

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Kontrola kvality skládání snRNP částic

Autoreferát dizertační práce

Adriana Roithová

2018

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady:

Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Školící pracoviště:

Oddělení biologie RNA, Ústav molekulární genetiky AVČR, v. v. i.

Autorka:

Adriana Roithová

Školitel:

doc. Mgr. David Staněk, PhD

S dizertací je možno se seznámit v knihovně Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Abstrakt	4
Úvod	6
Cíle práce	9
Materiály a metody.....	10
Výsledky.....	11
Diskuze.....	13
Souhrn	17
Seznam literatury:	19
Životopis	21

Abstrakt

snRNP patří k nejdůležitějším částem sestřihového komplexu. Jejich životní cyklus se odehrává v cytoplasmě, kde probíhají první fáze jejich biogeneze, a také v jádře, kde plní svoji hlavní funkci. Všechny snRNP jsou složeny z krátké nekódující RNA, z Sm či LSm proteinů tvořící 7-členný kruh a z proteinů specifických pro každý snRNP. Jejich životní cyklus začíná v jádře, kde jsou transkribovány RNA polymerázou II nebo III. Poté jsou transportovány do cytoplasmy. Během své cytoplasmatické fáze se formuje Sm kruh kolem specifické sekvence na RNA pomocí SMN komplexu a následně se trimetyluje čepička na 5'konci snRNA. Tyto 2 úpravy jsou signálem, že je snRNP připravena na transport do jádra, kde je hromaděna v jaderných strukturách nazývajících se Cajalova tělíska. V Cajalových tělískách probíhá finální část jejich zrání.

Průběh snRNP biogeneze je průběžně kontrolován. První kontrola probíhá v jádře ihned po jejich transkripci a následuje vytvoření exportního komplexu. Druhý kontrolní bod je v cytoplasmě a zahrnuje tvorbu Sm kruhu. Víme, že Sm kruh je tvořen SMN komplexem ale detailní mechanismus je stále neznámý. Pokud snRNA neprojde těmito kontrolními body, tak je v cytoplasmě degradována. Avšak, jak buňka rozlišuje mezi normálními a defektními snRNA se stále neví.

Třetí a poslední kontrolní bod se nachází v Cajalových tělískách. Signál, který navádí snRNP do těchto struktur je stále nepopsaný.

V mé práci jsme se soustředili na roli Sm kruhu v kontrole kvality během životního cyklu snRNP v jádře i v cytoplasmě.

Nejprve jsme našli důležitý motiv v Sm proteinech, který je zodpovědný za lokalizaci snRNP do Cajalových tělísek a zároveň jsme navrhli model, kde Sm kruh hraje důležitou roli při kontrole kvality zrání snRNP v Cajalových tělískách.

V druhé části jsme zkoumali roli proteinu Gemin3, který je součástí SMN komplexu zodpovědného za skládání Sm kruhu v cytoplasmě. Naše výsledky ukazují, že Gemin3 je RNA helikáza, jejíž funkcí v životním cyklu snRNP je rozplétat sekundární strukturu snRNA pro lepší přístup Sm vazebného místa pro tvorbu Sm kruhu.

Nakonec jsme se soustředili na osud nezralých snRNP, které nebyly schopny získat Sm kruh v cytoplasmě. Ukázaly jsme, že nezralé částice jsou hromaděny v cytoplasmatických P tělískách. Také jsme ukázaly novou roli LSm1 proteinu v degradaci špatných snRNA.

Úvod

Všechny buňky ve svém jádře obsahují dědičnou informaci ve formě DNA. Tato informace je rozdělena do menších jednotek zvané geny, které řídí vznik bílkovin. Aby vznikla funkční bílkovina, musí být tyto geny přepsány do messenger RNA (mRNA) pomocí transkripce a v cytoplasmě je poté tato mRNA přeložena do bílkoviny pomocí procesu zvaného translace. Tyto dva procesy – transkripce a translace jsou u eukaryot prostorově odděleny pomocí buněčného jádra.

Během jaderné fáze probíhá proces zvaný transkripce, při kterém vzniká pre-mRNA. Než je tato RNA transportována do cytoplasmy, musí projít několika změnami jako je přidání monometylované čepičky na 5'konec mRNA, vyštípnutí nekódujících sekvencí (intronů) a polyadenylace 3'konce. Proces, ve kterém jsou z pre-mRNA odstraněny nekódující sekvence (introny) a kódující sekvence (exony) jsou spojeny dohromady, se nazývá sestřih pre-mRNA. Introny jsou odstraňovány sestřihovým komplexem, který je tvořen velkým množstvím bílkovin a jeho hlavní katalytické jádro je tvořeno 5 malými jadernými ribonukleoproteinovými částicemi - snRNP. Každá tato částice je tvořena z male nekódující RNA (U1, U2, U4, U5 a U6), z Sm či LSm protein a z protein specifických pro každý snRNP. Můj projekt je zaměřen pouze na životní cyklus U1, U2, U4 a U5. Tyto snRNP jsou přepisovány v jádře pomocí RNA polymerázy II a poté jsou přeneseny z jádra do cytoplasmy, kde jsou vázány SMN komplexem, který formuje Sm kruh tvořený Sm proteiny kolem specifické sekvence (Sm místo) bohaté na uridin. Sm kruh stabilizuje snRNA a chrání ji před degradací nukleázami (shrnutí v Matera and Wang, 2014). Následně je monometylovaná čepička trimetylovaná pomocí Trimethyl guanosine syntázy TGS1 (Massenet et al., 2002). Po těchto dvou úpravách je snRNP připravena pro přenos zpět do jádra, kde se akumuluje v jaderných tělískách zvaných Cajalova tělíska.

Avšak mechanismus, jakým jsou snRNP částice navigovány do těchto tělísek, je stále neznámý. Cajalova tělíška jsou místa, kde probíhá finální úprava snRNP, vazba specifických proteinů a *de novo* skládání i recyklace U4/U6 di-snRNP a U4/U6·U5 tri-snRNP (Stanek et al., 2003). Poté je snRNP částice uvolněna do nukleoplazmy a stává se součástí sestřihového komplexu, kde se aktivně podílejí na sestřihu pre-mRNA. Vzhledem k tomu, že sestřih pre-mRNA patří k nejdůležitějším procesům v buňce a jeho nesprávné fungování vede k různým onemocněním jako je spinální muskulární atrofie či retinitis pigmentosa (Pellizzoni et al., 1998; Ruzickova and Stanek, 2016), musí být formování snRNP částic v buňce pod neustálou a precizní kontrolou.

Tvorba snRNP částic prochází 3 hlavními kontrolními body. První bod se nachází v jádře hned po přepisu pre-snRNA, kdy na 5' konec je navázána monometylovaná čepička. Následně se na ni vytvoří funkční exportní complex tvořený exportinem 1 a proteinem zvaným PHAX, který je specifický pro snRNA (Fornerod et al., 1997; Ohno et al., 2000). Pokud se tento komplex nevytvoří, snRNA je detekována jako defektní a je v jádře degradována (Suzuki et al., 2010).

Další kontrolní bod se nachází v cytoplasmě, kde je snRNA vázána SMN komplexem, který formuje Sm kruh kolem Sm místa na snRNA. Pokud Sm proteiny kruh nevytvoří, snRNA jsou transportovány do cytoplasmatických tělísek zvané P tělíška, kde jsou degradovány exonukleázou Xrn1 (Ishikawa et al., 2014; Shukla and Parker, 2014). P tělíška jsou místem, kde jsou uskladněny proteiny, které plní svoji funkci při degradaci mRNA (LSm1-7, Dcp1, Dcp2, Xrn1, Ago2 a další). Avšak mechanismus, jakým jsou defektní snRNA v cytoplasmě rozpoznávány a následně transportovány do P tělísek, je stále neznámý. Poslední studie ukázaly uridilaci na 3'konci zkrácené a nefunkční U2 snRNA (U2-trf) pomocí TUT4 a TUT7. Tato

modifikace je specifická pro RNA odsouzené k degradaci pomocí exonukleázy DIS3L2 (Ishikawa et al., 2018). Tato exonukleáza se však nenachází v P tělískách, ale je volně v cytoplasmě. Tyto experimenty ukazují, že buňka využívá více degradačních cest, kterými se zbavuje defektních snRNA.

Pokud snRNA získá Sm kruh a její monometylovaná čepička je trimetylována, je přenesena z cytoplasmy zpět do jádra, kde se akumuluje v Cajalových tělískách. Tyto tělíska jsou zároveň třetím a posledním kontrolním bodem životního cyklu snRNP. V Cajalových tělískách probíhají úpravy snRNA a jsou zde vázány specifické proteiny. Předchozí práce ukázaly, že pokud se specifické proteiny nemohou na snRNA navázat, snRNA se akumuluje v Cajalových tělískách a nemohou být uvolněny do cytoplasmy (Tanackovic and Kramer, 2005; Novotny et al., 2015). Ukazuje se tedy, že Cajalova tělíska nejsou pouze místem formování snRNP částic, ale také jejich místem kontroly. Avšak mechanismus, jakým jsou nesložené snRNA v Cajalových tělískách zachytávány a drženy, je stále nejasný.

Vzhledem k důležitosti formování snRNP částic jsme se rozhodli blíže prozkoumat jejich životní cyklus. Především, jak jsou snRNP navigovány do Cajalových tělísek a také jsme se rozhodli více prozkoumat jakými mechanismy jsou v buňce kontrolovány.

Cíle práce

V této práci se zaměřujeme na životní cyklus snRNP, které tvoří nejdůležitější část setřihového komplexu. Zaměřila jsem se na 3 hlavní cíle:

- Identifikovat lokalizační signal, který naviguje snRNP do jaderných struktur zvaných Cajalova tělíska
- Popsat roli podjednotky SMN komplexu zvané Gemin3, při formování Sm kruhu v cytoplasmě
- Identifikovat faktory zodpovědné za rozpoznání a degradaci nekompletních snRNP v cytoplasmě

Materiály a metody

V této práci jsem použila mikroinjekci do adherentních buněk a biochemické metody, jako imunoprecipitace, westernový přenos, *in vitro* transkripci a PCR k charakterizaci proteinů a snRNA sekvencí důležitých pro přenos do Cajalových tělísek. Využila jsem RNA interferenci použitím siRNA pro studium fyziologických funkcí proteinů našeho zájmu. Pro analýzu protein-RNA interakcí jsem použila izolaci RNA a reverzní transkripci kombinovanou s kvantitativní PCR (RT-qPCR).

Pomocí matematického modelování jsme analyzovali sekundární struktury U2 snRNA.

Pro sledování lokalizace snRNA a proteinů v buňce jsem využila pokročilé mikroskopické techniky. Pro počítání Cajalových tělísek v jednotlivých buňkách jsem využila analýzu pomocí Scan^R softwaru.

Výsledky

V prvním projektu jsem analyzovala sekvence a proteiny, které jsou důležité pro transport snRNP do jaderných struktur zvaných Cajalova tělíska. Moje experimenty ukázaly, že Sm proteiny tvořící Sm kruh hrají nepostradatelnou úlohu v tomto procesu. Identifikovala jsem lokalizační signal do Cajalových tělísek, který se nachází v úsecích SmB/B', SmD1 a SmD3 proteinů zvaných GR repetice. Dále jsem analyzovala kontrolu kvality formování snRNP v Cajalových tělískách a navrhla model, kde Sm proteiny hrají důležitou roli jak v transportu snRNP do Cajalových tělísek, tak i v kontrole, zda jsou snRNP částice v Cajalových tělískách správně sestaveny.

V druhém projektu jsem studovala novou sekundární strukturu snRNA, která byla objevena při matematickém modelování sekundárních struktur U2 snRNA mutantů v předchozím projektu. V této struktuře je Sm místo, důležité pro formování Sm kruhu, obklopeno sekvencemi, které spolu párují. Tuto smyčku jsme nazvali NSS (angl. Near Sm site). Tato struktura zmizí po sformování Sm kruhu kolem Sm místa. Z předchozích experimentů je známo, že SMN komplex hraje nepostradatelnou úlohu v tomto procesu. Jedna z podjednotek SMN komplexu, zvaná Gemin3, je anotována jako DEAD-box helikáza. Z mých experimentů vyplývá, že hraje důležitou roli při rozplétání NSS sekundární struktury, čímž napomáhá k formování Sm kruhu kolem Sm místa v cytoplasmě.

Ve třetím projektu jsem se zaměřila na kontrolu kvality formování snRNP částic v cytoplasmě. Ukázala jsem, že všechny snRNA (U1, U2, U4 a U5) jsou akumulovány v cytoplasmatických strukturách zvaných P tělíska a následně degradovány, pokud nebyly schopny získat Sm kruh. Analyzovala jsem LSm1 protein, který je součástí 5'-3' degradační dráhy v cytoplasmě. Objevila jsem, že tento protein interaguje s

snRNA pouze pokud není složen Sm kruh a snRNA jsou odsouzeny k degradaci. Dále jsem pozorovala sníženou akumulaci defektních snRNA v P tělískách, když jsem inhibovala LSm1 protein. Moje data ukazují, že LSm1 protein hraje důležitou roli v transportu defektních snRNA do P tělísek a zřejmě hraje roli i při jejich rozpoznávání v cytoplasmě.

Diskuze

Životní cyklus snRNP částic začíná v buněčném jádře, kde jsou snRNA přepisovány RNA polymerázou II a následně transportovány do cytoplasmy. V cytoplasmě je sformován Sm kruh pomocí SMN komplexu a monometylovaná čepička na 5'konci je trimetylovaná. Tyto dvě úpravy jsou signálem, že snRNP částice je připravena pro transport zpátky do jádra, kde probíhá jejich finální maturace a poté se stávají součástí sestřihového komplexu. V jádře jsou lokalizovány především v Cajalových tělískách, kde jsou finálně upraveny a jsou zde navázány specifické proteiny (Nesic et al., 2004; Stanek et al., 2003). Navzdory důležité roli Cajalových tělísek ve formování snRNP částic, nebylo stále jasné, jak jsou snRNP do těchto tělísek transportovány. V prvním projektu jsem ukázala, že Sm a SMN vazebná místa na snRNA jsou nezbytná a dostačující pro cílení snRNA do Cajalových tělísek.

Předchozí studie ukázaly, že minimální snRNA sekvence obsahující Sm a SMN vazebná místa jsou schopná vázat SMN komplex (Yong et al., 2004; Golembe et al., 2005). Také se předpokládá, že tento komplex napomáhá jadernému importu nově sformovaných snRNP částic a cílí je přes interakci s coilinem do Cajalových tělísek (Narayanan et al., 2004). Naše experimenty však ukázaly, že pokud není sestaven Sm kruh, snRNA nejsou transportovány do Cajalových tělísek, i když obsahují SMN vazebné místo. Dále jsme ukázaly, že snRNP částice s Sm kruhem byly akumulovány v Cajalových tělískách i když byl SMN protein inhibován. Z našich výsledků tedy vyplývá, že SMN komplex není důležitý pro cílení snRNP do Cajalových tělísek.

V Cajalových tělískách musí být snRNP částice zachycené. Jako hlavní kandidát podílející se na interakci s snRNP se nabízí coilin. Coilin je hlavní protein tvořící Cajalova tělíska. Předchozí studie ukázaly, že Sm proteiny interagují s coilinem přes svojí Sm doménu (Toyota et al., 2010; Xu et al., 2005). Tato interakce je stabilizována a posílena C-terminálním koncem Sm proteinů (Xu et al., 2005). C-terminální konec coilinu obsahuje Tudor doménu (Shanbhag et al., 2010), která u jiných proteinů interaguje s metylovanými Argininy (Pek et al., 2012). V mojí práci jsem ukázala, že delece GR repetice snižují akumulaci Sm proteinů v Cajalových tělískách. Je možné, že coilin interaguje s dimetylovanými Argininy v GR repeticích, které se nachází na C-konci SmB/B', SmD1 a SmD3 proteinů. Na druhou stranu, bylo ukázáno, že izolovaný coilin nevázal dimetylované Argininy *in vitro* (Shanbhag et al., 2010). Avšak novější studie s využitím iCLIP dat ukázala přímou vazbu snRNA a coilinu, což pravděpodobně může být další snRNA lokalizační signál.

Cajalova tělíska jsou místem finálního zrání snRNP (Stanek et al., 2003; Tanackovic and Kramer, 2005). Především studie ukázala že inhibice posledních fází životního cyklu U4, U5 a U6 snRNP vede k zadržení nematurovaných snRNP částic v Cajalově tělísku (Novotny et al., 2015). V mojí práci jsem pozorovala stejný fenotyp u U2 Δ SLI snRNA, která není schopná vázat jeden ze specifických proteinů SF3a komplexu. Na druhou stranu, když jsem v této snRNA odstranila ještě Sm místo, tato defektní snRNA nebyla akumulována v Cajalových tělískách. Z mých výsledků vyplývá, že Sm kruh je hlavním lokalizačním signálem do Cajalových tělísek. Na základě těchto dat jsme navrhli hypotézu, kde Sm kruh slouží jako lokalizační, tak i retenční signál Cajalových tělísek. Domníváme se, že interakce odhaleného Sm kruhu s proteiny v Cajalovém tělísku drží nehotovou snRNP a když je snRNP částice plně složena, snRNP změní konformaci a interakce Sm kruhu a

proteinů z Cajalových tělísek je přerušena, čímž je hotová snRNP částice uvolněna do nukleoplazmy.

Předchozí studie ukázaly, že SMN komplex hraje nepostradatelnou roli při formování Sm kruhu v životním cyklu snRNP, ale funkce jednotlivých komponent tohoto komplexu není stále plně známá (Pellizzoni et al., 1998; Massenet et al., 2002). Při matematickém modelování U2 snRNA sekundární struktury jsme zjistili, že Sm místo je obklopeno navzájem párujícími sekvencemi, které jsme nazvali NSS (angl. Near Sm site Stem). Tato sekundární struktura je otevřena, když je sestaven Sm kruh kolem Sm místa. Předchozí experimenty ukázaly, že SMN komplex je nezbytný pro tento proces (Paushkin et al., 2002). Inhibovala jsem jednu z komponent SMN komplexu, Gemin3, a pozorovala sníženou akumulaci snRNA v Cajalových tělískách. Přesná role Geminu3 ve formování Sm kruhu je stále nejasná. Tento protein je anotován jako DEAD-box RNA helikáza. Hlavní funkce RNA helikáz je rozvolňování sekundárních struktur RNA využitím energie z hydrolýzy ATP. Mutovala jsem U2 snRNA, kde jsem zesílila vazebnou schopnost NSS strukturu (U2stableNSS). Tato mutovaná snRNA nebyla transportována do Cajalových tělísek, což ukazuje, že Sm kruh nebyl složen. Naproti tomu, U2 snRNA, kde NSS vazba byla zeslabena (U2noNSS), byla transportována do Cajalových tělísek, i když Gemin3 byl v buňkách inhibován. Tyto data silně naznačují, že Gemin3 je důležitý pro rozvolnění NSS struktury pro zpřístupnění Sm místa k vazbě Sm proteinů.

Moje předešlá data ukázala důležitou roli Sm kruhu v transportu snRNP částic do Cajalových tělísek. Pokud Sm kruh není složen, snRNA se akumuluje v cytoplasmě. Předešlé experimenty ukázaly, že zkrácená forma U1 snRNA (U1-trf)

je akumulována v cytoplasmatických tělískách zvané P tělíska a jsou degradovány Xrn1 exonukleázou (Ishikawa et al., 2014; Shukla and Parker, 2014). Stejný fenotyp jsem pozorovala u všech endogenních snRNA (U1, U2, U4 a U5), když jsem zabránila sestavení Sm kruhu inhibicí Sm proteinů. Avšak mechanismus jakým jsou defektní snRNA v cytoplasmě rozpoznávány a cíleny do P tělísek je stále neznámý. P tělíska jsou místem, kde jsou shromažďovány proteiny plnící funkci v degradačních drahách mRNA takové jako Xrn1, Dcp1, Dcp2 nebo Ago2. Snažila jsem se najít protein, který je zodpovědný za rozpoznání a cílení defektních snRNA do P tělísek. Je známo, že LSm1-7 kruh je zodpovědný za stabilizaci enzymů odstraňujících čepičku z 5' konce RNA. Moje data ukazují, že Lsm1 protein hraje roli v transportu defektních snRNA do P tělísek. Ukázala jsem, že LSm1 váže snRNA pokud nemají Sm kruh. Inhibice LSm1 proteinu také zabraňuje akumulaci defektních snRNA v P tělískách. Tyto experimenty nám naznačují, že LSm1-7 kruh hraje roli při degradaci snRNA v cytoplasmě. Mechanismus, jakým je LSm1-7 kruh vázán na snRNA, je však stále neznámý. Vazebné místo pro LSm1-7 kruh je tvořeno 8 uridiny (Zhou et al., 2014). Nedávná studie ukázala, že zkrácená forma U2 snRNA (U2-tfs) je uridilovaná na 3' konci pomocí TUT4 a TUT7 enzymů (Ishikawa et al., 2018), což může vytvořit vazebné místo pro LSm proteiny. Z našich dat vyplývá, že jsme našli novou roli LSm1-7 kruhu v snRNA degradační dráze, avšak přesný mechanismus je stále nejasný.

Souhrn

V mojí práci jsem se zaměřila na životní cyklus snRNP. snRNP jsou klíčové komponenty sestřihového komplexu, který katalyzuje sestřih pre-mRNA. Můj projekt je rozdělen na tři části zabývající se skládáním a kontrolou snRNP částic během jejich maturace v jádře a v cytoplasmě.

V prvním projektu jsem studovala jadernou část snRNP biogeneze, ve které jsou tyto částice transportovány do Cajalových tělísek. V Cajalových tělískách probíhá jejich finální zrání. Moje data ukázala zásadní roli Sm proteinů v navigování snRNP do těchto jaderných struktur. Lokalizační signál jsme identifikovali v GR repeticích Sm proteinů SmB/B', SmD1 a SmD3. Dále moje experimenty ukazují že nekompletní snRNA jsou v Cajalových tělískách zadrženy více než standartní typy snRNA. Na základě mých dat jsme navrhli model, kde Sm proteiny jsou nezbytné jak pro transport snRNP do Cajalových tělísek, tak i pro jejich zadržení v nich během jejich finálního skládání.

V druhém projektu jsem studovala alternativní snRNA sekundární strukturu, kterou jsme objevili během matematického modelování U2 snRNA v předchozím projektu. V této sekundární struktuře je Sm místo obklopeno párující smyčkou, kterou jsme nazvali NSS (angl. Near Sm site Stem). Tato struktura se neobjevuje v snRNA po navázání Sm proteinů na Sm místo. Je známo, že SMN komplex hraje hlavní roli při formování Sm kruhu. Inhibovali jsme komponentu SMN komplexu zvanou Gemin3, která je anotována jako DEAD-box RNA helikáza a pozorovali sníženou akumulaci snRNA v Cajalových tělískách. Naše data ukazují, že Gemin3 hraje roli v rozvolňování NSS struktury pro zpřístupnění Sm místa pro vazbu Sm proteinů.

V třetím projektu jsem se zaměřila na kontrolu kvality skládání snRNP v cytoplasmě. Ukázala jsem, že rozrušení Sm kruhu vede k akumulaci snRNA v cytoplasmatických tělískách zvaných P tělíska a jejich následné degradaci Xrn1 exonukleázou. Do Xrn1 5'-3' degradační dráhy je zapojeno mnoho proteinů. Já jsem se zaměřila na LSm1-7 kruh, který hraje hlavní roli ve stabilizaci enzymů odstraňujících čepičku z 5' konce RNA (Dcp1 a Dcp2). Moje experimenty ukazují, že LSm1 protein hraje roli v transportu defektních snRNA do P tělísek, kde následně podléhají Xrn1 degradační dráze.

Seznam literatury:

- Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I.W. Mattaj. 1997. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell*. 90:1051–1060. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80371-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80371-2).
- Golembe, T.J., J. Yong, and G. Dreyfuss. 2005. Specific sequence features, recognized by the SMN complex, identify snRNAs and determine their fate as snRNPs. *Mol. Cell. Biol.* 25:10989–11004. doi:10.1128/MCB.25.24.10989-11004.2005.
- Ishikawa, H., Y. Nobe, K. Izumikawa, M. Taoka, Y. Yamauchi, H. Nakayama, R.J. Simpson, T. Isobe, and N. Takahashi. 2018. Truncated forms of U2 snRNA (U2-tfs) are shunted toward a novel uridylylation pathway that differs from the degradation pathway for U1-tfs. *RNA Biol.* 15:261–268. doi:10.1080/15476286.2017.1408766.
- Ishikawa, H., Y. Nobe, K. Izumikawa, H. Yoshikawa, N. Miyazawa, G. Terukina, N. Kurokawa, M. Taoka, Y. Yamauchi, H. Nakayama, T. Isobe, and N. Takahashi. 2014. Identification of truncated forms of U1 snRNA reveals a novel RNA degradation pathway during snRNP biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 42:2708–2724. doi:10.1093/nar/gkt1271.
- Massenet, S., L. Pellizzoni, S. Paushkin, I.W. Mattaj, and G. Dreyfuss. 2002. The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22:6533–6541.
- Matera, A.G., and Z. Wang. 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:108–21. doi:10.1038/nrm3742.
- Narayanan, U., T. Achsel, R. L??hrmann, and A.G. Matera. 2004. Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol. Cell.* 16:223–234. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.024.
- Nesic, D., G. Tanackovic, and A. Kramer. 2004. A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis. *J. Cell Sci.* 117:4423–4433. doi:10.1242/jcs.01308.
- Novotny, I., A. Malinova, E. Stejskalova, D. Mateju, K. Klimesova, A. Roithova, M. Sveda, Z. Knejzlik, and D. Stanek. 2015. SART3-Dependent Accumulation of Incomplete Spliceosomal snRNPs in Cajal Bodies. *Cell Rep.* doi:10.1016/j.celrep.2014.12.030.
- Ohno, M., A. Segref, A. Bachi, M. Wilm, and I.W. Mattaj. 2000. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell.* 101:187–198. doi:10.1016/S0092-8674(00)80829-6.
- Paushkin, S., A.K. Gubitza, S. Massenet, and G. Dreyfuss. 2002. The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:305–312. doi:10.1016/S0955-0674(02)00332-0.
- Pek, J.W., A. Anand, and T. Kai. 2012. Tudor domain proteins in development. *Development.* 139:2255–2266. doi:10.1242/dev.073304.
- Pellizzoni, L., N. Kataoka, B. Charroux, and G. Dreyfuss. 1998. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell.* 95:615–624. doi:S0092-8674(00)81632-3 [pii].
- Ruzickova, S., and D. Stanek. 2016. Mutations in spliceosomal proteins and retina degeneration. *RNA Biol.* 1–9. doi:10.1080/15476286.2016.1191735.
- Shanbhag, R., A. Kurabi, J.J. Kwan, and L.W. Donaldson. 2010. Solution structure of the carboxy-

- terminal Tudor domain from human Coilin. *FEBS Lett.* 584:4351–4356. doi:10.1016/j.febslet.2010.09.034.
- Shukla, S., and R. Parker. 2014. Quality control of assembly-defective U1 snRNAs by decapping and 5'-to-3' exonucleolytic digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:E3277–E3286. doi:10.1073/pnas.1412614111.
- Stanek, D., S.D. Rader, M. Klingauf, and K.M. Neugebauer. 2003. Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J. Cell Biol.* 160:505–516. doi:10.1083/jcb.200210087.
- Suzuki, T., H. Izumi, and M. Ohno. 2010. Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. *J. Cell Biol.* 190:603–612. doi:10.1083/jcb.201004109.
- Tanackovic, G., and A. Kramer. 2005. Human splicing factor SF3a, but not SF1, is essential for pre-mRNA splicing in vivo. *Mol. Biol. Cell.* 16:1366–1377. doi:10.1091/mbc.E04-11-1034.
- Toyota, C.G., M.D. Davis, A.M. Cosman, and M.D. Hebert. 2010. Coilin phosphorylation mediates interaction with SMN and SmB'. *Chromosoma.* 119:205–215. doi:10.1007/s00412-009-0249-x.
- Xu, H., R.S. Pillai, T.N. Azzouz, K.B. Shpargel, C. Kambach, M.D. Hebert, D. Schmpferli, and A.G. Matera. 2005. The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma.* 114:155–166. doi:10.1007/s00412-005-0003-y.
- Yong, J., T.J. Golembe, D.J. Battle, L. Pellizzoni, and G. Dreyfuss. 2004. snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly. *Mol. Cell. Biol.* 24:2747–2756.
- Zhou, L., Y. Zhou, J. Hang, R. Wan, G. Lu, C. Yan, and Y. Shi. 2014. Crystal structure and biochemical analysis of the heptameric Lsm1-7 complex. *Cell Res.* 24:497–500. doi:10.1038/cr.2014.18.

Životopis

Vzdělání:

2009 - 2012 Přírodovědecká fakulta Karlovy univerzity v Praze

Program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Bakalářská práce: Důležité faktory pro formování Cajalových tělísek

Školitel: David Staněk PhD. David.stanek@img.cas.cz , Ústav Molekulární Genetiky AVČR (Laboratoř Biologie RNA)

2012 – 2014 Přírodovědecká fakulta Karlovy univerzity v Praze

Program: Molekulární biologie, genetika a virologie

Diplomová práce: Cílení U2 snRNA do Cajalových tělísek

Školitel: David Staněk PhD. David.stanek@img.cas.cz , Ústav Molekulární Genetiky AVČR (Laboratoř Biologie RNA)

2014- Přírodovědecká fakulta Karlovy univerzity v Praze

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virology,
doktorské stadium

Kurzy

2014 - Školení pro práci s radioizotopy , Ústav Molekulární Genetiky AVČR

2014 - Pokroky v molekulární biologii a genetice, Ústav Molekulární Genetiky AVČR

2015 - Advanced course of Fluorescent Microscopy, EMBL course, Heidelberg, Germany

2016 - Elements of science, Ústav Molekulární Genetiky AVČR

Lektorské zkušenosti:

2015- dosud - školení Mikroinjekce do adherentních buněk, Ústav molekulární genetiky AVČR

2016 - Lektor projektu Otevřená věda, projekt – Nový svět RNA (vedení středoškolského studenta)

2018- Lektor projektu Otevřená věda, projekt – Velká síla malých RNA (vedení středoškolského studenta)

Jazyky:

Angličtina: pokročilá

Němčina: mírně pokročilá

Konference:

2013: RNA club, CEITEC, Brno

Plakátové sdělení: U2 snRNA targeting into Cajal bodies

2014: Complex life of mRNA, EMBL, Heidelberg, Germany

Plakátové sdělení: U snRNA targeting into Cajal bodies

2015: RNA club, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice

Prezentace: U snRNA targeting into Cajal bodies

Ocenění: The best Talk award

2016: RNA 2016, Kjóto, Japan

Plakátové sdělení: Sm ring dependent targeting of snRNP into Cajal bodies

2016: 12th International Congress of Cell Biology, Praha, Česká republika

Plakátové sdělení: Sm ring dependent targeting of snRNP into Cajal bodies

Ocenění: The best poster award

2017: RNA 2017, Praha, Česká republika

Plakátové sdělení: Quality control in snRNP assembly

Publikace:

SART3-Dependent Accumulation of Incomplete Spliceosomal snRNPs in Cajal

Bodies. Cell Rep. 2015 Jan 13. pii: S2211-1247(14)01059-6. doi:

10.1016/j.celrep.2014.12.030

Novotný I, Malinová A, Stejskalová E, Matějů D, Klimešová K, **Roithová A**, Švéda M, Knejzlík Z, Staněk D

The Sm-core mediates the retention of partially-assembled spliceosomal snRNPs in Cajal bodies until their full maturation Nucleic Acids Res. 2018 Feb 5. doi: 10.1093/nar/gky070

Adriana Roithová, Klára Klimešová, Josef Pánek, Cindy L. Will, Reinhard Lührmann, David Staněk and Cyrille Girard

Granty:

GAUK 460413: Role SMN během maturace snRNP v jádře - spoluřešitel

GAUK 134516: Kontrola kvality skládání snRNP v cytoplasmě- hlavní řešitel