChIP-qPCR (ChIP_{chelex}) analyzovala vazbu proteinu Cbf11 na promotorové oblasti genů *cut6*, *vht1* a *bio2*. Provedla jsem tři biologická opakování, avšak původní výsledky Dr. Oravcové se mi nepodařilo zreprodukovat. Na sledovaných lokusech jsem nezaznamenala vazbu Cbf11 kulminující v S fázi/cytokinezi. V kontextu tohoto neúspěchu a neúspěchu během studia vazby proteinu Cbf12/Cbf12DBM na DNA (5.3.2) vyvstaly pochybnosti o funkčnosti metody ChIP-qPCR. Později bylo prokázáno, že technika ChIP-qPCR funguje (5.4), ale ke studiu dynamiky vazby proteinu Cbf11 jsem se již nevrátila. Na důvod, proč se nepodařilo zreprodukovat původní výsledky Dr. Oravcové, jsem nepřišla.



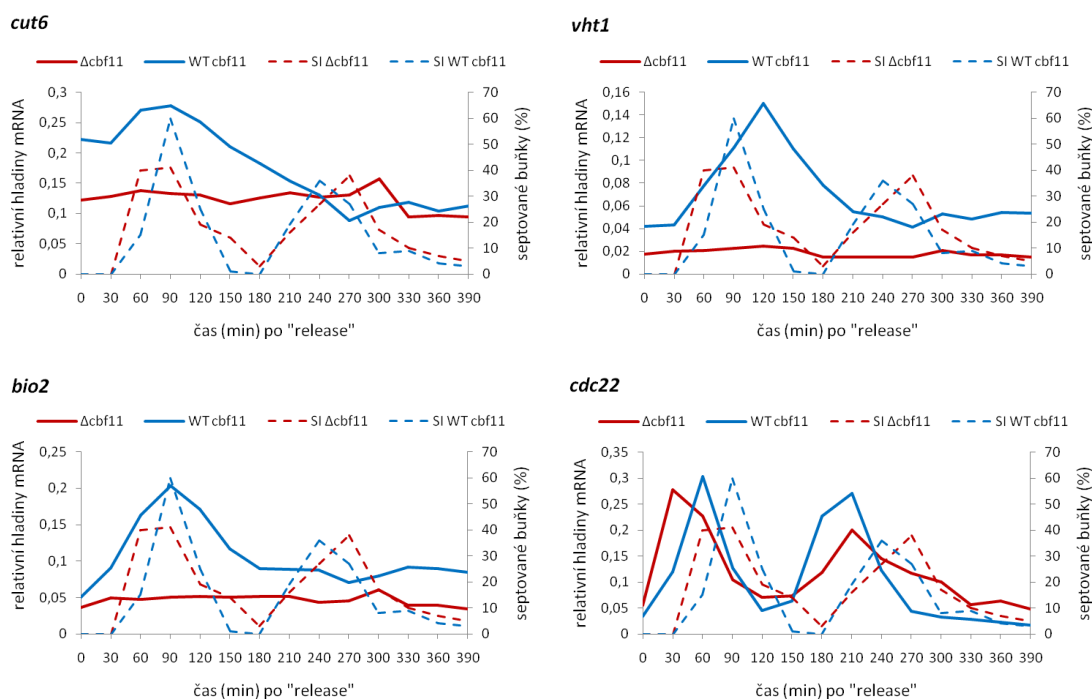
Obr. 31: Sledování synchronního průchodu kultury MP63 buněčným cyklem. Septační index (SI) vyjadřuje procento buněk se septem; výskyt septa koreluje za normálních růstových podmínek s S fází buněčného cyklu (Gómez & Forsburg 2004). SI byl určován mikroskopicky v časových bodech 0, 30, 60, 90, 120, 150 minut po vypuštění buněk ze zastavení v G2 fázi, tj. po „release“.

5.5.2 Vliv proteinu Cbf11 na hladinu transkriptu genů *cut6*, *vht1* a *bio2* v průběhu buněčného cyklu

Jak jsem již uvedla dříve (5.5.1), protein Cbf11 se váže do promotorových oblastí genů *cut6*, *vht1* a *bio2*, přičemž maximum vazby koreluje s výskytem septa (Oravcová 2014). Dalším cílem bylo zjistit, jak je ovlivněna exprese zmíněných genů v průběhu buněčného cyklu ne/přítomností proteinu Cbf11 a tedy jak Cbf11 tyto geny reguluje. Dr. Oravcová měřila hladinu mRNA genů *cut6*, *vht1* a *bio2* během průchodu dvěma po sobě následujícími buněčnými cykly. Z analýzy dat vyplynulo, že hladina mRNA genů *cut6*, *vht1* a *bio2* je snížena u kmene postrádajícího gen *cbf11* oproti kmenu s nemanipulovaným lokusem *cbf11*. Dále bylo zjištěno, že exprese studovaných genů

osciluje v rámci průchodu buněčnými cykly, přičemž periodické chování je podmíněno přítomností proteinu Cbf11 (Oravcová 2014). Aby mohly být výsledky publikovány, bylo potřeba provést nezávislé biologické opakování.

Buňky nesoucí gen *cbf11* (JB23) a buňky postrádající gen *cbf11* (MP61) jsem synchronizovala pomocí termosenzitivní alely *cdc25-22* v G2 fázi buněčného cyklu. Po opětovném vypuštění buněk do cyklu jsem v časových intervalech pokrývajících dva buněčné cykly měřila hladinu transkriptu genů *cut6*, *vht1* a *bio2*. K tomuto účelu jsem využila techniky RT-qPCR, tj. reverzní transkripce s následnou kvantifikací pomocí qPCR (Obr. 32). Výsledky nezávislého biologického opakování byly shodné s výsledky získanými Dr. Oravcovou. Exprese genů *cut6*, *vht1* a *bio2* podléhala periodickému chování v buňkách s přítomným genem *cbf11* na rozdíl od buněk $\Delta cbf11$, ve kterých byla navíc hladina mRNA studovaných genů snížena. Vrchol exprese byl pozorován během synchronního průchodu prvním buněčným cyklem v S fázi/cytokinezi (*cut6*, *bio2*), případně v časně G2 fázi (*vht1*). Průchod druhým buněčným cyklem již nebyl doprovázen tak výraznou oscilací exprese. Dnes již však víme, že zdánlivá periodicitu exprese mRNA cílových genů proteinu Cbf11 – genů *cut6*, *vht1* a *bio2* – je pravděpodobně artefaktem použité synchronizační metody, která zahrnuje tepelný šok. I kdyby však byl periodický nárůst hladiny mRNA studovaných genů vyvolán synchronizační metodou, stále platí, že exprese mRNA genů *cut6*, *vht1* a *bio2* je závislá na přítomnosti proteinu Cbf11 (Převorovský *et al.* 2016).



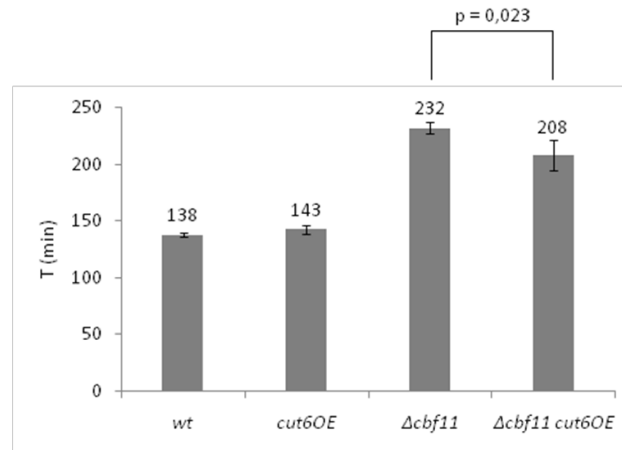
Obr. 32: Měření hladiny mRNA genů *cut6*, *vht1* a *bio2* v průběhu buněčného cyklu. Buňky s nemanipulovaným lokusem *cbf11* (WT *cbf11*) a buňky bez genu *cbf11* ($\Delta cbf11$) zablokované v G2 fázi byly přeneseny do permissivní teploty opět do cyklu vypuštěny („release“). Alikvoty buněk pro analýzu RT-qPCR byly odebrány v 30 minutových intervalech po „release“. Průchod dvěma po sobě následujícími buněčnými cykly byl sledován mikroskopicky určováním procenta buněk se septem. Hladiny mRNA genů *cut6*, *vht1* a *bio2* byly normalizovány na hladinu mRNA genu *act1*, jehož exprese se nemění v rámci buněčného cyklu (viz online nástroj „Gene Expression Viewer“: <http://bahlerweb.cs.ucl.ac.uk/cgi-bin/SPGE/geexview>, laborař Dr. Bählera). Periodicky exprimovaný gen *cdc22* byl použit jako pozitivní kontrola; exprese dosahuje maxima na rozhraní fázi G1/S (Fernandez Sarabia *et al.* 1993).

5.5.3 Vliv nadprodukce Cut6 na rychlost růstu kmene $\Delta cbf11$

V naší laboratoři se zabýváme rolí proteinu Cbf11 a Cut6 v procesu koordinace jaderného a buněčného dělení a jejich vzájemnou genetickou interakcí. Prokázali jsme, že protein Cbf11 je přímým transkripčním aktivátorem genu *cut6*, a také jsme zjistili, že nadprodukce proteinu Cut6 v buňkách $\Delta cbf11$ vede ke snížení výskytu „cut“ fenotypu (Převorovský *et al.* 2016). Další otázkou, kterou jsme si kladli, bylo, zda při nadprodukci Cut6 dojde k supresi růstového defektu pozorovaného u kmene postrádajícího gen *cbf11*.

S využitím spektrofotometru Varioskan Flash jsem změřila rychlost růstu kmene s nadprodukovaným proteinem Cut6 ve *wt* pozadí (*cut6OE*; MP550, MP551, MP552), respektive v pozadí $\Delta cbf11$ ($\Delta cbf11 cut6OE$; MP553, MP555, MP556). Dobu zdvojení jsem porovnávala s naměřenou dobou zdvojení kmene divokého typu (*wt*; JB32) a kmene s delecí genu *cbf11* ($\Delta cbf11$; MP44). Nadprodukce Cut6 ve *wt* pozadí nemá na rychlost

růstu kultury téměř žádný vliv. Z výsledků vyplývá, že u kmene $\Delta cbf11 cut6OE$ dochází k mírnému zvýšení rychlosti růstu, tedy ke snížení doby zdvojení, v porovnání s kmenem $\Delta cbf11$ (Obr. 33). Nadprodukce proteinu Cut6 je tedy schopna částečně suprimovat růstový defekt kmene $\Delta cbf11$.



Obr. 33: Ovlivnění doby zdvojení (T) kmene $\Delta cbf11$ při nadprodukcí Cut6. V grafu jsou uvedeny hodnoty doby zdvojení získané v případě genotypu *wt* a $\Delta cbf11$ průměrem hodnot ze tří technických replikátů, v případě genotypu *cut6OE* a $\Delta cbf11 cut6OE$ průměrem hodnot ze tří nezávislých klonů. Průměrná hodnota $T \pm$ směrodatná odchylka. Signifikance byla určena na základě jednostranného t-testu, typ: dva výběry se shodným rozptylem (vypočteno v Microsoft Office Excel 2007).

6 DISKUZE

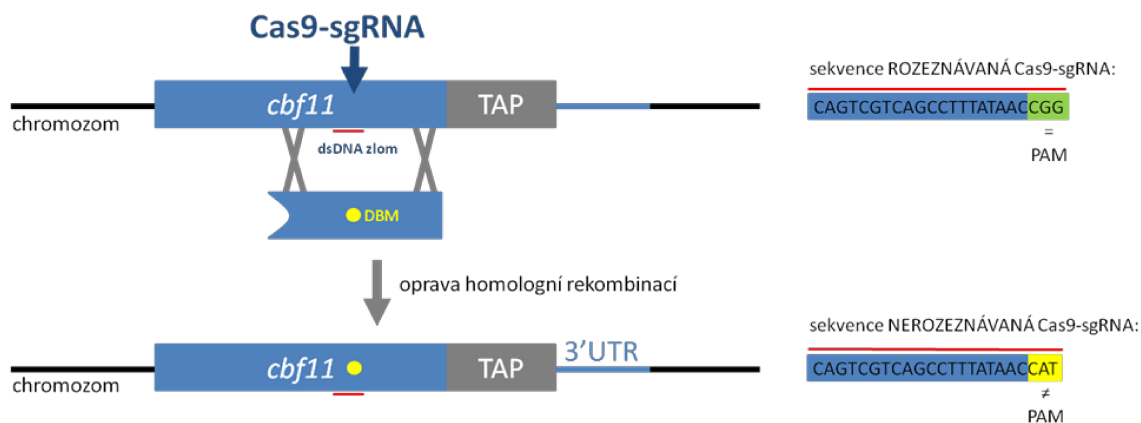
V genomu poltivé kvasinky *S. pombe* se nacházejí paralogní geny *cbf11* a *cbf12* kódující proteiny z rodiny transkripčních faktorů CSL (Převorovský *et al.* 2007; Převorovský *et al.* 2009). Již dříve byly v naší laboratoři identifikovány cílové lokusy, na které se proteiny CSL váží *in vivo* (Převorovský *et al.* 2015). K nalezení cílových míst byla využita metoda ChIP-seq; technika, která umožňuje mapovat interakce mezi proteiny a DNA na úrovni celého genomu (Schmidt *et al.* 2009). Mnoho z cílových míst neobsahuje známý vazebný motiv pro proteiny CSL, což vede k předpokladu, že proteiny Cbf11/12 se na DNA váží různými způsoby. Transkripční faktory se na své cílové sekvence mohou vázat přímo, ale mohou také být součástí větších komplexů a kontaktovat tak DNA nepřímo skrze jiné DNA-vazebné interakční partnery (Gordân *et al.* 2009). Doposud není známo, zda je přímá vazba proteinů CSL na DNA nezbytná pro vykonávání jimi regulovaných procesů. V rámci mé diplomové práce jsme si kladli za cíl charakterizovat způsoby vazby proteinů CSL na vybrané cílové lokusy a zjistit, s jakými biologickými funkcemi je daný režim vazby na DNA spojen.

6.1 Konstrukce kmenů za účelem studia režimu vazby proteinů CSL na DNA

Jako nástroj k objasnění DNA-vazebných módů proteinů CSL jsme využili bodovou mutaci v doméně zprostředkující vazbu na DNA – tzv. mutaci DBM („DNA binding mutation“) – která byla odvozena od savčího modelu (Chung *et al.* 1994). Jde o záměnu jedné konzervované aminokyseliny (Cbf11DBM R318H; Cbf12DBM R644H), která, jak bylo prokázáno, neovlivní stabilitu ani lokalizaci proteinu, nicméně protein Cbf11/12 se není schopen vázat *in vitro* na kanonický CSL-vazebný element (kapitola 1; Oravcová *et al.* 2013). V naší laboratoři jsme měli k dispozici pouze plazmidové konstrukty nesoucí zmíněnou mutaci a jedním z cílů mého diplomového projektu bylo zavést DBM přímo do chromozomálního lokusu genů *cbf11* a *cbf12*. Pracovala jsem na konstrukci kmenů s/bez mutace DBM v otevřeném čtecím rámci proteinů CSL, které by dále obsahovaly TAP-tag za 3'-koncem ORF a neporušenou oblast 3'UTR. Příprava kmenů se ukázala být daleko složitější, než se původně myslelo, nicméně nakonec se přeci jen podařilo zkonstruovat většinu z požadovaných kmenů (Tab. 34).

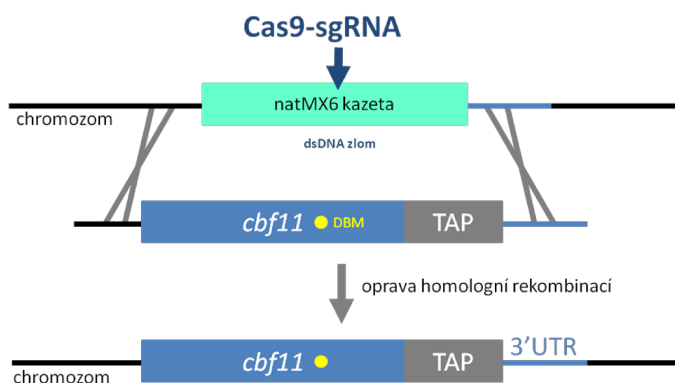
Kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP byly zkonstruovány za použití „*ura4* selekčního systému“ (Obr. 12). Pro přípravu DBM varianty jsem musela vyzkoušet více přístupů, ale nakonec se mi podařilo nalézt vhodné podmínky transformace a následné selekce. Kmen Cbf11-TAP jsem se nejprve pokusila připravit analogickým přístupem, který vedl k úspěšné konstrukci Cbf12DBM-TAP; v tomto případě jsem však neuspěla. Meziproduktem konstrukce je kmen postrádající funkční protein Cbf11. Máme podezření, že by v tomto kmeni mohla být vlivem absence Cbf11 nízká efektivita homologní rekombinace (viz níže). Homologní rekombinace mezi jednotlivými repeticemi rDNA (např. během oprav DNA) může vést ke změně počtu kopií rDNA. V kvasinkových buňkách byl popsán mechanismus, kterým buňka umí udržovat optimální počet kopií rDNA; rekombinace hraje v tomto procesu významnou roli (Kobayashi 2014). V kmeni $\Delta cbf11$ pozorujeme redukovaný počet kopií rDNA (Dr. Převorovský, nepublikováno) a je tedy možné, že kmen bez funkčního Cbf11 má narušenou schopnost rekombinace. Absence proteinu Cbf11 také vede k aberantní tvorbě heterochromatinu v oblasti centromery (Dr. Převorovský, nepublikováno) a narušení stavu chromatinu má u kvasinek vliv na mitotickou (Malagón & Aguilera 2001) i meiotickou homologní rekombinaci (Yamada *et al.* 2004). Zkusila jsem proto gen *cbf11* komplementovat, nicméně ani tento přístup nevedl k úspěšné konstrukci kmene Cbf11-TAP. Systém CRISPR/Cas9 zvyšuje efektivitu integrace templátového fragmentu do genomu, jelikož štěpením cílové DNA prostřednictvím endonukleázy Cas9 je v buňce vytvořeno více situací, kdy je potřeba využít rekombinaci k opravám dvouřetězcových zlomů. CRISPR/Cas9 tak představuje efektivnější způsob editace genomu v porovnání s dvoukrokovým integračním systémem využívajícím markerový gen *ura4*. Metodu CRISPR/Cas9 jsem zavedla v naší laboratoři a s jejím využitím jsem úspěšně zkonstruovala kmen Cbf11-TAP (Obr. 18). Analogickým způsobem jsem se pokusila připravit kmen Cbf11DBM-TAP, bohužel jsem však neuspěla. Potíže s konstrukcí kmene Cbf11DBM-TAP by mohly spočívat v následujícím. V požadovaném kmeni má být protein Cbf11 nahrazen za protein nesoucí mutaci DBM. Expese proteinu Cbf11DBM však může být potenciálním zdrojem problémů. Delece genu *cbf11* vede u *S. pombe* k mnoha defektům, které se projevují mj. zhoršeným růstem, a je možné, že některé z fenotypů bude sdílet i kmen nesoucí DBM v *cbf11* ORF. Můžeme spekulovat, že i kmen s Cbf11DBM poroste s výrazně větší dobou zdvojení oproti kmeni divokého typu. Pokud tedy během konstrukce požadovaného kmene dojde k integraci templátového fragmentu *cbf11DBM-TAP* do chromozomálního lokusu genu

cbf11, příslušní integranti porostou pomalu. Zhoršený růst na selekčním médiu může být dále potencován přítomností enzymu Cas9, jehož exprese je pro buňky toxická (Jacobs *et al.* 2014). Pro ověřování genotypu klonů narostlých na selekčních plotnách je potřeba vybírat nejmenší kolonie, jelikož právě ty jsou pravděpodobnými integranty (Rodríguez-López *et al.* 2016). Je možné, že ačkoli jsem preferenčně testovala nejmenší z monoklonií, pro ověřovací analýzu jsem vybírala ty „nesprávné“. To je patrné i z výrazně nižší úspěšnosti integrace templátového fragmentu do genomu. V případě templátu *cbf11-TAP* (konstrukce Cbf11-TAP) byl pomocí metody PCR detekován signál integrace u 7 kolonií ze 47 testovaných, tj. úspěšnost integrace 14,9 %. V případě templátového fragmentu *cbf11DBM-TAP* (konstrukce Cbf11DBM-TAP) jsem zaznamenala úspěšnost integrace pouze 1,2 %; integrační signál byl detekován pouze u jedné kolonie z 86 testovaných. Později se navíc ukázalo, že v kandidátním klonu došlo k integraci jen části templátové kazety, části bez DBM. Bylo by vhodné vysívat buňky po transformaci na větší počet selekčních ploten; doposud byl celý objem transformační směsi vysíván pouze na jednu selekční plotnu. Hustota buněčného porostu by se snížila, což je s výhodou pro pomalu rostoucí kolonie, které by nebyly „utiskovány“ a přerůstány rychleji rostoucími, a tedy pravděpodobně chybnými, jedinci. Jak zmiňuji výše, v jednom případě jsem sice detekovala integraci fragmentu *cbf11DBM-TAP* do chromozomálního lokusu, nicméně u této kolonie nebyla potvrzena přítomnost DBM; k homologní rekombinaci došlo v úseku za výskytem DBM. Navrhují úpravu konstrukce kmene Cbf11DBM-TAP, s využitím které by byl vyřešen problém s integrací templátového fragmentu do genomu až za místem výskytu DBM. V systému CRISPR/Cas9 je pro rozpoznání a efektivní štěpení cílové DNA pomocí Cas9-sgRNA naprosto klíčová přítomnost PAM („protospacer adjacent motif“) sekvence (Sternberg *et al.* 2014; Anders *et al.* 2014). Jedná se o trinukleotidovou sekvenci – 5'-NGG-3' pro enzym Cas9 odvozený ze *Streptococcus pyogenes* – která bezprostředně následuje za 20nukleotidovou cílovou sekvencí DNA určenou ke štěpení. V sekvenci *cbf11* ORF se přímo v místě výskytu požadované DBM nachází PAM sekvence (5'-CGG-3'; 952. – 954. nukleotid *cbf11* ORF), čehož bychom mohli využít při konstrukci kmene Cbf11DBM-TAP. Jako výchozí kmen pro konstrukci bychom použili kmen Cbf11-TAP (MP571/MP574). Endonukleázu Cas9 bychom zacílili do *wt* sekvence v místě požadované DBM a jako templát pro homologní rekombinaci bychom buňkám poskytli fragment *cbf11DBM*. Tento nebude rozpoznáván, a tedy nebude štěpen, komplexem Cas9-sgRNA, jelikož v jeho sekvenci se již nevyskytuje PAM sekvence (Obr. 34).



Obr. 34: Navržený způsob konstrukce kmene Cbf11DBM-TAP s využitím kmene Cbf11-TAP. Komplex Cas9-sgRNA by byl naváděn do *wt* sekvence *cbf11* ORF v místě požadované DBM. Podrobnější popis viz hlavní text.

Popíši ještě další způsob, který by mohl vést k úspěšné konstrukci kmene Cbf11DBM-TAP. Jako výchozí kmen pro konstrukci bychom mohli využít kmen s deletovaným genem *cbf11* a jako templát pro homologní rekombinaci bychom buňkám poskytli fragment *cbf11DBM-TAP* (Obr. 35). Jak jsem již zmínila, kmen $\Delta cbf11$ vykazuje řadu defektů. Předpokládáme, že vnesení DBM do *cbf11* ORF nebude mít na buňku závažnější dopad než samotná delece genu *cbf11*. Využitím „rodičovského“ kmene $\Delta cbf11$ by tedy mohl být vyřešen problém, kdy integranti porostou na selekčním médiu mnohem hůř než kmen výchozí (viz výše), a nemuselo by tak docházet k případné negativní selekci mutace DBM. Integrace fragmentu *cbf11DBM-TAP* do chromozomálního lokusu by mohla představovat pro buňky i určité funkční polepšení. V rolích proteinu Cbf11, které nejsou podmíněny přímou vazbou Cbf11 na DNA, by protein Cbf11DBM mohl být rovnocennou náhradou za nemutovaný Cbf11, což by se mohlo projevit dokonce zlepšením růstu kmene Cbf11DBM-TAP oproti $\Delta cbf11$.



Obr. 35: Navržený způsob konstrukce kmene Cbf11DBM-TAP s využitím kmene $\Delta cbf11$. Ve výchozím kmeni je ORF genu *cbf11* nahrazen selekční kazetou natMX6. Komplex Cas9-sgRNA by byl naváděn proti této kazetě.

6.2 Fenotypizace vytvořených kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP

U vytvořeného prototrofního kmene Cbf12-TAP a jeho DBM protějšku jsme se nejprve zaměřili na studium rychlosti růstu. Ověřili jsme, že mutace DBM rychlost růstu kultury neovlivňuje (Obr. 22). Dále jsme studovali vliv DBM na buněčné procesy, jejichž regulace se účastní protein Cbf12.

Protein Cbf12 pozitivně ovlivňuje buněčnou adhezivitu, kde funguje jako transkripční aktivátor některých genů kódujících flokuliny (Převorovský *et al.* 2009; Kwon *et al.* 2012). Metodou omývacího testu jsem zjistila, že přítomnost DBM v otevřeném čtecím rámci proteinu Cbf12 způsobuje ztrátu schopnosti buněk přilnout k agaru (Obr. 23). Z uvedeného vyplývá, že pro zachování schopnosti adheze buněk je vyžadována nemutovaná DNA-vazebná doména proteinu Cbf12 a tedy pravděpodobně i schopnost přímé vazby proteinu Cbf12 na DNA. Tento nález diskutuji ještě dále v souvislosti s *in vivo* vazebnou studií proteinu Cbf12/Cbf12DBM do promotorových oblastí genů souvisejících s regulací buněčné adheze (6.3). Na Obr. 23 si můžeme povšimnout, že kmen Cbf12-TAP vykazuje v obou biologických opakováních mírně zvýšenou schopnost adheze v porovnání s kmenem divokého typu. Je možné, že tato vlastnost je ovlivněna přítomností sekvence TAP-tagu, která je připojena za 3'-konec ORF genu *cbf12*. Stabilita mRNA genu *cbf12* je regulována skrze protein Zfs1 (Wells *et al.* 2012). Lze si představit, že struktura RNA sekvence TAP-tagu brání nasednutí proteinu Zfs1 na mRNA *cbf12*, čímž je zabráněno destabilizaci transkriptu. Pokud by akumulace mRNA *cbf12* vedla ke zvýšené produkci proteinu Cbf12, pozitivního regulátoru adhezivity, vysvětlovalo by to pozorovaný fenotyp – zvýšenou buněčnou adhezi kmene Cbf12-TAP oproti *wt*. Znalost hladiny exprese mRNA *cbf12* v kmene Cbf12-TAP by naší hypotézu mohla podpořit, či vyvrátit.

Dále jsme se zaměřili na studium vlivu DBM v odpovědi na genotoxický stres. Již dříve byla prokázána účast proteinu Cbf12 v procesu udržování integrity genomu, nicméně doposud není známo, jak přesně Cbf12 v tomto procesu působí (Dr. Převorovský, nepublikováno). Ze studia citlivosti buněk na CPT – látku způsobující genotoxický stres – vyplynulo, že kmen Cbf12DBM-TAP není v porovnání s $\Delta cbf12$ citlivý na přítomnost CPT v médiu (Obr. 24). Pro roli proteinu Cbf12 v procesu udržování integrity genomu tedy není klíčové zachovat schopnost jeho kanonické přímé vazby na DNA. V následující kapitole se mj. věnuji vlivu DBM na DNA-vazebnou aktivitu Cbf12 s ohledem na genotoxický stres (6.3).

6.3 Studium vazby Cbf12 a jeho DBM varianty na DNA *in vivo*

V rámci svého diplomového projektu jsem metodou ChIP-qPCR zkoumala vazbu proteinu Cbf12 a jeho DBM protějšku na vybrané cílové lokusy. Pro vazebnou analýzu jsem nejprve využila kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP vytvořené v trojitém auxotrofním pozadí. Ačkoliv mezi jednotlivými biologickými replikáty panovala nekonzistentnost co do výše absolutních hodnot detekovaného signálu, poskytl tento experiment alespoň vzhled do studované problematiky – protein Cbf12DBM se na všechny testované lokusy váže s nižší intenzitou oproti své nemutované verzi (Obr. 25). Zdá se tedy, že pro vazbu proteinu Cbf12 na testované cílové lokusy je potřeba, aby byla zachována funkčnost DNA-vazebné domény. V literatuře se diskutuje vliv auxotrofních mutací na pozorované fenotypy; uvedu několik příkladů. Buňky divokého typu flokulují ve speciálním médiu indukujícím flokulaci; mírně zvýšená flokulace byla pozorována u kmenů auxotrofních na leucin, uracil a/nebo adenin (Kwon *et al.* 2012). Byl také popsán vliv delece genu *ura4* na integritu buněčné stěny (Matsuo *et al.* 2013). Při identifikaci mutantů defektních v procesu respirace bylo dosaženo odlišných výsledků, pokud byla pro genetický screening použita auxotrofní, respektive prototrofní deleční knihovna. Data z této studie poukázala na silné genetické interakce mezi auxotrofními mutanty a delečními mutanty ovlivňujícími respiraci (Malecki *et al.* 2016). U kmene auxotrofního na adenin byla zaznamenána snížená schopnost proliferace a byl prokázán vliv adeninové auxotrofie na velikost buněk (Kokina *et al.* 2014). Dále bylo zjištěno, že auxotrofní mutace významně ovlivňují genovou expresi, i když jsou příslušné živiny doplněny v médiu (Alam *et al.* 2016). Kromě posledních dvou příkladů, které byly popsány u pučící kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, byla uvedená pozorování identifikována u *S. pombe*. Dále je možné, že proteiny CSL jsou u *S. pombe* nutričně regulovány; některé defekty kmene $\Delta cbf11$ jsou totiž významně potlačeny v minimálním médiu EMM, pravděpodobně vlivem nadbytku zdroje dusíku (Převorovský *et al.* 2015; Zach 2017). V dalším studiu vazby Cbf12/Cbf12DBM na DNA jsme proto pokračovali s prototrofními kmeny, u kterých je eliminováno narušení metabolické regulace. Jelikož buněčná adheze a odpověď na genotoxický stres byly ve středu našeho zájmu, zaměřili jsme se na studium těchto procesů i na molekulární úrovni. Sledovali jsme vazbu proteinu Cbf12 vs. Cbf12DBM do promotorových oblastí genů *cbf12*, *gsf2* a *pfl7*, které souvisí s regulací buněčné adheze, a dále do regulačních oblastí genů *atd1*, *nep2*, *mug115* a oblasti rDNA, které byly vybrány na základě možné

role v odpovědi na genotoxický stres (Tab. 36). Z pilotního experimentu je patrné, že vazba na testované lokusy je podmíněna schopností kanonické přímé vazby proteinu Cbf12 na DNA (Obr. 27). Co se týče problematiky adheze, je toto zjištění v souladu s projevem DBM na buněčné úrovni – kmen Cbf12DBM-TAP ztrácí schopnost adhezivitu. Předpokládáme, že protein Cbf12DBM se není schopen vázat do promotoru genů *cbf12*, *gsf2* a *pfl7*, tyto nejsou dostatečně transkripčně aktivovány, dochází ke snížené expresi flokulinů a buňky nedokážou přilnout k agaru. Předpoklad by bylo vhodné doplnit stanovením hladiny mRNA genů kódujících flokuliny ve studovaných kmenech Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP. V případě problematiky odpovědi na genotoxický stres jsme u vybraných lokusů *atd1*, *nep2*, *mug115* a rDNA nezaznamenali korelaci s fenotypem pozorovaným na buněčné úrovni; podle studia citlivosti buněk na CPT totiž není vyžadována schopnost kanonické přímé vazby Cbf12 na DNA. Uvažujeme-li, že protein Cbf12 hraje v procesu udržování integrity genomu roli transkripčního faktoru, pak vytipované oblasti pravděpodobně nemají na tento proces vliv a bylo by potřeba studovat vazbu na jiných kandidátních sekvencích. Nicméně protein Cbf12 nemusí zastávat jen funkci transkripčního faktoru. Je možné, že role Cbf12 v odpovědi na genotoxický stres není vůbec spojena s jeho DNA-vazebnou aktivitou. Mohl by se např. uplatňovat mimo jádro. Mimo-jaderná role transkripčního faktoru byla popsána u savčího proteinu INSM1. Transkripční faktor INSM1 („insulinoma-associated antigen-1“) obsahuje motiv zinkového prstu a uplatňuje se při vývoji pankreatu, kde funguje jako transkripční represor (Liu *et al.* 2006). Byly popsány dvě mimo-jaderné aktivity proteinu INSM1. Zprvém, váže se na cyklin D1, což vede k zastavení buněčného cyklu (Zhang *et al.* 2009). Zadruhé, svou vazbou na RACK1 („receptor of activated C kinase 1“) zabraňuje interakci RACK1 s inzulinovým receptorem (InR) a tím pádem brání aktivaci InR-signální dráhy, která je důležitá pro diferenciaci endokrinních buněk pankreatu (Zhang *et al.* 2014). Dalším příkladem transkripčního faktoru, jehož funkce není omezena pouze na regulaci transkripce, je protein p53 – klíčový senzor buněčného poškození. Bylo prokázáno, že v odpovědi na celou řadu stresových signálů protein p53 translokuje k povrchu mitochondrie, kde vyvolává permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, čímž dochází k uvolnění cytochromu *c* a dalších apoptogenních faktorů a tedy ke spuštění apoptózy. Tento p53-mitochondriální program pravděpodobně předchází p53-transkripčnímu programu, kdy protein p53 v odpovědi na aktivační stimuly transkripčně aktivuje proapoptotické geny, respektive reprimuje geny antiapoptotické (Marchenko *et al.* 2000; Erster *et al.* 2004).

Mimo-jaderná role proteinu p53 byla popsána i v procesu nekrózy. V reakci na oxidativní stres se protein p53 akumuluje v matrix mitochondrie, kde skrze interakci s cyklofilinem D vyvolává otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti, což vede ke spuštění nekrózy (Vaseva *et al.* 2012).

Na základě dat získaných metodami ChIP-seq (Převorovský *et al.* 2015) a ChIP-qPCR (tato práce) víme, že protein Cbf12 se mj. *in vivo* váže do regulačních oblastí již několikrát zmiňovaných genů *cbf12*, *gsf2*, *pfl7*, *atd1*, *nep2*, *mug115* a do oblasti rDNA. Navíc se do těchto regionů váže pravděpodobně přímo (viz výše). Analyzovala jsem, zda se v identifikovaných vazebných sekvencích nachází konsenzuální CSL-vazebný element GTG(A/G)GAA (4.8). Tento byl nalezen pouze u *pfl7*, *atd1* a *nep2* (Tab. 37). Protein Cbf12 je tedy v ostatních případech pravděpodobně schopen se vázat např. na degenerovaný konsenzuální vazebný motiv, popřípadě na nějaký alternativní motiv. Živočišné proteiny rodiny CSL jsou také schopné rozeznávat kromě kanonického vazebného elementu i další motivy (Barolo *et al.* 2000; Friedmann & Kovall 2010).

Tab. 37: Hledání vazebného motivu ve vybraných cílových sekvencích proteinu Cbf12. V tabulce jsou uvedeny počty konsenzuálních CSL-vazebných elementů nalezených v sekvenci pod zaznamenanou vazebnou událostí (pod „peakem“; ChIP-seq).

| název | produkt | motiv GTG(A/G)GAA |
|---------------|---|-------------------|
| <i>cbf12</i> | transkripční faktor Cbf12 | 0 |
| <i>gsf2</i> | dominantní flokulin Gsf2 | 0 |
| <i>pfl7</i> | flokulin Pfl7 | 1 |
| <i>atd1</i> | predikovaná aldehyddehydrogenáza Atd1 | 4 |
| <i>nep2</i> | NEDD8 proteáza Nep2 | 2 |
| <i>mug115</i> | protein Mug115 specifický pro <i>S. pombe</i> | 0 |
| <i>rDNA</i> | ribozomální RNA | 0 |

V laboratoři Dr. Chuy se na základě transkriptomických a ChIP-chip dat pokoušeli nalézt vazebný motiv pro protein Cbf12. Specifický vazebný motiv neidentifikovali. Pokud ale k hledání motivu využili promotorové oblasti několika vysoce indukovaných genů v kmeni s nadprodukovaným Cbf12, které byly zařazeny do kategorie genů kódujících proteiny buněčného povrchu, našli motiv, který se blíží kanonickému CSL-vazebnému elementu (Kwon *et al.* 2012).

Bylo by zajímavé studovat DNA-vazebnou aktivitu proteinu Cbf12/Cbf12DBM v rámci celého genomu. Rádi bychom proto provedli ChIP-seq experiment s kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP vytvořenými v rámci této práce. Porovnání vazebných událostí mezi kmeny by přispělo k objasnění biologických rolí proteinu Cbf12 spojených s různými režimy vazby na DNA.

7 SHRNU TÍ

Výsledky popsané v rámci předložené diplomové práce jsou shrnuty níže:

- Pracovali jsme na konstrukci kmenů nutných pro studium režimu vazby proteinů CSL na DNA u *Schizosaccharomyces pombe*. Potřebovali jsme vytvořit takové kmeny, ve kterých by byla/nebyla přítomna mutace DBM v chromozomálním lokusu genů kódujících proteiny CSL, ve kterých by byl připojen TAP-tag za 3'-konec ORF proteinů Cbf11/Cbf12 a které by obsahovaly intaktní oblast 3'UTR.
 - S využitím „*ura4* selekčního systému“ jsme úspěšně zkonstruovali kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP.
 - S použitím systému CRISPR/Cas9, který jsme u nás v laboratoři nově zavedli, jsme úspěšně vytvořili kmen Cbf11-TAP. Kmen Cbf11DBM-TAP se prozatím připravit nepodařilo.
- Fenotypizovali jsme prototrofní kmeny Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP.
 - Zjistili jsme, že rychlost růstu kultury není ovlivněna vnesením mutace DBM do otevřeného čtecího rámce genu *cbf12*.
 - Metodou omývacího testu bylo prokázáno, že přítomnost mutace DBM v proteinu Cbf12 zapříčiní ztrátu schopnosti buněk přilnout k agaru. Pro proces regulace buněčné adheze je potřeba zachovat intaktní DNA-vazebnou doménu proteinu Cbf12 a tedy pravděpodobně i schopnost kanonické přímé vazby proteinu Cbf12 na DNA.
 - Ze studia citlivosti buněk na CPT vyplynulo, že mutace DBM v proteinu Cbf12 nezpůsobí senzitivitu buněk na tuto genotoxickou látku. Role Cbf12 v procesu udržování integrity genomu není závislá na funkčnosti DNA-vazebné domény a tedy na schopnosti kanonické přímé vazby na DNA.
- Metodou ChIP-qPCR jsme studovali vazbu proteinu Cbf12 a jeho DBM varianty na DNA *in vivo*.
 - Zjistili jsme, že v případě využití auxotrofních kmenů Cbf12-TAP a Cbf12DBM-TAP se protein Cbf12DBM váže na všech 12 vybraných lokusů s nižší intenzitou oproti svému nemutovanému protějšku. Z toho plyne, že pro vazbu na tato konkrétní cílová místa je vyžadována schopnost přímé

vazby Cbf12 na DNA. K dalšímu studiu vazby Cbf12 vs. Cbf12DBM jsme využívali kmeny prototrofní.

- V rámci pilotního experimentu jsme zaznamenali snížení vazby proteinu Cbf12DBM do promotorových oblastí genů *cbf12*, *gsf2* a *pfl7*, které jsou transkripčně aktivovány skrze Cbf12 a souvisejí s regulací buněčné adheze. Pro vazbu Cbf12 do těchto oblastí je vyžadována neporušená DNA-vazebná doména. V procesu regulace buněčné adheze koreluje vazebná studie s projevem DBM na buněčné úrovni.
 - Na základě pilotního pokusu jsme zjistili, že pro vazbu proteinu Cbf12 do regulačních oblastí genů *atd1*, *nep2*, *mug115* a oblasti rDNA je potřeba, aby byla zachována funkčnost jeho DNA-vazebné domény. Zmíněné oblasti byly k testování vybrány pro svou potenciální roli v odpovědi na genotoxický stres. Zdá se, že vazba proteinu Cbf12 do zmíněných lokusů nemá zjevnou spojitost s citlivostí kmene $\Delta cbf12$ na camptothecin.
 - Ve vazebných sekvencích genů *cbf12*, *gsf2*, *pfl7*, *atd1*, *nep2*, *mug115* a v oblasti rDNA, kam se protein Cbf12 váže přímo, jsme hledali konsenzuální CSL-vazebný element GTG(A/G)GAA; tento byl nalezen pouze u *pfl7*, *atd1* a *nep2*. Protein Cbf12 je pravděpodobně schopen kromě kanonické vazebné sekvence rozeznávat i motivy jiné.
- Jelikož jsme měli podezření, že v našich laboratorních podmínkách nefunguje metoda ChIP-qPCR, zabývali jsme se ověřováním její funkčnosti.
 - Zjistili jsme, že technika ChIP-qPCR funguje. Pokud k izolaci precipitovaného materiálu použijeme fenol-chloroformovou extrakci, omezíme riziko selhání následné qPCR, ke kterému několikrát došlo při použití chelexu.
 - V rámci této práce jsou popsány také dílčí experimenty, které se týkají role Cbf11 v regulaci exprese vybraných genů v průběhu buněčného cyklu a funkčního propojení mezi proteiny Cbf11 a Cut6.
 - Z doposud neobjasněných důvodů se nepodařilo zreprodukovat původní výsledky naší laboratoře (Dr. Převorovský, Dr. Oravcová), které ukázaly, že pokud jsou buňky synchronizovány pomocí termosenzitivní alely *cdc25-22*,

dosahuje vazba proteinu Cbf11 do promotorových oblastí genů *cut6*, *vht1* a *bio2* maxima v S fázi buněčného cyklu a/nebo v cytokinezi.

- Podařilo se zreprodukovat experiment popisující vliv proteinu Cbf11 na hladinu transkriptu genů *cut6*, *vht1* a *bio2* v rámci buněčného cyklu při použití synchronizační metody využívající *cdc25-22*. Hladina mRNA genů *cut6*, *vht1* a *bio2* je snížena u kmene $\Delta cbf11$ v porovnání s kmenem, kde je gen *cbf11* přítomný. Exprese studovaných genů osciluje v rámci průchodu prvním buněčným cyklem; oscilace je však pravděpodobně artefaktem synchronizace, která zahrnuje tepelný šok.
- Zjistili jsme, že nadprodukcí proteinu Cut6 docílíme částečné suprese růstového defektu kmene $\Delta cbf11$.

8 PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY

- Ali Gianni, S. *et al.*, 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(8), p.e1000626.
- Anders, C. *et al.*, 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), pp.569–73.
- Andreishcheva, E.N. *et al.*, 2004. Five genes involved in biosynthesis of the pyruvylated Galbeta1,3-epitope in *Schizosaccharomyces pombe* N-linked glycans. *The Journal of biological chemistry*, 279(34), pp.35644–55.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415), pp.770–6.
- Baber-Furnari, B.A. *et al.*, 2000. Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint. *Molecular biology of the cell*, 11(1), pp.1–11.
- Bähler, J. *et al.*, 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)*, 14(10), pp.943–51.
- Barolo, S. *et al.*, 2000. A notch-independent activity of suppressor of hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell*, 103(6), pp.957–969.
- Bastia, D. & Singh, S.K., 2011. “Chromosome kissing” and modulation of replication termination. *Bioarchitecture*, 1(1), pp.24–28.
- Beltraminelli, N., Murone, M. & Simanis, V., 1999. The *S. pombe zfs1* gene is required to prevent septation if mitotic progression is inhibited. *Journal of cell science*, 112 Pt 18, pp.3103–14.
- Beltrao, P., Cagney, G. & Krogan, N.J., 2010. Quantitative genetic interactions reveal biological modularity. *Cell*, 141(5), pp.739–45.
- Beres, T.M. *et al.*, 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. *Molecular and cellular biology*, 26(1), pp.117–30.
- Del Bianco, C. *et al.*, 2010. Notch and MAML-1 complexation do not detectably alter the DNA binding specificity of the transcription factor CSL. *PloS one*, 5(11), p.e15034.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), pp.1513–23.
- Bray, S., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(September), pp.678–689.
- Brooks, S.A. & Blackshear, P.J., 2014. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(6–7), pp.666–79.
- Caetano, C., Klier, S. & Bruin, R. de, 2011. Phosphorylation of the MBF repressor Yox1p by the DNA replication checkpoint keeps the G1/S cell-cycle transcriptional program active. *PloS one*, 6(2), p.e17211.
- Daněš, P., 2015. The molecular mechanism of CSL protein participation in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*
- Díaz-Trelles, R. *et al.*, 2016. Notch-independent RBPJ controls angiogenesis in the adult heart. *Nature communications*, 7(May), p.12088.
- Dixon, S.J. *et al.*, 2009. Systematic mapping of genetic interaction networks. *Annual review of genetics*, 43(1), pp.601–25.
- Dodgson, J. *et al.*, 2009. Functional genomics of adhesion, invasion, and mycelial formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*, 8(8), pp.1298–306.
- Durand-Dubief, M. *et al.*, 2010. Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression *in vivo*. *The EMBO journal*, 29(13), pp.2126–34.
- Enoch, T., Carr, A.M. & Nurse, P., 1992. Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes & development*, 6(11), pp.2035–46.
- Erster, S. *et al.*, 2004. *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Molecular*

- and cellular biology, 24(15), pp.6728–41.
- Fantes, P., 1979. Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature*, 279(5712), pp.428–30.
- Fernandez Sarabia, M.J. *et al.*, 1993. The cell cycle genes *cdc22⁺* and *suc22⁺* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encode the large and small subunits of ribonucleotide reductase. *Molecular & general genetics : MGG*, 238(1–2), pp.241–51.
- Friedmann, D.R. & Kovall, R.A., 2010. Thermodynamic and structural insights into CSL-DNA complexes. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 19(1), pp.34–46.
- Friedmann, D.R., Wilson, J.J. & Kovall, R.A., 2008. RAM-induced allostery facilitates assembly of a notch pathway active transcription complex. *The Journal of biological chemistry*, 283(21), pp.14781–91.
- Furnari, B. *et al.*, 1999. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Molecular biology of the cell*, 10(4), pp.833–45.
- Ghosh, G. *et al.*, 1995. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature*, 373(6512), pp.303–10.
- Gómez, E.B. & Forsburg, S.L., 2004. Analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 241, pp.93–111.
- Gordán, R., Hartemink, A.J. & Bulyk, M.L., 2009. Distinguishing direct versus indirect transcription factor-DNA interactions. *Genome research*, 19(11), pp.2090–100.
- Greenall, A. *et al.*, 2002. Role of fission yeast Tup1-like repressors and Prr1 transcription factor in response to salt stress. *Molecular biology of the cell*, 13(9), pp.2977–89.
- Hartwell, L.H. & Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4930), pp.629–34.
- Hasan, A. *et al.*, 2014. Systematic analysis of the role of RNA-binding proteins in the regulation of RNA stability. *PLoS genetics*, 10(11), p.e1004684.
- Hayles, J. *et al.*, 2013. A genome-wide resource of cell cycle and cell shape genes of fission yeast. *Open biology*, 3(5), p.130053.
- Heigwer, F., Kerr, G. & Boutros, M., 2014. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature methods*, 11(2), pp.122–3.
- Hirayama, S. *et al.*, 2003. Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*, 278(20), pp.18078–84.
- Hoffman, C.S. & Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2–3), pp.267–72.
- Hori, K. *et al.*, 2008. A nonclassical bHLH Rbpj transcription factor complex is required for specification of GABAergic neurons independent of Notch signaling. *Genes & development*, 22(2), pp.166–78.
- Hori, K., Sen, A. & Artavanis-Tsakonas, S., 2013. Notch signaling at a glance. *Journal of cell science*, 126(Pt 10), pp.2135–40.
- Hsiang, Y. *et al.*, 1985. Camptothecin Induces Protein-linked DNA Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I*. *The Journal of biological chemistry*.
- Hsiang, Y., Lihou, M.G. & Liu, L.F., 1989. Arrest of Replication Forks by Drug-stabilized Topoisomerase I-DNA Cleavable Complexes as a Mechanism of Cell Killing by Camptothecin. *Cancer Research*, pp.5077–5082.
- Hughes, A.L., Todd, B.L. & Espenshade, P.J., 2005. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell*, 120(6), pp.831–42.
- Chatfield-Reed, K. *et al.*, 2016. Conserved and Diverged Functions of the Calcineurin-Activated Prz1 Transcription Factor in Fission Yeast. *Genetics*, 202(4), pp.1365–75.
- Chaudhuri, B., Ingavale, S. & Bachhawat, A.K., 1997. *apd1⁺*, a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics*, 145(1), pp.75–83.
- Chen, C.Y. *et al.*, 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, 107(4), pp.451–64.

- Chung, C.N. *et al.*, 1994. Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa. *Nucleic acids research*, 22(15), pp.2938–44.
- Jacobs, J.Z. *et al.*, 2014. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nature communications*, 5, p.5344.
- Kamens, J., 2015. The Addgene repository: an international nonprofit plasmid and data resource. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), pp.D1152-7.
- Kanamitsu, K. & Ikeda, S., 2011. Fission yeast homologs of human XPC and CSB, *rhp41* and *rhp26*, are involved in transcription-coupled repair of methyl methanesulfonate-induced DNA damage. *Genes & genetic systems*, 86(2), pp.83–91.
- Kanoh, J., Sugimoto, A. & Yamamoto, M., 1995. *Schizosaccharomyces pombe zfs1*⁺ encoding a zinc-finger protein functions in the mating pheromone recognition pathway. *Molecular biology of the cell*, 6(9), pp.1185–95.
- Kawashima, S.A. *et al.*, 2012. Analyzing fission yeast multidrug resistance mechanisms to develop a genetically tractable model system for chemical biology. *Chemistry & biology*, 19(7), pp.893–901.
- Kobayashi, T., 2008. A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus--rDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 30(3), pp.267–72.
- Kobayashi, T., 2014. Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 90(4), pp.119–29.
- Kovall, R.A. & Blacklow, S.C., 2010. Mechanistic insights into notch receptor signaling from structural and biochemical studies, *Elsevier Inc.*
- Kovall, R.A. & Hendrickson, W.A., 2004. Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *The EMBO journal*, 23(17), pp.3441–51.
- Kwon, E.G. *et al.*, 2012. Deciphering the transcriptional-regulatory network of flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS genetics*, 8(12), p.e1003104.
- de Lahondès, R., Ribes, V. & Arcangioli, B., 2003. Fission yeast Sap1 protein is essential for chromosome stability. *Eukaryotic cell*, 2(5), pp.910–21.
- Lai, W.S., Carrick, D.M. & Blackshear, P.J., 2005. Influence of nonameric AU-rich tristetraprolin-binding sites on mRNA deadenylation and turnover. *The Journal of biological chemistry*, 280(40), pp.34365–77.
- Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J., 2002. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *The Journal of biological chemistry*, 277(11), pp.9606–13.
- Lewinska, A. *et al.*, 2010. Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox report: communications in free radical research*, 15(2), pp.87–96.
- Liu, W.-D. *et al.*, 2006. INSM1 functions as a transcriptional repressor of the neuroD/beta2 gene through the recruitment of cyclin D1 and histone deacetylases. *The Biochemical journal*, 397(1), pp.169–77.
- Lõoke, M., Kristjuhan, K. & Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), pp.325–8.
- Louvi, A. & Artavanis-Tsakonas, S., 2012. Notch and disease: a growing field. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(4), pp.473–80.
- Lundin, C. *et al.*, 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 33(12), pp.3799–811.
- Malagón, F. & Aguilera, A., 2001. Yeast *spt6-140* mutation, affecting chromatin and transcription, preferentially increases recombination in which Rad51p-mediated strand exchange is dispensable. *Genetics*, 158(2), pp.597–611.
- Marchenko, N.D., Zaika, A. & Moll, U.M., 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *The Journal of biological chemistry*, 275(21), pp.16202–12.

- Masui, T. *et al.*, 2007. Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes & development*, 21(20), pp.2629–43.
- Mata, J. & Bähler, J., 2006. Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), pp.15517–22.
- Matsuzawa, T. *et al.*, 2011. Identification of a galactose-specific flocculin essential for non-sexual flocculation and filamentous growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology*, 82(6), pp.1531–44.
- Matsuzawa, T. *et al.*, 2013. The zinc finger protein Gsf1 regulates Gsf2-dependent flocculation in fission yeast. *FEMS yeast research*, 13(3), pp.259–66.
- Matsuzawa, T., Yoritsune, K. & Takegawa, K., 2012. MADS box transcription factor Mbx2/Pvg4 regulates invasive growth and flocculation by inducing *gsf2*⁺ expression in fission yeast. *Eukaryotic cell*, 11(2), pp.151–8.
- McDowall, M.D. *et al.*, 2015. PomBase 2015: updates to the fission yeast database. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), pp.D656–61.
- Mendes-Giannini, M.J.S. *et al.*, 2005. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. *FEMS immunology and medical microbiology*, 45(3), pp.383–94.
- Millar, J.B., Russell, P., *et al.*, 1992. Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast. *The EMBO journal*, 11(13), pp.4943–52.
- Millar, J.B., Lenaers, G. & Russell, P., 1992. Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *The EMBO journal*, 11(13), pp.4933–41.
- Minoguchi, S. *et al.*, 1997. RBP-L, a transcription factor related to RBP-Jkappa. *Molecular and cellular biology*, 17(5), pp.2679–87.
- Mojardín, L. *et al.*, 2015. Chromosome segregation and organization are targets of 5'-Fluorouracil in eukaryotic cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(2), pp.206–18.
- Morel, V. & 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 and Development*, 14(3), pp.377–388.
- Morishita, T. *et al.*, 2002. The *Schizosaccharomyces pombe rad60* gene is essential for repairing double-strand DNA breaks spontaneously occurring during replication and induced by DNA-damaging agents. *Molecular and cellular biology*, 22(10), pp.3537–48.
- Morita, T. & Takegawa, K., 2004. A simple and efficient procedure for transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)*, 21(8), pp.613–7.
- Mudge, D.K. *et al.*, 2012. Use of a *ura5*⁺-*lys7*⁺ cassette to construct unmarked gene knock-ins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics*, 58(1), pp.59–64.
- Murakami, H. & Okayama, H., 1995. A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature*, 374(6525), pp.817–9.
- Murzin, A.G., Lesk, M. & Chothiap, C., 1992. P-Trefoil Fold Patterns of Structure and Sequence in the Kunitz Inhibitors and Ia and Fibroblast Growth Factors. *Journal of molecular biology*, 223(2), pp.531–543.
- Nam, Y. *et al.*, 2006. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell*, 124(5), pp.973–83.
- Nam, Y. *et al.*, 2003. Structural requirements for assembly of the CSL-intracellular Notch1-Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *The Journal of biological chemistry*, 278(23), pp.21232–9.
- Navarro, F.J. & Nurse, P., 2012. A systematic screen reveals new elements acting at the G2/M cell cycle control. *Genome biology*, 13(5), p.R36.
- Nguyen, B.-C. *et al.*, 2006. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes & development*, 20(8), pp.1028–42.
- Nguyen, T.T.T. *et al.*, 2016. Predicting chemotherapeutic drug combinations through gene network profiling. *Scientific reports*, 6, p.18658.
- Noguchi, E. *et al.*, 2009. Assays used to study the DNA replication checkpoint in fission yeast. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 521, pp.493–507.
- Noisa, P. *et al.*, 2014. Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. *Journal of cell science*, 127(Pt 9), pp.2083–94.

- Nurse, P., Thuriaux, P. & Nasmyth, K., 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & general genetics : MGG*, 146(2), pp.167–78.
- Nyberg, K.A. *et al.*, 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics*, 36(1), pp.617–56.
- Ohmiya, R. *et al.*, 1999. A fission yeast gene (*prr1*⁺) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *Journal of biochemistry*, 125(6), pp.1061–6.
- Okazaki, K. *et al.*, 1990. High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research*, 18(22), pp.6485–9.
- Oravcová, M. *et al.*, 2013. Fission yeast CSL proteins function as transcription factors. *PLoS one*, 8(3), p.e59435.
- Oravcová, M., 2014. Transkripční faktory CSL a jejich role v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*
- Owczarzy, R. *et al.*, 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), pp.W163-9.
- Pan, X. *et al.*, 2012. Identification of novel genes involved in DNA damage response by screening a genome-wide *Schizosaccharomyces pombe* deletion library. *BMC genomics*, 13, p.662.
- Penton, A.L., Leonard, L.D. & Spinner, N.B., 2012. Notch signaling in human development and disease. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(4), pp.450–7.
- Pérez-Ortín, J.E. *et al.*, 2013. Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *Journal of molecular biology*, 425(20), pp.3750–75.
- Petersen, J. & Russell, P., 2016. Growth and the Environment of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor protocols*, 2016(3), p.pdb.top079764.
- Phalip, V., Lemoine, Y. & Jeltsch, J.M., 1999. Cloning of *Schizosaccharomyces pombe bio2* by heterologous complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Current microbiology*, 39(6), pp.348–0350.
- Pommier, Y. *et al.*, 2006. Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 81(6), pp.179–229.
- Převorovský, M. *et al.*, 2009. Cbf11 and Cbf12, the fission yeast CSL proteins, play opposing roles in cell adhesion and coordination of cell and nuclear division. *Experimental cell research*, 315(8), pp.1533–47.
- Převorovský, M., Půta, F. & Folk, P., 2007. Fungal CSL transcription factors. *BMC genomics*, 8, p.233.
- Převorovský, M. *et al.*, 2016. CSL protein regulates transcription of genes required to prevent catastrophic mitosis in fission yeast. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(22), pp.3082–3093.
- Převorovský, M. *et al.*, 2015. Fission Yeast CSL Transcription Factors: Mapping Their Target Genes and Biological Roles. *PLoS one*, 10(9), p.e0137820.
- Převorovský, M. *et al.*, 2011. N-termini of fungal CSL transcription factors are disordered, enriched in regulatory motifs and inhibit DNA binding in fission yeast. *PLoS one*, 6(8), p.e23650.
- Pursglove, S.E. & Mackay, J.P., 2005. CSL: a notch above the rest. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(12), pp.2472–7.
- Rhind, N. & Russell, P., 2000. Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *Journal of cell science*, 113 (Pt 2(Pt 22)), pp.3889–96.
- Rhind, N. & Russell, P., 2001. Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G₂ DNA damage and replication checkpoints. *Molecular and cellular biology*, 21(5), pp.1499–508.
- Robinson, J.T. *et al.*, 2011. Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*, 29(1), pp.24–6.
- Rodríguez-López, M. *et al.*, 2016. A CRISPR/Cas9-based method and primer design tool for seamless genome editing in fission yeast. *Wellcome Open Research*, 1(0), p.19.
- Ryan, C.J. *et al.*, 2012. Hierarchical modularity and the evolution of genetic interactomes across species. *Molecular cell*, 46(5), pp.691–704.
- Saitoh, S. *et al.*, 1996. Aberrant mitosis in fission yeast mutants defective in fatty acid synthetase and acetyl CoA carboxylase. *The Journal of cell biology*, 134(4), pp.949–61.

- Saitoh, S. *et al.*, 2015. Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Molecular biology of the cell*, 26(2), pp.373–86.
- Sharifmoghadam, M.R. *et al.*, 2010. Different steps of sexual development are differentially regulated by the Sec8p and Exo70p exocyst subunits. *FEMS microbiology letters*, 305(1), pp.71–80.
- Schmidt, D. *et al.*, 2009. ChIP-seq: using high-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions. *Methods (San Diego, Calif.)*, 48(3), pp.240–8.
- Sievers, F. *et al.*, 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), p.539.
- Singh, S.K. *et al.*, 2010. Regulation of replication termination by Reb1 protein-mediated action at a distance. *Cell*, 142(6), pp.868–78.
- Soares, E. V., 2011. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of applied microbiology*, 110(1), pp.1–18.
- Sorek, R., Lawrence, C.M. & Wiedenheft, B., 2013. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual review of biochemistry*, 82, pp.237–66.
- Sternberg, S.H. *et al.*, 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), pp.62–7.
- Stolz, J., 2003. Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)*, 20(3), pp.221–31.
- Suga, M. & Hatakeyama, T., 2005. A rapid and simple procedure for high-efficiency lithium acetate transformation of cryopreserved *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Yeast (Chichester, England)*, 22(10), pp.799–804.
- Tanaka, N. *et al.*, 1999. Cell surface galactosylation is essential for nonsexual flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of bacteriology*, 181(4), pp.1356–9.
- Tay, Z. *et al.*, 2013. Cellular robustness conferred by genetic crosstalk underlies resistance against chemotherapeutic drug doxorubicin in fission yeast. *PloS one*, 8(1), p.e55041.
- Terns, R.M. & Terns, M.P., 2014. CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed. *Trends in genetics : TIG*, 30(3), pp.111–8.
- Tsao, Y.P. *et al.*, 1993. Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system. *Cancer research*, 53(24), pp.5908–14.
- Tun, T. *et al.*, 1994. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic acids research*, 22(6), pp.965–971.
- Tvarůžková, J., 2015. The role of CSL proteins in oxidative stress response of *Schizosaccharomyces pombe*
- Uemura, T. & Yanagida, M., 1984. Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *The EMBO journal*, 3(8), pp.1737–44.
- Vachon, L. *et al.*, 2013. Functional characterization of fission yeast transcription factors by overexpression analysis. *Genetics*, 194(4), pp.873–84.
- Vallejo, J.A. *et al.*, 2013. Cell aggregations in yeasts and their applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), pp.2305–18.
- VanDussen, K.L. *et al.*, 2012. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 139(3), pp.488–97.
- Vaseva, A. V. *et al.*, 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149(7), pp.1536–48.
- Verstrepen, K.J. & Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology*, 60(1), pp.5–15.
- Walworth, N., Davey, S. & Beach, D., 1993. Fission yeast *chk1* protein kinase links the *rad* checkpoint pathway to *cdc2*. *Nature*, 363(6427), pp.368–71.
- Walworth, N.C. & Bernards, R., 1996. *rad*-dependent response of the *chk1*-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5247), pp.353–6.
- Wan, S., Capasso, H. & Walworth, N.C., 1999. The topoisomerase I poison camptothecin

- generates a Chk1-dependent DNA damage checkpoint signal in fission yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 15(10A), pp.821–8.
- Watson, A. *et al.*, 2003. Global Gene Expression Responses of Fission Yeast to Ionizing Radiation. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), pp.851–860.
- Wells, M.L. *et al.*, 2012. Posttranscriptional regulation of cell-cell interaction protein-encoding transcripts by Zfs1p in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*, 32(20), pp.4206–14.
- Wilson, J.J. & Kovall, R.A., 2006. Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell*, 124(5), pp.985–96.
- Wood, V. *et al.*, 2012. PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), pp.D695-9.
- Wood, V. *et al.*, 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), pp.871–80.
- Worthington, M.T. *et al.*, 2002. RNA binding properties of the AU-rich element-binding recombinant Nup475/TIS11/tristetraprolin protein. *The Journal of biological chemistry*, 277(50), pp.48558–64.
- Yamada, T. *et al.*, 2004. Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *The EMBO journal*, 23(8), pp.1792–803.
- Yang, X. *et al.*, 2004. Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Developmental biology*, 269(1), pp.81–94.
- Zach, R., 2017. The phenomenon of mitotic catastrophe in $\Delta cbf11$ mutant
- Zhang, T. *et al.*, 2014. Extra-nuclear activity of INSM1 transcription factor enhances insulin receptor signaling pathway and Nkx6.1 expression through RACK1 interaction. *Cellular signalling*, 26(4), pp.740–7.
- Zhang, T. *et al.*, 2009. Zinc finger transcription factor INSM1 interrupts cyclin D1 and CDK4 binding and induces cell cycle arrest. *The Journal of biological chemistry*, 284(9), pp.5574–81.
- Zhang, Y. *et al.*, 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology*, 9(9), p.R137.

9 PŘÍLOHY

9.1 Konstrukce kmene Cbf12-TAP pomocí „*ura4* selekčního systému“ (Dr. Oravcová)

9.1.1 První krok integrace – konstrukce kmene o genotypu *cbf12::ura4*⁺

Prvním integračním krokem byl zkonstruován kmen, ve kterém je část otevřeného čtecího rámce proteinu Cbf12 nahrazena genem *ura4* (genotyp: *cbf12::ura4*⁺).

Plazmid pMaP21 nesoucí sekvenci genu *ura4* sloužil jako templát pro homologní rekombinaci. Byl naštěpen trojicí restričních endonukleáz Sall, KasI a AlwNI a následně byl fosfatázován. Enzymy byly tepelně inaktivovány a celá směs byla transformována do kvasinkového kmene PN559. Dr. Oravcová postupovala podle protokolu 4.2.2.1. Přesné parametry transformace a odchylky od obecného protokolu byly následující:

- kmen *S. pombe* kultivován v médiu YES na OD 1,5
- transformující DNA – použity 3 µg plazmidu
- po aplikaci tepelného šoku transformované buňky resuspendovány do 4 ml neselekčního média YES a inkubovány přes noc ve 30°C; další den promyty sterilní diH₂O, resuspendovány do 300 µl diH₂O, vysety na selekční plotnu bez uracilu (EMM+A+L) a 3 dny inkubovány při 30°C.

Z kolonií narostlých po transformaci na selekčním médiu, a tedy schopných syntetizovat uracil, bylo vybráno 127 klonů a ty byly podrobeny dalšímu testování. U dvou klonů byla pomocí PCR ověřena integrace genu *ura4* do chromozomálního lokusu genu *cbf12*. K tomuto účelu byl využit trojprimerový systém MaP127+MP31+MP32. Nově vytvořené kmeny byly pojmenovány MaP178 a MaP179, přičemž první z nich byl použit pro druhý integrační krok.

9.1.2 Druhý krok integrace – konstrukce kmene Cbf12-TAP

Ve druhém kroku integrace byl jako templát pro homologní rekombinaci použit plazmid pMaP29, který obsahuje 3' část kódující sekvence genu *cbf12*, sekvenci kódující TAP-tag a část sekvence *cbf12* 3'UTR. Plazmid byl naštěpen restričními endonukleázami Sall, KasI a AlwNI, a poté byl fosfatázován. Enzymy byly tepelně

inaktivovány a směs byla transformována do kmene MaP178 podle protokolu 4.2.2.1. Zde jsou uvedeny přesné parametry transformace:

- kmen *S. pombe* kultivován v médiu YES na OD 2
- transformující DNA – použity 3 µg plazmidu
- neselekční médium – YES
- selekční médium – YES+5-FOA

Z 20 monoklonií, podrobených testování pomocí PCR, byla u 3 klonů prokázána integrace templátového fragmentu homologní rekombinací do genomu. K testování byl využit trojprimerový systém MaP127+MaP117+MP32. Nově vzniklé kmeny byly pojmenovány MaP183, MaP184 a MaP185. Chromozomální lokus genu *cbf12* byl u klonu MaP183 ověřen sekvenováním. V takto ověřeném kmeni byla metodou western blot prokázána exprese TAP-tagem značeného proteinu Cbf12. Podařilo se tedy zkonstruovat kmen Cbf12-TAP.

9.2 Konstrukce kmene o genotypu *cbf11::ura4⁺* (Dr. Oravcová)

Za účelem konstrukce kmene, ve kterém je část otevřeného čtecího rámce proteinu Cbf11 nahrazena genem *ura4*, byl do kmene PN559 transformován plazmid pMaP07. Tento sloužil jako templát pro homologní rekombinaci – kromě rekombinogenních oblastí obsahoval sekvenci genu *ura4*, kterou bylo nutné integrovat do chromozomálního lokusu genu *cbf11*. Plazmid byl pro účely transformace naštěpen restrikcími endonukleázami Sall, EcoO109I a AlwNI, a poté byl fosfatázován. Byly využity stejné podmínky transformace a následné selekce jako v kapitole 9.1.1. Na selekčním médiu vyrostly po transformaci stovky kolonií. Dalšímu testování bylo podrobena bezmála 200 monoklonií, nicméně pouze u jednoho klonu byla prokázána integrace templátového fragmentu do genomu. Integrace do chromozomu byla ověřena pomocí PCR s využitím páru primerů MaP127+MP28. Vytvořený kmen byl pojmenován MaP180.

9.3 Navržení cílové sekvence pro CRISPR/Cas9 v otevřeném čtecím rámci genu *ura4*

```
ATGGATGCTAGAGTATTTCAAAGCTATTCAGCTAGAGCTGAGGGGATGAAAAATCCCATTGC
CAAGGAATTGTTGGCTTTGATGGAAGAAAAGCAAAGCAACTTGTCAGTCGCGGTTCGATTGA
CGAAGAAATCCGAAATCTTAGAATTGGTAGATAAAATTGGACCCTATGTCTGTGTTATCAAG
ACACATATTGACGTTGTCTGAGGATTTTCGACCAGGATATGGTAGAAAAACTGGTGGCCTTAGG
TAAAAAGCATCGTTTTCTTATCTTTGAGGATCGCAAATTCGCAGACATTGGAAATACCGTCA
```

AGCTACAATATGCATCTGGTGTGTACAAAATTGCTTCTTGGGCTCATATCACAAATTGCCAT
ACAGTGCCAGGCGAGGGTATTATACAAGGCCTCAAAGAAGTTGGTTTACCTTTGGGACGTGG
TCTCTTGGTTTTGGCTGAAATGTCTTCCAAAGGCTCTTTGGCTACTGGTTCCTACACAGAGAA
AACCTTAGAATGGTTTGAGAAGCATACCGATTTTTGCTTTGGCTTATAGCTGGTTCGTCGATT
TCCTAACCTTCAAAGCGACTACATAACTATGTCCCCTGGTATCGGCTTGGATGTTAAAGGAG
ACGGGCTGGGACAGCAATATCGTACTCCTGAAGAAGTGATTGTAAACTGCGGTAGCGATAT
CATCATTTGTTGGTTCGTGGAGTCTATGGAGCTGGTCGTAATCCTGTTGTCTGAAGCCAAGAGAT
ATAGAGAAGCTGGTTGGAAGGCATATCAGCAAAGACTTTCTCAGCATTAA

navržená cílová sekvence

PAM sekvence

9.4 Navržení cílových sekvencí pro CRISPR/Cas9 v kazetě natMX6

TEF_p

GACATGGAGGCCAGAAATACCCTCCTTGACA GTCTTGACGTGCGCAGCTCA GGG GCATGATG
TGACTGTCGCCCCGTACATTTAGCCCATACATCCCATGTATAATCATTGTCATCCATACATTT
TGATGGCCGCACGGCGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGGA
AACGCTCCCCTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCCACGCCGCGCCCCTGTAGAGAAATATAAA
AGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTCATATACTTCCTTTTAAAAATCTTGCTAGGATA
CAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAACAACC

NAT

ATGGGTACCACTCTTGACGACACGGCTTACCGGTACCGCACCAGTGTCCCAGGGGACGCCGA
GGCCATCGAGGCACTGGATGGGTCCTTACCACCGACACCGTCTTCCGCGTCACCGCCACCG
GGGACGGCTTACCCTGCGGGAGGTGCCGGTGGACCCGCCCTGACCAAGGTGTTCCCCGAC
GACGAATCGGACGACGAATCGGACGACGGGGAGGACGGCGACCCGGACTCCCGGACGTTTCG
TCGCGTACGGGGACGACGGCGACCTGGCGGGCTTCGTGGTCATCTCGTACTCGGCGTGGAAC
CGCCGGCTGACCGTTCGAGGACATC GAGGTCGCCCCGGAGCACC GGG GCACGGGGTTCGGC
GCGCGTTGATGGGGCTCGGACGGAGTTCGCCGGCGAGCGGGGCGCCGGGACCTCTGGCT
GGAGGTCACCAACGTCAACGCACCGGCGATCCACGCGTACCGGCGGATGGGGTTTACCCTC
TGCGGCCTGGACACCGCCCTGTACGACGGCACCGCCTCGGACGGCGAGCGGCAGGCGCTCT
ACATGAGCATGCCCTGCCCTAATCAGT

TEF_t

ACTGACAATAAAAAGATTCTTGTGTTTTCAAGAACTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTTATATTGTA
GTTGTTCTATTTAATCAAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTCGCCTCGACATCATCTGCC
CAGATGCGAAGTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCATG CGTCAATCGTATGTGAATGC TGGTC
GCTATACTG

navržené cílové sekvence

PAM sekvence