

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
BUNĚČNÁ A VÝVOJOVÁ BIOLOGIE



**Bc. Martina Hálová**

Efektory chromatinových modifikací a jejich vztah k regulaci transkripce  
na modelu *Saccharomyces cerevisiae*

Chromatin modifiers and their relation to transcription regulation in  
*Saccharomyces cerevisiae*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Školitel: Doc. RNDr. Petr Folk, CSc.**

**Praha 2011**

**Prohlášení:**

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

V Praze, 29.08.2011

Martina Hálová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. a doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. za odborné vedení při práci na diplomovém projektu a za cenné rady při sepisování této práce. Děkuji rovněž Mgr. Ondřeji Gahurovi za přečtení některých částí rukopisu.

Mgr. Ondřeji Gahurovi, RNDr. Anně Valentové a Mgr. Kateřině Abrahámové, Ph.D. dále děkuji za zprostředkování mého prvního kontaktu s molekulární biologii v praxi a za naučení základních laboratorních metod. RNDr. Anně Valentové patří ještě zvláštní poděkování za veškerou práci spojenou s přípravou kmenů a testováním jejich fenotypů, čímž mi umožnila získat některé popsané výsledky. Všem ostatním členům laboratoře děkuji za vytvoření kamarádského kolektivu a příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině za všestrannou podporu, čímž mi umožnili vystudovat vysokou školu.

Práce byla vypracována za finanční podpory GAUK 119710.

# Abstrakt

Vztahy mezi transkripcí, úpravami primárního transkriptu a modifikacemi chromatinu jsou dosud jen nedostatečně poznány. Jedním z kandidátních faktorů, které tyto procesy spřahují, je lidský protein SNW1/SKIP. Tento protein je zapojen do regulace sestřihu pre-mRNA a ovlivňuje transkripci jak na úrovni iniciace, tak na úrovni elongace. Podle hypotézy z laboratoře K. Jones je do procesu elongace transkripce zapojen prostřednictvím interakce s pozitivním transkripčním elongačním faktorem b a ovlivňuje také vznik methylace histonu H3 na lysinu 4, modifikaci spojenou s aktivní transkripcí (Bres et al., *Genes Dev.* 19:1211-26, 2005, Bres et al., *Mol Cell.* 36:75-87, 2009). Kvasinkový ortholog, protein Prp45, byl v literatuře dosud spojován pouze s regulací sestřihu. Nepublikované výsledky získané v naší a jiných laboratořích však poukázaly na jeho zapojení i do procesu elongace transkripce. Cílem diplomového projektu bylo hledat vztahy mezi Prp45 a faktory regulujícími transkripci. Bylo potvrzeno, že u buněk s mutací *prp45(1-169)* dochází ke zpoždění exprese genů *PHO5* a *PHO84*. Byly zjištěny genetické interakce mezi *PRP45* a některými geny kódujícími efektory chromatinových modifikací. Funkce Prp45 při expresi genů *PHO5* a *PHO84* byla dále blíže charakterizována testováním vlivu mutace *prp45(1-169)* a současné delecce vybraného regulačního genu (*BUR2*, *PAF1*, *RAD6* nebo *SET1*). Bylo zjištěno, že funkce proteinu Prp45 při expresi těchto genů souvisí s proteiny Rad6 a Set1, což potvrzuje jeho úlohu v regulaci transkripce. Dále byly potvrzeny a rozšířeny poznatky o vlivu některých vybraných efektorů na represi transkripce genu *PHO5* v neindukčních podmínkách.

**Klíčová slova:** Prp45, elongace transkripce, Bur1, Bur2, Paf1, Rad6, Set1, methylace histonu H3

# Abstract

Relations among transcription, pre-mRNA processing and chromatin modifications are only partially understood. The human protein SNW1/SKIP belongs to factors which couple these processes. The protein plays role in pre-mRNA splicing and transcription on the level of both initiation and elongation. According to the hypothesis of K. Jones laboratory, it physically and functionally interacts with positive transcription elongation factor b during transcription elongation and influences methylation of histone H3 on lysine 4, a modification characteristic for active transcription (Bres et al., *Genes Dev.* 19:1211-26, 2005, Bres et al., *Mol Cell.* 36:75-87, 2009). The yeast ortholog of SNW1/SKIP, Prp45, was until now reported only in connection with splicing regulation. However, unpublished results from our Laboratory and others showed that it is employed in transcription elongation as well. The aim of the diploma project was to search for the relations between Prp45 and the factors regulating transcription. It was confirmed that the mutation *prp45(1-169)* results in the delay of *PHO5* and *PHO84* expression during transcriptional induction. Next, we discovered new genetic interactions between *PRP45* and several genes encoding the effectors of chromatin modifications. How Prp45 influences the expression of *PHO5* and *PHO84* was tested in *prp45(1-169)* mutated strains bearing the simultaneous deletion of a selected effector gene (*BUR2*, *PAF1*, *RAD6*, or *SET1*). It was discovered that the function of Prp45 during the expression of these genes is connected to Rad6 and Set1, which supports its role in transcription regulation. Finally, we provided new data on the influence of selected effectors on *PHO5* repression under non-inducing conditions.

**Key words:** Prp45, transcription elongation, Bur1, Bur2, Paf1, Rad6, Set1, H3 methylation

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Obsah</b> .....	<b>6</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Literární přehled</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Faktory účastníci se elongace transkripce</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Faktory modifikující CTD Pol II.....	13
2.1.2 Komplex Bur1-Bur2.....	14
2.1.2.1 Komplex Bur1-Bur2 se podílí na fosforylaci CTD Pol II .....	15
2.1.2.2 Komplex Bur1-Bur2 fosforyluje elongační faktor Spt5 .....	16
2.1.2.3 Komplex Bur1-Bur2 fosforyluje Rad6 .....	18
2.1.3 Komplex PAF.....	18
2.1.3.1 Vyzarování komplexu PAF k transkribovaným genům.....	19
2.1.3.2 Komplex PAF a fosforylace CTD Pol II .....	20
2.1.3.3 Komplex PAF a modifikace histonů .....	21
2.1.4 Ubiquitinylace histonu H2B na lysinu 123 .....	23
2.1.4.1 Ubiquitinylace H2BK123 a přestavby chromatinu .....	25
2.1.4.2 Ubiquitinylace H2BK123 a umlčování genů.....	26
2.1.5 Methylace H3K4 .....	28
2.1.5.1 Faktory ovlivňující di- a trimethylaci H3K4 .....	29
2.1.5.2 Fyziologická role methylace H3K4.....	31
2.1.6 Methylace H3K36 .....	32
2.1.6.1 Vznik di- a trimethylace H3K36 .....	33
2.1.6.2 Fyziologická role methylace H3K36 .....	33
2.1.7 Methylace H3K79 .....	34
2.1.8 Souhrn procesů probíhajících při elongaci transkripce .....	35
<b>2.2 Geny dráhy PHO</b> .....	<b>37</b>
2.2.1 Struktura promotoru a regulace transkripce genu <i>PHO5</i> .....	38
2.2.1.1 Faktory remodelující chromatin během indukce genu <i>PHO5</i> .....	39
2.2.1.2 Modifikace chromatinu a exprese genu <i>PHO5</i> .....	40
2.2.2 Regulace transkripce genu <i>PHO84</i> a struktura promotoru .....	42
2.2.2.1 Indukce transkripce genu <i>PHO84</i> ve srovnání s genem <i>PHO5</i> .....	42
2.2.2.2 Struktura promotoru genu <i>PHO84</i> .....	43
2.2.2.3 Faktory remodelující chromatin během indukce genu <i>PHO84</i> .....	44
2.2.2.4 Modifikace chromatinu a exprese genu <i>PHO84</i> .....	44
<b>2.3 Proteiny SNW</b> .....	<b>46</b>
2.3.1 Lidský ortholog SNW1/SKIP.....	46
2.3.2 Kvasinkový ortholog Prp45 .....	50
<b>3 Materiál a metody</b> .....	<b>54</b>
<b>3.1 Materiál</b> .....	<b>54</b>
3.1.1 Kultivační media a roztoky .....	54
3.1.1.1 Kvasinková kultivační media .....	54
3.1.1.2 Obecně používané roztoky .....	57
3.1.2 Přehled použitých kvasinkových kmenů.....	57
3.1.3 Přehled použitých primerů .....	59

3.1.4	Přehled použitých protilátek.....	59
3.1.5	Přehled použitých souprav pro manipulaci s nukleovými kyselinami.....	60
3.1.6	Přehled použitých velikostních standardů.....	60
3.1.7	Reakční směsi a programy PCR.....	61
3.1.7.1	Tvorba integrační kazety.....	61
3.1.7.2	PCR z kolonií.....	61
<b>3.2</b>	<b>Metody.....</b>	<b>63</b>
3.2.1	Příprava a výsev glycerolových konzervovaných kultur <i>S. cerevisiae</i> .....	63
3.2.2	Křížení a sporulace <i>S. cerevisiae</i> , tetradová analýza.....	63
3.2.3	Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou.....	64
3.2.4	Příprava proteinových extraktů <i>S. cerevisiae</i> .....	65
3.2.5	Tris-glycinová SDS-PAGE.....	66
3.2.6	Western blot.....	69
3.2.7	Imunodetekce proteinů na membráně.....	70
3.2.8	Fosfátové přenosy.....	71
3.2.9	Izolace chromozomální DNA z kvasinek.....	73
3.2.10	Izolace celkové RNA z kvasinek.....	74
3.2.11	Reverzní transkripce.....	76
3.2.12	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	77
3.2.13	Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu.....	78
3.2.14	Přečištění PCR produktů pomocí NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II (Macherey – Nagel).....	79
3.2.15	qRT-PCR.....	79
3.2.15.1	qRT-PCR s využitím iQ <sup>TM</sup> 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD).....	79
3.2.15.2	qRT-PCR s využitím LightCycler <sup>®</sup> 480 II (Roche Applied Science).....	80
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>82</b>
<b>4.1</b>	<b>Cíle diplomového projektu.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2</b>	<b>Analýza genové exprese metodou qRT-PCR.....</b>	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>Analýza exprese genů PHO na genetickém pozadí kmene EGY48.....</b>	<b>91</b>
4.3.1	Analýza exprese genů PHO u buněk s mutací <i>prp45(1-169)</i> .....	91
<b>4.4</b>	<b>Příprava kmenů s mutací <i>prp45(1-169)</i> a současnou delecí vybraného efektoru chromatinových modifikací.....</b>	<b>96</b>
4.4.1	Příprava kmene <i>prp45(1-169) Δset1</i> křížením.....	96
4.4.2	Příprava kmene <i>prp45(1-169) Δbur1</i> .....	98
<b>4.5</b>	<b>Testování fenotypu buněk s dvojitou mutací <i>prp45(1-169) Δbur1</i>.....</b>	<b>102</b>
<b>4.6</b>	<b>Testování exprese genů PHO v buňkách <i>prp45(1-169)</i> nesoucích delecí vybraného efektoru chromatinových modifikací.....</b>	<b>104</b>
4.6.1	Testování exprese genů PHO u buněk <i>prp45(1-169)</i> na genetickém pozadí BY4741.....	105
4.6.2	Expres genů PHO u buněk s delecí genu <i>BUR2</i> .....	109
4.6.3	Expres genů PHO u buněk s delecí genu <i>PAF1</i> .....	110
4.6.4	Expres genů PHO u buněk s delecí genu <i>RAD6</i> .....	112
4.6.5	Expres genů PHO u buněk s delecí genu <i>SET1</i> .....	113
<b>5</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>116</b>
<b>5.1</b>	<b>Indukce exprese genů PHO je u buněk s mutací <i>prp45(1-169)</i> zpožděná.....</b>	<b>117</b>
<b>5.2</b>	<b>Genetické interakce mezi <i>prp45(1-169)</i> a vybranými regulačními geny.....</b>	<b>118</b>
<b>5.3</b>	<b>Vliv genetického pozadí na expresi genu <i>PHO84</i> u buněk s mutací <i>prp45(1-169)</i> ve srovnání s divokými buňkami.....</b>	<b>121</b>
<b>5.4</b>	<b>Expres genů PHO u kmenů s delecemi vybraných efektorů chromatinových modifikací a role Prp45.....</b>	<b>123</b>

5.4.1	Expres genů PHO v kmenech s delecemi vybraných genů v represivních podmínkách .....	123
5.4.2	Expres genů PHO v kmenech s delecemi vybraných genů v indukčních podmínkách .....	126
<b>5.5</b>	<b>Expres genů PHO a otevírání chromatinové struktury.....</b>	<b>127</b>
<b>5.6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>Souhrn.....</b>	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>131</b>



## Seznam zkratek

<b>AA</b>	akrylamid
<b>AK</b>	aminokyselina
<b>APS</b>	amoniumpersulfát
<b>6-AU</b>	6-azauracil
<b>BIS</b>	N,N'-methylenebisakrylamid
<b>bp</b>	pár bazí (base pair)
<b>CDK</b>	cyklin-dependentní kináza
<b>COMPASS</b>	komplex proteinů asociovaných se Set1 (Complex of Proteins Associated with Set1)
<b>CTD</b>	C-terminální doména RNA polymerázy II
<b>DSIF</b>	DRB-sensitivity inducing factor
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>dNTP</b>	deoxyribonukleotidtrifosfát (směs dATP, dCTP, dTTP a dGTP)
<b>dTMP</b>	deoxythymidinmonofosfát
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>dUMP</b>	deoxyuridinmonofosfát
<b>EBV</b>	virus Epstein a Barrové (Epstein-Barr virus)
<b>EDTA</b>	ethylendiamintetraoctová kyselina
<b>FACT</b>	komplex FACT (facilitates chromatin transcription)
<b>5-FdUMP</b>	5-fluorodeoxyuridinmonofosfát
<b>5-FOA</b>	5-fluoroorotová kyselina
<b>5-FOMP</b>	5-fluoroorotidinmonofosfát
<b>5-FUMP</b>	5-fluorouridinmonofosfát
<b>HA</b>	hemaglutinin
<b>HAT</b>	histonacetyltransferáza
<b>HDAC</b>	histondeacetyláza
<b>HMT</b>	histonmethyltransferáza
<b>H2BK123Ub</b>	ubiquitylace histonu H2B na lysinu 123
<b>H2BK123R</b>	výměna argininu za lysin 123 histonu H2B
<b>H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3</b>	monomethylace, dimethylace, trimethylace histonu H3 na lysinu 4

<b>H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3</b> .....	monomethylace, dimethylace, trimethylace histonu H3 na lysinu 36
<b>H3K79me1, H3K79me2, H3K79me3</b> .....	monomethylace, dimethylace, trimethylace histonu H3 na lysinu 79
<b>kDa</b> .....	kilodalton
<b>mRNA</b> .....	mediátorová RNA (messenger RNA)
<b>NC</b> .....	nitrocelulóza
<b>NELF</b> .....	negative elongation factor
<b>NotchIC</b> .....	intracelulární doména receptoru Notch
<b>NTC</b> .....	komplex proteinů asociovaných s Prp19 (NineTeen complex)
<b>OD</b> .....	optická densita
<b>OMP</b> .....	orotidinmonofosfát
<b>PCR</b> .....	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
<b>PE</b> .....	polyethylen
<b>PEG</b> .....	polyethylenglykol
<b>P<sub>i</sub></b> .....	anorganický fosfát (inorganic phosphate)
<b>Pol II</b> .....	RNA polymeráza II
<b>PPIL1</b> .....	peptidyl-prolyl isomerase-like 1
<b>pre-mRNA</b> .....	prekurzorová mediátorová RNA (precursor messenger RNA)
<b>P-TEFb</b> .....	pozitivní transkripční elongační faktor b
<b>PVDF</b> .....	polyvinyliden fluorid
<b>qRT-PCR</b> .....	kvantitativní PCR v reálném čase (quantitative real time PCR)
<b>SAGA</b> .....	Spt-Ada-Gcn acetyltransferáza
<b>SALSA/SLIK</b> .....	SAGA-aletred, Spt8 absent/SAGA-like
<b>SD</b> .....	směrodatná odchylka (standard deviation)
<b>SDS</b> .....	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulfate)
<b>siRNA</b> .....	malá interferující RNA (small interfering RNA)
<b>snRNP</b> .....	malá jaderná ribonukleoproteinová partikule (small nuclear ribonucleoprotein particle)
<b>SQ</b> .....	arbitrární hodnota množství cDNA ve vzorku (starting quantity)
<b>s<sub>r</sub></b> .....	relativní směrodatná odchylka
<b>TAR</b> .....	element působící aktivaci <i>in trans</i> ( <i>trans</i> -activation response element)

**TBP** ..... TATA box vazebný protein (TATA binding protein)  
**TCA** ..... trichloroctová kyselina (trichloroacetic acid)  
**TEMED** ..... tetramethylethylendiamin  
**UMP** ..... uridinmonofosfát  
**VDR** ..... receptor vitamínu D (vitamin D receptor)  
**wt** ..... divoký typ (wild type)

# 1 Úvod

Exprese genetické informace na úrovni transkripce je spřažena také s úpravami vznikajícího transkriptu. Mezi tyto úpravy patří vznik čepičky, sestřih a polyadenylace. Ačkoliv dlouho byly tyto procesy studovány odděleně, nyní se ukazuje, že dochází ke vzájemnému provázání řízení transkripce RNA polymerázou II a těmito úpravami. Transkripce navíc v buňce neprobíhá na holé DNA, ale v kontextu chromatinu. Rovněž chromatinová struktura stejně jako posttranslační modifikace histonů ovlivňují proces transkripce a úpravy primárního transkriptu. Vzájemné vztahy mezi iniciací transkripce, elongací transkripce, strukturou chromatinu a procesy spjatými s úpravami primárního transkriptu jsou dosud objasněny jen částečně, přestože mají zásadní význam pro pochopení procesu exprese genetické informace.

Mezi faktory, které spřahují tyto procesy, patří proteiny SNW. Tyto esenciální proteiny byly dosud nalezeny u všech eukaryotických organismů. Role lidského orthologa, proteinu SNW1/SKIP, je spojena jak s regulací transkripce, a to na úrovni iniciace i elongace, tak se sestřihem pre-mRNA. SNW1/SKIP rovněž fyzicky i funkčně interaguje s některými enzymy, které zprostředkují vznik histonových modifikací, konkrétně methylaci H3K4, o které bylo na modelu savčích buněk ukázáno, že napomáhá vyvazovat komponenty spliceosomu.

Role orthologa proteinů SNW v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, Prp45, byla v literatuře dosud spojena pouze s regulací sestřihu pre-mRNA. Některé nepublikované výsledky z naší laboratoře stejně jako nepublikované výsledky jiných skupin však poukazují na jeho zapojení při regulaci transkripce. Cílem předkládané práce je blíže charakterizovat zapojení proteinu Prp45 při regulaci transkripce ve vztahu k chromatinovým modifikacím na modelu bezintronových genů *PHO5* a *PHO84*.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Faktory účastníci se elongace transkripce

Elongace transkripce je děj, který je vymezen vznikem otevřeného komplexu RNA polymerázy II (Pol II) a přepisem polyadenylačního signálu. Na průběhu elongace transkripce participuje mnoho faktorů. Mezi tyto faktory patří například faktory modifikující C-terminální doménu (CTD) Pol II, faktory kovalentně modifikující chromatin, faktory účastníci se přestaveb nukleosomů a další. V této kapitole bude popsána role vybraných faktorů při elongační fázi transkripce na modelu *Saccharomyces cerevisiae*. Kde to však bude relevantní, budou zmíněny výsledky získané také na obratlovčím modelu.

#### 2.1.1 Faktory modifikující CTD Pol II

CTD Pol II je součástí největší podjednotky Pol II, proteinu Rbp1. CTD se u kvasinky *S. cerevisiae* skládá z 26 opakování sekvence  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$  a u savců z 52 opakování (Corden, 1990). Pro průběh elongační fáze transkripce má důležitý význam fosforylace na Ser2 a Ser5.

U kvasinky *S. cerevisiae* byly identifikovány celkem čtyři cyklin-dependentní kinázy (CDK), které fosforylují CTD Pol II a mají vztah k transkripci. Mezi tyto kinázy patří Srb10, která je součástí holoenzymu Pol II (Liao et al., 1995) a fosforyluje CTD Pol II před utvořením preiniciačního komplexu. Tato fosforylace má na transkripci inhibiční vliv (Hengartner et al., 1998). Dále je to kináza Kin28, která je součástí obecného transkripčního faktoru TFIIF a která fosforyluje CTD na Ser5 (Cismowski et al., 1995, Rodriguez et al., 2000). Dvěma zbývajících CDK jsou Ctk1 s cyklinem Ctk2, které tvoří společně s proteinem Ctk3 komplex CTDK-I, a komplex CDK-cyklin Bur1-Bur2 (Lee and Greenleaf, 1991, Murray et al., 2001). Tyto CDK odpovídají svojí funkcí lidskému pozitivnímu transkripčnímu elongačnímu faktoru b (P-TEFb), který je odpovědný za fosforylaci CTD Pol II na Ser2 (Zhou et al., 2000c). Kinázou odpovědnou za většinu fosforylace na Ser2 je u *S. cerevisiae* kináza Ctk1 (Patturajan et al., 1999), komplex Bur1-Bur2 však k této fosforylaci také přispívá (Liu et al., 2009, Qiu et al., 2009). Vztah mezi těmito dvěma kinázami bude popsán v následující kapitole.

Fosforylace Ser2 a Ser5 je dynamický proces. V 5' oblastech transkribovaných genů je Pol II fosforylována na Ser5 (Komarnitsky et al., 2000, Schroeder et al., 2000). Fosforylace na Ser5 vyvazuje k transkribovaným genům například enzymy odpovědné za vznik čepičky (Cho et al., 1997, Ho and Schuman, 1999), komplex PAF (Qiu et al., 2006) a jeho prostřednictvím další komplexy modifikující chromatin, například histonmethyltransferázový (HMT) komplex COMPASS (Krogan et al., 2003a).

V průběhu elongační fáze transkripce dochází k defosforylaci Ser5 a naopak vzrůstá fosforylace na Ser2. V 3' oblastech genů je dominantní fosforylace na Ser2 (Komarnitsky et al., 2000, Schroeder et al., 2000). Fosforylace na Ser2 je důležitá například pro vyvazování HMT Set2, která trimethyluje histon H3 na lysinu 36 (H3K36me3) (Krogen et al., 2003b, Strahl et al., 2002).

Vzhledem k tomu, že lidský ortholog kvasinkového proteinu Prp45, který je v naší laboratoři dlouhodobě studován, interaguje s P-TEFb (viz dále), jsou poznatky o komplexu Bur1-Bur2 shrnuty v samostatné kapitole.

### 2.1.2 Komplex Bur1-Bur2

Komplex Bur1-Bur2 je tvořen CDK Bur1 a jejím cyklinem Bur2. Je nutno poznamenat, že Bur2 je považován za cyklin pouze podle homologie se savčími cykliny rodiny C a T, jeho hladina se v průběhu buněčného cyklu výrazně nemění (Yao et al., 2000, Spellman et al., 1998). Vliv komplexu Bur1-Bur2 na elongaci transkripce je podporován pozorováním, že buňky s mutacemi v genech *BUR1* a *BUR2* jsou citlivé na 6-azauracil (6-AU) a mykofenolovou kyselinu<sup>1</sup> (Murray et al., 2001, Keogh et al., 2003). Bur1 je také přítomen v elongačních komplexech na aktivně transkribovaných genech a buňky s mutantním genem *BUR1* vykazují defekty v elongaci transkripce (Keogh et al., 2003).

Delece genu kódujícího CDK *BUR1* způsobuje u buněk velmi vážný růstový defekt. Je to zřejmě způsobeno tím, že protein Bur1 ovlivňuje mnoho faktorů, které se účastní regulace elongace transkripce, a jeho delece má proto tak vážný důsledek (Liu et

---

<sup>1</sup> 6-azauracil a mykofenolová kyselina jsou chemické látky, které inhibují enzymy pro syntézu GTP. Samotná redukce množství GTP není pro buňky lethální, ale kmeny s mutací genů, které ovlivňují elongaci transkripce, jsou na toto činidlo citlivé. Používá se na testování vlivu mutace na elongaci transkripce.

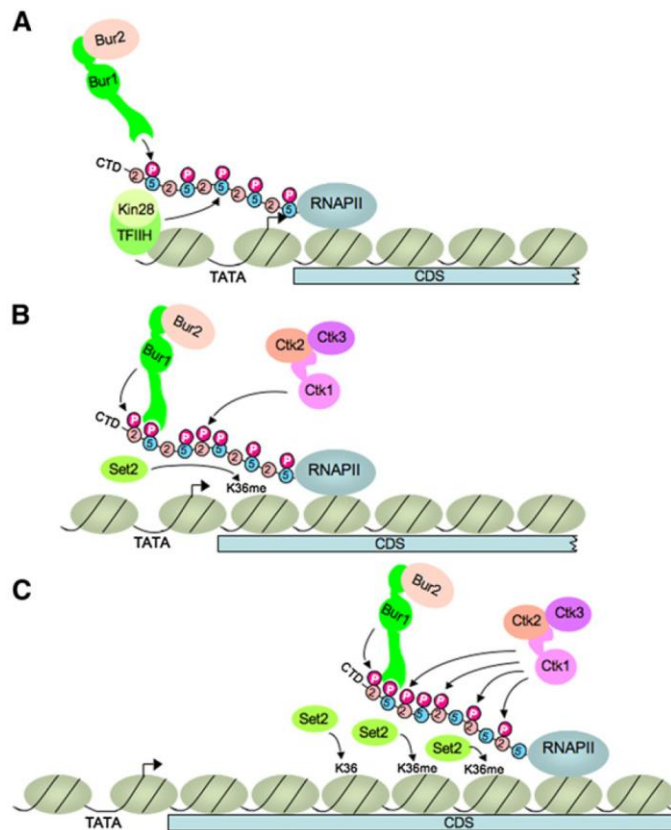
al., 2009). Znamé cíle, které komplex Bur1-Bur2 fosforyluje, jsou popsány v následujících kapitolách.

### ***2.1.2.1 Komplex Bur1-Bur2 se podílí na fosforylaci CTD Pol II***

Komplex Bur1-Bur2 přispívá k fosforylaci Ser2 na CTD Pol II, která se nachází v blízkosti promotoru transkribovaného genu (Liu et al., 2009, Qiu et al., 2009). V této oblasti se zdá být příspěvek k fosforylaci tohoto zbytku rovnocenný s příspěvkem kinázy Ctk1. Jak Pol II postupuje do oblastí distálně od promotoru, hlavní kinázou fosforylující Ser2 se stává kináza Ctk1. Protože obě kinázy stále zůstávají v blízkosti Pol II, musí docházet buď ke snižování aktivity komplexu Bur1-Bur2, nebo ke zvyšování aktivity kinázy Ctk1. Mechanismus ještě není plně objasněn, je také možné, že aktivita Ctk1 je stimulována komplexem Bur1-Bur2 (Qiu et al., 2009).

K CTD je komplex Bur1-Bur2 vyvazován přes interakci CTD-interakční domény, která je v C-koncové oblasti kinázy Bur1, s fosforylovaným Ser5. Fosforylace Ser5 kinázou Kin28 je tedy nutná pro vyvázání tohoto komplexu k CTD (Qiu et al., 2009).

Model zapojení Bur1-Bur2 do fosforylace CTD je na obrázku 2.1. Je zde také znázorněno vyvazování HMT Set2, která trimethyluje histon H3 na lysinu 36 (Strahl et al., 2002), prostřednictvím fosforylace Ser2 na CTD. Funkce této modifikace bude popsána v kapitole 2.1.6.



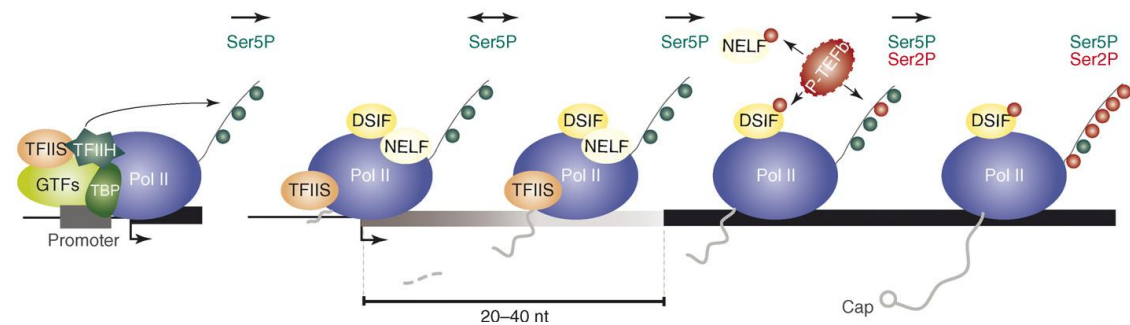
**Obr. 2.1 Zapojení komplexu Bur1-Bur2 do fosforylace CTD Pol II.** (A) Pro vyvázání komplexu Bur1-Bur2 na CTD Pol II je nutná fosforylace na Ser5 kinázou Kin28. (B) Příspěvek komplexu Bur1-Bur2 k fosforylaci Ser2 v CTD Pol II v oblastech blízko promotoru je rovnocenný s příspěvkem kinázy Ctk1. Znázorněno je také vyvazování HMT Set2 prostřednictvím fosforylace na Ser2 a následná H3K36me. (C) V oblastech distálně od promotoru se hlavní kinázou pro fosforylaci Ser2 na CTD Pol II stává Ctk1. Převzato z Qiu et al., 2009.

### 2.1.2.2 Komplex Bur1-Bur2 fosforyluje elongační faktor Spt5

U savců Pol II s CTD fosforylovanou na Ser5 po uvolnění z promotoru přepíše 20 – 40 nukleotidů a pak dochází k jejímu zastavení (RNA polymerase proximal pausing). Na tomto zastavení u savců participují dva komplexy, DRB-sensitivity inducing factor (DSIF) a negative elongation factor (NELF) (Wu et al., 2003, Aida et al., 2006). P-TEFb uvolňuje Pol II z pauzy tím, že fosforyluje NELF, čímž umožňuje jeho disociaci od Pol II. P-TEFb také fosforyluje DSIF, který je tvořen proteiny SPT4 a SPT5. K fosforylaci dochází v C-koncové oblasti faktoru SPT5 a tato fosforylace má za následek přeměnu DSIF z faktoru inhibujícího elongaci transkripce na faktor podporující elongaci (Yamada et al., 2006). Jakým způsobem fosforylace DSIF provádí tuto přeměnu, však zatím není jasné. Kromě toho, jak bylo zmíněno výše, P-TEFb fosforyluje také CTD



na Ser2 (Zhou et al., 2000c). Průběh začátku elongace, zastavení Pol II a jejího uvolnění z pauzy je znázorněn na obrázku 2.2.



**Obr. 2.2 Průběh časně fáze elongace transkripce, zastavení Pol II a její uvolnění z pauzy v savčích buňkách.** Po uvolnění Pol II z promotoru, kdy je CTD fosforylovaná na Ser5, dochází po přepsání 20 – 40 nukleotidů k jejímu zastavení. Na vzniku pauzy se podílí dva komplexy, DSIF a NELF. P-TEFb uvolňuje Pol II z pauzy tím, že fosforyluje NELF a umožňuje tak jeho disociaci od Pol II, dále že fosforyluje DSIF a tím umožňuje jeho přeměnu z komplexu, který inhibuje elongaci transkripce, na komplex, který stimuluje elongaci transkripce. P-TEFb také fosforyluje CTD Pol II na Ser2. Převzato z Koch et al., 2008, upraveno.

U kvasinky *S. cerevisiae* dosud nebyly identifikovány proteiny, které by byly homologní s faktorem NELF. Homology faktorů tvořících DSIF jsou u této kvasinky známy, jde o proteiny Spt4 a Spt5. Negativní vliv na elongaci transkripce však u těchto kvasinkových proteinů pozorován nebyl, známý je pouze jejich pozitivní vliv.

Faktor Spt5 má stejně jako savčí homolog C-terminální oblast tvořenou opakováním určité sekvence, tato sekvence se však u kvasinek a u savců liší. U kvasinek je tvořena 15 opakováními hexapeptidu S[T/A]WGG[Q/A]. Stejně jako u savců je tato oblast fosforylována. Za fosforylaci je zodpovědný právě komplex Bur1-Bur2, který svojí funkcí odpovídá savčímu P-TEFb (Zhou et al., 2009, Liu et al., 2009). Fosforylace komplexu Spt4-Spt5 usnadňuje vyvazování dalšího komplexu, který asociuje s Pol II a účastní se dalších procesů při elongaci transkripce, komplexu PAF. Esenciální pro vyvazování však fosforylace Spt5 není, protože při delecí C-terminální oblasti proteinu Spt5 dochází pouze k poklesu množství komplexu PAF na Pol II (Zhou et al., 2009, Liu et al., 2009). Jakým způsobem se fosforylace Spt5 podílí na vyvazování komplexu PAF k Pol II, dosud není známo. Nejjednodušší model, tedy že fosforylovaná C-terminální oblast Spt5 slouží jako platforma pro vyvazování komplexu PAF, se nezdá být správný, protože *in vitro* interakce mezi komplexy Spt4-Spt5 a PAF nebyly zvýšeny fosforylací

Spt5 (Liu et al., 2009). Další možností je, že fosforylace Spt5 působí nepřímo, tedy že stimuluje interakci mezi Pol II a komplexem PAF.

Ať už je mechanismus, jakým se fosforylace Spt5 podílí na vyvazování komplexu PAF, jakýkoli, je jisté, že tato fosforylace zprostředkovaná komplexem Bur1-Bur2 k vyvazování přispívá. Vzhledem k tomu, že komplex PAF participuje na vyvazování dalších faktorů spojených s elongací transkripce, jak bude popsáno dále, komplex Bur1-Bur2 tak nepřímo ovlivňuje i tyto následné procesy.

### **2.1.2.3 Komplex Bur1-Bur2 fosforyluje Rad6**

Mezi další známé substráty kinázového komplexu Bur1-Bur2 patří protein Rad6. Rad6 je kinázovým komplexem Bur1-Bur2 fosforylován na Ser120 (Wood et al., 2005). Rad6 je ubiquitin konjugační enzym, který je společně s ubiquitin ligázou Bre1 přítomen v komplexu s elongující Pol II a podílí se na ubiquitinylaci histonu H2B na lysinu 123 (Robzyk et al., 2000, Hwang et al., 2003, Wood et al., 2003a). Vliv této modifikace na elongaci transkripce bude popsán v následujících kapitolách. Fosforylace Ser120 na proteinu Rad6 je zřejmě důležitá k aktivaci katalytické aktivity, neovlivňuje vyvazování proteinu Rad6 zprostředkované ubiquitin ligázou Bre1 k elongačnímu komplexu (Wood et al., 2005, Wood et al., 2003a).

Z výše popsaných skutečností je zřejmé, že komplex Bur1-Bur2 je důležitým faktorem při procesu elongace transkripce. Fosforylací cílových proteinů ovlivňuje jejich aktivitu nebo tato fosforylace napomáhá vyvazování dalších komplexů účastnících se elongace transkripce.

### **2.1.3 Komplex PAF**

Komplex PAF asociuje s Pol II a participuje na mnoha procesech souvisejících s transkripcí. Účastní se například vyvazování faktorů, které modifikují chromatin; ovlivňuje vznik fosforylace CTD Pol II na Ser2; podílí se na regulaci délky telomer a participuje také na umlčování genů v blízkosti telomer; ovlivňuje průchod Pol II přes chromatin při elongaci transkripce; účastní se vzniku 3' konce mRNA a vyvazování faktorů pro úpravy 3' konce mRNA. Komplex PAF je u kvasinek tvořen pěti

podjednotkami, Paf1, Ctr9, Cdc73, Rtf1 a Leo1 (shrnuto v Jaehning, 2010). Některé vybrané aspekty funkce komplexu PAF při transkripci budou podrobněji popsány dále.

### **2.1.3.1 Vyzarování komplexu PAF k transkribovaným genům**

Komplex PAF byl detekován na promotorech, v 5' i 3' oblastech transkribovaných genů; na polyadenylačním místě je však z chromatinu uvolněn (Pokholok et al., 2002, Krogan et al., 2002b, Kim et al., 2004, Mueller et al., 2004, Qiu et al., 2006). Je proto schopen asociovat jak s nefosforylovanou formou CTD Pol II, tak s CTD fosforylovanou na Ser5 i Ser2 (Wade et al., 1996, Phatnani et al., 2004, Qiu et al., 2006). S Pol II je komplex PAF asociován hlavně prostřednictvím podjednotek Rtf1 a Cdc73 (Mueller et al., 2004).

Na vyzarování komplexu PAF na transkribované geny zřejmě participuje více faktorů. Nejlépe prostudované je zapojení faktorů Spt4-Spt5. Tyto faktory asociují s Pol II ještě před vyzarováním komplexu PAF, protože delece genů kódujících podjednotky komplexu PAF nemá vliv na přítomnost proteinů Spt4 a Spt5 na Pol II (Mueller et al., 2004, Qiu et al., 2006). Delece genu kódujícího Spt4 silně redukovala množství Paf1 po celé délce transkribovaného genu *ARG1*, včetně oblasti TATA boxu (Qiu et al., 2006). Jak bylo popsáno výše, faktor Spt5 je fosforylován komplexem Bur1-Bur2 v C-terminální oblasti a tato fosforylace také stimuluje vyzarování komplexu PAF k transkribovaným genům (Liu et al., 2009, Zhou et al., 2009). Stále však ještě není jasné, s jakou podjednotkou komplexu PAF faktory Spt4-Spt5 interagují.

Delece genu kódujícího Bur2 nebo inhibice kinázové aktivity Bur1 snížila množství podjednotek komplexu PAF na transkribovaných genech (Laribee et al., 2005, Wood et al., 2005). Toto pozorování potvrzuje účast komplexu Bur1-Bur2 při vyzarování komplexu PAF na transkribované geny, i když tato účast je nepřímá. Komplex Bur1-Bur2 je vyzarován k Pol II prostřednictvím fosforylace Ser5 na CTD Pol II (Qiu et al., 2009). Tato skutečnost vysvětluje pozorování, že pro stabilizaci interakce komplexu PAF s Pol II je nutná fosforylace CTD na Ser5 (Qiu et al., 2006).

Dalším kandidátem pro stimulaci vyzarování komplexu PAF na transkribované geny je komplex Ccr4-Not (Mulder et al., 2007, Laribee et al., 2007). Tento komplex reguluje procesy související s „životním cyklem“ mRNA, účastní se regulace transkripce,

ovlivňuje export do cytoplasmy i degradaci mRNA (Denis et al., 2001, Kruk et al., 2011, Badarinarayana et al., 2000, Kerr et al., 2011, Tucker et al., 2001).

Na vyvazování komplexu PAF na transkribované geny se mohou podílet také komplex FACT a protein Spt6 (Pavri et al., 2006, Kaplan et al., 2005). Komplex FACT (facilitates chromatin transcription) mění chromatinovou strukturu v průběhu elongační fáze transkripce. Podílí se jak na rozvolňování chromatinové struktury před elongující Pol II, tak na depozici nukleosomů za elongující Pol II (Belotserkovskaya et al., 2003, Mason and Struhl, 2003, Schwabish and Struhl, 2004). Protein Spt6 se také podílí na organizaci chromatinové struktury na přepisovaných genech (Bortvin and Winston, 1996, Kaplan et al., 2003). Oba tyto faktory jsou k Pol II vyvazovány před komplexem PAF a fyzicky interagují s jeho podjednotkami (Pavri et al., 2006, Kaplan et al., 2005).

Komplex PAF může být na transkribované geny vyvazován také přes interakce se vznikajícím transkriptem. K této interakci je zřejmě důležitá podjednotka Leo1 (Dermody and Buratowski, 2010).

### ***2.1.3.2 Komplex PAF a fosforylace CTD Pol II***

Komplex PAF se ukázal být důležitý pro vznik fosforylace CTD Pol II na Ser2 (Mueller et al., 2004, Nordick et al., 2008). Různé podjednotky komplexu PAF přitom ke vzniku této fosforylace přispívají různě. Delece genů kódujících podjednotky Paf1 a Ctr9 vedly k redukci ve fosforylaci Ser2 až na úroveň, jaká je v buňkách s delecí genu pro Ctk1, tedy kinázy, která je zodpovědná za vznik většiny fosforylace na Ser2 (Nordick et al., 2008, Patturajan et al., 1999). Delece genů kódujících podjednotky Cdc73 a Rtf1 měly menší vliv na snížení hladiny fosforylace na Ser2, tato hladina však byla stále o třetinu až o polovinu nižší než v divokých buňkách. Delece genu kódujícího Leo1 neměla na fosforylaci na Ser2 vliv vůbec (Nordick et al., 2008). Role komplexu PAF ve vyvazování Ctk1 na Pol II přitom potvrzena nebyla (Nordick et al., 2008). Komplex PAF se na regulaci vzniku této modifikace může podílet tak, že stimuluje aktivitu kinázy Ctk1. Jinou možností je, že ztráta komplexu PAF vede ke snadnější dostupnosti CTD pro fosfatázy, jejichž aktivitou dochází ke ztrátě fosforylace na Ser2 (Nordick et al., 2008).

### 2.1.3.3 Komplex PAF a modifikace histonů

V eukaryotických buňkách je DNA uložena ve formě chromatinu. Základní jednotkou chromatinu je nukleosom. Nukleosom je tvořen oktamerem proteinovým jádrem, kolem kterého je ovinuto 146 bp DNA. Proteinové jádro je tvořeno vždy dvojicí histonů H2A, H2B, H3 a H4. Aminokyselinové zbytky tvořící histony mohou být různě modifikovány, mezi tyto modifikace patří methylace, acetylce, fosforylace, ubiquitinylace, sumoylace, ADP-ribosylace, deiminace a izomerizace prolinu. Na jednom histonu může být přítomno několik typů modifikací, tyto modifikace poté ovlivňují procesy spojené s genovou expresí.

Mezi modifikace histonů, které jsou spojovány s aktivní transkripcí (Santos-Rosa et al., 2002, Pokholok et al., 2005, Schübeler et al., 2004), patří methylace histonu H3 na lysinech 4 (H3K4me), 36 (H3K36me) a 79 (H3K79me). Jeden až všechny tři vodíky na  $\epsilon$ -aminoskupině lysinu mohou být nahrazeny methylovým zbytkem, methylace proto může být ve formě monomethylace, dimethylace a trimethylace (např. H3K4me1, H3K4me2 a H3K4me3). Další modifikace spojovaná s aktivní transkripcí je monoubiquitinylace histonu H2B na lysinu 123 (H2BK123ub) (Xiao et al., 2005). Za methylaci H3K4 je odpovědná HMT Set1, která je součástí multipodjednotkového proteinového komplexu označovaného jako COMPASS (Complex of Proteins Associated with Set1) (Roguev et al., 2001, Miller et al., 2001). Methylace H3K36 je zprostředkována HMT Set2 (Strahl et al., 2002) a methylace H3K79 HMT Dot1 (van Leeuwen et al., 2002, Feng et al., 2002). Za vznik H2BK123ub jsou odpovědné ubiquitin konjugazační enzym Rad6 a ubiquitinligáza Bre1 a jejich asociovaný protein Lge1 (Robzyk et al., 2000, Hwang et al., 2003, Wood et al., 2003a). Jak bude popsáno dále, na vzniku všech těchto modifikací se podílí komplex PAF.

Podjednotky komplexu PAF Paf1 a Rtf1 se ukázaly být důležité pro vznik H3K4me3 (Ng et al., 2003a, Ng et al., 2003b, Xiao et al., 2005). Delece podjednotek *PAF1* a *RTF1* vedla k redukci množství H3K4me3 a ke sníženému vyvazování HMT Set1 do 5' oblastí genů, pro které je tato značka typická. Delece genů kódujících podjednotky Cdc73 a Leo1 naproti tomu neovlivnily hladinu H3K4me3 (Ng et al., 2003a). Cdc73 společně s Ctr9 však přispívají ke vzniku H3K4me2 (Xiao et al., 2005).

Podjednotky Paf1, Rtf1, Ctr9 a Cdc73 byly také důležité pro vznik H3K79me2 (Ng et al., 2003b, Xiao et al., 2005). Vyvazování HMT Dot1 nebylo v buňkách s delecí

genu *RTF1* k transkribovaným genům moc ovlivněno (Ng et al., 2003b), komplex PAF tedy zřejmě ovlivňuje pouze aktivitu Dot1, ne její vyvazování. Vznik di- a trimethylace H3K4 a H3K79 je však závislý na ubiquitylaci H2BK123 (Briggs et al., 2002, Sun and Allis, 2002, Schneider et al., 2005, Shahbazian et al., 2005). Komplex PAF tedy ovlivňuje vznik těchto modifikací nepřímo přes ovlivnění ubiquitylace H2B.

Delece genů kódujících podjednotky komplexu PAF Paf1 a Rtf1 silně redukovaly hladinu ubiquitylace H2B. Tato redukce byla doprovázena silnou redukcí H3K4me2 a H3K79me2. Delece genů *CTR9* a *CDC73* vedla k mírnější redukci ubiquitylace H2B, stejně tak byl pozorován i mírnější pokles H3K4me2 a H3K79me2. Delece *LEO1* neměla na hladinu ubiquitylace H2B vliv (Xiao et al., 2005, Ng et al., 2003b, Wood et al., 2003b). Tato korelace dokládá vliv ubiquitylace H2B na vznik těchto modifikací.

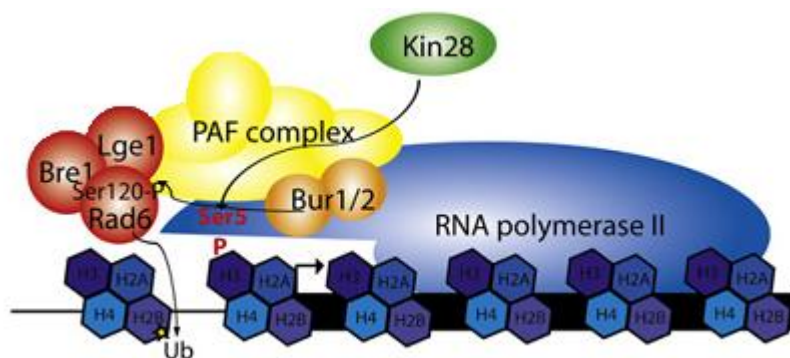
Protein Rad6 prostřednictvím proteinu Bre1 fyzicky interaguje s Pol II (Kim and Roeder, 2009), delece genů pro proteiny Rtf1 a Paf1 však tuto interakci silně redukovaly (Wood et al., 2003b, Xiao et al., 2005). V buňkách s delecí *RTF1* byl protein Rad6 stále detekován v promotorech, nicméně jeho přítomnost v kódující oblasti detekována nebyla. Z tohoto výsledku vyplývá, že k vyvázání proteinu Rad6 do promotoru transkribovaných genů není komplex PAF potřeba, za vyvázání do této oblasti je odpovědný protein Bre1 (Wood et al., 2003b). Komplex PAF je nutný až pro uvolnění proteinu Rad6 z promotoru do kódující oblasti a pro jeho asociaci s Pol II. Ubiquitylace H2B však nebyla u kmene s delecí *RTF1* detekována ani v promotoru. Ačkoliv tedy komplex PAF není nutný k vyvázání Rad6 na promotor, nějakým dosud neznámým způsobem stimuluje ubiquitylační aktivitu Rad6-Bre1 (Wood et al., 2003b, Xiao et al., 2005).

H3K36me je také ovlivněna komplexem PAF. Delece genů kódujících podjednotky Paf1 a Ctr9 vedly k vymizení H3K36me3, delece genu kódujícího podjednotku Cdc73 pouze snižovala hladinu H3K6me3 a delece genů kódujících podjednotky Rtf1 a Leo1 neovlivňovaly hladinu H3K36me3. Na H3K36me1 a H3K36me2 měly tyto delece buď jen velmi mírný nebo žádný vliv (Chu et al., 2007). Methylylace H3K36 není ovlivňována ubiquitylací H2B (Briggs et al., 2002). HMT Set2 však interaguje s CTD Pol II fosforylovanou na Ser2 (Krogan et al., 2003b). Vzhledem k tomu, že závažnost vymizení H3K36me3 u buněk s různou delecí podjednotek komplexu PAF téměř přesně koreluje s vlivem, jaký mají delece těchto podjednotek na fosforylaci Ser2 na CTD Pol II (Nordick et al., 2008), ovlivňuje zřejmě komplex PAF tuto modifikaci nepřímo prostřednictvím ovlivnění fosforylace CTD Pol II na Ser2.

Ze studií, jejichž závěry jsou shrnuty výše, vyplývá, že komplex PAF je důležitý pro vznik různých posttranslačních modifikací histonů. Přesný vliv té které podjednotky na vznik dané modifikace bude zjištěn až v průběhu budoucích studií.

#### 2.1.4 Ubiquitylace histonu H2B na lysinu 123

Další událostí, která nastává ve fázi následující po působení komplexů Bur1-Bur2 a PAF, je ubiquitylace H2BK123. Tuto modifikaci zprostředkují ubiquitin konjugací enzym Rad6, ubiquitinligáza Bre1 a jejich asociovaný protein Lge1 (Robzyk et al., 2000, Hwang et al., 2003, Wood et al., 2003a) (obr. 2.3).

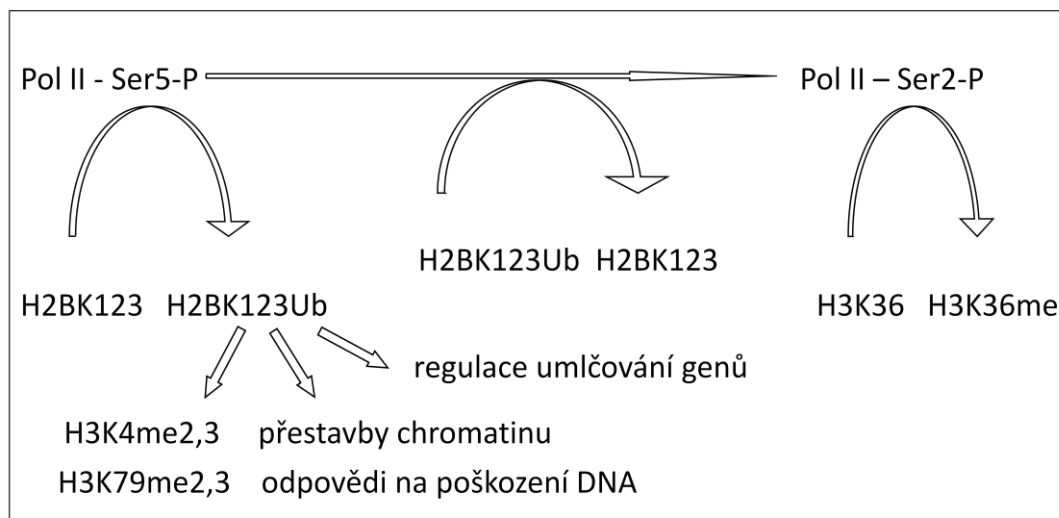


**Obr. 2.3 Ubiquitylace H2BK123 je zprostředkována komplexem Rad6-Bre1-Lge1 a pro její vznik jsou nezbytné Pol II a komplexy Bur1-Bur2 a PAF.** Znázorněna je fosforylace proteinu Rad6 na Ser120 kinázou Bur1 (Wood et al., 2005) a fosforylace CTD Pol II na Ser5 kinázou Kin28, která je důležitá pro vyvážení komplexů Bur1-Bur2 a potažmo i komplexu PAF (Qiu et al., 2006, Qiu et al., 2009). Převzato z Weake and Workman, 2008, upraveno.

Ubiquitylace H2BK123 byla detekována jak v promotoru, tak v kódující oblasti aktivně transkribovaných genů (Xiao et al., 2005). Elongaci transkripce ovlivňuje několika způsoby. Účastní se přestaveb chromatinové struktury na aktivně transkribovaných genech (Pavri et al., 2006, Fleming et al., 2008, Chandrasekharan et al., 2009) a je důležitá pro vznik di- a trimethylace H3K4 a H3K79 (Briggs et al., 2002, Sun and Allis, 2002, Schneider et al., 2005, Shahbazian et al., 2005). Participuje také na umlčování genů a vzniku heterochromatinu (Sun and Allis, 2002, Wood et al., 2003a). Také se ukazuje, že se podílí na odpovědích buňky na stres způsobený poškozením DNA (Giannattasio et al., 2005, Faucher and Wellinger, 2010).

Pro správný průběh elongace transkripce je nutné, aby byla ubiquitylace H2BK123 z chromatinu také odstraněna. Deubiquitylace je zprostředkována deubiquitylačním enzymem Ubp8, který je součástí komplexů SAGA (Spt-Ada-Gcn

acetyltransferase) a SALSA/SLIK (SAGA-aletered, Spt8 absent/SAGA-like) (Henry et al., 2003, Daniel et al., 2004). Odstranění ubiquitinylatione H2BK123 umožňuje asociaci komplexu CTDK-I s Pol II a následnou fosforylaci CTD Pol II na Ser2 (Wyce et al., 2007). Fosforylace na Ser2 je důležitá pro vyvazování HMT Set2, která zprostředkuje metylaci H3K36 (Krogan et al., 2003b, Strahl et al., 2002). Tato modifikace je charakteristická pro pozdější fázi elongace transkripce. Nepřítomnost ubiquitinylatione H2BK123 znemožňuje di- a trimethylaci H3K4 a H3K79, tyto zbytky zůstávají monomethylvány. Monomethylace těchto zbytků je také spojována s pozdějšími fázemi elongace transkripce, protože je charakteristická pro nukleosomy nacházející se na 3' koncích aktivních genů (Pokholok et al., 2005). Ubiquitinylatione H2BK123 a následná deubiquitinylatione tedy může sloužit jako kontrolní bod při přechodu z časných fází elongace do pozdějších fází elongace (Wyce et al., 2007). Cyklus ubiquitinylatione a následné deubiquitinylatione H2BK123 při elongaci transkripce a související pochody jsou zobrazeny na obrázku 2.4.



**Obr. 2.4 Cyklus ubiquitinylatione a deubiquitinylatione H2BK123 v průběhu elongační fáze transkripce a související pochody.** V časných fázích elongace transkripce, pro které je charakteristická modifikace CTD Pol II na Ser5, dochází ke vzniku ubiquitinylatione H2BK123. Tato modifikace participuje na přestavbách chromatinové struktury (Pavri et al., 2006, Fleming et al., 2008, Chandrasekharan et al., 2009), na vzniku di- a trimethylace H3K4 a H3K79 (Briggs et al., 2002, Sun and Allis, 2002, Schneider et al., 2005, Shahbazian et al., 2005), dále reguluje umlčování genů (Emre et al., 2005, Gardner et al., 2005, Qin et al., 2009, Wan et al., 2010) a procesy poškození DNA (Giannattasio et al., 2005, Faucher and Wellinger, 2010). V pozdějších fázích elongace je nezbytná deubiquitinylatione H2BK123, což umožňuje asociaci kinázy Ctk1 s Pol II a následnou fosforylaci na Ser2 (Wyce et al., 2007). Tato modifikace je důležitá pro vyvázání HMT Set2 a následnou metylaci H3K36 (Krogan et al., 2003b, Strahl et al., 2002).



#### 2.1.4.1 Ubiquitynlace H2BK123 a přestavby chromatinu

Prvotní studie spojující ubiquitynlaci H2B a přestavby chromatinu byla provedena *in vitro* na lidském systému. Byl navržen model, kdy ubiquitynlace H2BK120, která odpovídá kvasinkové ubiquitynlaci H2BK123, stimuluje funkci lidského komplexu FACT, který zprostředkuje odstranění dimeru H2A/H2B z nukleosomu a tím usnadňuje průchod Pol II přes nukleosomy (Pavri et al., 2006, Belotserkovskaya et al., 2003).

*In vivo* studie však ukázaly, že komplex FACT zprostředkuje spíše depozici nukleosomů za Pol II než jejich odstraňování (Mason and Struhl, 2003). V souladu s tímto nálezem jsou výsledky studie na kvasinkách, které ukazují, že ubiquitynlace H2BK123 spolupracuje s proteinem Spt16 (jeden z kvasinkových homologů komplexu FACT) na depozici nukleosomů po průchodu Pol II. Tato depozice je důležitá pro zabránění iniciace transkripce z kryptických aktivačních sekvencí. Navíc bylo ukázáno, že mezi ubiquitynlací H2BK123 a proteinem Spt16 existuje jakýsi vztah pozitivní zpětné vazby. Ubiquitynlace H2BK123 přispívá ke stabilizaci asociace faktoru Spt16 s kódující oblastí genu *GALI* a naopak faktor Spt16 podporuje vznik ubiquitynlace H2BK123 (Fleming et al., 2008).

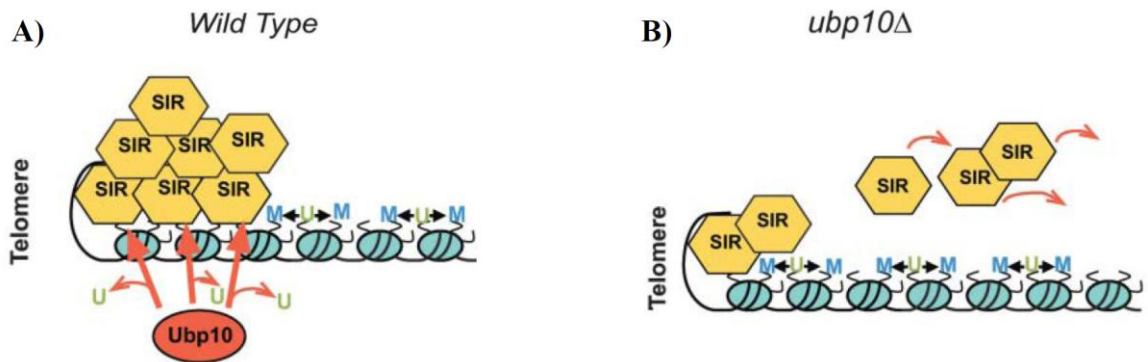
V souladu s pozorovanou funkcí ubiquitynlace H2BK123 na depozici nukleosomů je i nová studie, jejíž závěr je, že ubiquitynlace H2BK123 zvyšuje stabilitu nukleosomů (Chandrasekharan et al., 2009). Model navržený v této studii se pokouší objasnit funkci ubiquitynlace H2BK123 při přestavbách chromatinové struktury během elongace transkripce. Podle tohoto modelu ubiquitynlace H2BK123 po indukci exprese nejprve stabilizuje nukleosomy a tím usnadňuje vazbu Spt16 na chromatin. Po deubiquitynlaci proteinem Ubp8 dochází k destabilizaci nukleosomů a tato deubiquitynlace také může podporovat protein Spt16 ke zvýšenému odstraňování nukleosomů z kódujících oblastí, což usnadní pohyb Pol II. Po průchodu Pol II může dojít k opětovné ubiquitynlaci H2BK123, čímž je podpořena depoziční aktivita faktoru Spt16 a zároveň tato modifikace stabilizuje chromatinovou strukturu (Chandrasekharan et al., 2009).

#### 2.1.4.2 Ubiquitynlace H2BK123 a umlčování genů

K umlčování genů v kvasince *S. cerevisiae* dochází v telomerických oblastech, v oblastech kódujících rDNA a v oblastech *HM*, které kódují geny důležité pro ustavení párovacího typu. Už v době, kdy byly charakterizovány proteiny Rad6 a Bre1 jako efekторы ubiquitynlace H2BK123, byla jejich delece a následná ztráta ubiquitynlace H2BK123 spojena s defekty v umlčování genů (Huang et al., 1997, Sun and Allis, 2002, Wood et al., 2003a).

Umlčování genů je zprostředkováno proteiny komplexu Sir. Tyto proteiny se preferenčně vážou na nemetylované histony (Ng et al., 2003b). Protože ubiquitynlace H2BK123 zprostředkuje metylaci H3K4 a H3K79 (Briggs et al., 2002, Sun and Allis, 2002, Schneider et al., 2005, Shahbazian et al., 2005), podílí se tato chromatinová modifikace na umlčování genů prostřednictvím regulace vzniku těchto methylací (Emre et al., 2005, Gardner et al., 2005).

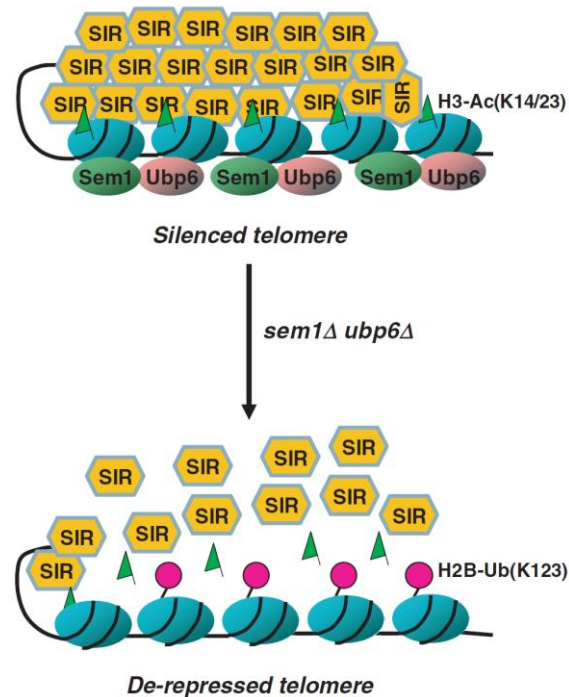
Na rozdíl od aktivních genů, kdy je během elongace transkripce ubiquitynlace H2BK123 odstraněna deubiquitynlačním enzymem Ubp8 (Henry et al., 2003, Daniel et al., 2004), za odstranění ubiquitinů z H2BK123 je v umlčovaných oblastech odpovědná deubiquitynláza Ubp10 (Emre et al., 2005, Gardner et al., 2005). Po odstranění ubiquitynlace H2BK123 nevzniká metylace H3K4 a H3K79, mohou se vázat proteiny komplexu Sir a dochází k umlčování. Bylo také ukázáno, že Ubp10 a proteiny komplexu Sir jsou na sobě při cílování do umlčovaných oblastí závislé, tato pozitivní zpětná vazba tak může přispívat k udržování umlčení (Emre et al., 2005). Role proteinu Ubp10 při umlčování genů je na příkladu umlčení telomerických oblastí znázorněna na obrázku 2.5.



**2.5 Role proteinu Ubp10 při umlčování telomerických oblastí.** (A) Protein Ubp10 deubiquitinyluje H2BK123 v telomerických oblastech, tím pádem je znemožněna také methylace H3K4 a H3K79. Histony tak zůstávají nemethylované a mohou vázat proteiny komplexu Sir, které zprostředkují umlčování. (B) V případě, že je gen kódující Ubp10 deletován, ubiquitinylace H2BK123 v telomerických oblastech přetrvává. To ústí v methylaci H3K4 a H3K79 a ke znemožněné vazbě proteinů komplexu Sir. Převzato z Emre et al., 2005, upraveno.

Původní studie však ukázaly, že znemožnění ubiquitinylace H2BK123 vede k defektům v umlčení telomerických oblastí (Huang et al., 1997, Sun and Allis, 2002, Wood et al., 2003a). Tento zdánlivý rozpor vysvětluje fakt, že množství proteinů komplexu Sir je zřejmě v buňce omezené (Buck and Shore, 1995, Smith et al., 1998). Ztráta globální ubiquitinylace H2BK123 a tedy i globální methylace H3K4 a H3K79 umožňuje vazbu proteinů komplexu Sir promiskuitně na celý genom. Hladina proteinů komplexu Sir se tak na oblastech, které mají být umlčené, snižuje, což vede k porušení umlčení.

Další deubiquitinylační enzym, který participuje na umlčování genů, je Ubp6 (Qin et al., 2009). Aktivita tohoto proteinu je řízena proteazomálním enzymem Sem1, role těchto proteinů je však na proteazomu nezávislá. Tyto enzymy ovlivňují umlčování telomerických oblastí, na umlčování oblastí rDNA a lokusů *HM* zřejmě nemají vliv. Deubiquitinylace H2BK123 zprostředkovaná Ubp6 a Sem1 vede ke vzniku acetylace H3K14 a H3K23, tedy modifikací, které jsou spojeny s umlčováním genů (Kelly et al., 2000). Takto acetylované histony váží proteiny komplexu Sir a dochází k umlčování. Při delecii obou faktorů přetrvává ubiquitinylace H2BK123, je znemožněna acetylace H3K14 a H3K23, proteiny komplexu Sir se neváží a umlčení telomer je porušeno (Qin et al., 2009). Role proteinů Ubp6 a Sem1 při umlčování genů je znázorněna na obrázku 2.6.

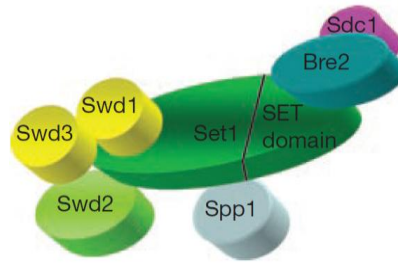


**Obr. 2.6 Role proteinů Ubp6 a Sem1 při umlčování telomerických oblastí.** Ubp6 a Sem1 zprostředkují deubiquitinylnaci H2BK123, tato deubiquitinylnace ústí ve vznik acetylce H3K14 a H3K23, tedy modifikací spojených s umlčováním telomer (Kelly et al., 2000). Na takto modifikované histony se váží proteiny komplexu Sir a dochází k umlčení. Při delecii obou faktorů ubiquitinylnace H2BK123 přetrvává, acetylce je znemožněna a to vede k odváznání proteinů komplexu Sir a k porušení umlčování telomerických oblastí. Převzato z Qin et al., 2009.

Umlčování genů je tedy komplexní proces, na kterém se podílí mnoho histonových modifikací. Plné pochopení souhry těchto modifikací je výzkumným úkolem do budoucna.

### 2.1.5 Methylnace H3K4

Methylnaci H3K4 zprostředkuje HMT Set1, která je součástí multipodjednotkového komplexu nazvaného COMPASS (Complex of proteins associated with Set1; Roguev et al., 2001, Miller et al., 2001). COMPASS se skládá z podjednotek Set1, Swd1 (Cps50), Swd2 (Cps35), Swd3 (Cps30), Bre2 (Cps60), Sdc1 (Cps25) a Spp1 (Cps40), jak je znázorněno na obrázku 2.7.



**Obr. 2.7 Podjednotky komplexu COMPASS.** Převzato z Vitaliano-Prunier et al., 2008, upraveno.

Methylace H3K4 může být realizována jako mono-, di- i trimethylace. Trimethylace H3K4 je charakteristická hlavně pro promotor a 5' oblast aktivně transkribovaných genů, dimethylace je charakteristická pro střední část a monomethylace pro 3' oblast aktivně transkribovaných genů (Pokholok et al, 2005). Methylace může být z histonů také odstraněna, specifickou demethylázou pro všechny stupně methylace H3K4 je protein Kdm5 (Jhd2) (Ingvarsdottir et al., 2007, Liang et al., 2007).

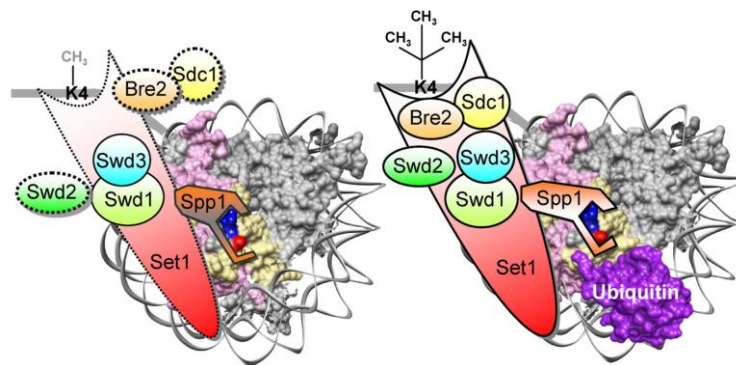
U kvasinky *S. cerevisiae* methylace H3K4 ovlivňuje různé procesy. Mezi tyto procesy patří elongace transkripce, umlčování telomerických oblastí, oblastí kódujících rDNA a lokusy *HM*, dále opravy DNA při vzniku dvojřetězcových zlomů a meiotická rekombinace (shrnutí v Dehé and Géli, 2006). Role methylace H3K4 při umlčování genů byla už naznačena v kapitole 2.1.4.2. Vliv methylace H3K4 na elongaci transkripce bude popsán v kapitole 2.1.5.2.

### 2.1.5.1 Faktory ovlivňující di- a trimethylaci H3K4

HMT Set1 je sama o sobě schopna pouze monometylovat H3K4, k di- a trimethylaci jsou důležité další podjednotky komplexu COMPASS, hlavně podjednotky Spp1, Bre2, Sdc1 a Swd2 (Schneider et al., 2005, Lee et al., 2007, Morillon et al., 2005).

Vznik di- a trimethylace H3K4 ovlivňují ještě další faktory. Asi nejvíce studovaný je vliv ubiquitinylace H2BK123. U kmenů s delecí genů *RAD6* a *BRE1* nebo u mutant s neubiquitinylovatelnou formou H2B (mutanta H2BK123R – Robzyk et al., 2000) dochází k výrazné redukci di- a trimethylace H3K4 (Schneider et al., 2005, Shahbazian et al., 2005), zatímco úroveň monomethylace ovlivněna není (Dehé et al., 2005). Výsledky studií zabývající se mechanismem vlivu ubiquitinylace H2BK123 na di- a trimethylaci

H3K4 však zatím poskytují nejednoznačné výsledky. Zdá se, že pro propojení ubiquitinylace H2BK123 s vícenásobnou methylací H3K4 jsou důležité podjednotky komplexu COMPASS Swd2 a Spp1 (Lee et al., 2007, Vitaliano-Prunier et al., 2008, Takahashi et al., 2009). Nejnovější model vlivu ubiquitinylace H2BK123 na vznik vícenásobné methylace H3K4 je znázorněn na obrázku 2.8 (Chandrasekharan et al., 2010).



**Obr. 2.8 Model zapojení ubiquitinylace H2BK123 při vícenásobné methylaci H3K4.** Komplex COMPASS interaguje přes podjednotku Spp1 se zbytky H2BR119 a H2BT122 (znázorněny modře a červeně). V případě, že H2BK123 není ubiquitinylován, dochází k oslabení interakcí podjednotek Swd2, Bre2 a Sdc1 s komplexem COMPASS (na obrázku vlevo, znázorněno přerušovanou čarou) a COMPASS není schopen vícenásobné methylace H3K4. Ubiquitinylace H2BK123 mění interakci komplexu COMPASS s nukleosomy, podjednotky Swd2, Bre2 a Sdc1 jsou asociovány stabilněji a dochází k di- a trimethylaci H3K4 (vpravo). Převzato z Chandrasekharan et al., 2010.

Model vychází z nálezu, že komplex COMPASS interaguje prostřednictvím podjednotky Spp1 s aminokyselinovými zbytky Arg119 a Thr122 na H2B bez ohledu na to, zda je H2BK123 ubiquitinylován. Pokud je H2BK123 bez ubiquitinylace, některé komponenty komplexu COMPASS, jako Swd2, Bre2 a Sdc1 (na obrázku vlevo, znázorněno přerušovanou čarou), jsou asociovány pouze slabě, takže COMPASS není schopen vícenásobné methylace. Po ubiquitinylaci H2BK123 se nějakým způsobem změní způsob asociace komplexu COMPASS s nukleosomy, podjednotky jsou asociovány silněji a to umožňuje vznik di- a trimethylace H3K4 (na obrázku vpravo) (Chandrasekharan et al., 2010).

Bylo také zjištěno, že ubiquitinylace H2BK123 stabilizuje interakci mezi histony H2A a H2B (Chandrasekharan et al., 2009) a že N-konec histonu H2A je důležitý pro vznik vícenásobné methylace H3K4 zřejmě tím, že ovlivňuje inkorporaci podjednotky Swd2 do komplexu COMPASS (Zheng et al., 2010). Ubiquitinylace H2BK123 tedy zřejmě napomáhá vytvoření určité platformy, která je nutná pro vyvázání, správnou

asociaci a konformaci podjednotek komplexu COMPASS, takže ten je poté schopen di- a trimethylace H3K4.

Rovněž některé další zbytky na nukleosomech ovlivňují vznik vícenásobné methylace H3K4. Na histonu H3 je to Arg2 (Kirmizis et al., 2007, Nakanishi et al., 2008). Dimethylace argininu 2 na histonu H3 ovlivňuje trimethylaci H3K4 negativním způsobem. Tato modifikace je charakteristická pro transkripčně neaktivní oblasti a vznik trimethylace H3K4 zřejmě inhibuje tak, že znemožňuje vazbu podjednotky Spp1 ke komplexu COMPASS (Kirmizis et al., 2007).

Další proteiny, které ovlivňují vícenásobnou methylaci H3K4 tím, že participují na propojení methylace H3K4 s ubiquitinyací H2BK123, jsou proteazomální ATPázy Rpt4 a Rpt6 (Ezhkova and Tansey, 2004) a komplex Ccr4-Not (Laribee et al., 2007, Mulder et al., 2007). Jejich způsob zapojení do tohoto procesu však zůstává blíže neobjasněný.

#### **2.1.5.2 Fyziologická role methylace H3K4**

Methylace H3K4 může být rozpoznávána různými proteiny, čímž dochází k vyvazování těchto proteinů k aktivně transkribovaným genům. Methylace je rozpoznávána několika doménami - chromodoménou, tudor doménou a PHD prsty (shrnuto v Taverna et al., 2007). Proteiny navíc mohou specificky rozpoznávat mono-, di- a trimethylaci H3K4, různý stupeň methylace proto vede k vyvazování různých faktorů.

S trimethylovaným H3K4 interaguje prostřednictvím domény PHD protein Yng1, který je součástí histonacetyltransferázového (HAT) komplexu NuA3. Tato interakce vede k vyvázání komplexu NuA3 do 5' oblastí transkribovaných genů a k acetylaci histonu H3 na lysinu 14 (Taverna et al., 2006). Methylovaný H3K4 také pomáhá stabilizovat interakci HAT komplexu NuA4 s nukleosomy, což vede k účinné acetylaci histonu H4 (Ginsburg et al., 2009). Di- a trimethylace H3K4 dále pomáhá vyvazovat enzym Isw1, který se účastní remodelace chromatinu (Santos-Rosa et al., 2003). Všechny tyto události podporují průběh elongace transkripce (Taverna et al., 2006, Ginsburg et al., 2009, Santos-Rosa et al., 2003).

Dimethylace H3K4, která se na transkribovaných genech vyskytuje v oblastech dále od promotoru (Pokholok et al., 2005), váže prostřednictvím podjednotky Set3, která

obsahuje doménu PHD, komplex obsahující histondeacetylázy (HDAC) Hos2 a Hst1. Tento komplex deacetyluje histony H3 a H4. Tato deacetylace však také působí na transkripci pozitivně (Kim and Buratowski, 2009). Různý stupeň methylace v různých oblastech transkribovaných genů tedy různě ovlivňuje dynamiku acetylace. V promotorech a v 5' oblastech transkribovaných genů, pro které je charakteristická H3K4me3 (Pokholok et al., 2005), může být acetylace vyžadována pro otevírání chromatinu, čímž je usnadněno vyvazování obecných transkripčních faktorů. V oblastech dále od promotoru, pro které je charakteristická H3K4me2 (Pokholok et al., 2005), je naopak pro správný průběh elongace transkripce vyžadována deacetylace histonů. Tato deacetylace může vést k represí transkripce z kryptických aktivačních sekvencí, analogicky jako v případě dráhy Set2/Rpd3S (viz kapitola 2.1.6.2; Kim and Buratowski, 2009).

Výzkum na savčích buňkách ukázal, že na trimethylovaný H3K4 se váže protein CHD1 a prostřednictvím CHD1 je potom vyvazována malá jaderná ribonukleoproteinová partikule U2 (U2 snRNP), která patří mezi komplexy sestřihující pre-mRNA (Sims et al., 2007). Zda dochází k interakci mezi trimethylovaným H3K4 a kvasinkovým homologem Chd1, bylo předmětem několika studií, výsledky těchto studií si však odporují (Pray-Grant et al., 2005, Sims et al., 2005). U savců byla také prokázána interakce mezi trimethylovaným H3K4 a podjednotkou TAF3 obecného transkripčního faktoru TFIID (Vermeulen et al., 2007), což dále ukazuje na zapojení trimethylace H3K4 do regulace transkripce.

### 2.1.6 **Methylace H3K36**

Methylace H3K36 je také spojována s aktivní transkripcí (Schübeler et al., 2004, Pokholok et al., 2005). Stejně jako methylace H3K4, i methylace H3K36 probíhá do všech tří stupňů a všechny stupně methylace jsou zprostředkovány HMT Set2 (Strahl et al., 2002). Di- a trimethylace H3K36 jsou charakteristické pro střední a 3' oblasti transkribovaných genů (Rao et al., 2005, Pokholok et al., 2005).



### **2.1.6.1 Vznik di- a trimethylace H3K36**

Pro vznik di- a trimethylace H3K36 jsou důležité různé faktory. Pro dimethylaci H3K36 je nutný N-konec HMT Set2, který obsahuje doménu SET (Youdell et al., 2008).

Pro trimethylaci H3K36 jsou nutné komplex Bur1-Bur2 (Chu et al., 2006), CTD Pol II a kináza Ctk1 (Youdell et al., 2008). Požadavek CTD Pol II a Ctk1 specificky pro trimethylaci H3K36 je v rozporu s dosavadní představou, že CTD fosforylovaná na Ser2 kinázou Ctk1 je nutná pro vyvázání HMT Set2 a obecně pro methylaci H3K36 (shrnuto ve Fuchs et al., 2009). Pro potvrzení této specifity však budou potřeba další studie. Na vzniku H3K36me3 také participují některé podjednotky komplexu PAF (viz kapitola 2.1.3.3, Chu et al., 2007).

Vznik H3K36me3 podporují také chaperony Spt6 a Asf1 (Youdell et al., 2008, Lin et al., 2010). Tyto chaperony se podílejí na organizaci chromatinové struktury na transkribovaných genech a jejich funkce je specifická vůči histonům H3 a H4 (Bortwin and Winston, 1996, Kaplan et al., 2003, English et al., 2006, Natsume et al., 2007, Sharp et al., 2001). Role Spt6 spočívá zřejmě v ovlivnění struktury chromatinového templátu, neboť chromatin izolovaný z buněk s některými mutacemi genu *SPT6* nebyl v *in vitro* testu schopen podstoupit H3K36me3. Nelze ale také vyloučit možnost, že Spt6 je nezbytný pro transkripci nějakého dosud neznámého faktoru, který ovlivňuje trimethylační aktivitu Set2 (Youdell et al., 2008).

Asf1 zřejmě podporuje vyvazování HMT Set2 k transkribovaným genům. K vícenásobné methylaci H3K36 je potřeba H4K44 (Du et al., 2008). Oblast zahrnující H4K44 je částečně kryta histony H2A a H2B, Set2 se proto může vázat zřejmě až na nukleosomy po odstranění H2A/H2B (Du et al., 2008). Asf1 se váže na dimer H3/H4 způsobem, který znemožňuje asociaci dimeru H2A/H2B s nukleosomem a oblast H4K44 tak zůstává odkryta (English et al., 2006, Natsume et al., 2007). Tímto způsobem zřejmě Asf1 umožňuje asociaci Set2 s nukleosomy (Lin et al., 2010). Proč však Asf1 ovlivňuje specificky H3K36me3, není známo.

### **2.1.6.2 Fyziologická role methylace H3K36**

Vzhledem k tomu, že vznik di- a trimethylace H3K36 je řízen odlišně, má di- a trimethylace H3K36 zřejmě rozdílné funkce. Tuto možnost podporuje zjištění, že

přítomnost H3K36me2 koreluje s tím, zda je gen exprimován nebo ne, ale nekoreluje s frekvencí transkripce (Rao et al., 2005). Naproti tomu přítomnost H3K36me3 koreluje se silnou genovou expresí (Pokholok et al., 2005).

Zajímavý je fakt, že delece genu *SET2* a některých podjednotek komplexu Rpd3S, stejně jako mutace v H3K36, která znemožnila metylaci v tomto místě, zvrátily těžký růstový defekt, který vykazují buňky s delecí genu *BUR1* (Keogh et al., 2005). Rpd3S je HDAC komplex, který prostřednictvím svých podjednotek Eaf3 a Rco1 interaguje s chromatinem methylovaným na H3K36 (Li et al., 2007, Carrozza et al., 2005, Joshi and Struhl, 2005, Keogh et al., 2005). Komplex Rpd3S poté deacetyluje histony za elongující Pol II a tato deacetylace zabraňuje iniciaci transkripce z kryptických aktivačních sekvencí (Carrozza et al., 2005, Joshi and Struhl, 2005, Keogh et al., 2005). Tímto způsobem tato dráha označovaná jako Set2/Rpd3S ustavuje určitý transkripční blok, k jehož překonání je zřejmě vyžadován komplex Bur1-Bur2 (Keogh et al., 2005). Podle dosavadního modelu byl komplex Rpd3S vyvazován do 3' oblastí transkribovaných genů prostřednictvím H3K36me3 (Carrozza et al., 2005, Joshi and Struhl, 2005, Keogh et al., 2005). Nové studie však ukázaly, že pro funkci komplexu Rpd3S je dostatečná H3K36me2 (Youdell et al., 2008, Li et al., 2009) a tato dimethylace je spíše než k vyvazování, kterou zajišťuje fosforylovaná CTD Pol II, nutná k aktivaci deacetylázové aktivity (Drouin et al., 2010).

Kromě dráhy Set2/Rpd3S methylace H3K36 ovlivňuje také umlčování genů (Tompa and Madhani, 2007) a replikaci DNA (Pryde et al., 2009).

### 2.1.7 Methylace H3K79

Methylace H3K79 je chromatinovou modifikací, která je stejně jako předchozí dvě methylace také spojována s aktivní transkripcí (Schübeler et al., 2004, Pokholok et al., 2005). Všechny stupně methylace H3K79 jsou zprostředkovány HMT Dot1, která je mezi HMT výjimečná v tom, že jde o HMT bez domény SET a methyluje zbytek, který se nachází na povrchu globulární domény histonu H3, ne na jeho N-konci (van Leeuwen et al., 2002, Feng et al., 2002).

Pro zprostředkování methylace H3K79 je nutná interakce mezi kyselou oblastí na C-konci HMT Dot1 a bazickou oblastí na N-konci histonu H4. Znemožnění této interakce vedlo k vymizení všech forem methylace H3K79 (Fingerman et al., 2007, Altaf et al.,

2007, Oh et al., 2010). Pro vznik di- a trimethylace H3K79 je navíc nezbytná ještě ubiquitinylace H2BK123 (Shahbazian et al., 2005, Ng et al., 2002b). Dot1 obsahuje v N-koncové doméně zbytky 101 – 140, které jsou odpovědné za rozeznání této ubiquitinylace (Oh et al., 2010). Podle modelu navrženého v nejnovější studii se Dot1 váže na nukleosomy, dojde k rozpoznání bazické oblasti na histonu H4 a tím je umožněn vznik monomethylace H3K79. V přítomnosti ubiquitinylace H2BK123 je umožněn vznik methylace H3K79 i do dalších stupňů (Oh et al., 2010). Jakým způsobem však ubiquitinylace H2BK123 mění methylační aktivitu Dot1 vůči svému substrátu, není známo.

HMT Dot1 a jí zprostředkovaná methylace H3K79 také negativně ovlivňuje umlčování heterochromatických oblastí (mechanismem naznačeným v kapitole 2.1.4.2), dále participuje při odpovědi na poškození DNA a reguluje průchod meiózou (Ng 2002a, van Leeuwen et al., 2002, San-Segundo and Roeder, 2000, Wysocki et al., 2005, Giannattasio et al., 2005).

Na rozdíl od předchozích typů methylací se však zdá, že mono-, di- a trimethylace H3K79 nemají, alespoň na umlčování genů, rozdílný vliv (Frederiks et al., 2008). Tato myšlenka je také podpořena nálezem, že všechny tři formy methylace na genomu kolokalizují (Shahbazian et al., 2005) a Dot1 je spíše enzymem distributivním než procesivním, což znamená, že v jedné reakci je schopen připojit pouze jednu methylovou skupinu (Frederiks et al., 2008). Mono- a dimethylace jsou tedy zřejmě pouze intermediáty vzniku trimethylace H3K79.

### 2.1.8 Souhrn procesů probíhajících při elongaci transkripce

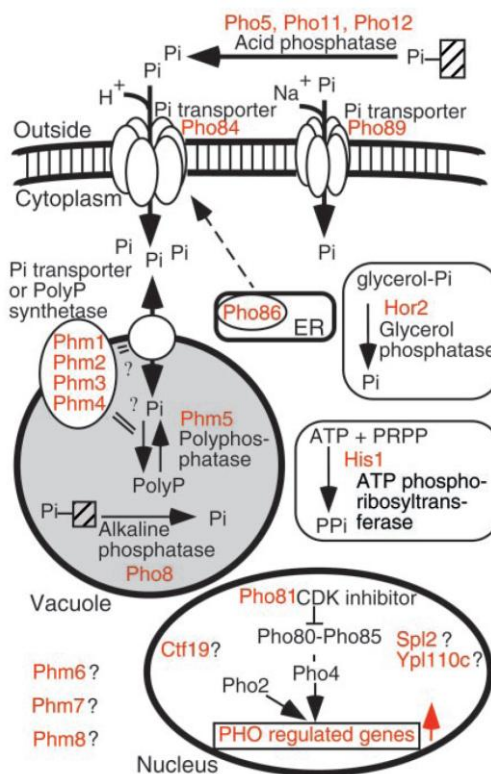
Na regulaci elongační fáze transkripce participuje mnoho faktorů. Důležitým regulačním uzlem je Pol II, jejíž CTD, která může být na různých místech fosforylována, slouží jako platforma pro vyvazování dalších efektorů participujících na elongační fázi transkripce. Základní kaskáda dějů zahrnuje vyvázání komplexu Bur1-Bur2, který participuje na vyvázání komplexu PAF. Komplex PAF je dále nutný pro vyvázání komplexů Rad6-Bre1-Lge1 a COMPASS, které zprostředkují chromatinové modifikace H2BK123 a H3K4. Ubiquitinylace H2BK123 zprostředkovaná komplexem Rad6-Bre1-Lge1 je do určité míry nadřazena methylacím H3K4 a H3K79, protože ovlivňuje vznik vyšších stupňů methylace těchto zbytků. Další důležitou modifikací je

methylace H3K36, jejíž vznik sice nezávisí na ubiquitylaci H2BK123, ale závisí na mnoha jiných faktorech spojených s elongační fází transkripce. Každá z těchto modifikací ovlivňuje kromě elongační fáze transkripce i další děje související s DNA, například umlčování genů, opravy DNA nebo replikaci. Odhalení dopadu všech těchto procesů na regulaci exprese genetické informace zůstává velkou výzvou molekulární biologie.

## 2.2 Geny dráhy PHO

Anorganický fosfát je pro všechny organismy esenciální živinou. Je nezbytný pro biosyntézu nukleových kyselin a buněčných membrán a účastní se také energetického metabolismu. Organismy přijímají živiny, včetně fosfátu, z vnějšího prostředí. Musely proto vyvinout mechanismus, jak regulovat jeho příjem, uskladňování a uvolňování, aby mohly reagovat na změny v jeho dostupnosti a aby se s těmito změnami mohly vypořádat (Torriani-Gorini et al., 1994).

V kvasince *S. cerevisiae* jsou za regulaci fosfátového metabolismu odpovědné proteinové produkty genů dráhy PHO. Tyto geny kódují například vysokoafinitní fosfátové transportéry *PHO84* a *PHO89* (Bun-Ya et al., 1991, Martinez and Persson, 1998), sekretované kyselé fosfatázy *PHO5*, *PHO11* a *PHO12* (Toh-e and Kakimoto, 1975, de Steensma et al., 1989) a enzymy důležité pro vznik intracelulárních polyfosfátových zásob *PHM1 – 4* (*VTC1 – 4*) (Cohen et al., 1999, Ogawa et al., 2000) (viz obr. 2.9, shrnuto v Persson et al., 2003).

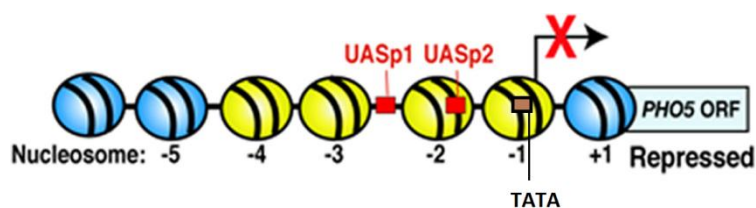


Obr. 2.9 Schéma regulace genů fosfátového metabolismu u kvasinky *S. cerevisiae*. Převzato z Ogawa et al., 2000.

Expresí těchto genů je pod kontrolou nejméně pěti faktorů. Jsou to transkripční faktory Pho2 a Pho4, dále komplex CDK Pho85 a cyklinu Pho80 a inhibitor CDK Pho81. Za situace, kdy má buňka dostatek fosfátu, je komplex Pho85-Pho80 aktivní a fosforyluje transkripční faktor Pho4 (Kaffman et al., 1994). Pro regulaci funkce Pho4 je důležitá hlavně fosforylace čtyř serinů (O'Neill et al., 1996). Fosforylace serinu v oblastech 2 a 3 usnadňuje export Pho4 z jádra (Kaffman et al., 1998a), fosforylace v oblasti 4 inhibuje jeho návrat zpět do jádra (Kaffman et al., 1998b) a fosforylace v oblasti 6 zabraňuje jeho interakci s transkripčním faktorem Pho2 (Komeili and O'Shea, 1999). To vše vede k represí transkripce genů dráhy PHO. V případě, že má buňka nedostatek fosfátu, inhibitor Pho81 inhibuje komplex Pho85-Pho80 (Schneider et al., 1994). Transkripční faktor Pho4 není nefosforylován a zůstává v jádře, kde interaguje s transkripčním faktorem Pho2. Společně se váží do promotorové oblasti a výsledkem je indukce exprese genů dráhy PHO (O'Neill et al., 1996, Barbaric et al., 1996, Kaffman et al., 1998a, Kaffman et al., 1998b).

### 2.2.1 Struktura promotoru a regulace transkripce genu *PHO5*

Ztráta nukleosomů z promotorů genů je obecná charakteristika aktivace transkripce u eukaryot (Boeger et al., 2003, Lee et al., 2004). Promotor genu *PHO5* se stal klasickým modelem pro studium změn ve struktuře chromatinu v závislosti na transkripčním stavu (aktivovaný vs. neaktivovaný) (Almer et al., 1986). V represivních podmínkách (v mediu s fosfátem) se v promotoru genu *PHO5* nacházejí čtyři přesně situované nukleosomy. Tyto nukleosomy se označují N-1, N-2, N-3 a N-4 (viz obr. 2.10). Nukleosom N-1 zakrývá TATA box a nukleosom N-2 zakrývá tzv. UASp2, což je jedno ze dvou míst pro vazbu transkripčního faktoru Pho4 (Svaren and Hörz, 1995). Další místo pro vazbu Pho4, UASp1, se nachází mezi nukleosomy N-2 a N-3.



**Obr. 2.10 Promotor genu *PHO5* v reprimujících podmínkách.** Žlutě jsou označeny nukleosomy N-1, N-2, N-3 a N-4. Místa UASp1 a UASp2 jsou znázorněna červenými obdélníky. Hnědý obdélník označuje TATA box. Převzato z Adkins et al., 2004, upraveno.

Po indukci transkripce (po přenosu do media bez fosfátu nebo se sníženou koncentrací fosfátu) je umožněn vstup transkripčního faktoru Pho4 do jádra. Pho4 interaguje s transkripčním faktorem Pho2, který usnadňuje jeho vazbu na UASp1 na promotoru genu *PHO5* (Barbaric et al., 1996), a indukuje odstranění nukleosomů z promotoru (Boeger et al., 2003, Reinke and Hörz, 2003, Adkins et al., 2004). Odstranění nukleosomů umožňuje vazbu Pho4 i na místo UASp2, které je jinak nepřístupné kvůli nukleosomu N-2 (Mao et al., 2011), což zvyšuje histon remodelační aktivitu na promotoru *PHO5*. Odstranění nukleosomů je klíčový prvek pro vyvázání obecných transkripčních faktorů, které jinak nukleosomy znemožňují (Adkins et al., 2007). Na vyvázání obecných transkripčních faktorů se podílí i Pho4 tím, že do promotoru přitahuje TATA-vazebný protein (TBP; Mao et al., 2011).

Při represi transkripce naopak dochází k depozici nukleosomů na promotoru. Za depozici je odpovědný histon chaperon Spt6 (Adkins and Tyler, 2006). Přítomnost nukleosomů kompetuje s vazbou obecných transkripčních faktorů, což postupně vede k utišení exprese genu *PHO5*.

### **2.2.1.1 Faktory remodelující chromatin během indukce genu *PHO5***

Na odstranění nukleosomů z promotoru genu *PHO5* jako důsledek vyvázání Pho4 se podílejí ATP-dependentní komplexy remodelující chromatin, chaperony specifické vůči histonům a faktory modifikující chromatin. Ze skupiny ATP-dependentních komplexů remodelujících chromatin jsou to SWI/SNF a Ino80 (Steger et al., 2003, Barbaric et al., 2007). Z chaperonů specifických vůči histonům jsou to Asf1 a FACT, které z promotoru genu *PHO5* odstraňují tetramery H3/H4 respektive dimery H2A/H2B (Ransom et al., 2009, Williams et al., 2008, Adkins et al., 2004, Korber et al., 2006, Tyler et al., 1999), a z faktorů modifikujících chromatin je to HAT komplex SAGA (Barbaric et al., 2001, Barbaric et al., 2003, Reinke and Hörz, 2003). Tento komplex však přispívá k otvírání chromatinové struktury genu *PHO5* více mechanismy, než jen svojí HAT aktivitou, za kterou je odpovědná podjednotka Gcn5 (Barbaric et al., 2003).

Delece *SNF2*, *INO80*, *ASF1* a *GCN5* v plně indukujících podmínkách (v mediu bez fosfátu) však pouze zpozdí expresi genu *PHO5*. Tyto faktory zřejmě působí v překrývajících se, ale do určité míry oddělených drahách, protože dvojitě mutace ještě více zpozdí expresi v podmínkách maximální indukce (Barbaric et al., 2007). Zajímavé je

zjištění, že na rozdíl od genu *PHO5* je indukce exprese genu *PHO8* striktně závislá na faktorech Gcn5 a Snf2 (Gregory et al., 1999). Tato rozdílnost zřejmě souvisí s vnitřní stabilitou nukleosomů v promotorech těchto genů. Promotor genu *PHO8* obsahuje nukleosomy s větší vnitřní stabilitou než promotor genu *PHO5* a to vede k větším požadavkům na remodelační faktory (Hertel et al., 2005).

Na všech výše zmíněných faktorech se promotor genu *PHO5* stává závislý až v podmínkách submaximální indukce (medium s malým množstvím fosfátu, např. 0,15 mM) (Korber et al., 2006, Dhasarathy and Kladde, 2005, Barbaric et al., 2007). Zvýšené požadavky na tyto faktory mohou být způsobeny sníženým množstvím transkripčního faktoru Pho4 asociovaného s promotorem genu *PHO5* v submaximálních indukčních podmínkách (Dhasarathy and Kladde, 2005, Springer et al., 2003).

### **2.2.1.2 Modifikace chromatinu a exprese genu *PHO5***

Jak bylo naznačeno výše, důležitou úlohu při otevírání chromatinové struktury promotoru genu *PHO5* během indukce má acetylace histonů (Barbaric et al., 2001, Barbaric et al., 2003, Reinke and Hörz, 2003, Nourani et al., 2004, Williams et al., 2008). Už v represivních podmínkách je do promotoru tohoto genu transkripčním faktorem Pho2 vyvazován HAT komplex NuA4 (Nourani et al., 2004), který acetyluje N-konec histonu H4 (Allard et al., 1999). Komplex NuA4 je pro indukci exprese genu *PHO5* absolutně nezbytný. Předpokládá se, že acetylace ustavená tímto komplexem připravuje promotor na remodelaci chromatinu a tím usnadňuje aktivaci při indukci. Mechanismus, jakým tento komplex připravuje chromatin na remodelaci, může být dvojitý. Hyperacetylace chromatinu tímto komplexem umožňuje vazbu Pho4 na DNA (bylo pozorováno, že Pho4 není schopen se vázat na promotor bez funkčního komplexu NuA4), nebo acetylace slouží jako značka pro vyvázání ATP-dependentních komplexů remodelujících chromatin (Nourani et al., 2004).

V průběhu indukce je po vazbě Pho4 do promotoru genu *PHO5* vyvazován komplex SAGA, jehož HAT podjednotka Gcn5 acetyluje N-konec histonu H3 (Barbaric et al., 2003, Zhang et al., 1998, Ruiz-García et al., 1997). Histony s acetylovaným N-koncem histonu H3 jsou brzy po indukci z promotoru odstraněny (Reinke and Hörz, 2003). Tato acetylace tedy přímo přispívá k otevírání chromatinové struktury (Barbaric et al., 2003).



Histon H3 je kromě N-konce acetylován také v globulární doméně na lysinu 56 (H3K56). HAT specifickou pro tento zbytek je Rtt109 a ke své funkci vyžaduje také histon chaperony Asf1 a Vps75 (Driscoll et al., 2007, Han et al., 2007, Collins et al., 2007, Tsubota et al., 2007). Acetylace tohoto zbytku zřejmě přispívá k destabilizaci nukleosomů a to usnadňuje otvírání chromatinu během indukce genu *PHO5* (Willimas et al., 2008).

Methylace H3K4 je spojována převážně s aktivně transkribovanými geny. V neidukčních podmínkách však pomáhá transkripci genu *PHO5* a některých dalších genů reprimovat. Delece genu *SET1*, který kóduje HMT zprostředkovávající tuto metylaci, vedla k derepresi transkripce těchto genů v represivních podmínkách (Carvin and Kladdé, 2004, Wang et al., 2011). Způsob, jakým Set1 prostřednictvím methylace H3K4 inhibuje expresi genu *PHO5*, souvisí s regulací acetylace histonu H3. Methylace H3K4 vyvazuje do promotoru genu *PHO5* HDAC komplex Rpd3L, který deacetyluje N-konce histonu H3. Deacetylace zabraňuje odstranění nukleosomů z promotoru genu *PHO5* a tím je transkripce inhibována (Wang et al., 2011).

Jakým způsobem H3K4me v promotoru inhibovaného genu *PHO5* vzniká, však zůstává otázkou. Bylo ukázáno, že kryptická transkripce probíhající na lokusu genů *GALI-GAL10* v represivních podmínkách vede ke vzniku H3K4me2 a H3K4me3 v promotorech těchto genů. Tyto modifikace vedou k vyvázání HDAC komplexu Rpd3S do oblasti promotorů a tím dochází k umlčení exprese genů *GALI-GAL10* v represivních podmínkách (Pinskaya et al., 2009). Ačkoliv pro gen *PHO5* byl také prokázán vznik kryptického transkriptu v represivních podmínkách, nebylo prokázáno, že by ovlivňoval vzorec H3K4me (Uhler et al., 2007). V případě genu *PHO5* tedy kryptická transkripce zřejmě není příčinou vzniku H3K4me v promotoru. Rovněž bylo ukázáno, že inhibice exprese genu *PHO5* závisí na HDAC komplexu Rpd3L a ne na Rpd3S (Wang et al., 2011). Role nekódujícího transkriptu nebyla zatím objasněna. Na základě dosavadního výzkumu se však zdá, že spíše přispívá k aktivaci transkripce než k její inhibici (Uhler et al., 2007).

## 2.2.2 Regulace transkripce genu *PHO84* a struktura promotoru

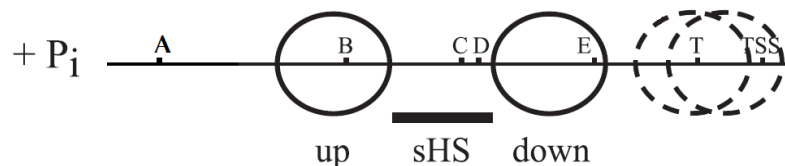
### 2.2.2.1 Indukce transkripce genu *PHO84* ve srovnání s genem *PHO5*

Gen *PHO84* a okolnosti vedoucí k indukci transkripce tohoto genu nejsou tak dobře prostudovány jako v případě genu *PHO5*. Indukce exprese genu *PHO84* je dosahováno v mediu s vyšší koncentrací fosfátu než je tomu v případě genu *PHO5* (Springer et al., 2003). Gen *PHO84* je dokonce částečně exprimován i v bohatém mediu, které obsahuje limitující množství fosfátu, zatímco gen *PHO5* není (Duina and Winston, 2004, Neef and Kladde, 2003).

Za těmito rozdílnostmi stojí různá odpověď promotorů těchto genů na různou fosforylaci transkripčního faktoru Pho4. V případě, kdy je buňka v mediu s vysokou koncentrací fosfátu, je komplex Pho85-Pho80 plně aktivní, Pho4 je fosforylován na všech čtyřech důležitých serinech (O'Neill et al., 1996), je odstraněn z jádra a transkripce všech genů dráhy PHO je inhibována. V případě, kdy je buňka v mediu bez fosfátu, je komplex Pho85-Pho80 neaktivní, Pho4 není fosforylován vůbec, je umožněn jeho vstup do jádra a tam spouští expresi všech genů dráhy PHO. V prostředí s intermediární koncentrací fosfátu, např. 0,15 mM, je komplex Pho85-Pho80 aktivní jen částečně. Za těchto podmínek je transkripční faktor Pho4 fosforylován jen na serinech v některých oblastech. Je sice umožněn jeho vstup do jádra, ale v této formě je schopen vázat se do promotoru a tedy aktivovat transkripci pouze u některých genů, například *PHO84*, zatímco u jiných genů, například *PHO5*, nikoli (Springer et al., 2003). Indukce genu *PHO84* je také rychlejší než indukce genu *PHO5*. Aby se buňka lépe vyrovnala s výkyvy extracelulární koncentrace fosfátu, vytváří si jeho vnitřní zásoby ve formě polyfosfátu. Po přenosu do prostředí s nízkým obsahem fosfátu jsou potřeby buňky po určitý čas kryty z těchto zásob, aktivita komplexu Pho85-Pho80 je tak po určitou dobu zachována. Jak jsou vnitřní zásoby polyfosfátu vyčerpávány, aktivita komplexu Pho85-Pho80 se postupně snižuje a z důvodů vysvětlených výše promotor genu *PHO84* odpovídá dříve než promotor genu *PHO5*. V případě, kdy byla znemožněna tvorba polyfosfátových zásob, byly oba geny exprimovány se stejnou kinetikou (Thomas and O'Shea, 2005).

### 2.2.2.2 Struktura promotoru genu *PHO84*

Struktura promotoru genu *PHO84* je schematicky znázorněna na obrázku 2.11. V represivních podmínkách (v mediu s fosfátem) se v promotoru nacházejí dva přesně situované nukleosomy označované jako „up“ a „down“ oddělené krátkou oblastí hypersenzitivní k působení DNázy (oblast sHS; short hypersensitive region). V oblasti TATA boxu se nachází polootevřená méně organizovaná chromatinová struktura (Wippo et al., 2009). V oblasti sHS se nacházejí dvě vysokoafinitní místa pro vazbu transkripčního faktoru Pho4 označovaná jako UASpC a UASpD. Nukleosomy „up“ a „down“ zakrývají nízkoafinitní místa vazby Pho4 UASpB respektive UASpE. Poslední místo pro vazbu Pho4, UASpA, se nachází v oblasti ještě dále od místa začátku transkripce (Ogawa et al., 1995).



**Obr. 2.11 Promotor genu *PHO84* v reprimujících podmínkách.** Plné kruhy označují dva přesně situované nukleosomy označované „up“ a „down“. Mezi nimi je znázorněna krátká oblast hypersenzitivní k působení DNázy (sHS, short hypersensitive region). Kruhy vyznačené přerušovanou čarou znázorňují polootevřenou méně organizovanou chromatinovou strukturu. Písmena A, B, C, D a E označují UASpA, UASpB, UASpC, UASpD a UASpE. Písmeno T označuje TATA box a TSS označuje místo startu transkripce (transcription start site). Převzato z Wippo et al., 2009, upraveno.

V indukujících podmínkách také dochází k odstranění nukleosomů z oblasti promotoru genu *PHO84*, odstranění je opět závislé na přítomnosti transkripčního faktoru Pho4 (Wippo et al., 2009). Zdá se, že pro dosažení plné transkripční aktivity je důležitější remodelace nukleosomu „down“. Tento nukleosom zakrývá místo vazby Pho4 UASpE, jehož celistvost je, hlavně v kombinaci s místy UASpC nebo UASpD, nezbytná pro plnou indukci genu *PHO84*. Místa UASpA a UASpB nebyla pro plnou aktivitu genu *PHO84* vyžadována (Ogawa et al., 1995, Wippo et al., 2009).

### 2.2.2.3 *Faktory remodelující chromatin během indukce genu PHO84*

Indukce exprese genu *PHO84*, stejně jako v případě *PHO5*, také závisí na komplexech SWI/SNF, SAGA, Ino80 a HAT Rtt109 (Lee et al. 2000, Shukla et al., 2006a, Shukla et al., 2006b, Duina et al., 2004, Jónsson et al., 2004, Steger et al., 2003, Wippo et al., 2009). Delece genů *SNF2*, *GCN5* a *INO80*, které kódují podjednotky těchto komplexů, stejně jako delece *RTT109*, však také pouze expresi zpožďovaly, neměly vliv na konečnou úroveň indukce. Zajímavé však bylo zjištění, že vliv těchto faktorů na odstranění nukleosomů „up“ a „down“ je různý (Wippo et al., 2009).

Odstranění nukleosomu „down“ nebylo na těchto faktorech striktně závislé, při deleci jednotlivých genů a dokonce i při dvojitých delecích *SNF2 INO80* a *SNF2 GCN5* byla pouze ovlivněna kinetika odstranění nukleosomu „down“. Vliv dvojitých mutací se projevil větším zpožděním exprese ve srovnání s jednoduchými delecemi, tyto faktory tedy stejně jako v případě genu *PHO5* působí v oddělených drahách a jsou vzájemně zastupitelné. Nukleosom „down“ tedy svými vlastnostmi připomíná nukleosomy v promotoru genu *PHO5* (Wippo et al., 2009).

Odstranění nukleosomu „up“ striktně záviselo na faktoru Snf2 a v podmínkách submaximální indukce se také stalo závislé na Ino80. Touto vlastností nukleosom „up“ připomíná nukleosomy v promotoru genu *PHO8* (Wippo et al., 2009).

Rozdílné požadavky na remodelační faktory nukleosomů „up“ a „down“ stejně jako v případě nukleosomů v promotorech genů *PHO5* a *PHO8* korelují s jejich rozdílnou vnitřní stabilitou. Nukleosom „up“ vykazuje vyšší vnitřní stabilitu a jeho remodelace je proto závislá na některých faktorech, zatímco nukleosom „down“ vykazuje nižší vnitřní stabilitu a jeho závislost na remodelačních faktorech pravděpodobně tedy není tak striktní (Wippo et al., 2009). Vzhledem k tomu, že exprese genu *PHO84* je více závislá na remodelaci nukleosomu „down“ (viz výše), celková úroveň exprese odráží pouze změny v remodelaci tohoto nukleosomu (Wippo et al., 2009).

### 2.2.2.4 *Modifikace chromatinu a exprese genu PHO84*

Jako v případě genu *PHO5*, také u genu *PHO84* byla prokázána acetylace histonu H3 v indukčních podmínkách, která závisela na podjednotce Gcn5 komplexu SAGA (Shukla et al., 2006a, Shukla et al., 2006b). A stejně jako v případě genu *PHO5* byla také

exprese genu *PHO84* dereprimována v represivních podmínkách v kmeni s delecí genu pro HMT Set1 (Carvin and Kladde, 2004).

Mechanismus, jakým přispívá Set1 k represi transkripce v neindukujících podmínkách, může být stejný jako v případě genu *PHO5* (tedy prostřednictvím asociace komplexu Rpd3L se Set1-dependenční H3K4me a následnou deacetylací nukleosomů v promotoru, Wang et al., 2011). Kromě toho byly publikovány další studie, které dávají do souvislosti Set1 a regulaci transkripce prostřednictvím transkriptu v antisense orientaci vznikajícího přepisem lokusu genu *PHO84* (Camblong et al., 2007, Camblong et al., 2009). Stabilizace tohoto transkriptu v průběhu stárnutí buněk nebo prostřednictvím delecce genu *RRP6*, který kóduje podjednotku jaderného exosomu odpovědného za degradaci kryptických transkriptů (Davis and Ares, 2006, Wyers et al., 2005), vedla k represi transkripce genu *PHO84* ve směru sense. Mechanismus působení stabilizovaného transkriptu antisense souvisí s vyvazováním HDAC Hda1 do promotoru genu *PHO84*. Následná deacetylace pak ústí v represi transkripce ve směru sense (Camblong et al., 2007). Vzhledem k tomu, že ztráta HMT Set1 vedla k redukci množství transkriptu antisense (Camblong et al., 2009), může Set1 přispívat k umlčování transkripce genu *PHO84* také tímto mechanismem.

## 2.3 Proteiny SNW

Proteiny SNW jsou sestřihové faktory, transkripční regulátory a adaptory, které byly identifikovány u všech dosud sekvenovaných eukaryotických organizmů. Jako adaptory váží enzymy, které se podílejí na interakcích s proteiny indukujícími konformační změny v rámci jaderných procesů genové exprese. Mezi tyto enzymy patří lidská peptidyl-prolyl izomeráza 1 (PPIL1; peptidyl-prolyl isomerie-like 1) ze skupiny cyklofilinů a její ortholog z *Dictyostelium discoideum* CypE a dále helikázy Prp22 z kvasinky *S. cerevisiae* a lidská U5 snRNP 200 kDa helikáza (Skruzny et al., 2001, Obama et al., 2006, Gahura et al., 2009, Zhang et al., 2003). Proteiny SNW obsahují unikátní strukturu s konzervovaným motivem SNWKN (odtud jejich název) a z funkčního hlediska je také zajímavé, že některé části těchto proteinů jsou tzv. „intrinsically disordered“ (Wang et al., 2010). Mezi nejvíce studované patří lidský zástupce SNW1/SKIP (Baudino et al., 1998, Dahl et al., 1998) a Prp45 z kvasinky *S. cerevisiae* (Albers et al., 2003).

### 2.3.1 Lidský ortholog SNW1/SKIP

Protein SNW1/SKIP se účastní regulace transkripce na úrovni iniciace, elongace a úprav primárního transkriptu (je zapojen do sestřihu pre-mRNA). V těchto procesech může sloužit jako adaptor pro vazbu dalších proteinů (např. různých transkripčních koregulátorů a enzymů důležitých pro sestřih) nebo může fungovat jako faktor, který tyto procesy vzájemně funkčně spřahuje (například elongaci transkripce se sestřihem pre-mRNA).

V sestřihových komplexech byl SNW1/SKIP poprvé detekován krátce po svém objevení (Neubauer et al., 1998). Další studie ukázala, že do sestřihové reakce vstupuje jako součást komplexu CDC5L v průběhu aktivace spliceosomu ještě před zahájením sestřihové reakce, je přítomen po dobu obou kroků sestřihu a odstupuje společně s vyštěpeným intronem (Makarov et al., 2002). Dále byla prokázána jeho fyzická interakce s některými podjednotkami U5 snRNP (Zhang et al., 2003). Také bylo ukázáno, že exprese zkráceného proteinu vedla k hromadění nesestřiženého VDR-responzivního reportérového transkriptu (Zhang et al., 2003).

SNW1/SKIP byl prokázán v celé řadě drah, které regulují iniciaci transkripce, nicméně jeho přesná role v tomto procesu dosud nebyla objasněna. Potencuje transkripční aktivitu zprostředkovanou dimerem VDR-RXR (Baudino et al., 1998, Zhang et al., 2001), transkripčními faktory Smad2/Smad3 (Leong et al., 2001) a MyoD (Kim et al., 2001). SNW1/SKIP se svým interakčním partnerem Ski také participují na regulaci průchodu buněčným cyklem, reprimují aktivitu pRB a příbuzného pocket proteinu p130, čímž umožňují buňkám vstup do buněčného cyklu (Prathapam et al., 2002). Dále například SNW1/SKIP působí v rámci signální dráhy Notch. V rámci této dráhy interaguje s transkripčním faktorem CBF1 a navázanými transkripčními korepresory SMRT, mSin3A, CIR a mHDAC2. Po přijetí signálu dochází k odštěpení intracelulární části receptoru Notch (NotchIC), který se naváže na CBF1 místo transkripčních korepresorů a dojde k aktivaci transkripce Notch-responsivních genů. SNW1/SKIP interaguje rovněž s komplexem CBF1-NotchIC. Podobně jako NotchIC působí také transkripční faktor EBNA2 z viru Epstein a Barrové (EBV), se kterým také SNW1/SKIP interaguje (Zhou et al., 2000a, Zhou et al., 2000b). SNW1/SKIP se tedy v rámci signální dráhy Notch podílí na přeměně CBF1 z transkripčního represoru na aktivátor.

Jakým způsobem se SNW1/SKIP účastní těchto přeměn, ani jakým způsobem ovlivňuje funkci ostatních transkripčních faktorů, nebylo dosud přesně objasněno. V rámci spliceosomu SNW1/SKIP vyvazuje PPIL1 a interaguje s ní tak, že nedochází k okupaci aktivního místa PPIL1 (Skruzny et al., 2001, Obama et al., 2006, Xu et al., 2006, Makarov et al., 2002). K vyvázání PPIL1 prostřednictvím SNW1/SKIP do spliceosomu dochází během přeměny na katalyticky aktivní spliceosom. PPIL1 může proto působit jako foldáza nebo chaperon, který se účastní této přeměny (Xu et al., 2006). Vzhledem k tomu, že SNW1/SKIP interaguje rovněž i s helikázami (Zhang et al., 2003), může se tímto způsobem podílet i na dalších přestavbách v rámci spliceosomu. Analogickým způsobem může protein SNW1/SKIP regulovat i přestavby v rámci preiniciačního komplexu při transkripci nebo může ovlivňovat konformaci transkripčních faktorů a tím modulovat jejich aktivitu (Folk et al., 2004, Wang et al., 2010). Interakční partneři proteinu SNW1/SKIP, kteří by tyto přeměny zajistili v rámci preiniciačního komplexu, však zatím nebyli identifikováni.

Studie z nedávné doby naznačují, že se protein SNW1/SKIP kromě iniciační fáze transkripce podílí také na regulaci elongace transkripce. Tyto studie byly provedeny na modelu genu HIV-1 integrovaného do genomu buněk HeLa. Po přepsání několika desítek

bázi tohoto genu dochází k pozastavení Pol II, které je indukováno faktory DSIF a NELF. Transkript vzniklý před pozastavením Pol II vytváří smyčku označovanou jako TAR (*trans*-activation response element). Tato smyčka se nachází na 5' koncích všech vznikajících virových transkriptů. Pro uvolnění Pol II z pauzy je nutná interakce virového proteinu Tat se smyčkou TAR. Protein Tat interaguje s cyklinem T1, který je součástí P-TEFb, čímž dochází k vyvazování P-TEFb prostřednictvím interakce Tat-TAR do promotorů virových genů. P-TEFb potom uvolňuje Pol II a tím umožňuje další průběh transkripce (shrnutí v Garber and Jones, 1999, Price, 2000 a Saunders et al., 2006).

Bylo ukázáno, že SNW1/SKIP fyzicky asociuje s P-TEFb a s komplexem P-TEFb-Tat a je vyžadován pro účinnou transaktivaci genu HIV-1. *In vitro* byla také prokázána přímá interakce rekombinantního proteinu SNW1/SKIP s komplexem Tat-P-TEFb-TAR. Z těchto výsledků vyplývá, že protein SNW1/SKIP je vyvazován prostřednictvím interakce s P-TEFb-Tat-TAR do promotoru genu HIV-1. Pomocí primer extension bylo ukázáno, že SNW1/SKIP *in vitro* i *in vivo* stimuluje elongaci transkripce genu HIV-1, ale iniciaci transkripce neovlivňuje (Bres et al., 2005). Spolu s proteinem SNW1/SKIP je do promotoru vyvazován také sestřihový komplex tri-snRNP110K, ale podjednotky U5 snRNP, se kterými SNW1/SKIP také asociuje (Zhang et al., 2003, Bres et al., 2005), byly detekovány až v kódující oblasti. Tento výsledek podporuje domněnku, že funkce SNW1/SKIP při regulaci elongace transkripce je nezávislá na jeho roli při sestřihu pre-mRNA (Bres et al., 2005).

Transfekce buněk siRNA proti SNW1/SKIP vedla ke snížení asociace proteinu c-Myc s promotorem genu HIV-1, ale vyvazování Tat, cyklinu T1, Pol II ani přítomnost fosforylace Ser2 a Ser5 na CTD Pol II neovlivnila. Vzájemná asociace c-Myc s SNW1/SKIP byla dokumentována technikou pull-down (Bres et al., 2009). c-Myc se dále přímo podílí na vyvazování proteinu TRRAP, který je součástí HAT komplexů NuA4/Tip60 a SAGA/GCN5 (Murr et al., 2007), do promotoru genu HIV-1. Bylo ukázáno, že c-Myc i TRRAP jsou vyžadovány pro transaktivaci genu HIV-1 prostřednictvím Tat (Bres et al., 2009).

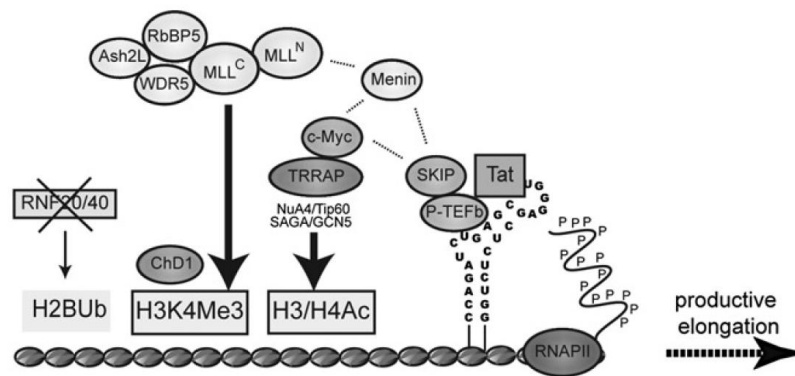
Kromě interakce SNW1/SKIP s c-Myc byla také technikou pull-down dokumentována interakce obou těchto proteinů s podjednotkami lidského HMT komplexu MLL1 (mezi tyto podjednotky patří Menin, Ash2L, RbBP5 a MLL1; Bres et al., 2009), což je jeden ze čtyř lidských HMT komplexů methylujících H3K4 orthologních ke kvasinkovému komplexu COMPASS (shrnutí v Shilatifard, 2008). Bylo



ukázáno, že se SNW1/SKIP podílí na vzniku genově specifické trimethylace H3K4, jeho úloha zřejmě spočívá v potenciaci funkce HMT komplexu MLL1. Zároveň však bylo zjištěno, že tato modifikace není nutná pro účinnou transaktivaci, protože transfekce buněk siRNA proti MLL1 a Ash2L nevedla ke snížení transaktivace. Jedinou podjednotkou, která byla pro transaktivaci nezbytná, byla podjednotka Menin.

Na základě těchto výsledků byl v laboratoři K. Jones navržen model, jakým by se SNW1/SKIP mohl podílet na regulaci elongace transkripce. Tento model je znázorněn na obrázku 2.12. Podle autorů se SNW1/SKIP účastní regulace elongace transkripce prostřednictvím Tat tak, že zprostředkuje acetylaci histonů vyvázáním c-Myc, který dále vyvazuje podjednotku HAT komplexů TRRAP. Kromě toho SNW1/SKIP asociuje také s proteinem Menin, který je pro transaktivaci nezbytný. Za vyvázání proteinu Menin však nebyl SNW1/SKIP (ani c-Myc) odpovědný. Jakou úlohu má Menin při transaktivaci, však zatím nebylo objasněno. SNW1/SKIP dále zprostředkuje trimethylaci H3K4, která sice není pro transaktivaci nezbytná, může však sloužit k vyvazování dalších sestřihových faktorů prostřednictvím proteinu CHD1, o kterém je známo, že interaguje s trimethylovaným H3K4 a vyvazuje U2 snRNP (viz kapitola 2.1.5.2; Sims et al., 2007). Protein SNW1/SKIP by mohl tímto způsobem přispívat k regulaci vyvazování spliceosomu (Bres et al., 2009).

Bylo také ukázáno, že SNW1/SKIP je vyžadován i pro bazální transkripci genu HIV-1 (tedy neregulovanou prostřednictvím Tat). V tomto případě byl SNW1/SKIP vyvazován prostřednictvím ubiquitylace H2B, která je zprostředkována proteiny RNF20/40 (lidská obdoba kvasinkových Rad6-Bre1). Prostřednictvím této ubiquitylace se SNW1/SKIP navíc vázal na „celkový“ chromatin, ne jen specificky ke genu HIV-1. Protein Tat nahradil potřebu ubiquitylace H2B pro vyvazování SNW1/SKIP (Bres et al., 2009).

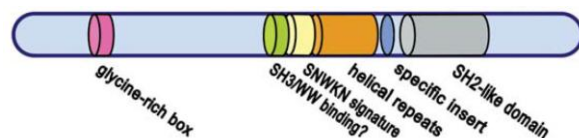


**Obr. 2.12 Model funkce proteinů SNW1/SKIP, c-Myc a Menin při transaktivaci HIV-1 prostřednictvím Tat.** SNW1/SKIP je na gen HIV-1 vyvazován prostřednictvím interakce s komplexem P-TEFb-Tat-TAR (Bres et al., 2005). SNW1/SKIP dále vyvazuje c-Myc (Bres et al., 2009), který interaguje s podjednotkou HAT komplexů TRRAP (shrnuto v Murr et al., 2007), a asociuje také s proteinem Menin. Menin, c-Myc i TRRAP jsou pro transaktivaci nezbytné. SNW1/SKIP dále zprostředkuje genově specifickou H3K4me3 potenciální funkci HMT komplexu MLL1. H3K4me3 může sloužit pro vyvazování sestřihových faktorů prostřednictvím CHD1. Transaktivace prostřednictvím Tat překonává potřebu ubiquitinylace H2B pro vyvazování SNW1/SKIP. Převzato z Bres et al., 2009.

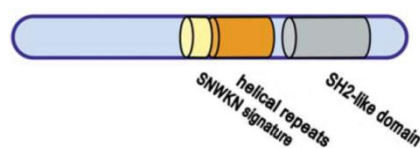
### 2.3.2 Kvasinkový ortholog Prp45

Orthologem proteinů SNW v kvasince *S. cerevisiae* je Prp45 o délce 379 aminokyselin a velikosti 42 kDa. V souladu s ostatními proteiny rodiny SNW vykazuje jadernou lokalizaci (Martinkova et al., 2002), svojí strukturou se však od kánonické struktury ostatních proteinů SNW poněkud odlišuje (viz obr. 2.13). Protein Prp45 postrádá část N-terminální oblasti včetně vysoce konzervované oblasti bohaté na glycin. Podobnost ostatních domén ve srovnání s orthology v jiných organismech je také výrazně menší, například počet prolinů v konzervované polyprolinové doméně je redukován ze sedmi na pouhé dva.

#### SNW proteiny



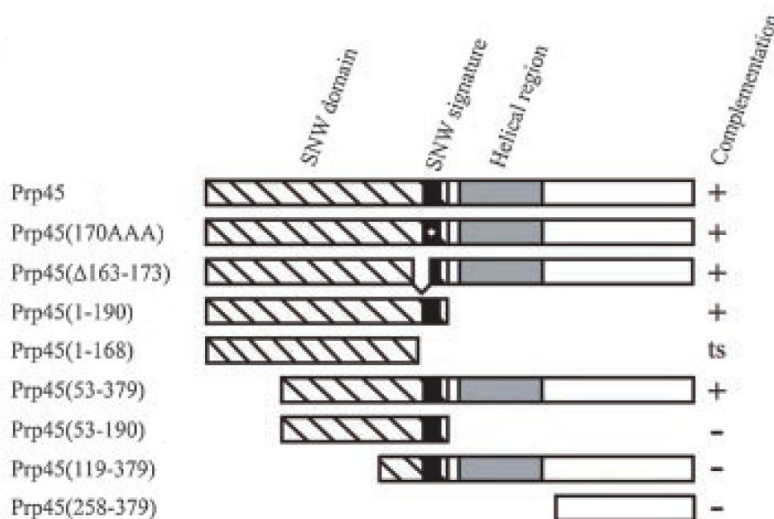
#### Prp45



**Obr. 2.13 Porovnání kánonické struktury proteinů SNW (nahore) se strukturou proteinu Prp45 z *S. cerevisiae* (dole).** Převzato z Folk et al., 2004, upraveno.

Fyziologická role proteinu Prp45 byla v dosud literatuře spojována pouze se sestřihem pre-mRNA. Byla prokázána fyzická interakce tohoto proteinu se sestřihovými faktory Prp46, Clf1 a Prp22 (Albers et al., 2003, Gahura et al., 2009). Prp45 také koprecipitoval s pre-mRNA, s intermediátem sestřihové reakce lariátem-exonem 2, s exonem 1 a s odstupujícím intronem. Ve spliceosomu je tedy přítomen po čas obou transesterifikačních reakcí a z reakce odstupuje zřejmě společně s vystřiženým intronem. Deplece tohoto proteinu rovněž vedla k hromadění nesestřižených reportérových genů (Albers et al., 2003).

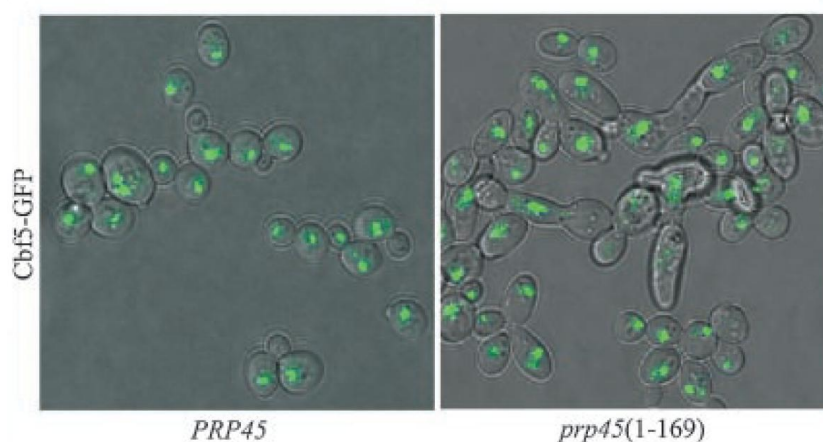
Ve snaze blíže charakterizovat roli proteinu Prp45 byly v naší laboratoři připraveny plazmidové konstrukty, ze kterých byly exprimovány různé deleční mutanty proteinu Prp45 (viz obrázek 2.14). Těmito konstrukty byl transformován diploidní kmen *PRP45/Δprp45* a po sporulaci byla testována schopnost komplementace růstu kmene s delecí *PRP45* jednotlivými delečními variantami proteinu Prp45 (Martinkova et al., 2002, Gahura et al., 2009). Tímto způsobem byla identifikována mutanta prp45(1-168), která sice komplementovala růst buněk s delecí *PRP45* při běžné kultivační teplotě 30 °C, ale buňky s tímto konstruktem vykazovaly citlivost ke zvýšené kultivační teplotě 37 °C (Gahura et al., 2009).



**Obr. 2.14 Schopnost komplementace růstu buněk s delecí *PRP45* různými delečními variantami proteinu Prp45.** Vlevo jsou vyznačeny jednotlivé mutanty. Prp45(170AAA) nese mutaci v absolutně konzervovaném motivu SNW. Vpravo je vyznačena schopnost komplementace růstu dané mutanty v buňkách s delecí genu *PRP45*. ts označuje termosenzitivní fenotyp. Převzato z Gahura et al., 2009, upraveno.

Objev „termosenzitivní“ alely umožnil bližší charakterizaci fyziologické role proteinu Prp45. Pro tyto účely byl připraven kmen s chromozomální mutací

*prp45(1-169)*. Kromě mutanty *prp45(1-169)* byly postupně připraveny také další deleční varianty. Ukázalo se, že viabilita buněk je zachována i v případě, kdy je exprimován protein *prp45* obsahující pouze prvních 131 aminokyselin (K. Abrahámová, nepublikované výsledky). Z hlediska fenotypových vlastností jsou však nejlépe prostudovány buňky s mutací *prp45(1-169)*. Tyto buňky jsou citlivé na zvýšenou kultivační teplotu; asi po 6 hodinách po přenosu do restriktivní teploty při kultivaci v tekutém mediu zastavují růst. I v běžné kultivační teplotě 30 °C také vykazují morfologický defekt (viz obr. 2.15), který připomíná defekt u buněk s mutací faktorů spojených s buněčným cyklem (tzv. *cdc* mutanty – cell division cycle mutants; Hartwell et al., 1974) (Gahura et al., 2009).



**Obr. 2.15 Morfologický defekt buněk s mutací *prp45(1-169)* při běžné kultivační teplotě 30 °C.** Jádru je vizualizováno zeleně pomocí jaderného proteinu Cbf5 označeného barvou GFP. Převzato z Gahura et al., 2009.

S využitím alely *prp45(1-169)* byly prokázány genetické interakce mezi alelou *prp45* a alelami sestřihových faktorů regulujících druhý krok sestřihu a alelami komponent komplexu sestavovaného kolem Prp19 (tzv. NTC – Nineteen complex, odpovídá komplexu CDC5L z vyšších eukaryot). Mezi tyto alely patří *SLU7*, *PRP17*, *PRP18*, *PRP22*, *SYF1*, *CLF1/SYF3*, *NTC20* A *CEF1*. Na základě těchto výsledků se předpokládá, že protein Prp45 je součástí komplexu NTC. Funkce proteinu Prp45 zřejmě spočívá v participaci na přestavbách spliceosomu v průběhu obou sestřihových reakcí a přispívá k účinnému sestřihu intronů s nekánonickými konsensus sekvencemi v místě větvení, v 5' a ve 3' sestřihových místech. Tuto funkci vykonává, alespoň zčásti, prostřednictvím vyvazování helikázy Prp22 (Gahura et al., 2009).

Jiná role proteinu Prp45 než v rámci sestřihu dosud nebyla v literatuře dokumentována. Na další funkce však poukazuje nález, že divoká varianta tohoto proteinu, stejně jako některé deleční mutanty, byly schopné po navázání do promotoru

reportérového genu aktivovat jeho transkripci (Martinkova et al., 2002). V souvislosti s předpokládanou rolí lidského proteinu SNW1/SKIP při regulaci transkripce (viz kapitola 2.3.1), byla u buněk s mutací *prp45(1-169)* provedena analýza transkriptomu metodou microarrays. Bylo zjištěno, že exprese některých genů je změněná, ačkoliv tyto geny neobsahují intron. Některé z těchto výsledků byly ověřeny také technikou Northern blot (K. Abrahámová, nepublikované výsledky; viz kapitola 4.1). Rovněž některé nepublikované nálezy z laboratoře J. Beggs ukazují na zapojení proteinu Prp45 při regulaci transkripce. Protein Prp45 byl celogenomovou analýzou s využitím chromatinové imunoprecipitace detekován v promotorových oblastech transkribovaných genů. Termosenzitivní alela *prp45-113* způsobovala při růstu buněk v nepermissivní teplotě defekt v elongační fázi transkripce. Tento defekt zřejmě souvisí s pozorovaným defektem v akumulaci Pol II fosforylované na Ser2 (J. Beggs, nepublikované výsledky).

Tyto výsledky tedy poukazují na zapojení proteinu Prp45 při regulaci transkripce. K bližšímu poznání role proteinu Prp45 při transkripci přispívají i výsledky tohoto diplomového projektu.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Kultivační media a roztoky

##### 3.1.1.1 Kvasinková kultivační media

**Ampicilin** (1000x koncentrovaný zásobní roztok)

100 mg/ml    zásobní prášek rozpustit do 4 ml deionizované vody a 1 ml 96% ethanolu

##### **YPAD**

10 g/l        Yeast extract powder (Formedium)

20 g/l        Universalpepton M66 (Merck)

100 mg/l     Adenin-hemisulfát (Sigma)

[15 g – 18 g    Agar (Oxoid)]

Rozpouštět do deionizované vody do devíti desetin konečného objemu. Sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C. Po vyklásování přidat jeden díl objemu sterilního 20% roztoku glukózy (výsledná koncentrace 2%) a po vychladnutí pod cca 55 °C přidat ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml).

##### **SD medium**

6,7 g/l        Yeast nitrogen base without amino acids (Difco)

1,394 g/l     Synthetic complete amino acid (Kaiser) drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura  
(Formedium)

[15 g – 18 g    Agar (Oxoid)]

Rozpouštět do deionizované vody do devíti desetin konečného objemu. Sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C. Po vyklásování přidat jeden díl sterilního 20% roztoku glukózy (výsledná koncentrace 2%) a po vychladnutí pod cca 55 °C přidat ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml). V případě potřeby přidat sterilní roztoky aminokyselin a uracilu (viz níže).

### **SD medium se standardní koncentrací fosfátu a bez přidaného fosfátu**

5,9 g/l	Yeast nitrogen base without amino acids and phosphate (Formedium)
1,394 g/l	Synthetic complete amino acid (Kaiser) drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura (Formedium)

SD se standardní koncentrací fosfátu – přidán  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na výslednou koncentraci 7,3 mM

SD bez přidaného fosfátu – přidán KCl na výslednou koncentraci 7,3 mM

Rozpouštět do deionizované vody do devíti desetin konečného objemu. Sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C. Po vyklávkování přidat jeden díl sterilního 20% roztoku glukózy (výsledná koncentrace 2%) a po vychladnutí pod cca 55 °C přidat ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml). V případě potřeby přidat sterilní roztoky aminokyselin a uracilu (viz níže).

### **SD medium bez aminokyselin se standardní koncentrací fosfátu a bez přidaného fosfátu**

Připravit stejně jako SD medium se standardní koncentrací fosfátu a bez přidaného fosfátu, jen bez přidání Synthetic complete amino acid (Kaiser) drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura (Formedium).

### **Medium s 5-FOA**

*Stejné složení jako SD medium se všemi aminokyselinami a dusíkatými bázemi.*

- Připravit roztok 5-fluoroorotové kyseliny (5-FOA, Fermentas) o koncentraci 2 mg/ml a o objemu odpovídajícímu polovině požadovaného konečného objemu media (výsledná koncentrace v hotovém mediu 1 mg/ml). Zahřívát maximálně na 65 °C, sterilizovat filtrací.
- Připravit 2x koncentrovaný základ pro SD medium, sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.
- Základ pro SD medium smíchat s glukózou, aminokyselinami a bázemi, nechat zchladnout na teplotu pod 65 °C a smíchat s roztokem 5-FOA.

### **Presporulační agar**

20 g/l	Pepton (Merck)
10 g/l	Yeast extract powder (Formedium)
20 g/l	Agar (Oxoid)

Rozpustit do deionizované vody do poloviny výsledného objemu, přidat polovinu výsledného objemu sterilního roztoku 20% glukózy (výsledná koncentrace 10%) a po zchladnutí pod 55 °C přidat ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml).

### **(Fowelův) sporulační agar**

0,5 g/100 ml	KAc
0,23 g/100 ml	KCl
2 g/100 ml	Agar (Oxoid)

Rozpustit do 97 ml deionizované vody, sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C, přidat ampicilin, aminokyseliny a báze podle potřeb daného kmene.

### **Ringerův roztok**

7,5 g/l	NaCl
0,075 g/l	KCl
0,1 g/l	NaHCO <sub>3</sub>
0,1 g/l	CaCl <sub>2</sub>

### **Roztoky aminokyselin, uracilu a adeninu (100x koncentrované zásobní roztoky)**

2 g/l	L-Histidin HCl monohydrát (Sigma)
10 g/l	L-Leucin (Sigma)
2 g/l	L-Tryptofan (Sigma)
2 g/l	Uracil (Sigma)
3 g/l	L-Lysin (Sigma)
2 g/l	L-Methionin (Sigma)
10 g/l	Adenin (Adenin-hemisulfát; Sigma)



### 3.1.1.2 Obecně používané roztoky

#### 10x TE pufr

0,1 mM Tris-HCl (Serva)

10 mM EDTA (BIO-RAD)

pH upravit pomocí HCl na požadovanou hodnotu.

#### Vzorkový pufr

0,06% Bromfenolová modř

60% Glycerol (Sigma)

60 mM EDTA (BIO-RAD)

### 3.1.2 Přehled použitých kvasinkových kmenů

Název	Genotyp	Zdroj, příprava
<b>EGY48</b>	MAT $\alpha$ <i>ura3 his3 trp1 LexA(6xop)-LEU2</i>	
<b>KAY02</b>	MAT $\alpha$ <i>ura3 his3 trp1 LexA(6xop)-LEU2, prp45(1-169)-HA::kanMX6</i>	Knock-in do EGY48
<b>BY4741</b>	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Euroscarf
<b>BY4742</b>	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Euroscarf
<b>Y25576</b>	MAT $\alpha/\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0/LYS2 MET15/met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0 bur1::kanMX4/BUR1</i>	Euroscarf
<b>GRF18</b>	MAT $\alpha$ <i>his3-11 his3-15 leu2-3 leu2-112 canr</i>	Larionov et al., 1985
<b>DBY804</b>	MAT $\alpha$ <i>set1::HIS3 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Bentley
<b>MHY07-2A*</b>	<i>prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0</i>	Křížení
<b>MHY07-2B*</b>	<i>his3<math>\Delta</math>0 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	- " -
<b>MHY07-2C</b>	MAT $\alpha$ <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 set1::HIS3 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0</i>	- " -
<b>MHY07-2D*</b>	<i>set1::HIS3 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0</i>	- " -
<b>MHY08-5A*</b>	<i>set1::HIS3 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	- " -
<b>MHY08-5B*</b>	<i>prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0</i>	- " -
<b>MHY08-5C*</b>	<i>his3<math>\Delta</math>0 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0</i>	- " -

<b>MHY08-5D</b>	MATa <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6 set1::HIS3 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ</i>	- " -
<b>MHY10</b>	MATa <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0 bur1::kanMX4 + pRS316-BUR1</i>	Knock-in do AVY42
<b>AVY17</b>	MATa <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Knock-in do BY4741
<b>AVY18</b>	MATa <i>prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Knock-in do BY4742
<b>AVY36-6A*</b>	<i>paf1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	Křížení
<b>AVY36-6B*</b>	<i>prp45(1-169)::HA-NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	- " -
<b>AVY36-6C*</b>	<i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	- " -
<b>AVY36-6D*</b>	<i>prp45(1-169)::HA-NatMX6 paf1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	- " -
<b>AVY39-9A*</b>	<i>prp45(1-169)::HA-NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	- " -
<b>AVY39-9B*</b>	<i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	- " -
<b>AVY39-9C*</b>	<i>rad6::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	- " -
<b>AVY39-9D*</b>	<i>prp45(1-169)::HA-NatMX6 rad6::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i>	- " -
<b>AVY42</b>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0 bur1::kanMX4 + pRS316-BUR1</i>	- " -
<b>AVY43</b>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0 bur1::kanMX4 + pGP111 (pRS416-BUR1)</i>	- " -
<b>AVY56-A</b>	MATa <i>prp45(1-169)::3HA-NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i>	- " -
<b>AVY56-B</b>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>	- " -
<b>AVY56-C</b>	MATa <i>bur2::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i>	- " -
<b>AVY56-D</b>	MATa <i>prp45(1-169)::3HA-NatMX6 bur2::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>	- " -

\* U takto označených kmenů nebyl testován párovací typ.

### 3.1.3 Přehled použitých primerů

Název	Sekvence	Použití
OG61	CCCAACTCGTTACAGATCTACTGC	přímý primer pro detekci <i>PHO84</i>
OG62	GTCTCTAGCACAGTTATGGTTCG	zpětný primer pro detekci <i>PHO84</i>
OG63	GAGGGTCCAGGTTACGACATTATC	přímý primer pro detekci <i>PHO5</i>
OG64	TAGGATATCGGTATCGTGGG	zpětný primer pro detekci <i>PHO5</i>
OG71	CGACGTTGTCGATGATGAAG	přímý primer pro detekci <i>TOM22</i>
OG72	GCAACGATTCTGTCCAAC	zpětný primer pro detekci <i>TOM22</i>
MH01	CGGTAACAGAGCTGACACCAGAGA	přímý primer pro detekci <i>ADH1</i>
MH02	ACGTATCTACCAACGATTTGACCC	zpětný primer pro detekci <i>ADH1</i>
KM09	GGAGAAGCTGATCCAAATGAGTGGAAAG ATACCTGCAGCTGTG <u>CGGATCCCCGGG</u> <u>TTAATTAA</u> **	přímý primer pro tvorbu mutanty <i>prp45(1-169)</i>
KM10	CAAGCACAAGAATGCTTTGTTTTCTA GTGCTCATCCTGGGC <u>GAATTCGAGCTC</u> <u>GTTTAAAC</u> **	zpětný primer pro tvorbu mutanty <i>prp45(1-169)</i>
KM02	GCTGAATTCATGCTATCGGTTCCCTTG CC	přímý primer pro detekci divoké alely <i>PRP45</i>
PL03	GAACTCGAGCTAAAGAGCTTTACCTAC AC	zpětný primer pro detekci divoké alely <i>PRP45</i>

\*\* Podtržená část nasedá na templátový plazmid, nepodtržená část tvoří přesah, přes který dochází k homolóní rekombinaci produktu PCR do chromosomu

### 3.1.4 Přehled použitých protilátek

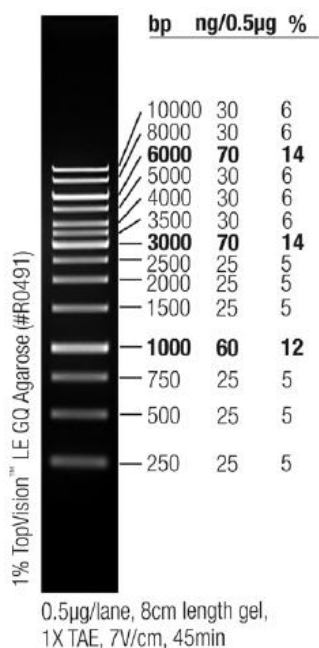
Protilátka	Specifikace	Ředění
Anti-HA.11 (16B12) (Covance, katalogové označení MMS-101P)	Značka HA	1:1000
GAM-AP (BIO-RAD, katalogové označení 170-6520)	Rozeznává myší protilátky (goat anti mouse), konjugát s alkalickou fosfatázou	1:4000

### 3.1.5 Přehled použitých souprav pro manipulaci s nukleovými kyselinami

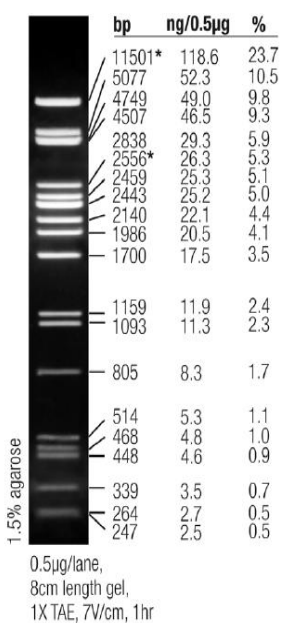
<b>Purifikace DNA</b>	NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel)
<b>Purifikace RNA</b>	MasterPure <sup>™</sup> Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies)
<b>Reverzní transkripce</b>	ReverAid <sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

### 3.1.6 Přehled použitých velikostních standardů

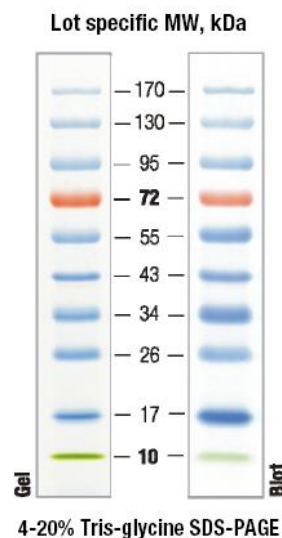
**GeneRuler 1 kb DNA Ladder Mix (Fermentas)**



**Pst1/λ**



**PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder (Fermentas)**



### 3.1.7 Reakční směsi a programy PCR

#### 3.1.7.1 Tvorba integrační kazety

##### Obsah reakční směsi:

5 µl 10x polymerázového pufru (Fermentas)  
1 µl 50% DMSO (výsledná koncentrace 5%)  
6 µl primeru KM10 (výsledná koncentrace 1,2 µM)  
6 µl primeru KM09 (výsledná koncentrace 1,2 µM)  
8 µl dNTP (Fermentas, výsledná koncentrace 0,4 mM každý)  
5 µl MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, výsledná koncentrace 2,5 mM)  
0,5 µl/100 µl směsi Taq Polymerázy (Fermentas)  
1 µl templátu  
17,5 µl deionizované H<sub>2</sub>O

##### Program:

94 °C, 2 min; 10 x (94 °C, 30 s; 43 °C, 30 s; 68 °C, 3 min); 20 x (94 °C, 30 s; 43 °C, 30 s; 72 °C, 3 min + 5 s each run); 72 °C, 7 min; 15 °C, 1 min

#### 3.1.7.2 PCR z kolonií

##### Obsah reakční směsi:

suspenze buněk v 7,5 µl deionizované H<sub>2</sub>O  
1,5 µl Taq pufru (Fermentas)  
1,5 µl primeru PL03 (výsledná koncentrace 1 µM)  
1,5 µl primeru KM02 (výsledná koncentrace 1 µM)  
1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, výsledná koncentrace 2,5 mM)  
1,5 µl dNTP (Fermentas, výsledná koncentrace 0,25 mM každý)  
0,5 µl / 100 µl směsi Taq polymerázy (Fermentas)

**Program:**

Program *COOK* (povaření 95 °C, 5 min)

94 °C, 2 min; 3 x (94 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 30 s); 23 x (93 °C, 20 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s); 72 °C, 5 min; 10 °C, 30 s

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava a výsev glycerolových konzervovaných kultur *S. cerevisiae*

*Výchozím materiálem může být jakákoliv suspenze buněk S. cerevisiae, včetně suspenze enzymaticky opracovaných spor.*

- K 500  $\mu\text{l}$  suspenze buněk přidat 500  $\mu\text{l}$  50% sterilního glycerolu. Důkladně ale šetrně promíchat překlápěním zkumavky.
- Inkubovat 30 min při pokojové teplotě za občasného promíchání překlápěním. Pak přenést do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tamtéž i uchovávat.
- Při výsevu z glycerolových konzerv sterilním párátkem nebo mikrobiologickou kličkou seškrábnout vrchní vrstvu zmrzlých buněk, nanést na plotnu s médiem a rozetřít skelněnou tyčinkou. Vše provádět rychle, aby buňky nerozmrzly.

### 3.2.2 Křížení a sporulace *S. cerevisiae*, tetradová analýza

#### Křížení a příprava diploidního kmene

- Vytvořit husté suspenze haploidních kultur opačného párovacího typu určených ke křížení (MAT $\alpha$  a MAT $\alpha$ ). Na medium YPAD přes sebe nakapat cca 30 – 50  $\mu\text{l}$  obou suspenzí. Inkubovat minimálně 4 hodiny při  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté převést kříženou biomasu na selekční medium, které umožňuje růst pouze diploidním jedincům.

#### Sporulace a tetradová analýza

- Buňky diploidního kmene resuspendovat do cca 30  $\mu\text{l}$  vody a vysít na plotnu s presporulačním agarem. Inkubovat do druhého dne při  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Narostlou biomasu kvantitativně přenést do mikrozkuavky s cca 15  $\mu\text{l}$  Ringerova roztoku nebo deionizované vody tak, aby vznikla hodně hustá, ale stále ještě pipetovatelná suspenze. Suspenzi potom kápnout na plotnu se sporulačním agarem, nechat zaschnout. Pokud je vrstva buněk vůči síle agaru příliš tenká, sporulace probíhá pomaleji.

- Inkubovat při pokojové teplotě 4 – 6 dní. Mikroskopicky kontrolovat množství vzniklých tetrad.
- Po dostatečné sporulaci přenést malé množství buněk do 50  $\mu$ l „yeast lytic“ enzymu (1 mg/ml). Inkubovat 5 – 10 min při pokojové teplotě, po dostatečném natrávení přidat 1 ml deionizované vody.
- Ke kraji rovné plotny (podle typu použitého mikromanipulátoru) s médiem YPAD nanést cca 20  $\mu$ l natrávené suspenze, rozetřít hokejkou a nechat zaschnout. Poté pomocí mikromanipulátoru oddělovat jednotlivé spory z vřecek. Inkubovat při 30 °C.
- Genotyp haploidů získaných ze spor určit pomocí selekčních médií.

### 3.2.3 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou

#### Příprava kompetentních buněk

- Kolonií zaočkovat 5 – 10 ml media YPAD nebo příslušného selekčního media, kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení stacionární fáze.
- Ráno přeočkovat do 10 ml media 2xYPAD nebo příslušného selekčního media na  $OD_{600} \sim 0,1$  a kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení  $OD_{600} \sim 0,4 - 0,6$  (tj.  $1,3 - 2,5 \times 10^7$  buněk na 1 ml kultury).
- Na jednu transformaci odebrat do sterilní 15 ml centrifugační zkumavky množství kultury, která obsahuje  $10^8$  buněk. Kulturu centrifugovat (Jouan MR 22i, 3200 rpm, 3 min, 23 °C).
- Supernatant odstranit, sediment promýt 10 ml sterilní deionizované vody, znovu centrifugovat.
- Supernatant odstranit, pelet resuspendovat do 1 ml sterilní deionizované vody a převést do 1,5 ml mikrozukavky. Buněčný pelet usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20, 13000 rpm, 1 min, pokojová teplota) a sediment odstranit.



### Vlastní transformace

- K buněčnému peletu přidat reagenty v následujícím pořadí:
  - 40  $\mu$ l deionizované vody
  - 36  $\mu$ l 1 M LiAc
  - 10  $\mu$ l ssDNA (salmon sperm DNA, 10 mg/ml, Sigma; čerstvě denaturovaná povařením)
  - 34  $\mu$ l plazmidové DNA rozpuštěné ve vodě (> 100 ng)
  - 240  $\mu$ l PEG 3500 (Sigma) 50% w/v
- Suspenzi zamíchat vortexováním.
- Inkubovat 40 min při 42 °C s občasným promícháním (překlápěním zkumavky).
- Po skončení inkubace centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13000 rpm, 3 min, pokojová teplota) a supernatant odstranit.
- Pelet resuspendovat v 1 ml sterilní deionizované vody a opět stočit (Hettich MIKRO 20, 13000 rpm, 1 min, pokojová teplota).
- Buňky resuspendovat do 100 – 200  $\mu$ l sterilní deionizované vody a 50 – 100  $\mu$ l vysévat na příslušné selekční médium. Inkubovat v termostatu při 30 °C 3 – 4 dny.

### 3.2.4 Příprava proteinových extraktů *S. cerevisiae*

*Podle Dr. Sychrové, FgÚ AVČR; upraveno*

- Kolonií zaočkovat 5 - 10 ml media, kultivovat přes noc (18 – 20 hod) na třepačce při 30 °C, 180 rpm.
- Ráno přeočkovat do 10 – 25 ml čerstvého media na OD<sub>600</sub> ~ 0,1 a kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení OD<sub>600</sub> ~ 0,3 – 1.
- Změřit OD<sub>600</sub> narostlé kultury, vypočítat, jaký objem kultury odpovídá 3 OD, tento objem převést do 15 ml centrifugační zkumavky a centrifugovat (Jouan MR 22i, 3200 rpm, 3 min, 23 °C).
- Supernatant odstranit, sediment resuspendovat v 1 ml sterilní deionizované vody, suspenzi převést do 1,5 ml mikrozskumavek a opět centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13000 rpm, 30 s, pokojová teplota).

- Supernatant odsát, inkubovat 10 – 15 min při -20 °C. Dlouhodobě lze skladovat při -80 °C.
- Připravit na ledu roztok 1,85 M NaOH a 7%  $\beta$ -mercaptoethanolu, 100  $\mu$ l roztoku přidat k suspenzi buněk a intenzivně vortexovat (30 s vortex, 30 s nechat zchladnout na ledu, celkem vortexovat 2 min) a pak inkubovat 10 min na ledu.

*Od tohoto kroku je nutné pracovat na ledu, aby nedošlo k ohřátí lyzátu a tedy k aktivaci proteáz; je možné přidat inhibitory proteáz, při dobrém chlazení však není nutné.*

- K suspenzi přidat 100  $\mu$ l 50% TCA, inkubovat 5 min na ledu, pak centrifugovat (Jouan MR 22i, 12000 rpm, 10 min, 0 °C).
- Supernatant odstranit, k sedimentu přidat 500  $\mu$ l 1 M Tris (nepufrovaný), sediment lehce resuspendovat a ihned znovu centrifugovat.
- Supernatant důkladně odstranit, sediment resuspendovat ve 100  $\mu$ l 2 x Laemmli pufru, přidat 1/20 objemu 1 M DTT.
- Suspenzi inkubovat 5 min při 90 – 100 °C, poté ihned umístit do -80 °C.

### **Roztoky**

**2x Laemmli pufr:** 0,112 M Tris-HCl, pH 6,8, 3,42% SDS, 12% (v/v) glycerol, 0,002% bromfenolová modř

## **3.2.5 Tris-glycinová SDS-PAGE**

*S využitím soupravy BIO-RAD Mini Protean II/III Cell*

### **Příprava gelů a aparatury**

- Podle návodu v soupravě sestavit aparaturu pro nalévání gelů.
- Připravit separační gel o požadované koncentraci (viz tabulka):

Zásobní roztok chemikálie (ml) (celkový objem 15 ml)	Výsledná koncentrace akrylamidu v separačním gelu		
	7,5 %	10 %	12 %
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7,50	6,75	5,25
<b>4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8</b>	3,75	3,75	3,75
<b>AA/BIS</b>	3,75	5,00	6,00
<b>TEMED</b>	0,01	0,01	0,01
<b>10% (w/v) APS</b>	0,05	0,05	0,05

- Do kádinky pipetovat zásobní roztoky v pořadí voda, pufr, akrylamid, TEMED a APS, důkladně zamíchat a okamžitě nanést do aparatury tak, aby zbylo místo pro nanesení zaostřovacího gelu asi 5 mm vysokého.
- Nanesený gel převrstvit vodou nebo izopropanolem, aby se zabránilo přístupu kyslíku, který zabraňuje polymeraci gelu. Po zpolymerování (asi za 10 – 30 min) se znovuobjeví rozhraní mezi vodou nebo izopropanolem a gelem.
- Po zpolymerování gelu vodu nebo izopropanol důkladně odsát a mezi sklíčka vložit teflonový hřebínek.
- Připravit zaostřovací gel (celkový objem 5,042 ml):

H <sub>2</sub> O	3,1 ml
4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8	1,25 ml
AA/BIS	0,65 ml
TEMED	7 µl
10% (w/v) APS	35 µl
- Po namíchání nanést zaostřovací gel do aparatury s připraveným teflonovým hřebínkem.
- Po zpolymerování zaostřovacího gelu opatrně vytáhnout hřebínek a jamky důkladně propláchnout elektrodoým pufr, aby se odstranily případné kousky gelu v jamkách.
- Mimo hlavní sestavit aparaturu podle návodu.
- Prostor mezi gely naplnit elektrodoým pufr a ověřit, zda pufr neprotéká aparaturou. Pokud protéká, je nutné aparaturu rozebrat, těsnící gummy odmastit ethanolem a opět sestavit.

### **Příprava vzorků a vlastní elektroforéza**

- K proteinovým vzorkům v Laemmli pufru přidat 1/20 objemu 1 M DTT a inkubovat asi 5 min při 95 °C. Během inkubace dochází k denaturaci proteinů a k vazbě SDS na proteinové řetězce.
- Mimo hlavní nádobu nanést pomocí mikrodávkovacího Hamilton do jamek gelu proteinové vzorky.
- Aparaturu s gely vložit do hlavní nádoby a naplnit ji elektrolytem.
- Aparaturu napojit na zdroj napětí. Pro průchod zaostřovacím gelem nastavit hodnotu konstantního proudu na 10 mA/0,75 mm gel, po vstupu vzorků do separačního gelu zvýšit hodnotu konstantního proudu na 20 mA na každý gel.
- Po dostatečném rozdělení vzorků aparaturu odpojit od zdroje napětí, rozebrat ji a gely případně označit pro zachování orientace nanášek.
- Dále pokračovat barvením gelů nebo přenosem proteinů na membránu metodou Western blot.

### **Barvení a sušení gelů**

- Gely fixovat asi 20 min ve fixačním roztoku, pak je na nejméně 20 min přenést do barvicího roztoku (Coomassie brilliant blue).
- Po obarvení gel vložit do odbarvovacího roztoku. Po odbarvení pozadí přidat do čistého odbarvovacího roztoku glycerol na výslednou koncentraci 3%. Gel zde ponechat 30 min.
- Gel vysušit na papíře Whatman pomocí vakuové sušičky (Model 578, BIO-RAD).

### **Roztoky**

**AA/BIS:** 30 g akrylamidu (Sigma)

0,8 g N,N'-metylenbisakrylamidu (Merck)

rozpustit do 100 ml vody a přefiltrovat přes 0,45 µm filtr, skladovat v temnu při 4 °C

**4x Tris-HCl/SDS pH 8,8:** 1,5 M Tris-HCl

0,4% SDS

91 g Tris base rozpustit do 300 ml vody; pH dorovnat 1 N

HCl na 8,8; doplnit vodou na objem 500 ml; přefiltrovat přes

0,45 µm filtr; přidat 2 g SDS; skladovat při 4 °C

**4x Tris-HCl/SDS pH 6,8:** 0,5 M Tris-HCl

0,4% SDS

6,05 g Tris base rozpustit do 40 ml vody; pH dorovnat 1 N HCl na 6,8; doplnit vodou na objem 100 ml; přefiltrovat přes 0,45 µm filtr; přidat 0,4 g SDS; skladovat při 4 °C

**5x elektrodový pufr:** 125 mM Tris (1,51 g na 100 ml vody)

950 mM glycin (7,2 g na 100 ml vody)

0,5% SDS (0,5 g na 100 ml vody)

dorovnat pH na hodnotu 8,3

**10% (w/v) APS:** NH<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, rozpouštět čerstvě

**Fixační roztok:** 20% methanol, 10% kyselina octová v deionizované vodě

**Barvicí roztok:** 20% methanol; 0,117% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD); 0,051% (v/v) Bismarck Brown R (Sigma); 7% kyselina octová ve vodě

**Odbarvovací roztok:** 20% methanol, 7% kyselina octová ve vodě

### 3.2.6 Western blot

*S využitím soupravy BIO-RAD Trans-blot*

- Nastříhat 2 papíry Whatman 3 mm na rozměr 11 x 8 cm, dále NC nebo PVDF membránu (BIO-RAD) na rozměr gelu a připravit si Petriho misku (průměr 18 cm) s asi 100 ml chlazeného transferového pufru. Další asi 1 l transferového pufru mít připravený v ledničce.
- NC membránu ponořit do transferového pufru a nechat sytit asi 5 min. PVDF membránu opláchnout v methanolu, teprve pak přenést do transferového pufru a nechat nasytit.
- Do Petriho misky s chlazeným transferovým pufrům ponořit podložku na skládání „sendviče“. Skládání „sendviče“ musí probíhat pod hladinou pufru. Na černou část podložky položit navlhčenou těsnicí porézní vložku („pad“), ze které byl vytlačen vzduch. Na „pad“ položit navlhčený papír Whatman, na něj gel, membránu, druhý papír a „pad“. Mezi vrstvami nesmí být vzduch. Po přiložení

druhého papíru lze vytlačit vzduchové bubliny jemným převálcováním zkumavkou.

- „Sendvič“ uzavřít čirou částí podložky, stlačit, zajistit a zasunout do držáku blotovacích desek v nádobě. Čirá deska musí směřovat k + pólu (červený) a černá deska k – pólu (černý).
- Do elektroforézové vany přidat chlazený transferový pufr, vložit nádobku s ledem, míchadélko a postavit na míchačku. Připojit zdroj napětí a nastavit hodnoty na 90 – 110 V. Podle potřeby vyměňovat led. Přenos je dokončen asi po 90 až 120 min.
- Po skončení přenosu odpojit zdroj napětí, vyjmout desku z držáku a rozebrat blot. Tužkou lze na membránu poznačit stranu s proteiny.
- Membránu s přenesenými proteiny opláchnout v pufru TBS. Membránu PVDF zablokovat glutaraldehydem, pak 3x 5 min opláchnout v TBS. Gel obarvit v Coomssie blue (viz kapitola 3.2.8). O kvalitě přenosu se lze přesvědčit pomocí množství přenesených markerů nebo vizualizací proteinů zbylých v gelu pomocí barvicího roztoku.
- Membránu lze po opláchnutí TBS pufru skladovat zatavenou v PE folii při 4 °C nebo ihned provést imunodetekci protilátkou.

## **Roztoky**

**Transferový pufr:** 25 mM Tris (3,03 g na 1 l roztoku)

192 mM glycin (14,4 g na 1 l roztoku)

20% (v/v) methanol (200 ml v 1 l roztoku)

**TBS:** 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 ml NaCl

### **3.2.7 Imunodetekce proteinů na membráně**

*Pomocí konjugátu sekundární protilátky s alkalickou fosfatázou*

- Membráno po promytí roztokem TBS (viz Western blot) nebo vytaženou z PE folie blokovat 1 hod v 3% gelatin/TBS (5% mléko/0,1% TTBS) ve víčku 96-ti jamkové destičky za mírného kývání na kývačce při pokojové teplotě.

- Odmýt 10 min v 1% gelatin/0,05% TTBS. Poté lze membránu skladovat zatavenou v PE folii při 4 °C.
- Membránu po třech stranách zatavit do PE folie, přidat 3 – 7 ml roztoku primární protilátky (přehled protilátek a jejich ředění je v kapitole 3.1.4) ředěné v 1% gelatin/0,05% TTBS (5% mléko/0,1% TTBS). Zatavit i zbývající stranu membrány, přesvědčit se, že neprotéká, a inkubovat 1 hod na kývačce při pokojové teplotě a přes noc při 4 °C, nebo 3 hod při pokojové teplotě.
- Membránu vyjmout, opláchnout v roztoku TTBS a poté odmývat 3x 10 min v TTBS.
- Zatavit membránu do PE folie a inkubovat 60 min při pokojové teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (AP) ředěnou v 1% gelatin/0,05% TTBS (3% mléko/0,05% TTBS).
- Po skončení inkubace membránu krátce opláchnout v AP pufru a ihned položit lícem do vyvíjecího roztoku. Inkubovat ve tmě při pokojové teplotě do vybarvení.
- Vyvíjení ukončit promytím membrány v 5 – 10 mM EDTA (pH 8,0), opláchnutím deionizovanou vodou a vysušením membrány.

### **Roztoky**

**TBS:** 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 ml NaCl

**TTBS:** TBS s 0,05% (0,1%) Tween 20 (Serva)

Tween pomalu pipetovat pipetou s ustřiženou špičkou, resuspendovat do malého objemu, poté doplnit TBS na požadovaný objem

**AP pufr:** 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Vyvíjecí roztok:** připravit naředěním zásobních reagensů (BIO-RAD) v AP pufru

Reagent A: 30 mg NBT v 70% DMF; 100x koncentrovaný

Reagent B: 15 mg BCIP ve vodě; 100x koncentrovaný

### **3.2.8 Fosfátové přenosy**

#### **Kultivace**

- Večer zaočkovat buňky (kličkou nátěr z plotny) do 10 ml media se standardní koncentrací fosfátu, kultivace na třepačce přes noc při 30 °C, 200 rpm.

- Ráno přeočkovat do 40 ml media se standardní koncentrací fosfátu na  $OD_{600} \sim 0,25$ , kultivace na třepačce ve 30 °C, 200 rpm do dosažení  $OD_{600} \sim 0,7$ .
- Po dosažení  $OD_{600} \sim 0,7$  buňky opět přeočkovat do 60 ml media se standardní koncentrací fosfátu na  $OD_{600} \sim 0,2$ , kultivovat do dosažení  $OD_{600} \sim 0,5$ .

### **Fosfátový přenos**

- Provést odběr „před promytím“, zpracovat tento odběr (viz dále).
- Spočítat, kolik kultury nutno odebrat, aby kultura po resuspendování peletu do 30 ml media měla  $OD_{600} \sim 0,5$ . Tento objem přenést do dvou 50 ml centrifugačních zkumavek.
- Kultury v centrifugačních zkumavkách centrifugovat (Jouan MR 22i, 3000 rpm, 3 min, pokojová teplota), supernatant odstranit.

*Začít měřit čas – čas 0 = okamžik, kdy se buněk dotkne medium bez přidaného fosfátu*

- Propláchnout - pelet v jedné centrifugační zkumavce resuspendovat do 45 ml (1,5krát objem kultury po přenosu, ze které se dělají odběry) media se standardní koncentrací fosfátu a pelet ve druhé centrifugační zkumavce resuspendovat do 45 ml media bez přidaného fosfátu, centrifugovat (Jouan MR 22i, 3000 rpm, 3 min, pokojová teplota), supernatant odstranit. Postup ještě jednou zopakovat.
- Pelet proplachovaný mediem se standardní koncentrací fosfátu resuspendovat do 30 ml media se standardní koncentrací fosfátu, pelet proplachovaný mediem bez přidaného fosfátu resuspendovat do 30 ml media bez přidaného fosfátu. Kultury převést do Erlenmeyerovy baňky, umístit zpět na třepačku a kultivovat (30 °C, 200 rpm).

*Proces proplachování nesmí od začátku měření času trvat déle než 25 - 30 min.*

### **Zpracování odběrů**

- V určených časech provést další odběry. Čas odběru například 60 minut znamená, že vzorek byl odebrán 60 minut po vrácení na třepačku. Ve skutečnosti je to tedy čas promytí (25 minut) + 60 minut.
- Odebírat 2 ml kultury (v pozdějších časech stačí 1 až 1,5 ml).



- Odebranou kulturu ihned stočit (Hettich MIKRO 20, 1 min, 13000 rpm, pokojová teplota), supernatant odstranit (vylitím), zamrazit v tekutém dusíku, skladovat při -80 °C.

### 3.2.9 Izolace chromozomální DNA z kvasinek

*Pro PCR; Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe; Hoffman and Winston, 1987*

- Zaočkovat 10 – 20 ml media kvasinkami, inkubovat na třepačce do dosažení stacionární fáze ( $OD_{600} \sim 3$ ).
- Centrifugovat v 50 ml centrifugačních zkumavkách (Jouan MR 22i, 3000 rpm, 3 min, pokojová teplota). Odstranit supernatant, buněčný pelet resuspendovat v 0,5 ml deionizované vody a převést do mikrozukavky se šroubovacím víčkem.
- Krátce centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13000 rpm, 5 s, pokojová teplota), supernatant opět odstranit. Sediment resuspendovat pomocí vortexování do zbývající kapaliny.
- K suspenzi přidat 200  $\mu$ l yeast lysis pufru, 200  $\mu$ l směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol a 300 mg skleněných kuliček.
- Intenzivně vortexovat 3 – 4 minuty (vždy 30 s vortexovat a 30 s chladit na ledu).
- Přidat 200  $\mu$ l TE pufru (pH 8,0) a centrifugovat (Jouan MR 22i, 20000 g, 10 min, 4 °C). Horní vodnou fázi převést do čisté mikrozukavky.
- Přidat 1 ml chlazeného 96% ethanolu. Promíchat překlápěním zkumavky, nevortexovat. Opět centrifugovat (Jouan MR 22i, 20000 g, 5 min, 4 °C).
- Supernatant odstranit, sediment resuspendovat ve 400  $\mu$ l TE pufru, přidat 3  $\mu$ l RNasy A (10 mg/ml). Inkubovat 5 min při 37 °C.
- Přidat 10  $\mu$ l  $NH_4Ac$  a 1 ml chlazeného 96% ethanolu. Promíchat překlápěním, inkubovat 1 hod při -20 °C.
- Po skončení inkubace centrifugovat (Jouan MR 22i, 20000 g, 5 min, 4 °C). Sediment 2x promýt vychlazeným 70% ethanolem a resuspendovat v 50  $\mu$ l deionizované vody.
- Kvalitu izolace zjistit elektroforeticky nebo s využitím přístroje NanoDrop (Thermo Scientific).

## **Roztoky**

**Yeast lysis pufr:** 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8),  
1 mM EDTA

**Fenol:chloroform:izoamylalkohol** - smíchat v poměru 25:24:1, směs převrstvit vodou,  
skladovat při -20 °C

### **3.2.10 Izolace celkové RNA z kvasinek**

*S využitím soupravy MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies).*

*Je nutné dodržovat zásady práce s RNA, používat plast a vodu zbavenou RNáz. Veškerý plast 3x sterilizovat v autoklávu, vodu ošetřit pomocí DEPC (Sigma) (1 ml na 1 l vody, inkubovat přes noc v digestoři, následně deaktivovat DEPC sterilizací v autoklávu).*

#### **Purifikace RNA**

- Rozmrazit už připravený buněčný pelet skladovaný při -80 °C nebo připravit čerstvý. Optimálnímu množství buněk pro izolaci odpovídá 1 – 1,5 ml kultury ve střední logaritmické fázi.
- Pro každý vzorek připravit směs 300 µl Extraction Reagent for RNA a 1 µl Proteinase K (50 µg/ µl). Tuto směs přidat ke vzorku a krátce intenzivně vortexovat.
- Inkubovat 10 – 15 min při 70 °C, každých 5 minut intenzivně vortexovat.
- Po skončení inkubace umístit vzorky na led, inkubovat na ledu 3 – 5 min. Poté přidat 175 µl MPC Protein Precipitation Reagent. V roztoku se mohou vytvořit sraženiny. Intenzivně vortexovat 10 s.
- Vzorek centrifugovat (Jouan MR 22i, 20000 g, 10 min, 4 °C), supernatant převést do čisté 1,5 ml centrifugační zkumavky.
- K supernatantu přidat 500 µl vychlazeného izopropanolu, promíchat překlápním zkumavky (30 – 40x).
- Vysráženou RNA usadit centrifugací (Jouan MR 22i, 20000 g, 10 min, 4 °C), supernatant důkladně odsát.

*Pokud je nutné ze vzorku odstranit kontaminující DNA (například pro qRT-PCR), pokračovat další částí protokolu Odstranění kontaminující DNA. Pokud stopy kontaminující DNA nevadí, pokračovat dál.*

- Vysráženou RNA 2x opláchnout 400 µl 70% ethanolu. Pomocí pipety ethanol důkladně odstranit.
- Pelet resuspendovat do 35 µl deionizované vody zbavené RNáz nebo do TE pufru (TE pufr ale může interferovat s dalšími postupy, například s reverzní transkripcí).
- Ke vzorku přidat 1 µl RiboGuard™ RNase Inhibitor.
- Kvalitu a množství izolované RNA zjistí pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific).
- Skladovat při -80 °C.

#### **Odstranění kontaminující DNA**

- Důkladně pomocí pipety odstranit izopropanol.
- Na jeden vzorek připravit směs 20 µl 10x DNase Buffer, 175 µl deionizované vody zbavené RNáz a 5 µl RNase-Free DNase I (1 U/ µl). Celkový objem směsi je tedy 200 µl na vzorek.
- Pelet RNA důkladně resuspendovat v připravené DNázové směsi. Resuspendovat pipetou, nevortexovat.
- Inkubovat při 37 °C po dobu 10 - 30 min.
- Po skončení inkubace přidat ke vzorku 200 µl 2x T and C Lysis Solution. Intenzivně vortexovat po dobu 5 s.
- Přidat 200 µl MPC Protein Precipitation Reagent. Ve vzorku se mohou vytvořit sraženiny. Vzorek důkladně promíchat vortexováním po dobu 10 s, pak inkubovat 3 – 5 min na ledu.
- Vzorek centrifugovat (Jouan MR 22i, 20000 g, 10 min, 4 °C), supernatant přenést do čisté 1,5 ml centrifugační zkumavky.
- K supernatantu přidat 500 µl vychlazeného izopropanol, promíchat překlápěním zkumavky (30 – 40x).
- Vysráženou RNA usadit centrifugací (Jouan MR 22i, 20000 g, 10 min, 4 °C), supernatant důkladně odsát.

- Vysráženou RNA 2x opláchnout 400  $\mu$ l 70% ethanolu. Pomocí pipety ethanol důkladně odstranit.
- Pelet resuspendovat do 35  $\mu$ l deionizované vody zbavené RNáz nebo do TE pufru (TE pufr ale může interferovat s dalšími postupy, například s reverzní transkripcí).
- Ke vzorku přidat 1  $\mu$ l RiboGuard<sup>TM</sup> RNase Inhibitor.
- Kvalitu a množství izolované RNA zjistit pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific).
- Skladovat při -80 °C.

### 3.2.11 Reverzní transkripce

*Pomocí soupravy ReverAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)*

*Je nutné dodržovat zásady práce s RNA, používat plast a vodu zbavenou RNáz. Veškerý plast 3x sterilizovat v autoklávu, vodu ošetřit pomocí DEPC (Sigma) (1 ml na 1 l vody, inkubovat přes noc v digestoři, následně deaktivovat DEPC sterilizací v autoklávu).*

*Přípravu směsi je vhodné provádět na ledu.*

- Do 0,5 ml mikrozkušavek napipetovat reagenty podle tabulky:

<b>Templátová RNA</b>	Celková RNA	0,1 – 5 $\mu$ g
	Poly(A) mRNA	10 ng – 0,5 $\mu$ g
	Genově specifická RNA	0,01 pg – 0,5 $\mu$ g
<b>Primer</b>	Oligo (dT) <sub>18</sub>	1 $\mu$ l
	Náhodné hexanukleotidy	1 $\mu$ l
	Genově specifický primer	15 – 20 pmol
<b>Voda zbavená RNáz</b>		Doplnit do 12 $\mu$ l
<b>Celkový objem</b>		12 $\mu$ l

- Pokud templátová RNA obsahuje hodně GC bohatých oblastí nebo vytváří sekundární struktury, směs krátce zamíchat, centrifugovat a inkubovat 5 min při 65 °C. Poté opět centrifugovat a nechat ochladit na ledu.

- K připravené směsi přidat ostatní reagenty:

5x Reaction Buffer	4 $\mu$ l
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 mM dNTP Mix	2 $\mu$ l
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Konečný celkový objem	20 $\mu$ l

- Promíchat pipetou, směs usadit centrifugací.
- Při použití primerů oligo (dT)<sub>18</sub> nebo genově specifických primerů inkubovat 60 min při 42 °C; při použití náhodných hexanukleotidů inkubovat 5 min při 25 °C a následně 60 min při 42 °C. Při použití templátové RNA hodně bohaté na GC páry může být inkubační teplota zvýšena až na 45 °C.
- Po skončení inkubace ukončit reakci zahřátím směsi na 70 °C po dobu 5 min.
- Skladovat při -80 °C.

### 3.2.12 Amplifikace DNA pomocí PCR

*Reakce je vhodné míchat na ledu. Výsledný objem reakcí je 10 – 100  $\mu$ l.*

- V mikrozkuhavce o objemu 0,2 – 0,5 ml smíchat reagenty:

Roztok a jeho zásobní koncentrace	Podíl na celkovém objemu	Výsledná koncentrace
deionizovaná voda	x	-
10 $\times$ polymerázový pufr (Fermentas)	1/10	1 $\times$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM; Fermentas)	1/10	1,5 až 2,5 mM dle aplikace
dNTP (každý 2,5 mM; Fermentas)	1/10	250 $\mu$ M
primer 1 (10 $\mu$ M)	1/10	1 $\mu$ M
primer 2 (10 $\mu$ M)	1/10	1 $\mu$ M
vzorek DNA		

- V případě použití templátové DNA přímo z kvasinkových kolonií („colony“ PCR) se sterilní bílou špičkou dotknout příslušné kvasinkové kolonie a buněčnou masu resuspendovat do sterilní deionizované vody o ½ výsledného objemu reakce. Suspenzi pro uvolnění DNA z buněk povařit 5 min při 95 °C. Poté ochladit na ledu a přidat ostatní reagenty.
- K reakční směsi přidat DNA polymerázu v množství doporučené výrobcem (Taq DNA Polymerase, Fermentas, 0,5 µl/100 µl směsi).
- Inkubovat v PCR cykléru (Peltier PTC-200, MJ Research, USA) podle příslušného programu (kapitola 3.1.7).
- Produkty PCR analyzovat elektroforeticky.

### 3.2.13 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

- Elektroforézu provádět v přístroji na horizontální gelovou elektroforézu se vzdáleností mezi elektrodami 14 cm v pufru 1x TAE.
- Gely připravovat z agarózy SeaPlaque LE, tyto gely používat pro eluční účely. Gely připravené z agaróz SeaKem a Nu-Sieve též pro analytické účely (vše FMC). Koncentrace agarózových gelů se pohybuje v rozmezí 0,8 - 2,5% v závislosti na velikosti dělených fragmentů DNA. Gely připravovat o tloušťce 3 – 5 mm a délce 6 – 10 cm.
- Do jamek o rozměrech 4 - 15× 1 mm nanést 5 – 50 µl vzorku (10 ng – 2 µg DNA) s 1/5 (pro eluci 1/10) objemu vzorkového pufru, dále pak 3 - 10 µl vzorku standartu velikostí fragmentů.
- Vzorky dělit při napětí 3 – 10 V/cm.
- Gel barvit po dobu 10 – 15 min v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml). Přebývající ethidium bromid odmyt v destilované vodě. Gel fotografovat v procházejícím UV záření s červeným/UV-filtrem. Snímky exponovat 2,5 - 4 s (digitální fotoaparát Panasonic DMC-FZ7).

### 3.2.14 **Přečištění PCR produktů pomocí NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey – Nagel)**

- Vyříznout fragment z agarózového gelu, fragment zvážit a umístit do mikrozkušavky.
- Na 100 mg agarózového gelu přidat 200 µl Buffer NT. Inkubovat při 50 °C s občasným promícháním na vortexu, dokud se gel kompletně nerozpustí (doba inkubace závisí na velikosti fragmentu, obvykle 5 – 10 min).
- Umístit kolonku do sběrné zkumavky a na kolonku přenést gel rozpuštěný v Buffer NT. Centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 2 min, 13000 rpm, pokojová teplota) a vylít obsah sběrné zkumavky.
- Kolonku umístit zpět do sběrné zkumavky a přidat 600 µl Buffer NT3. Opět centrifugovat, obsah sběrné zkumavky vylít.
- Kolonku opět umístit do sběrné zkumavky. Membránu kolonky vysušit centrifugací (Hettich MIKRO 20, 2 min, 13000 rpm, pokojová teplota).
- Kolonku s vysušenou membránou umístit do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Na kolonku přidat 15 – 50 µl Elution Buffer NT nebo deionizované vody a inkubovat 1 min při pokojové teplotě. Po skončení inkubace centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 2 min, 13000 rpm, pokojová teplota).

### 3.2.15 **qRT-PCR**

*Reakce je vhodné míchat na ledu. Předpřipravené směsi pro qRT-PCR obsahují fluorescenční barvu, proto je vhodné při přípravě reakcí postupovat rychle, aby nedošlo k jejímu vysvícení.*

#### 3.2.15.1 **qRT-PCR s využitím iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD)**

- Podle počtu reakcí připravit v mikrozkušavce směs sestávající z komerční směsi na qRT-PCR a primerů.

Směs na jednu reakci obsahuje:

12,5 µl iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD)

0,75 µl primeru 1 (zásobní koncentrace 10 µM)

0,75 µl primeru 2 (zásobní koncentrace 10 µM)

6 µl deionizované vody

- Směs pomocí multikanálové pipety pipetovat po 20 µl do spojených mikrozkušavek pro qRT-PCR o objemu 0,2 ml.
- Do mikrozkušavek opět pomocí multikanálové pipety přidat 5 µl směsi sestávající z templátové DNA a deionizované vody. Mikrozkušavky uzavřít.
- Mikrozkušavky vložit do přístroje (je nutné dávat pozor na správné pořadí!) a inkubovat dle příslušného programu.

Program pro qRT-PCR:

Cycle 1: (1X)

Step 1: 95.0 °C for 00:30.

Cycle 2: (2X)

Step 1: 95.0 °C for 01:00.

Cycle 3: (1X)

Step 1: 95.0 °C for 02:00.

Cycle 4: (40X)

Step 1: 95.0 °C for 00:15.

Step 2: 60.0 °C for 00:30.

Step 3: 72.0 °C for 00:20.

Data collection and real-time analysis enabled.

Cycle 5: (1X)

Step 1: 95.0 °C for 01:00.

Cycle 6: (91X)

Step 1: 95.0 °C-50.0 °C for 00:10.

Increase set point temperature after cycle 2 by -0.5 °C

Melt curve data collection and analysis enabled.

- Primární analýza dat provedena s využitím iQ™5 Optical System Software Version 1 (BIO-RAD).

### 3.2.15.2 qRT-PCR s využitím LightCycler® 480 II (Roche Applied Science)

- Podle počtu reakcí připravit v 1,5 ml mikrozkušavce směs sestávající z komerční směsi na qRT-PCR a primerů.



Směs na jednu reakci obsahuje:

6,25  $\mu$ l MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR<sup>®</sup> Assay NO ROX

(Eurogentec)

0,375  $\mu$ l primeru 1 (zásobní koncentrace 10  $\mu$ M)

0,375  $\mu$ l primeru 2 (zásobní koncentrace 10  $\mu$ M)

- Směs pomocí dávkovače (Eppendorf Xplorer<sup>®</sup>) pipetovat po 7  $\mu$ l do jamek 384 jamkové destičky.
- Ke směsi opět pomocí dávkovače přidat 5,5  $\mu$ l směsi templátové DNA a deionizované vody.
- Destičku zalepit fólií a reakční směsi promíchat s využitím vortexu.
- Reakční směs usadit centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5430, 3 min, 1500 g, pokojová teplota).
- Vložit destičku do přístroje a inkubovat dle příslušného programu.

Program pro qRT-PCR:

1. preinkubace 95 °C, 5 min

2. amplifikace (40x): 95 °C, 15 s

60 °C, 30 s

72 °C, 20 s, po proběhnutí tohoto kroku odečíst fluorescenci

3. analýza táním: 95 °C, 5 min

50 °C, 1 min

po 1 min zvyšovat teplotu o 1 °C, kontinuálně odečítat

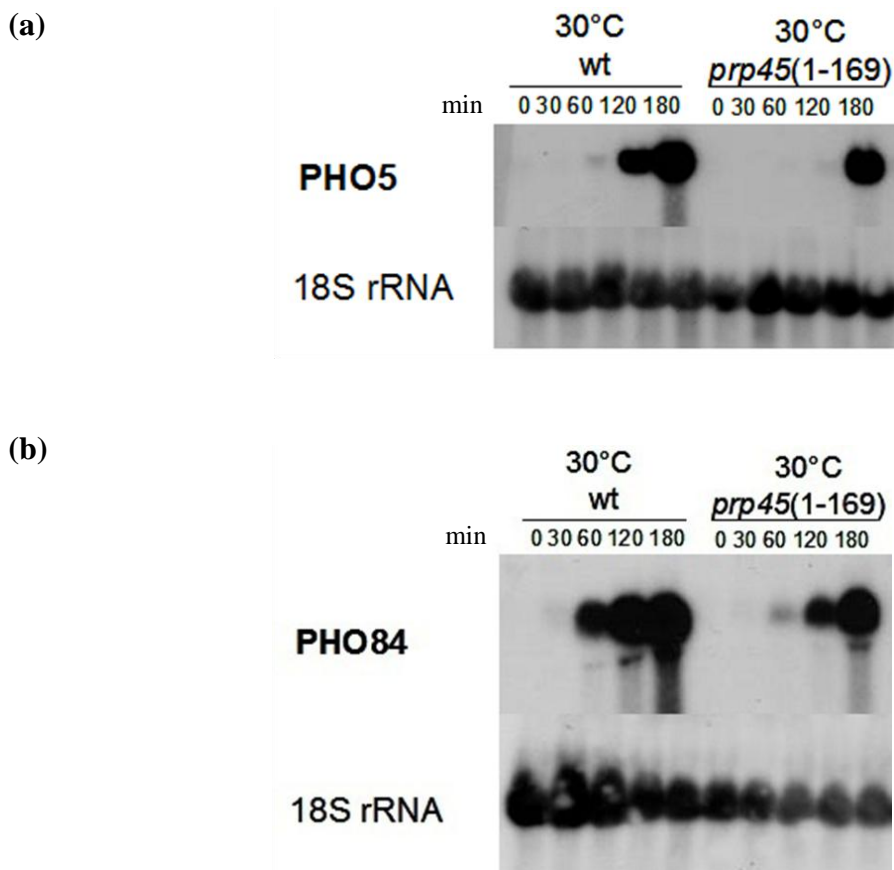
fluorescenci

- Primární analýza dat provedena s využitím LightCycler<sup>®</sup> 480 Software Version 1.5 (Roche Applied Science).

## 4 Výsledky

### 4.1 Cíle diplomového projektu

Můj diplomový projekt navazuje na práci Kateřiny Abrhánové, která se ve své disertační práci zabývala charakterizací role proteinu Prp45 u kvasinky *S. cerevisiae*. Pro tento účel využívala buňky s chromozomální mutací *prp45(1-169)* (viz Literární přehled), jejichž vlastnosti porovnávala s vlastnostmi buněk s divokou alelou genu *PRP45*. Funkce lidského orthologa Prp45, proteinu SNW1/SKIP, je kromě sestřihu spojována také s regulací iniciační a elongační fáze transkripce (viz Literární přehled). Vliv proteinu Prp45 na tyto procesy dosud nebyl v literatuře dokumentován. K. Abrhánová se proto rozhodla ověřit, zda i kvasinkový protein Prp45 neovlivňuje procesy spojené s transkripcí. Přistoupila proto k charakterizaci změn v množství transkriptů u buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami, pro tento účel využila techniku microarrays. Už v permissivní teplotě 30 °C byly pozorovány signifikantní změny v expresním profilu mutovaných buněk u 32 různých genů. Mezi geny, jejichž exprese byla ovlivněna nejvíce, patří některé geny dráhy PHO. Množství transkriptů těchto genů bylo u mutovaných buněk výrazně sníženo (K. Abrhánová, nepublikované výsledky). Vzhledem k tomu, že exprese genů dráhy PHO je relativně snadno regulovatelná, rozhodla se s využitím techniky Northern blot charakterizovat vliv mutace *prp45(1-169)* na expresi těchto genů podrobněji. Na obr. 4.1 jsou zobrazeny reprezentativní výsledky analýzy na příkladu dvou z testovaných genů, *PHO5* a *PHO84*. Je patrné, že indukce exprese těchto genů byla u buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami pomalejší.



**Obr. 4.1 Indukce exprese genů *PHO5* (a) a *PHO84* (b) je u buněk s mutací *prp45(1-169)* pomalejší.** Buňky s mutací a buňky divokého typu byly kultivovány v minimálním fosfátovém mediu a poté přeneseny do minimálního media bez fosfátu, čímž došlo k indukci exprese genů fosfátového metabolismu. Nárůst hladiny mRNA genů dráhy PHO byl zjišťován v různých časech po indukci technikou Northern blot. Obrázek zobrazuje expresi genů *PHO5* (a) a *PHO84* (b) v různých časech (min) po indukci, jak je indikováno nad jednotlivými drahami. (K. Abrahámová, nepublikované výsledky)

Pozorované změny v hladině transkriptů těchto genů mohou být důsledkem buď přímého vlivu proteinu Prp45 na jejich transkripci, nebo nepřímým důsledkem aberantního sestřihu jiných faktorů.

V literatuře bylo dokumentováno, že indukce exprese genů *PHO5* a *PHO84* je ovlivňována také některými efekty chromatinových modifikací, např. Set1, Paf1, Rad6 a Bre1 (Carvin and Kladde, 2004). Bylo proto zajímavé zjistit, zda vliv proteinu Prp45 na indukci exprese těchto genů nesouvisí s těmito proteiny. Vzhledem k publikované roli proteinu Prp45 při sestřihu pre-mRNA (Albers et al., 2003, Gahura et al., 2009) by mutace v tomto proteinu mohla potenciálně zapříčinit aberantní sestřih těchto faktorů a tím nepřímým způsobem ovlivnit indukci exprese genů dráhy PHO. Ani jeden z těchto proteinů nebo ostatních komponent komplexů, kterých jsou tyto proteiny součástí (viz

Literární úvod), však intron neobsahují. Intron rovněž neobsahují geny *PHO5*, *PHO84*, ani ostatní geny fosfátového metabolismu s nalezenou změnou v expresním profilu u buněk s mutací *prp45(1-169)*. Jak bylo popsáno v kapitole 2.2, geny dráhy PHO jsou pod kontrolou transkripčního faktoru Pho4, jehož lokalizace do jádra je regulována prostřednictvím fosforylace komplexem cyklin dependentní kinázy Pho85 a cyklinu Pho80. Kináza Pho85 intron obsahuje. Ovlivnění indukce exprese genů dráhy PHO prostřednictvím aberantního sestříhu tohoto proteinu u buněk s mutací *prp45(1-169)* se však nezdá být příčinou zpožděné indukce těchto genů, protože u kmene s delecí genu *PHO85* byla pozorována konstitutivní aktivace genů dráhy PHO (Huang et al., 2002).

Zdá se proto, že protein Prp45 ovlivňuje indukci exprese genů PHO prostřednictvím přímé regulace transkripce, ať už ve spojitosti s výše zmíněnými efekty, nebo ve spojitosti s jinými proteiny. Na spojitost proteinu Prp45 s regulací elongace transkripce také ukazují některé dosud nepublikované výsledky z laboratoře J. Beggs.

Cílem mého diplomového projektu bylo blíže charakterizovat roli proteinu Prp45 při indukci exprese genů dráhy PHO, konkrétně genů *PHO5* a *PHO84*. Tyto geny jsou poměrně dobře prostudovány z hlediska změn ve struktuře chromatinu (v jejich posttranslačních modifikacích, mobilitě nukleosomů atd.) v závislosti na stavu exprese (vypnuté vs. zapnuté; viz Literární přehled). K detekci změn exprese těchto genů jsme se rozhodli použít metodu kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction). Postup analýzy exprese bude popsán v následující kapitole.

Pro splnění zadání mého diplomového projektu byly stanoveny dílčí cíle:

1) Ověřit výsledky získané technikou Northern blot metodou qRT-PCR a dále nalézt vhodné podmínky pro testování role proteinu Prp45 při expresi genů *PHO5* a *PHO84*.

2) Testovat genetické interakce *PRP45* a vybraných genů účastnících se regulace transkripce. Pro toto testování byly vybrány geny, o jejichž proteinových produktech je známo, že ovlivňují expresi genů PHO (Carvin and Kladde, 2004), a dále geny, které s nimi funkčně souvisejí. Bylo tedy zapotřebí připravit kmeny s mutací *prp45(1-169)*

a současnou delecí ve vybraném genu a testovat jejich fenotypové vlastnosti (syntetická lethality, syntetické zhoršení růstu, citlivost na stresory a teplotu)<sup>2</sup>.

3) U takto připravených kmenů testovat vliv mutací na expresi genů *PHO5* a *PHO84*.

## 4.2 Analýza genové exprese metodou qRT-PCR

Expres genů fosfátového metabolismu *PHO5* a *PHO84* byla indukována přenesením buněk z media se standardní koncentrací fosfátu (7,3 mM) do media s 0,1 mM koncentrací fosfátu nebo do media bez přidaného fosfátu. Expres těchto genů byla stanovována v různých časech po přenosu (protokol viz kapitola 3.2.8).

Ze vzorků odebraných v různých časech po indukci byla izolována celková RNA a provedena reverzní transkripce (kapitoly 3.2.10 a 3.2.11). Jako primery pro reverzní transkripci byly použity buď náhodné hexanukleotidy nebo genově specifické primery. Genově specifické primery rozeznávaly mRNA genů *PHO5* a *PHO84*, jejichž expres byla měřena, a mRNA genů *TOM22* a *ADHI*, které sloužily jako referenční geny při následné analýze pomocí qRT-PCR (viz dále). Jako genově specifické primery pro reverzní transkripci byly použity tytéž zpětné primery, jaké byly používány také do qRT-PCR.

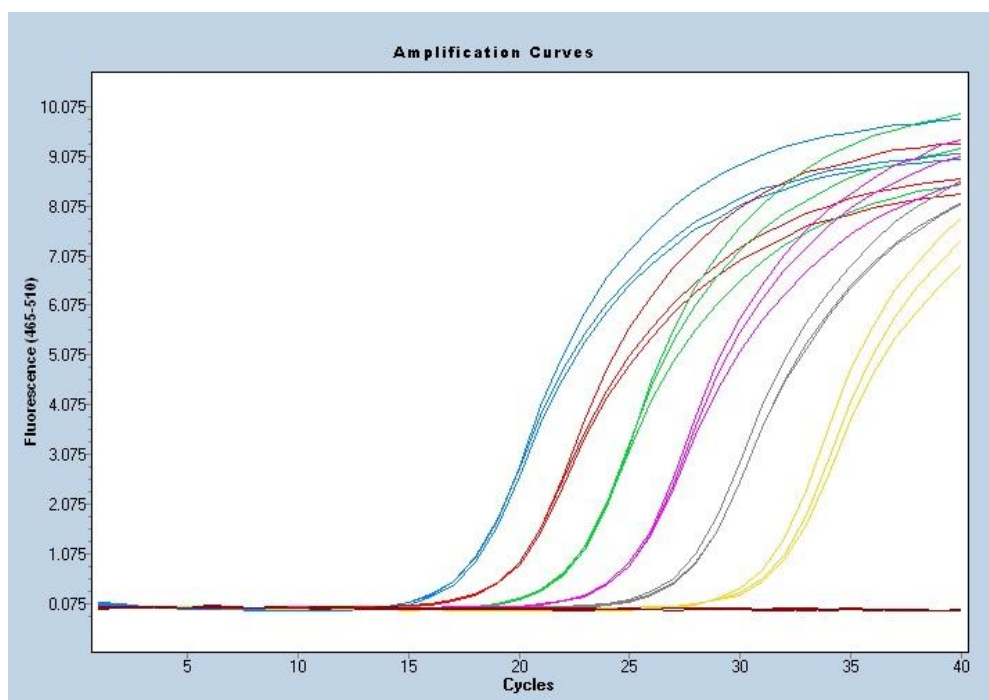
Po reverzní transkripci byl roztok cDNA naředěn tak, aby jako templát do reakce qRT-PCR bylo použito 0,05 – 0,4 µl této cDNA (množství se liší v závislosti na použitém přístroji pro qRT-PCR a podle množství templátové RNA použité při reverzní transkripci; kolik cDNA použít jako templát při reakci qRT-PCR je nutné zjistit empiricky).

Pro qRT-PCR byly použity primery detekující cDNA, která odpovídala transkriptům *PHO5*, *PHO84*, *TOM22* a případně i *ADHI* (primery OG63/OG64, OG61/OG62, OG71/OG72 a MH01/MH02). Primery rozeznávaly kódující oblasti detekovaných genů (3' oblasti genů *PHO5* a *PHO84*, střední část genu *ADHI* a 5' oblast genu *TOM22*) a velikost ampliconů byla v rozsahu od 87 bp v případě genu *TOM22* do 147 bp v případě genu *ADHI* (sekvence primerů viz kapitola 3.1.3). Reakce qRT-PCR byla vždy provedena i s kontrolními vzorky. Kontrolní vzorky vznikaly při reverzní transkripci a sloužily jednak pro odhalení případných kontaminací v reagentech pro reverzní transkripci i pro qRT-PCR (místo templátové RNA použita při reverzní

---

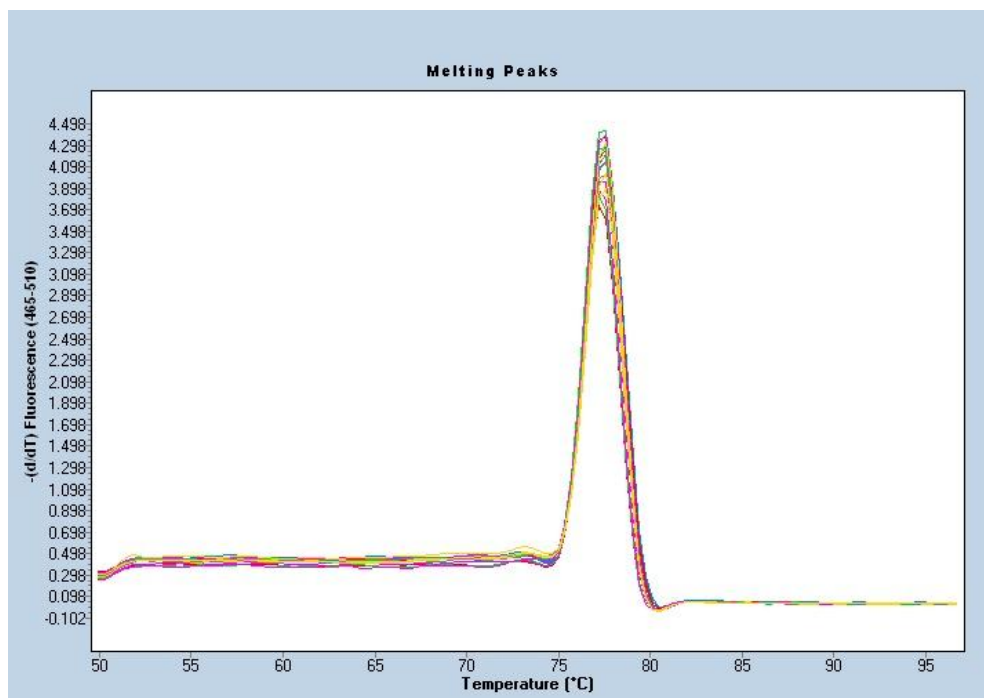
<sup>2</sup> Tento cíl byl realizován ve spolupráci s A. Valentovou.

transkripci deionizovaná voda) a jednak pro kontrolu kontaminace izolované RNA zbytkovou DNA (reverzní transkripce provedena bez reverzní transkriptázy). U každého vzorku byla exprese měřena v triplikátu. Pro detekci vznikajícího produktu při reakci PCR byla použita fluorescenční barva SybrGreen, která byla součástí směsi pro qRT-PCR (iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, BIO-RAD a nebo MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR<sup>®</sup> Assay NO ROX, Eurogentec). Tato sloučenina interkaluje mezi páry bází ve dvoušroubovici DNA a tehdy je excitovatelná zářením o vlnové délce 497 nm. Její emisní spektrum má vrchol v oblasti vlnové délky 520 nm (qPCR Technical Guide, Sigma, 2008). Míra fluorescence je úměrná množství dvojřetězcové DNA ve vzorku. Čím dříve dosáhne míra fluorescence určité hranice (viz poznámka pod čarou 3), tím bylo ve vzorku na počátku více DNA. Fluorescence byla v průběhu reakce měřena vždy po amplifikačním kroku. Výstupem reakce PCR byly amplifikační křivky; příklad amplifikačních křivek z přístroje LightCycler<sup>®</sup> 480 II, Roche Applied Science, je zobrazen na obrázku 4.2.



**Obr. 4.2 Amplifikační křivky z přístroje LightCycler<sup>®</sup> 480 II, Roche Applied Science.** Na ose x je znázorněn počet cyklů, na ose y fluorescence. Zobrazeny jsou amplifikační křivky standardů se zředovací faktorem 5. Vzorky, jejichž amplifikační křivky jsou znázorněny modře, obsahovaly na počátku největší množství templátové DNA. Vzorek, u kterého nedochází k amplifikaci, je negativní kontrola (do reverzní transkripce byla místo templátové RNA použita deionizovaná voda).

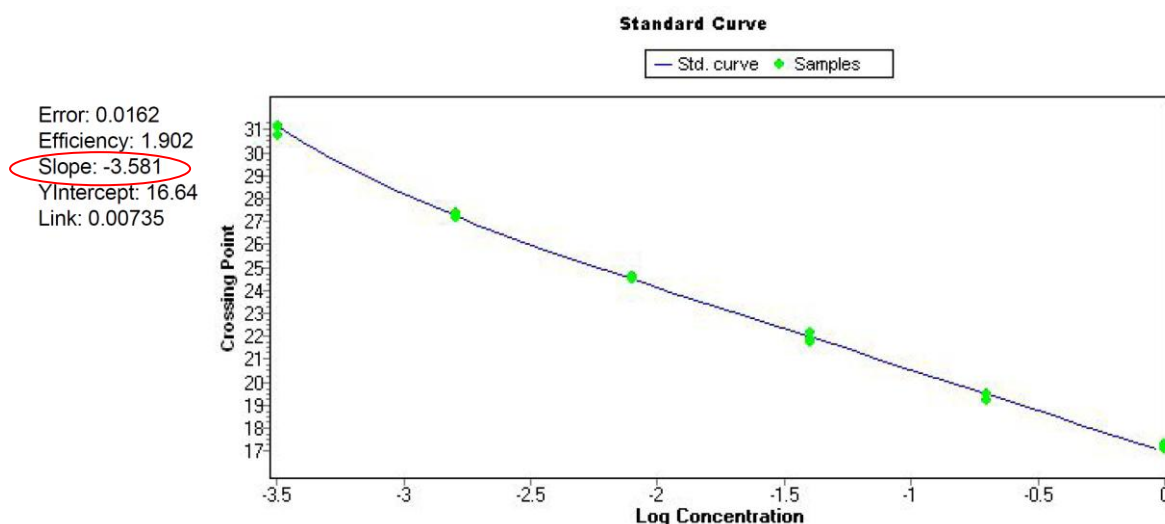
Nevýhodou detekce produktu PCR pomocí interkalačních barev je to, že detekují jakoukoliv dvojřetězcovou DNA, která vzniká při reakci. Je tedy důležité ověřit, že při reakci vzniká jen jeden produkt. Za tímto účelem se provádí tzv. analýza táním (melting analysis). Po proběhnutí reakce je vzorek ochlazen na 50 °C a postupně zahříván až na teplotu 95 °C při současném měření fluorescence. První derivace hodnot naměřené fluorescence podle změny teploty je potom vynesena do grafu proti teplotě (viz obr. 4.3). Přítomnost jednoho vrcholu na křivce indikuje vznik jednoho specifického produktu vzniklého při reakci. Pokud by na křivce bylo přítomno více vrcholů, znamenalo by to, že v průběhu reakce vznikaly ještě další nespecifické produkty a fluorescence jimi vyvolaná interferuje s hodnotami fluorescence vyvolané specifickým produktem.



**Obr. 4.3 Analýza táním.** Křivka sestavená přístrojem LightCycler<sup>®</sup> 480 II, Roche Applied Science. Jeden vrchol na křivce znamená, že při reakci vznikl pouze jeden požadovaný produkt.

Relativní množství detekované cDNA ve vzorcích bylo stanovováno metodou standardní křivky. Pro každý jednotlivý pár primerů použitý během jednoho stanovení byly současně se vzorky připraveny také reakční směsi, které obsahovaly známé množství DNA (standards). Pro sestavení standardní křivky byla použita buď izolovaná celková DNA z kvasinkových buněk, nebo byly smíchány cDNA z různých vzorků získaných při reverzní transkripci. Nejkoncentrovanější standard obvykle obsahoval 300 ng celkové DNA nebo 8x větší množství cDNA, než jaké bylo použito pro detekci

produktu ve vzorcích. Toto množství cDNA bylo zvoleno proto, aby se výsledná hodnota  $C_p$ <sup>3</sup> nejkonzentrovanejšího standardu lišila od vzorků alespoň o tři cykly. Ostatní standardy (celkem 6) byly vytvořeny ředěním nejkonzentrovanejšího standardu se zředovacími faktory 8 (pak se jednotlivé standardy lišily třemi cykly) nebo 5 (jednotlivé standardy se pak lišily o 2,3 cykly). Množství DNA v nejkonzentrovanejším standardu bylo položeno rovno jedné (tzv. hodnota SQ – starting quantity; počáteční množství DNA ve vzorku), u ostatních standardů pak hodnota SQ klesala podle typu ředění vždy 8x nebo 5x oproti hodnotě SQ předchozího standardu. Příklad standardní křivky se zředovacími faktory 5 je na obrázku 4.4. Hodnota směrnice (slope; na obrázku 4.4 označeno červeně) pro reakci probíhající se 100% efektivitou, kdy dochází ke zdvojení množství cílové DNA po každém cyklu, je -3,33. Reakce proběhla s dostatečnou spolehlivostí, pokud je hodnota směrnice standardní křivky v rozmezí -3,9 až -3,0. Tyto hodnoty odpovídají efektivitě 80 - 110 % (qPCR Technical Guide, Sigma, 2008).



**Obr. 4.4 Standardní křivka z přístroje LightCycler® 480 II, Roche Applied Science.**

Hodnoty SQ jednotlivých vzorků pak byly určeny na základě jejich vypočítaného  $C_p$  a standardní křivky. Pro kompenzaci rozdílu v nanáškách jednotlivých vzorků byly

<sup>3</sup>  $C_p$  = crossing point. Jde o počet cyklů, které byly nutné k tomu, aby hodnota fluorescence dosáhla určité hranice. Přístroj LightCycler® 480 II od firmy Roche Applied Science počítá tuto hranici jako maximum druhé derivace každé křivky. Čím nižší  $C_p$ , tím bylo ve vzorku více templátové DNA. Vzorek, který má v porovnání s jiným vzorkem hodnotu  $C_p$  nižší o 3, obsahoval (za předpokladu, že reakce proběhla se 100% účinností, tedy že došlo ke zdvojení DNA po každém cyklu) osmkrát více templátové DNA ( $2^3 = 8$ ).



hodnoty SQ normalizovány na hodnoty SQ naměřené pro housekeeping geny *TOM22* nebo *ADHI*. Ověřili jsme, že normalizace vzorků na gen *TOM22* nebo na gen *ADHI* poskytne stejné výsledky.

Celý postup při normalizaci výsledků a výpočet směrodatné odchylky (SD, standard deviation) je uveden v příkladu 4.1. Výpočet byl prováděn dle Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems, 2008.

#### **Příklad 4.1 Normalizace hodnot naměřených při qRT-PCR a výpočet směrodatné odchylky.**

Průměrné hodnoty SQ pro každý triplikát a směrodatnou odchylku každého triplikátu vypočítá přístroj. Výstup z přístroje je tedy následující:

Vzorek	<i>PHO84</i>		<i>TOM22</i>	
	SQ	SD	SQ	SD
A (wt, +P medium 1)	0,015382	0,000571	0,273838	0,005717
B (wt, +P medium 2)	0,015339	0,000976	0,320795	0,00285
C (wt, -P medium)	1,212274	0,091466	0,322743	0,006516
D (mut., +P medium 1)	0,013663	0,00133	0,213933	0,009091
E (mut., +P medium 2)	0,015234	0,00057	0,232284	0,00292
F (mut., -P medium)	0,361783	0,02609	0,226432	0,003903

Pro další postup bylo nejprve nutno pro všechny naměřené hodnoty spočítat relativní směrodatnou odchylku ( $s_r$ ) podle vzorce:

$$s_r = SD/SQ$$

Vzorek	<i>PHO84</i>			<i>TOM22</i>		
	SQ	SD	$s_r$	SQ	SD	$s_r$
A (wt, +P medium 1)	0,015382	0,000571	0,037121	0,273838	0,005717	0,020877
B (wt, +P medium 2)	0,015339	0,000976	0,063629	0,320795	0,00285	0,008884
C (wt, -P medium)	1,212274	0,091466	0,075450	0,322743	0,006516	0,020189
D (mut., +P medium 1)	0,013663	0,001330	0,097343	0,213933	0,009091	0,042495
E (mut., +P medium 2)	0,015234	0,00057	0,037416	0,232284	0,00292	0,012571
F (mut., -P medium)	0,361783	0,026090	0,072115	0,226432	0,003903	0,017237

Hodnoty naměřené pro gen *PHO84* byly normalizovány na hodnoty naměřené pro gen *TOM22* (nebo *ADHI*) u téhož vzorku. Pro normalizaci hodnot SQ byl používán vzorec:

$$SQ_{\text{normalizovaná}} = SQ_{PHO84}/SQ_{TOM22}$$

Hodnota  $s_r$  normalizovaného vzorku byla počítána podle vzorce:

$$s_r \text{ normalizovaná} = \sqrt{s_r \text{ PHO84}^2 + s_r \text{ TOM22}^2}$$

SD normalizovaného vzorku byla potom počítána jako:

$$SD_{\text{normalizovaná}} = SQ_{\text{normalizovaná}} \times S_r \text{ normalizovaná}$$

Vzorek	PHO84 na TOM22		
	SQ <sub>normalizovaná</sub>	SD <sub>normalizovaná</sub>	S <sub>r</sub> normalizovaná
A (wt, +P medium 1)	0,0561719	0,0023923	0,0425889
B (wt, +P medium 2)	0,04781558	0,00307197	0,0642462
C (wt, -P medium)	3,75615893	0,29337256	0,0781044
D (mut., +P medium 1)	0,06386579	0,00678346	0,1062143
E (mut., +P medium 2)	0,06558351	0,00258867	0,0394713
F (mut., -P medium)	1,59775562	0,11846781	0,0741464

Při vytváření grafů byla nejprve spočítána průměrná normalizovaná exprese daného genu ve fosfátovém mediu u divokých i mutovaných buněk (vzorků z fosfátového media bylo vždy několik, průměr byl počítán z důvodů získání přesnějšího údaje). Všechny hodnoty pak byly vztahovány k průměrné normalizované expresi daného genu ve fosfátovém mediu u buněk divokého typu (tato hodnota je vždy stanovena jako 1).

Počítáno bylo tedy podle vzorců:

$$SQ_{\text{konečná}} = SQ_{\text{normalizovaná vzorku}} / SQ_{\text{wt +P průměr}}$$

případně

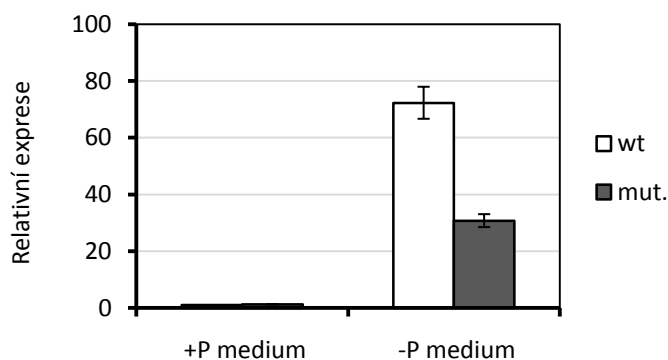
$$SQ_{\text{konečná}} = SQ_{\text{mut. +P průměr}} / SQ_{\text{wt +P průměr}}$$

Směrodatná odchylka u vzorků byla počítána podle vzorce:

$$SD = SQ_{\text{konečná}} \times S_r \text{ normalizovaná}$$

Vzorek	PHO84 na TOM22		
	Průměr +P medium	SQ <sub>konečná</sub>	SD
A, B (wt, +P medium)	0,05199374	1	0
C (wt, -P medium)	-	72,2425221	5,6424593
D, E (mut., +P medium)	0,06472465	1,24485466	0
F (mut., -P medium)	-	30,7297688	2,2785015

Po vnesení do grafu:



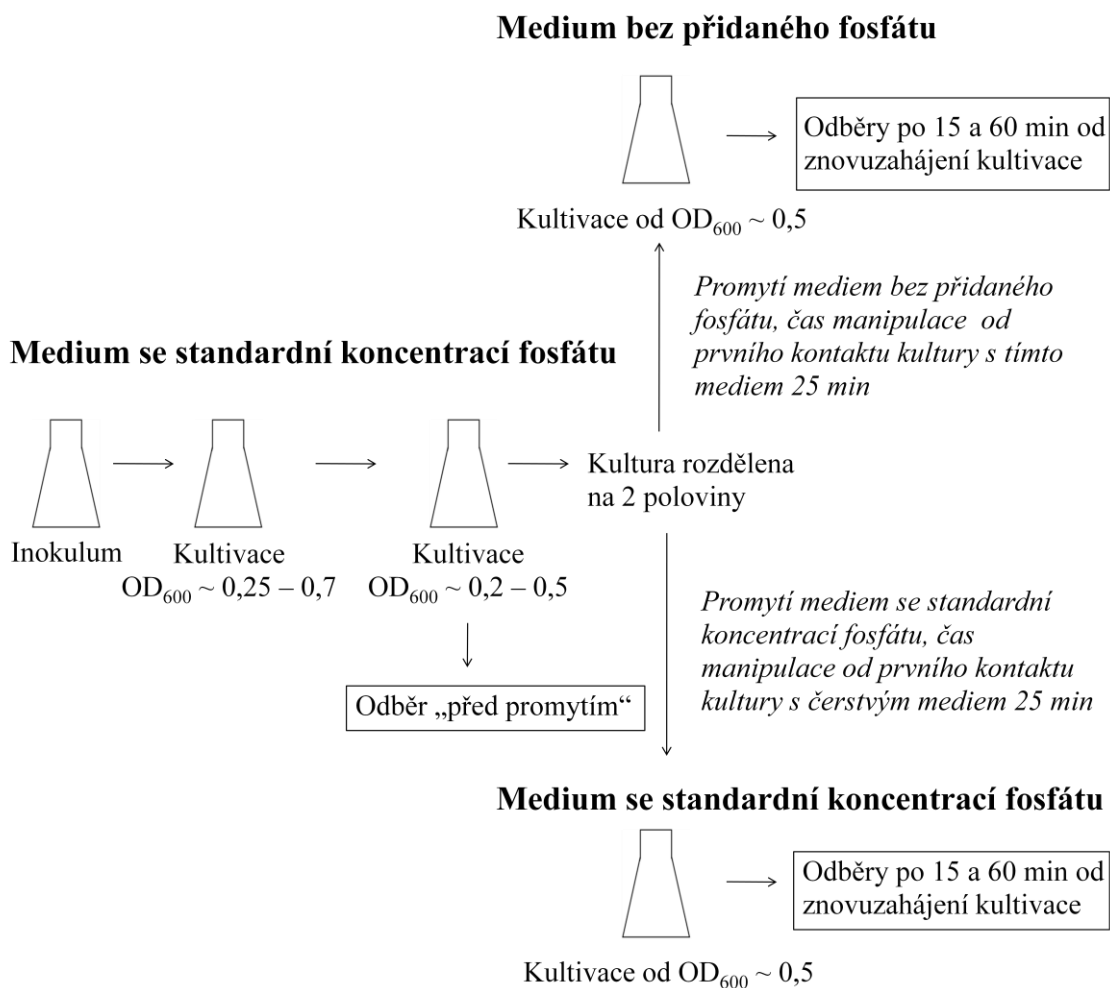
## 4.3 Analýza exprese genů PHO na genetickém pozadí kmene EGY48

Prvním dílčím cílem bylo rekapitulovat zpoždění indukce exprese genů *PHO5* a *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)*, které bylo pozorováno technikou Northern blot (K. Abrahámová, nepublikované výsledky), také metodou qRT-PCR. Nejprve jsme tedy pracovali s kmeny EGY48 a KAY02, se kterými byly získány předchozí výsledky. Pro účely dalšího testování jsme také chtěli nalézt podmínky, při kterých bude dosahováno největších rozdílů v expresi genů PHO mezi buňkami s divokou alelou genu *PRP45* ve srovnání s buňkami s alelou *prp45(1-169)*.

Exprese obou genů byla testována po přenosu z minimálního media (obsahuje zdroj dusíku, základní vitaminy, stopové prvky, minerály a aminokyseliny) se standardní koncentrací fosfátu do minimálního media bez přidaného fosfátu nebo po přenosu z minimálního media bez aminokyselin se standardní koncentrací fosfátu do minimálního media bez aminokyselin a bez přidaného fosfátu. Minimální medium bez aminokyselin však muselo být doplněno o některé aminokyseliny kvůli auxotrofiím použitých kmenů. Minimální medium bez aminokyselin jsme na začátku našich pokusů použili proto, že jsme se snažili o co nejvěrnější napodobení podmínek, při kterých prováděla původní pokusy K. Abrahámová na jiném pracovišti.

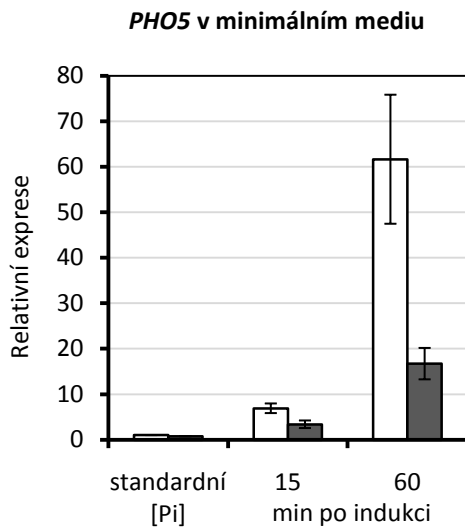
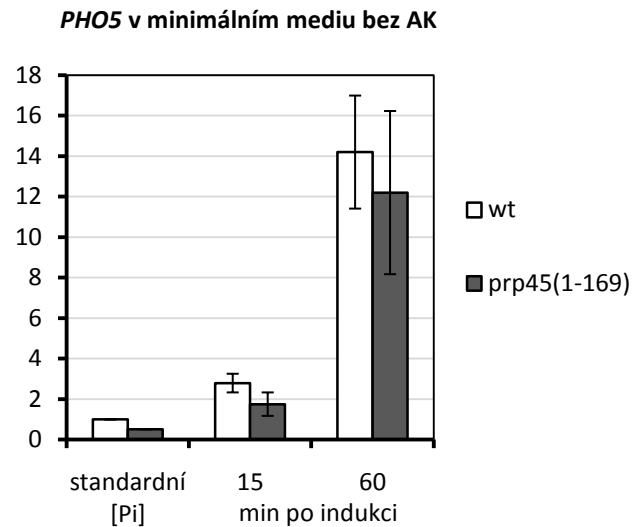
### 4.3.1 Analýza exprese genů PHO u buněk s mutací *prp45(1-169)*

V prvním pokusu jsme srovnávali expresi genů *PHO5* a *PHO84* ve dvou různých časech po přenosu z minimálního media nebo minimálního media bez aminokyselin se standardní koncentrací fosfátu do odpovídajícího media bez přidaného fosfátu. Jako standardní koncentrací fosfátu jsme používali 7,3 mM, protože takto koncentrovaný fosfát je v běžném minimálním mediu (od firmy Formedium). Schéma experimentu, tak jak byl prováděn i ve všech dalších případech, je na obrázku 4.5.

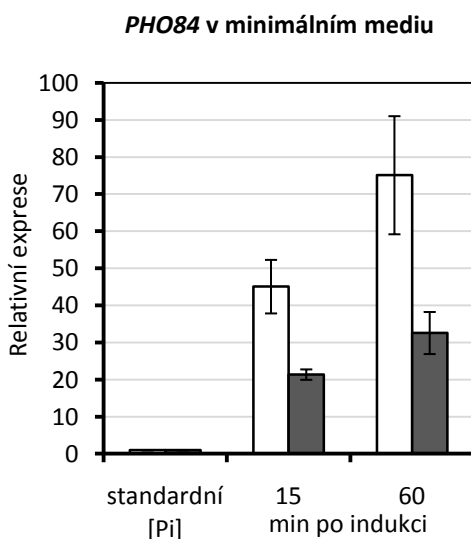
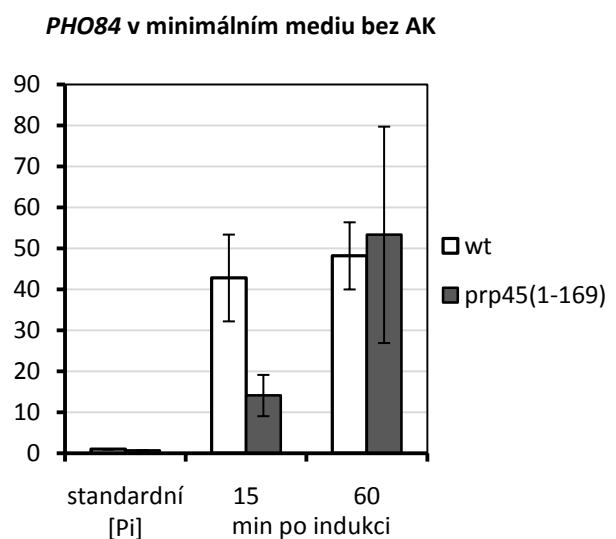


**Obr. 4.5 Schéma pokusů při manipulaci s koncentrací fosfátu v médiu.** Viz také kapitola 3.2.8 Fosfátové přenosy.

Výsledky jsou zobrazeny v grafech na obrázcích 4.6 a 4.7. Z výsledků je patrné, že se nám metodou qRT-PCR podařilo rekapitulovat defekt v expresi obou genů u buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami, jak bylo pozorováno při použití techniky Northern blot. Rozdíl se navíc projevil jak při použití minimálního média bez aminokyselin, tak při použití minimálního média. Pro další experimenty jsme proto již používali minimální medium.

**(a)****(b)**

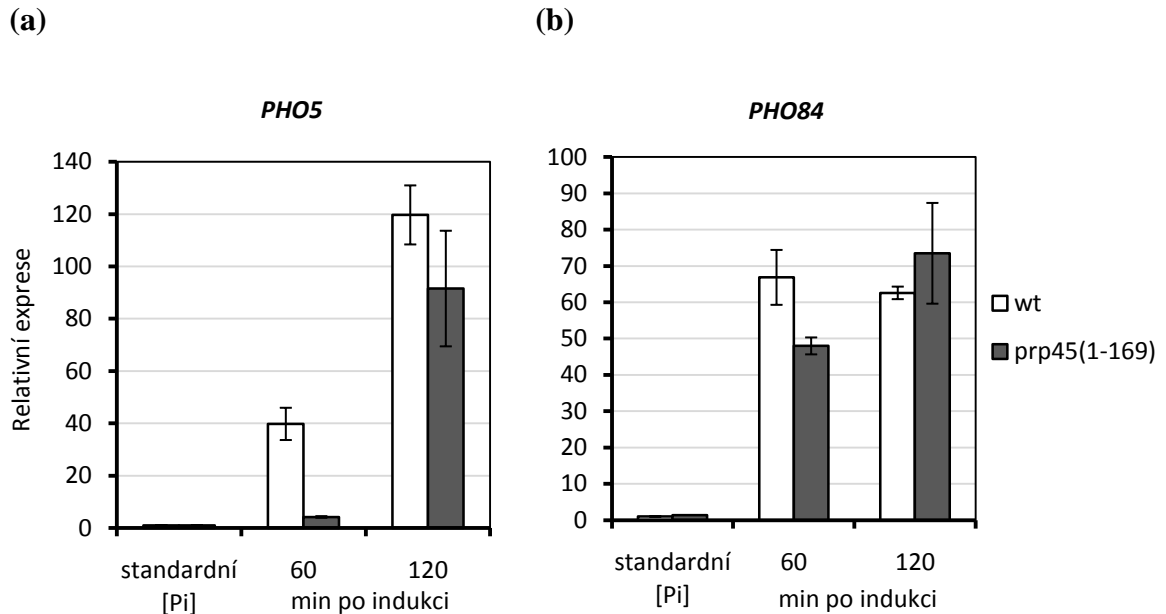
**Obr. 4.6 Indukce exprese genu *PHO5* po přenosu z media se 7,3 mM [P<sub>i</sub>] do media bez přidaného fosfátu - (a) minimální medium, (b) minimální medium bez aminokyselin.** Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [P<sub>i</sub>] u divokého kmene. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky tří technických opakování qRT-PCR.

**(a)****(b)**

**Obr. 4.7 Indukce exprese genu *PHO84* po přenosu z media se 7,3 mM [P<sub>i</sub>] do media bez přidaného fosfátu - (a) minimální medium, (b) minimální medium bez aminokyselin.** Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [P<sub>i</sub>] u divokého kmene. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky tří technických opakování qRT-PCR.

Vzhledem k tomu, že v minimálním mediu (s aminokyselinami, obr 4.6 (a) a 4.7 (a)) docházelo s přibývajícím časem k prohlubování rozdílů v expresi obou genů mezi divokými a mutantními buňkami, rozhodli jsme se vyzkoušet ještě delší časový

interval inkubace buněk v mediu bez přidaného fosfátu (60 a 120 min). Jak je ilustrováno na obrázku 4.8, ukázalo se, že ve 120. minutě po přenosu už dochází k vyrovnání hladin mRNA obou genů u divokých a mutovaných buněk.

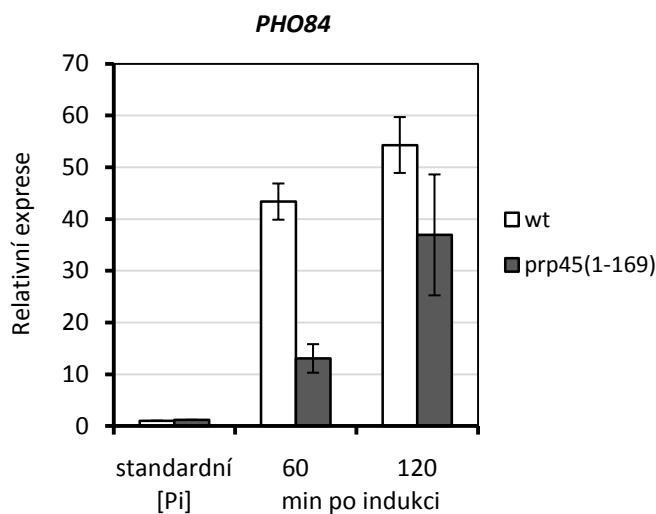


**Obr. 4.8** Ve 120. minutě po přenosu do media bez přidaného fosfátu dochází k vyrovnání hladin mRNA genů (a) *PHO5* i (b) *PHO84*. Expresie je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [P<sub>i</sub>] u divokého kmene. Grafy zobrazují reprezentativní výsledky dvou biologických opakování. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky tří technických opakování qRT-PCR.

Největší rozdíly v expresi obou genů byly pozorovány v 60. minutě po přenosu do media bez přidaného fosfátu. Rozdíl v expresi genu *PHO5* u mutovaných buněk ve srovnání s divokými buňkami je výraznější, než je tomu v případě genu *PHO84*.

Odlišné chování je zřejmě způsobeno tím, že k expresi genu *PHO84* dochází téměř okamžitě po vystavení buněk prostředí s nízkým obsahem fosfátu, zatímco k expresi genu *PHO5* dochází až po té, co buňka vyčerpá vnitřní zásoby polyfosfátu (viz kapitola 2.2.2.1; Thomas and O'Shea, 2005). Indukce exprese probíhá v delším časovém rozmezí a interval, ve kterém se může projevit zpoždění v expresi mezi mutovanými a divokými buňkami, je tak lépe experimentálně přístupný. Chtěli jsme proto ověřit, jak bude vypadat rozdíl v expresi genu *PHO84* mezi divokými a mutantními buňkami při submaximální indukci (Thomas and O'Shea, 2005). Předpokládali jsme, že i zde může dojít k prodloužení intervalu, ve kterém bude exprese tohoto genu u buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami nižší. Pro indukci jsme použili medium

s 0,1 mM koncentrací fosfátu. Odběry byly opět provedeny v 60. a 120. minutě po přenosu. Graf znázorňující expresi genu *PHO84* po přenosu do media s 0,1 mM [P<sub>i</sub>] je zobrazen na obrázku 4.9.



**4.9 Expese genu *PHO84* po přenosu do media s 0,1 mM [P<sub>i</sub>].** Expese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [P<sub>i</sub>] u divokého kmene. Graf zobrazuje reprezentativní výsledek dvou biologických opakování. Úsečky znázorňují směrodatnou odchylku tří technických opakování qRT-PCR.

Náš předpoklad se potvrdil; po přenosu do media s 0,1 mM koncentrací fosfátu byl v 60. minutě rozdíl v expresi genu *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami větší než v případě přenosu do media bez přidaného fosfátu (srov. s expresí genu *PHO84* na obrázcích 4.7a a 4.8b). Ve 120. minutě je rozdíl mezi divokými a mutovanými buňkami stále patrný, nicméně už dochází k vyrovnávání rozdílu v expresi mezi těmito buňkami.

Největší rozdíl v expresi genu *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami byl tedy dosažen v 60. minutě po přenosu z minimálního media se standardní koncentrací fosfátu do minimálního media s 0,1 mM koncentrací fosfátu. U genu *PHO5* byl tento rozdíl největší v 60. minutě po přenosu z minimálního media se standardní koncentrací fosfátu do minimálního media bez přidaného fosfátu.

## 4.4 Příprava kmenů s mutací *prp45(1-169)* a současnou delecí vybraného efektoru chromatinových modifikací

Naším dalším cílem bylo testovat genetické interakce *PRP45* s vybranými geny, jejichž proteinové produkty se účastní regulace transkripce. Případná genetická interakce mezi těmito geny a *PRP45* by nám mohla poskytnout informaci o tom, jakých procesů při elongaci transkripce se protein Prp45 účastní. Jelikož jsme měli potvrzené výsledky o vlivu proteinu Prp45 (ať už přímém či nepřímém) na indukci genů PHO a jelikož Carvin a Kladde ukázali, že delece některých genů kódujících proteiny účastnící se regulace transkripce ovlivňují expresi genů PHO (Carvin and Kladde, 2004), rozhodli jsme se, že se místo celogenomové studie zaměříme na geny, jejichž vztah k alele *prp45* je očekávatelný.

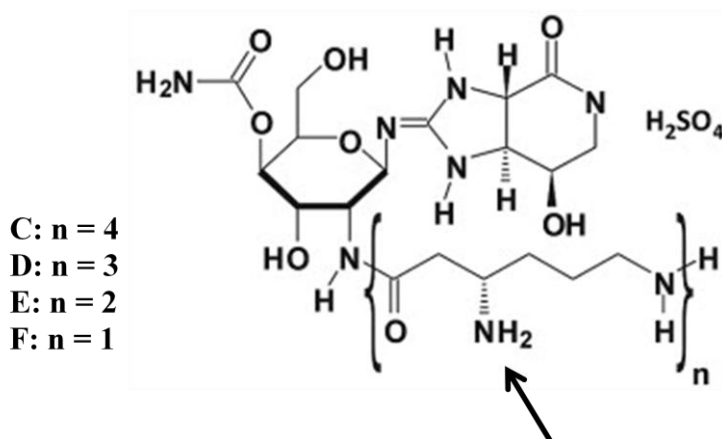
Pro splnění tohoto cíle bylo potřeba vytvořit panel kmenů s mutací *prp45(1-169)* a zároveň delecí genu pro vybraný efektor chromatinových modifikací. V prvním sledu tedy byly vybrány geny na základě výše uvedeného článku. Ve druhém sledu byly vybrány geny, které kódují proteiny příbuzné lidským proteinům, u kterých byl nalezen vztah k lidskému orthologu Prp45, proteinu SNW1/SKIP. Další geny byly vybrány proto, že ovlivňují procesy před nebo po působení výše zmíněných efektorů (viz Literární přehled). Zvoleny tak byly geny, jejichž proteinové produkty odpovídají svojí funkcí lidskému P-TEFb (Bur1, Bur2, Ctk1), jsou součástí komplexu PAF (Paf1, Rtf1), zprostředkovávají ubiquitylaci H2BK123 (Rad6, Bre1), metylaci H3K4 (Set1, Bre2), H3K36 (Set2) nebo H3K79 (Dot1), jsou součástí komplexů SAGA (HAT Gcn5, deubiquitylační enzym Ubp8, protein důležitý pro asociaci Ubp8 s ostatními komponentami komplexu Sgf11 a histonremodelační enzym Chd1) a Ccr4-Not (Not4). Z konsorcia Euroscarf a z laboratoře Davida Bentleyho (University of Colorado School of Medicine, USA) jsme získali soubor vybraných delečních mutant, do kterých byla zavedena mutace *prp45(1-169)*. Mutace byla zaváděna dvěma metodami, křížením nebo metodou knock-in.

### 4.4.1 Příprava kmene *prp45(1-169) Δset1* křížením

Z laboratoře D. Bentleyho jsme získali kmen DBY804. V tomto kmeni je v lokusu genu *SET1* vložen gen *HIS3*, zatímco endogenní *HIS3* je inaktivován. Buňky tedy



neexprimují gen *SET1* a jsou schopny růst na mediu bez histidinu. Pro získání kmene s delecí genu *SET1* a zároveň mutací *prp45(1-169)* byl tento kmen křížen s kmenem nesoucím mutaci *prp45(1-169)* (kmen AVY18). Alela *prp45(1-169)* byla vytvořena vložením integrační kazety kódující gen způsobující resistenci buněk k antibiotiku nourseothricin<sup>4</sup> do lokusu genu *PRP45* (postupem popsáným v další kapitole). Tento kmen je proto schopen růst v přítomnosti nourseothricinu. Zároveň má nefunkční alelu genu *HIS3*, není proto schopen růst na mediu bez přítomnosti histidinu.



**Obr. 4.10 Struktura antibiotika nourseothricin.** Šipkou je označeno místo, které je monoacylováno, čímž dochází k deaktivaci antibiotika. Písmena označují jednotlivé typy streptothricinů, číselná hodnota odpovídá počtu opakování lisylových zbytků. (zdroj [http://www.jenabioscience.com/images/625337ef95/NTC\\_superior\\_selection\\_tool.pdf](http://www.jenabioscience.com/images/625337ef95/NTC_superior_selection_tool.pdf), obrázek převzat a upraven [http://www.carlroth.com/media/\\_de-de/Graphics/00035537\\_0.jpg](http://www.carlroth.com/media/_de-de/Graphics/00035537_0.jpg)).

Haploidní kmeny byly kříženy a diploid byl selektován na základě schopnosti růstu na minimálním mediu bez histidinu v přítomnosti antibiotika nourseothricin. Získaný diploidní kmen byl sporulován a jedenáct ze vzniklých tetrad bylo mikromanipulováno. Celkem u sedmi tetrad byly všechny čtyři spory životaschopné a daly vzniknout haploidním klonům. Takto získané haploidní buňky byly testovány na požadovaný genotyp (růst na mediu bez histidinu a v přítomnosti nourseothricinu). Haploidní buňky s požadovaným genotypem byly dále testovány na párovací typ.

<sup>4</sup> Nourseothricin (viz obr. 4.10) je souhrnné označení pro směs streptothricinů C, D, E a F získávaných z bakterie *Streptomyces noursei*. Jako selekční agens se v molekulární genetice používá od roku 1993 (Krügel et al., 1993). Je to antibiotikum inhibující růst gram pozitivních i gram negativních bakterií, mycoplazem, některých prvoků, kvasinek a rostlin. Inhibice spočívá v interferenci se syntézou proteinů. Gen pro resistenci kóduje nourseothricin-N-acetyltransferázu, která monoacetyluje  $\beta$ -aminoskupinu na  $\beta$ -lisylovém zbytku, čímž dochází k deaktivaci antibiotika. Pro selekci kvasinkových kmenů se antibiotikum používá v mediu YPAD nebo v minimálním mediu v koncentraci 0,1 mg/ml.

Protože rodičovský kmen DBY804 je auxotrofní na methionin a rodičovský kmen AVY18 je auxotrofní na lysin, byly u haploidních buněk testovány i tyto auxotrofie. Pro další použití byly uschovány dvě kompletní tetrády.

#### **Rodičovské kmeny:**

**DBY804:** MATa *set1::HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*

**AVY18:** MATα *prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*

#### **Kmeny získané křížením (podtržené kmeny nesou dvojitou mutaci):**

**MHY07-2A:** MAT netestován *prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0*

**MHY07-2B:** MAT netestován *his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0*

**MHY07-2C:** MATα *prp45(1-169)-3HA::NatMX6 set1::HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0*

**MHY07-2D:** MAT netestován *set1::HIS3 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0*

**MHY08-5A:** MAT netestován *set1::HIS3 leu2Δ0 ura3Δ0*

**MHY08-5B:** MAT netestován *prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0*

**MHY08-5C:** MAT netestován *his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0*

**MHY08-5D:** MATa *prp45(1-169)-HA::NatMX6 set1::HIS3 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ*

#### **4.4.2 Příprava kmene *prp45(1-169) Δbur1***

Z konsorcia Euroscarf byl získán kmen Y25576 s následujícím genotypem:

**Y25576:** MATa/α *his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 bur1::kanMX4/BUR1*

Buňky s delecí genu *BUR1* vykazují velmi vážný růstový defekt, proto byl kmen, ze kterého jsme při přípravě vycházeli, diploidní. Pro vytvoření kmene s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δbur1* bylo nejprve nutno získat haploidní kmen *Δbur1* a ten pak křížit

s kmenem opačného párovacího typu nesoucím mutaci *prp45(1-169)*. Diploidní kmen byl transformován plazmidem pRS316-BUR1 (*URA3*, CEN, *BUR1*; S. Buratowski, Harvard Medical School, Boston, USA) nebo plazmidem pGP111 (*URA3*, CEN, *BUR1*; G. Prelich, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA), které kromě selekčního genu *URA3* nesly také divokou alelu genu *BUR1*, který by měl zaručit normální růst haploidních buněk s chromozomální delecí genu *BUR1*. Takto připravený diploidní kmen byl sporulován a získané tetrády byly mikromanipulovány. Tímto způsobem bylo získáno několik haploidních kmenů, mezi nimi i kmeny AVY42 a AVY43<sup>5</sup>. Genotypy těchto kmenů jsou následující:

**AVY42:** MATa *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0 BUR1::kanMX4* + pRS316-BUR1

**AVY43:** MATa *his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0 BUR1::kanMX4* + pGP111 (pRS416-BUR1)

Mým úkolem bylo tyto kmeny křížit s kmeny, které obsahují mutaci *prp45(1-169)*, a získat tak kmeny s požadovaným genotypem *prp45(1-169) Δbur1*. Buňky s delecí genu *BUR1* ale vykazaly sporulační defekt, z manipulovaných tetrad nedala ani jedna vzniknout čtyřem životaschopným haploidním buňkám. Pro zavedení mutace *prp45(1-169)* do haploidního kmene s chromozomální delecí genu *BUR1* jsme proto zvolili jiný přístup, techniku knock-in.

Pomocí PCR byla vytvořena integrační kazeta, která kóduje tři hemaglutininové (HA) značky, stop kodon a pod vlastním promotorem gen pro rezistenci k antibiotiku nourseothricin. Schéma integrační kazety je na obrázku 4.11. Konce kazety jsou homologní ke zvolené oblasti chromosomu, takže může být po transformaci do recipientního kmene integrována do genomu mechanismem homologní rekombinace. Tímto způsobem se vytváří definovaná delece, v našem případě zkrácení genu *PRP45* tak, aby se exprimoval protein obsahující prvních 169 aminokyselin (z celkových 379) a C-koncově značený pomocí HA. Integranti jsou potom selektováni na základě schopnosti růstu na mediu s nourseothricinem.

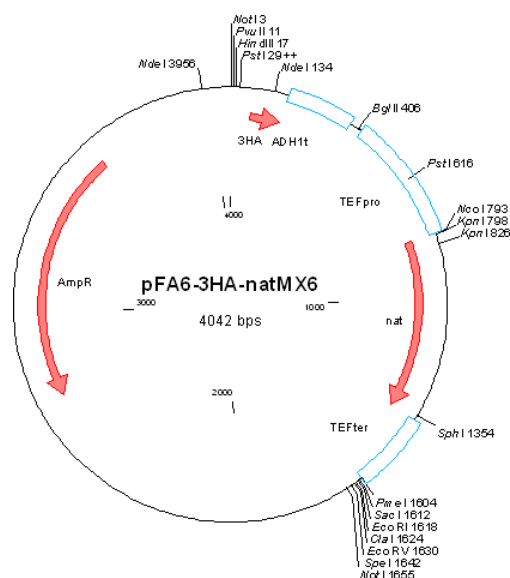
---

<sup>5</sup> Kmeny byly připraveny A. Valentovou.



**Obr. 4.11 Schéma integrační kazety.** Zeleně jsou vyznačeny oblasti homologní k lokusu genu *PRP45*, dále je žlutě oblast kódující 3xHA tag, červeně STOP kodon a modře pod vlastním promotorem gen pro rezistenci k nourseothricinu ( $\text{Nat}^R$ ).

Templátem pro reakci PCR byl plazmid p30412 (pFA6a-3HA-natMX6) (Euroscarf; Van Driessche et al., 2005) (obr. 4.12).



**Obr.4.12 Plazmid p30412 (pFA-6a-3HA-NatMX6).** Van Driessche et al., 2005. Obrázek byl získán z databáze konsorcia EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/P30412.html>).

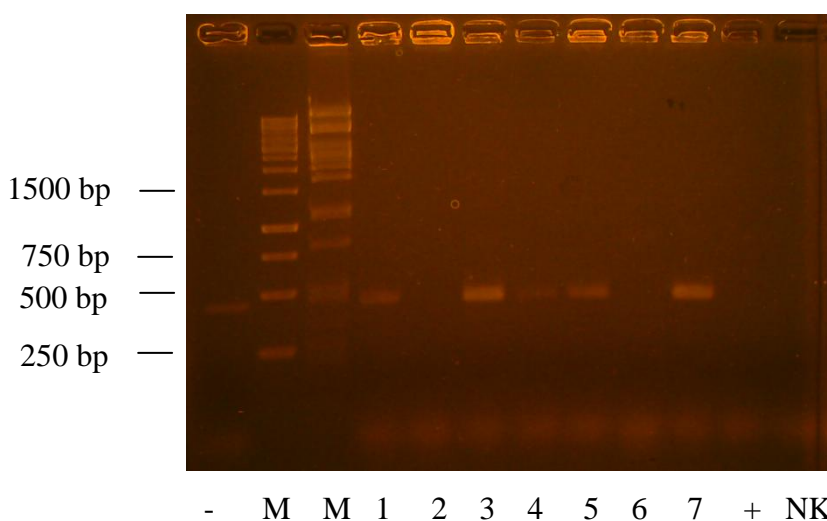
Pro reakci PCR byly použity takové primery, jejichž 20 nukleotidů na 3' konci je komplementárních k templátovému plazmidu a zbylých 42 nukleotidů na 5' konci tvoří tzv. „přesah“. „Přesah“ na jednom primeru je komplementární k sekvenci v pozici 466 až 507 bp od počátku transkripce v genu *PRP45* (tedy se sekvencí, která končí kódovanou 169. aminokyselinou; primer KM09) a „přesah“ na druhém primeru je komplementární k oblasti těsně za STOP kodonem genu *PRP45* (primer KM10). Reakcí PCR tak vzniká integrační kazeta, jejíž konce jsou homologní se zmíněnými oblastmi na chromosomu, což umožňuje homologní rekombinaci.

Protože templátový plazmid je bohatý na páry GC, reakce PCR neprobíhá optimálně a vzniká při ní hodně vedlejších produktů. Jednotlivé produkty reakce PCR byly proto odděleny pomocí agarózové gelové elektroforézy a specifický produkt

o velikosti 1668 bp byl z gelu vyřezán a přečištěn. Takto připravenou integrační kazetou byl transformován kmen AVY42. Buňky byly po transformaci vysety na plné medium YPAD a ponechány růst při pokojové teplotě do druhého dne, což je doba dostatečná k tomu, aby si vytvořily protein zajišťující rezistenci na nourseothricin. Druhý den byly buňky technikou replica plating přeneseny na medium YPAD s nourseothricinem a inkubovány při pokojové teplotě. Z narostlých kolonií jich bylo 12 ještě jednou přečárováno na čerstvou plotnu s mediem YPAD s nourseothricinem.

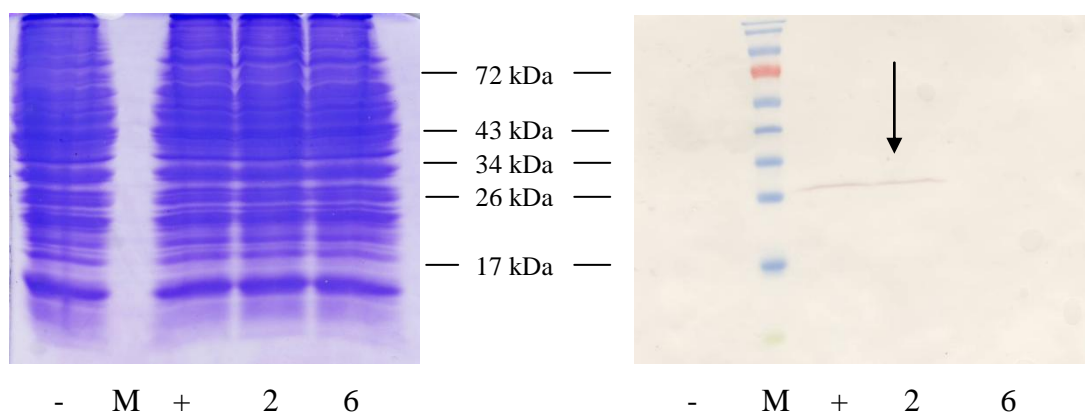
Integraci kazety do genomu jsme ověřili pomocí reakce PCR, kdy templátem pro tuto reakci byla DNA, která se uvolnila při inkubaci kvasinkových buněk při teplotě 95 °C (tzv. colony PCR). Byly použity primery, z nichž jeden nasedá do kódující oblasti genu *PRP45* (KM02) a druhý nasedá do oblasti genu *PRP45*, která kóduje protein až za 169. aminokyselinou (PL03). Pokud integrace proběhla správně, tento úsek byl ztracen při homologní rekombinaci, primer nemá kam nasedat a nevzniká produkt. Produkt o velikosti 438 bp tedy znamená, že integrace neproběhla správně. Pomocí colony PCR bylo ověřeno 7 ze získaných kolonií. Jako negativní kontrola byl použit kmen, který obsahuje divokou alelu *PRP45*, a jako pozitivní kontrola byl použit kmen, který nese mutaci *prp45*(1-169).

Produkty colony PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 4.13. Kolonie 1, 3, 4, 5 a 7 byly vyhodnoceny jako negativní (obsahují produkt, k integraci došlo na nesprávném místě). Kolonie 2 a 6 byly vyhodnoceny jako pozitivní (se správně vloženou integrační kazetou).



**Obr. 4.13** Výsledek „colony PCR“ transformantů. Znaménko – označuje negativní kontrolu (kmen EGY48 s divokou alelou genu *PRP45*), M marker, znaménko + pozitivní kontrolu (kmen KAY02 s mutací *prp45*(1-169)). NK je negativní kontrola reakce PCR.

Pomocí metody Western Blot bylo ověřeno, zda dochází k expresi mutovaného proteinu. Kolonie 2 a 6 byly kultivovány a z narostlé biomasy byly izolovány proteiny. Jako kontroly byly paralelně izolovány proteiny z kmene s mutací *prp45(1-169)* (kmen KAY02; pozitivní kontrola) a z kmene s divokou alelou genu *PRP45* (EGY48; negativní kontrola). Protein *prp45(1-169)* byl detekován pomocí protilátky anti-HA.11 (Covance), která rozeznává značku HA. Western analýza ukázala, že pouze jedna z testovaných kolonií, kolonie 2, exprimuje mutantní protein *prp45(1-169)* (obr. 4.14).



**Obr. 4.14 Ověření exprese *prp45(1-169)* u integrantů metodou Western Blot.** Vlevo 12% polyakrylamidový gel obarvený Coomassie Brilliant Blue, vpravo nitrocelulózová membrána. Znaménko – označuje negativní kontrolu, M marker, znaménko + pozitivní kontrolu. Primární protilátka anti-HA.11 (Covance) rozpoznává značku HA, která je na C-konci mutovaného proteinu *prp45(1-169)*. Z testovaných kolonií pouze kolonie 2 exprimuje mutovaný protein *prp45(1-169)* (označeno šipkou).

Tento nově vytvořený kmen byl označen MHY10<sup>6</sup>. Genotyp tohoto kmene je následující:

**MHY10:** *MATα prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0 BUR1::kanMX4 + pRS316-BUR1*

## 4.5 Testování fenotypu buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169)*

### *Δbur1*

Dalším z dílčích cílů bylo testovat, zda bude mít přítomnost mutace *prp45(1-169)* a současná delece genu kódujícího vybraný efektor chromatinových modifikací

<sup>6</sup> Ostatní kmeny připravila stejnými metodami A. Valentová.

syntetický efekt (syntetická lethality, syntetické zhoršení růstu, zvýšená citlivost na stresory a teplotu). Nálezy genetických interakcí by podpořily hypotézu o zapojení proteinu Prp45 do procesu elongace transkripce.

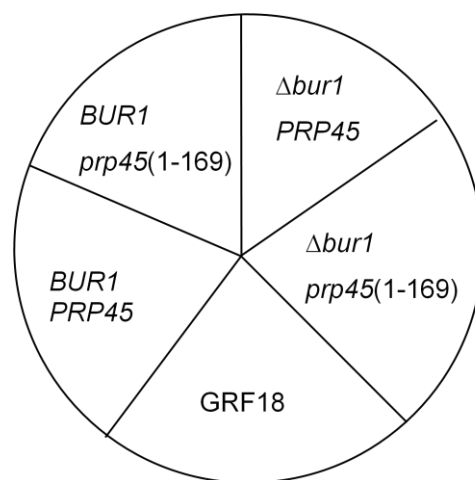
Připravený kmen s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δbur1* (MHY10) nese divokou alelu genu *BUR1* na plazmidu. Pro testování fenotypu buněk s dvojitou mutací bylo proto potřeba plazmid z buněk odstranit. Protože plazmid obsahuje gen *URA3* jako selekční marker, lze pro tento účel použít minimální medium s 5-fluoroorotovou kyselinou (5-FOA), která je pro buňky s funkčním genem *URA3* toxická<sup>7</sup> (Boeke et al., 1987).

Růstový fenotyp kmene MHY10 byl proto testován na minimálním mediu, do kterého byla přidána 5-FOA. Růst byl srovnáván s růstem kmene s divokou alelou genů *BUR1* i *PRP45* (BY4742), s kmenem s divokou alelou genu *BUR1* a mutací *prp45(1-169)* (AVY18) a s kmenem *Δbur1*, divokou alelou *PRP45* a s plazmidem pRS316-BUR1 (AVY42). Jako negativní kontrola byl použit kmen GRF18, který obsahuje endogenní gen *URA3*, na mediu s 5-FOA tedy nepřežívá. Výsledek je na obrázku 4.15. Obrázek zobrazuje kmene po 16 dnech kultivace ve 30 °C. Takto dlouhá doba není pro tyto růstové testy standardní, vzhledem k těžkému růstovému defektu kmenů s delecí genu *BUR1* však byla nutná. Je vidět, že kmen s jednoduchou delecí genu *BUR1* na mediu s 5-FOA přežívá, protože může ztratit daný plazmid. Naproti tomu kmen s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δbur1* na mediu s 5-FOA nepřežije, je tedy stále závislý na daném plazmidu. Z tohoto výsledku vyplývá, že geny *PRP45* a *BUR1* spolu geneticky interagují a tato interakce má charakter syntetické lethality<sup>8</sup>.

---

<sup>7</sup> Při *de novo* syntéze pyrimidinových nukleotidů vzniká orotát, který je orotátfosforibosyltransferázou přeměňován na orotidinmonofosfát (OMP). OMP je následně OMP dekarboxylázou, která je u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kódována genem *URA3*, přeměňován na uridinmonofosfát (UMP). 5-FOA je pseudosubstrát orotátfosforibosyltransferázy, která ji konvertuje na 5-fluoroorotidinmonofosfát (5-FOMP). 5-FOMP je následně OMP dekarboxylázou (kódovanou genem *URA3*) dekarboxylován na 5-fluorouridinmonofosfát (5-FUMP) a následně dehydroxylován na 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát (5-FdUMP). 5-FdUMP je inhibítorem thymidylátsyntázy, která methyloje dUMP za vzniku dTMP. V průběhu této reakce dochází k výměně vodíku na C<sub>5</sub> dUMP za methylovou skupinu. Vodík přitom odstupuje jako proton. U 5-FdUMP je na C<sub>5</sub> místo vodíku přítomen fluor, který kvůli vysoké elektronegativitě nemůže odstupovat ve formě F<sup>+</sup>. 5-FdUMP zůstává navázaná na enzymu a působí jako sebevražedný substrát.

<sup>8</sup> Syntetická lethality je typ interakce dvou genů, kdy přítomnost dvou mutací v jedné buňce vede ke smrti dané buňky, ačkoliv ani jedna mutace sama o sobě pro buňku lethální není.



**Obr. 4.15 PRP45 a BUR1 spolu geneticky interagují, tato interakce má charakter syntetické lethality.** Obrázek zobrazuje kmeny *BUR1*, *PRP45* (BY4742), *BUR1*, *prp45(1-169)* (AVY18),  $\Delta bur1$ , *PRP45* + pRS316-BUR1 (AVY42) a  $\Delta bur1$ , *prp45(1-169)* + pRS316-BUR1 (MHY10) po 16 dnech kultivace ve 30 °C na minimálním mediu s 5-FOA. Kmen GRF18 je negativní kontrola.

U buněk, u kterých dvojitá mutace vykazala nějaký změněný fenotypový projev<sup>9</sup> ve srovnání s buňkami s jednoduchými mutacemi, nejčastěji citlivost na růst při zvýšené kultivační teplotě, byl testován vliv těchto mutací na expresi genů *PHO5* a *PHO84*.

#### **4.6 Testování exprese genů PHO v buňkách *prp45(1-169)* nesoucích delecí vybraného efektoru chromatinových modifikací**

Křížením nebo technikou knock-in byly připraveny kmeny s delecí vybraných regulačních genů a zároveň s mutací *prp45(1-169)*. U vybraných dvojitých mutant jsme chtěli testovat vliv této dvojité mutace na expresi genů *PHO5* a *PHO84*. Připravené kmeny však byly jiného genetického pozadí než kmeny, na kterých byl ověřen nález, že je exprese těchto genů u buněk s mutací *prp45(1-169)* zpožděná. Je známo, že genetické pozadí má poměrně velký vliv na citlivost buněk k různým stresorům. Vliv genetického pozadí BY4741, ve kterém byly připraveny dvojité mutanty, se ukázal jako relativně silný. Například buňky s mutací *prp45(1-169)* na pozadí kmene EGY48 přestávají růst při kultivační teplotě 37 °C, zatímco na pozadí kmene BY4741 až při teplotě 39 °C. Proto

<sup>9</sup> Testování fenotypu dalších připravených kmenů prováděla A. Valentová.

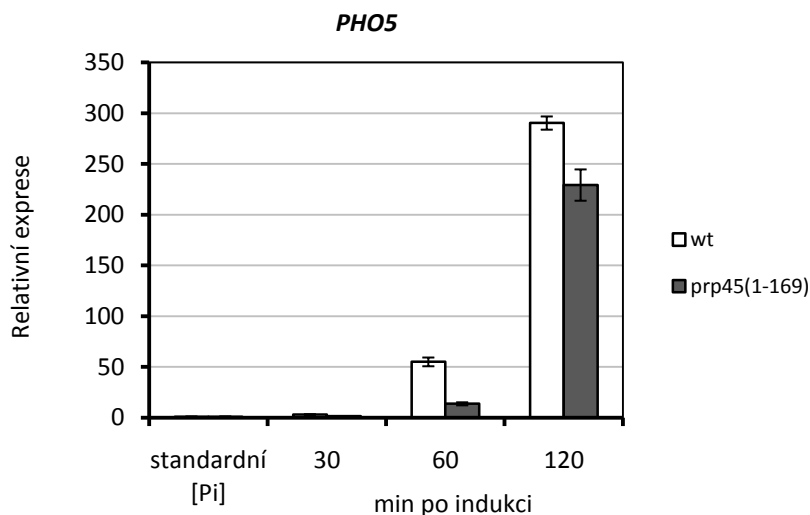


bylo nejprve nutno zopakovat testy a ověřit, že ke zpomalení indukce exprese genů *PHO5* a *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)* dochází i na tomto genetickém pozadí. Zároveň bylo nutno nalézt podmínky, kdy bude rozdíl v expresi mezi divokými a mutovanými buňkami největší.

#### 4.6.1 Testování exprese genů PHO u buněk *prp45(1-169)* na genetickém pozadí BY4741

Stejně jako v předchozím případě byla testována exprese genů *PHO5* a *PHO84* u divokých a mutovaných buněk v různých časech po přenosu z media se standardní koncentrací fosfátu do media bez přidaného fosfátu. V případě genu *PHO84* byla navíc testována také exprese po přenosu do media s 0,1 mM koncentrací fosfátu.

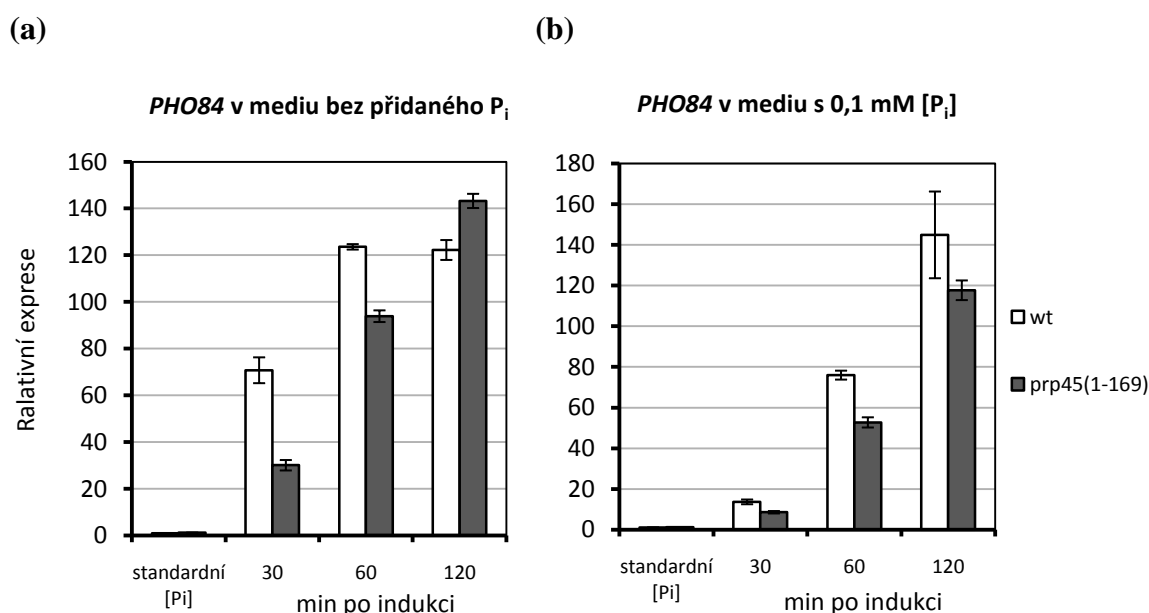
Výsledky potvrdily, že i na pozadí kmene BY4741 dochází u buněk s mutací *prp45(1-169)* ke zpomalení indukce exprese genů *PHO5* a *PHO84* ve srovnání s divokými buňkami. Největší rozdíl v expresi mezi divokými a mutovanými buňkami byl v případě genu *PHO5* v 60. minutě po přenosu do media bez přidaného fosfátu (viz obr. 4.16), stejně jako u buněk s genetickým pozadím EGY48.



**Obr. 4.16** Exprese genu *PHO5* u buněk s genetickým pozadím BY4741 po přenosu do media bez přidaného fosfátu. Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní  $[P_i]$  u divokého kmene. Největší rozdíl v expresi genu *PHO5* mezi divokými buňkami a buňkami s mutací *prp45(1-169)* byl v 60. minutě po přenosu do media bez přidaného  $P_i$ . Reverzní transkripce byla provedena z náhodných hexanukleotidů. Úsečky znázorňují směrodatnou odchylku tří technických opakování qRT-PCR.

Pro testování exprese genu *PHO84* jsme se rozhodli používat 30. minutu po přenosu do media bez přidaného fosfátu, protože v těchto podmínkách byl rozdíl v expresi na pozadí kmene BY4741 největší ze všech testovaných podmínek a časů (viz obr. 4.17).

Je však nutno poznamenat, že v průběhu dalších pokusů se ukázalo, že exprese genu *PHO84* je hodně variabilní a ne vždy byl v tomto čase zachycen rozdíl v expresi genu *PHO84* u mutovaných buněk ve srovnání s divokými buňkami. Tato variabilita byla, jak předpokládáme, částečně způsobena vlivem genetického pozadí na kinetiku indukce exprese a částečně vlivem experimentálních chyb. Tato problematika bude rozebrána v kapitole Diskuse. Do budoucna bude proto pro další pokusy nutné najít vhodnější podmínky pro testování vlivu mutace *prp45(1-169)* na expresi genu *PHO84*.

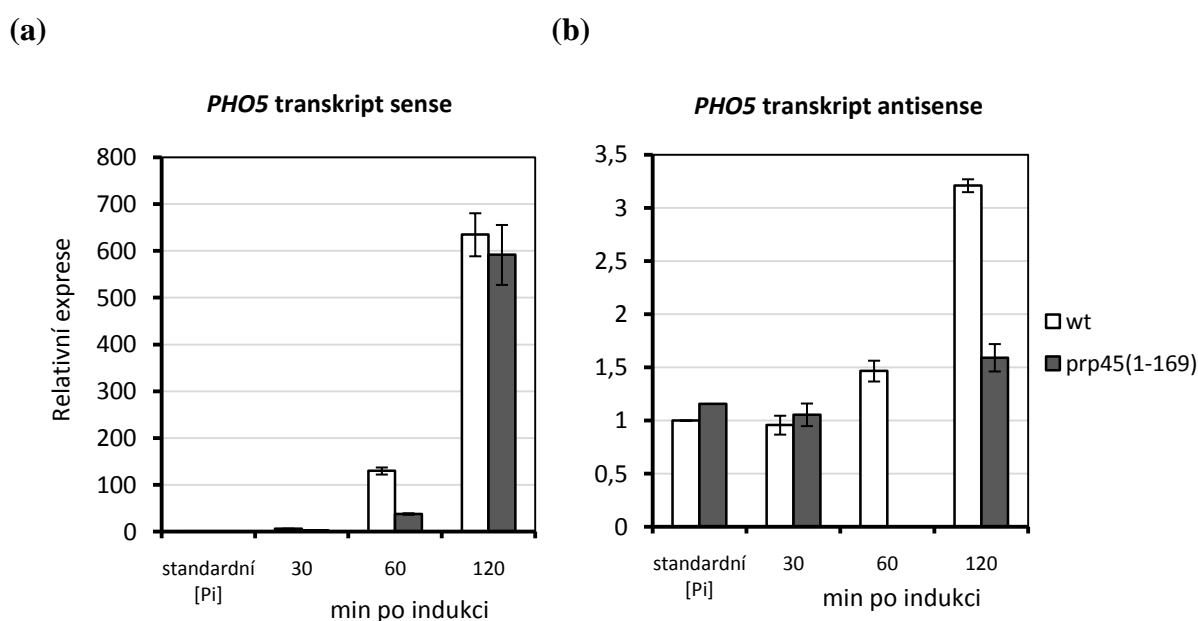


**Obr. 4.17 Exprese genu *PHO84* u buněk s genetickým pozadím BY4741 po přenosu do media bez přidaného fosfátu.** Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [ $P_i$ ] u divokého kmene. **(a)** Exprese genu *PHO84* po přenosu do media bez přidaného  $P_i$ . **(b)** Exprese genu *PHO84* po přenosu do media s 0,1 mM [ $P_i$ ]. Reverzní transkripce byla provedena z náhodných hexanukleotidů. Úsečky znázorňují směrodatnou odchylku tří technických opakování qRT-PCR.

Oba geny, *PHO5* i *PHO84*, jsou přepisovány také v orientaci antisense (Uhler et al., 2007, Camblong et al., 2007). U genu *PHO84* vede stabilizace transkriptu antisense k represii transkripce ve směru sense mechanismem zahrnujícím vyvazování histondeacetylázy Hda1 (Camblong et al., 2007). U genu *PHO5* není funkce transkriptu antisense úplně objasněna. Zdá se však, že spíše usnadňuje transkripci v sense orientaci

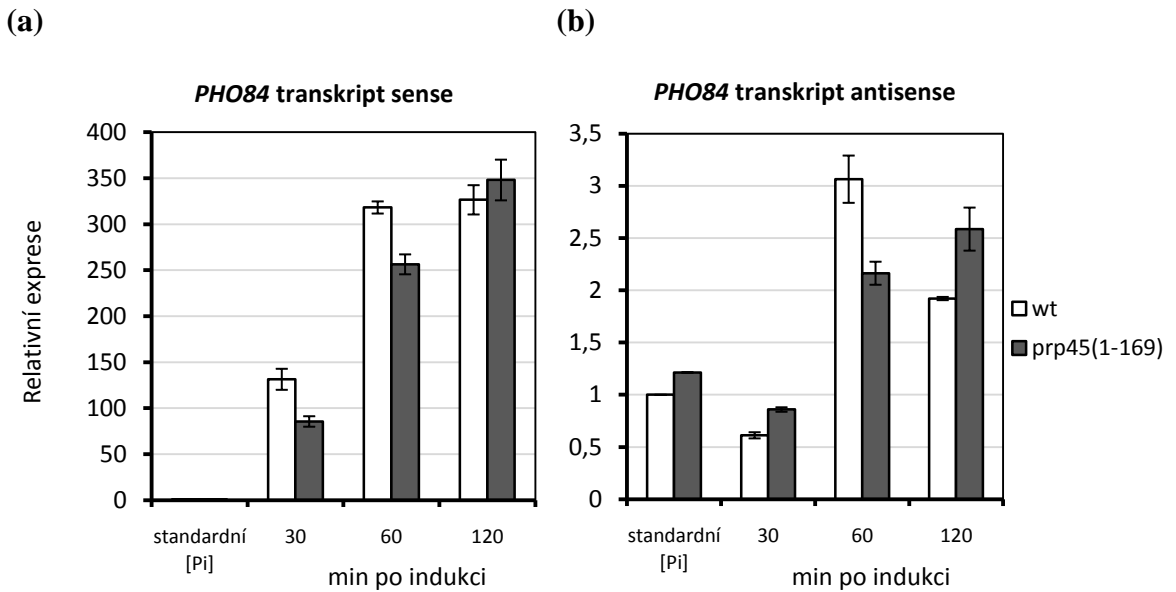
tím, že pomáhá otevírat chromatin v oblasti promotoru *PHO5*, než aby transkripci ve směru sense reprimoval (Uhler et al., 2007). Chtěli jsme se proto přesvědčit, zda změny v expresi genů *PHO5* a *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)* nejsou způsobeny změnami v množství transkriptů antisense a zda tyto změny neinterferují s detekcí transkriptů ve směru sense.

Reverzní transkripce byla proto místo z náhodných hexanukleotidů provedena jednak z primeru, který byl komplementární k transkriptu sense, a jednak z primeru, který byl komplementární k transkriptu antisense<sup>10</sup>. Výsledky jsou zobrazeny v grafech na obrázcích 4.18 a 4.19.



**Obr. 4.18 Srovnání exprese (a) ve směru sense a (b) ve směru antisense genu *PHO5* po přenosu do media bez přidaného fosfátu.** Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [P<sub>i</sub>] u divokého kmene. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky tří technických opakování qRT-PCR. Poznámka: data pro expresi antisense transkriptu z 60. minuty po přenosu do media bez přidaného fosfátu nebyla k dispozici.

<sup>10</sup> Pro detekci transkriptu sense byly při reverzní transkripci použity zpětné primery používané při analýze qRT-PCR a pro detekci transkriptu antisense byly při reverzní transkripci použity přímé primery použité při analýze qRT-PCR.



**Obr. 4.19** Srovnání exprese ve směru (a) sense a (b) antisense genu *PHO84* po přenosu do media bez přidaného fosfátu. Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [P<sub>i</sub>] u divokého kmene. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky tří technických opakování qRT-PCR.

V případě genu *PHO5* došlo během indukce ke zvýšení množství transkriptu antisense u divokých buněk ve srovnání s mutovanými buňkami. Hladina tohoto transkriptu je však u divokých buněk největší ve 120. minutě, tedy v době, kdy je hladina transkriptů sense u divokých a mutovaných buněk už vyrovnána. Že by za rychlejší indukci exprese genu *PHO5* stála stabilizace transkriptu antisense u divokých buněk ve srovnání s mutovanými buňkami, je proto nepravděpodobné. V případě genu *PHO84* hladina transkriptu antisense u divokých i mutovaných buněk se vzrůstajícím časem po indukci fluktovala. Ani v tomto případě proto nelze říct, že by za změny v expresi tohoto genu stála odlišná stabilizace transkriptu antisense u mutovaných buněk ve srovnání s divokými buňkami.

Z grafů je také patrné, že množství transkriptů antisense je u mutovaných i divokých buněk mnohokrát nižší než množství transkriptů sense (srov. měřítko na ose y). I toto nepatrné množství však může do určité míry interferovat s detekcí transkriptů v orientaci sense. Zjistili jsme, že se liší poměr SQ PHO ku *TOM22* v mediu se standardní koncentrací fosfátu v případě provedení reverzní transkripce z náhodných hexanukleotidů ve srovnání se situací, kdy byla reverzní transkripce provedena z primerů detekujících transkripty sense. V mediu se standardní koncentrací fosfátu, kdy k transkripci ve směru sense dochází jen náhodným uniknutím Pol II z reprimovaného

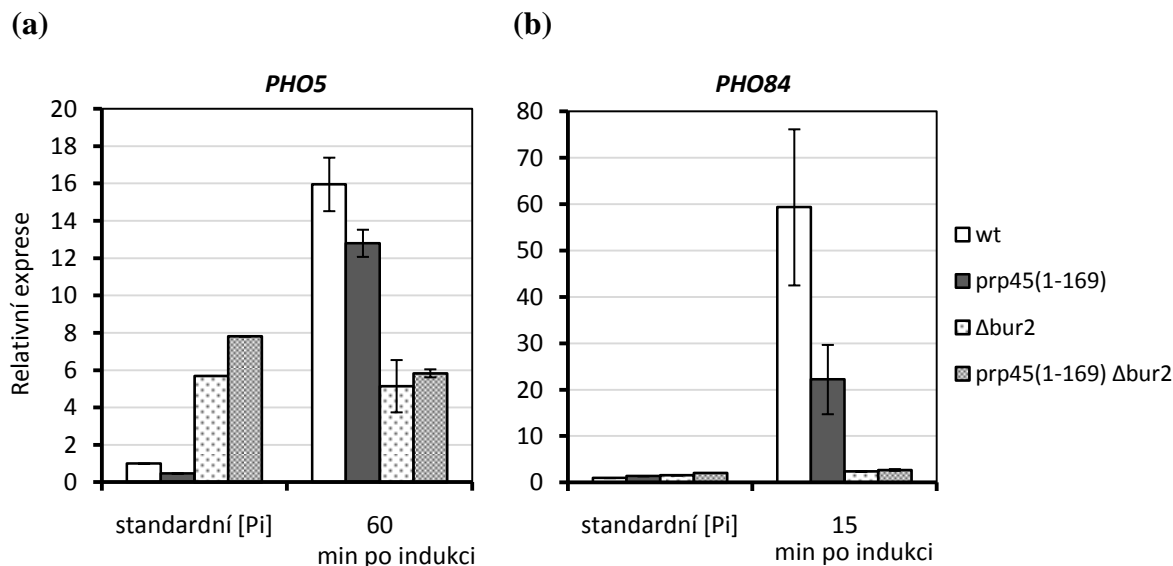
promotoru, je množství transkriptů antisense (tato transkripce probíhá kontinuálně; Camblong et al., 2007, Uhler et al., 2007) v porovnání s transkripty sense relativně velké. Náhodné hexanukleotidy umožňují vznik cDNA z transkriptů sense i antisense. Do hodnoty SQ spočítaného pomocí qRT-PCR jsou tedy zahrnuty i transkripty antisense. Použití takových primerů při reverzní transkripci, které rozeznávají pouze transkript sense, naproti tomu dá vznik cDNA pouze z transkriptů sense. Do hodnoty SQ spočítaného pomocí qRT-PCR jsou tedy zahrnuty pouze transkripty sense. Správnost této úvahy lze ověřit součtem hodnot SQ transkriptů sense a antisense získaných pomocí qRT-PCR u vzorků, kdy byla reverzní transkripce provedena z primerů detekujících transkripty sense a antisense. Tento součet odpovídal hodnotě SQ získané v pokusu, kdy reverzní transkripce byla provedena z náhodných hexanukleotidů. Vzhledem k tomu, že výsledky jsou potom vztahovány na expresi daného genu u buněk divokého typu v mediu se standardní koncentrací fosfátu, rozhodli jsme se proto u dalších pokusů provádět reverzní transkripci z primerů detekujících pouze transkripty sense obou genů.

#### 4.6.2 Exprese genů PHO u buněk s delecí genu BUR2

Komplex cyklin dependentní kinázy Bur1 a cyklinu Bur2 je jedním ze dvou kvasinkových kinázových komplexů, který je příbuzný k lidskému P-TEFb. S P-TEFb interaguje lidský ortholog proteinu Prp45, SNW1/SKIP (Bres et al., 2005; viz Literární přehled). Jak bylo popsáno výše, mutace *prp45(1-169)* a zároveň delece genu kódujícího CDK Bur1 vykazují vztah syntetické lethality. Testování fenotypu u buněk *prp45(1-169) Δbur2* ukázalo, že i tyto dvě alely spolu geneticky interagují. Tato interakce má charakter syntetického zhoršení růstu v podmínkách zvýšené kultivační teploty (A. Valentová, nepublikované výsledky). Bylo proto zajímavé zjistit, jak se tato dvojitá mutace projeví na expresi genů *PHO5* a *PHO84*.

Výsledky exprese genu *PHO5* ukazuje graf na obrázku 4.20 (a), kde je srovnána exprese tohoto genu u divokých buněk, u buněk s mutací *prp45(1-169)*, u buněk s delecí genu *BUR2* a u dvojitých mutant. Vliv na expresi genu *PHO5* byl pozorován už v případě, kdy byly buňky kultivovány v mediu, do kterého byl fosfát přidán na standardní koncentraci. U buněk *Δbur2* a u buněk s dvojitou mutací dochází v tomto mediu k derepresi genu *PHO5*. V 60. minutě po přenosu do media bez přidaného fosfátu, tedy do podmínek, ve kterých by mělo docházet k indukci genu *PHO5*, je však množství

jeho mRNA u těchto kmenů prakticky stejné jako v případě media se standardní koncentrací fosfátu. Gen *PHO5* je tedy zřejmě na pozadí  $\Delta bur2$  prakticky neindukovatelný.



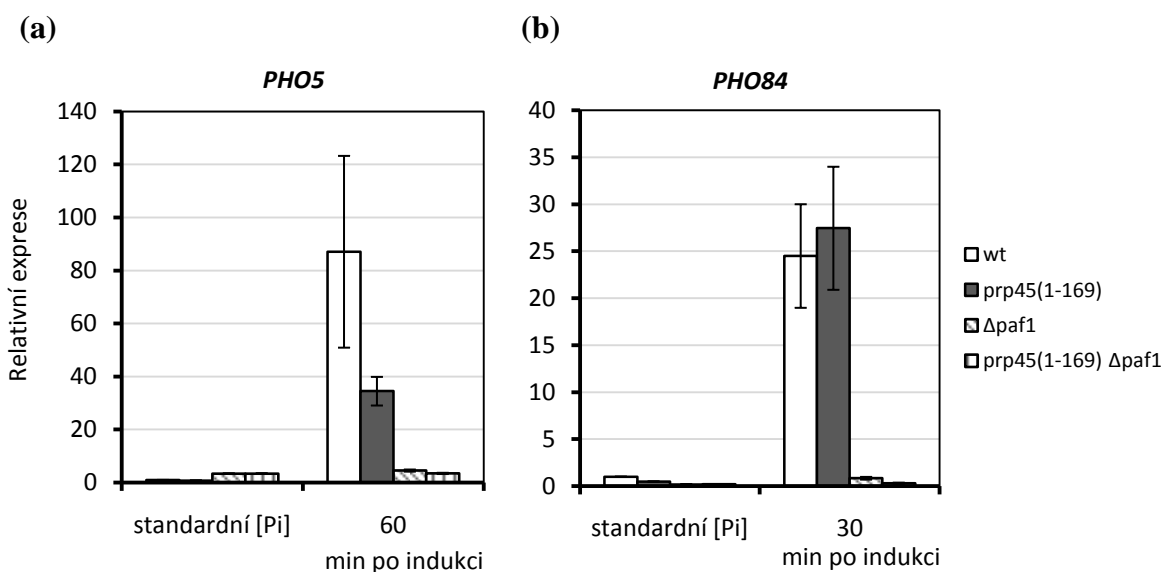
**Obr. 4.20** Expresse genu (a) *PHO5* a (b) *PHO84* u buněk s delecí genu *BUR2* po přenosu do media bez přidaného fosfátu. Expresse je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [Pi] u divokého kmene. Úsečky znázorňují směrodatnou odchylku tří technických opakování qRT-PCR.

Výsledky exprese genu *PHO84* jsou zobrazeny v grafu na obrázku 4.20 (b), kde je opět porovnána exprese tohoto genu u všech čtyř kmenů. Na rozdíl od genu *PHO5* nedochází u genu *PHO84* v buňkách s delecí genu *BUR2* a u buněk s dvojitou mutací k derepresi genu *PHO84* v mediu se standardní koncentrací fosfátu. Indukce exprese genu *PHO84* v 15. minutě po přenosu do media bez přidaného fosfátu, kdy je exprese u divokého kmene jasně patrná, však také nebyla u těchto buněk pozorována. Gen *PHO84* je tedy také zřejmě v těchto podmínkách neindukovatelný.

#### 4.6.3 Expresse genů PHO u buněk s delecí genu *PAF1*

Komplex PAF, jehož podjednotkou je protein Paf1, působí po zapojení komplexu Bur1/Bur2 a je důležitý pro vyvazování dalších faktorů ovlivňujících elongační fázi transkripce (viz kapitola 2.1.3). Vzhledem ke zvýšené citlivosti kmenů s dvojitou mutací *prp45(1-169)  $\Delta paf1$*  na vyšší kultivační teplotu (A. Valentová, nepublikované výsledky) byla testována exprese genů *PHO5* a *PHO84* také u kmenů s delecí genu *PAF1*.

Expresi genu *PHO5* u divokého kmene, u kmene *prp45(1-169)*, u kmene  $\Delta$ *paf1* a u kmene s dvojitou mutací zobrazuje graf na obrázku 4.21 (a). Podobně jako u buněk s delecí genu *BUR2* i u obou kmenů s delecí genu *PAF1* lze v mediu se standardní koncentrací fosfátu pozorovat derepresi genu *PHO5*, i když nabohacení není tak výrazné jako u buněk s delecí genu *BUR2*. Určité nabohacení mRNA tohoto genu ve fosfátovém mediu u buněk  $\Delta$ *paf1* bylo už dříve popsáno (Carvin and Kladde, 2004). Po přenosu buněk  $\Delta$ *paf1* a buněk s dvojitou mutací do media bez přidaného fosfátu není v daném čase, stejně jako v případě buněk  $\Delta$ *bur2*, exprese už dále indukována.



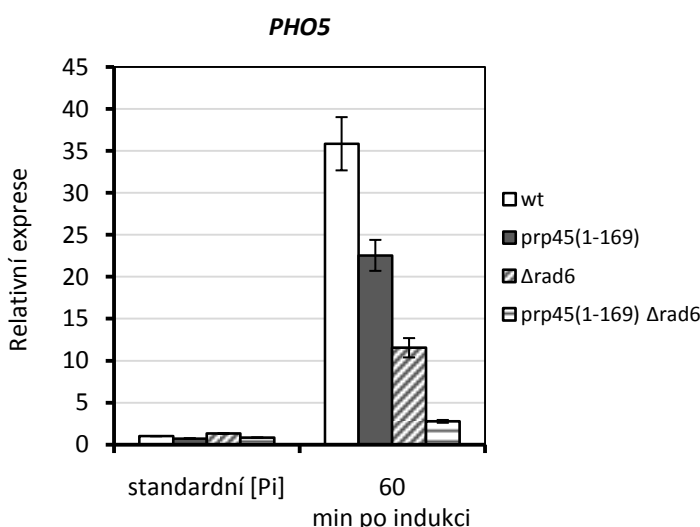
**Obr. 4.21** Exprese genu (a) *PHO5* a (b) *PHO84* u buněk s delecí genu *PAF1* po přenosu do media bez přidaného fosfátu. Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [P<sub>i</sub>] u divokého kmene. Úsečky znázorňují směrodatnou odchylku tří technických opakování qRT-PCR.

Exprese genu *PHO84* je zobrazena v grafu na obrázku 4.21 (b). V tomto případě se nepodařilo zachytit rozdíl v expresi genu *PHO84* mezi divokými buňkami a buňkami s mutací *prp45(1-169)*, tato problematika bude rozebrána v kapitole Diskuse. Výsledky jsou opět velmi podobné situaci, jaká byla pozorována u buněk s delecí genu *BUR2*. Na rozdíl od exprese genu *PHO5* není pozorována dereprese genu *PHO84* v mediu se standardní koncentrací fosfátu u buněk s jednoduchou delecí genu *PAF1* a u buněk s dvojitou mutací. Po přenosu do media bez přidaného fosfátu je množství transkriptu ve 30. minutě, kdy je indukce exprese genu *PHO84* u divokých buněk jasně patrná, stále na stejné úrovni jako v neindukujících podmínkách. I v tomto případě zřejmě k indukcí genu *PHO84* u buněk  $\Delta$ *paf1* a s dvojitou mutací nedochází.

#### 4.6.4 Exprese genů PHO u buněk s delecí genu RAD6

Po působení komplexů Bur1-Bur2 a PAF se do procesu elongace transkripce zapojují ubiquitin konjugační enzym Rad6 a ubiquitinligáza Bre1, které ubiquitinylyjí H2BK123 (viz kapitola 2.1.4; Hwang et al., 2003, Wood et al., 2003a, Robzyk et al., 2000). Dalšími kmeny, u kterých byla testována exprese genů *PHO5* a *PHO84*, byly kmeny s delecí genu *RAD6*. I v tomto případě byla pozorována zvýšená citlivost buněk s dvojitou mutací na vyšší kultivační teplotu (A. Valentová, nepublikované výsledky). Pokus, ve kterém byla sledována exprese genu *PHO84* u těchto kmenů, se mi bohužel nepodařilo dokončit.

Na obrázku 4.22 je graf s porovnáním exprese genu *PHO5* u divokých buněk, u buněk s mutací *prp45(1-169)*, u buněk  $\Delta rad6$  a u buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169) \Delta rad6. Na rozdíl od výsledků publikovaných v článku autorů Carvina a Kladdeho (Carvin and Kladde, 2004) nebyla detekována dereprese genu *PHO5* u buněk s delecí genu *RAD6* v mediu se standardní koncentrací fosfátu. U všech čtyř kmenů je exprese v tomto mediu reprimována a hladina mRNA je porovnatelná s hladinou mRNA u divokého kmene. Po přenosu buněk do media bez přidaného fosfátu se ukázalo, že v 60. minutě je hladina mRNA genu *PHO5* nejnižší u buněk s dvojitou mutací. Dochází zde tedy k prohloubení negativního efektu na expresi genu *PHO5*, který vykazují obě jednoduché mutanty zvlášť.*



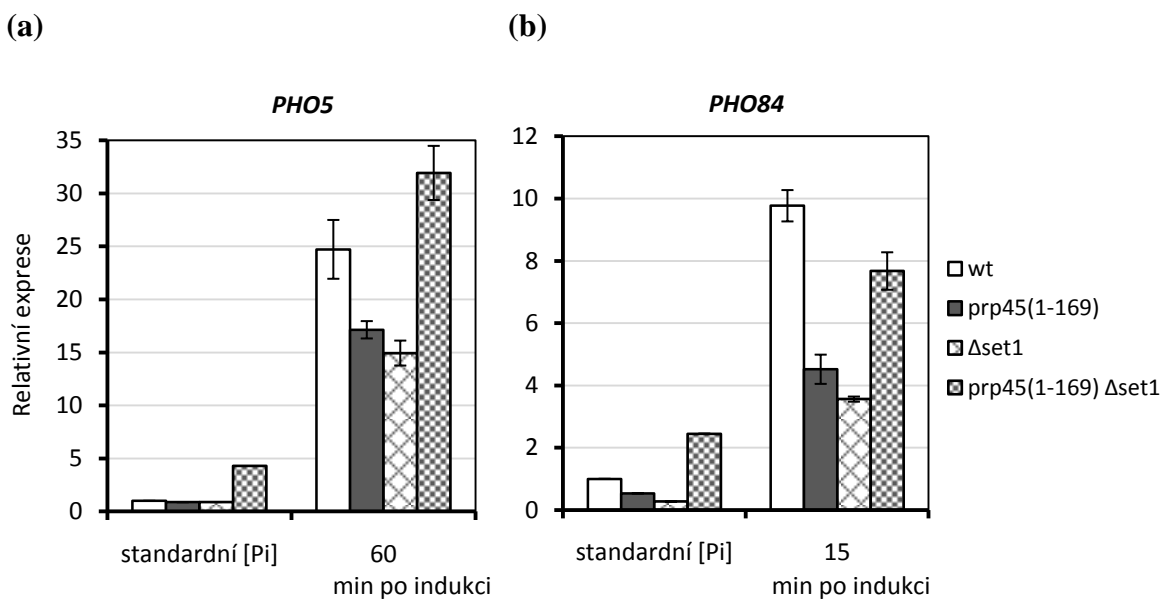
**Obr. 4.22** Exprese genu *PHO5* u buněk s delecí genu *RAD6* po přenosu do media bez přidaného fosfátu.. Exprese je vztažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní  $[P_i]$  u divokého kmene. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky tří technických opakování. Graf je reprezentativním výsledkem dvou biologických opakování qRT-PCR.



#### 4.6.5 Exprese genů PHO u buněk s delecí genu SET1

Posledními kmeny, u kterých byla testována exprese genů *PHO5* a *PHO84*, byly kmeny získané křížením buněk s mutací *prp45(1-169)* s buňkami s delecí genu *SET1* (viz kapitola 4.4.1). Pro testování byla vybrána tetráda s označením MHY08. Set1 je součástí HMT komplexu COMPASS, který methyloje H3K4 (Miller et al., 2001, Krogan et al., 2002a) a působí v kroku po ubiquitylaci H2BK123 proteiny Rad6/Bre1. Lidský ortholog proteinu Prp45, SNW1/SKIP, interaguje s proteiny Menin a některými dalšími proteiny, které jsou součástí jednoho z HMT komplexů specifických pro metylaci H3K4 u savců (Bres et al., 2009; viz Literární přehled). U kvasinek byla také prokázána genetická interakce mezi alelami genů *PRP45* a *SET1*, tato interakce měla charakter syntetického zhoršení růstu při vyšší kultivační teplotě (A. Valentová, nepublikované výsledky).

Při sledování exprese genu *PHO5* bylo zjištěno (obr. 4.23 (a)), že v mediu se standardní koncentrací fosfátu dochází k naboacení transkriptu genu *PHO5* u buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δset1*. U buněk s jednoduchou delecí genu *SET1*, kde bylo určité navýšení také očekáváno (Carvin and Kladde, 2004), však tento efekt pozorován nebyl. Definitivní potvrzení však bude vyžadovat další opakování. Naboacení transkriptu *PHO5* se u dvojitých mutant projevilo také po přenosu buněk do media bez přidaného fosfátu. Hladina exprese byla v tomto případě vyšší než u jednoduchých mutant zvláště a byla srovnatelná s hladinou exprese v divokých buňkách.



**Obr. 4.23** Expresse genu (a) *PHO5* a (b) *PHO84* u buněk s delecí genu *SET1* po přenosu do media bez přidaného fosfátu. Expresse je vytažena k průměrné expresi daného genu v mediu se standardní [Pi] u divokého kmene. Grafy znázorňují reprezentativní výsledky dvou biologických opakování. Úsečky znázorňují směrodatnou odchylku tří technických opakování qRT-PCR.

Výsledky exprese genu *PHO84* (obr. 4.23 (b)) odpovídají výsledkům exprese genu *PHO5*. V mediu se standardní koncentrací fosfátu je také patrné nabohacení transkriptu *PHO84* u buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δset1*. V 15. minutě po přenosu buněk do media bez přidaného fosfátu je množství transkriptu *PHO84* u dvojitě mutanty opět vyšší než u jednoduchých mutant zvlášť a dosahuje téměř úrovně divokého kmene.

Všechna dosud provedená pozorování jsou shrnuta v tabulkách 4.1 a 4.2. V tabulce 4.1 jsou shrnuty efekty na expresi genů *PHO5* a *PHO84*, jaké vykazují buňky s jednoduchou delecí genu kódujícího vybraný efektor chromatinových modifikací a buňky s dvojitou mutací v mediu se standardní koncentrací fosfátu (tedy v neindukujících podmínkách). Je také znázorněno, zda má dvojitá mutace ve srovnání s jednoduchou delecí na expresi nějaký další efekt. Tabulka 4.2 je uspořádána stejně, pouze shrnuje vliv daných mutací na expresi genů *PHO5* a *PHO84* v mediu bez přidaného fosfátu (tedy v podmínkách indukujících expresi obou genů).

Kmen	Expresie v mediu se standardní koncentrací fosfátu ve srovnání s divokými buňkami		Kmen	Expresie v mediu se standardní koncentrací fosfátu ve srovnání s divokými buňkami		Efekt dvojité mutace ve srovnání s jednoduchou delecí ve vybraném efektoru	
	<i>PHO5</i>	<i>PHO84</i>		<i>PHO5</i>	<i>PHO84</i>	<i>PHO5</i>	<i>PHO84</i>
<i>prp45(1-169)</i>	Stejná	Stejná	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Δbur2</i>	Dereprimována	Stejná	<i>Δbur2 prp45(1-169)</i>	Dereprimována	Stejná	Bez dalšího efektu	Bez dalšího efektu
<i>Δpaf1</i>	Dereprimována	Stejná	<i>Δpaf1 prp45(1-169)</i>	Dereprimována	Stejná	Bez dalšího efektu	Bez dalšího efektu
<i>Δrad6</i>	Stejná	-----	<i>Δrad6 prp45(1-169)</i>	Stejná	-----	Bez dalšího efektu	-----
<i>Δset1</i>	Stejná	Stejná	<i>Δset1 prp45(1-169)</i>	Dereprimována	Dereprimována	Zvýšená exprese	Zvýšená exprese

Tab. 4.1 Vliv jednoduché delecce genů kódujících vybraný efektor chromatinových modifikací a vliv dvojité mutace na expresi genů *PHO5* a *PHO84* v neindukujících podmínkách (v mediu se standardní koncentrací fosfátu).

Kmen	Expresie v indukujících podmínkách ve srovnání s divokými buňkami		Kmen	Expresie v indukujících podmínkách ve srovnání s divokými buňkami		Efekt dvojité mutace ve srovnání s jednoduchou delecí ve vybraném efektoru	
	<i>PHO5</i>	<i>PHO84</i>		<i>PHO5</i>	<i>PHO84</i>	<i>PHO5</i>	<i>PHO84</i>
<i>prp45(1-169)</i>	Zpožděná	Zpožděná	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Δbur2</i>	Neindukovatelná	Neindukovatelná	<i>Δbur2 prp45(1-169)</i>	Neindukovatelná	Neindukovatelná	Bez dalšího efektu	Bez dalšího efektu
<i>Δpaf1</i>	Neindukovatelná	Neindukovatelná	<i>Δpaf1 prp45(1-169)</i>	Neindukovatelná	Neindukovatelná	Bez dalšího efektu	Bez dalšího efektu
<i>Δrad6</i>	Zhoršená indukce	-----	<i>Δrad6 prp45(1-169)</i>	Zhoršená indukce	-----	Zhoršený defekt v expresi	-----
<i>Δset1</i>	Zhoršená indukce	Zhoršená indukce	<i>Δset1 prp45(1-169)</i>	Indukce nad úroveň divokého kmene	Indukce skoro na úroveň divokého kmene	Suprese defektu v expresi	Suprese defektu v expresi

Tab. 4.2 Vliv jednoduché delecce genů kódujících vybraný efektor chromatinových modifikací a vliv dvojité mutace na expresi genů *PHO5* a *PHO84* v indukujících podmínkách (v mediu bez přidaného fosfátu).

## 5 Diskuse

Cílem mého diplomového projektu bylo přispět k poznání, jakým způsobem je protein Prp45, jehož role byla dosud v literatuře spojována pouze se sestřihem pre-mRNA, zapojen do regulace transkripce. Toto zapojení nebylo ještě v literatuře dokumentováno. Protein Prp45 může v rámci sestřihu a transkripce působit nezávisle nebo může tyto procesy funkčně spřahovat. Na možnou spojitost proteinu Prp45 s regulací transkripce ukazují jednak výsledky získané na lidském orthologovi Prp45, proteinu SNW1/SKIP, a jednak některé dosud nepublikované výsledky získané v naší laboratoři a v laboratoři J. Beggs.

V rámci diplomového projektu byl studován vliv proteinu Prp45 na expresi genů fosfátového metabolismu *PHO5* a *PHO84*. Z předchozích pokusů provedených v naší laboratoři víme, že u buněk *prp45(1-169)* dochází ke zpoždění v jejich expresi po indukci (K. Abrhánová, nepublikované výsledky). Vliv této mutace na expresi těchto genů byl potvrzen metodou qRT-PCR u buněk dvou různých genetických pozadí. Dále byly studovány kombinace mutace *prp45(1-169)* a delece vybraného regulačního genu. Tyto geny byly vytipovány na základě známého vztahu k regulaci exprese *PHO5* a *PHO84* a na základě zjištěných genetických interakcí mezi *PRP45* a geny kódujícími tyto faktory (A. Valentová, nepublikované výsledky). Výsledky ukázaly, že protein Prp45 je zapojen do regulace exprese genů *PHO5* a *PHO84* na úrovni působení proteinů Rad6 a Set1.

Byly také potvrzeny a rozšířeny poznatky o vlivu některých efektorů chromatinových modifikací na represi transkripce genu *PHO5* v neindukujících podmínkách. Bylo potvrzeno, že delece genu *PAF1* vede k derepresi transkripce genu *PHO5* v těchto podmínkách, jak už bylo dříve popsáno (Carvin and Kladde, 2004). Toto pozorování bylo rozšířeno o zjištění, že k derepresi genu *PHO5* vede také delece faktoru *BUR2*, který působí v kroku před zapojením komplexu PAF. Navíc se ukázalo, že v buňkách s delecí genů *BUR2* a *PAF1* je exprese obou genů, *PHO5* i *PHO84*, už dále neindukovatelná.

## 5.1 Indukce exprese genů PHO je u buněk s mutací *prp45(1-169)* zpožděná

Metodou qRT-PCR jsme ověřili předchozí pozorování učiněné s využitím metod microarrays a Northern blot. U buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami dochází ke zpomalení indukce exprese genů *PHO5* a *PHO84*, po zhruba dvou hodinách inkubace v indukčních podmínkách se rozdíl v hladinách mRNA mezi divokými a mutovanými buňkami začínají vyrovnávat. Zpomalení indukce exprese jsme také ověřili u buněk dvou různých genetických pozadí, EGY48 a BY4741.

Na lokusech *PHO5* i *PHO84* probíhá také transkripce ve směru antisense (Camblong et al., 2007, Uhler et al., 2007). Zajímalo nás proto, zda tento antisense transkript nemůže ovlivňovat detekci sense transkriptu při použití náhodných hexanukleotidů při reverzní transkripci. Ukázalo se, že při použití náhodných hexanukleotidů antisense transkript interferuje s detekcí sense transkriptu v represivních podmínkách, protože jeho kvantita je v porovnání se sense transkripty relativně velká. V indukčních podmínkách se kvantita antisense transkriptů stává ve srovnání se sense transkripty v podstatě zanedbatelnou. Vzhledem k tomu, že výsledky jsou potom vztahovány na expresi daného genu v neindukujících podmínkách, rozhodli jsme se provádět reverzní transkripci z genově specifických primerů detekujících pouze sense transkripty.

O genu *PHO84* je známo, že stabilizace antisense transkriptu vede k inhibici transkripce ve směru sense (Camblong et al., 2007). Podobný mechanismus u genu *PHO5* nebyl prokázán, bylo publikováno, že funkce tohoto transkriptu spíše souvisí s usnadněním transkripce ve směru sense (Uhler et al., 2007). Zajímalo nás proto, zda mutace *prp45(1-169)* neovlivňuje transkripci ve směru sense prostřednictvím změn v transkripci ve směru antisense. V případě genu *PHO84* hladina antisense transkriptu u divokých i mutovaných buněk v průběhu času od indukce kolísala (obr. 4.19 (b)), ale nebyl pozorován významný rozdíl mezi mutovanými a divokými buňkami. Za zpomalení indukce exprese genu *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)* tedy zřejmě není odpovědná zvýšená stabilizace antisense transkriptu.

V případě genu *PHO5* nelze vyvodit jednoznačné závěry, protože v 60. minutě, ve které byl pozorován největší rozdíl v expresi mezi divokými a mutovanými buňkami, chybí data pro antisense transkript u mutovaných buněk. Ve 120. minutě bylo

pozorováno dvojnásobné zvýšení antisense transkriptu u divokých buněk ve srovnání s mutovanými buňkami (obr. 4.18 (b)). V tomto čase však už byla hladina sense transkriptů u divokých a mutovaných buněk vyrovnána, proto je spíše nepravděpodobné, že by za změny v indukci exprese genu *PHO5* u mutovaných buněk byla odpovědná změna ve stabilizaci antisense transkriptu.

Už samotný fakt, že u divokých buněk docházelo v indukujících podmínkách k navýšení hladiny antisense transkriptu genu *PHO5*, je poněkud překvapující. Uhler et al. ukázali, že antisense transkript vzniká pouze v neindukujících podmínkách, po přenosu do indukujících podmínek už nebyl antisense transkript detekován (Uhler et al., 2007). V našem případě naopak docházelo k určitému zvýšení hladiny antisense transkriptu s přibývajícím časem po indukci exprese u divokých buněk. Co je příčinou této diskrepance, však zůstává nejasné.

Jak už bylo poznamenáno výše, v indukčních podmínkách byla kvantita antisense transkriptů obou genů o několik řádů nižší, než byla kvantita sense transkriptů. Vzhledem k tomu, že jsme nenašli vztah mezi zpožděním transkripce genů *PHO5* a *PHO84* a zvýšenou stabilizací antisense transkriptu u buněk s mutací *prp45(1-169)*, nepřikládáme velkou váhu roli těchto transkriptů při ovlivňování exprese genů *PHO5* a *PHO84*. Pro potvrzení tohoto závěru však bude potřeba pokusy ještě zopakovat.

## **5.2 Genetické interakce mezi *prp45(1-169)* a vybranými regulačními geny**

Změny v expresi genů *PHO5* a *PHO84* byly v literatuře dokumentovány také u buněk s delecí některých genů kódujících proteiny se vztahem k elongaci transkripce (Paf1, Set1, Rad6, Bre1; Carvin and Kladde, 2004). Mutace *prp45(1-169)* může vést buď k aberantnímu sestřihu faktorů nezbytných pro indukci těchto genů, nebo se protein Prp45 přímo podílí na regulaci transkripce. Geny *PHO5* ani *PHO84* (ani ostatní geny fosfátového metabolismu, jejichž exprese byla u buněk s mutací *prp45(1-169)* zpožděna) intron neobsahují. Introny neobsahují ani geny se vztahem k expresi genů *PHO5* a *PHO84* identifikované ve výše zmíněné studii (Carvin and Kladde, 2004), stejně jako ostatní komponenty komplexů, jichž jsou tyto proteiny součástí. Z genů, jejichž proteinové produkty spouští expresi genů fosfátového metabolismu v odpověď na snížení intracelulární koncentrace fosfátu (*PHO4*, *PHO2*, *PHO80*, *PHO85* a *PHO81*; viz kapitola

2.2), obsahuje intron pouze gen kódující cyklin dependentní kinázu *PHO85*. Že by aberantní sestřih genu *PHO85* u buněk s mutací *prp45(1-169)* zapříčinil pozorovaný efekt, se nezdá pravděpodobné. V literatuře bylo publikováno, že delece genu *PHO85* vedla ke konstitutivní aktivaci genů fosfátového metabolismu (Huang et al., 2002). Intron tohoto genu také nevykazuje žádné charakteristiky, například nekanonické sekvence v 5' a 3' sestřihových místech (Gahura et al., 2009), které by dělaly jeho sestřih závislý na Prp45 (O. Gahura, osobní sdělení). Protein Prp45 tedy může přímo regulovat transkripci těchto genů, nicméně jeho působení prostřednictvím sestřihu nemůže být vyloučeno. Na zapojení proteinu Prp45 přímo do regulace transkripce ukazují některé dosud nepublikované výsledky z laboratoře J. Beggs.

Rozhodli jsme se proto testovat genetické interakce mezi *PRP45* a geny se známým vztahem k elongaci transkripce. Případná genetická interakce by nám mohla napovědět, kterých procesů při elongaci transkripce se protein Prp45 účastní. Místo celogenomové studie jsme se rozhodli zaměřit pouze na geny, jejichž interakce s alelou *prp45* se dá očekávat. Tyto geny byly vybrány jednak na základě článku Carvina a Kladdeho a jednak na základě studií provedených na lidském orthologovi Prp45, proteinu SNW1/SKIP (Bres et al., 2005, Bres et al., 2009). Byly rovněž zahrnuty geny, jejichž proteinové produkty působí před nebo po zapojení produktů těchto vybraných genů. Byly tedy připraveny kmeny s mutací *prp45(1-169)* a zároveň delece v genu, jehož proteinový produkt funkčně odpovídá lidskému P-TEFb (Bur1, Bur2, Ctk1), v genu kódujícího podjednotku komplexu PAF (Paf1, Rtf1), v genech, jejichž proteinové produkty zprostředkovávají ubiquitinylaci H2BK123 (Rad6, Bre1), metylaci H3K4 (Set1, Bre2), H3K36 (Set2) a H3K79 (Dot1) anebo v genech kódujících podjednotky komplexů SAGA (HAT Gcn5, deubiquitinylační enzym Ubp8, protein Sgf11 nutný k asociaci Ubp8 s ostatními komponentami komplexu a enzym Chd1, který se účastní přestaveb chromatinu) a Ccr4-Not (Not4).

Genetické syntetické interakce mohou být v podstatě dvojí, pozitivní, nebo negativní. Pozitivní interakce alel dvou genů je situace, kdy zhoršení nějakého fenotypového projevu (nejčastěji růstu, třeba i v suboptimálních podmínkách) v důsledku jedné mutace je zvráceno přítomností jiné mutace. Negativní interakce alel dvou genů je situace, kdy přítomnost obou mutací v jedné buňce vede k výraznému zhoršení fenotypového projevu („Synthetic sickness“) nebo dokonce ke smrti buňky („Synthetic lethality“), zatímco samy o sobě nemají mutace na fenotyp buněk žádný nebo jen mírný

vliv. Syntetické interakce naznačují, že proteinové produkty těchto genů působí buď v jedné metabolické anebo signální dráze, nebo že působí v paralelních drahách, které regulují společný proces. U některých připravených dvojitých mutant byl pozorován zhoršený růst při zvýšené kultivační teplotě ve srovnání s jednoduchými mutanty. Šlo o dvojitě mutanty *prp45(1-169) Δbur2*, *prp45(1-169) Δpaf1*, *prp45(1-169) Δrad6*, *prp45(1-169) Δset1* a některé další (A. Valentová, nepublikované výsledky). U buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δbur1* byl pozorován vztah syntetické lethality už při běžné kultivační teplotě. Buňky *Δbur1* vykazují velmi vážný růstový defekt, který je přičítán mnohačetnému zapojení proteinu Bur1 při regulaci elongační fáze transkripce (Liu et al., 2009). Tento těžký růstový defekt však lze zvrátit současnou delecí některých dalších genů, například *SET2* nebo genů kódujících komponenty komplexu Rpd3S, stejně jako mutací v H3K36, která znemožňuje metylaci v tomto místě (Keogh et al., 2005). Tento výsledek ukazuje na blízký funkční vztah mezi Bur1, Set2 a komplexem Rpd3S. Methylace H3K36 zprostředkovaná HMT Set2 potencuje funkci HDAC komplexu Rpd3S, který je k transkribovaným genům vyvázán zřejmě prostřednictvím fosforylované CTD Pol II (Drouin et al., 2010). Komplex Rpd3S deacetyluje histony po průchodu Pol II a tím zřejmě zabraňuje iniciaci transkripce z kryptických aktivačních sekvencí (dráha Set2/Rpd3S; Carrozza et al., 2005, Joshi and Struhl, 2005, Keogh et al., 2005). Aktivita Bur1 je zřejmě nutná k překonání transkripčního bloku ustaveného touto dráhou (Keogh et al., 2005). Bylo proto zajímavé zjistit, zda mutace *prp45(1-169)* také nepovede k reparaci růstového defektu způsobeného delecí genu *BUR1*, což by ukázalo na blízký vztah funkce Bur1 také k proteinu Prp45. Tato hypotéza se však nepotvrdila.

Ostatní testované buňky s dvojitou mutací se svými fenotypovými vlastnostmi, které byly testovány, nelišily od divokých buněk nebo od buněk s jednoduchými mutacemi (A. Valentová, nepublikované výsledky). Nalezení genetických interakcí mezi *PRP45* a omezenou skupinou faktorů účastnících se elongace transkripce ukazuje, že protein Prp45 souvisí s funkcí jen několika komplexů zapojených do procesu elongace transkripce. Mezi tyto komplexy patří Bur1-Bur2, PAF, Rad6-Bre1 a COMPASS.



### 5.3 Vliv genetického pozadí na expresi genu *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami

Abychom mohli testovat vliv proteinu Prp45 na expresi genů *PHO5* a *PHO84*, bylo nejprve nutné nalézt takové podmínky, kdy bude rozdíl v expresi těchto genů mezi divokými a mutovanými buňkami co největší. Pro testování exprese genu *PHO5* byla vybrána 60. minuta po přenosu do media bez přidaného fosfátu. V těchto podmínkách byl rozdíl v expresi ze všech testovaných časů největší bez ohledu na genetické pozadí buněk (obr. 4.6 (a), 4.8 (a) a 4.15; EGY48 vs. BY4741).

V případě genu *PHO84* bylo nalezení podmínek, při kterých je rozdíl v expresi mezi divokými a mutovanými buňkami největší, komplikovanější. V porovnání s genem *PHO5* vykazuje exprese genu *PHO84* nižší práh citlivosti pro výkyvy ve změnách koncentrace fosfátu (viz kapitola 2.2.2.1). Výkyvy ve změnách extracelulární koncentrace fosfátu jsou v buňce dočasně pufovány vnitřními polyfosfátovými zásobami, které částečně utlumují fyziologickou signalizaci vedoucí k indukci genů dráhy PHO (Thomas and O'Shea, 2005). Při postupném vyčerpávání polyfosfátu se snižuje aktivita komplexu Pho85-Pho80, transkripční faktor Pho4 je fosforylován jen částečně a v tomto stavu je schopen vázat se do promotoru genu *PHO84* a aktivovat jeho transkripci, zatímco do promotoru genu *PHO5* se váže až po úplné defosforylaci, tedy až po úplné deaktivaci komplexu Pho85-Pho80 po vyčerpání polyfosfátových zásob (Springer et al., 2003, Thomas and O'Shea, 2005). Důsledkem je, že exprese genu *PHO84* je indukována velmi brzy po té, co dojde k poklesu extracelulární koncentrace fosfátu. Po přenosu buněk do media bez přidaného fosfátu je indukce velmi rychlá, protože se začnou dříve vyčerpávat polyfosfátové zásoby a aktivita komplexu Pho85-Pho80 poklesne rychle. Interval, ve kterém je experimentálně zachytitelný rozdíl v expresi mezi divokými a mutovanými buňkami, je proto krátký. Předpokládali jsme, že v podmínkách submaximální indukce by mohlo dojít ke zpomalení vyčerpávání polyfosfátových zásob a tím ke zpomalení snižování aktivity Pho85-Pho80, čímž by se zpomalil nástup exprese genu *PHO84*. Interval, kdy je zachytitelný rozdíl v expresi tohoto genu mezi divokými a mutovanými buňkami, by se tak mohl prodloužit. Rozhodli jsme se proto expresi genu *PHO84* indukovat přenosem do media, do kterého byl fosfát přidán na výslednou koncentraci 0,1 mM (Thomas and O'Shea, 2005). U buněk s genetickým pozadím EGY48 byl tento přístup úspěšný, nástup exprese u divokých

i mutovaných kmenů se zpomalil a největší rozdíl v hladině mRNA byl v 60. minutě po přenosu do tohoto media (viz obr. 4.7 (a), 4.8 (b) a 4.9). Na expresi genu *PHO84* v kmenech s genetickým pozadím BY4741, na kterém byly připraveny dvojité mutanty, mělo však medium s 0,1 mM koncentrací fosfátu odlišný vliv. V tomto mediu došlo k výraznějšímu zpomalení indukce exprese u divokých buněk než u buněk s mutací *prp45(1-169)*. Z hlediska kinetiky indukce se tak rozdíl v expresi spíše setřely. Na základě těchto pokusů byla proto pro další testování indukce exprese genu *PHO84* u buněk s genetickým pozadím BY4741 zvolena 30. minuta po přenosu do media bez přidaného fosfátu.

Kmeny s různým genetickým pozadím se vzájemně liší malými, ale relativně častými změnami v sekvencích DNA (Schacherer et al., 2007, Winzeler et al., 2003). Protože většina fenotypových znaků je spíše kvantitativní povahy a tedy závislá na souhře více genů, mají i tyto malé rozdíly důležitý vliv na výsledný fenotyp buněk (Steinmetz et al., 2002, Yvert et al., 2003, Deutschbauer and Davis, 2005). Genetické pozadí BY4741 má ve srovnání s ostatními genetickými pozadími na fenotyp relativně silný vliv. Například buňky s mutací *prp45(1-169)* na pozadí EGY48 jsou citlivé na kultivační teplotu 37 °C, zatímco buňky s toutéž mutací na pozadí BY4741 jsou citlivé až na kultivační teplotu 39 °C. V souvislosti s indukcí genu *PHO84* bylo publikováno, že indukce tohoto genu na pozadí W303 závisí stejnou měrou na faktorech Rtt109 a Asf1. Vliv faktoru Rtt109 byl na genetickém pozadí BY4741 velmi podobný jako u buněk s genetickým pozadím W303, ale vliv faktoru Asf1 se na tomto genetickém pozadí ukázal jako téměř zanedbatelný (Wippo et al., 2009). Odlišné vlivy mutací na chování buněk s různým genetickým pozadím jsou tedy dokumentovány. Rozdílná odpověď buněk s mutací *prp45(1-169)* na genetickém pozadí BY4741 ve srovnání s buňkami s genetickým pozadím EGY48 na indukcii exprese genu *PHO84* v mediu s 0,1 mM koncentrací fosfátu má tedy svůj precedens. V této souvislosti je zajímavé zmínit, že sestříhové defekty pozorované u buněk s mutací *prp45(1-169)* jsou na teplotě nezávislé (O. Gahura, nepublikované výsledky). Teplotní senzitivita buněk s touto mutací proto může odrážet právě funkci proteinu Prp45 při elongaci transkripce a právě tuto funkci může ovlivňovat genetické pozadí.

Při dalších pokusech se však i v podmínkách popsanych výše objevily problémy se zachycováním rozdílů v expresi genu *PHO84* mezi divokými buňkami a buňkami s mutací *prp45(1-169)*. Protože všechny kmeny, kterých se tyto problémy týkaly, vznikly

křížením, lze tyto problémy také částečně přičíst vlivu genetického pozadí. Kříženy byly sice buňky stejného genetického pozadí, ale z různých zdrojů a se zavedenými různými mutacemi. Už v průběhu předchozích manipulací s těmito buňkami mohly vzniknout odlišné sekvenční polymorfismy, jejichž kombinace při vzájemném křížení vedla k rozdílům v kinetice exprese genu *PHO84* u získaných divokých buněk a získaných buněk s mutací *prp45(1-169)*. Problémy se zachycováním rozdílů v expresi genu *PHO84* mezi divokými a mutovanými buňkami mohly být však také částečně způsobeny experimentálními chybami, které vznikaly v průběhu pokusu, protože interval, ve kterém je tento rozdíl zachytitelný, je relativně krátký. Nejlepším způsobem, jak tyto problémy eliminovat, by bylo lépe optimalizovat podmínky pokusu a provést více biologických opakování, což zamýšlíme udělat.

## **5.4 Exprese genů PHO u kmenů s delecemi vybraných efektorů chromatinových modifikací a role Prp45**

Genetické interakce byly prokázány mezi *PRP45* a geny kódujícími proteiny, které svojí funkcí odpovídají lidskému P-TEFb, dále geny kódujícími podjednotky komplexu PAF a enzymy, které zprostředkovávají ubiquitylaci H2BK123 a metylaci H3K4. U vybraných kmenů byl testován vliv dvojitých mutací na expresi genů *PHO5* a *PHO84* ve srovnání s divokými buňkami a buňkami s jednoduchými mutacemi. Exprese těchto genů byla zjišťována jak v represivních podmínkách (medium se standardní, 7,3 mM koncentrací fosfátu), tak po přenosu do indukčních podmínek (medium bez přidaného fosfátu).

### **5.4.1 Exprese genů PHO v kmenech s delecemi vybraných genů v represivních podmínkách**

Při testování exprese genů PHO se ukázalo, že u buněk s delecí genu *PAF1* došlo v neindukčních podmínkách k derepresi genu *PHO5* (obr. 4.21 (a)). Tento efekt byl už v literatuře publikován dříve (Carvin and Kladde, 2004). Negativní vliv komplexu PAF na expresi mnoha jiných genů byl už také v literatuře dokumentován. Byla provedena studie, kdy byl s využitím techniky microarrays studován vliv delece genu *PAF1* na

expresi genů a u velkého množství genů bylo detekováno zvýšení exprese. Mezi tyto geny patří například gen *ARG1* (Penheiter et al., 2005). Gen *PHO5* sice nebyl ve výše popsané celogenomové studii nalezen, mohl však být v důsledku malé změny v expresi vyloučen jako nesignifikantní.

Naše výsledky navíc ukázaly, že k derepresi genu *PHO5* v neindukujících podmínkách dochází i v buňkách s delecí genu *BUR2* (obr. 4.20 (a)). Tento efekt ještě nebyl v literatuře popsán a je konzistentní s faktem, že komplex Bur1-Bur2 působí v krocích před vyvázáním komplexu PAF a k jeho vyvázání přispívá (Laribee et al., 2005, Wood et al., 2005, Liu et al., 2009, Zhou et al., 2009). Je nutné poznamenat, že k derepresi genu *PHO5* došlo v případě buněk s dvojitými mutacemi *prp45(1-169) Δbur2* a *prp45(1-169) Δpaf1* na stejnou úroveň, jako v případě buněk s jednoduchými delecemi genů *BUR2* a *PAF1* (obr. 4.20 a 4.21). Za derepresi jsou tedy odpovědné delece genů *BUR2* a *PAF1* a protein Prp45 k derepresi zřejmě nepřispívá.

Na to, proč nebyla dereprese v neindukujících podmínkách pozorována také u genu *PHO84*, zatím není jasná odpověď. Každopádně pro potvrzení tohoto pozorování je nutné pokusy ještě zopakovat. Pokud by se rozdíly v chování genu *PHO84* ve srovnání s genem *PHO5* potvrdily, bylo by tyto rozdíly možné vysvětlit na základě odlišné vnitřní stability nukleosomů v promotoru tohoto genu ve srovnání s genem *PHO5* (Wippo et al., 2009). Bylo ukázáno, že v případě genu *ARG1* protein Paf1 reprimuje expresi v neindukčních podmínkách prostřednictvím ubiquitinylace H2BK123 (Crisucci and Arndt, 2011), která stabilizuje nukleosomy v promotoru (Chandrasekharan et al., 2009). Podobný vliv ubiquitinylace H2BK123 na stabilitu nukleosomů v represivních podmínkách byl ukázán také v případě genu *PHO5* (Chandrasekharan et al., 2009). Nukleosom „up“ v promotoru genu *PHO84* vykazuje vyšší stabilitu než nukleosom „down“, který svou stabilitou odpovídá nukleosomům v promotoru genu *PHO5* (Wippo et al., 2009; viz Literární přehled). Nukleosom „up“ tedy k další stabilizaci nemusí potřebovat ubiquitinylací H2BK123 a její eliminace se proto na derepresi exprese v neindukčních podmínkách neprojeví. V indukčních podmínkách je však exprese genu *PHO84* více závislá na remodelaci nukleosomu „down“ (Wippo et al., 2009). Role stabilnějšího nukleosomu „up“ by tedy mohla souviset specificky s represí transkripce v neindukčních podmínkách.

Na základě výše popsaných pozorování byla tedy očekávána dereprese genu *PHO5* také u buněk s delecí *RAD6*. Tato dereprese byla už v literatuře také

dokumentována (Carvin and Kladde, 2004). Výsledky našich pokusů však tuto derepresi neukázaly (4.22 (a)). Carvin a Kladde detekovali expresi genu *PHO5* prostřednictvím jeho fosfatázové aktivity (rAPase assay; repressible acid phosphatase assay), zatímco my jsme používali qRT-PCR. Metoda qRT-PCR je ale pro detekci citlivější a navíc detekuje *PHO5* na úrovni mRNA, ne na úrovni proteinu. Rozdíl v pozorování také může souviset s tím, že Carvin a Kladde sice používali buňky se stejným genetickým pozadím, ale diploidní kmen, zatímco my jsme použili haploidy. Za zmínku však stojí, že dereprese genu *PHO5* (měřeno pomocí fosfátové aktivity) byla u buněk s delecí těchto genů nižší než u buněk s delecí genu *PAF1* (Carvin and Kladde, 2004). Protože v našem případě je už dereprese genu *PHO5* u buněk s delecí *PAF1* relativně malá, ještě subtilnější dereprese u buněk s delecí genu *RAD6* proto už nemusela být detekována. Je ale také na místě zmínit, že jde o měření exprese v represivních podmínkách, kdy je gen exprimován málo. Data proto mohou mít velký rozptyl. Pro potvrzení závěru, že k derepresi genu *PHO5* v represivních podmínkách opravdu nedochází, bude potřeba provést ještě další opakování.

Na základě výsledků publikovaných dříve byla také očekávána dereprese obou genů, *PHO5* i *PHO84*, u buněk s delecí genu *SET1* (Carvin and Kladde, 2004, Wang et al., 2011). V nejnovější studii byl navržen mechanismus, jakým methylace H3K4 reprimuje transkripci. Methylace H3K4 (hlavně trimethylace H3K4) vedla k vyvazování HDAC Rpd3L do promotoru genu *PHO5* a následná deacetylace znemožňovala iniciaci transkripce (Wang et al., 2011). Ani dereprese transkripce genů *PHO5* a *PHO84* v neindukujících podmínkách u buněk s delecí genu *SET1* však v našem případě pozorována nebyla (obr. 4.23). Důvody mohou být podobné jako v případě buněk s delecí *RAD6*. I tady dochází k menšímu rozsahu dereprese genu *PHO5* u buněk s delecí genu *SET1* než u buněk s delecí genu *PAF1* (Carvin and Kladde, 2004), čímž se dereprese genu *PHO5* u buněk s delecí *SET1* v našem případě mohla stát nedetekovatelnou. Také pro potvrzení tohoto výsledku bude nutno provést více biologických opakování. Je však zajímavé, že k derepresi obou genů v neindukujících podmínkách docházelo v případě buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δset1*.

#### 5.4.2 Exprese genů PHO v kmenech s delecemi vybraných genů v indukčních podmínkách

Po přenosu do indukčních podmínek byla exprese genů *PHO5* a *PHO84* u kmenů s delecí *BUR2* a *PAF1* stále na stejné úrovni jako v represivních podmínkách (obr. 4.20 a 4.21). V případě buněk s delecí *BUR1* a *PAF1* je exprese obou genů už zřejmě dále neindukovatelná. Neindukovatelnost exprese souvisí s předpovězenou duální rolí komplexu PAF (Crisucci and Arndt, 2011), a tedy potažmo i komplexu Bur1-Bur2, při transkripci. V represivních podmínkách zabraňují iniciaci transkripce, ale v indukčních podmínkách jsou pro transkripci nezbytné, protože ovlivňují vyvazování a funkci mnoha dalších faktorů souvisejících s regulací elongace (viz kapitoly 2.1.2 a 2.1.3). Jejich delece proto dereprimují transkripci v neindukčních podmínkách, ale už nepodporují elongaci v indukčních podmínkách. Přísně vzato však nemůžeme vyloučit, že by ještě nemohlo k další indukci dojít, protože exprese byla měřena pouze v jednom časovém bodě po přenosu do indukujících podmínek. Tuto možnost však považujeme spíše za nepravděpodobnou. Závěr o neindukovatelnosti však bude ještě nutno ověřit dalšími biologickými opakováními s měřením exprese obou genů ve více časových bodech po indukci. Buňky s dvojitými mutacemi *prp45(1-169) Δbur2* a *prp45(1-169) Δpaf1* také nevykazovaly žádný další efekt oproti buňkám s jednoduchými delecemi genů *BUR2* a *PAF1*. Protein Prp45 se tedy zřejmě do regulace transkripce zapojuje až v krocích po působení proteinů Bur2 a Paf1.

Dále byla testována exprese genu *PHO5* po přenosu do indukčních podmínek u kmene *Δrad6*, u kmene s mutací *prp45(1-169)* a u kmene s dvojitou mutací *prp45(1-169) Δrad6* (obr. 4.22). Buňky *Δrad6* vykázaly zhoršenou expresi ve srovnání s divokými buňkami a buňkami s mutací *prp45(1-169)*. Dvojitá mutace defekt v expresi ještě prohloubila.

Zpožděná indukce genu *PHO5* u buněk s delecí genu *RAD6* byla už dříve pozorována (Ransom et al., 2009). Bylo však také ukázáno, že mutace H2BK123R, která znemožňuje ubiquitinylation, stejně jako delece genu *BRE1*, nemá na indukci exprese genu *PHO5* žádný vliv (Ransom et al., 2009). Kromě ubiquitinligázy Bre1 tvoří protein Rad6 E2-E3 pár také s dalšími proteiny (Dohmen et al., 1991, Bailly et al., 1997). Rad6 se tedy může na indukci genu *PHO5* podílet prostřednictvím ubiquitinylace jiných substrátů. Prp45 může být vyžadován pro správnou funkci Rad6 v rámci drah ovlivňujících expresi

genu *PHO5* nezávisle na ubiquitylaci H2BK123. Pro ověření této hypotézy plánujeme změřit expresi genu *PHO5* také u buněk s delecí *BRE1* a u buněk s delecemi ostatních enzymů E3, jejichž funkce souvisí s Rad6. I v tomto případě plánujeme při dalších pokusech změřit expresi tohoto genu ve více časových intervalech po indukci.

U buněk s jednoduchými mutacemi *prp45(1-169)* a  $\Delta set1$  byla exprese obou genů po přenosu do indukujících podmínek snížena ve srovnání s divokými buňkami (obr. 4.23). Obě mutace snižovaly expresi podobně. V práci Wang et al. bylo nicméně pozorováno, že po přenosu do indukujících podmínek dochází k rychlejší indukci genu *PHO5* u mutantních buněk ve srovnání s divokými buňkami. Autoři tento rozdíl interpretovali jako důsledek toho, že delece genu *SET1* zrušila negativní vliv methylace H3K4 na expresi (Wang et al., 2011). Proč bylo v našem případě detekováno zpoždění indukce, není známo. Dvojitá mutace expresi genu *PHO84* vracela téměř na úroveň divokého kmene a v případě genu *PHO5* byla hladina mRNA dokonce ještě vyšší než u divokého kmene. Mutace *prp45(1-169)* a současná delece genu *SET1* tedy ruší inhibiční vliv, který mají na transkripci jednoduché mutanty zvlášť. Genově specifický efekt mutace SNW1/SKIP na methylaci H3K4 pozorovala ve svých studiích i K. Jones na savčím modelu (Bres et al., 2009).

## 5.5 Exprese genů PHO a otevírání chromatinové struktury

Zpoždění indukce *PHO5* a *PHO84* u buněk s mutací *prp45(1-169)* připomíná efekt, který mají na indukci těchto genů delece regulátorů, které jsou důležité pro otevírání chromatinové struktury (Gcn5, Asf1, Snf2 a Ino80; viz Literární přehled). Zatím nebyl nalezen faktor, který by byl esenciální pro toto otevírání. Bylo však ukázáno, že dvojitá delece ještě více zpozdí indukci exprese obou genů (Barbaric et al., 2007, Wippo et al., 2009). Tyto proteiny tedy zřejmě působí v paralelních drahách.

Je také zajímavé, že otevírání chromatinu v promotoru genu *PHO5* bylo na některých faktorech závislé až v podmínkách submaximální indukce (např. 0,15 mM koncentrace fosfátu; Korber et al., 2006, Dhasarathy and Kladde, 2005, Barbaric et al., 2007). Jak už bylo několikrát popsáno výše, v těchto podmínkách je transkripční faktor Pho4 fosforylován jen částečně. V této formě nebyl detekován v promotoru genu *PHO5*, což korelovalo s neschopností aktivovat transkripci tohoto genu. Naproti tomu byl detekován v promotoru genu *PHO84*, k jehož aktivaci transkripce došlo (Springer et al.,

2003). Rozdíly v expresi mohou být vysvětleny odlišnou kinetikou procesů vedoucích k aktivaci transkripce těchto genů (Springer et al., 2003). Transkripční faktor Pho4 může být fosforylován až po vazbě do promotoru daného genu a tato fosforylace může kompetovat s procesy vedoucími k indukci transkripce. Výsledná aktivace transkripce tak bude podmíněna poměrem rychlosti fosforylace Pho4 a rychlosti procesů vedoucích k aktivaci transkripce. Pokud by procesy vedoucí k aktivaci transkripce probíhaly rychleji u genu *PHO84* než u genu *PHO5*, částečná fosforylace Pho4 v podmínkách submaximální indukce by mohla kompetovat s těmito procesy u genu *PHO5*, ale ne u genu *PHO84* (Springer et al., 2003). Neschopnost vytvořit aktivně transkripční komplex by mohl vést k odvázní částečně fosforylovaného Pho4 z promotoru genu *PHO5*, což by také vysvětlilo rozdíly v přítomnosti částečně fosforylovaného Pho4 na promotorech genů *PHO5* a *PHO84*. Příkladem takového procesu vedoucího k aktivaci transkripce by mohlo být vyvazování faktorů odpovědných za otevírání chromatinové struktury (viz Springer et al., 2003). Částečná fosforylace Pho4 by mohla kompetovat s vazbou pouze některých těchto faktorů, zatímco na vyvazování jiných by takový vliv mít nemusela. V podmínkách s takovou koncentrací fosfátu, kdy už k indukci genu *PHO5* dochází, ale určitá frakce Pho4 by byla stále částečně fosforylována, by se indukce exprese stala závislou pouze na faktorech, kterým by nevadila přítomnost tohoto částečně fosforylovaného Pho4.

Bylo by zajímavé zjistit, zda protein Prp45 také nepřispívá k otevírání chromatinové struktury po indukci. Tuto hypotézu také podporují některé nepublikované výsledky získané v laboratoři J. Beggs. Byly nalezeny fyzické i genetické interakce mezi Prp45 a faktory remodelujícími chromatin, například Isw1 (J. Beggs, nepublikované výsledky). Na vyvazování proteinu Isw1 k transkribovaným genům participují také H3K4me2 a H3K4me3 (Santos-Rosa et al., 2003), což je konzistentní s funkční interakcí proteinů Prp45 a Set1. Plánujeme proto připravit kmeny s mutací *prp45(1-169)* a současnou delecí ve vybraném genu, jehož proteinový produkt přispívá k otevírání chromatinové struktury (např. *GCN5*, *ASF1*, *SNF2* a *INO80*) a porovnat kinetiku indukce po přenosu do indukčních podmínek. Pokud by se předpoklad potvrdil a u buněk s dvojitou mutací by došlo ve srovnání s buňkami s jednoduchými mutacemi ke zpomalení indukce exprese, vliv na kinetiku ztráty nukleosomů z promotorů genů *PHO5* a *PHO84* bychom potvrdili s využitím metody chromatinové imunoprecipitace. Vyzkoušíme také přenos do média s různými koncentracemi fosfátu, abychom odhalili



případnou závislost promotorů genů *PHO5* a *PHO84* na Prp45 při otevírání v podmínkách submaximální indukce.

## 5.6 Závěr

Výsledky získané při řešení tohoto diplomového projektu ukázaly, že protein Prp45, jehož funkce byla v literatuře doposud spojována pouze se sestřihem pre-mRNA, je zapojen také do regulace exprese genů fosfátového metabolismu *PHO5* a *PHO84*, které neobsahují intron. Protein Prp45 ovlivňuje jejich expresi ve spojitosti s funkcí některých efektorů chromatinových modifikací, proteinů Rad6 a Set1. Pro ověření této funkce plánujeme v budoucnu využít i další indukovatelné geny, například *GALI*, *GAL10* nebo *ARG1*. Dosavadní výsledky ukazují, že se i kvasinkový ortholog proteinů SNW, Prp45, zřejmě podílí na funkčním spřažení mezi probíhající transkripcí, modifikacemi chromatinu a úpravami vznikajícího transkriptu, jak bylo dokumentováno pro lidského orthologa proteinů SNW, SNW1/SKIP.

## 6 Souhrn

- Metodou qRT-PCR byly potvrzeny předchozí výsledky získané metodami microarrays a Northern blot, tedy že u buněk s mutací *prp45(1-169)* dochází ke zpomalení indukce genů fosfátového metabolismu *PHO5* a *PHO84*. Toto zpomalení bylo pozorováno u kmenů s genetickým pozadím EGY48 i BY4741.
- Křížením byly připraveny kmeny s mutací *prp45(1-169)* a současnou delecí genu *SET1*. Technikou knock-in byl připraven kmen s mutací *prp45(1-169)* a současnou delecí genu *BUR1*, který nesl divokou alelu *BUR1* na plazmidu.
- Byl testován vliv dvojité mutace *prp45(1-169) Δbur1* na fenotyp buněk. Výsledky ukázaly, že tyto geny vykazují vztah syntetické lethality.
- Metodou qRT-PCR byl testován vliv dvojitých mutací *prp45(1-169) Δbur2*, *prp45(1-169) Δpaf1*, *prp45(1-169) Δrad6* a *prp45(1-169) Δset1* na expresi genů *PHO5* a *PHO84*. Výsledky ukázaly, že funkce proteinu Prp45 souvisí s proteiny Rad6 a Set1.
- Byly potvrzeny a rozšířeny výsledky studií zabývajících se vlivem efektorů chromatinových modifikací na expresi genů v souvislosti s jejich dosud ještě ne dobře charakterizovanou rolí při represi transkripce. Delece genů *BUR2* a *PAF1* vedly k derepresi transkripce genu *PHO5* v neindukujících podmínkách. Po přenosu do indukujících podmínek se exprese obou genů, *PHO5* i *PHO84*, stává na těchto faktorech závislá, protože u kmenů s delecemi těchto faktorů nedošlo v porovnání s represivními podmínkami k dalšímu nárůstu hladiny mRNA.

## 7 Použitá literatura

**Adkins MW, Howar SR, Tyler JK.** Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast *PHO5* and *PHO8* genes. *Mol Cell*. Jun 4;14(5):657-66, 2004.

**Adkins MW, Tyler JK.** Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Mol Cell*. Feb 3;21(3):405-16, 2006.

**Adkins MW, Williams SK, Linger J, Tyler JK.** Chromatin disassembly from the *PHO5* promoter is essential for the recruitment of the general transcription machinery and coactivators. *Mol Cell Biol*. Sep;27(18):6372-82, 2007.

**Aida M, Chen Y, Nakajima K, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H.** Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the *junB* gene. *Mol Cell Biol*. Aug;26(16):6094-104, 2006.

**Albers M, Diment A, Muraru M, Russell CS, Beggs JD.** Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA*. Jan;9(1):138-50, 2003.

**Allard S, Utley RT, Savard J, Clarke A, Grant P, Brandl CJ, Pillus L, Workman JL, Côté J.** NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J*. Sep 15;18(18):5108-19, 1999.

**Almer A, Rudolph H, Hinnen A, Hörz W.** Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J*. Oct;5(10):2689-96, 1986.

**Altaf M, Utley RT, Lacoste N, Tan S, Briggs SD, Côté J.** Interplay of chromatin modifiers on a short basic patch of histone H4 tail defines the boundary of telomeric heterochromatin. *Mol Cell*. Dec 28;28(6):1002-14, 2007.

**Badarinarayana V, Chiang YC, Denis CL.** Functional interaction of CCR4-NOT proteins with TATA-binding protein (TBP) and its associated factors in yeast. *Genetics*. Jul;155(3):1045-54, 2000.

**Bailly V, Lauder S, Prakash S, Prakash L.** Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem*. Sep 12;272(37):23360-5, 1997.

**Barbaric S, Münsterkötter M, Svaren J, Hörz W.** The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast *PHO5* promoter. *Nucleic Acids Res*. Nov 15;24(22):4479-86, 1996.

**Barbaric S, Walker J, Schmid A, Svejstrup JQ, Hörz W.** Increasing the rate of chromatin remodeling and gene activation--a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *EMBO J*. Sep 3;20(17):4944-51, 2001.

**Barbaric S, Reinke H, Hörz W.** Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the *PHO5* promoter. *Mol Cell Biol*. May;23(10):3468-76, 2003.

**Barbaric S, Luckenbach T, Schmid A, Blaschke D, Hörz W, Korber P.** Redundancy of chromatin remodeling pathways for the induction of the yeast *PHO5* promoter in vivo. *J Biol Chem*. Sep 21;282(38):27610-21, 2007.

**Baudino TA, Kraichely DM, Jefcoat SC Jr, Winchester SK, Partridge NC, MacDonald PN.** Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J Biol Chem*. Jun 26;273(26):16434-41, 1998.

- Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D.** FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*. Aug 22;301(5636):1090-3, 2003.
- Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD.** Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol Cell*. Jun;11(6):1587-98, 2003.
- Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR.** 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol*. **154**:164-75, 1987.
- Bortvin A, Winston F.** Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science*. Jun 7;272(5267):1473-6, 1996.
- Bres V, Gomes N, Pickle L, Jones KA.** A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev*. May 15;19(10):1211-26, 2005.
- Bres V, Yoshida T, Pickle L, Jones KA.** SKIP interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat transactivation. *Mol Cell*. Oct 9;36(1):75-87, 2009.
- Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD, Strahl BD.** Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*. Aug 1;418(6897):498, 2002.
- Buck, SW, Shore D.** Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast. *Genes Dev*. Feb 1;9(3):370-84, 1995.
- Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y.** The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol*. Jun;11(6):3229-38, 1991.
- Camblong J, Iglesias N, Fickentscher C, Diepinois G, Stutz F.** Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell*. Nov 16;131(4):706-17, 2007.
- Camblong J, Beyrouthy N, Guffanti E, Schlaepfer G, Steinmetz LM, Stutz F.** Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*. Jul 1;23(13):1534-45, 2009.
- Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP, Workman JL.** Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*. Nov 18;123(4):581-92, 2005.
- Carvin CD, Kladde MP.** Effectors of lysine 4 methylation of histone H3 in *Saccharomyces cerevisiae* are negative regulators of *PHO5* and *GALI-10*. *J Biol Chem*. Aug 6;279(32):33057-62, 2004.
- Cismowski MJ, Laff GM, Solomon MJ, Reed SI.** *KIN28* encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol*. Jun;15(6):2983-92, 1995.
- Cohen A, Perzov N, Nelson H, Nelson N.** A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins. *J Biol Chem*. Sep 17;274(38):26885-93, 1999.
- Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, Schuldiner M, Gebbia M, Recht J, Shales M, Ding H, Xu H, Han J, Ingvarsdottir K, Cheng B, Andrews B, Boone C, Berger SL, Hieter P, Zhang Z, Brown GW, Ingles CJ, Emili A, Allis CD, Toczyski DP, Weissman JS, Greenblatt JF, Krogan NJ.** Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature*. Apr 12;446(7137):806-10, 2007.
- Corden JL.** Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*. Oct;15(10):383-7, 1990.
- Crisucci EM, Arndt KM.** The Paf1 complex represses *ARG1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae* by promoting histone modifications. *Eukaryot Cell*. Jun;10(6):712-23, 2011.

- Dahl R, Wani B, Hayman MJ.** The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene*. Mar 26;16(12):1579-86, 1998.
- Daniel JA, Torok MS, Sun ZW, Schieltz D, Allis CD, Yates JR 3rd, Grant PA.** Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem*. Jan 16;279(3):1867-71, 2004.
- Davis CA, Ares M Jr.** Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 28;103(9):3262-7, 2006.
- Dehé PM, Pamblanco M, Luciano P, Lebrun R, Moinier D, Sendra R, Verreault A, Tordera V, Géli V.** Histone H3 lysine 4 mono-methylation does not require ubiquitination of histone H2B. *J Mol Biol*. Oct 28;353(3):477-84, 2005.
- Dehé PM, Géli V.** The multiple faces of Set1. *Biochem Cell Biol*. Aug;84(4):536-48, 2006.
- Denis CL, Chiang YC, Cui Y, Chen J.** Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. *Genetics*. Jun;158(2):627-34, 2001.
- Dermody JL, Buratowski S.** Leo1 subunit of the yeast paf1 complex binds RNA and contributes to complex recruitment. *J Biol Chem*. Oct 29;285(44):33671-9, 2010.
- Deutschbauer AM, Davis RW.** Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast. *Nat Genet*. Dec;37(12):1333-40, 2005.
- Dhasarathy A, Kladde MP.** Promoter occupancy is a major determinant of chromatin remodeling enzyme requirements. *Mol Cell Biol*. Apr;25(7):2698-707, 2005.
- Dohmen RJ, Madura K, Bartel B, Varshavsky A.** The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15;88(16):7351-5, 1991.
- Driscoll R, Hudson A, Jackson SP.** Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science*. Feb 2;315(5812):649-52, 2007.
- Drouin S, Laramée L, Jacques PÉ, Forest A, Bergeron M, Robert F.** DSIF and RNA polymerase II CTD phosphorylation coordinate the recruitment of Rpd3S to actively transcribed genes. *PLoS Genet*. Oct 28;6(10):e1001173, 2010.
- Du HN, Fingerman IM, Briggs SD.** Histone H3 K36 methylation is mediated by a trans-histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4. *Genes Dev*. Oct 15;22(20):2786-98, 2008.
- Duina AA, Winston F.** Analysis of a mutant histone H3 that perturbs the association of Swi/Snf with chromatin. *Mol Cell Biol*. Jan;24(2):561-72, 2004.
- Emre NC, Ingvarsdottir K, Wyce A, Wood A, Krogan NJ, Henry KW, Li K, Marmorstein R, Greenblatt JF, Shilatifard A, Berger SL.** Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell*. Feb 18;17(4):585-94, 2005.
- English CM, Adkins MW, Carson JJ, Churchill ME, Tyler JK.** Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell*. Nov 3;127(3):495-508, 2006.
- Ezhkova E, Tansey WP.** Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell*. Feb 13;13(3):435-42, 2004.
- Faucher D, Wellinger RJ.** Methylated H3K4, a transcription-associated histone modification, is involved in the DNA damage response pathway. *PLoS Genet*. Aug 26;6(8), 2010.

- Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y.** Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol.* Jun 25;12(12):1052-8, 2002.
- Fingerman IM, Li HC, Briggs SD.** A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway. *Genes Dev.* Aug 15;21(16):2018-29, 2007.
- Fleming AB, Kao CF, Hillyer C, Pikaart M, Osley MA.** H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell.* Jul 11;31(1):57-66, 2008.
- Folk P, Půta F, Skruzny M.** Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci.* Mar;61(6):629-40, 2004.
- Frederiks F, Tzouros M, Oudgenoeg G, van Welsem T, Fornerod M, Krijgsveld J, van Leeuwen F.** Nonprocessive methylation by Dot1 leads to functional redundancy of histone H3K79 methylation states. *Nat Struct Mol Biol.* Jun;15(6):550-7, 2008.
- Fuchs SM, Larabee RN, Strahl BD.** Protein modifications in transcription elongation. *Biochim Biophys Acta.* Jan;1789(1):26-36, 2009.
- Gahura O, Abrhámová K, Skruzny M, Valentová A, Munzarová V, Folk P, Půta F.** Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *J Cell Biochem.* Jan 1;106(1):139-51, 2009.
- Garber ME, Jones KA.** HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Curr Opin Immunol.* Aug;11(4):460-5, 1999.
- Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE.** Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol Cell Biol.* Jul;25(14):6123-39, 2005.
- Giannattasio M, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M.** The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J Biol Chem.* Mar 18;280(11):9879-86, 2005.
- Ginsburg DS, Govind CK, Hinnebusch AG.** NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Mol Cell Biol.* Dec;29(24):6473-87, 2009.
- Gregory PD, Schmid A, Zavari M, Münsterkötter M, Hörz W.** Chromatin remodelling at the *PHO8* promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* Nov 15;18(22):6407-14, 1999.
- Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems, 2008.**
- Han J, Zhou H, Horazdovsky B, Zhang K, Xu RM, Zhang Z.** Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science.* Feb 2;315(5812):653-5, 2007.
- Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ.** Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* Jan 11;183(4120):46-51, 1974.
- Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, Wilson CJ, Koh SS, Young RA.** Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell.* Jul;2(1):43-53, 1998.
- Henry KW, Wyce A, Lo WS, Duggan LJ, Emre NC, Kao CF, Pillus L, Shilatifard A, Osley MA, Berger SL.** Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* Nov 1;17(21):2648-63, 2003.

- Hertel CB, Längst G, Hörz W, Korber P.** Nucleosome stability at the yeast *PHO5* and *PHO8* promoters correlates with differential cofactor requirements for chromatin opening. *Mol Cell Biol.* Dec;25(24):10755-67, 2005.
- Ho CK, Shuman S.** Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Mol Cell.* Mar;3(3):405-11, 1999.
- Hoffman CS, Winston F.** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57(2-3):267-72, 1987.
- Huang H, Kahana A, Gottschling DE, Prakash L, Liebman SW.** The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* Nov;17(11):6693-9, 1997.
- Huang D, Moffat J, Andrews B.** Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. *Mol Cell Biol.* Jul;22(14):5076-88, 2002.
- Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD.** A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell.* Jan;11(1):261-6, 2003.
- Chandrasekharan MB, Huang F, Sun ZW.** Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 29;106(39):16686-91, 2009.
- Chandrasekharan MB, Huang F, Chen YC, Sun ZW.** Histone H2B C-terminal helix mediates trans-histone H3K4 methylation independent of H2B ubiquitination. *Mol Cell Biol.* Jul;30(13):3216-32, 2010.
- Cho EJ, Takagi T, Moore CR, Buratowski S.** mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* Dec 15;11(24):3319-26, 1997.
- Chu Y, Sutton A, Sternglanz R, Prelich G.** The BUR1 cyclin-dependent protein kinase is required for the normal pattern of histone methylation by SET2. *Mol Cell Biol.* Apr;26(8):3029-38, 2006.
- Chu Y, Simic R, Warner MH, Arndt KM, Prelich G.** Regulation of histone modification and cryptic transcription by the Bur1 and Paf1 complexes. *EMBO J.* Nov 14;26(22):4646-56, 2007.
- Ingvarsdottir K, Edwards C, Lee MG, Lee JS, Schultz DC, Shilatifard A, Shiekhattar R, Berger SL.** Histone H3 K4 demethylation during activation and attenuation of *GALI* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* Nov;27(22):7856-64, 2007.
- Jaehning JA.** The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochim Biophys Acta.* May-Jun;1799(5-6):379-88, 2010.
- Jónsson ZO, Jha S, Wohlschlegel JA, Dutta A.** Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell.* Nov 5;16(3):465-77, 2004.
- Joshi AA, Struhl K.** Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell.* Dec 22;20(6):971-8, 2005.
- Kaffman A, Herskowitz I, Tjian R, O'Shea EK.** Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science.* Feb 25;263(5150):1153-6, 1994.
- Kaffman A, Rank NM, O'Neill EM, Huang LS, O'Shea EK.** The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature.* Dec 3;396(6710):482-6, 1998a.
- Kaffman A, Rank NM, O'Shea EK.** Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* Sep 1;12(17):2673-83, 1998b.

- Kaplan CD, Laprade L, Winston F.** Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science*. Aug 22;301(5636):1096-9, 2003.
- Kaplan CD, Holland MJ, Winston F.** Interaction between transcription elongation factors and mRNA 3'-end formation at the *Saccharomyces cerevisiae* GAL10-GAL7 locus. *J Biol Chem*. Jan 14;280(2):913-22, 2005.
- Kelly TJ, Qin S, Gottschling DE, Parthun MR.** Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing. *Mol Cell Biol*. Oct;20(19):7051-8, 2000.
- Keogh MC, Podolny V, Buratowski S.** Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. Oct;23(19):7005-18, 2003.
- Keogh MC, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ, Boone C, Emili A, Weissman JS, Hughes TR, Strahl BD, Grunstein M, Greenblatt JF, Buratowski S, Krogan NJ.** Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell*. Nov 18;123(4):593-605, 2005.
- Kerr SC, Azzouz N, Fuchs SM, Collart MA, Strahl BD, Corbett AH, Larabee RN.** The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *PLoS One*. Mar 28;6(3):e18302, 2011.
- Kim YJ, Noguchi S, Hayashi YK, Tsukahara T, Shimizu T, Arahata K.** The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Hum Mol Genet*. May 15;10(11):1129-39, 2001.
- Kim M, Ahn SH, Krogan NJ, Greenblatt JF, Buratowski S.** Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *EMBO J*. Jan 28;23(2):354-64, 2004.
- Kim T, Buratowski S.** Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell*. Apr 17;137(2):259-72, 2009.
- Kim J, Roeder RG.** Direct Bre1-Paf1 complex interactions and RING finger-independent Bre1-Rad6 interactions mediate histone H2B ubiquitylation in yeast. *J Biol Chem*. Jul 31;284(31):20582-92, 2009.
- Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, Singer MA, Vermeulen M, Mann M, Bähler J, Green RD, Kouzarides T.** Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature*. Oct 18;449(7164):928-32, 2007.
- Koch F, Jourquin F, Ferrier P, Andrau JC.** Genome-wide RNA polymerase II: not genes only! *Trends Biochem Sci*. Jun;33(6):265-73, 2008.
- Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S.** Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev*. Oct 1;14(19):2452-60, 2000.
- Komeili A, O'Shea EK.** Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science*. May 7;284(5416):977-80, 1999.
- Korber P, Barbaric S, Luckenbach T, Schmid A, Schermer UJ, Blaschke D, Hörz W.** The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast *PHO5* and *PHO8* promoters. *J Biol Chem*. Mar 3;281(9):5539-45, 2006.
- Krogan NJ, Dover J, Khorrami S, Greenblatt JF, Schneider J, Johnston M, Shilatifard A.** COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. *J Biol Chem*. Mar 29;277(13):10753-5, 2002a.
- Krogan NJ, Kim M, Ahn SH, Zhong G, Kobor MS, Cagney G, Emili A, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt JF.** RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol*. Oct;22(20):6979-92, 2002b.



- Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Ryan OW, Golshani A, Johnston M, Greenblatt JF, Shilatifard A.** The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell*. Mar;11(3):721-9, 2003a.
- Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Emili A, Boone C, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt J.** Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. Jun;23(12):4207-18, 2003b.
- Krügel H, Fiedler G, Smith C, Baumberg S.** Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene nat1 from *Streptomyces noursei*. *Gene*. May 15;127(1):127-31, 1993.
- Kruk JA, Dutta A, Fu J, Gilmour DS, Reese JC.** The multifunctional Ccr4-Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes Dev*. Mar 15;25(6):581-93, 2011.
- Larabee RN, Krogan NJ, Xiao T, Shibata Y, Hughes TR, Greenblatt JF, Strahl BD.** BUR kinase selectively regulates H3 K4 trimethylation and H2B ubiquitylation through recruitment of the PAF elongation complex. *Curr Biol*. Aug 23;15(16):1487-93, 2005.
- Larabee RN, Shibata Y, Mersman DP, Collins SR, Kemmeren P, Roguev A, Weissman JS, Briggs SD, Krogan NJ, Strahl BD.** CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 3;104(14):5836-41, 2007.
- Lee JM, Greenleaf AL.** CTD kinase large subunit is encoded by *CTK1*, a gene required for normal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Expr*. May;1(2):149-67, 1991.
- Lee TI, Causton HC, Holstege FC, Shen WC, Hannett N, Jennings EG, Winston F, Green MR, Young RA.** Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*. Jun 8;405(6787):701-4, 2000.
- Lee CK, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD.** Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet*. Aug;36(8):900-5, 2004.
- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A.** Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*. Dec 14;131(6):1084-96, 2007.
- Leong GM, Subramaniam N, Figueroa J, Flanagan JL, Hayman MJ, Eisman JA, Kouzmenko AP.** Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J Biol Chem*. May 25;276(21):18243-8, 2001.
- Li B, Gogol M, Carey M, Lee D, Seidel C, Workman JL.** Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. *Science*. May 18;316(5827):1050-4, 2007.
- Li B, Jackson J, Simon MD, Fleharty B, Gogol M, Seidel C, Workman JL, Shilatifard A.** Histone H3 lysine 36 dimethylation (H3K36me2) is sufficient to recruit the Rpd3s histone deacetylase complex and to repress spurious transcription. *J Biol Chem*. Mar 20;284(12):7970-6, 2009.
- Liang G, Klose RJ, Gardner KE, Zhang Y.** Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nat Struct Mol Biol*. Mar;14(3):243-5, 2007.
- Liao SM, Zhang J, Jeffery DA, Koleske AJ, Thompson CM, Chao DM, Viljoen M, van Vuuren HJ, Young RA.** A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*. Mar 9;374(6518):193-6, 1995.
- Lin LJ, Minard LV, Johnston GC, Singer RA, Schultz MC.** Asf1 can promote trimethylation of H3 K36 by Set2. *Mol Cell Biol*. Mar;30(5):1116-29, 2010.

- Liu Y, Warfield L, Zhang C, Luo J, Allen J, Lang WH, Ranish J, Shokat KM, Hahn S.** Phosphorylation of the transcription elongation factor Spt5 by yeast Bur1 kinase stimulates recruitment of the PAF complex. *Mol Cell Biol.* Sep;29(17):4852-63, 2009.
- Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, Lührmann R.** Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science.* Dec 13;298(5601):2205-8, 2002.
- Mao C, Brown CR, Griesenbeck J, Boeger H.** Occlusion of regulatory sequences by promoter nucleosomes in vivo. *PLoS One.* Mar 3;6(3):e17521, 2011.
- Martinez P, Persson BL.** Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* Jun;258(6):628-38, 1998.
- Martinkova K, Lebduska P, Skruzny M, Folk P, Puta F.** Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *J Biochem.* Oct;132(4):557-63, 2002.
- Mason PB, Struhl K.** The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol.* Nov;23(22):8323-33, 2003.
- Miller T, Krogan NJ, Dover J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Johnston M, Greenblatt JF, Shilatifard A.** COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 6;98(23):12902-7, 2001.
- Morillon A, Karabetsov N, Nair A, Mellor J.** Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Mol Cell.* Jun 10;18(6):723-34, 2005.
- Mueller CL, Porter SE, Hoffman MG, Jaehning JA.** The Paf1 complex has functions independent of actively transcribing RNA polymerase II. *Mol Cell.* May 21;14(4):447-56, 2004.
- Mulder KW, Brenkman AB, Inagaki A, van den Broek NJ, Timmers HT.** Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res.* 35(7):2428-39, 2007.
- Murr R, Vaissière T, Sawan C, Shukla V, Herceg Z.** Orchestration of chromatin-based processes: mind the TRRAP. *Oncogene.* Aug 13;26(37):5358-72, 2007.
- Murray S, Udupa R, Yao S, Hartzog G, Prelich G.** Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by the Bur1 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol.* Jul;21(13):4089-96, 2001.
- Nakanishi S, Sanderson BW, Delventhal KM, Bradford WD, Staehling-Hampton K, Shilatifard A.** A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. *Nat Struct Mol Biol.* Aug;15(8):881-8, 2008.
- Natsume R, Eitoku M, Akai Y, Sano N, Horikoshi M, Senda T.** Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature.* Mar 15;446(7133):338-41, 2007.
- Neef DW, Kladde MP.** Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of *PHO5*. *Mol Cell Biol.* Jun;23(11):3788-97, 2003.
- Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, Ajuh P, Sleeman J, Lamond A, Mann M.** Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet.* Sep;20(1):46-50, 1998.
- Ng HH, Feng Q, Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K.** Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev.* Jun 15;16(12):1518-27, 2002a.
- Ng HH, Xu RM, Zhang Y, Struhl K.** Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem.* Sep 20;277(38):34655-7, 2002b.

- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K.** Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*. Mar;11(3):709-19, 2003a.
- Ng HH, Dole S, Struhl K.** The Rtf1 component of the Paf1 transcriptional elongation complex is required for ubiquitination of histone H2B. *J Biol Chem*. Sep 5;278(36):33625-8, 2003b.
- Nordick K, Hoffman MG, Betz JL, Jaehning JA.** Direct interactions between the Paf1 complex and a cleavage and polyadenylation factor are revealed by dissociation of Paf1 from RNA polymerase II. *Eukaryot Cell*. Jul;7(7):1158-67, 2008.
- Nourani A, Utley RT, Allard S, Côté J.** Recruitment of the NuA4 complex poises the *PHO5* promoter for chromatin remodeling and activation. *EMBO J*. Jul 7;23(13):2597-607, 2004.
- Obama K, Kato T, Hasegawa S, Satoh S, Nakamura Y, Furukawa Y.** Overexpression of peptidyl-prolyl isomerase-like 1 is associated with the growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. Jan 1;12(1):70-6, 2006.
- Ogawa N, Saitoh H, Miura K, Magbanua JP, Bun-ya M, Harashima S, Oshima Y.** Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of *PHO84* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. Dec 10;249(4):406-16, 1995.
- Ogawa N, DeRisi J, Brown PO.** New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell*. Dec;11(12):4309-21, 2000.
- Oh S, Jeong K, Kim H, Kwon CS, Lee D.** A lysine-rich region in Dot1p is crucial for direct interaction with H2B ubiquitylation and high level methylation of H3K79. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 3;399(4):512-7, 2010.
- O'Neill EM, Kaffman A, Jolly ER, O'Shea EK.** Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science*. Jan 12;271(5246):209-12, 1996.
- Patturajan M, Conrad NK, Bregman DB, Corden JL.** Yeast carboxyl-terminal domain kinase I positively and negatively regulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain phosphorylation. *J Biol Chem*. Sep 24;274(39):27823-8, 1999.
- Pavri R, Zhu B, Li G, Trojer P, Mandal S, Shilatifard A, Reinberg D.** Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell*. May 19;125(4):703-17, 2006.
- Penheiter KL, Washburn TM, Porter SE, Hoffman MG, Jaehning JA.** A posttranscriptional role for the yeast Paf1-RNA polymerase II complex is revealed by identification of primary targets. *Mol Cell*. Oct 28;20(2):213-23, 2005.
- Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S, Lundh F.** Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. Jul;43(4):225-44, 2003.
- Phatnani HP, Jones JC, Greenleaf AL.** Expanding the functional repertoire of CTD kinase I and RNA polymerase II: novel phosphoCTD-associating proteins in the yeast proteome. *Biochemistry*. Dec 21;43(50):15702-19, 2004.
- Pinskaya M, Gourvenec S, Morillon A.** H3 lysine 4 di- and tri-methylation deposited by cryptic transcription attenuates promoter activation. *EMBO J*. Jun 17;28(12):1697-707, 2009.
- Pokholok DK, Hannett NM, Young RA.** Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol Cell*. Apr;9(4):799-809, 2002.

**Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA.** Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. Aug 26;122(4):517-27, 2005.

**Prathapam T, Kühne C, Banks L.** Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic Acids Res*. Dec 1;30(23):5261-8, 2002.

**Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant PA.** Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*. Jan 27;433(7024):434-8, 2005.

**Price DH.** P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. Apr;20(8):2629-34, 2000.

**Pryde F, Jain D, Kerr A, Curley R, Mariotti FR, Vogelauer M.** H3 k36 methylation helps determine the timing of cdc45 association with replication origins. *PLoS One*. Jun 12;4(6):e5882, 2009.

**Qin S, Wang Q, Ray A, Wani G, Zhao Q, Bhaumik SR, Wani AA.** Sem1p and Ubp6p orchestrate telomeric silencing by modulating histone H2B ubiquitination and H3 acetylation. *Nucleic Acids Res*. Apr;37(6):1843-53, 2009.

**Qiu H, Hu C, Wong CM, Hinnebusch AG.** The Spt4p subunit of yeast DSIF stimulates association of the Paf1 complex with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. Apr;26(8):3135-48, 2006.

**Qiu H, Hu C, Hinnebusch AG.** Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters. *Mol Cell*. Mar 27;33(6):752-62, 2009.

#### **qPCR Technical Guide, Sigma, 2008**

**Ransom M, Williams SK, Dechassa ML, Das C, Linger J, Adkins M, Liu C, Bartholomew B, Tyler JK.** FACT and the proteasome promote promoter chromatin disassembly and transcriptional initiation. *J Biol Chem*. Aug 28;284(35):23461-71, 2009.

**Rao B, Shibata Y, Strahl BD, Lieb JD.** Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Mol Cell Biol*. Nov;25(21):9447-59, 2005.

**Reinke H, Hörz W.** Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated *PHO5* promoter. *Mol Cell*. Jun;11(6):1599-607, 2003.

**Robzyk K, Recht J, Osley MA.** Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*. Jan 21;287(5452):501-4, 2000.

**Rodriguez CR, Cho EJ, Keogh MC, Moore CL, Greenleaf AL, Buratowski S.** Kin28, the TFIIF associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. Jan;20(1):104-12, 2000.

**Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, Pijnappel WW, Wilm M, Aasland R, Stewart AF.** The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J*. Dec 17;20(24):7137-48, 2001.

**Ruiz-García AB, Sendra R, Pamblanco M, Tordera V.** Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS Lett*. Feb 17;403(2):186-90, 1997.

**San-Segundo PA, Roeder GS.** Role for the silencing protein Dot1 in meiotic checkpoint control. *Mol Biol Cell*. Oct;11(10):3601-15, 2000.

**Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T.** Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. Sep 26;419(6905):407-11, 2002.

- Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsou N, Morillon A, Weise C, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T.** Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell*. Nov;12(5):1325-32, 2003.
- Saunders A, Core LJ, Lis JT.** Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Aug;7(8):557-67, 2006.
- Shahbazian MD, Zhang K, Grunstein M.** Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1. *Mol Cell*. Jul 22;19(2):271-7, 2005.
- Sharp JA, Fouts ET, Krawitz DC, Kaufman PD.** Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Curr Biol*. Apr 3;11(7):463-73, 2001.
- Shilatifard A.** Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol*. Jun;20(3):341-8, 2008.
- Shukla A, Stanojevic N, Duan Z, Sen P, Bhaumik SR.** Ubp8p, a histone deubiquitinase whose association with SAGA is mediated by Sgf11p, differentially regulates lysine 4 methylation of histone H3 in vivo. *Mol Cell Biol*. May;26(9):3339-52, 2006a.
- Shukla A, Bajwa P, Bhaumik SR.** SAGA-associated Sgf73p facilitates formation of the preinitiation complex assembly at the promoters either in a HAT-dependent or independent manner in vivo. *Nucleic Acids Res*. 34(21):6225-32, 2006b.
- Schacherer J, Ruderfer DM, Gresham D, Dolinski K, Botstein D, Kruglyak L.** Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains. *PLoS One*. Mar 28;2(3):e322, 2007.
- Schneider KR, Smith RL, O'Shea EK.** Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science*. Oct 7;266(5182):122-6, 1994.
- Schneider J, Wood A, Lee JS, Schuster R, Dueker J, Maguire C, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Shilatifard A.** Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Mol Cell*. Sep 16;19(6):849-56, 2005.
- Schroeder SC, Schwer B, Shuman S, Bentley D.** Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev*. Oct 1;14(19):2435-40, 2000.
- Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M.** The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev*. Jun 1;18(11):1263-71, 2004.
- Schwabish MA, Struhl K.** Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. Dec;24(23):10111-7, 2004.
- Sims RJ 3rd, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL, Reinberg D.** Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. Nov 30;28(4):665-76, 2007.
- Skruzný M, Ambrozková M, Fuková I, Martínková K, Blahůšková A, Hamplová L, Půta F, Folk P.** Cyclophilins of a novel subfamily interact with SNW/SKIP coregulator in *Dictyostelium discoideum* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta*. Oct 31;1521(1-3):146-51, 2001.
- Smith JS, Brachmann CB, Pillus L, Boeke JD.** Distribution of a limited Sir2 protein pool regulates the strength of yeast rDNA silencing and is modulated by Sir4p. *Genetics*. Jul;149(3):1205-19, 1998.
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B.** Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*. Dec;9(12):3273-97, 1998.

- Springer M, Wykoff DD, Miller N, O'Shea EK.** Partially phosphorylated Pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes. *PLoS Biol.* Nov;1(2):E28, 2003.
- de Steensma HY, de Jonge P, Kaptein A, Kaback DB.** Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: localization of a repeated sequence containing an acid phosphatase gene near a telomere of chromosome I and chromosome VIII. *Curr Genet.* Sep;16(3):131-7, 1989.
- Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, Wentz SR, O'Shea EK.** Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science.* Jan 3;299(5603):114-6, 2003.
- Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ, McCusker JH, Davis RW.** Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature.* Mar 21;416(6878):326-30, 2002.
- Strahl BD, Grant PA, Briggs SD, Sun ZW, Bone JR, Caldwell JA, Mollah S, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD.** Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* Mar;22(5):1298-306, 2002.
- Sun ZW, Allis CD.** Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature.* Jul 4;418(6893):104-8, 2002.
- Svaren J, Hörz W.** Interplay between nucleosomes and transcription factors at the yeast *PHO5* promoter. *Semin Cell Biol.* Aug;6(4):177-83, 1995.
- Takahashi YH, Lee JS, Swanson SK, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Triebel RC, Shilatifard A.** Regulation of H3K4 trimethylation via Cps40 (Spp1) of COMPASS is monoubiquitination independent: implication for a Phe/Tyr switch by the catalytic domain of Set1. *Mol Cell Biol.* Jul;29(13):3478-86, 2009.
- Taverna SD, Ilin S, Rogers RS, Tanny JC, Lavender H, Li H, Baker L, Boyle J, Blair LP, Chait BT, Patel DJ, Aitchison JD, Tackett AJ, Allis CD.** Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell.* Dec 8;24(5):785-96, 2006.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ.** How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol.* Nov;14(11):1025-40, 2007.
- Thomas MR, O'Shea EK.** An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 5;102(27):9565-70, 2005.
- Toh-e A, Kakimoto S.** Genes coding for the structure of the acid phosphatases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* Dec 30;143(1):65-70, 1975.
- Tompa R, Madhani HD.** Histone H3 lysine 36 methylation antagonizes silencing in *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Rpd3S histone deacetylase complex. *Genetics.* Feb;175(2):585-93, 2007.
- Torriani-Gorini, A., Silver, S., and Yagil, E.** Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology, Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1994.
- Tsubota T, Berndsen CE, Erkmann JA, Smith CL, Yang L, Freitas MA, Denu JM, Kaufman PD.** Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes. *Mol Cell.* Mar 9;25(5):703-12, 2007.
- Tucker M, Valencia-Sanchez MA, Staples RR, Chen J, Denis CL, Parker R.** The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* Feb 9;104(3):377-86, 2001.
- Tyler JK, Adams CR, Chen SR, Kobayashi R, Kamakaka RT, Kadonaga JT.** The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature.* Dec 2;402(6761):555-60, 1999.

- Uhler JP, Hertel C, Svejstrup JQ.** A role for noncoding transcription in activation of the yeast *PHO5* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 8;104(19):8011-6, 2007.
- Van Driessche B, Tafforeau L, Hentges P, Carr AM, Vandehaute J.** Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast*. Oct 15;22(13):1061-8, 2005.
- van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE.** Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell*. Jun 14;109(6):745-56, 2002.
- Vermeulen M, Mulder KW, Denissov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M, Timmers HT.** Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*. Oct 5;131(1):58-69, 2007.
- Vitaliano-Prunier A, Menant A, Hobeika M, Géli V, Gwizdek C, Dargemont C.** Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation. *Nat Cell Biol*. Nov;10(11):1365-71, 2008.
- Wade PA, Werel W, Fentzke RC, Thompson NE, Leykam JF, Burgess RR, Jaehning JA, Burton ZF.** A novel collection of accessory factors associated with yeast RNA polymerase II. *Protein Expr Purif*. Aug;8(1):85-90, 1996.
- Wan Y, Chiang JH, Lin CH, Arens CE, Saleem RA, Smith JJ, Aitchison JD.** Histone chaperone Chz1p regulates H2B ubiquitination and subtelomeric anti-silencing. *Nucleic Acids Res*. Mar;38(5):1431-40, 2010.
- Wang X, Zhang S, Zhang J, Huang X, Xu C, Wang W, Liu Z, Wu J, Shi Y.** A large intrinsically disordered region in SKIP and its disorder-order transition induced by PPIL1 binding revealed by NMR. *J Biol Chem*. Feb 12;285(7):4951-63, 2010.
- Wang SS, Zhou BO, Zhou JQ.** Histone H3 Lysine 4 Hypermethylation Prevents Aberrant Nucleosome Remodeling at the *PHO5* Promoter. *Mol Cell Biol*. Aug;31(15):3171-81, 2011.
- Weake VM, Workman JL.** Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*. Mar 28;29(6):653-63, 2008.
- Williams SK, Truong D, Tyler JK.** Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 1;105(26):9000-5, 2008.
- Winzeler EA, Castillo-Davis CI, Oshiro G, Liang D, Richards DR, Zhou Y, Hartl DL.** Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. *Genetics*. Jan;163(1):79-89, 2003.
- Wippo CJ, Krstulovic BS, Ertel F, Musladin S, Blaschke D, Stürzl S, Yuan GC, Hörz W, Korber P, Barbaric S.** Differential cofactor requirements for histone eviction from two nucleosomes at the yeast *PHO84* promoter are determined by intrinsic nucleosome stability. *Mol Cell Biol*. Jun;29(11):2960-81, 2009.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, Johnston M, Shilatifard A.** Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell*. Jan;11(1):267-74, 2003a.
- Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A.** The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem*. Sep 12;278(37):34739-42, 2003b.
- Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A.** The Bur1/Bur2 complex is required for histone H2B monoubiquitination by Rad6/Bre1 and histone methylation by COMPASS. *Mol Cell*. Nov 23;20(4):589-99, 2005.

- Wu CH, Yamaguchi Y, Benjamin LR, Horvat-Gordon M, Washinsky J, Enerly E, Larsson J, Lambertsson A, Handa H, Gilmour D.** NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev.* Jun 1;17(11):1402-14, 2003.
- Wyce A, Xiao T, Whelan KA, Kosman C, Walter W, Eick D, Hughes TR, Krogan NJ, Strahl BD, Berger SL.** H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell.* Jul 20;27(2):275-88, 2007.
- Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle JC, Dufour ME, Boulay J, Régnault B, Devaux F, Namane A, Séraphin B, Libri D, Jacquier A.** Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell.* Jun 3;121(5):725-37, 2005.
- Wysocki R, Javaheri A, Allard S, Sha F, Côté J, Kron SJ.** Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol Cell Biol.* Oct;25(19):8430-43, 2005.
- Xiao T, Kao CF, Krogan NJ, Sun ZW, Greenblatt JF, Osley MA, Strahl BD.** Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* Jan;25(2):637-51, 2005.
- Xu C, Zhang J, Huang X, Sun J, Xu Y, Tang Y, Wu J, Shi Y, Huang Q, Zhang Q.** Solution structure of human peptidyl prolyl isomerase-like protein 1 and insights into its interaction with SKIP. *J Biol Chem.* Jun 9;281(23):15900-8, 2006.
- Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H.** P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell.* Jan 20;21(2):227-37, 2006
- Yao S, Neiman A, Prelich G.** *BUR1* and *BUR2* encode a divergent cyclin-dependent kinase-cyclin complex important for transcription in vivo. *Mol Cell Biol.* Oct;20(19):7080-7, 2000.
- Youdell ML, Kizer KO, Kisseleva-Romanova E, Fuchs SM, Duro E, Strahl BD, Mellor J.** Roles for Ctk1 and Spt6 in regulating the different methylation states of histone H3 lysine 36. *Mol Cell Biol.* Aug;28(16):4915-26, 2008.
- Yvert G, Brem RB, Whittle J, Akey JM, Foss E, Smith EN, Mackelprang R, Kruglyak L.** Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors. *Nat Genet.* Sep;35(1):57-64, 2003.
- Zhang W, Bone JR, Edmondson DG, Turner BM, Roth SY.** Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J.* Jun 1;17(11):3155-67, 1998.
- Zhang C, Baudino TA, Dowd DR, Tokumaru H, Wang W, MacDonald PN.** Ternary complexes and cooperative interplay between NCoA-62/Ski-interacting protein and steroid receptor coactivators in vitamin D receptor-mediated transcription. *J Biol Chem.* Nov 2;276(44):40614-20, 2001.
- Zhang C, Dowd DR, Staal A, Gu C, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS, MacDonald PN.** Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing. *J Biol Chem.* Sep 12;278(37):35325-36, 2003.
- Zheng S, Wyrick JJ, Reese JC.** Novel trans-tail regulation of H2B ubiquitylation and H3K4 methylation by the N terminus of histone H2A. *Mol Cell Biol.* Jul;30(14):3635-45, 2010.
- Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Hayward SD.** A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol.* Feb;74(4):1939-47, 2000a.
- Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD.** SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol.* Apr;20(7):2400-10, 2000b.



**Zhou M, Halanski MA, Radonovich MF, Kashanchi F, Peng J, Price DH, Brady JN.** Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol.* Jul;20(14):5077-86, 2000c.

**Zhou K, Kuo WH, Fillingham J, Greenblatt JF.** Control of transcriptional elongation and cotranscriptional histone modification by the yeast BUR kinase substrate Spt5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 28;106(17):6956-61, 2009.

**Internetové zdroje:**

[http://www.jenabioscience.com/images/625337ef95/NTC\\_superior\\_selection\\_tool.pdf](http://www.jenabioscience.com/images/625337ef95/NTC_superior_selection_tool.pdf)

[http://www.carlroth.com/media/\\_de-de/Graphics/00035537\\_0.jpg](http://www.carlroth.com/media/_de-de/Graphics/00035537_0.jpg)

<http://homepages.ed.ac.uk/jeanb/index.html>

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/P30412.html>