

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Biologie
Študijný odbor: Fyziologie buňky



Bc. Libuša Koval'ová

Vzťah medzi zostrihom a posttranslačnými modifikáciami chromatinu
u *Saccharomyces cerevisiae*

The relationship between splicing and posttranslational modifications of
chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*

Diplomová práca

Školiteľ: doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Konzultant: Mgr. Martina Hálová

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením 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, 13. 8. 2018

Libuša Kovařová

PodĎakovanie

V prvom rade by som rada poĎakovala svojmu školiteľovi doc. RNDr. Petrovi Folkovi, CSc. za odborné vedenie pri práci na diplomovom projekte a za všetky cenné rady a trpezlivý prístup pri spisovaní tejto práce.

Obzvlášť by som chcela poĎakovať Mgr. Martine Hálovej za podporu a za neskonalú trpezlivosť v priebehu vysvetľovania všetkých laboratórnych metód, ktoré mi umožnili získať popísané výsledky. Moje poĎakovanie patrí aj ostatným členom laboratória za vytvorenie kamarátskeho kolektívu a príjemnej pracovnej atmosféry.

Najviac by som chcela poĎakovať mojim rodičom, babičke, Veronike a Lubomírovi za ich veľkú podporu po celú dobu môjho štúdia. Kamarátom ďakujem za neustále povzbudenie.

Práca bola vypracovaná za finančnej podpory GAUK 8214.

ABSTRAKT

Protein Prp45, kvasinkový ortholog lidského transkripčního koregulátoru SNW1/SKIP, byl v literatuře doposud spojován pouze s regulací sestřihu pre-mRNA. Naše laboratoř odhalila, že protein Prp45 geneticky interaguje nejen s proteiny zahrnutými v sestřihu pre-mRNA, ale také s faktory důležitými pro elongaci transkripce a enzymy katalyzujícími chromatinové modifikace. Naše výsledky a rovněž i poznatky o lidském orthologovi SNW1/SKIP naznačují, že by Prp45 mohl sloužit jako regulátor propojující sestřih, transkripci a stav chromatinu u *S. cerevisiae*.

Hlavním cílem diplomového projektu bylo zjistit, zda protein Prp45, který je nezbytný pro kotranskripční sestavování spliceozomu, ovlivňuje posttranslační modifikace chromatinu na transkribovaných genech. Pomocí chromatinové imunoprecipitace nicméně nebyl potvrzen vliv mutace *prp45(1-169)* na profil trimethylace histonu H3 na lyzinu 4 a acetylace histonu H3 na lyzinech 9, 14 a 18 na lokusech transkripčně aktivních genů. Naším cílem také bylo průtokovou cytometrií analyzovat chování buněk synchronizovaných pomocí α -faktoru. Bylo ukázáno, že mutace *prp45(1-169)* vede k prodloužení buněčného cyklu. V rámci diplomového projektu byl pro účely sledování dynamiky nukleozomů v kmenech *S. cerevisiae* zaveden systém indukované exprese značeného histonu H3.

Výsledky ukazují, že trimethylace histonu H3 na lyzinu 4 není ovlivněna zpožděním sestřihu ve vztahu k transkripci, a tedy zřejmě není přímo zahrnuta v regulacích, které spřahují tyto procesy u *S. cerevisiae*.

Klíčová slova: Prp45, regulace genové exprese, histon H3, methylace, acetylace

ABSTRACT

Protein Prp45, the yeast ortholog of the human transcription coregulator SNW1/SKIP, has been previously associated only with the regulation of pre-mRNA splicing. However, our laboratory found that protein Prp45 genetically interacts not only with the proteins involved in pre-mRNA splicing, but also with factors important for transcription elongation and with chromatin modifying enzymes. Our data and the information about the human ortholog SNW1/SKIP suggest that Prp45 could serve as a regulator coupling splicing, transcription and chromatin state in *S. cerevisiae*.

The main aim of this diploma thesis was to find out whether the protein Prp45, which is essential for cotranscriptional assembly of the spliceosome, affects posttranslational modifications of chromatin on transcribed genes. Using chromatin immunoprecipitation, the influence of *prp45*(1-169) mutation on trimethylation of histone H3 at lysine 4 and acetylation of histone H3 at lysines 9, 14 and 18 on transcriptionally active genes was not confirmed. The other aim was to analyse the behavior of cells synchronized by α -factor by using flow cytometry. According to our results, *prp45*(1-169) mutation leads to the prolongation of the cell cycle. For the purpose of monitoring the dynamics of nucleosomes in *S. cerevisiae* strains, the system of induced expression of tagged histone H3 was introduced as part of the thesis.

Our results show that H3K4 trimethylation is not affected by the delay of splicing with respect to transcription. We assume that this modification is not directly involved in the coupling of these processes in *S. cerevisiae*.

Key words: Prp45, regulation of gene expression, histone H3, methylation, acetylation

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
OBSAH.....	6
ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	10
1. ÚVOD.....	14
2. LITERÁRNY PREHLAD	15
2.1 Štruktúra chromatínu.....	15
2.1.1 Pozícia nukleozómov v rámci genómu.....	17
2.1.2 Dynamika nukleozómov	20
2.1.2.1 Prestavby chromatínu v priebehu bunkového cyklu	21
2.1.2.2 Prestavby chromatínu v priebehu transkripcie	23
2.2 Vzťah medzi transkripciou, zostrihom a štruktúrou chromatínu	25
2.2.1 Posttranslačné modifikácie chromatínu	27
2.2.1.1 Acetylácia histónov	27
2.2.1.2 Metylácia histónov	30
2.2.1.3 Ubikvitinylácia histónu H2B na lyzíne 123	36
2.2.2 Histónový variant H2A.Z	38
2.3 Úloha zostrihového faktoru Prp45 v spriahnutí procesov génovej expresie.....	40
3. MATERIÁL A METÓDY	48
3.1 Materiál	48
3.1.1 Zoznam použitých mikroorganizmov	48
3.1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	48
3.1.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
3.1.2 Kultivačné média a roztoky	49
3.1.2.1 Kvasinkové kultivačné média.....	49
3.1.2.2 Bakteriálne kultivačné média	53
3.1.2.3 Všeobecne používané roztoky.....	54
3.1.3 Prehľad použitých enzýmov modifikujúcich DNA	55

3.1.3.1	Amplifikácia DNA pomocou PCR.....	55
3.1.3.2	Štiepenie DNA restričnými endonukleázami	55
3.1.4	Prehľad použitých izolačných a ďalších súprav	56
3.1.5	Prehľad použitých primerov	56
3.1.6	Prehľad použitých protilátok	58
3.1.7	Prehľad použitých plazmidov	59
3.1.8	Prehľad použitých veľkostných štandardov.....	59
3.2	Metódy	60
3.2.1	Kultivácia a transformácia použitých mikroorganizmov.....	60
3.2.1.1	Príprava glycerolových konzerv	60
3.2.1.2	Kultivácia kmeňov <i>S. cerevisiae</i> na pevnom a v tekutom médiu.....	60
3.2.1.3	Transformácia.....	61
3.2.2	Kríženie a sporulácia <i>S. cerevisiae</i>	63
3.2.3	Meranie rastovej krivky kmeňov <i>S. cerevisiae</i>	64
3.2.3.1	Ručné meranie rastovej krivky pomocou spektrofotometra.....	64
3.2.3.2	Meranie rastovej krivky pomocou prístroja Varioskan	64
3.2.3.3	Vzťahy pre výpočet generačnej doby	64
3.2.4	Techniky manipulácie s DNA.....	65
3.2.4.1	Izolácia plazmidovej DNA z <i>E. coli</i>	65
3.2.4.2	Izolácia genómovej DNA zo <i>S. cerevisiae</i>	67
3.2.4.3	Štiepenie DNA restričnými endonukleázami	68
3.2.4.4	Amplifikácia DNA pomocou PCR.....	68
3.2.4.4.1	Tvorba integračnej kazety URA3 z pRS316.....	69
3.2.4.4.2	Overovacia PCR z kolónií <i>S. cerevisiae</i>	70
3.2.4.5	Elektroforetická analýza DNA v agarózovom géle.....	71
3.2.4.6	Prečistenie produktov PCR pomocou NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).....	72
3.2.5	Synchronizácia buniek.....	72

3.2.5.1	Blokovanie buniek v S fáze bunkového cyklu pomocou hydroxymočoviny	72
3.2.5.2	Blokovanie buniek v G1 fáze bunkového cyklu pomocou α -faktoru.....	73
3.2.5.3	Synchronizácia buniek pomocou α -faktoru.....	73
3.2.5.4	Analýza buniek pomocou prietokovej cytometrie.....	74
3.2.6	Techniky manipulácie s proteínmi.....	75
3.2.6.1	Príprava proteínových extraktov <i>S. cerevisiae</i>	75
3.2.6.2	Tris-tricinová elektroforéza SDS-PAGE.....	76
3.2.6.3	Western blot (prenos proteínov na membránu pomocou Bio-Rad Trans-blot)	79
3.2.6.4	Imunodetekcia proteínov na membráne	80
3.2.7	Chromatínová imunoprecipitácia a následná kvantitatívna PCR	81
3.2.7.1	Chromatínová imunoprecipitácia	81
3.2.7.2	Stanovenie prítomnosti značeného proteínu myc-H3 v rôznych frakciách odobraných v priebehu ChIP	86
3.2.7.3	Kvantitatívna PCR.....	87
3.2.7.4	Vyhodnotenie a normalizácia dát qPCR.....	89
4.	CIELE DIPLOMOVÉHO PROJEKTU	91
5.	VÝSLEDKY	92
5.1	Optimalizácia stanovenia histónov pomocou chromatínovej imunoprecipitácie..	92
5.1.1	Testovanie rozdielov v signáloch ChIP histónov za vybraných experimentálnych podmienok.....	93
5.1.2	Porovnanie signálu ChIP histónu H3 za rôznych kultivačných podmienok..	97
5.2	Sledovanie posttranslačných modifikácií chromatínu v mutante <i>prp45(1-169)</i> .	104
5.2.1	Mutácia <i>prp45(1-169)</i> nemá vplyv na trimetyláciu H3K4	104
5.2.2	Acetylácia H3K9/18 a H3K14 nie je ovplyvnená mutáciou <i>prp45(1-169)</i> .	108
5.3	Sledovanie vplyvu mutácie <i>prp45(1-169)</i> na synchronizovaných bunkách <i>S. cerevisiae</i>	114
5.3.1	Príprava kmeňov s deléciou génu BAR1	114
5.3.1.1	Príprava kmeňov <i>bar1</i> Δ pomocou metódy <i>Delitto perfetto</i>	114

5.3.1.2	Príprava kmeňa <i>bar1Δ prp45(1-169)* set1Δ</i> krížením.....	117
5.3.2	Optimalizácia podmienok pre blokovanie kmeňov <i>bar1Δ</i> v G1 fáze bunkového cyklu.....	118
5.3.2.1	Porovnanie signálu ChIP histónu H3 v kmeňoch blokových v G1 fáze bunkového cyklu.....	120
5.3.3	Analýza správania sa synchronizovaných buniek <i>S. cerevisiae</i> pomocou prietokovej cytometrie.....	122
5.4	Príprava systému pre sledovanie obratu nukleozómov.....	128
5.4.1	Optimalizácia podmienok pre indukciu expresie myc-značeného histónu H3.....	129
5.4.2	Indukcia expresie myc-H3 za použitia rôznych kombinácií plazmidových konštruktov.....	132
6.	DISKUSIA.....	135
6.1	Vplyv mutácie <i>prp45(1-169)</i> na posttranslačné modifikácie chromatinu.....	136
6.1.1	Mutácia <i>prp45(1-169)</i> neovplyvňuje trimetyláciu histónu H3 na lyzíne 4.....	136
6.1.2	Vplyv alely <i>prp45(1-169)</i> na acetyláciu histónu H3 na lyzíne 9, 14 a 18.....	138
6.1.3	Pozorované rozdiely medzi výsledkami v závislosti na normalizácii dát.....	139
6.1.4	Ďalšie možnosti vplyvu Prp45 v časných fázach zostavovania spliceozómu.....	140
6.2	Vplyv mutácie <i>prp45(1-169)</i> na správanie sa synchronizovaných buniek.....	141
6.2.1	Bunkový cyklus je u mutanty <i>prp45(1-169)</i> predĺžený.....	142
6.2.2	Zohráva proteín Prp45 úlohu pri remodelácii chromatinu?.....	143
7.	ZHRNUTIE.....	145
8.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	146

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

3' ss	3' zostrihové miesto intrónu
5-FOA	kyselina 5-fluoroorotová
(d)NTP	(deoxy)ribonukleozidtrifosfát
A, Ade	adenín
AA	akrylamid
AD	aktivačná doména B112
<i>ADHI-UAS</i>	<i>ADHI</i> aktivačná sekvencia v oblasti promotoru
APS	amoniumpersulfát
ARS	autonómne replikujúca sa sekvencia
ATP	adenozíntrifosfát
BBP	„branchpoint“ väzbový proteín
BIS	N,N'-metylenbisakrylamid
bp	počet párov báz
BSA	hovädzí sérový albumín
C	cytozín
Cdc	cyklín-dependentná kináza
CEN	centromerický
COMPASS	komplex proteínov asociovaných so Set1
<i>C_p</i>	miera koncentrácie amplifikovanej DNA (crossing point)
CRISPR	úseky DNA obsahujúce krátke repetície nukleotidov (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
Cryo-EM	elektrónová kryomikroskopia
CTD	C-terminálna doména RNA polymerázy II
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DTT	ditiotreitól
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ER	receptor pre β -estradiol
FACT	komplex FACT (Facilitates chromatin transcription)
G	guanín
H, His	histidín
H2BK123ub	ubikvitinylácia histónu H2B na lyzíne 123

H3K4me/36me/79me	metylácia histónu H3 na lyzíne 4, 36 alebo 79
H3K9ac/14ac/18ac/23ac	acetylácia histónu H3 na lyzíne 9, 14, 18 alebo 23
HA	hemaglutinín
HAT	histónacetyltransferáza
HDAC	históndeacetyláza
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová
HM lokusy	oblasti kódované génmi dôležitými pre ustanovenie párovacieho typu
HMT	histónmetyltransferáza
HRP	chrenová peroxidáza
HU	hydroxymočovina
ChIP	chromatínová imunoprecipitácia
IgG	imunoglobulín G
IN	„input“
IP pufo	premývací pufo
IP	precipitát
IROs	„integrative recombinant oligonucleotides“
K, Lys	lyzín
kDa	kilodalton
L, Leu	leucín
L1, L2	slučky
LB pufo	bakteriálne živné médium (lysogeny broth)
LB	lyzačný pufo (lysis buffer)
LiAc	octan lítny
M	metionín
mRNA	mediátorová RNA
NC	nitrocelulóza
NDR	oblasť s depletovanými nukleozómami (nucleosome-depleted region)
NFR	oblasť s depletovanými nukleozómami (nucleosome-free region)
NK	negatívna kontrola
nt	nukleotid
NTC	komplex proteínov asociovaných s Prp19 (NineTeen complex)
NTR	proteíny asociované s NTC (NTC related)
OD	optická denzita
ORF	otvorený čítací rámec

OUT	„output“
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovom géle
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PE	polyetylén
PEG	polyetylénglykol
PI	propidium jodid
PK	pozitívna kontrola
poly(dA:dT)	homopolymerické sekvencie bohaté na adenín a tymín
PPIL1	peptidyl-prolyl izomeráza (peptidyl-prolyl isomerase-like 1)
pre-mRNA	prekursorová mediátorová RNA (precursor messenger RNA)
Prp45	zostrihový faktor, proteín SNW (pre-mRNA processing protein 45)
pSer2	fosforylovaný serín CTD na pozícii 2
pSer5	fosforylovaný serín CTD na pozícii 5
P-TEFb	pozitívny transkripčný elongačný faktor b
P _{target}	promotor génu
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
R	arginín
rDNA	ribosomálna DNA
RES	Sub-komplex proteínov – súčasť spliceozómu (pre-mRNA retention and splicing)
RNA Pol II	RNA polymeráza II
RNA	kyselina ribonukleová
RNA-seq	sekvenovanie transkriptomu (RNA-sequencing)
rpm	otáčky za minútu
RT	izbová teplota
RT-qPCR	reverzná transkripcia nasledovaná kvantitatívnou PCR
SAGA	histónacetyltransferázový komplex (Spt/Ada/Gcn5/Ada)
SALSA/SLIK	histónacetyltransferázový komplex (SAGA-altered, Spt8 absent/SAGA-like)
SB pufor	pufor boritanu sodného
SD médium	definované médium pre kultiváciu kvasiniek
SDS	dodecylsulfát sodný
SMIT	„Single-molecule intron tracking“
snRNA	malá jadrová RNA
snRNP	malá jadrová ribonukleoproteínová partikula
SNW	proteín obsahujúci konzervovaný motív SNWKN

SR proteíny	proteíny bohaté na serín a arginín
ssDNA	„salmon sperm DNA“
<i>STD</i>	smerodajná odchýlka (z angl. standard deviation)
supp	„supplement“ (Synthetic complete amino acid (Kaiser) drop-out: - His, -Leu, -Trp, -Ura)
T	tymín
TAE pufor	pufor Tris-acetát-EDTA
TATA	promotorová sekvencia TATA
TBP	TATA box väzbový proteín (TATA box binding protein)
TBS	Tris-pufrovaný fyziologický roztok
TCA	kyselina trichlóroctová
TE pufor	Tris-EDTA pufor
TELVIR	telomerická oblasť na pravom ramene chromozómu VI
TEMED	tetrametyletyléndiamin
TF	transkripčný faktor
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometán
TSS	počiatok transkripcie (transcription start site)
TTBS	Tween-TBS
U, Ura	uracil
UTR	nekódujúca génová oblasť (untranslated region)
UV	ultrafialový (ultraviolet)
W, Trp	tryptofán
WB	western blot
wt	divoký typ (wild type)
YPAD	komplexné médium pre kultiváciu kvasiniek

1. ÚVOD

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) je v oblasti molekulovej biológie tradične používaným modelovým organizmom, ku ktorého štúdiu bola vyvinutá široká škála efektívnych genetických metód. Dnes je známe, že mnoho proteínov a základných bunkových procesov je medzi *S. cerevisiae* a vyššími eukaryotami „podobných“. To umožňuje využívať niektoré výsledky získané skúmaním *S. cerevisiae* pre objasnenie mechanizmov u zložitejších organizmov, vrátane ľudského. V našom laboratóriu využívame modelový organizmus *S. cerevisiae* k štúdiu zostrihu pre-mRNA. Dlhodobo sa zaoberáme zostrihovým faktorom Prp45, ktorý je pre proces zostrihu nevyhnutný. K odhaleniu jeho ďalších funkcií v rámci bunkových procesov napomáha jeho skrátaná termosenzitívna alela Prp45(1-169), ktorá vedie k miernym defektom zostrihu (Gahura et al. 2009; Hálová et al. 2017).

Kvasinka *S. cerevisiae* je pre štúdium základných mechanizmov zostrihu pre-mRNA výhodným modelom. Obsahuje málo intrónov (približne 5% funkčných génov), ktorých zostrihové sekvencie sú oproti vyšším eukaryotom konzervované (Schwartz et al. 2008). Proces zostrihu je jednoduchší (skoro žiaden alternatívny zostrih), zúčastňuje sa ho približne 90 proteínov, z ktorých takmer všetky majú svojich homológov vo vyšších eukaryotoch (Fabrizio et al. 2009). V súčasnosti je známe, že k zostrihu väčšiny intrónov u *S. cerevisiae* dochádza kotranskripčne, tzn. že zostavenie spliceozómu na primárnom transkripte a zostrih intrónu prebieha za prítomnosti RNA polymerázy II na templáte DNA (Alexander et al. 2010; Oesterreich et al. 2010; Oesterreich et al. 2011; Oesterreich et al. 2016). Procesy zostrihu a transkripcie sú navyše ovplyvňované chromaínovou štruktúrou a posttranslačnými modifikáciami histónov v danom úseku génov (Gunderson & Johnson 2009; Gunderson et al. 2011; Moehle et al. 2012; Sorenson et al. 2016). Vysvetlenie vzájomného vzťahu medzi transkripciou, zostrihom a stavom chromaínu má zásadný význam pre pochopenie procesu génovej expsie. K tomuto pochopeniu sa snažíme prispieť i výskumom v našom laboratóriu, vrátane výsledkov obsiahnutých v tejto diplomovej práci.

2. LITERÁRNY PREHLAD

2.1 Štruktúra chromatínu

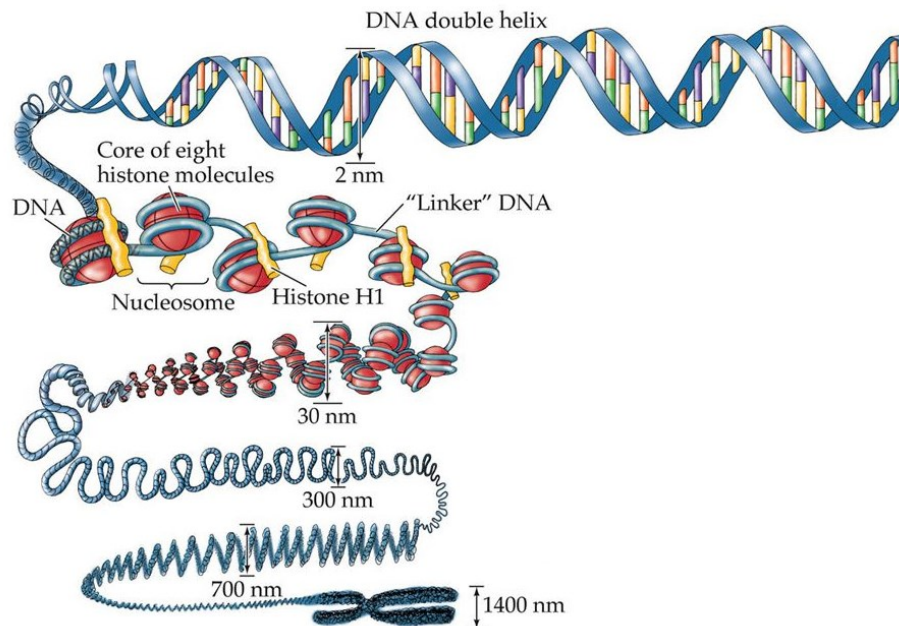
Základnú stavebnú jednotku chromatínu, nukleozóm, tvorí oktamér štyroch histónov H3, H4, H2A a H2B, okolo ktorého je naviazaný 145 – 147 bp dlhý úsek dvojreťazcovej DNA. Na jeden nukleozóm pripadá ~1.65 superhelikálnych závitov DNA usporiadaných do ľavotočivého toroidu (Kornberg 1974; Luger et al. 1997).

Históny sú vysoko konzervované proteíny, pričom každý z nich je u *S. cerevisiae* kódovaný dvoma génmi. Gény pre históny sú v jadre organizované do štyroch párov odlišne transkribovaných lokusov, kde dva páry (*HHT1* a *HHF1*; *HHT2* a *HHF2*) kódujú proteíny H3 a H4, a dva páry (*HTA1* a *HTB1*; *HTA2* a *HTB2*) kódujú proteíny H2A a H2B (Hereford et al. 1979; Smith & Andrésson 1983). Sekvenčné analýzy odhalili, že gény *HHT1* a *HHT2* kódujú identické históny H3 a gény *HHF1* a *HHF2* kódujú identické históny H4 (Smith & Andrésson 1983). Na rozdiel od toho, históny H2A kódované génmi *HTA1* a *HTA2* sa líšia o dve aminokyseliny a históny H2B kódované génmi *HTB1* a *HTB2* sa líšia štyrmi aminokyselinami (Choe et al. 1982; Wallis et al. 1980). Pri štúdiu histónov u *S. cerevisiae* sa ukázalo, že delécia ktoréhokolvek zo štyroch párov lokusov nespôsobuje letalitu buniek (Dollard et al. 1994). U kvasinky *S. cerevisiae* sa vyskytujú ďalšie tri varianty histónových proteínov, ktoré sú kódované jednou kópiou génov. Medzi ne patrí histón H1 (Patterton et al. 1998), esenciálny centromerický variant histónu H3, Cse4 (Meluh et al. 1998), a variant histónu H2A, H2A.Z (Santisteban et al. 2000).

Nukleozóm je tvorený heterotypickým tetramérom (H3-H4)₂ asociovaným s dvoma dimérmí (H2A-H2B). Každý z histónov obsahuje globulárnu doménu pozostávajúcu z troch α -helixov ($\alpha 1 - \alpha 3$) spojených dvomi krátkymi slučkami (L1, L2). Globulárna doména (nazývaná tiež „histone-fold“) je zodpovedná za heterodimerizáciu H3 s H4 a H2A s H2B. Ďalšou úrovňou tvorby nukleozómu je oligomerizácia heterodimérov (H3-H4) prostredníctvom interakcie medzi α -helixami histónov H3, čím sa vytvorí stabilné jadro nukleozómu, ktoré asocjuje s centrálnou časťou DNA. Z oboch strán tetraméru (H3-H4)₂ sa viažu diméry (H2A-H2B) prostredníctvom väzby medzi H2B a H4. Súčasťou histónov sú okrem globulárnej domény tiež neštruktúrované N-konce, ktoré sú flexibilné a vystupujú na povrch nukleozómov. N-konce spoločne s dlhými C-koncami histónov H2A

a H2B hrajú dôležitú úlohu v regulácii chromatinovej štruktúry, pretože sú prístupné rôznym modifikačným enzýmom. Históny majú vo svojej proteínovej molekule vysoký obsah bázických aminokyselín (hlavne lyzín, arginín), vďaka ktorým majú históny celkový kladný náboj. Kladný náboj histónov umožňuje priblíženie záporne nabitých fosfátových skupín molekuly DNA, čím dochádza ku kondenzácii chromatinu (Luger et al. 1997).

Nukleozómy sú ďalej usporiadané do chromatinových štruktúr vyššieho radu. Primárnu úroveň organizácie chromatinovej štruktúry reprezentuje chromatinové vlákno o priemere 10 nm (tzv. „beads on a string“). Jednotlivé jadrá nukleozómov sú v reťazci oddelené „linker“ DNA, ktorá je zvyčajne asociovaná s histónom H1. Medzi rôznymi druhmi organizmov sa dĺžka „linker“ DNA líši, pričom u *S. cerevisiae* je dlhá ~18 bp (W. Lee, Tillo, Bray, Randall H. Morse, et al. 2007). Sekundárnu úroveň organizácie chromatinu, ktorá je formovaná prostredníctvom interakcií nukleozómov, tvorí vlákno o priemere 30 nm, ktoré môže byť prítomné v rôznych konformáciách. Vyššie úrovne chromatinovej štruktúry až po mitotický chromozóm sú tvorené vzdialenými interakciami medzi kompaktnými 30nm vláknami a na ich vzniku sa podieľa celý rad nehistónových proteínov (Pruss et al. 1995). Tvorba mitotického chromozómu je zobrazená na Obr. 1.



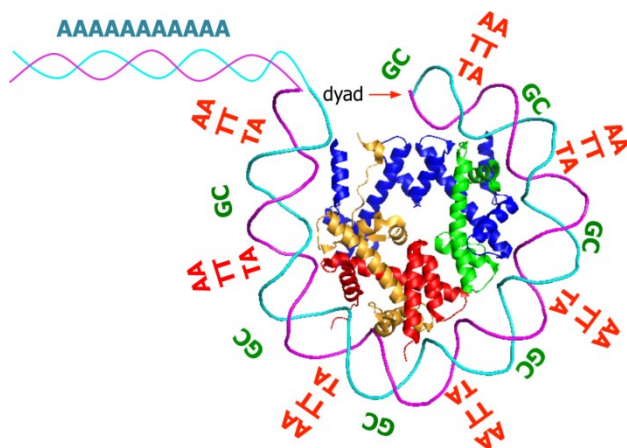
Obr. 1: **Model zbaľovania DNA do mitotického chromozómu.** DNA (2 nm) → nukleozóm (10 nm) → solenoid (30 nm) → chromatinové vlákno (300 nm) → chromatída (700 nm) → chromozóm (1400 nm) (prevzaté a upravené z Purves et al. 2004).

Chromatín je vysoko dynamickou štruktúrou. Miera jeho kondenzácie sa mení v závislosti na fáze bunkového cyklu, ale aj v závislosti na práve prebiehajúcom bunkovom procese (napr. transkripcia, rekombinácia, replikácia DNA, oprava DNA a i.). V profáze mitózy je chromatín postupne zbaľovaný do podoby vysoko kondenzovaných mitotických chromozómov, čo umožňuje ich segregáciu do dcérskych buniek. Vo zvyšných fázach bunkového cyklu sa tvoria tzv. interfázne chromozómy, ktoré sú v jadre organizované do chromozómových teritórií. Miera kondenzácie chromatínu sa v jednotlivých oblastiach DNA odlišuje, a preto sa môžu v rámci interfáznych chromozómov objavovať všetky stupne kondenzácie. Heterochromatín predstavuje najviac kondenzovanú oblasť DNA, ktorá je menej prístupná proteínovým faktorom, a tým reprimuje expresiu génov. Heterochromatín, ktorý je spojený so štruktúrne významnými oblasťami, ktoré obsahujú malý počet génov (centroméry, teloméry) a je vždy kondenzovaný, sa označuje ako konštitutívny heterochromatín, zatiaľ čo oblasti, na ktorých dočasne nedochádza k prepisu génov (umlčané gény) a za určitých okolností môžu dekonenzovať, vytvárajú fakultatívny heterochromatín. Chromatín s nižším stupňom kondenzácie, ktorý je väzbovo prístupný regulačným proteínom dôležitým pre transkripciu, rekombináciu, replikáciu a oprava DNA, je označovaný ako euchromatín.

2.1.1 Pozícia nukleozómov v rámci genómu

Presná lokalizácia nukleozómov je dôležitá pre správny priebeh bunkových procesov týkajúcich sa organizácie a stability chromatínu. Nukleozómy nie sú v genómovej DNA umiestnené náhodne, ale vyskytujú sa v určitých intervaloch, pričom niektoré z nich sú silno stabilizované a iné menej. Existujú špecifické oblasti, v ktorých sa nukleozómy vyskytujú vo zvýšenej miere, a oblasti, v ktorých sa nukleozómy nevyskytujú. Pri zostavovaní nukleozómov zohráva dominantnú úlohu primárna sekvencia DNA (tzv. *cis* determinanta). Rozsiahle štúdie odhalili, že existujú sekvenčné motívy, ktoré vedú buď k preferenčnej väzbe alebo deplécii nukleozómov. Oblasti DNA bohaté na homopolymerické sekvencie poly(dA:dT) obsahujú menej nukleozómov narozdiel od úsekov s vyšším výskytom nukleotidov GC. Sekvencie poly(dA:dT) sa vyskytujú v oblastiach 5' a 3'NFR (nucleosome-free region), v ktorých sú nukleozómy úplne depletované. K preferenčnému zostavovaniu nukleozómov dochádza v oblastiach DNA s

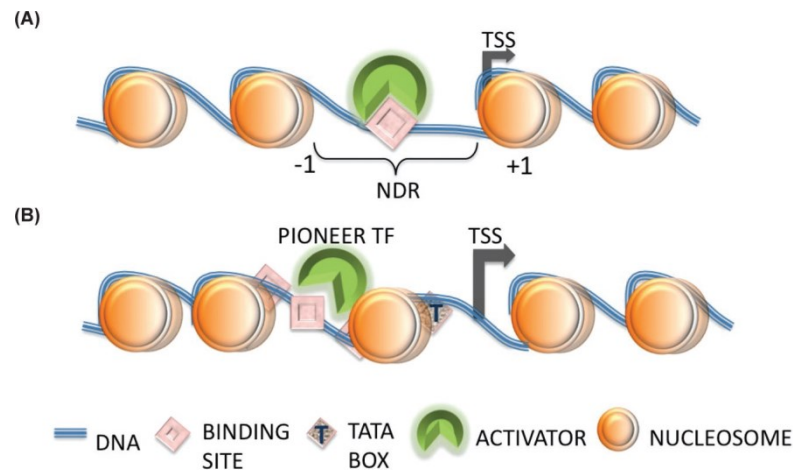
charakteristickým sekvenčným motívom, v ktorom sa v pravidelných 5 bp intervaloch striedajú AA/TT/AT dinukleotidy s GC dinukleotidmi, čo umožňuje ostrý ohyb DNA (Obr. 2). Dinukleotidová periodicitu zvyšuje afinitu sekvencií DNA k tvoriacim sa nukleozómom a usmerňuje umiestnenie nukleozómov v rámci DNA (Segal et al. 2006; Segal & Widom 2009). Štúdie však odhalili, že pravidelné umiestnenie nukleozómov nevyžaduje pozičný kód pre každý nukleozóm a môže byť dosiahnuté selektívnym umiestnením len niekoľkých nukleozómov. To znamená, že len malá podskupina nukleozómov je viazaná sekvenčne špecificky a podľa nich sa v patričných intervaloch viažu ostatné nukleozómy (Peckham et al. 2007). Pozícia nukleozómov môže byť ovplyvnená i celým radom ďalších faktorov (tzv. *trans* determinanty), ako sú napr. remodelačné enzýmy nukleozómov, transkripčné faktory, elongujúca RNA Pol II, DNA viažuce proteíny, histónové varianty, posttranslačné modifikácie histónov, ale i vzájomné interakcie medzi nukleozómami, ktoré sa nachádzajú v tesnej blízkosti (Workman & Kingston 1998; Shogren-Knaak et al. 2006). Každý z týchto faktorov sa môže navzájom ovplyvňovať a tým prispievať v určitej miere k lokalizácii nukleozómov.



Obr. 2: **Preferenčné zostavovanie nukleozómov.** DNA ovinutá okolo oktaméru histónov. Pre zostavovanie nukleozómov je optimálne pravidelné striedanie AA/TT/AT úsekov s GC úsekmi (prevzaté z Struhl a Segal 2013).

Celogenómové štúdie u kvasinky *S. cerevisiae* ukázali, že nukleozómy a ich varianty sú na 5' a 3'-koncoch génov organizované podľa špecifických motívov. V promotorových oblastiach génov nachádzajúcich sa pred počiatkom transkripcie (tzv. TSS, transcription start site) odhalili dva špecifické motívy fázovania nukleozómov, na základe ktorých možno promotory klasifikovať do dvoch kategórií: otvorené a zatvorené promotory (viď Obr. 3A a B). Otvorené promotory obsahujú približne 150 bp dlhú oblasť v smere k 5'-koncu od TSS, ktorá je charakterizovaná úplnou depléciou nukleozómov. Táto oblasť sa označuje ako 5'NFR a nachádzajú sa v nej väzbové miesta pre transkripčné faktory regulujúce transkripciu génov, väčšinou však neobsahuje TATA sekvencie

(Basehoar et al. 2004; Cairns 2009). Oblasť 5'NFR je ohraničená dvoma stabilne umiestnenými nukleozómami (-1 a +1 nukleozóm), podľa ktorých dochádza k väzbe ostatných príľahlých nukleozómov. -1 nukleozóm je lokalizovaný v smere k 5'-koncu od 5'NFR, zvyčajne v oblasti 150 – 300 bp pred TSS. +1 nukleozóm ohraničuje oblasť v smere k 3'-koncu od 5'NFR a predstavuje najsilnejšie lokalizovaný nukleozóm v kvasinkovom genóme. Oba nukleozómy často obsahujú histónový variant H2A.Z, ktorý napomáha iniciácii transkripcie tým, že pomáha k rýchlejšiemu rozpadu nukleozómov (Adam et al. 2001; Yuan et al. 2005; Raisner et al. 2005). V smere k 5'a 3'-koncu od TSS sú nukleozómy lokalizované s nižšou presnosťou, pričom sa so vzrastajúcou vzdialenosťou postupne zvyšuje tendencia k náhodným pozíciám nukleozómov (Yuan et al. 2005). Otvorené promotory sa vo všeobecnosti spájajú s konštitutívnymi génmi, ktoré nevyžadujú prísnu reguláciu transkripcie, tzn. môžu mať permanentne otvorené väzbové miesta pre transkripčné faktory. Na rozdiel od otvorených promotorov, zatvorené promotory neobsahujú 5'NFR, ale sú buď úplne alebo takmer okupované nukleozómami (W. Lee, Tillo, Bray, Randall H. Morse, et al. 2007). Nukleozómy pokrývajú TSS, oblasť ohraničujúcu TSS a väčšinu väzbových miest pre transkripčné aktívatory, avšak aspoň jedno väzbové miesto je vystavené, a to buď v „linker“ DNA medzi nukleozómami alebo v DNA v blízkosti vstupu/výstupu z nukleozómu. To umožňuje prístup tzv. „pioneer“ transkripčného faktoru k promotoru, pričom pre prístupnosť ďalších väzbových miest sú potrebné remodelátory chromatinu a histónové modifikácie (Struhl et al. 1989; Cairns 2009). Zatvorené promotory obsahujú TATA sekvencie lokalizované 40 – 120 bp v smere k 5'-koncu od TSS, ktoré sa nachádzajú vo vnútri okraja proximálneho nukleozómu a sú čiastočne blokované (Struhl et al. 1989; Basehoar et al. 2004; Cairns 2009). Zatvorené promotory sú často spájané s regulovanými génmi, ktoré vyžadujú prísnu reguláciu transkripcie, ako je napr. gén *PHO5*, ktorý je aktivovaný ako odpoveď na nedostatok fosfátu (Rogers et al. 1982; Rudolph & Hinnen 1987; Shivaswamy et al. 2008). Na 3'-koncoch väčšiny kvasinkových génov bola v oblasti terminácie transkripcie identifikovaná oblasť označovaná ako 3'NFR, ktorá má pravdepodobne vplyv na termináciu transkripcie a na iniciáciu anti-sense transkripcie (Mavrich et al. 2008).



Obr. 3: **Schematické znázornenie pozície nukleozómov** v rámci otvorených (A) a zatvorených (B) promotorov. (A) Stabilne umiestnené nukleozómy -1 a +1 ohraničujú 5'NDR (nucleosome-depleted region), v ktorej sa nachádzajú väzbové miesta pre transkripčné faktory. Otvorené promotory väčšinou neobsahujú TATA sekvencie. (B) Nukleozómy pokrývajú väčšinu väzbových miest pre transkripčné faktory (nie je prítomná NDR). Vystavenie väzbového miesta umožňuje prístup „pioneer“ transkripčného faktoru k promotoru. Zatvorené promotory obsahujú TATA sekvencie (prevzaté z Arya et al. 2010).

2.1.2 Dynamika nukleozómov

Štruktúra chromatinu napomáha nielen zbaleniu celého eukaryotického genómu do jadra buniek, ale taktiež reguluje prístupnosť genetickej informácie obsiahnutej v DNA. Nukleozómy podliehajú neustálym prestavbám v závislosti na práve prebiehajúcich bunkových procesoch, ako je transkripcia, replikácia DNA, rekombinácia a opravy DNA. K sprístupneniu sekvencií DNA pre väzbové proteíny bunka využíva mechanizmus, v ktorom dochádza k preusporiadaniu histónov tak, že sa rozpadne časť nukleozómu, poprípade celý nukleozóm, pričom pôvodné nukleozomálne históny sú následne nahradené novosyntetizovanými histónmi alebo inými komponentmi (napr. histónovými variantmi). Tento obrat nukleozómov má veľký vplyv na zloženie, štruktúru a funkciu rôznych genómových oblastí.

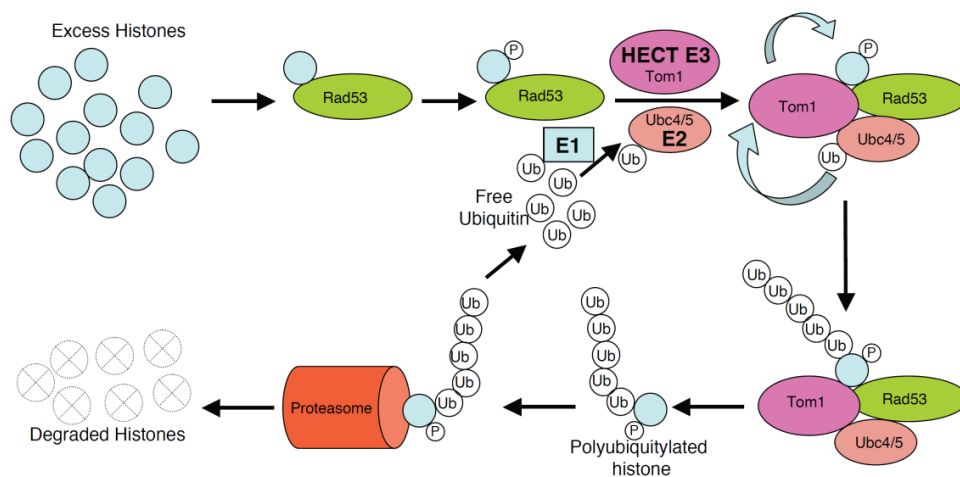
Na prestavbe chromatinu sa podieľa mnoho faktorov, ktoré uľahčujú výmenu histónov prostredníctvom destabilizácie interakcií histón-DNA a histón-histón, a medzi tieto faktory patria enzýmy modifikujúce históny, ATP-dependentné remodelátory chromatinu a histónové chaperony. Posttranslačné modifikácie histónov ovplyvňujú

stabilitu nukleozómov zmenou chemických interakcií v rámci nukleozómov alebo medzi susednými nukleozómami, čo vedie k vzniku otvoreného, poprípade zatvoreného chromatinu. ATP-dependentné komplexy remodelujúce chromatin, ktorých katalytická podjednotka patrí do RNA/DNA helikázovej superrodiny 2, využívajú energiu uvoľnenú hydrolýzou ATP k lokálnemu narušeniu asociácie histónov s DNA, čím umožňujú posun alebo úplné odstránenie nukleozómov zo špecifických oblastí v genóme (Becker & Hörz 2002). Eukaryotické bunky obsahujú štyri subrodiny ATP-dependentných komplexov remodelujúcich chromatin: SWI/SNF, ISWI, CHD a INO80 (Clapier & Cairns 2009). Aj keď tieto remodelátory využívajú spoločný základný mechanizmus narúšajúci histón-DNA interakcie, subrodiny ATP-dependentných remodelátorov majú odlišné účinky na pozíciu, stabilitu a zloženie nukleozómov. Kľúčovou skupinou faktorov, ktoré sa podieľajú na regulácii zmien v nukleozómovej kompozícii, sú histónové chaperony. Aj keď sa histónové chaperony značne odlišujú špecifickosťou interakcií, ich štruktúrou a funkciou vykonávajúcou v bunke, možno ich všeobecne definovať ako proteíny interagujúce s histónmi, ktoré sa podieľajú na uskladňovaní histónov, ich transporte a na rozpade a zostavovaní nukleozómov. Histónové chaperony sa tiež môžu podieľať na distribúcii histónových variant, čím definujú histónové prostredie dôležité pre funkciu a stabilitu genómu (zhrnuté v Hammond et al. 2017). Modifikátory histónov, ATP-dependentné remodelátory chromatinu a histónové chaperony môžu v bunke regulovať dynamiku chromatinu buď jednotlivo, alebo v kombinácii s ostatnými.

2.1.2.1 Prestavby chromatinu v priebehu bunkového cyklu

K rozmanitým prestavbám chromatinu dochádza v S fáze bunkového cyklu, kedy bunka musí okrem replikácie svojej DNA replikovať aj svoj chromatin. V priebehu replikácie sú staré nukleozómy náhodne distribuované medzi novovznikajúce sesterské vlákna DNA, pričom prázdne miesta sú dopĺňované novosyntetizovanými oktamérmí histónov (Butler & Mueller 1973). V proliferujúcich bunkách prebieha syntéza väčšiny histónov v S fáze bunkového cyklu. Štúdie odhalili, že inhibícia syntézy DNA vedie k rýchlejšej represii histónových génov, a že prechod S fázou bunkového cyklu v neprítomnosti syntézy histónov spôsobuje stratu životaschopnosti buniek, čo naznačuje, že syntéza histónov a replikácia DNA sú tesne prepojené procesy. V S fáze bunkového cyklu

musia bunky udržiavať veľmi citlivú rovnováhu medzi syntézou DNA a syntézou histónov, aby sa zabránilo tvorbe príliš malého alebo príliš veľkého množstva novosyntetizovaných histónov (zhrnuté Gunjan et al. 2005). V ostatných fázach bunkového cyklu je pre bunku dôležité udržiavať veľmi nízku hladinu voľných histónov. Ukázalo sa, že nadbytok voľných histónov v bunke negatívne ovplyvňuje rast buniek, vyvoláva genomickú nestabilitu (Meeks-Wagner & Hartwell 1986), zvýšenú citlivosť buniek voči poškodeniam DNA a cytotoxicitu (Gunjan & Verreault 2003; Singh et al. 2009). Negatívny vplyv voľných histónov v bunkách je spôsobený silným pozitívnym nábojom, kvôli ktorému sa voľné históny môžu nešpecificky viazať na negatívne nabitú molekulu v bunkách, vrátane nukleových kyselín a negatívne nabitých proteínov (Singh et al. 2010). U kvasinky *S. cerevisiae* je syntéza histónov regulovaná prevažne na úrovni transkripcie a na úrovni regulácie stability mRNA v priebehu bunkového cyklu. V G1 a G2 fáze bunkového cyklu dochádza k takmer úplnej represii transkripcie histónových génov prostredníctvom väzby supresorov do ich promotora (Osley & Lycan 1987; Xu et al. 1992). I napriek tomu určitá bazálna úroveň syntézy histónov prebieha neustále, pretože i mimo S fázy bunkového cyklu, predovšetkým v priebehu procesov transkripcie, rekombinácie a opráv DNA, dochádza v bunkách v určitej miere k prestavbám chromatinu a k inkorporácii novosyntetizovaných histónov do nukleozómov (Bonner et al. 1988; Dion et al. 2007). Ukázalo sa, že voľné históny, ktoré majú počas života približne 30 minút, sú v bunke sčasti vychytávané chaperonmi podieľajúcimi sa na prestavbe chromatinu a zvyšok je degradovaný prostredníctvom proteazomu (Gunjan & Verreault 2003; Andrews et al. 2010; Morillo-Huesca et al. 2010). Na degradácii voľných histónov sa podieľa kináza Rad53, ktorá rozoznáva a fosforyluje voľné históny, a tak stimuluje funkciu ubikvitinligázy. Ubikvitinligázy následne polyubikvitinylujú lyzínové zvyšky voľných histónov, čo vedie k ich degradácii v proteazome (Obr. 4; Singh et al. 2009, 2012).

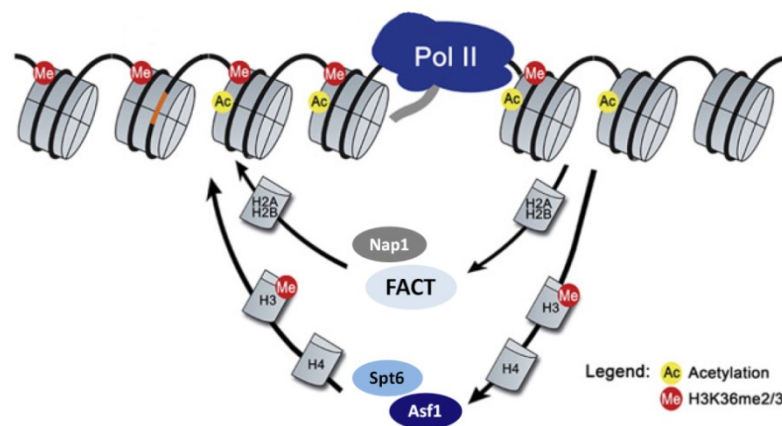


Obr. 4: **Schematické znázornenie degradácie voľných histónov.** Kináza Rad53 rozpoznáva a fosforyluje voľné históny, čím je stimulovaná funkcia ubikvitinylačných enzýmov Tom1 a Ubc4/5. Históny s polyubikvitinylovaným reťazcom (4 a viac ubikvitinov) sú následne degradované v proteazome, zatiaľ čo ubikvitiny sú recyklované (prevzaté zo Singh et al. 2009)

2.1.2.2 Prestavby chromatinu v priebehu transkripcie

Organizácia DNA do chromatinu predstavuje prekážku pre väzbu transkripčných faktorov k príslušným väzbovým sekvenciám a ovplyvňuje tak všetky kroky transkripcie. K prestavbám chromatinu dochádza vo vysokej miere v oblasti promotora, kde dochádza k väzbe mnohých transkripčných faktorov, a v kódujúcich oblastiach transkripčne aktívnych génov (Jamai et al. 2007; W. Lee, Tillo, Bray, Randall H. Morse, et al. 2007). V priebehu iniciácie transkripcie sú nukleozómy v oblasti promotora uvoľňované prostredníctvom ATP-dependných remodelátorov chromatinu, ale aj prostredníctvom transkripčných faktorov, ktoré samy osebe môžu uvoľniť nukleozóm (Workman & Kingston 1992; Anderson & Widom 2000). Ukázalo sa, že na promotoroch, ktoré obsahujú viac väzbových miest pre transkripčné faktory, dochádza k rýchlejšej výmene histónov H3/H4 než u promotora s menším obsahom príslušných sekvencií (Dion et al. 2007). V priebehu elongácie transkripcie sú nukleozómy uvoľňované pred RNA Pol II, a po jej prechode sú naviazané naspäť (Kristjuhan & Svejstrup 2004; Schwabish & Struhl 2004). V závislosti na transkripčnej aktivite génov je chromatin remodelovaný do rôznej miery, pričom miera prestavby nukleozómov v kódujúcich oblastiach koreluje s hustotou RNA Pol II, čiže s mierou transkripcie (Dion et al. 2007). U aktívne

transkribovaných génov, tzn. u génov s vyššou frekvenciou prechodu RNA Pol II, dochádza k rozsiahlejšiemu rozvoľneniu chromatinovej štruktúry, kedy sa rozpadá celý oktamer histónov z DNA (Jamai et al. 2007; Kulaeva et al. 2010). Zaujímavosťou však je, že prestavba nukleozómov v kódujúcich oblastiach je rýchlejšia u regulovaných génov než u konštitutívnych génov (po korekcii na početnosť RNA Pol II), čo môže súvisieť s tým, že po stresovom stimule dochádza u stresových génov k vlne transkripcie, kedy RNA Pol II nie sú rovnomerne rozmiestnené ako v prípade transkripcie konštitutívnych génov (Dion et al. 2007; Jamai et al. 2007). Prestavby chromatínu sú v priebehu elongácie transkripcie koordinované histónovými chaperonmi, ktoré sú často priamo alebo nepriamo asociované s RNA Pol II (Pavri et al. 2006). Tieto chaperony sa podieľajú nielen na rozvoľňovaní štruktúry chromatínu pred RNA Pol II, ale aj na depoziícii nukleozómov po jej prechode. Túto funkciu vykonávajú v prípade dimérov (H2A-H2B) chaperony Spt16 (súčasť komplexu FACT – Facilitates Chromatin Transcription) a Nap1, a v prípade tetraméru (H3-H4)₂ chaperony Asf1 a Spt6 (Obr. 5; Bortvin a Winston 1996; Belotserkovskaya et al. 2003; Adkins a Tyler 2006; Schwabish a Struhl 2004; Walfridsson et al. 2007). Okrem chaperonov je prestavba nukleozómov ovplyvňovaná tiež postranlačnými modifikáciami chromatínu, ale aj prítomnosťou histónových variant. Reorganizácia štruktúry chromatínu tak vytvára dynamické prostredie pre správny priebeh transkripcie (Clapier & Cairns 2009).



Obr. 5: Schematické znázornenie funkcie histónových chaperonov Asf1, Spt6, Nap1 a FACT pri remodelácii nukleozómov v priebehu transkripcie (prevzaté a upravené podľa Smolle a Workman 2013).

2.2 Vzťah medzi transkripciou, zostrihom a štruktúrou chromatinu

V súčasnosti je známe, že k zostavovaniu spliceozómu na nascentnej pre-mRNA a k zostrihu väčšiny intrónov u *S. cerevisiae* dochádza za prítomnosti RNA Pol II na templáte DNA, tzn. kotranskripčne. Na základe preukázaných súvislostí z literatúry možno pozerat' na transkripciu a zostrih pre-mRNA ako na vzájomne prepojené procesy, avšak mechanizmy a konkrétne faktory sprostredkujúce vzťahy medzi týmito procesmi boli doposiaľ objasnené len čiastočne (Elliott & Rosbash 1996; Kotovic et al. 2003; Görnemann et al. 2005; Lacadie & Rosbash 2005; Brugiolo et al. 2013). Dôležitou štruktúrou, ktorá umožňuje prepojenie procesov transkripcie a zostrihu pre-mRNA, je C-terminálna doména (CTD) RNA Pol II, ktorá sa u kvasiniek *S. cerevisiae* skladá z 26 opakovaní heptapeptidovej sekvencie $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ (Allison et al. 1985). Vzhľadom na štruktúrnu flexibilitu CTD a rôznorodosť väzbových povrchov generovaných rozsiahlymi posttranslačnými modifikáciami aminokyselinových zvyškov CTD má CTD schopnosť viazať rôzne regulačné proteíny. Zmeny v modifikáciách CTD v priebehu transkripcie napomáhajú pri koordinácii väzby nielen proteínov regulujúcich transkripciu, ale aj zostrihových faktorov, okrem toho i enzýmov dôležitých pre posttranslačné modifikácie chromatinu (zhrnuté v Srivastava a Ahn 2015). Bližším štúdiom kotranskripčného zostrihu sa ukázalo, že v oblasti terminálneho exónu dochádza k prechodnému zníženiu elongačnej rýchlosti RNA Pol II, kde je možné detekovať už zostrihnutú mRNA. Spomalenie prechodu RNA Pol II v tejto oblasti pravdepodobne poskytuje viac času na kotranskripčné zostavenie spliceozómu na pre-mRNA a následnú katalýzu zostrihu ešte pred ukončením transkripcie. Ukázalo sa tiež, že spomalenie RNA Pol II závisí na prítomnosti intrónu a na produktívnom zostrihu pre-mRNA (Alexander et al. 2010; Oesterreich et al. 2010; Oesterreich et al. 2011). Ďalej bolo pozorované, že rýchlosť transkripcie ovplyvňuje efektivitu zostrihu pre-mRNA (merané ako pomer pre-mRNA:mRNA) u *S. cerevisiae*. Zvýšenie elongačnej rýchlosti RNA Pol II znižuje efektivitu zostrihu, zatiaľ čo zníženie elongačnej rýchlosti efektivitu zostrihu zvyšuje (Moehle et al. 2014). Nedávne štúdie skupiny pod vedením K. Neugebauer poskytli prekvapivý pohľad na kinetiku kotranskripčného zostrihu prostredníctvom dvoch nových metód sekvenovania vznikajúcej pre-mRNA, SMIT (Single-molecule intron tracking) a sekvenovanie vznikajúcej RNA v plnej dĺžke (Full-length nascent RNA sequencing) (Oesterreich et al. 2016).

Prostredníctvom týchto metód ukázali, že katalýza zostrihu pre-mRNA nastáva už v čase, keď sa RNA Pol II vyskytuje 26 – 129 nukleotidov (nt) za 3' zostrihovým miestom (3'ss). Taktiež pozorovali, že zostrih sledovaných transkriptov je z 50 % kompletný, keď sa RNA Pol II nachádza v oblasti 45 nt od intrónov. Tieto výsledky naznačujú, že RNA Pol II a spliceozóm môžu fungovať v tesnej blízkosti (radovo niekoľko nukleotidov). Následnými štúdiami ďalej ukázali, že katalýza zostrihu môže prebiehať v časovom rámci transkripcie s niekoľkonukleotidovým oneskorením, čo naznačuje, že transkripcia a zostrih prebiehajú podobnou rýchlosťou. Poruchy, ktoré spomalia rýchlosť zostavovania spliceozómu alebo zvýšia rýchlosť transkripcie, vedú k oneskoreniu zostrihu pre-mRNA, pričom toto pozorovanie je v súlade s tvrdením, že miera elongácie RNA Pol II nepriamo koreluje s mierou zostrihutej mRNA (Moehle et al. 2014; Alpert et al. 2016; Oesterreich et al. 2016). Zaujímavosťou však je, že aj keď v mutantách s rýchlejšou RNA Pol II dochádza k oneskorenému dokončeniu zostrihu (posun v smere transkripcie), počiatok zostrihu zostáva nezmenený (27 nt od 3'ss v smere transkripcie). Tieto výsledky dokazujú, že zostavovanie spliceozómu na nascentnej pre-mRNA môže prebiehať veľmi rýchlo po syntéze intrónu RNA Pol II (Alpert et al. 2016; Oesterreich et al. 2016). Vzhľadom na blízkosť spliceozómu k chromatinovému templátu, zostrih prebieha v kontexte nielen transkripcie, ale aj chromatínu. V intrón-obsahujúcich génoch sú nukleozómy nabohatené viac v oblasti exónov než v intrónoch, čo naznačuje, že nukleozómy pravdepodobne pomáhajú vymedziť exóny na úrovni DNA. Nukleozómy môžu v oblasti exónov pôsobiť ako fyzická bariéra transkripcie, s čím súvisí zníženie rýchlosti RNA Pol II v tejto oblasti a spomalenie elongácie transkripcie (Oesterreich et al. 2010; Churchman & Weissman 2011; Weber et al. 2014). Bližším štúdiom vplyvu zmien v stave chromatínu na kotranskripčný zostrih sa zistilo, že priebeh zostrihu môže byť ovplyvnený špecifickými posttranslačnými modifikáciami histónov, a že poruchy v organizácii chromatínu majú negatívny vplyv na kotranskripčné zostavovanie spliceozómu (Gunderson & Johnson 2009; Gunderson et al. 2011; Oesterreich et al. 2011; Shieh et al. 2011; Hérissant et al. 2014).

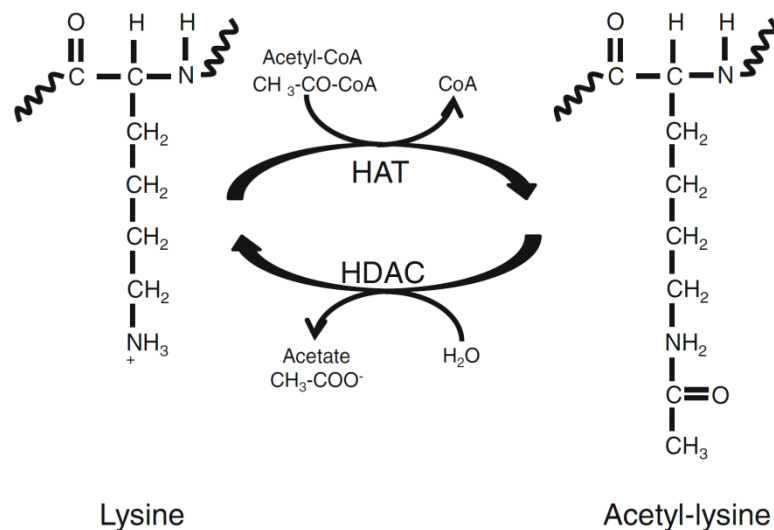
2.2.1 Posttranslačné modifikácie chromatínu

Histónové proteíny podliehajú reverzibilným posttranslačným modifikáciám na N- a C-koncových úsekoch, ale aj na povrchu ich globulárnej domény. Posttranslačné modifikácie histónov ovplyvňujú mieru kondenzácie chromatínu, interakcie medzi nukleozómami a slúžia ako platforma pre naviazanie proteínov regulujúcich procesy génovej expresie (Luger et al. 1997). Medzi významné histónové modifikácie patrí acetylácia, metylácia, ubikvitinylácia, fosforylácia, avšak v bunke sa nachádza i celý rad ďalších menej bežných modifikácií histónov ako je sumoylácia, ADP-ribozylácia, citrulinácia a i. (Huang et al. 2014). Doposiaľ bolo v literatúre preukázaných mnoho funkcií posttranslačných modifikácií histónov, avšak vysvetlenie konkrétneho významu posttranslačných modifikácií v bunkových procesoch zostáva predmetom ďalšieho štúdia. Ukázalo sa, že delécia N-terminálnej domény histónu H3 alebo H4 je zlučiteľná so životom kvasiniek, a teda posttranslačné modifikácie týchto histónov nie sú pre bunku esenciálne (Ling et al. 1996). Zostáva otázkou, či sú modifikácie histónov príčinou alebo dôsledkom vo vzťahu medzi prebiehajúcou transkripciou a s ňou súvisiacimi procesmi (zostrih primárneho transkriptu, export, a i.). Väčšina enzýmov modifikujúcich históny sú viazané prostredníctvom iných faktorov (transkripčné faktory, malé RNA a i.), ktoré určujú presnú lokalizáciu ich pôsobenia. Posttranslačné modifikácie chromatínu by tak mohli hrať dôležitú úlohu ako transkripčná pamäť, ktorá zaistuje efektívnejšiu odpoveď bunky zmenou rýchlosti alebo sily expresie vybraných génov na základe predošlých skúseností bunky (Urso et al. 2016). Transkripčná pamäť je najlepšie pochopená v prípade stresových génov, ako sú GAL gény indukovateľné galaktózou. Ich aktivácia je po rovnakom stimule rýchlejšia, pričom sa ukázalo, že transkripčná pamäť je asociovaná so zmenami v subnukleárnej lokalizácii a v chromatinovom stave génov. Okrem toho je transkripčná pamäť epigenetická, populácie buniek si ju zachovávajú i po niekoľkých deleniach (Kundu et al. 2007; Kundu & Peterson 2009; Henikoff & Shilatifard 2011).

2.2.1.1 Acetylácia histónov

Jednou z prvých objavených a najčastejšie sa vyskytujúcich histónových modifikácií je acetylácia katalyzovaná enzýmami histónacetyltransferázami (HAT), ktoré prenášajú acetylové zvyšky z acetyl-CoA na ϵ -amino skupinu lyzínových zvyškov na

N-terminálnych koncoch histónov (Obr. 6). Medzi špecificky acetylované lyzíny (K) patria K9, K14, K18, K23, K27 na históne H3 a K5, K8, K12, K16 na históne H4, a ďalšie lyzíny na histónoch H2A a H2B. Acetylová skupina ovplyvňuje pozitívny náboj histónov, čím dochádza k zoslabeniu interakcií nielen medzi histónmi a DNA, ale aj medzi nukleozómami (Lee et al. 1993; Wang & Hayes 2008). To vedie k preusporiadaniu nukleozómov pomocou ATP-dependentných remodelátorov chromatínu a k umožneniu väzby špecifických proteínových faktorov, ktoré sa podieľajú na transkripcii, replikácii, opravách DNA a mnohých ďalších procesoch (Allfrey et al. 1964; Struhl 1998). HAT sú rôznorodou skupinou enzýmov, ktoré sú evolučne konzervované od kvasiniek po ľudí. Rovnako ako iné enzýmy sprostredkujúce posttranslačné úpravy histónov sú HAT súčasťou multiproteínových komplexov, ktoré sú zložené z rôznych jedinečných podjednotiek, pričom ich kombinácia prispieva k unikátnym vlastnostiam a substrátovej špecifickosti každého komplexu HAT. Niektoré podjednotky HAT obsahujú rôzne domény, ktoré rozoznávajú a viažu modifikované proteínové zvyšky, a dopomáhajú väzbe HAT na vhodné miesto v genóme. Medzi tieto domény patria bromodomény rozoznávajúce acetylované lyzíny, ale aj WD40 doména, tudor doména, PHD prsty, ktoré rozoznávajú metylované zvyšky (Lee & Workman 2007).



Obr. 6: **Acetylácia lyzínového zvyšku.** Histónacetyltransferázy (HAT) katalyzujú prenos acetylovej skupiny z acetyl-CoA na ϵ -amino skupinu lyzínových zvyškov histónov. Pri acetylácii dochádza k zmene pozitívneho náboja. Odstránenie acetylovej skupiny z ϵ -N-acetyllyzínov je sprostredkované históndeacetylázami (HDAC) (prevzaté z Gutierrez a Romero-oliva 2013).

Histónová acetylácia hrá dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie, pričom koreluje so zvýšenou transkripčnou aktivitou génov. Najlepšie charakterizovanou histónacetyltransferázou, ktorá globálne ovplyvňuje acetyláciu histónov v rámci genómu, je Gcn5 (Grunstein et al. 2000). Gcn5 je typicky lokalizovaná v oblasti promotora a v kódujúcich oblastiach transkribovaných génov (Govind et al. 2007), kde primárne acetyluje históny H3 (K9, K14, K18, K23 a K27) a H2B (K11, K16) a tým uvoľňuje chromátin pre naviazanie transkripčných faktorov. Acetylované históny H3K9 a K14 sú nabohatené prevažne v oblasti promotora a TSS aktívnych génov a ich nabohatenie výrazne klesá naprieč kódujúcou oblasťou (Pokholok et al. 2005; Gunderson & Johnson 2009). Acetyltransferázová aktivita Gcn5 je závislá od asociácie v rôznych multipodjednotkových komplexoch. Gcn5 je katalytickou podjednotkou troch chromátin modifikujúcich komplexov: SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Ada), ADA a SALSA/SLIK (SAGA-altered, Spt8 absent/SAGA-like). Komplex SAGA je lokalizovaný do všetkých aktívnych promotorov, kde napomáha tvorbe preiniciačného komplexu a ovplyvňuje transkripčnú aktivitu RNA Pol II prostredníctvom interakcií s transkripčnými faktormi, vrátane TBP, a modifikácií chromátinu - acetylácie (H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac a H3K23ac) a deubikvitinylácie H2BK123. Na regulácii transkripcie sa podieľajú aj ostatné komplexy ADA a SALSA/SLIK (Grant et al. 1999).

Pre správny priebeh bunkových procesov je dôležité, aby bola acetylácia z chromátinu tiež odstránená. Deacetylácia histónov je sprostredkovaná históndeacetylázami (HDAC), ktoré sú ako HAT súčasťou multiproteínových komplexov (Obr. 6). Odstránením acetylovej skupiny z lyzínov sa zvyšuje pozitívny náboj histónov, ktoré pevnejšie viažu DNA, a tým dochádza k zmene prístupnosti DNA pre regulačné proteíny. Deacetylácia prostredníctvom HDAC prebieha v kódujúcich oblastiach transkribovaných génov. Rýchle odstraňovanie acetylových skupín z histónov má pravdepodobne za následok „maskovanie“ prebiehajúcej acetylácie v kódujúcej oblasti génov, čoho dôkazom je nabohatená acetylácia H3K9 a K14 v tejto oblasti po delícii HDAC (Gunderson et al. 2011). I keď sa funkcia HDAC všeobecne spája so stabilizáciou nukleozómov a represiou remodelujúcich aktivít, ukázalo sa, že HDAC sú tiež dôležité pre účinnú aktiváciu génovej expresie (Wang et al. 2002).

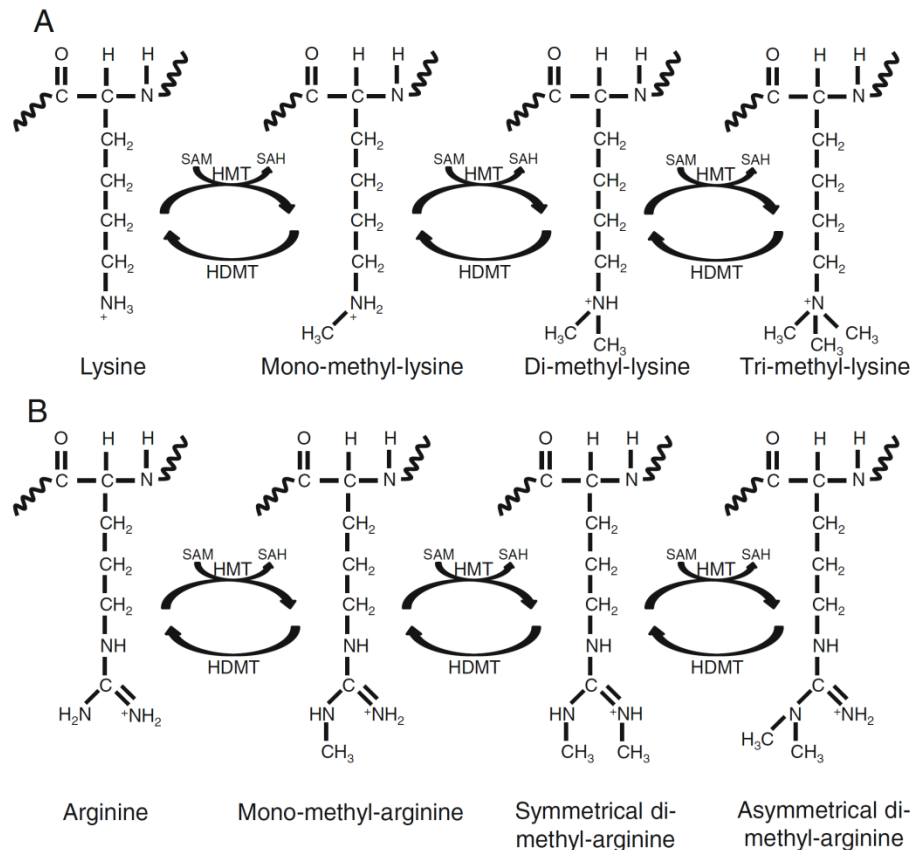
Štúdie zamerané na kotranskripčný zoster pre-mRNA odhalili, že acetylácia histónov prostredníctvom Gcn5 je dôležitá nielen pre pozitívnu stimuláciu transkripcie, ale

hrá dôležitú úlohu pri prepojení procesov transkripcie a zostrihu pre-mRNA. Ukázalo sa, že gén kódujúci Gcn5 geneticky interaguje s génmi kódujúcimi heterodimérne podjednotky U2 snRNP, Lea1 a Msl1, a že tieto interakcie sú závislé na acetyltransferázovej aktivite Gcn5. Pomocou analýzy ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) sa zistilo, že acetyltransferázová aktivita Gcn5 napomáha kotranskripčnému naviazaniu komponentov U2 snRNP (Lea1, Msl1) na miesto vetvenia pre-mRNA, avšak nie je dôležitá pre väzbu U1 snRNP (Gunderson & Johnson 2009). Ďalej sa ukázalo, že následné uvoľnenie U2 snRNP a asociáciu ďalších zostrihových faktorov ovplyvňuje deacetylácia histónov prostredníctvom históndeacetyláz Hos2 a Hos3 (Gunderson et al. 2011). To znamená, že pre optimálny priebeh kotranskripčného zostrihu pre-mRNA je dôležitá acetylácia i deacetylácia histónov.

2.2.1.2 Metylácia histónov

Jednou z najlepšie preskúmaných posttranslačných modifikácií je metylácia histónov katalyzovaná enzýmami histónmetyltransferázami (HMT), ktoré prenášajú metylové zvyšky z S-adenozylmetionínu na aminoskupiny lyzínov (K) a arginínov (R) histónov H3 a H4. Lyzíny môžu byť mono-, di- a trimetylované CH_3 skupinou, ktorá nahradzuje jeden až tri vodíky v NH_3^+ skupine (Obr. 7A). V prípade arginínu, ktorý obsahuje voľnú NH_2 a NH_2^+ skupinu, môže byť metylácia vo forme mono- a dimetylácie. Dimetylácia arginínu môže prebiehať symetricky na NH_2 skupine alebo asymetricky s jedným metylovým zvyškom na každej amino skupine (Obr. 7B). Medzi špecificky metylované lyzíny patria K4, K9, K27, K36 a K79 na históne H3 a K20 na históne H4. Pridanie metylovej skupiny neovplyvňuje náboj histónov, ale vytvára väzbové miesto pre regulačné faktory, ktoré špecificky rozpoznávajú metylované miesta na základe ich stupňa metylácie a okolitej aminokyselínovej sekvencie prostredníctvom rôznych domén. Medzi tieto domény patria chromodomény, domény tudor, PHD prsty, PWWP, WD40 a ďalšie (zhrnuté v Musselman et al. 2014). Na rozdiel od iných histónových modifikácií, ktoré špecifikujú aktívny alebo reprimovaný stav, metylácie histónových lyzínov majú dvojaký charakter, génovú expresiu môžu aktivovať alebo reprimovať v závislosti na ich pozícii a stupni metylácie. Podľa doterajších výsledkov je pravdepodobné, že metylácia H3K4, H3K36 a H3K79 pozitívne ovplyvňuje transkripciu, zatiaľ čo metylácia H3K9 a H3K27

transkripciu reprimujú (Black et al. 2012). U kvasinky *S. cerevisiae* nebola na rozdiel od iných organizmov metylácia H3K9 a H3K27 pozorovaná (Bean et al. 2016). Okrem regulácie transkripcie je metylácia chromatinu dôležitá pre rad ďalších procesov, ako je napr. umlčovanie génov, opravy DNA a rekombinácia.



Obr. 7: **Metylácia lyzínových (K) a arginínových (R) zvyškov.** (A) Lyzíny môžu byť mono-, di- a trimetylované metylovou skupinou z S-adenozylmetionínu (SAM), ktorá nahrádza vodíky v NH_3^+ skupine. (B) Arginíny, s voľnou NH_2 a NH_2^+ skupinou, môžu byť mono- a dimetylované. Metylácia arginínov môže byť symetrická a asymetrická. Metylácia K a R je sprostredkovaná špecifickými histónmetyltransferázami (HMT). Pri metylácii nedochádza k zmene pozitívneho náboja. Odstránenie metylovej skupiny katalyzujú histónové demetylázy (HDMT) (prevzaté z Gutierrez a Romero-oliva 2013).

Metylácia histónu H3 na lyzíne 4 (H3K4)

Metylácia H3K4 je katalyzovaná HMT Set1, ktorá je súčasťou multiproteínového komplexu COMPASS (Complex of proteins associated with Set1). COMPASS sa skladá z podjednotiek Set1, Swd1, Swd2, Swd3, Bre2, Sdc1, Spp1 a Shg1 (Shilatifard 2012). Metylácia H3K4 môže byť realizovaná ako mono-, di- i trimetylácia. HMT Set1 je schopná

len monometylovať, pre vznik di- a trimetylácie sú dôležité niektoré podjednotky komplexu COMPASS (Morillon et al. 2005; Schneider et al. 2005) a ďalšie faktory. Medzi tieto faktory patrí ubikvitinylácia H2BK123, ktorá slúži ako platforma pre správnu asociáciu a konformáciu podjednotiek komplexu COMPASS (J.-S. Lee, Shukla, Schneider, Selene K. Swanson, et al. 2007; Chandrasekharan et al. 2010; Chandrasekharan et al. 2011); podjednotky komplexu PAF (Paf1, Rtf1; (Ng, Robert, et al. 2003; Xiao et al. 2005); cyklín-dependentná kináza Bur1, ktorá je dôležitá pre trimetyláciu H3K4 (Laribee et al. 2005). Dôležité sú tiež proteazomové ATPázy Rpt4 a Rpt6 (Ezhkova & Tansey 2006) a komplex Ccr4-Not (Laribee et al. 2007), ktoré sa podieľajú na prepojení metylácie H3K4 a ubikvitinylácie H2BK123, a dimetylácia arginínu 2 na históne H3, ktorá naopak negatívne ovplyvňuje trimetyláciu H3K4 (Kirmizis et al. 2007). Metylácia H3K4 je z histónov odstránená pomocou demetylázy Jhd2, ktorá je špecifická pre všetky stupne metylácie (Liang et al. 2007).

Mono-, di- a trimetylácia H3K4 je v rámci aktívne transkribovaných génov rozdielne distribuovaná. Trimetylácia H3K4 je charakteristická pre promotor a 5' oblasť, dimetylácia H3K4 pre strednú časť a monometylácia H3K4 pre 3' oblasť aktívne transkribovaných génov (Pokholok et al. 2005). K lokalizácii a miere metylácie H3K4 prispieva i samotná RNA Pol II, ktorá je v priebehu iniciácie transkripcie fosforylovaná na Ser5 (pSer5) na C-terminálnej doméne (CTD). pSer5 a ďalšie faktory viažu HMT Set1, ktorá metyluje H3K4 v oblasti promotora (Ng, Robert, et al. 2003). Každý stupeň metylácie H3K4 je špecificky rozpoznávaný rôznymi efektormi, ako sú napr. regulátory acetylácie histónov, remodelácie chromátínu, elongácie transkripcie a zostrihu pre-mRNA. Trimetylovaný H3K4 v promotore a 5' oblasti transkribovaných génov interaguje s proteínom Yng1, ktorý je súčasťou histónacetyltransferázového komplexu NuA3. Táto interakcia umožňuje väzbu NuA3 komplexu do 5' oblasti, kde acetyluje H3K14 (Taverna et al. 2006). Tri- alebo dimetylovaný H3K4 je tiež rozpoznávaný histónacetyltransferázovým komplexom SAGA prostredníctvom interakcie s podjednotkou Sdf29, čo vedie k účinnej acetylácii susedných histónov v 5' oblasti (Bian et al. 2011). V oblasti vzdialenej od promotora transkribovaných génov dimetylácia H3K4 viaže prostredníctvom interakcie s podjednotkou Set3 komplex obsahujúci HDAC Hos2 a Hst1, ktorý účinne deacetyluje históny H3 a H4 (Kim & Buratowski 2009). Rôzny stupeň metylácie H3K4 v rôznych oblastiach transkribovaných génov môže teda rôzne

ovplyvňovať acetyláciu histónov. Ďalej sa ukázalo, že niektoré remodelátory chromatinu rozoznávajú metyláciu H3K4 a zúčastňujú sa v regulácii génovej expresie. Di- a trimetylácia H3K4 napomáha väzbe ATPázy Isw1, ktorá sa zúčastňuje remodelácie chromatinu (Santos-Rosa et al. 2003).

Na cicavčích bunkách sa preukázalo, že na metylovaný H3K4 sa viažu ATP-dependentné chromatin remodelujúce enzýmy CHD1 (H3K4me2 a me3; Sims et al. 2005) a NURF (H3K4me3, interakcia s podjednotkou BPTF; Wysocka et al. 2006). Prostredníctvom enzýmu CHD1 sa následne viaže U2 snRNP zúčastňujúca sa zostrihu pre-mRNA (Sims et al. 2007). Sledovaním úlohy trimetylácie H3K4 v kotranskripčnom zostrihu pre-mRNA sa ukázalo, že H3K4me3 má význam pre optimálnu funkciu spliceozómu v priebehu zostrihu a jej inhibícia vedie k defektnému odstráneniu intrónov z pre-mRNA (Sims et al. 2007; Barski et al. 2007; Davie et al. 2016). U cicavcov sa tiež zistilo, že všeobecný transkripčný faktor TFIID interaguje s trimetylovaným H3K4 prostredníctvom podjednotky TAF3, čo vedie k efektívnejšej tvorbe preiniciačného komplexu (Vermeulen et al. 2007; Lauberth et al. 2013). Všetky tieto skutočnosti poukazujú na zapojenie metylácie H3K4 do regulácie génovej expresie.

Metylácia H3K4 ovplyvňuje okrem transkripcie i ďalšie procesy. Medzi ne patrí napr. umlčovanie telomerickéj oblasti, rDNA a lokusov HM, bunkový rast, meiotická diferenciácia, segregácia chromozómov, opravy DNA pri dvojreťazcových zlomoch a organizácia bunkovej steny (zhrnuté v Dehé a Géli 2006). Pôsobenie metylácie H3K4 na zostrih pre-mRNA nebolo u kvasinky *S. cerevisiae* doposiaľ presne popísané (Sims et al. 2005; Shilatifard 2008).

Metylácia histónu H3 na lyzíne 36 (H3K36) a na lyzíne 79 (H3K79)

Podobne ako metylácia H3K4 sú metylácie H3K36 a H3K79 spájané s aktívnou transkripciou a prebiehajú do všetkých troch stupňov: mono-, di- a trimetylácie (Schubeler et al. 2004; Pokholok et al. 2005).

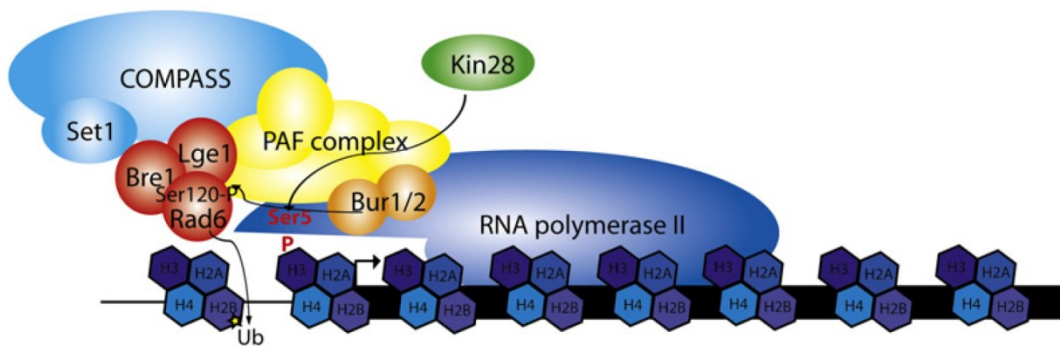
Metylácia H3K36 je do všetkých stupňov katalyzovaná HMT Set2, pričom di- a trimetylácia H3K36 sú charakteristické pre strednú a 3' oblasť aktívne transkribovaných

génov (Strahl et al. 2002; Pokholok et al. 2005). Ukázalo sa, že prítomnosť trimetylácie H3K36 koreluje so silnou transkripčnou aktivitou (Pokholok et al. 2005), zatiaľ čo prítomnosť dimetylácie nekoreluje s frekvenciou transkripcie, ale s tým, či je gén transkribovaný alebo nie (Rao et al. 2005). K lokalizácii a miere metylácie H3K36 prispieva podobne ako u metylácie H3K4 samotná RNA Pol II, ktorá je v priebehu elongácie transkripcie hyperfosforylovaná na CTD (pSer5 a pSer2). Hyperfosforylovaná CTD viaže Set1, ktorá v tejto oblasti metyluje H3K36 (Li et al. 2003; Krogan, Kim, et al. 2003; Xiao et al. 2003; Kizer et al. 2005). Pre metyláciu do vyššieho stupňa sú tiež potrebné N-koniec HMT Set2 obsahujúci doménu SET, ktorý je dôležitý pre dimetyláciu H3K4 (Youdell et al. 2008); cyklín-dependentné kinázy Bur1/Bur2 (Chu et al. 2006) a Ctk1 (Youdell et al. 2008); niektoré podjednotky komplexu PAF, ktorý je asociovaný s RNA Pol II (Chu et al. 2007); a histónové chaperony Spt6 a Asf1, ktoré sa podieľajú na reorganizácii chromatinu (Youdell et al. 2008; Lin et al. 2010). Metylácia H3K36 je z histónov odstránená prostredníctvom demetyláz Jhd1, ktorá rozpoznáva mono- a dimetylovaný H3K36, a Rph1, ktorá špecificky rozpoznáva di- a trimetylovaný H3K36 (Klose et al. 2007). Jednou z funkcií metylácie H3K36 je potlačenie iniciácie transkripcie z kryptických aktivačných sekvencií v kódujúcej oblasti. Metylovaný H3K36 interaguje s podjednotkami Eaf3 a Rco1 HDAC komplexu Rpd3, ktorý po naviazaní deacetyluje históny za elongujúcou RNA Pol II. Deacetyláciou histónov dôjde k stabilizácii chromatinu, čím sa zabráni prístupu k vnútorným iniciačným miestam pre transkripciu (Carrozza et al. 2005; Joshi & Struhl 2005; Keogh et al. 2005; Lee & Shilatifard 2007; Li et al. 2007). Štúdie zamerané na prepojenie procesov transkripcie a zostrihu pre-mRNA odhalili, že metylácia H3K36 u kvasinky *S. cerevisiae* zohráva dôležitú úlohu v kotranskripčnom zostrihu pre-mRNA. Ukázalo sa, že mutanty s mutáciami v metylácii H3K36 preukazujú podobné fenotypy ako mutanty s poruchami zostrihu pre-mRNA, a že gény kódujúce komponentov U1, U2 a tri-snRNP geneticky interagujú s génmi kódujúcimi metyltransferázu Set2 a demetylázu Jhd1. Pomocou CHIP analýzy ďalej zistili, že HMT Set2 uľahčuje väzbu U2 a U5 snRNP do spliceozómu (Sorenson et al. 2016). Z toho vyplýva, že i metylácia histónov pozitívne ovplyvňuje koordináciu väzby zostrihových faktorov na práve vznikajúci primárny transkript u *S. cerevisiae*. Metylácia H3K36 okrem transkripcie a zostrihu pre-mRNA ovplyvňuje tiež umlčovanie génov (Tompa & Madhani 2007) a replikáciu DNA (Pryde et al. 2009; Rizzardi et al. 2012).

Metylácia H3K79 je sprostredkovaná vysoko konzervovanou HMT Dot1. Dot1 katalyzuje mono-, di- a trimetyláciu H3K79, pričom metylácia do vyššieho stupňa prebieha distributívnym (neprocésívnym) mechanizmom, v ktorom sa Dot1 oddeľuje od histónu po každom cykle metylácie, tzn. Dot1 je schopná v jednej reakcii pripojiť len jednu metylovú skupinu (Frederiks et al. 2008). Oproti ostatným HMT Dot1 neobsahuje doménu SET a metyluje lyzínový zvyšok na globulárnej doméne v oblasti slučky L1 histónu H3. Táto oblasť nie je v kontakte s DNA a je lokalizovaná na povrchu nukleozómu (Feng et al. 2002). Pre umožnenie metylácie H3K79 je potrebná interakcia medzi kyslou oblasťou na C-konci HMT Dot1 a bázickou oblasťou na N-konci histónu H4, pričom Dot1 nie je aktívna na voľných histónoch, ale vyžaduje chromatinový substrát. Navyše sa ukázalo, že pre stabilné naviazanie Dot1 na chromatin je dôležitá acetylácia H3K14. Blokovanie interakcie medzi Dot1 a histónom H4 viedlo k vymiznutiu všetkých stupňov metylácie H3K79 (Lacoste et al. 2002; Altaf et al. 2007; Fingerman et al. 2007; Lee et al. 2018). Pre vznik di- a trimetylácie H3K79 je navyše dôležitá prítomnosť ubikvitinylácie H2BK123, ktorá je rozpoznávaná N-koncovou doménou Dot1 (Ng, Xu, et al. 2002; Shahbazian et al. 2005; Oh et al. 2010). Metyltransferázová aktivita Dot1 je tiež ovplyvnená podjednotkami komplexu PAF (Paf1 a Rtf1; Krogan et al. 2003). Dot1 a metylácia H3K79 boli detekované v kódujúcej oblasti aktívne transkribovaných génov, pričom existuje len veľmi malá korelácia medzi úrovňou metylácie H3K79 a transkripčnou aktivitou (Pokholok et al. 2005). Úloha metylácie H3K79 v regulácii transkripcie je u *S. cerevisiae* stále nejasná. Nedávne štúdie na kvasinkách však odhalili, že Dot1 funguje ako histónový chaperon a reguluje dynamiku nukleozómov prostredníctvom výmeny histónov v transkribovaných oblastiach dlhých génov, a to nezávisle na metylácii H3K79. Navyše ukázali, že Dot1 nezávisle na metyltransferázovej aktivite prispieva k transkripcii z kryptických aktivačných sekvencií v transkribovaných génoch u buniek s deletovanou HMT Set2. Tieto štúdie prispeli k novým poznatkom o funkcii Dot1 v regulácii transkripcie (Lee et al. 2018). Dot1 a ňou sprostredkovaná metylácia H3K79 tiež negatívne ovplyvňuje umlčovanie génov v heterochromatických oblastiach (Ng, Feng, et al. 2002; van Leeuwen et al. 2002), podieľa sa na opravách DNA pri jej poškodení (Giannattasio et al. 2005; Wysocki et al. 2005; Lazzaro et al. 2008) a reguluje bunkový cyklus (Giannattasio et al. 2005; Wysocki et al. 2005).

2.2.1.3 Ubikvitinylácia histónu H2B na lyzíne 123

Ďalšou významnou posttranslačnou modifikáciou je ubikvitinylácia histónov. Na rozdiel od ostatných modifikácií dochádza pri ubikvitinylácii k pripojeniu globulárneho proteínu ubikvitinu zloženého zo 76 aminokyselín. U kvasiniek je ubikvitinylovaný histón H2B na lyzíne 123 (H2BK123ub) prostredníctvom konjugačného enzýmu Rad6, ubikvitinligázy Bre1 a ich asociovaného proteínu Lge1 (Obr. 8; Robzyk et al. 2000; Hwang et al. 2003; Wood et al. 2003a). Ubikvitinylácia H2BK123 zohráva dôležitú úlohu pri aktivácii transkripcie génov (Kao et al. 2004), participuje tiež na umlčovaní génov a vzniku heterochromatínu (Sun & Allis 2002; Wood, Krogan, et al. 2003). Tiež sa ukázalo, že sa podieľa na odpovediach bunky na poškodenie DNA (Giannattasio et al. 2005; Game et al. 2006; Vlaming et al. 2014) a na meióze (Robzyk et al. 2000; Yamashita et al. 2004). Ubikvitinylácia H2BK123 je v priebehu transkripcie cyklicky ustavovaná a následne odstraňovaná. K deubikvitinylácii H2BK123 dochádza prostredníctvom deubikvitinyláčnych enzýmov Ubp8 a Ubp10. Enzým Ubp8, ktorý je súčasťou komplexu SAGA a SALSA/SLIK, je dôležitý pre aktiváciu génov (Henry et al. 2003; Daniel et al. 2004), zatiaľ čo enzým Ubp10, ktorý preferenčne odstraňuje ubikvitin z H2B na telomérach, je dôležitý pre umlčovanie génov (Emre et al. 2005; Gardner et al. 2005).



Obr. 8: Ubikvitinylácia H2BK123 sprostredkovaná komplexom Rad6/Bre1/Lge1. Pre vznik ubikvitinylácie H2BK123 sú dôležité RNA Pol II, cyklín-dependentné kinázy Bur1/Bur2 a komplex PAF. Znázornená je fosforylácia Rad6 na Ser120 komplexom Bur1/Bur2 a fosforylácia CTD RNA Pol II na Ser5 kinázou Kin28. Ubikvitinylácia H2BK123 je následne dôležitá pre väzbu komplexu COMPASS, ktorý di- a trimetyluje H3K4 (prevzaté z Weake a Workman 2008).

Ubikvitinylácia H2BK123 bola detekovaná v promotore a v kódujúcej oblasti aktívne transkribovaných génov (Xiao et al. 2005). Väzba a aktivita ubikvitinyláčného komplexu Rad6/Bre1/Lge1 sú regulované prostredníctvom interakcií s transkripčnou

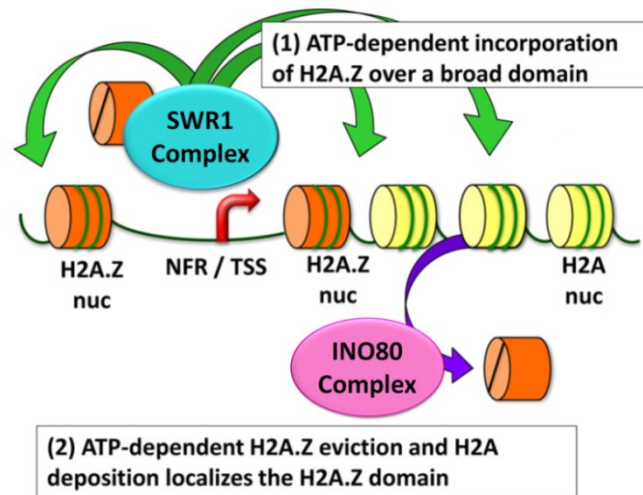
aparátúrou, vrátane RNA Pol II (Xiao et al. 2005), cyklín-dependentných kináz Bur1/Bur2 (Wood et al. 2005) a PAF komplexu (Obr. 8; Ng, Dole, et al. 2003; Wood, Schneider, et al. 2003; Xiao et al. 2005). Štúdie zamerané na ubikvitinyláciu H2BK123 odhalili, že priebeh transkripcie ovplyvňuje niekoľkými spôsobmi. Ukázalo sa, že ubikvitinylácia H2BK123 sa zúčastňuje prestavieb chromatinu na aktívne transkribovaných génoch (Fleming et al. 2008; Chandrasekharan et al. 2009). Na základe navrhnutého modelu sa predpokladá, že po indukcii transkripcie ubikvitinylácia H2BK123 stabilizuje nukleozómy a uľahčuje väzbu Spt16 na chromatín. Deubikvitinylácia H2BK123 enzýmom Ubp8 následne destabilizuje nukleozómy, zvýši aktivitu Spt16, čím dôjde k rýchlejšiemu odstráneniu nukleozómov z kódujúcich oblastí, a tým sa uľahčí prechod RNA Pol II. Po prechode RNA Pol II môže dôjsť v kódujúcich oblastiach k opätovnej ubikvitinylácii H2BK123, ktorá stabilizuje chromatín po depozícii nukleozómov proteínom Spt16 (Chandrasekharan et al. 2009). Absencia ubikvitinylácie a znížená depozícia nukleozómov spôsobená mutáciami v Spt16 vedie k aktivácii transkripcie z kryptických aktivačných sekvencií v kódujúcej oblasti (Mason & Struhl 2003; Fleming et al. 2008). Cyklus ubikvitinylácie a následnej deubikvitinylácie H2BK123 má v priebehu transkripcie vplyv aj na ďalšie procesy. Ubikvitinylácia H2BK123 ovplyvňuje aktivitu HMT Set1 a Dot1, a je dôležitá pre vznik di- a trimetylácie (Dover et al. 2002; Sun & Allis 2002; Dehé et al. 2005; Shahbazian et al. 2005). Taktiež sa ukázalo, že na niektorých intrón-obsahujúcich génoch uľahčuje trimetyláciu H3K36 sprostredkovanú HMT Set2 (Shieh et al. 2011). Deubikvitinylácia na H2BK123 enzýmom Ubp8 má za následok znemožnenie di- a trimetylácie na H3K4 a H3K79, pričom tieto lyzíny zostávajú monometylované. Deubikvitinyláciou H2BK123 sa tiež umožní väzba komplexu CTDK-I na RNA Pol II, ktorý fosforyluje Ser2 na CTD RNA Pol II (Wyce et al. 2007). Fosforylovaný Ser2 je dôležitý pre väzbu HMT Set2, ktorá di- a trimetyluje H3K36 (Li et al. 2003; Krogan, Kim, et al. 2003; Xiao et al. 2003; Kizer et al. 2005). Tieto súvislosti naznačujú, že ubikvitinylácia a následná deubikvitinylácia H2BK123 sú dôležité pre plnú aktiváciu transkripcie a pre správny prechod z časnej fázy elongácie do neskoršej fázy, pre ktorú je práve prítomnosť di- a trimetylácie H3K36 a monometylácie H3K4 a H3K79 charakteristická (Pokholok et al. 2005). Ďalej bolo pozorované, že de/ubikvitinylácia H2BK123 je dôležitá pre optimálny priebeh kontraskripčného zostrihu pre-mRNA. Ukázalo sa, že proteín Npl3, ktorý patrí do rodiny SR faktorov (bohaté na serín a arginín) a je dôležitý pre účinné naviazanie zostrihových faktorov, geneticky interaguje s ubikvitinligázou Bre1 a deubikvitinylázou Ubp8 (Moehle

et al. 2012). Ďalším štúdiom sa zistilo, že ubikvitinylácia H2B napomáha väzbe včasných zostrihových faktorov U1 a U2 snRNP na vznikajúcu pre-mRNA, pričom jej narušenie spôsobuje, podobne ako defekty v metylácii H3K4 a K36, akumuláciu intrónov v primárnych transkriptoch (Hérissant et al. 2014). Tieto zistenia značia, že de/ubikvitinácia je dôležitým prvkom v prepojení procesov transkripcie, zostrihu a posttranslačných modifikácií chromatinu.

2.2.2 Histónový variant H2A.Z

Veľký vplyv na štruktúru chromatinu a na procesy génovej expresie má aj histónový variant histónu H2A, H2A.Z, ktorý je rozšírený v chromatine všetkých eukaryot. Histónový variant H2A.Z je vysoko konzervovaný proteín s približne 60% zhodou v aminokyselinovej sekvencii s histónom H2A (Zlatanova & Thakar 2008). U kvasinky *S. cerevisiae* je H2A.Z kódovaný génom *HTZ1*, ktorého transkripcia je regulovaná v priebehu bunkového cyklu, a je čiastočne závislá na replikácii. Delícia génu pre H2A.Z nie je pre kvasinky *S. cerevisiae* letálna (Spellman et al. 1998; Santisteban et al. 2000). Variant H2A.Z môže byť do chromatinu inkorporovaný v priebehu celého bunkového cyklu (Zlatanova & Thakar 2008). U kvasinky *S. cerevisiae* je H2A.Z prítomný u približne dvoch tretín génov v promotoroch v reprimovanom/bazálnom stave, kde je typicky lokalizovaný do +1 (väčšina génov) a -1 nukleozómov (menšia skupina génov) ohraničujúcich NFR (Guillemette et al. 2005; Raisner et al. 2005; Zhang et al. 2005). Prítomnosť H2A.Z negatívne koreluje s prítomnosťou TATA sekvencií, čo naznačuje, že H2A.Z preferuje promotory neobsahujúce TATA sekvencie (tzn. otvorené promotory). H2A.Z však nie je limitovaný len na oblasti promotoru, niektoré nukleozómy obsahujúce H2A.Z sa vyskytujú aj v kódujúcej oblasti génov (Li et al. 2005; Hartley & Madhani 2009; Tirosh et al. 2010). Inkorporácia H2A.Z do chromatinu prebieha prostredníctvom komplexu SWR1, ktorý obsahuje proteín Swr1 (Swi/Snf príbuzná ATPáza) a 12 ďalších proteínových podjednotiek (Krogan, Keogh, et al. 2003). SWR1 komplex katalyzuje výmenu dimérov (H2A-H2B) za diméry (H2A.Z-H2B) prostredníctvom ATPázovej aktivity (Obr. 9; Luk et al. 2010). Ďalšími dôležitými podjednotkami komplexu SWR1 sú Swc2, ktorá viaže C-terminálny koniec H2A.Z, a Bdf1, ktorá prostredníctvom dvoch bromodomén rozoznáva acetylované históny H3 a H4, a napomáha väzbe H2A.Z na

acetylované promotory (Zhang et al. 2005; Millar & Grunstein 2006; Altaf et al. 2010). Naopak, komplex INO80 obsahujúci proteín Ino80 (homológ Snf2) môže katalyzovať spätnú výmenu dimérov (H2A.Z-H2B) za diméry (H2A-H2B) (Obr. 9; Papamichos-Chronakis et al. 2011).



Obr. 9: Schematické znázornenie výmeny dimérov (H2A.Z-H2B) pri remodelácii chromatínu prostredníctvom komplexov SWR1 a INO80 (prevzaté a upravené z Papamichos-Chronakis et al. 2011).

Ukázalo sa, že histónový variant H2A.Z sa významne podieľa na regulácii iniciácie transkripcie a génovej expresie. H2A.Z pravdepodobne zohráva úlohu pri naviazaní koaktivátorov Swi/Snf, Mediátoru, komplexu SAGA a všeobecného transkripčného faktoru TBP (Wan et al. 2009; Marques et al. 2010). Štúdie *in vitro* poukázali na menej stabilnú asociáciu H2A.Z s DNA, čo ma za následok vyššiu citlivosť H2A.Z na uvoľňovanie z chromatínu (Zhang et al. 2005). Keďže +1 nukleozómy predstavujú transkripčnú bariéru pre RNA Pol II, H2A.Z môže podporiť iniciáciu transkripcie prostredníctvom zníženia nukleozómovej bariéry (Zhang et al. 2005; Weber et al. 2014). Ďalšie štúdie tiež naznačujú úlohu H2A.Z pri regulácii elongácie transkripcie, pretože sa ukázalo, že H2A.Z geneticky interaguje s elongačnými faktormi (Spt5 a Dst1) a podporuje elongáciu transkripcie (Malagon et al. 2004; Santisteban et al. 2011). Prepojenie transkripcie a zostrihu pre-mRNA a úloha H2A.Z v regulácii transkripcie viedla k otázkam, či H2A.Z ovplyvňuje aj priebeh zostrihu pre-mRNA. Genetická analýza interakcií medzi *HTZ1* a génmi kódujúcimi neesenciálne zostrihovú faktory odhalili rozsiahle genetické interakcie s proteínmi asociovanými s U2 snRNP. Navyše sa ukázalo, že H2A.Z podporuje účinné preusporiadanie spliceozómu, pričom strata H2A.Z vedie k pretrvávajúcej väzbe U2 snRNP a k zníženiu väzby nasledujúcich snRNP na primárny transkript. Strata H2A.Z tiež

negatívne ovplyvňuje elongáciu transkripcie, čo naznačuje, že preusporiadanie spliceozómu je viazané na úlohu H2A.Z v elongácii transkripcie. Tieto štúdie poukázali na dôležitú úlohu H2A.Z v koordinácii zostrihu a elongácie transkripcie (Neves et al. 2017).

2.3 Úloha zostrihového faktoru Prp45 v spriahnutí procesov génovej expresie

V našom laboratóriu študujeme zostrihový faktor Prp45 (pre-mRNA processing protein 45) kvasinky *S. cerevisiae*, ktorý patrí k proteínom SNW. Proteíny SNW sú zostrihové faktory, ktoré boli identifikované takmer vo všetkých sekvenovaných eukaryotických organizmoch, výnimkami sú *Cyanidioschyzon merolae* a *Encephalitozoon cuniculi*, ktoré majú extrémne redukované spliceozómy (Grisdale et al. 2013; Stark et al. 2015). Proteíny SNW obsahujú jedinečnú sekvenciu s absolútne konzervovaným motívom SNWKN, pričom sa ukázalo, že časti týchto proteínov sú tzv. vnútorne neusporiadané (intrinsically disordered; Wang et al. 2010). Prvá zmienka o zapojení proteínov SNW v procese zostrihu pre-mRNA pochádza zo štúdií na ľudskom ortológu SNW1/SKIP (Dahl et al. 1998; Neubauer et al. 1998). Do zostrihu pre-mRNA vstupuje SNW1/SKIP ako súčasť komplexu CDC5L tesne pred vznikom aktívneho komplexu B* (pred prvou zostrihovou reakciou), zostáva naviazaný po celú dobu zostrihu a uvoľňuje sa spoločne s vystrihnutým intrónom (Makarov et al. 2002). V rámci spliceozómu SNW1/SKIP umožňuje väzbu periférne sa nachádzajúcich efektorových enzýmov. Proteín SNW1/SKIP viaže prostredníctvom C-terminálneho helixu helikázu Prp22 (DHX8), ktorá participuje pri druhom zostrihovom kroku a na rozpade spliceozómu (Bertram et al. 2017). Prostredníctvom N-terminálnej domény interaguje SNW1/SKIP s peptidyl-prolyl izomerázou PPIL1 (peptidyl-prolyl isomerie-like 1) z rodiny cyklofilínov, ktorá svojim izomerázovým pôsobením pravdepodobne uľahčuje remodeláciu spliceozómu (Skružný et al. 2001; Xu et al. 2006). Okrem zostrihu pre-mRNA bol SNW1/SKIP implikovaný ako významný transkripčný koregulátor na úrovni génovej aktivácie a represie (Zhang et al. 2001; Prathapam et al. 2002). SNW1/SKIP pôsobí v rámci niektorých signálnych dráh, ako je napr. Notch (Zhou, Fujimuro, Hsieh, Chen & Hayward 2000; Zhou, Fujimuro, Hsieh, Chen, Miyamoto, et al. 2000) a TGF- β (Leong et al. 2001), a participuje na regulácii prechodu bunkovým cyklom (Prathapam et al. 2002). Štúdie na modeli génu HIV-1

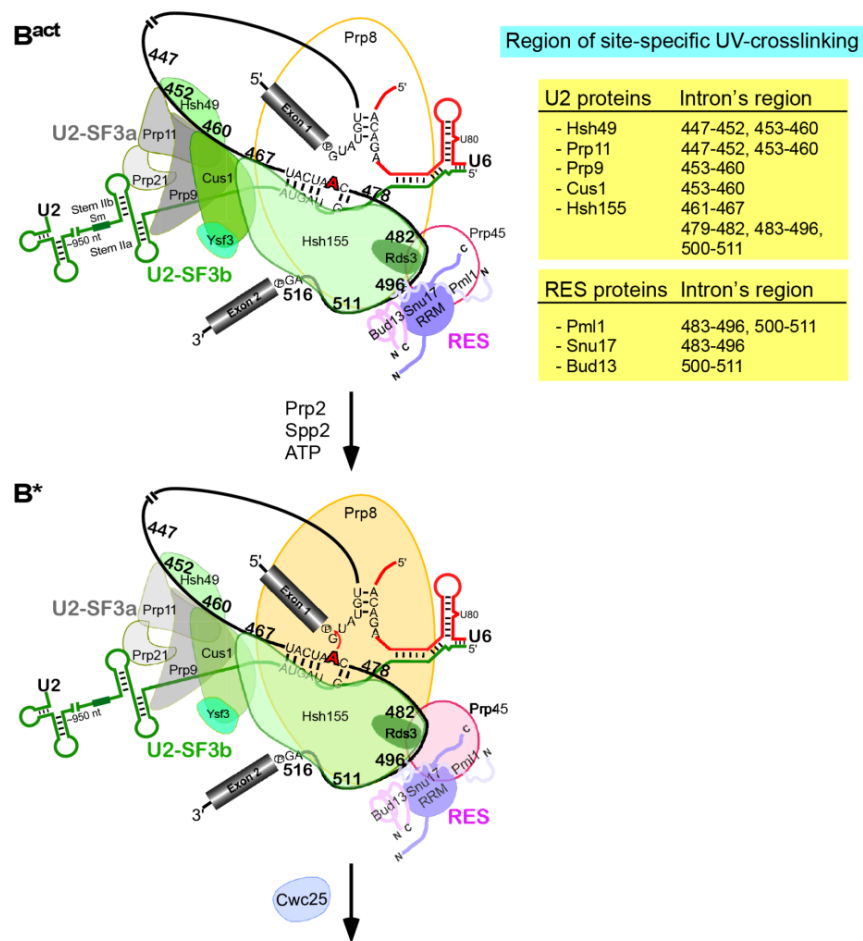
integrovaného do genómu buniek HeLa ukázali, že SNW1/SKIP sa podieľa nielen na regulácii iniciácie transkripcie, ale aj na regulácii elongácie transkripcie. SNW1/SKIP sa zapája do regulácie elongujúcej RNA Pol II prostredníctvom interakcie s komplexom P-TEFb-Tat-TAR (Brès et al. 2005) a je dôležitý pre asociáciu proteínu c-Myc s promotorom HIV-1 génu (Brès et al. 2009). Okrem toho bola identifikovaná interakcia SNW1/SKIP s podjednotkami ľudského HMT komplexu MLL1 (ortológ kvasinkového komplexu COMPASS), ktorý je zodpovedný za metyláciu H3K4 (Brès et al. 2009). Bolo navrhnuté, že SNW1/SKIP sa podieľa na vzniku génovo špecifickej trimetylácie H3K4, ktorá môže byť rozpoznávaná proteínom CHD1, o ktorom je známe, že viaže U2 snRNP (Sims et al. 2007). Týmto spôsobom by mohol SNW1/SKIP prispievať k regulácii zostavovania spliceozómu (Brès et al. 2009). Tieto výsledky prispievajú k domnienke, že SNW1/SKIP môže pôsobiť ako faktor, ktorý vzájomne prepája procesy transkripcie a zostrihu pre-mRNA.

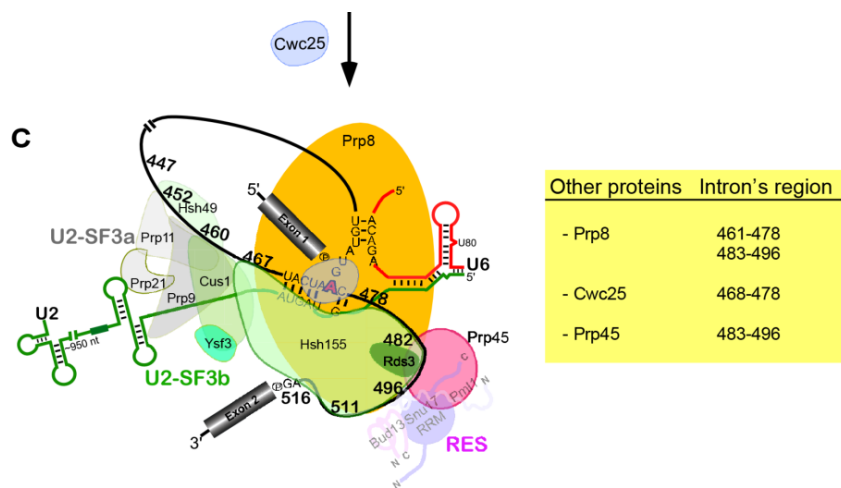
Štruktúra proteínu Prp45 a jeho interakční partneri

Proteín Prp45, o molekulovej hmotnosti 42 kDa a dĺžke 379 aminokyselinových zvyškov (AA), bol objavený ako súčasť komplexu penta-snRNP, ktorý obsahuje všetky snRNP a väčšinu známych zostrihových faktorov (Stevens et al. 2002). Podobne ako ostatné proteíny SNW vykazuje Prp45 jadrovú lokalizáciu (Martinkova et al. 2002). Primárna štruktúra proteínu Prp45 obsahuje niekoľko vysoko konzervovaných úsekov: polyprolínový motív, motív SNWKN (170. – 174. AA), helikálny motív a SH2-like doménu (Obr. 12, str. 46). Svojou štruktúrou sa však od štruktúry ostatných homológov SNW odlišuje. Prp45 má výrazne skrátenú N-terminálnu doménu (chýba vysoko konzervovaná oblasť bohatá na glycín) a jeho polyprolínový motív je redukovaný zo 7 na 2 prolínové zvyšky (Folk et al. 2004). Aj keď má Prp45 zachovaný absolútne konzervovaný motív SNWKN, jeho kompletná delécia nie je pre bunky letálna (Martinkova et al. 2002).

Na rozdiel od ľudského SNW1/SKIP bola úloha proteínu Prp45 doposiaľ potvrdená len pri zostrihu pre-mRNA. Identifikácia interakcie Prp45 s proteínmi komplexu NTC (nineteen complex; Prp46, Syf1 a Syf3) pomocou dvojhybridného systému (Albers et al. 2003) a nález genetických interakcií s niektorými komponentmi tohto komplexu (Syf1, Clf1/Syf2, Ntc20 a Cef1; Gahura et al. 2009) potvrdila asociáciu Prp45 s komplexom

NTC. K väzbe komplexu NTR (NTC related) do spliceozómu dochádza ešte pred prvou transesterifikačnou reakciou. Asociácia Prp45 bola pozorovaná už v rámci komplexu B^{act} (aktívny spliceozóm), avšak interakcia s oblasťou blízko 3' zostrihového miesta, ktorá bola ukázaná, nebola priama. K priamej väzbe Prp45 do oblasti intrónu (nukleotidy v mieste vetvenia) dochádza až v rámci katalyticky aktívneho komplexu B* (Albers et al. 2003; Fabrizio et al. 2009). Po prvom zostrihovom kroku dochádza v rámci C komplexu k navýšeniu sily tejto väzby o približne 80% (viď Obr. 10; Schneider et al. 2015). Prp45 asociuje so spliceozómom po celú dobu katalýzy a po ukončení zostrihu zostáva súčasťou komplexu obsahujúceho U2, U5 a U6 snRNP, kde je asociovaný s vystrihnutým intrónom (Albers et al. 2003).

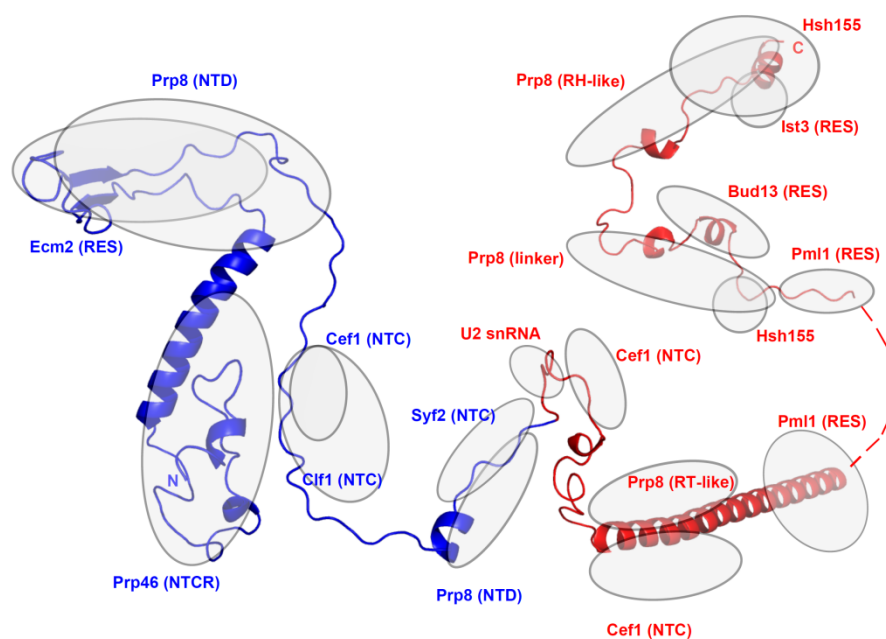




Obr. 10: Schematické znázornenie väzby niektorých zostrihových faktorov do oblasti intrónu (okolie miesta vetvenia) pre-mRNA v rámci aktívneho komplexu B^{act}, katalyticky aktívneho komplexu B* a komplexu C (po 1. zostrihovom kroku). V tabuľkách sú uvedené zostrihové faktory a ich presná väzbová oblasť intrónu. Intenzita zafarbenia jednotlivých štruktúr: U2 snRNP (sivá a zelená), RES komplex (fialová), Prp8 (žltá), Prp45 (ružová), odpovedá sile ich väzby v rámci primárneho transkriptu (prevzaté a upravené podľa Schneider et al. 2015).

S veľkým rozmachom elektrónovej kryomikroskopie (cryo-EM) bola v posledných rokoch publikovaná séria štruktúrnych štúdií spliceozómu *S. cerevisiae*, *S. pombe* a *H. sapiens* (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Bertram et al. 2017). Známa štruktúra proteínu Prp45 je doposiaľ nekompletná, avšak kombináciou informácií zo štruktúr cryo-EM *S. cerevisiae* B^{act} (číslo štruktúry 5GM6) a ľudského C* (číslo štruktúry 5MQF) komplexu bola navrhnutá štruktúra Prp45 (vid' Obr. 11; Yan et al. 2016; Bertram et al. 2017). Ukázalo sa, že motív SNWKN proteínu Prp45 sa nachádza v bezprostrednej blízkosti katalytického centra spliceozómu, kde je v kontakte s U2 snRNAs (small nuclear RNA). Prp45 má charakteristiky, ktoré sa prisudzujú vnútorne neusporiadaným proteínom, tzn. má vysoký obsah nabitých/polárnych aminokyselín a malý obsah hydrofóbných aminokyselín. Prp45 prebieha po celej dĺžke spliceozómu (od periferie skrz katalytické centrum až k periférii) a v rámci spliceozómu kontaktuje celý rad proteínov (Obr. 11). Ako už bolo spomínané, Prp45 interaguje s podjednotkami NTC komplexu (Cef1, Clf1/Syf2, Syf1, Syf3, Ntc20, Cwc15), ktorý sa podieľa na aktivácii spliceozómu (Albers et al. 2003; Ohi et al. 2005; Gahura et al. 2009). Ďalej je dôležitý pre väzbu DEAH-box RNA-helikázy Prp22, ktorá sa zúčastňuje druhej zostrihovej reakcie a podieľa sa na rozpade spliceozómu (Albers et al. 2003; Gahura et al. 2009). Okrem toho Prp45 fyzicky interaguje s ďalšími zostrihovými faktormi, napr. Prp8 (komponent U4/U6.U5 tri-snRNP komplexu), Prp2

(RNA-závislá DExD/H-box ATPáza), Hsh155 (zostrihový faktor asociovaný s U2 snRNP) a s podjednotkami RES (pre-mRNA REtention and Splicing) komplexu Ist3, Bud13 a Pml1 (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Yan et al. 2017; Galej et al. 2016; Nguyen et al. 2016; Rauhut et al. 2016). Proteín Prp45 interaguje s proteínmi RES komplexu prostredníctvom C-terminálnej domény a napomáha ich lokalizácii medzi Hsh155 a Prp8 (Rauhut et al. 2016). Na základe týchto výsledkov autori predpokladajú, že proteín Prp45 pravdepodobne uľahčuje dynamické prestavby spliceozómu a podieľa sa na stabilizácii katalytického centra prostredníctvom interakcií s ďalšími komponentmi spliceozómu (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Rauhut et al. 2016).



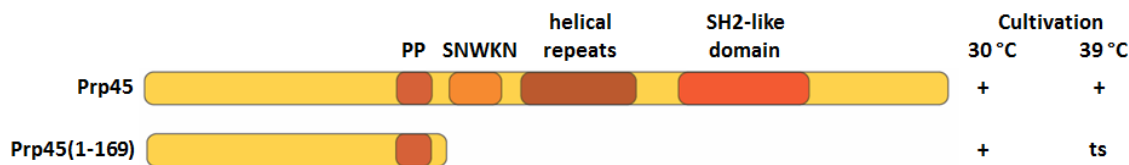
Obr. 11: **Schematické znázornenie štruktúry Prp45 a kontaktov v spliceozóme.** Štruktúra bola vytvorená kombináciou informácií z cryo-EM štruktúry B^{act} komplexu *S. cerevisiae* (5GM6) a ľudského komplexu C* (5MQF). Oblasť chýbajúca v mutante Prp45(1-169) je označená červenou (170. až 379. aminokyselina). Oblasti blízkeho kontaktu proteínov a RNA s proteínom Prp45 (vzdialenosť <math><4 \text{ \AA}</math>) sú označené sivými oválmi (prevzaté z Hálová et al. 2017).

Termosenzitivná alela *prp45(1-169)*

K štúdiu funkcie zostrihového faktora Prp45 bola v našom laboratóriu pomocou delécie N- a C-terminálnej domény získaná sada mutant Prp45, pričom sa ukázalo, že pre životaschopnosť bunky je esenciálna oblasť na N-konci proteínu Prp45 (zhrnuté v Martinkova et al. 2002; Gahura et al. 2009). Z hľadiska fenotypových vlastností sú

najlepšie preštudované bunky s deléciou C-terminálnej oblasti proteínu Prp45 (Obr. 12) označované ako *prp45(1-169)*. Táto mutanta bola pripravená použitím integračnej kazety obsahujúcej: homológny úsek k príslušnej oblasti génu *PRP45* (40 nt), tri hemaglutinínové značky (3x HA-tag), stop kodón, gén pre rezistenciu k selekčnému antibiotiku a homológny úsek k sekvencii za génom *PRP45* (40 nt). K štúdiu Prp45 boli prvotne používané bunky *prp45(1-169)* s rezistenciou ku geneticínu a s genetickým pozadím EGY48 (MAT α *ura3 his3 trp1 LexA(6xop)-LEU2*). Tieto bunky sú citlivé na zvýšenú kultivačnú teplotu a po prenose do reštriktívnej teploty (37 °C) postupne zastavujú svoj rast. Za štandardných podmienok (30 °C) bunky *prp45(1-169)* nevykazujú oproti wt (wild type) bunkám výrazný rastový defekt, ale je možné u nich pozorovať niekoľko morfológických abnormalít. Tieto bunky sú nadmerne predĺžené s deformovaným tvarom a ich značné percento má veľké neoddelené pupene. Sú citlivé k mikrotubulárnym inhibítorm (nocodazol, carbendazim, benomyl) a k cykloheximidu (inhibítorm translácie) (Gahura et al. 2009). Všetky uvedené fenotypy pripomínajú bunky s mutáciou faktorov spojených s bunkovým cyklom (tzv. cdc mutanty; (Hartwell et al. 1973). Súčasne sa k štúdiu Prp45 používajú bunky *prp45(1-169)* s rezistenciou k nourseothricínu a s genetickým pozadím BY4741 (MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*). Tieto bunky majú oproti wt bunkám mierne predĺžený rast, sú citlivé na zvýšenú kultivačnú teplotu a svoj rast zastavujú pri teplote 39 °C. V laboratóriu boli tiež pripravené bunky s „čistou“ C-koncovou skrúteninou proteínu Prp45 (genetické pozadie BY4741), tzn. C-koncová oblasť Prp45 bola z génu *PRP45* deletovaná pomocou metódy CRISPR (ďalej označovaná ako *prp45(1-169)**). Fenotyp týchto buniek nebol doposiaľ detailnejšie preštudovaný. Získané výsledky však ukazujú, že mutanta *prp45(1-169)** vykazuje oproti mutante *prp45(1-169)* miernejší fenotyp. V bežných kultivačných podmienkach (30 °C) rastú bunky *prp45(1-169)** podobnou rýchlosťou ako bunky *prp45(1-169)* a po presunutí do reštriktívnej teploty (39 °C, kultivácia 24 hod) postupne zastavujú rast, pričom kinetika spomaľovania rastu je oproti bunkám *prp45(1-169)* pomalšia (moje nepublikované výsledky). Mutanta *prp45(1-169)** má tiež menšiu citlivosť k látkam cykloheximidu, benomylu a calcofluoru v porovnaní s mutantou *prp45(1-169)*. Pomocou metódy RNA-seq sa navyše odhalilo, že mRNA proteínu Prp45(1-169)-3HA je v bunkách *prp45(1-169)* oproti mRNA proteínu Prp45(1-169) v bunkách *prp45(1-169)** nadprodukovaná (približne 2x viac), čo by mohlo mať v dôsledku vplyv na výsledný fenotyp. Hladina mRNA proteínu

Prp45(1-169) v bunkách *prp45(1-169)** je podobná hladine mRNA Prp45 u wt buniek (nepublikované výsledky; M. Hálová).



Obr. 12: Schéma proteínu Prp45 a jeho skráteného variantu kódovaného alelou *prp45(1-169)*. Označené sú jednotlivé domény. Alela *prp45(1-169)* spôsobuje citlivosť buniek k zvýšenej teplote kultivácie (označenie ts).

V rámci štúdia úlohy Prp45 v procese zostrihu pre-mRNA bolo odhalené, že mutácia *prp45(1-169)* zoslabuje asociáciu helikázy Prp22 so spliceozómom a ovplyvňuje presnosť výberu 3' zostrihového miesta (Gahura et al. 2009). Mutanta Prp45(1-169)-3HA navyše geneticky interaguje a vykazuje syntetickú letalitu v kombinácii s mutáciami v zostrihových faktoroch významných pre druhý zostrihový krok (Prp17, Prp18, Prp22 a Slu7) a s mutáciami v komponentoch komplexu NTC (Albers et al. 2003; Gahura et al. 2009). Štruktúrne dáta z B^{act} komplexu poukazujú, že skrátená forma Prp45 môže existovať v komplexe s Prp8 a NTC podobne ako Prp45 u wt buniek, ale je pravdepodobne nedostatočná pri sprostredkovaní väzby U2 snRNP a RES komplexu (Obr. 11; Hálová et al. 2017). Bunky s mutáciou *prp45(1-169)* vykazujú „slabý“ zostrihový defekt, ktorý sa v prípade použitia reportérových génov s neštandardnými zostrihovými miestami manifestuje (Gahura et al. 2009). K charakterizácii rozsahu defektov v zostrihu u *prp45(1-169)* bola využitá metóda RNA-seq, ktorou bola detekovaná hladina mRNA a pre-mRNA intrón-obsahujúcich génov. Výsledkom tejto analýzy bolo, že mutácia *prp45(1-169)* vedie k akumulácii nezostrihutej pre-mRNA (Hálová et al. 2017). Hladina mRNA a pre-mRNA endogénnych génov bola kvantifikovaná aj pomocou RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR), ktorou sa potvrdila tri až šesťnásobná akumulácia testovaných pre-mRNA u *prp45(1-169)* (Hálová et al. 2017). V prípade mutanty *prp45(1-169)** bola RT-qPCR detekovaná nižšia akumulácia testovaných pre-mRNA oproti mutante *prp45(1-169)* (nepublikované výsledky; M. Hálová). Analýzou HA značených zostrihových faktorov (Prp42, Msl5, Mud2, Msl1, Brr2 a Prp19) pomocou metódy CHIP bol sledovaný vplyv mutácie *prp45(1-169)* na kotranskripčný zostrih na transkripčne aktívnych génoch *ACT1* a *ECM33*. Touto analýzou sa odhalilo, že u buniek *prp45(1-169)* dochádza k oneskorenému kotranskripčnému vyvážovaniu Msl1-HA (U2

snRNP), Brr2 (U5 snRNP) a Prp19 (NTC komplex). Tieto výsledky ukazujú, že Prp45 ovplyvňuje naviazanie U2 snRNP, čo má následne vplyv na formovanie spliceozómu. To naznačuje, že Prp45 pôsobí pri zostavovaní spliceozómu už v časných fázach, kedy by ešte nemal byť do tohto komplexu (pre-spliceozómu) inkorporovaný (Hálová et al. 2017).

Nepublikované výsledky získané v našom laboratóriu naznačujú, že úloha Prp45 nie je v bunke obmedzená len na zostrih pre-mRNA. U buniek s mutáciou *prp45*(1-169) dochádza k oneskoreniu indukcie expresie niektorých génov, ktoré neobsahujú intrón, pričom sa domnievame, že ich expresiu by mohla Prp45 ovplyvňovať v spojitosti s funkciou niektorých efektorov histónových modifikácii (nepublikované výsledky; M. Hálová). K tomuto podozreniu prispieva i nález, že proteín Prp45 bol schopný po naviazaní do promotora reportérového génu aktivovať jeho transkripciu (Martinkova et al. 2002). Boli tiež identifikované genetické interakcie Prp45 s faktormi dôležitými pre elongáciu transkripcie a s faktormi regulujúcimi chromatinové modifikácie (nepublikované výsledky; M. Hálová). Jednou z otázok, ktoré sa ponúkajú vzhľadom k tomu, čo bolo uvedené, je, či Prp45 nejakým spôsobom ovplyvňuje stav chromatinu, čím by mohol regulovať kotranskripčné zostavovanie spliceozómu.

3. MATERIÁL A METÓDY

3.1 Materiál

3.1.1 Zoznam použitých mikroorganizmov

3.1.1.1 *Escherichia coli*

Tab. 1: Použitý kmeň *E. coli*

Kmeň	Genotyp	Zdroj, príprava
DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, λ-</i>	Stratagene

3.1.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Tab. 2: Použitie kmene *S. cerevisiae*

Kmeň	Genotyp	Zdroj, príprava
BY4741	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
AVY17	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)-3HA::NatMX6</i>	Knock-in do <i>BY4741</i>
AVY92	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1::kanMX6</i>	Knock-in do <i>BY4741</i>
ΔGCN5 (Y07285)	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGR252w::kanMX4</i>	Euroscarf
AVY93	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)-3HA::NatMX6 set1::kanMX6</i>	Knock-in do <i>AVY17</i>
AVY69	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)-3HA::NatMX6 YGR252w::kanMX4</i>	Knock-in do <i>ΔGCN5 (Y07285)</i>
MHY17-a	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)</i>	Knock-in do <i>BY4741</i>
MHY18-b	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)</i>	Knock-in do <i>BY4741</i>
MHY50-5a	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169) set1::kanMX6</i>	Križenie <i>MHY18-b</i> x <i>set1Δ</i>
MHY45-2b	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169) YGR252w::kanMX4</i>	Križenie <i>MHY18-b</i> x <i>gcn5Δ</i>
MHY52-8D	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169) set1::kanMX6</i>	Križenie <i>MHY18-b</i> x <i>set1Δ</i>

LKY07	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bar1Δ</i>	Delitto perfetto do <i>BY4741</i>
LKY08	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)-3HA::<i>NatMX6 bar1Δ</i></i>	Delitto perfetto do <i>AVY17</i>
LKY09	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1::<i>kanMX6 bar1Δ</i></i>	Delitto perfetto do <i>AVY92</i>
LKY10	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGR252w::<i>kanMX4 bar1Δ</i></i>	Delitto perfetto do <i>ΔGCN5</i>
LKY11	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)-3HA::<i>NatMX6 set1::<i>kanMX6 bar1Δ</i></i></i>	Delitto perfetto do <i>AVY93</i>
LKY12	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)-3HA::<i>NatMX6 YGR252w::<i>kanMX4 bar1Δ</i></i></i>	Delitto perfetto do <i>AVY69</i>
LKY19	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169) bar1Δ</i>	Delitto perfetto do <i>MHY17-a</i>
LKY20	MAT α ; <i>his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0; prp45(1-169); bar1Δ</i>	Delitto perfetto <i>MHY18-b</i>
LKY21	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169) set1::<i>kanMX4 bar1Δ</i></i>	Delitto perfetto do <i>MHY50-5a</i>
LKY22	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169) gcn5::<i>kanMX4 bar1Δ</i></i>	Delitto perfetto do <i>MHY45-2b</i>
LKY23	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169) set1::<i>kanMX4 bar1Δ</i></i>	Kříženie <i>LKY20</i> x <i>LKY09</i>
LKY25	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169) set1::<i>kanMX4 bar1Δ</i></i>	Delitto perfetto do <i>MHY52-8D</i>

* v rámci diplomovej práce boli pripravené kmene s označením *LKY*

3.1.2 Kultivačné médiá a roztoky

3.1.2.1 Kvasinkové kultivačné médiá

Kvasinkové kultivačné médiá pripraviť z deionizovanej vody (diH_2O) upravenej v prístroji Watrex filtry Rovapur 10 a Ultrapur, sterilizovať v autokláve 20 minút pri 121 °C. Pevné médiá pripraviť pridaním agaru (výsledná koncentrácia 2%) pred klávovaním. V prípade potreby po vychladnutí pod 55°C pridať príslušné množstvo ampicilínu (výsledná koncentrácia 100 $\mu\text{g/ml}$).

YPAD (komplexné médium)

YPD je variant bez adenínu

- Zloženie:

10 g/l Yeast Extract Powder (Formedium)

20 g/l Universalpepton M66 (Merck)

100 mg/l Adenin-hemisulfát (Sigma-Aldrich)

[+/- 20 g/l Agar (Oxoid)]

Pevné zložky rozpustiť do diH₂O do 9/10 koncového objemu, sterilizovať a pridať sterilný roztok 20% glukózy (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 2%.

SD médium (definované médium)

- Zloženie:

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

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

[+/- 20 g/l Agar (Oxoid)]

Pevné zložky rozpustiť do diH₂O do 9/10 koncového objemu, sterilizovať a pridať sterilný roztok 20% glukózy (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 2%. Podľa požadovanej selekcie pridať sterilné roztoky aminokyselín a uracilu (viď nižšie).

Selekčné médium s 5-FOA

- Zloženie rovnaké ako SD médium so všetkými aminokyselinami a dusíkatými bázami

Pripraviť roztok 5-fluoroorotovej kyseliny (5-FOA, ThermoFisher Scientific) o koncentrácii 2 mg/ml a o objeme odpovedajúcom 1/2 koncového objemu média (výsledná koncentrácia 1 mg/ml) a sterilizovať filtráciou. Pripraviť 2x koncentrovaný základ pre SD médium a sterilizovať v autokláve. K základu pre SD médium pridať sterilný roztok 20% glukózy (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 2%, roztoky aminokyselín a báz, nechať vychladnúť pod 65 °C a zmiešať s roztokom 5-FOA.

Selekčné médium s geneticínom (G-418)

Na prípravu selekčnej plotne pridať do príslušného množstva kompletného média YPAD s agarom vychladnutým pod 55 °C (1 plotňa = ~25 ml média) príslušné množstvo 100 mg/ml geneticínu (500x koncentrované antibiotikum, Gibco).

Presporulačný agar

- Zloženie:

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

Pevné zložky rozpustiť do diH₂O do polovice koncového objemu, pridať polovicu koncového objemu sterilného roztoku 20% glukózy (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 10%, po vychladnutí pod 55 °C pridať ampicilín na výslednú koncentráciu 100 µg/ml.

(Fowelov) sporulačný agar

- Zloženie:

0,5 g/100 ml KAc (Lachema)

0,23 g/100 ml KCl (Lach-Ner)

2 g/100 ml Agar (Oxoid)

Pevné zložky rozpustiť do 97 ml diH₂O, sterilizovať v autokláve 20 min pri 121 °C, pridať ampicilín, aminokyseliny a bázy podľa potrieb daného kmeňa.

Ringerov roztok

- Zloženie:

7,5 g/l NaCl (Lach-Ner)

0,075 g/l KCl (Lach-Ner)

0,1 g/l NaHCO₃ (Lachema)

0,1 g/l CaCl₂ (Sigma-Aldrich)

Roztoky aminokyselín, uracilu a adeninu (100x koncentrované zásobné roztoky)

2 g/l L-Histidín HCl monohydrát (Sigma-Aldrich)

10 g/l L-Leucín (Sigma-Aldrich)

2 g/l L-Tryptofán (Sigma-Aldrich)

2 g/l Uracil (Sigma-Aldrich)

3 g/l L-Lyzín (Sigma-Aldrich)

2 g/l	L-Metionín (Sigma-Aldrich)
10 g/l	Adenín (Adenin-hemisulfát, Sigma-Aldrich)

Ampicilín (1000x koncentrovaný zásobný roztok)

100 mg/ml zásobný prášok ampicilínu (Biotika)

Sterilnú substanciu v originálnej fľaštičke (Ampicilin pro inj. 500 mg) rozpustiť do 4 ml sterilnej diH₂O a 1 ml 96% etanolu (Lach-Ner).

3.1.2.2 Bakteriálne kultivačné média

Bakteriálne kultivačné média pripraviť z diH₂O upravenej v prístroji Watrex filtry Rovapur 10 a Ultrapur, sterilizovať v autokláve 20 minút pri 121 °C. Pevné média pripraviť pridaním agaru (výsledná koncentrácia 2%) pred klávaním.

LB

- Zloženie:

10 g/l	Trypton (Oxoid)
5 g/l	Yeast extract (Formedium Ltd)
10 g/l	NaCl (Lach-Ner)
[+/- 20 g/l	Agar (Oxoid)]

V prípade potreby pridať k vychladnutému médiu (pod 55 °C) selekčné antibiotikum ampicilín (Biotika) na výslednú koncentráciu 100 µg/ml.

3.1.2.3 Všeobecne používané roztoky

10x TE pufoer

- Zloženie:

0,1 mM Tris-HCl (Serva, Lach-Ner)

10 mM EDTA (Bio-Rad)

Upraviť pH pomocou HCl (Lach-Ner) na požadovanú hodnotu.

50x TAE pufoer

- Zloženie:

2M Tris; pH 8,5 (Serva)

1M ľadová kyselina octová (Lach-Ner)

100 mM Na₂EDTA (Lach-Ner)

20x SB pufoer

- Zloženie:

200 mM NaOH (Penta)

Upraviť na pH 8 pomocou kyseliny boritej (Lachema).

Vzorkový pufoer (elektroforéza DNA v TAE pufre)

- Zloženie:

0,06% bromfenolová modrá (Lachema)

60% glycerol (MP Biomedicals)

60 mM EDTA (Bio-Rad)

Vzorkový pufoer (elektroforéza DNA v SB pufre)

- Zloženie:

0,06% bromfenolová modrá (Lachema)

60% glycerol (MP Biomedicals); glycerol riediť v 1x SB pufre

3.1.3 Prehľad použitých enzýmov modifikujúcich DNA

3.1.3.1 Amplifikácia DNA pomocou PCR

Taq DNA polymeráza (rekombinantná, ThermoFisher Scientific)

10x Taq pufoer s KCl

10x Taq pufoer s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3.1.3.2 Štiepenie DNA restrikčnými endonukleázami

Všetky restrikčné endonukleázy sú od firmy MBI ThermoFisher Scientific s príslušnými puframí. Používať podľa inštrukcií od výrobcu (www.thermofisher.com). V Tab. 3 je uvedený zoznam restrikčných endonukleáz a restrikčných pufoerov použitých v tejto práci.

Tab. 3: Restričné endonukleázy a pufry

Restričné endonukleázy	Použitie
Apal	overenie pRS316
NcoI	overenie pRS316
PscI	overenie pRS316
XhoI	overenie pRS316
BamHI	linearizácia pRS316
Restričné pufry (10x koncentrované)	
Tango	

3.1.4 Prehľad použitých izolačných a ďalších súprav

Tab. 4: Použité izolačné a ďalšie súpravy

Izolácia plazmidovej DNA	NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)
Purifikácia DNA	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

3.1.5 Prehľad použitých primerov

Tab. 5: Použité primery na detekciu génu *ECM33* (IDT)

Názov	Sekvencie s orientáciou 5' - 3'	Typ	Použitie primeru
MH55	TTTCGGTAGCGTGCTTGAG	priamy	detekcia promotoru
MH56	GCAAGAGAGGTCCGTTGAT	spätný	
MH57	ATTCAAGAACGCTTTGACTGCT	priamy	detekcia exónu 1 a 5' oblasti intronu
MH58	TCGAGATTTGTGAGGAAAGAGG	spätný	
MH59	GTA CTTCTGCCACTGCTACTG	priamy	detekcia 5' oblasti exónu 2
MH60	AAGATAGTCAAGGAACCATCAATCTC	spätný	
MH70	TTGGAAAGTGTCGAAGGTTTCTC	priamy	detekcia strednej oblasti exónu 2
MH71	GTAGTGTTGTACCGTTGGAAG	spätný	
MH61	CGACTCTTCTCCAGTAACTTCTC	priamy	detekcia 3' oblasti exónu 2
MH62	AGATGTGGCACCGTTCTTG	spätný	

Tab. 6: Použité primery na detekciu génu *ACT1* (IDT)

Názov	Sekvencie s orientáciou 5' - 3'	Typ	Použitie primeru
MH126	TACATCAGCTTTTAGATTTTTCACG	priamy	detekcia exónu 1 a 5' oblasti intrónu
MH127	GCTAGAACATACCAGAATCCATTG	spätný	
MH124	AACGGTTCTGGTATGTGTAAAGC	priamy	detekcia 5' oblasti exónu 2

MH125	ACCGACGATAGATGGGAAGAC	spätný	
OG81	GATGGTGTACTCACGTCGTTTC	priamy	detekcia strednej oblasti exónu 2
OG82	GTAGTCAGTCAAATCTCTACCGGC	spätný	
MH37	GAAGGTCAAGATCATTGCTCCTC	priamy	detekcia 3' oblasti exónu 2
MH38	GAAACACTTGTGGTGAACGATAG	spätný	

Tab. 7: Použité primery na detekciu kontrolných úsekov (IDT)

Názov	Sekvence s orientáciou 5' - 3'	Typ	Použitie primeru
MH05	GGTGTACAATATGGACTTCCTCTT	priamy	detekcia <i>ADHI-UAS</i> (<i>ADHI</i> aktivačná sekvencia v oblasti promotora)
MH06	CTATTGTATATCTCCCCTCCGC	spätný	
MH74	AAATGGCAAGGGTAAAAACCAG	priamy	detekcia <i>TELVIR</i> (telomerická oblasť na pravom ramene chromozómu VI)
MH75	TCGGATCACTACACACGGAAAT	spätný	

Tab. 8: Ostatné použité primery (IDT)

Názov	Sekvence s orientáciou 5' - 3'	Typ	Použitie primeru
ZuC05	CTGTTTTTCTACCTCCGACATCATGC TGAAACATGGCATGGCTTTTCAATTC AATTCATC*	priamy	PCR integračnej kazety <i>URA3</i> z plazmidu pRS316
ZuC06	GAGATTTTTTTAGCATTATTCAATG AATAATGTGCTACTCCGCAGGGTAAT AACTGA*	spätný	PCR integračnej kazety <i>URA3</i> z plazmidu pRS316
ZuC09	TGACGTATTGTCATATTGACGTATC	spätný	overenie prítomnosti integrovanej kazety <i>bar1Δ::URA3</i>
ZuC10	GCTGATTGAGTTAGACAGTATCG	priamy	overenie prítomnosti integrovanej kazety <i>bar1Δ::URA3</i>
MH111	GTTAGCAGAATTGTCATGCAAGG	priamy	overenie integrovanej kazety <i>bar1Δ::URA3</i>
MH112	GTAGCAGCACGTTTCCTTATATGT	spätný	overenie integrovanej kazety <i>bar1Δ::URA3</i>
MH113	CGACCTTGTTATCATGGCATTG	spätný	detekcia mutanty <i>prp45(1-169)</i>
AV17	TGGTCAATAAGAGCGACCTC	spätný	detekcia mutanty <i>prp45(1-169)</i>
AV18	ACAGCCACCATATTGAGGTAG	priamy	detekcia mutanty <i>prp45(1-169)</i>
AV59	CAACCCTCAACTTACGAG	priamy	detekcia <i>SET1</i>
AV60	GATAGATTGTCGCACCTG	spätný	detekcia delécie <i>SET1</i>
AV62	GGTTGAGCGGTATCAGTA	spätný	detekcia <i>SET1</i>
MH88	GACTGTCGTAGGTGGCATA	priamy	detekcia <i>GCN5</i>
MH89	GTCGAACTGATGGCACAGAA	spätný	detekcia <i>GCN5</i>

* podtrhnutá časť nasadá na plazmid s templátom, nepodtrhnutá časť tvorí presah, prostredníctvom ktorého dochádza k homológnej rekombinácii produktu PCR do chromozómu

Tab. 9: Použité oligonukleotidy (IDT)

Názov	Sekvence s orientáciou 5' - 3'	Typ	Použitie
ZuC11	ACCTCCGACATCATGCTGAAACATGG CATGGCTTTTCAATTAATAAACTGTA TTATAAGTAAATGCATGTATACTAAA CT	priamy	delécia integrovanej kazety <i>URA3</i> z <i>bar1Δ::URA3</i>
ZuC12	AGTTTAGTATACATGCATTTACTTAT AATACAGTTTTTTAATTGAAAAGCCA TGCCATGTTTCAGCATGATGTCCGGAG GT	spätný	

3.1.6 Prehľad použitých protilátok

Tab. 10: Použité protilátky

Označenie	Špecifikácia	Katalógové číslo, výrobca
anti-H3	Králičia polyklonálna protilátka proti histónu H3	ab1791, Abcam
anti-H4	Králičia polyklonálna protilátka proti histónu H4	ab10158, Abcam
anti-H3K4me3	Králičia polyklonálna protilátka proti trimetylovanému histónu H3 na lyzíne 4	ab8580, Abcam
anti-H3K9/18ac	Králičia polyklonálna protilátka proti acetylovanému histónu H3 na lyzíne 9/18	07-593, Millipore-Upstate
anti-H3K14ac	Králičia monoklonálna protilátka proti acetylovanému histónu H3 na lyzíne 14	ab52946, Abcam
anti-HA.11 (klon 16B12)	Myšia monoklonálna protilátka proti hemaglutinínovému epitopu HA	MMS-101P, Covance
anti-myc (klon 9E10)	Myšia monoklonálna protilátka proti epitopu c-myc	MSS-150P, Covance
anti-PSTAIR	Myšia monoklonálna protilátka proti CDC28	P7962, Sigma-Aldrich
GAM-HRP	Sekundárna protilátka rozoznávajúca myšie primárne protilátky, konjugovaná s chrenovou peroxidázou (HRP)	Sc-2031, Santa Cruz
GAR-HRP	Sekundárna protilátka rozoznávajúca králičie primárne protilátky, konjugovaná s chrenovou peroxidázou (HRP)	Sc-2030, Santa Cruz

3.1.7 Prehľad použitých plazmidov

Tab. 11: Použité plazmidy

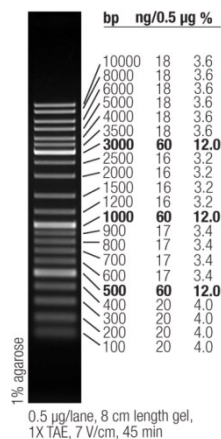
Názov	Vektor	Veľkosť v bp (celkovo/inzert)	Popis experimentu	Typ
pRS316	pRS316	4887/-	tvorba integračnej kazety <i>URA3</i> na deléciu génu <i>BAR1</i>	centromerický (CEN/ARS ori)
pZuC01	FRP793	6305/442	expresia myc-H3	centromerický (CEN/ARS ori)
pMH04	FRP880	7864/521	expresia proteínu s väzbovou doménou LexA, s väzbovým miestom pre β -estradiol a s aktivačnou doménou B112	centromerický (CEN/ARS ori)
pMH06	FRP880	8646/1300	expresia proteínu s väzbovou doménou LexA, s väzbovým miestom pre β -estradiol a s aktivačnou doménou B112	2-micron (2 μ ori)
pMH07	pMH05	7091/442	expresia myc-H3	2-micron (2 μ ori)

* pRS316 (Sikorski & Hieter 1989)

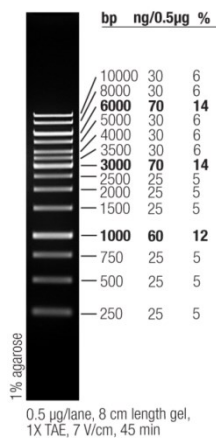
* pZuC01 pripravila Z. Cihlářová; pMH04, pMH06, pMH07 pripravila M. Hálová (Ottoz et al. 2014)

3.1.8 Prehľad použitých veľkostných štandardov

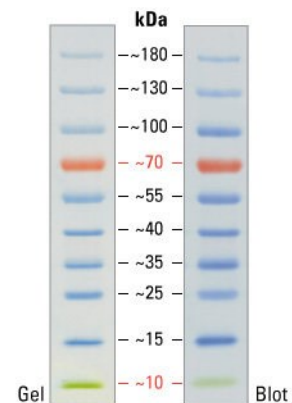
GeneRuler DNA Ladder Mix
(ThermoFisher Scientific)



GeneRuler 1kb DNA Ladder
(ThermoFisher Scientific)



PageRuler™ Prestained Protein Ladder
(ThermoFisher Scientific)



3.2 Metódy

3.2.1 Kultivácia a transformácia použitých mikroorganizmov

3.2.1.1 Príprava glycerolových konzerv

Pri príprave konzerv z tekutej kultúry buniek zmiešať v 1,5ml mikroskúmavke so skrutkovacím viečkom 500 μ l suspenzie buniek s 500 μ l 60% sterilného glycerolu (MP Biomedicals). Pri príprave konzerv z biomasy buniek narastenej na plotni s pevným médiom pridať do 500 μ l diH₂O pomocou sterilného špáradla časť biomasy a následne pridať 500 μ l 60% sterilného glycerolu. Pripravené glycerolové konzervy inkubovať 30 minút pri izbovej teplote za občasného premiešania. Konzervy preniesť a uskladniť v -80 °C.

3.2.1.2 Kultivácia kmeňov *S. cerevisiae* na pevnom a v tekutom médiu

Z glycerolovej konzervy zoškrabnúť pomocou očkovacej kličky alebo špáradla vrchnú vrstvu zamrznutých buniek, naniest' na plotňu s pevným médiom a rozotrieť. Pracovať rýchlo, aby konzerva nerozmrzla. Plotňu s vysiatymi bunkami umiestniť do termostatu a kultivovať pri teplote 30 °C. Plotňu s narastenými bunkovými kultúrami skladovať v chladničke pri teplote do 8 °C po dobu 4 týždňov.

Kultiváciu v tekutom médiu uskutočniť v sterilných Erlenmayerových bankách naplnených maximálne do 1/5 objemu banky (z dôvodu dostatočného prevzdušňovania kultúry buniek). Bunky narastené na plotni s pevným médiom odobrať pomocou očkovacej kličky a zaočkovať do kultivačného média. Bunkovú kultúru v banke kultivovať na trepačke pri 30 °C, 180 rpm. Optickú densitu bunkovej kultúry merať pri 600 nm na spektrofotometri WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter (OD_{reader} , Biochrom) proti príslušnému médiu.

3.2.1.3 Transformácia

Transformácia plazmidovej DNA do *E. coli* pomocou elektroporácie

V priebehu transformácie plazmidovej DNA elektroporáciou je potrebné pracovať na ľade. V čistej 0,5ml mikroskúmavke zmiešať 0,5 – 5 µl roztoku plazmidovej DNA v diH₂O/TE pufr (obsahuje 5 pg – 0,5 µg DNA) s 30 – 50 µl elektrokompetentných buniek *E. coli* *. Obsah mikroskúmavky previesť na dno vychladenej 0,2cm elektroporačnej kyvety (Bio-Rad). Na generátore pulzu Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad) nastaviť hodnoty kapacitancie 25 µF, napätie 2,5 kV a odpor 200 Ω. Po vložení kyvety do prístroja aplikovať pulz, ktorý dosiahne 4 – 5 milisekúnd. Obsah kyvety okamžite resuspendovať do 1 ml LB média s 0,5% glukózou (Sigma-Aldrich), previesť do sklenenej skúmavky a inkubovať 1 hodinu na trepačke (37 °C, 180 rpm). Na plotňu s LB médiom obsahujúcom príslušné selekčné antibiotikum (ampicilín, 100 µg/ml, Biotika) vysiať 100 µl kultúry. Plotňu umiestniť do termostatu a kultivovať cez noc pri teplote 37 °C.

* Elektrokompetentné bunky boli použité zo zásob laboratória.

Transformácia kvasiniek *S. cerevisiae* lítium-acetátovou metódou

Bunky zaočkovať do 5 – 10 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium), kultivovať cez noc na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia stacionárnej fázy. Ráno bunkovú kultúru preočkovať do 20 ml čerstvého média na $OD_{\text{reader}} \sim 0,3$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 0,9 - 1,8$. Na jednu transformáciu odobrať do sterilnej 15ml skúmavky množstvo kultúry, ktorá obsahuje 10^8 buniek (pri $OD_{\text{reader}} 1,5$ má kultúra $1,8 \times 10^7$ buniek/ml). Kultúru centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 3 min, 23 °C, 1 000 x g). Supernatant odstrániť, sediment premyť 10 ml sterilnej diH₂O a znovu centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 3 min, 23 °C, 1 000 x g). Supernatant odstrániť, sediment resuspendovať do 1 ml sterilnej diH₂O a previesť do čistej 1,5ml mikroskúmavky. Bunečný pelet centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 13 000 rpm) a supernatant odstrániť.

Pripraviť čerstvo denaturovanú ssDNA (salmon sperm DNA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich) povarením 10 minút pri 95 °C a nechať schladnúť na ľade.

K sedimentu kompetentných buniek postupne pridať:

40 μ l diH₂O

36 μ l 1 M LiAc (Sigma-Aldrich)

10 μ l čerstvo denaturovanej 10 mg/ml ssDNA (Sigma-Aldrich)

34 μ l plazmidovej DNA rozpustenej vo vode (> 100 ng)

240 μ l 50% w/w PEG 3500 (Sigma-Aldrich)

Transformačnú zmes dôkladne zamiešať vortexovaním a inkubovať 40 min pri teplote 42 °C za občasného premiešania otáčaním skúmavky. Po skončení inkubácie bunečnú suspenziu usadiť centrifugáciou (Eppendorf model 5417R, 3 min, RT, 13 000 rpm) a supernatant odstrániť. Sediment resuspendovať v 1 ml sterilnej diH₂O a znovu centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 1 min, RT, 13 000 rpm). Pelet buniek resuspendovať do 100 – 200 μ l sterilnej diH₂O a 50 – 100 μ l vysiať na plotňu s príslušným selekčným médiom. Inkubovať v termostate pri 30 °C 3 – 4 dni.

V prípade niektorých selekčných markerov *S. cerevisiae* potrebuje čas pre expresiu proteínov pre danú rezistenciu. V tomto prípade suspenziu buniek vysiať na YPAD, nechať exprimovať ideálne cez noc a potom pretlačiť na plotňu s daným selekčným médiom.

Rýchla transformácia kvasiniek *S. cerevisiae*

Rýchlu transformáciu kvasiniek možno využiť v prípade, že vopred vieme, že transformácia bude prebiehať s vysokou efektivitou. Príslušný kvasinkový kmeň rozotrieť na médium (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a nechať rásť cez noc. Z plotne zoškrabnúť cca 15 – 20 μ l buniek a resuspendovať do 25 μ l sterilnej diH₂O. Pripraviť čerstvo denaturovanú ssDNA (salmon sperm DNA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich) povarením 10 minút pri 95 °C a nechať schladnúť na ľade.

K suspenzii buniek pridať:

18 μ l 1 M LiAc; pH 7,5 (Sigma-Aldrich)

5 μ l čerstvo denaturovanej 10 mg/ml ssDNA (Sigma-Aldrich)

2 μ l plazmidovej DNA rozpustenej v diH₂O (> 100 ng)

120 μ l 50% w/w PEG 3500 (Sigma-Aldrich)

Transformačnú zmes intenzívne vortexovať a inkubovať 40 min pri 42 °C. Suspenziu buniek usadiť centrifugáciou (Eppendorf model 5417R, 3 min, RT, 13 000 rpm) a supernatant odstrániť. Sediment resuspendovať v 500 μ l sterilnej diH₂O, centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 1 min, RT, 13 000 rpm) a supernatant odstrániť. Pelet buniek resuspendovať do 200 μ l sterilnej diH₂O a vysiať 100 μ l na príslušné selekčné médium. Inkubovať v termostate pri 30 °C 3 – 4 dni.

3.2.2 Kríženie a sporulácia *S. cerevisiae*

A. Kríženie a príprava diploidného kmeňa

Z haploidných kultúr opačného párovacieho typu určených ku kríženiu (MATa a MAT α) vytvoriť suspenzie. Na selekčné médium, ktoré umožňuje rast len diploidným jedincom, nakvapkať cez seba cca 5 μ l oboch suspenzií. Inkubovať v termostate pri 30 °C.

B. Sporulácia a tetrádová analýza

Bunky diploidného kmeňa resuspendovať do 200 μ l diH₂O a vysiať na plotňu s presporulačným agarom. Inkubovať v termostate pri 30 °C do druhého dňa. Biomasu narastenú na plotni kvantitatívne preniesť do mikroskúmavky s 500 μ l sterilnej diH₂O, centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 30 s, RT, 13 000 rpm) a supernatant odstrániť. Pelet buniek resuspendovať v 100 μ l Ringerovho roztoku tak, aby vznikla hustá, ale pipetovateľná suspenzia. Suspenziu buniek potom kvapnúť na plotňu so sporulačným agarom a nechať zaschnúť. Inkubovať pri izbovej teplote 4 – 6 dní. Mikroskopicky kontrolovať množstvo vzniknutých tetrád. Po sporulácii preniesť malé množstvo buniek do 1,5ml mikroskúmavky so 100 μ l „yeast lytic“ enzýmu. Inkubovať v termostate pri 30 °C do druhého dňa. Po dostatočnom natrávení pridať k bunkám s „yeast lytic“ enzýmom 1 ml

sterilnej diH₂O. Bunečnú suspenziu sonikovať pomocou sondového sonikátoru (Bandelin Sonopuls HD 2070, 3x 15 s, chladenie na ľade, výkon 30 %,) a spóry skontrolovať pod mikroskopom. Podľa množstva spór vysiať na plotňu s médiom YPAD odpovedajúci objem suspenzie a inkubovať v termostate pri 30 °C. Genotyp haploidov získaných zo spór určiť pomocou selekčných médií alebo pomocou PCR.

3.2.3 Meranie rastovej krivky kmeňov *S. cerevisiae*

3.2.3.1 Ručné meranie rastovej krivky pomocou spektrofotometra

Bunky večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať cez noc na trepačke pri 30 °C, 180 rpm. Narastenú bunkovú kultúru ráno preočkovať do 30 ml média na $OD_{\text{reader}} \sim 0,05$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm). Na spektrofotometri WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter merať optickú denzitu buniek v kultúre každé dve hodiny až do dosiahnutia stacionárnej fázy.

3.2.3.2 Meranie rastovej krivky pomocou prístroja Varioskan

Bunky večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať na trepačke cez noc (30 °C, 180 rpm). Ráno bunky preočkovať do 5 ml média na $OD_{\text{reader}} \sim 0,03 - 0,05$. Do dvanásť jamkovej mikrotitračnej doštičky napipetovať v duplikátoch 1,4 ml nariadenej bunkovej kultúry, ako porovnávaciu vzorku použiť 1,4 ml média. Doštičku umiestniť do prístroja Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific). Kultúry buniek inkubovať 24 hodín pri príslušnej teplote za súčasného trepania (180 rpm, rozkmit 20 mm), pričom každých 10 minút je meraná optická denzita buniek ($\lambda = 600 \text{ nm}$).

3.2.3.3 Vzťahy pre výpočet generačnej doby

Zo získaných dát skonštruovať rastové krivky (GraphPad Prism 5, XY bodový graf: osa x = čas, osa y = $\log_2 OD$). Z intervalu, v ktorom rástli kultúry exponenciálne, vypočítať ich dobu zdvojenia (T) následujúcim spôsobom:

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

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

kde μ je špecifická rastová rýchlosť, r je počet delení za jednotku času, x_0 je počiatočná hodnota OD v exponenciálnej fáze v čase τ_0 , x je konečná hodnota OD v exponenciálnej fáze v čase τ .

3.2.4 Techniky manipulácie s DNA

3.2.4.1 Izolácia plazmidovej DNA z *E. coli*

Izolácia plazmidovej DNA alkalickou metódou

Klon *E. coli* nesúci príslušný plazmid rozmraziť na plotňu s vhodným typom média (LB) a selekčným antibiotikom (ampicilín, 100 $\mu\text{g/ml}$, Biotika). Kultivovať v termostate pri 37 °C cez noc. Jednu dobre oddelenú monokolóniu *E. coli* zaočkovať do 5 ml LB média so 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilínu a kultivovať cez noc na trepačke (37 °C, 180 rpm). Bakteriálnu kultúru ráno ochladiť na ľade 5 – 10 min, 2 ml pipetovať do 2ml mikroskúmavky, centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 30 s, 4 °C, 16 800 x g) a supernatant odstrániť. K sedimentu pipetovať zvyšok kultúry, znovu centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 30 s, 4 °C, 16 800 x g) a supernatant odstrániť. Sediment dokonale resuspendovať v 250 μl vychladeného roztoku I a zvortexovať. Od tohto kroku vzorku chladiť na ľade alebo v ľadovom kúpeli. K suspenzii pridať 500 μl roztoku II, opatrne premiešať poklepaním skúmavky a inkubovať 5 min pri izbovej teplote. Bunky zlyzujú, suspenzia sa prejasní a výrazne stúpne viskozita. Skúmavku opäť preniesť na ľad, pridať 375 μl vychladeného roztoku III, premiešať prevrátením skúmavky a inkubovať na ľade 5 minút. V roztoku sa vytvorí biela zrazenina. Zrazeninu centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, 4 °C, 16 000 x g) a supernatant preniesť do novej 2ml mikroskúmavky. Supernatant dokonale zmiešať s 800 μl izopropanolu (Penta), ihneď centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, 4 °C, 16 000 x g) a supernatant zliať. Zrazeninu krátko osušiť a rozpustiť v 300 μl diH₂O. Suspenziu dokonale zmiešať so 135 μl nasýteného roztoku LiCl (Lach-Ner) a inkubovať na ľade 5 minút. Vytvorenú zrazeninu

usadiť centrifugáciou (Eppendorf model 5417R, 2 min, 4 °C, 16 000 x g) a supernatant preniesť do novej 1,5ml mikroskúmavky. Plazmidovú DNA vyzrážať 530 µl 96% etanolu (Lach-Ner), inkubovať na ľade 5 minút. Zrazeninu usadiť centrifugáciou (Eppendorf model 5417R, 5 min, 4 °C, 16 000 x g), supernatant zliať, sediment opláchnuť 500 µl 70% etanolu, centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, 4 °C, 16 000 x g), supernatant odstrániť a sediment vysušiť v termostate pri 37 °C. Podľa množstva izolovaného plazmidu rozpustiť sediment v 50 – 200 µl diH₂O alebo TE pufru. Kvalitu izolácie plazmidovej DNA určiť elektroforeticky.

Roztoky:

Roztok I (TEG) 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza

Roztok II 1% SDS, 0,2 M NaOH

Roztok III 3 M KAc, 2 M kyselina octová; pH 4,8 – 5,4

Izolácia plazmidovej DNA pomocou kitu NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)

Klon *E. coli* nesúci príslušný plazmid rozmraziť na plotňu s vhodným typom média (LB) a selekčným antibiotikom (ampicilín, 100 µg/ml, Biotika). Kultivovať v termostate pri 37 °C cez noc. Jednu dobre oddelenú monokolóniu *E. coli* zaočkovať do sklenenej skúmavky s 2 ml LB média so 100 µg/ml ampicilínu a kultivovať cez noc na trepačke (37 °C, 180 rpm). Bakteriálnu kultúru ráno previesť do 2ml mikroskúmavky, centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 30 s, RT, 11 000 x g) a supernatant dôkladne odstrániť. Sediment resuspendovať v 250 µl pufru A1. Pridať 250 µl pufru A2, premiešať prevrátením skúmavky (8x) a nechať inkubovať pri izbovej teplote 5 minút. Pridať 300 µl pufru A3, premiešať prevrátením skúmavky (8x) a centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 8 min, RT, 11 000 x g). Supernatant prepipetovať do kolonky so zbernou skúmavkou, centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 11 000 x g) a obsah zbernej skúmavky vyliat. Do kolonky pridať 600 µl pufru A4, centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 11 000 x g), obsah zbernej skúmavky vyliat. Membránu

kolonky vysušiť centrifugáciou (Eppendorf MiniSpin PLUS, 2 min, RT, 11 000 x g). Kolonku s vysušenou membránou umiestniť do čistej 1,5ml mikroskúmavky, pridať 25 µl pufru AE, nechať stáť 1 minútu a centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 11 000 x g). Do kolonky znovu pridať 25 µl pufru AE, nechať stáť 1 minútu a centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 11 000 x g). Kvalitu izolovanej plazmidovej DNA zistiť elektroforeticky a pomocou spektrofotometra NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

3.2.4.2 Izolácia genómovej DNA zo *S. cerevisiae*

Izolácia DNA pomocou LiAc/SDS

Z plotne s príslušným kmeňom kvasiniek zoškrabnúť pomocou špáradla malé množstvo buniek, resuspendovať v 1,5ml mikroskúmavke so 100 µl 0,2 M LiAc (Sigma-Aldrich)/1% SDS (Sigma-Aldrich) a nechať inkubovať v termobloku 10 minút pri 70 °C. K suspenzii pridať 300 µl 96% etanolu (Lach-Ner), vortexovať a vytvorenú zrazeninu centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 3 min, RT, 15 000 x g). Etanol odstrániť vyklepnutím a pridať 500 µl 70% etanolu tak, aby sa pelet odlepil. Zrazeninu usadiť centrifugáciou (Eppendorf MiniSpin PLUS, 3 min, RT, 15 000 x g) a etanol dôkladne odsat', poprípade dosušiť v rozohriatom termobloku. Pelet rozpustiť v 100 µl diH₂O a centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 15 s, RT, 15 000 x g). Do reakcie PCR použiť 1 – 2 µl supernatantu.

Izolácia DNA v doštičke pomocou LiAc/SDS

Príslušný kvasinkový kmeň rozmraziť na plotňu s vhodným typom média a nechať rásť v termostate pri 30 °C cez noc. Z plotne zoškrabnúť pomocou špáradla malé množstvo buniek a resuspendovať v doštičke (BIOplastics) v 30 µl sterilnej diH₂O. Pridať 2x koncentrovaný roztok LiAc/SDS (výsledná koncentrácia 200 mM LiAc (Sigma-Aldrich), 1% SDS (Sigma-Aldrich)). Doštičku zalepiť, inkubovať v termobloku 10 minút pri 70 °C a krátko stočiť (Eppendorf model 5804R, 5s, RT, max otáčky). K suspenzii pridať 120 µl 96% etanolu (Lach-Ner) a vytvorenú zrazeninu DNA usadiť centrifugáciou (Eppendorf

model 5804R, 5 min, RT, max otáčky). Etanol z doštičky odstrániť vyklepnutím a sediment nechať uschnúť v rozohriatom termobloku (cca 5 min). K sedimentu pridať 100 μ l diH₂O, dôkladne premiešať vortexovaním a centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 5 min, RT, max otáčky). Izolovaná DNA je pripravená do reakcie PCR (použiť 2 – 5 μ l).

3.2.4.3 Štiepenie DNA restričnými endonukleázami

Pripraviť reakčnú zmes:

vzorka DNA v diH ₂ O	x μ l (0,1 – 4 μ g DNA)
10x koncentrovaný restričný pufo	1/10 výsledného objemu
restričná endonukleáza	1 – 10 U enzýmu/ μ g DNA
diH ₂ O	doplňok do celkového objemu

(Typ restričného pufru, teplota a doba štiepenia sa riadi podľa použitých restričných enzýmov a doporučenia výrobcu.)

Inkubovať 1 – 4 hodiny pri optimálnej teplote štiepenia daného restričného enzýmu. Reakciu zastaviť tepelnou inaktiváciou 20 minút pri 80 °C alebo ochladením zmesi na -20 °C. Množstvo a kvalitu naštiepenej DNA overiť elektroforézou v agarózovom géle.

3.2.4.4 Amplifikácia DNA pomocou PCR

Prípravu zmesi pre PCR je vhodné miešať na ľade. Celkový objem vzoriek 10 – 100 μ l. V mikroskúmavke o objeme 0,5 ml pripraviť premix (Tab. 12).

Tab. 12: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR

Roztok a jeho zásobná koncentrácia	Výsledná koncentrácia
diH ₂ O	-
10x koncentrovaný polymerázový pufo (ThermoFisher Scientific)	1x
MgCl ₂ (25 mM; ThermoFisher Scientific)	2,5 mM
dNTP (každý 2,5 mM; ThermoFisher Scientific)	250 μM
primer 1 (10 μM)	1 μM
primer 2 (10 μM)	1 μM
DNA polymeráza (ThermoFisher Scientific)	-

Do premixu pridať DNA polymerázu v množstve doporučovanom výrobcom (Taq DNA Polymerase, ThermoFisher Scientific, 0,5 μl/100 μl reakčnej zmesi). Nakoniec primiešať príslušné množstvo templátovej DNA (DNA izolovaná LiAc/SDS: 1 – 5 μl). Inkubovať v PCR cyklére s nastaveným príslušným programom PCR (viď kapitola 3.2.4.4.2). Produkty PCR analyzovať elektroforeticky.

3.2.4.4.1 Tvorba integračnej kazety URA3 z pRS316

Obsah reakčnej zmesi (50 μl):

5 μl	10x Taq pufo s (NH ₄) ₂ SO ₄ (ThermoFisher Scientific)
8 μl	dNTP (výsledná koncentrácia 0,4 mM každý, ThermoFisher Scientific)
5 μl	MgCl ₂ (výsledná koncentrácia 2,5 mM, ThermoFisher Scientific)
7 μl	primer ZuC05 (výsledná koncentrácia 1,2 μM)
7 μl	primer ZuC06 (výsledná koncentrácia 1,2 μM)
2 μl	templát DNA

16 μ l diH₂O

0,5 μ l/ 100 μ l zmesi Taq DNA polymeráza (ThermoFisher Scientific)

Tab. 13: Program PCR

Krok reakcie PCR	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	94 °C	2 min	1x
Denaturácia	94 °C	30 s	3x
Hybridizácia primerov	43 °C	30 s	
Amplifikácia	72 °C	1 min 30 s	
Denaturácia	94 °C	30 s	32x
Hybridizácia primerov	2 min	30 s	
Amplifikácia	30 s	1 min 30 s	
Finálna amplifikácia	72 °C	10 min	1x
Schladienie	10 °C	5 min	1x

3.2.4.4.2 Overovacia PCR z kolónií *S. cerevisiae*

Obsah reakčnej zmesi (15 μ l):

1,5 μ l 10x Taq pufor s KCl (ThermoFisher Scientific)

1,5 μ l dNTP (výsledná koncentrácia 0,25 mM každý, ThermoFisher Scientific)

1,5 μ l MgCl₂ (výsledná koncentrácia 2,5 mM, ThermoFisher Scientific)

1,5 μ l primer 1 (výsledná koncentrácia 1 μ M)

1,5 μ l primer 2 (výsledná koncentrácia 1 μ M)

5 μ l templátová DNA

2,5 μ l diH₂O

0,15 μ l Taq DNA polymeráza

Tab. 14: Všeobecný program PCR

Krok reakcie PCR	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	2 min	1x
Denaturácia	95 °C	15 s	25 – 40x
Hybridizácia primerov	50 – 60 °C (T _m -5)	30 s	
Amplifikácia	72 °C	1 min/kbp	
Finálna amplifikácia	72 °C	5 – 15 min	1x
Schladenie	10 °C	5 min	1x

Jednotlivé časy a teploty možno optimalizovať podľa konkrétnej situácie.

3.2.4.5 Elektroforetická analýza DNA v agarózovom géle

Elektroforézu vzoriek DNA uskutočniť v prístroji pre horizontálnu gélovú elektroforézu v pufre 1x TAE alebo 1x SB. V závislosti na veľkosti fragmentov DNA zvoliť koncentráciu agarózového gélu:

% agarózy v géle	Veľkosť lineárnej dsDNA (kb)
0,5	60 – 10
1	10 – 1
1,5	1 – 0,5
2	0,5 – 0,1

Do potrebného objemu 1x TAE alebo 1x SB pufru pridať príslušné množstvo agarózy (LE Agarosa) a variť do úplného rozpustenia. Po čiastočnom schladnutí agarózy naliať gél o hrúbke 3 – 5 mm a vytvoriť jamky zanorením hrebienku. Do jamiek gélu nanášať 5 – 50 µl vzorky DNA (10 ng – 2 µg) so vzorkovým pufrom (1/6 celkového objemu). Pre určenie veľkosti delenej DNA naniest' štandard veľkosti fragmentov o množstve odporúčanom výrobcom (podľa predpokladanej dĺžky DNA možno zvoliť rôzny typ štandardu, viď kapitola 3.1.8). Vzorky deliť pri napätí 3 – 10 V/cm gélu (TAE pufor) alebo 15 – 20 V/cm (SB pufor). Nechať separovať a potom gél farbiť v roztoku

etídium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 5 – 20 minút. Ofarbený gél vizualizovať pomocou UV žiarenia a vyfotiť. Snímky exponovať 2,5 – 6 s (digitálny fotoaparát Panasonic DMC-F27).

3.2.4.6 Prečistenie produktov PCR pomocou NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

Do produktu PCR o objeme 150 µl pridať 300 µl pufru NTI a prepipetovať do kolonky umiestnenej do zbernej skúmavky. Centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 30 s, RT, 11 000 x g) a obsah zbernej skúmavky vyliat'. Do kolonky pridať 700 µl pufru NT3, centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 30 s, RT, 11 000 x g) a obsah zbernej skúmavky vyliat'. Do kolonky znovu pridať 700 µl NT3, centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 30 s, RT, 11 000 x g) a obsah zbernej skúmavky vyliat'. Membránu kolonky vysušiť centrifugáciou (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 11 000 x g). Kolonku s vysušenou membránou umiestniť do čistej 1,5ml mikroskúmavky. Na kolonku pridať 25 µl elučného pufru NE alebo diH₂O, inkubovať 1 minútu pri izbovej teplote a centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 11 000 x g). Do kolonky znovu pridať 25 µl elučného pufru NE alebo diH₂O, inkubovať 1 minútu pri izbovej teplote a znovu centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 1 min, RT, 11 000 x g). Čistotu produktu PCR po prečistení overiť elektroforézou v agarózovom géle.

3.2.5 Synchronizácia buniek

3.2.5.1 Blokovanie buniek v S fáze bunkového cyklu pomocou hydroxymočoviny

Bunky večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať cez noc na trepačke pri 30 °C, 180 rpm. Ráno bunky preočkovať z narasteneho inokula do 40 ml média na $OD_{\text{reader}} 0,3$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 0,9$. Uskutočniť prvý odber v čase 0 pred aplikáciou hydroxymočoviny. Po dosiahnutí $OD_{\text{reader}} \sim 0,9$ odobrať do sterilnej 2ml mikroskúmavky 2 ml bunkovej kultúry (približne 2×10^7 buniek, pričom pri $OD_{\text{reader}} 1,5$ obsahuje biomasa

$1,8 \times 10^7$ buniek/ml). Vzorky centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, RT, 2 000 rpm), odstrániť supernatant a bunky fixovať v 2 ml vychladeného 70% etanolu. Skladovať v chladničke (4 °C). Do zvyšku kultúry buniek pridať príslušné množstvo 100 mg/ml hydroxymočoviny na výslednú koncentráciu 15 mg/ml (Sigma-Aldrich). V rôznych časových intervaloch od pridania hydroxymočoviny odoberať vzorky kultúry o objeme 2 ml po dobu dvoch hodín. V priebehu odberov kontrolovať kvalitu blokovania buniek mikroskopicky. Vzorky následne spracovať pre analýzu na prietokovom cytometri (viď kapitola 3.2.5.4)

3.2.5.2 Blokovanie buniek v G1 fáze bunkového cyklu pomocou α -faktoru

Bunky (*S. cerevisiae* párovacieho typu a) večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať cez noc na trepačke pri 30 °C, 180 rpm. Ráno bunky preočkovať z narasteneho inokula do 40 ml média na $OD_{\text{reader}} 0,3$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 0,9$. Uskutočniť prvý odber v čase 0 pred aplikáciou α -faktoru. Do sterilnej 2ml mikroskúmavky odobrať 2 ml nesynchronizovanej bunkovej kultúry. Vzorky centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, RT, 2 000 rpm), odstrániť supernatant a bunky fixovať v 2 ml vychladeného 70% etanolu. Skladovať v chladničke (4 °C). Do zvyšku kultúry buniek pridať príslušné množstvo 0,1 mM α -faktoru (výsledná koncentrácia 25 nM, Zymo Research). V rôznych časových intervaloch odoberať 2 ml bunkovej kultúry po dobu dvoch hodín. Kvalitu blokovania buniek kontrolovať behom odberov mikroskopicky. Vzorky následne spracovať pre analýzu na prietokovom cytometri (viď kapitola 3.2.5.4).

3.2.5.3 Synchronizácia buniek pomocou α -faktoru

Bunky večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať cez noc na trepačke pri 30°C. Ráno bunky preočkovať do 50 ml čerstvého média na $OD_{\text{reader}} 0,2$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 0,5$. Uskutočniť prvý odber v čase 0 pred aplikáciou α -faktoru. Do sterilnej 2ml mikroskúmavky odobrať 2 ml bunkovej kultúry. Vzorky centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, RT, 2 000 rpm), odstrániť supernatant a bunky fixovať v 2 ml vychladeného

70% etanolu. Skladovať v chladničke (4 °C). Do zvyšku kultúry buniek pridať príslušné množstvo 0,1 mM α -faktoru na výslednú koncentráciu 25 nM (Zymo Research). Po 120 minútach kultivácie s α -faktorom odobrať 2 ml kultúry buniek (2. odber, bunky blokované v G1 fáze bunkového cyklu). Kvalitu blokovania buniek skontrolovať mikroskopicky. Po druhom odbere zmerať *OD* kultúry buniek a do 50ml skúmavky odobrať také množstvo kultúry, aby po odmytí α -faktoru mala výsledná kultúra *OD*_{reader} 0,5. Kultúru buniek centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 3 min, 23 °C, 1000 x g). Supernatant odstrániť a premyť 30 ml temperovaného média. Znovu stočiť (Eppendorf model 5804R, 3 min, 23 °C, 1000 x g), sediment resuspendovať do 60 ml predhriateho a prevzdušeného média a kultivovať na trepačke pri 30 °C, 180 rpm. Odmytím α -faktoru sú kvasinky vypustené z G1 bloku do bunkového cyklu. V tejto fáze uskutočňovať odbery buniek (2 ml kultúry) každých 15 minút po dobu štyroch hodín. Vzorky následne spracovať pre analýzu na prietokovom cytometri (viď kapitola 3.2.5.4).

3.2.5.4 Analýza buniek pomocou prietokovej cytometrie

Z buniek fixovaných v 70% etanolu (Lach-Ner) odobrať 300 μ l a centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 3 min, RT, 1 000 x g). Supernatant odstrániť, pelet resuspendovať v 1 ml 25 mM citrátu sodného (Lachema) a inkubovať 10 minút. Vzorky stočiť (Eppendorf MiniSpin PLUS, 3 min, RT, 1 000 x g), pelet resuspendovať v 500 μ l 25 mM citrátu a pridať 2 μ l 10 mg/ml RNázy A (ThermoFisher Scientific). Inkubovať cez noc v termostate pri 37 °C. K suspenzii buniek pridať ďalších 500 μ l 50 mM citrátu sodného s 1 μ l 4 mg/ml propidium jodidu (výsledná koncentrácia 4 μ g/ml) a 20 μ l 0,5 M EDTA (výsledná koncentrácia 10 mM, Bio-Rad). Pred meraním vzorky sonikovať sondovým sonikátorom na najnižší výkon (Bandelin Sonopuls HD 2070, 3 – 5 s, chladová miestnosť) a následne skontrolovať pod mikroskopom. Veľkosť buniek (FSC-A), granularitu (SSC-A) a množstvo DNA (ECD-A) analyzovať pomocou prietokovej cytometrie na prístroji CytoFLEX S (Beckman Couter) *.

* Fluorescencia PI bola detekovaná po excitácii 561nm laserom s použitím filtra 610/20; FSC a SSC boli posúdené na základe rozptylu svetla 488nm modrým laserom.

3.2.6 Techniky manipulácie s proteínmi

3.2.6.1 Príprava proteínových extraktov *S. cerevisiae*

A. Kultivácia

Kultivácia nesynchronizovanej kultúry

Bunky večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať na trepačke cez noc (30 °C, 180 rpm). Narastenú bunkovú kultúru ráno preočkovať do 10 – 25 ml média na $OD_{\text{reader}} \sim 0,1$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 0,9 - 1,2$ (exponenciálna fáza). Po dosiahnutí $OD_{\text{reader}} \sim 0,9 - 1,2$ odobrať bunky pre izoláciu proteínov (viď bod C).

Kultivácia kultúry blokovanej v G1 fáze bunkového cyklu

Bunky večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať cez noc na trepačke (30 °C, 180 rpm). Bunkovú kultúru ráno preočkovať do príslušného množstva média na $OD_{\text{reader}} \sim 0,4$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 1,5$. Po dosiahnutí $OD_{\text{reader}} \sim 1,5$ pridať do kultúry buniek príslušné množstvo 0,1 mM α -faktoru (Zymo Research) na výslednú koncentráciu 25 nM. Bunkovú kultúru s α -faktorom kultivovať 2 hodiny na trepačke (30 °C, 180 rpm) a následne izolovať proteíny (viď bod C). Je vhodné súčasne s odberom buniek na prípravu proteínových extraktov odobrať 2 ml kultúry pre analýzu na prietokovom cytometri (overenie blokácie kultúry v G1 fáze, viď kapitola 3.2.5.4).

B. Indukcia expresie proteínu myc-H3 β -estradiolom

Pred indukciou expresie odobrať príslušné množstvo nesynchronizovanej kultúry buniek a izolovať proteíny (viď bod C). Do zvyšku kultúry pridať príslušné množstvo 100 μ M β -estradiolu (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 400 nM a inkubovať na trepačke (30 °C, 180 rpm). V rôznych časových intervaloch odobrať príslušné množstvo kultúry a izolovať proteíny (viď bod C).

C. Izolácia proteínov

Na prípravu proteínových extraktov sa odoberá objem kultúry odpovedajúci 9 OD_{reader} (celkové OD_{reader} kultúry = OD_{reader} x objem kultúry v ml), tento objem preniesť do 15ml skúmavky a centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 3 min, RT, 3 200 rpm). Supernatant odstrániť, sediment resuspendovať v 1 ml sterilnej diH_2O , suspenziu previesť do čistej 1,5ml mikroskúmavky a centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 30 s, RT, 13 000 rpm). Supernatant odsáť a bunky inkubovať 10 – 15 minút pri $-20\text{ }^{\circ}C$ (po tomto kroku možno bunky dlhodobo skladovať v $-80\text{ }^{\circ}C$). Od tejto chvíle je nutné pracovať v digestore (práca s β -merkaptóetanolom) a na ľade (proti aktivácii kvasinkových proteáz; možno pridať inhibítory proteáz, avšak pri dostatočnom chladení nie je nutné). K sedimentu buniek pridať 100 μ l čerstvo pripraveného roztoku 1,85 M NaOH (Penta) a 7% β -merkaptóetanolu (Sigma-Aldrich), intenzívne vortexovať (4x opakovať cyklus – 30 s vortex, 30 s chladiť na ľade) a inkubovať na ľade 10 minút. K suspenzii pridať 100 μ l 50% TCA, inkubovať na ľade 5 minút, potom centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 10 min, $0\text{ }^{\circ}C$, 12 000 rpm) a supernatant odstrániť. K sedimentu pridať 500 μ l 1 M Tris (nepufrovaný, Serva), ľahko ho resuspendovať a ihneď centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 1 min, $0\text{ }^{\circ}C$, 12 000 rpm). Supernatant odstrániť, sediment resuspendovať v 100 μ l 2 x Laemmli pufru, pridať 1/20 objemu 1 M DTT (Promega). Suspenziu inkubovať 5 minút pri $95\text{ }^{\circ}C$, potom umiestniť do $-80\text{ }^{\circ}C$.

Roztoky:

2 x Laemmli pufor	0,112 M Tris-HCl (pH 6,8; Serva, Lach-Ner), 3,42% SDS (Sigma-Aldrich), 12% (v/v) glycerol (MP Biomedicals), 0,002% bromfenolová modrá (Lachema)
--------------------------	---

3.2.6.2 Tris-tricinová elektroforéza SDS-PAGE

Tento typ elektroforézy je vhodný na separáciu menších proteínov ako je histón H3, myc-H3.

Príprava gélov a aparatúry pre vlastnú separáciu

Zostaviť aparatúru pre nalievanie gélu. Pripraviť 15% separačný gél bez pridania 10% APS a TEMED (viď Tab 15).

Tab. 15: Zloženie polyakrylamidového separačného gélu

Zásobný roztok, chemikálie	Výsledná koncentrácia akrylamidu 15%	
	1 gél (ml)	2 gély (ml)
30% AA/BIS	2	4
3x gélový pufor	2	4
50% glycerol (MP Biomedicals)	2	4
diH ₂ O	-	-
10% (w/v) APS (Sigma-Aldrich)	0,05	0,1
TEMED (Bio-Rad)	0,005	0,01

Zároveň namiešať i zaostrovací gél bez pridania 10% APS a TEMED (viď Tab. 16).

Tab. 16: Zloženie polyakrylamidového zaostrovacieho gélu

Zásobný roztok, chemikálie	1 gél	2 gély
30% AA/BIS	0,383	0,766
3x gélový pufor	0,75	1,5
50% glycerol (MP Biomedicals)	-	-
diH ₂ O	1,866	3,732
10% (w/v) APS (Sigma-Aldrich)	0,025	0,05
TEMED (Bio-Rad)	0,0025	0,005

Pripraviť všetko pre okamžité naniesenie gélov (dve striekačky s nasadenými špičkami). Do separačného gélu pridať príslušné množstvo 10% APS a TEMED (viď Tab. 15), prudko premiešať a ihneď naniesť do aparatúry tak, aby zostalo miesto na naniesenie zaostrovacieho gélu asi 5 mm vysokého. Do zaostrovacieho gélu rýchlo pridať príslušné množstvo 10% APS a TEMED (viď Tab. 16) a navrstviť ho na ešte nestuhnúť separačný gél. Vložiť hrebienok tak, aby pod ním nezostali bubliny vzduchu, ktoré by

Anódový pufo (10x)	200 mM Tris (Serva); pH 8,9
Katódový pufo (10x)	100 mM Tris (Serva), 100 mM Tricine (Sigma-Aldrich), 0,1% SDS (Sigma-Aldrich); pH okolo 8,25
Gélový pufo	3 M Tris (Serva), 0,3% SDS (Sigma-Aldrich); pH 8,45!
10% (w/v) APS	NH ₄ S ₂ O ₈ , rozpúšťať čerstvo (Sigma-Aldrich)
Farbiaci roztok	20% metanol (Lach-Ner), 0,117% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad), 7% kyselina octová (Lach-Ner)
Odfarbovací roztok	20% metanol (Lach-Ner), 7% kyselina octová (Lach-Ner)

3.2.6.3 Western blot (prenos proteínov na membránu pomocou Bio-Rad Trans-blot)

Veľkosť pórov nitrocelulózovej (NC) membrány zvoliť podľa veľkosti separovaných proteínov – na malé proteíny použiť membránu o veľkosti pórov 0,2 μm (Bio-Rad). Nastrihať papier Whatman (2 papiere/gél, 3 mm, rozmer 11 x 8 cm), NC membránu a pripraviť Petriho misky (priemer 18 cm) s približne 100 ml chladeného transférového pufru. Ďalší približne 1 l transférového pufru mať pripravený v chladničke. NC membránu ponoriť do transférového pufru a nechať sýtiť asi 5 minút. Do Petriho misky s chladeným transférovým pufrom ponoriť podložku na skladanie „sendviča“. Skladanie „sendviča“ musí prebiehať pod hladinou transférového pufru, snažiť sa zamedziť prítomnosti vzduchových bublín. Na čiernu časť podložky položiť navlhčenú tesniacu poréznu vložku (tzv. „pad“). Na „pad“ položiť navlhčený papier Whatman, na neho gél, membránu, druhý papier a „pad“. „Sendvič“ uzavrieť a zasunúť do držiaku blotovacích dosiek v nádobe (číru dosku k červenému kladnému pólu a čiernu dosku k čiernemu zápornému pólu). Do elektroforézovej nádoby naliať transférový pufo, vložiť nádobku s ľadom, miešadlo a postaviť na magnetickú miešačku. Pripojiť zdroj napätia, nastaviť napätie na 90 – 110 V a zapnúť miešanie. Elektroforézovú nádobu je potreba stále chladieť. Prenos je ukončený približne po 1,5 hodine. Membránu s prenesenými proteínmi oplachnúť v TBS pufre. Membránu možno po opláchnutí TBS pufrom skladovať zatavenú

v polyetylénovej (PE) fólii pri 4 °C alebo ihneď pokračovať v imunodetekcii protilátkou. Gél ofarbiť vo farbiacom roztoku (viď kapitola 3.2.6.2). O kvalite prenosu proteínov sa možno presvedčiť pomocou množstva preneseného markeru, vizualizáciou proteínov v géle pomocou farbiaceho roztoku alebo vizualizáciou proteínov na membráne pomocou Ponceau S (Sigma-Aldrich).

Roztoky:

Transférový pufo 25 mM Tris (3,03 g/l roztoku, Serva), 192 mM glycín (14,4 g/l roztoku, Serva), 20% (v/v) metanol (200 ml v 1 l roztoku, Lach-Ner)

TBS pufo 20 mM Tris-HCl (pH 8,0; Serva, Lach-Ner), 500 ml NaCl (Lach-Ner)

3.2.6.4 Imunodetekcia proteínov na membráne

Imunodetekcia proteínov pomocou konjugátu sekundárnej protilátky s chrenovou peroxidázou metódou ECLTM (Amersham Life science)

Membránu premytú TBS pufrom alebo vytiahnutú z PE fólie (viď Western blot) blokovať 1 hodinu v 5% mlieko/0,1% TTBS miernym miešaním na orbitálnej trepačke v Petriho miske alebo vo viečku 96-jamkovej doštičky. Membránu zataviť po troch stranách do PE fólie, pridať 4 – 8 ml roztoku primárnej protilátky riedenej v 5% mlieko/0,1% TTBS (riedenie protilátok je uvedené vo výsledkoch) a fóliu úplne zataviť. Inkubovať na orbitálnej trepačke 1 hodinu pri izbovej teplote a cez noc v chladničke pri 4 °C. Po vytiahnutí z protilátky membránu opláchnuť a potom premývať 3x 10 minút v TTBS. Membránu zataviť do PE fólie a inkubovať v roztoku konjugátu sekundárnej protilátky (IgG-HRP, Santa Cruz) riedeného v 3% mlieko/0,05% TTBS po dobu 1 hodiny pri RT. Po ukončení inkubácie membránu opláchnuť a potom premývať 4x 10 minút v TTBS. Následne membránu opláchnuť a premývať 2x 5 minút v TBS. Zmiešať detekčný roztok A a B (ECL detection reagent, GE Healthcare) v pomere 1:1 (1 membrána = 1 ml roztok A : 1 ml roztok B). Membránu z TBS položiť na čistý filtračný papier

a následne vložiť do detekčného roztoku. Membránu vložiť do euroobalu, pridať detekčný roztok tak, aby bola celá plocha membrány pokrytá detekčným roztokom a inkubovať 2 minúty pri izbovej teplote. Po pridaní detekčného roztoku peroxidáza katalyzuje chemiluminiscenčnú reakciu, ktorú je možné detekovať. Prebytok roztoku z membrány vytlačiť, membránu vložiť do prístroja LAS-4000 a vzniknutú chemiluminiscenciu detekovať.

Roztoky:

TTBS pufor 1x TBS, 0,05% Tween 20 (Serva)

3.2.7 Chromatínová imunoprecipitácia a následná kvantitatívna PCR

3.2.7.1 Chromatínová imunoprecipitácia

A. Kultivácia *S. cerevisiae*

Kultivácia nesynchronizovanej kultúry

Bunky ráno zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať cez deň (6 – 8 hodín) na trepačke (30 °C, 180 rpm). Narastenú bunkovú kultúru večer preočkovať do príslušného množstva média (50 ml kultúry pre jednu protilátku) na $OD_{\text{reader}} \sim 0,0015$ a kultivovať cez noc na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} 1,8 - 1,95$. Po dosiahnutí $OD_{\text{reader}} \sim 1,8$ fixovať (viď bod B).

Kultivácia kultúry blokovanej v G1 fáze bunkového cyklu

Bunky večer zaočkovať do 5 ml média (YPAD alebo príslušné selekčné médium) a kultivovať cez noc na trepačke (30 °C, 180 rpm). Narastenú bunkovú kultúru ráno preočkovať do príslušného množstva média (50 ml kultúry pre jednu protilátku) na $OD_{\text{reader}} \sim 0,4$ a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 1,5$. Po dosiahnutí $OD_{\text{reader}} \sim 1,5$ odobrať nesynchronizovanú kultúru buniek a fixovať (viď bod B) Do zvyšku

kultúry buniek pridať príslušné množstvo 0,1mM α -faktoru (Zymo Research) na výslednú koncentráciu 25 nM. Bunkovú kultúru s α -faktorom kultivovať 2 hodiny na trepačke (30 °C, 180 rpm) a následne fixovať (viď bod B). Je vhodné súčasne s odberom buniek na ChIP odobrať 2 ml kultúry pre analýzu na prietokovom cytometri (overenie blokácie kultúry v G1 fáze, viď kapitola 3.2.5.4).

B. Fixácia buniek

Po kultivácii buniek pridať k bunkovej kultúre 37% formaldehyd (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 1% (1,35 ml 37% formaldehydu na 50 ml bunkovej kultúry) a inkubovať presne 30 minút na trepačke (RT, 150 rpm). Fixáciu buniek ukončiť prídavkom 2,5M roztoku glycínu (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 0,125 M (2,5 ml 2,5M glycínu na 50 ml bunkovej kultúry). Bunky s glycínom inkubovať 10 minút na trepačke (RT, 150 rpm). Kultúry buniek potom preliať do 50ml skúmaviek a centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 3 min, 4 °C, 1000 x g). Pelet buniek po odstránení supernatantu resuspendovať v 40 ml sterilnej diH₂O a znovu centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 3 min, 4 °C, 1000 x g). Po odstránení supernatantu resuspendovať premytý pelet buniek v 1 ml sterilnej diH₂O, previesť do 2ml mikroskúmaviek a centrifugovať (Eppendorf model 5430, 1 min, RT, 16500 x g). Pelet fixovaných buniek uskladniť v -80 °C.

C. Dezintegrácia buniek

Všetky vzorky i pufry od tohto kroku chladiť na ľade alebo v ľadovom kúpeli.

K zmrazeným fixovaným bunkám pipetovať 270 μ l vychladeného LB pufra s príslušným množstvom roztoku inhibítora proteáz. Bunky resuspendovať a preniesť do skúmaviek so skrutkovacím viečkom s ~880 mg sklenených guľičiek (425 – 600 μ m, vopred umyté v kyseline chlorovodíkovej (Lach-Ner)). Následne bunky rozbiť pomocou prístroja FastPrep®-24 (MP Biomedicals) použitím cyklu: 3x, rýchlosť 5,5 m/s, 13 sekúnd. Medzi jednotlivými cyklami uskutočniť päťminútovú pauzu s uchovaním vzoriek v ľadovom kúpeli. Po rozbití buniek sklenené guľičky z bunkového lyzátu odstrániť. Dno i viečko skúmaviek s guľičkami prepichnúť nažhavenou tenkou ihlou, skúmavky vložiť do

1,5ml mikroskúmaviek s odstrihnutým viečkom. Zložené mikroskúmavky vložiť do 50ml skúmaviek a bunkový lyzát z guľičiek centrifugovať do mikroskúmaviek bez viečka (Eppendorf model 5804R, 2 min, 4 °C, 800 x g). Bunkový lyzát preniesť do nových 1,5ml mikroskúmaviek, guľičky prepláchnuť 100 µl LB pufru s inhibítormi proteáz a znovu centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 2 min, 4 °C, 800 x g). Obe frakcie spojiť a centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 10 min, 4 °C, 20000 x g). Supernatant odstrániť, peletu dôkladne resuspendovať v 600 µl LB pufru s inhibítormi proteáz a následne centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 10 min, 4°C, 20000 x g). Supernatant odstrániť a peletu resuspendovať v 270 µl LB pufru s inhibítormi proteáz. Vzorky sú týmto pripravené k sonikácii.

Roztoky:

LB pufor	50 mM HEPES (pH 7,6; Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Bio-Rad), 150 mM chlorid sodný (Lach-Ner), 1% Triton X-100 (Serva), 0,1% deoxycholát sodný (Sigma-Aldrich)
Kokteíl inhibítorov proteáz FY	62,6 mg zmes inhibítorov proteáz: AEBSF, E-64, pepstatín A, 1,10-fenantrolín (Serva), 1 ml DMSO (Serva); jednotlivé zložky zmiešať, pričom sa získa 100x koncentrovaný zásobný roztok

D. Sonikácia

K sonikácii, pri ktorej je chromátin naštiepený na kratšie fragmenty odpovedajúce veľkosti 200 – 800 bp DNA, použiť sonikátor BioRuptor™ Next Gen (Diagenode) s nastavených chladením na 2 °C. Pripravené vzorky sonikovať 15x 30 sekúnd s tridsaťsekundovými pauzami medzi cyklami. Sonikovať vždy 6 mikroskúmaviek, pri nižšom počte vzoriek pridať mikroskúmavky s diH₂O. Po sonikácii vzorky centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 20 min, 4 °C, 24000 x g) a supernatant odobrať. Vzorky jednotlivých kmeňov preniesť do čistých 1,5ml mikroskúmaviek a na spektrofotometre

NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) zmerať pri vlnovej dĺžke 280 nm koncentráciu proteínov (ako porovnávaciu vzorku použiť vodu). V prípade odlišností koncentrácií vzoriek viac než o 10%, vzorky nariediť LB pufrom s inhibítormi proteáz.

E. Blokácia protein A Sepharosy

Protein A Sepharosu (GE Healthcare) o množstve 17,5 μ l (na odstránenie nešpecifickej reaktivity, vid' bod F) alebo 45 μ l (na inkubáciu, vid' bod H) resuspendovať v 500 μ l LB pufra, centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 2 min, RT, 5400 x g) a supernatant odsáť pomocou injekčnej striekačky. Protein A Sepharosu resuspendovať v 500 μ l LB pufra s roztokom BSA o koncentrácii 0,5 mg/ml (Bio-Rad) a inkubovať na trepačke pre mikroskúmavky (Thermomixer® comfort, Eppendorf, 30 min, RT, 1000 rpm). Následne protein A Sepharosu centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 2 min, RT, 5400 x g) a supernatant odsáť. Protein A Sepharosu znovu resuspendovať v 500 μ l LB pufra s 0,5mg/ml roztokom BSA, inkubovať na trepačke (Thermomixer® comfort, Eppendorf, 30 min, RT, 1000 rpm) a po centrifugácii (Eppendorf MiniSpin PLUS, 2 min, RT, 5400 x g) supernatant odsáť.

F. Odstránenie nešpecifickej reaktivity

Supernatant získaný centrifugáciou vzoriek po sonikácii (objem \sim 250 μ l) pridať k 17,5 μ l blokovanej protein A Sepharosy (príprava podľa bodu E). Zmes inkubovať na rotačnej miešačke skúmaviek v chladovej miestnosti (FALC F205, 1 hod, 8 rpm). Po inkubácii vzorky centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 2 min, 4 °C, 5500 x g) a supernatant odobrať do čistej 1,5ml mikroskúmavky. Vzorky zamraziť v -80 °C, možno skladovať až týždeň bez straty aktivity.

G. Preinkubácia s primárnou protilátkou

Po rozmrazení vzoriek odobrať do 1,5ml mikroskúmaviek po 5 μ l a uchovať v -20 °C (vzorky označované ako „input“). Zvyšok vzoriek rozdeliť do 1,5ml

mikroskúmaviiek po 240 μ l (vzorky označované ako „output“) a pridať k nim 5 μ l primárnej protilátky špecifickej pre daný proteín (5 μ l protilátky na 50 ml bunkovej kultúry). Vzorky s protilátkou inkubovať na rotačnej miešačke skúmaviiek v chladovej miestnosti (FALC F205, 1 hod, 8 rpm). Po inkubácii vzorky krátko centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5s, 4 °C).

H. Inkubácia s protein A Sepharosou

Vzorky s príslušnou protilátkou pipetovať k 45 μ l zablokovanej protein A Sepharose (príprava podľa bodu E) a inkubovať na rotačnej miešačke skúmaviiek v chladovej miestnosti (FALC F205, 3 hod, 8 rpm). Po inkubácii vzorky centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 2 min, 4 °C, 5500 x g) a supernatant odstrániť.

I. Izolácia DNA

Guličky protein A Sepharosy s naviazanou protilátkou špecificky viažucou daný proteín zosieťovaný s úsekmi DNA premyť 6x v 700 μ l chladeného IP pufra. Po každom premytí vzorky centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 2 min, 4 °C, 5 500 x g) a supernatant odstrániť bez odobrania premývaných guličiek. Po ukončení premývania a odstránení supernatantu k vzorkám „output“ i „input“ pridať 100 μ l 10% Chelexu (Bio-Rad). Vzorky premiešať na vortexe (10 s) a inkubovať v termobloku pre odstránenie kovalentných väzieb medzi proteínmi a DNA vzniknutých po fixácii formaldehydom (10 min, 95 °C, po 5 minútach vzorky znovu premiešať 10 s). Vzorky potom centrifugovať (5 s, RT) a nechať vychladnúť. K vzorkám následne pipetovať 1 μ l 20 mg/ml proteinázy K (Roche). Vzorky premiešať (10 s) a inkubovať na trepačke (Thermomixer® comfort, Eppendorf, 30 min, 55 °C, 1 000 rpm). Po inkubácii vzorky inkubovať v termobloku pre inaktiváciu proteinázy (10 min, 95 °C, po 5 minútach vzorky znovu premiešať 10 s). Vzorky centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 2 min, RT, 5 500 x g) a odobrať 80 μ l supernatantu do čistých mikroskúmaviiek. K zmesi chelexu a guličiek pridať 60 μ l diH₂O, premiešať na vortexe (10 s) a znovu centrifugovať (Eppendorf MiniSpin PLUS, 2 min, RT,

5 500 x g). Odobrať 60 μ l supernatantu a spojiť s predošlými 80 μ l. Získanú izolovanú DNA uskladniť v -80 °C.

Roztoky:

IP pufo 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Serva, Lach-Ner), 1% Triton X-100 (Serva), 150 mM chlorid sodný (Lach-Ner), 5 mM EDTA (Bio-Rad), 0,5% NP-40 (IGEPAL CA630, Sigma-Aldrich)

3.2.7.2 Stanovenie prítomnosti značeného proteínu myc-H3 v rôznych frakciách odobraných v priebehu ChIP

Cez noc narastenú bunkovú kultúru ráno preočkovať do príslušného množstva média (50 ml kultúry pre jednu protilátku) na OD_{reader} 0,15 a kultivovať na trepačke (30 °C, 180 rpm) do dosiahnutia $OD_{\text{reader}} \sim 0,9$. Po dosiahnutí $OD \sim 1,5$ pridať do kultúry príslušné množstvo 100 μ M β -estradiolu (Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 400 nM. Bunkovú kultúru s β -estradiolom kultivovať 2 hodiny na trepačke (30 °C, 180 rpm) a následne spracovať podľa kapitoly 3.2.7.1 (body B – D). Pre analýzu prítomnosti exprimovaného myc-H3 odobrať: 5 μ l vzorky „input“ (pred pridaním primárnej protilátky), 700 μ l wash1 (prvé premytie matrice IP pufrom), 700 μ l wash2 (druhé premytie IP pufrom) a precipitát (guličky proteín A sepharosy s naviazaným materiálom).

Príprava proteínových extraktov

Jednotlivé odobraté vzorky následne spracovať pre analýzu pomocou techniky Western blot. K vzorke input pridať 20 μ l diH₂O a 25 μ l 2x Laemmli pufru. K vzorke precipitát pridať 20 μ l diH₂O a 20 μ l 2x Laemmli pufru. Proteíny zo vzoriek wash1 a wash2 precipitovať pomocou kyseliny trichloroctovej (TCA). K vzorkám pridať 6 μ l 50 μ g/ml BSA a taký objem TCA, aby jej výsledná koncentrácia bola 25%. Vzorky inkubovať 30 minút na ľade za občasného premiešania vortexovaním. Zmes centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 30 min, 4 °C, max otáčky) a supernatant odstrániť. Sediment resuspendovať

v 1 ml vychladeného acetónu s 0,05 M HCl a centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, 4 °C, max otáčky). Supernatant odstrániť a sediment resuspendovať v 1 ml acetónu. Vzorky opäť centrifugovať (Eppendorf model 5417R, 5 min, 4 °C, max otáčky) a supernatant odstrániť. Vysušený pelet rozpustiť v 20 µl diH₂O a 20 µl 2x Laemmli pufre. Všetky vzorky nakoniec inkubovať 10 minút pri 95 °C. Vzorky analyzovať pomocou metódy SDS-PAGE (nanáška 12 µl), Western blot a následnej imunodetekcie proteínov (viď kapitola 3.2.6).

3.2.7.3 Kvantitatívna PCR

Izolovanú DNA získanú chromatínovou imunoprecipitáciou vyhodnotiť pomocou kvantitatívnej PCR (qPCR). Pomocou spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) zmerať pri vlnovej dĺžke 260 nm koncentráciu izolovanej DNA u všetkých vzoriek (ako porovnávaciu vzorku použiť vodu).

Izolovaná DNA bola do reakcie qPCR v priebehu ChIP experimentov riedená dvoma spôsobmi.

1. spôsob riedenia vzoriek:

Izolovanú DNA jednotlivých vzoriek „input“ a „output“ nariediť na rovnakú koncentráciu 13,4 ng/µl. Do reakcie qPCR vziať 1,5 µl roztoku nariedenej templátovej DNA, čo predstavuje množstvo približne 20 ng DNA.

Obsah zmesi (1 reakcia, 11 µl):

4 µl	diH ₂ O
6,25 µl	MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR [®] Assay No ROX (Eurogentec)
0,375 µl	primer 1 (zásobný roztok o koncentrácii 10 µM)
0,375 µl	primer 2 (zásobný roztok o koncentrácii 10 µM)

2. spôsob riedenia vzoriek:

Po zmeraní koncentrácie izolovanej DNA všetkých vzoriek na spektrofotometri Nanodrop vypočítať priemernú koncentráciu vzoriek „input“ a priemernú koncentráciu vzoriek „output“. S využitím priemernej koncentrácie vypočítať riedenie templátovej DNA na koncentráciu 13,4 ng/μl. Vzorky „input“ a vzorky „output“ nariediť a do reakcie qPCR vziať 1,5 μl roztoku.

Obsah zmesi (1 reakcia, 8,5 μl):

5,9 μl	diH ₂ O
2 μl	5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR supermix (Solis Biodyne)
0,3 μl	primer 1 (zásobný roztok o koncentrácii 10 μM)
0,3 μl	primer 2 (zásobný roztok o koncentrácii 10 μM)

Chemikálie a DNA je vhodné chladit'. Príslušné množstvo dôkladne premiešanej zmesi pipetovať pomocou dávkovacej pipety (Eppendorf Xplorer®) na dno jednotlivých jamôk mikrotitračnej doštičky (celkovo 384 jamôk, *LightCycler® Multiwell Plate 384*, Rosche). K zmesi následne pipetovať pomocou dávkovacej automatickej pipety (Gilson) 1,5 μl roztoku nariedenej templátovej DNA. Templátovú DNA pipetovať na stenu jamôk mikrotitračnej doštičky tak, aby nedošlo ku kontamináciám medzi jednotlivými párami primerov. Po prenesení všetkých vzoriek doštičku utesniť samolepiacou fóliou (*LightCycler® Sealing Foil*, Rosche) , reakčnú zmes premiešať pomocou vortexu a centrifugovať (Eppendorf model 5804R, 3 min, RT, 1 500 x g). Doštičku s reakčnou zmesou vložiť do prístroja Light Cycler® 480 II a inkubovať podľa príslušného programu (Tm60). Všetky reakcie uskutočniť v triplikátoch.

Tab. 17: Program qPCR (Tm60).

Krok reakcie qPCR	Teplota	Čas	Počet cyklov
Preinkubácia	95 °C	5 min	1x
Amplifikácia	95 °C	15 s	40 – 45x
	60 °C	30 s	
	72 °C (po tomto kroku prístroj odčíta fluorescenciu)	20 s	
Analýza topením (melting)	95 °C	5 s	1x
	50 °C	1 min *	
Chladienie	40 °C	30 s	1x

* po 1 minúte zvyšovanie teploty o 1 °C, kontinuálne odčítanie fluorescencie prístrojom

Kvantitatívnu analýzu všetkých vzoriek uskutočniť pomocou LightCycler® 480 Software Version 1.5 (Roche Applied Science).

3.2.7.4 Vyhodnotenie a normalizácia dát qPCR

Kvantitatívna PCR (qPCR) je metóda založená na detekcii a kvantifikácii fluorescenčného signálu interkalačného farbiva (SYBR Green) obsiahnutého v reakčnej zmesi, ktorý je priamo úmerný množstvu vznikajúceho produktu PCR. Hodnota C_p (*crossing point*) predstavuje počet cyklov, ktoré boli potrebné pre dosiahnutie určitej hodnoty fluorescencie, čo znamená, že čím vyššia je hodnota C_p , tým menej templátovej DNA vzorka obsahovala. V priebehu qPCR boli jednotlivé vzorky templátovej DNA merané v technických triplikátoch. Kvantitatívnou PCR bola získaná hodnota C_p ako priemer technických triplikátov a smerodajná odchýlka každého triplikátu (*STD*).

Výsledky chromatinovej imunoprecipitácie boli vyjadrené buď ako percento inputu alebo ako relatívne nabohtenie konkrétneho úseku DNA oproti kontrolnému úseku.

Percento inputu bolo vypočítané s využitím nasledujúcich rovníc:

$$\Delta C_p = C_p(\text{out}) - C_p(\text{in})_{\text{priemer}}$$

$$\% \text{ "inputu" } = E^{-\Delta C_p} \cdot \frac{1}{f} \cdot 100$$

Výpočet smerodajnej odchýlky pre danú vzorku vychádza z rovnice:

$$SD = \sqrt{STD^2(in) + STD^2(out)}$$

Relatívne nabohatenie konkrétneho úseku DNA bolo stanované podľa tzv. Pfafflovej komparatívnej metódy $\Delta\Delta C_p$ s korekciou účinnosti (Pfaffl, 2001). Výpočet podľa rovnice:

$$\text{relatívne nabohatenie} = \frac{\% \text{ inputu}_{\text{testovaný lokus}}}{\% \text{ inputu}_{\text{kontrolný lokus}}} = \frac{[E_{\text{cieľ}}^{-\Delta C_p}_{\text{testovaný lokus}}] \cdot \frac{1}{f_{\text{testovaný lokus}}} \cdot 100}{[E_{\text{ref}}^{-\Delta C_p}_{\text{kontrolný lokus}}] \cdot \frac{1}{f_{\text{kontrolný lokus}}} \cdot 100}$$

V daných rovniciach predstavuje E účinnosť amplifikácie konkrétneho páru primerov, C_p (out) mieru koncentrácie amplifikovanej DNA získanej precipitáciou, C_p (in) mieru koncentrácie amplifikovanej DNA vstupujúcej do precipitácie, STD smerodajnú odchýlku triplikátov vzorky „input“ (in) a „output“ (out), f faktor riedenia vzorky „input“. Označenie C_p (in)_{priemer} predstavuje priemernú hodnotu C_p (in) jednotlivých vzoriek.

Faktor riedenia f je hodnota predstavujúca koľkokrát bola v qPCR reakcii vzorka „input“ nariedená viac oproti vzorke „output“. V tejto hodnote je započítané z akého objemu vzorky „input“ (V (in)) a vzorky „output“ (V (out)) bola izolovaná DNA (viď kapitola 3.2.7.1, bod G) a aký objem izolovanej DNA vzorky „input“ (V (DNA in)) a vzorky „output“ (V (DNA out)) bol vzatý do reakcie qPCR (viď kapitola 3.2.7.3). Výpočet faktoru riedenia podľa rovnice:

$$f = \frac{V(out)}{V(in)} \cdot \frac{V(DNA out)}{V(DNA in)}$$

Pri uskutočnení viacerých biologických opakovaní výsledné hodnoty relatívneho nabohatenia spriemerovať.

4. CIELE DIPLOMOVÉHO PROJEKTU

Môj diplomový projekt nadväzuje na moju bakalársku prácu, v ktorej som sa prvotnými výsledkami z chromatinovej imunoprecipitácie pokúsila zodpovedať na otázku, či má Prp45 vplyv na trimetyláciu histónu H3 na lyzíne 4 (H3K4me3). V rámci diplomovej práce som sa snažila na otázku vplyvu alely *prp45(1-169)* na hladinu metylácie zodpovedať, a taktiež som sa zamerala na vplyv *prp45(1-169)* na hladinu acetylácie histónov, na prechod bunkovým cyklom a na dynamiku chromatinu.

Pre splnenie diplomového projektu boli stanované tieto ciele:

- Sledovať vplyv mutácie *prp45(1-169)* na vybrané posttranslačné modifikácie (trimetylácia H3K4 a acetylácia H3K9/18 a H3K14) pomocou chromatinovej imunoprecipitácie.
- Sledovať vplyv mutácie *prp45(1-169)* na synchronizovaných bunkách:
 - pripraviť kmene *S. cerevisiae* s deletovaným génom pre proteázu Bar1 pomocou metódy *Delitto perfetto*
 - analyzovať chovanie synchronizovaných buniek *S. cerevisiae* pomocou prietokovej cytometrie.
- Sledovať vplyv mutácie *prp45(1-169)* na dynamiku nukleozómov:
 - zaviesť metódu indukibilnej expresie myc-značeného histónu H3.

5. VÝSLEDKY

5.1 Optimalizácia stanovenia histónov pomocou chromatinovej imunoprecipitácie

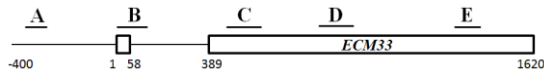
K analýze chromatinových modifikácií a hladiny histónov u buniek s mutovanou alelou génu *PRP45* bola využitá metóda chromatinovej imunoprecipitácie (ChIP), ktorá umožňuje pozorovať prítomnosť špecifických proteínov na cieľovej sekvencii DNA. V priebehu ChIP sú bunky fixované formaldehydom, čo vedie k vytvoreniu kovalentných väzieb medzi DNA a naviazanými proteínmi. Následne je DNA pomocou sonikácie fragmentovaná a fragmenty asociované s proteínom záujmu sú selektívne precipitované pomocou špecifickej protilátky. Po odstránení naviazaných proteínov je získaná DNA izolovaná. Frakcia fragmentov DNA pochádzajúcich z konkrétneho úseku genómu je kvantifikovaná pomocou kvantitatívnej PCR (qPCR). qPCR je založená na detekcii a kvantifikácii fluorescenčného signálu interkalačného farbiva SYBR Green obsiahnutého v reakčnej zmesi, ktorý rastie so vzrastajúcim množstvom produktu PCR. Prítomnosť modifikácií a histónov bola sledovaná na lokusoch génov *ECM33* a *ACT1*. Dôvodom výberu týchto génov bolo, že sú transkripčne aktívne, obsahujú intrón a dlhý terminálny exón. Tieto gény boli v našom laboratóriu použité aj v rámci súvisiacich projektov. Pre analýzu ChIP boli zvolené viaceré páry primerov, ktoré hybridizujú s rôznymi úsekmi génov nášho záujmu. Sekvencie primerov pre gény *ECM33* a *ACT1* a pre kontrolné úseky sú zhrnuté v kapitole 3.1.5.

V mojej bakalárskej práci bola zverejnená prvá séria pokusov z analýzy ChIP, pričom bola medzi týmito výsledkami značná variabilita. Keďže sme neboli s variabilitou týchto výsledkov spokojní, snažili sme sa tento problém riešiť hľadaním prípadných príčin. Za týmto účelom sme testovali rôzne podmienky kultivácie buniek, ktoré sa premietajú do stavu bunkového jadra a mohli by potenciálne ovplyvniť vlastnosti extrahovaného chromatinu a následné kroky chromatinovej imunoprecipitácie. Testovali sme tiež niektoré parametre v rámci protokolu ChIP tak, aby sme napr. vylúčili vplyv rôznych výrobcov reagensí pre qPCR alebo rôzneho obsahu prímiesí v extrahovanej DNA. Vzhľadom k tomu, že sme pozorovali relatívne veľké rozdiely v signále ChIP histónu H3 medzi wt a bunkami s mutáciou *prp45(1-169)*, zamerali sme sa predovšetkým na tento problém.

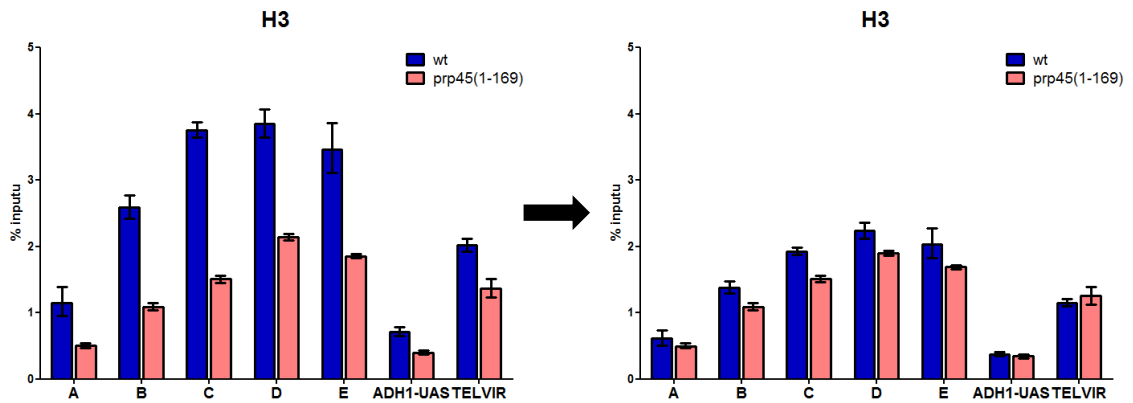
5.1.1 Testovanie rozdielov v signáloch ChIP histónov za vybraných experimentálnych podmienok

V rámci aspektov, ktoré sme testovali, sa ukázal ako najdôležitejší vplyv rôzneho obsahu prímiesí vo vzorkách izolovanej DNA. Týmto aspektom sme sa začali zaoberať vzhľadom k tomu, že sme si všimli, že hodnoty C_p „input“ sa medzi wt a mutantnými bunkami líšia. Hodnoty C_p „input“ odrážajú mieru koncentrácie amplifikovanej DNA vo vzorkách „input“, v ktorých bol izolovaný celkový chromátin z rovnakého počtu buniek. Očakávali sme, že sa tieto hodnoty nebudú medzi jednotlivými kmeňmi líšiť, pretože sme do qPCR použili vzorky v kvantitách, ktoré mali odrážať rovnakú koncentráciu DNA stanovenú spektrofotometricky (tzn. 20 ng DNA do reakcie qPCR). Preto sme hľadali možné príčiny tohto rozdielu. Domnievame sa, že vzorky „input“ obsahujú rôzne koncentrácie ďalších zložiek, ktoré pri meraní absorbancie interferujú a ovplyvňujú výslednú hodnotu koncentrácie DNA. To sa následne odrazí pri výpočte objemu izolovanej DNA potrebného preto, aby sa do reakcie qPCR použilo 20 ng DNA (v ďalšom texte je tento postup označovaný ako 1. spôsob, vid' kapitola 3.2.7.3). Kvôli prítomnosti prímiesí vo vzorke nie je do qPCR použité presne 20 ng DNA, čo vedie k rozdielnym hodnotám C_p „input“. Tieto rozdiely v C_p „input“ sú príčinou pozorovaného rozdielu v signále ChIP histónu H3 medzi wt a mutantou (Obr. 13B, panel naľavo). V ďalších experimentoch ChIP sme preto vzorky riedili na základe vypočítaného priemeru koncentrácií DNA pre wt a mutantné bunky stanovených na spektrofotometri (v ďalšom texte je tento postup označovaný ako 2. spôsob, vid' kapitola 3.2.7.3), aby bolo do reakcie qPCR použité adekvátne množstvo DNA (nie nutne presne 20 ng). Tento postup je legitímny, pretože faktor riedenia je zahrnutý do výpočtu výsledných hodnôt % „inputu“. Výsledky by teda nemali byť ovplyvňované tým, že mutantné a wt vzorky obsahujú rozdielne (a prípadne pokus od pokusu rôzne) koncentrácie zložiek, ktoré sa premietajú do výpočtu riedenia, a teda môžu ovplyvňovať výsledné hodnoty % „inputu“ u mutantných buniek (Obr. 13C, panel naľavo). Aby sme mohli výsledky získané z predchádzajúcich pokusov medzi sebou porovnávať, rozhodli sme sa pri súhrnnom vyhodnotení dát získaných z pokusov ChIP hodnoty C_p „input“ jednotlivých kmeňov spriemerovať a na túto hodnotu vzťahovať získané hodnoty C_p „output“, ktoré odrážajú mieru koncentrácie amplifikovanej DNA získanej precipitáciou (vyhodnotenie qPCR v kapitole 3.2.7.4; Obr. 13B a C, panely napravo).

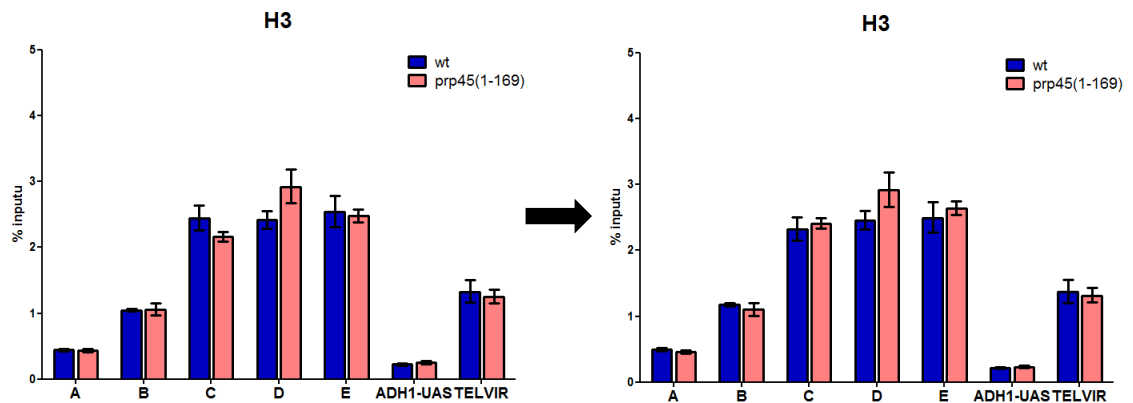
A



B



C



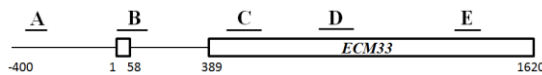
Obr. 13: ChIP analýza histónu H3 na géne *ECM33*. (A) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Signál histónu H3 vyjadrený ako % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú % „inputu“ vypočítané zo spriemerovanej hodnoty Ct „input“ jednotlivých vzoriek v rámci pokusu. Vzorky DNA boli do reakcie qPCR riedené 1. (B) a 2. (C) spôsobom (viď postup v kapitole 3.2.7.3). Jedná sa o jeden biologický pokus. Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3).

Druhým aspektom, ktorý sme riešili, bol vplyv odlišných reagensí. V priebehu experimentov ChIP došlo k výmene dodávateľa reagentie pre qPCR z MESA Green (Eurogentec) na EvaGreen (Solis Biodyne). Preto sme testovali, či zmena reagentie pre

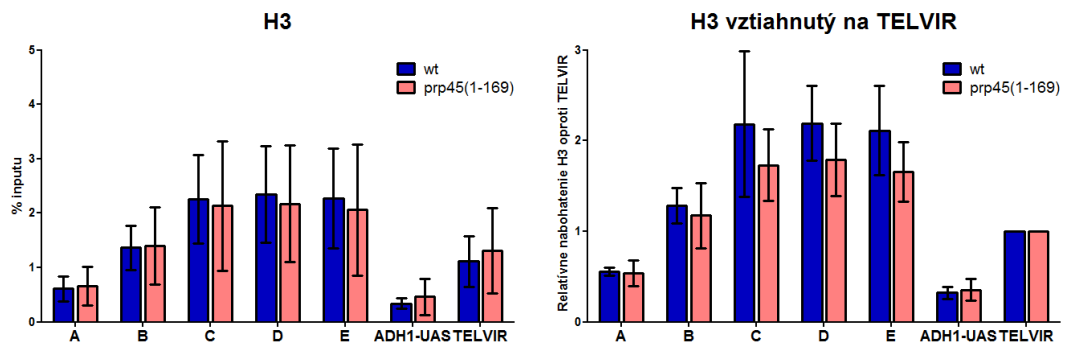
qPCR ovplyvní výsledný profil signálu ChIP histónu H3. Konečný výsledok ChIP nebol zmenou tejto reagentie ovplyvnený (neukázané výsledky).

Tretím aspektom, ktorý sme riešili, bol vplyv odlišnej dostupnosti epitopov pre protilátku špecificky rozoznávajúcu histón H3. Aby sme tento vplyv vylúčili, a vzhľadom k tomu, že stanovenie histónu H3 má odrážať hladinu nukleozómov (teda i H4), sme sa rozhodli porovnať ChIP pomocou protilátky špecificky rozoznávajúcej histón H3 a H4. Kmene wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*) boli kultivované a v exponenciálnej fáze rastu boli odobraté vzorky pre analýzu ChIP (kapitola 3.2.7.1). Fragменты DNA precipitované cez histón H3 a H4 boli kvantifikované pomocou qPCR (1. spôsob, kapitola 3.2.7.3) za použitia špecifických primerov pre úseky na génoch *ECM33* a *ACT1*. Signál ChIP histónu H3 a H4 bol vyjadrený ako % „inputu“ (ľavý panel grafov), pričom takto vyjadrené hodnoty boli navyše normalizované na kontrolnú oblasť TELVIR (pravý panel grafov). Z grafov pre histón H3 a H4 je zrejmé, že u buniek s mutáciou *prp45(1-169)* nedochádza k výrazným zmenám v signále ChIP histónu H3 a H4 v porovnaní s divokým kmeňom (Obr. 14). Analogicky boli rovnaké profily získané i pre gén *ACT1* (neukázané výsledky). Výsledky pre histón H3 a H4 sú podobné, čo potvrdilo, že sa nejedná o vplyv odlišnej dostupnosti epitopov pre použitú protilátku.

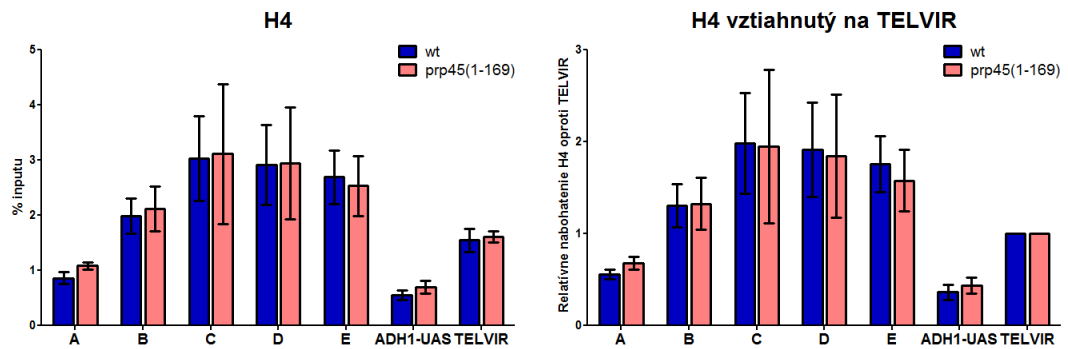
A



B

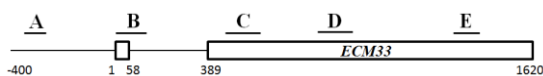
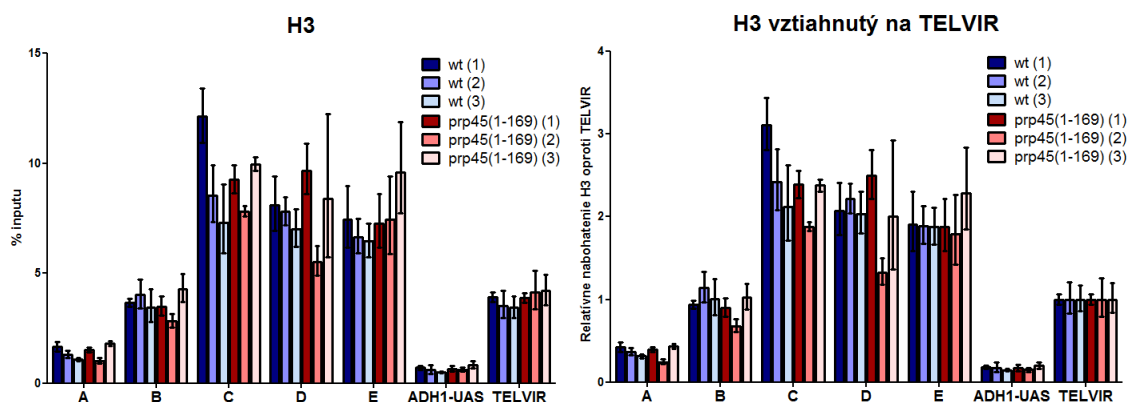


C



Obr. 14: ChIP analýza histónu H3 a H4 na géne *ECM33*. (A) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Signál histónu H3/H4 vyjadrený ako % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú relatívne nabohatenie signálu H3/H4 vyjadrené ako % „inputu“ H3/H4 vzťahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Výsledky sú zobrazené ako priemerné hodnoty zo siedmich (B) a z troch (C) biologických pokusov. Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z biologických pokusov (B, n=7; C, n=3).

Štvrtým aspektom, ktorý sme riešili, bol vplyv možných chýb experimentátora pri spracovaní vzoriek a rôzne vplyvy protokolu ChIP (dĺžka fixácie buniek formaldehydom, efektívnosť lýzie buniek, sonikácia chromatinu, a i.). Preto sme sa rozhodli zistiť, ako bude vyzerat' výsledok, keď jednu zmes rozdelíme na tri časti, ktoré sa spracujú paralelne. Aby sme to testovali, kmene wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*) boli kultivované a pred fixáciou formaldehydom bola každá kultúra buniek rozdelená na tri časti. Tieto tri časti boli následne paralelne spracované (viď kapitola 3.2.7.1). Fragmenty DNA precipitované cez histón H3 boli kvantifikované pomocou qPCR (2. spôsob, kapitola 3.2.7.3) za použitia špecifických primerov pre úseky na géne *ECM33*. Výsledne grafy ukazujú, že signál ChIP histónu H3 triplikátov jednotlivých kmeňov má tendenciu správať sa v rámci amplikonov (pre wt to sú A, C, D, E; pre *prp45(1-169)* to sú A, B, C, D) rovnako (Obr. 15). To naznačuje, že sa jedná o technickú variabilitu, ktorá vznikla pred analýzou qPCR, čiže v priebehu spracovania vzoriek. Aj keď v priebehu spracovania vzoriek technická variabilita vznikla, nevysvetľuje to pôvodne pozorované rozdiely v signále ChIP histónu H3 medzi wt a mutantou *prp45(1-169)*.

A**B**

Obr. 15: **ChIP analýza histónu H3 na gène *ECM33*.** (A) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B) Signál histónu H3 vyjadrený ako % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú relatívne nabohatenie signálu H3 vyjadrené ako % „inputu“ H3 vztiahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Pred fixáciou buniek formaldehydom boli bunky rozdelené na tri časti a následne boli paralelne spracované (označenie 1, 2 a 3; viď kapitola 3.2.7.1). Jedná sa o jeden biologický pokus. Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3).

5.1.2 Porovnanie signálu ChIP histónu H3 za rôznych kultivačných podmienok

V rámci riešenia otázky, čo spôsobuje rozdiel v signále ChIP histónov medzi wt a mutantou *prp45(1-169)*, sme tiež sledovali vplyv rôznych kultivačných podmienok. Dôvodom bol fakt, že kultivačné podmienky ovplyvňujú rýchlosť rastu a môžu ovplyvniť celkový stav bunky (teda i jadra), čo by sa mohlo v dôsledku premietnúť do získaných hodnôt signálu ChIP. Tieto výsledky sú pre úplnosť uvedené v nasledujúcich podkapitolách, aj keď priniesli negatívne nálezy v tom zmysle, že neukázali efekty podmienok kultivácie na signál ChIP histónu H3.

Kultivácia buniek v rôznych typoch kultivačných médií pri 30 °C

Jednou z testovaných možností bolo, že by problém pozorovaného rozdielu v signále ChIP histónu H3 mohol súvisieť s rôznou rýchlosťou rastu buniek, ktorá je ovplyvnená typom kultivačného média. Preto sme testovali vplyv rôznych typov médií na hladinu histónu H3.

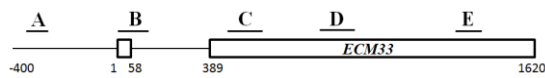
Aby sme pre analýzu ChIP vybrali vhodné podmienky, merali sme rast kmeňov wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*) v rôznych typoch kultivačných médií. Použili sme komplexné médium YPAD a definované média SD +supp, +H,L,U,W, +Ade; SD +supp, +H,L,U,W a SD –supp, +H,L,U,M. Rýchlosť rastu kmeňov bola pozorovaná spektrofotometricky meraním optickej denzity pri 600 nm „ručne“ (každé 2 hodiny) alebo s využitím prístroja Varioskan (každých 10 minút) do dosiahnutia stacionárnej fázy (viď kapitola 3.2.3). Z nameraných dát boli vypočítané generačné doby kmeňov, ktoré sú znázornené v tabuľke na Obr. 16A. Z výsledkov vyplýva, že v prípade kultivácie v definovanom médiu SD –supp, +H,L,U,M dochádza k výraznému zníženiu rýchlosti rastu oboch kmeňov v porovnaní s kultiváciou vo zvyšných médiách. Pre analýzu ChIP sme zvolili média YPAD, SD +supp, +H,L,U,W, v ktorých bunky rástli najrýchlejšie a SD –supp, +H,L,U,M, v ktorom bunky rástli najpomalšie.

Kmene wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*) boli kultivované pri 30 °C v kultivačných médiách YPAD, SD +supp, +H,L,U,W a SD –supp, +H,L,U,M. V oblasti exponenciálnej fázy rastu boli bunky odobraté pre analýzu ChIP (kapitola 3.2.7.1). Fragmenty DNA precipitované cez histón H3 boli kvantifikované pomocou qPCR (2. spôsob, kapitola 3.2.7.3) za použitia špecifických primerov pre úseky na géne *ECM33*. Výsledné grafy sú zobrazené na Obr. 16 (C až E). Na základe tejto analýzy sme konštatovali, že kultivácia buniek v rôznych typoch médií nemá vplyv na výsledný profil histónu H3 u wt kmeňa a mutanty *prp45(1-169)*.

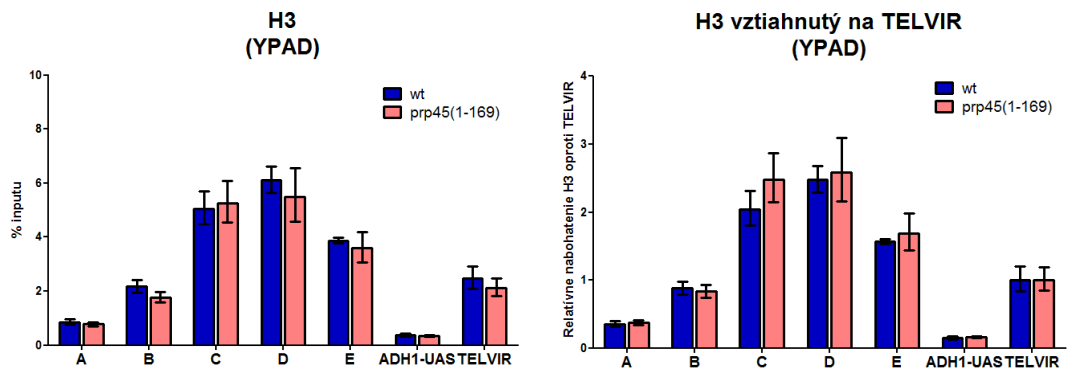
A

GENERAČNÁ DOBA [min]													
MÉDIUM	YPAD					SD +supp, +H,L,U,W		SD +supp, +H,L,U,W,+Ade		SD -supp,+H,L,U,M			
MERANIE	ručne			Varioskan		Varioskan		Varioskan		ručne		Varioskan	
POKUS	1.	2.	3.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
wt	95	89	87	83	90	83	82	86	82	116	116	111	113
prp45(1-169)	116	104	104	95	101	99	95	102	98	122	124	123	125

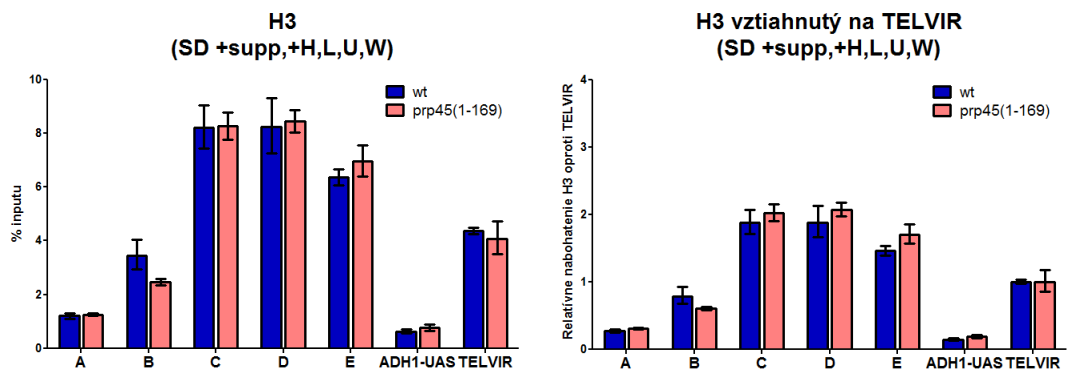
B



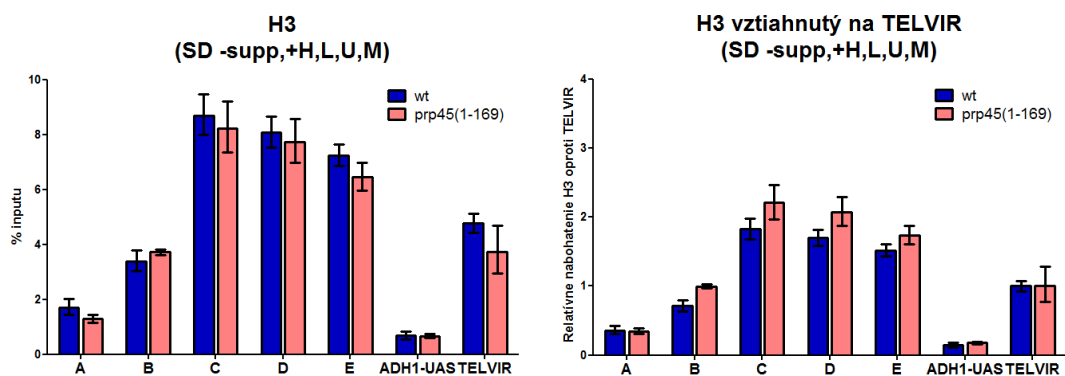
C



D



E



Obr. 16: **ChIP analýza histónu H3 na géne *ECM33*.** (A) Tabuľka znázorňujúca generačné doby kmeňov kultivovaných pri 30 °C v rôznych typoch médií. Rast kmeňov bol pozorovaný spektrofotometricky meraním optickej denzity (*OD*) pri 600 nm „ručne“ alebo pomocou prístroja Varioskan. (B) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (C až E) Signál histónu H3 vyjadrený ako % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú relatívne nabohatenie signálu H3 vyjadrené ako % „inputu“ H3 vzťahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Signál histónu H3 bol sledovaný v bunkách kultivovaných v médiu YPAD (C), v SD +supp, +H,L,U,W (D) a v SD -supp, +H,L,U,M (E). Jedná sa o jeden biologický pokus. Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3).

Kultivácia buniek v rôznych typoch kultivačných médií za rôznych teplotných podmienok

Vzhľadom k tomu, že rýchlosť rastu buniek je ovplyvnená kombináciou kultivačného média a teploty, rozhodli sme sa tiež testovať vplyv rôznych teplotných podmienok kultivácie na hladinu histónu H3.

Aby sme vybrali podmienky pre analýzu ChIP, merali sme podobne ako v predchádzajúcom prípade rast kmeňov wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*). Kmene boli kultivované v médiách YPAD a SD –supp, +H,L,U,M pri rôznych teplotách (27 °C, 29 °C, 34 °C a 39 °C). Rýchlosť rastu kmeňov bola pozorovaná spektrofotometricky meraním optickej denzity pri 600 nm „ručne“ (každé 2 hodiny; kultivácia pri 27 °C) alebo s využitím prístroja Varioskan (každých 10 minút; kultivácia pri 29 °C, 34 °C a 39 °C) do dosiahnutia stacionárnej fázy (kapitola 3.2.3). Z nameraných dát boli vypočítané generačné

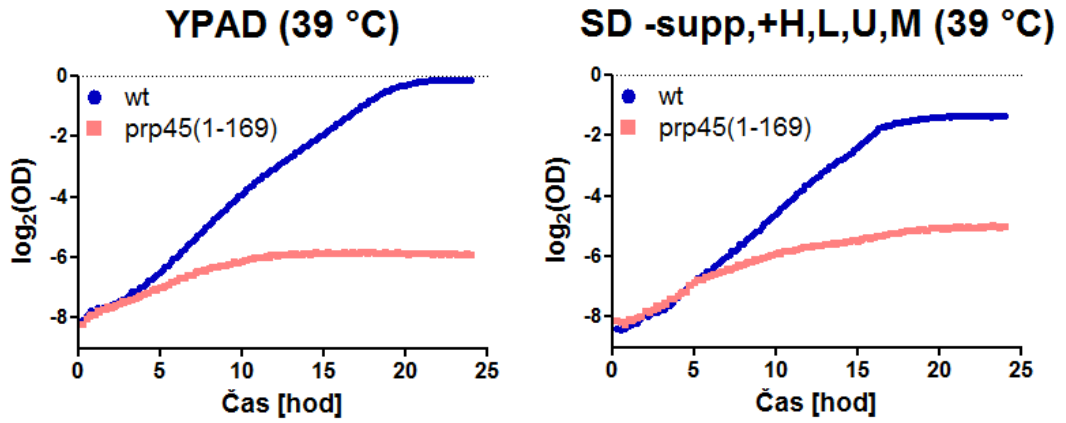
doby kmeňov, ktoré sú znázornené v tabuľke na Obr. 17A. Z výsledkov vyplýva, že za všetkých teplôt kultivácie dochádza k zníženiu rýchlosti rastu oboch kmeňov v SD –supp, +H,L,U,M v porovnaní s médiom YPAD. Pri kultivácii v reštriktívnej teplote (39 °C) je rast mutanty *prp45(1-169)* v médiu YPAD zastavený po približne 12 hodinách kultivácie a v médiu SD –supp, +H,L,U,M po približne 20 hodinách kultivácie (vid' rastovú krivku na Obr. 17B). Pre analýzu ChIP sme zvolili hraničné teploty kultivácie 27 °C a 34°C.

Kmene wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*) boli kultivované v definovaných médiách SD +supp, +H,L,U,W a SD –supp, +H,L,U,M pri teplote 30 °C (6 – 8 hodín). Následne boli bunky preočkované a kultivované pri 27 °C a 34 °C. V oblasti exponenciálnej fázy rastu boli bunky odobraté pre analýzu ChIP (kapitola 3.2.7.1). Fragmenty DNA precipitované cez histón H3 boli kvantifikované pomocou qPCR (2. spôsob, kapitola 3.2.7.3) za použitia špecifických primerov pre gén *ECM33*. Z grafov zobrazených na Obr. 17 (D až G) možno vidieť, že výsledný profil histónu H3 u wt kmeňa a mutanty *prp45(1-169)* nebol výrazne ovplyvnený kultiváciou buniek pri teplote 27 °C a 34 °C.

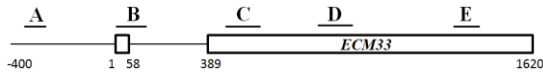
A

		GENERAČNÁ DOBA [min]							
MÉDIUM		YPAD				SD -supp,+H,L,U,M			
MERANIE	ručne	Varioskan			ručne	Varioskan			
TEPLOTA KULTIVÁCIE	27 °C	29 °C	34 °C	39 °C	27 °C	29 °C	34 °C	39 °C	
wt	99	82	77	122	116	110	102	125	
<i>prp45(1-169)</i>	108	95	102	273	124	120	132	188	

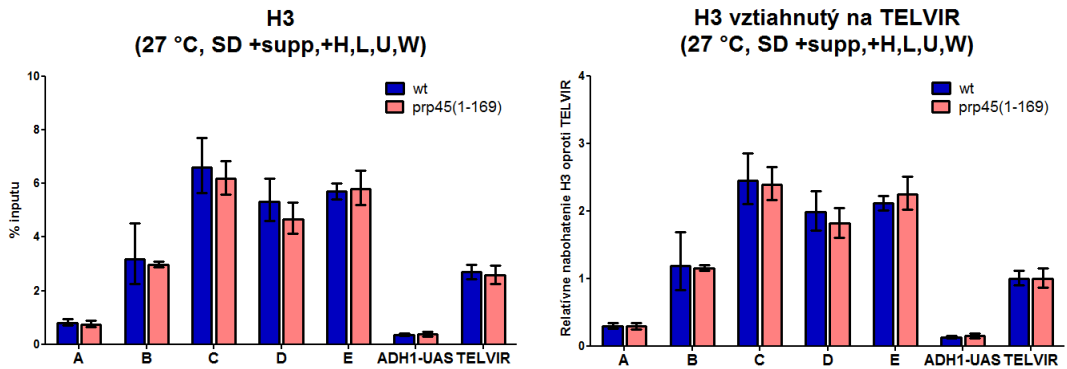
B



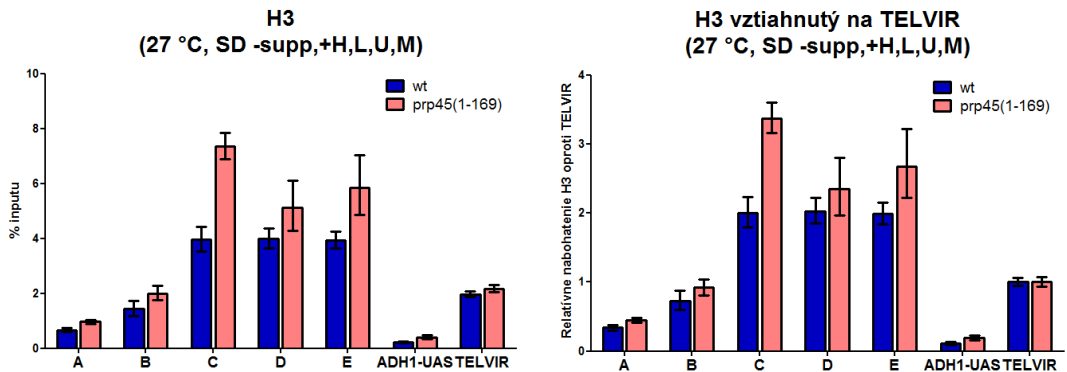
C



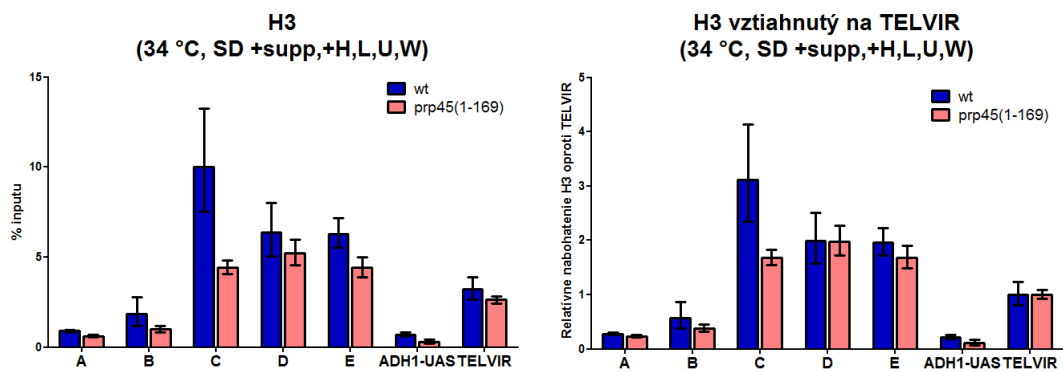
D



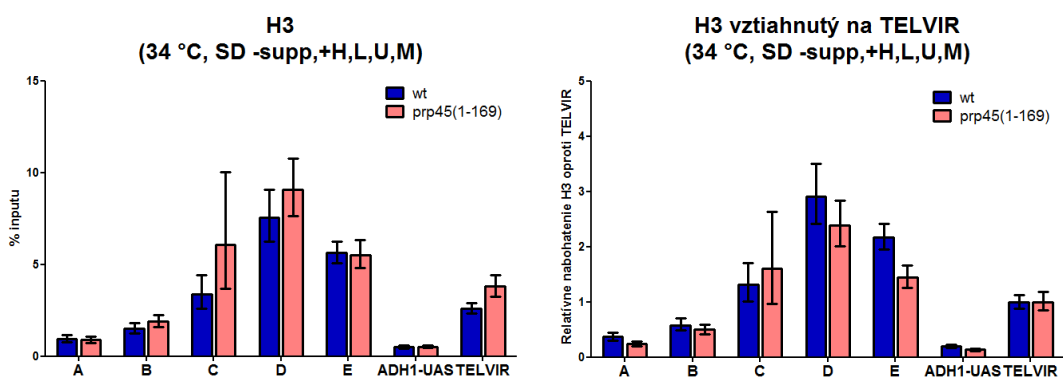
E



F



G



Obr. 17: ChIP analýza histónu H3 na géne *ECM33*. (A) Tabuľka znázorňujúca generačné doby kmeňov kultivovaných v médiu YPAD a SD -supp,+H,L,U,M za rôznych teplotných podmienok. Rast kmeňov bol pozorovaný spektrofotometricky meraním optickej denzity (*OD*) pri 600 nm „ručne“ alebo pomocou prístroja Varioskan. (B) Rastové krivky kmeňov *S. cerevisiae* kultivovaných v prístroji Varioskan pri 39 °C v médiu YPAD a v SD -supp,+H,L,U,M. Grafy zobrazujú logaritmicke závislosti $\log_2(OD)$ na čas. (C) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (D až G) Signál histónu H3 vyjadrený ako % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADHI-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú relatívne nabohtenie signálu H3 vyjadrené ako % „inputu“ H3 vztiahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Signál histónu H3 bol sledovaný v bunkách kultivovaných v médiu SD +supp, +H,L,U,W (D, F) a v SD -supp, +H,L,U,M (E, G) pri teplote 27 °C (D, E) a 34 °C (F, G). Jedná sa o jeden biologický pokus. Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3).

5.2 Sledovanie posttranslačných modifikácií chromatínu v mutante *prp45(1-169)*

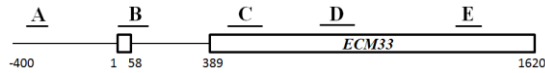
5.2.1 Mutácia *prp45(1-169)* nemá vplyv na trimetyláciu H3K4

Ako už bolo spomínané, v mojej bakalárskej práci som sa zamerala na pozorovanie vplyvu mutácie *prp45(1-169)* na trimetyláciu histónu H3 na lyzíne 4 (H3K4me3). Modifikácia H3K4me3 sa prevažne vyskytuje v miestach aktívnej transkripcie a je nabohatená na 5'-konci aktívnych génov (Liu et al. 2005). V bakalárskej práci boli zverejnené prvotné výsledky z dvoch nezávislých biologických pokusov, ktoré poukazovali na to, že mutácia *prp45(1-169)* výrazne neovplyvňuje profil H3K4me3 oproti divokému kmeňu. Variabilitu pozorovanú medzi týmito výsledkami sme sa snažili vysvetliť. V rámci toho sme uskutočnili niekoľko testov (viď kapitola vyššie), ktoré nám umožnili dospieť k čo najpresnejšiemu vyhodnoteniu experimentov ChIP. V rámci tejto práce boli zmerané dva nezávislé biologické pokusy. Vo výsledkoch sú ukázané namerané hodnoty signálu ChIP pre H3K4me3 z bakalárskej práce (Obr. 18B a 19B, pokusy 1 a 2) a z nových pokusov (Obr. 18B, pokusy 3 a 4; Obr. 19B, pokus 3). Aby bolo možné výsledky spoločne vyhodnotiť, tak sú výsledky z pokusov počítané podľa postupu v kapitole 3.2.7.4.

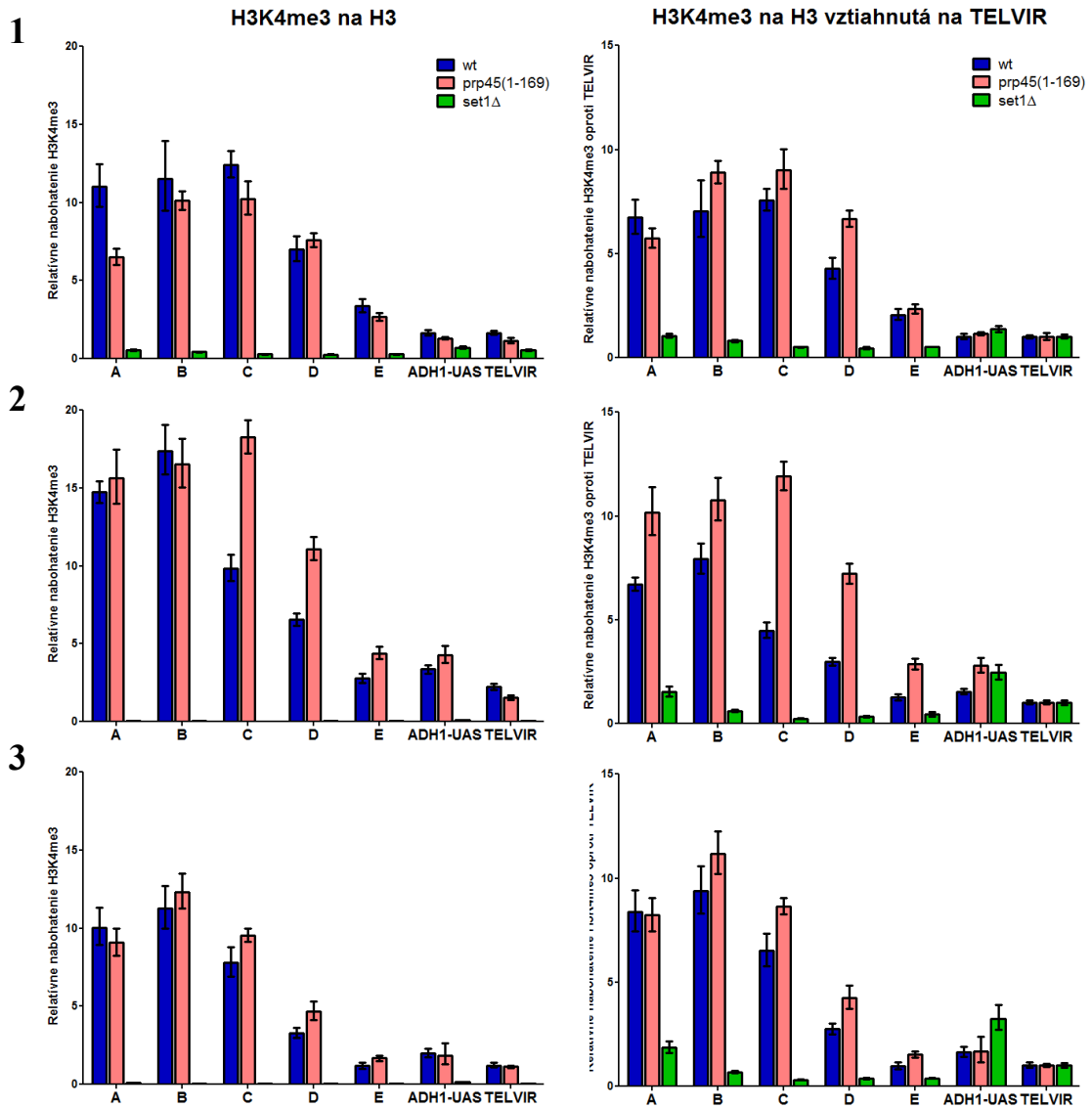
Kmene wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*) a *set1Δ* (*AVY92*) boli kultivované v médiu YPAD a v oblasti exponenciálnej fázy rastu boli bunky odobraté pre analýzu ChIP. Vzorky boli následne spracované za použitia protilátok špecificky rozoznávajúcich histón H3 a trimetyláciu H3K4 (kapitola 3.2.7.1). Izolované fragmenty DNA boli kvantifikované pomocou qPCR za použitia špecifických primerov pre úseky na génoch *ECM33* a *ACT1*. Vzorky pre qPCR boli v prvých troch pokusoch pripravené 1. spôsobom a vo štvrtom pokuse 2. spôsobom (kapitola 3.2.7.3). Výsledné grafy sú zobrazené na Obr. 18 a Obr. 19. Výsledky ukazujú jednotlivé biologické pokusy zobrazené zvlášť, aby bolo zrejmé, kde sú medzi jednotlivými pokusmi pozorované rozdiely. Podľa nášho názoru získané výsledky neukazujú, že by alela *prp45(1-169)* ovplyvňovala hladinu trimetylácie H3K4. Pokiaľ dochádza k ovplyvneniu trimetylácie H3K4, je pod rozlišovacou schopnosťou danou týmto typom stanovenia. Úlohu hrá, samozrejme, variabilita medzi pokusmi v kombinácii s obmedzeným počtom opakovaní. Z výsledného profilu H3K4me3 je zrejmé, že signál

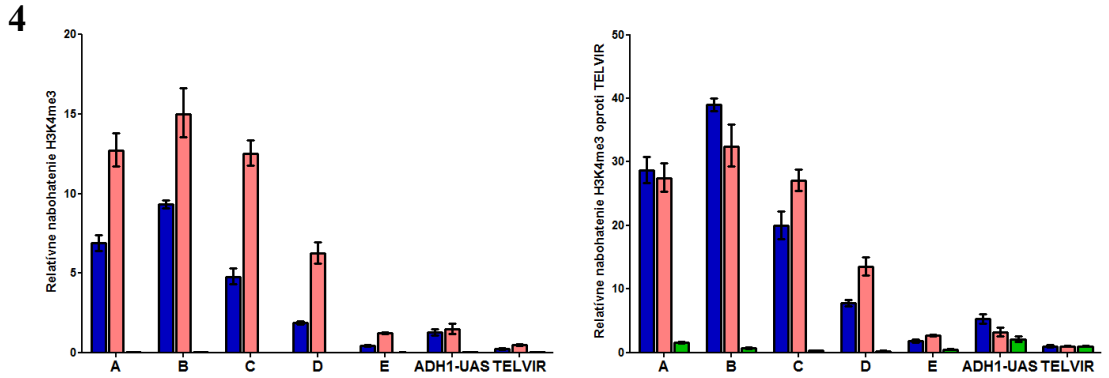
ChIP trimetylácie H3K4 je najvyšší v oblasti 5'-konca génov a klesá smerom k 3'-koncu. U kontrolného kmeňa s deletovanou histónmetyltransferázou *Set1* (*set1Δ*) nie je trimetylácia H3K4 na lokuse oboch génov pozorovaná.

A

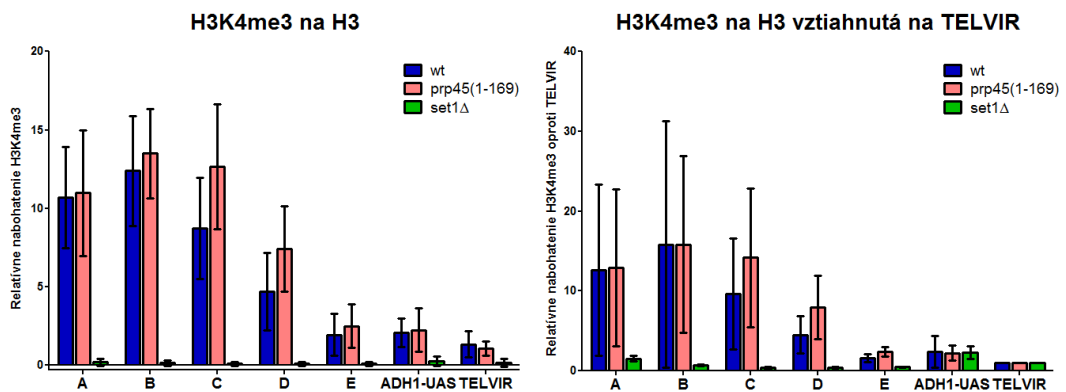


B



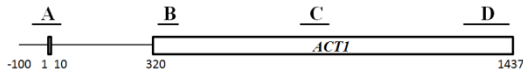


C

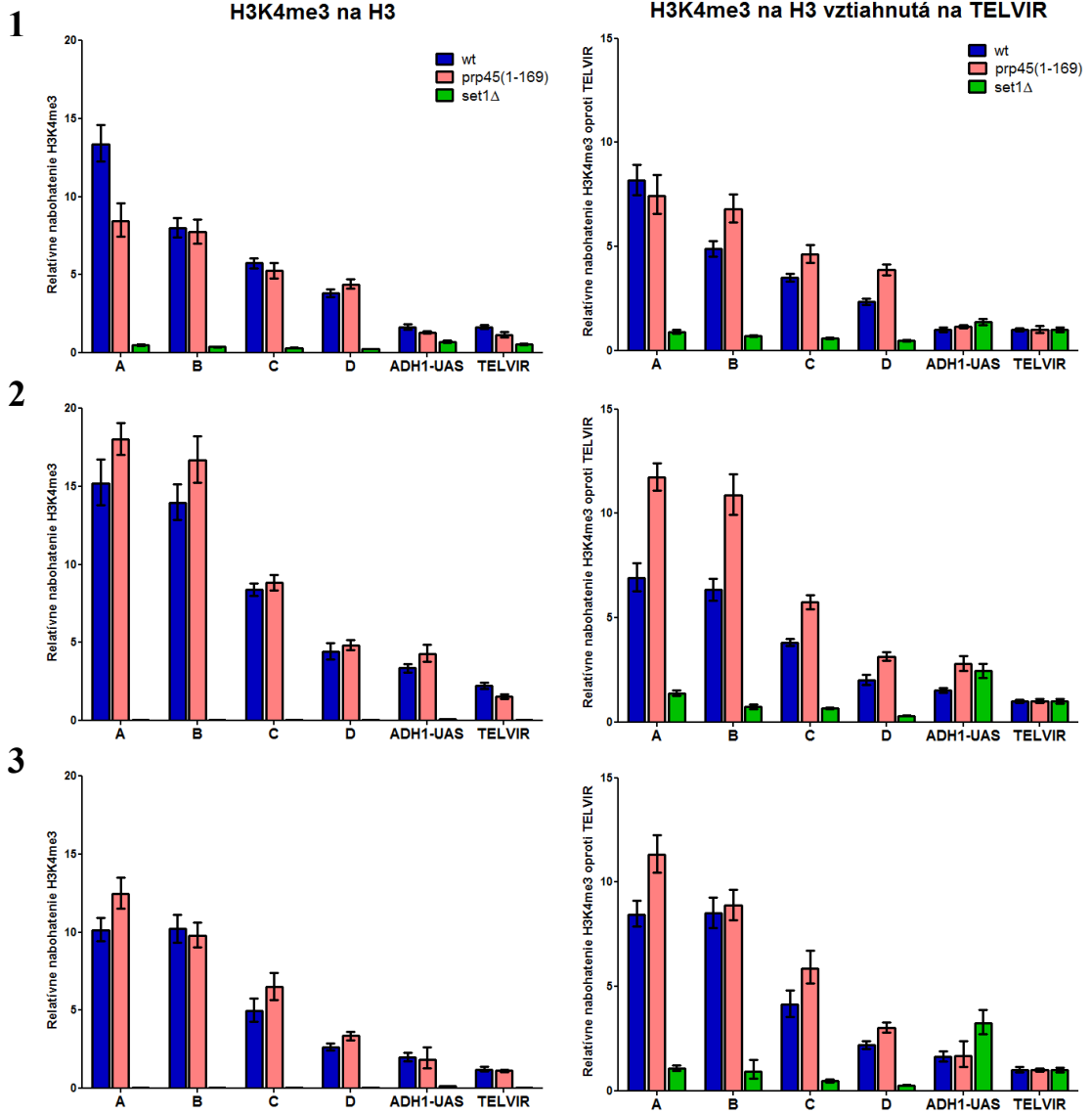


Obr. 18: ChIP analýza trimetylácie H3K4 na géne *ECM33*. (A) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Relatívne nabohatenie signálu H3K4me3 vyjadrené ako % „inputu“ H3K4me3 vztiahnuté na % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú hodnoty relatívneho nabohatenia signálu H3K4me3 vztiahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Výsledky štyroch biologických pokusov sú zobrazené jednotlivo (B, 1 až 4) a ako priemerné hodnoty (C). Dáta pre pokusy 1 a 2 sú prevzaté z mojej bakalárskej práce a sú vynesené s použitím postupu v kapitole 3.2.7.4 (B, 1 a 2). Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3) (B) a z biologických pokusov (C, n=4).

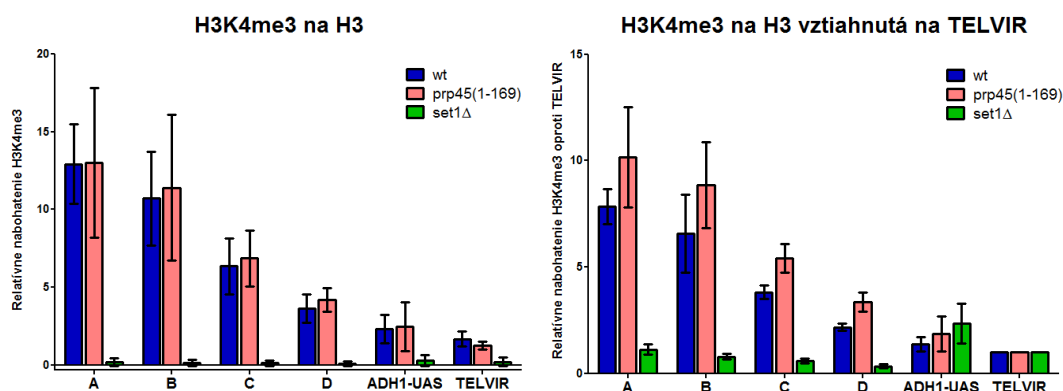
A



B



C



Obr. 19: Analýza trimetylácie H3K4 na transkripčne aktívnom géne *ACT1*. (A) Schéma génu *ACT1* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Relatívne nabohtenie signálu H3K4me3 vyjadrené ako % „inputu“ H3K4me3 vzťahnuté na % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ACT1* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú hodnoty relatívneho nabohtenia signálu H3K4me3 vzťahnuté na oblasť *TELVIR*. Výsledky troch biologických pokusov sú zobrazené jednotlivo (B, 1 až 3) a ako priemerné hodnoty (C). Dáta pre pokusy 1 a 2 sú prevzaté z mojej bakalárskej práce a sú vynesené s použitím postupu v kapitole 3.2.7.4 (B, 1 a 2). Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3) (B) a z biologických pokusov (C, n=3).

5.2.2 Acetylácia H3K9/18 a H3K14 nie je ovplyvnená mutáciou *prp45(1-169)*

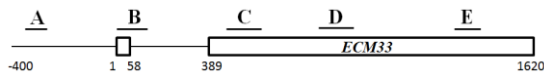
Ďalšou z možných chromaťinových modifikácií, ktorú by mohla mutácia *prp45(1-169)* ovplyvňovať, je acetylácia histónov. Štúdie totiž ukázali, že histónacetyltransferáza Gen5, ktorá primárne acetyluje históny H3 a H2B na nukleozómoch v oblasti promotora, ovplyvňuje kotranskripčné naviazanie komponentov U2 snRNP na miesto vetvenia pre-mRNA (Gunderson & Johnson 2009; Gunderson et al. 2011). Pomocou ChIP bola sledovaná acetylácia histónu H3 na lyzíne 9/18 (H3K9/18ac) a acetylácia histónu H3 na lyzíne 14 (H3K14ac).

Kmene wt (*BY4741*) a *prp45(1-169)* (*AVY17*) a *gcn5Δ* (*ΔGCN5*) boli kultivované v médiu YPAD. Vzorky pre ChIP analýzu boli odobraté v exponenciálnej fáze rastu a následne spracované za použitia protilátok špecificky rozoznávajúcich histón H3 a príslušnú acetyláciu (H3K9/18 a H3K14) (kapitola 3.2.7.1). Izolované fragmenty DNA

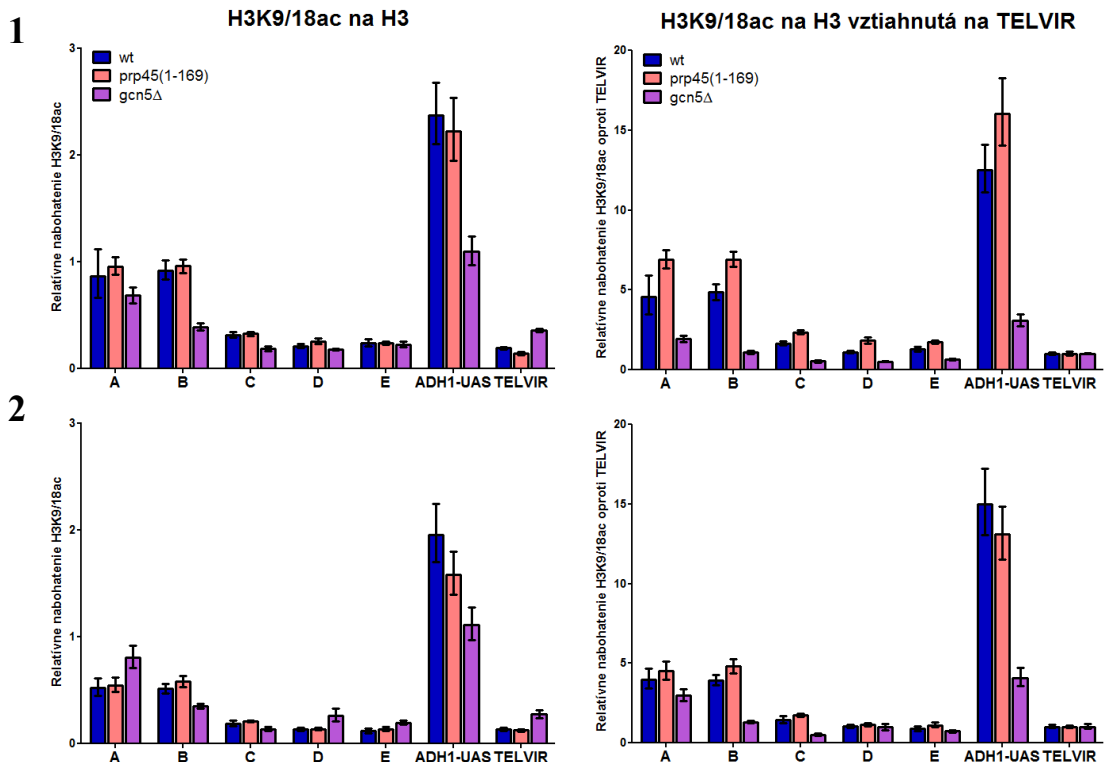
boli kvantifikované pomocou qPCR (1. spôsob, vid' kapitola 3.2.7.3). Výsledné grafy sú pre acetyláciu H3K9/18 zobrazené na Obr. 20 a Obr. 21, a pre acetyláciu H3K14 sú zobrazené na Obr. 22 a Obr. 23. Výsledky ukazujú biologické pokusy zobrazené zvlášť, aby bolo možné vidieť, kde sa medzi jednotlivými pokusmi vyskytujú rozdiely. Malý počet opakovaní s danou variabilitou nám však neumožňuje urobiť definitívny záver, že sa acetylácia H3K9/18 a H3K14 medzi wt a mutantou *prp45(1-169)* líši. Vo výslednom profile acetylácií na lokusoch oboch génov možno pozorovať, že acetylácia H3K9/18 a H3K14 je nabohatená v oblasti promotora a 5'-konca génov. Určitá hladina acetylácie H3K9/18 a H3K14 je pozorovaná aj v kontrolnom kmeni s deletovanou histónacetyltransferázou *gcn5Δ*.

Acetylácia H3K9/18

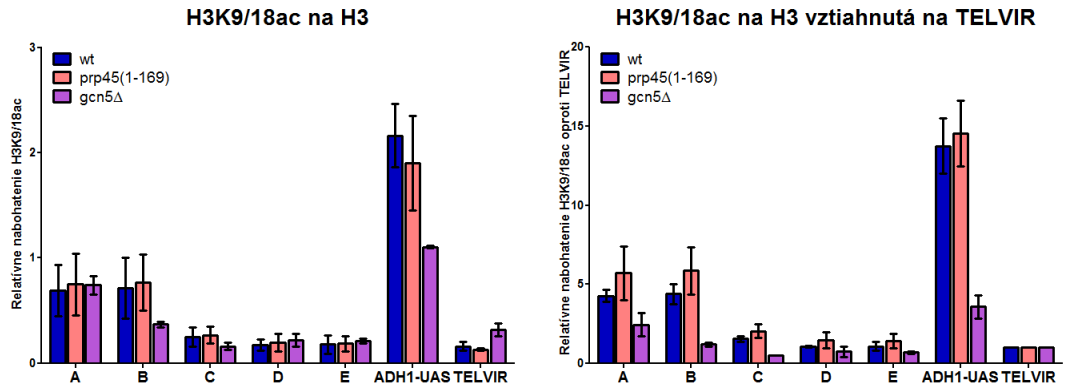
A



B

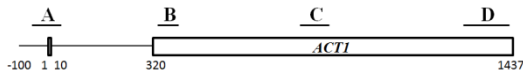


C

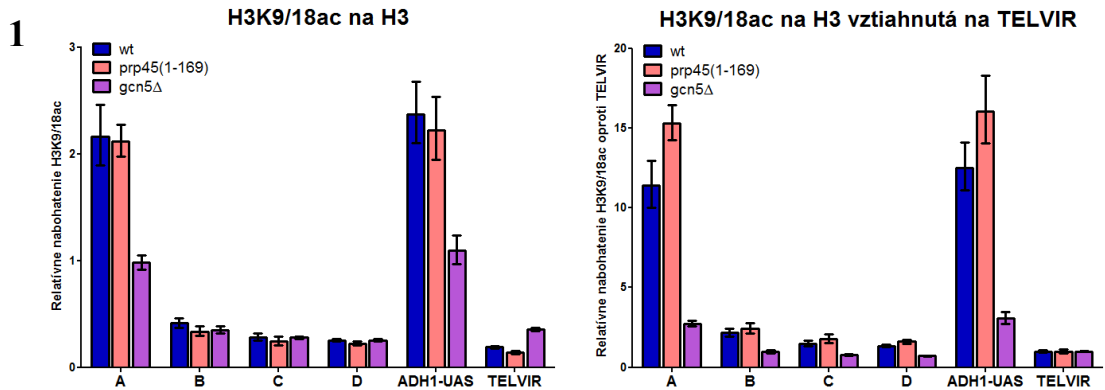


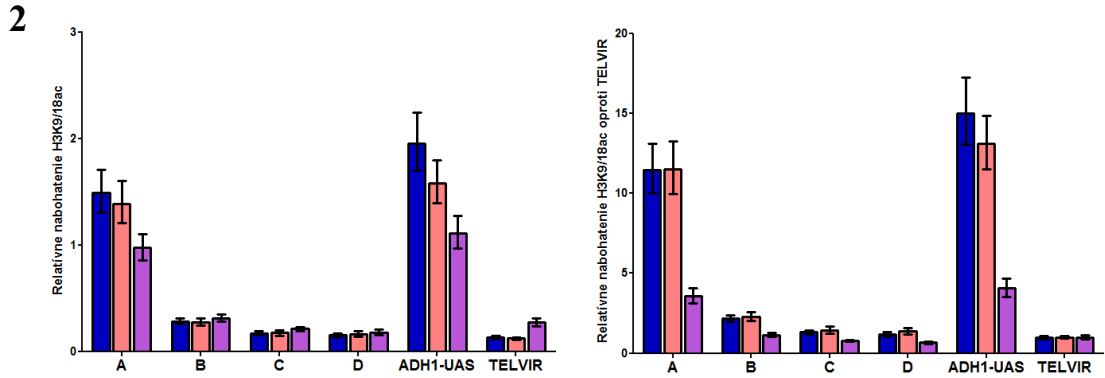
Obr. 20: ChIP analýza acetylácie H3K9/18 na géne *ECM33*. (A) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Relatívne nabohtenie signálu H3K9/18ac vyjadrené ako % „inputu“ H3K9/18ac vzťahnuté na % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú hodnoty relatívneho nabohtenia signálu H3K9/18ac vzťahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Výsledky dvoch biologických pokusov sú zobrazené jednotlivo (B, 1 až 2) a ako priemerné hodnoty (C). Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3) (B) a najvyššiu a najnižšiu získanú hodnotu z biologických pokusov (C, n=2).

A

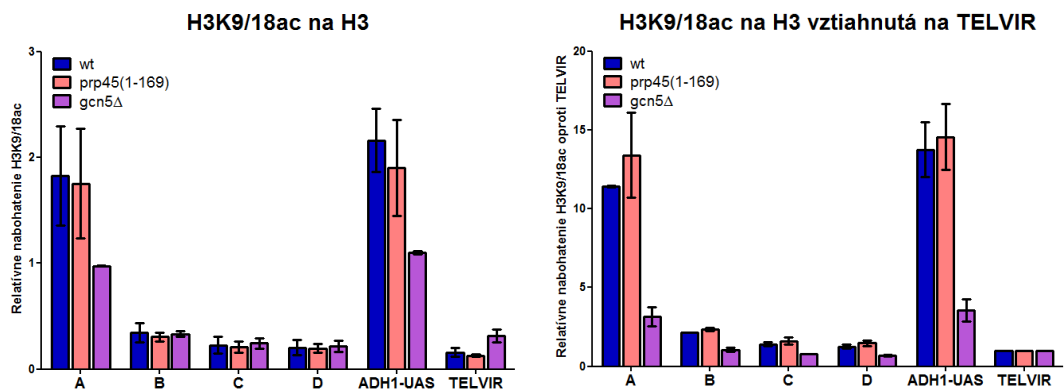


B





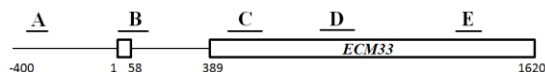
C



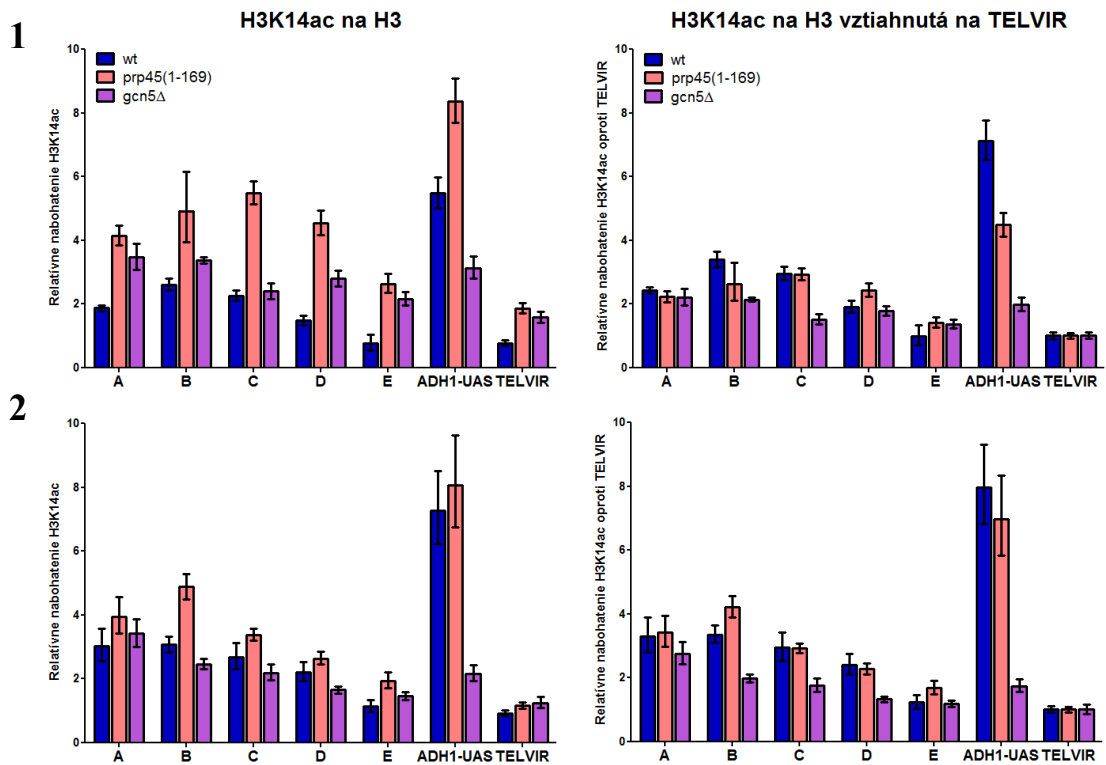
Obr. 21: ChIP analýza acetylácie H3K9/18 na géne *ACT1*. (A) Schéma génu *ACT1* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Relatívne nabohatenie signálu H3K9/18ac vyjadrené ako % „inputu“ H3K9/18ac vztiahnuté na % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ACT1* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú hodnoty relatívneho nabohatenia signálu H3K9/18ac vztiahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Výsledky dvoch biologických pokusov sú zobrazené jednotlivo (B, 1 až 2) a ako priemerné hodnoty (C). Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplicátov (n=3) (B) a najvyššiu a najnižšiu získanú hodnotu z biologických pokusov (C, n=2).

Acetylácia H3K14

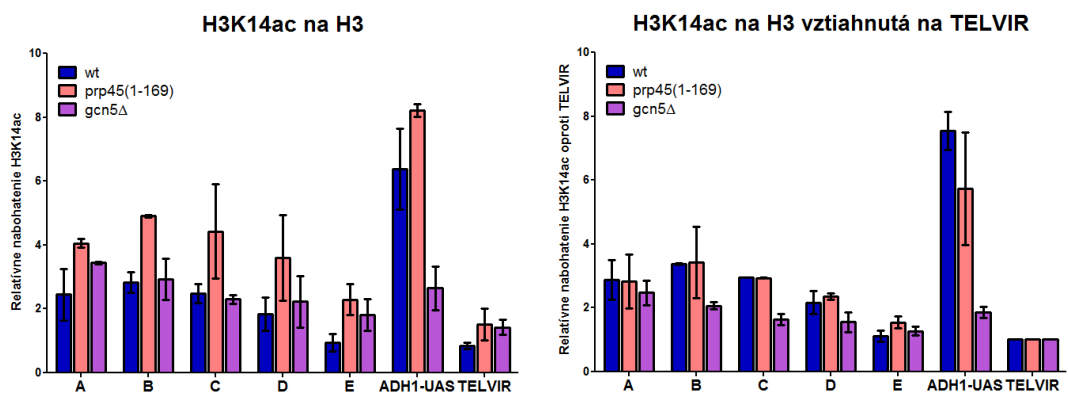
A



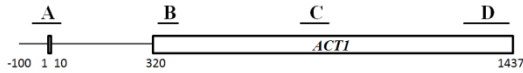
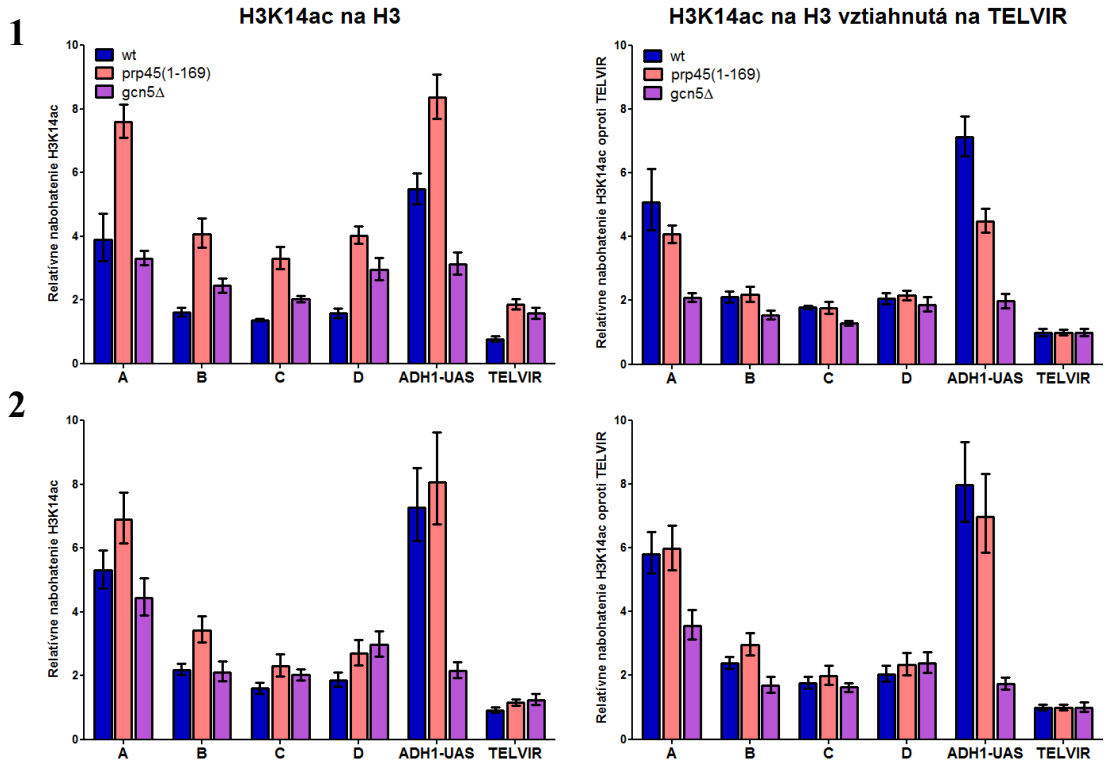
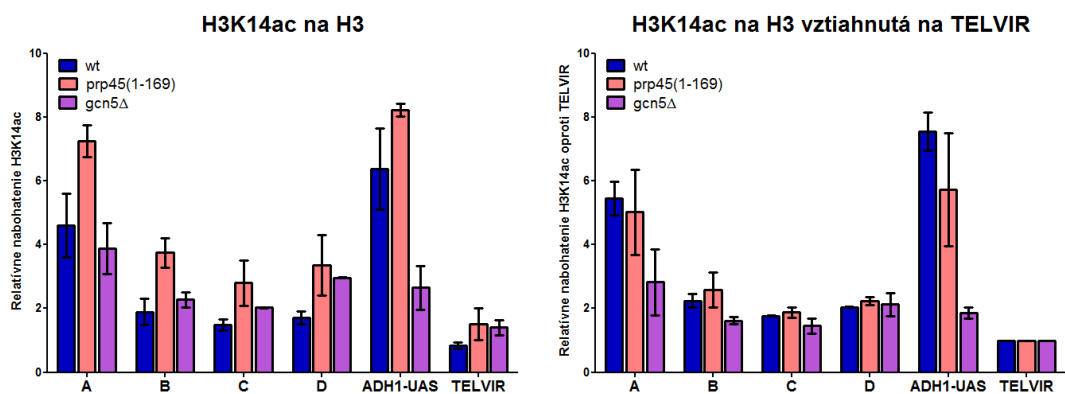
B



C



Obr. 22: ChIP analýza acetylácie H3K14 na gène *ECM33*. (A) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmí. (B, C) Relatívne nabohtenie signálu H3K14ac vyjadrené ako % „inputu“ H3K14ac vzťahnuté na % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú hodnoty relatívneho nabohtenia signálu H3K14ac vzťahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Výsledky dvoch biologických pokusov sú zobrazené jednotlivo (B, 1 až 2) a ako priemerné hodnoty (C). Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplicátov (n=3) (B) a najvyššiu a najnižšiu získanú hodnotu z biologických pokusov (C, n=2).

A**B****C**

Obr. 23: ChIP analýza acetylácie H3K14 na géne *ACT1*. (A) Schéma génu *ACT1* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Relatívne nabohtenie signálu H3K14ac vyjadrené ako % „inputu“ H3K14ac vzťahnuté na % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ACT1* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú hodnoty relatívneho nabohtenia signálu H3K14ac vzťahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Výsledky

dvoch biologických pokusov sú zobrazené jednotlivito (**B**, **1** až **2**) a ako priemerné hodnoty (**C**). Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplicátov (n=3) (**B**) a najvyššiu a najnižšiu získanú hodnotu z biologických pokusov (**C**, n=2).

5.3 Sledovanie vplyvu mutácie *prp45(1-169)* na synchronizovaných bunkách *S. cerevisiae*

V rámci diplomovej práce sme sa rozhodli testovať vplyv mutácie *prp45(1-169)* na synchronizovanej kultúre buniek. Hlavným dôvodom bolo podozrenie, že analýza heterogénnej kultúry buniek by mohla prispievať k variabilite výsledkov z ChIP experimentov. Na testovanie tohto vplyvu bol využitý α -faktor, prirodzený feromón kvasiniek, ktorý zastavuje kvasinky párovacieho typu \underline{a} v G1 fáze bunkového cyklu (Futcher 1999).

5.3.1 Príprava kmeňov s deléciou génu *BAR1*

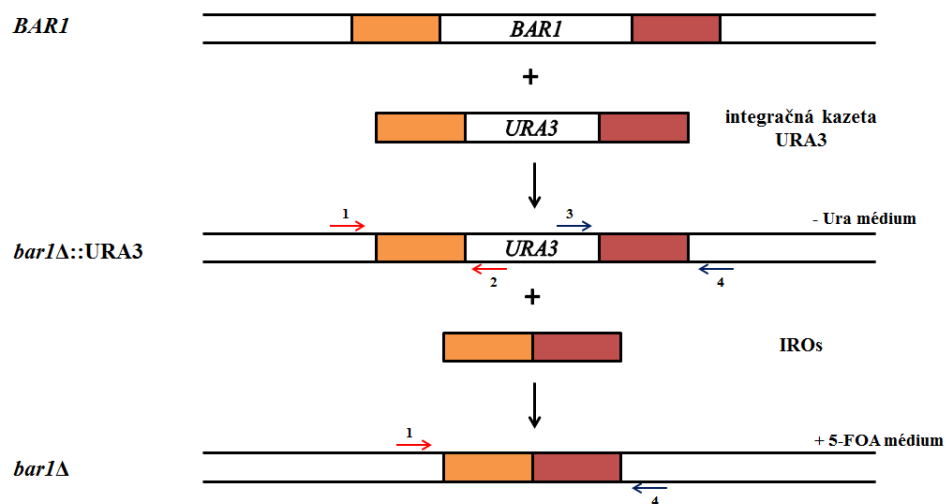
Kvasinky párovacieho typu \underline{a} exprimujú proteázu Bar1, ktorá štiepi α -faktor v ich bezprostrednej blízkosti. Aby bolo možné dlhodobo blokovat' bunky v G1 fáze, je potrebné buď k bunkám pridávať ďalší α -faktor alebo v bunkách deletovať gén kódujúci túto proteázu (MacKay et al. 1988).

5.3.1.1 Príprava kmeňov *bar1* Δ pomocou metódy *Delitto perfetto*

Odstránenie génu *BAR1* z kmeňov *S. cerevisiae* bolo uskutočnené pomocou metódy *Delitto perfetto* (vid' Obr. 24; Storici et al. 2001; Storici & Resnick 2006). Ide o dvojkrokový integračný systém, v ktorom sa k delícii génu *BAR1* využíva integračná kazeta obsahujúca gén *URA3*. Gén *URA3* kóduje orotidín-5'-fosfátdekarboxylázu, ktorá umožňuje v kvasinkách syntézu uracilu. U kvasiniek s deléciou *ura3* Δ sa tento gén používa ako marker umožňujúci pozitívnu i negatívnu selekciu. Na médiu bez uracilu prežijú len tie kmene, ktorých genóm kóduje funkčný enzým Ura3 a sú schopné si syntetizovať uracil (pozitívna selekcia). Negatívnu selekciu s využitím génu pre Ura3

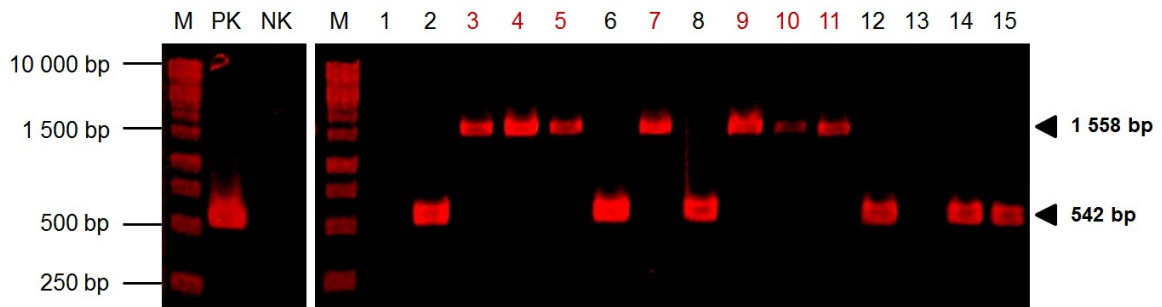
umožňuje kultivácia kvasiniek na médiu, ktoré obsahuje kyselinu 5-fluoroorotovú (5-FOA). Kyselina 5-fluoroorotová v bunkách s funkčným enzýmom Ura3 konvertuje na toxický fluorouridinmonofosfát, ktorý spôsobuje smrť bunky. Na médiu s 5-FOA prežijú len tie kmene, ktoré nemajú funkčný gén pre Ura3. V tomto médiu musí byť prítomný uracil.

Z plazmidu pRS316, ktorý bol pomocou restričných endonukleáz overený a linearizovaný, bola pomocou PCR za použitia primerov ZuC05 a ZuC06 amplifikovaná integračná kazeta obsahujúca gén *URA3*. Táto integračná kazeta obsahuje úseky homologné k 5' a 3'UTR oblasti génu *BARI*. V kmeňoch (*BARI*) bol gén *BARI* nahradený homológnu rekombináciou za kazetu. Kultivácia na selekčnom médiu SD bez uracilu umožnila rast klonom s úspešnou integráciou génu *URA3*. Takto pripravené kmene (*bar1Δ::URA3*) boli následne transformované dvojreťazcovým úsekom DNA, ktorý bol pripravený hybridizáciou oligonukleotidov ZuC11 a ZuC12 (tzv. IROs – Integrative Recombinant Oligonucleotides). Oligonukleotidy sú homologné k určitej oblasti 5' a 3'UTR pôvodného génu *BARI* tak, aby došlo homológnu rekombináciou k odstráneniu kazety *URA3*. Klony s úspešnou integráciou (*bar1Δ*) boli získané kultiváciou na selekčnom médiu SD s 5-FOA.



Obr. 24: Schematické znázornenie delécie *BARI* pomocou metódy *Delitto perfetto*. Oranžovo a červeno sú znázornené oblasti génu *BARI*, pomocou ktorých bola homológnu rekombináciou integrovaná kazeta *URA3* a následne IROs. Čísla 1 až 4 označujú primery použité pri overovaní jednotlivých krokov delécie *BARI*.

Kmene s deléciou *BARI* boli overované pomocou PCR. Pre PCR bola použitá genómičká DNA izolovaná z vybratých kolónií (pomocou LiAc/SDS) a primery ZuC09 a ZuC10, ktoré nasadajú do 5' a 3'UTR oblasti pôvodného génu *BARI* (vid' Obr. 24, primery označené ako 1 a 4). Produkty PCR boli detekované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. U testovaných kolónií *S. cerevisiae* s úspešne deletovaným génom *BARI* bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 542 bp. V niektorých kolóniách bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 1 558 bp, čo značí prítomnosť kazety URA3 (vid' Obr. 25).



Obr. 25: Príklad overenia delécie génu *BARI* v kolóniách *LKY09* pomocou PCR. Delécia génu *BARI* bola overená použitím páru primerov ZuC09/ZuC10, ktoré nasadajú do 5' a 3' UTR. Symbol M označuje marker (GeneRuler 1kb DNA Ladder), PK pozitívnu kontrolu (kmeň *LKY08* s deléciou *BARI*), NK negatívnu kontrolu (beztemplátová reakcia) a 1 až 15 testované kolónie kmeňa *LKY09* (genotyp v kapitole 3.1.1.2). Očakávaná veľkosť produktu PCR v kolóniách, kde ne/prebehla delécia *BARI* je 542/1 558 bp. V kolóniách 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 delécia *BARI* neprebehla.

Gén *BARI* bol odstránený v kmeňoch *BY4741*, *AVY17*, *AVY92*, Δ *GCN5*, *AVY93*, *AVY69*, *MHY17-a*, *MHY18-b*, *MHY50-5a*, *MHY45-2b*, *MHY52-8D*. Označenie a genotyp nových kmeňov je nasledujúci:

LKY07 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *bar1* Δ

LKY08 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *prp45*(1-169)-3HA::*NatMX6* *bar1* Δ

LKY09 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *set1*::*kanMX6* *bar1* Δ

LKY10 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *YGR252w*::*kanMX4* *bar1* Δ

LKY11 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *prp45*(1-169)-3HA::*NatMX6* *set1*::*kanMX6* *bar1* Δ

LKY12 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *prp45*(1-169)-3HA::*NatMX6* *YGR252w*::*kanMX4* *bar1* Δ

LKY19 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *prp45*(1-169) *bar1* Δ

LKY20 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *ura3* Δ 0 *lys2* Δ 0 *prp45*(1-169) *bar1* Δ

LKY21 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *lys2* Δ 0 *prp45*(1-169) *set1*::*kanMX4* *bar1* Δ

LKY22 MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *lys2* Δ 0 *prp45*(1-169) *gcn5*::*kanMX4* *bar1* Δ

Po delécii génu *BAR1* z kmeňov bol genotyp jednotlivých kmeňov overený pomocou PCR. Na overenie prítomnosti kazety *Prp45(1-169)-3xHA::NatMX6* boli využité primery AV17 a AV18, a na overenie čistej skrúteniny *prp45(1-169)* primery MH113 a AV18. Na detekciu *SET1* boli použité primery AV59 a AV62, a na detekciu *GCN5* primery MH88 a MH89.

V prípade novo pripraveného kmeňa *LKY21 (bar1Δ prp45(1-169)* set1Δ)* sa ukázalo, že je párovacieho typu α, čo znamená, že tento kmeň nie je možné použiť pre blokovanie v G1 fáze bunkového cyklu pomocou α -faktoru. Preto sme sa rozhodli kmeň s požadovaným genotypom znovu pripraviť. Boli využité dva spôsoby prípravy tohto kmeňa. Prvým spôsobom bolo využitie metódy *Delitto perfetto*. K tomu bol použitý kmeň *MHY52-8D* s príslušnými mutáciami (*prp45(1-169)* set1Δ*) a s overeným párovacím typom α. Odstránením génu *BAR1* z tohto kmeňa bol pripravený nasledujúci kmeň:

LKY25 MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169) set1::kanMX4 bar1Δ*

5.3.1.2 Príprava kmeňa *bar1Δ prp45(1-169)* set1Δ* krížením

Druhým spôsobom prípravy kmeňa s mutáciou *bar1Δ prp45(1-169)* set1Δ* bolo kríženie kmeňa *LKY09 (bar1Δ set1Δ, párovací typ α)* s kmeňom *LKY20 (bar1Δ prp45(1-169)*, párovací typ α)*. Príslušné haploidné kmene boli krížené, diploid bol selektovaný na základe schopnosti rastu na minimálnom médiu bez lyzínu a metionínu. Následne boli získané diploidné bunky sporulované. Po sporulácii bola masa buniek sonikovaná, čím sa usmrtili prítomné diploidné bunky, a vysiatá na médiu YPAD s geneticínom, na ktorom boli schopné narásť bunky s rezistenciou voči tomuto antibiotiku (bunky obsahujúce kazetu *kanMX6*). Haploidné bunky boli následne testované na párovací typ, pričom k ďalšiemu testovaniu boli použité bunky s párovacím typom α. Keďže rodičovské kmene sú auxotrofné, *LKY09* na metionín a *LKY20* na lyzín, boli u haploidných buniek testované i tieto auxotrofiie. V tomto prípade sa uschovali bunky s auxotrofiou k metionínu. Požadovaný genotyp buniek (*bar1Δ, prp45(1-169)*, set1Δ*) bol testovaný pomocou PCR (viď Obr. 26).

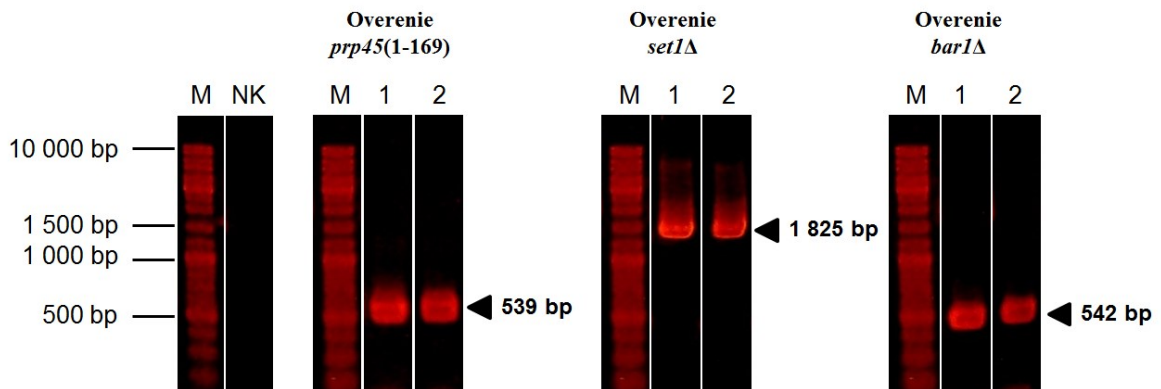
Genotyp rodičovských kmeňov:

LKY09 MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 set1::kanMX6 bar1 Δ*

LKY20 MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 ura3 Δ 0 lys2 Δ 0 prp45(1-169) bar1 Δ*

Genotyp kmeňa získaného krížením:

LKY23 MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 prp45(1-169) set1::kanMX4 bar1 Δ*

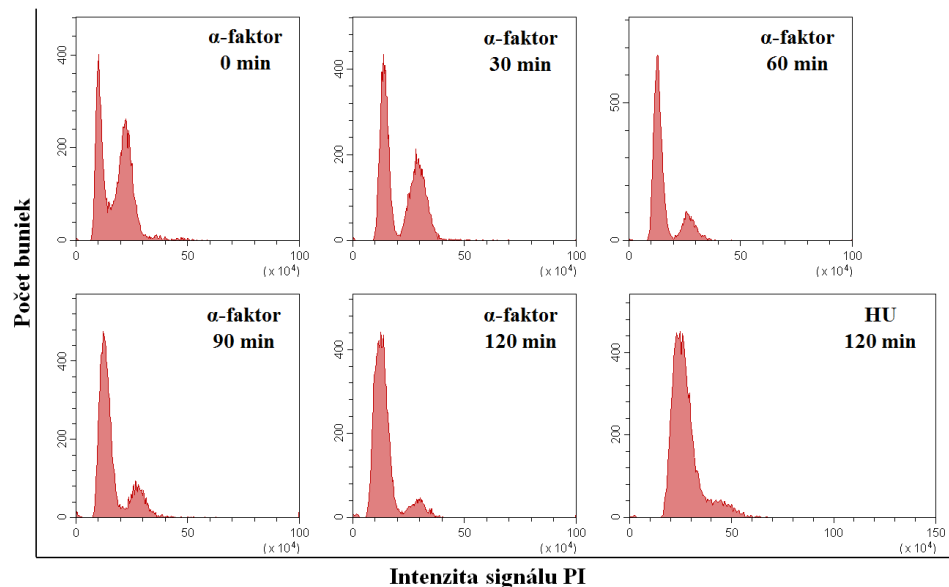


Obr. 26: Overenie genotypu pripraveného kmeňa *LKY23* pomocou PCR. Overenie genotypu dvoch kolónií (1, 2) kmeňa *LKY23*. Pár primerov MH113/AV18 potvrdil prítomnosť mutácie *prp45(1-169)* (veľkosť produktu PCR 539 bp). Mutácia *set1 Δ* bola overená použitím páru primerov AV59/AV62 (1 825 bp) a *bar1 Δ* použitím páru primerov ZuC09/ZuC10 (veľkosť produktu PCR 542 bp). Beztemplátová reakcia slúžila ako negatívna kontrola (NK). Symbol M označuje marker (GeneRuler DNA Ladder Mix).

5.3.2 Optimalizácia podmienok pre blokovanie kmeňov *bar1 Δ* v G1 fáze bunkového cyklu

Úspešnosť blokovania buniek pomocou α -faktoru bola testovaná u kmeňa *bar1 Δ* (*LKY07*) pomocou prietokovej cytometrie. Kmeň *bar1 Δ* bol kultivovaný a v exponenciálnej fáze rastu bol k nemu pridaný α -faktor (výsledná konc. 50 nM). Kultúra buniek s α -faktorom bola kultivovaná po dobu dvoch hodín, behom ktorých boli jednotlivé vzorky odobrané (0, 30, 60, 90 a 120 min) a následne fixované v etanole (kapitola 3.2.5.2). DNA vo fixovaných bunkách bola ofarbená použitím fluorescenčného farbiva propidium jodid (PI). Ako pozitívna kontrola pre tento pokus boli použité bunky, ktoré boli blokovanie na rozhraní G1/S fáze bunkového cyklu pomocou hydroxymočoviny (HU, výsledná koncentrácia 15 mg/ml, kapitola 3.2.5.1). Prietokovou cytometriou (prístroj CytoFLEX,

kapitola 3.2.5.4) bola meraná fluorescencia PI, ktorej intenzita odpovedá množstvu DNA v bunke. Vo vzorkách pred pridaním α -faktoru boli pozorované dve populácie buniek (viď Obr. 27). Prvá z nich odpovedá bunkám v G1 fáze bunkového cyklu (tzn. pred replikáciou, obsah DNA je rovný 1N). Dvojnásobným signálom PI sa vyznačuje populácia buniek, ktorá už prešla replikáciou (tzn. bunky v S/G2/M, obsah DNA je rovný 2N). Z výsledných histogramov možno vidieť, že už po 90 minútach pôsobenia α -faktoru došlo k výraznému poklesu buniek v S/G2/M fázy bunkového cyklu. Po 120 minútach kultivácie s α -faktorom bola väčšina buniek zastavená v G1 fáze bunkového cyklu (podobne ako u pozitívnej kontroly), čo znamená, že blokovanie buniek s deléciou *BARI* pomocou α -faktoru je funkčné. V priebehu pokusu boli tiež odoberané vzorky k mikroskopii. Po dvoch hodinách od aplikácie α -faktoru tvorila väčšina buniek tzv. schmoos, čo dokazovalo blokovanie buniek v G1 fáze bunkového cyklu (Lipke et al. 1976).



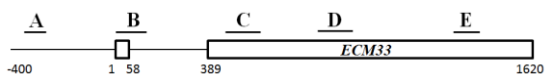
Obr. 27: **Blokovanie kmeňa *bar1Δ* v G1 fáze bunkového cyklu pomocou α -faktoru.** Jednparametrový histogram, v ktorom intenzita signálu PI (intenzita fluorescencie) koreluje s množstvom DNA. Označenie α -faktor 0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min značí dobu od pridania α -faktoru ku kultúre buniek. Ako pozitívna kontrola bolo využité blokovanie kvasiniek v S fáze bunkového cyklu pomocou hydroxymočoviny (HU, 120 min).

5.3.2.1 Porovnanie signálu ChIP histónu H3 v kmeňoch blokovaných v G1 fáze bunkového cyklu

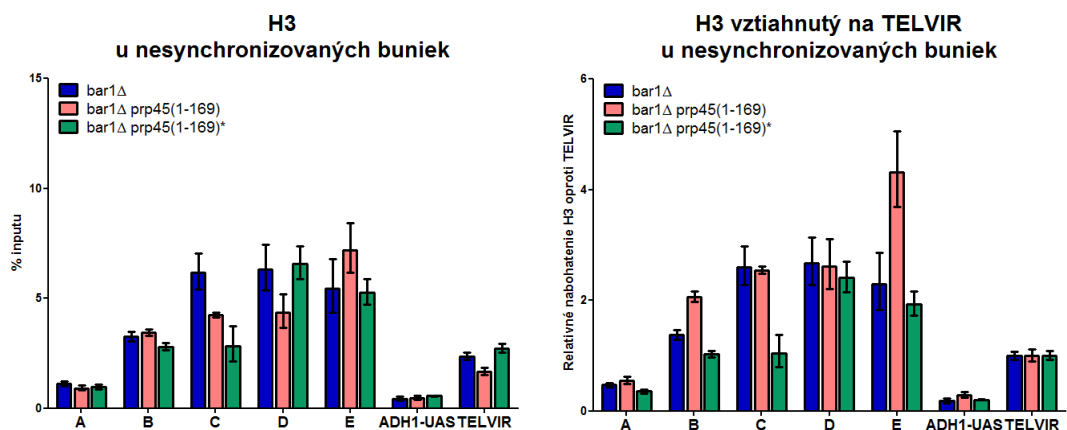
V rámci hľadania príčiny spôsobujúcej rozdiely v signále ChIP histónu H3 medzi wt a mutantou *prp45(1-169)* sme sa pokúsili zistiť, či zastavenie buniek v G1 fáze bunkového cyklu ovplyvní výsledný profil signálu ChIP histónu H3. Predpokladali sme, že zmeny v signále ChIP histónu H3 by mohli odrážať zmeny v relatívnych proporciách fáz bunkového cyklu u *prp45(1-169)*, tzn. že by zmeny v hladine histónov mohli byť artefaktom analýzy heterogénnej populácie buniek.

Novo pripravené kmene *bar1Δ* (LKY07), *bar1Δ prp45(1-169)* (LKY08) a *bar1Δ prp45(1-169)** (LKY19) boli kultivované a v exponenciálnej fáze rastu boli pred pridaním α -faktoru odobraté vzorky nesynchronizovaných buniek. K zvyšnej kultúre buniek bol následne pridaný α -faktor (výsledná konc. 50 nM). Bunkové kultúry s α -faktorom boli kultivované 2 hodiny a následne boli bunky blokované v G1 fáze bunkového cyklu odobraté pre analýzu ChIP (kapitola 3.2.7.1). Fragменты DNA precipitované cez histón H3 boli kvantifikované pomocou qPCR (2. spôsob, kapitola 3.2.7.3) s využitím špecifických primerov pre úseky na génoch *ECM33* a *ACT1*. Grafy pre nesynchronizovanú kultúru buniek (A) a kultúru buniek blokovaných v G1 fáze bunkového cyklu (B) sú zobrazené na Obr. 28. U buniek blokovaných v G1 fáze bunkového cyklu je možné podobne ako u nesynchronizovaných buniek vidieť, že u mutanty *bar1Δ prp45(1-169)* a *bar1Δ prp45(1-169)** nedochádza k výraznej zmene profilu ChIP signálu histónu H3 na lokusoch oboch génov oproti *bar1Δ* kmeňu. Pre gén *ACT1* boli získané obdobné výsledky (neukázané výsledky). Výsledky z tohto pilotného pokusu nenaznačili, že by rozdiely v signále ChIP histónu H3 boli spôsobené testovaním heterogénnej populácie buniek.

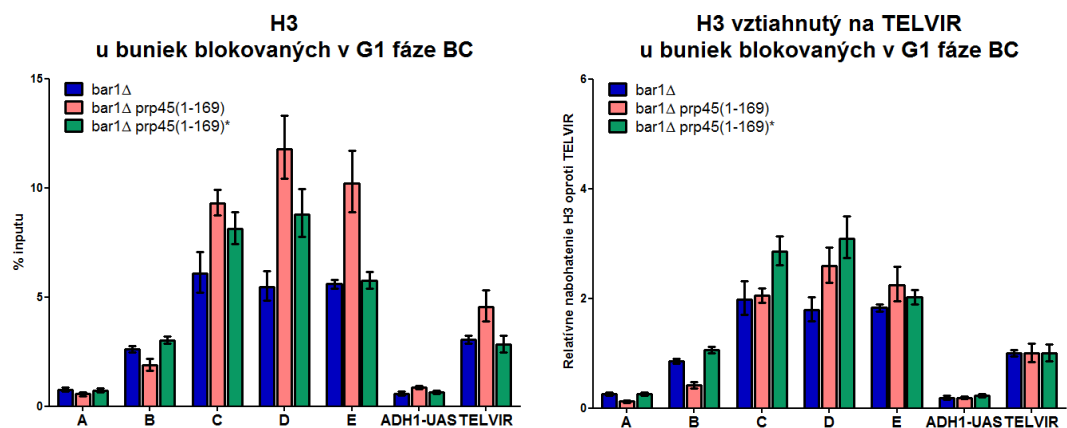
A



B

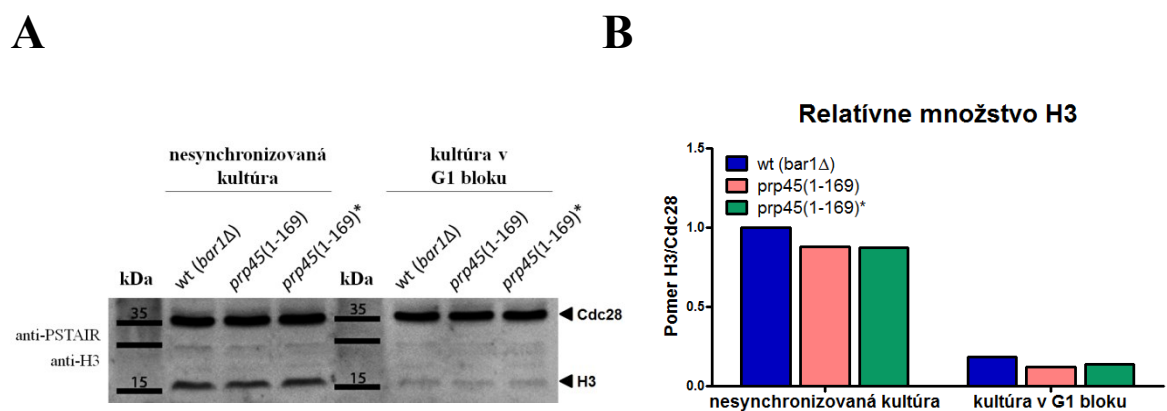


C



Obr. 28: ChIP analýza histónu H3 na géne *ECM33*. (A) Schéma génu *ECM33* s vyznačenými amplifikovanými úsekmi. (B, C) Signál histónu H3 vyjadrený ako % „inputu“ H3 na lokusoch génu *ECM33* a na kontrolných úsekoch (*ADH1-UAS*, *TELVIR*) (panely naľavo). Panely napravo ukazujú relatívne nabohatenie signálu H3 vyjadrené ako % „inputu“ H3 vzťahnuté na oblasť *TELVIR*. Pre ChIP analýzu boli odobraté bunky v exponenciálnej fáze rastu. Signál histónu H3 bol sledovaný v nesynchronizovaných bunkách (B) a v bunkách blokovaných v G1 fáze bunkového cyklu (C). Jedná sa o jeden biologický pokus. Chybové úsečky zobrazujú smerodajnú odchýlku získanú z technických triplikátov (n=3).

U nesynchronizovaných buniek a u buniek blokových v G1 fáze bunkového cyklu bolo pomocou metódy Western blot (WB) sledované aj celkové množstvo histónu H3 (Obr. 29A). Vzorky pre WB boli odobraté súčasne so vzorkami pre ChIP analýzu, tzn. pred pridaním α -faktoru a 2 hodiny od pridaní α -faktoru. Odobraté vzorky boli následne spracované (viď kapitola 3.2.6). Pre presnejšie porovnanie množstva histónu H3 medzi kmeňmi bola intenzita signálu získaného pre histón H3 kvantifikovaná a vzťahnutá k nanáškovkej kontrole Cdc28 (Obr. 29B). Z výsledkov je zrejmé, že u nesynchronizovaných buniek bolo v porovnaní s bunkami blokovanými v G1 fáze bunkového cyklu detekované väčšie množstvo histónu H3.



Obr. 29: Prítomnosť histónu H3 v nesynchronizovanej kultúre buniek a v bunkách blokovaných v G1 fáze bunkového cyklu. (A) Western blot ukazujúci prítomnosť exprimovaného histónu H3 v kmeňoch s deléciou génu pre proteázu Bar1. Na detekciu histónu H3 (17 kDa) bola využitá protilátka anti-H3 (riedenie 1:6000) a na detekciu nanáškovkej kontroly Cdc28 (34 kDa) protilátka anti-PSTAIR (riedenie 1:80000). Šípky označujú detekovaný proteín. (B) Graf znázorňujúci relatívne množstvo histónu H3. Výsledné hodnoty sú normalizované na *bar1Δ* nesynchronizovanej kultúry.

5.3.3 Analýza správania sa synchronizovaných buniek *S. cerevisiae* pomocou prietokovej cytometrie

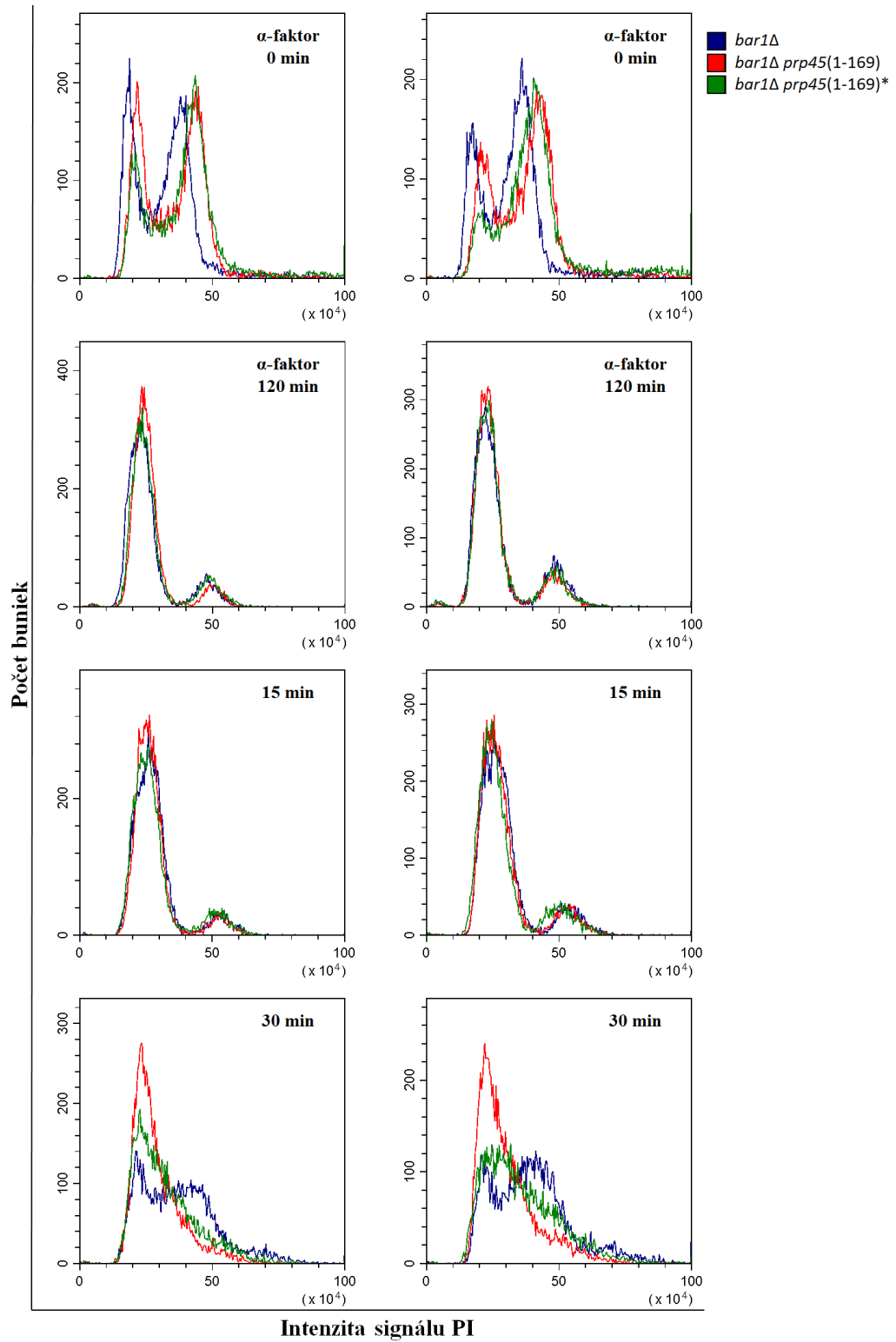
Pozorovanie živých kvasiniek pod mikroskopom odhalilo, že mutantné bunky *prp45(1-169)* (genetické pozadie EGY48) majú pri kultivácii v 30 °C morfológický defekt, oproti wt sú väčšie, podlhovasté a s deformovaným tvarom (Gahura et al. 2009). Čo sa týka rýchlosti rastu v médiu YPAD, bol nameraný rozdiel medzi wt a mutantou *prp45(1-169)* (genetické pozadie BY4741) pri kultivácii v 30 °C (10 – 20%

rozdiel medzi generačnými dobami), pričom pri kultivácii v reštriktívnej teplote 39 °C bol rast mutanty *prp45(1-169)* zastavený po približne 12 hodinách kultivácie (viď Obr. 17B, str. 103). Z týchto výsledkov je evidentné, že mutanta *prp45(1-169)* má dlhší bunkový cyklus než wt, čo sa prejaví na zmene doby trvania jednotlivých fáz bunkového cyklu. Zaujímalo nás, či bunky s mutáciou *prp45(1-169)*, kultivované za optimálnych podmienok, budú schopné po vypustení z bloku v G1 fáze synchronne vstúpiť do bunkového cyklu. Aby sme pozorovali správanie sa synchronizovaných buniek *prp45(1-169)*, bolo uskutočnené meranie obsahu DNA pomocou prietokovej cytometrie.

Kmene *S. cerevisiae bar1Δ* (LKY07), *bar1Δ prp45(1-169)* (LKY08) a *bar1Δ prp45(1-169)** (LKY19) boli kultivované a v exponenciálnej fáze rastu bol ku každej kultúre buniek pridaný α -faktor (výsledná konc. 50 nM, kapitola). Bunkové kultúry s α -faktorom boli kultivované 2 hodiny, následne boli premyté čerstvým médiom a vypustené z G1 bloku. Jednotlivé vzorky odoberaté v priebehu pokusu (pred pridaním α -faktoru, 2 hod od pridaní α -faktoru a každých 15 minút po dobu 4 hodín po vypustení z G1 bloku; viď kapitola 3.2.5.3) boli následne spracované a obsah DNA bol meraný na prietokovom cytometri CytoFLEX (kapitola 3.2.5.4). Z výsledných histogramov (Obr. 30) je možné vidieť, že po dvojhodinovom pôsobení α -faktoru bola väčšina buniek blokováná v G1 fáze bunkového cyklu (1N obsah DNA). Po vypustení z G1 bloku vstúpili do S fázy (zvyšujúci sa obsah DNA) ako prvé *bar1Δ* bunky a s približne 10 – 15 minútovým oneskorením za *bar1Δ* bunkami mutanty *bar1Δ prp45(1-169)* a *bar1Δ prp45(1-169)** (porovnanie v 30. a 45. minúte po vypustení z bloku). Znamky ďalšieho prechodu S fázou u *bar1Δ* buniek sú zrejmé v 90. a 150. minúte od vypustenia z bloku. V súlade s výsledkami získanými z merania rýchlosti rastu výsledky z prietokovej cytometrie ukazujú, že bunkový cyklus mutantných buniek *bar1Δ prp45(1-169)* a *bar1Δ prp45(1-169)** je v porovnaní s *bar1Δ* bunkami dlhší.

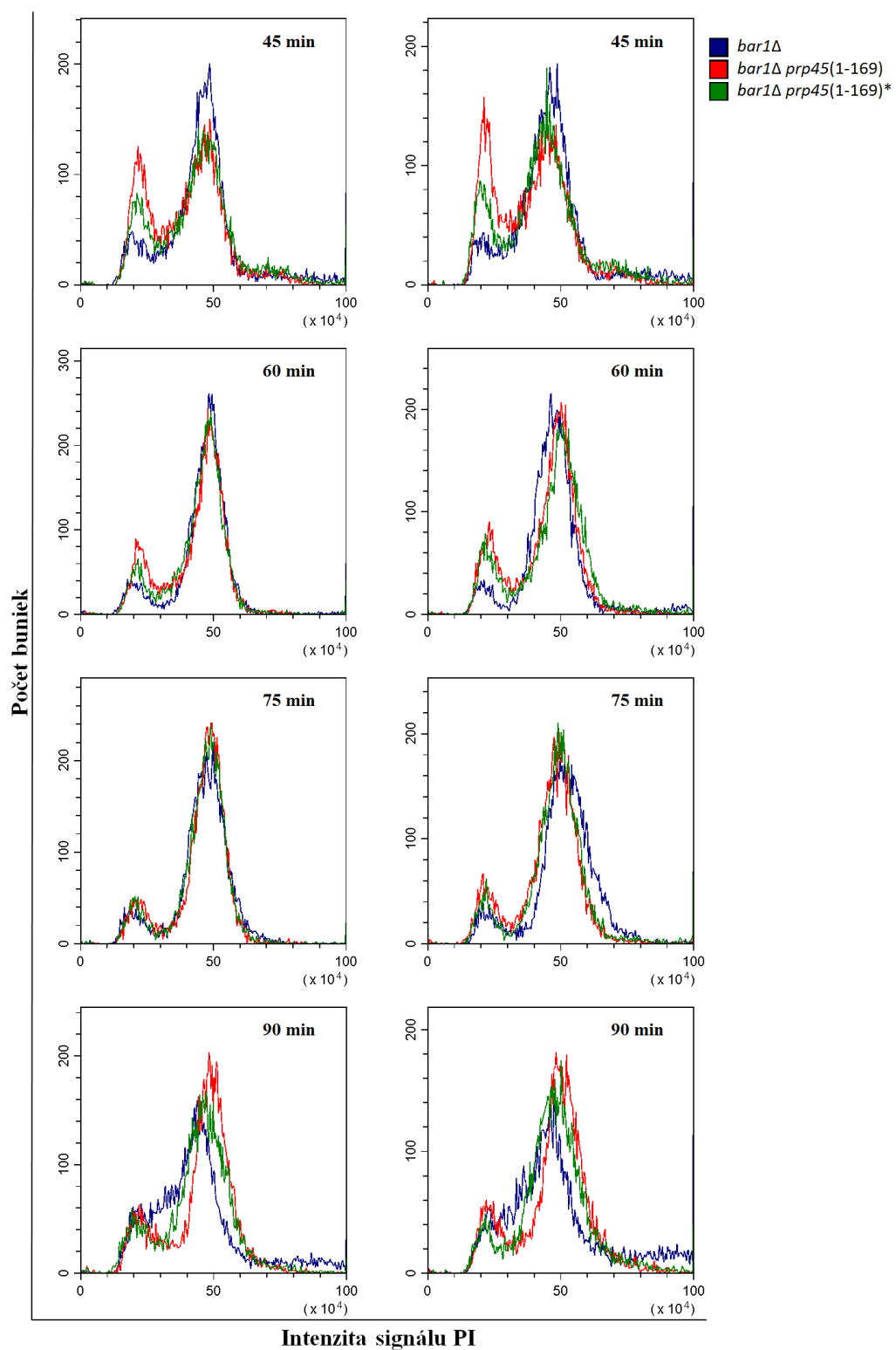
1. biologický pokus

2. biologický pokus



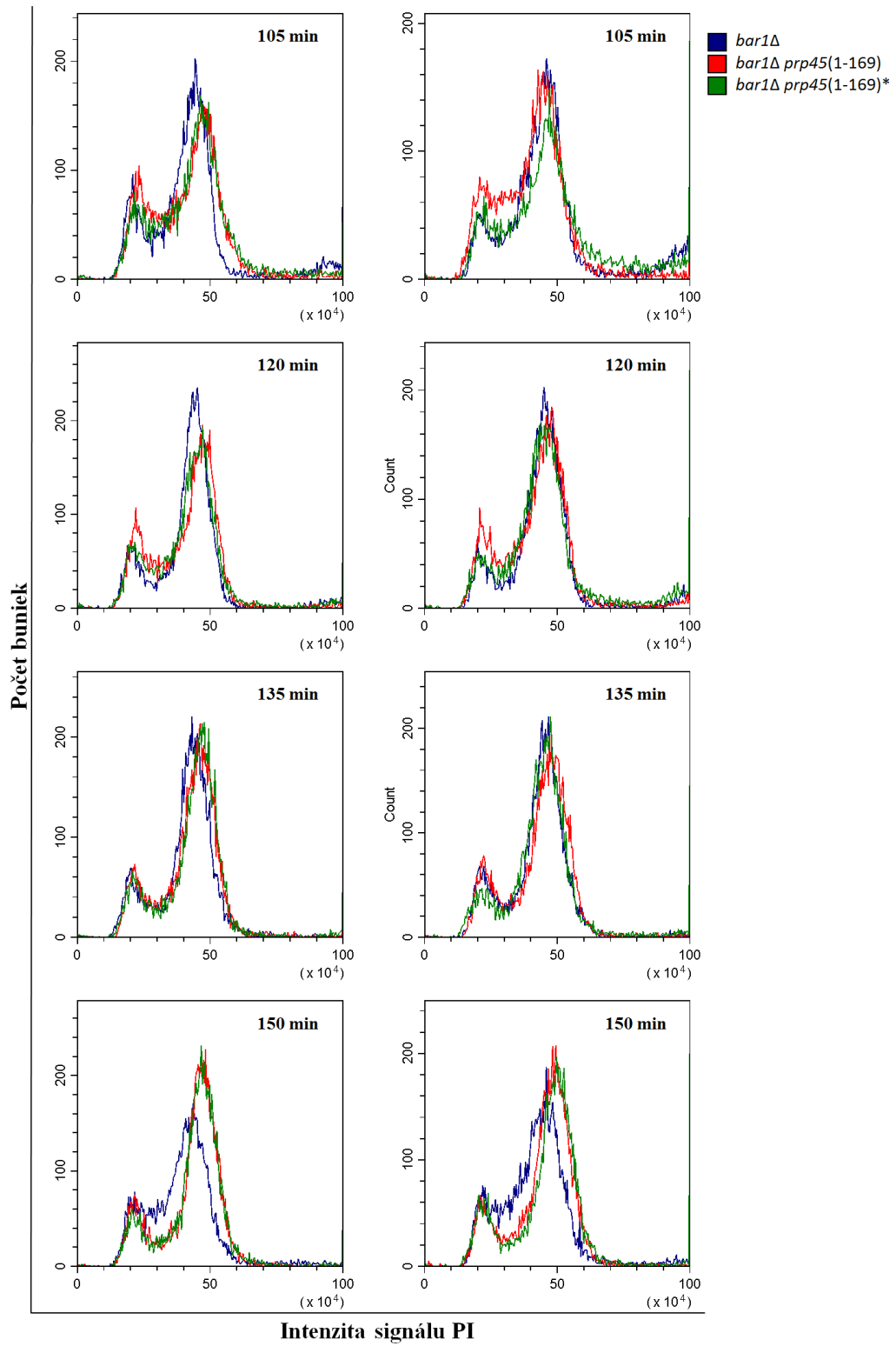
1. biologický pokus

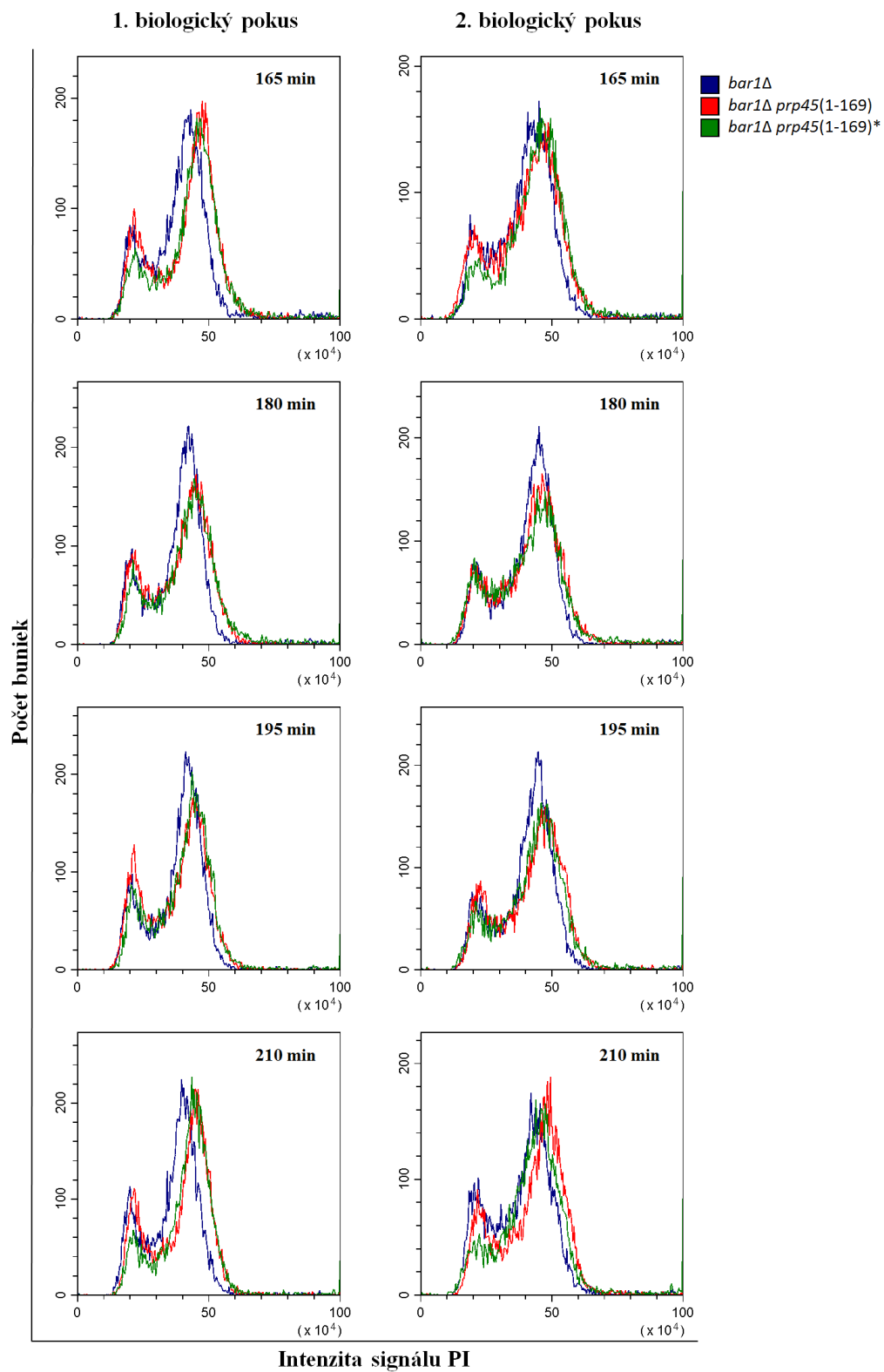
2. biologický pokus

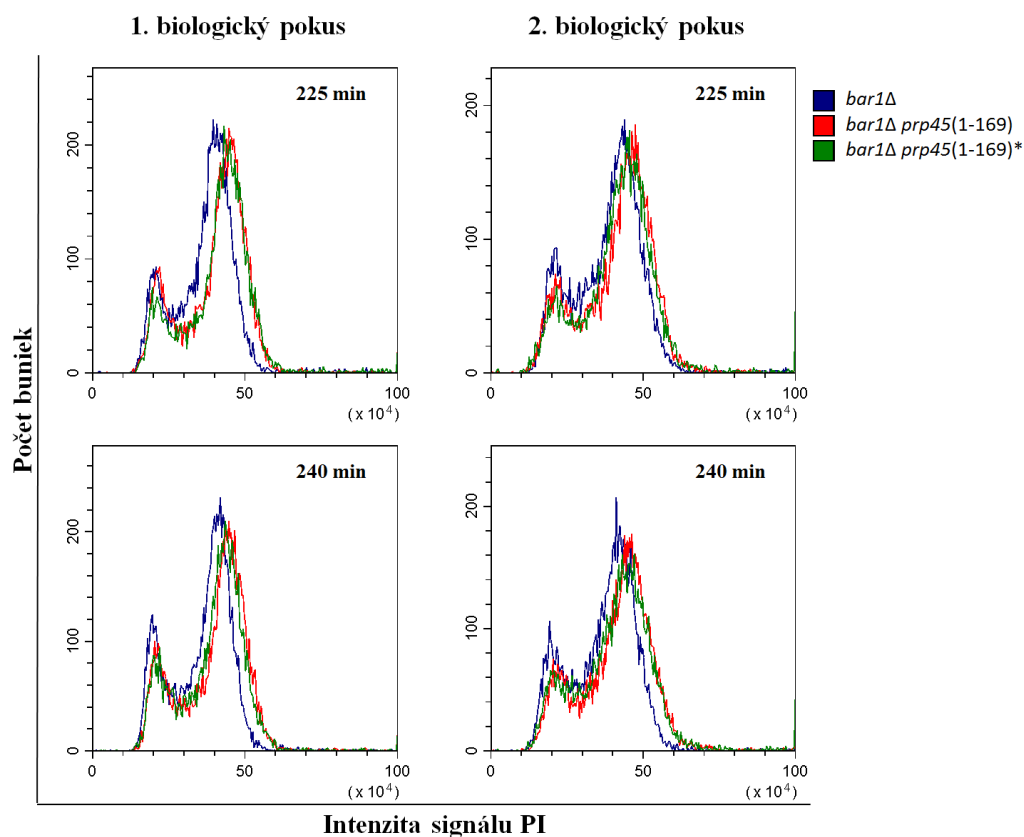


1. biologický pokus

2. biologický pokus





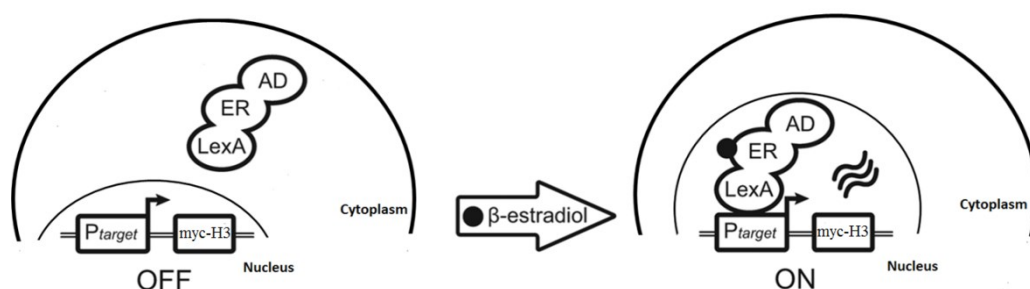


Obr. 30: Sledovanie synchronného prechodu kmeňov *S. cerevisiae* bunkovým cyklom . Jednparametrový histogram, v ktorom intenzita signálu PI koreluje s množstvom DNA. Vzorok pre prietokovú cytometriu boli odobraté v čase pred pridaním α -faktoru (α -faktor 0 min), 120 minút od aplikácie α -faktoru do kultúry buniek (α -faktor 120 min) a po vypustení z G1 bloku každých 15 minút po dobu 4 hodín (15 až 240 min).

5.4 Príprava systému pre sledovanie obratu nukleozómov

V našom laboratóriu sa ukázalo, že proteín Prp45 geneticky interaguje s histónovým variantom H2A.Z a s niektorými proteínmi komplexu SWR1, ktorý prostredníctvom ATPázovej aktivity katalyzuje výmenu dimérov (H2A-H2B) za diméry (H2A.Z-H2B) (nepublikované výsledky, M. Hálová). Bolo tiež potvrdené, že u buniek s mutáciou *prp45(1-169)* dochádza k oneskorenej indukcii expresie génov neobsahujúcich intrón, čo môže práve súvisieť so zmenami v prestavbe nukleozómov v oblasti promotora (nepublikované výsledky; M. Hálová). Tieto výsledky naznačujú, že by proteín Prp45 mohol zohrávať úlohu pri remodelácii chromatinu. Na sledovanie dynamiky nukleozómov v bunkách *prp45(1-169)* sme sa rozhodli zaviesť metódu, v ktorej by sme sledovali

inkorporáciu histónu H3 značeného epitomom myc do nukleozómov jednotlivých typov génov v závislosti na mutácii *prp45(1-169)* (Dion et al. 2007). Miera inkorporácie značeného histónu myc-H3 sledovaná v čase by mala odrážať dynamiku prestavby nukleozómov, ku ktorej dochádza i mimo S fázu, hlavne v priebehu transkripcie (Bonner et al. 1988). Rozhodli sme sa použiť LexA-ER-AD expresný systém, ktorý umožňuje indukovať expresiu histónu myc-H3 pomocou β -estradiolu (Ottoz et al. 2014). Tento systém využíva dva plazmidové konštrukty. Prvý plazmid nesie ORF pre konštitutívne exprimovaný syntetický transkripčný faktor, ktorý pozostáva z bakteriálnej DNA väzbovej domény LexA, z hormón väzbovej domény ľudského estrogénového receptora (ER, väzbové miesto pre β -estradiol) a z aktivačnej domény B112 (AD). Druhý plazmid nesie ORF pre indukovane exprimovaný N-koncovo značený histón H3 (myc-H3). Expresia myc-H3 je riadená väzbou transkripčného faktoru do jeho promotora obsahujúceho štyri kópie tzv. *lexA* boxu (fragment bakteriálneho *lexA* promotora) rozpoznávané doménou LexA. β -estradiol sa po pridaní do kultúry *S. cerevisiae* viaže na estrogénový receptor, dôjde ku konformačnej zmene transkripčného faktoru a k jeho translokácii do jadra, kde sa viaže do príslušného promotora a špúšťa transkripciu histónu myc-H3 (viď Obr. 31).



Obr. 31: **Znázornenie indukcie expresie histónu myc-H3 po pridaní β -estradiolu.** Lex – DNA väzbová doména, ER – receptor pre β -estradiol, AD – aktivačná doména B112, P_{target} – promotor génu pre myc-H3 (prevzaté a upravené podľa Ottoz 2014).

5.4.1 Optimalizácia podmienok pre indukciu expresie myc-značeného histónu H3

Na indukciu expresie myc-H3 sme sa prvotne rozhodli využiť centromerické plazmidové konštrukty s CEN/ARS replikačným počiatkom (umožňuje tvorbu 1 – 2 kópií na bunku) - pMH04 (kódujúci rekombinantný transkripčný faktor LexA) a pZuC01

(kódujúci myc-H3). K tomu, aby boli oba plazmidy v kvasinkách udržané, je nutné transformované bunky držať pod selekčným tlakom. Plazmidy pMH04 a pZuC01 obsahujú selekčné gény *HIS3* a *URA3*, a aby nedošlo k strate plazmidov, boli transformované kmene kultivované v selekčnom médiu SD bez prítomnosti histidínu a uracilu.

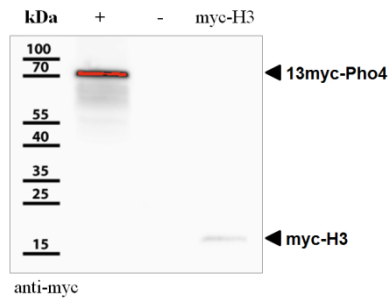
V prvom kroku bolo potrebné pomocou metódy Western blot (WB) overiť, či je v našich laboratórnych podmienkach zvolený indukčný systém funkčný. K tomuto účelu bol použitý kmeň wt (*BY4741*) nesúci plazmidy pMH04, pZuC01 (wt + pMH04, pZuC01) a kmeň *MHY12* s myc-značeným proteínom Pho4 (13myc-Pho4) slúžiaci ako pozitívna kontrola. V prípade kmeňa wt + pMH04, pZuC01 boli pripravené dve kultúry buniek, prvá s prídavkom β -estradiolu (výsledná konc. 400 nM) a druhá kultúra bez prídavku β -estradiolu slúžiaca ako negatívna kontrola. Z cez noc narastených kultúr boli odobraté vzorky, ktoré boli následne spracované pre WB (viď kapitola 3.2.6). Overenie indukcie myc-H3 pomocou WB je zdokumentované na Obr. 32A. Western analýzou bolo dokázané, že v kmeni wt + pMH04, pZuC01 dochádza k expresii myc-H3 po indukcii β -estradiolom.

Po overení funkčnosti systému expresie myc-H3 bol následne uskutočnený experiment, na základe ktorého bola zvolená vhodná koncentrácia β -estradiolu k indukcii expresie myc-H3. Kmeň *bar1 Δ* (*LKY07*) nesúci pMH04, pZuC01 (*bar1 Δ* + pMH04, pZuC01) bol kultivovaný a v exponenciálnej fáze rastu bol ku kultúre buniek pridaný β -estradiol (výsledná konc. 10, 20, 40, 80, 160, 320 a 400 nM). Vzorky pre WB boli odobraté pred pridaním β -estradiolu a v rôznych časových intervaloch od prídania β -estradiolu (15, 30, 60 a 120 min). Expresia myc-H3 pomocou WB je zdokumentovaná na Obr. 32B. Exprimovaný myc-H3 bolo možné detekovať od 60. minúty od prídania β -estradiolu, pričom množstvo myc-H3 bolo najvyššie v kmeňoch, u ktorých bola výsledná koncentrácia β -estradiolu 320 a 400 nM. Na základe tohto výsledku sme sa rozhodli v následujúcich experimentoch pridávať β -estradiol na výslednú koncentráciu 400 nM.

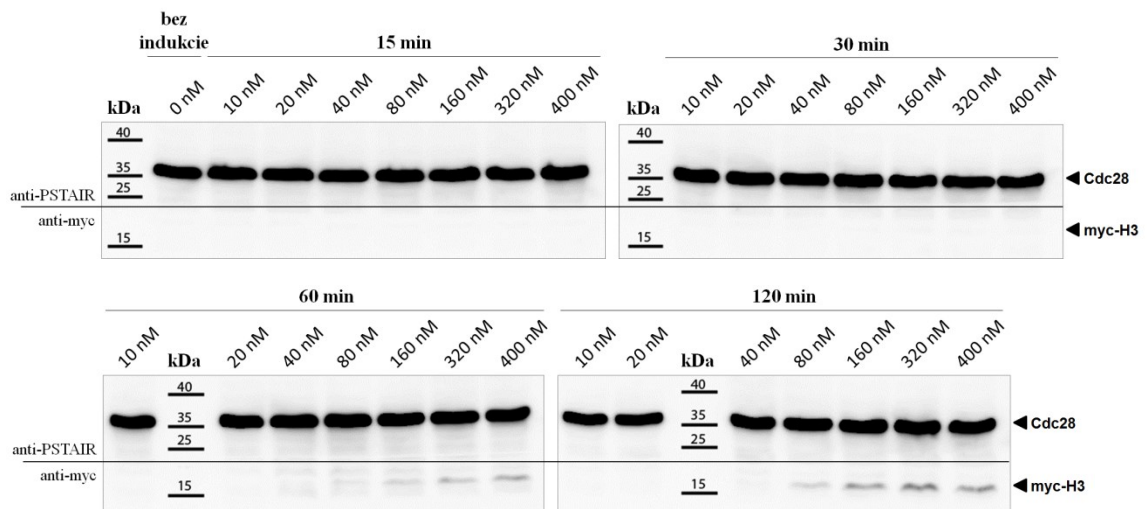
V ďalšom kroku sme sa rozhodli overiť, či dochádza k efektívnej imunoprecipitácii exprimovaného myc-H3. Chceli sme zistiť, kde prípadne v priebehu spracovania vzoriek dôjde k strate precipitovaného proteínu (myc-H3). K tomuto účelu bola využitá metóda WB s následnou imunodetekciou proteínov. Expresia myc-H3 bola indukovaná pridaním β -estradiolu (výsledná konc. 400 nM) a po dvoch hodinách od prídania β -estradiolu bola kultúra odobratá pre ChIP analýzu. Ne/prítomnosť myc-H3 bola stanovená v rôznych

frakciách ChIP („input“, „wash1“, „wash2“, imunoprecipitát). Jednotlivé frakcie boli spracované podľa postupu v kapitole 3.2.7.2. Ako pozitívna kontrola bol použitý kmeň exprimujúci zostrihový faktor Mud2-HA, ktorého imunoprecipitácia je efektívna. Touto analýzou sme potvrdili prítomnosť myc-H3 v chromaínovej frakcii bunkového lyzátu.(Obr. 32C).

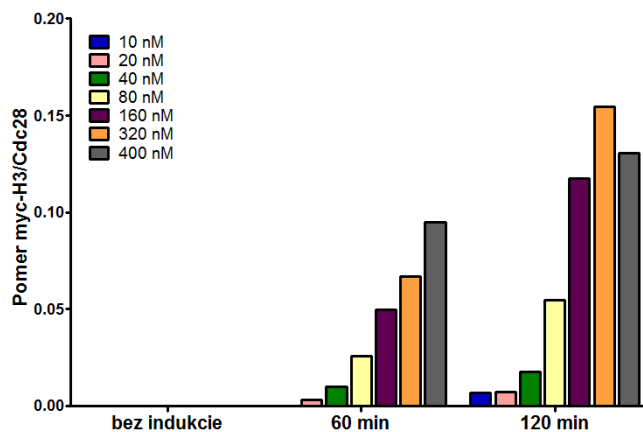
A



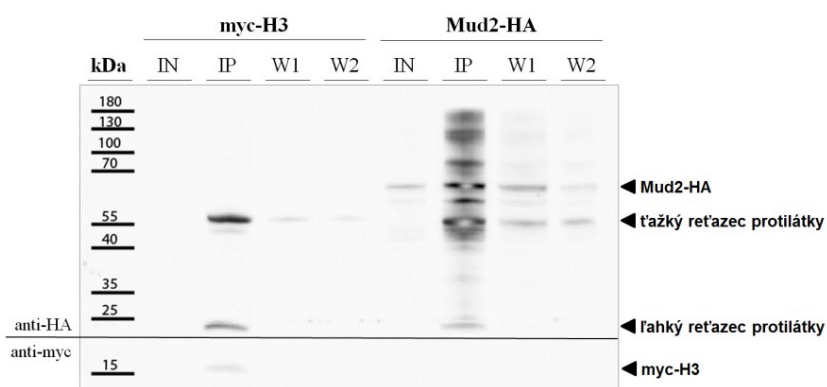
B



Relatívne množstvo myc-H3



C



Obr. 32: Testovanie indukcie expresie myc-značeného histónu H3. (A) Western blot ukazujúci prítomnosť histónu myc-H3 v kmeni *BY4741* nesúcom centromerické plazmidy po 2 hodinách od indukcie. Na detekciu histónu myc-H3 (18,2 kDa) a na detekciu pozitívnej kontroly 13myc-Pho4 (70 kDa) bola využitá protilátka anti-myc (riedenie 1:1000). Šípky označujú detekovaný proteín. (B) Western blot ukazujúci prítomnosť indukovaného myc-H3 v kmeni *bar1Δ* nesúcom centromerické plazmidy v časových intervaloch 15, 30, 60 a 120 minút od indukcie. Na indukciiu histónu myc-H3 boli použité rôzne koncentrácie β -estradiolu (10, 20, 40, 80, 160, 320 a 400 nM). Histón myc-H3 (18,2 kDa) bol detekovaný protilátkou anti-myc (riedenie 1:1000) a nanášková kontrola Cdc28 (34 kDa) protilátkou anti-PSTAIR (riedenie 1:3000). Šípky označujú detekovaný proteín. Graf znázorňuje relatívne množstvo histónu myc-H3 exprimovaného po 60 minútach od indukcie získané ako pomer expresie myc-H3 k nanáškovej kontrole Cdc28. (C) Stanovenie ne/prítomnosti indukovaného histónu myc-H3 vo vzorkách odobratých v priebehu ChIP analýzy: „input“ (IN, pred pridaním protilátky), wash1 (W1, prvé premytie matrice IP pufrom), wash 2 (W2, druhé premytie matrice IP pufrom) a precipitát (IP, guľičky proteín A Sepharosy s naviazaným materiálom). Na detekciu histónu myc-H3 (18,2 kDa) bola využitá protilátka anti-myc (riedenie 1:1000). Ako pozitívna kontrola bol využitý kmeň exprimujúci proteín Mud2-HA (63 kDa), na detekciu bola použitá protilátka anti-HA (riedenie 1:1000). Šípky označujú detekovaný proteín.

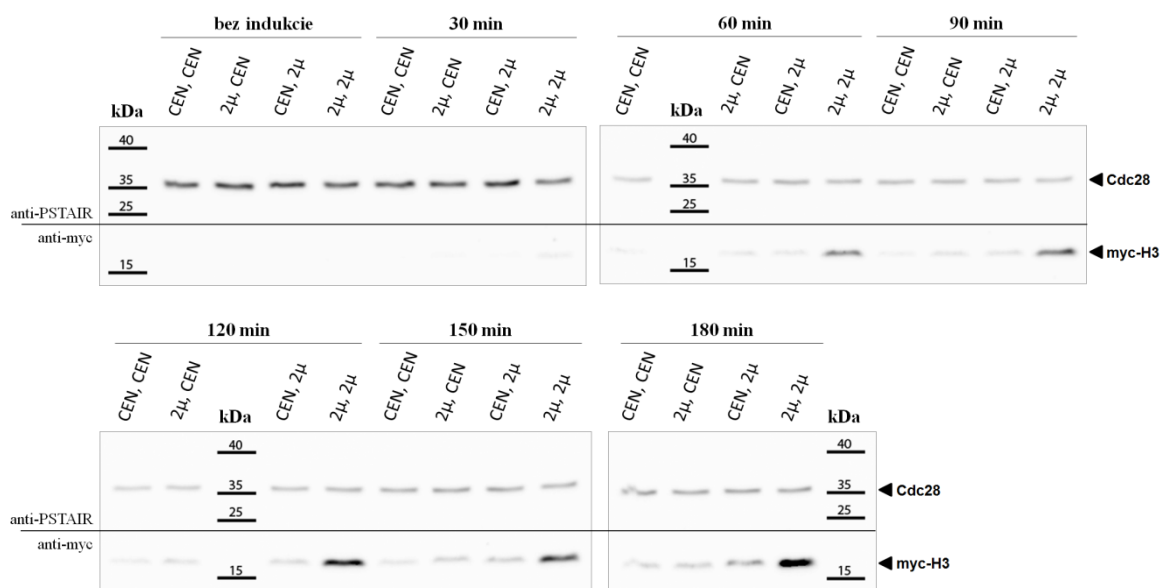
5.4.2 Indukcia expresie myc-H3 za použitia rôznych kombinácií plazmidových konštruktov

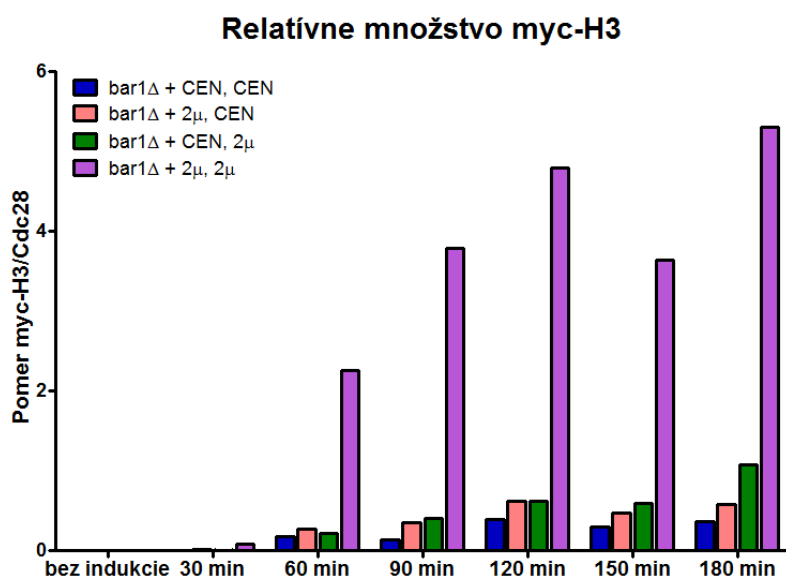
Na indukciiu expresie myc-H3 boli následne pripravené plazmidové konštrukty s 2-micron (2 μ) replikačným počiatkom (umožňuje tvorbu 50 a viac kópií plazmidu na bunku) - pMH06 (kódujúci rekombinantný transkripčný faktor LexA) a pMH07 (kódujúci myc-H3). Plazmidy pMH06 a pMH07 obsahujú podobne ako centromerické plazmidy

selekčné gény *HIS3* a *URA3*, a aby nedošlo k strate plazmidov, boli kmene nesúce 2 μ plazmidy kultivované v selekčnom médiu SD bez prítomnosti histidínu a uracilu.

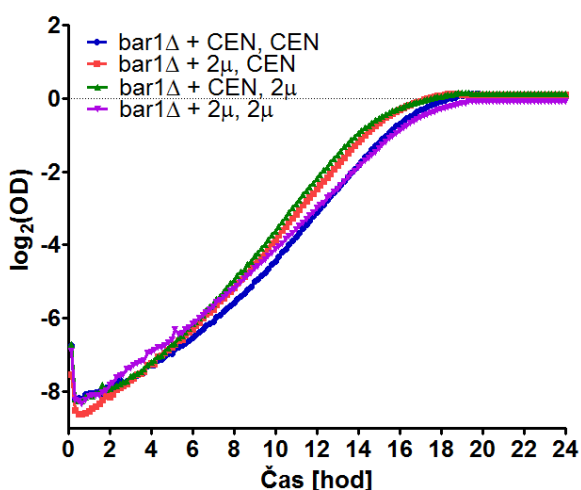
Zaujímalo nás, či v bunkách nesúcich 2 μ plazmidy dosiahneme vyššiu expresiu myc-H3 v porovnaní s centromerickými plazmidmi. Rozhodli sme sa preto pomocou Western blot testovať expresiu myc-H3 v kmeni *bar1 Δ* (*LKY07*), ktorý bol transformovaný rôznymi kombináciami plazmidových konštruktov. Kmene *bar1 Δ* + pMH04, pZuC01 (CEN, CEN); *bar1 Δ* + pMH06, pZuC01 (2 μ , CEN), *bar1 Δ* + pMH04, pMH07 (CEN, 2 μ) a *bar1 Δ* + pMH06, pMH07 (2 μ , 2 μ) boli kultivované a v exponenciálnej fáze bola indukovaná expresia myc-H3 pridaním β -estradiolu (výsledná konc. 400 nM). Vzorky pre WB boli odoberané pred pridaním β -estradiolu a v rôznych časových intervaloch od pridaneia β -estradiolu (30, 60, 90, 120, 150 a 180 min; kapitola 3.2.6). Expresia myc-H3 pomocou WB je zdokumentovaná na Obr. 33A, pričom je vidieť, že myc-H3 je exprimovaný vo veľkom množstve v bunkách s 2 μ plazmidmi. V týchto bunkách bolo možné detekovať myc-H3 už od 30 minúty od pridaneia β -estradiolu. V prípade využitia 2 μ plazmidu pre expresiu transkripčného faktora LexA bolo podozrenie, že by nadmerné množstvo LexA mohlo byť pre bunky toxické. Preto boli u kmeňov nesúcich rôzne kombinácie plazmidov merané rastové krivky na prístroji Varioskan pri 30 °C podľa postupu v kapitole 3.2.3.1. Z rastových kriviek možno vidieť, že ani v jednom z transformantov nie je rast výrazne ovplyvnený (Obr. 33B). Na základe týchto výsledkov sme sa pre sledovanie obratu nukleozómov rozhodli využiť expresný systém s 2 μ plazmidmi pMH06 a pMH07.

A





B



Obr. 33: Testovanie indukcie expresie myc-značeného histónu H3. (A) Western blot ukazujúci prítomnosť indukovaného myc-H3 v kmeni *bar1Δ* nesúcom centromerické (CEN) a 2μ plazmidy v rôznych kombináciách. Plazmidy sú označované dvoma symbolmi (CEN alebo 2μ) v takom poradí, kde prvý označuje plazmid konštitutívne exprimujúci transkripčný faktor LexA-ER-AD a druhý označuje plazmid exprimujúci histón myc-H3. Vzorky boli odoberaté v časových intervaloch 30, 60, 90, 120, 150 a 180 minút od indukcie. Histón myc-H3 (18,2 kDa) bol detekovaný protilátkou anti-myc (riedenie 1:1000) a nanášková kontrola Cdc28 (34 kDa) protilátkou anti-PSTAIR (riedenie 1:80000). Šípky označujú detekovaný proteín. Graf znázorňuje relatívne množstvo histónu myc-H3 exprimovaného v čase od indukcie získané ako pomer expresie myc-H3 k nanáškovej kontrole Cdc28. (B) Rastové krivky kmeňa *bar1Δ* nesúceho centromerické (CEN) a 2μ plazmidy v rôznych kombináciách. Bunky boli kultivované pri 30 °C v médiu YPAD, optická denzita (*OD*) bola meraná spektrofotometricky pri 600 nm v prístroji Varioskan. Grafy znázorňujú logaritmickú závislosť $\log_2(OD)$ na čase.

6. DISKUSIA

Úloha proteínu Prp45 bola doposiaľ spájaná len so zostrihom pre-mRNA. Poznatky o ľudskom ortológovi SNW1/SKIP, ako aj výsledky získané v našom laboratóriu na Prp45, prispievajú k myšlienke, že by Prp45 mohol pôsobiť ako regulátor prepájajúci zostrih pre-mRNA a transkripciu. Naše výsledky ukázali, že proteín Prp45 pôsobí na zostavovanie spliceozómu už v časej fáze zostrihu, keď Prp45 ešte nie je pevne zabudovanou súčasťou spliceozómu (Hálová et al. 2017). Tento efekt by bolo možné vysvetliť tým, že Prp45 hrá úlohu v riadení konformačných zmien spliceozomálnych subkomplexov predtým, než dôjde k vytvoreniu stabilných usporiadaní s molekulou pre-mRNA. Štruktúrne štúdie odhalili, že Prp45 má vysoký stupeň vnútornej neusporiadanosti a v štruktúre aktívneho spliceozómu je prítomný ako extendovaný reťazec na dĺžke viac než 160 Å (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Bertram et al. 2017; Hálová et al. 2017). Vzhľadom na unikátny charakter svojej molekuly by mohol Prp45 hrať úlohu ovplyvňovaním lokálnych mikroprostredí v prvých fázach zostavovania spliceozómu. Ďalej by Prp45 mohol ovplyvňovať lokálne koncentrácie a asociatívne funkcie ďalších komponentov dôležitých pre vlastnosti chromatinu a komplexov RNA Pol II na transkribovanom géne. Bola tiež odhalená jeho genetická interakcia s faktormi dôležitými pre elongáciu transkripcie a s enzýmami, ktoré regulujú chromatinové modifikácie (nepublikované výsledky; K. Abrhánová, M. Hálová, A. Valentová). Z literatúry je známe, že proteíny zúčastňujúce sa transkripcie a modifikácií chromatinu majú dôležitú úlohu v regulácii zostrihu pre-mRNA (Gunderson & Johnson 2009; Gunderson et al. 2011; Hérissant et al. 2014). Na základe týchto výsledkov sme sa rozhodli testovať hypotézu, že proteín Prp45 reguluje kotranskripčné zostavovanie spliceozómu prostredníctvom zmien v stave chromatinu.

6.1 Vplyv mutácie *prp45(1-169)* na posttranslačné modifikácie chromatinu

K vyšetreniu, či proteín Prp45 reguluje kotranskripčné zostavovanie spliceozómu prostredníctvom zmien v stave chromatinu sme sa rozhodli sledovať, či a ako sa menia posttranslačné modifikácie histónov v závislosti na mutácii *prp45(1-169)*. Pre pozorovanie vplyvu mutácie *prp45(1-169)* bola použitá metóda chromatinovej imunoprecipitácie, ktorá je pre sledovanie prítomnosti chromatinových modifikácií na cieľovej sekvencii DNA využívaná v mnohých štúdiách (Gunderson & Johnson 2009; Gunderson et al. 2011). Metódou ChIP boli sledované zmeny v trimetylácii H3K4 a v acetylácii H3K9/18 a H3K14 na lokusoch transkripčne aktívnych génov *ECM33* a *ACT1* obsahujúcich intrón a relatívne dlhú oblasť terminálneho exónu 2.

6.1.1 Mutácia *prp45(1-169)* neovplyvňuje trimetyláciu histónu H3 na lyzíne 4

Jedným z hlavných dôvodov výberu trimetylácie H3K4 bolo, že ľudský ortológ proteínu Prp45 (SNW1/SKIP) nepriamo interaguje s histónmetyltransferázou MLL1, ktorá katalyzuje trimetyláciu H3K4, a podieľa sa na vzniku tejto značky (Brès et al. 2009). Trimetylácia H3K4 je rozpoznávaná proteínom CHD1, ktorý napomáha naviazaniu jednotlivých snRNP na primárny transkript v 5' oblasti aktívnych génov. CHD1 tak ovplyvňuje účinnosť zostrihu intrónu na aktívnych génoch, pričom redukcia množstva tohto proteínu má dramatický efekt na asociáciu U2 snRNP a na účinnosť zostrihu pre-mRNA, ako aj na hladinu trimetylácie H3K4 (Sims et al. 2007). Samotná trimetylácia H3K4 je dôležitá pre správny priebeh kotranskripčného zostrihu u metazoi a jej inhibícia vedie k zníženiu účinnosti zostrihu intrónov (Sims et al. 2007; Davie et al. 2016). Dynamika trimetylácie H3K4 u metazoi je príkladom vzájomného pôsobenia medzi zostrihom pre-mRNA, transkripciou a stavom chromatinu, v ktorom zohráva úlohu zostrihový faktor SNW1/SKIP (Sims et al. 2007; Barski et al. 2007; Davie et al. 2016). V rámci mojej bakalárskej práce sme sa pokúsili sledovať vplyv mutácie *prp45(1-169)* na trimetyláciu H3K4 a tým zistiť, či by mohol Prp45 ovplyvňovať zostavovanie spliceozómu a tým kotranskripčný charakter zostrihu prostredníctvom tejto modifikácie histónov.

Keďže bola medzi získanými výsledkami výrazná variabilita, rozhodli sme sa v rámci diplomovej práce tento problém vyriešiť a zodpovedať otázku vplyvu alely *prp45(1-169)* na trimetyláciu H3K4 zodpovedať (Obr. 18 a 19, str. 105 – 108).

Na kontrolných úsekoch (TELVIR, *ADHI-UAS*) bolo pozorované nízke relatívne nabohtenie trimetylácie H3K4, čo sa očakávalo, pretože na telomére, ktorá tvorí heterochromatín, by sa trimetylácia H3K4 spojená s aktívnou transkripciou nemala vyskytovať (Liu et al. 2005) a v oblasti *ADHI-UAS* trimetylácia H3K4 nebola pozorovaná (Shukla et al. 2006). U kmeňa *set1Δ*, ktorý bol použitý ako ďalšia kontrola metódy ChIP, je trimetylácia H3K4 eliminovaná (Briggs et al. 2001). Z výsledného profilu trimetylácie H3K4 na lokusoch oboch génov možno vidieť, že trimetylácia H3K4 je nabohtená v oblasti 5'-konca génov a smerom k 3'-koncu klesá. Pozorovaný profil trimetylácie H3K4 sa zhoduje s literatúrou (Liu et al. 2005; Sims et al. 2007) a potvrdzuje, že metóda ChIP s využitím protilátky špecificky rozoznávajúcej túto značku funguje. Z výsledkov trimetylácie H3K4 na génoch *ECM33* a *ACT1* vyplýva, že medzi jednotlivými biologickými pokusmi sú pozorované rozdiely. S danou rozlišovacou schopnosťou tohto typu stanovenia však nie sme schopní prehlásiť, že trimetylácia H3K4 je u buniek *prp45(1-169)* oproti wt odlišná. To stále neznamená, že k vplyvu na trimetyláciu H3K4 v obmedzenom rozsahu nemôže dochádzať. Na cicavčích bunkách bolo totiž ukázané, že na reguláciu hladiny trimetylácie v miestach za TSS (v smere transkripcie) má vplyv účinnosť kotranskripčného zostrihu pre-mRNA, pričom inhibícia zostrihu pre-mRNA vedie k poklesu trimetylácie H3K4 (Davie et al. 2016). Kvantifikáciou účinnosti zostrihu u buniek *prp45(1-169)* (merané ako pomer mRNA:pre-mRNA) sa odhalilo, že účinnosť zostrihu je výrazne nižšia u *prp45(1-169)* oproti wt kmeňu (Převorovský et al. 2016; Hálová et al. 2017). Vzhľadom k tomu sme predpokladali, že by sa tento fenotyp mohol prejaviť na hladine trimetylácie H3K4 podobne ako v prípade cicavčích buniek, a teda že trimetylácia H3K4 bude znížená.

V kontraste k vyššie uvedenému nepublikované výsledky z RNA-seq odhalili, že delécia histónmetyltransferázy Set1 (*set1Δ*) nemá vplyv na účinnosť zostrihu, a v prípade dvojitej mutanty *prp45(1-169) set1Δ* nie je efekt alely *prp45(1-169)* na účinnosť zostrihu posilnený (nepublikované výsledky; M. Hálová). Tieto výsledky naznačujú, že proteín Prp45 nepôsobí na zostavovanie spliceozómu v časných fázach prostredníctvom trimetylácie H3K4.

6.1.2 Vplyv alely *prp45(1-169)* na acetyláciu histónu H3 na lyzíne 9, 14 a 18

Gunderson so spoluautormi navrhli, že histónacetyltransferáza Gcn5, ktorá je zodpovedná za acetyláciu na N-konci histónu H3 a H2B, reguluje naviazanie komponentov U2 snRNP (Lea1, Msl1) na miesto vetvenia na primárnom transkripte. Ukázalo sa, že komponenty Lea1 a Msl1 geneticky interagujú s Gcn5, a že delécia Gcn5 vedie k poruche kotranskripčného zostavovania spliceozómu na úrovni naviazania U2 snRNP. Tento efekt sa prenáša do ďalších fáz zostavovania spliceozómu (Gunderson & Johnson 2009). Podobný efekt bol pozorovaný v bunkách s mutáciou *prp45(1-169)*, ktorá spôsobuje oneskorené naviazanie U2 snRNP v časej fáze zostavovania spliceozómu, pričom sa tento defekt prenáša do neskorších fáz. Oneskorené je i kotranskripčné naviazanie U5 snRNP a komplexu NTC (Hálová et al. 2017). Vzhľadom k tomu, že sa hladina mRNA u buniek s mutáciou *prp45(1-169)* (Hálová et al. 2017) a u buniek s deletovanou Gcn5 (nepublikované výsledky; M. Hálová) rámcovo nemení (efekty mutácií na úrovni transkriptomov sú obmedzené), a že kotranskripčné zostavovanie spliceozómu je oneskorené, vyvodzujeme, že zostrih pre-mRNA je v týchto bunkách dokončovaný posttranskripčne. V laboratóriu sme tiež ukázali, že bunky *prp45(1-169)* v kombinácii s deléciou Gcn5 vykazujú syntetický efekt na úrovni akumulácie pre-mRNA (nepublikované výsledky; M. Hálová). Vyššie uvedené poznatky umožňujú vysvetliť pôsobenie proteínu Prp45 a Gcn5 buď v spoločnej dráhe, v ktorej regulujú väzbu jednotlivých komponentov do spliceozómu počínajúc U2 snRNP, alebo v paralelných dráhach, ktoré sa premietajú do jedného výstupu. Zaujímalo nás, či skrátaná alela *prp45(1-169)* ovplyvní nejakým spôsobom acetyltransferázovú aktivitu Gcn5, čo sa následne odrazí vo výslednom profile ňou sprostredkovanej acetylácie.

Metódou ChIP sme sledovali dva typy acetylácie, H3K9/18 (Obr. 20 a 21, str. 109 – 111) a H3K14 (Obr. 22 a 23, str. 111 – 113), ktoré sú sprostredkované Gcn5. Na kontrolných úsekoch (TELVIR, *ADHI-UAS*) bol pozorovaný signál ChIP oboch acetylácií podľa očakávania, kde na telomére by acetylácia nemala byť prítomná (Liu et al. 2005), zatiaľ čo na aktivačnej sekvencii v oblasti promotora *ADHI* by sa acetylácia mala vyskytovať (Pokholok et al. 2005). U kontrolného kmeňa s deletovanou Gcn5 (*gcn5Δ*) bola určitá hladina acetylácie prítomná na oboch génoch. Je to pravdepodobne spôsobené

prítomnosťou ďalších histónacetyltransferáz, ktoré sú v tomto kmeni funkčné a acetylujú sledované históny H3 na príslušných lyzínoch (Krebs 2007). Z výsledného profilu acetylácie H3K9/18 a H3K14 na lokusoch oboch génov možno vidieť, že acetylácia je nabohatená v oblasti promotora a 5'-konca génov a klesá naprieč kódujúcou oblasťou. Tento profil sa zhoduje s literatúrou (Pokholok et al. 2005; Gunderson & Johnson 2009) a potvrdzuje, že metóda ChIP s využitím protilátok špecificky rozoznávajúcej acetyláciu H3K9/18 a H3K14 funguje. Nízky počet meraní acetylácie H3K9/18 a H3K14 na génoch *ECM33* a *ACT1* (2 biologické pokusy) a určitá variabilita medzi výsledkami nám neumožňuje stanoviť definitívny záver. Zo získaných výsledkov však usudzujeme, že acetylácia H3K9/18 nie je mutáciou *prp45(1-169)* ovplyvnená, zatiaľ čo u acetylácie H3K14 nie je možné potvrdiť ani vyvrátiť tento vplyv. Naša súčasná predstava je taká, že Prp45 nereguluje zostavovanie spliceozómu prostredníctvom acetylácie histónov, ale že Prp45 pôsobí v časnej fáze zostrihu paralelne s acetyláciou.

6.1.3 Pozorované rozdiely medzi výsledkami v závislosti na normalizácii dát

Vzhľadom k tomu, že sú v literatúre výsledky z analýzy ChIP často uvádzané ako pomer k signálu v oblasti teloméru (Gunderson & Johnson 2009; Gunderson et al. 2011), sú v rámci mojich výsledkov uvedené aj takto vzťahnuté dáta. V prípade acetylácie H3K14 je možné si povšimnúť, že rozdiel v signále ChIP medzi wt a mutantou vymizne po normalizácii dát na kontrolnú oblasť TELVIR (Obr. 22 a 23, str. 111 – 113). Podobné zmeny v rozdieloch signálu ChIP medzi wt a mutantou po vzťahnutí na TELVIR boli pozorované aj pri trimetylácii H3K4 (Obr. 18B, pokus 4, str. 106). V skutočnosti je však diskutabilné, či dáva zmysel vzťahovať posttranslačné modifikácie spojené s aktívnou transkripciou na oblasť teloméru, kde predpokladáme, že by sa nemali vyskytovať, čiže výsledný signál by mal byť nulový. Jedná sa teda o signál, ktorého úroveň odráža nešpecifickú zložku chromatinovej imunoprecipitácie. Pri tomto štúdiu je však problém nájsť vhodnú kontrolnú oblasť, kde by sme nepredpokladali signál ChIP s nulovou hodnotou, a kde by sme zaručili, že sa v rámci rôznych mutantných kmeňov nemení. Tento problém by mohla vyriešiť exogénna „spike-in“ kontrola, teda prídavok chromatinu (respektíve celých buniek) s DNA, ktorá sa v príslušnom organizme nevyskytuje (Chen et

al. 2015). Pretože spike-in chromatín je vo všetkých vzorkách totožný a zdieľa celú procedúru s chromatínom skúmaných kmeňov, umožnil by presnejšiu kvantifikáciu signálu a robustnejšie vyhodnotenie biologických efektov skúmaných mutácií.

6.1.4 Ďalšie možnosti vplyvu Prp45 v časných fázach zostavovania spliceozómu

Minocha a spoluautori sa domnievajú, že proteín Mud2, ktorý asociuje na primárnom transkripte na mieste vetvenia spoločne so svojim väzbovým partnerom BBP, zohráva dôležitú úlohu nielen v zostrihu pre-mRNA, ale aj v transkripcii. Odhalili, že proteín Mud2 sa prostredníctvom fosforylovaného Ser2 na CTD RNA Pol II viaže na transkribované gény, a to aj na tie, ktoré neobsahujú intrón, a že je dôležitý pre plnú transkripčnú aktivitu *in vivo* a *in vitro*. Mud2 navyše interaguje s komplexom NTC a sprostredkováva jeho väzbu na transkribované gény (Minocha et al. 2018). Vzhľadom k týmto výsledkom by sme mohli predpokladať, že Prp45 v asociácii s komplexom NTC je prostredníctvom Mud2 prítomný na všetkých transkribovaných génoch, v prípade intrón-obsahujúcich génov už v časej fáze zostavovania spliceozómu, kde sme jeho pôsobenie ukázali (Hálová et al. 2017).

Z nameraných výsledkov analýzy ChIP predpokladáme, že Prp45 nepôsobí v časej fáze zostavovania spliceozómu prostredníctvom trimetylácie H3K4 a acetylácie H3K9/18 a H3K14. To znamená, že Prp45 pravdepodobne reguluje zostavovanie spliceozómu iným spôsobom. Jednou z možností je, že v časných fázach zostrihu pre-mRNA môže Prp45 pôsobiť prostredníctvom iných posttranslačných modifikácií. Jednou z nich by mohla byť ubikvitinylácia H2BK123, ktorá je dôležitá pre optimálny priebeh zostrihu primárneho transkriptu. Ligáza Bre1 sprostredkujúca túto modifikáciu geneticky interaguje s proteínom Npl3 patriacim do rodiny SR proteínov, ktorý sa zúčastňuje zostrihu pre-mRNA a je dôležitý pre účinné naviazanie zostrihových faktorov do spliceozómu (Moehle et al. 2012). Navyše sa preukázalo, že i samotná ubikvitinylácia H2BK123 je dôležitá pre postupné naviazanie zostrihových faktorov na primárny transkript v časej fáze zostrihu (Hérissant et al. 2014). Taktiež bola odhalená genetická interakcia podjednotiek ubikvitinyláčného komplexu s Prp45 (nepublikované výsledky; M. Hálová). Kvôli nedostupnosti protilátky

špecificky rozoznávajúcej ubikvitinylovaný histón H2B na lyzíne 123 nebola táto modifikácia sledovaná. Zostáva otázkou, či skrútená alela *prp45(1-169)* ovplyvňuje hladinu ubikvitinylácie H2BK123. Môžeme však predpokladať, že by sa zmeny v ubikvitinylácii H2BK123 pravdepodobne odrazili na zmene v hladine trimetylácie H3K4 (Dover et al. 2002; Nakanishi et al. 2009), čo sme v dôsledku nepotvrdili. Taktiež je možné, že oneskorené zostavovanie spliceozómu nie je dané ovplyvnením chromatinových modifikácií, ale že by proteín Prp45 mohol spôsobovať buď priamo alebo prostredníctvom iných väzbových proteínov zmeny v štruktúre chromatinu, ktoré vytvoria chromatinové prostredie nekompatibilné pre správne zostavovanie spliceozómu. Testovanie ďalších funkcií Prp45 v rámci časných fáz zostavovania spliceozómu je predmetom budúceho výskumu.

6.2 Vplyv mutácie *prp45(1-169)* na správanie sa synchronizovaných buniek

Výsledky získané v našom laboratóriu ukázali, že proteín Prp45 sa zúčastňuje nielen zostrihu pre-mRNA, kedy jeho mutácia *prp45(1-169)* vedie k zmene z kotranskripčného zostrihu na posttranskripčný zostrih (Hálová et al. 2017), ale je tiež zapojený do regulácie expisie niektorých génov neobsahujúcich intrón, kedy mutácia *prp45(1-169)* vedie k oneskorenej indukcii expisie (nepublikované výsledky; M. Hálová). Otázka, ktorú si kladieme, je, ako sa prejavujú zmeny, ktoré *prp45(1-169)* spôsobuje (tzn. zmeny v inducibilite expisie génov a zmeny v kotranskripčnom zostrihu). Aj keď sa tieto zmeny nemanifestujú ako veľké zmeny na úrovni transkriptomu (hladina mRNA je ovplyvnená len mierne; Hálová et al. 2017), prejavujú sa výrazne na raste buniek v interakcii s alelami modifikátorov chromatinu (nepublikované výsledky; M. Hálová). Súčasné poznatky poukazujú na to, že mikroprostredie vzniku nascentného transkriptu (zahrňujúceho chromatin a formujúce sa komplexy úprav pre-mRNA a exportu) je veľmi dôležité pre ďalší osud mRNA a súvisiace regulácie. Posttranskripčný zostrih tak môže ovplyvniť charakteristiky exportu a tie zase môžu ovplyvniť interakciu mRNA s translačným aparátom bunky. Nové štúdie u metazoi ukazujú, že mRNA v priebehu svojho životného cyklu podlieha veľkému počtu posttranskripčných modifikácií (Sauert et al. 2015; Hoernes & Erlacher 2017), a že môže interagovať s rozdielnymi subpopuláciami

ribozómov (Shi et al. 2017). Zmeny v týchto procesoch môžu významne ovplyvniť prejavy buniek, kedy sa očakávajú požiadavky na synchronizáciu génovej expresie či čiastočnú lokalizáciu génovej expresie. Vzhľadom k tomuto sme považovali za zaujímavé testovať fenotyp buniek v situácii, kedy musia synchronizovane regulovať veľké skupiny génov. Takou situáciou je napríklad regulácia prechodu bunkovým cyklom. V rámci diplomovej práce sme sa preto rozhodli sledovať vplyv mutácie *prp45(1-169)* na správanie sa synchronizovaných buniek.

6.2.1 Bunkový cyklus je u mutanty *prp45(1-169)* predĺžený

Aby sme zistili, či bunky s mutáciou *prp45(1-169)* kultivované za štandardných podmienok (30 °C) sú schopné chovať sa synchronne, uskutočnili sme meranie obsahu DNA pomocou prietokovej cytometrie. Na testovanie bol použitý prirodzený feromón kvasiniek α -faktor, ktorý zastavuje kvasinky párovacieho typu α v G1 fáze bunkového cyklu (Futcher 1999). Po vypustení z G1 bloku začali cyklovať wt (*bar1Δ*) i mutantné bunky, pričom u mutantných buniek je prechod bunkovým cyklom oproti wt pomalší (Obr. 30, str. 124 – 128). I napriek pomalšiemu prechodu buniek *prp45(1-169)* bunkovým cyklom sa zdá, že väčšina buniek je schopná zastaviť sa v G1 fáze bunkového cyklu a po vypustení z bloku synchronne vstúpia do bunkového cyklu, tzn. miera synchronizácie sledovaných kmeňov je rovnaká. To naznačuje, že mutácia *prp45(1-169)* nevedie k takej dysregulácii procesov, kedy by mali mutantné bunky problém správať sa synchronne. Tento fakt je i v súlade s pozorovaním, že sa mutantné kmene dajú krížiť. Pozorovaný dlhší bunkový cyklus u buniek s mutáciou *prp45(1-169)* je v súlade s meraním rastových kriviek pri 30 °C, kde bol pozorovaný 10 – 20% rozdiel v rýchlosti rastu medzi wt a mutantou *prp45(1-169)* (Obr. 16A, str. 99). Vzhľadom k tomu, že sa zmena v dĺžke bunkového cyklu premieta do doby trvania jednotlivých fáz, zostáva nateraz nevyriešené, či u mutanty *prp45(1-169)* dochádza k zmenám v relatívnych proporciách všetkých fáz bunkového cyklu alebo je výrazne predĺžená len niektorá z fáz.

6.2.2 Zohráva proteín Prp45 úlohu pri remodelácii chromatínu?

Výsledky nášho laboratória naznačujú spojitosť proteínu Prp45 s histónovým variantom H2A.Z, ktorý má veľký vplyv na štruktúru chromatínu tým, že mení obrat nukleozómov, tzn. umožňuje jednoduchšiu ejakciu nukleozómov z chromatínu (Zhang et al. 2005). Odhalili sme, že mutácia *prp45(1-169)* v kombinácii s deléciou génu *HTZI*, ktorý kóduje histónový variant H2A.Z, je synteticky letálna (nepublikované výsledky; M. Hálová). Pri štúdiu kvasiniek s deletovaným génom *HTZI* (*htz1Δ*) bol pozorovaný podobný fenotyp správania sa synchronizovanej kultúry po vypustení z G1 bloku ako v prípade buniek s mutáciou *prp45(1-169)* (Dhillon et al. 2006). Pomocou prietokovej cytometrie autori článku sledovali kultúru buniek *htz1Δ* blokovánú v G1 fáze bunkového cyklu pomocou α -faktoru po vypustení do bunkového cyklu. Odhalili, že bunky *htz1Δ* postupujú bunkovým cyklom oproti wt pomalšie. Na základe ďalších dostupných výsledkov to autori vysvetlili ako dôsledok predĺženia S fázy bunkového cyklu. Je možné, že dlhší bunkový cyklus u mutanty *prp45(1-169)* je tiež spôsobený predĺžením S fázy bunkového cyklu. V rámci štúdia úlohy proteínu Prp45 prostredníctvom mutanty *prp45(1-169)* sme našli ďalšie fenotypy, ktoré sú podobné fenotypom buniek s deletovaným génom pre H2A.Z. Ukázalo sa, že variant H2A.Z sa podieľa nielen na regulácii transkripcie, kde napomáha iniciácii a elongácii transkripcie (Xu et al. 2005; Weber et al. 2014), ale zohráva tiež dôležitú úlohu v kotranskripčnom zostrihu (Neves et al. 2017). Variant H2A.Z podporuje účinné preusporiadanie spliceozómu a jeho strata vedie k pretrvávajúcej väzbe U2 snRNP na primárnom transkripte, čím je ovplyvnená väzba nasledujúcich snRNP (Neves et al. 2017). Navyše sa ukázalo, že Prp45 geneticky interaguje s podjednotkami komplexu SWR1 (nepublikované výsledky; M. Hálová), ktorý hrá kľúčovú úlohu pri depozícii variantu H2A.Z (Krogan, Keogh, et al. 2003). Ako už bolo spomínané, mutácia *prp45(1-169)* vedie k oneskorenej indukcii expresie niektorých génov neobsahujúcich intrón, čo môže súvisieť so zmenami v prestavbe nukleozómov v oblasti promotora (nepublikované výsledky; M. Hálová). Zostáva otázkou, či by proteín Prp45 mohol ovplyvňovať remodeláciu chromatínu. Je možné, že mutácia *prp45(1-169)* spôsobuje zmeny, ktoré by mohli ovplyvniť aktivitu remodelačných proteínov na príslušných lokusoch génov, čo by mohlo v dôsledku ovplyvniť obrat nukleozómov. Bolo by zaujímavé zistiť, či sa dynamika prestavby nukleozómov mení v závislosti na mutácii *prp45(1-169)*. Preto sme sa rozhodli zaviesť metódu, v ktorej by sme sledovali

inkorporáciu myc-značeného histónu H3 do nukleozómov jednotlivých génov v čase (Dion et al. 2007). V rámci diplomovej práce bol systém pre sledovanie obratu nukleozómov pripravený (podľa Ottoz et al. 2014) a môže byť pri následnom štúdiu použitý.

7. ZHRNUTIE

- Pomocou chromaťínovej imunoprecipitácie bola analyzovaná trimetylácia H3K4 katalyzovaná Set1 a acetylácie H3K9/18 a H3K14 na intrón-obsahujúcich génoch *ECM33* a *ACT1*. Nebol nájdený efekt alely *prp45(1-169)*, o ktorej je známe, že postihuje kotranskripčné zostavovanie spliceozómu. Nepotvrdila sa tak hypotéza, že zostrihový faktor Prp45 ovplyvňuje zostavovanie spliceozómu v časnej fáze zostrihu prostredníctvom posttranslačných modifikácií chromaťínu na transkribovaných génoch.
- V bunkách s deletovanou proteázou Bar1 bol sledovaný vplyv alely *prp45(1-169)* na prechod bunkovým cyklom prietokovou cytometriou. Bolo zistené, že bunky s mutáciou *prp45(1-169)* majú predĺžený bunkový cyklus, ale sú schopné synchronne prejsť bunkovým cyklom po vypustení z G1 bloku. Alela *prp45(1-169)*, ktorá spomaľuje rýchlosť indukcie regulovaných génov (nepublikované výsledky; M. Hálová), má teda len obmedzený dopad na procesy, ktoré vyžadujú koordinovanú indukciu skupín génov, ako je prechod bunkovým cyklom.
 - Úspešne sme pripravili kmene *S. cerevisiae* s deletovaným génom pre proteázu Bar1.
- Úspešne sme pripravili kmene pre sledovanie obratu nukleozómov v kvasinkách *S. cerevisiae*.
 - Zaviedli sme systém β -estradiolom indukovanej expisie myc-značeného histónu H3. Systém môže byť použitý pre sledovanie rýchlosti inkorporácie značeného histónu H3 do promotorov a ORF testovaných génov.

8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Adam, M. et al., 2001. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Molecular and cellular biology*, 21(18), pp.6270–9.
- Adkins, M.W. & Tyler, J.K., 2006. Transcriptional Activators Are Dispensable for Transcription in the Absence of Spt6-Mediated Chromatin Reassembly of Promoter Regions. *Molecular Cell*, 21(3), pp.405–416.
- Albers, M. et al., 2003. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(1), pp.138–150.
- Alexander, R.D. et al., 2010. Splicing-Dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Molecular Cell*, 40(4), pp.582–593.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. & Mirsky, A.E., 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, pp.786–94.
- Allison, L.A. et al., 1985. Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell*, 42(2), pp.599–610.
- Alpert, T., Herzog, L. & Neugebauer, K.M., 2016. Perfect timing : splicing and transcription rates in living cells. , pp.1–3.
- Altaf, M. et al., 2007. Interplay of Chromatin Modifiers on a Short Basic Patch of Histone H4 Tail Defines the Boundary of Telomeric Heterochromatin. *Molecular Cell*, 28(6), pp.1002–1014.
- Altaf, M. et al., 2010. NuA4-dependent Acetylation of Nucleosomal Histones H4 and H2A Directly Stimulates Incorporation of H2A.Z by the SWR1 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp.15966–15977.
- Anderson, J. & Widom, J., 2000. Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *Journal of Molecular Biology*, 296(4), pp.979–987.
- Andrews, A.J. et al., 2010. The Histone Chaperone Nap1 Promotes Nucleosome Assembly by Eliminating Nonnucleosomal Histone DNA Interactions. *Molecular Cell*, 37(6), pp.834–842.
- Arya, G., Maitra, A. & Grigoryev, S.A., 2010. A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 27(6), pp.803–820.
- Barski, A. et al., 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129(4), pp.823–837.
- Basehoar, A.D., Zanton, S.J. & Pugh, B.F., 2004. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, 116(5), pp.699–709.
- Bean, A. et al., 2016. Genome-wide histone modification patterns in *Kluyveromyces Lactis* reveal evolutionary adaptation of a heterochromatin-associated mark.
- Becker, P.B. & Hörz, W., 2002. ATP-Dependent Nucleosome Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), pp.247–273.
- Belotserkovskaya, R. et al., 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5636), pp.1090–3.
- Bertram, K. et al., 2017. Cryo-EM Structure of a Pre-catalytic Human Spliceosome Primed for Activation. *Cell*, 170(4), p.701–713.e11.
- Bian, C. et al., 2011. Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *The EMBO Journal*, 30(14), pp.2829–2842.
- Black, J.C., Van Rechem, C. & Whetstone, J.R., 2012. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular cell*, 48(4), pp.491–507.
- Bonner, W.M. et al., 1988. Kinetics of accumulation and depletion of soluble newly synthesized histone in the reciprocal regulation of histone and DNA synthesis. *Biochemistry*, 27(17), pp.6542–50.

- Bortvin, A. & Winston, F., 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5267), pp.1473–6.
- Brès, V. et al., 2005. A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes and Development*, 19(10), pp.1211–1226.
- Brès, V. et al., 2009. SKIP Interacts with c-Myc and Menin to Promote HIV-1 Tat Transactivation. *Molecular Cell*, 36(1), pp.75–87.
- Briggs, S.D. et al., 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 15(24), pp.3286–95.
- Brugiolo, M., Herzel, L. & Neugebauer, K.M., 2013. Counting on co-transcriptional splicing. *F1000Prime Reports*, 5, p.9.
- Butler, W.B. & Mueller, G.C., 1973. Control of histone synthesis in HeLa cells. *Biochimica et biophysica acta*, 294(1), pp.481–96.
- Cairns, B.R., 2009. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature*, 461(7261), pp.193–198.
- Carrozza, M.J. et al., 2005. Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription. *Cell*, 123(4), pp.581–592.
- Chandrasekharan, M.B. et al., 2010. Histone H2B C-Terminal Helix Mediates trans-Histone H3K4 Methylation Independent of H2B Ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*, 30(13), pp.3216–3232.
- Chandrasekharan, M.B., Huang, F. & Sun, Z.-W., 2009. Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), pp.16686–16691.
- Chandrasekharan, M.B., Huang, F. & Sun, Z.W., 2011. Decoding the trans-histone crosstalk: Methods to analyze H2B ubiquitination, H3 methylation and their regulatory factors.
- Chen, K. et al., 2015. The Overlooked Fact: Fundamental Need for Spike-In Control for Virtually All Genome-Wide Analyses. *Molecular and cellular biology*, 36(5), pp.662–7.
- Choe, J., Kolodrubetz, D. & Grunstein, M., 1982. The two yeast histone H2A genes encode similar protein subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(5), pp.1484–7.
- Chu, Y. et al., 2007. Regulation of histone modification and cryptic transcription by the Bur1 and Paf1 complexes. *The EMBO journal*, 26(22), pp.4646–56.
- Chu, Y. et al., 2006. The Bur1 Cyclin-Dependent Protein Kinase Is Required for the Normal Pattern of Histone Methylation by Set2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), pp.3029–3038.
- Churchman, L.S. & Weissman, J.S., 2011. Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature*, 469(7330), pp.368–373.
- Clapier, C.R. & Cairns, B.R., 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, pp.273–304.
- Dahl, R., Wani, B. & Hayman, M.J., 1998. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene*, 16(12), pp.1579–1586.
- Daniel, J.A. et al., 2004. Deubiquitination of Histone H2B by a Yeast Acetyltransferase Complex Regulates Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), pp.1867–1871.
- Davie, J.R., Xu, W. & Delcuve, G.P., 2016. Histone H3K4 trimethylation: dynamic interplay with pre-mRNA splicing. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(1), pp.1–11.
- Dehé, P.-M. et al., 2005. Histone H3 Lysine 4 Mono-methylation does not Require Ubiquitination of Histone H2B. *Journal of Molecular Biology*, 353(3), pp.477–484.
- Dehé, P.-M. & Géli, V., 2006. The multiple faces of Set1 This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(4), pp.536–548.
- Dhillon, N. et al., 2006. H2A . Z Functions To Regulate Progression through the Cell Cycle. *Molecular and cellular biology*, 26(2), pp.489–501.
- Dion, M.F. et al., 2007. Dynamics of Replication-Independent Histone Turnover in Budding Yeast.

- Science*, 315(5817), pp.1405–1408.
- Dollard, C. et al., 1994. SPT10 and SPT21 Are Required for Transcription of Particular Histone Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, pp.5223–5228.
- Dover, J. et al., 2002. Methylation of Histone H3 by COMPASS Requires Ubiquitination of Histone H2B by Rad6. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), pp.28368–28371.
- Elliott, D.J. & Rosbash, M., 1996. Yeast pre-mRNA is composed of two populations with distinct kinetic properties. *Experimental cell research*, 229(2), pp.181–188.
- Emre, N.C.T. et al., 2005. Maintenance of Low Histone Ubiquitylation by Ubp10 Correlates with Telomere-Proximal Sir2 Association and Gene Silencing. *Molecular Cell*, 17(4), pp.585–594.
- Ezhkova, E. & Tansey, W.P., 2006. Chromatin immunoprecipitation to study protein-DNA interactions in budding yeast. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 313(3), pp.225–244.
- Fabrizio, P. et al., 2009. The Evolutionarily Conserved Core Design of the Catalytic Activation Step of the Yeast Spliceosome. *Molecular Cell*, 36(4), pp.593–608.
- Feng, Q. et al., 2002. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Current biology : CB*, 12(12), pp.1052–8.
- Fingerman, I.M., Li, H.-C. & Briggs, S.D., 2007. A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway. *Genes & Development*, 21(16), pp.2018–2029.
- Fleming, A.B. et al., 2008. H2B Ubiquitylation Plays a Role in Nucleosome Dynamics during Transcription Elongation. *Molecular Cell*, 31(1), pp.57–66.
- Folk, P., Půta, F. & Skružný, M., 2004. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: The concealed tie of dissimilar pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(6), pp.629–640.
- Frederiks, F. et al., 2008. Nonprocessive methylation by Dot1 leads to functional redundancy of histone H3K79 methylation states. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(6), pp.550–557.
- Futcher, B., 1999. Cell cycle synchronization. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology*, 21(2–3), pp.79–86.
- Gahura, O. et al., 2009. Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(1), pp.139–151.
- Galej, W.P. et al., 2016. Cryo-EM structure of the spliceosome immediately after branching. *Nature*, 537(7619), pp.197–201.
- Game, J.C. et al., 2006. The RAD6/BRE1 Histone Modification Pathway in *Saccharomyces* Confers Radiation Resistance Through a RAD51-Dependent Process That Is Independent of RAD18. *Genetics*, 173(4), pp.1951–1968.
- Gardner, R.G., Nelson, Z.W. & Gottschling, D.E., 2005. Ubp10/Dot4p Regulates the Persistence of Ubiquitinated Histone H2B: Distinct Roles in Telomeric Silencing and General Chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), pp.6123–6139.
- Giannattasio, M. et al., 2005. The DNA Damage Checkpoint Response Requires Histone H2B Ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 Methylation by Dot1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp.9879–9886.
- Görnemann, J. et al., 2005. Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Molecular Cell*, 19(1), pp.53–63.
- Govind, C.K. et al., 2007. Gcn5 Promotes Acetylation, Eviction, and Methylation of Nucleosomes in Transcribed Coding Regions. *Molecular Cell*, 25(1), pp.31–42.
- Grant, P.A. et al., 1999. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *The Journal of biological chemistry*, 274(9), pp.5895–900.
- Grisdale, C.J. et al., 2013. Transcriptome analysis of the parasite *Encephalitozoon cuniculi*: an in-depth examination of pre-mRNA splicing in a reduced eukaryote. *BMC Genomics*, 14(1), p.207.
- Grunstein, M. et al., 2000. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature*, 408(6811), pp.495–498.

- Guillemette, B. et al., 2005. Variant Histone H2A.Z Is Globally Localized to the Promoters of Inactive Yeast Genes and Regulates Nucleosome Positioning M. Groudine, ed. *PLoS Biology*, 3(12), p.e384.
- Gunderson, F.Q. & Johnson, T.L., 2009. Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. *PLoS Genetics*, 5(10).
- Gunderson, F.Q., Merkhofer, E.C. & Johnson, T.L., 2011. Dynamic histone acetylation is critical for cotranscriptional spliceosome assembly and spliceosomal rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), pp.2004–2009.
- Gunjan, A., Paik, J. & Verreault, A., 2005. Regulation of histone synthesis and nucleosome assembly. *Biochimie*, 87(7), pp.625–635.
- Gunjan, A. & Verreault, A., 2003. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell*, 115(5), pp.537–49.
- Gutierrez, S.E. & Romero-oliva, F.A., 2013. Epigenetic changes: a common theme in acute myelogenous leukemogenesis. , pp.1–14.
- Hálová, M. et al., 2017. Nineteen complex-related factor Prp45 is required for the early stages of cotranscriptional spliceosome assembly. *RNA (New York, N.Y.)*, 23(10), pp.1512–1524.
- Hammond, C.M. et al., 2017. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(3), pp.141–158.
- Hartley, P.D. & Madhani, H.D., 2009. Mechanisms that Specify Promoter Nucleosome Location and Identity. *Cell*, 137(3), pp.445–458.
- Hartwell, L.H. et al., 1973. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants. *Genetics*, 74(2), pp.267–86.
- Henikoff, S. & Shilatifard, A., 2011. Histone modification: cause or cog? *Trends in Genetics*, 27(10), pp.389–396.
- Henry, K.W. et al., 2003. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes & Development*, 17(21), pp.2648–2663.
- Hereford, L. et al., 1979. Isolation of Yeast Histone Genes H2A and H2B. *Cell*, 18(0), pp.1261–271.
- Hérissant, L. et al., 2014. H2B ubiquitylation modulates spliceosome assembly and function in budding yeast. *Biology of the Cell*, 106(4), pp.126–138.
- Hoernes, T.P. & Erlacher, M.D., 2017. Translating the epitranscriptome. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(1), pp.1–18.
- Huang, H. et al., 2014. SnapShot: Histone Modifications. *CELL*, 159, p.458–458.e1.
- Hwang, W.W. et al., 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Molecular cell*, 11(1), pp.261–6.
- Jamai, A., Imoberdorf, R.M. & Strubin, M., 2007. Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. *Molecular cell*, 25(3), pp.345–55.
- Joshi, A.A. & Struhl, K., 2005. Eaf3 Chromodomain Interaction with Methylated H3-K36 Links Histone Deacetylation to Pol II Elongation. *Molecular Cell*, 20(6), pp.971–978.
- Kao, C.-F. et al., 2004. Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes & Development*, 18(2), pp.184–195.
- Keogh, M.-C. et al., 2005. Cotranscriptional Set2 Methylation of Histone H3 Lysine 36 Recruits a Repressive Rpd3 Complex. *Cell*, 123(4), pp.593–605.
- Kim, T. & Buratowski, S., 2009. Dimethylation of H3K4 by Set1 Recruits the Set3 Histone Deacetylase Complex to 5' Transcribed Regions. *Cell*, 137(2), pp.259–272.
- Kirmizis, A. et al., 2007. Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature*, 449(7164), pp.928–932.
- Kizer, K.O. et al., 2005. A Novel Domain in Set2 Mediates RNA Polymerase II Interaction and Couples Histone H3 K36 Methylation with Transcript Elongation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), pp.3305–3316.
- Klose, R.J. et al., 2007. Demethylation of histone H3K36 and H3K9 by Rph1: a vestige of an H3K9 methylation system in *Saccharomyces cerevisiae*? *Molecular and cellular biology*,

- 27(11), pp.3951–61.
- Kornberg, R., 1974. Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin structure is based on a repeating unit of eight. *Science*, 184, pp.868–871.
- Kotovic, K.M. et al., 2003. Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. *Molecular and cellular biology*, 23(16), pp.5768–5779.
- Krebs, J.E., 2007. Moving marks: dynamic histone modifications in yeast. *Molecular bioSystems*, 3(9), pp.590–7.
- Kristjuhan, A. & Svejstrup, J.Q., 2004. Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *The EMBO Journal*, 23(21), pp.4243–4252.
- Krogan, N.J., Keogh, M.-C., et al., 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular cell*, 12(6), pp.1565–76.
- Krogan, N.J., Kim, M., et al., 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology*, 23(12), pp.4207–18.
- Krogan, N.J., Dover, J., et al., 2003. The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Molecular cell*, 11(3), pp.721–9.
- Kulaeva, O.I., Hsieh, F.-K. & Studitsky, V.M., 2010. RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), pp.11325–30.
- Kundu, S., Horn, P.J. & Peterson, C.L., 2007. SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster. *Genes & Development*, 21(8), pp.997–1004.
- Kundu, S. & Peterson, C.L., 2009. Role of chromatin states in transcriptional memory.
- Lacadie, S. a. & Rosbash, M., 2005. Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'??ss base pairing in yeast. *Molecular Cell*, 19(1), pp.65–75.
- Lacoste, N. et al., 2002. Disruptor of Telomeric Silencing-1 Is a Chromatin-specific Histone H3 Methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp.30421–30424.
- Laribee, R.N. et al., 2005. BUR kinase selectively regulates H3 K4 trimethylation and H2B ubiquitylation through recruitment of the PAF elongation complex. *Current biology : CB*, 15(16), pp.1487–93.
- Laribee, R.N. et al., 2007. CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), pp.5836–41.
- Laubert, S.M. et al., 2013. H3K4me3 Interactions with TAF3 Regulate Preinitiation Complex Assembly and Selective Gene Activation. *Cell*, 152(5), pp.1021–1036.
- Lazzaro, F. et al., 2008. Histone methyltransferase Dot1 and Rad9 inhibit single-stranded DNA accumulation at DSBs and uncapped telomeres. *The EMBO Journal*, 27(10), pp.1502–12.
- Lee, D.Y. et al., 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72(1), pp.73–84.
- Lee, J.-S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S.K., et al., 2007. Histone Crosstalk between H2B Monoubiquitination and H3 Methylation Mediated by COMPASS. *Cell*, 131(6), pp.1084–1096.
- Lee, J.-S. & Shilatifard, A., 2007. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 618(1–2), pp.130–134.
- Lee, K.K. & Workman, J.L., 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), pp.284–295.
- Lee, S. et al., 2018. Dot1 regulates nucleosome dynamics by its inherent histone chaperone activity in yeast. *Nature Communications*, 9(1), p.240.
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R.H., et al., 2007. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nature Genetics*, 39(10), pp.1235–1244.
- van Leeuwen, F., Gafken, P.R. & Gottschling, D.E., 2002. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell*, 109(6), pp.745–56.
- Leong, G.M. et al., 2001. Ski-interacting Protein Interacts with Smad Proteins to Augment

- Transforming Growth Factor- β -dependent Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp.18243–18248.
- Li, B. et al., 2007. Combined Action of PHD and Chromo Domains Directs the Rpd3S HDAC to Transcribed Chromatin. *Science*, 316(5827), pp.1050–1054.
- Li, B. et al., 2005. Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), pp.18385–18390.
- Li, B. et al., 2003. The Set2 Histone Methyltransferase Functions through the Phosphorylated Carboxyl-terminal Domain of RNA Polymerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp.8897–8903.
- Liang, G. et al., 2007. Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(3), pp.243–245.
- Lin, L. -j. et al., 2010. Asf1 Can Promote Trimethylation of H3 K36 by Set2. *Molecular and Cellular Biology*, 30(5), pp.1116–1129.
- Ling, X. et al., 1996. Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes & development*, 10(6), pp.686–99.
- Lipke, P.N., Taylor, A. & Ballou, C.E., 1976. Morphogenic Effects of a-Factor on *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Microbiology*, 127(1), pp.610–618.
- Liu, C.L. et al., 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biology*, 3(10).
- Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251–260.
- Luk, E. et al., 2010. Stepwise Histone Replacement by SWR1 Requires Dual Activation with Histone H2A.Z and Canonical Nucleosome. *Cell*, 143(5), pp.725–736.
- MacKay, V.L. et al., 1988. The *Saccharomyces cerevisiae* BAR1 gene encodes an exported protein with homology to pepsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(1), pp.55–9.
- Makarov, E.M. et al., 2002. Small Nuclear Ribonucleoprotein Remodeling During Catalytic Activation of the Spliceosome. *Science*, 298(5601), pp.2205–2208.
- Malagon, F. et al., 2004. Genetic interactions of DST1 in *Saccharomyces cerevisiae* suggest a role of TFIIS in the initiation-elongation transition. *Genetics*, 166(3), pp.1215–27.
- Marques, M. et al., 2010. Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription. *Epigenetics*, 5(4), pp.267–72.
- Martinkova, K. et al., 2002. Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *Journal of Biochemistry*, 132(4), pp.557–563.
- Mason, P.B. & Struhl, K., 2003. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Molecular and cellular biology*, 23(22), pp.8323–33.
- Mavrich, T.N. et al., 2008. A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome research*, 18(7), pp.1073–83.
- Meeks-Wagner, D. & Hartwell, L.H., 1986. Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. *Cell*, 44(1), pp.43–52.
- Meluh, P.B. et al., 1998. Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 94(5), pp.607–13.
- Millar, C.B. & Grunstein, M., 2006. Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), pp.657–666.
- Minocha, R. et al., 2018. Mud2 functions in transcription by recruiting the Prp19 and TREX complexes to transcribed genes. , (July), pp.1–15.
- Moehle, E. a. et al., 2012. The Yeast SR-Like Protein Npl3 Links Chromatin Modification to mRNA Processing. *PLoS Genetics*, 8(11), pp.1–15.
- Moehle, E.A. et al., 2014. Adventures in time and space. *RNA Biology*, 11(4), pp.313–319.
- Morillo-Huesca, M. et al., 2010. The SWR1 Histone Replacement Complex Causes Genetic Instability and Genome-Wide Transcription Misregulation in the Absence of H2A.Z M.

- Lichten, ed. *PLoS ONE*, 5(8), p.e12143.
- Morillon, A. et al., 2005. Dynamic Lysine Methylation on Histone H3 Defines the Regulatory Phase of Gene Transcription. *Molecular Cell*, 18(6), pp.723–734.
- Musselman, C.A., Khorasanizadeh, S. & Kutateladze, T.G., 2014. Towards understanding methyllysine readout. *Biochimica et biophysica acta*, 1839(8), pp.686–93.
- Nakanishi, S. et al., 2009. Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. *The Journal of cell biology*, 186(3), pp.371–7.
- Neubauer, G. et al., 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics*, 20(1), pp.46–50.
- Neves, L.T. et al., 2017. The histone variant H2A.Z promotes efficient cotranscriptional splicing in *S. cerevisiae*. *Genes and Development*, 31(7), pp.702–717.
- Ng, H.H., Feng, Q., et al., 2002. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes & development*, 16(12), pp.1518–27.
- Ng, H.H., Robert, F., et al., 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell*, 11(3), pp.709–19.
- Ng, H.H., Xu, R.-M., et al., 2002. Ubiquitination of Histone H2B by Rad6 Is Required for Efficient Dot1-mediated Methylation of Histone H3 Lysine 79. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), pp.34655–34657.
- Ng, H.H., Dole, S. & Struhl, K., 2003. The Rtf1 Component of the Paf1 Transcriptional Elongation Complex Is Required for Ubiquitination of Histone H2B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp.33625–33628.
- Nguyen, T.H.D. et al., 2016. CryoEM structures of two spliceosomal complexes: Starter and dessert at the spliceosome feast. *Current Opinion in Structural Biology*, 36, pp.48–57.
- Oesterreich, F.C. et al., 2016. Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell*, 165(2), pp.372–381.
- Oesterreich, F.C., Bieberstein, N. & Neugebauer, K.M., 2011. Pause locally, splice globally. *Trends in Cell Biology*, 21(6), pp.328–335.
- Oesterreich, F.C., Preibisch, S. & Neugebauer, K.M., 2010. Global analysis of nascent rna reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Molecular Cell*, 40(4), pp.571–581.
- Oh, S. et al., 2010. A lysine-rich region in Dot1p is crucial for direct interaction with H2B ubiquitylation and high level methylation of H3K79. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(4), pp.512–517.
- Ohi, M.D. et al., 2005. Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. *Molecular and cellular biology*, 25(1), pp.451–60.
- Osley, M.A. & Lycan, D., 1987. Trans-acting regulatory mutations that alter transcription of *Saccharomyces cerevisiae* histone genes. *Molecular and cellular biology*, 7(12), pp.4204–10.
- Ottoz, D.S.M., Rudolf, F. & Stelling, J., 2014. Inducible, tightly regulated and growth condition-independent transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 42(17).
- Papamichos-Chronakis, M. et al., 2011. Global Regulation of H2A.Z Localization by the INO80 Chromatin-Remodeling Enzyme Is Essential for Genome Integrity. *Cell*, 144(2), pp.200–213.
- Patterson, H.G. et al., 1998. The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273(13), pp.7268–76.
- Pavri, R. et al., 2006. Histone H2B Monoubiquitination Functions Cooperatively with FACT to Regulate Elongation by RNA Polymerase II. *Cell*, 125(4), pp.703–717.
- Peckham, H.E. et al., 2007. Nucleosome positioning signals in genomic DNA. *Genome Research*, 17(8), pp.1170–1177.
- Pokholok, D.K. et al., 2005. Genome-wide Map of Nucleosome Acetylation and Methylation in Yeast. *Cell*, 122(4), pp.517–527.
- Prathapam, T., Kühne, C. & Banks, L., 2002. Skip interacts with the retinoblastoma tumor

- suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic acids research*, 30(23), pp.5261–8.
- Převorovský, M. et al., 2016. Workflow for Genome-Wide Determination of Pre-mRNA Splicing Efficiency from Yeast RNA-seq Data. *BioMed Research International*, 2016, pp.1–9.
- Pruss, D., Hayes, J.J. & Wolffe, A.P., 1995. Nucleosomal anatomy - where are the histones? *BioEssays*, 17(2), pp.161–170.
- Pryde, F. et al., 2009. H3 K36 Methylation Helps Determine the Timing of Cdc45 Association with Replication Origins B. A. Sullivan, ed. *PLoS ONE*, 4(6), p.e5882.
- Purves, W.K. et al., 2004. *Life: The Science of Biology* 7th ed., Gordonsville: Sinauer Associates and W. H. Freeman & Co.
- Raisner, R.M. et al., 2005. Histone Variant H2A.Z Marks the 5' Ends of Both Active and Inactive Genes in Euchromatin. *Cell*, 123(2), pp.233–248.
- Rao, B. et al., 2005. Dimethylation of Histone H3 at Lysine 36 Demarcates Regulatory and Nonregulatory Chromatin Genome-Wide. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), pp.9447–9459.
- Rauhut, R. et al., 2016. Molecular architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* activated spliceosome. *Science*, 353(6306), pp.1399–1405.
- Rizzardi, L.F. et al., 2012. DNA Replication Origin Function Is Promoted by H3K4 Di-methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 192, pp.371–384.
- Robzyk, K., Recht, J. & Osley, M.A., 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5452), pp.501–4.
- Rogers, D.T., Lemire, J.M. & Bostian, K.A., 1982. Acid phosphatase polypeptides in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a differentially regulated multigene family (transcriptional regulation/yeast transformation/hybridization-selection/molecular evolution/yeast promoter). *Biochemistry*, 79, pp.2157–2161.
- Rudolph, H. & Hinnen, A., 1987. The yeast PHO5 promoter: phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5), pp.1340–4.
- Santisteban, M.S., Hang, M. & Smith, M.M., 2011. Histone variant H2A.Z and RNA polymerase II transcription elongation. *Molecular and cellular biology*, 31(9), pp.1848–60.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. & Smith, M.M., 2000. Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell*, 103(3), pp.411–422.
- Santos-Rosa, H. et al., 2003. Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Molecular cell*, 12(5), pp.1325–32.
- Sauert, M., Temmel, H. & Moll, I., 2015. Heterogeneity of the translational machinery: Variations on a common theme. *Biochimie*, 114, pp.39–47.
- Schneider, C. et al., 2015. Dynamic Contacts of U2, RES, Cwc25, Prp8 and Prp45 Proteins with the Pre-mRNA Branch-Site and 3' Splice Site during Catalytic Activation and Step 1 Catalysis in Yeast Spliceosomes. *PLoS Genetics*, 11(9), pp.1–27.
- Schneider, J. et al., 2005. Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Molecular cell*, 19(6), pp.849–56.
- Schubeler, D. et al., 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes & Development*, 18(11), pp.1263–1271.
- Schwabish, M.A. & Struhl, K., 2004. Evidence for Eviction and Rapid Deposition of Histones upon Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 24(23), pp.10111–10117.
- Schwartz, S.H. et al., 2008. Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome Research*, 18(1), pp.88–103.
- Segal, E. et al., 2006. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 442(7104), pp.772–778.
- Segal, E. & Widom, J., 2009. What controls nucleosome positions? *Trends in Genetics*, 25(8), pp.335–343.
- Shahbazian, M.D., Zhang, K. & Grunstein, M., 2005. Histone H2B Ubiquitylation Controls

- Processive Methylation but Not Monomethylation by Dot1 and Set1. *Molecular Cell*, 19(2), pp.271–277.
- Shi, Z. et al., 2017. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Molecular Cell*, 67(1), p.71–83.e7.
- Shieh, G.S. et al., 2011. H2B ubiquitylation is part of chromatin architecture that marks exon-intron structure in budding yeast. *BMC Genomics*, 12(1), p.627.
- Shilatifard, A., 2008. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(3), pp.341–348.
- Shilatifard, A., 2012. The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), pp.65–95.
- Shivaswamy, S. et al., 2008. Dynamic Remodeling of Individual Nucleosomes Across a Eukaryotic Genome in Response to Transcriptional Perturbation O. J. Rando, ed. *PLoS Biology*, 6(3), p.e65.
- Shogren-Knaak, M. et al., 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5762), pp.844–7.
- Shukla, A. et al., 2006. Ubp8p, a histone deubiquitinase whose association with SAGA is mediated by Sgf11p, differentially regulates lysine 4 methylation of histone H3 in vivo. *Molecular and cellular biology*, 26(9), pp.3339–3352.
- Sikorski, R.S. & Hieter, P., 1989. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), pp.19-27.
- Sims, R.J. et al., 2005. Human but Not Yeast CHD1 Binds Directly and Selectively to Histone H3 Methylated at Lysine 4 via Its Tandem Chromodomains. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), pp.41789–41792.
- Sims, R.J. et al., 2007. Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 28(4), pp.665–676.
- Singh, R.K. et al., 2010. Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell Cycle*, 9(20), pp.4236–4244.
- Singh, R.K. et al., 2009. Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. *Nature Cell Biology*, 11(8), pp.925–933.
- Singh, R.K. et al., 2012. Novel E3 Ubiquitin Ligases That Regulate Histone Protein Levels in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 7(5), p.e36295.
- Skruzný, M. et al., 2001. Cyclophilins of a novel subfamily interact with SNW/SKIP coregulator in *Dictyostelium discoideum* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1521(1–3), pp.146–151.
- Smith, M.M. & Andrésson, Ó.S., 1983. DNA sequences of yeast H3 and H4 histone genes from two non-allelic gene sets encode identical H3 and H4 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 169(3), pp.663–690.
- Smolle, M. & Workman, J.L., 2013. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), pp.84–97.
- Sorenson, M.R. et al., 2016. Histone H3K36 methylation regulates pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biology*, 13(4), pp.412–426.
- Spellman, P.T. et al., 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular biology of the cell*, 9(12), pp.3273–97.
- Srivastava, R. & Ahn, S.H., 2015. Modifications of RNA polymerase II CTD: Connections to the histone code and cellular function. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp.856–872.
- Stark, M.R. et al., 2015. Dramatically reduced spliceosome in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), pp.E1191-200.
- Stevens, S.W. et al., 2002. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Molecular cell*, 9(1), pp.31–44.

- Storici, F., Lewis, L.K. & Resnick, M.A., 2001. *In vivo* site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature biotechnology*, 19(8), pp.773–6.
- Storici, F. & Resnick, M.A., 2006. The Delitto Perfetto Approach to In Vivo Site-Directed Mutagenesis and Chromosome Rearrangements with Synthetic Oligonucleotides in Yeast. *Methods in Enzymology*, 409(1976), pp.329–345.
- Strahl, B.D. et al., 2002. Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Molecular and cellular biology*, 22(5), pp.1298–306.
- Struhl, G., Struhl, K. & Macdonald, P.M., 1989. The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell*, 57(7), pp.1259–73.
- Struhl, K., 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & development*, 12(5), pp.599–606.
- Struhl, K. & Segal, E., 2013. Determinants of nucleosome positioning. *TL - 20. Nature structural & molecular biology*, 20 VN-r(3), pp.267–273.
- Sun, Z.-W. & Allis, C.D., 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 418(6893), pp.104–108.
- Taverna, S.D. et al., 2006. Yng1 PHD Finger Binding to H3 Trimethylated at K4 Promotes NuA3 HAT Activity at K14 of H3 and Transcription at a Subset of Targeted ORFs. *Molecular Cell*, 24(5), pp.785–796.
- Tirosh, I., Sigal, N. & Barkai, N., 2010. Widespread remodeling of mid-coding sequence nucleosomes by Isw1. *Genome biology*, 11(5), p.R49.
- Tompa, R. & Madhani, H.D., 2007. Histone H3 Lysine 36 Methylation Antagonizes Silencing in *Saccharomyces cerevisiae* Independently of the Rpd3S Histone Deacetylase Complex. *Genetics*, 175(2), pp.585–593.
- Urso, A.D. et al., 2016. Set1 / COMPASS and Mediator are repurposed to promote epigenetic transcriptional memory. 1, pp.1–29.
- Vermeulen, M. et al., 2007. Selective Anchoring of TFIID to Nucleosomes by Trimethylation of Histone H3 Lysine 4. *Cell*, 131(1), pp.58–69.
- Vlaming, H. et al., 2014. Flexibility in crosstalk between H2B ubiquitination and H3 methylation in vivo. *EMBO reports*, 15(10), pp.1077–1084.
- Walfridsson, J. et al., 2007. A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *The EMBO journal*, 26(12), pp.2868–79.
- Wallis, J.W., Hereford, L. & Grunstein, M., 1980. Histone H2B genes of yeast encode two different proteins. *Cell*, 22(3), pp.799–805.
- Wan, Y. et al., 2009. Role of the Histone Variant H2A.Z/Htz1p in TBP Recruitment, Chromatin Dynamics, and Regulated Expression of Oleate-Responsive Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 29(9), pp.2346–2358.
- Wang, A., Kurdistani, S.K. & Grunstein, M., 2002. Requirement of Hos2 Histone Deacetylase for Gene Activity in Yeast. *Science*, 298(5597), pp.1412–1414.
- Wang, X. et al., 2010. A Large Intrinsically Disordered Region in SKIP and Its Disorder-Order Transition Induced by PPIL1 Binding Revealed by NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), pp.4951–4963.
- Wang, X. & Hayes, J.J., 2008. Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Molecular and cellular biology*, 28(1), pp.227–36.
- Weake, V.M. & Workman, J.L., 2008. Review Histone Ubiquitination : Triggering Gene Activity. *Molecular Cell*, 29(6), pp.653–663.
- Weber, C.M., Ramachandran, S. & Henikoff, S., 2014. Nucleosomes Are Context-Specific, H2A.Z-Modulated Barriers to RNA Polymerase. *Molecular Cell*, 53(5), pp.819–830.
- Wood, A., Krogan, N.J., et al., 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Molecular cell*, 11(1), pp.267–74.
- Wood, A. et al., 2005. The Bur1/Bur2 Complex Is Required for Histone H2B Monoubiquitination by Rad6/Bre1 and Histone Methylation by COMPASS. *Molecular Cell*, 20(4), pp.589–599.
- Wood, A., Schneider, J., et al., 2003. The Paf1 Complex Is Essential for Histone Monoubiquitination by the Rad6-Bre1 Complex, Which Signals for Histone Methylation by

- COMPASS and Dot1p. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp.34739–34742.
- Workman, J.L. & Kingston, R.E., 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual review of biochemistry*, 67, pp.545–79.
- Workman, J.L. & Kingston, R.E., 1992. Nucleosome core displacement in vitro via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5089), pp.1780–4.
- Wyce, A. et al., 2007. H2B Ubiquitylation Acts as a Barrier to Ctk1 Nucleosomal Recruitment Prior to Removal by Ubp8 within a SAGA-Related Complex. *Molecular Cell*, 27(2), pp.275–288.
- Wysocka, J. et al., 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, 442(7098), pp.86–90.
- Wysocki, R. et al., 2005. Role of Dot1-Dependent Histone H3 Methylation in G1 and S Phase DNA Damage Checkpoint Functions of Rad9. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), pp.8430–8443.
- Xiao, T. et al., 2005. Histone H2B Ubiquitylation Is Associated with Elongating RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), pp.637–651.
- Xiao, T. et al., 2003. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes & Development*, 17(5), pp.654–663.
- Xu, C. et al., 2006. Solution Structure of Human Peptidyl Prolyl Isomerase-like Protein 1 and Insights into Its Interaction with SKIP. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), pp.15900–15908.
- Xu, F., Zhang, K. & Grunstein, M., 2005. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell*, 121(3), pp.375–385.
- Xu, H. et al., 1992. Identification of a new set of cell cycle-regulatory genes that regulate S-phase transcription of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 12(11), pp.5249–59.
- Yamashita, K., Shinohara, M. & Shinohara, A., 2004. Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), pp.11380–11385.
- Yan, C. et al., 2016. Structure of a yeast activated spliceosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 352(6291), pp.1–18.
- Yan, C. et al., 2015. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science*, 349(6253), pp.1182–1191.
- Yan, C. et al., 2017. Structure of a yeast step II catalytically activated spliceosome. *Science*, 355(6321), pp.149–155.
- Youdell, M.L. et al., 2008. Roles for Ctk1 and Spt6 in Regulating the Different Methylation States of Histone H3 Lysine 36. *Molecular and Cellular Biology*, 28(16), pp.4915–4926.
- Yuan, G. et al., 2005. Genome-Scale Identification of Nucleosome Positions in *S. Cerevisiae*. *Genome Biology*, 6(6), pp.626–631.
- Zhang, C. et al., 2001. Ternary Complexes and Cooperative Interplay between NCoA-62/Ski-interacting Protein and Steroid Receptor Coactivators in Vitamin D Receptor-mediated Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), pp.40614–40620.
- Zhang, H., Roberts, D.N. & Cairns, B.R., 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, 123(2), pp.219–31.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L. & Hayward, S.D., 2000. A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *Journal of virology*, 74(4), pp.1939–47.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L., Miyamoto, A., et al., 2000. SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function. *Molecular and cellular biology*, 20(7), pp.2400–10.
- Zlatanova, J. & Thakar, A., 2008. H2A.Z: View from the Top. *Structure*, 16(2), pp.166–179.

