

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Jurica Ljubas

***Antisense* RNA regulira transkripciju gena *PHO5* putem
kromatin-modificirajućih i kromatin-remodelirajućih kompleksa**

Zagreb, 2021.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Igora Stuparevića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

SADRŽAJ RADA

UVOD.....	1
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kao modelni organizam.....	1
1.1. Ploiditet i tip parenja stanica kvasca <i>S. cerevisiae</i>	1
2. Kromatin - nukleoproteinski sadržaj kromosoma.....	2
2.1. Nukleosom - osnovna gradivna jedinica kromatina.....	2
2.2. Regulacija transkripcije putem remodeliranja strukture kromatina	4
3. Kromatin modificirajući kompleksi - acetilacija/deacetilacija histona.....	5
3.1. HAT - Histon-acetiltransferaze kao aktivatori transkripcije.....	5
3.2. HDAC - Histon-deacetilaze kao represori transkripcije.....	6
4. Kromatin-remodelirajući kompleksi.....	7
4.1. RSC - "esencijalni" kromatin-remodelirajući kompleks.....	8
5. Nekodirajuće RNA.....	8
6. Porodica gena PHO.....	11
6.1 Regulacija ekspresije gena <i>PHO5</i>	11
6.2. Remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO5</i>	12
OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	15
MATERIJAL I METODE.....	16
1. Materijal.....	16
1.1. Sojevi kvasca.....	16
1.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca.....	17
1.2.1. YNBP tekuća podloga.....	17
1.2.2. Sintetska tekuća podloga (-Pi).....	17
1.2.3. YPDa tekuća podloga.....	17
1.2.4. Drop out.....	18
1.2.5. Otopina elemenata u tragovima.....	18
1.3. Kemikalije i enzimi.....	18
1.4. Otopine.....	19
2. Metode.....	20

2.1. Transformacija kvasca litij acetatnom metodom.....	20
2.2. Izolacija genomske DNA kvasca.....	21
2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	21
2.4. Gel elektroforeza.....	22
2.5. Mjerenje aktivnosti enzima kisele fosfataze u suspenziji stanica kvasca.....	22
REZULTATI.....	24
1. Histon-deacetilaza Rpd3 je uključena u mehanizam putem kojeg stabilizacija <i>PHO5 antisense</i> RNA djeluje negativno na kinetiku ekspresije gena <i>PHO5</i>	25
2. Stabilizacija <i>PHO5 antisense</i> RNA nema dodatan negativni učinak na ekspresiju gena <i>PHO5</i> u odnosu na nedostatak histon-acetiltransferaze Gcn5 koja je ključna za acetilaciju histona promotora <i>PHO5</i>	29
2.1. Konstrukcija dvostrukog mutanta <i>gcn5 rrp6</i>	29
2.2. Gcn5 i <i>antisense</i> RNA djeluju u istom putu regulacije transkripcije gena <i>PHO5</i>	31
3. Inaktivacija kompleksa RSC i nakupljanje <i>PHO5 antisense</i> RNA imaju negativan sinergistički učinak na ekspresiju gena <i>PHO5</i>	33
RASPRAVA.....	39
ZAKLJUČCI.....	43
ZAHVALE.....	44
POPIS LITERATURE.....	45

UVOD

1. *Saccharomyces cerevisiae* kao modelni organizam

Kvasac *S. cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji pripada carstvu Fungi. Neizostavan je mikroorganizam u različitim granama prehrambene industrije, a značajne uloge ima i u farmaceutskoj industriji te se koristi kao modelni organizam u okviru istraživanja u područjima biotehnologije i molekularne genetike. Ono što odlikuje *S. cerevisiae* kao modelni organizam su kratko generacijsko vrijeme (otprilike 90 minuta za stanice divljeg tipa), ekonomičan uzgoj, jednostavan životni ciklus, dobar rast na kompleksnim i kemijski definiranim podlogama te relativno laka genetička manipulacija. Kompletan genom kvasca *S. cerevisiae* sekvenciran je 1996. godine, što ga čini prvim sekvenciranim eukariotskim organizmom (Goffeau i sur., 1996). Poznavanje kompletne sekvence genoma kvasca uvelike je pridonijelo razumijevanju osnovnih i specifičnih molekularnih mehanizama na temelju kojih funkcioniraju eukariotske stanice. Spoznaje dobivene istraživanjem kvasca *S. cerevisiae* primjenjive su i na stanice viših eukariota, budući da su mnogi kvaščevi geni homologni ljudskim genima (Fabrizio i sur., 2001). Osim za proučavanje molekularnih mehanizama, kvasac se kao modelni organizam koristi i za proučavanje staničnih struktura i njihovih funkcija. Temeljna saznanja o ekspresiji gena i ulogama različitih proteina dobivena su upravo proučavanjem kvasca (Hereford i Hartwell, 1974). Daljnjim su se istraživanjima dobila saznanja o drugim procesima poput replikacije DNA, signalnog sustava stanice te mitohondrijskog transporta (Karathia i sur., 2011).

1.1. Ploiditet i tip parenja stanica kvasca *S. cerevisiae*

Stanice kvasca mogu biti haploidne ili diploidne. Haploidne stanice sadrže 16 kromosoma, a diploidne njih 32. Haploidne stanice mogu biti dva različita tipa parenja, **a** ili α , dok su diploidne stanice **a**/ α tipa parenja. Lokus MAT, čija sekvencija uvjetuje tip parenja, nalazi se na 3. kromosomu. Ukoliko se na lokusu MAT nalazi sekvencija MAT**a**, kvasac je **a** tipa parenja, a ukoliko se tamo nalazi sekvencija MAT α , kvasac je α tipa parenja. Diploidna stanica (**a**/ α) nastaje parenjem dvaju haploidnih stanica suprotnog tipa parenja (Tamarin, 1999). Haploidne i diploidne stanice u optimalnim uvjetima podliježu mitozu tj. pupanju kao načinu mitotičke diobe. Optimalni uvjeti za uzgoj kvasca

podrazumijevaju dovoljno kisika i nutrijenata u podlozi, blago kiseli pH i temperaturu od 28 do 30°C. No, ukoliko se kvasac nađe u nepovoljnim uvjetima, iz diploidnih stanica mejozom mogu nastati četiri spore koje onda omogućavaju preživljavanje kvasca (Duina, Miller i Keeney, 2014).

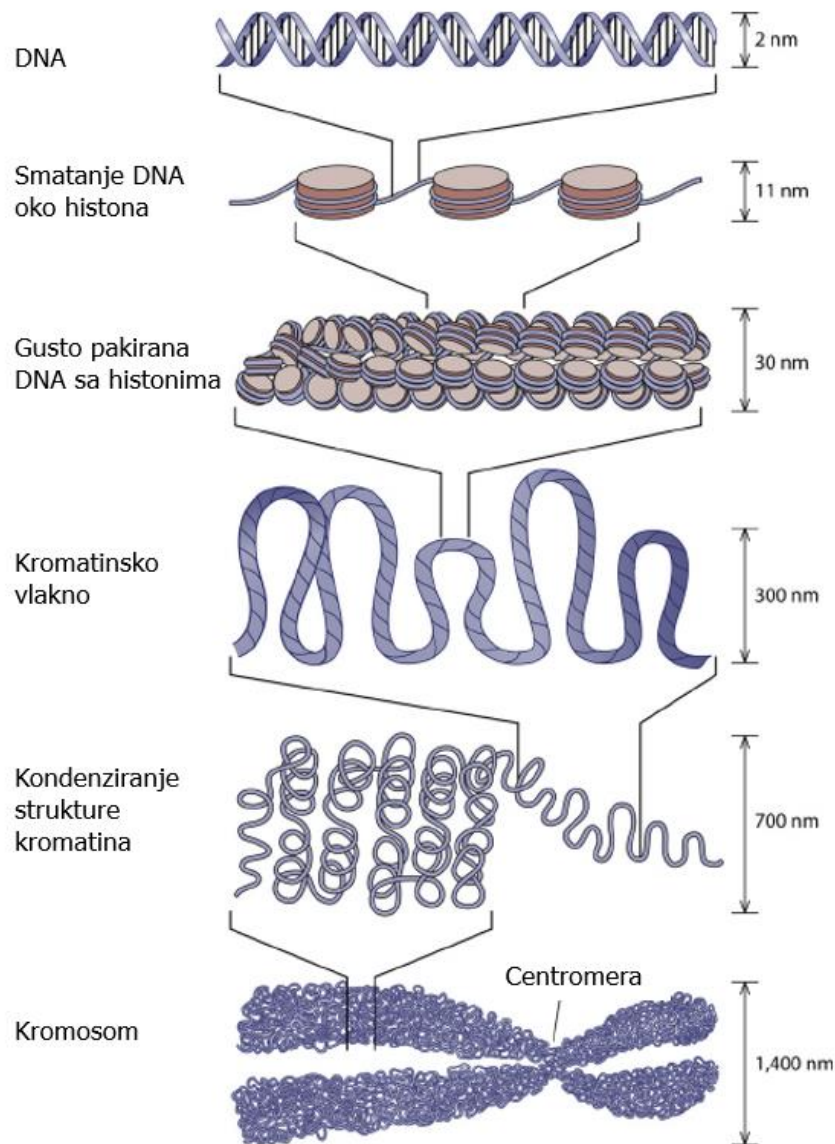
2. Kromatin - nukleoproteinski sadržaj kromosoma

Genetička informacija u eukariotskim organizmima, pa tako i u *S. cerevisiae*, pohranjena je u obliku DNA u kromosomima. Kromosomi se mogu vidjeti mikroskopom tek prilikom stanične diobe budući da su u interfazi dekondenzirani. Kako bi se genetski materijal uspješno kondenzirao u jezgri eukariotske stanice te distribuirao u stanice kćeri tijekom mitoze i mejoze, bilo da se radi o kvascu ili višim eukariotskim organizmima, DNA se kondenzira u strukturu zvanu kromatin, kompleks DNA i histonskih proteina. Ovakav način pakiranja zaštićuje DNA od odmotavanja i raznih oštećenja, čime genetička informacija ostaje očuvana. Dodatno, ovakav način kondenzacije DNA omogućuje i kompleksan mehanizam regulacije transkripcije gena, koji je specifičan za eukariotske organizme (Lin, Du i Xiao, 2020).

2.1. Nukleosom - osnovna gradivna jedinica kromatina

Nukleosomi su sastoje od oko 147 pb (parova baza) DNA omotanih oko 8 histonskih proteina koji tvore tzv. histonski oktamer (slika 1). Proteini koji grade histonski oktamer su tetramer H3-H4 te par dimera H2A-H2B (Kornberg 1974). U toj se strukturi nalazi i histon H1, poznatiji kao "*linker* histon". Histon H1 može regulirati savijanje kromatinskih vlakana u zbijeniju strukturu, ali nije od ključne važnosti za njezino stvaranje i funkcioniranje. Histon H1 se često povezuje uz represiju transkripcije (Thomas 1999). Histoni se u najvećoj mjeri sastoje od bazičnih aminokiselinskih ostataka lizina i arginina, čiji je pozitivan naboj ključan za ostvarivanje interakcija sa DNA. Budući da je okosnica DNA negativno nabijena zbog prisustva fosfatnih skupina, doći će do ionskih interakcija između histona i DNA, čime se onemogućava, odnosno otežava pristup i vezanje ostalih proteina na DNA. Upravo iz tog razloga nukleosom, odnosno kromatin, djeluje represivno na esencijalne stanične procese poput transkripcije gena, replikacije, rekombinacije te popravka DNA (Smolle 2018). Uzevši to u obzir, kromatin se mora remodelirati kako bi se ti procesi mogli neometano odvijati. Kromatin stoga

podliježe raznim promjenama koje uključuju pomicanje, uklanjanje ili kovalentno modificiranje histona, što posljedično dovodi do vezanja specifičnih proteina na regije DNA koje su do tada bile prekrivene nukleosomima (Baldi, Korber i Becker, 2020). Razaranje strukture kromatina je stoga zapravo prvi korak u regulaciji transkripcije gena, kojim se ona na taj način može inducirati (Roth 2001).



Slika 1. Shematski prikaz formiranja strukture kromatina (prilagođeno iz Jansen i Verstrepen, 2011).

2.2. Regulacija transkripcije putem remodeliranja strukture kromatina

Molekulama DNA je u strukturi nukleosoma, odnosno kromatina, otežan pristup od strane RNA-polimeraze i pripadajućih transkripcijskih faktora. Ukoliko transkripcijska mašinerija ne može prići DNA i prepoznati promotor određenog gena, budući da je on prekriven nukleosomima, transkripcija tog gena je reprimirana. Međutim, postoje i regije DNA koje se ne nalaze u strukturi nukleosoma. Takve regije nazivaju se "nukleazno-hipersenzitivne regije" (engl. *nuclease hypersensitive sites*). Prosječne su veličine oko 200 pb i posebno su osjetljive na djelovanje različitih nukleaza, otkud im potječe sam naziv. Te su regije od velike važnosti jer se u njima često nalaze specifične sekvence DNA koje prepoznaju transkripcijski aktivatori, čijim se vezanjem inducira transkripcija. No, čak ni to nije dovoljno kako bi došlo do potpune aktivacije transkripcije gena, budući da se struktura kromatina nužno mora remodelirati (Tamarin, 1999). Prvi je korak u tom procesu kovalentno modificirati histone, kako bi došlo do smanjenja njihova afiniteta za DNA. Postoje brojne modifikacije histona, a to su npr. metilacija, acetilacija i fosforilacija. Posljedice takvih preinaka su različite; primjerice, acetilacija histona dovodi do neutralizacije pozitivnog naboja lizinskih ostataka histona, pri čemu slabe veze sa DNA, što dovodi do opuštanja strukture kromatina (Gelato i Fischle, 2008). Druga posljedica toga je privlačenje kromatin-remodelirajućih kompleksa, budući da njihove podjedinice često sadrže bromodomene koje prepoznaju acetilirane pobočne ogranke histona (Fischle i sur., 2003). Histonski markeri koji su posljedica određene modifikacije se prepoznaju pojedinačno ili u određenim kombinacijama, što se naziva histonskim kodom. Međutim, treba uzeti u obzir kako svaka pojedinačna modifikacija histona ne označava konkretan marker za očitavanje od strane kromatin-remodelirajućih kompleksa (Gelato i Fischle, 2008), odnosno moguće je kako određene modifikacije histona neće rezultirati privlačenjem kromatin-remodelirajućih kompleksa. U tom slučaju se najčešće radi o pojedinačnim modifikacijama određenog histona, koje same po sebi nemaju značajan utjecaj, ali u kombinaciji sa drugim modifikacijama daju strukturu koju će prepoznati određene domene kromatin-remodelirajućih kompleksa i shodno tome, dovesti do aktivacije ili represije transkripcije gena (Karlić i sur., 2010).

3. Kromatin-modificirajući kompleksi - acetilacija/deacetilacija histona

Acetiliranje histona jedna je od, ako ne i najvažnija modifikacija histona, pri kojoj se ϵ -amino krajevi bočnih lanaca lizina acetiliraju ili deacetiliraju, ovisno o djelovanju određene skupine enzima. Dvije su skupine enzima koji kataliziraju ove reakcije. To su histon-acetiltransferaze (engl. *histone-acetyltransferases*, HAT) i histon-deacetilaze (engl. *histone deacetylases*, HDAC) (Grant i Berger, 1999). HAT i HDAC su recipročno regulirani enzimi te se njihovo djelovanje usko povezuje uz regulaciju transkripcije. Do tog se zaključka došlo kada je primijećeno da su regije DNA koje se transkribiraju hiperacetilirane, dok su regije DNA čija je transkripcija reprimirana hipoacetilirane (Carrozza i sur., 2003). Histon-acetiltransferaze u pravilu djeluju kao aktivatori transkripcije, a histon-deacetilaze kao represori transkripcije.

3.1. HAT - Histon-acetiltransferaze kao aktivatori transkripcije

HAT su skupina enzima koja prenosi acetilnu jedinicu sa Acetil-CoA na jedan ili više lizinskih ostataka na N-terminalnim krajevima histonskih proteina (Grant i Berger, 1999). Posljedica takve modifikacije je neutralizacija pozitivnog naboja lizina, čime slabe histon-DNA interakcije. Takva DNA u regijama hiperacetiliranih histona postaje dostupnija transkripcijskoj mašineriji, pri čemu se ti geni jače eksprimiraju (Kuo i Allis, 1998). Gotovo svi enzimi koji imaju ovakav učinak dijele određene motive i sekvence s najistraženijom HAT, Gcn5. Također, općenito su sve HAT podijeljene u dvije velike skupine: HAT tip A, u koje pripada Gcn5, i HAT tip B. Osnovna razlika između njih je činjenica da se HAT tipa A nalaze u jezgri i pri tome modificiraju histone vezane na DNA, dok se HAT tipa B nalaze u citoplazmi i modificiraju slobodne histone prije nego li se povežu s DNA u strukturu kromatina (Grant i Berger, 1999). Protein kvasca Gcn5, kao najvažniji predstavnik HAT, je katalitička podjedinica SAGA kompleksa. SAGA kompleks kvasca *S. cerevisiae* je multifunkcionalni proteinski koaktivatorski kompleks zaslužan za regulaciju transkripcije pojedinih gena, pa tako i gena *PHO5* (Wu i sur., 2004). Aktivni SAGA kompleks u stanici kovalentno modificira histone H2B i H3 (na aminokiselinskom ostatku Lys14) putem podjedinice Gcn5 te kao posljedica takvih modifikacija dolazi do opuštanja strukture kromatina (Wu i sur., 2004). To će rezultirati privlačenjem transkripcijskih faktora na promotore gena i, posljedično, aktivacijom transkripcije gena. Neka su istraživanja *in vivo* pokazala i afinitet ovog proteina za

histon H4, pri čemu se acetiliraju aminokiselinski ostatci Lys8 i Lys16, za koje su smatra da su ključni za stupanje u interakcije s transkripcijskom mašinerijom (Sterner i Berger, 2000). Gcn5 također ima ulogu acetiliranja i Rsc4, jedne od podjedinica RSC kompleksa koji je zaslužan za remodeliranje strukture kromatina (VanDemark i sur., 2007).

3.2. HDAC - Histon-deacetilaze kao represori transkripcije

Histon-deacetilaze djeluju suprotno od histon-acetiltransferaza, na način da deacetiliraju Lys ostatke histona, pri čemu se obnavlja pozitivan naboj Lys, a samim time povećava se i afinitet histona za DNA te struktura kromatina postaje kondenziranija. Stoga, HDAC djeluju kao represori transkripcije te imaju ključnu ulogu u regulaciji strukture kromatina (Fischle i sur., 2001). Tri su razreda u koja se dijele HDAC, a to su: *class I* u koju pripadaju Rpd3, Hos1 i Hos2, zatim *class II* koju čine Hda1 i Hos3 te *class III* koja se naziva Sirtuini u koju pripada Sir2 (Ekwall 2005). Podjela je temeljena ovisno o vrsti gena koje reguliraju pojedine HDAC. Tako je pokazano da su npr. geni koji nose upute za sintezu proteina koji sudjeluju u staničnom ciklusu regulirani putem Rpd3. Geni koji kodiraju za proteine u metabolizmu aminokiselina regulirani su putem Sir2, dok su geni koji nose upute za proteine koji sudjeluju u metabolizmu ugljika i transportu ugljikohidrata regulirani s Hda1 (Sterner i Berger, 2000). To upućuje na njihovu važnost, budući da svojim djelovanjem mogu reprimirati previsoku razinu ekspresije istoimenih gena. Takav način regulacije omogućava stanici da u određenim uvjetima može reprimirati ili aktivirati ekspresiju gena putem HDAC na razini kromatina.

Histon-deacetilaza Rpd3 je podjedinica Rpd3S, Rpd3L i Snt2C kompleksa. Rpd3S i Rpd3L kompleksi dijele zajedničku okosnicu sačinjenu od podjedinica Rpd3, Sin3 i Ume1, ali su im uloge različite. Kompleks Rpd3L prvenstveno djeluje na promotorima gena i regulira inicijaciju transkripcije, dok se Rpd3S ciljano djeluje na kodirajućim regijama gena (Wang, Zhou i Zhou, 2011). Unatoč tomu, aktivnost Rpd3 je jednaka u oba kompleksa te za posljedicu ima uklanjanje acetilne jedinice sa histona H3 i H4, što strukturu kromatina čini kondenziranijom i nedostupnijom transkripcijskoj mašineriji. Uz svoje brojne druge uloge u stanici, ona najvažnija podrazumijeva reguliranje transkripcije gena čiju transkripciju provode RNA polimeraza I i RNA polimeraza II,

tako da se smanjivanjem acetilacije struktura kromatina gušće kondenzira, pri čemu se otežava pristup navedenim enzimima. Mutanti *rpd3* pokazali su značajno povišenu razinu acetilacije histona u odnosu na stanice divljeg tipa, što je bilo i očekivano uzevši u obzir činjenicu da HDAC i HAT imaju suprotne uloge, te da ukoliko jedna izostane, druga pojačano ispoljava svoje djelovanje (Rundlett i sur., 1996). Također, Rpd3 je jedan od faktora zaslužan za regulaciju transkripcije gena *PHO5*, pri čemu ima represivno djelovanje (Vidal i Gaber, 1991). Ono što također karakterizira djelovanje Rpd3 je i reprimiranje intragenske transkripcije u sklopu kompleksa Rpd3S. Rpd3 je privučen i na lokuse gena koji se eksprimiraju kada se stanica nađe na visokim temperaturama, zbog čega mutanti *rpd3* imaju značajno slabiji rast u odnosu na stanice divljeg tipa pri povišenim temperaturama (Ruiz-Roig i sur., 2010). Također, pokazano je da u mutantima *rpd3* određene regije DNA postaju hiperacetilirane, čime se znatno povećava razina ekspresije tih gena, što upućuje na važnu regulatornu ulogu Rpd3 u stanici (Robert i sur., 2004). Rpd3 također indirektno aktivira telomerne gene osjetljive na izostanak histona, na način da reprimira transkripciju gena koji kodiraju za histone (Scipioni i sur., 2001).

4. Kromatin-remodelirajući kompleksi

Evolucijski očuvani od stanica kvasca do viših eukariota, kromatin-remodelirajući kompleksi dijele se u četiri velike porodice. To su: SWI/SNF, ISWI, CHD i INO80. Iako svaka od ovih porodica sadrži jedinstvene ATP-azne domene s pripadajućim dodatnim podjedinicama, između samih porodica postoje određene sličnosti. Sve koriste energiju dobivenu hidrolizom ATP-a, sve imaju domenu koja prepoznaje histonske modifikacije te im je slična i ATP-azna domena zaslužna za remodeliranje kromatina (Clapier i Cairns, 2009). Ona pokazuje visoku razinu homologije unutar same porodice, dok se kompleksi značajnije razlikuju po ostalim podjedinicama. Neke od njih grupirane su kao moduli, čija se funkcija očituje preko protein-protein interakcija ili DNA-protein interakcija (Tang, Nogales i Ciferri, 2010). Međusobnim djelovanjem svih modula pojedinog kompleksa određuje se specifična aktivnost kompleksa, iz čega naravno proizlaze i specifične uloge različitih vrsta remodelirajućih kompleksa pri određenom staničnom procesu ili na određenim regijama genoma (Clapier i Cairns, 2009).

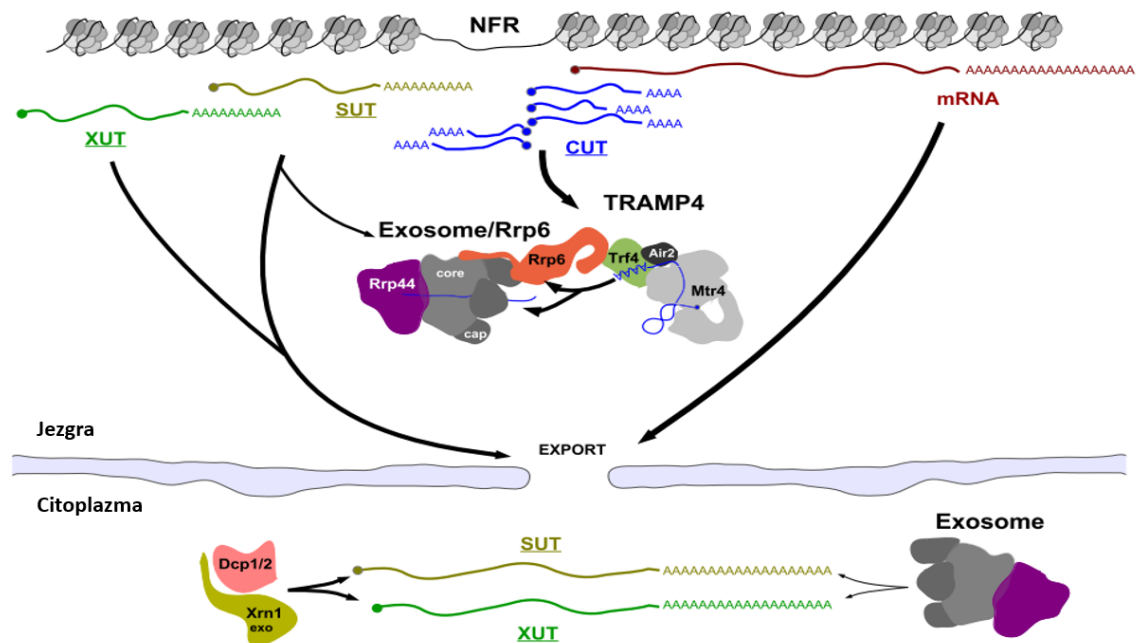
4.1. RSC - "esencijalni" kromatin-remodelirajući kompleks

RSC kompleks pripada SWI/SNF porodici kromatin-remodelirajućih kompleksa te se u stanici nalazi u oko 10 puta većoj koncentraciji nego li ostali kromatin-remodelirajući kompleksi (Ghaemmaghani i sur., 2003). Sačinjen je od 15 podjedinica od kojih je jedna Sth1, ATP-azna podjedinica čija je uloga značajna u ekspresiji ranih mejotičkih gena. RSC kompleks također sadrži i bromodomene putem kojih stupa u interakcije s acetiliranim ostatcima histona (Parnell, Huff i Cairns, 2008). Razlog zbog kojeg je ovaj kompleks neophodan stanici je činjenica da je uključen u mitotičku diobu stanice te bi njegovom potpunom inaktivacijom došlo do smrti stanice (Cairns i sur., 1996). RSC ključnu ulogu ima pri prijelazu stanice iz G2 u M fazu staničnog ciklusa (Tsuchiya i sur., 1992). Također, pokazano je da RSC sudjeluje u procesu NHEJ (*Non-Homologous End Joining*), pri čemu se popravljaju dvolančani lomovi u DNA, ali i u procesu homologne rekombinacije DNA, pri čemu ima djelovanje suprotno kompleksu SWI/SNF (Chai i sur., 2005). Ipak, primarna uloga RSC kompleksa je remodeliranje strukture kromatina. RSC kompleks se nalazi na oko 10% svih promotora u genomu kvasca (Ng i sur., 2002). Sukladno tome, ne može se reći kako je on "esencijalni" kromatin-remodelirajući kompleks za regulaciju transkripcije svih gena, budući da se njegova neizostavnost isključivo odnosi na druge navedene funkcije koje obnaša, a ne na aktivaciju/represiju transkripcije gena (Parnell, Huff i Cairns, 2008). U stanici postoje i drugi kromatin-remodelirajući kompleksi koji u određenim procesima ili na određenim lokusima genoma mogu zamijeniti ulogu RSC kompleksa. Induciranom inaktivacijom katalitičke podjedinice Sth1 *in vivo* pokazano je da struktura kromatina ostaje više kondenzirana nego li u normalnim uvjetima te da u tim uvjetima postoje određene razlike u kromatinskoj strukturi gena koje transkribiraju RNA polimeraza II i RNA polimeraza III, budući da dolazi do repositioniranja nukleosoma (Ye i sur., 2019), no isto tako uočene su promjene rezultirale pogrešnom segregacijom kromosoma zbog inaktivne ATP-azne podjedinice Sth1 koja je ključna za pravilnu organizaciju citoskeleta tijekom mejoze (Ye i sur., 2019).

5. Nekodirajuće RNA

Nekodirajuće RNA molekule su RNA koje nastaju procesom transkripcije, ali se ne translataju u proteine. Njihovu transkripciju provodi RNA polimeraza II. Tako nastale

nekodirajuće RNA se mogu podijeliti u nekoliko manjih grupa od kojih su najvažnije: rRNA, tRNA, miRNA (*micro* RNA), snRNA (*small nuclear* RNA), *antisense* RNA i dr. (Eddy 2001). Uloge takvih transkripata su versatilne, ali se za mnoge od njih zapravo ne zna ili nije u potpunosti razjašnjena njihova funkcija. Za molekule poput rRNA ili tRNA pokazana je uloga i mehanizam putem kojeg djeluju u stanici, ali su druge ncRNA (*non-coding* RNA) još uvijek slabo istražene. Najčešće se takvi transkripti povezuju uz regulaciju ekspresije gena na nekoliko razina u stanici, od regulacije transkripcije, strukture kromatina, preko *splicinga* RNA produkata do translacije proteina. Takav još nedovoljno istražen sustav regulacije mogao bi imati značajnu ulogu u razjašnjavanju genetičkih i evolucijskih razlika između vrsta, ali i dati saznanja o različitim genetski uvjetovanim bolestima (Mattick i Makunin, 2006). Usprkos činjenici da ovakvi nekodirajući transkripti imaju regulatorne uloge, prekomjerna transkripcija nekodirajućih RNA može imati i nepoželjne učinke za stanicu, budući da takvi transkripti mogu interferirati na svim razinama ekspresije gena. Primjerice, može doći do komplementarnog vezanja nekodirajućih RNA i mRNA molekula, čime se udio mRNA dostupnih za translaciju smanjuje te se na taj način usporava proces ekspresije gena. Iz tog je razloga stanici od iznimne važnosti pravilno kontrolirati razinu ekspresije nekodirajućih RNA molekula (Tudek, Candelli i Libri, 2015). Terminacija transkripcije i 3' procesiranje nekodirajućih RNA važni su alati kojima stanica uspješno regulira razinu takvih transkripata. NNS kompleks ima ključnu ulogu u terminaciji, a RNA egzosom u procesiranju i degradiranju nekodirajućih RNA (slika 2). NNS kompleks sastoji se od 3 podjedinice: RNA-vezujućih podjedinica Nrd1 i Nab3 te Sen1, ATP-azno ovisne helikazne podjedinice. C-terminalna domena RNAPII podliježe modifikaciji Ser5 tijekom procesa transkripcije, što prepoznaju Nrd1 i Nab3 i vežu se na transkribirane molekule RNA. Kao posljedica tog vezanja dolazi do terminacije transkripcije nekodirajućih RNA, nakon čega se one ubrzo degradirane RNA egzosomom (Arigo i sur., 2006; Camblong i sur., 2007). RNA egzosom je 3'-5' egzoribonukleazni proteinski kompleks koji posjeduje dvije katalitičke podjedinice, Rrp6 i Dis3, koj/e su zaslužne za procesiranje i degradiranje RNA transkripata (Januszyk i Lima, 2014).



Slika 2. Shematski prikaz degradacije nekodirajućih molekula RNA u jezgri i citosolu (Tudek, Candelli i Libri, 2015).

Antisense transkripti su nekodirajuće RNA koje nastaju inicijacijom transkripcije s 3' kraja kodirajućeg lanca pripadajućeg gena. Uloga velikog broja ovih transkripata je još uvijek, uglavnom, nepoznata i nedovoljno istražena (Murray i Mellor, 2016). Iako takve molekule ne nose uputu za sintezu proteina, njihova funkcija nije nevažna i povezuje se uz regulaciju ekspresije pojedinih gena (Mattick i Makunin, 2006). Tako je na genu *PHO84*, koji pripada istoj porodici gena kao i *PHO5*, pokazan značajan utjecaj *antisense* RNA na regulaciju *sense* transkripcije. U izostanku podjedinice RNA egzosoma Rrp6, dolazi do stabilizacije dva *antisense* transkripta. Takva stabilizacija dovodi do privlačenja HDAC na promotor gena *PHO84*, čija je konačna posljedica represija transkripcije gena *PHO84* (Camblong i sur., 2007). Budući da su kao i mnogi nekodirajući transkripti *antisense* transkripti terminirani NNS kompleksom i degradirani RNA egzosomom, u pravilu su nestabilni, čime je otežano njihovo istraživanje, što je jedan od ključnih razloga zbog čega je potpuni mehanizam njihova djelovanja i dalje uglavnom nepoznat.

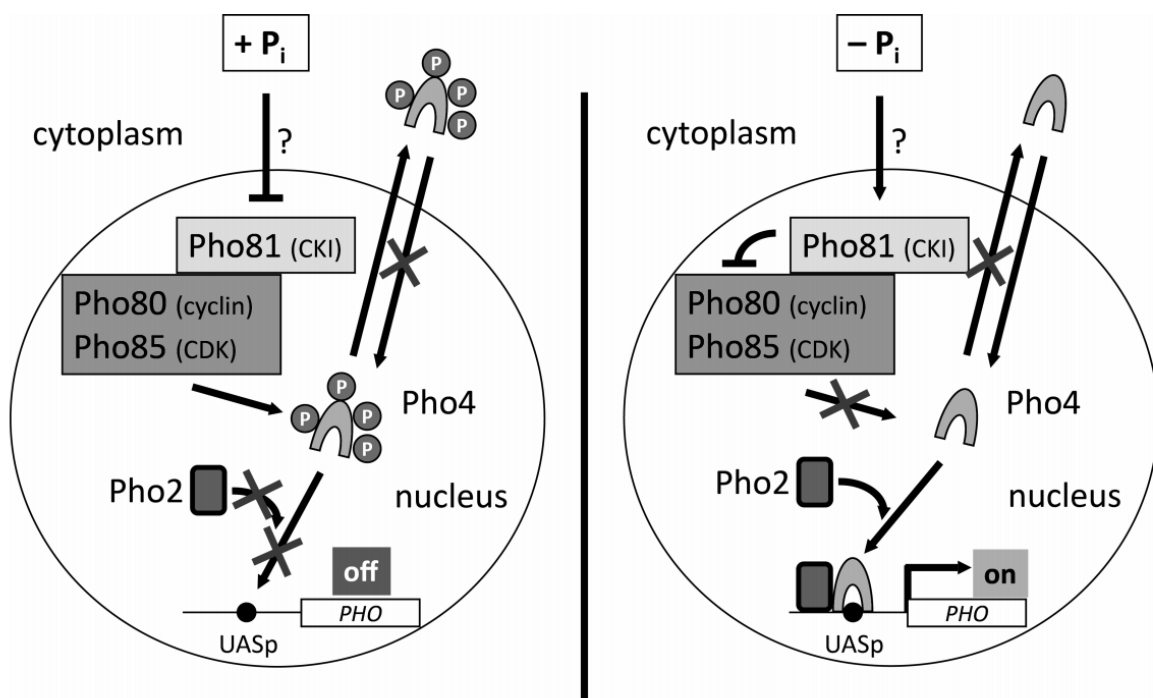
6. Porodica gena PHO

Sustav gena čija transkripcija ovisi o koncentraciji staničnog fosfata (PHO geni) kvasca *S. cerevisiae* sadrži oko 20-ak gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u staničnom transportu i metabolizmu fosfata. Kao predmet proučavanja ovog rada uzet je gen *PHO5* koji kodira za protein kiselu fosfatazu, čija se transkripcija aktivira u uvjetima kada stanica nema dovoljno fosfata anorganskog podrijetla (Oshima 1997). Međutim, čak ni sam izostanak fosfata nije dovoljan za indukciju gena *PHO5*, budući da stanica kvasca sadrži određenu količinu fosfata kao zalihu. Tek nakon potrošnje svog fosfata za potrebe različitih staničnih procesa (pr. replikacija DNA) dolazi do indukcije gena *PHO5* i posljedično, sinteze proteina kisele fosfataze (Auesukaree i sur., 2004; Korber i Barbaric, 2014).

6.1. Regulacija ekspresije gena *PHO5*

Iako je signal kojim stanica dobiva informaciju da fosfat u mediju nije prisutan i dalje nepoznat, njegovo se djelovanje očituje aktivacijom regulatornog proteina Pho4, čija je uloga aktivacija gena *PHO5*. Pho4 je protein koji ima karakteristični zavojnica-okret-zavojnica motiv (engl. *helix-turn-helix*) i veže se na specifičnu sekvencu promotora gena *PHO5* zvanu E-box. Radi se o sekvenci čiji je slijed nukleotida CACGTG (Vogel, Hörz i Hinnen, 1989; Münsterkötter, Barbaric i Hörz, 2000). Svojim vezanjem na promotor *PHO5* dovodi do indukcije transkripcije gena, a ona se dodatno pojačava vezanjem koaktivatora Pho2 na blisko mjesto u promotoru (Vogel, Hörz i Hinnen, 1989). Pho4 se konstitutivno eksprimira, međutim postoji mehanizam regulacije Pho4 koji se odvija preko para ciklin/ciklin-ovisnih kinaza Pho80/Pho85. Pho85 djeluje kao kinaza i na druge supstrate, međutim kada je u paru sa Pho80 takav kompleks ima veliki afinitet upravo za Pho4, pri čemu se protein Pho4 fosforilira ovisno o raspoloživosti fosfata u stanici (Korber i Barbaric, 2014). Par ciklin/ciklin-ovisnih kinaza Pho80/Pho85 je pod dodatnom regulacijom Pho81, koji se veže na par Pho80/Pho85 neovisno o koncentraciji fosfata u stanici. No, tek kada je ta koncentracija niska, odnosno kada vanjskog fosfata uopće ni nema, Pho81 djelovat će kao inhibitor kompleksa Pho80/Pho85. To će spriječiti kinaznu aktivnost kompleksa Pho80/Pho85 i neće doći do fosforilacije Pho4. Tada će se Pho4 sa svojim koaktivatorom Pho2 vezati na UASp (engl. *Upstream Activating Sequence phosphate*) mjesto promotora *PHO5*,

pri čemu dolazi do indukcije transkripcije gena *PHO5*. S druge strane, kada je u stanici koncentracija fosfata relativno visoka, Pho81 neće djelovati kao inhibitor para kinaza Pho80/Pho85, čime dolazi do fosforilacije Pho4, koji je tada inhibiran i nema sposobnost vezanja na UASp. Samim time, neće doći ni do jakog vezanja njegova koaktivatora Pho2, čime se reprimira ekspresija gena *PHO5* i ne dolazi do sinteze proteina kisele fosfataze. Posljedično će fosforilirani Pho4 biti transportiran iz jezgre u citosol stanice (Nakao i sur., 1986; Svaren i Hörz, 1997). Ukratko objašnjen signalni put koji regulira transkripciju gena *PHO5* prikazan je na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz signalnog puta koji regulira transkripciju gena *PHO5* u uvjetima kada je u stanici prisutan (+P_i) ili nije prisutan (-P_i) fosfat (Korber i Barbaric, 2014).

6.2. Remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5*

Promotor gena *PHO5* izvrstan je model za praćenje regulacije transkripcije gena povezane sa remodeliranjem strukture kromatina. Zbog svoje inducibilnosti, jake regulacije i ekstenzivnog remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*, ali i

činjenice da se aktivnost ovog gena može vrlo lako pratiti, gen *PHO5* predstavlja paradigmu za regulaciju transkripcije u eukariotskim stanicama (Korber i Barbaric, 2014). Danas je poznato kako na promotoru gena *PHO5* djeluje nekoliko kompleksa iz sve četiri porodice kromatin remodelirajućih kompleksa kvasca *S. cerevisiae*. U tu svrhu, praćeni su mutanti za proteine iz porodice SWI/SNF i INO80, čijom se pojedinačnom ili zajedničkom inaktivacijom znatno usporila kinetika ekspresije gena *PHO5*, ali nije bilo utjecaja na prekonoćnu razinu ekspresije, koja je bila slična onoj kod stanica divljeg tipa. Na osnovu toga, zaključeno je da ovi kompleksi djeluju kooperativno, ali neovisno jedan o drugom (Barbaric i sur., 2007). Obzirom da je kompleks RSC esencijalan za vijabilnost, odnosno rast stanica (Cairns i sur., 1996), bilo je otežano istraživanje njegove uloge. Korištenjem stanica mutanta *sth1^{td}* u kojima dolazi do sinteze temperaturno-osjetljive inačice katalitičke podjedinice kompleksa RSC, *Sth1^{td}*, koja se inaktivira pri restriktivnoj temperaturi (37°C), postigla se inaktivacija kompleksa RSC. Remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* u uvjetima indukcije pri restriktivnoj temperaturi u stanicama mutanta *sth1^{td}* bilo je znatno sporije, ali nakon produžene indukcije došlo je do potpunog otvaranja strukture kromatina (Musladin i sur., 2014). Kompletnija inaktivacija kompleksa RSC postignuta je sa stanicama mutanta *rsc2 sth1^{td}* u kojima je izoforma kompleksa RSC koja sadrži podjedinicu Rsc2 i čini 90% kompleksa RSC (Saha, Wittmeyer i Cairns, 2002) inaktivirana delecijom gena *RSC2*, a druga izoforma inaktivira se inaktivacijom katalitičke podjedinice *Sth1^{td}*. U stanicama dvostrukog mutanta *rsc2 sth1^{td}* uopće ne dolazi do remodeliranja strukture kromatina i do aktivacije transkripcije gena *PHO5*, čime je jasno pokazana kritična uloga kompleksa RSC u tom procesu. Time je utvrđeno da od pet kromatin-remodelirajućih kompleksa koji sudjeluju u remodeliranju kromatina promotora *PHO5* jedino kompleks RSC ima nezamjenjivu ulogu (Musladin i sur., neobjavljeni rezultati). Također, u modificiranju strukture kromatina promotora gena *PHO5* veliku ulogu igraju i kromatin-modificirajući kompleksi, od koji su najznačajniji HAT i DHAC. Istraživanjem histon-acetiltransferaze Gcn5 prethodno je pokazano da sama ne može acetilirati histone u strukturi kromatina, već mora biti dio proteinskog kompleksa SAGA, kako bi uspješno modificirala histone. Pokazana je uloga ovih kompleksa u modificiranju kromatina promotora gena *PHO5* acetilacijom histona, što rezultira njegovom aktivacijom. Shodno tome, stanice mutanta *gcn5* pokazuju znatno niže aktivnosti kisele fosfataze u početnim satima indukcije ekspresije gena *PHO5*, unatoč tome što je kompleks SAGA u stanici formiran (Gregory i sur., 1998). Sličan

efekt pokazan je i u radu (Barbaric i sur., 2007) pri čemu je s kombinacijom mutacije *gcn5* i mutacija u podjedinicama kompleksa SWI/SNF postignuta značajno sporija kinetika transkripcije gena *PHO5*. Rpd3, za razliku od Gcn5, usporava aktivaciju promotora *PHO5*, budući da u njegovu odsustvu dolazi do hiperacetilacije promotora *PHO5* (Rundlett i sur., 1996).

OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Nekodirajuće *antisense* RNA su molekule koje nastaju procesom transkripcije sa 3' kraja kodirajućeg lanca gena, ali se ne translatiraju u proteine. Pokazano je kako takvi transkripti imaju negativan regulatorni učinak na ekspresiju pripadajućih gena, ali je mehanizam putem kojeg djeluju i dalje nedovoljno istražen. Istraživanja su kroz godine pokazala da bi *antisense* RNA mogle djelovati putem kromatin-modificirajućih i -remodelirajućih kompleksa, na način da ih njihova transkripcija pojačano ili slabije privlači na promotorsku regiju pripadajućeg gena te time utječe na regulaciju transkripcije.

Opći cilj rada bio je ostvariti uvid u mehanizme regulacije transkripcije putem nekodirajućih RNA, koji se manifestiraju utjecajem na strukturu kromatina. Pri tome je kao model korišten kvašćev gen *PHO5*, čija je regulacija transkripcije remodeliranjem strukture kromatina promotorske regije izvrsno istražena, te na čijem lokusu dolazi do *antisense* nekodirajuće transkripcije.

Specifični cilj rada bio je ispitati djelovanje kromatin-modificirajućih enzima Rpd3 i Gcn5 te kromatin-remodelirajućeg kompleksa RSC u mehanizmu putem kojeg *antisense* RNA regulira ekspresiju gena *PHO5*.

MATERIJAL I METODE

1. Materijal

1.1. Sojevi kvasca

Tablica 1. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu

SOJ	GENOTIP	IZVOR
FSY1742 wt	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3</i>	(Castelnuovo i sur., 2014)
FSY3117 <i>rrp6</i>	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 Δrrp6::KANr</i>	(Castelnuovo i sur., 2014)
FSY3383 <i>rpd3</i>	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 Δrpd3::TRP1</i>	(Castelnuovo i sur., 2014)
FSY3384 <i>rrp6 rpd3</i>	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3Δrrp6::KANr rpd3::TRP1</i>	(Castelnuovo i sur., 2014)
Sth1-AA	<i>MATα tor1-1 fpr1::NAT RPL13A- 2xFKB12::TRP1 Sth1- FRB::kanMX6</i>	(Castelnuovo i sur., 2014)
Sth1-AA <i>rrp6</i>	<i>MATα tor1-1 fpr1::NAT RPL13A- 2xFKB12::TRP1 Sth1- FRB::kanMX6 rrp6::hph</i>	Ovaj rad
BY4741 wt	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann i sur., 1998)
BY4741 <i>rrp6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rrp6::KanMX4</i>	(Novačić i sur., 2021)
BY4741 <i>gcn5</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gcn5::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>gcn5 rrp6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gcn5::KanMX4 rrp6::hph</i>	Ovaj rad

1.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

Hranjive podloge pripremaju se vaganjem potrebnih komponenata koje se otapaju u deioniziranoj vodi. Tako pripremljene hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu pri tlaku od 1 atm i na temperaturi od 121°C. U podloge se prije korištenja dodaje 50%-tna otopina glukoze do finalne masene koncentracije glukoze 20 g/L.

1.2.1. YNBP tekuća podloga (+P_i)

YNB 6,7 g/L; drop out 2 g/L; KH₂PO₄ 1 g/L

Ovisno o auksotrofnosti soja, u podlogu se dodaju tvari rasta histidin (80 mg/L), uracil (80 mg/L), triptofan (80 mg/L) i leucin (160 mg/L). Nakon autoklaviranja, u podlogu se dodaje sterilizirana otopina glukoze do konačne masene koncentracije od 20 g/L. Ova podloga modifikacija je standardne YNB podloge za uzgoj kvasca, s dodatkom 1 g/L KH₂PO₄ u svrhu potpune represije PHO promotora (+P_i).

1.2.2. Sintetska tekuća podloga (-P_i)

drop out 2 g/L; asparagin 2 g/L; MgSO₄ x 7 H₂O 0,5 g/L; NaCl 0,1 g/L; CaCl₂ x 2 H₂O 0,1 g/L; Na-citrat 5,88 g/L; KCl 1 g/L; otopina elemenata u tragovima $\varphi = 0,002$

Ovisno o auksotrofnosti soja, u podlogu se dodaju tvari rasta histidin (80 mg/L), uracil (80 mg/L), triptofan (80 mg/L) i leucin (160 mg/L). Nakon autoklaviranja, u podlogu se dodaju sterilizirana otopina glukoze do konačne masene koncentracije od 20 g/L te filtracijom sterilizirane otopine 1 ($\varphi = 0.004$) i 2 ($\varphi = 0.0001$).

Otopina 1 - riboflavin 0,05 g/L, p-aminobenzojeva kiselina 0,05 g/L, inozitol 0,5 g/L

Otopina 2 - biotin 0,02 g/L, Ca-pantotenat 4 g/L, nikotinska kiselina 4 g/L, piridoksal 4 g/L, tiamin 4 g/L, folna kiselina 0,02 g/L

Ova podloga ne sadrži fosfat (-P_i) i korištena je za indukciju PHO promotora.

1.2.3. YPDa podloga

Pepton 20 g/L; kvašćev ekstrakt 10 g/L; adenin 0.1 g/L; glukoza 20 g/L

Kruta YPD podloga korištena je za uzgoj kvasca nakon transformacije LiAc metodom. Za dobivanje krute YPD podloge dodatno se dodaje agar u koncentraciji 16 g/L. Također, u svrhu selekcije transformanata dodan je Hygromycin B u koncentraciji 300 mg/L, neposredno prije izlijevanja podloga.

1.2.4. Drop out

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

1.2.5. Otopina elemenata u tragovima

borna kiselina 0,25 g/L; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L; KI 0,05 g/L; $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L

1.3. Kemikalije i enzimi

Agar, kvašćev ekstrakt: Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)

Aminokiseline (histidin, leucin, triptofan), agaroz, etidij bromid, polietilenglikol (PEG) 4000, p-nitrofenilfosfat, natrijev citrat, rapamicin: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

D (+) glukoza bezvodna: Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Kvašćev ekstrakt: Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)

Kvašćeva dušična baza bez aminokiselina (YNB): Difco (SAD)

Staklene kuglice: Sartorius, Njemačka

Standardi za DNA elektroforezu (1 kb DNA ladder): New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)

Taq polimeraza: izolirana u Laboratoriju za biokemiju

Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja koje su korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Acros Organics, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD), dok su kiseline i alkoholi nabavljeni od proizvođača Lach-Ner (Neratovice, Češka).

1.4. Otopine

Za transformaciju kvasca:

TE pufer (pH = 7,4)

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH se podešava dodatkom NaOH

0,1 M litijev acetat

1 M litijev acetat

50%-tna otopina polietilenglikola (PEG 4000)

Za izolaciju genomske DNA kvasca:

Pufer za razbijanje stanica

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1%-tni SDS, 2%-tni Triton X-100, 0,1 M NaCl

Otopina fenola/kloroforma 1:1

Otopina RNaze A

5 g/L ribonukleaze A otapa se u 5 mM Tris-HCl (pH = 7,5), otopina se prokuha 10 minuta radi inaktivacije moguće prisutne deoksiribonukleaze, a nakon hlađenja čuva se na -20 °C

Za gel elektroforezu:

50x koncentrirani TAE pufer (pH = 8,5)

2 M Tris, 1 M ledena octena kiselina, 50 mM EDTA; koristi se 1x koncentrirani Agarozni gel priprema se otapanjem agaroze zagrijavanjem u 1x koncentriranom TAE puferu

Otopina etidijevog bromida

Za mjerenje aktivnosti kisele fosfataze:

0,1 M Na-acetatni pufer (pH = 3,6)

0,1 M ledena octena kiselina, pH se podešava dodatkom NaOH

20 mM otopina p-nitrofenilfosfata

7,425 g/L p-nitrofenilfosfata otapa se u 0,1 M Na-acetatnom puferu (pH = 3,6),
priprema se neposredno prije mjerenja

1 M NaOH

2. Metode

2.1. Transformacija kvasca litij acetatnom metodom

Kvasac se uzgaja na rotacijskoj tresilici pri 30°C do logaritamske faze rasta u YPDa tekućoj podlozi. Potom se iz suspenzije kvasca izdvoji volumen koji sadrži 5 OD jedinica stanica kvasca u sterilnu Eppendorf kivetu i centrifugira 5min/3000rpm. Supernatant iznad taloga se odbaci, a talog stanica kvasca se resuspendira u 5ml sterilne deionizirane vode i ponovno centrifugira 5min/3000rpm, kako bi se isprala zaostala podloga. Ponovno se odbaci supernatant, a talog stanica se resuspendira u 0.7mL 0.1M LiAc i prenese u sterilnu Eppendorf epruvetu. Slijedi još jedno centrifugiranje 1min/8000rpm, nakon čega se ukloni supernatant, a na talog stanica se redom doda: 240 µL 50%-tnog PEG-a, 36 µL 1M LiAc, 25 µL jednolančane DNA (engl. *DNA carrier*, prethodno prokuhane tijekom 5 min na 100°C) te 50 µL transformirajuće DNA. Smjesa se vorteksira dok ne postane homogena, nakon čega slijedi inkubacija 30min na 30°C. Nakon toga slijedi toplinski šok, pri čemu se transformacijska smjesa inkubira 20min pri 42°C. Smjesa se centrifugira kako bi se uklonilo sve osim taloga stanica kvasca, koji se resuspendira u 3ml tekuće YPDa podloge. Suspenzija se inkubira 3h u rotacijskoj tresilici pri 30°C. Centrifugiranjem se odvoji većinski dio podloge, a ostatak se prenese na sterilnu krutu YPDa + HygB podlogu i inkubira na 30°C tijekom 5-7 dana, do porasta kolonija. Budući da se transformacija provodila s transformirajućom DNA koja sadrži *hph* marker gen, na ovakvim pločama doći će do selekcije i porasta kolonija kod kojih je u genom uspješno ugrađen gen za rezistenciju na antibiotik Hygromicin B.

2.2. Izolacija genomske DNA kvasca

Stanice kvasca uzgajane su na rotacijskoj tresilici u 10 mL YPDa podloge na 30°C do stacionarne faze rasta ($OD_{600} \sim 6$ OD/mL). Suspenzija je centrifugirana (5'/3000 rpm) te je talog stanica resuspendiran u 1 mL sterilne vode, što je otpipetirano u Eppendorf epruvetu. Nakon centrifugiranja (1'/13000 rpm), talog je resuspendiran u 200 μ L pufera za razbijanje stanica. Dodano je 200 μ L otopine fenola i kloroforma (1:1) i otprilike 300 μ L staklenih kuglica te je suspenzija snažno vorteksirana 4 minute. Dodano je 200 μ L TE pufera. Nakon centrifugiranja (5'/13000 rpm) je oko 400 μ L gornje vodene faze, koja je sadržavala DNA, pažljivo otpipetirano u novu Eppendorf epruvetu. Dodano je 2,5 volumena hladnog 96%-tnog etanola u svrhu taloženja DNA te je ostavljeno na -20°C barem 15 minuta. Nakon centrifugiranja (10'/11000 rpm), ispiranja hladnim 70%-tnim etanolom te ponovnom centrifugiranja (2'/11000 rpm), talog je osušen na zraku, a potom je otopljen u 400 μ L TE pufera. Suspenziji je dodano 5 μ L otopine RNaze A, nakon čega se smjesa inkubira u termobloku 15-30 minuta na 37°C. Dodani su otopina NaCl-a do koncentracije 0,2M, zatim 2,5 volumena hladnog 96%-tnog etanola, u svrhu taloženja DNA nakon čega je smjesa ostavljena preko noći na -20°C. Smjesa je centrifugirana (10'/11000 rpm), a talog je ispran hladnim 70%-tnim etanolom (2'/11000 rpm) i osušen na zraku. Izolirana DNA otopljena je u 500 μ L TE pufera i čuvana na -20°C.

2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR je proveden u svrhu provjere delecije gena *RRP6*. Reakcijska smjesa od 50 μ L sadržavala je 5 μ L pufera, 1 μ L 10 mM otopine sva 4 deoksiribonukleotida, 1 μ L izolirane genomske DNA, 1 μ L Taq DNA polimeraze, po 2.5 μ L odgovarajućih 10 μ M početnica (2x) i 37 μ L sterilne vode. Nakon provedenog PCR-a, produkti su analizirani gel elektroforezom u agaroznom gelu.

Reakcija se odvijala prema programu:

95°C/4min; 30x (95°C/30s; 59°C/30s; 72°C/ 2min); 72°C/7min

Početnice: RRP6_fwd 5' - CCCAAAAATATGAGGGGCATCGG - 3'

RRP6_rev 5' - AAAATGGTGTGCATGGGGGA - 3'

RRP6ORF_fwd 5' - AATAACCCCAGTCACTACCC - 3'

2.4. Gel elektroforeza

Uzorci DNA pomiješani su s migracijskim bojom i TE puferom te nanoseni u jažice gela. Gel elektroforeza provodila se u 0,8% agaroznom gelu u 1x TAE puferu pri naponu 85V. Nakon elektroforeze, gel je namakan u otopini etidijevog bromida 15 minuta, nakon čega je DNA u gelu vizualizirana uz UV svjetlo na uređaju Uvidoc HD6.

2.5. Mjerenje aktivnosti enzima kisele fosfataze u suspenziji stanica kvasca

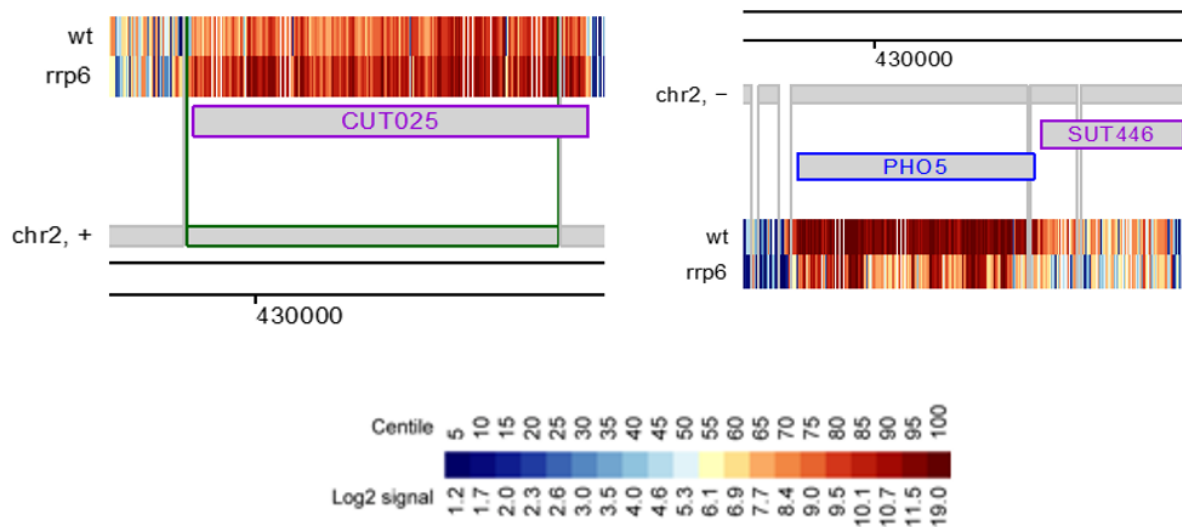
Stanice kvasca uzgajane su u tekućoj YNBP hranjivoj podlozi (visoka koncentracija fosfata- uvjeti represije PHO promotora) na rotacijskoj tresilici pri 30°C do logaritamske faze rasta. Odgovarajući volumen suspenzije je centrifugiran (5'/3000 rpm), talog stanica ispran je sterilnom vodom radi potpunog ispiranja fosfata iz podloge, te su stanice resuspendirane u tekućoj sintetskoj hranjivoj podlozi (ne sadrži fosfat - uvjeti indukcije PHO promotora) na koncentraciju 0,3 OD/mL i inkubirane na rotacijskoj tresilici na 30°C. Alikvot suspenzije stanica za mjerenje aktivnosti enzima određen je uzimajući u obzir koncentraciju suspenzije stanica (OD₆₀₀), očekivanu vrijednost aktivnosti te predviđeno vrijeme trajanja reakcije (5-15 minuta), kako bi izmjerena apsorbancija konačnog produkta bila u području linearnog očitavanja spektrofotometra (0,1-2). Alikvot je centrifugiran (5'/3000 rpm), a zatim ispran deioniziranom vodom (u slučaju da je korištena suspenzija u YNBP podlozi - 0h indukcije). Talog stanica kvasca resuspendiran je u 4,2 mL 0.1 M Na-acetatnog pufera (pH = 3,6). Pripremljene su dvije paralele uzorka od 1 mL te je uzet alikvot za mjerenje OD₆₀₀ vrijednosti suspenzije stanica u puferu. U međuvremenu je pripremljena 20 mM otopina p-nitrofenilfosfata u Na-acetatnom puferu. Uzorci i supstrat inkubirani su 10 minuta u vodenoj kupelji pri 30°C, nakon čega je reakcija započeta dodatkom 1 mL otopine supstrata u svaku od dvije paralele. Po isteku vremena, reakcija je zaustavljena dodatkom 1 mL 1 M otopine NaOH, čime se denaturira enzim. Slijepa proba sadržavala je sve komponente reakcije, ali je NaOH dodan prije supstrata pa je enzimska reakcija odmah zaustavljena, kako bi dobivena količina produkta u slijepoj probi bila rezultat isključivo spontanog raspada supstrata. Epruvete su centrifugirane (5'/3000 rpm), nakon čega je

supernatant korišten za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije produkta reakcije (p-nitrofenol) koji u lužnatom pH području daje žuto obojenje. Izmjerena apsorbancija uzorka pri 410nm proporcionalna je koncentraciji produkta, a specifična aktivnost enzima računa se prema formuli:

$$A = \frac{A_{410} * 1000}{OD_{600} * \text{vrijeme reakcije (min)}}$$

REZULTATI

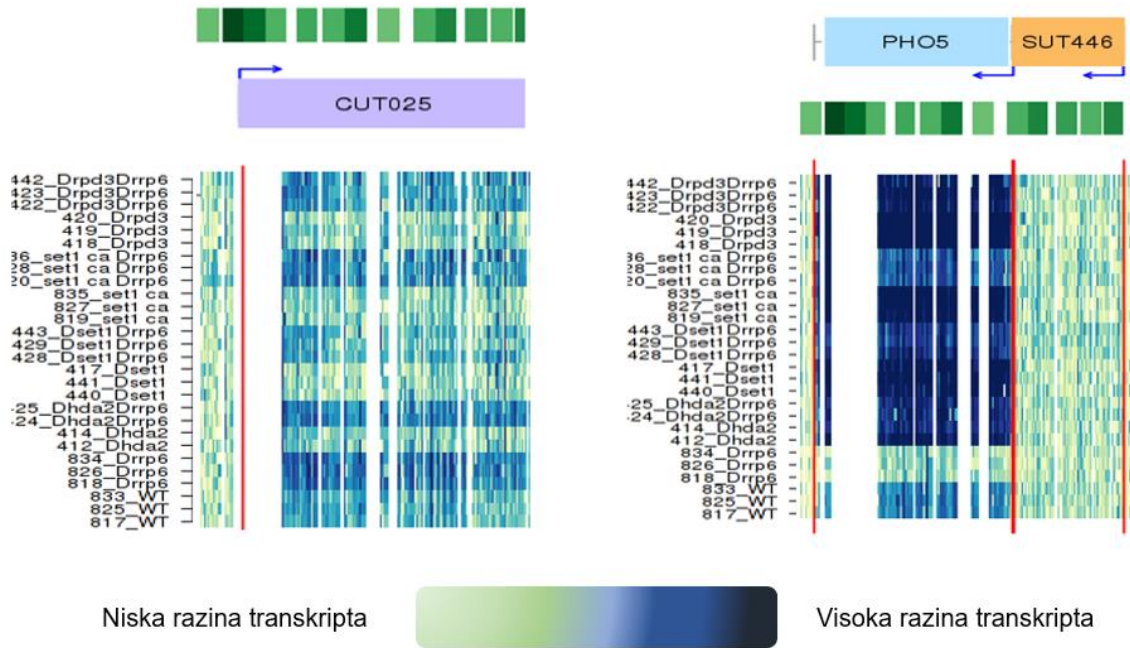
Promotor gena *PHO5* izvrstan je model za praćenje regulacije transkripcije gena u korelaciji sa remodeliranjem strukture kromatina. Zbog svoje inducibilnosti, jake regulacije i ekstenzivnog remodeliranja strukture kromatina promotora, gen *PHO5* predstavlja paradigmu za regulaciju transkripcije u eukariotskim stanicama (Korber i Barbaric, 2014). Signalni put kojim se inducira transkripcija ovog gena, kao i set kromatin-modificirajućih i -remodelirajućih kompleksa koji sudjeluju u regulaciji transkripcije ovog gena su dobro poznati, međutim nova istraživanja indiciraju na još složeniju i kompleksniju sliku regulacije gena *PHO5*. Specifično, pokazano je kako se na lokusu gena *PHO5* transkribira nekodirajuća *antisense* RNA CUT025, koja je stabilizirana prilikom inaktivacije ribonukleazne katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 (slika 4). Takva RNA nastaje transkripcijom sa 3' kraja kodirajućeg lanca gena *PHO5* i ne nosi uputu za sintezu proteina. Koristeći odgovarajuće setove mutanata kvasca, pokazano je kako je *PHO5 antisense* RNA nakon sinteze terminirana NNS kompleksom i degradirana RNA egzosomom te kako ima negativan regulatorni učinak na ekspresiju gena *PHO5* (neobjavljeni rezultati iz Laboratorija za biokemiju; Ljubas, Završni rad). Sukladno tome, zaustavljanje transkripcije *antisense* RNA pozitivno je utjecalo na kinetiku ekspresije gena *PHO5*, dok je pretjerano nakupljanje *antisense* RNA negativno utjecalo na kinetiku ekspresije gena *PHO5* (Ljubas, Završni rad). Međutim, molekularni mehanizam putem kojeg *PHO5 antisense* RNA djeluje na ekspresiju gena *PHO5* je i dalje nepoznat. Neka su istraživanja pokazala kako bi *antisense* RNA mogla djelovati putem kromatin-modificirajućih i -remodelirajućih kompleksa (Camblong i sur., 2007), te je eksperimentalna strategija ovog rada uključivala praćenje kinetike ekspresije gena *PHO5* sa stanicama mutanata za odgovarajuće kromatin-modificirajuće i -remodelirajuće komplekse pri uvjetima stabilizacije *PHO5 antisense* RNA, kako bi se dobio uvid u mehanizam njenog djelovanja.



Slika 4. Heatmap koji prikazuje razinu *PHO5* mRNA (desno) i *PHO5 antisense* RNA (CUT025, lijevo) u sojevima kvasca divljeg tipa i mutanta *rrp6* (Xu i sur., 2009).

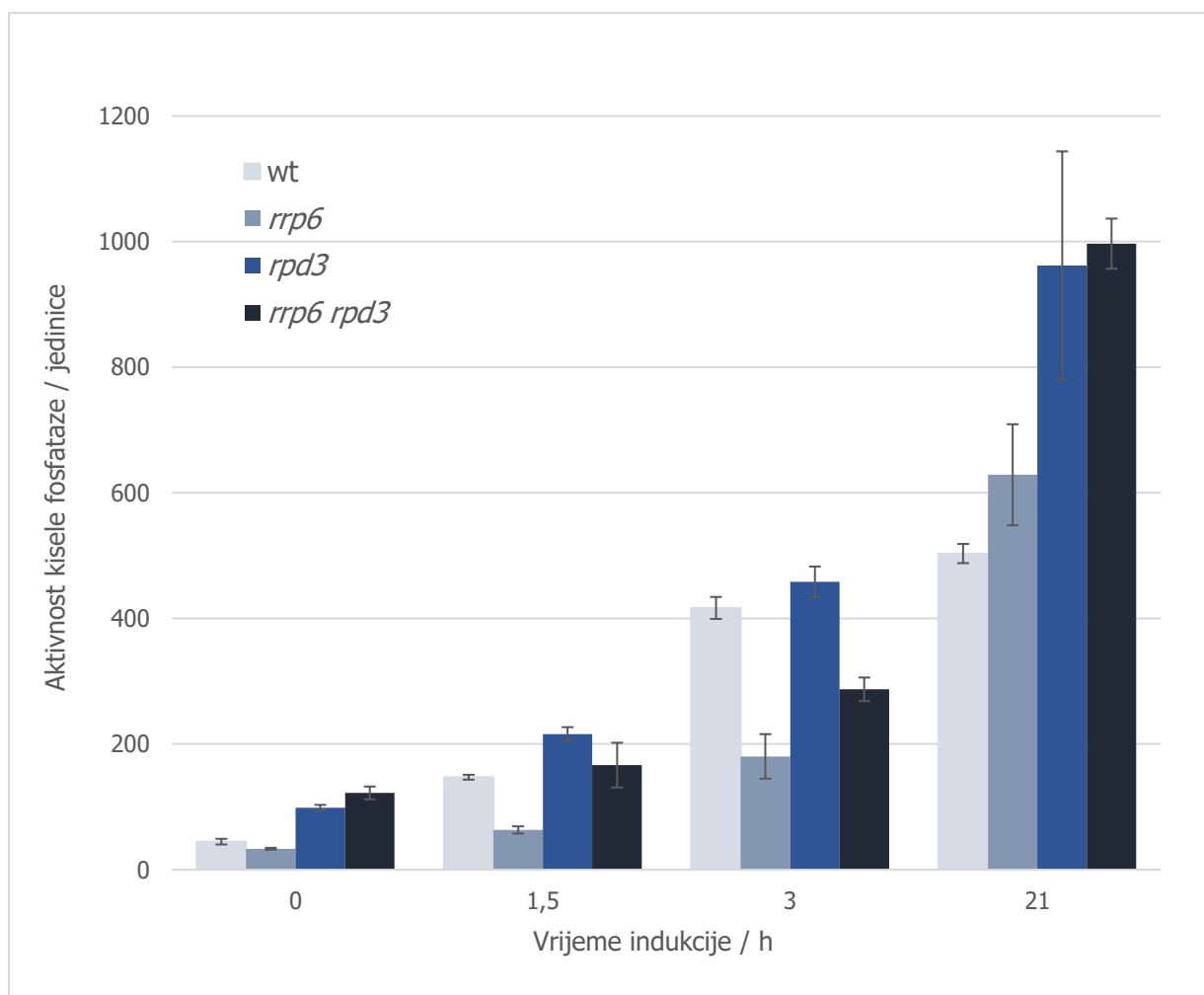
1. Histon-deacetilaza Rpd3 je uključena u mehanizam putem kojeg stabilizacija *PHO5 antisense* RNA djeluje negativno na kinetiku ekspresije gena *PHO5*

Histon-deacetilaza Rpd3 je podjedinica Rpd3S, Rpd3L i Snt2C kompleksa. Posljedica djelovanja ovog proteina je uklanjanje acetilne jedinice s lizinskih ostataka histona H3 i H4, što strukturu kromatina čini kondenziranijom i nedostupnijom transkripcijskoj mašineriji (Robert i sur., 2004; Castelnuovo i sur., 2014). Nedavnim istraživanjima provedenim na razini cijelog genoma kvasca predložen je mehanizam kojim *antisense* transkripti privlače HDAC poput Rpd3 na promotorske regije pripadajućih gena, čime negativno utječu na njihovu ekspresiju, te su iz podataka RNA sekvenciranja postojale indikacije da bi upravo ovakav mehanizam mogao biti uključen pri regulaciji ekspresije gena *PHO5* (Castelnuovo i sur., 2014) (slika 5). Iz tog razloga, u ovom je radu provedeno praćenje kinetike ekspresije gena *PHO5* prilikom nedostatka proteina Rpd3, samostalno ili u kombinaciji s nedostatkom proteina Rrp6, što uzrokuje stabilizaciju *PHO5 antisense* RNA, kako bi se utvrdila poveznica između Rpd3 i *PHO5 antisense* RNA.



Slika 5. Heatmap koji prikazuje razinu *PHO5* mRNA (desno) i *PHO5 antisense* RNA (CUT025, lijevo) u sojevima kvasca divljeg tipa, dvostrukih mutanata *rpd3 rrp6*, *hda2 rrp6*, *set1 rrp6* te odgovarajućih jednostrukih mutanata (Castelnuovo i sur., 2014).

Stanice divljeg tipa kvasca FSY1742 te odgovarajućih mutanata *rpd3*, *rrp6* i *rrp6 rpd3* uzgajane su u podlozi sa visokom koncentracijom fosfata (uvjeti represije gena *PHO5*, +P_i) do logaritamske faze rasta. Zatim je odgovarajući alikvot stanica precijepljen u podlogu bez fosfata (uvjeti indukcije gena *PHO5*, -P_i), nakon čega se u određenim vremenskim intervalima mjerila aktivnost enzima kisele fosfataze, produkta ekspresije gena *PHO5*.



Slika 6. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca divljeg tipa FSY1742 (wt) i izogenih mutanata *rrp6*, *rpd3* i *rrp6 rpd3*. Stanice su uzgajane pri 30°C na rotacijskoj tresilici u uvjetima represije gena *PHO5*, nakon čega su prebaćene u podlogu koja ne sadrži fosfat (inducibilni uvjeti). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici 6 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze. U usporedbi sa stanicama divljeg tipa, stanice mutanta *rpd3* pokazuju nešto više vrijednosti aktivnosti kisele fosfataze već u represivnim uvjetima, ali i tijekom inkubacije stanica u uvjetima indukcije gena. To je posljedica izostanka Rpd3, HDAC čija je uloga deacetiliranje histona koje posljedično dovodi do represije transkripcije gena, te su ovi rezultati u skladu s prethodno pokazanom negativnom ulogom Rpd3 u regulaciji transkripcije gena *PHO5* (Wang, Zhou i Zhou, 2011). Također, ovi rezultati su u skladu

s rezultatima sekvenciranja RNA prikazanima na slici 5, koji pokazuju da je razina *PHO5* mRNA veća u stanicama mutanta *rpd3* u odnosu na stanice divljeg tipa. Prateći aktivnost kisele fosfataze sa stanicama soja *rrp6* u odnosu na stanice divljeg tipa, kinetika ekspresije gena *PHO5* je u stanicama mutanta *rrp6* bila sporija, odnosno mjerene su niže razine aktivnosti u ranim satima indukcije gena (slika 6). Suprotno tome, razine aktivnosti izmjerene sa stanicama mutanta *rrp6* i stanicama divljeg tipa su nakon prekonoćne inkubacije u uvjetima indukcije gena bile vrlo slične, odnosno čak i nešto veće u slučaju mutanta *rrp6* (slika 6). Efekt negativnog utjecaja inaktivacije Rrp6 na ekspresiju gena *PHO5* je potkrijepljen i činjenicom da je u stanicama mutanta *rrp6* prisutna manja količina *PHO5* mRNA nego u stanicama divljeg tipa (slika 5). Pokazano je kako u stanicama mutanta *rrp6* dolazi do nakupljanja i stabilizacije *PHO5 antisense* RNA, što je također vidljivo na slici 5 i čemu se pripisuje negativan utjecaj inaktivacije Rrp6 na ekspresiju ovog gena (neobjavljeni rezultati iz Laboratorija za biokemiju).

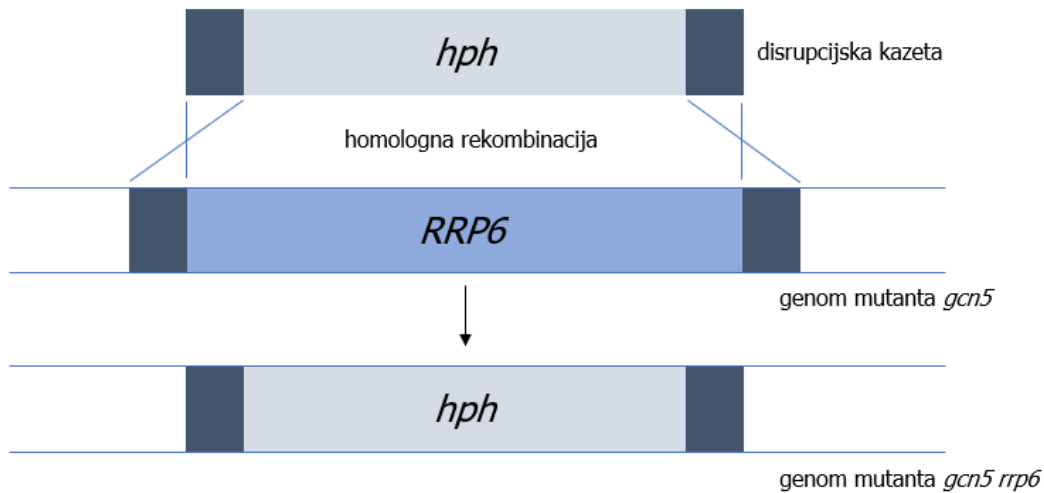
Prateći paralelno aktivnosti kisele fosfataze izmjerene sa stanicama sojeva *rrp6*, *rpd3* i dvostrukog mutanta *rrp6 rpd3*, pokazano je kako ona izmjerena sa stanicama dvostrukog mutanta prati sličan trend onoj izmjerenoj sa stanicama jednostrukog mutanta *rpd3*, odnosno uglavnom pokazuje razinu veću od one izmjerene sa stanicama divljeg tipa (slika 6). Budući da u stanicama dvostrukog mutanta *rrp6 rpd3* dolazi do pojačane stabilizacije *PHO5 antisense* RNA kao i u stanicama jednostrukog mutanta *rrp6* (slika 5), ovaj rezultat jasno pokazuje da se negativan utjecaj ove stabilizacije na ekspresiju gena *PHO5* ne ispoljava ukoliko je istovremeno inaktivirana histon-deacetilaza Rpd3. Drugim riječima, negativan utjecaj stabilizacije *PHO5 antisense* RNA ispoljava se samo ukoliko je u stanici prisutan aktivan protein Rpd3, što upućuje na zaključak da je upravo ova histon-deacetilaza uključena u mehanizam kojim *PHO5 antisense* RNA negativno regulira ekspresiju pripadajućeg gena. Međutim, bitno je primijetiti da je 3 h nakon precjepljivanja stanica kvasca u uvjete indukcije gena razina aktivnosti kisele fosfataze izmjerena sa stanicama dvostrukog mutanta *rrp6 rpd3* ipak manja u odnosu na razinu aktivnosti izmjerenu sa stanicama jednostrukog mutanta *rpd3* (slika 6). Ovaj efekt može se pripisati tome da su u stanicama mutanta *rpd3* i dalje aktivne i druge HDAC koje mogu biti privučene od strane *antisense* RNA, što bi rezultiralo smanjenom razinom ekspresije.

2. Stabilizacija *PHO5 antisense* RNA nema dodatan negativni učinak na ekspresiju gena *PHO5* u odnosu na nedostatak histon-acetiltransferaze Gcn5 koja je ključna za acetilaciju histona promotora *PHO5*

Histon-acetiltransferaza Gcn5 je katalitička podjedinica SAGA kompleksa, čija je glavna uloga acetiliranje histona H2B i H3 (Wu i sur., 2004). Acetiliranje histona dovodi do opuštanja strukture kromatina i posljedično do aktivacije transkripcije (Marmorstein i Roth, 2001). Ovi kompleksi u stanici reguliraju razinu transkripcije na velikom broju gena, pa tako i na genu *PHO5*. Brojna su istraživanja dala uvid u značaj Gcn5 na promotoru gena *PHO5*. Iako Gcn5 nije potreban za omogućavanje maksimalne razine transkripcije gena u uvjetima potpune indukcije, njegov izostanak očituje se snažnim usporavanjem kinetike aktivacije transkripcije gena *PHO5* (Barbaric i sur., 2007). U ovom je radu pokazano kako *PHO5 antisense* RNA potencijalno djeluje preko privlačenja HDAC na promotorsku regiju gena preko koje se transkribira. Budući da je enzim Gcn5 najvećim udjelom odgovoran za acetilaciju histona promotora *PHO5*, u skladu s navedenim modelom bilo bi za očekivati da nakupljanje *PHO5 antisense* RNA neće imati dodatan negativan učinak na kinetiku ekspresije gena u odnosu na sam izostanak proteina Gcn5. Kako bi se provjerila ova hipoteza, konstruirane su stanice dvostrukog mutanta *gcn5 rrp6* te je uspoređena kinetika ekspresije gena *PHO5* u ovim stanicama u odnosu na stanice divljeg tipa te jednostrukih mutanata *gcn5* i *rrp6*.

2.1. Konstrukcija dvostrukog mutanta *gcn5 rrp6*

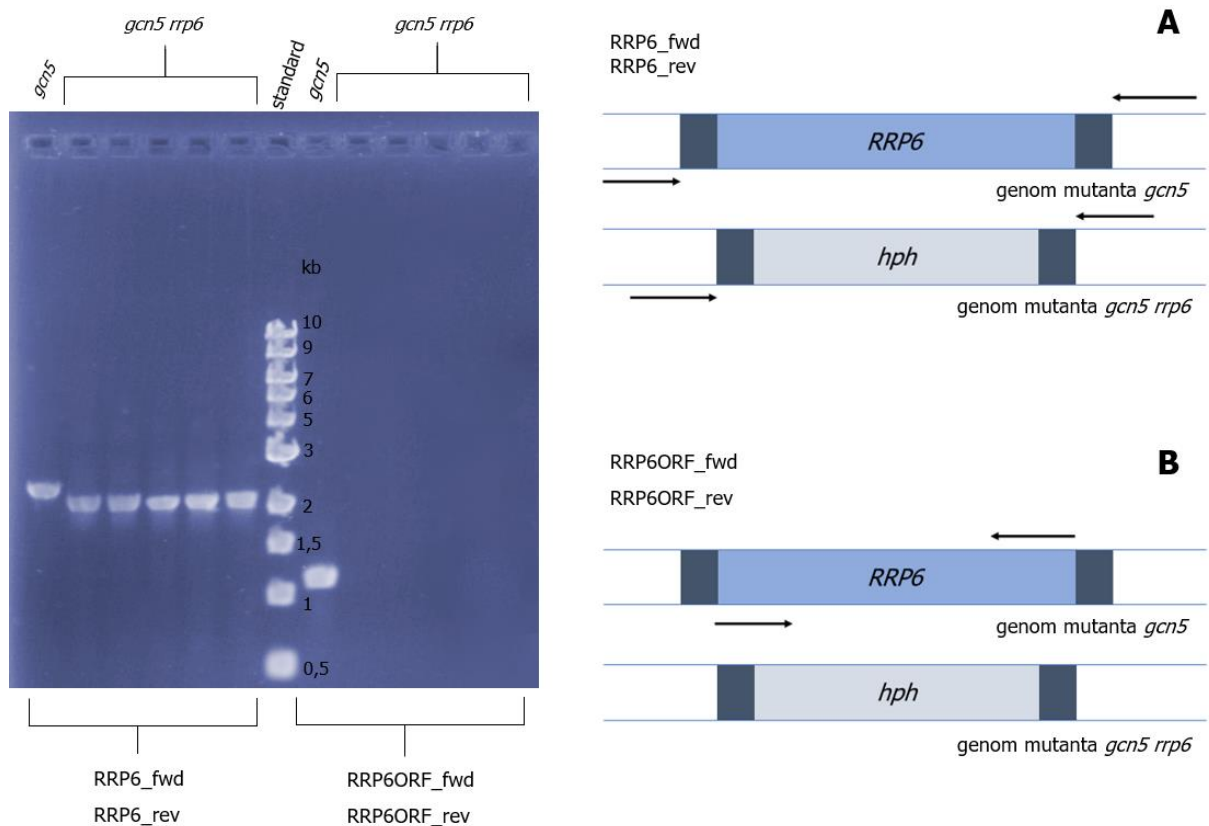
Stanice dvostrukog mutanta *gcn5 rrp6* konstruirane su transformacijom stanica *gcn5* s prethodno konstruiranom disrupcijskom kazetom *rrp6::hph* koja putem procesa homologne rekombinacije dovodi do delecije gena *RRP6*. Homologna rekombinacija je izmjena genetičke informacije između homolognih, odnosno identičnih ili vrlo sličnih sekvenci DNA. Budući da disrupcijska kazeta *rrp6::hph* sadrži krajeve homologne sekvencama koje se u genomu kvasca nalaze neposredno prije i nakon otvorenog okvira čitanja (engl. *open reading frame*, ORF) gena *RRP6*, ugrađuje se u taj dio genoma i dovodi do zamjene gena *RRP6* marker genom *hph* (slika 7). Dakle, kod ishodnih sojeva *gcn5* ovaj lokus kodirat će za funkcionalan protein Rrp6, dok će kod mutanata *rrp6* sadržavati gen odgovoran za rezistenciju na antibiotik higromicin. Na temelju te činjenice provedena je selekcija uspješno transformiranih stanica kvasca.



Slika 7. Shema ugrađivanja disrupcijske kazete *rrp6::hph* u genom mutanta *gcn5* kvasca *S. cerevisiae*, pri čemu dolazi do zamjene gena *RRP6* marker genom *hph*.

Selekcija transformanata vršena je na YPDa hranjivoj podlozi s dodatkom 300 µg/ml higromicina. Kako bi se potvrdila uspješnost delecije gena *RRP6*, odnosno ispravne ugradnje disrupcijske kazete, bilo je potrebno provesti genotipizaciju poraslih kolonija. Genotipizaciji prethodi izolacija genomske DNA iz ishodnog soja i konstruiranih mutanata kvasca, nakon čega se izolirana DNA umnaža PCR metodom uz odgovarajuće parove početnica zahvaljujući kojima će doći do umnažanja fragmenata različitih duljina ovisno o genotipu stanice, a nastali PCR produkti se analiziraju DNA gel elektroforezom. Korištena su dva seta početnica u svrhu potvrđivanja uspješnosti konstrukcije mutanata *rrp6* (slike **8A** i **8B**). Set početnica korišten u prvoj genotipizaciji se veže uzvodno i nizvodno od lokusa *RRP6*, zbog čega će tijekom odvijanja PCR reakcije biti umnoženi fragmenti DNA koji sadrže sekvencu gena *RRP6*, odnosno *hph*. Budući da je ORF gena *hph* kraći u odnosu na ORF gena *RRP6*, PCR produkt dobiven iz genomske DNA mutanata *rrp6::hph* biti će kraći. Za produkt umnožen iz genomske DNA mutanta *gcn5* očekivana veličina produkta je 2434 pb, dok je za mutanta *rrp6* očekivana veličina 2182 pb, što odgovara rezultatima dobivenima za sve ispitane kolonije transformanata (slika **8**). U drugoj genotipizaciji korišten je set početnica koje se hibridiziraju unutar ORF-a gena *RRP6*, što će dovesti do umnažanja PCR produkta od 1138 pb s genomskom DNA ishodnog soja te sojeva kod kojih nije uspješno deletiran gen *RRP6*. S genomskom DNA uspješno konstruiranih mutanata *rrp6* neće

doći do umnažanja PCR produkta obzirom da se početnice ne mogu vezati unutar ORF-a gena *RRP6* jer je isti zamijenjen genom *hph* (slika 8B). Genotipizacijom je potvrđena uspješna konstrukcija stanica mutanata *gcn5 rrp6*.

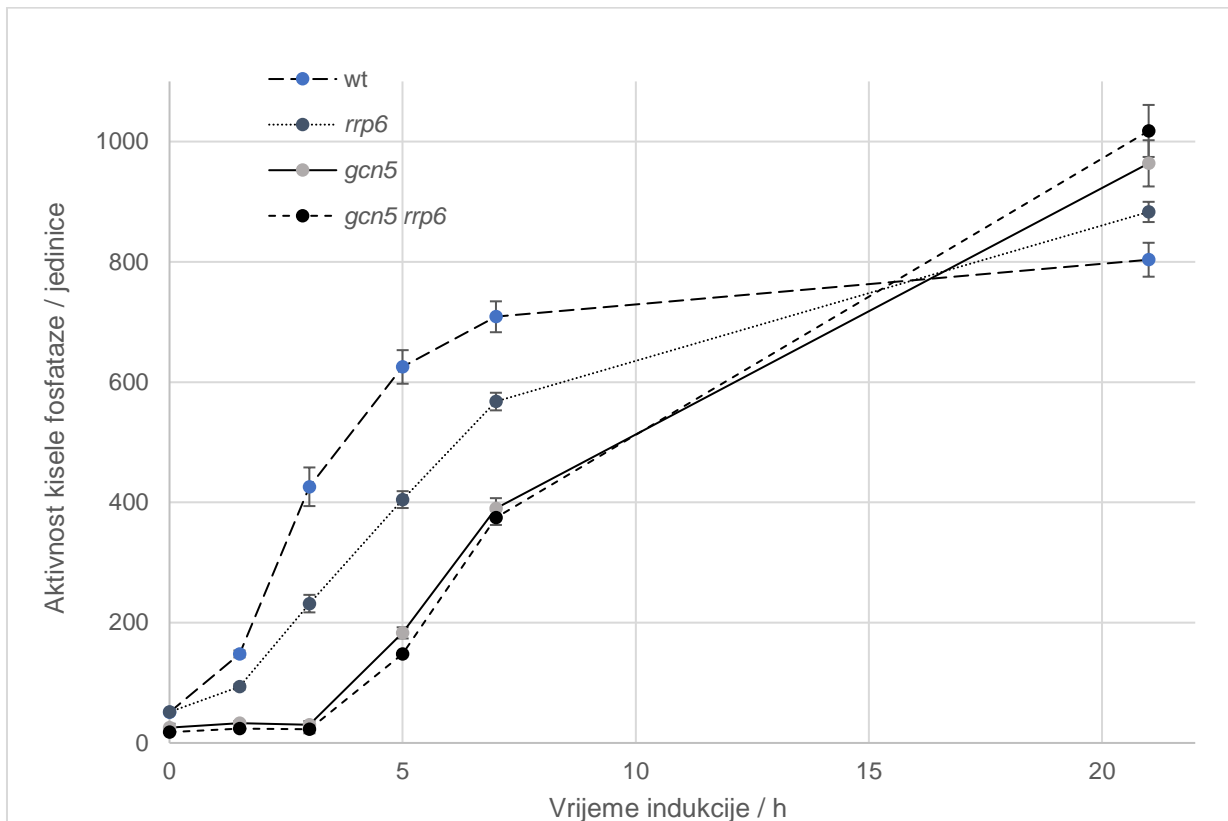


Slika 8. Genotipizacija mutanata *rrp6* vršena je PCR metodom s dva seta početnica (A i B), a provjera uspješnosti umnažanja produkata odgovarajućih veličina se vršila DNA gel elektroforezom u usporedbi sa standardima. Označene su jažice sa standardima, produktima umnoženima iz genomske DNA ishodnog soja *gcn5* te uspješne konstrukcije mutanata. Mjesta hibridizacije početnica naznačena su crnim strelicama.

2.2. Gcn5 i antisense RNA djeluju u istom putu regulacije transkripcije gena *PHO5*

Stanice divljeg tipa kvasca BY4741 te odgovarajućih mutanata *gcn5*, *rrp6* i *gcn5 rrp6* uzgajane su u podlozi sa visokom koncentracijom fosfata (uvjeti represije gena *PHO5*, +P_i) do logaritamske faze rasta. Zatim je odgovarajući alikvot stanica precijepljen u podlogu bez fosfata (uvjeti indukcije gena *PHO5*, -P_i), nakon čega se u određenim

vremenskim intervalima mjerila aktivnost enzima kisele fosfataze, produkta ekspresije gena *PHO5*.



Slika 9. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca divljeg tipa BY4741 (wt) i izogenih mutanata *rrp6*, *gcn5* i *gcn5 rrp6*. Stanice su uzgajane pri 30°C na rotacijskoj tresilici u uvjetima represije gena *PHO5* nakon čega su prebaćene u podlogu koja ne sadrži fosfat (inducibilni uvjeti). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici 9 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze. U usporedbi sa stanicama divljeg tipa, kinetika ekspresije gena *PHO5* u stanicama mutanta *rrp6* bila je sporija, odnosno mjerene su niže razine aktivnosti u ranim satima indukcije gena *PHO5* (slika 9). Suprotno tome, razine aktivnosti izmjerene sa stanicama mutanta *rrp6* i stanicama divljeg tipa su nakon prekonocne inkubacije u uvjetima indukcije gena *PHO5* bile vrlo slične, odnosno čak i nešto veće u slučaju mutanta *rrp6* (slika 9). Takav efekt mutacije *rrp6* bio je zamijećen i sa stanicama druge linije sojeva u prethodnom eksperimentu (slika 6). U odnosu na stanice divljeg tipa, kinetika ekspresije gena

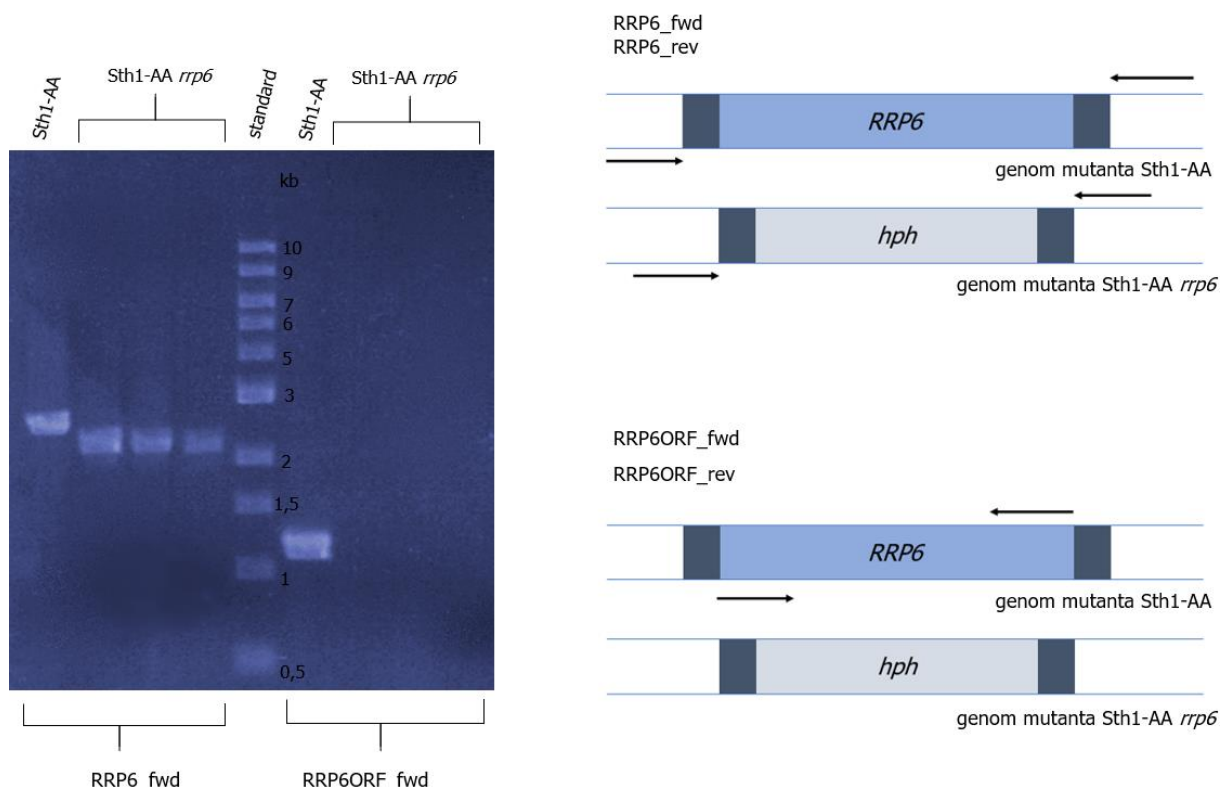
PHO5 u stanicama *gcn5* je bila znatno sporija, što potvrđuje rezultate rada (Barbaric i sur., 2007). Ovim mjerenjima je još jednom potvrđena činjenica da izostanak proteina Gcn5 ima negativan utjecaj na kinetiku ekspresije gena *PHO5*, odnosno da prisutnost ovog proteina omogućava razinu acetilacije histona promotora *PHO5* koja je nužna za fiziološku kinetiku remodeliranja kromatina promotora u uvjetima indukcije gena. Kinetika ekspresije gena *PHO5* bila je sporija u stanicama mutanta *gcn5* nego u stanicama mutanta *rrp6*, iz čega se može zaključiti da izostanak proteina Gcn5 ima značajniji učinak na ekspresiju gena *PHO5* od izostanka proteina Rrp6.

Prateći paralelno aktivnosti kisele fosfataze izmjerene sa stanicama sojeva *rrp6*, *gcn5* i dvostrukog mutanta *gcn5 rrp6*, pokazano je kako ona izmjerena sa stanicama dvostrukog mutanta prati gotovo identičan trend onoj izmjerenoj sa stanicama jednostrukog mutanta *gcn5* tijekom cijelog perioda indukcije gena (slika 9). Dakle, nedostatak proteina Rrp6 nije imao dodatan negativan učinak u odnosu na onaj uzrokovan izostankom proteina Gcn5, što upućuje na činjenicu da ova dva proteina djeluju u istom putu pri regulaciji transkripcije gena *PHO5*. Ukoliko *PHO5 antisense* RNA djeluje prvenstveno putem utjecaja na razinu acetilacije histona na promotorskoj regiji gena, dobiveni rezultat je u skladu s očekivanjima, budući da je u stanicama mutanta *gcn5* inaktivirana HAT koja na toj regiji ima najznačajniju ulogu.

3. Inaktivacija kompleksa RSC i stabilizacija *PHO5 antisense* RNA imaju negativan sinergistički učinak na ekspresiju gena *PHO5*

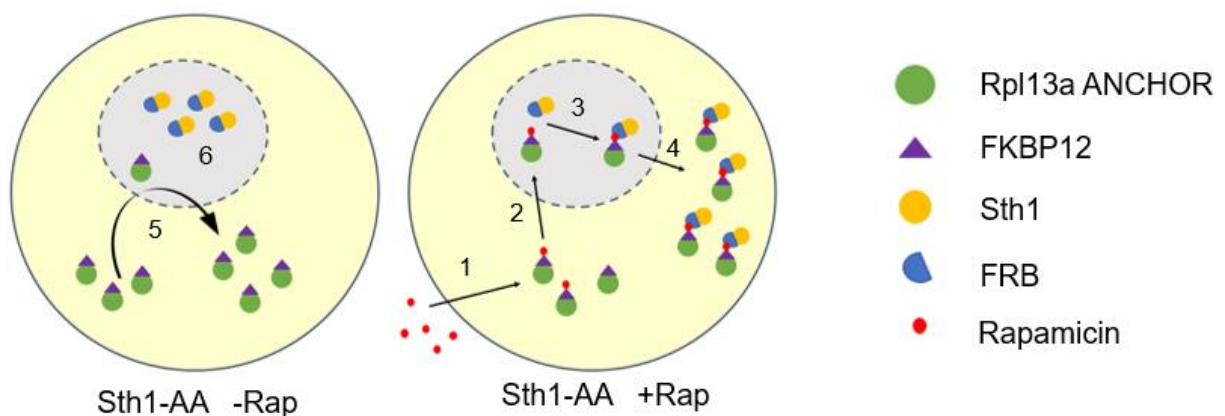
RSC kompleks pripada SWI/SNF porodici kromatin-remodelirajućih kompleksa. Sačinjen je od 15 podjedinica, od kojih dio sadrži i specifične bromodomene putem kojih stupaju u interakcije s acetiliranim ostatcima histona (Parnell, Huff i Cairns, 2008). Energiju dobivenu hidrolizom ATP-a, čiju reakciju provodi katalitička podjedinica Sth1, RSC kompleks koristi za pomicanje ili uklanjanje nukleosoma. To rezultira otvaranjem strukture kromatina, pri čemu takva DNA, bez nukleosoma, postaje izložena i dostupna transkripcijskoj mašineriji (Chen i sur., 2020). Na taj način RSC kompleks regulira transkripciju velikog broja gena, uključujući i gen *PHO5*. Pokazano je kako je njegova uloga na promotoru gena *PHO5* od izrazitog značaja (Musladin i sur., 2014). Istraživanje ovog kromatin-remodelirajućeg kompleksa je otežano budući da je on uključen u neke esencijalne stanične procese, pri čemu delecija RSC-a ili nekih njegovih podjedinica rezultira letalnim fenotipom. U tu svrhu, u ovom je radu korišten

Anchor away (AA) soj *Sth1-AA*, kod kojeg je moguće postići ciljani transport katalitičke podjedinice RSC kompleksa *Sth1* u citosol i time onemogućiti funkciju ovog proteina koju vrši u jezgri. Osim što je *Sth1* katalitička ATP-azna podjedinica, također sadrži i C-terminalnu bromodomenu koja je zaslužna za prepoznavanje acetiliranih histona (Chen i sur., 2020). Takvo bi prepoznavanje moglo rezultirati privlačenjem RSC-a na promotor *PHO5* i posljedično njegovim remodeliranjem. Kako bi se dobio uvid u međudjelovanje *PHO5 antisense* RNA i RSC kompleksa, konstruiran je i mutant *Sth1-AA rrp6*, identičnim principom opisanim u sekciji 2.1., te je proveden jednak postupak genotipizacije mutanata. Na slici **10** pokazan je rezultat genotipizacije mutanata, odnosno uspješne konstrukcije stanica mutanata *Sth1-AA rrp6*.



Slika 10. Genotipizacija mutanata *rrp6* vršena je PCR metodom s dva seta početnica (**A** i **B**), a provjera uspješnosti umnažanja produkata odgovarajućih veličina se vršila DNA gel elektroforezom u usporedbi sa standardima. Označene su jažice sa standardima, produktima umnoženima iz genomske DNA ishodnog soja *Sth1-AA* te uspješne konstrukcije mutanata. Mjesta hibridizacije početnica naznačena su crnim strelicama.

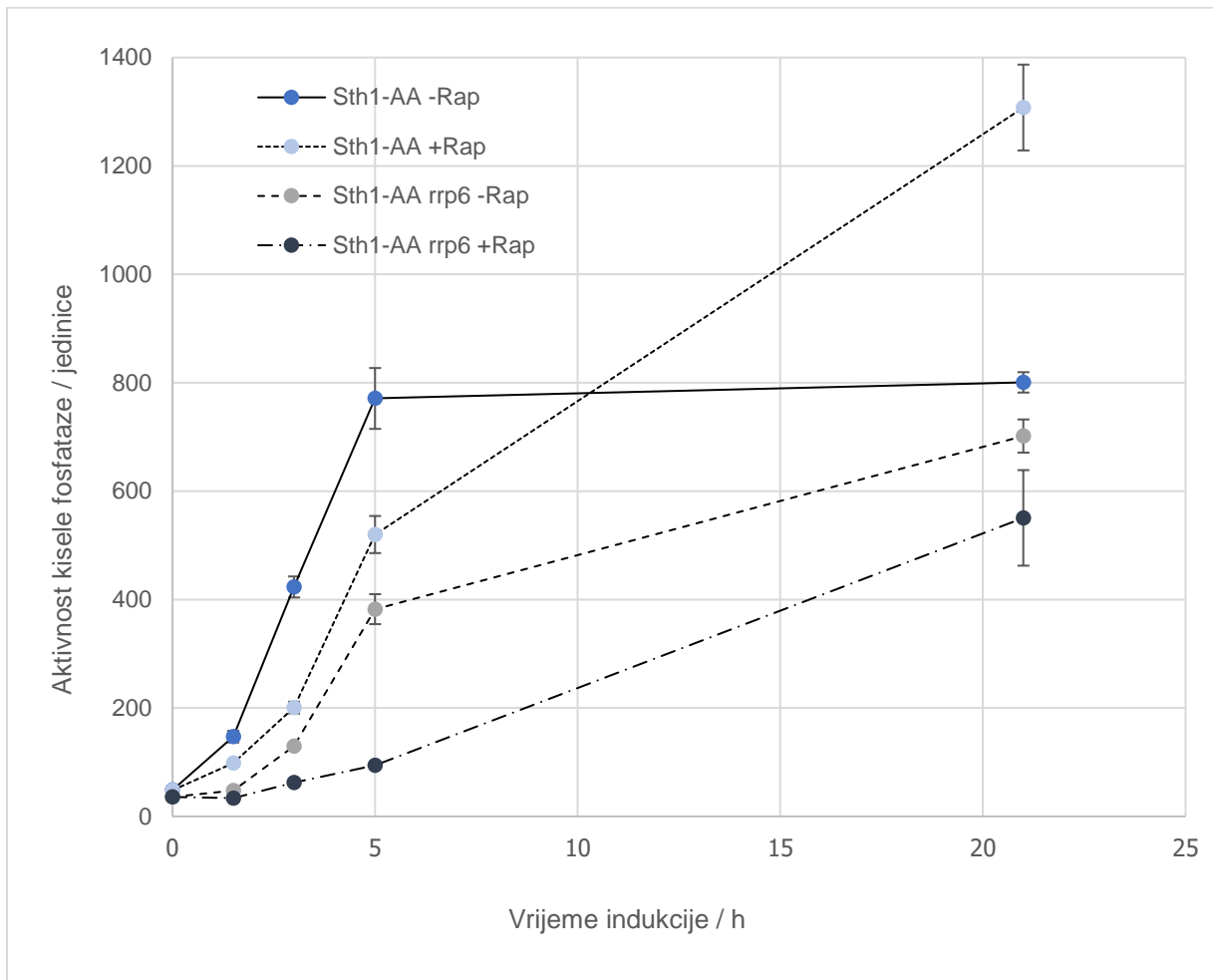
Korištenjem sustava Anchor away (AA) moguće je eksportirati protein od interesa iz jezgre u citosol dodatkom vanjskog liganda rapamicina u medij za uzgoj (slika 11). Anchor away tehnika moderni je genetički alat kojim se relativno lako, brzo i uvjetno može postići "inaktivacija", odnosno supresija djelovanja određenog proteina čija je funkcija nužna u jezgri (Haruki, Nishikawa i Laemmli, 2008). To se postiže indukcijom dimerizacije između proteina FKBP12 i domene FRB dodatkom liganda rapamicina (slika 11: 1). Na FKBP12 protein vezan je tzv. *anchor*, ribosomalni protein Rpl13a koji nakon sinteze u citosolu tranzijentno prolazi kroz jezgru gdje s ostalim ribosomalnim proteinima i rRNA formira ribosome. Ukoliko je na FKBP12-Rpl13a vezan rapamicin (slika 11: 2), tvori heterodimerni kompleks sa FRB domenom (slika 11: 3). U soju Sth1-AA, na FRB domenu je vezan esencijalni protein od interesa, Sth1, koji se nakon tvorbe kompleksa eksportira van jezgre (slika 11: 4). Ukoliko rapamicin nije prisutan, FKBP12-Rpl13a prolazi kroz jezgru, ali ne dimerizira sa FRB-Sth1 (slika 11: 5) pa ne dolazi do eksporta proteina Sth1 (slika 11: 6).



Slika 11. Shematski prikaz djelovanja sustava Anchor away, pri čemu se protein od interesa Sth1 iz jezgre eksportira citosol prilikom dodatka vanjskog liganda rapamicina, dok se u njegovu izostanku protein i dalje nalazi u jezgri te obnaša svoju funkciju.

Stanice mutanata kvasca Sth1-AA i Sth1-AA *rrp6* uzgajane su u podlozi sa visokom koncentracijom fosfata (uvjeti represije gena *PHO5*, +P_i) do logaritamske faze rasta. Zatim je odgovarajući alikvot stanica precijepljen u podlogu bez fosfata (uvjeti indukcije gena *PHO5*, -P_i), pri čemu je svaka kultura podijeljena na dva alikvota, od kojih je u jedan dodan ligand rapamicin u finalnoj koncentraciji od 1 µg/mL (+Rap), a u drugi nije

(-Rap). Nakon toga se u određenim vremenskim intervalima mjerila aktivnost enzima kisele fosfataze, produkta ekspresije gena *PHO5*.



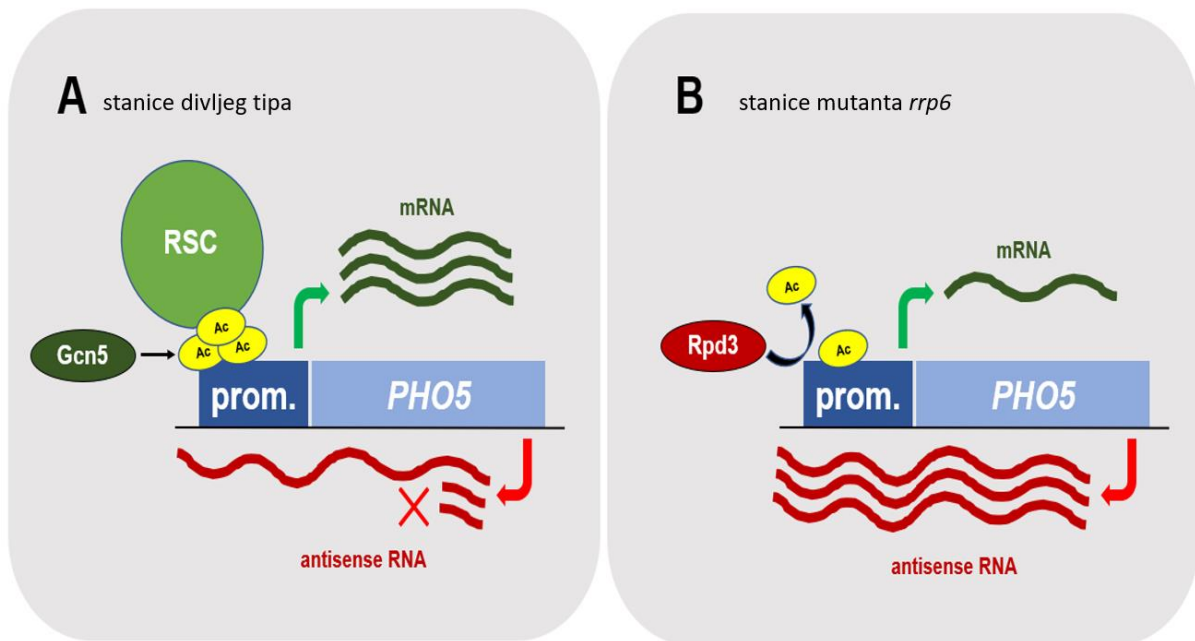
Slika 12. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca *Sth1-AA* i *Sth1-AA rrp6* bez (-Rap) i sa dodatkom rapamicina (+Rap). Stanice su uzgajane pri 30°C na rotacijskoj tresilici u uvjetima represije gena *PHO5* nakon čega su prebačene u podlogu koja ne sadrži fosfat (inducibilni uvjeti). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici 12 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze. Stanice *Sth1-AA* pri izostanku rapamicina (-Rap) predstavljaju ekvivalent stanica divljeg tipa, jer ne dolazi do eksporta esencijalnog proteina *Sth1* iz jezgre u citosol. Prilikom inkubacije tog soja u uvjetima indukcije u prisutnosti rapamicina (+Rap), u usporedbi s kontrolnim sojem izmjerene razine aktivnosti kisele fosfataze bile su niže u svim

točkama indukcije izuzev prekonocne inkubacije. Dakle, eksport Sth1 podjedinice iz jezgre, odnosno inaktivacija RSC kompleksa, ima jasan negativan učinak na kinetiku ekspresije gena *PHO5*. Tim je rezultatima potvrđena značajna uloga RSC kompleksa na promotoru gena *PHO5* (Musladin i sur., 2014). Također, kako remodeliranje strukture kromatina nije bilo u potpunosti onemogućeno u stanicama Sth1-AA tretiranim s rapamicinom (+Rap), to upućuje na zaključak kako drugi kromatin-remodelirajući kompleksi mogu zamijeniti ulogu RSC-a u remodeliranju kromatina promotorske regije gena *PHO5*. Alternativno, velika je mogućnost da inaktivacija kompleksa RSC u ranim satima indukcije u ovim stanicama nije bila potpuna, budući da je rapamicin bio dodan tek tijekom precjepljivanja stanice u uvjete indukcije. Stanice Sth1-AA *rrp6* bez dodatka rapamicina (-Rap) samo ispoljavaju efekt mutacije *rrp6*, budući da pri izostanku rapamicina ne dolazi do eksporta Sth1 iz jezgre u citosol. Tako su stanice tog mutanta zapravo ekvivalentne stanicama mutanta *rrp6*, što i usporedno odgovara izmjerenim vrijednostima, odnosno negativnom učinku izostanka proteina Rrp6 na kinetiku ekspresije gena *PHO5* (slika 6; slika 9). Usporedno, stanice Sth1-AA su pri dodatku rapamicina (+Rap) pokazivale više vrijednosti aktivnosti kisele fosfataze u svim točkama indukcije gena u odnosu na stanice mutanta Sth1-AA *rrp6* bez dodatka rapamicina (-Rap) (slika 12). Takav efekt upućuje na zaključak da je inaktivacija katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 potencijalno značajnija za ekspresiju gena *PHO5* nego inaktivacija RSC kompleksa. Međutim, kao što je prije navedeno, dodatak rapamicina prilikom precjepljivanja stanica u uvjete indukcije vjerojatno uzrokuje da je u ranim satima indukcije prisutna značajna količina podjedinice Sth1 u jezgri, te bi bilo za očekivati da bi predtretman ovih stanica rapamicinom u uvjetima represije gena doveo do značajnijeg efekta.

Istovremeni nedostatak proteina Rrp6 (Sth1-AA *rrp6*) i induciranje eksporta Sth1 iz jezgre dodatkom rapamicina (+Rap) doveo je do drastično sporije kinetike ekspresije gena *PHO5* u odnosu na svaki od pojedinačnih efekata (slika 12). Takav rezultat implicira na sinergistički negativni učinak inaktivacije RSC-a i nedostatka Rrp6, odnosno stabilizacije *PHO5 antisense* RNA. U skladu s mehanizmom predloženim na temelju rezultata ovog rada (slika 13), u stanicama u kojima je inaktivna katalitička podjedinica RNA egzosoma Rrp6 dolazi do nakupljanja *PHO5 antisense* RNA, kao i do njihove stabilizacije, što rezultira privlačenjem HDAC Rpd3 na promotorsku regiju i posljedično represijom transkripcije. Ukoliko se uz to inaktivira i RSC, kromatin-remodelirajući kompleks, dodatno se otežava aktivacija transkripcije budući da

struktura kromatina ostaje više kondenzirana: s jedne strane zbog manje dostupnosti RSC-a za vezanje na promotor *PHO5* zbog eksporta podjedinice Sth1 iz jezgre dodatkom rapamicina, te s druge strane zbog djelovanja HDAC privučenim od strane *antisense* RNA, što rezultira manjom količinom acetilnih oznaka na histonima promotora putem kojih RSC može biti privučen.



Slika 13. Predloženi model mehanizma putem kojeg *antisense* RNA regulira ekspresiju gena *PHO5*.

RASPRAVA

Razvitkom novih osjetljivijih metoda identificiranja i sekvenciranja RNA molekula otkriveno je kako se genomi eukariotskih stanica pervazivno transkribiraju, pri čemu nastaje velik broj nekodirajućih RNA molekula (Camblong i sur., 2007). U to se ubrajaju i *antisense* RNA molekule (asRNA), koje nastaju inicijacijom transkripcije s 3' kraja kodirajućeg lanca gena (Khorkova i sur., 2014). Pokazan je negativan regulatorni utjecaj asRNA na transkripciju određenog broja gena, ali se o samom mehanizmu njihovog djelovanja još uvijek zna jako malo. Istraživanja su kroz godine pokazala da bi *antisense* RNA mogle djelovati putem kromatin-modificirajućih i -remodelirajućih kompleksa, na način da ih njihova transkripcija pojačano ili slabije privlači na promotorsku regiju pripadajućeg gena te time utječe na regulaciju transkripcije. Iz tog razloga, gen *PHO5* kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je korišten kao modelni gen u ovom radu. Ovaj je gen izvrstan model za praćenje regulacije transkripcije gena u korelaciji sa remodeliranjem strukture kromatina. Neke od poželjnih karakteristika koje ovaj gen posjeduje su inducibilnost, ekstenzivno remodeliranje strukture kromatina promotora te jaka regulacija, pri čemu gen *PHO5* predstavlja gotovo savršenu paradigmu za regulaciju transkripcije u eukariotskim stanicama (Korber i Barbaric, 2014). Osim toga, za lokus ovog gena je pokazano da dolazi do stabilizacije, odnosno nakupljanja odgovarajuće *antisense* RNA kao posljedica izostanka proteina Rrp6, katalitičke podjedinice RNA egzosoma koji je zaslužan za procesiranje i degradiranje takvih transkripata (slika 4). Stoga je opći cilj ovog rada bio ostvariti uvid u mehanizme regulacije transkripcije putem *antisense* nekodirajućih RNA, koji se manifestiraju utjecajem na strukturu kromatina, dok je specifični cilj rada bio ispitati djelovanje kromatin-modificirajućih enzima Rpd3 i Gcn5 te kromatin-remodelirajućeg kompleksa RSC u mehanizmu putem kojeg *antisense* RNA regulira ekspresiju gena *PHO5*.

Budući da već postoje saznanja kako asRNA reguliraju transkripciju gena *PHO84* putem kromatin-modificirajućih kompleksa (Camblong i sur., 2007), preciznije putem privlačenja histon-deacetilaza Rpd3 i Hda1 na promotorsku regiju gena, u ovom je radu koristeći odgovarajuće setove mutanata ispitano dolazi li do sličnog mehanizma regulacije u sklopu regulatorne mreže srodnog gena *PHO5*. Iako se o regulaciji i signalnom putu aktivacije transkripcije ovog gena zapravo zna mnogo (Korber i Barbaric, 2014), uloga *antisense* RNA u regulaciji ekspresije tog gena još uvijek nije detaljno istražena. Tako je prvi cilj ovog rada bio provjeriti razinu ekspresije gena *PHO5*

putem praćenja aktivnosti enzima kisele fosfataze Pho5 u stanicama koje imaju inaktivan protein Rpd3, sa ili bez paralelne inaktivacije Rrp6, uslijed koje dolazi do nakupljanja i stabilizacije *antisense* RNA. Histon-deacetilaza Rpd3 je podjedinica Rpd3S, Rpd3L i Snt2C kompleksa. Posljedica djelovanja ovog proteina je uklanjanje acetilne jedinice s lizinskih ostataka histona H3 i H4, što strukturu kromatina čini kondenziranijom i nedostupnijom transkripcijskoj mašineriji (Robert i sur., 2004; Castelnuovo i sur., 2014). Delecija gena koji kodira za Rpd3 rezultirala je povišenom razinom ekspresije gena *PHO5* u odnosu na pripadajuće stanice kvasca divljeg tipa (slika 6), budući da protein Rpd3 u normalnim uvjetima indukcije svojim djelovanjem reprimira transkripciju gena *PHO5* (Rundlett i sur., 1996). Međutim, kako bi se istražila poveznica između *PHO5* asRNA i Rpd3, ispitana je razina ekspresije gena *PHO5* i sa stanicama jednostrukog mutanta *rrp6* te dvostrukog mutanta *rpd3 rrp6*. Sekvenciranjem RNA prethodno je pokazano kako u stanicama mutanta *rrp6* dolazi do nakupljanja i stabilizacije asRNA, što je slučaj i za stanice dvostrukog mutanta *rpd3 rrp6* (slika 5). Ta je činjenica povezana sa dobivenim rezultatima mjerenja aktivnosti kisele fosfataze (slika 6), na temelju čega se došlo do zaključka kako takav rezultat jasno pokazuje da se negativan utjecaj ove stabilizacije na ekspresiju gena *PHO5* ne ispoljava ukoliko je istovremeno inaktivirana histon-deacetilaza Rpd3. Drugim riječima, negativan utjecaj stabilizacije *PHO5 antisense* RNA ispoljava se samo ukoliko je u stanici prisutan aktivan protein Rpd3, što upućuje na zaključak da je upravo ova histon-deacetilaza uključena u mehanizam kojim *PHO5 antisense* RNA negativno regulira ekspresiju pripadajućeg gena. No s druge strane, dobiveni rezultati mjerenja aktivnosti za stanice *rpd3* i *rpd3 rrp6* također indiciraju kako Rpd3 nije jedina HDAC zaslužna za modificiranje strukture kromatina promotora *PHO5*, izmjerene niže aktivnosti sa stanicama *rpd3 rrp6* u odnosu na stanice *rpd3* prilikom inkubacije tijekom 3 h u uvjetima indukcije gena, ukazuju na to da stabilizirane *antisense* RNA potencijalno privlače i druge HDAC, primjerice Hda1. U prilog tome govore i rezultati sekvenciranja RNA (slika 5), koji pokazuju da u stanicama dvostrukog mutanta *hda2 rrp6* dolazi do stabilizacije *PHO5 antisense* RNA, ali se njen represivni učinak na razinu transkripcije gena *PHO5* također ne ispoljava.

Kako bi se dodatno potvrdilo da *PHO5 antisense* RNA sudjeluje u regulatornom putu koji djeluje putem (de)acetilacije histona, u istraživanje je uključena najekstenzivnije istražena HAT kvasca *S. cerevisiae*, Gcn5, čije je djelovanje suprotno od onoga koje ima Rpd3. Gcn5 je katalitička podjedinica SAGA kompleksa. SAGA kompleks kvasca

S. cerevisiae je multifunkcionalni proteinski koaktivatorski kompleks zaslužan za regulaciju transkripcije pojedinih gena, pa tako i gena *PHO5* (Wu i sur., 2004). Aktivni SAGA kompleks u stanici kovalentno modificira histone H2B i H3 (na aminokiselinskom ostatku Lys14) putem podjedinice Gcn5 te kao posljedica takvih modifikacija dolazi do opuštanja strukture kromatina (Wu i sur., 2004). To rezultira privlačenjem transkripcijskih faktora na promotore gena i, posljedično, aktivacijom transkripcije gena. Ekspresija gena *PHO5* praćena je sa stanicama mutanata *gcn5*, *rrp6* te dvostrukog mutanta *gcn5 rrp6*, kako bi se istražilo međudjelovanje stabilizacije *antisense* RNA i inaktivacije proteina Gcn5. Sa stanicama soja *gcn5* izmjerena je značajno sporija kinetika aktivacije transkripcije gena *PHO5* u odnosu na stanice divljeg tipa, što je još jednom potvrdilo važnu ulogu ove HAT na promotoru *PHO5* (Barbaric i sur., 2007). Uspoređujući aktivnosti kisele fosfataze u sojevima *rrp6* i *gcn5* sa dvostrukim mutantom *gcn5 rrp6*, pokazano je kako izmjerene vrijednosti aktivnosti u stanicama *gcn5 rrp6* daju gotovo identičan rezultat onom izmjenom u stanicama *gcn5* tijekom cijelog perioda indukcije gena (slika 9). Iz toga proizlazi kako nedostatak proteina Rrp6, čija se inaktivacija očituje stabilizacijom asRNA, nije imao aditivni negativni učinak s inaktivacijom proteina Gcn5. Takav rezultat implicira da ova dva proteina djeluju u istom putu pri regulaciji transkripcije gena *PHO5*. Ukoliko je pretpostavljeni mehanizam točan i *PHO5* asRNA djeluje putem utjecaja na razinu acetilacije histona na promotorskoj regiji gena, dobiveni rezultat je u skladu s očekivanjima, budući da je u stanicama mutanta *gcn5* inaktivirana HAT koja na toj regiji ima najznačajniju ulogu.

Posljednje, provjerena je poveznica između stabilizacije *PHO5 antisense* RNA i RSC kompleksa. RSC kompleks pripada SWI/SNF porodici kromatin-remodelirajućih kompleksa. Sastoji se od 15 podjedinica, od kojih dio sadrži i specifične bromodomene putem kojih stupaju u interakcije s acetiliranim ostatcima histona (Parnell, Huff i Cairns, 2008). Putem svoje katalitičke podjedinice Sth1, koja u sklopu RSC kompleksa osigurava energiju dobivenu hidrolizom ATP-a, RSC kompleks koristi za pomicanje ili uklanjanje nukleosoma. To rezultira otvaranjem strukture kromatina, pri čemu takva DNA, bez nukleosoma, postaje izloženija i dostupnija transkripcijskoj mašineriji (Chen i sur., 2020). Uzevši u obzir da je Sth1 esencijalni protein, korišteni su Anchor away sojevi Sth1-AA, kod kojih dolazi do eksporta proteina Sth1 u citosol uslijed dodatka vanjskog liganda rapamicina. Kako bi se istražilo međudjelovanje stabilizacije *antisense* RNA i RSC-a, u stanicama Sth1-AA deletiran je gen *RRP6*, te je s ovim

sojevima praćena ekspresije gena *PHO5* u uvjetima indukcije sa i bez dodatka rapamicina. Inaktivacija RSC kompleksa do koje dolazi dodatkom rapamicina, budući da se van jezgre eksportira katalitička podjedinica RSC-a Sth1, ima negativan učinak na kinetiku ekspresije gena *PHO5* koji je vjerojatno uzrokovan smanjenom mogućnosti remodeliranja strukture kromatina. Nadalje, istovremeni nedostatak proteina Rrp6 i Sth1 doveo je do drastično sporije kinetike ekspresije gena *PHO5* u odnosu na svaki od pojedinačnih efekata (slika 12). Tim je rezultatom pokazan aditivni negativni učinak obje mutacije, uslijed kojih dolazi do inaktivacije RSC-a te stabilizacije *PHO5 antisense* RNA, budući da su vrijednosti aktivnosti izmjerene sa sojem Sth1-AA *rrp6* (+Rap) bile niže i od vrijednosti izmjerenih sa sojevima Sth1-AA *rrp6* (-Rap) i Sth1-AA (+Rap) tijekom cijelog ranog perioda indukcije gena. Ovaj rezultat govori u prilog fenomenu koji je nedavno istražen na razini cijelog genoma kvasca, kojim je pokazano da je upravo smanjena razina acetilacije uzrokovana *antisense* transkripcijom uzrok slabijeg privlačenja podjedinice RSC-a Sth1 na promotorske regije gena te posljedično i manje dostupnosti kromatina te manje razine ekspresije gena (Gill i sur., 2020). Na temelju rezultata ovog rada predložen je molekularni mehanizam kojim nekodirajuća *antisense* RNA regulira ekspresiju gena *PHO5* (slika 13). Prema tom modelu, u stanicama mutanta *rrp6* dolazi do nakupljanja i stabilizacije *PHO5 antisense* RNA, što rezultira smanjenom razinom acetilacije promotora gena *PHO5*, budući da *antisense* RNA privlači histon-deacetilazu Rpd3. Ukoliko je razina acetilacije niska, manje su šanse da će se RSC kompleks vezati na promotor gena *PHO5* i remodelirati njegovu strukturu, budući da su acetilne oznake putem kojih RSC može biti privučen, na temelju bromodomena, ključne za njegovo djelovanje. Ipak, učinak stabilizacije *antisense* RNA ne onemogućava ekspresiju gena *PHO5* u potpunosti, već samo negativno utječe na kinetiku ekspresije u uvjetima indukcije gena. S druge strane, u stanicama divljeg tipa, u kojima je prisutna manja količina *PHO5* asRNA zbog njene terminacije NNS kompleksom i degradacije RNA egzosomom, ne dolazi do pojačanog privlačenja HDAC. Na promotoru gena *PHO5* dolazi do vezanja proteina Gcn5 i posljedično do acetilacije histona, što prepoznaju bromodomene RSC kompleksa koji je putem njih privučen na promotor te remodelira strukturu kromatina i aktivira transkripciju gena *PHO5*.

ZAKLJUČCI

1. Histon-deacetilaza Rpd3 je uključena u mehanizam putem kojeg stabilizacija *PHO5 antisense* RNA djeluje negativno na kinetiku ekspresije gena *PHO5*, budući da se efekt koji ispoljava stabilizacija *PHO5 antisense* RNA očituje samo kada je Rpd3 aktivan.
2. Histon-acetiltransferaza Gcn5 i *PHO5 antisense* RNA djeluju u istom putu regulacije transkripcije gena *PHO5*, budući da u stanicama dvostrukog mutanta *gcn5 rrp6* inaktivacija Rrp6 nije uzrokovala dodatni negativni učinak u odnosu na onaj koji ispoljava inaktivacija Gcn5.
3. Inaktivacija kompleksa RSC i stabilizacija *PHO5 antisense* RNA imaju negativan sinergistički učinak na ekspresiju gena *PHO5*.

ZAHVALE

Mentoru, doc. dr. sc. Igoru Stupareviću na izdvojenom vremenu, savjetima, potpori, ali i prilici da pod njegovim mentorstvom prijavim ovaj rad na natječaj za Rektorovu nagradu.

Doktorandici Ani Novačić, mag. ing. biotechn. na prenesenom znanju, brojnim savjetima, strpljenju, susretljivosti, proširivanju znanstvenih vidika i potpori prilikom izrade ovog rada.

Svim članovima Laboratorija za biokemiju na kolegijalnosti, savjetima i potpori prilikom izrade ovog rada.

Obitelji i prijateljima, za podršku u teškim trenucima, strpljenju i smjernicama koje su mi pomogle da budem bolji, uspješniji i temeljitiji u onome što radim.

POPIS LITERATURE

- Arigo, John T., Daniel E. Eyler, Kristina L. Carroll, and Jeffry L. Corden. 2006. "Termination of Cryptic Unstable Transcripts Is Directed by Yeast RNA-Binding Proteins Nrd1 and Nab3." *Molecular Cell* 23(6):841–51.
- Auesukaree, Choowong, Tomoyuki Homma, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, Yoshinobu Kaneko, and Satoshi Harashima. 2004. "Intracellular Phosphate Serves as a Signal for the Regulation of the PHO Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* 279(17):17289–94.
- Baldi, Sandro, Philipp Korber, and Peter B. Becker. 2020. "Beads on a String—Nucleosome Array Arrangements and Folding of the Chromatin Fiber." *Nature Structural and Molecular Biology* 27(2):109–18.
- Barbaric, Slobodan, Tim Luckenbach, Andrea Schmid, Dorothea Blaschke, Wolfram Hörz, and Philipp Korber. 2007. "Redundancy of Chromatin Remodeling Pathways for the Induction of the Yeast PHO5 Promoter in Vivo." *Journal of Biological Chemistry* 282(38):27610–21.
- Brachmann, Carrie Baker, Adrian Davies, Gregory J. Cost, Emerita Caputo, Joachim Li, Philip Hieter, and Jef D. Boeke. 1998. "Designer Deletion Strains Derived from *Saccharomyces Cerevisiae* S288C: A Useful Set of Strains and Plasmids for PCR-Mediated Gene Disruption and Other Applications." *Yeast* 14(2):115–32.
- Cairns, Bradley R., Yahli Lorch, Yang Li, Mincheng Zhang, Lynne Lacomis, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Jian Du, Brehon Laurent, and Roger D. Kornberg. 1996. "RSC, an Essential, Abundant Chromatin-Remodeling Complex." *Cell* 87(7):1249–60.
- Camblong, Jurgi, Nahid Iglesias, Céline Fickentscher, Guennaelle Dieppois, and Françoise Stutz. 2007. "Antisense RNA Stabilization Induces Transcriptional Gene Silencing via Histone Deacetylation in *S. Cerevisiae*." *Cell* 131(4):706–17.
- Carrozza, Michael J., Rhea T. Utley, Jerry L. Workman, and Jacques Côté. 2003. "The Diverse Functions of Histone Acetyltransferase Complexes." *Trends in Genetics* 19(6):321–29.
- Castelnuovo, Manuele, Judith B. Zaugg, Elisa Guffanti, Andrea Maffioletti, Jurgi Camblong, Zhenyu Xu, Sandra Clauder-Münster, Lars M. Steinmetz, Nicholas M. Luscombe, and Françoise Stutz. 2014. "Role of Histone Modifications and Early Termination in Pervasive Transcription and Antisense-Mediated Gene Silencing

- in Yeast.” *Nucleic Acids Research* 42(7):4348–62.
- Chai, Bob, Jian Huang, Bradley R. Cairns, and Brehon C. Laurent. 2005. “Distinct Roles for the RSC and Swi/Snf ATP-Dependent Chromatin Remodelers in DNA Double-Strand Break Repair.” *Genes and Development* 19(14):1656–61.
- Chen, Guochao, Wei Li, Fuxiang Yan, Duo Wang, and Yong Chen. 2020. “The Structural Basis for Specific Recognition of H3K14 Acetylation by Sth1 in the RSC Chromatin Remodeling Complex.” *Structure* 28(1):111-118.e3.
- Clapier, Cedric R., and Bradley R. Cairns. 2009. “The Biology of Chromatin Remodeling Complexes.” *Annual Review of Biochemistry* 78:273–304.
- Duina, Andrea A., Mary E. Miller, and Jill B. Keeney. 2014. “Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces Cerevisiae* Model System.” *Genetics* 197(1):33–48.
- Eddy, Sean R. 2001. “Non-Coding RNA Genes and the Modern RNA World.” *Nature Reviews Genetics* 2(12):919–29.
- Ekwall, Karl. 2005. “Genome-Wide Analysis of HDAC Function.” *Trends in Genetics* 21(11):608–15.
- Fabrizio, P., F. Pozza, S. D. Pletcher, C. M. Gendron, and V. D. Longo. 2001. “Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast.” *Science* 292(5515):288–90.
- Fischle, Wolfgang, Franck Dequiedt, Maryse Fillion, Michael J. Hendzel, Wolfgang Voelter, and Eric Verdin. 2001. “Human HDAC7 Histone Deacetylase Activity Is Associated with HDAC3 in Vivo.” *Journal of Biological Chemistry* 276(38):35826–35..
- Fischle, Wolfgang, Yanming Wang, Steven A. Jacobs, Youngchang Kim, C. David Allis, and Sepideh Khorasanizadeh. 2003. “Molecular Basis for the Discrimination of Repressive Methyl-Lysine Marks in Histone H3 by Polycomb and HP1 Chromodomains.” *Genes and Development* 17(15):1870–81.
- Gelato, Kathy A., and Wolfgang Fischle. 2008. “Role of Histone Modifications in Defining Chromatin Structure and Function.” *Biological Chemistry* 389(4):353–63.
- Ghaemmaghami, Sina, Won Ki Huh, Kiowa Bower, Russell W. Howson, Archana Belle, Noah Dephoure, Erin K. O’Shea, and Jonathan S. Weissman. 2003. “Global Analysis of Protein Expression in Yeast.” *Nature* 425(6959):737–41.
- Gill, Jatinder Kaur, Andrea Maffioletti, Varinia García-Molinero, Françoise Stutz, and Julien Soudet. 2020. “Fine Chromatin-Driven Mechanism of Transcription Interference by Antisense Noncoding Transcription.” *Cell Reports* 31(5).

- Goffeau, A., G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver. 1996. "Life with 6000 Genes." *Science* 274(5287):546–67.
- Grant, Patrick A., and Shelley L. Berger. 1999. "Histone Acetyltransferase Complexes." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 10(2):169–77.
- Gregory, Philip D., Andrea Schmid, Maasoumeh Zavari, Lin Liu, Shelley L. Berger, and Wolfram Hörz. 1998. "Absence of Gcn5 HAT Activity Defines a Novel State in the Opening of Chromatin at the PHO5 Promoter in Yeast." *Molecular Cell* 1(4):495–505.
- Haruki, Hirohito, Junichi Nishikawa, and Ulrich K. Laemmli. 2008. "The Anchor-Away Technique: Rapid, Conditional Establishment of Yeast Mutant Phenotypes." *Molecular Cell* 31(6):925–32.
- Hereford, L. M., and L. H. Hartwell. 1974. "Sequential Gene Function in the Initiation of *Saccharomyces Cerevisiae* DNA Synthesis." *Journal of Molecular Biology* 84(3):445–56.
- Jansen, A., and K. J. Verstrepen. 2011. "Nucleosome Positioning in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(2):301–20.
- Januszyk, Kurt, and Christopher D. Lima. 2014. "The Eukaryotic RNA Exosome." *Current Opinion in Structural Biology* 24(1):132–40.
- Karathia, Hiren, Ester Vilaprinyo, Albert Sorribas, and Rui Alves. 2011. "*Saccharomyces Cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study." *PLoS ONE* 6(2).
- Karlič, Rosa, Ho Ryun Chung, Julia Lasserre, Kristian Vlahoviček, and Martin Vingron. 2010. "Histone Modification Levels Are Predictive for Gene Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(7):2926–31.
- Khorkova, Olga, Amanda J. Myers, Jane Hsiao, and Claes Wahlestedt. 2014. "Natural Antisense Transcripts." *Human Molecular Genetics* 23(R1).
- Korber, Philipp, and Slobodan Barbaric. 2014. "The Yeast PHO5 Promoter: From Single Locus to Systems Biology of a Paradigm for Gene Regulation through Chromatin." *Nucleic Acids Research* 42(17):10888–902.
- Kornberg, Rd. 1974. "Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin Structure Is Based on a Repeating Unit of Eight." *Science* 184:868–71.

- Kuo, Min Hao, and C. David Allis. 1998. "Roles of Histone Acetyltransferases and Deacetylases in Gene Regulation." *BioEssays* 20(8):615–26. d
- Lin, Aiyang, Ying Du, and Wei Xiao. 2020. "Yeast Chromatin Remodeling Complexes and Their Roles in Transcription." *Current Genetics* 66(4):657–70.
- Ljubas, J. (2021) Uloga antisense nekodirajuće transkripcije u regulaciji ekspresije gena PHO5 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, prvostupnički rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Marmorstein, Ronen, and Sharon Y. Roth. 2001. "Histone Acetyltransferases: Function, Structure, and Catalysis." *Current Opinion in Genetics and Development* 11(2):155–61.
- Mattick, John S., and Igor V. Makunin. 2006. "Non-Coding RNA." *Human Molecular Genetics* 15 Spec No(1):17–29.
- Münsterkötter, Martin, Slobodan Barbaric, and Wolfram Hörz. 2000. "Transcriptional Regulation of the Yeast PHO8 Promoter in Comparison to the Coregulated PHO5 Promoter." *Journal of Biological Chemistry* 275(30):22678–85.
- Murray, Struan C., and Jane Mellor. 2016. "Using Both Strands: The Fundamental Nature of Antisense Transcription." *BioArchitecture* 6(1):12–21.
- Musladin, Sanja, Nils Krietenstein, Philipp Korber, and Slobodan Barbaric. 2014. "The RSC Chromatin Remodeling Complex Has a Crucial Role in the Complete Remodeler Set for Yeast PHO5 Promoter Opening." *Nucleic Acids Research* 42(7):4270–82.
- Nakao, J., A. Miyanochara, A. Toh-e, and K. Matsubara. 1986. "Saccharomyces Cerevisiae PHO5 Promoter Region: Location and Function of the Upstream Activation Site." *Molecular and Cellular Biology* 6(7):2613–23.
- Ng, Huck Hui, François Robert, Richard A. Young, and Kevin Struhl. 2002. "Genome-Wide Location and Regulated Recruitment of the RSC Nucleosome-Remodeling Complex." *Genes and Development* 16(7):806–19.
- Novačić, Ana, Valentin Beauvais, Marina Oskomić, Lucija Štrbac, Aurélie Le Dantec, A. Rachid Rahmouni, and Igor Stuparević. 2021. "Yeast RNA Exosome Activity Is Necessary for Maintaining Cell Wall Stability through Proper Protein Glycosylation." *Molecular Biology of the Cell* 32(5):363–75. doi: 10.1091/mbc.E20-08-0544-T.
- Oshima, Yasuji. 1997. "The Phosphatase System in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genes and Genetic Systems* 72(6):323–34.

- Parnell, Timothy J., Jason T. Huff, and Bradley R. Cairns. 2008. "RSC Regulates Nucleosome Positioning at Pol II Genes and Density at Pol III Genes." *EMBO Journal* 27(1):100–110.
- Robert, François, Dmitry K. Pokholok, Nancy M. Hannett, Nicola J. Rinaldi, Mark Chandy, Alex Rolfe, Jerry L. Workman, David K. Gifford, and Richard A. Young. 2004. "Global Position and Recruitment of HATs and HDACs in the Yeast Genome." *Molecular Cell* 16(2):199–209.
- Roth. 2001. "Istone Cetyltransferases." *Annu. Rev. Biochem* 81–120.
- Ruiz-Roig, Clàudia, Cristina Viéitez, Francesc Posas, and Eulàlia De Nadal. 2010. "The Rpd3L HDAC Complex Is Essential for the Heat Stress Response in Yeast." *Molecular Microbiology* 76(4):1049–62.
- Rundlett, Stephen E., Andrew A. Carmen, Ryuji Kobayashi, Sergei Bavykin, Bryan M. Turner, and Michael Grunstein. 1996. "HDA1 and RPD3 Are Members of Distinct Yeast Histone Deacetylase Complexes That Regulate Silencing and Transcription." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(25):14503–8.
- Saha, Anjanabha, Jacqueline Wittmeyer, and Bradley R. Cairns. 2002. "Chromatin Remodeling by RSC Involves ATP-Dependent DNA Translocation." *Genes and Development* 16(16):2120–34.
- Scipioni, Anita, Valeria Cavaliere, Giuseppe Gargiulo, De Santis, and Bruno Samori. 2001. "For the Article "Genomewide Studies of Histone Deacetylase Function in Yeast" by Bradley E. Bernstein, Jeffrey K. Tong, and Stuart L. Schreiber, Which Appeared in Number 25, December 5, 2000, Of." *Pnas* 98(25):5368–69.
- Smolle, Michaela M. 2018. "Chd1 Bends over Backward to Remodel." *Nature Structural and Molecular Biology* 25(1):2–3.
- Sterner, David E., and Shelley L. Berger. 2000. "Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(2):435–59.
- Svaren, John, and Wolfram Hörz. 1997. "Transcription Factors vs Nucleosomes: Regulation of the PHO5 Promoter in Yeast." *Trends in Biochemical Sciences* 22(3):93–97.
- Tang, Liling, Eva Nogales, and Claudio Ciferri. 2010. "Structure and Function of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes and Mechanistic Implications for Transcription." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 102(2–3):122–28.

- Tamarin, (1999) Tamarin: Principles of Genetics, 7. izd., The McGraw–Hill Companies, 443-465.
- Thomas, Jean. 1999. "Histone H1 : Location." *Current Opinion in Cell Biology* 312–17.
- Tsuchiya, E., M. Uno, A. Kiguchi, K. Masuoka, Y. Kanemori, S. Okabe, and T. Mikayawa. 1992. "The *Saccharomyces Cerevisiae* NPS1 Gene, a Novel CDC Gene Which Encodes a 160kDa Nuclear Protein Involved in G2 Phase Control." *EMBO Journal* 11(11):4017–26.
- Tudek, Agnieszka, Tito Candelli, and Domenico Libri. 2015. "Non-Coding Transcription by RNA Polymerase II in Yeast: Hasard or Nécessité?" *Biochimie* 117:28–36.
- VanDemark, Andrew P., Margaret M. Kasten, Elliott Ferris, Annie Heroux, Christopher P. Hill, and Bradley R. Cairns. 2007. "Autoregulation of the Rsc4 Tandem Bromodomain by Gcn5 Acetylation." *Molecular Cell* 27(5):817–28.
- Vidal, M., and R. F. Gaber. 1991. "RPD3 Encodes a Second Factor Required to Achieve Maximum Positive and Negative Transcriptional States in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 11(12):6317–27.
- Vogel, K., W. Hörz, and A. Hinnen. 1989. "The Two Positively Acting Regulatory Proteins PHO2 and PHO4 Physically Interact with PHO5 Upstream Activation Regions." *Molecular and Cellular Biology* 9(5):2050–57.
- Wang, S. S., B. O. Zhou, and J. Q. Zhou. 2011. "Histone H3 Lysine 4 Hypermethylation Prevents Aberrant Nucleosome Remodeling at the PHO5 Promoter." *Molecular and Cellular Biology* 31(15):3171–81.
- Wu, Pei Yun Jenny, Christine Ruhlmann, Fred Winston, and Patrick Schultz. 2004. "Molecular Architecture of the *S. Cerevisiae* SAGA Complex." *Molecular Cell* 15(2):199–208.
- Xu, Zhenyu, Wu Wei, Julien Gagneur, Fabiana Perocchi, Sandra Clauder-Münster, Jurgi Camblong, Elisa Guffanti, Françoise Stutz, Wolfgang Huber, and Lars M. Steinmetz. 2009. "Bidirectional Promoters Generate Pervasive Transcription in Yeast." *Nature* 457(7232):1033–37.
- Ye, Youpi, Hao Wu, Kangjing Chen, Cedric R. Clapier, Naveen Verma, Wenhao Zhang, Haiteng Deng, Bradley R. Cairns, Ning Gao, and Zhucheng Chen. 2019. "Structure of the RSC Complex Bound to the Nucleosome." *Science* 366(6467):838–43.

SAŽETAK

Jurica Ljubas

***Antisense* RNA regulira transkripciju gena *PHO5* putem kromatin-modificirajućih i kromatin-remodelirajućih kompleksa**

Antisense RNA su nekodirajući transkripti koji nastaju inicijacijom transkripcije sa 3' kraja kodirajućeg lanca gena. Njihova je uloga i dalje nedovoljno istražena, međutim na određenim je lokusima pokazano kako njihova stabilizacija negativno regulira razinu transkripcije pripadajućih gena. Također, postoje indikacije da bi takvi transkripti mogli djelovati putem kromatin-modificirajućih i kromatin-remodelirajućih kompleksa. Ovim radom ispitani su mehanizmi regulatornog djelovanja *antisense* RNA, koristeći gen *PHO5* kvasca *S. cerevisiae* kao model. Gen *PHO5* odabran je budući da je na istome prethodno dobro istražen proces modificiranja i remodeliranja strukture kromatina prilikom aktivacije transkripcije, te je uočena stabilizacija *antisense* RNA prilikom inaktivacije ribonukleaze Rrp6, koja inače degradira nekodirajuće transkripte. U ovom je radu pokazano da *PHO5 antisense* RNA regulira ekspresiju gena *PHO5* preko kromatin-modificirajućih kompleksa, putem utjecaja na proces acetilacije histona. Naime, pokazano je da je histon-deacetilaza Rpd3 uključena u mehanizam putem kojeg stabilizacija *PHO5 antisense* RNA djeluje negativno na kinetiku ekspresije gena *PHO5*. Poveznica s procesom acetilacije histona dodatno je potvrđena činjenicom da stabilizacija *PHO5 antisense* RNA nije uzrokovala dodatni negativan učinak na ekspresiju gena *PHO5* u odnosu na inaktivaciju histon-acetiltransferaze Gcn5, koja je u velikoj mjeri zaslužna za modificiranje strukture promotora *PHO5* te je potrebna za fiziološku kinetiku aktivacije transkripcije gena. Također je istraženo međudjelovanje stabilizacije *PHO5 antisense* RNA i inaktivacije kromatin-remodelirajućeg kompleksa RSC, čije podjedinice sadrže bromodomene putem kojih su privučene na promotorske regije gena na kojima su prisutni acetilirani histoni. Pokazano je da stabilizacija *PHO5 antisense* RNA i inaktivacija kompleksa RSC, postignuta Anchor away sustavom za katalitičku podjedinicu Sth1, imaju negativan sinergistički učinak na ekspresiju gena *PHO5*.

Ključne riječi: *antisense* RNA / gen *PHO5* / kromatin-modificirajući kompleksi / kromatin-remodelirajući kompleksi / kvasac *S. cerevisiae*

SUMMARY

Jurica Ljubas

Antisense RNA regulates *PHO5* gene expression via chromatin-modifying and chromatin-remodeling complexes

Antisense RNAs are non-coding transcripts that are made upon transcriptional initiation from the 3' ends of genes. Even though their role remains poorly understood, it has been shown that stabilization of certain asRNAs negatively affects transcription of their corresponding genes. In addition to that, there are indications that such RNAs may regulate gene expression *via* chromatin-modifying and chromatin-remodeling complexes. This work examined the mechanisms of transcriptional regulation through antisense RNAs, using the yeast *S. cerevisiae* *PHO5* gene as a model. *PHO5* gene was chosen because the modifications and remodeling of its chromatin structure are well-studied, accompanied by the fact that an antisense RNA is transcribed at its locus and is stabilized upon inactivation of Rrp6 ribonuclease, which normally degrades non-coding transcripts. Results of this work show that *PHO5* antisense RNA regulates *PHO5* gene expression *via* chromatin-modifying complexes by affecting histone acetylation. Histone-deacetylase Rpd3 is a part of a mechanism by which asRNA negatively affects *PHO5* gene expression kinetics. The link between antisense RNA and histone acetylation was further confirmed when *PHO5* antisense RNA stabilization did not cause an additional negative effect on *PHO5* gene expression compared to inactivation of histone-acetyltransferase Gcn5, which is the major histone-acetyltransferase acting at the *PHO5* promoter. Furthermore, the interplay between stabilization of *PHO5* antisense RNA and RSC remodeling complex was studied, considering that subunits of RSC complex contain bromodomains by which this complex is recruited to acetylated histones at the *PHO5* gene promoter. This work shows that simultaneous stabilization of *PHO5* antisense RNA and inactivation of RSC complex, achieved using the Anchor away technique for its catalytic subunit Sth1, have a negative synergistic effect on *PHO5* gene expression.

Key words: antisense RNA / *PHO5* gene / chromatin-modifying complexes / chromatin-remodeling complexes / yeast *S. cerevisiae*