

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Eva Ničová

Funkce proteinu Slu7 v sestřihu pre-mRNA *Saccharomyces cerevisiae*

The function of Slu7 protein in *Saccharomyces cerevisiae* pre-mRNA
splicing

diplomová práce

Školitel:

Doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 04. 05. 2012

Eva Ničová

Poděkování

Děkuji svému školiteli Františku Půtovi za odborné vedení diplomového projektu a za všechny cenné rady a připomínky, které se mi od něho dostaly.

Zvláště děkuji Ondrovi Gahurovi za veškeré konzultace týkající se mnoha laboratorních experimentů a též za připomínky k textům této práce. Děkuji Aničce Valentové za mateřský přístup k členům laboratoře a za mnoho metod, které mě naučila ovládat.

Chtěla bych poděkovat své rodině za všestrannou podporu, kterou mi nejen při studiu na vysoké škole, ale také po celý můj dosavadní život, poskytuje. Vím, že to není samozřejmé, a vážím si toho. Děkuji Martinovi, že je mi oporou.

Obsah

OBSAH	4
SEZNAM ZKRATEK	6
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1. CÍLE PRÁCE	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. SESTŘIH PRE-MRNA U KVASINKY <i>S. CEREVISIAE</i>	10
2.1.1. Sestavení spliceosomu a první transesterifikační reakce	12
2.1.2. Druhý sestřihový krok	13
2.1.3. Alternativní sestřih	14
2.2. PROTEIN SLU7	17
2.2.1. Struktura.....	17
2.2.1.1. Motiv zinc knuckle (ZK)	18
2.2.1.2. Motiv interagující s proteinem Prp18	18
2.2.1.3. NLS - jaderný lokalizační signál a lysin-rich domain u hSlu7	19
2.2.1.4. Motiv RED.....	20
2.2.2. Funkce proteinu Slu7	21
2.2.2.1. Asociace se spliceosomem	21
2.2.2.2. Vazba na 3' SS:	22
2.2.3. hSlu7	23
2.3. PROTEIN PRP22	25
2.4. PROTEIN PRP45	27
3. MATERIÁL A METODY	29
3.1. MATERIÁL.....	29
3.1.1. Seznam použitých přístrojů a aparatur.....	29
3.1.2. Seznam použitých chemikálií.....	30
3.1.3. Přehled použitých enzymů a příslušných pufrů.....	32
3.1.4. Přehled použitých protilátek.....	32
3.1.5. Seznam použitých kitů.....	33
3.1.6. Seznam použitých organismů	33
3.1.7. Seznam použitých a konstruovaných vektorů.....	34
3.1.8. Seznam použitých primerů	35
3.1.9. Standardy velikostí a množství DNA fragmentů a proteinů.....	36
3.1.10. Kultivační média a roztoky	37
3.1.11. Ošetření materiálu a chemikálií proti RNázám	40
3.2. METODY	41
3.2.1. Metody kultivace organismů.....	41
3.2.2. Příprava a výsev glycerolových konzerv <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.2.3. Křížení haploidních kmenů <i>S. cerevisiae</i>	42
3.2.4. Sporulace diploidních kmenů <i>S. cerevisiae</i> , mikromanipulace tetrad a tetradová analýza	42
3.2.5. Transformace <i>S. cerevisiae</i> lithium-acetátovou metodou.....	43
3.2.6. Transformace <i>E. coli</i> elektroporací	45
3.2.7. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> alkalickou metodou	46
3.2.8. Izolace plazmidové DNA z buněk <i>E. coli</i> pomocí NucleoSpin® Plasmid	47
3.2.9. Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).....	47
3.2.10. Amplifikace DNA metodou Colony PCR.....	48

3.2.11. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	48
3.2.12. Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu.....	49
3.2.13. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu.....	50
3.2.14. Ligace DNA v roztoku.....	50
3.2.15. Zaklonování produktů PCR pomocí TOPO TA Cloning® Kit.....	50
3.2.16. Izolace celkové RNA z buněk <i>S. cerevisiae</i>	51
3.2.17. Radioaktivní značení primerů a DNA markeru	51
3.2.18. Primer extension.....	52
3.2.19. Analýza produktů Primer extension pomocí PAGE s následnou vizualizací pomocí techniky Phosphorimaging	53
3.2.20. Příprava proteinových extraktů <i>S. cerevisiae</i>	54
3.2.21. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)	55
3.2.22. Western blot	57
3.2.23. Imunodetekce proteinů na membráně pomocí konjugátu sekundární protilátky s alkalickou fosfatázou	57
4. VÝSLEDKY	59
4.1. PŘÍPRAVA MUTANT <i>SLU7</i> A CHARAKTERIZACE FENOTYPU	59
4.1.1. Příprava plazmidu <i>pEN02 (pRS313-SLU7)</i>	59
4.1.2. Cílená mutagenese plazmidu <i>pEN02</i> - příprava plazmidů <i>pEN06</i> až <i>pEN11</i>	61
4.1.3. Příprava kmene <i>ENY08</i> - kmene s chromozomální delecí genu <i>SLU7</i> (s komplementačním plazmidem <i>pRS326-SLU7</i>)	63
4.1.4. Testování základních vlastností mutant <i>slu7</i> - viabilita.....	65
4.1.5. Testování základních vlastností <i>slu7</i> - teplotní senzitivita.....	66
4.2. TESTOVÁNÍ GENETICKÝCH INTERAKCÍ <i>SLU7</i>	68
4.2.1. Syntetická letalita mutací <i>slu7</i> s mutací <i>prp45(1-169)</i>	68
4.2.1.1. Příprava kmene <i>ENY13 slu7Δ prp45(1-169)</i>	68
4.2.1.2. Testování syntetické letality mutací <i>slu7</i> a <i>prp45(1-169)</i>	72
4.2.2. Syntetická letalita mutací <i>slu7</i> s mutacemi <i>prp22</i>	74
4.2.2.1. Příprava komplementačního plazmidu <i>pRS326-SLU7-PRP22</i>	74
4.2.2.2. Příprava kmene <i>ENY14 (slu7Δ prp22Δ)</i>	76
4.2.2.3. Příprava plazmidů nesoucích mutace v promotoru genu <i>PRP22</i>	78
4.2.2.4. Testování syntetické letality mutací <i>slu7</i> a <i>prp22</i> metodou plasmid shuffling.....	81
4.3. VLIV MUTANT <i>SLU7</i> NA SESTRĚH PRE-MRNA	84
4.3.1. Sestřih fúzních konstruktů genu <i>ACT1</i> - optimální a suboptimální substráty	86
4.3.2. Sestřih pre-mRNA obsahujících v oblasti mezi PB a 3´SS sekundární strukturu.....	91
4.3.3. Sestřih pre-mRNA obsahujících kompetující si 3´SS	93
5. DISKUSE.....	97
5.1. FENOTYP MUTACÍ V MOTIVU RED PROTEINU <i>SLU7</i>	97
5.2. GENETICKÉ INTERAKCE PŘIPRAVENÝCH MUTACÍ.....	98
5.3. <i>SLU7</i> A VLIV NA SESTRĚH PRE-MRNA	101
5.3.1. Výběr 3´SS	101
5.3.2. Vliv mutací motivu RED proteinu <i>Slu7</i> na sestřih optimálních a suboptimálních substrátů	103
5.3.3. Vliv mutací motivu RED proteinu <i>Slu7</i> na sestřih substrátů obsahujících sekundární strukturu v oblasti BP-3´SS.....	105
5.3.4. <i>Slu7p</i> a jeho vliv na výběr kompetujících si 3´SS	105
6. SHRUTÍ	110
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	111
PŘÍLOHY	117

Seznam zkratek

3'SS	3'sestřihové místo
5'SS	5'sestřihové místo
5-FOA	5-fluoroorotová kyselina
ak	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
BBP	branch point binding protein
BP	branch point, bod větvení
BS	branch site, místo větvení
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
LiAc	lithium acetát, lithium acetátový
mRNA	messenger RNA
NLS	jaderný lokalizační signál
nt	nukleotid
OD	optická denzita
ORF	otevřený čtecí rámeček
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pb	pár bází
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RNP	ribonukleoproteinová partikule
SDS	sodium dodecylsulfát
snRNA	malá jaderná ribonukleová kyselina
TAE	tris-acetát-EDTA
TBE	tris-borát-EDTA
TE	tris-EDTA
UV	ultrafialový
wt	wild type, divoký typ
ZK	zinc knuckle

Abstrakt

Alternativní sestřih je jedním z nástrojů regulace genové exprese. Za různých podmínek mohou z jednoho buněčného transkriptu vznikat různé mRNA kódující proteiny s různou funkcí, lokalizací či stabilitou. Lidský protein hSlu7 ovlivňuje alternativní sestřih některých genů prostřednictvím volby alternativních 3'sestřihových míst (3'SS). Ačkoli se původně zdálo, že kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* alternativní sestřih nevyužívají, v poslední době se množí důkazy, že tomu tak není. Rozhodli jsme se proto blíže charakterizovat funkci kvasinkového Slu7, který se účastní druhého kroku sestřihu pre-mRNA a je úzce spjatý s volbou 3'SS. Pozornost jsme zaměřili na vysoce sekvenčně konzervovaný, doposud nepopsaný motiv v esenciální části proteinu, nazvaný motiv RED. Mutace v motivu způsobují defekt druhého kroku sestřihu některých substrátů a ovlivňují poměr využití alternativních 3'SS některých sestřihových konstruktů. Výsledky pokusů ukazují na roli motivu ve výběru především distálních 3'SS. Genetické interakce mutací *slu7* s alelami genů *PRP45* a *PRP22* rozšiřují spletitou interakční síť sestřihových faktorů a naznačují možnou roli Slu7p ve vazbě Prp22p na spliceosom.

Abstract

Alternative splicing is one of the mechanisms how to regulate gene expression. Under different conditions, different mRNAs encoding proteins with different function, localization or stability can be made from one cellular transcript. The human hSlu7 protein affects the alternative splicing of some genes through alternative 3'splice site (3'SS) selection. Although it was thought that alternative splicing is absent from *Saccharomyces cerevisiae*, recent results argue against such conclusion. We therefore decided to characterize the function of the yeast Slu7 protein, which participates in the second step of splicing and is closely associated with the 3'SS selection. We focused on a highly conserved uncharacterized motif in the essential part of the Slu7 protein named the RED motif. Mutations in this motif caused second step splicing defects with some substrates and altered the alternative 3'SS usage ratio of some splicing constructs. Our results implicate a role for the RED motif in selecting proper 3'splice sites, especially the distal ones. Genetic interactions of *slu7* mutations with *PRP22* and *PRP45* mutant alleles add to the intricate interaction network of splicing factors and suggest a possible role of Slu7p in facilitating the Prp22p association with the spliceosome.

1. Cíle práce

Popsat roli konzervovaného motivu RED proteinu Slu7 v sestřihu pre-mRNA kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

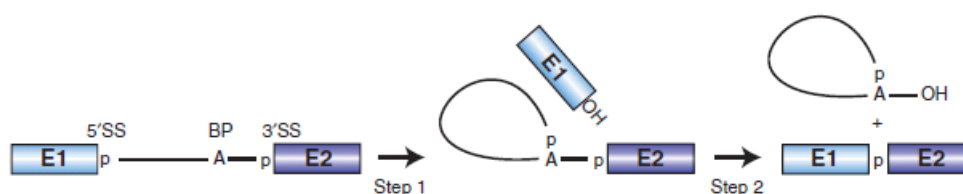
2. Literární přehled

2.1. Sestřih pre-mRNA u kvasinky *S. cerevisiae*

Některé buněčné transkripty eukaryotních organismů obsahují kromě exonů – oblastí, které budou následně sloužit jako kódující sekvence pro syntézu proteinů – také introny – sekvence nekódující, které jsou před translokací transkriptu do cytoplazmy odstraněny. Takové odstranění intronů následované spojením exonů je označováno pojmem sestřih pre-mRNA a probíhá v jádře v mnohokomponentovém komplexu proteinů a malých jaderných RNA (snRNA), v takzvaném sestřihovém komplexu – spliceosomu. Základní složkou spliceosomu je pět malých jaderných RNA označovaných snRNA U1, U2, U4, U5 a U6, které jsou asociovány s proteiny a tvoří tak ribonukleoproteinové partikule zvané snRNP částice. Kromě proteinů, které jsou integrální součástí těchto snRNP partikulí, se sestřihu účastní i další, non-snRNP, proteiny. Celý spliceosom je vysoce dynamický komplex, jehož složení se v průběhu sestřihu pre-mRNA mění. Některé RNA-RNA, RNA-proteinové i protein-proteinové interakce zanikají, vznikají nové, některé komponenty spliceosom opouštějí, jiné s ním v různých fázích sestřihu asociují. Dochází tak ke změnám konformace celého komplexu, které umožňují efektivní sestřih konkrétních pre-mRNA (shrnutí ve Wahl et al., 2009).

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je druhem, který obsahuje velmi malé množství genů nesoucích intron. Z celkového počtu asi 6000 genů obsahují intron necelé tři stovky z nich. V naprosté většině se navíc narozdíl od vyšších eukaryot jedná o přítomnost pouze jednoho intronu, ležícího mezi dvěma exony. Hranice mezi intronem a prvním exonem se nazývá 5'sestřihové místo (5'SS), hranice intronu a druhého exonu je označována pojmem 3'sestřihové místo (3'SS). Právě v těchto místech pak dochází k sestřihu pre-mRNA. Sekvence intronu v bezprostředním okolí obou míst je vysoce konzervovaná, těsně za 5'SS se nejčastěji vyskytuje hexanukleotid GUAUGU, poslední dinukleotid před 3'SS je vždy AG (Bon et al., 2003; Schwartz et al., 2008; shrnutí v Neuvéglise et al., 2011). Podstatou sestřihu pre-mRNA jsou dvě po sobě následující transesterifikační reakce. V první dochází k nukleofilnímu ataku fosfodiesterové vazby 5'sestřihového místa. Činitelem, který tento atak způsobuje, je 2'OH skupina invariantního adenosinu v jisté oblasti intronu,

keré se říká místo větvení (branch site – BS), samotný adenosin je označován termínem bod větvení (branch point – BP). Touto reakcí vzniká fosfodiesterová vazba mezi adenosinem v bodu větvení a počátečním nukleotidem intronu, vytvářející se struktura lasovitého tvaru se nazývá lariát-intermediát. Současně vzniká též volný exon1 s volnou -OH skupinou na 3' konci. Tato hydroxylová skupina pak při druhé transesterifikační reakci atakuje fosfodiesterovou vazbu v 3'sestřihovém místě, dochází k ligaci exonů a k uvolnění lasovitého intronu (shrnuto ve Will a Lührmann, 2011).



Obrázek 1: Mechanismus sestřihu pre-mRNA. Zobrazena je mRNA se dvěma exony (E1 a E2), mezi nimiž se nachází intron. V prvním kroku sestřihu dochází k nukleofilnímu ataku fosfodiesterové vazby v 5'sestřihovém místě (5'SS) pomocí konzervovaného adenosinu (bod větvení – BP). Vzniká volný exon1 a struktura lariát-intermediát (obsahující intron a exon2). Ve druhém kroku sestřihu atakuje volný exon1 fosfodiesterovou vazbu v 3'sestřihovém místě (3'SS), dochází k ligaci obou exonů a k uvolnění intronu v podobě lasovité struktury. (Převzato z Will a Lührmann, 2011.)

Ač jsou obě reakce chemicky nezávislé na dalších komponentách a jejich průběh nevyžaduje žádné dodání energie, pro správné vykonání sestřihu je potřeba obrovské množství komponent poskytovaných spliceosomem. Je nezbytné správně identifikovat obě sestřihová místa a bod větvení a ve správné časové souslednosti je vůči sobě vzájemně prostorově uspořádat, aby mohlo dojít k vykonání obou reakcí. Nutno podotknout, že sekvence exonů, délka intronů či vzdálenost bodu větvení od sestřihových míst se může u různých transkriptů výrazně lišit, i přesto musí být všechny správně sestřiženy (Spingola et al., 1999). V různých fázích sestřihu dochází k přeuspořádání interakcí pro zaujetí nejvhodnější konformace pro daný krok. Proteiny zodpovědné za tyto konformační změny komplexu náleží do rodiny RNA helikáz a za spotřeby energie ve formě ATP rozvíjejí RNA-RNA nebo RNA-proteinové interakce (shrnuto ve Staley a Guthrie, 1998).

2.1.1. Sestavení spliceosomu a první transesterifikační reakce

Před tím, než je umožněn průběh samotných sestřihových reakcí, dochází k sestavení spliceosomu. Potvrzeno bylo sestavení *de novo* na konkrétní pre-mRNA, která má být sestřižena, existuje však i předpoklad, že může docházet k vazbě pre-mRNA i již předpřipraveným spliceosomem (Stevens et al., 2002). Prvním krokem při sestavování spliceosomu je asociace pre-mRNA s U1 snRNP – na základě komplementarity sekvencí dochází k párování bází mezi oblastí 5' sestřihového místa a 5' částí U1 snRNA. Faktorem rozpoznávajícím u *S. cerevisiae* oblast místa větvení je branch point binding protein (BBP), který s pre-mRNA asociuje ve formě heterodimeru s proteinem Mud2p. BBP se váže do oblasti místa větvení na vysoce konzervovanou sekvenci UACUAAC (bod větvení je podtržen), vzniká tak uspořádání s názvem commitment complex neboli komplex E (Rutz a Séraphin, 1999). Vzniklý komplex interaguje s U2 snRNP – heterodimer BBP/Mud2p je z oblasti místa větvení v ATP-dependentním kroku vytěsněn helikázou Sub2p (Wang et al., 2008) a báze z této oblasti pre-mRNA vstupují do interakce s bázemi U2 snRNA – vytváří se helix, v jehož střední části ze struktury vyčnívá nepárující adenosin, budoucí bod větvení (Query et al., 1994). S oblastí bodu větvení též interagují proteiny asociované s U2 snRNP vytvářející dva subkomplexy – SF3a a SF3b. Komplex v této fázi se nazývá prespliceosom či komplex A. S komplexem dále asociuje již předsestavená tripartikule U4/U6.U5 tri-snRNP, čímž vzniká komplex B. Ten obsahuje všech pět snRNPs, nicméně stále se nejedná o katalyticky funkční spliceosom (shrnuto ve Will a Lührmann, 2011).

Aby byl komplex aktivován, musí dojít k rozsáhlému konformačnímu přeuspořádání přítomných komponent. Tyto změny vyžadují energii ve formě ATP. Interakce U1 snRNA s oblastí 5' sestřihového místa je za pomoci helikázy Prp28p přerušena a U1 snRNP částice je z komplexu vytěsněna (Staley a Guthrie, 1999). Původní kontakty mezi U4 a U6 snRNA jsou přerušeny pomocí helikázy Brr2 (Ragunathan a Guthrie, 1998), čímž je umožněno párování bází mezi U6 a U2 snRNA. U6 snRNA současně interaguje též s oblastí 5' sestřihového místa, se kterou původně interagovala U1 snRNA. Stejně jako U1 snRNP, také U4 snRNP komplex opouští. Pro aktivaci spliceosomu pro první transesterifikaci je též potřeba helikáza Prp2, jejíž aktivita způsobí vytěsnění proteinových subkomplexů SF3a a SF3b z oblasti místa větvení. Výsledkem této události je pravděpodobně uvolnění reaktivní

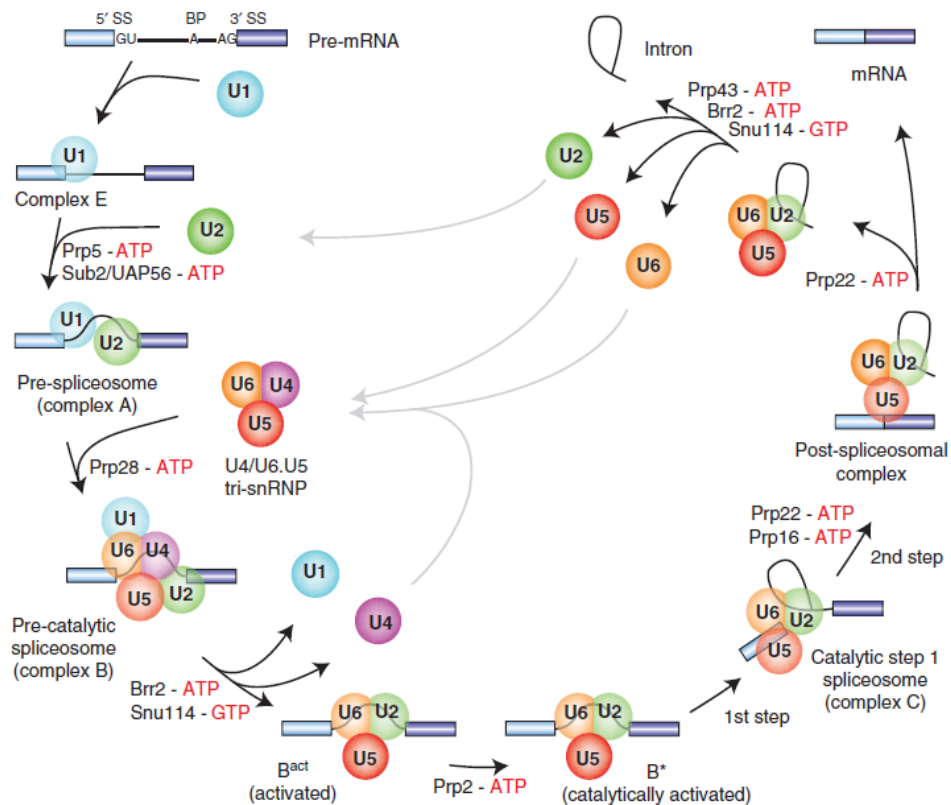
hydroxylové skupiny adenosinu bodu větvení pro následný nukleofilní atak 5'sestřihového místa (Warkocki et al., 2009; Lardelli et al., 2010). Se spliceosomem též asociuje Prp19-asociovaný komplex, tzv. NTC, který přináší další proteinové komponenty potřebné pro stabilizaci interakcí U5 a U6 snRNAs s pre-mRNA (Chen et al., 2002; Chan a Cheng, 2005). Sestřihový komplex vzniklý v této fázi se nazývá aktivovaný spliceosom či komplex B* a je připraven zprostředkovat první transesterifikační reakci.

Přesnou determinaci fosfodiesterové vazby, která má být v prvním kroku štěpena, zajišťuje párování bází mezi oblastí 5'SS a U6 snRNA – tato interakce je pro specifitu prvního kroku sestřihu klíčová. Také kontakt mezi U2 snRNA a místem větvení společně s extenzivní interakcí U2 snRNA s U6 snRNA přispívá ke vzniku struktury, která umožní správné nasměrování -OH skupiny adeninu z bodu větvení vůči vazbě v 5'sestřihovém místě (shrnuto ve Wahl et al., 2009).

2.1.2. Druhý sestřihový krok

Poté, co proběhne první transesterifikační reakce, dochází opět k remodelaci komplexu. Produkty prvního kroku sestřihu – volný exon1 a lariát-intermediát – musí být uspořádány tak, aby mohlo dojít ke druhé transesterifikaci. Jedním z klíčových hráčů zprostředkujících tuto konformační změnu je non-snRNP protein Prp16 (Schwer a Guthrie, 1992). Tato ATP dependentní helikáza uvolňuje z komplexu proteiny Cwc25 a Yju2, účastníky prvního kroku sestřihu. Disociace uvedených proteinů pravděpodobně umožňuje interakci spliceosomu s dalšími proteiny potřebnými pro druhý sestřihový krok – Slu7, Prp18 a Prp22. Recentní výsledky odhalily roli Prp16p také v prvním kroku sestřihu. Tato funkce Prp16p je nezávislá na přítomnosti ATP a týká se stabilizace Cwc25p při sestřihu suboptimálních substrátů (Tseng et al., 2011). V ATP dependentní fázi funkce Prp16p s komplexem asociuje i další non-snRNP protein – Prp17 (Jones et al., 1995). Oblast 3'sestřihového místa se dostává do katalytického centra spliceosomu. Ke správnému vzájemnému uspořádání obou exonů v této fázi napomáhá vysoce konzervovaná smyčka1 U5 snRNA, která interaguje s bázemi exonů v okolí obou sestřihových míst. Vzhledem k tomu, že sekvence exonů může být u různých transkriptů různá, párování s invariantními bázemi U5 snRNA je často velmi slabé. Ke stabilizaci těchto kontaktů slouží protein Prp8, který je integrální součástí snRNP partikule, a také non-snRNP protein Prp18 (Aronová et al., 2007). Po proběhnutí

druhé transesterifikační reakce je sestřihový komplex dále remodelován – helikáza Prp22 rozvolňuje kontakty mezi U5 snRNA a vzniklou mRNA, a umožňuje tak disociaci maturované mRNA ze spliceosomu (Company et al., 1991; Schwer, 2008). Další z helikáz – Prp43 následně uvolňuje ze spliceosomu vystřižený lariát-intron (Arenas a Abelson, 1997; Martin et al., 2002), následuje recyklace integrálních komponent komplexu pro využití v sestřihu další molekuly pre-mRNA. Průběh celého spliceosomálního cyklu ilustruje Obrázek 2.



Obrázek 2: Sestřih pre-mRNA a kompozice spliceosomu. Zobrazeny jsou jednotlivé fáze kompozice sestřihového komplexu v průběhu sestřihu pre-mRNA – od počátku jeho sestavování až po jeho rozpad a uvolnění sestřihových produktů (viz text 2.1.1 a 2.1.2). Základními složkami, které komplex v dané fázi tvoří, jsou jednotlivé snRNP (barevná kolečka U1 až U6), vyznačeny jsou též proteiny účastnící se remodelace komplexu. (Převzato z Will a Lührmann, 2011.)

2.1.3. Alternativní sestřih

U většiny eukaryotních organismů dochází k situacím, kdy je jeden genový transkript za určitých podmínek sestřihován různými způsoby. V důsledku tohoto alternativního sestřihu vznikají různé mRNA a jejich následnou translací jsou vytvářeny různé izoformy proteinů. Tyto proteiny se mohou lišit svou funkcí, lokalizací, stabilitou, aj. V rámci alternativního sestřihu dochází např. k vystřižení

některého z exonů či naopak k retenci intronu, uplatňuje se také využití alternativních 5' a 3' sestřihových míst. Alternativní sestřih je využíván v různých vývojových stádiích organismů, jako odpověď na měnící se podmínky prostředí, existuje tkáňově specifický alternativní sestřih (shrnutí v Chen a Manley, 2009).

Dlouhou dobu byli vědci přesvědčeni, že kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* alternativní sestřih nevyužívá. V posledních několika letech se však ukazuje, že i tento jednobuněčný organismus je schopen v odpověď na různé životní podmínky měnit genovou expresi nejen na úrovni transkripce, ale v některých případech též na úrovni sestřihu pre-mRNA. Nejčastější formou alternativního sestřihu u *S. cerevisiae* je volba mezi vystřížením či retencí intronu určitého jednointronového transkriptu. Výsledkem retence intronu bývá vznik nefunkční mRNA, jež je opravnými mechanismy buňky degradována, není tudíž umožněn vznik příslušného proteinu. Recentní výsledky nicméně odhalily, že tato kvasinka využívá též způsoby alternativního sestřihu, jejichž zásluhou vzniká několik izoforem konkrétního proteinu (shrnutí v Johnson a Vilardell, 2012).

Důkaz, že *S. cerevisiae* mění patern sestřihu mnoha transkriptů v závislosti na vnějších podmínkách přinesla práce z roku 2007 (Pleiss et al., 2007). Při nedostatečném přísunu aminokyselin dochází k ovlivnění sestřihu intron-obsahujících ribozomálních transkriptů – efektivita sestřihu se snižuje. Pokud je buňka vystavena jinému typu stresu, např. zvýšenému množství etanolu v médiu, dochází k regulaci sestřihu pre-mRNA dalších genů – efektivita sestřihu některých pre-mRNA se sníží, jiných naopak zvýší (Pleiss et al., 2007). Objev dalších genových transkriptů, které jsou při exponenciálním růstu buněk na bohatém médiu sestřihovány neefektivně, značí existenci dalších biologických procesů využívajících možnosti alternativního sestřihu pre-mRNA (Juneau et al., 2007).

Volba mezi sestřížením, či nesestřížením genového transkriptu je jedním z mechanismů regulace exprese třinácti intron-obsahujících genů specifických pro meiózu. Za podmínek navozujících sporulaci se výrazně zvýší efektivita sestřihu příslušných transkriptů, čímž dojde ke zvýšení hladiny funkčních mRNA, jež mohou být následně úspěšně translatovány (Juneau et al., 2007).

Dalším genem podstupujícím alternativní sestřih je *SUS1*, který obsahuje dva introny. Jeden z intronů nese nekanonické oblasti 5'SS a bodu větvení, což činí jeho sestřih méně efektivním než sestřih druhého, kanonického, intronu. Za určitých podmínek se mění poměr sestřihových variant transkriptu, což zřejmě ovlivňuje

deubikvitinylaci histonu H2B a též transport mRNA – procesy, v nichž se protein Sus1 uplatňuje. Sestřihová varianta se zachovaným intronem1 je schopna kódovat krátký protein, jeho biologický význam ovšem zatím není znám (Hossain et al., 2011; Cuenca-Bono et al., 2011).

Sestřih svého vlastního transkriptu regulují proteiny Rpl30 a Yra1. Pokud je ribozomální protein Rpl30 v nadbytku, váže se na svůj transkript a blokuje jeho sestřih. Transkript je následně degradován cytoplazmatickou dráhou nonsense-mediated decay (Vilardell a Warner, 1994; Vilardell et al., 2000). Protein Yra1 uplatňující se v jaderném exportu mRNA se také váže na svůj transkript a způsobuje export této nesestřižené pre-mRNA do cytoplazmy (Preker et al., 2002; Dong et al., 2007).

O alternativním sestřihu, při němž vznikají mRNA kódující odlišné izofomy proteinů s různou funkcí či lokalizací, lze hovořit v případě transkriptů genů *PTC7* a *SRC1*. Pre-mRNA genu *PTC7* obsahuje specifický intron, jehož počet nukleotidů je dělitelný třemi a v jehož sekvenci není žádný nesmyslný triplet (Juneau et al., 2007). Tento specifický rys umožňuje úspěšnou translaci jak sestřiženého, tak nesestřiženého transkriptu, což vede ke vzniku dvou izoforem proteinu Ptc7 s odlišnou funkcí i lokalizací. Protein kódovaný sestřiženou mRNA lokalizuje do mitochondrií a jeho exprese je závislá na typu zdroje uhlíku. Protein kódovaný nesestřiženou formou mRNA obsahuje navíc transmembránovou doménu a lokalizuje do jaderné membrány (Juneau et al., 2009).

Sestřih pre-mRNA genu *SRC1* je u *S. cerevisiae* zatím jediným dosud známým případem, kdy dochází k využití různých alternativních sestřihových míst. Intron tohoto genu nese dvě alternativními 5'sestřihová místa. Sestřih pre-mRNA v distálním, více konzervovaném 5'sestřihovém místě vede k translaci celého proteinu, který pak prochází dvakrát jadernou membránou. Využití proximálního, méně konzervovaného, 5'sestřihového místa způsobuje změnu otevřeného čtecího rámce v 3' koncové oblasti mRNA, navíc přerušeno předčasným nesmyslným tripletem, v jehož důsledku vzniká kratší varianta proteinu procházející jadernou membránou pouze jednou. Aktivita kratší formy proteinu ve srovnání s delší formou je mnohem nižší (Davis et al., 2000; Grund et al., 2008).

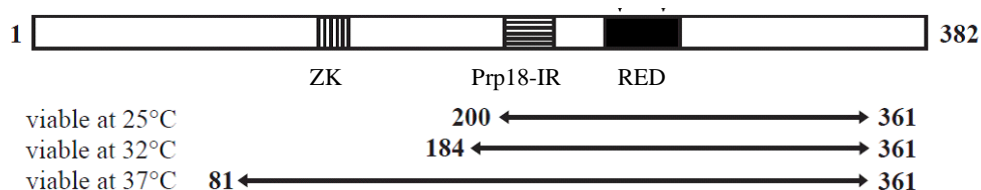
2.2. Protein Slu7

2.2.1. Struktura

Protein Slu7 je 382 aminokyselin dlouhý polypeptid kódovaný genem *SLU7* (Frank a Guthrie, 1992). Tento gen byl poprvé identifikován při hledání mutací, které interferují s mutací ve vysoce konzervované smyčce1 U5 snRNA. Odtud také pochází název SLU – synthetically lethal with U5 snRNA – synteticky letální s mutací v U5 snRNA. Nalezená alela *slu7-1* způsobuje citlivost buněk jak ke zvýšené (37 °C), tak ke snížené (18 °C) teplotě (Frank et al., 1992).

Gen *SLU7* je pro buňky *S. cerevisiae* esenciální (Frank a Guthrie, 1992), nicméně 199 ak z N-konce a 21 ak z C-konce sekvence proteinu je postradatelných. Delece až 80 N-terminálních aminokyselin nevykazuje žádný růstový fenotyp, delece ak 124 až 199 z N-konce způsobují rostoucí teplotně senzitivní fenotyp, delece 221 ak je letální. Zkrácení proteinu o 21 C-koncových ak nemá žádný vliv na růst buněk, nicméně delece 47 ak je letální (Zhang a Schwer, 1997; viz Obrázek 3).

Slu7p obsahuje do současné doby dva popsané motivy: zinc knuckle (ZK) a region interagující s proteinem Prp18 (prp18IR). U lidského homologa, hSlu7, byl dále charakterizován jaderný lokalizační signál. Předmětem této diplomové práce je další, zatím dostatečně nepopsaný, sekvenčně konzervovaný motiv v centrální části proteinu. Na základě tří konzervovaných aminokyselin je tento motiv dále označován jako motiv RED (viz Obrázek 3).



Obrázek 3: Schéma proteinu Slu7. Vyznačen je motiv zinc knuckle (ZK), oblast interagující s proteinem Prp18 (Prp18-IR), černě motiv zájmu této práce, dále označovaný jako motiv RED. Šipky vymezují oblast proteinu nezbytnou pro růst buněk v uvedených teplotách. (Převzato ze Zhang a Schwer, 1997 a Gahura et al., 2009.)

2.2.1.1. Motiv zinc knuckle (ZK)

Zinc knuckle patří do skupiny motivů zvané zinc finger, které pomocí cysteinových a histidinových aminokyselinových zbytků koordinují jeden či více atomů zinku. Proteiny s motivem zinc finger často váží nukleové kyseliny či se účastní protein-proteinových interakcí. Motiv zinc knuckle je tvořen dvěma krátkými beta listy spojenými obrátkou (knuckle), následuje krátký helix či smyčka. Konsensus sekvence zinc knuckle je $CX_2CX_4HX_4C$ (Krishna et al., 2003).

Motiv se v případě proteinu Slu7 nachází v jeho N-koncové oblasti (ak 122-135; Frank a Guthrie, 1992). Narušení motivu zavedením mutace *slu7-CCSS* (aminokyselinová záměna cysteinů 122 a 125 za seriny) nevykazuje vzhledem k wt verzi *SLU7* žádný růstový fenotyp (Frank a Guthrie, 1992), což koresponduje s faktem, že se celý motiv nachází v N-koncové, neesenciální části proteinu (Zhang a Schwer, 1997).

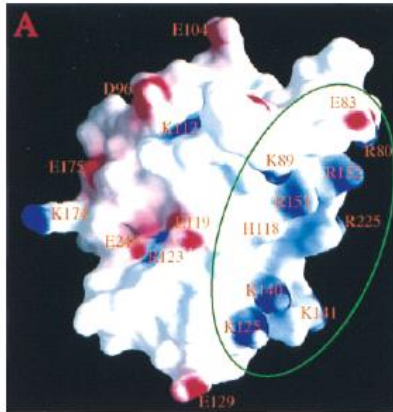
Bylo prokázáno, že lidský homolog Slu7 pomocí svého zinc knuckle skutečně zinek váže, mutace motivu (CCHC za SSGS) afinitu k zinku výrazně snižuje. Autoři studie výpočtem určili stechiometrii interakce 1 : 1, tj. jedna molekula proteinu váže jeden atom zinku (Shomron et al., 2004).

Zinc knuckle se v případě kvasinkového Slu7p zřejmě uplatňuje v asociaci proteinu se spliceosomem (viz 2.2.2.1).

2.2.1.2. Motiv interagující s proteinem Prp18

Další charakterizovanou oblastí proteinu Slu7 je region interagující s proteinem Prp18 (Prp18IR). Dvouhybridní analýzou byla tato oblast lokalizována do úseku ak 200-224 (Zhang a Schwer, 1997), mutační analýzou byla poté oblast upřesněna na ak 215-224 nesoucí sekvenci $^{215}EIELMKLELY^{224}$ (James et al., 2002).

Struktura velké části proteinu Prp18 je známa. Předpokládá se, že jednou částí svého povrchu Prp18p interaguje se Slu7p, zatímco povrch na opačné straně proteinu slouží k interakci s U5 snRNA. Helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$ proteinu Prp18 tvoří kladně nabitý povrch, který pravděpodobně interaguje se záporně nabitou oblastí Slu7p $^{215}EIELMKLELY^{224}$. Zajímavé je, že sekvence Slu7p ani Prp18p v těchto oblastech nejsou výrazně konzervované, nicméně náboj zůstává vždy zachován (Jiang et al., 1999).



Obrázek 4: Struktura Prp18p a oblast interagující se Slu7. Obrázek zachycuje strukturu velké části proteinu Prp18 (není přítomno pouze 79 N-koncových ak). Zeleným oválem je vyznačena predikovaná oblast interakce s proteinem Slu7. Aminokyselinové zbytky jsou označeny jednopísmennými názvy a číslem značícím jejich pozici v sekvenci, pozitivně nabitě zbytky mají modrou barvu, negativně nabitě barvu červenou. Povrch predikované oblasti interakce se Slu7p je pozitivně nabitý (Převzato z Jiang et al., 1999).

2.2.1.3. NLS - jaderný lokalizační signál a lysin-rich domain u hSlu7

Bioinformatická analýza sekvence lidského homologa Slu7, hSlu7, odhalila další motivy – bipartitní jaderný lokalizační signál (NLS) a oblast bohatou na aminokyselinové zbytky lysinu (lysine-rich domain). Zinc knuckle je v případě hSlu7 lokalizován uvnitř NLS, což představuje unikátní situaci. Protein hSlu7 je lokalizován v jádře v oblastech zvaných speckles, kde kolokalizuje s snRNP částicemi, vykazuje též difúzní signál v nukleoplazmě. V jádru ani v cytoplazmě přítomen není. Mutace (dokonce i jednoaminokyselinová záměna) bipartitního NLS způsobují akumulaci proteinu v cytoplazmě, což podporuje data získaná sekvenční analýzou. Akumulaci v cytoplazmě způsobují také mutace oblasti bazických ak nacházející se za predikovaným NLS či delece oblasti bohaté na lysin. Zajímavé je, že též mutace v zinc knuckle, který se sekvenčně překrývá s NLS, způsobují kumulaci proteinu v cytoplazmě, a schopnost vazby zinku zde hraje určující roli. (Shomron et al., 2004). Přítomnost NLS u Slu7 *S. cerevisiae* v literatuře popsána nebyla, nicméně příslušné aminokyseliny oblasti NLS jsou relativně dobře konzervovány, což lze usoudit z porovnání sekvencí obou proteinů (viz Obrázek 5). Jaderná lokalizace Slu7p byla potvrzena (Huh et al., 2003).

```

hSlu7 116 RKGACENCGAMTHKKKDCFERPRRVGAKFTGTN--IAPDEHVQPQLMFDYDGKRDRWNGYNP 175
ySLU7 118 SLSFCRNCGEAGHKEKDCMEKPRKMQLVPLNSQKNNGTVLVRATDDDWDSRKDRWYGYSG 179
      . * . ***      ** : *** : * : * : :      . . . *      . :      * : * : : * * * * .

```

Obrázek 5: Porovnání sekvence oblasti jaderného lokalizačního signálu lidského proteinu hSlu7 a Slu7 *S. cerevisiae* pomocí bioinformatického nástroje ClustalW2. Zobrazena je sekvence proteinu hSlu7 v oblasti ak 116-175 a jí odpovídající sekvence Slu7 v oblasti ak 118-179. Aminokyseliny zřejmě příslušející jadernému lokalizačnímu signálu (NLS) jsou podtrženy, sekvence zinc knuckle je označena modře. Konzervovanost aminokyseliny na příslušné pozici označují symboly * (shoda) a dvojtečka a tečka (konzervovanost slabší).

2.2.1.4. Motiv RED

Jedna z nejkonzervovanějších oblastí Slu7p se nachází v esenciální části proteinu downstream od Prp18-interakční oblasti, v úseku mezi aminokyselinami 245 a 277. O této oblasti se v literatuře nevyskytuje žádná zmínka až do roku 2009, kdy naše laboratoř publikovala výsledky týkající se genetických interakcí alely *prp45(1-169)* kódující zkrácenou verzi proteinu Prp45 (Gahura et al., 2009; viz 2.4). Při systematickém hledání mutací synteticky letálních *prp45(1-169)* byly nalezeny dvě mutace v genu *SLU7* – *slu7(K252E)* a *slu7(P268L)*, obě spadající do této konzervované oblasti. Prolin na pozici 268 je 100% konzervovaný – nachází se u všech dalších známých eukaryotních homologů Slu7 (viz Obrázek 6).

Homo	264	NL R I R E D IAK Y L R NLDPNSAY Y D P K T R A M R E N P	296
Mus	264	NL R I R E D IAK Y L R NLDPNSAY Y D P K T R A M R E N P	296
Xenopus	237	NL R I R E D TAK Y L R NLNLNSAY Y D P K T R A M R E N P	269
Danio	249	NL R I R E D IAK Y L R NLDPNSAY Y D P K T R A M R E N P	281
Drosophila	237	NL R I R E D TAK Y L R NLDPNSAY Y D P K T R S M R D N P	269
Oryza	237	NL R I R E D TAK Y L L NL D VNSAY Y D P K T R S M R E D P	269
Dictyostelium	229	NL R I R E D TAK Y L N L D VNSAF Y E P K S R S M R D N P	261
Sch_pombe	220	SL R M R E D VVA Y L R -ADNKNLQ Y E P K S R S M R D E T	251
Sacch_cere	245	ST R L R E D K A A Y L N D I N S T E S N Y D P K S R L Y K T E T	277
		. * : *** . ** : .. * : *** : : .	

Obrázek 6: Porovnání sekvencí oblasti předpokládaného motivu RED mezi jednotlivými homology Slu7 u různých organismů – *Homo sapiens* (NP_006416.3), *Mus musculus* (NP_945174.1), *Xenopus tropicalis* (AAI60476), *Danio rerio* (NP_001007368.1), *Drosophila melanogaster* (NP_651659.2), *Oryza sativa* (NP_001060905), *Dictyostelium discoideum* (XP_640489.1), *Schizosaccharomyces pombe* (NP_596034.1), *Saccharomyces cerevisiae* (AAS56027). Alignment byl vytvořen pomocí bioinformatického nástroje ClustalW2. Zobrazena je sekvence proteinu v oblasti ak uvedených čísla. Konzervovanost aminokyseliny na příslušné pozici označují symboly * (shoda) a : a . (konzervovanost slabší). Lysin na pozici 252 a prolin na pozici 268, jejichž záměny za kyselinu glutamovou, respektive leucin, způsobují u *S. cerevisiae* v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* letalitu, jsou podtrženy.

Nalezené mutace *slu7* způsobují při sestřihu substrátů suboptimálních pro druhý sestřihový krok snížení efektivity tohoto kroku vzhledem k wt buňkám (Gahura et al., 2009; V. Munzarová nepublikované výsledky). Přesné sekvenční, strukturální či funkční vymezení oblasti zatím není známo. Cílem této diplomové práce bylo alespoň částečně roli této části proteinu Slu7, dále označované jako motiv RED, osvětlit.

2.2.2. Funkce proteinu Slu7

Protein Slu7 se účastní druhého kroku sestřihu (Frank et al., 1992). Deplece Slu7p pomocí polyklonální protilátky způsobuje při *in vitro* sestřihu aktinové mRNA akumulaci exonu1 a lariát-intermediátu – tedy hromadění produktů prvního kroku sestřihu (Ansari a Schwer, 1995; Jones et al., 1995). Také *in vivo* i *in vitro* sestřih aktinového intronu u termosenzitivní mutanty *slu7-1* vykazuje akumulaci produktů prvního kroku sestřihu, a to jak při permissivní (25 °C), tak při nepermissivní (37 °C) teplotě (Frank et al., 1992).

Slu7p je *in vitro* postradatelný pro sestřih pre-mRNA vykazujících dostatečně krátkou vzdálenost mezi bodem větvení a 3'SS. Práce z roku 1996 (Brys a Schwer, 1996) uvádí, že Slu7p je třeba pro sestřih substrátů se vzdáleností BP-3'SS větší než 12 nt, při vzdálenosti 14 nt dochází k částečnému bloku druhého sestřihového kroku – mRNA vzniká v omezeném množství, v případě větší vzdálenosti BP-3'SS již téměř žádná maturovaná mRNA nevzniká. Obdobné vlastnosti vykazují taktéž proteiny Prp18 a Prp22, jejichž přítomnost je *in vitro* limitující pro sestřih transkriptů se vzdáleností BP-3'SS delší než 12 nt (Zhang a Schwer, 1997), respektive 21 nt (Schwer a Gross, 1998).

2.2.2.1. Asociace se spliceosomem

Slu7p není integrální součástí žádné z snRNP částic, je proto označován jako non-snRNP protein. Vstupuje do spliceosomu před proběhnutím druhé transesterifikační reakce. Před vykonáním ATP-dependentní funkce helikázy Prp16 koprecipituje s produkty první transesterifikační reakce, poté s mRNA a lariát-intronem. Slu7p se váže na spliceosom i v případě sestřihu substrátů, pro něž není z důvodu malé vzdálenosti BP-3'SS limitujícím faktorem. Asociace Slu7p se sestřihovým komplexem nevyžaduje přítomnost 3'sestřihového místa, ačkoli jeho vazba do této oblasti byla potvrzena crosslinking studií (viz níže). Předpokládá se tedy, že Slu7p se do spliceosomu váže díky protein-proteinovým interakcím (Brys a Schwer 1996).

Jakým způsobem je Slu7p rekrutován do spliceosomu, není jasné. Dosud známé informace ukazují na možnou roli helikázy Brr2p, která je v komplexu přítomna po celou dobu sestřihu a s níž Slu7p interaguje ve dvouhybridním testu. Slu7-interakční oblast lokalizuje do C-terminální poloviny Brr2p. Dalšími

interakčními partnery umožňujícími vazbu Slu7p do spliceosomu, by mohly být komponenty U5 snRNP (van Nues a Beggs, 2001).

Asociace Slu7 se spliceosomem je s největší pravděpodobností posílena vazbou na protein Prp18. Ten asociuje se sestřihovým komplexem následně po Slu7p a jeho přítomnost je nezbytná pouze ve vyšších teplotách (což koreluje s faktem, že PRP18 na rozdíl od *SLU7* není esenciálním genem; Horowitz a Abelson, 1993) Fyzická interakce obou proteinů byla prokázána dvouhybridní analýzou (viz 2.2.1.2). N-koncově zkrácené verze proteinu Slu7 ($\Delta 80$ až $\Delta 199$ ak) vykazují při *in vitro* sestřihu závislost na přítomnosti Prp18p, ačkoli nadprodukce delší z nich (*slu7* $\Delta 80$) umožní potřebu Prp18p překlenout. Závislost sestřihu pre-mRNA na Prp18p vykazují také buněčné extrakty obsahující proteiny Slu7 s poškozeným motivem zinc knuckle (jednoaminokyselinové záměny C122A, H130A, nebo C135A). Ztráta N-koncové části Slu7p obsahující motiv zinc knuckle tak zřejmě způsobuje závislost tohoto proteinu na Prp18p. Nicméně mutace *slu7*, které ruší interakci Slu7p a Prp18p identifikovanou dvouhybridním testem na *in vitro* sestřih pre-mRNA vliv nemají. Mutace zavedené současně do oblasti zinc knuckle i Prp18IR způsobují letalitu (či těžký růstový defekt) a *in vitro* znemožňují sestřih nezávisle na přítomnosti Prp18p. Z uvedených dat vyplývá, že *in vivo* postradatelný motiv zinc knuckle se stává nezbytným v případě nepřítomnosti proteinu Prp18p či jeho neschopnosti interagovat se Slu7p. Pokud je zinc knuckle narušen, vazba Slu7p do spliceosomu je závislá na interakci s Prp18p. Motivy zinc knuckle a Prp18IR se nejspíše uplatňují ve vazbě Slu7p ke spliceosomu a jejich funkce se zdají být alespoň částečně redundantní (James et al., 2002).

K disociaci Slu7p, Prp18p a též helikázy Prp22p, která se váže do spliceosomu následně po Prp18p, ze sestřihového komplexu dochází po proběhnutí druhé transesterifikační reakce společně s uvolněním mRNA, ještě před uvolněním vystřiženého lariát-intronu (James et al., 2002).

2.2.2.2. Vazba na 3'SS:

Studie z roku 1995 (Umen a Guthrie, 1995), za pomoci UV-crosslinking metody potvrdila *in vitro* vazbu Slu7p do oblasti 3'sestřihového místa. Do této oblasti se vážou také proteiny Prp8, Prp16 (Umen a Guthrie, 1995) a Prp22 (McPheeters a Muhlenkamp, 2003). K interakci s 3'SS dochází v případě všech zmíněných proteinů až po proběhnutí první transesterifikační reakce a v průběhu

sestřihu se míra jejich vazby mění. Prp16p se váže na 3'SS nejsilněji v nepřítomnosti ATP, po přidání ATP a jeho hydrolýze dochází k zeslabení interakce. Naopak Prp8p a Slu7p se vážou na 3'SS nejsilněji v současné přítomnosti Prp16p a ATP. K silné vazbě Slu7p s 3'SS přispívá též přítomnost proteinů Prp17 a Prp18. Autoři studie proto usuzují, že 3'SS je rozpoznáno nejméně ve dvou stádiích před druhou transesterifikační reakcí – nejprve pomocí Prp16p, jehož hydrolýza ATP umožní konformační změnu komplexu, která má za následek zeslabení vazby Prp16p a naopak posílení vazby proteinů Slu7 a Prp8 s 3'SS (Umen a Guthrie, 1995).

2.2.3. hSlu7

Jak již bylo uvedeno, lidským homologem proteinu Slu7 je hSlu7. Jedná se o polypeptid tvořený 586 aa – hSlu7 je tedy o více než 200 aa delší než kvasinkový Slu7 a obsahuje tudíž i oblasti (ponejvíce v C-koncové polovině polypeptidu), které se u Slu7 nevyskytují (viz porovnání sekvencí obou proteinů v kapitole Příloha). Stejně jako jeho kvasinkový homolog se hSlu7 účastní druhého kroku sestřihu, se spliceosomem asociuje před druhou transesterifikační reakcí a pro tuto vazbu není vyžadována přítomnost ani polypyrimidinového traktu ani 3'SS (Chua a Reed, 1999a).

Protein hSlu7 ovlivňuje výběr jak distálních, tak proximálních 3'sestřihových míst (podrobnější popis je uveden v kapitole Diskuse), s čímž zřejmě souvisí i jeho schopnost ovlivňovat alternativní sestřih některých genových produktů. Dokládají to pokusy využívající konstrukt odvozený od genu ADAR2. Exon8 tohoto genu přirozeně podléhá alternativnímu sestřihu – asi v 60 % transkriptů je tento exon přeskočen, ve zbylých 40 %, kdy je exon zavzat do mRNA, dochází využití distálního ze dvou možných čtyři nukleotidy vzdálených 3'sestřihových míst. Distální 3'SS předchází nukleotidy CAG, zatímco před proximálním 3'SS se nachází sekvence GAG, která toto místo činí velmi slabým. Zvýší-li se vzdálenost mezi 3'sestřihovými místy z původních 4 na 10 nt (konstrukt ADAR2+10), dochází k zavzetí exonu do mRNA velmi zřídka, využíváno je navíc proximální, nikoli distální 3'SS. Pokud se hladina proteinu hSlu7 v buněčném extraktu výrazně zvýší, proximální 3'SS je využíváno mnohem efektivněji, což vede též ke zvýšení frekvence zavzetí exonu8 do výsledné mRNA (Lev Maor et al., 2003; Shomron et al., 2004).

Vliv hladiny hSlu7 na alternativní sestřih konstruktů ADAR2 a ADAR2+10 byl dále potvrzen pokusy využívajícími pokles jaderné koncentrace hSlu7 díky UV ozáření či pomocí RNA interference. V případě obou konstruktů dochází při těchto podmínkách k výraznému snížení zavzetí exonu8 do mRNA (Shomron et al., 2005). Také snížení hladiny hSlu7 způsobené downregulací jeho transkripčního aktivátoru Sp1 vede ke změně alternativního sestřihu konstruktů ADAR2+10, opět dochází ke snížení frekvence inkluze alternativního exonu (Alberstein et al., 2007).

Všechny předchozí experimenty testující vliv hSlu7 na alternativní sestřih byly provedeny na uměle vytvořených konstruktech. Následujícím pokusem bylo však prokázáno, že protein hSlu7 ovlivňuje alternativní sestřih minimálně jednoho endogenního genu. Gen D-aspartát oxidázy (DDO) nese před svým alternativním exonem slabé 3'sestřihové místo (sekvence GAG). Tento exon je za běžných podmínek povětšinou zavzat do mRNA. Ovšem po UV ozáření či snížení hladiny hSlu7 pomocí RNAi je tento exon ve více než polovině případů přeskočen (Shomron et al., 2005). Po zvýšení hladiny hSlu7 díky RNAi jeho transkripčního represoru Elk-1 naopak dojde ke zvýšení inkluze alternativního exonu DDO (Alberstein et al., 2007).

V nedávné době byl objeven další gen, jehož alternativní sestřih zřejmě hSlu7 ovlivňuje – jedná se o XBP1. XBP1 kóduje transkripční faktor uplatňující se při aktivaci genů pro chaperony endoplazmatického retikula. V případě stresových podmínek je transkript sestřižen a kóduje funkční transkripční faktor. Nadprodukce proteinu RBM22 způsobující relokaci hSlu7 z jádra do cytoplazmy, má za následek za stresových podmínek redukcii sestřihu transkriptu Xbp1 (Janowicz et al., 2011).

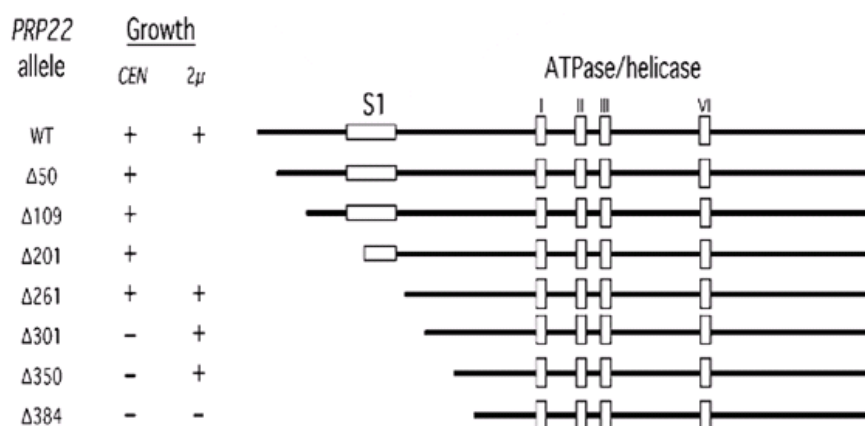
Na základě výše uvedených studií lze předpokládat, že nativní hladina proteinu hSlu7 v jádře je potřeba pro alternativní sestřih a výběr 3'SS určitých genů a že nižší koncentrace hSlu7 v jádře a potažmo i ve spliceosomu má za následek výběr suboptimálních 3'SS a/či vynechání exonů. Klinický význam hladiny hSlu7 pro lidský organismus popisují dvě recentní studie. Snížená hladina mRNA hSlu7 byla detekována v mukóze tlustého střeva pacientů trpících ulcerózní kolitidou (Häsler et al., 2011). Skrze dráhu EGFR - JNK - Elk1 downregulující hladinu hSlu7 dochází k regulaci sestřihu pre-mRNA genu TP73 vedoucí ke vzniku protumorigenní formy proteinu p73 hojně se vyskytující u hepatocelulárních karcinomů (Castillo et al., 2009).

Ne všechny buňčné linie však za přirozených podmínek exprimují hSlu7 stejnou měrou. Protein hSlu7 a jeho myší homolog mSlu7 vykazují rozdílnou míru exprese u kmenových buněk či u různých buněk tkání dospělých jedinců. Zajímavý rozdíl v expresi mSlu7 byl nalezen v buňkách slinivky dospělých myší – zatímco u buněk Langerhansových ostrůvků lze detekovat transkripty mSlu7, u acinárních exokrinních buněk nikoli. Různá exprese mSlu7 byla též nalezena u vyvíjejících se tkání myších embryí. Rozdílná exprese hSlu7 v průběhu vývoje a v různých tkáních ukazuje na to, že by tento protein mohl být „*context dependent*“ modulátor sestřihové mašinerie (Alberstein et al., 2007).

2.3. Protein Prp22

Prp22p je dalším z non-snRNP proteinů účastnících se sestřihu pre-mRNA. Uplatňuje se ve druhém sestřihovém kroku a při uvolňování maturované mRNA ze spliceosomu – rozvíjí kontakty mezi mRNA a U5 snRNA (Company et al., 1991; Schwer a Gross, 1998; Schwer, 2008). Schopnost rozvíjet duplexy RNA je dána RNA helikázovou aktivitou proteinu, vyžadována je též další vlastnost Prp22p – schopnost hydrolyzovat ATP (Schwer a Gross, 1998; Wagner et al., 1999). Popsána byla též role proteinu v zajištění přesnosti druhého kroku sestřihu (Mayas et al., 2006). Prp22p je obdobně jako Slu7p *in vitro* postradatelný pro druhý sestřihový krok substrátů s krátkou vzdáleností BP-3'SS – v tomto případě je limitní hodnotou 21 nt. Pro uvolnění sestřižené mRNA je však Prp22p potřeba vždy, nezávisle na této vzdálenosti (Schwer a Gross, 1998). Protein se váže na 8-11 nt intronu bezprostředně před 3'SS, nejedná se však o sekvenčně specifickou interakci (McPheeters et al., 2000; MCPheeters a Muhlenkamp, 2003). Asociace Prp22p se sestřihovým komplexem je podmíněna přítomností již asociovaného Slu7p (James et al., 2002).

Protein Prp22 je tvořen 1145 aminokyselinami (Company et al., 1991), pomocí deleční analýzy byla stanovena minimální funkční doména Prp22p lokalizující do oblasti ak 261-1145. Rozsáhlejší delece N-koncové části (Δ 301 a Δ 350) jsou schopny podpořit růst buněk pouze při vysoké nadprodukci. Extenzivnější zkrácení je letální i při vysoké expresi konkrétních alel (Schneider a Schwer, 2001; viz Obrázek 7).

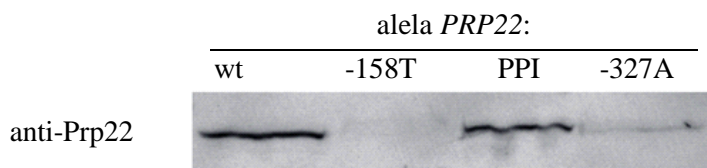


Obrázek 7: Zkrácené verze proteinu Prp22. Zkrácení proteinu Prp22 až o 261 N-koncových aminokyselin nezpůsobuje růstový defekt buněk, při extenzivnějším zkrácení ($\Delta 301$ a $\Delta 350$) jsou buňky schopné růstu jen při vysoké nadprodukci proteinu, zkrácení o 384 N-koncových ak je již letální i za podmínek vysoké nadprodukce. Schémata vpravo znázorňují zkrácené verze proteinu Prp22, obdélníky značí významné domény proteinu – motiv S1 a motivy zodpovědné za ATPázovou/helikázovou aktivitu proteinu. (Převzato ze Schneider a Schwer, 2001.)

Zkrácení proteinu o 261 ak nemá vliv na *in vitro* sestřih aktinové pre-mRNA, v případě rozsáhlejších zkrácenin dochází k defektu v druhém kroku sestřihu, nicméně určité množství maturované mRNA přesto vzniká. V současné době je o proteinu Prp22 známo, že jeho jaderný lokalizační signál se nachází v oblasti od 460. ak dále k C-konci a současně 465 N-koncových ak není součástí ATPázové domény Prp22p, neúčastní se vazby RNA ani nevykazuje helikázovou aktivitu. Letalitu zkrácenin $\Delta 301$ a $\Delta 350$ tedy nelze přisuzovat nepřítomnosti proteinu v jádře či poškození jeho katalytické funkce. N-koncová část proteinu v oblasti ak 262-350 se tudíž s největší pravděpodobností účastní vazby na spliceosom. Defekt zkrácenin Prp22p ve druhém kroku sestřihu lze proto přisoudit snížené schopnosti proteinu asociovat se spliceosomem. N-koncová část ovšem není jedinou oblastí proteinu, která se při vazbě na spliceosom uplatňuje, jistou roli hraje i C-terminální region. Současná exprese N- (1-480) a C- (466-1145) koncové části *PRP22 in trans* je schopná podpořit růst buněk v rozmezí teplot kultivace od 25 do 34 °C, ačkoli exprese pouze jedné či druhé části je letální (Schneider a Schwer, 2001).

V naší laboratoři bylo zjištěno, že mutace *prp22 $\Delta 301$* a *prp22 $\Delta 350$* jsou i při vysoké expresi odpovídajících alel synteticky letální s mutací *prp45(1-169)*. Buňky nesoucí kombinace alely *prp45(1-169)* s *prp22 $\Delta 109$* či s *prp22 $\Delta 261$* jsou schopné růstu, a to jak při přirozené, tak vysoké expresi uvedených alel *prp22*. Ve srovnání s buňkami exprimujícími tyto alely v kombinaci s wt *PRP45*, je však schopnost růstu slabší (L.Senohrábková, E. Holická, nepublikované výsledky). Syntetickou letalitu s *prp45(1-169)* vykazují též promotorové mutace *prp22(-158T)* a *prp22(-327A)*

způsobující snížení hladiny proteinu Prp22 v buňkách. Každá z těchto mutací však zřejmě ovlivňuje hladinu Prp22 různou měrou (Gahura et al., 2009; viz Obrázek 8).



Obrázek 8: Porovnání hladiny proteinu Prp22 v buňkách s různými alelami *prp22* pomocí metody western blot a následné imunodetekce. Hladina Prp22p kódovaného alelami *prp22*(-158T) a *prp22*(-327A) je výrazně nižší než v případě buněk s wt *PRP22* či u buněk s mutací v kódující sekvenci *PRP22* (PPI). (Převzato z Gahura et al., 2009.)

2.4. Protein Prp45

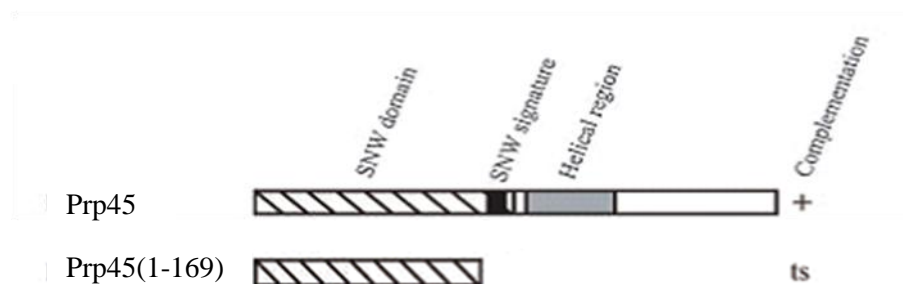
Protein Prp45 byl poprvé identifikován pomocí dvouhybridní analýzy při hledání interakčních partnerů proteinu Prp22 (Albers et al., 2003). Do současné doby byla popsána role Prp45p v sestřihu pre-mRNA (Albers et al., 2003; Gahura et al., 2009). Není ovšem vyloučeno, že se tento protein, stejně jako jeho další homologové u vyšších eukaryot (jmenujme např. lidský SKIP/SNW1/NCOA-62; Dahl et al., 1998; shrnuto ve Folk et al., 2004), účastní regulace transkripce. Prp45p je 379 ak dlouhý, na základě přítomnosti 100% konzervovaného aminokyselinového motivu SNWKN je společně ostatními ortology označován jako SNW protein (shrnut ve Folk et al., 2004; viz Obrázek 9).

Prp45p je nezbytný pro sestřih pre-mRNA (po zablokování jeho exprese dochází hromadění nesestřižených transkriptů) nezávisle na vzdálenosti BP-3'SS a asociuje se spliceosomem po celou dobu sestřihu – je přítomen v sestřihovém komplexu již před první transesterifikační reakcí, po proběhnutí druhého sestřihového kroku koprecipituje s vystřiženým intronem. Slabá asociace s malými jadernými RNA U2, U5 a U6 i za podmínek, kdy sestřih neprobíhá, ukazuje na přítomnost Prp45p i v postkatalytickém komplexu (Albers et al., 2003).

Prp45p je vzhledem ke svým homologům méně konzervovaný, N-koncovou oblast přítomnou u ostatních proteinů dokonce neobsahuje vůbec. Zachován je motiv SNWKN, nicméně ani jeho kompletní zrušení (delecí či záměnou aminokyselin za alaninové zbytky) není pro buňky letální (Martínková et al., 2002).

Buňky exprimující zkrácenou verzi proteinu obsahující pouhých 169 N-terminálních aminokyselin z celkových 379 (alela *prp45*(1-169); viz Obrázek 9)

vykazují teplotně senzitivní fenotyp – v závislosti na genetickém pozadí kmene nejsou schopny růst v 37 °C, případně v 39 °C.



Obrázek 9: Schéma proteinu Prp45 a jeho zkrácené verze kódované alelou *prp45(1-169)*. Označeny jsou jednotlivé domény. Alela *prp45(1-169)* způsobuje citlivost buněk ke zvýšené teplotě kultivace. (Převzato z Gahura et al., 2009.)

Na základě synteticky letálního screenu této mutanty byly identifikovány nové mutace několika proteinů komplexu NTC (Ntc20p, Clf1p/Syf3p, Cef1p,...) a také faktorů druhého sestřihového krok – Slu7p, Prp22p, Prp18p, Prp17p (Gahura et al., 2009). Mutace *slu7(P268L)*, *slu7(K252E)*, *prp22(-158T)* a *prp22(-327A)*, kterými se dále zabývá tato diplomová práce, a jejich vlastnosti jsou uvedeny v kapitolách týkajících se příslušných proteinů (viz. 2.2.1.4 a 2.3).

Na úzký vztah mezi proteiny Prp45 a Prp22 ukazují kromě dvouhybridní interakce a interakcí genetických také výsledky konstituce spliceosomu u mutanty *prp45(1-169)* postrádající C-koncovou část proteinu. Množství Prp22p ve spliceosomu je zde vzhledem k wt buňkám velmi sníženo. Expres C-konce Prp45 *in trans* hladinu Prp22p v sestřihovém komplexu zvýší. Tato data společně s výsledky dvouhybridního testu, které ukazují na interakci Prp22p právě s C-koncovou oblastí Prp45 (ak 262 -291), implikují roli C-terminální části Prp45p ve vazbě Prp22p do spliceosomu. Tuto hypotézu podporuje také zjištění, že mírná nadprodukce Prp22p zmírňuje teplotně senzitivní fenotyp mutanty *prp45(1-169)*, (Gahura et al., 2009).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Seznam použitých přístrojů a aparatur

Přístroj	Výrobce
----------	---------

Třepačky:

Třepačky Orbital shaker model 420 a 4520	Thermo/ Forma scientific
Kývací třepačka Mini-rocker shaker	Biosan
Orbitální třepačka IKA KS 260-basic	IKA® -Werke GmbH & Co. KG

Centrifugy:

Centrifuga Jouan MR22i rotor AM 2.18 (úhlový 24 × 1,5 ml) rotor AM 38.15 (úhlový, 8 × 38 ml) rotor SWM 180.5 (výkyvný, 4 × 200 ml)	Jouan
Mikrocentrifuga 5418	Eppendorf
Centrifuga K26D	MLW

Elektroforetické a blotovací aparatury:

Blue Marine 100 a 200 (horizontální agarózová elektroforéza)	Serva
Mini-PROTEAN® 3 CELL (vertikální proteinová PAGE)	BIO-RAD
Vertical gel electrophoresis system model V16 (vertikální DNA PAGE)	Bethesda Research Laboratories
Mini Trans-Blot Cell	BIO-RAD

Zdroje napětí:

Lightning Volt Power Supply Model OSP-300 (DNA agarózová elektroforéza)	OWL Separation systems
Lightning Volt Power Supply Model OSP-4000L (DNA PAGE)	OWL Separation systems
PowerPac universal (proteinové PAGE)	BIO-RAD

Termobločky a termostaty:

Termostat TCH 100	Laboratorní přístroje Praha
Termostat BT 120	Laboratorní přístroje Praha
Termobloček IncuBlock model 285	Denville Scientific
Termobloček Dry bath incubator model MD-01	Major science

Spektrofotometry:

NanoDrop (ND-2000)	Thermo Fisher Scientific
Spekol 20	Carl Zeiss Jena

Přístroj	Výrobce
-----------------	----------------

Váhy:

Předvážky A&D Model EK-120G	A&D Company
Analytické váhy A&D Model GR-120	A&D Company

Vybavení pro techniku phosphorimaging:

Imaging screen-K ve vyvíjecí kazetě	BIO-RAD
External laser molecular imager FX	BIO-RAD
Screen Eraser-K	BIO-RAD
Scanner Molecular imager FX	BIO-RAD

Další přístroje:

Transluminátor FOTO/UV21	Fotodyne incorporated
Laminární box HS 12	Heraeus instruments
Mikroskop Olympus CK2	Olympus
Mikromanipulátor	Singer Instrument
Porátor Gene Pulser Apparatus	BIO-RAD
Autokláv Tuttnauer 2540 EK	Tuttnauer
Přístroje Rowapur a Ultrapur pro deionizaci vody	Watrex
Fotoaparát Panasonic DMC-FZ27	Panasonic
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex VF2	Janke&Kunkel IKA Labortechnik
pH metr pH/ION analyser OP-271/1	Radelkis
PCR cycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
Monitor kontaminace Izotrak AB/100	Amersham QSA

Použitý software:

Program
ImageQuant
Quantity One 4.5.2
SerialCloner 2.1
ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

3.1.2. Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Výrobce
5-FOA	Sigma
6 × Loading dye	Fermentas
[γ ³² P] ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Izotop
Adenin-hemisulfát	Sigma
Akrylamid (≥99,9%)	Bio-Rad
Ampicilin	Biotika
APS (amonium persulfát; ≥98%)	Sigma
Bakteriologický agar	Oxoid
DEPC (dietylpyrokarbonát)	Sigma
DTT (dithiothreitol)	Bio-Rad
DMSO (dimethylsulfoxid)	Sigma
EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina)	Bio-Rad

Chemikálie	Výrobce
EtBr (ethidium bromid)	Sigma
Etanol absolutní	Serva
Formamid	International Biotechnologies
Geneticin (G418)	Amersham
Glukóza	Sigma
Glycerol ($\geq 99\%$)	Sigma
Glycin	Serva
HCl	Chemapol
NaHCO ₃	Chemapol
KCl	Penta
Kyselina octová	LACHEMA
NaCl	Lach-Ner
CaCl ₂ · 2H ₂ O ($\geq 99\%$)	Sigma
Izopropanol	Lach-Ner
Kyselina boritá	Chemapol
L-Histidin HCl monohydrát	Sigma
LiAc · 2H ₂ O (octan lithný dihydrát)	Sigma
LiCl (molecular biology grade)	Serva
L-Leucin	Sigma
L-Lysin (monohydrochlorid)	Sigma
L-Methionin	Sigma
L-Tryptofan	Sigma
MgCl ₂ · 6 H ₂ O ($\geq 99\%$)	Sigma
MgCl ₂ pro PCR	Fermentas
Močovina	Bio-Rad
N,N'-metylenbisakrylamid	Bio-Rad
Nourseothricin	HKI Jena
Octan draselný ($\geq 99\%$)	Sigma
PEG (polyetylglykol), mw cca 3350	Sigma
SDS (sodiumdodecylsulfát; $\geq 99\%$)	Sigma
SeaKem® LE agaróza	Cambrex Bio Science Rockland
Salmon sperm DNA	Sigma
Sušené odtučněné mléko	PML Protein. Mléko. Laktóza, a. s.
Synthetic complete amino acid drop-out: -His/-Leu/-Trp/-Ura	Formedium
TCA (kyselina trichloroctová)	Lach-Ner
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin)	Bio-Rad
Tris (Tris(hydroxymetyl)aminometan)	Serva
Tween 20	Serva
Universalpepton M66	MERCK
Uracil ($\geq 99,0\%$)	Sigma-Aldrich
Yeast Extract Powder	Formedium
Yeast nitrogen base without amino acids	Becton, Dickinson and company
Živný agar č. 2	Imuna Pharm

3.1.3. Přehled použitých enzymů a příslušných pufrů

DNA polymerázy:

- **Taq DNA Polymerase** (recombinant), 5 U/μl; Fermentas
10× Taq Buffer with KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40; Fermentas
- **High Fidelity PCR Enzyme Mix**, 5 U/μl; Fermentas
10× High Fidelity PCR Buffer; Fermentas

DNA ligáza:

- **T4 DNA Ligase**, 1 U/μl; Fermentas
10× T4 DNA Ligase Buffer, 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7,8 při 25°C); Fermentas

Restrikční endonukleázy:

Enzym	Rozpoznává a štěpí sekvenci	Výrobce
AfeI (Eco47III)	AGC/GCT	Fermentas
BamHI	G/GATCC	Fermentas
EcoRI	G/AATTC	Fermentas
EcoRV (Eco32I)	GAT/ATC	Fermentas
HindIII	A/AGCTT	Fermentas
KpnI	GGTAC/C	Takara
NcoI	C/CATGG	Fermentas
NdeI	CA/TATG	Fermentas
NheI	G/CTAGC	Fermentas
PstI	CTGCA/G	Fermentas
SacI	GAGCT/C	Fermentas
SalI	G/TCGAC	Fermentas
XbaI	T/CTAGA	Fermentas

Reakční pufrы byly zvoleny dle doporučení výrobce, v případě štěpení kombinací dvou enzymů byl zvolen pufr doporučený on-line nástrojem Double Digest firmy Fermentas.

Další enzymy:

- **RNáza A**; Fermentas
- **Yeast lytic enzyme (Quantazyme ylgTM)**; Qbiogene

3.1.4. Přehled použitých protilátek

Protilátka	Popis	Výrobce
HA.11	monoklonální (16B12) myší protilátka rozpoznávající epitop hemaglutininu chřipkového viru	Covance
GAM-AP	kozi protilátka rozpoznávající myší protilátky, konjugovaná s alkalickou fosfatázou	Bio-Rad

3.1.5. Seznam použitých kitů

Kit	Výrobce
QuikChange [®] II Site-Directed Mutagenesis Kit	Clontech
NucleoSpin [®] Plasmid	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin [®] Extract II	MACHEREY-NAGEL
RevertAid [™] First Strand cDNA Syntesis Kit	Fermentas
Primer Extension System – AMV Reverse Transcriptase	Promega
MasterPure [™] Yeast RNA Purification Kit	Epicentre Biotechnologies
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen

3.1.6. Seznam použitých organismů

Escherichia coli:

Kmen	Genotyp
DH5 α elektrokompetentní	ϕ 80dlacZ Δ M15 recA gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K^- , m_K^+) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)U169 (Stratagene)
DH5 α [™] -T1 ^R chemokompetentní	F ⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K^- , m_K^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (Invitrogen, TOPO TA Cloning [®] Kit)

Saccharomyces cerevisiae:

Kmen	Genotyp
AVY11	MATalfa ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 prp45(1-169)-HA::kanMX6
AVY11#28	MATalfa ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 prp45(1-169)-HA::kanMX6 prp22(-158T) + plazmid pOG02 (URA3 ADE3 PRP45 ampR)
AVY11#38	MATalfa ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 prp45(1-169)-HA::kanMX6 prp22(-327A) + plazmid pOG02 (URA3 ADE3 PRP45 ampR)
KAY02	MATalfa his3 LexA _{op(x6)} -LEU2 trp1 ura3 prp45(1-169)-HA::kanMX6
EGY48	MATalfa his3 LexA _{op(x6)} -LEU2 trp1 ura3
ENY08	MATa his3D1 leu2D0 lys2D0 met15D0 ura3D0 slu7::kanMX4 + plazmid pRS326-SLU7
ENY06	MATa his3D1 leu2D0 LYS2 met15D0 ura3D0 slu7::kanMX4 + plazmid pRS326-SLU7
LSY01	MATalfa his3D1 leu2D0 lys2D0 MET15 ura3D0 prp22::kanMX4 + plazmid pRS326-PRP22
ENY13	MATa his3D1 leu2D0 lys2D0 met15D0 ura3D0 prp45(1-169)-HA::natMX6 slu7::kanMX4 + plazmid pRS326-SLU7
ENY14	MATa his3D1 leu2D0 lys2D0 MET15 ura3D0 slu7::kanMX4 prp22::kanMX4 + plazmid pEN12 (pRS326-SLU7-PRP22)
Y24023	BY4743 MATa/alfa his3D1/his3D1 leu2D0/leu2D0 lys2D0/LYS2 MET15/met15D0 ura3D0/ura3D0 slu7::kanMX4/SLU7

3.1.7. Seznam použitých a konstruovaných vektorů

Základní vektory:

Plazmid	Původ
pRS313	Sikorski a Hieter, 1989
p425GPD	Mumberg et al., 1995
pCR [®] II-TOPO	TOPO TA Cloning [®] Kit (Invitrogen)
pRS326	Sikorski a Hieter, 1989
pFA6a-3HA-natMX6	Van Driessche et al., 2005

Odvozené vektory:

Následující vektory byly připraveny v laboratoři doc. Folka a doc. Půty či přímo v této práci, pokud není uvedeno jinak.

Zkratka	Systematický název
pEN01	pBluescript-SLU7
pEN02	pRS313-SLU7
pEN06	pRS313- <i>slu7</i> (D206A)
pEN07	pRS313- <i>slu7</i> (R247A)
pEN08	pRS313- <i>slu7</i> (R247E)
pEN09	pRS313- <i>slu7</i> (R249A)
pEN10	pRS313- <i>slu7</i> (R271A)
pEN11	pRS313- <i>slu7</i> (S245-D251)
pEN12	pRS326-SLU7-PRP22
pEN13	p425GPD-COF1-CUP1
pEN14	p425GPD- <i>cof1</i> Δ(91-140)-CUP1
pEN15	p425GPD- <i>cof1</i> Δ(91-140),G149A,C80T-CUP1
pEN16	p425GPD-UBC13-CUP1
pEN17	p425GPD- <i>ubc13</i> (G232A)-CUP1
pEN19	p425GPD-AWT-CUP1
pEN20	p425GPD-OWT-CUP1
pEN22	pCR [®] II-TOPO-promotor PRP22
pEN23	pCR [®] II-TOPO-promotor <i>prp22</i> (-158T)
pEN26	pCR [®] II-TOPO-promotor <i>prp22</i> (-327A)
pEN28	pRS315-PRP22*
pEN29	pRS315- <i>prp22</i> (-158A)
pEN32	pRS315- <i>prp22</i> (-327T)
pLS05	pRS315-PRP22*
pLS19	pRS325GPD- <i>prp22</i> Δ109
pLS20	pRS325GPD- <i>prp22</i> Δ261
pLS21	pRS325GPD- <i>prp22</i> Δ301
pLS22	pRS325GPD- <i>prp22</i> Δ350
nemá	pRS326-SLU7
nemá	pRS313- <i>slu7</i> (K252E)
nemá	pRS313- <i>slu7</i> (P268L)
nemá	pSE358-PRP22 (laboratoř B.Schwer)

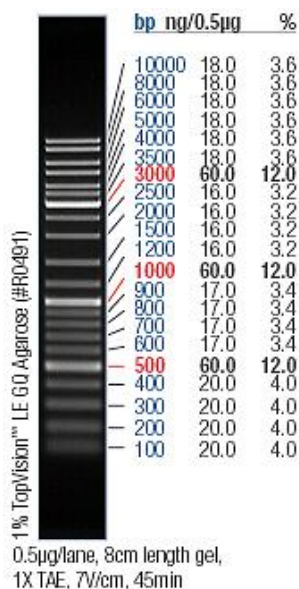
* liší se velikostí promotorové oblasti genu *PRP22*

3.1.8. Seznam použitých primerů

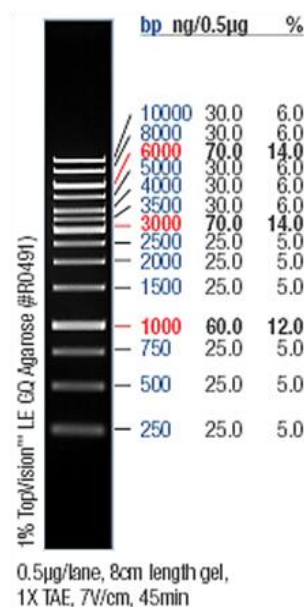
Primer	Použití	Sekvence 5' - 3'
EN01	<i>slu7</i> (D206A)F	GGAAAAGACAAAATCCCAAACCTGCAGAAACAC TATGGGATACAGATG
EN02	<i>slu7</i> (D206A)R	CATCTGTATCCCATAGTGTTTCTGCAGTTTG GGATTTGTCTTTTCC
EN03	<i>slu7</i> (R247E)F	CTCAGTTGTATAGGACATCAACGGAGCTCAG AGAAGATAAAGGCTGCTTACTTG
EN04	<i>slu7</i> (R247E)R	CAAGTAAGCAGCCTTATCTTCTCTGAGCTCC GTTGATGTCCTATACAACCTGAG
EN05	<i>slu7</i> (R247A)F	CTCAGTTGTATAGGACATCAACAGCGCTGAG AGAAGATAAAGGCTGCTTACTTG
EN06	<i>slu7</i> (R247A)R	CAAGTAAGCAGCCTTATCTTCTCTCAGCGCT GTTGATGTCCTATACAACCTGAG
EN07	<i>slu7</i> (R249A)F	GTATAGGACATCAACGAGATTGGCAGAAGAT AAGGCTGCTTACTTG
EN08	<i>slu7</i> (R249A)R	CAAGTAAGCAGCCTTATCTTCTGCCAATCTC GTTGATGTCCTATAC
EN09	<i>slu7</i> (R271A)F	CGGAGAGTAATTATGATCCTAAATCAGCGCT GTACAAAACCTGAAACACTGGGCGC
EN10	<i>slu7</i> (R271A)R	GCGCCAGTGTTTCAGTTTTGTACAGCGCTG ATTTAGGATCATAATTACTCTCCG
EN15	promotor- <i>PRP22</i> -F	GAGCTCAAGATATTCAGTGTAATCACACG
EN16	promotor- <i>PRP22</i> -R	GCCATATGTAATATCTTTGTGTTACCTATGT TG
M13F	sekvenační	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	sekvenační	AACAGCTATGACCATG
SP6	sekvenační	TATTTAGGTGACACTATAG
YAC06	primer extension- <i>CUP1</i>	GGCACTCATGACCTTC
YU14	primer extension- U14	ACGATGGGTTTCGTAAGCGTACTCCTACCGTG G
KM09	<i>PRP45</i> (del.169 5'-3')	GGAGAAGCTGATCCAAATGAGTGGAAGATAC CTGCAGCTGTGCGGATCCCCGGTTAATTAA
KM10	<i>PRP45</i> (behind STOP 3'-5')	CAAGCACAAGAATGCTTTGTTTTCTAGTGC TCATCCTGGGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
AV17	natMX6 kazeta	TGGTCAATAAGAGCGACCTC
AV18	<i>PRP45</i> střed	ACAGCCACCATATTGAGGTA

3.1.9. Standardy velikostí a množství DNA fragmentů a proteinů

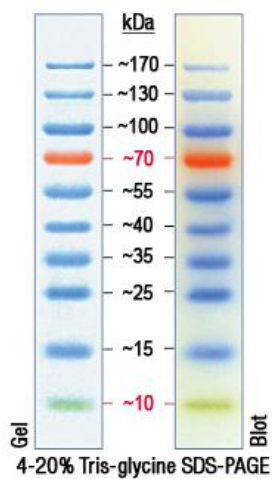
GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Litva)



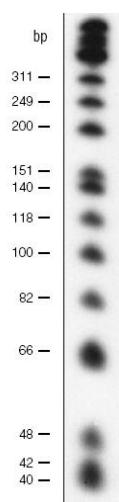
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, Litva)



PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Litva)



ΦX174 HindIII DNA marker (Promega, USA)



3.1.10. Kultivační média a roztoky

Sterilizace roztoků a nádobí

Pokud není uvedeno jinak, sterilizace kultivačních roztoků a médií probíhala autoklávováním v přístroji Tuttnauer 2540 EK při teplotě 119 °C po dobu 20 minut. Sterilizace kultivačního nádobí byla prováděna stejným způsobem, při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Kultivační média bakteriální:

- **LB médium (tekuté):**

Složka	Koncentrace
Destilovaná voda	-
Universalpepton M66	10 g/l
Yeast Extract Powder	5 g/l
NaCl	5 g/l

- sterilizováno, v případě potřeby přidán po zchladnutí média na cca 55 °C roztok antibiotika ampicilinu na výslednou koncentraci 100 mg/l

- **LB médium s glukózou (tekuté):**

- stejné složení jako LB médium
- po klávování přidán sterilní koncentrovaný roztok glukózy na výslednou koncentraci 0,5 g/l
- nepřidáván ampicilin

- **ŽA (pevné):**

Složka	Koncentrace
Destilovaná voda	-
Živný agar č. 2	40 g/l

- sterilizováno, nalito na Petriho misky (cca 25 ml na 1 misku o průměru 9 cm), ponecháno ztuhnout

- **ŽAMP (pevné):**

- jedná se o médium ŽA s přidáním ampicilinem na výslednou koncentraci 100 mg/l

Kvasinková kultivační média:

- voda do následujících médií byla upravena přístroji Rowapur a Ultrapur od firmy Watrex – dále označováno jako voda deionizovaná
 - sterilizované koncentrované roztoky glukózy, aminokyselin a uracilu přidávány do médií na příslušnou výslednou koncentraci až po sterilizaci směsi ostatních složek
 - ampicilin přidáván až po zchladnutí médií na cca 55 °C na výslednou koncentraci 100 mg/l
- **YPAD (tekuté či pevné** – v případě přípravy pevného média byl ke složkám přidán navíc bakteriologický agar na výslednou koncentraci 15-18 g/l):

Složka	Koncentrace
Deionizovaná voda	-
Universalpepton M66	20 g/l
Yeast Extract	10 g/l
Adenin-hemisulfát	100 mg/l
Glukóza	20 g/l
Ampicilin	100 mg/l

- v případě potřeby bylo po zchladnutí média přidáno selekční antibiotikum geneticin (G418) na výslednou koncentraci 200 µg/ml či antibiotikum nourseothricin na výslednou koncentraci 90 µg/ml

- **SD (tekuté; či pevné** – v případě přípravy pevného média byl ke složkám přidán navíc bakteriologický agar na výslednou koncentraci 15-18 g/l):

Složka	Koncentrace
Deionizovaná voda	-
Yeast nitrogen base without amino acids	6,7 g/l
Synthetic complete amino acid drop-out: -His/-Leu/-Trp/-Ura	0,6 g/l
Glukóza	20 g/l
Ampicilin	100 mg/l
L-Histidin HCl monohydrát	20 mg/l
L-Leucin	100 mg/l
L-Tryptofan	20 mg/l
Uracil	20 mg/l

- připravována byla také média, do kterých některá z aminokyselin či uracil nebyly přidány, takové SD médium bylo označeno **SD-X** (X = jednopísmenná zkratka dané složky – např. SD-H médium neobsahuje histidin, SD-U-L neobsahuje uracil a leucin)

- **SD-Lys:**

Složka	Koncentrace
Deionizovaná voda	-
Yeast nitrogen base without amino acids	6,7 g/l
Glukóza	20 g/l
Ampicilin	100 mg/l
L-Histidin HCl monohydrát	20 mg/l
L-Leucin	100 mg/l
L-Tryptofan	20 mg/l
Uracil	20 mg/l
L- Methionin	20 mg/l

- **SD-Met:**

- stejné složení jako SD-Lys, jen místo L-methioninu obsahuje L-lysin o výsledné koncentraci 30 mg/l

- **SD + 5-FOA:**

- stejné složení jako SD médium s aminokyselinami a uracilem dle potřeby kmene, navíc s obsahem 5-fluoroorotové kyseliny (5-FOA) o výsledné koncentraci 1 g/l
- SD médium s příslušnými aminokyselinami a uracilem připraveno 2× koncentrované, po vychladnutí pod 65 °C smíseno se stejným objemem roztoku 5-FOA o koncentraci 2 g/l, který byl sterilizován (vzhledem k teplotní nestabilitě 5-FOA) filtrací

- **Presporulační agar:**

Složka	Koncentrace
Deionizovaná voda	-
Universalpepton M66	20 g/l
Yeast Extract	10 g/l
Bakteriologický agar	20 g/l
Glukóza	100 g/l
Ampicilin	100 mg/l

- aminokyseliny a uracil přidávány dle potřeby daného kmene o stejných výsledných koncentracích jako u SD média

- **Sporulační agar:**

Složka	Koncentrace
Deionizovaná voda	-
Octan draselný	5 g/l
KCl	2,3 g/l
Bakteriologický agar	20 g/l
Ampicilin	100 mg/l

- aminokyseliny a uracil přidávány dle potřeby daného kmene o stejných výsledných koncentracích jako u SD média

- **Ringerův roztok:**

Složka	Koncentrace
Deionizovaná voda	-
NaCl	7,5 g/l
KCl	75 mg/l
NaHCO ₃	100 mg/l
CaCl ₂	100 mg/l

3.1.11. Ošetření materiálu a chemikálií proti RNázám

Mikrozkumavky a špičky byly sterilizovány klávováním třemi cykly za sebou. Používány byly pipety vyčleněné speciálně pro práci s RNA očištěné lihem. Deionizovaná voda byla upravena pomocí DEPC (dietylpyrokarbonát; 1 ml na 1 litr vody), inkubována přes noc v 37 °C a klávována. Veškerá manipulace s RNA a ošetřeným materiálem byla prováděna v rukavicích.

3.2. Metody

3.2.1. Metody kultivace organismů

Růst na pevných médiích

Použita byla sterilní pevná média (viz 3.1.10) v Petriho miskách (obvykle o průměru 9 či 6 cm). Organismus byl zaočkován sterilní mikrobiologickou kličkou, tyčinkou či sterilním párátkem, případně nanesen v suspenzi a rozetřen zahnutou skleněnou tyčinkou (tzv. „hocejkou“). Kultivace probíhala v termostatu, v případě *E. coli* 1 den při 37 °C, v případě *S. cerevisiae* 3 až 4 dny při 30 °C, pokud není u konkrétního experimentu uvedeno jinak. Média s mikroorganismy byla skladována v lednici max. po dobu 1 měsíce, v případě potřeby byly kmeny přečárkovány na novou misku. Jeden klon buněk lze pasážovat maximálně tři měsíce, poté je nutno založit nový klon z glycerolové konzervy uložené v -80°C, což bylo dodržováno.

Kultivace v třepaných médiích

Používána byla sterilní tekutá média (viz 3.1.10) ve sterilních 50ml až 250ml Erlenmeyerových baňkách. Objem média činil vždy max. 1/5 objemu příslušné baňky. Mikroorganismy byly zaočkovány sterilní mikrobiologickou kličkou a aerobně kultivovány na orbitální třepačce při frekvenci 180 až 220 rpm. Teplota kultivace je stejná jako v případě kultivace na pevných médiích, doba záleží na konkrétním použití. Generační doba *E. coli* je cca 30 min, *S. cerevisiae* cca 90-120 min. Nárůst kultury byl v některých případech sledován za použití spektrometru Spekol 20. Jako blank bylo použito totéž médium, ve kterém probíhala kultivace. Při OD kultury větší než 0,2 je odečet zatížen chybou, proto byly vzorky pro měření vhodně ředěny.

3.2.2. Příprava a výsev glycerolových konzerv *Saccharomyces cerevisiae*

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **60% (v/v) glycerol**, sterilizován autoklávováním

Ze všech nově vytvořených kmenů *S. cerevisiae* byly připraveny glycerolové konzervy vhodné pro dlouhodobé skladování. Biomasa použitá pro

přípravu konzerv byla původem z třepané kultury, případně z nárůstu na pevných médiích. Buňky byly resuspendovány v deionizované vodě a smíseny se stejným objemem 60% sterilního glycerolu. Směsi byly promíchány otáčením zkumavky, inkubovány cca 20 minut při pokojové teplotě a následně přeneseny do -80 °C, kde byly nadále uchovávány pro další použití.

Výsev buněk z glycerolových konzerv probíhal následovně: Sterilním párátkem byla seškrábnuta vrchní vrstva zmrzlých buněk a nanesena na misku s pevným YPAD médiem. Úkony byly prováděny co nejrychleji, aby konzervy nerozmrzly.

3.2.3. Křížení haploidních kmenů *S. cerevisiae*

Kříženy byly haploidní kmeny *S. cerevisiae* opačných párovacích typů (*MATa* a *MAT α*). Suspenze kmenů v deionizované vodě (cca 30-50 μ l) byly kápnuty přes sebe na pevné médium YPAD. Následovala inkubace min. 4 hodiny při teplotě 30 °C. Biomasa byla poté přenesena na vhodné pevné selekční médium, které umožňuje růst pouze diploidním jedincům, a inkubována několik dní při teplotě 30 °C.

3.2.4. Sporulace diploidních kmenů *S. cerevisiae*, mikromanipulace tetrád a tetrádová analýza

POUŽITÁ MÉDIA A ROZTOKY:

- **Presporulační agar** (viz 3.1.10)
- **Sporulační agar** (viz 3.1.10)
- **Ringerův roztok** (viz 3.1.10)
- **YLE: Yeast lytic enzyme** (1 mg/ml)
- **Pevné médium YPAD** (viz 3.1.10) nalité na Petriho misky tak, aby byla plocha co nejrovnější

Sporulace:

Příslušný diploidní kmen *S. cerevisiae* byl hustě nanesen na misku s presporulačním agarem a inkubován při 30 °C do druhého dne. Narostlá biomasa byla kvantitativně přenesena do mikrozkuavky a resuspendována takovém objemu Ringerova roztoku, aby vznikla hustá, ale ještě pipetovatelná suspenze. Suspenze

byla kápnuta na misku se sporulačním agarem a ponechána zaschnout. Do víčka Petriho misky byl vložen čtvereček navlhčené buničiny, misky s kulturou byly otočeny dnem nahoru. Buňky byly inkubovány 4-6 dní při pokojové teplotě. Průběžně bylo mikroskopicky kontrolováno množství vzniklých tetrad.

Mikromanipulace tetrad a tetradová analýza:

Malé množství dostatečně vysporulovaných buněk bylo resuspendováno v 50 μ l roztoku YLE (1 mg/ml). Vřečka byla ponechána enzymaticky opracovat přibližně 5-10 min při pokojové teplotě, kvalita natrávení byla kontrolována mikroskopicky. Dostatečně natrávená vřečka byla naředěna 1 ml deionizované vody.

Na jeden kraj misky s pevným médiem YPAD bylo nanášeno asi 20 μ l suspenze, která byla poté zahnutou tyčinkou (tzv. „hokejkou“) podél tohoto kraje do vymezeného úseku rozetřena. Po zaschnutí přebytečné vody následovalo oddělování jednotlivých spor z konkrétních vřeček pomocí mikromanipulátoru značky Singer. Spory byly ponechány klíčit po dobu několika dní při 30 °C, vzniklé monokolonie byly dále přeneseny na různá selekční média pro určení genotypu vzniklých kmenů.

3.2.5. Transformace *S. cerevisiae* lithium-acetátovou metodou

POUŽITÉ STERILNÍ ROZTOKY:

- **50% (w/v) PEG**
- **10 \times TE** (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7,5)
- **1 M LiAc**; pH 7,5

Smísením výše uvedených roztoků byly čerstvě připraveny následující premixy:

- **PEG/TE/LiAc:** 40% PEG, 1 \times TE, 100 mM LiAc
- **H₂O/TE/LiAc:** 1 \times TE, 100 mM LiAc

Využívaný přepočít pro ředění buněk: $OD_{600} 1 = 2 - 5 \times 10^7$ buněk/ml

Příprava buněk

Jednou či několika oddělenými koloniemi bylo zaočkováno 10-15 ml vhodného tekutého média (YPAD, selekční SD). Kultury byly inkubovány na třepačce (180 rpm) při 30 °C přes noc do stacionární fáze ($OD_{600} > 1,5$). V případě očekávané vysoké účinnosti transformace (plazmid standardní velikosti a množství, dobře rostoucí buňky) byla tato kultura přímo použita pro následující kroky. V případě potřeby zvýšit

efektivitu transformace byla kultura přeočkována na $OD_{600} = 0,1-0,2$ a ponechána růst (180 rpm, 30 °C) na OD cca 0,6 do exponenciální fáze růstu. Objem média byl zvolen dle počtu následujících transformačních reakcí (50 ml pro 10 transformačních reakcí). Získaná buněčná kultura byla centrifugována (1400 g, 3 min, 20 °C). Sediment byl promyt $1 \times$ až $2 \times$ jedním objemem deionizované vody, následně jednou 10 ml roztoku $H_2O/TE/LiAc$. Po každém promytí následovala centrifugace (parametry viz výše). Výsledný sediment byl resuspendován v příslušném objemu roztoku $H_2O/TE/LiAc$ na koncentraci $1 - 2,5 \times 10^9$ buněk/ml a inkubován minimálně 15 min při 30 °C, 180 rpm.

Vlastní transformace:

Jedna transformační směs byla připravena smísením následujících složek:

Složka	Množství
Buňky	50 μ l (cca $1-2,5 \times 10^8$ buněk)
Salmon sperm DNA (10 mg/ml; čerstvě denaturovaná minutovým varem, následně uchována na ledu)	5 μ l
Plazmidová DNA	1-5 μ l (>100 ng)
Roztok PEG/TE/LiAc	300 μ l

Připravené transformační směsi byly vortexovány a inkubovány 30 min při 30 °C, následoval teplotní šok inkubací směsí 20 min při 42 °C (možno i déle). V průběhu obou inkubací byly vzorky několikrát promíchány otáčením zkumavky. Směsi byly podrobeny centrifugaci (1500 g; 3 min), supernatant odsán pipetou. Centrifugace a odsání bylo opakováno pro odstranění veškerého roztoku PEG. Sediment byl resuspendován v jednom objemu deionizované vody a usazen centrifugací (900 g, 3 min). Promytý sediment byl resuspendován v 200 μ l deionizované vody, obvykle následoval výsev biomasy na dvě misky (1/10 objemu a zbytek) s vhodným pevným selekčním médiem. Mikroorganismy byly kultivovány v termostatu při 30 °C nejčastěji po dobu tří dnů. Po každé transformaci bylo vybráno několik monoklonií, které byly přeneseny na novou misku se selekčním médiem a rozčárkovány tak, aby došlo k nárůstu jednotlivých oddělených monoklonií. Až tyto monokolonie byly poté použity k dalším experimentům. Popsaným způsobem se eliminuje riziko kontaminace cíleného kmene živými netransformovanými buňkami, které by se mohly při neselektivních podmínkách začít množit.

3.2.6. Transformace *E. coli* elektroporací

Příprava kompetentních buněk

Pro přípravu kompetentních buněk byla použita kultura *E. coli DH5α* (3.1.6) v exponenciální fázi ($OD_{600} \sim 0,6$) třepaná v LB médiu (37 °C, 180 rpm). Pracováno bylo s objemem kultury 400 ml (= původní objem). Suspenze byla ochlazená 10 až 15 minut v ledové lázni – veškerý další postup též probíhal v ledové lázni. Následovala centrifugace (4000 rpm, a 4 °C, 10 min; centrifuga K26D, MLW). Sediment byl 2 × promyt původním objemem ledové deionizované vody (po každém promytí centrifugováno – 4000 rpm, 10 min), potřetí v polovičním objemu vody (opět centrifugace), resuspendován v malém množství 10% (w/w) ledového glycerolu a poté glycerolem doplněn na 1/4 původního objemu. Následovala centrifugace (20 min, 4 °C) a resuspendování v jednom objemu 10% glycerolu. Výsledná suspenze byla pipetována po 100-200 μ l do 1,5ml mikrozkušavek předem vychlazených v tekutém dusíku, dočasně ponechána tamtéž. Dlouhodobé skladování probíhalo v mrazáku s teplotou -80 °C.

Vlastní transformace plazmidové DNA

Postup až do aplikace elektrického pulzu probíhal v ledové lázni. K 50 μ l rozmrzlých (na ledu) elektrokompetentních buněk *E. coli DH5α* (3.1.6) byl přidán roztok plazmidové DNA v deionizované vodě (0,5-5 μ l) či ligační směs (obsahující 5 pg-0,5 μ g DNA). Suspenze byla převedena na dno vychlazené elektroporační kyvety (0,2 cm; BIO-RAD). Kyveta byla osušena a vložena do přístroje Gene Pulser Apparatus (generátor pulzu), následovala aplikace pulzu (za nastavených hodnot kapacity 25 μ F, napětí 2,5 kV a odporu 200 Ω). Po aplikaci pulzu (4-5 ms) byl obsah kyvety ihned resuspendován v 0,5-1ml LB média s glukózou (5 g/l) a převeden do 10ml skleněné zkumavky. Následovala inkubace na třepačce (37 °C, 180 rpm, 60 min.). Výsev byl prováděn na ŽAMP médium (obvykle cca 1/10 kultury na jednu Petriho misku, zbylá suspenze na druhou), inkubace v termostatu při 37 °C do druhého dne, či při laboratorní teplotě 2-3 dny.

3.2.7. Izolace plazmidové DNA z *E. coli* alkalickou metodou

Obvykle byly izolovány plazmidy, jejichž selekčním markerem byl gen zajišťující rezistenci k ampicilinu, proto všechna použitá média obsahovala přidáný ampicilin (100 mg/l).

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **Roztok I**
25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA-NaOH, 1% (w/v) glukóza; pH 8,0
- **Roztok II**
1% (w/v) SDS, 0,2 N NaOH
- **Roztok III**
3 M octan draselný, 2 M kyselina octová; pH 5,4

Bakteriální kmen *E. coli* nesoucí příslušný plazmid byl zaočkován na médium ŽAMP pro nárůst monoklonií a kultivován přes noc při 37 °C. Jednou dobře oddělenou kolonií bylo zaočkováno 50 ml LB média s ampicilinem, kultura inkubována na třepačce přes noc (37 °C, 180 rpm). Následovalo ochlazení v ledové lázni (5-10 min) a centrifugace (2800 g, 20 min, 4 °C). Sediment byl resuspendován ve 2 ml vychlazeného roztoku I. Mimo ledovou lázeň byly k suspenzi přidány 4 ml roztoku II (nechlazený, laboratorní teploty), promícháno otáčením zkumavky, ponecháno 1-5 minut při laboratorní teplotě lyzovat. Lyzát byl navrácen do ledové lázně a smísen se 3 ml ledově vychlazeného roztoku III, následovalo promíchání otáčením zkumavky a inkubace 15-30 minut na ledu (srážení proteinů). Sraženina byla usazena centrifugací (17000 g, 20 min, 4 °C), získaný supernatant dokonale smísen důkladným protřepáním zkumavky se 6/10 objemu vychlazeného izopropanolu a ihned centrifugován (2800 g, 5 min).

Supernatant byl odstraněn a sediment ponechán ve zkumavce oschnout, posléze rozpuštěn v 300 μ l deionizované vody a smísen se stejným objemem 10 M LiCl. Následovala desetiminutová inkubace při -80 °C. Vzniklá sraženina byla usazena centrifugací (16000 g, 5 min), supernatant smísen s jedním objemem 96% etanolu a opět inkubován 10 minut při -80 °C. Vysrážená plazmidová DNA byla usazena centrifugací (16000 g, 5 min), sediment odstraněn a sraženina opláchnuta 1 ml 70% etanolu. Následovala opětovná centrifugace a odstranění supernatantu. Sediment byl ponechán oschnout (odstranění zbytkového etanolu) a rozpuštěn

obvykle ve 100 µl deionizované vody (případně objem vody upraven dle velikosti sedimentu plazmidové DNA). Množství a kvalita vyizolované DNA byla posléze ověřena elektroforetickou analýzou.

3.2.8. Izolace plazmidové DNA z buněk *E. coli* pomocí NucleoSpin® Plasmid

Izolace plazmidové DNA z buněk *E. coli* byla prováděna za použití komerčního kitu **NucleoSpin® Plasmid (Macherey – Nagel, BRD)**, postupováno bylo podle standardního protokolu (Standard protocol: Isolation of plasmid DNA from *E. coli* with NucleoSpin® Plasmid). Obvykle byly použity 2 ml přes noc třepané kultury v LB médiu s ampicilinem. Množství a kvalita vyizolované DNA byla ověřena elektroforetickou analýzou, přesná koncentrace měřena spektrofotometrem NanoDrop (ND-2000 Thermo Fisher Scientific Inc).

3.2.9. Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)

Pokud není u konkrétních experimentů uvedeno jinak, byla pro PCR použita směs s komponentami výsledných koncentrací uvedených v tabulce. Příprava směsi probíhala v 0,2ml mikrozkušavkách obvykle na ledu a jednotlivé složky byly přidávány ve stejném pořadí, jak za sebou následují v tabulce. Objem směsi činil 10-100 µl (dle potřeby konkrétního experimentu). Inkubace probíhala v termocycleru PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) podle příslušného PCR programu navrženého pro konkrétní experiment. Používané DNA polymerázy jsou uvedeny v kapitole 3.1.3, přehled DNA primerů v kapitole 3.1.8. Konkrétní programy PCR jsou uvedeny v kapitole Výsledky vždy u příslušného experimentu.

Směs pro polymerázovou řetězovou reakci:

Složka	Výsledná koncentrace
Deionizovaná voda	-
Pufr pro DNA polymerázu	1×
MgCl ₂	1,5 až 2,5 mM
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	250 µM každý
Primer1	1 µM
Primer2	1 µM
Vzorek DNA	0,2 pg/µl až 20 ng/µl
DNA polymeráza	dle doporučení výrobce, viz 3.1.3

3.2.10. Amplifikace DNA metodou Colony PCR

Výchozím materiálem pro amplifikaci konkrétní DNA pomocí této metody byly celé buňky mikroorganismu *S. cerevisiae*. Vždy byla použita čerstvá (obvykle dvoudenní nárůst při teplotě 30 °C) kultura inkubovaná na pevném médiu. Biomasa z jedné menší monokolonie byla resuspendována v malém množství deionizované vody (cca 5-7 µl) a podrobena inkubaci v termocycleru (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research) při 95 °C po dobu 5 minut. Mezitím byl připraven premix z ostatních složek. Reagencie byly přidávány v takovém množství, aby jejich výsledná koncentrace po smísení se suspenzí buněk odpovídala hodnotám uvedeným v tabulce. Výsledný objem reakční směsi obvykle činil 15-25 µl.

Složka	Výsledná koncentrace
Deionizovaná voda	-
Pufr pro DNA polymerázu	1 ×
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	250 µM každý
Primer1	1 µM
Primer2	1 µM
DNA polymeráza	dle doporučení výrobce

Suspenze byla ochlazená na ledu a smísená s připraveným premixem. Směsi byly poté podrobeny inkubaci v termocycleru, parametry programu byly zvoleny dle konkrétního použití a jsou společně s typem DNA polymerázy a použitými primery uvedeny v kapitole Výsledky u konkrétních experimentů. Seznam všech DNA polymeráz a primerů udávají kapitoly 3.1.3 a 3.1.8.

3.2.11. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Štěpení DNA probíhalo dle doporučení výrobce restrikčních enzymů, nejčastěji firmy Fermentas, v případě štěpení kombinací dvou enzymů bylo postupováno dle konkrétního návodu získaného on-line nástrojem Double Digest téže firmy (www.fermentas.com). Při štěpení jedním enzymem bylo obecně postupováno způsobem uvedeným níže. Smísením uvedených složek byla připravena restrikční směs:

Složka	Množství
10× koncentrovaný vhodný restrikční pufr	1/10 výsledného objemu
DNA (rozpuštěná v deionizované vodě)	0,1-4 µg (dle výsledného objemu)
Deionizovaná voda	doplněno do výsledného objemu

V závislosti na struktuře a čistotě vzorku přidáváno 1-10 U enzymu/ μg DNA. Inkubace probíhala 1-4 hodiny při optimální teplotě štěpení (nejčastěji 37 °C), reakce byla obvykle zastavena ochlazením směsi na -20 °C. V případě kontaminace vzorků DNA molekulami RNA byly přidávány navíc 0,2 μl RNázy A (10 mg/ml). Výsledný objem byl nejčastěji zvolen 20 μl (pro restriční ověření DNA) či 50 μl (pro izolaci získaných fragmentů z agarózového gelu). Po proběhnutí reakce byla provedena elektroforetická analýza štěpené DNA, případně následovala izolace požadovaných fragmentů z agarózového gelu.

3.2.12. Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **1× TAE**
40 mM Tris, 20 mM ledová kyselina octová, 2 mM Na_2EDTA ; pH 8,5
- **6× Loading dye** (Fermentas)
0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7,6
- **Ethidium bromid** (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Elektroforéza DNA vzorků byla prováděna v aparaturách pro horizontální gelovou elektroforézu (Blue Marine 100 a 200, Serva; vzdálenost elektrod 18 cm, respektive 28,5 cm) za použití pufru 1× TAE. Gely byly připravovány z agarózy značky SeaKem® LE agarose (Cambrex BioScience Rockland), nejčastěji o koncentraci 1-1,5 % (v závislosti na velikosti analyzovaných fragmentů DNA), délky 6-10 cm, tloušťky 3-5 mm. Vzorky (5-50 μl) smíšené se vzorkovým pufrem (který činil 1/6 výsledného objemu) byly nanášeny do jamek o rozměrech 4 až 15 × 1 mm. Použité standardy velikostí fragmentů jsou uvedeny v kapitole 3.1.9). Dělicí napětí se pohybovalo v rozmezí 0,3-10 V/cm. Gely byly následně barveny v roztoku ethidium bromidu (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) po dobu cca 10 minut a fotografovány v procházejícím UV záření (transluminátor FOTO/UV21, Fotodyne incorporated) fotoaparátem s červeným/UV-filtrem (digitální fotoaparát Panasonic DMC-FZ27). Expozice trvala obvykle 2-2,5 sekundy.

3.2.13. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu

Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu byla prováděna za použití komerčního kitu NucleoSpin® Extract II (Macherey – Nagel), postupováno bylo podle návodu výrobce. Použitý objem elučního pufru se pohyboval v rozmezí 15-40 μ l. V některých případech byl pro zvýšení výtěžků eluční pufr temperován na teplotu 70 °C. Množství a kvalita izolátů byla ověřena elektroforetickou analýzou, přesná koncentrace měřena spektrofotometrem NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.2.14. Ligace DNA v roztoku

Ligace fragmentů DNA probíhala za použití T4 DNA ligázy (3.1.3; Fermentas). Používán byl protokol pro ligaci vektoru a inzertu s kohezními konci:

Reakční směs:

Složka	Množství
DNA vektoru	20-100 ng
DNA inzertu	v molárním poměru 1:1 až 5:1 vzhledem k vektoru
10 \times ligační pufr	2 μ l
T4 ligáza	1 U
Deionizovaná voda	doplněno do objemu 20 μ l

Ligační směs byla inkubována cca 4 hod. při teplotě asi 20 °C, případně pro zvýšení ligační účinnosti následně přenesena do vodní lázně o pokojové teplotě, umístěna v lázni do lednice a ponechána ligovat přes noc. Inaktivace ligázy následně probíhala zahřáním směsi na 70 °C po dobu 5 minut. Jeden až dva mikrolitry ligační směsi byly poté transformovány elektroporací do buněk *E. coli*.

3.2.15. Zaklonování produktů PCR pomocí TOPO TA Cloning® Kit

Tato metoda vyžaduje přítomnost jednonukleotidových přesahů na 3' koncích vláken DNA molekul. Proto se při PCR využívá polymeráza Taq, která na 3' konec syntetizovaného vlákna přidává jeden adenosin navíc. Pokud experiment vyžaduje použití jiné DNA polymerázy než Taq, je nutné po proběhnutí PCR ke směsi polymerázu Taq přidat a inkubovat po dobu 8-10 minut při 72 °C.

Použit byl kit TOPO TA Cloning® od firmy Invitrogen, postupováno bylo dle návodu. Vzhledem k vysoké účinnosti procedury byl celý postup prováděn s polovičním objemem komponent (viz tabulku dále).

Složení reakční směsi:

Složka	Množství
Salt solution	0,5 µl
pCR [®] II-TOPO	0,5 µl (5 ng)
Inzert (PCR produkt)	v molárním množství 1:1 až 5:1 vzhledem k vektoru
Deionizovaná voda	doplněno do celkového objemu 3 µl

Inkubace směsí při laboratorní teplotě trvala po dobu 30 minut. Následovala transformace 25 µl chemokompetentních buněk DH5α (Invitrogen) jedním mikrolitrem připravené směsi. Zvolena byla chemická metoda transformace pomocí teplotního šoku (30 s při 42 °C). Výsev byl proveden na dvě misky s ŽAMP médiem – 1/6 objemu na jednu misku, zbytek na druhou. Výsev je možno provádět na ŽAMP médium s přidaným IPTG a X-Gal pro vizuální odlišení kolonií obsahující TOPO-vektor s vloženým inzertem (bílé kolonie – inzercí produktu PCR dojde k přerušení genu lacZalfa) od kolonií s vektorem bez inzertu (kolonie modré).

3.2.16. Izolace celkové RNA z buněk *S. cerevisiae*

Pro izolaci celkové RNA byla použita třepaná kultura *S. cerevisiae* v exponenciální fázi (OD = 0,6-0,8) o objemu odpovídajícímu celkové OD = 0,8 – tj. cca 1-1,5 ml.

Samotná izolace probíhala pomocí kitu **MasterPure[™] Yeast RNA purification kit** (Epicentre Biotechnologies), konkrétně dle protokolu A. Používán byl laboratorní materiál ošetřený proti RNázám a voda ošetřená DEPC (3.1.11). Izopropanol a 70% etanol (připravený smísením 96% etanolu a vody ošetřené DEPC) byly používány ledově vychlazené. Koncentrace izolované RNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific). Vzorby byly skladovány při teplotě -80 °C.

3.2.17. Radioaktivní značení primerů a DNA markeru

Značení probíhalo pomocí sady **Primer Extension System – AMV Reverse Transcriptase (Promega, USA)** a radioaktivně značeného [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), postupováno bylo podle návodu v kitu. Jako kontrolní primer byl v této práci použit primer YU14, specifickým primerem byl YAC06 (3.1.8). Voda použitá při tomto postupu byla ošetřena proti RNázám (3.1.11).

Následující dvě tabulky uvádí složení reakčních směsí pro značení primerů, respektive DNA markeru Φ X174 HinfI DNA marker (3.1.9).

Reakční směs pro značení primerů:

Složka	Množství
Primer (10 μ M)	1 μ l
T4 PNK 10 \times pufr	1 μ l
[γ ³² P] ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	3 μ l
Voda	3 μ l
T4 Polynukleotid kináza (10 U/ μ l)	1 μ l

Reakční směs pro značení DNA markeru:

Složka	Množství
Defosforylovaný Φ X174 HinfI DNA marker (50 ng/ μ l)	5 μ l
T4 PNK 10 \times pufr	1 μ l
[γ ³² P] ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	3 μ l
T4 Polynukleotid kináza (10 U/ μ l)	1 μ l

Směsi byly inkubovány 10 minut při 37 °C, následně 2 min při 90 °C (pro inaktivaci T4 PNK) a usazeny centrifugací. Reakční směsi se značenými primery byly naředěny přidáním 90 μ l vody, ke směsi s DNA markerem bylo přidáno 190 μ l vody.

Následně byla stanovena míra inkorporace [γ ³²P]ATP, postupováno bylo dle návodu v kitu. Inkorporace by měla optimálně dosahovat alespoň 30 %, čehož bylo v případě pokusů této práce dosaženo. Značený DNA marker byl poté smísen s Loading Dye v poměru 1:9.

- **Loading Dye:**

98% formamid, 10 mM EDTA, 0,1% xylen cyanol, 0,1% bromfenolová modř

Značené primery a marker byly skladovány pro následné použití v -20 °C v olověné krabici.

3.2.18. Primer extension

Metoda primer extension byla prováděna za pomoci sady **RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit** (Fermentas) a pro konkrétní použití byla optimalizována Mgr. Ondřejem Gahurou, PhD. Jako výchozí materiál pro tuto metodu byla použita celková RNA izolovaná z buněk *S. cerevisiae*. Vzorokly byly

udržovány na ledu, pokud není uvedeno jinak. Před každým krokem byla reakční směs vzorky krátce centrifugována pro usazení objemu na dno zkumavky.

Smísením následujících komponent byla připravena směs, která byla následně inkubována 5 minut při 65 °C:

Složka	Množství
Celková RNA	3 µg
Specifický primer	15-20 pmol
Kontrolní primer	15-20 pmol
Voda	doplněno do objemu 12,5 µl

Na ledu byly ke směsi přidány další složky z kitu (celkem 7,5 µl):

Složka	Množství
5× reakční pufr	4 µl
Ribonukleázový inhibitor RiboLock™ (40 U/µl)	0,5 µl
dNTP mix (10 mM každý dNTP)	2 µl
Reverzní transkriptáza RevertAid™ M-MuLV (200 U/µl)	1 µl

Výsledná směs (o celkovém objemu 20 µl) byla inkubována 1 hodinu při 42 °C, posléze smísená s 20 µl Loading Dye (98% formamid, 10 mM EDTA, 0,1% xylen cyanol, 0,1% bromfenolová modř).

3.2.19. Analýza produktů Primer extension pomocí PAGE s následnou vizualizací pomocí techniky Phosphorimaging

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **Pufr TBE**
89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA; pH 8,0
- **40% protogel (AA/BIS)**
38% akrylamid, 2% N,N'-metylenbisakrylamid
- **10% APS** (amonium persulfát)
- **TEMED** (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin)

K analýze byl použit denaturující 8% polyakrylamidový gel o rozměrech 16 × 18 cm. Pro přípravu gelu bylo použito 50 ml premixu následujícího složení:

Složka	Výsledná koncentrace
Protogel (AA/BIS)	8%
Močovina	7 M
Pufr TBE	1×

K premixu bylo přidáno 200 μ l 10% APS a 35 μ l TEMED, ihned nalito mezi skla, jejichž spodní a boční hrany byly utěsněny 1% agarózou rozpuštěnou v 1 \times TBE. Po polymeraci byl gel umístěn do aparatury pro vertikální gelovou elektroforézu (Vertical gel electrophoresis system model V16, Bethesda Research Laboratories) zalité pufrem TBE a ponechán při napětí cca 280 V (zdroj Lightning Volt Power Supply Model OSP-4000L, OWL Separation systems, USA) asi 20 minut zahřát. Vzorky a DNA marker byly před nanášením do gelu inkubovány 10 min při 90 °C, jamky v gelu byly promyty pufrem TBE pomocí mikropipety Hamilton, aby došlo k odstranění vyplavené močoviny. Vzorky (17,5 μ l) a radioaktivně značený DNA marker (20 μ l, viz 3.1.9) byly nanášeny pomocí mikropipety Hamilton. Elektroforéza probíhala při napětí asi 300 V. Gel byl poté přenesen na filtrační papír Whatman (Whatman 3MM Chr, USA) stejných rozměrů a zabalen do potravinové fólie.

Gel zabalený do potravinové fólie byl vložen do vyvíjecí kazety s radiosenzitivním screenem (Imaging Screen-K, Kodak) a ponechán exponovat do druhého dne. Následovalo vyvolání exponovaného screenu za použití laseru External laser molecular imager FX (BIO-RAD) a scanneru Molecular imager FX (BIO-RAD). Využíván byl softwarový program Quantity One 4.5.2. Získané obrázky byly převedeny do formátu TIFF. Screen byl používán opakovaně, před každým dalším použitím byl 15-30 minut inkubován pod lampou Screen Eraser-K (BIO-RAD) pro „vymazání“ předchozího signálu. V některých případech byly signály dále vyhodnocovány denzitometricky, a to za použití programu ImageQuant.

3.2.20. Příprava proteinových extraktů *S. cerevisiae*

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **NaOH- β -merkaptóetanol**
1,85 M NaOH, 7% β -merkaptóethanol
- **2 \times Laemmli pufr**
0,112 M Tris-HCl, 3,42% SDS, 12% (v/v) glycerol, 0,002% bromfenolová modř; pH 6,8
- **50% TCA** (trichloroctová kyselina)
- **1 M Tris**

Pro přípravu proteinových extraktů byla použita třepaná kultura *S. cerevisiae* v exponenciální růstové fázi ($OD_{600} = 0,3-0,8$) o celkovém množství buněk odpovídajícím třem OD ($0,6-1,5 \times 10^8$ buněk). Příslušný objem kultury byl centrifugován (1600 g, 3 min, 20 °C), sediment resuspendován v 1 ml deionizované vody a opět centrifugován (1600 g, 1 min, 20 °C). Supernatant byl odstraněn, pelet ještě jednou centrifugován, zbytkový supernatant byl poté dokonale odstraněn. Následující kroky probíhaly v ledové lázni. Získaný sediment byl smísen se 100 μ l čerstvě připraveného roztoku NaOH- β -merkptoethanol. Směs byla celkem 2 minuty intenzivně vortexována. Aby nedocházelo k zahřívání vzorku, vortexování bylo prováděno 4 \times po dobu 30 s, po každých 30 s následovalo ochlazení stejnou dobu v ledové lázni. Ke vzorku bylo poté přidáno 100 μ l 50% TCA, inkubováno 5 minut na ledu. Následovala 2 \times opakovaná centrifugace (13000 g, 10 min, 0 °C), pokaždé byl odstraněn supernatant. Výsledný sediment byl resuspendován v 500 μ l nepufrovaného ledově vychlazeného 1 M Tris a ihned centrifugován (13000 g, 1 min, 0 °C). Získaný pelet byl poté resuspendován ve 100 μ l 2 \times Laemmli pufru, směs byla inkubována 5 minut při teplotě 95 °C a poté ihned přenesena do -80°C.

3.2.21. SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)

Pro elektroforetickou analýzu proteinových vzorků byl používán 12% separační gel o tloušťce 0,75 mm. Elektroforéza byla prováděna v komerční soupravě Mini-PROTEAN[®] 3 CELL (BIO-RAD), zdrojem napětí byl PowerPac universal (BIO-RAD).

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **Protogel (30% AA/ 0,8% BIS)**
30% akrylamid, 0,8% N,N'-metylenbisakrylamid
- **4 \times Tris-HCl/SDS, pH 8,8**
1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS; pH 8,8
- **4 \times Tris-HCl/SDS, pH 6,8**
0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS; pH 6,8
- **Elektrodový pufr**
25 mM Tris-HCl, 190 mM glycin, 0,1% SDS; pH 8,3
- **10% APS** (amonium persulfát)

- **1M DTT** (dithiothreitol)
- **TEMED** (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin)

Příprava proteinových vzorků:

Proteinové extrakty (příprava viz 3.2.20) uložené v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly 5 minut inkubovány při teplotě $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ a smíseny s 1/20 objemu 1 M DTT.

Příprava polyakrylamidového gelu:

V kádince byla smíšena uvedená množství následujících složek:

Složka	Množství
Protogel (30% AA/ 0,8% BIS)	2,0 ml
4× Tris-HCl/SDS, pH 8,8	1,25 ml
Deionizovaná voda	1,75 ml
TEMED	3,4 μl
10% APS	16,5 μl

Směs byla zamíchána kroužením kádinky a okamžitě nanášena do připravené aparatury mezi skla a převrstvena destilovanou vodou. Po polymeraci gelu (10-30 min) byla voda odstraněna (pipetou a filtračním papírem) a na separační gel byla nanášena směs pro zaostřovací gel připravená smísením následujících složek:

Složka	Množství
Protogel (30% AA/ 0,8% BIS)	325 μl
4× Tris-HCl/SDS, pH 6,8	625 μl
Deionizovaná voda	1,55 ml
TEMED	2,5 μl
10% APS	12,5 μl

Do gelu byl ihned zasunut hřebínek. Po polymeraci zaostřovacího gelu byl hřebínek vyňat a vzniklé jamky byly několikrát propláchnuty elektrodovým pufrem. Připravené vzorky o objemu 15 μl a marker proteinových velikostí (1-2 μl , viz 3.1.9) byly nanášeny pomocí mikropipety Hamilton. Elektroforéza probíhala v aparatuře zalité elektrodovým pufrem, v zaostřovacím gelu při konstantním proudu 10 mA/gel, po vstupu vzorků do separačního gelu při hodnotě 20 mA/gel. Gel byl dále použit pro přenos proteinů na membránu metodou Western blot (viz 3.2.22).

3.2.22. Western blot

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **Přenosový pufr**
25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% metanol, 0,05% SDS; pH 8,3
- **1× TBS**
20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl; pH 8,0
- **TTBS**
1× TBS, 0,05% Tween 20; pH 8,0

POUŽITÝ MATERIÁL:

- **Filtrační papír Whatman** (Whatman 3MM Chr, USA)
- **Nitrocelulózná membrána** (Nitrobind, MSI, USA)

Pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulóznou membránu metodou Western blot byl použita aparatura Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD). Polyakrylamidový gel s rozdělenými proteiny (viz 3.2.21) byl po dobu 10 až 20 minut ekvilibrován v přenosovém pufru, taktéž papír Whatman, nitrocelulózná membrána a houbičky byly nasyceny v přenosovém pufru. Sestavení přenosové kazety probíhalo dle návodu výrobce (pod hladinou přenosového pufru). Přenos byl prováděn v aparatuře s přenosovým pufrem při napětí 100 V po dobu dvou hodin, chlazeno přítomností nádoby s ledem. Po skončení přenosu a rozebrání kazety byla membrána oplachována 10 min v pufru TBS. Následovala imunodetekce proteinů na membráně pomocí protilátek (viz 3.2.23).

3.2.23. Imunodetekce proteinů na membráně pomocí konjugátu sekundární protilátky s alkalickou fosfatázou

POUŽITÉ ROZTOKY:

- **1× TBS**
20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl; pH 8,0
- **TTBS**
1× TBS, 0,05% Tween 20; pH 8,0
- **Blokovací roztok:**
1× TBS, 5% odtučněné mléko, 0,1% Tween 20

- **Roztok s primární protilátkou:**
protilátka HA.11 (ředěna 1:1000), 1× TBS, 5% odtučněné mléko, 0,05% Tween 20
- **Roztok se sekundární protilátkou:**
protilátka GAM-AP (ředěna 1:4000), 1× TBS, 3% odtučněné mléko, 0,05% Tween 20
- **Pufr AP:**
100 mM Tris-HCl, 0,5 mM MgCl₂; pH 9,5
- **AP color reagent A (BIO-RAD)**
NBT (nitroblue tetrazolium) v DMF (dimetylformamid)
- **AP color reagent B (BIO-RAD)**
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát) v DMF
- **Vyvíjecí roztok**
pufr AP, AP color reagent A (ředěno cca 1:500), AP color reagent B (ředěno cca 1:500)

Blokování membrány probíhalo v 30 ml blokovacího roztoku po dobu 1,5 hodiny při laboratorní teplotě na kývací třepačce. Následovala inkubace ve 4 ml roztoku s primární protilátkou HA.11 (Covance, viz 3.1.4) přes noc při 4 °C na kývací třepačce. Nenavázaná protilátka byla odmyta inkubací membrány 4 × 10 minut v pufru TTBS (vždy vyměněn roztok) na orbitální třepačce. Membrána byla poté inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě s 12 ml roztoku sekundární protilátky. Použita byla protilátka GAM-AP (BIO-RAD, viz 3.1.4) konjugovaná s alkalickou fosfatázou. Odmytí nenavázané sekundární protilátky proběhlo stejným způsobem jako v případě protilátky primární. Membrána byla poté po dobu 5 minut promývána v roztoku TBS, krátce opláchnuta v pufru AP a inkubována v 50 ml vyvíjecího roztoku ve tmě po dobu několika hodin. Po vizualizaci signálu byla membrána opláchnuta destilovanou vodou, vysušena a zatavena do polyetylenové fólie.

4. Výsledky

Cílem tohoto diplomového projektu bylo blíže popsat konzervovaný motiv RED proteinu Slu7. Rozhodli jsme se proto tento motiv podrobit cílené mutagenézi a na základě vlastností buněk nesoucích připravené alely *slu7* v porovnání s wt buňkami charakterizovat úlohu studovaného motivu. Pomocí polohově řízené mutagenéze genu *SLU7* jsme připravili sadu alel kódujících proteiny Slu7, které nesou jednoaminokyselinové záměny v motivu RED (4.1). Následovalo testování fenotypu získaných mutant (životaschopnost (4.1.4), citlivost ke zvýšené teplotě (4.1.5)), identifikace genetických interakcí mutací *slu7* s mutacemi v genech *PRP45* a *PRP22* (4.2) a analýza sestřihu pre-mRNA různých substrátů (4.3).

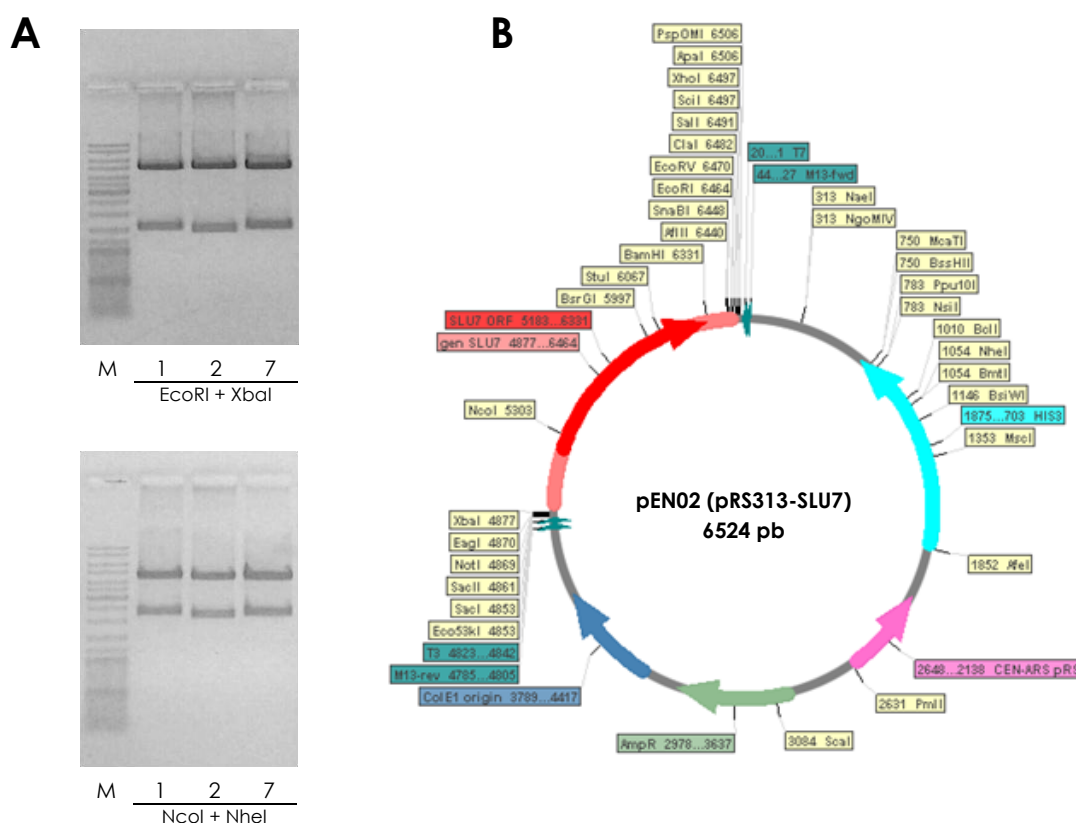
4.1. Příprava mutant *slu7* a charakterizace fenotypu

V první řadě bylo potřeba vytvořit sadu alel *slu7*, které ponosou mutace způsobující vždy jednu aminokyselinovou záměnu v motivu RED. Vzhledem k tomu, že šlo o cílenou mutagenézi, bylo potřeba způsobit záměnu konkrétních nukleotidů genu *SLU7*. Takové záměny lze mnohem snáze připravit, pokud se daný gen nachází na plazmidu, než v případě lokalizace na chromozomu. Rozhodli jsme se proto připravit plazmid nesoucí divokou verzi (wt) genu *SLU7*, podrobit ho polohově řízené mutagenézi pomocí PCR a získanými plazmidy s mutantním *slu7* transformovat kvasinkový kmen s chromozomální delecí genu *SLU7*.

4.1.1. Příprava plazmidu pEN02 (pRS313-*SLU7*)

Výchozím materiálem pro přípravu vhodného plazmidu nesoucího wt gen *SLU7* byla použita sekvence *SLU7* nesená na plazmidu získaném od laboratoře prof. Schwer. Tato sekvence *SLU7* je dlouhá 1593 pb a nese vzhledem ke chromozomální verzi genu jisté změny, které usnadňující případné manipulace (např. zavedení některých nových restrikčních míst, zkrácení 3' nepřekládané oblasti, viz Příloha), nicméně nemění aminokyselinovou sekvenci proteinu. Konkrétní inzert nesoucí tuto sekvenci byl v případě této práce získán restrikčním štěpením plazmidu pEN01 (pBluescript-SLU7), který byl připraven v předchozích experimentech. Jako vhodný

vektor pro následující aplikace byl zvolen plazmid pRS313. Jedná se o centromerický plazmid, selekčním markerem je gen *HIS3*. Plazmidy pRS313 i pEN01 byly podrobeny štěpení pomocí restričních endonukleáz EcoRI a XbaI, následovala elektroforetická analýza restričních směsí. Fragменты o velikosti 4937 pb původem z pRS313 a 1587 pb z pEN01 (fragment nesoucí *SLU7*) byly z gelu vyříznuty a izolovány. Následovala ligace obou fragmentů, elektroporace buněk *E. coli* DH5a získanými ligáty a výsev buněk na selekční médium ŽAMP. Z několika získaných transformantů byla izolována plazmidová DNA, která byla následně podrobena několika různým restričním štěpením pro ověření přítomnosti a správné lokalizace inzertu. Dva izoláty byly následně za použití primerů M13F a M13R sekvenovány. Izolát č. 1 odpovídal očekávané sekvenci genu *SLU7*. Připravený plazmid (pRS313-*SLU7*) byl označen názvem pEN02.



Obrázek 10: Plazmid pEN02 (pRS313-*SLU7*). **A** – Restriční ověření izolátů #1, #2 a #7 plazmidu pRS313-*SLU7*. Štěpeno kombinacemi enzymů EcoRI + XbaI (očekávané fragmenty 1587 a 4937 nt) a NcoI + NheI (fragmenty 4245 a 2271 nt); 1% agarózový gel, marker DNA Ladder Mix (M). Izolát #1 byl pojmenován pEN02 a použit pro další experimenty. **B** – Mapa plazmidu pEN02, vyznačeny hlavní komponenty plazmidu a některá unikátní restriční místa.

4.1.2. Cílená mutageneze plazmidu pEN02 – příprava plazmidů pEN06 až pEN11

Pro vytvoření nukleotidových záměn v genu *SLU7* byl použit kit pro polohově řízenou mutagenezi pomocí PCR s názvem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit. Touto metodou lze vytvořit záměny v sekvenci DNA, která bude poté kódovat pozměněný protein. Principem metody je využití dvou relativně dlouhých (cca 40 nt) naprosto komplementárních primerů, které nesou uprostřed sekvence požadované nukleotidové záměny. Prodlužováním těchto primerů podle komplementárních cirkulárních vláken plazmidové DNA pomocí vysoce přesné a procesivní DNA polymerázy PfuUltra vznikají lineární molekuly o délce stejné jako původní templátová molekula, nesoucí navíc požadované mutace. Poté, co je snížením teploty umožněno jednovláknovým molekulám renaturovat, vznikají dvouvláknové cirkulární molekuly, jejichž každé vlákno nese jedno přerušení. Po proběhnutí PCR se lze navíc zbavit templátových molekul původního plazmidu, který mutace neobsahuje. Inkubací získané směsi s restriční endonukleázou DpnI, která rozpoznává metylovanou sekvenci 5'-Gm⁶ATC-3', dochází k rozštěpení templátových molekul DNA. Plazmidová DNA izolovaná z většiny bakteriálních kmenů je totiž metylovaná metylázou Dam, produkt polymerázové řetězové reakce metylován není. Po vpravení cirkulárních produktů do buněk *E. coli* dochází díky opravným mechanismům těchto bakterií k zacelení jednořetězcových přerušení, a tak k získání intaktního plazmidu s kýženými mutacemi.

Byly navrženy takové mutace, které ve studovaném motivu způsobí záměnu jedné konzervované nabitě aminokyseliny za aminokyselinu s opačným nábojem či aminokyselinu neutrální. Jako kontrola byla navržena jedna záměna mimo oblast motivu. Příslušné sekvence DNA primerů pro jednotlivé aminokyselinové záměny byly navíc navrhнутy tak, aby zavedením mutace vzniklo nové restriční místo, jehož přítomnost umožní snadno odlišit mutovaný plazmid od původního.

Za použití dvojic primerů, které uvádí Tabulka 1, byl plazmid pEN02 pomocí kitu QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis podroben polymerázové řetězové reakci (složení směsí a program PCR viz Tabulka 2 a Tabulka 3). Po proběhnutí reakce následovala inkubace vzorků s 0,3 µl enzymu DpnI (10 U/µl) při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny.

Mutace	Primery	Sekvence forward primeru 5'-3'	RM
D206A	EN01, EN02	GGAAAAGACAAATCCCAA <u>ACTG</u> <u>CAG</u> AAAACACTATGGGAT ACAGATG	PstI
R247E	EN03, EN04	CTCAGTTGTATAGGACATCAACG <u>GAGCTC</u> CAGAGAAGATA AGGCTGCTTACTTG	SacI
R247A	EN05, EN06	CTCAGTTGTATAGGACATCAAC <u>AGCGCT</u> AGAGAAGATA AGGCTGCTTACTTG	AfeI
R249A	EN07, EN08	GTATAGGACATCAACGAGATTG <u>GC</u> AGAAGATAAGGCTGC TACTTG	není
R271A	EN09, EN10	CGGAGAGTAATTATGATCCTAAATC <u>AGCGCT</u> TACAAAA CTGAAACACTGGGCGC	AfeI

Tabulka 1: Navržené aminokyselinové záměny ve studovaném motivu proteinu Slu7 a příslušné DNA primery pro polohově řízenou mutagenézi. Tabulka udává vždy pouze sekvenci jednoho primeru z dvojice (s lichým číslem, forward primer), druhý je 100% komplementární. Zavedené restriční místo (RM) je zvýrazněno podtržením, nukleotidové záměny způsobující změnu aminokyseliny jsou označeny červeně, ostatní záměny označeny modře.

Reagencie	Množství [μl]
voda	11,0
pufr	1,5
dNTP mix	0,3
pEN02 (10 ng/ul)	1,5
primer1 (10 μM)	0,3
primer2 (10 μM)	0,3
PfuUltra polymeráza (2,5 U/ μl)	0,3
celkem	15,2

Tabulka 2: Použité reagencie a jejich množství pro polohově řízenou mutagenézi plazmidu pEN02. Množství odpovídá jedné reakční směsi. Za primer1 a 2 byly dosazeny vždy příslušné primery z navržené dvojice

Krok	Teplota (°C)	Čas (m:ss)
1	95	0:30
2	95	0:30
3	50	1:00
4	68	6:45
5	go to 2, 19 x	
12	END	

Tabulka 3: Program PCR použitý pro polohově řízenou mutagenézi plazmidu pEN02.

Takto získané produkty byly metodou teplotního šoku transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* XL1-blue (po 1 μl vzorků k 50 μl buněk), následovala kultivace na pevném selekčním médiu s obsahem ampicilinu (ŽAMP médium). Několik monoklonií získaných transformací každým produktem PCR bylo podrobena izolaci plazmidové DNA. Přítomnost zavedených mutací byla nejprve ověřena štěpením restričními enzymy, které rozpoznávají a štěpí nově vytvořené místo v oblasti mutace (viz Tabulka 1; zavedením mutace R249A žádné restriční místo zavedeno nebylo, proto nebylo možné izoláty tímto způsobem ověřit). Vhodní kandidáti byli následně ověřeni sekvenací s využitím primerů M13F a M13R. Bylo potvrzeno, že izoláty pRS313-*slu7*(D206A)#3, (R247A)#6,

(R247E)#2, (R271A)#3 a (R249A)#2 obsahují požadované záměny. Izolát pRS313-*slu7*(R247A)#2 nesl krom cílených záměn ještě další změny v sekvenci, které způsobují záměnu pěti aminokyselin motivu a zkrácení proteinu o jednu aminokyselinu. Tato náhodně vzniklá mutanta byla označena pRS313-*slu7*(S245-D251) a též použita pro další práci. Připravené plazmidy byly označeny pEN06 až pEN11. Porovnání všech získaných sekvencí motivu a příslušné názvy plazmidů zobrazuje Tabulka 4.

Plazmid	Mutace	Sekvence
pEN02	wt	242 YRTSTRLREDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271
pEN07	R247A	242 YRTSTALREDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271
pEN08	R247E	242 YRTSTELREDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271
pEN09	R249A	242 YRTSTRLAEDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271
pEN10	R271A	242 YRTSTRLREDKAAYLNDINSTESNYDPKSA 271
pEN11	(S245-D251)	242 YRTHSAERR-KAAYLNDINSTESNYDPKSR 270
pEN06	D206A	mimo studovaný motiv

Tabulka 4: Připravené mutanty *slu7*. Tabulka popisuje vytvořené plazmidy nesoucí příslušné mutace ve studovaném motivu. Zobrazen je úsek sekvence proteinu od 242. do 271. aminokyseliny (v případě mutace (S245-D251) do 270. ak). Konzervované ak motivu jsou u wt sekvence podtrženy. Změny vzhledem k původní sekvenci (wt) proteinu jsou označeny červeně. Mutace D206A leží mimo studovaný motiv, její sekvence v zobrazeném úseku je totožná se sekvencí wt. Mutanta (S245-D251) vykazuje navíc k záměnám též delecí jedné ak.

4.1.3. Příprava kmene ENY08 – kmene s chromozomální delecí genu *SLU7* (s komplementačním plazmidem pRS326-*SLU7*)

Pro testování fenotypu připravených mutant *slu7* bylo třeba získat kvasinkový kmen, který neobsahuje vlastní chromozomální verzi genu *SLU7*. Od firmy Euroscarf byl zakoupen diploidní kmen Y24023, který nese jednu funkční alelu genu *SLU7*, druhá alela je inaktivována nahrazením původní sekvence sekvencí kódující produkt zodpovědný za rezistenci kmenu k antibiotikům kanamycinu a geneticinu (tzv. kanamycinovou kazetou – kanMX4). Kmen Y24023 (*SLU7*-YDR088c) je následujícího genotypu: *BY4743; Mat a/alfa his3D1/his3D1 leu2D0/leu2D0 lys2D0/LYS2 MET15/met15D0 ura3D0/ura3D0 YDR088c::kanMX4/YDR088c*.

Sporulací jedné buňky tohoto diploidního kmene vzniknou čtyři haploidní spory, z nichž dvě ponosou wt verzi genu *SLU7* a zbylé dvě budou mít tento gen deletovaný. Vzhledem k tomu, že gen *SLU7* je pro buňky esenciální, je potřeba zajistit životaschopnost kmenů s delecí přítomností genu *SLU7* na komplementačním

plazmidu. Kmen Y24023 byl proto nejprve transformován plazmidem pRS326-SLU7. Jedná se o replikativní plazmid vyskytující se v buňkách ve vysokém počtu kopií (cca 10-40 kopií na buňku), selekčním markerem je gen *URA3*. Tento plazmid neobsahuje centromerickou oblast, a proto nedochází při buněčném dělení k jeho rovnoměrné segregaci do dceřiných buněk. Díky této skutečnosti je možné, že se plazmid z populace buněk může ztrácat, čehož bylo využito v následujících experimentech. Selekcce transformantů byla provedena na základě uracilové prototrofie kultivací na pevném médiu SD-U. Následovala sporulace buněk (viz 3.2.4) a mikromanipulace spor z devíti vřecek. Čtyři tetrády, jejichž všechny čtyři spory vyklíčily, byly následně podrobeny charakterizaci genotypu pomocí testování růstu na selekčních médiích. Přítomnost kazety *kanMX4* (tj. delece genu *SLU7*) byla testována kultivací buněk na bohatém médiu obsahujícím antibiotikum geneticin. Dále byla testována přítomnost funkční alely genu *MET15* kultivací na minimálním médiu bez methioninu (SD-Met), přítomnost funkční alely *LYS2* na minimálním médiu bez obsahu lyzinu a přítomnost komplementačního plazmidu kultivací na médiu bez uracilu. Křížením s haploidními kmeny se známým párovacím typem byl následně též zjištěn párovací typ jednotlivých kmenů. Úspěšně se podařilo charakterizovat genotyp a potvrdit společný původ všech čtyř spor z jednoho vřeka u dvou tetrád – tj. osmi haploidních kmenů (viz Tabulka 5). Pro další experimenty byl vybrán kmen ENY08.

kmen	genotyp
ENY01	<i>a slu7::kanMX4 LYS2 MET15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>
ENY02	<i>alfa slu7::kanMX4 lys2 met15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>
ENY03	<i>a SLU7 LYS2 met15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>
ENY04	<i>alfa SLU7 lys2 MET15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>
ENY05	<i>alfa SLU7 LYS2 MET15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>
ENY06	<i>a slu7::kanMX4 LYS2 met15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>
ENY07	<i>alfa SLU7 lys2 MET15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>
ENY08	<i>a slu7::kanMX4 lys2 met15 his3D1 leu2D0 ura3D0 +pRS326-SLU7</i>

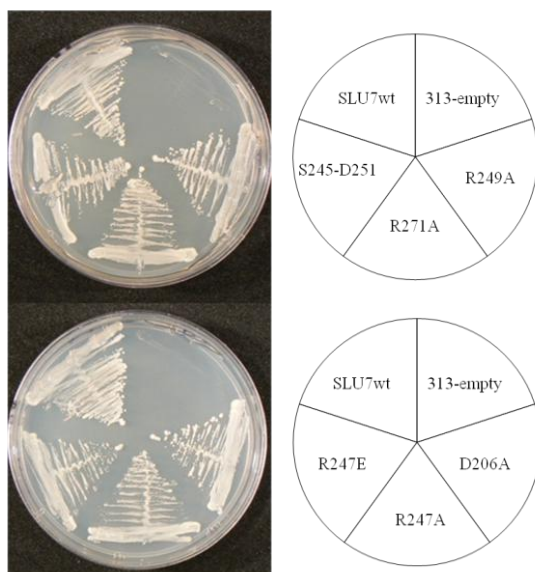
Tabulka 5: Haploidní kmeny získané sporulací diploidního kmene Y24023 a jejich genotyp. Kmeny ENY01 až ENY04 pocházejí z vřeka č. 1, kmeny ENY05 až ENY08 z vřeka č. 2. Pro další experimenty byl vybrán kmen ENY08.

4.1.4. Testování základních vlastností mutant *slu7* – viabilita

První stanovovanou vlastností připravených mutant *slu7* bylo, zda jsou schopné komplementovat chromozomální delecí genu *SLU7*. Pomocí tzv. metody plasmid shuffling bylo testováno, zda se buňky nesoucí plazmidy s mutantním *slu7* mohou obejít bez komplementačního plazmidu pRS326-*SLU7* nesoucího wt verzi genu *SLU7*. Kmen ENY08 byl jednotlivě transformován připravenými plazmidy pEN06 až pEN11, selekce proběhla na základě histidinové prototrofie. Tři monokolonie získané každou transformací byly přeneseny na médium s obsahem 5-fluoroorotové kyseliny a podrobeny testování růstu na tomto médiu.

Kyselina 5-fluoroorotová (5-FOA) je netoxická sloučenina, která je nicméně v buňkách s funkční orotin-5'-monofosfát dekarboxylázou konvertována sérií reakcí na 5-fluorouracil, který pro buňky toxický je. Přítomnost 5-fluorouracilu má za následek zablokování buněčného cyklu v S-fázi ústící v buněčnou smrt. Enzym orotin-5'-monofosfátdekarboxyláza je kódován genem *URA3*. Na médiu s 5-FOA mohou tedy přežít pouze ty buňky, které nemají tento gen funkční. V tomto případě se jedná o takové buňky, které jsou schopné ztratit komplementační plazmid pRS326-*SLU7* (který nese gen *URA3*), tj. nejsou závislé na přítomnosti wt verze genu *SLU7* tohoto plazmidu. Ztráta plazmidu není aktivním procesem, jedná se spíše o nezískání plazmidu dceřinou buňkou při replikaci. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, plazmidy, které nemají centromerickou oblast (což je i případ pRS326-*SLU7*), často při replikaci segregují do dceřiných buněk nerovnoměrně. S určitou pravděpodobností se tak v populaci objeví i buňky, které plazmid nezískaly. Pokud jsou i přesto životaschopné, porostou na médiu s 5-FOA.

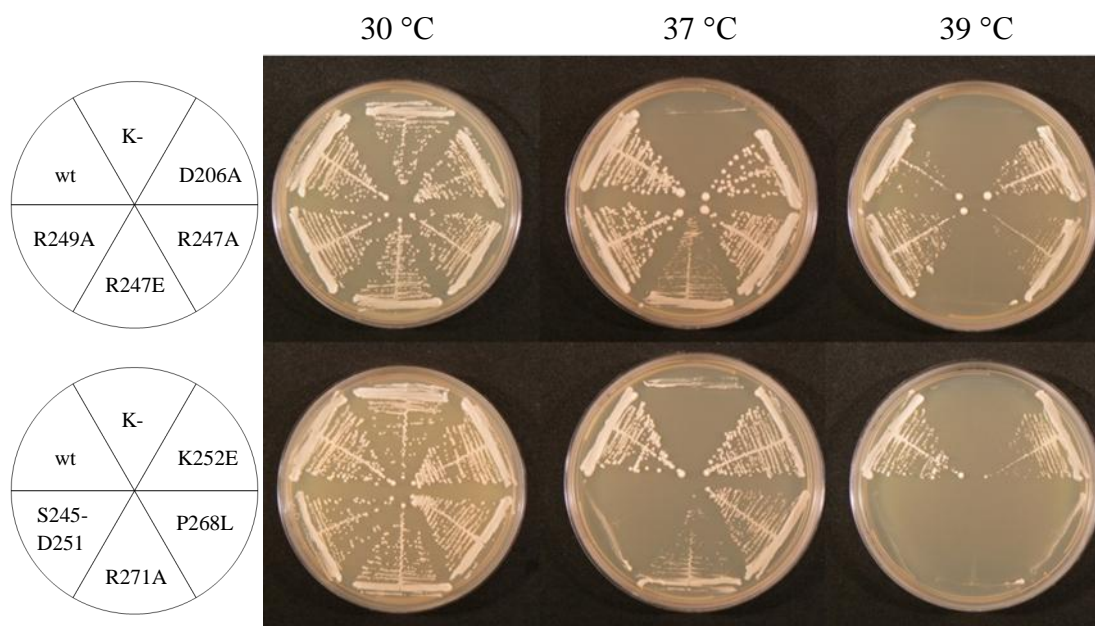
Bylo zjištěno, že všechny připravené mutanty *slu7* jsou životaschopné, všechny tři monokolonie od každého vzorku poskytly stejný výsledek. Jako pozitivní kontrola růstu na 5-FOA byl použit kmen ENY08 transformovaný plazmidem pEN02 (*HIS3*, *SLU7*). Negativní kontrolou jsou buňky ENY08 transformované prázdným plazmidem pRS313, které nemohou komplementační pRS326-*SLU7* ztratit. Výsledek ilustruje Obrázek 11 (zobrazen je vždy nárůst buněk původem jen z jedné monokolonie od každého vzorku).



Obrázek 11: Testování životaschopnosti buněk nesoucích mutantní *slu7*. Kmen ENY08 jednotlivě transformovaný plazmidy pEN06 až pEN11, kultivovaný na médiu s obsahem 5-FOA. Jako pozitivní kontrola slouží buňky transformované plazmidem pEN02 (SLU7wt), negativní kontrolou jsou buňky transformované prázdným plazmidem pRS313 (313-empty). Popisky označují kmen s konkrétní mutací v proteinu Slu7.

4.1.5. Testování základních vlastností *slu7* – teplotní senzitivita

Kmeny získané z předchozího experimentu kultivací na médiu s obsahem 5-FOA (ENY08 + plazmid nesoucí příslušnou mutantu *slu7*, bez přítomnosti komplementačního plazmidu) byly podrobeny testování teplotní senzitivity. Současně byly též testovány mutanty *slu7*(K252E) a *slu7*(P268L). Plazmidy pRS313-*slu7*(K252E) a pRS313-*slu7*(P268L) již dříve připravené Mgr. Vandou Munzarovou byly transformovány do kmene ENY08 a kultivovány na médiu s 5-FOA stejným způsobem jako předchozí popsané mutanty *slu7*. Všechny kmeny byly inkubovány na kompletním médiu YPAD při 30 °C, 37 °C a 39 °C po dobu několika dní. Opět bylo pracováno s triplikáty monoklonií od každého vzorku. Obrázek 12 ukazuje třídenní nárůst jednotlivých kmenů při uvedených teplotách (opět je zobrazen nárůst buněk vždy jen z jedné monokolonie od každého vzorku). Jako pozitivní kontrola růstu ve všech teplotách slouží kmen ENY08 transformovaný plazmidem pEN02 (nese wt *SLU7*) bez komplementačního plazmidu. Negativní kontrolou je kmen KAY02 připravený naší laboratoří (3.1.6), který je senzitivní k teplotě 37 °C a vyšší. Kmen nesoucí vícečetnou mutaci *slu7*(S245-D251) vykazuje jako jediný senzitivitu k teplotě 37 °C – není patrný žádný nárůst. Mutanty *slu7*(R247E), *slu7*(P268L) a *slu7*(R271A) při 37 °C více či méně rostou, ne však při 39 °C. Mutanty *slu7*(D206A), *slu7*(R247A) a *slu7*(R249A) teplotní senzitivitu nevykazují.



Obrázek 12: Testování teplotní senzitivity mutant *slu7*. Třídenní nárůst jednotlivých kmenů nesoucích mutace *slu7* v při teplotách 30 °C, 37 °C a 39 °C. Pozitivní kontrolou je kmen ENY08 transformovaný plazmidem pEN02 nesoucím wt SLU7 (wt), jako negativní kontrola slouží kmen KAY02 (K-), který je citlivý k teplotě 37 °C a vyšší. Popisky vlevo označují kmen s konkrétní mutací proteinu Slu7.

4.2. Testování genetických interakcí *slu7*

4.2.1. Syntetická letalita mutací *slu7* s mutací *prp45(1-169)*

O syntetickou letalitu dvou mutací se jedná v takovém případě, kdy každá mutace zvlášť je schopná podpořit růst buněk, nicméně současná přítomnost obou mutací způsobuje letalitu. Mutace *slu7(K252E)* a *slu7(P268L)* nacházející se ve studovaném vykazují syntetickou letalitu s mutací *prp45(1-169)*. Bylo proto rozhodnuto testovat, zda i mutace připravené v této práci v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* poskytnou stejný výsledek.

4.2.1.1. Příprava kmene ENY13 *slu7Δ prp45(1-169)*

Pro testování syntetické letality mutací *slu7* a *prp45* bylo třeba připravit kmen s chromozomální mutací *prp45(1-169)* a současně s chromozomální delecí genu *SLU7*, která bude komplementována přítomností wt verze téhož genu na plazmidu. Bylo proto rozhodnuto použít kmen ENY08 (*slu7Δ* + pRS326-*SLU7*) a pomocí integrace expresní kazety vytvořit zkrácenou verzi genu *PRP45*, která bude kódovat pouze prvních 169 aa proteinu. Kvasinky *S. cerevisiae* vykazují relativně vysokou míru homologní rekombinace, čehož je možné využít při přípravě delečních mutant různých genů. Obvykle se tak děje přípravou expresní kazety nesoucí na obou koncích nástavce homologní k sekvenci ohraničující oblast, která má být deletována. S určitou pravděpodobností dojde k výměně sekvencí nacházejících se mezi oblastmi homologie – tzn. k nahrazení sekvence části genu sekvencí expresní kazety. Kazeta obvykle kóduje určitý selekční marker, v našem případě byla použita kazeta udílející buňkám rezistenci k antibiotiku nourseothricinu nesená na plazmidu pFA6a-3HA-natMX6 (Van Driessche et al., 2005). Na N-konci kazety se nacházejí tři repetice části sekvence hemagglutininu (influenza virus hemagglutinin epitope; tzv. HA-tag) následované terminátorem transkripce. Připojení HA-tagů na C-konec zkráceného proteinu Prp45 umožní jeho následnou detekci pomocí anti-HA protilátky metodou western blot.

Plazmid pFA6a-3HA-natMX6 byl nejprve linearizován pomocí restričního enzymu HindIII (restriční místo HindIII leží mimo oblast expresní kazety). Kazeta byla amplifikována PCR za pomoci primerů, které na svých 5' koncích nesou nástavce homologní k oblastem genu *PRP45*: primer KM09 nese 42 nt homologních

k sekvenci *PRP45* kódující aminokyseliny 156-169, primer KM10 sekvenci 42 nt shodnou se sekvencí *PRP45* následující bezprostředně za stopkodonem (viz Tabulka 6). Zbývajících 20 nt na 3' konci primerů je homologních k jednomu, respektive druhému konci kazety. Vzhledem k vysokému obsahu GC párů v amplifikované kazetě byl do reakční směsi navíc přidáván DMSO. Použitý program PCR a výsledné koncentrace reagensů udávají Tabulka 7 a Tabulka 8.

Primer	Sekvence 5' - 3'	Délka
KM09	GGAGAAGCTGATCCAAATGAGTGAAGATACCTGCAGCTGTGCGGATCCCC GGGTTAATTAA	62 nt
KM10	CAAGCACAAAGAATGCTTTGTTTTTCCTAGTGCTCATCCTGGGCGAATTCGAG CTCGTTTAAAC	62 nt

Tabulka 6: Primery použité pro amplifikaci expresní kazety z plazmidu pFA6a-3HA-natMX6. Tučně je zvýrazněna sekvence primerů homologní k oblastem genu *PRP45*, zbylá sekvence nasedá na 5' konec (v případě KM09) či 3' konec (v případě KM10) amplifikované kazety.

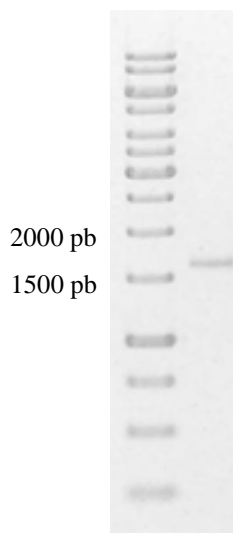
Reagencie	Výsledná konc.
MgCl ₂	2,5 mM
KM09	1,2 μM
KM10	1,2 μM
dNTPs	0,4 mM každý
pFA6a-3HA-natMX6	2 ng/μl
DMSO	1%
Pufř pro Taq polymerázu	1×
Taq polymeráza	

Tabulka 7: Reagencie a jejich výsledná koncentrace použitá pro PCR kazety pro integraci do genu *PRP45*. Výsledný objem reakční směsi byl roven 50 μl. (Převzato a upraveno dle Van Driessche et al., 2005.)

Krok	Teplota (°C)	Čas (m:ss)
1	94	2:00
2	94	0:30
3	43	0:30
4	68	3:00
5	go to 2, 9 x	
6	94	0:30
7	43	0:30
8	72	3:00 + 5 s each cycle
9	go to 6, 19 x	
10	72	7:00
11	15	1:00
12	END	

Tabulka 8: Program AV11 pro PCR kazety z linearizovaného plazmidu pFA6a-3HA-natMX6. (Převzato a upraveno dle Van Driessche et al., 2005.)

Produkt PCR byl podroben elektroforetické analýze v 1% agarózovém gelu, fragment o velikosti 1668 pb byl vyříznut a izolován z gelu. Vzhledem k přítomnosti nežádoucího bandu o velikosti cca 3000 pb byl izolát ještě jednou podroben elektroforetické analýze, excizi a izolaci z gelu. Získaný výsledný produkt ukazuje Obrázek 13.



Obrázek 13: PCR produkt získaný amplifikací kazety z plazmidu pFA6a-3HA-natMX6 pomocí primerů KM09 a KM10. Očekávaná velikost 1668 pb, 2 × přečištěno. Marker velikosti fragmentů GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Získaným fragmentem transformován kmen ENY08 (*slu7Δ PRP45*), výsev byl prováděn na pevné médium YPAD. Na tomto neselekčním médiu byly buňky inkubovány přes noc, druhý den byly přetiskány (metodou replica plating) na pevné médium YPAD s obsahem antibiotika nourseothricinu o výsledné koncentraci 90 µg/ml a inkubovány při 30 °C po dobu dvou dnů. Následně bylo vybráno osm transformantů, které byly přečarovány pro získání monoklonií a podrobeny ověření integrace kazety pomocí metody colony PCR. Pro amplifikaci byly použity primery AV17 (nasedá do oblasti kazety) a AV18 (nasedá do střední části genu *PRP45*, která má zůstat zachována). Očekávaná velikost produktu PCR v případě integrace kazety do správného místa je 510 pb. Jako pozitivní kontrola přítomnosti integrované kazety byl použit kmen KAY02 nesoucí zkrácenou verzi genu *prp45(1-169)* již dříve připravený v naší laboratoři stejným způsobem. Jako negativní kontrola posloužil kmen EGY48 obsahující wt verzi genu *PRP45*. Složení reakční směsi a použitý program PCR udávají Tabulka 9 a Tabulka 10.

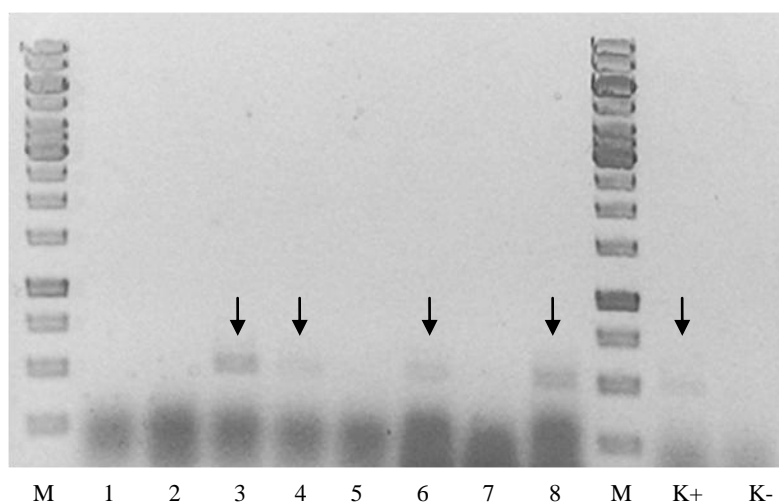
Složka	Výsledná koncentrace
Pufr pro polymerázu <i>Taq</i>	1×
Primer AV17	1 μM
Primer AV18	1 μM
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	250 μM každý
<i>Taq</i> polymeráza	0,25 U/μl

Tabulka 9: Složení směsi pro colony-PCR pro ověření integrace kazety do genu *PRP45*. Výsledný objem byl roven 15 μl.

Krok	Teplota (°C)	Čas (m:ss)
1	94	2:00
2	94	0:30
3	55	0:30
4	72	0:40
5	go to 2, 27 x	
6	72	5:00
7	10	1:00
12	END	

Tabulka 10: Program clony-PCR AV12 pro ověření integrace kazety do genu *PRP45*.

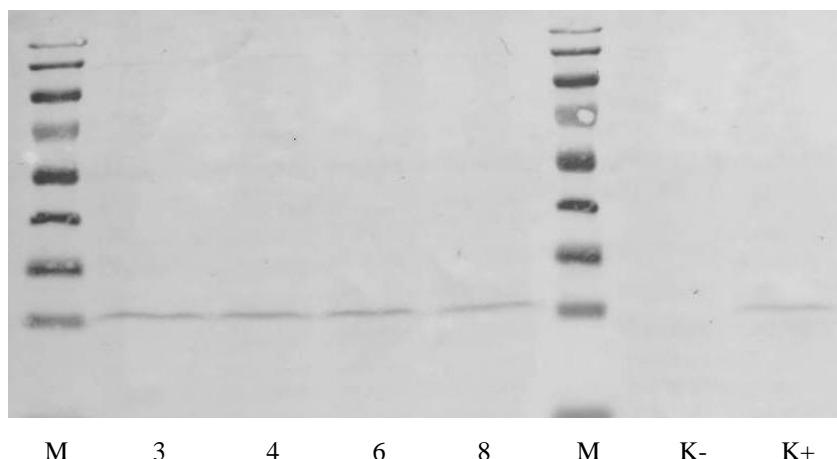
Produkty colony-PCR byly podrobeny elektroforetické analýze v 1% agarózovém gelu. Obrázek 14 dokumentuje, že správně integrovanou kazetu do genu *PRP45* nesou klony ENY08 #3, #4, #6 a #8.



Obrázek 14: Ověření integrace expresní kazety do genu *PRP45* pomocí colony-PCR. Specifický produkt je velikosti 510 pb (označeno šipkou). Čísla označují jednotlivé klony. Jako pozitivní kontrola (K+) slouží kmen KAY02 (*prp45*(1-169)::natMX6), negativní kontrolou (K-) je kmen EGY48 (*PRP45*). Marker (M) GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Klony ENY08 #3, #4, #6 a #8 byly dále podrobeny analýze, zda skutečně exprimují zkrácený protein Prp45(1-169) nesoucí na svém C-konci značku tří HA-tagů. Z jednotlivých klonů #3, #4, #6 a #8 a kmenů KAY02 a EGY48 byly připraveny proteinové extrakty, 15 μl bylo podrobena vertikální SDS-

polyakrylamidové elektroforéze ve 12% polyakrylamidovém gelu. Rozdělené proteiny byly metodou western blot přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Vizualizace zkráceného proteinu Prp45(1-169)-3HA byla provedena imunodetekcí: Primární myší monoklonální protilátka HA.11 (Covance) rozpoznává HA epitop proteinu, sekundární kozí polyklonální protilátka GAM-AP (Biorad), která obecně rozpoznává myší proteiny (**G**oat **A**nti **M**ouse), se váže na primární protilátku a umožňuje amplifikaci signálu. Sekundární protilátka je konjugovaná s alkalickou fosfatázou (**A**lkaline **P**hosphatase), k vizualizaci detekovaných proteinů dochází díky vzniku barevného produktu při inkubaci konjugátu se substráty alkalické fosfatázy. Všechny čtyři klony ENY08 #3, #4, #6 a #8 exprimují funkční zkrácený protein Prp45(1-169). Pro další experimenty byl vybrán klon #3, který byl nazván kmenem ENY13.



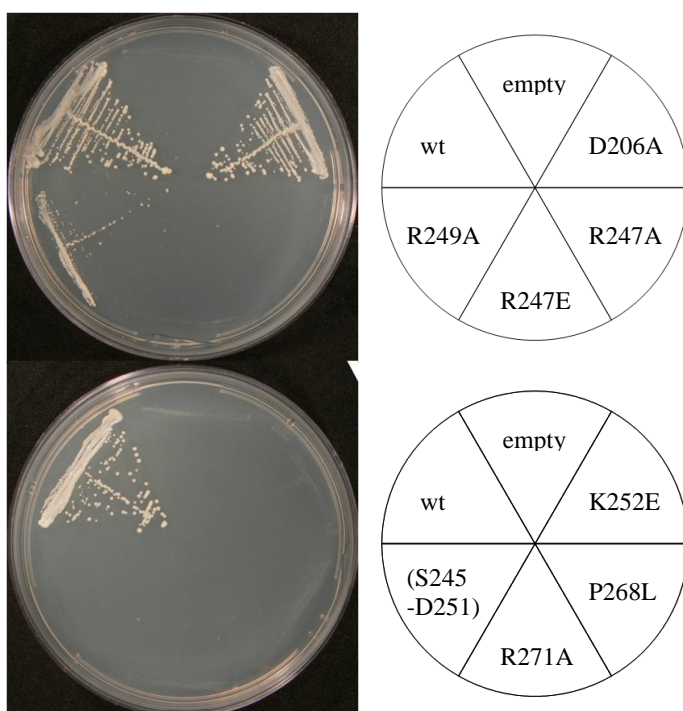
Obrázek 15: Ověření exprese zkrácené varianty proteinu Prp45 u uvedených kmenů. Imunodetekce proteinu Prp45(1-169)-3HA. Čísla 3, 4, 6, 8 označují klony ENY08#3, #4, #6 a #8. Jako pozitivní kontrola byl použit kmen KAY02 (K+), jako negativní kontrola (K-) kmen EGY08. Marker molekulových hmotností (M) PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

4.2.1.2. Testování syntetické letality mutací *slu7* a *prp45(1-169)*

Testování syntetické letality mutace *prp45(1-169)* a připravených mutací *slu7* proběhlo stejně jako testování viability v kapitole 4.1.4 metodou plasmid shuffling.

Kmen ENY13 (*slu7Δ prp45(1-169)*) byl jednotlivě transformován plazmidy pEN06 až pEN11 a též plazmidy pRS313-*slu7*(K252E) a pRS313-*slu7*(P268L). Pro kontrolu byla provedena též transformace plazmidem pEN02 (wt *SLU7*) a prázdným plazmidem pRS313. Selektce transformantů probíhala na médiu SD-H. Po jedné oddělené monocolonii získané transformací každým plazmidem bylo přeneseno na

médium s obsahem 5-FOA. Kultivace na tomto médiu probíhala při 30 °C po dobu tří dnů. Klony, které na médiu s 5-FOA nevyrostou, nejsou schopné ztratit komplementační plazmid pRS326-*SLU7*, nesou tedy takové mutace *slu7*, které jsou synteticky letální s mutací *prp45(1-169)*. Výsledek testování syntetické letality ukazuje Obrázek 16. Mutace *slu7*(R247A), (R247E), (R271A) a (S245-D251) jsou synteticky letální s *prp45(1-169)*. Také byla potvrzena již dříve popsaná syntetická letalita *prp45(1-169)* s mutacemi *slu7*(K252E) a *slu7*(P268L) testovaná v kmeni s jiným genetickým pozadím (Gahura et al., 2009). Mutace *slu7*(D206A), která se nachází mimo studovaný motiv, synteticky letální s *prp45(1-169)* není. Vzhledem k tomu, že buňky nesoucí kombinaci mutací *prp45(1-169)* a *slu7*(R249A) na médiu s obsahem 5-FOA částečně poporůstají, byl vztah těchto dvou mutací označen jako synthetic sickness – současná přítomnost obou mutací snižuje schopnost růstu buněk. Tento výsledek byl potvrzen testováním další nezávislé monokolonie získané transformací kmenu ENY13 plazmidem pEN09.



Obrázek 16. Testování syntetické letality mutací *slu7* a *prp45(1-169)*. Inkubace na médiu s 5-FOA, třídní nárůst, 30 °C. Kmen ENY13 (*slu7*Δ *prp45(1-169)*) s komplementačním uracilovým plazmidem pRS326-*SLU7*) byl jednotlivě transformován plazmidy pRS313-*slu7*(K252E), pRS313-*slu7*(P268L) a pEN06-pEN11. V případě syntetické letality mutace *prp45(1-169)*s konkrétní mutací *slu7* nejsou buňky schopné ztratit uracilový komplementační plazmid pRS326-*SLU7* a na médiu s obsahem 5-FOA nerostou. Jako pozitivní kontrola růstu slouží kmen ENY13 transformovaný plazmidem pEN02 nesoucím wt *SLU7* (wt), negativní kontrolou je kmen ENY13 transformovaný prázdným plazmidem pRS313 (empty). Popisky značí konkrétní zavedenou mutaci *slu7*.

4.2.2. Syntetická letalita mutací *slu7* s mutacemi *prp22*

V dalším kroku jsme se rozhodli testovat interakce připravených mutací *slu7* s mutacemi v genu *PRP22*. Vzhledem k velkému počtu alel a následných vzájemných kombinací bylo rozhodnuto testování podrobit tři mutace *slu7*, které v předchozích testech vykazovaly nejvýraznější fenotyp – *slu7*(R347E), *slu7*(P268L) a *slu7*(S245-D251). Zvolené mutace *prp22* a jejich stručný popis udává Tabulka 11, podrobnější charakteristika je uvedena v Literárním přehledu (2.3).

Alela	Charakteristika
<i>prp22#28</i>	mutace (-158T) v promotoru genu <i>PRP22</i> , způsobuje snížení hladiny proteinu Prp22 v buňkách
<i>prp22#38</i>	mutace (-327A) v promotoru genu <i>PRP22</i> , způsobuje snížení hladiny proteinu Prp22 v buňkách
<i>prp22Δ109</i>	alela kódující protein Prp22 zkrácený o 109 N-koncových aminokyselin
<i>prp22Δ261</i>	alela kódující protein Prp22 zkrácený o 261 N-koncových aminokyselin
<i>prp22Δ301</i>	alela kódující protein Prp22 zkrácený o 301 N-koncových aminokyselin
<i>prp22Δ350</i>	alela kódující protein Prp22 zkrácený o 301 N-koncových aminokyselin

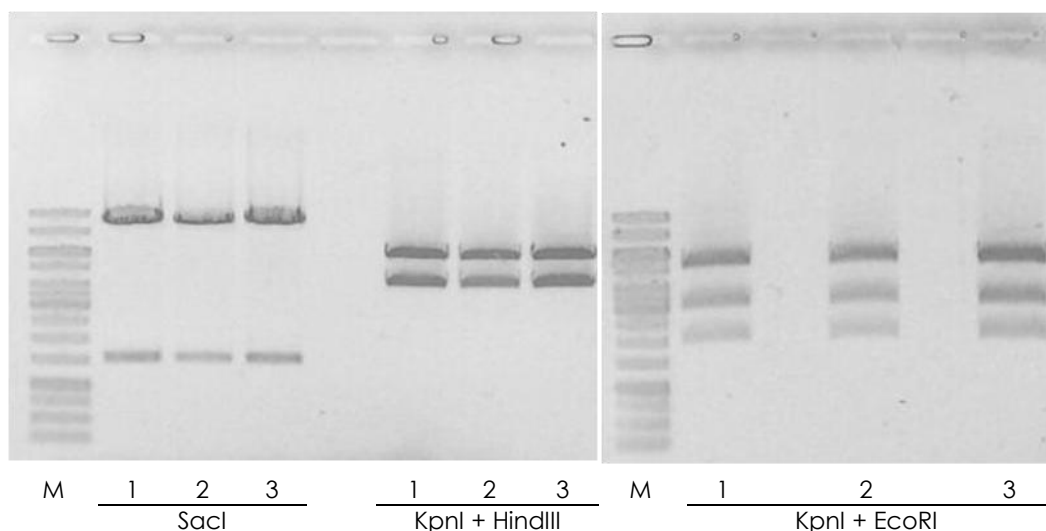
Tabulka 11: Mutace v genu *PRP22* vybrané pro testování syntetické letality s mutacemi *slu7*. Uvedeny jsou alely *prp22* kódující popsané mutace a jejich stručná charakteristika.

Vzhledem k přítomnosti mutant *slu7* a delečních variant *prp22* na plazmidech bylo rozhodnuto testovat syntetickou letalitu kombinací mutací obou genů opět metodou plasmid shuffling. Postup byl navržen následovně: Vytvořit kmen nesoucí chromozomální delecí obou testovaných genů (tzv. dvojistou deletantu) komplementovanou přítomností wt verzí obou genů na jednom společném komplementačním plazmidu se selekčním markerem *URA3*. Získaný kmen kotransformovat vždy dvojicí plazmidů s mutacemi *slu7* a *prp22* a růst transformantů testovat na médiu s obsahem 5-FOA. Mutace v promotoru *prp22*, které byly přítomny v chromozomální verzi genů v kmenech AVY11#28 a AVY11#38 (3.1.6) bylo potřeba zaklonovat do plazmidů.

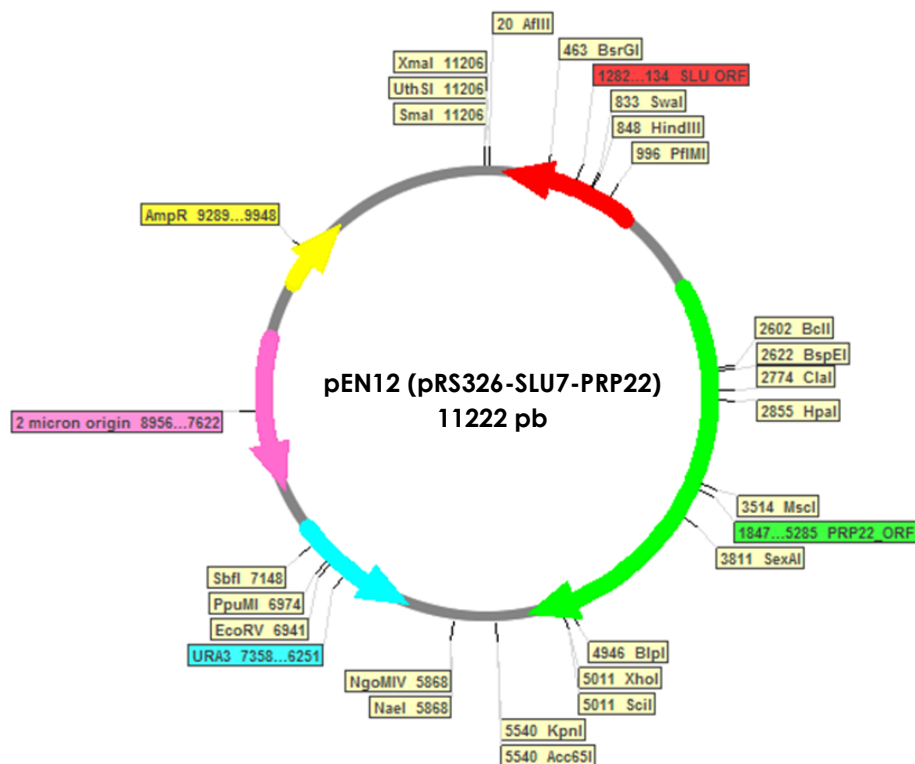
4.2.2.1. Příprava komplementačního plazmidu pRS326-SLU7-PRP22

Plazmid pRS326-SLU7-PRP22 byl vytvořen ligací tří fragmentů: vektoru pRS326, inzertu nesoucího wt verzi genu *SLU7* a inzertu nesoucího wt verzi genu *PRP22*. Fragment s genem *SLU7* byl získán štěpením plazmidu pEN02 kombinací restričních enzymů *SacI* a *EcoRI*, fragment s genem *PRP22* restričním štěpením plazmidu pSE358-*PRP22* pomocí enzymů *SacI* a *KpnI*. Vektor pRS326 byl štěpen

enzymy KpnI a EcoRI. Restrikční směsi byly podrobeny elektroforetické analýze v 1% agarózovém gelu, fragmenty příslušných velikostí (1607 pb v případě *SLU7*, 3929 pb v případě *PRP22* a 5674 pb u vektoru pRS326) byly vyříznuty a izolovány. Při restrikčním štěpení plazmidu pSE358-*PRP22* vznikly ovšem dva fragmenty blízké velikosti, jež nelze při vyřezávání z gelu dobře oddělit – velikost fragmentu nesoucího gen *PRP22* činila 3929 pb, fragmentu obsahujícího zbytek vektoru pSE358 cca 4170 pb. Izolát fragmentu s genem *PRP22* byl proto následně podroben dalšímu restrikčnímu štěpení, a to enzymem EcoRV. Sekvence, kterou tento enzym rozpoznává, se nachází pouze v nežádoucím fragmentu a jejím štěpením vzniknou dva menší fragmenty, jež lze dobře oddělit od kýženého fragmentu s genem *PRP22*. Restrikční směs byla tedy podrobena elektroforetické analýze, nyní již dobře oddělený fragment o velikosti 3929 byl vyříznut a opět izolován. Následovala ligace všech tří fragmentů, transformace elektroporací do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α a selekce transformantů na médiu ŽAMP. Několik narostlých monoklonií bylo podrobena izolaci plazmidové DNA, která byla poté štěpena několika kombinacemi restrikčních enzymů pro ověření přítomnosti obou genů. Všechny testované izoláty odpovídaly očekávaným výsledkům (viz Obrázek 17). Izolát pRS326-*SLU7-PRP22*#2 byl následně označen jako pEN12. Mapu plazmidu udává Obrázek 18).



Obrázek 17: Restrikční ověření tří izolátů plazmidu pRS326-*SLU7-PRP22*. V následujících experimentech byl používán izolát 2 označený jako **pEN12**. Očekávaná velikost fragmentů vzniklých štěpením enzymem SacI je 9557 a 1665 pb, štěpením kombinací enzymů KpnI a HindIII 6530 a 4682 a štěpením kombinací KpnI a EcoRI 5678, 3402 a 2142. 1% agarózový gel, marker (M) GeneRuler 1kb DNA Ladder.



Obrázek 18: Mapa plazmidu pEN12 (pRS326-SLU7-PRP22). Vyznačeny jsou hlavní komponenty a unikátní restrikční místa.

4.2.2.2. Příprava kmene ENY14 (*slu7Δ prp22Δ*)

Kmen nesoucí současně chromozomální delecí genu *SLU7* i *PRP22* byl připraven křížením haploidních kmenů ENY06 a LSY01, z nichž každý nesl delecí jednoho z genů:

ENY06: *Mat a his3D1 leu2D0 LYS2 met15D0 ura3D0 slu7::kanMX4 (+ pRS326-SLU7)*

LSY01: *MAT alfa his3D1 leu2D0 lys2D0 MET15 ura3D0 prp22::kanMX4 (+ pRS326-PRP22)*

Diploidní kříženec (který nese jednu funkční alelu od každého z obou genů *SLU7* a *PRP22*) byl inkubován na médiu s obsahem 5-FOA pro ztrátu nepotřebných komplementačních plazmidů pRS326-*SLU7* a pRS326-*PRP22*. Jedna oddělená monokolonie diploidního kmene vyrostlá na médiu s 5-FOA byla použita pro transformaci kmene komplementačním plazmidem pEN12, který nese současně oba dva funkční geny *SLU7* a *PRP22*. U buněk původem z jednoho transformovaného klonu byla poté navozena sporulace. Mikromanipulací bylo podrobena 16 věček.

Při sporulaci mohlo dojít ke vzniku spor nesoucích následující kombinace alel genů *SLU7* a *PRP22*:

- wt verze obou genů: *SLU7 PRP22*
- delece obou genů: *slu7Δ prp22Δ*
- wt verze jednoho a delece druhého genu: *SLU7 prp22Δ* či *slu7Δ PRP22*

V případě spor nesoucích deleci jednoho či obou genů je jejich životaschopnost závislá na přítomnosti komplementačního plazmidu pEN12. Nicméně ne každá spora plazmid při sporulaci získá, a tak může docházet k situaci, kdy některá spora z tetrády nevyklíčí. Kompletně (tj. všechny čtyři) vyklíčily spory pouze z jediné mikromanipulované tetrády. Vzhledem k tomu, že delece obou genů byly připraveny integrací stejné, kanamycinové, kazety, nelze jednoduše inkubací buněk na médiu s příslušným antibiotikem odlišit kmeny s jednoduchou delecí od kmenů s delecí dvojitou. Inkubací buněk z kompletní tetrády na médiu SD-U a na médiu YPAD s přidaným antibiotikem geneticinem bylo zjištěno, že všechny čtyři vzniklé kmeny obsahují komplementační plazmid a tři z nich nesou jednoduchou či dvojitou deleci genů *slu7* a/nebo *prp22*. Předpokládaný genotyp těchto čtyř kmenů je tedy:

- *SLU7 PRP22* + pEN12
- *slu7Δ prp22Δ* + pEN12
- *SLU7 prp22Δ* + pEN12
- *slu7Δ PRP22* + pEN12

Pro zjištění, která ze tří deletant je požadovaná deletanta dvojitá, bylo postupováno následovně: Každý kmen byl jednotlivě transformován plazmidem pEN02 (*SLU7*wt) či pLS05 (pRS315-*PRP22*wt) a následně inkubován na médiu s obsahem 5-FOA pro testování schopnosti ztráty komplementačního plazmidu pEN12. Kmen, který nemohl ztratit pEN12 ani v případě transformace plazmidem pEN02 ani plazmidem pLS05, je dvojitou deletantou. Ostatní kmeny se chovaly dle očekávání – jeden kmen mohl ztráct komplementační plazmid v obou případech, jeden kmen mohl ztráct pEN12 pouze v případě transformace plazmidem pEN02 a jeden kmen rostl na médiu s 5-FOA pouze po transformaci plazmidem pLS05. Kmeny byly dále inkubovány na selekčních médiích SD-Met a SD-Lys pro další charakterizaci genotypu. Testován byl také jejich párovací typ – křížením s kmeny, jejichž párovací typ byl znám. Tabulka 12 popisuje genotyp charakterizovaných

haploidních kmenů. Kmen ENY14 nese kýžený genotyp – obsahuje současně chromozomální delecí genů *SLU7* a *PRP22*.

Kmen	Genotyp
ENY14	<i>Mat a his3D1 leu2D0 lys2D0 MET15 ura3D0 slu7::kanMX4 prp22::kanMX4 (+ pRS326-SLU7-PRP22)</i>
ENY15	<i>Mat a his3D1 leu2D0 lys2D0 MET15 ura3D0 SLU7 prp22::kanMX4 (+ pRS326-SLU7-PRP22)</i>
ENY16	<i>Mat alfa his3D1 leu2D0 LYS2 met15D0 ura3D0 SLU7 PRP22 (+ pRS326-SLU7-PRP22)</i>
ENY17	<i>Mat alfa his3D1 leu2D0 LYS2 met15D0 ura3D0 slu7::kanMX4 PRP22 (+ pRS326-SLU7-PRP22)</i>

Tabulka 12. Příprava kmene *slu7Δ prp22Δ* Tabulka uvádí genotypy haploidních kmenů vzniklých z jedné tetrády při sporulaci křížence ENY06×LSY01 (*Mat a/alfa his3D1/his3D1 leu2D0/leu2D0 lys2D0/LYS2 met15D0/MET15 ura3D0/ura3D0 slu7::kanMX4/SLU7 prp22::kanMX4/PRP22 +pRS326-SLU7-PRP22*). Kmenem s požadovaným genotypem je ENY14.

4.2.2.3. Příprava plazmidů nesoucích mutace v promotoru genu *PRP22*

Pro testování syntetické letality mutace *prp45(1-169)* s dalšími mutacemi byl v naší laboratoři vytvořen kmen AVY11 (3.1.6). UV mutagenezí tohoto kmene byly mj. generovány klony AVY11#28 a AVY11#38 nesoucí mutace v promotorové oblasti genu *PRP22*. Tyto mutace jsou synteticky letální s mutací *prp45(1-169)* a způsobují snížení hladiny proteinu Prp22 v buňkách. Pro testování syntetické letality *slu7* s těmito mutacemi bylo potřeba připravit příslušné alely *prp22* nesené na plazmidu.

AVY11: *MAT alfa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 + plazmid pOG02*

AVY11#28: *MAT alfa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 prp22(-158T) + plazmid pOG02 (URA3, ADE3, PRP45, ampR)*

AVY11#38: *MAT alfa prp45(1-169)-HA::kanMX6 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 prp22(-327A) + plazmid pOG02 (URA3, ADE3, PRP45, ampR)*

V naší laboratoři byl již dříve připraven plazmid pLS05 (*pRS315-PRP22*) nesoucí wt verzi genu *PRP22*. Bylo proto rozhodnuto pomocí PCR amplifikovat promotorovou oblast alel *prp22* z kmenů AVY11#28 a AVY11#38 a tuto oblast vyměnit za původní promotorovou oblast *PRP22* v plazmidu pLS05. Promotorová oblast *PRP22* v plazmidu pLS05 činí pouze 239 pb, neobsahuje již tedy oblast, ve které došlo v případě kmene AVY11#38 k mutaci. Amplifikována byla proto celá sekvence nacházející se mezi ORF genu *PRP22* a ORF předcházejícího genu, což činí 409 pb. 5´nekódující oblast *PRP22* je v plazmidu pLS05 vymezena restričními místy *SacI* a *NdeI*. Byly proto navrženy primery EN15 a EN16 nesoucí na svých

5'koncích nástavce obsahující tato restrikční místa, aby mohlo následně dojít ke snadné výměně příslušných promotorových oblastí (viz Tabulka 13).

Primer	Sekvence 5' -3'	RM
EN15	<u>gagctc</u> AAGATATTCAGTGTAAATCACACG	SacI
EN16	gc <u>CATaTg</u> TAATATCTTTGTGTTACCTATGTTG	NdeI

Tabulka 13. Sekvence primerů EN15 a EN16 určených pro amplifikaci promotoru genu *PRP22* z kmenů odvozených od AVY11. Malá písmena označují sekvenci, která není komplementární s amplifikovaným úsekem DNA. Restrikční místo (RM) je podtrženo.

Amplifikace byla provedena metodou Colony PCR, použity byly monokolonie kmenu AVY11#28, AVY11#38 a též AVY11 (pro vytvoření kontrolního plazmidu obsahujícího kompletní promotorovou oblast *PRP22*.) Postupováno bylo dle protokolu uvedeného v kapitole 3.2.10, výsledný objem činil 25 μ l. Použita byla směs DNA polymeráz High Fidelity PCR Enzyme Mix o koncentraci 0,05 U/ μ l a příslušný reakční pufr. Zvolený program PCR uvádí Tabulka 14.

Krok	Teplota (°C)	Čas (m:ss)
1	94	2:00
2	94	0:30
3	43	0:30
4	72	0:45
5	go to 2, 2 \times	
6	94	0:30
7	52	0:30
8	72	0:45
9	go to 6, 21 \times	
10	72	7:00
11	END	

Tabulka 14. Program PCR pro amplifikaci promotorové oblasti alel *prp22* z kmenů AVY11, AVY11#28 a AVY11#38 pomocí primerů EN15 a EN16.

Před započítáním kroku 10 bylo ke směsí přidáno 0,25 μ l polymerázy Taq a program byl dokončen. Polymeráza Taq připojuje na konec syntetizovaného produktu jeden adenosin navíc, po renaturaci tak vzniká dvouvláknová DNA s jednonukleotidovými přesahy na 3'koncích obou vláken. Této vlastnosti využívá metoda TOPO-klonování, která následovala dále. Čtyři mikrolitry každé PCR směsi byly použity pro zaklonování produktu do TOPO-vektoru pCR[®] II-TOPO, postupováno bylo dle protokolu v kapitole 3.2.15. Vzhledem k negativnímu výsledku transformace – nevyrostly žádné kolonie, bylo rozhodnuto podrobit produkty předchozí PCR ještě několika cyklům v přítomnosti polymerázy Taq pro zajištění přítomnosti jednonukleotidových přesahů na 3'koncích molekul. Pět mikrolitrů směsi

podrobené předchozí PCR bylo použito jako templát pro další PCR. Výsledný objem reakční směsi činil 25 μ l, výsledné koncentrace pufru, primerů, $MgCl_2$ a dNTPs a byly stejné jako v předchozím případě, koncentrace polymerázy Taq činila 0,04 U/ μ l. Použitý program popisuje Tabulka 15.

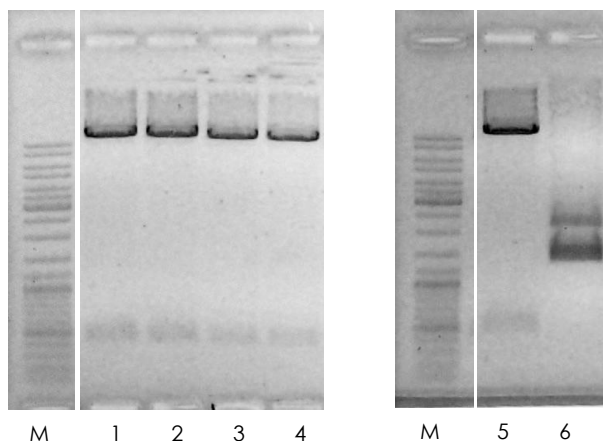
Krok	Teplota (°C)	Čas (m:ss)
1	94	2:00
2	94	0:30
3	52	0:30
4	72	0:45
5	go to 2, 4 \times	
6	72	7:00
7	END	

Tabulka 15. Program PCR pro dodatečnou amplifikaci produktů předchozí PCR, která sloužila k získání molekul DNA nesoucích promotorovou oblast alel *prp22*.

Následovalo zaklonování produktů do vektoru pCR[®]II-TOPO opět pomocí kitu TOPO TA Cloning[®] Kit. Molární poměr vektoru k inzertu byl asi 1:5 (5 ng vektoru o velikosti ~4000 pb a cca 2,5 ng inzertu o velikosti ~400 pb). Reakční směsi byly transformovány do chemokompetentních buněk DH5 α , výsev byl prováděn na pevné médium ŽAMP. Po třech monokloniích získaných transformací každým zaklonovaným produktem PCR bylo podrobena izolaci plazmidové DNA. Izoláty byly poté podrobeny restričnímu štěpení kombinací enzymů SacI a NdeI pro ověření přítomnosti zaklonovaných inzertů obsahujících sekvence promotorů alel *prp22*. Izoláty, jejichž štěpení poskytlo pozitivní výsledek (celkem 7 z původních devíti), byly sekvenovány. Izolát, který nesl sekvenci promotoru *PRP22* shodnou se sekvencí v kmeni AVY11 (tj. wt promotor), byl nazván pEN22. Izolát obsahující sekvenci promotoru s mutací -158T byl označen pEN23 a izolátu s mutací -327A byl přiřazen název pEN26.

Následovala výměna zkráceného promotoru *PRP22* v plazmidu pLS05 za promotory *prp22* nesené na plazmidech pEN22, pEN23 a pEN26. Všechny plazmidy včetně pLS05 byly štěpeny kombinací restričních endonukleáz SacI a NdeI. Restriční směsi byly podrobeny elektroforetické analýze v 1% agarózovém gelu, fragmenty o velikosti 9609 pb v případě štěpení pLS05 a 412 pb v případě štěpení ostatních plazmidů byly z gelu vyříznuty a izolovány. Dále byla provedena ligace jednotlivých verzí promotoru *prp22* s fragmentem vektoru pLS05. Ligáty byly transformovány elektroporací do elektrokompetentních buněk *E. coli* DH5 α , výsev byl prováděn na pevné médium ŽAMP. Po dvou monokloniích získaných transformací každou ligační směsí bylo podrobena izolaci plazmidové DNA.

Příslušné plazmidy, které při restričním ověření štěpením *SacI* a *NdeI* poskytly fragmenty o velikosti 412 a 9609 pb (viz Obrázek 19), byly pojmenovány pEN28 (wt promotor *PRP22*), pEN29 (promotor *prp22(-158T)*) a pEN32 (promotor *prp22(-327A)*).



Obrázek 19. Restriční ověření plazmidů vzniklých ligací vektoru pLS05 s různými verzemi promotoru *prp22*. Použita byla kombinace enzymů *SacI* a *NdeI*. Testovány byly izoláty vždy ze dvou monoclonií transformovaných ligační směsí obsahující: wt promotor *PRP22* (linie 1 a 2), mutovaný promotor *prp22(-158T)*; (linie 3 a 4) a promotor *prp22(-327A)*; (linie 6 a 7). Pozitivní výsledek poskytly izoláty v linii 1 až 5 – obsahují zaklonovaný promotor o velikosti 412 pb. 1% agarózový gel, Marker DNA ladder Mix.

4.2.2.4. Testování syntetické letality mutací *slu7* a *prp22* metodou plasmid shuffling.

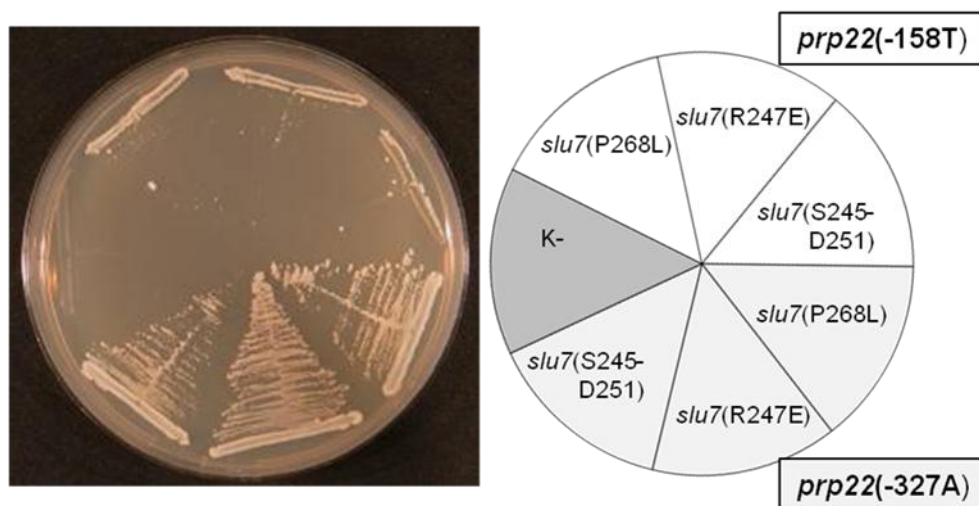
Připravený kmen ENY14 (*slu7Δ prp22Δ* + plazmid se *SLU7* a *PRP22*) byl kotransformován dvojicí plazmidů nesoucích vždy mutace v jednom a druhém genu (použité plazmidy udává Tabulka 16). Všechny použité testované kombinace uvádí výsledná Tabulka 17) Pro následnou kontrolu byl kmen ENY14 též transformován kombinací plazmidů s wt verzí obou genů.

Plazmid	Systematický název
nemá zkratku	pRS313- <i>slu7</i> (P268L)
pEN08	pRS313- <i>slu7</i> (R247E)
pEN11	pRS313- <i>slu7</i> (S245-D251)
pEN29	pRS315- <i>prp22(-158T)</i>
pEN32	pRS315- <i>prp22(-327A)</i>
pLS19	pRS325GPD- <i>prp22Δ109</i>
pLS20	pRS325GPD- <i>prp22Δ261</i>
pLS21	pRS325GPD- <i>prp22Δ301</i>
pLS22	pRS325GPD- <i>prp22Δ350</i>
pEN02	pRS313- <i>SLU7</i>
pEN28	pRS315- <i>PRP22</i>

Tabulka 16: Plazmidy použité při testování syntetické letality mutací *slu7* a *prp22*.

Plazmidy obsahující alely *slu7* nesou jako selekční marker gen *HIS3*, selekčním markerem plazmidů s alelami *prp22* je gen *LEU2*. Výsev kotransformantů byl proto proveden na pevné médium SD-L-H. Tři klony získané transformací každou kombinací plazmidů byly poté testovány na schopnost růstu na médiu s 5-FOA.

Konzistentní výsledek poskytují kombinace všech tří mutací *slu7* s mutacemi v promotoru *prp22*: Kombinace *prp22*(-158T) se *slu7*(P268L) či *slu7*(S245-D251) je synteticky letální, fenotyp kombinace s mutací *slu7*(R247E) lze označit jako synthetic sickness. Naopak kombinace všech testovaných mutací *slu7* s mutací *prp22*(-327A) nezpůsobuje žádné nebo téměř žádné zhoršení růstu buněk (viz Obrázek 20).



Obrázek 20: Růst buněk nesoucích kombinace promotorových mutací *prp22* s mutacemi *slu7*. Kmen ENY14 transformovaný kombinací plazmidů s mutacemi *prp22* a *slu7*, třídenní kultivace na médiu s 5-FOA (30 °C). Rostou ty transformanty, které mohou ztratit komplementační plazmid pEN12 (*SLU7 PRP22*). Bílé dílky schématu značí kombinaci uvedených mutací *slu7* s mutací *prp22*(-158T), světle šedé dílky kombinaci s mutací *prp22*(-327A), tmavě šedě negativní kontrola.

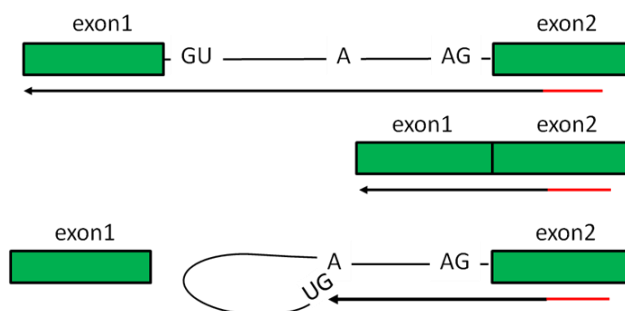
Žádný negativní vliv na růst buněk nemá též kombinace mutací *slu7* s mutací *prp22Δ109*. V případě transformantů nesoucích extenzivnější zkráceniny *prp22* je situace složitější. Růst buněk se v některých případech různí již v rámci trojice testovaných klonů transformovaných stejnou kombinací plazmidů, bylo proto přistoupeno k testování dalších čtyř až šesti nezávislých klonů. Získané výsledky shrnuje Tabulka 17, příslušný obrazový materiál je uveden v Příloze. V případě kombinace mutací *slu7* se zkrácenou *prp22Δ261* většina kolonií roste, v případě delších zkrácenin není většina buněk schopna růst podpořit nebo jen velmi slabě, avšak chování některých kolonií se vzájemně výrazně liší. Rozdíly v míře růstu jsou ještě výraznější, než je schopna postihnout Tabulka 17. Komentář k těmto výsledkům následuje v kapitole Diskuze.

		Mutace <i>slu7</i>								
		P268L			R247E			(S24 5-D251)		
Mutace <i>prp22</i>	(-158A)	0	3	0	0	3	0	0	0	3
	(-327T)	2	1	0	3	0	0	3	0	0
	Δ109	3	0	0	3	0	0	3	0	0
	Δ261	3	0	0	2	1	0	1	2	0
	Δ301	0	7	0	0	3	0	1	6	2
	Δ350	1	6	0	0	8	1	1	7	1
		roste jako wt	roste hůř	neroste	roste jako wt	roste hůř	neroste	roste jako wt	roste hůř	neroste

Tabulka 17: Shrnutí výsledků růstu buněk nesoucích kombinace mutací *slu7* a *prp22*. Pro každou kombinaci je uveden počet testovaných klonů, jejichž růst mírou odpovídá wt buňkám (zelené číslo), počet klonů, které rostou hůř než wt buňky (oranžové číslo) a počet klonů, které nejsou za daných podmínek životaschopné (červené číslo).

4.3. Vliv mutant *slu7* na sestřih pre-mRNA

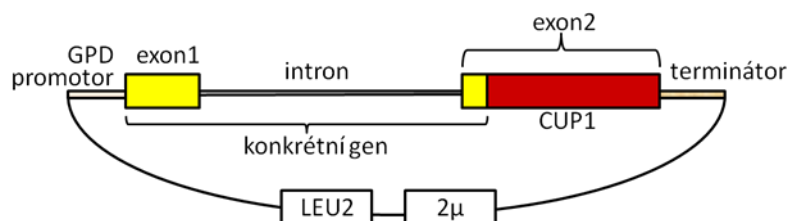
Dalším úkolem mé diplomové práce bylo testovat, zda mají připravené mutanty *slu7* vliv na sestřih pre-mRNA. K testování bylo použito metody primer extension využívající na 5' konci radioaktivně značený (P^{32}) primer DNA, který je svou sekvencí komplementární k analyzované RNA. Vlákno RNA slouží jako templát pro enzym reverzní transkriptázu, která směrem k jeho 5' konci prodlužuje primer DNA. Vzniká tak cDNA, jejíž množství odpovídá množství RNA přítomné v reakci. Použitím primeru homologního k části exonu2 konkrétního genu lze v jedné reakci získat několik různě dlouhých cDNA - v závislosti na tom, zda primer nasedl na pre-mRNA, mRNA, či lariát-intermediát (viz Obrázek 21). Díky radioaktivnímu značení lze jednotlivé typy cDNA po elektroforetické separaci vizualizovat a následně kvantifikovat a ze vzájemného poměru signálů usuzovat na efektivitu sestřihu dané pre-mRNA.



Obrázek 21: Princip metody primer extension. 5'-radioaktivně značený primer (červená linka) hybridizuje s exonem2 (zelený obdélník) a je reverzní transkriptázou prodlužován směrem k 5' konci konkrétní RNA (naznačeno černou šipkou). Na základě formy RNA (pre-mRNA, lariát-intermediát, či mRNA), která sloužila jako templát, vzniká různě dlouhý produkt cDNA. Následuje elektroforetická separace produktů podle jejich velikosti, vizualizace pomocí radiografické metody a poté kvantifikace.

Výhodou metody primer extension je možnost testovat efektivitu sestřihu pre-mRNA *in/post vivo*. Výchozím materiálem je celková RNA izolovaná z buněk určitého kmenu exprimujícího příslušný gen či sestřihový konstrukt. Sestřihové konstrukty použité v našem případě byly nesený na plazmidu pod silným (GPD) promotorem. Každý konstrukt vždy nesl sekvenci testovaného genu, jehož exon2 byl dále fúzován se sekvencí genu *CUP1* (Lesser a Guthrie, 1993; viz Obrázek 22). Díky přítomnosti sekvence *CUP1* na 3' konci všech konstruktů nezávisle na testovaném genu bylo možné pro metodu primer extension všech případech použít stejný primer – YAC06 (3.1.8). Jako kontrola a vnitřní standard reakce se obvykle používá některá

z RNA, jejíž produkce v buňkách je konstitutivní a není závislá na funkci sestřihového aparátu. V našem případě se jednalo o U14 snoRNA, která byla při primer extension přepisována z primeru YU14 (3.1.8).



Obrázek 22: Obecné schéma vektoru nesoucího sestřihový konstrukt používaného v této práci. Exon2 intron-obsahujícího genu zájmu (*ACT1*, *COF1* či *UBC13*) je fúzován s kódující sekvencí genu *CUP1*, která zajišťuje přítomnost sekvence shodné u všech konstruktů. Do této oblasti následně nasedá primer YAC06 využívaný metodou primer extension. Vysokou míru exprese zajišťuje silný promotor GPD. Selekcčním markerem je přítomnost genu *LEU2*, plazmid je replikativní (nese sekvenci 2μ). (Převzato a upraveno z Lesser a Guthrie, 1993.)

Pro testování byly použity kmeny ENY08 (*slu7Δ*) transformované plazmidy s mutantními alelami *slu7*(P268L), (R247E) a (S245-D251) bez přítomnosti komplementačního plazmidu pRS326-*SLU7*. Jako kontrola byl použit kmen ENY08 s wt *SLU7* na plazmidu pEN02 (pRS313-*SLU7*). Uvedené kmeny byly transformovány plazmidy s konkrétními sestřihovými konstrukty. Tři mikrogramy celkové RNA vyizolované z buněk každého klonu byly použity pro metodu primer extension (3.2.18) za současné přítomnosti primerů YAC06 a YU14. Následovala vertikální denaturující elektroforéza připravených vzorků v 8% polyakrylamidovém gelu. Jako standard velikostí byl použit radioaktivně značený DNA marker Φ X174 *Hinf*I DNA marker (viz 3.1.9). Získaný gel byl vložen do kazety s radiosenzitivním screenem a exponován do druhého dne, kdy proběhlo vyvolání screenu metodou phosphoimaging. Kvantifikace obrazu byla následně provedena programem ImageQuant.

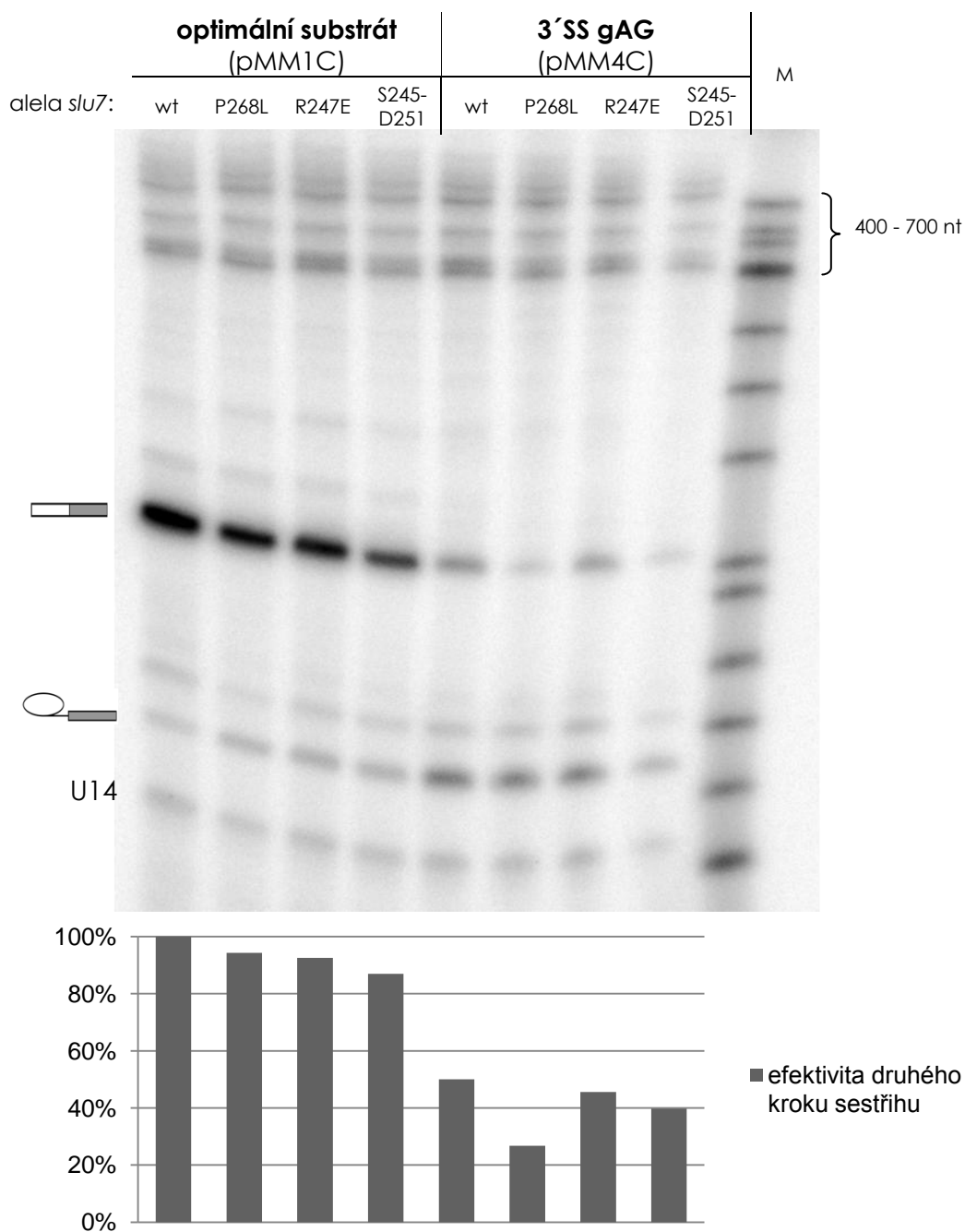
4.3.1. Sestřih fúzních konstruktů genu *ACT1* – optimální a suboptimální substráty

První otázkou bylo, zda jsou buňky s mutacemi *slu7* schopné efektivně sestřihovat takové pre-mRNA, jež nesou sekvenci optimální pro vykonání sestřihové reakce – tj. obsahují konsenzuální oblasti sestřihových míst a oblasti bodu větvení. V dalším sledu byly využity substráty, které jsou díky změnám v konzervovaných oblastech 3'SS či 5'SS sestřihovány již u wt buněk s nižší efektivitou – jedná se tedy o suboptimální substráty sestřihového aparátu. K tomuto účelu posloužily fúzní konstrukty *ACT1-CUP1* laskavě poskytnuté laboratoří prof. Konarské. Sekvence *ACT1* v těchto konstruktech vykazuje vzhledem k wt verzi genu některé změny – nejvýraznější je zkrácení exonu2 či dokonce jeho nahrazení rekombinantní sekvencí a jeho fúze s kódující oblastí genu *CUP1*. Za optimální substrát sestřihové reakce je považována pre-mRNA kódovaná konstruktem pMM1C, která nese konsenzuální oblasti 5'SS, 3'SS a oblast bodu větvení. Konstrukt pMM4C nese namísto sekvence UAG/ v 3'SS sekvenci gAG/. Tato sekvence se u pre-mRNA kvasinek *S. cerevisiae* téměř nevyskytuje a takovéto substráty jsou v důsledku poškození druhého kroku sestřihovány neefektivně i ve wt buňkách. Konstrukty pMA2C a pRH20 nesou nukleotidovou záměnu adenosinu na pozici 3 downstream od 5'SS za cytidin (A3C). Mutace A3C způsobuje defekt v druhém sestřihovém kroku, protože zavedením této nukleotidové záměny dochází k hyperstabilizaci interakcí mezi 5'SS a U6 snRNA, které musejí být před druhou transesterifikací rozvolněny (Konarská et al., 2006). Tyto dva konstrukty se vzájemně liší sekvencí a délkou exonu2. Stručný popis konstruktů uvádí Tabulka 18.

	5'SS	3'SS	exon2
pMM1C	wt	wt	13 rekomb. nt
pMM4C	wt	gAG	13 rekomb. nt
pMA2C	A3C	wt	50 nt ACT1
pRH20	A3C	wt	13 rekomb. nt

Tabulka 18. Fúzní konstrukty ACT1-CUP1 použité pro testování efektivity sestřihu pre-mRNA u mutant *slu7*. Konstrukt pMM1C je optimálním substrátem sestřihového aparátu - nese konsenzuální oblasti 5'SS (GTATGT), BS (TACTAAC), oblast před 3'SS je o tři nt kratší než u wt ACT1, nicméně konzervované TAG zůstává zachováno, prvních 13 nt exonu2 je rekombinantních (nejsou odvozeny od sekvence ACT1). Konstrukty pMM4C a pRH20 sloužící jako suboptimální substráty druhého sestřihového kroku jsou odvozeny od pMM1C; pMM4C nese nukleotidovou záměnu ve 3'SS (gAG), zatímco pRH20 nukleotidovou záměnu A3C v oblasti 5'SS.

Obrázek 23 zobrazuje radioaktivně značenou cDNA získanou reverzní transkripcí jednotlivých meziproductů a produktů sestřihu pre-mRNA konstruktů pMM1C (optimální substrát) a pMM4C (3'SS gAG/). Detekovat lze produkty odpovídající sestřižené mRNA, lariát-intermediátu a kontrolní U14 snoRNA. cDNA vzniklá reverzní transkripcí nesestřižené pre-mRNA (456 nt) se svou velikostí překrývá s nespecifickými produkty v oblasti velikostí 400-500 nt a nelze ji spolehlivě identifikovat. Kvantifikovány byly tedy pouze produkty odpovídající mRNA a lariát-intermediátu. Ze získaných hodnot byla vypočítána efektivita druhého kroku sestřihu dle vzorce $\text{mRNA}/(\text{mRNA} + \text{lariát-intermediát})$ tzn. signál produktů druhého kroku vztažený k signálům všech molekul, které úspěšně prošly prvním krokem sestřihu (tj. mRNA a lariát-intermediát). Hodnoty byly normalizovány k účinnosti sestřihu konsensuálního substrátu (pMM1C) v buňkách exprimujících wt *SLU7*. Při sestřihu optimálního substrátu (pre-mRNA konstrukt pMM1C) dochází u všech mutant *slu7* ke vzniku mRNA v množství srovnatelném s wt buňkami. Pokles efektivity druhého kroku se pohybuje max. do 15 % vzhledem k hodnotě wt buněk. Při sestřihu substrátu, který nese nukleotidovou záměnu gAG v 3'SS (konstrukt pMM4C), klesá efektivita druhého kroku již u wt buněk cca na polovinu vzhledem k sestřihu substrátu optimálního. U mutant *slu7*(R247E) a *slu7*(S245-D251) je situace obdobná, efektivita se pohybuje kolem 40 %. (Ačkoli kvantifikace produktů sestřihu u *slu7*(S245-D251) je vzhledem k nižší nanášce a tím celkově nižšímu signálu zatížena větší chybou.) V případě mutanty *slu7*(P268L) nicméně dochází k výrazně silnějšímu defektu – efektivita druhého kroku sestřihu je cca 25 %, což představuje vzhledem k sestřihu stejného substrátu u wt buněk pokles téměř na polovinu.



Obrázek 23: Sestřih optimálního substrátu (pMM1C) a substrátu s mutací gAG v 3'SS (pMM4C) u buněk s jednotlivými alelami *slu7*. Analýza spomocí metody primer extension. Piktogramy označují produkty odpovídající mRNA, lariát-intermediátu a U14 snoRNA. Produkt odpovídající pre-mRNA se se velikostně překrývá s nespecifickými produkty v oblasti 400-500 nt a nelze jej proto spolehlivě identifikovat. Marker molekulových hmotností Φ X174 HinfI DNA marker (M). Signál produktů byl kvantifikován, graf udává efektivitu druhého sestřihového kroku u jednotlivých kmenů dle vzorce mRNA/(mRNA+LI). Hodnoty byly normalizovány k účinnosti sestřihu substrátu pMM1C v buňkách exprimujících wt *SLU7* (první sloupec).

Ačkoli konstrukty pMA2C a pRH20 nesou stejnou nukleotidovou záměnu v intronu, efektivita druhého kroku sestřihu jejich pre-mRNA se vzájemně liší již na pozadí wt kmene. Příčinou je pravděpodobně rozdílná sekvence a délka exonu2 (viz Obrázek 24) – sekvence exonu bezprostředně následující za 3'SS je dalším prokázaným faktorem ovlivňujícím efektivitu druhého sestřihového kroku (Crotti a Horowitz, 2009). Z obrázku Obrázek 25 je patrné, že efektivita druhého kroku sestřihu pMA2C je výrazně nižší než v případě pRH20. pRH20 je ve wt buňkách sestřihován stejně efektivně jako optimální substrát pMM1C, u mutant *slu7* efektivita klesá o něco strměji než v případě sestřihu optimálního substrátu, nejvíce je postižena vícečetná mutanta *slu7*(S245-D251). Úspěšnost druhého kroku sestřihu substrátu pMA2C je u wt buněk cca 50%, což odpovídá již dříve publikovaným výsledkům (Collins a Guthrie, 2001; Konarská et al., 2006). Hodnoty u mutant jsou ještě nižší, nejvýraznější fenotyp vykazuje opět mutanta *slu7*(S245-D251).

```

pMA2C tactaacatcgattgcttcattccttttgttgctatattatattatgtttag/AGGTTGCTGCTTTGGT
pRH20 tactaacatcgattgcttcattccttttgttgctatatta-atg--tag/AATATTCATTCTC---
*****

```

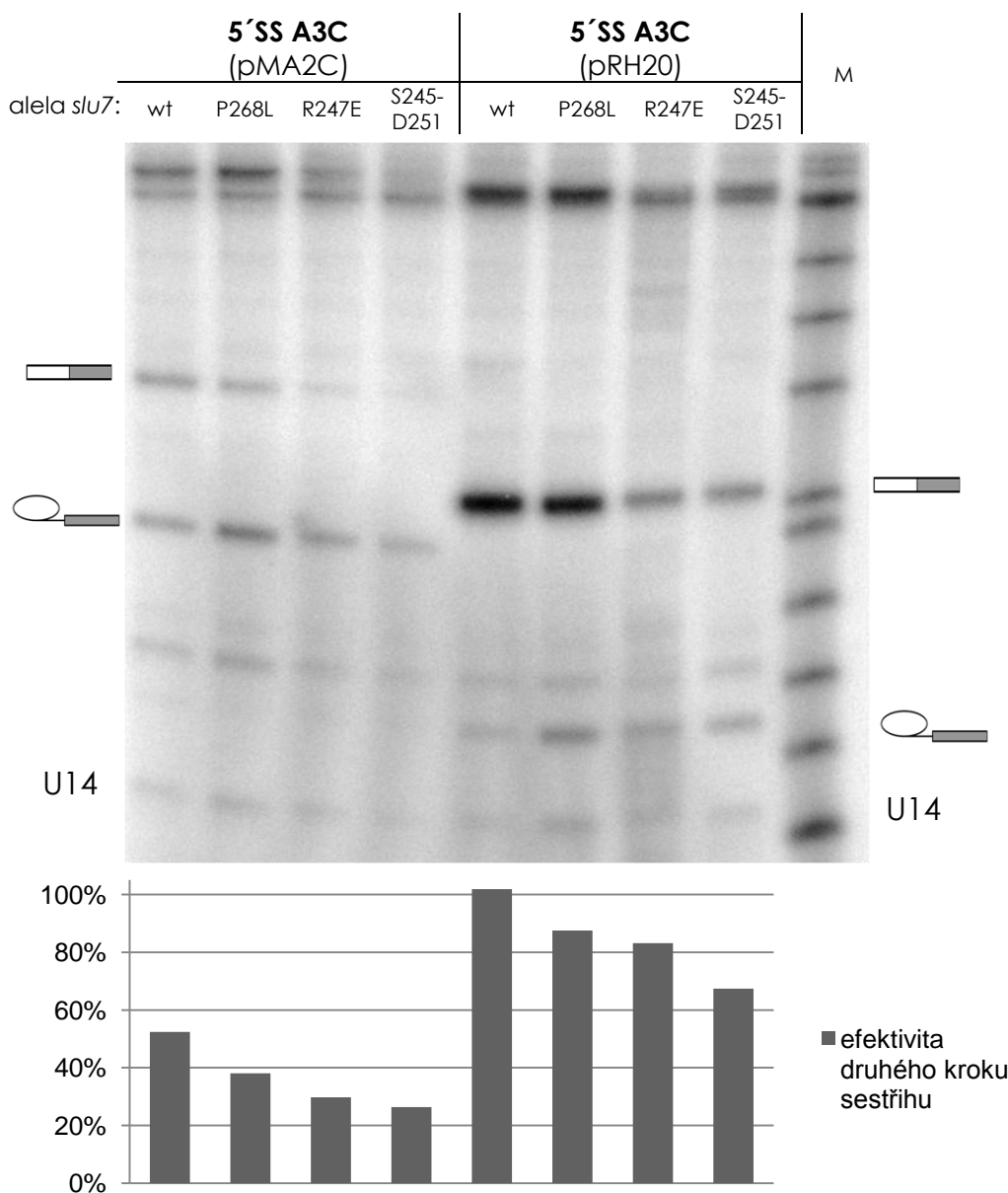


```

pMA2C TATTGATAACGGTTCTGGTATGTGTAAAGCCGGTACCGGGTTCAGCGAATTAATTAACTTCCAAA
pRH20 -----CGAATTAATTAACTTCCAAA
*****

```

Obrázek 24: Porovnání sekvence konstruktů pMA2C a pRH20. Zobrazena je sekvence od oblasti bodu větvení intronu *ACT1* až po kus kódující sekvence genu *CUP1*, která tvoří část exonu2 uvedených konstruktů. Sekvence intronu je psána malým písmem, sekvence exonu2 velkým písmem, bod větvení je podtržen, 3'SS označeno lomítkem, sekvence genu *CUP1* zvýrazněna italikou. Hvězdičky značí shodné nukleotidy na dané pozici. Konstrukt **pMA2C** nese stejné 3'SS jako wt *ACT1* a také sekvence exonu2 je stejná, zkrácená ovšem jen na 50 nt, následují 3 vložené nukleotidy (ACC), které společně s okolními nukleotidy dávají vznik restričnímu místu KpnI (GGTACC), dále následují nukleotidy kódující sekvence *CUP1* (startkodon ATG(Met) je nahrazen kodonem GGG(Gly)). Sekvence oblasti 3'SS konstruktů **pRH20** je pozměněna (delece tří nukleotidů, ač TAG je zachováno), následuje sekvence 13 nt, která nemá žádný vztah k sekvenci exonu2 *ACT1*, následující CDS genu *CUP1* je zkrácena o prvních 8 nt. Díky těmto odlišnostem obou konstruktů vznikají různě dlouhé produkty sestřihových reakcí, také efektivita sestřihu pre-mRNA se různí.



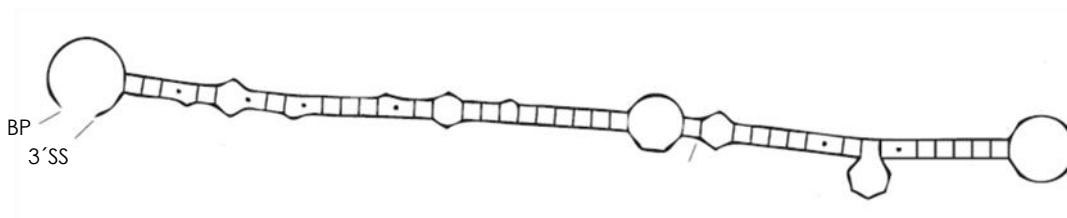
Obrázek 25: Sestřih substrátů pMA2C a pRH20 s mutací A3C v 5'SS u buněk s jednotlivými alelami *slu7*. Analýza spomocí metody primer extension. Substráty se vzájemně liší sekvencí a délkou exonu2 (viz Obrázek 24 a též efektivitou sestřihu. Piktogramy označují produkty odpovídající mRNA, lariát-intermediátu a U14 snoRNA. Produkt odpovídající pre-mRNA se se velikostně překrývá s nesespecifickými produkty v oblasti 400-500 nt, nelze jej proto spolehlivě identifikovat. Marker molekulových hmotností Φ X174 *Hinf*I DNA marker (M). Signál produktů byl kvantifikován, graf udává efektivitu druhého sestřihového kroku u jednotlivých kmenů dle vzorce mRNA/(mRNA+LI). Hodnoty byly normalizovány k účinnosti sestřihu substrátu pMM1C v buňkách exprimujících wt *SLU7* (viz Obrázek 23, první sloupec).

Překlonování sestřihových konstruktů.

Všechny následující použité konstrukty byly z důvodu přítomnosti nevhodného selekčního markeru překlonovány z původních vektorů do vektoru p425GPD. Jedná se o replikativní plazmid se selekčním markerem udělujícím buňkám leucinovou prototrofii (obsahuje gen *LEU2*), vysokou expresi vloženého inzertu zajišťuje konstitutivní GPD promotor. Připravené plazmidy byly označeny názvy pEN13 až pEN20 a jejich popis je uveden v kapitole 3.1.7.

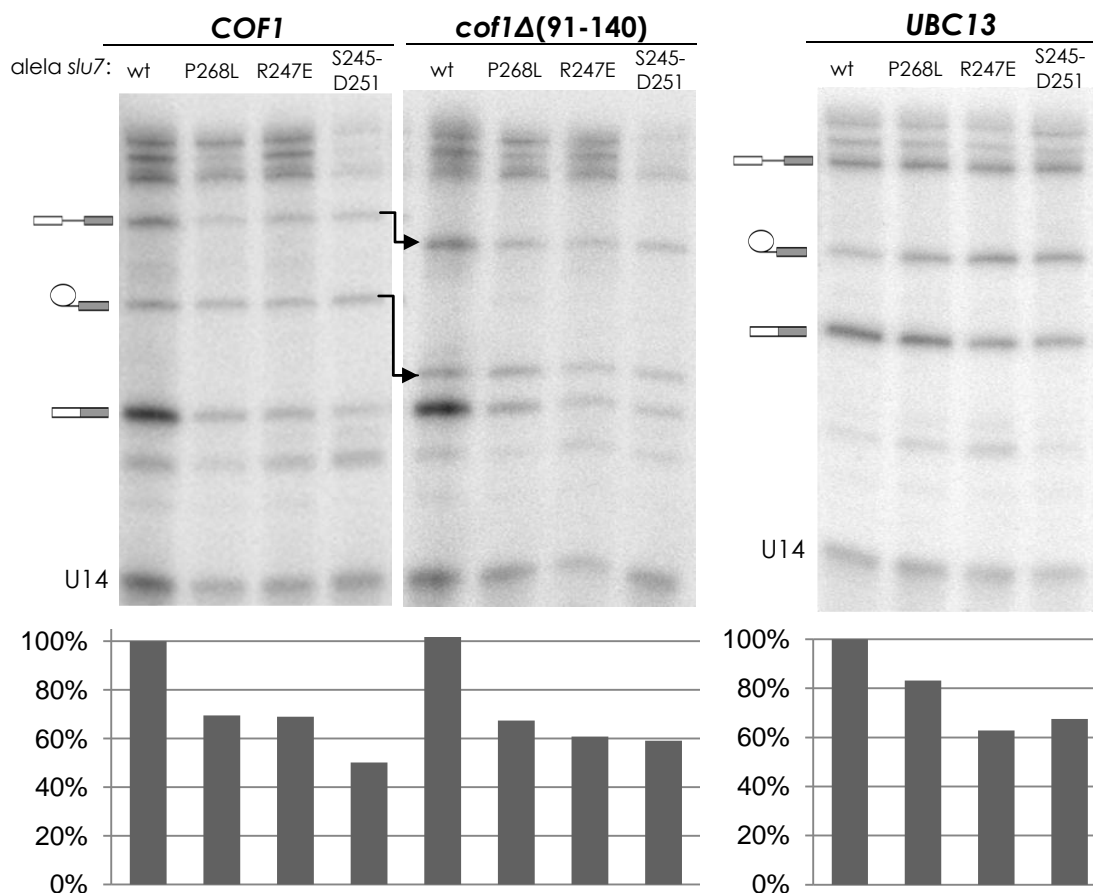
4.3.2. Sestřih pre-mRNA obsahujících v oblasti mezi PB a 3'SS sekundární strukturu

V dalším kroku jsme se rozhodli testovat vliv mutant *slu7* na sestřih substrátů, které vykazují v oblasti mezi BS a 3'SS sekundární strukturu. V případě genů *COF1* a *UBC13*, které obsahují extrémně dlouhou vzdálenost BP-3'SS (132 a 155 nt), dochází díky intramolekulárnímu párování bází v této oblasti ke vzniku vlásenkové struktury. Vznik této vlásenky umožní zkrácení strukturní vzdálenosti mezi BP a 3'SS a nalezení sekvenčně vzdáleného 3'SS (Gahura et al., 2011; viz Obrázek 26).



Obrázek 26: Schéma sekundární struktury vytvořené v oblasti mezi bodem větvení a 3'SS u intronu genu *COF1*.

V případě genu *COF1* byl testován konstrukt nesoucí wt sekvenci genu a konstrukt s delecí oblasti intronu mezi nukleotidy 91-140 (*cof1*(Δ 91-140)). Delecí nukleotidů 91-140 vzniká intron s kratší vlásenkou, strukturní vzdálenost BP-3'SS by však v případě obou konstruktů měla být stejná. Z výsledků primer extension a následné kvantifikace obrazu vyplývá, že všechny použité mutanty *slu7* sestřihují obě dvě pre-mRNA s nižší účinností než buňky s wt *SLU7*. Efektivita prvního kroku sestřihu narušena není či pouze slabě, zatímco druhý krok je narušen silněji. Výsledky testování sestřihu obou konstruktů vykazují naprosto stejný trend. Nejvíce postižena se zdá mutanta *slu7*(S245-D251), u níž celková efektivita sestřihu klesá ve srovnání s wt buňkami zhruba na polovinu (viz Obrázek 27).



Obrázek 27: Vliv mutant *slt7* na sestřih konstruktů obsahujících v oblasti BP-3'SS vlásenkovou strukturu. Analýza pomocí metody primer extension. Piktogramy označují produkty odpovídající pre-mRNA, lariát-intermediátu, mRNA a U14 snoRNA. Signál produktů odpovídajících mRNA a lariát-intermediátu byl kvantifikován, graf udává efektivitu druhého sestřihového kroku u jednotlivých kmenů dle vzorce mRNA/(mRNA+LI). Hodnoty byly v případě sestřihu konstruktů založených na genu *COF1* normalizovány k účinnosti sestřihu substrátu s wt *COF1* v buňkách exprimujících wt *SLU7* (první sloupec), v případě sestřihu konstruktů odvozeného od genu *UBC13* byly hodnoty normalizovány k účinnosti sestřihu tohoto konstruktů u buněk s wt *SLU7* (první sloupec druhého grafu).

Sestřih konstruktů založeného na wt sekvenci genu *UBC13* je v případě mutant *slt7* taktéž postižen – dochází k defektu druhého kroku sestřihu, opět je patrné hromadění lariát-intermediátu (viz Obrázek 27).

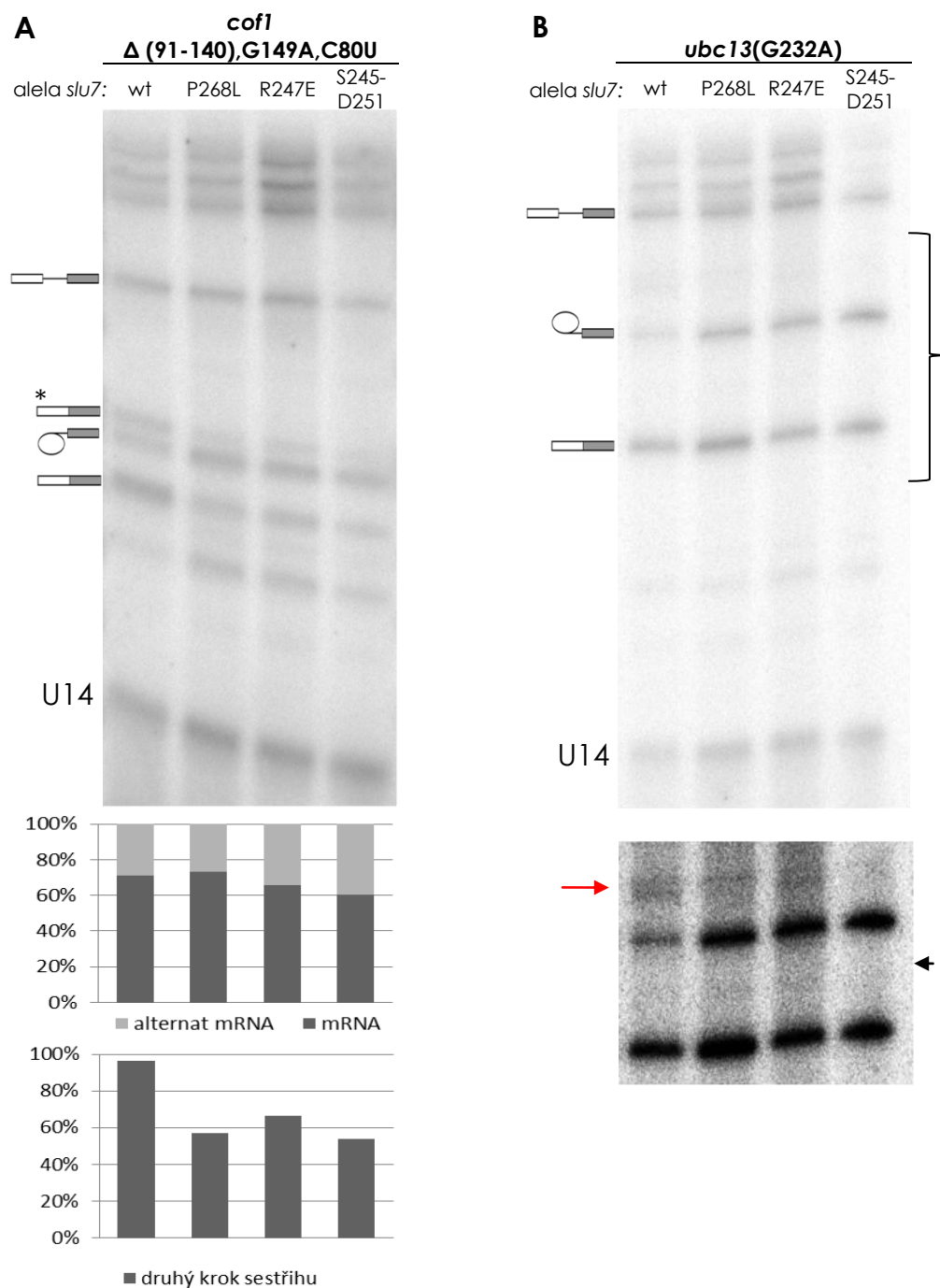
4.3.3. Sestřih pre-mRNA obsahujících kompetující si 3'SS

Mutační analýzou genů *COF1* a *UBC13* bylo zjištěno, že zavedením nukleotidových záměn způsobujících rozvolnění sekundární struktury dochází k využití alternativních 3'sestřihových míst, která byla původně maskována.

Mutace *cof1*-G149A způsobuje rozvolnění struktury intronu, což má za následek těžký defekt v jeho sestřihu. Zavedením stejné mutace do intronu, který má zkrácenou vlásenkovou strukturu (*cof1*Δ(91-140),G149A), dochází k preferenčnímu využití alternativního 3'SS. Jedná se o první AG downstream od bodu větvení. Zavedení kompenzační mutace *cof1*Δ(91-140),G149A,C80U, která umožní znovuuštění sekundární struktury intronu, způsobí opět preferenční výběr původního 3'SS, ačkoli alternativní 3'SS je stále minoritně využíváno. Obdobně Mutace *ubc13*(G232A) má za následek mírný pokles stability sekundární struktury intronu, což ústí ve využití několika dalších alternativních 3'SS míst, která jsou v případě wt verze genu *UBC13* maskována. Vzhledem k popsané roli Slu7p ve výběru kompetujících si 3'SS (viz Diskusi) se tyto konstrukty zdály být v případě mutant *slu7* zajímavým předmětem k testování. Opět byla provedena metoda primer extension, radiografická analýza a kvantifikace sestřihových produktů.

Poměr využití 3'sestřihových míst u konstruktu *cof1*Δ(91-140),G149A,C80U se v případě mutant *slu7* vzhledem k wt buňkám výrazně nemění. Efektivita druhého kroku sestřihu je opět u mutant *slu7* snižena, obdobně jako při sestřihu předchozích dvou kofilinových konstruktů (viz Obrázek 28).

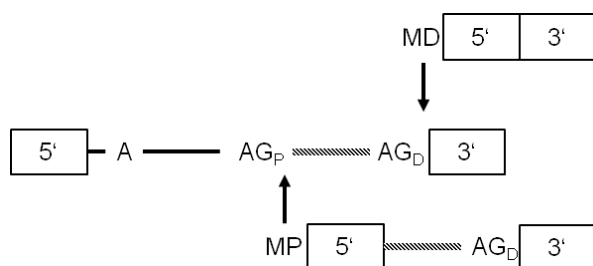
V případě sestřihu konstruktu *ubc13*(G232A) vzniká pouze velmi malé množství alternativních forem mRNA, a to jak u mutant *slu7*, tak u wt buněk – využití alternativních 3'sestřihových míst je za daných podmínek experimentu silně potlačeno. Vzájemný poměr forem mRNA proto nebyl stanovován. Ačkoli nebyla stanovována ani efektivita druhého sestřihového kroku, z obrázku 28B je patrné nabohacení lariát-intermediátu u mutant *slu7* vzhledem k wt buňkám. Druhý krok sestřihu je tedy stejně jako v případě konstruktu s wt *UBC13* u mutant *slu7* postižen.



Obrázek 28: Vliv mutant *slu7* na sestřih konstruktů založených na genech *COF1* a *UBC13* nesoucích alternativní 3'sestřihová místa. Analýza pomocí metody primer extension. Piktogramy označují produkty odpovídající pre-mRNA, lariát-intermediátu, formám mRNA a U14 snoRNA. **A: Sestřih konstruktů *cof1* Δ (91-140),G149A,C80U** u jednotlivých mutant *slu7*. Signál produktů odpovídajících formám mRNA a lariát-intermediátu byl kvantifikován, graf ve středu stránky udává poměrné zastoupení vzniklých forem mRNA (dominantní a alternativní). Efektivitu druhého sestřihového kroku u jednotlivých kmenů udává graf v dolní části obrázku. Hodnoty byly vztaženy k účinnosti sestřihu substrátu s wt *COF1* v buňkách exprimujících wt *SLU7* (Obrázek 27, první sloupec) **B: Sestřih konstruktů *ubc13*(G232A)**, níže zobrazen výřez oblasti gelu obsahující alternativní formy mRNA (označeno červenou šipkou), pro lepší vizualizaci byl zvýšen kontrast obrázku. Zastoupení alternativních forem mRNA nebylo vzhledem k nízkému signálu kvantifikováno, nebyla též stanovována efektivita druhého sestřihového kroku.

Pro testování vlivu *Slu7p* na výběr 3'sestřihových místa byly dále použity konstrukty OWT a AWT popsané v roce 1992 již v jednom z prvních článků týkajících se funkce tohoto proteinu (Frank a Guthrie, 1992; viz Diskusi). Jedná se o konstrukty založené na genu *ACT1*, jehož intronová sekvence byla cíleně pozměněna tak, aby kódovala transkript nesoucí dvě 3'sestřihová místa. Tato místa jsou v případě konstruktu OWT vzdálena od bodu větvení 10 a 44 nt, v případě konstruktu AWT 24 a 58 nt. Využitím bližšího 3'SS vzniká delší forma mRNA (MP), využitím vzdálenějšího 3'SS kratší forma mRNA (MD).

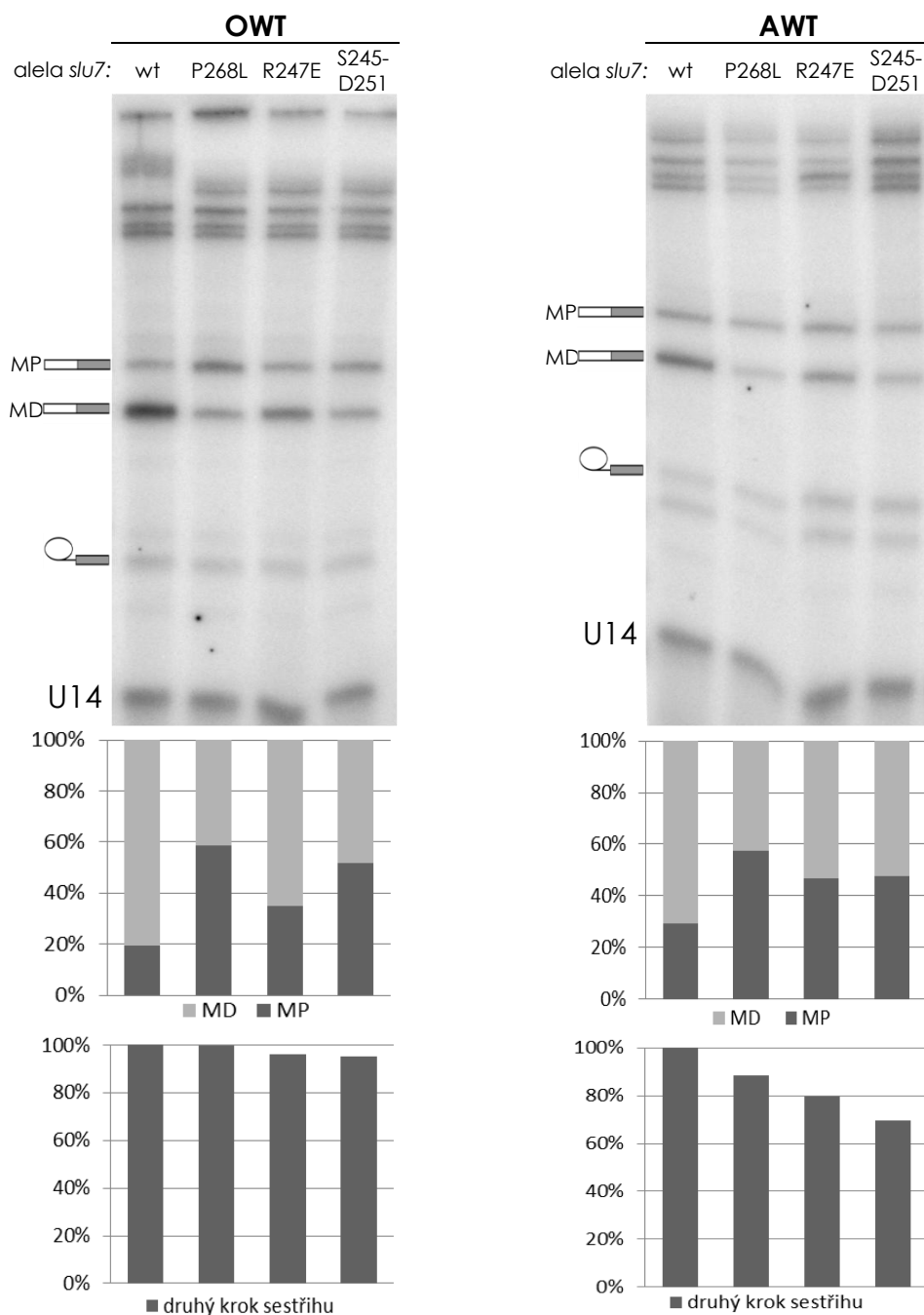
OWT tactaAcatcgatt**AG**cttcattctttttggttgctatattatatgttt**AG**
 AWT tactaAcatcgaaacaacaaacgatt**AG**cttcattctttttggttgctatattatatgttt**AG**



Obrázek 29: Konstrukty OWT a AWT nesoucí dvě 3'sestřihová místa a schéma jejich sestřihu. Zobrazena je sekvence konstruktů od oblasti bodu větvení do oblasti druhého 3'SS. Adenin bodu větvení je podtržen, dinukleotidy AG charakterizující 3'SS jsou označeny velkými písmeny. Schéma ukazuje vznik alternativních mRNA – sestřihem v proximálním 3'SS (AG_p) vzniká delší forma mRNA (MP), sestřihem v distálním (AG_d) 3'SS vzniká kratší mRNA (MD); exony jsou zobrazeny pomocí obdélníků. (Převzato z Frank a Guthrie, 1992.)

Wt buňky při sestřihu pre-mRNA OWT výrazně upřednostňují volbu distálního 3'SS – více než 80 % celkové sestřižené mRNA tvoří její kratší forma. K preferenční volbě distálního 3'SS dochází také u mutanty *slu7(R247E)*, naopak v případě *slu7(P268L)* je rovnováha posunuta směrem k výběru proximálního 3'SS (využíváno ve více než 60 % případů). U vícečetné mutanty *slu7(S245-D251)* jsou obě sestřihová místa využívána s téměř stejnou frekvencí – o něco více (asi 55 %) tvoří mRNA vzniklá sestřihem v proximálním 3'SS.

Při sestřihu pre-mRNA konstruktu AWT je opět u wt buněk častěji využíváno distálnější 3'SS (ve více než 70 %). Mutanty *slu7(R247E)* a *slu7(S245-D251)* tentokrát poskytují obdobné výsledky – obě formy mRNA vznikají v přibližně stejném množství, o něco více ve prospěch kratší z nich. V případě sestřihu AWT pre-mRNA u mutanty *slu7(P268L)* je častěji využíváno proximálnější z obou 3'SS – delší forma mRNA představuje asi 60 % celkové mRNA.



Obrázek 30: Vliv mutant *slu7* na sestřih konstruktů OWT a AWT nesoucích dvě kompetující si 3'sestřihová místa. Analýza pomocí metody primer extension. Piktogramy označují produkty odpovídající lariát-intermediátu, mRNA vzniklé sestřihem v proximálním 3'SS (MP), mRNA vzniklé sestřihem v distálním 3'SS (MD) a U14 snoRNA. Produkt odpovídající pre-mRNA se velikostně překrývá s nespecifickými produkty v oblasti 400-500 nt. Grafy ve střední části stránky udávají poměrné zastoupení obou forem mRNA u jednotlivých kmenů. Grafy ve spodní části stránky udávají efektivitu druhého sestřihového kroku vztahenou k hodnotě sestřihu daného konstruktů u buněk s wt *SLU7*.

5. Diskuse

5.1. Fenotyp mutací v motivu RED proteinu Slu7

Žádná ze zavedených jednoaminokyselinových záměn v motivu RED (*slu7*(R247A), *slu7*(R247E), *slu7*(R249A), *slu7*(R271A)) ani vícečetná mutace *slu7*(S245-D251) nejsou letální. Některé z nich ovšem způsobují citlivost buněk ke zvýšené teplotě – buňky s mutací *slu7*(S245-D251) nejsou schopné růst v teplotě 37 °C, pro mutanty *slu7*(R247E), *slu7*(R271A) a dříve získanou (Gahura et al., 2009) *slu7*(P268L) je restriktivní teplotou až 39 °C. Z výsledků je patrné, že záměna argininu na pozici 247 za kyselinu glutamovou, která nese opačný náboj, vykazuje silnější defekt než záměna za nenabitý alanin. *slu7*(R247A) stejně tak jako *slu7*(R249A) nevykazují na rozdíl od *slu7*(R247E) teplotně senzitivní fenotyp. Záměna R271A však již termosenzitivitu způsobuje, což by mohlo implikovat významnější roli náboje tohoto argininu. Teplotní senzitivitu způsobuje též mutace prolinu 268 za leucin, ačkoli zde nedochází ke změně náboje aminokyseliny. Záměna prolinu za leucin, jež se vzájemně výrazně liší tvarem, však zřejmě ovlivňuje strukturu oblasti proteinu. Nejvýraznější teplotní citlivost vykazují buňky s mutací *slu7*(S245-D251), jejímž zavedením dochází k záměně pěti a delecii jedné aminokyseliny, což zřejmě nejvíce ovlivní strukturu celého motivu. Uvedené výsledky shrnuje Tabulka 19.

alela <i>slu7</i>	sekvence oblasti	30°C	37°C	39°C
wt	242 YRTSTRLREDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271	+	+	+
R247A	242 YRTST AL REDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271	+	+	+
R247E	242 YRTST EL REDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271	+	+	-
R249A	242 YRTSTRL A EDKAAYLNDINSTESNYDPKSR 271	+	+	+
K252E	242 YRTSTRLREDE E AAYLNDINSTESNYDPKSR 271	+	+	+
P268L	242 YRTSTRLREDKAAYLNDINSTESNYD L KSR 271	+	+	-
R271A	242 YRTSTRLREDKAAYLNDINSTESNYDPK S A 271	+	+	-
(S245-D251)	242 YRTH S A E R R -KAAYLNDINSTESNYDPKSR 270	+	-	-

Tabulka 19 – Připravené mutace v motivu RED proteinu Slu7 a jejich fenotyp. První sloupec udává název alely *slu7*, druhý sloupec zobrazuje sekvenci oblasti pomocí jednopísmenných názvů aminokyselin. Záměna ak vzhledem k wt *SLU7* je označena červeně. Poslední tři sloupce udávají růst buněk (+ roste, - neroste) nesoucích indikované alely *slu7* v uvedených teplotách kultivace.

5.2. Genetické interakce připravených mutací

Mutace *slu7*(K252E) a *slu7*(P268L) byly nalezeny při hledání mutací synteticky letálních s mutací *prp45*(1-169), viz 2.4. Výsledky této diplomové práce dokumentují syntetickou letalitu (případně „synthetic sickness“) mutace *prp45*(1-169) se všemi připravenými mutacemi *slu7* zkoumaného motivu. Letalitu v kombinaci s *prp45*(1-169) ovšem způsobuje též mutace *slu7*(SS122/125CC) nacházející se v oblasti motivu zinc knuckle (V. Munzarová, E. Ničová, nepublikované výsledky). Genetická interakce *SLU7* s *PRP45* tedy není omezena pouze na motiv RED a lze předpokládat, že se jedná o interakci nepřímou. Tuto hypotézu podporují také výsledky dvouhybridních testů, které neprokázaly fyzickou interakci Slu7p a Prp45p (O. Gahura, nepublikované výsledky).

Protože interakce *SLU7* a *PRP45* se zdá být nepřímá, vyvstává zde otázka, zda existuje nějaký faktor, který jejich funkce spojuje. Existují indicie, že tímto faktorem by mohl být protein Prp22. Dvouhybridním testem byla potvrzena jeho fyzická interakce s C-koncovou částí Prp45p (Albers et al., 2003), která zřejmě napomáhá jeho vazbě do spliceosomu (Gahura et al., 2009; viz kapitolu 2.3). Vztah Prp22p ke Slu7p zase dokládá funkce ve stejné fázi sestříhu. Navíc – asociace Prp22p se spliceosomem je podmíněna přítomností již asociovaného Slu7p (James et al., 2002). Publikována též byla slabá dvouhybridní interakce obou proteinů (van Nues a Beggs, 2001). Dalším krokem pro bližší charakterizaci motivu RED proto bylo testování syntetické letality tří mutací *slu7* s nejvýraznějším fenotypem: *slu7*(P268L), *slu7*(R247E) a *slu7*(S245-D251) s mutacemi v genu *PRP22*. K testování byly vybrány promotorové mutace *prp22* způsobující snížení hladiny proteinu Prp22 v buňkách a též alely kódující zkrácené verze tohoto proteinu¹ (viz 2.3; 4.2.2.4).

Kombinace mutací *slu7* s mutací *prp22*(-158T) způsobuje silný růstový defekt buněk. Naopak kmeny nesoucí alelu *prp22*(-327A) v kombinaci s uvedenými alelami *slu7* žádný růstový defekt nemají, případně pouze slabý (viz Obrázek 20). Výrazně odlišné výsledky jsou nejspíše způsobeny odlišnou hladinou Prp22p v buňkách (viz Literární přehled Obrázek 8). Buňky s určitou nadlimitní hladinou proteinu Prp22 jsou tedy schopné mutace v motivu Slu7p kompenzovat, pokud však

¹ Všechny zkrácené verze *prp22* byly vysoce exprimované.

množství proteinu Prp22 klesne pod určitou mez, dochází za současné přítomnosti mutací *slu7* v motivu RED k vážným růstovým defektům. Z výsledků testu syntetické letality se zkrácenými verzemi *PRP22* též vyplývá, že větší roli hraje v kombinaci s mutacemi *slu7* hladina proteinu Prp22 než přítomnost či nepřítomnost jeho N-koncové části. Ani zkrácení Prp22p o 350 ak, které je samo o sobě letální a buňky jsou schopné růst pouze při silné nadprodukci takto zkráceného proteinu, nedosahuje v kombinaci s mutacemi *slu7* tak výrazného růstového defektu jako v případě mutace *prp22(-158T)*. Navíc rozdíly v růstu různých klonů nesoucích stejnou kombinaci mutací *slu7* a zkrácenin *prp22* zřejmě odráží odlišnou míru exprese Prp22p.

Mutace *slu7* zjevně neovlivňují fenotyp buněk nesoucích studované mutace *prp22* takovou měrou, jako alela *prp45(1-169)*, která je synteticky letální s oběma promotorovými mutacemi *prp22* a též výrazně zhoršuje růstový fenotyp buněk nesoucích zkráceniny Prp22p (Gahura et al., 2009; L. Senohrábková, nepublikované výsledky; viz Tabulka 20).

Prp45p není jediný faktor, prostřednictvím jehož vazby helikáza Prp22 asociuje se spliceosomem, protože buňky rostou (a sestřihují pre-mRNA) i v případě mutace *prp45(1-169)* kódující protein, který s Prp22 ve dvouhybridním testu neinteraguje (O. Gahura, nepublikované výsledky). Navíc Prp22p interaguje se sestřihovým komplexem jak N-, tak i C- koncovou částí. Je možné, že asociaci Prp22 se spliceosomem ovlivňuje protein Slu7. K interakci obou proteinů však zřejmě nedochází prostřednictvím N-koncové části Prp22p. Pokud by tomu tak bylo, očekávali bychom, že v případě delece N-koncové části Prp22p již mutace *slu7* nezhorší růstový fenotyp buněk. Mutace *slu7* ovšem vliv na růst buněk s extenzivnějšími zkráceninami Prp22p mají (Např. růstový fenotyp viabilní mutanty *prp22Δ261* se za současné přítomnosti vícečetné mutace *slu7* zhorší.). Předpokládáme tedy, že mutace v motivu RED proteinu Slu7 ovlivňují asociaci jiné než N-koncové části Prp22p se spliceosomem.

Jedním z možných vysvětlení syntetické letality mutací *slu7* a *prp45(1-169)* je aditivní negativní vliv na vazbu Prp22p do spliceosomu. Zavedením mutace *prp45(1-169)* dochází k výraznému snížení množství Prp22p ve spliceosomu v důsledku neefektivní vazby, pokud navíc dojde k zeslabení jeho interakce s dalším partnerem (Slu7p), sestřihový komplex není schopen správně fungovat, což znamená

pro buňku letální stav. Obdobná situace nastane, pokud se množství Prp22p ve spliceosomu sníží v důsledku mutace v promotoru *PRP22* a současně jsou zavedeny mutace ve *SLU7*.

		<i>SLU7</i>			<i>prp45(1-169)</i>	<i>PRP22</i>					
		P268L	R247E	S245-D251		-158T	-327A	Δ109	Δ261	Δ301	Δ350
<i>SLU7</i>	P268L	x	-	-	SL	SS	WT	WT	WT	SS	SS
	R247E	-	x	-	SL	SS	WT	WT	WT	SS	SS
	S245-D251	-	-	x	SL	SS	WT	WT	SS	SS	SS
<i>prp45(1-169)</i>		SL	SL	SL	x	SL	SL	SS	SS	SL	SL
<i>PRP22</i>	-158T	SS	SS	SS	SL	x	-	-	-	-	-
	-327A	WT	WT	WT	SL	-	x	-	-	-	-
	Δ109	WT	WT	WT	SS	-	-	x	-	-	-
	Δ261	WT	WT	SS	SS	-	-	-	x	-	-
	Δ301	SS	SS	SS	SL	-	-	-	-	x	-
	Δ350	SS	SS	SS	SL	-	-	-	-	-	x

Tabulka 20: Souhrn genetických interakcí mutací v genech *SLU7*, *PRP22* a *PRP45*. Tabulka uvádí všechny doposud testované kombinace mutací uvedených genů a růstový fenotyp příslušných buněk (zelená značí růst srovnatelný s wt buňkami (WT), oranžová definuje kombinaci mutací jako synthetic sickness (SS) – slabší růst než wt buňky, červeně označeny kombinace způsobující syntetickou letalitu (SL). Kombinace, které nebyly testovány, jsou označeny pomlčkou. Zpracováno na základě dat získaných v této diplomové práci, diplomové práci L. Senohrábkové a publikace Gahura et al., 2009.)

5.3. Slu7 a vliv na sestřih pre-mRNA

5.3.1. Výběr 3'SS

Klíčovou záležitostí zajišťující přesnost sestřihu pre-mRNA je správně identifikovat fosfodiesterové vazby, které mají být štěpeny. Na rozdíl od 5'sestřihového místa a místa větvení, která jsou definována šesti a sedmi konzervovanými nukleotidy, je 3'sestřihové místo definováno pouze dvěma 100% konzervovanými nukleotidy (Spingola et al., 1999; Schwartz et al., 2008). Sekvence intronu těsně před 3'sestřihovým místem obsahuje nukleotidy YAG (kde Y značí pyrimidin) a často se jedná o první YAG vyskytující se downstream od bodu větvení. 3'sestřihovému místu často předchází tzv. polypyrimidinový (polyY) trakt, u *S. cerevisiae* je vzhledem k vyšším eukaryotům méně konzervován a je tvořen ponejvíce uridiny (Shrnuto v Umen a Guthrie, 1995). Přítomnost poly-U traktu zvyšuje pravděpodobnost výběru 3'SS, kterému předchází, a to hlavně u intronů s velkou vzdáleností BP-3'SS (Patterson a Guthrie, 1991; Luukkonen a Séraphin, 1997). Nejvyšší konzervovanost poly-U traktu vykazují u *S. cerevisiae* intron-obsahující geny, které jsou vysoce efektivně sestřihované (Ma a Xia, 2011).

U metazoí dochází k rozpoznání 3'SS již v časné fázi sestřihu – ještě před prvním krokem, kvasinky *S. cerevisiae* vyžadují přítomnost 3'sestřihového místa až před druhým krokem sestřihu (Rymond a Rosbash, 1985).

K identifikaci 3'SS zřejmě dochází kombinací několika faktorů. Důležitým aspektem je vzdálenost 3'SS od bodu větvení, u většiny intronů *S. cerevisiae* spadá tato vzdálenost do intervalu 11 až 50 nt (Spingola et al., 1999). Identifikace 3'SS u pre-mRNA s velkou vzdáleností 3'SS-BP je závislá na polypyrimidinovém traktu (Patterson a Guthrie, 1991), naopak trinukleotidy YAG nacházející se od bodu větvení ve vzdálenosti menší než devět nt nejsou obvykle využity a jako 3'ss slouží YAG distálnější (Spingola et al., 1999). Obdobné závěry pramení z výzkumu lidských transkriptů – nejefektivněji jsou sestřihovány pre-mRNA, jejichž vzdálenost BP-3'SS se pohybuje v úzkém rozmezí 19-23 nt. Důvodem, proč nejsou sekvence YAG lokalizované příliš blízko bodu větvení využity jako 3'SS, může být sterická překážka ve formě nějakého faktoru vázaného v oblasti bodu větvení (Chua a Reed, 2001).

Na správnou lokalizaci 3'sestřihového místa má také vliv vzájemná interakce nukleotidů intronu v okolí obou sestřihových míst. Prokázána byla vazba mezi prvním a posledním nukleotidem intronu (v obou případech se jedná o guanosin; Parker a Siliciano, 1993). Vzájemně interagují též třetí nukleotid intronu za 5'sestřihovým místem (/GUA), pyrimidin na pozici -3 před 3'sestřihovým místem (YAG/) a guanosin na pozici 50 ve vysoce konzervovaném motivu ACAGAG u U6 snRNA (Collins a Guthrie, 2001).

Výběr 3'SS je též ovlivňován sekvencí exonů v okolí sestřihových míst (Crotti a Horowitz, 2009; Ma a Xia, 2011). Toto recentní zjištění je v souladu s faktem, že U5 snRNA před druhým krokem interaguje s nukleotidy obou exonů v oblasti sestřihových míst, a způsobuje tak jejich vzájemné přiblížení. K interakci U5 snRNA s exonem1 dochází již před první transesterifikační reakcí a tento kontakt přetrvává přes oba katalytické kroky. Po dokončení prvního kroku sestřihu pak U5 snRNA vstupuje do interakce i s nukleotidy exonu2 v okolí 3'sestřihového místa (shrnuto v Newman, 2008).

Zdá se, že přinejmenším v sestřihu některých intronů hraje roli též sekundární struktura, která je tvořena párováním bází mezi vnitřními nukleotidy intronu. Prokázán byl vliv na správnou selekci bodu větvení a na sestavování spliceosomu u některých intronů s dlouhou vzdáleností 5'SS-BP (Charpentier a Rosbash, 1996, Rogic et al., 2008). Výsledky získané v naší laboratoři ukazují, že tvorba této struktury by mohla u intronů s velkou vzdáleností mezi 3'SS a bodem větvení způsobit přiblížení vzdáleného 3'SS a stéricky zablokovat využití bližšího potenciálního 3'sestřihového místa (Gahura et al., 2011; Meyer et al., 2011)

Na výběru a správném použití 3'SS se podílejí také proteinové faktory. Prokázána byla vazba 3'SS pomocí Prp16p, Prp8p, Slu7p a Prp22p (Umen a Guthrie, 1995; McPheeters a Muhlenkamp, 2003). Jakým způsobem tyto proteiny přispívají k identifikaci 3'SS, není dosud objasněno. Z dostupné literatury se zatím lze domnívat, že s výběrem 3'SS je nejtěsněji spjatá funkce proteinu Slu7 (viz níže).

Slu7p je protein *in vitro* nezbytný pro druhý krok sestřihu substrátů s větší vzdáleností BP-3'SS než 12 nt (Brys a Schwer, 1996; Zhang a Schwer, 1997). Ačkoli tyto studie byly provedeny na rekombinantních konstruktech genu *ACT1*, je pravděpodobné, že přítomnost Slu7p je nezbytná také pro sestřih některých dalších buněčných transkriptů, což ostatně dokládá fakt, že gen *SLU7* je esenciální (Frank a

Guthrie, 1992). Vztah *Slu7p* k 3'SS dokládá již zmíněná crosslinking studie (Umen a Guthrie, 1995). Teorii vlivu *Slu7* na výběr 3'SS podporují též výsledky naší laboratoře, které dokumentují, že mutanta *slu7(P268L)* významně snižuje efektivitu druhého kroku sestřihu konstruktů obsahujícího mutaci v 3'SS (Gahura et al., 2009). Konzistentní s těmito informacemi jsou též data z roku 1992, která popisují vliv *Slu7p* na výběr kompetujících si 3'SS (Frank a Guthrie 1992). Dalším cílem této diplomové práce bylo proto testovat, zda má zkoumaný motiv RED proteinu *Slu7* vliv na sestřih různých substrátů a pokud ano, zda ovlivňuje výběr 3'SS.

5.3.2. Vliv mutací motivu RED proteinu *Slu7* na sestřih optimálních a suboptimálních substrátů

Pro popis role motivu RED proteinu *Slu7* v sestřihu pre-mRNA jsme nejprve využili několik sestřihových konstruktů odvozených od genu *ACT1*. Jednalo se o konstrukt s konsenzuální sekvencí sestřihových míst (optimální substrát) a dále o konstrukty, jež z důvodu záměn v sekvenci limitují druhý sestřihový krok – způsobují jeho částečný blok již u wt kmenu (suboptimální substráty).

Při sestřihu pre-mRNA s konsenzuální sekvencí sestřihových míst nemají mutace *slu7(P268L)*, *slu7(R247R)* ani *slu7(D245-S251)* výrazný vliv na efektivitu druhého sestřihového kroku. Získané výsledky korespondují se zjištěním, že všechny tři mutanty *slu7* jsou viabilní, a tudíž efektivita sestřihu pre-mRNA je pro přežití buněk dostatečná. Otázkou je, jak efektivní sestřih vzhledem k termosenzitivnímu fenotypu vykazují při zvýšených teplotách – což testováno zatím nebylo.

Mutace v motivu RED mají ovšem vliv na zpracování substrátů suboptimálních. Nejvýraznější defekt je patrný při zpracování substrátu s mutací v 3'SS (UAG → gAG) u mutanty *slu7(P268L)*. Hodnota efektivy druhého kroku sestřihu se zde pohybuje kolem 25 %, což představuje vzhledem ke kmenu s wt *SLU7* pokles téměř na polovinu. Výsledek odpovídá již publikovaným datům, kde hodnota úspěšnosti druhého sestřihového kroku v případě stejné mutanty a sestřihového konstruktů byla naměřena ještě nižší (Gahura et al., 2009). Ostatní dvě mutanty *slu7* se blíží spíše wt hodnotám než hodnotám *slu7(P268L)*. Kvantifikace produktů sestřihu u *slu7(S245-D251)* je ovšem vzhledem k nižší nanášce, a tím celkově nižšímu signálu, zatížena větší chybou. Ačkoli to nepovažujeme za příliš pravděpodobné, získané výsledky mohou být ovlivněny odlišným genetickým

pozadím jednotlivých mutant. Alela *slu7*(P268L) obsahuje v důsledku odlišné přípravy vektoru, na němž je nesena, vzhledem k ostatním alelám delší 5' a 3' nepřekládané oblasti.

Sestřih dvou různých konstruktů nesoucích záměnu A3C v 5'SS mutanty *slu7* ovlivňují, ale zdá se, že spíše nespecificky. Největší rozdíl od hodnot buněk s wt *SLU7* vykazuje u obou konstruktů, stejně jako v případě optimálního sestřihového substrátu, vícečetná mutanta *slu7*(S245-D251). Zmíněné sestřihové konstrukty s mutací v A3C v 5'SS se mimo jiné liší sekvencí exonu2, bezprostředně následující za 3'SS. Tento rozdíl zřejmě ovlivňuje efektivitu jejich sestřihu již na pozadí wt buněk. Ze získaných výsledků lze usuzovat, že sekvence exonu2 v okolí 3'SS ve vztahu k motivu RED proteinu Slu7 nehraje zásadní roli.

Defekt druhého sestřihového kroku je v případě suboptimálních konstruktů s mutací 3'SS gAG a s mutací 5'SS A3C způsoben odlišnými mechanismy. Záměna A3C v 5'SS způsobuje hyperstabilizaci konformace prvního kroku sestřihu. Slu7 zřejmě (podle dostupné literatury) neovlivňuje konformační změnu spliceosomu probíhající mezi dokončením první a započítáním druhé transesterifikační reakce. V této fázi se uplatňují zejména proteiny Prp16 a Prp17. Slu7p společně s Prp18p a Prp22p asociují se spliceosomem až v dalším sledu. Vliv mutací *slu7* na druhý krok sestřihu bychom tak očekávali spíše nespecifický, čemuž odpovídají získané výsledky. Defekt druhého sestřihového kroku v případě konstruktů s gAG v 3'SS je způsoben oslabením původně silného 3'SS (UAG). Identifikace takového 3'SS a je zřejmě v důsledku nekonsenzuální sekvence znesnadněna. Právě Slu7p je faktorem, jehož vliv na výběr 3'SS byl dokumentován. Očekávali bychom proto, že mutace *slu7* budou mít na sestřih substrátů s mutací 3'SS gAG vliv specifický. Zdá se, že jednu takovou mutaci jsme našli – je jí *slu7*(P268L). Tato mutace způsobuje v případě sestřihu substrátu s mutací v 3'SS dokonce výraznější poškození druhého sestřihového kroku než obecně nejsilnější mutace *slu7*(S245-D251).

5.3.3. Vliv mutací motivu RED proteinu Slu7 na sestřih substrátů obsahujících sekundární strukturu v oblasti BP-3'SS

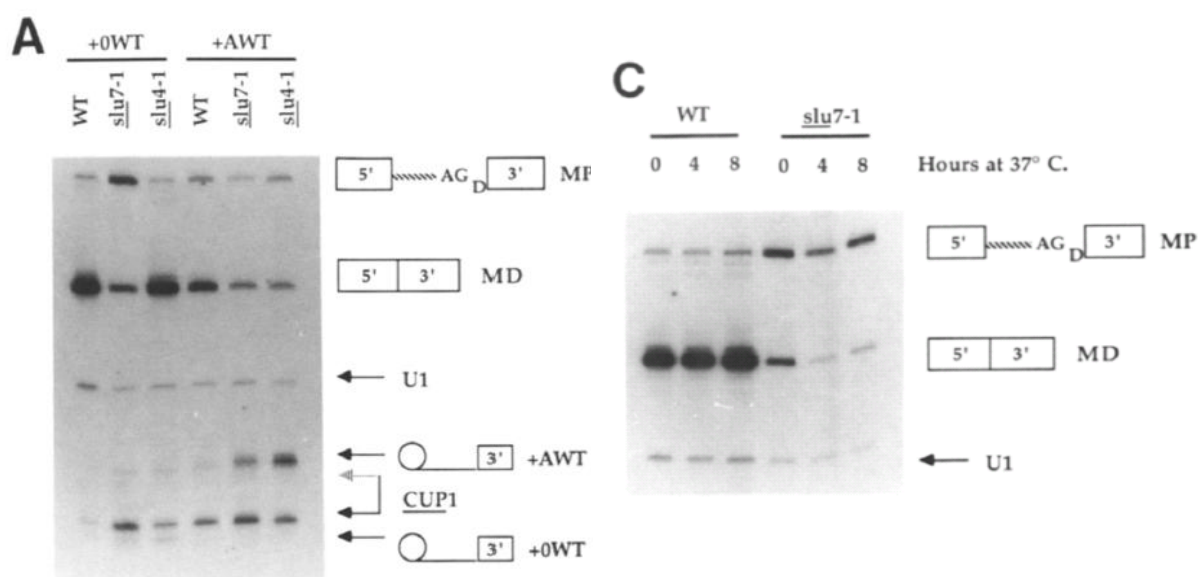
Recentní výsledky naší laboratoře ukazují na fenomén vzniku sekundární struktury u pre-mRNA s velkou vzdáleností mezi bodem větvení a 3'SS. Ověřena byla struktura u genu *COF1* a genu *UBC13*, u nichž vzniká v oblasti BP-3'SS vlásenka, díky které dochází ke zkrácení vzdálenosti těchto dvou bodů. Odstranění této vlásenky nemá na sestřih transkriptů vliv, ovšem její rozvolnění způsobuje významný sestřihový defekt (Gahura et al., 2011). Druhý krok sestřihu je v případě konstruktů s wt genem *COF1* u mutant *slu7* narušen, stejný defekt je patrný také při sestřihu konstruktů se zkrácenou vlásenkovou strukturou - nejvíce postižen je sestřih u mutanty *slu7*(S245-D251), u něhož efektivita druhého sestřihového kroku klesá vzhledem k wt buňkám o 40-50 %. Zkrácení vlásenkové struktury intronu *COF1* tedy nemá vzhledem k wt *COF1* u mutant *slu7* žádný vliv na sestřih dané pre-mRNA. Testování sestřihu konstruktů s genem *UBC13* poskytlo analogické výsledky jako při testování obou *COF1*-derivovaných konstruktů. Testování sestřihu konstruktů s rozvolněnou strukturou oblasti BP-3'SS u jednotlivých mutant *slu7* zatím nebylo provedeno.

5.3.4. Slu7p a jeho vliv na výběr kompetujících si 3'SS

Jakým způsobem dochází k výběru správného 3'SS, pokud se v oblasti za BP nachází více sekvencí YAG? Z výsledků studií provedených u kvasinky *S. cerevisiae* i u lidských transkriptů vyplývají následující závěry. Důležitou roli hraje vzdálenost 3'SS od bodu větvení a také vzájemná vzdálenost obou kompetujících si 3' sestřihových míst. U *S. cerevisiae* byla optimální vzdálenost 3'SS od BP určena v rozmezí 13-22 nt (Luukkonen a Séraphin, 1997), u lidských transkriptů 19-23 nt (Chua a Reed, 2001). Zajímavý je též vliv vzájemné vzdálenosti kompetujících si 3'SS u savčího sestřihového systému. Distální 3'SS je upřednostňováno tím více, čím blíže k proximálnímu se nachází; od vzdálenosti od 6 nt výše již není distální 3'SS kompetice schopné a využíváno je místo proximální (Chua a Reed, 2001). Toto tvrzení je podpráno bioinformatickou analýzou lidských alternativně sestřihovaných transkriptů (Alternative Splicing Database), která odhalila, že většina využívaných alternativních 3' sestřihových míst se nachází ve vzdálenosti do 6 nt od dominantního 3'SS (Tsai et al., 2010).

Studie z roku 1992 popisuje vliv kvasinkového *Slu7p* na výběr distálních 3'SS. Při sestřihu konstruktů nazvaného OWT, který nese jedno proximální a jedno distální 3'SS (vzdálené od bodu větvení 10 nt, respektive 44 nt; viz Výsledky Obrázek 29), dochází u wt buněk k preferenčnímu výběru distálního 3'SS. Sestřih stejného konstruktů u buněk s mutací *slu7-1* ukazuje na téměř stejnou frekvenci využití jak distálního, tak proximálního 3'SS. Defekt ve využívání proximálního 3'SS je dále prohlouben, pokud jsou mutanty *slu7-1* přeneseny do nepermissivní teploty 37 °C – již po čtyřech hodinách je využití distálního 3'SS výrazně potlačeno (Frank a Guthrie, 1992; viz Obrázek 31).

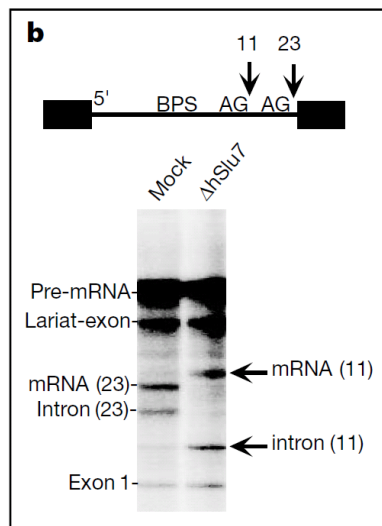
Následovalo testování sestřihu konstruktů AWT, jenž obsahoval dvě 3'SS, která byla od BP vzdálena více (24 nt a 58 nt), a byla tedy obě označena jako místa distální. Wt buňky opět využívají častěji vzdálenější z obou míst. U mutanty *slu7-1* dochází k výraznému snížení efektivity druhého sestřihového kroku – frekvence využití obou 3'SS se sníží stejnou měrou, a vzájemný poměr výsledných mRNA je tak stejný jako u buněk s wt *SLU7*. Závěrem studie tedy je, že *Slu7p* je potřeba pro efektivní využití distálních 3'SS míst a že neovlivňuje využití míst proximálních, což je konzistentní s faktem, že *Slu7p* není *in vitro* potřeba pro sestřih substrátů s velmi krátkou vzdáleností BP-3'SS. Mutace *slu7-1* zřejmě způsobuje specifickou změnu v sekvenci či struktuře proteinu, která má vliv na výběr 3'SS, protože mutace CCSS v oblasti zinc knuckle poměr výběru proximálního k distálnímu 3'SS téměř neovlivňuje.



Obrázek 31: Analýza sestřihu konstruktů OWT a AWT u mutanty *slu7-1*. (Převzato z Frank a Guthrie, 1992.)

V rámci charakterizace funkce motivu RED jsme se proto rozhodli analogickému testu podrobit též námi připravené mutanty *slu7*. Výše popsané konstrukty OWT a AWT nám byly laskavě poskytnuty laboratoří prof. Guthrie. Výsledky, které jsme získali v případě sestřihu pre-mRNA OWT u buněk s wt *SLU7*, odpovídají datům publikovaným v roce 1992 – výrazně častěji je využíváno distální 3'SS (asi 80 % celkové sestřižené mRNA tvoří její kratší forma). Každá ze tří testovaných mutant *slu7* vykazuje rozdílný patern využití obou 3'SS, efektivita druhého sestřihového kroku je však u všech mutant srovnatelná s hodnotou wt buněk. U mutanty *slu7*(R247E) je preferenčně využíváno distální 3'SS, ačkoli ne v takové míře jako u wt *SLU7*. V případě *slu7*(S245-D251) jsou obě místa využívána téměř stejně efektivně, zatímco u mutanty *slu7*(P268L) je častěji využíváno místo proximální (viz Výsledky Obrázek 30).

Autoři článku z roku 1992 tvrdí, že v případě mutanty *slu7-1* se efektivita využití proximálního 3'SS vzhledem k wt buňkám nemění, pouze se sníží efektivita využití distálního 3'SS. K tomuto tvrzení dospěli porovnáním hodnot získaných podílem signálu konkrétní formy mRNA a lariát-intermediátu (mRNA/LI) u mutantních a wt buněk. Nicméně z obrázků i dat uvedených v publikaci se lze domnívat, že k určitému zvýšení efektivity využití proximálního 3'SS u mutanty *slu7-1* v porovnání s wt buňkami přesto dochází. V našem případě dochází u všech mutant *slu7* vzhledem k wt buňkám ke zvýšení efektivity výběru proximálního 3'SS a současně ke snížení efektivity volby distálního, ačkoli v u každé mutanty v různé míře. Domníváme se, že minimálně v případě mutanty *slu7*(P268L) je výběr proximálního 3'SS aktivován, zatímco distálního 3'SS suprimován. Shodný závěr pramení též ze studie využívající extrakty lidských buněk s depletovaným hSlu7. U konstruktů, kde je za normálních podmínek častěji využíváno distální 3'SS, dochází v případě deplece hSlu7 ke specifické aktivaci výběru proximálního 3'SS a zároveň ke specifické supresi distálního 3'SS (viz Obrázek 32; Chua a Reed, 1999).



Obrázek 32: Aktivace proximálního 3'SS na úkor distálního u lidských buněčných extraktů s depletovaným hSlu7. (Převzato z Chua a Reed, 1999)

V případě sestřihu pre-mRNA konstruktů AWT volí buňky s wt *SLU7* opět častěji vzdálenější ze dvou (distálních) 3'SS. U mutant *slu7*(R247E) a *slu7*(S245-D251) jsou obě 3'SS využívána téměř rovnocenně. U *slu7*(P268L) převažuje opět volba bližšího 3'SS. U všech mutant se výrazně snižuje efektivita výběru vzdálenějšího 3'SS, ačkoli efektivita utilizace bližšího 3'SS je ve všech případech také poněkud snížena. To dokládá i snížení efektivit druhého kroku sestřihu konstruktů AWT u testovaných mutant, které bylo pozorováno též v případě mutanty *slu7-1* (Frank a Guthrie, 1992). V našem případě však není efektivita volby obou 3'SS snížena stejnou měrou, a to u žádné z mutant (viz Tabulka 21).

OWT	wt	P268L	R247E	S245-D251
MP/LI	1,10	3,24	1,54	2,21
MD/LI	4,59	2,27	2,88	2,04

AWT	wt	P268L	R247E	S245-D251
MP/LI	3,13	2,42	1,24	0,83
MD/LI	7,50	1,79	1,41	0,91

Tabulka 21: Využití kompetujících si 3'SS u mutant *slu7* při sestřihu konstruktů OWT a AWT. Efektivita využití proximálního a distálního 3'SS udávána jako poměr signálu konkrétní mRNA (MD či MP) k signálu lariát-intermediátu (LI). V případě všech mutant *slu7* se u konstruktů AWT vzhledem k wt buňkám výrazně snižuje efektivita utilizace distálního 3'SS.

Z výsledků naší studie vyplývá, že motiv RED je alespoň jednou z částí proteinu Slu7, která ovlivňuje volbu 3'SS. Hypotézu, že se jedná o vliv specifický, podporuje fakt, že záměna v oblasti zinc knuckle poměr tvorby alternativních mRNA neovlivňuje (Frank a Guthrie, 1992), ačkoli vykazuje syntetickou letalitu *s prp45*(1-169). V současné době pracujeme na identifikaci sekvence alely *slu7-1*, očekáváme nález mutací v oblasti tohoto motivu. Mutace v motivu ovlivňují efektivitu sestřihu substrátů se vzdáleným 3'SS (a to jak distálního 3'SS u konstruktů AWT a OWT, tak 3'SS u intronů genů *COF1* a *UBC13*, které obsahují v oblasti BP-3'SS vlásenkovou strukturu). Výběr alternativních 3'SS u konstruktů se sekundární strukturou u mutant *slu7* není výrazně ovlivněn. Možná proto, že jsou příliš daleko, možná také proto, že jsou maskována sekundární strukturou. V následujícím výzkumu považujeme za užitečné testovat vliv mutant *slu7* na sestřih konstruktů s rozvolněnou sekundární strukturou (např. *cof1d*(91-140),G149A). Vzhledem k tomu, že Slu7 nedisponuje enzymatickou aktivitou, je pravděpodobné, že narušením konzervovaného motivu RED se naruší vazebná schopnost Slu7 pro různé komponenty spliceosomu, nebo dojde k narušení struktury, která ústí ve ztrátu schopnosti jiné oblasti Slu7 vázat určité komponenty. Je možné, že Slu7 napomáhá organizovat introny s dlouhou vzdáleností BP-3'SS do struktur, které umožní přiblížení vzdáleného 3'SS katalytickému centru spliceosomu. Zdá se, že vícečetná mutace S245-D251 ovlivňuje sestřih pre-mRNA méně specificky (negativně ovlivňuje druhý sestřihový krok většiny substrátů) než mutace P268L, která vykazuje specifický defekt v sestřihu konstruktů s mutací v 3'SS a nejvýrazněji mění poměr alternativních forem mRNA konstruktů AWT a OWT. Jak již bylo uvedeno, záměna konzervovaného prolinu za leucin pravděpodobně výrazně ovlivní strukturu celé části proteinu Slu7. Otázkou je, jaké výsledky by poskytlo testování sestřihu pre-mRNA buněk s mutací (S245-D251) po přenesení do nepermissivní teploty.

Zřejmé je, že Slu7p se skutečně určitým mechanismem podílí na výběru 3'SS. Obdobné výsledky pramení též z výzkumu lidského homologa, který ovlivněním výběru alternativních 3'SS reguluje alternativní sestřih některých genů. Společně s množícími se důkazy o přítomnosti alternativního sestřihu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se tak Slu7 stává významným objektem, jehož podrobné studium by mohlo pomoci odkrýt mechanismus volby v daný okamžik vhodného 3'sestřihového místa u tohoto jednobuněčného modelového eukaryotního organismu.

6. Shrnutí

- Byly připraveny alely kódující proteiny Slu7 se záměnami v motivu RED, všechny připravené mutanty jsou životaschopné.
- Mutace *slu7*(S245-D251) způsobuje citlivost buněk ke zvýšené teplotě 37 °C, mutace *slu7*(R247E), (P268L) a (R271A) k teplotě 39 °C.
- Všechny mutace v motivu způsobují v kombinaci s mutací *prp45*(1-169) těžký růstový defekt buněk, téměř ve všech případech ústící v letalitu.
- Fitnes mutant *slu7*(P268L), (R247E) a (S245-D251) je ovlivňována hladinou proteinu Prp22. V případě poklesu množství Prp22p pod určitou hladinu nejsou mutanty schopné přežít.
- Mutace *slu7* v motivu RED negativně ovlivňují sestřih pre-mRNA substrátů suboptimálních pro druhý sestřihový krok a též substrátů nesoucích v oblasti mezi BP a 3'SS sekundární vlásenkovou strukturu.
- Mutace v motivu RED ovlivňují poměr využití alternativních 3'sestřihových míst substrátů OWT a AWT.
- Byla charakterizována role motivu RED ve výběru distálních 3'sestřihových míst.

7. Seznam citované literatury

- Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C. S. and Beggs, J. D.** (2003). Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA* **9**, 138–150.
- Alberstein, M., Amit, M., Vaknin, K., O'Donnell, A., Farhy, C., Lerenthal, Y., Shomron, N., Shaham, O., Sharrocks, A. D., Ashery-Padan, R., et al.** (2007). Regulation of transcription of the RNA splicing factor hSlu7 by Elk-1 and Sp1 affects alternative splicing. *RNA* **13**, 1988–1999.
- Ansari, A. and Schwer, B.** (1995). SLU7 and a novel activity, SSF1, act during the PRP16-dependent step of yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **14**, 4001–4009.
- Arenas, J. E. and Abelson, J. N.** (1997). Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11798–11802.
- Aronova, A., Bacíková, D., Crotti, L. B., Horowitz, D. S. and Schwer, B.** (2007). Functional interactions between Prp8, Prp18, Slu7, and U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *RNA* **13**, 1437–1444.
- Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuvéglise, C., Munsterkotter, M., Guldener, U., Mewes, H.-W., Van Helden, J., Dujon, B., et al.** (2003). Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1121–1135.
- Brys, A. and 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**, 707–717.
- Castillo, J., Goñi, S., Latasa, M. U., Perugorría, M. J., Calvo, A., Muntané, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Prieto, J., Avila, M. A., et al.** (2009). Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors. *Gastroenterology* **137**, 1805–1815.e1–4.
- Collins, C. A. and Guthrie, C.** (2001). Genetic interactions between the 5' and 3' splice site consensus sequences and U6 snRNA during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **7**, 1845–1854.
- Company, M., Arenas, J. and Abelson, J.** (1991). Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* **349**, 487–493.
- Crotti, L. B. and Horowitz, D. S.** (2009). Exon sequences at the splice junctions affect splicing fidelity and alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18954–18959.
- Cuenca-Bono, B., García-Molinero, V., Pascual-García, P., Dopazo, H., Llopis, A., Vilardell, J. and Rodríguez-Navarro, S.** (2011). SUS1 introns are required for efficient mRNA nuclear export in yeast. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8599–8611.
- Dahl, R., Wani, B. and Hayman, M. J.** (1998). The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene* **16**, 1579–1586.
- Davis, C. A., Grate, L., Spingola, M. and 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**, 1700–1706.

- Dong, S., Li, C., Zenklusen, D., Singer, R. H., Jacobson, A. and He, F.** (2007). YRA1 autoregulation requires nuclear export and cytoplasmic Edc3p-mediated degradation of its pre-mRNA. *Mol. Cell* **25**, 559–573.
- Folk, P., Půta, F. and Skruzný, M.** (2004). Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 629–640.
- Frank, D. and Guthrie, C.** (1992). An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev.* **6**, 2112–2124.
- Frank, D., Patterson, B. and Guthrie, C.** (1992). Synthetic lethal mutations suggest interactions between U5 small nuclear RNA and four proteins required for the second step of splicing. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5197–5205.
- Gahura, O., Abrahámová, K., Skruzný, M., Valentová, A., Munzarová, V., Folk, P. and Půta, F.** (2009). Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *J. Cell. Biochem* **106**, 139–151.
- Gahura, O., Hammann, C., Valentová, A., Půta, F. and Folk, P.** (2011). Secondary structure is required for 3' splice site recognition in yeast. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9759–9767.
- Grund, S. E., Fischer, T., Cabal, G. G., Antúnez, O., Pérez-Ortín, J. E. and Hurt, E.** (2008). The inner nuclear membrane protein Src1 associates with subtelomeric genes and alters their regulated gene expression. *J. Cell Biol.* **182**, 897–910.
- Häsler, R., Kerick, M., Mah, N., Hultschig, C., Richter, G., Bretz, F., Sina, C., Lehrach, H., Nietfeld, W., Schreiber, S., et al.** (2011). Alterations of pre-mRNA splicing in human inflammatory bowel disease. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 603–611.
- Horowitz, D. S. and Abelson, J.** (1993). A U5 small nuclear ribonucleoprotein particle protein involved only in the second step of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2959–2970.
- Hossain, M. A., Rodriguez, C. M. and Johnson, T. L.** (2011). Key features of the two-intron *Saccharomyces cerevisiae* gene *SUS1* contribute to its alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8612–8627.
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K.** (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691.
- Chan, S.-P. and Cheng, S.-C.** (2005). The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 31190–31199.
- Charpentier, B. and Rosbash, M.** (1996). Intramolecular structure in yeast introns aids the early steps of in vitro spliceosome assembly. *RNA* **2**, 509–522.
- Chen, M. and Manley, J. L.** (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 741–754.
- Chen, C.-H., Yu, W.-C., Tsao, T. Y., Wang, L.-Y., Chen, H.-R., Lin, J.-Y., Tsai, W.-Y. and Cheng, S.-C.** (2002). Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1029–1037.

- Chua, K. and Reed, R.** (1999). Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the spliceosome between the catalytic steps of splicing. *Genes Dev.* **13**, 841–850.
- Chua, K. and Reed, R.** (2001). An upstream AG determines whether a downstream AG is selected during catalytic step II of splicing. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1509–1514.
- James, S.-A., Turner, W. and Schwer, B.** (2002). How Slu7 and Prp18 cooperate in the second step of yeast pre-mRNA splicing. *RNA* **8**, 1068–1077.
- Janowicz, A., Michalak, M. and Krebs, J.** (2011). Stress induced subcellular distribution of ALG-2, RBM22 and hSlu7. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1045–1049.
- Jiang, J., Horowitz, D. S. and Xu, R. M.** (2000). Crystal structure of the functional domain of the splicing factor Prp18. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 3022–3027.
- Johnson, T. L. and Vilardell, J.** (2012). Regulated pre-mRNA splicing: The ghostwriter of the eukaryotic genome. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 538–545.
- Jones, M. H., Frank, D. N. and 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**, 9687–9691.
- Juneau, K., Palm, C., Miranda, M. and Davis, R. W.** (2007). High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1522–1527.
- Juneau, K., Nislow, C. and Davis, R. W.** (2009). Alternative splicing of PTC7 in *Saccharomyces cerevisiae* determines protein localization. *Genetics* **183**, 185–194.
- Konarska, M. M., Vilardell, J. and Query, C. C.** (2006). Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Mol. Cell* **21**, 543–553.
- Krishna, S. S., Majumdar, I. and Grishin, N. V.** (2003). Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res.* **31**, 532–550.
- Lardelli, R. M., Thompson, J. X., Yates, J. R., 3rd and Stevens, S. W.** (2010). Release of SF3 from the intron branchpoint activates the first step of pre-mRNA splicing. *RNA* **16**, 516–528.
- Lesser, C. F. and Guthrie, C.** (1993). Mutational analysis of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae* using a sensitive new reporter gene, CUP1. *Genetics* **133**, 851–863.
- Lev-Maor, G., Sorek, R., Shomron, N. and Ast, G.** (2003). The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science* **300**, 1288–1291.
- Luukkonen, B. G. and 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**, 779–792.
- Ma, P. and Xia, X.** (2011). Factors affecting splicing strength of yeast genes. *Comp. Funct. Genomics* **2011**, 212146.
- Martin, A., Schneider, S. and Schwer, B.** (2002). Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem.* **277**, 17743–17750.

- Martínková, K., Lebduška, P., Skružný, M., Folk, P. and Půta, F.** (2002). Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *J. Biochem* **132**, 557–563.
- Mayas, R. M., Maita, H. and Staley, J. P.** (2006). Exon ligation is proofread by the DExD/H-box ATPase Prp22p. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 482–490.
- McPheeters, D. S. and 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**, 4174–4186.
- McPheeters, D. S., Schwer, B. and 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**, 1313–1321.
- Meyer, M., Plass, M., Pérez-Valle, J., Eyras, E. and Vilardell, J.** (2011). Deciphering 3' splice selection in the yeast genome reveals an RNA thermosensor that mediates alternative splicing. *Mol. Cell* **43**, 1033–1039.
- Mumberg, D., Müller, R. and Funk, M.** (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119–122.
- Neuvéglise, C., Marck, C. and Gaillardin, C.** (2011). The intronome of budding yeasts. *C. R. Biol.* **334**, 662–670.
- Newman, A. J.** (2008). RNA Interactions in mRNA Splicing. In *Encyclopedia of Life Sciences* (ed. John Wiley & Sons, Ltd), Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Parker, R. and Siliciano, P. G.** (1993). Evidence for an essential non-Watson-Crick interaction between the first and last nucleotides of a nuclear pre-mRNA intron. *Nature* **361**, 660–662.
- Patterson, B. and Guthrie, C.** (1991). A U-rich tract enhances usage of an alternative 3' splice site in yeast. *Cell* **64**, 181–187.
- Pleiss, J. A., Whitworth, G. B., Bergkessel, M. and Guthrie, C.** (2007). Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress. *Mol. Cell* **27**, 928–937.
- Preker, P. J., Kim, K. S. and Guthrie, C.** (2002). Expression of the essential mRNA export factor Yra1p is autoregulated by a splicing-dependent mechanism. *RNA* **8**, 969–980.
- Query, C. C., Moore, M. J. and Sharp, P. A.** (1994). Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model. *Genes Dev.* **8**, 587–597.
- Raghuathan, P. L. and Guthrie, C.** (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr. Biol.* **8**, 847–855.
- Rogic, S., Montpetit, B., Hoos, H. H., Mackworth, A. K., Ouellette, B. F. and Hieter, P.** (2008). Correlation between the secondary structure of pre-mRNA introns and the efficiency of splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **9**, 355.
- Rutz, B. and Séraphin, B.** (1999). Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly. *RNA* **5**, 819–831.
- Rymond, B. C. and Rosbash, M.** (1985). Cleavage of 5' splice site and lariat formation are independent of 3' splice site in yeast mRNA splicing. *Nature* **317**, 735–737.

- Shomron, N., Reznik, M. and Ast, G.** (2004). Splicing factor hSlu7 contains a unique functional domain required to retain the protein within the nucleus. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3782–3795.
- Shomron, N., Alberstein, M., Reznik, M. and Ast, G.** (2005). Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. *J. Cell. Sci.* **118**, 1151–1159.
- Schmoltdt, A., Benthe, H. F. and Haberland, G.** (1975). Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1639–1641.
- Schneider, S. and Schwer, B.** (2001). Functional domains of the yeast splicing factor Prp22p. *J. Biol. Chem.* **276**, 21184–21191.
- Schwartz, S. H., Silva, J., Burstein, D., Pupko, T., Eyras, E. and Ast, G.** (2008). Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome Res.* **18**, 88–103.
- Schwer, B.** (2008). A conformational rearrangement in the spliceosome sets the stage for Prp22-dependent mRNA release. *Mol. Cell* **30**, 743–754.
- Schwer, B. and Gross, C. H.** (1998). Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17**, 2086–2094.
- Schwer, B. and Guthrie, C.** (1992). A conformational rearrangement in the spliceosome is dependent on PRP16 and ATP hydrolysis. *EMBO J.* **11**, 5033–5039.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D. and Ares, M., Jr** (1999). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **5**, 221–234.
- Staley, J. P. and Guthrie, C.** (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**, 315–326.
- Staley, J. P. and Guthrie, C.** (1999). An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol. Cell* **3**, 55–64.
- Stevens, S. W., Ryan, D. E., Ge, H. Y., Moore, R. E., Young, M. K., Lee, T. D. and Abelson, J.** (2002). Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol. Cell* **9**, 31–44.
- Tsai, K.-W., Chan, W.-C., Hsu, C.-N. and Lin, W.-C.** (2010). Sequence features involved in the mechanism of 3' splice junction wobbling. *BMC Mol. Biol.* **11**, 34.
- Tseng, C.-K., Liu, H.-L. and Cheng, S.-C.** (2011). DEAH-box ATPase Prp16 has dual roles in remodeling of the spliceosome in catalytic steps. *RNA* **17**, 145–154.
- Umen, J. G. and Guthrie, C.** (1995a). Prp16p, Slu7p, and Prp8p interact with the 3' splice site in two distinct stages during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **1**, 584–597.
- Umen, J. G. and Guthrie, C.** (1995b). The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **1**, 869–885.

- Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A. M. and Vandenhaute, J.** (2005). Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* **22**, 1061–1068.
- van Nues, R. W. and Beggs, J. D.** (2001). Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 1451–1467.
- Vilardell, J. and Warner, J. R.** (1994). Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. *Genes Dev.* **8**, 211–220.
- Vilardell, J., Chartrand, P., Singer, R. H. and Warner, J. R.** (2000). The odyssey of a regulated transcript. *RNA* **6**, 1773–1780.
- Wagner, J. D., Jankowsky, E., Company, M., Pyle, A. M. and Abelson, J. N.** (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**, 2926–2937.
- Wahl, M. C., Will, C. L. and Lührmann, R.** (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701–718.
- Wang, Q., Zhang, L., Lynn, B. and Rymond, B. C.** (2008). A BBP-Mud2p heterodimer mediates branchpoint recognition and influences splicing substrate abundance in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2787–2798.
- Warkocki, Z., Odenwälder, P., Schmitzová, J., Platzmann, F., Stark, H., Urlaub, H., Ficner, R., Fabrizio, P. and Lührmann, R.** (2009). Reconstitution of both steps of *Saccharomyces cerevisiae* splicing with purified spliceosomal components. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1237–1243.
- Will, C. L. and Lührmann, R.** (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**,.
- Zhang, X. and Schwer, B.** (1997). Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2146–2152.

Přílohy

Příloha 1

>SLU7_XbaI-EcoRI sekvenováno - 1593 bp

```
TCTAGACTTTTGGATTTTATACCTAGTGACAATTAATAATATAGAAAAGAGTTGGTAACCTCAGCTGCCGTA
CAATTTAATTGGAGAAGTTGTTCGAGTTTTTTTAAAGTACATTTTCATTGGAAACAAGTACTAGTACTAGTTCG
AAAGACAATAATAGTACCCATAACGATAACTCCTTCGTTATCTATTGAATAGCTTGCCTTTCAAGTAAATCAATA
TCAAGTCTGCGTATATCATTATCGAGCACTTCTGAAAAAGATACCAGTTACTGAAATACAACGATCGGATTA
ATATGAATAAACAGCAGAAAACAACGAAAATCGAAGCACTATTAACGAAAATAAAAGGCAACTACAACAAGCAAA
AGAAAAAATGAAAATATTCATATCCCCAGGTATATTAGAAATCAACCATGGTACTATAAGGATACCCCCAAAGAA
CAAGAAGGGAAGAAGCCCGCAATGATGATACGAGCACTGCAGAAGGAGGAGAAAAAAGCGACTACTTGGTGCATC
ATAGGCAAAAAGCAAAAGGGGGTGCCTTAGATATTGACAATAATTCAGAACCAAAAATTTGGTATGGGTATAAAGGA
TGAGTTCAAACTAATCAGACCCCAGAAGATGTCCGTCGAGATTCTCATTCGCTGTCAATTTGTAGGAATTGTGGG
GAAGCAGGGCATAAGGAGAAAGACTGCATGGAAAAACCTCGTAAGATGCAGAAGCTTGTCCCGATTTAAATTCAC
AAAAAATAATGGCAGACTTTTAGTACGAGCTACTGATGATGACTGGGACTCCAGAAAAGATAGATGGTACGGTTA
CTCAGGAAAAGAATACAATGAACTGATAAGTAAGTGGGAGCGTGATAAAAAGAAAATAAAATAAAAGGAAAAGACAAA
TCCCAACTGATGAAACACTATGGGATACAGATGAAGAGATAGAATAATGAAGTTAGAACTTTACAAGGATTCGG
TAGGTTTATTGAAGAAAGATGATGCTGATAATTTCTCAGTTGTATAGGACATCAACGAGATTGAGAGAAGATAAGGC
TGCTTACTTGAACGACATAAATTCACGGAGAGTAATTATGATCCTAAATCAAGATTGTACAAAACACTGAAACACTG
GGCGCAGTTGATGAAAAATCAAAAATGTTCCGCAGACATTTGACAGGTGAAGGCCTAAAAATTAACGAATTGAACC
AGTTTGTCTAGATCTCACGCTAAGGAAATGGGTATACGTGATGAAATTTGAGGATAAGGAAAAGTACAACATGTTTT
AGTCGCCAATCTACTAAATATGAATATCTGAAGAAAAACGGGAACAAGAAGAAACCAAGCAGCCCAAGATTGTC
AGCATTGAGATCTGGAAGCTAGGAAAGTAGATGGTACAAAGCAATCTGAGGAACAACGGAACCACTTAAAAGATT
TATATGGTTAGGATCCATCATTGAAATTTCCAATATCTAGTCACGGAGCACGAGAGGTAAAGAATTTAGAAAAAA
AAATGCGATGAGCTGAAAAAATTTGTCAAATATAAACTACATTCTTAAGTATACGTATATATCTTGC
```

Sekvence genu SLU7 používaná pro přípravu plazmidů v této diplomové práci. Sekvence nese vzhledem ke genomové verzi některé úpravy, na počátku ORF SLU7 je zavedeno restriční místo **NdeI**, na konci ORF SLU7 zavedeno restriční místo **BamHI**, čímž dochází ke změně sekvence stop-kodonu z TAA na TAG, **EcoRI** místo je zavedeno uměle o 183 nt upstream od přirozeného restričního místa EcoRI.

Příloha3 – Testování genetických interakcí alel *slu7* a *prp22*

Tabulka uvádí všechny testované kombinace mutací *slu7* a *prp22*, každá kombinace je označena číslem. Kmen ENY14 (*slu7Δ prp22Δ* + komplementační plazmid se *SLU7 PRP22 URA3*) byl transformován kombinací plazmidů nesoucích jednu alelu *slu7* a jednu alelu *prp22*. Inkubace na médiu s 5-FOA. Rostou pouze ty klony, které mohou ztratit komplementační plazmid. Klony, které nerostou, nesou kombinaci alel *prp22* a *slu7*, které jsou synteticky letální. Transformanty jsou označeny čísly ve formě **a-b**, **a** značí příslušnou kombinaci mutací dle tabulky, **b** značí pořadí testovaného klonu, K- negativní kontrolu.

		mutace <i>slu7</i>		
		P268L	R247E	(S245-D251)
mutace <i>prp22</i>	(-158T)	1	7	13
	(-327A)	2	8	14
	Δ 109	3	9	15
	Δ 261	4	10	16
	Δ 301	5	11	17
	Δ 350	6	12	18

