

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY**  
**KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE NA TÉMA:**

**UMLČOVÁNÍ GENŮ U KVASINEK**  
**(YEAST GENE SILENCING)**

Eva Tarabová

školitel: Mgr. Martin Kuthan, PhD.

2009/2010



## Obsah

Abstrakt .....	3
1. Úvod .....	5
2. Mechanismy .....	6
2.1 Modifikace histonů.....	7
2.2 SIR proteiny .....	7
2.2.1. Vazba a šíření.....	9
2.2.2. Další funkce .....	10
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
2.4 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	12
3. Lokusy párovacího typu .....	12
3.1 Párovací typy.....	12
3.1.1. <i>MAT</i> lokus .....	12
3.1.2. Homothalismus a heterothalismus .....	13
3.2 Přepínání párovacího typu.....	13
3.3 Umlčení <i>HM</i> lokusu .....	14
3.4 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	15
4. Telomery .....	17
5. rDNA .....	19
6. Centromery .....	20
7. Uspořádání genomu uvnitř jádra .....	22
8. Izolátory a hranice šíření .....	24
8.1 Vnitřní faktory.....	24
8.2 Vnější faktory.....	25
9. Dědičnost .....	27
10. Podobnosti u vyšších eukaryot.....	28
11. Závěr .....	29
12. Seznam použité literatury .....	30



## **Abstrakt**

V každé buňce je obsažena kompletní kopie celé genetické výbavy organismu. Ovšem ne všechny geny se exprimují, u vyšších eukaryot jsou buňky diferenciovány a dochází v nich k transkripci pouze určitých proteinů. To je umožněno díky umlčování genové exprese, která je stabilní během celého buněčného cyklu a epigeneticky předávána z jedné generace buněk na další. Slouží také k udržení integrity chromozomů, souvisí se správným průběhem buněčného dělení, u kvasinek dokonce umožňuje přepínání párovacího typu a zajišťuje správnou identitu buněk. Základem je kompaktní a vysoce organizovaná struktura chromatinu nazývaná heterochromatin. Mechanismus je společný mnoha různým organismům, přestože proteiny, které umlčování zajišťují, jsou odlišné.

### **Klíčová slova:**

centromera, heterochromatin, *HM* lokus, kvasinky, rDNA, SIR proteiny, telomera, umlčování genů

## **Abstract**

Each cell contains a complete copy of the entire genetic equipment of the organism. However not all genes are expressed, cells are differentiated in higher eukaryots and only certain proteins are transcribed in each cell. This is possible thanks to a gene silencing, that is stable throughout the whole cell cycle and epigenetically inherited from one generation to another. Gene silencing serves also in the maintenance of the chromosomal integrity, it is connected with the right progression of the cell division. It even enables mating type switching and ensures right cells' identity in yeasts. The basis is compact and a higher-ordered structure of chromatin called heterochromatin. The mechanism is common to many various organisms, although the proteins, which ensure silencing, are different.

### **Key words:**

centromere, heterochromatin, *HM* locus, yeasts, rDNA, SIR proteins, telomere, gene silencing



## 1. Úvod

Geny, respektive jejich exprese, mohou být umlčeny díky speciální struktuře chromatinu, nazývanou heterochromatin. (Rusche *et al.*, 2003) Je to označení pro transkripčně neaktivní chromatin, tedy pro kompaktní interfazickou chromatinovou strukturu. (Perrod & Gasser, 2003) V různých organizmech existuje více způsobů, jak tuto strukturu vytvořit, heterochromatin je tedy obecnější pojem než umlčený chromatin. Jedním z rozdílů je, že strukturu heterochromatinu lze v buňce rozpoznat, u umlčeného chromatinu to není podmínkou. (Moazed, 2001)

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je umlčeno méně než 1% genomu (u mušky *Drosophila* více než 30%, u lidí a u myši více než 50%). Její genom je totiž velmi kompaktní, geny obsahují málo intronů a jsou od sebe vzdáleny pouze 1–2 kpb (kilopáry bazí – tisíce párů bazí). Transkripčně neaktivní část genomu je tedy poměrně menší, než u jiných organismů.

Nejběžnější dva typy heterochromatinu se nazývají fakultativní (inaktivace tkáňově specifických domén) a konstitutivní (satelitní nekódující repetice). Fakultativní heterochromatin může být specifický pro jeden nebo dva homologní chromozomy, pro určitý typ buňky nebo vývojové stádium a potlačuje v genech specifické sekvence, které jsou poměrně časté. Konstitutivní heterochromatin zůstává kondenzovaný téměř ve všech tělních buňkách organismu a většinou ovlivňuje nekódující sekvence DNA. Ty jsou obvyklé v okolí centromer a telomer a mohou epigeneticky způsobit potlačení exprese přilehlých genů, takzvaný PEV (position effect variegation). (Perrod & Gasser, 2003)

Heterochromatin byl poprvé objeven Emilem Heitzem ve dvacátých letech minulého století v buňkách hmyzu a rostlin. (Moazed, 2001) Tato část DNA je během celého buněčného cyklu vysoce kondenzovaná a špatně přístupná pro transkripční aparát. Vytvoření takové struktury chromatinu je umožněno umlčovači, které mohou být i značně vzdálené od cílového místa inhibice transkripce a nejsou tedy sekvencně závislé na konkrétním genu. Liší se tím od genově specifického potlačování transkripce, kdy je umlčen jeden určitý promotor. (Rusche *et al.*, 2003) Primární efekty umlčování však probíhají především na krátké vzdálenosti přímo na promotoru nebo v jeho blízkosti. (Pirrota & Gross, 2005)

Základní, evolučně zakonzervované vlastnosti umlčeného chromatinu jsou hypoacetylované (částečně deacetylované) histony. (Moazed, 2001) Na modifikované histony se váží umlčovací proteiny, které způsobují další modifikace histonů, čímž se tato umlčovací struktura šíří podél chromatinového vlákna. Umlčení některých genů je zásadní pro správnou

funkci a identitu jednobuněčných organismů a pro diferenciaci buněk a tkání mnohobuněčných.

Kvasinky patří mezi oblíbené a často zkoumané modelové organismy. Snadno se kultivují, rychle se množí, jejich fyziologie je již poměrně dobře prozkoumána a výsledky pokusů jsou díky jednobuněčnosti jednoduše a rychle prokazatelné. Další výhodou je určitá možnost zobecnění učiněných objevů na principy fungování a mechanismy probíhající v lidských buňkách, protože obě skupiny patří do říše *Eukarya*.

## 2. Mechanismy

Výstavba heterochromatinových domén spojuje enzymy modifikující histony s proteiny, které se na histony váží. Přestože v různých organismech jsou použity různé proteiny, mechanismus je v podstatě stejný. Dochází ke kovalentním modifikacím histonů díky umlčovacím proteinům. V *S. cerevisiae* je to komplex obsahující SIR (silent information regulator) proteiny, v mnohobuněčných a *Schizosaccharomyces pombe* komplexy obsahující protein HP1 (heterochromatin protein 1), respektive jeho homolog Swi6. (Moazed, 2001) Na specifické chromozomální domény jsou tyto komplexy navázány díky *cis* působícím regulačním sekvencím nazývaných umlčovače (silencers). Jsou to asi 150 pb (párů bazí) dlouhé elementy s vazebnými místy pro sekvencně specifické faktory, které spouští umlčování vazbou komplexu proteinů. Na lokusu určujícím párovací typ (*HM* lokus) u *S. cerevisiae* jsou to faktory Rap1, Abf1 a ORC (origin recognition complex), na telomerách Rap1 a Ku70. V jiném kontextu mohou například spustit replikaci DNA nebo přispět k aktivaci transkripce. (Pirrota & Gross, 2005) Pro udržení umlčeného stavu jsou však umlčovače nezbytné. (Rusche *et al.*, 2003)

Umlčený chromatin je díky své struktuře méně přístupný nejen pro transkripční aparát, ale také pro buněčné mechanismy způsobující rekombinaci. Přístup k umlčenému chromatinu je ale regulován, protože i tato část genomu musí být během života buňky replikována a opravována.. Dokonce i aktivátory transkripce se mohou v určité omezené fázi buněčného cyklu na umlčený chromatin navázat. V pučivých kvasinkách jako je *S. cerevisiae* jsou dokonce umlčovací i transkripční proteiny navázány současně na jeden promotor. (Moazed, 2001) Heterochromatin tedy svou strukturou neznemožní přístup RNA polymerázy II k vláknu DNA, regulace genové exprese musí následovat až v dalších krocích po navázání preiniciačního komplexu, nebo umlčovací proteiny působí přímo na promotorový komplex. (Huang, 2002; Pirrota & Gross, 2005) Silná aktivace transkripce totiž může zrušit umlčení

genu, i když jen na omezenou dobu během buněčného cyklu. Přesný mechanismus zablokování transkripce zatím není zcela jasný, ale vlastnosti umlčených domén jsou během mitózy i meiózy děděny díky tomu, že struktura chromatinu je při duplikaci chromozomů replikována. (Pirrota & Gross, 2005; Moazed, 2001)

Pro zahájení umlčování je nutný průchod S fází buněčného cyklu (replikace DNA), ale nezávisí na replikaci umlčovače. Buněčným cyklem jsou tedy zřejmě ovlivněné jiné struktury než umlčovač, důležité pro zahájení umlčování. (Rusche *et al.*, 2003)

## 2.1 Modifikace histonů

U obou druhů kvasinek dochází ke stejným modifikacím chromatinu, přestože nemají žádné shodné sekvence pro tvorbu proteinů. U *S. cerevisiae* k umlčování dochází díky komplexům obsahujícím protein genu *Sir2* (*Sir2*), u *Sch. pombe* díky komplexům obsahujícím protein *Swi6*. Ten je podobný s dalšími proteiny ve vyšších eukaryotech, ale u *S. cerevisiae* nebyla nalezena žádná podobnost. (Huang, 2002) Umlčovací mechanismus u dělivých kvasinek funguje následovně: histonová methyltransferáza *Clr4* je fyzicky propojená s proteinem *Swi6* vážícím se na histony. Navázání na histon však nejdřív vyžaduje deacetylaci, která je zajištěna *Clr3* a *Clr6* nebo *Hda1*, a až potom methylaci histonu. (Bannister *et al.*, 2001) Hyperacetylace histonů aktivuje genovou expresi, hypoacetylace ji potlačuje, umlčené části genomu jsou tedy většinou hypoacetylované. (Huang, 2002) Přesto delece genů dvou histonových deacetyláz (*hda1* a *rpd3*) zvyšuje potlačování exprese genů na *HM* lokusu, telomerách i rDNA. Je to způsobeno tím, že mutace *hda1Δ* nebo *rpd3Δ* snižuje specifickou acetylaci nukleozomů v heterochromatinu nutnou pro jeho regulaci transkripce. (Rundlett *et al.*, 1996) *SAS2* a *SAS3* (something about silencing), geny kódující dvě histonové acetyltransferázy, jsou pozitivními i negativními regulátory umlčování na *HM* lokusu. Jejich delece zvyšuje chyby při umlčování na *HML*, ale zmírňuje chyby při umlčování na *HMR* (to může být nepřímý důsledek přerušení umlčování na telomerách). Umlčování na *HML* a *HMR* je tedy rozdílné a funkce *SAS2* a *SAS3* je závislá na okolních podmínkách. *Sas4* a *Sas5* jsou funkčně spojené se *Sas2* a *Sas3* a také negativně ovlivňují umlčování na *HMR* a pozitivně na *HML* a telomerách. (Huang, 2002)

## 2.2 SIR proteiny

Jsou to základní strukturní složky umlčeného chromatinu u *S. cerevisiae*. Vází se na umlčovač nebo přímo na telomery. (Rusche *et al.*, 2003) Navázáním způsobí iniciaci umlčování, ale jsou zodpovědné také za jeho šíření podél chromatinu.

Sir1 přispívá lepší vazbě ostatních proteinů na DNA (může zastoupit nutnost ORC a Rap1), ale k umlčování nutný není a nešíří se podél vlákna chromozomu spolu s ostatními. (Rusche *et al.*, 2003) Může však hrát roli při udržování struktury umlčeného chromatinu. (Huang, 2002)

Sir2 je evolučně zakonzervován ve všech organismech od bakterií po člověka. (Rusche *et al.*, 2003) U *S. cerevisiae* je potřebný k umlčování na všech místech genomu. Obsahuje vysoce konzervativní sekvenci 200 aminokyselin, která je pro umlčování nezbytná. (Huang, 2002) Sir2 je NAD<sup>+</sup>-závislá deacetyláza (čím více NAD<sup>+</sup>, tím silnější umlčování) a na rozdíl od ostatních histonových deacetyláz není inhibovaná trichostatinem A, ale malými molekulami obsahujícími A3, M15, sirtinol a splitomicin. In vitro deacetyluje lysin 9 histonu H3 a lysin 16 histonu H4 (přednostně před ostatními; je možné, že tato deacetylace pro šíření SIR proteinů stačí), in vivo deacetyluje všechny lysiny histonů H3 a H4. (Rusche *et al.*, 2003) Deacetylace probíhá díky hydrolýze NAD<sup>+</sup>, čímž vzniká nikotinamid, jehož zvýšená koncentrace ovlivňuje aktivitu Sir2 a také tvorbu komplexu Sir2-Sir4. (Tanny & Moazed, 2000) Pro umlčování je naprosto nezbytná, ale není zaměřena pouze na histony, jelikož delece genu *SIR2* příliš nemění celkovou míru jejich acetylace. (Smith *et al.*, 2000) Sir2 tvoří komplex se Sir4, který má právě NAD<sup>+</sup>-závislou histon-deacetylázovou aktivitu, a také komplex s Net1, který má převážně NAD<sup>+</sup>-nezávislou histon-deacetylázovou aktivitu. U *S. cerevisiae* má Sir2 čtyři homology: Hst1, Hst2, Hst3 a Hst4. Protein Hst1 reguluje strukturu chromatinu. Delece *HST1* sice neovlivňuje umlčování na žádném místě, ale zvýšená exprese tohoto genu tlumí chyby umlčování způsobené delecí *SIR2*. Hst1 je tedy důležitý při umlčování zprostředkovaném proteinem Sum1, kde se nevyskytuje Sir2. Hst2 je hlavní histonovou deacetylázou. K žádnému umlčování není nezbytný, nicméně zvýšená exprese genu *HST2* posílí umlčování rDNA a sníží umlčování na telomerách. Hst2 je totiž jaderný protein (na rozdíl od Hst1, který je cytoplazmatickým proteinem) a může tedy se Sir2 sdílet ligand nutný k umlčování na telomerách. Při zvýšené expresi *HST2* je tento ligand pro Sir2 málo dostupný, Sir2 se tedy uvolní od telomer do jaderka, čímž se sníží umlčování na telomerách a zvýší umlčování rDNA. Tyto homology mohou mít ovšem i jinou funkci než má Sir2. (Huang, 2002)

Sir3 má zřejmě pouze strukturní funkci a nevyskytuje se ani v jednom z komplexů obsahujících navázaný Sir2. (Rusche *et al.*, 2003; Huang, 2002)

Sir4 také nemá žádnou enzymatickou funkci, ale pouze strukturní. Asociuje s jaderným obalem, čímž sem poutá umlčený chromatin. Při přepínání párovacího typu zpřístupňuje

umlčený chromatin na *HM* lokusu pro rekombinaci díky vazbě s Dis1/Ris1. Také interaguje s ubiquitinovými hydrolázami, čímž poukazuje na zřejmou funkci ubiquitinu pro stabilizaci a regulaci aktivity Sir4.

Sir3p a Sir4p navíc oba stabilizují vazbu celého SIR komplexu na nukleozomy. (Rusche *et al.*, 2003) Mohou hrát další role při tvorbě vysoce organizovaných struktur kotvících umlčený chromatin na okraji jádra. To vyžaduje Ku70 nebo Esc1 interagující se Sir4, ovšem ani jeden z nich není pro umlčování nezbytný. (Pirrota & Gross, 2005)

Žádný ze SIR proteinů není nezbytný k životu buňky, ale delece na genech *SIR2*, *SIR3* nebo *SIR4* zcela zruší umlčování. Poškození genu *SIR1* jen částečně zmírní umlčování, protože Sir1 není nezbytně nutný k umlčování, napomáhá pouze navázání ostatních SIR proteinů na umlčovač. Sir1 může také být nahrazen zvýšenou expresí genu *ECS2* (establishment of silent chromatin 2), jehož protein (Ecs2) rekrutuje nebo případně stabilizuje SIR proteiny na vláknu umlčeného chromatinu. (Huang, 2002)

### 2.2.1. Vazba a šíření

Sir1 interaguje s umlčovačem nebo přímo se specifickou sekvencí na telomeře i bez přítomnosti dalších SIR proteinů. Sir4 se k místu iniciace umlčování naváže díky své afinitě k Sir1 a také k Rap1, který je navázaný na umlčovač. (Rusche *et al.*, 2003) Umožní také vazbu Sir2 díky tvorbě heterokomplexu Sir2-Sir4. Sir2 pak deacetyluje sousední nukleozom, což umožní vazbu dalšího Sir4 a také Sir3 díky jejich interakcím s deacetylovanými N-konci histonů H3 a H4. (Rusche *et al.*, 2003; Pirrota & Gross, 2005) Přesná funkce Sir3 zatím není známá, ale zřejmě upevňuje stabilitu histonových modifikací a vazby ostatních součástí SIR komplexu. Váže se také na Abf1, který asociuje s umlčovačem i protoumlčovačem (od místa umlčování je vzdálenější než umlčovač, samostatně umlčování nezpůsobí, ale pokud spolupracuje s umlčovačem, společně působí mnohem silněji (Bi, 2002)). Tvorba heterokomplexu Sir2-Sir4 zapříčiní vazbu dalšího Sir2, který opět deacetyluje sousední nukleozom, a tak dále. (Rusche *et al.*, 2003) Šíření je kontinuální, ale může být přerušeno navázáním katalyticky neaktivního Sir2, nebo také promotory RNA polymerázy II a III a vazbou aktivátorů přijímajících obecné transkripční faktory (general transcriptional factors – GTFs) a koaktivátory. (Rusche *et al.*, 2003; Pirrota & Gross, 2005) Také acetylace histonů H3 a H4, nebo vazba proteinů, které brání deacetylaci, histonová varianta Htz1 (v jiných organismech než kvasinkách nazývána H2A.Z) místo H2A, nebo methylace histonu H3 působí proti šíření SIR komplexu po chromozomu. Enzymy Set1, Dot1 a Sas2 methylující H3

jsou neustále potřeba pro ochranu euchromatinu před navázáním SIR proteinů. (Pirrota & Gross, 2005)

### 2.2.2. Další funkce

SIR proteiny působí také například při zabraňování vystřihnutí *HO* (homothalism) genu na lokusech *HMR* a *HML*, zabraňování tvorby extrachromozomální kruhové rDNA (ERC), která souvisí se stárnutím buňky, a při zabraňování spojování nehomologních konců na telomerách. (Pirrota & Gross, 2005)

Starší buňky *S. cerevisiae* jsou větší a méně pučí v důsledku ztráty umlčení *HM* lokusu. Pozdější dcery mají kratší životnost, protože dědí více stárnoucího faktoru od matky, jímž je právě ERC, která se ve starších buňkách hromadí. Rychlost tvorby ERC je ovlivněna koncentrací a katalytickou aktivitou Sir2. (Rusche *et al.*, 2003) Ten snižuje tvorbu ERC přímým tlumením homologní rekombinace na repetičích rDNA a nepřímo také potlačením transkripce *HM* lokusu (spolu se Sir3 a Sir4). Sir3 a Sir4 jsou ale ve starších buňkách přesunuty z telomer do jadérka, což snižuje umlčování *HM* lokusu. Při ztrátě tohoto umlčení pak dochází k expresi genů *a* i *α*, což zvýší rekombinaci repetice rDNA a tedy i tvorbu ERC. (Huang, 2002) Stárnutí ale nesouvisí jen s hromaděním ERC. (Rusche *et al.*, 2003)

SIR proteiny jsou také součástí mechanismu na opravu dvouvláknových zlomů DNA. Komplex Ku a SIR proteinů nahromaděný u telomer se přesune ke zlomu (snižuje se umlčování telomer) a usnadní párování nehomologních konců poškozené DNA vytvořením umlčené chromatinové struktury v místě zlomu.

Sir2 je, spolu s dalšími proteiny (např. Pch2), důležitý také pro meiotický kontrolní bod ve fázi pachytene (správná tvorba synaptonemálního komplexu, který drží pohromadě chromozomy při prvním dělení meiózy). Při normálním průběhu meiózy nejsou tyto proteiny potřeba, ale jsou nezbytné pro zastavení meiózy v tomto kontrolním bodě. Nacházejí se především v jádře, přičemž lokalizace Pch2, která je důležitá pro kontrolní funkci, je závislá na lokalizaci Sir2. Ta je zase závislá na jaderném proteinu Dot1, který je zahrnutý v pachyténním kontrolním bodě a *HM* a telomerickém umlčování.

Umlčování transkripce není jediný mechanismus v buňce, který je závislý na potlačeném nebo umlčeném chromatinu. Mezi další patří například rekombinace, udržení a oddělování chromozomů, organizace jádra a zřejmě i opravy DNA. Tedy většina proteinů, které modulují strukturu chromatinu také regulují umlčování. (Huang, 2002)

### 2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Množství SIR proteinů v buňce je limitované a všechna tři umlčená místa (*HM* lokusy, telomery a oblast rDNA) o ně soutěží, neboť lokální koncentrace i stechiometrie SIR proteinů v SIR komplexu určuje efektivitu umlčování. Na *HMR* jsou SIR proteiny rekrutovány Rap1, Abf1 a ORC, na telomerách Ku a Rap1 a na rDNA Net1. (Huang, 2002) Na telomerách je limitující především koncentrace Sir3, protože zvýšená exprese *SIR3* prodlužuje umlčování telomer o 4–20 kilopárů bází (kpb). (Hecht *et al.*, 1996) Mutace *rap1-12* snižuje umlčování na *HMR* lokusu a zvyšuje umlčování telomer, Rap1 tedy zřejmě reguluje množství SIR proteinů na telomerách. (Marcand *et al.*, 1996) Pro umlčování rDNA je limitující obsah Sir2. Zvýšená exprese *SIR2*, nebo defekty genů *SIR3* a *SIR4* zlepšují toto umlčování. Zvýšená exprese *SIR4* a N-koncové aminokyseliny 214 na Sir3 zvyšuje umlčování na telomerách a snižuje umlčování rDNA. (Smith *et al.*, 1998) Exprese Sir4 zkráceného na C-konci podporuje umlčování rDNA a brání umlčování na *HM* lokusech a telomerách, tedy Sir3 a Sir4 jsou z okraje jádra relokalizovány do jadérka, což je alespoň částečně zprostředkováno také Sir2. Sir1 zprostředkovává relokalizaci SIR proteinů z telomer na *HM* lokus, tedy snižuje umlčování na telomerách. (Huang, 2002)

Na *HM* lokusech a telomerách jsou pro umlčování důležité N-konce histonů H3 a H4, pro umlčování rDNA jsou důležité histony H2A a H2B. Delece histonových genů *HTA1-HTB1* sníží obsah H2A-H2B v buňce, čímž lokálně rozruší strukturu chromatinu a tím ukončí umlčování rDNA. (Huang, 2002) Varianta H2A (Htz1) je také nutná k umlčování na *HM* lokusu a telomerách. *HMR* lokus zřejmě upřednostňuje Htz1, protože zvýšená exprese *HTZ1* posílí toto umlčování. (Dhillon & Kamakaka, 2000)

Na výstavbě chromatinu se podílí například CAF-I (chromatin assembly factor I), který zprostředkovává vazbu 146 párů bází DNA a histonů dohromady tvořících nukleozom. Je to komplex tří podjednotek kódovaných třemi geny: *CAC1*, *CAC2* a *CAC3*. (Sharp *et al.*, 2001) Delece kteréhokoli z nich sníží umlčování na *HM* lokusech, telomerách i rDNA, protože umlčený stav chromatinu nemůže být udržen. Exprese histonových genů je kontrolována regulátory histonů (Hir proteiny). Delece *HIR* genů obnovují umlčování na *HM* lokusu a telomerách v *cacΔ* buňkách.

Regulace transkripce je zprostředkována také SET-doménovými proteiny. Set1 je regulátor struktury chromatinu, oprav DNA a funkce telomer. Mutace *SET1* zmírňuje umlčování na telomerách a zlepšuje opravnou funkci buněk po poškození DNA snížením umlčení opravných genů. (Huang, 2002)

## 2.4 *Schizosaccharomyces pombe*

U *Sch. pombe* se nacházejí nejrůznější homology SIR proteinů: např. spSir2, spHst2 a spHst4, který je sekvenčně nejbližší a funkčně spojený s Hst3 a Hst4 proteiny *S. cerevisiae*. Zvýšená exprese genu *spHst4* buňku ochrání před zvýšenou citlivostí na teplotu a chybami v umlčování způsobenými delecí *HST3* a *HST4*. spHst4, stejně jako Hst4, je koncentrován v jadérku, oba udržují strukturu a celistvost chromatinu. Organismy s mutací *spHst4* vykazují fenotypy shodné s mutanty *hst3* a *hst4* u *S. cerevisiae*, které se vyznačují růstovými a morfologickými chybami (k těm u mutantů *clr4*, *clr6*, *rik1* a *swi6* nedochází). (Freeman-Cook *et al.*, 1999; Huang, 2002) *spHst4* je mimo jiné důležitý pro funkci centromer a delece tohoto genu ovlivňuje umlčování na centromerách, telomerách i lokusech určujících párovací typ. Jeho mutace dále vede ke ztrátám chromozomů, roztříštění DNA a zvýšené citlivosti na látky destabilizující mikrotubuly (např. thiabendazol). V některých oblastech genomu interaguje s dalšími faktory, někde funguje zcela samostatně. (Huang, 2002)

## 3. Lokusy párovacího typu

### 3.1 Párovací typy

#### 3.1.1. *MAT* lokus

Párovací typ kvasinky je určen alelami jediného lokusu *MAT* (mating type) kódujícího proteiny, které řídí geny pro párovací feromony, receptory feromonů a další efekторы regulující typ buňky. *S. cerevisiae* může existovat v haploidním i diploidním stavu. Haploidní buňky exprimují jeden ze dvou párovacích typů **a** nebo  $\alpha$  (mají buď alelu *MATa*, nebo *MAT $\alpha$* ). Párují se s haploidními buňkami opačného typu a splynou v diploidní **a/a** buňku (má obě alely). Všechny tři typy buněk se mohou mitoticky dělit, u diploidních buněk může dojít také k meióze a vzniku čtyř haploidních askospor. (Montelone, 2002)

Sterilní mutanti ukázali, že na *MAT $\alpha$*  lokusu existují dva geny, na *MATa* nebyly nalezeny žádné mutace ovlivňující schopnost párování, změny se projeví až u diploidních buněk. Produkty *MATa1*, *MAT $\alpha$ 1* a *MAT $\alpha$ 2* jsou transkripční faktory, které regulují expresi genů dávajících různým typům buněk (**a**,  $\alpha$ , **a/a**) jejich specifické vlastnosti. (Strathern *et al.*, 1979) V  $\alpha$  buňkách *Mata1* asociuje s proteinem Mcm1 a tvoří aktivátor  $\alpha$ -specifických genů, *Mata2* také asociuje s Mcm1 a tvoří represor **a**-specifických genů a v **a** buňkách, kde *Mata1* ani *Mata2* není přítomen, se **a**-specifické geny exprimují (díky Mcm1). Tyto specifické geny kódují v haploidních buňkách produkty důležité pro párování. V diploidních buňkách vzniká

$\text{Mat}\alpha 1$ - $\text{Mat}\alpha 2$  dimer, který potlačuje specifické geny haploidních buněk včetně *RME1* (repressor of meiosis). Nedochozí tedy k párování, ale může proběhnout meióza.

Jednou z reakcí buňky na feromony opačného párovacího typu je zastavení buněčného cyklu v pozdní G1 fázi v úseku zvaném START, předcházejícímu replikaci DNA. Bez tohoto zastavení by k párování vůbec nedošlo. Buněčný cyklus je tedy ovlivněn transkripcí genů souvisejících s párováním, což ovšem platí i naopak. (Montelone, 2002)

### 3.1.2. Homothalismus a heterothalismus

Kvasinky se podle formy sexuálního rozmnožování dělí na dvě skupiny. Homothalické kmeny se po sporulaci vyskytují v haploidním stavu pouze dočasně, protože haploidní buňky přepínají svůj párovací typ a ihned konjugují. Buňky heterothalických kmenů nejsou schopny přepínání párovacího typu, takže se mohou stabilně vyskytovat i v haploidním stavu. Tento rozdíl mezi kmeny je důsledkem mutace jediného genu *HO*. Dominantní alela je odpovědná za homothalismus, kmeny s recesivní alelou jsou heterothalické. (Montelone, 2002)

Díky poznatkům získaným studiem změn párovacího typu u buněk *S. cerevisiae* byl vytvořen tak zvaný „kasetový model“ přepínání párovacího typu. *HM* lokusy (*HML* a *HMR*) obsahují umlčené kopie informace o párovacím typu, která je také přítomna na exprimovaném *MAT* lokusu. V homothalickém kmenu je informace zkopírovaná z „úschovného“ *HM* lokusu do „přehrávacího“ *MAT* lokusu. Pokud je  $\alpha$  informace nahrazena  $a$  informací, nebo naopak, párovací typ se přepne a buňka se může párovat s jinou nepřepnutou buňkou původně odvozenou od stejné homothalické spory. (Strathern *et al.*, 1979)

## 3.2 Přepínání párovacího typu

K přepínání dochází vždy ob generaci. Mateřská buňka projde jedním buněčným cyklem a vypučí z ní jedna dceřinná buňka. Po oddělení mateřská buňka přepne párovací typ a její další dceřinná buňka má opačný párovací typ než předchozí. (Montelone, 2002) Gen *HO* je zapnutý pouze v mateřské buňce a pouze v G1 fázi buněčného cyklu. Regulace probíhá díky *SWI* genům a také díky speciální struktuře chromatinu v místě *HO* genu. Gen *SWI5* kóduje transkripční faktor nutný pro navázání dalších elementů umožňujících expresi *HO*. (Gkikopoulos *et al.*, 2009; Montelone, 2002) Tento mechanismus nebyl u kvasinek objeven nikde jinde než při přepínání párovacího typu, ovšem uplatňuje se při vývoji savčích embryí.

K přepnutí párovacího typu tedy dochází následujícím způsobem: *HO* kóduje místně specifickou endonukleázu, která způsobuje dvouvláknový zlom DNA na *MAT* lokusu

a následnou rekombinaci. Vyštěpí 24 pb dlouhý úsek nechávajíc 4 pb dlouhý přesahující 3' konec. Funguje tedy podobně jako bakteriální endonukleázy. Mutace tohoto úseku zabrání jeho vyštěpení a následnému přepnutí párovacího typu. Buňka pomocí homologní rekombinace opraví zlom použitím jedné umlčené kopie informace o párovacím typu uložené na *HM* lokusu (*HML* nebo *HMR*). (Montelone, 2002)

### 3.3 Umlčení *HM* lokusu

Umlčování lokusů souvisejících s párováním je pro schopnost párování nezbytné. Pokud není *HM* lokus umlčen, exprimují se obě párovací informace a haploidní buňka má najednou vlastnosti nepárující se diploidní buňky. Umlčování probíhá podobně jako na telomerách nebo centromerách daného druhu kvasinky. U *S. cerevisiae* je potřeba protein Rap1 a SIR proteiny, u *Sch. pombe* proteiny Clr4, Clr6, Rik1 a Swi6. (Perrod & Gasser, 2003) Jsou zde přítomny specifické *cis* aktivní sekvence DNA nazývané umlčovače E a I, dlouhé méně než 250 pb. (Montelone, 2002; Perrod & Gasser, 2003) Závisí na nich výstavba a udržení potlačeného stavu *HM* lokusu. Jsou složeny ze specifické kombinace alespoň dvou ze tří možných vazebných míst pro *trans* aktivní faktory Rap1 (aktivační protein), ORC (origin recognition complex, represor) a Abf1, které působí jako protoumlčovače a umožní navázání umlčovacích proteinů. (Huang, 2002; Perrod & Gasser, 2003)

Umlčení *HM* lokusů je mnohem robustnější než umlčení telomer. *HML* je ovlivněn pouze mutacemi histonu H4 a *HMR* nevyžaduje modifikovaný N-konec histonů H3 ani H4. Navíc je jen mírně ovlivněn množstvím dostupných SIR proteinů. Je to možné díky nadbytečnosti míry umlčení a v případě oslabení (např. mutací genu některého umlčovacího proteinu) to neplatí. (Perrod & Gasser, 2003) Umlčení je také citlivé na vnější podmínky. (Rusche *et al.*, 2003) Jedna mutace umlčovače E umlčování neovlivní, kombinace více mutací má však velké důsledky. (Huang, 2002) Síla umlčení s rostoucí vzdáleností od umlčovače klesá, takže čím blíže je promotor místu vzniku umlčování, tím je jeho potlačení efektivnější. *HM* lokusy jsou lemovány dvěma umlčovači, přestože jeden na umlčení blízkého promotoru stačí. Navíc tři ze čtyř umlčovačů váží všechny tři faktory, Rap1, Abf1 i ORC komplex, přestože jakékoli dva jsou ve vhodném kontextu pro vazbu SIR proteinů postačující. *HM* lokusy jsou ke všemu umístěny blízko telomer, což také zvyšuje efektivitu umlčení (je zde větší koncentrace SIR proteinů). Nicméně i přes svou robustnost je heterochromatin

na *HM* lokusech dynamickou strukturou neustále vyžadující SIR proteiny a vážící iniciační komplexy umlčování na umlčovače v dělicích se i nedělicích se buňkách. (Perrod & Gasser, 2003)

U *S. cerevisiae* je umlčování *HM* lokusu je ovlivněno také proteiny Sum1, Mga2 a Spt2p. Sum1 (suppressor of *mat* or *sir*) byl původně určen jako supresor chyb při párování způsobených delecí genu *SIR2*. Váže DNA a potlačuje expresi meiotických genů potřebných pro sporulaci. Mutace na *SUM1-1* (jedna z alel genu *Sum1*) tlumí chyby umlčování způsobené delecí na *SIR2*, *SIR3* a *SIR4*, specifickou mutací *RAP1*, mutacemi na N-koncích histonů H3 a H4 a mutacemi v umlčovači E, důležitými pro vazbu Abf1, Rap1 a Orc1. Tato mutace zvýší afinitu Sum1 k ORC, ten pak na *HM* lokus váže Sum1-1, čímž zahájí umlčování. Je potřeba protein Hst1 (homolog Sir2). Mga2 a Spt2 jsou transkripční faktory regulující strukturu chromatinu. Delece jejich genů zvýší efektivitu umlčování řízeného *SUM1-1* a tlumí chyby umlčování způsobené delecí *SIR1* nebo mutací umlčovače na *HMR* lokusu. (Huang, 2002; Chi & Shore, 1996)

### **3.4 *Schizosaccharomyces pombe***

U *Sch. pombe* je párovací typ určen velmi podobným způsobem jako u *S. cerevisiae*. Konkrétní oblast genomu zahrnuje tři lokusy: *mat1*, *mat2-P* a *mat3-M*. Mezi *mat1* a *mat2-P* je 15 kpb dlouhá L oblast a mezi *mat2-P* a *mat3-M* je 11 kpb dlouhá K oblast. Je to tedy mnohem větší část genomu než u *S. cerevisiae*. (Huang, 2002) Oblast *mat2-P-K-mat3-M* je ohraničená dvěma elementy: 2 kpb dlouhými inverzními repeticemi IR-L a IR-R, které vymezují potlačení genové exprese. V K oblasti navíc byla objevena sekvence homologní s otr repeticemi v centromerách. Ta zakládá umlčování lokusu určujícího párovací typ díky přednostní vazbě Clr4. Pro umlčení, stejně jako na centromerách, je potřeba methylace histonu H3 a přítomnost Swi6 (pro šíření methylace H3). Na rozdíl od centromer je však RNAi mechanismus (viz kapitolu 6) potřebný pouze k výstavbě a ne k udržení umlčeného stavu. (Perrod & Gasser, 2003)

Párovací typ je určen přítomností informace Plus (P), nebo Mínus (M) na lokusu *mat1*. *mat2-P* a *mat3-M* jsou dárci informace během přepínání pohlaví, normálně jsou udržovány umlčené. Spolu s K oblastí, která kontroluje směr a nenáhodnost přepínání pohlaví, se navíc při meióze nerekombinují. (Huang, 2002) V celé oblasti určující pohlaví se vyskytují tři *cis* aktivní elementy, které spolu s produkty dalších genů ovlivňují umlčování na lokusu poskytujícím informaci o konkrétním pohlaví. Už jediná delece v těchto elementech způsobí

ztrátu umlčení. Jeden z elementů (RE-II) působí jako protoumlčovač: spolu s dalším elementem (homologie s *dg* a *dh* sekvencemi centromer v K oblasti) zvýší stabilitu umlčování. (Ekwall *et al.*, 1991; Huang, 2002)

Meiotické rekombinaci brání spolu s těmito *cis* elementy také *trans* faktory. Clr6 a Clr3 (cryptic loci regulator) jsou histonové deacetylázy (deacetylují histon H3), Clr4 a Swi6 jsou chromodoménové proteiny. (Huang, 2002) Clr4 obsahuje SET doménu, která je součástí SU(VAR)3-9 proteinové rodiny (ta obsahuje lidský, myší i drozofilí typ proteinu). Jsou to methyltransferázy a methylují histon H3, čímž vytvářejí vazebná místa pro proteiny asociované s heterochromatinem (např. HP1). Clr4 tedy kontroluje výstavbu umlčeného chromatinu na *mat2-P* a *mat3-M* lokusech a také na centromerách. Ovlivňuje směr přepínání pohlaví. (Ivanova *et al.*, 1998) Swi6 je výrazně homologický s proteiny asociovanými s chromatinem, jako např. drozofilí HP1 nebo Polycomb proteiny, které se podílí na výstavbě neaktivního chromatinu na telomerách. Je lokalizován na *mat2-P*, *mat3-M*, telomerách i centromerách, ale je k tomu potřeba Clr4. (Huang, 2002) Je důležitý pro dědičnost umlčování na *mat2-P* a *mat3-M* lokusech během mitózy a meiózy a také reguluje efektivitu při přepínání pohlaví. (Huang, 2002; Nakayama *et al.*, 2000) Mutace faktoru Rik1 zcela zruší metylaci histonu H3 a lokalizaci Swi6 na *mat2-P*, *mat3-M* i na centromerách. Rik1 může sloužit jako přenašeč Swi6 a Clr4 (a jiných proteinů vážících umlčený chromatin nebo modifikujících histony) k umlčenému chromatinu. Dalším *trans* faktorem je Chp2. Je to chromodoménový protein vysoce homologní se Swi6 a na umlčování se podílí na mnoha místech genomu buňky. Pro efektivitu přepínání pohlaví u *Sch. pombe* však není zcela nezbytný. Další histonovou deacetylázou (mimo Clr6 a Clr3) je Hda1. Je z 52% podobný Rdp3 u *S. cerevisiae* a z 58% lidskému HDAC1. Odstranění genu *hda1* zvýší umlčování na všech místech chromozomu, delece vede k částečné inhibici buněčného růstu. Hda1 reguluje expresi některých genů, jejichž produkty se účastní meiózy, čímž se podílí na kontrole jejích počátečních fází. (Huang, 2002)

## 4. Telomery

Telomery stabilizují konce lineárních chromozomů. Pokud by se replikovaly pouze běžnou DNA polymerázou, docházelo by ke ztrátě genetické informace. Většina eukaryotických organismů řeší tento problém pomocí telomerázy, která je sama sobě templátem a prodlužuje TG (thymin, guanin) bohatý úsek telomery. Telomery neochraňují chromozom pouze před ztrátou důležitých sekvencí DNA, ale také před spojováním volných konců a degradací jednotlivých chromozomů, což by jinak vedlo k nestabilitě celého genomu. Paradoxně, telomery pro své zachování využívají některé mechanismy sloužící právě k nehomolognímu spojování vnitřních dvouvláknových zlomů DNA (tedy volných, k sobě ne zcela patřících konců chromozomu). Na telomerách ovšem pouze usnadňují funkci telomerázy spíš než aby způsobovali rekombinaci jako u oprav zlomů.

U kvasinek jsou koncové TG bohaté repetice nepravidelné a přesahují pouze 300 pb, přestože spojují další subtelomerické motivy. (Perrod & Gasser, 2003) Tato část DNA tvoří spolu s komplexem proteinů zvláštní strukturu bez nukleozomů nazývanou telosom. (Wiley & Zakian, 1994) Ukázalo se, že nedílnou součástí telosomu jsou SIR proteiny. (Huang, 2002)

Pokud se telomery nereplikují, pak se přehýbají, což může usnadnit umlčení přilehlých promotorů. (Perrod & Gasser, 2003) V některých organismech, včetně lidí, tedy dochází k telomerickému pozičnímu efektu (TPE), čímž jsou umlčeny některé geny v blízkosti telomer. (Huang, 2002) Rap1 a Ku heterodimer vážící se na TG bohaté sekvence se váží i na umlčené subtelomerické nukleozomy vzdálené několik kpb od TG repetice. Mohlo by to být vysvětleno *trans* interakcemi telomer ve shluku na okraji jádra, kde jsou ukotveny, ale současné studie ukazují, že k ohybům dochází na základě protein-protein interakcí probíhajících Sir3 závislým *cis* způsobem. (Perrod & Gasser, 2003)

Umlčování na telomerách je podobné jako na *HM* lokusech, ale značně se liší od umlčování na centromerách. (Perrod & Gasser, 2003; Rusche *et al.*, 2003) Neslouží však jen k potlačení transkripce genů kódovaných na telomerách, ale také k zachování délky telomer dostatečné pro stabilizaci konce chromozomu. (Moazed, 2001) Umlčovací proteiny dokonce původně mohli mít funkci pouze pro udržení stability a délky konců chromozomů a umlčování na telomerách může být až druhotný efekt. Delece *SIR3* nebo *SIR4* totiž způsobuje zkracování telomer a nestabilitu mitotických chromozomů. (Huang, 2002)

Umlčování závisí na délce telomery, je citlivější na změny v množství umlčovacích proteinů než v případě *HM* lokusu a může být nestabilní díky mutacím ovlivňujícím acetylaci

a metylaci genomu. (Huang, 2002; Pirrota & Gross, 2005) Na telomerách je tedy více vazebných míst pro Rap1 (váže se na TG repetice), který rekrutuje proteiny SIR komplexu (především Sir3 a Sir4) a tím katalyzuje první krok pro šíření umlčování. (Huang, 2002; Perrod & Gasser, 2003) Vazba Sir4 na C<sub>1-3</sub>A/TG<sub>1-3</sub> úseky DNA (TG bohaté sekvence) je na Sir3 nezávislá, ale může jím být stabilizována. Naopak vazba Sir2 je na Sir3 závislá. SIR proteiny jsou nejdříve navázány na DNA, teprve potom se šíří po nukleozomech a vytváří strukturu umlčeného chromatinu telomer. (Bourns *et al.*, 1998) Šíření je závislé na celistvosti SIR komplexu, NAD<sup>+</sup>-závislé deacetylázové aktivitě Sir2 a na deacetylaci N-konců histonů H3 a H4. Celý proces umlčování probíhá následovně: Rap1 se naváže na TG repetice, rekrutuje Sir4, který následně naváže Sir2, čímž stabilizuje Rap1-Sir3 interakci. Nakonec se celý SIR komplex šíří po chromozomu od telomer směrem ke středu díky afinitě Sir3 a Sir4 k hypoacetylovaným koncům histonů.

Se zvětšující se vzdáleností od telomery intenzita umlčení klesá. Rozsah je však jiný než by napovídala tato závislost. Například subtelomerické Y elementy jsou proti umlčování zcela resistantní, ale X elementy, které se nacházejí ještě blíže středu chromozomu mohou být opětovně umlčeny díky protoumlčovačům. (Perrod & Gasser, 2003) Y elementy jsou totiž lemované izolátory nebo bariérami (STARs – subtelomeric anti-silencing regions), které umlčování brání. Je tedy diskontinuální s maximální intenzitou okolo protoumlčovačů uvnitř X elementu a šířící se směrem do středu s klesající účinností na vzdálenost asi 3 kpb. (Huang, 2002; Perrod & Gasser, 2003) Šíření se zcela zastaví kvůli působení histonové acetylázy nazývané Sas2, deacetylace pomocí Sir2 je tedy pro šíření nezbytná. Naopak ztráta funkce Sas2 umožní zvýšení vazby proteinu Sir3 a tím umlčování genové exprese dál od telomer. (Kimura *et al.*, 2002) O vazbu na Rap1 soutěží Sir3 s Rif1 a Rif2 (Rap1 interacting factors 1 and 2), které fungují jako negativní regulátory umlčování a prodlužování telomer. Proti těmto negativním regulátorům působí protein Ku. Ten je nutný k umlčování telomer a může hrát roli ve vazbě SIR proteinů. (Mishra & Shore, 1999) Struktura umlčení není všude stejná. Vnitřní obsahuje všechny SIR proteiny, vnější pouze Sir3. Orc1, Abf1 a Sir1 nejsou k umlčování na telomerách vyžadovány, ale jejich vazebná místa byla nalezena uvnitř X elementu.

Telomery *Sch. pombe* se skládají z následných repetit dlohých asi 300 pb bohatých na guanin. *Cis* a *trans* faktory působící při jejich umlčování nejsou dobře známé, ovšem bylo objeveno, že k nim jsou připojené Taz1 proteiny patřící do TRF proteinové rodiny. Tyto proteiny mají dvě domény: homologní s TRF (TRFH) a podobnou Myb. Sice negativně

ovlivňují délku telomer, ale tlumí jejich rekombinaci. Jsou nutné pro správné seskupení telomer na pólu dělicího vřeténka, což je zásadní pro pohyb jádra vedený telomerami (kvasinky nemají centrioly), správné oddělení chromozomů a rekombinaci během meiotické profáze. (Huang, 2002)

Potlačení exprese genů na místech telomer je u *Sch. pombe* ovlivněno také produkty genů *rat1*, *lot2*, *lot3* a *rap1*. Mutace *lot2* a *taz1* způsobí, že telomery nejsou spojeny s vřeténkem pólového tělíska. (Perrod & Gasser, 2003)

## 5. rDNA

Je to zkratka pro ribozomální DNA, neboli oblast genů pro rRNA a kódujících 35S a 5S RNA prekuzory. Vyskytuje se v tandemovém repetičích ve 100–200 kopiích oddělených mezigenovými vložkami (integenic spacers – IGS) na jednom nebo více místech chromozomu XII tvořících dohromady jadérko. (Huang, 2002; Perrod & Gasser, 2003; Moazed, 2001) Jsou to jedny z nejvíce transkribovaných genů, přesto udržují propojení s heterochromatinem. Geny ovlivněné RPE (rDNA position effect) vykazují vysoký stupeň proměnlivé a dědičně nestabilní exprese. Transkripce rDNA genů je zprostředkována RNA polymerázou I, je tedy možné, že umlčení blokuje přístup pro RNA polymerázu II, ale ne pro RNA polymerázu I. (Perrod & Gasser, 2003; Moazed, 2001)

V kvasinkách je stabilita a exprese rDNA regulována chromatinovou strukturou vkládající nukleozomy po celé doméně rDNA, čímž znepřístupňuje promotorové oblasti pro transkripci. (Perrod & Gasser, 2003) Pro její vytvoření je potřeba RENT komplex (regulator of nuclear silencing and telophase exit), který obsahuje minimálně tři komponenty: Sir2, Net1 (nucleolar establishing factor and telophase regulator 1) a Cdc14 (proteinová fosfatáza). (Huang, 2002) Sir1, Sir3 a Sir4 nejsou k umlčování rDNA potřebné, v tomto případě jsou pro šíření použity jiné proteiny. (Huang, 2002; Rusche *et al.*, 2003) Sir4 ale reguluje efektivnost umlčování rozdělením obsahu Sir2 v buňce mezi telomery a rDNA. Většinu lokalizuje do jadérka, na telomery jen malou část. Protein Net1 také rekrutuje Sir2 do jadérka (ovšem nebyly objeveny žádné části vážící se na DNA), stimuluje transkripci RNA polymerázou I její vazbou v jadérku, reguluje strukturu jadérka a navíc reguluje buněčný cyklus udržováním Cdc14 uvnitř jadérka až do anafáze. Uvolněný Cdc14 totiž defosforyluje jaderné a cytoplazmatické regulátory aktivity spouštěčů anafáze, čímž je zničí. (Huang, 2002) RENT komplex ale dohromady obsahuje osm proteinů a má jen slabou NAD<sup>+</sup>-závislou, zato velmi silnou NAD<sup>+</sup>-nezávislou deacetylázovou aktivitu díky deacetylázám Hos1 a Hos2

(HDA one similar 1 and 2). (Perrod & Gasser, 2003; Rundlett *et al.*, 1996) Narušení těchto enzymů vede k silné hyperacetylaci histonu H4 na rDNA, zato delece *sir2* nezpůsobuje v acetylaci drastické změny, zřejmě tedy ostatní deacetylázy hrají v umlčování rDNA důležitější role. Protože Sir2 i Net1 jsou navázány na fragmenty DNA po celé délce rDNA domény, vědci se domnívají, že je tento komplex schopen usměrněně se šířit podél chromatinového vlákna. Směr šíření je dán orientací promotoru pro RNA polymerázu I, k umlčování je dokonce nutný nějaký stupeň transkripce vykonané RNA polymerázou I. Avšak přesný mechanismus umlčování je zatím relativně nejasný.

Jednoznačnou funkcí Sir2 je však zabránění rekombinaci. (Perrod & Gasser, 2003) Zvýšená rekombinace rDNA, která může být způsobena právě ztrátou umlčování v *sir2* mutantech, vede k vystřihování rDNA repetice jako extrachromozomálních kruhů. Hromadění těchto kruhů v buňce vede k jejímu stárnutí a snížení životaschopnosti. (Moazed, 2001)

U *Sch. pombe* je rDNA posloupnost 70–100 repetice ve dvou velkých doménách (500–1000 kpb). Sousedí s telomerami na každém konci chromozomu III. Ani *cis* a *trans* faktory související s umlčováním rDNA, stejně jako u telomer, nejsou dobře známé, nicméně je jisté, že proteiny Chp1, Chp2, Swi6 a Clr4 jsou v umlčování rDNA repetice zahrnuty. (Huang, 2002) Jestli působí přímo nebo nepřímo je předmětem zkoumání. (Perrod & Gasser, 2003) Clr4 je během interfáze lokalizován v jadérku. (Huang, 2002)

## 6. Centromery

U *Sch. pombe* dochází k umlčování také na centromerách. Je to nezbytná část chromozomu poskytující místo pro navázání vřetena mikrotubulů při oddělování chromozomů v průběhu mitózy. (Perrod & Gasser, 2003) Centromery jsou u *Sch. pombe* oproti *S. cerevisiae* (asi 125 pb) relativně velké (40–100 kpb). (Huang, 2002) Jsou složeny z domén tvořících hutnou heterochromatinovou strukturu, čímž se stávají těžko vymezené podle sekvence, je tedy složité určit minimální velikost funkční centromery. (Perrod & Gasser, 2003) Centrální oblast je dlouhá asi 15 kbp a obsahuje centrální jadernou doménu (cnt) obklopenou opakujícími se sekvencemi, jejichž motivy (*dg* a *dh*) se vyskytují po celé centromeře, a lemovanou inverzními repeticemi (*imr* – innermost repeat a *otr* – outer repeat). Toto uspořádání je velmi podobné vyšším eukaryotům, v jejichž centromerách jsou velké oblasti opakujících se satelitních sekvencí. Centrální oblast centromery *Sch. pombe* je umlčena jen slabě, vnější oblasti silněji. (Huang, 2002) Díky heterochromatinu lemujícímu centrální oblast centromery může docházet k PEV až na vzdálenost 1 Mpb (milion párů bazí) nebo i víc.

Stupeň je ovlivněn přítomnými geny, represe může být nesouvislá a závislá na síle promotoru. A některé geny jsou skutečně adaptovány na expresi v heterochromatinovém prostředí. K PEV nestačí jen *cis* šíření heterochromatinu, jsou potřeba také *trans* působící faktory. (Perrod & Gasser, 2003)

Umlčování chromatinu tvořícího centromeru a tlumení rekombinací v těchto místech jsou pevně spojeny, podobně jako u lokusů párovacího typu. Jsou nutné také stejné *trans* faktory, z toho Swi6, Clr4, Clr6 a Rik1 hlavně ve vnějších oblastech. (Huang, 2002) Swi6 má na N-konci chromodoménu, pak ohebnou část a na C-konci chromoshadow doménu, která zprostředkovává autodimerizaci a protein-protein interakce, čímž vytváří strukturu heterochromatinu. (Perrod & Gasser, 2003) Swi6 se nejčastěji váže na methylovaný histon H3 a to přes svou chromodoménu. Histon H3 je methylován díky Clr4. (Bannister *et al.*, 2001) Ale pouze methylace H3 pro navázání Swi6 nestačí. Ještě předtím musí dojít k deacetylaci tohoto histonu a to pomocí Clr6 a Clr3. (Perrod & Gasser, 2003) Navíc jsou požadovány další, pro centromery specifické, faktory. Chp1 je chromodoménový protein, který se účastní umlčování ve vnějších oblastech. K jeho umístění zde jsou potřeba faktory Rik1 a Clr4. (Huang, 2002) Delece v genu pro Rik1 nebo Chp1 zabrání methylaci H3 i lokalizaci Swi6 na centromeře. (Perrod & Gasser, 2003) Genové mutace na lokusech obsahujících *csp* (centromere suppressor of position effect) zmírní umlčování vnějších oblastí centromer, ale umlčování na lokusech párovacího typu neovlivní. V centrální oblasti jsou navázány faktory Mis6 a Mis12 nutné pro umlčení této části. (Huang, 2002) Nezbytnou součástí umlčování na centromerách je také siRNA (small interfering RNA), konečný produkt RNAi (RNA interference) – mechanismu, který zpracovává dvouvláknovou RNA na krátké oligonukleotidy (21–25 nukleotidů). siRNA postupně brání nahromadění transkriptů příbuzných genů kódovaných homologní mRNA. Ke štěpení dsRNA (double strand RNA) pomocí RNAi dochází díky transkripci *dh* sekvencí. *dh* i *dg* siRNA jsou nutné pro správné cílové umístění Clr4, Rik1 a Chp1 na centromerách a pro udržení struktury okrajového heterochromatinu. Delece genů kódujících proteiny mechanismu RNAi vede ke ztrátě heterochromatinové struktury na okrajových částech centromery, k indukci transkripce zde ležících genů, ke ztrátě methylace histonu H3 a k delokalizaci Swi6 z centromer. (Perrod & Gasser, 2003; Volpe *et al.*, 2002)

*Trans* faktory související s umlčováním na centromerách jsou důležité také pro funkci centromer. Mutace genů kódujících tyto faktory vedou ke ztrátám chromozomů a také

ke zvýšené citlivosti buňky na látky ničící mikrotubuly, protože *trans* faktory s mikrotubuly interagují na kinetochoru. Chp1 například interaguje s  $\alpha$ -tubulinem, je tedy nutný pro přesnou segregaci chromozomů. To, že je oblast centromery umlčená, je pro její správnou funkci zcela zásadní. (Huang, 2002) Centrální heterochromatin totiž neslouží pouze k uchycení mikrotubulů, ale je také základem pro soudržnost sesterských chromatid. Potvrzuje to i občasné vytvoření nové centromery na neobvyklém místě chromozomu bez sekvence homologní s normální centromerou. (Perrod & Gasser, 2003) Navíc sekvence DNA tvořící centromeru není podobná ani u různých druhů organismů, přestože funkce jejich centromer jsou shodné. (Choo, 1997) Struktura a organizace vlákna je tedy pro funkci centromery důležitější než specifická sekvence DNA. (Perrod & Gasser, 2003)

Konkrétní struktura vzniká následnými procesy deacetylace a methylace. Clr3 a Clr6 deacetylují histon H3, který je pak methylován Clr4. Tím se vytvoří histonový kód, který je rozeznán Swi6, ten se váže podél methylovaných nukleozomů, čímž vzniká struktura podobná heterochromatinu. (Huang, 2002) Jedním z dědičných znaků centromery je přítomnost speciální varianty histonu H3, která se nachází pouze v její střední části. U *Sch. pombe* se nazývá Cnp1. Její přítomnost se zdá být zásadní pro vytvoření kinetochoru a míra její koncentrace i koncentrace ostatních histonů ovlivňuje umlčení i další funkce centromery. (Castillo *et al.*, 2007; Perrod & Gasser, 2003) Centromery se skládají z velkých elementů opakujících se sekvencí, na kterých dochází k místně specifickému umlčování genů transkribovaných RNA polymerázou II. Je to nejvíce zachovaný a rozšířený typ heterochromatinu.

Centromery *S. cerevisiae* nejsou umlčené ani nedochází k PEV, protože jsou jen 125 pb dlouhé a nejsou lemované heterochromatinem, který by umlčoval okolní geny. (Perrod & Gasser, 2003)

## **7. Uspořádání genomu uvnitř jádra**

Chromozomy jsou v interfazickém jádru prostorově uspořádány. Heterochromatin je soustředěný především na jaderný okraj, kde jaderná lamina (sít' intermediálních filament na vnitřní membráně jaderného obalu) interaguje s transkripčně umlčenými geny. Malá část jaderné laminy se také nachází uvnitř jádra, kde slouží k organizaci funkce genomu. Ovšem rostliny a nižší jednobuněčné organismy jadernou laminu nemají. Jejich heterochromatin se však také nachází blízko jaderného obalu nebo obkružuje jadérko a nikdy není v těsné blízkosti jaderných pórů.

Chromatinové vlákno je tvořeno kompaktní strukturou s limitovanou flexibilitou. Pokud se jeden lokus přesune na jiné místo jádra, ovlivní to i okolní geny. Může zde tedy působit evoluční tlak tak, že stejně regulované geny se v rámci vlákna chromatinu sdružují k sobě. (Towbin *et al.*, 2009)

Na okraj jádra je heterochromatin ukotven díky proteinům, které přímo tvoří jeho strukturu. Potlačení *HMR* je sníženo částečným poškozením *cis* elementu, ale může být znovu obnoveno přesunutím tohoto lokusu k jadernému obalu expresí proteinu vážícího specifickou sekvenci DNA hned vedle *HMR*. Tím se *HMR* dostane blízko oblasti SIR proteinů. Potlačení exprese to usnadní, ale samo o sobě nestačí. Navázání na jaderný okraj tedy nezabrání transkripční aktivitě genů, nicméně některé z nich jsou tímto umístěním ovlivněny. Míra vlivu může být dána i druhem proteinové kotvy nebo vazebnou silou promotoru. (Andruli *et al.*, 1998; Towbin *et al.*, 2009)

Umlčování vlastně není indukováno přesunutím genu uvnitř jádra, ale působením represoru transkripce, který se váže na proteiny vnitřní jaderné membrány sloužící k ukotvení chromatinového vlákna. Je také možné, že umlčení je stabilizováno *trans* interakcí s jinou heterochromatinovou doménou. Jaderný obal potom slouží jako prostředí pro kondenzaci stejně intenzivně exprimovaného chromatinu. (Towbin *et al.*, 2009)

Telomery u kvasinek jsou na jaderný obal navázány díky Mlp1 a Mlp2 (myosin-like nuclear pore complex proteins) obsahujících heterodimerický protein Ku (yKu70-yKu80), který váže konec chromozomu a pomáhá Rap1 navázat SIR komplex. (Huang, 2002; Perrod & Gasser, 2003; Towbin *et al.*, 2009) Pak také díky proteinu Sir4 a proteinu Mps3 se SUN-doménou (její C-konec sahá do mezimembránového prostoru jádra, N-konec do nukleoplasmy). Dochází zde k „circe efektu“, kdy jaderný obal usnadňuje umlčování shlukováním telomer, což zase hromadí umlčovací faktory včetně Sir2 a odděluje je od zbytku jádra. (Towbin *et al.*, 2009) Přesné umístění a struktura telomer je pro jejich umlčení důležitá, jaderný okraj napomáhá začátku umlčování a je místem pro hromadění Sir3 a Sir4, které spolu s Rap1 a subtelomerickou DNA tvoří ohniska umlčování na okraji jádra. Ovšem pouze správné umístění telomer pro umlčování nestačí. (Huang, 2002) Navíc není jasné, jestli tvorba ohnisek způsobí zvýšenou koncentraci Ku a SIR proteinů a tedy předchází umlčování telomer, nebo je to naopak jeho důsledek. (Perrod & Gasser, 2003)

Dalším membránovým proteinem, který má vliv na umlčování a lokalizaci genů je Src1. Nachází se v subtelomerické oblasti, na umlčeném lokusu určujícího párovací typ

a na heterochromatinové rDNA. Delece genu, který ho kóduje způsobí chybné potlačení skupiny telomerických genů, dekonduzaci rDNA a částečné uvolnění jádérka od jaderného okraje. V každém případě je umístění heterochromatinu na okraji jádra důvod i důsledek tohoto umlčeného stavu. (Towbin *et al.*, 2009)

## 8. Izolatory a hranice šíření

Izolatory jsou sekvence DNA, které blokují expresi genu vložením mezi posilovač a promotor, promotor pak nemůže být aktivován. Bariéry jsou sekvence blokující šíření heterochromatinu oddělením aktivních a neaktivních domén (Donze & Kamakaka, 2001). Šíření heterochromatinu je limitováno vnitřní nestabilitou struktury, je tedy omezeno jen do blízkosti umlčovačů. Pro udržení umlčeného chromatinu na požadovaných místech genomu jsou kromě umlčovačů a specifického uspořádání chromatinového vlákna nutné další vnitřní i vnější faktory. Strukturní součásti umlčeného chromatinu (v případě *S. cerevisiae* jsou to SIR proteiny) však sami podporují šíření. Sir2 po navázání na umlčovač deacetyluje okolní nukleozomy, čímž vytvoří vazebná místa pro Sir3 a Sir4, které naváží další Sir2. Tento mechanismus ovšem vytváří nebezpečí šíření heterochromatinu příliš daleko nebo jeho vznik na špatném místě. (Rusche & Lynch, 2009)

### 8.1 Vnitřní faktory

Vazbu SIR proteinů k nukleozomům snižují především některé histonové modifikace spojené s transkripčně aktivním chromatinem jako například acetylace histonu H4, methylace histonu H3 a přítomnost histonové varianty Htz1. Tedy i euchromatin má specifické faktory a mechanismy, které složí jako hranice mezi exprimovanými a neexprimovanými geny. (Meneghini *et al.*, 2003; Rusche & Lynch, 2009) V buňkách bez enzymů způsobujících tyto modifikace se heterochromatin šíří na delší vzdálenosti než obvykle. Bez Sas2 (acetyltransferáza) jsou SIR proteiny detekovatelné 10–20 kpb od telomer, přestože normálně je to jen 1–2 kpb. (Rusche & Lynch, 2009) Bez histonové varianty Htz1 a methylace histonu H3 dochází k umlčení až na vzdálenost 100 kpb od telomer. (Venkatasubrahmanyam *et al.*, 2007) Koncentrace SIR proteinů se při zvětšující se vzdálenosti od umlčovače snižuje, schopnost šíření je tedy omezená. Zastavení pomáhá také jejich limitovaný obsah v buňce a rychlá degradace SIR proteinů v umlčeném chromatinu, kdy jeden ze SIR komplexů raději disociuje než aby čekal na navázání dalšího, čímž se pravděpodobnost vazby směrem

od místa iniciace snižuje. Vyvážená síla vazby SIR proteinů k nukleozomům je velmi důležitá a možná se vyvinula během milionů let evoluce. Díky ní jsou geny sousedící s heterochromatinem jen mírně ovlivněny (nejsou zcela umlčeny, jen může docházet k nepravidelné expresi) a náhodné navázání SIR proteinů na deacetylovaný nukleozom se nešíří daleko. (Rusche & Lynch, 2009)

## 8.2 Vnější faktory

Nestabilní struktura umlčeného chromatinu není pro buňku tolik toxická, ale je třeba zajistit dokonalé umlčení na místech, kde je to nutné pro správnou funkci buňky (například lokusy párovacího typu). *HMR* i *HML* jsou tedy lemovány hned dvěma umlčovači E a I, které se navzájem posilují, a v promotoru *HML* se nachází vazebné místo pro Rap1, který stabilizuje vazbu SIR proteinů. Jednotlivé umlčovače se k sobě uvnitř jádra přibližují, čímž tvoří základ smyčky a vyššího uspořádání chromatinového vlákna.

Jako vnější faktory proti přílišnému šíření slouží hraniční elementy a protiumlčovací modifikace histonů. (Rusche & Lynch, 2009) Hranici mezi *HMR* lokusem a telomerou tvoří gen pro tRNA, transkribován RNA polymerázou III. Jeho schopnost transkribovat se je pro jeho hraniční funkci zásadní. Mutace v promotoru nebo dalších lokusech, které způsobí nefunkčnost komplexu RNA polymerázy III, sníží účinnost bariéry (Donze & Kamakaka, 2001). Mezi telomerou a *HML* se nachází 710 pb dlouhá sekvence nazvaná LB (left boundary), která také snižuje umlčování. (Bi, 2002) Jiné hranice umlčování v *S. cerevisiae* neexistují, takže se předpokládá, že šíření chromatinu se zastaví v zóně střetu aktivního a neaktivního chromatinu. (Rusche & Lynch, 2009)

Izolátory a chromatinové hranice navíc ovlivňují expresi genů prostorovým uspořádáním částí chromozomů do domén a také interakce enhancer-promotor. Obecně tedy omezují vliv umlčeného chromatinu na sousední geny. (Gerasimova & Corces, 2001) Geny vložené mezi telomery a *HM* lokusy jsou běžně umlčené díky PEV, ale *TEF1* a *TEF2* jsou vůči umlčování imunní. Je to zřejmě způsobené upstream aktivačním místem (UAS) pro tyto geny ribozomálních proteinů. (Bi, 2002) *TEF2*-UAS obsahuje 3 sekvence pro vazbu Rap1 a funguje jako fyzická bariéra šíření heterochromatinu. Narovná vlákno DNA a dojde ke ztrátě dvou nukleozomů, takže DNA má méně negativních nadobrátek. Šíření umlčeného chromatinu může být zablokováno také transkripcí. Kompletní transkripční jednotka z promotoru pro *TEF2* spojeného se sekvencí kódující *ADE2* blokuje šíření umlčeného chromatinu desetkrát silněji než *TEF2*-UAS. (Bi & Broach, 2001)

Izolátory jsou 149 pb dlouhé fragmenty obsahující tři následná vazebná místa pro Rap1. Jsou běžně nacházeny okolo *HMR* lokusu. Pokud jsou vloženy mezi umlčovač a promotor, pak zabrání utlumení promotoru umlčovačem, pokud mezi  $\alpha$  geny na *HML* lokusu a E umlčovač, slouží jako hranice pro šíření struktury umlčeného chromatinu. Obsahují *Tyl* LTR a sekvenci z genu pro tRNA. (Gerasimova & Corces, 2001) Ten obsahuje části promotoru, *boxA* a *boxB*, které slouží jako vazebná místa pro transkripční faktory TFIIC a TFIIB. Bariérová aktivita genu pro tRNA závisí na vzdálenosti mezi *boxA* a *boxB* a také na sekvencích, které ho lemují. (Bi & Broach, 2001) Izolátory vyžadují také Smc proteiny, které poskytnou strukturní součásti nutné pro kondenzaci chromozomu. Delece genů kódujících acetyltransferázy (např. *GCN5* nebo *SAS2*) snižuje izolační aktivitu, kdežto navázání Gal4-Sas2 nebo Gal4-Gcn5 vytvoří mohutný izolátor. Na *HMR* je šíření umlčeného chromatinu omezeno hraničními elementy na obou stranách tohoto lokusu. (Gerasimova & Corces, 2001) Zato na *HML* lokusu je šíření od umlčovače I směrově orientované. Jeho účinnost se s rostoucí vzdáleností se snižuje, ale sčítá se s působením umlčovače E. Působí tedy zároveň jako hranice. (Bi, 2002)

Na telomerách byly nalezeny sekvence zvané STARs (subtelomeric anti-silencing regions), ochraňující sousední geny před umlčovacím efektem telomer i *HML* lokusu. (Bi, 2002) Obsahují vazebná místa pro Tbf1 a Reb1 a jejich izolační aktivita spočívá v namnožení těchto míst, přičemž tři následná vazebná místa již blokují šíření umlčeného chromatinu. (Bi & Broach, 2001; Gerasimova & Corces, 2001) Funkce Tbf1 není známa, ale jeho doména vážící DNA je spojena s různými telomerickými proteiny včetně Taz1, který se nachází u dělivých kvasinek. Reb1 je slabý aktivátor transkripce, který je součástí mnoha promotorů pro RNA polymerázu I i II. (Gerasimova & Corces, 2001)

Pro mechanismus funkce izolátorů existují dva modely. V jednom případě izolátor blokuje enhancer a brání šíření jeho signálu, protože napodobuje promotor tím, že interaguje s některými, nebo dokonce se všemi proteiny transkripčního komplexu. Ve druhém případě ovlivňuje transkripci změnami ve vyšší organizaci struktury chromatinu. Je totiž asociován s místy silně citlivými na DNazu I a odděluje chromatinové domény s různým stupněm kondenzace vlákna. Tak funguje například izolátor *gypsy* s proteinovou částí Mod(mdg4). V genomu pro tento protein existuje mnoho vazebných míst, izolátory by tedy mohly být pravidelně rozmístěné podél chromozomu. Díky interakcím dalších proteinových složek jsou však nahloučené na několika místech, čímž vytvářejí specifické uspořádání chromatinového vlákna v jádře. Sekundárním efektem může být právě omezení DNA související s přenosem

signálu, který vysílá enhancer na promotor na sousedních doménách. Kumulace izolantů není náhodná a možná je potřeba další substrát, nebo je zprostředkována přímo jadernou laminou. Pokud jsou však enhancer a promotor na jedné doméně a mezi nimi jsou dva izolátory za sebou, pak se jejich účinek vyruší. (Bi & Broach, 2001)

Různé hraniční elementy nemají homologní sekvenci, ale všechny mají hodně vazebných míst pro regulační proteiny. Navázáním proteinového komplexu brání tvorbě nukleozomů, čímž zastaví šíření SIR proteinů a tím i umlčeného chromatinu. Gen pro tRNA je schopen zastavit tvorbu nukleozomu, ale musí být aktivní.

Proteiny, které slouží jako hranice umlčeného chromatinu, nemají v buňce pouze tuto funkci. Rap1 má v genomu kvasinky mnoho vazebných míst a slouží jako celkový regulátor aktivity transkripce, délky telomer, segregace kruhových plazmidů i meiotické rekombinace. Jeho konkrétní funkce závisí na ko-faktorech a na okolí. Také různé sekvence genů pro tRNA mají v genomu více funkcí. Silně inhibují transkripci promotorů RNA polymerázy II a způsobují pauzy v replikaci DNA. (Gerasimova & Corces, 2001)

## 9. Dědičnost

Na mechanismus předávání konkrétního charakteru struktury chromatinu existuje tak zvaná hypotéza histonového kódu. (Rusche *et al.*, 2003) Velmi tedy záleží, jestli byl chromatin umlčený v předešlém buněčném cyklu, nebo ne. (Pirrota & Gross, 2005) Při replikaci DNA a duplikaci chromozomu je konkrétní struktura chromatinu sama sobě vzorem, narozdíl od umlčovacích proteinů, které musí být pro výstavbu umlčeného chromatinu v dceřinných buňkách navázány *de novo*. Modifikované histony a strukturní proteiny jsou částečně děděny a za vhodných podmínek mohou způsobit opětovné vytvoření struktury umlčeného chromatinu v dceřinné buňce. Pokud už je struktura umlčeného chromatinu jednou vytvořena, je pak stabilně předávána dalším generacím. Zda-li se umlčený chromatin opravdu vytvoří je již jiná otázka. (Rusche *et al.*, 2003) Za běžného stavu je umlčování silné a stabilní. Pokud se organismus dostane do nepříznivých podmínek neklesá síla umlčování, ale jeho stabilita. Výstavba umlčeného chromatinu je pak v dceřinných buňkách nepravidelná. Tím vzniká mozaikovitá kolonie nebo jiný mnohobuněčný útvar (např. oko mušky *Drosophila*). (Pirrota & Gross, 2005)

U *S. cerevisiae* neznáme žádné specifické značky pro umlčování, epigenetika tedy může být založena spíše na absenci značek pro transkripci. Hypoacetylace histonů H3 a H4, absence methylace histonu H3 a nepřítomnost histonové varianty Htz1 mohou vytvořit vazebné místo

pro SIR proteiny a tím i umožnit umlčení. (Pirrota & Gross, 2005; Rusche & Lynch, 2009) SIR proteiny z původních histonů deacetylují nově vložené histony, čím odstraní značky pro genovou expresi. (Pirrota & Gross, 2005) Pro umlčenou doménu *Sch. pombe* obsahující *mat2* a *mat3* je například specifický histon H3 methylovaný na lysinu 9, kdežto okolní neumlčená oblast je charakteristická H3 methylovaným na lysinu 4. (Nakayama *et al.*, 2001) Je otázkou, jestli takové modifikace DNA stačí pro zaznamenání chromatinového stavu během replikace, ale studie prokazují, že kombinace různých úprav histonů je pro navázání umlčovacích proteinových komplexů dostačující. (Moazed, 2001)

## 10. Podobnosti u vyšších eukaryot

Umlčený chromatin je v obou kvasinkách řízen odlišnými *cis* elementy a *trans* faktory, má tedy jinou strukturu i biochemii. V *Sch. pombe* je mnoho homologů umlčovacích proteinů ze *S. cerevisiae*, ovšem ne všechny slouží k umlčování (např. Pku70). U vyšších eukaryot bylo nalezeno mnoho homologů umlčovacích proteinů obou kvasinek. SIR proteiny *S. cerevisiae* zde byly funkčně nahrazeny proteiny ze *Sch. pombe*. Struktura umlčeného chromatinu obou kvasinek i heterochromatinu vyšších eukaryot je značně podobná: opakující se sekvence DNA a malá koncentrace genů, nepřístupnost pro činidla měnící DNA, replikace až v pozdní S fázi a dědičnost během buněčného cyklu. (Huang, 2002)

Buněčná diferenciace mnohobuněčných vyžaduje expresi pouze určitého podsouboru genů specifického pro každou buňku. Část genomu tedy musí být umlčena. Eukaryota udržují expresi pouze těch genů, které byly určeny během embryonálního vývoje. (Moazed, 2001)

Jedním z nejprozkoumanějších organismů řazených mezi vyšší eukaryota je bezpochyby muška *Drosophila*. Stejně jako u kvasinek, i u ní bylo pozorováno přenášení genů inverzním otočením části chromozomu (position effect variegation) poblíž telomer a centromer, které jsou zde také umlčenými oblastmi genomu. Mimo jiné často dochází k nepravidelnému umlčení některých genů v různých buňkách (například gen *white* způsobující mozaikovitě oči). (Huang, 2002) Chromatinové komplexy jsou u této mušky tvořené pomocí PcG (Polycomb group) proteinů. Ty narozdíl od SIR proteinů zůstávají navázány v oblasti PRE (PcG response elements) a dál se nešíří. (Pirrota & Gross, 2005) Hranice šíření heterochromatinu jsou stejně jako u kvasinek založené na multinukleoproteinových komplexech. (Bi & Broach, 2001)

V největším středu zájmů pro nás však vždycky budeme my sami. Mechanismus umlčování genové exprese slouží u lidí například k inaktivaci jednoho z chromozomů X. (Huang, 2002) Bylo zjištěno, že lokalizace represorů i aktivátorů transkripce je stejná jako u kvasinek

nebo mušky *Drosophila*. (Pirrota & Gross, 2005) Potlačení genové exprese funguje na podobném principu jako umlčování okrajových částí centromery u *Sch. pombe*, přestože jsou zde jisté odlišnosti. Na telomerách se také nacházejí TG repetice i některé ligandy podobné kvasinkovým (homology Rap1, Cdc13 a Ku heterodimeru). TG repetice mají sice stejnou sekvenci, ale různou délku (5–30 kpb, u kvasinek méně než 500 pb). Konce chromozomů jsou také před degradací také chráněné smyčkami ohnutých telomer (mimo jiné). V lidských somatických buňkách také dochází k TPE (telomeric position effect). Je ovšem citlivý na obecný inhibitor histonových deacetyláz trichostatin A. Není totiž jasné, jestli Sir2, který trichostatinem A není inhibován, ovlivňuje TPE v jiných organismech než pučivých kvasinkách. (Perrod & Gasser, 2003) Jedním z rozdílů je, že heterochromatin není spojený s methylovaným lysinem 9 histonu H3 jako u *Sch. pombe*. (Moazed, 2001)

## 11. Závěr

Umlčování genové exprese je zásadní a nezbytnou součástí mechanismu fungování mnoha druhů eukaryot. Kvasinkám umožňuje přepínání párovacího typu a tedy párování v rámci jedné kolonie, u vyšších eukaryot umožňuje diferenciaci buněk, tkání a celého organismu. Především je ale nezbytné pro stabilitu a správnou funkci chromozomů. Není tedy divu, že se vědci usilovně snaží poodhalit tajemství těchto důležitých buněčných procesů.

Největších úspěchů zatím bylo dosaženo v oblasti přepínání párovacího typu u kvasinek, kde byl navržen tak zvaný „kasetový model“. Mnoho objevů již bylo učiněno i v dalších oblastech jako jsou telomery a centromery, které zřejmě nejvíce souvisí s vyššími eukaryoty. Ne zcela vyčerpaným námětem je jistě umlčování domény rDNA, kde zbývá objasnit ještě mnoho detailních i obecnějších principů, ale pro jedinečné objevy a studie je ještě mnoho prostoru v celé problematice regulace transkripce.

Pro možnost zobecnění objevů učiněných u kvasinek na vyšší eukaryota je zapotřebí se více věnovat mechanismům u *Sch. pombe*, homology jejíchž proteinů nacházíme u vyšších eukaryot spíše než homology proteinů *S. cerevisiae*. Základní mechanismus umlčování se ovšem táhne napříč celou živočišnou i rostlinnou říší, jen nástroje, tedy konkrétní proteiny, si každý organismus přizpůsobil svým možnostem a potřebám.

## 12. Seznam použité literatury

Andrulis, E. D., Neiman, A. M., Zappulla, D. C. & Sternglanz, R. (1998): Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing, *Nature*. 1998 (6693): 592–595

Bi, X. (2002): Domains of gene silencing near the left end of chromosome III in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 2002 (4): 1401–1407

Bi, X. & Broach, J. R. (2001): Chromosomal boundaries in *S. cerevisiae*, *Current Opinion in Genetics & Development* 2001 (11): 199–204

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. & Kouzarides, T. (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain, *Nature* 2001 (410): 120–124.

Bourns, B. D., Alexander, M. K., Smith, A. M. & Zakian, V. A. (1998): Sir Proteins, Rif Proteins, and Cdc13p Bind *Saccharomyces* Telomeres In Vivo, *Molecular and Cellular Biology* 1998 (9): 5600–5608

Castillo, A. G., Mellone, B. G., Partridge, J. F., Richardson, W., Hamilton, G. L., Allshire, R. C. & Pidoux, A. L., (2007): Plasticity of fission yeast CENP-A chromatin driven by relative levels of histone H3 and H4, *PLoS Genet*. 2007 (7): 1264–1274

Dhillon, N. & Kamakaka, R. T. (2000): A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR, *Mol Cell* 2000 (4): 769–780

Donze, D. & Kamakaka, R. T. (2001): RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*, *The EMBO Journal* 2001 (3): 520–531

Ekwall, K., Nielsen, O. & Ruusala, T. (1991): Repression of a mating type cassette in the fission yeast by four DNA elements, *Yeast*. 1991 (7): 745–755.

- Freeman-Cook, L. L., Sherman, J. M., Brachmann, C. B., Allshire, R. C., Boeke, J. D. & Pillus, L. (1999): The *Schizosaccharomyces pombe* *hst4(+)* gene is a SIR2 homologue with silencing and centromeric functions, *Mol Biol Cell*. 1999 (10): 3171–3186
- Gerasimova, T. I. & Corces, V. G. (2001): Chromatin Insulators and Boundaries: Effects on Transcription and Nuclear Organization, *Annu. Rev. Genet.* 2001 (35): 193–208
- Gkikopoulos, T., Havas, K. M., Dewar, H. & Owen-Hughes, T. (2009): SWI/SNF and Asf1p Cooperate To Displace Histones during Induction of the *Saccharomyces cerevisiae* *HO* Promoter, *Molecular and Cellular Biology* 2009 (15): 4057–4066
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S. & Grunstein M. (1996): Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin, *Nature* 1996 (383): 92–96
- Huang, Y. (2002): Transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomices pombe*, *Nukleic acid research* 2002 (7): 1465–1482
- Chi, M.-H. & Shore, D. (1996): *SUM1-1*, a Dominant Suppressor of *SIR* Mutations in *Saccharomyces cerevisiae*, Increases Transcriptional Silencing at Telomeres and *HM* Mating-Type Loci and Decreases Chromosome Stability, *Molecular and Cellular Biology* 1996 (8): 4281–4294
- Choo, K. H. A. (1997): Centromere DNA Dynamics: Latent Centromeres and Neocentromere Formation, *Am. J. Hum. Genet.* 1997 (61): 1225–1233
- Ivanova, A. V., Bonaduce, M. J., Ivanov, S. V. & Klar, A. J. (1998): The chromo and SET domains of the Clr4 protein are essential for silencing in fission yeast, *Nat. Genet.* 1998 (2): 192–195
- Kimura, A., Umehara, T. & Horikoshi, M. (2002): Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing, *Nat Genet.* 2002 (3): 370–377

Marcand, S., Buck, S. W., Moretti, P., Gilson, E. & Shore, D. (1996): Silencing of genes at nontelomeric sites in yeast is controlled by sequestration of silencing factors at telomeres by Rap 1 protein, *Genes Dev.* 1996 (11): 1297–1309

Meneghini, M. D., Wu, M. & Madhani, H. D., (2003): Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin, *Cell* 2003 (5): 725–736

Mishra, K. & Shore, D. (1999): Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins, *Curr Biol.* 1999 (19): 1123–1126

Moazed, D. (2001): Common Themes in Mechanisms of Gene Silencing, *Molecular Cell* 2001 (8): 489–498

Montelone, B. A. (2002): Yeast Mating Type, *Encyclopedia of life sciences*

Nakayama, J., Klar, A. J. & Grewal, S. I. (2000): A chromodomain protein, Swi6, performs imprinting functions in fission yeast during mitosis and meiosis, *Cell.* 2000 (3): 307–317

Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. & Grewal, S. I. (2001): Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly, *Science* 2001 (5514): 110–113

Perrod, S. & Gasser, S. M. (2003): Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences, *Cell. Mol. Life Sci.* 2003 (60): 2303–2318

Pirrota, V. & Gross, D. S. (2005): Epigenetic Silencing Mechanisms in Budding Yeast and Fruit Fly: Different Paths, Same Destinations, *Molecular Cell* 2005 (18): 395–398

Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M. & Grunstein, M. (1996): HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 (93): 14503–14508

Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. & Rine, J. (2003): The Establishment, Inheritance, and Function of Silenced Chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu. Rev. Biochem.* 2003 (72): 481–516

Rusche, L. N. & Lynch, P. J. (2009): Assembling Heterochromatin in the Appropriate Places: A Boost Is Needed, *Journal of Cellular Physiology* 2009 (219): 525–528

Sharp, J. A., Fouts, E. T., Krawitz, D. C. & Kaufman, P. D. (2001): Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing, *Curr Biol.* 2001 (7): 463–473

Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammadi, S., Starai, V. J., Avalosi, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, Ch., Wolberger, C. & Boeke, J. F. (2000): A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family, *PNAS* 2000 (12): 6658–6663

Smith, J. S., Brachmann, C. B., Pillus, L. & Boeke, J. D. (1998): Distribution of a limited Sir2 protein pool regulates the strength of yeast rDNA silencing and is modulated by Sir4p, *Genetics* 1998 (3): 1205–1219

Strathern, J. F., Blair L. C. & Herskowitz, I. (1979): Healing of mat mutations and control of mating type interconversion by the mating type locus in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979 (7): 3425–3429

Tanny, J. C. & Moazed, D. (2000): Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: Evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product, *PNAS* 2001 (2): 415–420

Towbin, B. D., Meister, P. & Gasser, S. M. (2009): The nuclear envelope – a scaffold for silencing?, *Current Opinion in Genetics & Development* 2009 (19): 180–186

Venkatasubrahmanyam S., Hwang, W. W., Meneghini, M. D., Tong, A. H. Y. & Madhani, H. D. (2007): Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the

euchromatic factors Set1 and H2A.Z, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 (42): 16609–16614

Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. & Martienssen, R. A. (2002): Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi, *Science* 2002 (5588): 1833–1837

Wiley, E. A. & Zakian, V. A. (1994): Extra Telomeres, but Not Internal Tracts of Telomeric DNA, Reduce Transcriptional Repression at *Saccharomyces* Telomeres, *Genetics* 1995 (139): 67–79