

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



**Interakce proteinů Prp45 a Prp22
ve spliceosomu pučící kvasinky**

The interaction of Prp22 and Prp45 proteins in budding
yeast spliceosome

Lenka Senohrábková
2010

školitel: Doc. RNDr. František Půta, CSc.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně, na základě konzultací se svým školitelem a s pomocí citovaných literárních zdrojů.

Září 2010

Lenka Senohrábková

Mé poděkování patří všem, kteří mi pomohli dostat se až k psaní této práce.

Ráda bych poděkovala rodině a především rodičům za všestrannou podporu a zájem. Petře Macháčkové děkuji za její podporu na blízko i na dálku. Lence Kasalové děkuji za mé zapojení do volnočasových aktivit a občasné navrácení do reality ze snových výšin.

Děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Ráda bych také poděkovala svému školiteli Doc. Františku Půtovi a rovněž Doc. Petru Folkovi za odborné vedení této diplomové práce, mnoho cenných rad a kritických připomínek. Ondřeji Gahurovi a Anně Valenotvé děkuji za jejich ochotu, trpělivost a rady při prvních krůčcích mého experimentování.

Práce vznikla za finanční podpory následujících zdrojů: MSM0021620858, LC07032 a GAUK 119710.

Abstrakt

Protein Prp22 je DEAH box RNA helikáza, která má dvě funkce v sestřihu pre-mRNA: účastní se druhé transesterifikační reakce (ATP independentní funkce) a uvolňuje maturovanou mRNA ze spliceosomu (ATP dependentní funkce). Prp45p, kvasinkový ortholog lidského transkripčního koregulátoru SNW/SKIP, je esenciální sestřihový faktor, přítomný ve spliceosomu po celou dobu sestřihové reakce. Mutanta *prp45(1-169)* geneticky interaguje s některými alelami NTC komplexu a sestřihovými faktory druhého kroku, včetně *PRP22*. Jedním z výsledků této práce je zjištění, že mutanty *prp22(-158T)* a *prp22(-327A)*, které jsou synteticky letální s mutací *prp45(1-169)*, mají kvůli mutaci v upstream regulační oblasti sníženou hladinu proteinu Prp22. Mutanty *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI)* a *prp22(-327A)* ovlivňují sestřih pre-mRNA s mutací v 5' ss v závislosti na sekvenci druhého exonu. N-terminální mutanty *prp22(Δ301)* a *prp22(Δ350)* jsou synteticky letální s *prp45(1-169)*. Syntetická letalita je možná způsobena snížením efektivity vazby Prp22p do spliceosomů na úrovni, která není pro buňky již viabilní.

klíčová slova: sestřih pre-mRNA, *PRP22*, *PRP45*

Abstract

Protein Prp22 is a DEAH box RNA helicase, which plays two distinct roles in pre-mRNA splicing: it participates in second transesterification step (ATP independent function) and it releases mature mRNA from the spliceosome (ATP dependent function). Prp45p, yeast ortholog of the human transcription co-regulator SNW/SKIP, is an essential splicing factor, it is included in spliceosome throughout the splicing reaction. Mutant *prp45(1-169)* genetically interacts with some alleles of NTC complex and second step splicing factors, one of them is also gene *PRP22*. Here we present, that mutants *prp22(-158T)* and *prp22(-327A)*, which are synthetically lethal with *prp45(1-169)*, express lower amount of Prp22p due to the mutation in upstream regulation region. Mutants *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI)* and *prp22(-327A)* affect splicing of pre-mRNA with mutation in 5' splice site with respect to sequence of the second exon. N-terminal mutants *prp22(Δ301)* and *prp22(Δ350)* are synthetically lethal with *prp45(1-169)*. Synthetic lethality is possibly caused by lower efficiency of Prp22 recruitment to the spliceosomes, which is no more viable for cells.

key words: pre-mRNA splicing, *PRP22*, *PRP45*

1. Úvod	8
2. Literární úvod	9
2.1 Sestřih pre-mRNA v <i>S. cerevisiae</i>	9
2.1.1 Sestavování spliceosomu a průběh sestřihu	9
2.1.2 RNA helikázy <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.2 Gen <i>PRP22</i>	13
2.2.1 Struktura s funkce Prp22p	13
2.2.2 Funkce proteinu Prp22 v sestřihu pre-mRNA.....	15
2.2.2.1 Role Prp22p v průběhu druhé transesterifikační reakce.....	15
2.2.2.2 Uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu.....	16
2.2.3 Role Prp22p v přesnosti sestřihu pre-mRNA	17
2.2.4 Model funkce Prp22p v uvolňování mRNA	18
2.2.5 Interakční partneři Prp22p	19
2.3 Gen <i>PRP45</i>	20
2.3.1 Stavba proteinu Prp45	20
2.3.2 Funkce proteinu Prp45	23
2.3.2.1 Genetické interakce <i>PRP45</i>	24
2.4 Interakce proteinů Prp45 a Prp22.....	25
3. Materiál a metody.....	26
3.1 Materiál.....	26
3.1.1 Seznam použitých organismů.....	26
3.1.2 Přehled použitých plasmidů a vektorů	27
3.1.3 Seznam primerů.....	28
3.1.4 Přehled použitých komerčních kitů	29
3.1.5 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů.....	29
3.1.6 Kultivační média a roztoky	30
3.1.6.1 Kultivace bakteriálních kmenů	30
3.1.6.2 Kultivace kvasinkových kmenů.....	30
3.2 Metody	32
3.2.1 Metody kultivace organismů.....	32
3.2.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	33
3.2.3 Amplifikace DNA metodou PCR	33
3.2.4 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu	34
3.2.5 Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou z <i>E. coli</i>	34
3.2.6 NucleoSpin® Extract II - Izolace fragmentů DNA z gelu	36
3.2.7 NucleoSpin® Extract II – Protocol for PCR clean-up	37
3.2.8 Ligace DNA v roztoku.....	37
3.2.9 Transformace <i>E. coli</i> elektroporací.....	37
3.2.10 Klonování PCR produktů pomocí TOPO TA Cloning® Kit	38
3.2.11 Vysoce efektivní transformace <i>S. cerevisiae</i>	39
3.2.12 Křížení a sporulace <i>S. cerevisiae</i> , tetradová analýza	40
3.2.13 Izolace celkové RNA z <i>S. cerevisiae</i>	41
3.2.14 Značení primerů pomocí sady Primer Extension System – AMV Reverse Transcriptase.....	42
3.2.15 Značení DNA markeru pomocí sady Primer Extension System – AMV Reverse Transcriptase	43
3.2.16 Primer extension pomocí sady RevertAid™ First Strand cDNA Syntesis Kit	43
3.2.17 Analýza produktů Primer extension pomocí PAGE	44
3.2.18 Ošetření materiálu a chemikálií proti RNázám	45

3.2.19 Příprava proteinových extraktů <i>S. cerevisiae</i>	45
3.2.20 Stanovení proteinové koncentrace s použitím komerční sady DC Protein Assay	46
3.2.21 Tris – glycinová SDS - gelová elektroforéza proteinů.....	47
3.2.22 Western blot	48
3.2.23 Imunodetekce proteinů na membráně metodou ECL™	49
4. Výsledky.....	51
4.1 Úvod	51
4.2 Charakterizace kmenů <i>prp22(-327A)</i> , <i>prp22(300PPI)</i> a <i>prp22(-158T)</i>	52
4.2.1 Příčina sníženého množství proteinu Prp22 v kmenech <i>prp22(-327A)</i> a <i>prp22(-158T)</i>	52
4.2.2 Vliv mutant <i>prp22(-158T)</i> , <i>prp22(300PPI)</i> , <i>prp22(-327A)</i> na sestřih suboptimálních substrátů	54
4.3 N-terminální mutanty proteinu Prp22.....	59
4.3.1 Postup při vytváření N-terminálních mutant Prp22p	59
4.3.2 Příprava kmenů pro testování N-terminálních mutant <i>prp22(Δ109)</i> , <i>prp22(Δ261)</i> , <i>prp22(Δ301)</i> a <i>prp22(Δ350)</i>	66
4.3.3 Testování N-terminálních mutant <i>prp22(Δ109)</i> , <i>prp22(Δ261)</i> , <i>prp22(Δ301)</i> a <i>prp22(Δ350)</i>	68
5. Diskuze	74
5.1 Charakterizace kmenů <i>prp22(-327A)</i> , <i>prp22(-158T)</i> a <i>prp22(300PPI)</i>	74
5.1.1 Snížené množství Prp22p v kmenech <i>prp22(-327A)</i> , <i>prp22(-158T)</i> a <i>prp22(300PPI)</i>	74
5.1.2 Vliv kmenů <i>prp22(-327A)</i> , <i>prp22(-158T)</i> a <i>prp22(300PPI)</i> na sestřih suboptimálních substrátů s mutací v 5' ss a blízkosti BP	75
5.2 Testování funkčních vlastností N-terminálních mutant <i>prp22(Δ109)</i> , <i>prp22(Δ261)</i> , <i>prp22(Δ301)</i> a <i>prp22(Δ350)</i>	77
6. Souhrn.....	80
7. Seznam citované literatury	81
8. Příloha	89
8.1 Mapy stěžejních plasmidů a vektorů použitých v práci.....	89
8.2 Sekvence pSE358-PRP22	92
8.3 Vytvořené kmeny pro testování funkčních vlastností N-terminálních mutant Prp22p	92

Seznam zkratek

5'ss	5'sestřihové místo (5'splice site)
3'ss	3'sestřihové místo (3'splice site)
5-FOA	5-fluoroorotová kyselina (5-fluoroorotic acid)
AA	aminokyselinový zbytek
ATP	adenosintrifosfát
BP	místo větvení (branch point)
bp	počet párů bází (base pair)
EtBr	ethidiumbromid
kDa	kilodalton – jednotka molekulové hmotnosti
nt	nukleotid/y
NTC	proteinový komplex proteinu Prp19 (nineteen complex)
NTP	nukleosidtrifosfát
ORF	otevřený čtecí rámeček (open reading frame)
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RM	restrikční místo
snRNA	malá jaderná ribonukleová kyselina
snRNP	malá jaderná ribonukleoproteinová částice
UV	ultrafialové
WT	divoký typ (wilde type)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. Úvod

Sestřih pre-mRNA je klíčový děj odehrávající se v jádře buňky, v průběhu kterého jsou odstraněny nekódující sekvence za vzniku maturované mRNA. Při sestřihu je důležité přesné rozpoznání sekvencí obklopující intron, jelikož chyba v průběhu tohoto procesu může mít za následek posun čtecího rámce v kódující oblasti transkriptu. Na druhou stranu spliceosom musí být schopen se přizpůsobit změnám v délce intronů, jejich sekvence a organizace.

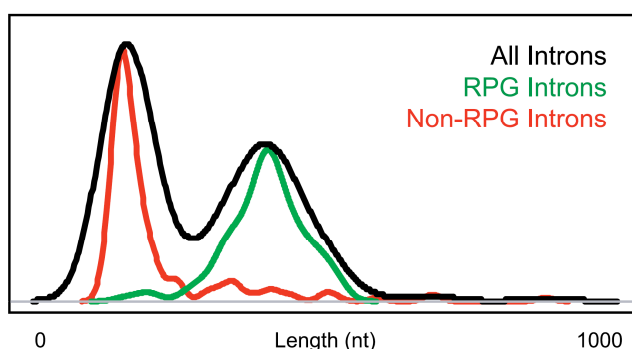
V naší laboratoři se již delší dobu zabýváme studiem sestřihového faktoru Prp45p (**pre-mRNA processing**). Deleční analýzou byla vytvořena řada N- a C-terminálních mutantů tohoto proteinu, které se dále charakterizovaly například na schopnost komplementace genomové delece *PRP45*, účinnost sestřihu arteficiálních sestřihových konstruktů a interakce mutantů Prp45p s dalšími proteiny přístupem dvouhybridní interakce.

Nejvíce je prostudována mutanta *prp45(1-169)*, která vykazuje syntetickou letalitu s určitými mutantami sestřihových faktorů. Mezi nalezené mutanty patří i mutace v genu *PRP22*. Vztahem proteinů Prp45 a Prp22 jsem se zabývala v experimentální části práce.

2. Literární úvod

2.1 Sestřih pre-mRNA v *S. cerevisiae*

Z celkového počtu 6000 genů pouze cca 250 obsahuje intron, většina pouze jeden (Davis et al., 2000). Tyto geny jsou vysoce exprimované (tvoří asi 1/3 buněčných transkriptů) a lze je rozdělit na ribosomální a neribosomální. Podstatná část (102 ze 139) ribosomálních genů má intron, který je výrazně delší než u neribosomálních genů (obr. 1; Ares et al., 1999; Pleiss et al., 2007).

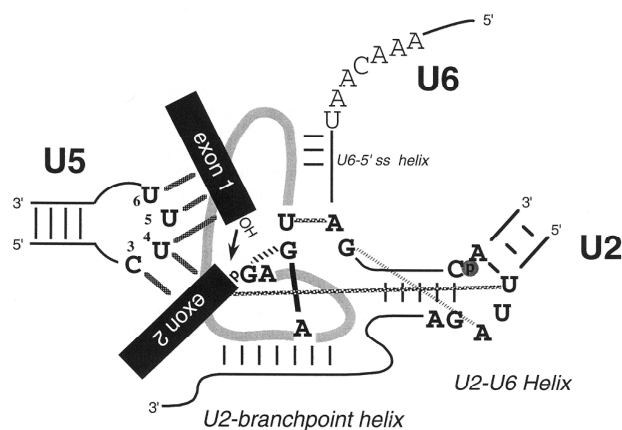


Obr. 1 Délka kvasinkových intronů. Kvasinkové geny obsahující intron (černá), ribosomální kvasinkové geny s intronem (zelená) a neribosomální geny s intronem (červená; převzato z Pleiss et al., 2007).

2.1.1 Sestavování spliceosomu a průběh sestřihu

Přesnost a efektivita sestřihu pre-mRNA je dána proteinovými faktory (in trans), (ribonukleoproteinový komplex/spliceosom) a cis elementy, sekvencemi v pre-mRNA (5' splice site, 5'ss; branch point, BP; 3' splice site, 3'ss). Spliceosom se skládá z pěti malých jaderných RNA (U1 snRNA, U2snRNA, U4/U6.U5 snRNA) a asociovaných proteinů (shrnuto v Sperling et al., 2008; Staley a Guthrie, 1998). Jeho sestavování se děje postupnou asociací malých jaderných ribonukleových partikulí (snRNP) s cis elementy na pre-mRNA. Nejdříve dochází k interakci U1 snRNP s konzervovanými nukleotidy (nt; GURAGU, R = A nebo G) v 5'ss, vzniklý komplex U1snRNP:5'ss, je nazýván commitment komplex. Následuje asociace U2 snRNP se sekvencí BP (UACUAAC, tučně je zvýrazněn větvicí nukleotid), která je ale již předtím rozpoznána proteinem BBP (branch bridging protein). Toto dvojí rozpoznání stejné sekvence vede ke zvýšení přesnosti sestřihu (shrnuto v Newman, 2008). Navázání U2 snRNA má za následek „vytlačení“ nepárového adenosinu ven ze sekvence U2 snRNA, tento nukleofil po aktivaci spliceosomu atakuje 5'ss. Vstup tri snRNP komplexu U4/U6.U5 do sestřihové reakce vede k velké změně RNA-RNA interakcí uvnitř spliceosomu.

kteřý obsahuje sekvenci uridinmonofosfátu a je umístěn mezi BP a 3' ss (shrnuto v Umen a Guthrie, 1995). Druhý sestřihový krok lze rozdělit podle činnosti proteinů, které se ho účastní na dva stupně: ATP dependentní (Prp16p a Prp17p) a ATP independentní (Slu7p, Prp18p a Prp22p, Prp8p). Pouze Prp16p a Prp8p jsou esenciální pro průběh druhého kroku sestřihu (James et al., 2002; Schwer a Gross, 1998, shrnuto v Umen a Guthrie, 1995). Protein Prp16 je RNA helikáza, jejímž působením dojde ke konformační změně 3' ss, které se následně přemístí do katalytického místa spliceosomu (Schwer a Guthrie, 1992). Proteiny Prp18, Slu7 a Prp22 jsou *in vitro* nezbytné při větší vzdálenosti BP a 3' ss (Brys a Schwer, 1996; Schwer a Gross, 1995; Zhang a Schwer, 1997; viz kapitola 3.2.1). Výběru 3' ss se zřejmě účastní i jiné proteiny (shrnuto v Brow, 2002; Newman, 2008; Umen a Guthrie, 1995).



Obr. 3 Spliceosom před druhou transesterifikační reakcí. Šedě je značena pre-mRNA a černě exony 1 a 2 (převzato a upraveno z Umen a Guthrie, 1995).

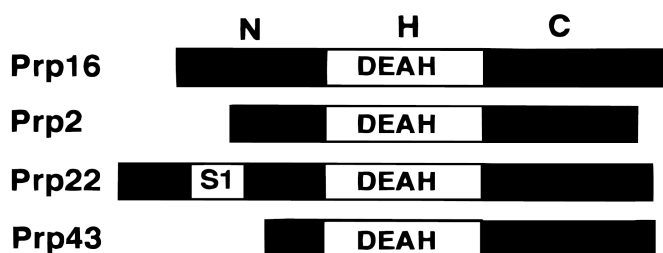
V druhém transesterifikačním kroku kyslík v 3'hydroxylové skupině exonu 1 nukleofilně atakuje fosfodiesterovou vazbu v 3' ss (obr. 3). Ligací exonů vzniká maturovaná mRNA a lará-intron (Brow, 2002).

2.1.2 RNA helikázy *Saccharomyces cerevisiae*

Přestože obě transesterifikační reakce probíhají bez dodání energie, je sestřih pre-mRNA proces s velkou spotřebou energie. Energie uvolněná hydrolýzou nukleosidtrifosfátů, je nezbytná pro změny konformace spliceosomu prostřednictvím RNA helikáz (shrnuto v de la Cruz et al., 1999).

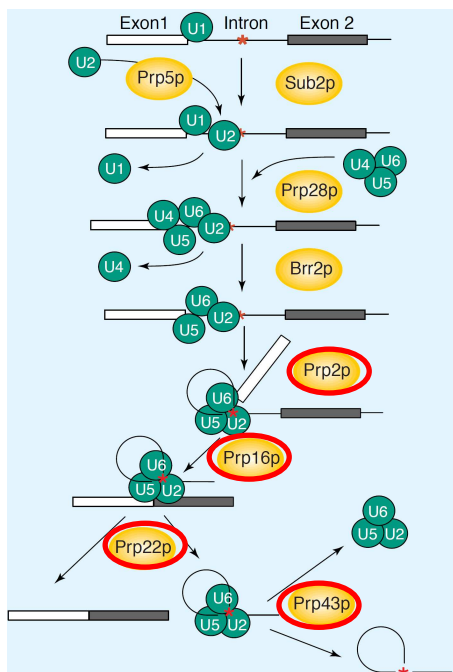
Genom *Saccharomyces cerevisiae* kóduje 39 RNA helikáz, které hrají zásadní roli v metabolismu RNA. Účastní se transkripce, sestřihu pre-mRNA, maturace, exportu a degradace RNA, translace a biogeneze ribosomů (shrnuto v Bleichert a Baserga,

2007; de la Cruz et al., 1999). Tyto enzymy obsahují 7-9 konzervovaných helikázových motivů, prostřednictvím kterých váží substrát (Caruthers et al., 2000) a nukleotid (preferenčně ATP; Walker et al., 1982), jehož hydrolýza uvolní energii potřebnou k rozvolnění RNA-RNA duplexů, RNA-DNA duplexů nebo disociaci proteinů z RNA (Zhang a Green, 2001; shrnuto v Staley a Guthrie, 1998). Na základě aminokyselinové sekvence helikázových motivů se RNA helikázy dělí do dvou nadrodin SF1 (superfamily 1; DEAD box, DEAH box a Ski2-like proteiny) a SF2 (superfamily 2; Upf1 a Upf1-like proteiny; Gorbalenya a Koonin, 1993). RNA helikázy nadrodiny SF2 jsou podle aminokyselinové sekvence helikázového motivu II, souhrnně označovány DExD/H box (podle konzervovaného aminokyselinového motivu, kde x může být jakákoliv aminokyselina; Jankowsky a Jankowsky, 2000; shrnuto v de la Cruz et al., 1999). Do rodiny DEAH box se řadí 4 proteiny (Prp2, Prp16, Prp22 a Prp43), které vykazují vysoký stupeň sekvenční homologie v helikázové doméně i C-terminální extenzi (obr. 4; Arenas a Abelson, 1997; Burgess et al., 1990; Company et al., 1991; Chen a Lin, 1990; shrnuto v de la Cruz et al., 1999).



Obr. 4 RNA helikázy rodiny DEAH box kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. N, N-koncová doména; H, helikázová doména; C, C-koncová doména; S1, S1 motiv (převzato a upraveno z Wang a Guthrie, 1998).

Proteiny rodiny DEAH box se účastní různých fází sestřihu pre-mRNA. Prp2p působí před první transesterifikační reakcí (Kim a Lin, 1993, 1996), Prp16p před druhou transesterifikační reakcí (Schwer a Guthrie, 1992), Prp22p uvolňuje maturovanou mRNA ze spliceosomu (Company et al., 1991) a Prp43p způsobuje rozpad spliceosomu (obr. 5; Arenas a Abelson, 1997).



Obr. 5 RNA helikázy *S. cerevisiae*, které se účastní sestřihu pre-mRNA. Červeně zakroužkované jsou RNA helikázy rodiny DEAH box (převzato a upraveno z de la Cruz et al., 1999).

2.2 Gen *PRP22*

2.2.1 Struktura s funkce Prp22p

Gen *PRP22* kóduje protein o molekulové hmotnosti 130 kDa a délce 1145 aminokyselinových zbytků (AA). Protein Prp22 je RNA stimulovaná NTPáza a NTP dependentní RNA helikáza, patří do rodiny DEAH box proteinů a působící ve směru 3'→5' (Gorbalenya a Koonin, 1993; Schwer a Gross, 1998; Tanaka a Schwer, 2005; Wagner et al., 1998).

Prp22p má modulární stavbu, skládá se z centrální části, která obsahuje 7 helikázových motivů (obr. 6) a N- a C- terminálních extenzi. Deleční analýzou byla definována minimální funkční oblast (262-1145 AA) tohoto proteinu. N-terminální delece 301 a 350 AA je viabilní pouze při silné nadprodukci takto mutovaného proteinu (Schneider a Schwer, 2001).

N-terminální konec Prp22p obsahuje S1 motiv (177-256 AA), který vykazuje homologii s bakteriálním ribosomálním proteinem S1. Tento motiv není esenciální, jeho delece či substituce jednotlivých aminokyselin za alanin nijak neovlivní funkci proteinu (Company et al., 1991; Schneider a Schwer, 2001).



Obr. 6 Modulární stavba proteinu Prp22. Centrální část Pprp22p je tvořena 7 helikázovými motivy (písmena v jednotlivých motivech představují jednopísmenné zkratky aminokyselin).

Aminokyselinová sekvence a funkce jednotlivých motivů byla stanovena na základě mutačních analýz a krystalografických studií RNA helikáz typu DExD/H box Prp22p, eIF4A, NPHII viru kravských neštovic a NS3 viru hepatitidy typu C (Caruthers et al., 2000; Fry et al. 1986; Kim et al., 1998; Lin a Kim, 1999; Pause a Sonenberg, 1992; Schneider et al., 2004; Schwer a Meszaros, 2000; Walker et al., 1982).

Motiv I (⁵⁰⁹GSGKT⁵¹³), také známý pod názvem Walkerův motiv A, vytváří smyčkovitou strukturu (P-loop), na kterou se váže β fosfát ATP (Company et al., 1991; Kim et al., 1998; Lin a Kim, 1999; Walker et al., 1982). Důležitou roli zde hraje konzervovaný Lys⁵¹², jehož mutace (K512A) je letální (Schwer a Gross, 1998).

Motiv Ia (⁵³⁴TQPRRVAA⁵⁴¹) - funkce tohoto motivu není u proteinu Prp22 zcela objasněna. Mutační analýzou byla získána mutanta *prp22*(V539I), která suprimuje chladově senzitivní (cs) fenotyp *prp22*(S635A) a navrácí helikázovou aktivitu proteinu Prp22. Přesto motiv Ia neovlivňuje helikázovou aktivitu, jelikož substituce všech aminokyselin tohoto motivu za alanin, neovlivní biologickou funkci Prp22p. Výjimku tvoří Arg⁵³⁸, jehož mutace (R538A) způsobuje růstový defekt při 15°C (Company et al., 1991; Schneider et al., 2004; Schwer a Meszaros, 2000).

Motiv II (⁶⁰³DEAH⁶⁰⁶), nazývaný též Walkerův motiv B (Walker et al., 1982). Esenciální aminokyselina Asp⁶⁰³ váže Mg²⁺ a prostřednictvím této vazby interaguje s ATP. Motiv II tak pomáhá orientovat komplex ATP-Mg²⁺ do vhodné pozice pro hydrolýzu (Caruthers et al., 2000; Company et al., 1991; Fry et al., 1986; Kim et al., 1998).

Motiv III (⁶³⁵SAT⁶³⁷) spřahuje hydrolýzu ATP s helikázovou aktivitou. Mutanty *prp22*(S635A) a *prp22*(T637A) mají cs fenotyp, hydrolyzují ATP, ale postrádají helikázovou aktivitu, která je esenciální pro uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu (Schwer a Meszaros, 2000). Sekundární supresorové mutace *prp22*(S635A-V539I) a *prp22*(T637A-H853I) částečně potlačují cs fenotyp v nepermisivní teplotě (Campodonico a Schwer, 2002; viz. kapitola 2.2.2.2). V buňkách *prp22*(S635A) a *prp22*(T637A) inkubovaných při zvýšené teplotě, dochází k uvolňování mRNA ze spliceosomu *in vitro* (Schwer a Meszaros, 2000).

Motiv IV (⁶⁹⁵LVFLTG⁷⁰⁰) – Substitucí Phe⁶⁹⁷ za Ala byla získána cs mutanta *prp22*(F697A), která má stejný defekt v sestřihu jako výše uvedené mutanty *prp22*(S635A) a *prp22*(T637A). V případě inkubace buněk při zvýšené teplotě je opět tento defekt *in vitro* odstraněn. Dodáním tepelné energie se zřejmě kompenzuje

neschopnost mutant spřáhnout hydrolýzu ATP s mechanickým uvolněním mRNA ze spliceosomu (Campodonico a Schwer, 2002; Schneider et al., 2004).

Motiv V (757TNIAETSIT765) váže RNA. RNA helikáza NS3 viru hepatitidy typu C váže RNA prostřednictvím interakce hydroxyskupiny Thr⁴¹¹ s fosfátem v cukr-fosfátové „kostře“ (Company et al., 1991; Gorbalenya a Koonin, 1993; Kim et al., 1998; Lin a Kim, 1999). Thr⁴¹¹ obsažený v motivu V, odpovídá Thr⁷⁵⁷ v proteinu Prp22. Mutanta *prp22*(T757A) má basální ATPázovou aktivitu, která není stimulovatelná RNA. Zatímco ATPázová aktivita *prp22*(T765A) je striktně závislá na RNA. Provedením experimentu gel shift bylo zjištěno, že obě výše uvedené mutanty *prp22* váží RNA. Buď jedna aminokyselinová substituce nenaruší vazbu RNA, nebo jsou v proteinu Prp22 přítomna další vazebná místa pro RNA (Company et al., 1991; Schneider et al., 2004).

V **Motiv VI (804QRKGRAGR811)** jsou esenciální aminokyseliny Gln⁸⁰⁴, Gly⁸⁰⁷, Arg⁸⁰⁸, Arg⁸¹¹, jejich substituce za alanin je letální. (Schneider et al., 2004). RNA helikáza NS3 viru hepatitidy typu C obsahuje v motivu VI Arg⁴⁶⁴ a Arg⁴⁶⁷, které se váží na γ a α fosfát ATP (Kim et al., 1998; Lin a Kim, 1999). Aminokyseliny Arg⁸⁰⁸, Arg⁸¹¹ se také možná podílí na vazbě nukleotidu.

2.2.2 Funkce proteinu Prp22 v sestřihu pre-mRNA

Protein Prp22 má dvě funkce v průběhu sestřihu pre-mRNA, účastní se druhé transesterifikační reakce (ATP independentní funkce) a uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu (ATP dependentní funkce; Company et al., 1991; Schwer a Gross, 1998; Wagner et al., 1998).

2.2.2.1 Role Prp22p v průběhu druhé transesterifikační reakce

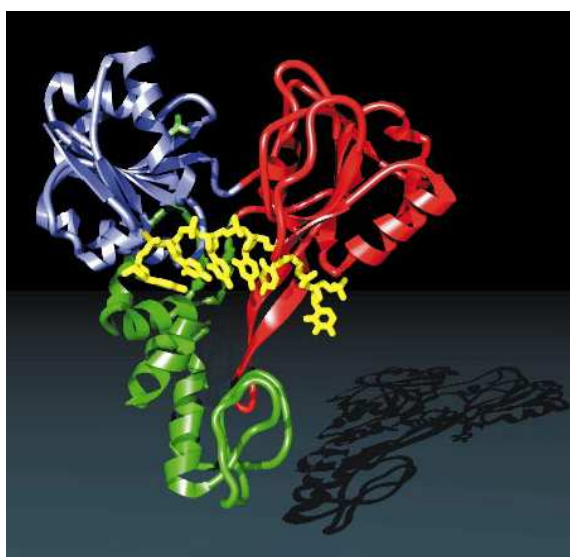
Prp22p se váže do spliceosomu před druhou transesterifikační reakcí, asocijuje s minimálně 8 posledními nukleotidy intronu. Pro průběh druhého kroku sestřihu je funkce Prp22p *in vitro* esenciální, jestliže je vzdálenost mezi BP a 3' ss ≥ 21 nt (McPheeters et al., 2000; McPheeters a Muhlenkamp, 2003; Schwer a Gross, 1998). Proteiny Prp18 a Slu7 jsou *in vitro* nezbytné pro průběh druhé transesterifikační reakce, pokud je vzdálenost mezi BP a 3' ss ≥ 12 nt (Brys a Schwer, 1996; Zhang a Schwer, 1997). Možná proteiny Prp22, Prp18 a Slu7 vytváří molekulový můstek mezi BP a 3' ss. Tento molekulový můstek zřejmě slouží pouze u transkriptů s větší vzdáleností BP a 3' ss k správnému rozpoznání 3' ss a umístění 3' hydroxy skupiny exonu 1 do katalytického místa (Schwer a Gross, 1998).

2.2.2.2 Uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu

Prp22p rozvíjí duplexy nukleových kyselin (RNA-RNA, RNA-DNA) s 3' koncovým přesahem, tvořeným řetězcem RNA, jehož délka určuje efektivitu helikázové aktivity. Jelikož katalytická efektivita (k_{cat}/K_m) je 13x-40x větší pro duplex nukleových kyselin (NK) s 3' koncovým přesahem tvořeným 20-30 nt ve srovnání s duplexem NK, kde tento přesah tvoří pouze 10 nt. Při délce 3'koncového přesahu ≥ 49 nt je efektivita helikázové aktivity primárně určena stabilitou duplexu NK. Protein Prp22 je schopný rozvíjet krátké duplexy NK o malé stabilitě a pouze pokud je v nadbytku (20:1) vzhledem k substrátu. Z těchto výsledků vyplývá, že Prp22p pravděpodobně není procesivní helikáza (Tanaka a Schwer, 2005).

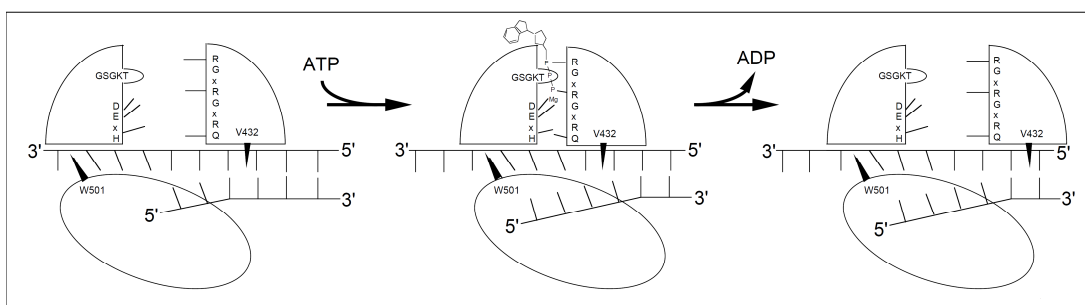
Prp22p hydrolyzuje všechny běžné nukleosidtrifosfáty a deoxynukleosidtrifosfáty s podobnými hodnotami K_m a k_{cat} (Tanaka a Schwer, 2005).

Pro uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu je důležité spřažení ATPázové a helikázové aktivity Prp22p (Campodonico a Schwer, 2002; Schneider et al., 2004; Schwer a Meszaros, 2000). Jak u proteinu Prp22 dochází k spřažení hydrolýzy ATP a helikázové aktivity není zcela přesně objasněno. Krystalografické studie DExH RNA helikázy NS3 viru hepatitidy typu C, se kterou Prp22p vykazuje určitý stupeň homologie, navrhuji níže uvedený model. Protein NS3 se skládá ze tří globulárních domén. Doména 1 obsahuje motiv I (váže α fosfát NTP) a II (prostřednictvím Mg^{2+} váže γ fosfát NTP), doména 2 obsahuje motiv VI (váže β a γ fosfát NTP) a doména 3 je tvořená C-terminální extenzí (obr. 7). Domény 1 a 2 jsou spojené flexibilní smyčkou tvořenou motivem III (Kim et al., 1998; Lin a Kim, 1999; Yao et al., 1997).



Obr. 7 RNA helikáza NS3 viru hepatitidy typu C. Doména 1 je značena modře, doména 2 červeně, doména 3 zeleně a navázaný oligonukleotid žlutě (převzato z Kim et al., 1998).

Duplex nukleových kyselin s 3'koncovým přesahem se váže do žlábků, oddělujícího doménu 3 od domén 1 a 2. Vazba ATP vede ke konformační změně, která se projeví zmenšením vzdálenosti mezi doménou 1 a 2. Energie uvolněná hydrolýzou ATP způsobí translokaci proteinu podél řetězce ve směru 3'→5' (obr. 8). Za striktní orientaci helikázové aktivity je pravděpodobně zodpovědná aminokyselina Trp⁵⁰¹, jehož postranní aromatický řetězec se interkaluje mezi báze duplexu NK. Substituce T501A způsobí úplnou ztrátu helikázové aktivity. Pouze při záměně Trp⁵⁰¹ za jinou aminokyselinu s postranním aromatickým řetězcem (Phe) zůstane helikázová aktivita proteinu zachována (Gwack et al., 1996; Kim et al., 1995, 1998; Lin a Kim, 1999).



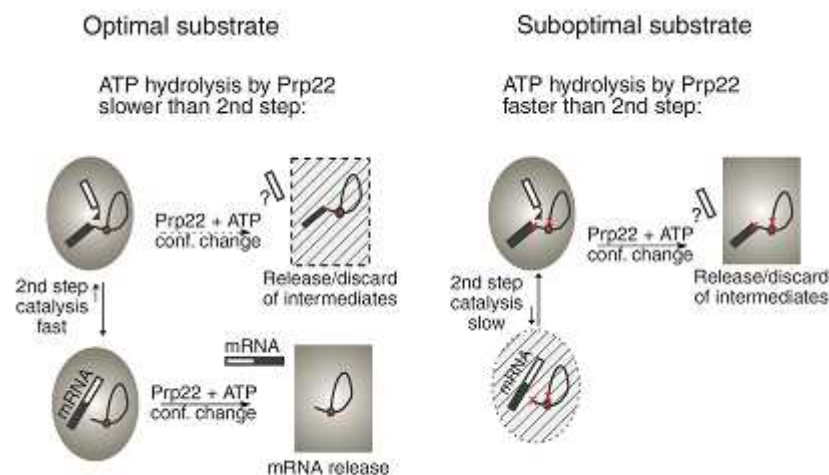
Obr. 8 Schematické znázornění spřažení helikázové a ATPázové aktivity proteinu NS3 (převzato z Kim et al., 1998).

Změna velikosti žlábků mezi doménami 1 a 2 je umožněná díky flexibilní smyčce tvořené motivem III. Tento motiv pravděpodobně spřahuje vazbu ATP a jeho hydrolýzu s konformačními změnami, nezbytnými pro helikázovou aktivitu proteinu (Kim et al., 1998, Lin a Kim 1999). Mutace v motivu III *prp22*(S635A) rozpřahuje ATPázovou a helikázovou aktivitu Prp22p. Sekundární supresorové mutace *prp22*(S635A-V539I) v motivu Ia a *prp22*(S635-A760V) v motivu V odstraňují tento defekt. V proteinu NS3 jsou motivy Ia (doména 1) a V (doména 2) naproti sobě. Záměna isoleucinu za valin a valinu za alanin v supresorových mutantách *prp22*(S635A-V539I) a *prp22*(S635-A760V), vede zvětšení velikosti postranního řetězce o jednu methylovou skupinu. Toto zvětšení objemu postranního řetězce by se mohlo projevit v usnadnění otevření žlábků mezi doménou 1 a 2 při hydrolýze ATP a umožnit tak pohyb Prp22p podél řetězce RNA (Schwer a Meszaros, 2000).

2.2.3 Role Prp22p v přesnosti sestřihu pre-mRNA

ATPázová a helikázová aktivita Prp22p hraje důležitou roli i v přesnosti sestřihu pre-mRNA. Protein Prp22 negativně ovlivňuje ligaci exonů u transkriptů s mutací v 5'ss, BP a 3'ss. Mutace v 3'ss negativně ovlivní ligaci exonů *in vivo* i *in vitro* pouze

u transkriptů, označovaných „near-consensus“ (WT 3' ss UAG; jednonukleotidová záměna na druhé či třetí pozici). V případě ATP nebo helikázově deficientních mutant Prp22p podstoupí tyto transkripty ligaci exonů za vytvoření mRNA. Ligace exonů u „non-consensus“ transkriptů (dinukleotidová záměna AG v 3' ss) není ovlivňována Prp22p. Již samotný výskyt takovéto mutace vede k hromadění lariát-intermediátu a 5' exonu. Prp22p zřejmě ovlivňuje ligaci exonů u těch transkriptů, které jsou schopné podstoupit katalýzu a vyžadují proto další kontrolu. Na základě těchto výsledků byl navržen následující kinetický model, ve kterém hraje ATPázová aktivita Prp22p funkci časovače. V případě optimálních substrátů (WT 5' ss, BP, 3' ss) dojde k ligaci exonů dříve než k hydrolyze navázaného ATP Prp22p. U suboptimálních substrátů se dříve hydrolyzuje ATP, což má za následek konformační změnu spliceosomu, která zabrání ligaci exonů (obr. 9; Mayas et al., 2006). Působením RNA helikázy Prp43p dojde k uvolnění lariát intermediátu a 5' exonu ze spliceosomu (Mayas et al., 2010). Tento model je v souladu s pozorováním, že v průběhu druhého kroku sestřihu Prp22p asocijuje pouze transientně s transkripty s WT 3' ss. Naopak u transkriptů s mutací v 3' ss dochází k zesílení interakce s Prp22p (McPheeters, 2000). Přeměna jedné konformace spliceosomu na další a přesnost sestřihu jsou spíš dva výsledky jedné činnosti než dvě funkce Prp22p (Query a Konarska, 2006).

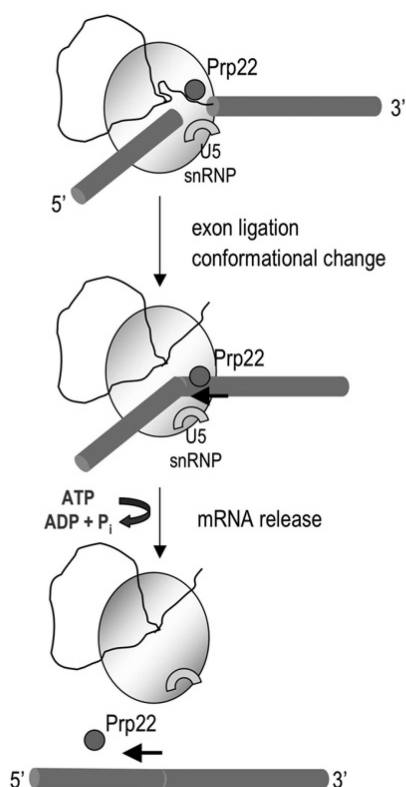


Obr. 9 Kinetický model role Prp22p v přesnosti sestřihu pre-mRNA (převzato a upraveno z Query a Konarska, 2006).

2.2.4 Model funkce Prp22p v uvolňování mRNA

Prp22p se váže do spliceosomu před druhou transesterifikační reakcí, asocijuje zde s oblastí intronu (minimálně 8 nukleotidů) upstream od 3' ss (McPheeters et al.,

2000; McPheeters a Muhlenkamp, 2003). Pro katalýzu druhého kroku sestřihu je důležité přiblížení volného 3' konce exonu 1 a vázaného 5' konce exonu 2, což se děje prostřednictvím „smyčky 1“ U5 snRNP. Nukleotidy obsažené v této smyčce, jsou fylogeneticky invariantní a interagují s exonovými sekvencemi v blízkosti 3'ss a 5'ss, které však fylogeneticky konzervované nejsou (Frank et al., 1994; shrnuto v Newman, 2008). Interakce U5 snRNA:exon je slabá, párování bazí mezi těmito sekvencemi má často non-Watson-Crickovský charakter. K zesílení této vazby dochází pomocí proteinů Prp18 a Prp8, které jsou součástí U5 snRNP (Bacíková a Horowitz, 2005; Crotti et al., 2007; Teigelkamp et al., 1995a). Prp8p se váže na oblast 5'exonu (minimálně 8 nt) upstream od 5'ss a oblast 3'exonu (minimálně 13 nt) downstream od 3'ss (McPheeters et al., 2000; McPheeters a Muhlenkamp, 2003; Teigelkamp et al.,



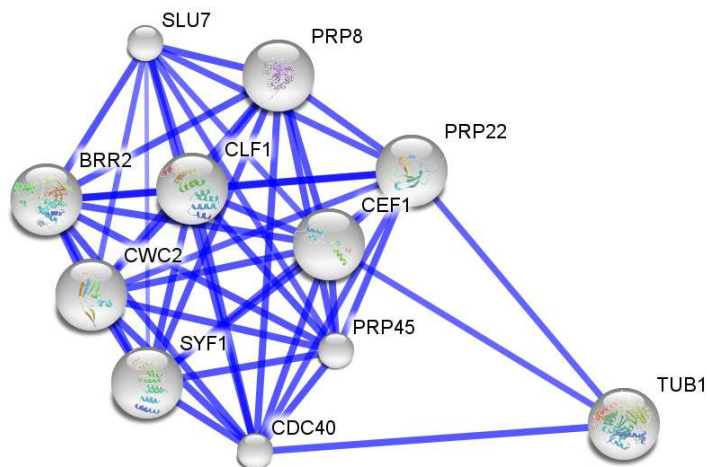
Obr. 10 Model uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu a role Prp22 v tomto procesu (převzato z Schwer, 2008).

1995a,b). Po ligaci exonů se Prp22p přemístí z 3' konce intronu na oblast exonu 2 (více jak 13 nt; Schwer, 2008). Substituce jakékoliv aminokyseliny za Arg¹⁷⁵³ proteinu Prp8 vede k zeslabení interakce U5 snRNA:exon (Aronova et al., 2007). Energie uvolněná hydrolýzou ATP vede k pohybu Prp22p ve směru 3'→5', rozrušení kontaktu U5 snRNP:mRNA a následnému uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu (obr. 10; Schwer a Meszaros, 2000; Schwer, 2008). V kmeni s cs mutantami *prp22* (helikázově deficientní) a mutantou *prp8* (substituce Arg¹⁷⁵³) dochází k uvolnění maturované mRNA ze spliceosomu při nepermissivní teplotě (Aronova et al., 2007; Schwer a Meszaros, 2000). Dodnes není určeno, zda Prp22p svou helikázovou aktivitou narušuje interakci Prp8p:mRNA nebo U5 snRNA:mRNA.

2.2.5 Interakční partneři Prp22p

Protein Prp22 interaguje s řadou proteinů, které jsou zapojené nejenom v sestřihu pre-mRNA (např. Slu7p, Prp45p, Prp8p), ale také např. v tvorbě mikrotubulů (Tub1p), v dráze degradující mRNA s předčasnými terminačními kodóny (Upf1p), v iniciaci

transkripce (Taf10p) či výběru místa pučení (Bud31p; www.string.org; www.yeastgenome.org). Součástí „interaktomu“ Prp22p je mj. i protein Prp45 (obr. 11).



Obr. 11 Schematické znázornění části interakčních partnerů Prp22p

(http://string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl?taskId=UX5L_QqG_r2_&interactive=yes&advanced_menu=_unassigned&network_flavor=confidence).

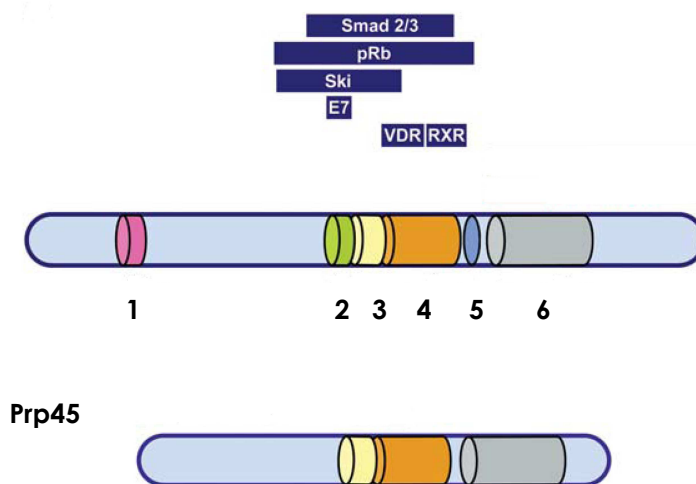
2.3 Gen *PRP45*

2.3.1 Stavba proteinu Prp45

Gen kódující protein Prp45/Fun20 byl původně identifikován při analýze chromozomu I *S. cerevisiae* jako esenciální gen s neznámou funkcí (FUN20, **UN**known; Diehl et al., 1991; Harris et al., 1992). Protein Prp45 (42 kDa) o délce 379 AA obsahuje konzervovaný aminokyselinový motiv SNWKN (170-174 AA), na základě kterého je řazen do skupiny proteinů SNW (Folk et al., 1996; Martinkova et al., 2002). Proteiny SNW jsou preferenčně jaderně lokalizované a nacházíme je v celé eukaryotické říši, např. v *S. cerevisiae* (Prp45p; Albers et al., 2003), *Schizosaccharomyces pombe* (Snw1; Ambrozkova et al., 2002), *Dictyostelium discoideum* (SnwA; Folk et al., 1996), *Caenorhabditis elegans* (CeSKIP; Kostrouchova et al., 2002), *Drosophila melanogaster* (Bx42; Wieland et al., 1992) a v člověku (SKIP; Dahl et al., 1998). Genomová delece *PRP45* není suprimována expresí proteinů SnwA, Snw1 a SKIP, což značí specifickou roli Prp45p (shrnuto v Folk et al., 2004). Avšak autoři jiné publikace z téhož roku připouští funkční substituci Prp45p proteinem SKIP (Figueroa a Hayman, 2004).

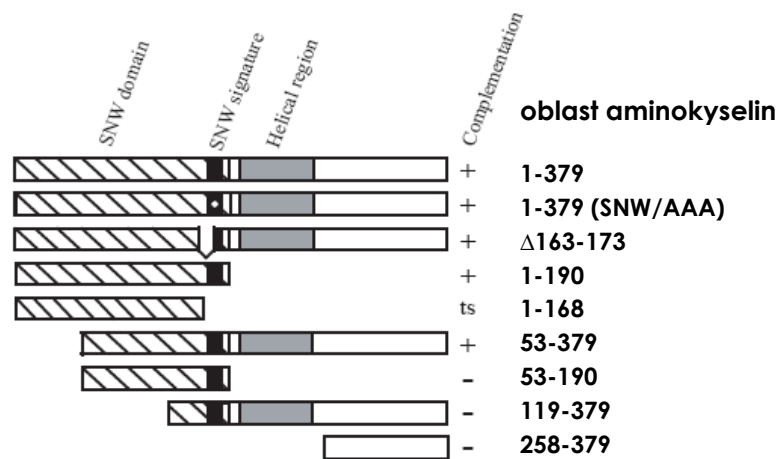
Proteiny SNW obsahují N- a C-terminální doménu a centrální část s druhově specifickými motivy/sekvencemi (obr. 12; shrnuto v Folk et al., 2004). Protein Prp45 má výrazně zkrácenou N-terminální doménu, neobsahuje glycin bohatou oblast a polyprolinový motiv (obr. 12).

Proteiny orthologní k lidskému SKIP



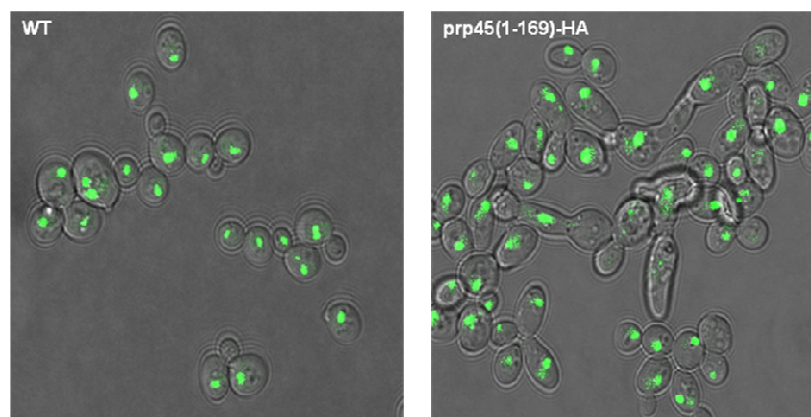
Obr. 12 Schematické znázornění stavby proteinů orthologních k lidskému SKIP a Prp45p. 1, glycin bohatá oblast; 2, polyprolinová oblast; 3, konzervovaný SNWKN motiv; 4, helikální motivy; 5, druhově specifické inserty; 6, SH2-like doména. V horní části obrázku jsou znázorněné oblasti přibližné vazby některých interakčních partnerů proteinu SKIP (převzato a upraveno z Folk et al., 2004).

Delecí N- a C-terminální domény byla získána sada mutantů *PRP45* (obr. 13). Z tohoto experimentu vplynuly následující poznatky. Ektopicky exprimovaná mutanta Prp45p s delecí aminokyselinových zbytků 1-52 (*prp45(53-379)*) je schopná komplementovat genomovou delecí *PRP45*. Kombinace delecí 1-52 s delecí 191-379 AA (*prp45(53-190)*) vede ke vzniku nefunkčního proteinu. N-koncových 52 aminokyselin je slabě konzervovaných a oblast zahrnující 53-123 AA vykazuje 42% podobnost s lidským orthologním proteinem SKIP. Mutanta Prp45(53-190) není viabilní pravděpodobně proto, že absence obou koncových částí proteinu najednou brání zaujetí nativní konformace (Martinkova et al., 2002). Konzervovaný motiv SNW není pro funkci Prp45p esenciální, neboť ektopická exprese mutantů s delecí *prp45(Δ163-173)* či substitucí tohoto motivu *prp45(SNW170AAA)* suprimuje genomovou delecí *PRP45* (Martinkova et al., 2002). Buňky s delecí motivu SNW v kombinaci s C-terminální delecí *prp45(1-168)* jsou životaschopné, avšak citlivé ke zvýšené teplotě 37°C (Gahura et al., 2009; Martinková et al., 2002).



Obr. 13 Schematické znázornění delečních mutantů *PRP45*. Mutanta 1-379 (SNW/AAA), obsahuje substituci SNW170AAA; Δ 163-173, obsahuje delecí 10 AA (převzato a upraveno z Gahura et al., 2009).

Esenciální oblast proteinu Prp45 obsahuje aminokyseliny 1-168. Buňky s genomovou C-terminální delecí *prp45(1-169)* vykazují citlivost ke zvýšené teplotě 37°C, nokodazolu (inhibice polymerace mikrotubulů), cykloheximidu (inhibice translace) a mají morfologický defekt (obr. 14). U některých mutantů sestřihových faktorů *PRP17*, *PRP22* nebo *CEF1* je růstový defekt způsoben zhoršením sestřihu pre-mRNA genu *TUB1*, kódujícího α tubulin, což má za následek zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi (Vijayraghavan et al., 1989; Shea et al., 1994; Vaisman et al., 1995). Odstraněním intronu z genu *TUB1* dojde k průchodu buněk G2/M fází a částečnému zrušení růstového defektu (Burns et al., 2002). Ektopická exprese genu *TUB1* bez intronu v mutantě *prp45(1-169)* nijak neovlivní růstový defekt buněk (Gahura et al., 2009).

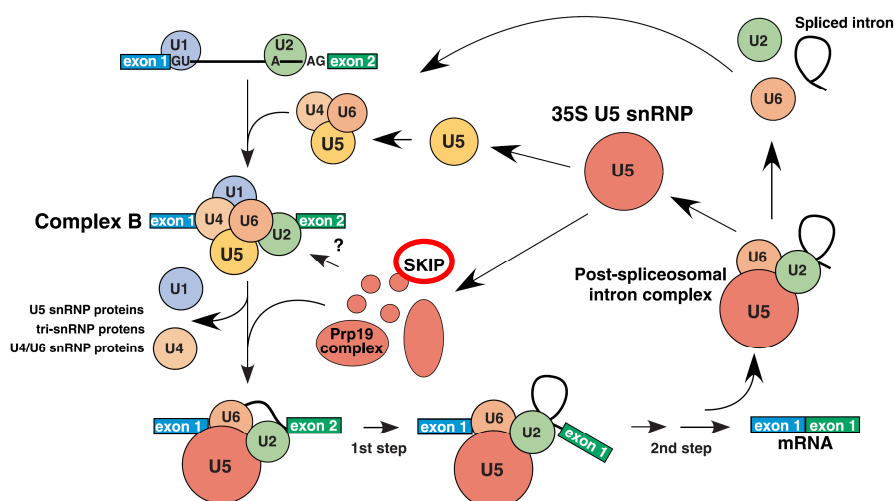


Obr. 14 Buňky kmene *prp45(1-169)* kultivované při permissivní teplotě 30°C, které exprimují genomově tagovaný protein Cbf5-GFP pro vizualizaci jádra.

2.3.2 Funkce proteinu Prp45

Protein Prp45 byl identifikován v penta-snRNP komplexu (Stevens et al., 2002), a také ve vysokomolekulárním proteinovém komplexu, který obsahuje sestřihové faktory (Ohi et al., 2002). Další práce potvrdily účast proteinu Prp45 na sestřihu *in vivo*. Prp45p je jaderný protein, který asocijuje se spliceosomálním komplexem po celou dobu sestřihu a po uvolnění mRNA ze spliceosomu je Prp45p součástí postsestřihového komplexu, kde interaguje s vystřiženým intronem (Albers et al., 2003). Prp45p je pravděpodobně asociován s NTC komplexem v průběhu obou sestřihových kroků. NTC komplex obsahuje minimálně deset proteinů - Prp19, Ntc20, Snt309, Isy1, Syf2, Cwc2, Prp46, Clf1, Cef1, a Syf1, které jsou evolučně vysoce konzervované (Chen et al., 1998, 2001, 2002; Tarn et al., 1994; Tsai et al., 1999). Asociaci Prp45p s tímto komplexem naznačují výsledky proteomické analýzy, ve které byl protein Prp45 identifikován jako součást komplexu sestřihových faktorů asociovaných s Cef1p, Prp19p, Syf1p, Cwc2p, Syf1p, Syf3p nebo Prp46p (Gavin et al., 2002; Ohio et al., 2002; Wang et al., 2003). Interakci Prp45p s NTC komplexem potvrzuje také nález genetické interakce *PRP45* s geny několika komponent (*SYF1*, *CLF1/SYF3*, *NTC20*, *CEF1*) tohoto komplexu, učiněný v naší laboratoři (Gahura et al., 2009). Dvouhybridní analýzou byla zjištěna interakce Prp45p s proteiny Prp46, Syf1 a Syf3. Prp45p pravděpodobně není interním členem NTC komplexu, ale zřejmě interaguje s některými jeho složkami (Albers et al., 2003).

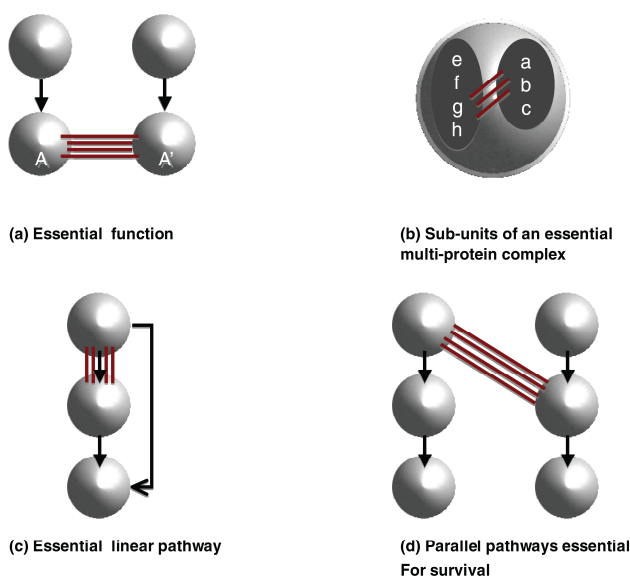
Lidský orthologní protein SKIP se stejně jako Prp45p váže do spliceosomu před první transesterifikační reakcí a zůstává zde vázán po celou dobu sestřihu (obr. 15; Makarov et al., 2002).



Obr. 15 Schematické znázornění průběhu sestřihu pre-mRNA. Červěně je zakroužkován lidský orthologní protein SKIP (převzato a upraveno z Makarov et al., 2002).

2.3.2.1 Genetické interakce PRP45

Genetická interakce nastává mezi dvěma geny, jejichž proteiny působí v jedné esenciální dráze nebo ve dvou paralelních drahách. Tyto proteiny mohou, ale nemusí vykazovat přímou interakci (Tucker a Fields, 2003). Syntetická letalita je typ genetické interakce. Dvě mutace jsou synteticky letální, jestliže samostatný výskyt jedné mutace je pro buňku vitální, ale kombinace těchto dvou mutací způsobí letalitu (obr. 16).



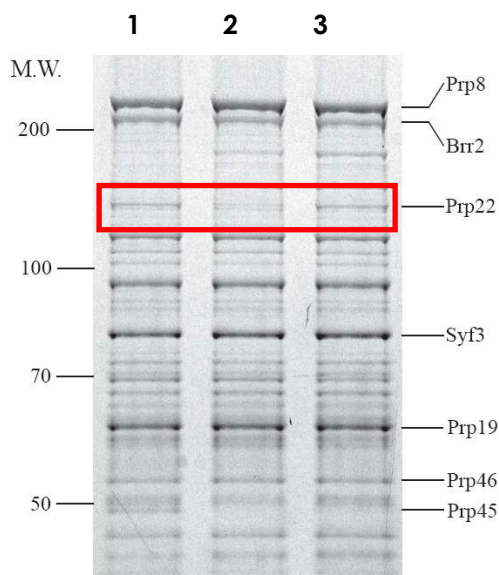
Obr. 16 Schematické znázornění příkladů syntetické letality. Každé kolečko znázorňuje multiproteinový komplex. Červěné čáry spojují mutované proteiny, které jsou synteticky letální. a) složky A a A' jsou esenciální a jejich funkce je redundantní (mohou to být paralogy); b) dvě podjednotky esenciálního multiproteinového komplexu; c) dvě složky interagující v esenciální lineární dráze (jedna mutace snižuje tok touto dráhou); d) paralelní dráhy, které jsou dohromady esenciální. Mutace faktoru jedné dráhy je kompenzována druhou dráhou (převzato z LeMeur a Gentleman, 2008).

Mutanta *prp45(1-169)* je synteticky letální s některými mutantami sestřihových faktorů (*PRP17*, *SLU7*, *PRP18*, *PRP22*) a složkami NTC komplexu (viz. výše; Gahura et al., 2009).

Sestřih „consensus“ substrátů mutantu *prp45(1-169)* nijak neovlivňuje, avšak sestřih „non-consensus“ substrátů (mutace v 5' ss, BP, 3' ss) je u této mutanty oproti WT *PRP45* zhoršen. V kmeni *prp45(1-169)* s koexpresí C-terminálního konce (119-379 AA) Prp45p dojde k navrácení efektivity sestřihu non-konsenzuálních substrátů na úroveň pozorovatelnou ve WT kmeni (Gahura et al., 2009).

2.4 Interakce proteinů Prp45 a Prp22

Z dvouhybridní analýzy vyplynulo, že protein Prp45 obsahuje minimálně jednu C-terminálně lokalizovanou (262-291 AA) oblast, prostřednictvím které interaguje s Prp22p (Albers et al., 2003). Tento náález potvrzují i výsledky naší laboratoře. Hmotnostní spektrometrická analýza spliceosomálních komplexů, izolovaných z buněk kmene nesoucího genomovou mutaci *prp45(1-169)* ukázala, že tato mutace má za následek výrazné snížení Prp22p přítomného ve spliceosomech. Při koexpresi C-terminálního konce (119-379 AA) Prp45p *in trans* se množství proteinu Prp22 vázaného v spliceosomech navrátí na úroveň srovnatelnou s WT kmenem (obr. 17). Protein Prp45 svou C-terminální částí možná reguluje Prp22p, buď nepřímo - ovlivněním konformace druhého kroku sestřihu, nebo přímou vazbou Prp22p do spliceosomu a regulací jeho aktivity (Gahura et al., 2009).



Obr. 17 SDS-PAGE, rozdělení proteinů z vyzolovaných spliceosomálních komplexů přes Cwc2-TAP z kmenů *PRP45* (1); *prp45(1-169)* (2); *prp45(1-169)* + *prp45(119-379)* (3). Červěný obdélník obsahuje oblast s množstvím proteinu Prp22 (převzato a upraveno z Gahura et al., 2009).

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Seznam použitých organismů

Escherichia coli

kmen **DH5 α** : ϕ 80dlacZ Δ M15 recA gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K , m_K^+) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)U169 (Stratagene)

kmen **DH5 α TM-T1R**: F Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_K m_K^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (Invitrogen)

Saccharomyces cerevisiae

kmen **AVY11**: MAT α prp45 (1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 trp1 (plasmid pOG02)

kmen **AVY11#30**: MAT α prp45 (1-169)-HA::kanMX6, prp22(300PPI) ade2 ade3 his3 leu2 ura3 trp1

kmen **AVY11#28**: MAT α prp45 (1-169)-HA::kanMX6, prp22(-158T) ade2 ade3 his3 leu2 ura3 trp1

kmen **AVY11#38**: MAT α prp45 (1-169)-HA::kanMX6, prp22(-327A) ade2 ade3 his3 leu2 ura3 trp1

kmen **Y20335**: MAT α / α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/LYS2 MET15/met15 Δ 0 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 PRP22::kanMX4/PRP22

kmen **LSY01**: MAT α PRP22::kanMX4 his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 MET15 ura3 Δ 0 (plasmid pRS326-PRP22)

kmen **LSY05**: MAT α PRP22::kanMX4 prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 MET15 ura3 Δ 0 (plasmid pRS326-PRP22)

3.1.2 Přehled použitých plasmidů a vektorů

V práci byly použity pro klonování plasmidy a podvojně vektory - pSE358-PRP22, pRS315, pRS325, pLS05-pLS11, pLS14-pLS22, pro zjištění sníženého množství Prp22p v kmenech *prp22(-158T)* a *prp22(-327A)* plasmidy - pOG12, p413ADH, pSE358-PRP22) a pro testování sestřihu metodou primer extension plasmidy - pRH20, pMA2C a pC256A. Mapy stěžejních plasmidů a vektorů jsou uvedeny v příloze (viz. Příloha, kapitola 8.1).

plasmid	systematický název	selektce	typ	původ
pOG12		<i>TRP1, ampR</i>	2μ	Gahura et al., 2009
p413ADH		<i>HIS3, ampR</i>	cen	Mumberg et al., 1995
pRS315		<i>LEU2, ampR</i>	cen	Sikorski a Hieter, 1989
pRS325		<i>LEU2, ampR</i>	2μ	Sikorski a Hieter, 1989
pCR [®] II-TOPO [®]		<i>ampR, kanR</i>		TOPO TA Cloning [®] Kit
p416GPD		<i>URA3, ampR</i>	cen	Mumberg et al., 1995
pRS326-PRP22		<i>URA3, ampR</i>	2μ	Půta, tato práce
pSE358-PRP22		<i>TRP1, ampR</i>	cen	Schwer a Meszaros, 2000
pLS05	pRS315-PRP22	<i>LEU2, ampR</i>	cen	tato práce
pLS06	pRS325-PRP22	<i>LEU2, ampR</i>	cen	tato práce
pLS07	pCR [®] II-TOPO [®] -Δ109	<i>ampR, kanR</i>		tato práce
pLS08	pCR [®] II-TOPO [®] -Δ261	<i>ampR, kanR</i>		tato práce
pLS09	pCR [®] II-TOPO [®] -Δ301	<i>ampR, kanR</i>		tato práce
pLS10	pCR [®] II-TOPO [®] -Δ350	<i>ampR, kanR</i>		tato práce
pLS11	pCR [®] II-TOPO [®] -ΔGPD	<i>ampR, kanR</i>		tato práce
pLS14	pRS315-PRP22Δ109	<i>LEU2, ampR</i>	cen	tato práce
pLS15	pRS315-PRP22Δ261	<i>LEU2, ampR</i>	cen	tato práce
pLS16	pRS315-PRP22Δ301	<i>LEU2, ampR</i>	cen	tato práce
pLS17	pRS315-PRP22Δ350	<i>LEU2, ampR</i>	cen	tato práce
pLS18	pRS325GPD-PRP22	<i>LEU2, ampR</i>	2μ	tato práce
pLS19	pRS325GPD-PRP22Δ109	<i>LEU2, ampR</i>	2μ	tato práce
pLS20	pRS325GPD-PRP22Δ261	<i>LEU2, ampR</i>	2μ	tato práce
pLS21	pRS325GPD-PRP22Δ301	<i>LEU2, ampR</i>	2μ	tato práce
pLS22	pRS325GPD-PRP22Δ350	<i>LEU2, ampR</i>	2μ	tato práce
pRH20		<i>LEU2, ampR</i>	cen	Konarska
pMA2C		<i>LEU2, ampR</i>	2μ	Konarska
pC256A		<i>LEU2, ampR</i>	2μ	Konarska

3.1.3 Seznam primerů

Pro přípravu a sekvenaci N-terminálních mutant proteinu Prp22 byly použity primery - LS01-LS05, LS08-LS11, M13R, M13F a pro testování sestřihu metodou primer extension primery U14 a YAC06.

primer	sekvence	délka (bp)
LS01	CATATGATAACTGAGTCCAGGAACA	26
LS02	CATATGAGAAATACTGAAAGTGTCGAAG	28
LS03	CATATGCTAATTGCCAGCGGTG	22
LS04	CATATGCAACAACGAGACGAGAC	23
LS05	CATATGATCTCGTATGGCAAAGAAC	26
LS08	GGGCCCATCATCTGTATTC	19
LS09	CCATGGCCTTAGCATCAAATAG	24
LS10	GCGAGCTCCGAGTTATCATTATC	24
LS11	GGATCCCATATGTTCGAAACTAAGTCTTG	30
YAC06	GGCACTCATGACCTTC	16
U14	ACGATGGGTTCGTAAGCGTACTCCTACCGTGG	32
M13R	GTAAAACGACGGCCAGT	17
M13F	AACAGCTATGACCATG	16

3.1.3 Seznam DNA modifikujících enzymů

DNA ligáza:

T4 DNA ligáza LC (MBI Fermentas): 1 U/μl

10x ligační pufr (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8 při 25°C)

Polymeráza pro amplifikaci fragmentů použitých ke konstrukcím N-terminálních mutant proteinu Prp22:

Expand High Fidelity polymerase (Roche-Boehringer Mannheim): 100 U/ 30μl

10x reakční pufr (100 mM Tris-HCl, 500 mM MgCl₂, 15 mM MgCl₂, pH 8,3 při 25°C)

Restrikční endonukleázy:

Pro přípravu N-terminálních mutant proteinu Prp22 byly využity uvedené restrikční endonukleázy.

enzym	výrobce
SacI	MBI Fermentas
NdeI	MBI Fermentas
KpnI	Takara Bio Inc
NcoI	MBI Fermentas
Apal	MBI Fermentas
HindIII	MBI Fermentas

Reakční pufrý a podmínky pro digesci byly zvoleny dle doporučení výrobce (www.fermentas.com, www.takara-bio.com).

3.1.4 Přehled použitých komerčních kitů

Klonování DNA:

TOPO TA Cloning® (Invitrogen)

Purifikace a přečištění DNA:

NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel)

Primer extension:

Primer extension system – RevertAid Extension™ First Strand cDNA Syntesis Kit

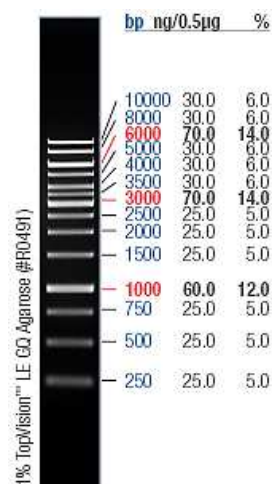
(MBI Fermentas)

AMV Reverse Transcriptase (Promega)

3.1.5 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

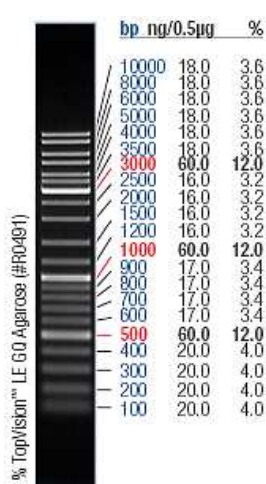
(MBI Fermentas)



0.5µg/lane, 8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min

GeneRuler™ DNA Ladder Mix

(MBI Fermentas)



0.5µg/lane, 8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min

3.1.6 Kultivační média a roztoky

3.1.6.1 Kultivace bakteriálních kmenů

Všechna média se připravují z destilované vody a sterilizují v autoklávu 20 min při 121°C.

1× LB

10 g/l	Universalpepton M66 (MERCK)
5 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD)
5 g/l	NaCl (Penta)

2× LB (Super LB)

20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD)
5 g/l	NaCl (Penta)
0,1 mg/l	Thyamin (Sigma)

ŽA

4% živný agar č. 2 (Imuna)

Pro selekci *E. coli* transformovaných plasmidy, nesoucími gen *ampR*, přidat do obou medií ampicilin (Biotika) o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Do ŽA přidat ampicilin (ŽA-AMP) až po ochlazení na cca 55°C.

3.1.6.2 Kultivace kvasinkových kmenů

Kultivační média se připravují z deionizované vody (Rovapur 100 a Ultrapur, Watrex) a sterilizují v autoklávu 20 min při 121°C.

YPAD

20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD)
100 mg/l	Adenin-hemisulfát (Sigma)
15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD)

Rozpustit v 900 ml deionizované vody. Po sterilizaci v autoklávu přidat 100 ml 20% glukózy (Sigma) a ampicilin (Biotika, výsledná koncentrace 100 µg/ml). K vlažnému médiu nebo na ztuhlý agar se dle potřeby může jinak přidat geneticin (Amersham, výsledná koncentrace 0,2 mg/ml).

SD médium

6,7 g/l	Yeast nitrogen base without amino acids (zdroj dusíku, vitamíny, základní a kovové ionty, Difco™)
1,394 g/l	Syntetic complete (SC-HIS, -LEU, -TRP, -URA) (směs aminokyselin a bází vyjma uvedených, Formedium LTD)
15-18 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD)

Rozpustit v 900 ml deionizované vody. Po sterilizaci v autoklávu přidat 100 ml 20% glukózy (Sigma), ampicilin (Biotika, výsledná koncentrace 100 µg/ml) a 10 ml roztoku aminokyselin a bází dle požadované selekce (viz. níže).

SD médium s 5-FOA

Pro selekci kvasinek ura- je SD médium doplněno o kyselinu 5-fluoroorotovou (5-FOA, Sigma) v koncentraci 1 g/l. Níže je uveden postup přípravy:

- Rozpustit 1 g 5-FOA v 500 ml deionizované vody. Při rozpouštění se může roztok zahřívat max. na 65°C (sterilizovat filtrací, filtr 25 mm).
- Připravit 400 ml SD média (množství vložených složek SD média je vypočteno na konečný objem 1 l, 2x koncentrovaný základ). Po autoklávování přidat 10 ml roztoku aminokyselin a bází (viz. níže) dle požadované selekce, 100 ml 20% glukózy a ampicilin (Biotika, výsledná koncentrace 100 µg/ml).
- Po vychladnutí 2x koncentrovaného základu SD média s přidanou glukózou a aminokyselin pod 65°C, smíchat s roztokem 5-FOA.

Presporulační agar

20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium LTD)
20 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD)

Rozpustit v 500 ml deionizované vody. Po sterilizaci autoklávováním přidat 500 ml 20% glukózy (Sigma, výsledná koncentrace 10%) a ampicilin (Biotika, výsledná koncentrace 100 µg/ml).

Fowelův (sporulační) agar

5 g/l	KAc (Sigma)
2,3 g/l	KCl (Lachema-Brno, Chemapol)
20 g/l	Agar Bacteriological (Oxoid LTD)

Rozpustit v 970 ml deionizované vody. Po autoklávování přidat ampicilin (Biotika, výsledná koncentrace 100 µg/ml) a nezbytné aminokyseliny (viz. níže) dle potřeb daného kmene.

Roztoky aminokyselin a uracilu (100x koncentrované zásobní roztoky)

L-histidin HCl monohydrát (Sigma)	2 g/l
L-leucin (Sigma)	10 g/l
L-tryptofan (Sigma)	2 g/l
L-uracil (Sigma)	2 g/l

3.2 Metody

3.2.1 Metody kultivace organismů

Růst na pevných médiích

- Mikrobiologickou kličkou nebo sterilním párátkem zaočkovat Petriho misky (průměr 60 mm nebo 90 mm) s médiem vhodným pro organismus (viz. kap. 3.1.6, Kultivační média a roztoky).
- Kultivovat 1 den v případě *E. coli* nebo 3-4 dny u *S. cerevisiae*. Běžná kultivační teplota je 37°C pro *E. coli* a 30°C pro *S. cerevisiae*.
- Petriho misky se *S. cerevisiae* lze skladovat maximálně tři týdny v lednici při 10°C, poté se musí kultura přenést na nové plotny. Buňky lze takto pasážovat maximálně dva měsíce, potom je potřeba založit novou kulturu z glycerolové konzervy uložené v mrazáku při teplotě -80°C.

Kultivace v třepaných médiích

- Do Erlenmayerovy baňky (50-250 ml) nalít kultivačním médiem (maximálně 1/10 celkového objemu baňky), médium zaočkovat příslušnými mikroorganismy a mikroorganismy aerobně kultivovat na třepačce při otáčkách 180-200 rpm. Kultivační teplota se řídí typem organismu (viz výše).

- Růst kultury sledovat fotometricky (turbidometricky) na spektrometru (Specol 20, SRN), jako blank se použít kultivační médium. Pokud je optická denzita větší než 0,2 vzorek ředit, protože odečet by byl zatížen chybou.

Glycerolové konzervy *S. cerevisiae*

Příprava a výsev

Výchozí materiál může být jakákoliv suspenze buněk *S. cerevisiae*, včetně suspenze enzymaticky opracovaných kvasinkových spor.

- K suspenzi kvasinek v deionizované vodě nebo kultivačním médiu přidat 60% glycerol v poměru 1:1. Důkladně (avšak šetrně) promíchat v ruce.
- Po 20 min inkubaci na ledu (za občasného promíchání překlápěním mikrozkušavky) přenést do mrazáku (-80°C) a zde uchovávat.
- Na Petriho misku s daným typem média nanést při výsevu vrstvu zmrzlých buněk seškráblých z povrchu glycerolových konzerv, pomocí mikrobiologické kličky či sterilního párátko. Tento postup se musí provádět rychle, aby glycerolové konzervy nerozmrzly.

Roztoky:

60% glycerol 60% (v/v) glycerol (Sigma)

3.2.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- V 500 µl mikrozkušavce připravit následující restrikční směs:
 - 2 µl 10x restrikčního pufru (1/10 výsledného objemu)
 - X µl DNA v deionizované vodě (0,1-4 µg DNA)
 - doplnit deionizovanou vodou do objemu 20 µl
- Přidat 1-10 U enzymu/µg DNA, v závislosti na čistotě vzorku. Při optimální teplotě štěpení inkubovat 1-4 h. Reakci poté zastavit přidáním vzorkového pufru či zmrazením. Restrikční endonukleázy lze teplotně inaktivovat (www.fermentas.com, www.takara-bio.com).

3.2.3 Amplifikace DNA metodou PCR

Příprava směsi před vložením do PCR cyklu se provádí na ledu. Celkový objem vzorků je 10-100 µl.

- Směs připravit v 200 µl mikrozkušavce (výsledný objem 15 µl):

- 0,1-7,5 µl templátové DNA (ve výsledném objemu 10 pg - 1 µg)
- 1,5 µl reakčního pufru bez MgCl₂ (1/10 výsledného objemu)
- 1,5 µl primeru 1 (zásobní konc. 10 µM)
- 1,5 µl primeru 2 (zásobní konc. 10 µM)
- 0,9-1,5 µl MgCl₂ (zásobní konc. 25 mM)
- 1,5 µl dNTP (zásobní konc. 4x 2,5 mM)

Podle potřeby doplnit deionizovanou vodou do objemu 15 µl

- Přidat DNA polymerázu v množství doporučené výrobcem.
- Použít jednu negativní kontrolu (reakce bez templátu) pro zjištění případné kontaminace, a pokud je to možné i jednu pozitivní kontrolu pro ověření specifity reakce.
- Mikrozkušavku s reakční směsí pro PCR inkubovat v PCR cykleru (Peltier PTC-200, MJ Research) dle příslušného programu.
- PCR produkty se analyzují elektroforeticky v agarózovém gelu.

3.2.4 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

- Elektroforetická analýza DNA vzorků se provádí v přístroji pro horizontální gelovou elektroforézu. Používá se k tomu pufr 1x TAE a agarózové gely o tloušťce 3-5 mm.
- Agarózu SeaPlaque LE používat pro eluční, agarózy SeaKem a Nu-Sieve pro analytické účely (vše FMC). Podle velikosti DNA fragmentů se volí koncentrace agarózových gelů 0,8-2,5%.
- Vzorek o objemu 5–50 µl (10 ng – 2 µg DNA) se nanáší do jamek o rozměrech 4-15x 1mm s 1/5-1/10 objemu vzorkového pufru. Na gel dál nanášet 3-10 µl vzorku standartu velikostí fragmentů. Dělicí napětí používat v rozmezí 1-10 V/cm délky gelu.
- Po dobu 5-10 min gel barvit v roztoku ethidiumbromidu (0,5 µg/ml). Gely fotografovat v procházejícím UV záření s červeným/UV-filtrem a snímky exponovat 2,5-4 sekundy (digitální fotoaparát Panasonic DMC-F27).

Roztoky:

- 1x TAE** 40 mM Tris, 20 mM ledová kyselina octová, 2 mM Na₂EDTA, pH 8,5
- 6x vzorkový pufr** 0,06% bromfenolová modř, 60% glycerol, 60 mM EDTA

3.2.5 Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou z *E. coli*

Birboim (1983), upraveno pro semipreparativní izolaci plasmidové DNA z 10–50 ml bakteriální kultury.

1. den (odpoledne)

- ŽA-AMP plotnu zaočkovat bakteriálním klonem *E. coli* nesoucí plasmid s genem *ampR*. Kultivovat přes noc při 37°C.

2. den (odpoledne)

- Do Erlenmayerovy baňky (objem 50-250 ml) nalít 10-50 ml živného média, které obsahuje 100 µg/ml ampicilinu. Médium zaočkovat jednou dobře oddělenou kolonií.
- Inkubace přes noc v třepačce při 180 rpm a 37°C (po dobu min. 16 h).

3. den (ráno)

- Ochladit kulturu v ledové lázni (cca 10 min), přelit do centrifugační zkumavky (50 ml Falcon) a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 000 rpm, 20 min, 0°C).
- Supernatant slít, sediment dokonale resuspendovat v 1 ml **roztoku I**¹ a inkubovat na ledu po dobu 15 min. Poté zkumavku vyjmout z ledové lázně a přidat 2 ml **roztoku II**. Promíchat převrácením zkumavky (buňky lyzují, suspenze se projasní, výrazně stoupne viskozita). Inkubovat 1-10 min.
- Zkumavku vrátit do ledové lázně a přidat 1,5 ml **roztoku III**, lehce promíchat a inkubovat po dobu 30-60 min na ledu (z roztoku vypadne bílá sraženina).
- Vysráženou směs převést do zkumavek pro rotor na centrifugu Jouan MR22i a sraženinu oddělit centrifugací (Jouan MR22i, rotor AM 38.15, 15 000 rpm, 20 min, 4°C).
- Do polypropylenové centrifugační zkumavky převést supernatant. Po zjištění jeho objemu dokonale smístit s 0,6 objemu isopropanolu a ihned centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 000 rpm, 6 min, 20°C).
- Supernatant slít a kapky na okraji odsát buničitou vatou. Sediment krátce osušit, rozpustit v 300 µl deionizované vody a převést do mikrozukavky.
- Po odměření objemu, dokonale smístit se stejným objemem 10 M LiCl. Inkubovat při -20°C po dobu 60 min nebo při -80°C, 20 min.
- Vzniklou sraženinu usadit centrifugací (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 5 min, 20°C), supernatant převést do nové mikrozukavky.
- Po odměření objemu supernatantu, plasmidovou DNA vysrážet z roztoku jedním objemem 96% ethanolu při teplotě -20°C nejméně 60 min nebo -80°C, 20 min.
- Vysráženou plasmidovou DNA sedimentovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 5 min, 20°C), supernatant slít a sediment 2-3x opláchnout 1 ml 70% EtOH (event. utržený

¹ Množství přidávaných roztoků I-III (v poměru 1:2:1,5) se volí dle objemu a nárůstu kultury. Uvedené objemy roztoků I-III v textu odpovídají cca 15 ml kultury.

sediment usadit centrifugací) a ponechat vysušit na stole nebo v termostatu při 37°C.

- Sediment dle množství rozpustit v 100-200 µl deionizované vody nebo TE pufru (pH 8.0). Elektroforézou v agarózovém gelu zjistit množství a kvalitu izolované plasmidové DNA.

Roztoky:

roztok I (TEG) 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza

roztok II 1% SDS, 0,2 N NaOH (čerstvý)

roztok III 3 M octan draselný (KAc), 2 M kys. octová, pH 5,4

3.2.6 NucleoSpin® Extract II - Izolace fragmentů DNA z gelu (Macherey - Nagel)

- Oblast gelu s požadovaným fragmentem DNA vyříznout čistým skalpelem, přenést do mikroskopické zkumavky a zvážit.
- Na 100 mg agarózy přidat 200 µl roztoku NT (pokud je agaróza hustší než 2%, přidat dvojnásobný objem roztoku NT).
- Vzorek inkubovat při teplotě 50°C, do doby než se agaróza úplně rozpustí (5-10 min). V průběhu inkubace vzorek krátce promíchat každé 2-3 min.
- Kolonku NucleoSpin Extract II umístit do sběrné 2 ml mikroskopické zkumavky. Vzorek nanést do kolonky a centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 1 min, 20°C), poté odstranit roztok ze sběrné 2 ml mikroskopické zkumavky.
- Přidat 700 µl roztoku NT3 a opět centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 1 min, 20°C).
- Odstranit roztok ze sběrné 2 ml mikroskopické zkumavky. Pro zbavení se zbytku ethanolu obsaženého v roztoku NT3 zopakovat centrifugaci (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 2 min, 20°C).
- Do čisté 1,5 ml mikroskopické zkumavky umístit kolonku. Nanést 15–50 µl elučního pufru nebo deionizované vody, nechat stát 1 min při pokojové teplotě a poté centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 1 min, 20°C). Při eluci fragmentů větších než 5 kb použít pro větší výtěžek eluční pufr přehřátý na 70°C.

3.2.7 NucleoSpin® Extract II – Protocol for PCR clean-up (Macherey - Nagel)

- Jeden objem vzorku smíchat se dvěma objemy roztoku NT (např. 100 µl vzorku smíchat s 200 µl roztoku NT). Při objemu vzorku menším než 100 µl, doplnit do 100 µl vodou nebo roztokem NT.
- Dále pokračovat od bodu 4 podle návodu 3.2.6. NucleoSpin® Extract II - Izolace fragmentů DNA z gelu.

3.2.8 Ligace DNA v roztoku

- V 500 µl mikrozkušavce připravit reakční směs:
1 µl 10x ligačního pufru (10x ligační pufr obsahuje 5 mM ATP)
DNA vektor a inzert v molárním poměru 1:3-4 (0,1-10 mM)
do výsledného objemu 10 µl doplnit deionizovanou vodou
DNA ligáza v množství doporučené výrobcem
- Ligační směs inkubovat 2–4 h při laboratorní teplotě. Účinnost reakce se zvýší, pokud se ligační směs přenesení na vodní lázeň o pokojové teplotě, lázeň se umístí do lednice a ligace se ponechá probíhat přes noc.
- Ligázu inaktivovat zahřátím na 65°C po dobu 15 min. Ligační směs (1-5 µl) transformovat do *E. coli*.

3.2.9 Transformace *E. coli* elektroporací

Příprava kompetentních buněk

1. den (odpoledne)

- Do Erlenmayerovy baňky (objem 100 ml) nalít 10 ml média Super LB, médium zaočkovat jednou dobře oddělenou kolonií kmene *E. coli* DH5alfa (nebo jiného kmene dle potřeby) a kultivovat přes noc na třepačce (180 rpm) při 37°C.

2. den (ráno)

- Narostlou kulturou zaočkovat 400 ml média Super LB na OD₆₀₀ ~ 0,05 (dvě 2 l Erlenmayerovy baňky po 200 ml média).
- Kulturu třepat (180 rpm, 37°C) až dosáhne OD₆₀₀ ~ 0,6.
- Erlenmayerovy baňky přenést do ledové lázně a kulturu vychladit na 4°C (následující kroky provádět na ledu).
- Do dvou 250 ml plastových centrifugačních zkumavek (Nalgene) přelít kulturu a buňky usadit centrifugací (Janetzki K26, 3 500 rpm, 10 min, 4°C).

- Opatrně slít supernatant, sediment pipetou sterilně resuspendovat v 10 ml ledové deionizované vody, poté vodou doplnit na původní objem a opět centrifugovat.
- Sediment resuspendovat a doplnit na ledu vychlazenou vodou na objem 100 ml, suspenzi buněk přelit do dvou 50 ml centrifugačních zkumavek (50 ml Falcon) znovu centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 000 rpm, 20 min, 4°C).
- Sedimenty pipetou resuspendovat v 5 ml 10% (w/w) ledového glycerolu a poté 10% glycerolem doplnit do objemu 50 ml a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 4 000 rpm, 20 min, 4°C). Promytí glycerolem lze zopakovat.
- Sedimenty resuspendovat ve stejném objemu 10% glycerolu (včetně zbytkového objemu supernatantu). Rozdělit buněčnou suspenzi po 100-200 µl do 1,5 ml mikrozkuvek předem vychlazených v tekutém dusíku.
- Mikrozkuvky s buněčnou suspenzí ihned zamrazit v tekutém dusíku, dlouhodobě skladovat při teplotě -80°C v mrazáku.

Vlastní transformace plasmidové DNA

- Na generátoru pulzu přístroje Gene Pulser Apparatus (BIO-RAD) nastavit hodnoty kapacitance 25 µF, napětí 2,5 kV a odpor 200 Ω.
- Do 500 µl mikrozkuvky s 0,5–5 µl roztoku plasmidové DNA v deionizované vodě/TE pufru nebo ligační směsi (obsahující 5 pg - 0,5 µg DNA) na ledu přidat 30-50 µl elektrokompetentních buněk.
- Na dno vychlazené 0,2 cm elektroporační kyvety (BIO-RAD) převést pipetou obsah mikrozkuvky. Kyvetu vložit do přístroje a aplikovat puls. Výsledná časová konstanta by měla být v rozmezí 4-5 ms.
- Do kyvety ihned přidat 1 ml LB média s 0,5% glukózy, buněčnou suspenzi převést do skleněné zkumavky a kulturu inkubovat 60 min na třepačce (37°C, 180 rpm).
- Na ŽA plotny s příslušným typem antibiotika (ampicilin, 100 µg/ml) vysít 20 µl a 200 µl kultury (v případě ligační směsi celý objem na více ploten), inkubovat přes noc v termostatu při 37°C.

3.2.10 Klonování PCR produktů pomocí TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)

- V 500 µl mikrozkuvce namíchat následující směs:
 0,5-2,4 µl produktu PCR
 0,5-1 µl 4x koncentrovaného roztoku solí
 do výsledného objemu 3 µl doplnit deionizovanou vodou
 0,5-1 µl vektoru pCR®II-TOPO®

- Jemně promíchat a inkubovat při pokojové teplotě 10-30 min, reakci zastavit přenesením na led.
- Ze směsi odebrat 2 μ l a transformovat do chemicky kompetentních buněk *E. coli* kmen DH5 α TM-T1^R:
 - DNA přidat k buňkám a suspenzi mírně promíchat
 - suspenzi buněk s DNA inkubovat 5-30 min na ledu, umístit na 30 s do 42°C (teplotní šok) a poté okamžitě přemístit zpět na led
 - přidat 250 μ l SOC média a inkubovat 1 h při 37°C
- Suspenzi buněk (10-50 μ l) vysít na ŽA-AMP plotny (ampicilin o výsledné koncentraci 100 μ g/ml) s chromogenním substrátem X-Gal (zásobní koncentrace 20 mg/ml, Promega). Pro zajištění přiměřené hustoty kolonií je výhodné vysévat vzájemně dva různé objemy buněk (např. 20 μ l a 200 μ l).
- Z narostlých kolonií vybrat bílé či světle modré (teoreticky by insert měly obsahovat jen plasmidy v bílých koloniích; není však výjimkou, když rekombinantní plasmid dává vznik světle modrým koloniím; sytě modré obvykle obsahují vektor bez insertu). Z vybraných kolonií izolovat plasmidy a jejich identitu ověřit restrikční analýzou nebo pomocí PCR.

3.2.11 Vysoce efektivní transformace *S. cerevisiae*

Podle Gietz a Woods, 2002. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol.* 313:107-20

1. den (odpoledne)

- Jednou dobře oddělenou kolonií příslušného kmene *S. cerevisiae* zaočkovat 10 ml YPAD/ minimálního SD média v Erlenmeyerově baňce (objem 100 ml) a kultivovat přes noc na třepačce (180 rpm) při 30°C.

2. den (ráno)

- Narostlou kulturou zaočkovat 10-25 ml stejného minimálního SD média/YPAD média na OD₆₀₀ ~ 0,1 (2-5x 10⁶ buněk/ml). Kultivovat na třepačce při 30°C a 180 rpm, dokud nedosáhne OD₆₀₀ ~ 0,4-0,5.
- Odebrat z kultury (OD₆₀₀ ~ 0,4) 7,6 ml (10⁸ buněk) do 50 ml centrifugační zkumavky (Falcon) a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 3 000 rpm, 5 min, 20°C).
- Odstranit supernatant, buňky opláchnout ve 25 ml deionizované vody a opět centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 3 000 rpm, 5 min, 20°C).
- Odstranit supernatant, sediment resuspendovat v 1 ml deionizované vody, přenést do 1,5 ml mikrozkuavky a centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 30 s, 20°C).

- Do 1,5 ml mikrozkušavky připravit transformační mix:
 - 73 μ l deionizované vody
 - 36 μ l 1 M LiAc (Sigma)
 - 10 μ l ssDNA (10 mg/ml, Sigma), denaturovat povařením, poté inkubovat na ledu
 - 1 μ l plasmidové DNA (0,1-1 μ g)
 - 240 μ l 50% PEG (3 500, Sigma)
 Transformační směs důkladně promíchat.
- Buňky resuspendovat v transformačním mixu, inkubovat při 42°C po dobu 40-90 min (dobu lze prodloužit až na 3 h pro zvýšení efektivity transformace). V průběhu inkubace promíchat směs převrácením zkumavky cca každých 10-15 min.
- Centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 rpm, 30 s, 20°C), dokonale odstranit supernatant a resuspendovat v 300 μ l deionizované vody.
- Vysít 50 μ l a 100 μ l buněk na plotny s YPAD nebo příslušným selekčním médiem. Inkubovat 3-4 dny při 30°C.

Roztoky:

50% PEG 5 g/10 ml (w/v) PEG 3350 (Sigma)

1M LiAc 1,53 g/15 ml (Sigma), pH upravit zředěnou kys. octovou na 7,5

3.2.12 Křížení a sporulace *S. cerevisiae*, tetradová analýza

Křížení a příprava diploidů

- Na pevné bohaté YPAD médium nakapat na sebe suspenze buněčných kultur (30-50 μ l) haploidních kmenů opačného párovacího typu (MAT α a MATa) určených ke křížení. Inkubovat min. 4 h při teplotě 30°C.
- Selektovat diploidní jedince nanesením křížené biomasy na selekční médium.

Sporulace a tetradová analýza

- Diploidní kmen *S. cerevisiae* hustě nanést na plotnu s presporulačním agarem, inkubovat do druhého dne při 30°C.
- Do 1,5 ml mikrozkušavky s deionizovanou vodou nebo Ringerovým roztokem přenést (kvantitativně) narostlou biomasu za vzniku husté, avšak pipetovatelné suspenze buněk. Vzniklou suspenzi nakapat na plotnu se sporulačním agarem.
- Plotny inkubovat 4-6 dní při pokojové teplotě. Průběžně mikroskopicky kontrolovat množství vzniklých tetrad.

- Malé množství sporulovaných buněk resuspendovat v 50 μ l yeast lytic enzyme (1 mg/ml), inkubovat cca 5-10 min. Průběžně mikroskopicky kontrolovat natrávení vřecek. Dostatečně enzymaticky opracovaná vřecka naředit 1 ml deionizované vody.
- Na rovnou plotnu s YPAD médiem nanést cca 20 μ l buněčné suspenze a kapku „roztáhnout“ koncem hokejky (neroztírat) ve vymezené úseči plotny.
- Po zaschnutí nanesené vody oddělovat jednotlivé spory vřecek s pomocí manuálního mikromanipulátoru (WSW, Singer).

3.2.13 Izolace celkové RNA z *S. cerevisiae*

1. den (odpoledne)

- Do Erlenmayerovy baňky (100 ml) nalít 15 ml minimálního SD média, médium zaočkovat jednou dobře oddělenou kolonií příslušného kmene *S. cerevisiae*. Inkubovat přes noc na třepačce při dané teplotě a 180 rpm.

2. den (ráno)

- Narostlou kulturou očkovat 25 ml stejného selekčního SD média na $OD_{600} \sim 0,4$. Kultivovat na třepačce při dané teplotě a 180 rpm, dokud nedosáhne $OD_{600} \sim 0,7$.
- Kulturu stočit v předchlazené centrifuze (JouanMR22i, rotor SWM 180.5, 3 000 rpm, 3 min, 4°C). Supernatant slít.
- Sediment resuspendovat v 1ml vychlazené vody (4°C), přenést do 2 ml mikrozkušky se šroubovacím víčkem, centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 5 000 rpm, 1 min, 4°C) a odstranit supernatant.
- V tomto kroku je možné buňky zamrazit v tekutém dusíku a uchovávat v mrazáku při -80°C.
- Do ledové lázně vložit mikrozkušku s buňkami a nechat roztát. Pokud není určeno jinak, ponechat buňky celou dobu v ledové lázni.
- Buňky resuspendovat v 500 μ l extrakčního pufru, okamžitě přidat 500 μ l směsi kyselého fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu (25:24:1), vortexovat a inkubovat při 65°C po dobu 1h. Průběžně vortexovat (10 s) každých 10 min.
- Vzorky přenést do ledové lázně (1 min), vortexovat (20 s) a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 14 000 rpm, 15 min, 4°C).
- Horní (vodnou) fázi přenést do nové 2 ml mikrozkušky se šroubovacím víčkem, přidat 500 μ l směsi kyselého fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu (25:24:1). Promíchat převrácením zkušky a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 14 000 rpm, 5 min, 4°C).

- Horní (vodnou) fázi přenést do nové 2 ml mikrozkušavky se šroubovacím víčkem, přidat 500 μ l směsi chloroformu a izoamylalkoholu (24:1). Promíchat převrácením zkumavky a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 14 000 rpm, 5 min, 4°C).
- Do nové 1,5 ml mikrozkušavky si předem připravit 900 μ l 96% ethanolu a 50 μ l NaAc (3 M, pH 5,2), přenést sem horní (vodnou) fázi z předchozího kroku a vortexovat. Inkubovat přes noc při -20°C nebo při -80°C po dobu 1 h.
- Vzorky centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor AM 2.18, 14 000 rpm, 10 min, 4°C). Odstranit supernatant a sediment opláchnout 70% ethanolom. Stočit, odstranit zbytek kapaliny a nechat krátce oschnout při pokojové teplotě.
- Sediment resuspendovat v 50 μ l vody (vodu pouze přidat a sediment nechat rozpustit na ledu za občasného pomíchání pipetou). Vzorek skladovat při -80°C.
- Pro zjištění koncentrace a čistoty izolované RNA naředit alikvót 1:250 (celkový objem 1 ml nebo dle velikosti zvolené kyvety). Změřit absorbanci při 260 nm a 280 nm (UV-VIS Spectrophotometer 1650 PC, Shimadzu). Poměr 260/280 by měl být roven 2 (číslo nižší než 1,8 indikuje významné množství kontaminace). Množství spočteme ze vztahu: $A_{260} = 1$, potom koncentrace měřeného roztoku je 40 ng/ μ l.
- Integritu izolované RNA je možné kontrolovat na běžném agarózovém 1% TAE gelu (barvení EtBr).

Roztoky:

Extrakční pufr: 1 mM EDTA, 0,1 M LiCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 1% SDS (SDS přidávat až těsně před použitím)

poznámka: Všechny používané materiály a chemikálie musí být ošetřeny proti RNázám (viz kapitola 3.2.18).

3.2.14 Značení primerů pomocí sady Primer Extension System – AMV Reverse Transcriptase (Promega)

- V mikrozkušavce smíchat následující reakční směs:
 - 1 μ l primeru (10 μ M)
 - 1 μ l 10x T4 PNK pufru
 - 3 μ l [γ^{32} P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
 - 3 μ l vody (celkový objem 10 μ l)
 - 2 μ l T4 Polynukleotid kinázy (5-10 U/ μ l)
- Inkubovat při 37°C po dobu 10 min.
- Pro inaktivaci T4 Polynukleotid kinázy inkubovat směs 2 min při 90°C, ochladit na ledu a kapalinu soustředit na dně centrifugací. Naředit přidáním 90 μ l vody, skladovat při -20°C.

- Pro určení procenta inkorporace: 4 μ l značeného primeru smíchat s 12 μ l vody. Roztok nanést po 3 μ l na čtyři připravené kousky filtru Whatman® DE81.
- Všechny filtry vysušit, dva filtry použít pro stanovení celkové aktivity ve vzorku a ze dvou filtrů odmyt [γ^{32} P]ATP: dvakrát v 50 ml sodno-fosfátového pufru (0,5 M, pH 6,8) po dobu 5 min.
- Filtry jednotlivě umístit do scintilačních nádobek, přidat 2 ml vody a změřit na scintilačním počítači v uhlíkovém okně.
- Vypočítat průměr hodnot totálních filtrů a promytých filtrů, spočítat procento inkorporace: (aktivita promytých filtrů/aktivita celková) x 100. Inkorporace by měla dosáhnout alespoň 30%.

Roztoky:

Sodno-fosfátový pufr: 86,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Doplnit vodou do 1l a upravit pH (NaOH nebo H_3PO_4)

3.2.15 Značení DNA markeru pomocí sady Primer Extension System – AMV Reverse Transcriptase (Promega)

- V mikrozkuhavce smíchat reakční směs:
 - 5 μ l defosforylovaného DNA markeru (např. Φ X174 Hinfl)
 - 1 μ l 10x T4 PNK pufru
 - 3 μ l [γ^{32} P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
 - 1 μ l T4 Polynukleotid kinázy (5-10 U/ μ l)
- Následuje stejný postup jako při značení primerů, včetně stanovení inkorporace. Značený DNA marker se ředí přidáním 190 μ l vody a skladuje při -20°C .
- Pro PAGE se na gel nanáší 1 μ l značeného markeru smíchaného s 9 μ l Loading Dye.

Roztoky:

Loading Dye: 98% formamid, 10 mM EDTA, 0,1% xylene cyanol, 0,1% bromfenol blue

3.2.16 Primer extension pomocí sady RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

- V mikrozkuhavce udržované na ledu smíchat reakční směs:
 - 3-10 μ g templátové RNA
 - 1 μ l značeného primeru
 - vodou doplnit na objem 12 μ l

- Reakční směs opatrně promíchat, inkubovat 5 min při 63°C a poté přenést zpět na led.
- Do reakční směsi přidat složky v následujícím pořadí:
 - 4 µl reakčního pufru
 - 1 µl ribonukleázového inhibitoru RiboLock™ (20 U/µl)
 - 2 µl dNTP mix (10 mM)
- Směs inkubovat 5 min při 37°C, poté přidat 1µl reverzní transkriptázy RevertAid™ M-MuLV (200 U/µl). Inkubovat po dobu 1 h při 42°C.
- Reakci zastavit přidáním 20 µl Loading Dye a inkubací 10 min při 90°C.

3.2.17 Analýza produktů Primer extension pomocí PAGE

Vzorky se nanášejí na 8% denaturující polyakrylamidový gel o rozměrech 16x18 cm.

- Sestavit skla pro nalévání gelu, dokonale utěsnit spodní a boční hrany (nanést malé množství 1% agaróзовého gelu v TBE pufru na dno a boky aparatury).
- Dokonalé smíchat níže uvedené složky na polyakrylamidového gelu (50 ml):
 - 17,5 ml vody
 - 21 g močoviny
 - 10 ml 40% akrylamidu (38% akrylamid + 2% bis akrylamid)
 - 5 ml 10x TBE
 - 300 µl 10% APS (čerstvě rozpuštěný)
 - 40 µl TEMED
- Okamžitě nalít mezi skla a shora umístit hřebínek. Po polymeraci gel bez hřebínku vložit do elektroforetické aparatury, zalít 1x TBE puftrem a aparaturu připojit k napětí 280 V - na cca 20 min pro zahřátí gelu.
- Jamky v gelu promýt pipetováním TBE pufru (odstraní se tak vyplavená močovina). Vzorky a DNA marker před nanesením na gel inkubovat 10 min při 90°C. Nanést 10 µl DNA markeru nebo 20 µl vzorku s pomocí mikropipety Hamilton.
- Produkty PE dělit pod napětím cca 250 V, aparaturu od zdroje napětí odpojit, pokud je linie bromfenolové modři asi 2 cm nad spodním okrajem gelu.
- Aparaturu rozebrat. Gel přenést do vody s 10% glycerolem, inkubovat při pokojové teplotě po dobu 30 min a poté gel vysušit na sušičce gelů (8 h, s vyhříváním a připojením k vývěvě, Gel dryer – model 583, BIO-RAD) vakuem. Gel zatavením uzavřít do polyethylénové folie, vložit do kazety pro záznam záření (K-screen, BIO-RAD), exponovat 24-48 h.
- Exponované kazety skenovat na přístroji phosphoimager (Molecular Imager PharoFX, BIO-RAD).

Roztoky:

10x TBE (1l): 107,8 g TRIS, 55 g kyselina boritá, 7,07 g EDTA, doplnit vodou na požadovaný objem

3.2.18 Ošetření materiálu a chemikálií proti RNázám

- Plasty (mikrozkumavky, špičky) používat RNase-free, lze je také sterilně zabalené 3x po sobě klávkovat (dostatečné pro inaktivaci RNáz). Stejným způsobem lze ošetřit i sklo, které se dá též vypéct při 220°C po dobu 4 h.
- Voda pro přípravu roztoků a reakci reverzní transkriptázy se upravuje pomocí DEPC (diethylpyrokarbonát). Do 1 l vody přidat 1 ml DEPC, inkubovat přes noc při 37°C a klávkovat. Vodu lze upravit i 3x opakovaným klávkováním.
- Elektroforetickou aparaturu na RNA důkladně omýt detergentem, vypláchnout ošetřenou vodou nebo 3% peroxidem vodíku a ošetřenou demineralizovanou vodou.
- Pracovní stůl omýt zředěným Savem, pipety otřít a vyčistit lihem.

3.2.19 Příprava proteinových extraktů *S. cerevisiae*

(podle Dr. Sychrové, FgÚ ČAV, upraveno)

1. den (odpoledne)

- Jednou dobře oddělenou kolonií příslušného kmene *S. cerevisiae* zaočkovat 10 ml YPAD/ minimálního SD média v Erlenmeyerově baňce (objem 100 ml) a kultivovat přes noc na třepačce (180 rpm) při 30°C.

2. den (ráno)

- Narostlou kulturou zaočkovat 10-25 ml stejného selekčního SD média/YPAD média na $OD_{600} = 0,1$ ($2-5 \times 10^6$ buněk/ml). Kultivovat na třepačce při 30°C a 180 rpm, dokud nedosáhne $OD_{600} = 0,3-1,0$.
- Po změření OD_{600} narostlé kultury, vypočítat jaký objem kultury odpovídá 3 OD (celkové OD kultury = $OD_{600} \times$ objem kultury v ml). Vypočítaný objem převést do 50 ml zkumavky (Falcon) a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5, 3 200 rpm, 3 min při pokojové teplotě).
- Supernatant odstranit, sediment resuspendovat v 1 ml deionizované vody. Buněčnou suspenzi přenést do nové 1,5 ml mikrozkumavky a centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor MPW-310, 13 000 rpm, 30 s, pokojová teplota).

- Supernatant odstranit, sediment ještě jednou stočit pro odstranění zbytkové vody (Jouan MR 22i, rotor MPW-310, 13 000 rpm, 30 s, pokojová teplota). V tomto kroku je možné buňky zamrazit v tekutém dusíku a skladovat při -80°C.
- Zkumavku vložit na led a sediment resuspendovat přidáním 100 µl čerstvě připraveného roztoku 2 M NaOH se 7% β-merkapt ethanol (930 µl 2 M NaOH + 70 µl β-merkapt ethanolu). Buněčnou suspenzi intenzivně vortexovat 30 s, vrátit mikrozukavku na krátkou dobu led. Tento krok opakovat po dobu 2 min.
- K buněčnému lyzátu přidat 100 µl 50% TCA, vortexovat a inkubovat po dobu 5 min na ledu. Centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor MPW-310, 12 000 rpm, 10 min, 0°C).
- Odstranit supernatant, opět centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor MPW-310, 12 000 rpm, 10 min, 0°C).
- Odstranit zbytkový supernatant, sediment lehce resuspendovat v 500 µl nepufrovaného 1 M Tris. Odebrat 50 µl alikvót pro pozdější určení proteinové koncentrace vzorku, zbytek ihned centrifugovat (Jouan MR 22i, rotor MPW-310, 12 000 rpm, 1 min, 0°C).
- Odstranit supernatant, sediment resuspendovat přidáním 100 µl 2x Laemmliho pufru, inkubovat 20 min při 80°C (nebo 5 min při 90-100°C) a poté ihned umístit do -80°C.
- Před nanesením na polyakrylamidový gel vzorky krátce (cca 5 min) povařit. K vzorkům přidat dithiothreitol (1/20 objemu vzorku). Vzorky krátce stočit na stolní centrifúze (cca 30 s, 10 000 rpm, pokojová teplota) a nanést na polyakrylamidový gel.

Roztoky:

2x Laemmli pufr: 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4,1% SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,002% bromfenolová modř

3.2.20 Stanovení proteinové koncentrace s použitím komerční sady DC Protein Assay (BIO-RAD)

*Proteinovou koncentraci buněčných lyzátu kvasinky *S. cerevisiae* stanovujeme kolorimetricky. Tato metoda je podobná Lowryho metodě, ale stanovení proteinové koncentrace pomocí sady DC Protein Assay trvá pouze 15 min a vzorky jsou stabilní po dobu až 2 h.*

- Připravit ředící řadu BSA (bovinní sérový albumin):

BSA 2 mg/ml (μl)	Tris pufr (μl)	Finální koncentrace (mg/ml)
0	50	0
5	45	0,2
10	40	0,4
20	30	0,8
37,5	12,5	1,5

- Odebraný 50 μl alikvót vzorku při preparaci proteinů naředíme do nové 0,5 ml mikroskopické zkumavky: 25 μl aliquotu, přidat 25 μl Tris pufru
- Do 1,5 ml mikroskopické zkumavky připravit roztok AS': 1 ml roztoku A + 20 μl roztoku S
- Z naředěných odebraných alikvótů vzorků a standardů BSA odebrat 25 μl do nové 1,5 ml mikroskopické zkumavky, přidat 125 μl roztoku AS', odstranit případně vzniklé bubliny.
- Do každé mikroskopické zkumavky přidat 1 ml roztoku B, krátce vortexovat a nechat po dobu 15 min ve tmě při pokojové teplotě.
- Změřit absorbanci vzorků a standardů při 750 nm.
- Ze získaných hodnot standardů vytvořit kalibrační křivku (závislost absorbance na proteinové koncentraci) a podle ní vypočítat koncentraci vzorků.

3.2.21 Tris – glycinová SDS - gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE; souprava BIO-RAD Mini Protean 3 Cell)

- Sestavit aparaturu pro nalévání gelu, dokonale utěsnit spodní a boční hrany.
- Připravit separační gel (10%) smícháním příslušné směsi ve skleněné kádince:
 - 1,67 ml protogelu (30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid)
 - 1,25 ml 4x Tris/SDS (pH 8,8)
 - 2,08 ml deionizované vody
 - 3,4 μl TEMED
 - 16,5 μl 10% APS (čerstvý)
- Překryjeme cca 0,5 cm vrstvou isopropanolu, abychom zabránili přístupu kyslíku, a tím umožnili homogenní polymeraci separačního gelu.
- Po polymeraci separačního gelu (10-30 min), odstranit isopropanol odsátím pipetou (zbytkový isopropanol odsát vložení kousku filtračního papíru mezi skla aparatury) a nanést směs pro zaostřovací gel:
 - 0,325 ml protogelu (30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid)
 - 0,625 ml 4x Tris/SDS (pH 6,8)
 - 1,550 ml deionizované vody

2,5 µl TEMED

12,5 µl 10% APS (čerstvě rozpuštěný)

lhned vložit hřebínek pro vytvoření jamek na nanášení vzorků, případně vytlačený přebytečný zaostřovací gel setřít pomocí buničiny.

- Po polymeraci zaostřovacího gelu (vytvoří se znatelné rozmezí mezi separačním a zaostřovacím gelem), vytáhnout hřebínek a jamky několikrát opláchnout 1x SDS pufrém.
- Dvojici gelů (nebo jeden gel a doplňující plastový nástavec) vložit do aparatury pro elektroforézu, nanést proteinové vzorky a zalít 1x SDS pufrém (opatrně, aby se vzorky z jamek nevyplavily).
- Dělení vzorků v zaostřovacím gelu probíhá při limitaci proudu na 10 mA/gel. Po vstupu vzorků do separačního gelu, zvýšit hodnotu konstantního proudu na 20 mA/gel.
- Když BFB dosáhne spodního okraje gelu, vypnout zdroj elektrického napětí a gel vyjmout z aparatury. Gel barvit, nebo použít pro přenos proteinů na membránu metodou Western blot.

Roztoky:

4x Tris/SDS pH 8,8: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS, přefiltrováno přes filtr s póry 0,45 mm, skladovat v temnu při 4°C

4x Tris/SDS pH 6,8: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS, přefiltrováno přes filtr s póry 0,45 mm, skladovat v temnu při 4°

1x SDS pufr: 25 mM Tris (pH 8,3), 190 mM glycin, 0,1% SDS

Barvicí roztok: 20% methanol, 10% kyselina octová, 0,114% Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD)

Odbarvovací roztok: 20% methanol, 7% kyselina octová

poznámka: Při přípravě zaostřovacího a separačního gelu je nezbytné pracovat v rukavicích, neboť monomer akrylamidu je neurotoxin, který se absorbuje kůží.

3.2.22 Western blot (BIO-RAD Trans-blot)

- Do skleněné Petriho misky (průměr 18 cm) nalít cca 100 ml chlazeného transferového pufru, vložit otevřený sendvič pro přípravu blotu (černou stranou na dno misky) a na něj položit houbičku namočenou v přenášečím (transfer) pufru. Po celou dobu přípravy musí být blot pod hladinou přenosového pufru.
- Nastříhat filtrační papír (Whatman, 3 mm) na příslušnou velikost (11x 8 cm), navlhčit v přenosovém pufru, vložit do sendviče na houbičku.

- Přenést gel s rozdělenými proteiny na filtrační papír, přiložit pomocí pinzety nitrocelulózovou membránu (Nitrobind, MSI) nasycenou v přenosovém pufru. Velikost membrány odpovídá velikosti gelu.
- Na membránu vložit filtrační papír (Whatman, 3 mm) namočený v přenosovém pufru, položit na něj houbičku taktéž namočenou v přenosovém pufru.
- Vytlačit vzduchové bubliny jemným válčováním skleněnou zkumavkou, rukou stlačit a sendvič uzavřít.
- Sendvič vložit (čirou deskou k + pólu (červený) a černou deskou k - pólu (černý)) do desek blotovací aparatury v nádobě. Do elektroforézové vany nalít přenosový pufr, vložit nádobku s ledem a magnetické míchadlo.
- Přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu probíhá při napětí 90-110 V, za stálého míchání pufru v lázni a po dobu 1-3 h v závislosti na velikosti přenášeného proteinu. Po cca 30 min je třeba měnit nádržku s ledem.
- Po skončení přenosu proteinů vypnout zdroj napětí, rozebrat blot a membránu opláchnout v pufru TBS.
- Ihned provést imunodetekci proteinů nebo membránu zatavit do polyetylenové fólie a skladovat při 4°C pro pozdější zpracování.
- Gel lze barvit (cca 30 min) pro zjištění kvantity přenosu proteinů. Do druhého dne nechat odbarvit.

Roztoky:

Přenosový pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol, 0,05% SDS

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl

3.2.23 Imunodetekce proteinů na membráně (pomocí konjugátu sekundární protilátky s křenovou peroxidázou) metodou ECL™ (Amersham Life Science)

- Membránu inkubovat ve vaničce s blokovacím roztokem na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1) v termostatu při 37°C po dobu 45 min.
- Připravit pytlíček z polyetylenové fólie zatavené ze tří stran, napipetovat roztok primární protilátky a vložit blokovanou membránu. Zatavit pytlíček ze zbývající strany a inkubovat na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1) přes noc v lednici při 4°C.
- Druhý den membránu vyjmout a nenavázanou primární protilátku odmyt roztokem TTBS (5x, po dobu 5 min) ve skleněné Petriho misce umístěné na třepačce.
- Obdobným způsobem inkubovat membránu se sekundární protilátkou po dobu 1 h při pokojové teplotě.

- Membránu vyjmout a odmýt nenávanou sekundární protilátku obdobně jako v případě primární protilátky. Poté promýt 1x v roztoku TBS po dobu 5 min.
- Membránu vložit do plastové vaničky s vyvíjecím roztokem pro křenovou peroxidázu (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology):
smíchat roztok luminolu s roztokem stabilního peroxidu v poměru 1:1 (objemy roztoků se volí dle velikosti použité nádoby pro inkubaci membrány, která musí být ve vyvíjecím roztoku zcela ponořená)
inkubovat 1-2 min ve tmě při pokojové teplotě
- Membránu krátce osušit, přiložením hrany membrány na nový filtrační papír, vložit do průhledné kancelářské fólie a jemně vytlačit případně vzniklé bublinky. Vložit do filmové kazety lícem vzhůru, v temné komoře přiložit film (Amersham Hyperfilm[®] ECL), zavřít kazetu a film exponovat po dobu, dle kvantity proteinu a intenzity signálu.
- Exponovaný film vyvolat na vyvíjecím automatu (OPTIMAX X-Ray Film Processor).

Roztoky:

Blokovací roztok: 4% roztok BSA (Milipore) v TTBS

TTBS: 0,05% Tween20 (Serva) v TBS

Roztok primární protilátky: 1%BSA v TTBS + primární protilátka anti-prp22 (polyklonální králíčí, poskytnutá Prof. Schwerovou), ředění 1:1000

Roztok sekundární protilátky: 1%BSA v TTBS + sekundární protilátka anti-rabbit, konjugovaná s křenovou peroxidázou (monoklonální, Cell Signaling), ředění 1:5000

4. Výsledky

4.1 Úvod

Část mé experimentální práce navazuje na diplomovou práci Anny Valentové „Genetické interakce mutace *PRP45* v *S. cerevisiae*“ (Valentová, 2008), která byla věnována hledání synteticky letálních interakčních partnerů mutace *prp45(1-169)*.

Pro studium syntetické letality byly v naší laboratoři připraveny kmeny AVY11 a FPY4B (Gahura et al. 2009).

kmen **FPY4B**: *MATa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3*

kmen **AVY11**: *MATalfa prp45 (1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 trp1*

Výše uvedené kmeny byly transformovány plasmidem pOG02 (*PRP45 URA3 ADE3 amp^R cenΔ*). Plasmid má narušenou centromerickou oblast, což způsobuje jeho relativně rychlou ztrátu za neselektivních podmínek. Plasmid pOG02 je pro buňky nezbytný, jestliže se UV mutagenézí zasáhne takový gen, který vykazuje společně s mutací *prp45(1-169)* letalitu. Tímto způsobem se našlo několik kmenů, v kterých byly následně identifikovány mutované geny. Tři mutace byly nalezeny v genu *PRP22* (Gahura et al. 2009).

Dvě mutace v genu *PRP22* se nacházejí v upstream regulační oblasti - *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)*. Jedna mutace je umístěna v otevřeném čtecím rámci *prp22(300PPI)*. Následná detekce hladiny proteinu Prp22 pomocí metody Western blot, ukázala snížení množství proteinu v kmenech *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* oproti situaci ve WT kmeni (AVY11). Hladina proteinu Prp22 v kmeni *prp22(300PPI)* je srovnatelná s množstvím proteinu Prp22 ve WT kmeni (obr. 18).



Obr.18 Detekce hladiny proteinu Prp22 pomocí metody Western blot v kmenech *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* *prp22(300PPI)* a AVY11(WT; provedl Mgr. Ondřej Gahura).

Část mé diplomové práce se zabývá charakterizací kmenů *prp22(-327A)*, *prp22(300PPI)* a *prp22(-158T)*. A část se týká tvorby N-terminálních mutant proteinu Prp22 a genetické interakce těchto mutant s mutací *prp45(1-169)*.

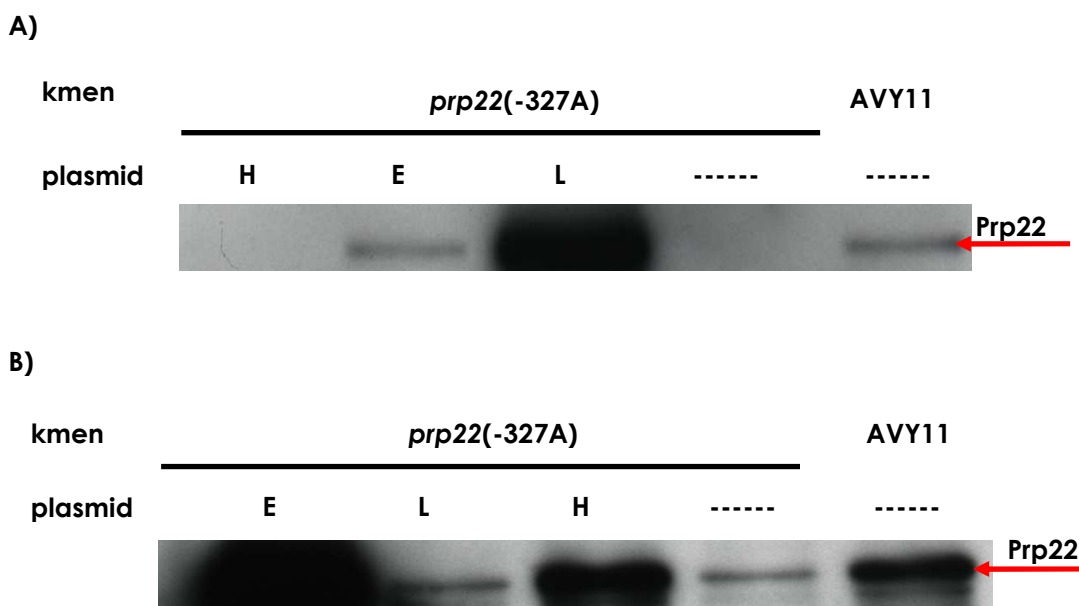
4.2 Charakterizace kmenů *prp22(-327A)*, *prp22(300PPI)* a *prp22(-158T)*

4.2.1 Příklad snižení množství proteinu Prp22 v kmenech *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)*

Snížení množství proteinu Prp22 v kmenech *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* může být způsobeno mutacemi, které se nacházejí v upstream regulační oblasti. Tyto mutace by mohly vést ke snížení genové exprese genu *PRP22*. Nižší hladina proteinu Prp22 může být zapříčiněna i vlivem UV mutagenese. V jejím průběhu mohlo dojít k zasažení trans faktoru regulujícího genovou expresi *PRP22*, což by mělo za následek snížení množství proteinu Prp22.

Do kmenů *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* jsem transformovala centromerický plasmid nesoucí gen *PRP22* klonovaný pod vlastním (pSE358-*PRP22*) nebo silným promotorem *ADH1* (pOG12). Pro kontrolu jsem použila prázdný vektor (p413ADH). Jelikož kmeny *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* již obsahují plasmid - pOG02 (*PRP45 URA3*), který zajišťuje jejich přežití, selektovala jsem buňky transformované pOG12 a p413ADH na minimálním SD médiu bez uracilu a histidinu, buňky s plasmidem pSE358-*PRP22* na základě uracilové a tryptofanové prototrofie.

Transformované buňky rostly přes noc na třepačce při 30°C. Následující ráno jsem buňky přeočkovala na OD 0,1 a sebrala při OD 0,5. Po vytvoření proteinových lyzátů a spektrofotometrickém změření koncentrace vyizolovaných proteinů jsem vzorky naředila na srovnatelnou koncentraci 4 mg/ml. K vzorkům jsem přidala vzorkový pufr, dithiothreitol, krátce je povařila a poté elektroforeticky rozdělila na 10% polyakrylamidovém gelu (PAA gel). Následně jsem proteiny přenesla na nitrocelulózu membránu metodou Western blot, membránu blokovala v 4% roztoku BSA (bovinní sérum albumin) a inkubovala s primární polyklonální protilátkou (králíčí, poskytnutá Prof. Schwerovou). Po odmytí nenavázané primární protilátky jsem membránu inkubovala v roztoku se sekundární protilátkou, konjugovanou s křenovou peroxidázou (anti-rabbit, Cell Signaling). Následovalo odmytí nenavázané sekundární protilátky a inkubace membrány ve vyvíjecím roztoku (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology). Detekce signálu probíhala přiložením filmu (Amersham Hyperfilm ECL; obr. 19).



Obr. 19 Imunodetekce proteinu Prp22 v kmeni *prp22(-158T)* A a *prp22(-327A)* B. Pro snazší orientaci ve Western blotech, je ektopická exprese genu *PRP22* pod vlastním promotorem značena písmenem L (low expression, pSE358-PRP22), pod promotorem *ADH1* (high expression, pOG12) a prázdný plasmid E (empty, p413ADH). -----, kmen, do kterého nebyl transformován plasmid. Kmen AVY11 sloužil jako kontrola.

Expese genu *PRP22* pod vlastním promotorem a na centromerickém plasmidu je dostatečná pro navrácení hladiny proteinu Prp22 na úroveň srovnatelnou s WT kmenem. Toto navrácení množství proteinu Prp22 na úroveň WT kmene by nebylo pozorovatelné, jestliže by vlivem UV mutagenese došlo k zasažení nějakého trans faktoru, který reguluje genovou expresi *PRP22*. Snížení množství proteinu Prp22 v kmenech *prp22(-158T)* a *prp22(-327A)* je tedy způsobeno mutacemi v upstream regulační oblasti genu *PRP22*.

Podařilo se nám tak rozšířit rozsah upstream regulační oblasti genu *PRP22*. Při konstrukci plasmidu pSE358-PRP22 (Schneider a Schwer, 2001) byla coby regulační oblast genu *PRP22* použito upstream 234 bp (viz. kapitola 4.3.1), avšak mutanta *prp22(-327A)* nese mutaci v pozici -327. Výsledky prokazují, že výskyt mutace i v této pozici vede ke snížení genové exprese *PRP22*, i když v menším rozsahu než je tomu u mutanty *prp22(-158T)*.

4.2.2 Vliv mutant *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI)*, *prp22(-327A)* na sestřih suboptimálních substrátů

Pro testování sestřihu pre-mRNA jsem použila metodu primer extension (PE). Krátký oligonukleotid (primer), radioaktivně (^{32}P) značený na 5'konci, hybridizuje s 3'koncovou oblastí RNA templátu. Po přidání reverzní transkriptázy dochází k prodlužování 3'konce primeru směrem k 5'konci templátu. Poměr množství výsledných reverzních transkriptů odpovídá počtu vložených molekul RNA templátu. Detekce signálu jednotlivých sestřihových intermediátů probíhá autoradiograficky.

V diplomové práci jsem použila fúzní konstrukty *ACT1-CUP1* poskytnuté Prof. Konarskou, taktéž primery YAC06 a U14 dle jejího návrhu (Siatecka et al., 1999). Jako suboptimální substráty označuji sestřihové konstrukty s mutací v intronu genu *ACT1*. Tyto intronové mutace jsou umístěné v 5'ss, BP a nebo v 3'ss (tab. 1).

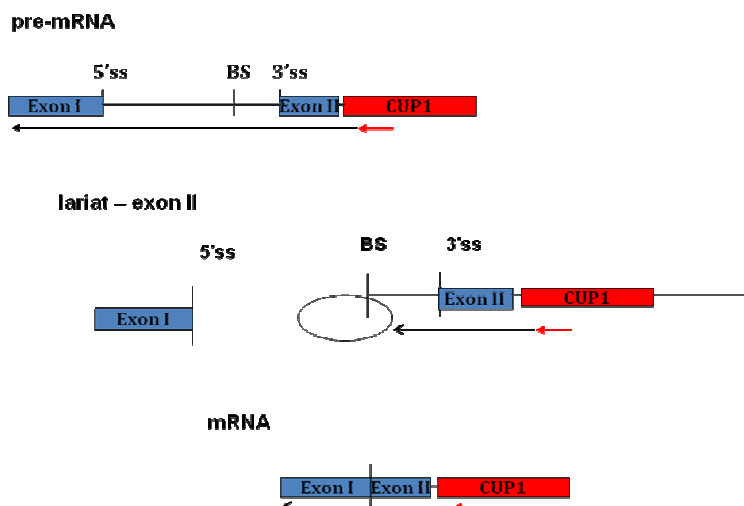
primery: YAC06 GGCACCTCATGACCTTC

U14 ACGATGGGTTTCGTAAGCGTACTCCTACCGTGG

fúzní konstrukty <i>ACT1-CUP1</i>	mutace	sekvence exonu 2	typ plasmidu
pRH20	5'ss (A3C)	AAT	centromerický
pMA2C	5'ss (A3C)	AGG	2 μ
pC256A	BP (C256A)	AGG	2 μ

Tab. 1 Přehled použitých fúzních konstruktů *ACT1-CUP1*. Sekvence exonu 2, v tabulce jsou uvedené první tři nukleotidy exonu 2, které se nacházejí bezprostředně downstream od 3'ss - AGG je sekvence genu *ACT1*, AAT sekvence není identická se sekvencí genu *ACT1*.

Radioaktivně značený primer YAC06 nasedá v oblasti genu *CUP1* (obr. 20). Konstitutivně exprimovaný gen, kódující U14 snRNA, jsem použila jako referenční gen. Použité primery jsem značila na 5'konci radioaktivním [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. Nejlepší použitelnost primeru je v průběhu prvních dvou týdnů, což vyplývá z poločasu rozpadu použitého izotopu ($T_{1/2} = 14,3$ dne).



Obr. 20 Schematické znázornění metody primer extension. Modře jsou značené exony I a II genu *ACT1*, červená šipka značí radioaktivně značený primer YAC06.

Kmeny testované metodou PE:

AVY11 - kmen použitý při hledání synteticky letálních interakcí, nese mutaci *prp45(1-169)* a WT kopii genu *PRP45* na plasmidu

prp22(-327A)*, *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI) - kmeny nalezené při hledání mutací synteticky letálních s mutací *prp45(1-169)*, kmeny nesou uvedené mutace a WT kopii genu *PRP45* na plasmidu

EGY48 (*PRP45 PRP22*) - kontrolní kmen

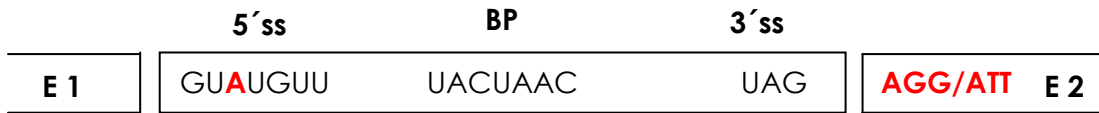
EH2 (*prp45(1-169) PRP22*) - kontrolní kmen

Do výše uvedených kmenů jsem transformovala fúzní konstrukty *ACT1-CUP1* uvedené v tab. 1. Plasmidy obsahují selekční marker *LEU2*, a lze je selektovat na základě leucinové prototrofie.

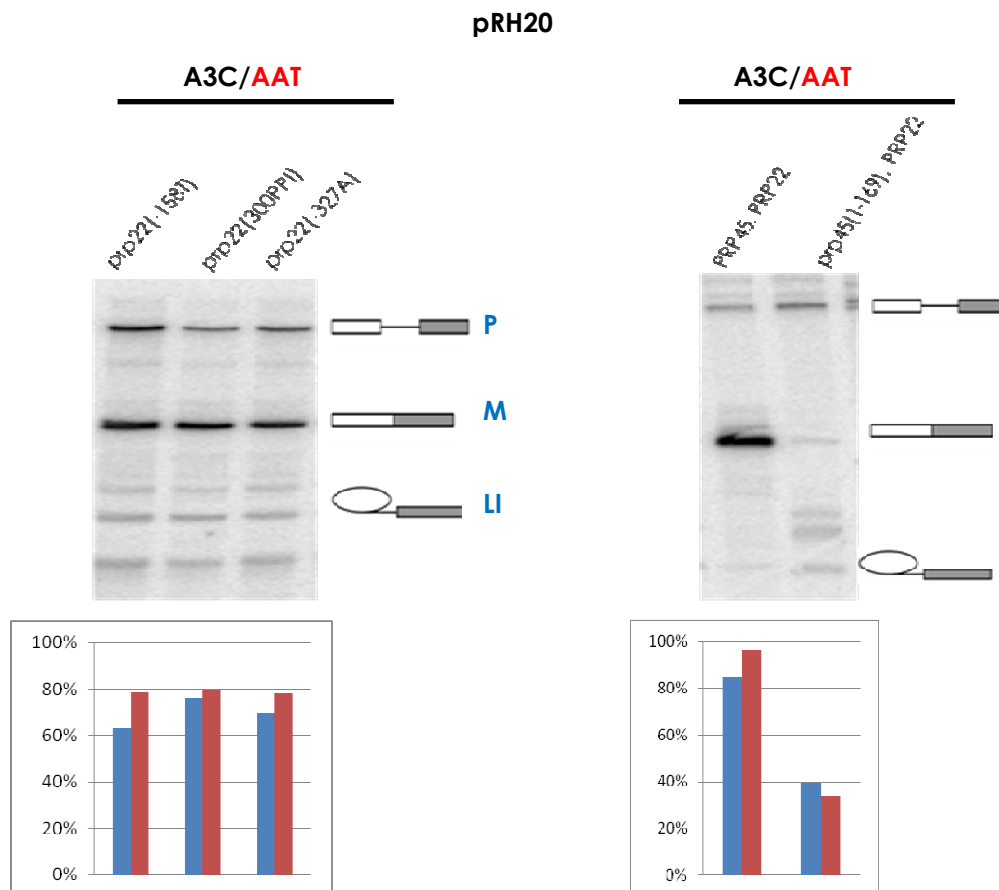
Transformované kmeny rostly přes noc v SD médiu bez leucinu na třepačce při teplotě 30°C. Druhý den jsem buňky přeočkovala na OD 0,1 a sbírala při OD 0,4. Po vytvoření buněčných lyzátů a izolaci celkové RNA, jsem čistotu a koncentraci RNA ve vzorcích, měřila spektrofotometricky (UV-VIS Spectrophotometer 1650 PC, Shimadzu). Produkty PE jsem elektroforeticky rozdělila na 8% denaturujícím PAA gelu, gel následně zavařila do polyethylénové folie a vložila do kazety k expozici (K-screen, BIO-RAD). Skenování exponovaných kazet probíhalo s použitím přístroje phosphoimager (Molecular Imager PharoFX, BIO-RAD). Kvantifikace získaných autoradiogramů se uskutečnila v programu ImageQuant.

Sestřihové konstrukty pRH20 a pMA2C obsahují substituce adenosinu za cytidin (A3C) v 5'ss (obr. 21). Mutace A3C má za následek zhoršení druhého sestřihového kroku, a to hyperstabilizací konformace prvního kroku sestřihu (Konarska et al., 2006).

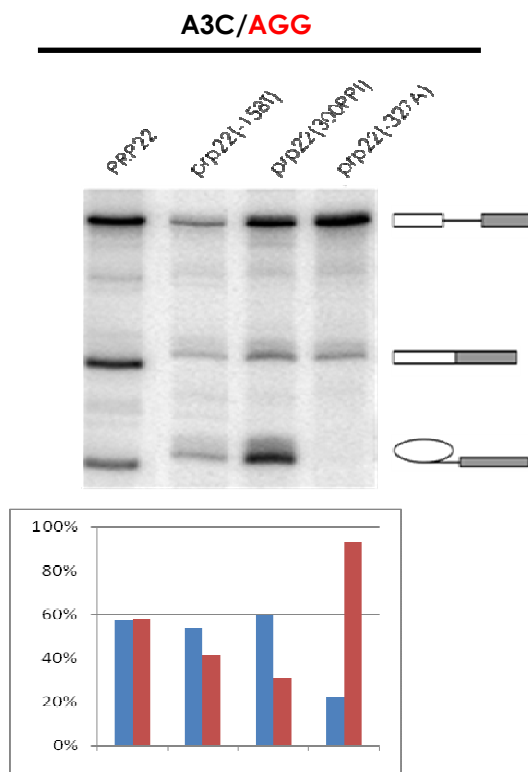
Tato zvýšená stabilita je způsobena tím, že se po přeuspořádání spliceosomu (za účasti NTC komplexu), vytváří mezi U6 snRNA a templátem jeden Watson-Crikovský pár navíc, než je tomu u transkriptu s WT 5' ss (Chan and Cheng, 2005).



Obr. 21 Schematické znázornění intronu genu *ACT1*. Červěně je v 5' ss znázorněn adenosin, který je vyměněn za cytidin. První tři NTP exonu II (E 2) jsou v plasmidu pMA2C sekvencí genu *ACT1* (AGG), plasmid pRH20 má za intronem sekvencí (AAT), která není sekvencí genu *ACT1*.



pMA2C



Obr. 22 PE sestřihového konstruktu pRH20 (A3C/AAT) a pMA2C (A3C/AGG) v kmenech *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI)*, AVY11, EGY48(*PRP45 PRP22*) a EH2(*prp45(1-169) PRP22*). P, pre-mRNA; M, mRNA; LI, lariát intermediát. Grafy znázorňují kvantifikaci efektivity prvního (modré sloupce) a druhého (červené sloupce) kroku sestřihu. Efektivita jednotlivých kroků sestřihu se počítá podle vzorců: první krok $(M+LI)/(P+M+LI)$ a druhý krok $M/(M+LI)$. Výsledné hodnoty jsou normalizovány na sestřih konsenzuálního konstruktů ve WT kmeni (EGY48).

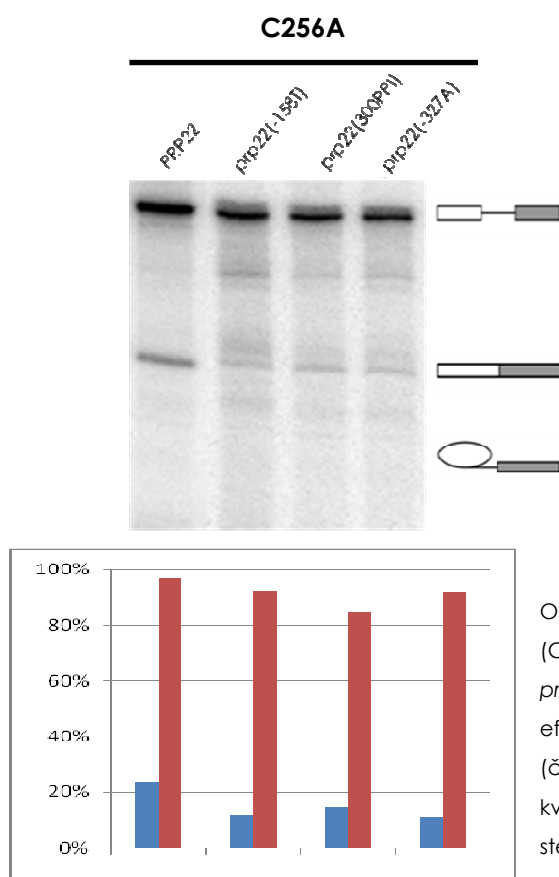
Účinnost prvního a druhého kroku sestřihu konstruktů pRH20 je ve WT kmeni (EGY48) vysoká. V kmeni EH2 s mutací *prp45(1-169)* dochází k narušení prvního kroku sestřihu a akumulaci pre-mRNA. Mutanty *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)* ovlivňují sestřih suboptimálních substrátů v závislosti na sekvenci druhého exonu za 3' ss intronu (obr. 22).

Posledním testovaným sestřihovým konstruktem byl pC256A. Tento konstrukt obsahuje mutaci v blízkosti BP (obr. 23). Výskyt mutace C256A vede k destabilizaci prvního kroku sestřihu, která je pravděpodobně způsobena snížením efektivity párování U2 snRNA s oblastí BP (Smith et al. 2007).



Obr. 23 Schematické znázornění intronu genu *ACT1*. Červěně je znázorněn cytidin, který je vyměněn za adenosin v sestřihovém konstruktu pC256A. Bezprostředně downstream od 3' ss se nachází sekvence genu *ACT1* (AGG).

pC256A



Obr. 24 Výsledky PE sestřihového konstruktů pC256A (C256A) v kmenech *prp22*(-327A), *prp22*(-158T), *prp22*(300PPI) a AVY11. Grafy znázorňující kvantifikaci efektivity prvního (modré sloupce) a druhého (červené sloupce) kroku sestřihu. Postup při kvantifikaci efektivity jednotlivých kroků sestřihu byl stejný, jako u předchozích konstruktů s mutací v 5' ss.

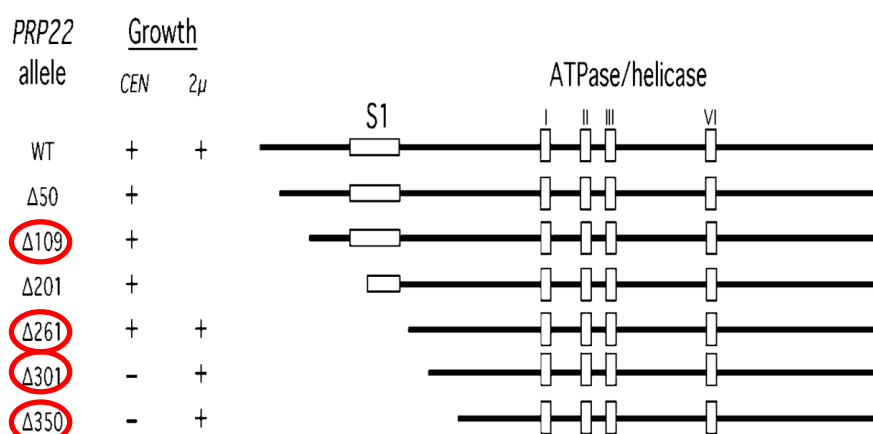
Mutace C256A se používá pro hledání supresorů prvního kroku sestřihu. Kmeny *prp22*(-327A), *prp22*(-158T) a *prp22*(300PPI) nesuprimují efekt mutace v blízkosti místa větvení (obr. 24).

4.3 N-terminální mutanty proteinu Prp22

4.3.1 Postup při vytváření N-terminálních mutant Prp22p

Laboratoř Prof. Schwerové se již delší dobu zabývá studiem proteinu Prp22. Jedním z jejich experimentálních výsledků je definice minimální funkční oblasti (262-1145 AA) tohoto proteinu, a to přístupem tvorby N-terminálních mutant Prp22p (Schneider a Schwer, 2001).

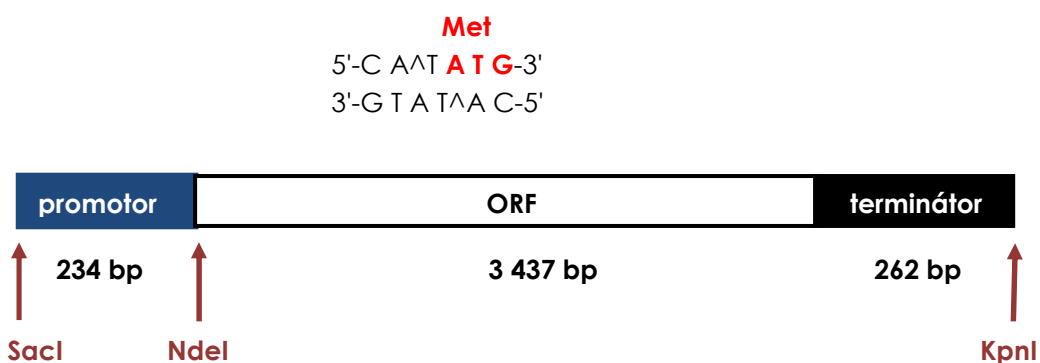
V diplomové práci jsem se zabývala tvorbou N-terminálních zkrácení proteinu Prp22 $\Delta 109$, $\Delta 261$, $\Delta 301$ a $\Delta 350$ (obr. 25), a jejich funkčností. Deletanty byly exprimovány z centromerického plasmidu (exprese pod vlastním promotorem) nebo z vysokokopiovového plasmidu (exprese pod silným konstitutivním promotorem genu *GPD1*). Pro tvorbu N-terminálních mutant jsme zvolili obdobný přístup jako Prof. Schwerová (Schneider a Schwer, 2001).



Obr. 25 Schematické znázornění N-terminálních mutant Prp22p. Červeně zakroužkované jsou N-terminální mutanty proteinu Prp22, kterými jsem se ve své diplomové práci zabývala. +, ektopická exprese příslušné N-terminální mutanty Prp22p komplementuje genomovou delecí genu *PRP22*; -, ektopická exprese daných N-terminálních mutant proteinu Prp22 nekomplementuje genomovou delecí genu *PRP22* (převzato a upraveno z Schneider a Schwer, 2001).

Prof. Schwerová nám poskytla plasmid pSE358-PRP22, který sloužil jako výchozí materiál pro tvorbu N-terminálních mutant Prp22p. Jelikož nebyla k dispozici nukleotidová sekvence toho plasmidu, nemohli jsme zjistit, přes jaká restrikční místa (RM) byl gen *PRP22* do vektoru pSE358 vložen. Plasmid jsme proto sekvenovali s použitím univerzálních primerů M13R a M13F (Laboratoř sekvenace DNA, PŘF UK v Praze; www.web.natur.cuni.cz/~seqlab/). Z porovnání sekvence genu *PRP22*, získané sekvenováním a sekvence pocházející z databáze *S. cerevisiae* (ORF *PRP22* + 1kbp upstream/downstream; www.yeastgenome.org), vplynuly následující

informace. Gen *PRP22* byl klonován do vektoru pSE358 přes restrikční místa *SacI* a *KpnI*. Restrikční místo *KpnI* se přirozeně nachází v downstream oblasti genu *PRP22*, stejně tak se přirozeně vyskytuje RM *SacI* v upstream oblasti. Ovšem umístění RM *SacI* je v plasmidu pSE325-*PRP22* změněno. Přirozeně se RM *SacI* nachází v pozici -781, v plasmidu pSE358-*PRP22* je RM *SacI* introdukováno do pozice -234. Na rozhraní upstream regulační oblasti a otevřeného čtecího rámce (ORF) genu *PRP22* v plasmidu pSE358-*PRP22* se nachází RM *NdeI*, jehož součástí je ATG kodón kódující aminokyselinu methionin (obr. 26, výsledky sekvenace; viz. Příloha, kapitola 8.2).

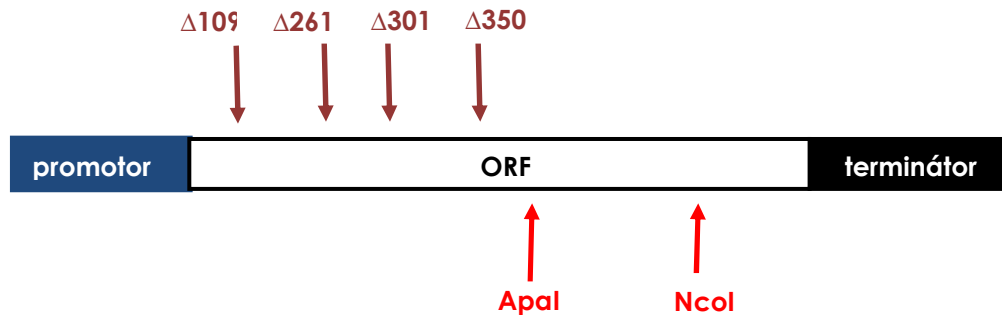


Obr. 26 Schematické znázornění genu *PRP22* vloženého do vektoru pSE358.

N-terminální delece genu *PRP22* jsem vytvořila introdukcí *NdeI* restrikčního místa a Met kodónu do pozic: Ser-109, Lys-261, Gln-301 a Glu-350 v ORF (obdobně jako Schneider a Schwer, 2001). Jednotlivé fragmenty N-terminálních mutant Prp22p vznikaly amplifikací s použitím metody PCR. V každé PCR reakci jsem použila dvojici primerů (tab. 2). Prvních 6 nukleotidů na 5'konci prvního primeru tvoří RM *NdeI*, součástí druhého primeru je RM *Apal* nebo *NcoI* (viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.3). RM *Apal* a *NcoI* se přirozeně nacházejí v ORF genu *PRP22* (obr. 27).

N-terminální mutant Prp22p	velikost amplifikovaného fragmentu genu <i>PRP22</i> v bp	použité primery	restrikční místa na koncích amplif. fragmentů
Δ109	777	LS01, LS08	<i>NdeI</i> , <i>Apal</i>
Δ261	321	LS02, LS08	<i>NdeI</i> , <i>Apal</i>
Δ301	201	LS03, LS08	<i>NdeI</i> , <i>Apal</i>
Δ350	1507	LS04, LS09	<i>NdeI</i> , <i>NcoI</i>

Tab. 2 Přehled N-terminálních mutant Prp22p a jejich bližší charakterizace.



Obr. 27 Schematické znázornění genu *PRP22*. Hnědé šipky značí místa nasedání primerů LS01, LS02, LS03, LS04, jejichž prvních 6 nukleotidů na 5'konci kóduje RM NdeI. Červené šipky označují místa pro primery LS08 a LS09, kde prvních 6 nukleotidů na 5'konci tvoří RM ApaI nebo NcoI.

K amplifikaci všech jednotlivých fragmentů N-terminálních mutantů Prp22p byl použit stejný PCR program. Výjimku tvoří kroky 4) a 8), kde délka kroku odpovídá délce amplifikovaného fragmentu.

- 1) 95°C – 3 min
- 2) 94°C – 30 s
- 3) 45°C – 30 s
- 4) 72°C – 50 s ($\Delta 109$, $\Delta 261$), 30 s ($\Delta 301$), 95 s ($\Delta 350$)
- 5) go to 2) 2x
- 6) 94°C – 30 s
- 7) 54°C – 30 s
- 8) 72°C – 50 s ($\Delta 109$, $\Delta 261$), 30 s ($\Delta 301$), 95 s ($\Delta 350$)
- 9) Go to 6) 16x
- 10) 72°C - 10 min

PCR produkty N-terminálních mutantů *prp22*($\Delta 109$), *prp22*($\Delta 261$) a *prp22*($\Delta 301$) jsem elektroforeticky rozdělila na 2% agarózovém gelu, reakční směs mutantů *prp22*($\Delta 350$) na 1% agarózovém gelu. Po obarvení DNA ethidiumbromidem (EtBr), jsem příslušnou oblast z gelu vyřízla a DNA izolovala (viz. Materiál a metody, kapitola 3.2.6). Následovalo klonování příslušných PCR fragmentů do vektoru pCR®II-TOPO® (3 973 bp) a jejich transformace do chemicky kompetitivních buněk *E. coli* DH5a-T1^R, dodávaných v kitu TOPO TA Cloning® (viz. Materiál a metody, kapitola 3.2.8). Transformované buňky jsem vysela na ŽA-AMP plotny s 25 μ l X-Gal (zásobní koncentrace, 20 mg/ml) a inkubovala přes noc při 37°C. Součástí vektoru pCR®II-TOPO® je gen LacZ. Tento gen kóduje enzym β -galaktozidázu, která přeměňuje chromogenní substrát X-Gal na modrý produkt - indigo. Pokud dojde ke

vložení PCR fragmentu do vektoru, přeruší se tím ORF LacZ genu (nebude vznikat enzym β -galaktozidáza). Pomocí systému LacZ lze tedy vizuálně rozlišit buňky transformované vektorem s vloženým inzertem (bílé kolonie), od buněk transformovaných vektorem bez introdukovaného inzertu (modré kolonie).

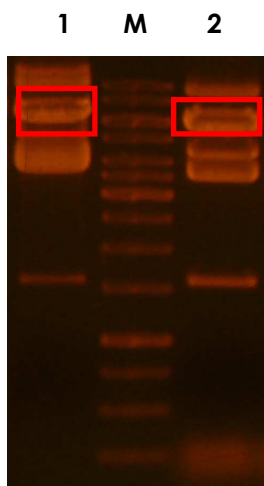
Plasmidy vyizolované ze čtyř bílých kolonií *E. coli*, jsem restriktivně štěpila příslušnými enzymy ($\Delta 109$, $\Delta 261$, $\Delta 301$: NdeI-ApaI, $\Delta 350$: NdeI-NcoI) a restriktivně štěpenou směs fragmentů elektroforeticky rozdělila na 2% ($\Delta 109$, $\Delta 261$, $\Delta 301$) nebo 1% ($\Delta 350$) agarózovém gelu. Oblast DNA obarvenou EtBr jsem z gelu vyřízla, izolovala a vyizolované fragmenty klonovala do plasmidů pLS05 (pRS315-PRP22) a pLS18 (pRS325GPD-PRP22) přes příslušná restriktivní místa, za vzniku plasmidů pLS15-pLS17 a pLS19-pLS22 (viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.2). Všechny N-terminální mutanty Prp22 klonované ve vektoru pCR[®]II-TOPO[®] byly před jejich dalším použitím sekvenčně ověřeny. Sekvence N-terminálních mutantů *prp22*($\Delta 109$), *prp22*($\Delta 261$), *prp22*($\Delta 301$) probíhala s použitím dvou univerzálních primerů M13F a M13R, zatímco mutantu *prp22*(350) jsem sekvenovala třemi primery M13R, M13F a LS05.

Do vektorů pRS315 a pRS325 jsem klonovala gen *PRP22*, štěpený přes restriktivní místa SacI-KpnI z plasmidu pSE358-PRP22. U obou vektorů jsem použila metodu částečné digesce, protože se ve vektorech pRS315 a pRS325 vyskytují dvě KpnI restriktivní místa. Při úplné digesci enzym rozštěpí obě RM přítomná v plasmidu a vzniknou dva DNA fragmenty různé velikosti. Při částečné digesci rozštěpí enzym frakci molekul plasmidu v jednom RM, a tyto molekuly budou tudíž linearizovány.

pRS315 - částečná digesce (6 018 bp), úplná digesce (1 720 bp, 4 298 bp)

pRS325 - částečná digesce (6 849 bp), úplná digesce (1 621 bp, 5 228 bp)

Po digesci jsem reakční směs elektroforeticky rozdělila na 1% agarózovém gelu, DNA obarvila EtBr (obr. 28), fragmenty DNA o délce odpovídající linearizovanému plasmidu jsem vyřízla a izolovala.



Obr. 28 DNA produkty vzniklé částečnou digescí restriční endonukleázou KpnI pRS315 (1), pRS325 (2). Červeně orámované jsou linearizované vektory o velikosti 6 018 bp (1) a 6 849 bp (2). M, marker (1 kb DNA ladder; viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.5).

Vyizolované fragmenty o velikosti 6 018 bp (pRS315) a 6 849 bp (pRS325) jsem dále štěpila restriční endonukleázou SacI, což v každé reakční směsi vedlo ke vzniku čtyř DNA fragmentů:

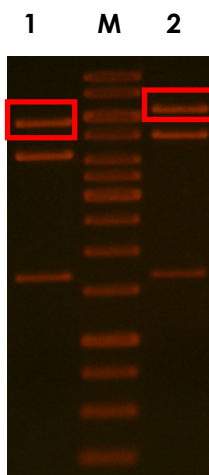
pRS315

- digesce v RM KpnI umístěném v polylinkeru (6 018 bp) → restriční štěpení SacI → 5 916 bp, 102 bp
- digesce v RM KpnI umístěném mimo oblast polylinkeru (6 018 bp) → restriční štěpení SacI → 1 618 bp, 4 400 bp

pRS325

- digesce v RM KpnI umístěném v polylinkeru (6 018 bp) → restriční štěpení SacI → 6 747 bp, 102 bp
- částečná digesce v RM KpnI umístěném mimo oblast polylinkeru (6 018 bp) → restriční štěpení SacI → 1 723 bp, 5 126 bp

DNA fragmenty jsem elektroforeticky rozdělila na 1% agarózovém gelu, obarvila EtBr (obr. 29), příslušné oblasti vyřízla a DNA izolovala.



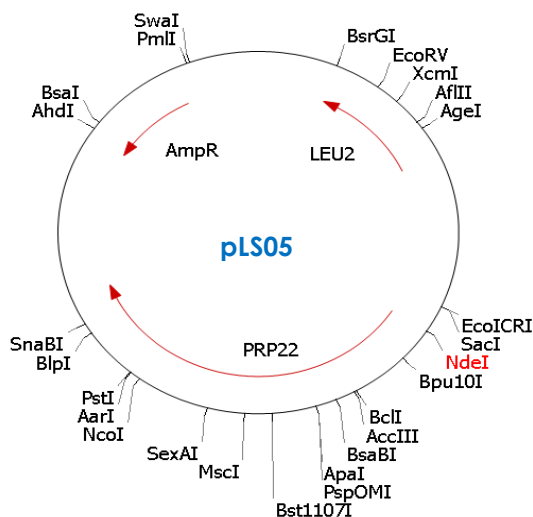
Obr. 29 DNA produkty vzniklé restrikčním štěpením linearizovaných vektorů pRS315 (1) a pRS325 (2) restrikční endonukleázou *SacI*. Červeně orámované jsou fragmenty o velikosti 5 916 bp (1) a 6 747 bp (2). M, marker (1 kb DNA ladder, viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.5).

Plasmid pSE358-PRP22 jsem štepila restrikčními enzymy *KpnI-SacI*. Tímto restrikčním štěpením vznikají dva DNA fragmenty, které se velikostně překrývají. Proto jsem restrikční směs dále štepila enzymem *HindIII*, přítomným ve vektoru. Pro všechny tři enzymy nelze zvolit jedny reakční podmínky, z tohoto důvodu jsem plasmid pSE358-PRP22 nejdříve štepila restrikčními endonukleázami *KpnI-SacI*. Enzymy jsem po 2 h reakce teplotně inaktivovala (80°C, 20min) a směs DNA fragmentů přečistila pomocí kitu NucleoSpin® Extract II (viz. Materiál a metody, kapitola 3.2.6). Následovala digesce restrikční endonukleázou *HindIII*. Vzniklé DNA produkty jsem elektroforeticky rozdělila na 1% agarózovém gelu, obarvila EtBr (obr. 30) a fragment DNA, velikostně odpovídající genu *PRP22* (3 933 bp), z gelu vyřízla a DNA izolovala.



Obr. 30 Restrikčně štěpený plasmid pSE358-PRP22 restrikčními endonukleázami *SacI-KpnI-HindIII*. Červeně je orámovaný gen *PRP22* (3 933 bp). M = marker (1 kb DNA ladder, viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.5).

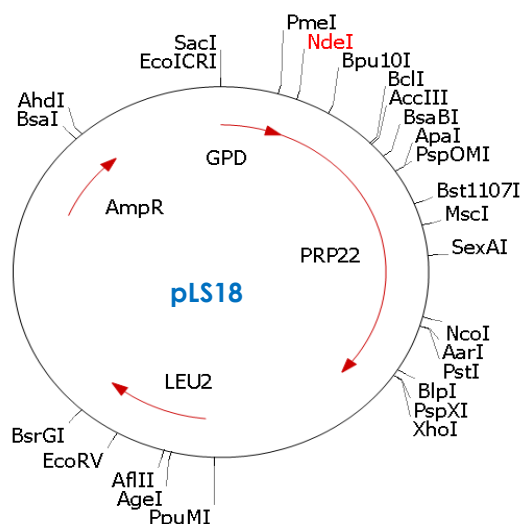
Ligací genu *PRP22* restrikčně štěpeného z vektoru pSE358-PRP22 a vektorů pRS15 a pRS325 vznikly plasmidy pRS315-PRP22 (pLS05) a pRS325-PRP22 (pLS06). Do plasmidu pLS05 jsem dále klonovala fragmenty $\Delta 109$, $\Delta 261$, $\Delta 301$ a $\Delta 350$ restrikčně štěpené příslušnými restrikčními endonukleázami z vektoru pCR®II-TOPO® (pLS7-pLS10; viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.2).



Do pLS06 jsem před gen *PRP22* introdukovala promotor *GPD1*, amplifikovaný z plasmidu p416GPD, metodou PCR s použitím primerů pLS10 a pLS11.

- 1) 95°C – 3 min
- 2) 94°C – 30 s
- 3) 47°C – 30 s
- 4) 72°C – 45 s
- 5) go to 2) 2x
- 6) 94°C – 30 s
- 7) 62°C – 30 s
- 8) 72°C – 45 s
- 9) Go to 6) 16x
- 10) 72°C – 10 min

Po izolaci PCR produktu (781 bp) z 2% agarózového gelu jsem DNA klonovala do vektoru pCR[®]II-TOPO[®] a následně sekvenci ověřila (primery M13R, M13F). Restriktivně štěpený promotor *GPD1* z vektoru pCR[®]II-TOPO[®] jsem vložila přes RM SacI-NdeI do pLS06 a vzniklý plasmid pojmenovala pLS18. Do tohoto plasmidu jsem klonovala fragmenty Δ109, Δ261, Δ301 a Δ350 restriktivně štěpené přes příslušná RM z vektoru pCR[®]II-TOPO[®] (pLS7-pLS10; viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.2).



Všechny analýzy sekvencí genu *PRP22* a promotoru *GPD1* probíhaly pomocí programů: Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) a BioEdit.

4.3.2 Příprava kmenů pro testování N-terminálních mutant *prp22*(Δ 109), *prp22*(Δ 261), *prp22*(Δ 301) a *prp22*(Δ 350)

Pro testování N-terminálních mutant bylo potřeba připravit příslušné kmeny s genotypy *PRP45 prp22*- Δ a *prp45*(1-169) *prp22*- Δ .

Jelikož je gen *PRP22* esenciální, transformovala jsem do diploidního kmene Y20335 před sporulací plasmid pRS326-*PRP22* (*PRP22 URA3* 2 μ).

kmen Y20335: *MATa/alfa his3* Δ 1/*his3* Δ 1 *leu2* Δ 0/*leu2* Δ 0 *lys2* Δ 0/*LYS2 MET15/met15* Δ 0 *ura3* Δ 0/*ura3* Δ 0 *PRP22::kanMX4/PRP22*

požadovaný kmen: *PRP22::kanMX4* (plasmid pRS326-*PRP22*)

Následná mikromanipulace 13 tetrad vedla k získání 40 haploidních klonů, které jsem dále testovala na bohatém YPAD mediu s antibiotikem geneticin (G418, 0,2 mg/ml). Požadovaný genotyp byl přítomen u třinácti klonů. Pro další práci jsem použila klon 5B, pojmenovaný LSY01 (viz. Příloha, kapitola 8.3).

Diploidní kmen vzniklý křížením kmenů LSY01 a AVY17 na bohatém YPAD mediu, jsem následně selektovala na rezistenci k antibiotikům geneticinu (G418, 0,2 mg/ml) a nourseothricinu (clonNAT, 0,9 mg/ml) na YPAD mediu.

kmen LSY01: *MATalfa PRP22::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0*
(plasmid pRS326-PRP22)

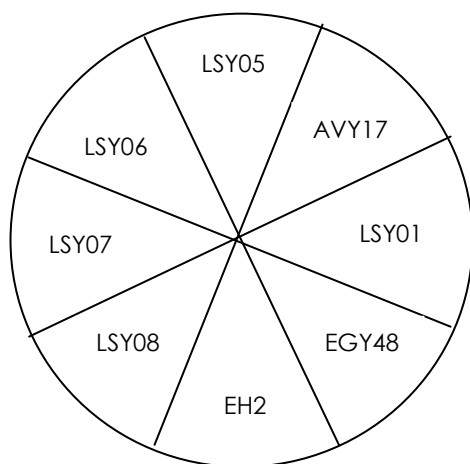
kmen AVY17: *MATa prp45(1-169)::HA-NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*

požadovaný kmen: *prp45(1-169)::HA-NatMX6 PRP22::kanMX4*
(plasmid pRS326-PRP22)

Mikromanipulací 14 tetrád jsem získala 43 haploidních buněk, které jsem následně testovala na bohatém YPAD mediu s antibiotiky geneticin (G418, 0,2mg/ml) a nourseothricin (clonNAT, 0,9 mg/ml). Požadovaný genotyp byl přítomen u čtyř klonů (viz. Příloha, kapitola 8.3). Klon 3A, pojmenovaný LSY05, jsem použila pro testování funkčních vlastností N-terminálních mutant Prp22p.

kmen LSY05: *MATalfa PRP22::kanMX4 prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0* (plasmid pRS326-PRP22)

Vytvořené kmeny LSY01 a LSY05-LSY08 jsem testovala na bohatém YPAD mediu na schopnost růst za teploty 37°C (obr. 31).



Obr. 31 Testování kmenů LSY01, LSY05, LSY06, LSY07, a LSY08 na citlivost ke zvýšené teplotě. Kmen EGY48 (*PRP45*) sloužil jako pozitivní kontrola, kmen EH2 (*prp45(1-169)*) jako kontrola negativní. Kmeny byly inkubovány tři dny na bohatém YPAD mediu při teplotě 30°C, 35°C a 37°C.

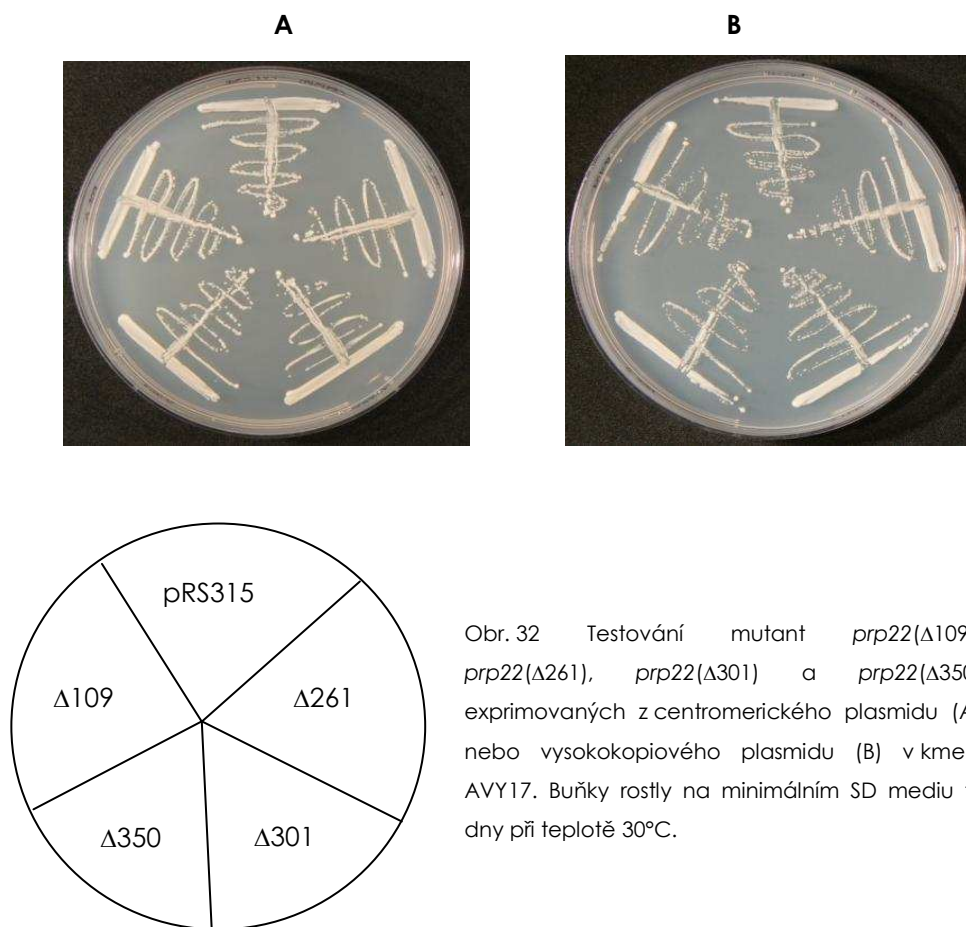
Testované kmeny LSY01, LSY05, LSY06, LSY07 a LSY08 nejeví senzitivitu k teplotě inkubace 35°C resp. 37°C.

4.3.3 Testování N-terminálních mutantů *prp22*($\Delta 109$), *prp22*($\Delta 261$), *prp22*($\Delta 301$) a *prp22*($\Delta 350$)

N-terminální mutanty *prp22*($\Delta 109$), *prp22*($\Delta 261$), *prp22*($\Delta 301$) a *prp22*($\Delta 350$) exprimované z centromerického plasmidu pod vlastním promotorem, pLS14-pLS17, nebo pod silným konstitutivním promotorem *GPD1*, pLS19-pLS22, (viz. Materiál a metody, kapitola 3.1.2) jsem transformovala do kmenů AVY17, LSY01 a LSY05. Transformované buňky vykazují leucinovou prototrofií.

Testování transformovaných buněk proběhlo v kmeni AVY17 na minimálním SD mediu bez leucinu (obr. 32).

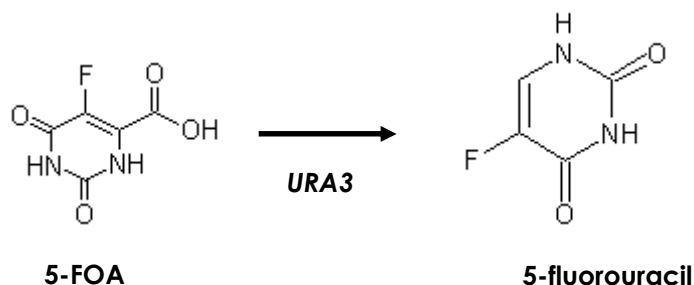
kmen AVY17: *MAT a prp45(1-169)::HA-NatMX6 his3 $\Delta 1$ leu2 $\Delta 0$ met15 $\Delta 0$ ura3 $\Delta 0$*



Obr. 32 Testování mutantů *prp22*($\Delta 109$), *prp22*($\Delta 261$), *prp22*($\Delta 301$) a *prp22*($\Delta 350$) exprimovaných z centromerického plasmidu (A) nebo vysokokopiového plasmidu (B) v kmeni AVY17. Buňky rostly na minimálním SD mediu tři dny při teplotě 30°C.

Ektopická exprese N-terminálních mutant Prp22p nemá dominantně negativní charakter, tj. jejich samotná exprese buňky nijak viditelně nepoškozuje a nezpůsobuje růstový defekt.

Buňky kmenů LSY01 a LSY05 transformované plasmidy exprimující mutanty *PRP22*, *prp22*(Δ109), *prp22*(Δ261), *prp22*(Δ301) a *prp22*(Δ350) jsem selektovala na minimálním SD mediu s 5-FOA (5-fluoroorotová kyselina). Transformované buňky, které neztratí plasmid pRS326-PRP22 na minimálním SD mediu s 5-FOA (1 g/l) nepřežijí. Plasmid totiž nese gen *URA3*, kódující enzym oritidin-5'fosfát dekarboxylázu (OMP dekarboxyláza), který katalyzuje přeměnu 5-FOA na fluoroorotidine monofosfát a následně dekarboxylací vzniká pyrimidinový analog 5-fluorouridin monofosfát (obr. 33), inhibitor thymidylát syntázy.

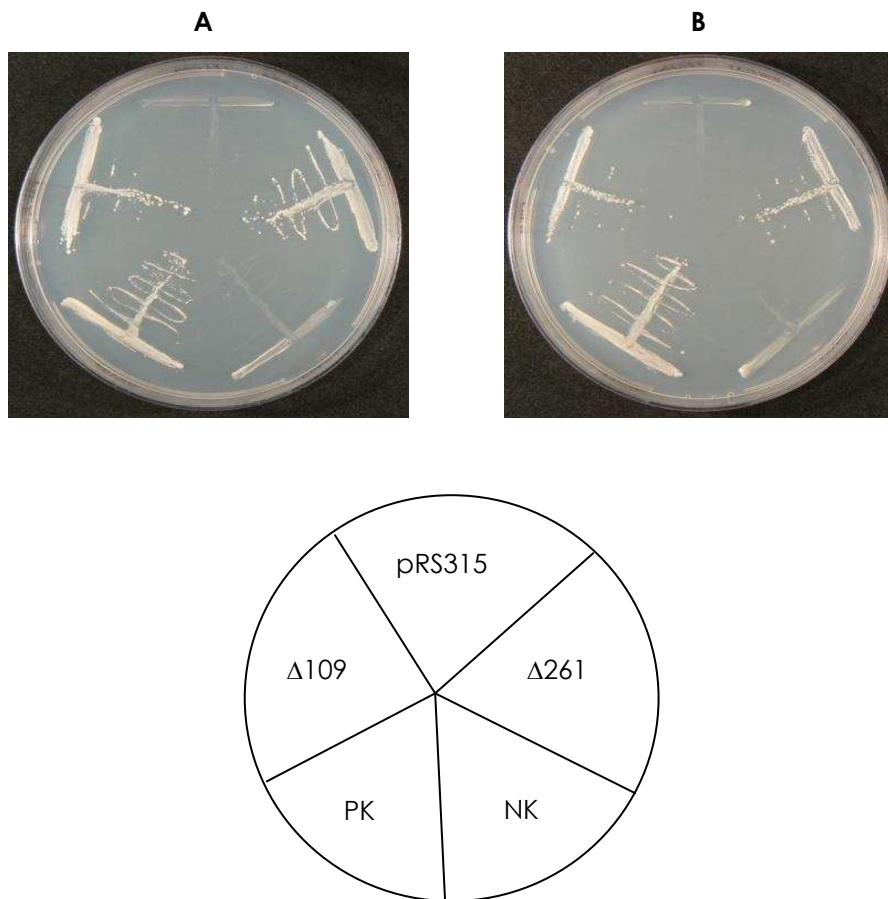


Obr. 33 Gen *URA3* kódující enzym OMP dekarboxylázu, katalyzuje přeměnu 5-FOA na pyrimidinový analog 5-fluorouracil, inhibitor thymidylát syntázy.

Na minimálním mediu s 5-FOA tak vyrostou pouze ty buňky kmene LSY01 a LSY05, které ztratily plasmid pRS326-PRP22 a z plasmidu exprimují N-terminální mutantu Prp22p, schopnou komplementovat genomovou delecí genu *PRP22*. Jinými slovy, pokud buňky ztratí plasmid s genem *URA3*, ale budou obsahovat prázdný plasmid (pRS315/pRS325) nevyrostou na minimálním SD mediu s 5-FOA, stejně tak jako nevyrostou buňky s genem *URA3*.

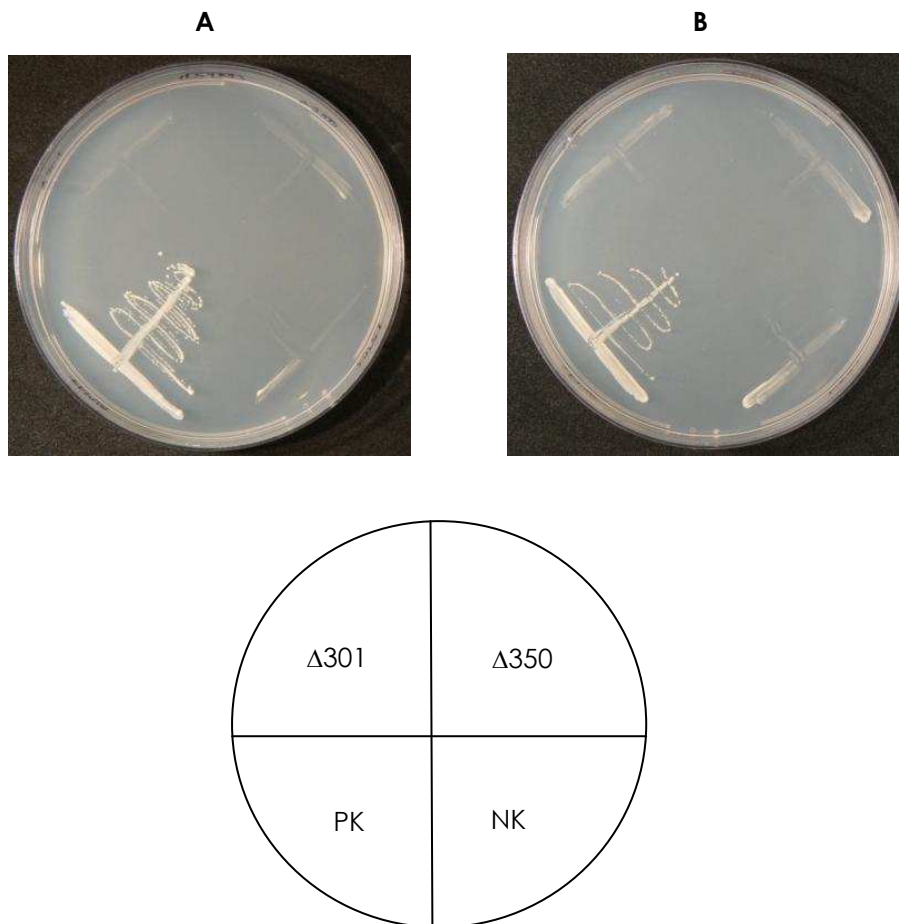
kmen LSY01: *Matalfa PRP22::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0*
(plasmid pRS326-PRP22)

kmen LSY05: *Matalfa PRP22::kanMX4 prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0* (plasmid pRS326-PRP22)



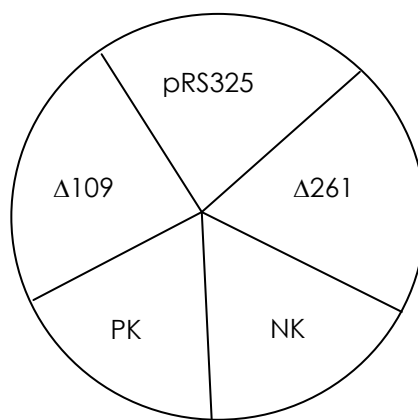
Obr. 34 Testování mutantů *prp22*($\Delta 109$) a *prp22*($\Delta 261$) exprimovaných z centromerického plasmidu a pod vlastním promotorem v kmeni LSY01 (A) a LSY05(B). Buňky rostly na minimálním SD mediu s 5-FOA tři dny při teplotě 30°C. PK, pozitivní kontrola (kmen AVY17); NK, negativní kontrola (kmen LSY01).

N-terminální mutanty Prp22p $\Delta 109$ a $\Delta 261$, exprimované z centromerického plasmidu a pod vlastním promotorem, komplementují genomovou delecí genu *PRP22* jak v kmeni LSY01 (*PRP45*), tak i v kmeni LSY05 (*prp45*(1-169)) (obr. 34).



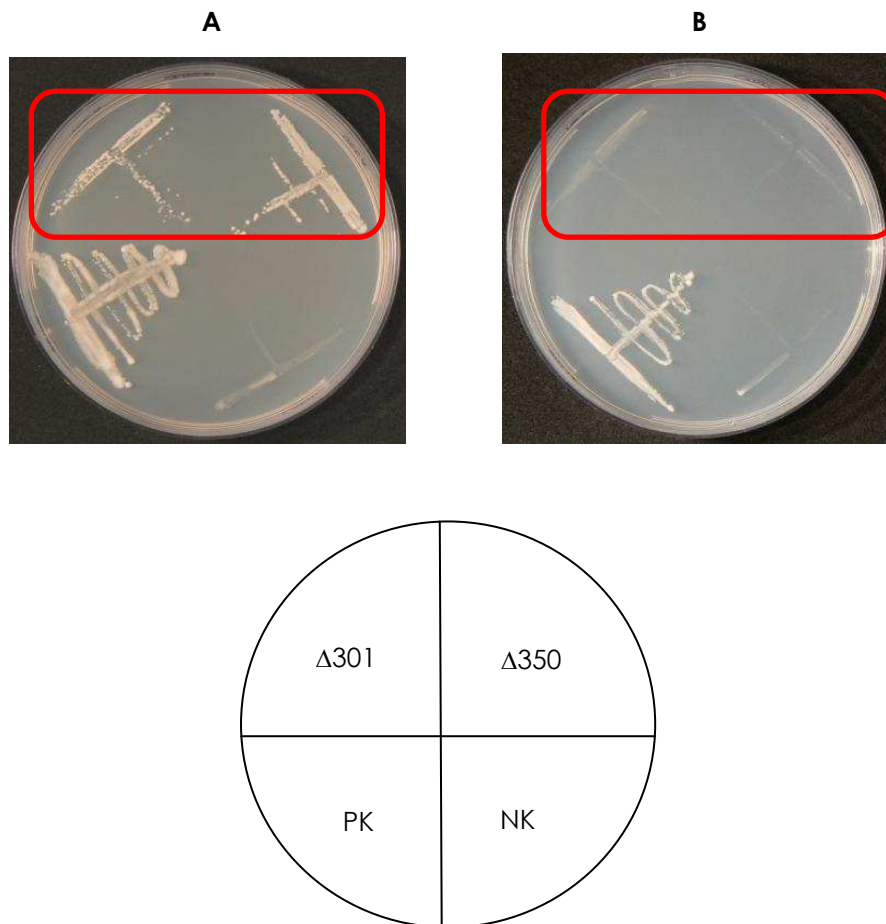
Obr. 35 Testování mutant *prp22*(Δ 301) a *prp22*(Δ 350) exprimovaných z centromerického plasmidu a pod vlastním promotorem v kmeni LSY01 (A) a LSY05 (B). Buňky rostly na minimálním SD mediu s 5-FOA tři dny při teplotě 30°C. PK, pozitivní kontrola (kmen AVY17); NK, negativní kontrola (kmen LSY01).

V kmenech LSY01 (*PRP45*) a LSY05 (*prp45*(1-169)) nedochází k supresi genomové delece genu *PRP22* expresí mutant *prp22*(Δ 301) a *prp22*(Δ 350) z centromerického plasmidu (obr. 35).



Obr. 36 Testování mutant *prp22*(Δ 109) a *prp22*(Δ 261) exprimovaných z vysokokopiového plasmidu pod promotorem *GPD1* v kmeni LSY01 (A) a LSY05 (B). Buňky rostly na minimálním SD mediu s 5-FOA tři dny při teplotě 30°C. PK, pozitivní kontrola (kmen AVY17); NK, negativní kontrola (kmen LSY01).

Mutanty *prp22*(Δ 109) a *prp22*(Δ 261), exprimované z vysokokopiového plasmidu pod promotorem *GPD1*, komplementují genomovou delecí genu *PRP22* jak v kmeni LSY01 (*PRP45*), tak i v kmeni LSY05 (*prp45*(1-169)).



Obr. 37 Testování mutant *prp22*(Δ 301) a *prp22*(Δ 350) exprimovaných z vysokokopiového plasmidu pod promotorem *GPD1* v kmeni LSY01 (A) a LSY05 (B). Buňky rostly na minimálním SD mediu s 5-FOA tři dny při teplotě 30°C. PK, pozitivní kontrola (kmen AVY17); NK, negativní kontrola (kmen LSY01).

N-terminální mutanty *prp22p*(Δ 301) a *prp22*(Δ 350), exprimované z vysokopiového plasmidu pod promotorem *GPD1*, komplementují genomovou delecí genu *PRP22* v kmeni LSY01 nesoucí WT alelu *PRP45*. Mutanty *prp22*(Δ 109) a *prp22*(Δ 261) vykazují syntetickou lethálitu s mutací *prp45*(1-169) (obr. 37).

5. Diskuze

Diplomová práce měla v zásadě dva cíle. Prvním cílem bylo zjistit, zda mutace nalezené v promotoru genu *PRP22* jsou kauzální příčinou snížení hladiny proteinu v mutantních buňkách. Druhým cílem pak bylo zjistit, jakým způsobem mutace proteinu Prp45(1-169), tj. rozsáhlá delece C-terminální části Prp45p, ovlivňuje funkčnost zkrácenin proteinu Prp22.

5.1 Charakterizace kmenů *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)*

5.1.1 Snížené množství Prp22p v kmenech *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)*

Mutanty *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI)* byly nalezeny v naší laboratoři RNDr. Annou Valentovou. Všechny tři mutace vykazují syntetickou letalitu s mutací *prp45(1-169)*. Mutace v kmenech *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* se nacházejí v upstream regulační oblasti genu *PRP22*, zatímco mutanta *prp22(300PPI)* obsahuje mutaci v otevřeném čtecím rámcí. Analýza hladiny proteinu Prp22 metodou Western blot ukázala výrazné snížení množství Prp22p v kmenech *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* oproti WT kmeni (AVY11). Množství proteinu Prp22 v kmeni *prp22(300PPI)* je s hladinou proteinu ve WT kmeni srovnatelné.

Snížení množství proteinu Prp22 v kmenech *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* by mohlo být způsobeno, buď uvedenými mutacemi umístěnými v upstream regulační oblasti, což je hypotéza zřejmě pravděpodobnější. Nebo by snížení mohlo být důsledkem mutace/í v genu nějakého trans-faktoru, který reguluje genovou expresi *PRP22*. Taková/é mutace mohly být generovány náhodou v průběhu UV mutagenese.

Na myšlenku, že by příčinou snížení hladiny Prp22p mohl být nějaký trans faktor a ne nalezené mutace, nás přivedlo zjištění, že v plasmidu pSE358-PRP22 (Schneider a Schwer, 2001) bylo jako promotor pro expresi *PRP22* použito jen 234 bp nacházející se upstream ORF, zatímco jedna z našich mutací leží až ve vzdálenosti 327 bp. Hladina Prp22p exprimovaného z tohoto plasmidu odpovídá WT kmeni, zatímco hladina v mutantě *prp22(-327A)* je, jak bylo uvedeno, výrazně nižší.

Výsledky mé experimentální práce ukazují, že nižší hladina Prp22p v kmenech *prp22(-327A)* a *prp22(-158T)* je zapříčiněna mutacemi obsaženými v upstream regulační oblasti *PRP22*. Tento závěr vyplývá ze skutečnosti, že ektopická exprese genu *PRP22* v centromerickém plasmidu a pod vlastním promotorem

(pSE358-PRP22), tj. exprese proteinu v množství odpovídajícím nativní expresi, navrácí množství proteinu Prp22 na úroveň pozorovanou ve WT kmeni. Pokud by příčinou snížení hladiny Prp22p v mutantních buňkách byl trans faktor (např. transkripční faktor, faktor regulující specifickou proteázu, apod.), zůstala by hladina i při ektopické expresi WT proteinu nízká. Z výsledků je patrné, že tomu tak není.

5.1.2 Vliv kmenů *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)* na sestřih suboptimálních substrátů s mutací v 5' ss a blízkosti BP

Protein Prp22 má dvě funkce v sestřihu pre-mRNA, účastní se druhé transesterifikační reakce a uvolňuje maturovanou mRNA ze spliceosomu (viz. Literární úvod, kapitoly 2.2.2.1 a 2.2.2.2).

Pro testování sestřihu byly použity fúzní sestřihové konstrukty *ACT1-CUP1*, které v plasmidech pRH20 a pMA2C obsahují substituci adenosinu za cytidin v 5' ss (A3C). Výskyt takovéto mutace v 5' ss má za následek zhoršení druhého kroku sestřihu (viz. Výsledky, kapitola 4.2.2). Plasmidy pRH20 a pMA2C se vzájemně liší typem a délkou sekvence exonu 2, která je v pMA2C identická se sekvencí genu *ACT1* a tvoří jí 68 bp, zatímco v plasmidu pRH20 je tato sekvence dlouhá 106 bp a není identická se sekvencí genu *ACT1*.

Sestřihový konstrukt pRH20 jsem testovala, jak v kmenech *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI)*, tak i v kmenech EGY48 (*PRP45 PRP22*) a EH2 (*prp45(1-169) PRP22*).

Jak lze očekávat, ve WT kmeni EGY48 (*PRP45 PRP22*) je efektivita sestřihu plasmidu pRH20 vysoká jak v prvním, tak i v druhém kroku sestřihu. V kmeni EH2 s genomovou C-terminální delecí genu *PRP45* (*prp45(1-169)*) dochází ke zhoršení sestřihu v obou krocích. Protein Prp45 se svou C-terminální částí pravděpodobně podílí na vyvazování Prp22p do spliceosomu (viz. Literární úvod, kapitola 2.5), ta však v mutantním proteinu chybí. Lze usuzovat, že v kmeni EH2 dochází ke zhoršení druhého kroku sestřihu kvůli absenci C-terminální části Prp45p, což má za následek snížení množství proteinu Prp22 v spliceosomálních komplexech (Gahura et al., 2009). Funkce Prp22p v druhé transesterifikační reakci je *in vitro* esenciální, pouze při vzdálenosti BP a 3' ss ≥ 21 NTP. Byla navržena hypotéza, ve které Prp22p společně s proteiny Slu7 a Prp18 vytváří molekulový můstek mezi BP a 3' ss. Tento můstek zřejmě slouží u transkriptů s větší vzdáleností BP a 3' ss k správnému rozpoznání 3' ss a umístění 3' hydroxy skupiny exonu 1 do katalytického místa (Schwer a Gross, 1998; viz. Literární úvod, kapitola 2.2.2.1). Plasmidy pRH20 a pMA2C mají vzdálenost BP a 3' ss větší než 21 nukleotidů (pRH20 - 36 nt, pMA2C - 39 nt). Hromadění produktu

(lariát-intermediátu) první sestřihové reakce v kmeni EH2 může být důsledkem lokálního nedostatku Prp22p ve spliceosomu, a s tím spojenými obtížemi při vytváření molekulového můstku mezi BP a 3' ss. Tento návrh je v souladu s pozorováním defektu druhého kroku sestřihu v buněčném extraktu s deplecí Prp22p, a nebo Slu7p (Schwer a Gross, 1998). Změna v prvním kroku sestřihu s vysokou pravděpodobností neodráží vazbu Prp22p prostřednictvím Prp45p do spliceosomu (viz. výše). Současné experimenty prováděné metodou RT-PCR ukazují, že v kmeni EH2 se hromadí pre-mRNA endogenních genů, obsahujících intron (Ondřej Gahura, nepublikováno).

Sestřih plasmidu pMA2C jsem testovala v kmenech *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)*, *prp22(300PPI)* a AVY11.

Efektivita sestřihu plasmidu pMA2C v kmeni AVY11 je mírně zhoršena v porovnání s efektivitou sestřihu pRH20 v kmeni EGY48. Kmen AVY11 obsahuje genomovou C-terminální delecí genu *PRP45* (*prp45(1-169)*) a zároveň plasmid pOG02 (pOG02 - *PRP45 URA3*). Zhoršení v druhém kroku sestřihu může být zapříčiněno přítomností mutace *prp45(1-169)*, která kompetuje s WT Prp45p o vazbu do spliceosomu. V buňce se tak budou nacházet různé spliceosomální komplexy, buď s WT Prp45p schopným svou C-terminální částí vyvazovat protein Prp22, nebo s mutantou proteinu Prp45(1-169), v jejíž přítomnosti dochází ke snížení množství Prp22p ve spliceosomech (Gahura et al., 2009).

Mutace *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)* mají negativní dopad na sestřih pre-mRNA kódované z plasmidu pRH20. Je zajímavé, že všechny mutanty *prp22* ovlivňují sestřih tohoto konstruktu podobně, bez ohledu na výskyt mutace v genu *PRP22*/množství Prp22p, avšak efektivita sestřihu konstruktů pMA2C se u jednotlivých mutantů *prp22* liší. Proč se jednotlivé mutanty „chovají“ v případě sestřihu pRH20 podobně, zatímco při sestřihu pMA2C je efektivita sestřihu různá, neumíme prozatím vysvětlit. Při komplexním porovnání efektivit sestřihu konstruktů pRH20 a pMA2C u mutantů *prp22*, bez ohledu na výskyt mutace v genu *PRP22*, lze pozorovat vyšší efektivitu sestřihu v případě konstruktů pRH20. Jak již bylo zmíněno výše, sekvence exonu 2 tohoto fúzního konstruktů není identická se sekvencí genu *ACT1*, zatímco v plasmidu pMA2C je identická se sekvencí genu *ACT1*. Kromě funkce Prp22p v druhém kroku sestřihu se zdá, že tento protein hraje roli i v přesnosti sestřihu pre-mRNA, a to prostřednictvím své ATPázové a helikázové aktivity. Prp22p negativně ovlivňuje ligaci exonů *in vivo* i *in vitro* u sestřihových konstruktů s jednonukleotidovou záměnou („near-consensus“) v 3' ss, a také limituje ligaci exonů *in vitro* u substrátů s mutací v 5' ss či BP (Mayas et al., 2006; viz. Literární úvod, kapitola 2.2.3). Možná protein Prp22 ovlivňuje přesnost sestřihu i s ohledem na sekvenci exonu 2, nacházející se downstream od 3' ss. Prp22p vstupuje do spliceosomu před druhou transesterifikační reakcí, váže se zde na oblast intronu (minimálně 8 nt)

pre-mRNA upstream od 3' ss (McPheeters et al., 2000; MCPheeters a Muhlenkamp, 2003). Po ligaci exonů dochází k přemístění Prp22p do oblasti sekvence exonu 2, která obsahuje minimálně 13 nt (Schwer, 2008; viz. Literární úvod, kapitola 2.2.4). Prp22p negativně ovlivňuje ligaci exonů pouze u „near-consensus“ transkriptů s mutací v 3' ss, nikoliv u „non-consensus“ transkriptů (dinukleotidová záměna v 3' ss; Mayas et al., 2006, viz. Literární úvod, kapitola 2.2.3). Zvýšená efektivita sestřihu u plasmidu pRH20 může být způsobena tím, že sekvence exonu 2 není identická se sekvencí genu *ACT1*, je možné ji tedy označit za „non-consensus“. Lze usuzovat, že ligaci exonů tohoto substrátu neovlivňuje Prp22p, na rozdíl od plasmidu pMA2C, jehož sekvence exonu 2 je identická se sekvencí genu *ACT1*. Zdá se, že mutanty *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)* ovlivňují sestřih konstruktů s mutací v 5' ss, v závislosti na sekvenci exonu 2. Nelze ovšem opomenout výsledek experimentu, který ukázal výrazné hromadění lariát-intermediátu a 5' exonu, při *in vitro* testování „non-consensus“ substrátů s mutací v 3' ss, bez ohledu na funkčnost proteinu Prp22 (Mayas et al., 2006). Mé výsledky však neukazují výraznou akumulaci lariát-intermediátu v kmenech s mutací v *PRP22*. Pro testování hypotézy pravící, že Prp22p ovlivňuje ligaci exonů i v závislosti na sekvenci exonu 2, se v naší laboratoři připravují sestřihové konstrukty, které se budou vzájemně lišit pouze prvními třemi nukleotidy této sekvence.

Posledním testovaným sestřihovým konstruktem v kmenech AVY11, *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)* byl plasmid pC256A, který obsahuje substituci cytidinu za adenosin (C256A) v blízkosti místa větvení (UACUAAC, tučně je označen substituovaný cytidin, tučně a podtržením větvící adenosin). Výskyt takovéto mutace vede k výraznému snížení efektivit prvního kroku sestřihu (viz. Výsledky, kapitola 4.2.2). Mutanty *prp22(-327A)*, *prp22(-158T)* a *prp22(300PPI)* neovlivňují sestřih substrátu s mutací v blízkosti místa větvení. Tento závěr je v souladu s tím, že protein Prp22 je sestřihový faktor druhého kroku.

5.2 Testování funkčních vlastností N-terminálních mutantů *prp22(Δ109)*, *prp22(Δ261)*, *prp22(Δ301)* a *prp22(Δ350)*

V laboratoři Prof. Schwerové byla vytvořena série mutací, představující N-terminální delecce proteinu Prp22. Bylo ukázáno, že ektopická exprese mutantů *prp22(Δ109)* a *prp22(Δ261)* z centromerického plasmidu a pod vlastním promotorem komplementuje genomovou delecí genu *PRP22*. Mutanty *prp22(Δ301)* a *prp22(Δ350)* jsou schopné suprimovat genomovou delecí *PRP22* pouze při nadprodukcii (exprese

z vysokokopiového plasmidu a pod silným konstitutivním promotorem; Schneider a Schwer, 2001). Dále bylo zjištěno, že nadprodukce ATP deficientní mutanty *prp22(D603A)* v kmeni s WT alelou *PRP22* způsobuje růstovou inhibici, která je zapříčiněna kompeticí WT Prp22p a mutanty proteinu Prp22(D603A) o vazbu do spliceosomu (Schwer a Meszaros, 2000). Exprese mutanty *prp22(D603A)* s N-terminální delecí 262 aminokyselin také způsobuje růstovou inhibici, avšak exprese této mutanty s N-terminální delecí 350 aminokyselin růstovou inhibici mírně redukuje a delece 465 aminokyselin růstovou inhibici zruší. Tyto výsledky značí, že protein Prp22 obsahuje minimálně jednu, N-terminálně lokalizovanou oblast (262-350 AA), přes kterou je tento protein vyvazován do spliceosomu (Schneider a Schwer, 2001). Tato oblast je nezbytná, ale nikoliv dostatečná pro vazbu Prp22p do spliceosomu, jelikož ektopicky exprimovaná N-terminální mutanta proteinu Prp22(1-480) není schopná efektivně kompetovat s WT Prp22p o vazbu do spliceosomu (Schneider a Schwer, 2001). Protein Prp22 pravděpodobně obsahuje dvě oblasti pro vazbu do spliceosomu, jednu lokalizovanou N-terminálně a druhou C-terminálně.

Z výsledků dvouhybridní interakce vyplynulo, že Prp22p interaguje s C-terminální oblastí (262-291 AA) proteinu Prp45. V opačné situaci, kdy Prp45p byl použitý jako protein-návnada nebyl ani v jednom případě učiněn nálezn Prp22p (Albers, 2003). Výsledky dvouhybridní analýzy provedené v naší laboratoři potvrzují interakci mezi Prp45p a Prp22p, přičemž tato interakce není zprostředkována oblastí 1-169 AA proteinu Prp45 (Ondřej Gahura, nepublikované výsledky). Interakce mezi těmito proteiny může být nepřímá nebo slabá a může být stabilizována dalším sestřihovým proteinem.

Vzhledem ke skutečnostem, že snížení hladiny Prp22p je letální v mutantě *prp45(1-169)* a že mezi Prp45p a Prp22p byla nalezena interakce v dvouhybridním systému, bylo zajímavé se ptát, zda delece definované Prof. Schwerovou jako vitální, budou vitálními i na genetickém pozadí *prp45(1-169)*.

V kmenech LSY01 (*PRP45 prp22-Δ*) a LSY05 (*prp45(1-169) prp22-Δ*) byly ektopicky exprimovány N-terminální mutanty *prp22(Δ109)*, *prp22(Δ261)*, *prp22(Δ301)* a *prp22(Δ350)* z centromerického plasmidu (*PRP22* pod vlastním promotorem) nebo z vysokokopiového plasmidu (*PRP22* pod promotorem *GPD1*).

Ektopická exprese N-terminální mutanty *prp22(Δ109)* nebo *prp22(Δ261)* v kmeni LSY01, nesoucí delecí ORF *PRP22* a WT alelu *PRP45*, komplementuje genomovou delecí *PRP22*, zřejmě díky přítomnosti N-terminální oblasti Prp22p (262-350 AA) a C-terminální části (170-379 AA) Prp45p, které efektivně vyvazují Prp22p do spliceosomálních komplexů. Avšak mutanty *prp22(Δ301)* a *prp22(Δ350)* jsou v kmeni LSY01 schopné komplementovat genomovou delecí *PRP22* pouze při nadprodukci.

Lze usuzovat, že absence části/celé N-terminální oblasti (262-350 AA) Prp22p zřejmě způsobí nižší efektivitu vazby tohoto proteinu do spliceosomů. Ektopicky exprimované mutanty *prp22*(Δ 109) a *prp22*(Δ 261) suprimují genomovou delecí *PRP22* v kmeni LSY05 (*prp45*(1-169) *prp22*- Δ) už při množství odpovídajícím nativní expresi (exprese pod vlastním promotorem a z centromerického plasmidu). Tyto výsledky značí, že delece C-terminální části (170-379 AA) Prp45p nemá tak dramatický vliv na efektivitu vazby Prp22p do spliceosomů, jako delece části/celé N-terminální oblasti (262-350 AA) Prp22p. Avšak kombinace těchto dvou delecí je synteticky letální, jelikož mutanty *prp22*(Δ 301) a *prp22*(Δ 350) exprimované v kmeni LSY05 (*prp45*(1-169) *prp22*- Δ) nesuprimují genomovou delecí *PRP22* ani při své nadprodukci. Lze hypotetizovat, že mutanta *prp45*(1-169) vykazuje syntetickou letalitu s mutantou *prp22*(Δ 301) a *prp22*(Δ 350) kvůli snížení efektivity vazby Prp22p do spliceosomálních komplexů na úroveň, která není pro buňky již viabilní.

6. Souhrn

- Bylo zjištěno, že snížená hladina proteinu Prp22 v kmenech *prp22(-158T)* a *prp22(-327A)* je způsobena uvedenými mutacemi v promotorové oblasti genu *PRP22*.
- Bylo zjištěno, že hladinu Prp22p ovlivňuje mutace v poloze -327 od start kodónu, a tudíž regulační oblast tohoto genu sahá minimálně do této vzdálenosti.
- Bylo zjištěno, že mutanty *prp22(-327A)*, *prp22(300PPI)* a *prp22(-158T)* ovlivňují sestřih suboptimálních substrátů s mutací v 5' ss v závislosti na sekvenci druhého exonu.
- Byly připraveny kmeny LSY01 a LSY05 pro testování funkčních vlastností N-terminálních mutant Prp22p.
- Bylo zjištěno, že N-terminální mutanty *prp22(Δ109)*, *prp22(Δ261)*, *prp22(Δ301)*, *prp22(Δ350)* nejeví negativní dominanci.
- Bylo zjištěno, že mutanty *prp22(Δ301)* a *prp22(Δ350)* jsou synteticky letální s mutantou *prp45(1-169)*.

7. Seznam citované literatury

Albers M, Diment A, Muraru M, Russell CS, Beggs JD. 2003. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA*. 9(1):138-50.

Ambrozková M, Půta F, Fuková I, Skružný M, Brábek J, Folk P. 2001. The fission yeast ortholog of the coregulator SKIP interacts with the small subunit of U2AF. *Biochem Biophys Res Commun*. 284(5):1148-54.

Ares M Jr, Grate L, Pauling MH. 1999. A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA*. 5(9):1138-9.

Arenas JE, Abelson JN. 1997. Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(22):11798-802.

Aronova A, Bacíková D, Crotti LB, Horowitz DS, Schwer B. 2007. Functional interactions between Prp8, Prp18, Slu7, and U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *RNA*. 13(9):1437-44.

Bacíková D, Horowitz DS. 2005. Genetic and functional interaction of evolutionarily conserved regions of the Prp18 protein and the U5 snRNA. *Mol Cell Biol*. 25(6):2107-16.

Bleichert F, Baserga SJ. 2007. The long unwinding road of RNA helicases. *Mol Cell*. 27(3):339-52. Review

Brow DA. 2002. Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet*. 36:333-60. Review

Brys A, Schwer B. 1996. Requirement for SLU7 in yeast pre-mRNA splicing is dictated by the distance between the branchpoint and the 3' splice site. *RNA*. 2(7):707-17.

Burgess S, Couto JR, Guthrie C. 1990. A putative ATP binding protein influences the fidelity of branchpoint recognition in yeast splicing. *Cell*. 60(5):705-17.

Burns CG, Ohi R, Mehta S, O'Toole ET, Winey M, Clark TA, Sugnet CW, Ares M Jr, Gould KL. 2002. Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 22(3):801-15.

Campodonico E, Schwer B. 2002. ATP-dependent remodeling of the spliceosome: intragenic suppressors of release-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Prp22. *Genetics*. 160(2):407-15.

Caruthers JM, Johnson ER, McKay DB. 2000. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(24):13080-5.

Company M, Arenas J, Abelson J. 1991. Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature.* 349(6309):487-93.

Crotti LB, Bacíková D, Horowitz DS. 2007. The Prp18 protein stabilizes the interaction of both exons with the U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 21(10):1204-16.

Dahl R, Wani B, Hayman MJ. 1998. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of Drosophila Bx42. *Oncogene.* 16(12):1579-86.

Davis CA, Grate L, Spingola M, Ares M Jr. 2000. Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic Acids Res.* 28(8):1700-6.

de la Cruz J, Kressler D, Linder P. 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci.* 24(5):192-8. Review

Diehl BE, Pringle JR. 1991. Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I: identification of additional transcribed regions and demonstration that some encode essential functions. *Genetics* 127(2):287-298.

Figueroa JD, Hayman MJ. 2004. The human Ski-interacting protein functionally substitutes for the yeast PRP45 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(4):1105-9.

Folk P, Puta F, Krpejšová L, Blahusková A, Markos A, Rabino M, Doffin RP. 1996. The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in *Dictyostelium*. *Gene.* 181(1-2):229-31.

Folk P, Půta F, Skružný M. 2004. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci.* 61(6):629-40, Review

Frank DN, Roiha H, Guthrie C. 1994. Architecture of the U5 small nuclear RNA. *Mol Cell Biol.* 14(3):2180-90.

Fry DC, Kuby SA, Mildvan AS. 1986. ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(4):907-11.

Gahura O, Abrahmová K, Skruzny M, Valentova A, Munzarova V, Folk P, Puta F. 2009. Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *J Cell Biochem.* 106(1):139-51.

Gavin AC, Bösche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Höfert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415(6868):141-7.

Gorbalenya AE, Koonin EV. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:419-429.

Gwack Y, Kim DW, Han JH, Choe J. 1996. Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 225(2):654-9.

Harris SD, Cheng J, Pugh TA, Pringle JR. 1992. Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I. On the number of genes and the identification of essential genes using temperature-sensitive-lethal mutations. *J. Mol. Biol.* 225(1):53-65.

Chan SP, Cheng SC. 2005. The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J Biol Chem.* 280(35):31190-9.

Chen CH, Tsai WY, Chen HR, Wang CH, Cheng SC. 2001. Identification and characterization of two novel components of the Prp19p-associated complex, Ntc30p and Ntc20p. *J Biol Chem.* 276(1):488-94.

Chen CH, Yu WC, Tsao TY, Wang LY, Chen HR, Lin JY, Tsai WY, Cheng SC. 2002. Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. *Nucleic Acids Res.* 30(4):1029-37.

Chen JH, Lin RJ. 1990. The yeast PRP2 protein, a putative RNA-dependent ATPase, shares extensive sequence homology with two other pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* 18(21):6447.

Chen HR, Jan SP, Tsao TY, Sheu YJ, Banroques J, Cheng SC. 1998. Snt309p, a component of the Prp19p-associated complex that interacts with Prp19p and associates with the spliceosome simultaneously with or immediately after dissociation of U4 in the same manner as Prp19p. *Mol Cell Biol.* 18(4):2196-204.

James SA, Turner W, Schwer B. 2002. How Slu7 and Prp18 cooperate in the second step of yeast pre-mRNA splicing. *RNA.* 8(8):1068-77.

Jankowsky E, Jankowsky A. 2000. The DExH/D protein family database. *Nucleic Acids Res.* 28(1):333-4.

Jones MH, Frank DN, Guthrie C. 1995. Characterization and functional ordering of Slu7p and Prp17p during the second step of pre-mRNA splicing in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21):9687-91.

Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. 1995. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 215(1):160-6.

Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR. 1998. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure.* 6(1):89-100.

Kim SH, Lin RJ. 1993. Pre-mRNA splicing within an assembled yeast spliceosome requires an RNA-dependent ATPase and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(3):888-92.

Kim SH, Lin RJ. 1996. Spliceosome activation by PRP2 ATPase prior to the first transesterification reaction of pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol.* 16(12):6810-9.

Konarska MM, Vilardell J, Query CC. 2006. Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Mol Cell.* 21(4):543-53.

Kostrouchova M, Housa D, Kostrouch Z, Saudek V, Rall JE. 2002. SKIP is an indispensable factor for *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(14):9254-9.

Le Meur N, Gentleman R. 2008. Modeling synthetic lethality. *Genome Biol.* 9(9):R135.

Lin C, Kim JL. 1999. Structure-based mutagenesis study of hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol.* 73(10):8798-807.

Luukkonen BG, Séraphin B. 1997. The role of branchpoint-3' splice site spacing and interaction between intron terminal nucleotides in 3' splice site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16(4):779-92.

Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, Luhrmann R. 2002. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science.* 298(5601):2205-8.

Martinkova K, Lebduska P, Skruzny M, Folk P, Puta F. 2002. Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *J Biochem.* 132(4):557-63.

Mayas RM, Maita H, Staley JP. 2006. Exon ligation is proofread by the DExD/H-box ATPase Prp22p. *Nat Struct Mol Biol.* 13(6):482-90.

Mayas RM, Maita H, Semlow DR, Staley JP. 2010. Spliceosome discards intermediates via the DEAH box ATPase Prp43p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(22):10020-5.

McPheeters DS, Schwer B, Muhlenkamp P. 2000. Interaction of the yeast DExH-box RNA helicase prp22p with the 3' splice site during the second step of nuclear pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 28(6):1313-21.

McPheeters DS, Muhlenkamp P. 2003. Spatial organization of protein-RNA interactions in the branch site-3' splice site region during pre-mRNA splicing in yeast. *Mol Cell Biol.* 23(12):4174-86.

Newman AJ. 2008. RNA Interactions in mRNA Splicing. *Encyclopedia of life sciences.* overview.

Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL. 2002. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol.* 22(7):2011-24.

Patterson B, Guthrie C. 1991. A U-rich tract enhances usage of an alternative 3' splice site in yeast. *Cell.* 64(1):181-7.

Pause A, Sonenberg N. 1992. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11(7):2643-54.

Pleiss JA, Whitworth GB, Bergkessel M, Guthrie C. 2007. Transcript specificity in yeast pre-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components. *PLoS Biol.* 5(4):e90.

Query CC, Konarska MM. 2006. Splicing fidelity revisited. *Nat Struct Mol Biol.* 13(6):472-4.

Schneider S, Schwer B. 2001. Functional domains of the yeast splicing factor Prp22p. *J Biol Chem.* 276(24):21184-91.

Schneider S, Campodonico E, Schwer B. 2004. Motifs IV and V in the DEAH box splicing factor Prp22 are important for RNA unwinding, and helicase-defective Prp22 mutants are suppressed by Prp8. *J Biol Chem.* 279(10):8617-26.

Schwer B, Guthrie C. 1992. A conformational rearrangement in the spliceosome is dependent on PRP16 and ATP hydrolysis. *EMBO J.* 11(13):5033-9.

Schwer B, Gross CH. 1998. Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 17(7):2086-94.

Schwer B, Meszaros T. 2000. RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 19(23):6582-91.

Schwer B. 2008. A conformational rearrangement in the spliceosome sets the stage for Prp22-dependent mRNA release. *Mol Cell.* 30(6):743-54.

Shea JE, Toyn JH, Johnston LH. 1994. The budding yeast U5 snRNP Prp8 is a highly conserved protein which links RNA splicing with cell cycle progression. *Nucleic Acids Res.* 22(25):5555-64.

Siatecka M, Reyes JL, Konarska MM. 1999. Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center. *Genes Dev.* 13(15):1983-93.

Smith DJ, Query CC, Konarska MM. 2007. trans-splicing to spliceosomal U2 snRNA suggests disruption of branch site-U2 pairing during pre-mRNA splicing. *Mol Cell.* 26(6):883-90.

Sperling J, Azubel M, Sperling R. 2008. Structure and function of the Pre-mRNA splicing machine. *Structure.* 16(11):1605-15. Review

Spingola M, Grate L, Haussler D, Ares M Jr. 1999. Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 5(2):221-34.

Staley JP, Guthrie C. 1998. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell.* 92(3):315-26. Review

Stevens SW, Ryan DE, Ge HY, Moore RE, Young MK, Lee TD, Abelson J. 2002. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal pentasnrNP. *Mol Cell.* 9(1):31-44.

Tanaka N, Schwer B. 2005. Characterization of the NTPase, RNA-binding, and RNA helicase activities of the DEAH-box splicing factor Prp22. *Biochemistry.* 44(28):9795-803.

Tarn WY, Hsu CH, Huang KT, Chen HR, Kao HY, Lee KR, Cheng SC. 1994. Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J.* 13(10):2421-31.

Teigelkamp S, Newman AJ, Beggs JD. 1995a. Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *EMBO J.* 14(11):2602-12.

Teigelkamp S, Whittaker E, Beggs JD. 1995b Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing. *Nucleic Acids Res.* 23(3):320-6.

Tsai WY, Chow YT, Chen HR, Huang KT, Hong RI, Jan SP, Kuo NY, Tsao TY, Chen CH, Cheng SC. 1999. Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J Biol Chem.* 274(14):9455-62.

Tucker ChL, Fields S. 2003. Lethal combinations. *Nature genetics.* 35(3):204-5.

Umen JG, Guthrie C. 1995. The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA.* 1(9):869-85. Review

Vaisman N, Tsouladze A, Robzyk K, Ben-Yehuda S, Kupiec M, Kassir Y. 1995. The role of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc40p in DNA replication and mitotic spindle formation and/or maintenance. *Mol Gen Genet.* 247(2):123-36.

Vijayraghavan U, Company M, Abelson J. 1989. Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 3(8):1206-16.

Wagner JD, Jankowsky E, Company M, Pyle AM, Abelson JN. 1998. The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATP-dependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes. *EMBO J.* 17(10):2926-37.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945-51.

Wang Q, Hobbs K, Lynn B, Rymond BC. 2003. The Clf1p splicing factor promotes spliceosome assembly through N-terminal tetratricopeptide repeat contacts. *J Biol Chem.* 278(10):7875-83.

Wang Y, Guthrie C. 1998. PRP16, a DEAH-box RNA helicase, is recruited to the spliceosome primarily via its nonconserved N-terminal domain. *RNA.* 4(10):1216-29.

Wieland C, Mann S, von Besser H, Saumweber H. 1992. The *Drosophila* nuclear protein Bx42, which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged. *Chromosoma.* 101(8):517-25.

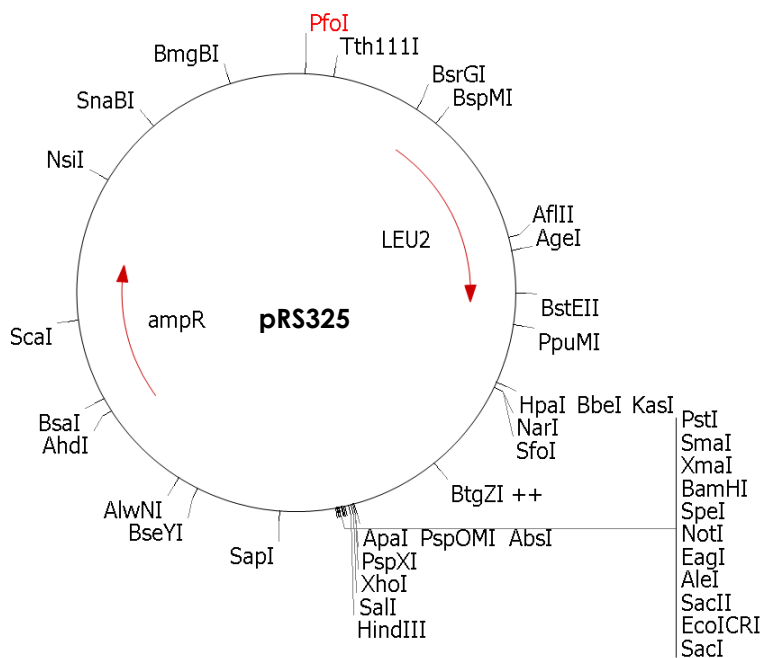
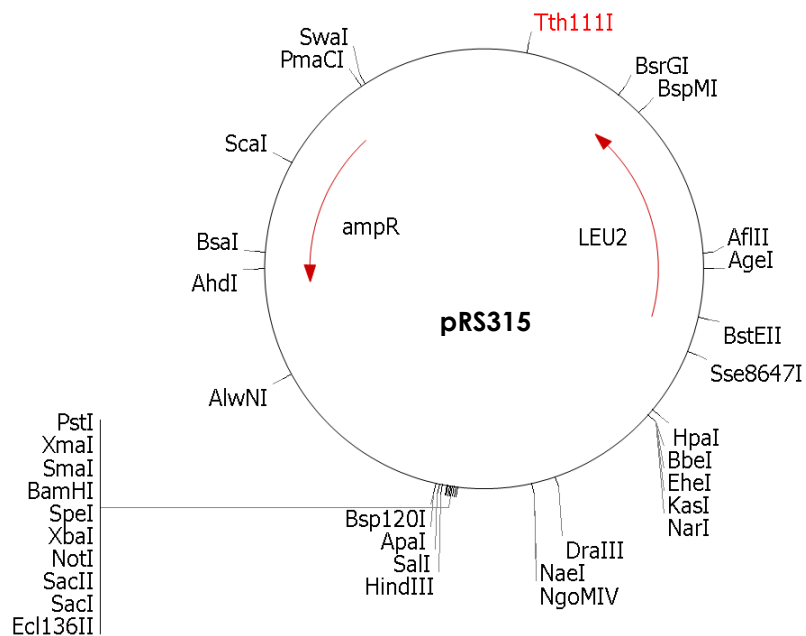
Yao N, Hesson T, Cable M, Hong Z, Kwong AD, Le HV, Weber PC. 1997. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol.* 4(6):463-7.

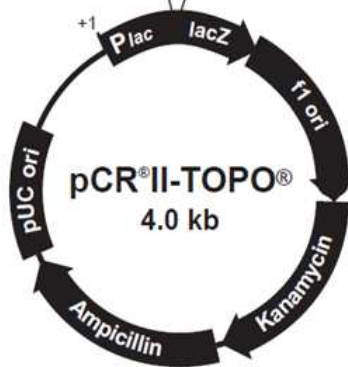
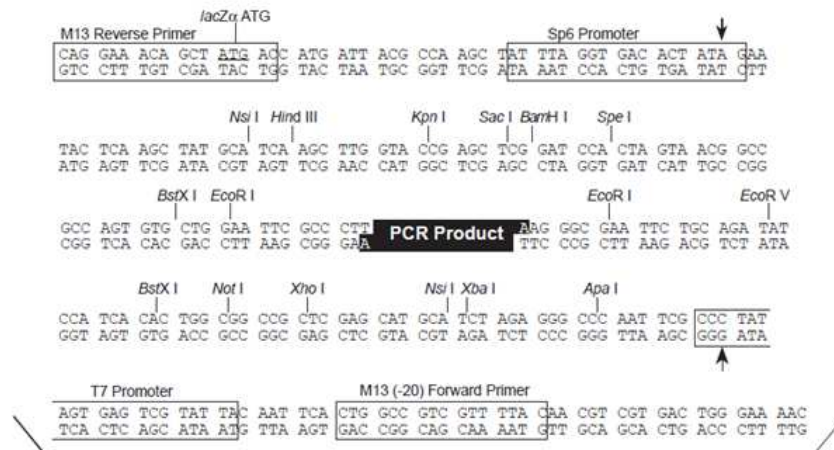
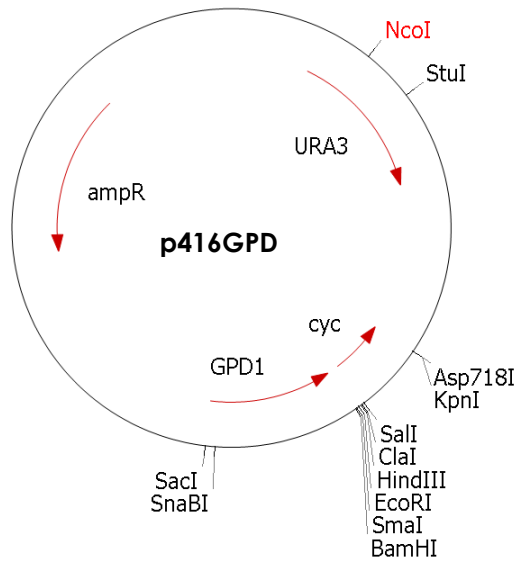
Zhang M, Green MR. 2001. Identification and characterization of yUAP/Sub2p, a yeast homolog of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56. *Genes Dev.* 15(1):30-5.

Zhang X, Schwer B. 1997. Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res.* 25(11):2146-52.

8. Příloha

8.1 Mapy stěžejních plasmidů a vektorů použitých v práci





- kmen LSY06:** *MATalfa PRP22::kanMX4 prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0* (plasmid pRS326-PRP22)
- kmen LSY07:** *MATa PRP22::kanMX4 prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0* (plasmid pRS326-PRP22)
- kmen LSY08:** *MATa PRP22::kanMX4 prp45(1-169)-HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0* (plasmid pRS326-PRP22)