

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ana Novačić

**Ključna uloga Arp podjedinica u regulaciji aktivnosti  
kromatin-remodelirajućih kompleksa u kvascu  
*Saccharomyces cerevisiae***

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. emeritusa dr. sc. Slobodana Barbarića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016/2017.

# SADRŽAJ RADA

UVOD .....	1
1. Nukleosom – represor transkripcije .....	1
1.1. Regulacija transkripcije putem remodeliranja strukture kromatina promotora.....	1
2. Kromatin-remodelirajući proteinski kompleksi.....	2
2.1. Kromatin-remodelirajući kompleksi porodice SWI/SNF kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : struktura i funkcije .....	3
3. Porodica PHO gena kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
3.1. Regulacija transkripcije gena <i>PHO5</i> .....	9
3.2. Promotor gena <i>PHO5</i> – paradigma za regulaciju transkripcije putem remodeliranja strukture kromatina promotorske regije.....	11
3.3. Remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO8</i> .....	12
OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	14
MATERIJAL I METODE .....	15
1. Materijal.....	15
1.1. Sojevi kvasca .....	15
1.2. Sojevi bakterija.....	16
1.3. Plazmidi.....	16
1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca .....	16
1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterija .....	17
1.6. Kemikalije i enzimi.....	18
1.7. Otopine.....	18
2. Metode .....	21
2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i> .....	21
2.2. Izolacija plazmidne DNA iz <i>E. coli</i> (midiprep) .....	21
2.3. Transformacija kvasca litij acetatnom metodom .....	21
2.4. Izolacija genomske DNA kvasca.....	22
2.5. Gel elektroforeza.....	23
2.6. Lančana reakcija polimerazom .....	23
2.7. Mjerenje aktivnosti enzima kisele fosfataze u suspenziji stanica kvasca .....	23
2.8. Izolacija jezgri stanica kvasca.....	24

2.9. Analiza remodeliranja strukture kromatina digestijom restrikcijским enzimima .....	25
2.10. Southern blot .....	26
REZULTATI.....	29
1. Aktivnost proteina Arp9 potrebna je za aktivaciju transkripcije gena <i>PHO5</i> .....	29
1.1. Izostanak aktivacije transkripcije gena <i>PHO5</i> u stanicama mutanta <i>arp9<sup>ts</sup></i> nije posljedica slabijeg indukcijskog signala .....	32
1.2. Pojačanje aktivacijskog potencijala promotora <i>PHO5</i> prekomjernom ekspresijom aktivatora transkripcije Pho4 ne može nadomjestiti negativan učinak inaktivacije proteina Arp9.....	34
2. Inaktivacija proteina Arp9 sprječava remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO5</i> .....	36
2.1. Prekomjerna ekspresija aktivatora Pho4 omogućuje djelomično otvaranje strukture kromatina promotora <i>PHO5</i> u stanicama mutanta <i>arp9<sup>ts</sup></i> .....	37
3. Inaktivacija proteina Arp9 onemogućava potpuno remodeliranje strukture kromatina promotora <i>PHO8</i> .....	39
RASPRAVA.....	41
ZAKLJUČCI.....	45
ZAHVALE .....	46
POPIS LITERATURE.....	47
SAŽETAK.....	55
SUMMARY .....	56

# UVOD

## 1. Nukleosom – represor transkripcije

Ekspresija gena ključan je stanični proces u kojemu se uputa zapisana u slijedu nukleotida DNA preko RNA intermedijera prevodi u slijed aminokiselinskih ostataka u proteinskom lancu, koji se smata u specifičnu trodimenzionalnu konformaciju iz koje proizlazi njegova biološka funkcija. Proces ekspresije gena najčešće je reguliran na razini prvog koraka – transkripcije gena.

Fundamentalna razlika u regulaciji procesa transkripcije kod eukariotskih u odnosu na prokariotske stanice proizlazi iz činjenice da je DNA eukariota omotana oko histonskih proteina, odnosno nalazi se u strukturi kromatina. Osnovna ponavljajuća strukturna jedinica kromatina je nukleosom, kojeg čine 146 parova baza DNA omotanih oko oktamera histonskih proteina H2A, H2B, H3 i H4 (Kornberg i Lorch, 1999). Čvrsta interakcija negativno nabijene DNA s pozitivno nabijenim proteinima histonima onemogućuje vezanje drugih proteina na DNA, zbog čega struktura kromatina djeluje represivno na generalnoj razini te utječe i na sve ostale procese koji uključuju interakcija proteina i DNA, kao što su replikacija, rekombinacija i popravak DNA. Remodeliranje strukture kromatina, pri čemu se histoni pomiču, uklanjaju ili modificiraju, preduvjet je za vezanje nehistskih proteina na regije DNA prekrivene nukleosomima.

### 1.1. Regulacija transkripcije putem remodeliranja strukture kromatina promotora

Obzirom na arhitekturu strukture kromatina promotora, u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* razlikujemo dva tipa promotorskih regija. Promotori gena koji se transkribiraju konstitutivno tipično su „otvoreni“ promotori koji sadrže regiju slobodne DNA (NFR, *Nucleosome Free Region*) duljine oko 200 parova baza, okruženu precizno pozicioniranim nukleosomima (Yuan i sur., 2005). Opći transkripcijski faktori i RNA polimeraza II slobodno se vežu na NFR i dovode do inicijacije transkripcije.

Suprotno tome, promotori inducibilnih gena pripadaju u skupinu „zatvorenih“ promotora koji su uglavnom prekriveni represivnim nukleosomima. Kraće regije slobodne DNA između nukleosoma na zatvorenim promotorima sadrže mjesta za vezanje tzv. „pionirskih“ transkripcijskih faktora (PTF, *Pioneer Transcription Factors*), to jest specifičnih aktivatora transkripcije (Peper i Dahl, 2015). Primarna uloga ovih proteina je privlačenje kromatin-modificirajućih i -remodelirajućih proteinskih kompleksa na područje promotora. Kromatin-modificirajući kompleksi kataliziraju kovalentne modifikacije aminokiselinskih ostataka na amino-krajevima histonskih proteina. Ove modifikacije same ne dovode do potpunog remodeliranja strukture kromatina, ali ga olakšavaju na dva načina. Prvo, neutralizacija pozitivnog naboja lizinskih ostataka acetilacijom oslabljuje interakcije modificiranog histona s DNA i, drugo, modificirani aminokiselinski ostatci predstavljaju supstrat za vezanje drugih, kromatin-remodelirajućih proteinskih kompleksa (Fischle i sur., 2003). Kromatin-remodelirajući kompleksi, ATP-aze koje dovode do disocijacije nukleosoma (vidi iduće poglavlje), često sadrže domene preko kojih se specifično vežu na kovalentno modificirane aminokiselinske ostatke histonskih proteina, koji predstavljaju epigenetičke oznake (Taverna i sur., 2007). Proces remodeliranja kromatina promotorske regije dovodi do pomicanja nukleosoma (mehanizam *sliding in cis*), disocijacije nukleosoma (mehanizam *eviction in trans*) ili zamjene pojedinih histona unutar oktamera inačicama koje uvjetuju drugačiju strukturu nukleosoma (Eberharter i Becker, 2004). Regulatorna mjesta na području promotorske regije gena nakon remodeliranja kromatina postaju slobodna za vezanje proteina transkripcijske mašinerije, čime je omogućena aktivacija transkripcije.

## **2. Kromatin-remodelirajući proteinski kompleksi**

Kromatin-remodelirajući proteinski kompleksi koriste energiju hidrolize ATP-a za translokaciju nukleosomalne DNA, pri čemu dolazi do pomicanja, izbacivanja ili restrukturiranja nukleosoma (Clapier i Cairns, 2009). Ovi proteinski kompleksi evolucijski su očuvani te kod svih eukariota razlikujemo četiri porodice kromatin-remodelirajućih kompleksa: SWI/SNF, ISWI, CHD i INO80. Katalitička ATP-azna podjedinica pojedinog kompleksa pokazuje visoku razinu homologije unutar porodice, a kompleksi se razlikuju po ostalim podjedinicama, od kojih neke dolaze kao moduli, čija se funkcija manifestira putem protein-protein ili protein-DNA interakcija (Tang i sur., 2010). Kooperativna aktivnost svih modula

pojednog kompleksa određuje specifičnu remodelirajuću aktivnost kompleksa, iz čega proizlaze različite uloge ovih kompleksa u remodeliranju strukture kromatina pri određenom staničnom procesu ili na određenom području genoma (Clapier i Cairns, 2009).

## 2.1. Kromatin-remodelirajući kompleksi porodice SWI/SNF kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: struktura i funkcije

Porodica kromatin-remodelirajućih kompleksa SWI/SNF (*Switching defective/Sucrose Non-Fermenting*) kod većine eukariotskih organizama obuhvaća dva oligoproteinska kompleksa koji se razlikuju u većem broju podjedinica, uključujući i katalitičku, a sadrže i neke zajedničke podjedinice. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* unutar ove porodice razlikujemo komplekse SWI/SNF i RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*), čije su podjedinice prikazane u tablici 1.

**Tablica 1.** Podjedinice kromatin-remodelirajućih kompleksa porodice SWI/SNF kvasca *S. cerevisiae*.

\*katalitička podjedinica kompleksa ‡podjedinice koje ulaze u sastav Arp modula, prilagođeno prema Tang i sur., 2010.

Kompleks	SWI/SNF	RSC
	Swi2/Snf2*	Sth1*
<b>Homologne podjedinice</b> (u istome redu)	Swi3	Rsc8/Swh3
	Swp73	Rsc6
	Snf5	Sfh1
	(Arp7,9, Rtt102)‡	
<b>Specifične podjedinice</b>	Swi1/Adr6, Swp82, Taf14, Snf6, Snf11	Rsc1/2,3,4,5,7,9,10,30, Htl1, Ldb7

Katalitička podjedinica svakog kompleksa porodice SWI/SNF uz ATP-aznu domenu sadrži i domenu HSA (*Helicase-SANT-Associated*), na amino-kraju, i bromodomenu na karboksi-kraju proteina. Preko HSA domene katalitička podjedinica pojedinog kompleksa stupa u interakcije s Arp modulom (Szerlong i sur., 2008). U stanicama kvasca ovaj se modul sastoji od proteina Arp7, Arp9 i Rtt102. Katalitička podjedinica preko svoje bromodomene stupa u interakcije s acetiliranim ostacima lizina histonskih proteina. Određeni kompleksi ove porodice sadrže dodatne bromodomene, koje mogu biti dio iste podjedinice (tzv.

polibromodomene) ili različitih podjedinica. Tijekom aktivacije transkripcije pojedinih gena, djelovanjem enzima histon-acetiltransferaza dolazi do hiperacetilacije ostataka lizina histonskih proteina na području promotora, te se remodelirajući kompleksi porodice SWI/SNF preko svojih bromodomena stabilnije učvršćuju na području promotora (Hassan i sur., 2002).

Kompleks RSC u svom sastavu ima dvije podjedinice, Rsc3 i Rsc30, preko kojih se veže na specifične sekvence DNA koje se nalaze oko 100 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije gena (Badis i sur., 2008), što je bio prvi pokazani primjer kromatin-remodelirajućeg kompleksa koji je privučen na područje promotorske regije preko domene koja se veže na DNA, a ne putem protein-protein interakcija s drugim proteinima uključenim u proces aktivacije transkripcije ili putem epigenetičkih oznaka.

### **2.1.1. Uloga proteina srodnih aktinu u regulaciji aktivnosti kromatin-remodelirajućih kompleksa**

Porodica proteina srodnih aktinu (*Actin-Related Proteins*, ARPs) u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* obuhvaća 10 proteina, Arp1-Arp10, imenovanih redoslijedom od najvećeg (Arp1) do najmanjeg (Arp10) stupnja homologije s aktinom (Poch i Winsor, 1997). Strukturna sličnost ovih proteina s aktinom uglavnom je ograničena na središnju regiju, koja je kod aktina odgovorna za vezanje i hidrolizu ATP-a. Značajnije su razlike u vanjskim regijama, koje kod aktina služe polimerizaciji i za interakcije s drugim proteinima, poput miozina i tropomiozina (Kabsch i Holmes, 1995). Unatoč strukturnoj sličnosti aktinu, za neke od ovih proteina (Arp7 i Arp9) pokazano je da ne mogu vezati i hidrolizirati ATP (Cairns i sur., 1998).

Proteini Arp1-Arp3 te Arp10 uglavnom su lokalizirani u citoplazmi, a ostali se nalaze u jezgri stanice (Poch i Winsor, 1997). Funkcija proteina srodnih aktinu koji se nalaze u jezgri slabo je istražena te se pretpostavlja da imaju uloge u regulaciji procesa koji se odvijaju u jezgri, kao što su segregacija kromosoma tijekom mitoze, popravak DNA i transkripcija gena (Belin i Mullins, 2013; Minoda i sur., 2005). Monomeri aktina i proteini srodni aktinu dolaze kao strukturne regulatorne podjedinice određenih kompleksa koji kataliziraju kovalentne preinake histona, kao što je acetilacija (NuA4 histon-acetiltransferaza), i kromatin-remodelirajućih kompleksa (INO80, SWR1, SWI/SNF i RSC) u kvascu



*Saccharomyces cerevisiae* (Galarneau i sur., 2000; Shen i sur., 2003; Krogan i sur., 2003; Cairns i sur., 1998), vidi tablicu 2.

**Tablica 2.** Pregled proteinskih kompleksa uključenih u proces remodeliranja strukture kromatina u kvascu *S. cerevisiae* koji sadrže aktin i/ili proteine srodne aktinu kao podjedinice. Prevedno iz Dion i sur., 2010.

Proteinski kompleks	Puno ime	Katalitička podjedinica	Aktin/proteini srodni aktinu sadržani u kompleksu
<b>NuA4</b>	Nucleosome acetyltransferase of H4	Esa1	aktin, Arp4
<b>INO80</b>	Inositol requiring mutant 80	Ino80	aktin, Arp4, Arp5, Arp8
<b>SWR1</b>	Sick with Rat8 <sup>ts</sup>	Swr1	aktin, Arp4, Arp6
<b>SWI/SNF</b>	Switching defective/Sucrose Non-Fermenting	Snf2	Arp7, Arp9
<b>RSC</b>	Remodels the Structure of Chromatin	Sth1	Arp7, Arp9

Arp moduli stupaju u interakcije s HSA domenom katalitičke ATP-azne podjedinice pojedinog kromatin-remodelirajućeg kompleksa (Szerlong i sur., 2008) te tako mogu regulirati njenu aktivnost. Uloga proteina srodnih aktinu u regulaciji aktivnosti remodelirajućih kompleksa eksperimentalno je utvrđena za kompleks INO80, budući da su mutanti *arp5* i *arp8* pokazivali fenotipske karakteristike tipične za mutante *ino80*. Biokemijskim istraživanjima *in vitro* pokazano da je u odsustvu proteina Arp5 i Arp8 kompleks INO80 gotovo u potpunosti izgubio ATP-aznu aktivnost i sposobnost vezanja na DNA (Shen i sur., 2003). Suprotno tome, ATP-azna aktivnost kompleksa RSC *in vitro* nije u potpunosti ovisila o proteinima Arp7 i Arp9, koji se u kompleks ugrađuju kao heterodimer i esencijalni su za vijabilnost stanice (Szerlong i sur., 2003; Lobsiger i sur., 2014). Grupa B. R. Cairnsa pokazala je da odsutnost proteina Arp7, odnosno Arp9 u RSC-u smanjuje ATP-aznu aktivnost dva puta u odnosu na nativni kompleks (Szerlong i sur., 2008). Ista grupa nedavno je detaljnije ispitala ulogu modula Arp7/9, koji se sastoji od dimera Arp7/9 i proteina Rtt102 koji uzrokuje promjenu konformacije dimera čineći je kompaktnijom (Turegun i sur., 2013). Pokazano je da dodatak ovog modula katalitičkoj podjedinici Sth1 rezultira povećanom učinkovitošću procesa translokacije DNA, koja uz dovoljno visoku ATP-aznu aktivnost omogućuje pomicanje te, u konačnici, izbacivanje nukleosoma s DNA (Clapier i sur., 2016). Također, kompleks RSC koji nije sadržavao modul Arp7/9 imao je značajno smanjenu sposobnost klizanja nukleosoma te je u potpunosti

izgubio mogućnost uklanjanja histona s DNA. Nadalje, nađeno je da se mutacije koje omogućuju supresiju *arp* fenotipa grupiraju u dvjema regijama katalitičke podjedinice kompleksa RSC, Sth1: u tzv. post-HSA domeni, koja se nalazi neposredno pokraj HSA domene koja veže modul Arp7/9, te u subdomeni ATP-azne domene nazvanoj Protrusion 1. Daljnjim genetičkim i biokemijskim eksperimentima utvrđena je negativna uloga domene post-HSA i pozitivna uloga subdomene Protrusion 1 u regulaciji remodelirajuće aktivnosti kompleksa RSC (Clapier i sur., 2016). U skladu s rezultatima istraživanja s kompleksom RSC, nedavno je utvrđena uloga ovih domena i u mehanizmu djelovanja kompleksa SWI/SNF (Liu i sur., 2017).

### **2.1.2. Kompleks RSC – jedini kromatin-remodelirajući kompleks esencijalan za vijabilnost kvasca**

Kompleks RSC je u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prisutan u oko 10 puta višoj koncentraciji nego ostali kromatin-remodelirajući kompleksi (Ghaemmaghami i sur., 2003) i jedini je kromatin-remodelirajući kompleks koji je esencijalan za rast stanica kvasca, budući da je njegova aktivnost neophodna za prelazak iz G2 u M fazu staničnog ciklusa (Tsuchiya i sur., 1992). Nađeno je da kompleks RSC postoji u dvije izoforme koje se razlikuju samo po prisutnosti podjedinice Rsc1 ili Rsc2, pri čemu je 90% RSC-a u stanici u obliku izoforme koja sadrži Rsc2 (Cairns i sur., 1999). Pojedinačna inaktivacija proteina Rsc1 ili Rsc2 nije letalna, no njihova kombinirana inaktivacija ima letalan fenotip (Cairns i sur., 1999), iz čega slijedi da izoforme RSC-a imaju barem neke preklapajuće funkcije. Pokazana su i brojne specifične funkcije izoformi RSC-a. Na primjer, oba kompleksa sudjeluju u popravku dvolančanog loma DNA, ali u različitim fazama tog procesa (Chambers i sur., 2012), a nedavno je pokazano da samo kompleks koji sadrži podjedinicu Rsc1 ima ulogu u indukciji procesa autofagije (Yu i sur., 2015).

Brojna *in vivo* i *in vitro* istraživanja govore u prilog značajnoj ulozi kromatin-remodelirajuće aktivnosti kompleksa RSC u procesu transkripcije gena (Lorch i Kornberg, 2015). Na razini genoma je pokazana lokalizacija kompleksa RSC na oko 10% kvašćevih promotora (Ng i sur., 2002). Inaktivacija katalitičke

podjedinice kompleksa RSC, Sth1, rezultira generalnom represijom transkripcije (Parnell i sur., 2008). Aktivnost kompleksa RSC implicirana je i u pozicioniranju nukleosoma te održavanju regija slobodne DNA na području promotorskih regija gena transkripciju kojih katalizira RNA polimeraza III, gdje je njegova inaktivacija dovela do značajno povećane gustoće nukleosoma. Inaktivacija katalitičke podjedinice kompleksa RSC nema jednako dramatičan utjecaj na pozicioniranje nukleosoma na području promotora gena koji se transkribiraju RNA polimerazom II, gdje dolazi samo do promjena u položaju pojedinačnih nukleosoma (Parnell i sur., 2008). Inaktivacija podjedinice Rsc3, preko koje se kompleks RSC veže na specifične sekvence DNA, također dovodi do povećanja gustoće nukleosoma na područjima promotora koje sadrže mjesto vezanja ove podjedinice (Badis i sur., 2008). Mogućnost kompleksa RSC za stvaranje i održavanje regija slobodne DNA nedavno je jasno pokazana eksperimentima *in vitro* na razini genoma. Kromatin je rekonstituiran spontanom asocijacijom pročišćene DNA i histona, nakon čega su u sustav dodani pojedini kromatin-remodelirajući kompleksi. Jedino je kompleks RSC doveo do stvaranja regija slobodne DNA koje su uglavnom odgovarale onima koje nalazimo *in vivo*. Pretpostavlja se da kompleks RSC prepoznaje regije bogate sekvencom poli(dA:dT) na području promotora (Krietenstein i sur., 2016).

Zbog esencijalne uloge kompleksa RSC u diobi stanica, postoji mali broj istraživanja u kojima je ispitana uloga ovog kompleksa *in vivo* na pojedinačnom promotoru. Pokazana je bitna uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora i posljedično aktivaciji transkripcije gena *PHO5* (Musladin i sur., 2014) te skupine *heat shock* gena (Erkina i sur., 2010). Ustanovljena je i specifična uloga kompleksa RSC na promotoru gena *GAL1/10*, gdje je RSC, neovisno o uvjetima represije ili indukcije, vezan na nukleosom kojega održava u djelomično remodeliranom stanju. Unutar ovog „mininukleosoma“, za kojeg je utvrđeno da obuhvaća DNA od samo 130 parova baza, nalazi se mjesto vezanja aktivatora Gal4, koje je zbog aktivnosti kompleksa RSC dostupnije za vezanje te je omogućena fiziološka kinetika aktivacije promotora (Floer i sur., 2010). Za razliku od kromatin-remodelirajuće aktivnosti kompleksa RSC pri aktivaciji transkripcije, aktivnost RSC-a je na području promotora gena *CHA1* potrebna za održavanje zatvorene strukture kromatina u uvjetima represije (Moreira i Holmberg, 1999). Također, postoje indicije da bi kompleks RSC mogao sudjelovati u pozicioniranju nukleosoma na području promotora *PHO8* u uvjetima represije (Wippo i sur., 2011).

### 2.1.3. Kompleks SWI/SNF

Kompleks SWI/SNF bio je prvi otkriveni kompleks istoimene porodice, pri čemu je pokazana njegova ključna uloga u procesima promjene tipa parenja kvasca i iskorištavanja saharoze kao izvora ugljika (Tang i sur., 2010). Kao što je utvrđeno i za kompleks RSC, kromatin-remodelirajuća aktivnost kompleksa SWI/SNF može doprinijeti aktivaciji ili represiji transkripcije pojedinog gena. Tako ovaj kompleks sudjeluje u aktivaciji transkripcije gena *PHO8* (Gregory i sur., 1999) i *PHO5* (Barbaric i sur., 2007) te u represiji transkripcije gena *SER3* (Martens i Winston, 2002).

Nedavna istraživanja utjecanja inaktivacije pojedinačnih podjedinica kompleksa SWI/SNF na sklapanje ovog oligoproteinskog kompleksa, kao i na remodelirajuću aktivnost (Dutta i sur., 2017; Sen i sur., 2017), bila su potaknuta činjenicom da su u oko 20% ljudskih tumora otkrivene mutacije u barem jednoj od podjedinica ljudskih homologa ovog kompleksa (Caudle i sur., 2016). Pokazano je da podjedinica Snf5 stupa u interakcije s katalitičkom ATP-aznom podjedinicom Snf2, pri čemu pozitivno djeluje na regulaciju kromatin-remodelirajuće aktivnosti kompleksa (Sen i sur., 2017). Također, utvrđena je podjela kompleksa SWI/SNF na četiri modula: (1) katalitički modul (Snf2/11) (2) Arp modul (Arp7/9, Rtt102) (3) Snf5/Swi3 modul podijeljen na submodule Snf6,12-Swi3 i Snf5-Swp82-Taf14 te (4) Swi1 modul. Inaktivacija pojedinog proteina ili modula dovodi do sklapanja aberantnog kompleksa SWI/SNF i globalnih promjena u ekspresiji gena (Dutta i sur., 2017).

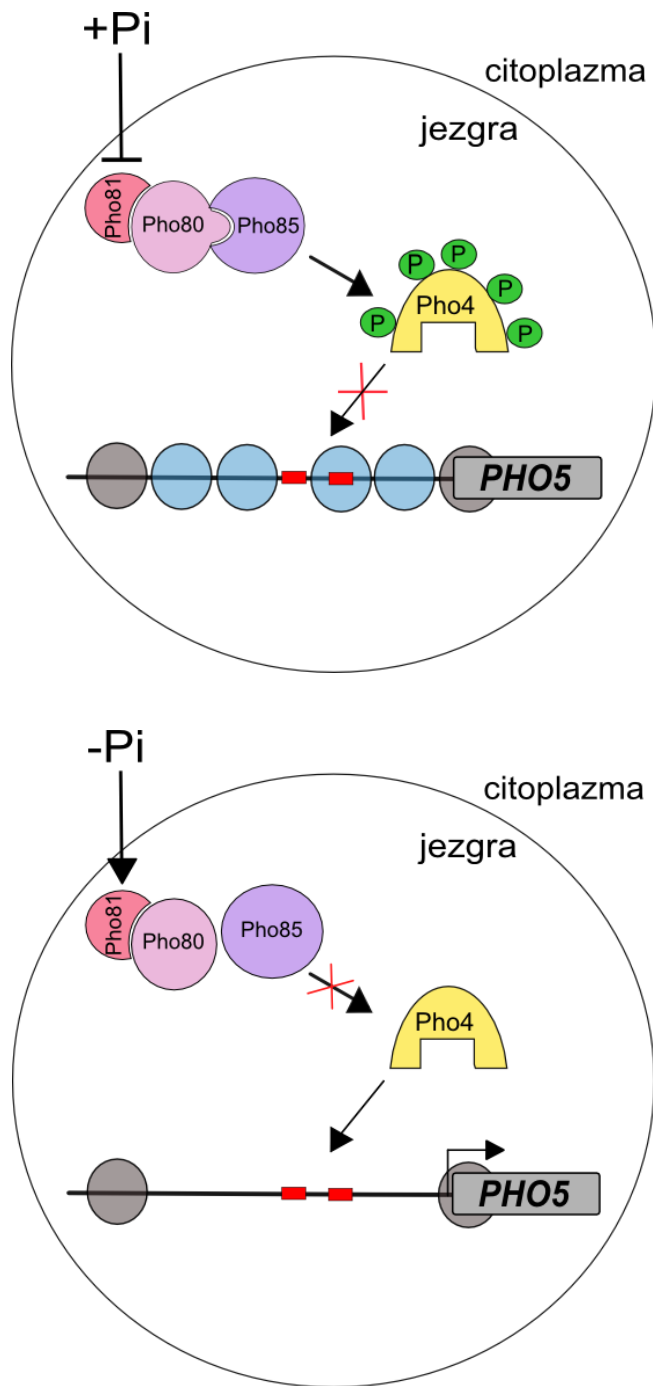
## 3. Porodica PHO gena kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Regulacijski sustav gena čija se transkripcija regulira ovisno o koncentraciji staničnog fosfata (PHO geni) kvasca *Saccharomyces cerevisiae* obuhvaća 20-ak gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u staničnom transportu i metabolizmu fosfata. Tijekom uzgoja stanica u mediju koji sadrži dovoljno visoku koncentraciju fosfata, transkripcija PHO gena je reprimirana, a nedostatak izvanstaničnog fosfata dovodi do indukcije transkripcije ovih gena putem PHO signalnog puta. PHO signalni put dovodi do aktivacije specifičnog aktivatora Pho4 i posljedično do transkripcije PHO gena (Fascher i sur., 1990).

### 3.1. Regulacija transkripcije gena *PHO5*

Aktivator transkripcije Pho4 konstitutivno se sintetizira, neovisno o dostupnosti fosfata (Wykoff i O'Shea, 2001), a njegova aktivnost u procesu inicijacije transkripcije regulira se višestrukim mehanizmima. U uvjetima represije, to jest pri dovoljnoj koncentraciji fosfata (+P<sub>i</sub>), aktivan je kompleks ciklina i ciklin-ovisne kinaze Pho80-Pho85, koja višestruko fosforilira aktivator Pho4. Fosforilacija različitih ostataka serina proteina Pho4 onemogućava interakcije s koaktivatorom Pho2, omogućuje eksport proteina Pho4 iz jezgre u citosol i blokira njegov ponovni transport u jezgru, te je posljedično onemogućena aktivacija transkripcije gena *PHO5* (Komeili i O'Shea, 1999). U uvjetima indukcije, to jest kod nedostatka fosfata (-P<sub>i</sub>), dolazi do aktivacije regulatornog proteina Pho81 koji inaktivira kompleks Pho80-Pho85 (Schneider i sur., 1994), što je pokazano na slici 1. Ne dolazi do fosforilacije proteina Pho4 te se aktivator Pho4 zadržava u jezgri stanice, gdje se veže na sekvence DNA specifičnog slijeda nukleotida, UASp (*Upstream Activating Sequence phosphate*), u promotorskim regijama. Koaktivator Pho2 potreban za je stabilno vezanje, odnosno pojačavanje aktivacijskog potencijala aktivatora Pho4 (Barbarić i sur., 1996; Barbaric i sur., 1998). Za razliku od proteina Pho4, koji je specifični aktivator transkripcije gena *PHO5* i drugih *PHO* gena, protein Pho2 je pleiotropni aktivator uključen u aktivaciju transkripcije brojnih drugih gena, kao što su *HIS4*, *TRP4*, *ADE2*, *CYC1* i *HO* (Liu i sur., 2000).

Preduvjet za aktivaciju transkripcije inducibilnih gena je remodeliranje strukture kromatina promotora. U uvjetima represije, regulatorne sekvence na području promotora, kao i mjesto početka transkripcije (TSS, *Transcription Start Site*), prekriveni su karakteristično pozicioniranim nukleosomima, što sprječava vezanje proteina uključenih u inicijaciju transkripcije, kao što specifični i opći transkripcijski faktori i RNA polimeraza, na promotor. Tijekom aktivacije transkripcije gena dolazi do vezanja aktivatora na UASp mjesta koja se nalaze u kratkim regijama slobodne DNA između nukleosoma. Aktivator Pho4 svojom aktivacijskom domenom stupa u interakcije s kromatin-modificirajućim i kromatin-remodelirajućim kompleksima, koji dovode do lokalnog remodeliranja strukture kromatina na području promotora. Pri tome dolazi do pomicanja ili uklanjanja histona s promotora, čime regulatorne DNA sekvence dotad prekrivene nukleosomima postaju slobodne za vezanje aktivatora ili transkripcijske mašinerije te je omogućena inicijacija transkripcije.



**Slika 1.** Mehanizam regulacije aktivacije transkripcije gena *PHO5* u ovisnosti o koncentraciji fosfata: uvjeti represije (visoka koncentracija fosfata, +P<sub>i</sub>) i indukcije (nedostatak fosfata, -P<sub>i</sub>). Nukleosomi obojeni plavo podliježu remodeliranju u uvjetima indukcije, a obojeni sivo ne podliježu. Prilagođeno prema Korber i Barbaric, 2014.

### 3.2. Promotor gena *PHO5* – paradigma za regulaciju transkripcije putem remodeliranja strukture kromatina promotorske regije

Gen *PHO5* kodira za izoenzim nespecifične kisele fosfataze Pho5, koja djeluje kao fosfomonoesteraza u periplazmatskom prostoru kvasca. Promotor gena *PHO5* bio je prvi i do danas je najbolje istražen model za istraživanje regulacije transkripcije putem remodeliranja strukture kromatina promotorske regije (Korber i Barbaric, 2014). U uvjetima represije (+P<sub>i</sub>) područje promotora *PHO5* prekriveno je s 4 nukleosoma (vidi sliku 1), pri čemu se između nukleosoma -2 i -3 nalazi kratka regija slobodne DNA duljine oko 70 parova baza unutar koje se nalazi mjesto vezanja aktivatora Pho4, UASp1 (Almer i sur., 1986). S druge strane, mjesto UASp2 je u uvjetima represije prekriveno nukleosomom -2 te zato nije dostupno za vezanje aktivatora (Venter i sur., 1994). TATA element i mjesto početka transkripcije prekriveni su nukleosomom -1. U uvjetima indukcije dolazi do ekstenzivnog remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*, pri čemu dolazi do disocijacije većine nukleosoma promotorske regije (Boeger i sur., 2008). Aktivator Pho4 tada se veže i na mjesto UASp2 te dolazi do vezanja općih transkripcijskih faktora i RNA polimeraze na promotor, čime je omogućena inicijacija transkripcije.

Jaka regulacija i ekstenzivno remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5*, u kombinaciji s postojanjem relativno jednostavnih metoda za praćenje razine aktivacije transkripcije i remodeliranja kromatina ovog promotora, čine ga atraktivnim modelom za istraživanje povezanosti regulacije transkripcije i remodeliranja strukture kromatina promotorske regije (Korber i Barbaric, 2014). Korištenja promotora *PHO5*, kao i drugih gena PHO porodice, kao modelnog sustava utvrđeni su neki od općih principa u ovom području istraživanja. Tako je pokazano da je remodeliranje kromatina promotora preduvjet, a ne posljedica transkripcije gena (Fascher i sur., 1993), te da do remodeliranja kromatina dolazi i u odsutnosti replikacije DNA (Schmid i sur., 1992). Također, na primjeru promotora *PHO5* prvi put je *in vivo* pokazan mehanizam remodeliranja kromatina *in trans*, pri kojem se histoni uklanjaju s DNA (Reinke i Hörz, 2003; Korber i sur., 2004; Boeger i sur., 2004). Na primjeru promotora *PHO5* po prvi put je pokazano kooperativno djelovanje više kromatin-remodelirajućih kompleksa u remodeliranju strukture kromatina na području istog promotora (Barbaric i sur., 2007; Musladin i sur., 2014), što je također kasnije nađeno na primjerima promotora gena u stanicama viših eukariota (Morris i sur., 2014).

Tako je sada poznato da u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5* sudjeluje pet kompleksa iz sve četiri porodice kromatin-remodelirajućih kompleksa kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Pojedinačna inaktivacija kompleksa SWI/SNF i INO80 te istovremena inaktivacija kompleksa Isw1 i Chd1 imale su utjecaj samo na kinetiku remodeliranja kromatina *PHO5*, ali ne i na krajnju razinu remodeliranja kromatina u uvjetima fiziološke indukcije, čime je pokazano kooperativno djelovanje tih kompleksa u navedenom procesu (Barbaric i sur., 2007). Obzirom da je kompleks RSC esencijalan za vijabilnost, odnosno rast stanica (Cairns i sur., 1996), zbog čega nije moguće koristiti delecijske mutante, istraživanja uloge kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora *PHO5* provedena su tek nedavno. Korištene su stanice mutanta *sth1<sup>td</sup>* u kojima dolazi do sinteze temperaturno-osjetljive inačice katalitičke podjedinice kompleksa RSC, *Sth1<sup>td</sup>*, koja se inaktivira pri restriktivnoj temperaturi (37°C), čime se postiže inaktivacija kompleksa RSC. Remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5* u uvjetima indukcije pri restriktivnoj temperaturi u stanicama mutanta *sth1<sup>td</sup>* bilo je znatno sporije, ali nakon produžene indukcije došlo je do potpunog otvaranja strukture kromatina (Musladin i sur., 2014). Međutim, potpunija inaktivacija kompleksa RSC postignuta je sa stanicama mutanta *rsc2 sth1<sup>td</sup>* u kojima je izoforma kompleksa RSC, koja sadrži podjedinicu Rsc2 i čini 90% kompleksa RSC (Cairns i sur., 1999), inaktivirana delecijom gena *RSC2*, a druga izoforma inaktivira se inaktivacijom katalitičke podjedinice *Sth1<sup>td</sup>*. U stanicama dvostrukog mutanta *rsc2 sth1<sup>td</sup>* uopće ne dolazi do remodeliranja strukture kromatina i posljedično do aktivacije transkripcije gena *PHO5*, čime je jasno pokazana kritična uloga kompleksa RSC u tom procesu (Musladin, 2014). Time je utvrđeno da od pet kromatin-remodelirajućih kompleksa koji sudjeluju u remodeliranju kromatina promotora *PHO5* jedino kompleks RSC ima nezamjenjivu ulogu.

### **3.3. Remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8***

Gen *PHO8* kodira za nespecifičnu alkalnu fosfatazu Pho8, glikoprotein koji u vakuoli sudjeluje u hidrolizi unutarstaničnih rezervi fosfata (Donella-Deana i sur., 1993). Aktivnost promotora *PHO8*, kao i promotora *PHO5*, regulira se ovisno o dostupnosti fosfata putem remodeliranja strukture kromatina (Barbaric i sur., 1992). U uvjetima represije (+P<sub>i</sub>) područje promotora *PHO8* prekriveno je nukleosomima, pri čemu se između nukleosoma -3 i -4 nalazi kratka regija slobodne DNA koja sadrži UASp2, mjesto vezanja



aktivatora Pho4. Remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* dovodi do djelomičnog uklanjanja nukleosoma s promotora, čime je omogućeno vezanje transkripcijske mašinerije te posljedično aktivacija transkripcije gena *PHO8*. Remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8* u uvjetima indukcije nije efikasno kao remodeliranje kromatina promotora *PHO5*, budući da određene regije promotora *PHO8* i nakon remodeliranja pokazuju relativno nisku razinu dostupnosti DNA za cijepanje restriktivnim enzimima, što se pripisuje destabiliziranim nukleosomima koji su još uvijek prisutni na promotoru (Barbaric i sur., 1992). Također je utvrđeno da se samo jedno od dva potencijalna mjesta vezanja aktivatora Pho4 na području promotorske regije gena *PHO8* koristi *in vivo*, što može objasniti nižu razinu aktivacije transkripcije gena *PHO8* u odnosu na gen *PHO5* (Munsterkötter i sur., 2000). U uvjetima represije struktura kromatina promotora *PHO8* djelomično je otvorena (oko 40%; Barbarić i sur., 1992). Zanimljivo je da, unatoč tome da aktivaciju transkripcije gena *PHO5* i *PHO8* pokreće protein Pho4, proces remodeliranja strukture kromatina ovih promotora zahtijeva aktivnost različitih kromatin-remodelirajućih kompleksa. U procesu remodeliranja kromatina promotora *PHO8* pri indukciji gena kritično je potrebna aktivnost kompleksa SWI/SNF (Gregory i sur., 1999) i u značajnoj mjeri aktivnost kompleksa INO80 (Barbaric i sur., 2007), dok pod ovim uvjetima kompleks RSC ne sudjeluje u remodeliranju kromatina ovog promotora (Musladin i sur., 2014). U literaturi postoje i rezultati koji ukazuju na ulogu kromatin-remodelirajućeg kompleksa RSC u pozicioniranju nukleosoma na području promotora *PHO8* u uvjetima represije (Wippo i sur., 2011). Međutim, u dva rada u kojima su analizirani položaji nukleosoma na razini genoma nakon inaktivacije kompleksa RSC, za lokus *PHO8* su dobiveni oprečni rezultati (Badis i sur., 2008; Parnell i sur., 2008), tako da potencijalna uloga ovog kompleksa na području promotora *PHO8* nije razjašnjena. Različiti zahtjevi za aktivnosti kromatin-remodelirajućih kompleksa na područjima promotora *PHO5* i *PHO8* objašnjavaju se razlikama u arhitekturi strukture kromatina promotorske regije i stabilnosti nukleosoma na područjima ovih promotora, koje su utvrđene biokemijskim istraživanjima *in vitro* (Hertel i sur., 2005).

## OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

DNA u eukariotskim stanicama dolazi u strukturi kromatina, to jest čvrsto obavijena oko oktamera histonskih proteina i nedostupna je za interakcije s drugim proteinima. Remodeliranje strukture kromatina stoga prethodi svim biološkim procesima koji uključuju interakcije drugih nehistskih proteina s DNA, kao što je proces aktivacije transkripcije gena. Mehanizmi djelovanja oligoproteinskih kromatin-remodelirajućih kompleksa, koji kataliziraju modifikacije i strukturne promjene kromatinske strukture, predmet su intenzivnih i kompetitivnih istraživanja. Pri tome je poseban naglasak na istraživanjima *in vivo*, koja bi trebala potvrditi dosadašnje spoznaje do kojih se došlo biokemijskim istraživanjima *in vitro*.

Opći cilj ovog rada bio je doprinijeti razumijevanju mehanizama procesa remodeliranja strukture kromatina u kontekstu regulacije transkripcije gena.

Specifični cilj ovih istraživanja bio je ispitati ulogu proteina Arp9, podjedinice remodelirajućih kompleksa SWI/SNF i RSC, u regulaciji aktivnosti ovih kompleksa u procesu remodeliranja kromatina promotorske regije kvašćevih inducibilnih gena *PHO5* i *PHO8*.

# MATERIJAL I METODE

## 1. Materijal

### 1.1. Sojevi kvasca

Tablica 3. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

SOJ	GENOTIP	IZVOR
<b>ARP9</b>	<i>MATa lys2-128δ leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 arp9::LEU2 [p100; ARP9; CEN TRP1]</i>	(Szerlong i sur., 2003)
<b>arp9<sup>ts</sup></b>	<i>MATa lys2-128δ leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 arp9::LEU2 [p1014; arp9 G337F G338L; CEN TRP1]</i>	(Szerlong i sur., 2003)
<b>ARP9 + pP4</b>	<i>ARP9 [pP4-70U; PHO4; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
<b>arp9<sup>ts</sup> + pP4</b>	<i>arp9<sup>ts</sup> [pP4-70U; PHO4; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
<b>ARP9 pho80</b>	<i>ARP9 pho80::HIS3</i>	Ovaj rad
<b>arp9<sup>ts</sup> pho80</b>	<i>arp9<sup>ts</sup> pho80::HIS3</i>	Ovaj rad

Svi sojevi konstruirani su u genetičkoj pozadini YBC, koja je derivat genetičke pozadine S288C (Szerlong i sur., 2003).

Sojevi +pP4 konstruirani su transformacijom ishodnih sojeva episomalnim plazmidom pP4-70U. Selekcija transformanata provedena je uzgojem na hranjivoj podlozi bez uracila.

Delecijski mutanti *pho80* konstruirani su transformacijom ishodnih sojeva linearnim fragmentom DNA koji sadrži disrupcijsku kazetu *pho80::HIS3*. Selekcija transformanata koji su ugradili kazetu provedena uzgojem na hranjivoj podlozi bez histidina, a uspješnost delecije gena *PHO80* provjerena je lančanom reakcijom polimerazom.

## 1.2. Sojevi bakterija

Za umnožavanje i izolaciju plazmida korištene su komercijalno dostupne kompetentne stanice bakterije *E. coli*, soj DH5 $\alpha$  (genotip: F $^-$   $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^-$ , mK $^+$ ) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*) proizvođača Invitrogen, SAD.

## 1.3. Plazmidi

### 1.3.1. Plazmid pP4-70U

Plazmid pP4-70U episomalni je ekspresijski plazmid koji nosi gen *PHO4* pod kontrolom nativnog promotora. Zbog ishodišta replikacije plazmida 2 $\mu$  u stanici se nalazi u velikom broju kopija te dovodi do prekomjerne ekspresije proteina Pho4. Detaljno je opisan u radu Svaren i sur., 1994.

## 1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

Sterilizacija pripremljenih hranjivih podloga, otopine glukoze te otopina aminokiselina provodi se u autoklavu pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1 atm. Nakon sterilizacije čuvaju se na sobnoj temperaturi. Krute hranjive podloge jednakog su sastava kao i tekuće, uz dodatak 16 g /L agara prije sterilizacije.

### 1.4.1. YNBP tekuća podloga

YNB 6,7 g/L; drop out 2 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L

Ovisno o auksotrofnosti soja, u podlogu se dodaju histidin (80 mg/L), uracil (80 mg/L), triptofan (80 mg/L) i leucin (160 mg/L). Nakon autoklaviranja dodaje se autoklaviranjem sterilizirana otopina glukoze do koncentracije 20 g/L. Ova podloga modifikacija je standardne YNB podloge za uzgoj kvasca, s dodatkom 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> kako bi se osigurala potpuna represija PHO promotora (+P<sub>i</sub>).

### 1.4.2. Sintetska tekuća podloga

drop out 2 g/L; asparagin 2 g/L;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L; NaCl 0,1 g/L;  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  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 histidin, uracil, triptofan i leucin, u istim koncentracijama kao kod YNBP podloge. Nakon autoklaviranja dodaje se autoklaviranjem sterilizirana otopina glukoze do koncentracije 20 g/L te filtracijom sterilizirane otopina 1 ( $\varphi = 0.004$ ) (riboflavin 0,05 g/L, *p*-aminobenzojeva kiselina 0,05 g/L, inozitol 0,5 g/L) i otopina 2 ( $\varphi = 0.0001$ ) (biotin 0,02 g/L, Ca-pantotemat 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 i koristi se za indukciju PHO promotora (-P<sub>i</sub>).

### 1.4.3. 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

### 1.4.4. 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

## 1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj *E. coli* korištena je neselektivna tekuća podloga LB, sastava: bactotripton 10 g/L; kvašičev ekstrakt 5 g/L; NaCl 5 g/L, ili selektivna tekuća podloga LB-Amp, jednakog sastava uz dodatak 100 µg/mL antibiotika ampicilina. Krute podloge su osim navedenih komponenata sadržavale još i 16 g/L agara.

## 1.6. Kemikalije i enzimi

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

Agar, kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB): Becton, Dickinson and Company (BD), SAD

Aminokiseline, *p*-nitrofenilfosfat, spermin, spermidin, etidijev bromid, fenol, kloroform, polietilenglikol (PEG) 4000, natrijev dodecil sulfat (SDS), ficol 400,  $\beta$ -merkaptetoetanol, oligonukleotidi, Triton X-100, natrijev citrat: Sigma, Njemačka

Agaroz: Lonza, Švicarska

Ribonukleaza A (RNaza A), proteinaza K, restrikcijski enzim *Cla*I: Roche Diagnostics, Njemačka

Restrikcijski enzimi (osim *Cla*I): New England Biolabs, SAD

Zimolijaza 100 T: Amsbio, UK

Pufer za lančanu reakciju polimerazom (PCR), deoksiribonukleotidi, standardi za elektroforezu:

Fermentas, Thermo Scientific, SAD

Taq polimeraza: izolirana u Laboratoriju za biokemiju

Staklene kuglice: Sartorius, Njemačka

## 1.7. Otopine

### Za transformaciju kvasca:

TE pufer (pH = 7,4)

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

0,2 M litijev acetat

60%-tna otopina polietilenglikola

0,6 g polietilenglikola (PEG 4000) otopi se u 0,4 mL deionizirane vode te se potpuno otapa i sterilizira prokuhavanjem 10 min, priprema se neposredno prije upotrebe i koristi nakon hlađenja na oko 30 °C

### **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

osnovna otopina priprema se u koncentraciji 5 g/L i čuva u tamnoj bočici na +4 °C, a otopina za vizualizaciju DNA priprema se razrjeđivanjem osnovne otopine u omjeru 1:10000 u deioniziranoj vodi

### **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 na dan mjerenja, između mjerenja čuva se na +4 °C

1 M NaOH

### **Za izolaciju jezgri:**

Predinkubacijska otopina

0,72 M  $\beta$ -merkaptoetanol, 2,78 mM EDTA

Otopina za protoplastiranje

1 M sorbitol, 5 mM  $\beta$ -merkaptetoetanol

Otopina zimolijaze

$\gamma$  = 20 g/L, otopljeno u deioniziranoj vodi

Otopina fikola (pH = 6,8)

180 g/L fikol PM 400; 0,02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,25 mM EGTA, 0,25 mM EDTA. Za pripremu se koriste koncentrirane otopine EGTA (0,1 M, pH = 8,3) i EDTA (0,5 M, pH = 8). pH se podešava dodatkom KOH

### **Za digestiju jezgri:**

10x koncentrirani pufer za digestiju jezgri restrikcijским enzimima (10x SSTEEM, pH = 7,4)

1,5 mM spermin; 5 mM spermidin; 0,1 M Tris; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA, 0,1 M  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mM  $\beta$ -merkaptetoetanol; 0,5 mM NaCl. Za pripremu se koriste koncentrirane otopine EGTA (0,1 M, pH = 8,3), EDTA (0,5 M, pH = 8) i Tris-HCl (1 M, pH = 7,4). pH se podešava pomoću HCl-a

STOP otopina

52,6 g/L SDS; 42 mM EDTA, 0,53 M Tris. Za pripremu se koriste koncentrirane otopine: SDS (200 g/L), EDTA (0,5 M, pH = 8) i Tris-HCl (1 M, pH = 7,4)

Otopina proteinaze K

$\gamma$  = 20 g/L, otopljeno u 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0)

Otopina izoamilni alkohol / kloroform (IAC)

izoamilni alkohol ( $\varphi$  = 0,04); kloroform ( $\varphi$  = 0,96)

### **Za Southern blot:**

Pufer za denaturaciju

0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

20 x koncentrirani SSC pufer

3 M NaCl, 0,3 M natrijev citrat



## 2. Metode

### 2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *E. coli*

Alikvoti kompetentnih stanica od 50  $\mu\text{L}$  čuvaju se u Eppendorf epruvetama na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Prije transformacije otopljeni su na ledu, nakon čega je u epruvete dodano 1 - 5  $\mu\text{L}$  (1 – 10 ng) plazmidne DNA i lagano promiješano protresanjem. Epruvete su inkubirane na ledu 30 minuta, nakon čega je slijedio temperaturni šok, 20 sekundi na  $42^{\circ}\text{C}$ , te ponovno inkubacija na ledu 2 minute. U svaku epruvetu dodano je 950  $\mu\text{L}$  tekućeg medija LB zagrijanog na  $37^{\circ}\text{C}$  te je sve skupa inkubirano 1 sat na  $37^{\circ}\text{C}$  na rotacionoj tresilici (225 rpm). Po 200  $\mu\text{L}$  svake suspenzije naciepljeno je na selektivnu ploču LB s dodatkom 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  antibiotika ampicilina i inkubirano je preko noći na  $37^{\circ}\text{C}$ , do porasta kolonija.

### 2.2. Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli* (midiprep)

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

### 2.3. Transformacija kvasca litij acetatnom metodom

Stanice kvasca uzgajane su u YNBP tekućoj podlozi na  $30^{\circ}\text{C}$  ili  $24^{\circ}\text{C}$  (kod temperaturno-osjetljivih mutanata) do logaritamske faze rasta ( $\text{OD}_{600} = 1-2 \text{ OD}/\text{mL}$ ). Suspenzija je centrifugirana (4/3000 rpm), talog je ispran TE puferom pa resuspendiran u TE puferu na  $\text{OD}_{600}$  vrijednost 55  $\text{OD}/\text{mL}$ . Dodan je jednak volumen 0,2 M otopine litijevog acetata kao TE pufera te je suspenzija inkubirana 45 minuta na rotacijskog tresilici pri  $30^{\circ}\text{C}$ . 100  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica otpipetirano je u sterilnu Eppendorf epruvetu, dodana je plazmidna DNA (1  $\mu\text{g}$  kružnog plazmida ili 6-10  $\mu\text{g}$  lineariziranog plazmida) te je smjesa inkubirana 25 minuta na  $30^{\circ}\text{C}$  bez miješanja. U smjesu je uz snažno vorteksiranje dodano 145  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene 60%-tne otopine PEG-a i inkubirano je 45 minuta pri  $30^{\circ}\text{C}$  bez miješanja. Nakon

inkubacije slijedilo je 6 minuta temperaturnog šoka na 42°C, nakon čega je suspenzija dvaput isprana hladnom sterilnom vodom (centrifugiranje 1'/8000 rpm). Talog stanica resuspendiran je u 120 µL sterilne vode te nacijepljen na odgovarajuću krutu selektivnu podlogu. Uzgoj se provodio na 30°C ili 24°C do porasta kolonija transformanata (2-5 dana).

## **2.4. Izolacija genomske DNA kvasca**

Stanice kvasca uzgajane su na rotacijskoj tresilici u 10 mL YNBP podloge na 30°C ili 24°C (kod temperaturno-osjetljivih mutanata) do stacionarne faze rasta ( $OD_{600} \sim 6$  OD/mL). Suspenzija je centrifugirana (4'/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 µL pufera za razbijanje stanica. Dodano je 200 µL otopine fenola i kloroforma (1:1) i otprilike 300 µL staklenih kuglica te je suspenzija snažno vorteksirana 4 minute. Dodano je 200 µL TE pufera. Nakon centrifugiranja (5'/11000 rpm) je oko 400 µL 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 (5'/11000 rpm) talog je osušen na zraku te je potom resuspendiran u 400 µL TE pufera. Suspenziji je dodano 5 µL otopine RNaze A i inkubirana je u termobloku na 37°C 15 minuta. Dodani su otopina NaCl-a do koncentracije 0,2 M pa 2,5 volumena hladnog 96%-tnog etanola, u svrhu taloženja DNA, te je ostavljeno na -20 °C barem 15 minuta ili preko noći. Suspenzija je centrifugirana (5'/11000 rpm), a talog je ispran hladnim 70%-tnim etanolom pa je osušen na zraku. Izolirana DNA otopljena je u 50 µL TE pufera.

Koncentracija izolirane genomske DNA određena je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 260 nm, uz pretpostavku da  $A_{260}=1$  odgovara koncentraciji dvolančane DNA od 50 µg/mL.

## 2.5. Gel elektroforeza

Uzorci DNA pomiješani su s migracijskim bojom i TE puferom te nanjeni u jačice gela. Gel elektroforeza provodila se u agaroznom gelu (0,8-1,5%, ovisno o veličini fragmenata DNA) u 1x TAE puferu pri naponu 70-100 V. Nakon elektroforeze gel je namakan u otopini etidijevog bromida 15 minuta. DNA u gelu vizualizirana je na transiluminatoru uz UV svjetlo.

## 2.6. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom provedena je u svrhu provjere delecije gena *PHO80*. Reakcijska smjesa od 50 µL sadržavala je 0,3 µg genomske DNA izolirane iz odgovarajućeg soja, svaki od 4 dNTP-a u koncentraciji 0,2 mM, svaku od početnica *forward* (ACAACGGAAGACCGCCTATT) i *reverse* (CATGAAATGGTTCTGTCAAGG) u koncentraciji 0,5 mM, 1 U Taq polimeraze i 1x koncentrirani reakcijski pufer s MgCl<sub>2</sub>. Reakcija se odvijala prema programu:

4' 94°C // 30x (30" 94°C/ 30" 58°C/ 2' 68°C) // 7' 68°C

Nakon PCR-a produkti su analizirani gel elektroforezom u agaroznom gelu. Fragment umnožen iz soja *PHO80* je veličine 1987 parova baza, a kod soja *pho80::HIS3* ne dobije se produkt.

## 2.7. 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 rotacijskog tresilici na 24°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 37°C.

Alikvot suspenzije stanica za mjerenje aktivnosti enzima određen je uzimajući u obzir koncentraciju suspenzije stanica ( $OD_{600}$ ), 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 sterilnom vodom (u slučaju da je korištena suspenzija u YNBP podlozi – 0 h indukcije) te je talog resuspendiran u 4 mL 0.1 M Na-acetatnog pufera (pH = 3,6). Pripremljene su dvije paralele uzorka od 1 mL te je uzet alikvot za mjerenje  $OD_{600}$  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 natrijeva hidroksida, 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 lužnatome daje žuto obojenje. Apsorbancija uzorka pri 410 nm proporcionalna je koncentraciji produkta, a specifična aktivnost enzima računa se prema formuli:

$$A = \frac{A_{410} * 1000}{OD_{600} \text{ u puferu} * t \text{ (min)}}$$

## 2.8. Izolacija jezgri stanica kvasca

Stanice kvasca uzgajane su u tekućoj hranjivoj podlozi (YNBP ili sintetska) pri odgovarajućoj temperaturi (24°C ili 37°C) na rotacijskoj tresilici. Alikvot koji sadrži 60 OD jedinica kvasca (po uzorku za jednu digestiju jezgri) uzet je za centrifugiranje (5'/4°C /4000 rpm). Talog stanica dalje je držan na ledu kako bi stanice prestale rasti, odnosno inducirati. Ispran je s 30 mL hladne vode te prebačen u prethodno prethodno izvaganu kivetu i ponovno je centrifugiran (5'/4°C/4000 rpm). Talog je izvagan, resuspendiran u 2 volumena predinkubacijske otopine po gramu taloga, i inkubiran na rotacijskoj tresilici 30 minuta pri

30°C. Suspenzija je centrifugirana (5'/4°C/4000 rpm), isprana s 30 mL hladne 1 M otopine sorbitola te je talog resuspendiran u 5 mL otopine za protoplastiranje po gramu taloga. Izmjerena je OD<sub>600</sub> vrijednost suspenzije, dodano je 100 µL otopine zimolijaze po gramu taloga i inkubirano je 45-60 minuta na rotacijskoj tresilici na 30°C. Tijekom inkubacije povremeno je mjerena OD<sub>600</sub> vrijednost kako bi se ispitala uspješnost protoplastiranja, da bi se po potrebi dodalo još otopine zimolijaze i produljila inkubacija na do 1 sat. Suspenzija je centrifugirana (5'/4°C/4000 rpm), talog je ispran s 30 mL hladne 1 M otopine sorbitola pa resuspendiran u 7 mL otopine fikola po gramu taloga. Suspenzija je centrifugirana (45'/4°C/11000 rpm), a potom je talog jezgri naglo smrznut u suhom ledu (+EtOH) i čuvan na -70 °C do digestije.

## **2.9. Analiza remodeliranja strukture kromatina digestijom restriksijskim enzimima**

Za primarnu digestiju kromatina korišteni su restriksijski enzimi čija se mjesta cijepanja na ispitivanim promotorima pod uvjetima represije nalaze unutar nukleosoma koji podliježu remodeliranju prilikom indukcije. Za sekundarnu digestiju gole DNA korišteni su restriksijski enzimi koji cijepaju nedaleko uzvodno i nizvodno od odgovarajućeg mjesta koje se cijepa tijekom primarne digestije. Enzimi korišteni za analizu strukture kromatina u ovom radu te položaji restriksijskih mjesta na promotorskim regijama prikazani su u tablici 4 i na slici 2.

Dostupnost restriksijskog mjesta za primarnu digestiju (izražena kao količina DNA pocijepane restriksijskim enzimom u odnosu na ukupnu DNA fragmenta promotora) ovisila o stupnju remodeliranja nukleosoma i predstavljala mjeru za stupanj remodeliranja strukture kromatina promotora.

Alikvot za digestiju jezgri (izoliran iz otprilike 60 OD jedinica kvasca) otopljen je na ledu, ispran je s 3 mL SSTEEM pufera (centrifugiranje 10'/4000 rpm/4°C) i zatim resuspendiran u 200 µL STEEM pufera. Dodano je 120 U restriksijskog enzima za primarnu digestiju (vidi tablicu 4). Suspenzija je lagano izmiješana, inkubirana je 45 minuta na 37°C, nakon čega je enzimska reakcija zaustavljena dodatkom 19 µL STOP otopine. Dodano je 20 µL otopine proteinaze K i inkubirano je dodatnih 30 minuta na 37°C. Zatim je dodano 50 µL 5 M NaClO<sub>4</sub> i 300 µL fenola, snažno vorteksirano 4 minute, nakon čega je dodano 300 µL otopine izoamilni alkohol/kloroform (IAC) te ponovno snažno vorteksirano 10ak sekundi.

Suspencija je centrifugirana (5'/13000 rpm), pažljivo je izdvojena gornja vodena faza (oko 300 µL) koja je sadržavala DNA, i prenijeta je u novu Eppendorf epruvetu. Dodano joj je 300 µL otopine IAC i snažno je vorteksirano. Nakon centrifugiranja (5'/13000 rpm) ponovno je izdvojena gornja faza, prenijeta je u novu epruvetu te je dodano 750 µL (2,5 volumena) hladnog 96%-tnog etanola, nakon čega je DNA taložena na -20°C. Suspencija je zatim centrifugirana (15'/11000 rpm/4 °C), talog je ispran hladnim 96%-tnim etanolom, osušen je i otopljen u 100 µL TE pufera. Dodano je 8 µL otopine RNaze A i sve je inkubirano je 1 sat na 37°C. DNA je taložena dodatkom 4 µL 5 M natrijevog klorida i 280 µL hladnog 96%-tnog etanola na -20 °C. Centrifugirana je (15'/11000 rpm/4°C). Talog je ispran hladnim 70%-tnim etanolom i nakon sušenja otopljen u 50 µL TE pufera i korišten za sekundarnu digestiju. Restrikcija je provedena u volumenu od 250 µL, sljedećeg sastava: 50 µL otopina DNA, 25 µL 10x koncentrirani pufer za restriksijski enzim, 40 U enzima (u slučaju da se sekundarna digestija radi s dva enzima, od svakoga po 40 U) i sterilna deionizirana voda do ukupnog volumen. Nakon inkubacije 2 sata na 37°C DNA je istaložena dodatkom 10 µL 5 M natrijevog klorida i 650 µL hladnog 96%-tnog etanola, suspencija je inkubirana na -20 °C, centrifugirana je (15' /11000 rpm/4 °C), talog je ispran hladnim 70%-tnim etanolom i nakon sušenja otopljen u 25 µL TE pufera i korišten za analizu metodom po Southernu (Southern blot).

## **2.10. Southern blot**

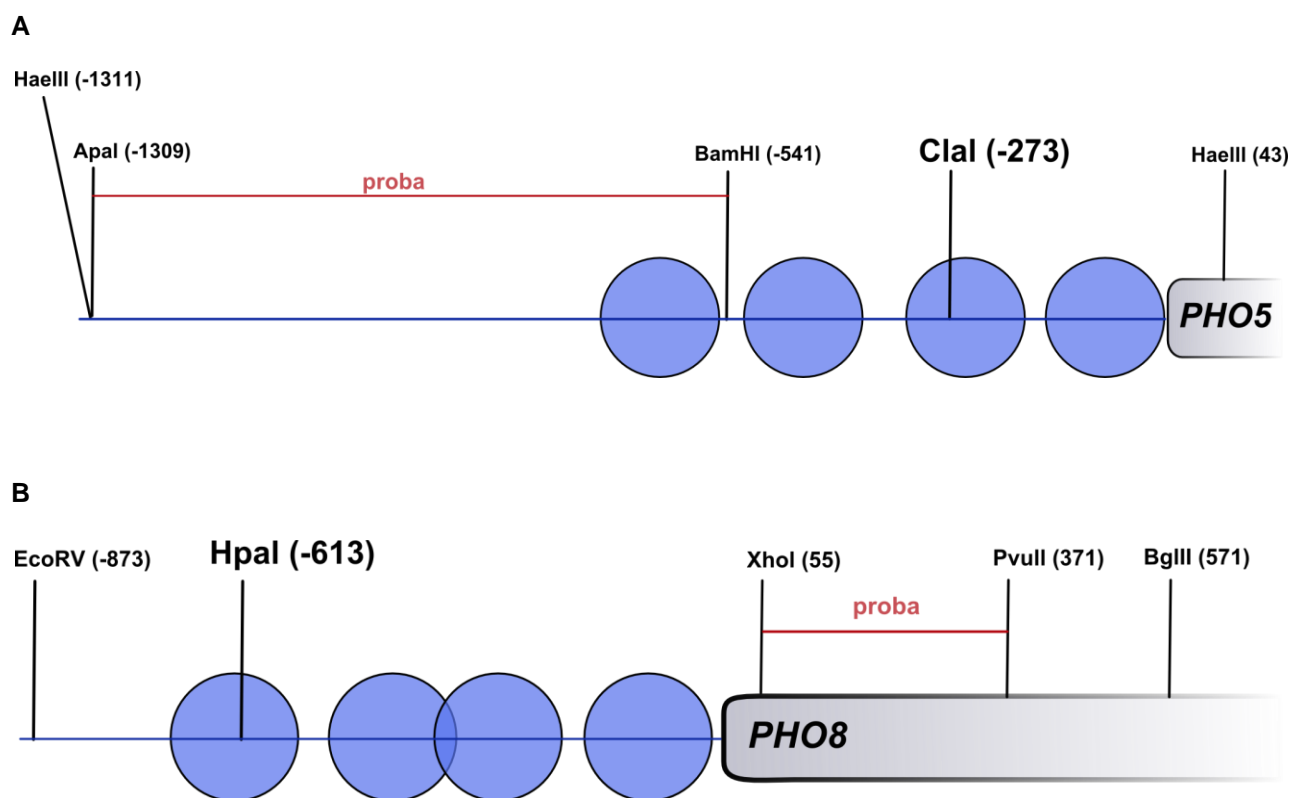
Elektroforeza DNA provedena je u 1,5%-tnom agaroznom gelu dimenzija 19 cm x 20 cm x 1 cm u TAE puferu pri naponu 100 V oko 3 sata. Neposredno prije završetka elektroforeze odrezan je komad najlonske membrane (Biodyne B, proizvođač Pall Corporation, SAD) približno veličine gela, namakan je barem 10 minuta u vodi i zatim 10 minuta u 20x koncentriranom SSC puferu (20xSSC), uz lagano protresanje. Nakon elektroforeze, gel je uz lagano protresanje inkubiran 20 minuta u puferu za denaturaciju. Pripremljena je instalacija za kapilarni prijenos DNA iz gela na membranu: u plitku plastičnu kadicu uliven je pufer 20xSSC visine 2-3 cm te je stavljen stalak uzdignut iznad razine pufera, prekriven je s dva komada papira za blot prethodno namočena u puferu 20xSSC, pri čemu su rubovi papira bili uronjeni u pufer. Na podložak je stavljen gel i prekriven membranom. Na membranu su stavljena tri komada papira za blot veličine membrane (dva papira prethodno namočena u puferu 20xSSC i jedan suhi

papir) te komadi staničevine, presavijeni na veličinu nešto veću od membrane, do visine otprilike 20 cm. Na vrh je postavljeno blago opterećenje. Prijenos DNA na membranu odvijao se preko noći, a idući dan je membrana, između dva suha papira za blot, pečna u suhom sterilizatoru dva sata na 80°C.

Membrana je hibridizirana <sup>32</sup>P-radioaktivnom DNA probom, a analizom „PhosphorImager“ utvrđen je postotak porezane DNA. Hibridizacija membrane i „PhosphorImager“ analiza provedena je u laboratoriju dr.sc. Philippa Korbera (Biomedical Center Munich)

**Tablica 4.** Restriksijski enzimi korišteni za analizu strukture kromatina.

Promotor	Restriksijski enzimi		Proba za hibridizaciju
	Primarna digestija	Sekundarna digestija	
<i>PHO5</i>	ClaI	HaeIII	(Almer i sur., 1986)
<i>PHO8</i>	HpaI	BglII i EcoRV	(Barbaric i sur., 1992)



**Slika 2.** Shematski prikaz položaja restriksijskih mjesta i DNA proba korištenih za analizu strukture kromatina promotora *PHO5* (**A**) i *PHO8* (**B**) u ovom radu. Položaji nukleosoma i DNA proba preuzeti su iz Almer i sur., 1986 te Barbaric i sur., 1992.



## REZULTATI

### 1. Aktivnost proteina Arp9 potrebna je za aktivaciju transkripcije gena *PHO5*

Proteini Arp7 i Arp9 regulatorne su podjedinice kromatin-remodelirajućih kompleksa SWI/SNF i RSC (Szerlong i sur., 2003). U komplekse se ugrađuju kao heterodimer koji stupa u interakcije s katalitičkom podjedinicom svakog od kompleksa (Szerlong i sur., 2008), zbog čega se inaktivacijom proteina Arp7 ili Arp9 gubi aktivnost modula Arp7/9. Ovi proteini esencijalni su za vijabilnost stanica, što najvjerojatnije proizlazi iz njihove ključne uloge u regulaciji aktivnosti kompleksa SWI/SNF i RSC, koja je pokazana biokemijskim istraživanjima *in vitro* (Clapier i sur., 2016). Međutim, do danas nije ispitana aktivnost modula Arp7/9 u procesu remodeliranja strukture kromatina i posljedično aktivacije pojedinog promotora u uvjetima *in vivo*. Promotori kvašćevih gena *PHO5* i *PHO8* dobar su model za istraživanje uloge modula Arp7/9 u regulaciji aktivnosti kromatin-remodelirajućih kompleksa SWI/SNF i RSC budući da ovi kompleksi imaju ključnu ulogu u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora i posljedično aktivacije transkripcije ovih gena. Preliminarni rezultati u Laboratoriju za biokemiju pokazali su da inaktivacija proteina Arp7 ili Arp9 ima negativan utjecaj na aktivaciju transkripcije gena *PHO5* (neobjavljeni rezultati), što je u skladu s esencijalnom ulogom remodelirajućih kompleksa SWI/SNF i RSC u procesu aktivacije transkripcije gena *PHO5* (Musladin i sur., 2014). U ovom radu su prvo provedena su detaljna istraživanja uloge proteina Arp9 u procesu aktivacije promotora *PHO5*.

Budući da je delecija gena *ARP9* letalna za stanice, korišten je temperaturno osjetljivi (*ts*, *temperature-sensitive*) mutant *arp9<sup>ts</sup>*. U stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* gen *ARP9* je deletiran, a mutirana inačica nalazi se na centromernom plazmidu. Stanice koje su označene kao *ARP9* u ovom radu istog su genotipa, osim što se na centromernom plazmidu nalazi funkcionalni gen *ARP9* pa su stoga ekvivalentne stanicama divljeg tipa (vidi Materijal i metode). U stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* dolazi do sinteze proteina Arp9<sup>ts</sup> koji je nestabilan pri 37°C (restriktivna temperatura) te dolazi do inaktivacije ovog proteina, dok je protein stabilan pri 24°C (permisivna temperatura). To omogućuje uzgoj stanica pri permisivnoj temperaturi i induciranu inaktivaciju proteina Arp9<sup>ts</sup> prebacivanjem stanica na restriktivnu temperaturu.

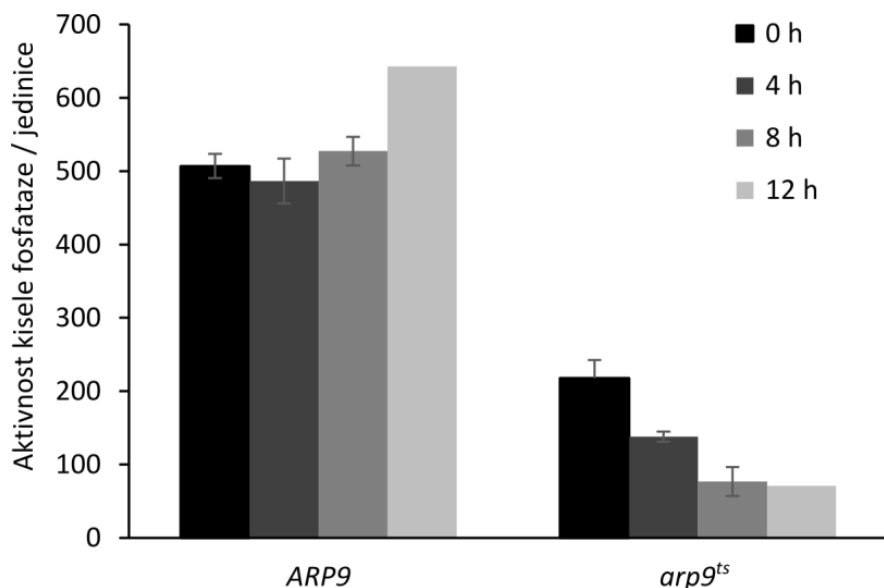
Stanice divljeg tipa (*ARP9*) i mutanta *arp9<sup>ts</sup>* uzgojene su u podlozi s visokom koncentracijom fosfata (uvjeti represije gena *PHO5*, +P<sub>i</sub>) pri 24°C. Da bi se utvrdilo vrijeme potrebno za potpunu inaktivaciju proteina Arp9<sup>ts</sup> pri inkubaciji na 37°C, stanice su prije indukcije podvrgnute predinkubaciji pri 37°C (0,4, 8 ili 12 h) u +P<sub>i</sub> podlozi te je praćen rast stanica u periodu predinkubacije i tijekom indukcije. Značajna ili potpuna inaktivacija proteina Arp9<sup>ts</sup> dovodi do prestanka rasta stanica.

**Tablica 5.** Rast stanica praćen je spektrofotometrijski, mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini 600 nm, iz čega je izračunat prosječan broj generacija koji stanice naprave u određenim uvjetima. Stanice *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>* uzgajane su pri 24°C u podlozi s visokom koncentracijom fosfata (+P<sub>i</sub>) te predinkubirane pri 37°C u istoj podlozi kroz vrijeme naznačeno u tablici, nakon čega su podvrgnute indukciji inkubacijom u podlozi bez fosfata (-P<sub>i</sub>) pri 37°C. Rast je praćen tijekom 35 h indukcije kako bi se pouzdano utvrdilo da stanice prestaju rasti.

Vrijeme predinkubacije pri 37°C +P <sub>i</sub> / h	<i>ARP9</i>		<i>arp9<sup>ts</sup></i>	
	Broj generacija tijekom predinkubacije	Broj generacija tijekom indukcije	Broj generacija tijekom predinkubacije	Broj generacija tijekom indukcije
0	/	3,2	/	2,9
4	1,6	3,2	1,6	2,6
8	3,1	3,1	3,0	1,3
12	4,5	3,1	3,7	1,2

U tablici 5 pokazano je da je nakon 8 h predinkubacije došlo do značajne inaktivacije proteina Arp9<sup>ts</sup>, budući da u ovim uvjetima mutant *arp9<sup>ts</sup>* tijekom indukcije u mediju bez fosfata napravi 1,3 generacije i prestane rasti. Stanice divljeg tipa (*ARP9*) u uvjetima indukcije prestaju rasti nakon 3,1-3,2 generacije, neovisno o duljini perioda predinkubacije, zbog potrošnje unutarstaničnih rezervi fosfata.

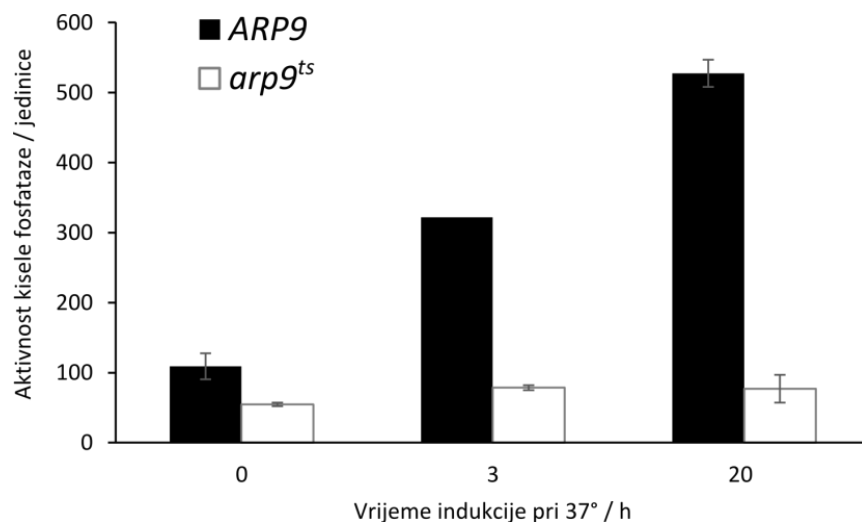
Da si se ispitao učinak inaktivacije proteina Arp9<sup>ts</sup> na razinu aktivacije transkripcije gena *PHO5*, stanice mutanta i divljeg tipa su, nakon predinkubacije na 37°C u podlozi s fosfatom, prebačene u podlogu bez fosfata, što dovodi do indukcije gena *PHO5*, te inkubirane na 37°C. Razina transkripcije gena *PHO5* praćena je neizravno, mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze, produkta ekspresije gena *PHO5*.



**Slika 3.** Razina aktivacije transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>*. Stanice su uzgajane pri 24°C u uvjetima represije u podlozi s visokom koncentracijom fosfata (+P<sub>i</sub>) te predinkubirane pri 37°C u istoj podlozi kroz vrijeme naznačeno u legendi, nakon čega su podvrgnute indukciji inkubacijom u podlozi bez fosfata (-P<sub>i</sub>) pri 37°C. Aktivnost kisele fosfataze mjerena je nakon 20 h indukcije. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju raspon rezultata dva, odnosno standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici **3**, za stanice mutanta *arp9<sup>ts</sup>* pokazano je da razina transkripcije pada produljenjem vremena predinkubacije na 37°C te da predinkubacija duža od 8 h ne dovodi do daljnjeg pada razine transkripcije. Stoga je 8 h predinkubacije na 37°C u podlozi s visokom koncentracijom fosfata odabrano za daljnje eksperimente. Kao što je očekivano, za kontrolni soj *ARP9*, kod kojeg dolazi do sinteze nativnog proteina Arp9, predinkubacija na 37°C ne utječe na razinu transkripcije gena *PHO5*.

Da bi se potvrdilo da 8 h predinkubacije na 37°C dovodi do visoke razine inaktivacije Arp9<sup>ts</sup> koja onemogućava aktivaciju transkripcije gena *PHO5* već u prvim satima indukcije (3 h), praćena je kinetika aktivacije transkripcije gena *PHO5*.



**Slika 4.** Kinetika aktivacije transkripcije gena *PHO5* je praćena mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>*. Stanice su uzgajane pri 24°C u uvjetima represije podlozi s visokom koncentracijom fosfata (+P<sub>i</sub>) te predinkubirane 8 h u istoj podlozi pri 37°C, nakon čega su podvrgnute indukciji inkubacijom u podlozi bez fosfata (-P<sub>i</sub>) pri 37°C. Vrijednosti pokazane za *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>* nakon 20 h indukcije predstavljaju ista mjerenja prikazana na slici 3. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju raspon rezultata dva, odnosno standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

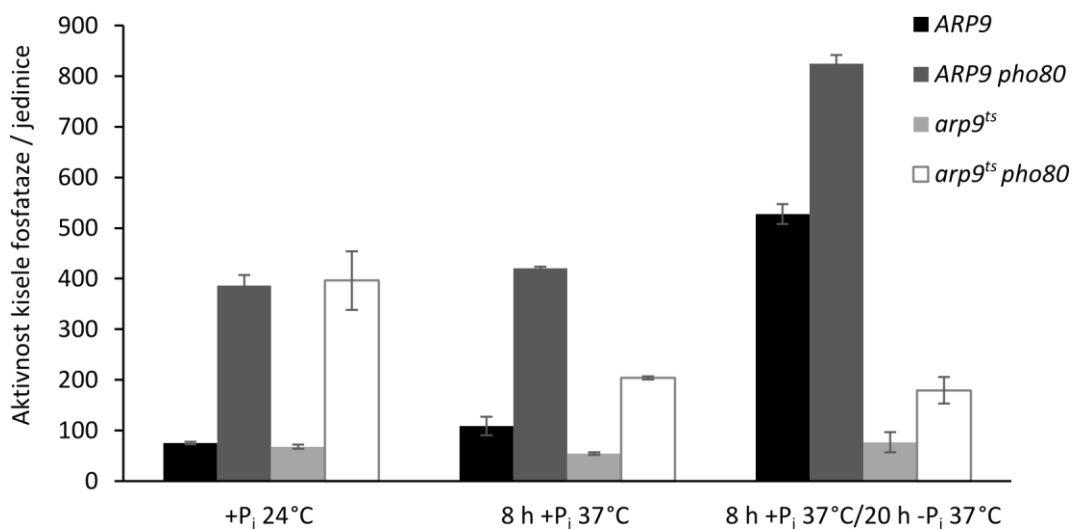
Na slici 4 jasno je pokazano da u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* koje su predinkubirane 8 h na 37°C uopće ne dolazi do aktivacije transkripcije.

### 1.1. Izostanak aktivacije transkripcije gena *PHO5* u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* nije posljedica slabijeg induksijskog signala

Kako bi se isključila mogućnost da je izostanak aktivacije transkripcije gena *PHO5* u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* indirektna posljedica slabog induksijskog signala zbog prestanka rasta stanica ovog mutanta pri indukciji na 37°C, proveden je sljedeći kontrolni eksperiment. U stanicama *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>* deletiran je gen *PHO80* koji kodira za ciklin Pho80. Pri uvjetima represije gena *PHO5*, kompleks ciklina Pho80 i ciklin-ovisne kinaze Pho85 fosforilira i time inaktivira aktivator transkripcije Pho4 (Komeili i O'Shea, 1999). U uvjetima nedostatka intracelularnog fosfata induksijski signal dovodi do inaktivacije kompleksa Pho80/85

putem proteina Pho81 te posljedično ne dolazi do fosforilacije aktivatora Pho4, koji onda aktivira transkripciju gena *PHO5* (Korber i Barbaric, 2014). Zbog delecije gena *PHO80* u stanicama mutanta *pho80*, aktivator Pho4 aktivan je i pri uvjetima represije. Time se "zaobilazi" nativni signalni put te je stoga razina aktivacije transkripcije u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup> pho80* neovisna o nativnom indukcijskom signalnom putu.

Stanice mutanata *ARP9 pho80* i *arp9<sup>ts</sup> pho80*, kao i stanice *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>*, uzgajane su pri 24°C u podlozi s visokom koncentracijom fosfata, nakon čega su prvo predinkubirane 8 h u istoj podlozi pri 37°C, a zatim su inkubirane u podlozi bez fosfata pri 37°C kroz 20 h.



**Slika 5.** Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama *ARP9*, *ARP9 pho80*, *arp9<sup>ts</sup>* i *arp9<sup>ts</sup> pho80*. Stanice su uzgajane pri 24°C u uvjetima represije u podlozi s visokom koncentracijom fosfata (+P<sub>i</sub>) te predinkubirane 8 h u istoj podlozi pri 37°C, nakon čega su podvrgnute indukciji inkubacijom u podlozi bez fosfata (-P<sub>i</sub>) pri 37°C. Vrijednosti pokazane za *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>* nakon predinkubacije, odnosno 20 h indukcije predstavljaju ista mjerenja prikazana na slici 4, odnosno 3. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju raspon rezultata dva, odnosno standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

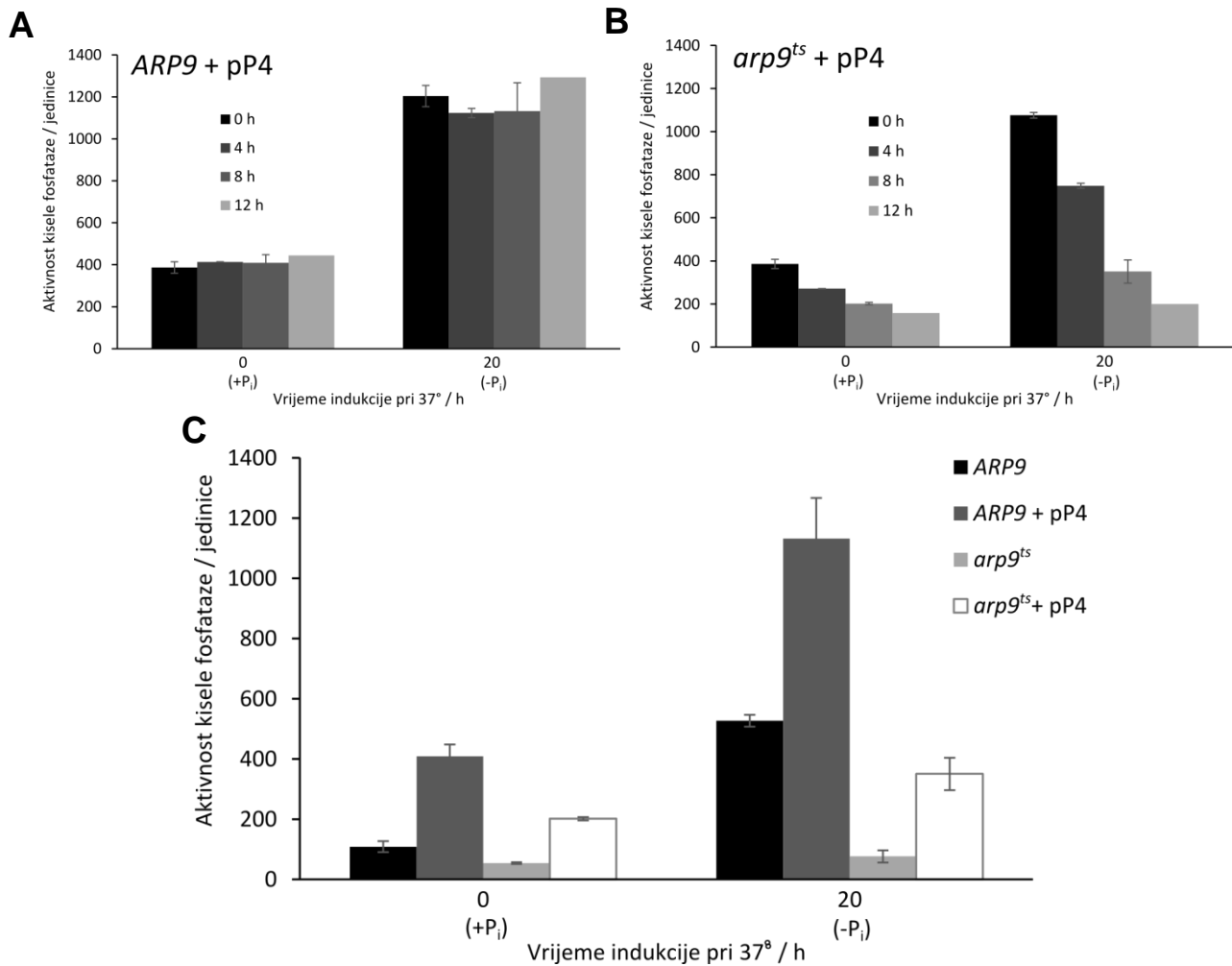
Kao što je pokazao na slici 5, tijekom uzgoja stanica pod represivnim uvjetima u podlozi s visokom koncentracijom fosfata pri 24°C stanice *ARP9 pho80* i *arp9<sup>ts</sup> pho80* pokazivale su jasan *pho80* fenotip,

odnosno razinu transkripcije znatno višu od one izmjerene u odgovarajućim *PHO80* stanicama, pri čemu nije bilo razlika u razini transkripcije kod *ARP9 pho80* i *arp9<sup>ts</sup> pho80*. Nakon 8 h predinkubacije na 37°C, pri inače represivnim uvjetima, izmjerena je viša razina transkripcije u stanicama dvostrukog mutanta *arp9<sup>ts</sup> pho80* u odnosu na *arp9<sup>ts</sup>*, međutim postignuta razina još uvijek je bila znatno niža od one postignute u *ARP9 pho80* stanicama. Nadalje, dok inkubacija stanica u podlozi bez fosfata dovodi do daljnjeg povećanja razine transkripcije u stanicama *ARP9 pho80*, razina transkripcije u stanicama *arp9<sup>ts</sup> pho80* ostaje na istoj razini kao što je izmjereno u represivnim uvjetima. To se može objasniti potpunom inaktivacijom proteina Arp<sup>ts</sup> tijekom 8 h predinkubacije na 37°C. Ovi rezultati isključuju mogućnost neizravnog efekta inaktivacije Arp<sup>ts</sup> na aktivaciju transkripcije gena *PHO5*, koja dovodi do niže razine induksijskog signala u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* zbog slabog rasta ovih stanica pri indukciji na 37°C (Korber i Barbaric, 2014).

## **1.2. Pojačanje aktivacijskog potencijala promotora *PHO5* prekomjernom ekspresijom aktivatora transkripcije Pho4 ne može nadomjestiti negativan učinak inaktivacije proteina Arp9**

Prijašnja istraživanja pokazala su potpuni izostanak aktivacije transkripcije gena *PHO5* u stanicama u kojima je inaktiviran kompleks RSC (Musladin, 2014). Međutim, prekomjerna ekspresija aktivatora transkripcije Pho4 u stanicama istog mutanta dovodi do više razine aktivacije transkripcije (neobjavljeni rezultati) pa je bilo zanimljivo provjeriti hoće li prekomjerna ekspresija proteina Pho4 imati isti efekt na razinu aktivacije transkripcije u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>*.

Stanice *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>* transformirane su episomalnim plazmidom pP4. Taj plazmid sadrži gen *PHO4* koji kodira za aktivator transkripcije gena *PHO5*, protein Pho4, a u stanicama kvasca se replicira u velikoj broju kopija što dovodi do prekomjerne ekspresije aktivatora Pho4 (vidi Materijal i metode).



**Slika 6.** Razina aktivacije transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama *ARP9*, *ARP9 + pP4*, *arp9<sup>ts</sup>* i *arp9<sup>ts</sup> + pP4*. Stanice su uzgajane pri 24°C u uvjetima represije u podlozi s visokom koncentracijom fosfata (+P<sub>i</sub>) te predinkubirane pri 37°C u istoj podlozi tijekom perioda vremena naznačenog u legendi (**A** i **B**), odnosno tijekom 8 h (**C**), nakon čega su podvrgnute indukciji inkubacijom u podlozi bez fosfata (-P<sub>i</sub>) pri 37°C. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju raspon rezultata dva, odnosno standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Kao što je očekivano, prekomjerna ekspresija aktivatora Pho4 u stanicama *ARP9* dovodi do značajne razine transkripcije već pri represivnim uvjetima (+P<sub>i</sub>) te nešto veće razine transkripcije pri uvjetima indukcije (-P<sub>i</sub>), neovisno o vremenu predinkubacije na 37°C (slika **6A**). Ovi rezultati potvrđuju povećanje aktivacijskog potencijala promotora *PHO5* kao posljedicu prekomjerne ekspresije aktivatora Pho4.

Prekomjerna ekspresija Pho4 u stanicama mutanta *arp9<sup>fs</sup>* koje su predinkubirane 8 h na 37°C dovodi do nešto veće razine transkripcije pri u uvjetima represije u odnosu na razinu transkripcije koja se postiže u ovim stanicama kod fiziološke koncentracije Pho4. Daljnjom inkubacijom pod uvjetima indukcije kroz 20 h razina transkripcije u stanicama *arp9<sup>fs</sup>* + pP4 se povećava, no značajno je niža u usporedbi s onom koja se postiže u stanicama *ARP9* + pP4 u istim uvjetima (slike **6B** i **6C**).

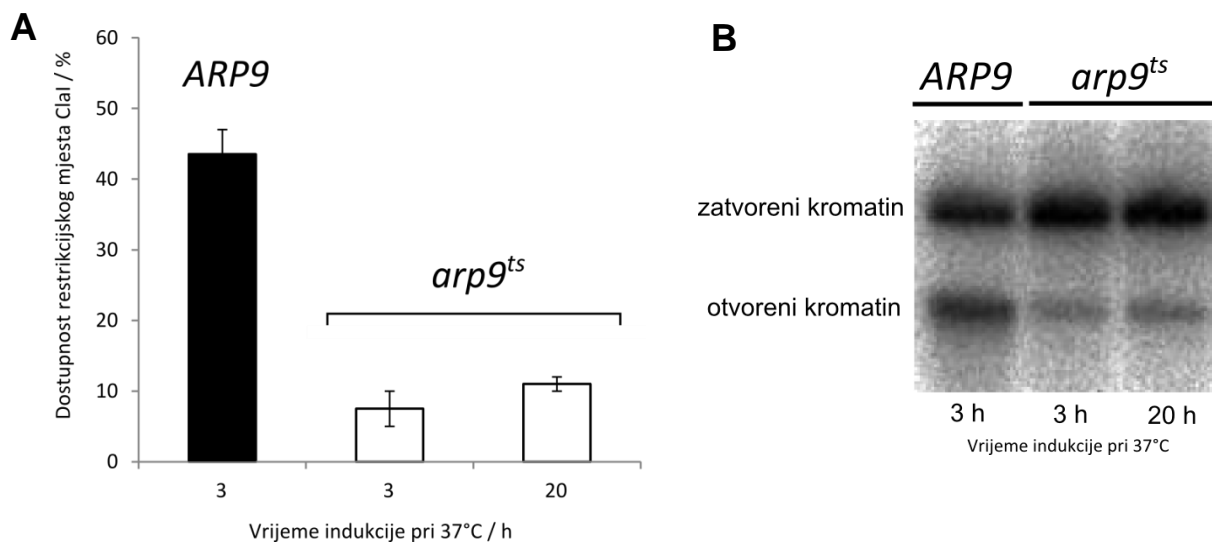
Ovi rezultati pokazuje da povećani aktivacijski potencijal promotora *PHO5* ne dovodi do znatnog povećanja razine transkripcije u stanicama *arp9<sup>fs</sup>* + pP4 pri uvjetima indukcije nakon produžene inaktivacije na 37°C (8 h pri uvjetima represije i 20 h pri uvjetima indukcije).

## **2. Inaktivacija proteina Arp9 sprječava remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO5***

Kako bi se utvrdilo je li izostanak aktivacije transkripcije gena *PHO5* u stanicama mutanta *arp9<sup>fs</sup>* pri 37°C posljedica spriječenog remodeliranja strukture kromatina promotora, remodeliranje strukture kromatina praćeno je metodom digestije kromatina restrikcijom enzimom ClaI. Pod uvjetima represije, mjesto cijepanja DNA enzimom ClaI na području promotora *PHO5* nalazi se unutar nukleosoma -2 te stoga nije dostupno, a disocijacijom nukleosoma prilikom aktivacije promotora postaje dostupno. Razina dostupnosti tog mjesta uobičajeno se koristi kao mjera za razinu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*.

Stanice *ARP9* i *arp9<sup>fs</sup>* uzgajane su pri 24°C u uvjetima represije u podlozi s visokom koncentracijom fosfata, nakon čega su predinkubirane 8 h u istoj podlozi pri 37°C te su podvrgnute indukciji inkubacijom u podlozi bez fosfata pri 37°C. Nakon 3, odnosno 20 h indukcije izolirane su jezgre stanica, čime je očuvana struktura kromatina, koji je potom cijepan restrikcijom enzimom ClaI. Dalje je provedena izolacija DNA te su fragmenti DNA nakon sekundarne digestije analizirani metodom Southern blot (vidi Materijal i metode).





**Slika 7.** Razina dostupnosti DNA promotora *PHO5* u stanicama *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>*, analizirana digestijom restrikcijskim enzimom Clal (**A**) i slika reprezentativnog Southern blota (**B**). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju raspon rezultata dva neovisno ponovljena eksperimenta.

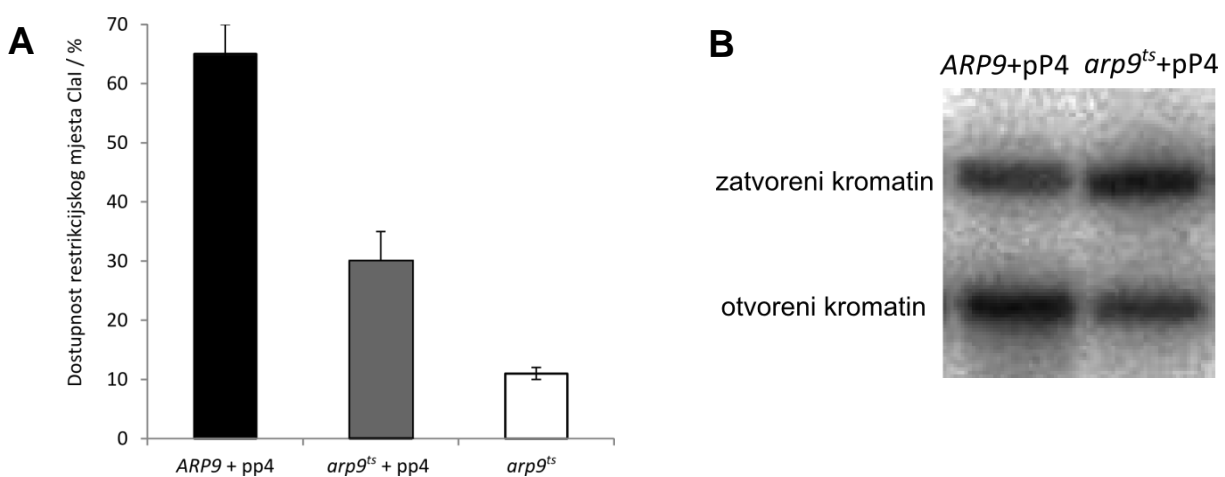
Na slici 7 jasno je pokazano da u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* koje su predinkubirane 8 h na 37°C praktički ne dolazi do remodeliranja kromatina promotora *PHO5* u uvjetima indukcije, za razliku od stanica *ARP9* s kojima se već nakon 3 h indukcije postiže značajna razina remodeliranja kromatina. Ovi rezultati jasno pokazuju da je izostanak aktivacije transkripcije gena *PHO5* u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* posljedica spriječenog remodeliranja kromatina promotora *PHO5*.

## 2.1. Prekomjerna ekspresija aktivatora Pho4 omogućuje djelomično otvaranje strukture kromatina promotora *PHO5* u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>*

Razina transkripcije izmjerena u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* + pP4 (kod kojeg dolazi do prekomjerne sinteze aktivatora Pho4) nakon 8 h predinkubacije u na 37°C te 20 h inkubacije u uvjetima indukcije na 37°C bila je značajno niža od one koja se postiže u stanicama *ARP9* + pP4 u istim uvjetima (slika 6C). Međutim, postignuta razina transkripcije ipak je ukazivala na mogućnost da pri prekomjernoj ekspresiji aktivatora Pho4 u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* dolazi do makar djelomičnog otvaranja strukture kromatina

promotora *PHO5*. Stoga je provedena analiza razine remodeliranja kromatina promotora *PHO5* digestijom restrikcijskim enzimom Clal.

Stanice *ARP9* + pP4 i *arp9<sup>ts</sup>* + pP4 uzgajane su pri 24°C u uvjetima represije u podlozi s visokom koncentracijom fosfata te predinkubirane 8 h u istoj podlozi pri 37°C, nakon čega su podvrgnute indukciji inkubacijom u podlozi bez fosfata kroz 20 h pri 37°C te je provedena analiza kromatina kao što je opisano u prethodnom eksperimentu.



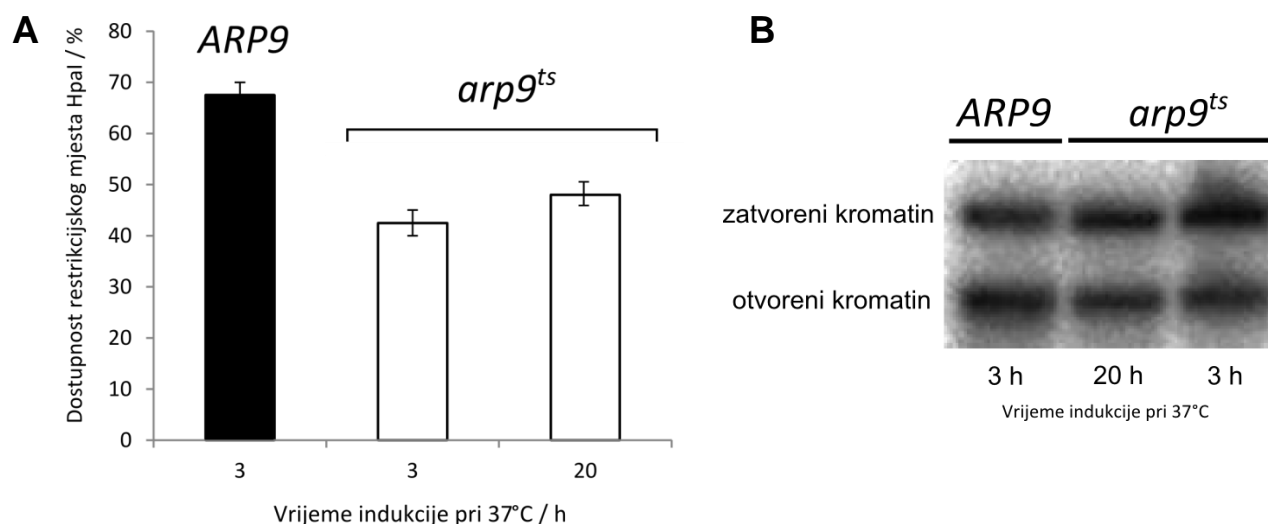
**Slika 8.** Razina dostupnosti DNA promotora *PHO5* u stanicama *ARP9* + pP4, *arp9<sup>ts</sup>* + pP4 i *arp9<sup>ts</sup>*, analizirana digestijom restrikcijskim enzimom Clal (**A**) i slika reprezentativnog Southern blota (**B**). Vrijednosti pokazane za *arp9<sup>ts</sup>* predstavljaju ista mjerenja prikazana na slici **7A**. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju raspon rezultata dva neovisno ponovljena eksperimenta.

Analiza razine remodeliranja kromatina (slika **8**) pokazala je da prekomjerna ekspresija aktivatora Pho4 dovodi samo do djelomičnog otvaranja kromatina promotora u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* te je razina remodeliranja još uvijek značajno niža od one postignute u stanicama *ARP9* u kojima dolazi do prekomjerne sinteze proteina Pho4.

### 3. Inaktivacija proteina Arp9 onemogućava potpuno remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8*

Pod uvjetima indukcije promotora *PHO8* dolazi do potpunog uklanjanja nukleosoma -3, koji se nalazi uzvodno od UASp2 sekvence, te promjena u strukturi kromatina nizvodno od UASp2 (Barbaric i sur., 1992). Za proces remodeliranja esencijalna je aktivnost kompleksa SWI/SNF, tako da u stanicama mutanta *snf2*, u kojim je potpuno uklonjen ovaj kompleks, uopće ne dolazi do otvaranja kromatina promotorske regije (Gregory i sur., 1999). S druge strane, aktivnost kompleksa RSC nije potrebna za potpuno otvaranje kromatina pri aktivaciji promotora *PHO8* (Musladin i sur., 2014). Stoga je promotor *PHO8* prikladan za ispitivanje uloge Arp podjedinica u regulaciji aktivnosti samog kompleksa SWI/SNF.

Alikvoti jezgri stanica koje su korištene za ispitivanje efekta inaktivacije proteina Arp9<sup>ts</sup> na proces remodeliranja kromatina promotora *PHO5* (slika 7) korišteni su i za ispitivanje razine remodeliranja kromatina promotora *PHO8* digestijom restriktivnim enzimom HpaI, koji cijepa DNA unutar nukleosoma -3.



**Slika 9.** Razina dostupnosti DNA promotora *PHO8* u stanicama *ARP9* i *arp9<sup>ts</sup>*, analizirana digestijom restriktivnim enzimom HpaI (**A**) i slika reprezentativnog Southern blota (**B**). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju raspon rezultata dva neovisno ponovljena eksperimenta.

Utvrđeno je da je razina remodeliranja kromatina nakon 3 h indukcije znatno niža u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* (40-45%) u odnosu na stanice divljeg tipa (65-70%, slika 9). Dobiveni efekt pokazuje da protein Arp9 ima bitnu, ali ne i esencijalnu ulogu aktivatora katalitičke podjedinice kompleksa SWI/SNF u procesu remodeliranja kromatina promotora *PHO8*.

## RASPRAVA

Istraživanje uloge kromatin-remodelirajućih kompleksa u procesu aktivacije transkripcije gena putem remodeliranja strukture kromatina promotorske regije te specifičnih uloga pojedinih podjedinica, odnosno modula ovih oligoproteinskih kompleksa, uglavnom su provedena *in vivo* na razini cijelog genoma. Međutim, rezultate takvih opsežnih istraživanja potrebno je nadopuniti detaljnim istraživanjima fokusiranima na procese remodeliranja kromatina pri regulaciji aktivacije transkripcije pojedinih gena. To pogotovo vrijedi za regulaciju transkripcije inducibilnih gena, koju nije moguće adekvatno istražiti u studijama provedenim na razini genoma pri standardnim fiziološkim uvjetima uzgoja stanica. Kod inducibilnih gena, potrebno je ispitati ulogu ovih kompleksa, odnosno njihovih podjedinica, u uvjetima represije i indukcije transkripcije.

Rezultati biokemijskih istraživanja *in vitro*, usmjerenih na mehanizam regulacije aktivnosti kromatin-remodelirajućih kompleksa, upućuju na ključnu ulogu Arp podjedinica u regulaciji aktivnosti katalitičke podjedinice kompleksa RSC, Sth1, odnosno katalitičke podjedinice kompleksa SWI/SNF, Snf2. Utvrđeno je da dimer podjedinica Arp7 i Arp9 stupa u interakcije s katalitičkom podjedinicom Sth1, odnosno Snf2, preko njihovih HSA domena (Szerlong i sur., 2008). Nedavna istraživanja *in vitro* pokazala su da Arp podjedinice ispoljavaju regulatornu funkciju putem promjene konformacije subdomene Protrusion 1 koja se nalazi unutar ATP-azne domene katalitičke podjedinice kompleksa RSC (Clapier i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je ispitati ulogu podjedinica Arp7/9 u regulaciji aktivnosti kompleksa SWI/SNF i RSC u procesu remodeliranja kromatina promotorske regije kvašćevih inducibilnih gena *PHO5* i *PHO8* pod uvjetima *in vivo*. Promotori inducibilnih gena *PHO5* i *PHO8* odabrani su kao prikladan modelni sustav, budući da je preduvjet za aktivaciju transkripcije gena *PHO5* i *PHO8* remodeliranje strukture kromatina promotorske regije (Barbaric i sur., 1992; Barbaric i sur., 2007), u kojem ključnu ulogu imaju kompleksi SWI/SNF i RSC (Gregory i sur., 1999; Musladin i sur., 2014).

Budući da je inaktivacija Arp podjedinica letalna za stanice kvasca, korištene su stanice mutanta *arp9<sup>ts</sup>* u kojima je deletiran nativni gen *ARP9*, a gen koji kodira za temperaturno-osjetljivu inačicu proteina Arp9 nalazi se na centromernom ekspresijskom plazmidu. Time je omogućen uzgoj stanica na temperaturi

24°C, pri kojoj je mutirani protein Arp9<sup>ts</sup> stabilan, te je zatim inducirana inaktivacija proteina inkubacijom stanica na restriktivnoj temperaturi (37°C). Nakon uzgoja stanica u uvjetima represije gena *PHO5* (podloga s visokom koncentracijom fosfata) pri 24°C, stanice mutanta *arp9<sup>ts</sup>* i stanice divljeg tipa (koje sadrže nativni gen *ARP9* na centromernom ekspresijskom plazmidu) prvo su predinkubirane 8 h pri restriktivnoj temperaturi u podlozi istog sastava, kako bi se omogućila značajna razina inaktivacije proteina Arp9<sup>ts</sup>, a zatim je pokrenuta indukcija transkripcije prebacivanjem stanica u podlogu bez fosfata. Pokazano je da u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* ne dolazi do značajne aktivacije promotora *PHO5*, odnosno transkripcije gena *PHO5*. Proveden je kontrolni eksperiment u kojem je u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* deletiran gen koji kodira za negativni regulator transkripcije gena *PHO5*, ciklin Pho80, što dovodi do aktivacije transkripcije i pri uvjetima represije. U stanicama dvostrukog mutanta *arp9<sup>ts</sup> pho80* se stoga isključuje mogući neizravni utjecaj inaktivacije proteina Arp9<sup>ts</sup> na razinu indukcije, zbog izostanka diobe stanica mutanta pri indukciji na 37°C, pa time i na aktivaciju transkripcije gena *PHO5*. Rezultati su pokazali da u stanicama dvostrukog mutanta *arp9<sup>ts</sup> pho80* dolazi do veće razine aktivacije transkripcije nego u mutantu *arp9<sup>ts</sup>*, ali višestruko niže u odnosu na razinu izmjerenu u stanicama *ARP9 pho80*. Time je potvrđeno da izostanak aktivacije transkripcije u stanicama *arp9<sup>ts</sup>* nije posljedica niske razine indukcije.

Prethodna istraživanja uloge kompleksa RSC u procesu aktivacije transkripcije gena *PHO5* pokazala su da inaktivacija katalitičke podjedinice kompleksa RSC dovodi do usporavanja procesa remodeliranja kromatina, ali da ima i negativni učinak na neki od koraka u procesu transkripcije koji slijede nakon otvaranja kromatinske strukture promotora (Musladin i sur., 2014). Da bi se utvrdilo je li izostanak aktivacije promotora *PHO5* u potpunosti posljedica izostanka remodeliranja strukture kromatina promotorske regije, provedena je analiza dostupnosti DNA. Nađeno je da u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>*, za razliku od stanica divljeg tipa, uopće ne dolazi do otvaranja kromatina promotorske regije gena *PHO5* (slika 7).

Oba kompleksa, RSC i SWI/SNF, koja u svom sastavu imaju modul Arp7/9, imaju bitnu ulogu u remodeliranju kromatina promotora *PHO5*. Potpuna inaktivacija kompleksa RSC dovodi do izostanka remodeliranja kromatina promotora *PHO5* (Musladin, 2014), a isto je utvrđeno u stanicama dvostrukog mutanta *snf2 sth1<sup>td</sup>*, u kojem je potpuno inaktiviran kompleks SWI/SNF i djelomično inaktiviran kompleks

RSC (Musladin i sur., 2014). S druge strane, potpuna inaktivacija samog kompleksa SWI/SNF samo usporava kinetiku procesa remodeliranja, ali produžena indukcija rezultira otvaranjem kromatina (Barbaric i sur., 2007). Činjenica da je sa stanicama mutanta *arp9<sup>fs</sup>* dobiven isti efekt kao i sa stanicama mutanta *snf2 sth1<sup>td</sup>*, to jest potpuni izostanak remodeliranja kromatina, ukazuje na značajnu ulogu proteina Arp9 u aktivaciji remodelirajuće aktivnosti oba kompleksa. Međutim, nije moguće razlučiti je li aktivacija putem Arp modula od kritičnog značaja za remodelirajuću aktivnost jednog ili oba remodelirajuća kompleksa ili je u odsustvu proteina Arp9 aktivnost kompleksa SWI/SNF i RSC samo umanjena.

Za razliku od promotora *PHO5*, u stanicama mutanta *arp9<sup>fs</sup>* došlo je do značajne razine remodeliranja kromatina promotora *PHO8* (43%), no znatno niže u odnosu na stanice divljeg tipa (68%, slika **9**). Budući da potpuna inaktivacija kompleksa SWI/SNF, u stanicama u kojima je deletiran gen koji kodira za katalitički podjedinicu Snf2, dovodi do potpunog izostanka remodeliranja promotora *PHO8* (Gregory i sur., 1999), može se zaključiti da protein Arp9 nema esencijalnu ulogu u aktivaciji remodelirajuće aktivnosti kompleksa SWI/SNF. Ne možemo, međutim, analogno zaključiti da Arp9 također nije esencijalan za aktivnost kompleksa SWI/SNF u procesu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO5*. Naime, dosadašnje spoznaje o remodelirajućim kompleksima ključnim za remodeliranje kromatina ova dva, kao i trećeg PHO promotora, *PHO84*, pokazuju znatne razlike, iako se sva tri promotora aktiviraju istim aktivatorom Pho4. Stoga se moglo zaključiti da specifične razlike u arhitekturi strukture kromatina pojedinog promotora uvjetuju specifične potrebe za uključivanjem određenih remodelirajućih kompleksa u procesu remodeliranja strukture kromatina pri aktivaciji pojedinog promotora (Wippo i sur., 2009; Barbaric i sur., 2007; Korber i Barbaric, 2014). Stoga je moguće da je aktivacija pomoću Arp9 kritična za aktivnost kompleksa SWI/SNF u procesu remodeliranja kromatina promotora *PHO5*, iako ne i za remodeliranje kromatina promotora *PHO8*. Mogući odgovor na ove dileme mogao bi se naći ispitivanjem uloge podjedinice Arp9 pri remodeliranju promotora *PHO84*. Naime, remodeliranje jednog od nukleosoma na ovom promotoru je u potpunosti ovisno o kompleksu SWI/SNF, a kompleks RSC nije uključen, dok u remodeliranju drugog nukleosoma na istom promotoru sudjeluju i SWI/SNF i RSC, ali ni jedan ni drugi nisu esencijalno potrebni (Wippo i sur., 2009; Musladin i sur., 2014).

Eksperimenti nedavno provedeni u Laboratoriju za biokemiju pokazali su da prekomjerna ekspresija aktivatora transkripcije gena *PHO5*, proteina Pho4, dovodi do djelomičnog otvaranja kromatina u stanicama mutanta *rsc2 sth1<sup>td</sup>* u kojima je potpuno inaktiviran kompleks RSC te da u neznoj mjeri dolazi i do otvaranja kromatina u stanicama dvostrukog mutanta *snf2 sth1<sup>td</sup>* (neobjavljeni rezultati). Stoga je bilo zanimljivo provjeriti hoće li prekomjerna ekspresija aktivatora Pho4 imati isti utjecaj na remodeliranje kromatina promotora *PHO5* u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>*. Prekomjerna ekspresija aktivatora Pho4 u stanicama ovog mutanta dovela je samo do neznoj otvaranja kromatina promotora (30%), značajno nižeg od razine koja se postiže u stanicama divljeg tipa uz prekomjernu sintezu proteina Pho4 (65%, slika 8). Prekomjerna ekspresija aktivatora Pho4 također eliminira mogućnost niske razine indukcije u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* kao značajnog uzroka za izostanak remodeliranja kromatina i posljedično aktivacije promotora *PHO5*. Razina remodeliranja kromatina promotora *PHO5* u stanicama *arp9<sup>ts</sup>* u kojima dolazi do prekomjerne sinteze proteina Pho4 (slika 8) odgovara onoj postignutoj sa stanicama *snf2 sth1<sup>td</sup>* uz prekomjernu sintezu proteina Pho4 (neobjavljeni rezultati) te ukazuje na značajnu ulogu proteina Arp9 u aktivaciji kromatin-remodelirajuće aktivnosti oba kompleksa, SWI/SNF i RSC. Pri tome, kao što je već rečeno, nije moguće razlučiti je li aktivacijska uloga Arp podjedinica od kritične važnosti za aktivnost jednog ili oba kompleksa. Djelomično remodeliranje kromatina u stanicama mutanata *arp9<sup>ts</sup>* i *snf2 sth1<sup>td</sup>* uz prekomjernu sintezu aktivatora Pho4 moglo bi se objasniti pojačanim privlačenjem ostalih kromatin-remodelirajućih kompleksa (INO80, Isw1, Chd1) koji ne sadrže podjedinicu Arp9, koji su u manjoj mjeri uključeni u proces remodeliranja kromatina promotora *PHO5*, ili čak drugih koaktivatora transkripcije, kao što su kompleks SAGA i Mediator, na područje promotora *PHO5* preko aktivacijske domene Pho4. Međutim, i u jednom i u drugom slučaju dolazi samo do djelomičnog otvaranja kromatina, što rezultira relativno niskom razinom aktivacije transkripcije te se može pretpostaviti da pri fiziološkim uvjetima indukcije nije od značaja. Stoga bi se moglo zaključiti da je aktivnost Arp podjedinica remodelirajućih kompleksa SWI/SNF i RSC od kritičnog značaja za proces remodeliranja kromatina pri fiziološkoj indukciji PHO gena.



## ZAKLJUČCI

Aktivnost proteina Arp9, koji je podjedinica kromatin-remodelirajućih kompleksa SWI/SNF i RSC i esencijalna je komponenta regulatornog modula Arp7/9, kritična je za remodeliranje strukture kromatina promotora i posljedično aktivaciju transkripcije gena *PHO5*.

Izostanak remodeliranja kromatina promotora *PHO5* nije indirektna posljedica niske razine indukcije u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>*, već direktna posljedica izostanka aktivacije kromatin-remodelirajuće aktivnosti kompleksa RSC i kompleksa SWI/SNF, uslijed inaktivacije proteina Arp9.

Inaktivacija proteina Arp9 znatno je smanjila razinu, ali nije u potpunosti spriječila remodeliranje strukture kromatina promotora *PHO8*, čime je pokazana pozitivna uloga modula Arp7/9 u regulaciji aktivnosti kompleksa SWI/SNF pri remodeliranju kromatina promotora *PHO8*.

Pojačanje aktivacijskog potencijala promotora *PHO5*, putem prekomjerne ekspresije aktivatora transkripcije Pho4, omogućilo je samo djelomično remodeliranje kromatina promotora *PHO5* u stanicama mutanta u kojima je inaktiviran protein Arp9.

## ZAHVALE

Prvenstveno zahvaljujem mentoru *professoru emeritusu* dr. sc. Slobodanu Barbariću na vremenu koje odvaja kako bi me podučio svakom aspektu istraživačkog rada.

Također zahvaljujem dr. sc. Philippu Korberu (Biomedical Center Munich) na hibridizaciji membrana radioaktivnim DNA probama, koje je u njegovom laboratoriju pripremila doktorandica Maria Walker, te na PhosphorImager analizi.

## POPIS LITERATURE

Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A., Hörz, W. (1986) Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* **5**, 2689–2696.

Badis, G., Chan, E.T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C.D., Gossett, A.J., Hasinoff, M.J., Warren, C.L., Gebbia, M., Talukder, S., Yang, A., Mnaimneh, S., Terterov, D., Coburn, D., Li Yeo, A., Yeo, Z.X., Clarke, N.D., Lieb, J.D., Ansari, A.Z., Nislow, C., Hughes, T.R. (2008) A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol. Cell* **32**, 878–887.

Barbaric, S., Fascher, K.D., Hörz, W. (1992) Activation of the weakly regulated PHO8 promoter in *S. cerevisiae*: chromatin transition and binding sites for the positive regulatory protein PHO4. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1031–1038.

Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Blaschke, D., Hörz, W., Korber, P. (2007) Redundancy of chromatin remodeling pathways for the induction of the yeast PHO5 promoter in vivo. *J. Biol. Chem.* **282**, 27610–27621.

Barbaric, S., Münsterkötter, M., Goding, C., Hörz, W. (1998) Cooperative Pho2-Pho4 interactions at the PHO5 promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho4 at UASp2. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2629–2639.

Barbaric, S., Münsterkötter, M., Svaren, J., Hörz, W. (1996) The homeodomain protein Pho2 and the basic-helix-loop-helix protein Pho4 bind DNA cooperatively at the yeast PHO5 promoter. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4479–4486.

Belin, B.J., Mullins, R.D. (2013) What we talk about when we talk about nuclear actin. *Nucleus* **4**, 291–297.

Boeger, H., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D. (2008) Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription. *Cell* **133**, 716–726.

Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S., Kornberg, R.D. (2004) Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol. Cell* **14**, 667–673.

Cairns, B.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Winston, F., Kornberg, R.D. (1998) Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol. Cell* **2**, 639–651.

Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., Kornberg, R.D. (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87**, 1249–1260.

Cairns, B.R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R.D., Winston, F. (1999) Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol. Cell* **4**, 715–723.

Caudle, A.S., Yang, W.T., Mittendorf, E.A., Kuerer, H.M. (2016) SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes and Cancer. **150**, 137–143.

Chambers, A.L., Brownlee, P.M., Durley, S.C., Beacham, T., Kent, N. , Downs, J. (2012) The two different isoforms of the RSC chromatin remodeling complex play distinct roles in DNA damage responses. *PLoS One* **7**, e32016.

Clapier, C.R., Cairns, B.R. (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273–304.

Clapier, C.R., Kasten, M.M., Parnell, T.J., Sirinakis, G., Zhang, Y., Cairns, B.R., Clapier, C.R., Kasten, M.M., Parnell, T.J., Viswanathan, R., Szerlong, H. (2016) Regulation of DNA Translocation Efficiency within the Chromatin Remodeler RSC/Sth1 Potentiates Nucleosome Sliding and Ejection. *Mol. Cell* **62**, 453–461.

Donella-Deana, A., Ostojic, S., Pinna, L.A., Barbaric, S. (1993) Specific dephosphorylation of phosphopeptides by the yeast alkaline phosphatase encoded by PH08 gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1177**, 221–228.

Dutta, A., Sardu, M., Gogol, M., Gilmore, J., Zhang, D., Florens, L., Abmayr, S.M., Washburn, M.P., Workman, J.L. (2017) Composition and Function of Mutant Swi/Snf Complexes. *Cell Rep.* **18**, 2124–2134.

Eberharter, A., Becker, P.B. (2004) ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J. Cell Sci.* **117**, 3707–11.

Erkina, T.Y., Zou, Y., Freeling, S., Vorobyev, V.I., Erkine, A.M. (2010) Functional interplay between chromatin remodeling complexes RSC, SWI/SNF and ISWI in regulation of yeast heat shock genes. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1441–1449.

Fascher, K.D., Schmitz, J., Hörz, W. (1990) Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **9**, 2523–2528.

Fascher, K.D., Schmitz, J., Hörz, W. (1993) Structural and functional requirements for the chromatin transition at the PHO5 promoter in *Saccharomyces cerevisiae* upon PHO5 activation. *J. Mol. Biol.* **231**, 658–667.

Fischle, W., Wang, Y., Allis, C.D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 172–183.

Floer, M., Wang, X., Prabhu, V., Berrozpe, G., Narayan, S., Spagna, D., Alvarez, D., Kendall, J., Krasnitz, A., Stepansky, A., Hicks, J., Bryant, G.O., Ptashne, M. (2010) A RSC/nucleosome complex determines chromatin architecture and facilitates activator binding. *Cell* **141**, 407–418.

Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A.A., Zhang, Y., Hélot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Stillman, D.J., Côté, J. (2000) Multiple Links between the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex and Epigenetic Control of Transcription. *Mol. Cell* **5**, 927–937.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741.

Gregory, P.D., Schmid, A., Zavari, M., Münsterkötter, M., Hörz, W. (1999) Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* **18**, 6407–6414.

Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., Workman, J.L. (2002) Function and Selectivity of Bromodomains in Anchoring Chromatin-Modifying Complexes to Promoter Nucleosomes. *Cell* **111**, 369–379.

Hertel, C.B., Längst, G., Hörz, W., Korber, P. (2005) Nucleosome stability at the yeast PHO5 and PHO8 promoters correlates with differential cofactor requirements for chromatin opening. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10755–10767.

Kabsch, W., Holmes, K.C. (1995) The actin fold. *FASEB J.* **9**, 167–174.

Komeili, A., O'Shea, E.K. (1999) Roles of Phosphorylation Sites in Regulating Activity of the Transcription Factor Pho4. *Science* **284**, 977–980.

Korber, P., Barbaric, S. (2014) The yeast PHO5 promoter: from single locus to systems biology of a paradigm for gene regulation through chromatin. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10888–10902.

Korber, P., Luckenbach, T., Blaschke, D., Hörz, W. (2004) Evidence for histone eviction in trans upon induction of the yeast PHO5 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10965–10974.

Kornberg, R.D., Lorch, Y. (1999) Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell* **98**, 285–294.

Krietenstein, N., Wal, M., Watanabe, S., Park, B., Peterson, C.L., Pugh, B.F., Korber, P. (2016) Genomic Nucleosome Organization Reconstituted with Pure Proteins. *Cell* **167**, 709–721.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D.P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T.R., Buratowski, S., Greenblatt, J.F. (2003) A

Snf2 Family ATPase Complex Required for Recruitment of the Histone H2A Variant Htz1. *Mol. Cell* **12**, 1565–1576.

Liu, C., Yang, Z., Yang, J., Xia, Z., Ao, S. (2000) Regulation of the yeast transcriptional factor PHO2 activity by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 31972–31978.

Liu, X., Li, M., Xia, X., Li, X., Chen, Z. (2017) Mechanism of chromatin remodelling revealed by the Snf2-nucleosome structure. *Nature*, 1–17.

Lobsiger, J., Hunziker, Y., Richmond, T.J. (2014) Structure of the full-length yeast Arp7-Arp9 heterodimer. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 310–316.

Lorch, Y., Kornberg, R.D. (2015) Chromatin-remodeling and the initiation of transcription. *Q. Rev. Biophys.* **48**, 465–470.

Martens, J. a, Winston, F. (2002) Evidence that Swi / Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.*, 2231–2236.

Minoda, A., Saitoh, S., Takahashi, K., Toda, T. (2005) BAF53/Arp4 Homolog Alp5 in Fission Yeast Is Required for Histone H4 Acetylation, Kinetochorespindle Attachment, and Gene Silencing at Centromere. *Mol. Biol. Cell* **16**, 316–327.

Moreira, J.M., Holmberg, S. (1999) Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *EMBO J.* **18**, 2836–2844.

Morris, S.A., Baek, S., Sung, M.-H., John, S., Wiench, M., Johnson, T.A., Schiltz, R.L., Hager, G.L., (2014) Overlapping chromatin-remodeling systems collaborate genome wide at dynamic chromatin transitions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 73–81.

Munsterkötter, M., Barbaric, S., Hörz, W. (2000) Transcriptional regulation of the yeast PHO8 promoter in comparison to the coregulated PHO5 promoter. *J. Biol. Chem.* **275**, 22678–85.

Musladin, S. (2014) Uloga kompleksa RSC u remodeliranju strukture kromatina promotora PHO gena kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Musladin, S., Krietenstein, N., Korber, P., Barbaric, S. (2014) The RSC chromatin remodeling complex has a crucial role in the complete remodeler set for yeast PHO5 promoter opening. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4270–4282.

Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., Struhl, K. (2002) Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* **16**, 806–819.

Parnell, T.J., Huff, J.T., Cairns, B.R. (2008) RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *EMBO J.* **27**, 100–10.

Peper, J.S., Dahl, R.E. (2015) Pioneer Transcription Factors, Chromatin Dynamics, and Cell Fate Control. **22**, 134–139.

Poch, O., Winsor, B. (1997) Who's Who among the *Saccharomyces cerevisiae* Actin-Related Proteins? A Classification and Nomenclature Proposal for a Large Family. **1058**, 1053–1058.

Reinke, H., Hörz, W. (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol. Cell* **11**, 1599–1607.

Schmid, A., Fascher, K.D., Hörz, W. (1992) Nucleosome disruption at the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction occurs in the absence of DNA replication. *Cell* **71**, 853–64.

Schneider, K.R., Smith, R.L., O'Shea, E.K. (1994) Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* **266**, 122–126.

Sen, P., Luo, J., Hada, A., Paul, S., Ranish, J., Bartholomew, B., Hailu, S.G., Dechassa, M.L., Persinger, J., Brahma, S. (2017) Loss of Snf5 Induces Formation of an Aberrant SWI/ SNF Complex Loss of Snf5 Induces Formation of an Aberrant SWI/SNF Complex. *Cell Rep.* **18**, 2135–2147.



Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., Wu, C. (2003) Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol. Cell* **12**, 147–155.

Svaren, J., Schmitz, J., Hörz, W. (1994) The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the PHO5 promoter. *EMBO J.* **13**, 4856–4862.

Szerlong, H., Hinata, K., Viswanathan, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cairns, B.R. (2008) The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 469–476.

Szerlong, H., Saha, A., Cairns, B.R. (2003) The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin remodeling. *EMBO J.* **22**, 3175–3187.

Tang, L., Nogales, E., Ciferri, C. (2010) Structure and function of SWI / SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **102**, 122–128.

Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., Patel, D.J. (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1025–1040.

Tsuchiya, E., Uno, M., Kiguchi, A., Masuoka, K., Kanemori, Y., Okabe, S., Mikayawa, T. (1992) The *Saccharomyces cerevisiae* NPS1 gene, a novel CDC gene which encodes a 160 kDa nuclear protein involved in G2 phase control. *EMBO J.* **11**, 4017–4026.

Turegun, B., Kast, D.J., Dominguez, R. (2013) Subunit Rtt102 Controls the Conformation of the Arp7 / 9 Heterodimer and Its Interactions with Nucleotide and the Catalytic Subunit of SWI / SNF Remodelers. *Mol. Cell* **288**, 35758–35768.

Venter, U., Svaren, J., Schmitz, J., Schmid, A., Hörz, W. (1994) A nucleosome precludes binding of the transcription factor Pho4 in vivo to a critical target site in the PHO5 promoter. *EMBO J.* **13**, 4848–4855.

Wippo, C.J., Israel, L., Watanabe, S., Hochheimer, A., Peterson, C.L., Korber, P. (2011) The RSC chromatin remodelling enzyme has a unique role in directing the accurate positioning of nucleosomes. *EMBO J.* **30**, 1277–1288.

Wippo, C.J., Krstulovic, B.S., Ertel, F., Musladin, S., Blaschke, D., Stürzl, S., Yuan, G.-C., Hörz, W., Korber, P., Barbaric, S. (2009) Differential cofactor requirements for histone eviction from two nucleosomes at the yeast PHO84 promoter are determined by intrinsic nucleosome stability. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2960–2981.

Wykoff, D.D., O’Shea, E.K. (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**, 1491–1499.

Yu, F., Imamura, Y., Ueno, M., Suzuki, S.W., Ohsumi, Y., Yukawa, M., Tsuchiya, E. (2015) The yeast chromatin remodeler Rsc1-RSC complex is required for transcriptional activation of autophagy-related genes and inhibition of the TORC1 pathway in response to nitrogen starvation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 1248–1253.

Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J., Rando, O.J. (2005) Genome-Scale Identification of Nucleosome Positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**, 626–630.

# SAŽETAK

Ana Novačić

## Ključna uloga Arp podjedinica u regulaciji aktivnosti kromatin-remodelirajućih kompleksa u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

U strukturi kromatina DNA je čvrsto omotana oko histonskih proteina, što djeluje represivno na sve stanične procese koji uključuju interakcije drugih proteina i DNA, kao što je proces aktivacije transkripcije gena. Remodeliranje strukture kromatina promotorske regije gena je stoga nužan korak koji prethodi procesu inicijacije transkripcije. Remodeliranje kromatina provode kromatin-remodelirajući kompleksi koji koriste energiju hidrolize ATP-a za disocijaciju histona s DNA, čime se oslobađaju mjesta na DNA za vezanje aktivatora transkripcije i RNA polimeraze. Ovi oligoproteinski kompleksi uz katalitičku podjedinicu sadrže i dodatne podjedinice preko kojih se regulira aktivnost kompleksa. Heterodimer proteina Arp7 i Arp9 čini regulatorni modul kromatin-remodelirajućih kompleksa SWI/SNF i RSC u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Nedavno provedeni eksperimenti *in vitro* ukazuju na ključnu ulogu Arp proteina u aktivaciji remodelirajuće aktivnosti ovih kompleksa.

U ovom radu istražena je uloga podjedinice Arp9 u procesu remodeliranja kromatina u stanicama kvasca, pri čemu su kao modelni sustav korišteni promotori gena *PHO5* i *PHO8*. Budući da inaktivacija Arp podjedinica ima letalan fenotip, korištene su stanice temperaturno-osjetljivog mutanta *arp9<sup>ts</sup>*. Pokazano je da je aktivnost proteina Arp9 kritična za proces remodeliranja strukture kromatina i posljedično aktivaciju promotora *PHO5* te da izostanak remodeliranja nije indirektna posljedica niske razine indukcije. Također, pojačanje aktivacijskog potencijala promotora *PHO5* putem prekomjerne ekspresije aktivatora transkripcije Pho4 u stanicama mutanta *arp9<sup>ts</sup>* dovodi samo do niske razine remodeliranja kromatina. Za razliku od promotora *PHO5*, inaktivacija proteina Arp9 značajno, ali ne i potpuno, smanjuje razinu remodeliranja strukture kromatina promotora *PHO8*, iako do aktivacije oba promotora dolazi djelovanjem istog aktivatora, Pho4.

Rezultati dobiveni u ovom radu predstavljaju prve spoznaje o ključnoj aktivacijskoj ulozi Arp podjedinica kompleksa SWI/SNF i RSC u procesu remodeliranja kromatina pri aktivaciji pojedinih promotora u *in vivo* uvjetima.

Ključne riječi: regulacija aktivacije transkripcije / kromatin-remodelirajući kompleksi SWI/SNF i RSC / Arp7/9 / PHO promotori / kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

## SUMMARY

Ana Novačić

### **Crucial role of Arp subunits in regulating the activity of chromatin remodeling complexes in yeast *Saccharomyces cerevisiae***

In chromatin structure, DNA is tightly wrapped around histone proteins, which exerts a repressive effect on all cellular processes that involve interactions of other proteins with DNA, such as transcriptional activation. Remodeling of chromatin structure at the promoter region is therefore a prerequisite for initiation of transcription. Chromatin remodeling complexes enable this process by catalysing ATP-dependent histone eviction, which exposes regulatory sequences for binding of transcriptional activators and RNA polymerase. These complexes consist of a catalytic subunit and multiple regulatory subunits. Regulatory module in which proteins Arp7 and Arp9 form a heterodimer is found in both SWI/SNF and RSC chromatin remodeling complexes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Recent experiments done *in vitro* point to a role of this module in regulating the remodeling activity of these complexes.

This work examines the regulatory role of Arp9 subunit *in vivo*, using yeast *PHO5* and *PHO8* promoters as a model system. Since inactivation of Arp subunits is lethal, temperature-sensitive *arp9<sup>ts</sup>* mutant cells were used for investigating the effect of Arp9 inactivation. Experiments done in this work showed that Arp9 activity is critical for remodeling of chromatin structure at and activation of the *PHO5* promoter. This negative effect is not an indirect consequence of low induction signal in mutant cells. Furthermore, increasing *PHO5* promoter activation potential through activator Pho4 overexpression leads to a low level of chromatin remodeling. In contrast to effect observed at the *PHO5* promoter, Arp9 inactivation significantly, but not completely, impairs remodeling of chromatin structure at the coregulated *PHO8* promoter.

Results of this work show for the first time the crucial role of Arp subunits in regulating the chromatin remodeling activity of SWI/SNF and RSC complexes in activation of certain promoters *in vivo*.

Key words: transcriptional regulation / chromatin remodeling complexes SWI/SNF and RSC / Arp7/9 / PHO promoters / yeast *Saccharomyces cerevisiae*