

32 46

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



***Regulace alternativního sestřihu pre-mRNA***

Diplomová práce

**Tereza Tománková**

Školitel: Mgr. David Staněk, PhD.  
Konsultant: Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

Praha 2008

**Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Mgr. Davida Staňka, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.**

**Praha, 2.5.2008**

*Veronika Tománková*  
.....

Ráda bych poděkovala zejména svému školiteli Mgr. Davidu Staňkovi, PhD. za jeho odborné vedení, trpělivost a přátelský přístup při vypracovávání mé diplomové práce.

Děkuji také všem členům laboratoře RNA biologie Ústavu molekulární genetiky za jejich pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji také všem svým blízkým za jejich podporu během vypracovávání mé diplomové práce i během celého mého studia.

## Seznam zkratek

RNA pol II	RNA polymerasa II
Pre-mRNA	prekurzorová mRNA
snRNPs	small nuclear ribonucleoprotein particles (malé jaderné ribonukleoproteinové částice)
hnRNPs	heterogenous nuclear ribonucleoprotein particles (heterogenní jaderné ribonukleoproteinové částice)
FN	fibronectin
FN EDI exon (EDA, EIIIA)	exon obsažený v genu pro fibronectin (extra domain I)
FN EDII exon	exon obsažený v genu pro fibronectin (extra domain II)
ESE	exonic splicing enhancer (zesilovač exonového sestříhu)
ESS	exonic splicing silencer (zeslabovač exonového sestříhu)
ISE	intronic splicing enhancer (zesilovač intronového sestříhu)
HAT	histonová acetyltransferasa
HDAC	histonová deacetylasa
HDACi	inhibitor histonové deacetylasy
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetal calf serum
TSA	Trichostatin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
NaBut	Butyrát sodný
CHX	Cykloheximid
siRNA	jednovláknová RNA, zaměřená proti určité mRNA, specificky ji váže a degraduje ji

TBE	Tris-borát EDTA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
DTT	Dithiotreitol
Taq pol	DNA polymerasa získaná z termostabilní bakterie Thermophilus Aquaticus
NCAM	neural cell adhesion molecule (adhezní molekula neuronů)
MSD	muscle specific domain (svalově specifická doména)
MHC	myosin heavy chain (těžký řetězec myosinu)

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>2</b>
1.1 PRE-MRNA SESTŘIH .....	2
1.1.1 <i>Posttranskripční modifikace</i> .....	2
1.1.2 <i>Sestřihový komplex a sestřihové faktory</i> .....	2
1.1.3 <i>Mechanismus sestřihu</i> .....	3
1.2 ALTERNATIVNÍ PRE-MRNA SESTŘIH.....	5
1.2.1 <i>Definice alternativního sestřihu</i> .....	5
1.2.2 <i>Příklady alternativního sestřihu</i> .....	6
1.3 REGULACE ALTERNATIVNÍHO SESTŘIHU .....	8
1.3.1 <i>Vliv sestřihových faktorů na alternativní sestřih</i> .....	8
1.3.2 <i>Regulační sekvence alternativního sestřihu</i> .....	8
1.3.3 <i>Regulační proteiny Nova-1, Nova-2</i> .....	9
1.3.4 <i>Vliv RNA polymerasy II</i> .....	10
1.4 STRUKTURA CHROMATINU A JEHO MODIFIKACE.....	11
1.4.1 <i>Struktura chromatinu</i> .....	11
1.4.2 <i>Modifikace histonů</i> .....	11
1.4.3 <i>Methylace a fosforylace histonů</i> .....	12
1.5 ACETYLACE HISTONŮ A JEJÍ ROLE PŘI REGULACI GENOVÉ EXPRESE .....	13
1.5.1 <i>Acetylace histonů</i> .....	13
1.5.2 <i>Vliv acetylace histonů na modifikaci chromatinu</i> .....	14
1.5.3 <i>Histonové deacetylas a jejich inhibitory</i> .....	14
1.5.3.1 <i>Rozdělení histonových deacetylas</i> .....	14
1.5.3.2 <i>Lokalizace histonových deacetylas v buňkách</i> .....	15
1.5.3.3 <i>Mechanismus působení histonových deacetylas</i> .....	16
1.5.3.4 <i>Inhibitory histonových deacetylas</i> .....	16
1.5.3.5 <i>Acetylace histonů a pre-mRNA sestřih</i> .....	17
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>18</b>
<b>3. METODY.....</b>	<b>19</b>
3.1 PŘÍPRAVA BUNĚK.....	19
3.2 IZOLACE RNA .....	20
3.3 REVERZNÍ TRANSKRIPCE.....	20
3.4 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION = POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE) ....	21
<b>4. MATERIÁLY A PŘÍSTROJE .....</b>	<b>24</b>
4.1 MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE.....	24
4.2 PŘÍSTROJE .....	25
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>26</b>
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>35</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>38</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>39</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Pre-mRNA sestřih

### 1.1.1 Posttranskripční modifikace

Pre-mRNA sestřih je přesně regulovaný proces, ke kterému dochází po transkripci genů a který předchází translaci mRNA do proteinů.

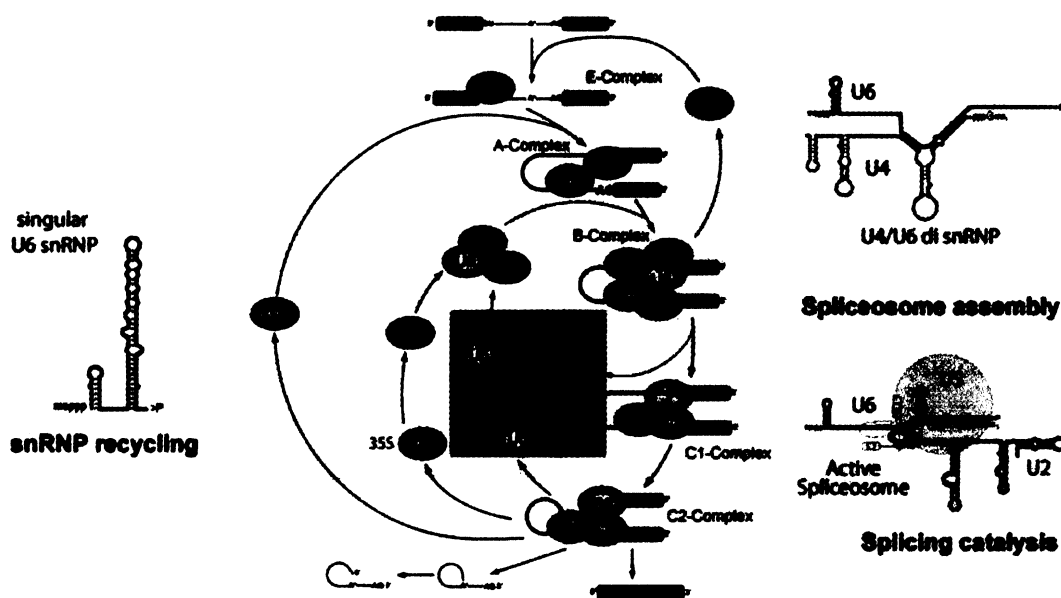
Jakmile je RNA syntetizována RNA polymerasou II (RNA pol II), podléhá několika posttranskripčním modifikacím. Jednou z nich je přidání guaninového nukleotidu na 5' konec primárního transkriptu, který je následně methylován a vytvoří se tzv. čepička. K tomuto procesu dochází ještě před dokončením transkripce celého genu. Další modifikací je polyadenylace, ke které dochází na 3' konci. U eukaryotních mRNA je nejdříve 3' konec naštěpen nukleázou a následně je na nově vytvořený konec mRNA přidána sekvence složená z několika stovek adeninů. Tak vzniká tzv. poly(A)-konec. Další modifikace je mnohem radikálnější a její podstata byla odhalena v roce 1977. Buněční biologové zjistili, že eukaryotní mRNA, transportovaná do cytoplazmy, je mnohem kratší než genomová sekvence, ze které byla přepsána, i když má stále na svých koncích čepičku a poly(A)-konec, a musí u ní tedy dojít k vyštěpení vnitřních úseků. Bylo zjištěno, že transkripcí genů vzniká primární transkript (pre-mRNA), obsahující kódující sekvence (exony), přerušované sekvencemi nekódujícími (introny). Tyto nekódující sekvence jsou v buněčném jádře vystřiženy v procesu zvaném pre-mRNA sestřih, a dochází tak ke spojení exonů za vzniku mRNA, která je následně transportována do cytoplazmy a tam překládána do proteinů [1].

### 1.1.2 Sestřihový komplex a sestřihové faktory

Důležitou roli v pre-mRNA sestřihu hraje rozpoznání sestřihového místa, které zahrnuje množství relativně slabých interakcí přispívajících k vytvoření komplexu, ve kterém dochází k sestřihu [2]. Tento komplex se nazývá sestřihový komplex a je složen

z pěti malých jaderných ribonukleoproteinových částic (snRNPs) a 50 – 100 proteinů [3, 4]. Je to dynamický „stroj“, vznikající pokaždé nanovo na pre-mRNA substrátu. Přestože první krok vzniku tohoto komplexu je energeticky nezávislý, následující kroky již vyžadují energii, získanou hydrolýzou NTP [5].

Sestřihový komplex vzniká navázáním U1 snRNP na pre-mRNA. Následně se váží U2 snRNP a U5 a U4/U6 snRNPs, U1 a U4 jsou destabilizovány a sestřihový komplex je aktivovaný. Takovéto uspořádání komplexu je zachováno od kvasinek až po savce [6]. Na molekulární úrovni korespondují jednotlivé kroky vzniku sestřihového komplexu se změnami v RNA:RNA interakcích. Tyto interakce se navzájem vylučující, vznik jedné vyžaduje přerušení druhé. Při navázání U5 a U4/U6 snRNPs dochází také k velkému počtu RNA:RNA přeskupení, jež jsou důležité pro sestřih [7] (Obr.1).



Obr.1: Sestřihový komplex (spliceosom) a sestřihové faktory (snRNPs) účastníci se procesu sestřihu (převzato z [http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Spliceosome\\_ball\\_cycle\\_new2.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Spliceosome_ball_cycle_new2.jpg)).

### 1.1.3 Mechanismus sestřihu

Proces sestřihu probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku atakuje 2' hydroxyl adenosinu branch pointu (větvičího bodu) 5' sestřihové místo, čímž dochází k rozštěpení



fosfodiesterové vazby a zároveň k vytvoření 2'5' fosfodiesterové vazby mezi branch pointem a 5' koncovým nukleotidem intronu. Při prvním kroku tedy vzniká 5' exon a intron-3' exon, s intronem ve formě lasa. Po další konformační změně uvnitř spliceosomu dochází ke druhému kroku. Nově uvolněný 3' hydroxyl 5' exonu, vytvořený při prvním kroku, atakuje 3' sestřihové místo, dochází k rozštěpení fosfodiesterové vazby a vytváří se nová fosfodiesterová vazba mezi 5' exonem a 3' exonem. Exony jsou tedy spojeny dohromady a intron je uvolněn ve formě lasa. Po dokončení druhého kroku se pak spliceosom rozvolní a jeho komponenty jsou obnoveny pro další koloběh sestřihu [8] (Obr.1).

V prvních krocích tvorby sestřihového komplexu dochází k rozpoznání specifických úseků na obou koncích intronu [9]. U1 snRNP se váže na 5' sestřihové místo. Tento faktor není vyžadován během transesterifikačních reakcí [10], je ale důležitý pro následnou výměnu za sestřihový faktor U6 [7]. U2 snRNP faktor (U2AF) rozpoznává oblast zvanou polypyrimidin-tract, respektive sekvenci AG na 3' konci intronu [11]. Sestřihový faktor 1 (SF1), nazývaný také branch-point-binding-protein (BBP), rozpoznává oblast zvanou branch point [12]. Na tuto oblast se následně v místě vazby BBP váže U2 snRNP [7]. Takový způsob záměny se zdá být prvním příkladem sestřihového komplexu, ve kterém jsou protein:RNA interakce nahrazeny RNA:RNA interakcemi [6]. Po připojení U4/U6.U5 tripletu snRNP ke spliceosomu dochází k velkému množství RNA:RNA přeskupení [7]. V tripletu snRNP se U6 váže komplementárně s U4 přes větve I a II. V kvasinkách je tato interakce, zahrnující 24 párů bazí, velmi stabilní [6]. I přes tuto stabilitu jsou obě větve U4/U6 interakce porušeny během přestavby spliceosomu a jeho aktivace [7].

Po spojení exonů je vytvořená mRNA ze spliceosomu uvolněna. Spliceosom pak musí být následně transformován, aby byl umožněn další proces sestřihu. Dochází k rozvolnění komplexu lasovitého intronu vázaného na snRNPs, lasovitý intron je degradován a snRNPs se mohou zapojit do další reakce. Uvolnění mRNA, rozvolnění a obnovení snRNPs vyžadují rozsáhlá RNA:RNA přeskupení. Komplementární vazba U6 na 5' sestřihové místo, vazba U2 na branch point a vazba U5 na exony musí být přerušena, navíc musí být znovu obnovena konformace U2, U4 a U6 [6].

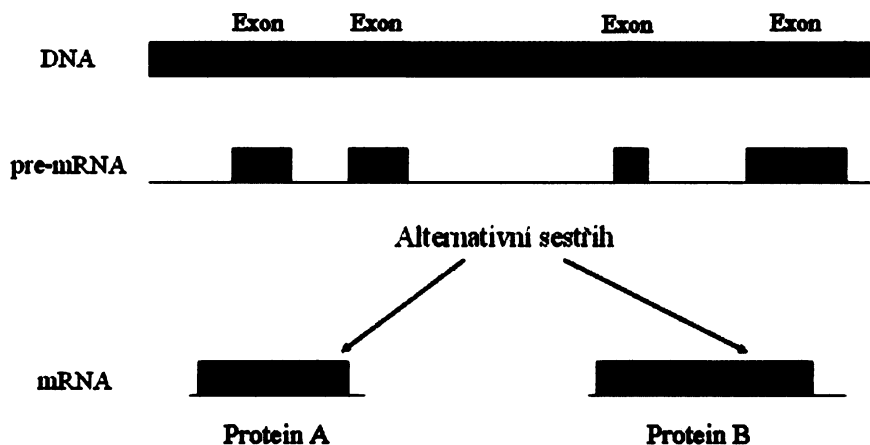
Při sestřihu hrají důležitou roli také specifické proteiny, které asociují s primárními transkripty a tvoří tak hustě sbalené ribonukleoproteinové komplexy, zvané heterogenní jaderné ribonukleoproteinové částice (hnRNPs) [13, 14]. Tyto asociované proteiny obsahují různé typy RNA-vázajících motivů a domén bohatých na glycin a ostatní

aminokyseliny (kromě RS domén) a jejich uspořádání na mRNA má vliv na její osud v jádře [9]. Tyto hnPNR proteiny se sdružují s pre-mRNA do pravidelných 40S struktur, srovnatelných s nukleosomálním sbalením DNA [13]. Tímto sbalením se k sobě mohou přiblížit i vzdálené oblasti a mohou tedy vznikat komplexy přes intron. Ty jsou účinnější než komplexy přes exon a mají za následek lepší zahrnutí exonů se slabými sestřihovými místy. Rozpoznání sestřihového místa přes intron závisí na délce tohoto intronu a oslabuje se, když má intron 200-250 nukleotidů. Za touto hranicí jsou již rozpoznávána sestřihová místa přes exon. Velikost intronu tedy ovlivňuje, jakým způsobem bude exon sestřižen. V případě, že je exon lemován dlouhými introny, je pravděpodobnější přeskočení tohoto exonu namísto jeho zavedení do mRNA [15]. Pokud však je exon lemován introny malými, pak je do mRNA začleněn [16]. V lidském genomu je většina exonů krátká a intronů dlouhá [17], většina sestřihových míst je tedy rozpoznávána přes exony. Velikost a umístění lemujících intronů tedy kontroluje mechanismus rozpoznání sestřihového místa a ovlivňuje frekvenci a typ alternativního sestřihu pre-mRNA [15].

## **1.2 Alternativní pre-mRNA sestřih**

### **1.2.1 Definice alternativního sestřihu**

Pre-mRNA sestřih může probíhat rozličnými způsoby, a tak z jedné genomové sekvence může vzniknout několik různých mRNA kódujících různé proteiny, čímž se výrazně zvyšuje kódující kapacita geonomu (Obr.2, str.6). Expres genů je regulována selekcí alternativních míst a způsobu sestřihu a určitý typ exonu v jedné diferencované buňce může být součástí intronu v buňce druhé. Příkladem je krysí gen pro svalový protein  $\alpha$ -tropomyosin, který poskytuje různým sestřižením 7 tkáňově-specifických variant [18]. Tento sestřih, jehož výsledkem vznikají zabudováním nebo vystřižením určitých exonů různé mRNA, je nazýván alternativním pre-mRNA sestřihem a může fungovat i jako „vypínač“ genové exprese zavedením stop kodonů do mRNA, kdy dojde k předčasné terminaci translace. Je tedy proměnlivým mechanismem regulace genové exprese a vysvětluje vznik velkého množství různých druhů proteinů z relativně malého počtu genů.



Obr.2: Alternativní sestřih pre-mRNA dávající vznik dvěma různým proteinům (převzato z [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/images/alternative\\_splicing.gif](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/images/alternative_splicing.gif)).

### 1.2.2 Příklady alternativního sestřihu

Alternativní sestřih je dobře popsán pro případ proteinů ovlivňujících pohlaví mušky octomilky (*Drosophila*). Jedná se o dva samostatné mechanismy. V prvním případě obsahuje primární transkript proteinu *tra* (*transformer*) dvě alternativní místa sestřihu na 3' konci exonu 2. V případě využití tzv. proximálního místa sestřihu, které se nachází blíže k 5' konci exonu 1, dojde k determinaci samčího pohlaví, v případě využití druhého místa sestřihu, které se nachází blíže k 3' konci exonu 2 je determinováno samičí pohlaví octomilky. Tohle odlišné štěpení je dáno existencí stop kodonu UAG mezi těmito dvěma místy sestřihu. U samečka dojde k vazbě sestřihového faktoru U2AF a tím k odhalení stop kodonu, a protein *tra* tak nevzniká. U samic je však první místo sestřihu blokováno vazbou tzv. SXL proteinu (produkt tzv. sex-lethal genu *sxl*, který je funkční jen u samic), který blokuje vazbu U2AF. Ten se tedy váže do druhého místa sestřihu, nedojde k přečtení stop kodonu a vzniká tak funkční protein *tra*, který následně reguluje sestřih tzv. *doublesex* (*dsx*) pre-mRNA. První tři exony jsou vždy tvořeny nezávisle na pohlaví. U samečků však dochází k vystržení exonu 4 a vzniká tak tzv. DSX-M protein (male specific DSX protein). U samic dochází v přítomnosti funkčního proteinu *tra* k jeho vazbě do specifických míst v exonu 4, dojde tak k aktivaci alternativního místa sestřihu a ponechání

tohoto exonu v řetězci mRNA. Vzniká tak DSX-F protein (female specific DSX protein), který funguje jako represor specifických samčích genů [18].

Dalším příkladem alternativně sestřiženého genu je gen pro kalcitonin a protein spojený s kalcitoninem (calcitonin/calcitonin-gene-related-peptide – calcitonin/CGRP). Ten je alternativně sestřižen a polyadenylován. U většiny buněk je zahrnut exon 4 a zaveden polyA úsek na jeho 3' konci, zatímco u neuronálních buněk dochází k přeskočení exonu 4 a zavedení polyA úseku nacházejícím se dále po směru vlákna. Výběr alternativního 3' sestřihového místa a zároveň odlišného polyadenylačního místa u genu pro calcitonin/CGRP tak dává vznik buď kalciovému homeostatickému hormonu ve štítné žláze (exon 4 je zaveden) nebo vasodilatačnímu neuropeptidu v nervovém systému (exon 4 je přeskočen) [9].

Alternativním sestřihem vzniká také velké množství různých receptorů. Například takto vzniká přes 1000 různých isoform receptorů ze tří neurexinových genů [19, 20] nebo 576 proteinových variant *cSlo* genu pro draselný kanál v ptačím hlemýždi [21]. Alternativní sestřih participuje také na regulaci využití různých exonů u „genů podobným neuronálnímu cadherinu“ (neural cadherin-like genes) a dovoluje tak vznik celé rodině proteinů vázajících se na buněčný povrch [22, 23].

Dalším příkladem alternativního sestřihu je gen pro fibronectin (FN). U tohoto genu dochází k sestřihu ve třech specifických místech [24], čímž vzniká u lidí 20 různých polypeptidů [25, 26]. Jednou ze sestřihových oblastí je EDI exon (označovaný také jako EDA nebo EIIIA). Je selektivně vyštěpen z FN v mRNA produkované hepatocyty a zaveden v mnoha různých typech buněk [27]. Zavedení EDI exonu je závislé na sekvenci, obsahující 81 nukleotidů, která se nachází v centrální části exonu [28]. Tato oblast se skládá ze zesilovače exonového sestřihu bohatého na purin (exonic splicing enhancer, ESE) a dalšího exonového elementu umístěného 13 nukleotidů před ESE, který funguje jako zeslabovač exonového sestřihu (exonic splicing silencer, ESS) [27].

## **1.3 Regulace alternativního sestřihu**

### **1.3.1 Vliv sestřihových faktorů na alternativní sestřih**

Biochemické studie ukázaly, že výběr sestřihového místa může být regulován hnRNP a SR proteiny [29]. Tak například v závislosti na těchto proteinech mohou vznikat T a t proteiny SV40 viru ze stejné pre-mRNA použitím alternativního 5' sestřihového konce. Koncentrace SR proteinového sestřihového faktoru ASF (nazývaného také faktor 2 nebo SF2) ovlivňuje použití bližšího sestřihového místa. Při nízkých koncentracích tohoto faktoru se váže U1 snRNP pouze na funkčně silnější sestřihové místo. To znamená, že slabé 5' sestřihové místo není vybráno kvůli blízkosti silnějšího 3' sestřihového místa. Vyšší hladina tohoto faktoru naopak umožňuje navázání U1 snRNP na 5' sestřihová místa, i když se nacházejí blízko silnějšího 3' sestřihového místa [29, 30, 31].

Naopak, hnRNP A1 působí proti aktivitě SR proteinů, a způsobují tak výběr vzdálenějšího 5' sestřihového místa, neboť přístup bližšího místa pro ASF/SF2 může být blokován vazbou hnRNP A1 [9]. HnRNP A1 protein také reguluje sestřih pre-mRNA tím, že podporuje přeskočení exonu lemovaného optimálními vazebnými místy pro hnRNP A1. Interakce mezi hnRNP A1 proteiny vázanými na tato lemující místa také podporují sestřih vzdálenějších exonů tím, že jejich sestřihová místa přibližuje k sobě [32].

### **1.3.2 Regulační sekvence alternativního sestřihu**

Jednoduché protipůsobení individuálních hnRNP proteinů a sestřihových faktorů představuje základní operace mnohem komplexnější souhry faktorů a regulátorů, vedoucí k sestřihu [9]. K těmto komplexním souhrám dochází na určitých sekvencích v pre-mRNA. Jednou z nich jsou zeslabovače exonového sestřihu (ESS). P-element transposasy je produkován pouze v zárodečných buňkách *Drosophily*, v nichž dochází k vystřížení intronu 3. Inhibice sestřihu intronu 3 v somatické buňce vede naopak k tvorbě inhibitoru transposasy. V exonu 3 se nacházejí pseudo-5' sestřihová místa, jež fungují jako exonové zeslabovače (exonic silencers). Ty jsou v somatických buňkách vázány multiproteinovým komplexem obsahujícím hnRNP protein hrp48 a P-element inhibitor (PSI), jenž usnadňuje navázání U1 snRNP [33].

Další ze sekvencí, zesilovač exonového sestřihu (ESE) se nachází v genu dávajícím vznik oběma pohlavím u *Drosophily* (doublesex gene, *dsx*). Tento gen jsme již zmiňovali u popisu mechanismu alternativního sestřihu. V tomto genu se nachází exon 4, v němž jsou oblasti, obsahující šest opakujících se sekvencí 13 nukleotidů a sekvenci bohatou na purin (purine-rich element, PRE). Ty fungují jako exonové zesilovače, podporující zavedení exonu 4 do mRNA u samičího pohlaví [9]. Na těchto sekvencích se sdružují proteiny Tra a Tra2 s dalšími SR proteiny, a to RNA-vázající protein 1 (RNA-binding protein 1, RBP1) na opakujících se sekvencích a *Drosophila* sestřihový faktor/sestřihový faktor 2 (dASF/SF2) na PRE. Tento stabilní zesilovací komplex se může vytvořit pouze v přítomnosti všech tří proteinů [34]. Tra tedy působí jako specifický vypínač umožňující vznik samičího pohlaví.

Další z těchto sekvencí jsou zesilovače intronového sestřihu (ISE) a zeslabovače intronového sestřihu (ISS). Komplex sdružující se na zesilovači intronového sestřihu, jenž podporuje zavedení malého exonu v savčím genu *Src*, má určité podobnosti s komplexem zahrnutým v regulaci P-elementu, i když rozpoznávaná sekvence a výsledek působení jsou rozdílné. 18 nukleotidů dlouhý N1 exon se nachází mezi exony 3 a 4 v neuronech. Malá velikost exonu je důležitá pro jeho přeskočení u všech buněk kromě neuronů. Přeskočení exonu je také podporováno proteinem vázajícím polypyrimidin (PTB), nacházejícím se před i za exonem N1. Multiproteinový komplex obsahující hnRNPs a další faktory se vytváří za exonem N1 a má synergistický efekt se sekvencí na 5' konci exonu N1 [9].

Umístění faktorů na pre-mRNA hraje také důležitou roli ve výběru sestřihového místa. SR protein-vázající zesilovač adenoviru, nacházející se nad větvcím bodem, blokuje přístup U2 snRNP a způsobuje tak inhibici sestřihu. Když je však umístěný pod 3' větvcím bodem, působí jako zesilovač exonového sestřihu [35]. Tato inhibiční funkce SR proteinů záleží na jejich fosforylačním stavu [9].

### 1.3.3 Regulační proteiny Nova-1, Nova-2

V mozku je regulovaný alternativní sestřih předním mechanismem, díky němuž mohou neuronální buňky získat specializované molekulární struktury a regulační cesty potřebné k zachycení a přenosu signálů. Nové biologické funkce byly vytvořeny jemnými změnami v proteinové struktuře jako důsledek tkáňově specifických sestřihových drah. Proteinové isoformy, podílející se na vytváření synapsí, na zachycení neurotransmiteru a

fungující jako iontový kanál, jsou syntetizovány v neuronech s přídatným (obvykle malým) proteinovým segmentem, který se v ostatních typech buněk nenachází. To znamená, že odpovídající pre-mRNA je sestřihována stejným způsobem v různých typech buněk, ale pouze u neuronálních buněk dochází k aktivaci určitých sestřihových drah [36]. Nedávné studie ukázaly, že při regulaci tkáňově specifického sestřihu v mozku hraje důležitou roli specifický neuronální protein Nova-1 [37].

Nova-1 a jemu velmi podobný Nova-2 jsou RNA-vázající proteiny, poprvé identifikované jako autoimunní antigeny u pacientů s určitými formami paraneoplastických neurologických poruch [38]. RNA-vázající proteiny jsou hojné v buněčném jádře, kde sbalují vznikající transkripty a participují na dalších procesech RNA nebo na exportu RNA. V cytoplasmě pak regulují stabilitu mRNA, efektivitu translace nebo lokalizaci RNA [39, 40]. Nova proteiny byly objeveny unikátně v neuronálních mozkových buňkách, kde jsou lokalizovány v buněčném jádře, a proto se předpokládá, že by tyto proteiny mohly být tkáňově specifickými regulátory alternativního sestřihu [36]. Nedávné studie, zabývající se úlohou proteinů vázajících specifickou neuronální RNA v jádře a úlohou těchto molekul při přežití a vývoji neuronů, ukázaly, že Nova-1 je důležitý pro přežití neuronálních buněk v jejich postnatální fázi. Myš postrádající Nova-1 vypadá normálně při narození, ale umírá během asi 2 týdnů. Patologickým defektem je smrt neuronálních buněk v oblastech mozkového kmene a míchy, kde je Nova-1 exprimován [37].

#### **1.3.4 Vliv RNA polymerasy II**

Transkripce a procesy v pre-mRNA byly po dlouhou dobu považovány za nezávislé děje, než mnoho biochemických a cytologických experimentů dokázalo, že posttranslační modifikace pre-mRNA jako „nasazení“ čepičky, rozštěpení a následná polyadenylace a sestřih jsou úzce spojené s transkripcí RNA pol II [41, 42, 43, 44]. Spojení mezi transkripcí a alternativním sestřihem bylo prokázáno díky studiím, které ukázaly, že struktura promotoru ovlivňuje alternativní sestřih genu pro fibronectin (FN) [45, 46]. Byly provedeny studie efektů různých transkripčních aktivátorů na sestřih exonu FN EDI (extra domain I) a bylo dokázáno, že rychle postupující RNA pol II upřednostňuje přeskok exonu EDI, zatímco pomalu postupující RNA pol II upřednostňuje zavedení tohoto exonu do mRNA. V enzymu RNA pol II u *Drosophily* byla provedena bodová mutace, udělující enzymu pomalejší rychlost elongace a touto pomalou RNA pol II pak bylo stimulováno

zavedení exonu FN EDI [47]. Avšak zavedení dalších alternativních exonů jako FN-EDII a exonu 7B heterogenní jaderné ribonukleoproteinové částice A1 (hnRNPA1-E7B) již nebylo touto pomalou RNA pol II ovlivňováno. Důvodem je to, že zavedení těchto dvou exonů je kontrolováno intronovými regulačními sekvencemi [48, 49], zatímco zavedení exonu EDI je kontrolováno exonovými regulačními sekvencemi, a to exonovým zesilovačem sestřihu (ESE) [50].

## **1.4 Struktura chromatinu a jeho modifikace**

### **1.4.1 Struktura chromatinu**

U eukaryot je lineární molekula DNA sbalena v jádře do chromosomů za pomoci proteinů, navázaných na tuto molekulu DNA. Komplex DNA a proteinů se nazývá chromatin. Základní jednotkou chromatinu je nukleosom, který se skládá z molekuly DNA, dlouhé 147 nukleotidových párů, ovinuté dvakrát kolem komplexu osmi histonů. Ten obsahuje po dvou molekulách histonů H2A, H2B, H3 a H4. Každý nukleosom je oddělený řetězcem DNA dlouhým 10-60 nukleotidových párů. Vzniká tak 10-nm vlákno, připomínající korálky na niti. Toto uspořádání je dále sbaleno do kondenzovanější formy, kdy jsou nukleosomy těsně přiloženy k sobě a vytvářejí tak 30-nm vlákno, stabilizováno interakcemi mezi histony různých nukleosomů [51]. Vlákno je pak dále kondenzováno na několika úrovních a konečným sbalením vzniká chromosom, v němž je molekula DNA 10 000krát kratší než v rozvinuté formě [52].

### **1.4.2 Modifikace histonů**

Každé histonové jádro obsahuje globulární doménu, zprostředkovávající interakce histonů v histonovém oktameru a umožňující dvojité ovinutí molekuly DNA kolem tohoto oktameru. Každý z histonů obsahuje též řetězec, 25-30 aminokyselin dlouhý, který je bohatý na bazické aminokyseliny a nachází se na povrchu nukleosomu. Tyto histonové „ocasy“ nepřispívají ke struktuře jednotlivých nukleosomů ani k jejich stabilitě, ale hrají důležitou roli v kontrole sbalení nukleosomů do vyšších struktur a představují komplexní



povrch, na kterém dochází k protein-proteinovým interakcím a mnoha posttranslačním modifikacím jako jsou acetylace a methylace lysinu a argininu, fosforylace serinu a threoninu, ubikvitinace a ribosylace. Tyto modifikace mohou probíhat i několikastupňově, například lysin může přijímat jednu, dvě nebo i tři methylové skupiny a stejně tak i arginin může být mono- nebo di-methylovaný. Většina posttranslačních modifikací probíhá na amino- a karboxy- koncových částech histonů, ale stále více modifikací je objevováno i v centrálních částech histonů. Dá se říci, že skoro každý dostupný řetězec histonu může být terčem k posttranslačním modifikacím [51].

Modifikace histonů pravděpodobně kontrolují strukturu a funkci chromatinového vlákna, různé modifikace pak mají za následek odlišné funkční změny. Nedávné studie ukázaly, že kombinace modifikací histonů na specifických místech koreluje s určitými biologickými funkcemi. Například kombinace acetylace histonu H4 na lysinu 8, acetylace histonu H3 na lysinu 14 a fosforylace histonu H3 na serinu 10 podporuje transkripci. Naopak tri-methylace histonu H3 na lysinu 9 a neacetylované H3 a H4 histony vedou k represi transkripce [51].

### 1.4.3 Methylace a fosforylace histonů

Methylace histonů byla poprvé popsána v roce 1964 [53]. Přímá spojitost mezi methylací a transkripcí byla objevena zhruba o třicet let později, kdy bylo prokázáno, že histonová methyltransferasa CARM1, specifická pro arginin histonu H3, interaguje a spolupracuje s koaktivátorem receptoru pro steroidní hormon GRIP-1 při procesu aktivace transkripce [54]. Přednostně jsou methylovány histony H3 (na lysinech 4, 9, 27) a H4 (na lysinu 20), což prokázaly mnohé studie zabývající se modifikacemi histonů [55].

Fosforylace histonů hraje důležitou roli v procesech jako je transkripce, oprava DNA, apoptosa a kondensace chromosomů [56]. Bylo ukázáno, že fosforylace serinu 10 na histonu H3 koreluje s aktivací genů u savčích buněk [57], a také s indukcí transkripce během odezvy na teplotní šok u *Drosophily* [58]. Fosforylace histonu H2A koreluje s kondensací mitotického chromosomu a zdá se, že i zde hraje serin 10 klíčovou roli [56]. Například mutace serinu 10 v histonech *Tetrahymeny* způsobují abnormální kondensaci chromosomů a defektní separaci chromosomů během anafáze [52]. K fosforylaci histonu H3 dochází po aktivaci signálních drah vedoucích k poškození DNA. Například

konzervovaný úsek na karboxylovém konci histonu H2A u kvasinek a H2A.X u savců je velmi rychle fosforylován po vystavení činidlům poškozujícím DNA [59, 60]. K fosforylaci dochází na serinu 139 a je závislá na fosfatidylinositol-3-OH kinase Mec1 u kvasinek. Mec1-dependentní fosforylace serinu 139 je zřejmě potřebná k dobře fungující opravě DNA. To naznačuje, že fosforylace tedy zprostředkovává změny ve struktuře chromatinu a tím usnadňuje opravu DNA [52].

Fosforylace histonů se uplatňuje také při replikaci DNA. Studie fosforylačních míst na lidských histonech H1A a H1B během buněčného cyklu ukázaly, že fosforylace v jednom místě v C-koncové doméně histonu H1 předchází počátku replikace DNA, zatímco fosforylace druhého místa po ní následuje [61]. To vedlo k návrhu, že fosforylace H1 předcházející počátku replikace DNA může vést ke změně konformace chromatinu, což umožňuje replikaci DNA [62]. Byly provedeny studie, v nichž byly použity protilátky proti hyperfosforylovanému histonu H1 ke sledování závislosti replikace na fosforylaci histonu H1 během S-fáze. Bylo zjištěno, že fosforylace H1 působí jako první krok mechanismu, který umožňuje dekonkondensaci chromatinu a následně přístup specifických DNA-vazebných faktorů, důležitých při replikaci DNA i jiných regulačních procesech v buněčném cyklu [63]. Navíc, *in vivo* experimenty s mutanty, majícími defekt ve fosforylaci histonu H1, ukázaly, že snížená fosforylace H1 má za následek nedostatečnou replikaci DNA [64].

## **1.5 Acetylace histonů a její role při regulaci genové exprese**

### **1.5.1 Acetylace histonů**

Acetylace je nejvíce prozkoumanou modifikací histonů a je úzce spojená s aktivací transkripce u eukaryot [65, 66, 67]. K acetylaci histonů dochází na  $\text{NH}_3^+$  skupinách lysinových zbytků na N-koncových částech histonů. Je to reversibilní proces, při kterém je přenášena acetylová skupina z acetyl koenzymu A za pomoci enzymu histonové acetyltransferasy na  $\text{NH}_3^+$  skupinu lysinových zbytků [68]. Nejčastěji bývají acetylovány lysiny na pozicích 9, 14, 18, 23 na histonu H3 a lysiny na pozicích 5, 8, 12, 16 na histonu H4 [69]. Zavedením acetylových skupin na lysin se neutralizuje pozitivní náboj a zvyšuje

se hydrofobicita; při opačné reakci, deacetylaci, za pomoci enzymu histonové deacetylasy, jsou acetylové skupiny odstraněny a pozitivní náboj je obnoven [68].

## **1.5.2 Vliv acetylce histonů na modifikaci chromatinu**

Acetylce histonů neutralizuje bazický náboj koncových částí histonů, což může ovlivnit nukleosomální funkci několika způsoby. Dochází například ke snížení afinity N-koncových domén histonů k DNA [70]. Změna koncových částí histonů může také ovlivňovat interakci mezi nukleosomy a dalšími nehistonovými proteiny. Některé regulační proteiny mohou například přednostně interagovat s méně acetylovanými histony; acetylce histonů tak může být překážkou pro tyto interakce [68].

Mnohé studie, provedené od objevení acetylce histonů již před více než třiceti lety [71], prokázaly úzkou spojitost mezi acetylací histonů a transkripčně aktivním chromatinem. Hyperacetylované histony jsou spojeny s některými transkripčně aktivními doménami, zatímco hypoacetylované histony jsou soustředěny v místech, která jsou při transkripci potlačována [65]. Acetylací histonů dochází k rozvolnění chromatinu, transkripční faktory tak mohou snadněji přistupovat k nukleosomální DNA a zvyšuje se tak stupeň transkripce [72, 73, 74]. Nedávné studie pak ukázaly, že některé regulátory transkripce mají aktivity histonových acetyltransferas (HAT) a deacetylasy (HDAC), což potvrzuje důležitou roli acetylce a deacetylce v regulaci transkripce [68]. Dále se zaměříme pouze na histonové deacetylasy a jejich inhibitory, neboť těmi jsme se zabývali při naší práci.

## **1.5.3 Histonové deacetylasy a jejich inhibitory**

### **1.5.3.1 Rozdělení histonových deacetylasy**

Enzymy histonových deacetylasy nepůsobí samy, ale vytvářejí s dalšími proteiny represorové komplexy [75]. Podle proteinů, se kterými se váží, můžeme rozlišit dvě rodiny histonových deacetylasy (HDACs): SIR2 rodina  $\text{NAD}^+$ -dependentních HDACs, která byla objevena teprve nedávno a je zatím málo prozkoumána, a klasická rodina HDACs. Ta se dělí na třídy I a II [76, 77]. HDACs třídy I (HDAC1, 2, 3, 8) jsou příbuzné s transkripčním

regulátorem RPD3 u kvasinek, HDACs třídy II (HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10) mají domény podobné s HDA1, další deacetylase nalezenou u kvasinek [76]. Nedávno byla objevena nová deacetylase HDAC11, která je podobná HDACs třídy I, ale není zde zařazena z důvodu malé sekvenční podobnosti [78]. HDAC třídy I jsou exprimovány ve většině buněk, zatímco exprese HDACs třídy II je více omezena, což naznačuje, že mohou být zahrnuty do buněčné diferenciaci a procesu podporujícího vývoj [79, 80].

### 1.5.3.2 Lokalizace histonových deacetylase v buňkách

HDACs se nacházejí v jádře, některé mohou být i v cytosolu; záleží na jejich regulačních doménách [75]. HDAC1 a HDAC2 jsou lokalizovány výhradně v jádře [81], HDAC3 může být lokalizována i v cytoplasmě [77], HDAC8 se vyskytuje ve velmi malém množství v jádře [82]. HDAC třídy II jsou schopné pohybovat se dovnitř a ven z jádra jako odpověď na signály v buňce. HDAC6 se nachází převážně v cytoplasmě [83, 84], HDAC11 naopak v jádře [78]. HDAC10 může být lokalizována jak v jádře, tak i v cytoplasmě, ačkoli funkce této lokalizace nebyla zatím objasněna [85, 86]. HDAC9 může být cytosolická nebo jaderná, v závislosti na sestřižené variantě [84, 87].

Lokalizace HDAC4, 5 a 7 je přísně regulovaný proces. Pohyb těchto HDACs mezi jádrem a cytosolem byl značně prozkoumán u diferencujících svalových buněk [77, 88, 89]. U HDAC4 dochází k fosforylaci  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentní kinasou (CaMK) a následnému exportu do cytosolu. Tam je fosforylovaná HDAC4 vázána na cytosolický 14-3-3 protein, který ji tak zadržuje v cytosolu. Po spojení svalových buněk dochází k terminální diferenciaci, HDAC4 je díky svému sníženému fosforylačnímu stavu uvolněná z 14-3-3 proteinu a putuje zpátky do jádra. HDAC5 se zdržuje během proliferace svalových buněk v jádře a je určena k vycestování do cytosolu během diferenciaci, což je zprostředkováno CaMK, ale také doménou zodpovědnou za export z jádra [75]. HDAC7 je sekvenčně velmi podobná HDAC5, ale chybí jí doména zodpovědná za export z jádra. Za export z jádra do cytosolu je zde zodpovědná CaMK a vazba 14-3-3 [84, 90, 91].

### 1.5.3.3 Mechanismus působení histonových deacetylas

Mechanismus působení enzymů HDACs spočívá v odstranění acetylové skupiny z histonů, které jsou součástí nukleosomu. Hypoacetylace má za následek zmenšení prostoru mezi nukleosomem a kolem něj obtočenou DNA. Toto těsnější uspořádání snižuje přístupnost transkripčních faktorů a vede k represi transkripce [92, 93, 94]. Katalytická doména HDAC je tvořena sekvencí zhruba 390 aminokyselin, část úseku je konzervovaná. Aktivní místo je tvořeno jemně zakřiveným trubicovitým váčkem s rozšířenou spodní částí [95]. K odstranění acetylové skupiny dochází prostřednictvím systému přenosu náboje, ve kterém jsou zahrnuty dva přilehlé histidinové zbytky, dva aspartátové zbytky a jeden tyrosinový zbytek [79, 95]. Pro funkci tohoto systému je důležitá přítomnost kofaktorů, z nichž stěžejní jsou  $Zn^{2+}$  ionty, které se váží do vazebného místa ve spodní části váčku [75].

### 1.5.3.4 Inhibitory histonových deacetylas

Mnoho let studií vedlo k objevu různých typů HDAC inhibitorů, od těch s komplikovanou strukturou (Trichostatin A, TSA) až po ty velmi jednoduché (butyrát) [75]. Inhibitory HDACs (HDACi) způsobují hyperacetylaci histonů a následně pak aktivaci transkripce určitých genů díky relaxaci DNA v chromatinu [96]. Obecně mají HDACi schopnost indukovat potlačení růstu, diferenciaci nebo apoptosu rakovinných buněk *in vitro* a *in vivo* [96-107].

HDACi blokují přístup k aktivnímu místu HDAC (reversibilně nebo ireversibilně). Jeden z nejsilnějších prozkoumaných inhibitorů je Trichostatin (TSA). TSA je fermentační produkt *Streptomyces*, který působí jako silný inhibitor proliferace u nádorových buněk. TSA patří ke skupině hydroxamidových kyselin a účinkuje *in vitro* již při nanomolárních množstvích [108]. Další skupinou inhibitorů HDACs jsou mastné kyseliny s krátkými řetězci jako butyrát, fenylbutyrát a kyselina valproová. Tyto sloučeniny mají mnohem menší inhibiční účinky než TSA (účinkují při milimolárním množství). Třetí skupinou inhibitorů jsou cyklická tetrapeptidová antibiotika, která jsou charakterizována svou složitou strukturou a vysokým inhibičním potenciálem. Většina z těchto sloučenin jsou produkty bakterií nebo hub [75].

### **1.5.3.5 Acetylace histonů a pre-mRNA sestřih**

Vliv acetylace histonů na pre-mRNA sestřih byl prokázán již v roce 2002, kdy Alberto R. Kornblihtt s kolegy jako první ukázali vliv TSA na sestřih EDI exonu na plazmidu [109]. Zjistili, že mutant aktivační domény VP16 nazýván SW6, inhibující elongaci transkripce polymerasou II, způsobuje snížení pravděpodobnosti přeskočení exonu. Přeskočení exonu bylo naopak obnoveno v přítomnosti SW6 buď s SV40 zesilovačem nebo s HIV Tat proteinem, které specificky stimulují elongaci transkripce. Schopnost aktivátorů stimulovat elongaci transkripce polymerasou II korelovala s jejich schopností zvýšit pravděpodobnost přeskočení EDI exonu, inhibitor elongace pak způsobil zavedení EDI exonu. Použitím TSA jako inhibitoru histonových deacetylas, jenž stimuluje elongaci, pak došlo k inhibici zavedení EDI exonu a EDI exon byl přeskočen [109].

V bakalářské práci jsem ukázala, že acetylace histonů hraje roli při alternativním sestřihu endogenních pre-mRNA. V této práci byl studován vliv acetylace histonů na alternativní sestřih genu pro fibronectin. Jako inhibitor histonových deacetylas byl použit TSA a bylo dokázáno, že acetylace histonů podporuje přeskočení alternativního exonu a vytvoření kratší sestřižené formy mRNA [110]. V diplomové práci jsem na tuto skutečnost navázala a dále studium vlivu acetylace histonů na sestřih pre-mRNA rozšířila.

## 2. Cíl práce

**Zjištění vlivu acetylace histonů na alternativní sestřih pre-mRNA.**

## 3. Metody

### 3.1 Příprava buněk

Používali jsme lidskou buněčnou linii získanou z rakovinného epitelu děložního čípku. Buňky byly izolovány v roce 1951 z černošské ženy Henrietty Lacks (odtud název HeLa buňky) a jsou používány v mnoha laboratořích po celém světě. Buňky byly pěstovány v DMEM, které obsahovalo 10 % FCS (Fetal calf serum) a antibiotika. K inhibici histonových deacetylas jsme použili Trichostatin A (TSA) a butyrát sodný (NaBut). Při použití Trichostatinu A jsme do jedné petriho misky přidali TSA rozpuštěný v DMSO a do druhé petriho misky DMSO jako kontrolu. Bylo nutno přidat k mediu s buněčnou kulturou takové množství TSA o koncentraci 1 mg/ml, aby výsledná koncentrace v mediu byla 330 nmol/l. Bylo tedy nutno k mediu o objemu 7 ml přidat 7  $\mu$ l roztoku TSA, čímž jsme získali požadovanou koncentraci v roztoku. Do druhé petriho misky jsme přidali 7  $\mu$ l DMSO pro vytvoření stejného prostředí. Buněčné kultury jsme inkubovali po dobu 24 hodin při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.

Při použití butyrátu sodného bylo nutno přidat k mediu s buněčnou kulturou takové množství vodného roztoku NaBut o koncentraci 1 mol/l, aby výsledná koncentrace v mediu byla 5 mmol/l. Bylo tedy nutno k mediu o objemu 1 ml přidat 5  $\mu$ l roztoku NaBut, čímž jsme získali požadovanou koncentraci v roztoku. Buněčné kultury jsme inkubovali s NaBut po dobu 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 hodin při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>, neovlivněné buňky sloužily jako kontrola. Pro inhibici proteosyntézy jsme k buněčné kultuře přidali cykloheximid o koncentraci 100 mg/ml, do 1 ml media jsme přidali 1  $\mu$ l roztoku cykloheximidu [111]. Buněčné kultury jsme inkubovali po dobu 18 hodin při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.

Pro zjištění, která z histonových deacetylas ovlivňuje alternativní sestřih, jsme použili siRNA specifické proti mRNA HDAC1 a HDAC2. Pro každou HDAC jsem použili 3 různé siRNA zaměřené proti odlišným exonům. 0,5  $\mu$ l od každé z těchto siRNA (o koncentraci 25  $\mu$ mol/l) jsem inkubovali s 50  $\mu$ l DMEM bez FCS, stejně tak 0,75  $\mu$ l kontrolní siRNA, která není zaměřena proti žádné mRNA (o koncentraci 50  $\mu$ mol/l), jsme inkubovali s 50  $\mu$ l DMEM bez FCS po dobu 5-ti minut při laboratorní teplotě. Stejnou



dobu jsme inkubovali i druhý roztok, obsahující 3  $\mu\text{l}$  oligofectaminu a 12  $\mu\text{l}$  DMEM bez FCS. Po 5-ti minutách inkubace jsme tyto roztoky smíchali a inkubovali je 20 minut při laboratorní teplotě. Následně jsme je přidali k mediu s buněčnou kulturou a inkubovali je po dobu 48 hodin a 72 hodin při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.

Další buněčnou kulturou, kterou jsme používali, byly C2C12 buňky, myší svalové buňky (myoblasty), diferencující v myotubuly. Buňky byly pěstovány v DMEM, které obsahovalo 10 % FCS a antibiotika, pro diferenciaci buněk bylo použito DMEM, obsahující 2 % koňské serum a antibiotika. K buněčné kultuře jsme přidávali NaBut tak, aby výsledná koncentrace v mediu byla 5 mmol/l. NaBut jsem přidali k nediferencovaným buňkám a inkubovali je po dobu 24 hodin při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Po dobu 24 hodin jsme inkubovali také neovlivněné buňky, které sloužily jako kontrola. Část buněčné kultury, která nebyla ničím ovlivněna, jsme nechali diferencovat v diferenciačním mediu po dobu 48 hodin při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.2 Izolace RNA**

Z buněčné kultury jsme odsáli medium a přidali k ní roztok TRIZOLu, do každé z petriho misek 200  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku. Buněčné kultury jsme inkubovali 5 minut při laboratorní teplotě a roztok pipetovali nahoru a dolů, aby se DNA rozlámala. Roztoky jsme přenesli do zkumavek, přidali k nim 40  $\mu\text{l}$  chloroformu a protřepali. Centrifugovali jsme je 15 minut při 14 000 g a 4°C. Odebrali jsme horní fázi o objemu 120  $\mu\text{l}$  a přidali k ní 100  $\mu\text{l}$  isopropanolu, zamíchali a inkubovali 10 minut při laboratorní teplotě. Centrifugovali jsme 10 minut při 14 000 g a 4°C. Odebrali jsme supernatant a pelet na dně zkumavky promyli 250  $\mu\text{l}$  70 % ethanolu. Ethanol jsme odsáli a izolovanou RNA jsme vysušili, rozpustili ve 20  $\mu\text{l}$  dvakrát destilované vody a uchovávali při teplotě -20°C.

### **3.3 Reverzní transkripce**

Dalším krokem byla reverzní transkripce, proces, při kterém je RNA přepisována enzymem, zvaným reverzní transkriptasa, zpět do sekvence DNA. Tak vzniká komplementární DNA (cDNA), která následně slouží jako templát pro PCR.

Při reverzní transkripci izolované RNA jsme použili reverzní primer pro přepis genu pro fibronectin (Fib RT), v případě dalších testovaných genů jsme použili příslušné reverzní primery. Dále jsme použili 10 mM deoxy-nukleotidy a dvakrát destilovanou H<sub>2</sub>O. Množství jednotlivých látek jsou uvedena v tabulce (Tabulka 1).

	<b>Fib</b>
RNA	3 $\mu$ l
reverzní oligonukleotidové primery (2 $\mu$ M)	Fib RT: 1 $\mu$ l
deoxy-nukleotidy (10 mM)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9,5 $\mu$ l

Tabulka 1: Množství látek potřebných pro reverzní transkripci izolované RNA.

Pro reverzní transkripci jsme použili kit SuperScript III (Invitrogen). Připravené roztoky jsme inkubovali 5 minut při 65°C a poté jsme je dali na led. Přidali jsme k nim 4  $\mu$ l pufru (1st strand buffer), 1  $\mu$ l 0,1 M DTT a 0,5  $\mu$ l enzymu reverzní transkriptasa (SuperScript Reverse transcriptase III, 200U/ $\mu$ l). Roztoky jsme inkubovali 5 minut při laboratorní teplotě a poté 30 minut při 55°C a 15 minut při 70°C. Vytvořenou cDNA jsme uchovávali při teplotě -20°C.

### 3.4 PCR (Polymerase chain reaction = polymerasová řetězová reakce)

Pomocí PCR byla amplifikována cDNA, vytvořená reverzní transkripcí z izolované RNA. Pro tuto reakci byly použity oligonukleotidové primery (Fib a, Fib b), v případě dalších genů jsme pak použili příslušné oligonukleotidové primery pro tyto geny. Dále byly pro tuto reakci použity deoxy-nukleotidy, 10x PCR pufr, DNA-polymerasa (Taq pol, 5U/ $\mu$ l) a dvakrát destilovaná H<sub>2</sub>O. Použitá množství těchto látek jsou uvedena v tabulce (Tabulka 2, str.22). Amplifikovali jsme cDNA s použitím primerů Fib a a Fib b, RNA s použitím primerů Fib a a Fib b měla sloužit jako negativní kontrola.

	<b>Fib</b>	<b>NC</b>
cDNA	3 $\mu$ l	0,45 $\mu$ l
oligonukleotidové primery (100 $\mu$ M)	Fib a+b: 0,5 $\mu$ l	Fib a+b: 0,5 $\mu$ l
10x PCR pufr	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l
deoxy-nukleotidy (10 mM)	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Taq pol	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	16,5 $\mu$ l	19,05 $\mu$ l

**Tabulka 2: Množství látek potřebných pro amplifikaci cDNA pomocí PCR.**

**Fib** = cDNA s použitím primerů Fib a a Fib b, **NC** = negativní kontrola

5  $\mu$ l výsledné DNA bylo rozděleno ve 2 % agarosovém gelu v TBE obsahujícím Gel star (1:10 000) elektroforézou 1 hodinu při 75 V a pozorováno pod ultrafialovým světlem.

Oligonukleotidové primery, které jsme při naší práci používali, uvádíme v následující tabulce (Tabulka 3, str. 23).

<b>Fib - a</b>	5'- TGG AGT ACA ATG TCA GTG TTT – 3'
<b>Fib - b</b>	5'- CTG GAC CAA TGT TGG TGA ATC – 3'
<b>Fib - RT</b>	5'- AGT TGG TTA AAT CAA TGG ATG – 3'
<b>Bim - F</b>	5'- CTT GCC AGG CCT TCA ACC ACT AT – 3'
<b>Bim - R</b>	5'- ACA CCA GGC GGA CAA TGT AAC GTA – 3'
<b>e-cadherin - F</b>	5'- GTG GTT CAA GCT GCT GAC CTT CA – 3'
<b>e-cadherin - R</b>	5'- GGG CTT CAT TCA CAT CCA GCA CAT – 3'
<b>hnRNPA1 - F</b>	5'- GTG GCT TTG GTG GCA GC – 3'
<b>hnRNPA1 - R</b>	5'- CTT GGT TTC GTG GTT TTG CAA – 3'
<b>NCAM - F</b>	5'- GAC TGG CGG CCC TCA ACG GCA A – 3'
<b>NCAM - R</b>	5'- CCA GAT AGT GTC TGA TGG GGG A – 3'
<b>Myogenin - F</b>	5'- AGT GAA TGC AAC TCC CAC AGC – 3'
<b>Myogenin - R</b>	5'- CGT CTC TCG TAG GAG AAG ACT – 3'
<b>MHC - F</b>	5'- TGG TGG TTA AAC CAG AGG ACG – 3'
<b>MHC - R</b>	5'- GGT AGA GAC TGT TGC GGA TGG – 3'
<b>B-actin - F</b>	5'- TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G – 3'
<b>B-actin - R</b>	5'- TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C – 3'
<b>siRNA HDAC1_1</b>	5'- GCC GGU CAU GUC CAA AGU Att – 3'
<b>siRNA HDAC1_2</b>	5'- GGG AUA CUU UUA UGC AAC Ctt – 3'
<b>siRNA HDAC1_3</b>	5'- GGA CUG UCC AGU AUU CGA Utt – 3'
<b>siRNA HDAC2_1</b>	5'- GCC ACU GCC GAA GAA AUG Att – 3'
<b>siRNA HDAC2_2</b>	5'- GCU GUG AAG UUA AAC CGA Ctt – 3'
<b>siRNA HDAC2_3</b>	5'- GCC UAU UAU CUC AAA GGU Gtt – 3'

Tabulka 3: Seznam použitých primerů.

## 4. Materiály a přístroje

### 4.1 Materiály a chemikálie

Buněčná kultura (HeLa buňky, C2C12 buňky)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Invitrogen)

Trichostatin A (TSA - Sigma-Aldrich)

Butyrát sodný (NaBut – Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid (DMSO - Merck Schuchardt)

Cykloheximid (CHX - Calbiochem)

TRIZOL (Invitrogen)

Chloroform (Merck Shuchardt)

Isopropanol (Sigma-Aldrich)

70 % Ethanol, 100 % Ethanol

Dvakrát destilovaná H<sub>2</sub>O

siRNA proti HDAC1, HDAC2 (25 μM); negativní kontrola siRNA (50 μM) (Ambion)

Oligonukleotidové primery: 2 μM a 100 μM (Generi-biotech)

Deoxy-nukleotidy (10 mM) (Roche)

Kit SuperScript III (Invitrogen)

10x PCR pufr (MPI-CBG)

Taq polymerase (Taq pol - MPI-CBG)

Agarosa (AppliChemGmbH)

10x TBE pufr (Tris-borát EDTA)

Gel star (Cambrex)

Markery :100 bp, 1 000 bp (Fermentas)

## **4.2 Přístroje**

Zařízení pro elektroforézu (Bio - Rad)

MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad)

Centrifuge 5417R (Eppendorf)

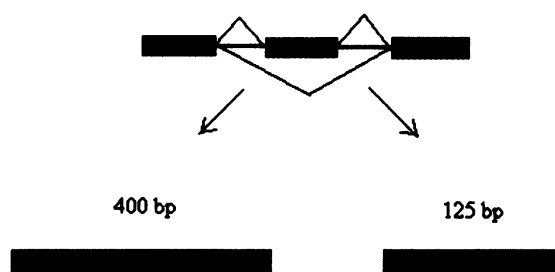
Biofuge pico (Heraeus)

Dry bath incubator (Sanyo)

Electronic UV transilluminator (Ultra-Lum)

## 5. Výsledky

V bakalářské práci [110] jsme studovali vliv acetylace histonů na alternativní sestřih na HeLa buňkách a zaměřili jsme se na gen pro fibronectin. Ten obsahuje exon, který může být vystřižen nebo zaveden do mRNA, a tak mohou alternativním sestřihem vzniknout dvě různé formy, přičemž v HeLa buňkách jsou produkovány obě formy mRNA. Forma se zavedeným alternativním exonem má velikost 400 párů bazí (bp = base pair), forma s vystřiženým alternativním exonem má velikost 125 párů bazí (Obr.3).



Obr.3: Dvě různě sestřižené formy fibronectinu: se zavedeným alternativním exonem (400 bp) a s vystřiženým alternativním exonem (125 bp).

Buňky byly inkubovány s Trichostatinem A, který specificky inhibuje histonové deacetylasy a způsobuje tak hyperacetylaci histonů, a bylo zjištěno, že vzniká více kratší sestřižené formy mRNA, ve které je alternativní exon přeskočen [110] (viz též Obr.4 d), str.30). V diplomové práci jsme na tuto skutečnost navázali a dále studovali vliv acetylace histonů na alternativní sestřih.

Nejprve jsme vyzkoušeli vliv acetylace histonů na alternativní sestřih některých dalších genů. Vybrali jsme si 3 různé geny (bim, e-cadherin , hnRNPA1), které jsou v HeLa buňkách alternativně sestřihovány za vzniku dvou různě dlouhých forem mRNA, a za pomoci TSA a NaBut testovali, jak bude ovlivněn alternativní sestřih. Gen pro fibronectin sloužil jako pozitivní kontrola (Obr.4, str.30). Buňky jsme inkubovali s TSA a s DMSO jako kontrolou, a také s NaBut o různých koncentracích. Izolovali jsme RNA a reverzní transkripcí ji převedli do cDNA s použitím reverzních primerů pro příslušné geny: bim-R, e-cadherin-R, hnRNPA1-R, Fib-R. Abychom mohli dobře detekovat dvě různě

dlouhé formy mRNA, vznikající alternativním sestřihem těchto genů, cDNA po reverzní transkripci jsme amplifikovali pomocí PCR a analyzovali na 2 % agarosovém gelu. V případě genu pro bim ( Obr.4 a), str.30) jsme buňky inkubovali s TSA (linie 2), s DMSO (linie 3), s NaBut o koncentraci 5 mmol/l (linie 4) a s NaBut o koncentraci 2,5 mmol/l (linie 5). Porovnáním dvou různých forem mRNA jsme konstatovali, že u tohoto genu nedochází po inhibici histonových deacetylas k žádným výrazným změnám v alternativním sestřihu. V případě genu pro e-cadherin ( Obr.4 b), str.30) jsme buňky inkubovali s TSA (linie 2) a s DMSO (linie 3). Ani zde jsme nepozorovali žádné výrazné změny v alternativním sestřihu. Dalším testovaným genem byl gen pro hnRNPA1 ( Obr.4 c), str.30). Buňky jsme inkubovali s NaBut o koncentraci 5 mmol/l (linie 3) a porovnávali změny v alternativním sestřihu tohoto genu oproti neovlivněným buňkám (linie 2). Stejně jako u dvou předchozích, ani u tohoto genu jsme nepozorovali žádné výrazné změny v alternativním sestřihu. Jako pozitivní kontrolu jsme použili gen pro fibronectin (Obr.4 d), str.30), u něhož jsme po inkubaci buněk s NaBut o koncentraci 5 mmol/l (linie 3) pozorovali výraznou změnu v alternativním sestřihu oproti neovlivněným buňkám (linie 2).

Vzhledem k tomu, že u žádného z dalších testovaných genů jsme nepozorovali po inhibici histonových deacetylas výrazné změny v alternativním sestřihu, vrátili jsme se k původně testovanému genu pro fibronectin, u něhož byly změny prokazatelné, a zaměřili jsme se na časový průběh vlivu inhibice histonových deacetylas na alternativní sestřih. Buňky byly inkubovány s 5 mM NaBut jako inhibitorem histonových deacetylas po dobu 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 hodin. Intenzity dvou různých forem mRNA izolovaných z buněk inkubovaných různě dlouhou dobu s NaBut jsme vyhodnotili pomocí programu Image J. Vypočítali jsme poměry relativních intenzit pro fibronectin s vystřiženým a zavedeným alternativním exonem a tyto poměry vztáhli na poměr intenzit těchto dvou forem u kontrolních buněk. Měření bylo provedeno čtyřikrát a průměrné hodnoty pro poměry relativních intenzit dvou různě sestřižených forem byly vyneseny do grafu v závislosti na čase (Graf 1, str.31). Z rostoucí křivky vyplývá, že během inkubace buněk s NaBut dochází ke změně v alternativním sestřihu ve prospěch vzniku kratší formy mRNA, ve které je alternativní exon přeskočen. Maximálních hodnot je dosaženo v rozmezí 15 – 24 hodin, kdy je vliv inhibice histonových deacetylas na alternativní sestřih největší.

Abychom vyloučili, že inhibice histonových deacetylas a následná hyperacetylace histonů má vliv na expresi určitých proteinových faktorů, které mohou až druhotně

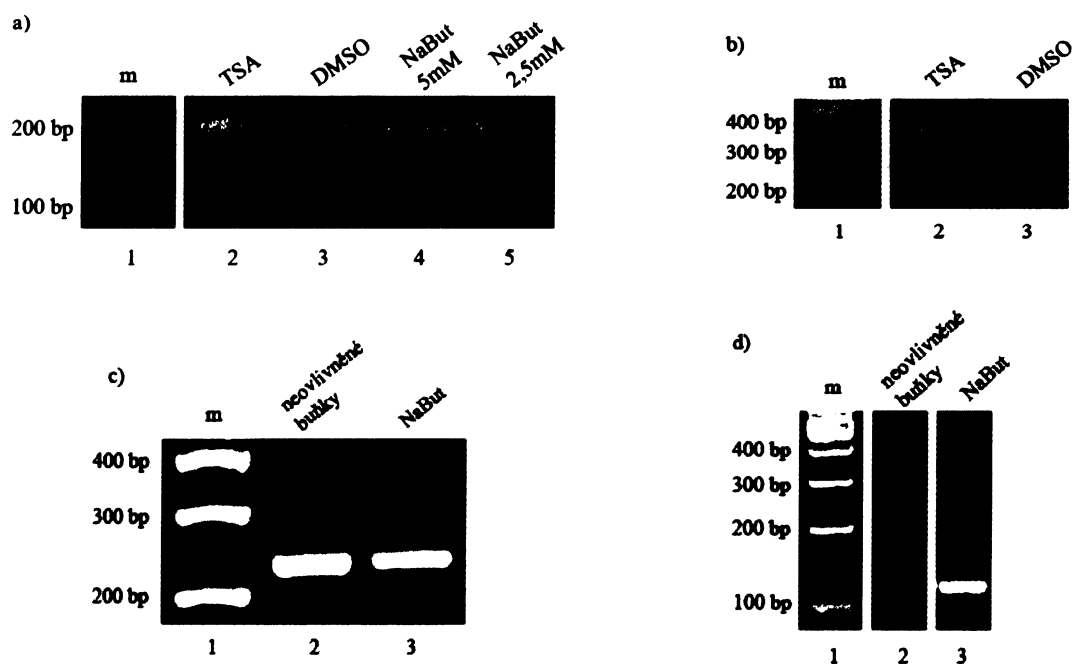


ovlivňovat alternativní sestřih, použili jsme cykloheximid (CHX), který je velmi účinným inhibitorem proteosyntézy. Buňky jsme nechali inkubovat po dobu 18 hodin pouze s NaBut a s NaBut společně s CHX. Neovlivněné buňky sloužily jako kontrola (Obr.5, str.32). U buněk inkubovaných s NaBut společně s CHX (linie 4) jsme pozorovali v porovnání s neovlivněnými buňkami (linie 2) nárůst kratší sestřižené formy mRNA.

Pro zjištění, která z histonových deacetylase ovlivňuje alternativní sestřih genu pro fibronectin, jsme použili siRNA specifické pro mRNA HDAC1 a HDAC2, které jsou nejhojnější a jsou lokalizovány výhradně v jádře [75]. siRNA jsou krátké RNA, zaměřené proti určitým mRNA, na které se specificky váží a degradují je. Buněčnou kulturu jsme inkubovali se směsí tří siRNA proti HDAC1 zaměřenými proti různým exonům, stejně tak pro HDAC2 jsme použili směs tří siRNA zaměřených proti různým exonům. Buňky jsme inkubovali s siRNA po dobu 48 hodin a 72 hodin. Buněčná kultura inkubovaná s siRNA, která není specifická pro žádnou mRNA, sloužila jako kontrola. Zároveň jsme inkubovali po dobu 24 hodin buňky s NaBut, které sloužily jako pozitivní kontrola, neovlivněné buňky pak sloužily pro negativní kontrolu (Obr.6, str.33). U buněk inkubovaných po dobu 48 hodin s siRNA proti HDAC1 (linie 3) jsme pozorovali změnu v alternativním sestřihu ve prospěch vzniku kratší sestřižené formy mRNA v porovnání s negativní kontrolou (linie 2) i s buňkami inkubovanými s siRNA proti HDAC2 (linie 4), u nichž jsme změnu v alternativním sestřihu nepozorovali. U buněk inkubovaných s siRNA po dobu 72 hodin jsme zaznamenali obdobný efekt. I zde došlo po inkubaci s siRNA proti HDAC1 (linie 6) ke změně poměru obou alternativních forem ve prospěch kratší sestřižené formy mRNA v porovnání s negativní kontrolou (linie 5) i s buňkami inkubovanými s siRNA proti HDAC2 (linie 7). Amplifikace s RNA templátem, který není metodou PCR amplifikován, sloužila jako kontrola pro zjištění kontaminace genomovou DNA (linie 11).

Vliv acetylase histonů na alternativní sestřih jsme studovali také na C2C12 buňkách, myších svalových buňkách (myoblastech) diferencujících v myotubuly. Pro použití těchto buněk jsme se rozhodli ze dvou důvodů. Při diferenciaci byly prokázány změny v alternativním sestřihu některých genů [112, 113, 114], a dále pak bylo zjištěno, že HDAC se při diferenciaci pohybují z jádra do cytoplasmy [115]. V této práci jsme chtěli otestovat, zda HDAC ovlivňují alternativní sestřih při diferenciaci. Zaměřili jsme se na gen pro NCAM (neural cell adhesion molecule = adhezní molekula neuronů), který je důležitým mediátorem buněčných interakcí nezávislých na vápníku, a studovali vliv NaBut na alternativní sestřih tohoto genu. V tomto genu se vyskytuje blok exonů, označovaný

jako MSD (muscle specific domain = svalově specifická doména), který je specificky zaváděn do mRNA u diferencovaných svalových buněk. Nediferencované myoblasty jsme inkubovali s NaBut po dobu 24 hodin v mediu podporujícím buněčné dělení, neovlivněné buňky sloužily jako kontrola. Část buněčné kultury jsme nechali diferencovat v diferenciačním mediu. Z buněk jsme izolovali RNA a reverzní transkripčí ji převedli do cDNA s použitím reverzního primeru pro NCAM. Vytvořenou cDNA jsme následně amplifikovali pomocí PCR a nanесли na 2 % agarosový gel. (Obr.7, horní výřez, str.34). U nediferencovaných buněk inkubovaných s NaBut (linie 3) jsme v porovnání s nediferencovanými neovlivněnými buňkami (linie 2) pozorovali změnu v alternativním sestřihu; došlo zde k vytvoření mRNA se zavedeným blokem exonů MSD. Tato forma mRNA se zavedeným blokem exonů byla v menším množství vytvořena i u diferencovaných neovlivněných buněk (linie 4). Exprese myogeninu sloužila jako marker diferencovaných buněk [116] (Obr.7, prostřední výřez, str.34),  $\beta$ -actin sloužil jako kontrola nanášky (Obr. 7, spodní výřez, str.34).

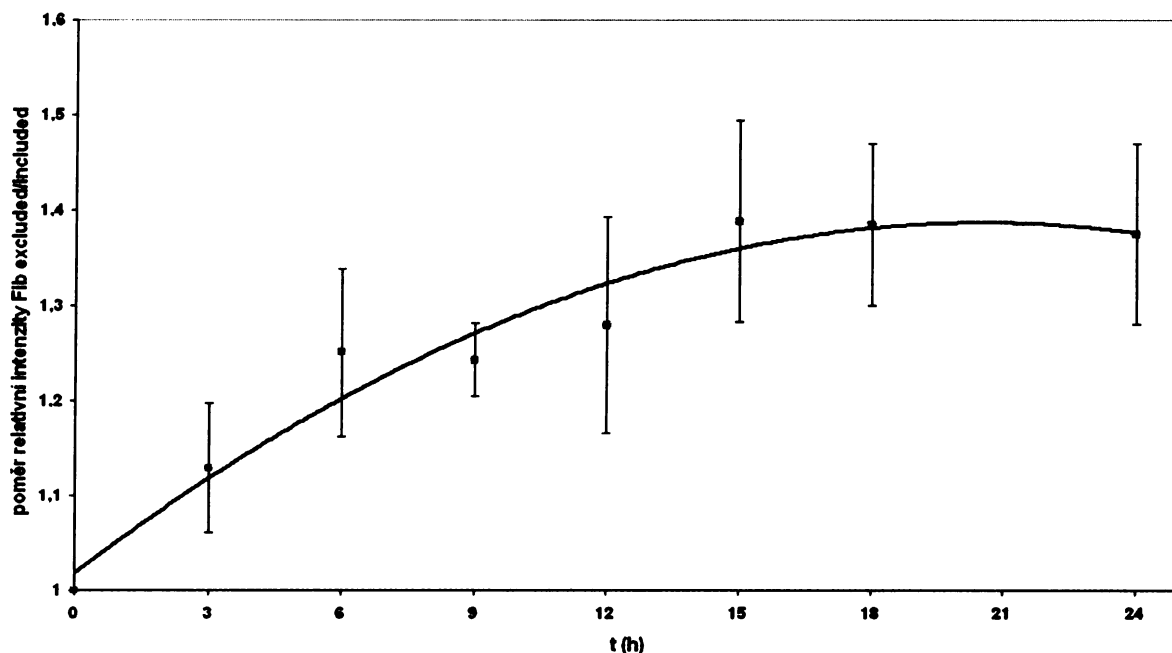


Obr.4: Vliv acetylace histonů na alternativní sestřih genu pro a) bim, b) e-cadherin, c) hnRNPA1, d) fibronectin.

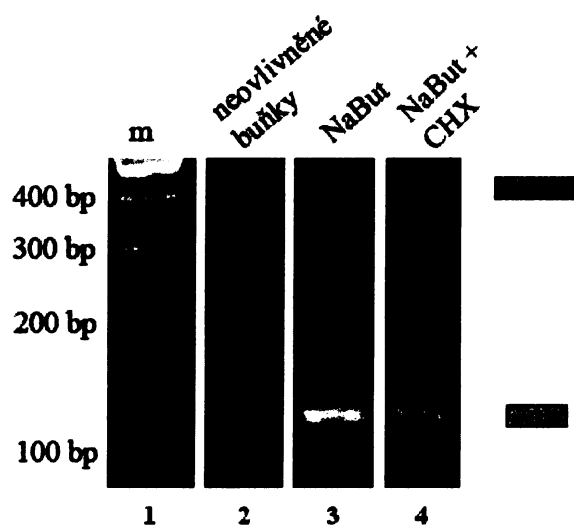
cDNA z HeLa buněk inkubovaných s TSA a NaBut, které působí jako inhibitory histonových deacetylaz, a cDNA z kontrolních buněk byla amplifikována pomocí PCR a analyzována na 2% agarosovém gelu. V linii 1 byl nanesen marker.

- a) U buněk inkubovaných s TSA (linie 2) a s NaBut o koncentraci 5 mM (linie 4) a 2,5 mM (linie 5) nebyly pozorovány žádné výrazné změny v alternativním sestřihu genu pro bim v porovnání s buňkami inkubovanými s DMSO (linie 3).
- b) U buněk inkubovaných s TSA (linie 2) jsme v porovnání s buňkami inkubovanými s DMSO (linie 3) taktéž nepozorovali žádné výrazné změny v alternativním sestřihu genu pro e-cadherin.
- c) U buněk inkubovaných s NaBut (linie 3) nebyla rovněž v porovnání s neovlivněnými buňkami (linie 2) pozorována výrazná změna v alternativním sestřihu genu pro hnRNPA1.
- d) Gen pro fibronectin sloužil jako pozitivní kontrola. U buněk inkubovaných s NaBut (linie 3) pozorujeme výraznou změnu v alternativním sestřihu v porovnání s neovlivněnými buňkami (linie 2).

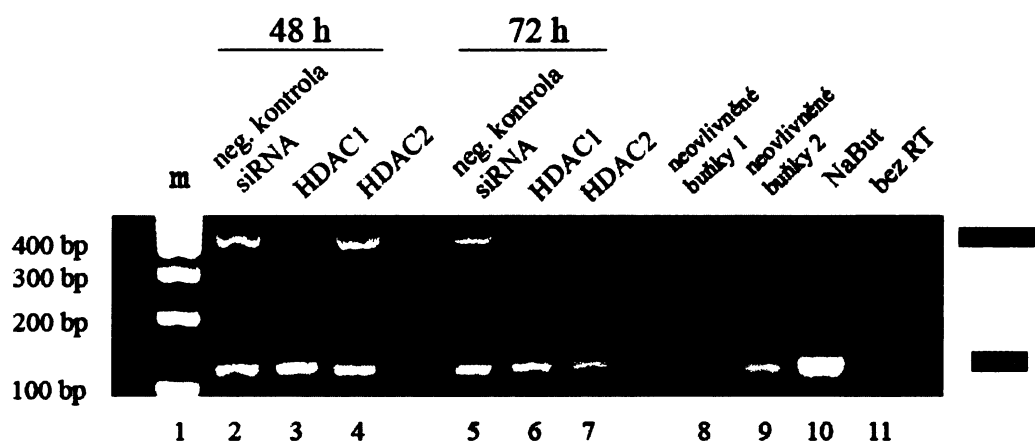
**Závislost poměru relativní intenzity pro Fib excluded/included na čase**



Graf 1: Závislost alternativního sestřihu fibronectinu na době inkubace s NaBut. Měření bylo provedeno čtyřikrát, chybové úsečky udávají standardní odchylku od průměru. Buňky byly inkubovány s NaBut po dobu 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 24h pro zjištění vlivu acetylce histonů na alternativní sestřih genu pro fibronectin v čase. Vypočítali jsme poměry relativních intenzit pro fibronectin s vystřiženým a zavedeným alternativním exonem (Fib excluded/included) a tyto poměry vztáhli na poměr intenzit těchto dvou forem u kontrolních buněk. Během 24 hodin docházelo ke změně v poměru dvou forem mRNA (se zavedeným a vystřiženým alternativním exonem) a narůstalo množství kratší formy mRNA, ve které byl alternativní exon vystřižen. Maximální změny alternativního sestřihu bylo dosaženo po 15 – 24 hodinách inkubace s NaBut.



Obr.5: Vliv inhibice proteosyntézy na změny v alternativním sestřihu způsobené NaBut. HeLa buňky byly inkubovány s NaBut a s CHX, který je silným inhibitorem proteosyntézy (linie 4), a alternativní sestřih fibronectinu byl porovnán s neovlivněnými buňkami (linie 2) a buňkami ovlivněnými jen NaBut (linie 3). Tyto výsledky ukazují, že inhibice histonových deacetylás ovlivňuje alternativní sestřih fibronectinu i po inhibici proteosyntézy.



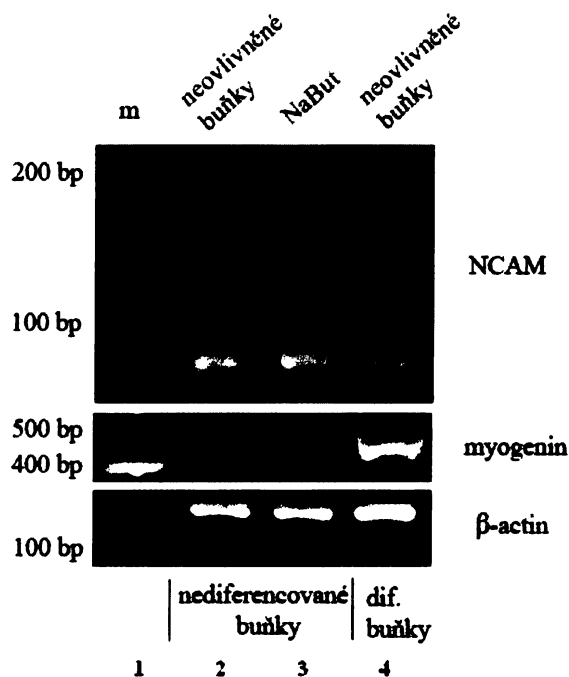
Obr.6: Vliv odstranění histonových deacetylasy 1 a 2 na alternativní sestřih fibronectinu. Pro odstranění HDAC1 a HDAC2 jsme použili siRNA specifické pro mRNA těchto deacetylasy a pozorovali vliv jejich odstranění na alternativní sestřih genu pro fibronectin. cDNA byla amplifikována pomocí PCR s použitím primerů pro fibronectin a analyzována na 2% agarosovém gelu.

U buněk inkubovaných po dobu 48 h s siRNA proti HDAC1 (linie 3) jsme pozorovali změnu v alternativním sestřihu genu pro fibronectin; bylo zde vytvořeno méně delší formy mRNA v porovnání s negativní kontrolou (linie 2) i s buňkami inkubovanými s siRNA proti HDAC2 (linie 4), u nichž jsme nepozorovali žádné změny.

Podobný efekt jsme pozorovali i u buněk inkubovaných po dobu 72 h s siRNA. I zde bylo vytvořeno méně delší formy mRNA u buněk inkubovaných s siRNA proti HDAC1 (linie 6) v porovnání s negativní kontrolou (linie 5) a s buňkami inkubovanými s siRNA proti HDAC2 (linie 7).

U buněk inkubovaných po dobu 24 h s NaBut (linie 10), který způsobuje inhibici histonových deacetylasy a byl použit jako kontrola, pozorujeme výrazný nárůst kratší sestřižené formy mRNA v porovnání s neovlivněnými buňkami (linie 8 a 9). Jako negativní kontrola pak byla použita RNA (linie 11), která není metodou PCR amplifikována.

V linii 1 byl nanesen marker.



Obr.7: Vliv acetylce histonů na alternativní sestřih genu pro NCAM.

Horní výřez: Nediferencované C2C12 buňky byly inkubovány s NaBut (linie 3) a alternativní sestřih NCAM porovnán s kontrolními nediferencovanými (linie 2) a diferencovanými buňkami (linie 4). V linii 1 byl nanesen marker.

Prostřední výřez: Myogenin sloužil jako marker diferenciace, jehož exprese se výrazně zvyšuje u diferencovaných buněk (linie 4) [116]. cDNA byla nanesena ve stejném pořadí jako u genu pro NCAM..

Spodní výřez:  $\beta$ -actin sloužil jako kontrola nanášky, cDNA byla nanesena ve stejném pořadí jako u předchozích.

## 6. Diskuse

Posttranslační modifikace histonů jsou důležitým faktorem pro modulaci struktury chromatinu a regulaci transkripce [117]. Nejprozkoumanější z těchto modifikací je acetylace histonů [75]. To, že by acetylace histonů mohla ovlivňovat alternativní sestřih pre-mRNA, bylo naznačeno v roce 2002, kdy skupina vědců ukázala, že inkubace buněk s TSA mění sestřih arteficiální pre-mRNA vnesené do buněk uměle na plasmidu. Bylo ukázáno, že po inkubaci s TSA dochází k větší pravděpodobnosti přeskočení EDI exonu [109]. V bakalářské práci [110] jsme ukázali vliv acetylace histonů na alternativní sestřih endogenních pre-mRNA. Na HeLa buňkách jsme studovali vliv acetylace histonů na alternativní sestřih genu pro fibronectin a ukázali jsme, že po inkubaci buněk s TSA dochází k přeskočení alternativního exonu a vytvoření většího množství sestřižené formy mRNA. V diplomové práci jsme na tyto výsledky navázali a při použití jiného inhibitoru histonových deacetylas, butyrátu sodného, jsme dospěli ke stejnému výsledku. Inhibicí histonových deacetylas tedy dochází k ovlivnění alternativního sestřihu ve prospěch vzniku kratší sestřižené formy mRNA, ve které je alternativní exon přeskočen.

Při studiu závislosti alternativního sestřihu na době inkubace s NaBut jsme ukázali, že maximální změny, a tedy největší pravděpodobnosti přeskočení alternativního exonu, je dosaženo po 15 – 24 hodinách. Jelikož histony jsou acetylovány v nejvyšší míře v rozmezí 3 – 6 hodin po přidání NaBut (nepublikované výsledky, Eva Dušková), ukazuje se, že nejdříve dochází k acetylaci histonů a následně pak k ovlivnění alternativního sestřihu. Změny v alternativním sestřihu se projevují pomaleji, neboť původní mRNA je stabilní a změny v poměru obou mRNA forem se tak projevují pomaleji.

Abychom potvrdili, že efekt inhibitorů HDAC je skutečně zprostředkován HDAC, dvě nejhojnější HDAC (HDAC1 a 2) jsme z buněk specificky odstranili pomocí siRNA a zjistili jsme, že odstraněním HDAC1 došlo ke změně v alternativním sestřihu genu pro fibronectin ve prospěch vzniku kratší sestřižené formy mRNA. Ukázali jsme tedy, že HDAC1 se účastní procesu alternativního sestřihu a jejím odstraněním dochází k podobnému efektu jako při inhibici butyrátem sodným. Z těchto výsledků vyplývá, že enzymatická aktivita HDAC1 ovlivňuje alternativní sestřih fibronectinu.

Vliv acetylace histonů na alternativní sestřih jsme studovali také na C2C12 buňkách (myoblastech), diferencujících v myotubuly. U těchto buněk byly při diferenciaci prokázány změny v alternativním sestřihu některých genů [112, 113, 114], a bylo také



zjištěno, že HDAC se při diferenciaci pohybují z jádra do cytoplasmy [115]. V této práci jsme chtěli otestovat, jestli HDAC mají vliv na alternativní sestřih podobně jako je tomu u HeLa buněk. Jako modelový gen jsme zvolili NCAM, u kterého dochází ke změnám alternativního sestřihu během diferenciaci svalových buněk. Ukázali jsme, že inhibice HDAC vyvolává u nediferencovaných buněk podobné změny v alternativním sestřihu, které jsou normálně pozorovatelné jen u diferencovaných svalových buněk. Při procesu diferenciaci svalových buněk hrají důležitou roli histonové deacetylas, které se pohybují mezi jádrem a cytoplazmou a svou lokalizací mohou ovlivnit diferenciaci myoblastů v myotubuly. HDAC5 se u nediferencovaných myoblastů nachází převážně v jádře, naopak při diferenciaci se pohybuje směrem z jádra do cytoplasmy [115]. Inkubací nediferencovaných buněk s NaBut tedy pravděpodobně dochází k inhibici histonové deacetylas, která je u myoblastů přítomna v jádře, a tato inhibice ovlivňuje alternativní sestřihu genu pro NCAM a stimuluje u něj zavedení bloku exonů MSD do mRNA. Inhibice HDAC u nediferencovaných buněk by tak mohla mít stejný efekt jako jejich přesun do cytoplasmy. U diferencovaných buněk pozorujeme také změnu v alternativním sestřihu a zavedení bloku exonů MSD do mRNA v porovnání s nediferencovanými buňkami, i když změna zde není tak výrazná jako po inkubaci s NaBut. Vysvětlením by mohla být skutečnost, že během diferenciaci není transportována z jádra do cytoplasmy veškerá histonová deacetylasa. Určitá část může v jádře zůstat, a tedy potlačovat zavedení bloku exonů do mRNA. Navíc je důležité, že změny v alternativním sestřihu po inhibici HDAC se projevují nezávisle na diferenciaci, neboť u buněk inkubovaných s NaBut nedochází k expresi diferenciačních markerů (myogenin – Obr.7, str.34; MHC – nepublikováno).

Jak jsme ukázali, inhibice histonových deacetylas a hyperacetylace histonů ovlivňuje alternativní sestřih pre-mRNA. Jakým způsobem by k tomuto ovlivnění mohlo docházet? Hyperacetylací histonů by mohla být stimulována exprese určitých proteinových faktorů, které by až druhotně mohly ovlivňovat alternativní sestřih. Pro vyloučení tohoto jevu jsme použili cykloheximid, který je účinným inhibitorem proteosyntézy, a ukázali jsme, že k ovlivnění alternativního sestřihu v důsledku inhibice histonových deacetylas dochází i po inhibici proteosyntézy. Přesto, že změna v alternativním sestřihu nebyla po inkubaci s NaBut a cykloheximidem tak výrazná jako po inkubaci pouze s NaBut, byla prokazatelná, a můžeme tedy říci, že hyperacetylace histonů nemá vliv na expresi proteinového faktoru, který by následně ovlivňoval alternativní sestřih.

V případě nedostatečné specifity histonových deacetylas by mohlo jejich inhibicí docházet také k acetylaci již přítomných proteinů, které by následně mohly mít vliv na alternativní sestřih. Na potvrzení či vyvrácení této hypotézy se v současné době pracuje.

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím alternativní sestřih je RNA polymerasa II. Při studiu alternativního sestřihu EDI exonu na plazmidu bylo zjištěno, že existuje korelace mezi rychlostí RNA polymerasy II a zavedením nebo vystřížením EDI exonu. Po stimulaci elongace transkripce docházelo k přeskočení EDI exonu, při pomalém průběhu transkripce naopak docházelo k zavedení EDI exonu do mRNA [109]. Rychlost, se kterou se RNA polymerasa II posouvá po vláknech DNA, závisí na struktuře chromatinu. Chromatin a jeho modifikace mají tedy zásadní význam pro regulaci transkripce. Mnohé studie již prokázaly úzkou spojitost mezi acylací histonů a transkripčně aktivním chromatinem. Acylace histonů dovoluje přístup transkripčních faktorů k vláknu DNA a usnadňuje tak proces transkripce [72, 73, 74]. Nedávné studie prokázaly, že hyperacetylované histony jsou rozpoznávány specifickými bromodomény chromatin-vázajících proteinů. Proteiny Brd2 a Brd3, obsahující dvě bromodomény, asociují přednostně *in vivo* s hyperacetylovaným chromatinem a usnadňují pohyb RNA polymerasy II po templátu během transkripce genů [117]. Hyperacetylaci histonů je tak stimulována vazba proteinů, které následně ovlivňují rychlost RNA polymerasy II, a tím mohou ovlivňovat i alternativní sestřih.

## 7. Závěr

V naší práci jsme navázali na výsledky bakalářské práce [110] a dále studovali vliv inhibice HDAC na alternativní sestřih na HeLa buňkách a C2C12 buňkách. Na HeLa buňkách jsme studovali vliv butyrátu sodného na alternativního sestřihu genu pro fibronectin a zjistili jsme, že NaBut má stejný vliv na alternativní sestřih tohoto genu jako jiný inhibitor histonových deacetylas, TSA. Dále jsme zmapovali závislost alternativního sestřihu na době inkubace s NaBut a zjistili jsme, že maximální změny v alternativním sestřihu, kdy docházelo k největší pravděpodobnosti přeskočení alternativního exonu, bylo dosaženo po 15 – 24 hodinách inkubace s NaBut. Odstraněním určitých histonových deacetylas pomocí specifických siRNA jsme ukázali, že histonová deacetylase HDAC1 hraje důležitou roli při alternativním sestřihu fibronectinu. Použitím cykloheximidu jako inhibitoru proteosyntézy jsme pak vyloučili úlohu proteinového regulátoru, jehož exprese by se mohla vlivem hyperacetylace histonů zvyšovat a druhotně tak ovlivňovat alternativní sestřih. Na C2C12 buňkách jsme studovali vliv acetylce histonů na gen pro NCAM a ukázali jsme, že u nediferencovaných buněk bylo inkubací s NaBut stimulováno zavedení bloku exonů MSD do mRNA, který je normálně zaveden jen u buněk diferencovaných. Všechny tyto výsledky jako první na světě ukazují na zásadní roli histonových deacetylas při regulaci alternativního sestřihu endogenních pre-mRNA.

## 8. Použitá literatura

1. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Essential cell biology. *Garland Publishing, Inc., New York USA* (1998)
2. Reed, R.: Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 215-220 (1996)
3. Burge, C. B. et al.: Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. *The RNA World* (2nd edn), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 525-560 (1999)
4. Kramer, A.: The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 367-409 (1996)
5. Moore, M. J., Query, C. C., Sharp, P. A.: Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. *The RNA World*, R. F. Gesteland and J. F. Atkins, eds., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 303-357 (1993)
6. Staley, J. P., Guthrie Ch.: Mechanical device of the spliceosome: Motors, clocks, springs and things. *Cell* **92** (1998)
7. Nilsen, T. W.: RNA-RNA interactions in nuclear pre-mRNA splicing. *RNA structure and function*, R. Simons and M. Grunberg-Manago, eds., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 279-307 (1998)
8. Nilsen, T. W.: The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* **25**, 1147-1148 (2003)
9. Smith, Ch. W. J., Valcárcel, J.: Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in Biochemical Science* **25**, 381-388 (2000)
10. Yean, S.-L., Lin, R.-J.: Analysis of small nuclear RNAs in a precatalytic spliceosome. *Gene Expr.* **5**, 301-313 (1996)
11. Moore, M. J.: Intron recognition comes of age. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 14-16 (2000)
12. Berglund, J. A. et al.: Teh splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**, 781-787 (1997)
13. McAfee, J. G. Et al.: The packaging of pre-mRNA. *Eukaryotic mRNA processing* (Krainer, A. R., ed.), Oxford University Press, 68-102 (1997)
14. Krecic, A. M., Swanson, M. S.: hnRNP complexes: composition, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 363-371 (1999)
15. Fox-Walsh, K. L., Yimeng Dou, Lam, B. J., She-pin Hung, Baldi, P. F., Hertel, K. J.: The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (45), 16176–16181 (2005)
16. Sterner, D. A., Carlo, T., Berget, S. M.: Architectural limits on split genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15081–15085 (1996)
17. Sakharkar, M. K., Chow, V. T., Kanguane, P., *Silico Biol.* **4**, 0032 (2004)
18. Malý, J.: Molekulární a buněčná biologie. Skriptum PřF Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Ústí nad Labem, 63-65 (2006)
19. Ullrich, B., Ushkaryov, Y. A., Sudhof, T. C.: Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* **14**, 497-507 (1995)
20. Missler, M., Sudhof, T. C.: Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet.* **14**, 20-26 (1998)
21. Black, D. L.: Splicing in the inner ear: a familiar tune, but what are the instruments? *Neuron* **20**, 165-168 (1998)

22. Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N., Yasuda, R., Watanabe, M., Ishii, H., Yasuda, M., Mishina, M., Yagi, T.: Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* **20**, 1137-1151 (1998)
23. Wu, Q., Maniatis, T.: A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* **97**, 779-790 (1999)
24. Caputi M., Baralle F. E., Melo C. A.: Analysis of the linkage between fibronectin alternative spliced sites during ageing in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* **1263**, 53-59 (1995)
25. Kornblihtt A. R., Pesce C. G., Alonso C. R., Cramer P., Srebrow A., Werbajh S., Muro A. F.: The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J.* **10**, 248-257 (1996)
26. Ffrench-Constant C.: Alternative splicing of fibronectin—many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res.*, **221**, 261-271 (1995)
27. Muro, A. F., Caputi, M., Rajalakshmi Pariyarath, Pagani, F., Buratti, E., Baralle, F. E.: Regulation of Fibronectin EDA Exon Alternative Splicing: Possible Role of RNA Secondary Structure for Enhancer Display. *Mol Cell Biol.* **19**(4), 2657-2671 (1999)
28. Mardon H. J., Sebastio G., Baralle F. E.: A role for exon sequences in alternative splicing of the human fibronectin gene. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7725-7733 (1987)
29. Cáceres, J. F., Krainer, A. R.: Mammalian pre-mRNA splicing factors. *Eukaryotic mRNA processing* (Krainer, A. R., ed.), Oxford University Press, 174-212 (1997)
30. Chabot, B.: Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends Genet.* **12**, 472-478 (1996)
31. Eperon, I. C. et al.: Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *EMBO J.* **9**, 3607-3617 (1993)
32. Blanchette, M., Chabot, B.: Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J.* **18**, 1939-1952 (1999)
33. Adams, M. D. et al.: Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 331-339 (1996)
34. Lunch, K. W., Maniatis, T.: Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes Dev.* **10**, 2089-2101 (1996)
35. Kanopka, A. et al.: Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* **381**, 535-538 (1996)
36. Grabowski, P. J.: Genetic evidence for a Nova regulator of alternative splicing in the brain. *Neuron* **25**, 254-256 (2000)
37. Jensen, K. B., Dredge, B. K., Stefani, G., Zhong, R., Buckanovich, R. J., Okano, H. J., Yang, Y. Y. L., Darnell, R. B. *Neuron* **25**, 359-371 (2000)
38. Darnell, R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4529-4536 (1996)
39. Dreyfuss, G., Manutis, M. J., Pinol-Roma, S., Burd, C. G., *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 289-321 (1993)
40. Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Hentze, M. W., *Trends Biochem. Sci.* **23**, 409-411 (1998)
41. Maniatis, T., Reed, R.: An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**, 499-506 (2002)
42. Bentley, D.: The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 336-342 (2002)

43. Proudfoot, N. J., Furger, A., Dye, M. J.: Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**, 501-512 (2002)
44. Neugebauer, K. M.: On the importance of being cotranscriptional. *J. Cell Sci.* **115**, 3865-3871 (2002)
45. Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., Kornblihtt, A. R.: Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11456-11460 (1997)
46. Cramer, P., Cáceres, J. F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A. F., Baralle, F. E., Kornblihtt, A. R.: Coupling of transcription with alternative splicing, RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol. Cell* **4**, 251-258 (1997)
47. Manuel de la Mata, Alonso, C. R., Kadener S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelish, F., Cramer, P., Bentley, D., Kornblihtt, A. R.: A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol. Cell* **12**, 525-532 (2003)
48. Lim, L. P., Sharp, P. A.: Alternative splicing of the EIIIB exon depends on specific TGCATG repeats. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3900-3906 (1998)
49. Simard, M., Chabot, B.: Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7353-7362 (2000)
50. Caputi, M., Casari, G., Guenzi, S., Tagliabue, R., Sidoli, A., Melo, C. A., Baralle, F. E.: A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic Acid Res.* **22**, 1018-1022 (1994)
51. Peterson, C. L., Laniel, M.-A.: Histones and histone modification. *Curr. Biology* **14**, R546-R551 (2004)
52. Grant, P. A.: A tale of histone modifications. *Genome Biology* **2**(4), 0003.1-0003.6 (2001)
53. Murray, K.: The occurrence of  $\epsilon$ -N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* **3**, 10-15 (1964)
54. Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., Stallcup, M. R.: Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**, 2174-2177 (1999)
55. Strahl, B. D., Obha, R., Cook, R. G., Allis, C. D.: Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahynema*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14967-14972 (1999)
56. Cheung, P., Allis, C. D., Sassone-Corsi, P.: Signaling to chromatin through histones modifications. *Cell* **103**, 263-271 (2000)
57. Thomson, S., Mahadevan, L. C., Clayton, A. L.: MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 205-214 (1999)
58. Nowak, S. J., Corces, V. G.: Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev.* **14**, 3003-3013 (2000)
59. Downs, J. A., Lowndes N. F., Jackson, S. P.: A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**, 1001-1004 (2000)
60. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W. M.: Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**, 905-916 (1999)
61. Ajiro, K., Borun, T. W., Shulman, S. D., Fadden, G. M., Cohen, L. H., *Biochemistry* **20**, 1454-1464 (1981)

62. Halmer, L., Gruss, C.: Effects of cell cycle dependent histone H1 phosphorylation on chromatin structure and chromatin replication. *Nucleic Acids Research* **24**(8), 1420-1427 (1996)
63. Lu, M. J., Dadd, C. A., Mizzen, C. A., Perry, C. A., McLachlan, D. R., Annunziato, A. T., Allis, C. D., *Chromosoma* **103**, 111-121 (1994)
64. Yasuda, H., Matsumoto, Y., Mita, S., Marunouchi, T., Yamada, M., *Biochemistry* **20**, 4414-4419 (1981)
65. Grunstein, M.: Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352 (1997)
66. Brownell, J. E., Allis, C. D.: Special HATs for special occasions: Linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 1176-1184 (1996)
67. Wolffe, A. P., Pruss, D.: Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**, 817-819 (1996)
68. Kuo, M.-H., Allis, C. D.: Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* **20**, 615-626 (1998)
69. Roth, S. Y., Denu, J. M., Allis, C. D.: Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81-120 (2001)
70. Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P., Bradbury, E. M.: Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 „tail“ to DNA. *J. Biol. Chem.* **268**, 305-314 (1993)
71. Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A. E.: Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 786-794 (1964)
72. Vettese-Dadey, M., Grant, P. A., Hebbes, T. R., Crane-Robinson, C., Allis, C. D., Workman, J. L.: Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.* **15**, 2508-2518 (1996)
73. Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., Wolffe, A. P.: A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**, 73-84 (1993)
74. Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G., Wolffe, A. P.: Histone acetylation: Influence on transcription by RNA polymerase, nucleosome mobility and positioning, and linker histone dependent transcriptional repression. *EMBO J.* **14**, 2209-2216 (1997)
75. De Ruijter, A. J. M., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., Van Kuilenburg, A. B. P.: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737-749 (2003)
76. Bjerling, P., Silverstein, R. A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S., Ekwall, K.: Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2170-2181 (2002)
77. Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., Verdin, E.: Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol. Cell* **9**, 45-57 (2002)
78. Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F., Atadja, P.: Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 25748-25755 (2002)

79. Buggy, J. J., Sideris, M. L., Mak, P., Lorimer, D. D., McIntosh, B., Clark, J. M.: Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem. J.* **350**, 199-205 (2000)
80. Galasinski, S. C., Resing, K. A., Goodrich, J. A., Ahn, N. G.: Phosphatase inhibition leads to histone deacetylase1/2 phosphorylation and disruption of co-repressor interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 19618-19626 (2002)
81. Johnstone, R. W.: Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **1**, 287-299 (2002)
82. Van den Wyngaert, I., De Vries, W., Kremer, A., Neefs, J., Verhasselt, P., Luyten, W. H., Kass, S. U.: Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett.* **478**, 77-83
83. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., Yao, T. P.: HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455-458 (2002)
84. Bertos, N. R., Wang, A. H., Yang, X. J.: Class II histone deacetylases: structure, function and regulation. *Biochem. Cell Biol.* **79**, 243-252 (2001)
85. Fischer, D. D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F. A., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P., Cohen, D.: Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem.* **277**, 6656-6666 (2002)
86. Kao, H. Y., Lee, C. H., Komarov, A., Han, C. C., Evans, R. M.: Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 187-193 (2002)
87. Zhou, X., Marks, P. A., Rifkind, R. A., Richon, V. M.: Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10572-10577 (2001)
88. Fischle, W., Dequiedt, F., Fillion, M., Hendzel, M. J., Voelter, W., Verdin, E.: Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 35826-35835
89. Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S., Schreiber, S. L.: Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 47733-47741 (2001)
90. Kao, H. Y., Verdel, A., Tsai, C. C., Simon, C., Juguilon, H., Khochbin, S.: Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J. Biol. Chem.* **276**, 47496-47507 (2001)
91. Dressel, U., Bailey, P. J., Wang, S. C., Downes, M., Evans, R. M., Muscat, G. E.: A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 17007-17013 (2001)
92. Wade, P. A.: Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 693-698 (2001)
93. Strahl, B. D., Allis, C. D.: The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45 (2000)
94. Yoshida, M., Furumai, R., Nishiyama, M., Komatsu, Y., Nishino, N., Horinouchi, S.: Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **48**, S20-S26 (2001)
95. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., Pavletich, N. P.: Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-193 (1999)



96. Suenaga, M., Soda, H., Oka, M., Yamaguchi, A., Nakatomi, K., Shiozawa, K., Kawabata, S., Kasai, T., Yamada, Y., Kamihira, S. et al.: Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* **97**, 621-625 (2002)
97. Ito, K., Barnes, P. J., Adock, I. M.: Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6891-6903 (2000)
98. Munster, P. N., Troso-Sandoval, T., Rosen, N., Rifkind, R., Marks, P. A., Richon, V. M.: The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 8492-8497 (2001)
99. Pelidis, M. A., Carducci, M. A., Simons, J. W.: Cytotoxic effects of sodium phenylbutyrate on human neuroblastoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **12**, 889-893 (1998)
100. Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., Heinzl, T.: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**, 6969-6978 (2001)
101. Della Ragione, F., Critini, V., Della Pietra, V., Borriello, A., Oliva, A., Indaco, S., Yamamoto, T., Zappia, V.: Genes modulated by histone acetylation as a new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett.* **499**, 199-204 (2001)
102. Remiszewski, S. W., Sambucetti, L. C., Atadja, P., Bair, K. W., Cornell, W. D., Green, M. A., Howell, K. L., Jung, M., Kwon, P., Trogani, N., Walker, H.: Inhibitors of human histone deacetylase: synthesis and enzyme and cellular activity of straight chain hydroxamates. *J. Med. Chem.* **45**, 753-757 (2002)
103. Lavoie, R., Bouchain, G., Frechette, S., Woo, S. H., Khalil, E. A., Leit, S., Fournel, M., Yan, P. T., Trachy-Bourget, M., Beaulieu, C. et al.: Design and synthesis of a novel class of histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2847-2850 (2001)
104. Kim, M. S., Son, M. W., Kim, W. B., In, P. Y., Moon, A.: Apicidin, an inhibitor of histone deacetylase, prevents H-ras-induced invasive phenotype. *Cancer Lett.* **157**, 23-30 (2000)
105. Sandor, V., Bakke, S., Robey, R. W., Kang, M. H., Blagosklonny, M. V., Bender, J., Brooks, R., Piekarz, R. L., Tucker, E., Figg, W. D. et al.: Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin. Cancer Res.* **8**, 718-728 (2002)
106. Marks, P. A., Rifkind, R., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., Kelly, W. K.: Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 194-202 (2001)
107. Kijima, M., Yoshida, M., Sugita, K., Horinouchi, S., Beppu, T.: Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **268**, 22429-22435 (1993)
108. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T.: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174-17179 (1990)
109. Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D., Kornblihtt, A. R.: Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **277**, 43110-43114 (2002)
110. Tománková, T.: Regulace pre-mRNA sestřihu v buněčném jádře. Bakalářská práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2006)

111. Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, Ch.-Ch., Kain, S. R.: Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem.* **273**, 34970-34975 (1998)
112. Boutz, P. L., Chawla, G., Stoilov, P., Black, D. L.: MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes&Development* **21**, 71-84 (2007)
113. Ichida, M., Endo, H., Ikeda, U., Matsuda, Ch., Ueno, E., Shimada, K., Kagawa, Y.: MyoD is indispensable for muscle-specific alternative splicing in mouse mitochondrial ATP synthase  $\gamma$ -subunit pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 8492-8501 (1998)
114. Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, H. E., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K., Inoue, K.: A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.* **22**, 905-912 (2003)
115. McKinsey, T. A., Zhang, Ch-L., Lu, J., Olson, E. N.: Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106-111 (2000)
116. Kaspar, P., Pajer, P., Sedlak, D., Tamaoki, T., Dvorak, M.: c-Myb inhibits myogenic differentiation through repression of MyoD. *Experimental Cell Research* **309**, 419-428 (2005)
117. LeRoy, G., Rickards, B., Flint, S. J.: The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acylation to transcription. *Molecular Cell* **30**, 51-60 (2008)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka