

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Karolína Hájková**

Působení SR-like proteinů při maturaci a vedení mRNA do cytoplazmy  
Effect of SR-like proteins in maturation and transfer of mRNA to the cytoplasm

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Abrahámová, Ph.D.

Praha, 2020

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala Mgr. Kateřině Abrahámové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracování mé bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03. 08. 2020

Karolína Hájková

## **ABSTRAKT**

Mezi skupinu proteinů účastnících se sestřihu transkriptů u metazoí patří tzv. SR proteiny. Jedná se o RNA-vazebné proteiny, pro které je charakteristická přítomnost domény bohaté na serin a arginin. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* kóduje geny pro proteiny, které jsou svým aminokyselinovým složením a strukturou podobné skupině SR proteinů a jsou proto označovány jako SR-like proteiny. Jedná se o tři proteiny s doménou RS: Npl3, Gbp2 a Hrb1. Ukazuje se, že tyto proteiny zastávají více funkcí, mezi něž kromě sestřihu patří i kontrola kvality sestřižených mRNA a jejich export z jádra do cytoplazmy. Tato bakalářská práce se bude zabývat právě těmito třemi kvasinkovými proteiny a jejich rolí v sestřihu, exportu a degradaci.

### **Klíčová slova**

Npl3, Gbp2, Hrb1, mRNA, transkripce, sestřih, export, degradace

## **ABSTRACT**

Metazoan SR proteins is a group of proteins involved in splicing. They are RNA-binding proteins characterized by the presence of serine and arginine-rich domain. The yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, encodes genes for proteins that are similar in amino acid composition and structure to the group of SR proteins and are therefore called SR-like proteins. There are three proteins with RS domain in yeast: Npl3, Gbp2 and Hrb1. These proteins have been shown to have many functions, including, in addition to splicing, quality control of spliced mRNAs and their export from the nucleus to the cytoplasm. This Bachelor's thesis will deal with these three yeast proteins and their role in splicing, export and degradation.

### **Key words**

Npl3, Gbp2, Hrb1, mRNA, transcription, splicing, export, degradation

# OBSAH

ZKRATKY POUŽITÉ V TEXTU .....	1
1. ÚVOD .....	3
2. SESTRŮH pre-mRNA.....	4
3. EXPORT mRNA.....	7
4. DEGRADACE RNA.....	9
5. SR PROTEINY A EUKARYOTA .....	11
6. STRUKTURA.....	12
6.1. Struktura SR proteinů .....	12
6.2. Struktura SR-like proteinů .....	14
6.3. Posttranslační modifikace SR-like proteinů .....	16
7. FUNKCE SR-like PROTEINŮ .....	18
7.1. Interakce s RNA.....	18
7.2. SR-like proteiny jsou v kontaktu s RNA již během transkripce.....	19
7.3. Proteiny Gbp2 a Hrb1 interagují s komplexem TREX.....	20
7.4. Role SR-like proteinů v sestřihu .....	21
7.5. Role SR-like proteinů v exportu .....	22
7.6. Gbp2 a Hrb1 hrají roli při kontrole kvality mRNA .....	23
8. ZÁVĚR.....	25
SEZNAM LITERATURY.....	27

## ZKRATKY POUŽITÉ V TEXTU

3' SS	3' splice site, 3' sestřihové místo
5' SS	5' splice site, 5' sestřihové místo
BP	branch point, místo větvení v intronu
CBC	cap-binding complex, komplex vázající se na 5' čepičku
C-konec	carboxy end of a protein, karboxylový konec proteinu
CRAC	crosslinking and analysis of cDNA (complementary DNA), vytvoření kovalentní vazby a analýza příslušné cDNA (komplementární DNA)
CTD	C-terminální doména
DEAD-box	motiv s aminokyselinovou sekvencí aspartát-glutamát-alanin- aspartát
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
ChIP	chromatin immunoprecipitation, chromatinová imunoprecipitace
mRNA/mRNP	messenger RNA/ribonucleoprotein, mediátorová RNA/ribonukleoprotein
N-konec	amino end of a protein, amino konec proteinu
NMD	nonsense-mediated decay, typ degradační dráhy
NMR	nuclear magnetic resonance, nukleární magnetická rezonance
NTC	nineteen-complex, komplex proteinů s rolí v sestřihu
NTR	NTC-related, komplex proteinů s rolí v sestřihu
polyA RNA	polyadenylated RNA, polyadenylovaná RNA
pre-mRNA	pre-messenger RNA, nematurovaná mRNA
RNA pol	RNA polymerase, RNA polymeráza
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
RNA-IP	RNA-immunoprecipitation, RNA-imunoprecipitace
RRM	RNA recognition motif, typ domény rozpoznávající RNA
RS doména	arginine-serine domain, doména bohatá na aminokyseliny arginin a serin
snRNA/snRNP	small nuclear RNA/ribonucleoprotein, malá jaderná RNA/ribonukleoprotein
SR	serine-arginine sequence, sekvence serin-arginin

TRAMP	Trf-Air-Mtr polyadenylation complex, polyadenylační komplex proteinů Trf, Air, Mtr
TREX	transcription-export complex, komplex proteinů s rolí v transkripci a exportu



# 1. ÚVOD

V jádře eukaryotních organismů vzniká procesem transkripce z vlákna DNA tzv. pre-mRNA. Tato pre-mRNA je kotranskripčně a posttranskripčně upravována do formy mRNA, ze které může být v průběhu děje zvaném translace nasyntetizován funkční protein. Úpravy transkriptů zahrnují capping na 5' konci, sestřih intronů, odštěpení 3' konce a jeho polyadenylaci. Během úprav a po nich se mRNA v interakci s řadou proteinů formuje do podoby ribonukleové partikule mRNP, kterou následně čeká export z jádra do cytoplazmy. V cytoplasmě pak nakonec probíhá výše zmíněná translace (\*Köhler a Hurt, 2007).

Jednou skupinou proteinů, které mají souvislost s procesem maturace mRNA a jejího exportu, jsou SR proteiny. Tato bakalářská práce je zaměřena na poznatky z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. U této kvasinky byly nalezeny proteiny, jež jsou SR proteinům podobné svou strukturou a též jsou zapojeny do maturačních procesů mRNA. Jedná se o tzv. SR-like proteiny.

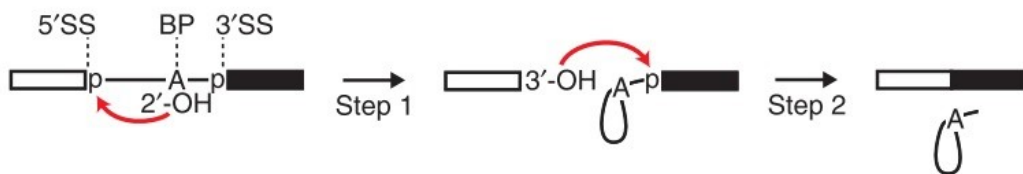
Mezi tyto SR-like proteiny v *Saccharomyces cerevisiae* patří proteiny Npl3, Gbp2 a Hrb1. Zdá se, že jejich funkce je rozsáhlá. Jsou v asociaci s probíhající transkripcí a podílejí se na sestřihu a exportu mRNA. Také se ukazuje, že jejich působení sahá až ke kontrolním a degradačním mechanismům, které se vztahují k RNA.

Zatímco protein Npl3 je více zapojen do sestřihu pre-mRNA, proteiny Gbp2 a Hrb1 jsou potřebné spíše ke kontrole správně sestřižených transkriptů. V bakalářské práci se proto budu zabývat působením těchto tří SR-like proteinů v jednotlivých procesech, od transkripce po export a degradaci RNA.

## 2. SESTŘIH pre-mRNA

V genomu *Saccharomyces cerevisiae* se v genech kódujících proteiny nachází přibližně 300 nekódujících oblastí, tzv. intronů (\*Schreiber et al., 2015). Délka intronů se pohybuje v rozmezí 52 až 1001 nukleotidů. Nejvíce intronů má délku okolo 100 nebo 400 nukleotidů (Spingola et al., 1999). Introny jsou z genomu transkribovány společně s kódujícími oblastmi genů. Z transkribované pre-mRNA musí však být tyto introny vystřiženy, aby mohl následovat export a translace (\*Schreiber et al., 2015).

Sestřih pre-mRNA se uskutečňuje již během transkripce (\*Meinel a Sträßer, 2015). V rámci tohoto procesu se uskutečňují dvě po sobě následující transesterifikační reakce, jejichž průběh je znázorněn na obrázku č.1. V prvním kroku dochází ke štěpení 5' sestřihového místa (5'SS) za vzniku exon1 a exon2-lariát intermediátu. Při druhé reakci je pak štěpeno 3' sestřihové místo (3'SS), dochází k vyštěpení intronu a k ligaci exonů (\*Shi, 2017).



**Obrázek 1: Schéma sestřihu.** Prvním krokem sestřihu vzniká exon1 a exon2-lariát intermediát. Ve druhém kroku je vyštěpen intron, dochází k ligaci exonů a vzniká sestřižený transkript (\*Plaschka et al., 2019).

Sestřih pre-mRNA transkriptů obsahujících intron je prováděn za účasti komplexu zvaného spliceozom. Jedná se o dynamickou strukturu, která se postupně sestavuje na pre-mRNA určené k sestřihu. Jak je spliceozom postupně přestavován, lze na základě odlišnosti v jeho složení a konformaci rozlišit minimálně sedm různých stádií (\*Shi, 2017).

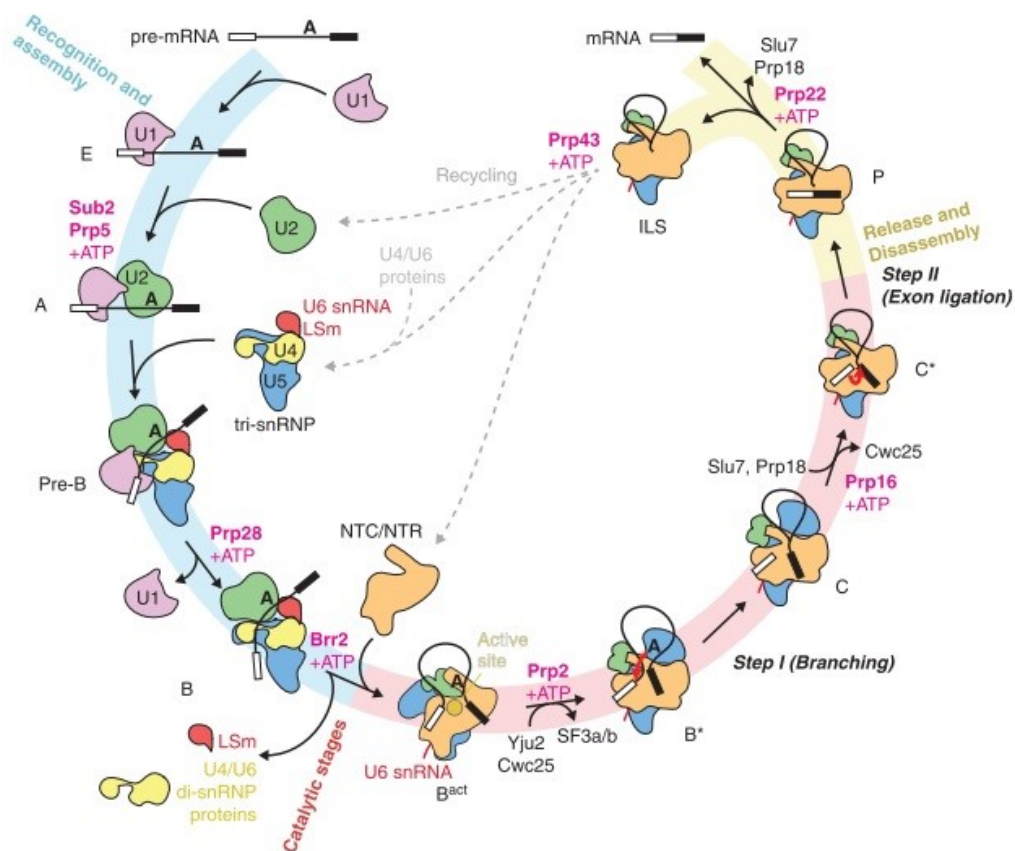
Utváření spliceozomu se účastní pět snRNA, které jsou společně s proteiny uloženy do podjednotek snRNP: U1, U2, U4, U5 a U6 snRNP. Kromě snRNP jsou potřebnou součástí spliceozomu i komplexy NTC a NTR (\*Shi, 2017). Celkově je kvasinkový spliceozom tvořen přibližně 70 proteiny (\*Plaschka et al., 2019).

Na začátku sestavování spliceozomu interaguje U1 snRNP s 5'SS na příslušné pre-mRNA. Následuje rozpoznání místa větvení (branchpoint; BP) uvnitř intronu proteinem Msl5 společně v heterodimeru s proteinem Mud2. Protein Msl5 zároveň interaguje i s U1 snRNP a 5'SS se tak

dostává do blízkosti BP. Za účasti helikáz dochází k výměně dimeru Msl5-Mud2 za U2 snRNP. Do této sestavy je dále připojena U4/U6.U5 tri-snRNP (\*Plaschka et al., 2019).

Postupně, opět s pomocí proteinů s helikázovou aktivitou, dochází k uvolnění U1 a U4 snRNP, místo toho jsou ke spliceozomu přivedeny komplexy NTC a NTR. Dále se mění konformace vznikajícího spliceozomu a dochází k jeho aktivaci. V této formě spliceozomu pak může proběhnout první transesterifikační reakce. Na spliceozom následně působí další, pozdní faktory, které opět vedou k přestavbě spliceozomu a je tak umožněn průběh i druhé transesterifikační reakce, ligace exonů (\*Plaschka et al., 2019).

Po ukončení druhého kroku sestřihu dochází k uvolnění sestřižené mRNA. Spliceozom se zároveň začíná rozvolňovat, odpojují se jednotlivé podjednotky snRNP a komplex NTC. Všechny tyto podjednotky mohou být poté využity pro sestřih další pre-mRNA a celý cyklus se tak opakuje (\*Plaschka et al., 2019).



**Obrázek 2: Schéma sestavování spliceozomu.** Modrá část kruhu znázorňuje skládání spliceozomu; růžová část ukazuje fázi, kdy probíhá sestřih; ve žluté části je znázorněno rozvolňování spliceozomu. Po vnějším okraji kruhu jsou popsány jednotlivé formy spliceozomu. Helikázy jsou popsány tmavě růžově, ostatní proteiny černě (\*Plaschka et al., 2019).

Mezi proteiny, které se podílí na sestřihu pre-mRNA, patří mimo jiné i SR proteiny. Některé z nich zůstávají připojeny k mRNA i po proběhnutí sestřihu a jsou s ní nadále transportovány do cytoplazmy. Zároveň se tak účastní dalšího zpracování mRNA, jako je export a translace, na kterém se aktivně podílejí (\*Köhler and Hurt, 2007).

### 3. EXPORT mRNA

Membrány v buňkách eukaryotních organismů oddělují děje probíhající v jednotlivých buněčných kompartmentech a umožňují tak průběh mnoha metabolických procesů zároveň. Ty by se jinak vzájemně ovlivňovaly a nemohly tak probíhat efektivně. Jaderná membrána slouží k oddělení buněčných dějů, jako je replikace a transkripce DNA v jádře a translace mRNA v cytoplazmě. Odděluje tedy děje potřebné pro maturaci nascentní RNA a její translaci, čímž snižuje riziko translace nematurovaných mRNA. Proteiny tak vznikají jen z upravené mRNA, které je umožněn export do cytoplazmy (\*Stewart, 2010).

Na transportu mRNA se podílí protein Mex67. Jedná se o exportní faktor, který vytváří heterodimer s proteinem Mtr2. Společně tyto proteiny interagují skrze FG-nukleoporiny (jejich název je odvozen od vysokého obsahu fenylalaninu a glycinu) s komplexem proteinů jaderného póru (\*Niño et al., 2013). Zároveň, kromě rozpoznání jaderného póru, má protein Mex67 za úkol rozeznat i mRNA (\*Xie a Ren, 2019).

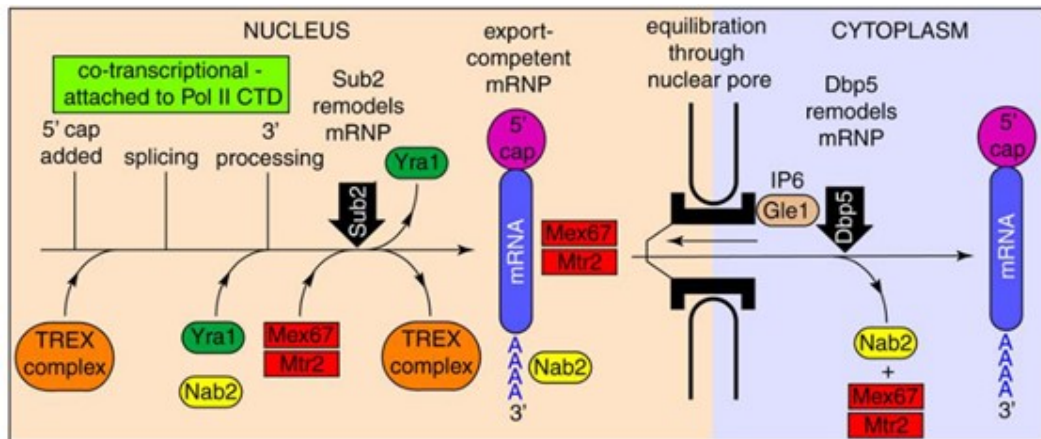
Mex67 váže RNA již v průběhu transkripce, avšak jeho afinita k RNA je nízká. Vazba proteinu Mex67 na RNA je proto posílena pomocí dalších proteinů, které vazbu zprostředkují. Na interakci mRNA s proteinem Mex67 se mimo jiné podílí komplex zvaný TREX. Jedná se o soubor proteinů, které se vážou kotranskripčně k RNA. Tento komplex je k RNA veden již během elongace transkripce a následně se podílí na tvorbě mRNP a jejím exportu a propojuje tak tyto děje dohromady. Jeho součástí je komplex THO a proteiny Yra1 a Sub2 (\*Niño et al., 2013). Zároveň, v *Saccharomyces cerevisiae* s komplexem TREX interagují SR-like proteiny Gbp2 a Hrb1, jak je popsáno dále v textu (\*Chanarat et al., 2012).

Komplex TREX se podílí na exportu transkriptů pocházejících jak z genů s intronem, tak bez intronu (\*Erkman a Kutay, 2004). Nicméně, TREX byl také nalezen v interakci s komplexem NTC. Uvažuje se o tom, že by komplex NTC mohl být důležitý pro připojení komplexu TREX k transkribovaným genům. Vazba komplexu TREX k transkriptům obsahujících intron by tak mohla záviset na sestřihu (Chanarat et al., 2011).

Vazba exportního faktoru Mex67 k RNA je regulována DEAD-box helikázou Sub2. Helikáza Sub2 zajišťuje přivedení proteinu Yra1 k RNA. Protein Yra1 pak slouží jako adaptér pro Mex67 a RNA (\*Xie a Ren, 2019). Kromě Yra1 interaguje s RNA a exportním faktorem Mex67 i protein Nab2. Protein Yra1 však opouští mRNP ještě před exportem partikule, zatímco protein Nab2 zůstává připojen a vstupuje společně s mRNP do cytoplazmy (\*Niño et al., 2013).

S exportním faktorem Mex67 dále přímo interaguje SR-like protein Npl3, který také slouží jako adaptorový protein pro vazbu Mex67 na RNA. Protein Npl3 nejprve interaguje s RNA polymerázou II, zvyšuje její aktivitu a podporuje tak elongaci transkripce. Následně zůstává připojen k mRNA a slouží jako zmíněný adaptér mezi RNA a proteinem Mex67. Společně s mRNA je protein Npl3 nakonec transportován až do cytoplazmy (\*Niño et al., 2013).

Proces exportu je znázorněn na obrázku č.3. Je na něm možné vidět, jak se postupně připojují jednotlivé faktory potřebné pro průběh exportu a podílí se na utváření mRNP. V cytoplazmě pak dochází pomocí helikázy Dbp5 k uvolnění exportních faktorů z mRNA vedené k translaci (\*Stewart, 2010).



**Obrázek 3: Schéma exportu mRNA do cytoplazmy za účasti řady proteinů.** K nascentní RNA je kotranskripčně rekrutován komplex TREX a dále se k němu přidávají proteiny Yra1 a Nab2. Postupně se utváří ribonukleová partikule. Protein Yra1 usnadňuje interakci faktoru Mex67 s RNA a následně je uvolněn. Vznikající mRNP bude následně exportována. V cytoplazmě dochází k rozvolnění mRNP a uvolňuje se mRNA (\*Stewart, 2010).

## 4. DEGRADACE RNA

Jak již bylo zmíněno, vznik mRNA je spojen s řadou procesů, které stojí za jejími úpravami do podoby, ve které bude mRNA transportována do cytoplazmy. Tam posléze příslušná mRNA bude sloužit jako předloha, podle které vznikne translací protein (\*Köhler a Hurt, 2007).

Pokud dojde k narušení některého z kroků provázejících vznik RNA, může dojít k tomu, že taková RNA obsahuje chyby. Jestliže je však chybná RNA využita pro translaci, mohou podle ní vznikat proteiny, jež budou mít poškozenou nejen strukturu, ale i funkci. Chyby, které vznikly na úrovni RNA, se tak mohou projevit na vyšší úrovni, i třeba celého organismu, například v podobě onemocnění (\*Fasken a Corbett 2009).

Proto je třeba předejít možnosti, aby byly chybné mRNA translatovány. U eukaryotních organismů existují mechanismy, které tomuto zabraňují. Jejich principem je rozpoznat špatnou RNA a navést k ní protein s ribonukleázovou aktivitou, který zajistí degradaci této RNA. Ke kontrole, zda je RNA správně maturována, dochází v jádře, ale i v cytoplazmě (\*Fasken a Corbett, 2009).

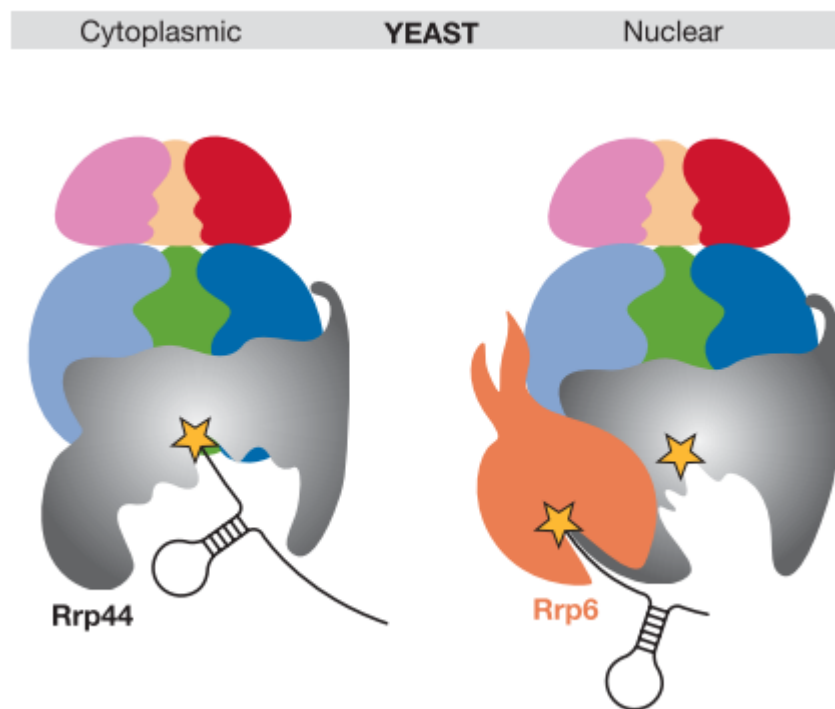
Hlavním proteinovým komplexem pro degradaci špatné RNA je exozom. Vyskytuje se jak v jádře, tak v cytoplazmě, avšak v mírně odlišné formě, jak je popsáno níže. Jedná se o strukturu, kterou lze nalézt napříč eukaryotními organismy, ale i u archeí. V *Saccharomyces cerevisiae* je exozom tvořen devíti podjednotkami, šest z nich tvoří kruh, jenž má stabilní formu jen v přítomnosti zbylých tří podjednotek. Exozom rozeznává RNA na základě interakce cukr-fosfátové kostry nukleové kyseliny s kladně nabitou oblastí hexamerového kruhu bohatou na arginin (\*Vanacova a Stef, 2007).

Exozom slouží k 3' degradaci mnoha typů RNA, včetně pre-mRNA, u nichž došlo k chybě v maturaci nebo mají chybnou kódující sekvenci. Samotný exozom nemá u kvasinky katalytickou aktivitu, ale jsou k němu připojovány další podjednotky zodpovídající za degradaci: exonukleáza Dis3/Rrp44, přítomná jak v jádře, tak v cytoplazmě, a ribonukleáza Rrp6, která se nachází pouze v jádře, jak je znázorněno na obrázku č.4 (\*Vanacova a Stef, 2007).

Plnit degradační funkci exozomu napomáhá komplex TRAMP. Tento komplex se v kvasince nachází ve dvou formách, TRAMP4 a TRAMP5 a je tvořen třemi složkami. Obsahuje protein s polyA polymerázovou aktivitou: Trf4 v komplexu TRAMP4 a Trf5 v TRAMP5. Další součástí je protein Air1 nebo Air2, které nejspíše slouží k vazbě RNA. Třetím proteinem komplexu TRAMP je helikáza Mtr4 (\*Houseley et al., 2006).

Komplex TRAMP přidává na RNA určené k degradaci krátký polyA konec. Zároveň také TRAMP interaguje s exozomem. Exozom je pravděpodobně schopen rozpoznat správně polyadenylovaný transkript od špatných, více nebo méně polyadenylovaných, transkriptů. Takové transkripty jsou pak degradovány pomocí exonukleáz přítomných na exozomu. (\*Houseley et al., 2006).

Kromě degradace exozomem z 3' konce existují i další způsoby, jak naložit s nesprávně maturovanými RNA. V cytoplazmě funguje například tzv. NMD dráha. Tato dráha slouží k degradaci transkriptů, v jejichž sekvenci jsou přítomné kodóny vedoucí k předčasné terminaci translace. Translace takové RNA by pak vedla ke vzniku zkrácených proteinů (\*Fasken a Corbett, 2009). Degradace může být též zajištěna z 5' konce pomocí exonukleáz nebo tzv. dráhou no-go štěpící mRNA, na které došlo k pozastavení ribozomu a translace tedy neprobíhá (\*Houseley et al., 2006).



**Obrázek 4: Znázornění struktury kvasinkového exozomu.** Místa označená hvězdou představují oblast, kde dochází k degradaci RNA. Vlevo: cytoplazmatický exozom, vpravo: jaderný exozom (\*Vanacova a Stef, 2007).



## 5. SR PROTEINY A EUKARYOTA

SR proteiny byly poprvé zaznamenány v 90. letech 20. století u octomilky *Drosophila melanogaster*. Jednalo se o proteiny, které hrály roli v regulaci sestřihu. Při prozkoumávání dalších podobných proteinů u člověka se ukázalo, že se jedná o skupinu proteinů, které obsahují doménu bohatou na aminokyseliny arginin a serin (doména RS). Právě podle této charakteristické domény také dostaly svůj název, SR proteiny (\*Long a Caceres, 2009).

Postupem času byly nalezeny další proteiny obsahující serin-argininovou doménu. Proto tyto proteiny začaly být považovány za konzervovanou třídu proteinů vyskytující se u vyšších eukaryot (\*Shepard a Hertel, 2009).

Bylo také nalezeno velké množství proteinů, které obsahují doménu RS, avšak nejsou řazeny mezi SR proteiny. Je tomu tak proto, že skupina SR proteinů není charakterizována pouze přítomností domény RS. Tato skupina je definována též přítomností domény RRM, která zprostředkovává interakci proteinu s RNA (\*Long a Caceres, 2009).

Zároveň jsou SR proteiny svojí funkcí spojeny s působením na sestřih a alternativní sestřih. V proteinech přítomná doména RS slouží ke zprostředkování interakcí s proteiny, které se podílí na utváření spliceozomu, a napomáhá tak k jeho sestavení (\*Long a Caceres, 2009). Doména RS byla také zkoumána u sestřihového faktoru U2AF, který sice není řazen do skupiny SR proteinů, ale tuto doménu obsahuje, neboť je důležitá pro jeho působení v sestřihu. Zde doména RS přímo interagovala s 5' sestřihovým místem a místem větvení na pre-mRNA. Autoři se domnívají, že i skrze tuto interakci mohou domény RS ovlivňovat sestřih (Shen a Green, 2004).

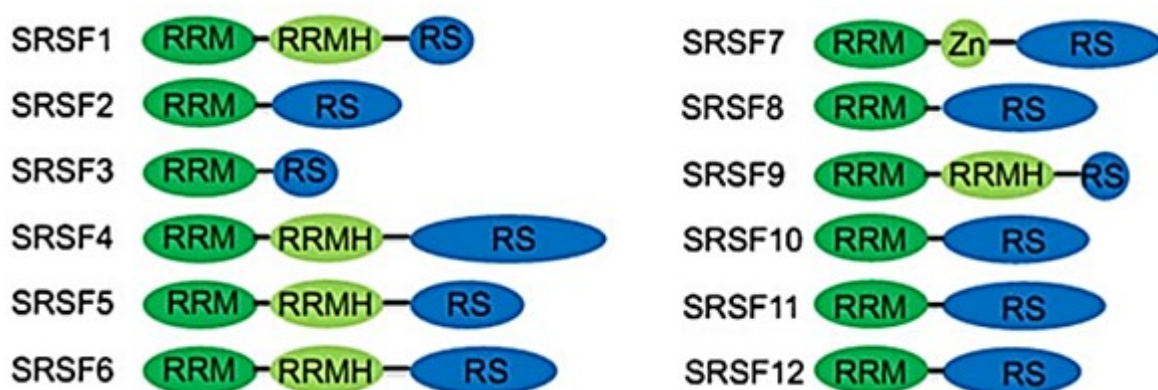
Některé proteiny s doménou RS se od skupiny SR proteinů liší. Například neobsahují doménu RRM nebo naopak mají navíc jiné domény. Kromě strukturních odlišností se mohou lišit i ve své funkci. Mohou hrát svou roli i mimo sestřih. Protože ale tyto proteiny obsahují charakteristickou RS doménu, jsou označovány jako SR-like proteiny (\*Long a Caceres, 2009).

V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* můžeme naleznout proteiny, které nejsou typickými SR proteiny, ale jsou právě řazeny do skupiny SR-like proteinů (Deka et al., 2008). Popis a uspořádání těchto proteinů a jejich domén je popsáno níže.

## 6. STRUKTURA

### 6.1. Struktura SR proteinů

Skupina SR proteinů je charakteristická přítomností 1 nebo 2 RRM struktur vyskytujících se blíže k N-konci proteinu zodpovědných za vazbu RNA (obrázek 5). Na C-koncové části proteinu se pak nachází doména RS (Zahler et al., 1992) obsahující alespoň 50 aminokyselin, mezi nimiž se z více jak 40 % nachází sekvence serin-arginin, nebo v opačném pořadí arginin-serin. Funkční charakteristikou této skupiny proteinů je pak jejich role primárně v sestřihu (Manley a Krainer, 2010).

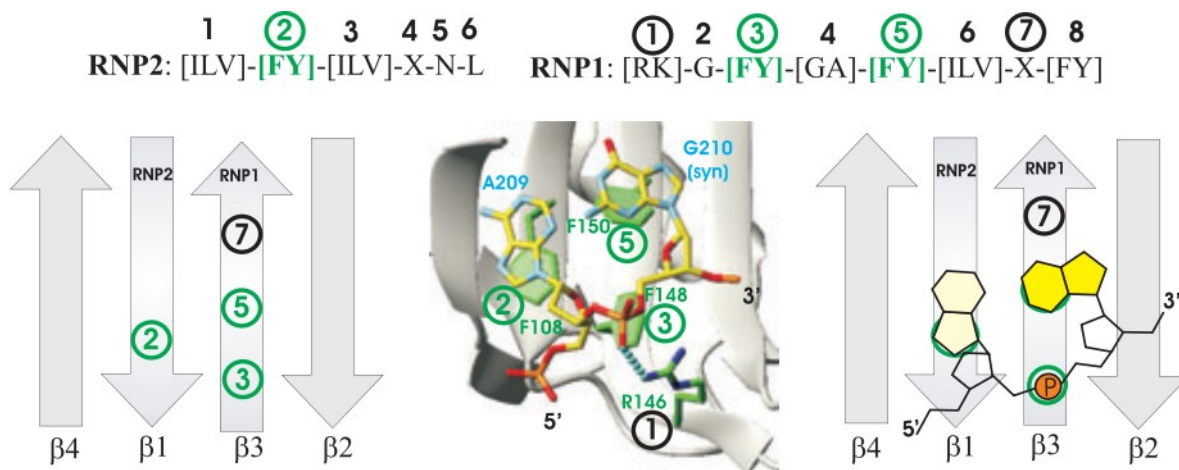


**Obrázek 5: Schématické znázornění funkčních domén SR proteinů.** Popis obrázku: RRM – typ domény rozpoznávající RNA, RRMH – doména vykazující homologii k RRM, RS – doména bohatá na sekvence arginin-serin, Zn – typ zinkové vazebné domény (zink-knuckle) (\*Zhou a Fu, 2013).

Jak již bylo zmíněno, aby byl protein počítán mezi SR proteiny, musí kromě domény RS obsahovat doménu RRM, která slouží k rozpoznání a vazbě na RNA (\*Long a Caceres, 2009).

Domény RRM mají obecně strukturu  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ . Vazba mezi RNA a doménou RRM je zprostředkována stacking interakcemi mezi nukleotidy na RNA a aminokyselinami s aromatickým kruhem na struktuře  $\beta_1$  a  $\beta_3$ . Cukerný zbytek nukleotidů je stabilizován hydrofobní interakcí s aromatickou aminokyselinou na  $\beta_3$  a fosfátový zbytek iontovou interakcí s pozitivně nabitými aminokyselinami. Ke zvýšení afinity k RNA napomáhají okrajové N- a C-koncové oblasti domény RRM, které interagují se skupinou 2'OH na ribóze na RNA a umožňují tak její rozpoznání od DNA (Maris et al., 2005).

Domény RRM nejsou výsadou pouze eukaryotních organismů, ale je možné je nalézt také u bakterií, virů či v mitochondriích (Maris et al., 2005).

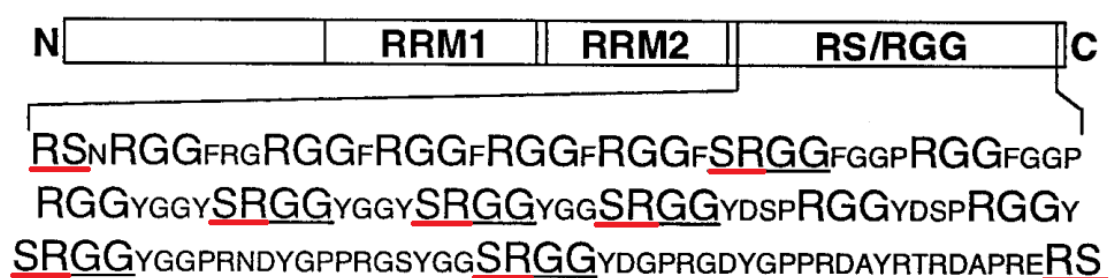


**Obrázek 6: Interakce mezi doménou RRM a nukleovou kyselinou.** Obrázek ilustruje interakci domény RRM2 proteinu hnRNPA1 s DNA (obecně platí i pro RRM jiných proteinů v interakci s RNA). Na interakci se podílí 2 nukleotidy v rámci DNA. Báze směrem k 5'konci DNA interaguje s fenylalaninem znázorněným pod číslem 2 na  $\beta_1$  listu v rámci konzervované sekvence RNP2. Báze směrem k 3'konci je v interakci s fenylalaninem v rámci listu  $\beta_3$  v sekvenci RNP1 na pozici číslo 5. Fenylalanin na  $\beta_3$  označený číslem 3 stabilizuje cukerné zbytky obou nukleotidů a fosfát mezi nimi je stabilizován iontovou interakcí s kladně nabitou aminokyselinou argininu znázorněnou pod číslem 1 (Maris et al., 2005).

## 6.2. Struktura SR-like proteinů

Jedním z SR-like proteinů, který se vyskytuje v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, je protein Npl3. Tento protein je tvořen ze 414 aminokyselin dlouhé sekvence. Zatímco u klasických SR proteinů, jenž mají RRM domény uloženy N-terminálně, u proteinu Npl3 se jeho 2 RRM domény vyskytují více ve středu aminokyselinového řetězce. Samotný N-konec je tvořen mnoha aminokyselinami typu prolin, glutamin a glutamát (Deka et al., 2008) a v oblasti C-konce je přítomen RGG box, který obsahuje řadu aminokyselinových sekvencí arginin-glycin-glycin. RGG box zároveň také zahrnuje 8 dipeptidických úseků serinu a argininu, které jsou součástí domény RS. Vzájemně se tak tyto dva motivy překrývají (Siebel a Guthrie, 1996).

### Npl3 Protein Domains



**Obrázek 7: Schéma struktury proteinu Npl3.** Protein obsahuje dvě domény RRM a doménu RS s 8 červeně podtrženými SR/RS aminokyselinovými sekvencemi (Siebel a Guthrie, 1996).

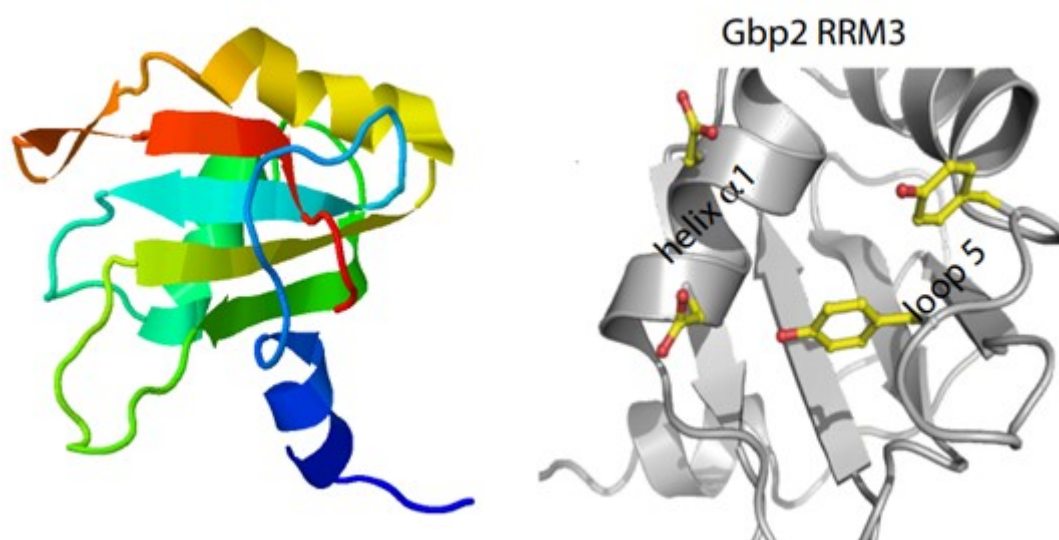
Do skupiny SR-like proteinů v *Saccharomyces cerevisiae* je dále řazen protein Gbp2. Tento protein je tvořen 427 aminokyselinami (SGD, 2020). Na rozdíl od proteinu Npl3 a dalších SR proteinů obsahuje 3 RRM domény. Je zajímavé, že RS doména proteinu se vyskytuje na jeho N-konci, nikoliv na C-konci, jak je tomu u klasických SR proteinů. V této RS doméně se vyskytují 4 RGG sekvence a 9 SR nebo RS dipeptidů (Windgassen a Krebber, 2003).

Dalším SR-like proteinem je také Hrb1. Mezi proteiny Gbp2 a Hrb1 lze pozorovat strukturní i funkční podobnost, neboť se jedná o dva paralogní proteiny (Byrne a Wolfe, 2005). Protein Hrb1 je složen ze sekvence 454 aminokyselin (SGD, 2020). Stejně jako Gbp2 také tento protein obsahuje 3 RRM domény a N-terminálně RS doménu, v níž je však přítomno 10 SR, respektive RS dipeptidických sekvencí a 2 RGG tripeptidy (Häcker a Krebber, 2004).

<b>Hrb1</b>	<b>RS/RGG</b>	<b>RRM1</b>	<b>RRM2</b>	<b>RRM3</b>
<b>Gbp2</b>	<b>RS/RGG</b>	<b>RRM1</b>	<b>RRM2</b>	<b>RRM3</b>
<b>Npl3</b>	<b>APQE</b>	<b>RRM1</b>	<b>RRM2</b>	<b>RS/RGG</b>

**Obrázek 8: Struktura proteinů Gbp2 a Hrb1 v porovnání s proteinem Npl3.** Popis obrázku: RRM1/2/3 – typ vazebné domény pro RNA; RS/RGG – překrývající se motivy RS a RGG (převzato a upraveno z Häcker a Krebber, 2004).

Oproti obvyklé sekundární struktuře RRM domén (RRM1 a RRM2) typu  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  je doména RRM3 u obou proteinů, Gbp2 i Hrb1, na N-konci rozšířena. Obsahuje navíc krátký  $\alpha_0$  helix, jenž je zachycen tmavě modrou barvou na obrázku č.9, vlevo. Za  $\alpha_0$  helixem následuje aminokyselinová sekvence, která interaguje s C-terminální oblastí proteinu (Martínez-Lumbreras et al., 2016).



**Obrázek 9: Struktura RRM3 domény u proteinu Gbp2.** Vlevo: N-terminální doména je znázorněna tmavě modře ( $\alpha_0$  helix), C-terminální červeně (PDB ID: 2MZQ; Martínez-Lumbreras et al., 2016); vpravo: 2 tyrozinové zbytky vycházející z 5. smyčky (Martínez-Lumbreras et al., 2016).

### 6.3. Posttranslační modifikace SR-like proteinů

Všechny tři proteiny, Npl3, Gbp2 i Hrb1 jsou vázány k mRNA a společně s ní, v rámci mRNP, jsou transportovány do cytoplazmy. Jedná se tedy o proteiny, které přechází z jádra do cytoplazmy a zpět, aby mohly plnit svou funkci. Pro zajištění správného umístění, v jádře či cytoplazmě, slouží jejich posttranslační modifikace (Krebber et al., 1999; Windgassen a Krebber, 2003; Häcker a Krebber, 2004).

Jednou z modifikací těchto proteinů, je fosforylace. U proteinu Npl3 je za ní zodpovědná převážně kináza Sky1, avšak pravděpodobně i další kinázy, což dokazuje experiment, kdy odstranění kinázy Sky1 způsobí snížení fosforylace proteinu Npl3, nikoliv však plné vymizení fosforylace. *In vitro* analýza ukázala, že kináza Sky1 fosforyluje protein Npl3 na serinu nejbližší C-konci, na poslední serin-argininové sekvenci v rámci domény RS. Tato posttranslační modifikace je nejspíše důležitá pro správnou lokalizaci proteinu Npl3 do jádra. Zároveň fosforylace také snižuje asociaci proteinu Npl3 s RNA izolovanou za polyA konec a má tak vliv na jeho uvolnění z RNA. Poté, co je protein Npl3 v cytoplazmě fosforylován, dochází k vazbě mezi Npl3 a proteinem Mtr10 (Gilbert et al., 2001), který slouží jako karyoferin (Pemberton et al., 1997) a napomáhá importu Npl3 do jádra. Protein Mtr10 se kromě importu podílí i na samotné disociaci proteinu Npl3 z RNA (Gilbert et al., 2001).

V RS doméně proteinu Gbp2 se nachází 3 serinové zbytky (Ser13, Ser15 a Ser17), které by, na základě pozorování fosforylace lidskou kinázou SRPK (homolog kinázy Sky1) na lidských SR proteinech, mohly být kvasinkovou kinázou Sky1 fosforylovány. Při substituci těchto serinů za alanin nejsou dané mutanty lokalizovány pouze v jádře, ale i v cytoplazmě. Výjimku tvoří substituční mutanta pro Ser13, která je stále převážně lokalizována v jádře, až v kombinaci s mutovanou kinázou Sky1, je daná mutanta více i v cytoplazmě. Příslušné experimenty značí rozdílnou citlivost těchto tří serinových reziduí k fosforylaci kinázou Sky1. Při mutaci Ser13 je tento protein k fosforylaci stále alespoň částečně citlivý, tedy fosforylace bude spíše zajištěna na reziduích Ser15 a Ser17 (Windgassen a Krebber, 2003).

Nicméně, u proteinu Gbp2 má fosforylace spíše vliv pouze na jeho lokalizaci do jádra než na jeho uvolnění z mRNA. Zatímco samotná disociace proteinu z mRNA v cytoplazmě závisí převážně na proteinu Mtr10 (Windgassen a Krebber, 2003).

Stejně jako Npl3 a Gbp2, i protein Hrb1 může být fosforylován (Häcker a Krebber 2004). Avšak, narozdíl od proteinů Npl3 a Gbp2, protein Hrb1 není fosforylován kinázou Sky1 (Porat et al., 2006). Obecně je tedy fosforylace všech tří proteinů důležitá pro jejich umístění do jádra,

pro disociaci SR-like proteinů z mRNA se pak v hlavní roli uplatňuje protein Mtr10. Ten také současně u všech tří proteinů slouží k jejich importu do jádra (Windgassen et al., 2004).

Kromě fosforylace jsou tyto SR-like proteiny také metylovány. Za metylaci proteinu Npl3 je zodpovědná argininová metyltransferáza Hmt1. Experimenty s odstraněním domény bohaté na RGG tripeptidy z proteinu Npl3 naznačují, že metylace tohoto proteinu probíhá právě v oblasti této domény (Siebel a Guthrie, 1996). Tato posttranslační modifikace se ukázala jako důležitá pro export proteinu Npl3 z jádra do cytoplazmy (Shen et al., 1998).

Byly provedeny další experimenty, tentokrát na mutované formě proteinu Npl3, kde byly argininy ve všech RGG tripeptidech v rámci RGG domény nahrazeny lyzinem. Taková mutanta proteinu nebyla metylována. Zajímavé ale je, že tato mutace umožnila export proteinu Npl3 do cytoplazmy. Pro export by tedy mohlo být zapotřebí zamaskování RGG tripeptidů, ať metylací, nebo substitucí aminokyseliny v tripeptidu (Xu a Henry, 2004). Zároveň metylace proteinu Npl3, respektive jeho RGG domény, brání jeho fosforylaci kinázou Sky1 (Lukasiewicz et al., 2007)

Jelikož i SR-like proteiny Gbp2 a Hrb1 obsahují RGG tripeptidové sekvence, bylo zkoumáno, zda by mohly být tyto proteiny metylovány. Ukázalo se, že jak protein Gbp2, tak i Hrb1 mohou též sloužit jako substrát pro metyltransferázu Hmt1 a být tedy metylovány. Export těchto dvou proteinů z jádra do cytoplazmy se však narozdíl od proteinu Npl3 zdá být na metylaci nezávislý (Shen et al., 1998; Windgassen a Krebber, 2003).

## 7. FUNKCE SR-like PROTEINŮ

### 7.1. Interakce s RNA

Stejně jako klasické SR proteiny, i proteiny Npl3, Gbp2 a Hrb1 jsou uzpůsobené k interakci s ribonukleovou kyselinou. Všechny tři proteiny byly nalezeny v interakci s RNA izolovanou za polyadenylovaný konec (Henry et al., 1996; Windgassen a Krebber, 2003; Häcker a Krebber, 2004).

Protein Npl3 interaguje převážně s mRNA, a byl nalezen ve vyšší asociaci s transkripty genů pro ribozomální proteiny (Guisbert et al., 2005). Experiment s proteinem Npl3 však objevil jeho interakci i s jinými než polyadenylovanými RNA. Autoři nedávné studie použili pro výzkum interakcí analýzu CRAC. Tato metoda spočívá v „cross-linku“ proteinu k RNA a následném ošetření RNázou, enzymem, který štěpí RNA, po níž zůstane pouze část RNA krytá proteinem. K této RNA jsou z obou stran připojeny nukleotidové sekvence, protein je odstraněn proteinázou a příslušná RNA je reverzně transkribována a analyzována. Analýza CRAC ukázala, že protein Npl3 sice váže převážně kódující mRNA, ale také nekódující transkripty, které jsou transkribovány pomocí RNA pol II (Holmes et al., 2015).

V rámci studií proteinu Npl3 bylo zkoumáno, jak Npl3 interaguje s RNA. Na základě NMR bylo pozorováno, že protein Npl3 přednostně interaguje s oblastmi bohatými na uracil a guanin. Avšak, ukázala se i slabá vazba obou RRM domén k AU bohatým oblastem. Doména RRM2 interagovala silněji s RNA bohatou na nukleotidy U a G. Na rozdíl od RRM1, která i s touto RNA interagovala slabě. Odlišná afinita k oblastem bohatým na UG zároveň poukazuje na to, že tyto dvě vazebné domény fungují v rámci proteinu Npl3 nezávisle na sobě (Deka et al., 2008).

Dále byla zkoumána i interakce proteinu Gbp2 s RNA. Experiment ukázal, že protein Gbp2 váže RNA na sekvenci nukleotidů GGUG prostřednictvím domény RRM2. S RNA obsahující danou sekvenci pak protein interaguje silněji v přítomnosti další domény, RRM1. Zatímco třetí doména, RRM3, nemá na rozeznání RNA znatelný vliv. Stejným způsobem domény proteinu Gbp2 umožňují interakci nejen s RNA, ale dokonce i s DNA (GGTG), ovšem pro vazbu s proteinem je preferována RNA (Martínez-Lumbreras et al., 2016).



## 7.2. SR-like proteiny jsou v kontaktu s RNA již během transkripce

V rámci studia SR-like proteinů se objevily experimenty, které naznačují přítomnost těchto proteinů v blízkosti RNA již během transkripce. Byl proveden koimunoprecipitační experiment, při němž se společně v komplexu objevil protein Npl3 s RNA polymerázou II. Npl3 zůstává v komplexu s RNA pol II i po působení RNázy. Data poukazují na interakci proteinu Npl3 s transkripční mašinerií RNA polymerázy II (Lei et al., 2001). Vzápětí bylo objeveno, že je protein Npl3 asociován s geny, jež jsou transkribovány pomocí RNA pol II, nikoliv RNA pol I (Lei a Silver, 2002) či RNA pol III (Lei et al., 2001).

Pozdější studie za pomoci pull-down analýzy poukázala na možnou přímou interakci RNA pol II s proteinem Npl3. Tato interakce byla snížena při fosforylaci proteinu Npl3 na Ser411 v oblasti domény RS. Data příslušné studie zároveň poukázala na pozitivní vliv proteinu Npl3 na elongaci transkripce (Dermody et al., 2008).

Provedený experiment s využitím ChIP analýzy odhalil zvýšenou asociaci proteinu Npl3 s chromatinem v kódující oblasti genů na 5' i 3' konci na rozdíl od chromatinu z oblasti mimo geny. Kromě toho se také ukázalo, že asociace proteinu Npl3 s chromatinem je nejspíše závislá na transkripci. Při aktivaci transkripce se totiž výrazně zvýší hladina příslušné transkribované DNA imunoprecipitované s proteinem Npl3 (Lei et al., 2001).

CRAC analýza, díky níž byla objevena interakce proteinu Npl3 s RNA, transkribovanou pomocí RNA pol II, zároveň odhalila nejvýraznější asociaci proteinu Npl3 na 5' konci mRNA. Autoři studie uvažují o možnosti, že tato odlišnost od výše uvedené ChIP analýzy, která odhalila výraznou asociaci Npl3 s chromatinem i na 3' konci genu, by mohla být dána tím, že protein Npl3 na 3' konci genu interaguje spíše s transkripční mašinerií, kdežto na 5' konci genu pak i se samotnou RNA. Všechny výše zmíněné experimenty poukazují na to, že protein Npl3 je k RNA vázán již během transkripce (Holmes et al., 2015).

Nedávná studie se zabývala komplexem CBC, který je vázán na 5' čepičku mRNA. Autoři studie mimo jiné pozorovali vliv CBC na asociaci proteinu Npl3 s aktivně transkribovanými geny. Jejich experimenty ukazují, že v případě absence podjednotky CBC (kvasinkový kmen *cbp80Δ*) docházelo k poklesu náboru proteinu Npl3 k aktivně transkribovaným genům. Asociace proteinu Npl3 s transkribovanými geny se tedy zdá být podporována působením komplexu CBC (Sen et al., 2019).

Do souvislosti s transkripcí by kromě proteinu Npl3 mohly být zařazeny i proteiny Gbp2 a Hrb1. Na základě ChIP analýzy se zjistila interakce proteinů Gbp2 a Hrb1 s aktivně transkribovanými kódujícími oblastmi genů. Tato interakce se mírně sníží po působení

RNázy A, nicméně stále přetrvává, což by mohlo naznačovat přímou interakci s chromatinem s částečnou vazbou přes RNA v okolí. Následné RNA-IP experimenty objevily interakci obou proteinů s nově syntetizovanou mRNA pocházející ze stejných genů zkoumaných při ChIP analýze (Hurt et al., 2004).

### **7.3. Proteiny Gbp2 a Hrb1 interagují s komplexem TREX**

U obou proteinů, Gbp2 i Hrb1, byla zjištěna interakce se všemi podjednotkami komplexu TREX. Jelikož proteiny obsahují domény RRM interagující s RNA, zjišťovalo se, zda vazba na komponenty komplexu TREX není zprostředkována právě skrze RNA. Byl proveden experiment, kdy se zkoumala společná imunoprecipitace proteinů Gbp2 a Hrb1 s jednotlivými proteiny komplexu za podmínek působení RNázy A, přičemž imunoprecipitace nebyla narušena. Jinými slovy experiment značí, že interakce s komponentami komplexu TREX není závislá na přítomnosti RNA a jde tedy o přímou fyzickou interakci (Hurt et al., 2004).

Zatímco domény RRM1a RRM2 proteinů Gbp2 a Hrb1 rozpoznávají nukleové kyseliny, za protein-proteinovou interakci s komplexem THO/TREX je zodpovědná doména RRM3. Na obrázku č.9 je znázorněno, že v doméně RRM3, v oblasti 5. smyčky, se nachází 2 tyrozinové zbytky. Tyto tyroziny se účastní vazby s proteiny Tho2 a Hpr1, které jsou součástí komplexu THO. Tyroziny jsou přítomné i u některých SR proteinů u člověka v rámci aminokyselinového motivu YxYGG, kde by podle autorů mohly, podobně jako proteiny Gbp2 a Hrb1, sloužit k vazbě ke komponentám komplexu TREX (Martínez-Lumbreras et al., 2016).

Přestože proteiny interagují s komplexem TREX, jejich nepřítomnost nenaruší jeho sestavení ani export mRNA do cytoplazmy, tedy nezdají se být v tomto směru esenciální (Hurt et al., 2004).

Společně, s výše uvedenými informacemi o interakci těchto dvou proteinů s transkribovanými geny, by tyto experimenty mohly odpovídat tomu, že proteiny Gbp2 a Hrb1 putují společně s komplexem TREX a RNA polymerázou II podél transkribované sekvence DNA a následně jsou z chromatinu přesunuty na nově vznikající pre-mRNA (Hurt et al., 2004).

Proteiny Gbp2 a Hrb1 byly nalezeny i v asociaci s cyklin-dependentní kinázou Ctk1, která zajišťuje fosforylaci CTD RNA polymerázy II. Mohlo by se tak jednat o další způsob propojení těchto SR-like proteinů s probíhající transkripcí. Autoři příslušné studie uvažují o tom, že by proteiny Gbp2 a Hrb1 mohly být na nascentní RNA přeneseny prostřednictvím interakce s komplexem TREX anebo s kinázou Ctk1 (Hurt et al., 2004).

#### 7.4. Role SR-like proteinů v sestřihu

Při delecí genu pro Npl3 byla pozorována zvýšená hladina nesestřížené pre-mRNA v jádře kvasinky, zejména transkriptů genů pro ribozomální proteiny. Tuto akumulaci pre-mRNA by bylo možné vysvětlit jako důsledek narušení procesu sestřihu. Pozorování kvasinkového kmene *npl3Δ* zároveň odhalilo genetickou interakční síť *npl3Δ*, která je podobná profilu genetických interakcí sestřihových faktorů, jako jsou *PRP11*, *SNU66*, *PRP4* a dalších. Podobnost genetického profilu *npl3Δ* s mutacemi genů pro sestřihové faktory tak podporuje úvodní myšlenku, že tento SR-like protein hraje roli v sestřihu (Kress et al., 2008).

Na působení Npl3 v sestřihu dále poukazují i objevené negativní genetické interakce mezi *npl3Δ* a mutacemi genů pro sestřihové faktory, jako např. výše uvedený *snu66Δ*. *npl3Δ* negativně interaguje i s mutacemi genů kódujících proteiny, které jsou součástí U1 a U2 snRNP ve spliceozomu, např. s *nam8Δ* (Kress et al., 2008).

Na základě koimunoprecipitačních experimentů byly objeveny i interakce fyzické mezi proteinem Npl3 a faktory působícími v rané fázi sestavování spliceozomu. Jedná se o interakce s proteiny, jež jsou součástí spliceozomální podjednotky U1 snRNP, a proteinem Msl5 interagujícím s pre-mRNA v místě větvení. Ze zkoumaných proteinů podjednotky U1 snRNP zůstává protein Npl3 po ošetření RNázou v asociaci pouze s faktorem Nam8. Interakce ostatních proteinů s proteinem Npl3 je citlivá k RNáze, tedy jde spíše o nepřímou interakci (Kress et al., 2008). Na druhou stranu, protein Npl3 nebyl nalezen ve fyzické interakci s proteiny, které působí až v pozdní fázi sestřihu (Kress et al., 2008; Hackmann et al., 2014).

Jelikož protein Npl3 interaguje se sestřihovými faktory, bylo zkoumáno, zda ovlivňuje jejich asociaci k chromatinu. Příslušný experiment vycházel z genů, jejichž sestřih je narušen/inhibován termosensitivní mutací *npl3-1*. Provedená ChIP analýza odhalila, že v kvasinkovém kmeni *npl3-1* je snížena asociace Prp42 (součást U1 snRNP) a Lea1 (součást U2 snRNP) s těmito geny. Na základě získaných dat autoři studie poukazují na to, že by protein Npl3 mohl sloužit k efektivnímu náboru U1 a U2 snRNP k chromatinu a zprostředkovávat tak kotranskripční vazbu raných sestřihových faktorů k nascentní pre-mRNA (Kress et al., 2008).

Další experimenty propojují do souvislosti také modifikaci chromatinu, respektive ubikvitinaci histonu H2B proteinem Bre1, se sestřihem pre-mRNA závislým na proteinu Npl3. V kvasinkovém kmeni *npl3Δ* dochází v jádře k akumulaci pre-mRNA transkribovaných z genů pro ribozomální proteiny, což poukazuje na sestřihový defekt (Kress et al., 2008). Ukázalo se, že při dvojitě delecí jak *NPL3*, tak *BRE1*, je v porovnání s kmenem *npl3Δ* akumulace těchto

pre-mRNA ještě navýšena. Zdá se tedy, že ubikvitinace chromatinu má vliv na průběh sestřihu (Moehle et al., 2012).

Nedávná studie se zaměřovala na působení metylace proteinu Npl3 metyltransferázou Hmt1 na sestřih pre-mRNA genu *SUS1*. Transkript tohoto genu obsahuje 2 introny a na 5' SS prvního intronu má odlišnou sekvenci, rozeznávanou podjednotkou U1 snRNP, než v kvasince bývá typická. Absence metyltransferázy Hmt1 vede ke snížení schopnosti sestřihu právě prvního intronu v rámci transkriptu pro protein Sus1. Naopak, mutace proteinu Npl3 substitucí Arg15 a Arg17 za lyziny, což mimikuje metylovaný stav proteinu Npl3, vede k obnovení sestřihu v *hmt1Δ* kmeni. Tento experiment poukazuje na vliv metylace proteinu Npl3 na sestřih intronu s nekanonickou 5' SS sekvencí (Muddukrishna et al., 2017).

Narozdíl od Npl3, delece genu pro Gbp2 a/nebo Hrb1 nezpůsobuje zvýšenou akumulaci pre-mRNA v jádře. *npl3Δ* také vykazuje mnohem výraznější negativní interakce s mutacemi genů pro sestřihové faktory, než *gbp2Δ* či *hrb1Δ* (Kress et al., 2008). Zároveň autoři jiné studie uvádějí, že jejich delece neovlivňuje sestřih. Data pro podložení této informace však nebyly ve studii ukázány (Martínez-Lumbreras et al., 2016).

Proteiny Gbp2 a Hrb1 byly nalezeny ve fyzické i negativní genetické interakci s Prp17, faktorem druhého kroku sestřihu, a proteinem Prp43 účastnícího se rozvolňování spliceozomu po proběhnutí sestřihu (Hackmann et al., 2014).

## 7.5. Role SR-like proteinů v exportu

Přestože jsou proteiny Gbp2 a Hrb1 k RNA pravděpodobně vázány kotranskripčně za účasti komplexu TREX, zdá se, že svou funkci více uplatňují až později (Hackmann et al., 2014).

Ukázalo se, že proteiny Gbp2 a Hrb1 přednostně nalezneme v asociaci s transkripty, které pochází z genů obsahujících intron. Z experimentu s využitím RNA imunoprecipitace vyplynulo, že tyto proteiny se k RNA vážou ještě za přítomnosti intronu, tedy před proběhnutím druhého kroku sestřihu. Oba proteiny byly také nalezeny v asociaci i s aktivovanou formou spliceozomu B<sup>act</sup> (obrázek 2) potřebnou pro proběhnutí prvního kroku sestřihu. Toto naznačuje, že proteiny Gbp2 a Hrb1 interagují s aktivně stříhanou pre-mRNA. Zatímco protein Npl3 byl nalezen v obdobné míře interakce s oběma druhy transkriptů, obsahujících i neobsahujících intron (Hackmann et al., 2014).

Zároveň při mutaci sestřihových faktorů, které hrají roli ve druhém kroku sestřihu (*prp17Δ*) a při rozvolňování spliceozomu (*prp43(3247A)*), se snižuje asociace Gbp2 i Hrb1 s polyadenylovanou RNA, kdežto interakce Npl3 s touto RNA není takovými mutacemi příliš

ovlivněna. Tyto a výše zmíněné experimenty naznačují, že proteiny Gbp2 a Hrb1 interagují s transkripty již během sestřihu, pro stabilizaci této vazby je však důležité, aby sestřih proběhl do konce (Hackmann et al., 2014).

Byly identifikovány některé sestřihové faktory zapojené do pozdní fáze sestřihu, jejichž mutace, například *prp17(336.)*, *slu7-EIE*, *prp43(S247A)*, zabránila exportu proteinů Gbp2 a Hrb1 do cytoplazmy. Mutace stejných sestřihových faktorů ale neovlivnila export Npl3 (Hackmann et al., 2014). Neboť proteiny Gbp2 a Hrb1 interagují s komplexem TREX, jehož vazba do mRNP by mohla být narušena chybou sestřihu (Chanarat et al., 2011), autoři uvažují o možnosti, že by defekt v exportu těchto proteinů mohl být dán chybou připojení komplexu TREX k RNA. Pak by do mRNP nebyly vázány ani proteiny Gbp2 a Hrb1 (Hackmann et al., 2014).

Provedené imunoprecipitační experimenty také ukázaly přímou fyzickou interakci všech tří SR-like proteinů s exportním faktorem Mex67. V kmenech s mutací v pozdních sestřihových faktorech (*prp8(908/988)*, *prp17Δ*) dochází ke ztrátě asociace Gbp2 a Hrb1 s Mex67, zatímco stejné mutace nemají vliv na interakci tohoto exportního faktoru s proteinem Npl3. Je proto velmi pravděpodobné, že sestřih je důležitý pro stabilní interakci proteinů Gbp2 a Hrb1 s transkripty, ale také pro interakci s exportním faktorem Mex67 (Hackmann et al., 2014).

Další studie se zaměřila na export mRNA při vyvolání stresové situace působením vysoké teploty. Pokud buňka podléhala teplotnímu stresu, došlo k zamezení asociace mRNA s exportním faktorem Mex67 a jeho adaptorovými proteiny, včetně všech tří SR-like proteinů. Adaptorové proteiny však zůstaly ve vazbě s Mex67. Zdá se, že by k disociaci adaptorových proteinů mohlo docházet, aby se z mRNA uvolnil exportní faktor Mex67 a zabránilo se tak exportu transkriptů do cytoplazmy (Zander et al., 2016).

## **7.6. Gbp2 a Hrb1 hrají roli při kontrole kvality mRNA**

Proteiny Gbp2 a Hrb1 přímo fyzicky interagují s Mlp1, faktorem pro kontrolu kvality mRNA, a Mtr4, podjednotkou komplexu TRAMP důležitým v roli pro degradaci chybně maturovaných transkriptů. Gbp2 i Hrb1 jsou také v negativní genetické a nepřímé fyzické interakci s ribonukleázou Rrp6, která je součástí jaderného exozomu (Hackmann et al., 2014).

Při zkoumání, zda delece genů pro tyto dva SR-like proteiny způsobí poruchu v exportu mRNA do cytoplazmy, se ukázal opak. Narozdíl od kmene s mutovaným exportním faktorem Mex67, kdy je export mRNA zasažen a dochází k akumulaci transkriptů v jádře, při deleci Gbp2 nebo Hrb1 není mRNA v jádře zadržována. Dokonce naopak dochází k úniku nesestřižených

transkriptů z jádra do cytoplazmy. Tento únik se navíc projevuje v mnohem větší míře než např. v *mlp1Δ* nebo *rrp6Δ* kmeni. Toto zjištění poukazuje na významnou roli proteinů Gbp2 a Hrb1 v dozoru nad sestřihem a exportem mRNA, respektive na jejich schopnost odhalovat nesprávně sestřižené transkripty a bránit takovým transkriptům ve vstupu do cytoplazmy (Hackmann et al., 2014).

V kvasinkovém kmeni *mlp1Δ* byly nesestřižené transkripty, které unikly do cytoplazmy, ve vazbě na proteiny Gbp2 a Hrb1. Data značí jak interakci těchto dvou SR-like proteinů se špatně sestřiženými transkripty, ale také spoluúčast proteinu Mlp1 s Gbp2 a Hrb1 na zadržení těchto transkriptů v jádře (Hackmann et al., 2014).

Komplex TRAMP byl u savců nalezen v asociaci s proteiny podjednotek U4 a U6 snRNP přes helikázu Mtr4. V buňkách tedy dochází k propojení komplexu TRAMP a spliceozomu (Nag a Steitz, 2012). V kvasince je umožněna interakce helikázy Mtr4 se sestřihovým faktorem Prp17. V případě nepřítomnosti Gbp2 nebo Hrb1 komplex TRAMP s faktorem Prp17 asociuje méně. Pokud buňce chybí oba dva tyto proteiny, pak tato asociace nebyla pozorována vůbec. Z toho vyplývá, že tyto dva SR-like proteiny jsou důležité pro zprostředkování efektivní vazby komplexu TRAMP ke spliceozomu (Hackmann et al., 2014).

Na základě koimunoprecipitačních experimentů se také ukázalo, že se vylučují interakce Gbp2/Hrb1 s Mex67 a zároveň s Mtr4. V případě, kdy vstupuje do komplexu s Gbp2 nebo Hrb1 exportní faktor Mex67, pak již tento komplex neinteraguje s Mtr4, komponentou komplexu TRAMP. Naopak protein Gbp2 nebo Hrb1 v komplexu s proteinem Mtr4 dále nemůže interagovat s Mex67 (Hackmann et al., 2014).

Autoři příslušné studie na základě získaných, výše zmíněných dat, uvažují o možnosti, že při správném sestřihu vážou proteiny Gbp2 a Hrb1 exportní faktor Mex67. Pokud však sestřih včas neproběhne, naváže se na tyto SR-like proteiny helikáza Mtr4 a taková RNA bude degradována (Hackmann et al., 2014).

Příslušné experimenty naznačují, že by Gbp2 a Hrb1 mohly rozeznávat nesprávně a správně sestřižené transkripty, třídít je a navigovat buď k exportu, nebo k degradaci v jaderném exozomu (Hackmann et al., 2014).

## 8. ZÁVĚR

SR-like proteiny v *Saccharomyces cerevisiae* patří mezi RNA-vazebné proteiny (\*Long a Caceres, 2009), které se podílejí na procesech umožňujících export mRNA do cytoplazmy (\*Köhler a Hurt, 2007) a doprovází RNA již během transkripce a úprav, které transkript čekají. Společně s mRNA jsou baleny do ribonukleové partikule a napomáhají jejímu exportu (\*Meinel a Sträßer, 2015). Zároveň jsou v rámci mRNP též transportovány přes jadernou membránu do cytoplazmy (\*Köhler a Hurt, 2007).

Jedná se tedy o proteiny, které přechází přes jadernou membránu z jádra do cytoplazmy a odtud je třeba je přenést zpět. Roli zde sehrává protein Mtr10, který přenáší tyto proteiny přes jadernou membránu z cytoplazmy zpět do jádra. K jaderné lokalizaci těchto proteinů mimo to přispívá i jejich fosforylace (Krebber et al., 1999; Windgassen a Krebber, 2003; Häcker a Krebber, 2004).

Všechny tři SR-like proteiny v *Saccharomyces cerevisiae* jsou k RNA vázány již v průběhu transkripce. Zatímco protein Npl3 se zdá být k RNA přiváděn skrze interakci s transkripční mašinerií RNA polymerázy II (Lei et al., 2001) nebo dokonce přímou interakcí s RNA pol II (Dermody et al., 2008), proteiny Gbp2 a Hrb1 jsou k transkriptům spíše vedeny prostřednictvím komplexu TREX (Hurt et al., 2004).

Přestože jsou tyto proteiny přiváděny k RNA kotranskripčně, vypadá to, že svou roli sehrávají jindy, a to i v odlišných etapách vývoje RNA. Zdá se, že protein Npl3 interaguje s mnoha pre-mRNA, z nichž ty, které obsahují intron, pak vede k sestřihu. Zároveň také vykazuje negativní genetické interakce se sestřihovými faktory prvního kroku sestřihu a s proteiny rané fáze sestavování spliceozomu. Jeví se proto jako potřebný spíše na počátku probíhajícího sestřihu pre-mRNA (Kress et al., 2008).

Zatímco u SR-like proteinů Gbp2 a Hrb1 se nezdá, že by ovlivňovaly sestřih transkriptů, spíše se uplatňují až později. Ze získaných informací lze usuzovat, že mají za úkol kontrolovat správný průběh maturace, respektive sestřihu RNA. Nejspíše jsou tyto proteiny schopné odlišit dobře a špatně sestřižené transkripty. Na základě interakcí buď s exportním faktorem Mex67, nebo Mtr4, komponentou komplexu TRAMP potřebného pro degradaci, zjevně rozhodují o osudu transkriptu, zda bude transkript transportován do cytoplazmy či zakončí své putování degradací (Hackmann et al., 2014).

Je zajímavé, že proteiny Gbp2 a Hrb1 nejspíše pro stabilní interakci s mRNA vyžadují, aby proběhl sestřih. Zatímco nesestřižené transkripty vážou méně silně (Hackmann et al., 2014). Má slabší vazba na nesestřižené a silnější vazba na sestřižené transkripty vliv na jejich funkci

v kontrole kvality mRNA? Mohla by síla vazby těchto dvou SR-like proteinů k transkriptu ovlivňovat, zda bude k transkriptu navázán komplex TRAMP či protein Mex67?

Nicméně kromě Gbp2 a Hrb1, s exportním faktorem Mex67 fyzicky interaguje i protein Npl3. Dá se tedy usuzovat, že v exportu mRNA do cytoplazmy se uplatňují všechny tři SR-like proteiny (Hackmann et al., 2014).

Proteiny Gbp2 a Hrb1 vážou spíše transkripty, které obsahují/obsahovaly intron. Zároveň se zdá, že zajišťují kontrolu správného sestřihu (Hackmann et al., 2014). Nicméně, když je mRNA správně sestřižená, nemusí být zcela správně maturovaná. Je tedy možné, že se podílí i na kontrole zbylých maturačních procesů?

Narozdíl od proteinů Gbp2 a Hrb1, protein Npl3 váže transkripty ať obsahují nebo neobsahují intron (Hackmann et al., 2014) a podílí se na stimulaci elongace transkripce (Dermody et al., 2008). U transkriptů s intronem se protein Npl3 uplatňuje v jejich sestřihu (Kress et al., 2008). Mohl by se u bezintronových mRNA podílet na jiných mechanismech zrání RNA? Nebo je interakce proteinu Npl3 s transkripty pocházejícími z bezintronových genů pouze záležitostí jeho působení v transkripci a exportu RNA?

Vyvstávají zde stále další otázky, týkající se úlohy proteinů Npl3, Gbp2 a Hrb1 v maturaci transkriptů a jejich vedení do cytoplazmy, na které by bylo vhodné se v případných nových výzkumech a pracích více zaměřit a pokusit se najít podrobnější odpovědi, abychom tak dosáhli uceleného pohledu na tyto proteiny.



## SEZNAM LITERATURE

- Byrne, Kevin P., and Kenneth H. Wolfe. 2005. "The Yeast Gene Order Browser: Combining Curated Homology and Syntenic Context Reveals Gene Fate in Polyploid Species." *Genome Research* 15 (10): 1456–61. <https://doi.org/10.1101/gr.3672305>.
- Chanarat, Sittinan, Cornelia Burkert-Kautzsch, Dominik M. Meinel, and Katja Sträßer. 2012. "Prp19C and TREX: Interacting to Promote Transcription Elongation and mRNA Export." *Transcription* 3 (1): 8–12. <https://doi.org/10.4161/trns.3.1.19078>.
- Chanarat, Sittinan, Martin Seizl, and Katja Sträßer. 2011. "The Prp19 Complex Is a Novel Transcription Elongation Factor Required for TREX Occupancy at Transcribed Genes." *Genes and Development* 25 (11): 1147–58. <https://doi.org/10.1101/gad.623411>.
- Deka, Pritilekha, Miriam E. Bucheli, Claire Moore, Stephen Buratowski, and Gabriele Varani. 2008. "Structure of the Yeast SR Protein Npl3 and Interaction with MRNA 3'-End Processing Signals." *Journal of Molecular Biology* 375 (1): 136–50. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.029>.
- Dermody, Jessica L., Jonathan M. Dreyfuss, Judit Villén, Babatunde Ogundipe, Steven P. Gygi, Peter J. Park, Alfred S. Ponticelli, Claire L. Moore, Stephen Buratowski, and Miriam E. Bucheli. 2008. "Unphosphorylated SR-like Protein Npl3 Stimulates RNA Polymerase II Elongation." *PLoS ONE* 3 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003273>.
- Erkman, Judith A., and Ulrike Kutay. 2004. "Nuclear Export of MRNA: From the Site of Transcription to the Cytoplasm." *Experimental Cell Research* 296 (1): 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.015>.
- Fasken, Milo B., and Anita H. Corbett. 2009. "Mechanisms of Nuclear MRNA Quality Control." *RNA Biology* 6 (3): 237–41. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8330>.
- Gilbert, Wendy, Christian W. Siebel, and Christine Guthrie. 2001. "Phosphorylation by Sky1p Promotes Npl3p Shuttling and MRNA Dissociation." *Rna* 7 (2): 302–13. <https://doi.org/10.1017/S1355838201002369>.
- Guisbert, Karen Kim, Kent Duncan, Hao Li, and Christine Guthrie. 2005. "Functional Specificity of Shuttling HnRNPs Revealed by Genome-Wide Analysis of Their RNA Binding Profiles." *Rna* 11 (4): 383–93. <https://doi.org/10.1261/rna.7234205>.
- Häcker, Sabine, and Pleike Krebber. 2004. "Differential Export Requirements for Shuttling Serine/Arginine-Type MRNA-Binding Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 279 (7): 5049–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300522200>.

- Hackmann, Alexandra, Haijia Wu, Ulla Maria Schneider, Katja Meyer, Klaus Jung, and Heike Krebber. 2014. "Quality Control of Spliced MRNAs Requires the Shuttling SR Proteins Gbp2 and Hrb1." *Nature Communications* 5: 3123. <https://doi.org/10.1038/ncomms4123>.
- Henry, M, C Z Borland, M Bossie, and P A Silver. 1996. "Potential RNA Binding Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae* Identified as Suppressors of Temperature-Sensitive Mutations in NPL3." *Genetics* 142 (1): 103–15.
- Holmes, Rebecca K., Alex C. Tuck, Chenchen Zhu, Hywel R. Dunn-Davies, Grzegorz Kudla, Sandra Clauder-Munster, Sander Granneman, Lars M. Steinmetz, Christine Guthrie, and David Tollervey. 2015. "Loss of the Yeast SR Protein Npl3 Alters Gene Expression Due to Transcription Readthrough." *PLoS Genetics* 11 (12): 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005735>.
- Houseley, Jonathan, John LaCava, and David Tollervey. 2006. "RNA-Quality Control by the Exosome." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (7): 529–39. <https://doi.org/10.1038/nrm1964>.
- Hurt, Ed, Ming Juan Luo, Susanne Röther, Robin Reed, and Katja Sträßer. 2004. "Cotranscriptional Recruitment of the Serine-Arginine-Rich (SR)-like Proteins Gbp2 and Hrb1 to Nascent mRNA via the TREX Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7): 1858–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308663100>.
- Köhler, Alwin, and Ed Hurt. 2007. "Exporting RNA from the Nucleus to the Cytoplasm." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (10): 761–73. <https://doi.org/10.1038/nrm2255>.
- Krebber, Heike, Tetsuya Taura, Margaret S. Lee, and Pamela A. Silver. 1999. "Uncoupling of HnRNP Npl3p from MRNAs during the Stress-Induced Block in mRNA Export." *Genes and Development* 13 (15): 1994–2004. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1994>.
- Kress, Tracy L, Nevan J Krogan, and Christine Guthrie. 2008. "A Single SR-like Protein, Npl3, Promotes Pre-mRNA Splicing in Budding Yeast." *Molecular Cell* 32 (5): 727–34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.013>.
- Lei, Elissa P., Heike Krebber, and Pamela A. Silver. 2001. "Messenger RNAs Are Recruited for Nuclear Export during Transcription." *Genes and Development* 15 (14): 1771–82. <https://doi.org/10.1101/gad.892401>.
- Lei, Elissa P., and Pamela A. Silver. 2002. "Intron Status and 3'-End Formation Control Cotranscriptional Export of mRNA." *Genes and Development* 16 (21): 2761–66. <https://doi.org/10.1101/gad.1032902>.

- Long, Jennifer C., and Javier F. Caceres. 2009. "The SR Protein Family of Splicing Factors: Master Regulators of Gene Expression." *Biochemical Journal* 417 (1): 15–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20081501>.
- Lukasiewicz, Randall, Bradley Nolen, Joseph A. Adams, and Gourisankar Ghosh. 2007. "The RGG Domain of Npl3p Recruits Sky1p Through Docking Interactions." *Journal of Molecular Biology* 367 (1): 249–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.031>.
- Manley, James L, and Adrian R Krainer. 2010. "A Rational Nomenclature for Serine/Arginine-Rich Protein Splicing Factors (SR Proteins)." *Genes & Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1934910>.
- Maris, Christophe, Cyril Dominguez, and Frédéric H.T. Allain. 2005. "The RNA Recognition Motif, a Plastic RNA-Binding Platform to Regulate Post-Transcriptional Gene Expression." *FEBS Journal* 272 (9): 2118–31. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x>.
- Martínez-Lumbreras, Santiago, Valerio Taverniti, Silvia Zorrilla, Bertrand Séraphin, and José Manuel Pérez-Cañadillas. 2016. "Gbp2 Interacts with THO/TREX through a Novel Type of RRM Domain." *Nucleic Acids Research* 44 (1): 437–48. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1303>.
- Meinel, Dominik M., and Katja Sträßer. 2015. "Co-Transcriptional MRNP Formation Is Coordinated within a Molecular MRNP Packaging Station in *S. Cerevisiae*." *BioEssays* 37 (6): 666–77. <https://doi.org/10.1002/bies.201400220>.
- Moehle, Erica A., Colm J. Ryan, Nevan J. Krogan, Tracy L. Kress, and Christine Guthrie. 2012. "The Yeast SR-Like Protein Npl3 Links Chromatin Modification to mRNA Processing." *PLoS Genetics* 8 (11): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003101>.
- Muddukrishna, Bhavana, Christopher A. Jackson, and Michael C. Yu. 2017. "Protein Arginine Methylation of Npl3 Promotes Splicing of the SUS1 Intron Harboring Non-Consensus 5' Splice Site and Branch Site." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1860 (6): 730–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.04.001>
- Nag, Anita, and Joan A Steitz. 2012. "Tri-SnRNP-Associated Proteins Interact with Subunits of the TRAMP and Nuclear Exosome Complexes, Linking RNA Decay and Pre-mRNA Splicing." *RNA Biology* 9 (3): 334–42. <https://doi.org/10.4161/rna.19431>.
- Niño, C. A., L. Hérisant, A. Babour, and C. Dargemont. 2013. "mRNA Nuclear Export in Yeast." *Chemical Reviews* 113 (11): 8523–45. <https://doi.org/10.1021/cr400002g>.
- Pemberton, Lucy F., Jonathan S. Rosenblum, and Günter Blobel. 1997. "A Distinct and Parallel Pathway for the Nuclear Import of an mRNA-Binding Protein." *Journal of Cell Biology*

- 139 (7): 1645–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1645>.
- Plaschka, Clemens, Andrew J Newman, and Kiyoshi Nagai. 2019. “Structural Basis of Nuclear Pre-mRNA Splicing: Lessons from Yeast.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11 (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032391>.
- Porat, Ziv, Omri Erez, and Chaim Kahana. 2006. “Cellular Localization and Phosphorylation of Hrb1p Is Independent of Sky1p.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1763 (2): 207–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.01.001>.
- Schreiber, Konrad, Gergely Csaba, Martin Haslbeck, and Ralf Zimmer. 2015. “Alternative Splicing in next Generation Sequencing Data of *Saccharomyces Cerevisiae*.” *PLoS ONE* 10 (10): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140487>.
- Sen, Rwik, Priyanka Barman, Amala Kaja, Jannatul Ferdoush, Shweta Lahudkar, Arpan Roy, and Sukesh R. Bhaumik. 2019. “Distinct Functions of the Cap-Binding Complex in Stimulation of Nuclear mRNA Export.” *Molecular and Cellular Biology* 39 (8): 1–20. <https://doi.org/10.1128/mcb.00540-18>.
- Shen, Elisa C., Michael F. Henry, Valerie H. Weiss, Sandro R. Valentini, Pamela A. Silver, and Margaret S. Lee. 1998. “Arginine Methylation Facilitates the Nuclear Export of HnRNP Proteins.” *Genes and Development* 12 (5): 679–91. <https://doi.org/10.1101/gad.12.5.679>.
- Shen, Haihong, and Michael R. Green. 2004. “A Pathway of Sequential Arginine-Serine-Rich Domain-Splicing Signal Interactions during Mammalian Spliceosome Assembly.” *Molecular Cell* 16 (3): 363–73. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.021>.
- Shepard, Peter J., and Klemens J. Hertel. 2009. “The SR Protein Family.” *Genome Biology* 10 (10): 242. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-10-242>.
- Shi, Yigong. 2017. “The Spliceosome: A Protein-Directed Metalloribozyme.” *Journal of Molecular Biology* 429 (17): 2640–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.07.010>.
- Siebel, C W, and C Guthrie. 1996. “The Essential Yeast RNA Binding Protein Np13p Is Methylated.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13641–13646. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13641>.
- Spingola, Marc, Leslie Grate, David Haussler, and Ares Manuel. 1999. “Genome-Wide Bioinformatic and Molecular Analysis of Introns in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Rna* 5 (2): 221–34. <https://doi.org/10.1017/S1355838299981682>.
- Stewart, Murray. 2010. “Nuclear Export of mRNA.” *Trends in Biochemical Sciences* 35 (11): 609–17. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.001>.
- Vanacova, Stepanka, and Richard Stef. 2007. “The Exosome and RNA Quality Control in the Nucleus.” *EMBO Reports* 8 (7): 651–57. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401005>.

- Windgassen, Merle, and Heike Krebber. 2003. "Identification of Gbp2 as a Novel Poly(A)+ RNA-Binding Protein Involved in the Cytoplasmic Delivery of Messenger RNAs in Yeast." *EMBO Reports* 4 (3): 278–83. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor763>.
- Windgassen, Merle, Dorothée Sturm, Iván J Cajigas, Carlos I González, Matthias Seedorf, Holger Bastians, and Heike Krebber. 2004. "Yeast Shuttling SR Proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p Are Part of the Translating MRNPs, and Npl3p Can Function as a Translational Repressor." *Molecular and Cellular Biology* 24 (23): 10479–91. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10479-10491.2004>.
- Xie, Yihu, and Yi Ren. 2019. "Mechanisms of Nuclear mRNA Export: A Structural Perspective." *Traffic* 20 (11): 829–40. <https://doi.org/10.1111/tra.12691>.
- Xu, C., and M. F. Henry. 2004. "Nuclear Export of HnRNP Hrp1p and Nuclear Export of HnRNP Npl3p Are Linked and Influenced by the Methylation State of Npl3p." *Molecular and Cellular Biology* 24 (24): 10742–56. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.24.10742-10756.2004>.
- Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk, and M. B. Roth. 1992. "SR Proteins: A Conserved Family of Pre-mRNA Splicing Factors." *Genes and Development* 6 (5): 837–47. <https://doi.org/10.1101/gad.6.5.837>.
- Zander, Gesa, Alexandra Hackmann, Lysann Bender, Daniel Becker, Thomas Lingner, Gabriela Salinas, and Heike Krebber. 2016. "mRNA Quality Control Is Bypassed for Immediate Export of Stress-Responsive Transcripts." *Nature* 540 (7634): 593–96. <https://doi.org/10.1038/nature20572>.
- Zhou, Zhihong, and Xiang Dong Fu. 2013. "Regulation of Splicing by SR Proteins and SR Protein-Specific Kinases." *Chromosoma* 122 (3): 191–207. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0407-z>.

Internetové zdroje:

- GBP2 Protein | SGD. *Saccharomyces Genome Database* | SGD [online]. Copyright © Stanford University, Stanford, CA 94305. [cit. 22.07.2020]. Dostupné z: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000000517/protein>
- HRB1 Protein | SGD. *Saccharomyces Genome Database* | SGD [online]. Copyright © Stanford University, Stanford, CA 94305. [cit. 22.07.2020]. Dostupné z: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004949/protein>

Obrázek PDB:

PDB ID: 2MZQ; Martínez-Lumbreras, Taverniti, Zorrilla, Séraphin, & Pérez-Cañadillas, 2016