

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Zuzana Cihlářová**

Prp45 v regulaci exprese paralogních genů *TUB1* a *TUB3* v *S. cerevisiae*

Regulation of *S. cerevisiae* *TUB1* and *TUB3* paralogous genes expression by Prp45

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Školitel: Doc. RNDr. František Půta, CSc.**

**Praha 2017**

**Prohlášení:**

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

V Praze, 26. 4. 2017

Zuzana Cihlářová

### **Poděkování:**

Své upřímné poděkování bych ráda věnovala svému školiteli doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. za cenné rady a odborné vedení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. a Mgr. Martině Hálové za odborné vedení při práci na diplomovém projektu a za všechny podněty a rady.

Mgr. Martině Hálové patří ještě zvláště poděkování za neskonalou trpělivost během konzultací a vysvětlování všech laboratorních metod, které mi umožnily získat popsané výsledky. Ráda bych poděkovala také všem ostatním členům laboratoře za vytvoření přátelského pracovního kolektivu.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za důvěru a všestrannou podporu během celého studia.

Práce byla vypracována za finanční podpory GAUK 8214.

## Abstrakt

Prp45 je esenciální sestřihový faktor kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Lidský ortholog Prp45 – protein SNW1/SKIP – je zapojen do regulace sestřihu pre-mRNA a pravděpodobně ovlivňuje proces transkripce a modifikace histonů. Naše laboratoř odhalila genetické interakce sestřihového faktoru Prp45 nejen s proteiny zahrnutými v sestřihu pre-mRNA, ale rovněž také s faktory důležitými pro elongaci transkripce a s efektory chromatinových modifikací. Naše předběžné výsledky tak naznačují, že by protein Prp45 mohl sloužit jako faktor propojující sestřih, transkripci a stav chromatinu u *S. cerevisiae*.

Prvním cílem této diplomové práce bylo prozkoumat roli intronů v regulaci genové exprese paralogních genů *TUB1* a *TUB3*, a zda je tato regulace závislá na sestřihu. Pomocí kvantitativní PCR jsem zjistila, že exprese paralogních genů *TUB1* a *TUB3* není závislá na přítomnosti jejich intronů a ani na funkčním sestřihu. Druhým cílem této diplomové práce bylo zjistit potenciální úlohu proteinu Prp45 v regulaci chromatinového stavu. Pro tento účel jsem zavedla systém  $\beta$ -estradiolem indukované exprese značeného histonu H3 a následně jsem metodou chromatinové imunoprecipitace měřila inkorporaci tohoto histonu do nukleozomů. I přes nedostatečnou průkaznost výsledky naznačují, že by mutace *prp45*(1-169) mohla zvyšovat dynamiku nukleozomů v genech, které obsahují intron.

### **Klíčová slova:**

*PRP45*, intron, regulace genové exprese, paralogní geny *TUB1* a *TUB3*, histon H3, dynamika

## Abstract

Prp45 is an essential splicing factor of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The human ortholog of Prp45 – protein SNW1/SKIP – is involved in splicing and probably influences transcription and histone modification. The genetic interaction of Prp45 with splicing factors is well described. We have additionally demonstrated that Prp45 genetically interacts also with factors involved in transcription regulation and histone modification enzymes. Our preliminary data therefore suggest that Prp45 might be a factor that connects processes of splicing, transcription, and chromatin modification and dynamics in *S. cerevisiae*.

The first aim of this project was to investigate the role of introns in intra- and intergenic expression regulation of paralogous genes *TUB1* and *TUB3* and whether is this regulation influenced by aberrant splicing. Using quantitative PCR we found that expression of paralogous genes *TUB1* and *TUB3* is not dependent on the presence of their introns or correct splicing. The second aim of this project was to explore the potential role of Prp45 in the regulation of chromatin state. For this purpose, we used the system of  $\beta$ -estradiol-induced expression of myc-tagged histone H3 and determined its incorporation into nucleosomes by chromatin immunoprecipitation. Despite the lack of reproducibility, our results indicate that mutation *prp45(1-169)* probably increase the dynamics of nucleosomes in intron-containing genes.

### Keywords:

*PRP45*, intron, gene expression regulation, paralogous genes *TUB1* and *TUB3*, histone H3, dynamics

## Seznam zkratek

<b>A</b>	adenin
<b>AD</b>	aktivační doména B112
<b>AK</b>	aminokyselina
<b>APS</b>	amoniumpersulfát
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>bp</b>	počet párů bází
<b>BIS</b>	N,N'-methylenebisakrylamid
<b>BS</b>	místo větvení
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>C</b>	cytosin
<b>Cdc</b>	cyklin dependentní kináza
<b>cDNA</b>	komplementární DNA
<b>CTD</b>	C-terminální doména
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	kyselina deoxyribonukleová
<b>(d)NTP</b>	(deoxy)ribonukleosidtrifosfát
<b>ds</b>	dvouvláknový ( <i>double-stranded</i> )
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ER</b>	receptor pro $\beta$ -estradiol
<b>FACT</b>	komplex FACT ( <i>facilitates chromatin transcription</i> )
<b>5-FOA</b>	5-fluoroorotová kyselina
<b>G</b>	guanin
<b>GTP</b>	guanosintrifosfát
<b>H3K4me/36me/79me</b>	methylace histonu H3 na lyzinu 4 nebo 36 nebo 79
<b>H2B123ub</b>	ubiquitinylace histonu H2B lyzinu 123
<b>HA</b>	hemaglutinin
<b>HAT</b>	histonacetyltransferáza
<b>HEPES</b>	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
<b>HMT</b>	histonmetyltransferáza
<b>HU</b>	hydroxymočovina
<b>ChIP</b>	chromatinová imunoprecipitace

<b>Ig</b>	imunoglobulin
<b>IROs</b>	dvouřetězcový úsek DNA ( <i>integrative recombinant oligo.</i> )
<b>kb</b>	kilobáze
<b>kDa</b>	kiloDalton – jednotka molekulové hmotnosti
<b>LB</b>	bakteriální živné médium nebo lyzační pufr
<b>LiAc</b>	lithium acetát
<b>MAP</b>	proteiny asociované s mikrotubuly
<b>m<sup>7</sup>G</b>	7-metylguanosin
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b>NC</b>	nitrocelulóza
<b>NFR</b>	oblast depletovaná na nukleozomy ( <i>nucleosome free region</i> )
<b>nt</b>	nukleotid
<b>NTC</b>	s Prp19 asociovaný komplex ( <i>nineteen complex</i> )
<b>NTR</b>	proteiny asociované s NTC ( <i>NTC related</i> )
<b>OD<sub>600</sub></b>	optická denzita při vlnové délce 600 nm
<b>ORF</b>	otevřený čtecí rámeček
<b>PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PE</b>	polyetylen
<b>PEG</b>	polyetylen glykol
<b>PI</b>	propidium iodid
<b>poly(dA:dT)</b>	úsek DNA bohatý na adenin a thymin
<b>pSer<sub>2</sub></b>	fosforylovaný serin CTD v pozici 2
<b>pSer<sub>5</sub></b>	fosforylovaný serin CTD v pozici 5
<b>qPCR</b>	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
<b>pre-mRNA</b>	prekurzorová mediátorová RNA
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RES</b>	sestříhový komplex ( <i>pre-mRNA retention and splicing</i> )
<b>RNAPII</b>	RNA polymeráza II
<b>RNA-seq</b>	metoda RNA sekvenování
<b>RP</b>	ribosomální proteiny
<b>rpm</b>	otáčky za minutu
<b>RT</b>	pokožová teplota

<b>RT-qPCR</b>	reverzní transkripce následovaná kvantitativní PCR
<b>SAGA</b>	Spt-Ada-Gcn acetyltransferáza
<b>SD</b>	směrodatná odchylka
<b>SD médium</b>	kvasinkové minimální médium
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SNP</b>	jednonukleotidový polymorfismus
<b>snRNA</b>	malá jaderná RNA
<b>snRNP</b>	malá jaderná ribonukleoproteinová partikule
<b>SNW</b>	skupina proteinů obsahujících konzervovaný motiv SNWKN
<b>SPB</b>	mikrotubuly organizující centrum
<b>SR proteiny</b>	serin/arginin bohaté proteiny
<b>T</b>	thymin
<b>TAE</b>	pufr Tris-acetát-EDTA
<b>TCA</b>	trichloroctová kyselina
<b>TEMED</b>	tetramethylethylendiamin
<b>TF</b>	transkripční faktor
<b>TRIS</b>	2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol
<b>TSS</b>	transkripční počátek
<b>U</b>	uracil
<b>UTR</b>	nekódující genová oblast ( <i>untranslated region</i> )
<b>UV</b>	ultrafialové ( <i>ultraviolet</i> )
<b>wt</b>	divoký typ ( <i>wild type</i> )
<b>YPAD</b>	kvasinkové živné médium suplementované adeninem
<b>3'ss</b>	3' sestřihové místo
<b>5'ss</b>	5' sestřihové místo
<b>Δ</b>	genová delece
<b>Δi</b>	delece intronu



# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	12
<b>2. Literární přehled</b> .....	13
2.1 Transkripce a RNA polymeráza II .....	13
2.1.1 C-terminální doména a její modifikace .....	13
2.2 Primární transkript <i>S. cerevisiae</i> a jeho úpravy.....	13
2.3 Sestřih pre-mRNA <i>S. cerevisiae</i> .....	15
2.4 Sestřihový faktor Prp45 .....	17
2.4.1 Interakční partneři a funkce Prp45 v rámci sestřihu.....	18
2.4.2 Termosenzitivní varianta prp45(1-169).....	19
2.5 Mikrotubulární cytoskelet <i>S. cerevisiae</i> .....	21
2.5.1 Benomyl.....	21
2.6 Paralogní geny <i>TUB1</i> a <i>TUB3</i> .....	22
2.6.1 Paralogní geny a jejich introny .....	24
2.7 Chromatinová struktura .....	26
2.7.1 Pozice nukleozomů v genomu <i>S. cerevisiae</i> .....	27
2.7.2 Dynamika nukleozomů .....	28
2.7.3 Obrat nukleozomů .....	29
2.8 Vztah transkripce, sestřihu a chromatinu .....	31
2.8.1 Histonové modifikace .....	31
2.8.2 Enzymy histonových modifikací propojující transkripci a sestřih u <i>S. cerevisiae</i> .....	33
<b>3. Materiál a metody</b> .....	35
3.1 Materiál.....	35
3.1.1 Kultivační média a roztoky.....	35
3.1.2 Přehled použitých kvasinkových kmenů .....	37
3.1.3 Přehled použitých primerů.....	39
3.1.4 Přehled použitých protilátek .....	40
3.1.5 Přehled použitých plasmidů.....	40
3.1.6 Přehled použitých DNA modifikujících enzymů .....	42
3.1.7 Přehled použitých standardů velikostí .....	43
3.1.8 Reakční směsi a programy PCR .....	43
3.2 Metody.....	45
3.2.1 Křížení <i>S. cerevisiae</i> (určení párovacího typu).....	45
3.2.2 Příprava a výsev glycerolových konzerv <i>S. cerevisiae</i> .....	45
3.2.3 Synchronizace <i>S. cerevisiae</i> $\alpha$ -faktorem v G1 fázi buněčného cyklu.....	45
3.2.4 Průtoková cytometrie.....	47
3.2.5 SPOT test <i>S. cerevisiae</i> .....	47
3.2.6 Transformace .....	48
3.2.7 Techniky manipulace s proteiny .....	51
3.2.8 Techniky manipulace s DNA.....	61
3.2.9 Techniky manipulace s RNA.....	72

<b>4. Cíle diplomového projektu .....</b>	<b>76</b>
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>77</b>
5.1 Příprava kmenů s delecí intronu v paralogním genu <i>TUB1</i> nebo <i>TUB3</i> v kombinaci s mutací <i>prp45(1-169)</i> s identickým genetickým pozadím .....	78
5.1.2 Zavedení zkrácené verze genu <i>prp45(1-169)</i> pomocí homologní rekombinace .	78
5.2 Nově připravené kmeny jsou různě citlivé ke zvýšené kultivační teplotě 37 °C a k mikrotubulárnímu inhibitoru benomyly .....	80
5.2.1 Citlivost buněk ke zvýšené kultivační teplotě .....	81
5.2.2 Citlivost buněk k mikrotubulárnímu inhibitoru benomyly .....	81
5.2.3 Citlivost buněk ke zvýšené kultivační teplotě a současně k benomyly .....	82
5.3 Intronem zprostředkovaná intergenová regulace genové exprese mezi paralogními geny <i>TUB1</i> a <i>TUB3</i> .....	83
5.3.1 Ověření primerů pro RT-qPCR .....	83
5.3.2 Testování změn v poměrech hladin mRNA a pre-mRNA genů <i>TUB1</i> a <i>TUB3</i> ..	86
5.4 Expres <i>TUB1</i> ani <i>TUB3</i> se u kmenů <i>prp45(1-169)</i> v přítomnosti benomyly nemění .....	87
5.5 Stanovení mobility nukleozomů v oblastech genu <i>TUB3</i> v závislosti na přítomnosti intronu a mutace <i>prp45(1-169)</i> .....	89
5.5.1 Příprava kmenů s delecí <i>BARI</i> pro déle trvající blok <i>S. cerevisiae</i> v G1 fázi buněčného cyklu v přítomnosti $\alpha$ -faktoru .....	90
5.5.2 Zavedení plazmidového systému pro indukcii exprese histonu myc-H3 .....	93
5.5.3 Ověření nově zavedeného systému exprese histonu myc-H3 v kvasinkách v G1 bloku.....	94
5.5.4 Pilotní experiment: Zavedení metody stanovení denzity histonu myc-H3 v lokusu genu <i>TUB3</i> pomocí chromatinové imunoprecipitace.....	95
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>100</b>
6.1 Ovlivňuje delece intronů z paralogních genů <i>TUB1</i> a <i>TUB3</i> růstový fenotyp mutantů <i>prp45(1-169)</i> ?.....	100
6.2 Dřívější výsledky nebyly testováním kmenů s identickým genetickým pozadím potvrzeny .....	101
6.2.1 Termosenzitivita buněk <i>prp45(1-169)</i> je nezávislá na přítomnosti intronů v paralogních genech pro tubulin $\alpha$ .....	101
6.2.2 Delece intronů z <i>TUB1</i> a <i>TUB3</i> vede k potlačení citlivosti buněk <i>prp45(1-169)</i> k benomyly .....	102
6.3 První hypotéza.....	103
6.3.1 Na intronu závislá intergenová regulace exprese mezi paralogními geny <i>TUB1</i> a <i>TUB3</i> nebyla potvrzena.....	103
6.3.2 Kvasinky <i>prp45(1-169)</i> nemění expresi <i>TUB1</i> a <i>TUB3</i> ani v přítomnosti benomyly.....	104
6.4 Druhá hypotéza.....	105
6.4.1 Delece intronů z genů pro tubulin $\alpha$ zvyšuje životaschopnost kvasinek <i>prp(1-169)</i> v podmínkách kombinovaného stresu .....	106

6.5 Změny v dynamice nukleozomů genu <i>TUB3</i> po delecii jeho intronu a u buněk s mutací <i>prp45(1-169)</i> .....	107
6.5.1 Nekonzistence množství histonu H3 a myc-H3 v lokusu genu <i>TUB3</i> u kmenů s <i>tub3Δi</i> a mutací <i>prp45(1-169)</i> mezi provedenými biologickými opakováními	107
6.5.2 Množství detekovaného histonu myc-H3 se mezi jednotlivými kmeny liší.....	108
<b>7. Shrnutí</b> .....	110
<b>8. Přehled citované literatury</b> .....	111

## 1. Úvod

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je v oblasti molekulární biologie hojně využívaným modelovým organismem, který má podrobně anotovaný genom, k jehož modifikacím byla vytvořena široká paleta dostupných, jednoduchých a velmi efektivních metod. Při bližším srovnání kvasinkové a lidské buňky zjistíme, že řada proteinů a základních buněčných procesů je konzervována. Tato skutečnost umožňuje některé výsledky získané zkoumáním *S. cerevisiae* využít pro objasnění mechanismů fungování buněčných procesů složitějších organismů, včetně lidského. V naší laboratoři využíváme tento modelový organismus pro studium sestřihu pre-mRNA, kterého se v kvasince účastní přibližně 90 proteinů a téměř všechny mají své homology u vyšších eukaryot (Fabrizio *et al.*, 2009). Zabýváme se genem *PRP45*, který kóduje stejnojmenný esenciální sestřihový faktor Prp45. Byla vytvořena zkrácená varianta tohoto genu *prp45(1-169)*, projevující se termosenzitivitou „postižených“ buněk. Tuto mutantu využíváme jako nástroj s destabilizovaným spliceozomem, jež vykazuje defekty sestřihu (Gahura *et al.*, 2009) a napomáhá odhalení buněčných procesů, pro něž je protein Prp45 a exaktní průběh sestřihu nezbytný.

Většina procesů v buňce byla tradičně studována a chápána odděleně, dnes je však jasné, že jsou tyto procesy funkčně a regulačně provázány. K sestavování spliceozomu a sestřihu většiny intronů kvasinky *S. cerevisiae* dochází na právě vznikajícím primárním transkriptu, ještě za přítomnosti RNA polymerázy II (Oesterreich *et al.*, 2010; Alexander *et al.*, 2010). Transkripce a sestřih jsou navíc úzce ovlivněny také chromatinovou strukturou a posttranslačními modifikacemi histonů v odpovídajícím úseku genu (Gunderson a Johnson, 2009; Gunderson *et al.*, 2011; Moehle *et al.*, 2012; Sorenson, 2016). Pochopení mechanismu provázání těchto buněčných procesů je zcela zásadní pro komplexní chápání genové exprese.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Transkripce a RNA polymeráza II

Transkripce je proces, během kterého je určitá část nukleotidové sekvence DNA, na základě komplementarity bází, s vysokou přesností přepsána do sekvence RNA, která je označována jako primární transkript (pre-mRNA). Přepis všech genů kodujících proteiny je katalyzován DNA-dependentní RNA polymerázou II (RNAPII). Jedná se o vysoce konzervovaný enzym, který je u kvasinky tvořen 12 podjednotkami (Rpb1-Rpb12). Součástí katalytické podjednotky Rpb1 je C-terminální doména (CTD), která je nezbytná pro regulaci řady buněčných procesů (Phatnani *et al.*, 2004).

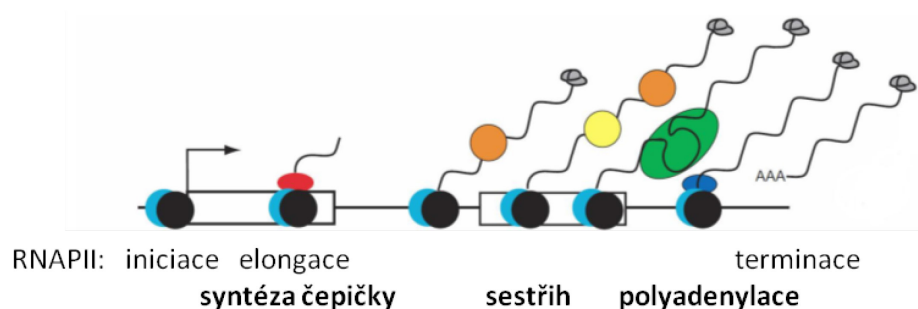
#### 2.1.1 C-terminální doména a její modifikace

C-terminální doménu RNAPII u *S. cerevisiae* tvoří tandemově se opakující heptapeptidová sekvence Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub> (Allison *et al.*, 1985). Jednotlivé aminokyseliny této sekvence jsou během transkripce dynamicky modifikovány, čímž se tvoří specifický „CTD kód“, který umožňuje vyvazování konkrétních proteinových faktorů (Buratowski, 2003; Kornblihtt *et al.*, 2004). Nejvýznamnější modifikací CTD je fosforylace Ser<sub>2</sub> a Ser<sub>5</sub>, která je výsledkem rozdílného působení kináz a fosfatáz v průběhu transkripce. V 5' oblasti transkribovaných genů je CTD fosforylována na Ser<sub>5</sub> (pSer<sub>5</sub>), což napomáhá vyvazování faktorů potřebných pro syntézu 7-methylguanositové (m<sup>7</sup>G) čepičky na 5' konci právě vznikající pre-mRNA (Cho *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 2000). Během elongační fáze transkripce dochází k postupné defosforylaci Ser<sub>5</sub> a naopak vzrůstá fosforylace na Ser<sub>2</sub> (pSer<sub>2</sub>; Komarnitsky *et al.*, 2000). pSer<sub>2</sub> pak v 3' oblasti genu napomáhá vazbě faktorů nutných pro maturaci právě vznikajícího transkriptu na 3' konci (Licatalosi *et al.*, 2002).

### 2.2 Primární transkript *S. cerevisiae* a jeho úpravy

Pre-mRNA musí před exportem z jádra a translací do proteinů v cytoplasmě projít řadou úprav. Kromě syntézy m<sup>7</sup>G čepičky a polyadenylace 3' konce transkriptu se jedná o sestřih, tj. vystřížení nekódujících oblastí (intronů) a pospojování oblastí kódujících (exonů) za vzniku funkční mRNA (Obr. 1). U kvasinky *S. cerevisiae* probíhá sestřih

většiny intronů ještě před dokončením transkripce, tedy kotranskripčně (Oesterreich *et al.*, Alexander *et al.*, 2010). Tento proces je katalyzován nukleoproteinovým komplexem spliceozomem, jehož jednotlivé komponenty jsou, stejně jako faktory nezbytné pro maturaci 3' a 5' konce transkriptu, postupně vázány na pre-mRNA již během transkripce (Görnemann *et al.*, 2005; Lacadie a Rosbash, 2005; Alexander a Beggs, 2010). Studium sestřihu je nezbytné nejen z hlediska komplexního chápání genové exprese, ale také pro případnou léčbu nemocí, které jsou s aberantním sestřihem spojené (retinitis pigmentosa, cystická fibróza nebo svalová dystrofie; Slaugenhaupt *et al.*, 2001; Wilkie *et al.*, 2008; Ward a Cooper, 2010).



Obr. 1: **Schematické znázornění transkripce a úprav primárního transkriptu.** červená – faktor pro syntézu m<sup>7</sup>G-čepičky, oranžová/žlutá – sestřihové faktory, zelená – kompletní spliceozom, modrá – polyadenylační faktory (převzato a upraveno dle Neugebauer, 2002).

Evoluční zachování intronů v genomu eukaryot naznačuje, že se nejedná o funkčně zcela bezvýznamné nekódující sekvence (Kent a Zahler, 2000; Fedorov *et al.*, 2002; Rogozin *et al.*, 2003). Introny jsou naopak přítomny v 95 % genů člověka (Lander *et al.*, 2001), podílejí se na regulaci genové exprese a díky nim probíhá alternativní sestřih, čímž zvyšují kódující potenciál genů (Lopez, 1998; Smith a Valcárcel, 2000; Stetefeld a Ruegg, 2005). Alternativním sestřihem může z jediného genu vzniknout řada sestřihových variant, podle kterých dochází k tvorbě strukturně potenciálně i funkčně odlišných proteinů. Tento proces hraje významnou roli zejména při buněčné diferenciaci (shrnutí v Chen a Manley, 2009). Vysoké zastoupení intronů však není pravidlem a jejich množství a charakter se mezi jednotlivými druhy výrazně liší. Vhodným modelovým organismem pro studium sestřihu je kvasinka *S. cerevisiae*, jejíž genom sice obsahuje pouze 5 % intronů (~ 270 genů; Schwartz *et al.*, 2008), ale ty jsou extenzivně transkribovány, a tak transkripty genů obsahujících intron představují 27 % celkové mRNA v buňce. Navíc téměř všech 90 proteinů, které se účastní sestřihu, má své homology u vyšších eukaryot (Fabrizio *et al.*, 2009).

## 2.3 Sestřih pre-mRNA *S. cerevisiae*

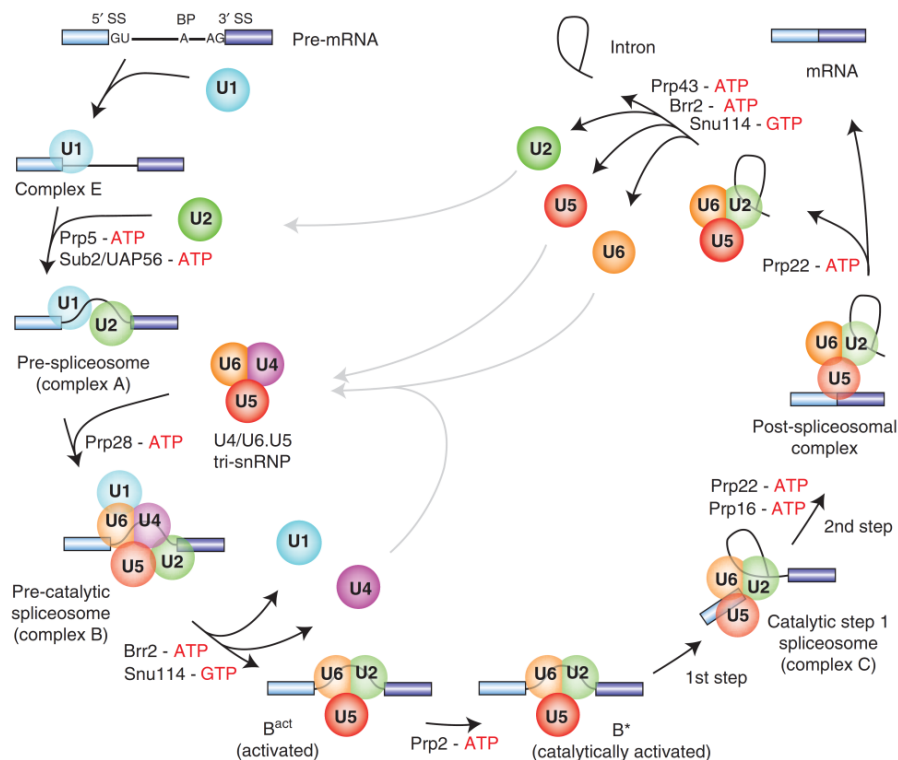
Sestřih pre-mRNA je dynamický a extrémně komplikovaný proces s velkými nároky na přesnost. Probíhá ve dvou následných transesterifikačních reakcích, které jsou katalyzovány, již dříve zmíněným, nukleoproteinovým komplexem spliceozomem. Probíhající transesterifikace je chemickou přeměnou jedné fosfodiesterové vazby v druhou za využití právě uvolněné energie (Obr. 2). I přes to, že samotný reakční mechanismus sestřihu nepotřebuje dodání energie z vnějšku, je kvůli zajištění přesnosti a regulovatelnosti celého procesu spotřebováno velké množství adenosintrifosfátu (ATP). Energie získaná hydrolyzou ATP je využita RNA helikázami DExD/H-box, které rozvolňují RNA-RNA a RNA-protein interakce, a řídí tak dynamické přestavby spliceozomu (Lin *et al.*, 1987; Pyle, 2008). Hlavní komponenty spliceozomu jsou ribonukleoproteinové partikule snRNP tvořené asociací malých jaderných snRNA (U1, U2, U4, U5 a U6) se specifickými sestřihovými proteiny. Vedle nich se sestřihu účastní i řada dalších proteinů a proteinových komplexů, mezi které patří NTC komplex (*The NineTeen Complex*) a proteiny s ním asociované (NTR - *NTC related*).

Korektní rozeznání a vystřížení intronu je zajištěno jeho krátkými velmi silně konzervovanými sekvencemi: 5' sestřihovým místem (5'ss – GUAUGU) a oblastí větvení (BS - UACUAAC). Ve vhodné vzdálenosti od BS je vybíráno 3' sestřihové místo (3'ss - AG), které se nachází u většiny intronů 20-40 nukleotidů od BS (Obr. 2; Spingola *et al.*, 1999; Bon *et al.*, 2003).

Obr. 2: **Transesterifikační reakce sestřihu** (Collins a Guthrie, 2000).

Formování spliceozomu začíná vazbou U1 snRNP do 5'ss. Následně dochází k rozeznání oblasti větvení, do které se váže heterodimer Msl5•Mud2 (tvoří se komplex E). Ten je okamžitě vystřídán U2 snRNP, jenž v místě vazby (BS) zpřístupňuje katalytický adenosin (tvoří se komplex A; Query *et al.*, 1994). Následuje interakce pre-spliceozomu s U4/U6•U5 tri-snRNP a NTC komplexem (tvoří se komplex B). RNA-helikázy Prp28 a Brr2, které jsou součástí U5 snRNP, indukují rozsáhlé strukturální přestavby, disociaci U4 a U1 snRNP a stabilizaci U5 a U6 snRNP (Laggerbauer *et al.*,

1998; Staley a Guthrie, 1999; Chan *et al.*, 2003). Nově navázaný U6 snRNP interaguje s U2 snRNP, čímž dochází ke sférickému přiblížení 5'ss a BS, nezbytnému pro následující katalytický krok (tvoří se komplex B<sup>act</sup>). K plné aktivaci komplexu dochází teprve vazbou RNA-helikázy Prp2 (tvoří se komplex B\*), což vede k zahájení první transesterifikační reakce mezi 2'-hydroxylovou skupinou katalytického adenosinu (BS) a fosfodiesterovou vazbou v 5'ss (Kim a Lin, 1996; Ohrt *et al.*, 2012). Vzniká tak „volný“ exon 1 a lasovitá struktura intronu stále spojená s exonem 2 (tvoří se komplex C). Sestřih je dokončen druhou transesterifikační reakcí, během které volná 3'-hydroxylová skupina exonu 1 atakuje fosfodiesterovou vazbu na rozhraní intron-exon 2 (3'ss), čímž dochází ke spojení obou exonů a uvolnění intronu ve formě lariátu. Díky helicázám Prp22 a Prp43 dochází k uvolnění sestřižené mRNA a k rozpadu spliceozomu, jehož komponenty jsou znovu využity pro další kola sestřihu (Obr. 3; Tsai *et al.*, 2005; Schwer, 2008; Rino a Carmo-Fonseca, 2009). Uvolněná lasovitá struktura intronu je poté linearizována pomocí enzymu Dbr1 a degradována zejména 5'-exonukleázami (Mitchell a Tollervey, 2001; Khalid *et al.*, 2005).



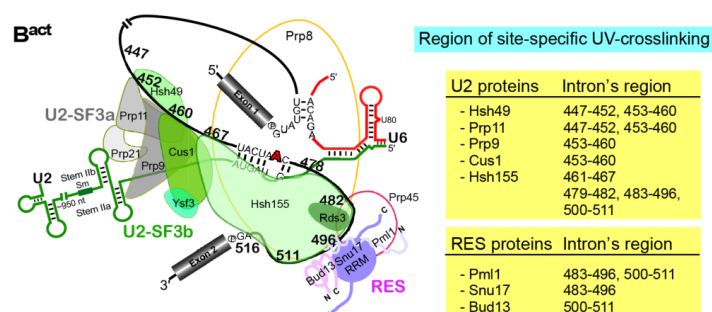
Obr. 3: Sestřih pre-mRNA – formování spliceozomu, jeho rozpad a recyklace jednotlivých komponent pro další cyklus sestřihu (Will a Lührmann, 2011).

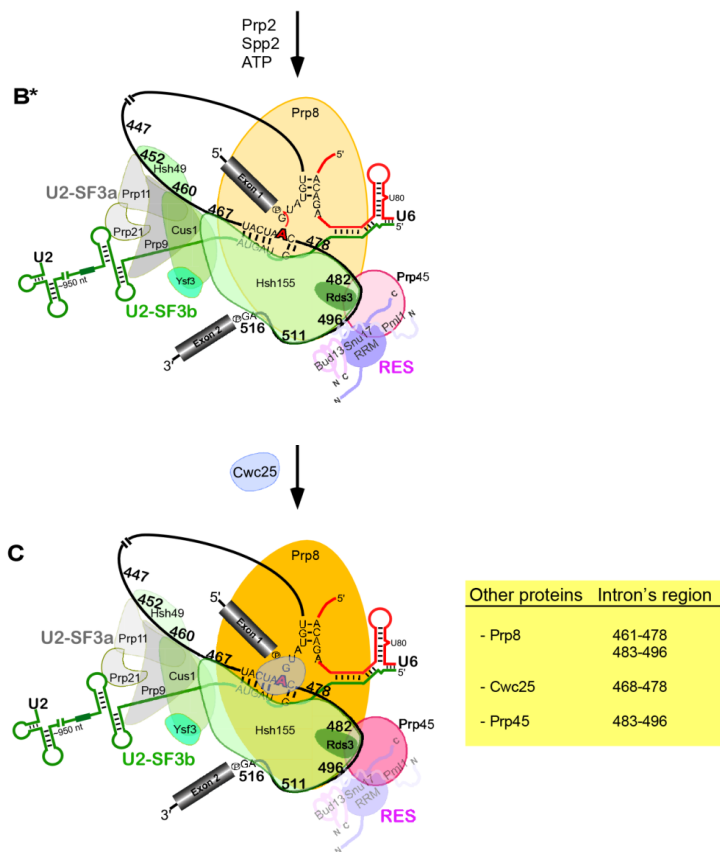


## 2.4 Sestřihový faktor Prp45

V naší laboratoři studujeme esenciální sestřihový faktor Prp45 (*pre-mRNA processing*) kvasinky *S. cerevisiae*. Jedná se o ortholog lidského proteinu SNW1/SKIP, který byl mj. identifikován jako vazebný partner onkogenu Ski, z čehož také pramení jeho název (Dahl *et al.*, 1998). Kromě sestřihu pre-mRNA se lidský SNW1/SKIP účastní celé řady dalších významných buněčných procesů (Neubauer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003). Působí v rámci některých signálních drah, jako je například Notch (Zhou *et al.*, 2000) nebo TGF $\beta$  (Leong *et al.*, 2001) a je významným transkripčním koregulátorem na úrovni genové aktivace a represe (Zhang *et al.*, 2001; Prathapam *et al.*, 2002).

Prp45 je esenciální 379 aminokyselin dlouhý protein o molekulové hmotnosti 42 kDa. Jeho primární struktura zahrnuje několik vysoce konzervovaných úseků: polyprolinový motiv, zcela konzervovanou SNW doménu (SNWKN), helikální motiv a SH2-like doménu. V porovnání s jeho orthology se jedná o jednodušší variantu proteinu, která má výrazně zkrácenou N-terminální část (Folk *et al.*, 1996). Protein Prp45 tak v důsledku tohoto zkrácení nezprostředkovává např. vazbu izomerázy Cyp2 (*cyclophilin*), která pravděpodobně usnadňuje remodelaci spliceozomu (Skrůžný *et al.*, 2001). Zatím byla potvrzena úloha proteinu Prp45 pouze při sestřihu pre-mRNA (Alberts a Beggs, 1999). Jeho asociace se spliceozomem byla detekována již v rámci komplexu B<sup>act</sup>, k jeho přímé vazbě do oblasti intronu však dochází až v rámci katalyticky aktivního komplexu B\* (Albers *et al.*, 2003; Fabrizio *et al.*, 2009). Po první transesterifikační reakci sestřihu navíc dochází k navýšení síly této vazby až o 80 % (Obr. 4; Schneider *et al.*, 2015). Po skončení sestřihu zůstává protein Prp45 společně s U2, U5 a U6 snRNP navázán na vystřiženém lariátu (Albers *et al.*, 2003).





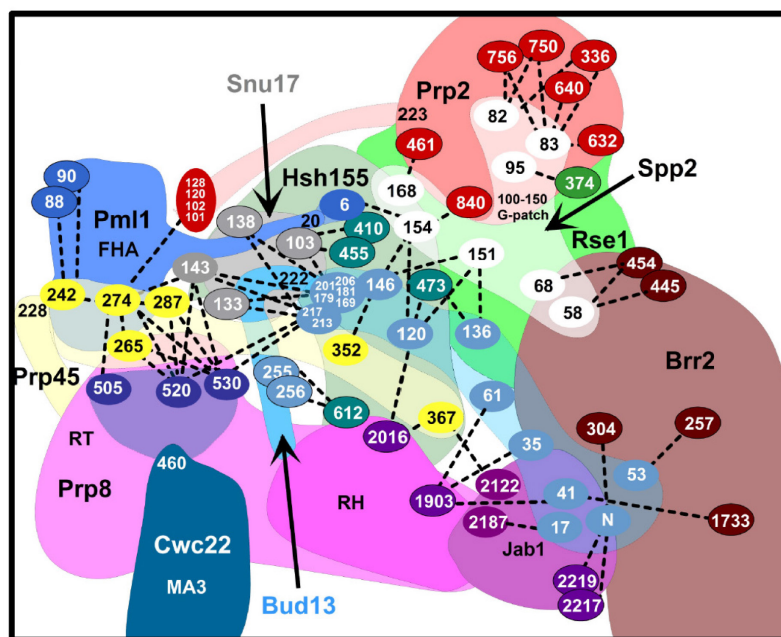
Obr. 4: Schematické znázornění vazby některých sestřihových faktorů do konkrétních oblastí pre-mRNA v rámci komplexu B<sup>act</sup>, B\* a C. V tabulkách jsou uvedeny názvy sestřihových faktorů a jejich přesná vazebná oblast intronu. Intenzita zbarvení jednotlivých struktur (U2 snRNP (šedá a zelená) a RES komplex (filalová)), pak odpovídá síle jejich vazby v rámci primárního transkriptu (Schneider *et al.*, 2015).

#### 2.4.1 Interakční partneři a funkce Prp45 v rámci sestřihu

Mezi interakční partnery Prp45 patří protein Prp46, který je součástí NTC komplexu podílejícího se na aktivaci spliceozomu (Ohi *et al.*, 2005). Dále interaguje a je nezbytný pro vyvazování DEAH-box RNA-helikázy Prp22, která se účastní druhé transesterifikační reakce sestřihu, participuje na rozpadu spliceozomu a je významná pro sestřih nestandardních intronů (Schwer a Gross, 1998; Albers *et al.*, 2003; Gahura *et al.*, 2009). S obrovským rozmachem elektronové kryomikroskopie byla v letech 2015-2017 vydána řada strukturních studií spliceozomu, které odhalují lokalizaci proteinu Prp45 v bezprostřední blízkosti katalytického centra spliceozomu. Díky svojí strukturální neuspořádanosti se protein Prp45 rozkládá od katalytického centra až k samotné periférii spliceozomu a kromě Prp46 a Prp22 fyzicky interaguje i s dalšími sestřihovými proteiny

např. Prp8, Prp2, Pml1, Bud13, Hsh155, Cef1, Cwc15 a Clf1/Syf2 (Obr. 5; Yan *et al.*, 2015, 2016, 2017; Galej *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2016; Rauhut *et al.*, 2016).

Výše zmíněné proteiny Pml1 a Bud13 jsou součástí RES komplexu (*pre-mRNA Retention and Splicing*), který se podílí na sestřihu nestandardních intronů a je významný pro retenci nesestřižené pre-mRNA v jádře (Dziembowski *et al.*, 2004). Protein Prp45 interaguje s těmito proteiny svojí C-koncovou částí a napomáhá jejich lokalizaci mezi Hsh155 a Prp8 (Obr. 5A). Na základě těchto výsledků se autoři domnívají, že protein Prp45 pravděpodobně usnadňuje dynamické přestavby spliceozomu a podílí se na stabilizaci protein-proteinových interakcí (Yan *et al.*, 2015, 2016; Rauhut *et al.*, 2016).

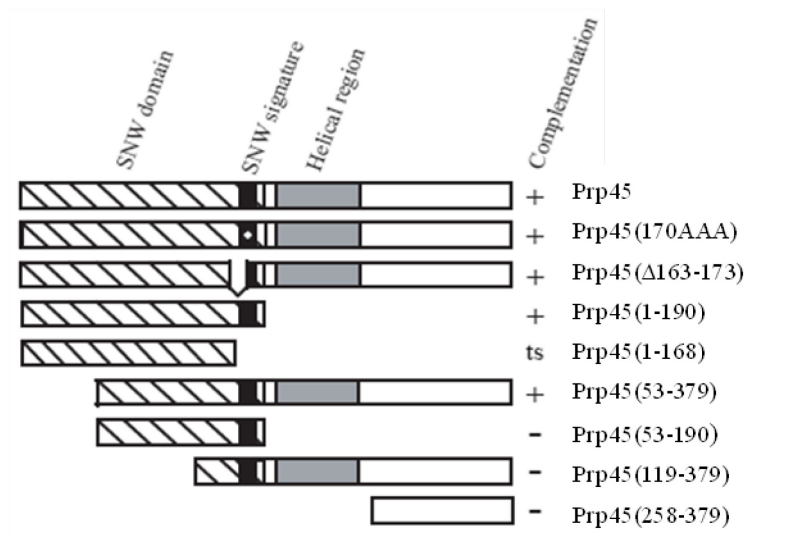


Obr. 5: Znárodnění pozice, struktury a interakční partnerů proteinu Prp45. Prp45 v rámci B<sup>act</sup> komplexu. Čísla ve žlutých oválech znázorňují aminokyselinové zbytky Prp45, skrz které interaguje s ostatními komponentami spliceozomu (Rauhut *et al.*, 2016).

#### 2.4.2. Termosenzitivní varianta prp45(1-169)

V naší laboratoři byla ke studiu funkce esenciálního proteinu Prp45 vytvořena jeho zkrácená termosenzitivní mutanta *prp45(1-169)*. Kvasinky, které exprimují zkrácenou alelu *prp45(1-169)*, využíváme jako systém s destabilizovaným spliceozomem, který vykazuje slabý sestřihový defekt. Tento defekt se prohlubuje v případě transkriptů s nestandardními sestřihovými místy (Gahura *et al.*, 2009; Gahura nepublikovaná data). Expres zkráceného proteinu Prp45(1-169) v kvasinkách zachovává za standardních podmínek, kromě mírného prodloužení generační doby, nenarušený růst.

Pokud však tyto mutanty přeneseme do restriktivní teploty 37 °C, je jejich růst postupně zastaven (Gahura *et al.*, 2009).



Obr. 6: N- a C-koncové deleční varianty proteinu Prp45 vytvořené v naší laboratoři. Znaménkem + nebo – je znázorněna schopnost daných mutantních proteinů zajistit růst kmenů s delecí genomického PRP45; *ts* pak označuje získanou termosenzitivní alelu (převzato a upraveno dle Gahura *et al.*, 2009).

Protein Prp45 prostřednictvím své C-koncové oblasti interaguje s ostatními sestřihovými faktory, které s největší pravděpodobností napomáhá vyvazovat a stabilizovat v rámci spliceozomu (Rauhut *et al.*, 2016). V případě mutanty *prp45*(1-169) detekujeme v spliceozomu signifikantně nižší množství helikázy Prp22, přičemž jejím řízeným nabohacením můžeme *ts* fenotyp *prp45*(1-169) částečně suprimovat (Gahura *et al.*, 2009). Mutanta *prp45*(1-169) navíc geneticky interaguje a vykazuje syntetickou letalitu v kombinaci s mutacemi v řadě faktorů významných pro druhý krok sestřihu (Slu7, Prp17, Prp18 a Prp22) a s mutacemi v některých komponentech NTC komplexu (Sfy1, Clf1/Sfy2, Ntc20 a Cef1; Burns *et al.*, 2002; Albers *et al.*, 2003; Chawla *et al.*, 2003; Gahura *et al.*, 2009).

Jak již bylo uvedeno, *S. cerevisiae* exprimující mutantní protein Prp45(1-169) sice nevykazují žádný výrazný růstový defekt za standardních podmínek, ale můžeme u nich pozorovat několik morfologických abnormalit. Nadměrně prodloužené deformované kvasinky *prp45*(1-169) jsou citlivé k mikrotubulárním inhibitorům (nocodazol, carbendazim a benomyl) a značné procento buněk má velké neoddělené pupeny (~ 25,5 %), jejichž výskyt se v nepermissivní teplotě 37 °C ještě zvyšuje (~ 49 %). Všechny tyto výše uvedené fenotypy připomínají *cdc* mutanty (mutace faktorů spojených s buněčným

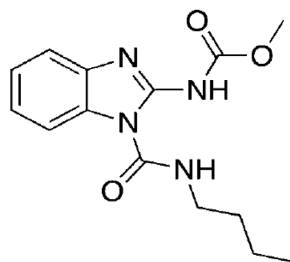
cyklem) a naznačují možný problém v mikrotubulárním aparátu buňky (Gahura *et al.*, 2009).

## 2.5 Mikrotubulární cytoskelet *S. cerevisiae*

Mikrotubul je dynamická polární struktura tvořená 13 protofilamenty, jejichž základní stavební jednotkou je heterodimer globulárního tubulinu  $\alpha$  (kódován geny *TUB1* a *TUB3*; (Schatz *et al.*, 1986b) a  $\beta$  (gen *TUB2*; (Neff *et al.*, 1983). K polymeraci mikrotubulů dochází v okamžiku, kdy množství dimerů  $\alpha\beta$  s navázaným guanosintrifosfátem (GTP) dosáhne tzv. kritické koncentrace. Naopak v okamžiku, kdy je hydrolyza GTP rychlejší než asociace GTP „nabitých“ dimerů, dochází k jejich depolymeraci. Mikrotubul je u kvasinky *S. cerevisiae* kotven a stabilizován v tzv. mikrotubuly organizujícím centru (SPB - *spindle pole body*) a asociuje s řadou proteinů (MAP - *Microtubules Associated Proteins*), které mu propůjčují v buňce nepostradatelné role. Mikrotubulární systém se účastní zejména segregace chromosomů, pohybu váčků a organel či polarizovaného růstu (Barnes *et al.*, 1990; Winsor a Schiebel, 1997).

### 2.5.1 Benomyl

Benomyl, derivát benzimidazolu, je selektivně toxický pro mikroorganismy a hojně se používá jako fungicid (Obr. 7; Davidse a Flach, 1977). Snižuje dynamiku mikrotubulů a vede k jejich postupné depolymeraci, inhibuje tak mitotické vřetenko a poškozuje proces dělení buněk (Quinlan *et al.*, 1980; Delgado a Conde, 1984). Jeho vazebným cílem je tubulin  $\beta$  – konkrétní mutace v aminokyselinové skladbě tubulinu  $\beta$  dávají vzniknout rezistentním kmenům (Thomas *et al.*, 1985; Reijo *et al.* 1994). Tyto aminokyseliny leží převážně v centru tubulinu  $\beta$ , nicméně přesné vazebné místo nebylo dosud odhaleno (Richards *et al.*, 2000). Je zajímavé, že potenciální vazebné pozice pro benomyl jsou mezi živočichy a houbami velmi silně konzervovány, benomyl je přitom pro živočichy v podstatě netoxický (Gupta *et al.*, 2004). Tento selektivní účinek však může mít i jiné důvody než změněné vazebné místo, jako je rozdílná regulace jeho aktivity, nebo rozdílný selektivní import či export z buněk (Wride *et al.*, 2014).



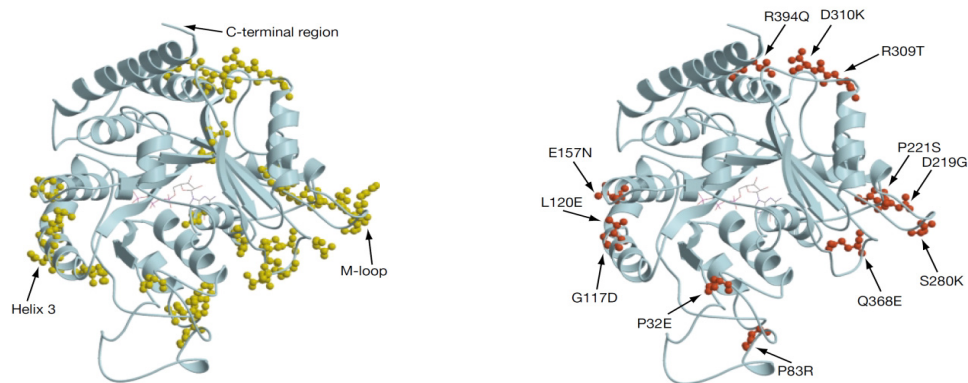
Obr. 7: **Struktura molekuly benomyly** (Wride *et al.*, 2014).

## 2.6 Paralogní geny *TUB1* a *TUB3*

Genom kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje dva geny pro tubulin  $\alpha$ , *TUB1* a *TUB3*. Nacházejí se na začátku chromosomu 13 a vykazují vysokou sekvenční podobnost - identita nukleotidové sekvence je  $\sim 81\%$  a sekvence aminokyselin  $\sim 90\%$ . Oba geny obsahují intron a právě sekvence intronů se mezi těmito geny významně liší. Intron genu *TUB1* je dlouhý 116 nukleotidů, zatímco intron genu *TUB3* je více než dvakrát delší - 298 nukleotidů (Schatz *et al.*, 1986). Jedná se o geny, které vznikly celogenomovou duplikací u předka *S. cerevisiae* před více než 100 milióny let (Wolfe a Shields, 1997). Po této události bylo přibližně 10 % duplikovaných genů zachováno, neboť v průběhu evoluce tyto geny divergovaly, čímž získaly změněné nebo zcela nové funkce (Langkjær *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2004). Genom kvasinky *S. cerevisiae* podstoupil i další dílčí duplikační události, a paralogy tak ve výsledku zaujímají přibližně 19 % všech genů (Byrne a Wolfe, 2005).

Bylo zjištěno, že přibližně 70 % všech paralogních genů je exprimováno asymetricky (Parenteau *et al.*, 2011), tato skutečnost platí i v případě genů pro tubulin  $\alpha$ . *TUB1* je majoritní a esenciální gen, který dává v buňce vzniknout 90 % veškerého tubulinu  $\alpha$ , kdežto *TUB3* je minoritní gen, jehož delece vede pouze ke zvýšené citlivosti buněk k mikrotubulárnímu inhibitoru benomyly (Schatz *et al.*, 1986b; Bode *et al.*, 2003). Naproti tomu až třicetinásobné navýšení exprese *TUB1* nebo *TUB3* nemá na životaschopnost kvasinky žádný efekt, avšak vede k zvýšené rezistenci buněk k benomyly (Schatz *et al.*, 1986a; Katz *et al.*, 1990). Dostatečné navýšení exprese minoritního genu *TUB3* dokáže suprimovat letální fenotyp způsobený delecí *TUB1*. Tato skutečnost a výrazná strukturální podobnost obou proteinů pak ukazuje na jejich funkční redundanci (Schatz *et al.*, 1986a). Nicméně mikrotubuly, ve kterých je tubulin  $\alpha$  zastoupen pouze proteinem Tub1, jsou velmi dynamické a snadno depolymerují. Naopak

u mikrotubulů, které obsahují pouze Tub3, bylo pozorováno výrazné snížení dynamiky a vysoká stabilita (Bode *et al.*, 2003). Proteiny Tub1 a Tub3 se liší pouze ve 39 aminokyselinách, které se nacházejí převážně na povrchu struktury tubulinu  $\alpha$ , a to zejména v místě laterální interakce mezi protofilamenty mikrotubulů, což vysvětluje rozdílnou dynamiku a náchylnost obou typů mikrotubulů k depolymeraci (Obr. 8; Nogales *et al.*, 1999). Minoritně zastoupený protein Tub3 s největší pravděpodobností slouží k doladění dynamiky mikrotubulů v buňce (Bode *et al.*, 2003).

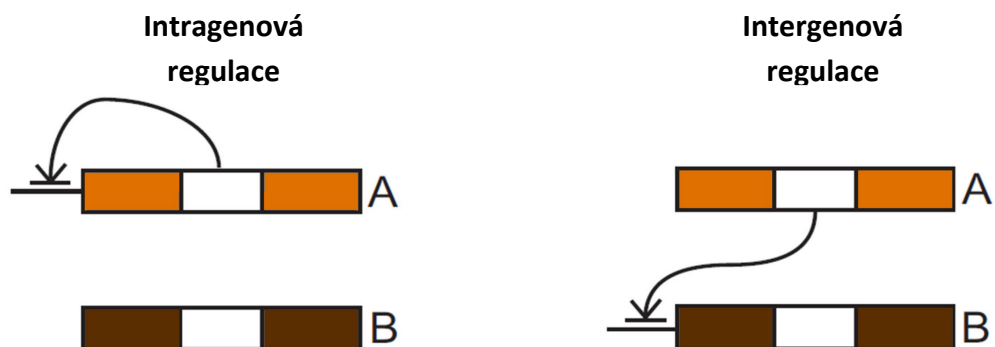


Obr. 8: **Struktura kvasinkového tubulinu  $\alpha$ .** Žlutě jsou znázorněny aminokyseliny, které se liší mezi proteiny Tub1 a Tub3. Aminokyseliny, které způsobují změnu náboje v daném místě, jsou označeny červeně (upraveno dle Bode *et al.*, 2003).

Mutace některých sestřihových faktorů jako jsou *CEF1*, *PRP16*, *PRP17* a *PRP22* způsobují výraznější defekt sestřihu konkrétních transkriptů, a to zejména transkriptu *TUB1*. Například v buňkách, které nesou termosenzitivní mutaci *cef1-13*, můžeme detekovat pouze poloviční množství mRNA *TUB1*, které dává vzniknout o 30 % méně Tub1. Tento stav vede k tvorbě nestabilních mikrotubulů, buňka není schopná se dělit a dochází k zastavení buněčného cyklu. Delece intronu z *TUB1* (*tub1 $\Delta$ i*) nebo nabohacení *TUB1* z plazmidu vede k potlačení tohoto fenotypu (Burns *et al.*, 2002; Chawla *et al.*, 2003). Navíc bylo zjištěno, že nepoměrně vyšší množství tubulinu  $\beta$  oproti tubulinu  $\alpha$  je pro buňku toxické. Stabilita mikrotubulů tedy závisí nejen na poměru izotypů tubulinu  $\alpha$ , ale i na poměru tubulinu  $\alpha$  a  $\beta$  (Burke *et al.*, 1989; Katz *et al.*, 1990; Weinstein a Solomon 1990). Zda je sestřih primárního transkriptu *TUB1* ovlivněn také mutací v sestřihovém faktoru Prp45 (*ts*; *prp45(1-169)*), bylo již před lety částečně zodpovězeno v naší laboratoři. Ukázalo se, že delece intronu z *TUB1* nemá na růstový fenotyp buněk *prp45(1-169)* žádný viditelný efekt (Gahura *et al.*, 2009).

### 2.6.1 Paralogní geny a jejich introny

Nejprozkoumanější a největší skupinu paralogních genů tvoří geny kódující ribozomální proteiny (RP; Byrne a Wolfe, 2005). RP geny, ale i celá řada dalších paralogních genů, jsou v buňce extenzivně transkribovány a i přes obecně nízký výskyt intronů v genomu *S. cerevisiae* přibližně 11 % z nich intron obsahuje (80 % RP genů; Spingola *et al.*, 1999; Parenteau *et al.*, 2008; Plocik a Guthrie, 2012). Přítomnost této nekódující sekvence pozitivně koreluje se zvýšenou genovou expresí (Ares *et al.*, 1999; Vinogradov, 2001). U genů s intronem vzniká v průměru 3.9 krát více transkriptu a 3.3 krát více proteinu, než je tomu v případě jejich bezintronových protějšků (Deutschbauer *et al.*, 2005; Juneau *et al.*, 2006). V jedné ze studií regulace genové exprese RP genů je ukázáno, že delece intronu z jednoho paralogu může ovlivňovat jak množství jeho vlastní mRNA (intragenová regulace), tak i množství mRNA druhého paralogu (intergenová regulace; Obr. 9). Tento mechanismus rozšiřuje regulační komplexitu organismu a částečně osvětluje retenci intronů v genomu *S. cerevisiae*, i přes velmi nízký výskyt alternativního sestřihu (Pleiss *et al.*, 2007; Parenteau *et al.*, 2011).

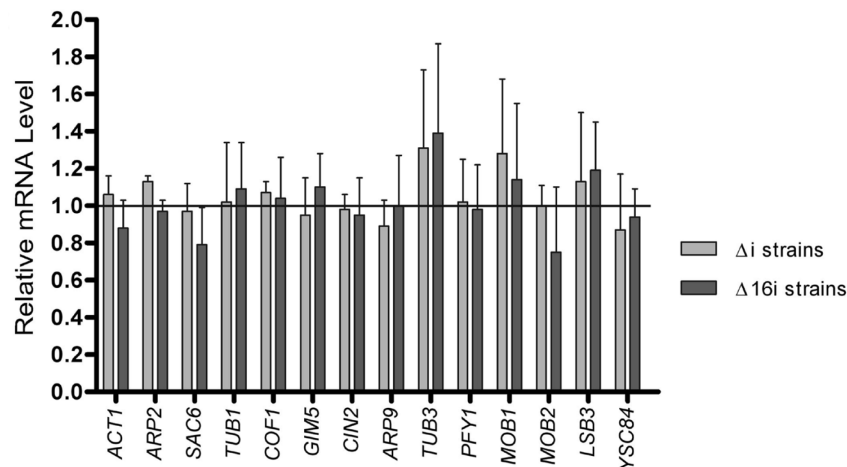


Obr. 9: Schematické znázornění vzájemného ovlivnění genové exprese mezi paralogy. Oranžová a hnědá pole znázorňují exony a bílé introny. Šipka pak směřuje k promotoru genu, jehož exprese je přítomností intronu ovlivněna (převzato a upraveno dle Parenteau *et al.*, 2011).

Delece většiny intronů z genomu kvasinky *S. cerevisiae* nemá na její růst v komplexním médiu za standardních podmínek vliv. Při detailním zkoumání se však ukázalo, že delece 16 % z nich ovlivňuje růst kvasinky v nestandardních podmínkách (přítomnost stresoru, alternativní složení média apod.), přičemž pouze v případě tří genů (*MTR2*, *YRA1* a *TAD3*) způsobuje delece intronu výraznější růstový defekt, který je ale plně napraven expresí bezintronové verze tohoto genu pod heterologním promotorem. Expresní analýza vybraných genů navíc dokazuje, že delece všech 16 intronů z 15 genů



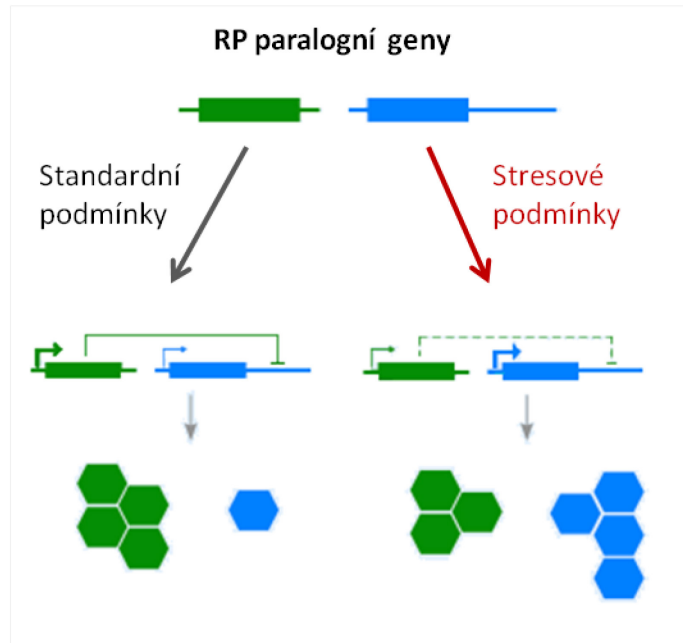
spojených s cytoskeletem *S. cerevisiae* (včetně paralogních genů *TUB1* a *TUB3*) nezpůsobuje výrazný růstový defekt ani signifikantní změnu jejich exprese. Ve většině případů můžeme pozorovat pouze drobné odchylky relativních genových expresí. Jediné odstranění intronu z genu *TUB3* způsobuje výraznější nárůst vlastní mRNA oproti buňkám divokého typu (Obr. 10; Parenteau *et al.*, 2008).



Obr. 10: **Relativní exprese cytoskeletálních genů před a po delecii intronu.** Světle šedé sloupce znázorňují míru exprese cytoskeletálního genu po delecii jeho intronu. Tmavě šedé sloupce pak míru exprese cytoskeletálního genu po delecii všech intronů z genů spojených s cytoskeletem. Jednotlivá měření jsou vztažena k hodnotám naměřeným v buňkách divokého typu (Parenteau *et al.*, 2008).

Ze stejné laboratoře vychází i studie, která tuto expresní analýzu později rozšířila právě o RP geny. Ukázalo se, že výše zmíněná na intronu závislá intergenová regulace genové exprese je pro kvasinku zásadní zejména v nestandardních podmínkách, kdy je potřeba změnit produkci ribozomálních proteinů, a tedy i míru translace v závislosti na měnícím se prostředí. V případě paralogních RP genů má delece intronu ve 43 % případů negativní a ve 41 % případů pozitivní efekt na expresi druhého paralogu. Obecný mechanismus této regulace není dosud zcela jasný, ale zdá se, že introny hrají zásadní roli v určení poměru mRNA jednotlivých paralogů. Jak bylo uvedeno, většina paralogních genů je exprimována asymetricky, přičemž ke změně poměru mRNA jednotlivých RP genů dochází v přítomnosti stresoru nebo delecí jednoho z intronů (Parenteau *et al.*, 2011; Plocik a Guthrie, 2012; Petibon *et al.*, 2016). Minoritní gen je preferenčně exprimován v nestandardních podmínkách a jeho úplná delece vede ke zvýšené citlivosti kmenů k danému stresoru (Obr. 11.; Parenteau *et al.*, 2015). Roli intronu v rámci intergenové

regulace genové exprese navíc potvrzuje fakt, že záměna intronů mezi paralogními geny převrací poměr jejich exprese (*RPS9A* a *RPS9B*; Petibon *et al.*, 2016).



Obr. 11: Schématické znázornění asymetrické exprese paralogních genů a její změny v nestandardních podmínkách (převzato a upraveno dle Parenteau *et al.*, 2015).

I přes řadu studií, které se zabývají genovou expresí paralogních genů, je stále nejasné, zda intergenová regulace genové exprese probíhá výhradně u ribozomálních genů, nebo ovlivňuje expresi i jiných paralogů. Předběžné výsledky získané v naší laboratoři naznačily protichůdný efekt delece intronů z paralogních genů *TUB1* a *TUB3* na termosenzitivitu sestříhové mutanty *prp45(1-169)*. Na základě těchto výsledků byla formulována otázka, zda intergenová regulace genové exprese skrze intron neprobíhá i mezi paralogními geny pro tubulin  $\alpha$  (Konířová, diplomová práce 2010). Tato práce se však potýkala s experimetálními nedostatky, proto bylo nutné tento vztah dále objasnit, což je také jedním z cílů této diplomové práce.

## 2.7 Chromatinová struktura

Základní stavební jednotku chromatinu, nukleozom, tvoří 145-147 párů bází (bp) dlouhý úsek DNA 1.65 krát ovinutý kolem oktameru histonů, který se skládá ze dvou dimerů H2A-H2B a tetrametu H3-H4 (Kornberg, 1974; Richmond a Davey, 2003). Díky kladnému náboji histonů dochází k stérickému přiblížení záporně nabitě DNA, což umožňuje kondenzaci dlouhé lineární molekuly DNA. Histony jsou globulární proteiny

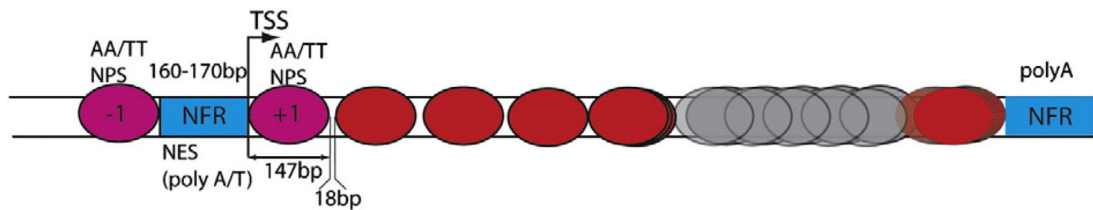
s nestrukturovanými N-konci, které vyčnívají na povrch nukleozomů, a jsou tak přístupné modifikačním enzymům. Na jednom histonu může být přítomno i několik typů posttranslačních modifikací, které regulují sílu vazby nukleozomů k DNA, mezi nukleozomy navzájem a slouží jako vazebná platforma pro další regulační proteiny (Luger *et al.*, 1997). Jednotlivé nukleozomy, které odděluje „linker DNA“ dlouhá ~ 18 bp (Lee *et al.*, 2007), jsou uspořádány do vyšších chromatinových struktur, na jejichž stavbě se podílí histon H1, ale i řada nehistonových proteinů (Pruss *et al.*, 1995).

Chromatin je vysoce dynamickou strukturou a míra jeho kondenzace závisí mimo jiné na fázi buněčného cyklu. K nejvyšší kondenzaci dochází během buněčného dělení, kdy je chromatin kondenzován do podoby mitotických chromozomů, což umožňuje jejich segregaci do dceřiných buněk. Ve zbývajících fázích buněčného cyklu tvoří tzv. interfázni chromozomy, jejichž míra kondenzace se v jednotlivých oblastech DNA liší. Jako heterochromatin je označována velmi silně kondenzovaná oblast DNA, která reprimuje vazbu proteinových faktorů a tedy i genovou expresi. Více rozvolněná a vazebně přístupná oblast DNA je označována jako euchromatin. Změna míry kondenzace a remodelace chromatinu probíhá jak v rámci buněčné diferenciace, tak v závislosti na právě probíhajícím buněčném procesu - transkripce, rekombinace, oprava a replikace DNA.

### **2.7.1 Pozice nukleozomů v genomu *S. cerevisiae***

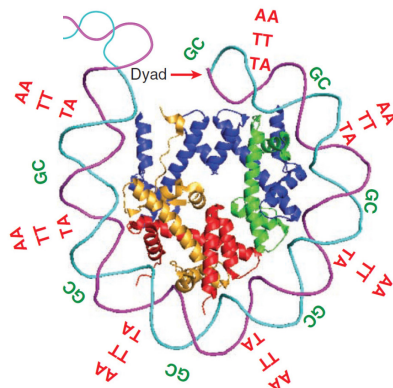
Většina nukleozomů *S. cerevisiae* (~ 80 %) má v genomu dobře definovanou pozici a jejich lokalizace je u všech buněk dané populace stejná (Yuan *et al.*, 2005). Namapování všech nukleozomů do genomu *S. cerevisiae* odhalilo některé konzervované vzorce jejich výskytu. Téměř u každého genu (~ 95 %) se vyskytuje přibližně 150 bp dlouhý úsek promotoru, který se nachází před transkripčním počátkem (TSS), ve kterém nukleozomy zcela chybí (5'NFR – *nucleosome free region*; Yuan *et al.*, 2005). Tato oblast je ohraničena velmi stabilně lokalizovanými -1 a +1 nukleozomy, které slouží jako vodítko pro vyvazování ostatních přilehlých nukleozomů. Přesnost lokalizace ostatních nukleozomů se tak postupně snižuje se zvyšující vzdáleností od +1 nukleozomu (Obr. 12; Mavrich *et al.*, 2008). V oblasti 5'NFR se typicky nacházejí vazebná místa pro transkripční faktory (TF), které regulují transkripci jednotlivých genů. *In vivo* studie navíc odhalují, že 5'NFR je v nativním stavu buňky ještě rozsáhlejší, což je způsobeno

právě extenzivní vazbou TF (Hartley a Madhani, 2009; Kaplan *et al.*, 2009). Vedle 5'NFR nalezneme u většiny genů také oblast 3'NFR, která pravděpodobně ovlivňuje terminaci transkripce, ale její přesná funkce je zatím nejasná (Mavrich *et al.*, 2008).



Obr. 12: Schematické znázornění pozice nukleozomů v rámci jednoho genu *S. cerevisiae*. Znázornění -1 a +1 nukleozomů, které ohraničují 5'NFR, a postupně snižující se přesnosti lokalizace nukleozomů „downstream“ od +1 nukleozomu (Radman-Livaja a Rando, 2010).

Definovanou pozici nukleozomů v genomu, která je zásadní pro správný průběh buněčných procesů, ovlivňuje také primární sekvence DNA. Oblasti DNA bohaté na nukleotidy AT, a to zejména poly(dA:dT), obsahují obecně méně nukleozomů oproti oblastem s vyšším podílem nukleotidů GC. Ukázalo se, že pro tvorbu nukleozomů je optimální střídání AA/TT/AT s GC nukleotidy v pravidelných intervalech 5 bp (Obr. 13; Segal a Widom, 2009; Tillo a Hughes, 2009).

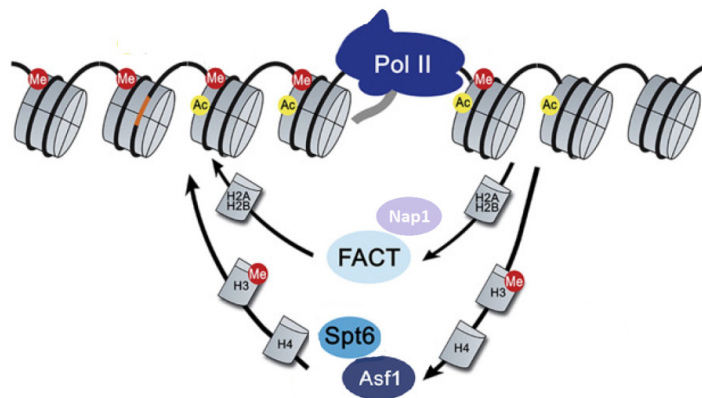


Obr. 13: *dsDNA* ovinutá kolem oktameru histonů. Pravidelné střídání AA/TT/AT úseků s GC úseky je optimální pro tvorbu nukleozomu (Struhl a Segal, 2013).

## 2.7.2 Dynamika nukleozomů

Jak již bylo uvedeno výše, chromatin je *in vivo* neustále přestavován v závislosti na právě probíhajících buněčných procesech. Na přestavbě nukleozomů se podílí ATP-závislé komplexy remodelující chromatin. Tyto komplexy využívají energii uvolněnou hydrolýzou ATP na destabilizaci vazeb mezi histony a DNA, čímž umožňují posun nukleozomů nebo i jejich úplné odstranění (shrnutí v Becker, 2002; Clapier a Cairns, 2009).

Vzhledem k uvedeným informacím není překvapivé, že k přestavbám chromatinu dochází také během transkripce (Wasylyk a Chambon, 1980). Chromatin je přestavován do různé míry na základě transkripční aktivity genů. V případě málo transkribovaných genů jsou nukleozomy v dané oblasti rozvolněny pouze částečně a z oktameru histonů je uvolněn pouze dimer H2A-H2B, který je po průchodu RNAPII okamžitě navázán zpět (Kireeva *et al.*, 2002). V případě více transkribovaných genů je však rozvolnění rozsáhlejší a dochází k rozpadu celého oktameru histonů (Jamai *et al.*, 2007; Kulaeva *et al.*, 2010). Přestavby nukleozomů jsou během transkripce koordinovány chaperony, které velmi často přímo nebo nepřímo asociují s podjednotkami RNAPII (Pavri *et al.*, 2006). Chaperony se podílí jak na rozvolňování chromatinové struktury před RNAPII, tak na depozici nukleozomů po jejím průchodu. V případě dimerů H2A-H2B tuto funkci vykonávají chaperony Spt16 (komplex FACT - *Facilitates Chromatin Transcription*) a Nap1, a v případě tetrametru H3-H4 chaperony Asf1 a Spt6 (Obr. 14; Belotserkovskaya a Reinberg, 2004; Adkins a Tyler, 2006; Schwabish a Struhl, 2006; Walfridsson *et al.*, 2007). Dynamika histonů je nejvyšší v oblasti promotoru, kde dochází k vyvazování řady transkripčních faktorů, a v kódujících oblastech transkripčně aktivních genů (Lee *et al.*, 2007), přičemž míra dynamiky nukleozomů v kódujících oblastech koreluje s hustotou RNAPII, tzn. s mírou transkripce (Dion *et al.*, 2007).

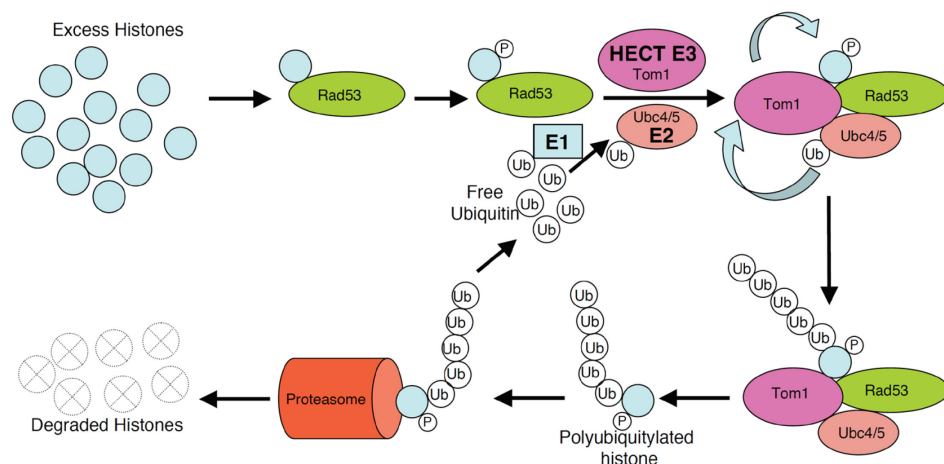


Obr. 14: Schematické znázornění funkce chaperonů (Nap1, FACT, Spt6 a Asf1) při remodelaci nukleozomů během transkripce (převzato a upraveno dle Smolle a Workman, 2013).

### 2.7.3 Obrat nukleozomů

Během replikace DNA jsou staré histony přeuspořádány na nově vznikající dceřiná vlákna a doplněny nově syntetizovanými (Butler a Mueller, 1973). V ostatních

fázích buněčného cyklu je však pro buňku nezbytné udržovat velmi nízkou hladinu volných histonů. Silně bazické histony se totiž mohou vázat na záporně nabitou DNA, a narušovat tak její stabilitu (Gunjan a Verreault, 2003). V případě kvasinky *S. cerevisiae* je syntéza histonů regulována zejména na úrovni transkripce. Mimo S-fázi buněčného cyklu je transkripce histonových genů téměř zcela reprimována vazbou supresorů do jejich promotoru (Osley a Lycant, 1987; Xu *et al.*, 1992; Sherwood *et al.*, 1993; Sutton *et al.*, 2001). Určitá bazální hladina syntézy však probíhá neustále a k přestavbám a inkorporaci nově syntetizovaných histonů do nukleozomů dochází v malé míře i mimo S-fázi buněčného cyklu (transkripce, opravy DNA a rekombinace; Bonner *et al.*, 1988). Sledování inkorporace histonu H3 značeného epitopem myc u *S. cerevisiae* v G1 bloku navíc odhaluje, že z plazmidu exprimovaný histon H3 velmi rychle nahrazuje původní histony (Dion *et al.*, 2007). Ukázalo se, že část volných histonů je v buňce vyvazována chaperony (Andrews *et al.*, 2010; Morillo-Huesca *et al.*, 2010), ale zbytek je degradován, přičemž poločas života volných histonů je přibližně 30-40 min (Gunjan a Verreault, 2003). Degradace histonů je řízena prostřednictvím kinázy Rad53, která reguluje funkci několika ubiquitin ligáz. Stimulované ligázy polyubiquitinylují lyzinové zbytky volných histonů, což vede k jejich degradaci v proteolytickém komplexu, proteazomu (Obr. 15; Singh *et al.*, 2009, 2012).



Obr. 15: **Schematické znázornění degradace volných histonů.** Volné histony jsou rozeznány a fosforylovány kinázou Rad53, která tak stimuluje funkci ubiquitinylačních enzymů (Tom1, Ubc4/5). Polyubiquitinylované histony jsou pak degradovány v proteazomu (Singh *et al.*, 2009).

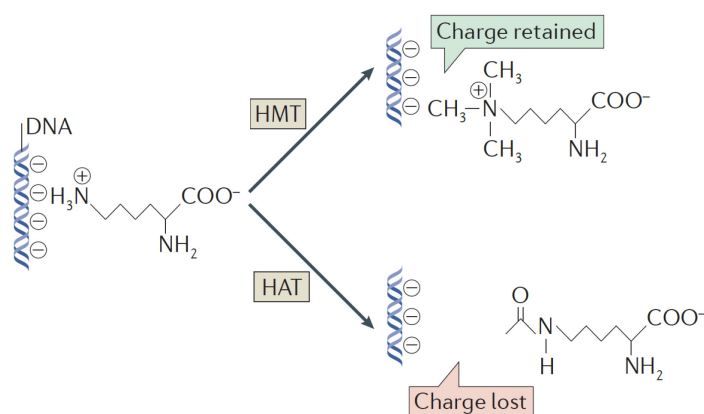
## 2.8 Vztah transkripce, sestřihu a chromatinu

Na základě výše zmíněných skutečností je třeba pohlížet na stav chromatinu, transkripci a úpravy pre-mRNA jako na propojené procesy, které se vzájemně zásadně ovlivňují. Konkrétní proteiny a mechanismy, které zprostředkují vztahy mezi těmito procesy v jádře, jsou však stále objasněny pouze částečně. Významnou strukturou, která umožňuje jejich propojení, je C-terminální doména RNAPII, která váže jak sestřihové faktory, tak enzymy nezbytné pro posttranslační modifikace histonů (shrnutí v Srivastava a Ahn, 2015). Řada studií navíc diskutuje vliv konkrétní pozice a množství nukleozomů, a typu histonových modifikací v daném genu na průběh sestřihu. V případě intron-obsahujících genů *S. cerevisiae* jsou oblasti exonů obecně více bohaté na nukleozomy, které slouží jako fyzická bariéra transkripce (Hodges *et al.*, 2009; Schwartz *et al.*, 2009). Průchod RNA polymerázy II je zpomalen zejména v oblasti terminálního exonu, což pravděpodobně poskytuje spliceozomu více času na jeho kotranskripční sestavení (shrnutí v Oesterreich *et al.*, 2011). Dále bylo ukázáno, že rychlost transkripce ovlivňuje efektivitu sestřihu mnoha pre-mRNA *S. cerevisiae*. Snížení elongační rychlosti RNAPII zvyšuje efektivitu sestřihu a obráceně (shrnutí v Moehle *et al.*, 2014).

### 2.8.1 Histonové modifikace

Histonové modifikace mohou ovlivňovat míru kondenzace chromatinu, interakce mezi nukleozomy, a slouží jako vazebné epitopy pro řadu specifických domén regulačních proteinů. První objevená histonová modifikace, acetylace, ovlivňuje pozitivní náboj lyzinových zbytků histonů, a vede k rozvolnění chromatinu (Obr. 16; Phillips, 1965). Rozvolněný chromatin je přístupnější specifickým proteinovým faktorům a usnadňuje transkripci, replikaci, ale i opravy DNA (Allfrey *et al.*, 1964). Při metylaci histonů H3 může být nahrazen jeden až tři vodíky lyzinu metylovým zbytkem (mono-, di-, tri-metylace). Přidání metylové skupiny nijak neovlivňuje náboj histonů, ale slouží zejména jako vazebná značka pro jiné regulační faktory (Obr. 16). Dle dosavadních výsledků je pravděpodobné, že H3K4me, H3K36me a H3K79me (metylace histonu H3 na lyzinu 4, 36 nebo 79) pozitivně ovlivňují transkripci, kdežto H3K9me a H3K27me (metylace histonu H3 na lyzinu 9 nebo 27) ji reprimují. V oblasti promotoru se nejvíce vyskytuje H3K4me3 a ve střední a 3' oblasti aktivně transkribovaných genů H3K36me2/3 (Santos-Rosa *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003; Pokholok *et al.*, 2005). Histonmetyltransferázy (HMT) Set1 a Set2 jsou dynamicky vyvazovány na CTD RNAPII

na základě její rozdílné fosforylace (Kapitola 2.1.1). Během iniciace transkripce je v promotoru prostřednictvím pSer<sub>5</sub> a dalších proteinových faktorů vyvazována Set1, která metyluje lyzin 4 histonu H3 (Ng *et al.*, 2003). Naopak během elongační fáze transkripce se Set2, která metyluje lyzin 36 histonu H3, váže na hyperfosforylovanou CTD (pSer<sub>5</sub> a pSer<sub>2</sub>; Xiao *et al.*, 2003). Z toho vyplývá, že lokalizace a míra histonových modifikací v rámci genu je ovlivňována také samotnou RNA polymerázou II. Do celé problematiky metylací histonových zbytků přináší řadu otázek zjištění, že delece genů pro histon-metyltransferázy Set1 a Set2 nezpůsobuje žádné výrazné změny genové exprese (Lenstra *et al.*, 2011).



Obr. 16: Acetylace a metylace lyzinového zbytku a jeho změna náboje a interakce s DNA. HAT – histonacetyltransferáza; HMT – histonmetyltransferáza (Tessarz a Kouzarides, 2014).

Další významná modifikace histonů je fosforylace, která vede k neutralizaci pozitivního náboje histonů. Fosforylace histonu H2A napomáhá zejména správné lokalizaci opravných komplexů při poškození DNA (Downs *et al.*, 2000). Ubiquitynlace se od ostatních modifikací liší tím, že dochází k připojení globulární domény složené ze 76 aminokyselin, což zásadně ovlivňuje konformaci nukleozomů. Podílí se na umlčování genů a rozšíření heterochromatinu (Sun a Allis, 2002). Navíc se ukázalo, že předchozí mono-ubiquitynlace na lyzinu 123 histonu H2B ovlivňuje funkci HMT Set1 a Dot1 (Briggs, 2002; Shahbazian *et al.*, 2005). V buňce se však nachází i celá řada dalších méně běžných posttranslačních modifikací histonů jako je sumoylace, ADP-ribozylace, deiminace a izomerizace prolinu.

Funkce a význam posttranslačních modifikací histonů však nebyla dosud zcela objasněna. Navíc se ukázalo, že delece N-terminální domény histonu H3 nebo H4 nemá vliv na životaschopnost *S. cerevisiae*, a posttranslační modifikace těchto histonů tedy nejsou pro kvasinku esenciální (Ling *et al.*, 1996). Lze tedy spekulovat, zda jsou



histonové modifikace příčinou nebo důsledkem dynamických procesů v buňce. Většina histon-modifikujících enzymů je totiž vyvazována pomocí jiných transkripčních faktorů nebo malých RNA, které určují přesnou lokalizaci jejich funkce. Posttranslační modifikace histonů by tak mohly hrát roli buněčné paměti, která by zajišťovala žádoucí kinetiku buněčných procesů – např. fyziologické intervaly mezi jednotlivými cykly transkripce (shrnutí v Henikoff a Shilatifard, 2011).

### **2.8.2 Enzymy histonových modifikací propojující transkripci a sestřih u *S. cerevisiae***

Dynamická acetylace, ubiquitylance a metylace nukleozomů hraje při propojení transkripce a sestřihu u kvasinky *S. cerevisiae* roli. Histonacetyltransferáza Gcn5, která je katalytickou podjednotkou SAGA komplexu, katalyzuje připojení acetylové skupiny na histony H3 a H2B (Georgakopoulos *et al.*, 1992). Acetylace histonů pozitivně stimuluje transkripci a napomáhá kotranskripčnímu vyvazování U2 snRNP (Gunderson a Johnson, 2009). Histondeacetylázy Hos2 a Hos3 jsou naopak nezbytné pro následnou deacetylaci histonů, která umožňuje vazbu dalších sestřihových faktorů a optimální průběh sestřihu (Gunderson *et al.*, 2011). Ubiquityllygáza Bre1 katalyzuje připojení ubiquitinu na lyzin 123 histonu H2B (Wood *et al.*, 2003) a geneticky interaguje s proteinem Npl3 z rodiny SR faktorů (*bohaté na serin a arginin*). Tento protein, napomáhá kotranskripčnímu vyvazování U1 a U2 snRNP a během transkripce asociuje přímo s RNAPII (Dermody *et al.*, 2008; Kress *et al.*, 2008). Pro optimální průběh sestřihu je důležitá také histon-deubiquitylase Ubp8, která zajišťuje správnou dynamiku ubiquitylance (Moehle *et al.*, 2012). Již výše zmiňovaná histonmetyltransferáza Set2 (Kapitola 2.9.1), která katalyzuje připojení metylové skupiny na lyzin 36 histonu H3, usnadňuje vazbu U2 a U5 snRNP do spliceozomu. Z výše uvedeného vyplývá, že i metylace histonů pozitivně ovlivňuje koordinaci vyvazování sestřihových faktorů na právě vznikající primární transkript (Sorenson, 2016).

Nepublikované výsledky naší laboratoře naznačují, že úloha proteinu Prp45 v buňce není omezena pouze na sestřih. Odhalili jsme jeho genetickou interakci s faktory důležitými pro elongaci transkripce a s faktory regulujícími modifikace histonů. K tomuto podezření navíc přispívá i fakt, že jeho mutantní verze *prp45(1-169)* ovlivňuje expresi některých genů, které neobsahují intron (Martinkova *et al.*, 2002). V případě více prostudovaného orthologního proteinu SNW1/SKIP byla již implikována jeho účast

v regulaci transkripce a jeho nepřímá interakce s podjednotkami HMT komplexu MLL1 (Brès *et al.*, 2005, 2009). MLL1 komplex katalyzuje připojení metylové skupiny na lizin 4 histonu 3, přičemž přítomnost této histonové modifikace u *H. sapiens* napomáhá vyvazování sestřihových faktorů na pre-mRNA (Sims *et al.*, 2007). Můžeme se tedy jen ptát, zda protein Prp45 nějakým způsobem ovlivňuje stav chromatinu, čímž by mohl regulovat kotranskripční vyvazování komponent spliceozomu.

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Kultivační média a roztoky

##### 3.1.1.1 Kultivační média a roztoky pro *S. cerevisiae*

Všechny média sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.

Variantu pevného média připravit přidáním agaru na výslednou koncentraci 2% (20 g/l).

V případě potřeby po vychladnutí pod 55 °C přidat 250 µl ampicilinu (výsledná koncentrace 100 µg/ml).

#### - YPAD (Komplexní bohaté médium)

*YPD je varianta bez adeninu*

10 g/l	<b>Yeast extract</b> (Formedium)	2,5 g na 250 ml
20 g/l	<b>Pepton</b> (Merck)	5 g na 250 ml
100 mg/l	<b>Adenin-hemisulfát</b> (Sigma)	0,025 g na 250 ml
(+/- 20 g/l)	<b>Agar bacteriological</b> (Oxoid)	(5 g na 250 ml)

- Rozpouštět do 225 ml mpH<sub>2</sub>O, sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.
- Přidat 25 ml sterilního roztoku 20% glukosy (finální koncentrace 2%; Sigma).

#### - 2x YPAD

20 g/l	<b>Yeast extract</b> (Formedium)	5 g na 250 ml
40 g/l	<b>Pepton</b> (Merck)	10 g na 250 ml
100 mg/l	<b>Adenin-hemisulfát</b> (Sigma)	0,025 g na 250 ml
(+/- 20 g/l)	<b>Agar bacteriological</b> (Oxoid)	(5 g na 250 ml)

- Rozpouštět do 200 ml mpH<sub>2</sub>O, sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.
- Přidat 50 ml sterilního roztoku 20% glukosy (finální koncentrace 4%; Sigma).

#### - SD medium (minimální médium)

*syntetic defined medium*

6,7 g/l	<b>Yeast nitrogen base without amino acids YNB</b> (Difco)	1,675 g na 250 ml
---------	---	-------------------

1,394 g/l	<b>Syntetic complete amino acids</b>	0,3485 g na 250 ml
	<b>drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura (Formedium)</b>	
(+/- 20 g/l)	Agar bacteriological (Oxoid)	(5 g na 250 ml)

- Rozpouštět do 225 ml mpH<sub>2</sub>O, sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.
- Přidat 25 ml sterilního roztoku 20% glukosy (finální koncentrace 2%; Sigma).
- V případě potřeby přidat po 2,5 ml 100x koncentrovaných sterilních roztoků aminokyselin (His, Leu, Trp) a uracilu.

- **Selekční medium s 5-FOA**

- Připravit 2x koncentrovaný základ pro SD medium (stejně množství reagentů rozpustit do 125 ml mpH<sub>2</sub>O), sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.
- Po zchladnutí pod 55 °C přidat do 125 ml sterilního základu 2x SD média:
  - 25 ml sterilního roztoku 20% glukosy (Sigma)
  - 250 µl ampicilinu (výsledná koncentrace 100 µg/ml)
  - 2,5 ml sterilních roztoků aminokyselin (100x His, Leu, Trp i Ura)
  - 100 ml 5-FOA (2 mg/ml; Fermentas)

*Na magnetické míchačce při 50 °C rozpustit 0,2 g 5-FOA do 100 ml mpH<sub>2</sub>O (max 65 °C, pak se 5-FOA rozkládá). Po rozpuštění sterilizovat pomocí filtru.*

- **Selekční medium s nourseothricinem (ClonNAT)**

- Na přípravu jedné selekční plotny přidat do 25 ml kompletního YPAD média s agarem (zchlazeným na 55 °C) 25 µl Nourseothricinu (1000x koncentrované antibiotikum, které je 100 µg/ml; BioScience)

- **Selekční medium s benomylem**

*Pro zajištění rovného povrchu a ideální vlhkosti je vhodné plotny nalít den před vlastním SPOT testem.*

- Do kompletního YPAD média s agarem (ochlazeným na 55 °C) přidat benomyl na finální koncentraci 20 µg/ml. Pro přípravu dvou ploten míchat 50 ml YPAD média se 100 µl zásobního benomyly v DMSO (Aldrich; 10 mg/ml).

*Abychom zabránili vzniku sraženin, benomyl přidávat pomalu za současného míchání na magnetické míchačce při 55 °C.*

- **Roztoky aminokyselin**

*100x koncentrované zásobní roztoky*

<b>(His) L-Histidin HCl monohydrát</b> (Sigma)	2 g/l
<b>(Leu) L-Leucin</b> (Sigma)	10 g/l
<b>L-Tryptofan</b> (Sigma)	2 g/l
<b>Uracil</b> (Sigma)	2 g/l
<b>L-Lysin</b> (Sigma)	3 g/l
<b>L-Methionin</b> (Sigma)	2 g/l

- **Ampicilin**

*1000x koncentrovaný zásobní roztok (Biotika)*

- 100 mg/ml; sterilní substanci v originální lahvičce (Ampicilin pro inj. 500 mg) rozpustit do 4 ml sterilní mpH<sub>2</sub>O a 1 ml 96% EtOH

**3.1.1.2 Bakteriální kultivační média**

*Všechny média sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.*

*Variantu pevného média připravit přidáním agaru na výslednou koncentraci 2% (20 g/l).*

- **LB médium**

10 g/l	<b>Trypton</b> (Sigma)	2,5 g na 250 ml
5 g/l	<b>Yeast extract</b> (Formedium)	1,25 g na 250 ml
10 g/l	<b>NaCl</b> (Penta)	2,5 g na 250 ml
(+/- 20 g/l)	<b>Agar bacteriological</b> (Oxoid)	(5g na 250 ml)

- Rozpouštět do 250 ml mpH<sub>2</sub>O, sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C.
- V případě potřeby po vychladnutí pod 55 °C přidat 250 µl ampicilinu (výsledná koncentrace 100 µg/ml).

**3.1.2 Přehled použitých kvasinkových kmenů**

Název	Genotyp	Zdroj
<b>AVY17</b>	MATa <i>prp45</i> (1-169)-HA:: <i>NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Knock-in do BY4741
<b>BY4741</b>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
<b>TUB3Δ</b>	YML123CxBY4741	Kolekce

		deletantů
<b>JPY10H7</b>	MATalfa <i>ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 ade2Δ::hisG</i>	<i>Parenteau J.</i>
<b>JPY11D4</b>	MATa <i>tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	<i>Parenteau J.</i>
<b>JPY12F8</b>	MATalfa <i>tub1Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 ade2Δ::hisG</i>	<i>Parenteau J.</i>
<b>MMY01</b>	MATa <i>ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY02</b>	MATa <i>ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY03</b>	MATa <i>tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY07</b>	MATalfa <i>tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY08</b>	MATalfa <i>tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY09</b>	MATalfa <i>tub1Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY10</b>	MATalfa <i>tub1Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY11</b>	MATalfa <i>tub1Δi tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>MMY12</b>	MATalfa <i>tub1Δi tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	křížení
<b>ZuCY01</b>	MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Knock-in do MMY01
<b>ZuCY03</b>	MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6, tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Knock-in do MMY03
<b>ZuCY07</b>	MATalfa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Knock-in do MMY07
<b>ZuCY09</b>	MATalfa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub1Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Knock-in do MMY09
<b>ZuCY11</b>	MATalfa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub1Δi tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Knock-in do MMY11
<b>ZuCY12</b>	MATa <i>bar1Δ::URA3 ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do MMY01
<b>ZuCY13</b>	MATa <i>bar1Δ::URA3 prp45(1-169)-3HA::NatMX6 ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do ZuCY01
<b>ZuCY14</b>	MATa <i>bar1Δ::URA3 tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do MMY03
<b>ZuCY15</b>	MATa <i>bar1Δ::URA3 prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do ZuCY03
<b>ZuCY16</b>	MATa <i>bar1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do ZuCY12
<b>ZuCY17</b>	MATa <i>bar1Δ prp45(1-169)-3HA::NatMX6 ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do ZuCY13
<b>ZuCY18</b>	MATa <i>bar1Δ tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do ZuCY14
<b>ZuCY19</b>	MATa <i>bar1Δ prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200</i>	Delitto perfetto do ZuCY15
<b>ZuCY20</b>	MATa <i>bar1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200 + pMH04 + pZuC01-1</i>	Transformace do ZuCY16
<b>ZuCY21</b>	MATa <i>bar1Δ prp45(1-169)-3HA::NatMX6 ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200 + pMH04 + pZuC01-1</i>	Transformace do ZuCY17
<b>ZuCY22</b>	MATa <i>bar1Δ tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200 + pMH04 + pZuC01-1</i>	Transformace do ZuCY18
<b>ZuCY23</b>	MATa <i>bar1Δ prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200 + pMH04 + pZuC01-1</i>	Transformace do ZuCY19
<b>ZuCY24</b>	MATa <i>bar1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200 + pMH04 + pZuC02-1</i>	Transformace do ZuCY16

### 3.1.3 Přehled použitých primerů

Primery od IDT USA

Název	Sekvence	Použití
<b>KM09</b>	GGAGAAGCTGATCCAAATGAGTGGAAGATACCTGCA GCTGTGCGGATCCCCGGGTTAATTAA	přímý primer - tvorba kazety pro <i>prp45</i> (1-169)
<b>KM10</b>	CAAGCACAGAATGCTTTGTTTTCTAGTGCTCATCC TGGGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	zpětný primer - tvorba kazety pro <i>prp45</i> (1-169)
<b>AV17</b>	TGGTCAATAAGAGCGACCTC	zpětný primer - detekce <i>prp45</i> (1-169)
<b>AV18</b>	ACAGCCACCATATTGAGGTAG	přímý primer - detekce <i>prp45</i> (1-169)
<b>KA34</b>	GAGGTCATTAGTATTAATGTTG	přímý primer - <i>TUB3</i> mRNA pro qPCR
<b>OG105</b>	CCTCCAAATGGCCGTCTTC	zpětný primer - <i>TUB3</i> mRNA pro qPCR
<b>OG107</b>	CCCCGTTTCATGGAAGAATGTA	zpětný primer - total <i>TUB3</i>
<b>MH156</b>	GAGAAGTTATTAGTATTAATGTGC	přímý primer - <i>TUB1</i> mRNA pro qPCR
<b>OG116</b>	TCTTCTAGATGTCCATCC	zpětný primer - <i>TUB1</i> mRNA pro qPCR
<b>OG139</b>	AAACAATGAGAGAAGTTATTAGTATTAATGGTA	přímý primer - <i>TUB1</i> pre- mRNA (ex1/int) pro qPCR
<b>OG140</b>	TTGCGTTGAAGTTAGTAATGAAAGATG	zpětný primer - <i>TUB1</i> pre- mRNA (int) pro qPCR
<b>ZuC05</b>	CTGTTTTTCTACCTCCGACATCATGCTGAAACATGGC ATGGCTTTTCAATCAATTCATC	přímý primer - tvorba URA3 kazety z pRS316
<b>ZuC06</b>	GAGATTTTTTTAGCATTATTCAATGAATAATGTGCT ACTCCGCAGGGTAATAACTGA	zpětný primer - tvorba URA3 kazety z pRS316
<b>MH111</b>	GTTAGCAGAATTGTCATGCAAGG	přímý primer - detekce <i>barΔ::URA3</i> zezadu
<b>ZuC09</b>	TGACGTATTGTCATATTGACGTATC	zpětný primer - detekce <i>barΔ::URA3</i> , zezadu
<b>ZuC10</b>	GCTGATTGAGTTAGACAGTATCG	přímý primer - detekce <i>barΔ::URA3</i> zepředu
<b>MH112</b>	GTAGCAGCACGTTTCTTATATGT	zpětný primer - detekce <i>barΔ::URA3</i> zepředu
<b>ZuC11</b>	ACCTCCGACATCATGCTGAAACATGGCATGGCTTTTC AATTAATAAACTGTATTATAAGTAAATGCATGTATA CTAAACT	přímý primer - delece URA3 z <i>barΔ::URA3</i>
<b>ZuC12</b>	AGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTT TTAATTGAAAAGCCATGCCATGTTTCAGCATGATGTC GGAGGT	zpětný primer - delece URA3 z <i>barΔ::URA3</i>
<b>MH172</b>	CCGAATTCATGGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAG ACTTGCCAGAACTAAACAAACAGCT	přímý primer - myc-H3 kazeta
<b>MH173</b>	GCATCTCGAGTCATGATCTTTCACCTCTTAG	zpětný primer - myc-H3/H3 kazeta
<b>MH174</b>	CCGAATTCATGGCCAGAACTAAACAAACAGCT	přímý primer - H3 kazeta
<b>M13</b>	CCAGGGTTTTCCAGTCACG	přímý primer - sekvenční primer
<b>ZuC13</b>	CAGGACGTTTCAAGGAGCTT	přímý primer - exon2 <i>TUB3</i>

		pro ChIP
<b>ZuC14</b>	GTCACATTGGTCGGCCATC	zpětný primer - exon2 <i>TUB3</i> pro ChIP
<b>ZuC17</b>	GTGTGATACCAAGTTCCGAATTA	přímý primer - exon2 <i>TUB3</i> pro ChIP
<b>ZuC18</b>	CATCAGGTCTGAATTTCTG	zpětný primer - exon2 <i>TUB3</i> pro ChIP
<b>AV33</b>	ACCCATGAATCCAACTCC	přímý primer - exon2 <i>TUB3</i> pro ChIP
<b>AV34</b>	CAGTTAGCCATGTACTTCCC	zpětný primer - exon2 <i>TUB3</i> pro ChIP
<b>OG135</b>	GACAATGAGAGAGGTCATTAGTATTAATGGTA	přímý primer - exon1/intron <i>TUB3</i> pro ChIP
<b>OG136</b>	GAATGAATCAAACCAGATCAGATCAAAC	zpětný primer - intron <i>TUB3</i> pro ChIP

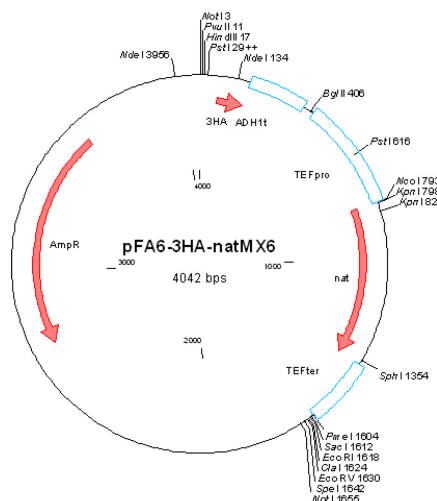
### 3.1.4 Přehled použitých protilátek

Protilátka	Specifikace	Ředění
Anti-HA.11 (16B12) Covance, MMS-101P	Specifická protilátka proti HA (mouse)	1:1000
GAM-AP BIO-RAD, 170-6520	Goat anti mouse konjugovaná s alkalickou fosfatázou	1:4000
c-myc (9E10) Covance, MSS-150P	Specifická protilátka proti c-myc (mouse)	1:1000
IgG-HRP Santa Cruz, sc-2031	Goat anti mouse konjugovaná s křenovou peroxidázou	1:1000
Anti-histone H3 Abcam, GR2764-3, ab1791	Specifická protilátka proti histonu H3 (rabbit)	1:1000

### 3.1.5 Přehled použitých plasmidů

- **p30412:** pFA6a-3HA-natMX6 (Euroscarf; Van Driessche *et al.*, 2005)

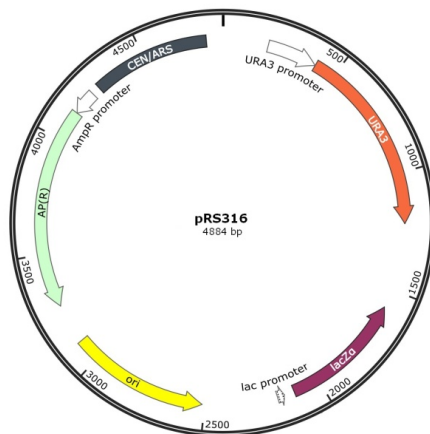
Použit na přípravu integrační kazety pro homologní rekombinaci s lokusem genu *PRP45*.





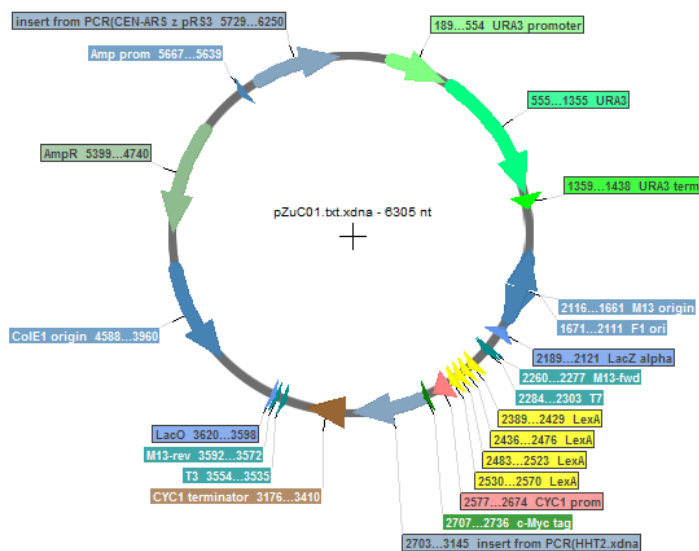
- **pRS316:**

Použit na přípravu integrační kazety URA3 pro delecí genu *BAR1*.



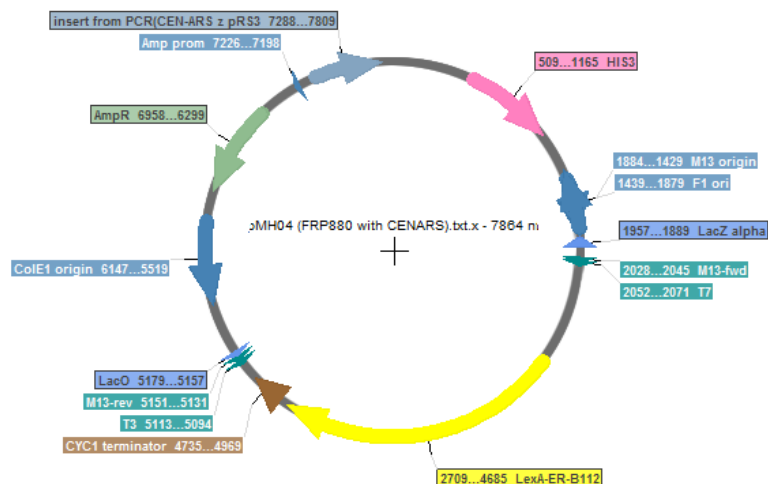
- **pZuC01**

Centromerický plazmid (*CEN/ARS ori*) odvozený od *FRP793* (Addgene; Ottoz et al., 2014). ORF pro citrin byl nahrazen fragmentem kódujícím histon *H3* značený epitomem *myc* na N-konci. Exprese *myc-H3* je regulována promotorem, který obsahuje 4 vazebná místa pro vazebnou doménu *LexA*.



- **pMH04** (od M. Hálové)

Centromerický plazmid (*CEN/ARS ori*) odvozený od *FRP880* (Addgene; Ottoz et al., 2014). Kóduje protein s vazebnou doménou *LexA*, vazebným místem pro  $\beta$ -estradiol a aktivační doménou *B112*.



### 3.1.6 Přehled použitých DNA modifikujících enzymů

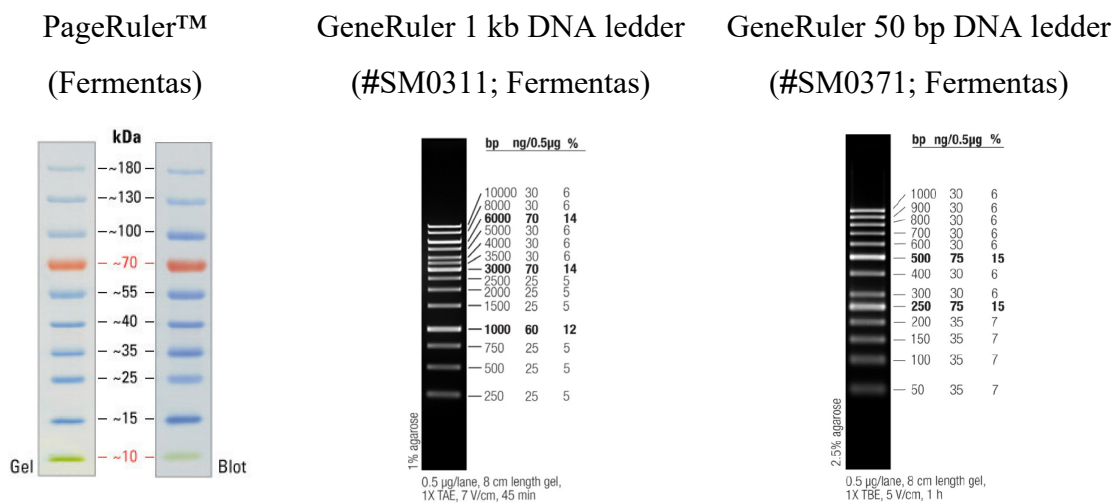
Enzym	Šarže, výrobce	Pufr
<b>FastAP thermosensitive alkaline phosphatase</b>	#EF0654 (Fermentas) 1 U/μl	10x FastAP pufr
<b>T4 polynucleotide kinase</b>	#EK0031 (Fermentas) 10 U/μl	10x reakční pufr A
<b>Klenow fragment</b>	#EP0054 (Fermentas) 2 U/μl	10x reakční pufr
<b>T4 DNA ligase</b>	#EL0015 (Fermentas) 1 U/μl	10× reakční pufr
<b>Taq polymerase</b>	#EP0402 (Fermentas) 5 U/μl	10× reakční pufr s KCl
<b>Expend High Fidelity polymerase</b>	#11732641001 (Roche) 100 U/30 μl	10x reakční pufr

### Restrikční endonukleázy

Enzym	Výrobce	Použití
<i>NotI</i> (#ER0591)	MBI Fermentas	ověření p30412
<i>SalI</i> (#1080S)	TaKaRa	ověření p30412
<i>EcoRI</i> (#ER0271)	MBI Fermentas	ověření p30412 a pZuC01
<i>HindIII</i> (#ER0501)	MBI Fermentas	linearizace p30412 a ověření pZuC01
<i>NcoI</i> (#ER0571)	MBI Fermentas	ověření pRS316
<i>PscI</i> (#ER1871)	MBI Fermentas	ověření pRS316
<i>ApaI</i> (#ER1411)	MBI Fermentas	ověření pRS316
<i>XhoI</i> (#ER0691)	MBI Fermentas	ověření pRS316 a pZuC01
<i>BamHI</i> (#ER0051)	MBI Fermentas	linearizace pRS316
<i>BshTI</i> (#ER1461)	MBI Fermentas	ověření pZuC01

Pufry dle výrobce: [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com), [www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)

### 3.1.7 Přehled použitých standardů velikostí



### 3.1.8 Reakční směsi a programy PCR

#### - Tvorba kazety pro *prp45*(1-169)

#### PCR směs:

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

#### PCR program:

Krok PCR reakce	Teplota	Čas	Počet cyklů
<b>Počáteční denaturace</b>	94 °C	2 min	1x
<b>Denaturace</b>	94 °C	30 s	10x
<b>Hybridizace primerů</b>	43 °C	30 s	
<b>Amplifikace</b>	68 °C	3 min	
<b>Denaturace</b>	94 °C	30 s	

<b>Hybridizace primerů</b>	43 °C	30 s	20x
<b>Amplifikace</b>	72 °C	3 min + 5 s každé kolo	
<b>Finální amplifikace</b>	72 °C	7 min	1x
<b>Zchlazení</b>	10 °C	1 min	

- **Tvorba URA3 kazety z pRS316**

**PCR směs:**

10x polymerázového pufru (Fermentas)

8 ul dNTP (Fermentas, výsledná koncentrace 0,4 mM každý)

7 ul ZuC05 (výsledná koncentrace 1,4 uM)

7 ul ZuC06 (výsledná koncentrace 1,4 uM)

5 ul MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, výsledná koncentrace 2,5 mM)

2,5 ul plazmidové DNA (100 ng)

15,5 ul mpH<sub>2</sub>O

0,5 μl/100 μl směsi Taq Polymerázy (Fermentas)

**PCR program:**

Krok PCR reakce	Teplota	Čas	Počet cyklů
<b>Počáteční denaturace</b>	94 °C	5 min	1x
<b>Denaturace</b>	94 °C	30 s	3x
<b>Hybridizace primerů</b>	43 °C	30 s	
<b>Amplifikace</b>	68 °C	1 min 30 s	
<b>Denaturace</b>	94 °C	30 s	32x
<b>Hybridizace primerů</b>	43 °C	30 s	
<b>Amplifikace</b>	72 °C	1 min 30 s	
<b>Finální amplifikace</b>	72 °C	10 min	1x
<b>Zchlazení</b>	10 °C	5 min	

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Křížení *S. cerevisiae* (určení párovacího typu)

*Selekční plotny – umožní růst pouze diploidním buňkám, které vznikly zkrřížením opačného párovacího typu. Nejčastěji SD plotny bez určitých AK dle prototrofie diploidů.*

- Na selekční plotny nakapat suspenzi haploidního kmene o známém párovacím typu (MATa nebo MAT $\alpha$ ).
- Poté do kapky suspenze známého párovacího typu kápnout suspenzi testovaného haploidního kmene. Inkubovat v termoboxu při 30 °C přes noc.
- V místě, kde detekujeme nárůst biomasy, došlo ke zkrřížení haploidů. Jednalo se tedy o opačné párovací typy.

### 3.2.2 Příprava a výsev glycerolových konzerv *S. cerevisiae*

*S konzervami pracovat vždy ve sterilním prostředí.*

#### Příprava konzerv

- V 1,5ml mikrozkušavce s barevným šroubovacím víčkem smíchat 500  $\mu$ l mpH<sub>2</sub>O s 500  $\mu$ l 60% glycerolu. Do připraveného roztoku sterilním párátkem přenést velké množství biomasy *S. cerevisiae*.
- Suspenzi promíchat vortexováním a uchovávat v -80 °C.

#### Výsev konzerv

- Sterilním párátkem nanést na plotnu (YPAD nebo příslušné selekční médium) malé množství zmrzlých buněk z vrchní vrstvy glycerolové konzervy. Vše provádět rychle, tak aby konzerva nerozmrzla (jednotlivé kmeny vysévat postupně).

### 3.2.3 Synchronizace *S. cerevisiae* $\alpha$ -faktorem v G1 fázi buněčného cyklu

*$\alpha$ -faktorem (Zymo Research) lze synchronizovat pouze *S. cerevisiae* párovacího typu a.*

*1. den (večer)*

- Několika koloniemi *S. cerevisiae* zaočkovat 5 ml média (YPAD nebo příslušné selekční médium), kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení stacionární fáze.

## 2. den (ráno)

- Ráno přeočkovat inokulum do 20 ml čerstvého média na OD<sub>600</sub> 0,3 a kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení OD<sub>600</sub> ~ 0,9.

### 1) Odběr vzorků pro analýzu na průtokovém cytometru

- Provést první odběr v čase 0 před aplikací  $\alpha$ -faktoru. Do sterilní 1,5ml mikrozkuřavky odebrat takové množství kultury, které obsahuje 10<sup>7</sup> buněk (při OD<sub>600</sub> 1,5 obsahuje biomasa 1,8 x 10<sup>7</sup> buněk/ml). Kulturu centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 30 s, RT), supernatant odstranit a buňky zafixovat pomocí 1 ml chlazeného 70% EtOH a uskladnit v lednici.
- Do zbytku kultury přidat takové množství  $\alpha$ -faktoru, aby jeho finální koncentrace byla 50 nM a kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm.
- Po 1 hod kultivace s  $\alpha$ -faktorem provádět odběry každých 30 min po dobu minimálně dvou hodin. Současně s odběry provádět mikroskopii kultury pro určení indexu pučení (*budding index* - podíl buněk s fenotypem shmoo).
- Vzorky následně zpracovat pro analýzu na průtokovém cytometru (3.2.4 Průtoková cytometrie)

### 2) Příprava synchronizované kultury pro aktivaci exprese histonu myc-H3 a následné odběry pro ChIP a analýzu na průtokovém cytometru

- Do 250 ml kultury v exponenciální fázi přidat  $\alpha$ -faktor na finální koncentraci 50nM. Synchronizovat 2 hod na třepačce při 30 °C, 180 rpm.
- Provést první odběr 50 ml kultury pro ChIP jako negativní kontrolu bez aktivace exprese histonu myc-H3.
- Do synchronizované kultury v G1 fázi buněčného cyklu přidat takové množství  $\beta$ -estradiolu, aby jeho finální koncentrace byla 400nM. Expresi značeného histonu H3 indukovat po dobu dvou hodin za současného třepání kultury při 30 °C, 180 rpm.

- Následně provádět odběry pro CHIP (50 ml) každých 30 min po dobu dvou hodin.
- Je vhodné současně s odběry na CHIP odebírat vždy i 1 ml kultury pro analýzu na průtokovém cytometru pro pozdější ověření synchronosti kultury.

*Synchronizace hydroxymočovinou (blok na přechodu G1/S fáze buněčného cyklu) se provádí dle stejného protokolu, kde namísto 50 nM  $\alpha$ -faktoru je přidána hydroxymočovina ve finální koncentraci 15 mg/ml.*

### **3.2.4 Průtoková cytometrie**

#### ***1. den***

- Odebrat 300  $\mu$ l kultury fixované v 70 % EtOH, buňky usadit centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 3 900 rpm, 3 min., RT).
- Buňky rehydratovat 5-10 min v 1 ml 50mM citrátu sodném a opět stočit.
- Sediment resuspendovat v roztoku 500  $\mu$ l 50mM Na citrátu s 2  $\mu$ l Rnázy A (Fermentas).
- Takto připravené buňky inkubovat v termostatu při 37 °C přes noc.

#### ***2. den***

- K suspenzi buněk přidat dalších 500  $\mu$ l 50mM citrátu sodném s propidium jodidem tak, aby výsledná koncentrace byla 4  $\mu$ g/ml (přidáme 1  $\mu$ l zásobního roztoku o koncentraci 4 mg/ml).
- Před samotným měřením sonikovat (buňky synchronizované  $\alpha$ -faktorem – sonikovat sondovým sonikátorem na nejnižší výkon, 1-2 s).
- Velikost buněk (FSC-A), granularitu (SSC-A) a množství DNA (ECD-A) měřit pomocí průtokové cytometrie (přístroj CytoFLEX).

### **3.2.5 SPOT test *S. cerevisiae***

*Studium citlivosti buněk ke zvýšené teplotě 37 °C a k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu.*

#### **Pěstování buněk**

##### ***1. den (večer)***

- Množstvím biomasy *S. cerevisiae* o velikosti špendlíkové hlavičky zaočkovat 10 ml tekutého média (YPAD nebo příslušné selekční médium). Kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm do pozdní stacionární fáze.

## **2. den (ráno)**

- Narostlou kulturu přeočkovat do 10 ml čerstvého média na  $OD_{600} \sim 0,3$ , kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení  $OD_{600} 0,9 - 1,8$  (exponenciální fáze růstu).
- Sklízet takový objem kultury, který odpovídá 0,3  $OD_{600}$ . Vypočítaný objem přenést do 1,5ml mikrozkuřavky, stočit na stolní centrifuze (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 30 s, RT) a sediment resuspendovat v 500  $\mu$ l  $mpH_2O$ .

## **Vlastní SPOT test**

- Do prvního sloupce 96 jamkové mikrotitrační destičky přenést 100  $\mu$ l suspenze od každého testovaného kmene. Do ostatních 6 sloupců (2-7) připravit 200  $\mu$ l  $mpH_2O$ .
- Odebrat 50  $\mu$ l buněčné suspenze z prvního sloupce a přenést ji do 200  $\mu$ l  $mpH_2O$  v druhém sloupci. Suspenzi promíchat pipetováním a opět přenést 50  $\mu$ l z druhého sloupce do třetího. Takto pokračovat až do sloupce 7, čímž získáme ředící řadu buněk (suspenze buněk vždy 5x ředěna oproti předchozímu sloupci).
- Pro vlastní SPOT používat kovového „ježka“ (replica plater; Sigma) s 48 ostny, kterého vždy mezi jednotlivými SPOTy sterilizovat opálením (3x) a nechat zchladnout minimálně 5 min (po více SPOTech je vhodné čas pro zchladnutí prodloužit).
- Pomocí „ježka“ přenést ředící řadu buněk z 2 – 7 sloupce mikrotitrační destičky na požadované selekční plotny.
- Po zaschnutí kapiček plotny umístit do termoboxu o příslušné teplotě.
- Plotny fotit vždy 3. a 5. den.

## **3.2.6 Transformace**

### **3.2.6.1 Transformace plasmidové DNA do *E. coli***

*Během transformace plasmidové DNA elektroporací je třeba pracovat na ledu.*



- V čisté 0,5 ml mikrozkušavce smíchat 1,5  $\mu$ l plasmidové DNA v ligační směsi (5 pg – 0,5  $\mu$ g DNA) s 40  $\mu$ l elektrokompentních buněk *E. coli*.
- Nastavit generátor pulzu Gene Pulser Apparatus (Biorad, USA)
  - Kapacitance: 25  $\mu$ F
  - Napětí: 2,5 kV
  - Odpor: 200  $\Omega$
- Suspenzi elektrokompentních buněk s plasmidovou DNA přenést na dno vychlazené 0,2 cm elektroporační kyvety (Biorad, USA), vložit do generátoru pulzu a aplikovat pulz (časová konstanta 4-5 ms).
- Do kyvety okamžitě přidat 1 ml chlazeného LB média s 0,5% glukosou (Sigma), resuspendovat a přenést do skleněné sterilní zkumavky.
- Transformovanou kulturu inkubovat 60 min při 37 °C a 180 rpm.
- Po skončení inkubace vysít 200-1000  $\mu$ l buněčné suspenze na LB plotny s příslušným selekčním antibiotikem (ampicilin – 100  $\mu$ l/ml, Biotika, SR) a inkubovat v termostatu při 37 °C.

### 3.2.6.2 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou

*V případě transformace, o níž předem víme, že bude probíhat s vysokou efektivitou, lze přípravu kompetentních buněk nahradit pouhým resuspendováním 15-20  $\mu$ l buněk z plotny ve 25  $\mu$ l mpH<sub>2</sub>O.*

#### Příprava kompetentních buněk

##### *1. den (večer)*

- Několika koloniemi *S. cerevisiae* zaočkovat 10 ml media (YPAD nebo příslušné selekční médium), kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení stacionární fáze.

##### *2. den*

- Ráno kulturu přeočkovat do 20 ml čerstvého média na OD<sub>600</sub>=0,3 a kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení OD<sub>600</sub> ~ 1,2 – 1,8.
- Do sterilní 15ml centrifugační zkumavky odebrat takové množství kultury, které obsahuje 10<sup>8</sup> buněk (při OD 1,5 má kultura 1,5 x 10<sup>7</sup> buněk/ml). Buňky usadit

centrifugací (Eppendorf model 5804R, 2 335 rpm, 3 min, 23 °C), supernatant odstranit.

- Sediment buněk promýt 10 ml mpH<sub>2</sub>O a opět stočit (Eppendorf model 5804R, 2 335 rpm, 3 min, 23 °C), supernatant odstranit.
- Sediment ještě jednou promýt 1 ml mpH<sub>2</sub>O a suspenzi přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky, opět stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 30 s, RT) a supernatant odstranit.

### **Vlastní transformace**

- Připravit čerstvě denaturovanou ssDNA (solmon sperm DNA, 10 mg/ml; Sigma). Povařit 10 µl ssDNA 5 min v 95 °C a poté nechat zchladnout na ledu.
- K buňkám postupně přidat:
  - 40 µl mpH<sub>2</sub>O
  - 36 µl 1M LiAc (Sigma)
  - 10 µl čerstvě denaturované ssDNA
  - 34 µl plasmidové DNA (~ 100 ng)
  - 240 µl 50% PEG 3500 (Sigma)
- Suspenzi promíchat vortexováním a inkubovat 40 min v bločku při teplotě 42 °C a třepání 1000 rpm (pro zvýšení účinnosti transformace lze inkubaci protáhnout až na 3 hod).
- Po skončení inkubace transformované buňky usadit centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 1 min, RT), supernatant odstranit.
- Peletu promýt 1 ml mpH<sub>2</sub>O a opět stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 1 min, RT), supernatant odstranit.
- Transformované buňky resuspendovat do 150 µl mpH<sub>2</sub>O a vysévat na příslušnou selekční plotnu. Inkubovat v termostatu při 30 °C.

*V případě některých selekčních markerů kvasinka potřebuje čas pro expresi proteinů pro danou rezistenci.*

- V takovém případě suspenzi vysévat na YPAD, nechat exprimovat min 3 hod (ideálně přes noc), a teprve poté přetiskat na plotnu s daným inhibitorem.

**1M LiAc**                      1,53 g LiAc rozpustit ve mpH<sub>2</sub>O do finálního objemu 15 ml, pH 7,5 (upravit kyselinou octovou)

### **3.2.7 Techniky manipulace s proteiny**

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

##### **Příprava buněk**

###### ***1. den (večer)***

- Několika koloniemi *S. cerevisiae* zaočkovat 5 ml média (YPAD nebo příslušné selekční médium), kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení stacionární fáze.

###### ***2. den***

- Ráno kulturu přeočkovat do 15 ml čerstvého média na OD<sub>600</sub>=0,3 a kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení OD<sub>600</sub> ~ 0,9 - 2,4.
- Do 15ml centrifugací zkumavky přenést takové množství kultury, které odpovídá 9 OD<sub>600</sub> a buňky usadit centrifugací (Eppendorf model 5804R, 2 335 rpm, 3 min, 23 °C).
- Sediment promýt 1 ml mpH<sub>2</sub>O a znovu stočit (Eppendorf model 5804R, 2 335 rpm, 3 min, 23 °C).
- Sediment resuspendovat v 1 ml mpH<sub>2</sub>O a suspenzi přenést do čisté 1,5ml mikrozukavky a opět stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 30 s, RT).
- Supernatant odstranit a promyté buňky inkubovat 10 min při -20 °C (po tomto kroku lze buňky dlouhodobě skladovat v -80 °C).

##### **Proteinové extrakty**

*Od této chvíle je nutné pracovat v digestoři (práce s β-mercaptoethanolem) a na ledu (proti aktivaci proteáz).*

- K získaným buňkám přidat 100 μl roztoku 1,85M NaOH a 7% β-mercaptoethanol a 4x opakovat cyklus vortexování - 30 s vortexovat, 30 s nechat zchladnout na ledu. Poté inkubovat suspenzi buněk 10 min na ledu.

- Po skončení inkubace přidat k suspenzi 100 µl 50% TCA, inkubovat dalších 5 min na ledu a pelet usadit centrifugací (Eppendorf model 5417R, 12 000 rpm, 10 min, 4 °C), supernatant odstranit.
- Sediment resuspendovat v 500 µl nepufrovaném 1M Tris a opět centrifugovat (Eppendorf model 5417R, 12 000 rpm, 10 min, 4 °C), supernatant důkladně odstranit.
- Sediment důkladně resuspendovat do 100 µl 2x Laemmli pufru a přidat 1/20 objemu 1M DTT (počítejme objem suspenze 200 µl). Vše povařit 10 min při 95 °C.
- Připravené proteinové extrakty lze okamžitě separovat pomocí SDS-PAGE nebo uchovávat v -80 °C (poté je nutné opět přidat 1/20 objemu 1M DTT a suspenzi povařit).

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

### 3.2.7.2 Elektroforéza SDS – PAGE

#### Příprava gelu pro vlastní separaci

##### 1) Tris-tricinová SDS – PAGE

*Tento typ gelu je vhodný pro separaci menších proteinů jako je myc-histon H3.*

- Připravit sestavu pro nalévání gelu (používáme gely tloušťky 0,75 mm).
- Připravit 15% separační gel podle tabulky:

Chemikálie	na 1 gel (ml)	na 2 gely (ml)
<b>30% AA/BIS</b>	2	4
<b>3x Gelový pufr</b>	2	4
<b>50% glycerol</b>	2	4
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	0	0

- Připravit zaostřovací gel podle tabulky:

Chemikálie	na 1 gel (ml)	na 2 gely (ml)
<b>30% AA/BIS</b>	0,383	0,766

<b>3x Gelový pufr</b>	0,75	1,5
<b>50% glycerol</b>	0	0
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	1,866	3,732

- Do separačního gelu přidat 50 µl 10% APS (na 2 gely 100 µl) a 5 µl TEMED (na 2 gely 10 µl), prudce směs promíchat a ihned nanést stříkačkou s ustříženou žlutou špičkou přibližně 6 mm pod konec hřebínku.
- Do zaostřovacího gelu rychle přidat 25 µl 10% APS (na 2 gely 50 µl) a 2,5 µl TEMED (na 2 gely 5 µl) a směs navrstvit na ještě neztuhlý separační gel. Rychle mezi skla do gelu vložit hřebínek tak, aby kolem něho neuvízly bubliny vzduchu, které by mohly poškodit vznikající jamky.
- Nechat tuhnout přibližně 10 – 15 min. Vytáhnout hřebínek a jamky propláchnout katodovým pufrem.

<b>Anodový pufr</b>	200mM Tris (pH 8,9)
<b>Katodový pufr</b>	100mM Tris, 100mM Tricine, 0,1 % SDS (pH 8,25)
<b>Gelový pufr</b>	3,0M Tris (pH 8,45), 0,3% SDS
<b>AA/BIS</b>	30 g akrylamidu, 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu (Merck) → rozpustit do 100 ml mpH <sub>2</sub> O a přefiltrovat (0,45µm)

### 1) Tris-glycinová SDS – PAGE

*Obecně používaný typ separačního gelu.*

- Připravit sestavu pro nalévání gelu (používáme gely tloušťky 0,75 mm).
- Připravit separační gel o požadované koncentraci:

Chemikálie (ml)	Výsledná koncentrace akrylamidu		
	7,5%	10%	12%
<b>30% AA/BIS</b>	3,75	5,00	6,00
<b>4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8</b>	3,75	3,75	3,75
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	7,50	6,75	5,25

- Do separačního gelu přidat 50  $\mu$ l 10% APS (na 2 gely 100  $\mu$ l) a 5  $\mu$ l TEMED (na 2 gely 10  $\mu$ l), prudce směs promíchat a ihned nanést stříkačkou s ustříženou žlutou špičkou přibližně 6 mm pod konec hřebínku.
- Okamžitě separační gel převrstvit vodou (přístup vzduchu inhibuje polymeraci) a nechat ztuhnout přibližně 10-30 min.
- Po zpolymerování odstranit vodu a připravit zaostřovací gel:

Chemikálie	objem (ml)
<b>30 % AA/BIS</b>	0,65
<b>4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8</b>	1,25
<b>mpH2O</b>	3,1

- Do zaostřovacího gelu přidat 35  $\mu$ l 10% APS (na 2 gely 70  $\mu$ l) a 7  $\mu$ l TEMED (na 2 gely 14  $\mu$ l) a směs navrstvit na separační gel. Rychle mezi skla do gelu vložit hřebínek tak, aby kolem něho neuvízly bubliny vzduchu, které by mohly poškodit vznikající jamky.
- Nechat polymerovat přibližně 30 min. Vytáhnout hřebínek a jamky propláchnout elektrodoým puřrem.

### **Vlastní separace SDS-PAGE**

- Vzorky pro separaci na SDS-PAGE 3 minuty povařit při 95 °C s 1/20 objemu 1M DDT.
- Sestavit aparaturu pro nanášení vzorků, vložit do ní gely a do prostoru mezi nimi nalít elektrodoým puřr. Pomocí mikrodávkoře Hemilton do jamek nanést vzorky a marker (PageRuler). Komplet vložit do elektroforézové vany a naplnit ji elektrodoým puřrem
- Na zdroji napětí nastavit 10 mA/gel a nechat vzorky zaostřovat. V okamřiku, kdy vzorky (bromfenolová modř) vstoupí do separačního gelu, proud přenastavit na 20 mA/gel.
- Proteiny separovat až do okamřiku, kdy bromfenolová modř ve vzorcích dorazí na konce gelu (pro tris-tricinový gel: 3-4 hod; pro tris-glyinový gel: 1-2 hod), poté odpojit zdroj napětí.

- Po vyjmutí gelu z aparatury odříznout zaostřovací gel a jeden definovaný roh gelu pro snazší orientaci nanášek.

<b>AA/BIS</b>	30 g akrylamidu, 0,8 g N,N'-metylenbisakrylamidu → rozpustit do 100 ml mpH <sub>2</sub> O a přefiltrovat (0,45 μm)
<b>4x Tris-HCl/SDS pH 8,8</b>	1,5M Tris-HCl, 0,4% SDS → 91 g Tris base rozpustit do 300 ml mpH <sub>2</sub> O (pH 8,8), doplnit do 500 ml, přefiltrovat (0,45 μm) a přidat 2 g SDS
<b>4x Tris-HCl/SDS pH 6,8</b>	0,5M Tris-HCl, 0,5M Tris-HCl → 6,05 g Tris base rozpustit do 40 ml mpH <sub>2</sub> O (pH 6,8), doplnit do 100 ml, přefiltrovat (0,45 μm) a přidat 0,4 g SDS
<b>5x elektrodový pufr</b>	125 Tris, 950mM glycin, 0,5% SDS, pH 8,3

### 3.2.7.3 Western blot

*Přenos proteinů na membránu pomocí BIO-RAD Trans-blot.*

- Velikost pórů NC membrány zvolit de velikosti separovaných proteinů – malé proteiny/malé póry a obráceně (Nitrobind, MSI, USA; Hybond P, Amersham). Dle množství a velikosti gelů nastříhat papíry Whatman (2 papíry na jeden gel) a membránu. Membránu sytit v chlazeném transferovém pufru minimálně 5 min.
- Pod hladinou transferového pufru začít skládat sendvič, snažit se zamezit přítomnosti vzduchových bublin. Na černou část blotovací desky položit těsnicí porézní vložku a na ni navlhčený papír Whatman. Následně na povrch papíru opatrně přenést gel ze separační aparatury, nasycenou membránu, druhý papír a opět porézní vložku. Ze sendviče lze případné bublinky vytlačit jemným převálcováním přes druhý papír Whatman. Vše uzavřít čirou deskou sendviče a zasunout do držáku blotovacích desek v elektroforézové nádobě (čirá deska k červenému kladnému pólu; černá deska k černému zápornému pólu).
- Nádobu umístit na míchačku, nalít do ní chlazený transferový pufr a vložit nádobku s ledem. Na zdroji napětí nastavit 100 V a zapnout míchání. Při přenosu se celý systém zahřívá, kontrolujeme proto nádobku s ledem a vyměňujeme ji přibližně každých 30 min.

- Po ukončení přenosu, který trvá přibližně 1,5 hodiny, odpojit zdroj a vyjmout desky a blot rozebrat.
- Na membráně označit tužkou stranu s proteiny a opláchnout ji v TBS pufru (membránu lze skladovat zatavenou v PE folii při 4 °C).
- Gel fixovat barvit v Coomassie blue nejméně 30 min. Po barvení gel vložit do odbarvovacího roztoku a odbarvovat přes noc.

<b>Přenosový pufr</b>	25mM Tris, 192mM glycin, 20% methanol
<b>Barvicí roztok</b>	20% metanol, 0,117% Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD), 0,051% Bismarck Brown R (Sigma), 7% kys. octová v mpH <sub>2</sub> O
<b>Odbarvovací roztok</b>	20% methanol, 7% kys. octová v mpH <sub>2</sub> O

#### 3.2.7.4 Imunodetekce proteinů na membráně

- Membránu promytou roztokem TBS nebo vytaženou z PE folie blokovat 1 hod v 5% mléko/0,1% TTBS při pokojové teplotě na třepačce, 150 rpm.
- Zablokovanou membránu zatavit po třech stranách do PE folie, přidat 5 ml roztoku primární protilátky v 5% suspenzi mléka v 0,1% TTBS. Zatavit i poslední stranu a takto inkubovat 1 hod na třepačce při pokojové teplotě.
- Inkubaci membrány s primární protilátkou dokončit třepáním při 4 °C přes noc (lze inkubovat pouze 3 hod při pokojové teplotě).
- Membránu vyjmout z roztoku primární protilátky, opláchnout ji v roztoku TTBS a poté opakovat omývání 3x 10 min v TTBS.
- Membránu opět zatavit do nové PE folie a inkubovat 60 min s konjugátem sekundární protilátky v 3% suspenzi mléka v 0,05% TTBS.
- Po ukončení inkubace membránu opláchnout v TTBS a promývat 4x 10 min v TTBS a 2x 5 min v TBS.
- Následně lze různými způsoby vizualizovat pozici sekundární protilátky na membráně (viz Detekce alkalickou fosfatázu; detekce chemiluminiscenci).

<b>TBS</b>	20mM Tris-HCl (pH 8,0), 500mM NaCl
------------	------------------------------------



**TTBS**

TBS s 0,05% Tween 20

### 1) Detekce alkalickou fosfatázou (AP)

*Sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (GAM-AP; BIO-RAD), která z přidávaného substrátu tvoří barevnou sraženinu.*

- Po skončení inkubace membránu 5 min ekvilibrovat v AP pufru a ihned položit lícem do vyvíjecího roztoku. Inkubovat ve tmě při pokojové teplotě do vybarvení.
- Vyvíjení ukončit promytím membrány v 5 – 10mM EDTA (pH 8,0), opláchnutím deionizovanou vodou a vysušením membrány.

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

**Reagent A (100x)** 30 mg NBT v 70% DMF

**Reagent B (100x)** 15 mg BCIP v mpH<sub>2</sub>O

**Vyvíjecí roztok** naředěním 100x koncentrovaných zásobních roztoků reagensů A a B v AP pufru

### 2) Detekce chemiluminiscencí

*Sekundární protilátka konjugovaná s peroxidázou (IgG-HRP; Santa Cruz). Po přidání substrátu peroxidáza katalyzuje chemiluminiscenční reakci, kterou je možné detekovat pomocí přístroje LAS-4000.*

- Membránu po omytí v TBS osušit filtračním papírem a vložit do směsi substrátů ECL detection reagent (GE Healthcare) v poměru 1:1.
- Vzniklou chemiluminiscenci detekovat pomocí přístroje LAS-4000.

#### 3.2.7.5 Chromatinová imunoprecipitace ChIP

*Studium interakce DNA s proteiny.*

##### **Pěstování buněk**

- Inokulem zaočkovat požadované množství čerstvého média (YPAD nebo příslušné selekční médium), kultivovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm. Sklízet minimálně 50 ml kultury o OD<sub>600</sub> 0,6 – 0,9. Při pěstování různých kmenů sklízíme v různých časech po dosažení stejného OD<sub>600</sub>

## Fixace

- Do 50 ml kultury přidat formaldehyd na výslednou koncentraci 1% (1,35 ml 37% formaldehydu). Fixovat přesně 30 min na třepačce (RT, 150 rpm).
- Fixaci ukončit přidáním glycinu na výslednou koncentraci 0,125 M (2,5 ml 2,5M glycinu). Inkubovat 10 min na třepačce (RT, 150 rpm).
- Fixovanou kulturu přenést do 50ml centrifugací zkumavky a usadit centrifugací (Eppendorf model 5804R, 3 000 rpm, 3 min, RT), supernatant odstranit.
- K sedimentu přidat 40 ml mpH<sub>2</sub>O, resuspendovat a opět stočit (Eppendorf model 5804R, 3 000 rpm, 3 min, RT), supernatant odstranit.
- Pelet suspendovat v 1 ml mpH<sub>2</sub>O a přenést do čisté 2ml mikrozukavky a opět stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS; 3 900 rpm, 3 min, RT), supernatant odstranit. Takto připravené buňky uchovávat zmražené v -80 °C do dalšího zpracování.

## Rozbíjení a sonikace

*Buňky a všechny používané roztoky chladit na ledové lázni, spustit chlazení všech potřebných přístrojů (Eppendorf model 5804R, Eppendorf model 5417R, sonikátor).*

- Do popsaných mikrozukavek s šroubovacím víčkem (bílé a trojhranné) odvážit 800 mg skleněných kuliček (myté v kyselině) a předchladit je na ledové lázni.
- K zmraženým buňkám přidat 270 µl LB pufru s koktejlem inhibitorů proteáz (před samotným experimentem přidat k LB pufru 1/100 objemu inhibitoru proteáz (Proteáze Inhibitor Mix FY; Serva)), resuspendovat je a přenést do zkumavek s vychlazenými kuličkami.
- Pomocí tří cyklů rozbíjení ve FastPrep-24 (MP) buňky homogenizovat (1 cyklus: speed 5,5, time 13 s). Mezi jednotlivými cykly buňky chladit 5 min na ledové lázni.
- Nad kahanem nažhavit tenkou jehlu (Ø 0,45 mm x 25 mm) a propíchnout dno zkumavky. Vložit ji do čisté 1,5ml mikrozukavky s odstřiženým víčkem. Propíchnout také víčko zkumavky pro vyrovnání tlaků při stáčení.
- Vše vložit do 50ml centrifugační zkumavky a buněčný lyzát vytočit do čisté 1,5ml mikrozukavky centrifugací (Eppendorf model 5804R, 3 000 rpm, 3 min, 4 °C).

- Kuličky ještě jednou propláchnout 200 µl LB pufru s koktejlem inhibitorů proteáz a znovu stočit (Eppendorf model 5804R, 3 000 rpm, 3 min, 4 °C), frakce spojit.
- Získaný lyzát přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky a centrifugovat (Eppendorf model 5417R; 15 000 rpm, 10 min, 4 °C), supernatant odstranit.
- K sedimentu opět přidat 600 µl LB pufru s koktejlem inhibitorů proteáz a důkladně resuspendovat, opět stočit (Eppendorf model 5417R; 15 000 rpm, 10 min, 4 °C), supernatant odstranit.
- Finální vzorek pro sonikaci připravit resuspendováním omytého lyzátu buněk ve 270 µl LB pufru s koktejlem inhibitorů proteáz.
- Vzorky sonikovat v předchlazeném sonikátoru BioRuptor 15x 30s on, 15x 30s off (chlazení zapnout minimálně 1 hod předem na 2 °C).
- Sonikát stočit (Eppendorf model 5417R; 16 400 rpm, 15 min, 4 °C). Supernatant obsahující fragmenty DNA přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky (*lze uchovávat po dobu několika dnů v -80 °C*).

### **Blokace protein A sepharózy a odstranění nespecifické reaktivity (*preclear*)**

*Ideálně začít s blokací protein A sepharózy (GE Healthcare) již během předchozích kroků (trvá více než 1 hod).*

- Do 1,5ml mikrozkušavky odebrat 15-20 µl protein A sepharózy uštířenu žlutou špičkou, přidat 500 µl LB pufru a stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS; 9 000 rcf, 2 min, RT), supernatant odstranit injekční stříkačkou, jejíž jehlou neprojdou kuličky sepharózy.
- Protein A sepharózu blokovat v 500 µl LB pufru s 0,5% BSA, inkubovat 30 min na třepačce při 24 °C a 1000 rpm. Poté opět stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS; 9 000 rcf, 2 min, RT), supernatant odstranit injekční stříkačkou a blokování opakovat ještě jednou.
- K takto zablokované protein A sepharóze přidat 270 µl sonikátu, inkubovat 1 hod na kolotoči v chladové místnosti.
- Po inkubaci vzorky stočit (Eppendorf model 5417R; 7 700 rpm, 2 min, 4 °C) a supernatant přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky.

- Pomocí NanoDrop (Tab. 1; ThermoScientific) změřit koncentraci proteinů, která by se mezi jednotlivými vzorky neměla lišit a o více než 10 % (popřípadě doředíme vzorky LB pufrem).
- Odebereme 5 µl sonikátu jako input, který uchováme v -20 °C až do izolace DNA (*v tuto chvíli lze vzorky uchovávat po dobu několika dnů v -80 °C*).

### **Preinkubace a inkubace**

- Před samotnou preinkubací začít blokovat 45 µl protein A sepharózy stejně jako v předchozím kroku, kterou využijeme později pro inkubaci.
- Během blokace protein A sepharózy zahájit preinkubaci. Ke zbytku sonikátu přidat 5 µl protilátky a vzorky inkubovat 1 hod na kolotoči v chladové místnosti.
- Po preinkubaci vzorky stočit (Eppendorf model 5417R; 7 700 rpm, 2 min, 4 °C) a supernatant přidat k 45 µl zablokované protein A sepharózy, inkubovat na kolotoči 3 hod v chladové místnosti.

### **Promývání, odvázní proteinů a izolace DNA**

- Protein A sepharózu s navázanými fragmenty DNA centrifugovat (Eppendorf model 5417R; 2000 rpm, 1 min, 4 °C), supernatant odstranit.
- Sepharózu promýt 1 ml chlazeného IP pufru, stočit (Eppendorf model 5417R; 2000 rpm, 30 s, 4 °C), supernatant odstranit. Promývání opakovat ještě 5x.
- Přinést předem odebraný input z -20 °C. K inputu a k omyté sepharóze přidat 100 µl 10 % Chelexu (Biorad). Vše 10 s vortexovat a inkubovat 10 min při 95 °C.
- Po zchladnutí vzorků přidat 1 µl Proteinázy K (Roche; 20 mg/ml), krátce vortexovat a inkubovat 30 min při 55 °C a třepání 1000 rpm. Po inkubaci inaktivovat proteinázu K inkubací 10 min v 95 °C.
- Vzorky centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS; 12 000 rpm, 1 min, RT) a odebrat 80 µl roztoku DNA z vrchní vrstvy supernatantu do čisté 1,5ml mikrokumavky.
- K sedimentu (sepharóza, Chelex, DNA) se zbytkem supernatantu (DNA) přidat dalších 60 µl mpH<sub>2</sub>O, vše vortexovat a opět stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS;

12 000 rpm, 1 min, RT). Do 1,5ml mikrozkušavky s 80 µl DNA přenést dalších 60 µl supernatantu.

- Kvalitu a koncentraci DNA změřit pomocí NanoDrop (Tab. 1; ThermoScientific). Pro měření vzorků pomocí LightCycler 480 (qPCR) použít ~ 20 ng DNA/reakce.

Typ nukleové kyseliny	Poměr absorbancí	Hodnota pro čistou NK
DNA	A260/A280	1,8
	A260/A230	1,8 - 2,2
RNA	A260/A280	2,0
	A260/A230	1,8 - 2,2

Tab. 1: Hodnoty naměřené pomocí NanoDropu, které odpovídají čistotě nukleové kyseliny.

<b>Lysis pufr (LB)</b>	50nM Hepes (pH 7,6), 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% Deoxycholát sodný (Na-Doc)
<b>IP pufr</b>	Tris HCl (pH 7,5), 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-, 0,5% NP-40

### 3.2.8. Techniky manipulace s DNA

#### 3.2.8.1 Izolace plasmidové DNA z *E. coli* alkalickou metodou

*Při nižších požadavcích na objem izolované plasmidové DNA lze izolaci provádět pomocí NuclSpin Plasmid (Macherey-Nagel, BRD).*

##### **1. den**

- Jednou kolonií *E. coli* zaočkovat 30 ml 1x LB média s příslušným selekčním antibiotikem (100 µl/ml ampicilinu) a kultivovat přes noc na třepačce při 37 °C, 180 rpm (min. 16 hod).

##### **2. den (práce na ledové lázni)**

- Narostlou kulturu přenést do 50ml centrifugační zkumavky, inkubovat 10 min na ledové lázni a centrifugovat (Eppendorf model 5804R, 2 335 rpm, 20 min, 4 °C).
- Supernatant odstranit, sediment důkladně resuspendovat do 2 ml roztoku I a inkubovat 5 min na ledové lázni.

- Po skončení inkubace k suspenzi přidat 4 ml roztoku II, lehce promíchat překlápěním zkumavky a inkubovat 1-10 min při RT.
- Na ledové lázni přidat 3 ml roztoku III, lehce promíchat překlápěním zkumavky a inkubovat 15 min na ledové lázni. Suspenzi centrifugovat (Eppendorf model 5804R, 11 000 rpm, 20 min, 4 °C).
- Supernatant přenést do čisté 50ml centrifugační zkumavky a odečíst objem. Přidat 0,6 objemu isopropanolu, ihned centrifugovat (Eppendorf model 5804R, 2 335 rpm, 6 min, 20 °C) a supernatant důkladně odstranit.
- Sediment rozpustit v 300 µl mpH<sub>2</sub>O a přinést do sterilní 1,5ml mikrozukavky.
- K danému roztoku (300 µl + objem sedimentu) přidat stejný objem 10M LiCl a inkubovat 20 min při -80 °C.
- Sraženinu centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 5 min, 20 °C) a supernatant přenést do čisté 1,5ml mikrozukavky.
- Plasmidovou DNA vysrážet jedním objemem 96% EtOH, inkubovat 20 min při -80 °C.
- Sraženinu centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 5 min, 20 °C) a sediment 2-3x opláchnout 70% EtOH (pelet vždy usadit centrifugací). Alkohol odsát a zbytek nechat odpařit.
- Dle množství izolovaného plasmidu rozpustit do 100-200 µl mpH<sub>2</sub>O.
- Čistotu izolované DNA změřit pomocí NanoDrop (Tab. 1; ThermoScientific) a elektroforeticky.

<b>Roztok I</b>	25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA-NaOH, 1% glukóza
<b>Roztok II</b>	1% SDS, 0,2M NaOH
<b>Roztok III</b>	3M KAc, 2M kys. octová (pH 5,4)

### 3.2.8.2 Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pomocí NucleoSpin Plasmid

*Izolace plasmidové DNA pomocí NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid; Macherey-Nagel, BRD).*

- Kulturu *E. coli* připravit dle protokolu 3.2.8.1 Izolace plastidové DNA z *E.coli* alkalickou metodou (1. den).
- 2 ml narostlé kultury přenést do sterilní 2ml mikrozkušavky, buňky usadit centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 30 s, RT) a supernatant odstranit.
- Sediment důkladně resuspendovat v 250 µl pufru A1.
- K suspenzi přidat 250 µl pufru A2, lehce promíchat překlápěním zkumavky (6-8x) a inkubovat 5 min při RT.
- Přidat 300 µl pufru B3, opět lehce promíchat překlápěním zkumavky (6-8x) a centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 5 min, RT).
- Supernatant (750 µl) přenést do komerční kolonky umístěné ve sběrné zkumavce (*Column in a Collection Tube*) a plasmidovou DNA zachytit na membráně kolonky (*Column*) centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 1 min, RT).
- Supernatant ze sběrné zkumavky (*Collection Tube*) odstranit a kolonku do ní opět vložit. Membránu kolonky omýt 600 µl pufru A4, centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 1 min, RT) a supernatant opět odstranit.
- Membránu kolonky vysušit centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 11 000 rcf, 2 min, RT).
- Kolonku přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky a plasmidovou DNA eluovat 50 µl pufru AE (pro vyšší účinnost eluce použít 2x 25 µl). Membránu s elučním AE pufrem inkubovat 1 min při RT, a poté centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 1 min, RT).
- Množství a kvalitu izolované DNA změřit pomocí NanoDropu (Tab. 1; ThermoScientific; blank - AE pufř).

### **3.2.8.3 Izolace chromozomální DNA *S. cerevisiae* fenol-chloroformovou extrakcí**

*Práce v digestoři a v rukavicích (karcinogenní směs fenol:chloroform:izoamylalkohol).*

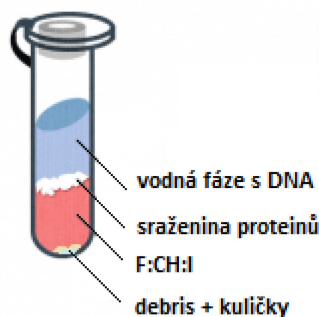
**1. den (večer)**

- Několika koloniemi *S. cerevisiae* zaočkovat 15 ml média (YPAD nebo příslušné selekční médium), kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení stacionární fáze (OD<sub>600</sub> ~ 9).

## 2. den

- Narostlou kulturu ve stacionární fázi přenést do 50ml centrifugační zkumavky, buňky usadit centrifugací (Eppendorf model 5804R, 2 335 rpm, 3 min, RT) a supernatant odstranit.
- Buněčný pelet resuspendovat v 0,5 ml mpH<sub>2</sub>O a přenést do mikrozukavky s šroubovacím víčkem (bílé a trojhranné).
- Buňky opět usadit centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 13 000 rpm, 5 s, RT), část supernatantu odstranit a buňky ve zbytku promíchat krátkým vortexováním.
- V digestoři přidat k suspenzi buněk 200 µl YLP (Yeast Lysis Puffer), 200 µl směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1) a 300 mg skleněných kuliček (myté v kyselině).
- Pomocí tří cyklů rozbíjení ve FastPrep-24 (MP) buňky homogenizovat (1 cyklus: speed 5,5, time 20 s). Mezi jednotlivými cykly buňky inkubovat 5 min na ledu.
- K suspenzi rozbitých buněk přidat 200 µl TE pufru (pH 8,0) a centrifugovat (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 min, 4 °C).

### Vzniklé fáze:



- Opatrně odebrat horní vodnou fázi s DNA a přenést ji do čisté 1,5ml mikrozukavky.
- Přidat 1 ml chlazeného 96% EtOH, promíchat překlápěním a opět stočit (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 5 min, 4 °C).





- DNA zachytit na membráně kolonky centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 30 s, RT), supernatant odstranit.
- Membránu omýt přidáním 700  $\mu$ l pufru NT3, opět stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 30 s, RT), supernatant odstranit.
- Membránu kolonky vysušit centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 1 min, RT) a přebytečný alkohol nechat odpařit inkubací otevřené kolonky 2-5 min při 70 °C.
- Kolonku (*Column*) přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky a DNA eluovat 15-30  $\mu$ l pufru NE (lze nahradit mpH<sub>2</sub>O): membránu s elučním NE pufrem nejprve inkubovat 1 min při RT, a poté centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 1 min, RT).

### 3.2.8.6 Purifikace DNA z agarózového gelu

*DNA extrakce z agarosového gelu pomocí NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, BRD).*

- Potřebné fragmenty DNA vyříznout z agarosového gelu. Snažit se minimalizovat expozici UV záření, které způsobuje poškození DNA.
- Do 2ml mikrozkušavky přidat 200  $\mu$ l NTI pufru ke každým 100 mg agarosového gelu s DNA (< 2%). Inkubovat 5-10 min při 50 °C a 1000 rpm (prodloužit inkubaci do úplného rozpuštění gelu).
- Vzorek přenést na kolonku ve sběrné zkumavce (*Column in a Collection Tube*), centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 30 s, RT), supernatant odstranit.
- Membránu kolonky 2x omýt 700  $\mu$ l pufru NT3, vždy stočit (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 30 s, RT) a supernatant odstranit.
- Membránu vysušit centrifugací (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 1 min, RT).
- Kolonku (*Column*) přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky a DNA eluovat 35  $\mu$ l pufru NE (pro vyšší účinnost eluce použít 2x 25 ml): membránu s elučním pufrem vždy nejprve inkubovat 1 min při RT, a poté centrifugovat (Eppendorf MiniSpin PLUS, 12 800 rpm, 1 min, RT).

### 3.2.8.7 Amplifikace DNA pomocí PCR

Je vhodné PCR reakce připravovat na ledu a v rukavicích.

Celkový objem vzorků může být dle požadavků 10-100  $\mu$ l. Výslednou koncentraci  $MgCl_2$  lze optimalizovat dle konkrétní situace (1,5 – 2,5mM).

#### Příprava PCR reakce

- Na jednu reakci připravit 7,5  $\mu$ l premixu:

	Zásobní koncentrace	Objem v 15 $\mu$ l PCR reakci	Výsledná koncentrace
<b>10x polymerázový pufr</b>	-	1,5 $\mu$ l	1x
<b>Forward primer</b>	10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ l	1 $\mu$ M
<b>Reverse primer</b>	10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ l	1 $\mu$ M
<b>MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)</b>	25mM	1,5 $\mu$ l	2,5mM
<b>dNTP (Fermentas)</b>	každý 2,5mM	1,5 $\mu$ l	250 $\mu$ M
<b>DNA polymeráza (Fermentas)</b>	V případě Taq polymerázy – 0,5 $\mu$ l/100 $\mu$ l směsi (jinak dle konkrétního doporučení výrobce)		

#### Templátová DNA

- DNA izolovaná LiAc v SDS: 2  $\mu$ l supernatantu + 5,5  $\mu$ l mpH<sub>2</sub>O
- DNA o známé koncentraci: 10 pg – 1  $\mu$ g DNA/reakce v 7,5  $\mu$ l mpH<sub>2</sub>O

- V 0,2ml mikrozkušavce smíchat 7,5  $\mu$ l premixu a 7,5  $\mu$ l templátové DNA.
- Vzorky okamžitě inkubovat v PCR cycleru s nastaveným příslušným PCR programem.

#### Obecný PCR program:

Krok PCR reakce	Teplota (°C)	čas	Počet cyklů
<b>Počáteční denaturace</b>	95	1-3 min	1x
<b>Denaturace</b>	95	30 s	25-40x
<b>Hybridizace primerů</b>	T <sub>m</sub> -5	30 s	
<b>Amplifikace (syntetická fáze)</b>	72	1 min/kb	
<b>Finální amplifikace</b>	72	5-15 min	1x

Jednotlivé časy a teploty lze optimalizovat dle konkrétní situace.

### 3.2.8.8 RealTime PCR (RT-qPCR)

- Na jednu reakci připravit 8,5  $\mu$ l premixu:
  - 5  $\mu$ l MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR<sup>®</sup> (Eurogentec)
  - 0,3  $\mu$ l přímý primer
  - 0,3  $\mu$ l zpětný primer
  - 2,9  $\mu$ l mpH<sub>2</sub>O

*Je vhodné všechny chemikálie a DNA neustále chladit a pracovat s nimi v rukavicích. Navíc je vhodné s fluorescenční barvou SybrGreen pracovat rychle, aby nedošlo k jejímu vysvícení.*

- Premix pipetovat pomocí elektronické pipety Eppendorf po 8,5  $\mu$ l na dno 384 jamkové mikrotitrační destičky (*LightCycler<sup>®</sup> Multiwell Plate 384*; Rosche).
- Elektronickou pipetou Gilson přidat do premixu 1,5  $\mu$ l templátové DNA (pozn.: templátovou DNA pipetovat na bok jamek mikrotitrační destičky tak, aby nedošlo ke kontaminacím mezi jednotlivými páry primerů).

#### Typy templátových DNA:

- *Ověření specifity primerů pro qPCR: vytvořit 5x ředící řadu standardu DNA, ve které má nejkoncentrovanější standard S1 koncentraci ~ 300 ng/ $\mu$ l (40-50 ng DNA do qPCR reakce).*
- *RT-qPCR analýza - určení množství RNA ve vzorku: 0,05  $\mu$ l cDNA (complementary DNA) s 1,45  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.*
- *ChIP-qPCR analýza - DNA získaná pomocí metody ChIP: ~ 20 ng DNA do qPCR reakce.*
- Po přenesení všech qPCR reakcí do mikrotitrační destičky, destičku přelepit fólií (*LightCycler<sup>®</sup> Sealing Foil*; Rosche), promíchat vortexováním a stočit (Eppendorf model 5804R, 1 000 ref, 3 min, 4 °C).
- Vzorky měřit za využití příslušného programu (program Tm60) pomocí přístroje LightCycler 480 typ b.

Program Tm60:

Krok qPCR reakce	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
<b>Pre-inkubace</b>	95 °C	5 min	1x

<b>Amplifikace</b>	95 °C	15 s	40x
	60 °C	30 s	
	72 °C → <i>odečet fluorescence</i>	20 s	
<b>Analýza táním</b>	95 °C	5 min	1x
	50 °C	1 min *	

\* po 1 min zvyšovat teplotu o 1 °C a kontinuálně odečítat fluorescence

### Vyhodnocení qPCR:

Kvantitativní PCR (qPCR) je metoda, která umožňuje na základě kvantifikace fluorescenčního signálu stanovit množství vybrané NK v buňce. Míra fluorescence je úměrná množství *dsDNA* (dvouřetězcová DNA) ve vzorku. Hodnota  $C_p$  (*crossing point*) udává počet cyklů, které byly nutné pro dosažení určité hodnoty fluorescence, což znamená, že čím nižší je hodnota  $C_p$ , tím více templátové DNA vzorek obsahoval. Během qPCR analýzy provádíme měření technických triplikátů. Získaná hodnota  $C_p$  je průměrem těchto technických opakování se směrodatnou odchylkou SD. E je dříve zjištěnou účinností qPCR reakce obsahující konkrétní pár primeru.

- **RT-qPCR analýza**

Hodnoty naměřené pro sledovaný gen v daném vzorku (*vz*) byly normalizovány na hodnoty naměřené pro gen *TOM22* (*housekeeping gene*), jehož hladina by se neměla v mutantech měnit.

$$\Delta C_{p(vz)} = C_p(vz) - C_p(TOM22)$$

Směrodatná odchylka pro normalizovaný vzorek byla vypočítána dle vzorce:

$$\Delta SD_{(vz)} = \sqrt{SD_{(vz)}^2 + SD_{(TOM22)}^2}$$

Při určování relativní exprese sledovaného genu, byly normalizované hodnoty  $C_p$  daného vzorku přepočítány na efektivitu použitého páru primeru a vztaženy k hodnotám získaným pro referenci (*ref*).

$$\text{relativní exprese} = \frac{[E_{(vz)}^{-\Delta C_{p(vz)}}]}{[E_{(ref)}^{-\Delta C_{p(ref)}}]}$$

- **ChIP-qPCR analýza**

Hodnota  $C_p$  pro daný vzorek (*vz*) byla vypočítána jako rozdíl hodnot  $C_p$  imunoprecipitátu (*out* - fragmenty DNA získané precipitací) a  $C_p$  „inputu“ (*in* – fragmenty DNA vstupující do precipitace).

$$\Delta C_{p(vz)} = C_p(out) - C_p(in)$$

Směrodatná odchylka pro daný vzorek byla vypočítána dle vzorce:

$$SD_{(vz)} = \sqrt{SD_{(out)}^2 + SD_{(in)}^2}$$

Při výpočtu relativního nabohacení úseku sledovaného genu, byly hodnoty  $C_p$  daného vzorku přepočítány na efektivitu použitého páru primeru a vztaženy k hodnotám získaným pro referenci (*ref*).

$$\text{relativní nabohacení} = \frac{[E_{(vz)}^{-\Delta C_{p(vz)}}]}{[E_{(ref)}^{-\Delta C_{p(ref)}}]}$$

### 3.2.8.9 Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu

*S ethidium bromidem pracovat v rukaviciích, jedná se o karcinogenní interkalační látku.*

- DNA separovat v přístroji pro horizontální gelovou elektroforézu v 1x TAE pufru.
- Dle velikosti DNA zvolit hustotu agarosového gelu:

% agarosy v gelu	Velikost lineární <i>ds</i> DNA (kb)
0,5	60 - 10
1	10 - 1
1,5	1 - 0,5
2	0,5 - 0,1

- Do potřebného objemu 1x TAE pufru přidat příslušné množství agarózy (LE Agarosa) a vařit do úplného rozpuštění.
- Po částečném zchladnutí agarózy nalít gel o tloušťce 3-5 mm a současně vytvořit jamky zanořením hřebínku.
- Do jamek nanášet 5-50  $\mu$ l DNA (2-10 ng) s 1/5 objemu 6xLD vzorkového pufru. Pro určení velikosti separované DNA je potřeba současně nanést standard velikostí fragmentů (možno zvolit různý dle předpokládané délky separované DNA).

- Na zdroji napětí nastavit 0,3-10 V/cm gelu. Nechat separovat, a poté gel barvit v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 5-20 min (délka barvení koreluje s tloušťkou gelu).
- Obarvený gel vizualizovat pomocí UV záření a fotografovat ho s pomocí UV filtru. Snímky exponovat 2,5-4 s (digitální fotoaparát Panasonic DMC-F27)

<b>1x TAE</b>	40mM Tris (Serva; 20mM ledová kyselina octová, 2mM Na <sub>2</sub> EDTA (Biorad), pH 8,5
<b>6x vzorkový pufr</b>	0,06% bromfenolová modř, 60% glycerol, 60mM EDTA (Biorad)

### 3.2.8.10 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- V 0,5ml mikrozkuhavce namíchat restrikční směs a doplnit mpH<sub>2</sub>O na finální objem 20 µl.

<b>10x restrikční pufr</b>	2 µl	1/10 výsledného objemu
<b>vzorek DNA v mpH<sub>2</sub>O</b>	~ 1 µl	0,1-4 µg
<b>restrikční enzym</b>	0,5-1 µl	5-10 U (units)/µg štěpené DNA

*Do reakce lze pro odstranění RNA přidat 0,2 µl RNAsy (10 mg/ml).*

- Inkubovat 1-4 hod při optimální teplotě štěpení daného restrikčního enzymu (nejčastěji 37 °C).
- Reakci zastavit inkubací směsí 20 min při 65 °C (lze upravit dle konkrétních požadavků daného restrikčního enzymu).

### 3.2.8.11 Ligace DNA v roztoku

- V 0,5ml mikrozkuhavce namíchat ligační směs a doplnit mpH<sub>2</sub>O na finální objem 10 µl.

<b>10x ligační pufr</b>	1 µl	1/10 výsledného objemu
<b>DNA vektor/inzert</b>	poměr 1:3	100 ng : 300 ng
<b>T4 DNA ligáza</b>	0,2 µl	0,08 U (units)

*Ligační směs upravit v případě ligace tupých konců (dle ThermoScientific product information).*

- Ligační směs inkubovat 2-4 hod při pokojové teplotě (popř. 30 min ve 37 °C, a poté 30 min při pokojové teplotě).
- Pro zvýšení účinnosti lze ligovat ve vodní lázni o pokojové teplotě, a následně v lednici před noc.
- Ligázu inaktivovat inkubací směsi 10 min při 65 °C.

### 3.2.9 Techniky manipulace s RNA

#### 3.2.9.1 Izolace RNA

*S RNA vždy pracovat na ledu a v rukavicích, abychom zabránili přenosu RNáz a degradaci RNA.*

#### Příprava buněk

##### 1. den

- Ráno zaočkovat několika koloniemi *S. cerevisiae* 5 ml média (YPAD nebo příslušné selekční médium), kultivovat 8-9 hod na třepačce při 30 °C, 180 rpm do dosažení stacionární fáze.
- Po 8-9 hod kulturu přeočkovat do 10 ml čerstvého média na OD<sub>600</sub>=0,0015; kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C, 180 rpm.

##### 2. den

- Kulturu kultivovat ideálně na OD=1,8 (maximálně však 2,4) a sklízet takový objem, který odpovídá 3 OD.
- Suspenzi buněk přenést do sterilní 2ml mikrozkuřavky, usadit centrifugací (Eppendorf model 5417R, 20 000 rcf, 1 min, 4 °C), supernatant odstranit a sediment skladovat při -80 °C.

#### Vlastní izolace RNA

*Izolace RNA za použití MasterPure™ Yeast RNA, purification kit (cat. nos. MPY03010 a MPY03100; Epicentre® - Illumina company).*

#### Purifikace RNA

- Dle počtu vzorků (1,5 ml kultury ve střední logaritmické fázi) připravit premix smícháním 300 µl Extraction Reagent for RNA s 1 µl proteinázy K (50 µg/µl).



- K rozmrzlým buňkám přidat 300  $\mu$ l premixu, promíchat vortexováním a inkubovat 15 min při 70 °C a 1000 rpm.
- Po skončení inkubace chladit buňky 5 min na ledu.
- K suspenzi buněk přidat 175  $\mu$ l MPC Protein Precipitation Reagent (ve vzorku se může tvořit sraženina) a 10 s intenzivně vortexovat.
- Vzorek centrifugovat (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 min, 4 °C) a supernatant přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky,
- K supernatantu přidat 500  $\mu$ l chlazeného isopropanolu a zamíchat překlápěním zkumavky (30-40x).
- Precipitovanou NK usadit centrifugací (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 min, 4 °C) a supernatant důkladně odstranit.

#### **Odstranění kontaminující DNA**

- Dle počtu vzorků připravit roztok DNázy I. Rozpis na jeden vzorek:
 

10x DNase Buffer	20 $\mu$ l
mpH <sub>2</sub> O	175 $\mu$ l
RNase- Free DNase I	5 $\mu$ l
- Pelet NK důkladně resuspendovat do 198  $\mu$ l roztoku DNázy I a inkubovat 30 min při 37 °C.
- Po skončení inkubace přidat 200  $\mu$ l roztoku 2x T and C Lysis Solution, promíchat vortexováním 5s.
- Přidat dalších 200  $\mu$ l MPC Protein Precipitation Reagent (ve vzorku se může tvořit sraženina), vortexovat 10 s a inkubovat 5 min na ledu.
- Buněčné debris odstranit centrifugací (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 min, 4 °C) a supernatant přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky.
- K precipitované RNA přidat 500  $\mu$ l chlazeného isopropanolu, zamíchat překlápěním zkumavky (30-40x).
- Vysráženou RNA usadit centrifugací (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 min, 4 °C) a supernatant odstranit.

- Pelet 2x omýt 400 µl chlazeného 70% EtOH, odlepený pelet vždy usadit centrifugací (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 s, 4 °C).
- Supernatant důkladně odstranit a vysráženou RNA resuspendovat v 35 µl mpH<sub>2</sub>O s 1 µl RiboGuard<sup>TM</sup> RNase Inhibitor.
- Kvalitu a koncentraci izolované RNA zjistit pomocí přístroje NanoDrop (Tab. 1; Thermo Scientific) a skladovat při -80 °C.

### 3.2.9.2 Reverzní transkripce

*Syntéza komplementární cDNA k izolované RNA pomocí reverzní transkriptasy. Práce v rukavicích a na ledu.*

- Část izolované RNA naředit 4x (30 µl mpH<sub>2</sub>O s 10 µl RNA) a za pomoci přístroje NanoDrop (ThermoScientific) přeměřit její koncentraci.
- Připravit roztok RNA (2 µg) s 1 µl Random hexamer primer (#S0142) a doplnit do objemu 12,8 µl DEPC-treated H<sub>2</sub>O (#R0601). Vše krátce promíchat, stočit (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 s, 4 °C) a inkubovat 5 min při 65 °C.
- Po skončení inkubace vzorky zchladit na ledu, krátce stočit (Eppendorf model 5417R, 15 000 rpm, 10 s, 4 °C) a uložit na led.
- Dle počtu vzorků namíchat premix pro reverzní transkripci v následujícím pořadí.  
Návod na jeden vzorek:

<b>5x reakční pufr</b>	4 µl
<b>dNTP Mix - každý 10 mM</b> (#R0191)	2 µl
<b>RiboLock RNase Inhibitor</b> (#EO0381; Fermentas)	0,25 µl (10 units)
<b>RevertAid Reverse Transcriptase</b>	1 µl (200 units)

- K 12,8 µl roztoku RNA přidat 7,2 µl premixu, krátce promíchat a stočit (Eppendorf model 15 000 rpm, 10 s, 4 °C)
- Vzorky inkubovat 10 min při 25 °C a poté 60 min při 42 °C.
- Po skončení inkubace enzym inaktivovat 10 min při 70 °C.

- Pro analýzu vzorků za pomoci qPCR použít na jednu reakci 0,05  $\mu$ l cDNA s 1,45  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (cDNA lze dlouhodobě skladovat v -80 °C).

## 4. Cíle diplomového projektu

### První projekt

- **Ověřit dříve pozorovaný protichůdný efekt delece intronů z paralogních genů *TUB1* a *TUB3* na termosenzitivitu sestřihové mutanty *prp45(1-169)* s kmeny s identickým genetickým pozadím.**
  - a. Připravit kmeny s delecí intronu v genech *TUB1* a *TUB3* v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* s jinak identickým genetickým pozadím.
  - b. Otestovat citlivost těchto kmenů ke zvýšené kultivační teplotě (37 °C) a k mikrotubulárnímu inhibitoru benomyly.
- **Stanovit, zda mezi paralogními geny *TUB1* a *TUB3* probíhá vzájemná regulace genové exprese zprostředkovaná přítomností intronu.**
  - a. Pozorovat změny hladin mRNA a pre-mRNA *TUB1* a *TUB3* v závislosti na přítomnosti/absenci intronů v kmenech s funkčním a defektním sestřihem (*prp45(1-169)*).
  - b. Pozorovat změny v poměrech hladin mRNA a pre-mRNA genů *TUB1* a *TUB3* v přítomnosti mikrotubulárního inhibitoru benomyly a defektního sestřihu (*prp45(1-169)*).

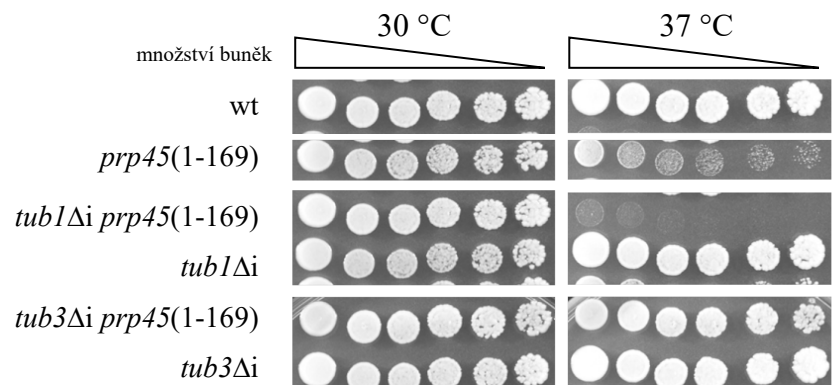
### Druhý projekt

- **Stanovit mobilitu nukleozomů v oblastech genu *TUB3* v závislosti na přítomnosti intronu a na defektu sestřihu (*prp45(1-169)*).**
  - a. Připravit kmeny s delecí genu *BARI* pro déle travící blok buněčného cyklu v G1 fázi pomocí  $\alpha$ -faktoru.
  - b. Zavést do těchto kmenů systém expresních vektorů pro  $\beta$ -estradiolem indukovanou expresi histonu H3 značeného epitopem myc a ověřit funkčnost tohoto systému.
  - c. Testovat změnu míry inkorporace histonu myc-H3 do nukleozomů nacházejících se v sekvenci transkribované oblasti genu *TUB3* v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti intronu a defektního sestřihu (*prp45(1-169)*).

## 5. Výsledky

### První projekt

Tato diplomová práce navazuje na předchozí výsledky *Jany Konířové* (Konířová 2010, Diplomová práce), která mj. testovala citlivost kmenů *prp45(1-169) tub1Δi* a *prp45(1-169) tub3Δi* ke zvýšené kultivační teplotě (37 °C; Obr. 17). Výsledky SPOT testu naznačují, že delece intronu z paralogních genů *TUB1* a *TUB3* má na termosenzitivitu sestříhové mutanty *prp45(1-169)* různý a navzájem opačný efekt. Zatímco delece intronu v *TUB1* citlivost mutanty *prp45(1-169)* ke zvýšené teplotě ještě zvýšila, delece intronu v méně dynamickém *TUB3* tento růstový defekt suprimovala. Vzhledem k protichůdnému efektu delece těchto intronů byla vznesena otázka, zda mezi paralogními geny pro tubulin  $\alpha$  neprobíhá intergenová regulace genové exprese skrze intron. Její práce se však potýkala s řadou technických problémů. Testované kmeny měly rozdílné genetické pozadí: JPY12F8 *ade-*, *HIS+* nebo JPY11D4 *ADE+*, *his-*. Různé genetické pozadí by mohlo vnést do experimentu falešně pozitivní/negativní výsledky (Grünenfelder a Winzeler, 2002; Winzeler *et al.*, 2003), a tak je potřeba pro zajištění lepší porovnatelnosti sledovaných fenotypů tyto výsledky validovat v kmenech s identickým genetickým pozadím.



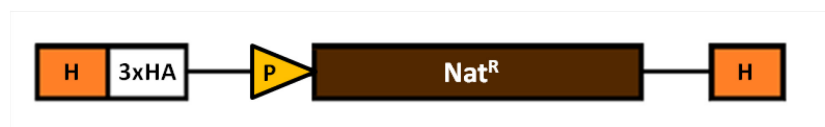
Obr. 17: **Citlivost kmenů ke zvýšené teplotě 37 °C.** V levé části panelu je znázorněn zkrácený genotyp testovaných kmenů. Červeně jsou označeny kmeny s genetickým pozadím *JPY12F8 ade-*, *HIS+*. Zeleně jsou označeny kmeny s genetickým pozadím *JPY11D4 ADE+*, *his-*. Kvasinky byly na plotny naneseny v koncentrační řadě s ředícím faktorem 5 (Konířová 2010, Diplomová práce).

## 5.1 Příprava kmenů s delecí intronu v paralogním genu *TUB1* nebo *TUB3* v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* s identickým genetickým pozadím

Od kolegyně *Michaely Markové* jsem získala kmeny MMY (přehled použitých kvasinkových kmenů), které nesou delecí intronu z paralogního genu *TUB1*, *TUB3* nebo z obou genů s identickým genetickým pozadím (JPY10H7 *ADE+*, *his-*). V těchto kmenech byla mechanismem homologní rekombinace vytvořena N-koncově zkrácená varianta genu *PRP45*.

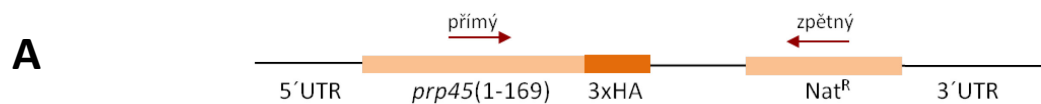
### 5.1.2 Zavedení zkrácené verze genu *prp45(1-169)* pomocí homologní rekombinace

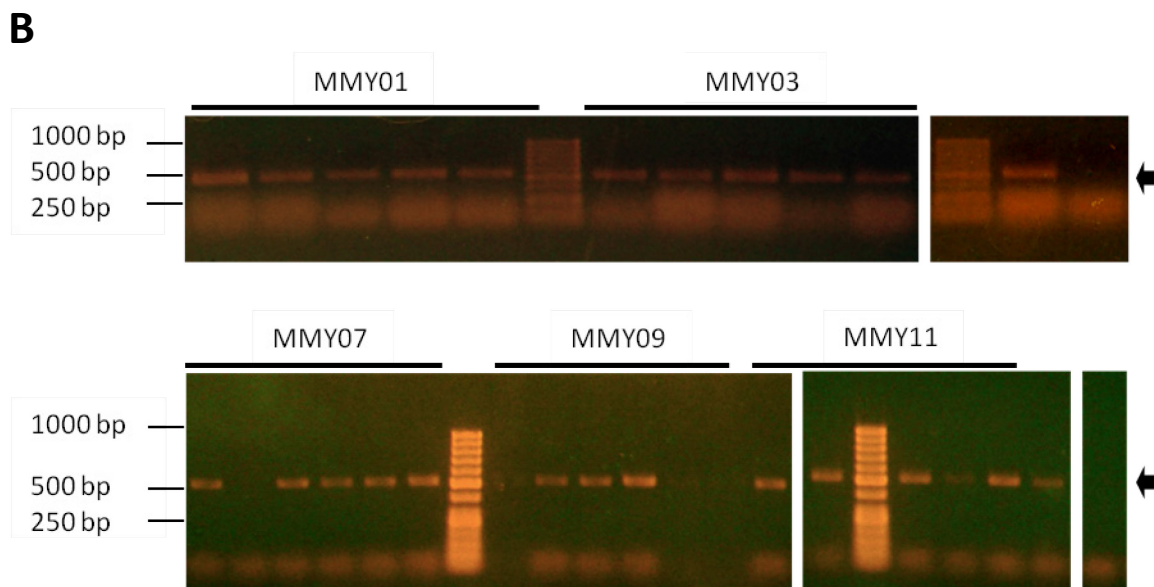
Z plazmidu p30412, který byl restrikcí štěpením ověřen a linearizován, byla pomocí PCR s použitím primerů KM09 a KM10 amplifikována integrační kazeta. Tato kazeta nese homologní úseky k zvolené oblasti genu *PRP45*, tři hemaglutininové značky (3x HA-tag) a gen pro rezistenci k selekčnímu antibiotiku nourseothricinu ( $\text{Nat}^R$ ; obr. 18). Kazeta byla integrována do genomu recipientních kmenů MMY01, MMY03, MMY07, MMY09 a MMY11, čímž došlo k vytvoření N-koncově zkrácené varianty proteinu Prp45(1-169)-3xHA. Úspěšně transformované kvasinky byly následně selektovány na médiu s nourseothricinem.



Obr. 18: Schematické znázornění integrační kazety. H – homologní úseky k lokusu genu *PRP45*, 3xHA – 3x sekvence kódující HA tag, P – promotor,  $\text{Nat}^R$  – gen rezistence k nourseothricinu.

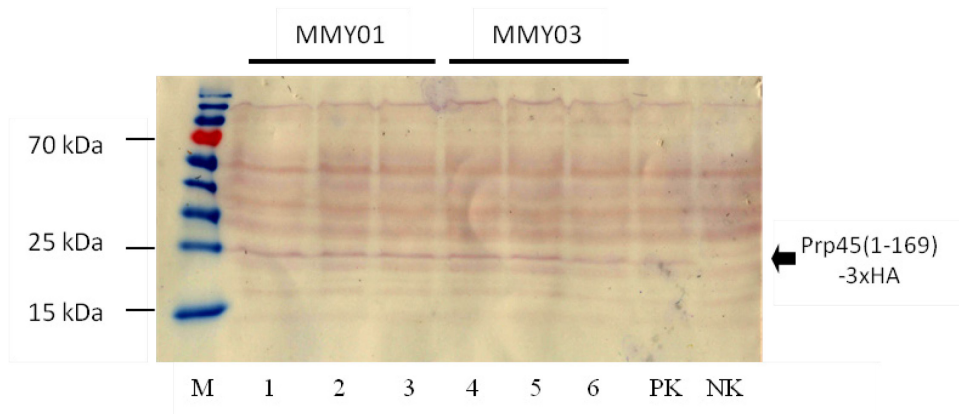
Integrace kazety do správného místa genomu byla u kolonií *S. cerevisiae*, které vyrostly na médiu s nourseothricinem, ověřena pomocí PCR. Pro tuto PCR byla použita genomická DNA z vybraných kolonií a dva primery, z nichž jeden (AV18) nasedá do N-koncové části genu *PRP45* a druhý (AV17) nasedá do oblasti genu rezistence k nourseothricinu (Obr. 19A). Očekávaná velikost produktu PCR, pokud byla integrace delecí kazety do genu *PRP45* úspěšná, činí 510 nt (Obr. 19B).

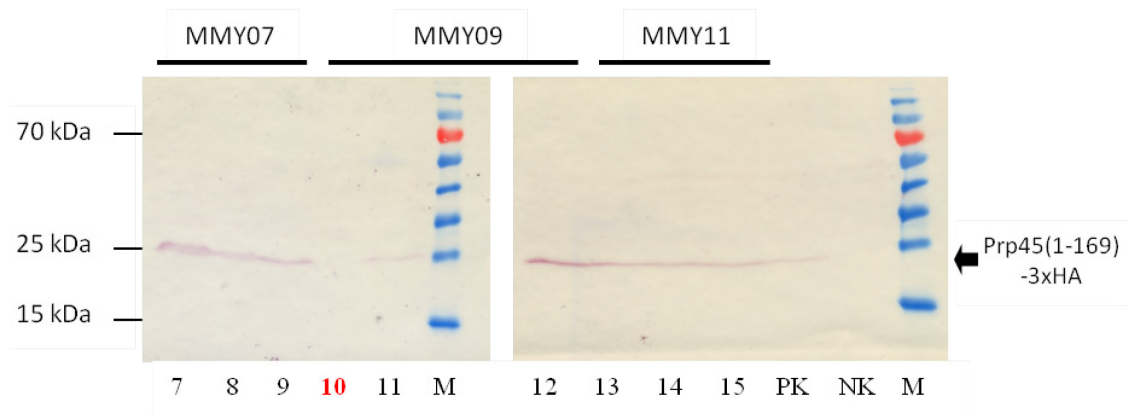




Obr. 19: (A) Schematické znázornění hybridizace primerů s *prp45(1-169)*. (B) Výsledek ověření přítomnosti mutace *prp45(1-169)* pomocí PCR. M – marker, PK – pozitivní kontrola (AVY17), NK – negativní kontrola (BY4741). Šipka značí pozici ampliconu o očekávané velikosti 510 nt. Označení nad gelem udává název původního kmene, který byl transformován integrační kazetou. Pro další ověření byly použity vždy první tři pozitivní kolonie od každého kmene.

Schopnost exprimovat zkrácený protein Prp45(1-169)-3xHA (dále jen Prp45(1-169)) o molekulové hmotnosti 25,8 kDa byla u vytvořených kmenů ověřena pomocí metody western blot. Pro zajištění validity výsledků byla současně zpracována také pozitivní a negativní kontrola, tedy zavedený kmen exprimující *prp45(1-169)* a kmen s divokou alelou *PRP45*. Přítomnost proteinu Prp45(1-169) byla detekována primární protilátkou rozpoznávající HA epitop a následnou aplikací konjugátu sekundární protilátky s alkalickou fosfatázou (Obr. 20). Vzhled membrán se liší kvůli změnám podmínek přenosu a blotování. V lyzátech nově vytvořených kmenů byl imunodetekován protein předpokládané velikosti, který byl přítomen i v použité pozitivní kontrole, nikoli však v kontrole negativní (Obr. 20).





Obr. 20: **Ověření exprese mutantního proteinu Prp45(1-169) metodou western blot.** M – marker, PK – pozitivní kontrola (AVY17), NK – negativní kontrola (BY4741), 1-15 – testované kolonie. **10** – kolonie neexprimuje Prp45(1-169). Šipka značí protein o očekávané velikosti 25,8 kDa. Označení nad gelem udává název původního kmenu, který byl transformován integrační kazetou.

Inzerci kazety byly získány kmeny s mutací *prp45(1-169)*. Označení a genotyp nových kmenů *S. cerevisiae* je následující:

**ZuCY01** MATa *prp45(1-169)-3HA::NatMX6 ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

**ZuCY03** MATa *prp45(1-169)-3HA::NatMX6, tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

**ZuCY07** MATalfa *prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

**ZuCY09** MATalfa *prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub1Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

**ZuCY11** MATalfa *prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub1Δi tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

## 5.2 Nově připravené kmeny jsou různě citlivé ke zvýšené kultivační teplotě 37 °C a k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu

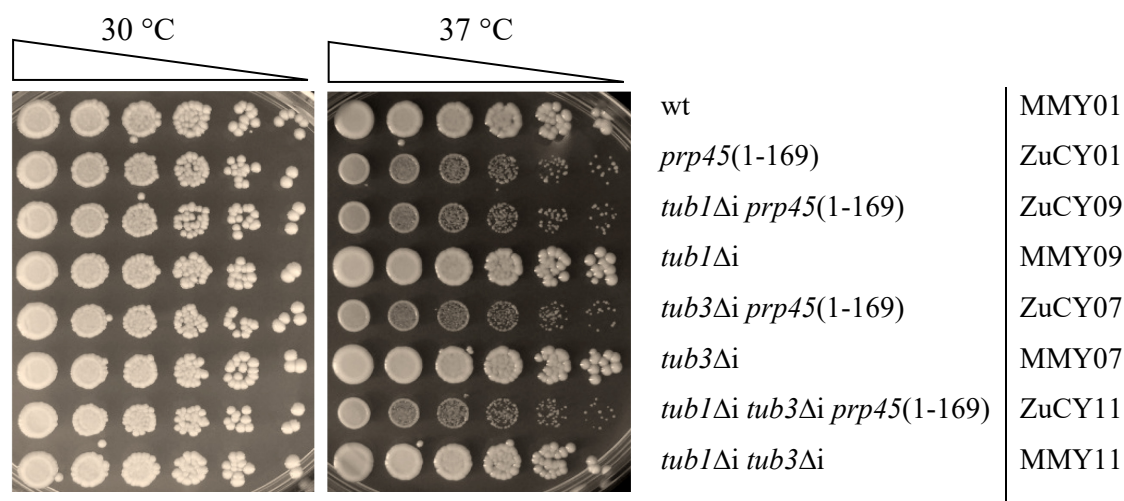
Fenotyp kmenů, které exprimují zkrácenou verzi proteinu Prp45(1-169), byl již v naší laboratoři popsán dříve. Kvasinky s touto mutací jsou mj. citlivé ke zvýšené teplotě a k cytoskeletárním inhibitorům nocodazol, carbendazim a benomyl.

SPOT test je jednoduchou metodou pro snadné porovnání růstových schopností kvasinkových kmenů pod vlivem různých stresorů. Použitím tohoto testu bylo provedeno srovnání růstu původních kmenů MMY, které nesou pouze delecii intronu v *TUB1* nebo *TUB3* s nově připravenými kmeny ZuCY, které navíc vykazují aberantní sestřih (mutanta *prp45(1-169)*).



### 5.2.1 Citlivost buněk ke zvýšené kultivační teplotě

Na YPAD plotnu byly naneseny kapky ředěné kultury ve střední exponenciální fázi růstu a kultivovány 3 dny v příslušných teplotách (30 °C a 37 °C). V porovnání s kvasinkou divokého typu vykazuje mutant *prp45(1-169)*, podle očekávání, při zvýšené kultivační teplotě aberantní růst. Růst kmenů s delecí intronu v genech *TUB1* a *TUB3* naopak žádný viditelný fenotyp nevykazuje. Delecí těchto intronů v kvasinkách exprimujících zkrácený protein Prp45(1-169) nedošlo k dříve pozorovanému zlepšení jejich růstu. Termosenzitivita mutantů *prp45(1-169)* tedy na přítomnosti intronu v genech *TUB1* a *TUB3* není závislá a dříve pozorované změny byly pravděpodobně způsobeny rozdílným genetickým pozadím (Obr. 21).

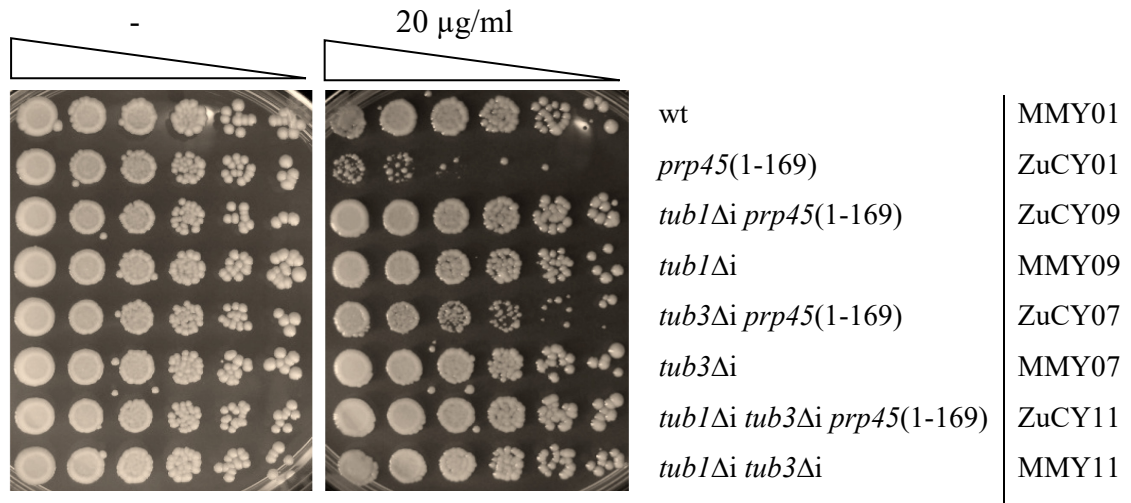


Obr. 21: **Citlivost kmenů ke zvýšené teplotě.** První kapka zleva odpovídá 5 µl buněčné suspenze o OD ~ 1,2 a každá další je pětkrát zředěna oproti předchozí. Plotny byly kultivovány tři dny v uvedených teplotách 30 °C a 37 °C, přičemž 30 °C je ideální kultivační teplota, která pro kvasinku *S. cerevisiae* nepředstavuje stresové podmínky. Pro ověření validity výsledků byl experiment třikrát zopakován (uveden reprezentativní výsledek).

### 5.2.2 Citlivost buněk k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu

Dále jsme ověřovali, zda delece intronu z genů pro tubulin  $\alpha$  (*TUB1* a *TUB3*) ovlivňuje senzitivitu mutantů *prp45(1-169)* k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu. Kmeny byly naneseny na YPAD médium s benomylem (20 µg/ml) nebo s DMSO (rozpuštědo benomylu; negativní kontrola) a kultivovány tři dny ve 30 °C. Získané výsledky potvrzují dříve pozorovanou senzitivitu mutantních kmenů *prp45(1-169)* k tomuto inhibitoru. Samotné odstranění intronů z *TUB1* a *TUB3* nemá na růst

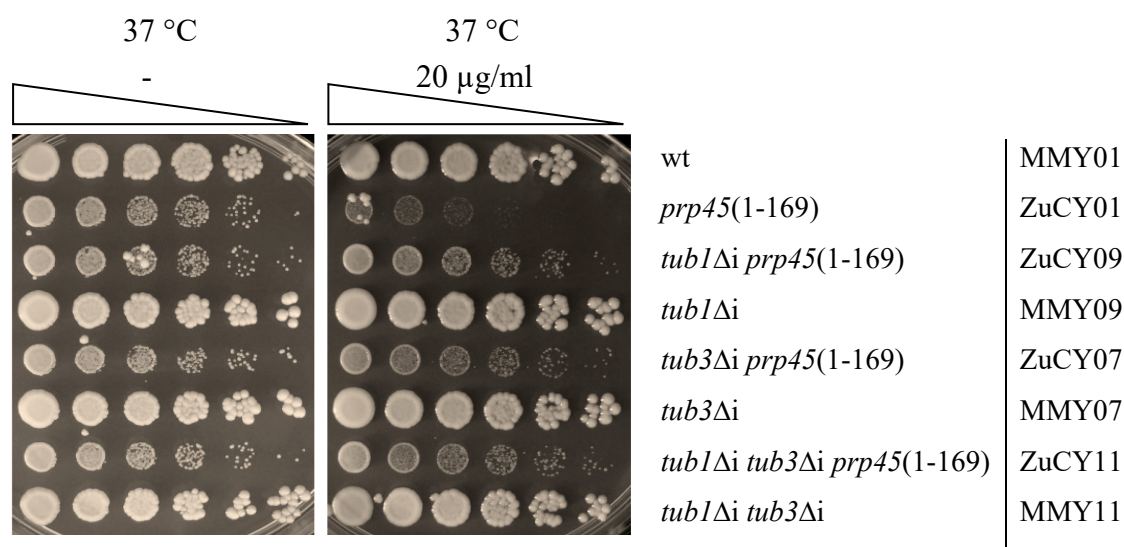
*S. cerevisiae* vliv. Ukázalo se však, že citlivost buněk *prp45(1-169)* k benomylu je částečně potlačena delecí intronu z *TUB3*. Delece intronu z *TUB1* a rovněž i z obou genů pro tubulin  $\alpha$  současně navrácí růst *prp45(1-169)* na médiu s benomylem zcela do normálu (Obr. 22).



Obr. 22: Citlivost kmenů k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu. První kapka zleva odpovídá 5 µl buněčné suspenze o OD ~ 1,2 a každá další je pětikrát zředěna oproti předchozí. Plotny s rozdílnou koncentrací benomylu (0 a 20 µg/ml) byly kultivovány tři dny při 30 °C. Pro ověření validity výsledků byl experiment třikrát zopakován (uveden reprezentativní výsledek).

### 5.2.3 Citlivost buněk ke zvýšené kultivační teplotě a současně k benomylu

Za pomoci SPOT testu byl následně zkoumán také efekt na schopnost růstu při aplikaci obou stresorů současně (zvýšená teplota a benomyl). Testované kmeny byly nakapány na YPAD médium s benomylem (20 µg/ml) a kultivovány tři dny při teplotě 37 °C. Kvasinky *PRP45* wt s delecí intronu v genech *TUB1* a *TUB3* nevykazují žádný viditelný fenotyp ani v přítomnosti obou stresorů současně. V případě buněk *prp45(1-169)* však můžeme vidět kumulativní efekt vlivu obou těchto stresorů. Ten se projevuje prohloubením růstového defektu oproti situaci pouze s jedním nebo druhým stresorem. Delece intronu z minoritního *TUB3*, majoritního *TUB1*, ale i z obou genů pro tubulin  $\alpha$  růst buněk *prp45(1-169)* nepatrně vylepšuje (Obr. 23).



Obr. 23: Citlivost kmenů ke zvýšené teplotě a mikrotubulárnímu inhibitoru benomyly. První kapka zleva odpovídá 5 µl buněčné suspenze o OD ~ 1,2 a každá další je pětkrát zředěna oproti předchozí. Plotny s rozdílnou koncentrací benomyly (0 a 20 µg/ml) byly kultivovány tři dny při 37 °C. Pro lepší porovnání růstových fenotypů testovaných kmenů byly kvasinky na plotně vlevo vystaveny pouze zvýšené kultivační teplotě (37 °C). Experiment byl třikrát zopakován, uveden reprezentativní výsledek.

### 5.3 Introne m zprostředkovaná intergenová regulace genové exprese mezi paralogními geny *TUB1* a *TUB3*

Dříve pozorovaný protichůdný efekt delece intronů z *TUB1* a *TUB3* na termosenzitivitu mutanty *prp45(1-169)* na základě mnou sledovaných růstových fenotypů nebyl potvrzen (Obr. 21). Dříve pozorované změny byly pravděpodobně způsobeny rozdílným genetickým pozadím testovaných kmenů.

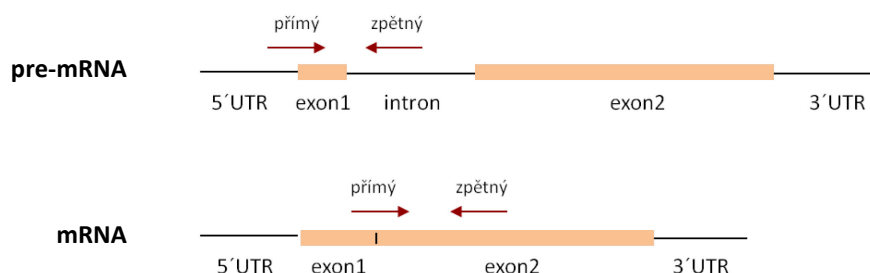
Intergenovou regulaci genové exprese mezi těmito paralogními geny přesto vyloučit nemůžeme. Zda delece intronu z *TUB1* ovlivňuje expresi *TUB3* a naopak, bylo testováno pomocí expresní analýzy RT-qPCR v kmenech *tub1Δi* a *tub3Δi*. K ověření, zda se sestřih podílí na této potenciální na intronu závislé intergenové regulaci exprese, byly hladiny primárního a sestřiženého transkriptu kvantifikovány v kmenech s mutantním sestřihovým faktorem *prp45(1-169)*.

#### 5.3.1 Ověření primerů pro RT-qPCR

Z databáze primerů používaných v naší laboratoři bylo vybráno několik vhodných kandidátů pro detekci mRNA a pre-mRNA *TUB1* a *TUB3* (Tab. 2; obr. 24).

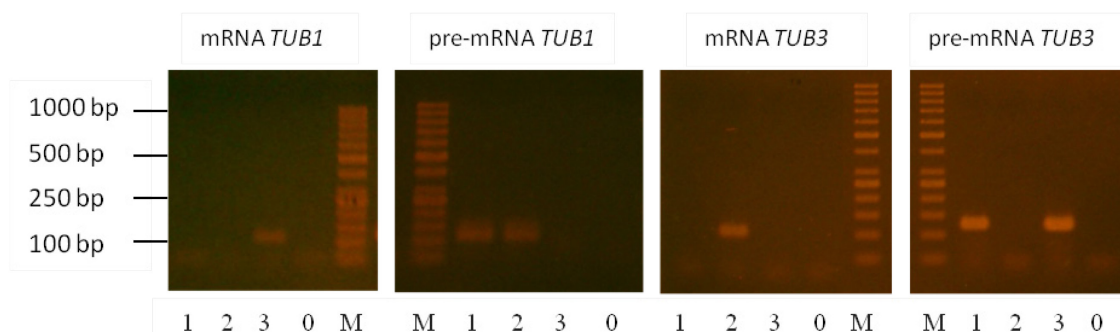
Detekovaná RNA	přímý primer	zpětný primer	délka ampliconu
<i>TUB1</i> mRNA	MH156	OG116	109 nt
<i>TUB1</i> pre-mRNA	OG139	OG140	116 nt
<i>TUB3</i> mRNA	KA34	OG105	106 nt
<i>TUB3</i> pre-mRNA	OG135	OG136	123 nt

Tab. 2: Vybrané primery pro qPCR, které hybridizují s mRNA a pre-mRNA *TUB1* a *TUB3*.



Obr. 24: Schematické znázornění hybridizace primerů pro qPCR s pre-mRNA a mRNA *TUB1* nebo *TUB3*. Primery pro detekci pre-mRNA *TUB1* a *TUB3* byly navrženy tak, že jeden z nich nasedá do oblasti přechodu 5'UTR (*untranslated region*) a exonu1 a druhý do oblasti intronu před místo větvení (BS). Tento pár primerů tak detekuje pouze nesestříženou pre-mRNA a nikoli meziproducty sestřihu jako je lariát-exon2 nebo volná lariátová struktura.

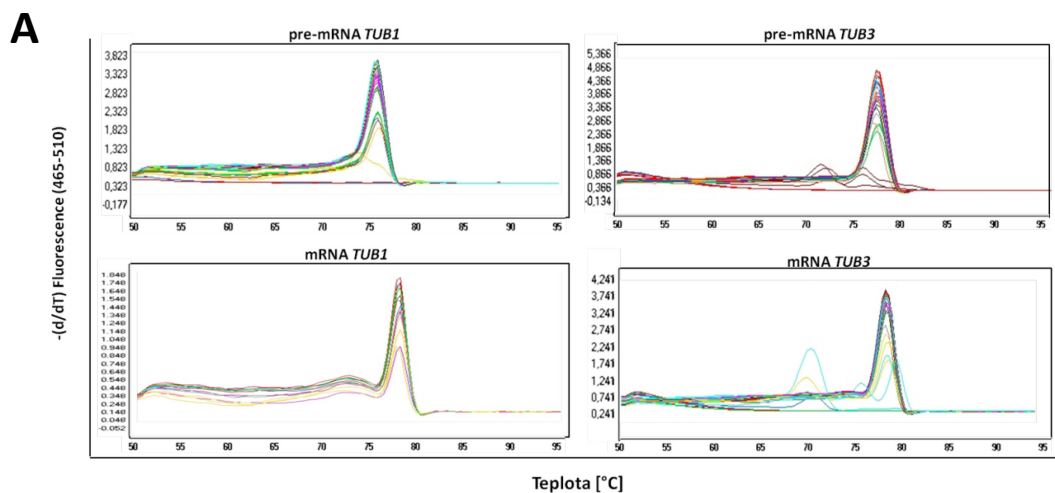
Zvolené primery nebyly doposud pro qPCR používány, proto bylo nutné ověřit, zda mají k dané oblasti dostatečnou specifitu, a zda jsou funkční za podmínek qPCR. Nejprve bylo provedeno ověření pomocí klasické PCR. Amplifikací genomické DNA z MMY01 (wt), MMY07 (*tub3Δi*) nebo MMY09 (*tub1Δi*) vznikly pro každý pár primerů pouze specifické produkty o očekávané velikosti, jejichž hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2 (Obr. 25).

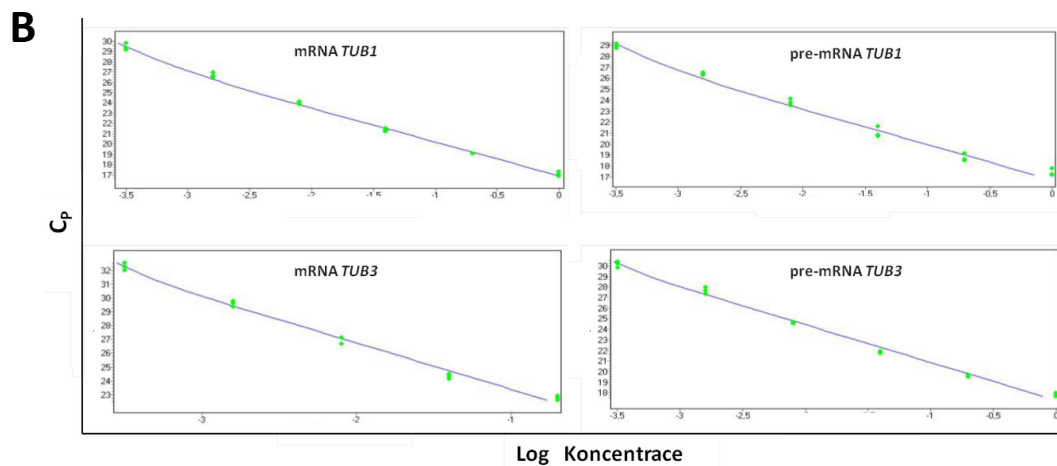


Obr. 25: Ověření specifity primerů pomocí PCR. 1 - MMY01 (wt), 2 - MMY07 (*tub3Δi*), 3 - MMY09 (*tub1Δi*), 0 – beztemplátová kontrola, M – marker. Označení nad gelem uvádí sekvenci RNA, se kterou by měl daný pár primerů hybridizovat.

Primery byly ověřeny také v podmínkách samotné qPCR reakce. Během qPCR dochází k měření fluorescence interkalační barvy MESA Green, která se váže do jakékoli dvouřetězcové DNA (*dsDNA*). Analýza táním je metoda, která dokáže odhalit počet amplifikačních produktů (*dsDNA*) v qPCR vzorku. Vzorek je postupně zahříván, čímž dochází k denaturaci *dsDNA* a tato denaturace je spojena s poklesem fluorescenčního signálu. Výsledná křivka je výnosem derivace měřené intenzity fluorescenčního signálu proti teplotě. Každý produkt s odlišnou délkou a nukleotidovým složením má jinou teplotu, při níž denaturuje, což se projeví větším počtem vrcholů výsledné křivky. Při ověřování primerů pro pre-mRNA a mRNA *TUB1* detekujeme jediný vrchol křivky analýzy táním, což znamená, že primery amplifikují jenom jeden produkt. V případě pre-mRNA a mRNA *TUB3* jsme však nezískali pouze jeden ostrý vrchol (Obr. 26A). Odchýlené křivky byly získány měřením nejkonzentrovanejšího standardu (50 ng), přičemž takto vysoké koncentrace templátové DNA v reálném experimentu nikdy není dosaženo, proto jsme od této drobné odchylky odhlédli.

Účinnost amplifikace qPCR s danými páry primerů byla stanovena pomocí standardní křivky. Naměřené hodnoty  $C_P$  ředící řady standardů byly vyneseny proti jejich známé koncentraci a efektivita každého primeru byla vypočítána z parametrů získané standardní křivky. Jako templát byla použita směs cDNA připravená z kmenů MMY07 (*tub3Δi*) a MMY09 (*tub1Δi*). Jednotlivé standardy byly ředěné vždy pětkrát proti předchozímu standardu, tento rozdíl odpovídá přibližně 2,3 cyklu ( $C_P$ ). 100% efektivita, kdy je množství DNA po každém cyklu zdvojeno, odpovídá směrnici standardní křivky -3,33. Získané hodnoty směrnice se pohybovaly v rozmezí mezi -3,9 až -3,0 (efektivita 80 – 110 %; obr. 26B), což potvrzuje, že ověřené primery jsou plně funkční a spolehlivé.





Ob. 25: Ověření primerů pro RT-qPCR analýzu hladin mRNA a pre-mRNA *TUB1* a *TUB3*. Křivky byly sestaveny přístrojem LightCycler® 480 II, Roche Applied Science. (A) Analýza táním. (B) Standardní křivka. Konkrétní naměřené hodnoty jsou u primerů pro detekci: mRNA *TUB1* -3,362, pre-mRNA *TUB1* - 3,292, mRNA *TUB3* -3,227, pre-mRNA *TUB3* - 3,578 (páry primerů se směnicemi v rozmezí -3,9 až -3,0 jsou dle manuálu od Sigma-Aldrich® považovány za spolehlivé).

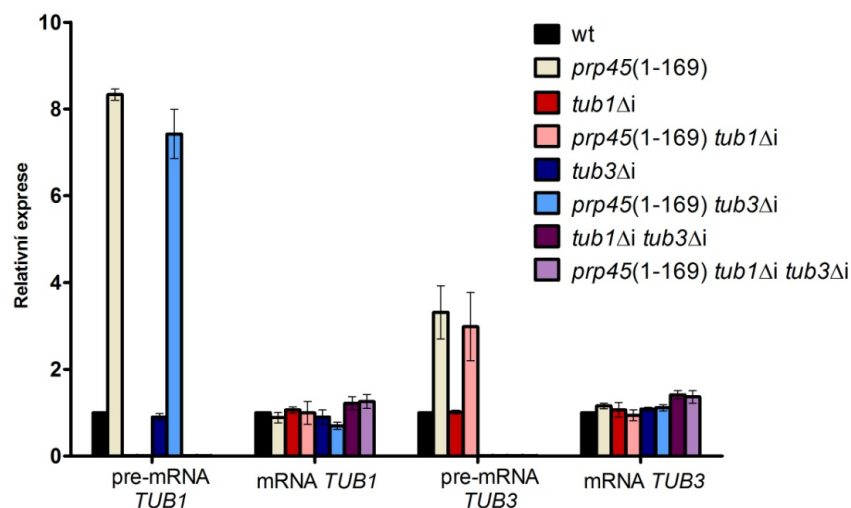
### 5.3.2 Testování změn v poměrech hladin mRNA a pre-mRNA genů *TUB1* a *TUB3*

Míra exprese *TUB1* a *TUB3* v závislosti na deleci intronu a aberantním sestřihu byla měřena pomocí RT-qPCR v kmenech:

- MMY01 wt
- MMY07 *tub3*Δi
- MMY09 *tub1*Δi
- MMY11 *tub1*Δi *tub3*Δi
- ZuCY01 *prp45*(1-169)
- ZuCY07 *prp45*(1-169) *tub3*Δi
- ZuCY09 *prp45*(1-169) *tub1*Δi
- ZuCY11 *prp45*(1-169) *tub1*Δi *tub3*Δi

Z buněčné kultury *S. cerevisiae* ve střední exponenciální fázi růstu byla izolována celková RNA, která byla pomocí náhodných hexanukleotidů a reverzní transkriptázy přepsána do cDNA. Vzorky byly měřeny v technických triplikátech a samotný experiment byl třikrát nezávisle zopakován s různými klony stejného kmene. Naměřené hodnoty  $C_t$  byly normalizovány na hodnoty naměřené pro gen *TOM22* (*housekeeping gene*), jehož míra exprese by se v kmenech s mutací *prp45*(1-169) a s delecí intronů v genech pro tubulin  $\alpha$  neměla měnit. Normalizované hodnoty pro každý pár primerů byly vztaženy k hodnotám získaným v kvasinkách divokého typu.

Hladina mRNA *TUB1* a *TUB3* se po deleci intronu a ani v mutantech *prp45(1-169)* výrazně nemění. V mutantech *prp45(1-169)* podle očekávání stoupá hladina pre-mRNA genů pro tubulin  $\alpha$ , a to zejména u majoritního genu *TUB1* (Obr. 27). Vzhledem k tomu, že delece intronu z *TUB1* nemění hladinu mRNA *TUB3* a naopak, můžeme vyloučit intergenovou regulaci genové exprese závislou na intronu.

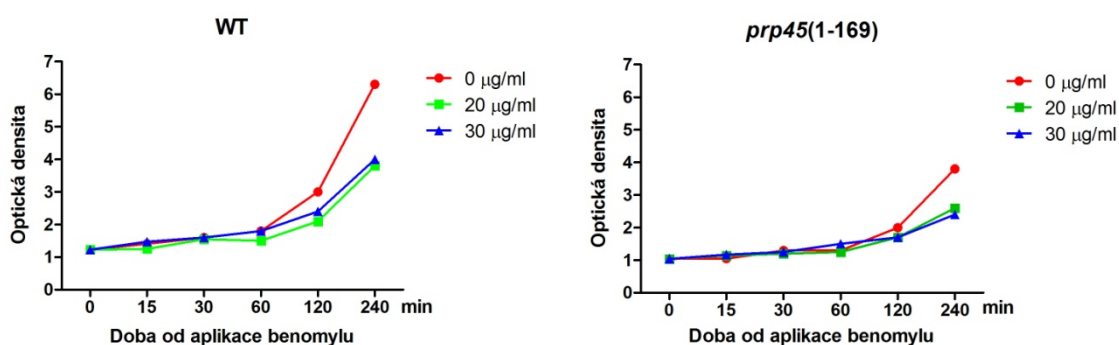


Obr. 27: Graf relativní exprese paralogních genů *TUB1* a *TUB3* v závislosti na rozdílném genotypu. Jednotlivé barvy znázorňují konkrétní kmeny, u nichž byla měřena hladina mRNA a pre-mRNA *TUB1* nebo *TUB3*. Jednotlivé hodnoty byly normalizovány na hodnoty pro *TOM22*. Normalizované hodnoty byly vztaženy k hodnotám wt, které byly položeny rovny jedné. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku mezi třemi nezávislými biologickými pokusy.

#### 5.4 Expese *TUB1* ani *TUB3* se u kmenů *prp45(1-169)* v přítomnosti benomyly nemění

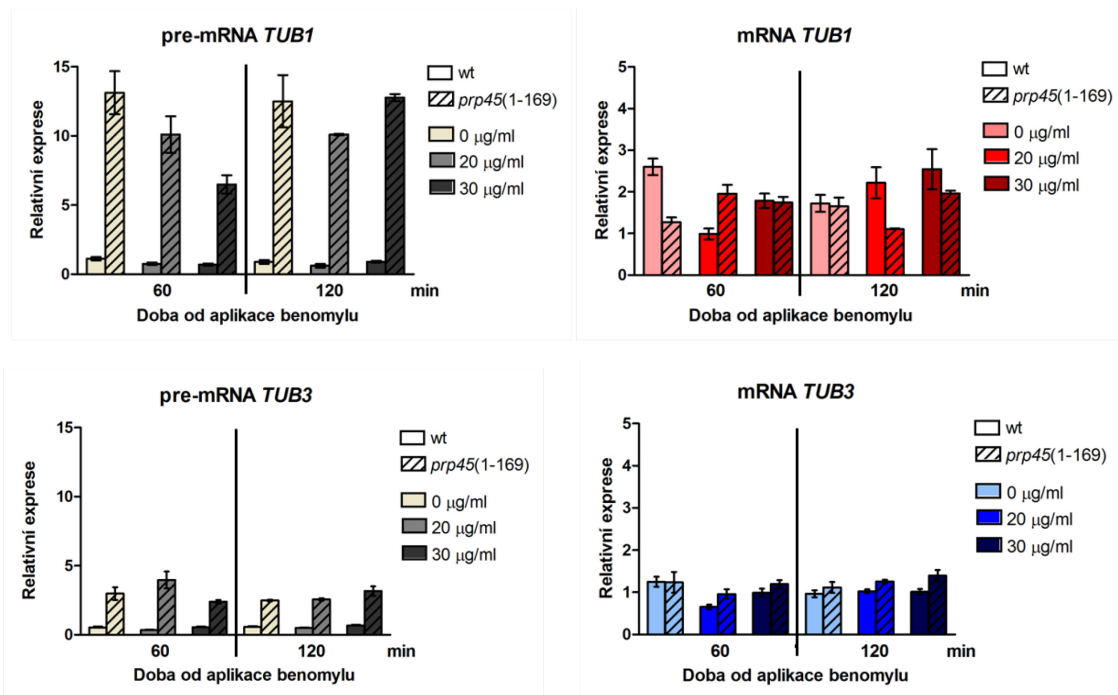
Na základě předchozích výsledků SPOT testů víme, že delece intronu z genu *TUB1* nebo *TUB3* ovlivňuje senzitivitu *prp45(1-169)* k benomyly. Delece intronu z minoritního genu pro tubulin  $\alpha$  *TUB3* senzitivitu k benomyly snižuje pouze částečně, zatímco delece intronu z majoritního genu *TUB1* ji zcela suprimuje (Obr. 22). Obecně platí, že mikrotubuly, které obsahují protein Tub1 jako jediný izotyp tubulinu  $\alpha$ , jsou více dynamické a méně stabilní než v případě proteinu Tub3. Naskýtá se tedy otázka, zda kvasinka *S. cerevisiae* v reakci na přítomnost benomyly, který ovlivňuje polymeraci mikrotubulů, nemění produkci izotypů tubulinu  $\alpha$ , čímž by mohla reparovat jejich narušenou dynamiku. Přítomnost mutanty *prp45(1-169)*, která způsobuje defekty v sestřihu, by pak mohla tento hypotetický mechanismus ovlivnit, což by vysvětlovalo její zvýšenou citlivost k benomyly.

Kmeny MMY01 (wt) a ZuCY01 (*prp45(1-169)*) byly kultivovány v YPAD médiu do dosažení střední exponenciální fáze růstu. Poté byla kultura rozdělena a dále kultivována v YPAD médiu s benomylen o různé koncentraci – 0, 20 a 30  $\mu\text{g/ml}$ . Během kultivace byly odebírány vzorky buněčné suspenze pro porovnání růstu testovaných kmenů měřením jejich optické denzity (OD). Kvasinky *prp45(1-169)* rostou pomaleji než kvasinky divokého typu, což koreluje s jejich mírně prodlouženou generační dobou a známou citlivostí k benomylu (Obr. 28). Současně byly odebírány také vzorky pro analýzu exprese (RT-qPCR) *TUB1* a *TUB3* v různých časech od přidání benomylu (30, 60, 120 a 240 min). Vzorky pro RT-qPCR byly zpracovány a analyzovány jako v předchozím experimentu (Kapitola 5.3.2). Z výsledků na obrázku 29 je patrné, že v buňkách wt a *prp45(1-169)* po kultivaci s benomylen nedochází ke změně exprese genů *TUB1* a *TUB3*. Hladina mRNA *TUB1* a *TUB3* je téměř neměnná ve všech vzorcích. Dle očekávání dochází k nabohacení pre-mRNA *TUB1* a *TUB3* v kmenech s mutací *prp45(1-169)*. Tento efekt je výraznější v případě pre-mRNA majoritního genu pro tubulin  $\alpha$  *TUB1* (Obr. 29). Hladina pre-mRNA *TUB1* a *TUB3* sice částečně fluktuuje, nicméně stále odpovídá pozorování z předchozího pokusu (Obr. 27). Námi formulovaná hypotéza se nepotvrdila a kvasinka *S. cerevisiae* v reakci na použitý stresor nemění poměr Tub1 a Tub3 změnou míry jejich exprese. Potlačení citlivosti *prp45(1-169)* k benomylu po delecii intronů z *TUB1* a *TUB3* bude probíhat pravděpodobně jiným mechanismem.



Obr. 28: Růstové křivky testovaných kmenů v přítomnosti vzrůstající koncentrace benomylu v YPAD médiu. WT – MMY01, *prp45(1-169)* – ZuCY01. Růstová křivka je vynesena hodnota OD v čase. Jednotlivé barvy znázorňují rozdílnou koncentraci benomylu (0, 20 a 30  $\mu\text{g/ml}$ ).





Obr. 29: Relativní exprese *TUB1* a *TUB3* u kvasinek divokého typu a s mutací *prp45(1-169)* po 60 a 120 minutách od aplikace benomyly. wt – MMY01, *prp45(1-169)* – ZuCY01. Jednotlivé relativní exprese byly normalizovány na relativní exprese pro *TOM22* a vztaheny k hodnotám wt (vzorek odebrán před přidáním benomyly – čas 0, 0 µg/ml benomyly). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku mezi třemi technickými opakováními. Experiment byl proveden pouze jednou.

## Druhý projekt

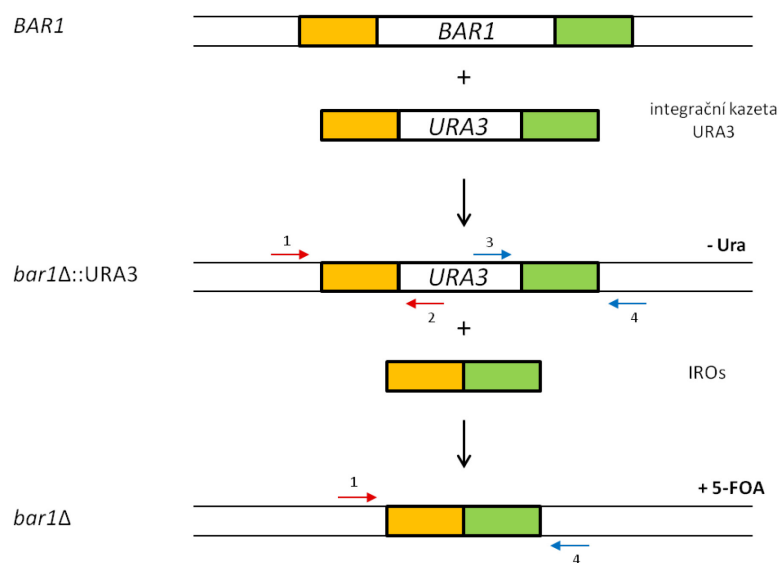
### 5.5 Stanovení mobility nukleozomů v oblastech genu *TUB3* v závislosti na přítomnosti intronu a mutace *prp45(1-169)*

Výsledky získané v naší laboratoři naznačují, že by protein Prp45 mohl regulovat vyvazování komponent spliceozomu prostřednictvím změn ve stavu chromatinu (Kapitola 2.8.2). Nepublikovaná data získaná metodou ChIP z naší laboratoře ukazují, že v genech *ECM33* a *ACT1* u kvasinkových buněk *prp45(1-169)* dochází k poklesu ChIP signálu histonu H3 a H4 v porovnání s kvasinkami divokého typu. Jedním z možných vysvětlení tohoto fenotypu je pomalejší průběh buněčného cyklu mutanty *prp45(1-169)*. Při jeho zpomalení projde S-fází v čase analýzy menší frakce buněk, takže pokles ChIP signálu histonu H3 a H4 v mutantě *prp45(1-169)* by mohl být pouze artefaktem analýzy heterogenní populace kvasinek. Takového artefaktu by se pak mělo být možno zbavit zastavením testovaných buněk v určité fázi buněčného cyklu.  $\alpha$ -faktor je přirozený kvasinkový feromon, který kvasinky párovacího typu  $\underline{a}$  zastaví v G1 fázi buněčného

cyklu (Throm a Duntze, 1970; Fitcher, 1999). Kvasinky však kódují proteázu Bar1, která štěpí  $\alpha$ -faktor v jejich bezprostředním okolí (Sprague a Herskowitz, 1981; Chan a Otte, 1982). Pro zajištění déle trvajících bloků buněk v G1 fázi je proto nutné, buď neustále do kultury dodávat další  $\alpha$ -faktor a nebo, lépe, tuto proteázu odstranit.

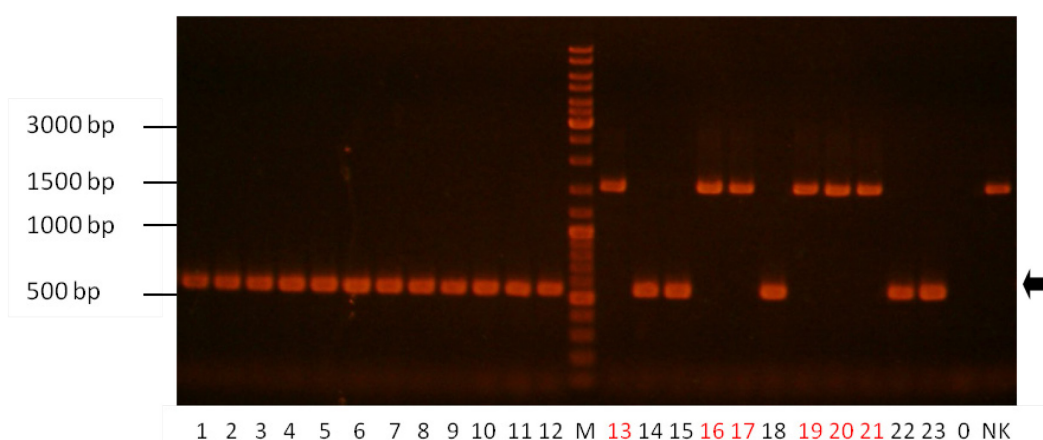
### 5.5.1 Příprava kmenů s delecí *BAR1* pro déle trvajících blok *S. cerevisiae* v G1 fázi buněčného cyklu v přítomnosti $\alpha$ -faktoru

Odstranění genu *BAR1* bylo provedeno prostřednictvím metody *Delitto perfetto* (Obr. 30; Storici *et al.*, 2001; Storici a Resnick, 2006). Z plazmidu pRS316, který byl restrikcí štěpením ověřen a linearizován, byla pomocí PCR s použitím primerů ZuC05 a ZuC06 amplifikována integrační kazeta s genem *URA3* jako markerem. Tato kazeta nese homologní úseky k 5' a 3'UTR genu *BAR1*. Gen *BAR1* byl v kmenech MMY01, ZuCY01, MMY03 a ZuCY03 homologní rekombinací nahrazen genem pro dekarboxylázu Ura3, která kvasinkám (*ura3 $\Delta$ 0*) umožňuje syntézu uracilu. Přítomnost tohoto enzymu tedy umožňuje selekci úspěšných integrantů na SD médiu bez uracilu. Takto připravené kmeny byly následně transformovány IROs (*Integrative Recombinant Oligonucleotides*; dvouřetězcový úsek DNA, který byl připraven hybridizací oligonukleotidů ZuC11 a ZuC12). Navržené IROs je homologní k určité části 5' a 3'UTR původního genu *BAR1*, tak aby prostřednictvím rekombinace mezi homologními oblastmi došlo k odstranění kazety *URA3*. Úspěšní integranti byly získáni selekcí na médiu s 5-FOA (*5-fluoroorotová kyselina*). V přítomnosti 5-FOA produkují buňky s divokou alelou *URA3* toxický fluorouridinmonofosfát a hynou.



Obr. 30: Schematické znázornění delece *BARI* metodou *Delitto perfetto*. Žlutá a zelená pole znázorňují oblasti genu *BARI*, prostřednictvím kterých byla homologní rekombinací inzertována kazeta *URA3* a následně *IROs*. Čísla 1 – 4 značí primery, které byly použity pro ověření jednotlivých kroků delece.

Delece *BARI* byla ověřena pomocí PCR. Pro ověření byly použity primery 1 a 4 (*ZuC09* a *ZuC10*), které nasedají do 5' a 3'UTR původního genu *BARI* a jejichž pozice v genu *BARI* jsou znázorněny na obrázku 30. U většiny testovaných kolonií *S. cerevisiae* byl detekován PCR produkt o velikosti 542 nt, očekávané při deleci genu *BARI*. V šesti případech měl detekovaný PCR produkt velikost 1558 nt, což značí retenci *BARI* (Obr. 31).



Obr. 31: Ověření delece genu *BARI* pomocí PCR. M – marker, 0 – beztemplátová kontrola, NK – negativní kontrola (MMY01), 1-23 – testované kolonie. 13, 16, 17, 19, 20 a 21 – kolonie, u kterých delece *BARI* neproběhla. Šipka značí pozici amplikonu o očekávané velikosti 542 nt. Pro další experiment byly použity vždy tři pozitivní kolonie od každého transformovaného kmene, tedy kolonie 1-3 (původní kmen MMY01), 4-6 (původní kmen *ZuCY01*), 7-9 (původní kmen MMY03) a 10-12 (původní kmen *ZuCY03*).

Odstraněním genu *BARI* v MMY01, *ZuCY01*, MMY03 a *ZuCY03* byly připraveny následující kmeny:

**ZuCY16** MATa *bar1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

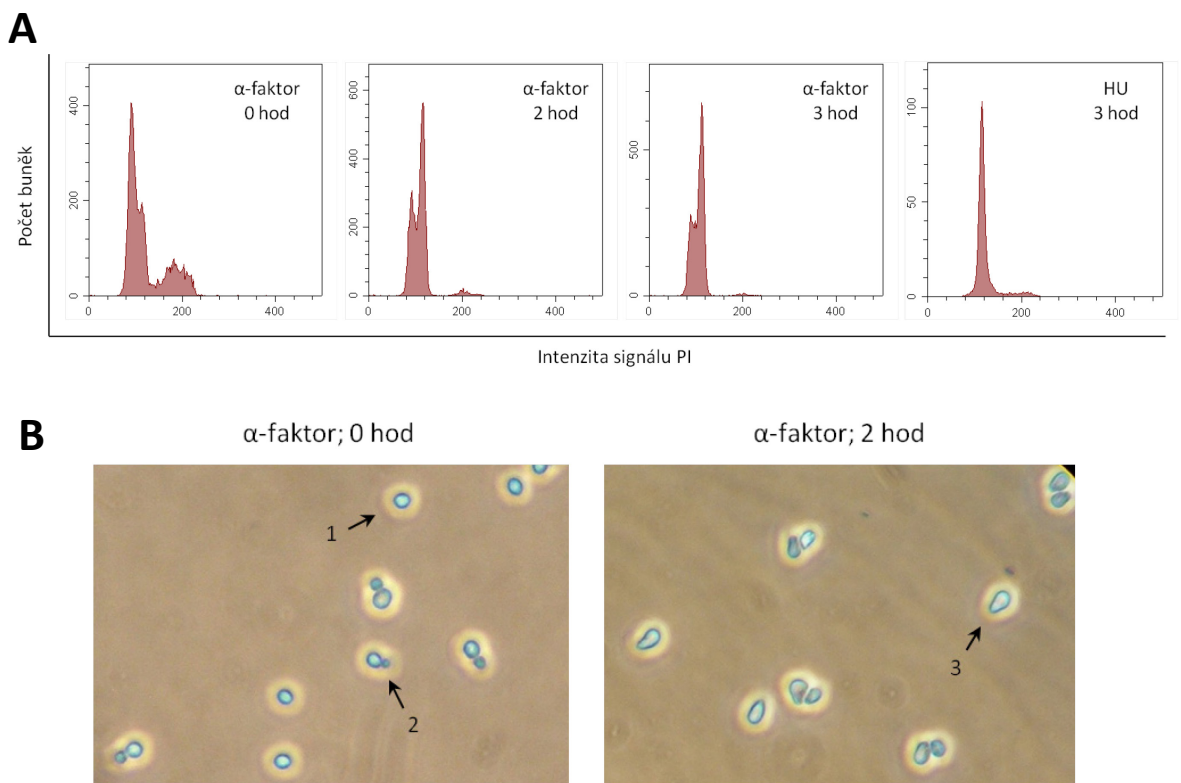
**ZuCY17** MATa *bar1Δ prp45(1-169)-3HA::NatMX6 ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

**ZuCY18** MATa *bar1Δ tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

**ZuCY19** MATa *bar1Δ prp45(1-169)-3HA::NatMX6 tub3Δi ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ200*

Zda u kmenů *bar1Δ* po aplikaci  $\alpha$ -faktoru skutečně dochází k zastavení buněčného cyklu v G1, bylo ověřeno pomocí průtokové cytometrie. Do kultury ve střední exponenciální fázi růstu byl přidán  $\alpha$ -faktor na finální koncentraci 50 nM. Kultura byla

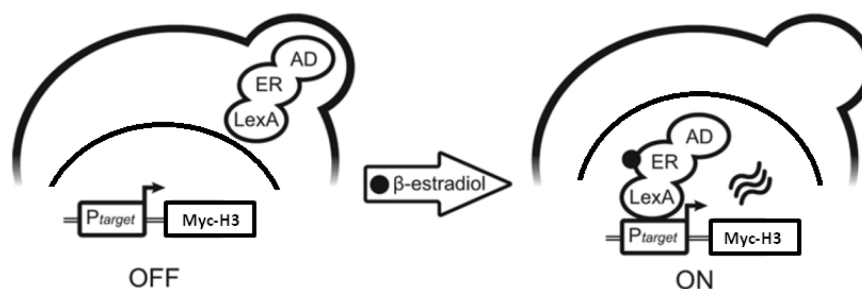
synchronizována po dobu 3 hodin, během které byly odebrány jednotlivé vzorky. DNA byla obarvena fluorescenční barvou propidium iodid (PI). Jako pozitivní kontrola byly použity buňky zastavené na rozhraní G1/S fáze buněčného cyklu hydroxymocovinou (HU; 15 mg/ml). Průtokovou cytometrií byla měřena fluorescence PI, jejíž intenzita odpovídá obsahu DNA v buňce. Před přidáním  $\alpha$ -faktoru jsme pozorovali dvě buněčné populace. První z nich, jejíž obsah DNA je roven 1N, odpovídá buňkám v pre-replikační G1 fázi. Populace vyznačující se dvojnásobným signálem (obsah její DNA je roven 2N) pak reprezentuje buňky, které již replikací prošly. Po 2 hodinách působení  $\alpha$ -faktoru můžeme pozorovat výrazný pokles buněk v S/G2/M fázi buněčného cyklu (stejně jako u pozitivní kontroly HU), což znamená, že synchronizace je funkční (Obr. 32A). V průběhu synchronizace byly odebrány také vzorky pro mikroskopii. Většina sledovaných kvasinek po 2 hodinách od aplikace  $\alpha$ -faktoru tvoří typické shmoo (tvar hrušky), které dokazuje blok buňky v G1 fázi (Obr. 32B; Lipke *et al.*, 1976).



Obr. 32: Kvasinky ZuCY16 (*bar1 $\Delta$* ) vykazují již po dvou hodinách kultivace s  $\alpha$ -faktorem zástavu buněčného cyklu v G1 fázi. (A) Jednparametrový histogram. Intenzita signálu PI – intenzita fluorescence, která koreluje s množstvím DNA.  $\alpha$ -faktor 0 hod, 2 hod, 3 hod – doba od aplikace  $\alpha$ -faktoru do kultury. HU 3 hod – kultura 3 hod od přidání hydroxymocoviny. (B) Mikroskopie buněčné kultury ZuCY16 (*bar1 $\Delta$* ) před a po aplikaci  $\alpha$ -faktoru. Obrázek vlevo – kultura ve střední exponenciální fázi růstu bez  $\alpha$ -faktoru. Obrázek vpravo – kultura po 2 hodinách od aplikace  $\alpha$ -faktoru. 1 – kvasinka *S. cerevisiae*, 2 – pučící kvasinka, 3 – kvasinka s charakteristickým fenotypem shmoo.

### 5.5.2 Zavedení plazmidového systému pro indukci exprese histonu myc-H3

Pro určení, zda protein Prp45 ovlivňuje dynamiku nukleozomů jsme se rozhodli sledovat inkorporaci histonu H3 značeného epitopem myc do nukleozomů genu *TUB3* u buněk zastavených v G1 fázi buněčného cyklu, a to v závislosti na přítomnosti intronu v genu *TUB3* a mutace *prp45(1-169)*. Míra inkorporace ektopicky exprimovaného značeného histonu H3 by měla odrážet dynamiku přestavby nukleozomů mimo S-fázi, ke které dochází zejména během transkripce. Expresní systém LexA-ER-AD (Obr. 33; Ottoz *et al.*, 2014), který jsme se rozhodli použít, umožňuje  $\beta$ -estradiolem indukovat expresi histonu myc-H3. Tento systém pracuje se dvěma plazmidovými vektory. První centromerický plazmid pMH04 dává vzniknout rekombinantnímu transkripčnímu faktoru (TF), který obsahuje vazebnou doménu LexA, vazebné místo pro  $\beta$ -estradiol a aktivační doménu B112. Druhý centromerický plazmid pZuC01 nese ORF pro N-koncově značený histon H3, jehož exprese je řízena vazbou TF skrze doménu LexA do jeho promotoru. Přidáním  $\beta$ -estradiolu do buněčné kultury *S. cerevisiae* dochází k translokaci TF do jádra, kde se váže do promotoru na plazmidu pZuC01, a spouští tak transkripci histonu myc-H3.



Obr. 33: **Znázornění změny exprese genu pro histon myc-H3 po přidání  $\beta$ -estradiolu.** LexA – DNA vazebná doména, ER – receptor pro  $\beta$ -estradiol, AD – aktivační doména B112, P – promotor genu pro myc-H3 (převzato a upraveno dle Ottoz, *et al.*, 2014).

Kotransformací centromerických plazmidů pMH04 a pZuC01 byly připraveny následující kmeny:

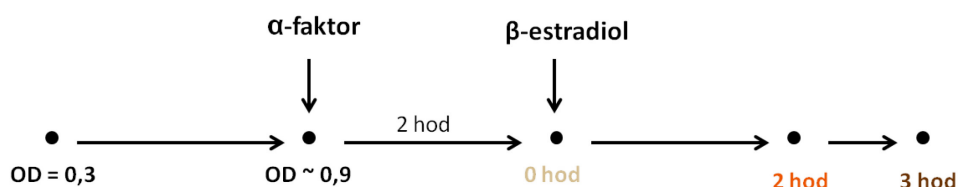
<b>ZuCY20</b>	MATa <i>bar1</i> $\Delta$ <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>his3</i> $\Delta$ 200	} + pMH04 pZuC01
<b>ZuCY21</b>	MATa <i>bar1</i> $\Delta$ <i>prp45(1-169)</i> -3HA:: <i>NatMX6</i> <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>his3</i> $\Delta$ 200	
<b>ZuCY22</b>	MATa <i>bar1</i> $\Delta$ <i>tub3</i> $\Delta$ i <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>his3</i> $\Delta$ 200	
<b>ZuCY23</b>	MATa <i>bar1</i> $\Delta$ <i>prp45(1-169)</i> -3HA:: <i>NatMX6</i> <i>tub3</i> $\Delta$ i <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>his3</i> $\Delta$ 200	

Pro udržení obou plazmidů je nutné transformované buňky *S. cerevisiae* držet pod neustálým selekčním tlakem. Plazmidy pMH04 a pZuC01 obsahují selekční geny *HIS3*

a *URA3*. Aby si kvasinky ponechaly oba transformované plazmidy, je nutná jejich kultivace v SD selekčním médiu bez histidinu a uracilu.

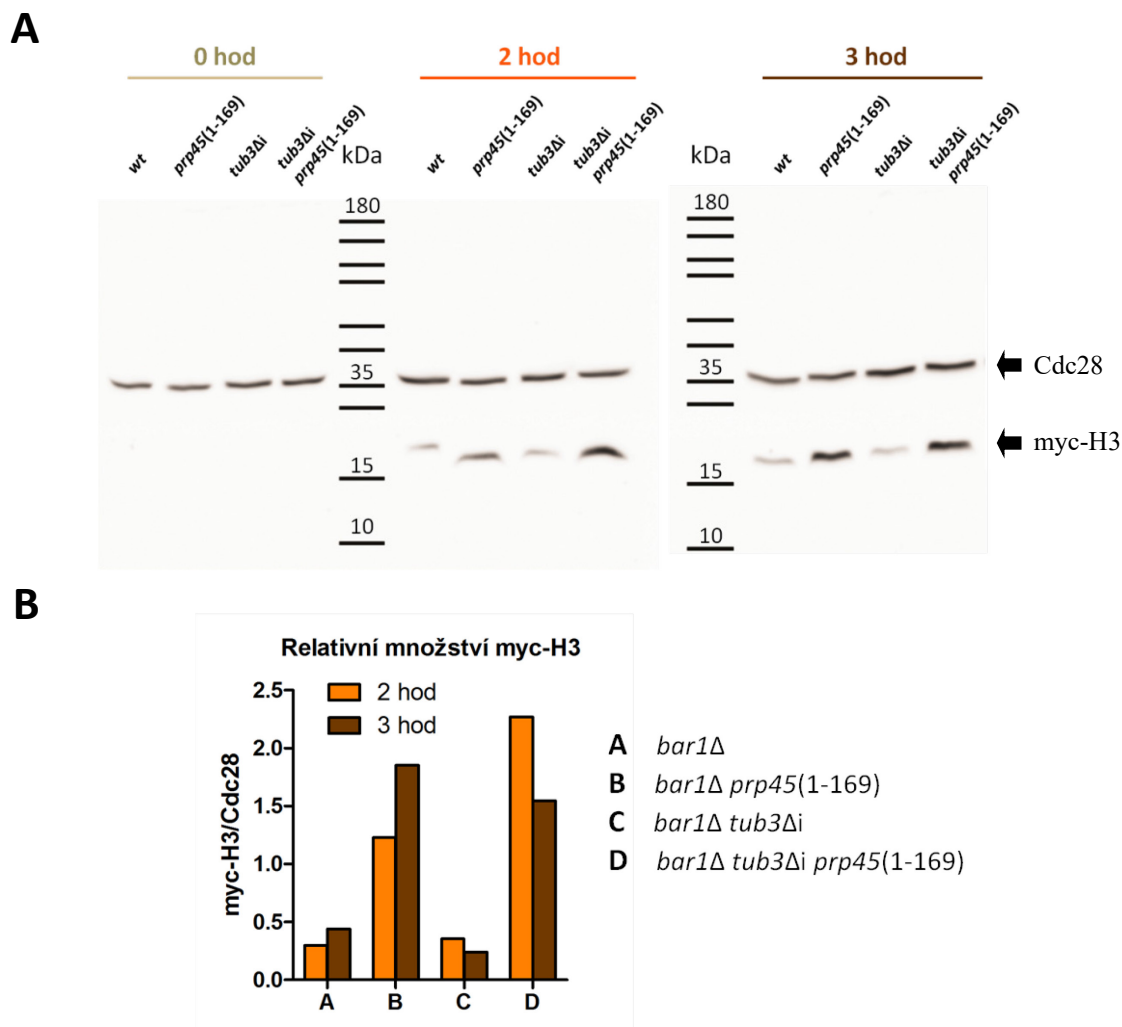
### 5.5.3 Ověření nově zavedeného systému exprese histonu myc-H3 v kvasinkách v G1 bloku

Kmeny *bar1Δ* nesoucí plazmidy pMH04 a pZuC01 byly kultivovány do střední exponenciální fáze růstu v SD médiu bez histidinu a uracilu. Následně byl po dobu 2 hodin aplikován  $\alpha$ -faktor, čímž byly kvasinky zastaveny v G1 fázi buněčného cyklu. Do takto připravené kultury byl přidán  $\beta$ -estradiol na finální koncentraci 400 nM (Obr. 34). V určitých časových bodech experimentu (0, 2 a 3 hodiny od aplikace  $\beta$ -estradiolu) byly odebrány vzorky buněčné kultury pro ověření exprese histonu myc-H3 pomocí western blotu.



Obr. 34: Schematické znázornění experimentu. OD – optická denzita kultury. 0 hod, 2 hod, 3 hod – doba od aplikace  $\beta$ -estradiolu do kultury. Vzorky pro western blot byly odebrány v časových bodech 0 hod, 2 hod a 3 hod.

Na primární protilátku, která detekovala přítomnost epitopu myc, byla navázána sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou. Jako nanášková kontrola byla imunodetekována cyklin dependentní kináza Cdc28, jejíž množství by v buňce mělo být neměnné (shrnutí v Mendenhall a Hodge, 1998). Dle výsledků western blotu je zřejmé, že k indukci exprese histonu myc-H3 dochází u všech testovaných kmenů již po 2 hodinách od přidání  $\beta$ -estradiolu (Obr. 35A). Pro přesné porovnání množství histonu myc-H3 mezi jednotlivými kmeny byla intenzita signálu získaného pro histon myc-H3 kvantifikována a vztažena k nanáškové kontrole Cdc28 (Obr. 35B). Z obrázku 35 je patrné, že množství histonu myc-H3 se mezi jednotlivými kmeny zásadně liší. U kmenů s mutací *prp45(1-169)* bylo v porovnání s ostatními kmeny detekováno větší množství značeného histonu.



Obr. 35: U všech testovaných kmenů dochází k indukci exprese histonu myc-H3 po přidání  $\beta$ -estradiolu. (A) Western blot prokazující přítomnost myc-H3 u všech kmenů již po 2 hodinách. Všechny testované kmeny jsou *bar1Δ*. 0 hod, 2 hod a 3 hod – doba od aplikace  $\beta$ -estradiolu do kultury. Cdc28 – kontrola nanášky (34 kDa). myc-H3 – N-koncově značený histon H3 (16,5 kDa). (B) Graf znázorňující relativní množství histonu myc-H3. Experiment nebyl zopakován.

#### 5.5.4 Pilotní experiment: Zavedení metody stanovení denzity histonu myc-H3 v lokusu genu *TUB3* pomocí chromatinové imunoprecipitace

Chromatinová imunoprecipitace je metoda umožňující studium interakcí mezi proteiny a DNA. Buňky jsou fixovány formaldehydem, což vede k vytvoření kovalentních vazeb mezi DNA a navázanými proteiny. Následně je DNA pomocí sonikace fragmentována a fragmenty (velikost 200 – 800 bp) asociované s proteinem našeho zájmu jsou selektivně imunoprecipitovány pomocí primární protilátky specifické pro tento protein. Po odstranění navázaných proteinů je získaná DNA izolována. Abundance fragmentů DNA pocházejících z konkrétního úseku genomu je kvantifikována pomocí qPCR, přičemž získané hodnoty  $C_p$  korelují s množstvím

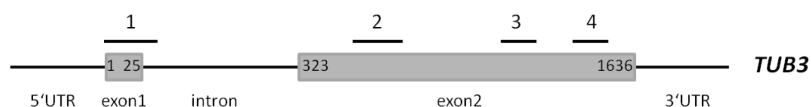
navázaného proteinu v dané oblasti DNA. Po indukované produkci histonu myc-H3 můžeme za pomoci specifické protilátky v kvasinkách *S. cerevisiae* sledovat jeho inkorporaci v čase do nukleozomů v určité genové oblasti.

#### 5.5.4.1 Ověření primerů pro ChIP-qPCR analýzu

Pro ChIP-qPCR vyhodnocení bylo zvoleno více párů primerů, které hybridizují s různými částmi kódujících oblastí genu našeho zájmu (Tab. 3; obr. 36), což nám umožní analyzovat histonovou dynamiku v kontextu celého genu. Některé primery pro gen *TUB3* byly nově navrženy a některé vybrány z databáze.

Amplifikovaná oblast genu <i>TUB3</i>	přímý primer	zpětný primer	délka amplikonu
<b>exon1-intron</b> (-4 - 119)	OG135	OG136	123 nt
<b>exon2</b> (539 - 691)	ZuC13	ZuC14	152 nt
<b>exon2</b> (1144 - 1248)	ZuC17	ZuC18	104 nt
<b>exon2</b> (1384 - 1492)	AV33	AV34	108 nt

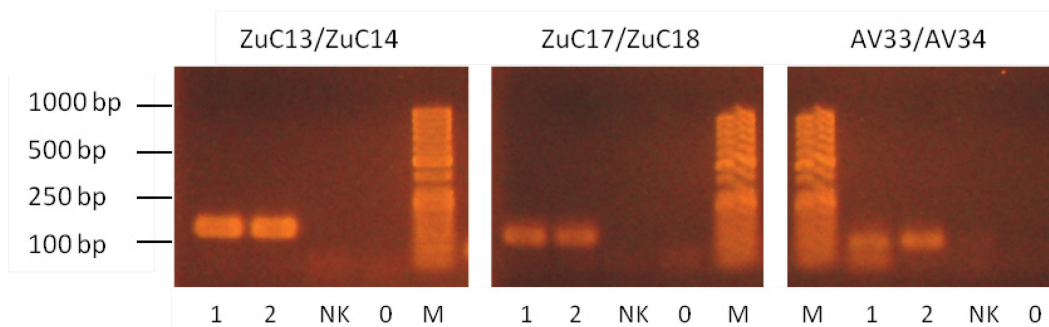
Tab. 3: Primery pro ChIP-qPCR, které hybridizují s jednotlivými oblastmi *TUB3*.



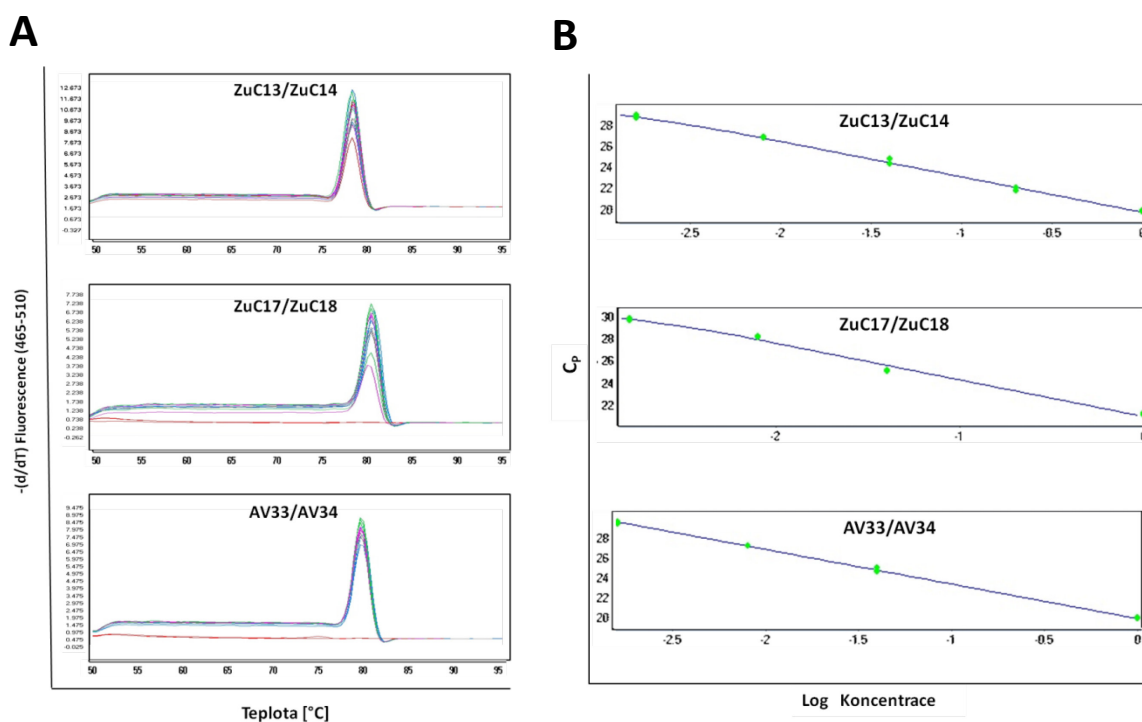
Obr. 36: Schematické znázornění hybridizace primerů pro ChIP-qPCR do lokusu genu *TUB3*.

Stejně jako v případě primerů pro RT-qPCR (Kapitola 5.3.1) bylo nutné nově navržené primery nejprve ověřit. Specifita primerů byla ověřena pomocí PCR, během které byly v testovaných kmenech wt a *tub3Δi* detekovány amplifikační produkty o očekávané velikosti (Tab. 3). Naopak v případě kmenu *TUB3Δ* produkt detekován nebyl, tudíž byla vyloučena hybridizace testovaných primerů s paralogním genem *TUB1* (Obr. 37). Pomocí analýzy tání bylo provedeno ověření specifity primerů v podmínkách qPCR. Získané křivky tání měly jediný vrchol, což dokazuje přítomnost jediného amplifikačního produktu (Obr. 38A). Dostatečná účinnost qPCR reakce s danými páry primerů byla ověřena pomocí standardní křivky. Získané hodnoty směrnice standardních křivek se pohybovaly v rozmezí mezi -3,9 až -3,0 (efektivita 80 – 110 %), efektivita qPCR reakce je tedy dostatečná (Obr. 38B).





Obr. 37: **Ověření specifity primerů pomocí PCR.** 1 – *tub3Δi* (MMY03), 2 – wt (MMY01), NK – negativní kontrola (*TUB3Δ*), 0 – beztemplátová kontrola, M – marker. Označení nad gelem uvádí testovaný pár primerů.



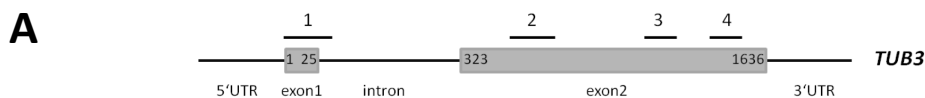
Obr. 38: **Ověření specifity a efektivity primerů pro ChIP-qPCR.** Křivky byly sestaveny přístrojem LightCycler<sup>®</sup> 480 II, Roche Applied Science. Výsledky analýzy táním (A) a standardní křivky (B). Konkrétní naměřené hodnoty jsou pro ZuC13/ZuC14 -3,329, ZuC17/ZuC18 -3,271 a AV33/AV34 -3,457.

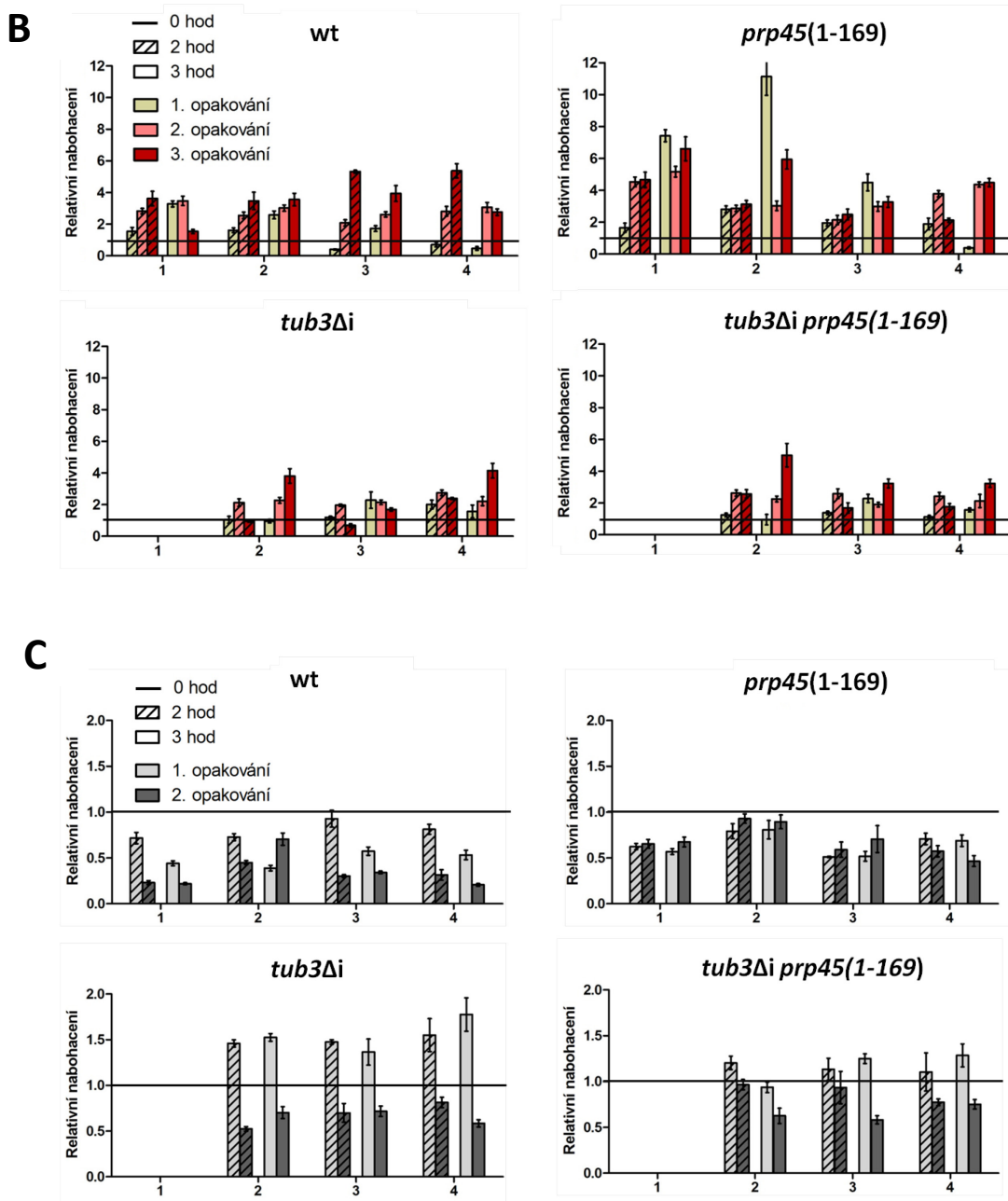
#### 5.5.4.2 Množství histonu H3 a myc-H3 v lokusu genu *TUB3* u kmenů s *tub3Δi* a mutací *prp45(1-169)*

Nově připravené kmeny ZuCY20 (*bar1Δ*), ZuCY21 (*bar1Δ prp45(1-169)*), ZuCY22 (*bar1Δ tub3Δi*) a ZuCY23 (*bar1Δ prp45(1-169) tub3Δi*) s transformovaným systémem plazmidů pMH04 a pZuC01 byly kultivovány dle schématu na obrázku 34. Vzorky pro ChIP analýzu byly odebírány vždy v duplikátu v časových bodech 0, 2 a 3 hodiny od přidání  $\beta$ -estradiolu. Vzorky byly zpracovány dle protokolu ChIP s použitím

protilátky proti histonu H3 nebo proti epitopu myc. Touto metodou byla získána směs DNA obsahující fragmenty odpovídající vazebným místům histonu H3 nebo myc-H3. Imunoprecipitované fragmenty DNA byly kvantifikovány pomocí qPCR s využitím specifických primerů pro *TUB3* (Obr. 39A). Expze každého vzorku byla měřena v technickém triplicátu a samotný experiment byl třikrát zopakován s různými klony stejného kmene. V případě ChIP experimentu s protilátkou proti histonu H3 byla opakování pouze dvě. Naměřené hodnoty  $C_P$  imunoprecipitátu (fragmenty DNA získané po precipitaci) byly normalizovány na hodnoty  $C_P$  „inputu“ (fragmenty DNA vstupující do precipitace). Takto normalizované hodnoty byly vztaženy k hodnotám naměřeným pro vzorek 0 hod (kultura bez indukce) v daném kmenu a páru primerů. Na základě takto vztažených hodnot můžeme detekovat konkrétní změnu ChIP signálu histonu H3 nebo histonu myc-H3 v konkrétním místě genu *TUB3* (Obr. 39)

Hodnoty naměřeného ChIP signálu pro histon myc-H3 v oblastech genu *TUB3* jsou v rámci provedených biologických opakování značně nekonzistentní. Jedná se tedy pouze o pracovní výsledek. Nicméně i přes to je z výsledků patrný nárůst signálu v kvasinkách *prp45(1-169)* oproti wt. Tento nárůst je nejvyšší po třech hodinách od indukce expze histonu myc-H3 v oblasti 5' konce genu *TUB3* a směrem k 3' konci klesá (Obr. 39B). Naměřený ChIP signál pro genomický histon H3 by neměl během experimentu významně fluktuovat. U většiny testovaných kmenů však pozorujeme pokles ChIP signálu pro histon H3 s indukcí expze histonu myc-H3, tedy oproti času 0 hod. Navíc v případě kmenů wt a *tub3Δi* se hodnoty liší i mezi biologickými opakováními (Obr. 39C).





Obr. 39: Vyhodnocení analýzy ChIP pro gen *TUB3* (A) Schema lokusu genu *TUB3* s vyznačenými amplifikovanými úseky (1, 2, 3 a 4). Soupcové grafy vyjadřující relativní nabožení ChIP signálu pro histon myc-H3 (B) nebo pro histon H3 (C). Nad každým grafem je znázorněn zkrácený genotyp, všechny testované kmeny však mají odstraněný gen pro proteinázu Bar1. Vodorovná čára značí hodnotu relativního nabožení, která odpovídá ChIP signálu pro histon H3 nebo myc-H3 v čase 0 hod. Šrafování sloupců odlišuje hodnoty pro vzorky odebrané po 2 nebo 3 hodinách od aplikace  $\beta$ -estradiolu do kultury. Výsledná relativní nabožení pro jednotlivá biologická opakování jsou odlišena barevně (stupně červené pro histon myc-H3 a stupně šedé pro histon H3). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku technických triplikátů.

## 6. Diskuze

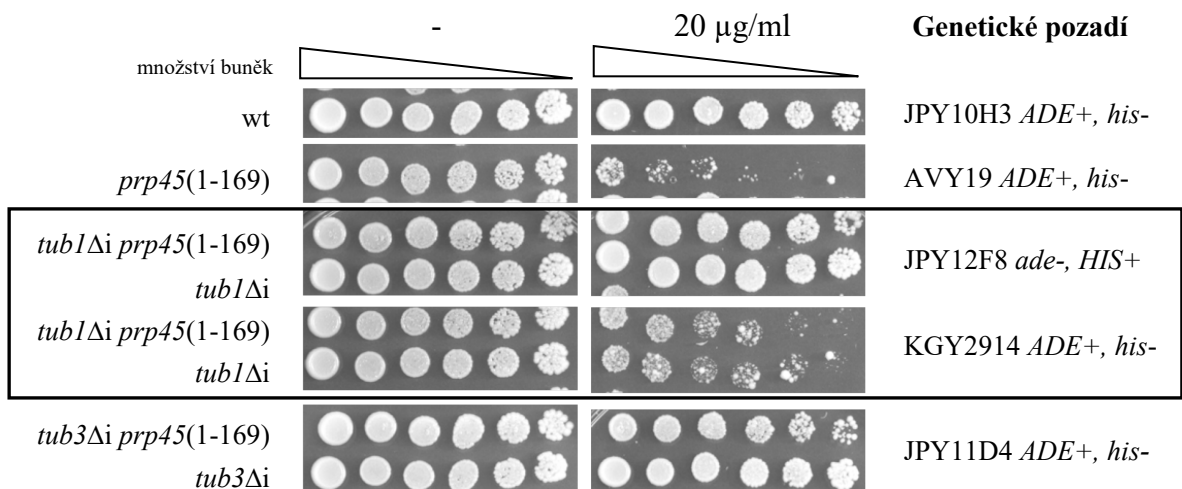
### První projekt

Expres kvasinkových genů může být regulována přítomností sekvence intronu. U některých paralogních genů pro ribozomální proteiny byla kromě této intragenové regulace genové exprese objevena také tzv. intergenová regulace genové exprese, během které může přítomnost intronu v konkrétním paralogním genu u *S. cerevisiae* ovlivňovat nejen hladinu své vlastní mRNA, ale i hladinu mRNA druhého paralogu (Obr. 9; Parenteau *et al.*, 2011; Abrhánová *et al.*, v tisku).

#### 6.1 Ovlivňuje delece intronů z paralogních genů *TUB1* a *TUB3* růstový fenotyp mutanty *prp45(1-169)*?

Jana Konířová ve své diplomové práci zjistila, že delece intronů z paralogních genů *TUB1* a *TUB3* ovlivňuje růstový fenotyp kvasinek *prp45(1-169)*, které vykazují defektní sestřih. Delece intronu z paralogního genu *TUB1* (JPY12F8 *ade-*, *HIS+*) vedla ke zvýšení termosenzitivity *prp45(1-169)*, kdežto delece intronu v méně dynamickém *TUB3* (JPY11D4 *ADE+*, *his-*) tento růstový defekt suprimovala (Obr. 17; Konířová 2010). Delece intronu z genu *TUB1* měla navíc opačný vliv na citlivost kvasinky *prp45(1-169)* k mikrotubulárnímu inhibitoru benomyly než delece intronu z genu *TUB3* (Obr. 40; Konířová 2010). Na základě opačného efektu delece intronů z paralogních genů *TUB1* a *TUB3* v testovaných podmínkách byla formulována otázka, zda na intronu závislá intergenová regulace genové exprese probíhá také mezi paralogními geny *TUB1* a *TUB3*.

Získaná data nejsou nicméně konkluzivní, neboť testováním vlivu mikrotubulárního inhibitoru benomyly na růst kvasinek *S. cerevisiae* s rozdílným genetickým pozadím byly získány také zcela odlišné fenotypy (Obr. 40 – označeno rámečkem). Delece intronu z genu *TUB1* (JPY12F8 *ade-*, *HIS+*) nebo *TUB3* (JPY11D4 *ADE+*, *his-*) u buněk s mutací *prp45(1-169)* vedla ke snížení jejich citlivosti k benomyly. Naproti tomu v případě kmenů s genetickým pozadím KGY2914 (*ADE+*, *his-*) delece intronu z genu *TUB1* neměla na citlivost mutanty *prp45(1-169)* k benomyly žádný pozorovatelný vliv (Obr. 40; Konířová 2010).



Obr. 40: **Citlivost kmenů k mikrotubulárnímu inhibitoru.** V levé části panelu je znázorněn zkrácený genotyp testovaných kmenů. V pravé části panelu jsou znázorněna genetická pozadí testovaných kmenů. Rámeček značí testované kmeny, které jsou shodné ve sledovaných genech, ale vykazují různé růstové fenotypy (Konířová 2010, Diplomová práce).

Vzhledem k tomu, že rozdílné genetické pozadí testovaných kmenů může zcela zásadně ovlivňovat jak pozorované buněčné procesy, tak buněčné fenotypy (Moses *et al.*, 2002; Fritsch *et al.*, 2009), nebyly tyto výsledky konkluzivní. V rámci mé diplomové práce byly experimenty zopakovány s kmeny s identickým genetickým pozadím (JPY10H7 *ADE+*, *his-*), což zajišťuje vzájemnou porovnatelnost výsledků.

## 6.2 Dřívější výsledky nebyly testováním kmenů s identickým genetickým pozadím potvrzeny

### 6.2.1 Termosenzitivita buněk *prp45(1-169)* je nezávislá na přítomnosti intronů v paralogních genech pro tubulin $\alpha$

Termosenzitivita mutanty *prp45(1-169)* byla již dříve v naší laboratoři popsána (Gahura *et al.*, 2009). Není tedy překvapivé, že i v rámci této práce vykazují kmeny s mutací *prp45(1-169)* oproti kvasinkám divokého typu zhoršený růst při kultivaci v nepermisivní teplotě 37 °C. Samotné odstranění intronů z *TUB1* a *TUB3* na růst kvasinek se stejným genetickým pozadím za zvýšené kultivační teploty nemá vliv. Testováním růstu dvojitých mutant *prp45(1-169) tub1Δi* a *prp45(1-169) tub3Δi* se

ukázalo, že termosenzitivita mutanty *prp45(1-169)* je nezávislá na přítomnosti či nepřítomnosti intronů v paralogních genech *TUB1* a *TUB3* (Obr. 21).

### **6.2.2 Delece intronů z *TUB1* a *TUB3* vede k potlačení citlivosti buněk *prp45(1-169)* k benomyly**

V souladu s dřívějšími výsledky vykazují kvasinky *prp45(1-169)* zhoršený růst také při kultivaci v médiu s mikrotubulárním inhibitorem benomylym oproti kvasinkám divokého typu (Obr. 22; Konířová 2010). Testováním *S. cerevisiae* s genetickým pozadím JPY10H7 *ADE+*, *his-* se ukázalo, že samotné odstranění intronů z *TUB1* a *TUB3* nemá na růst buněk *PRP45* (wt) za přítomnosti benomyly v médiu vliv, což je také v souladu s literaturou (Parenteau *et al.*, 2008). Odstranění intronů z *TUB1* a *TUB3* však zcela zásadně ovlivňuje citlivost mutanty *prp45(1-169)* k tomuto mikrotubulárnímu inhibitoru. Delece intronu z *TUB3* růst buněk *prp45(1-169)* nepatrně vylepšuje, přičemž delece intronu z *TUB1* dokonce růstový defekt kmenu *prp45(1-169)* na médiu s benomylym zcela suprimuje (Obr. 22).

Mnou získané růstové fenotypy kvasinkových kmenů s delecí intronů v genech *TUB1* a *TUB3* v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* s jinak identickým genetickým pozadím dříve pozorovaný efekt nepotvrdily. Tento protichůdný efekt delece intronů na fenotyp mutanty *prp45(1-169)* lze přisoudit rozdílnému genetickému pozadí dříve testovaných kmenů. Na základě těchto výsledků nedokážeme říct, které z použitých genetických pozadí je pro testování růstových fenotypů *S. cerevisiae* nejvhodnější. Můžeme však toto téma uzavřít s tím, že pro jejich korektní porovnání je nezbytné co nejvíce eliminovat ostatní rozdíly (tedy i polymorfizmy jednotlivých genetických pozadí), které by mohly výsledky ovlivnit.

Pro vysvětlení mnou pozorované suprese senzitivity buněk *prp45(1-169)* k benomyly po delecí intronů z paralogních genů *TUB1* a *TUB3* byly postulovány dvě hypotézy.

### 6.3 První hypotéza:

**Benomyem narušená dynamika mikrotubulů může být u *S. cerevisiae* reparována prostřednictvím změny stechiometrie Tub1 a Tub3.**

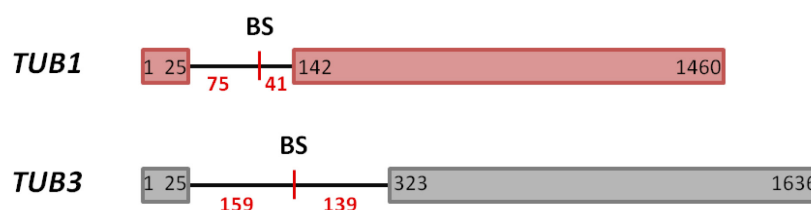
Aminokyselinová sekvence tubulinu  $\alpha$  kódovaná paralogními geny *TUB1* a *TUB3* se liší pouze z 10 % (Schatz *et al.*, 1986b). Aminokyseliny, které nejsou konzervovány, se nacházejí převážně na povrchu proteinu, a to zejména v místě laterálních interakcí mezi protofilamenty mikrotubulů. Mikrotubuly, které obsahují Tub1 jako jediný tubulin  $\alpha$ , jsou dynamičtější, a naopak mikrotubuly obsahující pouze Tub3 jsou stabilnější. Minoritně zastoupený protein Tub3 s největší pravděpodobností v buňce slouží k doladění dynamiky mikrotubulů (Bode *et al.*, 2003). Mikrotubulární inhibitor benomyl snižuje dynamiku mikrotubulů a způsobuje jejich postupnou depolymeraci (shrnuť v Singh *et al.*, 2008). Na základě těchto znalostí byla formulována první hypotéza, která předpokládá, že by kvasinka *S. cerevisiae* mohla reparovat benomyem narušenou dynamiku mikrotubulů prostřednictvím změny stechiometrie Tub1 a Tub3. Narušení sestřihu pre-mRNA *TUB1* a *TUB3* přítomností mutantního sestřihového faktoru Prp45(1-169) by mohlo tento hypotetický mechanismus ovlivnit, což by vysvětlovalo zvýšenou citlivost této mutanty k benomylu. Lze si představit, že podstatou tohoto mechanismu je intergenová regulace genové exprese *TUB1* a *TUB3*, která řídí jejich stechiometrii právě prostřednictvím sekvence intronu. Reparace růstu *prp45(1-169) tub1 $\Delta$*  a *prp45(1-169) tub3 $\Delta$*  by se pak dala vysvětlit nefyziologickým nabožením Tub1 a Tub3 v kvasince v důsledku odstranění nutnosti sestřihu jejich intronů (Obr. 22). Tato hypotéza je v souladu s literaturou, která říká, že nabožení tubulinu  $\alpha$  v kvasinkách *S. cerevisiae* zvyšuje jejich rezistenci k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu (Schatz *et al.*, 1986a).

#### 6.3.1 Na intronu závislá intergenová regulace exprese mezi paralogními geny *TUB1* a *TUB3* nebyla potvrzena

Na základě výsledků RT-qPCR je patrné, že ve všech testovaných kmenech se hladina mRNA *TUB1* a *TUB3* nemění (Obr. 27). Mutace *prp45(1-169)* a ani delece intronů z paralogních genů pro tubulin  $\alpha$  tedy nemá na expresi *TUB1* a *TUB3* vliv. Vzhledem k tomu, že delece intronu z *TUB1* nemění hladinu mRNA *TUB3* a naopak,

můžeme intron-dependentní intergenovou regulaci genové exprese u těchto paralogních genů vyloučit.

Současně byla u testovaných kmenů měřena i hladina pre-mRNA. Dle očekávání buňky s mutací *prp45(1-169)* výrazně akumulují nesestřiženou pre-mRNA obou testovaných genů *TUB1* i *TUB3* (Obr. 27). Přesná funkce proteinu Prp45 v sestřihu zatím není jasná. Výsledky z naší laboratoře však ukazují, že mutanta *prp45(1-169)* způsobuje defekt v disociaci časného sestřihového faktoru Msl5, což má za následek zpožděné vyvazování U2 snRNP, U5 snRNP a NTC komplexu (M. Hálová nepublikovaná data). Protein Prp45 navíc interaguje s některými faktory, o kterých je známo, že se podílí na druhém kroku sestřihu (Albers *et al.*, 2003; Gahura *et al.*, 2009). Tento esenciální faktor je tedy pravděpodobně důležitý v různých fázích sestřihu, což by akumulaci pre-mRNA v kmeni s mutantním Prp45(1-169) mohlo vysvětlit. Další výsledky naší laboratoře ukazují, že defekt sestřihu a akumulace pre-mRNA v mutantě *prp45(1-169)* je ještě výraznější u transkriptů s nestandardními sestřihovými místy (Gahura *et al.*, 2009). Jak již bylo uvedeno, gen *TUB1* obsahuje relativně krátký standardní intron o délce 116 nt, zatímco gen *TUB3* obsahuje intron dlouhý 298 nt s neobvykle velkou vzdáleností mezi BS a 3'ss (139 nt; průměrná vzdálenost ~ 36 nt; obr. 41; Spingola *et al.*, 1999). Lze tedy očekávat, že akumulace pre-mRNA bude v případě genu *TUB3* ještě výraznější než v případě *TUB1*. Nicméně naměřená data ukazují opak a mutanta *prp45(1-169)* akumuluje dvakrát více pre-mRNA *TUB1* než pre-mRNA *TUB3* (Obr. 27).



Obr. 41: Schematické znázornění paralogních genů *TUB1* a *TUB3*. BS – oblast větvení intronu. Červená čísla znázornění vzdálenost v nt mezi 5'ss a BS a mezi BS a 3'ss.

### 6.3.2 Kvasinky *prp45(1-169)* nemění expresi *TUB1* a *TUB3* ani v přítomnosti benomyly

Intergenovou regulaci genové exprese mezi paralogními geny *TUB1* a *TUB3* jsme na základě předchozích výsledků sice vyloučili, ale otázkou zůstává, zda stechiometrie Tub1 a Tub3 není regulována pouze v přítomnosti benomyly. Z výsledků je však patrné,



že se hladina mRNA *TUB1* a *TUB3* u kmenů wt a *prp45(1-169)* v jednotlivých koncentracích benomyly (0, 20 a 30 µg/ml) nemění (Obr. 29). Můžeme tedy vyloučit, že by kvasinky v reakci na přítomnost mikrotubulárního inhibitoru benomyly míru exprese *TUB1* a *TUB3* měnily. K regulaci poměru Tub1 a Tub3 však může docházet např. na úrovni jejich translace nebo až na proteinové úrovni. Toto podezření je navíc v souladu s výsledky naší laboratoře, které ukazují, že množství mRNA *TUB1* a *TUB3* u *S. cerevisiae* je téměř srovnatelné, kdežto poměr proteinů Tub1/Tub3 je 7,48 (Tab. 4). Majoritní zastoupení proteinu Tub1 v kvasince *S. cerevisiae* je tak pravděpodobně důsledkem rozdílné translace mRNA *TUB1* a *TUB3*.

	mRNA	tubulin $\alpha$	tubulin $\alpha$ (Bode <i>et al.</i> , 2003)
<b><i>TUB1</i></b>	55 %	88 %	90 %
<b><i>TUB3</i></b>	45 %	12 %	10 %

Tab. 4: **Stechiometrie mRNA *TUB1* a *TUB3* a izotypů tubulinu  $\alpha$  Tub1 a Tub3.** Expresní a proteomická data naší laboratoře: poměr mRNA *TUB1/TUB3* je 1,2, kdežto poměr proteinů Tub1/Tub3 je 7,47 (nepublikovaná RNA-seq a proteomická data naší laboratoře), což je srovnatelné se stechiometrií, kterou uvádí literatura: poměr proteinů Tub1/Tub3 je 9 (Bode *et al.*, 2003).

## 6.4 Druhá hypotéza:

**Příčinou snížené viability mutantního kmene *prp45(1-169)* by mohl být kumulativní efekt většího množství stresorů.**

Druhá, alternativní hypotéza říká, že růstová aberace buněk *prp45(1-169)* na benomyly je pouze kumulativním efektem většího množství stresorů. Kvasinky *prp45(1-169)* vykazují slabý sestřihový defekt, který se projevuje akumulací pre-mRNA celé řady genů (Gahura *et al.*, 2009). Tato akumulace zatěžuje jaderné aparáty degradace RNA a představuje buněčný stres. Část akumulované pre-mRNA navíc může proniknout do cytoplazmy a translatovat se, vzhledem k retenci intronu, do nefunkčních a potenciálně toxických polypeptidů (Z. Cit nepublikovaná data). Primární transkripty *TUB1* i *TUB3* obsahují v rámci svého intronu předčasný STOP kodón, a jejich translací tak vzniká 22 resp. 33 aminokyselin dlouhý protein. Tyto „proteiny“ pak zahlcují navíc i aparáty degradace proteinů. Defektní sestřih v kvasinkách *prp45(1-169)* by navíc mohl narušit

rovnováhu volných sestřihových faktorů v buňce, které by tak byly v důsledku jejich vyvázání v nedostatku. Za standardních podmínek jsou však kvasinky *prp45(1-169)* schopné růst stejně dobře jako kvasinky divokého typu. Takovýto nerovnovážený stav však může podstatně snižovat schopnost kvasinky vhodně a včas reagovat na další stresové podněty, což se pak může negativně projevit na jejich životaschopnosti. Jistou indicií v tomto smyslu je velmi dlouhá lag fáze stacionární kultury po přenesení z 37 °C do optimálních růstových podmínek. Delece intronů ze silně transkribovaných genů, jako je *TUB3*, ale zejména *TUB1*, by mohla snížit stresovou zátěž a vysvětlit zlepšení růstu *prp45(1-169) tub1Δ* a *prp45(1-169) tub3Δ* na médiu s benomylem (Obr. 22).

#### **6.4.1 Delece intronů z genů pro tubulin $\alpha$ zvyšuje životaschopnost kvasinek *prp(1-169)* v podmínkách kombinovaného stresu**

Kvasinky s mutací *prp45(1-169)* jsou citlivé jak k zvýšené kultivační teplotě, tak k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu. Pokud je vystavíme kombinaci těchto stresorů, můžeme pozorovat extrémně špatný růst až letalitu buněk *prp45(1-169)* v porovnání s buňkami divokého typu. Ukázalo se, že delece intronu z *TUB1*, ale i z *TUB3* mírně vylepšuje růstový fenotyp buněk *prp(1-169)* v přítomnosti obou těchto stresorů (Obr. 23).

Jak již bylo uvedeno, v kvasinkách *prp45(1-169)* se akumuluje velké množství nematurované pre-mRNA. Tento buněčný stres nemá za standardních podmínek vliv na růst *S. cerevisiae*. Pokud jsou kvasinky *prp45(1-169)* přeneseny do nepermissivní teploty 37 °C, projeví se jejich termosenzitivita, pravděpodobně v důsledku prohloubení sestřihových defektů. Přidání dalšího stresoru ve formě benomylu je pro buňky *prp45(1-169)* téměř letální. Pokud však odstraníme introny z *TUB1* nebo *TUB3*, jejichž pre-mRNA je v buňkách *prp45(1-169)* abundantní, snížíme s největší pravděpodobností stresovou zátěž. Otázkou zůstává, jak je možné, že delece intronu z majoritního *TUB1*, minoritního *TUB3*, ale i z obou genů pro tubulin  $\alpha$  vylepšuje růst buněk *prp45(1-169)* do stejné míry.

## **Druhý projekt**

Obecně je dnes přijímáno, že sestřih většiny intronů kvasinky *S. cerevisiae* probíhá kotranskripčně, tedy že k sestavení spliceozomu a vlastnímu sestřihu dochází na

právě vznikající pre-mRNA, tj. ještě před dokončením její syntézy (Alexander *et al.*, 2010; Oesterreich *et al.*, 2010). Výsledky naší laboratoře naznačují význam proteinu Prp45 pro kotranskripční průběh sestřihu. Ukázalo se, že mutanta *prp45(1-169)* negativně ovlivňuje vyvazování sestřihových faktorů v časné fázi sestavování spliceozomu (M. Hálová nepublikovaná data). Pokud je sestavení spliceozomu u kvasinek *prp45(1-169)* opožděno, ale množství mRNA se nemění, pak je sestřih pravděpodobně dokončen posttranskripčně. Další výsledky naší laboratoře ukázaly, že *prp45(1-169)* geneticky interaguje nejen s mutacemi sestřihových faktorů, ale také s delečními alelami efektorů chromatinových modifikací (nepublikovaná data). Na základě těchto výsledků se domníváme, že by protein Prp45 mohl regulovat vyvazování komponent spliceozomu prostřednictvím změn ve stavu chromatinu.

## **6.5 Změny v dynamice nukleozomů genu *TUB3* po delecí jeho intronu a u buněk s mutací *prp45(1-169)***

Pro vyšetření výše uvedené domněnky jsme se rozhodli sledovat, zda a jak se mění hustota nukleozomů na intron obsahujícím genu *TUB3* u *S. cerevisiae* v závislosti na mutaci *prp45(1-169)*. Rozhodli jsme se využít systém  $\beta$ -estradiolem indukované exprese histonu H3 značeného epitopem myc a měření jeho inkorporace do nukleozomů. Abychom vyloučili efekt pomalejšího buněčného cyklu mutanty *prp45(1-169)* na měřené množství značeného histonu H3, blokovali jsme kvasinky v G1 fázi buněčného cyklu  $\alpha$ -faktorem (kmeny *bar1* $\Delta$ ). Metodou CHIP bylo provedeno měření míry inkorporace značeného histonu H3 do různých částí kódujících oblastí genu *TUB3* v různých časech od indukce exprese. Detekovanou míru inkorporace jsme porovnávali mezi kmeny wt, *prp45(1-169)*, *tub3* $\Delta$ i a *tub3* $\Delta$ i *prp45(1-169)*.

### **6.5.1 Nekonzistence množství histonu H3 a myc-H3 v lokusu genu *TUB3* u kmenů s *tub3* $\Delta$ i a mutací *prp45(1-169)* mezi provedenými biologickými opakováními**

Z naměřených výsledků vyplývá, že množství histonu myc-H3 v oblastech genu *TUB3* je v rámci provedených biologických opakování nekonzistentní (Obr. 39). Pokud bychom však odhlédli od této nekonzistence a diskutovali získaná data zcela nekriticky, můžeme pozorovat vcelku zajímavý trend. Kmen *prp45(1-169)* vykazuje v porovnání

s ostatními testovanými kmeny (*wt*, *tub3Δi* a *tub3Δi prp45(1-169)*) nárůst ChIP signálu pro histon myc-H3. Toto relativní nabohacení je nejvyšší v oblasti 5' konce genu a směrem k 3' konci klesá (Obr. 39B). Mohli bychom spekulovat, že mutace *prp45(1-169)* zvyšuje dynamiku nukleozomů, přičemž toto navýšení dynamiky by bylo v daném genu závislé na přítomnosti intronu.

Nicméně, vzhledem k nekonzistenci získaných dat, se jedná pouze o jakýsi pracovní výsledek. Zásadní nedostatek, který snižuje validitu těchto dat, je detekovaný rozdíl ChIP signálu pro histon H3 mezi různými podmínkami a biologickými opakováními (Obr. 39C). Během chromatinové imunoprecipitace byla použita polyklonální protilátka vázající více povrchových epitopů histonu H3 (Lipman *et al.*, 2005). Vzhledem k tomu, že tato protilátka pravděpodobně precipituje jakýkoli histon H3, tedy i myc-H3, celkové množství histonu H3 by se tak nemělo během experimentu měnit.

Pro úspěšný průběh experimentu je navíc nutné, aby v buňkách blokových v G1 fázi buněčného cyklu docházelo k dostatečné expresi genu *TUB3*. Kvasinky byly blokovány přirozeným feromonem  $\alpha$ -faktorem, který simuluje situaci podobnou přítomnosti opačného párovacího typu (Throm a Duntze, 1970). Takto stimulované kvasinky za pomoci aktinového a mikrotubulárního cytoskeletu tvoří typické struktury shmoo (Read *et al.*, 1992). Předpokládáme, že je gen *TUB3* v G1 bloku dostatečně exprimován a inkorporace značeného histonu H3 do jeho nukleozomů probíhá. K inkorporaci volných histonů do nukleozomů mimo S-fázi buněčného cyklu totiž dochází zejména během transkripce (Bonner *et al.*, 1988). Pokud by ale transkripce *TUB3* neprobíhala v dostatečné míře, pak bychom se v rámci získaných ChIP signálů pro histon myc-H3 pohybovali na či mírně nad hranicí pozadí, což by vysvětlovalo námi naměřené nízké hodnoty signálu a také velké relativní rozdíly.

### **6.5.2 Množství detekovaného histonu myc-H3 se mezi jednotlivými kmeny liší**

Pomocí metody western blot byla ve všech testovaných kmenech detekována přítomnost histonu H3 značeného epitopem myc (Obr. 35). K indukci exprese histonu myc-H3 dochází již po 2 hodinách od přidání  $\beta$ -estradiolu, jeho množství se však mezi jednotlivými kmeny výrazně liší. Kmeny, které exprimují mutantní protein Prp45(1-169),

obsahují přibližně 4násobně vyšší množství histonu myc-H3 v buněčných lyzátech oproti ostatním testovaným kmenům (Obr. 35B).

Pokud by  $\beta$ -estradiolem indukovaná exprese histonu myc-H3 probíhala mezi jednotlivými kmeny v různé míře, pak by byly získané ChIP výsledky vzájemně zcela neporovnatelné. Kvasinky by v důsledku rozdílné dostupnosti značeného histonu H3 během přestaveb nukleozomů inkorporovaly jeho rozdílné množství, což by se projevilo jako umělé snížení/zvýšení ChIP signálu. Námí detekovaná množství histonu myc-H3 pomocí western blotu však odráží jeho ustálený stav v buňce (*steady state*), který představuje poměr exprese a degradace. Tyto výsledky tedy nemusí nutně znamenat rozdílnou míru indukce exprese značeného histonu H3 mezi jednotlivými kmeny. Zajímavým vysvětlením by mohla být naopak jeho rozdílná míra degradace v rámci jednotlivých testovaných kmenů. Mimo S-fázi buněčného cyklu je transkripce histonových genů téměř zcela reprimována a hladina volných histonů je udržována na velmi nízké úrovni (shrnutě v Osley, 1991). Pokud nejsou nově syntetizované histony inkorporovány do nukleozomů nebo vyvázány chaperony, dochází k jejich degradaci v proteolytickém komplexu, proteozomu (Singh *et al.*, 2012). Poločas života volného histonu mimo S-fázi je tak přibližně 30-40 min (Gunjan a Verreault, 2003). Přestavby nukleozomů a inkorporace nově syntetizovaných histonů však do určité míry probíhají v průběhu celého buněčného cyklu a to zejména během transkripce. Výsledky jiné studie, která se zabývala dynamikou nukleozomů v G1 fázi buněčného cyklu u *S. cerevisiae*, tvrdí, že z plazmidu exprimovaný histon H3 velmi rychle nahrazuje původní histony (Dion *et al.*, 2007).

Námí detekované rozdíly v množství histonu myc-H3 mezi jednotlivými kmeny by pak mohly být důsledkem a odrazem jeho odlišné míry inkorporace do nukleozomů, což koreluje se získanými ChIP daty (Obr. 39B). V případě kmenů s mutací *prp45(1-169)* by mohlo docházet k zvýšení dynamiky nukleozomů na intron-obsahujících genech, což by se projevilo vyšší inkorporací histonu myc-H3 do přestavovaných nukleozomů. Značené histony by tak byly v důsledku vyšší inkorporace do nukleozomů méně degradovány, což by se projevilo jejich obecně vyšší abundancí. Na základě tohoto předběžného nálezu však nedokážeme hypotézu uzavřít a k objasnění fenomenu bude nutné navrhnot další experimenty.

## 7. Shrnutí

### První projekt

- **Testováním růstu kmenů s delecí intronu v paralogním genu *TUB1* nebo *TUB3* v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* s identickým genetickým pozadím jsme dřívější výsledky naší laboratoře nepotvrdili.**
  - a. Termosenzitivita buněk *prp45(1-169)* je nezávislá na přítomnosti intronů v paralogních genech pro tubulin  $\alpha$ .
  - b. Citlivost buněk *prp45(1-169)* k benomyly je částečně potlačena delecí intronu z *TUB3*, přičemž delece intronu z *TUB1* navrácí růst *prp45(1-169)* na médiu s benomylem zcela do normálu.
- **Na intronu závislá intergenová regulace genové exprese mezi paralogními geny *TUB1* a *TUB3* nebyla potvrzena.**
  - a. Delece intronu z *TUB1* nemění hladinu mRNA *TUB3* a naopak. Hladina mRNA *TUB1* a *TUB3* se nemění ani v mutantě *prp45(1-169)*. Dle očekávání buňky s mutací *prp45(1-169)* výrazně akumulují pre-mRNA obou testovaných genů *TUB1* i *TUB3*.
  - b. U mutanty *prp45(1-169)* nedochází ke změně hladin mRNA *TUB1* a *TUB3* ani v přítomnosti mikrotubulárního inhibitoru benomyly.

### Druhý projekt

- **Úspěšně jsme zavedli systém  $\beta$ -estradiolem indukované exprese histonu myc-H3 v kvasinkách zastavených v G1 fázi buněčného cyklu.**
  - a. Kmeny *bar1 $\Delta$*  jsou schopny bloku v G1 fázi buněčného cyklu po dobu experimentu bez přidání dalšího  $\alpha$ -faktoru.
  - b. U všech testovaných kmenů dochází k indukci exprese histonu myc-H3, jehož množství se však mezi jednotlivými kmeny liší.
  - c. Relativní množství histonu H3 a myc-H3 v oblastech genu *TUB3* je v rámci provedených biologických opakování nekonzistentní.

## 8. Přehled citované literatury

- Adkins, M. W. and Tyler, J. K.** (2006) 'Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions', *Molecular Cell*.
- Albers, M. and Beggs, J.** (1999) Identification and characterisation of Prp45p and Prp46p, two novel pre-mRNA splicing factors in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C. S. and Beggs, J. D.** (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. and Beggs, J. D.** (2010) 'Cross-talk in transcription, splicing and chromatin: who makes the first call?', *Biochemical Society transactions*, 38(5), pp. 1251–6.
- Alexander, R. D., Innocente, S. A., Barrass, J. D. and Beggs, J. D.** (2010) 'Splicing-Dependent RNA polymerase pausing in yeast', *Molecular Cell*, 40(4), pp. 582–593.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R. and 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(1938), pp. 786–94.
- Allison, L. a, Moyle, M., Shales, M. and Ingles, C. J.** (1985) 'Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases.', *Cell*, 42(2), pp. 599–610.
- Andrews, A. J., Chen, X., Zevin, A., Stargell, L. A. and Luger, K.** (2010) 'The Histone Chaperone Nap1 Promotes Nucleosome Assembly by Eliminating Nonnucleosomal Histone DNA Interactions', *Molecular Cell*.
- Ares, M., Grate, L. and Pauling, M. H.** (1999) 'A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA', *RNA*, 5, pp. 1138–1139.
- Barnes, G., Drubin, D. G. and Stearns, T.** (1990) 'The cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae*', *Current Opinion in Cell Biology*.
- Becker, P. B.** (2002) 'Nucleosome sliding: facts and fiction.', *The EMBO journal*, 21(18), pp. 4749–53.
- Belotserkovskaya, R. and Reinberg, D.** (2004) 'Facts about FACT and transcript elongation through chromatin', *Current Opinion in Genetics and Development*.
- Bode, C. J., Jr, M. L. G., Suprenant, K. A. and Himes, R. H.** (2003) 'The two  $\alpha$ -tubulin isotypes in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics in vitro', *EMBO report*, 4(1), pp. 94–99.
- Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuvéglise, C., Munsterkötter, M., Guldener, U., Mewes, H.-W., Van Helden, J., Dujon, B. and Gaillardin, C.** (2003) 'Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns.', *Nucleic acids research*, 31(4), pp. 1121–35.
- Bonner, W. M., Wu, R. S., Panusz, H. T. and Muneses, C.** (1988) 'Kinetics of Accumulation and Depletion of Soluble Newly Synthesized Histone in the Reciprocal Regulation of Histone and DNA Synthesis', *Biochemistry*, 27, pp. 6542–6550.
- Brès, V., Gomes, N., Pickle, L. and Jones, K. A.** (2005) 'A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat', *Genes and Development*.
- Brès, V., Yoshida, T., Pickle, L. and Jones, K. A.** (2009) 'SKIP interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat transactivation.', *Molecular cell*, 36(1), pp. 75–87.
- Buratowski, S.** (2003) 'The CTD code.', *Nature structural biology*, 10(9), pp. 679–80.

- Burke, D., Gasdaska, P. and Hartwell, L.** (1989) 'Dominant Effects of Tubulin Overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular and cellular biology*, pp. 1049–1059.
- Burns, C. G., Ohi, R., Mehta, S., O'Toole, E. T., Winey, M., Clark, T. A., Sugnet, C. W., Ares Jr, M. and Gould, K. L.** (2002) 'Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Mol Cell Biol*, 22(3), pp. 801–815.
- Butler, W. B. and Mueller, G. C.** (1973) 'Control of histone synthesis in HeLa cells', *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*.
- Byrne, K. P. and Wolfe, K. H.** (2005) 'The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species', *Genome Research*.
- Carrillo Oesterreich, F., Preibisch, S. and Neugebauer, K. M.** (2010) 'Global analysis of nascent rna reveals transcriptional pausing in terminal exons', *Molecular Cell*.
- Clapier, C. R. and Cairns, B. R.** (2009) 'The biology of chromatin remodeling complexes.', *Ann Rev Biochem*, 78, pp. 273–304.
- Collins, C. A. and Guthrie, C.** (2000) 'The question remains: Is the spliceosome a ribozyme?', *Nature structural biology*, 7(10), pp. 850–854.
- Dahl, R., Wani, B. and Hayman, M. J.** (1998) 'The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42.', *Oncogene*, 16(12), pp. 1579–86.
- Davidse, L. C. and Flach, W.** (1977) 'Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*.', *The Journal of cell biology*, 72(1), pp. 174–93.
- Delgado, M. A. and Conde, J.** (1984) 'Benomyl Prevents Nuclear Fusion in *Saccharomyces cerevisiae*', *MolGenGenet*, 193, pp. 188–189.
- Dermody, J. L., Dreyfuss, J. M., Villén, J., Ogundipe, B., Gygi, S. P., Park, P. J., Ponticelli, A. S., Moore, C. L., Buratowski, S. and Bucheli, M. E.** (2008) 'Unphosphorylated SR-like protein Npl3 stimulates RNA polymerase II elongation', *PLoS ONE*, 3(9).
- Deutschbauer, A. M., Jaramillo, D. F., Proctor, M., Kumm, J., Hillenmeyer, M. E., Davis, R. W., Nislow, C. and Giaever, G.** (2005) 'Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast', *Genetics*.
- Dion, M. F., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Friedman, N. and Rando, O. J.** (2007) 'Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast.', *Science (New York, N.Y.)*, 315(5817), pp. 1405–8.
- Downs, J. A., Lowndes, N. F. and Jackson, S. P.** (2000) 'A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair', *Nature*, 408(21).
- Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A. M. and Vandenhoute, J.** (2005) 'Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance', *Yeast*, 22(13), pp. 1061–1068.
- Dziembowski, A., Ventura, A.-P., Rutz, B., Caspary, F., Faux, C., Halgand, F., Laprèvote, O. and Séraphin, B.** (2004) 'Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing.', *The EMBO journal*, 23(24), pp. 4847–56.
- Fabrizio, P., Dannenberg, J., Dube, P., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H. and Lührmann, R.** (2009) 'The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome.', *Molecular cell*, 36(4), pp. 593–608.



- Fedorov, A., Merican, A. F. and Gilbert, W.** (2002) 'Large-scale comparison of intron positions among animal, plant, and fungal genes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), pp. 16128–16133.
- Folk, P., Půta, F., Krpejšová, L., Blahůšková, A., Markoš, A., Rabino, M. and Dottin, R. P.** (1996) 'The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in *Dictyostelium*', *Gene*.
- Fritsch, E. S., Schacherer, J., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.-L., Potier, S. and de Montigny, J.** (2009) 'Influence of genetic background on the occurrence of chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*.' *BMC genomics*, 10, p. 99.
- Futcher, B.** (1999) 'Cell cycle synchronization', *Methods in Cell Science*, 21(2–3), pp. 79–86.
- Gahura, O., Abrahámová, K., Skružný, M., Valentová, A., Munzarová, V., Folk, P. and Půta, F.** (2009) 'Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates', *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Galej, W. P., Wilkinson, M. E., Fica, S. M., Oubridge, C., Newman, A. J. and Nagai, K.** (2016) 'Cryo-EM structure of the spliceosome immediately after branching', *Nature*, 537(7619), pp. 197–201. 1
- Georgakopoulos, T., Thireos, G. and Thireos, G.** (1992) 'Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription', *The EMBO Journal*, 1(1), pp. 4145–41.
- Görnemann, J., Kotovic, K. M., Hujer, K. and Neugebauer, K. M.** (2005) 'Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex.', *Molecular cell*, 19(1), pp. 53–63.
- Grünenfelder, B. and Winzeler, E. a** (2002) 'Treasures and traps in genome-wide data sets: case examples from yeast.', *Nature reviews. Genetics*, 3(9), pp. 653–61.
- Gunderson, F. Q. and Johnson, T. L.** (2009) 'Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly', *PLoS Genetics*.
- Gunderson, F. Q., Merkhofer, E. C. and 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.
- Gundllapalli Moses, S. B., Cordero Otero, R. R., Grange, D. C. La, Van Rensburg, P. and Pretorius, I. S.** (2002) 'Different genetic backgrounds influence the secretory expression of the LKA1-encoded *Lipomyces kononenkoae*  $\alpha$ -amylase in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*', *Biotechnology Letters*, 651, pp. 651–656.
- Gunjan, A. and Verreault, A.** (2003) 'A Rad53 Kinase-Dependent Surveillance Mechanism that Regulates Histone Protein Levels in *S. cerevisiae*', *Cell*.
- Gupta, K., Bishop, J., Peck, A., Brown, J., Wilson, L. and Panda, D.** (2004) 'Antimitotic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin', *Biochemistry*.
- Hartley, P. D. and Madhani, H. D.** (2009) 'Mechanisms that Specify Promoter Nucleosome Location and Identity', *Cell*.
- Henikoff, S. and Shilatifard, A.** (2011) 'Histone modification: Cause or cog?', *Trends in Genetics*.
- Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M. and Bustamante, C.** (2009) 'Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II.', *Science (New York, N.Y.)*.

- Chan, R. K. and Otte, C. A.** (1982) 'Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones.', *Molecular and cellular biology*, 2(1), pp. 11–20.
- Chan, S.-P., Kao, D.-I., Tsai, W.-Y. and Cheng, S.-C.** (2003) 'The Prp19p-associated complex in spliceosome activation.', *Science (New York, N.Y.)*, 302(5643), pp. 279–82..
- Chawla, G., Sapra, A. K., Surana, U. and Vijayraghavan, U.** (2003) 'Dependence of pre-mRNA introns on PRP17, a non-essential splicing factor: Implications for efficient progression through cell cycle transitions', *Nucleic Acids Research*, 31(9), pp. 2333–2343.
- Chen, M. and Manley, J. L.** (2009) 'Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 741–54.
- Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R. and Buratowski, S.** (1997) 'mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain.', *Genes & development*, 11(24), pp. 3319–26.
- Jamai, A., Imoberdorf, R. M. and Strubin, M.** (2007) 'Continuous Histone H2B and Transcription-Dependent Histone H3 Exchange in Yeast Cells outside of Replication', *Molecular Cell*.
- Juneau, K., Miranda, M., Hillenmeyer, M. E., Nislow, C. and Davis, R. W.** (2006) 'Introns regulate RNA and protein abundance in yeast', *Genetics*.
- Kaplan, N., Moore, I. K., Fondufe-Mittendorf, Y., Gossett, A. J., Tillo, D., Field, Y., Leproust, E. M., Hughes, T. R., Lieb, J. D., Widom, J. and Segal, E.** (2009) 'The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome', *Nature*, 458(7236), pp. 362–366.
- Katz, W., Weinstein, B. and Solomon, F.** (1990) 'Regulation of Tubulin Levels and Microtubule Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*: Consequences of Altered Tubulin Gene Copy Number', *Molecular and cellular biology*, 10(10), pp. 5286–5294.
- Kellis, M., Birren, B. W. and Lander, E. S.** (2004) 'Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. TL - 428', *Nature*, 428 VN-(6983), pp. 617–624.
- Kent, W. J. and Zahler, A. M.** (2000) 'Conservation, regulation, synteny, and introns in a large-scale *C. briggsae*-*C. elegans* genomic alignment.', *Genome research*, 10(8), pp. 1115–25.
- Khalid, M. F., Damha, M. J., Shuman, S. and Schwer, B.** (2005) 'Structure-function analysis of yeast RNA debranching enzyme (Dbr1), a manganese-dependent phosphodiesterase', *Nucleic Acids Research*.
- Kim, S.-H. and Lin, R.-J.** (1996) 'Spliceosome Activation by PRP2 ATPase prior to the First Transesterification Reaction of Pre-mRNA Splicing', *Molecular and cellular biology*, 16(12), pp. 6810–6819.
- Kireeva, M. L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M. and Studitsky, V. M.** (2002) 'Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: Loss of the H2A/H2B dimer during transcription', *Molecular Cell*.
- Komarnitsky, P., Cho, E. J. and Buratowski, S.** (2000) 'Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription.', *Genes & development*, 14(19), pp. 2452–60.
- Kornberg, R. D.** (1974) 'Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.', *Science (New York, N.Y.)*, 184(139), pp. 868–871.
- Kornblihtt, A. R., de la Mata, M., Fededa, J. P., Munoz, M. J. and Nogues, G.** (2004) 'Multiple links between transcription and splicing.', *RNA (New York, N.Y.)*, 10(10), pp. 1489–98.

- Kress, T. L., Krogan, N. J. and Guthrie, C.** (2008) 'A Single SR-like Protein, Npl3, Promotes Pre-mRNA Splicing in Budding Yeast', *Molecular Cell*, 32(5), pp. 727–734.
- Kulaeva, O. I., Hsieh, F.-K. and 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.
- Lacadie, S. A. and Rosbash, M.** (2005) 'Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast', *Molecular Cell*.
- Laggerbauer, B., Achsel, T. and Lührmann, R.** (1998) 'The human U5-200kD DEXH-box protein unwinds U4/U6 RNA duplexes in vitro.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), pp. 4188–92.
- Lander, E. S., et al.** (2001) 'Initial sequencing and analysis of the human genome.', *Nature*, 409(6822), pp. 860–921.
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R. H., Davis, R. W., Hughes, T. R. and Nislow, C.** (2007) 'A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast.', *Nat Genet*, 39(10), pp. 1235–1244.
- Lenstra, T. L., Benschop, J. J., Kim, T., Schulze, J. M., Brabers, N. A. C. H., Margaritis, T., van de Pasch, L. A. L., van Heesch, S. A. A. C., Brok, M. O., Groot Koerkamp, M. J. A., Ko, C. W., van Leenen, D., Sameith, K., van Hooff, S. R., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Hentrich, T., Kobor, M. S., Buratowski, S. and Holstege, F. C. P.** (2011) 'The Specificity and Topology of Chromatin Interaction Pathways in Yeast', *Molecular Cell*.
- Leong, G. M., Subramaniam, N., Figueroa, J., Flanagan, J. L., Hayman, M. J., Eisman, J. A. and Kouzmenko, A. P.** (2001) 'Ski-interacting Protein Interacts with Smad Proteins to Augment Transforming Growth Factor- $\beta$ -dependent Transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp. 18243–18248.
- Licatalosi, D. D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J. B. and Bentley, D. L.** (2002) 'Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II.', *Molecular cell*, 9(5), pp. 1101–11.
- Lin, R. J., Lustig, A. J. and Abelson, J.** (1987) 'Splicing of yeast nuclear pre-mRNA in vitro requires a functional 40S spliceosome and several extrinsic factors.', *Genes & development*.
- Ling, X., Harkness, T. A. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G. and Grunstein, M.** (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 and Development*.
- Lipke, P. N., Taylor, A. and Ballou, C. E.** (1976) 'Morphogenic effects of alpha-factor on *Saccharomyces cerevisiae* a cells.', *Journal of bacteriology*, 127(1), pp. 610–8.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Weis-Garcia, F. and Trudel, L. J.** (2005) 'Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.', *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 46(3), pp. 258–68.
- Lopez, A. J.** (1998) 'Alternative splicing of pre-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation', *Annual Review of Genetics*, 32(1), pp. 279–305.
- Luger, K., Mä, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J.** (1997) 'Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution', *Nature*, 389.
- Martinkova, K., Lebduska, P., Skruzny, M., Folk, P. and Puta, F.** (2002) 'Functional Mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 Identifies the SNW Domain as Essential for Viability', *J. Biochem*, 132(4), pp. 557–563.

- Mavrich, T. N., Ioshikhes, I. P., Venters, B. J., Jiang, C., Tomsho, L. P., Qi, J., Schuster, S. C., Albert, I. and Pugh, B. F.** (2008) 'A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome', *Genome Research*.
- Mendenhall, M. D. and Hodge, A. E.** (1998) 'Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.' *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(4), pp. 1191–243.
- Mitchell, P. and Tollervey, D.** (2001) 'mRNA turnover', *Current Opinion in Cell Biology*.
- Moehle, E. A., Braberg, H., Krogan, N. J. and Guthrie, C.** (2014) 'Adventures in time and space: Splicing efficiency and RNA polymerase II elongation rate.', *RNA biology*, 11(4), pp. 313–9.
- Moehle, E. A., Ryan, C. J., Krogan, N. J., Kress, T. L. and Guthrie, C.** (2012) 'The Yeast SR-Like Protein Npl3 Links Chromatin Modification to mRNA Processing', *PLoS Genetics*.
- Morillo-Huesca, M., Maya, D., Munoz-Centeno, M. C., Singh, R. K., Oreal, V., Reddy, G. U., Liang, D., Géli, V., Gunjan, A. and Chávez, S.** (2010) 'FACT prevents the accumulation of free histones evicted from transcribed chromatin and a subsequent cell cycle delay in G1', *PLoS Genetics*.
- Neff, N. F., Thomas, J. H., Grisafi, P. and Botstein, D.** (1983) 'Isolation of the  $\beta$ -Tubulin Gene from Yeast and Demonstration of Its Essential Function In Vivo', *Cell*, 33, pp. 211–219.
- Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. and Mann, M.** (1998) 'Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex.', *Nature genetics*, 20(1), pp. 46–50.
- Neugebauer, K. M.** (2002) 'On the importance of being co-transcriptional.', *Journal of cell science*, 115(Pt 20), pp. 3865–71.
- Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A. and Struhl, K.** (2003) 'Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity', *Molecular Cell*.
- Nguyen, T. H. D., Galej, W. P., Fica, S. M., Lin, P. C., Newman, A. J. and Nagai, K.** (2016) 'CryoEM structures of two spliceosomal complexes: Starter and dessert at the spliceosome feast', *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd, 36, pp. 48–57.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A. and Downing, K. H.** (1999) 'High-resolution model of the microtubule', *Cell*.
- Oesterreich, F. C., Bieberstein, N. and Neugebauer, K. M.** (2011) 'Pause locally, splice globally', *Trends in Cell Biology*.
- Ohi, M. D., Kooi, C. W. Vander, Rosenberg, J. A., Ren, L., Hirsch, J. P., Chazin, W. J., Walz, T. and Gould, K. L.** (2005) 'Structural and Functional Analysis of Essential pre-mRNA Splicing Factor Prp19p', *Molecular and cellular biology*, 25(1), pp. 451–460.
- Ohrt, T., Prior, M., Dannenberg, J., Odenwalder, P., Dybkov, O., Rasche, N., Schmitzova, J., Gregor, I., Fabrizio, P., Enderlein, J. and Luhrmann, R.** (2012) 'Prp2-mediated protein rearrangements at the catalytic core of the spliceosome as revealed by dcFCCS', *Rna*, 18, pp. 1244–1256.
- Osley, M. A.** (1991) 'The regulation of histone synthesis in the cell cycle.', *Annual review of biochemistry*, 60, pp. 827–61.
- Osley, M. A. and Lycant, D.** (1987) 'trans-Acting Regulatory Mutations That Alter Transcription of *Saccharomyces cerevisiae* Histone Genes', *Molecular and cellular biology*, 7(12), pp. 4204–4210.
- Ottoz, D. S. M., Rudolf, F. and Stelling, J.** (2014) 'Inducible, tightly regulated and growth condition-independent transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*', *Nucleic Acids Research*.

- Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J. F., Wellinger, R. J., Chabot, B. and Elela, S. A.** (2011) 'Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes', *Cell*.
- Parenteau, J., Durand, M., Véronneau, S., Lacombe, A.-A., Morin, G., Guérin, V., Cecez, B., Gervais-Bird, J., Koh, C.-S., Brunelle, D., Wellinger, R. J., Chabot, B. and Elela, S. A.** (2008) 'Deletion of Many Yeast Introns Reveals a Minority of Genes that Require Splicing for Function', *Molecular Biology of the Cell*, 19, pp. 1932–1941.
- Parenteau, J., Lavoie, M., Catala, M., Malik-Ghulam, M., Gagnon, J. and Abou Elela, S.** (2015) 'Preservation of Gene Duplication Increases the Regulatory Spectrum of Ribosomal Protein Genes and Enhances Growth under Stress', *Cell Reports*.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A. and Reinberg, D.** (2006) 'Histone H2B Monoubiquitination Functions Cooperatively with FACT to Regulate Elongation by RNA Polymerase II', *Cell*.
- Petibon, C., Parenteau, J., Catala, M. and Elela, S. A.** (2016) 'Introns regulate the production of ribosomal proteins by modulating splicing of duplicated ribosomal protein genes', *Nucleic Acids Research*.
- Phatnani, H. P., Jones, J. C. and Greenleaf, A. L.** (2004) 'Expanding the functional repertoire of CTD kinase I and RNA polymerase II: Novel phosphoCTD-associating proteins in the yeast proteome', *Biochemistry*.
- Phillips, D. M. P.** (1965) 'The Presence of Acetyl Groups in Histones', *Biochemical Journal*, 87(1958), pp. 258–263.
- Pleiss, J. A., Whitworth, G. B., Bergkessel, M. and Guthrie, C.** (2007) 'Rapid, Transcript-Specific Changes in Splicing in Response to Environmental Stress', *Molecular Cell*.
- Plocik, A. M. and Guthrie, C.** (2012) 'Diverse forms of RPS9 splicing are part of an evolving autoregulatory circuit', *PLoS Genetics*.
- Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D. K. and Young, R. A.** (2005) 'Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast.', *Cell*, 122(4), pp. 517–27.
- Prathapam, T., Kühne, C. and Banks, L.** (2002) 'Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity', *Nucleic Acids Research*, pp. 5261–5268.
- Pruss, D., Hayes, J. J. and Wolffe, A. P.** (1995) 'Nucleosomal anatomy - where are the histones?', *BioEssays*.
- Pyle, A. M.** (2008) 'Translocation and Unwinding Mechanisms of RNA and DNA Helicases', *Annual Review of Biophysics*, 37(1), pp. 317–336.
- Query, C. C., Moore, M. J. and Sharp, P. A.** (1994) 'Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: Evidence for the bulged duplex model', *Genes and Development*.
- Quinlan, R. A., Pogson, C. I. and Gull, K.** (1980) 'The influence of the microtubule inhibitor, methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) on nuclear division and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*.' , *Journal of cell science*, 46(1), pp. 341–52.
- R Briggs, C. M.** (2002) 'Briggs 2002', *Trends in cell biology*, 7, pp. 204–210.
- Radman-Livaja, M. and Rando, O. J.** (2010) 'Nucleosome positioning: How is it established, and why does it matter?', *Developmental Biology*.

- Rauhut, R., Fabrizio, P., Dybkov, O., Hartmuth, K., Pena, V., Chari, A., Kumar, V., Lee, C.-T., Urlaub, H., Kastner, B., Stark, H. and Luhrmann, R.** (2016) 'Molecular architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* activated spliceosome', *Science*, 353(6306), pp. 1399–1405.
- Read, E. B., Okamura, H. H. and Drubin, D. G.** (1992) 'Actin- and tubulin-dependent functions during *Saccharomyces cerevisiae* mating projection formation.', *Molecular biology of the cell*, 3(4), pp. 429–44.
- Reijo, R. A., Cooper, E. M., Beagle, G. J. and Huffaker, T. C.** (1994) 'Systematic Mutational Analysis of the Yeast B-Tubulin Gene', *Molecular Biology of the Cell*, 5, pp. 29–43.
- Richards, K. L., Anders, K. R., Nogales, E., Schwartz, K., Downing, K. H. and Botstein, D.** (2000) 'Structure–Function Relationships in Yeast Tubulins.', *Molecular Biology of the Cell*, 11, pp. 1887–1903.
- Richmond, T. J. and Davey, C. A.** (2003) 'The structure of DNA in the nucleosome core.', *Nature*, 423(6936), pp. 145–50.
- Rikke B. Langkjær, Cliften, P. F., Johnston, M. and Piskur, J.** (2003) 'Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes', *Nature*, 421(February), pp. 848–852.
- Rino, J. and Carmo-Fonseca, M.** (2009) 'The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus?', *Trends in cell biology*, 19(8), pp. 375–84.
- Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., Sorokin, A. V., Mirkin, B. G. and Koonin, E. V.** (2003) 'Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution.', *Current biology : CB*, 13(17), pp. 1512–7.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C. T., Schreiber, S. L., Mellor, J. and Kouzarides, T.** (2002) 'Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3', *Nature*, 419(6905), pp. 407–411.
- Segal, E. and Widom, J.** (2009) 'Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization', *Current Opinion in Structural Biology*.
- Shahbazian, M. D., Zhang, K. and Grunstein, M.** (2005) 'Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1', *Molecular Cell*.
- Sherwood, P. W., Tsang, S. and Osley, M. A.** (1993) 'Characterization of HIRJ and HIR2, Two Genes Required for Regulation of Histone Gene Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular and cellular biology*, 13(1), pp. 28–38.
- Schatz, P. J., Pillus, L., Grisafi, P., Solomon, F. and Botstein, D.** (1986a) 'Two Functional  $\alpha$ -Tubulin Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Encode Divergent Proteins', *Molecular and cellular biology*, pp. 3711–3721.
- Schatz, P. J., Solomon, F. and Botstein, D.** (1986b) 'Genetically Essential and Nonessential  $\alpha$ -Tubulin Genes Specify Functionally Interchangeable Proteins', *Molecular and cellular biology*, 6(11), pp. 3722–3733.
- Schneider, C., Agafonov, D. E., Schmitzová, J., Hartmuth, K., Fabrizio, P. and Lührmann, R.** (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*.
- Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S. and Bentley, D.** (2000) 'Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II.', *Genes & development*, 14(19), pp. 2435–40.
- Schwabish, M. A. and Struhl, K.** (2006) 'Asf1 Mediates Histone Eviction and Deposition during Elongation by RNA Polymerase II', *Molecular Cell*.

- Schwartz, S. H., Silva, J., Burstein, D., Pupko, T., Eyraş, E. and Ast, G.** (2008) 'Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes', *Genome Research*.
- Schwartz, S., Meshorer, E. and Ast, G.** (2009) 'Chromatin organization marks exon-intron structure.', *Nature structural & molecular biology*. Nature Publishing Group, 16(9), pp. 990–5.
- Schwer, B.** (2008) 'A Conformational Rearrangement in the Spliceosome Sets the Stage for Prp22-Dependent mRNA Release', *Molecular Cell*.
- Schwer, B. and Gross, C. H.** (1998) 'Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing', *EMBO Journal*.
- Sims, R. J., Millhouse, S., Chen, C. F., Lewis, B. A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J. L. and Reinberg, D.** (2007) 'Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing', *Molecular Cell*.
- Singh, P., Rathinasamy, K., Mohan, R. and Panda, D.** (2008) 'Microtubule assembly dynamics: An attractive target for anticancer drugs', *IUBMB Life*, 60(6), pp. 368–375.
- Singh, R. K., Gonzalez, M., Kabbaj, M.-H. M. and Gunjan, A.** (2012) 'Novel E3 Ubiquitin Ligases That Regulate Histone Protein Levels in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *PLoS ONE*, 7(5).
- Singh, R. K., Kabbaj, M. H. M., Paik, J. and Gunjan, A.** (2009) 'Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis.', *Nature cell biology*, 11(8), pp. 925–33.
- Skružný, M., Ambrozková, M., Fuková, I., Martínková, K., Blahšková, A., Hamplová, L., Půta, F. and Folk, P.** (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.
- Slaugenhaupt, S. A., Blumenfeld, A., Gill, S. P., Leyne, M., Mull, J., Cuajungco, M. P., Liebert, C. B., Chadwick, B., Idelson, M., Reznik, L., Robbins, C., Makalowska, I., Brownstein, M., Krappmann, D., Scheidereit, C., Maayan, C., Axelrod, F. B. and Gusella, J. F.** (2001) 'Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia.', *American journal of human genetics*, 68(3), pp. 598–605.
- Smith, C. W. J. and Valcárcel, J.** (2000) 'Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control', *Trends in Biochemical Sciences*, 25(8), pp. 381–388.
- Smolle, M. and Workman, J. L.** (2013) 'Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 1829(1), pp. 84–97.
- Sorenson, M. R.** (2016) 'Histone H3K36 methylation regulates pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*'. *RNA Biology*, 13:4, 412–426
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D. and Ares, M.** (1999) 'Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*'. *RNA (New York, N.Y.)*, 5(2), pp. 221–34.
- Sprague, G. F. and Herskowitz, I.** (1981) 'Control of Cell Type in Yeast by the Mating Type Locus The al-a2 Hypothesis', *J. Mol. Biol.*, 147, pp. 357–372.
- Srivastava, R. and Ahn, S. H.** (2015) 'Modifications of RNA polymerase II CTD: Connections to the histone code and cellular function', *Biotechnology Advances*.
- Staley, J. P. and Guthrie, C.** (1999) 'An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p', *Molecular Cell*.

- Stetefeld, J. and Ruegg, M. A.** (2005) 'Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing', *Trends in Biochemical Sciences*.
- Storici, F., Lewis, L. K. and Resnick, M. A.** (2001) 'In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides.', *Nature biotechnology*, 19(8), pp. 773–6.
- Storici, F. and 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*.
- Struhl, K. and Segal, E.** (2013) 'Determinants of nucleosome positioning.', *Nature structural & molecular biology*. Nature Publishing Group, 20(3), pp. 267–73.
- Sun, Z.-W. and Allis, C. D.** (2002) 'Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast', *Nature*, 418, pp. 104–108.
- Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M. A. and Sternglanz, R.** (2001) 'Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription.', *Genetics*, 158(2), pp. 587–96.
- Tessarz, P. and Kouzarides, T.** (2014) 'Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics', *Nature Publishing Group*, 15.
- Thomas, J. H., Neff, N. F. and Botstein, D.** (1985) 'Isolation and characterization of mutations in the beta-tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*.', *Genetics*, 111(4), pp. 715–734.
- Throm, E. and Duntze, W.** (1970) 'Mating-Type-Dependent Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Journal of bacteriology*, 104(3), pp. 1388–90.
- Tillo, D. and Hughes, T. R.** (2009) 'G+C content dominates intrinsic nucleosome occupancy.', *BMC bioinformatics*, 10, p. 442.
- Tsai, R. T., Fu, R. H., Yeh, F. L., Tseng, C. K., Lin, Y. C., Huang, Y. H. and Cheng, S. C.** (2005) 'Spliceosome disassembly catalyzed by Prp43 and its associated components Ntr1 and Ntr2', *Genes and Development*.
- Vinogradov, A. E.** (2001) 'Intron length and codon usage', *Journal of Molecular Evolution*, 52(1), pp. 2–5.
- Walfridsson, J., Khorosjutina, O., Matikainen, P., Gustafsson, C. M. and Ekwall, K.** (2007) 'A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly.', *The EMBO journal*, 26(12), pp. 2868–79.
- Ward, A. J. and Cooper, T. A.** (2010) 'The pathobiology of splicing', *Journal of Pathology*, pp. 152–163.
- Wasylyk, B. and Chambon, P.** (1980) 'Studies on the Mechanism of Transcription of Nucleosomal Complexes', *Eur. J. Biochem*, 103, pp. 219–226.
- Weinstein, B. and Solomon, F.** (1990) 'Phenotypic Consequences of Tubulin Overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Differences between Alpha-Tubulin and Beta-Tubulin', *Molecular and cellular biology*, 10(10), pp. 5295–5304.
- Wilkie, S. E., Vaclavik, V., Wu, H., Bujakowska, K., Chakarova, C. F., Bhattacharya, S. S., Warren, M. J. and Hunt, D. M.** (2008) 'Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by missense mutations in the splicing factor gene PRPF31.', *Molecular vision*, 14, pp. 683–90.
- Will, C. L. and Lührmann, R.** (2011) 'Spliceosome structure and function', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Winsor, B. and Schiebel, E.** (1997) 'An overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton', *Yeast*.



- Winzeler, E. A., Castillo-Davis, C. I., Oshiro, G., Liang, D., Richards, D. R., Zhou, Y. and Hartl, D. L.** (2003) 'Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays', *Genetics*.
- Wolfe, K. H. and Shields, D. C.** (1997) 'Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome.', *Nature*, 387(6634), pp. 708–713.
- Wood, A., Krogan, N. J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J. F., Johnston, M. and Shilatifard, A.** (2003) 'Short Article Bre1, an E3 Ubiquitin Ligase Required for Recruitment and Substrate Selection of Rad6 at a Promoter', *Molecular Cell*, 11, pp. 267–274.
- Wride, D. A., Pourmand, N., Bray, W. M., Kosarchuk, J. J., Nisam, S. C., Quan, T. K., Berkeley, R. F., Katzman, S., Hartzog, G. A., Dobkin, C. E. and Lokey, R. S.** (2014) 'Confirmation of the cellular targets of benomyl and rapamycin using next-generation sequencing of resistant mutants in *S. cerevisiae*', *Mol. BioSyst. Mol. BioSyst.*, 10(10), pp. 3179–3187.
- Xiao, T., Hall, H., Kizer, K. O., Shibata, Y., Hall, M. C., Borchers, C. H. and Strahl, B. D.** (2003) 'Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast', *Genes and Development*.
- Xu, H., Kim, U. J., Schuster, T. and Grunstein, M.** (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.
- Yan, C., Hang, J., Wan, R., Huang, M., Wong, C. C. L. and Shi, Y.** (2015) 'Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution.', *Science (New York, N.Y.)*, 349(6253), pp. 1182–91.
- Yan, C., Wan, R., Bai, R., Huang, G. and Shi, Y.** (2016) 'Structure of a yeast activated spliceosome at 3.5 Å resolution.', *Science (New York, N.Y.)*, 353(6302), pp. 904–11.
- Yan, C., Wan, R., Bai, R., Huang, G. and Shi, Y.** (2017) 'Structure of a yeast step II catalytically activated spliceosome.', *Science (New York, N.Y.)*, 355(6321), pp. 149–155.
- Yuan, G.-C., Liu, Y.-J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J. and Rando, O. J.** (2005) 'Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*.' *Science (New York, N.Y.)*, 309(5734), pp. 626–30.
- Zhang, C., Baudino, T. A., Dowd, D. R., Tokumaru, H., Wang, W. and MacDonald, P. N.** (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, C., Dowd, D. R., Staal, A., Gu, C., Lian, J. B., Van Wijnen, A. J., Stein, G. S. and MacDonald, P. N.** (2003) 'Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing', *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp. 35325–35336.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J.-D., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G. and Hayward, S. D.** (2000) 'SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function.', *Molecular and cellular biology*, 20(7), pp. 2400–10.