

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2021

Libuše Kratochvilová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ KVASINKOVÉHO ISOGENNÍHO SYSTÉMU PRO
STUDIUM INTERAKCÍ PROTEINU IFI16 S DNA**

YEAST ISOGENIC SYSTEM AS A METHOD FOR STUDY OF IFI16 PROTEIN INTERACTIONS WITH DNA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Libuše Kratochvilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1711/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Libuše Kratochvilová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití kvasinkového isogenního systému pro studium interakcí proteinu IFI16 s DNA

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše k tématu.
- Příprava kompetentních buněk.
- Pěstování bakteriálních a kvasinkových kultur.
- Izolace plasmidů.
- Izolace a purifikace proteinů.
- Transformace bakterií a kvasinek.
- Příprava isogenních kvasinkových kmenů.
- Studium interakce proteinu IFI16 s DNA v jednohybridním kvasinkovém systému.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Libuše Kratochvilová
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá vazbou interferonem gama indukovaného proteinu 16 (IFI16) k sekundárním lokálním strukturám G-kvadruplexu (G4) a jeho mutacím v jednohybridním kvasinkovém systému (Y1H). Protein IFI16 v buňce rozpoznává vlastní a cizorodou nebo poškozenou DNA, podílí se na tvorbě inflamazomu a indukuje expresi interferonu typu I (IFN-I). Rovněž má podíl na regulaci transkripce a restrikci virové infekce. Bylo prokázáno, že protein IFI16 se preferenčně váže ke strukturám G-kvadruplexů a je schopen je touto vazbou stabilizovat. G-kvadruplexy jsou řazeny mezi nekanonické struktury DNA a RNA tvořené sekvencemi bohaté na G. Snadno jsou tvořeny za fyziologických podmínek a nachází se v řadě významných regulačních strukturách genomu jako jsou telomery nebo promotory onkogenů. Jsou také součástí řady virových genomů. To z nich dělá vynikající potenciální cíle při léčbě nádorových a virových onemocnění. V první experimentální části práce byly připraveny nové reportérové kmeny kvasinek *S. cerevisiae* metodou *Delitto Perfetto*, které se lišily pouze v sekvenci s potenciálem tvorby G-kvadruplexu, které byly navrženy a analyzovány programem *DNA Analyser*. Správnost vkládaných sekvencí byla ověřena PCR a Sangerovým sekvenováním a srovnáním s dodanými sekvencemi oligonukleotidů programem *Blast*. V druhé části práce byly nově připravené kmeny transformovány vektory pro expresi proteinů p53, IFI16 a posuzován vliv vazby IFI16-G4 na expresi reportérového genu ve spojitosti s nádorovým supresorem p53 s využitím luciferázových reportérových testů. Vyhodnocení proběhlo na základě statistické analýzy velikostí účinků získaných po normalizování signálu luminescence na optickou hustotu kultury při vlnové délce 600 nm. Ze získaných výsledků vyplývá, že protein IFI16 má různý vliv na trans-aktivační potenciál nádorového supresoru p53 v závislosti na vazbě k vznikajícím strukturám v blízkosti promotoru genu, a že k úspěšnému vytvoření G-kvadruplexu bylo třeba dosáhnout prahové hodnoty *G4Hunteru skóre* alespoň 1,591 a zohlednit potenciál dané sekvence formovat úspěšně alespoň 2 G-tetrády.

KLÍČOVÁ SLOVA

IFI16, p53, G-kvadruplex, *Saccharomyces*, jednohybridní kvasinkový systém, *Delitto Perfetto*, inflamazom

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the binding of interferon gamma-induced protein 16 (IFI16) to the secondary local structures of the G-quadruplex (G4) and its mutations in the single-hybrid yeast system (Y1H). The IFI16 protein in the cell recognizes its own and foreign or damaged DNA, is involved in the formation of the inflammasome and induces the expression of type I interferon (IFN-I). It is also involved in the regulation of transcription and restriction of viral infection. It has been shown that the IFI16 protein binds preferentially to G-quadruplex structures and is able to stabilize them by this binding. G-quadruplexes are classified as non-canonical DNA and RNA structures formed by G-rich sequences. They are easily formed under physiological conditions and are found in a number of important regulatory structures of the genome such as telomeres or oncogene promoters. They are also part of a number of viral genomes. This makes them excellent potential targets in the treatment of cancer and viral diseases. In the first part of the work, new reporter strains of *S. cerevisiae* yeasts were prepared by the *Delitto Perfetto* method, differing only in sequence with the potential for G-quadruplex formation, which was designed and analyzed by the DNA Analyzer program. The correctness of the inserted sequences was verified by PCR and Sanger sequencing and comparison with the supplied oligonucleotide sequences by the *Blast* program. In the second part of the work, the newly prepared strains were transformed with vectors for the expression of p53, IFI16 proteins, and the effect of IFI16-G4 binding on the expression of the gene in connection with the tumor suppressor p53 was assessed using luciferase reporter assays. The evaluation was performed on the basis of a statistical analysis of the magnitudes of the effects obtained after normalization of the luminescence signal on the optical density of the culture at a wavelength of 600 nm. The results show that the IFI16 protein has a different effect on the trans-activation potential of the p53 tumor suppressor depending on binding to emerging structures near the reporter gene promoter, and that a *G4Hunter threshold* of at least 1,591 had to be reached and taken into account to successfully form a G-quadruplex. the potential of the sequence to successfully form at least 2 G-tetrads.

KEYWORDS

IFI16, p53, G-quadruplex, *Saccharomyces*, single-hybrid yeast system, *Delitto Perfetto*, inflammasome

KRATOCHVILOVÁ, Libuše. *Využití kvasinkového isogenního systému pro studium interakcí proteinu IFI16 s DNA*. Brno, 2021. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Václav Brázda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za vedení této práce, trpělivost, odborné připomínky a poskytnuté prostředky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Natálii Bohálové za vstřícný a objektivní přístup, čas, četné cenné rady, přiblížení studované problematiky a pomoc při zpracování této práce.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Kvasinky	8
2.1.1 Využití v potravinářství a dalším průmyslu.....	8
2.1.2 Využití v genovém inženýrství	8
2.1.3 Studium transkripčních faktorů.....	9
2.2 Protein IFI16.....	12
2.2.1 Rodina proteinů HIN-200.....	12
2.2.2 Struktura proteinu IFI16	13
2.2.3 Úloha proteinu IFI16 v organismu.....	14
2.2.4 Vazba proteinů obsahující HIN domény k DNA	20
2.2.5 Vazba IFI16 k DNA	21
3 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	23
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 Materiály	24
4.1.1 Kmeny kvasinek a bakterií	24
4.1.2 DNA	24
4.1.3 Chemikálie.....	25
4.1.4 Přístroje	25
4.2 Použitá média a další roztoky	26
4.2.1 Média použitá při kultivaci bakterií:	26
4.2.2 Média použitá při kultivaci kvasinek:	26
4.2.3 Další roztoky:.....	27
4.3 Metody	28
4.3.1 <i>DNA Analyser</i>	28
4.3.2 Transformace bakterií.....	29
4.3.3 <i>Delitto Perfetto</i> – příprava nových kmenů kvasinek <i>in vivo</i>	29
4.3.4 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	29
4.3.5 Purifikace DNA po PCR.....	30
4.3.6 Transformace kvasinek pomocí lithium acetátové metody	31
4.3.7 Luciferázové reportérové testy.....	31
4.3.8 Statistická analýza dat	32
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
5.1 Návrh sekvencí G-kvadruplexů	33
5.2 Příprava nových reportérových kmenů	33
5.3 Luciferázové reportérové testy	35
6 ZÁVĚR.....	40
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	41
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55
PŘÍLOHA: Příprava nových reportérových kmenů.....	59

1 ÚVOD

Kvasinky hrály odnepaměti významnou roli v životech lidí. Kromě výroby alkoholických nápojů jsou využívány také k výrobě některých potravinářských výrobků, vitamínů, organických kyselin, bioaktivních látek a řady dalších produktů. Díky svému rychlému růstu, možnosti pracovat pomocí mikrobiologických metod a analogii k molekulárním procesům, které probíhají u eukaryot se pak staly oblíbenými mikroorganismy při studiu buněčné signalizace. Snadné manipulace s jejich genomem umožnily vývoj řady reportérových systémů, které se vyskytují na shodném chromozomálním lokusu a odlišují se pouze sekvencí responzivních elementů. Toho se hojně využívá při studiu trans-aktivačního potenciálu transkripčních faktorů.

Ke studiu vazby transkripčních faktorů a proteinů schopných vázat DNA s konjugovanou transkripční doménou k vybraným responzivním elementům eukaryotního organismu je využíván tzv. jednohybridní kvasinkový systém. Na základě interakce „návnadových“ sekvencí DNA s proteiny, které jsou označovány jako „kořisti“ lze určit cílové sekvence, na které se studovaný protein váže nebo určit druhy proteinů, které s vybranou sekvencí interagují. Jako jednoduchý způsob editace genomu kvasinek *in vivo* pro získání nových reportérových kmenů je využívána metoda *Delitto Perfetto*. Za pomoci jednohybridního kvasinkového systému tak lze studovat mj. i vazbu interferonem gama indukovaného proteinu 16 (IFI16) k DNA.

Protein IFI16 patří do vysoce homologní rodiny hematopoetických jaderných proteinů HIN-200 nesoucích jednu až dvě tandemově umístěné 200-aminokyselinové repetice zvané HIN domény (HIN-A a HIN-B). Protein plní v organismu řadu důležitých funkcí – působí jako senzor virové a bakteriální DNA a významně se podílí na buněčné proliferaci, transkripční regulaci, opravě DNA, vrozené imunitní odpovědi, aktivaci inflamazomu a restrikci virové infekce. Rovněž byl prokázán jeho vliv při transkripční regulaci nádorového supresoru p53, kdy napomáhá vedení C-konce p53 a zmírňuje nespecifické interakce při vazbě proteinu p53 k DNA. Schopnost proteinů vázat se k DNA je dána prostřednictvím záhybů schopných vázat oligonukleotidy. Obě HIN domény proteinu IFI16 vykazují preferenci k odlišným strukturám DNA, ale celý protein vykazuje větší afinitu vazby k nadšroubovicové a křížové DNA spíše než k lineární. V současné době se ukazuje, že protein je schopen rozpoznat strukturu tzv. G-kvadruplexu (G4), preferenčně se na ni vázat, a dokonce ji stabilizovat.

G-kvadruplexy jsou nekanonické sekundární lokální struktury DNA a RNA, které se snadno tvoří za fyziologických podmínek ze sekvencí bohatých na G. Jsou přítomny v řadě významných regulačních oblastech jako jsou telomery nebo promotory onkogenů. Rovněž jsou přítomny i v řadě virových genomů. Významné lokalizace G-kvadruplexů v genomu eukaryot z nich dělají vynikající potenciální cíle při léčbě nádorových a virových onemocněních.

V minulosti se řada výzkumů věnovala vazbě proteinu IFI16 k různým strukturám DNA. Dosud však nebyla studována vazba IFI16 k sekvencím DNA s odlišným potenciálem tvorby G-kvadruplexu, kdy by mutované formy původní sekvence G4 měly předem definovaný potenciál tvorby pomocí programu, jakým je například *DNA Analyser*. Také nebyl studován vliv takto vzniklého komplexu G4-IFI16 a jeho stabilizace na velikost trans-aktivačního účinku ve spojitosti s nádorovým supresorem p53. Tato práce tak může vést nejen k lepšímu chápání vazby IFI16 ke strukturám G-kvadruplexu, ale také jeho vlivu na transkripční regulaci a represi virové infekce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky se řadí mezi heterotrofní eukaryotní organismy náležící mezi vyšší houby. Jedná se většinou o jednobuněčné organismy, které svůj název dostaly díky své schopnosti zkvašovat sacharidy na ethanol a oxid uhličitý [1]. Jsou jedním z biotechnologicky nejvyužívanějších mikroorganismů. Lze je uplatnit v potravinářství, farmacii, či v oblastech vědy a techniky [2, 3].

2.1.1 Využití v potravinářství a dalším průmyslu

Kvasinky jsou nejčastěji využívány v oblastech potravinářství a klasických biotechnologií, kdy slouží díky svým kvasným vlastnostem k výrobě alkoholických nápojů, fermentovaných potravin, bioaktivních látek, organických kyselin a vitaminů [2]. Stále více se rozvíjí také jejich využití ve vědeckých kruzích, kde se hojně uplatňuje *Saccharomyces cerevisiae*, která poskytuje možnost studia regulací metabolismu a buněčné signalizace u eukaryot díky svému rychlému růstu a snadné izolaci mutantů [4]. Kromě toho sloužila i při studiu chování a vlastností v beztlížném prostoru, který neprokázal žádné ovlivnění buněčného cyklu, základních metabolických aktivit ani změnu ultrastruktury buňky [3].

O nejstarších počátcích potravinářského využití kvasinek svědčí důkazy staré 6 000–8 000 let pocházející z keramiky sumerské a egyptské kultury a piktografických záznamů z Babylonu. Tyto obrazce a písemné záznamy dokládají výrobu alkoholických nápojů, které jsou velmi podobné současnému pivu a vínu [3, 5]. V dnešní době se řada průmyslově využívaných technologií výrob lihovin a potravin zdokonalila. Využití kvasinek však zůstalo neměnné. Používají se také při výrobě krmné biomasy, droždí, získávání ergosterolu (prekurzor vitamínu D), významných enzymů, nebo při biotransformační výrobě fenylacetylkarbinolu jako prekurzoru efedrinu [2].

To, jaký druh kvasinek se ke konkrétní výrobě použije, je dáno jejich specifickými fyziologickými vlastnostmi. V potravinářství rozlišujeme mlékárenské nebo pekařské kvasinky a při výrobě alkoholických nápojů tzv. pivovarské, vinařské a lihovarské kmeny [3, 6]. Řada dalších druhů se podílí na produkci amylolytických enzymů α -amylasy štěpící škrob endogenně na oligosacharidy a glukoamylasy štěpící dextriny na zkvasitelné cukry (molekuly glukózy). Kromě toho jsou některé druhy schopné využít odpadní substráty a n-alkany nebo štěpit komponenty dřevní hmoty – degradace xylanů a utilizace celulózy.

2.1.2 Využití v genovém inženýrství

Zásahem do metabolických drah metodami genového inženýrství lze připravit řadu organismů, které jsou schopny produkovat významné sloučeniny (enzymy, antibiotika, organické kyseliny, aminokyseliny a vitaminy) s novými vlastnostmi nebo proteiny tvořící se v jiných, těmto mikroorganismům nepříbuzných, buňkách [2, 3]. Početnou skupinu organismů, které dokáží produkovat velké množství heterologních proteinů, tvoří methylotrófní kvasinky (až 30 % všech buněčných proteinů) [7].

V případě produkce daného proteinu je nezbytné příslušný gen nejprve izolovat z genomu donorového organismu, vhodně ho upravit procesy pro přípravu rekombinantních molekul DNA a vložit do expresního vektoru. Rekombinantní molekula je následně přenesena do hostitelského organismu, kde započne exprese cizorodého produktu. Takto lze vyrobit například lidský inzulin nebo růstový hormon [8].

V případě většiny eukaryotních proteinů je nezbytné využít právě kvasinky, neboť tyto proteiny vyžadují posttranslační enzymové úpravy jako modifikace aminokyselin nebo proteolytické štěpení, které jsou z mikroorganismů schopné provést pouze kvasinky [9]. Mezi nejvýznamnější geneticky využívané druhy patří *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* a *Schizosaccharomyces pombe*.

2.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Existuje řada důvodů, proč se *Saccharomyces cerevisiae* stala tak oblíbeným organismem při studiu buněčné signalizace eukaryot. U celé řady jejích životních dějů najdeme analogii k procesům probíhajících v savčích buňkách. Dostatečně rychle se množí a lze s ní pracovat mikrobiologickými metodami. Navíc existuje v haploidním stavu, který umožňuje přípravu nejrozličnějších mutantních kmenů. Tyto haploidní buňky se mohou mezi sebou vzájemně křížit, díky čemuž získáváme diploidní kultury. Ty po sporulaci tvoří opět haploidní potomstvo, které lze podrobit genetické analýze. Další výhodou je vysoká frekvence homologních rekombinací, ke kterým v buňkách dochází, a které tak usnadňují genetické manipulace. Jedná se o první eukaryotický organismus, u kterého se podařilo zjistit celou sekvenci nukleotidů v genomové DNA. Kvasinka může obsahovat extrachromozomální DNA v podobě 2 μm jaderného plazmidu, který se využívá při metodách genomového inženýrství pro přípravu kvasinkových vektorů [3, 8, 9].

2.1.2.2 *Pichia pastoris*

P. pastoris, dnes překlasičkována na *Komagataella pastoris*, patří mezi methylotrófní kvasinky. Z biotechnologického hlediska je významná zejména produkcí heterologních proteinů. V minulosti byl proces využíván pro komerční produkci krmné biomasy jako doplňkových látek pro zvířata. Od 80. let 20. století se *P. pastoris* začala používat jako heterologní proteinový expresní systém, který využívá regulovatelný promotor alkohol oxidázy 1 (AOX1). Kombinací procesu pro produkci SCP a AOX1 vznikl systém produkující vysoké množství heterologních proteinů. V 90. letech se průmyslově začal vyrábět rostlinný enzym hydroxynitril lyáza, který se používá jako biokatalyzátor při výrobě enantiomerního *m*-fenoxybenzaldehyd kyanohydrinu (základ syntetických pyrethroidů) [2, 3, 7].

2.1.2.3 *Schizosaccharomyces pombe*

Jedná se o druhou kvasinku (po *S. cerevisiae*) a celkem šestý organismus, jehož genom byl plně osekvenován. Má nejmenší počet predikovaných genů (4 824), jaký lze u eukaryot zaznamenat a dokonce i o skoro tisíc genů méně než pučící kvasinky (kolem 5 570–5 651). Stejně jako pro další štěpné kvasinky je i pro ni typické, že její genom je ze 43 % tvořen introny [10]. Tato kvasinka se využívá pro studium buněčného cyklu eukaryot, zejména regulačních mechanismů meiózy. Například na ní byla popsána regulace segregace chromozomů během meiózy. Za normálních okolností roste v haploidním stavu, ale při nedostatku některých živin (např. dusíku) je schopna diploidizovat konjugací a iniciovat tak meiózu. Přejchod z mitózy na meiózu je řízen proteinem Mei2, který se váže na RNA, a který je také klíčovým faktorem při expresi genů pro meiózu a kinázu Pat1 [3, 10, 11].

2.1.3 Studium transkripčních faktorů

Transkripční faktory (TF) jsou bílkoviny schopné spouštět transkripci konkrétních genů a regulovat tak buněčné procesy. Většina transkripčních faktorů rozpoznává *cis*-působící elementy v podobě

DNA responzivních elementů (RE), což jsou krátké sekvence nukleotidů, které tvoří součást promotorů a zesilovačů transkripce. Snadná manipulace s genomem a přístup k řadě regulovaných systémů pro heterologní expresi proteinů umožnily vývoj mnoha reportérových systémů sdružujících se na vybraném chromozomálním lokusu a lišících se pouze specifickým RE transkripčního faktoru. U transkripčních faktorů, které jsou aktivní jako dimery nebo tetramery však nemusí afinita vazby na DNA předpovídat transkripční citlivost promotoru [4, 12, 13].

2.1.3.1 Jednohybridní kvasinkový systém

K určení specifických sekvencí DNA nebo naopak identifikaci transkripčních faktorů a DNA vázajících proteinů s konjugovanou trans-aktivační doménou (hybridních proteinů), které se k nim váží je využíván jednohybridní kvasinkový systém (Y1H). Sekvence DNA je běžně označována jako „návnada“ a hybridní protein jako „kořist“ [14]. Y1H je obdobou dvouhybridního kvasinkového systému (Y2H), který posuzuje iniciaci transkripce pomocí interakce dvou proteinových domén se specifickou funkcí (DNA vazebná a DNA aktivační doména) [15–17]. Systémy zaměřené na transkripční faktory („TF-centered“) studují, na které cílové segmenty DNA se protein váže. Naopak systémy zaměřené na DNA („DNA-centered“) určují škálu transkripčních faktorů, které s DNA interagují [14].

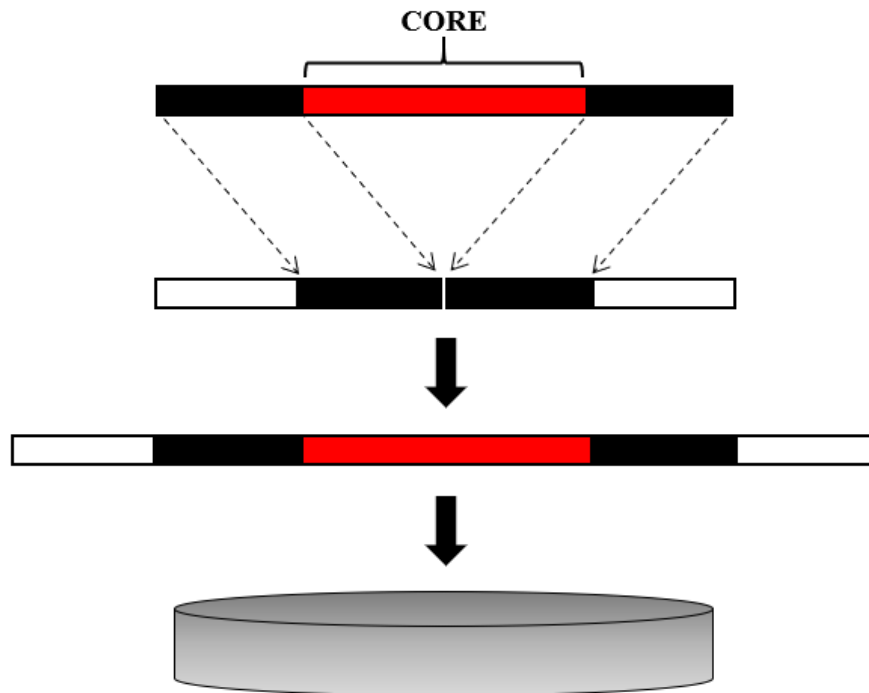
Princip celého Y1H systému spočívá v inkorporaci specifické sekvence DNA před gen exprimující reportérový protein a zanesení plazmidů kódujících TF nebo DNA vázající protein s konjugovanou trans-aktivační doménou. Při interakci s DNA pak dochází k indukci exprese reportérového genu [14, 18].

Díky kvasinkám tak lze kvantifikovat dopad mutací transkripčních faktorů nebo variant RE, koexpresi kofaktorů a účinnost malých molekul na trans-aktivaci reportérových genů. Expresi lidských transkripčních faktorů v kvasinkách umožňují indukovatelné, potlačitelné nebo konstitutivní promotory [19]. Pro studium rodin proteinů p53 a řady dalších se nejvíce uplatnil indukovatelný GAL1 promotor, jehož transkripční rychlost lze ovlivnit množstvím galaktózy v médiu. Bazální exprese transkripčního faktoru z promotoru GAL1 lze dosáhnout také použitím rafinózy jako zdroje uhlíku, naopak exprese může být utlumena přítomností glukózy [20]. Ke koexpresi dvou transkripčních faktorů stejného konstruktů je pak možné využít obousměrný promotor GAL1,10.

2.1.3.2 *Delitto Perfetto*

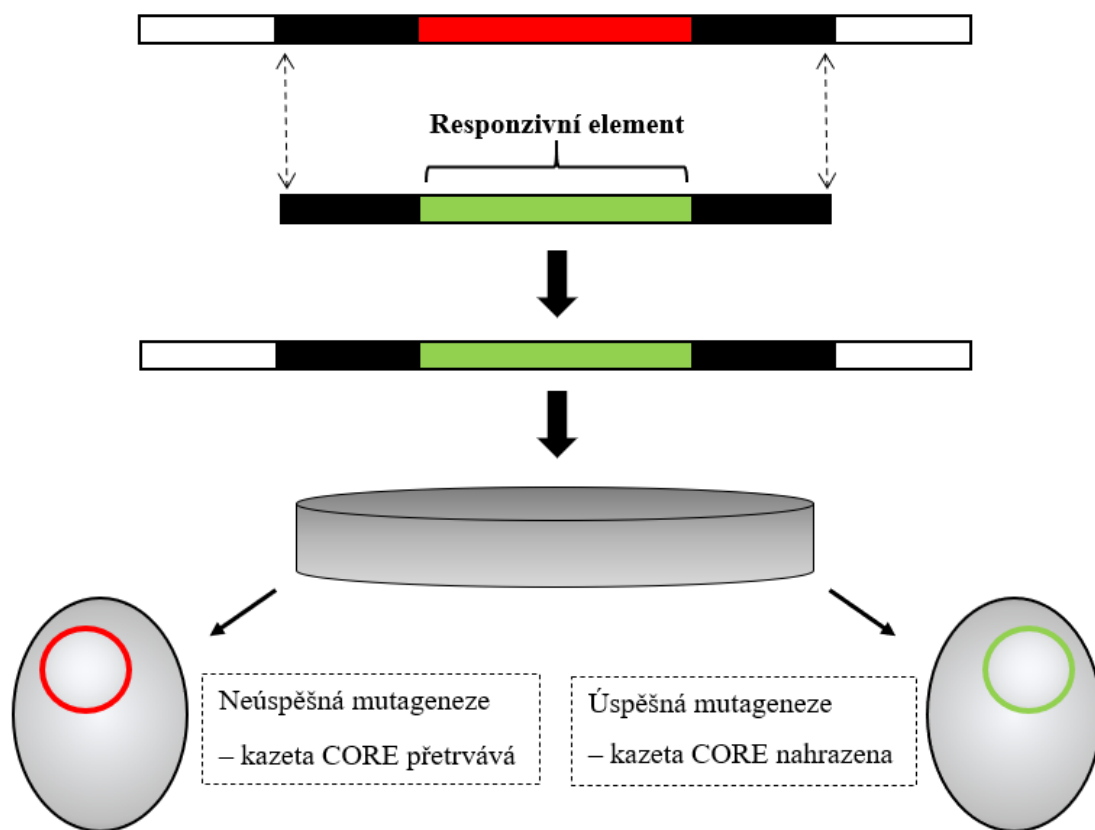
Delitto Perfetto je jednoduchý způsob jakým lze *in vivo* mutovat genom kvasinek a získat tak nové reportérové kmeny, které se využívají při studiu buněčné signalizace eukaryotních organismů [21, 22]. Název techniky se dá přeložit z italského jako „dokonalá vražda“ a odkazuje tak na schopnost cíleně měnit genom kvasinek, aniž by v něm zůstaly stopy po cizí DNA [23].

Celý princip funguje ve dvou krocích, které nevyžadují žádné další složité klonovací a sekvenační mezikroky k potvrzení mutagenese [24]. Nejprve je nezbytné do genetického kódu kvasinky v místě, které chceme pozměnit, vložit tzv. selektovatelnou reportérovou „kazetu“ CORE (z anglického „COUNTERselectable REporter“), která bude obsahovat dva markery, jak je vidět na obrázku 1. Před samotným vložením kazety je nezbytné uvážit vlastnosti kmene, do kterého chceme danou kazetu vkládat, již přítomné markery a samotný druh mutace, kterou posléze chceme kmen vystavit. Můžeme se setkat s *non-break* a *break* systémem, pro které bylo vytvořeno celkem 7 CORE kazet. Kazetu lze před experimentem amplifikovat metodou PCR, kdy je zapotřebí znát koncové 50nukleotidové sekvence homologie pro použití vhodných primerů [22].



Obrázek 1: Schéma metody *Delitto Perfetto* (1. krok). Dochází k zavedení jedné z vybraných kazet ohraničené homologními sekvencemi nukleotidů a kultivaci takto upravených kvasinek. Bílá pole označují genom kvasinky, který není vystaven rekombinaci. Černá pole značí homologní sekvence kazety s genomem. Červená pole označují sekvenci vkládané kazety.

Druhým krokem je nahrazení této „kazety“ za nově vybrané oligonukleotidy nebo jiný genetický materiál s požadovanými modifikacemi původního segmentu chromozomální DNA [22], jak je schematicky zakresleno na obrázku 2. Oba tyto kroky přitom pracují na principu homologní rekombinace sekvencí [24]. To znamená, že požadované konce řetězců jsou komplementární s konci oligonukleotidů a obě tyto části navzájem rekombinují. Původní kazeta je tedy nově vloženými oligonukleotidy plně nahrazena. Rekombinace je účinnější v případě, že nejprve vytvoříme dvouřetězcový zlom DNA (DSB). Vkládané kazety (plazmidy) obsahují indukovatelný promotor GAL1 a *SceI* gen pro expresi I-SceI restriční endonukleázy, která je schopna tyto dvouřetězcové zlomy na straně I-SceI. tvořit [22].



Obrázek 2: Schéma metody *Delitto Perfetto* (2. krok). Nově připravené kvasinky jsou v druhém kroku schopny kazetu CORE nahradit RE na základě homologní rekombinace sekvencí. Získáme tak kolonie s nahrazenou (zeleně zbarvený kruh) i přetrvávající kazetou (červeně zbarvený kruh), které podrobujeme selekci dle vlastností kazety. Bílá pole označují genom kvasinky, který není vystaven rekombinaci. Černá pole značí homologní sekvence kazety s oligonukleotidem. Červené pole označují sekvenci vkládané kazety. Zelená pole označují vkládaný responzivní element.

2.2 Protein IFI16

Lidský jaderný interferonem (IFN) gama indukovatelný protein 16 (IFI16) se řadí do vysoce homologní rodiny interferonem indukovatelných jaderných proteinů nesoucích HIN doménu tvořenou 200-aminokyselinovým motivem označovaným jako HIN-200 [25, 26].

Je konstitutivně exprimován v lymfoidních hematopoetických buňkách a po indukci interferony typu alfa nebo gama v některých myeloidních hematopoetických buňkách. Dále byla jeho exprese pozorována v epiteliálních buňkách prsu, vaječníku a prostaty [27–30]. Snížená exprese nebo dokonce úplná ztráta exprese IFI16 byla detekována u rakoviny slinivky břišní, prostaty a prsu [31–33].

IFI16 se může nacházet jak v jádře, tak v cytoplasmě, a to v závislosti na typu buňky [34] a posttranslačních modifikacích [35, 36]. Například u keratinocytů vystavených UV záření tak dochází k přesunu IFI16 z jádra do cytoplasmy [37].

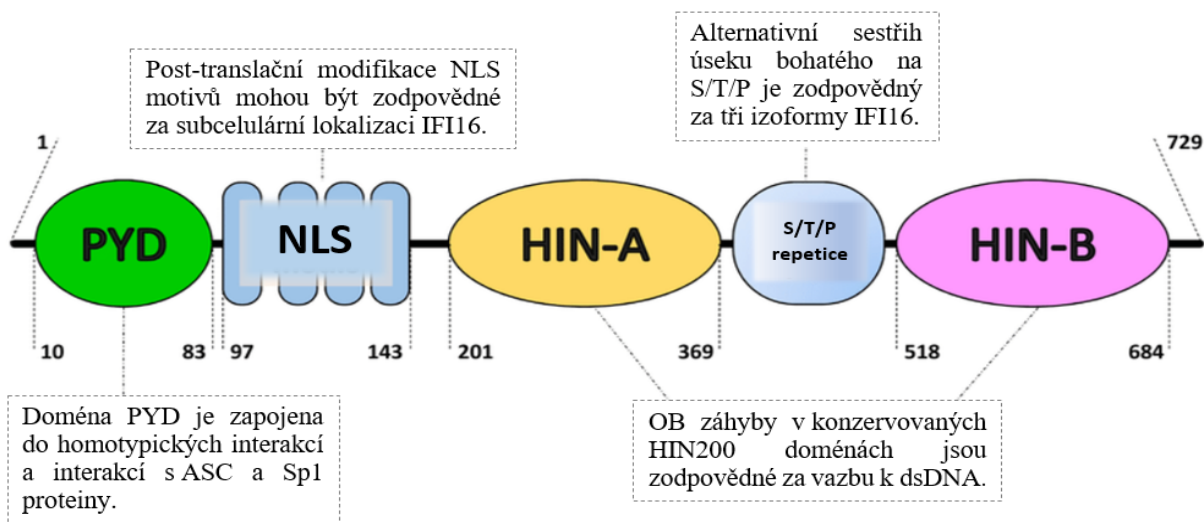
2.2.1 Rodina proteinů HIN-200

Do rodiny HIN-200 patří všechny hematopoetické jaderné proteiny s repeticí o délce 200 aminokyselin [38] přítomných samostatně nebo jako tandemová repetice [39]. Geny exprimující

tyto bílkoviny byly nalezeny na lidském i myším chromosomu 1 v lokuse nazývaném „klastre genů 200“ a sám IFI16 sdílí homologii s minimálně šesti dalšími myšími IFN-indukovatelnými geny [38]. Kromě IFI16 do lidské větve rodiny řadíme další 3 členy, a to AIM2 (interferonem indukovatelný protein chybějící v melanomu AIM2, z angl. absent in melanoma 2), IFIX (interferonem indukovatelný protein X) a MNDA (nukleární diferenační antigen myeloidních buněk) [40]. U myši pak nalezneme i p202a, p202b, p203, p204 a D3. Jak myši, tak lidské proteiny ale mají podobné primární aminokyselinové sekvence a biologické vlastnosti. Proteiny jsou pozitivně regulovány jak interferony typu I (α a β), tak II (γ) [39]. Rodina HIN-200 je charakterizována HIN doménou na C-konci a ve většině případů také konzervovanou α -šroubovicovou PYRIN doménou na N-konci, která se uplatňuje zejména při interakci protein-protein [41, 42]. Konzervovaná HIN doména se podílí na vazbě DNA a také zprostředkovává interakce protein-protein při regulaci transkripce. Může se nacházet samostatně nebo i v druhé kopii [30, 32, 43, 44]. PYRIN doména patří do nadrodiny proteinů obsahujících tzv. smrtící domény. Je pro ně charakteristické, že se podílejí na množství zánětlivých a imunitních odpovědí a v případě ohrožení buňky i apoptóze. Zvláštností je, že chybí u myších proteinů p202a i p202b [39, 42]. Právě myší protein p202a byl v minulosti předmětem mnoha výzkumů s ohledem na jeho dvě HIN domény [39]. Bylo prokázáno, že tyto repetice reagují s mnoha transkripčními faktory, jako jsou např. p53, NF κ B, pRB, AP-1, MyoD a E2F. Takovéto spojení by v budoucnu mohlo vést k tvorbě proteinových komplexů sloužících k modulaci transkripce cílových genů [32, 45].

2.2.2 Struktura proteinu IFI16

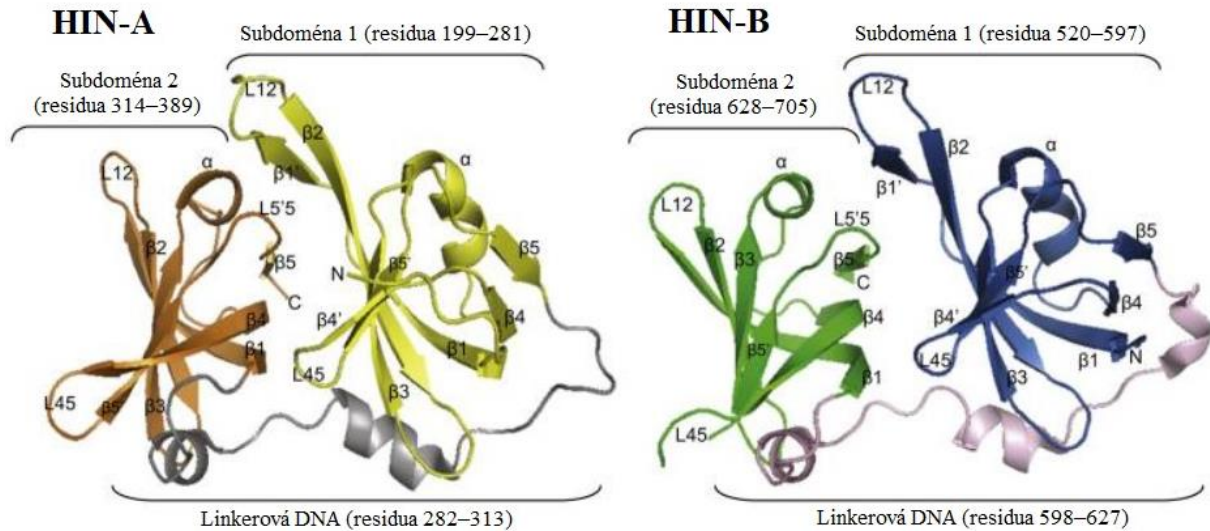
Protein IFI16 obsahuje dvě tandemové karboxy-terminálních HIN domény HIN-A a HIN-B na C-konci a jednu amino-terminální PYRIN doménu (PYD) na N-konci. Blíže je jeho struktura popsána na obrázku 3.



Obrázek 3: Organizace domén IFI16. Protein obsahuje PYRIN doménu (PYD) účastnící se interakcí protein-protein, čtyři jaderně lokalizované signální motivy (NLS) a dvě hematopoetické interferonem indukované jaderné domény HIN-A a HIN-B odděleny raménkem [47] (upraveno).

Obě HIN domény se rozprostírají na aminokyselinových zbytcích (residuích) 192–393 a 515–710 [39]. Každá obsahuje dvě subdomény, které jsou orientovány v tandemu [39, 46]. Popis subdomén obou HIN domén je uveden na obrázku 4. První subdoména je složena z osmi β řetězců

a jedné α šroubovice. Celý tento útvar tvoří kulovitou hlavěň o rozměrech $13 \times 18 \times 36 \text{ \AA}^3$ v HIN-A a $14 \times 18 \times 35 \text{ \AA}^3$ v HIN-B. Obdobně je složena i druhá subdoména tvořená pouze šesti β řetězci a jednou α šroubovicí. Ta je však oproti první doméně o něco menší – v HIN-A to je $11 \times 19 \times 21 \text{ \AA}^3$ a v HIN-B $10 \times 20 \times 22 \text{ \AA}^3$. Obě subdomény jsou spojeny mezidoménovou linkerovou DNA s dvěma α helixy v HIN-A a třemi α helixy v HIN-B doméně [39].



Obrázek 4: Struktura HIN domén proteinu IFI16. Struktura HIN-A (vlevo) a HIN-B (vpravo) domén proteinu IFI16 s označenými konci C a N [48] (upraveno).

Přestože si jsou obě domény sekvenčně podobné (shoda 40 %), jsou vidět jejich odlišnosti v různých oblastech smyček a orientaci blízkých sekundárních strukturních prvků [39]. Úsek mezi nimi *spacer* (česky znám spíše jako raménko) je regulován sestřihem mRNA a může obsahovat až tři kopie vysoce konzervované 56aminokyselinové domény serinu/threoninu/prolinu (S/T/P), které jsou kódovány odlišnými exony. Po translaci různě sestřihané mRNA se tak můžeme setkat s alespoň 3 různými izoformami (IFI A, B, C). Všechny izoformy je možné fosforylovat na serinových a threoninových residuech, ale ne na tyrosinu [49]. Protein IFI16 je svou strukturou velmi podobný myšimú p204, který ale za HIN doménami obsahuje oblasti bohaté na S/T. Doména obsahuje asi 90 aminokyselinových motivů, a může homotypicky interagovat s jinými typy proteinů obsahující stejnou doménu. Tyto komplexy pak hrají klíčovou roli při buněčném cyklu, apoptóze a zánětlivých odpovědích [50].

2.2.3 Úloha proteinu IFI16 v organismu

Protein IFI16 působí jako senzor virové a bakteriální DNA [51] a významně se podílí na buněčné proliferaci [32], transkripční regulaci [52, 53], opravě DNA, vrozené imunitní odpovědi, aktivaci inflamazomu a restrikci virové infekce [54, 55]. Jako inflamazom označujeme oligomerní multiproteinovou strukturu s IFI16. Struktura inflamazomu spouští protizánětlivé procesy a v určitých typech buněk může vyvolat pyroptózu, což je druh programované buněčné smrti. Na rozdíl od apoptózy se při ní účastní kaspáza-1 (Casp-1) a dochází při ní k buněčným otokům a permeabilizaci buněčné membrány [56, 57]. Při invazi patogenů a následnému rozpoznání cizorodé DNA proteinem IFI16 dochází k tvorbě jeho ohnisek, což spouští expresi genu pro interferon β (IFN β) [58].

2.2.3.1 Vliv proteinu IFI16 při represí transkripce

Transkripční aktivátory i represory jsou převážně modulární proteiny, jejichž odlišné oblasti mají schopnost interagovat s DNA a dalšími proteiny, ať už se jedná o proteiny jiných buněk či virů. K represí transkripce přitom nedochází kompeticí represorů s transkripčními aktivátory, nýbrž přímou interakcí represorů s transkripčními aktivátory nebo samotným transkripčním aparátem. K potlačení transkripce dochází, pokud represor fúzuje s heterologní doménou, která váže DNA a je přiveden na odpovídající místo promotoru [59].

Bylo prokázáno, že protein IFI16 hraje významnou roli při regulaci transkripce. Působí jako represor, a to až na vzdálenost 1 000 páru bází po směru od iniciace transkripce. K represí transkripce není třeba protein plné délky. Expres samotné 200aminokyselinové repetice fúzující s DNA vazebnou doménou vyvolává dostatečné potlačení transkripce [52]. Dále je IFI16 schopen vazby s dalšími transkripčně-regulačními proteiny jako jsou p53 a pRb, které samy o sobě také mohou působit jako aktivní represory [60]. Ze všech lidských členů rodiny HIN-200 byla na proteinu IFI16 prvně prokázána takováto molekulární funkce, což dalo podnět k dalšímu zkoumání regulačních a buněčně-diferenčních vlastností celé proteinové rodiny. To, že regulační vlastnosti v rodině HIN-200 vykazuje nejen IFI16, ale je závislá na vazebné doméně HIN [52], dokládá i zjištění, že protein p202 (myší protein rodiny HIN-200) může interagovat s regulačními proteiny transkripce, jako jsou p53 [61], pRb [62], E2F [63], c-Jun, c-Fos a NFκB [64] a ovlivňovat jejich sekvenčně specifickou vazbu k DNA. V případě proteinů p53, E2F a AP-1 má tato interakce za následek úplnou ztrátu transkripční aktivity [61, 63, 64]. Při studiu mechanismu, kterým protein p202 dokáže inhibovat aktivaci transkripce proteinu p53 nebyla nalezena prokazatelná vazba mezi p202 a 80–390 aminokyselinovými zbytky C-konce proteinu p53, což naznačuje možnou slabou vazbu p202 s N-koncovou doménou p53 nebo maskování použitých monoklonálních protilátek proteinovým komplexem [61]. Represe transkripční aktivity proteinu p53 a dalších výše zmíněných proteinů jejichž aktivita je modulována mj. i proteinem p202 byla prokazatelně inhibována jeho nadměrnou expresí [64, 65]. Pokusy dokládající vliv proteinu p202 na aktivitu reportérových genů aktivovaných proteinem p53 byly prováděny v stabilních buněčných liniích konstitutivně nadměrně exprimujících protein p202, liniích s posttranskripčním umlčením p202 protismyslovou RNA a liniích nesoucích mutovaný gen *p53* [61].

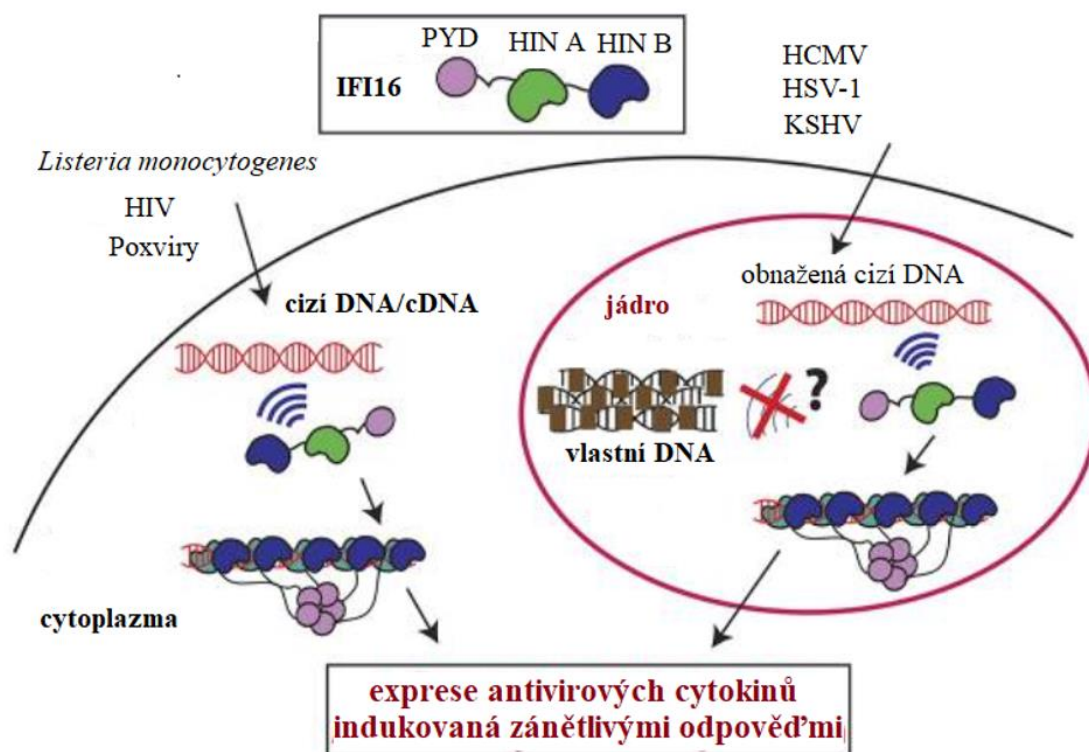
Buněčná linie nesoucí mutovaný gen pro p53 byla prvně transfekována plazmidem exprimující protein p53, což mělo za následek zvýšení aktivity reportérových genů. Nadměrná exprese p202 pak snižovala bazální expresi reportérových genů i expresí zprvu stimulovanou transfekovaným p53. Inhibiční účinek se zvyšoval s rostoucí koncentrací transfekovaného plazmidu exprimující p202. Pouze v případě buněčné linie s posttranskripčně umlčeným proteinem p202 protismyslovou RNA došlo ke zvýšení exprese reportérových genů. Experimenty však již nepopisují vliv použité RNA na expresi jiných genů, které mohly mít podíl na změně aktivity p53 i v přítomnosti p202 [61].

2.2.3.2 IFI16 jako senzor DNA při vrozené imunitní odpovědi

Schopnost rozpoznávat vlastní a cizorodou DNA v intracelulárním prostředí hraje klíčovou roli ve vrozené imunitě. Eukaryotní organismy mají veškerou dsDNA uloženou v jádře. Pokud se tedy vyskytne molekula DNA v cytoplazmě, včetně dsDNA hostitele jako je tomu u některých autoimunitních onemocnění, kdy dochází k nadměrnému hromadění DNA v buňkách, je taková DNA vyhodnocena senzory jako poškozená a organismus zahájí nespecifickou imunitní odpověď. Některé

DNA viry jsou schopny se této prvotní cytozolické detekci často úspěšně vyhnout, protože jejich genom je obnažen až v jádře buňky [66, 67].

Organismus hostitele po detekci exogenní DNA v jádře zahájí sestavení supramolekulárních signálních platform, které spouští zánětlivé reakce vůči cizí DNA, ale nikoliv vůči vlastní dsDNA [36, 55, 68]. Exprese antivirových cytokinů indukovaná zánětlivými odpověďmi je schematicky zobrazena na obrázku 5. V případě, že organismus ztratí schopnost rozlišovat cizorodou a vlastní DNA dochází k rozvinutí závažných autoimunitních onemocnění a imunitní buňky útočí na buňky vlastní [69].



Obrázek 5: Detekce cizorodé dsDNA v jádře a cytoplasmě. Protein IFI16 detekuje exogenní dsDNA v cytoplasmě i karyoplasmě hostitelské buňky a tvoří signální ohniska indukující expresi interferonu typu I. Vlastní dsDNA buňky je sbalena spolu s histony do komplexu nukleozomů a je tak chráněna vůči vazbě IFI16 a oligomerizaci [70](upraveno).

Patogenní DNA je v jádře rozlišována pravděpodobně na základě integrálního shromažďování do proteinových vláken na dsDNA a bylo prokázáno, že vazba proteinu IFI16 k DNA je závislá na délce. IFI16 se kooperativně váže vzhledem k vlastní dsDNA a shlukuje se do odlišných proteinových vláken než vůči cizorodé neinteragující patogenní dsDNA [69]. Rozdíl je způsoben přístupností DNA, zatímco dsDNA viru okamžitě po infekci je obnažená, vlastní DNA buňky tvoří strukturou nukleozomů (histony obalené chromatinem), které ztěžují vazbu proteinů na molekulu DNA. Vstup virové DNA do buňky indukuje tvorbu nukleozomů s nehostitelskou DNA. I v takovém případě dochází k tvorbě proteinových vláken, ale tyto oblasti bývají sbaleny volněji a úseky mezi jednotlivými komplexy poskytují místo pro vazbu IFI16. Mechanismus tvorby signálních ohnisek je prostý. Několik molekul proteinu IFI16 se nejprve váže na úseky exogenní DNA a poté se pohybují podél řetězce. S přibývajícím počtem molekul, které se na tuto DNA váží, začne docházet k tvorbě nepohyblivého proteinového oligomeru [70]. Relativní vazebná afinita IFI16

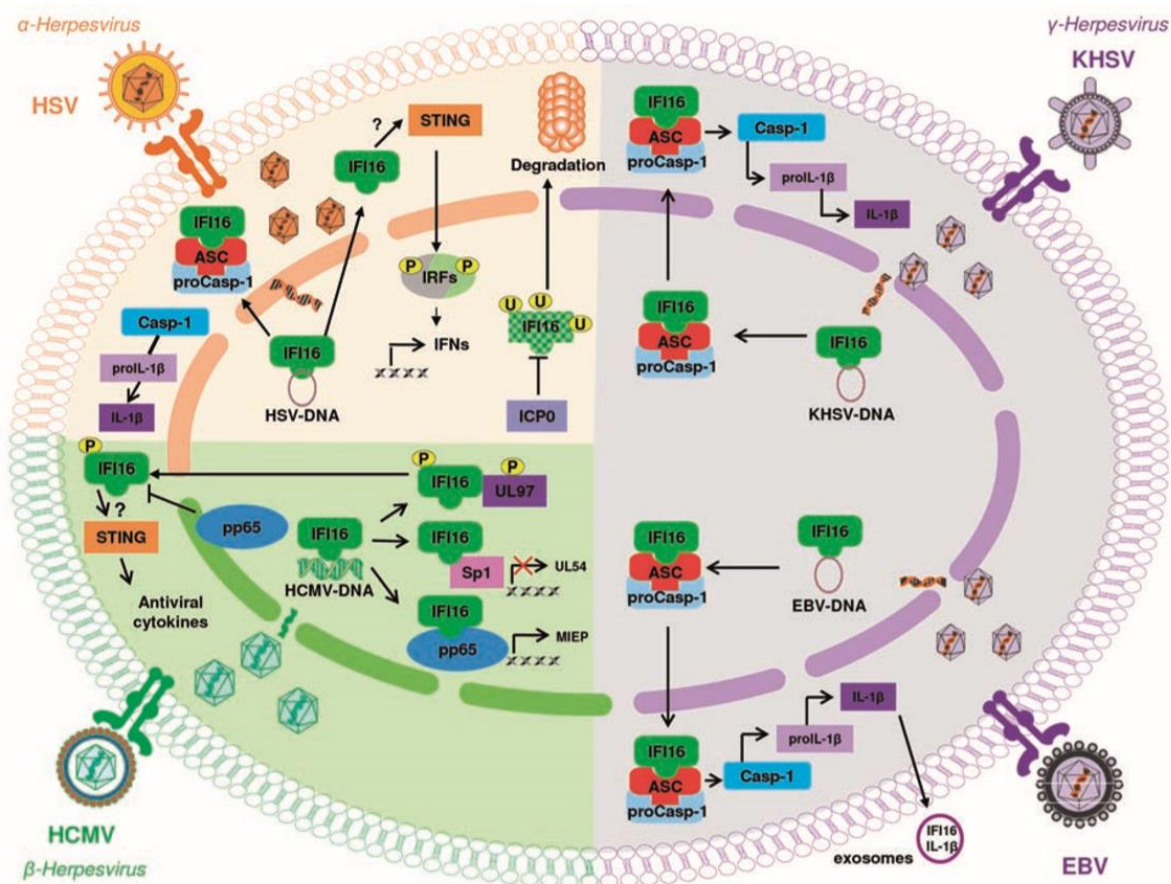
k různým fragmentům dsDNA se mění v závislosti na koncentracích proteinu IFI16 a množství vazebných míst, což souvisí s již zmiňovanou délkou dsDNA. Protein IFI16 je rovněž specifický v tom, že umožňuje rozšíření vláken spojením více oligomerů způsobem *end-to-end*, které tak vytváří oligomery vyšších řádů [69].

Je zajímavé, že kooperativní vazbu IFI16 k DNA a tvorbu filament řídí povrchové zbytky PYRIN domény, která se však sama na DNA neváže a je zodpovědná spíše za oligomerizaci. Tento regulační mechanismus umožňuje vazbu molekul proteinu IFI16 vedle sebe a tvorbu signálních ohnisek [69]. Navíc sestava proteinových vláken řízená PYRIN doménou zajišťuje tvorbu komplexu IFI16-dsDNA, který slouží nejen jako signální prvek, ale je schopen rovněž interferovat s virovým replikačním aparátem a přímo potlačovat replikaci exogenní DNA bez následné aktivace IFN [69, 71]. Izolované DNA vazebné HIN domény, u kterých byla naopak potvrzena schopnost vázat rozdílné druhy DNA, interagují bez tvorby vláken. To vyvrací dříve zavedený konvenční model, který předpokládal, že IFI16 je náhodně rozptýlen na jakékoliv vlastní nebo cizí DNA a preferenčně váže dlouhé molekuly dsDNA bez dalších regulačních mechanismů [69, 72].

2.2.3.3 Vliv proteinu IFI16 při virové infekci

Jako první obranný mechanismus při infekci cizorodými mikrobiálními patogeny organismus zahájí nespecifickou (vrozenou) imunitní odpověď. Ta je tvořena buněčnou a humorální složkou. Buněčná složka zahrnuje především lymfocyty (NK-buňky a některé B-lymfocyty), granulocyty, makrofágy a trombocyty [57]. Humorální složku tvoří koagulační a fibrinolytický systém, složky komplementu s proteiny akutní fáze schopné přivodit lýzi buněk a cytokiny, zvláště pak skupina interferonů, která je kromě obrany proti virovým infekcím odpovědná i za regulaci imunitní odpovědi [73]. V savčích buňkách je virová DNA rozpoznávána díky konstitutivně exprimovaným proteinům označovaným jako DNA senzory. Po rozpoznání cizorodé DNA se na ni váží a vyvolávají sekreci cytokinů, jako jsou interferony typu I (IFN-I) a stimulují další buněčné dráhy zajišťující obranu buňky [74]. Ztráta těchto sensorů snižuje imunitní odpověď na cizí DNA *in vivo* i v tkáních [58, 75–77]. Bylo dokázáno, že IFI16 po rozpoznání DNA spouští expresi cytokinů v infikovaných jádrech i v subcelulárním prostředí [36, 55, 78, 79]. V cytosolu se po rozpoznání virového genomu signalizace šíří stimulatorem interferonových genů (STING) [58, 80], serin/threonin proteinovou TANK-vazebnou kinázou 1 (TBK-1) [81] a regulačním faktorem interferonů 3 (IRF3) [82, 83]. Ten dimerizuje a přechází do jádra, kde zapojuje regulátory transkripce a indukuje expresi cytokinů.

Restrikce virové infekce proteinem IFI16 byla nejvíce studována u čeledi herpetických virů (neboli herpesvirů) na jejichž DNA se protein váže [84]. Herpesviry jsou obalené DNA viry, pro které je typické, že po nákaze latentně přetrvávají po zbytek života v těle hostitele a způsobují závažná onemocnění při oslabení jeho imunity. Řada proteinů těchto virů je uzpůsobena tak, aby působily na protein IFI16 a blokovaly jeho imunitní signalizaci [85]. Schématické znázornění jednotlivých signálních drah nespecifické imunitní reakce, ve kterých je zapojen protein IFI16 při daných typech infekcí herpesviry se nachází na obrázku 6.



Obrázek 6: Působení proteinu IFI16 při infekci herpesviry. V levém horním kvadrantu jsou znázorněny signální dráhy při infekci α -herpesvirem herpes simplex 1 (HSV-1). V levém spodním kvadrantu jsou znázorněny dráhy při infekci β -herpesvirem lidským cytomegalovirem (HCMV) a pravá polovina znázorňuje průběh infekce γ -herpesviry Kaposhiho herpesvirem spojeným se sarkomem (KSHV) a virem Epstein-Barrové (EBV) [84](upraveno).

Asociace proteinu IFI16 s genomem viru herpes simplex (HSV) nastává již jednu hodinu po infekci a způsobuje chromatinovou represi transkripce virové DNA [86]. Po rozpoznání genomu HSV-1 přechází protein IFI16 z jádra buňky do cytoplazmy [58] a tvoří komplex inflamazomu s adaptorovým proteinem ASC (adaptorový protein spojený s apoptózou, podobný skvrnitému proteinu obsahující CARD, z angl. apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) a prokaspázou-1 (proCasp-1). Inflamazom indukuje štěpení a aktivaci kaspázy-1 a IL-1 β (interleukin 1 β) [84]. Rovněž dochází k aktivaci signální dráhy STING-IRF-3, která indukuje expresi IFN typu I (IFN-I) [36, 78]. HSV-1 vůči tomuto obrannému hostitelskému mechanismu v raných fázích infekce využívá infikovaný buněčný protein 0 (ICP0), který se řadí do skupiny proteinů exprimovaných ihned po infekci (IE proteiny). ICP0 se uplatňuje při přechodu z lytické fáze infekce do fáze latentní a způsobuje proteolytické štěpení proteinového komplexu proteazomu [68, 78, 80]. Bylo prokázáno, že v případě infekce mutantní formou HSV d106 exprimující vysoké hladiny ICP0 ale nulové hladině dalších okamžitých proteinů (IE proteinů) viru, dochází po snímání proteinem IFI16 k inhibici aktivace dráhy IRF-3. Naopak infekce HSV d109, u kterého byly mutovány geny pro IE proteiny ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 a ICP47 nezpůsobila změnu indukce genů, které reagovaly na IRF-3 [78]. V případě infekce buňky HSV-1 je protein IFI16 rovněž

naváděn do jaderných těles ND10 (jaderná tělesa 10, z angl. nuclear domains with 10 seen dots), kde se zaměřuje na degradaci [87]. ND10 v buňce plní řadu úloh včetně regulace genů [88, 89], zastavení buněčného cyklu [90], apoptózy [91], opravy DNA [92] a onkogeneze [93, 94]. Tato makromolekulární tělesa jsou schopna asociovat s genomem herpesvirů, regulovat chromatin, virové a buněčné geny na úrovni transkripce [95] a alespoň částečně tak inhibovat expresi HSV-1, čímž se podílí na antivirové obraně organismu [96, 97].

Při infekci lidským cytomegalovirem (HCMV) rozpoznává protein IFI16 komplex viru s DNA a blokuje replikaci viru tím, že blokuje aktivitu transkripčních faktorů na virovém promotoru genu *UL54* [71]. Tyto virové transkripční faktory jsou velmi podobné TF Sp1 (protein specificity 1, z angl. specificity protein 1) [84], který se váže na úseky promotorů bohaté na guanin a cytosin (GC-motivy) [98]. PUL83, protein kapsidu HCMV označovaný také jako pp65 [99], potlačuje indukci antivirových cytokinů, blokuje aktivaci NK-buněk a prezentaci antigenu nezbytnou pro spuštění imunitní odpovědi T buněk [79, 99]. Prostřednictvím strukturního proteinu pp65 a virové proteinové kinázy se HCMV snaží translokovat protein IFI16 z jádra [79]. Jakmile se protein IFI16 dostává do cytoplazmy spouští dráhu STING-IRF-3, která vede k aktivaci exprese IFN-I. Vazba a přesun IFI16 proteinem pp65 vede k dysregulaci NF- κ B (nukleární faktor kappa B, z angl. nuclear factor kappa B) [100–104], která indukuje trans-aktivaci hlavního okamžitého časného promotoru (MIEP) [105]. Ten u HCMV řídí expresi trans-aktivátorů lytického cyklu [85]. Proteiny NF- κ B jsou další skupinou transkripčních faktorů odpovědných za protizánětlivě a vrozené imunitní odpovědi. V buňkách jsou konstitutivně exprimovány, ale vyskytují se i ve formě neaktivních komplexů s inhibítorem I κ B. Při reakci na specifické podněty jako např. TNF α (nádorový nekrotizující faktor) a PAMPS (molekuly spojené s patogenními infekcemi) dochází vlivem I κ B kinázy k fosforylaci I κ B, což umožní proteinům NF- κ B přesunout se do jádra, kde působí jako sekvenčně specifický transkripční faktor [106–108]

Při rozpoznání DNA herpesviru spojeného s Kaposiho sarkomem (KSHV) nebo viru Epstein-Barrové (EBV) v latentní fázi aktivuje protein IFI16 (stejně jako v případě napadení buňky HSV-1) ASP a proCasp-1, se kterými tvoří inflamazom. Ten přechází z jádra do cytoplazmy a indukuje vznik Casp-1 a IL-1 β [58]. EBV i KSHV jako svůj obranný mechanismus indukují exkreci IFI16 a IL-1 β z buněčného prostoru prostřednictvím membránových váček zvaných exosmózy [84, 109]. Za sekvestraci proteinu IFI16 a IL-1 β z buněčného prostoru je zodpovědný hostitelský protein Rab27a [109]. IFI16 je schopen detekovat také provirovou DNA HIV-1 v jádrech napadených T lymfocytů CD4⁺ [110, 111] a následně spouštět buněčnou signalizaci navozenou kaspázou-1 [112].

IFI16 není nezbytný pro aktivaci kanonické signální dráhy STING po virové infekci. Kromě něho je virovou DNA schopna snímat také cGAS (cyklická GMP-AMP syntáza) jako tomu je v buňkách HEK293T které postrádají mnoho klíčových složek pro snímání DNA. [113–116]. Vyřazení IFI16 nebo ND10 nemá pozorovatelný vliv na aktivaci TBK-1, ale vyřazení STING již vede k výraznému oslabení imunitní odpovědi. Ztráta proteinu IFI16 však potlačuje indukci antivirových cytokinů po infekci HSV-1 a znemožňuje přesunu ND10 k vstupním bodům genomu viru na okrajových částech jádra [74]. Rozsah funkcí proteinu IFI16 a zvýšená citlivost na exogenní DNA je odlišná pro specifické buněčné typy. Ke zvýšení senzitivity vůči exogenní DNA dochází v monocitech a buňkách THP1, kde je indukována silná exprese proteinu IFI16. Jeho hladiny jsou ještě více zvyšovány stimulací DNA [58]. Rovněž bylo prokázáno, že v lidských keratinocytech

je protein IFI16 schopen kooperovat s cGAMP při aktivaci STING a oba tyto nezávislé signály jsou nezbytné pro jeho optimální fosforylaci, translokaci a plnou aktivaci závislých signálních drah, což slouží jako další úroveň regulace STING z důvodu falešné aktivace imunitní odpovědi [117]. Existuje řada dalších regulačních mechanismů, které mohou ovlivňovat funkci STING, jako například posttranslační modifikace, kam řadíme fosforylaci TBK1 a dalšími kinázami [118, 119], ubikvitylaci s ubikvitinovými řetězci spojenými s třemi jeho lysinovými residui K48-, K63- a K27- a palmytoylaci (tvorba kovalentních vazeb mastných kyselin jako je kyselina palmitová na cystein nebo méně častá vazba na serinová a threoninová residua proteinů) [120, 121, 122, 123; 124]. Mechanismus aktivace STING se tak ukazuje jako mnohem složitější s ohledem na přísnější kontrolu a případné další dosud neobjasněné regulační mechanismy působící za fyziologických podmínek, které mohou být dány omezenou koncentrací proteinu STING v buňkách [117].

2.2.3.4 Interakce IFI16 s nádorovým supresorem p53

Jaderný protein p53 plní funkci tzv. „strážce genomu“. Jeho primární funkcí je udržování genetické stability a zamezení vzniku rakoviny. Patří mezi jedny z nejvíce studovaných nádorových supresorových proteinů. Podílí se na regulaci procesů jako jsou stárnutí, buněčný cyklus, odpovědi na poškození DNA a v případě ohrožení organismu i apoptózy [125–127]. Pokud dojde k poškození genomu, zahájí p53 řadu buněčných procesů, které mají dané poškození opravit. V případě, že jsou tyto opravy neúčinné, nastává apoptóza, tedy programovaná buněčná smrt nebo nádorová transformace [128, 129].

Při studiu vzájemného vlivu IFI16 a transkripčního faktoru p53 bylo prokázáno, že se IFI16 významně podílí na jeho transkripční regulaci [31, 32, 130] a zároveň společně vytvářejí protein-proteinové interakce. Obě HIN domény IFI16 reagují s C-koncem a hlavní doménou (*core domain*) p53. HIN-A doména rozpoznává C-konec p53 vlivem svého hydrofobního povrchu a způsobuje zmírnění nespecifických interakcí nebo pozměňuje vedení C-konce. Tyto změny usnadňují sekvenčně specifické vazby DNA k hlavní doméně proteinu p53, se kterou interaguje i HIN-B doména, která tak přispívá k stabilizaci komplexu p53-DNA [39, 131]. Tím se zvýší i transkripční aktivace proteinu p21 [39], který je schopen vázat se na cyklin-dependentní kinázy (CDK) a inaktivovat je. Inhibice CDK následně zapříčiňuje zastavení buněčného cyklu ve fázích G1 a G2 [132]. Kromě HIN domén se do regulačních mechanismů zapojuje i doména PYRIN, která prostřednictvím interakcí s nádorovým supresorovým proteinem BRCA1 (protein citlivý na rakovinu prsu typu 1, z angl. breast cancer type 1) podporuje apoptózu, která je závislá právě na proteinu p53 [131].

Při studiu vlivu aktivity transkripce prostřednictvím p53 byly využity luciferázové testy na lidské buněčné linii plicního karcinomu H1299 neexprimujícího endogenní p53 ani IFI16. Transfekce samotného proteinu p53 zvýšila expresi reportérového genu osmkrát, zatímco kombinace IFI16 a p53 až patnáctkrát, a to v závislosti na množství exprimovaného IFI16. IFI16 je tak skrze HIN domény A a B schopen regulovat trans-aktivační funkci zprostředkovanou proteinem p53 [39].

2.2.4 Vazba proteinů obsahující HIN domény k DNA

Schopnost vazby HIN domén k DNA je dána dvěma malými strukturálními jednotkami schopnými vázat oligonukleotidy a oligosacharidy (tzv. *OB-folds*), které tyto domény obsahují [133]. Oba záhyby obsažené v HIN-A doméně vykazují větší afinitu vazby k jednořetězcové DNA (ssDNA)

než dvouřetězcové DNA (dsDNA) a jsou schopny ji sbalit a tvořit s ní oligomer [44]. HIN-B doména je naproti tomu schopna vázat dsDNA. Tato její schopnost bývá posílena přítomností druhé (HIN-A) domény [34]. Proteiny schopné takto se vázat na DNA jsou zapojeny takřka kdykoliv, kdy je přítomna ssDNA nebo ssRNA. To je dělá nepostradatelné při transkripci, translaci, opravě, replikaci a rekombinaci DNA i udržování telomer [46]. Protein IFI16 není schopen se k DNA tímto způsobem celý vázat. V buněčné linii monocytů THP-1 byl protein IFI16 sice detekován v komplexu s přenesenou imobilizovanou ssDNA a dsDNA, ty se však vázaly spíše na jednotlivé HIN domény než na celý protein [34]. Vazbě HIN domén proteinu IFI16 k DNA napomáhá i PYRIN doména, která se přímo na vazbě nepodílí, ale při rozpoznání cizorodé DNA odkrývá vazebná místa pro DNA na HIN doménách a oligomerizuje.

2.2.5 Vazba IFI16 k DNA

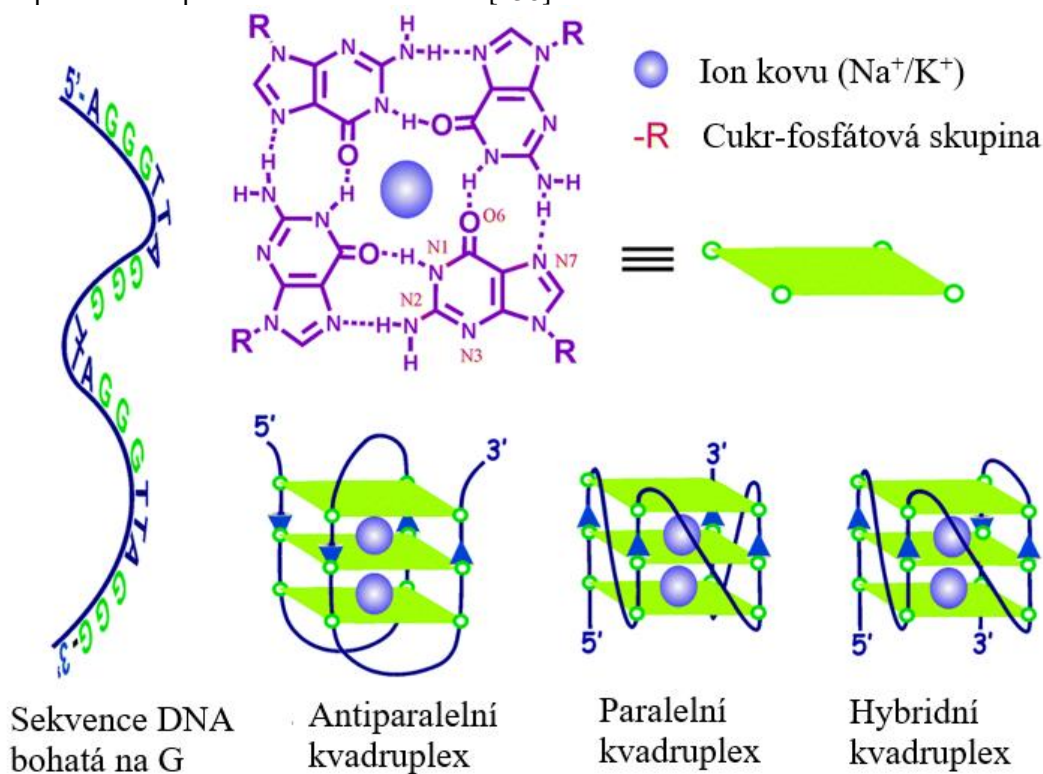
Protein IFI16 o plné délce nevykazuje vazbu k jednořetězcové DNA a s dvouřetězcovou DNA reaguje sekvenčně nespecifickým způsobem [69] prostřednictvím elektrostatických interakcí mezi záporně nabitou páteří řetězce cukr-fosfát a pozitivně nabitými proteinovými zbytky [72]. Protein má větší tendenci vázat se k nadšroubovicové a křížové DNA spíše než k lineární, třebaže jsou sekvence obou DNA shodné [134] a úlohu může hrát i samotná délka vazby [58, 69]. V současné době se ukazuje, že protein je schopen rozpoznat strukturu tzv. G-kvadruplexu a přednostně se na ni vázat, třebaže je přítomna jen ve velmi omezené míře oproti zbytku genomu. Rovněž byla prokázána schopnost tuto strukturu proteinem stabilizovat. Samotná DNA vazebná HIN-A doména upřednostňuje vazbu na jednořetězcovou DNA, která je bohatá na guanin (G) a má tak potenciál tvořit G-kvadruplex. IFI16 navíc upřednostňuje G-kvadruplex oproti stejně sekvenčně uspořádané dvouřetězcové DNA. Třetí doména proteinu IFI16 – PYRIN vykazuje také schopnost vazby k různým strukturám DNA, a to v různém rozsahu. Nejvíce byla opět prokázána afinita vazby ke G-kvadruplexu, ale následoval i významný vliv dvouřetězcové a jednořetězcové DNA, který byl v porovnání s vlivem na domény HIN vyšší. Vzhledem k tomu že doména PYRIN se účastní oligomerizace proteinu IFI16, mohou tak všechny tyto formy DNA ovlivňovat interakce s dalšími proteiny a možná i následnou oligomerizaci [51].

2.2.5.1 G-kvadruplexy

G-kvadruplexy se řadí mezi nekanonické sekundární struktury DNA a RNA [135]. Jedná se o sekvence bohaté na G, které se snadno tvoří za fyziologických podmínek [136]. Nacházejí se ve významných regulačních strukturách genomů jako jsou lidské telomery [137], oblasti promotorů onkogenů [136], místa zahájení replikací a 5'-3' nepřekládaná oblast mRNA. Rovněž hrají významnou roli při regulaci řady buněčných procesů jako jsou replikace, transkripce, translace a genové stability [138]. G-kvadruplexy se nacházejí i v genomech archeí, bakterií, eukaryot a virů [139]. Ligandy stabilizující G-kvadruplexy jsou potenciální terapeutické cíle při léčbě nádorových a virových onemocněních a proto je v současnosti studiu těchto struktur věnována zvýšená pozornost [140, 141]. Jejich studium se neuplatňuje pouze při výrobě léčiv, ale stále více roste jejich uplatnění i při použití pro biomateriály [142, 143], biosenzory [144, 145] a biokatalyzátory [146].

Jak je vidět na obrázku 7, základní jednotku G-kvadruplexů tvoří tzv. G-tetráda, kterou představují čtyři guaninové báze párující se dle Hoogsteena a vzájemně interagující prostřednictvím vodíkových vazeb. Stabilizaci G-tetrád zajišťují sodné a draselné ionty [147–149]. Tetrády mohou zaujímat *anti* nebo *syn* glykosidickou konformaci a řetězce mohou být jak paralelní,

tak antiparalelní [136]. Kvadruplexy jsou nejčastěji složeny ze dvou, tří nebo čtyř tetrád, které jsou tvořeny jednou molekulou DNA (intramolekulární). V případě, že se do uskupení zapojuje i další molekula hovoříme o tzv. intermolekulárním G-kvadruplexu. Zatímco tetramolekulární G-kvadruplexy jsou obvykle vázány paralelně a přijímají *anti* glykosidickou vazbu, intramolekulární G-kvadruplexy jsou velmi strukturně rozmanité v topologii skládání, smyčkové konformaci a zakončovacích strukturách [150]. I při znalosti primární struktury je tak těžké odhadnout konformaci G-kvadruplexu bez experimentálního stanovení [138]



Obrázek 7: Struktura tetrád a různé topologie. Základ G-kvadruplexu je tvořen G-tetrádami z čtyř guaninových bází interagujících prostřednictvím vodíkových vazeb. G-kvadruplex je stabilizován sodnými a draselnými ionty [151] (upraveno).

3 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

- 1) Literární rešerše k tématu
- 2) Příprava kompetentních buněk
- 3) Pěstování bakteriálních a kvasinkových kultur
- 4) Izolace plazmidů
- 5) Transformace bakterií a kvasinek
- 6) Příprava isogenních kvasinkových kmenů
- 7) Studium interakce proteinu IFI16 s DNA v jednohybridním kvasinkovém systému

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

Genetický materiál, kmeny mikroorganismů, chemikálie, přístrojové vybavení a další laboratorní pomůcky byly poskytnuty ze zdrojů oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i., kde také probíhaly veškeré experimenty.

4.1.1 Kmeny kvasinek a bakterií

- **yLFM-ICORE** (*MATa*; *leu2-3,112*; *trp1-1*; *his3-11,15*; *can1-100*; *ura3-1*; *RE::pCyc1::LUC1*), *S. cerevisiae*, kmen byl poskytnut prof. Albertem Ingem z Centra integrativní biologie (CIBIO, University of Trento). Kazeta ICORE byla nahrazena některým z mutovaných oligonukleotidů sekvence PUMA-KSHV metodou *Delitto Perfetto*.
- **yLFM-PUMA** (*MATa*; *leu2-3,112*; *trp1-1*; *his3-11,15*; *can1-100*; *ura3-1*; *RE::pCyc1::LUC1*), *S. cerevisiae*, kmen byl poskytnut Mgr. Natálií Bohálovou z Biofyzikálního ústavu, AV ČR.
- **yLFM-PUMA-KSHV** (*MATa*; *leu2-3,112*; *trp1-1*; *his3-11,15*; *can1-100*; *ura3-1*; *RE::pCyc1::LUC1*), *S. cerevisiae*, kmen byl poskytnut Mgr. Natálií Bohálovou z Biofyzikálního ústavu, AV ČR.
- **yLFM-RE** (*MATa*; *leu2-3,112*; *trp1-1*; *his3-11,15*; *can1-100*; *ura3-1*; *RE::pCyc1::LUC1*), *S. cerevisiae*, kmeny připravené v rámci bakalářské práce metodou *Delitto Perfetto*.
- **Stb13 chemicky kompetentní buňky**, *E. coli*; Thermo Fischer Scientific.

4.1.2 DNA

V průběhu experimentů byl použit následující genetický materiál:

- **nosičová jednořetězcová DNA** – salmon sperm ssDNA; Thermo Fisher.
- **plazmid pRS314** (selektovatelný marker kvasinek – TRP1; selektovatelný marker bakterií – ampicilin (Amp); byl použit jako prázdný vektor).
- **plazmid pRS315** (selektovatelný marker kvasinek – LEU2; selektovatelný marker bakterií – Amp; byl použit jako prázdný vektor).
- **vektor pLLS89** (selektovatelný marker kvasinek – LEU2; exprimuje protein p53; obsahuje indukibilní GAL promotor; byl poskytnut prof. Albertem Ingem z Centra integrativní biologie (CIBIO, University of Trento).
- **vektor pTSAD TADIFI16** (selektovatelný marker kvasinek – TRP1; exprimuje protein IFI16 konjugovaný s transkripčně aktivační doménou (TAD); obsahuje neindukovatelný ADH (alkoholdehydrogenázový) promotor; byl připraven v laboratoři Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu, AV ČR).
- **DNA žebříček** (100 bp *DNA Ladder*; New England Biolabs)

Tabulka 1: Primery. Primery byly použity pro PCR a při přípravě vzorků na sekvenování.

Primer	Sekvence 5'–3'	Výrobce
Ade-přímý	AAGTTGCCTAGTTTCATGAA	Generi Biotech
Luc-zpětný	CATAGCTTCTGCCAACCGAA	Generi Biotech

Tabulka 2: Oligonukleotidy. Oligonukleotidy použité na přípravu nových reportérových kmenů *S. cerevisiae* metodou Delitto Perfetto. Původní sekvence KSHV byla mutována dle programu G4 Killer (viz podkapitola 4.3.1.2 G4 Killer). Všechny byly dodány firmou Eurofins Genomics.

Oligonukleotid	Sekvence 5'–3'
PUMA	CTGCAAGTCCTGACTTGTCC
PUMA-KSHV	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGGGCGGGGGACGGGGGAGGGG
PUMA-KSHV-1no	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAAGCGGGGGACGGGGGAGGGG
PUMA-KSHV-2no	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAAGCGAAAGACGGGGGAGGGG
PUMA-KSHV-3no	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGAAGCGAAAGACGAAAGAGGGG
PUMA-KSHV-mut1.0	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGAGCGGTGGACGGAGGAGTAG
PUMA-KSHV-mut1.5	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGAGCGGTGGACGGTGGAGGAG
PUMA-KSHV-mut2.0	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGAGCGGTGGACGGAGGAGGGG

4.1.3 Chemikálie

V rámci experimentů byly použity některé specifické chemikálie a sady, jejichž seznam je shrnut v tabulce 3.

Další chemikálie, které se běžně vyskytují v molekulárně-biologických a biotechnologických laboratořích, byly obstarány v nejvyšší možné čistotě a jsou ze seznamu vynechány.

Tabulka 3: Přehled použitých chemikálií v průběhu celé práce.

Chemikálie	Výrobce
5-fluoroorotová kyselina (5-FOA)	Thermo Scientific
Ampicilin	Gibco
Detekční sada pro bioluminescenci – <i>Bright Glo Luciferase assay</i>	Promega
G418 (geneticin)	Gibco
<i>Passive Lysis Buffer</i>	Promega
PCR purifikační sada – <i>High Pure PCR Product Purification kit</i>	Sigma-Aldrich
Sada na izolaci plazmidové DNA – <i>E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I Omega</i>	BIO-TEK
Základ pro kompletní kvasinkové médium – <i>YPD Broth</i>	Sigma-Aldrich
Základní médium s dusíkem pro kvasinky – <i>Yeast Nitrogen Base</i>	Sigma-Aldrich

4.1.4 Přístroje

Během experimentů byly použity některé specifické přístroje:

- čtečka ELISA – Synergy Hybrid Multi-Mode Microplate Reader; BioTek
- spektrofotometr – NanoDrop 2 000; Thermo Scientific
- transiluminátor – Amersham Imager 680

Další přístroje, které se běžně vyskytují v molekulárně-biologických a biotechnologických laboratořích, byly ze seznamu vynechány.

4.2 Použitá média a další roztoky

4.2.1 Média použitá při kultivaci bakterií:

SOC médium

2 % trypton
0,5 % kvasinkový extrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM glukóza.

LB médium

1 % trypton
0,5 % kvasinkový extrakt
1 % NaCl

4.2.2 Média použitá při kultivaci kvasinek:

Kompletní tekuté neselektivní médium (YPDA)

50 g·l⁻¹ *YPD broth*
200 mg·l⁻¹ adenin

Kompletní pevné neselektivní médium (YPDA misky)

50 g·l⁻¹ *YPD broth*
200 mg·l⁻¹ adenin
2 % agar

Selektivní médium s geneticinem (G418 misky; negativní selekce)

50 g·l⁻¹ *YPD broth*
200 mg·l⁻¹ adenin
2 % agar
G418 200 mg·l⁻¹
(ze zásobního 50 mg·ml⁻¹)

Syntetické tekuté médium s galaktózou

6,7 g·l⁻¹ *Yeast Nitrogene base*
2 % galaktóza
200 mg·l⁻¹ adenin
20 mg·l⁻¹ histidin
100 mg·l⁻¹ leucin
20 mg·l⁻¹ tryptofan
90 mg·l⁻¹ lysin
20 mg·l⁻¹ uracil

**Syntetické selektivní misky ItA
(po transformaci pomocí DMSO)**

6,7 g·l⁻¹ *Yeast Nitrogene base*
2 % agar
2 % dextróza
200 mg·l⁻¹ adenin
20 mg·l⁻¹ histidin
90 mg·l⁻¹ lysin
20 mg·l⁻¹ uracil

**5-FOA misky
(pozitivní selekce)**

6,7 g·l⁻¹ *Yeast Nitrogene base*
2 % agar
2 % dextróza
200 mg·l⁻¹ adenin
20 mg·l⁻¹ histidin
100 mg·l⁻¹ leucin
20 mg·l⁻¹ tryptofan
90 mg·l⁻¹ lysin
20 mg·l⁻¹ uracil
1 g·l⁻¹ 5-FOA

**Syntetické leucin a tryptofan selektivní tekuté
médium s rafinózou (SRItA – luciferázové testy)**

6,7 g·l⁻¹ *Yeast Nitrogene base*
2 % rafinóza
200 mg·l⁻¹ adenin
20 mg·l⁻¹ histidin
90 mg·l⁻¹ lysin
20 mg·l⁻¹ uracil

4.2.3 Další roztoky:

LiAc/TE/PEG

100 mM dihydrátu octanu lithného, 1x TE pufr, 58% PEG

LiAc/TE

100 mM dihydrátu octanu lithného, 1x TE pufr

PCR lyzační pufr

200 mM dihydrátu octanu lithného, 1% SDS

10x TE pufr

100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM EDTA, pH 8

4.3 Metody

4.3.1 DNA Analyser

Pro analýzu lokálních sekundárních struktur nukleotidových sekvencí lze využít webový server *DNA Analyser*, který byl vyvinut ve spolupráci Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR a Katedry informatiky Mendelovy univerzity v Brně. Jedná se o bezplatný nástroj, díky kterému lze snadno predikovat tvorbu lokálních sekundárních struktur DNA nebo RNA.

4.3.1.1 G4 Hunter

G4 Hunter je nástroj pro hledání sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexů v nukleových kyselinách. Algoritmus posuzuje G-bohatost a G-šikmost dané sekvence a dle určitých parametrů vyhodnocuje tendenci tvořit G-kvadruplex. Čím vyššího *G4Hunter skóre* bylo dosaženo, tím větší je pravděpodobnost tvorby G-kvadruplexu.

Platí, že každé G má na skóre pozitivní vliv, zatímco cytozin (C) ho ovlivňuje negativně. Adenin (A) a tymin (T) nemají vliv na výsledné *G4Hunter skóre*. S každou následující bází G v řadě se skóre zvýší o jednotku a tato hodnota je pak sčítána pro všechny za sebou jdoucí báze G v dané části sekvence (ne však v celé sekvenci). To stejné platí i pro bázi C, ale v jejím případě se skóre vždy snižuje. Obě tyto hodnoty lze snižovat a zvyšovat až do čísla 4, takže i když sekvence obsahuje 6 G bází za sebou, tak při výpočtech můžeme pouze 6krát přičíst hodnotu 4 a ne 6. Na výsledné skóre pak má vliv i délka sekvence, tedy počet bází, kterými se součet hodnot bází dělí [152].

Příklad výpočtu skóre pro sekvenci ATGGATGGATGATGAT:

Celková délka sekvence = 16 nukleotidů

Součet hodnot bází: $0 + 0 + 2 + 2 + 0 + 0 + 2 + 2 + 0 + 0 + 1 + 0 + 0 + 1 + 0 + 0 = 10$

Výsledná prahová hodnota je vypočtena dle vztahu (4.1):

$$\text{Skóre} = \frac{\text{Součet hodnot bází}}{\text{Celková délka sekvence}} \quad (4.1)$$

$$\text{Skóre} = \frac{10}{16}$$

$$\text{Skóre} = 0,625 [-]$$

Po skončení analýzy se zobrazuje seznam výsledků s pozicí, délkou, skutečnou sekvencí, skóre a teplotní mapa. Ta ukazuje množství oblastí bohatých na G a lze ji snadno přepnout do „procentního zobrazení“, díky kterému získáme lepší představu o zastoupení těchto míst v daném segmentu. Při vyhodnocení sekvence mají báze své vlastní barvy pro lepší rozlišení – červenou G, modrou C a šedou A a T [152].

4.3.1.2 G4 Killer

G4 Killer zobrazuje možné mutace dané sekvence s potenciálem tvorby G-kvadruplexu dle námi zadaného *G4Hunter skóre*. Celý proces spočívá v provedení různých modelů mutací a přepočítání jejich výsledného skóre, které je následně seřazeno od nejlépe po nejhůře odpovídající výsledky [152].

4.3.1.3 P53 predictor

P53 predictor je softvér pro výpočet teoretické afinity vazby p53 na cílovou 20 párů bází dlouhou sekvenci [153].

4.3.2 Transformace bakterií

Transformace byla provedena pomocí teplotního šoku v několika krocích. Kompetentní buňky Stb13 byly nechány rozmraznout na ledě a ke každým 50 μl bylo přidáno 50 ng plazmidové DNA (pRS314, pRS315, plls89, pTSAD TADIFI16). Rovněž byla udělána i negativní kontrola bez vložení plazmidové DNA. Buňky byly inkubovány 30 minut na ledě a poté byly přeneseny do předem vyhřátého termobloku na 45 s při 42 °C. Po teplotním šoku byly buňky přeneseny opět na 2 minuty na led a následně bylo přidáno 250 μl SOC média předehřátého na 37 °C. Po hodinové inkubaci při 37 °C na 250 rpm bylo rozetřeno 60 μl transformační směsi na misky s LB médiem a antibiotikem (ampicilin) o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

4.3.3 *Delitto Perfetto* – příprava nových kmenů kvasinek *in vivo*

Kolonie kmenu yLFM-ICORE byla první den inokulována do 5 ml YPDA tekutého média a inkubována do druhého dne při teplotě 30 °C a 150 rpm.

Následně proběhla transformace, kdy bylo médium s kulturou stočeno a získaný pelet byl promyt 50 ml Mili-Q vody kvůli odstranění zbytků dextrózy. Bylo přidáno 5 ml syntetického tekutého média s galaktózou ohřátého na pokojovou teplotu, které indukovalo expresi restriční endonukleázy indukující DSB v blízkosti kazety ICORE. Směs byla vlita do menší Erlenmayerovy baňky a nechána třepat 4 hodiny při 30 °C. Kvasinková kultura byla po 4 hodinách stočena na 3 minuty při 8 000 g. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 50 ml Mili-Q vody. Směs byla protřepána a opět stočena. Pelet byl promyt 10 ml Mili-Q vody a nakonec ještě 3 ml směsi LiAc/TE. Buňky byly zakoncentrovány v 600 μl směsi LiAc/TE. K 50 μl takto připravených kompetentních buněk bylo přidáno 5 μl oligonukleotidů o koncentraci 200 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 5 μl předem denaturované nosičové DNA a 300 μl směsi PEG/LiAc/TE. Transformační směsi byly nechány 30 minut při 30 °C a 200 rpm a poté přemístěny na 15 minut do vodné koupele předehřáté na 42 °C. Mikrozkuhavky byly stočeny na 3 minuty při 3 000 rcf, PEG odsán a pelet resuspendován v 100 μl Mili-Q vody. 50 μl bylo důkladně rozetřeno na YPDA misky a inkubováno na 30 °C do druhého dne.

Třetí den byla provedena pozitivní selekce, kdy YPDA misky byly orazítkovány na misky s 5-FOA a ty byly inkubovány 3 dny při 30 °C. Šestý den byla provedena negativní selekce pomocí misek s G418. Každá z 5-FOA misek byla orazítkována na G418 a YPDA misku. Jako první byla orazítkována miska s G418, aby bylo zajištěno, že každá kolonie byla důkladně otačena a neměli jsme falešně pozitivní výsledky. Misky byly opět inkubovány do druhého dne při 30 °C. Sedmý den byly udělány roztěry v podobě stromečků z kolonií, které narostly na YPDA miskách, ale ne na miskách s G418. Misky byly inkubovány 3 dny při teplotě 30 °C. Desátý den byly připraveny roztěry ve tvaru čtverečků o velikosti asi 1x1 cm na YPDA misky. Takto připravené roztěry byly inkubovány do druhého dne při teplotě 30 °C. Jedenáctý den byly udělány repliky roztěrů na G418 a YPDA misky jako v šestém dni a inkubovány do druhého dne na 30 °C.

Dvanáctý den byly odebrány vzorky na PCR z roztěrů, které narostly na YPDA miskách, ale na miskách s G418 se objevily jako pouhý stín.

4.3.4 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Začlenění oligonukleotidů do kvasinkového chromozomu bylo potvrzeno amplifikací DNA metodou PCR a následnou elektroforézou.

Extrakce genomové kvasinkové DNA byla provedena dle postupu v článku *Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications* [154].

Nejprve bylo třeba provést tzv. optimalizaci PCR, kdy byla na nově připraveném kmenu vzniklého homologní rekombinací kazety ICORE mutovaným oligonukleotidem PUMA-KSHV-1no zjištěna optimální teplota nasednutí primerů gradientovou PCR. Tato optimalizovaná teplota pro hybridizaci pak byla použita na všechny další vzorky.

PCR byla provedena v několika krocích. Byly vybrány vhodné kandidátní kolonie, které rostly na YPDA agarových miskách, ale na G418 se projeví jako pouhý náznak otlačení. Z takto vybraného a označeného čtverečku každého vzorku byla odebrána kolonie a resuspendována v 100 μ l PCR lyzačního pufru z 1% SDS a inkubována na 5 minut v termobloku předeřhřátém na 70 °C. Ke směsi bylo přidáno 300 μ l 99,98% ethylalkoholu a vše bylo pečlivě smícháno pomocí vortexu. Směs alkoholu, pufru a vzorku byla centrifugována po dobu tří minut na 14 000 rcf. Supernatant byl odsát a pelet byl promyt 300 μ l 70 % ethylalkoholu a opět centrifugován jako v předešlém případě. Supernatant byl opět odpipetován a k peletu bylo přidáno 100 μ l Mili-Q vody. Pelet byl ve vodě resuspendován a před přidáním k směsi potřebné pro PCR stočen po dobu 15 s opět na 14 000 rcf.

Reakční směs pro PCR byla připravena z:

- 5 μ l 10x PCR pufru
- 4 μ l 2,5mM dNTPs
- 1 μ l primeru Ade-přímý o koncentraci 10 pmol· μ l⁻¹
- 1 μ l primeru Luc-zpětný o koncentraci 10 pmol· μ l⁻¹
- 1 μ l supernatantu
- 0,25 μ l Taq polymerázy
- 37,75 μ l Mili-Q vody

Pro gradientovou PCR byly nastaveny teploty nasednutí primeru v rozmezí 55–60 °C. Nejspecifičtější byly vzorky při teplotě 55 °C, která byla následně použita i pro ostatní kmeny. Počáteční denaturace trvala déle (8 minut) a byla nastavena na 94 °C. Následovalo 35 opakujících se cyklů sestávajících z denaturace na 94 °C po dobu 1 minuty, nasednutí primerů při teplotě 55 °C po dobu 1 minuty a polymerace při 72 °C trávající 2 minuty. Poslední elongace byla nastavena na 5 minut při 72 °C.

Po dokončení PCR bylo nanášeno 10 μ l na 1% agarózový gel s přísávkem barviva Gel Red. Agarózová elektroforéza probíhala v prostředí 1x koncentrovaného TAE pufru při pokojové teplotě 15 minut na 90 V a poté 30 minut na 110 V.

4.3.5 Purifikace DNA po PCR

Přečistění DNA po PCR bylo provedeno pomocí komerčně dodávaného PCR purifikační sady dle následujícího postupu.

Směs s amplifikovanou DNA byla přenesena do čisté mikrozkušavky a doplněna Mili-Q vodou na objem 100 μ l. K roztoku bylo přidáno 500 μ l vazebného pufru a vše bylo přeneseno na kolonu se sběrnou nádobou, která byla centrifugována na 14 000 rcf po dobu 1 minuty. Obsah sběrné nádoby byl vylit a navázaná DNA byla promyta nejprve 500 a poté 200 μ l promývacího pufru. Každé promytí doprovázela centrifugace kolony na 14 000 rcf po dobu 1 minuty a vylití přefiltrovaného roztoku ze sběrné nádoby. Kolona byla přenesena do čisté mikrozkušavky a těsně nad filtrem bylo přidáno 50 μ l elučního pufru. Následovalo stočení po dobu 1 minuty na 14 000 rcf.

Po izolaci byla změřena koncentrace dsDNA a zkontrolován signál při 260 nm na přístroji NanoDrop 2 000. Ze zjištěných koncentrací byl vypočten objem potřebný pro sekvenaci k dosažení koncentrace $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v 15 μl roztoku a přidány 2 μl primeru Luc. Takto připravené vzorky byly odeslány na Sangerovo sekvenování firmě Eurofins Genomics.

4.3.6 Transformace kvasinek pomocí lithium acetátové metody

První den byla jedna kolonie nově připravených kmenů a kmenů PUMA a PUMA-KSHV inokulována do 5 ml YPDA tekutého média a inokulum bylo inkubováno přes noc při 30 °C a 80 rpm.

Druhý den proběhla samotná transformace. K 5 ml inokula z předcházejícího dne bylo přidáno 40 ml YPDA média předehřátého na 30 °C a suspenze byly převedeny do menších Erlenmayerových baněk, ve kterých byly inkubovány při 30 °C a 90 rpm do dosažení optické hustoty kultury při 600 nm (OD_{600}) v rozmezí 0,8–1. Kultura byla poté stočena v centrifugačních zkumavkách při pokojové teplotě a 9 000 rcf po dobu 3 minut. Supernatant byl odlit a pelet byl 2x promyt 50 ml a 10 ml Mili-Q vody. Poslední promytí bylo provedeno 3 ml roztoku LiAc/TE. Pelet byl resuspendován v 600 μl roztoku LiAc/TE. K 50 μl takto připravených kompetentních buněk bylo přidáno 300 μl roztoku PEG/LiAc/TE, 2 μl plazmidů (pRS314, pRS315, plls89 a pTSAD TADIFI16) a 5 μl předem zdenaturované nosičové ssDNA ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Rovněž byla připravena negativní kontrola bez plazmidů. Mikrozukmavky s takto připravenými vzorky byly třepány po dobu 30 minut při 30 °C a 90 rpm a následně byly přemístěny na 20 minut do termobloku předehřátého na 42 °C. Vzorky v mikrozukmavkách byly stočeny po dobu 3 minut při 3 000 rcf. Supernatant obsahující PEG byl odsát a pelet byl resuspendován v 100 μl Mili-Q vody. Transformační směs o objemu 50 μl byla rozetřena na syntetické selektivní ItA misky, které byly inkubovány 3 dny při 30 °C.

4.3.7 Luciferázové reportérové testy

Pátý den od začátku transformace byly připraveny roztěry ve tvaru čtverečků z narostlých transformovaných kmenů kvasinek. Bylo zhotoveno 6 roztěrů o velikosti 1x1 cm na čisté ItA misky. Misky byly inkubovány 3 dny při 30 °C. Takto narostlé misky byly použity na analýzu luciferázovým testem.

Do prázdné 96 jamkové destičky s plochým dnem bylo nadávkováno 200 μl SRItA tekutého média s rafinózou a přeneseno vždy 5 vzorků roztěrů čtverečků z každé transformace nově připravených kmenů a kmenů PUMA a PUMA-KSHV. Tato destička sloužila jako zásobní pro 96 jamkovou destičku s 60 μl SRItA tekutého média s rafinózou a destičku s 60 μl SRItA tekutého média s 0,24% koncentrací galaktózy. Do obou destiček bylo přeneseno 60 μl buněčné suspenze ze zásobní destičky (výsledná koncentrace galaktózy v druhé destičce po tomto přidavku činila 0,12 %).

Z takto připravených buněčných suspenzí bylo přeneseno 20 μl vzorku do 384 jamkové mikrotitrační destičky a přidáno 20 μl 2x koncentrovaného lyzačního pufru *Passive Lysis Buffer*. Směs byla třepána při pokojové teplotě po dobu 15 minut při 300 rpm. Poté bylo přidáno 20 μl luciferázového substrátu *Bright Glo Luciferase assay* a okamžitě změřena bioluminiscence a OD_{600} na přístroji Synergy Hybrid Multi-Mode Microplate Reader.

Obě 96 jamkové destičky byly zafilmovány, aby se zamezilo vysychání a inkubovány 24 hodin při teplotě 30 °C a 100 rpm. Druhý den byla provedena stejná analýza.

4.3.8 Statistická analýza dat

Naměřená bioluminiscence byla normalizována na OD_{600} . Byly spočteny průměry signálů luminescence normalizovaných na optickou hustotu (RLU) a velikostí účinků v porovnání s prázdným vektorem, příslušné výběrové směrodatné odchylky, standardní chyby výběru a dvouvýběrový studentův T-TEST k prázdnému vektoru i k p53. Ten sloužil k porovnání statistické významnosti získaných hodnot. Každý typ transformantu byl analyzován minimálně v třech opakováních a byly vyřazeny extrémní hodnoty, které přesahovaly 1,5násobek interkvartilového rozpětí. Jako chybové úsečky při grafickém zobrazení normalizovaných hodnot velikostí účinků byly použity výběrové směrodatné odchylky.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Návrh sekvencí G-kvadruplexů

Sekvence nukleotidů, na jejichž základě měla být sledována vazba proteinu IFI16 ke strukturám s rozdílným potenciálem tvorby G-kvadruplexu, byly navrženy a analyzovány programem *DNA Analyser*.

Pro tuto bakalářskou práci byla mutovaná sekvence G-kvadruplexu KSHV programem *G4 Killer*, který byl popsán v podkapitole 4.3.1.2 *G4 Killer* při *G4Hunter skóre* 2 (sekvence s názvem KSHV-mut2.0 v tabulce 4), při *G4Hunter skóre* 1,5 (sekvence s názvem KSHV-mut1.5 v tabulce 4) a při *G4Hunter skóre* 1 (sekvence s názvem KSHV-mut1.0 v tabulce 4). Sekvence KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-3no byly namodelovány ze sekvence KSHV tak, aby neobsahovaly G-tetrády, které by mohly mít potenciál tvořit G-kvadruplex.

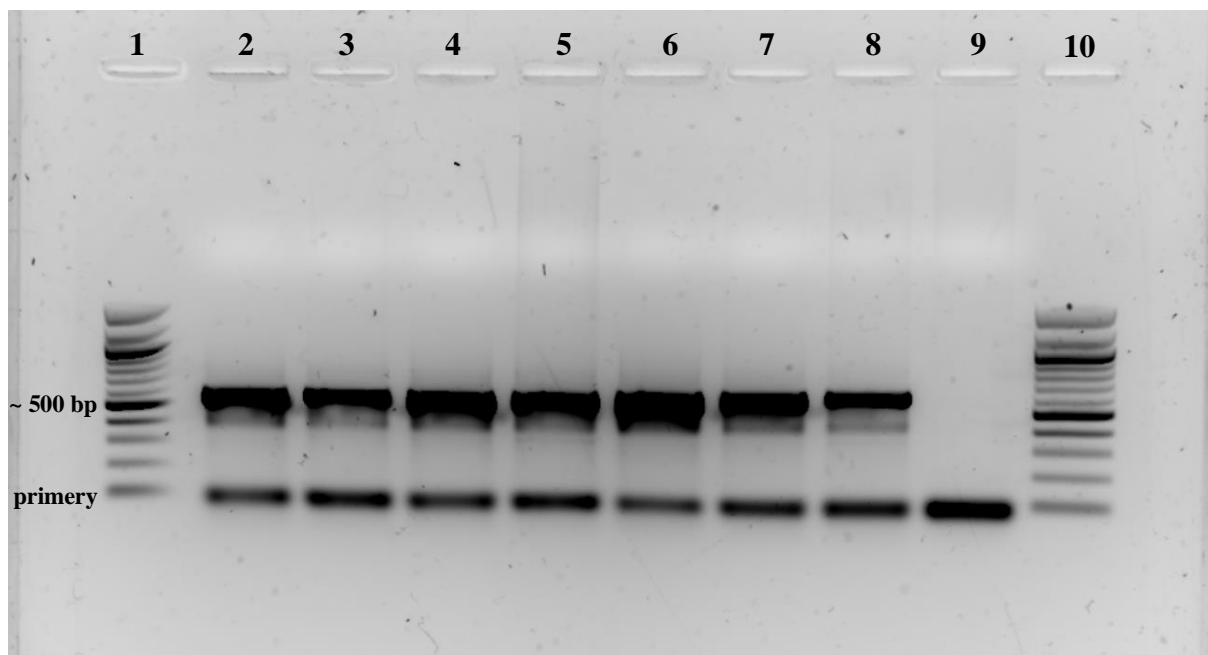
Tabulka 4: G-kvadruplexy. Mutované sekvence KSHV-mut2.0, KSHV-mut1.5 a KSHV-mut1.0 byly vybrány na základě zadané hodnoty *G4Hunteru skóre*. Sekvence KSHV-1no, KSHV-2no a KSHV-3no byly namodelovány tak, aby netvořily intramolekulární G-kvadruplex.

G-kvadruplex	Sekvence 5'–3'	G4Hunter skóre	bp
KSHV	GGGGCGGGGACGGGGGAGGGG	3,182	22
KSHV-1no	GAAGCGGGGACGGGGGAGGGG	2,545	22
KSHV-2no	GAAGCGAAAGACGGGGGAGGGG	1,727	22
KSHV-3no	GAAGCGAAAGACGAAAGAGGGG	0,909	22
KSHV-mut1.0	GGAGCGGTGGACGGAGGAGTAG	0,955	22
KSHV-mut1.5	GGAGCGGTGGACGGTGGAGGAG	1,091	22
KSHV-mut2.0	GGAGCGGTGGACGGAGGAGGGG	1,591	22

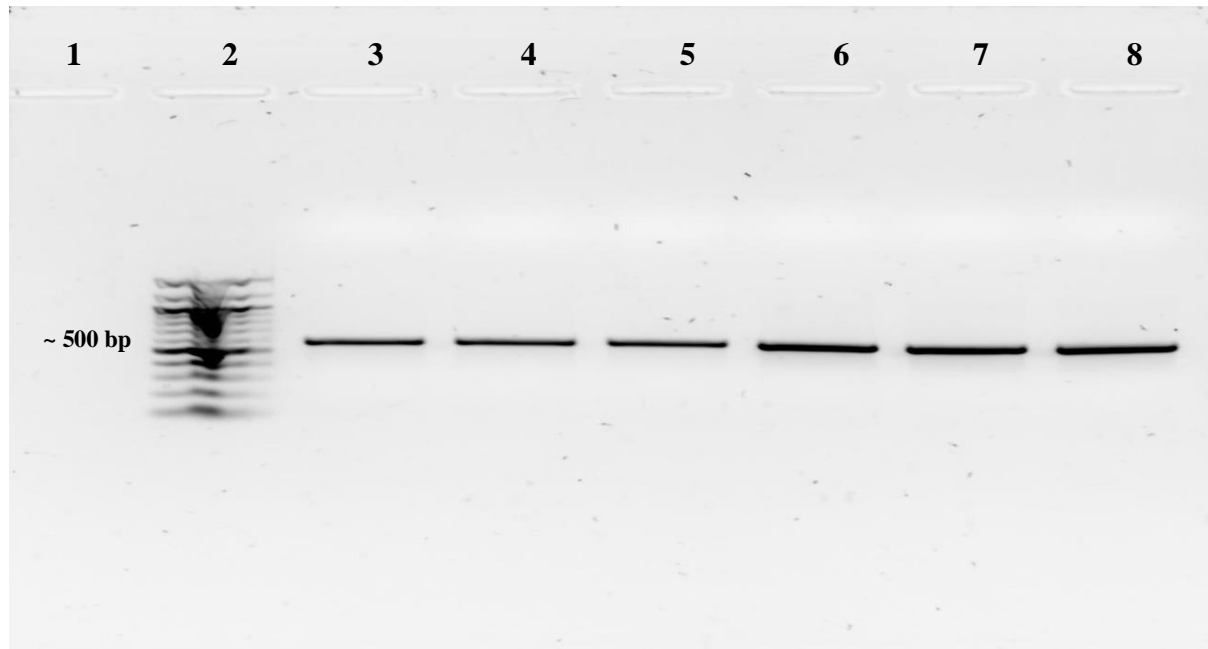
5.2 Příprava nových reportérových kmenů

Metodou *Delitto Perfetto* bylo úspěšně připraveno 6 nových reportérových kmenů kvasinek *S. cerevisiae* PUMA-KSHV-1no, PUMA-KSHV-2no, PUMA-KSHV-3no, PUMA-KSHV-mut1.0, PUMA-KSHV-mut1.5 a PUMA-KSHV-mut2.0. Jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce 2. Obrázková dokumentace jednotlivých kroků přípravy nových kmenů touto metodou je součástí bakalářské práce ve formě přílohy.

Příprava kmenů spočívala v začlenění reportérového konstrukt (responzivního elementu) před promotor isogenního kmene yLFM-ICORE a nahrazení již přítomné ICORE kazety principem homologní rekombinace. Zaváděný konstrukt obsahoval cílovou sekvenci p53 v promotoru genu PUMA a některou z mutovaných sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu uvedenou v tabulce 4. Nově připravené kmeny byly podrobeny několikastupňové pozitivní i negativní selekci kyselinou 5-fluoroorotovou a geneticinem. Začlenění požadované sekvence bylo potvrzeno amplifikováním úseku nukleotidů o délce přibližně 500 bp pomocí PCR a následně horizontální elektroforézou v agarózovém gelu. Pro optimalizaci teploty nasednutí primeru byla nejprve provedena gradientová PCR, která ukázala, že reakce je nejspecifičtější při teplotě 55 °C. Po potvrzení přítomnosti vložené sekvence oligonukleotidů byly vzorky přečištěny komerční sadou (viz obrázky 8 a 9) a odeslány na sekvenování firmě Eurofins Genomics. Správnost sekvencí byla ověřena programem *Blast* porovnáním s dodanými oligonukleotidy.



Obrázek 8: Analýza gelu po PCR na transiluminátoru. Přítomnost vkládané sekvence byla potvrzena amplifikací pomocí PCR a následnou horizontální elektroforézou. Starty 1 a 10 obsahují 100 bp DNA žebříček. Starty 2–7 obsahují vkládané sekvence PUMA-RE kmenů připravených v rámci bakalářské práce (zleva PUMA-KSHV-1no, PUMA-KSHV-2no, PUMA-KSHV-3no, PUMA-KSHV-mut1.0, PUMA-KSHV-mut1.5 a PUMA-KSHV-mut2.0). Start 8 obsahuje sekvenci kmene PUMA-KSHV, která sloužila jako pozitivní kontrola a start 9 obsahuje negativní kontrolu.



Obrázek 9: Analýza gelu na transiluminátoru po přečištění vzorků. Před odesláním vzorků na sekvenování byla přítomnost sekvence u nových kmenů opětovně potvrzena horizontální elektroforézou. Start 1 je prázdný. Start 2 obsahuje 100 bp DNA žebříček. Starty 3–8 obsahují vkládané sekvence PUMA-RE kmenů (zleva PUMA-KSHV-1no, PUMA-KSHV-2no, PUMA-KSHV-3no, PUMA-KSHV-mut1.0, PUMA-KSHV-mut1.5 a PUMA-KSHV-mut2.0).

Při ověřování správnosti neodpovídaly některé z cílových sekvencí přesně vkládaným oligonukleotidům v promotoru genu PUMA. K odchylce v podobě bodových mutací docházelo vždy v konkrétním místě:

vkládaná sekvence PUMA (směr 5'–3'): CTGCAAGTCCTGACTTGTCC

mutovaná sekvence PUMA (směr 5'–3'): **GG**GCAAGTCCTGACTTGTCC

Tyto náhodně se tvořící, ale stále se opakující mutace nebyly dříve při použití metody *Delitto Perfetto* popsány, ale mohou být způsobeny mikrohomologií sekvencí již při samotné transformaci. Příčinou mutací nemohl být některý z použitých postupů (možná mutace při chybné polymeraci řetězce Taq polymerázou v průběhu PCR), protože byly specifické pro konkrétní polohu v sekvenci PUMA a v sekvencích G-kvadruplexů se nikdy nevyskytovaly, ať již bylo *G4Hunter skóre* jakkoliv nízké a tvorba G-kvadruplexu nebyla očekávána. Nelze tedy předpokládat, že by k mutacím docházelo u všech sekvencí, které netvoří sekundární lokální strukturu G-kvadruplexu. Mutace se týkaly pouze některých kolonií, které nebyly vyselektovány, protože bodovými substitucemi nukleotidů nebyly narušeny selekční markery kmenů.

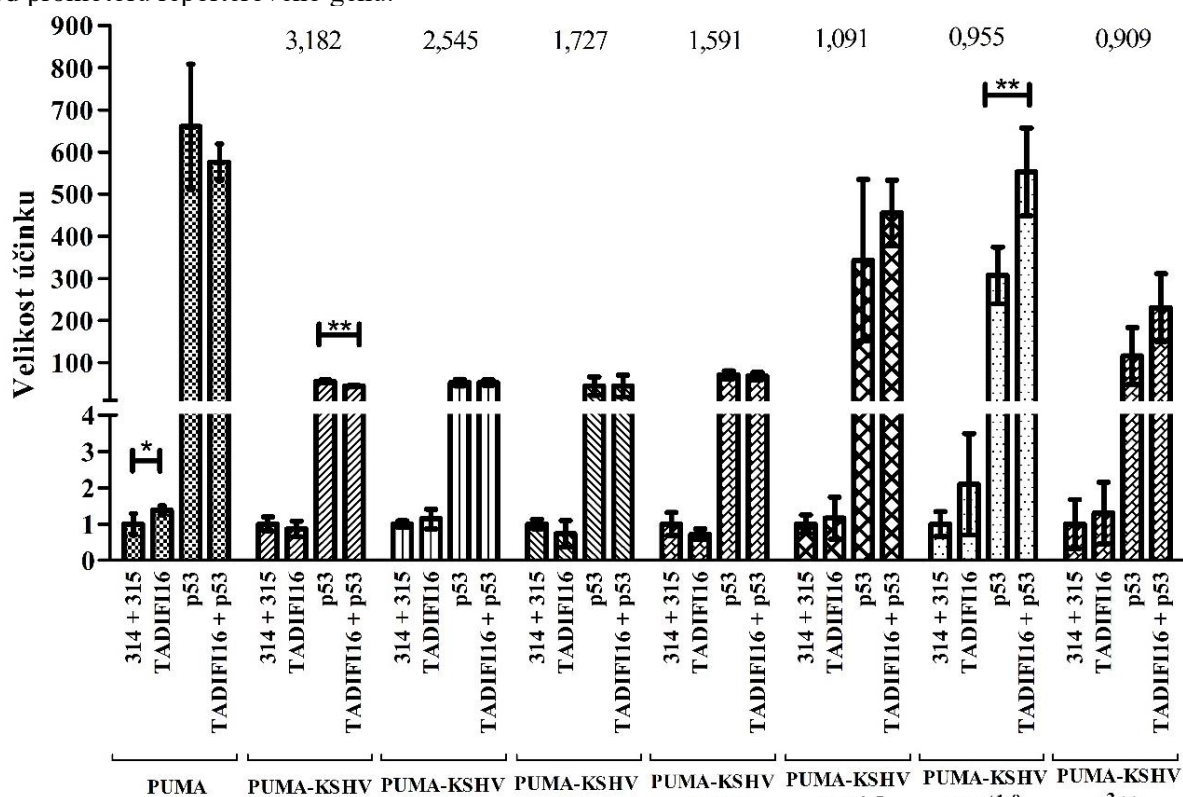
5.3 Luciferázové reportérové testy

Pomocí luciferázových reportérových testů byly *in vivo* studovány vazebné vlastnosti proteinu IFI16 k sekvencím s rozdílným potenciálem tvorby G-kvadruplexu a vliv této vazby na transkripci reportérového genu v jednotlivých kmenech.

Pro testy byly transformovány nově připravené kmeny a kmeny PUMA a PUMA-KSHV, které sloužily k porovnání velikosti účinku nových kmenů. Celkem byly na přípravu transformantů použity 4 plazmidy, a to plazmidy pro prázdné vektory pRS314 a pRS315, plazmid exprimující protein p53 s galaktózovým promotorem a plazmid exprimující protein IFI16 s trans-aktivační doménou p53 (TADIFI16) a alkoholdehydrogenázovým promotorem (ADH) kvůli případné kompetici s galaktózovým promotorem plazmidu exprimující p53 při koexpresi. Kombinace plazmidů (pRS314 + pRS315, pRS314 + p53, pRS315 + TADIFI16 a p53 + TADIFI16) byly vybrány tak, aby bylo možné kvasinky selektovat pomocí leucin-tryptofan selektivních misek s adeninem na základě selekčních markerů (LEU2 a TRP1), které kódují.

Velikosti účinků byly měřeny pro SRItA médium a SRItA médium s 0,12% přídavkem galaktózy v čase T0 a po 24 hodinách inkubace při třepání a 30 °C. Signál luminescence byl normalizován na OD₆₀₀ a byla provedena statistická analýza. Do sloupcových grafů byly vyneseny hodnoty velikostí účinků v porovnání s prázdným vektorem pro transformanty všech kmenů a příslušné chybové úsečky, které představovaly směrodatné výběrové odchylky. Rovněž byly zaznačeny statisticky významné rozdíly při koexpresi plazmidů kódujících p53 a TADIFI16 oproti samotnému p53, které byly určeny pomocí studentova T-TESTu k p53. Výsledky jednotlivých kmenů byly porovnány vzhledem k vypočtenému *G4Hunteru skóre*, které mělo predikovat potenciál tvorby G-kvadruplexu, jak je vidět na grafu 1. U kmene PUMA nebyla tato hodnota uvedena, protože sekvence sama není bohatá na G-báze a nepředpokládáme tedy u ní tvorbu G-kvadruplexu. Nejvyšší hodnotu *G4Hunteru skóre* dosahovala původní sekvence KSHV. Dále pak sekvence KSHV-1no a KSHV-2no, které byly navrženy tak, aby i přes vysokou hladinu *G4Hunteru skóre* neobsahovaly G-tetrády s potenciálem tvorby G-kvadruplexů. Následovaly sekvence KSHV-mut2.0, KSHV-mut1.5 a KSHV-mut1.0, které byly cíleně namodelovány programem *G4 Killer*. Nejnížší prahové hodnoty dosahovala sekvence KSHV-3no.

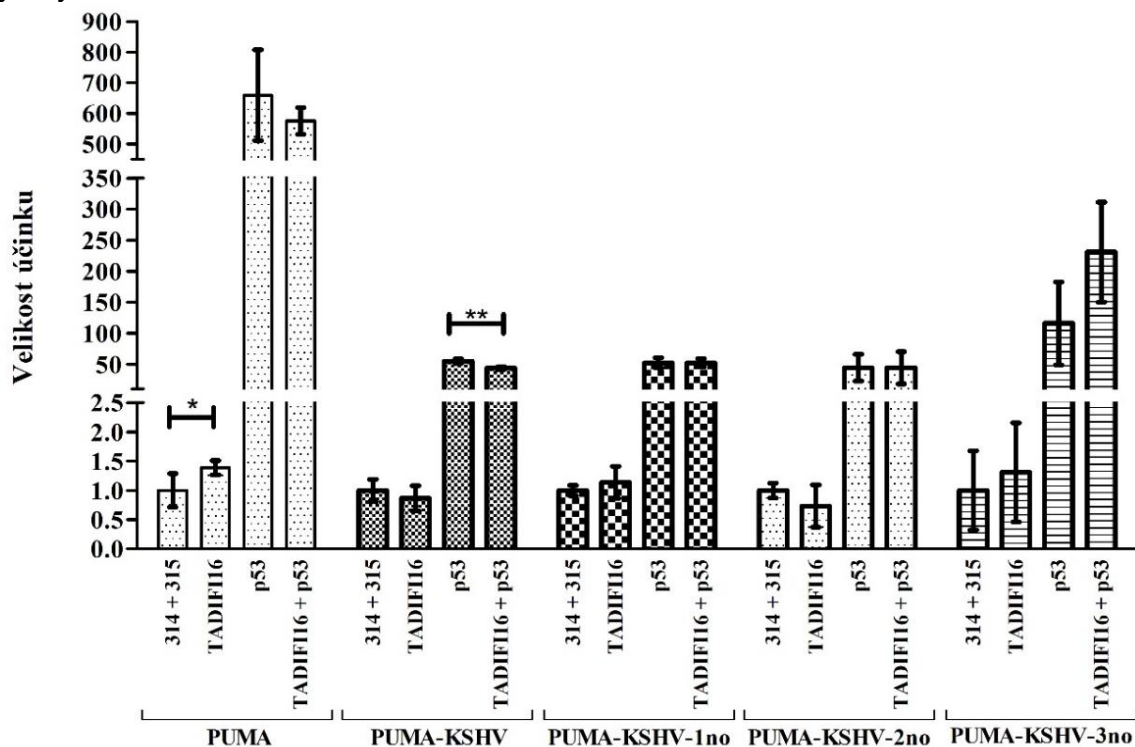
U všech kmenů obsahujících motiv KSHV bez ohledu na to, zda G-kvadruplex tvořily či nikoliv, došlo ke snížení signálů oproti kmeni PUMA. K tomu docházelo patrně vlivem vložení oligonukleotidů za tuto sekvenci, protože došlo ke zvětšení vzdálenost navázaného proteinu p53 od promotoru reportérového genu.



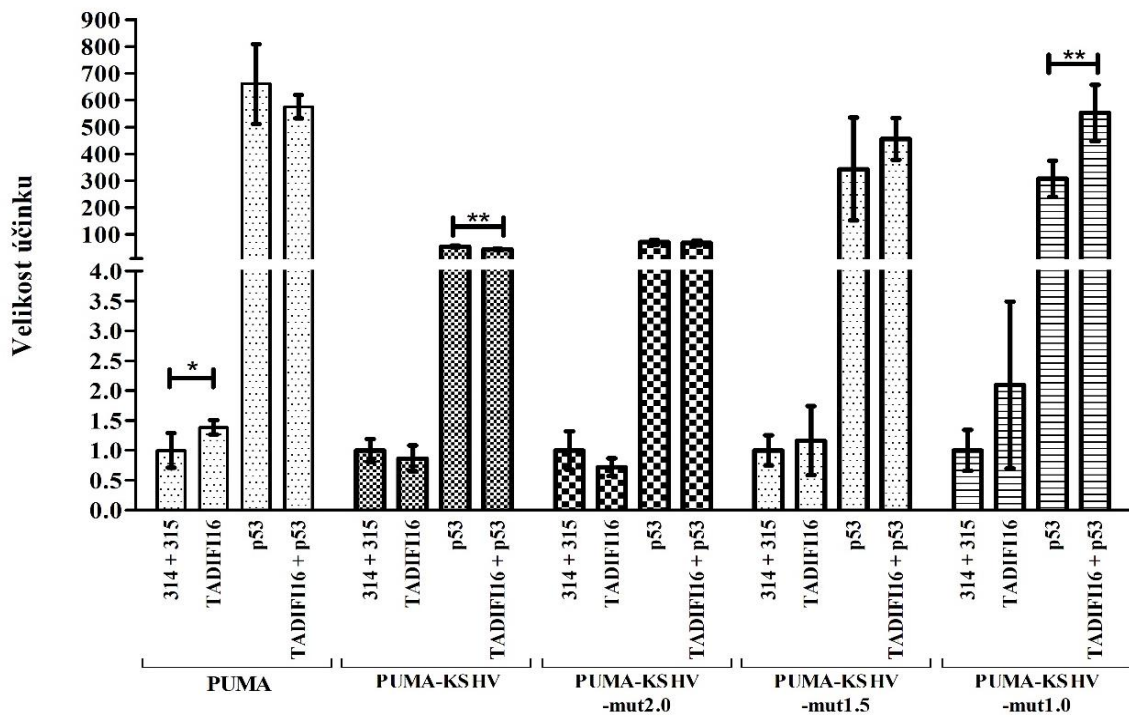
Graf 1: Vyhodnocení transaktivačních potenciálů proteinů IFI16, p53 a jejich koexprese vůči prázdnému vektoru. Výsledky jednotlivých kmenů jsou uvedeny sestupně dle G4Hunteru skóre, které je uvedeno v horní části grafu. Hvězdička označuje statisticky významnou změnu velikosti účinku na hladině 0,05. Dvě hvězdičky značí statistickou významnost na hladině 0,01.

V případě sekvence původního G-kvadruplexu (kmen PUMA-KSHV) došlo k statisticky významnému snížení exprese reportérového genu při koexpresi obou proteinů oproti expresi samotného proteinu p53 na hladině 0,01. U kmene PUMA-KSHV-mut1.0 došlo naopak ke statisticky významnému zvýšení trans-aktivačního potenciálu na hladině 0,01. V případě kmenů PUMA-KSHV-mut1.5 a PUMA-KSHV-3no došlo ke zvýšení exprese reportérového genu při koexpresi proteinů IFI16 a p53 oproti samotnému p53, které ale nedosáhlo statistického významu. U kmene PUMA-KSHV-mut2.0 došlo naopak ke snížení exprese v případě koexprese oproti samotnému p53. Kmeny PUMA-KSHV-2no a PUMA-KSHV-1no při koexpresi proteinů dosahovaly přibližně stejných velikosti účinků jako při expresi samotného proteinu p53. V prvním případě však docházelo k mírnému zvýšení a v tom druhém naopak snížení. Stejný efekt byl pozorován rovněž při porovnání exprese samotného proteinu IFI16 s konjugovanou trans-aktivační doménou oproti prázdnému vektoru, ale statistická významnost byla dosažena pouze u kmene PUMA na hladině 0,05, kdy došlo k zvýšení exprese reportérového genu. Lépe jsou tyto rozdíly vidět na grafech 2 a 3, kde jsou pro srovnání zahrnuty vedle nových kmenů i kmeny PUMA a PUMA-KSHV. Je zajímavé, že v případě kmenů PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-2no byl efekt při porovnání exprese TADIFI16 oproti prázdnému vektoru opačný než v případě srovnání exprese p53 v koexpresi oproti

samotnému proteinu p53. Vzhledem k velkému rozdílu v hodnotách obou *G4Hunter* skóre však jde pravděpodobně pouze o odchylku, ke které došlo v průběhu měření, čemuž odpovídají i rozsahy chybových úseček.

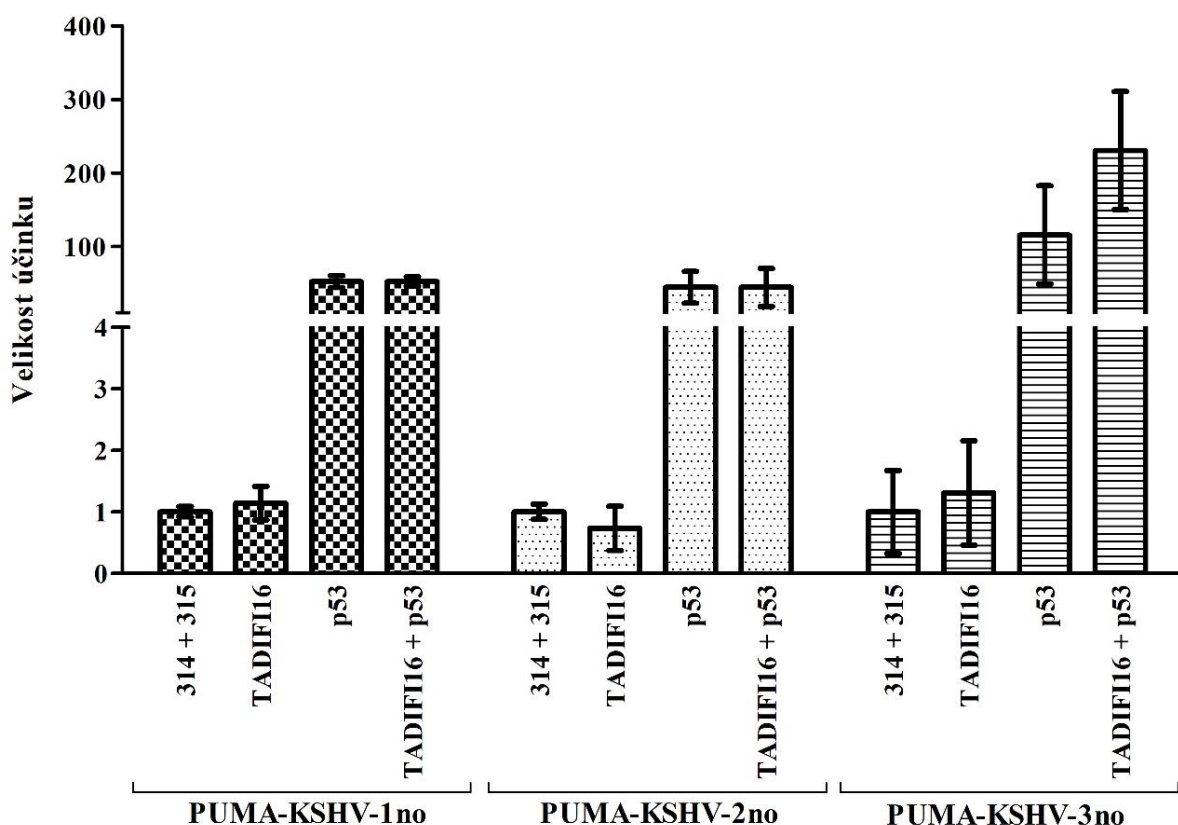


Graf 2: Závislosti velikostí účinků kmenů bez potenciálu tvorby *G*-kvadruplexu a kontrolních kmenů PUMA a PUMA-KSHV. V případě kmenů PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-2no nedošlo při koexpresi k výraznějším změnám oproti samotnému p53.



Graf 3: Závislosti velikostí účinků kmenů s potenciálem tvorby *G*-kvadruplexu a kontrolních kmenů PUMA a PUMA-KSHV. Pouze v případě kmene PUMA-KSHV-mut2.0 došlo k represí exprese reportérového genu způsobenou vazbou proteinu IFI16 (*TADIFI16*) k vzniklé struktuře *G*-kvadruplexu.

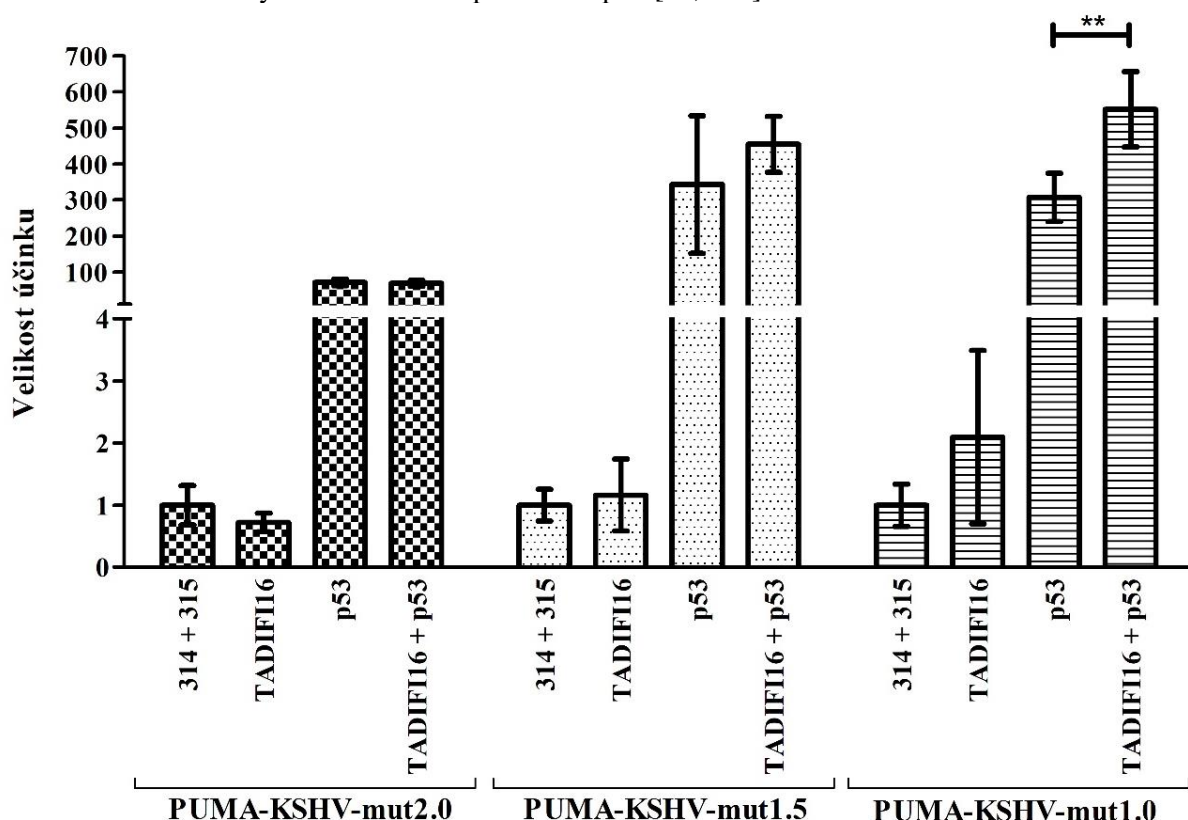
Grafy 4 a 5 porovnávají jednotlivé výsledky nových kmenů mezi sebou, kdy byly kmeny rozděleny dle toho, jak byla mutovaná sekvence G-kvadruplexu navržena. U kmenů s označením PUMA-KSHV-1no, PUMA-KSHV-2no a PUMA-KSHV-3no nebyla předpokládána tvorba G-kvadruplexu i přes vysokou hladinu *G4Hunteru skóre*, která byla ve dvou případech dokonce vyšší než u sekvencí, kde byla jeho tvorba očekávána. Přestože jsou tyto sekvence bohaté na G, nejsou schopny plnohodnotně vytvořit G-kvadruplex jako sekvence KSHV, který se řadí mezi paralelní G-kvadruplexy [155]. Ty jsou tvořeny čtyřmi G-tetrádami strukturovanými tak, jak je zakresleno na obrázku 7 které tyto sekvence však neobsahují.



Graf 4: Závislosti velikostí účinků kmenů PUMA-KSHV-1no, PUMA-KSHV-2no a PUMA-KSHV-3no. Kmeny byly seřazeny dle klesajícího *G4Hunteru skóre*. Oligonukleotidy KSHV-1no a KSHV-2no byly pravděpodobně natolik bohaté na G-báze, že umožnily vazbu proteinu IFI16 (TADIFI16) k DNA samotnou HIN-A doménou.

V případě kmenů s označením „mut“ bylo nejvyšší *G4Hunter skóre* navrženo pro sekvenci KSHV-mut2.0 a nejnižší pro KSHV-mut1.0. Podle předpokladu měl tedy kmen PUMA-KSHV-mut2.0 vysoký potenciál tvorby G-kvadruplexu. U tohoto kmene docházelo ke snížení exprese reportérového genu vlivem vazby proteinu IFI16 na strukturu vzniklého G-kvadruplexu, který se nacházel před promotorem reportérového genu stejně jako u původní nemutované sekvence s potenciálem tvorby G-kvadruplexu – PUMA-KSHV. Navázaný protein tak pravděpodobně může stabilizovat strukturu G-kvadruplexu a působit i jako „překážka“ mezi proteinem p53 a promotorem reportérového genu. Díky tomu protein IFI16 (TADIFI16) snižuje trans-aktivační potenciál proteinu p53 [155]. Naopak u sekvence PUMA-KSHV-mut1.0 došlo k statisticky významnému zvýšení exprese reportérového genu při koexpresi obou proteinů vzhledem k samotnému p53. To odpovídá zjištění, že protein IFI16 v případě absence G-kvadruplexu rozpoznává HIN-A doménou C-konec p53 vlivem svého hydrofobního povrchu a způsobuje zmírnění nespecifických interakcí p53 s DNA

nebo pozměnění vedení jeho C-konce. Tím napomáhá vedení proteinu p53 do cílových míst, což má za následek zvýšení aktivačního potenciálu p53 [39, 131].



Graf 5: Závislosti velikostí účinků kmenů PUMA-KSHV-mut2.0, PUMA-KSHV-mut1.5 a PUMA-KSHV-mut1.0. S klesající prahovou hodnotou G4Hunteru skóre roste trans-aktivační vliv proteinu p53 v koexpressi s proteinem IFI16 (TADIFI16).

Je zajímavé, že v případě kmenů PUMA-KSHV-1no a PUMA-KSHV-2no, které netvořily G-kvadruplex, ale jejichž sekvence měly vysoký potenciál jeho tvorby nedošlo ke stejnému efektu jako v případě kmenů PUMA-KSHV-3no a PUMA-KSHV-mut1.0, tedy ke zvýšení trans-aktivačního účinku proteinu p53 vlivem IFI16 (TADIFI16). Je pravděpodobné, že v případě těchto sekvencí tedy docházelo spíše k vazbě proteinu IFI16 (TADIFI16) samotnou DNA vazebnou HIN-A doménou, která vykazuje preferenci vázat se na ssDNA bohatou na G-báze [51].

Oligonukleotidy nově připravených kmenů by bylo třeba podrobit analýze jejich sekundární struktury jinou než bioinformatickou metodou, která nám sice napomáhá při predikci tvorby G-kvadruplexu, ale již nezohledňuje formování struktur za fyziologických podmínek a další možné mechanismy, které mají na vazbu proteinu IFI16 vliv.

6 ZÁVĚR

Teoretická část této práce byla věnována stručnému shrnutí významu kvasinek v oblastech klasických i moderních biotechnologií, proteinu IFI16 a jeho vazbě k DNA. Protein IFI16 patří do rodiny proteinů HIN-200 a působí jako senzor virové a bakteriální DNA. Rovněž se v organismu podílí na buněčné proliferaci, transkripční regulaci, vrozené imunitní odpovědi, restrikci virové infekce a řadě dalších úloh. Bylo prokázáno, že IFI16 obsahuje jednu PYRIN doménu, která se účastní interakcí protein-protein a dvě DNA vazebné HIN domény (HIN-A a HIN-B), které vykazují různou afinitu k různým strukturám DNA. Celý protein se preferenčně váže k nekanonickým sekundárním lokálním strukturám G-kvadruplexů a je schopen je touto vazbou stabilizovat, což z něj dělá vynikající potenciální prostředek při léčbě řady nádorových a virových onemocnění.

V experimentální části práce bylo nejprve připraveno šest nových reportérových kmenů kvasinek *S. cerevisiae* metodou *Delitto Perfetto*, které se lišily pouze v sekvencích s potenciálem tvorby G-kvadruplexu (*G4Hunter skóre*) určeným pomocí programu *DNA Analyser*. Vkládané sekvence oligonukleotidů obsahovaly kromě mutované sekvence G-kvadruplexu KSHV i cílové místo pro protein p53 (PUMA) a byly cíleně umístěny před promotor reportérového genu. Následně byla v jednohybridním kvasinkovém systému s využitím luciferázových reportérových testů studována vazba proteinu IFI16 s trans-aktivační doménou p53 (TADIFI16) k navrženým sekvencím G-kvadruplexů a její vliv na expresi reportérového genu ve spojitosti s nádorovým supresorem p53.

U nově připravených kmenů došlo k represí transkripce reportérového genu způsobenou vazbou proteinu IFI16 (TADIFI16) na strukturu vzniklého G-kvadruplexu, pouze u kmene PUMA-KSHV-mut2.0 s prahovou hodnotou *G4Hunteru skóre* 1,591. V případě kmenů PUMA-KSHV-1no, PUMA-KSHV-2no a PUMA-KSHV-3no nedocházelo k potlačení transkripce, protože tyto sekvence neobsahovaly potřebné skupiny nukleotidů bohaté na G, které by byly schopny se účinně zformovat do konformace G-kvadruplexu. U sekvence PUMA-KSHV-mut1.5 byl pozorován stejný efekt jako u PUMA-KSHV-mut1.0, tedy zvýšení exprese reportérového genu při koexpresi proteinů p53 a TADIFI16 vzhledem k samotnému p53, ale bez dosažení statistické významnosti. Při porovnání *G4Hunteru skóre* sekvencí mutovaných G-kvadruplexů u nově připravených kmenů lze říct, že je třeba dosáhnout alespoň prahové hodnoty 1,591, aby došlo k úspěšné tvorbě G-kvadruplexu, který by mohl být případně stabilizován proteinem IFI16 za fyziologických podmínek, a že rozhodující je i množství a rozložení G-bází.

Všechny tyto výsledky byly dosaženy prostřednictvím *in vivo* experimentů v kmenech kvasinek *S. cerevisiae*, kde mohlo docházet k ovlivnění exprese i dalšími vlivy a mechanismy, které dosud nebyly diskutovány nebo předpokládány. Některé výsledky jsou rovněž zatíženy vyššími odchylkami, které jsou patrné ze sestrojených chybových úseček.

V budoucnu je tedy nezbytné výsledky ověřit například na základě *in vitro* vazbových experimentů proteinu IFI16 a studovaných oligonukleotidů a blíže prozkoumat vzniklé struktury jinak než bioinformatickou analýzou. K tomu by bylo možné využít např. CD nebo NMR spektroskopii. Nabízí se rovněž použití jiného modelového organismu než *S. cerevisiae* nebo tkáňových kultur a srovnání s vlivem samotného proteinu IFI16 bez konjugované trans-aktivační domény proteinu p53.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VONDRÁČEK, Otakar. *Výroba lihu a ušlechtilých pálenek z ovoce*. Praha: Česká společnost chemická, 1945.
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů*. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [3] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa). ISBN 80-7184-990-1.
- [4] SHARMA, Vasundhara, Paola MONTI, Gilberto FRONZA a Alberto INGA. Human transcription factors in yeast: the fruitful examples of P53 and NF-κB. *FEMS Yeast Research* [online]. 2016, **16**(7) [vid. 2020-04-02]. ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/fow083
- [5] PROCHÁZKA, Stanislav a Karel KOSARĚ. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000.
- [6] RYCHTERA, Mojmir, Jirí UHER a Jan PÁČA. *Lihovarství, droždářství a vinařství. II. část. 2. vydání*. 1991.
- [7] *Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production* / SpringerLink [online]. [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-014-5732-5>
- [8] BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vydání. Přel. Martin FELLNER. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [9] ROSYPAL, Stanislav, Jirí DOŠKAŘ, Karel PETRZIK a Vladislava RŮŽIČKOVÁ. *Úvod do molekulární biologie IV. Molekulární biologie rostlinných virů, Priony, Molekulární evoluce, Vznik života, Metody molekulární biologie, Genové inženýrství*. Třetí inovativní vydání. Brno: Rosypal S., Grafex, nedatováno.
- [10] YANAGIDA, Mitsuhiro. The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biology* [online]. 2002, **3**(3), comment2003.1. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2002-3-3-comment2003
- [11] WATANABE, Yoshinori a Masayuki YAMAMOTO. *S. pombe mei2+* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* [online]. 1994, **78**(3), 487–498. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(94)90426-X
- [12] *A survey of DNA motif finding algorithms* / *BMC Bioinformatics* / Full Text [online]. [vid. 2020-04-05]. Dostupné z: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-S7-S21>
- [13] PORUBIAKOVÁ, Otilia, Natália BOHÁLOVÁ, Alberto INGA, Natália VADOVIČOVÁ, Jan COUFAL, Miroslav FOJTA a Václav BRÁZDA. The Influence of Quadruplex Structure in Proximity to P53 Target Sequences on the Transactivation Potential of P53 Alpha Isoforms. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **21**(1). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21010127
- [14] ARDA, H. Efsun a Albertha J. M. WALHOUT. Gene-centered regulatory networks. *Briefings in Functional Genomics* [online]. 2010, **9**(1), 4–12. ISSN 2041-2657. Dostupné z: doi:10.1093/bfgp/elp049
- [15] FIELDS, S. a O. SONG. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* [online]. 1989, **340**(6230), 245–246. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/340245a0

- [16] RUAL, Jean-François, Kavitha VENKATESAN, Tong HAO, Tomoko HIROZANE-KISHIKAWA, Amélie DRICOT, Ning LI, Gabriel F. BERRIZ, Francis D. GIBBONS, Matija DREZE, Nono AYIVI-GUEDEHOUSOU, Niels KLITGORD, Christophe SIMON, Mike BOXEM, Stuart MILSTEIN, Jennifer ROSENBERG, Debra S. GOLDBERG, Lan V. ZHANG, Sharyl L. WONG, Giovanni FRANKLIN, Siming LI, Joanna S. ALBALA, Janghoo LIM, Carlene FRAUGHTON, Estelle LLAMOSAS, Sebiha CEVIK, Camille BEX, Philippe LAMESCH, Robert S. SIKORSKI, Jean VANDENHAUTE, Huda Y. ZOGHBI, Alex SMOLYAR, Stephanie BOSAK, Reynaldo SEQUERRA, Lynn DOUCETTE-STAMM, Michael E. CUSICK, David E. HILL, Frederick P. ROTH a Marc VIDAL. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* [online]. 2005, **437**(7062), 1173–1178. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature04209
- [17] WALHOUT, A. J., R. SORDELLA, X. LU, J. L. HARTLEY, G. F. TEMPLE, M. A. BRASCH, N. THIERRY-MIEG a M. VIDAL. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2000, **287**(5450), 116–122. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.287.5450.116
- [18] REECE-HOYES, John S. a Albertha J.M. WALHOUT. Gene-centered yeast one-hybrid assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2012, **812**, 189–208. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-455-1_11
- [19] *Quantitative Analysis of NF-κB Transactivation Specificity Using a Yeast-Based Functional Assay* [online]. [vid. 2020-04-05]. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130170>
- [20] INGA, Alberto, Francesca STORICI, Thomas A. DARDEN a Michael A. RESNICK. Differential Transactivation by the p53 Transcription Factor Is Highly Dependent on p53 Level and Promoter Target Sequence. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2002, **22**(24), 8612–8625. ISSN 0270-7306, 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.22.24.8612-8625.2002
- [21] RESNICK, M. A. a B. S. COX. Yeast as an honorary mammal. *Mutation Research* [online]. 2000, **451**(1–2), 1–11. ISSN 0027-5107. Dostupné z: doi:10.1016/s0027-5107(00)00036-1
- [22] STORICI, F., L. K. LEWIS a M. A. RESNICK. In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology* [online]. 2001, **19**(8), 773–776. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/90837
- [23] MEDLIN, Jennifer. Delitto Perfetto: foreign DNA disappears without a trace. *Environmental Health Perspectives*. 2002, **110**(2), A88–A91. ISSN 0091-6765.
- [24] WACH, A., A. BRACHAT, R. PÖHLMANN a P. PHILIPPSEN. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* [online]. 1994, **10**(13), 1793–1808. ISSN 0749-503X. Dostupné z: doi:10.1002/yea.320101310
- [25] GUTTERMAN, J. U. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1994, **91**(4), 1198–1205. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.4.1198
- [26] STARK, G. R., I. M. KERR, B. R. WILLIAMS, R. H. SILVERMAN a R. D. SCHREIBER. How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1998, **67**, 227–264. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.227
- [27] GARIGLIO, Marisa, Barbara AZZIMONTI, Marco PAGANO, Giorgio PALESTRO, Marco DE ANDREA, Guido VALENTE, Gianfranco VOGLINO, Luisa NAVINO a Santo LANDOLFO.

- Immunohistochemical expression analysis of the human interferon-inducible gene IFI16, a member of the HIN200 family, not restricted to hematopoietic cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* [online]. 2002, **22**(7), 815–821. ISSN 1079-9907. Dostupné z: doi:10.1089/107999002320271413
- [28] WEI, Wu, Christopher J. P. CLARKE, Gino R. SOMERS, Kim S. CRESSWELL, Kate A. LOVELAND, Joseph A. TRAPANI a Ricky W. JOHNSTONE. Expression of IFI 16 in epithelial cells and lymphoid tissues. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 2003, **119**(1), 45–54. ISSN 0948-6143. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-002-0485-0
- [29] RAFFAELLA, Ravera, Daniela GIOIA, Marco DE ANDREA, Paola CAPPELLO, Mirella GIOVARELLI, Peggy MARCONI, Roberto MANSERVIGI, Marisa GARIGLIO a Santo LANDOLFO. The interferon-inducible IFI16 gene inhibits tube morphogenesis and proliferation of primary, but not HPV16 E6/E7-immortalized human endothelial cells. *Experimental Cell Research* [online]. 2004, **293**(2), 331–345. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2003.10.014
- [30] LUDLOW, Louise E. A., Ricky W. JOHNSTONE a Christopher J. P. CLARKE. The HIN-200 family: more than interferon-inducible genes? *Experimental Cell Research* [online]. 2005, **308**(1), 1–17. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.032
- [31] FUJIUCHI, Nobuko, Jason A. AGLIPAY, Takao OHTSUKA, Naoki MAEHARA, Fikret SAHIN, Gloria H. SU, Sam W. LEE a Toru OUCHI. Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(19), 20339–20344. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M400344200
- [32] XIN, Hong, Jonathan CURRY, Ricky W. JOHNSTONE, Brian J. NICKOLOFF a Divaker CHOUBEY. Role of IFI 16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(31), 4831–4840. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1206754
- [33] TRAPANI, J. A., K. A. BROWNE, M. J. DAWSON, R. G. RAMSAY, R. L. EDDY, T. B. SHOW, P. C. WHITE a B. DUPONT. A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon-gamma in myeloid cells. *Immunogenetics* [online]. 1992, **36**(6), 369–376. ISSN 0093-7711. Dostupné z: doi:10.1007/BF00218044
- [34] VEERANKI, Sudhakar a Divaker CHOUBEY. Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: regulation of subcellular localization. *Molecular Immunology* [online]. 2012, **49**(4), 567–571. ISSN 1872-9142. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2011.11.004
- [35] CHOUBEY, D. a P. LENGYEL. Interferon action: nucleolar and nucleoplasmic localization of the interferon-inducible 72-kD protein that is encoded by the Ifi 204 gene from the gene 200 cluster. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1992, **116**(6), 1333–1341. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.116.6.1333
- [36] LI, Tuo, Benjamin A. DINER, Jin CHEN a Ileana M. CRISTEA. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(26), 10558–10563. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1203447109
- [37] COSTA, S., C. BORGOGNA, M. MONDINI, M. DE ANDREA, P. L. MERONI, E. BERTI, M. GARIGLIO a S. LANDOLFO. Redistribution of the nuclear protein IFI16 into the cytoplasm of

- ultraviolet B-exposed keratinocytes as a mechanism of autoantigen processing. *The British Journal of Dermatology* [online]. 2011, **164**(2), 282–290. ISSN 1365-2133. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10097.x
- [38] *HIN-200: a novel family of IFN-inducible nuclear proteins expressed in leukocytes - Dawson - 1996 - Journal of Leukocyte Biology - Wiley Online Library* [online]. [vid. 2020-10-05]. Dostupné z: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jlb.60.3.310>
- [39] LIAO, Jack C.C., Robert LAM, Vaclav BRAZDA, Shili DUAN, Mani RAVICHANDRAN, Justin MA, Ting XIAO, Wolfram TEMPEL, Xiaobing ZUO, Yun-Xing WANG, Nickolay Y. CHIRGADZE a Cheryl H. ARROWSMITH. Interferon-Inducible Protein 16: Insight into the Interaction with Tumor Suppressor p53. *Structure (London, England : 1993)* [online]. 2011, **19**(3), 418–429. ISSN 0969-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2010.12.015
- [40] BURRUS, G. R., J. A. BRIGGS a R. C. BRIGGS. Characterization of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: relationship to interferon-inducible proteins. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 1992, **48**(2), 190–202. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.240480210
- [41] HILLER, Sebastian, Andreas KOHL, Francesco FIORITO, Torsten HERRMANN, Gerhard WIDER, Jürg TSCHOPP, Markus G. GRÜTTER a Kurt WÜTHRICH. NMR structure of the apoptosis- and inflammation-related NALP1 pyrin domain. *Structure (London, England: 1993)* [online]. 2003, **11**(10), 1199–1205. ISSN 0969-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2003.08.009
- [42] STEHLIK, Christian a John C. REED. The PYRIN connection: novel players in innate immunity and inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2004, **200**(5), 551–558. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20032234
- [43] KOUL, D., N. U. OBEYESEKERE, J. U. GUTTERMAN, G. B. MILLS a D. CHOUBEY. p202 self-associates through a sequence conserved among the members of the 200-family proteins. *FEBS letters* [online]. 1998, **438**(1–2), 21–24. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/s0014-5793(98)01263-0
- [44] YAN, Hongyue, Kush DALAL, Benjamin K. HON, Philippe YOUKHARIBACHE, Desmond LAU a Frederic PIO. RPA nucleic acid-binding properties of IFI16-HIN200. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2008, **1784**(7–8), 1087–1097. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2008.04.004
- [45] CHOUBEY, D. P202: an interferon-inducible negative regulator of cell growth. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2000, **14**(3), 187–192. ISSN 0393-974X.
- [46] THEOBALD, Douglas L., Rachel M. MITTON-FRY a Deborah S. WUTTKE. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* [online]. 2003, **32**, 115–133. ISSN 1056-8700. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biophys.32.110601.142506
- [47] FigURE 1 | Domain organization of the IFN-inducible protein 16 (IFI16).... *ResearchGate* [online]. [vid. 2020-11-20]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Domain-organization-of-the-IFN-inducible-protein-16-IFI16-From-the-N-to-the_fig1_325401067
- [48] *The HIN Domain of IFI16* [online]. 9. března 2011 [vid. 2020-11-20]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=3760383_nihms473695f1.jpg

- [49] JOHNSTONE, R. W., M. H. KERSHAW a J. A. TRAPANI. Isotypic variants of the interferon-inducible transcriptional repressor IFI 16 arise through differential mRNA splicing. *Biochemistry* [online]. 1998, **37**(34), 11924–11931. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi981069a
- [50] PARK, Hyun Ho, Yu-Chih LO, Su-Chang LIN, Liwei WANG, Jin Kuk YANG a Hao WU. The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation. *Annual Review of Immunology* [online]. 2007, **25**(1), 561–586. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656
- [51] HÁRONÍKOVÁ, Lucia, Jan COUFAL, Iva KEJNOVSKÁ, Eva B. JAGELSKÁ, Miroslav FOJTA, Petra DVOŘÁKOVÁ, Petr MULLER, Borivoj VOJTESEK a Václav BRÁZDA. IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(6), e0157156. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157156
- [52] JOHNSTONE, R. W., J. A. KERRY a J. A. TRAPANI. The human interferon-inducible protein, IFI 16, is a repressor of transcription. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1998, **273**(27), 17172–17177. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.27.17172
- [53] THOMPSON, Mikayla R., Shruti SHARMA, Maninjay ATIANAND, Søren B. JENSEN, Susan CARPENTER, David M. KNIPE, Katherine A. FITZGERALD a Evelyn A. KURT-JONES. Interferon γ -inducible protein (IFI) 16 transcriptionally regulates type I interferons and other interferon-stimulated genes and controls the interferon response to both DNA and RNA viruses. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, **289**(34), 23568–23581. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.554147
- [54] SINGH, Vivek Vikram, Nagaraj KERUR, Virginie BOTTERO, Sujoy DUTTA, Sayan CHAKRABORTY, Mairaj Ahmed ANSARI, Nitika PAUDEL, Leela CHIKOTI a Bala CHANDRAN. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in endothelial and B cells activates gamma interferon-inducible protein 16-mediated inflammasomes. *Journal of Virology* [online]. 2013, **87**(8), 4417–4431. ISSN 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.03282-12
- [55] KERUR, Nagaraj, Mohanan Valiya VEETIL, Neelam SHARMA-WALIA, Virginie BOTTERO, Sathish SADAGOPAN, Pushpalatha OTAGERI a Bala CHANDRAN. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host & Microbe* [online]. 2011, **9**(5), 363–375. ISSN 1934-6069. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2011.04.008
- [56] BROZ, Petr a Vishva M. DIXIT. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews. Immunology* [online]. 2016, **16**(7), 407–420. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri.2016.58
- [57] AMARANTE-MENDES, Gustavo P., Sandy ADJEMIAN, Laura Migliari BRANCO, Larissa C. ZANETTI, Ricardo WEINLICH a Karina R. BORTOLUCI. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9** [vid. 2020-11-20]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.02379
- [58] UNTERHOLZNER, Leonie, Sinead E. KEATING, Marcin BARAN, Kristy A. HORAN, Søren B. JENSEN, Shruti SHARMA, Cherilyn M. SIROIS, Tengchuan JIN, Eicke LATZ, T. Sam XIAO, Katherine A. FITZGERALD, Søren R. PALUDAN a Andrew G. BOWIE. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology* [online]. 2010, **11**(11), 997–1004. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1932

- [59] HANNA-ROSE, W. a U. HANSEN. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends in genetics: TIG* [online]. 1996, **12**(6), 229–234. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/0168-9525(96)10022-6
- [60] DAWSON, M. J. a J. A. TRAPANI. The interferon-inducible autoantigen, IFI 16: localization to the nucleolus and identification of a DNA-binding domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1995, **214**(1), 152–162. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1995.2269
- [61] DATTA, B., B. LI, D. CHOUBEY, G. NALLUR a P. LENGYEL. p202, an interferon-inducible modulator of transcription, inhibits transcriptional activation by the p53 tumor suppressor protein, and a segment from the p53-binding protein 1 that binds to p202 overcomes this inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(44), 27544–27555. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.44.27544
- [62] CHOUBEY, D. a P. LENGYEL. Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(11), 6134–6140. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.11.6134
- [63] CHOUBEY, D., S. J. LI, B. DATTA, J. U. GUTTERMAN a P. LENGYEL. Inhibition of E2F-mediated transcription by p202. *The EMBO journal*. 1996, **15**(20), 5668–5678. ISSN 0261-4189.
- [64] MIN, W., S. GHOSH a P. LENGYEL. The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1996, **16**(1), 359–368. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/mcb.16.1.359
- [65] LENGYEL, Peter, Divaker CHOUBEY, Shyr-Jiann LI a Bansidhar DATTA. The interferon-activatable gene 200 cluster: from structure toward function. *Seminars in Virology* [online]. 1995, **6**(3), 203–213. ISSN 1044-5773. Dostupné z: doi:10.1006/smvy.1995.0025
- [66] ORZALLI, Megan H. a David M. KNIFE. Cellular sensing of viral DNA and viral evasion mechanisms. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2014, **68**, 477–492. ISSN 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-091313-103409
- [67] PALUDAN, Søren R. a Andrew G. BOWIE. Immune sensing of DNA. *Immunity* [online]. 2013, **38**(5), 870–880. ISSN 1097-4180. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2013.05.004
- [68] JOHNSON, Karen E., Leela CHIKOTI a Bala CHANDRAN. Herpes Simplex Virus 1 Infection Induces Activation and Subsequent Inhibition of the IFI16 and NLRP3 Inflammasomes. *Journal of Virology* [online]. 2013, **87**(9), 5005–5018. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00082-13
- [69] MORRONE, Seamus R., Tao WANG, Leeza M. CONSTANTOULAKIS, Richard M. HOOY, Michael J. DELANNOY a Jungsan SOHN. Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2014, **111**(1), E62-71. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1313577111
- [70] STRATMANN, Sarah A, Seamus R MORRONE, Antoine M VAN OIJEN a Jungsan SOHN. The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex. *eLife* [online]. nedatováno, **4** [vid. 2021-04-10]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.11721
- [71] GARIANO, Grazia Rosaria, Valentina DELL'OSTE, Matteo BRONZINI, Deborah GATTI, Anna LUGANINI, Marco De ANDREA, Giorgio GRIBAUDO, Marisa GARIGLIO a Santo

- LANDOLFO. The Intracellular DNA Sensor IFI16 Gene Acts as Restriction Factor for Human Cytomegalovirus Replication. *PLoS Pathogens* [online]. 2012, **8**(1), e1002498. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1002498
- [72] JIN, Tengchuan, Andrew PERRY, Jiansheng JIANG, Patrick SMITH, James A. CURRY, Leonie UNTERHOLZNER, Zhaozhao JIANG, Gabor HORVATH, Vijay A. RATHINAM, Ricky W. JOHNSTONE, Veit HORNUNG, Eicke LATZ, Andrew G. BOWIE, Katherine A. FITZGERALD a T. Sam XIAO. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* [online]. 2012, **36**(4), 561–571. ISSN 1097-4180. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2012.02.014
- [73] BIENIASZ, Paul D. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nature Immunology* [online]. 2004, **5**(11), 1109–1115. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni1125
- [74] DINER, Benjamin A., Krystal K. LUM, Jared E. TOETTCHER a Ileana M. CRISTEA. Viral DNA Sensors IFI16 and Cyclic GMP-AMP Synthase Possess Distinct Functions in Regulating Viral Gene Expression, Immune Defenses, and Apoptotic Responses during Herpesvirus Infection. *mBio* [online]. 2016, **7**(6) [vid. 2021-01-31]. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01553-16
- [75] BURDETTE, Dara L., Kathryn M. MONROE, Katia SOTELO-TROHA, Jeff S. IWIG, Barbara ECKERT, Mamoru HYODO, Yoshihiro HAYAKAWA a Russell E. VANCE. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* [online]. 2011, **478**(7370), 515–518. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature10429
- [76] ISHIKAWA, Hiroki a Glen N. BARBER. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* [online]. 2008, **455**(7213), 674–678. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature07317
- [77] SAUER, John-Demian, Katia SOTELO-TROHA, Jakob VON MOLTKE, Kathryn M. MONROE, Chris S. RAE, Sky W. BRUBAKER, Mamoru HYODO, Yoshihiro HAYAKAWA, Joshua J. WOODWARD, Daniel A. PORTNOY a Russell E. VANCE. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infection and Immunity* [online]. 2011, **79**(2), 688–694. ISSN 1098-5522. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00999-10
- [78] ORZALLI, Megan H., Neal A. DELUCA a David M. KNIPE. Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICPO protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2012, **109**(44), E3008–E3017. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1211302109
- [79] LI, Tuo, Jin CHEN a Ileana M. CRISTEA. Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion. *Cell Host & Microbe* [online]. 2013, **14**(5), 591–599. ISSN 1934-6069. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2013.10.007
- [80] ORZALLI, Megan H., Sara E. CONWELL, Christian BERRIOS, James A. DECAPRIO a David M. KNIPE. Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, **110**(47), E4492-4501. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1316194110
- [81] TANAKA, Yasuo a Zhijian J. CHEN. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Science Signaling* [online]. 2012, **5**(214), ra20. ISSN 1937-9145. Dostupné z: doi:10.1126/scisignal.2002521

- [82] STETSON, Daniel B. a Ruslan MEDZHITOV. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* [online]. 2006, **24**(1), 93–103. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2005.12.003
- [83] ZHONG, Bo, Yan YANG, Shu LI, Yan-Yi WANG, Ying LI, Feici DIAO, Caoqi LEI, Xiao HE, Lu ZHANG, Po TIEN a Hong-Bing SHU. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* [online]. 2008, **29**(4), 538–550. ISSN 1097-4180. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2008.09.003
- [84] DELL’OSTE, Valentina, Deborah GATTI, Alessandro G. GIORGIO, Marisa GARIGLIO, Santo LANDOLFO a Marco DE ANDREA. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *The New Microbiologica*. 2015, **38**(1), 5–20. ISSN 1121-7138.
- [85] COLLINS-MCMILLEN, Donna, Mike RAK, Jason C. BUEHLER, Suzu IGARASHI-HAYES, Jeremy P. KAMIL, Nathaniel J. MOORMAN a Felicia GOODRUM. Alternative promoters drive human cytomegalovirus reactivation from latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2019, **116**(35), 17492–17497. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1900783116
- [86] JOHNSON, Karen E., Virginie BOTTERO, Stephanie FLAHERTY, Sujoy DUTTA, Vivek Vikram SINGH a Bala CHANDRAN. IFI16 restricts HSV-1 replication by accumulating on the hsv-1 genome, repressing HSV-1 gene expression, and directly or indirectly modulating histone modifications. *PLoS pathogens* [online]. 2014, **10**(11), e1004503. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1004503
- [87] CUCHET-LOURENÇO, Delphine, Gail ANDERSON, Elizabeth SLOAN, Anne ORR a Roger D. EVERETT. The viral ubiquitin ligase ICP0 is neither sufficient nor necessary for degradation of the cellular DNA sensor IFI16 during herpes simplex virus 1 infection. *Journal of Virology* [online]. 2013, **87**(24), 13422–13432. ISSN 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.02474-13
- [88] ZHONG, S., P. SALOMONI a P. P. PANDOLFI. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nature Cell Biology* [online]. 2000, **2**(5), E85-90. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/35010583
- [89] COHEN, N., M. SHARMA, A. KENTSISS, J. M. PEREZ, S. STRUDWICK a K. L. BORDEN. PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *The EMBO journal* [online]. 2001, **20**(16), 4547–4559. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/20.16.4547
- [90] WANG, Z. G., L. DELVA, M. GABOLI, R. RIVI, M. GIORGIO, C. CORDON-CARDO, F. GROSVELD a P. P. PANDOLFI. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1998, **279**(5356), 1547–1551. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.279.5356.1547
- [91] BERNARDI, Rosa a Pier Paolo PANDOLFI. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(56), 9048–9057. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1207106
- [92] CARBONE, Roberta, Mark PEARSON, Saverio MINUCCI a Pier Giuseppe PELICCI. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* [online]. 2002, **21**(11), 1633–1640. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1205227

- [93] SALOMONI, Paolo a Pier Paolo PANDOLFI. The role of PML in tumor suppression. *Cell* [online]. 2002, **108**(2), 165–170. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(02)00626-8
- [94] ZHOU, W. a S. BAO. PML-mediated signaling and its role in cancer stem cells. *Oncogene* [online]. 2014, **33**(12), 1475–1484. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2013.111
- [95] EVERETT, Roger D., Sabine RECHTER, Peer PAPIOR, Nina TAVALAI, Thomas STAMMINGER a Anne ORR. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *Journal of Virology* [online]. 2006, **80**(16), 7995–8005. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00734-06
- [96] GU, Haidong a Yi ZHENG. Role of ND10 nuclear bodies in the chromatin repression of HSV-1. *Virology Journal* [online]. 2016, **13** [vid. 2021-01-31]. ISSN 1743-422X. Dostupné z: doi:10.1186/s12985-016-0516-4
- [97] GEOFFROY, Marie-Claude a Mounira K. CHELBI-ALIX. Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* [online]. 2011, **31**(1), 145–158. ISSN 1557-7465. Dostupné z: doi:10.1089/jir.2010.0111
- [98] *SP1 Sp1 transcription factor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI* [online]. [vid. 2021-03-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6667>
- [99] CRISTEA, Ileana M., Nathaniel J. MOORMAN, Scott S. TERHUNE, Christian D. CUEVAS, Erin S. O'KEEFE, Michael P. ROUT, Brian T. CHAIT a Thomas SHENK. Human Cytomegalovirus pUL83 Stimulates Activity of the Viral Immediate-Early Promoter through Its Interaction with the Cellular IFI16 Protein. *Journal of Virology* [online]. 2010, **84**(15), 7803–7814. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00139-10
- [100] YUROCHKO, A. D., M. W. MAYO, E. E. POMA, A. S. BALDWIN a E. S. HUANG. Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *Journal of Virology*. 1997, **71**(6), 4638–4648. ISSN 0022-538X, 1098-5514.
- [101] YUROCHKO, A. D., T. F. KOWALIK, S. M. HUONG a E. S. HUANG. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *Journal of Virology*. 1995, **69**(9), 5391–5400. ISSN 0022-538X, 1098-5514.
- [102] YUROCHKO, Andrew D. a Eng-Shang HUANG. Human Cytomegalovirus Binding to Human Monocytes Induces Immunoregulatory Gene Expression. *The Journal of Immunology*. 1999, **162**(8), 4806–4816. ISSN 0022-1767, 1550-6606.
- [103] SAMBUCETTI, L.c., J.m. CHERRINGTON, G.w. WILKINSON a E.s. MOCARSKI. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *The EMBO Journal* [online]. 1989, **8**(13), 4251–4258. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08610.x
- [104] KOWALIK, T. F., B. WING, J. S. HASKILL, J. C. AZIZKHAN, A. S. BALDWIN a E. S. HUANG. Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-kappa B activity during human cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1993, **90**(3), 1107–1111. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.90.3.1107
- [105] DEMERITT, Ian B., Liesl E. MILFORD a Andrew D. YUROCHKO. Activation of the NF-κB Pathway in Human Cytomegalovirus-Infected Cells Is Necessary for Efficient Transactivation of

- the Major Immediate-Early Promoter. *Journal of Virology* [online]. 2004, **78**(9), 4498–4507. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.78.9.4498-4507.2004
- [106] LEE, Jaehwi, Man Hee RHEE, Eunji KIM a Jae Youl CHO. BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets. *Mediators of Inflammation* [online]. 2012, **2012**, 416036. ISSN 1466-1861. Dostupné z: doi:10.1155/2012/416036
- [107] PIERCE, J. W., R. SCHOENLEBER, G. JESMOK, J. BEST, S. A. MOORE, T. COLLINS a M. E. GERRITSEN. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1997, **272**(34), 21096–21103. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.34.21096
- [108] OECKINGHAUS, Andrea a Sankar GHOSH. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2009, **1**(4), a000034. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000034
- [109] ANSARI, Mairaj Ahmed, Vivek Vikram SINGH, Sujoy DUTTA, Mohanan Valiya VEETIL, Dipanjan DUTTA, Leela CHIKOTI, Jie LU, David EVERLY a Bala CHANDRAN. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *Journal of Virology* [online]. 2013, **87**(15), 8606–8623. ISSN 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00805-13
- [110] DOITSH, Gilad, Nicole L. K. GALLOWAY, Xin GENG, Zhiyuan YANG, Kathryn M. MONROE, Orlando ZEPEDA, Peter W. HUNT, Hiroyu HATANO, Stefanie SOWINSKI, Isa MUÑOZ-ARIAS a Warner C. GREENE. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* [online]. 2014, **505**(7484), 509–514. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature12940
- [111] JAKOBSEN, Martin R., Rasmus O. BAK, Annika ANDERSEN, Randi K. BERG, Søren B. JENSEN, Jin TENGCHUAN, Tengchuan JIN, Anders LAUSTSEN, Kathrine HANSEN, Lars OSTERGAARD, Katherine A. FITZGERALD, T. Sam XIAO, Jacob G. MIKKELSEN, Trine H. MOGENSEN a Søren R. PALUDAN. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, **110**(48), E4571-4580. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1311669110
- [112] MONROE, Kathryn M., Zhiyuan YANG, Jeffrey R. JOHNSON, Xin GENG, Gilad DOITSH, Nevan J. KROGAN a Warner C. GREENE. IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T Cells Abortively Infected with HIV. *Science* [online]. 2014, **343**(6169), 428–432. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1243640
- [113] ABLASSER, Andrea, Marion GOLDECK, Taner CAVLAR, Tobias DEIMLING, Gregor WITTE, Ingo RÖHL, Karl-Peter HOPFNER, Janos LUDWIG a Veit HORNUNG. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* [online]. 2013, **498**(7454), 380–384. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature12306
- [114] DINER, Elie J., Dara L. BURDETTE, Stephen C. WILSON, Kathryn M. MONROE, Colleen A. KELLENBERGER, Mamoru HYODO, Yoshihiro HAYAKAWA, Ming C. HAMMOND a Russell E. VANCE. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Reports* [online]. 2013, **3**(5), 1355–1361. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2013.05.009

- [115] SUN, Lijun, Jiayi WU, Fenghe DU, Xiang CHEN a Zhijian J. CHEN. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2013, **339**(6121) [vid. 2021-04-11]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1232458
- [116] WU, Jiayi, Lijun SUN, Xiang CHEN, Fenghe DU, Heping SHI, Chuo CHEN a Zhijian J. CHEN. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2013, **339**(6121), 826–830. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1229963
- [117] ALMINE, Jessica F., Craig A. J. O’HARE, Gillian DUNPHY, Ismar R. HAGA, Rangeetha J. NAIK, Abdelmadjid ATRIH, Dymna J. CONNOLLY, Jordan TAYLOR, Ian R. KELSALL, Andrew G. BOWIE, Philippa M. BEARD a Leonie UNTERHOLZNER. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**(1), 14392. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms14392
- [118] LIU, Siqi, Xin CAI, Jiayi WU, Qian CONG, Xiang CHEN, Tuo LI, Fenghe DU, Junyao REN, You-Tong WU, Nick V. GRISHIN a Zhijian J. CHEN. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* [online]. 2015, **347**(6227) [vid. 2021-04-12]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaa2630
- [119] KONNO, Hiroyasu, Keiko KONNO a Glen N. BARBER. Cyclic Dinucleotides Trigger ULK1 (ATG1) Phosphorylation of STING to Prevent Sustained Innate Immune Signaling. *Cell* [online]. 2013, **155**(3), 688–698. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.09.049
- [120] ZHONG, Bo, Lu ZHANG, Caoqi LEI, Ying LI, Ai-Ping MAO, Yan YANG, Yan-Yi WANG, Xiao-Lian ZHANG a Hong-Bing SHU. The Ubiquitin Ligase RNF5 Regulates Antiviral Responses by Mediating Degradation of the Adaptor Protein MITA. *Immunity* [online]. 2009, **30**(3), 397–407. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2009.01.008
- [121] WANG, Yanming, Qiaoshi LIAN, Bo YANG, Shanshan YAN, Haiyan ZHOU, Lan HE, Guomei LIN, Zhexiong LIAN, Zhengfan JIANG a Bing SUN. TRIM30 α Is a Negative-Feedback Regulator of the Intracellular DNA and DNA Virus-Triggered Response by Targeting STING. *PLOS Pathogens* [online]. 2015, **11**(6), e1005012. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1005012
- [122] WANG, Qiang, Xing LIU, Ye CUI, Yijun TANG, Wei CHEN, Senlin LI, Huansha YU, Youdong PAN a Chen WANG. The E3 Ubiquitin Ligase AMFR and INSIG1 Bridge the Activation of TBK1 Kinase by Modifying the Adaptor STING. *Immunity* [online]. 2014, **41**(6), 919–933. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2014.11.011
- [123] ZHANG, Jing, Ming-Ming HU, Yan-Yi WANG a Hong-Bing SHU. TRIM32 Protein Modulates Type I Interferon Induction and Cellular Antiviral Response by Targeting MITA/STING Protein for K63-linked Ubiquitination *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2012, **287**(34), 28646–28655. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.362608
- [124] TSUCHIDA, Tetsuo, Jian ZOU, Tatsuya SAITOH, Himanshu KUMAR, Takayuki ABE, Yoshiharu MATSUURA, Taro KAWAI a Shizuo AKIRA. The Ubiquitin Ligase TRIM56 Regulates Innate Immune Responses to Intracellular Double-Stranded DNA. *Immunity* [online]. 2010, **33**(5), 765–776. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2010.10.013

- [125] LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* [online]. 1992, **358**(6381), 15–16. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/358015a0
- [126] OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2003, **10**(4), 431–442. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4401183
- [127] LEVINE, Arnold J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* [online]. 1997, **88**(3), 323–331. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81871-1
- [128] SUZUKI, Kazuho, Nurmaa DASHZEVEG, Zheng-Guang LU, Naoe TAIRA, Yoshio MIKI a Kiyotsugu YOSHIDA. Programmed cell death 6, a novel p53-responsive gene, targets to the nucleus in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer Science* [online]. 2012, **103**(10), 1788–1794. ISSN 1349-7006. Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02362.x
- [129] WANG, Xuyi, Evan R. SIMPSON a Kristy A. BROWN. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Research* [online]. 2015, **75**(23), 5001–5007. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0563
- [130] JOHNSTONE, R. W., W. WEI, A. GREENWAY a J. A. TRAPANI. Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16. *Oncogene* [online]. 2000, **19**(52), 6033–6042. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1204005
- [131] AGLIPAY, Jason A., Sam W. LEE, Shinya OKADA, Nobuko FUJIUCHI, Takao OHTSUKA, Jennifer C. KWAK, Yi WANG, Ricky W. JOHNSTONE, Chuxia DENG, Jun QIN a Toru OUCHI. A member of the Pyrin family, IFI16, is a novel BRCA1-associated protein involved in the p53-mediated apoptosis pathway. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(55), 8931–8938. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1207057
- [132] MANSILLA, Sabrina Florencia, María Belén DE LA VEGA, Nicolás Luis CALZETTA, Sebastián Omar SIRI a Vanesa GOTTIFREDI. CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication. *Genes* [online]. 2020, **11**(6) [vid. 2021-01-25]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11060593
- [133] ALBRECHT, Mario, Divaker CHOUBEY a Thomas LENGAUER. The HIN domain of IFI-200 proteins consists of two OB folds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2005, **327**(3), 679–687. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.056
- [134] BRÁZDA, Václav, Jan COUFAL, Jack C. C. LIAO a Cheryl H. ARROWSMITH. Preferential binding of IFI16 protein to cruciform structure and superhelical DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2012, **422**(4), 716–720. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.065
- [135] ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* [online]. 2012, **489**(7414), 57–74. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11247
- [136] YANG, Danzhou a Keika OKAMOTO. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **2**(4), 619–646. ISSN 1756-8927. Dostupné z: doi:10.4155/fmc.09.172
- [137] BLACKBURN, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature* [online]. 2000, **408**(6808), 53–56. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35040500
- [138] YANG, Danzhou. G-Quadruplex DNA and RNA. *G-Quadruplex Nucleic Acids* [online]. 2019, **2035**, 1–24. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9666-7_1

- [139] BRÁZDA, Václav, Yu LUO, Martin BARTAS, Patrik KAURA, Otilia PORUBIAKOVÁ, Jiří ŠŤASTNÝ, Petr PEČINKA, Daniela VERGA, Violette DA CUNHA, Tomio S. TAKAHASHI, Patrick FORTERRE, Hannu MYLLYKALLIO, Miroslav FOJTA a Jean-Louis MERGNY. G-Quadruplexes in the Archaea Domain. *Biomolecules* [online]. 2020, **10**(9). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10091349
- [140] RUGGIERO, Emanuela a Sara N RICHTER. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Research* [online]. 2018, **46**(7), 3270–3283. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky187
- [141] ASAMITSU, Sefan, Shunsuke OBATA, Zutao YU, Toshikazu BANDO a Hiroshi SUGIYAMA. Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy. *Molecules* [online]. 2019, **24**(3), 429. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24030429
- [142] CALZOLARI, A., R. DI FELICE, E. MOLINARI a A. GARBESI. G-quartet biomolecular nanowires. *Applied Physics Letters* [online]. 2002, **80**(18), 3331–3333. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.1476700
- [143] YATSUNYK, Liliya A., Oscar MENDOZA a Jean-Louis MERGNY. „Nano-oddities”: unusual nucleic acid assemblies for DNA-based nanostructures and nanodevices. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2014, **47**(6), 1836–1844. ISSN 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/ar500063x
- [144] PLATELLA, Chiara, Claudia RICCARDI, Daniela MONTESARCHIO, Giovanni N. ROVIELLO a Domenica MUSUMECI. G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* [online]. 2017, **1861**(5 Pt B), 1429–1447. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.027
- [145] MA, Dik-Lung, Chun WU, Zhen-Zhen DONG, Wing-Sze TAM, Sze-Wan WONG, Chao YANG, Guodong LI a Chung-Hang LEUNG. The Development of G-Quadruplex-Based Assays for the Detection of Small Molecules and Toxic Substances. *Chemistry, an Asian Journal* [online]. 2017, **12**(15), 1851–1860. ISSN 1861-471X. Dostupné z: doi:10.1002/asia.201700533
- [146] RIOZ-MARTÍNEZ, Ana a Gerard ROELFES. DNA-based hybrid catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2015, **25**, 80–87. ISSN 1879-0402. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2014.12.033
- [147] HUD, N. V., F. W. SMITH, F. A. ANET a J. FEIGON. The selectivity for K⁺ versus Na⁺ in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: a thermodynamic analysis by 1H NMR. *Biochemistry* [online]. 1996, **35**(48), 15383–15390. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi9620565
- [148] WILLIAMSON, J. R., M. K. RAGHURAMAN a T. R. CECH. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* [online]. 1989, **59**(5), 871–880. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(89)90610-7
- [149] SEN, Dipankar a Walter GILBERT. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* [online]. 1990, **344**(6265), 410–414. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/344410a0
- [150] CHEN, Yuwei a Danzhou YANG. Sequence, Stability, and Structure of G-Quadruplexes and Their Interactions with Drugs. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* [online]. 2012, **50**(1), 17.5.1-17.5.17. ISSN 1934-9289. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1705s50

- [151] C. BHASIKUTTAN, Achikanath a Jyotirmayee MOHANTY. Targeting G-quadruplex structures with extrinsic fluorogenic dyes: promising fluorescence sensors. *Chemical Communications* [online]. 2015, **51**(36), 7581–7597. Dostupné z: doi:10.1039/C4CC10030A
- [152] BRÁZDA, Václav, Jan KOLOMAZNÍK, Jiří LÝSEK, Lucia HÁRONÍKOVÁ, Jan COUFAL a Jiří ŠT'ASTNÝ. Palindrome analyser – A new web-based server for predicting and evaluating inverted repeats in nucleotide sequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2016, **478**(4), 1739–1745. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.015
- [153] VEPRINTSEV, Dmitry B. a Alan R. FERSHT. Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(5), 1589–1598. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm1040
- [154] LÖÖKE, Marko, Kersti KRISTJUHAN a Arnold KRISTJUHAN. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* [online]. 2011, **50**(5), 325–328. ISSN 1940-9818. Dostupné z: doi:10.2144/000113672
- [155] BOHÁLOVÁ, Natália. Rozpoznávání strukturních motivů a virové DNA proteinem IFI16. 2019, 79.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-FOA	kyselina 5-fluoroorotová
AD	aktivační doména (z angl. activation domain)
ADH	alkoholdehydrogenázový promotor
AIM2	interferonem indukovatelný protein chybí v melanomu AIM2 (z angl. absent in melanoma 2)
Amp	ampicilin
AOX1	promotor alkoholoxidázy 1
AP-1	protein rozpoznávající a interagující s enhancery (z angl. activator protein 1)
ASC	adaptorový protein spojený s apoptózou, podobný skvrnitému proteinu obsahující CARD (z angl. apoptosis-associated speck-like protein containing CARD)
BRCA1	protein citlivý na rakovinu prsu typu 1 (z angl. breast cancer type 1)
Casp-1	kaspáza 1 (z angl. caspase 1)
CD spektroskopie	spektroskopie cirkulárního dichroismu
CD ⁴⁺	skupina T-lymfocytů s diferenciační skupinou povrchových glykoproteinů lokalizovaných převážně na vnější straně cytoplazmatické membrány
CDK	cyklin-dependentní kináza (z angl. cyclin-dependent kinase)
cGAMP	cyklický guanosinmonofosfát-adenosinmonofosfát (z angl. cyclic guanosinemonophosphate-adenosinmonophosphate)
cGas	cyklická GMP-AMP syntáza (z angl. cyclic GMP-AMP synthase)
CORE kazeta	selektovatelná reportérová kazeta (z angl. counterselectable reporter)
DMSO	dimethylsulfoxid (z angl. dimethyl sulfoxide)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (z angl. deoxyribonucleic acid)
DSB	dvouřetězcový zlom DNA (z angl. double-strand DNA break)
dsDNA	dvouřetězcová DNA (z angl. double-stranded DNA)
E2F	skupina transkripčních faktorů zapojených do regulace buněčného cyklu a syntézy DNA v savčích buňkách
EBV	virus Epstein-Barrové (z angl. Epstein-Barr Virus)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
G418	geneticin (druh aminoglykosidického antibiotika)
GAL1	galaktózou indukovatelný promotor
GC-motivy	úseky bohaté na guanin a cytosin
GTPáza	GTP (guanosintrifosfát) fosfohydroláza (z angl. syn. GTP-binding protein)

H1299	buněčná linie plicního karcinomu neexprimující p53 ani IFI16
HCMV	lidský cytomegalovirus (z angl. Human Cytomegalovirus)
HIN-200	rodina interferonem indukovatelných jaderných proteinů nesoucích HIN doménu tvořenou 200-aminokyselinovým motivem
HIV	virus lidské imunodeficiency (z angl. Human Immunodeficiency Virus)
HSV-1	virus herpes simplex typ 1 (z angl. Herpes Simplex Virus 1)
HSV d106	mutantní forma viru herpes simplex exprimující vysoké hladiny ICP0 a nulové hladiny jiných IE proteinů
HSV s109	mutantní forma viru herpes simplex s mutacemi genů pro ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 a ICP47
ICP0	infikovaný buněčný polypeptid (z angl. infected cell polypeptide 0)
IE proteiny	okamžité časné proteiny (z angl. immediate-early proteins)
IFI16	interferonem γ indukovatelný protein 16 (z angl. interferon gamma inducible protein 16)
IFIX	interferonem indukovatelný protein X (z angl. interferon gamma inducible protein X)
IFN	interferon
I κ B	inhibitor nukleárního faktoru kappa B (z angl. inhibitor of nuclear factor kappa B)
IL-1 β	interleukin 1 β
IRF-3	interferonový regulační faktor 3 (z angl. interferon regulatory factor 3)
I-SceI	intronem kódovaná endonukleáza I-SceI přítomná v mitochondriích <i>S. cerevisiae</i> (z angl. intron-encoded endonuklease I-SceI)
K48-, K63-, K27-	lysinová residua ubiquitinu
KSHV	herpesvirus spojený s Kaposiho sarkomem (z angl. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus)
LB	médium používané při kultivaci bakterií (z angl. lysogeny broth)
LEU2	biosyntéza leucinu; marker kvasinek
LiAc	octan lithný (z angl. lithium acetate)
ItA	leucin tryptofan selektivní (misky) obsahující adenin
Mei2	protein vázající RNA podílející se na meióze u <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
MIEP	hlavní okamžitý-časný promotor HCMV (z angl. major immediate-early promoter)
Mili-Q voda	ultračistá voda
mj.	mimo jiné

MNDA	nukleární diferenační antigen myeloidních buněk (z angl. myeloid cell nuclear differentiation antigen)
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
MyoD	protein pro stanovení myoblastů (z angl. myoblast determination protein 1)
ND10	jaderná tělesa 10 (z angl. nuclear domains with 10 seen dots)
NFκB	nukleární faktor kappa B (z angl. nuclear factor kappa B)
NK-buňky	přirození zabíječi (z angl. Natural Killer cells)
NLS	sekvence jaderné lokalizace (z angl. nuclear localization sequence)
NMR spektroskopie	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
OB-fold	úsek proteinu se schopností vazby k oligonukleotidům a oligosacharidům (z angl. oligonucleotide/oligosaccharide binding properties)
OD ₆₀₀	optická hustota při 600 nm
p53	buněčný nádorový antigen, „strážce genomu“ (z angl. cellular tumor antigen p53)
PAMPS	molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenů (z angl. pathogen-associated molecular patterns)
Pat1	protein spojený s DNA topoizomerázou II (z angl. protein associated with topoisomerase II)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PEG	polyethylenglykol (z angl. polyethylene glycol)
pp65	strukturní protein lidského cytomegaloviru (z angl. lower matrix protein 65)
pRB	protein související s retinoblastomem (z angl. retinoblastoma-related protein)
proCasp-1	prokaspáza 1 (z angl. procaspase-1)
pUL83	jiné označení pp65
PUMA	modulátor apoptózy p53 (z angl. p53 upregulated modulator of apoptosis)
PYD	PYRIN doména
Rab proteiny	malé guanosintrifosfatázy regulující proteinový transport
RE	responzivní element (z angl. response element)
RLU	normalizovaný signál luminescence na optickou hustotu
RNA	kyselina ribonukleová (z angl. ribonucleic acid)
S/T	doména serinu a threoninu
S/T/P	doména serinu, threoninu a prolinu

SCP	krmná biomasa (z angl. Single Cell Proteins)
SOC médium	bohaté kultivační médium používané při pokusech s bakteriemi (z angl. super optimal broth with catabolite repression)
Sp1	protein specifity 1 (z angl. specificity protein 1)
SRItA	syntetické leucin tryptofan selektivní médium s rafinózou
ssDNA	jednořetězcová DNA (z angl. single-stranded DNA)
ssRNA	jednořetězcová RNA (z angl. single-stranded RNA)
STING	stimulátor interferonových genů (z angl. stimulator of interferon genes)
TAD	transkripčně-aktivační doména (z angl. trans-activation domain)
TBK-1	TANK vazebná kináza 1 (z angl. TANK-binding kinase 1)
TE	pufr obsahující EDTA a Tris v daných koncentracích
TF	transkripční faktor (z angl. transcription factor)
THP1	buněčná linie monocytů
TNF α	nádorový nekrotizující faktor (z angl. tumor necrosis factor)
UL54	strukturní protein lidského cytomegaloviru
UV	ultrafialové (záření) (z angl. ultraviolet)
Y1H	jednohybridní kvasinkový systém (z angl. yeast one-hybrid system)
Y2H	dvouhybridní kvasinkový systém (z angl. yeast two-hybrid system)
YPDA	bohaté médium používané při kultivaci kvasinek

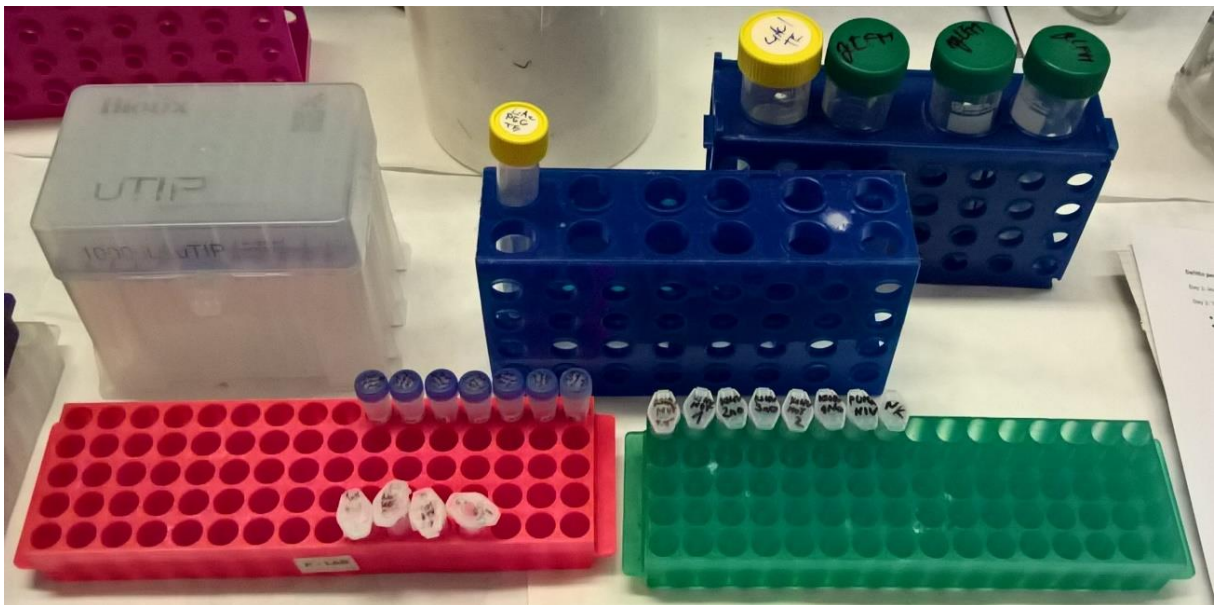
PŘÍLOHA: Příprava nových reportérových kmenů

1. den: inokulace



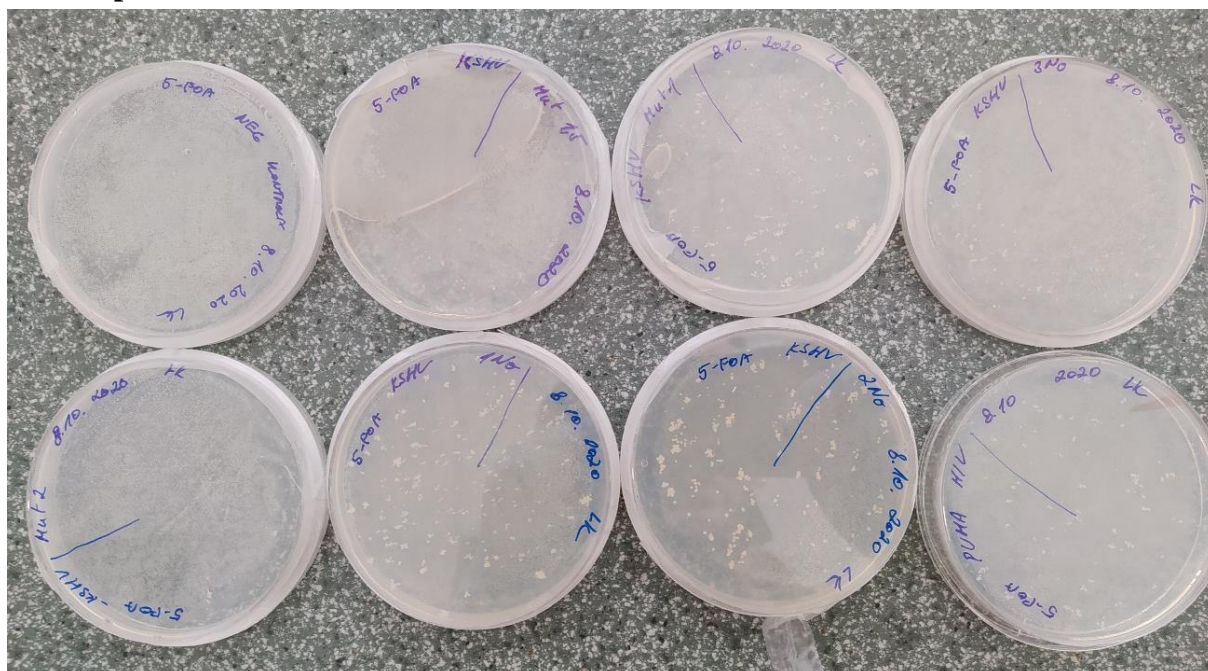
Obrázek 10: Inokulace a inkubace. Tři kolonie kmene *yLFM-ICORE* byly přeneseny do 5 ml YPDA tekutého média a inkubovány do druhého dne při teplotě 30 °C a 150 rpm (foceno 7. 10. 2020).

2. den: transformace



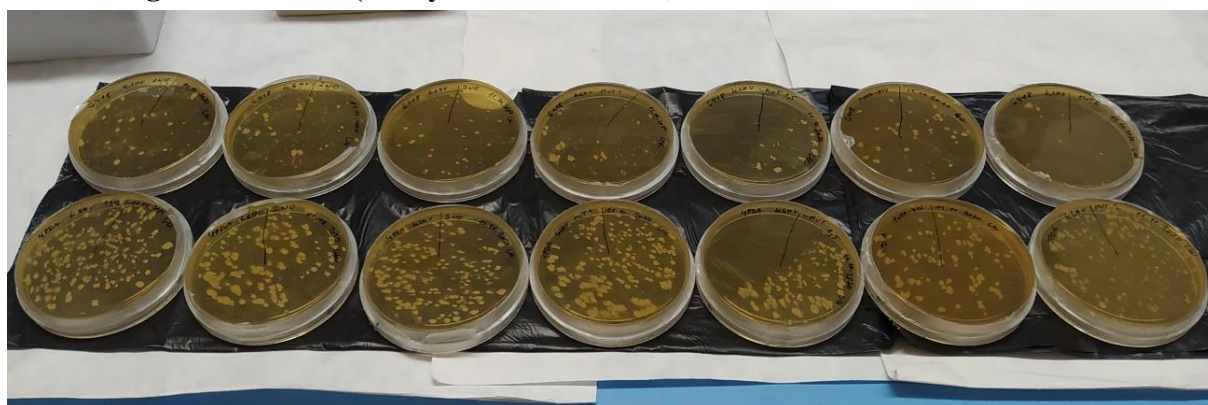
Obrázek 11: Transformace. Kultura byla promyta a byla přidána galaktóza, která indukovala expresi restriční endonukleázy. Byly připraveny kompetentní buňky, které byly transformovány oligonukleotidy s mutovanými sekvencemi G-kvadruplexů (viz Tabulka 2) a transformační směs byla rozetřena na čisté YPDA misky, které byly inkubovány při 30 °C do druhého dne (foceno 7. 10. 2020).

3. den: pozitivní selekce

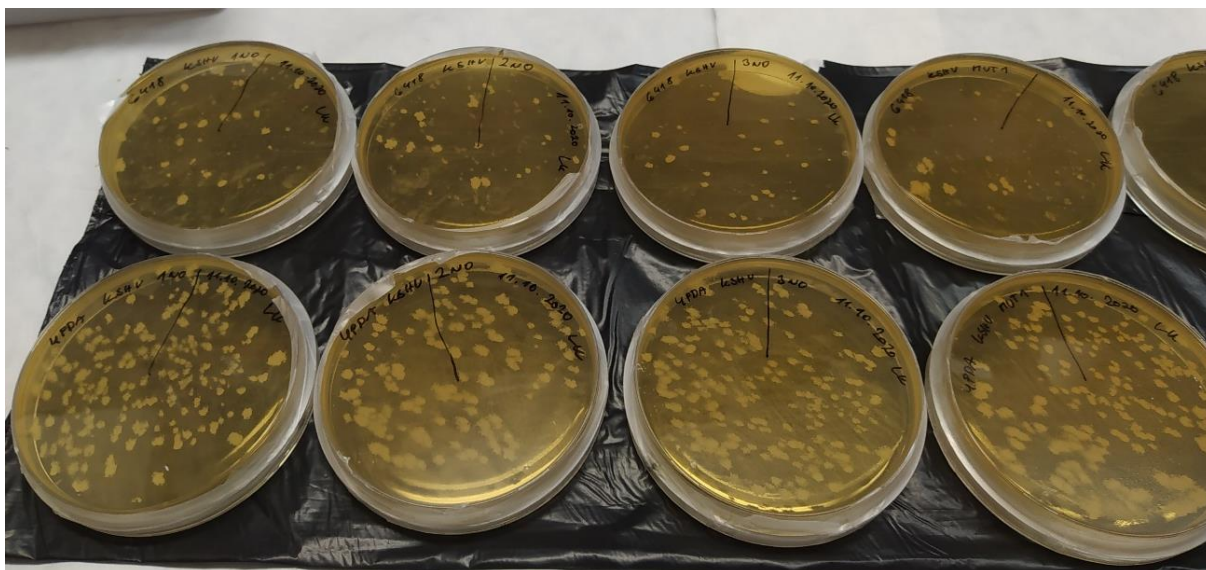


Obrázek 12: Pozitivní selekce. Rozetřená směs na YPDA miskách obsahovala kvasinky s nahrazenou i přetrvávající ICORE kazetou, proto byla provedena pozitivní selekce pomocí 5-fluoroorotové kyseliny. YPDA misky byly orazítkovány na misky s 5-FOA a ty byly inkubovány 3 dny při 30 °C. Nově připravené kmeny rostou na miskách s 5-FOA. Pro lepší vyhodnocení narostlých a nenarostlých kolonií po razítkování byly misky opatřeny značkou, kterou představovala čára fixem (foceno 11. 10. 2020).

6. den: negativní selekce (misky s G418 a YPDA)

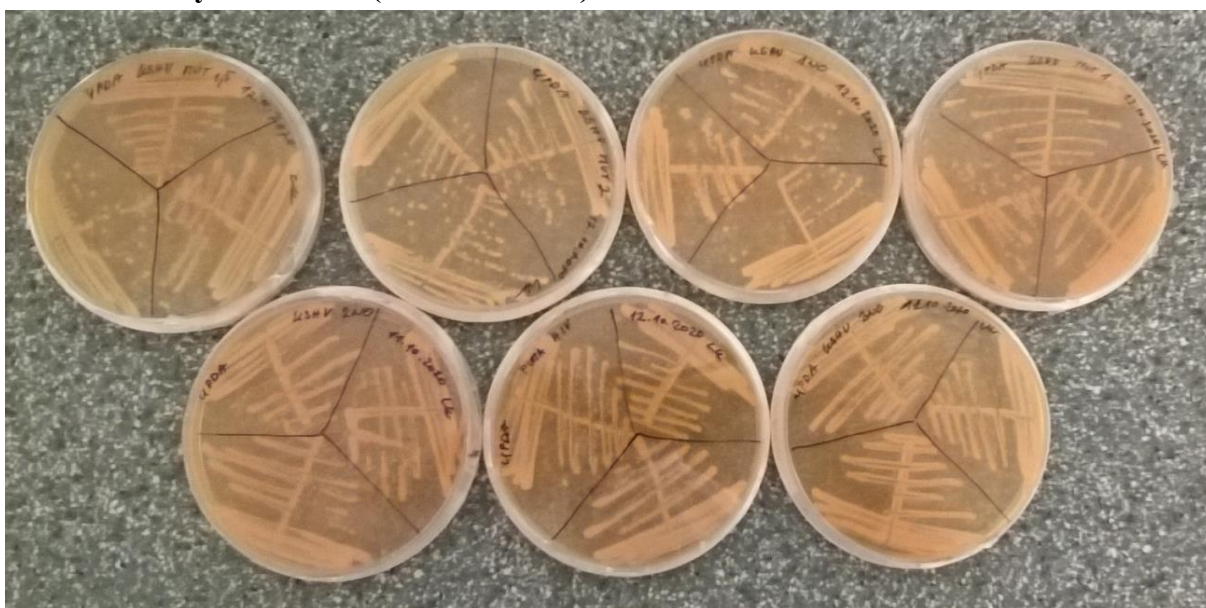


Obrázek 13: Negativní selekce. Negativní selekce byla provedena pomocí geneticinu. Orazítkované 5-FOA misky s narostlými koloniemi byly orazítkovány na misky s G418 a nové YPDA misky a inkubovány do dalšího dne při 30 °C. Na obrázku jsou ve spodní řadě umístěny YPDA a vrchní řadu tvoří G418 misky. Nově připravené kmeny rostly na YPDA miskách, ale na miskách s G418 se projeví pouze jako stín tzn., že kolonie viditelně nerostly, ale byly vidět náznaky kolonií po razítkování. (foceno 12. 10. 2020).

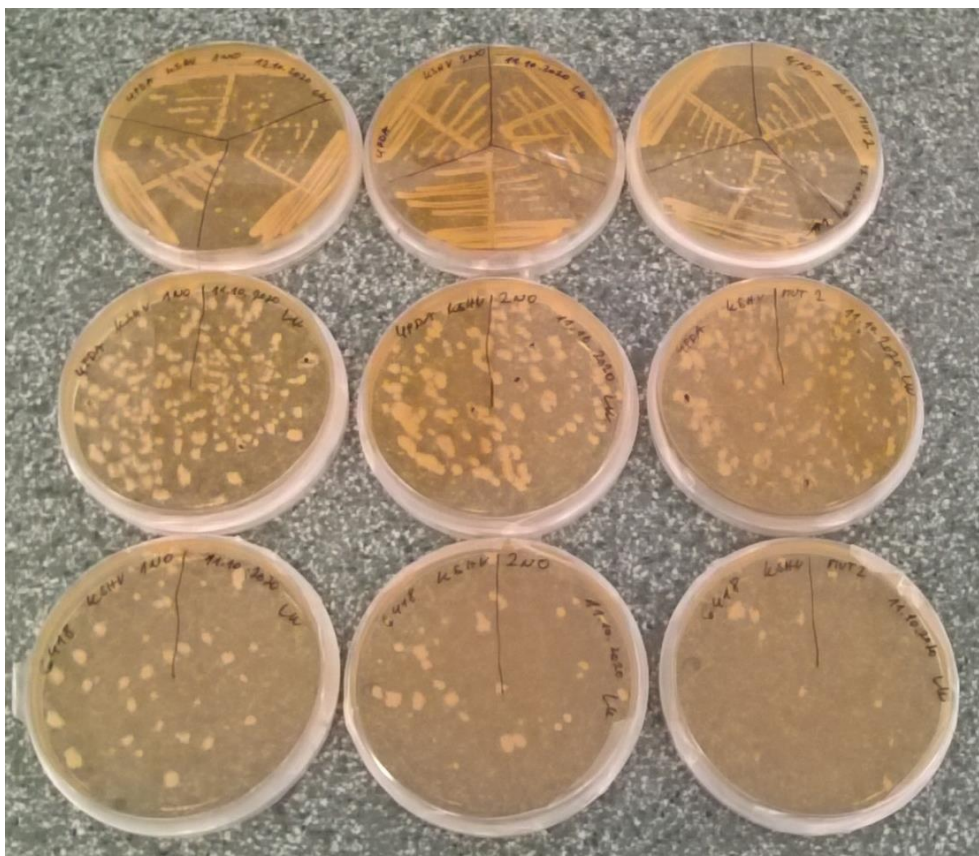


Obrázek 14: Negativní selekce detailně. Detailní záběr YPDA misek ve spodní řadě a G418 misek ve vrchní řadě při negativní selekci ukazuje, že některé kolonie, které narostly na YPDA miskách, nenarostly na miskách s G418 (foceno 12. 10. 2020).

7. den: roztěry stromečků (z YPDA misek)

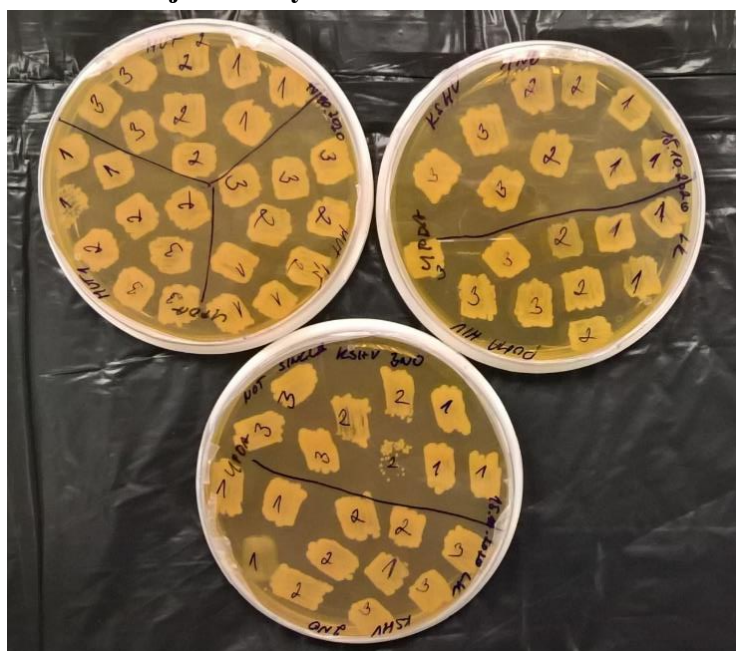


Obrázek 15: Roztěry stromečků. Byly vybrány 3 kolonie každého kmene, které narostly na YPDA miskách, ale ne na miskách s G418 a z těchto kolonií byly udělány roztěry ve tvaru stromečků na čisté YPDA misky, které byly inkubovány 3 dny při teplotě 30 °C. Některé stromečky neobsahovaly jednotlivé kolonie (foceno 15. 10. 2020).



Obrázek 16: Srovnání roztěrů a misek z negativní selekce. Na obrázku jsou ve spodní řadě umístěny G418 misky. Uprostřed jsou YPDA misky se značením kolonií, které byly odebrány na roztěry stromečků a vrchní řadu tvoří již narostlé roztěry stromečků (foceno 15. 10. 2020).

10. den: roztěry čtverečků z jednotlivých kolonií



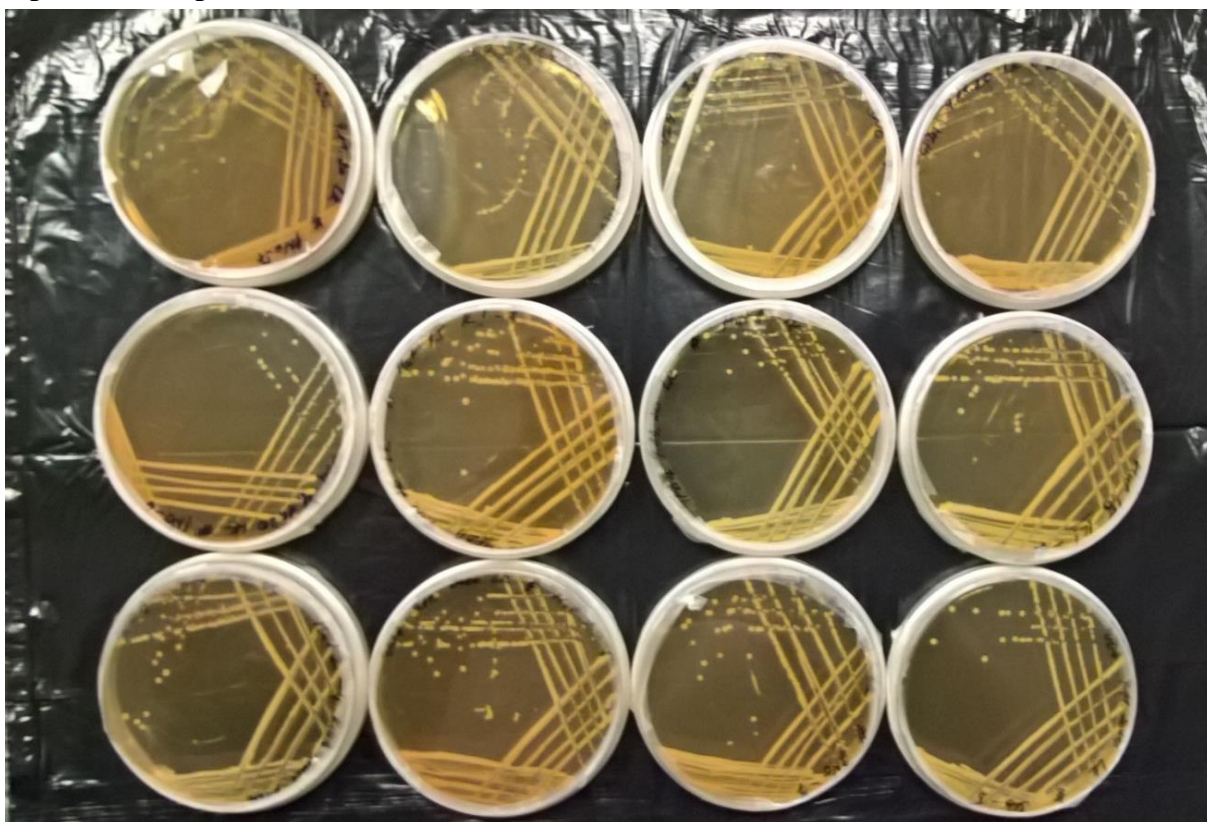
Obrázek 17: Roztěry čtverečků. Z každého roztěru stromečku byly vybrány 3-4 kolonie, které byly rozetřeny do tvaru čtverečků o velikosti asi 1x1 cm na čisté YPDA misky. Misky byly inkubovány do dalšího dne při 30 °C (foceno 19. 10. 2020).

11. den: repliky roztěrů (na G418 a YPDA misky)



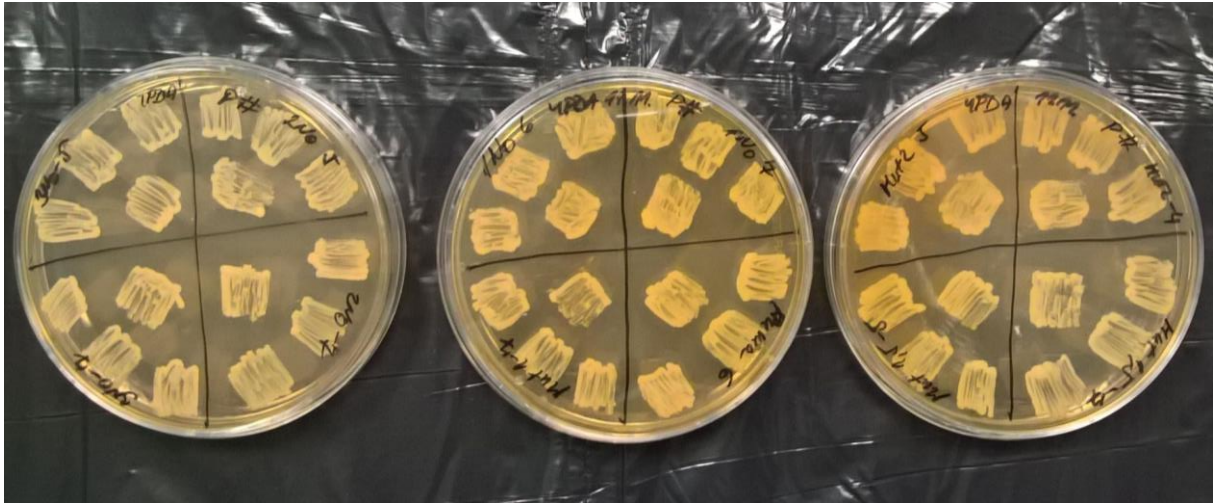
Obrázek 18: Repliky roztěrů. Na obrázku je vidět ukázka razítkování roztěrů při 2. negativní selekci, která byla provedena stejně jako 6. den. Nově orazítkované misky byly inkubovány do dalšího dne při 30 °C (foceno 20. 10. 2020).

Opakování experimentu



Obrázek 19: Křížové roztěry. Při vyhodnocení výsledků sekvenací bylo zjištěno, že vzorky z připravených roztěrů obsahovaly směs kvasinek s mutovanou a správnou sekvencí, což bylo zřejmě následkem odebrání více než jedné kolonie z roztěrů stromečků. Experiment byl vrácen o několik kroků zpět a místo roztěrů stromečků

byly zhotoveny křížové roztěry nově odebraných kolonií po 1. negativní selekci, které byly inkubovány 3 dny při 30 °C (foceno 10. 11. 2020).



Obrázek 20: Roztěry čtverečků z nových křížových roztěrů. Z každého křížového roztěru byly vybrány 4 kolonie, které byly rozetřeny do tvaru čtverečků na čisté YPDA misky. Misky byly inkubovány do dalšího dne při 30 °C. Následovala příprava replik stejně jako 11. den experimentu (foceno 11. 11. 2020).