

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Klára Křivánková

Role metylace H3K36 při opravách DNA germinálních a somatických buněk
The role of H3K36 methylation in DNA repair of germinal and somatic cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ondřej Mihola, Ph.D.

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, 14. 5. 2017

.....
Klára Křivánková

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Miholovi, Ph.D. za jeho vstřícný přístup, trpělivost a odborné rady při psaní bakalářské práce a také za čas, ve kterém se mi věnoval.

Abstrakt

Histonové modifikace ovlivňují celou řadu buněčných dějů, jedním z nich je i oprava poškození DNA. Tato práce se zaměřuje na metylaci lysinu 36 histonu 3 (H3K36). V první části práce je popsána role této modifikace v lokalizaci dvouvláknových zlomů DNA v germinálních buňkách. Dvouvláknové zlomy zde iniciují meiotickou rekombinaci, která je nezbytná pro správný průběh meiózy. V této práci jsou podrobněji popsány celkem tři metyltransferázy histonů. První z nich je PRDM9, enzym exprimovaný pouze v oocytech a spermatocytech během meiotické profáze a zodpovědný za rozmístění hotspotů rekombinace u většiny savců. Druhá část práce je zaměřena na roli metylace H3K36 na opravy poškození DNA v somatických buňkách pomocí homologní rekombinace (HR) a nehomologního spojení konců DNA (NHEJ). V druhé části práce jsou popsány metyltransferázy SETD2 a SETMAR. SETD2 trimetyluje H3K36 a H3K36me3 je rozeznávána proteinem LEDGF, díky kterému jsou k DNA naváděny další komponenty nutné pro HR. Protein SETMAR dimetyluje H3K36 a spolu s touto histonovou modifikací podporuje opravu DNA zlomů pomocí NHEJ. Studium metylace H3K36 je důležité pro lepší pochopení jednotlivých způsobů oprav DNA. Správná oprava DNA zlomů je nutná pro udržení celistvosti genomu a potlačení vzniku rakoviny. Chybná regulace metylace H3K36 proto ovlivňuje řadu lidských nádorů.

Klíčová slova: opravy dvouvláknových zlomů DNA, metylace H3K36, rekombinace, meióza, PRDM9, SETD2, SETMAR

Abstract

Histone modifications affect many cellular processes including DNA damage repair. This thesis focusses on the methylation of lysine 36 of histone 3 (H3K36). The role of this modification in the localization of DNA double-stranded breaks in germinal cells is described in the first part of this thesis. Double-stranded breaks initiate meiotic recombination, which is essential for successful meiosis. This thesis also describes three histone methyltransferases. The first is PRDM9, an enzyme expressed only in oocytes and spermatocytes during meiotic prophase and responsible for the localization of recombination hotspots in most mammals. The second part of this thesis deals with the role of H3K36 methylation in DNA damage repair in somatic cells using homologous recombination (HR) and nonhomologous DNA ending joining (NHEJ). The proteins SETD2 and SETMAR are described in the second part. SETD2 trimethylates H3K36, and H3K36me3 is recognized by the LEDGF protein. Through LEDGF, other components necessary for HR are recruited to DNA. SETMAR dimethylates H3K36 and together with this histone modification promote DNA break repair with NHEJ. The research of H3K36 methylation is important for a better understanding of each DNA repair mechanisms. The correct repair of DNA breaks is necessary for maintaining genome integrity and suppression of cancer. Many human tumours are therefore affected by the incorrect regulation of H3K36 methylation.

Key words: DNA double strand break repair, H3K36 methylation, recombination, meiosis, PRDM9, SETD2, SETMAR

Seznam použitých zkratek

ALL	akutní lymfatická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
BAC	bakteriální umělý chromozom
cDNA	cirkulární DNA
CO	<i>crossover</i>
dsDNA	dvouvláknová DNA
DSB	dvouvláknový zlom/dvouvláknové zlomy
H3K36me	monometylace lysinu 36 na histonu 3
H3K36me2	dimetylace lysinu 36 na histonu 3
H3K36me3	trimetylace lysinu 36 na histonu 3
H3K4me3	trimetylace lysinu 4 na histonu 3
<i>hotspot</i>	místo častého výskytu (např. rekombinace)
HR	homologní rekombinace
<i>Hst1</i>	gen hybridní sterility 1
ChIP	chromatinová imunoprecipitace
MMEJ	mikrohomologií řízené spojení konců
MMR	DNA <i>mismatch repair</i>
NCO	<i>noncrossover</i>
NDR	oblast chudá na nukleozomy
NHEJ	nehomologní spojení konců DNA
SC	synaptonemální komplex
siRNA	malá interferující RNA
ssDNA	jednovláknová DNA
XL	DNA ligáza IV/XRCC4

Obsah

<i>Úvod</i>	1
1 Role H3K36 metylace v eukaryotní buňce	2
1.1 Specifická role H3K36 metylace v germinálních buňkách	4
1.1.1 Meióza a rekombinace	4
1.1.1.1 Vznik dvouvláknových zlomů v DNA	6
1.1.1.1.1 Lokalizace hotspotů rekombinace u <i>Caenorhabditis elegans</i>	6
1.1.1.1.2 Lokalizace hotspotů rekombinace u myši a člověka.....	6
1.1.1.1.2.1 PRDM9 určuje místa rekombinace u savců	7
1.1.1.1.3 Vlastní tvorba DSB a vazba meiotických rekombináz	9
1.1.1.2 Opravy dvouvláknových zlomů DNA	11
1.1.1.2.1 Role metylace H3K36 v opravách pomocí HR u <i>Caenorhabditis elegans</i>	11
1.1.1.3 Párování a dvouvláknové zlomy u pohlavních chromozomů	12
1.1.1.4 Epigenetické značky určující hotspoty rekombinace	13
1.1.1.4.1 H3K36me3 v hotspotech rekombinace	13
1.2 Role H3K36 metylace v somatických buňkách	16
1.2.1 SETD2 histon-metyltransferáza	16
1.2.2 H3K36 metylace se účastní oprav DNA pomocí MMR	17
1.2.3 H3K36 metylace v opravách DSB	18
1.2.3.1 H3K36me3 určuje, zda dojde k opravě DSB pomocí HR nebo NHEJ	18
1.2.3.2 Role H3K36me3 při HR v somatických buňkách.....	21
1.2.3.3 Role metylace H3K36 při opravách pomocí nehomologního spojení konců.....	21
1.3 Role metylace H3K36 při vzniku rakoviny	25
Závěr	27
Přehled použité literatury	29

Úvod

Dvouvláknové zlomy DNA (DSB) se vyskytují jak v germinálních, tak v somatických buňkách a pokud by nebyly opraveny, jsou takovéto buňky pro organismus nebezpečné. Existují dvě hlavní cesty opravy těchto zlomů, a to cesta homologní rekombinace a cesta nehomologního spojení konců DNA. Homologní rekombinace je nezbytnou součástí meiózy, procesu dělení buněk, při kterém dochází k tvorbě haploidních gamet. Díky meiotické rekombinaci dochází k výměně části genetického materiálu mezi homologními chromozomy, což dává vzniknout novým kombinacím sekvencí DNA. Tím se zajišťuje nárůst genetické diverzity, který je důležitý pro evoluci.

Programované dvouvláknové zlomy iniciují homologní rekombinaci a důležitým činitelem v procesu určování míst vzniku těchto DSB jsou epigenetické modifikace histonů. Histonové modifikace se také uplatňují v opravách pomocí homologní rekombinace i nehomologního spojení konců DNA. Histony mohou být modifikovány například acetylací, metylací, fosforylací či ubikvitinací. Přidání některé z těchto chemických skupin na histony vede k otevření či kondenzaci chromatinové struktury či takto modifikovaný histon může být rozpoznáván jinými proteiny a navádět je tak na chromatin.

V této práci jsem se zaměřila na metylaci lysinu 36 histonu 3 (H3K36), která hraje ve výše zmíněných procesech nemalou úlohu. Předmětem této bakalářské práce je popsání rolí této epigenetické modifikace v určování míst vzniku meiotických DSB, v homologní rekombinaci somatických a germinálních buněk a v neposlední řadě i při opravách DNA nehomologním spojením konců. Zároveň budou popsány histonové metyltransferázy, enzymy, které tuto epigenetickou značku na histony umisťují.

Kromě své role v opravách dvouvláknových zlomů se metylace H3K36 uplatňuje také při iniciaci transkripce a alternativním sestřihu, a to jak v somatických, tak v germinálních buňkách. Při transkripci a alternativním sestřihu se také uplatňují metyltransferázy NSD1, NSD2, NSD3 a ASH1, u nichž však nebyla dosud prokázána žádná spojitost jejich metylační aktivity s opravami dvouvláknových zlomů DNA. Všechny v této práci zmíněné metyltransferázy mají také velký význam v progresi rakoviny, kterou ovlivňuje nesprávné rozmístění metylovaných H3K36 v chromatinu. Roli metylace H3K36 v rozvoji různých typů rakoviny bude také věnována část této bakalářské práce.

1 Role H3K36 metylace v eukaryotní buňce

Trimetylace H3K36 má v eukaryotických buňkách širokou škálu využití. Nezastupitelná role této histonové modifikace byla identifikována jak v transkripci a alternativním sestřihu, tak v opravách DSB, či nesprávného zařazení báze při replikaci a rekombinaci (Li *et al*, 2013; a shrnuto v Wagner & Carpenter 2012).

Většina doposud identifikovaných savčích metyltransferáz schopných metylovat H3K36 ovlivňuje transkripci a alternativní sestřih a nebyla dosud u nich prokázána žádná role v opravách poškození DNA. Jsou to například NSD1 (angl. *nuclear receptor SET domain-containing 1*), NSD2 (angl. *nuclear receptor SET domain-containing 2*), NSD3 (angl. *nuclear receptor SET domain-containing 3*) a ASH1 (angl. *asymmetric synthesis of HO*) metyltransferáza (shrnuto v Wagner & Carpenter 2012). Lucio-Eterovic a její kolegové potvrdili pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP) schopnost NSD1 metylovat H3K36 a zároveň detekovali snížení H3K36me, H3K36me2 i H3K36me3 v buňkách s odstraněným NSD1. V buňkách bez NSD1 je snížená transkripce genů, z čehož plyne, že NSD1 reguluje genovou expresi a následkem toho jeho mutace vedou u lidí k řadě onemocnění (Lucio-Eterovic *et al*, 2010). NSD2 monometyluje a dimetyluje H3K36, ale nemá žádný vliv na míru výskytu H3K36me3. H3K36me2 se nachází v tělech genů (intronech a exonech) a napomáhá transkripci (Kuo *et al*, 2011).

Mezi H3K36 metyltransferázy účastníci se kromě regulace transkripce i oprav DNA patří enzymy SETD2 (Carvalho *et al*, 2014) a SETMAR (Fnu *et al*, 2011; Lee *et al*, 2005), jimž budou v této práci věnovány samostatné podkapitoly. Ta bude věnována i histon-metyltransferáze PRDM9, která je exprimována výlučně v germinálních buňkách většiny savců, kde se účastní determinace míst rekombinace (Powers *et al*, 2016).

Kromě metyltransferáz mají na rozmístění metylovaných H3K36 vliv i histon-demetylázy, enzymy odstraňující metylové skupiny z konců histonů. Metylace histonů tedy nejsou neměnnými epigenetickými modifikacemi, jak se dříve myslelo, ale jsou enzymaticky odstranitelné (Klose *et al*, 2006). Jednou ze známých demetyláz vyskytujících se u myši a člověka je KDM4A (jiný název JHDM3A nebo také JMJD2A), která je schopná odstraňovat metylové skupiny z H3K36me2 i H3K36me3 *in vivo* (Klose *et al*, 2006; Whetstine *et al*, 2006). Role demetyláz rodiny KDM4 v opravách chyb vzniklých při replikaci DNA je

popsána v kapitole 1.2.2. Další H3K36 demetylázou vyskytující se u výše zmíněných organismů je KDM2B (jiný název JHDM1B) (He *et al.*, 2008).

1.1 Specifická role H3K36 metylace v germinálních buňkách

1.1.1 Meióza a rekombinace

Meióza je proces, kterým jsou produkovány pohlavní buňky, v jejichž jádrech je počet chromozomových sad redukován na polovinu původního množství. Tento krok je pro pohlavně se rozmnožující organismy naprosto nezbytný, jelikož bez něj by docházelo v každé nové generaci ke znásobení genomu. Proces meiózy se skládá ze dvou na sebe navazujících dělení, kterým předcházelo pouze jedno kolo replikace genetické informace. V průběhu prvního meiotického dělení dochází k rozchodu homologických chromozomů k opačným pólům buňky, následně během druhého meiotického dělení dochází již k rozchodu jednotlivých chromatid a to stejným způsobem, jako je tomu při mitóze.

Aby došlo ke správnému rozdělení homologických chromozomů do dceřiných buněk, musí tyto chromozomy nejprve v průběhu meiotického dělení najít svého partnera, se kterým se spárují. Mezi homology, chromozomy přenášejícími stejné geny, vzniká fyzické propojení zformováním struktury nazývané synaptonemální komplex (SC). Dalším fyzickým propojením mezi homology jsou chiasmata, místa překřížení chromatid, kde došlo k výměně genetického materiálu v průběhu rekombinace. Tato propojení jsou nezbytná pro správný průběh meiózy, jelikož zajišťují správnou orientaci homologických chromozomů vůči pólům buňky a jejich správný rozchod během prvního meiotického dělení. Porušení tohoto fyzického kontaktu homologů může vést ke vzniku aneuploidií (Dernburg *et al*, 1998; a shrnuto v Snustad *et al*, 2009).

Obě meiotická dělení jsou tvořena čtyřmi fázemi, a to profází, metafází, anafází a telofází. Profázi prvního meiotického dělení můžeme rozdělit do pěti stádií. Prvním stádiem profáze I je leptotene, kdy dochází ke kondenzaci chromozomů a objevují se programované dvouvláknové zlomy DNA iniciující homologní rekombinaci. Na ní navazuje zygotene, kdy se chromozomy ještě více kondenzují a mezi homologickými chromozomy vznikají synapse. Synapse je podmíněna vznikem proteinové struktury synaptonemálního komplexu postupně se tvořící po celé délce mezi párujícími se chromozomy. Účelem SC je držet homologní chromozomy u sebe v ideální vzdálenosti pro další fáze rekombinace. V následujícím stádiu, pachytene, pokračuje kondenzace chromozomů, které jsou v této fázi již plně spárovány

(formování SC je dokončeno). Během pachytene také dochází ke *crossoverům* (CO), výměnám úseků nesesterských chromatid homologních chromozomů. Díky tomu vznikají mezi homology další fyzická propojení v místech chiazmat. Předposledním stádiem profáze I je diplotene, kdy dochází k rozpadu SC a k částečnému oddělení spárovaných chromozomů. Ty však stále zůstávají v těsném fyzickém kontaktu v oblasti chiazmat. V posledním stádiu profáze I, diakinezi, se homologní chromozomy přesunují do ekvatoriální roviny a je dokončena jejich kondenzace (shrnutí v Snustad *et al*, 2009; Zickler a Kleckner 1998; Zickler a Kleckner 2015).

Pro správný rozchod homologních chromozomů je nezbytný nejen SC, ale také přítomnost minimálně jednoho *crossoveru* na chromozom (Farré *et al*, 2013; Sun *et al*, 2005a). Průběh profáze prvního meiotického dělení se liší u různých organismů, např. u *Caenorhabditis elegans* probíhá párování a tvorba synapsí nezávisle na rekombinaci, která se objevuje až později (shrnutí v Zickler a Kleckner 2015).

Meiotická homologní rekombinace je proces, vyskytující se u téměř všech pohlavně se množících organismů, který díky výměně části genetické informace mezi homologními chromozomy v gametogenezi významně přispívá k nárůstu genetické diverzity. Kromě své úlohy při vytváření genetické rozmanitosti, hraje rekombinace důležitou úlohu i při párování homologních chromozomů a jejich správné segregaci do dceřiných buněk během prvního meiotického dělení. Homologní rekombinace je iniciována programovanými dvouvláknovými zlomy DNA, jejichž rozmístění je ovlivněno metylovanými lysiny histonu 3 (Powers *et al*, 2016; shrnutí v Zickler a Kleckner, 2015).

1.1.1.1 Vznik dvouvláknových zlomů v DNA

Vznik dvouvláknových zlomů DNA iniciujících homologní rekombinaci je katalyzován enzymem SPO11 (Dernburg *et al*, 1998; Keeney *et al*, 1997). Dvouvláknové zlomy (DSB) se objevují během G2 fáze buněčného cyklu či během leptotene a jejich distribuce v genomu u většiny druhů je nenáhodná (shrnuto v Zickler & Kleckner 2015). Většina DSB se sdružuje v takzvaných rekombinačních hotspotech, asi 1-2 kilobáze dlouhých úsecích DNA (Jeffreys *et al*, 1998; a shrnuto v Paigen & Petkov 2010), které jsou nepravidelně rozmístěny po celém genomu téměř všech dosud studovaných eukaryotických organismů od kvasinky po člověka (Baudat *et al*, 2010; Borde *et al*, 2009). U většiny savců se v lokalizaci míst rekombinace uplatňuje H3K4me3 (Baudat *et al*, 2010) a v nedávné době byl potvrzen i výskyt H3K36me3 v hotspotech rekombinace u myši (Grey *et al*, 2017; Powers *et al*, 2016).

1.1.1.1.1 Lokalizace hotspotů rekombinace u *Caenorhabditis elegans*

Pro *Caenorhabditis elegans* je typické, že na každý pár chromozomů připadá pouze jeden *crossover* za meiózu (Hillers a Villeneuve, 2003). Různorodost frekvence vzniku *crossoverů* u *C. elegans* je dána působením velkých chromozomových domén. Nebyly zde nalezeny stejné typy hotspotů rekombinace jako u ostatních studovaných druhů, např. jako u kvasinky či myši, kde se na určení hotspotů rekombinace podílejí metyltransferázy Set1 a PRDM9 metylující H3K4 (Baudat *et al*, 2010; Borde *et al*, 2009). Pro *C. elegans* nebyly dosud nalezeny žádné silné hotspoty rekombinace. Patrně se zde neuplatňuje epigenetická značka H3K4me3, neboť v jejím rozmístění v místech rekombinace a mimo ně nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl (Kaur & Rockman 2014; a shrnuto v Yu *et al*, 2016). Ačkoliv v místech hotspotů nebyl pozorován nárůst trimetylace na histonech typických pro hotspoty rekombinace výše zmíněných druhů, metylace H3K36 je důležitá pro pozdější fáze oprav poškození DNA a pro udržení celistvosti genomu (Amendola *et al*, 2017; viz kapitola 1.1.1.2.1.).

1.1.1.1.2 Lokalizace hotspotů rekombinace u myši a člověka

Bylo prokázáno, že rozmístění hotspotů rekombinace není dáno pouze sekvencí DNA, ale že k jejich určení významně přispívá i organizace chromatinu, která může být ovlivněna epigenetickými značkami umístěnými na histonech (Buard *et al*, 2009; Neumann a Jeffreys, 2006; Walker *et al*, 2015). Buard a jeho kolegové zjistili, že u myši se v místech rekombinace nachází více trimetylovaného lysinu 4 na histonu 3 (H3K4me3), a identifikovali tak první

epigenetickou značku určující místa rekombinačních hotspotů u savců (Buard *et al*, 2009). Téměř výhradním regulátorem určujícím hotspoty rekombinace u myši a člověka je PRDM9 (Baudat *et al*, 2010), o němž je podrobněji psáno v navazující podkapitole. U jedinců, u nichž byl PRDM9 vyřazen z funkce, se hotspoty rekombinace přesunují do míst obohacených o H3K4me3 mechanismem nezávislým na PRDM9 (Brick *et al*, 2012), což jsou například místa promotorů transkripčně aktivních genů (Guenther *et al*, 2007). Důležitost organizace chromatinu pro rozmístění rekombinačních hotspotů byla také potvrzena nedávno objevenou epigenetickou značkou H3K36me3 nacházející se v hotspotech rekombinace (Powers *et al*, 2016).

1.1.1.1.2.1 PRDM9 určuje místa rekombinace u savců

Gen *Prdm9*, nazývaný také jako Meisetz (angl. *meiosis induced factor containing a PR/SET domain and zinc finger motif*), byl prvně popsán jako gen, který je důležitý pro progresi časně meiotické profáze u myši, a který kóduje metyltransferázu přenášející metylovou skupinu z S-adenosylmetioninu na specifické lysiny histonu 3 (Hayashi *et al*, 2005). K expresi tohoto enzymu dochází výhradně v oocytech a spermatocytech během meiotické profáze. Hayashi a jeho kolegové prokázali schopnost PRDM9 metylovat dimetylovaný lysin 4 histonu 3 (vzniká tedy H3K4me3) a ukázali, že PRDM9 je nezbytný pro úspěšné dokončení meiózy. Samci i samice s vyřazeným *Prdm9* jsou totiž sterilní v důsledku zástavy meiotického dělení na úrovni pachytene. Pachytenní meiocyty vykazují neopravené DSB spojené s poruchami párování homologických chromozomů (Hayashi *et al*, 2005; Hayashi a Matsui, 2006). Později bylo dokázáno, že PRDM9 působí metylaci nejen na H3K4me2, ale i na nemetylovaném či monometylovaném substrátu H3K4 (Wu *et al*, 2013).

Gen *Prdm9* byl také studován z hlediska jeho role v hybridní sterilitě, která se projevuje u některých samčích kříženců mezi (pod)druhy myši domácí *Mus m. musculus* a *Mus m. domesticus* (Forejt a Iványi, 1974). V rámci pozičního klonování genu hybridní sterility 1 (*Hst1*), který je zodpovědný za daný fenomén, byl gen *Prdm9* identifikován jako jeden z kandidátních genů (Trachtulec *et al*, 2005). Genetickým mapováním se *Hst1* oblast nejprve lokalizovala na myším chromosomu 17 (Forejt *et al*, 1991), a následně se zužovala až na takovou úroveň, kdy bylo možné přejít k identifikaci kandidátních genů. V takto lokalizované *Hst1* oblasti se kromě genu *Prdm9* nacházelo dalších 5 funkčních protein-kódujících genů (a šest pseudogenů), které mohly být zodpovědné za zástavu spermatogeneze

v hybridech (Trachtulec *et al*, 2005). Posledním krokem v identifikaci *Prdm9* genu jako genu hybridní sterility 1 byl experiment zahrnující transfekci myších embryonálních kmenových buněk bakteriálními umělými chromozomy (BAC) nesoucími různé úseky *Hst1* oblasti, tudíž zahrnujících sekvence odlišných kandidátních genů a sledování plodnosti v první generaci hybridních samců nesoucích tyto transgeny (Mihola *et al*, 2009).

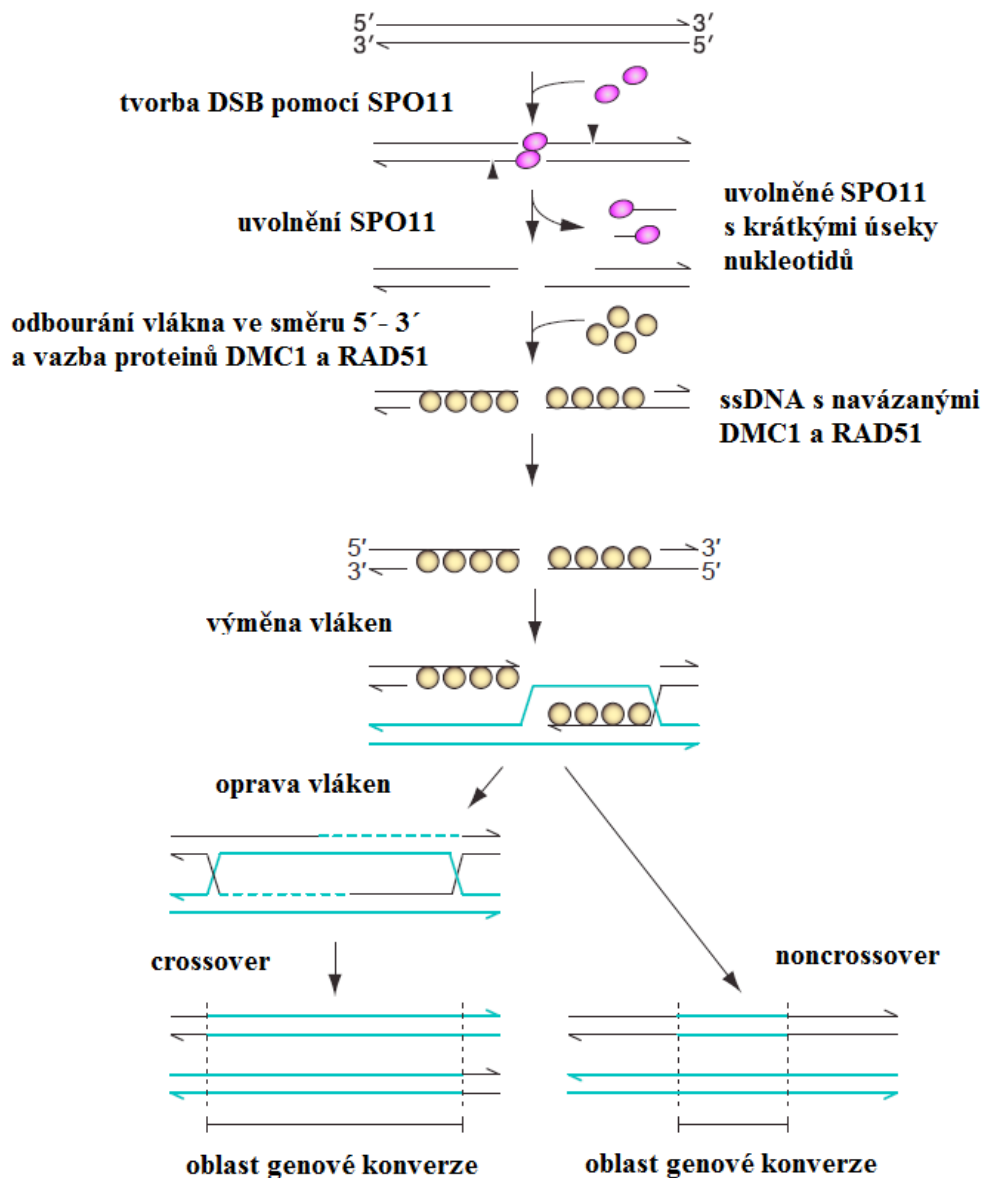
V roce 2010 bylo objeveno, že gen *Prdm9* je zodpovědný za kontrolu lokalizace hotspotů rekombinace, a to jak u myši, tak lidí (Baudat *et al*, 2010; Parvanov *et al*, 2010). PRDM9 protein obsahuje dvě dobře popsané domény, PR/SET doménu s metyltransferázovou aktivitou, která je evolučně konzervovaná a poté doménu zinkových prstů, která slouží k specifické vazbě proteinu k DNA. Porovnáním cDNA sekvencí *Prdm9* dvou myších kmenů bylo zjištěno, že většina polymorfismů mezi alelami tohoto genu se nachází v jeho doméně zinkových prstů (Baudat *et al*, 2010). Odlišnosti mezi doménami zinkových prstů různých alel byly potvrzeny sekvenováním exonu 12 genu *Prdm9* obsahujícím doménu zinkových prstů u dvaceti myších kmenů a šedesáti čtyřech různých vzorků lidské DNA. Myší alely *Prdm9* se lišily v počtu opakování zinkových prstů (11 - 14 opakování) a v kodonu pro aminokyselinu v pozici 6, 9 a 12. Mezi lidskými vzorky byly nalezeny dvě převládající alely s dvanácti tandemovými opakováními v doméně zinkových prstů a několik minoritních alel (Parvanov *et al*, 2010). Tato doména je mezi alelami *Prdm9* vysoce variabilní a různé varianty PRDM9 proteinu tak díky ní můžou rozeznávat různé sekvence DNA a určovat tak odlišná místa rekombinace. Varianty zinkových prstů tohoto proteinu úzce souvisí s variabilitou hotspotů rekombinace napříč genomy savců. Výskyt funkčního PRDM9 byl potvrzen u těchto savců: *Mus musculus* (Baudat *et al*, 2010; Kono *et al*, 2014), *Bos taurus* (Sandor *et al*, 2012), *Pan*, *Gorilla* (Schwartz *et al*, 2014) a *Homo sapiens* (Baudat *et al*, 2010). Naproti tomu u *Canidae* se funkční PRDM9 nenachází. U této čeledi byla v sekvenci pseudogenu *Prdm9* nalezena řada mutací v doméně zinkových prstů a oproti sekvenci funkčních *Prdm9* jiných savců zde bylo také nalezeno mnoho stop kodonů (Muñoz-Fuentes *et al*, 2011). Po vazbě PRDM9 ke specifické sekvenci DNA, katalyzuje PR/SET doména trimetylaci H3K4, a jak bylo nedávno dokázáno i H3K36, na okolních nukleozomech (Baker *et al*, 2015; Baudat *et al*, 2010; Grey *et al*, 2011, 2017; Powers *et al*, 2016).

1.1.1.1.3 Vlastní tvorba DSB a vazba meiotických rekombináz

U myši a lidí existují dvě izoformy SPO11, a to SPO11 α a SPO11 β , kdy za většinu programovaných DSB je zodpovědná SPO11 β (Bellani *et al*, 2010; Romanienko a Camerini-Otero, 1999, 2000). Do formování DSB se zapojují i další proteiny, u myši například MEI4, REC114 či HORMAD1 (shrnutí v Capilla *et al*, 2016).

Zmiňovaný enzym SPO11 je homologem A podjednotky topoizomerázy VI nalezené u archea. Byla prokázána její sekvenční podobnost se SPO11 pocházejícího ze *Saccharomyces cerevisiae*. Pro tvorbu zlomu v DNA je pro všechny typy topoizomeráz nezbytný tyrozin, kde dojde k narušení fosfodiesterové vazby a vzniku přechodné vazby mezi vláknem DNA a proteinem. Bergerat a kolegové našli v sekvenci SPO11 konzervovaný tyrozinový zbytek (konkrétně tyrozin 135), který se nacházel i v sekvenci topoizomerázy VI z archea; tento tyrozin se ukázal jako nezbytný pro tvorbu DSB pomocí SPO11. To podpořilo tvrzení, že SPO11 je homologem topoizomerázy VI, a že štěpí DNA na stejném principu jako topoizomerázy II (Topo VI je typ topoizomerázy II, který tvoří dvouvláknové zlomy) (Bergerat *et al*, 1997).

SPO11 se váže na 5' konec DNA pomocí molekuly tyrozinu a tvoří tak přechodný meziprodukt. Následně dojde k odpojení krátkých úseků DNA s navázaným SPO11 a ve vlákně vzniknou zlomy. Exonukleázovou aktivitou ve směru 5' \rightarrow 3' je generována jednovláknová DNA (ssDNA), na kterou se poté váží proteiny DMC1 a RAD51 (obr. 1) (Lange *et al*, 2016; a shrnutí v de Massy 2013). RAD51 a DMC1 jsou rekombinázy, nezbytné pro správný průběh savčí meiózy (Dai *et al*, 2017; Short *et al*, 2016). Tyto enzymy se vyskytují u většiny eukaryotických organismů a jsou zodpovědné za hledání homologních sekvencí při rekombinaci. DMC1 je aktivní pouze v pohlavních buňkách zatímco RAD51 hraje úlohu i v buňkách somatických (Shinohara *et al*, 1992; Tarsounas *et al*, 1999).



Obrázek 1: Vznik a oprava dvouvláknových zlomů DNA meiotickou rekombinací.

Převzato a upraveno z Lange *et al*, 2016.

Množství DSB se odvíjí od velikosti chromozomu. Menší chromozomy obsahují větší množství DSB, a tak zvyšují šanci, aby tyto chromozomy našly svého homologa a spárovaly se s ním (Lange *et al*, 2016). Faktory, které jsou pro vznik DSB nezbytné, jsou eliminovány ve chvíli, kdy dojde k formaci SC (tzn. ve chvíli, kdy chromozom našel svého homologa) a dojde tudíž k zastavení vzniku DSB. Menším chromozomům může trvat déle, než najdou svého homologa a tudíž budou déle indukovat tvorbu DSB (Lange *et al*, 2016; a shrnuto v Capilla *et al*, 2016).

Mechanismus, jakým SPO11 rozeznává metylované histony v hotspotech rekombinace, zatím není zcela objasněn. Není jisté, zda PRDM9 zůstává po metylaci H3K4 a H3K36 v místě hotspotu navázan na DNA a účastní se tak navádění SPO11 komplexu. Grey a kolegové navrhli model, kde PRDM9 nebo jím působené H3K4me3 a H3K36me3 zprostředkovávají kontakt místa rekombinace se SPO11 komplexem lokalizovaným na chromozomální ose (Grey *et al*, 2017). Baker a jeho kolegové zase poukazují na to, že PRDM9 aktivně tvoří v místě své vazby na DNA oblasti chudé na nukleozomy (NDR) a zároveň potvrdili, že tyto NDR oblasti indukované pomocí PRDM9 se shodují s oblastmi dvouvláknových zlomů DNA (Baker *et al*, 2014). Také u *Saccharomyces cerevisiae* bylo prokázáno, že SPO11 se preferenčně váže do NDR oblastí (Pan *et al*, 2011), kde je chromatinová struktura pro enzym SPO11 přístupnější. PRDM9 na histony umisťuje metylační značky spojené s otevřeným chromatinem (Baker *et al*, 2014), jeho funkcí tak může být rozvolnění chromatinu umožňující vazbu enzymu SPO11 a tím i vytvoření programovaných DSB.

1.1.1.2 Opravy dvouvláknových zlomů DNA

V pohlavních buňkách se během meiózy generuje mnoho DSB, a proto musí existovat mechanismus zajišťující jejich správnou opravu. Na rozdíl od somatických buněk je templátem pro opravy DSB homologní DNA. Výsledkem oprav DSB při rekombinaci může být *crossover* (CO), kdy dochází k reciproké výměně DNA mezi homologními chromozomy nebo častěji *noncrossover* (NCO), kdy k reciproké výměně nedochází (obr. 1). Oba tyto výstupy meiotické rekombinace mohou být spojeny s genovou konverzí. Jenom malá část DSB nacházejících se na chromozomech vyústí v CO (u myši a člověka jen kolem jedné desetiny), nicméně z hlediska zajištění správného rozchodu homologních chromozomů je nezbytná přítomnost minimálně jednoho CO na chromozom (shrnuto v Lange *et al*, 2016; Snustad *et al*, 2009).

1.1.1.2.1 Role metylace H3K36 v opravách pomocí HR u *Caenorhabditis elegans*

Metylace H3K36 se uplatňuje jak u časných fází oprav poškození DNA, tak i v pozdních fázích oprav DSB pomocí homologní rekombinace. Zde se uplatňuje H3K36me2 regulovaná pomocí JMJD-5. Gen *jmjd-5* se nachází u *Caenorhabditis elegans*, kde byl vliv této modifikace u pohlavních buněk také studován (Amendola *et al*, 2017). Potřeba *jmjd-5* pro udržení stability genomu v somatických buňkách, byla identifikována již dříve za využití

RNA interference (Pothof *et al.*, 2003). Existuje savčí homolog tohoto proteinu, JMJD5/KDM8, jehož nezbytnost byla prokázána pro vývoj embrya u myši, pro rozvoj rakoviny a pro mitotické dělení (He *et al.*, 2016; Oh a Janknecht, 2012). Různé práce poukazují na demetylázovou a hydroxylázovou aktivitu tohoto savčího proteinu, jeho katalytická aktivita je tudíž stále předmětem diskuze (Ishimura *et al.*, 2012; Oh a Janknecht, 2012; Del Rizzo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). JMJD-5 u *Caenorhabditis elegans* ovlivňuje úroveň H3K36me2 a je nezbytný pro opravy DSB cestou homologní rekombinace. *Jmjd-5* kóduje protein dlouhý 579 aminokyselin a řadí se do rodiny KDM8 proteinů. Bylo potvrzeno, že *jmjd-5* není pravděpodobně nutný pro časné fáze oprav DNA, neboť nebyly pozorovány změny v navádění RAD51 do míst DSB, naopak se účastní až postsynaptické fáze opravy (tj. až po navedení RAD51 na ssDNA přesahy v místě zlomu) a napomáhá dokončení homologní rekombinace. Ztráta *jmjd-5* vede ke zvýšení hladiny H3K36me2, nijak však neovlivňuje hladinu H3K36me a H3K36me3. Také se potvrdilo, že *jmjd-5* reguluje H3K36me2 převážně u pohlavních buněk a brání vzniku pozastavených rekombinačních meziproductů (dsDNA s navázaným RAD51; kdy pro úspěšné dokončení rekombinace je nutné, aby byl RAD51 v pozdním stádiu pachytene z vlákna odstraněn) (Amendola *et al.*, 2017).

1.1.1.3 Párování a dvouvláknové zlomy u pohlavních chromozomů

Párování chromozomů X a Y je mnohem náročnější než autozomů, neboť tyto chromozomy nejsou homologní po celé své délce a tudíž je mezi nimi málo fyzických propojení. Jedinou homologní oblastí u pohlavních chromozomů je pseudoautozomální oblast (PAR). Ke spárování gonozomů dochází v profázi později, než je tomu u autozomů. Jak již bylo zmíněno výše, pro homologní párování jsou nezbytné dvouvláknové zlomy. Jelikož jsou gonozomy X a Y homologní pouze v krátké oblasti PAR, musí na nich u heterogametického pohlaví vznikat více DSB než na autozomech, aby došlo k jejich úspěšnému spárování. Kauppi a kolegové dokázali, že DSB v PAR oblasti vznikají s odlišnou dynamikou než u autozomů. Přítomnost DSB sledovali prostřednictvím markerů RAD51/DMC1, což jsou proteiny vážící se na jednovláknové úseky DNA vzniklé 5' → 3' exonukleázovou aktivitou v místě zlomu. Přítomnost těchto markerů zaznamenali v pozdější fázi zygotene, než je tomu u autozomů. To může znamenat, že dvouvláknové zlomy se v PAR oblasti tvoří později nebo se na tyto zlomy později váží proteiny RAD51/DMC1 (Kauppi *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2016).

Jak již bylo zmíněno výše, u většiny savců jsou skoro všechna místa rekombinace závislá na PRDM9. U myši však byly v PAR oblasti nalezeny stejné hotspoty u *Prdm9*^{-/-} i *Prdm9*^{+/+} jedinců a stejné hotspoty se v PAR oblasti vyskytovaly také mezi jedinci s odlišnými alelami genu *Prdm9*. Odlišné alely mají jinou doménu zinkových prstů a jejich činností vznikají hotspoty v rozdílných místech. Z toho vyplývá, že u myši nejsou hotspoty v pseudoautozomální oblasti pohlavních chromozomů určovány PRDM9 a dochází zde k rekombinaci nezávisle na tomto enzymu (Brick *et al*, 2012). Nezávislost rozmístění hotspotů rekombinace na PRDM9 v této oblasti byla také potvrzena Powers a jejími kolegy sledováním výskytu H3K4me3 a H3K36me3 u *Prdm9*^{+/+} a *Prdm9*^{-/-} myši. Trimetylace H3K36 je závislá na PRDM9, překvapivě se však ve velmi malé míře nachází i u *Prdm9*^{-/-} jedinců. To naznačuje, že v PAR oblasti pohlavních chromozomů je trimetylace působená odlišným mechanismem nezávislým na PRDM9. Výskyt H3K36me3 v PRDM9 nezávislé oblasti potvrzuje důležitost této značky pro lokalizaci DSB a jejich opravy (Powers *et al*, 2016), jak je podrobněji rozvedeno v následující kapitole. U lidí bylo potvrzeno, že PRDM9 určuje místa rekombinace v PAR1 oblasti, což je jedna ze dvou PAR oblastí u lidí (Hinch *et al*, 2014), nicméně důležitost H3K36 metylace v rekombinaci lidských pohlavních buněk zůstává zatím otevřená.

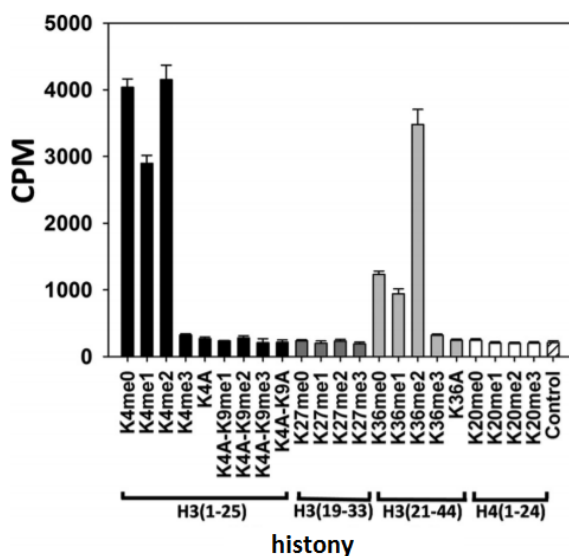
1.1.1.4 Epigenetické značky určující hotspoty rekombinace

Místa iniciace rekombinace jsou značena metylovými skupinami umístěnými na lysinech histonu 3, které zde u většiny savců umísťuje PRDM9. První známou metylací v místech rekombinace u savců byla trimetylace lysinu 4 na histonu 3 (H3K4me3) (Buard *et al*, 2009). Tato trimetylace se objevuje před vznikem DSB, nikoliv jako důsledek jejich vzniku či oprav. Při testování metylační aktivity enzymu PRDM9 se ukázalo, že tato metyltransferáza je schopná kromě metylace H3K4 metylovat i H3K36 (Brick *et al*, 2012; Buard *et al*, 2009; Wu *et al*, 2013).

1.1.1.4.1 H3K36me3 v hotspotech rekombinace

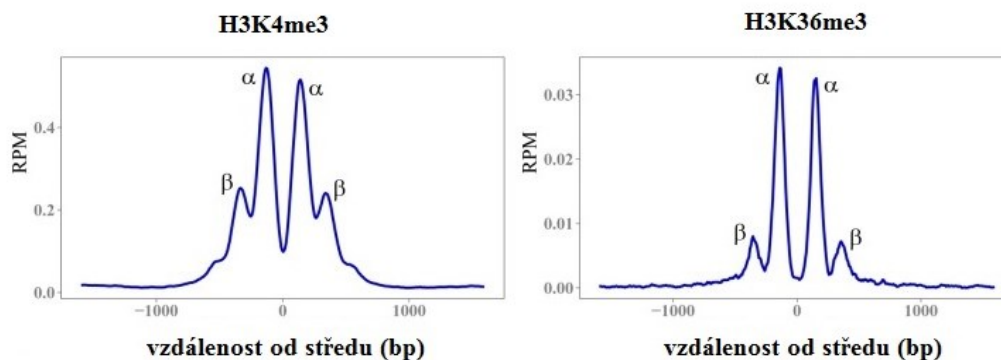
Schopnost PRDM9 metylovat H3K36 byla nejprve potvrzena v několika studiích *in vitro*, kdy byla nejprve testována samostatná PR/SET doména a následně i celý PRDM9 protein. Bylo prokázáno, že PRDM9 metyluje nemetylovaný, monometylovaný i dimetylovaný H3K36, ale nejvyšší specifitu enzym vykazoval pro dimetylovaný substrát (obr. 2) (Eram *et al*, 2014; Powers *et al*, 2016).

PRDM9 trimetyluje H3K36



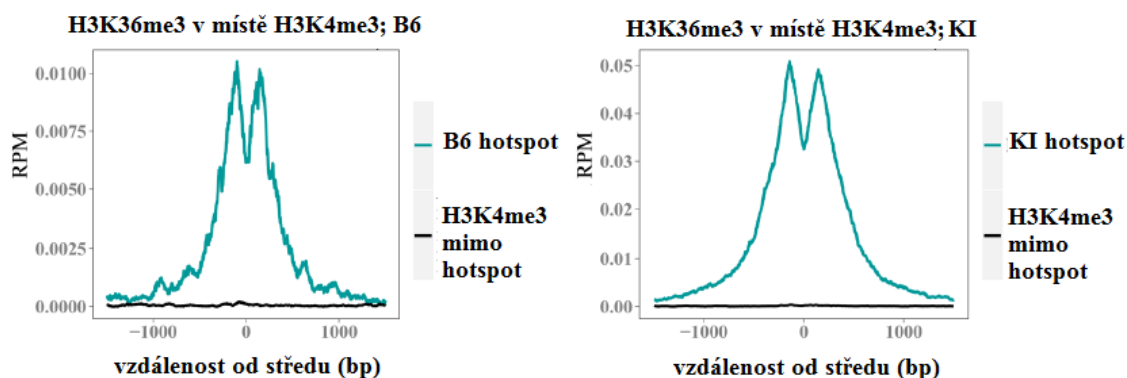
Obrázek 2: Schopnost PRDM9 metylovat různé substráty *in vitro*, byla zkoumána chemickou analýzou založenou na sledování množství radioaktivně značených metylových skupin inkorporovaných působením PRDM9 na jednotlivé histony. Na ose y je v jednotkách *counts per minute* (CPM) vyjádřena míra detekovaného ionizujícího záření za minutu. Převzato a upraveno z Eram *et al*, 2014.

Podrobnější informace o trimetylaci lysinu 36 na histonu 3 byly získány pomocí metody ChIP-seq s použitím specifické H3K36me3 protilátky. Touto metodou se nejprve z myších spermatocytů izolovaly pomocí chromatinové immunoprecipitace (ChIP) krátké úseky DNA, které byly v kontaktu s metylovaným H3K36me3 histonem. Tyto fragmenty byly následně sekvenovány. Data z H3K36me3 ChIP-seq (Powers *et al*, 2016) byla dále porovnávána s daty z H3K4me3 ChIP-seq (Baker *et al*, 2014). V oblastech promotorů, pro které je typické větší množství H3K4me3, nedocházelo k nárůstu H3K36me3. Naopak v místech hotspotů rekombinace známých pro myší kmen B6 byl patrný nárůst H3K36me3 a zároveň H3K4me3, a to jak v oblastech genů, tak i mimo ně. Z toho můžeme usuzovat, že PRDM9 trimetyluje H3K36 v místech rekombinace *in vivo*. Porovnáním dat z ChIP-seq metod, kdy křivka pro H3K4me3 a H3K36me3 měla velmi podobný tvar a zároveň vzdálenost mezi jednotlivými α a β vrcholy křivky byla velmi podobná, vyvodili, že tyto trimetylace se vyskytují na stejném nukleosomu (obr. 3). Navíc je z grafu patrné, že PRDM9 je schopen kromě nejbližšího nukleosomu (α) trimetylovat H3K36 i na nukleosomu sousedním (β), i když s nižší efektivitou než H3K4 (Powers *et al*, 2016).



Obrázek 3: Nárůst H3K4 a H3K36 trimetylace v místech rekombinačních hotspotů ve spermatocytech myši kmene B6. Centrum hotspotu obsahující 36 bp dlouhé vazebné místo PRDM9 je v grafu umístěno na ose x v bodě 0. Píky α a β znázorňují trimetylaci příslušného lysinu na daném nukleozomu. Na ose y je vyjádřena míra trimetylace příslušného lysinu histonu 3 v RPM (*reads per million*). Převzato a upraveno z Powers *et al*, 2016.

Sledováním výskytu H3K36me3 a H3K4me3 v hotspotech a mimo ně byl ve varletech zjištěn společný výskyt obou trimetylací pouze v místech rekombinačních hotspotů (obr. 4). Imunoprecipitací H3K4me3 z *Prdm9^{+/+}* a *Prdm9^{-/-}* myši a následnou detekcí H3K4me3 a H3K36me3 pomocí specifických protilátek bylo ověřeno závislost přítomnosti obou epigenetických značek na jednom nukleozomu na PRDM9 (Powers *et al*, 2016).



Obrázek 4: Výskyt H3K36me3 a H3K4me3 v oblastech uvnitř hotspotů a oblastech mimo hotspoty rekombinace u spermatocytů myších kmenů B6 a B6-*Prdm9^{CAST}* (KI), které se liší místy hotspotů rekombinace. Osa x je jako v obr. 3. Na ose y je vyjádřena míra společné trimetylace H3K4 a H3K36 v RPM (*reads per million*). Převzato a upraveno z Powers *et al*, 2016.

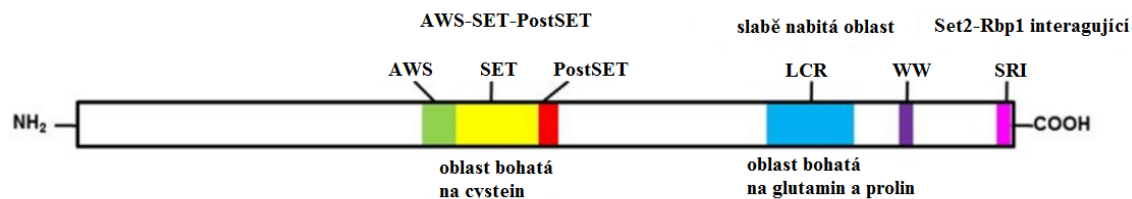
1.2 Role H3K36 metylace v somatických buňkách

Jak již bylo zmíněno, H3K36 trimetylace má v somatických buňkách širokou škálu využití. Role této histonové modifikace byla prokázána kromě regulace transkripce a alternativního sestřihu také v procesech spojených s opravami DNA při replikaci či rekombinaci (Li *et al*, 2013; a shrnuto v Wagner a Carpenter 2012). Klíčovým enzymem účastnícím se těchto DNA opravných procesů je SETD2 histon-metyltransferáza (Pfister *et al*, 2014); jejím funkcím a jí tvořeným epigenetickým modifikacím bude věnována následující kapitola.

1.2.1 SETD2 histon-metyltransferáza

SETD2 (angl. *SET domain containing 2*) neboli také HYPB (angl. *huntingtin-interacting protein B*) se řadí mezi metyltransferázy využívající S-adenosylmetionin k přenesení metylu na lysin či arginin. Pro metyltransferázy specifické pro H3K36 je společným znakem přítomnost evolučně konzervované SET domény (130 aminokyselin dlouhý řetězec) s metyltransferázovou aktivitou; liší se však doménou, pomocí které rozeznávají místa chromatinu (Huang *et al*, 1998; a shrnuto v Ruthenburg *et al*, 2007; Wagner a Carpenter 2012).

Při analýze lidského proteinu HYPB byly nalezeny dvě konzervované oblasti, a to SET doména s přilehlou AWS a PostSET doménou, které jsou bohaté na cystein a pravděpodobně mají metyltransferázovou aktivitu, a WW doména poblíž C konce, která je zodpovědná za interakce mezi proteiny (obr. 5). Porovnáním sekvence proteinu HYPB s databází známých proteinů byla odhalena podobnost HYPB se SET2 proteinem, H3K36 metyltransferázou u *Saccharomyces cerevisiae* (Strahl *et al*, 2002). Podobnost mezi oběma metyltransferázami byla nalezena jak u SET, tak i WW domény (Sun *et al*, 2005b), z čehož lze vyvodit, že tyto proteiny jsou funkčními homology. Sun a kolegové také *in vitro* potvrdili metyltransferázovou aktivitu HYPB proteinu, jeho specifitu pro metylaci H3K36 a schopnost metylovat sám sebe. Byla také prokázána interakce mezi HYPB proteinem a hyperfosforylovanou RNA polymerázou II (Sun *et al*, 2005b).



Obrázek 5: Schematické znázornění struktury SetD2. Převzato a upraveno z Yi *et al*, 2015.

Bannister a jeho kolegové byli první, kdo analyzovali metylaci H3K36 (mono-, di-, i trimetylaci) v genech živočichů, konkrétně kuřete. Na rozdíl od trimetylovaného H3K4, který se vyskytuje v promotorech na 5' konci aktivně transkribovaných genů, potvrdili výskyt H3K36me2 a H3K36me3 zejména ve 3' oblastech těchto genů (Bannister *et al*, 2005; Schneider *et al*, 2004). Také se podařilo identifikovat myši homolog lidského HYPB/SETD2, gen *Setd2*. V genech buněčné linie myších fibroblastů je SETD2, stejně jako jeho kvasinkový homolog, zodpovědný za H3K36me3 v transkripčně aktivních oblastech. SETD2 zde během elongace transkripce interaguje s polymerázou. Po vyřazení *Setd2* z funkce došlo v buňkách myších fibroblastů k dramatickému snížení H3K36me3 na 3' koncích transkripčně aktivních genů, ale hladina H3K36me2 a H3K36me1 zůstala nezměněna. *Setd2* byl tudíž označen za gen pro metyltransferázu nezbytnou pro trimetylaci H3K36 a mající u myši význam pro regulaci transkripce (Edmunds *et al*, 2008).

1.2.2 H3K36 metylace se účastní oprav DNA pomocí MMR

Li a jeho kolegové zkoumali roli trimetylace H3K36 v opravách chybného párování bází a opravách inzercí či delecí vzniklých během replikace DNA (tzv. DNA *mismatch repair* - MMR) v lidských HeLa buňkách. Oblast chybného párování je v lidských buňkách rozeznávána proteiny hMutS α (heterodimer hMSH2 a hMSH6) a hMutS β (heterodimer hMSH2 a hMSH3). Protein hMutS α obsahuje PWWP doménu (pojmenována podle své centrální sekvence prolin-tryptofan-tryptofan-prolin); schopnost vazby této domény na H3K36 byla testována pro nemodifikovaný, mono-, di-, a trimetylovaný lysin 36. Nejsilnější interakce byla nalezena mezi PWWP doménou a H3K36me3, hMutS α je tudíž schopen rozeznávat výše zmíněnou epigenetickou značku (je to tzv. reader H3K36me3). Dalším důkazem pro důležitost H3K36me3 v rozmístění hMutS α na chromatinu byl snížený výskyt hMutS α v buňkách neobsahujících SETD2. Li a kolegové tímto prokázali význam H3K36me3 a SETD2 metyltransferázy pro MMR *in vivo* (Li *et al*, 2013). KDM4 je skupina

lysinových demetyláz, tedy proteinů odstraňujících z lysinu metylovou skupinu. Tato skupina zahrnuje pět proteinů, z nichž KDM4A, KDM4B a KDM4C se uplatňují v demetylaci H3K36me2 a H3K36me3 (Awwad a Ayoub, 2015). Protože bylo prokázáno, že H3K36me3 se uplatňuje v navedení hMutSα na chromatin (Li *et al*, 2013), Awwad a jeho kolegové se zaměřili na roli KDM4 demetyláz v MMR u lidských buněk. Sledovali hladinu H3K36me3 v buňkách s nadměrnou expresí KDM4A-C a pozorovali zde snížení H3K36me3. Tím bylo potvrzeno, že zvýšená exprese KDM4A-C ovlivňuje MMR. V přítomnosti nadměrného množství KDM4A-C se v důsledku defektní MMR zvýšila frekvence výskytu spontánních mutací až tisíckrát. Vliv demetylační aktivity KDM4 na MMR byl také potvrzen tím, že v buňkách obsahujících mutantní KDM4C bez demetylační aktivity byla frekvence výskytu mutací přibližně sedmkrát nižší než v buňkách s nemutantní KDM4C. Stejně zvýšená hladina exprese KDM4A-C, jakou využili ve svých experimentech, se vyskytuje i u buněk adenokarcinomu prsu. Protože se snížením exprese KDM4C opět obnovil správný průběh MMR a frekvence výskytu spontánních mutací se přibližně dvacetšestkrát snížila v porovnání s buňkami s nadměrnou expresí KDM4C, vyvstává otázka, zda by se pomocí inhibitoru KDM4C nemohla obnovit správnost MMR oprav u nádorových buněk a tím například změnit citlivost těchto buněk k protinádorové léčbě (Awwad a Ayoub, 2015).

1.2.3 H3K36 metylace v opravách DSB

Dvouvláknové zlomy v DNA mohou být opraveny pomocí homologní rekombinace (HR), která je schopná přesně obnovit původní sekvenci, k čemuž potřebuje sekvenci homologní, nebo pomocí nehomologního spojení konců DNA (NHEJ), kdy dojde přímo ke spojení poškozených konců bez nutnosti homologní sekvence. V buňkách savců je většina DSB opravena pomocí NHEJ (Fattah *et al*, 2010). Epigenetické modifikace chromatinu hrají významnou roli při rozhodnutí, jakým způsobem bude DSB opraven (Aymard *et al*, 2014) a jsou i významné pro úspěšný průběh jeho opravy.

1.2.3.1 H3K36me3 určuje, zda dojde k opravě DSB pomocí HR nebo NHEJ

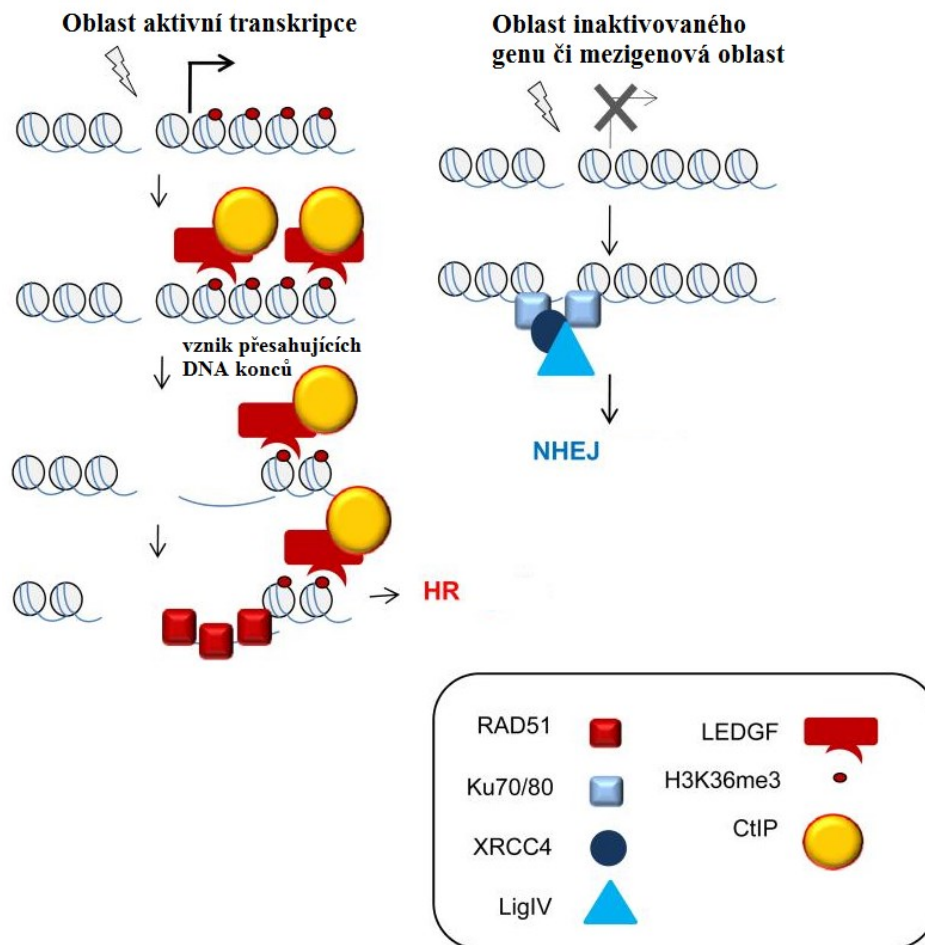
Po indukci dvouvláknových zlomů DNA může vznikat řada meziproductů v závislosti na tom, zda jsou DSB opraveny pomocí dráhy NHEJ nebo HR (shrnutí v Hartlerode a Scully 2009). To, jaká cesta opravy DSB bude zvolena je dáno tím, jaké proteiny se do místa DSB preferenčně váží. Zda jsou to proteiny napomáhající HR, např. CtIP, MRE11 nebo proteiny umožňující NHEJ, např. Ku heterodimer (Aymard *et al*, 2014; Fattah *et al*, 2010; Sartori *et al*,

2007). V této kapitole bude rozebrán mechanismus určující jaké z proteinů účastnících se oprav poškození DNA se do míst DSB váží.

Sledováním výskytu klíčových proteinů HR (RAD51) a NHEJ (XRCC4) dráhy v místě poškození DNA u buněk v G1 a G2 fázi buněčného cyklu se ukázalo, že RAD51 se v místě DSB více vyskytoval v G2 fázi, zatímco XRCC4 se vyskytoval v místech DSB se stejnou mírou v obou fázích cyklu. To naznačuje, že DSB jsou v G1 fázi přednostně opravovány pomocí NHEJ dráhy, zatímco v G2 fázi mohou být DSB opravovány oběma mechanismy (Aymard *et al*, 2014). DSB, kam se po částečném odbourání jednoho z vláken na 3' přesahující ssDNA konec váže RAD51, jsou opravovány pomocí HR a nejsou nijak ovlivňovány přítomností či nepřítomností XRCC4 a naopak DSB, kde nedochází k vazbě RAD51 jsou při opravách závislé na přítomnosti XRCC4. Protože způsob opravy je zásadně ovlivněn vazbou zmíněných proteinů do míst poškození DNA, je nasnadě, že to, zda dojde k HR či NHEJ, je ovlivněno genetickými a epigenetickými faktory. Trimetylace H3K36 se hojně vyskytuje v oblastech aktivní transkripce (Edmunds *et al*, 2008; Kolasinska-Zwierz *et al*, 2009) a tato epigenetická značka napomáhá v navedení RAD51 do míst DSB (Pfister *et al*, 2014). DSB v transkripčně aktivních místech jsou tudíž preferenčně opraveny pomocí HR. Snížení hladiny H3K36me3 zapříčiněné poklesem exprese SETD2 metyltransferázy pomocí siRNA vedlo ke snížení výskytu RAD51 v místech DSB a s tím i úbytku jejich oprav pomocí HR. H3K36me3 je rozeznávána pomocí proteinu LEDGF (angl. *lens epithelium-derived growth factor*, standardní název PSIP1), který se pomocí své PWWP domény váže na H3K36me3. Tento protein navádí k DSB endonukleázu CtIP (angl. *C-terminal binding protein interacting protein*), která odbourává vlákna DNA v místě zlomu od 5' konce, tudíž vzniknou 3' přesahující konce, na které se může vázat RAD51 a RPA (angl. *replication protein A*). V nepřítomnosti H3K36me3 se snižuje hladina CtIP navedených do míst DSB a ve výsledku dochází k opravě pomocí varianty NHEJ, tzv. mikrohomologií řízeného spojení konců (MMEJ) namísto HR. Umožnění vzniku 3' přesahujících konců nutných pro homologní rekombinaci je další významnou úlohou H3K36me3 (Eidahl *et al*, 2013; Pfister *et al*, 2014).

Teprve po vytvoření ssDNA konců může dojít k navázání RAD51 a k opravě zlomu pomocí HR (obr. 6) (Aymard *et al*, 2014). U kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* má metylace H3K36 v určování způsobu opravy DSB odlišnou roli. Metylace vzniklá působením Set2 zde snižuje přístupnost chromatinu a brání vzniku ssDNA přesahujících konců v místech DSB, čímž zde upřednostňuje NHEJ. Kromě toho navádí do míst poškození DNA protein Ku,

který napomáhá opravě zlomu pomocí NHEJ (Pai *et al*, 2014). U *Schizosaccharomyces pombe* je způsob opravy DSB také regulován buněčným cyklem. NHEJ se uplatňuje během G1 fáze cyklu, HR naopak během S a G2 fáze (Ferreira a Cooper, 2004). V závislosti na tom se modifikuje i H3K36; metylace H3K36 se objevuje v G1 fázi, zatímco acetylace H3K36, která působí rozvolnění chromatinu a podporuje HR, je přítomna během S/G2 fáze buněčného cyklu (Pai *et al*, 2014).



Obrázek 6: Určení způsobu opravy DSB pomocí trimethylace H3K36. Aktivně transkribované geny obsahují epigenetickou značku H3K36me3 a jsou preferenčně opraveny pomocí HR. Převzato a upraveno z Aymard *et al*, 2014.

1.2.3.2 Role H3K36me3 při HR v somatických buňkách

Homologní rekombinace zajišťuje udržení genomové stability pomocí přesné opravy DSB za využití homologní sekvence jako templátu. Kroky homologní rekombinace při opravách DNA v somatických buňkách jsou stejné jako v meiotické rekombinaci germinálních buněk. Tedy po iniciaci pomocí tvorby dvouvláknových zlomů DNA následuje úprava konců DNA za vzniku jednořetězcových ssDNA úseků s 3'přesahujícími konci. Následuje vazba RAD51 rekombinázy na ssDNA konce a invaze vláken do homologní sekvence za vzniku DNA meziprojektu obsahujícího D-smyčku. Poté dochází k prodloužení 3'konců DNA pomocí DNA polymerázy podle templátové homologní sekvence a vzniku dvou překřížených vláken tzv. Hollidayovy struktury. Tato struktura je dále procesována za vzniku produktů s *noncrossoverem* či *crossoverem* (shrnutí v San Filippo *et al*, 2008).

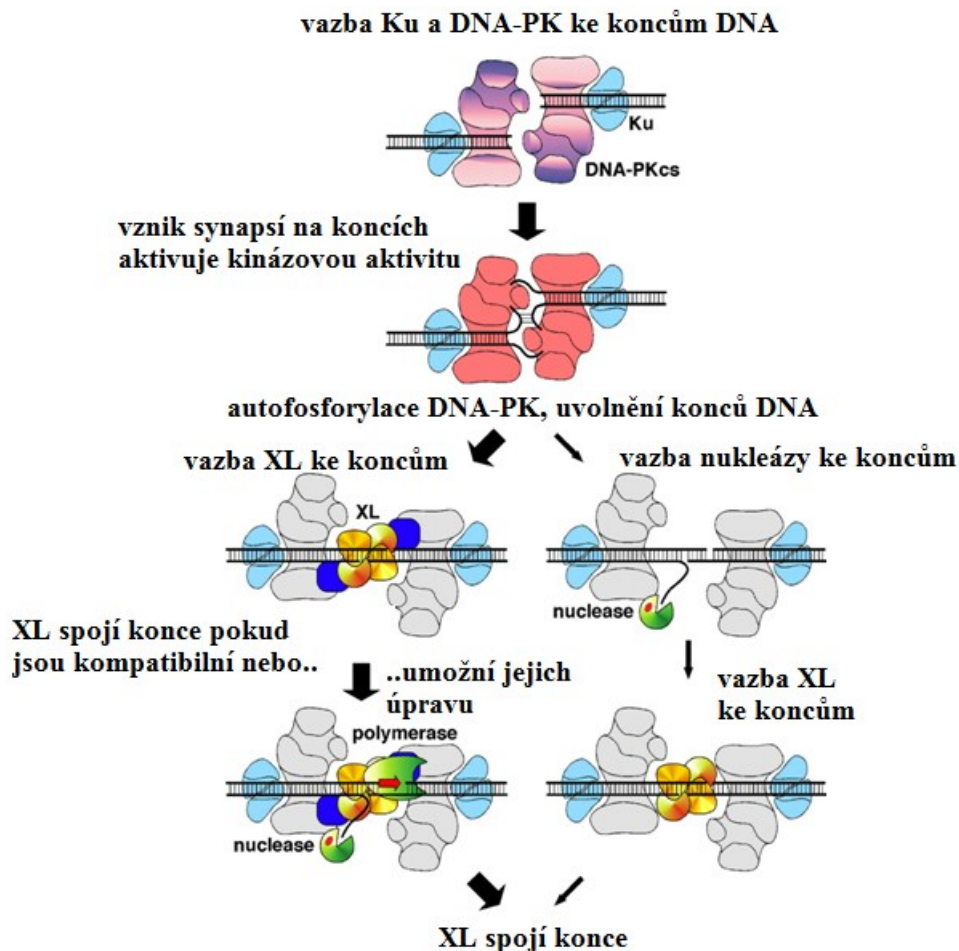
Důležitou roli zde hraje opět SETD2 metyltransferáza. Pfister s kolegy prokázali na lidských buňkách, že histonové modifikace katalyzované tímto enzymem napomáhají navádět do míst DSB faktory nutné pro opravu DNA pomocí homologní rekombinace. Porovnávali výskyt γ H2AX (histon H2AX fosforylovaný na serinu) a proteinu RAD51 u buněk s funkčním SETD2 a buněk, u kterých byla snížena exprese *SETD2* pomocí siRNA. γ H2AX se nachází v místech dvouvláknových zlomů DNA a využívá se jako marker pro jejich lokalizaci. V místě poškození DNA dochází k výskytu γ H2AX v řádu několika minut (Lukas *et al*, 2011; Rogakou *et al*, 1998, 1999). U buněk bez funkční SETD2 metyltransferázy se nacházelo výrazně více γ H2AX a zároveň byla v těchto buňkách výrazně nižší hladina RAD51, z čehož vyplývá, že SETD2 je důležitý pro úspěšné opravy DSB. Kromě toho také sledovali hladinu H3K36me3 u jedinců s funkčním *SETD2* a bez funkčního *SETD2* genu. U jedinců bez aktivního *SETD2* byla hladina H3K36me3 výrazně nižší. Z těchto dat vyplývá, že H3K36me3 zprostředkovaná metyltransferázovou aktivitou SETD2 je nezbytná pro navedení RPA a RAD51 do míst dvouvláknových zlomů DNA a úspěšný průběh opravy DSB pomocí homologní rekombinace (Pfister *et al*, 2014). V buňkách bez SETD2 byla míra výskytu homologní rekombinace snížena asi na ~50 % (Carvalho *et al*, 2014).

1.2.3.3 Role metylace H3K36 při opravách pomocí nehomologního spojení konců

Mechanismus oprav pomocí nehomologního spojení konců (NHEJ) je nezbytný nejen pro opravy patologických DSB, ale i fyziologických DSB vzniklých během V(D)J rekombinace (shrnutí v Lieber 2010). V opravách pomocí NHEJ se uplatňuje SETMAR, fúzní protein s metyltransferázovou aktivitou, a jím působená H3K36me2, která napomáhá

navádět komponenty NHEJ opravného systému ke zlomům v DNA (Fnu *et al*, 2011; Lee *et al*, 2005). Po vzniku DSB se jako první na DNA váže heterodimer Ku (Ku70/Ku80), který zde plní několik funkcí. Po vazbě k DNA změní svou konformaci a teprve poté se mohou na DNA vázat pro opravy nezbytné enzymy jako jsou nukleáza, polymeráza a ligáza. Ku-DNA komplex k sobě může navádět tyto enzymy v jakémkoliv pořadí, což vede k tomu, že mohou z daného místa po opravě vzniknout odlišné produkty (shrnutí v Lieber 2008). Důležitost přítomnosti Ku heterodimeru byla dokázána tím, že při jeho absenci se velmi snížila hladina oprav pomocí NHEJ. Významnou funkcí Ku heterodimeru je zejména to, že snižuje degradaci konců DNA tím, že na ně navádí specifickou na DNA závislou protein kinázu (DNA-PK). Existuje i alternativní cesta opravy pomocí NHEJ v nepřítomnosti Ku, která zahrnuje vznik krátkých delecí v místech mikrohomologie (MMEJ) (Ma *et al*, 2003). Ku heterodimer je určitě důležitým faktorem v NHEJ, jelikož je tato dráha v jeho nepřítomnosti mnohem méně efektivní (Feldmann *et al*, 2000). V navádění Ku do míst DSB se uplatňuje H3K36me2, jak je podrobněji popsáno níže (Fnu *et al*, 2011).

DNA-PK je 470 kDa velký protein, který je naváděn k DSB Ku heterodimerem (Pospiech *et al*, 2001) a tvořící komplex s endonukleázou Artemis *in vitro* i *in vivo*. DNA-PK k sobě přiblíží konce DNA, čímž dojde ke kinázové aktivitě enzymu (obr. 7) (Yoo *et al*, 1999). Tato kinázová aktivita slouží k translokaci Ku heterodimeru podél DNA helixu a k fosforylaci sebe sama a endonukleázy Artemis. Pokud je její kinázová aktivita oslabena, je komplex DNA-PK-Ku zablokovaný na DNA koncích a tato DNA nemůže podstupovat další úpravy, jako je polymerace, degradace či ligace DNA. Fosforylací aktivovaná Artemis se svou endonukleotickou aktivitou podílí na úpravě 5' a 3' přesahujících konců a je nezbytná pro úspěšnou opravu DSB vzniklých ionizujícím zářením (Calsou *et al*, 1999; Ma *et al*, 2002).



Obrázek 7: Mechanismus NHEJ. Úprava konců před ligací závislá na XL je zobrazena vpravo, úprava pomocí nukleázy nezávisle na XL je zobrazena vlevo. Převzato a upraveno z Budman et al. 2007.

DNA-PK také aktivuje komplex DNA ligáza IV/XRCC4 (XL) a navede ho na DNA. Pro ligaci vláken DNA jsou *in vivo* nezbytné jak XRCC4, tak DNA ligáza IV. U kompatibilních konců DNA dojde okamžitě k jejich ligaci, u nekompatibilních konců dojde nejprve k jejich upravení (obr. 7) (Budman *et al*, 2007).

Význam metylace H3K36 pro NHEJ byl studován pomocí ChIP na speciálně upravené línii lidských buněk (HT1904) s preferenčním vznikem jediného DSB v přesně definované oblasti, který byl opravován pomocí NHEJ (Fnu *et al*, 2011). Gen *SETMAR* (jiný název Metnase), vznikl fúzí genu pro SET metyltransferázu a transposázového genu mobilního elementu a vyskytuje se pouze u vyšších primátů (Cordaux *et al*, 2006). Protein SETMAR vykazuje schopnost dimetylovat H3K36 a s menší účinností i H3K4 *in vitro*. Zároveň bylo potvrzeno, že hraje důležitou roli v opravách pomocí NHEJ a je zde důležitá jeho SET

doména (Lee *et al*, 2005). Transposázová doména proteinu SETMAR napomáhá integraci cizorodé virové DNA do hostitelského genomu, což bylo potvrzeno tím, že nadprodukce SETMAR vedla ke zvýšení integrace HIV cirkulární DNA do genomu lidských HEK293 buněk (Williamson *et al*, 2008).

Byla prokázána interakce mezi proteinem SETMAR a DNA ligázou IV, která je důležitou součástí opravného systému NHEJ. SETMAR podporuje NHEJ u všech typů konců vláken DNA (tj. 5' přesahujících, 3' přesahujících i tupých konců) s tím, že největšího efektu bylo dosaženo u 5' přesahujících konců. Tento fakt společně s interakcí SETMAR s DNA ligázou IV podporuje domněnku, že SETMAR podporuje opravu DSB pomocí NHEJ (Hromas *et al*, 2008). Dále bylo prokázáno, že SETMAR fyzicky interaguje s PRPF19 (jiný název human PSO4), který je nezbytný pro navedení enzymu SETMAR do míst dvouvláknových zlomů u člověka (Beck *et al*, 2008). PRPF19 je nezbytný pro opravy DSB, jelikož snížením jeho exprese pomocí siRNA docházelo k nahromadění DSB v buňkách, k apoptóze a ke sníženému přežívání buněk po poškození DNA (Mahajan a Mitchell, 2003).

Při studiu H3K36me2 u linie buněk HT1904 byl potvrzen výskyt H3K36me2, proteinu SETMAR a dalších součástí opravného systému v místech DSB pomocí ChIP i kvantitativní PCR. Dimetylovaný H3K36 se nachází pouze v těsné blízkosti DSB a míra výskytu SETMAR v místech DSB koreluje s mírou H3K36me2. Schopnost SETMAR dimetylovat H3K36 byla také ověřena testováním proteinu SETMAR s mutantní SET doménou, kdy v buňkách nedocházelo k hromadění H3K36me2. Proteinem SETMAR způsobená H3K36me2 napomáhá navedení Ku70 a NBS1 (angl. *nijmegen breakage syndrome 1*), proteinů NHEJ opravného systému, do míst DSB. Zvýšením hladiny SETMAR proteinu, s čímž souvisí i zvýšení hladiny H3K36me2, se zvýšila hladina proteinů Ku70 a NBS1 v místech DSB. Naopak pokles hladiny proteinu SETMAR zapříčinil snížení hladiny proteinů Ku70 a NBS1 v místech dvouvláknových zlomů DNA. Vazba Ku70 v místech DSB následně navádí do těchto míst další komponenty opravného systému a tím je umožněna oprava těchto DSB pomocí NHEJ (Fnu *et al*, 2011).

1.3 Role metylace H3K36 při vzniku rakoviny

Aby nedošlo v organismu k propuknutí rakoviny, je nutné, aby byla všechna poškození DNA správně opravena a v buňkách se nehromadily mutace, a to hlavně v protoonkogenech (geny podporující dělení buňky, jejichž porušení má vliv na maligní transformaci buňky) či nádorových supresech. Nádorový supresor je gen, který svou funkcí negativně ovlivňuje dělení buněk a chrání je tak před propuknutím a rozvojem rakoviny. Jeho mutace či delece je důležitým krokem při vzniku nádorů. Roli nádorových supresorů plní i v této práci zmíněné metyltransferázy, a to SETD2 i metyltransferázy rodiny NSD (NSD1, NSD2 a NSD3) (Dalgliesh *et al*, 2010; Ezponda *et al*, 2013; Jaju *et al*, 2001). Pro přesné opravení DSB je využívána homologní rekombinace, pro niž je nezbytná SETD2 metyltransferáza a jí působená H3K36me₃, jak bylo popsáno v kapitole 1.2.3.1 a 1.2.3.2 (Pfister *et al*, 2014). Význam ztráty či mutací SETD2 spojených se změnami hladiny H3K36me₃ byl pozorován u rakoviny ledvin (Dalgliesh *et al*, 2010), akutní a chronické leukémie (Parker *et al*, 2016; Zhu *et al*, 2014) a v gliomech mozku (Fontebasso *et al*, 2013), což potvrzuje význam funkční SETD2 metyltransferázy v zabránění vzniku rakoviny.

První zmínka o SETD2 v souvislosti s rakovinou je z roku 2010, kdy Dalgliesh a jeho kolegové identifikovali inaktivační mutaci u SETD2 v ccRCC (angl. *clear cell renal cell carcinoma*), což je nejčastější nádor ledvin dospělých. Inaktivační mutace vede ke snížení hladiny H3K36me₃. Tento objev inaktivační mutace v metyltransferáze upozornil na důležitost mutací v proteinech, které se podílejí na modifikaci chromatinu, pro rozvoj lidské rakoviny (Dalgliesh *et al*, 2010; Duns *et al*, 2010). Buňky, ve kterých se vyskytuje mutantní SETD2, nejsou schopny aktivovat opravný mechanismus v případě poškození DNA. Právě chyby v opravách DNA vedoucí k nestabilitě genomu jsou typickým znakem pro nádorové buňky s mutacemi v SETD2 (Carvalho *et al*, 2014; Pfister *et al*, 2014). Později bylo také prokázáno, že mutací *SETD2* dochází ke změně rozložení H3K36me₃, což vede k odlišnému alternativnímu sestřihu RNA a vzniku jiných sestřihových variant než je tomu u buněk s nemutantním *SETD2* genem (Ho *et al*, 2016). Mutace v SETD2 ovlivňují také rozvoj akutní myeloidní leukémie (AML). Tyto mutace vedou u metyltransferázy ke ztrátě její funkce a tudíž ke snížení hladiny H3K36me₃ v leukemických buňkách. Studium role SETD2 ve vývoji leukémie u myši bylo prokázáno, že snížením exprese SETD2 (SETD2 knockdown) došlo k urychlení vývoje leukémie a ke vzniku jejího vážnějšího fenotypu (Zhu *et al*, 2014). Kromě AML byly mutace v *SETD2* nalezeny i v případě chronické lymfatické leukémie

(Parker *et al*, 2016), což potvrdilo roli SETD2 jako nádorového supresoru a důležitost H3K36me3 ve vývoji leukémie.

První zmínka o roli PRDM9 v souvislosti s onemocněním u člověka byla učiněna v roce 2013 Hussin a jejími kolegy. Ti našli spojitost mezi vzácnějšími alelami *PRDM9* a dětskou akutní lymfatickou leukémií (ALL). Bylo potvrzeno, že na rozvoj ALL u dětského pacienta má vliv druh alely *PRDM9* vyskytující se u jeho rodičů. Pokud v germinálních buňkách jednoho z rodičů byla nalezena pro danou populaci vzácná alela *PRDM9*, a tudíž byly hotspoty meiotické rekombinace lokalizovány v netypických místech, vedlo to u potomka k nestabilitě genomu a k rozvoji ALL. Hussin s kolegy předpokládali, že PRDM9 může být zodpovědný za translokace nalezené u leukemických buněk (Hussin *et al*, 2013). Později byla provedena ještě jedna studie na potvrzení vlivu vzácných alel *PRDM9* na dětskou ALL, ale v případě obou prací bylo k dispozici jen malé množství dat, a proto je třeba výsledky ještě ověřit na větším počtu pacientů (Hussin *et al*, 2013; Woodward *et al*, 2014).

Roli nádorových supresorů u různých typů rakovin plní i proteiny rodiny NSD. Metyltransferáza NSD1 se uplatňuje například u akutní myeloidní leukémie (Jaju *et al*, 2001) a při rozvoji neuroblastomů (Berdasco *et al*, 2009). NSD3 je spojena s rakovinou prsu, v jejichž buňkách byla tato metyltransferáza i poprvé popsána (Angrand *et al*, 2001) a zároveň stejně jako NSD1 se uplatňuje také u akutní myeloidní leukémie (Rosati *et al*, 2002). A v neposlední řadě nadměrná exprese NSD2 je spojena s rakovinou prostaty (Ezponda *et al*, 2013).

Závěr

V této bakalářské práci byl popsán význam metylace H3K36 v opravách poškození DNA a v určování rozmístění programovaných dvouvláknových zlomů v průběhu meiotické rekombinace. Methylace H3K36 je katalyzována několika různými metyltransferázami. Jednou z metyltransferáz je PRDM9, která se účastní lokalizace hotspotů meiotické rekombinace a jejíž výskyt byl potvrzen u několika savčích druhů, a která je kromě metylace H3K4 schopna i mono-, di- a trimethylace H3K36. Trimethylace H3K36 a H3K4 se společně vyskytuje pouze v místech hotspotů rekombinace, H3K36me₃ se tak spolupodílí na jejich určení. PRDM9 je důležitý pro úspěšný průběh meiózy a laboratorní myši bez tohoto proteinu jsou sterilní. Pro meiotickou rekombinaci je nutný vznik programovaných dvouvláknových zlomů indukovaných enzymem SPO11. Tento enzym potřebuje pro svou funkci rozvolněný chromatin. Otevření chromatinu může být způsobeno právě umístěním metylových skupin na některá místa histonů (H3K4me₃, H3K36me₃). Otázkou zatím zůstává, zda PRDM9 po trimethylaci H3K4 a H3K36 zůstává navázán na chromatin a podílí se na navedení SPO11 do místa rekombinace nebo je SPO11 komplex schopen rozeznat hotspot místo pouze na základě společné přítomnosti H3K4me₃ a H3K36me₃. Schopnost PRDM9 trimetylovat H3K36 byla zjištěna teprve v nedávné době, a tudíž bude zajímavé zjistit, zda se H3K36me₃ uplatňuje pouze při určení hotspotů meiotické rekombinace a při navedení SPO11 komplexu k místu DSB anebo zda se uplatňuje i v opravách DSB jako je tomu v somatických buňkách. Tedy zda dochází na H3K36me₃ místech v hotspotech k vazbě LEDGF, který sem následně navádí další komponenty opravného systému vedoucí k homologní rekombinaci.

Druhou významnou H3K36 metyltransferázou je SETD2, která je kromě své schopnosti trimetylovat H3K36 neopomenutelným nádorovým supresorem u člověka. H3K36me₃ působená SETD2 hraje důležitou roli v opravách chybného párování bází, vzniklého při replikaci DNA, pomocí DNA *mismatch repair* systému, stejně jako v určení zda dojde k opravě dvouvláknového zlomu pomocí homologní rekombinace či nehomologního spojení konců. Opravy homologní rekombinací jsou na rozdíl od oprav nehomologním spojením konců DNA mnohem přesnější, a to díky využití homologní sekvence jako templátu pro opravu. Pro udržení funkčnosti proteinů je nutné, aby oblasti aktivní transkripce byly opravovány právě s vysokou přesností. Toho je docíleno díky výskytu H3K36me₃ v tělech genů. Výskyt této epigenetické modifikace zajistí, že zlomy v těchto místech budou opraveny právě homologní rekombinací. Naproti tomu pro opravy nehomologním spojením konců

DNA, které se kromě oprav potencionálně letálních dvouvláknových zlomů DNA uplatňují i při opravě zlomů vzniklým během V(D)J rekombinace, jsou důležité dimethylace H3K36 působené metyltransferázovou aktivitou fúzního proteinu SETMAR. Výskyt H3K36me2 v místech zlomu napomáhá navedení komponent NHEJ opravného systému do míst poškození DNA.

Dvouvláknové zlomy DNA v somatických buňkách jsou bez správného opravení pro organismus nebezpečné, neboť hrozí, že se z takovýchto buněk stanou buňky nádorové. Rakovina vzniká v buňkách s nahromaděnými mutacemi v protoonkogenech či nádorových supresorech. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, mutace mohou být indukovány karcinogenními látkami, ale také vznikají chybami polymerázy při replikaci, a pokud nejsou správně opraveny, může to ve výsledku vést ke vzniku nádoru. Právě proto je nutné, aby MMR systém správně fungoval. H3K36me3 je rozeznávána proteiny hMuta, které jsou také zodpovědné za rozpoznávání míst chybného párování, a tato epigenetická značka tak ovlivňuje rozmístění těchto proteinů na chromatinu. Pokud je hladina H3K36me3 snížena, četnost mutací v genomu rapidně stoupá, neboť místo oprav pomocí homologní rekombinace dochází k opravám pomocí MMEJ. MMEJ není přesný opravný systém a dochází k nárůstu genomové nestability. Ke snížení hladiny H3K36me3 dochází například působením demetyláz rodiny KDM4 a v buňkách s jejich nadměrnou expresí se tak hromadí spontánní mutace. Nadměrná exprese KDM4 byla nalezena u rakoviny prsu (Berry *et al*, 2012) či plic (Malette a Richard, 2012).

Studium mechanismů oprav DNA zlomů a histonových modifikací, které hrají v úspěšnosti oprav poškození DNA nezanedbatelnou roli, je tedy významné pro pochopení všech faktorů ovlivňujících celistvost genomu.

Přehled použité literatury

- Amendola PG, Zaghet N, Ramalho JJ, Vilstrup Johansen J, Boxem M, Salcini AE (2017). JMJD-5/KDM8 regulates H3K36me2 and is required for late steps of homologous recombination and genome integrity. *PLoS Genet* **13**: e1006632.
- Angrand P-O, Apiou F, Stewart AF, Dutrillaux B, Losson R, Chambon P (2001). NSD3, a New SET Domain-Containing Gene, Maps to 8p12 and Is Amplified in Human Breast Cancer Cell Lines. *Genomics* **74**: 79–88.
- Awwad SW, Ayoub N (2015). Overexpression of KDM4 lysine demethylases disrupts the integrity of the DNA mismatch repair pathway. *Biol Open* **4**: 498–504.
- Aymard F, Bugler B, Schmidt CK, Guillou E, Caron P, Briois S, Iacovoni JS, Daburon V, Miller KM, Jackson SP, Legube G (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 366–374.
- Baker CL, Petkova P, Walker M, Flachs P, Mihola O, Trachtulec Z, Petkov PM, Paigen K (2015). Multimer Formation Explains Allelic Suppression of PRDM9 Recombination Hotspots. *PLOS Genet* **11**: e1005512.
- Baker CL, Walker M, Kajita S, Petkov PM, Paigen K (2014). PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Res* **24**: 724–32.
- Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T (2005). Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem* **280**: 17732–17736.
- Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, Coop G, Massy B de (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science (80-)* **327**: 836–840.
- Beck BD, Park SJ, Lee YJ, Roman Y, Hromas RA, Lee SH (2008). Human Pso4 is a metnase (SETMAR)-binding partner that regulates metnase function in DNA repair. *J Biol Chem* **283**: 9023–9030.
- Bellani MA, Boateng KA, McLeod D, Camerini-Otero RD (2010). The expression profile of the major mouse SPO11 isoforms indicates that SPO11beta introduces double strand breaks and suggests that SPO11alpha has an additional role in prophase in both spermatocytes and oocytes. *Mol Cell Biol* **30**: 4391–4403.
- Berdasco M, Roperio S, Setien F, Fraga MF, Lapunzina P, Losson R, Alaminos M, Cheung NK, Rahman N, Esteller M (2009). Epigenetic inactivation of the Sotos overgrowth syndrome gene histone methyltransferase NSD1 in human neuroblastoma and glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21830–21835.
- Bergerat A, Massy B de, Gabelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**: 414–417.
- Berry WL, Shin S, Lightfoot SA, Janknecht R (2012). Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer. *Int J Oncol* **41**: 1701–1706.
- Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V, Nicolas A (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J* **28**: 99–111.
- Brick K, Smagulova F, Khil P, Camerini-Otero RD, Petukhova GV (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* **485**: 642–645.
- Buard J, Barthès P, Grey C, Massy B de (2009). Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J* **28**: 2616–2624.

- Budman J, Kim SA, Chu G (2007). Processing of DNA for nonhomologous end-joining is controlled by kinase activity and XRCC4/ligase IV. *J Biol Chem* **282**: 11950–11959.
- Calsou P, Frit P, Humbert O, Muller C, Chen DJ, Salles B (1999). The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA. *J Biol Chem* **274**: 7848–7856.
- *Capilla L, Garcia Caldés M, Ruiz-Herrera A (2016). Mammalian meiotic recombination: A toolbox for genome evolution. *Cytogenet Genome Res* **150**: 1–16.
- Carvalho S, Vitor AC, Sridhara SC, Martins FB, Raposo AC, Desterro JM, Ferreira J, Almeida SF de (2014). SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *Elife* **3**: e02482.
- Cordaux R, Udit S, Batzer MA, Feschotte C (2006). Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase gene from a mobile element. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 8101–8106.
- Dai J, Voloshin O, Potapova S, Camerini-Otero RD (2017). Meiotic knockdown and complementation reveals essential role of RAD51 in mouse spermatogenesis. *Cell Rep* **18**: 1383–1394.
- Dagliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, Jones D, Knott H, Kok CY, Lau KW, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maquire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, O'Meara S, Pleasance E, Rajasingham A, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turrell K, Dykema KJ, Khoo SK, Petillo D, Wondergem B, Anema J, Kahnoski RJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA (2010). Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* **463**: 360–363.
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* **94**: 387–398.
- Duns G, Berg E van den, Duivenbode I van, Osinga J, Hollema H, Hofstra RMW, Kok K (2010). Histone methyltransferase gene SETD2 ss a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* **70**: 4287–4291.
- Edmunds JW, Mahadevan LC, Clayton AL (2008). Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J* **27**: 406–420.
- Eidahl JO, Crowe BL, North JA, McKee CJ, Shkriabai N, Feng L, Plumb M, Graham RL, Gorelick RJ, Hess S, Poirier MG, Foster MP, Kvaratskhelia M (2013). Structural basis for high-affinity binding of LEDGF PWWP to mononucleosomes. *Nucleic Acids Res* **41**: 3924–3936.
- Eram MS, Bustos SP, Lima-Fernandes E, Siarheyeva A, Senisterra G, Hajian T, Chau I, Duan S, Wu H, Dombrovski L, Schapira M, Arrowsmith CH, Vedadi M (2014). Trimethylation of histone H3 lysine 36 by human methyltransferase PRDM9 protein. *J Biol Chem* **289**: 12177–12188.
- Ezponda T, Popovic R, Shah MY, Martinez-Garcia E, Zheng Y, Min D-J, Will C, Neri A, Kelleher NL, Yu J, Licht JD (2013). The histone methyltransferase MMSET/WHSC1 activates TWIST1 to promote an epithelial–mesenchymal transition and invasive properties of prostate cancer. *Oncogene* **32**: 2882–2890.
- Farré M, Micheletti D, Ruiz-Herrera A (2013). Recombination rates and genomic shuffling in human and chimpanzee - a new twist in the chromosomal speciation theory. *Mol Biol Evol* **30**: 853–864.
- Fattah F, Lee EH, Weisensel N, Wang Y, Lichter N, Hendrickson EA (2010). Ku Regulates the Non-Homologous End Joining Pathway Choice of DNA Double-Strand Break Repair

- in Human Somatic Cells. *PLoS Genet* **6**: e1000855.
- Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S, Pfeiffer P (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res* **28**: 2585–2596.
- Ferreira MG, Cooper JP (2004). Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev* **18**: 2249–2254.
- Fnu S, Williamson EA, Haro LP De, Brenneman M, Wray J, Shaheen M, Radhakrishnan K, Lee SH, Nickoloff JA, Hromas R (2011). Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 540–545.
- Fontebasso AM, Schwartzenruber J, Khuong-Quang D-A, Liu X-Y, Sturm D, Korshunov A, Jones DT, Witt H, Kool M, Albrecht S, Fleming A, Hadjadj D, Busche S, Lepage P, Montpetit A, Staffa A, Gerges N, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Zadeh G, Faury D, Pfister SM, Jabado N, Majewski J (2013). Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol* **125**: 659–669.
- Forejt J, Iványi P (1974). Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus L.*). *Genet Res* **24**: 189–206.
- Forejt J, Vincek V, Klein J, Lehrach H, Loudová-Micková M (1991). Genetic mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the Hybrid sterility-1 gene. *Mamm Genome* **1**: 84–91.
- Grey C, Barthès P, Chauveau-Le Fric G, Langa F, Baudat F, Massy B de (2011). Mouse PRDM9 DNA-binding specificity determines sites of histone H3 lysine 4 trimethylation for initiation of meiotic recombination. *PLoS Biol* **9**: e1001176.
- Grey C, Clément JAJ, Buard J, Leblanc B, Gut I, Gut M, Duret L, Massy B de (2017). In vivo binding of PRDM9 reveals interactions with noncanonical genomic sites. *Genome Res* **27**: 580–590.
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**: 77–88.
- *Hartlerode AJ, Scully R (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* **423**: 157–168.
- Hayashi K, Matsui Y (2006). Meisetz, a novel histone tri-methyltransferase, regulates meiosis-specific epigenesis. *Cell Cycle* **5**: 615–620.
- Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**: 374–378.
- He J, Kallin EM, Tsukada Y, Zhang Y (2008). The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1169–1175.
- He Z, Wu J, Su X, Zhang Y, Pan L, Wei H, Fang Q, Li H, Wang DL, Sun FL (2016). JMJD5 (Jumonji Domain-containing 5) associates with spindle microtubules and is required for proper mitosis. *J Biol Chem* **291**: 4684–4697.
- Hillers KJ, Villeneuve AM (2003). Chromosome-wide control of meiotic crossing over in *C. elegans*. *Curr Biol* **13**: 1641–1647.
- Hinch AG, Altemose N, Noor N, Donnelly P, Myers SR (2014). Recombination in the human Pseudoautosomal region PAR1. *PLoS Genet* **10**: e1004503.
- Ho TH, Park IY, Zhao H, Tong P, Champion MD, Yan H, Monzon FA, Hoang A, Tamboli P, Parker AS, Joseph RW, Qiao W, Dykema K, Tannir NM, Castle EP, Nunez-Nateras R, Teh BT, Wang J, Walker CL, Hung MC, Jonasch E (2016). High-resolution profiling of histone h3 lysine 36 trimethylation in metastatic renal cell carcinoma. *Oncogene* **35**: 1565–1574.

- Hromas R, Wray J, Lee S-H, Martinez L, Farrington J, Corwin LK, Ramsey H, Nickoloff JA, Williamson EA (2008). The human set and transposase domain protein Metnase interacts with DNA Ligase IV and enhances the efficiency and accuracy of non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)* **7**: 1927–1937.
- Huang S, Shao G, Liu L (1998). The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression. *J Biol Chem* **273**: 15933–15939.
- Hussin J, Sinnett D, Casals F, Idaghdour Y, Bruat V, Saillour V, Healy J, Grenier JC, Malliard T de, Busche S, Spinella JF, Larivière M, Gibson G, Andersson A, Holmfeldt L, Ma J, Wei L, Zhang J, Andelfinger G, Downing JR, Mullighan CG, Awadalla P (2013). Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. *Genome Res* **23**: 419–430.
- Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T, Suzuki T (2012). Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of Cdkn1a expression. *Development* **139**: 749–759.
- Jaju RJ, Fidler C, Haas OA, Strickson AJ, Watkins F, Clark K, Cross NC, Cheng JF, Aplan PD, Kearney L, Boulwood J, Wainscoat JS (2001). A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood* **98**: 1264–1267.
- Jeffreys AJ, Murray J, Neumann R (1998). High-resolution mapping of crossovers in human sperm defines a minisatellite-associated recombination hotspot. *Mol Cell* **2**: 267–273.
- Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M (2011). Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science* **331**: 916–920.
- Kaur T, Rockman MV (2014). Crossover heterogeneity in the absence of hotspots in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **196**: 137–148.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**: 375–384.
- Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* **442**: 312–316.
- Kolasinska-Zwierz P, Down T, Latorre I, Liu T, Liu XS, Ahringer J (2009). Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat Genet* **41**: 376–381.
- Kono H, Tamura M, Osada N, Suzuki H, Abe K, Moriwaki K, Ohta K, Shiroishi T (2014). Prdm9 polymorphism unveils mouse evolutionary tracks. *DNA Res* **21**: 315–326.
- Kuo AJ, Cheung P, Chen K, Zee BM, Kioi M, Lauring J, Xi Y, Park BH, Shi X, Garcia BA, Li W, Gozani O (2011). NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. *Mol Cell* **44**: 609–620.
- Lange J, Yamada S, Tischfield SE, Pan J, Kim S, Zhu X, Socci ND, Jasin M, Keeney S (2016). The landscape of mouse meiotic double-strand break formation, processing, and repair. *Cell* **167**: 695–708.e16.
- Lee S-H, Oshige M, Durant ST, Rasila KK, Williamson EA, Ramsey H, Kwan L, Nickoloff JA, Hromas R (2005). The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18075–18080.
- Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, Li GM (2013). The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSα. *Cell* **153**: 590–600.

- *Lieber MR (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* **283**: 1–5.
- *Lieber MR (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**: 181–211.
- Lucio-Eterovic AK, Singh MM, Gardner JE, Veerappan CS, Rice JC, Carpenter PB (2010). Role for the nuclear receptor-binding SET domain protein 1 (NSD1) methyltransferase in coordinating lysine 36 methylation at histone 3 with RNA polymerase II function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 16952–16957.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* **13**: 1161–1169.
- Ma J-L, Kim EM, Haber JE, Lee SE (2003). Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol Cell Biol* **23**: 8820–8828.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**: 781–794.
- Mahajan KN, Mitchell BS (2003). Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10746–10751.
- Mallette FA, Richard S (2012). JMJD2A promotes cellular transformation by blocking cellular senescence through transcriptional repression of the tumor suppressor CHD5. *Cell Rep* **2**: 1233–1243.
- *Massy B de (2013). Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annu Rev Genet* **47**: 563–599.
- Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC, Forejt J (2009). A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* **323**: 373–375.
- Muñoz-Fuentes V, Rienzo A Di, Vilà C (2011). Prdm9, a major determinant of meiotic recombination hotspots, is not functional in dogs and their wild relatives, wolves and coyotes. *PLoS One* **6**: e25498.
- Neumann R, Jeffreys AJ (2006). Polymorphism in the activity of human crossover hotspots independent of local DNA sequence variation. *Hum Mol Genet* **15**: 1401–1411.
- Oh S, Janknecht R (2012). Histone demethylase JMJD5 is essential for embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun* **420**: 61–65.
- Pai C-C, Deegan RS, Subramanian L, Gal C, Sarkar S, Blaikley EJ, Walker C, Hulme L, Bernhard E, Codlin S, Bähler J, Allshire R, Whitehall S, Humphrey TC (2014). A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice. *Nat Commun* **5**: 4091.
- *Paigen K, Petkov P (2010). Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet* **11**: 221–233.
- Pan J, Sasaki M, Kniewel R, Murakami H, Blitzblau HG, Tischfield SE, Zhu X, Neale Mj, Jasin M, Socci ND, Hochwagen A, Keeney S (2011). A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell* **144**: 719–731.
- Parker H, Rose-Zerilli MJ, Larrayoz M, Clifford R, Edelmann J, Blakemore S, Gibson J, Wang J, Ljungström V, Wojdacz TK, Chaplin T, Roghanian A, Davis Z, Parker A, Tausch E, Ntoufa S, Ramos S, Robbe P, Alsolami R, Steele AJ, Packham G, Rodríguez-Vicente AE, Brown L, McNicholl F, Forconi F, Pettitt A, Hillmen P, Dyer M, Cragg MS, Chelala C, Oakes CC, Rosenquist R, Stamatopoulos K, Stilgenbauer S, Knight S, Schuh A, Oscier DG, Strefford Jc (2016). Genomic disruption of the histone methyltransferase SETD2 in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* **30**: 2179–2186.

- Parvanov ED, Petkov PM, Paigen K (2010). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* **327**: 835.
- Pfister SX, Ahrabi S, Zalmas LP, Sarkar S, Aymard F, Bachrati CZ, Helleday T, Legube G, Thangue NB La, Porter AC, Humphrey TC (2014). SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. *Cell Rep* **7**: 2006–2018.
- Pospiech H, Rytönen AK, Syväoja JE (2001). The role of DNA polymerase activity in human non-homologous end joining. *Nucleic Acids Res* **29**: 3277–3288.
- Pothof J, Haaften G van, Thijssen K, Kamath RS, Fraser AG, Ahringer J, Plasterk RH, Tijsterman M (2003). Identification of genes that protect the *C. elegans* genome against mutations by genome-wide RNAi. *Genes Dev* **17**: 443–448.
- Powers NR, Parvanov ED, Baker CL, Walker M, Petkov PM, Paigen K (2016). The meiotic recombination activator PRDM9 trimethylates both H3K36 and H3K4 at recombination hotspots *in vivo*. *PLoS Genet* **12**: e1006146.
- Rizzo PA Del, Krishnan S, Trievel RC (2012). Crystal structure and functional analysis of JMJD5 indicate an alternate specificity and function. *Mol Cell Biol* **32**: 4044–4052.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* **146**: 905–916.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**: 5858–5868.
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD (1999). Cloning, characterization, and localization of mouse and human SPO11. *Genomics* **61**: 156–169.
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* **6**: 975–987.
- Rosati R, Starza R La, Veronese A, Aventin A, Schwienbacher C, Vallespi T, Negrini M, Martelli MF, Mecucci C (2002). NUP98 is fused to the NSD3 gene in acute myeloid leukemia associated with t(8;11)(p11.2;p15). *Blood* **99**: 3857–3860.
- *Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* **25**: 15–30.
- *San Filippo J, Sung P, Klein H (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**: 229–257.
- Sandor C, Li W, Coppieters W, Druet T, Charlier C, Georges M (2012). Genetic variants in REC8, RNF212, and PRDM9 influence male recombination in cattle. *PLoS Genet* **8**: e1002854.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**: 509–514.
- Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69**: 457–470.
- Short JM, Liu Y, Chen S, Soni N, Madhusudhan MS, Shivji MKK, Venkitaraman AR (2016). High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-stranded DNA by electron cryo-microscopy. *Nucleic Acids Res* **44**: 9017–9030.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* **6**: 73–77.
- Schwartz JJ, Roach DJ, Thomas JH, Shendure J (2014). Primate evolution of the recombination regulator PRDM9. *Nat Commun* **5**: 4370.
- *Snustad DP, Simmons MJ (2009). *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita.

- Strahl BD, Grant PA, Briggs SD, Sun Z-W, Bone JR, Caldwell JA, Mollah S, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD (2002). Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **22**: 1298–1306.
- Sun F, Trpkov K, Rademaker A, Ko E, Martin RH (2005a). Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* **116**: 172–178.
- Sun X-J, Wei J, Wu X-Y, Hu M, Wang L, Wang H-H, Zhang QH, Chen SJ, Huang QH, Chen Z (2005b). Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. *J Biol Chem* **280**: 35261–35271.
- Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE, Moens PB (1999). RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* **147**: 207–220.
- Trachtulec Z, Mihola O, Vlček C, Himmelbauer H, Pačes V, Forejt J (2005). Positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biol J Linn Soc* **84**: 637–641.
- *Wagner EJ, Carpenter PB (2012). Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 115–126.
- Walker M, Billings T, Baker CL, Powers N, Tian H, Saxl RL, Choi K, Hibbs MA, Carter GW, Handel MA, Paigen K, Petkov PM (2015). Affinity-seq detects genome-wide PRDM9 binding sites and reveals the impact of prior chromatin modifications on mammalian recombination hotspot usage. *Epigenetics Chromatin* **8**: 31.
- Wang H, Zhou X, Wu M, Wang C, Zhang X, Tao Y, Chen N, Zang J (2013). Structure of the JmjC-domain-containing protein JMJD5. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**: 1911–1920.
- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**: 467–481.
- Williamson EA, Farrington J, Martinez L, Ness S, O'Rourke J, Lee S-H, Nickoloff Hromas R (2008). Expression levels of the human DNA repair protein metnase influence lentiviral genomic integration. *Biochimie* **90**: 1422–1426.
- Woodward EL, Olsson ML, Johansson B, Paulsson K (2014). Allelic variants of *PRDM9* associated with high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **166**: 947–949.
- Wu H, Mathioudakis N, Diagouraga B, Dong A, Dombrovski L, Baudat F, Cusack S, Massy B de, Kadlec J (2013). Molecular basis for the regulation of the H3K4 methyltransferase activity of PRDM9. *Cell Rep* **5**: 13–20.
- Yi X, Jiang XJ, Li XY, Jiang DS (2015). Histone methyltransferases: Novel targets for tumor and developmental defects. *Am J Transl Res* **7**: 2159–2175.
- Yoo S, Dynan WS (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* **27**: 4679–4686.
- *Yu Z, Kim Y, Dernburg AF (2016). Meiotic recombination and the crossover assurance checkpoint in *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cell Dev Biol* **54**: 106–116.
- Zhu X, He F, Zeng H, Ling S, Chen A, Wang Y, Yan X, Wei W, Pang Y, Cheng H, Hua C, Zhang Y, Yang X, Lu X, Cao L, Hao L, Dong L, Zou W, Wu J, Li X, Zheng S, Yan J, Zhou J, Zhang L, Mi S, Wang X, Zhang L, Zou Y, Chen Y, Geng Z, Wang J, Zhou J, Liu X, Wang J, Yuan W, Huang G, Cheng T, Wang QF (2014). Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. *Nat Genet* **46**: 287–293.
- *Zickler D, Kleckner N (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* **32**: 619–697.

*Zickler D, Kleckner N (2015). Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: a016626.

* sekundární citace