

Uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora PHO gena kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Musladin, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:994118>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Sanja Musladin

**THE ROLE OF RSC COMPLEX IN CHROMATIN
STRUCTURE REMODELING OF THE YEAST
Saccharomyces cerevisiae PHO GENE
PROMOTERS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Sanja Musladin

**ULOGA KOMPLEKSA RSC U REMODELIRANJU
STRUKTURE KROMATINA PROMOTORA PHO GENA
KVASCA *Saccharomyces cerevisiae***

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof.dr.sc. Slobodan Barbarić

Zagreb, 2014.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Sanja Musladin

**THE ROLE OF RSC COMPLEX IN CHROMATIN
STRUCTURE REMODELING OF THE YEAST
Saccharomyces cerevisiae PHO GENE PROMOTERS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Slobodan Barbarić, Ph.D., Full Professor

Zagreb, 2014.

Zahvaljujem svima koji su mi na bilo koji način pomogli u stvaranju ovog rada.

Sadržaj

| | |
|---|-------------|
| SAŽETAK | xi |
| ABSTRACT | xiii |
| § 1. UVOD | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 4 |
| 2.1. Modifikacije strukture kromatina | 4 |
| 2.1.1. Kovalentne modifikacije histona..... | 5 |
| 2.1.2. Remodeliranje strukture kromatina | 7 |
| 2.2. Kompleks RSC | 8 |
| 2.3. Sustav PHO gena kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 13 |
| 2.3.1. Regulacija ekspresije gena unutar PHO sustava..... | 14 |
| 2.3.2. Promotori PHO gena: modelni sustav u izučavanju regulacije transkripcije remodeliranjem strukture kromatina..... | 14 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 21 |
| 3.1. Materijali | 21 |
| 3.1.1. Kemikalije i enzimi..... | 21 |
| 3.1.2. Otopine i puferi..... | 22 |
| 3.1.3. Sojevi kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 23 |
| 3.1.4. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja stanica kvasca..... | 26 |
| 3.1.5. Sojevi bakterija | 27 |
| 3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterija..... | 27 |
| 3.1.7. Plazmidi | 27 |
| 3.1.8. Oligonukleotidi..... | 28 |
| 3.2. Metode rada | 28 |
| 3.2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i> , soj <i>DH5a</i> | 28 |
| 3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz <i>E. coli</i> („midiprep“)..... | 29 |
| 3.2.3. Transformacija stanica kvasca <i>S. cerevisiae</i> litij acetatnom metodom..... | 29 |
| 3.2.4. Izolacija genomske DNA iz kvasca..... | 30 |
| 3.2.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela | 30 |
| 3.2.6. Lančana reakcija polimeraze..... | 30 |
| 3.2.7. Indukcija PHO promotora i mjerenje aktivnosti enzima kisele fosfataze u suspenziji stanica kvasca..... | 31 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.8. Indukcija promotora „ <i>PHO5</i> -variant 33“ i mjerenje aktivnosti enzima β -galaktozidaze u suspenziji stanica kvasca..... | 32 |
| 3.2.9. Izolacija jezgri iz kvasca..... | 33 |
| 3.2.10. Analiza remodeliranja strukture kromatina digestijom restriksijskim enzimima..... | 34 |
| 3.2.11. „Southern blot“..... | 35 |
| § 4. REZULTATI..... | 39 |
| 4.1. Aktivnost kompleksa RSC potrebna je za potpunu indukciju gena <i>PHO5</i>..... | 39 |
| 4.2. Inaktivacija kompleksa RSC dovodi do usporavanja procesa remodeliranja strukture kromatina promotora <i>PHO5</i>..... | 40 |
| 4.3. Niža razina indukcije gena <i>PHO5</i> u stanicama <i>sth1^{td}</i> nije posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa..... | 44 |
| 4.4. Kompleks RSC izravno sudjeluje u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora <i>PHO5</i> te je učinak inaktivacije pojačan kod uvjeta slabije indukcije..... | 46 |
| 4.4.1. Inaktivacija <i>Sth1^{td}</i> dovodi do nepotpunog remodeliranja strukture kromatina te sprječava aktivaciju promotora <i>PHO5</i> pod uvjetima indukcije inaktivacijom ciklina <i>Pho80^{ts}</i> | 46 |
| 4.4.2. Inaktivacija <i>Sth1^{td}</i> sprječava remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO5</i> pod uvjetima indukcije inhibicijom ciklin ovisne kinaze <i>Pho85^{F82G}</i> | 48 |
| 4.5. Remodeliranje strukture kromatina inačice promotora <i>PHO5</i> aktivirane putem aktivatora Gal4 također je sporije u odsustvu kompleksa RSC..... | 50 |
| 4.6. Za remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO5</i> esencijalno je potrebna aktivnost jednog od kompleksa, RSC ili SWI/SNF..... | 52 |
| 4.7. Aktivnost kompleksa RSC neophodna je za remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO5</i> u odsustvu kompleksa ISW1 i CHD1..... | 58 |
| 4.8. Aktivnost kompleksa RSC nije potrebna za remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO8</i> i <i>PHO84</i>..... | 60 |
| 4.9. Inaktivacija <i>Sth1^{td}</i> u stanicama <i>rsc2 sth1^{td}</i> sprječava remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO5</i>, a ne utječe na otvaranje kromatina promotora <i>PHO8</i> i <i>PHO84</i>..... | 63 |
| § 5. RASPRAVA..... | 67 |
| § 6. ZAKLJUČAK..... | 76 |
| § 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 77 |
| § 8. LITERATURNI IZVORI..... | 78 |
| § 9. DODATAK..... | xv |
| § 10. ŽIVOTOPIS..... | xxi |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ULOGA KOMPLEKSA RSC U REMODELIRANJU STRUKTURE KROMATINA PROMOTORA PHO GENA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Sanja Musladin

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

Promotor gena *PHO5* kvasca *S. cerevisiae* predstavlja jedan od najbolje istraženih modelnih sustava u proučavanju regulacije transkripcije remodeliranjem strukture kromatina. Ispitan je učinak inaktivacije katalitičkih podjedinica svih remodelirajućih kompleksa ne-esencijalnih za rast stanica kvasca na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* te do danas nije nađen kompleks čija aktivnost bi bila neophodno potrebna za ovaj proces. Uloga kompleksa RSC, jedinog esencijalnog kompleksa uključenog u remodeliranje strukture kromatina u kvascu, u indukciji *PHO* promotora *in vivo* do sada nije ispitana. U ovom radu pokazano je da potpuna inaktivacija kompleksa RSC sprječava promjenu strukture kromatina prilikom indukcije promotora *PHO5*. Detaljnim kontrolnim eksperimentima je potvrđeno da je aktivnost ovog kompleksa izravno uključena u proces remodeliranja strukture kromatina promotora, odnosno da pokazani učinak nije posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa ili slabije ekspresije nekog od proteina signalnog puta uslijed inaktivacije kompleksa. Za razliku od promotora *PHO5*, nađeno je da aktivnost kompleksa RSC nije uključena u remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*, unatoč aktivaciji istim specifičnim aktivatorom transkripcije.

(88 + XXIII stranice, 35 slika, 5 tablica, 129 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: kompleks RSC/ kvasac *Saccharomyces cerevisiae*/ promotori *PHO* gena/
regulacija transkripcije/ remodeliranje strukture kromatina

Mentor: Prof.dr.sc. Slobodan Barbarić

Ocjenitelji: Izv.prof.dr.sc. Ita Gruić Sovulj
Prof.dr.sc. Slobodan Barbarić
Dr.sc. Mary Sopta, v. zn. sur.

Rad prihvaćen: 4. lipnja 2014.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

THE ROLE OF RSC COMPLEX IN CHROMATIN STRUCTURE REMODELING OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* PHO GENE PROMOTERS

Sanja Musladin

Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

The yeast *S. cerevisiae* *PHO5* promoter has proven an excellent model for studying the regulation of gene expression through chromatin structure remodeling. The complete set of yeast remodeling complexes non-essential for cell viability was tested for involvement in massive transition of promoter chromatin structure upon induction, but none of the many tested remodeler gene mutations prevented *PHO5* promoter opening. The role of RSC, only remodeling complex essential for cell viability, in chromatin remodeling upon induction of *PHO* promoters was unassessed *in vivo* so far. Here, the involvement of RSC complex was examined and it was shown that complete inactivation of RSC's activity prevented chromatin transition at the *PHO5* promoter. A set of control experiments confirmed a direct effect of RSC inactivation, at the level of promoter chromatin remodeling, rather than being a consequence of compromised signaling pathway or cell cycle arrest. Interestingly, RSC was hardly involved in chromatin transitions at the *PHO8* and *PHO84* promoters, despite cofactor recruitment by the same transactivator.

(88 + XXIII pages, 35 figures, 5 tables, 129 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: chromatin remodeling/ *PHO* promoters/ RSC complex/ transcriptional regulation/ yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Supervisor: Dr. Slobodan Barbarić, Full Professor

Reviewers: Dr. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor
Dr. Slobodan Barbarić, Full Professor
Dr. Mary Sopta, Senior Research Associate

Thesis accepted: June 4th, 2014

§ 1. UVOD

Kompaktna, kondenzirana struktura kromatina eukariotskih stanica predstavlja prepreku odvijanju bioloških procesa koji uključuju interakcije proteina i DNA, kao što su transkripcija, replikacija, popravak i rekombinacija DNA. Stoga prilikom ovih procesa dolazi do reguliranih modifikacija strukture kromatina, koje se odvijaju djelovanjem dviju osnovnih skupina proteina: kompleksa koji kataliziraju kovalentne modifikacije histona te kompleksa koji koriste energiju hidrolize ATP-a za remodeliranje strukture kromatina^{1,2}.

S obzirom na strukturu kromatina, promotorske regije gena kvasca *S. cerevisiae* moguće je podijeliti u dvije skupine: takozvane „otvorene“ i „prekrivene“ promotore. Otvorene promotore karakterizira regija slobodne DNA bez nukleosoma, NFR (engl. *Nucleosome Free Region*) dužine oko 150 pb, neposredno uzvodno od mjesta početka transkripcije, koja omogućuje nesmetano vezanje transkripcijskih faktora i RNA-polimeraze. Ovakvi promotori aktiviraju transkripciju konstitutivno eksprimiranih gena. Suprotno tome, kod prekrivenih promotora su pod uvjetima represije transkripcije regulatorne sekvence DNA i mjesto za vezanje RNA-polimeraze prekriveni nukleosomima. Posljedično, za inicijaciju transkripcije s ovih promotora, koji reguliraju ekspresiju inducibilnih gena, potrebna je aktivnost proteinskih kompleksa uključenih u modifikacije strukture kromatina^{3,4}.

Promotori *PHO* gena kvasca, čija aktivnost je regulirana ovisno o koncentraciji fosfata u podlozi za uzgoj stanica, spadaju u skupinu prekrivenih promotora i pokazali su se kao izvrstan modelni sustav u izučavanju povezanosti remodeliranja strukture kromatina i regulacije transkripcije gena. Proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* uključuje aktivnosti histon-acetiltransferaze Gen5⁵, kompleksa SWI/SNF (engl. *switching defective/ sucrose non-fermenting*), INO80 (engl. *inositol requiring 80*)⁶, ISW1 (engl. *imitation switch*), i CHD1 (engl. *chromodomain, helicase, DNA binding*)⁷ koji kataliziraju remodeliranje kromatina te proteina „šaperona“ za histone Asf1⁸. Međutim, aktivnosti ovih proteina nisu neophodne za otvaranje kromatina i aktivaciju promotora prilikom fiziološke indukcije, već njihovo odsustvo samo usporava ove procese. Dakle, proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* je rezultat kooperativnog djelovanja više proteinskih kompleksa čije aktivnosti se djelomično preklapaju. Unatoč tome što je ispitan učinak

inaktivacije svih 15 kompleksa uključenih u remodeliranje kromatina u kvascu koji su se pokazali kao ne-esencijalni za rast stanica, do danas nije pronađen kompleks čija aktivnost bi bila neophodna za remodeliranje kromatina ovog promotora. Za razliku od *PHO5*, remodeliranje kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*, koji se aktiviraju istim specifičnim aktivatorom transkripcije kao *PHO5*, nije moguće u odsustvu kompleksa SWI/SNF^{9,10}.

RSC (engl. *Remodels the Structure of Chromatin*) je jedini kompleks uključen u remodeliranje strukture kromatina u kvascu čija aktivnost je esencijalna za rast stanica te je u stanicama prisutan u znatno većoj koncentraciji od ostalih proteinskih kompleksa srodnih funkcija. Aktivnost kompleksa RSC u remodeliranju nukleosoma *in vitro* je intenzivno istražena¹¹⁻¹⁸, a predloženi mehanizam djelovanja odgovara mehanizmu predloženom za proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*^{15,18}, ukazujući na moguću ulogu kompleksa u remodeliranju strukture kromatina pri aktivaciji ovog promotora. Budući da je inaktivacija kompleksa RSC letalna za stanice, te ispitivanje njegove uloge zahtijeva korištenje temperaturno osjetljivih mutanata, do danas nije ispitana uloga ovog kompleksa u remodeliranju strukture kromatina pri indukciji *PHO* promotora *in vivo*.

U okviru ovog istraživanja provedeni su opsežni, detaljno kontrolirani *in vivo* eksperimenti s ciljem utvrđivanja uloge kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5*, *PHO8* i *PHO84*. Budući da je RSC jedini kompleks uključen u remodeliranje strukture kromatina u kvascu čija uloga do sada nije ispitana, rezultati ovih istraživanja doveli su do cjelovite spoznaje o proteinskim kompleksima uključenima u proces remodeliranja kromatina *PHO* promotora. U svrhu inaktivacije kompleksa, konstruiran je temperaturno osjetljivi mutant katalitičke podjedinice Sth1, *sth1^{td}*¹⁹. Osim fiziološke indukcije *PHO* gena inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata, korišteni su i alternativni mehanizmi indukcije, kod kojih aktivacija transkripcije ne ovisi o signalu nedostatka fosfata. Time je bilo moguće isključiti učinak inaktivacije kompleksa RSC na komponente *PHO*-signalnog puta te posljedično neizravan utjecaj na proces remodeliranja strukture kromatina promotora. U istu svrhu, ali i kako bi se utvrdilo da li je uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5* određena specifičnim aktivatorom transkripcije, korištena je inačica promotora *PHO5* kod koje su mjesta za vezanje nativnog aktivatora Pho4 zamijenjena mjestima za aktivator Gal4 te je aktivacija regulirana *GAL*-signalnim putem²⁰. Ispitano je i međudjelovanje kompleksa RSC sa drugim proteinskim kompleksima za koje je prethodno

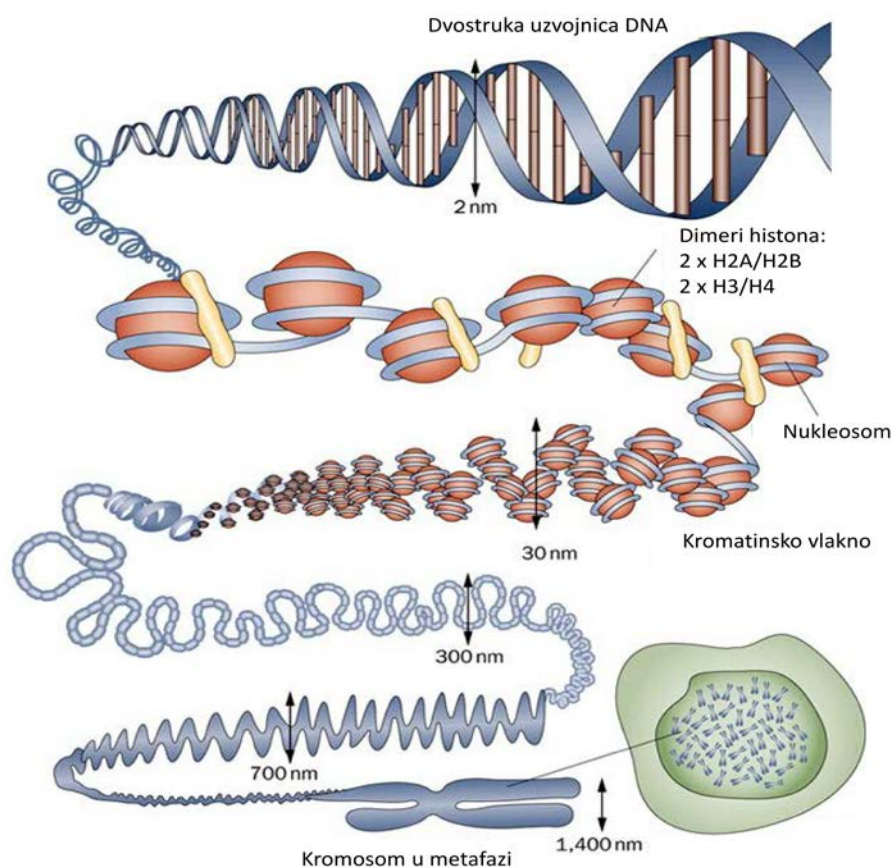
pokazano da sudjeluju u procesu remodeliranja kromatina *PHO* promotora, SWI/SNF, INO80, ISW1 i CHD1^{6,7}, konstrukcijom odgovarajućih višestrukih mutanata kvasca.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Modifikacije strukture kromatina

U jezgrama eukariotskih stanica genetski materijal je kompaktno smješten u obliku kromatina, kompleksa DNA i proteina od kojih većinu čine histoni. Osnovna strukturna jedinica kromatina, nukleosom, predstavlja oktamer histonskih proteina H2A, H2B, H3 i H4 oko kojega je omotan segment DNA od 147 parova baza (pb)^{21,22}. Histonski proteini unutar oktamera sastoje se od globularnih karboksi-terminalnih domena i nestrukturiranih amino-krajeva koji se protežu izvan strukture nukleosoma te su stoga dostupni enzimima koji kataliziraju različite posttranslacijske kovalentne modifikacije²³. Nukleosomi, povezani segmentima slobodne DNA s kojom stupaju u interakcije histoni H1, tvore kromatinska vlakna debljine 30 nm. Ovakav stupanj uređenosti kromatina prisutan je tijekom interfaze, dok daljnjim smatanjem kromatinskih vlakana nastaju kompaktnije strukture te se najviši stupanj kondenzacije kromatina postiže tijekom metafaze mitoze²⁴ (Slika 1).

Kompaktna, kondenzirana struktura kromatina djeluje represivno na procese transkripcije, replikacije, popravka i rekombinacije DNA, sprječavajući pristup DNA proteinima uključenima u ove procese. Modifikacije strukture kromatina su stoga nužan preduvjet za odvijanje bioloških procesa. Proteini uključeni u modifikacije strukture kromatina najčešće su podjedinice oligomernih proteinskih kompleksa, a prema načinu djelovanja podijeljeni su u dvije osnovne skupine: komplekse koji kataliziraju kovalentne modifikacije histona¹ te komplekse koji koriste energiju hidrolize ATP-a za remodeliranje strukture kromatina². Također, za proces strukturiranja i remodeliranja nukleosoma bitna je aktivnost takozvanih „šaperona“, proteina koji specifično vežu slobodne histonske proteine sprječavajući na taj način njihovu međusobnu agregaciju²⁵.



Slika 1. Stupnjevi uređenosti strukture kromatina²⁶

2.1.1. Kovalentne modifikacije histona

Amino-krajevi histona unutar nukleosoma podložni su različitim posttranslacijskim reverzibilnim kovalentnim modifikacijama, uključujući acetilaciju, metilaciju, ubikvitinilaciju i sumoilaciju lizinskih ostataka, fosforilaciju serinskih i treoninskih te metilaciju argininskih ostataka²⁷. Djelovanje kovalentnih modifikacija histona u regulaciji bioloških procesa unutar stanice ostvaruje se na dva načina: izravnim narušavanjem interakcija između DNA i histonskih proteina, primjerice acetilacijom i fosforilacijom, kojima se neutralizacijom pozitivnog naboja na lizinskim ostacima histona onemogućuju interakcije s negativno nabijenom molekulom DNA te neizravno, pri čemu modificirani aminokiselinski ostatci histona postaju supstrati za vezanje proteinskih kompleksa uključenih u regulaciju bioloških procesa. Interakcije proteinskih kompleksa s kovalentno modificiranim ostacima histona su visoko specifične s obzirom na aminokiselinsku sekvencu unutar koje se ostatak nalazi, a

ostvaruju se preko karakterističnih domena; bromo-domene specifično prepoznaju acetilirane ostatke histona, dok se kromo-, Tudor, PHD i MBT domene specifično vežu na metilirane ostatke histona te su osjetljive na stupanj metilacije (mono-, di- ili tri-metilacija)²⁸.

Najbolje proučena reverzibilna kovalentna modifikacija histona je acetilacija koju kataliziraju enzimi histon-acetiltransferaze, dok uklanjanje acetilnih skupina kataliziraju histon-deacetilaze. Poznato je da je acetiliranje ϵ -aminoskupina lizina usko povezano s regulacijom ekspresije gena: pojačana acetilacija histona karakteristika je transkripcijski aktivnog kromatina, dok se deacetilirani histoni povezuju s represivnom, transkripcijski inaktivnom strukturom kromatina^{29,30}. Osim toga, nađena je poveznica acetilacije kromatina s regulacijom popravka oštećenja DNA, regulacijom staničnog ciklusa, replikacijom stanica te procesom apoptoze³¹⁻³³. Najznačajnija histon-acetiltransferaza kvasca, enzim Gcn5, dolazi kao podjedinica velikih proteinskih kompleksa, od kojih je najbolje proučen kompleks SAGA stanica kvasca³⁴. Pri indukciji transkripcije, neki specifični aktivatori transkripcije, npr. Gcn4, Gal4 i Pho4, nakon vezanja za regulatorna mjesta na promotorima gena stupaju u interakciju s kompleksom SAGA što dovodi do pojačane acetilacije histona promotora³⁵⁻³⁷. Bromo-domena podjedinice Gcn5 ostvaruje interakcije s acetiliranim lizinskim ostacima histona te tako osigurava stabilno zadržavanje kompleksa na promotorima i nakon disocijacije specifičnog aktivatora³⁸. Osim acetilacije histona, kompleks SAGA ostvaruje dodatne aktivnosti bitne za proces indukcije transkripcije; podjedinica Spt3 ima ulogu pri vezanju općeg transkripcijskog faktora, proteina TBP (engl. *TATA-box-binding protein*), na promotore nekih gena³⁹.

Metilacija histona, katalizirana histon-metiltransferazama, također je intenzivno proučavana i predstavlja najstabilniju kovalentnu modifikaciju histona. Prije se smatralo da je ova modifikacija ireverzibilna, a u posljednjem desetljeću utvrđeno je postojanje enzima demetilaza i njihova aktivnost u demetiliranju lizinskih i argininskih ostataka histona⁴⁰. Metilacija histona povezana je s transkripcijski aktivnim, ali i inaktivnim kromatinom, ovisno o položaju metiliranog ostatka, stupnju metilacije, ali i modifikacijama okolnih aminokiselinskih ostataka histona^{27,41}.

Utvrđeno je složeno međudjelovanje modifikacija histona: modifikacija jednog aminokiselinskog ostatka može poticati ili sprječavati modifikaciju drugog ostatka, budući da proteini koji kataliziraju ove modifikacije specifično prepoznaju kombinacije postojećih modifikacija histona. Ovakva međusobna „komunikacija“ modifikacija utvrđena je ne samo

među aminokiselinskim ostatcima na amino-kraju istog histonskog proteina, već i između aminokiselinskih ostataka različitih histona unutar nukleosoma, ali i između susjednih nukleosoma. Činjenica da istovjetna modifikacija histona može imati različit, čak i suprotan utjecaj na određeni biološki proces u stanici ovisno o kontekstu ostalih modifikacija histona te da specifične kombinacije kovalentnih modifikacija histona određuju da li će se pojedini biološki proces odvijati ili ne, dovela je do postavljanja takozvane hipoteze histonskog koda, koji bi predstavljao složenu, epigenetsku nadopunu informacije sadržane u genetskom kodu^{27,42,43}.

2.1.2. Remodeliranje strukture kromatina

Prema dosadašnjim saznanjima, kompleksi koji koriste energiju oslobođenu hidrolizom ATP-a za narušavanje interakcija DNA i histona te time dovode do remodeliranja strukture kromatina svrstavaju se u četiri porodice: SWI/SNF, ISWI, INO80 i CHD. Ovakva podjela zajednička je svim eukariotskim stanicama, od kvasca do čovjeka. Katalitičke podjedinice svih četiriju porodica sadrže evolucijski sačuvanu katalitičku domenu ATP-azne aktivnosti, a razlikuju se u specifičnim domenama kojima je katalitička domena okružena. Zajedničke karakteristike svih kompleksa su: (i) veći afinitet prema nukleosomu od afiniteta prema slobodnoj DNA, (ii) domene koje specifično prepoznaju kovalentno modificirane histone, (iii) evolucijski sačuvana katalitička domena odgovorna za narušavanje interakcija između DNA i histona, (iv) domene uključene u regulaciju aktivnosti katalitičke domene te (v) domene pomoću kojih se ostvaruju interakcije s drugim kompleksima uključenima u modifikacije kromatina i transkripcijskim faktorima².

Prema mehanizmu djelovanja ovi kompleksi svrstavaju se u skupinu DNA-translokaza i od esencijalne su važnosti za biološke procese u stanicama: sudjeluju u formiranju kromatina nakon replikacije osiguravajući potrebne razmake između novonastalih nukleosoma⁴⁴, lokalnim uklanjanjem histona omogućuju inicijaciju replikacije i kretanje DNA-polimeraze duž lanca⁴⁵ te osiguravaju pristup DNA enzimima odgovornima za popravak DNA i rekombinaciju. Također, neophodni su u regulaciji ekspresije gena: privučeni specifičnim aktivatorima transkripcije na promotore gena kataliziraju remodeliranje strukture kromatina čime postaju dostupna regulatorna mjesta i mjesto za vezanje RNA-polimeraze i omogućena je aktivacija transkripcije², sudjeluju u elongaciji transkripcije stupajući u interakcije s

faktorima elongacije⁴⁶, a također je pokazano međudjelovanje s enzimima histon-deacetilazama u procesu represije transkripcije⁴⁷.

Kompleksi koji koriste energiju hidrolize ATP-a za remodeliranje strukture kromatina djeluju na jedan od tri načina: takozvanim mehanizmom „*in cis*“ ili „klizanjem nukleosoma“ koji se odnosi na stvaranje regije slobodne DNA sabijanjem nukleosoma, mehanizmom „*in trans*“ koji podrazumijeva potpuno uklanjanje histona s DNA te zamjenom pojedinih histona unutar histonskog oktamera proteinima varijantama histona^{48,49}.

Ovi kompleksi sadrže domene koje specifično prepoznaju modificirane histonske ostatke: bromo-domene visokog afiniteta prema acetiliranim lizinskim ostacima te kromo- i PHD-domene preko kojih se ostvaruju interakcije s metiliranim histonima². Kompleks SWI/SNF, koji ima bitnu ulogu u ekspresiji oko 6% kvašćevih gena, sadrži bromo-domena na karboksikraju. Pokazano je međudjelovanje acetilacije histona i aktivnosti kompleksa SWI/SNF u aktivaciji transkripcije gena. Naime, pri indukciji gena, interakcije određenih podjedinica ovog kompleksa sa specifičnim aktivatorom transkripcije dovode do privlačenja kompleksa na promotorske regije, međutim, u slučaju niske razine acetilacije histona nije moguće njegovo stabilno zadržavanje na promotoru te posljedično remodeliranje strukture kromatina nakon disocijacije aktivatora. U slučaju acetiliranja lizinskih ostataka histona djelovanjem kompleksa SAGA ili NuA4, nakon interakcije sa specifičnim aktivatorom transkripcije uspostavljaju se i interakcije kompleksa SWI/SNF s acetiliranim histonima preko bromo-domene, što omogućuje njegovo stabilno zadržavanje na promotoru neovisno o prisutnosti aktivatora^{38,50}. Kompleksi porodice CHD sadrže kromo-domene na amino-kraju te je u humanim stanicama pokazano specifično vezanje kompleksa hCHD1 na di- i tri- metilirani ostatak lizina 4 histona H3 povezan s aktivacijom transkripcije^{51,52}. Dakle, međudjelovanje kompleksa koji kataliziraju kovalentne modifikacije histona i kompleksa uključenih u remodeliranje strukture kromatina ima bitnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, međutim nije potpuno jasno da li su interakcije karakterističnih domena kompleksa s modificiranim ostacima histona potrebne isključivo za njihovo specifično vezanje na promotorske regije, ili sudjeluju i u regulaciji aktivnosti ovih kompleksa².

2.2. Kompleks RSC

Kompleks RSC (engl. *Remodels the Structure of Chromatin*) kvasca *S. cerevisiae* dio je porodice SWI/SNF remodelirajućih kompleksa i pronađen je na osnovu homologije određenih

podjedinica s podjedinicama kompleksa SWI/SNF⁵³. U stanicama kvasca prisutan je u znatno većoj koncentraciji od ostalih kompleksa uključenih u remodeliranje strukture kromatina⁵⁴, te je jedini takav kompleks esencijalan za rast stanica⁵³. Za sada je poznato 17 podjedinica kompleksa (Sth1, Rsc1, Rsc2, Rsc3, Rsc4, Rsc6, Rsc7/Npl6, Rsc8, Rsc9, Sfh1, Arp7, Arp9, Rsc30, Htl1, Rtt102, Rsc58 i Ldb7)⁵⁵. Katalitička podjedinica Sth1 kodirana je esencijalnim genom, neophodnim za prelazak iz G2 u M fazu staničnog ciklusa^{56,57}, koji sadrži slijed nukleotida dužine 2 kb homologan genu SNF2^{58,59}. Također je utvrđena i djelomična homologija podjedinica Rsc6, Rsc8 i Sfh1 s proteinima Swp73, Swi3 i Snf5 kompleksa SWI/SNF^{53,60}, dok su proteini Arp7 i Arp9 podjedinice oba kompleksa⁶¹.

Nađeno je da kompleks RSC u stanicama dolazi u dva izooblika, koji se razlikuju isključivo po tome što sadrže ili protein Rsc1 ili Rsc2, pri čemu je kompleks s podjedinicom Rsc2 prisutan u znatno većoj koncentraciji. Proteini Rsc1 i Rsc2 dijele 62% sličnosti, a unutar regije homologije nalaze se dvije bromo-domene, AT petlja za koju se pretpostavlja da sudjeluje u specifičnim interakcijama proteina s određenima sljedovima DNA¹⁶, regija BAH („bromo-adjacent-homology“) za koju je nađeno da stupa u specifične interakcije s histonom H3 *in vitro*⁶² te dvije karboksi-terminalne domene neophodne za povezivanje ovih proteina u kompleks. Pojedinačna inaktivacija proteina Rsc1 ili Rsc2 nije letalna za stanice, dok je za stanice dvostrukog mutanta *rsc1 rsc2* utvrđen letalan fenotip, što ukazuje na djelomično preklapajuće aktivnosti dvaju izooblika kompleksa¹⁶ te je na razini genoma pokazana njihova lokalizacija na jednakim regijama kromosoma⁶³. Međutim, nađene su brojne različite funkcije dvaju izooblika: kompleks s podjedinicom Rsc2 specifično je potreban za određene funkcije u mitozu⁶⁴, koheziju sestrinskih kromatida⁶⁵ i održavanje plazmida s 2 μm ishodištem replikacije⁶⁶, a pokazane su i različite uloge izooblika u procesu sporulacije^{67,68} te u staničnom odgovoru na oštećenja DNA⁵⁵.

Aktivnost kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina pokazana je *in vitro*. Nađeno je da nukleosomalna DNA u prisustvu ovog kompleksa i ATP-a postaje znatno više osjetljiva na digestiju enzimom DNazaI⁵³. Istraživanja mehanizma djelovanja pokazala su da se kompleks veže za srž nukleosoma čime se pokreće DNA-translokazna aktivnost katalitičke podjedinice Sth1, ovisna o hidrolizi ATP-a¹⁷ te dolazi do pomicanja histonskog oktamera po DNA¹³ ili do potpunog uklanjanja oktamera pri čemu akceptor može biti protein „šaperon“ za histone¹¹ ili slobodna molekula DNA¹². Nadalje, nađeno je da djelovanjem kompleksa dolazi do selektivnog uklanjanja nukleosoma promotorskih regija dok se nukleosomi koji prekrivaju

strukturni gen ne uklanjaju. Ovakva specifičnost objašnjena je postojanjem karakterističnih kovalentnih modifikacija histona u promotorskim regijama, posebice acetilacije te prisutnošću proteina inačica histona, Htz1, što dovodi do destabilizacije nukleosoma⁶⁹. Mehanizam remodeliranja nukleosoma predložen za kompleks RSC na osnovu *in vitro* ispitivanja je takozvani „sliding-mediated nucleosome disassembly“, objašnjen u poglavlju 2.3.2. Ovaj mehanizam ujedno je i predložen za proces remodeliranja strukture kromatina pri indukciji promotora kvašćevog gena *PHO5 in vivo*¹⁸.

Budući da nekoliko podjedinica kompleksa RSC sadrži bromo-domene koje su se pokazale esencijalnim za aktivnost kompleksa, smatra se da su specifične interakcije kompleksa s acetiliranim ostacima histona neophodne za njegovu funkciju. Acetilacija histona H3 višestruko pojačava remodeliranje nukleosoma katalizirano ovim kompleksom *in vitro*, pri čemu je nađeno da utječe na vezanje kompleksa za nukleosome, ali i na samu aktivnost kompleksa. Smatra se da interakcije kompleksa s acetiliranim histonskim proteinima uzrokuju promjenu konformacije te posljedično veću aktivnost kompleksa u remodeliranju nukleosoma. S druge strane, acetilacija histona H4 nije utjecala na remodeliranje kromatina katalizirano kompleksom RSC *in vitro*¹⁴. Katalitička podjedinica Sth1 sadrži jednu bromo-domenu na karboksi-kraju za koju su eksperimentima *in vitro* pokazane specifične interakcije s acetiliranim ostatkom lizina 14 histona H3 i lizina 21 histona H2A^{57,70}. Kod proteina Rsc1 i Rsc2 se unutar regije homologije nalaze dvije bromo-domene (BD#1 i BD#2), od kojih je BD#2 neophodna za aktivnost oba proteina te mutacija BD#2 proteina Rsc2 ima letalan fenotip u stanicama mutanta *rsc1* i obrnuto, dok je BD#1 potrebna za neke specifične, ne-esencijalne funkcije proteina Rsc2¹⁶. Esencijalna podjedinica Rsc4 sadrži dvije bromo-domene (BD1 i BD2), takozvane „tandem-bromo-domene“, smještene neposredno jedna iza druge, obje neophodno potrebne za rast stanica. Pokazano je da je za funkciju bromo-domena Rsc4 potrebna aktivnost histon-acetiltransferaze Gcn5, podjedinice kompleksa SAGA te da se u *in vitro* eksperimentima preko BD2 ostvaruju specifične interakcije proteina Rsc4 s acetiliranim ostatkom lizina 14 histona H3 (H3K14), koji je supstrat Gcn5 *in vivo*^{71,72}. Međutim, nađeno je da protein Gcn5 također acetilira ostatak lizina 25 na samom proteinu Rsc4 (Rsc4-K25) koji zatim ostvaruje interakcije s BD1 istog proteina, što sprječava interakcije BD2 s H3K14. Dakle, aktivnost Gcn5 potrebna je za vezanje bromo-domene Rsc4 za lizinske ostatke histona, ali istovremeno i sprječava to vezanje te se smatra da se na taj način regulira vrijeme zadržavanja kompleksa RSC na promotorima gena. Budući da su

bromo-domene proteina Rsc4 esencijalne za rast stanica, a sprječavanje acetilacije H3K14 i Rsc4-K25 nema letalan fenotip, pretpostavlja se postojanje dodatnih liganada preko kojih se ostvaruju interakcije s bromo-domenama Rsc4, što, međutim, do danas nije potvrđeno⁷².

Korištenjem metodologije kromatin-imunoprecipitacije i DNA čipova („ChIP-on-chip“) provedena je analiza lokalizacije kompleksa RSC na razini genoma. Utvrđena je prisutnost kompleksa na oko 700 kromosomalnih regija, od čega većinu čine geni čiju transkripciju katalizira RNA-polimeraza III, primarno geni koji kodiraju za tRNA. Smatra se da je kompleks privučen na promotore ovih gena izravnim interakcijama s RNA-polimerazom III i općim transkripcijskim faktorima, te nije utvrđena specifičnost prema promotorskim regijama određenih tRNA gena⁶³. Nađeno je da podjedinica kompleksa Rsc4 stupa u interakcije s podjedinicom Rpb5 RNA-polimeraza eukariota te je pokazana ko-imunoprecipitacija kompleksa RSC sa sve tri RNA-polimeraze⁷³. Budući da je kod gena koji kodiraju za tRNA utvrđen najniži sadržaj histona u usporedbi s ostatkom genoma, te da je pokazano da se inaktivacijom katalitičke podjedinice kompleksa RSC značajno povećava gustoća histona, tj. nukleosoma na ovim genima, kompleks RSC je vjerojatno odgovoran za održavanje niske gustoće nukleosoma na dijelovima genoma koji sadrže tRNA gene¹⁹. Također, ustanovljena je prisutnost kompleksa na promotorima određenih skupina gena koji se transkribiraju pomoću RNA-polimeraze II, uključujući gene koji kodiraju za histone, snRNA te cikline karakteristične za S-fazu staničnog ciklusa, kao i gene čiji su produkti bitni za funkcije mitohondrija, metabolizam nefermentabilnih ugljikohidrata i dušika⁶³. Za razliku od gena čija transkripcija je katalizirana RNA-polimerazom III, smatra se da je ovdje kompleks RSC specifično privučen na promotore određenih gena, prije vezanja RNA-polimeraze II, interakcijama sa specifičnim aktivatorima ili represorima transkripcije⁶³. Djelovanjem ovog kompleksa dolazi do lokalnog remodeliranja jednog ili nekoliko nukleosoma neposredno uz mjesto za vezanje RNA-polimeraze i općih transkripcijskih faktora¹⁹. Osim interakcija kompleksa RSC sa specifičnim transkripcijskim faktorima i komponentama holoenzima RNA-polimeraze, također je nađeno da se preko podjedinice Rsc3 ostvaruju izravne interakcije s karakterističnim sljedovima DNA promotorskih regija, koje se obično nalaze stotinjak nukleotida uzvodno od mjesta početka transkripcije⁷⁴.

Vrlo mali broj istraživanja odnosi se na ispitivanje izravne uloge kompleksa RSC u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora vezanom uz regulaciju transkripcije gena pod uvjetima *in vivo*. Ustanovljena je uloga ovog kompleksa u aktivaciji transkripcije gena

GALI/10. Promotori gena *GALI/10* sadrže slijed nukleotida „UASg“ za vezanje specifičnog aktivatora transkripcije, proteina Gal4. Pri uzgoju stanica u podlozi s glukozom ekspresija gena *GAL4* je reprimirana, čime je reprimirana i transkripcija gena *GALI/10*. Prebacivanjem stanica u podlogu s rafinozom dolazi do sinteze proteina Gal4 koji se veže na mjesto UASg, međutim aktivacija transkripcije gena *GALI/10* je spriječena vezanjem proteina inhibitora Gal80 na aktivacijsku domenu Gal4. Dodatkom galaktoze dolazi do inaktivacije Gal80 te posljedično aktivacije transkripcije gena *GALI/10*. Ustanovljeno je da se kompleks RSC pod uvjetima represije nalazi vezan za nukleosom koji prekriva UASg i održava ga u djelomično remodeliranom stanju. Prilikom indukcije transkripcije u stanicama koje su iz podloge s glukozom prebačene u podlogu s galaktozom, proces aktivacije promotora *GALI/10* je znatno sporiji u odsustvu kompleksa RSC, dok inaktivacija kompleksa nema utjecaja na brzinu aktivacije promotora u stanicama pred-inkubiranim u podlozi s rafinozom. Zaključeno je da djelomično remodeliranje nukleosoma koji prekriva UASg, katalizirano kompleksom RSC, pri rastu stanica u podlozi s glukozom omogućuje brže vezanje novo-sintetiziranog aktivatora te posljedično bržu aktivaciju transkripcije nakon dodatka galaktoze. S druge strane, u stanicama uzgajanim u podlozi s rafinozom aktivator Gal4 je prisutan te s vremenom uspije nadvladati represivno djelovanje nukleosoma, odnosno veže se za UASg, tako da dodatkom galaktoze dolazi do brze aktivacije transkripcije neovisno o aktivnosti kompleksa RSC⁷⁵.

Utvrđena je i uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina pri aktivaciji promotora takozvanih „heat shock“ gena, *HSP12*, *HSP82* i *SSA4*. Smanjena razina transkripcije gena koji kodira za katalitičku podjedinicu kompleksa, Sth1, dovodi do nepotpunog uklanjanja histona prilikom aktivacije ovih promotora te sprječava vezanje RNA-polimeraze II. Smanjena ekspresija *STH1* ima jednak učinak na sva tri promotora, iako se aktivatori ovih gena djelomično razlikuju: promotori gena *HSP82* i *SSA4* aktiviraju se specifičnim aktivatorom HSF, dok je za aktivaciju promotora *HSP12* uz HSF bitan je i specifičan aktivator transkripcije Msn2/4. S druge strane, inaktivacija kompleksa SWI/SNF negativno je utjecala samo na uklanjanje histona promotora *HSP12*. Na osnovu toga je pretpostavljeno da je kompleks SWI/SNF privučen na ovaj promotor interakcijama s aktivatorom Msn2/4, dok je učinak kompleksa RSC neovisan o specifičnom aktivatoru te se, s obzirom na već poznate interakcije podjedinice kompleksa Rsc4 s podjedinicom Rpb5 RNA-polimeraza⁷³, pretpostavlja da je ovaj kompleks generalno potreban za vezanje RNA-polimeraze II⁷⁶.

Osim uloge u aktivaciji transkripcije navedenih gena, pokazano je da je kompleks RSC neophodan i za održavanje represivne strukture kromatina promotora gena *CHAI*, koji kodira za serin/ treonin deaminazu, odnosno, da inaktivacija kompleksa dovodi do uklanjanja nukleosoma promotorske regije i posljedično potpune indukcije gena *CHAI* pod uvjetima represije transkripcije⁷⁷. Također, nedavno je objavljeno da kompleks RSC sudjeluje u pozicioniranju nukleosoma promotora *PHO8* pod uvjetima represije⁷⁸.

Uz sudjelovanje u procesu regulacije transkripcije, nađeno je da je aktivnost kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina uključena i u procese popravka dvolančanih lomova DNA mehanizmima homologne rekombinacije i nehomolognog sparivanja krajeva („NHEJ“), pri čemu se smatra da lokalno uklanjanje nukleosoma u okolini lomova osigurava dostupnost DNA proteinima uključenima u popravak^{79–81}. Nadalje, aktivnost ovog kompleksa uključena je i u proces promjene tipa parenja kod kvasca⁸² te u vezanje proteina kohezina za centromere kromosoma i kromatide, što je bitno za koheziju sestričkih kromatida, rekombinaciju kromatida i pravilno odvajanje kromosoma tijekom diobe^{83,84}.

2.3. Sustav PHO gena kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Anorganski fosfat neophodno je potreban za odvijanje većine metaboličkih procesa, uključujući biosintezu nukleinskih kiselina i fosfolipida, energetske metabolizam i prijenos signala te stoga stanice posjeduju regulatorne mehanizme koji omogućuju brzi odgovor u slučaju promjene u dostupnosti fosfata iz okoline i prilagodbu na novonastale uvjete^{85,86}.

U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* geni čija ekspresija je regulirana ovisno o koncentraciji anorganskog fosfata u stanici dio su PHO regulacijskog sustava. Kao odgovor na nisku koncentraciju fosfata u podlozi za uzgoj, u stanicama dolazi do indukcije transkripcije ovih gena, čiji produkti omogućuju maksimalno iskorištavanje preostalog fosfata iz podloge i korištenje rezervi fosfata pohranjenih u stanicama u obliku molekula polifosfata. Geni *PHO5*, *PHO10* i *PHO11* kodiraju za izoenzime nespecifične kisele fosfataze, *PHO8* kodira za nespecifičnu alkalnu fosfatazu, produkti gena *PHO84* i *PHO89* su transportni proteini visokog afiniteta odgovorni za transport fosfata kroz staničnu membranu, *PHO86* kodira za protein zadužen za usmjeravanje Pho84 u staničnu membranu, a *PHO81* za pozitivni regulatorni protein unutar PHO sustava.

Izoenzimi kisele fosfataze su glikoproteini locirani u periplazmatskom prostoru stanice odgovorni za hidrolizu izvanstaničnih izvora fosfata, kako bi se omogućilo preživljavanje

stanica pod uvjetima nedostatka anorganskog fosfata u podlozi. Alkalna fosfataza Pho8 je također glikoprotein lociran u vakuoli, koji optimalno djelovanje ostvaruje kod pH 8 i sudjeluje u hidrolizi unutarstaničnih rezervi fosfata.

Osim navedenih, kvasac posjeduje još nekoliko gena koji kodiraju za enzime fosfataze čija ekspresija ne ovisi o koncentraciji fosfata, među njima *PHO3* koji kodira za nespecifičnu kiselu fosfatazu te *PHO13* koji kodira za alkalnu fosfatazu specifičnu za supstrat *p*-nitrofenil fosfat [48 i reference navedene u radu], 88,89.

2.3.1. Regulacija ekspresije gena unutar PHO sustava

Geni PHO sustava sadrže u svojim promotorskim regijama jednu ili više kopija karakterističnog slijeda nukleotida CACGTG i/ ili CACGTT, takozvane „uzvodne aktivirajuće sekvence“ (UAS; engl. *Upstream activating sequence*) koju prepoznaje specifični aktivator transkripcije Pho4. Kao odgovor na promjenu koncentracije fosfata u okolini, regulira se lokalizacija i aktivnost proteina Pho4, čija ekspresija ne ovisi o dostupnosti fosfata⁹⁰. Poznato je da je za stabilne interakcije Pho4 s uzvodnim aktivirajućim sekvencama potrebno kooperativno vezanje s koaktivatorom, proteinom Pho2. Protein Pho2 uključen je u aktivaciju transkripcije brojnih drugih gena, uključujući *HIS3*, *TR4*, *CYCI*, *ADE2* i *HO* [48 i reference navedene u radu].

Pri uzgoju stanica u podlozi s fosfatom dolazi do višestruke fosforilacije proteina Pho4 katalizirane kompleksom ciklina Pho80 i ckin-ovisne kinaze Pho85⁹¹. Protein eksportin Msn5, zadužen za eksport iz jezgre, ima visok afinitet prema fosforiliranom Pho4, dok je afinitet proteina importina Pse1, odgovornog za transport u jezgru, prema fosforiliranom Pho4 nizak, kao i afinitet koaktivatora Pho2⁹². Dakle, pod ovim uvjetima je Pho4 inaktivan i lociran u citoplazmi te je posljedično nivo ekspresije PHO regulona nizak. Uzgojem stanica u podlozi bez fosfata dolazi do aktivacije proteina Pho81, inhibitora kompleksa Pho80 – Pho85. Pho81 je u inaktivnom obliku vezan za kompleks Pho80 – Pho85, a nakon aktivacije dovodi do disocijacije i time inaktivacije ovog kompleksa⁹³. Posljedično, dolazi do nakupljanja nefosforiliranog proteina Pho4 u jezgri te aktivacije transkripcije gena PHO sustava⁹⁴.

2.3.2. Promotori PHO gena: modelni sustav u izučavanju regulacije transkripcije remodeliranjem strukture kromatina

S obzirom na strukturu kromatina, promotorske regije gena kvasca *Saccharomyces cerevisiae* moguće je podijeliti u dvije skupine: takozvane „otvorene“ i „prekrivene“ promotore.

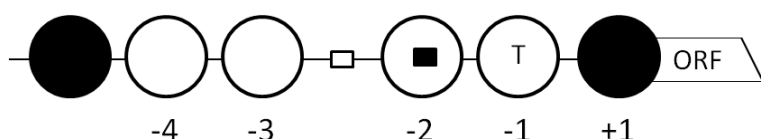
Otvorene promotore karakterizira regija slobodne DNA bez nukleosoma, NFR (engl. *Nucleosome Free Region*), dužine oko 150 pb, neposredno uzvodno od mjesta početka transkripcije, što omogućuje nesmetano vezanje transkripcijskih faktora i RNA-polimeraze te takvi promotori aktiviraju ekspresiju konstitutivno eksprimiranih gena. Suprotno tome, kod prekrivenih promotora su regulatorne sekvence DNA pod uvjetima represije transkripcije prekrivene nukleosomima što sprječava vezanje transkripcijskih faktora i RNA-polimeraze te je za inicijaciju transkripcije potrebna aktivnost proteina uključenih u modifikacije strukture kromatina. Takvi promotori reguliraju ekspresiju inducibilnih gena^{3,4}.

Promotori *PHO* gena spadaju u skupinu prekrivenih promotora i pokazali su se kao izvrstan modelni sustav u izučavanju povezanosti remodeliranja strukture kromatina i regulacije transkripcije gena. Promotor gena *PHO5* predstavlja prvi i jedan od najbolje istraženih primjera izrazite promjene strukture kromatina kao preduvjeta za aktivaciju transkripcije⁹⁵. Na primjeru ovog promotora ustanovljeni su neki od temeljnih principa i mehanizama regulacije ekspresije gena remodeliranjem strukture kromatina: pokazano je da remodeliranje strukture kromatina nije posljedica već preduvjet za transkripciju gena, budući da prilikom indukcije mutiranog promotora *PHO5*, kod kojega je transkripcija spriječena delecijom „TATA box-a“, svedeno dolazi do remodeliranja kromatina⁹⁶. Također, utvrđeno je da proces remodeliranja kromatina nije uvjetovan replikacijom stanica⁹⁷ te je kod ovog promotora po prvi puta pokazan mehanizam remodeliranja strukture kromatina „*in trans*“, tj. potpuno uklanjanje histona s DNA pod uvjetima „*in vivo*“^{98,99}.

Promjene strukture kromatina prilikom indukcije promotora *PHO8* i *PHO84* također su opsežno istražene^{8-10,100}. Za sva tri promotora je pokazano da je u procesu remodeliranja strukture kromatina esencijalno potreban aktivator transkripcije Pho4^{10,100,101}.

Promotor gena *PHO5* je pod uvjetima represije transkripcije prekriven s 4 nukleosoma, obično označavanima brojevima -1 do -4 s obzirom na mjesto početka transkripcije, pri čemu se između nukleosoma -2 i -3 nalazi kratka regija slobodne DNA, dužine 70 pb, koja sadrži slijed nukleotida za vezanje aktivatora Pho4 niskog afiniteta, UASp1⁹⁵. Ovakva regija naziva se i „hipersenzitivna sekvenca“ (HS), s obzirom na to da je izrazito podložna digestiji enzimom DNaza I, za razliku od dijelova DNA unutar nukleosoma koji su zaštićeni od digestije. Drugo mjesto za vezanje aktivatora, UASp2, visokog afiniteta nalazi se unutar nukleosoma -2 te pod uvjetima represije nije dostupno¹⁰². Mjesto za vezanje RNA-polimeraze prekriveno je nukleosomom -1 (Slika 2). Prilikom indukcije promotora dolazi do

vezanja aktivatora Pho4 na mjesto UASp1 te se uspostavljaju interakcije njegove aktivacijske domene s kompleksima uključenima u modifikacije strukture kromatina koji pokreću proces remodeliranja kromatina¹⁰³. Posljedično, dolazi do remodeliranja sva četiri nukleosoma koji prekrivaju promotorsku regiju, pri čemu nastaje NFR dužine 600 pb, čime i mjesto UASp2 postaje dostupno za stabilno vezanje aktivatora¹⁰² te je omogućeno vezanje općih transkripcijskih faktora i RNA-polimeraze i inicijacija transkripcije⁹⁶.



Slika 2. Shematski prikaz strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima represije. Označeni su položaji nukleosoma koji podliježu remodeliranju (○) i nukleosoma koji se ne remodeliraju prilikom indukcije promotora (●), mjesta za vezanje aktivatora transkripcije Pho4 visokog (■) i niskog afiniteta (□) te „TATA-box“ (T), prema literaturnom izvoru⁹⁵.

Kasnija istraživanja su pokazala da pod uvjetima indukcije transkripcije nisu potpuno uklonjena sva četiri nukleosoma s promotorske regije, već je na aktivnom promotoru uvijek prisutan prosječno jedan nukleosom nepromijenjene strukture i varijabilnog položaja. Budući da je za promotor *PHO5* pokazano potpuno uklanjanje histona s DNA, prisutnost nukleosoma na aktivnom promotoru prvotno je objašnjena postojanjem ravnoteže između uklanjanja i formiranja nukleosoma, odnosno, aktivacija promotora je definirana kao prelazak strukture kromatina iz statičnog u dinamično stanje¹⁰⁴. Kasnije je za promotor *PHO5* predložen specifičan mehanizam remodeliranja strukture kromatina, takozvani „sliding-mediated nucleosome disassembly“ koji pretpostavlja da je na aktivnom promotoru uvijek prisutan jedan nukleosom nepromijenjene strukture čiji položaj je varijabilan, ali nikada ne dolazi do njegovog uklanjanja^{15,18}. Prema ovom modelu, proizašlom na osnovu *in vitro* ispitivanja mehanizma djelovanja kompleksa RSC, vezanje kompleksa za određeni nukleosom promotora dovodi do „klizanja“ tog nukleosoma po DNA i na taj način potpunog remodeliranja susjednih nukleosoma. Dakle, remodelirajući kompleks koristi nukleosom za

koji je vezan za uklanjanje ostalih nukleosoma promotora, pri čemu nukleosom za koji je kompleks vezan nije moguće ukloniti¹⁸. Činjenica da je proces remodeliranja ograničen na nukleosome promotora, dok okolni nukleosomi ne podliježu remodeliranju, objašnjena je specifičnim kovalentnim modifikacijama histona i prisutnošću proteina inačica histona unutar nukleosoma promotorskih regija⁶⁹; pokazana je pojačana acetilacija nukleosoma promotora te prisutnost inačice histona H₂A.Z^{33,105}, koji se povezuju s destabilizacijom nukleosoma, odnosno s transkripcijski aktivnim kromatinom.

Pokazano je da u procesu aktivacije promotora *PHO5* sudjeluje histon-acetiltransferaza Gcn5, podjedinica kompleksa SAGA. U odsustvu Gcn5 remodeliranje kromatina promotora je znatno sporije, no postiže se potpuno otvaranje kromatina te je uloga ovog proteina utvrđena tek primjenom takozvanog „kinetičkog pristupa“, to jest ispitivanjem utjecaja inaktivacije pojedinog proteina na kinetiku procesa remodeliranja, umjesto na krajnju razinu remodeliranja strukture kromatina⁵.

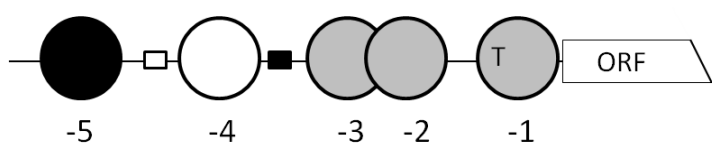
Ispitivanjem učinka inaktivacije katalitičkih podjedinica, ATP-aza, svih 15 kompleksa uključenih u remodeliranje strukture kromatina u kvascu koji nisu esencijalni za rast stanica na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* nađeno je da je jedino u odsustvu proteina Snf2 i Ino80 kinetika remodeliranja strukture kromatina promotora značajno sporija, ali bez utjecaja na krajnji stupanj otvaranja kromatina. Istovremena inaktivacija oba proteina imala je dodatan učinak na kinetiku remodeliranja, što ukazuje na neovisno djelovanje ovih proteina u procesu aktivacije promotora, međutim u stanicama dvostrukog mutanta *snf2 ino80* također je postignuto potpuno remodeliranje strukture kromatina promotora nakon produžene indukcije⁶. Osim toga, nađeno je da je indukcija gena *PHO5* sporija prilikom istovremene inaktivacije ATP-aza Isw1 i Chd1, dok pojedinačne inaktivacije ovih proteina nemaju utjecaja⁷. Pokazani „*in trans*“ mehanizam remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*, uklanjanjem histona s DNA, upućivao je na sudjelovanje proteina šaperona za histone u procesu remodeliranja, koji bi vezao histone uklonjene s promotorske regije, te je nađeno da je kinetika remodeliranja strukture kromatina promotora značajno sporija u odsustvu proteina Asf1^{8,106}, „šaperona“ za histone H3/H4¹⁰⁷.

S obzirom na pokazano specifično vezanje bromo-domene kompleksa SWI/SNF za acetilirane histone, neophodno za stabilno zadržavanje kompleksa na promotoru i posljedično remodeliranje strukture kromatina³⁸, pretpostavljeno je međudjelovanje kompleksa SWI/SNF i SAGA prilikom indukcije promotora *PHO5*. Međutim, nađeni značajno jači učinak na

kinetiku remodeliranja kromatina u stanicama dvostrukog mutanta *gcn5 snf2* u odnosu na jednostruke mutante upućuje i na dodatno, neovisno djelovanje ovih kompleksa u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora⁶.

Ovi rezultati pokazuju da je proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* rezultat kooperativnog djelovanja više različitih proteinskih kompleksa, a osim toga upućuju na postojanje dodatne remodelirajuće aktivnosti pri indukciji promotora. Zanimljivo je da unatoč tome što do danas nije pronađen proteinski kofaktor čija aktivnost bi bila neophodno potrebna u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* prilikom fiziološke indukcije u podlozi bez fosfata, neki kofaktori su se pokazali esencijalnim za ovaj proces pod uvjetima sub-maksimalne indukcije. Ovakvi uvjeti postižu se uzgojem stanica u podlozi niske koncentracije fosfata, ili pojačanom ekspresijom specifičnog aktivatora transkripcije Pho4 pri uzgoju stanica u podlozi visoke koncentracije fosfata te također inaktivacijom negativnih regulatora transkripcije, proteina Pho80 i Pho85, pri uzgoju stanica u podlozi visoke koncentracije fosfata. Slabija indukcija podrazumijeva nižu koncentraciju aktivnog aktivatora transkripcije, Pho4, u jezgri u odnosu na jaku fiziološku indukciju, što dovodi do veće potrebe za kompleksima uključenima u remodeliranje strukture kromatina. Pojedinačne inaktivacije proteina Gcn5, Snf2^{6,108,109}, Ino80⁶ i Asf1⁸ te zajednička inaktivacija Isw1 i Chd1⁷ spriječile su remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* pod ovakvim uvjetima.

Aktivnost promotora gena *PHO8* također je regulirana putem remodeliranja strukture kromatina: pod uvjetima represije promotorska regija je prekrivena nukleosomima pri čemu se između nukleosoma -3 i -4 nalazi kratka HS koja sadrži mjesto za vezanje aktivatora Pho4 visokog afiniteta, UASp2 (Slika 3).

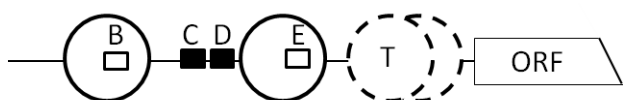


Slika 3. Shematski prikaz strukture kromatina promotora *PHO8* pod uvjetima represije.

Označeni su položaji nukleosoma koji podliježu djelomičnom (◐) ili potpunom remodeliranju (○) i nukleosoma koji se ne remodeliraju prilikom indukcije promotora (●), mjesta za vezanje aktivatora transkripcije Pho4 visokog (■) i niskog afiniteta (□) te „TATA-box“ (T), prema literaturnom izvoru¹⁰⁰.

Pod uvjetima indukcije dolazi do remodeliranja nukleosoma promotora *PHO8*, pri čemu mjesto za vezanje RNA-polimeraze postaje dostupno, no, za razliku od promotora *PHO5*, remodeliranje nije potpuno te se pretpostavlja da su na dijelovima aktivnog promotora prisutni destabilizirani nukleosomi¹⁰⁰. U *in vitro* ispitivanjima nađena su dva mjesta za vezanje aktivatora Pho4 na promotoru¹⁰⁰, međutim samo je za mjesto visokog afiniteta, UASp2 pokazana funkcionalnost *in vivo* iz čega vjerojatno proizlazi niža razina aktivacije transkripcije gena *PHO8* u odnosu na *PHO5*¹¹⁰, koji sadrži dva funkcionalna mjesta za vezanje aktivatora. Za proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO8* neophodno je potrebna aktivnost proteina Gcn5 te kompleksa SWI/SNF; u njihovom odsustvu ne dolazi do aktivacije promotora⁹. Također, u remodeliranju sudjeluje i kompleks INO80, no njegova aktivnost je potrebna za učinkovitu kinetiku remodeliranja, bez utjecaja na krajnju razinu otvaranja kromatina⁶. Ispitivanja provedena *in vitro* pokazala su veću stabilnost nukleosoma promotora *PHO8* u odnosu na promotor *PHO5*, čime se objašnjava veća potreba za kofaktorima uključenima u remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8*¹¹¹.

Promotor gena *PHO84* pod uvjetima represije sadrži kratku HS, između dva nukleosoma, unutar koje se nalaze dva mjesta za vezanje aktivatora Pho4 visokog afiniteta, UASpC i UASpD. Prilikom indukcije dolazi do potpunog remodeliranja ovih nukleosoma pri čemu postaju dostupna dva dodatna mjesta za vezanje aktivatora nižeg afiniteta, UASpB i UASpE (Slika 4), dok se još jedno mjesto za vezanje aktivatora, UASpA, nalazi više uzvodno na promotoru.



Slika 4. Shematski prikaz strukture kromatina promotora *PHO84* pod uvjetima represije.

Označeni su položaji nukleosoma koji podliježu remodeliranju (○ i ⊙), mjesta za vezanje aktivatora transkripcije Pho4 visokog (■) i niskog afiniteta (□) te „TATA-box“ (T). Isprekidane linije označavaju nukleosome čiji položaj nije jasno određen. Položaji su označeni prema literaturnom izvoru¹⁰.

Pokazano je da mjesta za vezanje aktivatora UASpA i UASpB ne doprinose aktivaciji transkripcije, dok su mjesta UASpC, UASpD i UASpE od esencijalne važnosti za učinkovitu aktivaciju promotora.

Za razliku od promotora *PHO5* i *PHO8*, dio DNA koja sadrži „TATA box“ je na promotoru *PHO84* djelomično dostupan pod uvjetima represije, odnosno položaj nukleosoma koji prekriva „TATA box“ nije strogo određen¹⁰. Nadalje, razina aktivacije transkripcije gena *PHO84* je veća u odnosu na *PHO5*, što je u skladu s većim brojem UAS-elemenata¹¹². Osim toga, u usporedbi s promotorom *PHO5*, do aktivacije promotora *PHO84* dolazi kod niže razine indukcije, odnosno pri nižoj koncentraciji aktivatora Pho4 u jezgri. Na promotoru *PHO84* se UAS elementi visokog afiniteta nalaze unutar HS, što omogućuje čvrsto vezanje aktivatora pri nižoj koncentraciji, dok se na promotoru *PHO5* unutar HS nalazi mjesto nižeg afiniteta UASp1, a mjesto visokog afiniteta je pod uvjetima represije prekriveno nukleosomom i postaje dostupno tek nakon remodeliranja kromatina pokrenutog vezanjem Pho4 za UASp1^{113,114}.

Nađeno je da u procesu remodeliranja kromatina promotora *PHO84* sudjeluju proteini Gcn5, Snf2, Ino80 i Asf1, međutim nisu u jednakoj mjeri potrebni za uklanjanje oba nukleosoma koji podliježu remodeliranju: remodeliranje nukleosoma uzvodno od HS nije moguće u odsustvu Snf2 te je značajno usporeno u odsustvu Ino80, dok je remodeliranje nukleosoma nizvodno od HS sporije, ali potpuno o odsustvu Snf2 i u manjoj mjeri ovisi o aktivnosti proteina Ino80. Ovi rezultati predstavljaju prvi primjer različite potrebe za kofaktorima uključenima u remodeliranje dvaju nukleosoma istog promotora¹⁰. Korištenjem takozvanog „N-score“ algoritma koji pokazuje vjerojatnost formiranja nukleosoma na određenoj sekvenci DNA¹¹⁵, *in silico* je predviđena veća stabilnost nukleosoma uzvodno od HS u odnosu na nukleosom nizvodno od HS, što je dodatno potvrđeno *in vitro* ispitivanjima stabilnosti ovih nukleosoma. Također, pokazano je da destabilizacijom nukleosoma uzvodno od HS uvođenjem mutacija u sekvencu DNA koju prekriva ovaj nukleosom, njegovo remodeliranje *in vivo* prestaje ovisiti o aktivnosti proteina Snf2¹⁰. Ovime je dodatno potvrđena hipoteza, postavljena prethodno na temelju usporedbe procesa remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* i *PHO8*¹¹¹, prema kojoj je potreba za kofaktorima u procesu remodeliranja određena stabilnošću nukleosoma i ne ovisi nužno o specifičnom aktivatoru transkripcije¹⁰.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

Kemikalije i enzimi korišteni u ovom radu nabavljeni su od sljedećih proizvođača:

- agar, kvašćev ekstrakt, pepton, bactotripton, kvašćeva dušična baza bez aminokiselina (YNB): Becton, Dickinson and Company (BD), SAD
- aminokiseline, galaktoza, rafinoza, *p*-nitrofenil fosfat, *p*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid, ampicilin, G418, spermin, spermidin, etidijev bromid, bromfenol plavo, fenol, kloroform, polietilenglikol (PEG) 4'000, albumin goveđeg seruma (BSA), natrijev dodecil sulfat (SDS), fikol PM 400, sorbitol, β -merkaptioetanol, oligonukleotidi, Triton X-100, natrijev citrat: Sigma, Njemačka
- agaroz: Lonza, Švicarska
- ribonukleaza A (RNaza A), proteinaza K, restrikcijska endonukleaza *Cla*I: Roche Diagnostics GmbH, Njemačka
- sve restrikcijske endonukleaze (osim *Cla*I): New England Biolabs, SAD
- zimolijaza 100 T: amsbio, UK
- pufer za lančanu reakciju polimerazom (PCR), deoksiribonukleotidi, standardi za DNA elektroforezu: Fermentas, Thermo Scientific, SAD
- *Taq* polimeraza: izolirana u našem laboratoriju ekspresijom rekombinantnog gena u *E. coli*, kao dio diplomskog rada
- T4 DNA ligaza: Takara, Japan
- 4-amino-1-tertbutil-3-(1'-naftil)pirazolo[3,4-d]pirimidin (1-NaPP1): Toronto Research Chemicals Inc., Kanada
- staklene kuglice: Sartorius, Njemačka
- sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja korištene su od proizvođača Acros Organics (SAD), dok su kiseline i alkoholi korišteni od proizvođača Carlo Erba (Italija)

3.1.2. Otopine i puferi

- Pufer TE (pH = 7,4): 10 mmol L⁻¹ Tris; 1 mmol L⁻¹ EDTA. Pripremljen je razrjeđivanjem koncentriranih otopina (1 mol L⁻¹ Tris-HCl pH = 7,4 i 0,5 mol L⁻¹ EDTA pH = 8), pH je podešen pomoću natrijevog hidroksida
- 50 x koncentrirani pufer TAE: 2 mol L⁻¹ Tris; 1 mol L⁻¹ octene kiseline, 50 mmol L⁻¹ EDTA. Za pripremu je korištena koncentrirana otopina EDTA (0,5 mol L⁻¹, pH = 8) i ledena octena kiselina. pH ovako pripremljenog pufera bio je oko 8,5.
- 0,1 mol L⁻¹ acetatni pufer (pH = 3,6): 0,1 mol L⁻¹ octene kiseline, pH je podešen pomoću natrijevog hidroksida
- Pufer LacZ: 0,06 mol L⁻¹ Na₂HPO₄; 0,04 mol L⁻¹ NaH₂PO₄; 0,01 mol L⁻¹ KCl; 0,002 mol L⁻¹ MgSO₄; 0,04 mol L⁻¹ β-merkaptotanol
- Pufer za razbijanje stanica (pH = 4,8): 10 mmol L⁻¹ Tris; 10 mmol L⁻¹ EDTA; Triton X-100 (φ = 0,02); 0,1 mol L⁻¹ NaCl; 10 g L⁻¹ SDS
- 10 x koncentrirani pufer za digestiju jezgri restrikcijским enzimima (10 x SSTEEM, pH = 7,4): 1,5 mmol L⁻¹ spermin; 5 mmol L⁻¹ spermidin; 0,1 mol L⁻¹ Tris; 2 mmol L⁻¹ EDTA; 2 mmol L⁻¹ EGTA, 0,1 mol L⁻¹ MgCl₂; 50 mmol L⁻¹ β-merkaptotanol; 0,5 mmol L⁻¹ NaCl. Za pripremu su korištene koncentrirane otopine EGTA (0,1 mol L⁻¹, pH = 8,3), EDTA (0,5 mol L⁻¹, pH = 8) i Tris-HCl (1 mol L⁻¹, pH = 7,4). pH je podešen pomoću kloridne kiseline.
- Pufer za denaturaciju: 0,5 mol L⁻¹ NaOH, 1,5 mol L⁻¹ NaCl
- 20 x koncentrirani pufer SSC: 3 mol L⁻¹ NaCl; 0,3 mol L⁻¹ natrijev citrat
- 10 x koncentrirani pufer Denhardt: 2 g L⁻¹ fikor PM 400; 2 g L⁻¹ albumin goveđeg seruma (BSA); 10 mmol L⁻¹ EDTA; 50 g L⁻¹ SDS; 2 g L⁻¹ polivinilpirolidon-40 (PVP-40)
- Predhibridizacijski pufer: 20 x SSC (φ = 0,1); 10 x Denhardt (φ = 0,1); DNA sperme lososa
- Otopina EDTA 0,5 mol L⁻¹ (pH = 8): 0,5 mol L⁻¹ dinatrijeve soli EDTA; pH je podešen dodatkom peleta natrijevog hidroksida
- Otopina EGTA 0,1 mol L⁻¹ (pH = 8,3): 0,1 mol L⁻¹ Titriplex VI, pH je podešen pomoću kalijevog hidroksida

- Otopina etidijevog bromida: osnovna otopina pripravljena je u koncentraciji 5 g L^{-1} i čuvana u tamnoj bočici na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Otopina za vizualizaciju DNA pripravljena je razrjeđivanjem osnovne otopine u omjeru 1:10 000.
- Otopina fikola (pH = 6,8): 180 g L^{-1} fikol PM 400; $0,02 \text{ mol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$; $0,25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EGTA}$, $0,25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$. Za pripremu su korištene koncentrirane otopine EGTA ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8.3) i EDTA ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8). pH je podešen pomoću kalijeveg hidroksida.
- Otopina izoamilni alkohol / kloroform (IAC): izoamilni alkohol ($\varphi = 0,04$); kloroform ($\varphi = 0,96$)
- Otopina polietilenglikola $0,6 \text{ g mL}^{-1}$: $0,6 \text{ g}$ polietilenglikola (PEG) 4'000 pomiješano je s $0,4 \text{ mL}$ deionizirane vode (ukupni volumen 1 mL) i prokuhano 10 min radi otapanja i sterilizacije. Otopina je korištena svježe napravljena, nakon hlađenja na $\sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Otopina proteinaze K: $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$, otopljeno u $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$ (pH = 8,0)
- Otopina RNaze A: 5 g L^{-1} ribonukleaze A otopljeno u $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$ (pH = 7,5). Otopina je prokuhana 10 minuta radi inaktivacije moguće prisutne deoksiribonukleaze, a nakon hlađenja čuvana je na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Otopina za protoplastiranje: 1 mol L^{-1} sorbitol; $5 \text{ mmol L}^{-1} \beta$ -merkaptotanol
- Otopina zimolijaze 100 T: $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$, otopljeno u deioniziranoj vodi
- Predinkubacijska otopina: $0,72 \text{ mol L}^{-1} \beta$ -merkaptotanol; $2,78 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$
- STOP otopina: $52,6 \text{ g L}^{-1} \text{ SDS}$; $42 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$, $0,53 \text{ mol L}^{-1} \text{ Tris}$. Za pripremu su korištene koncentrirane otopine: SDS (200 g L^{-1}), EDTA ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8) i Tris-HCl (1 mol L^{-1} , pH = 7,4)
- Agarozni gel: pripremljen je otapanjem agaroze zagrijavanjem u puferu TAE. Koncentracija agaroze u gelu bila je od 7 do 20 g L^{-1} , ovisno o veličini fragmenata DNA koji su razdvajani elektroforezom.
- Otopine antibiotika: ampicilin, 100 g L^{-1} ; G418, 50 g L^{-1} . Otopine su sterilizirane filtracijom i čuvane na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.3. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Laboratorijski sojevi kvasca *S. cerevisiae* korišteni u ovom radu prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Laboratorijski sojevi kvasca *S. cerevisiae* korišteni u ovom radu

| Soj | Genotip | Izvor |
|--|--|-----------------------------------|
| CY337 | <i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 leu2-Δ1 his3-Δ200</i> | ¹¹⁶ |
| CY337 <i>sth1^{td}</i> | CY337 <i>sth1Δ::pCUP1-sth1^{td}::URA3</i> | Ovaj rad |
| CY337 <i>rsc2</i> | CY337 <i>rsc2::HIS3</i> | D. Hlevnjak, Diplomski rad, 2013. |
| CY337 <i>rsc2 sth1^{td}</i> | CY337 <i>rsc2::HIS3 sth1Δ::pCUP1-sth1^{td}::URA3</i> | Ovaj rad |
| YBC82 | <i>MATα his3Δ200 leu2Δ1 lys2-128Δ trp1Δ63 ura3-52 rsc2::HIS3</i> | ¹⁶ |
| CY407 | CY337 <i>snf2::HIS3</i> | ¹¹⁶ |
| CY407 <i>sth1^{td}</i> | CY407 <i>sth1Δ::pCUP1-sth1^{td}::URA3</i> | Ovaj rad |
| CY407 <i>ino80</i> | CY407 <i>ino80::URA3</i> | ⁶ |
| CY407 <i>asf1</i> | CY407 <i>asf1::kanMX4</i> | ⁸ |
| YS44 | <i>MATα his3-11 his3-15 leu2-3 leu2-112 ura3-432 can^Rpho80^{ts}</i> | ⁹⁷ |
| YS44 <i>sth1^{td}</i> | YS44 <i>sth1Δ::pCUP1-sth1^{td}::URA3</i> | Ovaj rad |
| W1588-4C | <i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 RAD5</i> | ¹¹⁷ |
| YTT223 | W1588-4C <i>isw1::ADE2 chd1::TRP1</i> | ¹¹⁷ |
| YTT223 <i>sth1^{td}</i> | YTT223 <i>sth1Δ::pCUP1-sth1^{td}::URA3</i> | Ovaj rad |
| YS30 | <i>MATα his3-11 his3-15 leu2-3 leu2-112 ura3-432 can^Rpho85::HIS3</i> | ¹¹⁸ |
| YS30 <i>pho85^{F82G}</i> | YS30 <i>pho85^{F82G}</i> | Ovaj rad |
| YS30 <i>pho85^{F82G} sth1^{td}</i> | YS30 <i>pho85^{F82G} sth1Δ::pCUP1-sth1^{td}::URA3</i> | Ovaj rad |
| W303 | <i>MATα ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1</i> | ¹¹⁹ |
| <i>P_{GALI}-CDC20</i> | W303 <i>cdc20::LEU2 trp1::P_{GALI}-CDC20-TRP1</i> | ¹²⁰ |
| <i>P_{GALI}-CDC20 sth1^{td}</i> | <i>sth1Δ::pCUP1-sth1^{td}::URA3</i> | Ovaj rad |

Budući da je inaktivacija katalitičke podjedinice kompleksa RSC, Sth1, letalna za stanice, korišten je temperaturno-osjetljivi „degron“ mutant *sth1^{td}*. U ovom soju, na amino-kraj

proteina Sth1 vezana je temperaturno osjetljiva inačica proteina dihidrofolat-reduktaze miša (DHFR^{ts}) veličine 21 kDa. DHFR^{ts} sadrži temperaturno-osjetljivi „N-degron“ signal koji se sastoji od destabilizirajućeg aminokiselinskog ostatka na N-kraju i unutarnjeg lizinskog ostatka podložnog višestrukoj ubikvitinilaciji, što u konačnici upućuje protein na razgradnju prema pravilu N-kraja. Degradacijski signal je na 24 °C zaklonjen u unutrašnjosti proteina i tek djelomičnom promjenom konformacije proteina na 37 °C postaje supstrat proteolize pokrenute pravilom N-kraja. Ova proteoliza je izrazito procesivna pa na 37 °C dolazi do brze degradacije cijelog kimernog proteina (DHFR-Sth1)¹²¹. Za konstrukciju mutanata kvasca koji sadrže alel *sth1^{td}* korišten je integrativni plazmid p1622 (§ 3.1.7. Plazmidi). Plazmid je lineariziran cijepanjem restrikcijским enzimom *PmlI* unutar lokusa *STH1* i korišten za transformaciju stanica kvasca. Fragment je ugrađen homolognom rekombinacijom unutar gena *STH1*, a uspješnost ugradnje provjerena je metodom lančane reakcije polimeraze (§9. Dodatak, Slika 29.) (početnice i veličine umnoženih fragmenata navedene su u poglavlju 3.1.8. Oligonukleotidi). Također, potvrđen je fenotip svih konstruiranih sojeva *sth1^{td}* prestankom rasta na 37 °C, kao što je prikazano na Slici 6. (§ 4.1.) za stanice soja CY337 *sth1^{td}*.

Delecijски mutant CY337 *rsc2 sth1^{td}* konstruiran je transformacijom stanica soja CY337 *sth1^{td}* fragmentom DNA koji sadrži disrupcijsku kasetu *rsc2::HIS3* umnoženu iz soja YBC82. Za umnožavanje disrupcijske kasete metodom lančane reakcije polimeraze korištene su početnice na nukleotidnim položajima -381 i +2971 u odnosu na početni kodon gena *RSC2* (ATG). Uspješnost delecije gena *RSC2* provjerena je metodom lančane reakcije polimeraze korištenjem jednakih početnica kao za umnožavanje disrupcijske kasete („početnice 1“) te dodatnog para početnica na nukleotidnim položajima -524 u odnosu na početni kodon gena *RSC2* i +532 u odnosu na početni kodon gena *HIS3* („početnice 2“; §9. Dodatak, Slika 30.) (početnice i veličine umnoženih fragmenata navedene su u poglavlju 3.1.8. Oligonukleotidi). Za konstrukciju mutanata kvasca koji sadrže alel *pho85^{F82G}* konstruiran je integrativni plazmid pPHO85^{F82G} (§ 3.1.7. Plazmidi). Plazmid je lineariziran cijepanjem restrikcijским enzimom *AflIII* unutar lokusa *LEU2* i korišten za transformaciju stanica kvasca soja YS30 (*pho85Δ*). Fragment je ugrađen homolognom rekombinacijom unutar alela *leu2*.

3.1.4. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja stanica kvasca

Za submerzni uzgoj stanica kvasca u podlozi visoke koncentracije fosfata (+Pi; uvjeti represije PHO promotora) korištena je selektivna tekuća podloga YNBP sastava: 6,7 g L⁻¹ kvašćeve dušične baze bez aminokiselina (YNB), 2 g L⁻¹ smjese aminokiselina koja sadrži sve aminokiseline i tvari potrebne za rast kvasca osim onih preko kojih se vrši selekcija auksotrofnih sojeva („drop out“; Tablica 2.), 1 g L⁻¹ KH₂PO₄ te 20 g L⁻¹ šećera. Ovisno o auksotrofnosti soja, u podlogu su dodavani histidin (80 mg L⁻¹), uracil (80 mg L⁻¹), triptofan (80 mg L⁻¹) i leucin (160 mg L⁻¹). Ova podloga je modifikacija standardne podloge za uzgoj kvasca YNB, s dodatkom 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, kako bi se osigurala potpuna represija PHO promotora.

Tablica 2. Smjesa aminokiselina i tvari potrebnih za rast stanica kvasca („drop out“)

| | | | |
|-------------------------|----|-----------------------------------|------|
| adenin | 3g | L-izoleucin | 2g |
| L-alanin | 2g | L-lizin | 4g |
| L-arginin | 2g | L-metionin | 2g |
| L-asparagin | 2g | <i>p</i> -aminobenzojeva kiselina | 0,2g |
| L-asparaginska kiselina | 2g | L-fenilalanin | 2g |
| L-cistein | 2g | L-prolin | 2g |
| L-glutamin | 2g | L-serin | 2g |
| L-glutaminska kiselina | 2g | L-treonin | 2g |
| L-glicin | 2g | L-tirozin | 2g |
| inozitol | 2g | L-valin | 2g |

Za submerzni uzgoj stanica kvasca u podlozi bez fosfata (-Pi; uvjeti indukcije PHO promotora) korištena je minimalna sintetska tekuća podloga sastava: 20 g L⁻¹ glukoze, 2 g L⁻¹ smjese „drop-out“ (jednaka kao za podlogu YNB; Tablica 2.), 2 g L⁻¹ asparagina, 0,5 g L⁻¹ MgSO₄x7H₂O, 0,1 g L⁻¹ NaCl-a, 0,1 g L⁻¹ CaCl₂x2H₂O, 5,88 g L⁻¹ Na-citrata, 1 g L⁻¹ KCl-a i otopina elemenata u tragovima ($\varphi = 0,002$) (0,25 g L⁻¹ borna kiselina, 0,02 g L⁻¹ CuSO₄x5H₂O, 0,05 g L⁻¹ KI, 0,1 g L⁻¹ FeCl₃x6H₂O, 0,2 g L⁻¹ MgSO₄x7H₂O, 0,1 g L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄x4H₂O i 0,2 g L⁻¹ ZnSO₄x7H₂O). Nakon autoklaviranja podloge, dodane su još otopina 1 ($\varphi = 0,004$) (0,05 g L⁻¹ riboflavin, 0,05 g L⁻¹ *p*-aminobenzojeva kiselina, 0,5 g L⁻¹ inozitol; sterilizirano filtracijom) i otopina 2 ($\varphi = 0,0001$) (0,02 g L⁻¹ biotin, 4 g L⁻¹ Ca-pantotemat, 4g L⁻¹ nikotinska kiselina, 4 g L⁻¹ piridoksal, 4 g L⁻¹ tiamin, 0,02 g L⁻¹ folna

kiselina; sterilizirano filtracijom). Histidin, uracil, triptofan i leucin dodavani su u jednakim koncentracijama kao i u tekući medij YNBP, ovisno o auksotrofности soja.

Krute hranjive podloge jednakog su sastava kao i tekuće, uz dodatak 16 g L⁻¹ agara.

Hranjive podloge, otopine šećera te otopine aminokiselina sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 atm.

Stanice transformirane plazmidom pP_{pho5v33}-*lacZ* uzgajane su u selektivnoj podlozi s 20 g L⁻¹ rafinoze pod uvjetima represije, a indukcija inačice promotora *PHO5* koja se aktivira pomoću aktivatora Gal4 („*PHO5*-variant 33“) postignuta je dodatkom 20 g L⁻¹ galaktoze u podlogu.

Stanice soja *P_{GALI}::CDC20* koje sadrže esencijalan gen *CDC20* pod kontrolom promotora *GALI* uzgajane su u podlozi s 20 g L⁻¹ rafinoze i 20 g L⁻¹ galaktoze. Prebacivanjem ovih stanica u logaritamskoj fazi rasta u podlogu s 20 g L⁻¹ glukoze postignuta je represija promotora *GALI* i prestanak rasta stanica zbog represije transkripcije gena *CDC20*.

Sve ostale stanice uzgajane su u podlozi s 20 g L⁻¹ glukoze.

Stanice temperaturno osjetljivih mutanata, *sth1^{td}* i *pho80^{ts}*, uzgajane su na 24 °C (permissivna temperatura) i zatim prebacivane na 37 °C radi inaktivacije temperaturno osjetljivih proteina. Prilikom prebacivanja na 37 °C stanice su bile u logaritamskog fazi rasta. U eksperimentima u kojima nisu korišteni temperaturno osjetljivi mutanti, stanice su uzgajane na 30 °C.

3.1.5. Sojevi bakterija

Za umnožavanje i izolaciju plazmida korištene su komercijalno dostupne kompetentne stanice bakterije *E. coli*, soj DH5α (genotip: F- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*) proizvođača Invitrogen, SAD.

3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za submerzni uzgoj *E. coli* korištena je neselektivna tekuća podloga LB sastava: 10 g L⁻¹ bactotripton; 5 g L⁻¹ kvašičev ekstrakt; 5 g L⁻¹ NaCl, ili selektivna tekuća podloga LB-Amp jednakog sastava uz dodatak 100 μg/mL ampicilina.

Krute podloge su osim navedenih komponenata sadržavale još i 16 g/L agara.

3.1.7. Plazmidi

- Plazmid pPHO85^{F82G} konstruiran je ovom radu izrezivanjem fragmenta *DraIII* – *Sall*, koji sadrži alel *pho85*^{F82G} pod kontrolom promotora *PHO85*, iz plazmida opisanog

prethodno¹²², i njegovom ligacijom u plazmid pRS305¹²³. Za ligaciju je korišten fragment *SalI* – *DraIII* vektora pRS305, molarni omjer vektora i inserta bio je 1 : 3, korišteno je oko 80 ng vektora.

- Plazmid pP_{pho5v33}-*lacZ* konstruiran je prethodno iz plazmida pP_{pho5}-*lacZ*, koji sadrži gen *lacZ* pod kontrolom promotora *PHO5*, zamjenom dvaju mjesta za vezanje aktivatora Pho4 na promotoru *PHO5* (UASp1 i UASp2) mjestima za vezanje aktivatora Gal4²⁰.
- Plazmid p1622 konstruiran je prethodno iz plazmida pRS306¹²³ i sadrži konstrukt Ub-DHFR^{ts}-HA-*STH1* i selektivni marker *URA3*^{19,121}. Plazmid je poklon dr. B. R. Cairnsa, Sveučilište Utah, SAD.

3.1.8. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi (početnice) korišteni za metodu lančane reakcije polimeraze prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Oligonukleotidi (početnice) korišteni u ovom radu

| Opis | Slijed nukleotida 5' – 3' | Veličina umnoženog fragmenta DNA |
|--|--|--|
| Potvrda ugradnje fragmenta koji sadrži alel <i>sth1^{td}</i> u lokus <i>STH1</i> | fwd: 5' CAGGCGTCCTCT CTGAGGTCCA 3' rev: 5' CCTTCGCATTGA AATCTGCTGA 3' | U stanicama <i>sth1^{td}</i> dobije se fragment veličine ~650 pb (ispravna ugradnja fragmenta u lokus <i>STH1</i>), dok se u stanicama <i>STH1</i> ne dobije produkt. |
| Umnožavanje disrupcijske kasete <i>rsc2::HIS3</i> i potvrda delecije gena <i>RSC2</i> („početnice 1“; §9.Dodatak, Slika 30.) | fwd: 5' TGTAGCTGCCTG AACTCG 3' rev: 5' GAAGACAATGG CGTAGTG 3' | Fragment umnožen iz soja <i>rsc2::HIS3</i> je veličine ~1800 pb, a iz soja <i>RSC2</i> 3369 pb. |
| Potvrđivanje delecije gena <i>RSC2</i> disrupcijskom kasetom <i>rsc2::HIS3</i> („početnice 2“; §9.Dodatak, Slika 30.) | fwd: 5' GGTCCCCCAAT CCATACTAA 3' rev: 5' ATTCTTGCCTCG CAGACAAT 3' | U stanicama <i>rsc2::HIS3</i> dobije se fragment veličine ~1300 pb (ispravna ugradnja disrupcijske kasete u lokus <i>RSC2</i>), dok se u stanicama <i>RSC2</i> ne dobije produkt. |

3.2. Metode rada

3.2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *E. coli*, soj *DH5α*

Alikvoti kompetentnih stanica od 50 µL čuvani su u Eppendorf epruvetama na -70 °C te su prije transformacije otopljeni na ledu. Nakon otapanja, u epruvete je dodano 1 - 5 µL (1 – 10 ng) plazmidne DNA i lagano promiješano protresanjem. Po potrebi je rađena pozitivna i

negativna kontrola transformacije. Za pozitivnu kontrolu, alikvotu kompetentnih stanica dodano je 2,5 μL plazmidne DNA pUC19 (250 pg) priložene od proizvođača, dok za negativnu kontrolu nije dodana DNA. Epruvete su inkubirane na ledu 30 minuta, nakon čega je slijedio temperaturni šok, 20 sekundi na 42 °C te ponovno inkubacija na ledu 2 minute. Zatim je u svaku epruvetu dodano 950 μL tekućeg medija LB zagrijanog na 37 °C te je sve skupa inkubirano 1 sat na 37 °C na rotacionoj tresilici (225 rpm). Nakon toga je po 200 μL svake suspenzije naciepljeno na selektivnu ploču LB s dodatkom 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina i inkubirano preko noći na 37 °C. Ostatak suspenzija koji nije naciepljen na ploče čuvan je u frižideru na +4 °C i po potrebi ponovno naciepljen idući dan.

3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli* („midiprep“)

Izolacija plazmidne DNA rađena je korištenjem komercijalno dostupnog kita „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ proizvođača Qiagen, Nizozemska. Protokol za izolaciju te sve potrebne otopine priloženi su od proizvođača.

3.2.3. Transformacija stanica kvasca *S. cerevisiae* litij acetatnom metodom

Stanice kvasca uzgojene su preko noći na rotacionoj tresilici u 10 mL tekuće podloge YNBP do logaritamske faze rasta. Izmjerena je vrijednost OD_{600} na spektrofotometru (između 1 i 2 / mL), stanice su odvojene od podloge centrifugiranjem (5 min / 3000 rpm), a talog je ispran sterilnim puferom TE. Nakon ponovnog centrifugiranja, talog je resuspendiran u sterilnom puferu TE, pri čemu je volumen pufera podešen tako da vrijednost OD_{600} suspenzije u puferu bude 50- 60 / mL. Dodan je volumen 0,2 mol L^{-1} litijevog acetata jednak volumenu pufera TE te je suspenzija inkubirana na rotacionoj tresilici na 30 °C 1 sat. Zatim je 100 μL suspenzije stanica odpipetirano u Eppendorf epruvetu, dodana je DNA (1 – 3 μg kružne plazmidne DNA, 6 – 10 μg linearnog fragmenta DNA) ukupnog volumena do 15 μL te je sve skupa inkubirano 30 minuta na 30 °C bez miješanja. Suspenziji stanica i DNA potom je dodano 145 μL otopine polietilenglikola 4'000 0,6 g mL^{-1} uz snažno protresanje i inkubirana je 45 minuta do 1 sat na 30 °C bez miješanja. Slijedio je temperaturni šok, 6 minuta na 42 °C, nakon čega je u suspenziju dodano 1 mL hladne sterilne deionizirane vode te su stanice odvojene centrifugiranjem (1 min / 8000 rpm). Talog je ispran s 1 mL sterilne vode, centrifugiran, resuspendiran u 120 μL sterilne vode i naciepljen na krute selektivne podloge. Ploče su

nakon naciepljivanja inkubirane na 30 °C ili na 24 °C (temperaturno osjetljivi mutanti) do porasta kolonija (2 – 4 dana).

3.2.4. Izolacija genomske DNA iz kvasca

Stanice kvasca uzgojene su preko noći na rotacionoj tresilici u 10 mL tekuće hranjive podloge YNBP do stacionarne faze rasta (vrijednost OD₆₀₀ izmjerena na spektrofotometru bila je iznad 6 / mL). Centrifugiranjem su odvojene od podloge, talog je resuspendiran u 1 mL sterilne deionizirane vode i dobivena suspenzija je odpipetirana u Eppendorf epruvetu. Nakon centrifugiranja (1 min / 8000 rpm) talog je resuspendiran u 200 µL pufera za razbijanje stanica, dodano je 300 µL otopine fenol-kloroform (1 : 1), 300 µL staklenih kuglica te je suspenzija snažno miješana na „vortex“ uređaju 4 minute. Zatim je dodano 200 µL pufera TE i nakon centrifugiranja (5 min / 13 000 rpm) je pažljivo izdvojena gornja vodena faza koja sadrži DNA (oko 400 µL) i prenijeta u novu Eppendorf epruvetu. Dodan je 1 mL (2,5 x volumen) hladnog 96%-tnog etanola, DNA je istaložena centrifugiranjem (5 min / 13 000 rpm / 4 °C), a talog je ispran s 1 ml hladnog 70%-tnog etanola i osušen na zraku. Nakon sušenja, talog je otopljen u 400 µL pufera TE uz dodatak 5 µL otopine RNaze A i inkubiran na 37 °C 15 minuta. Zatim je ponovno istaložena DNA dodatkom 16 µL 5 mol L⁻¹ natrijevog klorida i 1 mL hladnog 96%-tnog etanola, suspenzija je centrifugirana (5 min / 13 000 rpm / 4 °C), talog je ispran s 1 ml hladnog 70%-tnog etanola, osušen na zraku, otopljen u 50 – 100 µL pufera TE i čuvan na -20 °C. Uspješnost izolacije provjerena je elektroforetskom analizom na agaroznom gelu (na gel je nanesen 1 µL uzorka), a koncentracija DNA je određena spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 260 nm (obično 3 – 5 µg µL⁻¹).

3.2.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Izolacija DNA iz agaroznog gela rađena je korištenjem komercijalno dostupnog kita „QIAquick Gel Extraction Kit“ proizvođača Qiagen, Nizozemska. Protokol za izolaciju te sve potrebne otopine priloženi su od proizvođača.

3.2.6. Lančana reakcija polimeraze

Reakcijske smjese volumena 50 µL za provođenje lančane reakcije polimeraze sadržavale su:

- genomska DNA: 0,3 µg
- početnice: 0,5 µmol L⁻¹

- deoksiribonukleozid trifosfati: 0,2 mmol L⁻¹ svaki
- 1 x koncentrirani pufer za *Taq* polimerazu s MgCl₂
- *Taq* polimeraza: 1 U
- sterilna deionizirana voda do ukupnog volumena

Reakcija se odvijala prema sljedećem programu:

1. 1 ciklus: 5 minuta 95 °C
2. 30 ciklusa: 30 sekundi 95 °C / 30 sekundi 60 °C / 1 – 3.5 min 72 °C (ovisno o veličini umnožavanog fragmenta; otprilike 1 minuta za 1000 pb)
3. 1 ciklus: 7 minuta 72 °C

3.2.7. *Indukcija PHO promotora i mjerenje aktivnosti enzima kisele fosfataze u suspenziji stanica kvasca*

Stanice kvasca uzgojene su preko noći na rotacionoj tresilici u tekućoj hranjivoj podlozi YNBP visoke koncentracije fosfata (uvjeti represije PHO promotora) do logaritamske faze rasta. Uvjeti indukcije postignuti su precjepljivanjem i inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata: izračunat je potreban volumen suspenzije stanica tako da vrijednost OD₆₀₀ u podlozi bez fosfata bude oko 0,3 / mL, stanice su centrifugiranjem odvojene od podloge (5 min / 3000 rpm), talog je ispran sterilnom deioniziranom vodom, resuspendiran u željenom volumenu sintetske podloge te je suspenzija inkubirana na rotacionoj tresilici.

Količina stanica potrebnih za mjerenje aktivnosti kisele fosfataze određena je prema očekivanoj aktivnosti i željenom vremenu trajanja reakcije (obično 5 – 10 minuta), tako da koncentracija produkta reakcije bude u području linearnog očitavanja spektrofotometra. Izračunati volumen stanica je centrifugiran i resuspendiran u 4 mL 0,1 mol L⁻¹ acetatnog pufera (pH = 3,6). U slučaju mjerenja aktivnosti sa stanicama uzgojenima u podlozi visoke koncentracije fosfata, talog je ispran vodom prije resuspendiranja u puferu, jer bi anorganski fosfat iz podloge djelovao kao inhibitor kisele fosfataze. Suspenziji u puferu izmjerena je vrijednost OD₆₀₀. Reakcijska smjesa sadržavala je 1 mL suspenzije stanica u puferu i 1 mL otopine supstrata (20 mmol L⁻¹ *p*-nitrofenil fosfat otopljen u puferu za mjerenje aktivnosti). Reakcija se provodila na 30 °C (suspenzije stanica i otopina supstrata predinkubirane su 5 – 10 min na 30 °C), a zaustavljena je dodatkom 1 ml 1 mol L⁻¹ NaOH. U slijepu probu je na 1 mL suspenzije stanica u puferu dodan 1 mL 1 mol L⁻¹ NaOH, kako bi se enzim denaturirao i enzimska reakcija se ne bi odvijala te zatim 1 mL otopine supstrata, pri čemu je nastali

produkt bio posljedica spontanog raspada supstrata. Nakon provedene reakcije, stanice su centrifugiranjem odvojene od supernatanta koji je korišten za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije produkta enzimske reakcije, *p*-nitrofenola. Apsorbancija uzorka pri 410 nm proporcionalna je koncentraciji *p*-nitrofenola, a specifična aktivnost enzima izračunata je kao omjer apsorbancije i broja stanica izraženog pomoću vrijednosti OD₆₀₀:

$$\text{aktivnost} = \frac{A_{410} * 1000}{\text{OD}_{600} * t_{\text{reakcije}}}$$

Mjerenjem ovisnosti A_{410} o vremenu trajanja reakcije potvrđeno je da su sva mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze u ovom radu provedena u području inicijalne brzine enzimske reakcije (§9. Dodatak, Slika 31.).

Brojanjem stanica (komorica Thoma, Hirschmann) potvrđeno je da su omjeri broj stanica/OD₆₀₀ približno jednaki za stanice svih sojeva uspoređivanih unutar jednog eksperimenta te je isključen mogući utjecaj različite morfologije stanica na vrijednost OD₆₀₀ (§9. Dodatak, Tablica 4.).

3.2.8. Indukcija promotora „*PHO5-variant 33*“ i mjerenje aktivnosti enzima β -galaktozidaze u suspenziji stanica kvasca

Stanice su uzgojene preko noći na rotacionoj tresilici u tekućoj hranjivoj podlozi YNBP s 20 g L⁻¹ rafinoze do logaritamske faze rasta. Indukcija putem aktivatora Gal4 postignuta je dodatkom 20 g L⁻¹ galaktoze: stanice su razrijeđene tako da vrijednost OD₆₀₀ bude otprilike 0,3 / mL i inkubirane na tresilici u podlozi s 20 g L⁻¹ rafinoze i 20 g L⁻¹ galaktoze.

Količina stanica potrebnih za mjerenje aktivnosti β -galaktozidaze određena je prema očekivanoj aktivnosti i željenom vremenu trajanja reakcije (obično 5 – 10 minuta), tako da koncentracija produkta reakcije bude u području linearnog očitavanja spektrofotometra. Izračunati volumen stanica je centrifugiran i resuspendiran u 3,5 mL pufera LacZ te je dobivenoj suspenziji izmjerena vrijednost OD₆₀₀. Reakcijska smjesa sadržavala je 0,8 mL suspenzije stanica u puferu kojoj je dodano 20 μ L kloroforma i 50 μ L 1 g L⁻¹ otopine natrijevog dodecilsulfata uz snažno „vortexiranje“ (budući da je β -galaktozidaza unutarstanični enzim, ovaj korak je bio potreban radi permeabilizacije stanične membrane) te 0,2 mL otopine supstrata (15 mmol L⁻¹ *p*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid otopljen u deioniziranoj vodi). Reakcija se provodila na 30 °C (suspenzije stanica i otopina supstrata

predinkubirane su 5 – 10 min na 30 °C), a zaustavljena je dodatkom 0,5 ml 1 mol L⁻¹ Na₂CO₃. U slijepu probu je na 0,8 mL suspenzije stanica u puferu dodano 20 µL kloroforma i 50 µL 1 g L⁻¹ otopine natrijevog dodecilsulfata te 0,5 mL 1 mol L⁻¹ Na₂CO₃, kako bi se enzim denaturirao i enzimska reakcija se ne bi odvijala te zatim 0,2 mL otopine supstrata, pri čemu je nastali produkt bio posljedica spontanog raspada supstrata. Nakon provedene reakcije stanice su centrifugiranjem odvojene od supernatanta koji je korišten za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije produkta enzimske reakcije, *p*-nitrofenola. Apsorbancija uzorka pri 410 nm proporcionalna je koncentraciji *p*-nitrofenola, a specifična aktivnost enzima izračunata je kao omjer apsorbancije i broja stanica izraženog pomoću vrijednosti OD₆₀₀:

$$\text{aktivnost} = \frac{A_{410} * 10000}{OD_{600} * 0,8 * t_{\text{reakcije}}}$$

Mjerenjem ovisnosti A₄₁₀ o vremenu trajanja reakcije potvrđeno je da su sva mjerenja aktivnosti enzima β-galaktozidaze u ovom radu provedena u području inicijalne brzine enzimske reakcije (§9. Dodatak, Slika 31.).

Brojanjem stanica (komorica Thoma, Hirschmann) potvrđeno je da su omjeri broj stanica / OD₆₀₀ približno jednaki za stanice svih sojeva uspoređivanih unutar jednog eksperimenta te je isključen mogući utjecaj različite morfologije stanica na vrijednost OD₆₀₀ (§9. Dodatak, Tablica 4.).

3.2.9. Izolacija jezgri iz kvasca

Stanice kvasca uzgojene su na rotacionoj tresilici u odgovarajućoj tekućoj hranjivoj podlozi, ovisno o uvjetima pod kojima su izolirane jezgre. Potrebna količina stanica određena je prema broju analiza kromatina za koje su jezgre korištene: za digestiju jednim restriktivnim enzimom potreban je alikvot jezgri izoliran iz 70 OD jedinica stanica kvasca. Suspenzija je centrifugirana (5 min / 4000 rpm / 4°C), talog je držan na ledu i ispran s 30 mL hladne vode (niska temperatura održavana je kako bi se zaustavila indukcija / rast stanica, što je posebno bitno u slučaju ispitivanja kinetike indukcije) i prebačen u prethodno izvagane kivete za centrifugiranje. Suspenzija je ponovno centrifugirana (5 min / 4000 rpm / 4°C), talog je izvagan, resuspendiran u 2 mL predinkubacijske otopine po gramu i inkubiran na tresilici 30 minuta na 30 °C. Slijedilo je centrifugiranje (5 min / 4000 rpm), ispiranje taloga s 30 mL sorbitola (1 mol L⁻¹) i resuspendiranje u 5 mL otopine za protoplastiranje po gramu taloga.

Dobivenoj suspenziji izmjerena je vrijednost OD₆₀₀ (razrijeđenje za mjerenje OD₆₀₀ je 1:100), dodano je 100 µL otopine zimolijaze po gramu taloga i inkubirano na tresilici na 30 °C 30 minuta. Nakon inkubacije ponovno je mjerena vrijednost OD₆₀₀ i ako je protoplastiranje bilo uspješno vrijednost je bila minimalno 80% niža nego izmjerena prije dodatke zimolijaze (odnosno 60% ukoliko su jezgre izolirane iz stanica u stacionarnoj fazi rasta). U slučaju da protoplastiranje nije bilo uspješno, dodano je još enzima i dodatno inkubirano pri čemu ukupno vrijeme inkubacije nije prelazilo 1 sat. Zatim je suspenzija centrifugirana (5 min / 4000 rpm / 4°C), talog je ispran s 30 mL hladnog sorbitola (1 mol L⁻¹) i nakon centrifugiranja resuspendiran u 7 mL hladne otopine fikola po gramu i po potrebi raspodijeljen u više alikvota. Talog je cijelo vrijeme držan na ledu i centrifugiran na niskoj temperaturi kako ne bi došlo do pucanja protoplasta. Suspenzija u otopini fikola je centrifugirana (45 min / 13 000 rpm / 4 °C), nakon čega je talog jezgri naglo zamrznut (15 minuta u mješavini suhog leda i etanola ili u tekućem dušiku) i čuvan na -70 °C.

3.2.10. Analiza remodeliranja strukture kromatina digestijom restriksijskim enzimima

Za digestiju su odabrani restriksijski enzimi čija se mjesta cijepanja na ispitivanom promotoru pod uvjetima represije nalaze unutar nukleosoma koji podliježe remodeliranju prilikom indukcije. Dostupnost restriksijskih mjesta (izražena kao količina DNA pocijepane restriksijskim enzimom u odnosu na ukupnu DNA fragmenta promotora) ovisila je o stupnju remodeliranja nukleosoma i predstavljala je mjeru za stupanj remodeliranja strukture kromatina promotora.

Alikvot jezgri otopljen je na ledu, ispran s 3 mL pufera SSTEEM, centrifugiran (10 min / 4000 rpm / 4°C) i resuspendiran u 200 µL istog pufera (ako je alikvot jezgri bio namijenjen za digestiju s više restriksijskih enzima ili više koncentracija istog enzima, napravljen je potreban broj alikvota po 200 µL). Zatim je dodan restriksijski enzim: korišteno je 1000 U enzima *TaqI* te 120 U ostalih enzima (Tablica 3.). Za svaki enzim je provjereno da korištena koncentracija nije ograničavajuća za dostupnost restriksijskog mjesta na DNA, radeći digestiju alikvota istih jezgri s dvostruko većom koncentracijom od uobičajeno korištene. Suspenzija je lagano izmiješana, inkubirana na 37 °C 45 minuta te je zatim enzimska reakcija zaustavljena dodatkom 19 µL STOP otopine. Dodano je 20 µL otopine proteinaze K i inkubirano dodatnih 30 minuta na 37 °C. Zatim je dodano 50 µL 5 mol L⁻¹ NaClO₄ i 300 µL fenola, snažno miješano na „vortex“ uređaju 4 minute, dodano 300 µL otopine izoamilni

alkohol/ kloroform (IAC) i ponovno snažno miješano 10ak sekundi. Suspenzija je centrifugirana (5 min / 13 000 rpm), pažljivo je izdvojena gornja vodena faza (oko 300 μL), prenijeta u novu Eppendorf epruvetu, dodano je 300 μL otopine IAC i snažno izmiješano. Nakon centrifugiranja (5 min / 13 000 rpm) ponovno je izdvojena gornja faza, prenijeta u novu epruvetu te je dodano 750 μL (2,5 x volumen) hladnog 96%-tnog etanola nakon čega je DNA taložena 15 – 30 minuta na $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Suspenzija je zatim centrifugirana (15 min / 13 000 rpm / $4\text{ }^\circ\text{C}$), talog je ispran hladnim 96%-tnim etanolom, osušen i otopljen u 100 μL pufera TE. Dodano je 8 μL otopine RNaze A i sve skupa inkubirano 1 sat na $37\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon toga istaložena je DNA dodatkom 4 μL 5 mol L^{-1} natrijevog klorida i 280 μL hladnog 96%-tnog etanola, uz inkubaciju 15 – 30 minuta na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ te centrifugiranje (15 min / 13 000 rpm / $4\text{ }^\circ\text{C}$). Talog je ispran hladnim 70%-tnim etanolom i nakon sušenja otopljen u 50 μL pufera TE i korišten za sekundarnu digestiju restrikcijским enzimom. Za sekundarnu digestiju odabrani su enzimi čijim cijepanjem se dobije fragment DNA koji sadrži sekvencu ispitivanog promotora. Restrikcija je provedena u volumenu od 250 μL (50 μL otopina DNA, 25 μL 10 x koncentrirani pufer za restrikcijски enzim (priložen od proizvođača), 40 U enzima i sterilna deionizirana voda do ukupnog volumena). Nakon inkubacije 2 sata na temperaturi preporučenoj za restrikcijски enzim DNA je istaložena dodatkom 10 μL 5 mol L^{-1} natrijevog klorida i 650 μL hladnog 96%-tnog etanola, suspenzija je inkubirana 15 – 30 minuta na $-20\text{ }^\circ\text{C}$, centrifugirana (15 min / 13 000 rpm / $4\text{ }^\circ\text{C}$), talog je ispran hladnim 70%-tnim etanolom i nakon sušenja otopljen u 25 μL pufera TE i korišten za analizu metodom po Southern-u („Southern blot“).

Enzimi korišteni za analizu strukture kromatina u ovom radu te položaji restrikcijских mjesta na promotorskim regijama gena prikazani su u Tablici 3 i na Slici 5.

3.2.11. „Southern blot“

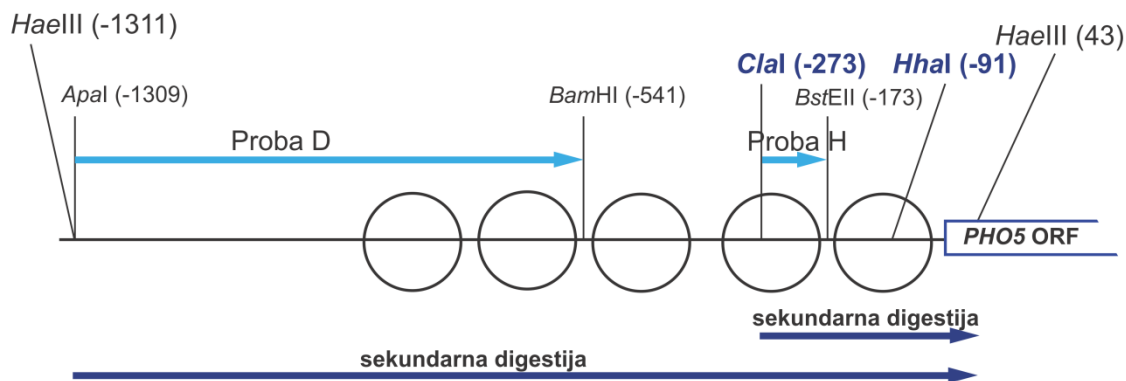
Elektroforeza se provodila na agaroznom gelu (otopina agaroze 15 g L^{-1} u puferu TAE) dimenzija 19 x 20 x 1 cm u puferu TAE pri naponu 130 V oko 2 sata. Neposredno prije završetka elektroforeze odrezan je komad najlonske membrane (Biodyne B, proizvođač Pall Corporation, SAD) približno veličine gela, namakan 10 minuta u vodi i zatim 10 minuta u 20 x koncentriranom puferu SSC (20xSSC), uz lagano protresanje. Nakon elektroforeze, gel je inkubiran 20 minuta u puferu za denaturaciju, uz lagano miješanje. Pripremljen je postav za blot: u plitku plastičnu kadicu uliven je pufer 20xSSC visine 2-3 cm te je stavljen stalak

uzdignut iznad razine pufera, prekriven s dva komada papira za blot (proizvođač Whatman, SAD) prethodno namočena u puferu 20xSSC, pri čemu su rubovi papira bili uronjeni u pufer. Na tako pripremljen podložak stavljen je gel nakon denaturacije i prekriven membranom. Na membranu su stavljena tri komada papira za blot veličine membrane (dva papira prethodno namočena u puferu 20xSSC i jedan suhi papir) te komadi staničevine, presavijeni na veličinu nešto veću od membrane, do visine otprilike 20 cm. Na vrh je postavljeno blago opterećenje (obično staklena boca sa 0,5 L tekućine). Prijenos DNA na membranu odvijao se preko noći, a idući dan je membrana, između dva suha papira za blot, inkubirana u suhom sterilizatoru dva sata na 80 °C. Zatim je isprana u 3 x koncentriranom puferu SSC u vodenoj kupelji na 68 °C, nakon toga u 3 x SSC + 1 x Denhardt puferu na istoj temperaturi 2 sata, sve uz protresanje te potom u 25 mL predhibridizacijskog pufera u hibridizacijskom cilindru u pećnici na 68 °C uz rotiranje (smjer rotacije bio je suprotan smjeru u kojem je savijena membrana), najmanje 1 sat. Slijedila je hibridizacija: fragment DNA obilježen radioaktivnim izotopom ³²P („proba“) denaturiran je 5 minuta na 95 °C te zatim stavljen na led; u hibridizacijski cilindar je nakon izlivanja postojećeg dodano novih 5 mL predhibridizacijskog pufera te 30 – 40 µL probe i inkubirano preko noći na 68 °C uz rotiranje cilindra. Zatim je membrana tri puta kratko isprana u puferu 2 x SSC te 3 puta po 30 minuta u puferu 2 x SSC + 1 x Denhardt u vodenoj kupelji na 68 °C i umotana u plastičnu foliju pazeći da ne ostanu nabori na strani na kojoj je DNA. Slijedila je detekcija signala u uređaju PhosphorImager; dužina ekspozicije prilagođena je jačini signala (količina DNA, radioaktivnost probe...), nekoliko sati ili preko noći. Kvantifikacija količine DNA pocijepane restrikcijским enzimom, u odnosu na ukupnu DNA fragmenta promotora, rađena je upotrebom programa Aida Image Analyzer software v.3.52. Fragmenti DNA obilježeni radioaktivnim izotopom ³²P korišteni za hibridizaciju („probe“) opisani su u Tablici 3 i na Slici 5. Hibridizaciju membrana provodili su kolege iz Instituta Adolf Butenandt Sveučilišta u Minhenu.

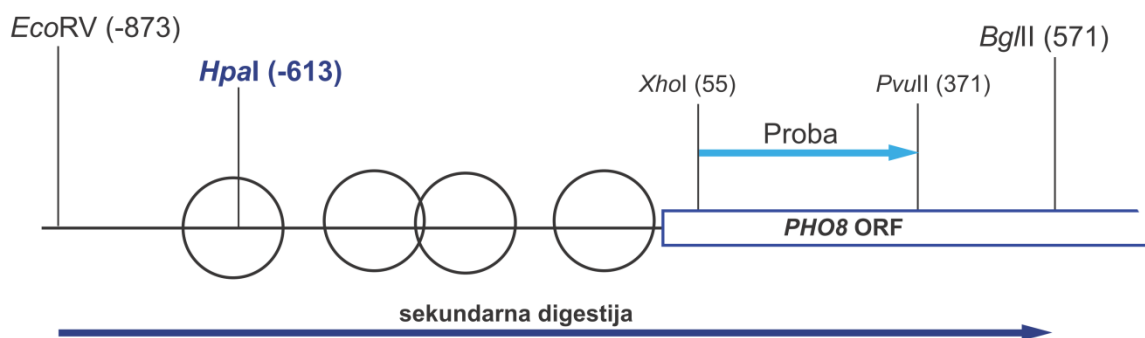
Tablica 3 . Restriksijski enzimi i DNA „probe“ korišteni za analizu strukture kromatina u ovom radu

| Promotor | Restriksijski enzim korišten za analizu | Restriksijski enzimi, sekundarna digestija | „Proba“ za hibridizaciju |
|---------------------------|---|--|-------------------------------------|
| <i>PHO5</i> | <i>ClaI</i> | <i>HaeIII</i> | Proba D ⁹⁵ |
| | <i>HhaI</i> | <i>ClaI</i> i <i>HaeIII</i> | Proba H ⁹⁵ |
| „ <i>PHO5</i> -variant33“ | <i>ClaI</i> | <i>PvuII</i> i <i>HindIII</i> | ²⁰ |
| <i>PHO8</i> | <i>HpaI</i> | <i>BglII</i> i <i>EcoRV</i> | ¹⁰⁰ |
| <i>PHO84</i> | <i>HhaI</i> | <i>HindIII</i> | Proba (<i>HhaI</i>) ¹⁰ |
| | <i>TaqI</i> | <i>AvaII</i> i <i>ClaI</i> | Proba (<i>TaqI</i>) ¹⁰ |

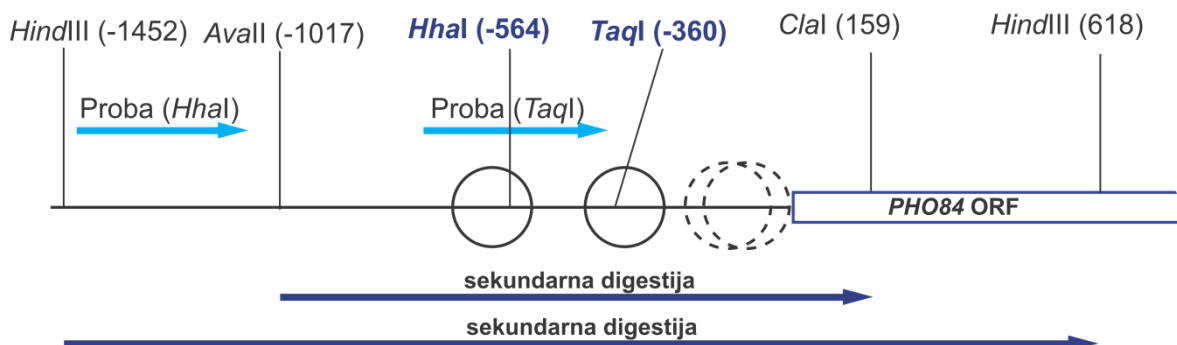
A



B



C

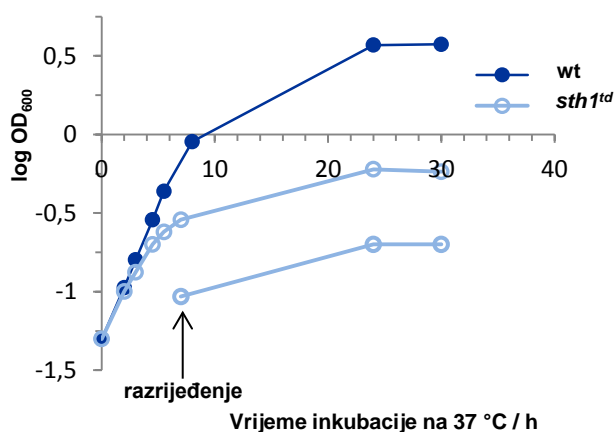


Slika 5. Shematski prikaz položaja restrikcijskih mjesta i DNA „proba“ korištenih za analizu strukture kromatina promotora *PHO5* (A), *PHO8* (B) i *PHO84* (C) u ovom radu. Označeni su položaji nukleosoma (○). Isprekidane linije označavaju nukleosome čiji položaj nije jasno određen. Položaji nukleosoma i DNA proba preuzeti su iz literaturnih izvora^{10,95,100}.

§ 4. REZULTATI

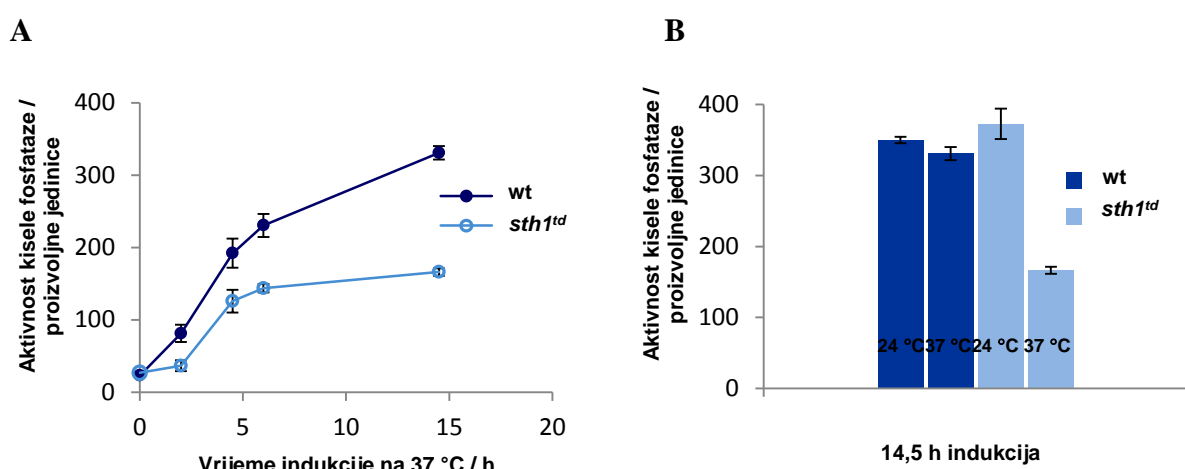
4.1. Aktivnost kompleksa RSC potrebna je za potpunu indukciju gena *PHO5*

Kompleks RSC je jedini kompleks uključen u remodeliranje strukture kromatina u kvascu čija uloga u remodeliranju kromatina prilikom indukcije promotora *PHO5* do sada nije ispitana *in vivo*⁶. Budući da je inaktivacija katalitičke podjedinice kompleksa RSC, proteina Sth1, letalna za stanice, za ispitivanje uloge ovog kompleksa u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5* konstruiran je temperaturno osjetljivi mutant *sth1^{td}* (CY337 *sth1^{td}*; §3.1.3.). Ovaj soj sadrži tzv. „degronsku“ sekvencu vezanu na amino-kraj proteina Sth1 zbog koje dolazi do njegove brze razgradnje na 37 °C, dok je na 24 °C protein stabilan¹²¹. Inkubacija stanica *sth1^{td}* 6 - 8 sati na 37 °C dovodi do inaktivacije Sth1^{td}, što je potvrđeno prestankom rasta, mjenjenim pomoću vrijednosti optičke gustoće stanica (OD₆₀₀) (Slika 6.). Ovi rezultati su u skladu s provedenom analizom „western blot“ koja pokazuje znatno slabiji signal proteina Sth1^{td} nakon 6 sati inkubacije stanica na 37 °C, u odnosu na inkubaciju na 24 °C¹²⁴.



Slika 6. Rast stanica divljeg tipa i mutanta *sth1^{td}* u podlozi s fosfatom na 37 °C. Nakon 7 sati inkubacije na 37 °C, stanice *sth1^{td}* su razrijeđene kako bi se isključio mogući prestanak rasta zbog ranije stacionarne faze.

Stanice divljeg tipa i mutanta *sth1^{td}*, uzgajane u standardnoj hranjivoj podlozi YNB visoke koncentracije fosfata na 24 °C (dalje u tekstu: podloga s fosfatom) (uvjeti represije *PHO* gena), prebačene su u podlogu bez fosfata (uvjeti indukcije) i inkubirane na 24 ili 37 °C. Ispitivana je kinetika indukcije gena *PHO5* mjerenjem aktivnosti produkta ekspresije, enzima kisele fosfataze (Slika 7.). Prilikom inkubacije na 37 °C, indukcija gena je znatno niža u stanicama mutanta *sth1^{td}* u odnosu na divlji tip (A), dok na 24 °C nema razlike između stanica divljeg tipa i mutanta (B), što pokazuje da je snižena indukcija na 37 °C posljedica inaktivacije temperaturno osjetljivog proteina Sth1^{td}.

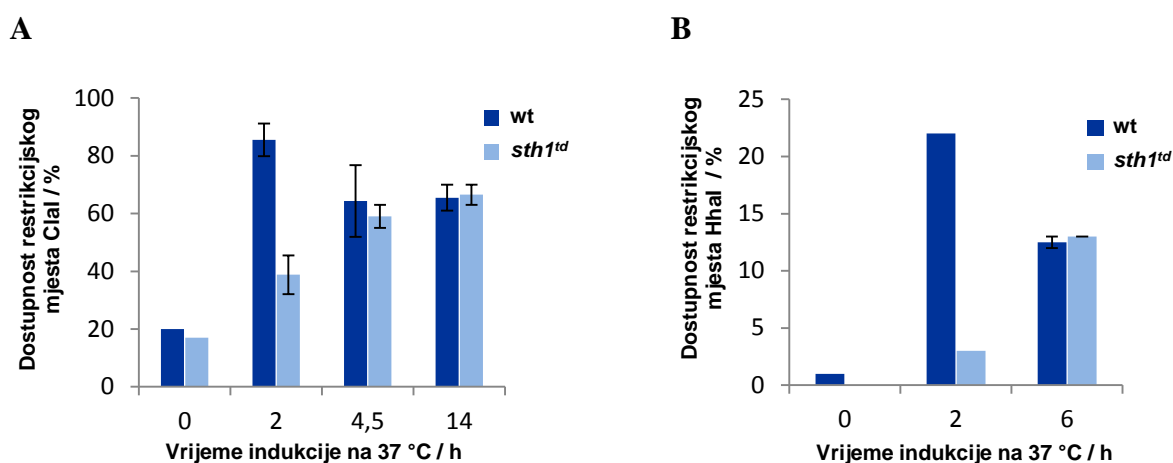


Slika 7. Utjecaj inaktivacije proteina Sth1^{td} na kinetiku indukcije gena *PHO5* tijekom inkubacije stanica u podlozi bez fosfata. Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

4.2. Inaktivacija kompleksa RSC dovodi do usporavanja procesa remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*

Kako bi se utvrdilo da li je niža indukcija gena *PHO5* u stanicama *sth1^{td}* na 37 °C posljedica nepotpunog remodeliranja strukture kromatina promotora, ispitana je kinetika remodeliranja strukture kromatina metodom digestije kromatina restriksijskim enzimima. Korišteni su restriksijski enzimi *ClaI* i *HhaI*; mjesto cijepanja enzima *ClaI* pod uvjetima represije se nalazi unutar nukleosoma -2, dok se mjesto cijepanja enzima *HhaI* nalazi unutar nukleosoma -1 koji

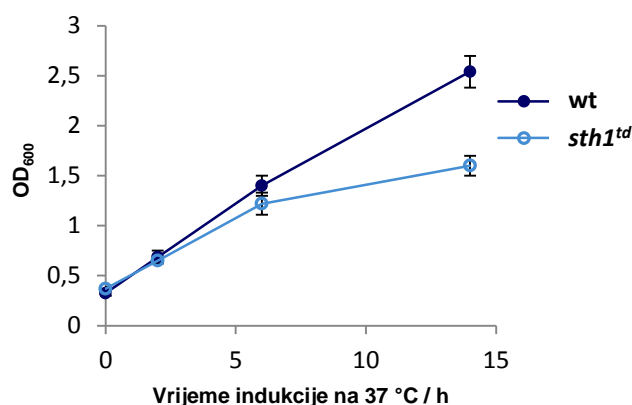
prekriva „TATA-box“, te stoga nisu dostupna, a postaju dostupna uklanjanjem nukleosoma prilikom indukcije promotora (Slika 5., §3.2.11.). Dostupnost ovih mjesta uobičajeno se koristi kao mjera za razinu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*⁹⁵. Kinetika remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*, prilikom indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata na 37 °C, značajno je sporija u stanicama mutanta *sth1^{td}*, ali se nakon produžene indukcije postiže jednaka razina otvaranja kromatina kao u stanicama divljeg tipa (Slika 8.).



Slika 8. Utjecaj inaktivacije proteina *Sth1^{td}* na kinetiku remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata na 37 °C. Razina remodeliranja nukleosoma -2 praćena je digestijom restriktivnim enzimom *ClaI* (A), a nukleosoma -1 restriktivnim enzimom *HhaI* (B). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Dakle, može se zaključiti da je sporija kinetika indukcije gena (Slika 7. A) posljedica sporijeg remodeliranja strukture kromatina, te stoga sporije aktivacije promotora u stanicama mutanta. Međutim, znatno niža krajnja razina indukcije u stanicama *sth1^{td}* na 37 °C u odnosu na stanice divljeg tipa (Slika 7. A i B) ne proizlazi iz nepotpunog remodeliranja kromatina već upućuje na sudjelovanje kompleksa RSC u nekom od koraka koji slijedi nakon inicijacije transkripcije. Ovi rezultati (Slike 7. i 8.) pokazuju da kompleks RSC sudjeluje u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* te da je njegova aktivnost bitna za normalnu kinetiku

procesa, ali nije esencijalno potrebna za otvaranje kromatina nakon produžene indukcije. Međutim, nedostatak ovog eksperimenta proizlazi iz činjenice da inaktivacija proteina Sth1^{td}, koja dovodi do prestanka rasta stanica, nije prethodila indukciji promotora, već se odvijala usporedno s indukcijom. Naime, PHO-signalni put aktivira se signalom o nedostatku fosfata za koji je neophodan određeni rast stanica u podlozi bez fosfata, odnosno trošenje unutarstaničnih rezervi polifosfata¹²⁵. Prilikom usporedne inaktivacije Sth1^{td} i indukcije promotora, u početnim satima inkubacije u podlozi bez fosfata rast stanica mutanta *sth1^{td}* i divljeg tipa bio je podjednak (Slika 9.), što upućuje na jednaku jačinu indukcije, ali i ukazuje na značajnu koncentraciju aktivnog kompleksa RSC. Stoga se ne može isključiti mogućnost da je koncentracija aktivnog kompleksa u prvim satima indukcije bila dovoljna za pokretanje procesa remodeliranja strukture kromatina te da bi opaženi učinak na remodeliranje kromatina promotora *PHO5* bio jači kada bi potpuna inaktivacija proteina Sth1^{td} prethodila indukciji.

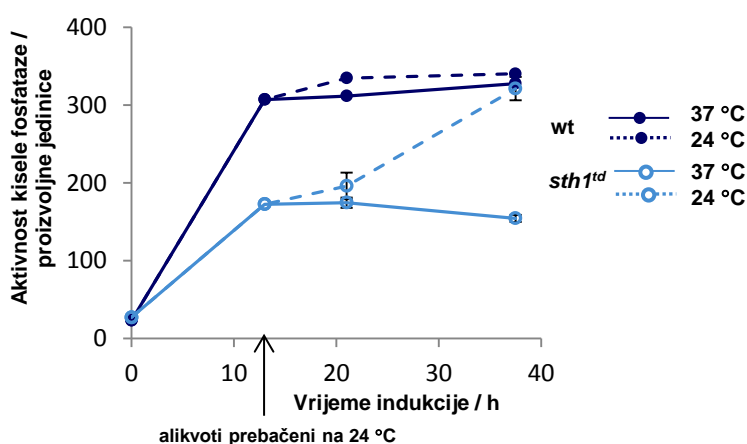


Slika 9. Rast stanica divljeg tipa i mutanta *sth1^{td}* tijekom inkubacije u podlozi bez fosfata na 37 °C. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

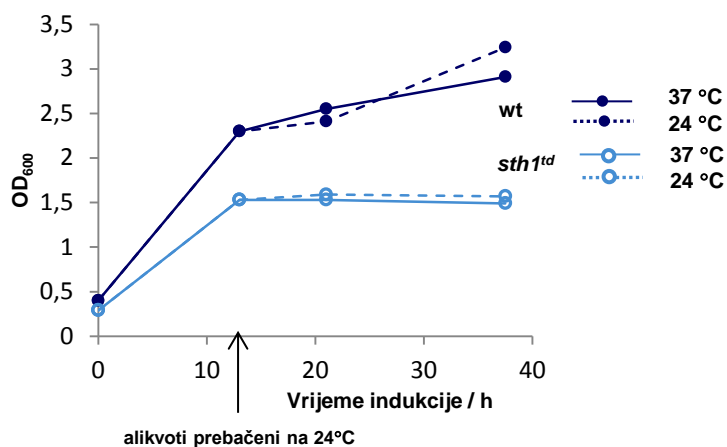
Unatoč tome što je rast stanica divljeg tipa i *sth1^{td}* u početnim satima inkubacije u podlozi bez fosfata na 37 °C podjednak, stanice mutanta prestaju rasti nakon približno dvije generacije zbog inaktivacije Sth1^{td}, dok stanice divljeg tipa prestaju rasti nakon nešto više od tri generacije uslijed iscrpljivanja zaliha polifosfata. Stoga je bilo potrebno provjeriti da li je niža razina aktivacije promotora *PHO5* u stanicama *sth1^{td}* dijelom posljedica slabije indukcije uzrokovane nedovoljnim trošenjem zaliha polifosfata. Stanice divljeg tipa i mutanta *sth1^{td}*, uzgojene na 24 °C u podlozi s fosfatom inkubirane su 13 sati u podlozi bez fosfata na 37 °C

nakon čega su podijeljene u dva alikvota; jedan je ostavljen na istoj temperaturi, a drugi prebačen na 24 °C čime je zaustavljena inaktivacija $Sth1^{td}$ te su inkubirani dodatna 24 sata. Tijekom eksperimenta praćena je aktivacija promotora i rast stanica (Slika 10.).

A



B



Slika 10. Prebacivanjem stanica $sth1^{td}$, inkubiranih u podlozi bez fosfata, sa 37 °C na 24 °C postiže se jednaka razina aktivacije promotora $PHO5$ kao u stanicama divljeg tipa (A), bez daljnjeg rasta (B). Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7.

Nakon 13 sati indukcije na 37 °C aktivacija promotora u stanicama $sth1^{td}$ bila je značajno niža nego u stanicama divljeg tipa (Slika 10. A), kao što je već pokazano u prethodnom

eksperimentu (Slika 7.). Rast stanica mutanta je zaustavljen tijekom 13 sati inkubacije u podlozi bez fosfata na 37 °C te nije došlo do daljnjeg rasta nakon prebacivanja na 24 °C (Slika 10. B); preostala koncentracija fosfata očigledno nije bila dovoljna za pokretanje rasta stanica unatoč prestanku inaktivacije *Sth1^{td}*. Dakle, trošenje zaliha polifosfata rastom stanica u podlozi bez fosfata bilo je jednako u stanicama *sth1^{td}* inkubiranim na 37 °C i prebačenima na 24 °C iz čega se može pretpostaviti jednaka jačina indukcije u ovim stanicama. Međutim, prebacivanjem stanica *sth1^{td}* na 24 °C došlo je do snažne aktivacije promotora te je postignuta jednaka razina aktivacije kao kod stanica divljeg tipa.

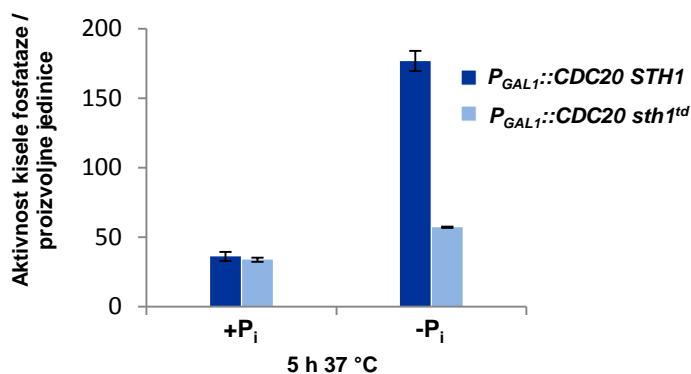
Ovi rezultati jasno pokazuju da niža razina aktivacije promotora *PHO5* kod mutanta *sth1^{td}* na 37 °C nije posljedica nedovoljnog signala indukcije u tim stanicama, već je izravan rezultat inaktivacije *Sth1^{td}*. Također, ovim eksperimentom je pokazano da prestanak rasta stanica uslijed inaktivacije *Sth1^{td}*, tijekom 13 sati inkubacije na 37 °C, nije doveo do značajnog porasta broja mrtvih stanica; prebacivanjem stanica na 24 °C i posljedičnim prestankom inaktivacije *Sth1^{td}* postignuta je jednaka razina aktivacije promotora kao u stanicama divljeg tipa, bez daljnjeg rasta.

4.3. Niža razina indukcije gena *PHO5* u stanicama *sth1^{td}* nije posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa

Inaktivacija *Sth1^{td}* dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u fazi G2/M^{56,57}. Stoga je bilo potrebno isključiti mogućnost da je niža razina indukcije gena *PHO5* u stanicama *sth1^{td}* na 37 °C neizravna posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa te su u tu svrhu korištene stanice koje sadrže alel *P_{GALI}::CDC20*. U ovakvom konstrukt esencijalan gen *CDC20*, koji kodira za aktivator kompleksa „Anaphase-promoting complex / cyclosome“ (APC/C), neophodnog za prelazak iz metafaze u anafazu tijekom mitoze, nalazi se pod regulacijom promotora gena *GALI*. Dodatkom glukoze u medij za uzgoj stanica dolazi do represije transkripcije gena *CDC20* i zaustavljanja staničnog ciklusa u mitozu¹²⁶.

Pokazano je da se koncentracija unutarstaničnih rezervi polifosfata, čija razgradnja pod uvjetima nedostatka anorganskog fosfata u podlozi pokreće signal za indukciju gena *PHO5*, mijenja tijekom staničnog ciklusa te je najniža u mitozu¹⁰⁸. Iz tog razloga u stanicama kojima je represijom gena *CDC20* zaustavljen rast u mitozu, za indukciju gena *PHO5* u podlozi bez fosfata nije nužan rast, odnosno daljnje trošenje rezervi polifosfata¹²⁶. Stoga je konstruiran soj

$P_{GALI}::CDC20\ sth1^{td}$ (§3.1.3.) kako bi se ispitalo da li će i u stanicama kojima je prethodno zaustavljen rast u mitozu inaktivacija $Sth1^{td}$ imati negativan učinak na indukciju gena $PHO5$. Stanice $P_{GALI}::CDC20\ STH1$ i $P_{GALI}::CDC20\ sth1^{td}$, uzgojene na 24 °C u podlozi s fosfatom koja je kao izvor ugljika sadržavala rafinozu i galaktozu, prebačene su u podlogu s glukozom i inkubirane 3 sata pri čemu dolazi do represije transkripcije gena $CDC20$, te posljedično prestanka rasta stanica (§9. Dodatak, Slika 32.). Suspenzije stanica su zatim podijeljene u dva alikvota; jedan je dalje inkubiran u istoj podlozi, dok je drugi prebačen u podlogu s glukozom bez fosfata što dovodi do indukcije gena $PHO5$. Alikvoti su inkubirani 5 sati na 37 °C kako bi došlo do inaktivacije $Sth1^{td}$ (Slika 11.). Nakon 5 sati inkubacije na 37°C u podlozi bez fosfata postignuta je potpuna indukcija gena $PHO5$ u stanicama $P_{GALI}::CDC20\ STH1$, dok je inaktivacija $Sth1^{td}$ u soju $P_{GALI}::CDC20\ sth1^{td}$ i pod ovim uvjetima dovela do znatno niže razine indukcije. Ovim rezultatima isključena je mogućnost da je uočeni negativan učinak inaktivacije $Sth1^{td}$ na indukciju gena $PHO5$ (Slika 7. A) neizravna posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa u stanicama $sth1^{td}$.



Slika 11. Indukcija gena $PHO5$ u podlozi bez fosfata na 37°C u stanicama $STH1$ i $sth1^{td}$ nakon zaustavljanja rasta represijom transkripcije gena $CDC20$. Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

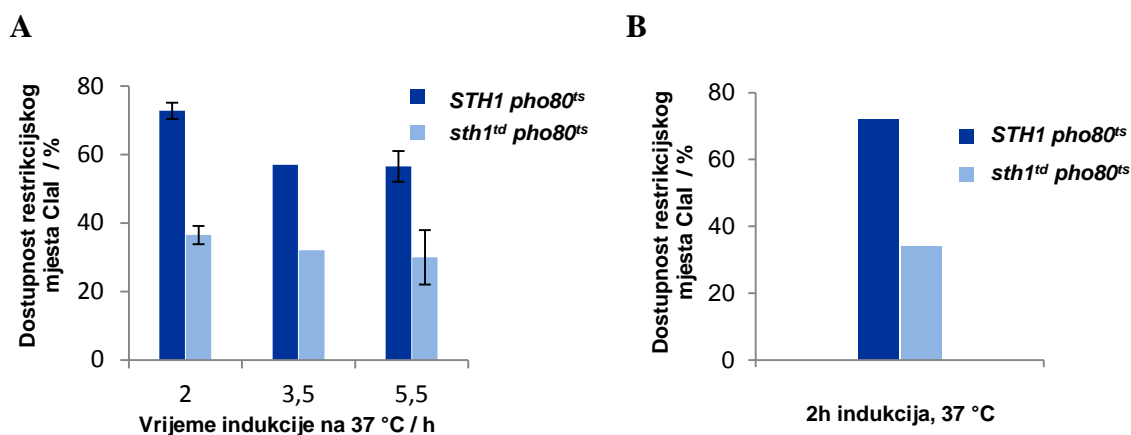
4.4. Kompleks RSC izravno sudjeluje u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* te je učinak inaktivacije pojačan kod uvjeta slabije indukcije

Kako bi se potvrdilo da kompleks RSC izravno sudjeluje u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*, odnosno da inaktivacija *Sth1^{td}* nema negativan učinak na neku od komponenata PHO-signalnog puta i time neizravno utječe na razinu aktivacije promotora, korišteni su alternativni mehanizmi indukcije putem inducibilne inaktivacije negativnih regulatora transkripcije, proteina *Pho80* i *Pho85*^{97,122} koji tvore kompleks ciklina i ciklin ovisne kinaze. Inaktivacijom ovih proteina isključuje se PHO-signalni put zbog čega do indukcije promotora dolazi pod inače represivnim uvjetima, u podlozi visoke koncentracije fosfata te je prethodno pokazano da je ovakva indukcija, za razliku od fiziološke, moguća i u odsustvu replikacije stanica⁹⁷.

4.4.1. Inaktivacija *Sth1^{td}* dovodi do nepotpunog remodeliranja strukture kromatina te sprječava aktivaciju promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inaktivacijom ciklina *Pho80^{ts}*

Za inducibilnu inaktivaciju proteina *Pho80* korištene su stanice temperaturno osjetljivog mutanta *pho80^{ts}* (YS44; §3.1.3.). Inkubacijom ovih stanica na 37 °C dolazi do inaktivacije *Pho80^{ts}* te posljedično indukcije promotora *PHO5* u podlozi visoke koncentracije fosfata. Konstruiran je soj *sth1^{td} pho80^{ts}* (YS44 *sth1^{td}*; §3.1.3.) i ispitana je kinetika remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* prilikom indukcije inkubacijom stanica na 37 °C. Stanice oba soja, *STH1 pho80^{ts}* i *sth1^{td} pho80^{ts}*, uzgojene na 24 °C u podlozi s fosfatom do logaritamske faze rasta, prije indukcije su inkubirane 1 sat u podlozi bez histidina kako bi se zaustavio rast u fazi G1 staničnog ciklusa (§9. Dodatak, Slika 33.). Time je isključena razlika u rastu stanica, do koje bi došlo zbog prestanka rasta stanica *sth1^{td} pho80^{ts}* uslijed inaktivacije *Sth1^{td}* na 37 °C i posljedično mogući neizravan utjecaj na indukciju promotora. Nakon dva sata indukcije u stanicama *STH1 pho80^{ts}* postignuto je potpuno otvaranje kromatina promotora, dok je kod stanica *sth1^{td} pho80^{ts}*, čak i nakon produžene indukcije, stupanj remodeliranja bio značajno niži (Slika 12. A). Ovim eksperimentom je pokazano da je aktivnost kompleksa RSC izravno uključena u proces remodeliranja strukture kromatina promotora, odnosno da pokazana niža razina remodeliranja kromatina nije posljedica negativnog učinka inaktivacije kompleksa na PHO-signalni put. Jednak rezultat dobiven je i sa stanicama koje prije indukcije nisu inkubirane u podlozi bez histidina (Slika 12. B) čime je

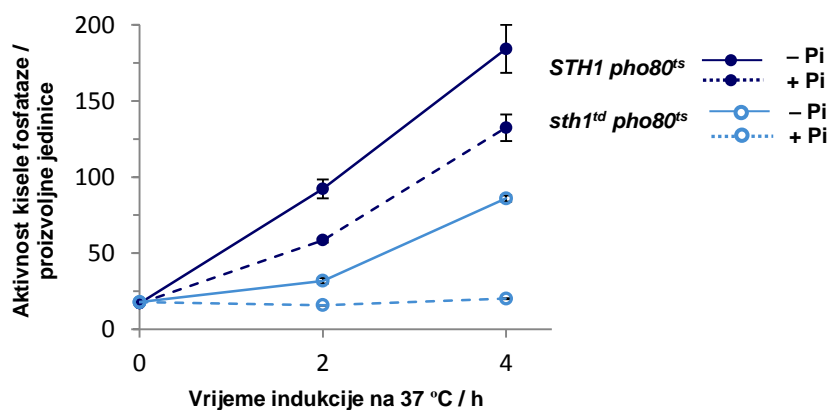
potvrđeno da je indukcija promotora inaktivacijom proteina Pho80 neovisna o replikaciji stanica, kao što je pokazano prijašnjim istraživanjima⁹⁷.



Slika 12. Utjecaj inaktivacije proteina Sth1^{td} na kinetiku remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inaktivacijom Pho80^{ts}. Stanice su prije indukcije inkubirane 1 sat u polozi bez histidina kako bi se zaustavila replikacija (A), ili su uzgajane u podlozi sa svim aminokiselinama neophodnima za rast (B). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Poznato je da je indukcija promotora *PHO5* putem inaktivacije ciklina Pho80 slabija od fiziološke (§9. Dodatak, Tablica 5.) te je prijašnjim istraživanjima pokazano da je potreba za kofaktorima uključenima u remodeliranje strukture kromatina jače izražena kod uvjeta slabije indukcije^{6,8,106,108,109}, što bi moglo biti objašnjenje za jači negativan učinak inaktivacije Sth1^{td} pod ovim uvjetima u odnosu na učinak opažen kod jake indukcije u podlozi bez fosfata (Slika 8. A). Kako bi potvrdili ovu pretpostavku, stanice *STH1 pho80^{ts}* i *sth1^{td} pho80^{ts}*, uzgojene na 24 °C u podlozi s fosfatom, podijeljene su u dva alikvota te dalje inkubirane na 37 °C u istoj podlozi ili u podlozi bez fosfata. Ispitana je kinetika aktivacije promotora *PHO5* (Slika 13.). Kao što je očekivano, u stanicama *STH1 pho80^{ts}* inkubiranim u podlozi s fosfatom aktivacija promotora je značajno niža nego kod jače indukcije u podlozi bez fosfata, dok kod stanica *sth1^{td} pho80^{ts}* uopće nije došlo do aktivacije promotora pod uvjetima indukcije u podlozi s fosfatom. U podlozi bez fosfata aktivacija u stanicama *sth1^{td} pho80^{ts}* je značajna, iako slabija

nego u stanicama *STH1 pho80^{ts}*, što je u skladu s već pokazanim rezultatima učinka inaktivacije *Sth1^{td}* pod uvjetima fiziološke indukcije u podlozi bez fosfata (Slika 7.).



Slika 13. Učinak inaktivacije proteina *Sth1^{td}* na kinetiku aktivacije promotora *PHO5* pojačan je pod uvjetima indukcije inaktivacijom *Pho80^{ts}* u podlozi s fosfatom. Kinetika aktivacije promotora *PHO5* praćena je tijekom inkubacije stanica u podlozi s fosfatom (+Pi) ili bez fosfata (-Pi) na 37 °C. Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Dakle, ovaj eksperiment je pokazao da je i u slučaju inaktivacije kompleksa RSC negativan učinak na proces remodeliranja strukture kromatina jače izražen kod uvjeta slabije indukcije, kao što je prethodno nađeno za komplekse SWI/SNF i INO80^{6,108,109}.

Budući da se i kod ovih uvjeta proces inaktivacije proteina *Sth1^{td}* odvijao usporedno s indukcijom na 37 °C, moguće je da bi uočeni negativan učinak bio jači da je potpuna inaktivacija *Sth1^{td}* postignuta prije indukcije.

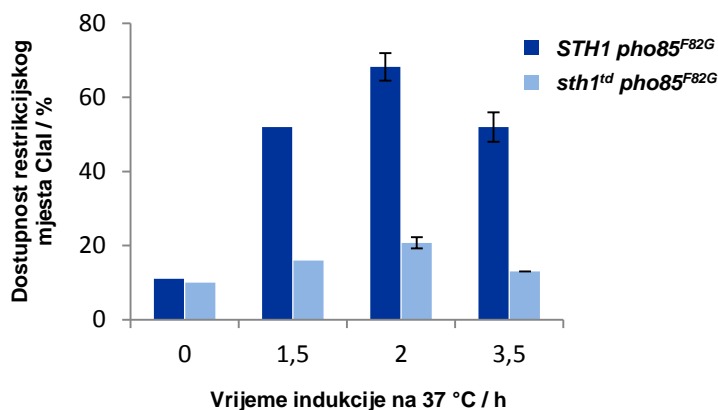
4.4.2. Inaktivacija *Sth1^{td}* sprječava remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inhibicijom ciklin ovisne kinaze *Pho85^{F82G}*

Kako bi mogli ispitati kinetiku indukcije promotora u stanicama u kojima je kompleks RSC prethodno inaktiviran, konstruirani su sojevi *pho85^{F82G}* i *pho85^{F82G} sth1^{td}* (YS30 *pho85^{F82G}* i YS30 *pho85^{F82G} sth1^{td}*; §3.1.3.). U ovim stanicama dolazi do inhibicije kinaze *Pho85^{F82G}* dodatkom 4-amino-1-tertbutil-3-(1'-naftil)-pirazolo-[3,4-d]-pirimidina (1-NaPP1), čime se

postiže indukcija promotora *PHO5* pod inače represivnim uvjetima visoke koncentracije fosfata. Stoga je moguće inaktivirati *Sth1^{td}* inkubacijom stanica na 37 °C te zatim pokrenuti indukciju promotora dodatkom 1-NaPP1.

Stanice *STH1 pho85^{F82G}* i *sth1^{td} pho85^{F82G}*, uzgojene na 24° C, inkubirane su 5,5 sati na 37 °C pri čemu je došlo do inaktivacije proteina *Sth1^{td}*, potvrđene prestankom rasta mutanta *sth1^{td} pho85^{F82G}*. Kako bi isključili mogući utjecaj različitog rasta na indukciju promotora, rast stanica *STH1 pho85^{F82G}* također je zaustavljen inkubacijom 1 sat u podlozi bez uracila (§9. Dodatak, Slika 34.) te je zatim pokrenuta indukcija promotora dodatkom 1-NaPP1 (Slika 14.). Nakon dva sata indukcije u stanicama *STH1 pho85^{F82G}* postignuto je potpuno otvaranje kromatina, dok je kod stanica *sth1^{td} pho85^{F82G}*, čak i nakon produžene indukcije, kromatin ostao gotovo potpuno zatvoren.

Dakle, pod ovakvim uvjetima slabije indukcije (§9. Dodatak, Tablica 5.) aktivnost kompleksa RSC je neophodna za remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5*. Iako je stanicama *STH1* zaustavljen rast u u fazi G1 staničnog ciklusa, a stanicama *sth1^{td}* u G2/M, s obzirom na rezultate prikazane na Slici 11. nije vjerojatno da je uočeni učinak inaktivacije *Sth1^{td}* neizravna posljedica prestanka rasta stanica u fazi G2/M.

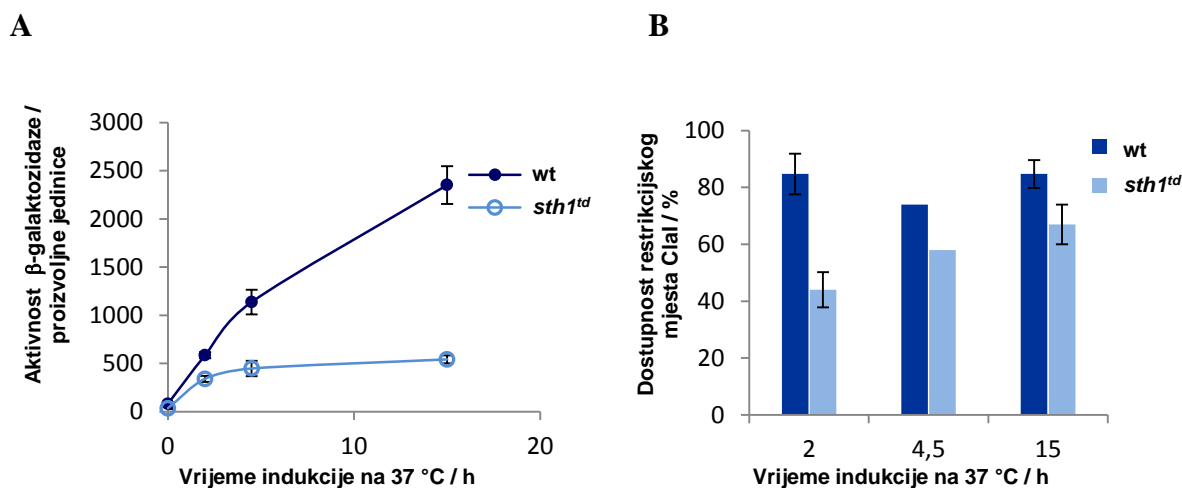


Slika 14. Utjecaj inaktivacije proteina *Sth1^{td}* na kinetiku remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inaktivacijom *Pho85^{F82G}*. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

4.5. Remodeliranje strukture kromatina inačice promotora *PHO5* aktivirane putem aktivatora Gal4 također je sporije u odsustvu kompleksa RSC

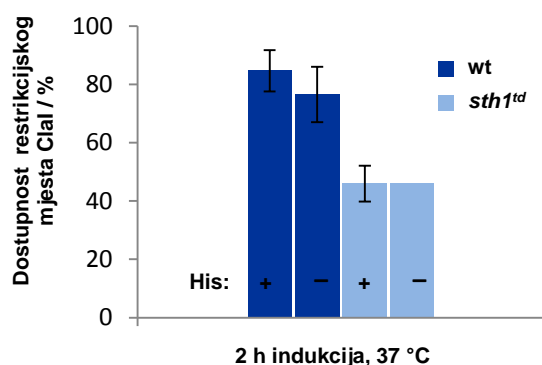
Prethodna istraživanja su pokazala da inačica promotora *PHO5*, kod koje su oba mjesta za vezanje aktivatora Pho4 zamijenjena mjestima za aktivator Gal4 („*PHO5*-variant 33“), ima jednaku strukturu kromatina pod uvjetima represije te jednaku promjenu strukture kromatina prilikom indukcije kao nativni promotor²⁰. Također, ovaj promotor pokazuje istovjetnu potrebu za kofaktorima uključenima u remodeliranje strukture kromatina^{5,6}. Indukcija inačice promotora putem GAL-signalnog puta je jača od fiziološke indukcije promotora *PHO5* te ne ovisi o rastu stanica, tako da je moguće ispitivati aktivaciju ovog promotora i nakon prethodne inaktivacije kompleksa RSC, koja dovodi do prestanka rasta.

Stanice divljeg tipa i mutanta *sth1^{td}* transformirane su plazmidom $pP_{pho5v33-lacZ}$, koji sadrži gen *lacZ* pod regulacijom promotora „*PHO5*-variant 33“, uzgojene na 24 °C u podlozi s rafinozom te zatim inkubirane dodatnih 6 sati u istoj podlozi na 37 °C pri čemu je došlo do inaktivacije *Sth1^{td}*, potvrđene prestankom rasta stanica mutanta *sth1^{td}*. Indukcija promotora je zatim pokrenuta dodatkom galaktoze te je praćena kinetika aktivacije promotora mjerenjem aktivnosti enzima β -galaktozidaze, produkta ekspresije gena *lacZ* i kinetika remodeliranja strukture kromatina. U stanicama mutanta *sth1^{td}* razina aktivacije promotora je značajno niža (Slika 15. A). Također, kinetika remodeliranja strukture kromatina značajno je sporija u odnosu na divlji tip, ali se nakon produžene indukcije postiže približno jednaka razina otvaranja kromatina (Slika 15. B). Dakle, jednako kao kod nativnog promotora, inaktivacija *Sth1^{td}* dovodi do usporavanja procesa remodeliranja strukture kromatina inačice promotora *PHO5* te također ima negativan učinak na neki od koraka procesa transkripcije koji slijedi nakon remodeliranja kromatina.



Slika 15. Utjecaj inaktivacije proteina Sth1^{td} na kinetiku aktivacije (A) i remodeliranja strukture kromatina (B) inačice promotora *PHO5* („*PHO5*-variant33“). Aktivnost β -galaktozidaze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.8. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Da bi se potvrdilo da negativan učinak inaktivacije proteina Sth1^{td} na proces remodeliranja strukture kromatina inačice promotora *PHO5* nije neizravno uzrokovan prestankom rasta stanica *sth1^{td}*, odnosno da indukcija ovog promotora ne ovisi o rastu stanica, proveden je kontrolni eksperiment (Slika 16.). Stanice divljeg tipa i *sth1^{td}* uzgojene na 24 °C u podlozi s rafinozom inkubirane su 5 sati na 37 °C i zatim dodatnih sat vremena u istoj podlozi sa ili bez histidina, pri čemu je u podlozi bez histidina došlo do prestanka rasta stanica divljeg tipa, dok su stanice *sth1^{td}* prestale rasti zbog inaktivacije Sth1^{td} na 37 °C (§9. Dodatak, Slika 35.). Indukcija promotora je zatim pokrenuta dodatkom galaktoze. Razina remodeliranja strukture kromatina nakon 2 sata indukcije bila je jednaka u stanicama divljeg tipa neovisno o replikaciji. Također, inkubacija u podlozi bez histidina ne utječe na remodeliranje kromatina u stanicama mutanata *sth1^{td}*. Dakle, može se zaključiti da zaustavljanje rasta stanica prije ili tijekom indukcije ne utječe na proces remodeliranja kromatina inačice promotora *PHO5*.



Slika 16. Utjecaj replikacije stanica na remodeliranje strukture kromatina prilikom indukcije inačice promotora *PHO5* („*PHO5*-variant 33“). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

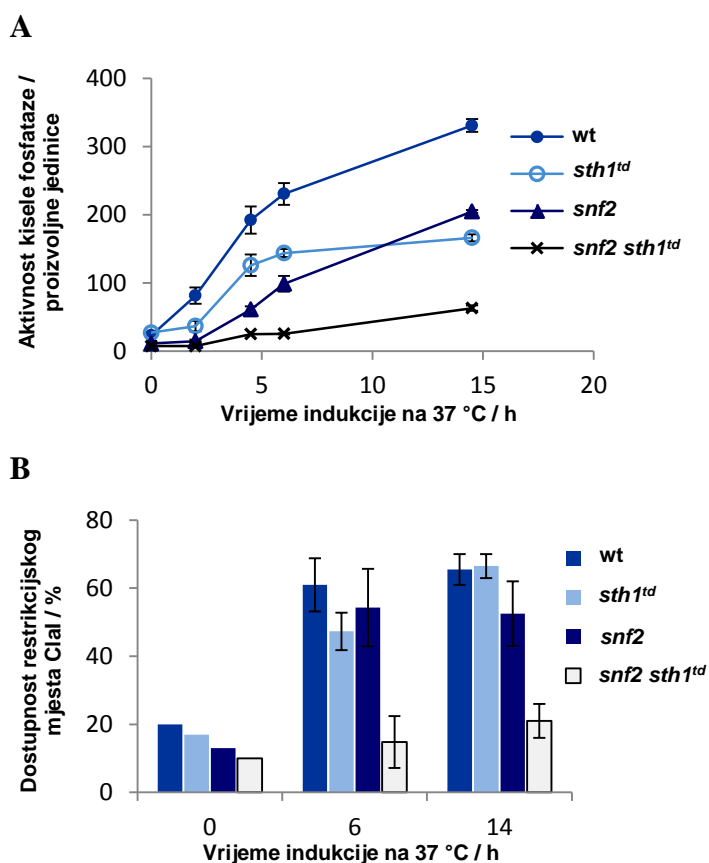
Rezultatima ovih eksperimenata dodatno je potvrđeno da učinak inaktivacije *Sth1^{td}* na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* nije vezan uz PHO-signalni put i nije posljedica slabijeg rasta stanica *sth1^{td}*, budući da je jednak rezultat kao za nativni promotor dobiven za inačicu promotora aktiviranu putem GAL-signalnog puta, kod koje indukcija ne ovisi o rastu stanica. Također, pokazano je da potreba za aktivnosti kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5* nije određena specifičnim aktivatorom transkripcije Pho4.

4.6. Za remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* esencijalno je potrebna aktivnost jednog od kompleksa, RSC ili SWI/SNF

Prijašnja istraživanja pokazala su da kompleks SWI/SNF sudjeluje u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5* te da je u njegovom odsustvu kinetika remodeliranja znatno usporena, ali nakon produžene indukcije postiže se potpuno otvaranje kromatina⁶, slično kao što je u ovom radu pokazano za kompleks RSC (Slika 8.). Postavlja se pitanje da li je aktivnost kompleksa RSC odgovorna za otvaranje kromatina promotora u odsustvu kompleksa SWI/SNF i obrnuto, odnosno, da li bi inaktivacija oba kompleksa spriječila remodeliranje strukture kromatina.

Konstruiran je dvostruki mutant *snf2 sth1^{td}* (CY407 *sth1^{td}*; §3.1.3.) te je ispitana je kinetika aktivacije promotora i kinetika remodeliranja strukture kromatina pod uvjetima indukcije

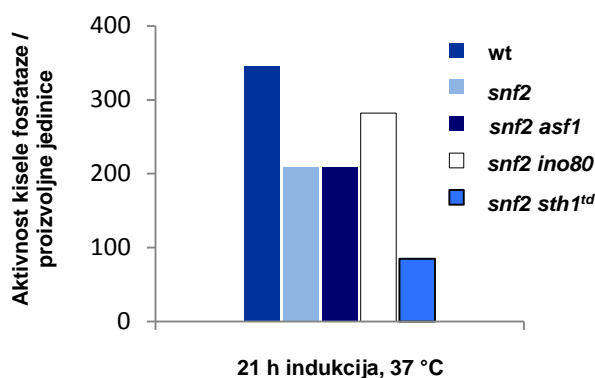
inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata. Stanice divljeg tipa i mutanata *sth1^{td}*, *snf2* i *snf2 sth1^{td}*, uzgajane u podlozi s fosfatom na 24 °C prebačene su u podlogu bez fosfata te inkubirane na 37 °C radi usporedne indukcije promotora i inaktivacije Sth1^{td}. U prvih 6 sati indukcije, aktivacija promotora u stanicama dvostrukog mutanta *snf2 sth1^{td}* je gotovo zanemariva, dok je kod jednostrukih mutanata aktivacija značajna, ali slabija nego u divljem tipu (Slika 17. A), kao što je već pokazano za stanice *sth1^{td}* (Slika 7.) i prethodno objavljeno za *snf2*⁶. Za razliku od stanica jednostrukih mutanata, kod dvostrukog mutanta čak niti nakon produžene indukcije gotovo uopće nije došlo do otvaranja kromatina u odnosu na razinu postignutu pod uvjetima represije (Slika 17. B).



Slika 17. Utjecaj zajedničke inaktivacije proteina Sth1^{td} i Snf2 na kinetiku aktivacije (A) i remodeliranja strukture kromatina (B) promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata na 37 °C. Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Ovi rezultati pokazuju da proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata na 37 °C zahtjeva ili aktivnost kompleksa RSC ili SWI/SNF.

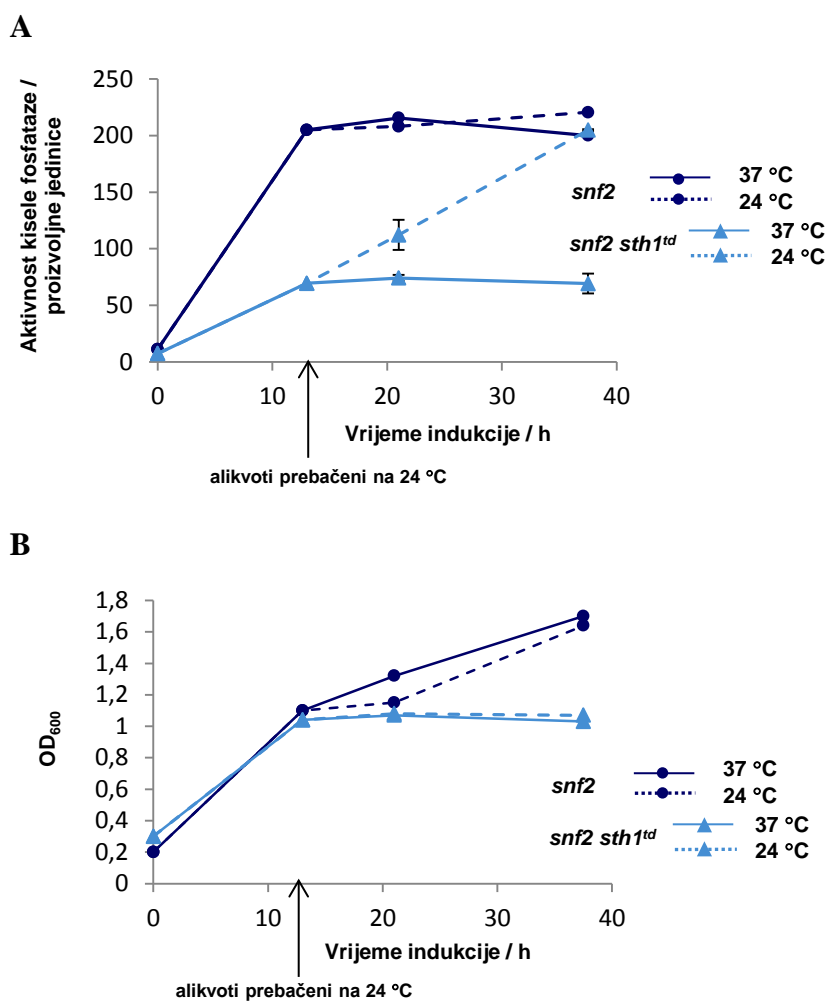
Za razliku od ovog istraživanja provedenog sa stanicama *snf2 sth1^{td}*, u prijašnjim istraživanjima provedenima s nekoliko dvostrukih i trostrukih mutanata u genima koji kodiraju za kofaktore uključene u remodeliranje kromatina pokazana je sporija, ali potpuna aktivacija promotora *PHO5*⁶. Međutim, ta su ispitivanja provedena na fiziološkoj temperaturi (30 °C). Kako bi provjerili da li je rezultat dobiven sa stanicama *snf2 sth1^{td}* posljedica povišene temperature, ispitana je aktivacija promotora u mutantima *snf2 ino80* i *snf2 asf1* na 37 °C (Slika 18.). Stanice divljeg tipa i mutanata *snf2*, *snf2 ino80*, *snf2 asf1* i *snf2 sth1^{td}*, uzgajane u podlozi s fosfatom na 24 °C prebačene su u podlogu bez fosfata i inkubirane preko noći na 37 °C. Kod svih stanica, osim *snf2 sth1^{td}* postignuta je značajna aktivacija promotora, no nešto niža nego što je prethodno nađeno kod inkubacije stanica na 30 °C⁶. Dakle, indukcija na 37 °C dovodi do nešto slabije aktivacije promotora, ali izostanak aktivacije promotora u stanicama *snf2 sth1^{td}* nije isključivo posljedica inkubacije na povišenoj temperaturi.



Slika 18. Aktivacija promotora *PHO5* u podlozi bez fosfata na 37 °C u stanicama divljeg tipa i mutanata *snf2*, *snf2 asf1*, *snf2 ino80* te *snf2 sth1^{td}*. Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7.

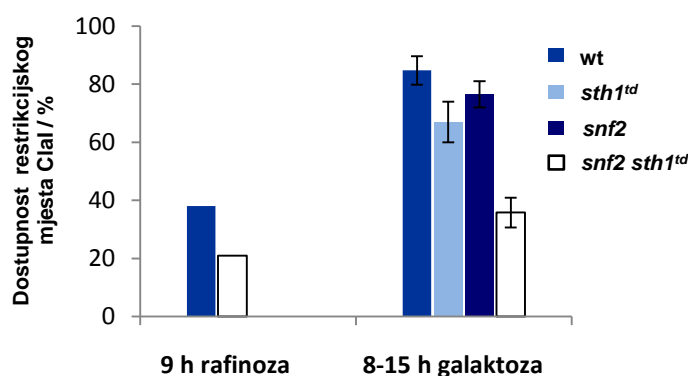
U usporedbi s ostalim mutantima, rast stanica *snf2 sth1^{td}* tijekom indukcije na 37 °C je sporiji te stanice prestaju rasti nakon nešto manje od dvije generacije zbog inaktivacije *Sth1^{td}*. Stoga je bilo potrebno provjeriti da li je izostanak aktivacije promotora *PHO5* posljedica niže razine indukcije u ovim stanicama, zbog nedovoljnog trošenja zaliha polifosfata te je proveden

kontrolni eksperiment jednak eksperimentu prikazanom na Slici 10. U stanicama *snf2 sth1^{td}* koje su nakon 13 sati inkubacije u podlozi bez fosfata na 37 °C prebačene na 24 °C radi prestanka inaktivacije Sth1^{td}, je bez daljnjeg rasta (Slika 19. B), odnosno bez daljnjeg trošenja polifosfata i pojačavanja signala indukcije, postignuta jednaka aktivacija promotora *PHO5* kao u stanicama *snf2* (Slika 19. A). Dakle, izostanak aktivacije promotora u stanicama dvostrukog mutanta na 37 °C ne proizlazi iz niže razine indukcije, već je izravna posljedica inaktivacije Sth1^{td}.



Slika 19. Prebacivanjem stanica *snf2 sth1^{td}*, inkubiranih u podlozi bez fosfata, sa 37 °C na 24 °C postiže se jednaka razina aktivacije promotora *PHO5* kao u stanicama *snf2* (A), bez daljnjeg rasta (B). Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7.

U stanicama mutanta *snf2 sth1^{td}* ispitano je i remodeliranje strukture kromatina inačice promotora *PHO5*, koja se aktivira GAL signalnim putem pomoću aktivatora Gal4 („*PHO5*-variant 33“). Korištenjem ovog promotora bilo je moguće ispitati učinak zajedničke inaktivacije kompleksa RSC i SWI/SNF pod uvjetima jake indukcije koja ne ovisi o rastu stanica. Stanice divljeg tipa i mutanata *sth1^{td}*, *snf2* i *snf2 sth1^{td}*, transformirane plazmidom *pP_{pho5v33}-lacZ*, uzgojene su na 24 °C do logaritamske faze rasta u podlozi s rafinozom te zatim inkubirane 6 sati na 37 °C pri čemu je došlo do inaktivacije *Sth1^{td}*, potvrđene prestankom rasta mutanata *sth1^{td}* i *snf2 sth1^{td}*. Stanice su zatim inkubirane dodatnih 9 sati u istoj podlozi ili 8 – 15 sati u podlozi s galaktozom. Nakon 8 - 15 sati indukcije u stanicama dvostrukog mutanta *snf2 sth1^{td}* nije došlo do znatnog otvaranja kromatina u odnosu na razinu postignutu pod uvjetima represije, za razliku od jednostrukih mutanata *snf2* i *sth1^{td}*, kod kojih je stupanj remodeliranja bio jednak kao u divljem tipu (Slika 20.).

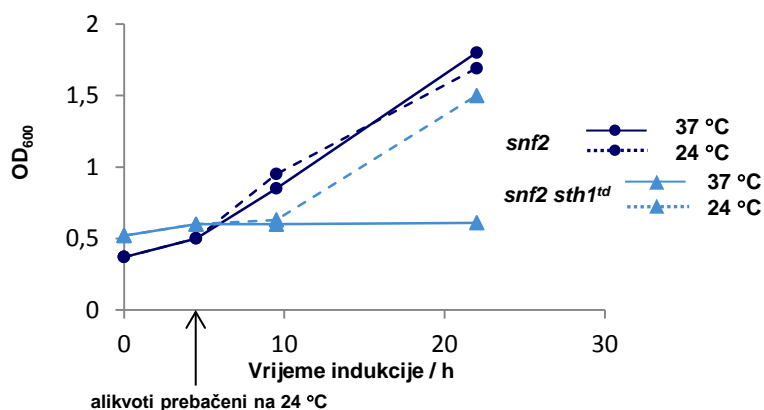


Slika 20. Utjecaj zajedničke inaktivacije proteina *Sth1^{td}* i *Snf2* na remodeliranje strukture kromatina inačice promotora *PHO5* („*PHO5*-variant 33“). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

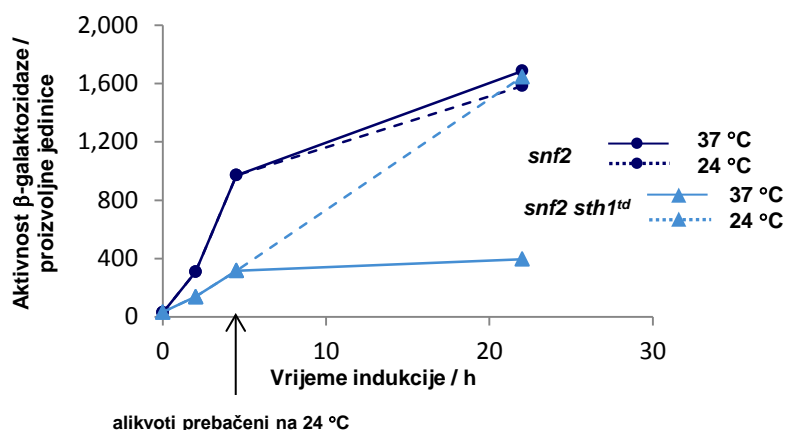
Ovi rezultati u skladu su s rezultatima dobivenima za nativni promotor *PHO5*, čime je pokazano da učinak zajedničke inaktivacije kompleksa RSC i SWI/SNF nije vezan uz indukciju putem PHO-signalnog puta te aktivatora Pho4. Osim toga, dodatno je potvrđeno da učinak opažen za nativni promotor nije posljedica slabije indukcije uslijed slabijeg rasta stanica *snf2 sth1^{td}*, budući da je isti rezultat dobiven za inačicu promotora kod koje indukcija ne ovisi o rastu stanica (Slika 16.).

Također, korišten je eksperiment analogan eksperimentu prikazanom na Slici 19. kako bi se potvrdilo da je u stanicama *snf2 sth1^{td}* izostanak aktivacije inačice promotora *PHO5* i prestanak rasta stanica na 37 °C izravna posljedica inaktivacije *Sth1^{td}* (Slika 21.).

A



B



Slika 21. Prebacivanjem stanica *snf2 sth1^{td}* inkubiranih u podlozi s galaktozom sa 37 °C na 24 °C postiže se jednak rast (A) i jednaka aktivacija inačice promotora *PHO5* („*PHO5*-variant 33“) (B) kao u stanicama *snf2*. Aktivnost β-galaktozidaze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.8.

Stanice uzgojene na 24 °C do logaritamske faze rasta u podlozi s rafinozom predinkubirane su 6 sati na 37 °C u istoj podlozi, nakon čega je dodana galaktoza. Nakon 4,5 sati indukcije stanice su podijeljene u dva alikvota: jedan je ostavljen na istoj temperaturi, a drugi prebačen

na 24 °C radi prestanka inaktivacije Sth1^{td} i inkubirani su dodatna 24 sata. Stanice dvostrukog mutanta *snf2 sth1^{td}*, koje su prestale rasti tijekom 6 sati predinkubacije na 37 °C zbog inaktivacije Sth1^{td}, nakon prebacivanja na 24 °C su postigle jednaku razinu rasta (Slika 21. A) i aktivacije promotora (Slika 21. B) kao stanice *snf2*. Dakle, prestanak rasta stanica dvostrukog mutanta, kao i niska razina aktivacije promotora na 37 °C izravno i isključivo proizlaze iz inaktivacije proteina Sth1^{td}.

4.7. Aktivnost kompleksa RSC neophodna je za remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* u odsustvu kompleksa ISW1 i CHD1

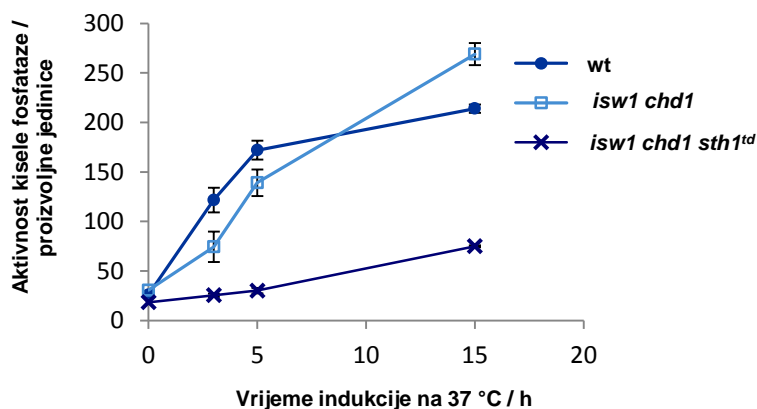
Prijašnjim istraživanjima utvrđeno je da pojedinačna inaktivacija katalitičkih podjedinica kompleksa ISW1 i CHD1 ne utječe značajno na indukciju promotora *PHO5*^{6,99}. Međutim, u stanicama dvostrukog mutanta *isw1 chd1* fiziološka indukcija gena *PHO5*, pri inkubaciji stanica u podlozi bez fosfata, bila je usporena u odnosu na divlji tip, dok je pod uvjetima slabije indukcije, inaktivacijom negativnog regulatora transkripcije Pho80, pokazan izostanak aktivacije transkripcije u ovom soju⁷.

Kako bi utvrdili da li je prethodno nađena sporija indukcija gena *PHO5* kod istovremene inaktivacije proteina Isw1 i Chd1 posljedica sporijeg procesa remodeliranja strukture kromatina, u ovom radu je usporedno ispitivana kinetika indukcije gena i kinetika remodeliranja strukture kromatina promotora u stanicama soja *isw1 chd1* (YTT223; §3.1.3.) prilikom inkubacije u podlozi bez fosfata na 37 °C. Kinetika indukcije značajno je sporija u ovim stanicama u odnosu na divlji tip, kao što je već objavljeno⁷, ali nakon produžene indukcije aktivnost kisele fosfataze dostiže jednaku vrijednost kao u divljem tipu (Slika 22. A). Kinetika remodeliranja strukture kromatina promotora u stanicama dvostrukog mutanta u skladu je s kinetikom indukcije gena; usporena je, no nakon 15 sati inkubacije u podlozi bez fosfata postiže se jednaka razina otvaranja kromatina kao u divljem tipu (Slika 22. B). Dakle, sporija indukcija gena posljedica je usporenog procesa remodeliranja strukture kromatina, odnosno sporije aktivacije promotora *PHO5*.

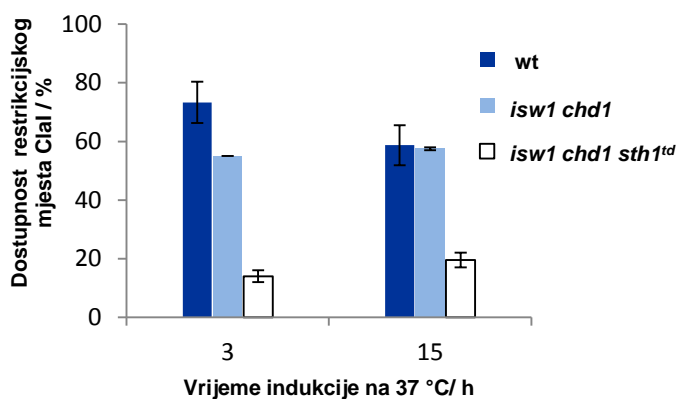
Budući da je rezultatima do sada pokazanima u ovom radu utvrđeno sudjelovanje kompleksa RSC u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*, bilo je interesantno ispitati da li je aktivnost kompleksa RSC neophodna za otvaranje kromatina promotora u odsustvu proteina Isw1 i Chd1 i obrnuto, odnosno da li će zajednička inaktivacija sva tri kompleksa spriječiti remodeliranje kromatina. Konstruiran je soj *isw1 chd1 sth1^{td}* (YTT223

sth1^{td}; §3.1.3.). Inaktivacija *Sth1^{td}*, usporedna s indukcijom u podlozi bez fosfata, u stanicama ovog soja dovodi do znatno niže aktivacije promotora (Slika 22. A) te sprječava remodeliranje strukture kromatina (Slika 22. B).

A



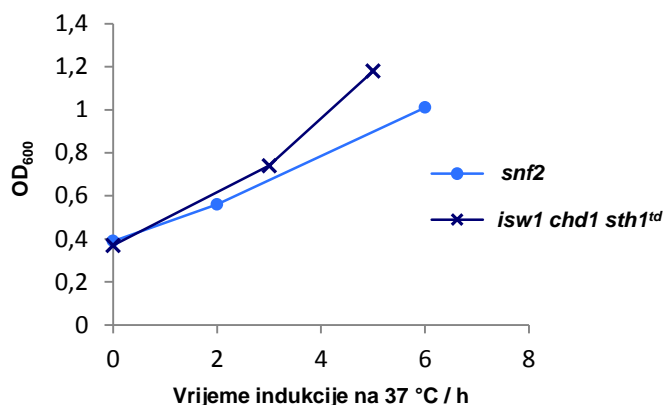
B



Slika 22. Utjecaj zajedničke inaktivacije proteina *Sth1^{td}*, *Isw1* i *Chd1* na aktivaciju (A) i remodeliranje strukture kromatina (B) promotora *PHO5*. Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Dakle, proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* zahtjeva ili aktivnost kompleksa RSC ili ISW1 i CHD1, odnosno, u odsustvu proteina *Isw1* i *Chd1* kompleks RSC ima esencijalnu ulogu u indukciji promotora i obrnuto.

Budući da je rast stanica *isw1 chd1 sth1^{td}* u prvih 6 sati indukcije bio nešto brži od rasta stanica *snf2* (Slika 23.), kod kojih je nakon 6 sati indukcije postignuto potpuno remodeliranje strukture kromatina (Slika 17.), izostanak remodeliranja kromatina u stanicama *isw1 chd1 sth1^{td}* nije neizravna posljedica slabije indukcije uzrokovane sporijim rastom.



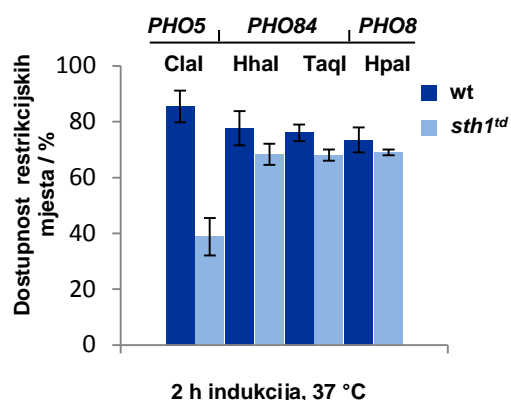
Slika 23. Usporedba rasta stanica *isw1 chd1 sth1^{td}* s rastom stanica *snf2* tijekom inkubacije u podlozi bez fosfata na 37 °C

4.8. Aktivnost kompleksa RSC nije potrebna za remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*

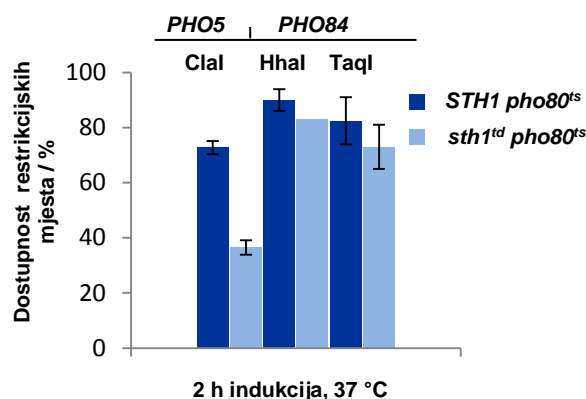
Promotori gena *PHO8* i *PHO84* aktiviraju se istim specifičnim aktivatorom transkripcije kao promotor *PHO5* pod uvjetima nedostatka fosfata. Prilikom indukcije ovih promotora također dolazi do znatne promjene strukture kromatina, međutim, potrebe za kofaktorima koji dovode do remodeliranja kromatina različite su u odnosu na promotor *PHO5*^{6,9,10,100}. Prethodno je pokazano da u odsustvu proteina Snf2 uopće ne dolazi do remodeliranja kromatina promotora *PHO8*⁹, kao i do uklanjanja jednog od nukleosoma promotora *PHO84* koji podliježu remodeliranju, dok je remodeliranje drugog nukleosoma promotora *PHO84* sporije, ali potpuno pod ovim uvjetima¹⁰. Budući da je u ovom radu utvrđena značajna uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5*, bilo je interesantno ustanoviti da li je i u kojoj mjeri aktivnost ovog kompleksa uključena u otvaranje kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*.

Ispitano je remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84* u stanicama *sth1^{td}* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata te indukcije putem inaktivacije negativnih regulatora transkripcije, Pho80 i Pho85 (Slika 24.).

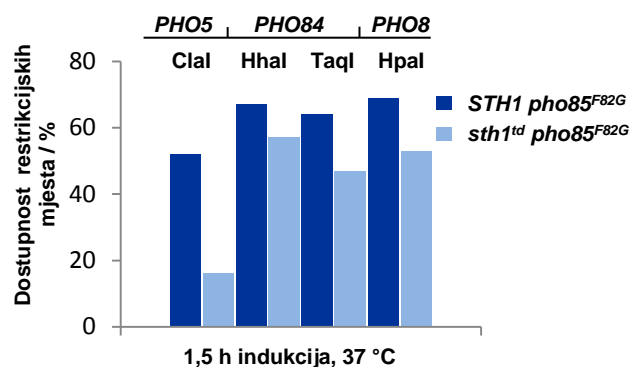
A



B



C

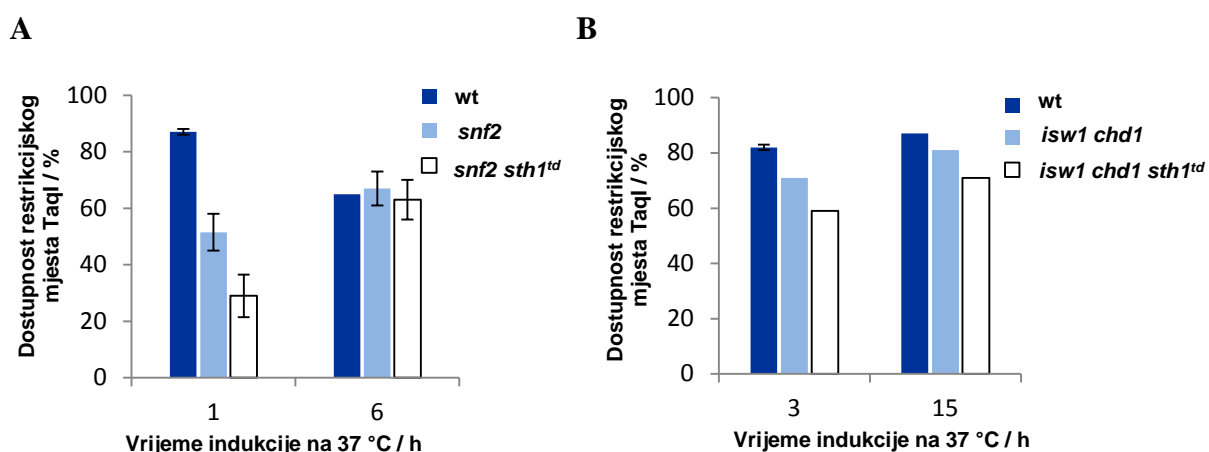


Slika 24. Usporedba učinka inaktivacije proteina *Sth1^{td}* na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5*, *PHO8* i *PHO84* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata (A) te indukcije inaktivacijom *Pho80^{ts}* (B) i *Pho85^{F82G}* (C). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Stanice su uzgajane kao što je opisano prethodno (Slike 7 A, 12 i 14). Za digestiju naznačenim restriktivnim enzimima korišteni su alikvoti jezgri koje su prethodno upotrebljavane za analizu strukture kromatina promotora *PHO5*. Inaktivacija proteina *Sth1^{td}* nije imala utjecaja na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata (Slika 24. A), kao i prilikom indukcije putem inaktivacije *Pho80^{ts}* (Slika 24. B), dok je vrlo slabi efekt uočen prilikom inaktivacije kinaze *Pho85^{F82G}* (Slika 24. C) kod koje je razina indukcije najniža (§9. Dodatak,

Tablica 5.). Ovi rezultati pokazuju da, za razliku od promotora *PHO5*, kompleks RSC nije u značajnoj mjeri uključen u remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*.

Prijašnja istraživanja pokazala su da je kinetika remodeliranja nukleosoma promotora *PHO84* koji se nalazi nizvodno od HS u odsustvu proteina Snf2 usporena, ali nakon produžene indukcije postiže se potpuno remodeliranje¹⁰, jednako što je nađeno za promotor *PHO5*⁶. Stoga je bilo interesantno ispitati da li će inaktivacija *Sth1^{td}* u stanicama *snf2 sth1^{td}* onemogućiti remodeliranje ovog nukleosoma, kao što je u ovom radu nađeno za promotor *PHO5* (Slika 17. B). Osim toga, ispitano je i remodeliranje ovog nukleosoma u stanicama mutanta *isw1 chd1 sth1^{td}*, kod kojih je remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* također bilo spriječeno (Slika 22. B). Stanice divljeg tipa i mutanata *snf2* i *snf2 sth1^{td}* te *isw1 chd1* i *isw1 chd1 sth1^{td}* uzgajane su kao što je opisano (Slike 17 i 22), a remodeliranje nukleosoma promotora *PHO84* nizvodno od HS ispitano je digestijom restrikcijskim enzimom *TaqI* (Slika 25.).



Slika 25. Utjecaj zajedničke inaktivacije proteina *Sth1^{td}* i *Snf2* (A) te *Sth1^{td}*, *Isw1* i *Chd1* (B) na remodeliranje nukleosoma nizvodno od HS promotora *PHO84* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata (-Pi) na 37 °C. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Inaktivacijom *Sth1^{td}* u stanicama *snf2 sth1^{td}* kinetika remodeliranja ispitanog nukleosoma je dodatno usporena u odnosu na stanice mutanta *snf2*, međutim, remodeliranje je potpuno nakon produžene indukcije (Slika 25. A). Nadalje, istovremena inaktivacija *Isw1* i *Chd1* ne

utječe na remodeliranje ispitanog nukleosoma promotora *PHO84*, a inaktivacija *Sth1^{td}* u stanicama *isw1 chd1 sth1^{td}* ima vrlo blagi učinak (Slika 25. B). Prema tome, ovi rezultati pokazuju znatnu razliku između nukleosoma promotora *PHO5* i ispitanog nukleosoma promotora *PHO84*, s obzirom na potrebu za kofaktorima uključenima u proces remodeliranja.

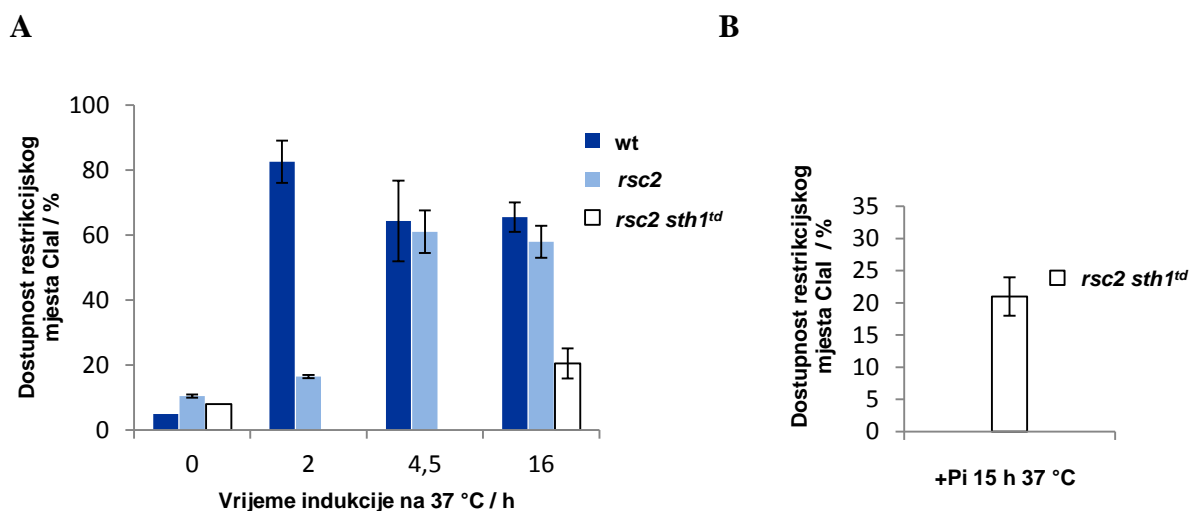
4.9. Inaktivacija *Sth1^{td}* u stanicama *rsc2 sth1^{td}* sprječava remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5*, a ne utječe na otvaranje kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*

U ovom radu ustanovljeno je da je aktivnost kompleksa RSC neophodna za fiziološki učinkovitu kinetiku remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije u podlozi bez fosfata, ali nije esencijalno potrebna za potpuno otvaranje kromatina (Slika 8.). Međutim, kao što je navedeno, pod ispitanim uvjetima je inaktivacija *Sth1^{td}* bila usporedna s indukcijom promotora te se ne može isključiti mogućnost da bi pokazani negativan učinak bio jači, odnosno da bi remodeliranje strukture kromatina promotora bilo spriječeno kada bi inaktivacija kompleksa RSC prethodila indukciji. Također, uzevši u obzir visoku koncentraciju ovog kompleksa u stanicama⁵⁴ te rezultate „western blot-a“ koji pokazuju slabi signal proteina *Sth1^{td}* nakon 6 sati inkubacije stanica na 37 °C¹²⁴, moguće je da se u stanicama *sth1^{td}* niti nakon duže inkubacije na 37 °C ne postiže potpuna inaktivacija kompleksa RSC.

Nedavno je pokazano da je u stanicama mutanta *rsc2*, u kojima postoji samo izooblik kompleksa RSC s podjedinicom Rsc1, odnosno koncentracija kompleksa je znatno snižena u odnosu na stanice divljeg tipa¹⁶, remodeliranje strukture kromatina prilikom indukcije promotora *PHO5* znatno sporije nego u divljem tipu (D. Hlevnjak, Diplomski rad, 2013.). U svrhu dobivanja odgovora na pitanje da li je aktivnost kompleksa RSC esencijalno potrebna za remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* konstruiran je soj *rsc2 sth1^{td}* (CY337 *rsc2 sth1^{td}*; §3.1.3.). Inaktivacijom proteina *Sth1^{td}* u ovim stanicama tijekom indukcije na 37 °C postići će se potpunija inaktivacija kompleksa RSC nego u stanicama jednostrukog mutanta *sth1^{td}*, budući da je početna koncentracija kompleksa smanjena.

Stanice divljeg tipa i mutanata *rsc2* i *rsc2 sth1^{td}* uzgajane u podlozi s fosfatom na 24 °C prebačene su u podlogu bez fosfata i 37 °C radi usporedne indukcije promotora i inaktivacije *Sth1^{td}*. Ispitana je kinetika remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* (Slika 26.). U stanicama jednostrukog mutanta *rsc2*, kao što je već pokazano (D. Hlevnjak, Diplomski rad,

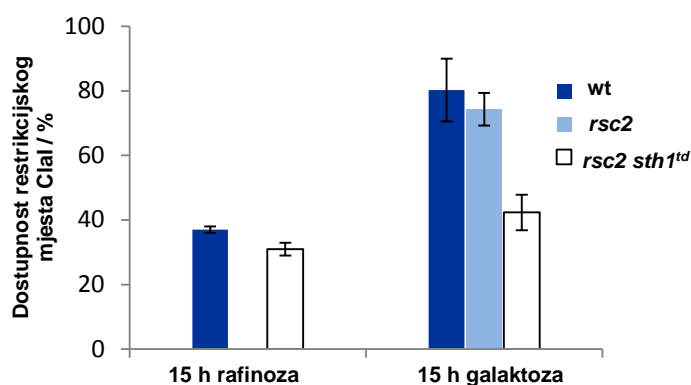
2013.) proces remodeliranja je znatno sporiji, ali je nakon 15 sati inkubacije u podlozi bez fosfata postignuta približno jednaka razina otvaranja kromatina kao u divljem tipu. Međutim, u stanicama dvostrukog mutanta *rsc2 sth1^{td}*, čak niti nakon produžene indukcije nije došlo do otvaranja kromatina (Slika 26. A) u odnosu na razinu postignutu pod uvjetima represije (Slika 26. B).



Slika 26. Utjecaj inaktivacije proteina *Sth1^{td}* u stanicama mutanta *rsc2 sth1^{td}* na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata na 37 °C. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

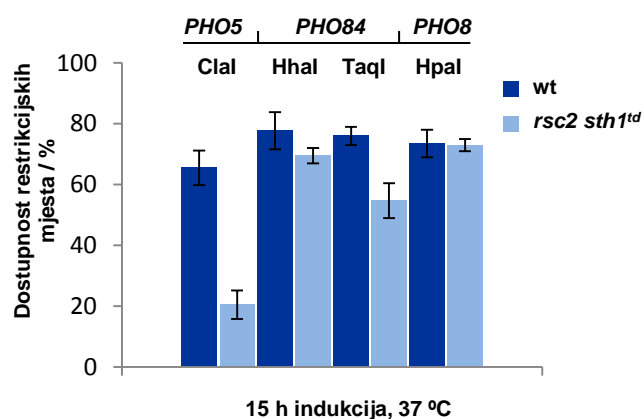
Ovi rezultati ukazuju na esencijalnu ulogu kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5* pod ispitanim uvjetima te da je otvaranje kromatina postignuto nakon produžene indukcije u stanicama *sth1^{td}* posljedica nepotpune inaktivacije kompleksa. U stanicama *rsc2 sth1^{td}* ispitano je i remodeliranje strukture kromatina inačice promotora *PHO5* koja se aktivira specifičnim aktivatorom transkripcije Gal4. Stanice divljeg tipa i mutanata *rsc2* i *rsc2 sth1^{td}*, transformirane su plazmidom *pP_{pho5v33}-lacZ*, uzgojene na 24 °C do logaritamske faze rasta u podlozi s rafinozom te zatim inkubirane 6 sati na 37 °C pri čemu je došlo do inaktivacije *Sth1^{td}*, potvrđene prestankom rasta mutanta *rsc2 sth1^{td}*. Stanice su zatim inkubirane dodatnih 15 sati u istoj podlozi ili u podlozi s galaktozom. Nakon 15 sati indukcije u stanicama dvostrukog mutanta *rsc2 sth1^{td}* nije došlo do znatnog otvaranja kromatina u

odnosu na razinu postignutu pod uvjetima represije, za razliku od stanica jednostrukog mutanta *rsc2* kod kojih je stupanj remodeliranja bio jednak kao u divljem tipu (Slika 27.). Dakle, kompleks RSC esencijalan je i za potpuno remodeliranje kromatina inačice promotora *PHO5*. Otvaranje kromatina ovog promotora, pokazano prethodno u stanicama *sth1^{td}*, očigledno je posljedica nepotpune inaktivacije proteina *Sth1^{td}* u tim stanicama, unatoč predinkubaciji stanica 6 sati na 37 °C. Ovim eksperimentom pokazano je i da izostanak remodeliranja kromatina prilikom indukcije nativnog promotora *PHO5* ne može biti posljedica slabijeg rasta stanica *rsc2 sth1^{td}*, budući da je jednak rezultat dobiven i za inačicu promotora kod koje indukcija ne ovisi o rastu stanica.



Slika 27. Utjecaj inaktivacije proteina *Sth1^{td}* u stanicama mutanta *rsc2 sth1^{td}* na remodeliranje strukture kromatina inačice promotora *PHO5* („*PHO5*-variant 33“). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

Nadalje, u stanicama *rsc2 sth1^{td}* ispitano je i remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84* (Slika 28.), kod kojih je, na temelju rezultata dobivenih inaktivacijom *Sth1^{td}* (Slika 24.), isključena značajna uloga kompleksa RSC u procesu remodeliranja. Stanice su uzgajane kao što je opisano u prethodnom eksperimentu (Slika 26.), a za digestiju naznačenim restrikcijskim enzimima korišteni su alikvoti jezgri prethodno upotrijebljenih za analizu strukture kromatina promotora *PHO5*. Za razliku od promotora *PHO5*, pri jačoj inaktivaciji kompleksa RSC nije opažen značajan utjecaj na otvaranje kromatina promotora *PHO8* i *PHO84* (Slika 28.), čime je dodatno potvrđeno da kompleks RSC nije uključen u remodeliranje strukture kromatina ovih promotora.



Slika 28. Utjecaj inaktivacije proteina Sth1^{td} u stanicama mutanta *rsc2 sth1^{td}* na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84* pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata na 37 °C. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata 3-5 neovisno ponovljenih eksperimenata.

§ 5. RASPRAVA

Promotori *PHO* gena kvasca pokazali su se kao izvrstan modelni sustav u izučavanju povezanosti modifikacija strukture kromatina i regulacije transkripcije, a posebno se to odnosi na promotor gena *PHO5* koji predstavlja prvi i jedan od do danas najbolje istraženih primjera izrazite promjene strukture kromatina kao preduvjeta za aktivaciju transkripcije. Posljednjih 15-ak godina, na primjeru ovog promotora ustanovljeni su temeljni principi i mehanizmi regulacije ekspresije gena putem remodeliranja strukture kromatina. Međutim, unatoč provedenim opsežnim istraživanjima, do danas nije u potpunosti dobiven odgovor na pitanje koji su sve proteinski kompleksi odgovorni za promjenu strukture kromatina prilikom indukcije promotora *PHO5* te postoji li kompleks čija aktivnost je esencijalno potrebna za remodeliranje. Kompleksi SWI/ SNF i INO80 sudjeluju u procesu remodeliranja, međutim nisu neophodno potrebni te je njihova uloga u indukciji promotora *PHO5* utvrđena tek primjenom takozvanog „kinetičkog pristupa“, to jest ispitivanjem utjecaja inaktivacije određenog kompleksa na kinetiku procesa remodeliranja, a ne samo na krajnji stupanj remodeliranja strukture kromatina⁶. Također, aktivacija ovog promotora sporija je i u odsustvu proteina Isw1 i Chd1, ali se aktivnost jednog može gotovo u potpunosti zamijeniti aktivnošću drugog proteina te je značajan utjecaj na brzinu aktivacije uočljiv tek inaktivacijom oba proteina⁷.

U ovom radu po prvi puta je ispitana uloga kompleksa RSC u indukciji *PHO* promotora *in vivo*, jedinog remodelirajućeg kompleksa u kvascu čija aktivnost je esencijalna za preživljavanje stanica te jedinog kompleksa čija uloga u indukciji promotora *PHO5* do sada nije ispitana.

Inaktivacija katalitičke podjedinice kompleksa, Sth1^{td}, na 37 °C pod uvjetima indukcije u podlozi bez fosfata, dovela je do značajno sporijeg remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* u odnosu na stanice divljeg tipa, no nakon produžene indukcije postignuto je potpuno otvaranje kromatina. Ovakav rezultat upućivao bi na to da kompleks RSC sudjeluje, ali nije neophodno potreban u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora. Međutim, budući da fiziološkoj indukciji gena *PHO5* prethodi trošenje unutarstaničnih zaliha polifosfata, što zahtijeva određeni rast stanica u podlozi bez fosfata¹²⁵,

a inaktivacija esencijalnog kompleksa RSC inkubacijom stanica na 37 °C dovodi do prestanka rasta, eksperimentalni pristup je bio takav da u ispitivanim stanicama inaktivacija Sth1^{td} nije prethodila, već je bila usporedna s indukcijom promotora. Time je omogućen rast stanica *sth1^{td}* u početnim satima inkubacije u podlozi bez fosfata koji je bio dovoljan za stvaranje potpunog signala indukcije, što je potvrđeno kontrolnim eksperimentom (Slika 10.). No, upravo stoga što je u početnim satima indukcije na 37 °C bila prisutna značajna koncentracija aktivnog kompleksa RSC koja je omogućila rast stanica, postojala je mogućnost da bi u slučaju potpune inaktivacije proteina Sth1^{td} prije indukcije aktivacija promotora *PHO5* bila spriječena, te se na temelju ovih rezultata nije mogla isključiti esencijalna uloga kompleksa u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5*.

Inaktivacija esencijalnog proteina Sth1^{td} onemogućuje prelazak između faza G2 i M^{56,57} staničnog ciklusa, te je bilo potrebno ispitati da li je usporeno remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* neizravna posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa. Proveden je kontrolni eksperiment u kojemu je stanicama *STH1* i *sth1^{td}* prije indukcije zaustavljen rast u metafazi mitoze represijom transkripcije esencijalnog gena *CDC20*. Time je isključen mogući utjecaj zaustavljanja staničnog ciklusa u fazi G2/M na razinu aktivacije promotora u stanicama mutanta, do kojeg bi došlo uslijed inaktivacije Sth1^{td} na 37°C usporedne s indukcijom. Budući da je pokazano da su rezerve polifosfata unutar stanica najniže u mitozu, indukcija gena *PHO5* u podlozi bez fosfata u stanicama kojima je rast zaustavljen u mitozu ne zahtijeva njihovo trošenje, odnosno neovisna je rastu stanica¹²⁶. Aktivacija promotora bila je znatno niža u stanicama *sth1^{td}* u odnosu na divlji tip i pod ovim uvjetima, čime je jasno pokazano da učinak inaktivacije Sth1^{td} nije posljedica zaustavljanja staničnog ciklusa.

Korištenjem mutanata kvasca kod kojih je moguće inducibilno inaktivirati negativne regulatore transkripcije gena *PHO5*, Pho80 i Pho85 te na taj način inducirati promotor *PHO5* neovisno o signalu nedostatka fosfata i rastu stanica, pokazano je da kompleks RSC izravno sudjeluje u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora, odnosno da opaženo sporije remodeliranje kromatina u stanicama *sth1^{td}* na 37 °C nije neizravna posljedica učinka inaktivacije kompleksa na neku od komponenata PHO-signalnog puta. Inaktivacija kompleksa pod ovim uvjetima imala je znatno jači učinak nego kod uvjeta indukcije u podlozi bez fosfata: krajnji stupanj remodeliranja strukture kromatina u stanicama mutanta *sth1^{td} pho80^{ts}* u kojima je inaktivacija Sth1^{td} bila usporedna s indukcijom promotora na 37 °C bio je otprilike dvostruko niži nego u stanicama *STH1 pho80^{ts}*, dok je kod indukcije inaktivacijom Pho85^{F82G},

gdje je bilo moguće postići inaktivaciju Sth1^{td} prethodno indukciji, remodeliranje strukture kromatina bilo potpuno spriječeno. Opaženi jači učinak na remodeliranje kromatina promotora može se objasniti činjenicom da je razina indukcije koja se postiže inaktivacijom negativnih regulatora transkripcije niža od fiziološke. Naime, prethodna istraživanja s drugim kofaktorima uključenima u proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* pokazala su veću potrebu za ovim kofaktorima pod uvjetima slabije indukcije te je u odsustvu pojedinih proteina remodeliranje strukture kromatina promotora pod ovim uvjetima bilo spriječeno, dok je pod uvjetima jake fiziološke indukcije bilo samo usporeno^{6,8,106,108,109}. Stoga pod uvjetima sub-maksimalne indukcije nije moguće zaključivati o tome da li je neki kofaktor esencijalno potreban u procesu remodeliranja.

Inaktivacija proteina Sth1^{td} u jednakoj je mjeri utjecala na remodeliranje strukture kromatina nativnog promotora *PHO5* i inačice promotora koja se aktivira pomoću aktivatora Gal4. Važno je istaknuti da inaktivacija Sth1 nema utjecaja na indukciju promotora *GALI* u stanicama prethodno uzgojenima u podlozi s rafinozom⁷⁵. Dobiveni rezultati dodatno su potvrdili da usporeno remodeliranje strukture kromatina nativnog promotora u stanicama *sth1^{td}* nije vezano uz indukciju promotora putem PHO-signalnog puta. Također, pokazano je da uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5* ne ovisi o specifičnom aktivatoru Pho4 već je određena samom strukturom kromatina promotora, što je u skladu s prethodnim opažanjima vezanima uz druge kofaktore koji sudjeluju u procesu remodeliranja kromatina ovog promotora^{5,6,8}. S obzirom da indukcija inačice promotora, za razliku od fiziološke indukcije nativnog promotora, ne ovisi o rastu stanica, bilo je moguće prethodno inaktivirati Sth1^{td} te zatim pokrenuti indukciju, no unatoč tome aktivnost kompleksa RSC nije se pokazala esencijalno potrebnom za remodeliranje strukture kromatina. Ipak, na osnovu ovoga se ponovno ne može u potpunosti isključiti esencijalna uloga kompleksa u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*; moguće je da u stanicama *sth1^{td}*, nakon 6 sati predinkubacije na 37 °C, nije postignuta potpuna inaktivacija kompleksa RSC, uzevši u obzir visoku koncentraciju kompleksa u stanicama⁵⁴ te rezultate „western blot-a“ koji pokazuju slabi signal proteina Sth1^{td} nakon 6 sati inkubacije stanica na 37 °C¹²⁴.

Aktivnost kompleksa RSC pokazala se esencijalnom za remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* u odsustvu kompleksa SWI/SNF te ISW1 i CHD1, što predstavlja prve primjere višestruke inaktivacije remodelirajućih kompleksa kojima je potpuno spriječeno

otvaranje kromatina ovog promotora pod uvjetima indukcije u podlozi bez fosfata. Kontrolnim eksperimentima je pokazano da ovaj rezultat nije posljedica slabije indukcije uslijed slabog rasta stanica višestrukih mutanata. Također, utvrđeni jednak učinak zajedničke inaktivacije kompleksa RSC i SWI/SNF na aktivaciju nativnog promotora te inačice promotora koja se aktivira aktivatorom Gal4 pokazao je da potreba za aktivnosti ovih kompleksa u aktivaciji promotora nije vezana uz PHO-signalni put i aktivator Pho4.

Budući da je u odsustvu proteina Snf2 pokazano remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* mehanizmom potpunog uklanjanja histona „*in trans*“⁶, a inaktivacija kompleksa RSC pod ovim uvjetima sprječava remodeliranje, očito je da je kompleks RSC odgovoran za uklanjanje histona u stanicama *snf2*. R. Kornberg i suradnici su na osnovu mehanizma djelovanja kompleksa RSC utvrđenog *in vitro*¹¹, koji odgovara mehanizmu predloženom za remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5*^{15,18}, sugerirali moguću ulogu ovog kompleksa u indukciji promotora. Međutim, kasnije su pokazali da je u stanicama *isw1 chd1 pho80* spriječena aktivacija promotora *PHO5* u podlozi visoke koncentracije fosfata, na temelju čega su izveli zaključak da je zajednička aktivnost proteina Isw1 i Chd1 neophodna za remodeliranje strukture kromatina promotora te posljedično isključili moguću ulogu kompleksa RSC⁷. Međutim, ovdje nije uzeto u obzir da je indukcija promotora putem inaktivacije proteina Pho80 slabija od fiziološke. Kao što je već rečeno, kod uvjeta slabije indukcije je i prethodno nađena esencijalna uloga nekih od kofaktora čije se aktivnosti pod uvjetima jake fiziološke indukcije nisu pokazale neophodnima za remodeliranje kromatina promotora *PHO5*^{5,6,8,106,108,109,127}, zbog čega se kod takvih uvjeta ne može zaključivati o esencijalnoj ulozi određenog kofaktora ili isključiti ulogu ostalih. U ovom radu jasno je pokazano sporije, ali potpuno remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* u odsustvu proteina Isw1 i Chd1 pod uvjetima jake indukcije te potpuni izostanak remodeliranja nakon dodatne inaktivacije *Sth1*^{td}. Rezultati esencijalne uloge kompleksa RSC u procesu remodeliranja kromatina promotora *PHO5* u odsustvu proteina Snf2 te Isw1 i Chd1 ukazivali su na to da je uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina ovog promotora bitnija od uloga ostalih kompleksa, bilo zbog njegovog specifičnog mehanizma djelovanja ili zbog visoke koncentracije ovog kompleksa u stanicama.

Kompleks RSC se u stanicama pojavljuje u dva oblika, različita po tome što sadrže ili strukturnu podjedinicu Rsc1 ili Rsc2, pri čemu je kompleks s Rsc2 prisutan u znatno većoj koncentraciji te su utvrđene neke funkcionalne razlike dvaju oblika, no zbog djelomičnog

preklapanja njihovih aktivnosti pojedinačne delecije gena *RSC1* i *RSC2* nisu letalne za stanicu¹⁶. Nedavnim istraživanjima u ovom laboratoriju ustanovljeno je znatno sporije remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* u stanicama mutanta *rsc2*, dok u stanicama *rsc1* nije opažen učinak na indukciju promotora (D. Hlevnjak, Diplomski rad, 2013.), što se može objasniti većom koncentracijom izooblika kompleksa s podjedinicom Rsc2, ili specifičnim sudjelovanjem samo ovog izooblika u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5*. U svrhu potpunije inaktivacije kompleksa RSC i dobivanja odgovora na pitanje o esencijalnoj ulozi kompleksa u aktivaciji promotora *PHO5*, konstruiran je soj *rsc2 sth1^{td}*. Remodeliranje strukture kromatina prilikom indukcije na 37 °C u stanicama *rsc2 sth1^{td}* bilo je potpuno spriječeno, za razliku od znatno sporijeg, ali potpunog otvaranja kromatina u stanicama jednostrukih mutanata *rsc2* i *sth1^{td}*. Dakle, aktivnost kompleksa RSC pokazala se esencijalno potrebnom u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* pod ispitanim uvjetima, a potpuno otvaranje kromatina postignuto nakon produžene indukcije u stanicama *sth1^{td}* posljedica je nepotpune inaktivacije kompleksa. Pri tome je koncentracija aktivnog kompleksa RSC preostala u stanicama *sth1^{td}* tijekom inkubacije na 37 °C očigledno bila dovoljna za potpuno otvaranje kromatina promotora *PHO5* u prisustvu ostalih kompleksa koji sudjeluju u remodeliranju kromatina ovog promotora, dok je u odsustvu bilo proteina Snf2 ili Isw1 i Chd1 čak i nepotpuna inaktivacija Sth1^{td} spriječila otvaranje kromatina. Izostanak otvaranja kromatina u stanicama *rsc2 sth1^{td}* također pokazuje sudjelovanje oba izooblika kompleksa RSC u indukciji promotora *PHO5*, budući da je inaktivacija katalitičke podjedinice kompleksa, Sth1^{td}, u stanicama mutanta *rsc2 sth1^{td}* koje sadrže samo izooblik kompleksa s podjedinicom Rsc1, potpuno spriječila remodeliranje strukture kromatina promotora.

Za razliku od promotora *PHO5*, inaktivacija kompleksa RSC u stanicama *sth1^{td}* nije imala značajan utjecaj na remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*, čak niti pod uvjetima slabije indukcije. Također, u stanicama dvostrukog mutanta *rsc2 sth1^{td}*, u kojemu se postiže potpunija inaktivacija kompleksa, dolazi do potpunog remodeliranja kromatina ovih promotora. Prijašnja ispitivanja uloge kompleksa RSC u održavanju represivne strukture kromatina promotora *PHO8* pokazala su sudjelovanje kompleksa u pozicioniranju nukleosoma ovog promotora pod uvjetima represije⁷⁸. Međutim, prema rezultatima ovog rada očito je da uloga pojedinog kofaktora u pozicioniranju nukleosoma na promotoru ne mora nužno upućivati i na njegovu ulogu u indukciji promotora. Do sada se smatralo da je promotor

PHO84, s obzirom na stabilnost nukleosoma, hibrid između promotora *PHO5* i *PHO8*. Nukleosom uzvodno od HS odgovarao je stabilnim nukleosomima promotora *PHO8*, budući da je za njegovo remodeliranje, jednako kao za promotor *PHO8*^{6,128}, neophodno potrebna aktivnost kompleksa SWI/SNF i u značajnoj mjeri aktivnost kompleksa *INO80*. S druge strane, nukleosom nizvodno od HS uspoređivan je s nukleosomima promotora *PHO5*, čije remodeliranje je usporeno, ali potpuno u odsustvu oba kompleksa¹⁰. Međutim, u ovom radu je pokazano da je mehanizam remodeliranja nukleosoma promotora *PHO84* nizvodno od HS ipak različit od promotora *PHO5*, budući da je remodeliranje ovog nukleosoma neovisno o aktivnosti kompleksa RSC te tek nešto sporije u stanicama dvostrukog mutanta *snf2 sth1^{td}*. Rezultati ispitivanja uloge kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina triju ko-aktiviranih promotora dobiveni u ovom radu potvrđuju već predloženi koncept da potreba za proteinskim kompleksima u procesu remodeliranja pojedinog promotora nije, ili ne mora isključivo biti određena specifičnim aktivatorom transkripcije, već specifičnom organizacijom strukture kromatina promotora, tj. stabilnošću nukleosoma^{10,111}. Osim toga, jasno utvrđena različita potreba za aktivnošću kompleksa RSC kod tri PHO promotora, u eksperimentima provedenima s istim stanicama i pod jednakim uvjetima indukcije, dodatno pokazuje da znatan učinak inaktivacije kompleksa na proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* nije neizravna posljedica niže razine indukcije izazvane slabijim rastom stanica *sth1^{td}*. Budući da je ispitivanje uloge kompleksa RSC u indukciji PHO promotora zahtijevalo korištenje temperaturno osjetljivih mutanata te posljedično rad na povišenoj temperaturi, ne može se u potpunosti isključiti mogućnost da bi opaženi učinak inaktivacije kompleksa bio nešto slabiji pri indukciji stanica na 30 °C. Međutim, u ovom radu je pokazano da na 37 °C dolazi do neznatnog pojačavanja učinka inaktivacije ostalih kompleksa koji sudjeluju u remodeliranju kromatina promotora *PHO5* na razinu aktivacije promotora. Također, unatoč radu na nefiziološkoj temperaturi inaktivacija kompleksa RSC nije imala utjecaja na proces remodeliranja kromatina promotora *PHO8* i *PHO84* aktiviranih istim signalnim putem kao *PHO5*, te stoga nije vjerojatno izrazito negativno međudjelovanje povišene temperature i inaktivacije kompleksa RSC na indukciju promotora *PHO5*.

Aktivnost kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina do sada je uglavnom proučavana pod uvjetima *in vitro*^{12–15,17,18,53}, a ovaj rad predstavlja jedan od malobrojnih pokazanih primjera izravnog sudjelovanja kompleksa u procesu uklanjanja nukleosoma vezanom uz aktivaciju promotora *in vivo*. Nedavna istraživanja pokazala su da smanjena

razina transkripcije gena koji kodira za katalitičku podjedinicu kompleksa, Sth1, dovodi do nepotpunog uklanjanja histona prilikom aktivacije triju promotora „heat shock“ gena, koji nisu u potpunosti aktivirani istim specifičnim aktivatorima transkripcije te sprječava vezanje RNA-polimeraze II⁷⁶. Autori su, prema tome, zaključili da djelovanje kompleksa RSC u aktivaciji ovih promotora nije određeno aktivatorom transkripcije i nije specifično za pojedini promotor, već je ovaj kompleks vjerojatno generalno potreban za vezanje RNA-polimeraze II⁷⁶, s obzirom na već poznate interakcije podjedinice Rsc4 s podjedinicom Rpb5 polimeraze⁷³. Rezultati dobiveni u ovom radu za PHO promotore također pokazuju da uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina nije vezana uz aktivaciju promotora putem određenog aktivatora transkripcije. No, suprotno od prijašnjeg zaključka, nađeno je da aktivnost ovog kompleksa nije generalno potrebna za inicijaciju transkripcije već je potreba za aktivnošću određena specifičnom organizacijom strukture kromatina pojedinog promotora. Moguće je, međutim, da i kod „heat shock“ promotora kompleks RSC nije izravno potreban za vezanje RNA-polimeraze, već je izostanak vezanja polimeraze u odsustvu ovog kompleksa posljedica izostanka remodeliranja kromatina. Na osnovu prethodnih istraživanja na razini cjelokupnog genoma je pretpostavljeno da je djelovanje kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina gena transkribiranih RNA-polimerazom III nespecifično i ostvaruje se preko interakcija kompleksa s polimerazom i općim transkripcijskim faktorima, dok je kod gena koji se transkribiraju pomoću RNA-polimeraze II aktivnost kompleksa specifično potrebna samo za promotore točno određenih gena^{19,63}, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu.

Na primjeru promotora *GALI/10* je pokazano da aktivnost kompleksa RSC u aktivaciji transkripcije ne dovodi izravno do uklanjanja nukleosoma promotora već omogućuje brže vezanje specifičnog aktivatora Gal4 koji pokreće proces remodeliranja. Kompleks je trajno vezan za nukleosom koji prekriva mjesto za vezanje aktivatora i održava ga u djelomično remodeliranom stanju te posljedično dolazi do brzog vezanja Gal4 pod uvjetima indukcije. S obzirom da je utvrđeno vezanje kompleksa RSC za nukleosome promotora više kvašćevih gena, autori su pretpostavili da ovakav način djelovanja kompleksa nije specifičan isključivo za promotore *GALI/10*⁷⁵. Ostaje otvoreno pitanje da li je ovakav mehanizam djelovanja kompleksa RSC moguć i kod promotora *PHO5*.

Pokazano je da su bromo-domene kompleksa RSC esencijalne za njegovu funkciju te da se preko njih ostvaruju specifične interakcije kompleksa s ostatcima lizina acetiliranima

djelovanjem histon-acetiltransferaze Gcn5, podjedinice kompleksa SAGA^{16,71,72}. Stoga se s obzirom na već pokazanu ulogu proteina Gcn5 u procesu aktivacije promotora *PHO5*⁵ može pretpostaviti međudjelovanje kompleksa SAGA i RSC u ovom procesu. Ali, budući da inaktivacija proteina Gcn5 ne sprječava već samo usporava ovaj proces⁵, za razliku od potpune inaktivacije kompleksa RSC, očito je da se djelovanje kompleksa RSC može ostvariti i neovisno o aktivnosti Gcn5. Osim toga, na promotorima nekih gena utvrđeno je postojanje karakterističnog slijeda nukleotida za koji se specifično veže podjedinica Rsc3, te se smatra da ove interakcije sudjeluju u privlačenju kompleksa RSC na te promotore⁷⁴. Međutim, na promotoru *PHO5* nije nađen ovakav slijed nukleotida⁷⁸, iz čega se može pretpostaviti da se vezanje kompleksa RSC za ovaj promotor ne ostvaruje preko podjedinice Rsc3.

Rezultati dobiveni u ovom radu dali su konačan odgovor na pitanje koji proteinski kompleksi (ATP-aze) sudjeluju u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5*, budući da jedino uloga kompleksa RSC do sada nije bila ispitana. Pokazalo se da je ovaj proces kompleksniji nego što se pretpostavljalo: otvaranje kromatina promotora *PHO5* rezultat je kooperativnog djelovanja ukupno pet kompleksa (RSC, SWI/SNF, INO80, ISW1 i CHD1) iz svih četiriju porodica kompleksa uključenih u remodeliranje kromatina u kvascu (SWI/SNF, INO80, ISW1 i CHD). Pri tome je jedino aktivnost kompleksa RSC u procesu remodeliranja potpuno nezamjenjiva, međutim za fiziološki učinkovitu kinetiku remodeliranja potrebne su i aktivnosti ostalih kompleksa. Djelovanje kompleksa SWI/SNF, kao i INO80 može se djelomično nadoknaditi aktivnostima ostalih kompleksa te je u njihovom odsustvu remodeliranje sporije, ali potpuno, dok se aktivnosti kompleksa ISW1 i CHD1 mogu u cijelosti međusobno nadomjestiti te je za normalnu brzinu otvaranja kromatina nužno prisustvo jednog od kompleksa. Ostaje otvoreno pitanje da li esencijalna uloga kompleksa RSC u remodeliranju kromatina promotora *PHO5* proizlazi iz njegovog specifičnog i nezamjenjivog mehanizma djelovanja, ili aktivnost ovog kompleksa nije mehanistički esencijalna, ali je kritična za postizanje ukupne sume remodelirajuće aktivnosti potrebne za potpuno otvaranje kromatina. Posljednje se čini mogućim s obzirom na znatno višu koncentraciju kompleksa RSC u usporedbi s koncentracijama ostalih kompleksa u stanici. S druge strane, činjenica da unatoč visokoj koncentraciji kompleks RSC ne sudjeluje u remodeliranju kromatina promotora *PHO8* i *PHO84* (pri čemu je u *in vitro* ispitivanjima utvrđena veća stabilnost nukleosoma promotora *PHO8* u odnosu na *PHO5*), dok je aktivnost

kompleksa SWI/SNF esencijalna, upućuje na to da na pojedinim promotorima postoji specifična potreba za određenim kompleksom, koja ne proizlazi iz njegove koncentracije.

U skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu, nedavno je u stanicama miša na razini genoma pokazano da se mjesta za vezanje različitih remodelirajućih kompleksa u velikoj mjeri preklapaju, što upućuje na to da remodeliranje strukture kromatina pojedinog promotora generalno zahtijeva koordinirano djelovanje više kompleksa¹²⁹. Dakle, čini se mogućim da i kod kvasca proces remodeliranja češće uključuje kooperativno djelovanje više kompleksa, kao što je nađeno na primjeru promotora *PHO5*, koji se ponovno pokazao kao dobar modelni sustav za izučavanje temeljnih principa i mehanizama remodeliranja strukture kromatina.

§ 6. ZAKLJUČAK

Kompleks RSC uključen je u proces remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* te je jedini kompleks čija aktivnost je esencijalna za ovaj proces pod uvjetima jake indukcije transkripcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata na 37 °C.

Aktivnost kompleksa RSC esencijalna je i za potpuno uklanjanje nukleosoma inačice promotora *PHO5* koja se aktivira aktivatorom transkripcije Gal4, što potvrđuje da učinak ovog kompleksa nije vezan uz PHO signalni put, niti je specifičan za aktivaciju promotora putem Pho4.

Kompleksi ISW1 i CHD1 su također uključeni u remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5*, no njihova istovremena inaktivacija samo usporava proces uklanjanja nukleosoma.

Zajedno s prijašnjim saznanjima, sada je poznato da u procesu otvaranja kromatina promotora *PHO5* sudjeluje ukupno pet kompleksa (RSC, SWI/SNF, INO80, ISW1, CHD1), iz svih četiriju porodica ATP-aza uključenih u remodeliranje kromatina u kvascu (SWI/SNF, INO80, ISW1, CHD1).

Za razliku od promotora *PHO5*, utvrđeno je da kompleks RSC nije uključen u remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* i *PHO84*, koji se induciraju putem istog signalnog puta kao promotor *PHO5* i aktiviraju istim specifičnim aktivatorom transkripcije, proteinom Pho4.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

NFR: regija DNA bez nukleosoma; engl. *Nucleosome-free region*

HS: kraća regija DNA između nukleosoma podložna digestiji enzimom DNazaI; engl. *Hypersensitive site*

RSC: engl. *Remodels the structure of chromatin*

SWI/SNF: engl. *Switching defective/ sucrose non-fermenting*

ISWI: engl. *Imitation switch*

INO80: engl. *Inositol requiring 80*

CHD: engl. *Chromodomain, helicase, DNA binding*

UAS: engl. *Upstream activating sequence*

TBP: engl. *TATA-box-binding protein*

wt: engl. *wild type*

+Pi: uvjeti uzgoja stanica u podlozi s fosfatom

–Pi: uvjeti uzgoja stanica u podlozi bez fosfata

pb: parovi baza dvostruke uzvojnice DNA

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. G. E. Zentner and S. Henikoff, Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20** (2013) 259–66.
2. C. R. Clapier and B. R. Cairns, The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78** (2009) 273–304.
3. B. R. Cairns, The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461** (2009) 193–8.
4. I. Tirosh and N. Barkai, Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res.* **18** (2008) 1084–91.
5. S. Barbaric, J. Walker, A. Schmid, J. Q. Svejstrup and W. Hörz, Increasing the rate of chromatin remodeling and gene activation--a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *EMBO J.* **20** (2001) 4944–51.
6. S. Barbaric, T. Luckenbach, A. Schmid, D. Blaschke, W. Hörz and P. Korber, Redundancy of chromatin remodeling pathways for the induction of the yeast PHO5 promoter in vivo. *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 27610–21.
7. A. H. Ehrensberger and R. D. Kornberg, Isolation of an activator-dependent, promoter-specific chromatin remodeling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 10115–20.
8. P. Korber, S. Barbaric, T. Luckenbach, A. Schmid, U. J. Schermer, D. Blaschke and W. Hörz, The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 5539–45.
9. P. D. Gregory, A. Schmid, M. Zavari, M. Münsterkötter and W. Hörz, Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* **18** (1999) 6407–14.
10. C. J. Wippo, B. S. Krstulovic, F. Ertel, S. Musladin, D. Blaschke, S. Stürzl, G.-C. Yuan, W. Hörz, P. Korber and S. Barbaric, Differential cofactor requirements for histone eviction from two nucleosomes at the yeast PHO84 promoter are determined by intrinsic nucleosome stability. *Mol. Cell. Biol.* **29** (2009) 2960–81.
11. Y. Lorch, B. Maier-Davis and R. D. Kornberg, Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 3090–3.
12. Y. Lorch, M. Zhang and R. D. Kornberg, Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* **96** (1999) 389–92.

13. Y. Lorch, M. Zhang and R. D. Kornberg, RSC unravels the nucleosome. *Mol. Cell* **7** (2001) 89–95.
14. N. Chatterjee, D. Sinha, M. Lemma-dechassa, S. Tan, M. A. Shogren-knaak and B. Bartholomew, Histone H3 tail acetylation modulates ATP-dependent remodeling through multiple mechanisms *Nucleic Acids Res.* **39** (2011) 8378–8391.
15. B. R. Cairns, Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (2007) 989–96.
16. B. R. Cairns, A. Schlichter, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. D. Kornberg and F. Winston, Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol. Cell* **4** (1999) 715–23.
17. A. Saha, J. Wittmeyer and B. R. Cairns, Chromatin remodeling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12** (2005) 747–55.
18. H. Boeger, J. Griesenbeck and R. D. Kornberg, Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription. *Cell* **133** (2008) 716–26.
19. T. J. Parnell, J. T. Huff and B. R. Cairns, RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *EMBO J.* **27** (2008) 100–10.
20. G. Ertinger, *Rolle der Transkriptionsfaktoren bei der Öffnung der Chromatinstruktur am PH05-Promotor in Saccharomyces cerevisiae* (1998) at http://books.google.hr/books/about/Rolle_der_Transkriptionsfaktoren_bei_der.html?id=qz-CAAAACAAJ&pgis=1
21. R. D. Kornberg, Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184** (1974) 868–71.
22. K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389** (1997) 251–60.
23. T. Kouzarides, Chromatin Modifications and Their Function *Cell* **128** (2007) 693–705.
24. G. Felsenfeld and M. Groudine, Controlling the double helix. *Nature* **421** (2003) 448–53.
25. Y.-J. Park and K. Luger, Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18** (2008) 282–9.

26. S. Tonna, A. El-Osta, M. E. Cooper and C. Tikellis, Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Nephrol.* **6** (2010) 332–41.
27. W. Fischle, Y. Wang and C. D. Allis, Histone and chromatin cross-talk *Curr. Opin. Cell Biol.* **15** (2003) 172–183.
28. S. D. Taverna, H. Li, A. J. Ruthenburg, C. D. Allis and D. J. Patel, How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (2007) 1025–40.
29. T. R. Hebbes, A. W. Thorne and C. Crane-Robinson, A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7** (1988) 1395–402.
30. M. Grunstein, Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389** (1997) 349–52.
31. J. Füllgrabe, N. Hajji and B. Joseph, Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ.* **17** (2010) 1238–43.
32. A. W. Bird, D. Y. Yu, M. G. Pray-Grant, Q. Qiu, K. E. Harmon, P. C. Megee, P. A. Grant, M. M. Smith and M. F. Christman, Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* **419** (2002) 411–5.
33. S. K. Kurdistani and M. Grunstein, Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4** (2003) 276–84.
34. P. A. Grant, L. Duggan, J. Côté, S. M. Roberts, J. E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C. D. Allis, F. Winston, S. L. Berger and J. L. Workman, Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11** (1997) 1640–50.
35. S. Barbaric, H. Reinke and W. Hörz, Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the PHO5 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 3468–76.
36. E. Larschan and F. Winston, The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev.* **15** (2001) 1946–56.
37. C. E. Brown, L. Howe, K. Sousa, S. C. Alley, M. J. Carrozza, S. Tan and J. L. Workman, Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* **292** (2001) 2333–7.
38. A. H. Hassan, P. Prochasson, K. E. Neely, S. C. Galasinski, M. Chandy, M. J. Carrozza and J. L. Workman, Function and Selectivity of Bromodomains in Anchoring Chromatin-Modifying Complexes to Promoter Nucleosomes *Cell* **111** (2002) 369–379.

39. A. M. Dudley, C. Rougeulle and F. Winston, The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator-binding step in vivo *Genes Dev.* **13** (1999) 2940–2945.
40. N. Mosammamaparast and Y. Shi, Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu. Rev. Biochem.* **79** (2010) 155–79.
41. N. Justin, V. De Marco, R. Aasland and S. J. Gamblin, Reading, writing and editing methylated lysines on histone tails: new insights from recent structural studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** (2010) 730–8.
42. B. D. Strahl and C. D. Allis, The language of covalent histone modifications. *Nature* **403** (2000) 41–5.
43. T. Jenuwein and C. D. Allis, Translating the histone code. *Science* **293** (2001) 1074–80.
44. D. V Fyodorov, M. D. Blower, G. H. Karpen and J. T. Kadonaga, Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev.* **18** (2004) 170–83.
45. J. A. Vincent, T. J. Kwong and T. Tsukiyama, ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15** (2008) 477–84.
46. R. Simic, D. L. Lindstrom, H. G. Tran, K. L. Roinick, P. J. Costa, A. D. Johnson, G. A. Hartzog and K. M. Arndt, Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J.* **22** (2003) 1846–56.
47. G. Burgio, G. La Rocca, A. Sala, W. Arancio, D. Di Gesù, M. Collesano, A. S. Sperling, J. A. Armstrong, S. J. van Heeringen, C. Logie, J. W. Tamkun and D. F. V Corona, Genetic identification of a network of factors that functionally interact with the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *PLoS Genet.* **4** (2008) e1000089.
48. P. B. Becker and W. Hörz, ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **71** (2002) 247–73.
49. T. Tsukiyama, The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3** (2002) 422–9.
50. A. H. Hassan, K. E. Neely and J. L. Workman, Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* **104** (2001) 817–27.
51. J. F. Flanagan, L.-Z. Mi, M. Chruszcz, M. Cymborowski, K. L. Clines, Y. Kim, W. Minor, F. Rastinejad and S. Khorasanizadeh, Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438** (2005) 1181–5.

52. R. J. Sims, C.-F. Chen, H. Santos-Rosa, T. Kouzarides, S. S. Patel and D. Reinberg, Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 41789–92.
53. B. R. Cairns, Y. Lorch, Y. Li, M. Zhang, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Du, B. Laurent and R. D. Kornberg, RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87** (1996) 1249–60.
54. S. Ghaemmaghami, W.-K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O’Shea and J. S. Weissman, Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425** (2003) 737–41.
55. A. L. Chambers, P. M. Brownlee, S. C. Durley, T. Beacham, N. a Kent and J. a Downs, The two different isoforms of the RSC chromatin remodeling complex play distinct roles in DNA damage responses. *PLoS One* **7** (2012) e32016.
56. C. Campsteijn, A.-M. J. Wijnands-Collin and C. Logie, Reverse genetic analysis of the yeast RSC chromatin remodeler reveals a role for RSC3 and SNF5 homolog 1 in ploidy maintenance. *PLoS Genet.* **3** (2007) e92.
57. J. Du, I. Nasir, B. K. Benton, M. P. Kladde and B. C. Laurent, Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Snf/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins. *Genetics* **150** (1998) 987–1005.
58. E. Tsuchiya, M. Uno, A. Kiguchi, K. Masuoka, Y. Kanemori, S. Okabe and T. Mikayawa, The *Saccharomyces cerevisiae* NPS1 gene, a novel CDC gene which encodes a 160 kDa nuclear protein involved in G2 phase control. *EMBO J.* **11** (1992) 4017–26.
59. B. C. Laurent, X. Yang and M. Carlson, An essential *Saccharomyces cerevisiae* gene homologous to SNF2 encodes a helicase-related protein in a new family. *Mol. Cell. Biol.* **12** (1992) 1893–1902.
60. Y. Cao, B. Cairns, R. Kornberg and B. Laurent, Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression *Mol. Cell. Biol.* **17** (1997) 3323–3334.
61. B. R. Cairns, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, F. Winston and R. D. Kornberg, Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol. Cell* **2** (1998) 639–51.
62. A. L. Chambers, L. H. Pearl, A. W. Oliver and J. A. Downs, The BAH domain of Rsc2 is a histone H3 binding domain. *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 9168–82.

63. H. H. Ng, F. Robert, R. A. Young and K. Struhl, Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* **16** (2002) 806–19.
64. V. Rossio, E. Galati, M. Ferrari, A. Pelliccioli, T. Sutani, K. Shirahige, G. Lucchini and S. Piatti, The RSC chromatin-remodeling complex influences mitotic exit and adaptation to the spindle assembly checkpoint by controlling the Cdc14 phosphatase. *J. Cell Biol.* **191** (2010) 981–97.
65. K. K. Baetz, N. J. Krogan, A. Emili, J. Greenblatt and P. Hieter, The ctf13-30/CTF13 genomic haploinsufficiency modifier screen identifies the yeast chromatin remodeling complex RSC, which is required for the establishment of sister chromatid cohesion. *Mol. Cell. Biol.* **24** (2004) 1232–44.
66. M. C. V. L. Wong, S. R. S. Scott-Drew, M. J. Hayes, P. J. Howard and J. A. H. Murray, RSC2, encoding a component of the RSC nucleosome remodeling complex, is essential for 2 microm plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **22** (2002) 4218–29.
67. D. Bungard, M. Reed and E. Winter, RSC1 and RSC2 are required for expression of mid-late sporulation-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **3** (2004) 910–8.
68. M. Yukawa, H. Koyama, K. Miyahara and E. Tsuchiya, Functional differences between RSC1 and RSC2, components of a for growth essential chromatin-remodeling complex of *Saccharomyces cerevisiae*, during the sporulation process. *FEMS Yeast Res.* **2** (2002) 87–91.
69. Y. Lorch, J. Griesenbeck, H. Boeger, B. Maier-Davis and R. D. Kornberg, Selective removal of promoter nucleosomes by the RSC chromatin-remodeling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18** (2011) 881–5.
70. Q. Zhang, S. Chakravarty, D. Ghersi, L. Zeng, A. N. Plotnikov, R. Sanchez and M.-M. Zhou, Biochemical profiling of histone binding selectivity of the yeast bromodomain family. *PLoS One* **5** (2010) e8903.
71. M. Kasten, H. Szerlong, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Werner and B. R. Cairns, Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO J.* **23** (2004) 1348–59.
72. A. P. VanDemark, M. M. Kasten, E. Ferris, A. Heroux, C. P. Hill and B. R. Cairns, Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Mol. Cell* **27** (2007) 817–28.
73. J. Soutourina, V. Bordas-Le Floch, G. Gendrel, A. Flores, C. Ducrot, H. Dumay-Odelot, P. Soularue, F. Navarro, B. R. Cairns, O. Lefebvre and M. Werner, Rsc4

- connects the chromatin remodeler RSC to RNA polymerases. *Mol. Cell. Biol.* **26** (2006) 4920–33.
74. G. Badis, E. T. Chan, H. van Bakel, L. Pena-Castillo, D. Tillo, K. Tsui, C. D. Carlson, A. J. Gossett, M. J. Hasinoff, C. L. Warren, M. Gebbia, S. Talukder, A. Yang, S. Mnaimneh, D. Terterov, D. Coburn, A. Li Yeo, Z. X. Yeo, N. D. Clarke, *et al.*, A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol. Cell* **32** (2008) 878–87.
75. M. Floer, X. Wang, V. Prabhu, G. Berrozpe, S. Narayan, D. Spagna, D. Alvarez, J. Kendall, A. Krasnitz, A. Stepansky, J. Hicks, G. O. Bryant and M. Ptashne, A RSC/nucleosome complex determines chromatin architecture and facilitates activator binding. *Cell* **141** (2010) 407–18.
76. T. Y. Erkina, Y. Zou, S. Freeling, V. I. Vorobyev and A. M. Erkin, Functional interplay between chromatin remodeling complexes RSC, SWI/SNF and ISWI in regulation of yeast heat shock genes. *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) 1441–9.
77. J. M. Moreira and S. Holmberg, Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *EMBO J.* **18** (1999) 2836–44.
78. C. J. Wippo, L. Israel, S. Watanabe, A. Hochheimer, C. L. Peterson and P. Korber, The RSC chromatin remodelling enzyme has a unique role in directing the accurate positioning of nucleosomes. *EMBO J.* **30** (2011) 1277–88.
79. B. Chai, J. Huang, B. R. Cairns and B. C. Laurent, Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* **19** (2005) 1656–61.
80. E. Y. Shim, S. J. Hong, J.-H. Oum, Y. Yanez, Y. Zhang and S. E. Lee, RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **27** (2007) 1602–13.
81. E. Y. Shim, J.-L. Ma, J.-H. Oum, Y. Yanez and S. E. Lee, The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **25** (2005) 3934–44.
82. N. A. Kent, A. L. Chambers and J. A. Downs, Dual chromatin remodeling roles for RSC during DNA double strand break induction and repair at the yeast MAT locus. *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 27693–701.
83. J. Huang, J. Hsu and B. C. Laurent, The RSC Nucleosome-Remodeling Complex Is Required for Cohesin's Association With Chromosome Arms *Mol. Cell* **13** (2004) 739–750.
84. J.-H. Oum, C. Seong, Y. Kwon, J.-H. Ji, A. Sid, S. Ramakrishnan, G. Ira, A. Malkova, P. Sung, S. E. Lee and E. Y. Shim, RSC facilitates Rad59-dependent homologous

- recombination between sister chromatids by promoting cohesin loading at DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **31** (2011) 3924–37.
85. M. Johnston and M. Carlson, in *Mol. Cell. Biol. Yeast Saccharomyces Gene Expr.* (1992) Cold Spring Harbor Laboratory Press doi:10.1101/087969365.21B.193 193 – 281.
86. B. L. Persson, J. O. Lagerstedt, J. R. Pratt, J. Pattison-Granberg, K. Lundh, S. Shokrollahzadeh and F. Lundh, Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **43** (2003) 225–44.
87. Y. Oshima, The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **72** (1997) 323–34.
88. W. T. Lau, R. W. Howson, P. Malkus, R. Schekman and E. K. O’Shea, Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (2000) 1107–12.
89. R. A. Zvyagilskaya, F. Lundh, D. Samyn, J. Pattison-Granberg, J.-M. Mouillon, Y. Popova, J. M. Thevelein and B. L. Persson, Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8** (2008) 685–96.
90. N. Ogawa, N. Hayashi, H. Saito, K. Noguchi, Y. Yamashita and Y. Oshima, in *Phosphate Microorg. Cell. Mol. Biol.* (1994) American Society for Microbiology 56–62.
91. A. Kaffman, I. Herskowitz, R. Tjian and E. K. O’Shea, Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* **263** (1994) 1153–6.
92. A. Komeili and E. K. O’Shea, Roles of Phosphorylation Sites in Regulating Activity of the Transcription Factor Pho4 *Sci.* **284** (1999) 977–980.
93. K. R. Schneider, R. L. Smith and E. K. O’Shea, Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* **266** (1994) 122–6.
94. E. M. O’Neill, A. Kaffman, E. R. Jolly and E. K. O’Shea, Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* **271** (1996) 209–12.
95. A. Almer, H. Rudolph, A. Hinnen and W. Hörz, Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* **5** (1986) 2689–96.

96. K. D. Fascher, J. Schmitz and W. Hörz, Structural and functional requirements for the chromatin transition at the PHO5 promoter in *Saccharomyces cerevisiae* upon PHO5 activation. *J. Mol. Biol.* **231** (1993) 658–67.
97. A. Schmid, K. D. Fascher and W. Hörz, Nucleosome disruption at the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction occurs in the absence of DNA replication. *Cell* **71** (1992) 853–64.
98. P. Korber, T. Luckenbach, D. Blaschke and W. Hörz, Evidence for histone eviction in trans upon induction of the yeast PHO5 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **24** (2004) 10965–74.
99. H. Boeger, J. Griesenbeck, J. S. Strattan and R. D. Kornberg, Removal of Promoter Nucleosomes by Disassembly Rather Than Sliding In Vivo *Mol. Cell* **14** (2004) 667–673.
100. S. Barbarić, K. D. Fascher and W. Hörz, Activation of the weakly regulated PHO8 promoter in *S. cerevisiae*: chromatin transition and binding sites for the positive regulatory protein PHO4. *Nucleic Acids Res.* **20** (1992) 1031–8.
101. K. D. Fascher, J. Schmitz and W. Hörz, Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **9** (1990) 2523–8.
102. U. Venter, J. Svaren, J. Schmitz, A. Schmid and W. Hörz, A nucleosome precludes binding of the transcription factor Pho4 in vivo to a critical target site in the PHO5 promoter. *EMBO J.* **13** (1994) 4848–55.
103. J. Svaren, J. Schmitz and W. Hörz, The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the PHO5 promoter. *EMBO J.* **13** (1994) 4856–62.
104. H. Boeger, J. Griesenbeck, J. S. Strattan and R. D. Kornberg, Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol. Cell* **11** (2003) 1587–98.
105. H. Zhang, D. N. Roberts and B. R. Cairns, Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123** (2005) 219–31.
106. M. W. Adkins, S. R. Howar and J. K. Tyler, Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol. Cell* **14** (2004) 657–66.
107. C. M. English, M. W. Adkins, J. J. Carson, M. E. A. Churchill and J. K. Tyler, Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* **127** (2006) 495–508.
108. D. W. Neef and M. P. Klade, Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of PHO5. *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 3788–97.

109. A. Dhasarathy and M. P. Kladde, Promoter occupancy is a major determinant of chromatin remodeling enzyme requirements. *Mol. Cell. Biol.* **25** (2005) 2698–707.
110. M. Munsterkötter, S. Barbaric and W. Hörz, Transcriptional regulation of the yeast PHO8 promoter in comparison to the coregulated PHO5 promoter. *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 22678–85.
111. C. B. Hertel, G. Längst, W. Hörz and P. Korber, Nucleosome stability at the yeast PHO5 and PHO8 promoters correlates with differential cofactor requirements for chromatin opening. *Mol. Cell. Biol.* **25** (2005) 10755–67.
112. N. Ogawa, H. Saitoh, K. Miura, J. P. Magbanua, M. Bun-ya, S. Harashima and Y. Oshima, Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of PHO84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **249** (1995) 406–16.
113. M. Springer, D. D. Wykoff, N. Miller and E. K. O’Shea, Partially phosphorylated Pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes. *PLoS Biol.* **1** (2003) E28.
114. F. H. Lam, D. J. Steger and E. K. O’Shea, Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature* **453** (2008) 246–50.
115. G.-C. Yuan and J. S. Liu, Genomic sequence is highly predictive of local nucleosome depletion. *PLoS Comput. Biol.* **4** (2008) e13.
116. E. Richmond and C. L. Peterson, Functional analysis of the DNA-stimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2. *Nucleic Acids Res.* **24** (1996) 3685–92.
117. T. Tsukiyama, J. Palmer, C. C. Landel, J. Shiloach and C. Wu, Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **13** (1999) 686–97.
118. P. D. Gregory, A. Schmid, M. Zavari, L. Lui, S. L. Berger and W. Hörz, Absence of Gcn5 HAT activity defines a novel state in the opening of chromatin at the PHO5 promoter in yeast. *Mol. Cell* **1** (1998) 495–505.
119. R.-P. Jansen, C. Dowzer, C. Michaelis, M. Galova and K. Nasmyth, Mother Cell-Specific HO Expression in Budding Yeast Depends on the Unconventional Myosin Myo4p and Other Cytoplasmic Proteins *Cell* **84** (1996) 687–697.
120. H. H. Lim, P. Y. Goh and U. Surana, Cdc20 is essential for the cyclosome-mediated proteolysis of both Pds1 and Clb2 during M phase in budding yeast. *Curr. Biol.* **8** (1998) 231–4.
121. R. J. Dohmen, P. Wu and A. Varshavsky, Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science* **263** (1994) 1273–6.

122. A. S. Carroll, A. C. Bishop, J. L. DeRisi, K. M. Shokat and E. K. O'Shea, Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (2001) 12578–83.
123. R. S. Sikorski and P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122** (1989) 19–27.
124. S. Musladin, N. Krietenstein, P. Korber and S. Barbaric, The RSC chromatin remodeling complex has a crucial role in the complete remodeler set for yeast PHO5 promoter opening. *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 4270–82.
125. M. R. Thomas and E. K. O'Shea, An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (2005) 9565–70.
126. S. Pondugula, D. W. Neef, W. P. Voth, R. P. Darst, A. Dhasarathy, M. M. Reynolds, S. Takahata, D. J. Stillman and M. P. Kladde, Coupling phosphate homeostasis to cell cycle-specific transcription: mitotic activation of *Saccharomyces cerevisiae* PHO5 by Mcm1 and Forkhead proteins. *Mol. Cell. Biol.* **29** (2009) 4891–905.
127. S. Huang and E. K. O'Shea, A systematic high-throughput screen of a yeast deletion collection for mutants defective in PHO5 regulation. *Genetics* **169** (2005) 1859–71.
128. P. D. Gregory, A. Schmid, M. Zavari, M. Münsterkötter and W. Hörz, Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* **18** (1999) 6407–14.
129. S. A. Morris, S. Baek, M.-H. Sung, S. John, M. Wiench, T. A. Johnson, R. L. Schiltz and G. L. Hager, Overlapping chromatin-remodeling systems collaborate genome wide at dynamic chromatin transitions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21** (2014) 73–81.

§ 9. DODATAK

Tablica 4. Omjeri broja stanica i vrijednosti OD₆₀₀ za stanice kvasca *S. cerevisiae* korištene u ovom radu

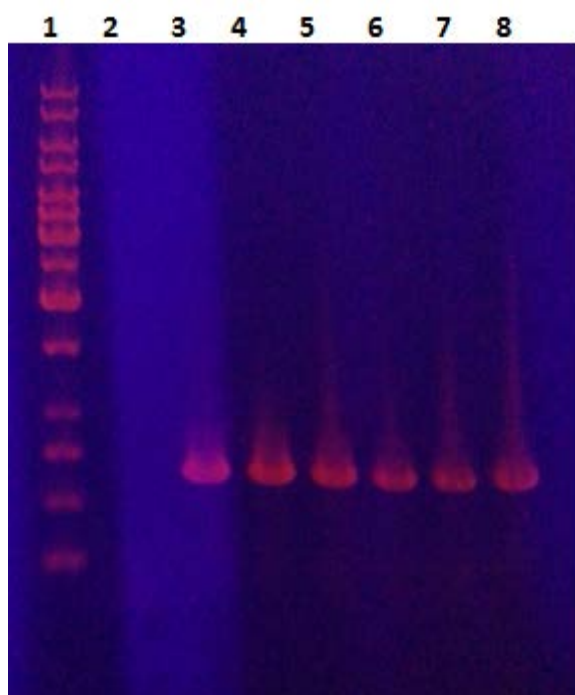
| | (broj stanica/ OD ₆₀₀) x 10 ⁻⁷ ; -Pi 37 °C | | | | |
|--|---|---------------|-------|---------------|------------|
| | 0 h | 2 h | 4.5 h | 6 h | 15 h |
| CY337 | 2 ± 0,1 | 2,1 ± 0,15 | 1,7 | 1,7 ± 0,03 | 1,1 ± 0,1 |
| CY337 <i>sth1^{td}</i> | 2 ± 0,2 | 2 ± 0,025 | 1,7 | 1,65 ± 0,1 | 1,15 ± 0,1 |
| CY407 | 2 ± 0,2 | 1,8 ± 0,1 | 1,7 | 1,7 | 1 ± 0,05 |
| CY407 <i>sth1^{td}</i> | 2,1 ± 0,05 | 1,9 ± 0,05 | 1,6 | 1,5 ± 0,05 | 1,1 |
| | 0 h | 3 h | 5 h | 15 h | |
| W1588 | 2,41 ± 0,03 | 2,3 ± 0,05 | 2,1 | 1,42 ± 0,03 | |
| YTT223 | 2,525 ± 0,025 | 2,35 ± 0,1 | 2,15 | 1,325 ± 0,025 | |
| YTT227 | 2,3 ± 0,05 | 2,3 | 2 | 1,3 ± 0,05 | |
| YTT223 <i>sth1^{td}</i> | 2,5 | 2,225 ± 0,025 | 1,9 | 1,275 ± 0,025 | |
| YTT227 <i>sth1^{td}</i> | 2,43 ± 0,06 | 2,1 ± 0,2 | 1,95 | 1,2 ± 0,1 | |

| | (broj stanica/ OD ₆₀₀) x 10 ⁻⁷ ; 2% galaktoza 37°C | | | |
|---|---|-------------|------------|------|
| | 0 h | 2 h | 4.5 h | 15 h |
| CY337 + pP_{pho5v33}-lacZ | 2,4 ± 0,1 | 2,4 ± 0,15 | 2,5 ± 0,05 | 2,0 |
| CY337 <i>sth1^{td}</i> + pP_{pho5v33}-lacZ | 1,7 ± 0,05 | 1,8 | 1,8 | 1,7 |
| CY407 + pP_{pho5v33}-lacZ | 1,85 ± 0,1 | 1,75 ± 0,05 | 1,8 | 1,7 |
| CY407 <i>sth1^{td}</i> + pP_{pho5v33}-lacZ | 2,0 ± 0,07 | 1,8 | 1,9 | 1,8 |

| | (broj stanica/ OD ₆₀₀) x 10 ⁻⁷ ; 37°C | |
|--|--|---------------|
| | | 5 h |
| P_{GALI}-CDC20 | +Pi | 1 |
| | -Pi | 0,975 ± 0,025 |
| P_{GALI}-CDC20 <i>sth1^{td}</i> | +Pi | 0,95 ± 0,05 |
| | -Pi | 1,05 ± 0,05 |

Tablica 5. Usporedba maksimalne razine indukcije gena *PHO5*, mjerene aktivnošću kisele fosfataze, postignute pod uvjetima indukcije inkubacijom stanica u podlozi bez fosfata (-Pi) te indukcije putem inaktivacije negativnih regulatora transkripcije *Pho80^{ts}* i *Pho85^{F82G}* u podlozi visoke koncentracije fosfata (+Pi). Aktivnost kisele fosfataze u proizvoljnim jedinicama definirana je u poglavlju 3.2.7.

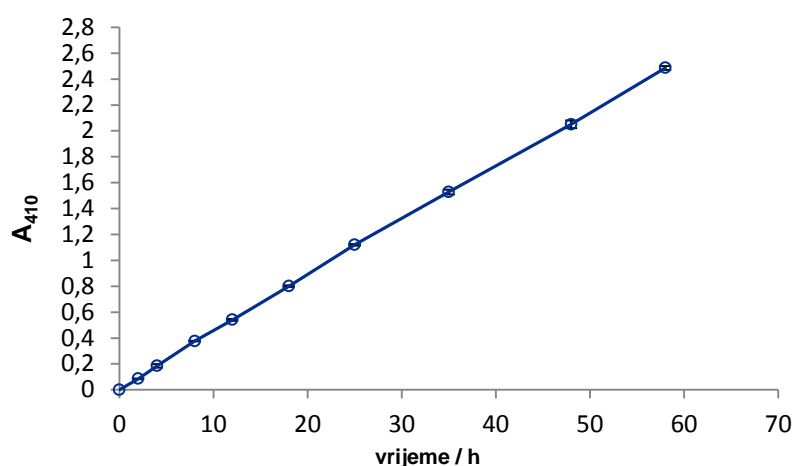
| | Aktivnost kisele fosfataze/ proizvoljne jedinice |
|---|---|
| CY337 wt, 15 h -Pi 37 °C | 650 - 700 |
| YS44 (<i>pho80^{ts}</i>), 4h 37°C +Pi | 330 - 400 |
| YS30 <i>pho85^{F82G}</i> , 4h NaPP1 +Pi | 200 - 270 |



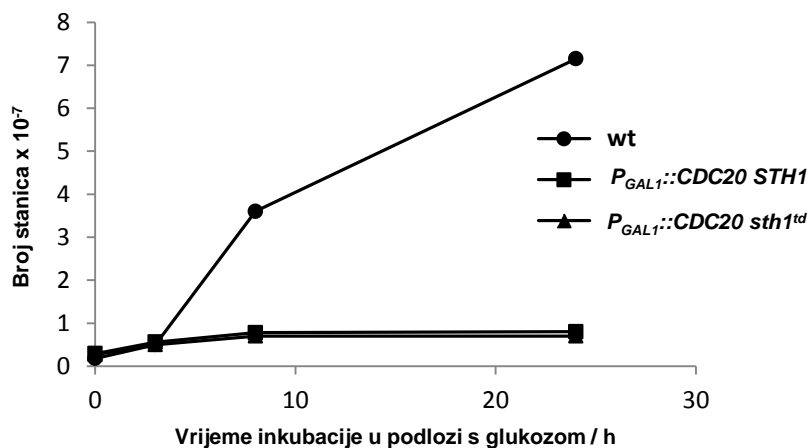
Slika 29. Potvrda ugradnje integrativnog plazmida p1622, koji sadrži alel *sth1^{td}*, unutar lokusa *STH1* u stanicama sojeva konstruiranih u ovom radu (1 – fragmenti DNA poznate veličine „1kb DNA-ladder“, proizvođač Fermentas; 2 – CY337 wt; 3 – CY337 *sth1^{td}*; 4 – YS44 *sth1^{td}*; 5 – CY407 *sth1^{td}*; 6 – YS30 *pho85^{F82G} sth1^{td}*; 7 – YTT223 *sth1^{td}*; 8 – *P_{GALI}-CDC20 sth1^{td}*). Početnice za metodu lančane reakcije polimeraze opisani su poglavljima 3.1.3. i 3.1.8, a uvjeti provođenja reakcije u poglavlju 3.2.6.



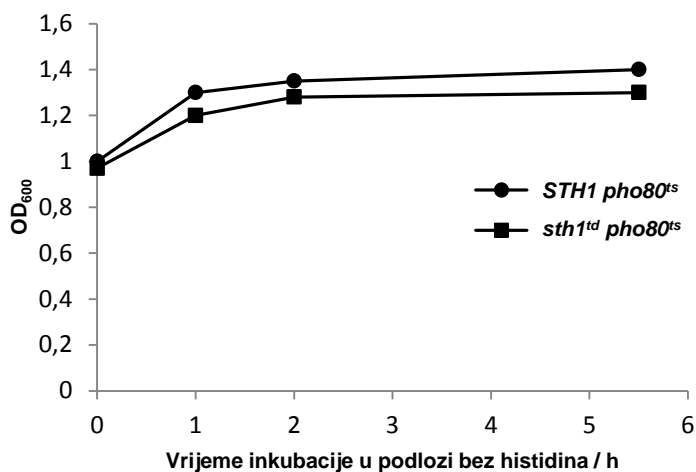
Slika 30. Potvrda delecije gena *RSC2* korištenjem disrupcijske kasete *rsc2::HIS3* u stanicama soja *CY337 sth1^{td}* (1 – fragmenti DNA poznate veličine „1kb DNA-ladder“, proizvođač Fermentas; 2 – *CY337 sth1^{td}*; 3 – *CY337 sth1^{td} rsc2*; 4 – *CY337 sth1^{td}*; 5 – *CY337 sth1^{td} rsc2*). Za metodu lančane reakcije polimeraze korištena su dva para početnica, opisana u poglavljima 3.1.3. i 3.1.8 (uzorci 2 i 3 – „početnice 1“; uzorci 4 i 5 – „početnice 2“). Uvjeti provođenja reakcije opisani su u poglavlju 3.2.6.



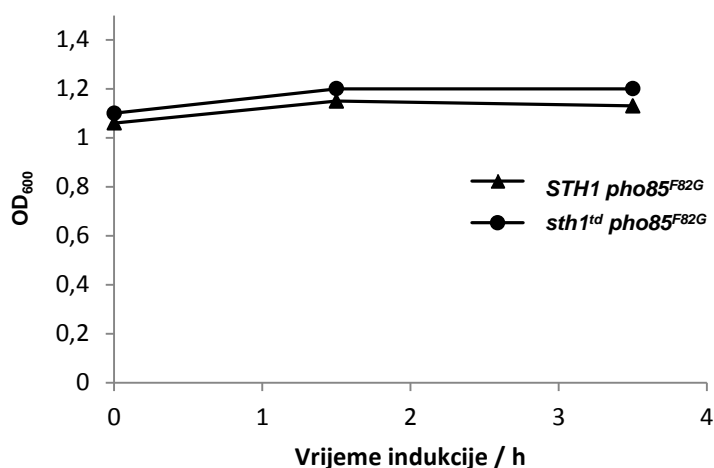
Slika 31. Ovisnost A_{410} o vremenu trajanja reakcije. A_{410} uzoraka mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze i β -galaktozidaze provedenih u ovom radu bile su 0.1 – 1.



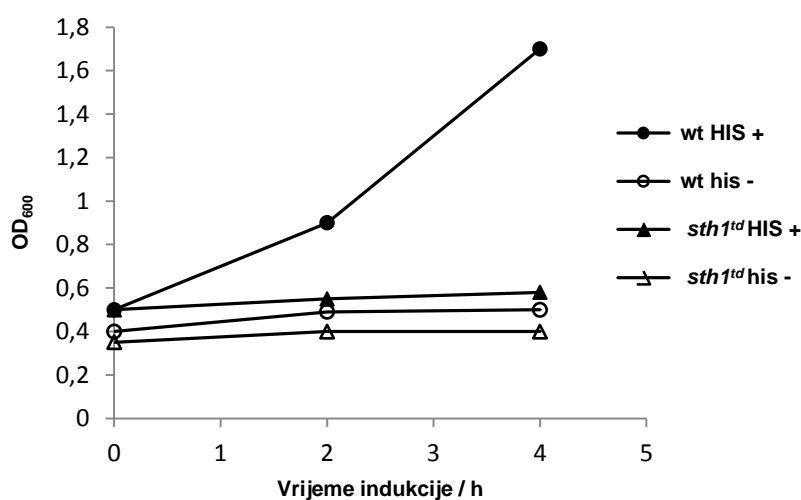
Slika 32. Rast stanica sojeva $P_{GAL1}::CDC20 STH1$ i $P_{GAL1}::CDC20 sth1^{td}$ tijekom inkubacije u podlozi s glukozom



Slika 33. Rast stanica sojeva $pho80^{ts} STH1$ i $pho80^{ts} sth1^{td}$ tijekom inkubacije u podlozi bez histidina



Slika 34. Rast stanica sojeva *pho85^{F82G} STH1* i *pho85^{F82G} sth1^{td}* tijekom indukcije promotora *PHO5* inhibicijom kinaze *Pho85^{F82G}*. Stanice oba soja predinkubirane su 5,5 sati na 37 °C prije indukcije (stanice *STH1 pho85^{F82G}* posljednjih sat vremena predinkubirane su u podlozi bez uracila).



Slika 35. Rast stanica divljeg tipa i mutanta *sth1^{td}* tijekom indukcije inačice promotora *PHO5* („*PHO5*-variant 33“) dodatkom galaktoze. Stanice su predinkubirane 5 sati na 37 °C prije indukcije te dodatnih sat vremena u podlozi sa (HIS+) ili bez histidina (his-), također na 37 °C.

§ 10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime **Sanja Musladin**
Titula dipl. ing. biotehnologije
Adresa Dalmatinska 7, 10430 Samobor
Telefon 091 737 9384
E-mail smusladin@pbf.hr
Državljanstvo hrvatsko
Datum i mjesto rođenja 28.09.1982., Zagreb

RADNO ISKUSTVO

Datum 2008. -
Ustanova zaposlenja Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za biokemiju
Naziv radnog mjesta znanstveni novak/ asistent
Područje rada znanstveno-istraživački rad u području regulacije ekspresije gena remodeliranjem strukture kromatina u kvascu *S. cerevisiae* / sudjelovanje u nastavi na preddiplomskim kolegijima Biokemija I i Biokemija II te diplomskom kolegiju Molekularna biologija

ŠKOLOVANJE

Datum 2008. -
Mjesto Zagreb
Ustanova Prirodoslovno-matematički fakultet
Studij Doktorski studij kemije, smjer biokemija
Zvanje

Datum 2001. – 2007.
Mjesto Zagreb
Ustanova Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Studij Biotehnologija, smjer biokemijsko-mikrobiološki
Zvanje dipl. ing. biotehnologije

USAVRŠAVANJE

Datum siječanj – veljača 2007., listopad 2010.
Mjesto München, Njemačka
Ustanova Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität
Područje znanstveno-istraživački rad u području regulacije ekspresije gena remodeliranjem strukture kromatina u kvascu *S. cerevisiae*

ZNANSTVENI I DRUGI PROJEKTI

- Datum znanstveni novak na projektu od travnja 2008.
Naziv projekta Ekspresija gena u kvascu: kontrola transkripcije remodeliranjem kromatina (MZOŠ 058-0580477-0247)
Voditelj projekta Prof. dr. sc. Slobodan Barbarić

ČLANSTVA U ZNANSTVENIM ORGANIZACIJAMA I TIJELIMA

Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (2009.)

ZNANSTVENA AKTIVNOST**ZNANSTVENI RADOVI:**

1. S. Musladin, N. Krietenstein, P. Korber and S. Barbaric, The RSC chromatin remodeling complex has a crucial role in the complete remodeler set for yeast PHO5 promoter opening. *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 4270–82.
2. S. Musladin and S. Barbarić, Yeast PHO Genes: An Excellent Model for Elucidation of Chromatin-Remodelling Mechanisms. *Food Technol. Biotechnol.* **48** (2010) 308–316.
3. C. J. Wippo, B. S. Krstulovic, F. Ertel, S. Musladin, D. Blaschke, S. Stürzl, G.-C. Yuan, W. Hörz, P. Korber and S. Barbaric, Differential cofactor requirements for histone eviction from two nucleosomes at the yeast PHO84 promoter are determined by intrinsic nucleosome stability. *Mol. Cell. Biol.* **29** (2009) 2960–81.

DOMAĆI I MEĐUNARODNI KONGRESI I SKUPOVI:

2012. 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, Sevilla, Španjolska (poster)
2012. FEBS 3+ Meeting "From molecules to life and back", Opatija, Hrvatska (kratko predavanje)
2011. Nucleosome4D Spetses Summer School on Chromatin and Systems Biology, Spetses, Grčka (poster)
2011. 2011 CSHL Meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor, New York, SAD (poster)
2010. 3rd SFB TR5 Symposium "Chromatin - Assembly and Inheritance of Functional States", München, Njemačka (poster)
2010. 10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation "The secret life of biomolecules", Opatija, Hrvatska (poster)
2008. 50 Years of Molecular Biology in Croatia, Zagreb, Hrvatska (poster)
2007. 2007 CSHL Meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor, New York, SAD (poster)

TEČAJEVI I RADIONICE

2011. Nucleosome4D Spetses Summer School on Chromatin and Systems Biology, Spetses, Grčka

OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinski jezik hrvatski
Ostali jezici engleski (aktivno), talijanski (pasivno)

Poznavanje rada na računalu MS Windows i MS Office, CorelDraw, Adobe Illustrator, stručni programi (Redasoft Visual Cloning, SimVector)