

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

---

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Libuša Kovařová**

Využití protilátek k charakterizaci chromatinových modifikací u  
*Saccharomyces cerevisiae*

Use of antibodies for the characterization of chromatin modifications in  
*Saccharomyces cerevisiae*

**Bakalářská práce**

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Praha 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a doc. RNDr. Petra Folka, CSc., 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 dne

Podpis.....

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. a vedoucímu laboratoře doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. za všechny cenné rady a trpělivý přístup při odborném vedení této práce. Zvláště děkuji Mgr. Martině Hálové za nespočet teoretických i praktických rad, které mi práci ulehčily. Děkuji také všem ostatním členům Laboratoře regulace genové exprese za pomoc, podporu a vytvoření přátelské pracovní atmosféry. Nejvíce bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

## ABSTRAKT

Transkripce prekurzorové mRNA (pre-mRNA) a její sestřih byly donedávna vnímány jako dva na sobě nezávislé procesy. Na modelu *Saccharomyces cerevisiae* bylo ukázáno, že sestavování komplexu katalyzujícího sestřih pre-mRNA, spliceosomu, probíhá kotranskripčně, tedy v době před ukončením transkripce RNA polymerasou II. Studium kotranskripčního sestřihu se zjistilo, že proteiny účastnící se transkripce a specifické chromatinové modifikace mohou ovlivňovat sestřih pre-mRNA a jeho regulaci. Uvažuje se rovněž, že sestavování spliceosomu a modifikace chromatinu se vzájemně ovlivňují.

Protein Prp45, kvasinkový ortholog lidského transkripčního koregulátoru SKIP/SNW1, byl v literatuře dosud spojován pouze se sestřihem. Nepublikované výsledky získané v naší laboratoři naznačují, že by Prp45 mohl sloužit jako regulátor spřahující procesy transkripce a sestřihu. Ukázali jsme, že *PRP45* geneticky interaguje s faktory důležitými pro elongaci transkripce, mimo to i s enzymy katalyzujícími chromatinové modifikace, a že protein Prp45 ovlivňuje sestavování spliceosomu v časně fázi sestřihu pre-mRNA.

Cílem bakalářského projektu bylo pomocí metody chromatinové imunoprecipitace sledovat propojení fyziologické role proteinu Prp45 a trimethylace H3K4. Bylo zjištěno, že mutace *prp45(1-169)* výrazně neovlivňuje profil trimethylace H3 na lysinu 4, která je charakteristická pro transkripčně aktivní geny.

**Klíčová slova:** protilátky, qPCR, histon, kvasinka

## ABSTRACT

Transcription of precursor mRNA (pre-mRNA) and its splicing were originally conceived as two separate processes. Using *Saccharomyces cerevisiae* as a model, it was shown that the assembly of the complex catalyzing pre-mRNA splicing (spliceosome) can occur cotranscriptionally, i. e., during the time before the termination of transcription by RNA polymerase II. Research on cotranscriptional splicing revealed that proteins involved in transcription and specific chromatin modifications may affect pre-mRNA splicing and its regulation. It is also possible that spliceosome assembly and chromatin modifications can affect each other.

Prp45, the yeast ortholog of the human transcription coregulator SKIP/SNW1, has been previously associated only with splicing. The results obtained in our laboratory suggest that Prp45 could be used as a regulator coupling the processes of transcription and splicing. We have shown that *PRP45* has genetic interactions with factors important for transcription elongation, as well as chromatin modifications, and that it affects early stage of spliceosome assembly.

The aim of this bachelor project was document the relationship between the physiological role of Prp45 and H3K4 trimethylation using chromatin immunoprecipitation. It was found that *prp45(1-169)* mutation does not markedly affect the trimethylation of histone 3 at lysine 4, which is characteristic for transcriptionally active genes.

**Key words:** antibodies, qPCR, histone, yeast

# OBSAH

ABSTRAKT .....	4
ABSTRACT.....	5
OBSAH.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	11
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
1.2 Transkripce a její regulace .....	12
1.2.1 Iniciace transkripce prekurzorové mediátorové RNA .....	13
1.2.2 Elongace transkripce prekurzorové mediátorové RNA .....	15
1.3 Sestřih prekurzorové mRNA.....	16
1.3.1 Průběh sestřihu u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
1.3.2 Sestřihový faktor Prp45 .....	19
1.4 Spřažení transkripce a sestřihu.....	21
1.5 Chromatinová imunoprecipitace .....	23
1.5.1 Způsoby tvorby zesíťovaného chromatinu .....	25
1.5.2 Specifikace protilátek .....	26
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	30
3. MATERIÁLY A METODY .....	31
3.1 Použité přístroje .....	31
3.2 Použitý materiál a chemikálie .....	32
3.2.1 Seznam použitých chemikálií .....	32
3.2.2 Použité kvasinkové kmeny .....	33
3.2.3 Přehled použitých primerů.....	33
3.2.4 Přehled použitých protilátek .....	34

3.2.5	Ostatní materiál.....	34
3.3	Metody .....	34
3.3.1	Příprava kvasinkového kultivačního media.....	34
3.3.2	Příprava glycerolových konzerv .....	35
3.3.3	Kultivace kmenů <i>S. cerevisiae</i> na pevném a v tekutém mediu.....	35
3.3.4	Měření růstové křivky kmenů <i>S. cerevisiae</i> .....	36
3.3.5	Chromatinová imunoprecipitace.....	36
3.3.6	Kvantitativní PCR.....	40
3.3.7	Vyhodnocení a normalizace dat kvantitativní PCR.....	42
4.	VÝSLEDKY .....	43
4.1	Charakterizace růstových vlastností použitých kmenů <i>S. cerevisiae</i> .....	43
4.2	Vyhodnocení chromatinové imunoprecipitace kvantitativní PCR.....	45
5.	DISKUZE .....	49
6.	ZÁVĚR .....	52
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	53

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3' ss, 5' ss	3' a 5' sestřihové místo intronu
A	adenin
<i>ADHI</i> -UAS	<i>ADHI</i> aktivační sekvence v oblasti promotoru
BP místo	místo větvení intronu (z angl. <i>branch point</i> )
bp	párů basí (z angl. <i>base pairs</i> )
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumin</i> )
C	cytosin
CBC	komplex vázající 7-methylguanositovou čepičku na 5'-konec primárního transkriptu mRNA (z angl. <i>cap binding complex</i> )
C <sub>L</sub> , V <sub>L</sub>	konstantní a variabilní doména lehkého řetězce protilátky
<i>Cp</i>	míra koncentrace amplifikované DNA
CTD	C-terminální doména (z angl. <i>C-terminal domain</i> )
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DSIF	inhibiční elongační faktor (z angl. <i>DRB sensitivity inducing factor</i> )
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	metoda využívající se ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů (z angl. <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> )
G	guanin
H3K4me3/36me3	trimethylace histonu H3 na lysinu 4 nebo lysinu 36
H3K79me2	dimethylace histonu H3 na lysinu 79
H3K9ac/14ac/56ac	acetylace histonu H3 na lysinu 9, lysinu 14 nebo lysinu 56
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
C <sub>H</sub> , V <sub>H</sub>	konstantní a variabilní doména těžkého řetězce protilátky
ChIP	chromatinová imunoprecipitace (z angl. <i>chromatin immunoprecipitation</i> )
ChIP-chip	chromatinová imunoprecipitace s analýzou DNA pomocí hybridizace DNA na mikročip
ChIP-seq	chromatinová imunoprecipitace s analýzou DNA pomocí sekvenace



Ig	imunoglobulin (protilátka)
LB	bakteriální živné médium (z angl. <i>lysogeny broth</i> )
LB	lyzační pufr (z angl. <i>lysis buffer</i> )
mRNA	mediátorová RNA
NELF	negativní elongační faktor (z angl. <i>negative elongation factor</i> )
nt	nukleotid
NTC	komplex asociující se spliceosomem (z angl. <i>NineTeen complex</i> )
<i>OD</i> <sub>595</sub>	optická denzita při vlnové délce 595 nm
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pol II	RNA polymerasa II
pre-mRNA	prekurzorová mediátorová RNA (z angl. <i>precursor messenger RNA</i> )
Prp45	sestřihový faktor, protein SNW (z angl. <i>pre-mRNA processing protein 45</i> )
P-TEFb	pozitivní transkripční elongační faktor b
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	kyselina ribonukleová
rpm	otáčky za minutu (z angl. <i>revolutions per minute</i> )
RT	pokožová teplota (z angl. <i>room temperature</i> )
SAGA	multipodjednotkový koaktivující transkripční komplex (z angl. <i>Spt/Ada/Gcn5/Ada complex</i> )
snRNA	malá jaderná RNA (z angl. <i>small nuclear RNA</i> )
snRNP	malá ribonukleoproteinová partikule (z angl. <i>small nuclear ribonucleoprotein</i> )
SNW	skupina proteinů obsahujících konzervovaný motiv SNWKN
<i>STD</i>	směrodatná odchylka triplikátu (z angl. <i>standard deviation</i> )
T	tymin
TATA box	promotorová sekvence
TBP	TATA box vazebný protein (z angl. <i>TATA box binding protein</i> )
TEL VIR	telomerická oblast na pravém rameni chromosomu VI

TFIIA/B/D/E/F/H	transkripční faktor A/B/D/E/F/H
U	uracil
Ub-H2B	ubikvitinylace histon H2B
wt	divoký typ (z angl. <i>wild type</i> )
YPAD	kvasinkové živné medium (z angl. <i>yeast extract-peptone-adenine-dextrose medium</i> )

# 1. ÚVOD

## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Pro výzkum v molekulární biologii se jako modelový organismus osvědčil druh kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). *S. cerevisiae* patří do třídy vřeckovýtrusných hub označované jako askomycety. Reprodukuje se nepohlavně pučením a její buňky mají oválný až kulovitý tvar o velikosti 5 – 10  $\mu\text{m}$ , přičemž jejich velikost se s věkem mění.

Kmeny *S. cerevisiae* mohou na rozdíl od jiných mikroorganismů existovat ve dvou základních stabilních stavech, jako haploidní a diploidní buňky [1,2]. Díky nízké komplexitě genomu a velmi aktivní homologní rekombinaci byly pro *S. cerevisiae* záhy vyvinuty molekulárně genetické metody založené na využití procesu meiózy nebo mitózy, kdy je velmi snadné vytvořit mutaci vložením transformované DNA do specifického místa v genomu. Díky těmto metodám byla mimo jiné *S. cerevisiae* prvním eukaryotním organismem, jehož genom byl kompletně sekvenován. Její jaderný genom obsahuje haploidní set šestnácti dobře charakterizovaných chromosomů o velikosti od 200 do 2 200 kb, do kterých je soustředěno přibližně 5 850 funkčních genů [3].

Vlastnosti, kvůli kterým se *S. cerevisiae* stala vhodným modelem pro studium eukaryotní buňky, jsou zejména komerční dostupnost, snadná a levná kultivace v laboratorních podmínkách (rychlý růst, nepatogenita, růst na chemicky definovaném mediu), dobře definovaný genetický systém, snadná replikace a izolace mutantů. U haploidních buněk *S. cerevisiae* (s jednou kopií od každého chromosomu) je významný především vysoce univerzální transformační systém a vysoká aktivita homologní rekombinace transformované DNA, což usnadnilo tvorbu geneticky modifikovaných kmenů. To u *S. cerevisiae* umožnilo studium proteinů *in vivo* a jejich vzájemných interakcí, zkoumání chromosomové struktury nebo studium regulace genové exprese analýzou transkripce, sestřihu a jiných buněčných procesů [4,5].

Mnohé proteiny, buněčné pochody a jejich regulace objevené u *S. cerevisiae* pomohly při studiu vyšších eukaryot. Podobnost mezi proteiny i buněčnými pochody

vyšších eukaryot umožnila využívat některé výsledky získané zkoumáním *S. cerevisiae* pro objasnění mechanismů u složitějších organismů, včetně lidského [2].

## 1.2 Transkripce a její regulace

Genová exprese u eukaryot je vysoce komplexní a přísně regulovaný proces, kterým je informace uložená v genu převedena do funkčního buněčného produktu. Genetická informace zakódovaná do DNA je v jádře eukaryotických buněk organizována do chromosomů. Chromosom představuje specifickou buněčnou strukturu, která je tvořena chromatinovým vláknem, jehož základní stavební jednotkou je nukleosom. Nukleosom je tvořen proteinovým jádrem sestávajícím z oktameru histonových proteinů H3, H4, H2A a H2B, kolem kterého je ovinuta dvouvláknová DNA. Na jeden nukleosom připadá ~145 – 147 bp DNA. Nukleosomy se dále uspořádávají do vyšších celků. Na vzniku těchto vyšších chromatinových struktur se podílejí další nehistonové proteiny a někdy také histonový protein H1. Chromatin je dynamickou strukturou, která se v závislosti na fázi buněčného cyklu mění. Před vstupem do mitózy dochází k postupnému sbalování chromatinu, přičemž vznikají vysoce kondenzované mitotické chromosomy. V interfázi (po buněčném dělení) se vyskytují tzv. interfázni chromosomy s rozvolněným chromatinem, které jsou v jádře uspořádány tak, že každý chromosom má své místo označované jako chromosomové teritorium. Rozvolnění chromatinu avšak není ve všech oblastech stejné, proto se mohou v rámci interfázni chromosomu objevovat všechny stupně kondenzace. Forma chromatinu, která je nejvíce kondenzovaná a nedochází na ní k expresi genů, se označuje jako heterochromatin. Naopak zbývající formy chromatinu s nižším stupněm kondenzace, který umožňuje přístup regulačních proteinů důležitých pro transkripci, rekombinaci, opravu a replikaci DNA, jsou označovány jako euchromatin. Histonové proteiny mohou na N-koncových úsecích podléhat posttranslačním modifikacím, které způsobují zejména změnu vazby DNA na nukleosomy nebo slouží jako platforma pro navazování regulačních proteinů pro procesy regulující genovou expresi. Modifikace histonů je tedy jedním z důležitých způsobů ovlivnění strukturní změny chromatinu [6,7].

Prvním stupněm genové exprese je transkripce genů, při které dochází k přepsání genetické informace z příslušného úseku molekuly DNA do jednovláknové molekuly RNA (tzv. primární transkript) s vysokou přesností na základě komplementarity basí. Enzymy

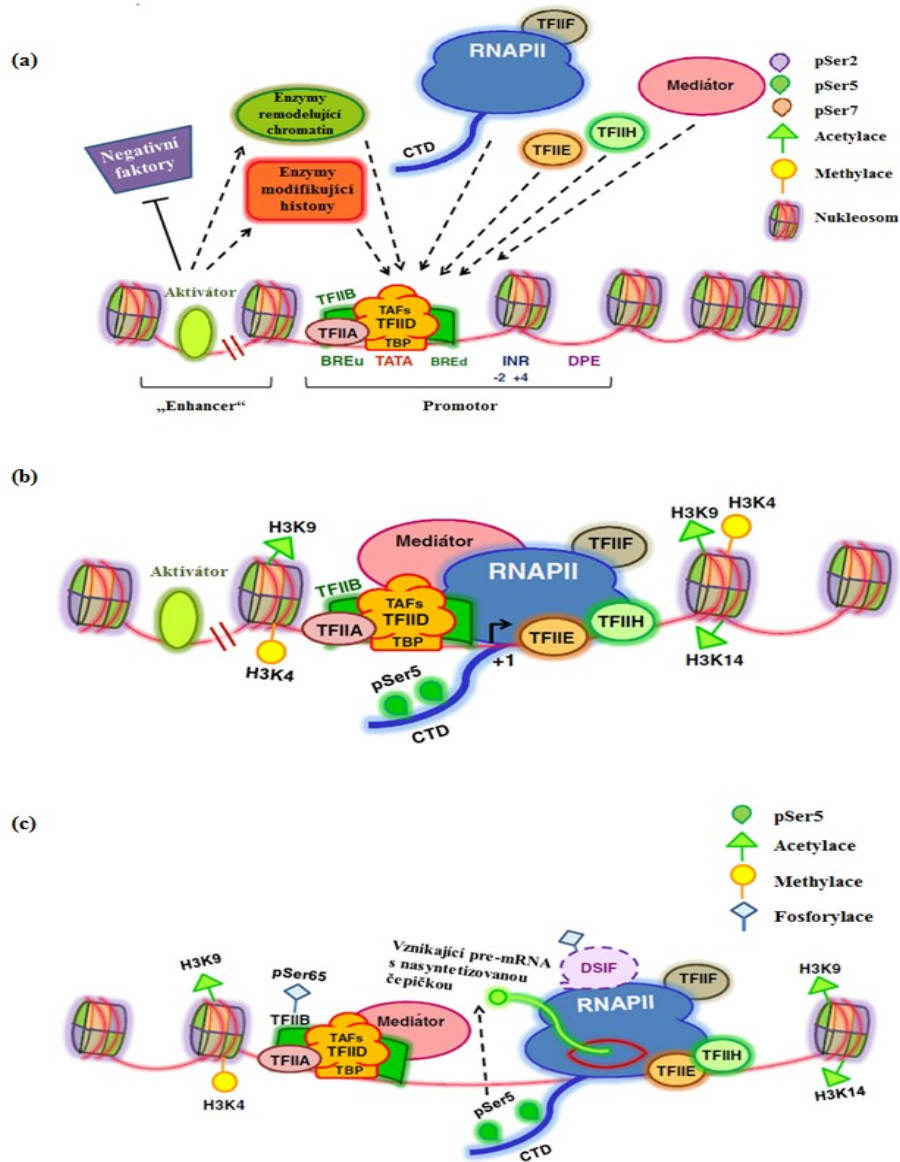
podílející se na transkripci jsou označovány jako DNA dependentní RNA polymerasy a jsou tří základních typů: RNA polymerasa I, II a III. Zatímco RNA polymerasa I přepisuje prekurzor ribosomální RNA, RNA polymerasa III přepisuje řadu malých nekódujících RNA, jako jsou například transferové RNA. Pro transkripci strukturálních genů nesoucích informaci pro syntézu polypeptidových řetězců se specifickým uspořádáním aminokyselinových zbytků slouží RNA polymerasa II (Pol II), jejímž produktem je tzv. prekurzorová mediátorová RNA (pre-mRNA). Transkripci lze rozdělit do tří charakteristických fází na iniciaci, elongaci a terminaci [6,8].

### 1.2.1 Inicie transkripce prekurzorové mediátorové RNA

Iniciaci transkripce předchází tvorba pre-iniciačního komplexu, která je navozená vazbou genově specifického aktivátoru na sekvenci DNA („enhancer“) nacházející se u savců až tisíce bp od promotoru (proti směru transkripce, ale mohou i ve směru transkripce). Vazba aktivátoru podporuje navázání obecných transkripčních faktorů (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF, TFIIH) a RNA polymerasy II na specifickou sekvenci promotoru. Nejvýznamnějším krokem pro vznik pre-iniciačního komplexu je rozpoznání krátké promotorové sekvence (TATA box) proteinem TBP, který je součástí transkripčního faktoru TFIID. Protein TBP způsobuje lokální ohyb DNA a usnadňuje tak navázání ostatních obecných transkripčních faktorů, které napomáhají nasednutí Pol II na promotor. Tvorby pre-iniciačního komplexu se účastní také strukturálně flexibilní multiproteinový komplex důležitý pro regulaci transkripce, tzv. mediátor. Mediátor funguje jako transkripční koaktivátor, který asociuje s obecnými transkripčními faktory i s Pol II a koordinuje jejich vazbu na promotor DNA (Obr. 1a, str. 14). Mediátor je také nutný pro správné formování iniciačního komplexu na genech neobsahujících TATA box v oblasti promotoru [6,9,10].

Inicie transkripce je zahajována prostřednictvím faktoru TFIIH, který rozplétá dvojvlákno DNA a modifikuje C-terminální doménu (CTD) Pol II, která se u kvasinek *S. cerevisiae* skládá z 26 a u savců z 52 opakování sekvence  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ . Po fosforylaci Ser5 CTD Pol II cyklin-dependentní kinasou, která je součástí TFIIH, dochází k změně konformace Pol II, a k jejímu následnému uvolnění z pre-iniciačního komplexu a k syntetizování řetězce RNA (Obr. 1b, str. 14) [11]. Odlišení iniciační a elongační fáze transkripce souvisí s délkou vznikajícího transkriptu RNA. Syntéza více než 12 nukleotidů

RNA a uvolnění faktoru TFIIB z komplexu s Pol II značí produktivní iniciaci a vstup do rané fáze elongace (Obr. 1c) [12].



Obr. 1: **Schématické znázornění iniciace transkripce.** (a) Rozpoznání oblasti sekvence „enhanceru“ genově specifickým aktivátorem podporuje postupné navázání obecných transkripčních faktorů, mediátoru a Pol II na specifickou sekvenci promotoru, čímž dochází k postupnému sestavování pre-iniciačního komplexu. Navazování enzymů modifikujících histony jakož i enzymů remodelujících chromatin k promotoru vytváří vhodné prostředí pro iniciaci transkripce. (b) Stabilita pre-iniciačního komplexu je dána přítomností obecných transkripčních faktorů, mediátoru a Pol II. Epigenetické modifikace zahrnují mimo jiné acetylaci na H3K9, H3K14 a metylaci na H3K4. Fosforylace CTD Pol II na Ser5 předchází změně konformace Pol II, po které dochází k jejímu uvolnění z pre-iniciačního komplexu a k zahájení iniciace transkripce. (c) Produktivní iniciace začíná syntézou 12 nt RNA, pokračuje uvolněním fosforylovaného faktoru TFIIB z komplexu s Pol II a končí vstupem do rané fáze elongace. Během pauzování Pol II závislého na faktorech DSIF a NELF dochází na 5'-konci pre-mRNA k syntéze 7-methyguanositinové čepičky pomocí enzymů, které rozeznávají fosforylovaný Ser5. Převzato a upraveno z [13].

Když je délka řetězce RNA méně než 10 nt, může dojít s vyšší pravděpodobností k předčasnému přerušení transkripce [14].

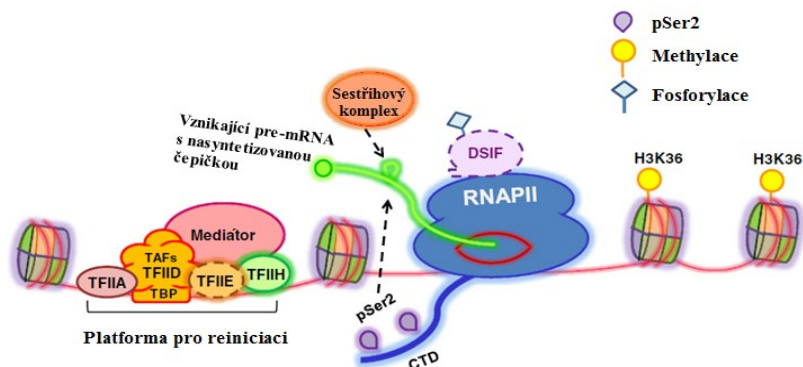
Organizace DNA do chromatinu představuje překážku pro vazbu transkripčních faktorů k jejich příslušným sekvencím a ovlivňuje tak všechny kroky transkripce. Sekvenčně specifické aktivátory (transkripční faktory) zprostředkovávají vazbu enzymů kovalentně modifikujících histony, jako jsou acetyltransferasy a methyltransferasy [15]. Acetylaci histonu H3 na lysinech 9 (H3K9ac), 14 (H3K14ac) nebo trimethylaci histonu H3 na lysinu 4 (H3K4me3) na promotorových nukleosomech rozpoznávají enzymy, které reorganizují chromatinovou strukturu využitím energie z hydrolýzy ATP. Reorganizace chromatinu zpřístupňuje sekvenci DNA a vytváří tak dynamické prostředí pro iniciaci transkripce (Obr. 1b, str. 14) [16].

Iniciace transkripce je také regulována dalšími obecnými kofaktory, které jsou důležité pro přenos regulačního signálu mezi genově specifickými aktivátory a obecným transkripčním aparátem. Mezi obecné kofaktory patří faktory asociované na proteinu TBP, mediátor a pozitivní a negativní kofaktory, které fungují buď nezávisle, nebo se navzájem kombinují [11].

### **1.2.2 Elongace transkripce prekurzorové mediátorové RNA**

Elongace transkripce je vysoce regulovaný proces, který je zahájen vznikem otevřeného komplexu Pol II. V rané fázi elongace transkripce dochází k tzv. pauzování Pol II, což znamená její zastavení v proximální promotorové oblasti ve vzdálenosti 20 – 60 nt od startu transkripce. Pauzování Pol II je ovlivněno různými faktory, jako například negativním elongačním faktorem (NELF) a komplexem DSIF, které jsou důležité pro stabilizaci pauzované Pol II [17,18]. Během pauzování Pol II dochází k syntéze 7-methylguanositinové čepičky na 5'-konci vznikající RNA, která je katalyzována enzymy rozpoznávajícími fosforylovaný Ser5 na Pol II. Uvolnění pauzované Pol II, tedy zahájení produktivní elongace, je řízeno pozitivním transkripčním elongačním faktorem b (P-TEFb), jehož součástí je cyklin-dependentní kinasa, která fosforyluje Ser2 CTD Pol II, stejně jako NELF (po fosforylaci se z komplexu s Pol II uvolňuje) a DSIF (stává se z něho pozitivní elongační faktor) [18]. V průběhu produktivní elongace dochází postupně k defosforylaci Ser5 a k vzrůstu fosforylace Ser2, která je dominantní v 3'oblasti

genu (Obr. 2) [19]. Přepisem polyadenylačního signálu se transkripce dostává do fáze terminace.



Obr. 2: **Schématické znázornění elongace transkripce.** Zahájení produktivní elongace uvolněním pauzované Pol II v důsledku fosforylace CTD Pol II na Ser2 a faktorů NELF a DSIF. Během transkripce dochází na CTD Pol II k postupné defosforylaci Ser5 a fosforylaci Ser2. Zvýšená fosforylace Ser2 je provázená kotranskripčním sestavováním sestřihového komplexu na nascentní pre-mRNA. Epigenetické modifikace spojené s produktivní elongací zahrnují metylaci na H3K36. Převzato a upraveno z [13].

Regulace pauzování Pol II a její rychlosti během produktivní elongace má důležitou úlohu v regulaci úrovně a načasování produkce mediátorové RNA. Na regulaci pauzování a rychlosti Pol II se během elongace transkripce výrazně podílí i přestavba chromatinu. Mezi klíčové epigenetické signály spojené s elongací patří trimethylace histonu H3 na lysinu 36 (H3K36me3) methyltransferasou Set2, pro jejíž navazování je důležitá fosforylace Ser2 (Obr. 2). Dalšími modifikacemi histonů jsou ubikvitinylace H2B, acetylace histonu H3 na lysinu 56 (H3K56ac) a dimethylace histonu H3 na lysinu 79 (H3K79me2). Tyto histonové značky ovlivňují pohyb Pol II po chromatinu buď přímo, rozvolněním DNA z nukleosomů, nebo nepřímo, vytvořením platformy pro navázání histonových chaperonů, čímž dojde k odstranění histonů nebo nukleosomů, a k jejich následnému obnovení po elongaci Pol II [20].

### 1.3 Sestřih prekurzorové mRNA

Eukaryotické geny jsou exprimovány ve formě prekurzorových mRNA (pre-mRNA), které jsou před transportem z jádra do cytoplazmy postupně modifikovány. Většina pre-mRNA obsahuje kromě úseků kódujících proteiny (exony) i sekvence nekódující proteiny (introny), které jsou z pre-mRNA odstraněny procesem nazývaným sestřih pre-mRNA. Úprava pre-mRNA sestřihem intronů je důležitým regulačním



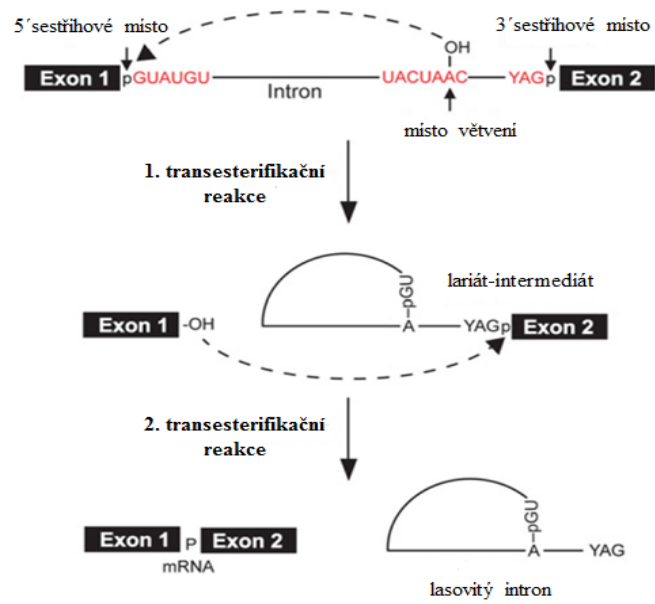
procesem před tvorbou funkčního proteinu, čili je nepostradatelná v regulaci genové exprese. Sestřih pre-mRNA je důležitý také pro rozšíření komplexity transkriptomu, a to prostřednictvím tzv. alternativního sestřihu probíhajícího zejména u vyšších eukaryot, při němž dochází díky různým způsobům sestřihu ke vzniku vícero rozdílných mRNA z jednoho genu [6,8].

Jednotlivé organismy se odlišují počtem a charakterem intronů, přičemž větší množství intronů ve většině genů obsahují vyšší eukaryota. U kvasinky *S. cerevisiae* pouze 5 % z celkového počtu funkčních genů obsahuje intron (přibližně 270 genů). *S. cerevisiae* má na rozdíl od vyšších eukaryot ve většině těchto genů přítomný pouze jeden intron [21]. Odstranění intronu z pre-mRNA je katalyzováno ve dvou transesterifikačních krocích dynamickým ribonukleoproteinovým komplexem zvaným spliceosom. Spliceosom je složen z pěti malých jaderných RNA (snRNA, z angl. small nuclear RNA) bohatých na uracil – U1, U2, U4, U5 a U6 snRNA, které asociací se specifickými proteiny vytváří malé ribonukleoproteinové partikule (snRNP, z angl. small nuclear ribonucleoprotein) [22]. Součástí spliceosomu je kromě snRNP také řada tzv. non-snRNP proteinů. Komponenty spliceosomu rozeznávají dvě sekvence: 5'sestřihové místo tvořící hranici mezi prvním exonem a intronem (5'ss) a oblast obsahující invariantní nukleotid adenosin označovanou jako místo větvení (BP místo). Ve vhodné vzdálenosti od BP místa je vybíráno 3'sestřihové místo ohraničující intron a druhý exon (3'ss) [23].

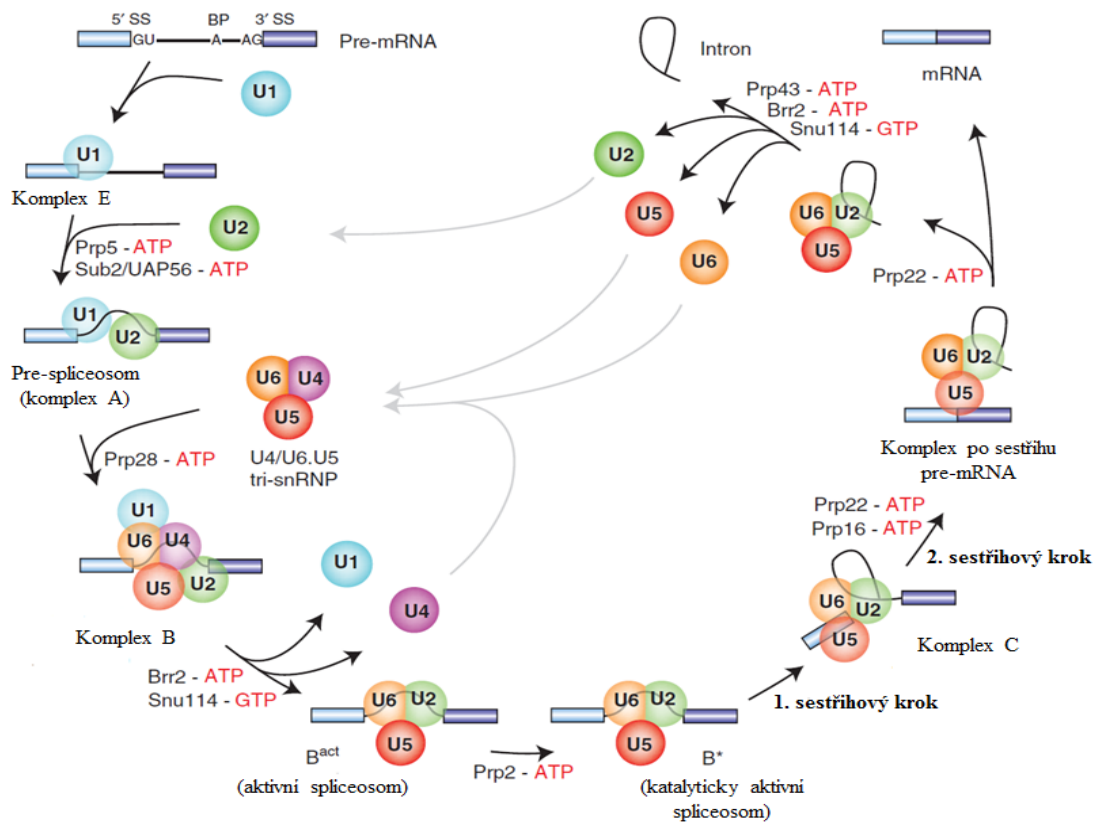
### 1.3.1 Průběh sestřihu u *Saccharomyces cerevisiae*

Sekvence intronu v bezprostředním okolí 5'ss, BP místa a 3'ss je u *S. cerevisiae* vysoce konzervována (Obr. 3a, str. 18) [23]. Sestavování spliceosomu je iniciováno tvorbou tzv. komplexu E, který vzniká asociací U1 snRNP s 5'ss pre-mRNA na základě komplementarity sekvencí [24] a rozpoznáním BP místa proteinem BBP, který s pre-mRNA asociuje ve formě heterodimeru s proteinem Mud2 [25]. Komplex E interaguje s U2 snRNP, čímž dochází k vytěsnění heterodimeru BBP-Mud2 aktivitou ATP dependentní helikasy Sub2. Interakcí U2 snRNP s uvolněným BP místem se vytváří helix, z jehož struktury vyčnívá nepárující adenosin důležitý pro první krok sestřihu a vzniká tak tzv. komplex A nebo také pre-spliceosom [26]. Pre-spliceosom je pak rozpoznán U4/U6.U5 tri-snRNP, čímž vzniká komplex B obsahující všech pět snRNP.

(a)



(b)



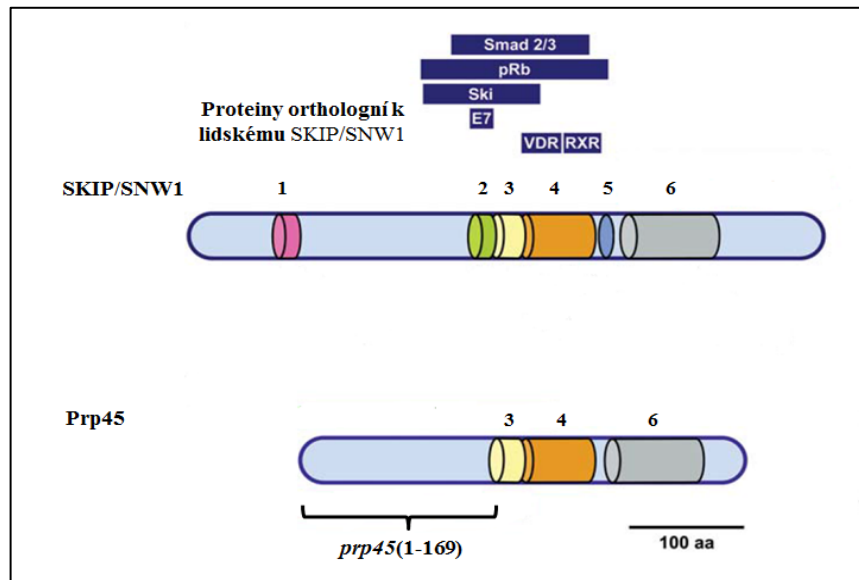
Obr. 3: **Schéma sestřihu pre-mRNA.** (a) Konzervované sekvence v okolí sestřihových míst u *S. cerevisiae* jsou znázorněny červeně. Sestřih pre-mRNA probíhá ve dvou transesterifikačních reakcích, které jsou katalyzovány spliceosomem. Sestřih pre-mRNA je ukončen uvolněním mRNA a lasovitého intronu. (b) Tvorba a rozpad sestřihového komplexu se znázorněnou vazbou a recyklací jednotlivých snRNP a některých sestřihových faktorů. Převzato a upraveno z [27,28]

Spolu s tri-snRNP je do komplexu inkorporován vysoce konzervovaný proteinový komplex NTC s dalšími příslušnými faktory [29]. Aby byl spliceosom katalyticky funkční, musí dojít k rozsáhlému konformačnímu přeuspořádání komponent spliceosomu za spotřeby energie ATP. Konformační změny vedoucí ke vzniku aktivního spliceosomu zahrnují uvolnění U1 snRNP a disociaci U4 snRNP, která je způsobena přerušением interakcí mezi U6 a U4 snRNA. U6 snRNA se následně páruje s U2 snRNA a současně interaguje také s oblastí 5' ss, se kterou původně asociovala U1 snRNA [30], což má za následek vznik struktury umožňující správnou vzájemnou orientaci interagujících skupin. S komplexem interaguje i komplex NTC, který přináší další proteinové komponenty důležité pro stabilizaci interakcí U5 a U6 snRNAs s pre-mRNA po disociaci U4 snRNP [31]. Takto vzniklý komplex se nazývá katalyticky aktivní spliceosom. Základem sestřihu pre-mRNA jsou dvě po sobě následující nezávislé transesterifikační reakce (viz Obr. 3a, str. 18). První transesterifikační reakce je iniciována nukleofilním atakem fosforu (ve fosfátu 5' ss) 2' hydroxylovou skupinou invariantního adenosinu BP místa. Vzniká přitom fosfodiesterová vazba mezi adenosinem a počátečním nukleotidem intronu tvořícím lasovitou strukturu zvanou lariát-intermediát a exon 1 s aktivní hydroxylovou skupinou na 3'-konci. Po proběhnutí první transesterifikační reakce dochází k remodelaci komplexu (vzniká komplex C). Na komplexu C pak dochází k druhé transesterifikační reakci, při které aktivní 3' hydroxylová skupina exonu 1 nukleofilně atakuje fosfor ve fosfátu 3' ss, čímž dochází k ligaci obou exonů a k uvolnění intronu ve formě lariátu [32]. Sestřih pre-mRNA je úspěšně ukončen rozpadem spliceosomu a uvolněním maturované mRNA, která je exportována z jádra [33]. Průběh tvorby sestřihového komplexu s příslušnými sestřihovými faktory je zobrazen na Obr. 3b (str. 18).

### 1.3.2 Sestřihový faktor Prp45

Prp45 (odvozeno z angl. pre-mRNA processing protein 45) je sestřihovým faktorem u *S. cerevisiae*, který byl identifikován v komplexu penta-snRNP při tvorbě aktivního spliceosomu [34] a ve vysokomolekulárním proteinovém komplexu obsahujícím sestřihové faktory [35]. Gen, který kóduje protein Prp45/Fun20, byl původně identifikován během analýzy chromosomu I u *S. cerevisiae* jako esenciální s neznámou funkcí (označovaný *FUN20* z angl. function unknown) [36]. Součástí proteinu Prp45 o délce 379 aminokyselin a molekulární velikostí 42 kDa je konzervovaný aminokyselinový motiv SNWKN (170. – 174. aminokyselina), na základě kterého byl Prp45 zařazen do skupiny

proteinů SNW. Tato skupina je tvořena esenciálními sestřihovými faktory s absolutně konzervovaným motivem SNWKN objeveným ve všech sekvenovaných eukaryotických organismech. Prp45 má na rozdíl od lidského orthologa SKIP/SNW1 výrazně zkrácenou N-terminální doménu, čili neobsahuje oblast bohatou na glycin a jeho polyprolinový motiv je redukován na 2 prolinové zbytky (Obr. 4) [37].



Obr. 4: **Sestřihový faktor Prp45.** Schématické znázornění stavby proteinů orthologních k lidskému SKIP/SNW1. Oblasti na proteinu SKIP/SNW1: 1. glycin bohatá oblast, 2. polyprolinový motiv, 3. konzervovaný SNWKN motiv, 4. Helikální motivy, 5. Druhově specifické inserty, 6. SH2-like doména. V horní části jsou znázorněné oblasti přibližné vazby některých interakčních partnerů SKIP/SNW1. Na obrázku je také znázorněno, které oblasti obsahuje mutanta s C-terminální delecí *prp45(1-169)*. Převzato a upraveno z [37].

Prp45 je asociován s proteinovým komplexem NTC a do spliceosomu se váže před první transesterifikační reakcí. Identifikace interakce Prp45 s proteiny Prp46, Syf1 a Syf3 komplexu NTC [38] a také nález genetických interakcí *PRP45* s geny několika komponent tohoto komplexu: *SYF1*, *CLF1/SYF3*, *NTC20* a *CEF1* [39], potvrdila asociaci Prp45 s proteinovým komplexem NTC. Po ukončení sestřihu Prp45 zůstává součástí komplexu obsahujícího U2, U5 a U6 snRNP, kde interaguje s vystřiženým intronem [38].

V naší laboratoři byla pomocí delecí N- a C-terminální domény získána sada mutantů Prp45, přičemž se ukázalo, že esenciální oblast důležitá pro životaschopnost buňky je na N-konci proteinu Prp45. Buňky s delecí C-terminální oblasti označované jako *prp45(1-169)* vykazují citlivost ke zvýšené teplotě, látkám nokodazolu (inhibující

polymeraci mikrotubulů) a cykloheximidu (inhibující translaci), a mají rovněž morfoloický defekt. V kombinaci s některými mutanty sestřihových faktorů a komponentami komplexu NTC je mutanta *prp45(1-169)* synteticky letální. Díky tomu byly identifikovány genetické a fyzické interakce faktoru Prp45 s mnoha proteiny účastnicími se sestřihu. Prokázalo se také, že Prp45 ovlivňuje složení aktivního spliceosomu a zejména druhý sestřihový krok [39]. Alela *prp45(1-169)* se v naší laboratoři využívá jako nástroj k odhalení dalších funkcí proteinu Prp45 v procesu sestřihu a zrání pre-mRNA.

#### 1.4 Spřažení transkripce a sestřihu

Transkripce pre-mRNA a její sestřih byly dlouho vnímány jako dva na sobě nezávislé procesy. Postupem času se ukázalo, že k sestavování spliceosomu na primárním transkriptu RNA dochází ještě za přítomnosti Pol II na chromatinovém templátu a že sestřih pre-mRNA a transkripce jsou vzájemně funkčně a regulačně propojeny. První experiment, kterým se dokázalo, že sestřih může probíhat současně s transkripcí, tzv. kotranskripčně, byl proveden na chorionových genech *Drosophila melanogaster* [40], což bylo podnětem pro další studia kotranskripčního sestřihu. Dnes je známo, že sekvence intronu pre-mRNA může být rozeznávána kontraskripčně, ale i posttranskripčně, čili poté co byl primární transkript vytvořen [41] a u jednotlivých organismů se to může odlišovat.

Kotranskripční průběh sestřihu primárního transkriptu pre-mRNA byl pozorován také u kvasinky *S. cerevisiae*, která má obecně kratší funkční geny než vyšší eukaryota [42]. Skupina vědců pod vedením K. Neugebauer se u *S. cerevisiae* zabývala navazováním U1 snRNP k 5' ss intronu primárního transkriptu *in vivo*. Jejich studie prokázaly, že U1 snRNP se na pre-mRNA váže během transkripce a její akumulace koreluje s přítomností a pozicí intronů. Také se ukázalo, že detekce U1 snRNP je závislá na syntéze mRNA a že je narušena odstraněním intronu. Přítomnost intronu je tedy nezbytná pro kotranskripční navazování U1 snRNP [43]. Další vědecké skupiny se u *S. cerevisiae* zaměřily na mechanismus kotranskripčního formování spliceosomu. U vybraných genů s dlouhým terminálním exonem sledovaly postupné navazování snRNP a zjistily, že navazování U1 snRNP včetně dalších snRNP probíhá kotranskripčně. Detekovaly také akumulaci komplexu NTC v době, kdy se Pol II vyskytovala na exonu 2, což vedlo k názoru, že kotranskripčně probíhá i katalýza sestřihu [44,45]. Dále se ukázalo, že komplex CBC vázající 7-methylguanoinovou čepičku na 5'-konec primárního transkriptu krátce

po iniciaci transkripce je potřebný pro kotranskripční sestavování spliceosomu (vazba komponent spliceosomu, disociace U1 snRNP z 5' ss), čili že komplex CBC funkčně propojuje sestřih pre-mRNA a transkripci [44].

Předchozí studie dokázaly, že dochází ke kotranskripčnímu navazování sestřihových faktorů, ale nebylo jasné, jestli kotranskripčně probíhá i katalýza sestřihu, zvláště u genů *S. cerevisiae*, které jsou krátké. V roce 2010 dvě skupiny vědců detailně zkoumaly kotranskripční sestřih u *S. cerevisiae* a pozorovaly, že ke kotranskripčnímu sestřihu dochází u většiny genů [46,47]. Skupina pod vedením K. Neugebauer došla k výsledkům, že u 74% testovaných genů je intron odstraněn kotranskripčně a že sestřiženou mRNA lze detekovat již v době, kdy se Pol II nachází v oblasti přibližně 250 bp od 3'-konce genu (proti směru transkripce) [46]. Druhá skupina pod vedením J. Beggsové prokázala, že u jejích modelových genů dochází k přechodnému zpomalování Pol II v oblasti 3' ss, kde je možné detekovat již sestřiženou mRNA. V této oblasti dochází k zvýšené fosforylaci Ser2 na CTD Pol II, což je provázáno vazbou sestřihových faktorů a faktorů pro tvorbu poly(A) řetězce na 3'-konci. Snížení elongační rychlosti Pol II umožňuje katalýzu sestřihu ještě před ukončením transkripce i u genů s krátkým terminálním exonem. Zpomalování Pol II závisí na přítomnosti intronu a na produktivním sestřihu pre-mRNA [47]. Obě skupiny prokázaly, že u většiny vysoce transkribovaných genů obsahujících intron u *S. cerevisiae* probíhá sestřih pre-mRNA kotranskripčně, což spojují s přechodným zpomalováním Pol II v oblasti terminálního exonu [46,47].

Bližším studiem kotranskripčního sestřihu pre-mRNA se zjistilo, že proteiny podílející se na transkripci a specifické modifikace histonů vedoucí k reorganizaci chromatinu mohou ovlivňovat sestřih pre-mRNA a jeho regulaci [48,49]. U *S. cerevisiae* bylo dokázáno, že acetylace a deacetylace histonů zprostředkují kotranskripční asociaci jednotlivých snRNP. Histonacetyltransferasa Gcn5 (katalytická podjednotka koaktivujícího transkripčního komplexu SAGA), která primárně acetyluje histony H3 a H2B v oblasti promotoru a uvolňuje chromatin pro navazování transkripčních faktorů, ovlivňuje kotranskripční navazování komponent U2 snRNP na BP místo. Uvolnění U2 snRNP a asociaci dalších sestřihových faktorů umožňuje deacetylace histonů pomocí histondeacetylasy Hos2 a Hos3 [50,51]. Dále bylo pozorováno, že ubikvitinylace histonu H2B a methylace histonu H3, které jsou důležité pro aktivaci transkripce a dynamiku nukleosomů, jsou také důležité pro sestřih primárního transkriptu. Ukázalo se, že protein

Npl3 patřící do rodiny SR proteinů účastnících se sestřihu, který je potřebný pro úspěšné kotranskripční navazování sestřihových faktorů, geneticky interaguje s ligasou Bre1 zodpovědnou za ubikvitinylaci H2B (Ub-H2B) [52]. Dalším studiem se zjistilo, že Ub-H2B napomáhá navazování časných sestřihových faktorů, U1 a U2 snRNP, na vznikající pre-mRNA [53]. Ub-H2B je také důležitá pro vznik dalších epigenetických signálů, jako je trimethylace H3 na lysinu 4 prostřednictvím methyltransferasy Set1 [54] a na lysinu 79 prostřednictvím methyltransferasy Dot1 [55], a usnadňuje trimethylaci H3 na lysinu 36 methyltransferasou Set2 na některých genech obsahujících intron [49]. Sledováním trimethylace H3K4, která je lokalizována v 5'oblasti genů, a trimethylace H3K36, která se zvyšuje směrem ke 3'-koncu genů, se ukázalo, že mají význam pro optimální funkci spliceosomu během sestřihu pre-mRNA a jejich inhibice vedla k defektnímu odstranění intronů z pre-mRNA. U *S. cerevisiae* však působení methylace H3 na sestřih pre-mRNA není přesně popsáno [53,56–58].

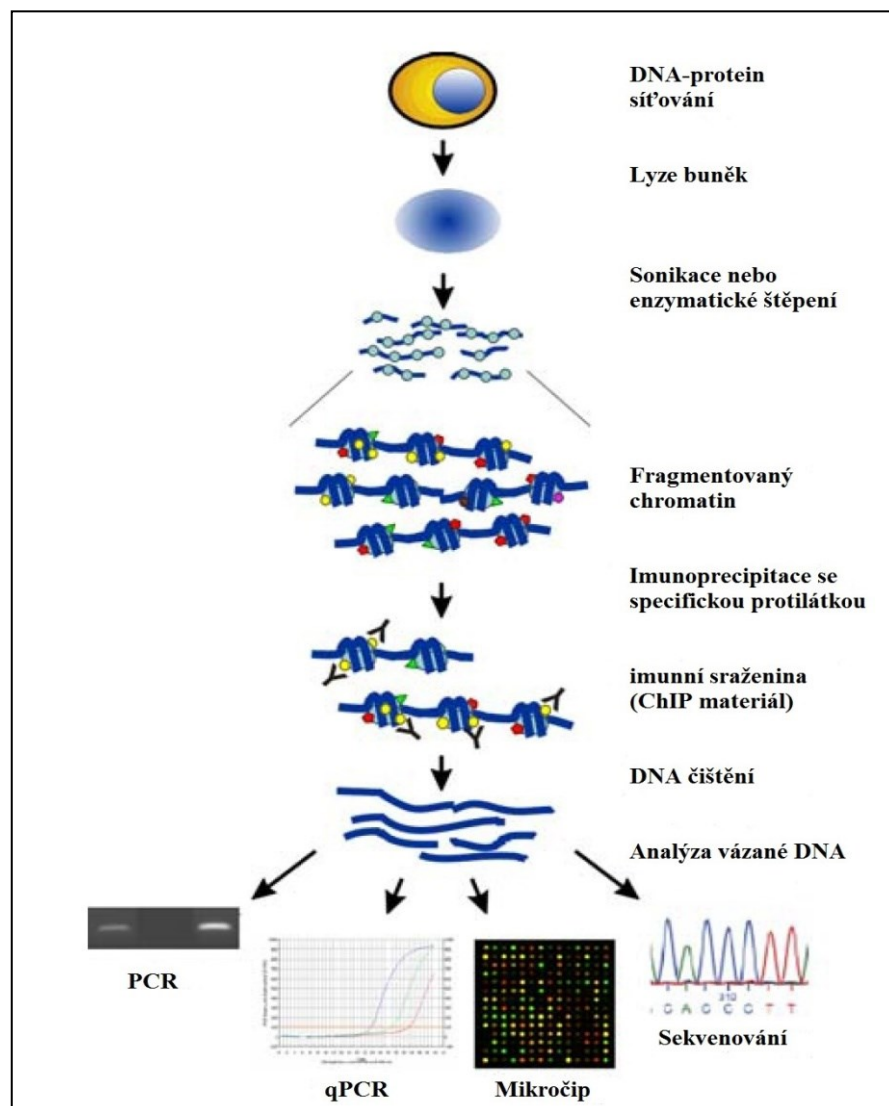
Předchozí studie tedy ukázaly, že specifické modifikace histonů důležité pro regulaci transkripce funkčních genů také regulují kotranskripční sestavování sestřihového komplexu. Vědecké skupiny se proto zaměřily na přesnější charakterizaci působení modifikací histonů na celkový sestřih pre-mRNA. Tyto výsledky dále potvrzují, že sestřih pre-mRNA a transkripce jsou funkčně propojené procesy, a že jejich spřažení tvoří v procesu genové exprese další regulační úroveň, jejíž pochopení je teprve v počátcích. K tomuto pochopení se snažíme přispět i výzkumem v naší laboratoři včetně výsledků obsažených v této bakalářské práci.

## 1.5 Chromatinová imunoprecipitace

Interakce mezi proteiny a DNA uvnitř buněk mají v biologických procesech nesmírně důležitou úlohu. Udržují například stabilitu genomu, účastní se segregace chromosomů během mitózy nebo jsou významné v regulaci exprese genů [59]. Pro přesnější charakterizaci interakcí mezi specifickými proteiny a cílovými sekvencemi DNA se využívá typ imunoprecipitační metody nazývaný chromatinová imunoprecipitace (ChIP, z angl. Chromatin immunoprecipitation) [60]. Chromatinová imunoprecipitace je úspěšně využívána pro mapování modifikovaných histonů a různých variant histonů podél cílových genů lokalizovaných v genomu. Umožňuje také na příslušném místě molekuly

DNA detekovat *in vivo* pozici transkripčních faktorů a jiných proteinů asociovaných na chromosomu [59,61].

Metoda ChIP se skládá z několika kroků (Obr. 5). Prvním krokem je fixace buněk použitím nesespecifického síťovacího činidla, přičemž dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi proteiny a DNA a proteiny navzájem. Zesíťování chromatinu zabrání přeskupování nebo ztrátě proteinů asociovaných na DNA z jejich cílové sekvence během provádění dalších separačních kroků [62].



Obr. 5: **Jednotlivé kroky chromatinové imunoprecipitace** následované různými metodami analýzy výsledné DNA. Převzato a upraveno z [59]

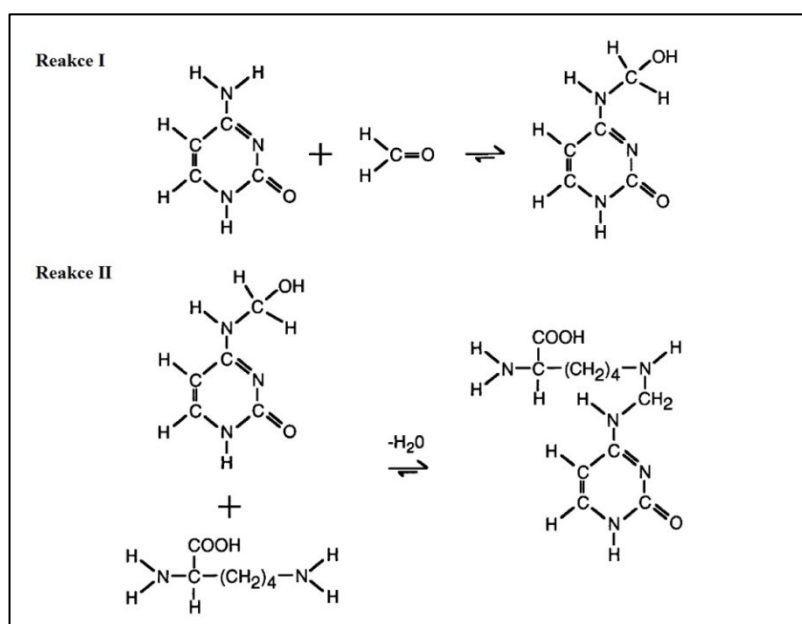
Po lyzi buněk a po oddělení buněčných komponent je jaderný chromatin enzymaticky nebo ultrazvukem štěpen na kratší fragmenty o velikosti odpovídající 200 – 800 bp DNA



v závislosti na zvoleném protokolu [60]. Proteiny neinteragující s chromatinem jsou odstraněny a fragmenty DNA asociované s proteiny jsou selektivně imunoprecipitovány s použitím primární protilátky specifické pro daný protein. Protilátka je zachycena na afinitní sorbent, který obsahuje na agarosovém gelu kovalentně imobilizovaný protein A nebo G schopný selektivně vázat Fc fragment imunoglobulinu. Po rozrušení kovalentních vazeb mezi proteiny a proteiny a DNA zvýšením teploty jsou proteiny odstraněny a získaná DNA je purifikována. Výsledná DNA může být blíže charakterizována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) [62], kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) [63], DNA mikročipem (ChIP-chip) [64], přímým sekvenováním (ChIP-seq) [58] nebo molekulárním klonováním a sekvenováním [65].

### 1.5.1 Způsoby tvorby zesíťovaného chromatinu

Pro zachování interakcí mezi proteiny a DNA byla vyvinuta různá reakční činidla a techniky [61]. Mezi nejpoužívanější síťovací činidlo patří formaldehyd, jehož schopnost tvorby kovalentních vazeb mezi proteiny a DNA, proteiny a proteiny a proteiny a RNA *in vivo* je využívána od šedesátých let dvacátého století [59]. Z chemického hlediska je formaldehyd silně polární sloučenina, jejíž součástí je atom uhlíku působící jako elektrofilní centrum. Amino- a iminoskupiny aminokyselin (lysin, arginin, histidin) a DNA (primárně adenin, cytosin) nukleofilně atakují uhlík karbonylové skupiny za tvorby intermediátu, tzv. Schiffovy báze.



Obr. 6: **Vznik kovalentní vazby** mezi cytosinem (DNA) a lysinem (protein) použitím formaldehydu. Převzato a upraveno z [66].

Schiffova báze může dále reagovat s druhou aminoskupinou za současného uvolnění vody, přičemž se tvoří methylenový můstek mezi proteiny a DNA (viz Obr. 6, str. 25) [67,68]. Formaldehyd zprostředkovává vznik kovalentní vazby mezi proteiny, které se nacházejí v těsné blízkosti DNA (ve vzdálenosti 2 Å), bez ohledu na to, zda jsou proteiny na DNA vázány přímo nebo se jenom nacházejí v jejím blízkém okolí [62]. Takto vzniklé vazby mezi proteinem a DNA jsou reversibilní a mohou být zrušeny vysokou teplotou, přičemž proteiny a DNA mohou být dále analyzované [69].

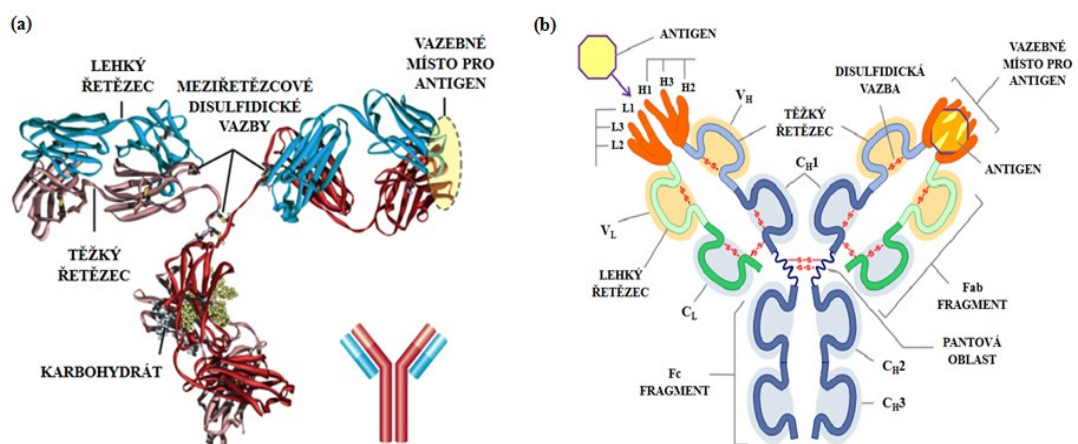
Kromě formaldehydu se na zesíťování chromatinu využívají i další síťovací činidla, která mají rozdílný rozsah délek vazby mezi proteiny a DNA. Mohou být proto použita v kombinaci s formaldehydem pro detekci proteinů na cílové sekvenci DNA, které by nebylo možné detekovat jenom použitím formaldehydu. Mezi taková patří například cisplatina (vzdálenost 4 Å), která vytváří kovalentní vazby mezi proteiny a DNA, ale ne mezi proteiny a proteiny [62], nebo dimethylsulfát [69]. Pro vytvoření kovalentní vazby mezi proteiny a DNA se využívá také UV záření („nulová“ vzdálenost) o vlnové délce okolo 260 nm [70].

### 1.5.2 Specifikace protilátek

Protilátky (nazývané také imunoglobuliny Ig) patří do heterogenní skupiny glykoproteinů živočišného původu. Jsou syntetizovány a vylučovány plazmatickými buňkami B-lymfocytů (B buňky) jako odpověď imunitního systému na přítomnost makromolekul antigenů, které jsou součástí infekčních agens (bakterie, viry) nebo jiných cizorodých látek.

Všechny protilátky vytvářejí globulární struktury připomínající tvar písmena ypsilon (Y). Jsou složeny ze čtyř polypeptidových podjednotek – dvou totožných těžkých řetězců (~55 kDa) a dvou totožných lehkých řetězců (~25 kDa), které jsou vzájemně spojeny kovalentními disulfidickými můstky a nekovalentními vazbami (Obr. 7a, str. 27). Oba druhy řetězců jsou na N-koncové části tvořeny úsekem (100 – 110 aminokyselin) sekvenčně variabilním (tzv. variabilní oblast), přičemž na C-koncové části jsou tvořeny konzervovaným úsekem, který je stejný nebo vykazuje jen malé rozdíly (tzv. konstantní oblast). Lehký řetězec sestává z jedné konstantní domény ( $C_L$ ) a jedné variabilní domény ( $V_L$ ), které mají stejně dlouhou sekvenci aminokyselin, na rozdíl od těžkého řetězce obsahujícího jednu variabilní doménu ( $V_H$ ) a tři nebo čtyři konstantní domény ( $C_{H1-3}$ ).

Na základě sekvenční odlišnosti konstantní oblasti těžkého řetězce rozdělujeme protilátky u savců do pěti hlavních tříd – IgG, IgM, IgA, IgE, IgD – a u ptáků do tří hlavních tříd – IgY, IgM, IgD. V N-koncové části každého ramene složeného z lehkého a části těžkého řetězce se nachází sekvence 6 vysoce variabilních smyček (5 – 10 aminokyselin), které tvoří unikátní komplementární vazebné místo pro antigen. Protilátky rozeznávají pouze část proteinového antigenu zvanou epitop (15 – 20 aminokyselin) a vytvářejí s ním komplex protilátka-antigen. Za určitých poměrů protilátka/antigen dochází ke vzájemnému prosítování a následné precipitaci komplexu za vzniku tzv. imunoprecipitátu. Pro různé epitopy antigenu jsou produkovány různé protilátky. Obě rozvětvená ramena (Fab fragment) jsou spojena se zbývající částí obou těžkých řetězců (Fc fragment) tzv. pantovou oblastí bohatou na prolin, treonin a serin. Pantová oblast umožňuje laterálním a rotačním pohybem obou ramen vytvořit optimální vazbu mezi antigenem a protilátkou (Obr. 7b) [6,8,71].



Obr. 7: **Struktura protilátky.** (a) Stuhlý model protilátky ve tvaru písmena Y. (b) Schematické znázornění protilátky složené ze čtyř polypeptidových řetězců (dva stejné těžké řetězce a dva stejné lehké řetězce) navzájem spojených disulfidickými vazbami. Každý z řetězců je složen z variabilní ( $V_H$ ,  $V_L$ ) a konstantní ( $C_H1 - 3$ ,  $C_L$ ) oblasti. Vazebné místo pro antigen je tvořeno sekvencí 6 variabilních smyček ( $L1 - L3$ ,  $H1 - H3$ ) a nachází se v oblasti styku variabilní domény těžkého řetězce ( $V_H$ ) a variabilní domény lehkého řetězce ( $V_L$ ). Převzato a upraveno z [6,72].

Protilátky produkované jedním klonem plazmatických B lymfocytů, které jsou namířené proti jednomu epitopu určitého antigenu, se označují jako monoklonální. Polyklonální protilátky jsou tvořeny směsí monoklonálních protilátek produkovaných různými plazmatickými B buňkami a jejich vazebná místa mají různou specifitu k jednotlivým epitopům určitého antigenu hostitele [71].

Schopnost protilátek selektivně vázat specifické epitopy antigenů se začala široce využívat nejen v medicíně pro diagnostiku různých chorob, ale i v jiných vědních odborech. V chromatinové imunoprecipitaci se používají buď protilátky proti nativním proteinům, nebo proti značkám, kterými jsou nativní proteiny označeny. To umožňuje analyzovat i proteiny, pro které nejsou protilátky běžně dostupné [73]. Po splnění určitých požadavků jsou pro ChIP vhodné jak monoklonální, tak i polyklonální protilátky.

### **Požadavky na protilátky:**

#### 1. vysoká vazebná afinita

- po navázání protilátky na specifický protein by nemělo dojít k její disociaci během dalších manipulací

#### 2. vysoká specifita

- protilátka by měla být schopná selektivně vázat specifické epitopy antigenů v přítomnosti jiných epitopů [71]
- pro ověření, že protilátka nereaguje s dalšími proteiny, se nejčastěji používá metoda ELISA nebo inkubace antigenů vázaných na membránu v přítomnosti různých koncentrací kompetujících peptidů [74]

#### 3. specifická vazba na sorbent agarózového typu

- protilátka by se měla vázat na tzv. agarózovou či magnetickou matici prostřednictvím proteinu A nebo G, což jsou proteiny obsahující specifické vazebné místo pro Fc fragment imunoglobulinu IgG [75]

#### 4. vysoká kvalita

- protilátka by měla být vhodná pro použití v metodách jako je například ChIP, ChIP-Seq nebo ChIP-chip
- protilátka je proto ověřována dodavatelem pomocí validačních testů (používá se např. metoda ChIP-Seq, elektroforetický přenos na membránu, průtoková cytometrie)

## 5. monoklonální vs. polyklonální protilátky

- polyklonální protilátky obsahují směs protilátek rozeznávajících několik různých epitopů na stejném proteinu a dosahují tak vyšší citlivost; někdy mají nízkou specificitu
- monoklonální protilátky jsou vysoce specifické, ale jejich dostupnost je omezená
- v případě dostupnosti obou typů protilátek je třeba uskutečnit doplňkové testy, které rozhodnou o vhodnosti protilátky pro daný typ experimentu [74]

## 2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Pro splnění zadání bakalářské práce byly stanoveny tyto cíle:

- Charakterizace růstových vlastností použitých kmenů *S. cerevisiae*, a to divokého kmenu (wt), kmenu obsahujícího mutaci *prp45(1-169)* a kmenu s deletovanou histonmethyltransferasou Set1 ( $\Delta set1$ ).
- Zavedení chromatinové imunoprecipitace (ChIP) s protilátkami proti histonu H3 a methylovanému histonu H3 k detekci změn methylace chromatinu v kmenech *S. cerevisiae*.
- Metodou ChIP zjistit, jak mutace *prp45(1-169)* ovlivňuje profil trimethylace histonu H3 na lysinu 4 (H3K4me3) na genech obsahujících intron *ECM33* a *ACT1*.

### **3. MATERIÁLY A METODY**

#### **3.1 Použité přístroje**

##### **Centrifugy**

Jouan MR22i – rotory AM2.18, AM38.15, SWM 180.5 (Jouan, Francie), mikrocentrifugy – model 5417R, 5804R, 5418, 5430 a miniSpin plus (Eppendorf, Německo)

##### **Třepačky**

Orbital shaker model 420 a 4520 (Thermo Scientific, USA), orbitální třepačka IKA KS 260-basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo), rotační míchačka zkumavek model Falc F205 (FALC, Itálie), rotátor Multi RS-60 (Biosan, Lotyšsko)

##### **Termobločky a termostaty**

termobloček AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet, USA), termobloček IncuBlock™ model 285 (Denville Scientific, USA), termobloček Thermomixer® comfort (Eppendorf, Německo), termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

##### **Spektrofotometry**

NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), Spekol 20 (Carl Zeiss Jena, Německo), WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter (Biochrom, Velká Británie)

##### **Váhy**

analytické váhy A&D Model GR-120 (A&D Company, Japonsko), předvážky A&D Model EK-120G (A&D Company, Japonsko)

##### **Další přístroje**

FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA), laminární box HS12 (Heraeus Instruments, Německo), sonikátor BioruRuptor™ Next Gen (Diagenode, Belgie), Vortex Mixer (VELP® Scientifica, USA), Vortex-2 Genie® (Scientific Industries, USA), LightCycler® 480 II (Roche, Německo), dávkovací automatické pipety Eppendorf Xplorer® (Eppendorf, Německo) a Gilson (Gilson, USA)

## **3.2 Použitý materiál a chemikálie**

### **3.2.1 Seznam použitých chemikálií**

#### **Biorad, USA**

EDTA, hovžzí sérový albumin (BSA), Chelex

#### **Biotika, Slovenská republika**

ampicilin

#### **Eurogentec, Belgie**

MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR<sup>®</sup> Assay No ROX

#### **Formedium, Velká Británie**

kvasinkový extrakt (Yeast Extract Powder)

#### **GE Healthcare, Švédsko**

protein A Sepharosa

#### **Lach-Ner, Česká republika**

chlorid sodný, ethanol 96%, kyselina chlorovodíková 35%

#### **Merck, Německo**

Universalpepton M66

#### **MP Biomedicals, USA**

glycerol

#### **Roche, Německo**

proteinasa K



## Serva, Německo

DMSO, glycin, směs inhibitorů proteas (Protease-Inhibitor Mix FY; AEBSF, E-64, Pepstatin A, 1,10-fenanthrolin; katalogové číslo: 3910403),  
Tris [*Tris*(hydroxymethyl)aminomethan], Triton X-100

## Sigma-Aldrich, USA

adenin-hemisulfát, formaldehyd 37% (v H<sub>2</sub>O, 10 – 15% methanol jako stabilizátor, expirace po otevření do jednoho roku), glukóza, HEPES, monohydrát deoxycholátu sodného, NP-40 (IGEPAL CA630)

## Thermo Scientific, USA

bakteriologický agar (Oxoid)

### 3.2.2 Použité kvasinkové kmeny

Tabulka 1: Použité kmeny *S. cerevisiae* (ze sbírky kmenů laboratoře doc. RNDr. Petra Folka, CSc.)

Kmen	Název	Genotyp	Zdroj, příprava
wt	<i>BY4741</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	Euroscarf
<i>prp45</i> (1-169)	<i>AVY17</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>; prp45(1-169)-HA::NatMX6; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	Knock-in do <i>BY4741</i>
<i><math>\Delta</math>set1</i>	<i>AVY92</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>; set1::kanMX6; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	Knock-in do <i>BY4741</i>

### 3.2.3 Přehled použitých primerů

Tabulka 2: Použité primery pro detekci genu *ECM33* (IDT, USA)

Název	Sekvence s orientací 5' - 3'	Typ	Primer pro detekci
<b>MH55</b>	TTTCGGTAGCGTGCTTGAG	přímý	promotoru
<b>MH56</b>	GCAAGAGAGGTCCGTTGAT	zpětný	
<b>MH57</b>	ATTCAAGAACGCTTTGACTGCT	přímý	exonu 1 a 5' oblasti intronu
<b>MH58</b>	TCGAGATTTGTGAGGAAAGAGG	zpětný	
<b>MH59</b>	GTACTTCTGCCACTGCTACTG	přímý	5' oblasti exonu 2
<b>MH60</b>	AAGATAGTCAAGGAACCATCAATCTC	zpětný	
<b>MH70</b>	TTGGAAAGTGTCGAAGGTTTCTC	přímý	střední oblasti exonu 2
<b>MH71</b>	GTAGTGTGTCACCGTTGGAAG	zpětný	
<b>MH61</b>	CGACTCTTCTCCAGTAACTTCTC	přímý	3' oblasti exonu 2
<b>MH62</b>	AGATGTGGCACCGTTCTTG	zpětný	

Tabulka 3: Použité primery pro detekci genu *ACT1* (IDT, USA)

Název	Sekvence s orientací 5' - 3'	Typ	Primer pro detekci
MH126	TACATCAGCTTTTAGATTTTTTCACG	přímý	exonu 1 a 5' oblasti intronu
MH127	GCTAGAACATACCAGAATCCATTG	zpětný	
MH124	AACGGTTCTGGTATGTGTAAAGC	přímý	5' oblasti exonu 2
MH125	ACCGACGATAGATGGGAAGAC	zpětný	
OG81	GATGGTGTTACTCACGTCGTTC	přímý	střední oblasti exonu 2
OG82	GTAGTCAGTCAAATCTCTACCGGC	zpětný	
MH37	GAAGGTCAAGATCATTGCTCCTC	přímý	3' oblasti exonu 2
MH38	GAAACACTTGTGGTGAACGATAG	zpětný	

Tabulka 4: Použité primery pro detekci kontrolních úseků (IDT, USA)

Název	Sekvence s orientací 5' - 3'	Typ	Primer pro detekci
MH05	GGTGTACAATATGGACTTCCTCTT	přímý	<i>ADHI</i> -UAS ( <i>ADHI</i> aktivační sekvence v oblasti promotoru)
MH06	CTATTGTATATCTCCCCTCCGC	zpětný	
MH74	AAATGGCAAGGGTAAAAACCAG	přímý	TELVIR (telomerická oblast na pravém rameni chromosomu VI)
MH75	TCGGATCACTACACACGGAAAT	zpětný	

### 3.2.4 Přehled použitých protilátek

Tabulka 5: Použité protilátky

Označení	Specifikace	Číslo šarže, katalogové číslo výrobce
H3	specifická protilátka proti histonu H3	GR2764-3, ab1791, Abcam
H3K4me3	specifická protilátka proti trimetylovanému histonu H3 na lysinu 4	GR73721-1, ab8580, Abcam

### 3.2.5 Ostatní materiál

injekční stříkačka Injekt®-F (BBraun, Německo), jehla Sterican 26G x 1 (BBraun, Německo), skleněné kuličky (Sigma-Aldrich, USA)

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Příprava kvasinkového kultivačního media

Kultivační medium YPAD bylo připravováno rozpuštěním pevných složek do deionizované vody do 9/10 konečného objemu. Pro přípravu pevného media byl do deionizované vody přidán navíc agar. Po sterilizaci v autoklávu (20 minut při 121 °C)

byla k roztoku přidána 1/10 objemu sterilního 20% roztoku glukózy a po vychladnutí pod přibližně 55 °C byl přidán roztok ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml.

- Složení media YPAD:

10 g/l	kvasinkový extrakt (Yeast Extract Powder)
20 g/l	Universalpepton M66
100 mg/l	adenin-hemisulfát
15 g – 18 g	agar
2%	glukóza (20% zásobní roztok)
100 µg/ml	ampicilin (zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml)

### 3.3.2 Příprava glycerolových konzerv

Pro dlouhodobé uskladnění použitých kmenů *S. cerevisiae* byly vytvořeny glycerolové konzervy. Při přípravě konzerv bylo 500 µl suspenze buněk smícháno s 500 µl 60% sterilního glycerolu. Při přípravě konzerv z biomasy buněk narostlé na plotně s pevným médiem byla do 500 µl deionizované vody pomocí sterilního párátko přidána nabraná část biomasy a pak bylo přidáno 500 µl 60% sterilního glycerolu. Takto připravené glycerolové konzervy byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě za občasného promíchání překlápěním nebo na vortexu. Konzervy pak byly přeneseny a uskladněny v -80 °C.

### 3.3.3 Kultivace kmenů *S. cerevisiae* na pevném a v tekutém médiu

Z glycerolových konzerv byly buňky pomocí očkovací kličky nebo párátko naneseny na plotnu s pevným médiem a rozetřeny skleněnou tyčinkou. Plotny s vyšetými buňkami byly umístěny do termostatu a kultivovány při teplotě 30 °C. Buněčné kultury narostlé na plotnách byly skladovány v lednici při teplotě do 8 °C po dobu 4 týdnů.

Kultivace v tekutém médiu byla prováděna ve sterilních Erlenmayerových baňkách, které byly naplněny maximálně do 1/5 objemu baňky z důvodu dostatečného provzdušňování buněčné kultury. Pomocí očkovací kličky byly buňky z plotny odebrány a

zaočkovány do kultivačního média. Baňky s buněčnými kulturami byly umístěny do termostataného inkubátoru a kultivovány (180 rpm, 30 °C). Na spektrofotometru Spekol 20 byla měřena optická denzita buněk v kultuře při 595 nm (označení  $OD_{595}$ ), jako srovnávací vzorek bylo použito medium YPAD.

### 3.3.4 Měření růstové křivky kmenů *S. cerevisiae*

Buňky byly večer zaočkovány do 10 ml media YPAD a kultivovány přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm. Ráno byly buňky přeočkovány do 30 ml media YPAD na  $OD_{595} \sim 0,025$  a kultivovány na třepačce (180 rpm, 30 °C). Optická denzita buněk byla měřena každé dvě hodiny až do dosažení stacionární fáze.

**Vztahy pro výpočet generační doby ( $T$ ) a specifické růstové rychlosti ( $\mu$ ):**

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{\tau - \tau_0},$$

$$T = \frac{1}{r}, \quad \text{přičemž } r = \frac{\mu}{\ln 2},$$

kde  $r$  je počet dělení za jednotku času,  $x_0$  je počáteční hodnota  $OD_{595}$  v exponenciální fázi v čase  $\tau_0$ ,  $x$  je konečná hodnota  $OD_{595}$  v exponenciální fázi v čase  $\tau$ .

### 3.3.5 Chromatinová imunoprecipitace

ChIP slouží ke studiu interakcí mezi specifickými proteiny (např. modifikovaný histony) a cílovými sekvencemi DNA.

#### A. Kultivace

Buňky byly ráno zaočkovány do 5 ml media YPAD a kultivovány přes den (6 – 8 hod) na třepačce (180 rpm, 30 °C). Narostlé buněčné kultury byly večer přeočkovány do příslušného množství media YPAD (50 ml kultury pro jednu protilátku) na  $OD_{595} \sim 0,0005$  a kultivovány přes noc na třepačce (180 rpm, 30 °C) do dosažení  $OD_{595} \sim 0,60$ .

#### B. Fixace

Po kultivaci buněk na  $OD_{595} \sim 0,60 - 0,65$  bylo provedeno chemické zesíťování mezi proteiny a DNA a proteiny navzájem. K buňkám byl přidán 37% formaldehyd

na výslednou koncentraci 1% (1,35 ml 37% formaldehydu na 50 ml buněčné kultury). Po přidavku formaldehydu byly buněčné kultury inkubovány na třepačce přesně 30 minut (150 rpm, RT). Fixace buněk byla ukončena přidavkem 2,5 M roztoku glycinu na výslednou koncentraci 0,125 M (2,5 ml 2,5 M glycinu na 50 ml buněčné kultury). Buňky s glycinem byly inkubovány na třepačce 10 minut (150 rpm, RT). Buněčné kultury pak byly přesunuty do zkumavek (50 ml) a centrifugovány (1000 x g, 3 min, 4 °C). Pelety buněk byly po odstranění supernatantu resuspendovány ve 40 ml sterilní deionizované vody a znovu centrifugovány (1000 x g, 3 min, 4 °C). Po odstranění supernatantu byly promyté pelety resuspendovány v 1 ml sterilní deionizované vody, převedeny do mikrozkušavek (2 ml) a centrifugovány (16 500 x g, 1 min, RT). Pelety fixovaných buněk byly uskladněny v -80 °C.

### **C. Dezintegrace buněk**

Všechny vzorky i pufrů byly od tohoto kroku chlazené na ledu nebo ledové lázni.

K zmrazeným fixovaným buňkám bylo pipetováno 270 µl vychlazeného LB pufru s příslušným množstvím roztoku inhibitorů proteas a buňky byly resuspendovány. Suspenze buněk byla pipetována do zkumavek se šroubovacím víčkem s 880 mg skleněných kuliček (425 – 600 µm). Skleněné kuličky byly předem omyty v kyselině chlorovodíkové. Následně byly buňky rozbity pomocí přístroje FastPrep®-24 použitím cyklu pro *S. cerevisiae*: 3x, rychlost 5,5 m/s, 13 s. Mezi jednotlivými cykly byla pětiminutová pauza, během níž byly vzorky uchovány v ledové lázni. Po rozbití buněk byly skleněné kuličky z buněčného lyzátu odstraněny: Dno i víčko zkumavek s kuličkami bylo propíchnuto nažhavenou tenkou jehlou. Zkušavky byly vloženy do mikrozkušavek (1,5 ml), jejichž víčko bylo ustřiženo. Složené mikrozkušavky byly takto vloženy do zkumavek (50 ml) a buněčný lyzát byl z kuliček centrifugací vytočen do mikrozkušavek bez víčka (800 x g, 2 min, 4 °C). Buněčný lyzát byl pak přenesen do nové mikrozkušavky (1,5 ml), kuličky byly propláchnuty 100 µl LB pufru s inhibitory proteas a znovu centrifugovány (800 x g, 2 min, 4 °C). Frakce byly pak spojeny a centrifugovány (20000 x g, 10 min, 4 °C). Po odstranění supernatantu byla peleta důkladně resuspendována v 600 µl LB pufru s inhibitory proteas a následně centrifugována (20000 x g, 10 min, 4 °C). Odstraněním supernatantu a resuspendováním pelety v 270 µl LB pufru s inhibitory proteas byly vzorky připravené k sonikaci.

- Složení LB pufaru:

50 mM        HEPES pH 7,6

1 mM         EDTA

150 mM      chlorid sodný

1%           Triton X-100

0,1%         deoxycholát sodný

- Složení koktejlu inhibitorů proteas FY:

62,6 mg směsi inhibitorů proteas: AEBSF, E-64, pepstatin A, 1,10-fenanthrolin

1 ml DMSO

- smícháním se získal 100x koncentrovaný zásobní roztok

#### **D. Sonikace**

Pomocí sonikace byl chromatin naštěpen na fragmenty odpovídající velikosti 200 – 800 bp DNA. Pro sonikaci byl použit sonikátor BioRuptor, jehož chlazení bylo nastaveno na 2 °C. Připravené vzorky byly sonikovány 15x 30 sekund s třicetisekundovými pauzami mezi cykly. Sonikováno bylo vždy 6 mikrozkušavek, přičemž při nižším počtu vzorků byly přidány mikrozkušavky s 300 µl deionizované vody. Po sonikaci byly vzorky centrifugovány (24000 x g, 20 min, 4 °C) a supernatant byl odebrán. Vzorky jednotlivých kmenů kvasinek byly přeneseny do čistých mikrozkušavek (1,5 ml) a na spektrofotometru (NanoDrop 2000) byly při vlnové délce 280 nm změřeny koncentrace proteinů (jako srovnávací vzorek byla použita voda, objem měřeného vzorku byl 2 µl). Pokud se koncentrace lišily více než 10 %, byly vzorky naředěny LB pufrem s inhibitory proteas tak, aby byla konečná koncentrace proteinů vzorků stejná.

#### **E. Blokace protein A Sepharosy**

Protein A Sepharosa o množství 17,5 µl (pro odstranění nespecifické reaktivity, viz bod F.) nebo 45 µl (pro inkubaci, viz bod H.) byla resuspendována v 500 µl LB pufaru,

centrifugována (5400 x g, 2 min, RT) a supernatant byl odsát pomocí injekční stříkačky. Protein A Sepharosa byla resuspendována v 500 µl LB pufru s roztokem BSA o koncentraci 0,5 mg/ml, inkubována na třepačce pro mikrozkušavky (1000 rpm, 30 min, RT). Poté byla protein A Sepharosa centrifugována (5400 x g, 2 min, RT) a supernatant byl odsát. Následně byla protein A Sepharosa znovu resuspendována v 500 µl LB pufru s 0,5 mg/ml roztokem BSA, inkubována na třepačce (1000 rpm, 30 min, RT) a po centrifugaci (5400 x g, 2 min, RT) byl supernatant odsát.

#### **F. Odstranění nespecifické reaktivity**

Supernatant získaný odstředěním vzorků po sonikaci o objemu přibližně 250 µl byl přidán k 17,5 µl blokované protein A Sepharosy. Směs byla inkubována na rotační míchačce zkumavek v chladové místnosti (8 rpm, 1 hod). Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (5500 x g, 2 min, 4 °C) a supernatant byl odebrán do čisté mikrozkušavky. Vzorky byly pak zamraženy v – 80 °C; vzorky bylo možno skladovat až týden bez ztráty aktivity.

#### **G. Preinkubace**

Po rozmražení vzorků bylo do mikrozkušavek (1,5 ml) odebráno po 5 µl a uchováno v -20 °C. Tyto vzorky jsou označovány jako „input“. Zbytek vzorků byl pak rozdělen do mikrozkušavek (1,5 ml) po 240 µl a bylo k nim přidáno 5 µl příslušné protilátky (5 µl protilátky na 50 ml výchozí kultury). Tyto vzorky budou dále označovány jako „output“. Vzorky s protilátkou byly inkubovány na rotační míchačce zkumavek v chladové místnosti (8 rpm, 1 hod). Po ukončení inkubace byly vzorky krátce centrifugovány (5 s, 4 °C).

#### **H. Inkubace**

Vzorky s příslušnou protilátkou byly pipetovány k 45 µl zablokované protein A Sepharosy (příprava podle bodu E.). Směs byla inkubována na rotační míchačce zkumavek v chladové místnosti (8 rpm, 3 hod). Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (5500 x g, 2 min, 4 °C) a supernatant byl odstraněn.

## I. Izolace DNA

Kuličky protein A Sepharosy s protilátkou specificky vázající studovaný protein zesít'ované s úseky DNA byly šestkrát promývány 700 µl chlazeného IP pufru. Po každém promytí byly vzorky centrifugovány (5500 x g, 2 min, 4 °C) a supernatant byl opatrně odstraněn bez odebrání promývaných kuliček. Po skončení promývání a po úplném odstranění supernatantu bylo k vzorkům typu „output“ i „input“ přidáno 100 µl 10% chelexu. Všechny vzorky byly promíchány na vortexu (10 s) a vloženy do termobloku pro odstranění kovalentních vazeb mezi proteiny a DNA vzniklých fixací 37% formaldehydem (10 min, 95 °C), přičemž po 5 minutách inkubace byly vzorky znovu promíchány (10 s). Vzorky byly poté centrifugovány (5 s, RT) a nechány vychladnout. Následně byl k vzorkům pipetován 1 µl proteinasy K o koncentraci 20 mg/ml. Vzorky byly promíchány (10 s) a inkubovány na třepače (1000 rpm, 30 min, 55 °C). Po inkubaci byly vzorky inkubovány v termobloku pro inaktivaci proteinasy K (10 min, 95 °C), po 5 minutách inkubace byly vzorky promíchány (10 s). Po centrifugaci vzorků (5500 x g, 2 min, RT) bylo odebráno 80 µl supernatantu do čistých mikrozkušavek (1,5 ml). K směsi chelexu a kuliček bylo přidáno 60 µl deionizované vody, promícháno (10 s) a znovu centrifugováno (5500 x g, 2 min, RT). 60 µl supernatantu bylo odebráno a spojeno s předešlými 80 µl supernatantu. Získaná izolovaná DNA byla uskladněna v -80 °C.

- Složení IP pufru:

50 mM	Tris-HCl pH 7,5
1%	Triton X-100
150 mM	chlorid sodný
5 mM	EDTA
0,5%	NP-40 (IGEPAL CA630)

### 3.3.6 Kvantitativní PCR

Izolovaná DNA byla nakonec vyhodnocena pomocí kvantitativní PCR (qPCR). Použitím spektrofotometru NanoDrop2000 byla při vlnové délce 260 nm změřena koncentrace izolované DNA u všech vzorků (jako srovnávací vzorek byla použita voda,



objem měřeného vzorku byl 2  $\mu\text{l}$ ). Pro qPCR bylo ze všech vzorků následně ředěním připraveno 80  $\mu\text{l}$  roztoku templátové DNA o výsledné koncentraci 13,0 – 13,9 ng/ $\mu\text{l}$ . Do mikrozkuhavek (1,5 ml) byla podle počtu reakcí připravena směs o příslušném složení.

- Obsah směsi (na jednu reakci):

4 $\mu\text{l}$	deionizované vody
6,25 $\mu\text{l}$	MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR <sup>®</sup> Assay No ROX
0,375 $\mu\text{l}$	primer 1 (zásobní roztok o koncentraci 10 $\mu\text{M}$ )
0,375 $\mu\text{l}$	primer 2 (zásobní roztok o koncentraci 10 $\mu\text{M}$ )

Důkladně promíchaná směs byla pomocí dávkovací automatické pipety (Eppendorf Xplorer<sup>®</sup>) pipetována po 11  $\mu\text{l}$  do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky (celkově 384 jamek). Následně bylo k směsi pomocí dávkovací automatické pipety (Gilson) pipetováno 1,5  $\mu\text{l}$  roztoku templátové DNA, což představuje hmotnost přibližně 20 ng. Destička byla utěsněna samolepící fólií, reakční směs byla promíchána pomocí vortexu a pak centrifugována (1500 x g, 3 min, RT). Destička s reakční směsí byla vložena do přístroje Light Cycler<sup>®</sup> 480 II a inkubována podle daného programu. Všechny reakce byly prováděny v triplikátech.

### **Program pro qPCR:**

1. Preinkubace: 95 °C, 5 min
2. Amplifikace (40x): 95 °C, 15 s  
60 °C, 30 s  
72 °C, 20 s - po tomto kroku přístroj odečítal fluorescenci
3. Analýza táním: 95 °C, 5 s  
50 °C, 1 min  
zvyšování teploty o 1 °C po 1 min, kontinuální odečítání fluorescence přístrojem
4. Chlazení: 40 °C, 30 s

Kvantitativní analýza všech vzorků byla provedena pomocí LightCycler<sup>®</sup> 480 Software Version 1.5 (Roche Applied Science).

### 3.3.7 Vyhodnocení a normalizace dat kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR) je metoda, která je založena na detekci a kvantifikaci fluorescenčního signálu, který je přímo úměrný množství vznikajícího produktu PCR. Provedením qPCR byly získány pro jednotlivé templáty DNA v triplikátech hodnoty  $C_p$  představující míru koncentrace amplifikované DNA ve vzorku a směrodatná odchylka každého triplikátu  $STD$ .

Podle tzv. Pfafflovy komparativní metody  $\Delta\Delta C_p$  s korekcí účinnosti byla stanovena relativní kvantita konkrétního úseku DNA [76]:

$$\text{relativní kvantita} = \frac{[E_{cil}^{-\Delta C_{p_{cil}}}]}{[E_{ref}^{-\Delta C_{p_{ref}}}]}$$

Výsledky metody ChIP byly vyhodnoceny dvěma způsoby. Prvním způsobem jako % vzorku označovaného jako „input“ ( $\Delta C_p$ , byl použit pouze výraz v čitateli zlomku). Pro každý vzorek byl vypočten rozdíl hodnoty vzorku „output“ a hodnoty vzorku „input“:

$$\Delta C_{p_{cil}} = C_p(out) - C_p(in)$$

$$\% \text{ vzorku "input"} = E_{cil}^{-\Delta C_{p_{cil}}}$$

kde  $\Delta C_{p_{cil}}$  představuje hodnotu  $C_p$  vzorku „output“ vztaženou na hodnotu  $C_p$  vzorku „input“ a  $E_{cil}$  je účinnost amplifikace pro daný pár primerů, která byla stanovena na základě standardní křivky.

Druhým způsobem byly výsledky vyjádřeny jako násobek hodnoty kontrolního úseku ( $\Delta\Delta C_p$ , všechny hodnoty (výraz v čitateli zlomku) byly normalizovány na kontrolní hodnotu (výraz ve jmenovateli zlomku)), přičemž:

$$\Delta C_{p_{ref}} = C_p(out) - C_p(in)$$

$$\% \text{ kontrolního vzorku "input"} = E_{ref}^{-\Delta C_{p_{ref}}}$$

kde  $\Delta C_{p_{ref}}$  představuje hodnotu  $C_p$  vzorku „output“ vztaženou na hodnotu  $C_p$  příslušného vzorku „input“ a  $E_{ref}$  je účinnost amplifikace pro kontrolní pár primerů.

Při provedení více biologických opakování byly výsledné hodnoty relativní kvantity zprůměrovány.

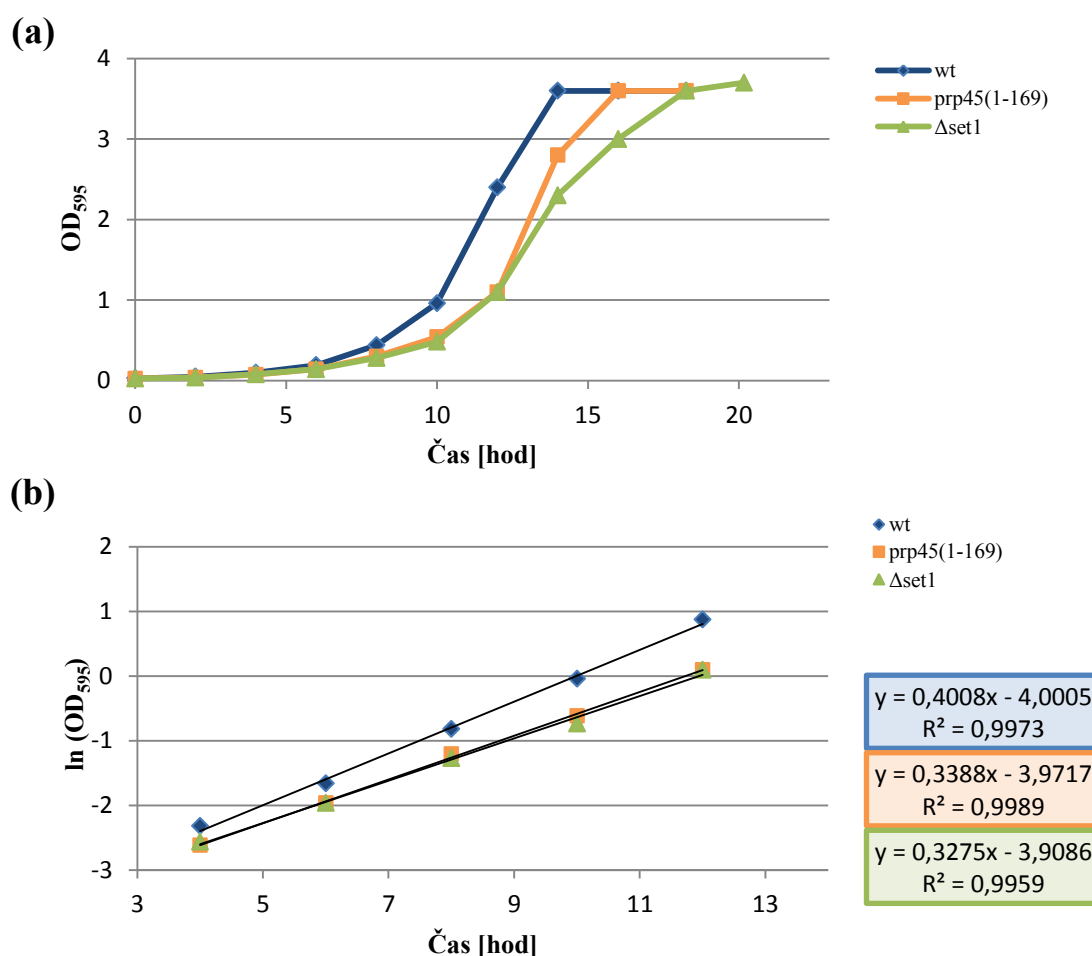
## 4. VÝSLEDKY

Fyziologická role proteinu Prp45 v procesu sestřihu není doposud úplně známa. V naší laboratoři se zabýváme výzkumem tohoto proteinu a podle získaných nepublikovaných výsledků předpokládáme, že Prp45 je regulátorem, který propojuje procesy sestřihu a transkripce a že působí na sestavování spliceosomu v časné fázi sestřihu. Bylo ukázáno, že *PRP45* geneticky interaguje s faktory účastnicími se elongace transkripce a faktory regulujícími chromatinové modifikace a také bylo naznačeno, že některé chromatinové modifikátory mají roli v sestřihu pre-mRNA [50,53]. To vedlo k vzniku hypotézy, že Prp45 může regulovat sestavování spliceosomu prostřednictvím modifikací histonů.

Tato bakalářská práce byla zaměřena na pozorování vlivu mutace *prp45(1-169)* na profil trimethylace histonu H3 na lysinu 4 přítomné na aktivních genech pomocí metody chromatinové imunoprecipitace (ChIP). Pro tento účel byly zvoleny tři kmeny *S. cerevisiae*, a to divoký kmen (wt), kmen obsahující mutantní alelu proteinu Prp45 [*prp45(1-169)*] a kmen s deletovanou histonmethyltransferasou Set1 ( $\Delta$ *set1*) sloužící jako kontrolní kmen.

### 4.1 Charakterizace růstových vlastností použitých kmenů *S. cerevisiae*

U vybraných kmenů *S. cerevisiae*, které byly kultivovány v tekutém živném mediu YPAD v třepačce za optimálních podmínek (30 °C, 180 rpm), byly studovány růstové vlastnosti. Růst jednotlivých kmenů byl pozorován spektrofotometricky měřením optické denzity buněk při 595 nm ( $OD_{595}$ ) každé dvě hodiny do dosažení stacionární fáze (kapitola 3.3.4). Z naměřených hodnot byly sestrojeny 2 grafy, a to závislost  $OD_{595}$  na čase (Obr. 8a, str. 44) a závislost přirozeného logaritmu  $OD_{595}$  na čase (Obr. 8b, str. 44). V grafu logaritmické závislosti byly jednotlivé soubory bodů z exponenciální fáze proloženy lineární regresní funkcí (viz Obr. 8b, str. 44).



Obr. 8: **Růstová křivka kmenů *S. cerevisiae*.** (a) Graf znázorňující lineární závislost  $OD_{595}$  na čase. (b) Graf znázorňující logaritmickou závislost  $\ln(OD_{595})$  na čase. Soubory bodů jsou proloženy lineární regresní funkcí, přičemž znázorněné rovnice přímek a spolehlivosti  $R^2$  barvou odpovídají typu souborů bodů. Použité kmeny *S. cerevisiae* jsou v grafech barevně odlišeny: wt kmen tmavě modré body, kmen s mutací proteinu Prp45 oranžové body a kmen s delecí histonmethyltransferasy Set1 zelené body.

Použitím rovnic přímek (Obr. 8) a vztahů (viz kapitola 1.3.4) byly vypočteny specifické růstové rychlosti a generační doby buněčných populací *S. cerevisiae*. Výsledné hodnoty pro divoký kmen, kmen s mutací *prp45(1-169)* a kmen s deletovanou histonmethyltransferasou Set1 jsou znázorněny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Hodnoty specifické růstové rychlosti a generační doby kmenů *S. cerevisiae*

Kmen	Specifická růstová rychlost [h <sup>-1</sup> ]	Generační doba [h]	Generační doba [min]
wt	0,401	1,73	104
<i>prp45(1-169)</i>	0,339	2,05	123
<i>Δset1</i>	0,328	2,12	127

Měřením růstu buněčných kultur bylo ukázáno, že vybrané kmeny *S. cerevisiae* jsou si růstovými vlastnostmi podobné a mohou se tedy při použití v dalších pokusech srovnávat.

## 4.2 Vyhodnocení chromatinové imunoprecipitace kvantitativní PCR

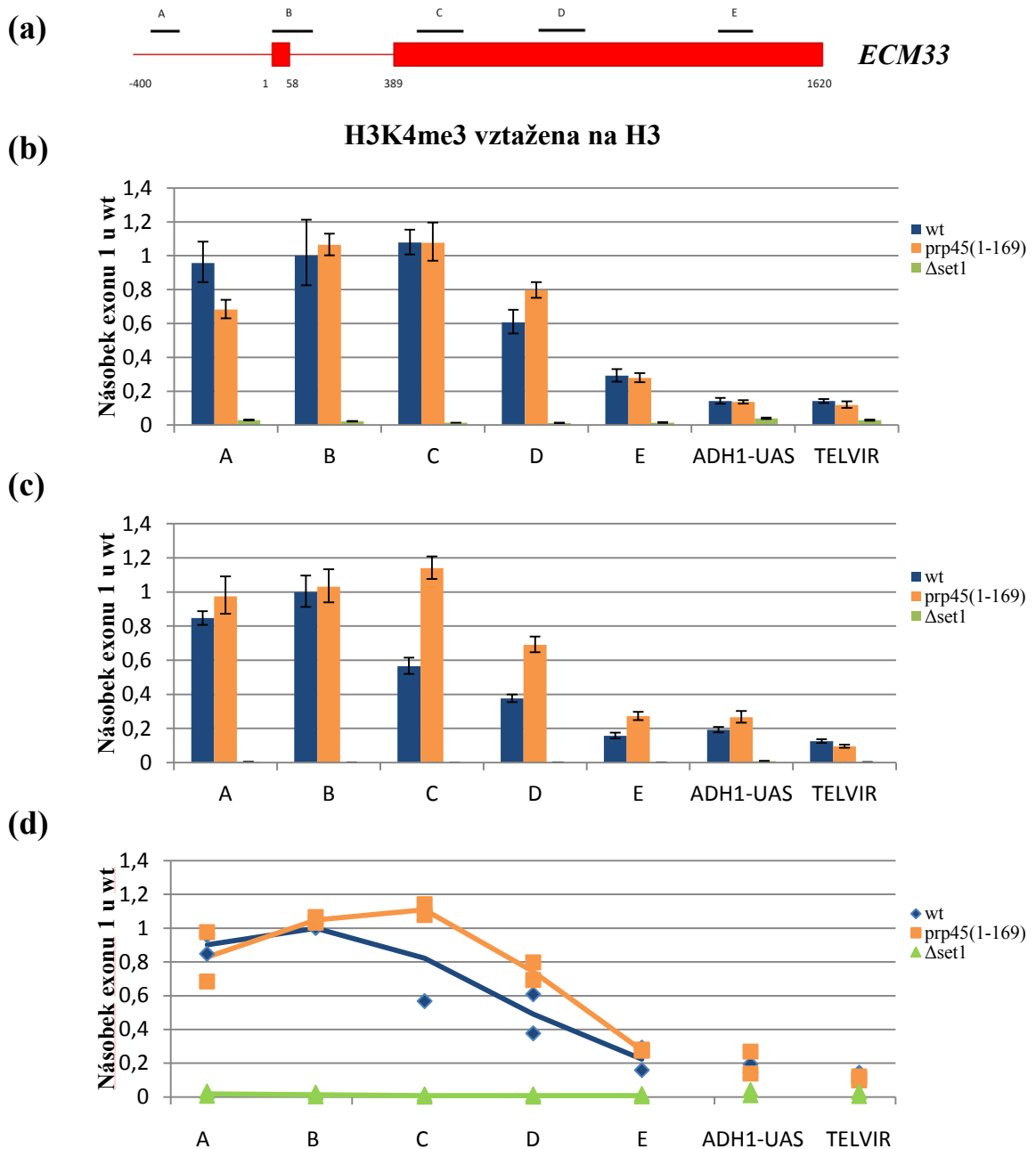
Pro sledování vlivu mutace proteinu Prp45 na trimethylaci histonu H3 na lysinu 4 (H3K4me3), která se vyskytuje především v místech aktivní transkripce a je nabohacena na 5'-konci aktivních genů [77], byla využita metoda chromatinové imunoprecipitace (ChIP) a kvantitativní PCR (qPCR), které umožňují pozorovat přítomnost modifikovaných histonů na cílové sekvenci DNA.

Vybrané buněčné kmeny *S. cerevisiae* (wt, *prp45*(1-169),  $\Delta$ *set1*) byly kultivovány v živném mediu YPAD za optimálních podmínek (30 °C, 180 rpm). V oblasti exponenciální fáze růstu ( $OD_{595}$  0,60 – 0,65) byly buňky fixovány a chromatin zesíťován 1% formaldehydem. Zesíťovaný chromatin byl následně sonikací rozbit na fragmenty o délce 200 – 800 bp DNA, a poté byla provedena inkubace se specifickou protilátkou. Pro tento experiment byly zvoleny protilátky vázající epitopy histonu H3 a trimethylovaného H3K4. Protilátky s navázanými fragmenty chromatinu byly imobilizovány na pevnou matici a nenavázaný buněčný materiál byl odstraněn. Po rozrušení kovalentních vazeb mezi proteiny a DNA zahřátím na 95 °C byly proteiny (včetně protilátek) degradovány proteázou a získaná DNA byla purifikována (viz kapitola 3.3.5). Tímto procesem se získala směs fragmentů DNA, které byly rozeznány proteinem našeho zájmu (histonem H3 nebo trimethylovaným H3K4).

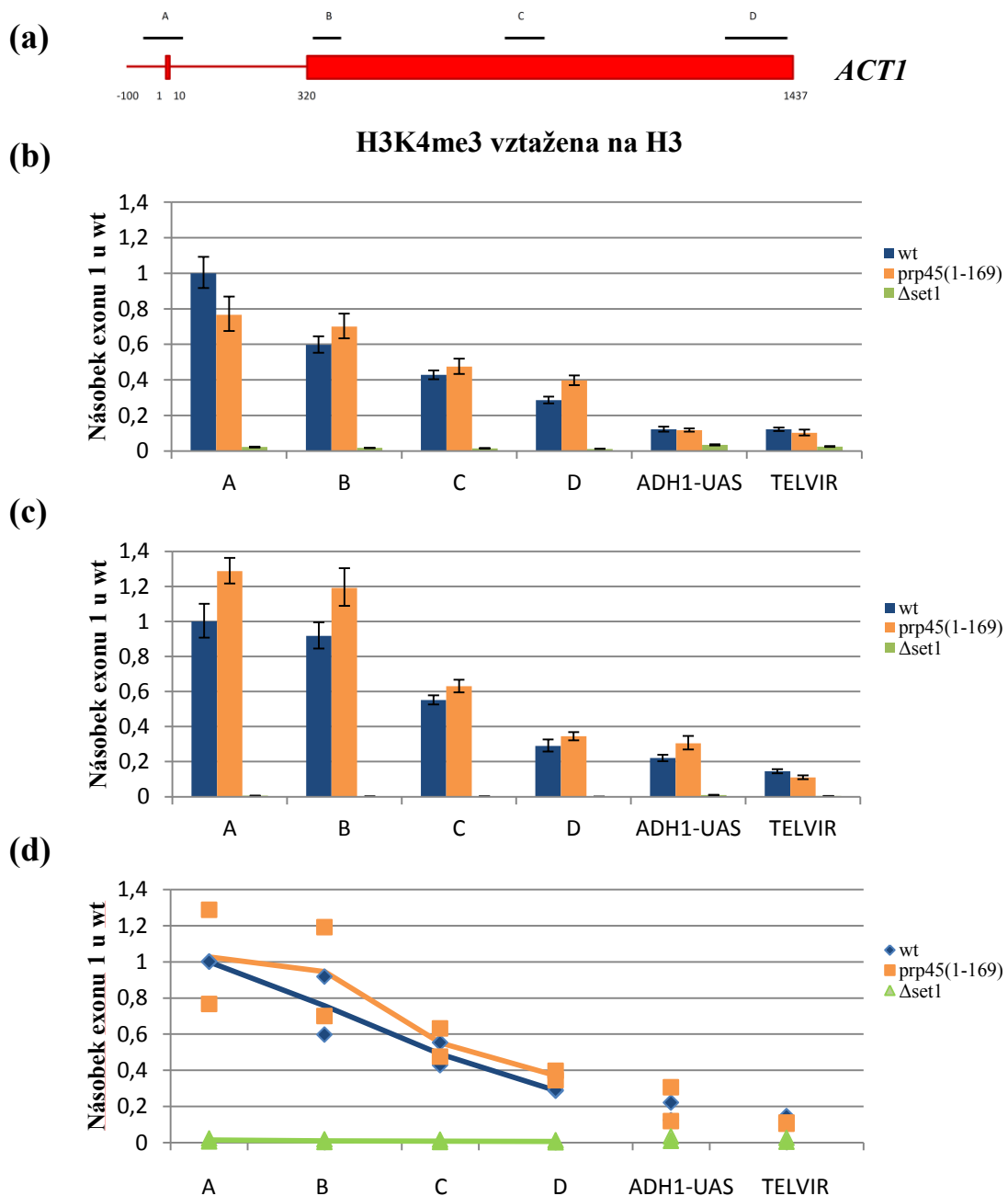
Dalším krokem byla kvantifikace frakce fragmentů DNA pomocí qPCR v reakční směsi obsahující interkalační barvivo SYBR Green prováděné na přístroji Light Cycler® 480 II (viz kapitola 3.3.6). Tato metoda je založena na detekci a kvantifikaci fluorescenčního signálu barviva SYBR Green, který roste se vzrůstajícím množstvím produktu PCR (amplikonů). Změna trimethylace H3K4 byla pozorována na lokusech genů obsahujících intron *ACT1* a *ECM33*. Důvodem výběru těchto genů bylo, že obsahují dlouhý terminální exon a byly použity v dřívějších pokusech. Množství H3K4me3 bylo u genu *ECM33* sledováno na promotoru (amplikon A), exonu 1 a 5'oblasti intronu (amplikon B), 5'oblasti exonu 2 (amplikon C), střední oblasti exonu 2 (amplikon D) a 3'oblasti exonu

2 (amplikon E). Jednotlivé amplifikované úseky jsou znázorněny na Obr. 9a (str. 47). U genu *ACT1* bylo množství H3K4me3 pozorováno na exonu 1 a 5' oblasti intronu (amplikon A), 5' oblasti exonu 2 (amplikon B), střední oblasti exonu 2 (amplikon C) a 3' oblasti exonu 2 (amplikon D), přičemž amplikony jsou znázorněny na Obr. 10a (str. 48). Sekvence primerů pro oba geny jsou shrnuty v kapitole 3.2.3. Jako kontrolní úseky byly použity primery pro detekci *ADHI* aktivační sekvence v oblasti promotoru (*ADHI-UAS*) a telomerické oblasti na pravém rameni chromosomu VI (TEL<sub>VIR</sub>), jejichž sekvence jsou shrnuty v kapitole 3.2.3. Provedením qPCR byly získány pro jednotlivé fragmenty DNA hodnoty  $C_p$  (míra koncentrace amplifikované DNA) a *STD* (směrodatná odchylka), které byly vyhodnoceny podle Pfafflovy komparativní metody (viz kapitola 3.3.7). Výsledné hodnoty pro H3K4me3 vyjadřující relativní kvantitu konkrétního úseku DNA na genech *ACT1* a *ECM33* byly vztaženy na výsledné hodnoty pro H3, čili vztaženy na celkové relativní množství histonu H3. Takto získané hodnoty byly nakonec vyneseny do sloupcového grafu pro gen *ECM33* (viz Obr. 9b,c; str. 47) a pro gen *ACT1* (Obr. 10b,c; str. 48). Celkově byla provedena dvě nezávislá biologická opakování, jejichž výsledné hodnoty relativní kvantity byly vyneseny do jednoho grafu, ve kterém byl jejich průměr propojen úsečkou (Obr. 9d, str. 47; Obr. 10d, str. 48).

Na výsledných grafech, ve kterých byly vyneseny naměřené hodnoty představující relativní nabohacení trimethylovaného H3K4 na genech *ECM33* (Obr. 9, str. 47) a *ACT1* (Obr. 10, str. 48), je možno vidět, že profil trimethylace H3 na lysinu 4 na aktivních genech u kmene *prp45(1-169)* se výrazně neodlišuje od profilu H3K4me3 na aktivních genech u divokého kmene. U kontrolního kmene s deletovanou histonmethyltransferasou *Δset1* trimethylace H3K4 na lokusu obou genů není pozorována.



Obr. 9: **Vyhodnocení analýzy ChIP pro gen *ECM33*.** (a) Schéma organizace lokusu genu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úseky. (b) Sloupcový graf vyjadřující relativní nabohacení H3K4me3 na lokuse genu *ECM33* a na kontrolních úsecích (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) oproti exonu 1 u divokých buněk. Graf představuje první biologické opakování. Výsledné hodnoty jsou pro jednotlivé kmeny *S. cerevisiae* barevně odlišeny, a to tak, že modrá barva představuje divoký kmen (wt), oranžová kmen s mutací Prp45 [*prp45(1-169)*] a zelená kmen s delecí histonmethyltransferasy ( $\Delta$ set1). Znárodně hodnoty představují hodnoty pro trimetylovaný H3K4 normalizované na hodnoty celkového množství histonu H3. Úsečky zobrazují směrodatnou odchylku, která byla získána z technických triplikátů při qPCR. (c) Sloupcový graf zobrazující výsledné hodnoty z druhého biologického opakování (d) Souhrnný graf s vyneseními hodnotami z obou biologických opakování, kde úsečka propojuje jejich průměrnou hodnotu.



Obr. 10: **Vyhodnocení analýzy ChIP pro gen *ACT1***. (a) Schéma organizace lokusu genu *ACT1* s vyznačenými amplifikovanými úseky. (b) Sloupcový graf vyjadřující relativní nabožení H3K4me3 na lokuse genu *ACT1* a na kontrolních úsecích (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) oproti exonu 1 u divokých buněk. Graf představuje první biologické opakování. Výsledné hodnoty jsou pro jednotlivé kmeny *S. cerevisiae* barevně odlišeny, a to tak, že modrá barva představuje divoký kmen (wt), oranžová kmen s mutací Prp45 [*prp45(1-169)*] a zelená kmen s delecí histonmethyltransferasy ( $\Delta set1$ ). Znázorněné hodnoty představují hodnoty pro trimetylovaný H3K4 normalizované na hodnoty celkového množství histonu H3. Úsečky zobrazují směrodatnou odchylku, která byla získána z technických triplikátů při qPCR. (c) Sloupcový graf zobrazující výsledné hodnoty z druhého biologického opakování (d) Souhrnný graf s vyneseními hodnotami z obou biologických opakování, kde úsečka propájí jejich průměrnou hodnotu.



## 5. DISKUZE

Na modelu *S. cerevisiae* bylo prokázáno, že sestřih pre-mRNA začíná kotranskripčně a předpokládá se, že sestavování spliceosomu na nascentním transkriptu a posttranslační modifikace chromatinu odpovídajícího úseku genu se vzájemně ovlivňují [41-58]. Výsledky naší laboratoře naznačují, že protein Prp45, dosud popsán jako sestřihový faktor, by mohl sloužit jako regulátor propojující sestřih a transkripci. Protein Prp45 geneticky interaguje nejen s proteiny zahrnutými v sestřihu pre-mRNA, ale také s faktory důležitými pro elongaci transkripce, mimo jiné i s faktory regulujícími modifikace chromatinu. Dále se ukázalo, že mutace *prp45(1-169)* negativně ovlivňuje navazování sestřihových faktorů v časně fázi sestavování spliceosomu (nepublikovaná data). Na základě těchto výsledků jsme formulovali hypotézu, že Prp45 reguluje sestavování spliceosomu prostřednictvím chromatinových modifikací.

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat působení mutace *prp45(1-169)* na trimethylaci histonu H3 na lysinu 4 a tím zjistit, zda by Prp45 mohl regulovat sestavování spliceosomu před prvním krokem sestřihu prostřednictvím trimethylace H3K4. Jedním z hlavních důvodů výběru trimethylace H3K4 bylo, že se u savčích buněk ukázalo, že proteiny vážící se na methylované histony (H3K4me3) napomáhají navazování jednotlivých snRNP na nascentní transkript a ovlivňují tak účinnost sestřihu pre-mRNA [56]. Dalším důvodem bylo, že pro trimethylaci histonu H3 je nezbytná ubikvitinylace histonu H2B, u které byl vliv na sestřih primárního transkriptu již ukázán [53]. Pro pozorování vlivu mutace *prp45(1-169)* byla použita metoda chromatinové imunoprecipitace, která je pro sledování přítomnosti chromatinových modifikací na cílové sekvenci DNA využívána v mnoha studiích [50,51]. Byly využity specifické protilátky vážící epitopy histonu H3 a trimethylovaného H3K4. V obou případech se jedná o králičí polyklonální protilátky, které splňují požadavky a jsou vhodné pro ChIP [74,78]. Metodou ChIP byla získána směs DNA obsahující fragmenty odpovídající vazebným místům histonu H3 nebo H3K4me3, které byly vyhodnoceny pomocí kvantitativní PCR. Při qPCR byly chromatinové změny detekovány na lokusech aktivních genů *ECM33* a *ACT1*, které obsahují relativně dlouhý terminální exon 2. Ve výsledných grafech (Obr. 9, str. 47; Obr. 10, str. 48) bylo u obou genů pozorováno, že relativní nabožení trimethylovaného H3K4 u kmene s mutací Prp45 není významně odlišné od relativního nabožení H3K4me3 u

divokého kmene. Ve výsledném profilu H3K4me3 na lokusech obou genů bylo možno také vidět, že v oblasti 5'-konce genů je relativní nabohacení H3K4me3 nejvyšší a směrem k 3'-konci klesá, což je v souladu s literaturou [56,77]. U kontrolních úseků *ADHI-UAS* (*ADHI* aktivační sekvence v oblasti promotoru) a TELVIR (telomerické oblasti na pravém rameni chromosomu VI) bylo sledováno nízké relativní nabohacení trimethylovaného H3K4, což se shoduje s očekávaným výsledkem. Na telomeře, která je součástí heterochromatinu, by se neměla vyskytovat H3K4me3, která je spojena s aktivní transkripcí [77], a u oblasti *ADHI-UAS* methylace H3K4 nebyla pozorována [79]. Pro kontrolu provedení metody CHIP byl použit kmen s deletovanou histonmethyltransferasou *Set1*, u kterého bylo předpokládáno, že trimethylace H3K4 na lokusu obou genů nebude pozorována, což se potvrdilo.

Z naměřených výsledků vyplývá, že mutace *prp45(1-169)* neovlivňuje trimethylaci H3 na lysinu 4. To znamená, že H3K4me3 není příčinou zpožděného navazování sestřihových faktorů a že protein *Prp45* pravděpodobně reguluje sestavování spliceosomu jiným způsobem. V této souvislosti se nabízejí alternativní hypotézy.

Jednou z hypotéz je, že *Prp45* může působit v časně fázi sestřihu pre-mRNA prostřednictvím jiných posttranslačních modifikací. Je možné, že mutace *prp45(1-169)* ovlivňuje chromatinové modifikace jako je například acetylace či ubikvitinylace. Nedávno bylo ukázáno, že histonacetyltransferasa *Gcn5*, která acetyluje histony H3 a H2B, ovlivňuje navazování komponent U2 snRNP na BP místo. Zjistilo se, že geny kódující heterodimerní proteiny U2 snRNP (*Lea1* a *Msl1*) geneticky interagují s genem kódujícím *Gcn5* a také, že delece *Gcn5* ( $\Delta$ *Gcn5*) způsobuje opožděné navazování *Lea1* a *Msl1* na BP. Dále se prokázalo, že jak acetylace histonů tak i deacetylace zprostředkovávají správnou asociaci jednotlivých snRNP na vznikající pre-mRNA [50,51]. Nepublikované výsledky naší laboratoře ukázaly, že mutace *prp45(1-169)* způsobuje opožděné navazování komponent U2 snRNP, přičemž tento defekt se přenáší do pozdnějších fází sestavování spliceosomu, kdy kotranskripční navazování U5 snRNP a NTC je už téměř nedetekovatelné. Vzhledem k tomu, že se hladina mRNA u wt buněk a buněk s mutací *prp45(1-169)* nemění a ke kotranskripčnímu sestřihu zřejmě nedochází kvůli opožděnému navazování sestřihových faktorů, dovozujeme, že u buněk s mutací *prp45(1-169)* dochází k sestřihu pre-mRNA posttranskripčně. V laboratoři jsme rovněž ukázaly, že buňky s dvojitou mutací *prp45(1-169)*  $\Delta$ *Gcn5* vykazují syntetický efekt na úrovni akumulace

pre-mRNA. Na základě toho předpokládáme, že Prp45 nepůsobí na sestavování spliceosomu prostřednictvím acetylace histonů, ale že Prp45 působí v časně fázi sestřihu paralelně s acetylací.

U ubikvitinylace H2B se prokázalo, že ligasa Bre1, která ji zprostředkovává, geneticky interaguje s proteinem Npl3 účastnícím se sestřihu pre-mRNA a také, že Ub-H2B je důležitá pro navazování sestřihových faktorů U1 a U2 snRNP na syntetizující se pre-mRNA v časně fázi sestřihu [52,53]. Na základě toho předpokládáme, že by mohl Prp45 působit na sestavování spliceosomu v časně fázi sestřihu pre-mRNA prostřednictvím ubikvitinylace.

Další alternativní hypotézou je, že aberantní navazování sestřihových faktorů není dáno ovlivněním chromatinových modifikací, ale že Prp45 může působit přímo změny ve struktuře chromatinu, které vytvoří chromatinové prostředí, které není kompatibilní pro sestavování spliceosomu. Testování těchto hypotéz je otázkou budoucího výzkumu.

## 6. ZÁVĚR

Cíle bakalářské práce byly splněny:

- Byly charakterizovány růstové vlastnosti divokého kmene, kmene s mutací *prp45(1-169)* a kmene s deletovanou histonmethyltransferasou Set1.
- Pro ověření správnosti formulované hypotézy byla zavedena metoda ChIP s využitím specifických protilátek proti epitopům histonu H3 a trimetylovanému H3K4.
- Bylo zjištěno, že protein Prp45 neovlivňuje sestavování spliceosomu v časně fázi sestřihu prostřednictvím trimethylace H3K4.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Feldmann, H.: Yeast: Molecular and Cell Biology. 2nd ed. Munich: Adolf Butenandt Institute, Molecular Biology (2012).
- [2] Sherman, F.: An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Encycl. Mol. Biol. Mol. Medicin* **6**, 302–325 (1997).
- [3] Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., et al.: Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563–567 (1996).
- [4] Sherman, F.: Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3–41 (2002).
- [5] Hinnen, A.: Transformation yeast. *Spring* **75**, 1929–1933 (1978).
- [6] Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., et al.: Molecular cell biology. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company (2003).
- [7] Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. Richmond, T. J.: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
- [8] Alberts, P., Johnson, B., Lewis, A., Raff, J., Roberts, M.: Molecular Biology of the Cell, 5th ed. New York: Garland Science (2008).
- [9] Biddick, R., Young, E. T.: Yeast Mediator and its role in transcriptional regulation. *Comptes Rendus - Biol.* **328**, 773–782 (2005).
- [10] Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., Martinez, E.: Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* **389**, 52–65 (2007).
- [11] Thomas, M. C., Chiang, C.-M.: The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178 (2006).
- [12] Sainsbury, S., Bernecky, C., Cramer, P.: Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 129–143 (2015).
- [13] Shandilya, J., Roberts, S. G. E.: The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1819**, 391–400 (2012).
- [14] Liu, X., Bushnell, D. A., Silva, D.-A., Huang, X., Kornberg, R. D.: Initiation complex structure and promoter proofreading. *Science* **333**, 633–637 (2011).
- [15] Li, B., Carey, M., Workman, J. L.: The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**, 707–719 (2007).

- [16] Clapier, C. R., Cairns, B. R.: The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273–304 (2009).
- [17] Kwak, H., Fuda, N. J., Core, L. J., Lis, J. T.: Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science* **339**, 950–953 (2013).
- [18] Adelman, K., Lis, J. T.: Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nature Reviews Genetics* **13**, 720–731 (2012).
- [19] Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S., Bentley, D.: Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. 2435–2440 (2000).
- [20] Venkatesh, S., Workman, J. L.: Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 178–189 (2015).
- [21] Schwartz, S. H., Silva, J., Burstein, D., Pupko, T., Eyras, E., et al.: Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome Res.* **18**, 88–103 (2008).
- [22] Brow, D. A.: Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 333–360 (2002).
- [23] Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuvéglise, C., et al.: Molecular evolution of eukaryotic genomes: Hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1121–1135 (2003).
- [24] Siliciano, P. G., Guthrie, C.: 5' splice site selection in yeast: genetic alterations in base-pairing with U1 reveal additional requirements. *Genes Dev.* **2**, 1258–1267 (1988).
- [25] Abovich, N., Rosbash, M.: Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell* **89**, 403–412 (1997).
- [26] Query, C. C., Moore, M. J., Sharp, P. A.: Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: Evidence for the bulged duplex model. *Genes Dev.* **8**, 587–597 (1994).
- [27] Chen, H., Cheng, S.: Functional roles of protein splicing factors. *Biosci. Rep.* **32**, 345–359 (2012).
- [28] Will, C. L., Lührmann, R.: Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–2 (2011).
- [29] Fabrizio, P., Dannenberg, J., Dube, P., Kastner, B., Stark, H., et al.: The Evolutionarily Conserved Core Design of the Catalytic Activation Step of the Yeast Spliceosome. *Mol. Cell* **36**, 593–608 (2009).
- [30] Sontheimer, E. J., Steitz, J. A.: The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome. *Science* **262**, 1989–1996 (1993).

- [31] Chan, S. P., Cheng, S. C.: The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 31190–31199 (2005).
- [32] Moore, M. J., Sharp, P. A.: Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* **365**, 364–368 (1993).
- [33] Company, M., Arenas, J., Abelson, J.: Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* **349**, 487–493 (1991).
- [34] Stevens, S. W., Ryan, D. E., Ge, H. Y., Moore, R. E., Young, M. K., et al.: Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal pentasnrNP. *Mol. Cell* **9**, 31–44 (2002).
- [35] Ohi, M. D., Gould, K. L.: Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA* **8**, 798–815 (2002).
- [36] Harris, S. D., Cheng, J., Pugh, T. A., Pringle, J. R.: Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I. On the number of genes and the identification of essential genes using temperature-sensitive-lethal mutations. *J. Mol. Biol.* **225**, 53–65 (1992).
- [37] Folk, P., Půta, F., Skružný, M. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: The concealed tie of dissimilar pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 629–640 (2004).
- [38] Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C. S., Beggs, J. D.: Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA* **9**, 138–150 (2003).
- [39] Gahura, O., Abrahámová, K., Skružný, M., Valentová, A., Munzarová, V., et al.: Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *J. Cell. Biochem.* **106**, 139–151 (2009).
- [40] Osheim, Y. N., Miller, O. L., Beyer, A. L.: RNP particles at splice junction sequences on *Drosophila* chorion transcripts. *Cell* **43**, 143–151 (1985).
- [41] Lopez, P. J., Séraphin, B.: Uncoupling yeast intron recognition from transcription with recursive splicing. *EMBO Rep.* **1**, 334–339 (2000).
- [42] Elliott, D. J., Rosbash, M.: Yeast pre-mRNA is composed of two populations with distinct kinetic properties. *Exp. Cell Res.* **229**, 181–188 (1996).
- [43] Kotovic, K. M., Lockshon, D., Boric, L., Neugebauer, K. M.: Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5768–5779 (2003).

- [44] Görnemann, J., Kotovic, K. M., Hujer, K., Neugebauer, K. M.: Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Mol. Cell* **19**, 53–63 (2005).
- [45] Lacadie, S. A., Rosbash, M.: Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5' ss base pairing in yeast. *Mol. Cell* **19**, 65–75 (2005).
- [46] Oesterreich, F. C., Preibisch, S., Neugebauer, K. M.: Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Mol. Cell* **40**, 571–581 (2010).
- [47] Alexander, R. D., Innocente, S. A., Barrass, J. D., Beggs, J. D.: Splicing-dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Mol. Cell* **40**, 582–593 (2010).
- [48] Oesterreich, F. C., Bieberstein, N., Neugebauer, K. M.: Pause locally, splice globally. *Trends in Cell Biology* **21**, 328–335 (2011).
- [49] Shieh, G. S., Pan, C.-H., Wu, J.-H., Sun, Y.-J., Wang, C.-C., et al.: H2B ubiquitylation is part of chromatin architecture that marks exon-intron structure in budding yeast. *BMC Genomics* **12**, 627 (2011).
- [50] Gunderson, F. Q., Johnson, T. L.: Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. *PLoS Genet.* **5**, (2009).
- [51] Gunderson, F. Q., Merkhofer, E. C., Johnson, T. L.: Dynamic histone acetylation is critical for cotranscriptional spliceosome assembly and spliceosomal rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2004–2009 (2011).
- [52] Moehle, E. A., Ryan, C. J., Krogan, N. J., Kress, T. L., Guthrie, C. The Yeast SR-Like Protein Npl3 Links Chromatin Modification to mRNA Processing. *PLoS Genet.* **8**, 1–15 (2012).
- [53] Hérissant, L., Moehle, E., Bertaccini, D., Van Dorsselaer, A., Schaeffer-Reiss, C., et al.: H2B ubiquitylation modulates spliceosome assembly and function in budding yeast. *Biol. Cell* **106**, 126–138 (2014).
- [54] Sun, Z.-W., Allis, C. D.: Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**, 104–108 (2002).
- [55] Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z.-W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., et al.: Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**, 498 (2002).
- [56] Sims, R. J., Millhouse, S., Chen, C. F., Lewis, B. A., Erdjument-Bromage, H., et al.: Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell* **28**, 665–676 (2007).



- [57] Sims, R. J., Reinberg, D.: Processing the H3K36me3 signature. *Nature genetics* **41**, 270–271 (2009).
- [58] Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., et al.: High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129**, 823–837 (2007).
- [59] Collas, P.: The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol. Biotechnol.* **45**, 87–100 (2010).
- [60] Schoppee Bortz, P. D., Wamhoff, B. R.: Chromatin immunoprecipitation (chip): Revisiting the efficacy of sample preparation, sonication, quantification of sheared dna, and analysis via pcr. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
- [61] Kuo, M. H., Allis, C. D.: In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* **19**, 425–433 (1999).
- [62] Spencer, V. A., Sun, J.-M., Li, L., Davie, J. R.: Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* **31**, 67–75 (2003).
- [63] Sikder, D., Kodadek, T.: Genomic studies of transcription factor-DNA interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **9**, 38–45 (2005).
- [64] Lee, T. I., Johnstone, S. E., Young, R. A. Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nat. Protoc.* **1**, 729–748 (2006).
- [65] Wei, C. L., Wu, Q., Vega, V. B., Chiu, K. P., Ng, P., et al.: A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**, 207–219 (2006).
- [66] Orlando, V., Strutt, H., Paro, R.: Analysis of Chromatin Structure by in vivo Formaldehyde Cross-Linking. *METHODS A Companion to Methods Enzymol.* **214**, 205–214 (1997).
- [67] Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V., Rao, U., Ranganathan, K., Elizabeth, J.: Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **16**, 400 (2012).
- [68] Puchtler, H., Meloan, S. N.: On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* **82**, 201–204 (1985).
- [69] Solomon, M. J., Varshavsky, A.: Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6470–6474 (1985).
- [70] Zhang, L., Zhang, K., Prändl, R., Schöffl, F.: Detecting DNA-binding of proteins in vivo by UV-crosslinking and immunoprecipitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 705–711 (2004).

- [71] Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., Weis-Garcia, F.: Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* **46**, 258–268 (2005).
- [72] [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=immunoglobulin+lambd-chains&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=immunoglobulin+lambd-chains&lang=1) (22.3.2015).
- [73] Ezhkova, E., Tansey, W. P. Chromatin immunoprecipitation to study protein-DNA interactions in budding yeast. *Methods Mol. Biol.* **313**, 225–244 (2006).
- [74] <http://epigenie.com/recognizing-a-great-chip-antibody/> (zobrazeno dne 8.5.2015).
- [75] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/antibody-products.html?TablePage=9679188> (zobrazeno dne 8.5.2015).
- [76] Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2002-2007 (2001).
- [77] Liu, C. L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S. L., et al.: Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol.* **3**, (2005).
- [78] <http://www.abcam.com/nav/primary-antibodies> (zobrazeno dne 18.5.2015).
- [79] Shukla, A., Stanojevic, N., Duan, Z., Sen, P., Bhaumik, S. R.: 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.* **26**, 3339–3352 (2006).

