

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Eliška Kročová

Vliv modifikací rRNA na iniciaci translace u eukaryot

Influence of rRNA modifications on translation initiation in eukaryots

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Praha, 2013

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, 3. 5. 2013

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. V první řadě děkuji mému školiteli Martinu Pospíškovi, který si vždy našel čas, aby mi poradil a pomohl během mé práce. Mé díky patří také Václavu Vopálenskému, který mě trpělivě naučil většinu metod a který mi poskytl spoustu dobrých rad.

Děkuji všem členům Laboratoře biochemie RNA za vytvoření skvělého pracovního prostředí a za pomoc během mé práce v laboratoři, zejména Tomáši Maškovi, Kristině Roučové, Josefu Novákovi, Kateřině Mocové, Silvii Mrvové a Michalu Sýkorovi.

Mé velké díky patří laborantkám Vlastě Pelechové a Petře Studničkové, které mi vždy s ochotou připravily vše, co jsem potřebovala.

V neposlední řadě děkuji mým rodičům a blízkým, jež mě podporovali během celého mého studia. Bez nich bych tuto závěrečnou práci neměla možnost napsat.

Abstrakt

Modifikace ribosomální RNA se vyskytují u všech živých organismů. Funkce modifikací rRNA mohla začít být studována až ve chvíli, kdy byl popsán způsob vzniku těchto modifikací. V současné době se vědci zaměřují nejen na studium jednotlivých modifikací, ale i na význam celkové úrovně modifikací rRNA pro zrání a funkci ribosomu.

Tato práce se zabývá vlivem 2'-O-methylací na cytidinu 1639 a adenosinu 100 v 18S rRNA a uridinu 2729 ve 25S rRNA na iniciaci translace u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se zvláštním zřetelem na iniciaci translace řízené vnitřním vazebným místem pro ribosom (IRES). V průběhu diplomové práce byly úspěšně vytvořeny kmeny s delecí v genech snR51, snR70 a s dvojitou delecí v obou zmíněných genech. Byly provedeny pilotní experimenty, které ukázaly na význam produktů obou genů v iniciaci translace.

Klíčová slova:

rRNA, 2'-O-methylace, iniciace translace, vnitřní vazebné místo pro ribosom, IRES, ribosom

Abstract

Modifications of ribosomal RNA are present in every living organism. The function of rRNA modifications could be studied only when the process of modifications was described. Currently, scientists study not only individual modifications but also the importance of global level of modifications for maturation and function of ribosome.

This thesis deals with the influence of 2'-O-methylation of citidine 1639 and adenosine 100 in 18S rRNA and uridine 2729 in 25S rRNA on initiation in yeast *Saccharomyces cerevisiae* with special attention of translation controlled by internal ribosome entry site (IRES). Strains with deletion in genes snR51, snR70 and double deletion in both genes were successfully created during my master study. Pilot experiments showed the importance of products of both genes in translation initiation.

Keywords

rRNA, 2'-O-methylation, translation initiation, internal ribosome entry site, IRES, ribosome

Obsah

1. Seznam zkratek	11
2. Úvod.....	13
3. Cíle práce	14
4. Literární přehled	15
4.1 Vznik a úpravy ribosomu.....	15
4.1.1 První okamžiky života pre-rRNA.....	15
4.1.2 Modifikace ribosomální RNA	16
4.1.2.1 Způsob vzniku modifikace nukleotidu ribosomální RNA	17
4.1.2.1 H/ACA RNPs	18
4.1.2.2 Box C/D RNPs	19
4.1.2.3 Další funkce snoRNPs komplexů.....	20
4.1.2.4 Modifikace rRNA specifickými proteiny.....	20
4.2 Úloha modifikací rRNA	21
4.2.1 Hypermodifikovaný pseudouridin 1191 18S rRNA	21
4.2.2 Dimethylace adenosinů 1771 a 1772 18S rRNA.....	22
4.2.3 Bud23p a methylace guanosinu 1575 18S rRNA.....	23
4.2.4 Vliv poruchy dyskerinu na buněčnou translaci	24
4.2.5 Význam jednotlivých modifikací rRNA	26
4.2.5.1 Rezistence vůči antibiotikům	29
4.2.5.2 Rychlost růstu a účinnost translace	30
4.2.5.3 Vliv modifikací rRNA na iniciaci translace.....	32
4.2.5.4 Chybovost ribosomu během elongace translace	32
4.2.5.5 Poruchy terminace translace	32
5. Materiál a metody	34
5.1 Materiál.....	34

5.1.1	Chemikálie	34
5.1.2	Roztoky	36
5.1.3	Komerční puřry a roztoky nezahrnuté v soupravách	37
5.1.4	Enzymy	37
5.1.5	Standardy molekulových hmotností	38
5.1.6	Komerční soupravy.....	38
5.1.7	Vektory	39
5.1.8	Oligonukleotidové primery	40
5.1.9	Použité protilátky	40
5.1.10	Mikroorganismy	41
5.1.10.1	Bakteriální kmemy	41
5.1.10.2	Kvasinkové kmemy	41
5.1.11	Kultivační média	41
5.1.11.1	Bakteriální kultivační média.....	41
5.1.11.1.1	Tekutá média.....	41
5.1.11.1.2	Agarové půdy	41
5.1.11.2	Kvasinková kultivační média	42
5.1.11.2.1	Tekutá média.....	42
5.1.11.2.2	Agarové půdy	42
5.2	Metody	43
5.2.1	Práce s mikroorganismy	43
5.2.1.1	Kultivace bakterií	43
5.2.1.2	Kultivace kvasinek	43
5.2.1.3	Skladování mikroorganismů.....	43
5.2.1.4	Měření růstu mikroorganismů.....	43
5.2.1.4.1	Stanovení růstových křivek kvasinkových kmemů.....	43

5.2.1.5	Testování auxotrofních požadavků kvasinkových kmenů	44
5.2.1.5.1	Pro potvrzení genotypů kvasinkových kultur	44
5.2.1.5.2	Pro semikvantitativí odhad exprese reportérových genů.....	44
5.2.1.6	Indukce GAL promotoru pomocí galaktosy	44
5.2.1.7	Odléčení kvasinkových kmenů od vektoru pSH63.....	45
5.2.2	Práce s DNA.....	45
5.2.2.1	Izolace DNA	45
5.2.2.1.1	Minipreparace vektorů plasmidového typu z <i>E. coli</i>	45
5.2.2.1.2	Midipreparace vektorů plasmidového typu z <i>E. coli</i>	46
5.2.2.1.3	Izolace bakteriální DNA pro PCR reakci.....	47
5.2.2.1.4	Izolace kvasinkové chromozomální DNA pro PCR reakci	47
5.2.2.1.5	Izolace DNA z agarosového gelu pomocí FastBack DNA Minispin Kit.....	47
5.2.2.2	Měření koncentrace DNA	48
5.2.2.3	Agarosová elektroforesa.....	48
5.2.2.4	PCR	49
5.2.2.4.1	Složení směsi pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR)	49
5.2.2.4.2	Použité PCR programy.....	50
5.2.2.5	Modifikace DNA	51
5.2.2.5.1	Štěpení restrikčními endonukleasami.....	51
5.2.2.5.2	Ligace DNA.....	52
5.2.2.6	Vnášení DNA do mikroorganismů.....	52
5.2.2.6.1	Transformace buněk <i>E. coli</i> elektroporací.....	52
5.2.2.6.2	Transformace kvasinkových buněk pomocí LiAc.....	53
5.2.2.6.3	Vysokovýtěžková transformace kvasinkových buněk pomocí LiAc	53
5.2.3	Práce s proteiny.....	54
5.2.3.1	Příprava kvasinkových lyzátů	54

5.2.3.1.1	Vysokovýtěžková příprava kvasinkových lyzátů.....	54
5.2.3.1.2	Příprava kvasinkových lyzátů pro měření enzymových aktivit	55
5.2.3.2	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	56
5.2.3.3	Semi-dry metoda pro western-blot	57
5.2.3.4	Chemiluminiscenční detekce	58
5.2.3.5	Barvení polyakrylamidových gelů	58
5.2.3.6	Sušení polyakrylamidových gelů	59
5.2.3.7	Měření aktivity β -galaktosidasy	59
5.2.3.8	Měření aktivity světluškové luciferasy.....	59
5.2.3.9	Měření koncentrace proteinů pomocí BCA testu	59
5.2.3.10	Výpočet směrodatné odchylky	60
6.	Výsledky	61
6.1	Příprava delečních kmenů <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
6.1.1	Ověření laboratorního kmene pJ69-4A.....	61
6.1.2	Příprava delečních DNA kazet	61
6.1.2.1	Příprava pUG vektorů pro vytvoření delečních kazet.....	64
6.1.2.2	Vytvoření delečních kazet.....	65
6.1.3	Genetická modifikace laboratorního kmene pJ69-4A	66
6.1.3.1	Transformace pJ69-4A	66
6.1.3.2	Ověření správné rekombinace.....	66
6.1.3.3	Finální úpravy nově vzniklých kmenů	68
6.2	Analytické vektory pFGAL4h-HCV	70
6.2.1	Testovací systém pFGAL4h-HCV	70
6.2.2	Izolace vektorů a jejich transformace do referenčních kmenů	71
6.3	Analýza referenčních kmenů obsahující vektory pFGAL4h-X	71
6.3.1	Testování auxotrofních požadavků referenčních kmenů	72

6.3.2	Růstové vlastnosti testovaných kmenů v tekutém selekčním médiu.....	82
6.3.3	Růstové vlastnosti testovaných kmenů v médiu obsahující stoupající koncentrace 3-AT.....	85
6.3.4	Měření aktivit světluškové luciferasy a β -galaktosidasy.....	87
6.3.5	Analýza N-koncové části Gal4 proteinu.....	92
6.4	Použití vektorů testujících iniciaci translace.....	94
7.	Diskuze.....	98
7.1	Vytvoření kvasinkových kmenů s chybějícími modifikacemi Cm1639, Am100 a Um2729 rRNA.....	98
7.2	Vliv modifikací rRNA na iniciaci translace závislé na IRES elementu.....	99
7.3	Vliv modifikací rRNA na iniciaci translace nezávislé na IRES elementu.....	102
8.	Souhrn.....	103
9.	Seznam literatury.....	104

1. Seznam zkratek

Zkratka	Vysvětlení
β -gal	β -galaktosidasa
DC	dekódující centrum malé podjednotky ribosomu
Δ 51	deleční kmen pJ69-4A <i>snr51Δ::lox-P</i>
Δ 70	deleční kmen pJ69-4A <i>snr70Δ::lox-P</i>
Δ 70/51	deleční kmen pJ69-4A (<i>snr70,snr51Δ</i>):: <i>lox-P</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETS	vnější mezerník
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HCV	virus hepatitidy typu C
HH	Hoyeraal-Hreidarssonův syndrom
IRES	vnitřní vazebné místo pro ribosom
ITS	vnitřní mezerník
LSU	velká ribosomální podjednotka
Luc	světlušková luciferasa
mRNA	mediátorová RNA
Nm	2'-O-methylace nukleotidu
ORF	otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerasova řetězová reakce
pFGAL4h-X	Série vektorů odvozených od vektoru pFGAL4h
pre-rRNA	prekurzorová ribosomální RNA
PTC	peptidyl transferázová doména ribosomu
PVDF	polyvinyliden fluoridová membrána
rRNA	ribosomální RNA
snoRNA	malá jadéřková RNA

snoRNP	malý jadérový ribonuleoproteinový komplex
SSU	malá ribosomální podjednotka
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
tRNA	transferová RNA
UTR	netranslatovaná oblast mRNA
X-DC	kongenitální dyskeratosa vázaná na X chromosom
Ψ	pseudouridin

2. Úvod

Jedna z nejdůležitějších komponent v buňce, ať se jedná o buňku bakterií, archaea nebo eukaryont, je ribosom. Jeho funkcí je syntetizovat v cytoplasmě proteiny propojením jednotlivých aminokyselin podle předlohy mRNA. Aminokyseliny se k ribosomu dostávají navázané na molekulu tRNA. Aby vše správně fungovalo, musí s ribosomem kromě již zmíněných molekul spolupracovat i řada dalších translačních faktorů.

U eukaryont je ribosom formován v jadérku, ve kterém dochází k transkripci rRNA, její úpravě a správnému uspořádání do vyšších strukturních úrovní. Do jadérka jsou také směřovány ribosomální proteiny, jejichž přítomnost je během vzniku a zrání ribosomu velice důležitá. Dále se celého procesu účastní i řada dalších proteinů a ribonukleoproteinových komplexů (snoRNP), jež hrají roli při štěpení rRNA, modifikaci nukleotidů rRNA a skládání jednotlivých složek ribosomu. Celý tento biologický proces je komplikovaný. Buňka do něj investuje značné množství energie s cílem, aby byla zajištěna správná struktura ribosomu a tím pádem i jeho funkčnost. Příkladem vážného onemocnění způsobeného chybami v sestavování ribosomu je Bowen-Conradiho syndrom jehož příčinou je, mutace v proteinu Nep1, který se účastní skládání ribosomu a přímo modifikuje rRNA. Úpravy ribosomu neprobíhají jenom v jadérku. Některé procesy se uskutečňují dokonce až v cytoplasmě, kam se dostávají jednotlivě složené podjednotky pomocí specifických transportních proteinů. Důležitou vlastností ribosomu je jeho přesnost. Bez ní by totiž mohlo docházet k nesprávnému zařazování aminokyselin a vznikaly by nefunkční proteiny. Podle současných představ se zdá, že v místech interakce ribosomu s translačními faktory, mRNA, tRNA a vznikajícím peptidem je tato oblast ribosomu klíčová pro přesnost translace. Proto je většina studií týkajících se modifikace rRNA zaměřena na nukleotidy vyskytující se v těchto oblastech.

Tato práce se zabývá vlivem delece genu pro snoRNA, která zprostředkovává 2'-O-methylaci rRNA v dekodujícím centru malé podjednotky ribosomu, na iniciaci translace.

3. Cíle práce

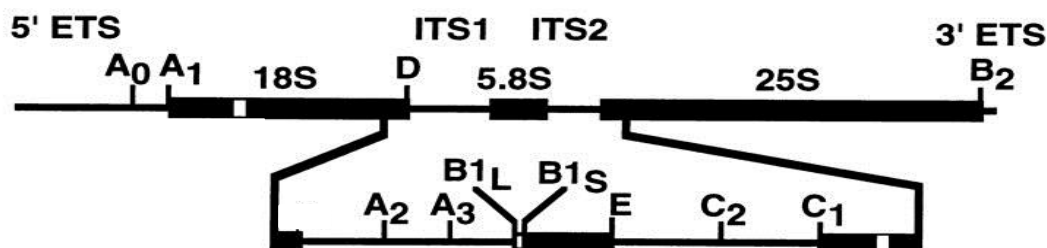
Analyzovat s využitím kvasinkového modelu vliv delece genu *snR70* na translaci řízenou IRES elementem hepatitidy typu C.

4. Literární přehled

Jelikož si jsou ribosomy různých eukaryotních organismů velice podobné, zaměřím se především na popis jejich vzniku u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, u které jsou nejlépe prostudovány.

4.1 Vznik a úpravy ribosomu

Eukaryotní ribosom obsahuje po jedné kopii čtyř rRNA 5S, 5.8S, 18S a 25S (u *S. cerevisiae*), 28S (u *H. sapiense*). Pouze 5S rRNA je přepisována RNAPolymerasou II, ostatní rRNA jsou přepisovány RNAPolymerasou I. RNAPolymerasa I syntetizuje 35S pre-rRNA u *S. cerevisiae* (45S pre-rRNA u *H. sapiens*). V primárním transkriptu jsou jednotlivé rRNA odděleny dvěma vnitřními mezerníky (ITS1 a ITS2) a lemovány dvěma vnějšími mezerníky (5'-ETS a 3'-ETS), Obr. 4.1. Dále je ribosom složen z přibližně 65 ribosomálních proteinů.

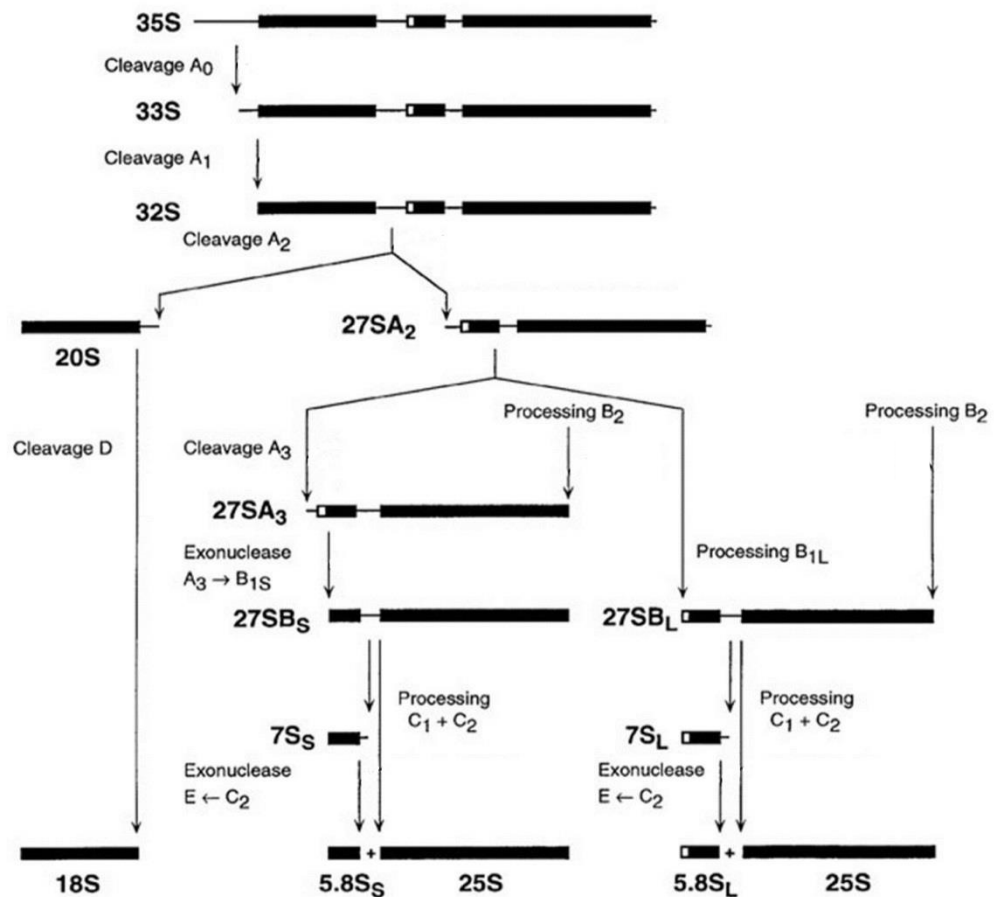


Obr. 4.1: Schéma primárního transkriptu 35S pre-rRNA s vyznačenými mezerníky. Písmeny A-D jsou označena místa štěpení, upraveno podle (Lafontaine *et al* 1998b).

4.1.1 První okamžiky života pre-rRNA

Během několikaminutové syntézy pre-rRNA nedochází k jakékoli úpravě transkriptu (Allmang and Tollervey 1998). První krok, který odstartuje celý proces úprav pre-rRNA, je kotranskripční endoribonukleotické štěpení pre-rRNA v oblasti 3'-ETS. Následují dvě štěpení v oblasti 5'-ETS A₀ a A₁, po kterých vznikne 32S pre-rRNA. Ta je rozštěpena na dvě molekuly 20S a 27SA₂ v místě štěpení A₂, které se nachází v ITS1. Molekula 20S pre-rRNA je spolu s dalšími faktory transportována do cytoplasmy, kde posledním štěpením v místě D vzniká zralá 18S rRNA. Molekula 27SA₂ může být upravena dvěma cestami. Výsledné produkty se liší pouze v rozdílné velikosti 5.8S rRNA, viz Obr. 4.2. Celý proces štěpení rRNA je podrobně popsán v (Venema and Tollervey 1999). Jaký význam má vznik dvou

5.8S rRNA zatím není znám. Kromě ribonukleas jsou potřebné také helikasy a jiné proteiny, zodpovědné za správné složení pre-rRNA.



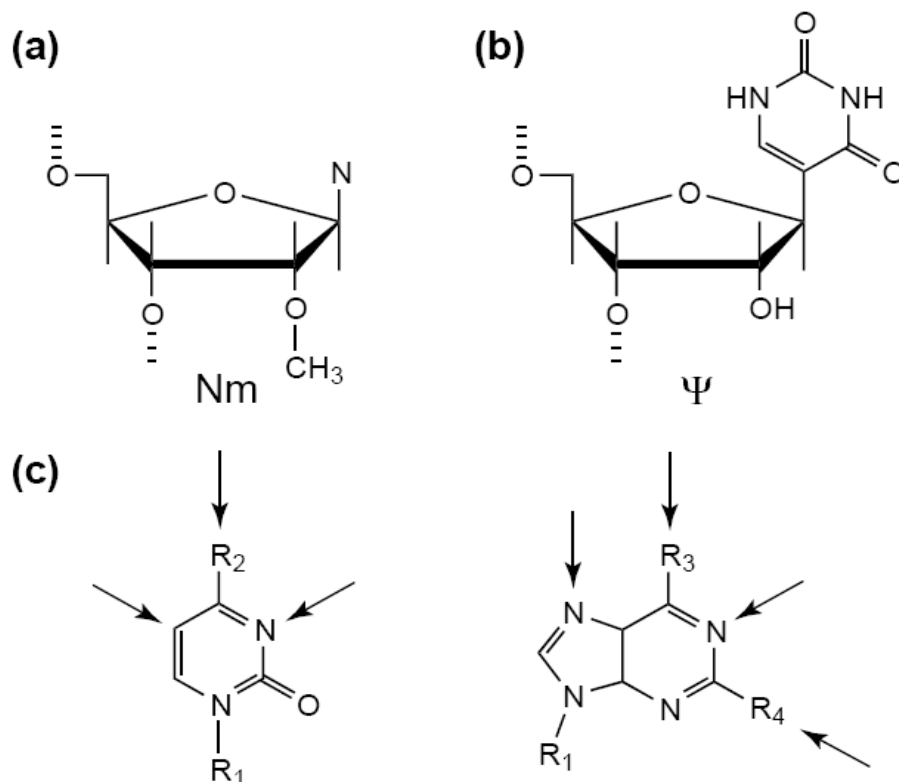
Obr. 4.2: Schéma štěpení pre-rRNA kvasinky *S. cerevisiae*. Z primárního transkriptu (35S pre-rRNA) postupným endoribonukleotickým a exoribonukleotickým štěpením vznikají jednotlivé molekuly ribosomální RNA. Dále jsou zde znázorněny možné cesty úpravy 27SA₂ pre-rRNA, upraveno podle (Oeffinger and Tollervey 2003).

4.1.2 Modifikace ribosomální RNA

Krátce poté, co je dokončena transkripce 35S pre-rRNA, dochází k modifikaci jejích nukleotidů. Tyto modifikace můžeme rozdělit do tří hlavních skupin: pseudouridylace (Ψ), methylace hydroxylové skupiny vázané na C2' ribosy (Nm), kovalentní modifikace báze, nejčastěji methylace (Obr. 4.3). Většina modifikovaných nukleotidů se vyskytuje v jádře ribosomu nebo na rozhraní podjednotek. Minimum modifikovaných nukleotidů je v oblasti, kde dochází k RNA-proteinovým interakcím (Decatur and Fournier 2002). Kromě pozice je také zajímavá korelace mezi komplexitou organismu a počtem modifikovaných nukleotidů (Decatur and Fournier 2002), viz Tab. 4.1.

	Pseudouridylace	2'-O-methylace	Modifikace bází
<i>E. coli</i>	11	4	19
<i>S. cerevisiae</i>	44	54	10
<i>H. sapiens</i>	~91	105	10

Tab. 4.1: Množství modifikovaných nukleotidů ribosomální RNA u některých organismů (Decatur and Fournier 2002, Ofengand 2002).



Obr. 4.3: Znázornění možných modifikací ribosomální RNA. (a) 2'-O-methylace. (b) konverze uridinu na pseudouridin. (c) šipky ukazují místa, na kterých je možné kovalentní vazbou modifikovat nukleotid. Nejčastěji se jedná o methylaci, ale vyskytuje se například i acethylace. Převzato z (Decatur and Fournier 2002).

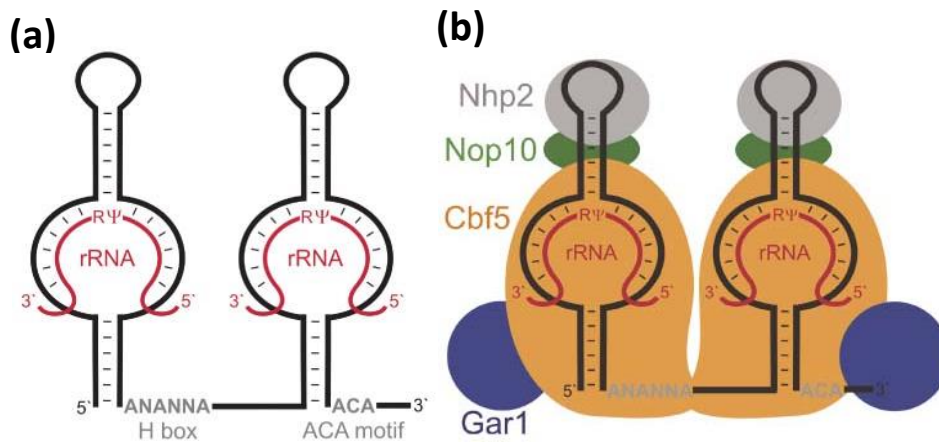
4.1.2.1 Způsob vzniku modifikace nukleotidu ribosomální RNA

U bakterií jsou modifikace vytvářeny specifickými proteiny, oproti tomu u eukaryot dochází ke vzniku většiny modifikací pomocí jadérekových RNA-proteinových komplexů (snoRNPs). Existuje šest proteinů, které specificky modifikují konkrétní nukleotid. Jedná se o Bmt2 modifikující m¹A2142 25S rRNA (Sharma *et al* 2013), Bud23p methylující G1575 18S rRNA (White *et al* 2008), Dim1p methylující A1771 a A1772 18S rRNA (Lafontaine *et al*

1994), Nep1p methylující pseudouridin 1191 18S rRNA (Meyer *et al* 2011), Spb1p methylující G2922 25S rRNA (Bonnerot *et al* 2003). Celkově má *S. cerevisiae* 96 nukleotidů modifikovaných pomocí snoRNPs, sedm nukleotidů modifikovaných pomocí proteinu a pět nukleotidů, u kterých daný mechanismus zatím není známý (Samarsky and Fournier 1999). Avšak vraťme se zpět k nejdůležitějšímu modifikačnímu aparátu ribosomální RNA u eukaryot k snoRNP komplexům, které obsahují malou jadérovou RNA (snoRNA) a čtyři proteiny. Malé jadérové ribonukleové komplexy můžeme rozdělit do dvou skupin, podle snoRNA, kterou obsahují, neboli na H/ACA RNPs a C/D RNPs, shrnuto v (Watkins and Bohnsack 2012).

4.1.2.1 H/ACA RNPs

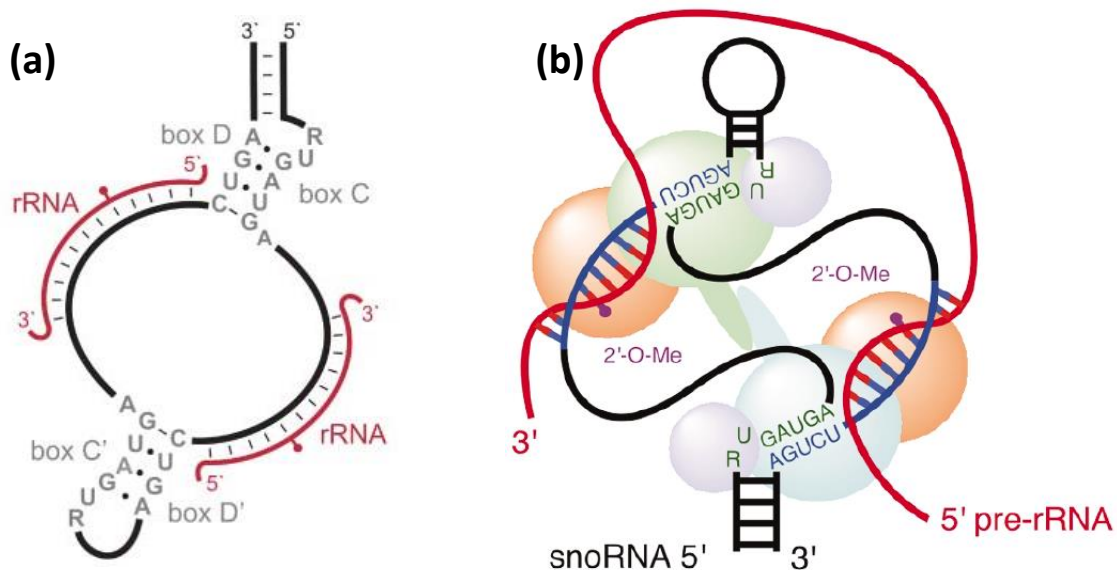
Komplexy H/ACA RNPs jsou zodpovědné za konverzi uridinu na pseudouridin. H/ACA RNPs obsahují malou jadérovou RNA z rodiny H/ACA snoRNA. Charakteristickými sekvenčními motivy pro tuto rodinu malých jadérových RNA jsou H box a ACA motiv, které se vyskytují vždy na 3' koncích vlásenek (Obr. 4.4a) (Ganot *et al* 1997b). V bublinách těchto vlásenek dochází k hybridizaci s pre-rRNA a tím k určení nukleotidu, který má být modifikován (Ganot *et al* 1997a). Katalytickým enzymem je zde protein Cbf5 (Lafontaine *et al* 1998a), u *H. sapiens* označován jako dyskerin (Heiss *et al* 1998). Dyskerin nebo Cbf5p se váže v oblasti bubliny k H/ACA snoRNA a konvertuje uridin na pseudouridin. Dalšími RNA vazebnými proteiny v snoRNP komplexu jsou Nhp2 a Nop10 (Henras *et al* 1998). Posledním proteinem snoRNP komplexu je Gar1 protein, jenž se váže na Cbf5p (Obr. 4.4b) (Bousquet-Antonelli *et al* 1997). Poslední tři zmíněné proteiny mají důležitou úlohu pro vytvoření správné konformace celé partikule, zejména snoRNA a katalytického enzymu. Na snoRNA se váží dva snoRNP komplexy, každý na jednu vlásenku (Obr. 4.4b) (Watkins *et al* 1998).



Obr. 4.4: Schématické znázornění H/ACA snoRNPs. (a) Struktura H/ACA snoRNA (černě) v interakci s rRNA (červeně). (b) Struktura komplexu snoRNPs s barevně vyznačenými proteiny a snoRNA (černě), rRNA (červeně), převzato z (Watkins and Bohnsack 2012).

4.1.2.2 Box C/D RNPs

Komplexy C/D RNPs methylojí hydroxylovou skupinu vázanou na C2' ribosy. Malá jadéřková RNA, jež přináší celý komplex ke konkrétnímu nukleotidu, je z rodiny C/D snoRNA. Do rodiny C/D snoRNA patří molekuly obsahující boxy C a D, jejichž sekvence jsou v celé C/D snoRNA rodině shodné. V malé jadéřkové RNA se oba boxy vyskytují dvakrát, proto jsou označeny jako C, D a C', D' (Obr. 4.5a) (Balakin *et al* 1996). Enzymem, který methyloje hydroxylovou skupinu, je u *S. cerevisiae* protein Nop1, u *H. sapiens* označovaný jako fibrilarin (Tollervey *et al* 1993). Dalšími proteiny snoRNP komplexu jsou Nop56p, Nop58p a Snu13p (15.5K/NHPX u *H. sapiens*). Všechny proteiny mají RNA vazebnou doménu a v jednom komplexu se vyskytují po dvou kopiích (Obr. 4.5b) (Lafontaine and Tollervey 2000).



Obr. 4.5: Schematické znázornění C/D snoRNPs. (a) Struktura C/D snoRNA (černě) v interakci s rRNA (červeně) (Watkins and Bohnsack 2012). (b) Struktura snoRNPs Nop1p (oranžově), Nop56p (zeleně), Nop58p (světle modře), Snu13p (světle fialově). Molekula snoRNA znázorněna (černě) s vyznačenou sekvencí komplementární k rRNA (modře), rRNA (červeně) převzato z (Fatica and Tollervey 2003).

4.1.2.3 Další funkce snoRNPs komplexů

Komplexy snoRNPs se účastní i dalších procesů týkajících se metabolismu RNA. U kvasinky *S. cerevisiae* molekuly U14 a snR10, přesněji řečeno jejich komplexy, ovlivňují střížení pre-rRNA a modifikují nukleotidy rRNA C414 18S RNA (U14) a Ψ 2923 (snR10) (Venema and Tollervey 1999). Existují lidské snoRNA, které hrají úlohu při regulaci alternativního sestřihu (Kishore and Stamm 2006), RNA editingu (Vitali *et al* 2005) a regulaci genové exprese (Ender *et al* 2008, Ono *et al* 2010). Avšak u těchto snoRNA nebyla zjištěna schopnost modifikace rRNA.

4.1.2.4 Modifikace rRNA specifickými proteiny

U kvasinky *S. cerevisiae* bylo do této doby objeveno šest proteinů, jež specificky modifikují nukleotidy ribosomální RNA. O proteinech Nep1, Dim1 a Bud23 budu mluvit v následujících kapitolách (3.2.1, 3.2.2 a 3.2.3). Protein Spb1 methyduje G2922 25S RNA. V případě potřeby může Spb1p methylovat i sousední U2921 25S RNA, jestliže tento nukleotid není modifikován pomocí snoRNP komplexu obsahující snR52 (Bonnerot *et al* 2003, Lapeyre and Purushothaman 2004). Protein Bmt2 methyduje A2142 25S rRNA, další funkce tohoto proteinu zatím nejsou známy (Sharma *et al* 2013). Protein Rrp8 methyduje

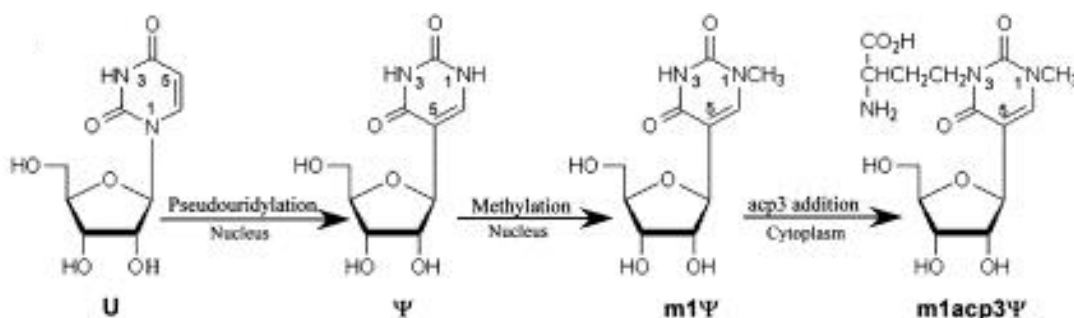
A645 25S rRNA (Peifer *et al* 2013) a dále se účastní štěpení pre-rRNA v A₂ místě (Bousquet-Antonelli *et al* 2000).

4.2 Úloha modifikací rRNA

Studovat význam modifikací nukleotidů ribosomální RNA je možné dvěma hlavními cestami. Zaprvé potlačit syntézu enzymatických proteinů ze snoRNP komplexů, tedy Cbf1p (dyskerin) nebo Nop1p (fibrilarin), a tím zamezit vzniku pseudouridinů nebo 2'-O-methylovaným nukleotidům v celém ribosomu. Zadruhé zabránit modifikaci konkrétního nukleotidu pomocí delece jemu příslušné snoRNA. Neméně důležitou cestou je zaměřením se na nukleotidy, jejichž modifikace je prováděna pomocí specifických proteinů, u nichž byla zjištěna většinou i další funkce.

4.2.1 Hypermodifikovaný pseudouridin 1191 18S rRNA

Hypermodifikovaný pseudouridin na pozici 1191 18S rRNA u *S. cerevisiae* je modifikován vícekrokově. U nukleotidu 1191 nejprve dojde k jeho konversi na pseudouridin pomocí snoRNP obsahující snR35 (Schattner *et al* 2004). Pseudouridin je následně methylován na pozici N1 proteinem Nep1 (Meyer *et al* 2011). A jako poslední přichází na řadu acetylace N3, ke které dochází až v cytoplasmě. Její modifikační aparát zatím není znám (Obr. 4.6).



Obr. 4.6: Schématické znázornění jednotlivých kroků modifikace uridinu 1191 18S RNA převzato z (Liang *et al* 2009).

Studie, zabývající se významem modifikovaných nukleotidů vyskytujících se v dekodujícím centru ribosomu, zjistily poruchy translace u kvasinkových kmenů s deletovanou snR35 (Baudin-Baillieu *et al* 2009, Liang *et al* 2009). U těchto kmenů docházelo ke zpomalení buněčného růstu a k častějšímu posunu ve čtecím rámci o +1. Liang a jeho kolektiv pokračovali ve studiu významu hypermodifikovaného nukleotidu

dále. Zjistili, že u kmene s deletovanou snR35 je narušena úprava 20S pre-rRNA a tím dochází ke snížení množství 18S rRNA v buňce. Detailnější studie ukázala, že daný fenotyp není zapříčiněn nepřítomností snR35. Rozhodující roli bude tedy mít hypermodifikovaný nukleotid. Autorům se ovšem nepodařilo přesně identifikovat zodpovědnou modifikaci. S jistotou dokázali vyloučit acethylaci, protože k ní docházelo i na nekonvertovaném uridinu 1191. Další výzkum hypermodifikovaného pseudouridinu 1191 mohl pokračovat až po objevení modifikačního aparátu zodpovědného za metylaci N1. Pseudouridin na pozici 1191 u *S. cerevisiae* je methylován proteinem Nep1, označovaném také jako Emg1p (Meyer *et al* 2011).

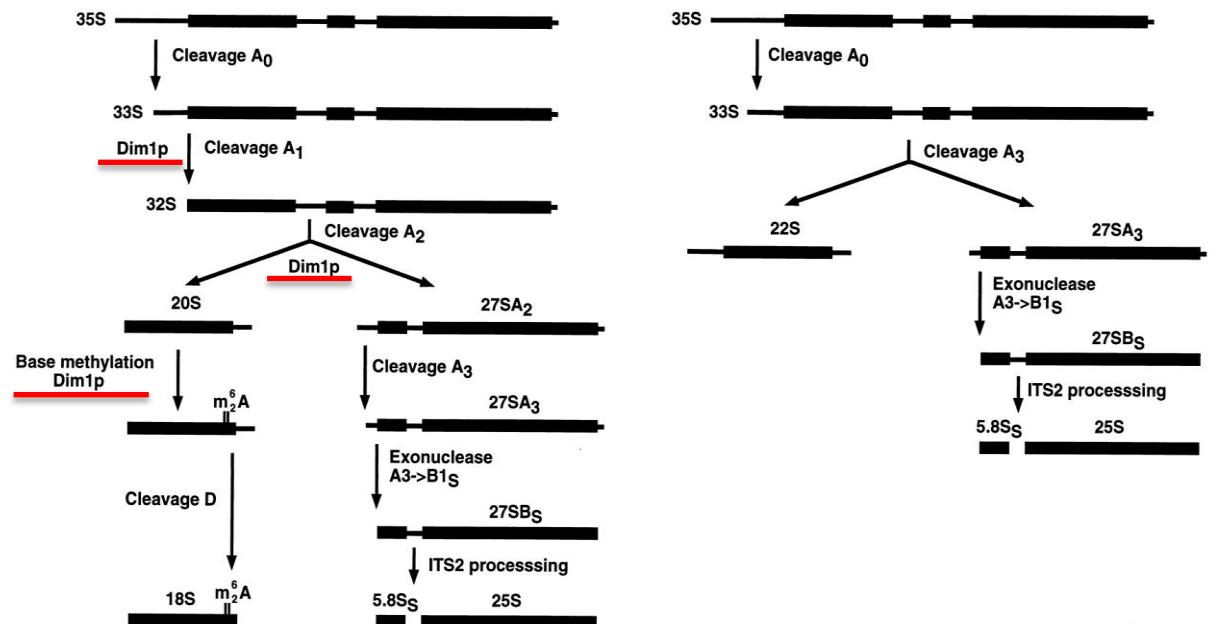
Nep1 je vysoce evolučně konzervovaný jaderný protein. Bodová mutace vedoucí k záměně aspartátu za glycin na pozici 86 u lidského Nep1p (Nep1^{D86G}) způsobuje onemocnění známé jako Bowen-Conradiho syndrom (Armistead *et al* 2009). Charakteristickými poruchami pro toto autozomálně recesivní onemocnění jsou prenatální a hlavně postnatální růstová retardace, těžká psychomotorická retardace, mikrocefalie a další poruchy spojené s poruchou růstu (Lowry *et al* 2003). Projevy choroby jsou velice podobné abnormalitám u trisomie chromosomu 18, bohužel i průměrná doba života pacientů je shodná s pacienty mající trisomii 18.

Protein Nep1 není jen methyltransferasa, ale je i esenciálním proteinem sestavujícím ribosom (Thomas *et al* 2011). Mutovaný protein Nep1^{D86G} byl studován jak v kvasinkových, tak i v savčích buňkách. Bylo objeveno, že tato mutace nemá vliv na methyltransferasovou aktivitu *in vitro*. Takto mutovaný protein se nedostává do jádérka, takže zde nemůže pomáhat při sestavování ribosomu (Meyer *et al* 2011).

4.2.2 Dimethylace adenosinů 1771 a 1772 18S rRNA

Dalšími nukleotidy, které jsou u kvasinky modifikovány pomocí specifického proteinu a možná mají roli při úpravě rRNA, jsou adenosiny 1771 a 1772 18S rRNA. Jejich aminoskupiny jsou na pozici 6 dimethylovány proteinem Dim1. Při delecii proteinu Dim1 dochází k hromadění 22S pre-rRNA, což naznačuje, že v těchto buňkách dochází k poruše štěpení pre-rRNA na pozicích A₁ a A₂, viz Obr. 4.7 (Lafontaine *et al* 1995). Vzniklá 22S pre-rRNA není dále střižena. Lafontaine a jeho kolektiv (1998b) vytvořili kvasinkové kmeny s několika variantami Dim1p. Pomocí vhodně navržených pokusů zjistili, že

k poruchám úprav dochází i v kvasinkových kmenech, které mají dimetylované adenosiny 1171 a 1772 (Lafontaine *et al* 1998b). Dim1p sice není přímo zodpovědný za štěpení v A₁ a A₂, ale jeho přítomnost v jadérku a interakce s ostatními ribosomálními proteiny jsou nezbytnou podmínkou pro správnou úpravu pre-rRNA.



Obr. 4.7: Schématické znázornění štěpení pre-rRNA kvasinky *S. cerevisiae*. Vlevo červeně zvýrazněné působení proteinu Dim1. Vpravo schématické znázornění úprav kvasinkové pre-rRNA s nefunkčním Dim1 proteinem, upraveno podle (Lafontaine *et al* 1998b).

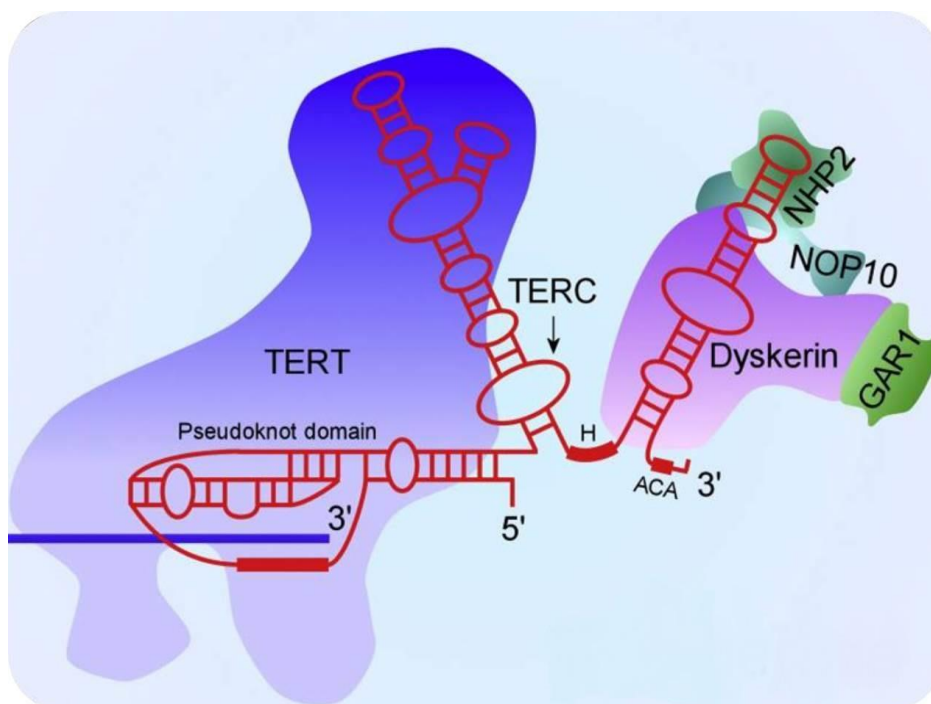
4.2.3 Bud23p a methylace guanosinu 1575 18S rRNA

U kvasinky *S. cerevisiae* je dusík na pozici 7 guanosinu 1575 18S rRNA methylován proteinem Bud23. Delece Bud23p má vliv na zpomalení buněčného růstu kvasinky (White *et al* 2008). Sérií pokusů White a kolektiv (2008) zjistili, že znemožnění modifikace nemá vliv na poruchu buněčného růstu. Detailnějšími studiemi se snažili zjistit, k jaké poruše v buňce dochází. Porovnáním složení 40S, 60S a 80S rRNA v kontrolním kmeni a v kmeni *bud23Δ* pozorovali snížení hladiny 40s a 80S rRNA a zvýšení 60S rRNA. Hladiny jednotlivých rRNA ukazují na problém zrání malé ribosomální podjednotky. Další výsledky objasnily, že se v kmeni *bud23Δ* vyskytuje menší množství 18S rRNA, než v kontrolním kmeni. Nakonec se autorům podařilo zjistit, že Bud23p má význam při transportu malé podjednotky ven z jádra. Ač nemá jaderný exportní signál, jeho přítomnost v komplexu je pro export malé podjednotky z jádra významná.

4.2.4 Vliv poruchy dyskerinu na buněčnou translaci

Jak už jsem zmínila dříve, dyskerin je pro buňku velice důležitý protein. Existují dva lidské syndromy, jež jsou zapříčiněny bodovými mutacemi v genu pro dyskerin *DKC1*. Jsou to Hoyeraal-Hreidarssonův syndrom (HH) a kongenitální dyskeratosa vázaná na X (X-DC). Geneticky se jedná o gonosomálně recesivní poruchy. U pacientů s X-DC je zasažena hlavně kostní dřeň a kůže. Dalšími defekty jsou například předčasné stárnutí, dystrofie nehtů, slizniční leukoplakie, intersticiální plicní fibróza a zvýšená pravděpodobnost výskytu rakoviny (Dokal 2000). Hoyeraal-Hreidarssonův syndrom se vyznačuje aplastickou anémií, imunodeficiencí, mikrocefalií, růstovou retardací a cerebelární hypoplasií. V podstatě se jedná o těžší formu X-DC (Hoyeraal *et al* 1970).

Dyskerin je v komplexu se všemi malými RNA obsahujícími motiv H/ACA. Je součástí komplexů snoRNPs konvertujících uridin na pseudouridin, Cajalových tělísek a telomerázové RNA (Obr. 4.8).

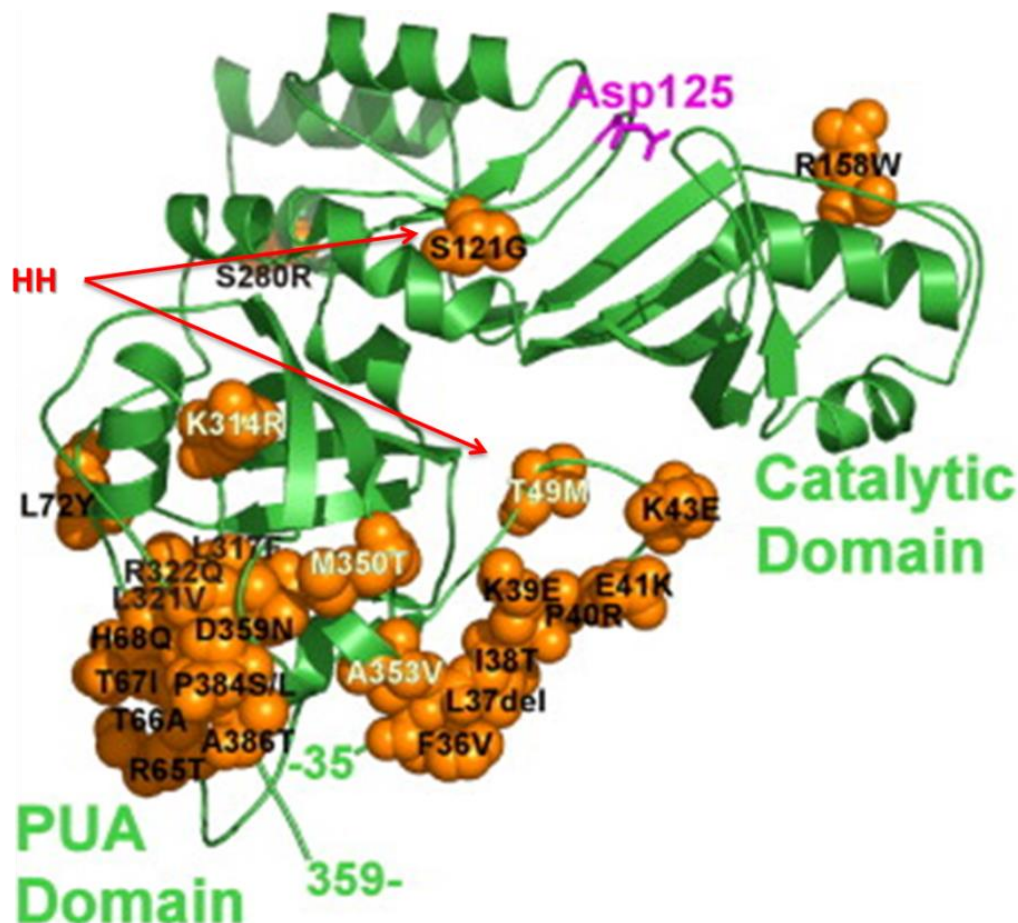


Obr. 4.8: Schématické znázornění telomerázového komplexu. Červeně je zde vyznačena RNA z rodiny H/ACA, která slouží jako templát pro prodloužení konců chromozomu. Dále je zde znázorněna vazba dyskerinu a dalších H/ACA RNA vazebných proteinů.

Většina mutací jednotlivých alel *Dkc1p* u X-DC se nachází v PUA doméně (Rashid *et al* 2006). U Hoyeraal-Hreidarssonova syndromu byly zjištěny záměny S121G v katalytické

doméně nebo T49M v PUA doméně (Knight *et al* 1999), viz Obr. 4.9. Funkcí PUA domény dyskerinu je stabilizovat vazbu na RNA (Rashid *et al* 2006).

Molekulární podstatu problému u X-DC a HH se vědci snaží objevit od počátku dvacátého prvního století. První studie byly zaměřeny na mutaci *DKC1* genu a vytvoření stabilní myší linie s hypomorfní alelou *Dkc1^m*, u které sledovali patologie (Ruggero *et al* 2003). Už u prvních dvou generací byly pozorovány poruchy kostní dřeně, jako je anémie a lymfopenie, dále byly také pozorovány další poruchy vyskytující se u pacientů s X-DC. A protože u 50 % myší s *Dkc1^m* se vyskytly tumory, je Dkc1 protein brán částečně jako tumor-supresorový gen. Jako první byl sledován stav telomer, které se u první až třetí generace nelišily od kontrolních vzorků. První pozorovatelné změny telomer jsou až ve čtvrté generaci (Ruggero *et al* 2003). Během dalších studií bylo zjištěno, že u *Dkc1^m* lymfocytů je ovlivněna translace proteinů p53, p27, XIAP a Bcl-xL (Bellodi *et al* 2010a, Bellodi *et al* 2010b, Yoon *et al* 2006). Společným faktorem těchto proteinů je, že jejich mRNA obsahuje v 5'-UTR IRES elementu (vnitřní vazebné místo pro ribosom). Porucha translace závislé na IRES elementu byla pozorována i u jiné práce (Jack *et al* 2011), ve které byly využity kmeny *S. cerevisiae* s mutovaným Cbf5^{D95A} proteinem (kvasinkový homolog dyskerinu), myší embryonické fybroblasty (MEF) obsahují *Dkc1^m* a HeLa buňky, u kterých byla potlačena exprese Dkc1p pomocí siRNA. V této práci se testovala schopnost translace začínající na virovém IRES elementu, neboli IGR-IRES elementu pocházejícího z viru paralýzy cvrčků. U všech typů modifikovaných buněk byla pozorována snížená schopnost ribosomu začít translaci na IRES elementu oproti kontrolám. Další poruchou ribosomu u všech typů buněk, neobsahujících funkční dyskerin, byl častější posun ve čtecím rámci o -1. Proto za patologické projevy X-DC může být zodpovědné jak snížené množství pseudouridinů v ribosomu, tak i ztráta funkčnosti telomerasy zapříčiněné přítomností mutovaného dyskerinu.

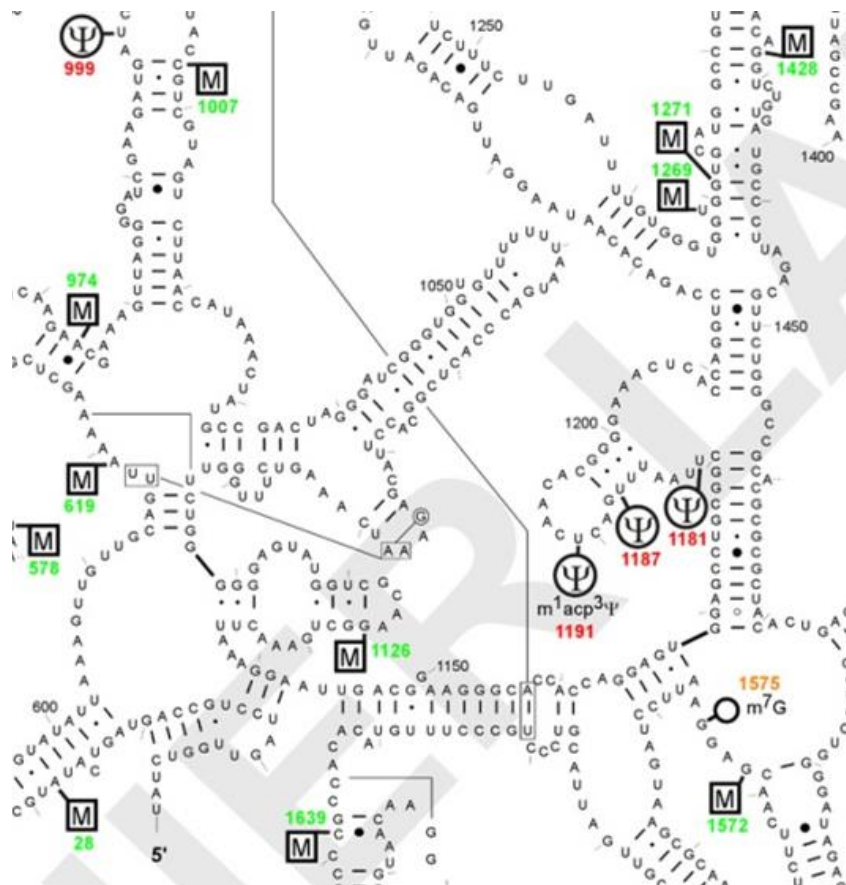


Obr. 4.9: Terciální struktura Dkc1p s vyznačenými mutacemi u X-DC, oranžově. Červené šipky ukazují na dvě záměny vyskytující se u Hoyeraal-Hreidarssonova syndromu. Fialový aspartát 125 je katalitickou aminokyselinou Dkc1p, převzato z (Rashid *et al* 2006).

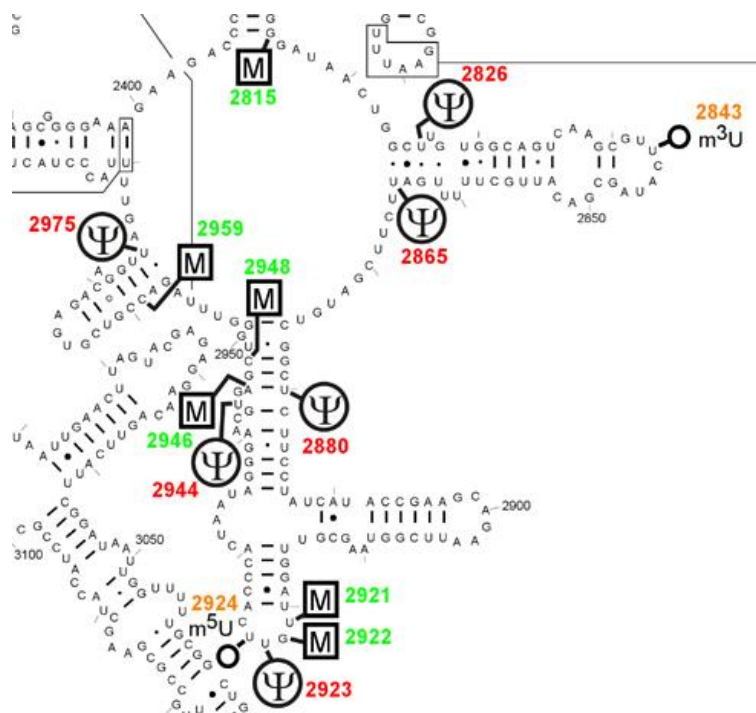
4.2.5 Význam jednotlivých modifikací rRNA

Pro studium úlohy jednotlivých modifikací rRNA se používá *S. cerevisiae* jako klasický eukaryotní model. Ne u všech modifikovaných nukleotidů rRNA byl studován jejich význam. Je to především proto, že ribosom *S. cerevisiae* obsahuje celkem 108 modifikovaných nukleotidů. Dá se říci, že se vědci zaměřili na studium modifikovaných nukleotidů, vyskytujících se převážně ve funkčních oblastech ribosomu. Jedná se o dekodující centrum, peptidyltransferasovou doménu, mezipodjednotkové spoje B1a a B2a. Dekodující centrum (DC) je součástí malé podjednotky ribosomu, kde dochází k interakcím s mRNA a tRNA v A-, P- i E-místě. Peptidyltransferasová doména (PTC) je tvořena 25S rRNA a proteiny velké podjednotky. Interaguje s akceptorovými rameny tRNA v A- a P-místě a také s aminokyselinovými zbytky. Mezipodjednotkový spoj B1a je tvořen převážně šroubovicí 38 (H38). Šroubovice 38 je také označována jako prst A-místa, protože svým vrcholem interaguje s tRNA v A-místě. Jako spoj B2a je označována interakce šroubovice 44 z malé podjednotky a šroubovice 69 (H69) z velké podjednotky.

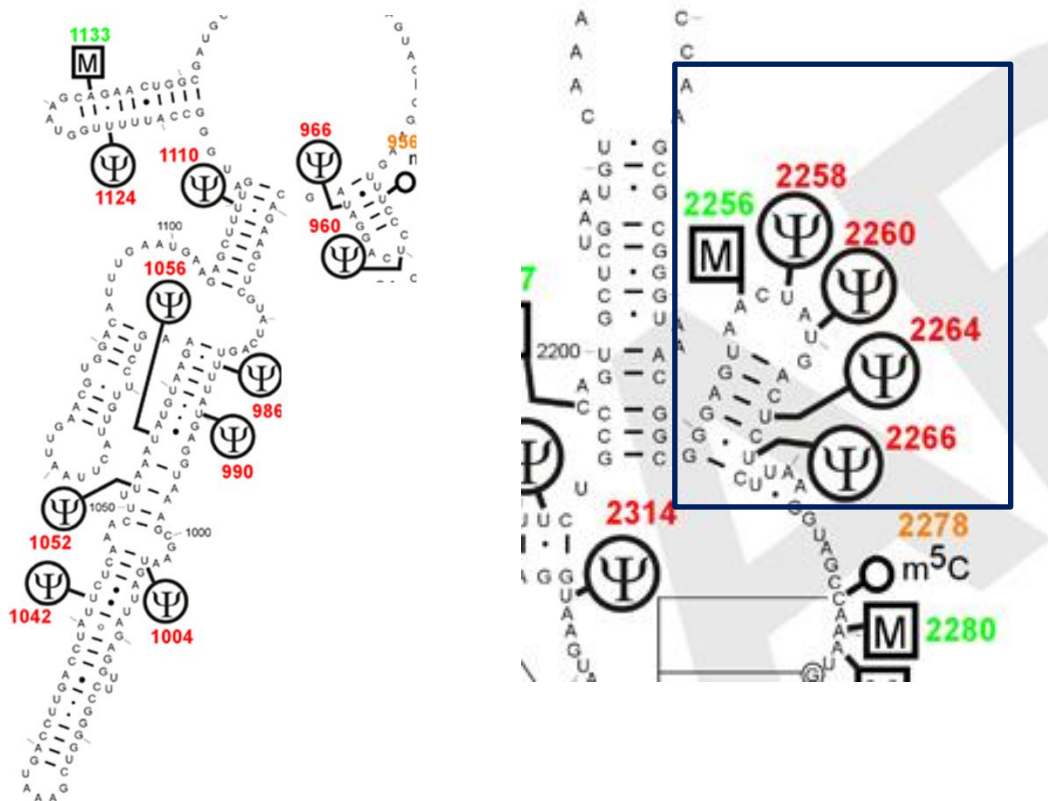
Šroubovice 69 interaguje také s D smyčkou tRNA v A- a P-místě. Pravděpodobné interakce byly převzaty z krystalové struktury 70S ribosomu *Thermus thermophilus* (Yusupov *et al* 2001). Pro lepší orientaci v následujících kapitolách přikládám schématické znázornění sekundární struktury jednotlivých domén rRNA *S. cerevisiae* (Obr. 4.10 – 4.12). K zamezení modifikace konkrétního nukleotidu došlo pomocí delece příslušné snoRNA. Vědci používali kvasinkové kmeny s deletovanou jednou snoRNA a nebo kombinaci více deletovaných snoRNA, kdy se jednalo o modifikované nukleotidy pocházející ze stejné funkční oblasti. Nejčastěji byly sledovány tyto vlastnosti, rezistence vůči antibiotiku působící na ribosom, rychlost buněčného růstu, účinnost translace, chybovost ribosomu během elongace translace a poruchy terminace translace.



Obr. 4.10: Schématické znázornění sekvence 18S rRNA s vyznačenými modifikacemi v dekódujícím centru ribosomu kvasinky *S. cerevisiae*. M jsou 2'-O-methylace se zeleně vyznačenými pozicemi, Ψ jsou pseudouridiny s červeně označenými pozicemi a kroužek označuje modifikace bází s oranžově vyznačenou pozicí, převzato z (Piekna-Przybylska *et al* 2007).



Obr. 4.11: Schématické znázornění sekvence 25S rRNA s vyznačenými modifikacemi v peptidyltransferasovém centru ribosomu kvasinky *S. cerevisiae*. M jsou 2'-O-methylace se zeleně vyznačenými pozicemi, Ψ jsou pseudouridiny s červeně označenými pozicemi a kroužek označuje modifikace bází s oranžově vyznačenou pozicí, převzato z (Piekna-Przybylska *et al* 2007).



Obr. 4.12: Schématické znázornění sekvence 25S rRNA s vyznačenými modifikacemi v mezipodjednotkových spojích B1a (vlevo) a B2a (vpravo v obdelníku) u kvasinky *S. cerevisiae*. M jsou 2'-O-methylace se zeleně vyznačenými pozicemi, Ψ jsou pseudouridiny s červeně označenými pozicemi a kroužek označuje modifikace bází s oranžově vyznačenou pozicí, převzato z (Piekna-Przybylska *et al* 2007).

4.2.5.1 Rezistence vůči antibiotikům

Jako inhibitory translace se používala antibiotika anisomycin, který se váže do A-místa PTC, sparsomycin vážící se do P-místa PTC, neomycin a paromycin interagující s DC. Z tohoto hlediska nejvýznamnější je modifikace Ψ2923 v PTC, u které byl zjištěn vliv na citlivost k neomycinu, paromycinu a sparsomycinu (King *et al* 2003, Rakauskaitė and Dinman 2008). Z malé podjednotky byl prokázán vliv Um1269 na citlivost k anisomycinu (Esguerra *et al* 2008) a m¹acp³Ψ1191 v kombinaci s dalšími modifikacemi z DC na citlivost k neomycinu. U H69 byl zjištěn vliv nukleotidů Ψ2258 a Ψ2260, vyskytujících se ve smyčce šroubovice, na citlivost k neomycinu (Liang *et al* 2007). Citlivost na anisomycin byla prokázána u kvasinkových kmenů s chybějícími modifikacemi nukleotidů na pozici U2347, A2640 (Esguerra *et al* 2008) a u nukleotidů z PTC U2921 a G2922 (Baxter-Roshek *et al* 2007). U kmenů s chybějícími modifikacemi Ψ2865 a Ψ2826 v kombinaci s Ψ2880 byla zjištěna citlivost na sparsomycinové antibiotikum (Baxter-Roshek *et al* 2007). Nepřítomnost modifikací nukleotidů ribosomální RNA může mít vliv na změnu struktury rRNA. Změna struktury rRNA, potažmo ribosomu, nebo změna stability konkrétní

struktury, může měnit interakce s translačními inhibitory, a tím ovlivňovat citlivost kmenů na určitá antibiotika.

4.2.5.2 Rychlost růstu a účinnost translace

Měření rychlosti růstu buněčných kvasinkových kultur, ať už je to pomocí stanovování růstových křivek v tekutém médiu, nebo pouhé pozorování a porovnávání schopnosti růstu na pevných médiích, je součástí prací (Badis *et al* 2003, Esguerra *et al* 2008, King *et al* 2003, Liang *et al* 2007, Liang *et al* 2009, Liang *et al* 2010, Piekna-Przybylska *et al* 2008). V podstatě se jedná o prvotní porovnání modifikovaných kmenů oproti kontrolnímu kmeni. Výsledný rozdíl nám neodpovídá na otázku, jaké buněčné pochody jsou ovlivněné. O něco specifičtější jsou testy prováděné Esguerrou a kolektivem (2008), kteří se zaměřili na pozorování poruch buněčného růstu v médiích s přidanými látkami ovlivňující např. buněčnou signalizaci, syntézu DNA a její opravy, anebo látkami vytvářející pro buňku stresové prostředí. Celkové shrnutí jejich výsledků je na Obr. 4.13. Nejhuře zvládali změněné podmínky kmeny s chybějícími modifikacemi Cm1639 SSU, Um2347 a Am2946 z LSU, u kterých bylo pozorováno zpomalení buněčného růstu ve více testovaných médiích. Všeobecně lze říci, že zamezení modifikací více nukleotidů v jednom kmeni, má za následek zhoršení stavu buňky. Tento jev je možné pozorovat i u dalších testů, zaměřujících se konkrétněji na funkčnost ribosomu. Další testy jsou zaměřené na měření množství inkorporovaného ^{35}S -methioninu, jenž ukazuje na schopnost buňky translatovat. Měření množství inkorporovaného ^{35}S -methioninu byly podrobeny kmeny s chybějícími modifikacemi na pozicích Ψ 1187, $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191, Gm1428, Cm1639 SSU (Liang *et al* 2009), Ψ 1004, Ψ 1042, Ψ 1052 LSU (Piekna-Przybylska *et al* 2008), Ψ 2129 a Ψ 2133 a Ψ 2264, Am2256, Ψ 2258 a Ψ 2260, Ψ 2266 LSU (Liang *et al* 2007), Ψ 2826 a Ψ 2880, Ψ 2865, Ψ 2923, Ψ 2944, Ψ 2975 LSU (King *et al* 2003). Výraznější odchylky od kontrol byly pozorovány u kmenů s chybějícími modifikacemi $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191, $m^1\text{acp}^3\Psi$ 1191 a Cm1639 v oblasti DC (Liang *et al* 2009) a Ψ 2923 z oblasti PTC (King *et al* 2003).

4.2.5.3 Vliv modifikací rRNA na iniciaci translace

Vliv jednotlivých modifikací rRNA u kvasinky a jiných eukaryotních organismů na iniciaci translace nebyl dosud testován. Určitým způsobem se iniciací translace zabývají již zmíněné práce (Bellodi *et al* 2010a, Bellodi *et al* 2010b, Jack *et al* 2011, Yoon *et al* 2006). Všechny tyto práce studují poruchy dyskerinu a jejich vlivu na iniciaci translace závislou na IRES elementech, viz kapitola 4.2.4.

4.2.5.4 Chybovost ribosomu během elongace translace

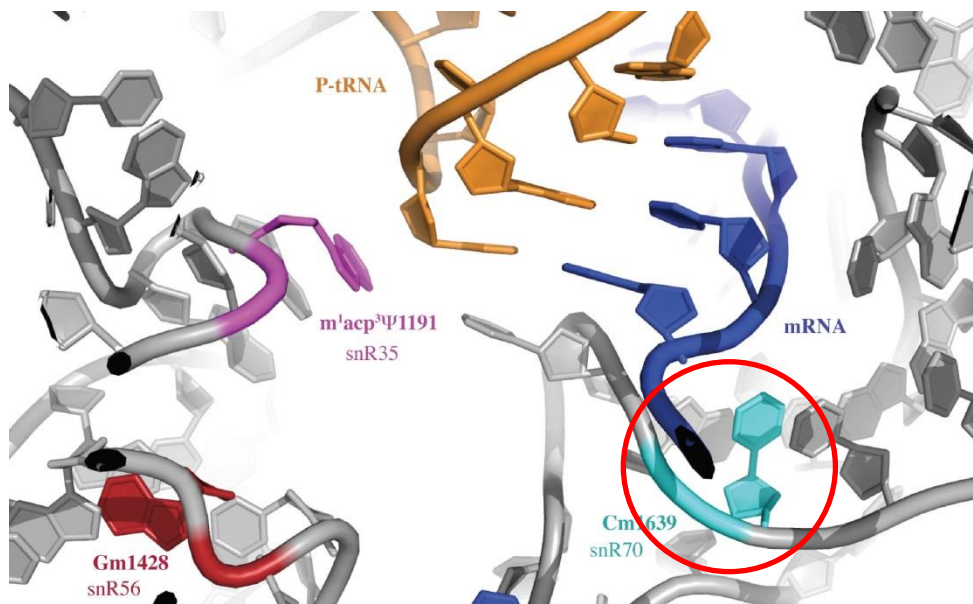
Pro stanovení chybovosti překladu během elongace se u kvasinky *S. cerevisiae* nejčastěji zkoumá posun čtecího rámce o +1 nebo -1 pozici. Poruchy elongace translace byly testovány u kmenů s chybějícími modifikacemi Um578, Ψ 999, Cm1007, Ψ 1187, $m^1acp^3\Psi$ 1191, Gm1271, Gm1428, Cm1639 SSU, Ψ 960, Ψ 986, Ψ 1004, Ψ 1042, Ψ 1052, Ψ 1124, Am2256, Ψ 2258, Ψ 2260, Ψ 2264, Ψ 2266 LSU (Baudin-Baillieu *et al* 2009), Ψ 2826 a Ψ 2880, Ψ 2865, Gm2922, Um2921, Ψ 2923, Ψ 2944, Ψ 2975 LSU (Baxter-Roshek *et al* 2007). Zvýšení četnosti posunu ve čtecím rámci +1 i -1 bylo pozorováno u kmenů s chybějícími modifikacemi $m^1acp^3\Psi$ 1191, Cm1639 DC (Baudin-Baillieu *et al* 2009). U kmene s chybějícími modifikacemi Um2921 a Gm2922 PTC byl pozorován častější posun o -1 nukleotid (Baxter-Roshek *et al* 2007). Dalšími charakteristikami může být začlenění jiné aminokyseliny do zkoumaného proteinu anebo afinita ribosomu k tRNA. Zdá se, že na zařazování správné aminokyseliny mohou mít vliv chybějící modifikace Um2921 a Gm2922 (Baxter-Roshek *et al* 2007). U kmene s chybějící modifikací Ψ 2923 byla stanovena nižší afinita ribosomu k peptidyl-tRNA (Rakauskaite and Dinman 2008). Zde ale musím upozornit na to, že autoři zabránili konverzi uridinu na pozici 2923 tím, že zaměnili U2923 na cytidin. Tato záměna by na výsledky pokusu mohla mít vliv.

4.2.5.5 Poruchy terminace translace

Poslední fází ribosomu během jeho překladu je správné zakončení translace. Testuje se schopnost rozpoznat terminační kodóny UAA, UAG nebo UGA u kvasinkových kmenů s chybějícími modifikacemi Um578, Ψ 999, Cm1007, Ψ 1187, $m^1acp^3\Psi$ 1191, Gm1271, Gm1428, Cm1639 SSU, Ψ 960, Ψ 986, Ψ 1004, Ψ 1042, Ψ 1052, Ψ 1124, Am2256, Ψ 2258, Ψ 2260, Ψ 2264, Ψ 2266 LSU (Baudin-Baillieu *et al* 2009), Ψ 2826 a Ψ 2880, Ψ 2865, Gm2922, Um2921, Ψ 2923, Ψ 2944, Ψ 2975 LSU (Baxter-Roshek *et al* 2007). U kmene s chybějící modifikací Cm1639 docházelo častěji k pročení stop kodónu UAG oproti

kontrole (Baudin-Baillieu *et al* 2009). U modifikovaných nukleotidů Ψ 2865 z oblasti PTC bylo pozorováno častější pročtení všech stop kodónů a u nukleotidů Ψ 2975, Ψ 2826 a Ψ 2880 častější pročtení stop kodónu UAG (Baxter-Roshek *et al* 2007). Zajímavostí je, že nukleotidové modifikace v oblasti šroubovice 69 mají spíše opačný vliv. Tedy u kmenů s chybějící modifikací Ψ 2258, Ψ 2260, Ψ 2266 a Ψ 2269 docházelo ke snížení četnosti pročtení stop kodónu a i posunu ve čtecím rámci (Baudin-Baillieu *et al* 2009). Dalo by se říci, že tyto modifikace snižují chybovost ribosomu. Proč se pseudouridiny v šroubovici 69 objevují od prokaryot až po lidské buňky? Jak u prokaryotního ribosomu, tak i u lidského ribosomu je právě těmito pseudouridiny stabilizována celá šroubovice 69 (Sumita *et al* 2005).

Ze všech výzkumů vyplývá, že modifikace rRNA nejsou zbytečné a mají své strukturálně funkční opodstatnění. Některým modifikacím je prozatím přikládán větší význam, avšak ne všechny modifikace byly důkladně prozkoumány. Ve své práci jsem se zaměřila na modifikaci nukleotidu Cm1639, jenž se nachází v dekodujícím centru ribosomu (Obr. 4.14). Pozičně odpovídající nukleotid C1402 u *E. coli* je také modifikován. Význam modifikace C1402 u *E. coli* byl studován a zjistilo se, že má vliv na iniciaci translace z kodónu AUU (Kimura and Suzuki 2010).



Obr. 4.14: Schématické znázornění 3D struktury dekodujícího centra ribosomu *S. cerevisiae* v oblasti P-místa namodelovaného na strukturu ribosomu *E. coli*. Modře je znázorněna poloha mRNA, oranžově tRNA. Fialově, červeně a světle modře jsou vyznačeny modifikované nukleotidy rRNA s jejich modifikační snoRNA. V červeném kroužku je zvýrazněna modifikace Cm1639 (Baudin-Baillieu *et al* 2009).

5. Materiál a metody

5.1 Materiál

5.1.1 Chemikálie

Název	Výrobce	Použitá zkratka
3-aminotriazol	Sigma	3-AT
adenin	ANGUS	
agar	ForMedium™	
agarosa	Serva, Invitrogen	
akrylamid	Serva	
amoniumpersulfát	Serva	APS
ampicilin	Spofa, Sigma	amp
beta-merkptoethanol		
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva	
deionizovaná voda		ddH ₂ O
deoxynukleosidtrifosfáty	Fermentas, Roche	dNTP
dithiotreitol	AMRESCO	DTT
ethylendiamintetraoctová kyselina	Serva	EDTA
ethanol	Lach-Ner	
ethidium bromid	Sigma	EtBr
fenol	MERCK	
fenylmethylsulfonyl fluorid		PMSF
glukosa	Serva	
glycerol	Sigma, Lach-Ner	
glycin		
L-histidin	Serva	
hydroxid sodný	Lachema	NaOH
chlorid hořečnatý	Sigma	MgCl ₂

chlorid sodný	Lach-Ner	NaCl
chloroform	Lach-Ner	
isoamylalkohol	Lachema	
isopropanol	Lach-Ner	
kyselina chlorovodíková	Lachema	HCl
kyselina octová	Lach-Ner	
kyselina p-kumarová		
kyselina trichloroctová	Sigma	TCA
leucin	ANGUS	
luminol		
L-lysin	Nutritional Biochemicals Co.	
L-methionin	MERCK	
N,N'-methylenbisakrylamid	Serva	
octan draselný	Sigma	
octan litný	Sigma	LiAc
octan sodný	Sigma	
Pepton	OXOID	
polyethylenglykol 4000	Serva	
sacharosa	Serva	
síran amonný	Lach-Ner	
sodium dodecyl sulfát	Serva	SDS
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin	Sigma	TEMED
Tris		
tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Serva	Tris
tris(hydroxymethyl)-aminomethan chlorid	Serva	Tris-Cl
Triton X-100	Serva	
L-tryptofan	Reanal	
uracil	Sigma	

5.1.2 Roztoky

1x TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl

3 M KAc: 59,7% 5 M KAc (v/v), 10,9% ledová kyselina octová (v/v), 28,4% ddH₂O

3 M NaAc: 40,8 g/l NaAc

4x Tris-HCl/SDS pH 6,8: 0,5 M Tris-Cl, 4 g/l SDS, upraveno HCl na pH 6,8

4x Tris-HCl/SDS pH 8,8: 1,5 M Tris-Cl, 4 g/l SDS, upraveno HCl na pH 8,8

5x SDS-PAGE pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS

6x vzorkový pufr: 53,8% 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8 (v/v), 38,5% glycerol (v/v), 7,6% beta-merkptoethanol (v/v), 77 g/l SDS, 0,38 g/l brom-fenolová modř

blokovací roztok: 1x TBS, 0,5% Tween 20, 5% sunar

blotovací roztok: 20 % methanol (v/v), 0,29% glycin (w/v), 0,58% Tris (w/v), 0,037% SDS (w/v)

Coomassie Brilliant Blue: 10% kyselina octová (v/v), 0,006% Coomassie Brilliant Blue G-250

fixační roztok: 25% isopropanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v)

lyzační pufr: 100 mM draselnofosfátový pufr (pH 7,8)

lyzační roztok: 100 mM draselnofosfátový pufr (pH 7,8), 0,2% Triton X-100 (v/v), 0,5mM DTT

odmývací roztok: 1x TBS, 0,5% Tween 20

převrstvovací pufr: 4x ředěný 4x Tris-HCl/SDS pH 8,8

roztok II: 1% SDS (w/v), 0,2 M NaOH

STET roztok: 10% sacharosa (v/v), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA-NaOH, 1% Triton X-100 (v/v)

sušící roztok: 10% ethanol (v/v), 4% glycerol (v/v)

TAE pufr (50x koncentrovaný, Tris-octan EDTA): 24,2% Tris-HCl (w/v), 5,7% HCl (v/v), 10% 0,5 M EDTA (pH 8,0)

TE roztok: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA-NaOH

TEG roztok: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA, 10% glycerol (v/v)

TRN: ribonukleáza A, 0,1mM tris-HCl (pH 7,5), 0,045mM NaCl

upravený fenol: vodou nasycený fenol ekvilibrovaný 50 mM Tris-HCl na pH 8,0, 0,1% 8-hydroxychinolin, 0,1% β-merkaptoethanol

upravený chloroform: chloroform a isoamylalkohol v poměru 24:1

5.1.3 Komerční pufrы a roztoky nezahrnuté v soupravách

dNTPs: 10mM dATP, 10mM dGTP, 10mM dCTP, 10mM dTTP, v H₂O

PCR pufr (10x koncentrovaný): 100mM Tris-HCl (pH 8,8), 500mM KCl, 15mM

MgCl₂

pufr pro restrikční endonukleázy Orange: 50mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C), 100mM

NaCl, 10mM MgCl₂, 0,1mg/ml BSA (Fermentas)

pufr pro restrikční endonukleázy Red: 10mM Tris-HCl (pH 8.5 při 37 °C) 100mM KCl,

10mM MgCl₂, 0,1mg/ml BSA (Fermentas)

pufr pro T4 DNA ligázu: 40mM Tris-HCl (pH 7,8 při 25 °C), 10mM MgCl₂, 10mM DTT,

0,5mM ATP (Fermentas)

25x upravená vývojka (Kodak)

25X upravený ustalovač (Kodak)

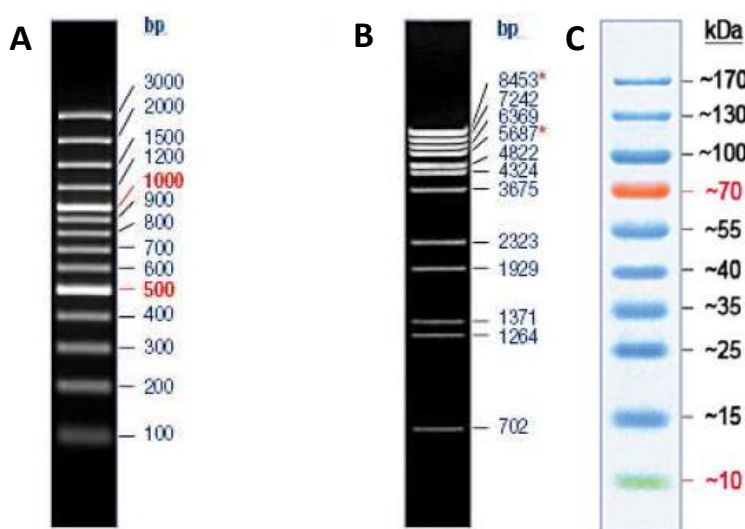
5.1.4 Enzymy

<u>Název</u>	<u>Koncentrace</u>	<u>Výrobce</u>
lysozym	500 U/mg	Serva
Pfu polymerasa	5 U/μl	Fermentas
Taq polymerasa	5 U/μl	
T4 DNA ligáza	5 U/μl	Fermentas
Restrikční endonukleasy	10 U/μl	Fermentas

ribonukleasa A 58 U/mg Sigma

5.1.5 Standardy molekulových hmotností

<u>Název produktu</u>	<u>Výrobce</u>	
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp	Fermentas	(Obr. 5.1)
Lambda DNA/Eco91I (BstEII)	Fermentas	(Obr. 5.1)
PageRuler™ Prestained Protein Ladd	Fermentas	(Obr. 5.1)



Obr. 5.1: Standardy molekulových hmotností. A) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. B) Lambda DNA/Eco91I. C) Předbarvený proteinový standard.

5.1.6 Komerční soupravy

Dual-Light® System – Applied Biosystems

Dual-Luciferase® Reporter Assay System - Promega

FastBack DNA Minispin Kit (100) – Renogen Biolab

QuantiPro BCA Assay Kit – Sigma

5.1.7 Vektory

Název vektoru	Původ
430	Valášek, L.
431	Valášek, L.
432	Valášek, L.
466	Valášek, L.
467	Valášek, L.
490	Valášek, L.
pFGAL4-L270	Mašek T. 2007
pFGAL4 ^{A/UUG} h	Mašek T. 2007
pFGAL4 ^{A/UUG} h-HCV1	Mašek T. 2007
pFGAL4 ^{A/UUG} h-HCV1 ^{A/UUG}	Mašek T. 2007
pFGAL4h-HCV1	Mašek T. 2007
pFGAL4h-HCV1 ^{Δ1-15AA}	Mašek T. 2007
pFGAL4h-HCV1 ^{ACCAUG/AUGACC}	Mašek T. 2007
pFGAL4h-HCV1 ^{A/UUG}	Mašek T. 2007
pFGAL4h-HCV3	Mašek T. 2007
pFGAL4h-L270-HCV1	Mašek T. 2007
pTG4h	Roučová K. 2012
pSH63	Güldener U. 2002
pUG72	Güldener U. 2002
pUG73	Güldener U. 2002

5.1.8 Oligonukleotidové primery

Název primeru	Nukleotidová sekvence
leu_B	TGATGTTGAAGTTATCCTTGGATTTGG
leu_C	CAACGTCGAAATCTCATGGATGAT
pUG_kazeta_F	CAGCTGAAGCTTCGTACGCTGCA
pUG_kazeta_R	CGCATAGGCCACTAGTGGATCTGA
snr51F	TTTCTTATTTCAATTTATTCCTTATCAGTTGATTTGGATGATAAAAGAG ACTGTTGCGGACAGTTCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
snr51R	GAAGAGAACCAAGAGTTATTTAAAGGGCTACATAGGGTGCAAGATTA GTTAGGTTGTAGAACTAGTTCAGCTGAAGCTTCGTACGC
snr70F	AAAGAAAGCATTATCTTTTCATTATTATCTTTTTTCATGCCTGCAATGGAA TTTTTAATTTTCCTTTTCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
snr70R	GTCTCTTTTATCATCCAAATCAACTGATAAGGAATAAATTGAAATAAGA AACAAATTTCCGAAAAAATCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
test_70/51_F	CGATGCCGATTTAAGGTTACTGTAC
test_70/51_R	ACTCAAATATAGCACCATTGTGAGT
ura_B	CAGACCGATCTTCTACCCAGAAT
ura_C	TTGGCTAATCATGACCCAG

5.1.9 Použité protilátky

Název protilátky	Výrobce
Sc-510	Santa Cruz Biotechnonology®
Sc-2005	Santa Cruz Biotechnonology®

5.1.10 Mikroorganismy

5.1.10.1 Bakteriální kmeny

Escherichia coli XL1-Blue: *recA1*; *endA1*; *gyrA96*; *thi-1*; *hsdR17*; *supE44*; *relA1*; *lac* [*F'* *proAB*⁺; *lacI*^qZ; Δ M15; *Tn10* (*Tetr*)]. (Stratagene)

5.1.10.2 Kvasinkové kmeny

Saccharomyces cerevisiae pJ69-4A: *MATa*; *trpl-901*; *leu2-3,112*; *ura3-52*; *his3-200*; *gal4*; *gal80*; *LYS2::GAL1-HIS3*; *GAL2-ADE2*; *met2::GAL7-lacZ*. (James et al. 1996)

Saccharomyces cerevisiae pJ69-4A Δ 70: *MATa*; *trpl-901*; *leu2-3,112*; *ura3-52*; *his3-200*; *gal4*; *gal80*; *LYS2::GAL1-HIS3*; *GAL2-ADE2*; *met2::GAL7-lacZ*; *snR70 Δ ::lox-P*. (tato práce)

Saccharomyces cerevisiae pJ69-4A Δ 51: *MATa*; *trpl-901*; *leu2-3,112*; *ura3-52*; *his3-200*; *gal4*; *gal80*; *LYS2::GAL1-HIS3*; *GAL2-ADE2*; *met2::GAL7-lacZ*; *snR51 Δ ::lox-P*. (tato práce)

Saccharomyces cerevisiae pJ69-4A Δ 70,51: *MATa*; *trpl-901*; *leu2-3,112*; *ura3-52*; *his3-200*; *gal4*; *gal80*; *LYS2::GAL1-HIS3*; *GAL2-ADE2*; *met2::GAL7-lacZ*; *snR70 Δ snR51 Δ ::lox-P*. (tato práce)

5.1.11 Kultivační média

5.1.11.1 Bakteriální kultivační média

5.1.11.1.1 Tekutá média

2xTY médium: 1,6% pepton; 1% kvasničný autolyzát; 0,5% NaCl; upravit pomocí NaOH na pH 7,0

2xTY médium s ampicilinem: 1,6% pepton; 1% kvasničný autolyzát; 0,5% NaCl; upraveno pomocí NaOH na pH 7,0, 100 mg/l ampicilin

5.1.11.1.2 Agarové půdy

2x TY médium + 2% agar

V případě potřeby média s antibiotikem byl přidán ampicilin ve stejném množství jako u tekutého média.

5.1.11.2 *Kvasinková kultivační média*

5.1.11.2.1 Tekutá média

SD-: 1,74 g Yeast Nitrogen Base, 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2% glukosy

SD+: SD-, adenin (A), L-histidin (H), L-leucin (L), L-lysin (Lys), L-methionin (M), L-tryptofan (T), uracil (U).

Selekční minimální média: složení jako SD+, ale chybí zde konkrétní aminokyselina, báze nebo kombinace více chybějících složek.

-T gal: SD+, bez L-tryptofanu a místo 0,2% glukosy je zde 0,2% galaktosa.

YPD: 0,5% kvasniční autolyzát (w/v), 1% pepton (w/v), 2% glukosa (v/v)

5.1.11.2.2 Agarové půdy

YPDA: YPD + 2% agar (w/v)

SD půdy: SD-, SD+ nebo selekční média + 2% agar (w/v)

5.2 Metody

5.2.1 Práce s mikroorganismy

5.2.1.1 *Kultivace bakterií*

Bakteriální kmeny byly kultivovány v tekutém médiu za aerobních podmínek v reciproce třepačce v Erlenmayerových baňkách, případně na agarových půdách. Oba typy kultivace probíhaly při teplotě 37 °C.

5.2.1.2 *Kultivace kvasinek*

Kvasinkové kmeny byly kultivovány v tekutém médiu za aerobních podmínek v reciproce třepačce v Erlenmayerových baňkách, případně na agarových půdách. Oba typy kultivace probíhaly při teplotě 28 °C.

5.2.1.3 *Skladování mikroorganismů*

Bakteriální nebo kvasinkové kmeny byly krátkodobě, týdny až měsíce, skladovány na agarových půdách při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobé skladování byly čerstvě napěstované mikroorganismy převedeny do 25% glycerolu a skladovány při -80 °C.

5.2.1.4 *Měření růstu mikroorganismů*

Měření průběhu růstu bylo provedeno pomocí měření změny optické denzity (OD) na spektrometru Spectronic® Helios Beta (Thermo Electron Corporation). U měření kvasinkové kultury bylo použito záření o vlnové délce 660 nm, tato hodnota je dále zapisována jako dolní index. Kultury, jejichž hodnoty OD_{660} by měly překročit 1, byly ředěny.

5.2.1.4.1 Stanovení růstových křivek kvasinkových kmenů

Přes noc narostlá kultura z tekutého média při 28 °C byla zaočkována do vytemperovaného média na OD_{660} 0,1. V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky a změřeny hodnoty OD_{660} . Tyto hodnoty byly vyneseny do grafů. Odběr vzorků pokračoval až do doby, kdy kultura přešla do stacionární fáze. Poslední odběr byl proveden následujícího dne.

5.2.1.5 *Testování auxotrofních požadavků kvasinkových kmenů*

5.2.1.5.1 Pro potvrzení genotypů kvasinkových kultur

Auxotrofní požadavky kvasinkových kmenů byly testovány po dlouhodobém skladování při 4 °C a při vyočkování buněk uskladněných při -80 °C, v některých případech i po transformaci.

- Bylo pracováno s čerstvě narostlými kvasinkovými kulturami na Petriho miskách.
- Sterilním párátkem bylo odebráno množství malé špendlíkové hlavičky (cca 10 µl) a resuspendováno ve 100 µl ddH₂O.
- Tato suspenze byla 100 krát naředěna a 5 µl vyseto na agarové médium.
- Po třech až šesti dnech růstu byly odečteny výsledky

5.2.1.5.2 Pro semikvantitativí odhad exprese reportérových genů

- Bylo pracováno s čerstvě narostlými kvasinkovými kulturami na Petriho miskách.
- Sterilním párátkem bylo odebráno množství velké špendlíkové hlavičky (cca 20 µl) a resuspendováno v 1 ml ddH₂O.
- U získané suspenze byla změřena její OD₆₆₀ a naředěna na OD₆₆₀ = 1.
- Pro testování bylo na selekční agarové misky nakapáno 5 µl kvasinkové suspenze o OD₆₆₀ = 1 a po 5 µl této suspenze ředěné 10x, 100x, 1000x, 10000x.
- Po několika dnech byly odečteny výsledky.

5.2.1.6 *Indukce GAL promotoru pomocí galaktosy*

- Čerstvá kvasinková kultura nesoucí vektor s příslušným konstruktem byla přenesena do 10 ml selekčního média obsahující místo glukosy galaktosu.
- Kultura byla aerobně inkubována přes noc při 28 °C
- Na agarovém médiu se selekcí pro vektor bylo vyseto po 0,1 µl, 1 µl, 10 µl a 100 µl kultury.
- Kolonie byly sterilním párátkem přeneseny na agarové médium se selekcí pro vektor a se selekcí pro vektor i pro vloženou auxotrofní kazetu.
- Byly vybrány jenom ty kolonie, které rostly pouze na agarovém médiu se selekcí pro vektor.

5.2.1.7 *Odléčení kvasinkových kmenů od vektoru pSH63*

- Požadované kvasinkové kmeny byly přeneseny do 10 ml tekutého minimálního média.
- Kultura byla ponechána v aerobních podmínkách při 28 °C do druhého dne.
- 1 ml kultury byl přenesen do 9 ml tekutého minimálního média a kultura byla opět inkubována stejně jako v předcházejícím kroku.
- Tímto způsobem byla kvasinková kultura pěstována jeden týden.
- Na agarové minimální médium bylo vyseto po 0,1 µl, 1 µl, 10 µl a 100 µl kultury.
- Sterilním párátkem byly kolonie přeneseny na agarové minimální médium a agarové minimální médium se selekcí pro vektor.
- Pro další práci byly vybrány jen ty kolonie, které nerostly na agarovém médiu se selekcí pro vektor.

5.2.2 *Práce s DNA*

5.2.2.1 *Izolace DNA*

5.2.2.1.1 *Minipreparace vektorů plasmidového typu z E. coli*

- Přes noc nechat narůst bakteriální kultury na agarových plotnách se selekčním médiem při 37 °C.
- Sterilním párátkem bylo přeneseno množství bakteriální biomasy odpovídající ploše 3x2 cm do 500 µl STET roztoku a přidáno 5 µl 5% lysozymu.
- Suspenze byla důkladně resuspendována a inkubována 2 min při 95 °C.
- Při laboratorní teplotě byly vzorky centrifugovány 10 min při 13000 g.
- Pelet byl párátkem odstraněn.
- K supernatantu bylo přidáno 280 µl isopropanolu, roztok byl důkladně promíchán a inkubován po 30 min při -20 °C.
- Roztok byl centrifugován 15 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 500 µl 70% EtOH.
- Opět byl roztok centrifugován 10 min při 13000 g a laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn a pelet dokonale vysušen ve SpeedVac.
- Vysušený pelet byl resuspendován v 30 µl TE roztoku, nebo 25 µl TE roztoku a 5 µl TRN.

5.2.2.1.2 Midipreparace vektorů plasmidového typu z E. coli

- Přes noc nechat narůst bakteriální kulturu v tekutém selekčním médiu o celkovém objemu 50 ml.
- Bakteriální kultura byla centrifugována 10 min při 5000 g a laboratorní teplotě.
- Pelet byl důkladně resuspendován ve 2 ml TEG roztoku.
- K suspenzi byly přidány 4 ml čerstvě připraveného roztoku II. Vzorek byl opatrně promíchán pouze otáčením zkumavky a inkubován 5 min při laboratorní teplotě.
- K suspenzi byly přidány 3 ml roztoku 3 M KAc, opět byl opatrně promíchán pouze otáčením zkumavky a inkubován 20 minut na ledu.
- Suspenze byla centrifugována 30 min při 5000 g a 4 °C.
- Supernatant byl přefiltrován přes gázu, k němu bylo přidáno 6 ml isopropanolu, vše bylo promícháno a inkubováno 10 min při -20 °C.
- Suspenze byla centrifugována 30 min při 5000 g a 4 °C.
- Sediment byl resuspendován 3 ml 70% EtOH.
- Suspenze byla centrifugována 15 min při 5000 g a 4 °C.
- Sediment byl zcela vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován ve 400 µl TE roztoku.
- Poté bylo přidáno 4 µl TRN a suspenze byla nechána 1 h při 37 °C.
- Přečištění DNA:
 - Ke 400 µl suspenze bylo přidáno 400 µl upraveného fenolu, centrifugováno 5 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
 - K odebrané vodné fázi bylo přidáno 200 µl upraveného fenolu a 200 µl upraveného chloroformu, centrifugováno 5 min při 13000 g a laboratorní teplotě, následně byla odebrána vodná fáze. Tento krok byl několikrát opakován, dokud se na rozhraní mezi fázemi objevovaly vysrážené proteiny.
 - K odebrané vodné fázi bylo přidáno 400 µl upraveného chloroformu, centrifugováno 5 min při 13000 g a laboratorní teplotě. Vodná fáze byla odebrána k následnému zpracování.
- K vodné fázi bylo přidáno 35 µl 3 M NaAC a 875 µl vychlazeného 98% EtOH. DNA byla srážena přes noc při -20 °C.

- Vysrážená DNA byla centrifugována 20 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Sediment byl resuspendován v 1 ml vychlazeného 70% EtOH, centrifugován 15 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Pelet byl po dokonalém vysušení při laboratorní teplotě resuspendován ve 150 μ l ddH₂O.

5.2.2.1.3 Izolace bakteriální DNA pro PCR reakci

- Bylo nabráno malé množství bakteriální kultury.
- Bakteriální biomasa byla resuspendována v 50 μ l ddH₂O.
- Suspenze byla inkubována 10 min při 95 °C.
- Poté byla suspenze ponechána 5 min na ledu.
- Tyto dva kroky byly opakovány celkem 3x.
- Před použitím templátu pro PCR reakci byla suspenze krátce centrifugována 10 s při 13000 g a laboratorní teplotě.

5.2.2.1.4 Izolace kvasinkové chromozomální DNA pro PCR reakci

Tato rychlá a jednoduchá metoda izolace kvasinkové chromozomální DNA byla použita pro získání templátu pro PCR reakci.

- Bylo nabráno malé množství kvasinkové kultury.
- Biomasa byla resuspendována v 50 μ l 20 mM NaOH.
- Suspenze byla inkubována 20 min při 95 °C.
- Poté byla suspenze chlazená na ledu 5 minut.
- Tyto dva kroky byly opakovány celkem 3x.
- Před použitím templátu pro PCR reakci byla suspenze krátce centrifugována 10 s při 13000 g a laboratorní teplotě.

5.2.2.1.5 Izolace DNA z agarosového gelu pomocí FastBack DNA Minispin Kit

- Oblast 0,5% agarosového gelu s požadovanou DNA byla vyříznuta a přenesena do předem zvážené mikrozkušavky. Poté byla mikrozkušavka i s obsahem znovu zvážena.
- Do mikrozkušavky byl přidán rozpouštěcí roztok o objemu (ml) rovném trojnásobku váhy agarosového gelu (g).

- Agarosový gel byl rozpuštěn při 60 °C po dobu 5 min za občasného promíchání.
- Suspenze byla přenesena do centrifugační kolonky a centrifugována 1 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Sedimentovaná tekutina byla z jímací části kolonky odstraněna. Do kolonky bylo přidáno 750 µl promývacího roztoku a opět byla kolonka centrifugována 1 min při 13000 g a laboratorní teplotě.
- Promývací krok byl ještě jednou opakován s 250 µl promývacího roztoku.
- Po odstranění jímací zkumavky byla kolonka vložena do mikrozukavky. Do kolonky bylo vneseno 30 µl ddH₂O. Následovala centrifugace 1 min při 13000 g a laboratorní teplotě. Voda s DNA byla jímána do mikrozukavky.

5.2.2.2 *Měření koncentrace DNA*

Pro běžnou práci s DNA byla její koncentrace odhadována při elektroforetické analýze.

Pro transformaci DNA do mikroorganismů byla koncentrace DNA měřena na mikrokapilárním spektrofotometru NanoDrop-1000 v objemu 1,5 µl.

5.2.2.3 *Agarosová elektroforesa*

- Množství agarosu odpovídající požadované koncentraci, viz Tab. 5.1, bylo rozpuštěno ve 100 ml 1x koncentrovaném TAE pufru.
- Roztok byl následně ochlazen na cca 60 °C a nalit do vaničky. Poté byl přidán ethidium bromid o výsledné koncentraci 0,1 µg/ml. Dále byl zasunut hřeben s potřebným počtem zubů a gel byl ponechán při pokojové teplotě, aby ztuhnul.
- Po ztuhnutí byl z gelu vyndán hřeben. Gel spolu s vaničkou byl přenesen do elektroforetického přístroje a přelit 1x koncentrovaným TAE pufrům.
- Do jamiček vytvořených hřebem byly nanášeny vzorky, v případě potřeby byl nanášen i standard molekulových hmotností.
- Gel byl zapojen do elektrického pole o napětí 5 V/cm gelu. Doba působení elektrického napětí byla přibližně 1 hodinu.
- Výsledky byly vyfoceny pod UV světlem.

Koncentrace gelu	Velikost dělených DNA fragmentů	Množství agarosy na 100 ml gelu
0,3%	5-60 kbp	0,3 g
0,6%	1-20 kbp	0,6 g
0,8%	0,8-12 kbp	0,8 g
1,0%	0,5-7 kbp	1,0 g
1,2%	0,3-6 kbp	1,2 g
1,5%	0,2-4 kbp	1,5 g
2,0%	0,1-2 kbp	2,0 g

Tab. 5.1: Koncentrace agarosového gelu pro optimální rozlišení zkoumaných fragmentů DNA o různých velikostech.

5.2.2.4 PCR

5.2.2.4.1 Složení směsi pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR)

Složení směsi pro běžnou PCR

- 1 µl templátové DNA
- 1 µl Taq polymerasy
- 1,25 µl „forward“ primeru
- 1,25 µl „reverse“ primeru
- 0,5 µl dNTP
- 2,5 µl 10x koncentrovaného PCR pufu
- 17,5 µl ddH₂O

U negativní kontroly byl místo 1 µl templátové DNA přidán 1 µl ddH₂O.

Složení směsi PCR pro vytvoření rekombinantních fragmentů

- 2 µl templátové DNA
- 2 µl Taq polymerasy + 1% Pfu polymerasy
- 2,5 µl „forward“ primeru

- 2,5 µl „reverse“ primeru
- 1 µl dNTP
- 5 µl 10x koncentrovaného PCR pufru
- 35 µl ddH₂O

5.2.2.4.2 Použité PCR programy

PCR pro ověření přítomnosti pUG72, pUG73 plazmidů

Požítá dvojice primerů: pUG_kazeta_F, pUG_kazeta_R

94 °C	3 min		
94 °C	30 s	}	35 cyklů
52 °C	30 s		
72 °C	3 min		
72 °C	10 min		
4 °C	do odvolání		

PCR pro přípravu rekombinantních fragmentů

Použité primery: snr70F, snr70R, snr51F, snr51R

94 °C	3 min		
94 °C	30 s	}	25 cyklů
65 °C	30 s		
72 °C	3 min		
72 °C	10 min		
4 °C	do odvolání		

PCR pro ověření správného vložení rekombinantního fragmentu do kvasinkového genomu

Použité dvojice primerů: test_70/51_F, leu_B nebo ura_C; test_70/51_R, leu_C nebo ura_B

94 °C	3 min		
94 °C	30 s	}	35 cyklů
53 °C	30 s		
72 °C	1 min		
72 °C	10 min		
4 °C	do odvolání		

Gradientová PCR

Tato PCR byla použita pro zjištění optimální teploty nasedání primerů. Testovány byly všechny primery.

94 °C	3 min		
94 °C	30 s	}	35 cyklů
45 - 65 °C	30 s		
72 °C	3 min		
72 °C	10 min		
4 °C	do odvolání		

5.2.2.5 Modifikace DNA

5.2.2.5.1 Štěpení restričními endonukleasami

Složení restriční směsi za účelem analýzy vektoru pUG73

Celkem byly připraveny 4 reakční směsi. Každá směs obsahovala jeden typ restriční endonukleasy a pro ni vhodný pufr.

- 3 µl vzorku připraveného metodou minipreparací vektorů
- 1 µl enzymu (BglII, HindIII, NdeI)
- 0,5 µl TRN
- 1 µl 10x koncentrovaného pufru (Orange, Red, Orange)
- 4,5 µl ddH₂O

Tyto reakční směsi byly inkubovány při 37 °C po dobu 3 hod.

Restrikční endonukleotická reakce byla inaktivována při 80 °C po dobu 20 min.

Celá reakční směs, tedy 10 µl, byla nanесena na 0,8% agarosovou elektroforesu.

Přečištění vektoru pUG73 pomocí endonukleotického štěpení

Složení restrikční endonukleotické směsi:

- 2 µl vektoru izolovaného midipreparací
- 1 µl HindIII
- 2 µl 10x koncentrovaného pufru Red
- 15 µl ddH₂O

Tato reakční směs byla inkubována při 37 °C po dobu 3 hod.

Reakce byla inaktivována 20 min při 80 °C.

Vše bylo nanесeno na 0,5% agarosovou elektroforesu za účelem izolace DNA.

5.2.2.5.2 Ligace DNA

Složení ligační směsi:

- 5 µl templátu
- 2 µl ligasy
- 3 µl ligačního pufru
- 20 µl ddH₂O

Směs byla inkubována přes noc při 16 °C.

Směs byla inaktivována 10 min při 65 °C.

5.2.2.6 Vnášení DNA do mikroorganismů

5.2.2.6.1 Transformace buněk *E. coli* elektroporací

- Do vychlazené mikrozkuřavky obsahující 1 µl naředěné DNA, celkové množství DNA bylo přibližně 100 ng, bylo přidáno 50 µl suspenze elektrokompetentních buněk *E. coli*.

- Promíchaná směs byla inkubována 1 min na ledu.
- Poté byla směs přenesena do vychlazené elektroporační kyvety o vzdálenosti elektrod 2 mm.
- Kyveta byla vložena do elektroporátoru Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) a byl aplikován puls při napětí 2,5 kV, kapacitanci 25 μ F a odporu 200 Ω .
- Okamžitě po pulsu byl ke směsi přidán 1 ml 2x TY média pokojové teploty.
- Směs byla přenesena do nové mikrozkuhavky a třepána 1 hod při 37 °C.
- Transformované buňky byly vysety na Petriho misky s příslušným selekčním médiem v množství 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l a na poslední Petriho misku bylo nanášeno zbylé množství buněk.

5.2.2.6.2 Transformace kvasinkových buněk pomocí LiAc

- Širší stranou sterilního párátko bylo přeneseno přibližně 25 μ l čerstvě narostlých buněk z Petriho misek do 1 ml 100 mM LiAc. Buněčná suspenze byla důkladně resuspendována.
- Buňky byly centrifugovány 5 s při 3000 g a supernatant byl odstraněn.
- K sedimentu bylo přidáno přesně v pořadí:
 - 240 μ l 50% PEG (w/v)
 - 36 μ l 1,0 M LiAc
 - 50 μ l denaturované ssDNA (2,0 mg/ml)
 - 25 μ l naředěné vektorové DNA o celkovém množství 5 μ g.
- Reakční směs byla důkladně promíchána a inkubována 20 min při 42 °C.
- Transformační směs byla inkubována při laboratorní teplotě přes noc.
- Transformované buňky byly vysety ve třech ředění na Petriho misky s příslušným selekčním médiem a inkubovány několik dní při 28 °C.

5.2.2.6.3 Vysokovýtěžková transformace kvasinkových buněk pomocí LiAc

- Do 5 ml kultivačního média byla sterilně přenesena kvasinková kultura a inkubována za aerobních podmínek při 28 °C přes noc.
- Koncentrace buněk byla spektrofotometricky změřena. Do 50 ml vytemperovaného média byl přenesen takový objem kultury, aby výsledné množství buněk v médiu bylo $OD_{660} = 0,3$, což zhruba odpovídá 5×10^6 buněk/ml.

- Buněčná kultura byla ponechána růst za aerobních podmínek při 28 °C do $OD_{660} = 1,05$, neboli konečného množství buněk 2×10^7 buněk/ml.
- Kultura byla sterilně přenesena do 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugována 5 min při 3000 g a laboratorní teplotě.
- Po odstranění supernatantu byly sedimentované buňky promyty v 25 ml sterilní ddH₂O a opět centrifugovány 5 min při 3000 g a laboratorní teplotě.
- Supernatant byl opět odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1 ml 100 mM LiAc a přeneseny do mikrozukavky a centrifugovány 30 s při maximálních otáčkách.
- Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 1 ml 100 mM LiAc.
- Do nových mikrozukavek bylo přeneseno 100 µl suspenze a směs byla centrifugována přibližně 7 s.
- Po odstranění supernatantu bylo k buňkám přidáno přesně v pořadí:
 - 240 µl 50% PEG (w/v)
 - 36 µl 1,0 M LiAc
 - 50 µl denaturované ssDNA (2,0 mg/ml)
 - 34 µl roztoku DNA o výsledném množství 5 µg
- Reakční směs byla důkladně resuspendována, inkubována 30 min při 28 °C.
- Poté byla reakční směs inkubována 20 min při 42 °C.
- Buněčná směs byla po teplotním šoku centrifugována 30 s při 4500 g a laboratorní teplotě.
- Po odstranění supernatantu byly buňky jemně rozmíchány v 1 ml sterilní ddH₂O.
- Transformované buňky byly vysety ve třech ředěních na Petriho misky s příslušným selekčním médiem.

5.2.3 Práce s proteiny

5.2.3.1 Příprava kvasinkových lyzátů

5.2.3.1.1 Vysokovýtěžková příprava kvasinkových lyzátů

- Do 5 ml tekutého média byla sterilně přenesena kvasinková kultura, nechána aerobně růst přes noc při 28 °C.
- 3 ml kultury byly centrifugovány 1 min při 13000 g a 4 °C.

- Sediment byl promyt 1 ml ddH₂O a centrifugován 1 min při 13000 g a 4 °C.
- Supernatant byl dokonale odstraněn a buněčný sediment byl zmražen nejméně na 20 min při -20 °C.
- K buňkám bylo přidáno 100 µl 1 M NaOH se 7% β-merkaptoethanolem, tento roztok byl čerstvě připraven.
- Buněčná suspenze byla dobře promíchaná a ponechána 2 min při laboratorní teplotě.
- K buněčné suspenzi bylo přidáno 100 µl 50% TCA, suspenze byla dobře promíchána a inkubována 5 min na ledu.
- Suspenze byla centrifugována 5 min při 13000 g a 4 °C.
- Supernatant byl důkladně odstraněn.
- Buněčný sediment byl důkladně promíchán v 500 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0, tento pufr byl zchlazen na ledu.
- Suspenze byla centrifugována 1 min při 13000 g a 4 °C.
- Supernatant byl odstraněn a sediment byl promíchán v 6x vzorkovém pufru.
- Před nanesením na polyakrylamidovou elektroforesu byl lyzát inkubován 5 min v termobločku při 95 °C, nebo ve vodní lázni při 100 °C.

5.2.3.1.2 Příprava kvasinkových lyzátů pro měření enzymových aktivit

- Do 10 ml tekutého média byla sterilně přenesena buněčná kultura a inkubována přes noc za aerobních podmínek při 28 °C.
- Druhý den byla kvasinková kultura sterilně přenesena do vytemperovaného 40 ml kultivačního média na konečnou koncentraci OD₆₆₀ = 0,1 a aerobně inkubována při 28 °C.
- Každé dvě hodiny byl z kultury odebrán vzorek, který byl změřen na spektrofotometru.
- Ve druhé třetině exponenciální fáze růstu bylo odebráno 30 ml buněčné kultury.
- Kvasinková kultura byla centrifugována 10 min při 3000 g a 4 °C.
- K sedimentu bylo přidáno 700 µl vychlazeného lyzačního pufru, suspenze byla důkladně promíchána a centrifugována 5 min při 8000 g a 4 °C.
- Předchozí krok byl opakován pro důkladnější promytí buněčné suspenze.

- K sedimentu bylo přidáno 700 μ l lyzačního roztoku s 1 mM PMSF, suspenze byla důkladně promíchána a přenesena do nové vychlazené mikroskopické kuličky obsahující přibližně 400 μ l skleněných kuliček.
- Buňky byly homogenizovány v kulovém mlýnku 3 min, 30 kmity/s.
- Buněčný lyzát byl pročištěn centrifugací 5 min při 8000 g a 4 °C.
- Supernatant obsahující buněčné proteiny byl přenesen do nové mikroskopické kuličky.

Takto připravené buněčné lyzáty se skladují při -80 °C, při analýze se lyzáty nechávají na ledu.

5.2.3.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

- Nejprve byly sestaveny skla do nalévacího stojanu.
- Roztok pro separační gel byl namíchán podle hodnot uvedených v tabulce Tab. 5.2.
- Persíran amonný (APS) a TEMED byly přidány těsně před nanášením roztoku mezi skla.
- Roztok byl přenesen mezi skla a zalit až po okraj převrstvovacím roztokem, aby se k polymerační reakci nedostal kyslík, který polymeraci inhibuje.
- Přibližně po 30 min, kdy došlo k zpolymerování gelu, byl převrstvovací roztok vylit a okolí separačního gelu bylo opatrně vysušeno filtračním papírem.
- Separační gel byl zalit zaostřovacím roztokem a do něj byl zasunut hřebínek.
- Složení zaostřovacího roztoku:
 - 3,05 ml ddH₂O
 - 1,25 ml 4x Tris-HCl/SDS pH 6.8
 - 0,65 ml 30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid
 - 37,5 μ l 10% APS (w/v)
 - 7,5 μ l TEMED
- Po 30 min byla aparatura rozebrána, skla s polyakrylamidovými gely přemístěny do elektroforetické aparatury, zality 1x SDS-PAGE puřrem.
- Hřebínky byly vysunuty a jamky byly opatrně propláchnuty 1x SDS-PAGE puřrem.
- Do jamek bylo nanášeno požadované množství vzorků.
- K dělení proteinů docházelo při 150 V po dobu 1 hod.

Koncentrace akrylamidu (%)	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15
ddH ₂ O	8,75	8,25	7,75	7,25	6,75	6,25	5,75	5,25	4,75	3,75
4x Tris-HCl/SDS pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	5,50	6,00	6,50	7,50
10% APS (w/v)	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
TEMED	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015

Tab. 5.2: Použité množství roztoků pro přípravu separačního gelu o požadované konečné koncentraci polyakrylamidu. Uváděné množství roztoků je v ml. Takto připravený separační roztok vystačí na dva polyakrylamidové gely.

5.2.3.3 *Semi-dry metoda pro western-blot*

- Aparatura byla rozebrána a od separačního gelu byl oddělen zaostřovací gel.
- Separační gel byl přenesen do blotovacího roztoku a inkubován na kývačce 20 min při laboratorní teplotě.
- Na blotovací přístroj byly položeny 3 filtrační papíry Whatman, které byly namočené do blotovacího roztoku.
- Na filtrační papíry byl položen polyakrylamidový gel, na něj byla položena v blotovacím roztoku namočená nitrocelulosevá membrána* a nakonec byly položeny 3 namočené filtrační Whatman papíry.
- Pomocí 50ml centrifugační zkušavky byly vytlačeny bubliny a vše bylo přiklopeno druhým dílem blotovacího přístroje.
- Aparatura byla zapojena do elektrického proudu 2 mA/cm² membrány po dobu 1 hod.
- Poté byla aparatura rozebrána, tužkou byly na membráně vyznačeny standardy molekulových hmotností a strana membrány, která byla v kontaktu s polyakrylamidovým gelem.
- Takto označená membrána byla přenesena do blokovacího roztoku na 1 hod.
- Polyakrylamidový gel byl přenesen do fixačního roztoku, kde byl inkubován 30 min.

- Membrána z blokovacího roztoku byla zatavena do fólie spolu s vhodně naředěnou primární protilátkou a ponechána přes noc při 4 °C. Primární protilátka byla ředěna blokovacím roztokem do celkového objemu 1 ml.
 - Membrána byla následně promyta 3x po 15 min v odmyvacím roztoku a inkubována 1 hod v blokovacím roztoku.
 - Membrána byla zatavena do fólie s vhodně naředěnou sekundární protilátkou a inkubována 2 hod při 4 °C. Sekundární protilátka byla ředěna v blokovacím roztoku do celkového objemu 1 ml.
 - Membrána po inkubaci byla promyta 3x po 15 min v odmyvacím roztoku.
 - Následně bylo možné analyzovat vzorky chemiluminiscenčně.
- * Při použití PVDF membrány se PVDF membrána nejprve namočí do methanolu a poté se opláchne ddH₂O.

5.2.3.4 Chemiluminiscenční detekce

- Ve dvou 50ml centrifugačních zkumavkách bylo smícháno 18 ml ddH₂O a 2 ml Tris-HCl, pH 8,5.
- Do jedné zkumavky bylo přidáno 12 µl 30% H₂O₂.
- Do druhé zkumavky byly přidány zásobní roztoku 200 µl luminolu a 88 µl kyseliny p-kumarové.
- Oba roztoky byly nality na membránu a promíchány.
- Po krátké inkubaci byla membrána založena do kazety s fotografickým filmem a inkubována podle očekávané intenzity signálu.
- Film byl následně inkubován 5 min ve vývojce, opláchnut vodou.
- Poté byl ponořen do ustalovače a ponechán zde 15 min. Z ustalovače byl film vyndán a důkladně promyt vodou.
- Po oschnutí byla na fotografický film vyznačena pozice membrány a standardů molekulových hmotností.

5.2.3.5 Barvení polyakrylamidových gelů

- Z fixačního roztoku byl gel přenesen do roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 a inkubován na kývačce přes noc při laboratorní teplotě.
- Odbarvení pozadí polyakrylamidového gelu probíhalo v ddH₂O přibližně jeden den.

5.2.3.6 *Sušení polyakrylamidových gelů*

- Po odbarvení byl polyakrylamidový gel přenesen na 30 min do sušícího roztoku.
- Následně byl polyakrylamidový gel přenesen na 2 filtrační papíry navlhčené v sušícím roztoku a překryt potravinářskou fólií.
- Takto připravený gel se sušil v sušičce gelů 2 hod při 80 °C.

5.2.3.7 *Měření aktivity β-galaktosidasy*

Sestava Dual-Light® System obsahuje Galacton-Plus® substrát, Reaction Buffer Diluent, Accelerator-II.

- Substrát Galacton-Plus® byl naředěn s Reaction Buffer Diluent v poměru 1:100.
- Do naředěného substrátu byl přidán kvasinkový lyzát (kapitola 4.2.3.1.2) v poměru 10:1.
- Reakční směs byla inkubována po 1 hod při laboratorní teplotě v temnu
- Luminometrem Microlite TLX2 (Dynatech Laboratories) byl k roztoku přidán Accelerator-II v poměru 2:3. Luminiscence byla měřena po dobu 10 s.

Vzorky byly měřeny v tetraplikátech.

5.2.3.8 *Měření aktivity světluškové luciferasy*

Sestava Dual-Luciferase® Reporter Assay System obsahuje Luciferin Dilution Buffer, Luciferin.

- 10 mM luciferin byl 100 krát naředěn Luciferin Dilution pufrém.
- Do roztoku luciferinu bylo přidáno ATP o finální koncentraci 10 mM.
- Kvasinkový lyzát, viz kapitola 4.2.3.1.2, byl 100 krát naředěn lyzačním roztokem.
- Luminometrem Microlite TLX2 (Dynatech Laboratories) byl k naředěnému lyzátu přidán roztok luciferinu v poměru 1:10. Luminiscence byla měřena po dobu 10 s.

Vzorky byly měřeny v tetraplikátech.

5.2.3.9 *Měření koncentrace proteinů pomocí BCA testu*

Souprava QuantiPro BCA Assay Kit obsahuje QA pufr, QuantiPro BCA QB, sulfát měďnatý.

- Do mikrotitrační destičky byla nanášena řadící řada proteinového standardu BSA o koncentraci 10 – 100 mg/ml, dále byla nanášena ddH₂O a 50 krát ředěné vzorky, vše v objemu 75 µl.
- Do každé jamky bylo nanášeno 75 µl roztoku QA, QB a sulfátu měďnatého v poměru 25:25:1.
- Destička byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hod.
- Koncentrace proteinů byla odečtena po změření vzorků na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm.

Buněčné lyzáty byly připraveny podle kapitoly 4.2.3.1.2, lyzační roztok neobsahoval DTT. Vzorky byly měřeny v duplikátech.

5.2.3.10 Výpočet směrodatné odchylky

Směrodatná odchylka z rozptylu poměru dvou průměrů byla vypočítána podle vzorce poskytnutého od dr. Romana Krejčího.

$$\text{var} \left(\frac{\bar{a}}{\bar{b}} \right) \approx \left(\frac{\bar{a}}{\bar{b}} \right)^2 * \left(\frac{s_a^2}{\bar{a}^2} + \frac{s_b^2}{\bar{b}^2} \right)$$

Kdy jednotlivé značky jsou:

\bar{a} je průměrná hodnota aktivity a

\bar{b} je průměrná hodnota aktivity b, nebo průměrná hodnota koncentrace proteinů

s_a je směrodatná odchylka průměru a

s_b je směrodatná odchylka průměru b

Výslednou směrodatnou odchylku vypočteme jako odmocninu z rozptylu dvou průměrů.

6. Výsledky

6.1 Příprava delečních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*

6.1.1 Ověření laboratorního kmene pJ69-4A

Kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* pJ69-4A (James, 1996) byl vytvořen pro dvouhybridní analýzy. Má porušené metabolické dráhy pro syntézu histidinu (*his3*), methioninu (*met2*), leucinu (*leu2*) a tryptofanu (*trp1*). Dále má deletované geny kódující transkripční faktory Gal4p a Gal80p, jež mohou aktivovat transkripci genů obsahujících GAL promotory. Kmen pJ69-4A obsahuje chromozomálně lokalizované geny *ADE2*, *HIS3* a *lacZ*, jejichž transkripce je pod kontrolou promotorů *GAL2*, *GAL1* a *GAL7*. To znamená, že dodáme-li buňce protein Gal4, bude schopna obnovit metabolické dráhy syntézy adeninu, histidinu a produkovat β -galaktosidasu.

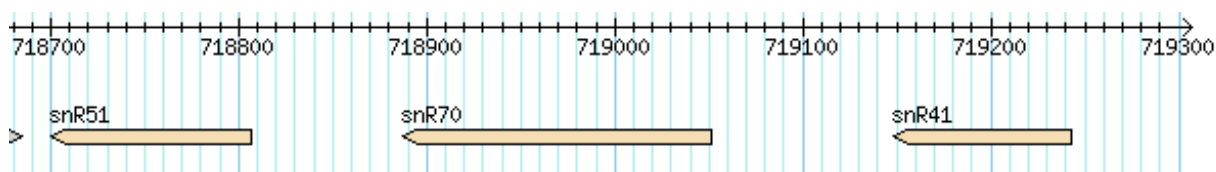
Obdrženou kvasinkovou kulturu pJ69-4A, která byla uchovávána při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, jsem inkubovala při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ na komplexním agarovém médiu pro získání monoklonií. U několika monoklonií jsem ověřila jejich auxotrofní vlastnosti a vybrala vhodný klon pro následnou práci.

6.1.2 Příprava delečních DNA kazet

Protože naším cílem bylo sledovat vliv konkrétních modifikací ribosomální RNA na iniciaci translace, bylo nutné vybrat konkrétní modifikovaný nukleotid. Po prostudování existující literatury, jsem vybrala 2'-O-methylovaný cytidin na pozici 1639 18S RNA. U této modifikace byly pozorovány změny růstu (Esguerra, 2008), množství začleněného ^{35}S -methioninu (Liang, 2009), vliv na elongaci a terminaci translace (Baudin-Ballieu, 2009). Dalším důvodem, proč by mohla právě tato modifikace mít vliv na iniciaci translace, je její pozice v rámci ribosomu. Cytidin 1639 18S rRNA se nachází v dekodující oblasti v P-místě a v blízkosti mRNA.

Malá jadérová RNA přinášející modifikační aparát, jenž modifikuje C1639, je u kvasinky *S. cerevisiae* snR70. Gen pro snR70 se nachází na chromozomu 16 v polycistronní jednotce obsahující také geny pro snR41 a snR51. Jako první se v transkriptu nachází snR41 následována snR70 a jako poslední je zde snR51 (Obr. 6.1). Mým úkolem bylo pomocí homologní rekombinace odstranit genomový úsek pro snR70 záměnou za gen

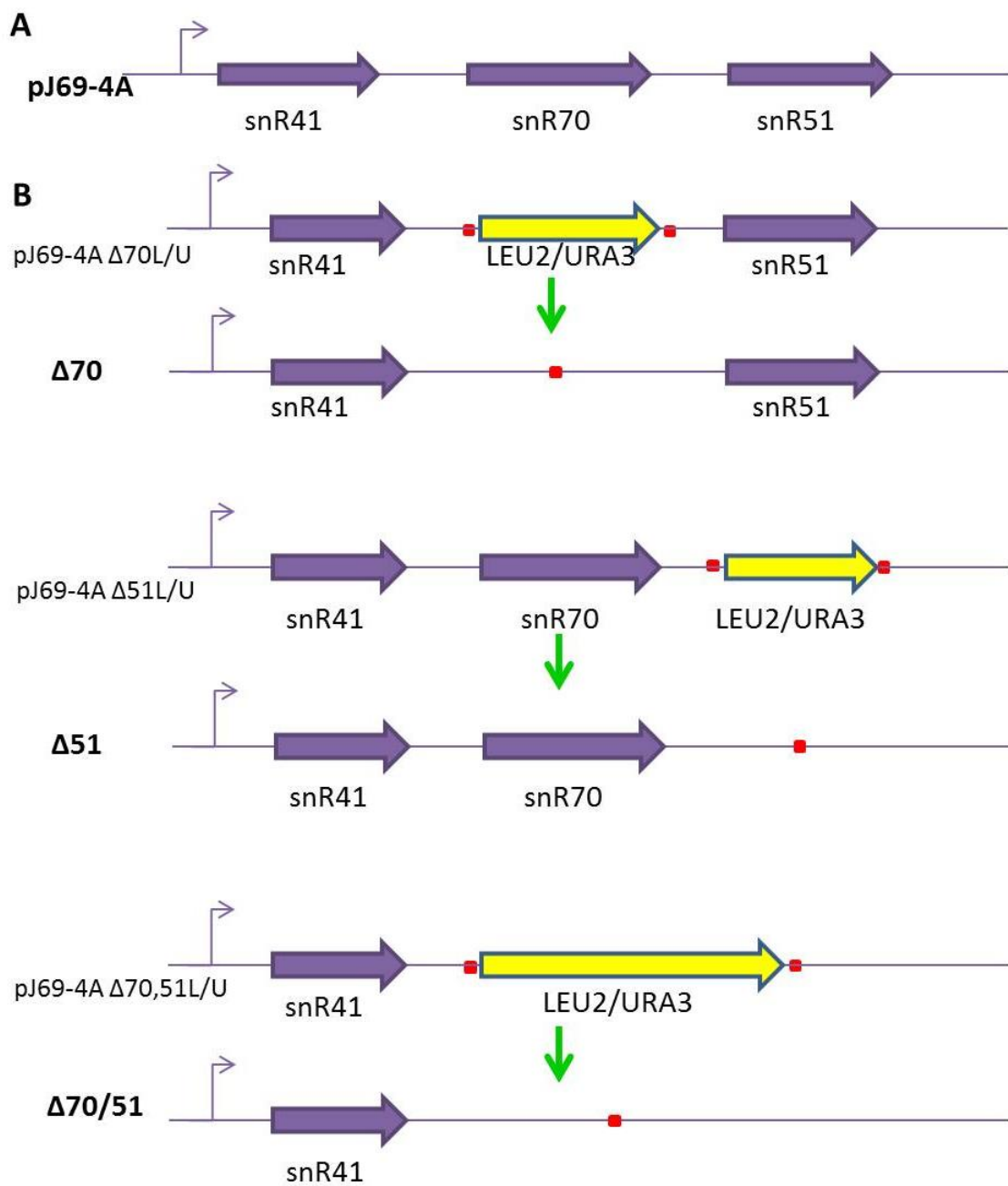
LEU2 nebo *URA3*. Kazeta obsahující *LEU2/URA3* má vlastní promotor a terminátor. Vneseme-li selekční kazetu místo genu pro snR70, nemělo by docházet k přepisu snR51. Z literatury studující modifikaci C1639 není jasné, zda u jejich mutovaných kvasinkových kmenů dochází k přepisu malé jadéřkové RNA snR51. Rozhodli jsme se tedy vytvořit nejen kmen mající deletovaný genový úsek pro snR70, ale i kmen s deletovaným úsekem pro snR51 a kmen s deletovanými oběma úseky malých jadéřkových RNA (snR70 a snR51) viz schéma (Obr. 6.2). Zjednodušeně řečeno, chtěli jsme vytvořit kvasinkové kmeny s nefunkční snR70, s nefunkční snR51 a kvasinkový kmen s nefunkčními oběma snoRNA molekulami.



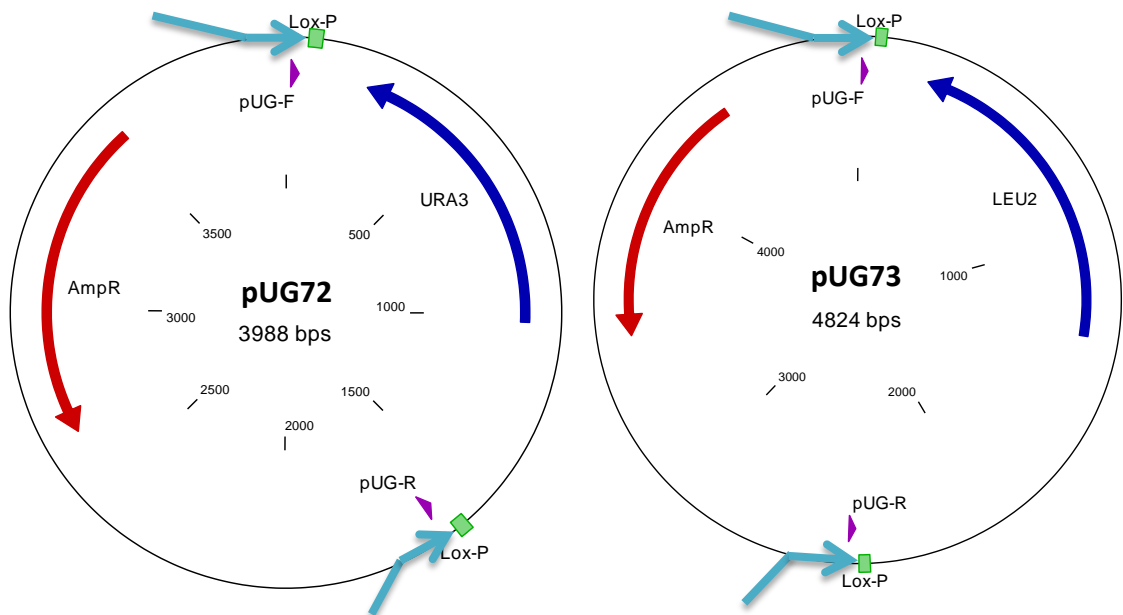
Obr. 6.1: Znárodnění pozic snR41, snR70 a snR51 na chromozomu 16; 718,6 kbp – 719,3 kbp. Převzato z www.yeastgenome.org.

Deleční fragmenty jsem vytvořila pomocí PCR. Navržené primery pro deleční kazetu snR51F, snR51R, snR70F, snR70R, kapitola 4.1.8, obsahují přibližně 65 nukleotidů dlouhý úsek homologní k chromozomální DNA kvasinky *S. cerevisiae* a na 3'-konci primerů 19 respektive 23 nukleotidů dlouhý úsek homologní k pUG vektorům (Obr. 5.3). Deleční kazeta vytvořena PCR obsahuje gen vhodný pro selekci a na krajích sekvenčně specifické úseky pro konkrétní lokus.

Vektory pUG72 a pUG73 obsahují gen pro ampicilinovou rezistenci (β -laktamasa), pro možnou selekci v bakteriálních kulturách. Vektory pUG se používají pro přípravu delečních kazet. Při vhodném navrhnutí primerů jsme schopni nejen vložit selekční gen do genomu kvasinky *S. cerevisiae*, ale také později tento gen vyštěpit pomocí Cre rekombinasy. Cre rekombinasa specificky rozpoznává dvě Lox-P místa a pomocí rekombinace odstraní DNA vyskytující se právě mezi nimi (Gueldener *et al* 2002), Obr. 6.3.



Obr. 6.2: Schéma delece snoRNA molekul u kmene pJ69-4A. A) Znázorněna pozice snR70 v polycistronní jednotce na chromozomu 16 kvasinky *S. cerevisiae*. B) Zjednodušené znázornění delecí snR70, snR51 u nově vytvořených kmenů. Červeně jsou vyznačena Lox-P místa.



Obr. 6.3: Schéma vektorů použitých pro vytvoření delečních kazet pUG72 (vlevo), pUG73 (vpravo). Světle modré šipky představují deleční primery, jež jsou na svém 3'-konci homologní k pUG vektorům a jejich 5'-konec je sekvenčně shodný s chromozomálním úsekem, kde má být vložen vzniklý fragment. Selektivním genem je buď *URA3* (pUG72), nebo *LEU2* (pUG73), tmavě modrá. Dále DNA fragmenty obsahují dvě Lox-P místa pro případné vystřížení sekvence, jíž obklopují. Protože se jedná o kyvadlové vektory, nachází se zde ampicilinová rezistence, červeně.

6.1.2.1 Příprava pUG vektorů pro vytvoření delečních kazet

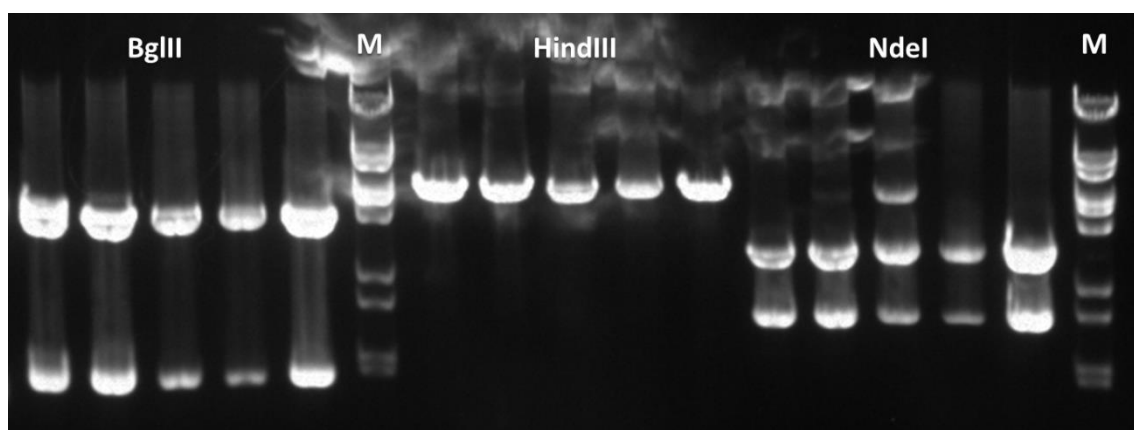
Obdržené vektory jsem nejprve elektroporací vnesla do *E. coli* XL1-Blue buněk. Od takto upravených buněčných kultur jsem otestovala několik monoklonií. Daný pUG vektor jsem pomocí PCR a pUG specifických primerů ověřila. Kolonie se správným vektorem jsem vybrala pro následující práci. Vybrané kolonie jsem přenesla do tekutého selektivního média a pomocí midipreparace plasmidové bakteriální DNA (kapitola 5.2.2.1.2) jsem připravila potřebné množství pUG vektoru pro následné zpracování. Kvalitu izolace jsem ověřila elektroforeticky.

Vektor pUG73 jsem ještě dále přečistila. Jako první jsem provedla restriční štěpení izolovaného vektoru restriční endonukleasou HindIII. Měla by vzniknout lineární DNA, protože HindIII ve vektoru pUG73 štěpí pouze jednou. Směs pro endonukleotické štěpení jsem nanesla na 0,5% agarosovou elektroforesu a velikostně odpovídající proužek na agarosovém gelu jsem vyřízla a vyizolovala DNA (5.2.2.1.5). Pomocí T4 DNA ligasy jsem lineární DNA spojila (5.2.2.5.2) a elektroporací vnesla do bakterií *E. coli* XL1-Blue

(5.2.2.6.1). Z narostlých monokloniích jsem metodou minipreparace bakteriální plasmidové DNA vyizolovala vektor (5.2.2.1.1). Poslední krok ověření vektoru jsem provedla pomocí restriční štěpení enzymy BglIII, HindIII a NdeI (Tab. 6.1, Obr. 6.4). Vybrala jsem vhodné monoklonie a vyizolovala plasmidovou DNA midipreparační metodou.

Restriční endonukleasa	Počet štěpících míst	Předpokládané velikosti fragmentů [bp]
BglIII	2	1192, 3632
HindIII	1	4824
NdeI	2	1857, 2967

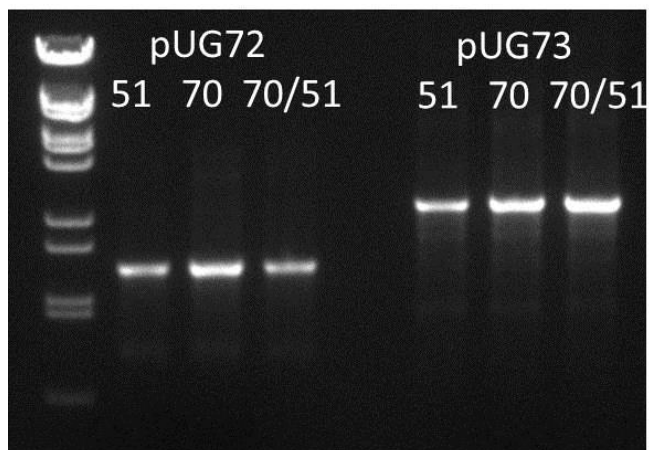
Tab. 6.1: Velikost fragmentů pUG73 vektoru vzniklá po působení konkrétních endonukleotických enzymů.



Obr. 6.4: Elektroforetické dělení fragmentů DNA vzniklých endonukleotickým štěpením plasmidové DNA pUG73 vyizolované z pěti monoklonií (1-5). Všechna pět plasmidů bylo štěpeno enzymy BglIII, HindIII a NdeI. Očekávané velikosti fragmentů naštěpených plasmidů byly pro BglIII 1192, 3632; HindIII 4824; NdeI 1857, 2967. M - použitý marker Lambda DNA/Eco91I (Fermentas).

6.1.2.2 Vytvoření delečních kazet

Získané vektory pUG72 a pUG73 jsem naředila v TE pufru (pUG72 300x a pUG73 30x). Naředěné vektory jsem použila jako templát pro PCR reakci. Použitá kombinace primerů a PCR program jsou uvedeny v kapitole metody 5.2.2.4.2. Poté jsem deleční kazety nanasla na 0,5% agarosovou elektroforesu a velikostně odpovídající proužek jsem z gelu vyizolovala (kapitola 5.2.2.1.5). Výsledek byl elektroforeticky ověřen (Obr. 6.5). Pro každou deleční transformaci byly deleční kazety nově připraveny.



Obr. 6.5: PCR vytvořené a přečištěné deleční kazety použité k vytvoření delečních kmenů pJ69-4A Δ 70L/U (70), pJ69-4A Δ 51L/U (51), pJ69-4A Δ 70,51L/U (70/51). Velikosti vzniklých fragmentů pro pUG72: 51 – 1725 bp, 70 – 1727 bp, 70/51 – 1725, pro pUG73: 51 – 2561 bp, 70 – 2563 bp, 70/51 – 2561 bp. Použitý molekulový standard Lambda DNA/Eco91I (Fermentas).

6.1.3 Genetická modifikace laboratorního kmene pJ69-4A

Pro delecí genů v kvasince *S. cerevisiae* jsme se rozhodli využít homologní rekombinace. Následně bychom chtěli vložený selekční gen vyštěpit pomocí Cre rekombinasy.

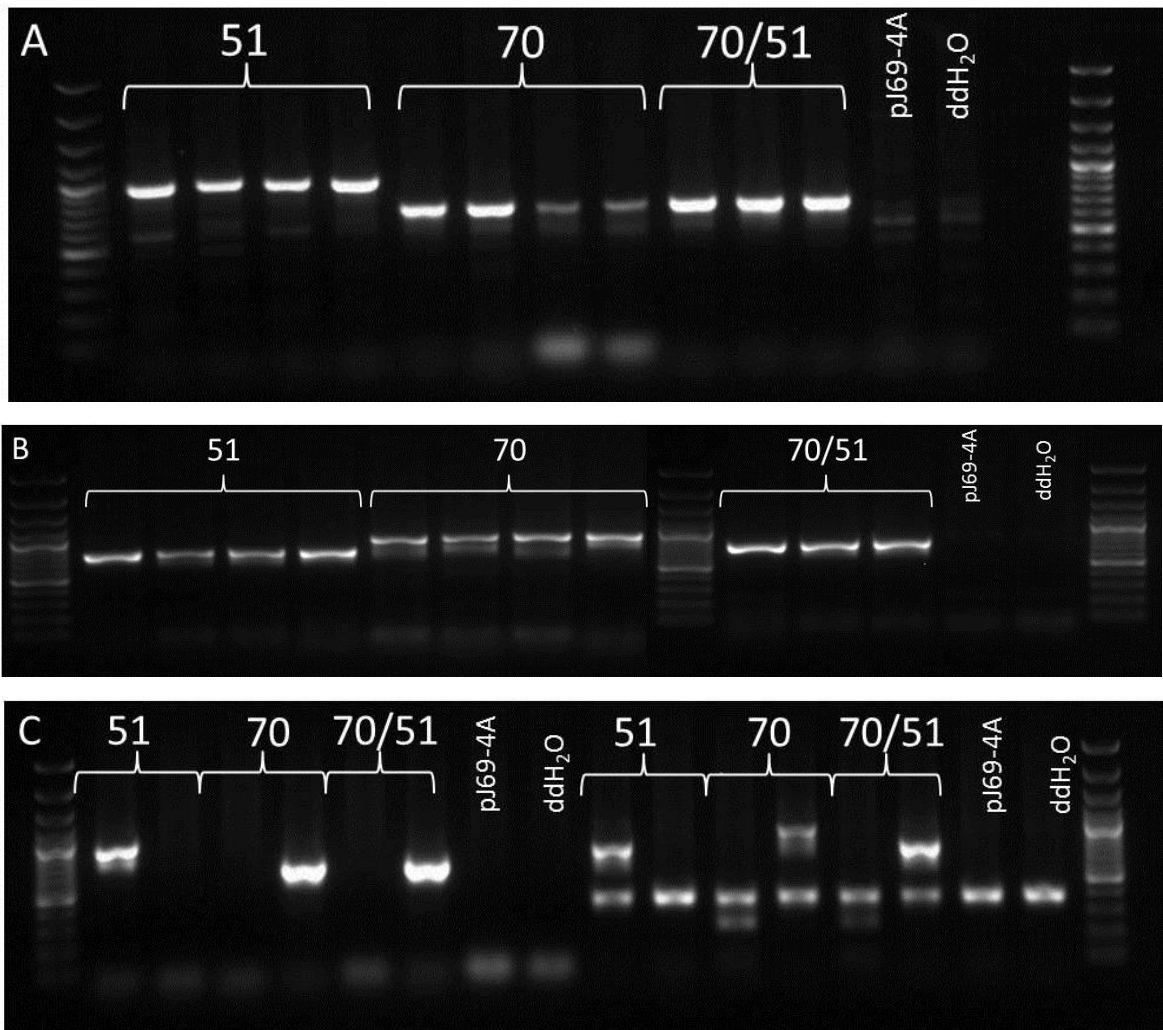
6.1.3.1 Transformace pJ69-4A

Vytvořené deleční kazety, neboli lineární dvouřetězcovou DNA obsahující selekční gen, dvě Lox-P místa a na koncích kazety homologní úseky k chromozomální DNA, jsem pomocí transformačních metod vnesla do kvasinkového kmene pJ69-4A. Nejprve bylo nutné najít transformační metodu, která bude mít dostatečnou účinnost. Po několika neúspěšných pokusech se mi podařilo získat transformované kolonie. Použitá transformační metoda byla vysokovýběžková transformace kvasinkových buněk pomocí LiAc, kapitola 5.2.2.6.3.

6.1.3.2 Ověření správné rekombinace

Od každého typu kmenů narostlých po transformaci jsem vybrala po pěti monokloniích, vyizolovala z nich chromozomální DNA, kapitola 5.2.2.1.3, a pomocí PCR jsem ověřila úspěšnost vložení fragmentu do kvasinkového genomu, kapitola 5.2.2.4.2. Ověření bylo navrženo tak, že jeden z dvojice primerů (test_70/51_F nebo test_70/51_R) nasedá do genomu kousek od modifikované oblasti a druhý primer (leu_B, leu_C, ura_B, ura_C) nasedá na sekvenci pocházející z vloženého fragmentu. Toto ověření jsem provedla pro oba konce vloženého fragmentu. Primery sekvenčně homologické k chromozomální části DNA jsem navrhla tak, abych je mohla použít pro všechny kmény a

zároveň abych byla schopna různé deleční kmene od sebe odlišit (Obr. 6.6). Sekvence Leu a Ura primerů byla převzata z Güldener (2002).



Obr. 6.6: Vizualizace kontrolního PCR. A) Kontrolní PCR produkty po použití primerů test_70,51_R a leu_C. Velikosti produktů u kmene pJ69-4A Δ 51L (51) je 962 bp, pJ69-4A Δ 70L (70) je 718 bp, pJ69-4A Δ 70,51L (70/51) je 718 bp. B) Kontrolní PCR produkty po použití primerů test_70,51_F a leu_B. Velikosti produktů u kmene pJ69-4A Δ 51L (51) je 744 bp, pJ69-4A Δ 70L (70) je 935 bp, pJ69-4A Δ 70,51L (70/51) je 744 bp. C) Kontrolní PCR po použití primerů test_70,51_R a ura_B (vlevo). Velikosti produktů u kmene pJ69-4A Δ 51U (51) je 873 bp, pJ69-4A Δ 70U (70) je 629 bp, pJ69-4A Δ 70,51U (70/51) je 629 bp. Kontrolní PCR po použití primerů test_70,51_F a ura_C (vpravo). Velikosti produktů u kmene pJ69-4A Δ 51U (51) je 776 bp, pJ69-4A Δ 70U (70) je 967 bp, pJ69-4A Δ 70,51U (70/51) je 776 bp. Jako kontroly byly použity templáty chromozomální DNA vyizolované z kvasinkového kmene pJ69-4A. Jako druhá kontrola byla použita bez templátová PCR reakce.

Celkově jsem získala deleční kmeny:

pJ69-4A Δ 70L: pJ69-4A *snr70::LEU2*

pJ69-4A Δ 70U: pJ69-4A *snr70::URA3*

pJ69-4A Δ 51L: pJ69-4A *snr51::LEU2*

pJ69-4A Δ 51U: pJ69-4A *snr51::URA3*

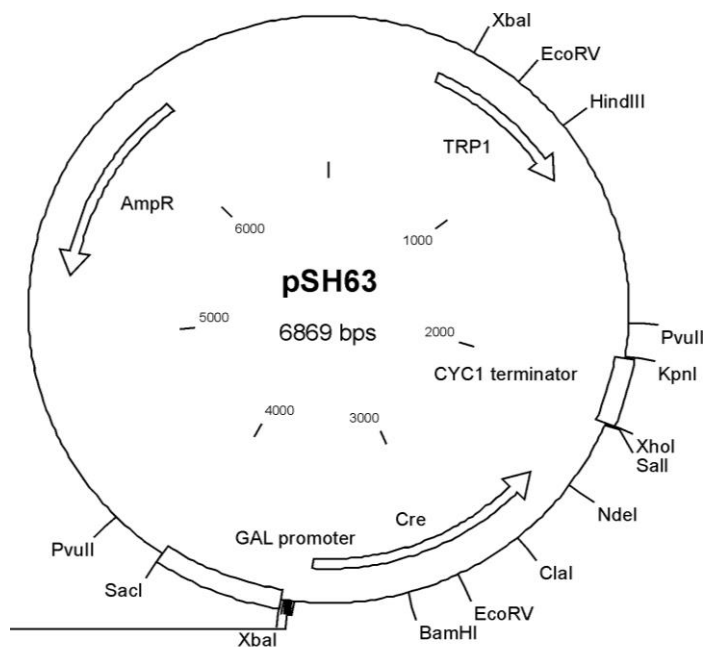
pJ69-4A Δ 70,51L: pJ69-4A (*snr70, snr51*):*LEU2*

pJ69-4A Δ 70,51U: pJ69-4A (*snr70, snr51*):*URA3*

Dále jsem pracovala pouze s kmeny obsahujícími vložený *LEU2* gen, protože od kvasinkových kmenů s vloženým *URA3* genem se mi nepodařilo získat dostatečné množství klonů.

6.1.3.3 *Finální úpravy nově vzniklých kmenů*

Z ověřených kmenů jsme se společně se školitelem rozhodli odstranit vloženou DNA sekvenci za použití Cre rekombinasy, která rozpoznává Lox-P místa. Nejprve jsem tedy do delečních kmenů vnesla vektor pSH63 (Obr. 6.7) kódující Cre rekombinásu, jejíž transkripce je závislá na přítomnosti galaktosy v médiu. Vnášení pSH63 vektoru proběhlo podle návodu z kapitoly 5.2.2.6.2. Poté jsem dvě vybrané monokolonie přenesla do tekutého selekčního média obsahujícího galaktosu jako zdroj uhlíku a energie (-T gal). Tímto krokem jsem aktivovala expresi Cre rekombinasy, viz kapitola 5.2.1.6. Poté jsem buňky nanasla na agarové plotny (-T) v několika množstvích a získané monokolonie jsem sterilním párátkem přenesla na agarové plotny (-T a -TL). Vybrala jsem a dále zpracovávala kolonie, které byly schopné růst pouze na -T Petriho miskách. Důvodem této negativní selekce bylo, že jsem chtěla získat kvasinkové kmeny, u kterých došlo k vyštěpení vloženého genu. Dalším krokem bylo zbavení se vloženého pSH63 vektoru, jež jsem provedla podle návodu z kapitoly 5.2.1.7. Tentokrát negativní selekce proběhla na agarových plotnách -T a SD^+ . Z takto získaných kmenů jsem vyizolovala chromozomální DNA, viz kapitola 5.2.2.1.4, a provedla PCR reakci pro ověření vystřížení vloženého genu. Pro tento účel jsem použila dvojici primerů test_70,51_F a test_70,51_R. Očekávanou velikost fragmentů jsem uvedla v tabulce, Tab. 6.2.



Obr. 6.7: Schéma vektoru pSH63 obsahující gen pro Cre rekombinasi. Kromě *Cre* genu, vektor pSH63 obsahuje gen *TRP1* pro selekci v kvasinkových buňkách a *AmpR* pro selekci v bakteriálních buňkách.

Deleční kmen	Předpokládaná velikost produktu [bp]
$\Delta 70$	963
$\Delta 51$	971
$\Delta 70,51$	727

Tab. 6.2: Velikost lineární DNA vzniklá PCR reakcí. Jako templát PCR reakce byly použity kvasinkové kmeny pJ69-4A $\Delta 70$ ($\Delta 70$), pJ69-4A $\Delta 51$ ($\Delta 51$), pJ69-4A $\Delta 70,51$ ($\Delta 70/51$) s vyštěpenou selekční kazetou.

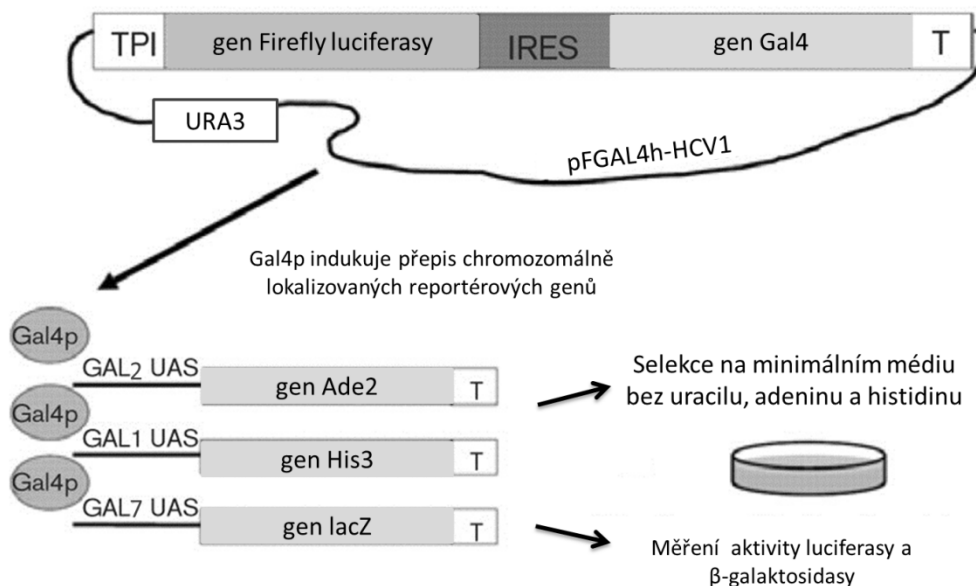
Pro zjednodušení dále uvádím pJ69-4A $\Delta 70$ jako $\Delta 70$, pJ69-4A $\Delta 51$ jako $\Delta 51$ a pJ69-4A $\Delta 70,51$ jako $\Delta 70/51$.

6.2 Analytické vektory pFGAL4h-HCV

Vytvořené deleční kvasinkové kmeny $\Delta 70$, $\Delta 51$, $\Delta 70/51$ a kontrolní kvasinkový kmen pJ69-4A jsem dále upravila, abych mohla testovat vliv modifikací na iniciaci translace. Prakticky se jednalo o vnesení analytických vektorů odvozených od vektoru pFGAL4h (pFGAL4h-X).

6.2.1 Testovací systém pFGAL4h-HCV

Pro sledování funkčnosti IRES struktury viru Hepetitidy typu C byly Tomášem Maškem (2002) navrženy pFGAL4h-X vektory. Vektory pFGAL4h-X jsou kyvadlové. Pro replikaci v bakterii *E. coli* mají vektory pFGAL4h *ori* sekvenci a pro selekci buněk nesoucích vektor obsahují gen pro ampicilinovou rezistenci (amp^r). Pro udržení se v kvasinkových buňkách *S. cerevisiae* obsahují vektory pFGAL4h-X 2μ sekvenci a pro selekci buněk je jejich součástí *URA3* gen. V kvasinkových buňkách *S. cerevisiae* dochází k přepisu bicistronní mRNA kódované vektory pFGAL4h-X. Překlad prvního cistronu, světluškové luciferasy, je závislý na čepičce. Iniciace translace druhého cistronu, proteinu Gal4, je řízená IRES elementem HCV. Přítomnost proteinu Gal4 můžeme pozorovat jako změnu fenotypu pJ69-4A buněk z His^- a Ade^- na His^+ a Ade^+ , nebo měřením aktivity β -galaktosidasy (Obr. 6.8).



Obr. 6.8: Schéma fungování testovacího systému. Vnesení vektorů pFGAL4h-X do kvasinkového kmene pJ69-4A mění jeho fenotyp z Ura^- na Ura^+ . Po překladu Gal4p, který indukuje transkripci chromozomálně lokalizovaných genů, se mění fenotyp kvasinkových kmenů na Ade^+ a His^+ . Upraveno podle (Masek *et al* 2007).

Pro tuto diplomovou práci bylo vybráno několik vektorů typu pFGAL4h-X z knihovny vektorů IRESite <http://www.iresite.org/> (Mokrejs *et al* 2010), viz Tab. 6.3.

Název	Vlastnosti	Zkrácené označení
pFGAL4 ^{A/UUG} _h	Bodová mutace (A→U) v prvním kodónu <i>GAL4</i> neobsahující HCV IRES strukturu	24
pFGAL4 ^{A/UUG} _h -HCV1	Bodová mutace (A→U) v prvním kodónu <i>GAL4</i>	48
pFGAL4 ^{A/UUG} _h -HCV1 ^{A/UUG}	Bodová mutace (A→U) v prvním kodónu <i>GAL4</i> a <i>HCV core proteinu</i>	73
pFGAL4h-HCV1	Vektor obsahující nezměněné IRES	HCV1
pFGAL4h-HCV1 ^{Δ1-15AA}	Narušení domény IV IRES elementu	12
pFGAL4h-HCV1 ^{ACCAUG/AUGACC}	Posun pozice AUG <i>HCV core proteinu</i>	SW27
pFGAL4h-HCV1 ^{A/UUG}	Bodová mutace (A→U) v prvním kodónu <i>HCV core proteinu</i>	50
pFGAL4h-HCV3	Posun ve čtecím rámci (+1) <i>HCV core proteinu</i>	HCV3
pFGAL4h-L270-HCV1	Před HCV IRES strukturou vložený 270 nt dlouhý inzert z bakteriofága λ	14
pFGAL4-L270	Před <i>Gal4</i> vložen 270 nt dlouhý inzert z bakteriofága λ	L270

Tab. 6.3: Shrnutí všech použitých pFGAL4h-X vektorů.

6.2.2 Izolace vektorů a jejich transformace do referenčních kmenů

Obdržené pFGAL4h-X vektory jsem elektroporací (kapitola 5.2.2.6.1) vnesla do buněk *E. coli* XL1-Blue. Metodou midipreparace vektorů (kapitola 5.2.2.1.2) jsem vyzolovala plasmid v potřebném množství. Vektory pFGAL4h-X jsem vnesla do testovaných kmenů pJ69-4A, Δ70, Δ51, Δ70,51 (kapitola 5.2.2.6.2).

6.3 Analýza referenčních kmenů obsahující vektory pFGAL4h-X

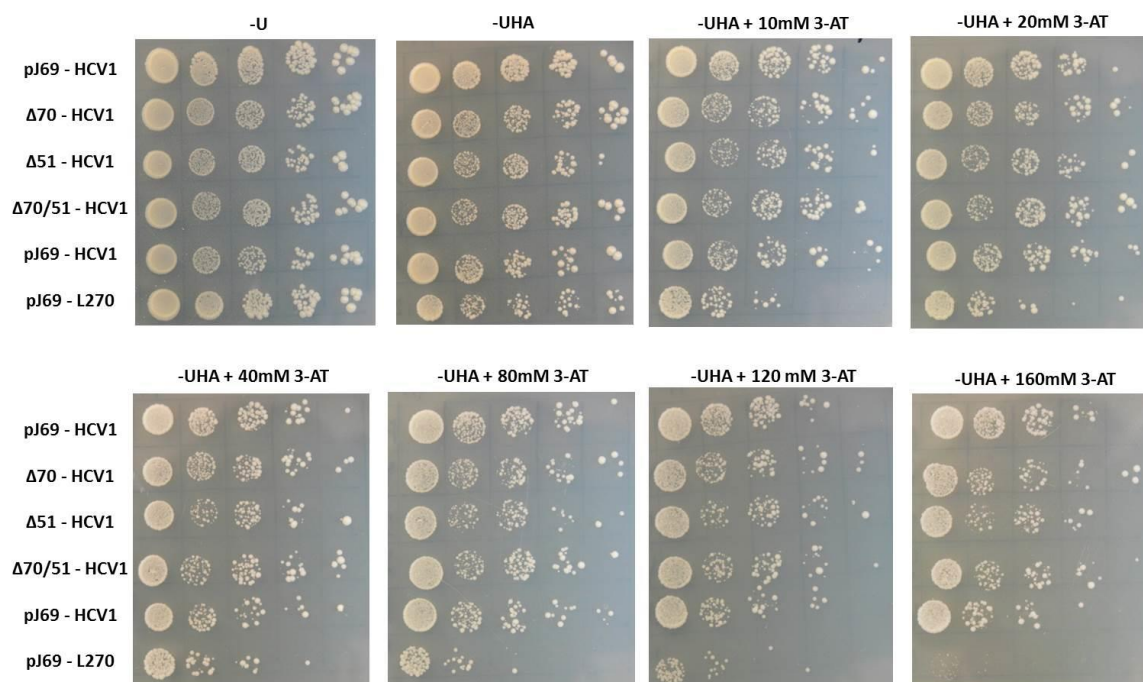
Spojením kmenů pJ69-4A a vektorů pFGAL4h-X je možné sledovat efektivnost translace závislé na IRES elementu. Testovat iniciaci translace v kmenech pJ69-4A

s pFGAL4h-X vektory je možné buď sledováním změn auxotrofních požadavků, nebo měřením změn aktivit β -galaktosidasy.

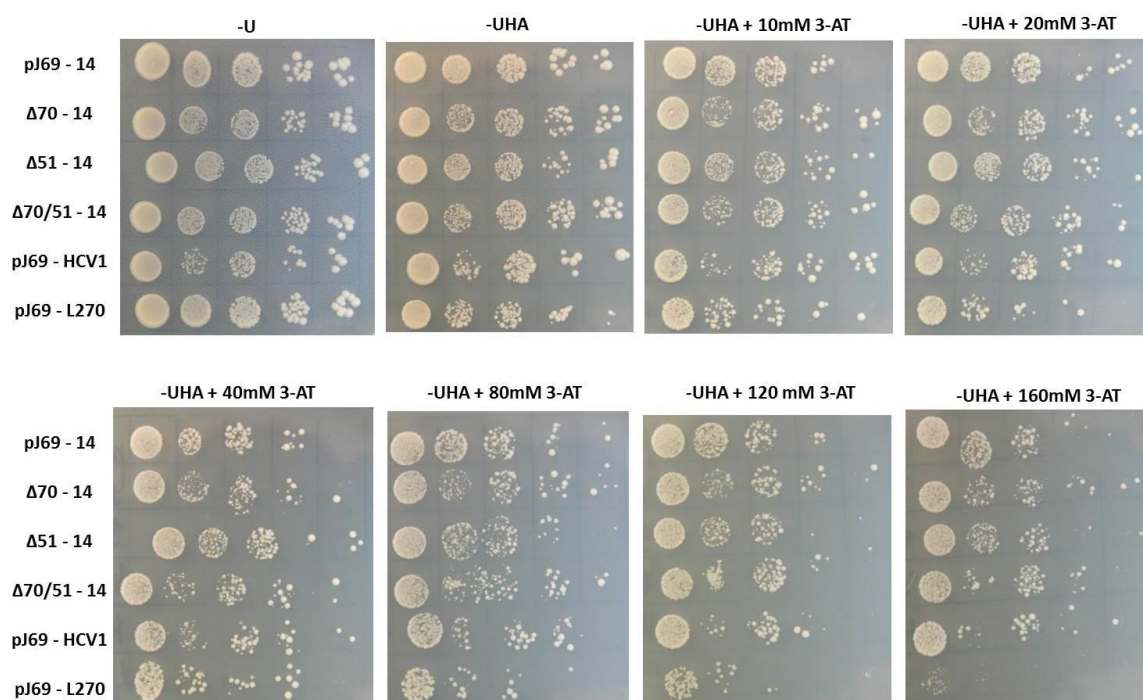
6.3.1 Testování auxotrofních požadavků referenčních kmenů

Analýzou auxotrofních požadavků u testovaných kmenů, tedy pJ69-4A, $\Delta 70$, $\Delta 51$, $\Delta 70,51$ s vektory pFGAL4h-X, jsem provedla pomocí kapkového testu, viz 5.2.1.5.2. Jako selekční agarové misky byly použity Petriho misky obsahující minimální agarové médium bez uracilu (-U), minimální agarové médium bez uracilu, histidinu a adeninu (-UHA), minimální agarové médium bez uracilu, histidinu, adeninu s přidavkem různých koncentracích 3-aminotriazolu (-UHA + 3-AT). Agarové misky -U jsem použila pro ověření naneseného množství buněk tak, aby bylo možné na následujících selekčních miskách porovnávat jednotlivé testované kmeny. Následující fotografie (Obr. 6.9 – 6.18) dokumentují výsledky testování auxotrofních požadavků testovaných kmenů obsahujících různé vektory pFGAL4h-X. Na jednotlivé misky jsem vždy nanasla konkrétní testované kmeny pJ69-4A, $\Delta 70$, $\Delta 51$, $\Delta 70,51$ obsahující jeden typ vektoru pFGAL4h-X a pJ69-4A obsahující pFGAL4h-HCV1 a pJ69-4A obsahující vektor pFGAL4-L270. Kvasinkový kmen pJ69-4A obsahující vektor pFGAL4h-HCV1 byl použit jako pozitivní kontrola a kmen pJ69-4A obsahující vektor pFGAL4-L270 byl použit jako kontrola minimální exprese. Kontroly byly vybrány na základě práce (Masek *et al* 2007). Testované kmeny obsahující vektory HCV1, 14, 24, 48, SW27 jsem testovala na selekčních miskách -UHA, -UHA + 10 mM 3-AT, -UHA + 20 mM 3-AT, -UHA + 40 mM 3-AT, -UHA + 80 mM 3-AT, -UHA + 120 mM 3-AT a -UHA + 160 mM 3-AT. Testované kmeny obsahující vektory HCV3, 12 a 50 jsem testovala na selekčních miskách -UHA, -UHA + 1 mM 3-AT, -UHA + 5 mM 3-AT, -UHA + 10 mM 3-AT, -UHA + 20 mM 3-AT, -UHA + 40 mM 3-AT, -UHA + 80 mM 3-AT. Rozhodující pro navržení použitých selekčních podmínek byla předchozí práce Maška a kolektivu (2007). Testované kmeny obsahující vektor 73 jsem nejprve testovala na selekčních miskách jako kvasinkové kmeny s vektory HCV3, 12 a 50. První testování kmenů s vektorem 73 se ukázalo, že i tyto selekční podmínky jsou pro testované kmeny s vektorem 73 příliš náročné. Rozhodli jsme se tedy testované kmeny s vektorem 73 analyzovat na Petriho miskách obsahujících agarová média -U, -UA, -UH, -UHA, -UH + 1 mM 3-AT, -UH + 5 mM 3-AT, -UHA + 1 mM 3-AT, -UHA + 5 mM 3-AT. Na následujících tabulích jsou předloženy vzorové výsledky

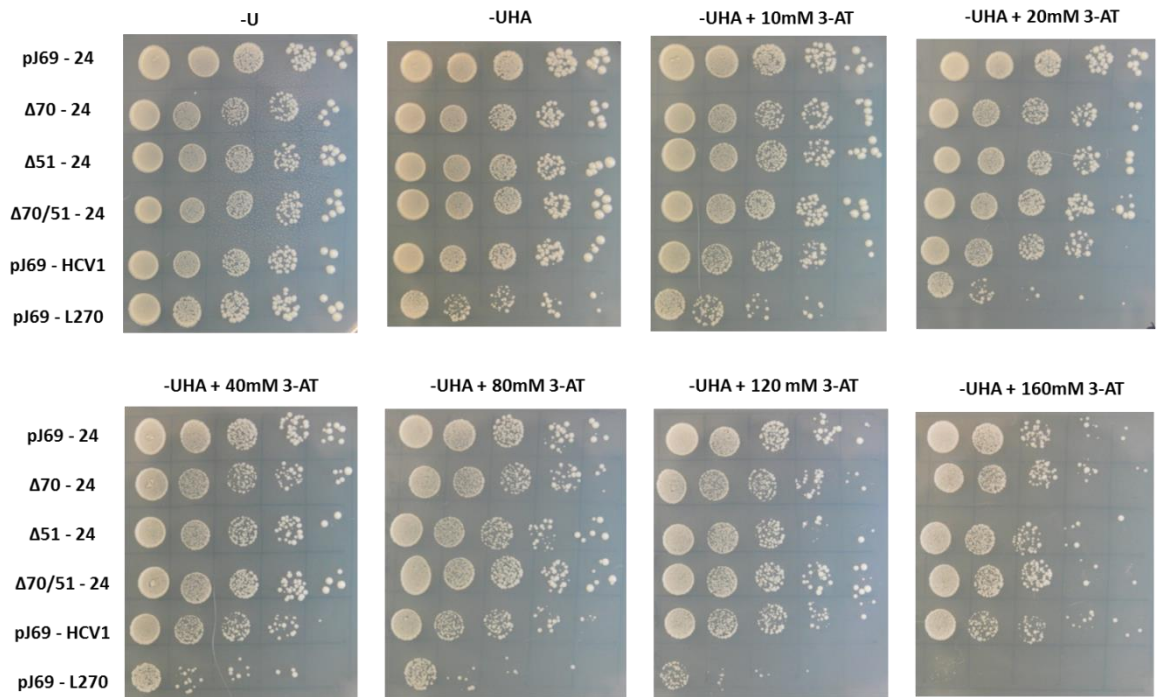
testovaných kmenů obsahujících pFGAL4h-X vektory. Počet opakování jednotlivých experimentů je uveden u každé tabule.



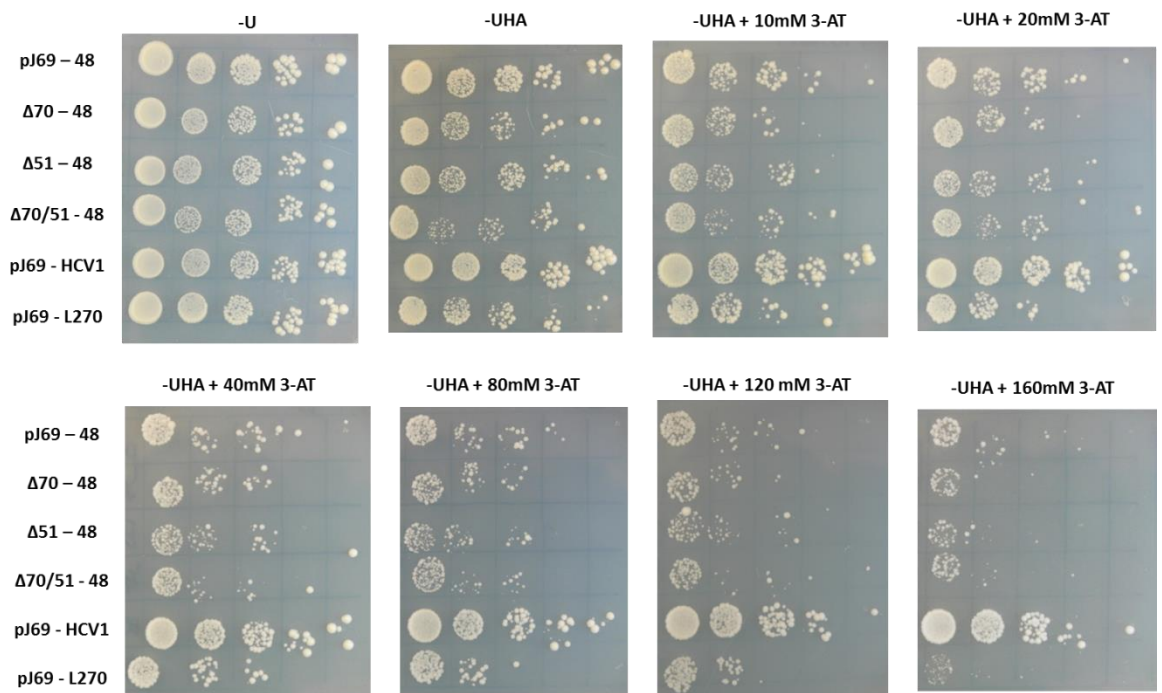
Obr. 6.9: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor HCV1. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 11. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.



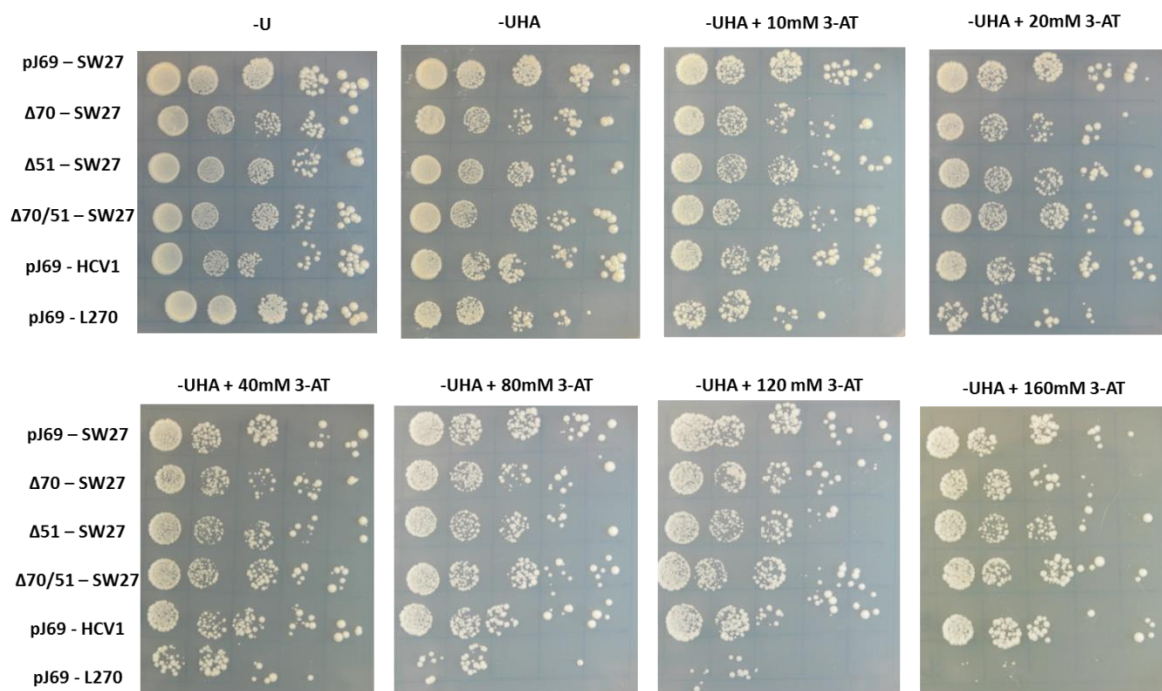
Obr. 6.10: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 14. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 10. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.



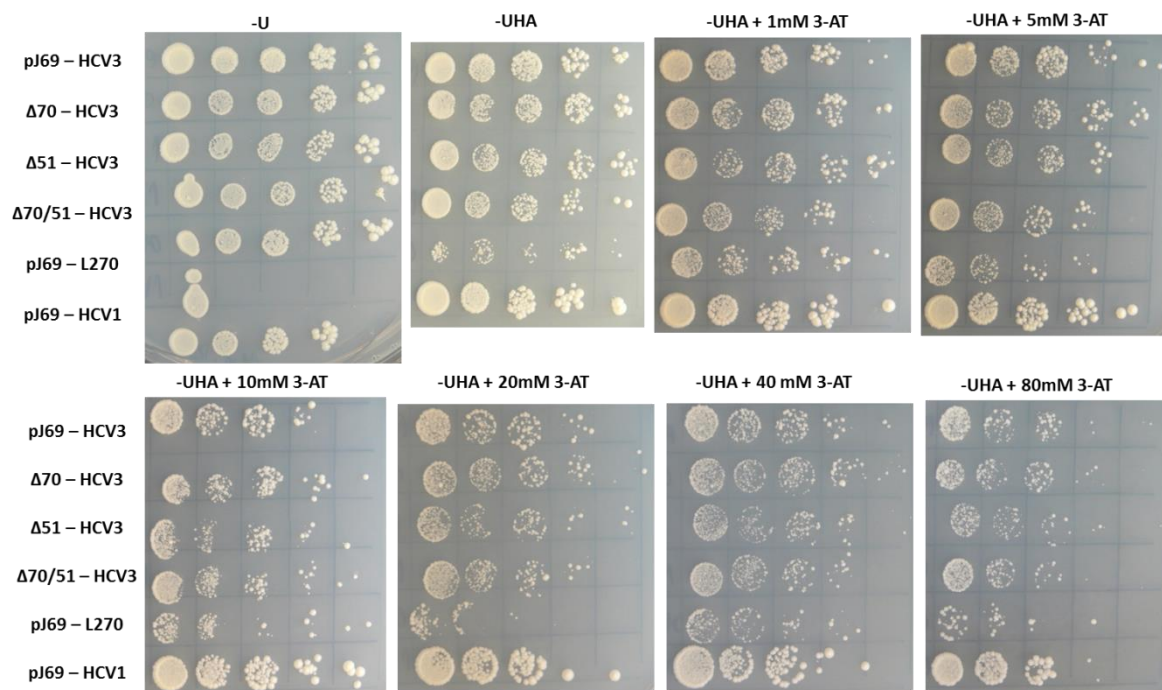
Obr. 6.11: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 24. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 9. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.



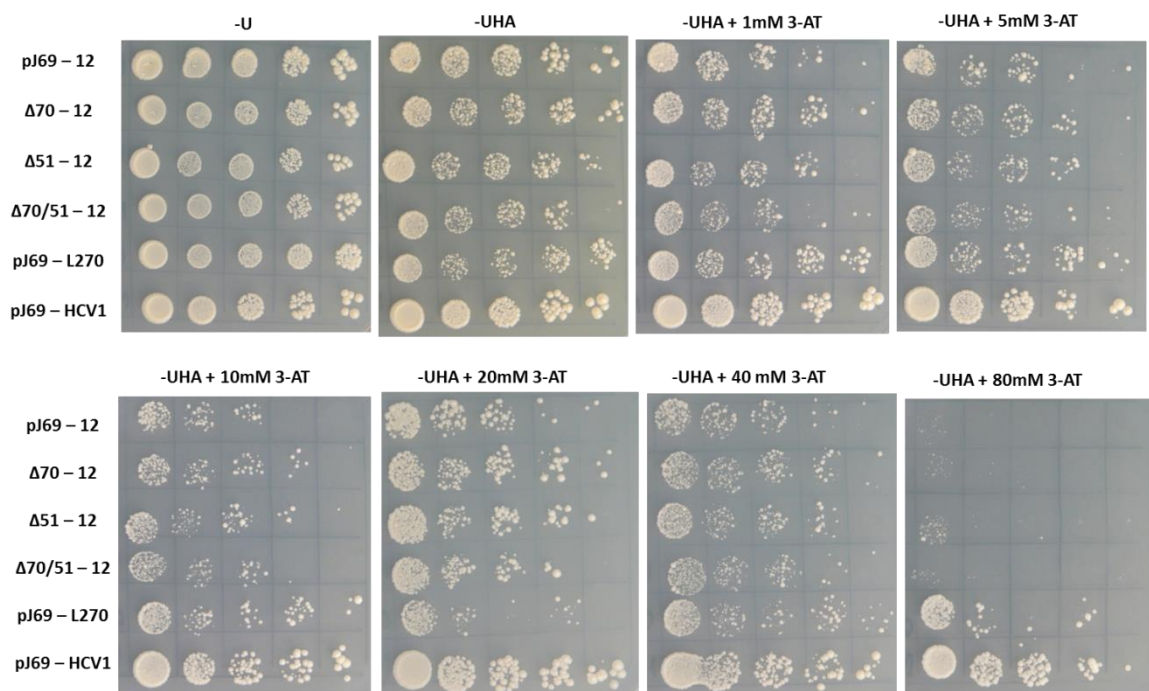
Obr. 6.12: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 48. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 14. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.



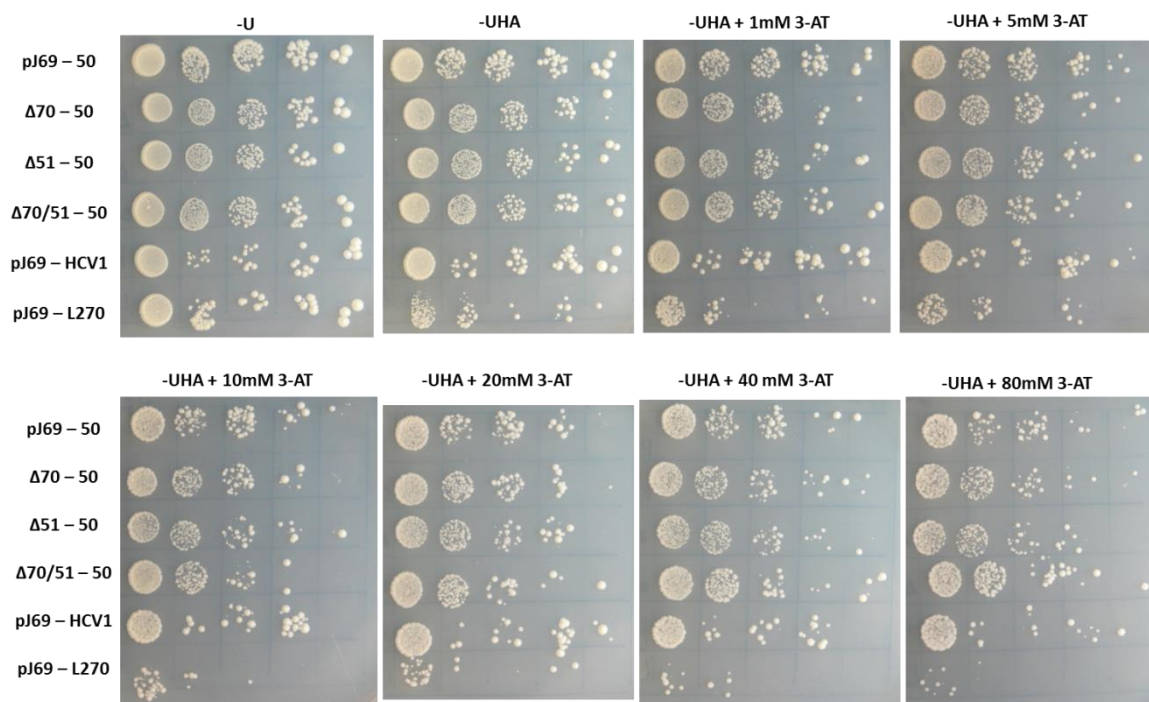
Obr. 6.13: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor SW27. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 15. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.



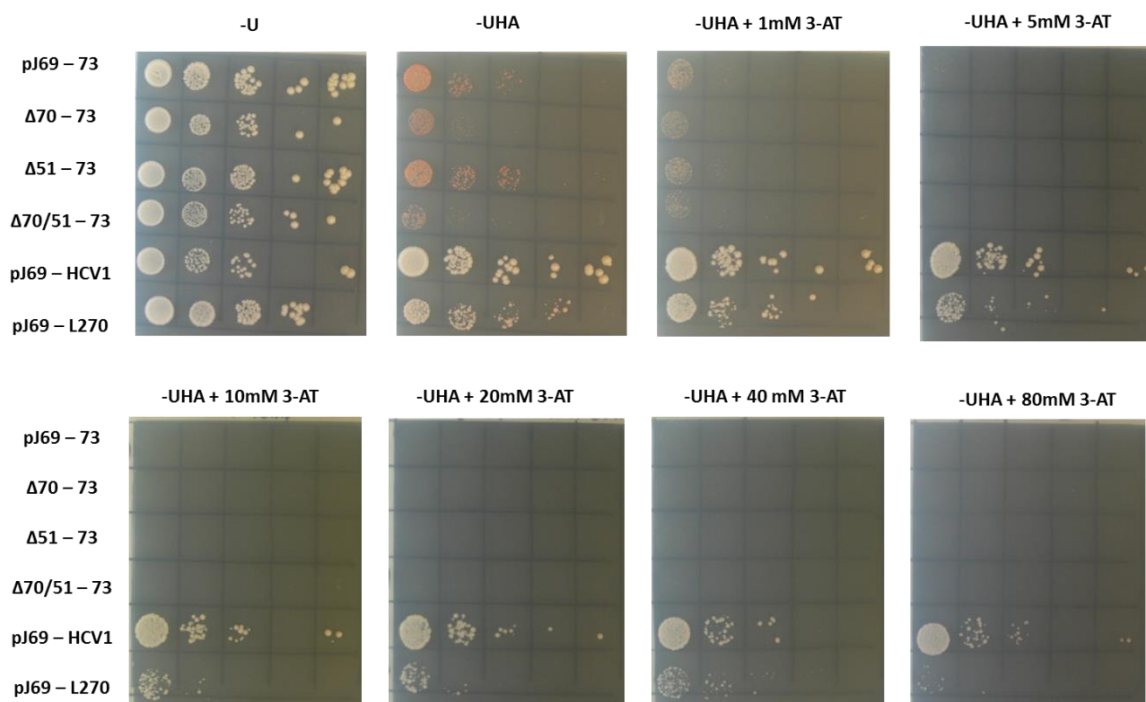
Obr. 6.14: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor HCV3. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 12. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.



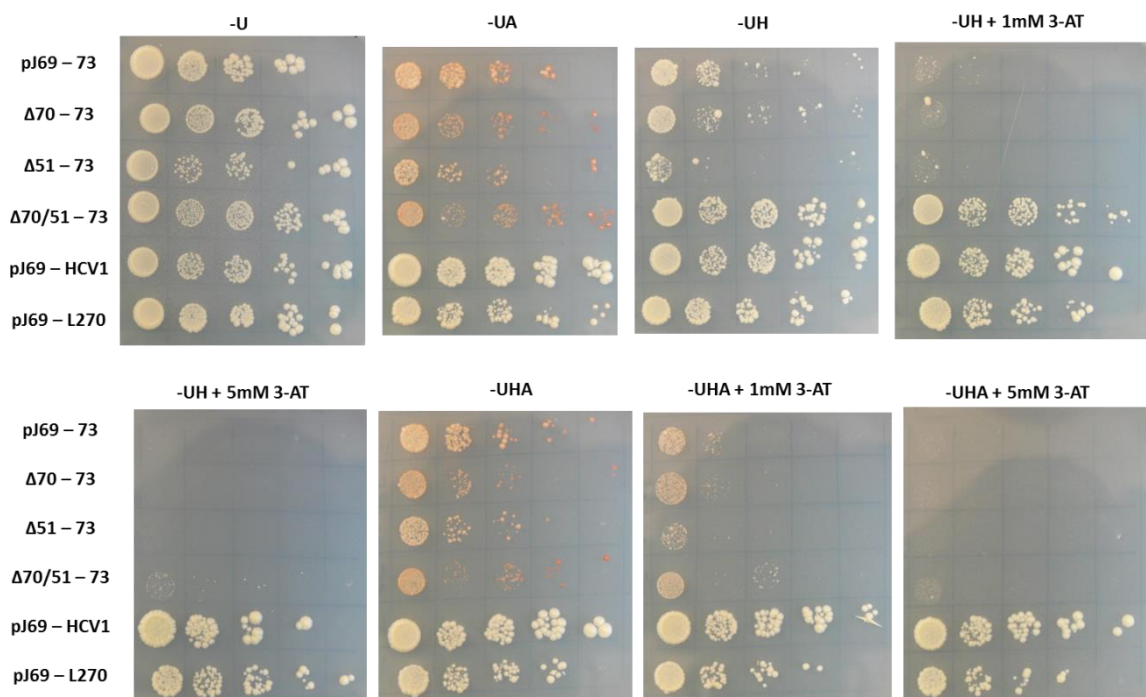
Obr. 6.15: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 12. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 12. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.



Obr. 6.16: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 50. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 10. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.

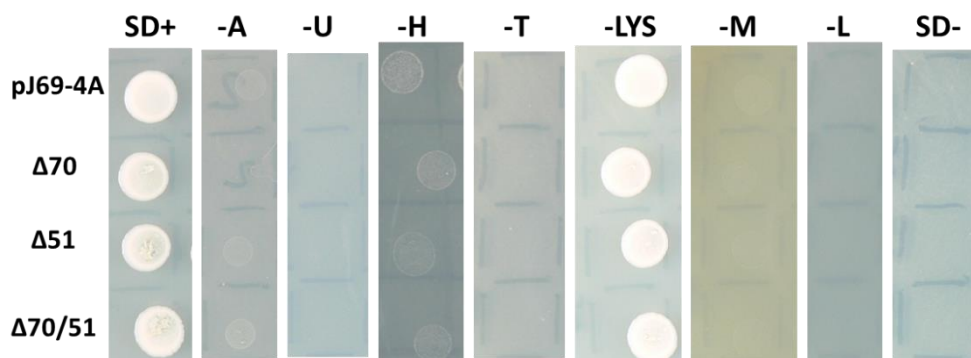


Obr. 6.17: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 15. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Tato analýza byla provedena pouze jednou, poté byla navržena nová sada selekčních misek.

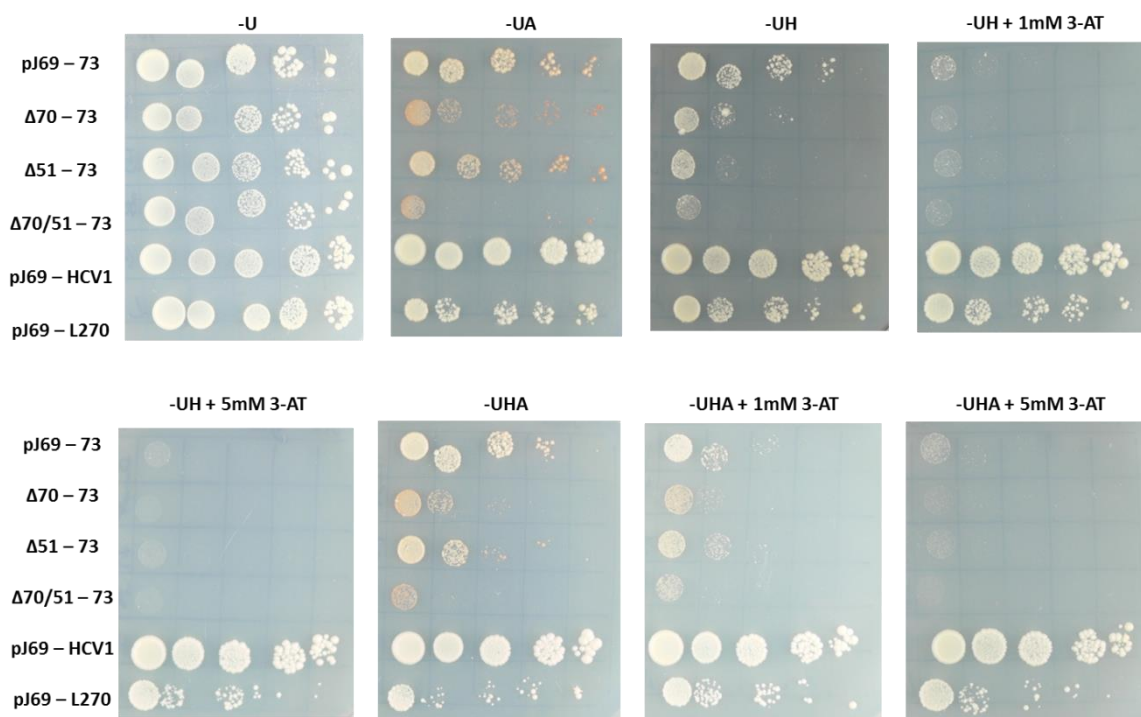


Obr. 6.18: Kapkový test kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73; nový typ agarových misek. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 17. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.

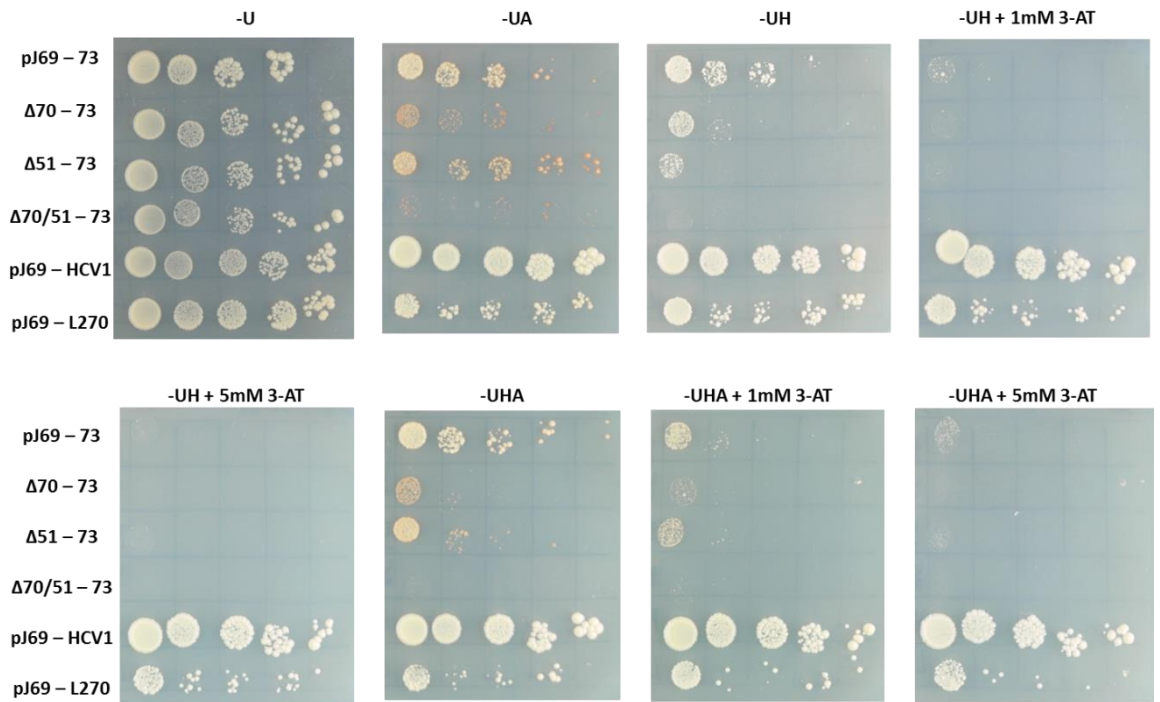
Rozhodli jsme se potvrdit kapkový test s testovanými kmeny obsahující vektor 73. Testované kmeny jsem nejprve podrobila auxotrofnímu testu pro potvrzení genotypu (Obr. 6.19). Následně jsem do ověřených testovaných kmenů vnesla vektor 73, viz kapitola 5.2.2.6.3. Z narostlých monoklonií jsem vybrala čtyři, které jsem podrobila kapkovému testu, viz kapitola 5.2.1.5.2. Pro ověření výsledků jsem použila stejné typy misek jako v předchozí analýze testovaných kmenů s vektorem 73 (Obr. 6.20a – 6.20d).



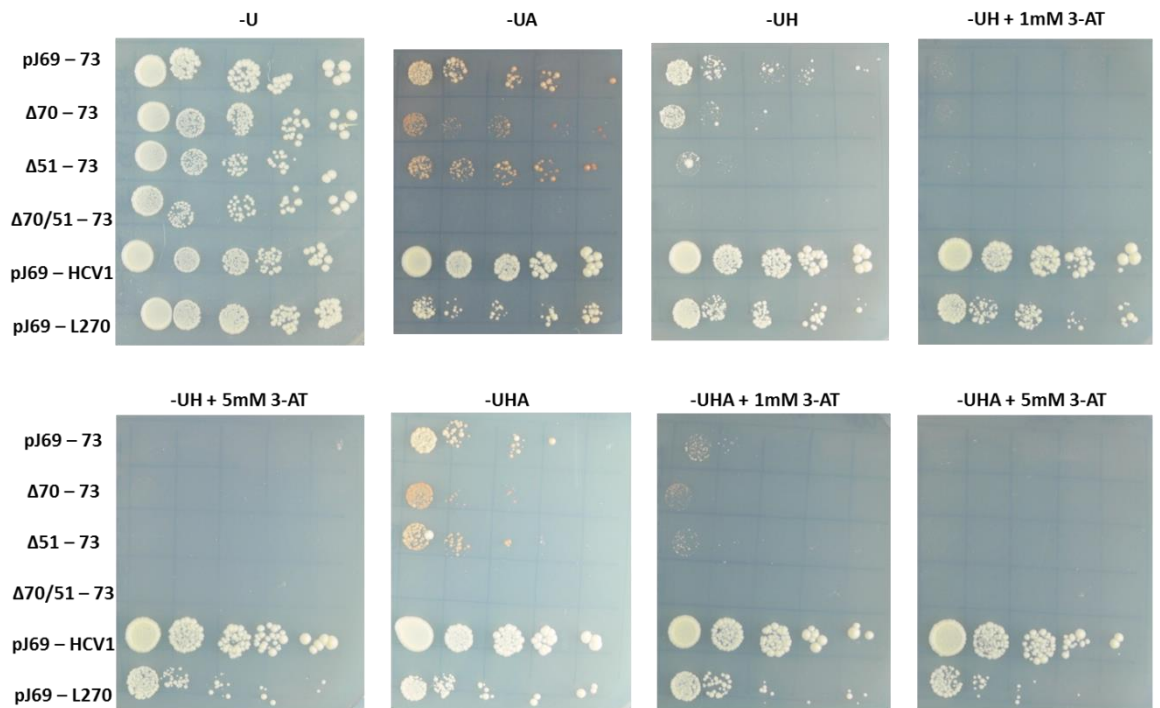
Obr. 6.19: Auxotrofní ověření testovaných kmenů. Petriho misky byly foceny 6. den po nakapání. Růst testovaných kmenů (pJ69-4A, Δ70, Δ51, Δ70/51) na různých minimálních médiích (nad sloupci) odpovídá předpokládanému fenotypu.



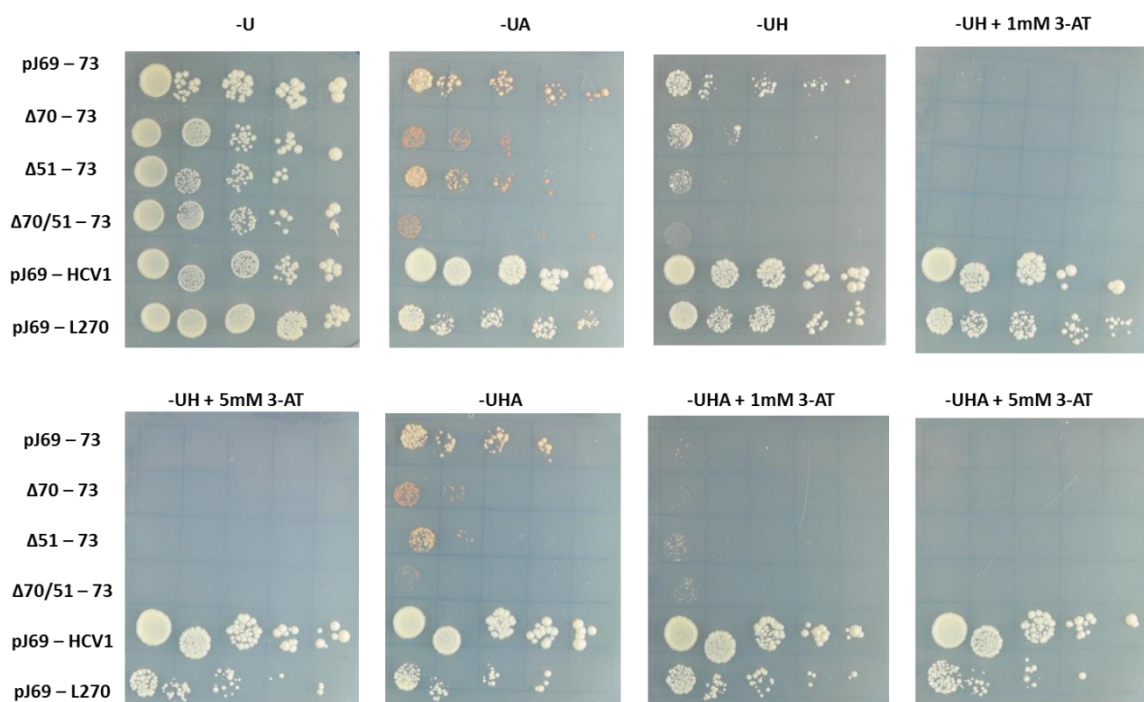
Obr. 6.20a: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73 nový typ agarových misek, nově připravené kmeny. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 12. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií.



Obr. 6.20b: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73 nový typ agarových misek, nově připravené kmeny. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 12. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií.



Obr. 6.20c: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73 nový typ agarových misek, nově připravené kmeny. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 12. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií.

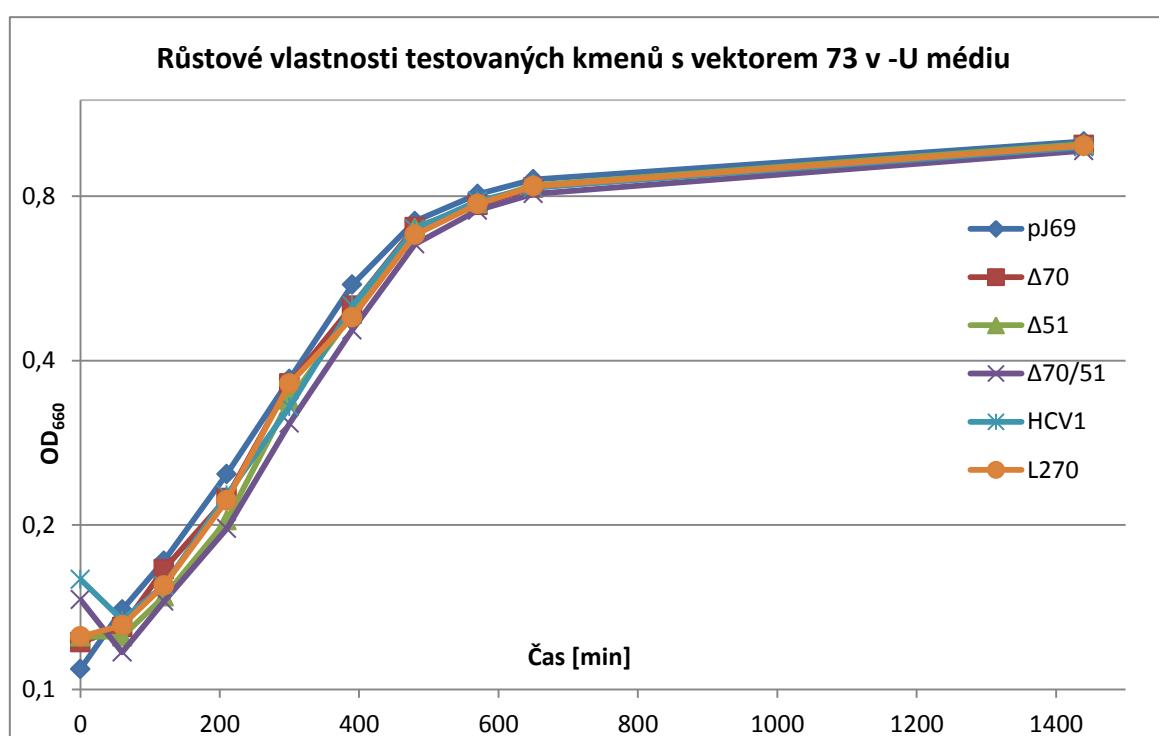


Obr. 6.20d: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73 nový typ agarových misek, nově připravené kmeny. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 12. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií.

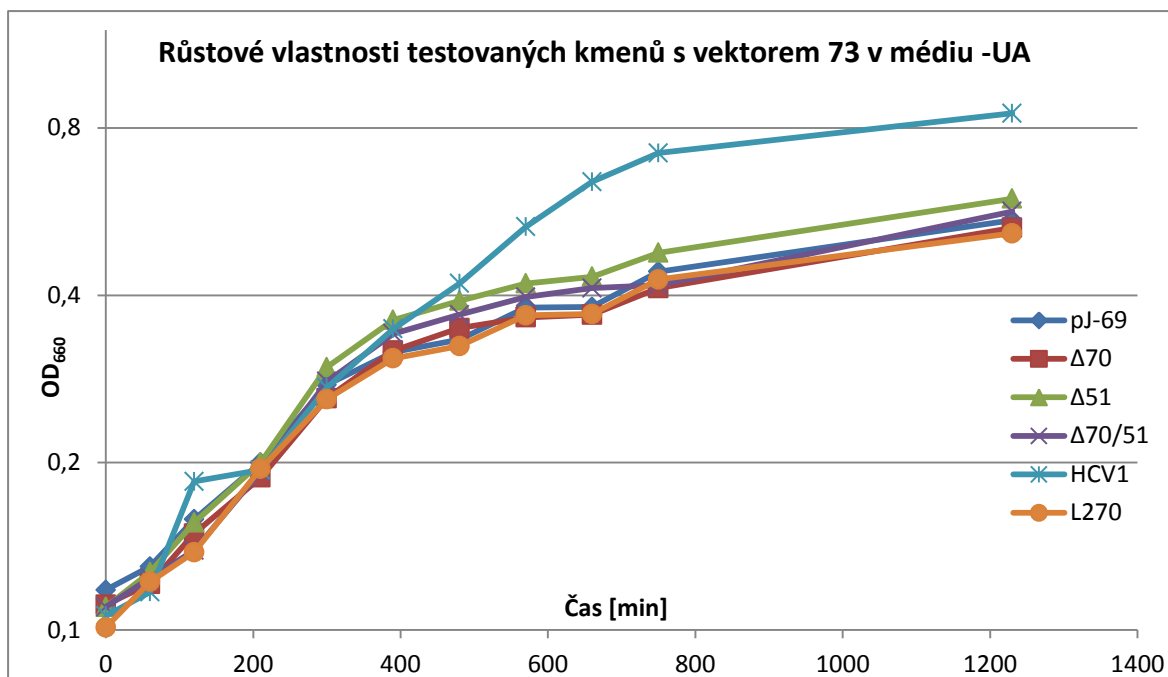
Jak je vidět na některých panelech, ve vyšších koncentracích 3-AT deleční kmen $\Delta 70$ roste lépe než původní kmen pJ69-4A se stejným vektorem. Tento fenotyp platí pro testované kmeny s vektory HCV1 (Obr. 6.9), 14 (Obr. 6.10), HCV3 (Obr. 6.14) a 12 (Obr. 6.15). Rozdílný fenotyp mezi jednotlivými testovanými kmeny je vidět u vektoru 73, kdy deleční kmen $\Delta 70$ a kmen $\Delta 70/51$ roste daleko hůře než původní kmen pJ669-4A.

6.3.2 Růstové vlastnosti testovaných kmenů v tekutém selekčním médiu

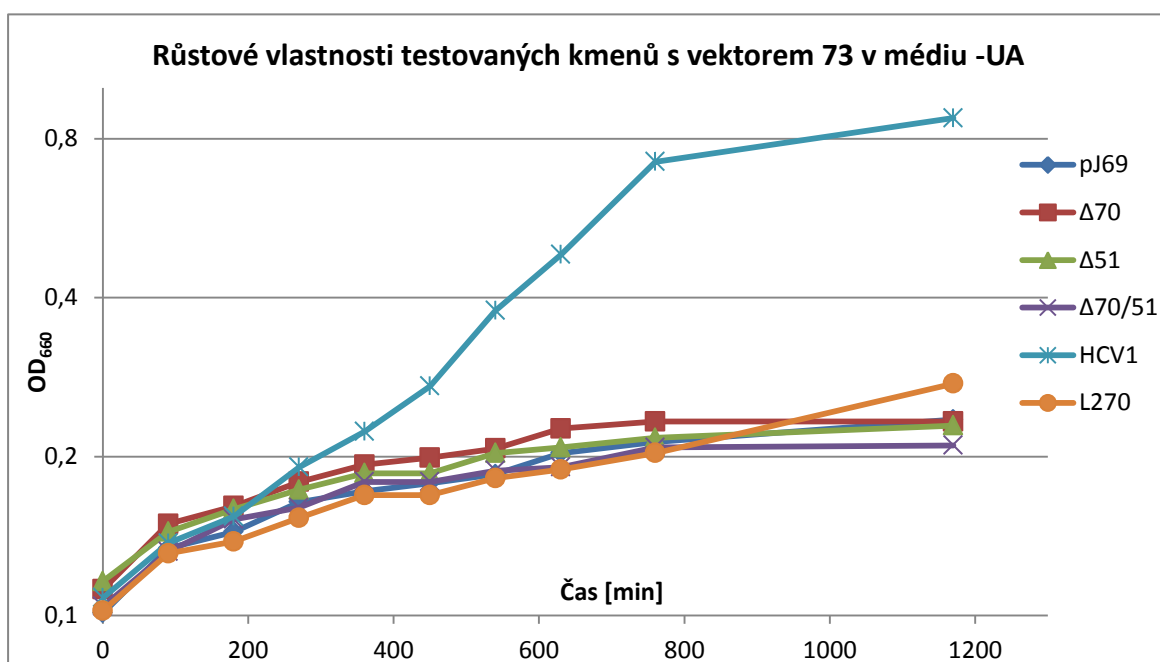
Společně se školitelem diplomové práce jsme se rozhodli stanovit růstové vlastnosti testovaných kmenů obsahujících vektor 73 v tekutých médiích -UA a -UH. Rozhodnutí bylo učiněno na základě odlišných vlastností testovaných kmenů obsahujících vektor 73 na agarových médiích -UA a -UH. Stanovení růstových křivek jsem provedla podle metody 5.2.1.4.1. Testované kmeny jsem inkubovala v médiích -U (Obr. 6.21), -UA (Obr. 6.22, 6.23) a -UH (Obr. 6.24, 6.25, 6.26), intervaly mezi jednotlivými odběry vzorků byly 90minutové. Jako kontroly byly opět použity kmeny pJ69-4A obsahující vektor HCV1 a pJ69-4A obsahující vektor L270.



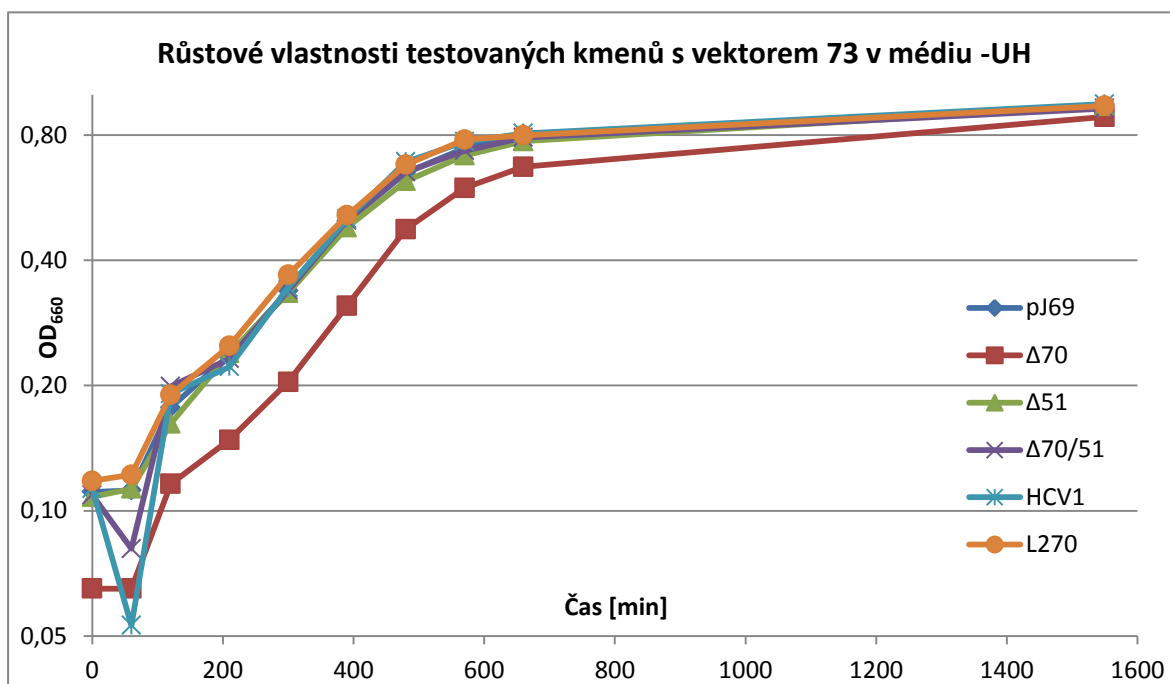
Obr. 6.21: Růstová křivka testovaných kmenů s vektorem 73 v -U médiu. Průměrné doby zdvojení v exponenciální fázi růstu pro jednotlivé kmeny jsou: pJ69 (pJ69-4A s vektorem 73) 184 min, Δ70 (Δ70 s vektorem 73) 177 min, Δ51 (Δ51 s vektorem 73) 182 min, Δ70/51 (Δ70/51 s vektorem 73) 174 min, HCV1 (pJ69-4A s vektorem HCV1) 191 min, L270 (pJ69-4A s vektorem L270) 190 min.



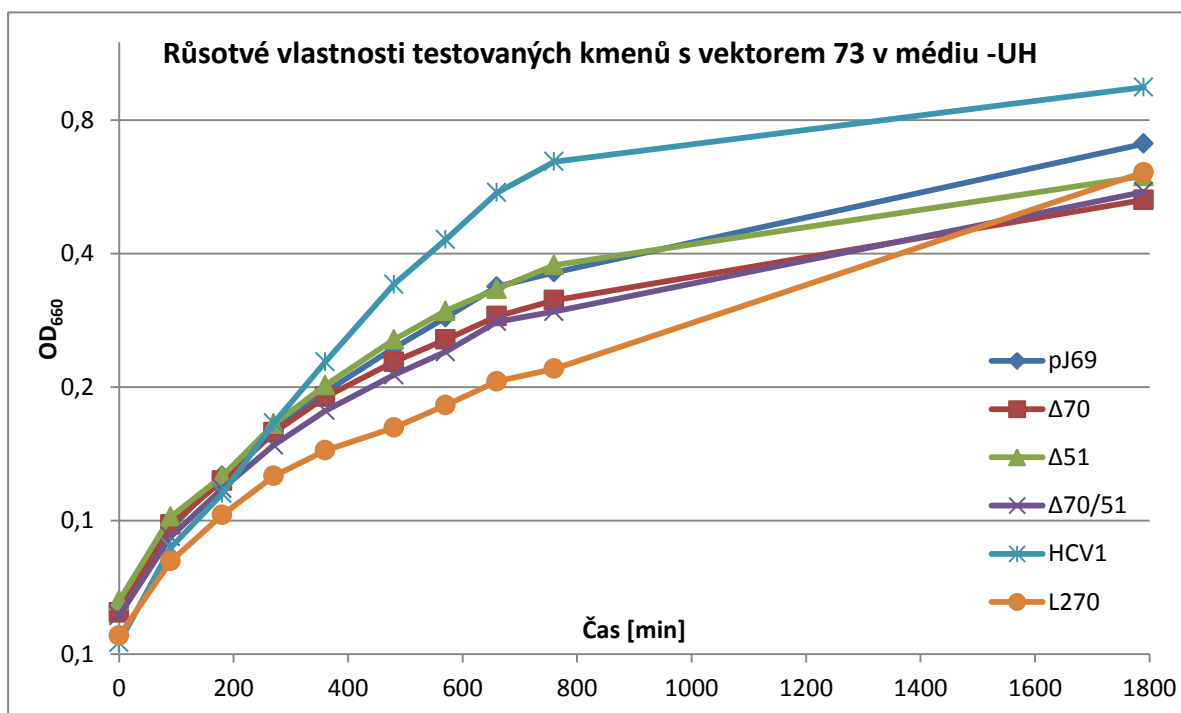
Obr. 6.22: Růstová křivka testovaných kmenů s vektorem 73 v -UA médiu. První měření v -UA médiu.



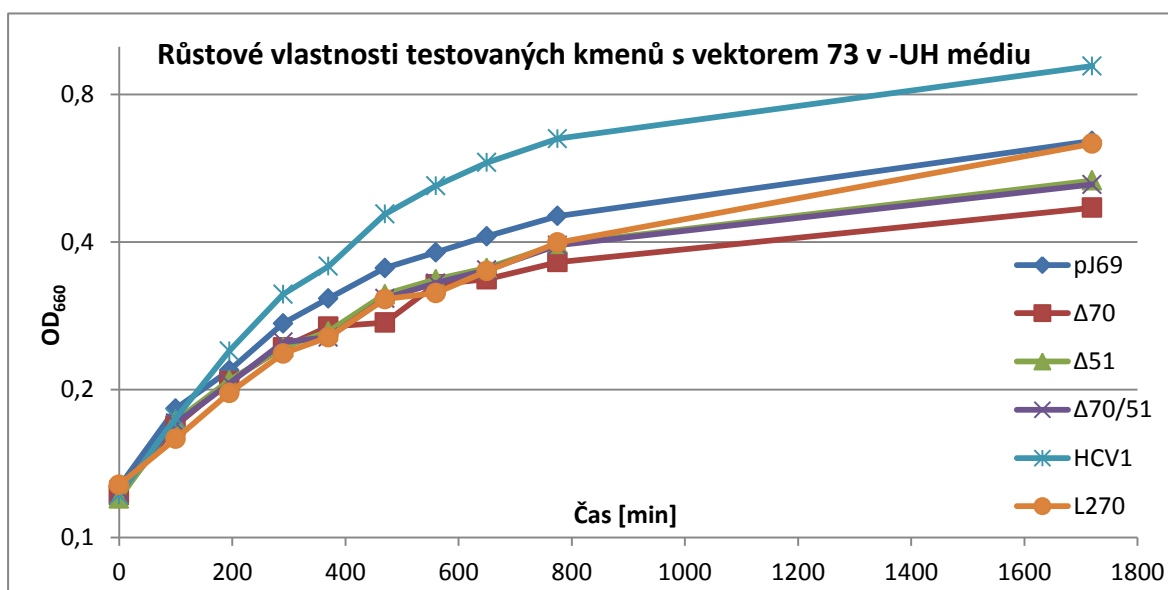
Obr. 6.23: Růstová křivka testovaných kmenů s vektorem 73 v -UA médiu. Druhé stanovení růstové křivky v -UA médiu. Průměrné doby zdvojení v exponenciální fázi růstu pro jednotlivé kmeny jsou: pJ69 (pJ69-4A s vektorem 73) 1234 min, Δ70 (Δ70 s vektorem 73) 1358 min, Δ51 (Δ51 s vektorem 73) 1272 min, Δ70/51 (Δ70/51 s vektorem 73) 1414 min, HCV1 (pJ69-4A s vektorem HCV1) 315 min, L270 (pJ69-4A s vektorem L270) 1031 min.



Obr. 6.24: Růstová křivka testovaných kmenů s vektorem 73 v -UH médiu. První měření v -UH médiu. Průměrné doby zdvojení v exponenciální fázi růstu pro jednotlivé kmeny jsou: pJ69 (pJ69-4A s vektorem 73) 190 min, Δ70 (Δ70 s vektorem 73) 163 min, Δ51 (Δ51 s vektorem 73) 201 min, Δ70/51 (Δ70/51 s vektorem 73) 186 min, HCV1 (pJ69-4A s vektorem HCV1) 168 min, L270 (pJ69-4A s vektorem L270) 190 min.



Obr. 6.25: Růstová křivka testovaných kmenů s vektorem 73 v -UH médiu. Druhé měření v -UH médiu. Průměrné doby zdvojení v exponenciální fázi růstu pro jednotlivé kmeny jsou: pJ69 (pJ69-4A s vektorem 73) 325 min, Δ70 (Δ70 s vektorem 73) 395 min, Δ51 (Δ51 s vektorem 73) 359 min, Δ70/51 (Δ70/51 s vektorem 73) 374 min, HCV1 (pJ69-4A s vektorem HCV1) 220 min, L270 (pJ69-4A s vektorem L270) 464 min.

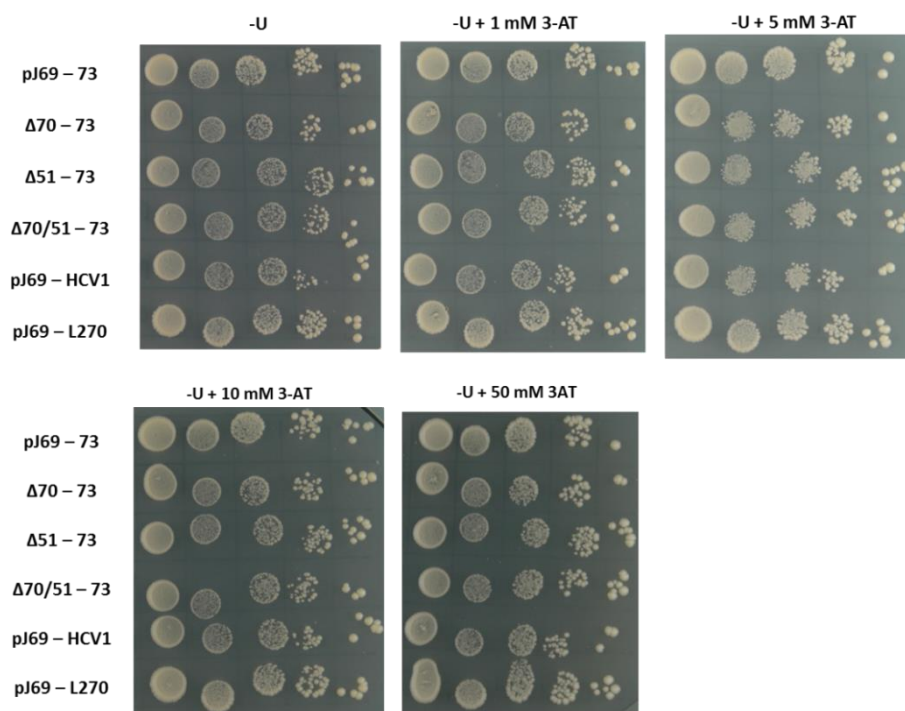


Obr. 6.26: Růstová křivka testovaných kmenů s vektorem 73 v -UH médiu. Třetí měření v nově připraveném -UH médiu. Průměrné doby zdvojení v exponenciální fázi růstu pro jednotlivé kmeny jsou: pJ69 (pJ69-4A s vektorem 73) 379 min, Δ70 (Δ70 s vektorem 73) 432 min, Δ51 (Δ51 s vektorem 73) 391 min, Δ70/51 (Δ70/51 s vektorem 73) 358 min, HCV1 (pJ69-4A s vektorem HCV1) 246 min, L270 (pJ69-4A s vektorem L270) 461 min.

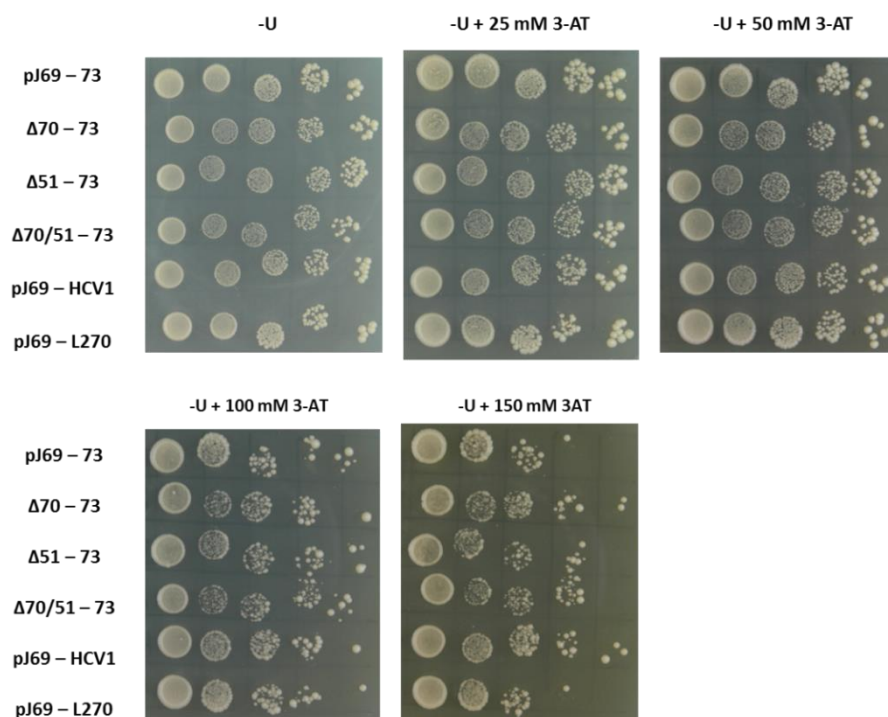
Růstové vlastnosti jednotlivých testovaných kmenů se od sebe výrazně neliší.

6.3.3 Růstové vlastnosti testovaných kmenů v médiu obsahující stoupající koncentrace 3-AT

Jednou z možností, proč testované kmeny s vektorem 73 mají odlišné fenotypové vlastnosti, je reakce jednotlivých kmenů na nefyziologické podmínky. Mezi nefyziologické podmínky můžeme řadit výskyt 3-aminotriazolu v médiu, proto jsem testované kmeny s vektorem 73 podrobila kapkovému testu, kapitola 5.2.1.5.2, na agarovém médiu -U se stoupající koncentrací 3-AT tedy, 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM 3-AT (Obr. 6.27) a 25 mM, 50 mM, 100 mM a 150 mM 3-AT (Obr. 6.28). K testovaným kmenům (pJ69-4A, Δ70, Δ51 a Δ70/51) obsahující vektor 73 jsem na Petriho misky nakapala také kontrolní kmeny pJ69-4A obsahující vektory HCV1 a L270. U kapkového testu použitých agarových médiích s koncentracemi 3-AT od 25 mM do 150 mM jsem provedla čtyři biologické replikáty.



Obr. 6.27: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73 na selekčním médiu pouze pro vektor a obsahující stoupající koncentrace 3-aminotriazolu. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 12. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií.

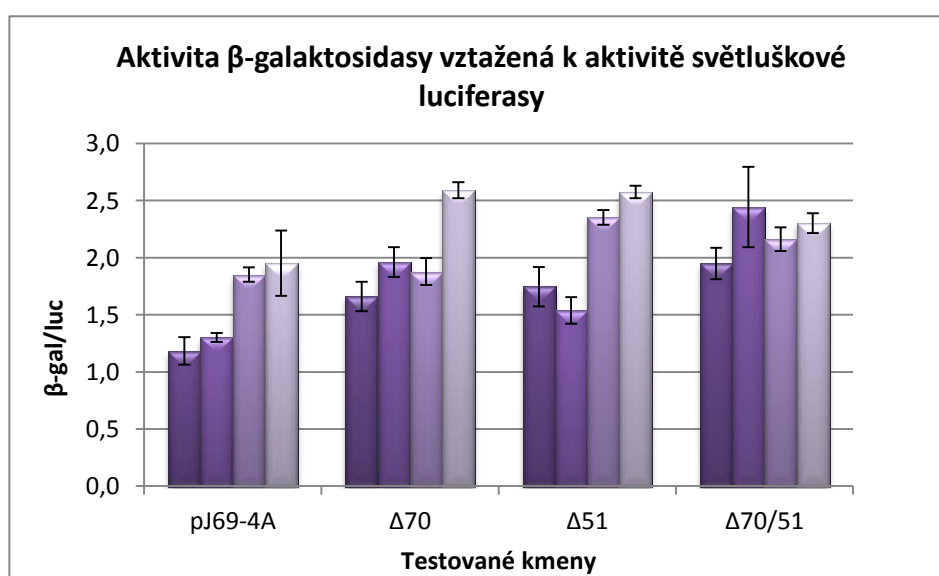


Obr. 6.28: Kapkový test testovaných kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73 na selekčním médiu pouze pro vektor a obsahující stoupající koncentrace 3-aminotriazolu. V jednotlivých sloupcích bylo použito desítkové ředění. Fotografie byly pořízeny 8. den po nakapání. Typ selekční misky je napsán nad fotografií. Vzorová tabule ze čtyř opakování.

Jak je vidět na vzorové tabuli (Obr. 6.28) deleční kmen $\Delta 70$ roste v koncentracích 100 mM a 150 mM 3-AT o něco lépe než původní kmen pJ69-4A.

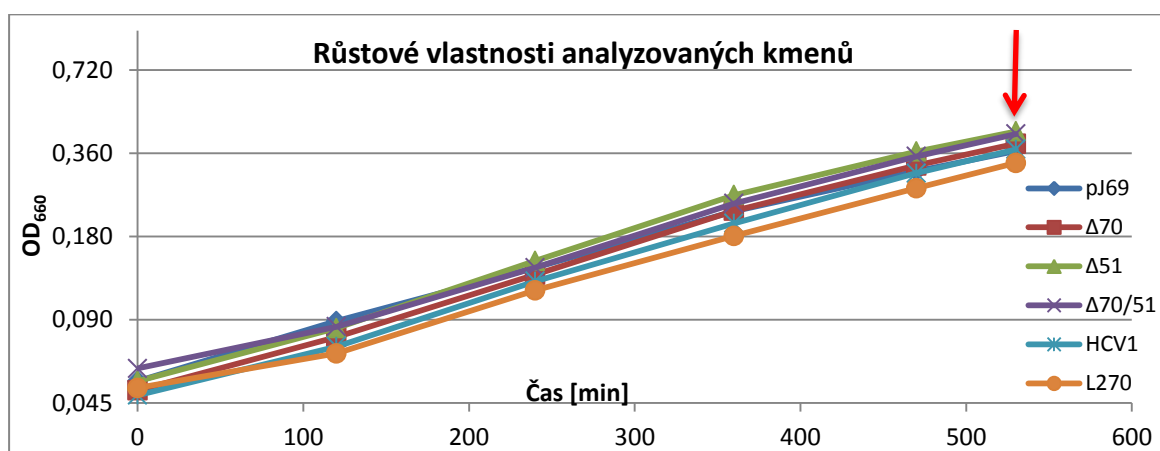
6.3.4 Měření aktivit světluškové luciferasy a β -galaktosidasy

Kromě sledování změn auxotrofních požadavků testovaných kmenů obsahujících vektory pFAL4h na minimálních médiích je možné měřit aktivity β -galaktosidasy, a tím stanovit schopnost buněk překládat Gal4 protein, neboli funkčnost HCV IRES elementů. Aktivitu světluškové luciferasy jsem měřila proto, abych mohla normalizovat hodnoty aktivit β -galaktosidasy. Prvotní měření jsem provedla s testovanými kmeny obsahujícími vektor 73 vytvořenými pro ověření kapkových testů, viz kapitola 6.3.1, poslední odstavec. Celkem jsem použila 16 testovaných kmenů obsahujících vektor 73 a dva kontrolní kmeny pJ69-4A s vektory HCV1 a L270. Malé množství všech kvasinkových kmenů jsem přenesla do 40 ml tekutého -U média a aerobně inkubovala při 28 °C přes noc. Druhý den jsem z 30 ml kvasinkové kultury připravila buněčné lyzáty, viz kapitola 5.2.3.1.2. Luciferasovou aktivitu jsem měřila na luminometru Microlite TLX2 pomocí soupravy Dual-Luciferase® Reporter Assay System (kapitola 5.2.3.8), β -galaktosidasovou aktivitu jsem měřila také na luminometru Microlite TLX2 pomocí soupravy Dual-Light® System (kapitola 5.2.3.7). Změřené aktivity jsem vynesla do grafu, Obr. 6.29.



Obr. 6.29: Aktivita β -galaktosidasy vztažená k aktivitě světluškové luciferasy testovaných kmenů obsahujících vektor 73. Jednotlivé skupiny sloupců obsahují jeden typ testovaných kmenů s vektorem 73, celkem čtyři nezávislé kolonie.

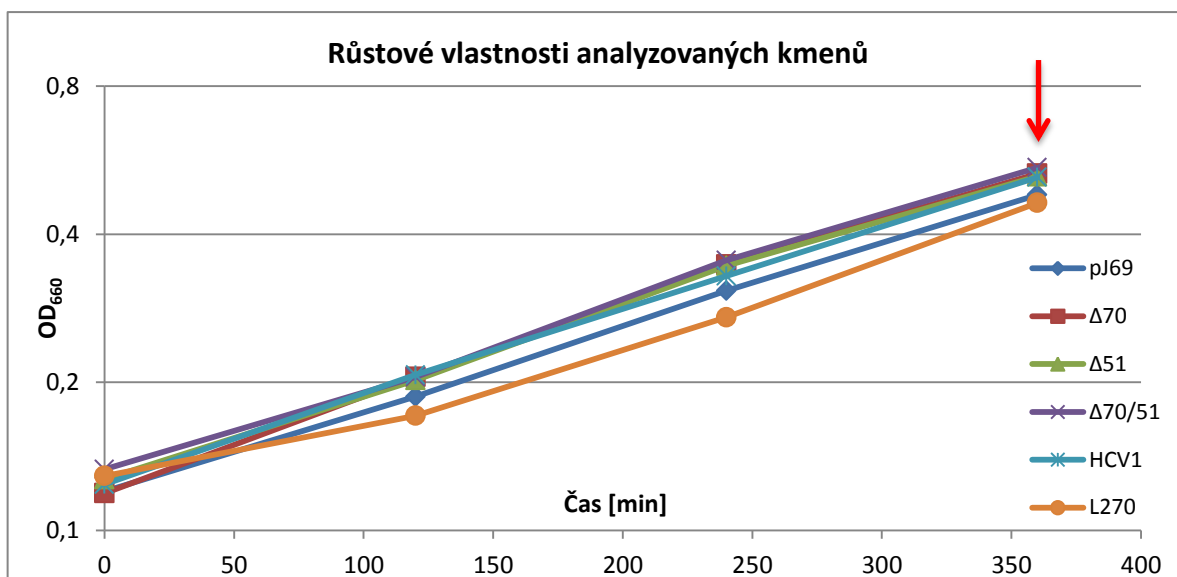
Výsledky měření aktivit β -galaktosidasy nejsou zcela jednoznačné, jednotlivé aktivity se v rámci stejných kmenů příliš liší. Jedním z důvodů tak velkých odchylek může být, že se jednotlivé kmeny byly pro měření odebrány v různých fázích růstu. Proto jsme se rozhodli změnit postup přípravy buněčných lyzátů. Nejprve jsem stanovovala růstovou křivku testovaných kmenů (Obr. 6.30a a 6.31a), kapitola 5.2.1.4.1, a přibližně v polovině exponenciální fáze růstu jsem odebrala 30 ml kvasinkové kultury a připravila buněčné lyzáty, kapitola 5.2.3.1.2. Pro toto měření jsem použila od každého testovaného kmene obsahujícího vektor 73 jen jeden klon. Měření probíhala ve dvou biologických replikátech, Obr. 6.30b a 6.31b.



Obr. 6.30a: Růstové vlastnosti analyzovaných kmenů při přípravě buněčných lyzátů. Červená šipka označuje okamžik odběru kultury pro vytvoření buněčných lyzátů. Průměrné doby zdvojení v exponenciální fázi růstu pro jednotlivé kmeny jsou: pJ69 (pJ69-4A s vektorem 73) 210 min, $\Delta 70$ ($\Delta 70$ s vektorem 73) 187 min, $\Delta 51$ ($\Delta 51$ s vektorem 73) 189 min, $\Delta 70/51$ ($\Delta 70/51$ s vektorem 73) 186 min, HCV1 (pJ69-4A s vektorem HCV1) 179 min, L270 (pJ69-4A s vektorem L270) 183 min.



Obr. 6.30b: Aktivita β -galaktosidasy vztahovaná k aktivitě světluškové luciferasy u jednotlivých testovaných kmenů obsahujících vektor 73 (fialová) a dvou kontrolních kmenů pJ69-4A obsahujících vektory HCV1 (světle modrá) a L270 (oranžová). Buněčné lyzáty byly připraveny z kvasinkové kultury v exponenciální fázi růstu, Obr. 6.30a. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ze čtyř technických opakování.



Obr. 6.31a: Růstové vlastnosti analyzovaných kmenů při přípravě buněčných lyzátů, druhý biologický replikát. Červená šipka označuje okamžik odběru kultury pro vytvoření buněčných lyzátů. Průměrné doby zdvojení v exponenciální fázi růstu pro jednotlivé kmeny jsou: pJ69 (pJ69-4A s vektorem 73) 180 min, Δ70 (Δ70 s vektorem 73) 169 min, Δ51 (Δ51 s vektorem 73) 178 min, Δ70/51 (Δ70/51 s vektorem 73) 179 min, HCV1 (pJ69-4A s vektorem HCV1) 174 min, L270 (pJ69-4A s vektorem L270) 210 min.



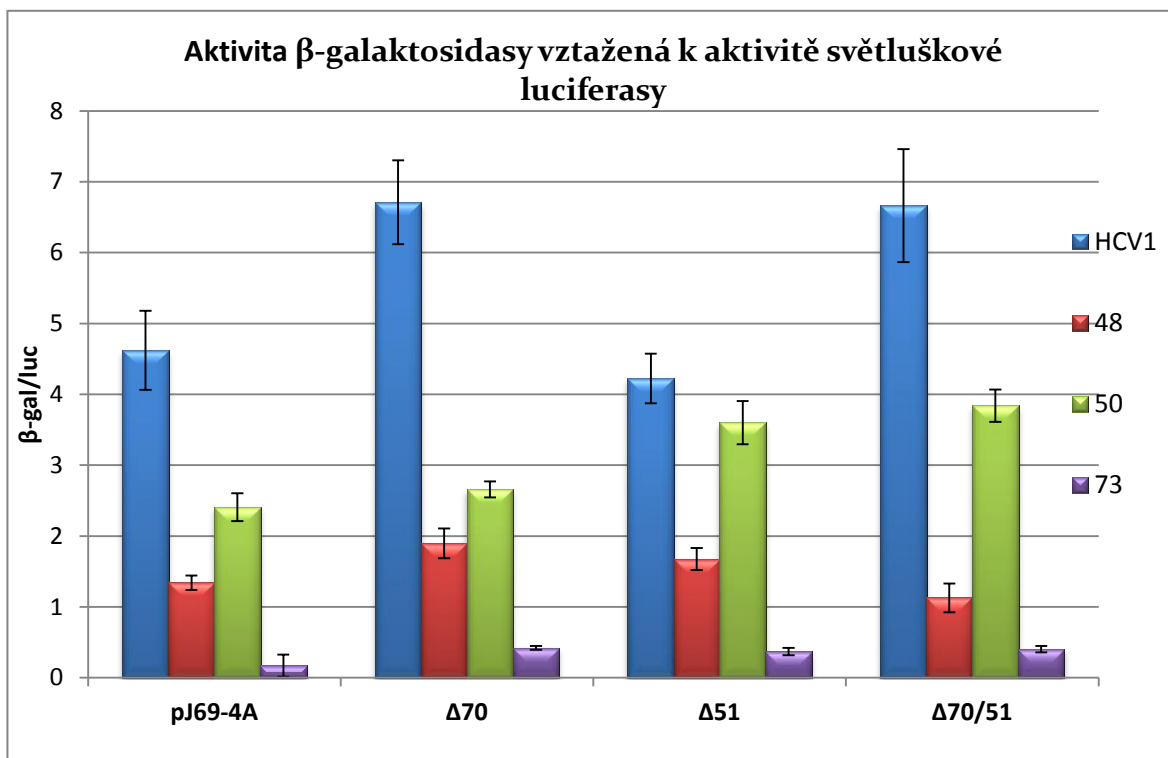
Obr. 6.31b: Druhé stanovení aktivit β-galaktosidasy vztažené k aktivitě světluškové luciferasy u jednotlivých testovaných kmenů obsahujících vektor 73 (fialově) a dvou kontrolních kmenů pJ69-4A obsahujících vektory HCV1 (světle modrá) a L270 (oranžová). Buněčné lyzáty byly připraveny z kvasinkové kultury v exponenciální fázi růstu, Obr. 6.31a. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ze čtyř technických opakování.

Z naměřených aktivit je zřejmé, že každá delece vede k vyšší naměřené hodnotě normalizované β-galaktosidasy, přičemž nejvyšší hodnotu má kmen s deletovanými oběma geny. V tomto kmeni dochází k častějšímu překlada proteinu Gal4, než u původního kmene pJ69-4A.

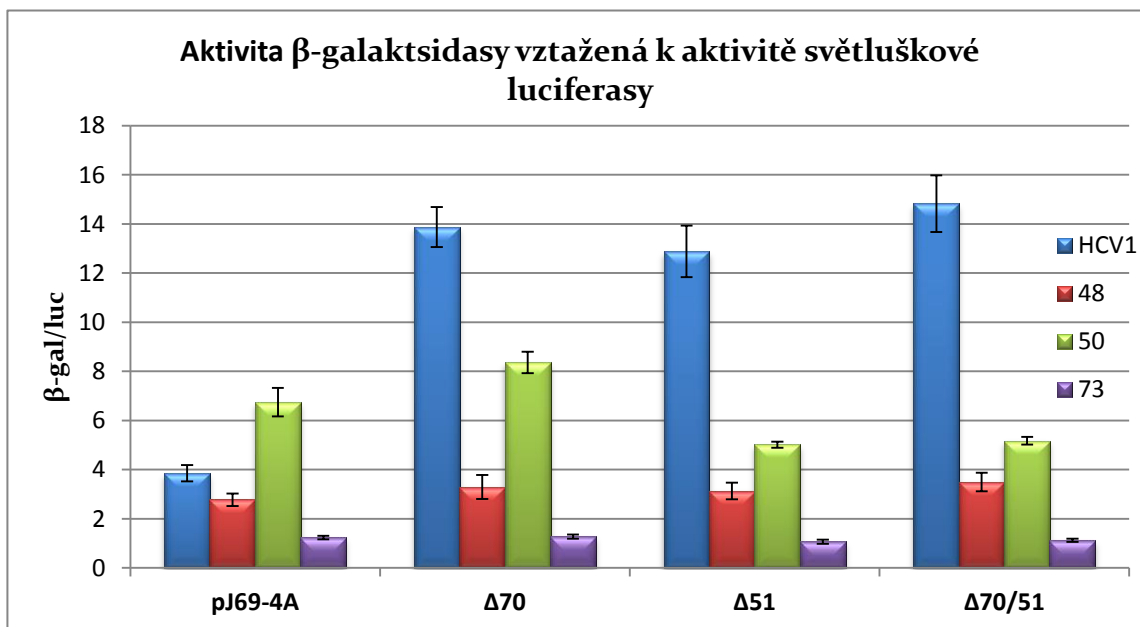
Patrné rozdíly v β -galaktosidasových aktivitách u testovaných kmenů obsahujících vektor 73 nás přivedly k zamyšlení, který UUG kodón je příčinou této vyšší aktivity. Rozhodli jsme se tedy změřit aktivity β -galaktosidasy i u testovaných kmenů obsahujících vektor 48, záměna AUG kodónu Gal4p na UUG kodón, a obsahujících vektor 50, záměna AUG kodónu ve struktuře IV HCV IRES elementu na UUG kodón. Pro kontrolu jsem měřila i aktivity β -galaktosidasy testovaných kmenů obsahujících vektor HCV1 (Obr. 6.32 a 6.33). Příprava buněčných lyzátů a měření aktivit probíhala se všemi 16 kvasinkovými kmeny najednou, abych mohla získané aktivity porovnávat mezi jednotlivými druhy vektorů. Opět jsem nejprve stanovovala růstovou křivku, viz Tab. 6.4, a přibližně v polovině exponenciální fáze růstu jsem odebrala 30 ml pro přípravu buněčných lyzátů. Pro přehlednost neuvádím grafické znázornění růstových křivek, pouze tabulku průměrných dob zdvojení. Daný pokus jsem provedla ve dvou biologických replikátech, první a druhé měření.

Kvasinkový kmen	Průměrná doba zdvojení, první měření [min]	Průměrná doba zdvojení, druhé měření [min]
pJ-HCV	247	168
Δ 70-HCV	262	181
Δ 51-HCV	240	164
Δ 70/51-HCV	224	181
pJ-48	220	194
Δ 70-48	209	189
Δ 51-48	224	183
Δ 70/51-48	219	200
pJ-50	191	172
Δ 70-50	207	182
Δ 51-50	192	168
Δ 70/51-50	201	185
pJ-73	244	170
Δ 70-73	206	172
Δ 51-73	192	181
Δ 70/51-73	209	173

Tab. 6.4: Průměrné doby zdvojení kvasinkových kultur připravovaných pro měření β -galaktosidasové a luciferasové aktivity. Celkem byly připraveny dva biologické replikáty, proto dvě měření růstových vlastností testovaných kmenů.

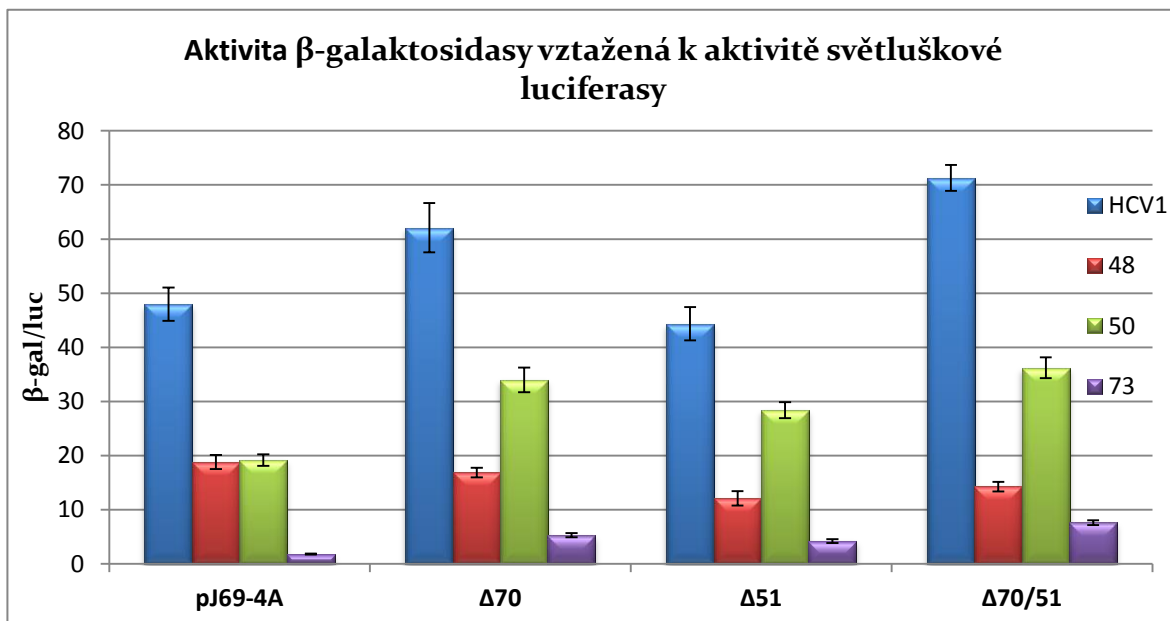


Obr. 6.32: Aktivity β -galaktosidas vztážené k aktivitám světluškové luciferasy u testovaných kmenů obsahujících vektor HCV1 (modře), vektor 48 (červeně), vektor 50 (zeleně) a vektor 73 (fialově). Skupiny sloupců odpovídají jednomu typu testovaných kmenů. Měření lyzáty byly z prvního měření. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ze čtyř technických opakování.



Obr. 6.33: Druhé měření aktivit β -galaktosidas vztážené k aktivitám světluškové luciferasy u testovaných kmenů obsahujících vektor HCV1 (modře), vektor 48 (červeně), vektor 50 (zeleně) a vektor 73 (fialově). Skupiny sloupců odpovídají jednomu typu testovaných kmenů. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ze čtyř technických opakování.

Protože druhé měření aktivit β -galaktosidasy a luciferasy jsem prováděla s novým GalactonPlus® substrátem, rozhodla jsem se buněčné lyzáty připravené v prvním pokusu přeměřit s novým GalactonPlus® substrátem (Obr. 6.34).



Obr. 6.34: Přeměření aktivit β -galaktosidas vztažené k aktivitám světluškové luciferasy u testovaných kmenů obsahujících vektor HCV1 (modře), vektor 48 (červeně), vektor 50 (zeleně) a vektor 73 (fialově). Skupiny sloupců odpovídají jednomu typu testovaných kmenů. Na měření byly použity buněčné lyzáty připravené jako první. K přeměření byl použit nový GalactonPlus® substrát. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ze čtyř technických opakování.

Vyšší hodnoty poměrů aktivit β -galaktosidasy a světluškové luciferasy u přeměření aktivit buněčných lyzáatů jsou pravděpodobně dány novým substrátem, ale také mohou být dány rozdílnou stabilitou enzymů ve skladovaných buněčných lyzátech. Pravděpodobně je světlušková luciferasa méně stabilní. Na tomto místě bych ráda upozornila na rozdílné poměry aktivit u testovaných kmenů obsahujících vektor HCV1. Deleční kmeny $\Delta 70$ a $\Delta 70/51$ obsahující vektor HCV1 mají vyšší poměry aktivit než původní kmen pJ69-4A obsahující vektor HCV1. Tento trend je patrný u všech měření.

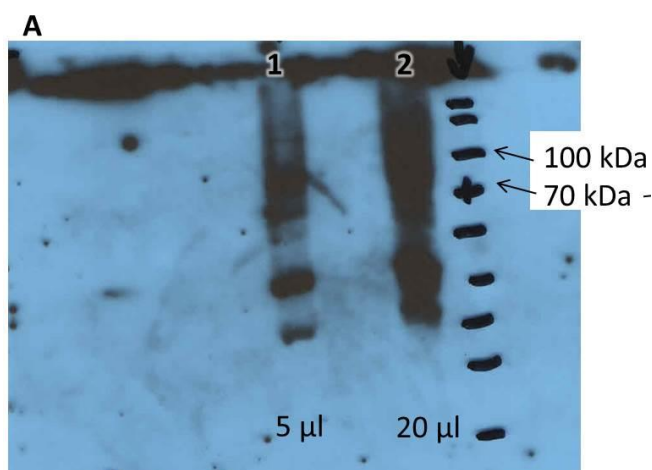
6.3.5 Analýza N-koncové části Gal4 proteinu

Abychom zjistili, ze kterého UUG probíhá translace proteinu Gal4 v testovaných kmenech obsahujících vektor 73, rozhodli jsme se analyzovat N-koncovou část vzniklého Gal4 proteinu. Cílem bylo nejprve otestovat, zda protilátka Sc-510 je schopna rozpoznat Gal4p kódovaný vektorem 73. V případě pozitivního výsledku by tato protilátka byla

použita pro analýzu N-koncové části peptidu pomocí imunoprecipitace a následné chromatografii nebo hmotnostní spektrometrii.

V první řadě bylo nutné optimalizovat metody pro detekci proteinu Gal4 ve vzorku. Nejprve jsem připravila buněčné lyzáty, kapitola 5.2.3.1.1. Buněčnou suspenzi jsem nanasla na polyakrylamidový gel a v elektrickém poli jsem vzorky dělila podle molekulární hmotnosti, 5.2.3.2. Polyakrylamidový gel se vzorky jsem buď obarvila Coomassie Brilliant Blue G-250, kapitola 5.2.3.5., nebo jsem rozdělžené proteiny přenesla na nitroceluloseovou membránu, kapitola 5.2.3.3. Nitroceluloseovou membránu je možné inkubovat s protilátkami a chemiluminiscenční metodou detekovat konkrétní proteiny, kapitola 5.2.3.4.

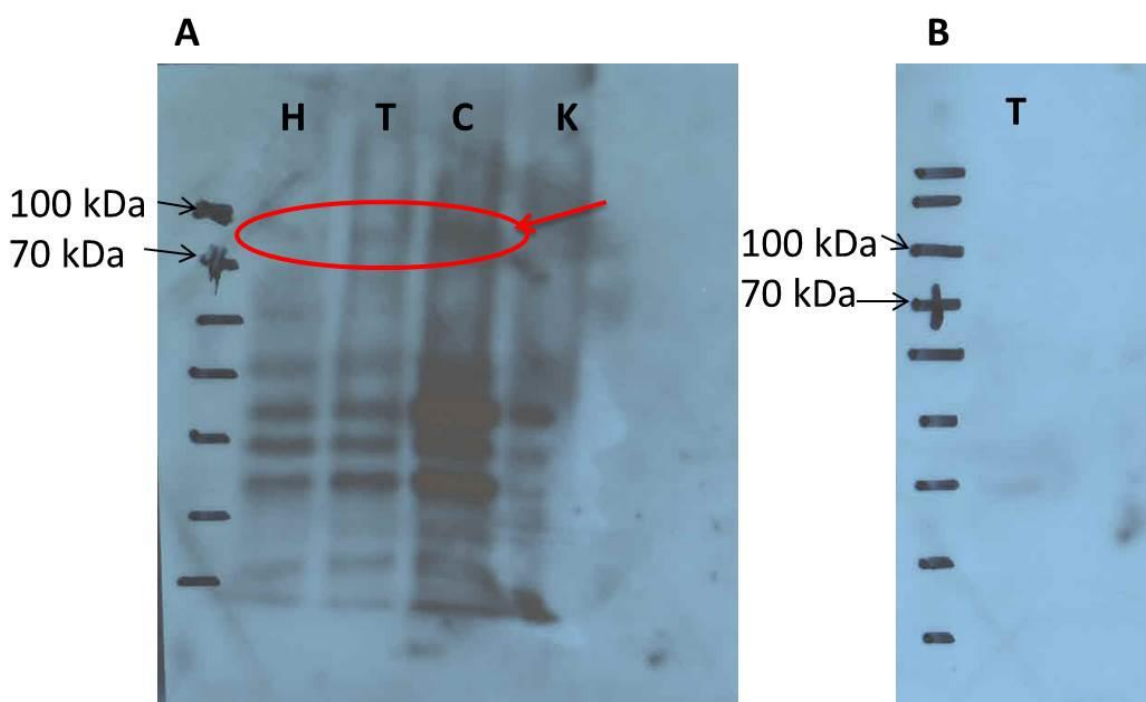
Jako první jsem připravila buněčné lyzáty z kvasinkového kmene pJ69-4A obsahující vektor pCL. Vektor pCL obsahuje gen *GAL4* regulovaný *ADH1* promotorem a terminátorem. Z tohoto vektoru by měla být dostatečná produkce proteinu Gal4 pro chemiluminiscenční detekci proteinů (Obr. 6.35). Molekulární hmotnost proteinu Gal4 je 99,4 kDa, použitá primární protilátka byla Sc-510.



Obr. 6.35: Chemiluminiscenční detekce proteinu Gal4 pomocí primární protilátky Sc-510. Lyzáty byly připraveny z buněčné kultury pJ69-4A obsahující vektor pCL. A) Prvotní pokus vzorek z buněčné kultury obsahující pCL plasmid A1) 5 µl vzorku a A2) 20 µl vzorku.

Po několika neúspěšných pokusech jsem se na rady kolegů rozhodla použít PVDF membránu místo nitroceluloseové membrány. Na polyakrylamidový gel jsem nanasla buněčné lyzáty připravené z kvasinkových kmenů pJ69-4A obsahující vektory pFGAL4h-HCV1, pTG4h (vektor stejný jako pFGAL4h, liší se pouze selekčním genem), pCL. Dále jsem na tento gel nanasla kvasinkový lyzáát z pJ69-4A s vektorem pCL připravený

pro první analýzu, jako pozitivní kontrolu. Na druhou polovinu gelu jsem nanesla ještě jednou standard molekulových hmotností a buněčný lyzát připravený z kvasinkového kmene pJ69-4A s vektorem pTG4h. Po přenesení rozdělených vzorků z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu jsem část membrány se standardem a vzorkem obsahující pTG4h vektor odřízla. Tuto část membrány jsem místo kroku inkubace s primární protilátkou inkubovala pouze v blokovacím roztoku. Výsledná chemiluminiscenční detekce je zobrazena na Obr. 6.36.



Obr. 6.36: A) Chemiluminiscenční detekce proteinu Gal4 ve vzorcích kvasinkových kultur pJ69-4A obsahujících vektory pFGAL4h-HCV1 (H), pTG4h (T), pCL (C) a pJ69-4A s vektorem pCL z první analýzy (K). B) Analýza kvasinkového lyzátu pJ69-4A obsahující vektor pTG4h bez inkubace membrány s primární protilátkou. Červená elipsa ukazuje na protein Gal4. Vzorky byly z polyakrylamidového gelu přeneseny na PVDF membránu.

6.4 Použití vektorů testujících iniciaci translace

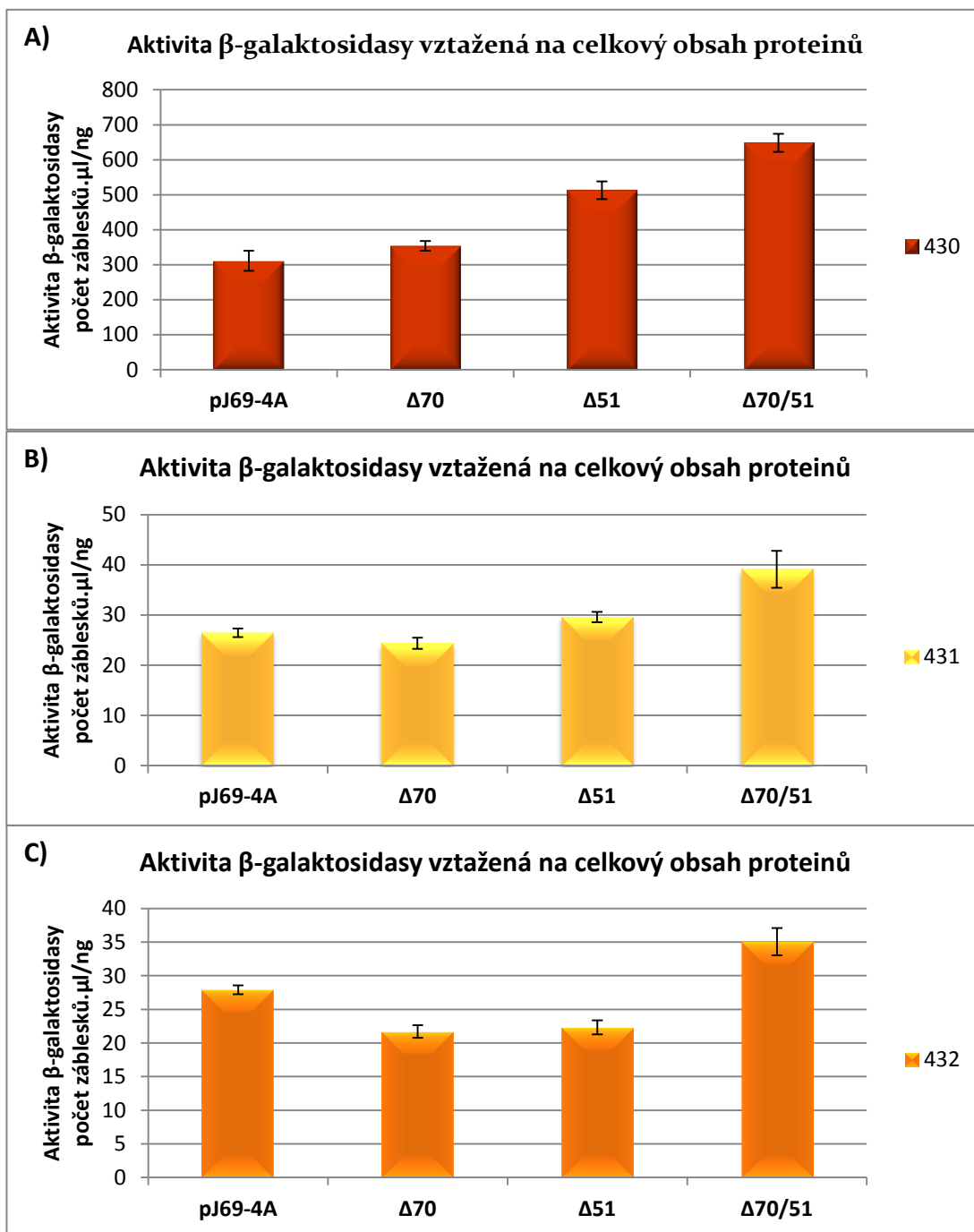
Pro ověření rozdílů v translaci jednotlivých testovaných kmenů jsem obdržela 6 testovacích vektorů (Tab. 6.5). Vektory 430, 431, 432 obsahují fúzní protein *His4* s *LacZ*; *LacZ* kóduje β -galaktosidasu. U vektoru 430 je sekvence *His4p* nezměněna, jeho první kodón je AUG (Met) a třetí kodón UUG (Leu), tento vektor byl tedy používán jako kontrola klasické iniciace translace. Vektor 431 má modifikován první kodón *His4p* na UUG (Leu) a vektor 432 má zaměněn první kodón *His4p* na AUU (Ile) a třetí kodón je zaměněn na UUA (Leu). Vektory 466, 467 a 490 obsahují fúzní protein *Gcn4* s *LacZ*. Ke vzniku

β -galaktosidasy u vektorů 466 a 467 dochází jen v případě, že není překládán první ORF (pročítání star kodónu; „leaky scanning“). Vektor 490 neobsahuje ORF v 5'UTR mRNA dávající vznik fúznímu proteinu Gcn4-LacZ, byl tedy použit jako kontrola normální translace.

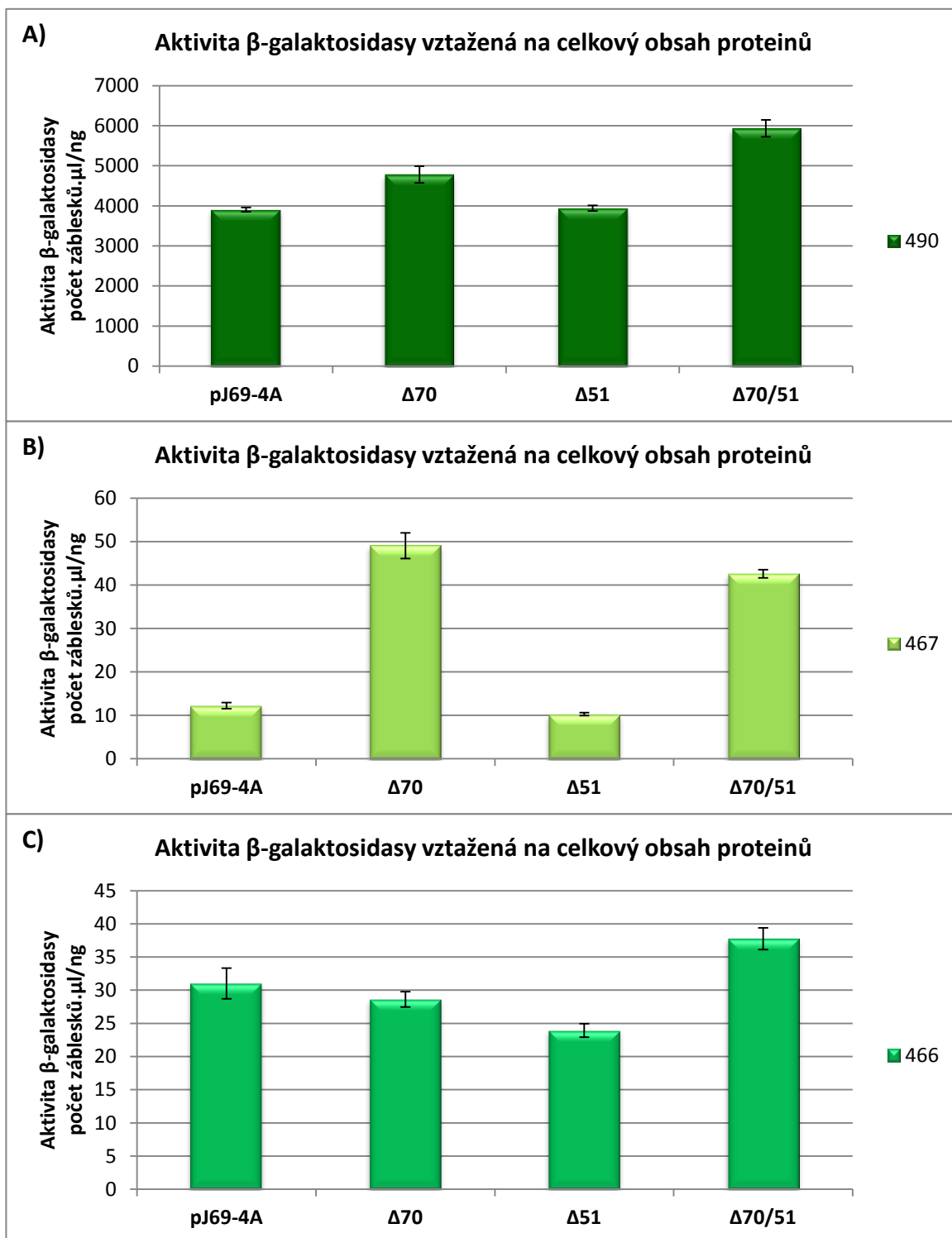
Typ vektoru	Vlastnosti vektoru	Selekce vektoru v kvasinkách
430	1. kodón AUG, 3. kodón UUG	<i>Ura3⁺</i>
431	1. kodón UUG, 3. kodón UUG	<i>Ura3⁺</i>
432	1. kodón AUU, 3. kodón UUA	<i>Ura3⁺</i>
466	5'UTR oblast obsahuje ORF4	<i>Ura3⁺</i>
467	5'UTR oblast obsahuje ORF1	<i>Ura3⁺</i>
490	5'UTR oblast neobsahuje ORF	<i>Ura3⁺</i>

Tab. 6.5: Shrnutí použitých vektorů pro testování iniciace translace na jiném než AUG kodónu (430, 431 a 432) a pro testování pročítání iniciačního kodónu (466, 467 a 490).

Nejprve jsem nově získané vektory vyizolovala midipreparační metodou, kapitola 5.2.2.1.2. Následně jsem vnesla vyizolovanou plasmidovou DNA do testovaných kmenů, kapitola 5.2.2.6.2. Ze získaných monoklonií jsem vybrala dvě od každého kmene a ověřila jejich auxotrofní požadavky, kapitola 5.2.1.5.1. Ověřené testované kmene obsahující testovací vektory jsem připravila na stanovení růstových vlastností v tekutém médiu -U, kapitola 5.2.1.4.1. Přibližně v polovině exponenciální fáze růstu jsem odebrala 30 ml kultury a z ní připravila buněčné lyzáty, kapitola 5.2.3.1.2. Lyzační roztok neobsahoval DTT. Použití DTT znemožňuje měření koncentrace proteinů pomocí BCA testu, kapitola 5.2.3.9. Od získaného buněčného lyzátu jsem odebrala 50 μ l na měření koncentrace proteinů. Do zbylého množství buněčného lyzátu jsem přidala DTT do výsledné koncentrace 0,5 mM. Koncentrace proteinů jsem měřila pomocí QuantiPro™ BCA Assay soupravy, kapitola 5.2.3.9. Aktivitu β -galaktosidasy jsem měřila pomocí soupravy Dual-Light® System, kapitola 5.2.3.7. Naměřené aktivity β -galaktosidasy v jednotlivých testovaných kmenech jsem vynesla do grafů (Obr. 6.37 a 6.38).



Obr. 6.37: Aktivity β -galaktosidasy naměřené u testovaných kmenů obsahujících vektory 430 (a), 431 (b) a 432 (c) vztažené na celkovou koncentraci proteinů. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ze tří technických opakování.



Obr. 6.38: Aktivity β -galaktosidasy naměřené u testovaných kmenů obsahujících vektory 490 (a), 467 (b) a 466 (c) vztážené na celkovou koncentraci proteinů. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ze tří technických opakování.

Jak je vidět u všech testovaných vektorů, aktivita β -galaktosidasy u delečního kmene $\Delta 70/51$ je vyšší než u kontrolního kmene pJ69-4A. Tento trend je patrný u všech měření. U vektorů 490 a 467 má deleční kmen $\Delta 70$ také vyšší aktivitu β -galaktosidasy než kontrolní kmen. Tyto výsledky jsou pilotní a je třeba je zopakovat.

7. Diskuze

Význam modifikací nukleotidů ribosomální RNA je v současné době stále více studován. Některým modifikacím už byly přiznány vlivy na funkčnost ribosomu. Význam vlivu modifikací rRNA na iniciaci translace zůstává z velké části neobjasněn. Překvapuje mě, že i když je iniciace překladu jedním z nejdůležitějších kroků proteinové exprese, je tento děj tak málo prostudován.

Já jsem se ve své práci zaměřila na modifikaci Cm1639 a na její vliv na iniciaci translace u kvasinky *S. cerevisiae*, tuto problematiku přede mnou zatím nikdo nestudoval.

7.1 Vytvoření kvasinkových kmenů s chybějícími modifikacemi Cm1639, Am100 a Um2729 rRNA

Při výběru modifikace rRNA, u které jsem chtěla studovat její význam, jsem se rozhodovala podle několika faktů. Zaprvé jsem se zaměřila na nukleotidové modifikace, u kterých už byl dříve popsán nějaký vliv na funkci ribosomu. Zadruhé mě zajímala pozice dané modifikace v rámci ribosomu. Z těchto důvodů jsem vybrala modifikaci Cm1639 18S rRNA. Nepřítomnost methylace hydroxylové skupiny vázané na 2' uhlíku ribosy cytidinu 1639 18S rRNA má vliv na častější posun ribosomu ve čtecím rámci o +1 i o -1 pozici (Baudin-Baillieu *et al* 2009), v kombinaci s nepřítomností $m^1acp^3\psi$ 1191 má vliv na snížení míry translace (Liang *et al* 2009) a u kmene s chybějící modifikací Cm1639 častěji dochází k pročitání stop kodónu UAG (Baudin-Baillieu *et al* 2009). Když se podíváme na pozici cytidinu 1639 v ribosomu, Obr. 4.14, zjistíme, že leží v P-místě dekódujícího centra ribosomu v blízkosti mRNA. V P-místě dekódujícího centra ribosomu leží ještě další dva modifikované nukleotidy $m^1acp^3\psi$ 1191 a Gm1428. U modifikace Gm1428 nebyl pozorován výraznější vliv na funkčnost ribosomu (Baudin-Baillieu *et al* 2009, Esguerra *et al* 2008, Liang *et al* 2009). U hypermodifikovaného ψ byl zjištěn vliv na četnější posuny ve čtecím rámci během translace (Baudin-Baillieu *et al* 2009) a u kvasinkového kmene s chybějící modifikací $m^1acp^3\psi$ 1191 byla pozorována změna citlivosti na neomycinové antibiotikum a nižší množství začlenění ^{35}S -methioninu (Liang *et al* 2009).

Cytidin 1639 z malé ribosomální podjednotky je methylován snoRNP partikulí obsahující malou jadéřkovou RNA snR70 (Lowe and Eddy 1999). Molekula *snr70* je přepisována z polycistronního transkriptu, jenž obsahuje také gen pro *snR41* a *snR51*.

Molekuly snR41 a snR51 se také účastní methyloací nukleotidů rRNA. Gen *snr70* se v operonu nachází uprostřed a za ním je gen pro *snR51*. U kvasinky *S. cerevisiae* je možné deletovat geny pomocí homologní rekombinace. Já jsem měla v plánu vyměnit gen *snr70* za deleční kazetu obsahující gen pro selekci, *LEU2* nebo *URA3*. Použité deleční kazety obsahují vlastní promotor a terminátor. Jestliže bych tedy vyměnila gen *snr70* za deleční kazetu, pravděpodobně by nedocházelo k transkripci genu *snR51*. Jakým způsobem se v předchozích studiích vyvarovali tomuto problému, mi dosud není známo. Hlavně se mi nepodařilo zjistit, zda v případě delečních kmenů *snR70Δ* dochází k přepisu genu *snR51*. Proto jsme se společně se školitelem rozhodli vytvořit tři deleční kvasinkové kmeny, abychom získali všechny možné varianty a příslušné kontroly. Jeden kvasinkový kmen má deletován gen *snR70*, druhý kmen má deletován gen *snR51* a třetí kmen má deletován oba geny. Zároveň jsem u modifikovaných kmenů odstranila pomocí Cre rekombinasy deleční kazetu. Z původních delečních kazet v chrozomomu delečních kmenů zbyl pouze 106 nukleotidů dlouhý inzert obsahující jedno lox-P místo. Molekula snR51 je součástí snoRNP komplexu, který methyluje Am100 18S rRNA a Um2729 25S rRNA (Lowe and Eddy 1999). Kvasinkový kmen s deletovaným genem *snR51* byl studován v práci (Esguerra *et al* 2008) a byla u něj pozorována snížená schopnost růstu na médiu obsahujícím zvýšené množství $MnCl_2$.

7.2 Vliv modifikací rRNA na iniciaci translace závislé na IRES elementu

Pro studium delečních kmenů, které jsem připravila, jsem využila v naší laboratoři používané vektory vytvořené doktorem Maškem. Jedná se o vektory testující IRES element hepatitidy typu C. Doktoru Maškovi a kolektivu (2007) se podařilo zjistit, že můžeme využít kvasinkový model *S. cerevisiae* ke studiu IRES elementu lidského a tkáňově specifického viru HCV. Ve své práci jsem využila 10 vektorů odvozených od vektoru pFGAL4h vybraných z knihovny vektorů připravených pro studium HCV IRES elementu. Hlavní výhodou sady pFGAL4h-X vektorů pro testování iniciace translace závislé na IRES elementu je, že je z nich přepisována bicistronní reportérová mRNA. Nejprve z této mRNA dochází k překladu světluškové luciferasy a následně je translatován Gal4p. Translace Gal4p je závislá právě na HCV IRES elementu. Protein Gal4 je transkripční faktor ovlivňující v kvasince pJ69-4A přepis několika reportérových genů, *ADE2*, *HIS3* a β -galaktosidasy. Aby byla translace z IRES elementu funkční, musí zde být iniciační AUG kodón následovaný 15

kodóny *HCV core* proteinu a až poté následuje první kodón Gal4 proteinu. Modifikace vektoru se vyskytují v doméně IV IRES elementu, neboli v oblasti, kde se nachází první kodón *HCV core* proteinu, a v iniciačním kodónu Gal4p. Tato sada vektorů obsahuje záměnu AUG (prvního kodónu) na UUG u *HCV core* proteinu, posuv ve čtecím rámci, rozrušení struktury domény IV, posunutí pozice AUG v rámci domény IV, záměnu AUG na UUG u prvního kodónu Gal4p a záměnu obou již zmíněných AUG na UUG. Samozřejmě jsem použila i vektor obsahující divoký typ HCV IRES elementu a vektor neobsahující HCV IRES element, ale obsahující 270 nukleotidů dlouhý inzert z bakteriofága λ , jako negativní kontrolu.

Změny auxotrofních požadavků delečních kmenů jsem pozorovala na médiích -UHA se zvyšující se koncentrací 3-aminotriazolu. Molekula 3-AT je kompetitivní inhibitor imidazolfosfát dehydratasy (Joung *et al* 2000). Pomocí série médií obsahujících zvyšující se koncentrace 3-AT je možné sledovat sílu transkripce proteinu His3, neboli míru translace Gal4p. Tento systém je používán v práci (Masek *et al* 2007).

Deleční kmen $\Delta 70$ obsahující některé vektory pFGAL4h-X roste lépe než původní kmen pJ69-4A obsahující stejné vektory. Například při porovnání testovaných kmenů obsahujících vektor HCV3 je tento trend vidět. U vektoru HCV3 se jedná o posun ve čtecím rámci o +1 pozici. U kmene $\Delta 70$ tedy pravděpodobně dochází k častějšímu posunu ribosomu ve čtecím rámci o +1 pozici. Tyto zjištěné výsledky by odpovídali výsledkům z práce Baudin-Ballieu a kolektivu (2009), kde také pozorovali častější posun ribosomu ve čtecím rámci. Ráda bych upozornila, že v mém případě se jedná o translaci závislou na IRES elementu a v jejich práci se jednalo o na čepičce závislou translaci.

Zajímavý fenotyp se zdá být vidět i u testovaných kmenů obsahujících divoký typ HCV IRES elementu (HCV1), jenž by mohl odpovídat častější iniciaci translace Gal4p u kvasinkového kmene $\Delta 70$, Obr. 6.9. Tyto rozdíly nejsou příliš patrné. Když však porovnáme tyto výsledky s výsledky z měření aktivit β -galaktosidasy u testovaných kmenů obsahujících vektor HCV1, tak se dané rozdíly potvrdí. Deleční kmene $\Delta 70$ a $\Delta 70/51$ mají výrazně vyšší poměr aktivit enzymů β -galaktosidasy a světluškové luciferasy. To znamená, že s velkou pravděpodobností dochází k častější iniciaci IRES závislé translace u kmenů s chybějící modifikací Cm1639. Protože vliv konkrétních nukleotidů na iniciaci translace do

této doby nikdo nestudoval, nemohu své výsledky s ničím porovnat. Iniciaci translace závislou na IRES elementu se zabývaly práce studující význam savčího dyskerinu (Bellodi *et al* 2010a, Bellodi *et al* 2010b, Jack *et al* 2011, Yoon *et al* 2006), kdy pozorovaly snížení účinnosti translace závislé na IRES elementu. Kvasinkový homolog dyskerinu je protein Cbf5. Mutací Cbf5p a tím zrušení pseudouridylací rRNA u kvasinky *S. cerevisiae* Jacket a kolektiv (2011) testovali iniciaci translace závislou na IRES elementu. Jejich výsledky ukázaly, že ribosom bez pseudouridinů má nižší afinitu k IRES elementu a tím pádem je u takovýchto ribosomů nižší míra translace závislá na IRES elementu. Avšak tato metodika se výrazně liší od mých studií. Je velký rozdíl mezi ribosomem s chybějící jednou modifikací a ribosomem s chybějícími 44 modifikacemi. Chybění 44 modifikací může kompletně rozrušit strukturu celého ribosomu. Například pseudouridiny v H69 stabilizují celou šroubovici 69, neboli celý mezipodjednotkový most (Sumita *et al* 2005).

Když se podíváme na výsledky prvotních pokusů testujících na čepičce závislou iniciaci translace, je u testovaných kmenů obsahujících kontrolní vektory (430 a 490) možné pozorovat četnější iniciaci translace u delečních kmenů $\Delta 70$ a $\Delta 70/51$. Mohlo by se tedy zdát, že nejenom u iniciace translace závislé na IRES struktuře je míra translace vyšší u delečních kmenů $\Delta 70$ a $\Delta 70/51$. Avšak tyto výsledky jsou pouze prvotní a je nutné je zopakovat.

Rozdílný fenotyp auxotrofních požadavků byl pozorovatelný u testovaných kmenů obsahujících vektor 73. U vektoru 73 byly zaměněny AUG kodóny na UUG jak u *HCV core* proteinu, tak i u Gal4p. Po snížení selekčních podmínek byly patrné rozdíly fenotypů. Deleční kmeny $\Delta 70$ a $\Delta 70/51$ měly problémy růst na -UA médiu. Kmen $\Delta 51$ na médiu -UA rostl sice o něco lépe než zbylé dva deleční kmeny, ale rostl o něco málo hůř než původní kmen pJ69-4A. Výrazně lepší růst delečního kmene $\Delta 70/51$ s vektorem 73 na médiu -UH byl pravděpodobně dán mutací v kmeni, Obr. 6.18. Toto vysvětlení podporuje i fakt, že po ověření delečních kmenů a po novém vnesení analyzačního vektoru 73 do testovaných kmenů se tento fenotyp již neobjevil, Obr. 6.20a-d. Když porovnáme rozdílné růstové vlastnosti testovaných kmenů obsahujících vektor 73 na médiu -UA a naměřené hodnoty poměrů aktivit β -galaktosidasy a světluškové luciferasy u těchto kmenů, zdá se, že si navzájem protiřečí. Já bych problémy růstu delečních kmenů $\Delta 70$ a $\Delta 70/51$ s vektorem 73 na médiu -UA vysvětlila jako odlišnou odpověď na buněčný stres. Z poměrů aktivit

vyplývá, že translace Gal4p z tohoto vektoru není příliš četná, tedy vzniká malé množství proteinů Ade2 a His3, a tím buňky strádají na aminokyseliny. Kvasinkové kmeny pJ69-4A a $\Delta 51$ lépe odpovídají na buněčný stres způsobený chyběním adeninu v médiu. V budoucnu by bylo potřeba toto tvrzení ověřit. Rozdíly v růstu jednotlivých testovaných kmenů na médiích -UA a -UH by mohly být také dány způsobem vytvoření kvasinkového kmene pJ69-4A. Nevíme, jak přesně James a jeho kolektiv (1996) vytvořili kmen pJ69-4A. Původní gen *HIS3* je inaktivován delecí úseku od nukleotidu -205 až po nukleotid 835. U původního genu *ADA2* došlo k záměně guanosinu na thymidin na pozici 190, což vede k záměně kodónu kódujícího glutamin na stop kodón. Funkční gen *HIS3* s novou promotorovou oblastí byl vnesen za gen *LYS2*, ten zůstal neporušen. Funkční gen *ADE2* s novou promotorovou oblastí pod kontrolou GAL2 byl vnesen pomocí homologní rekombinace přes jedno homologní místo do místa *ade2*, a proto může mít ponechanou vzdálenou regulační oblast původního *ADE2* genu. Tím pádem může docházet k částečné transkripci genu *ADE2* a tím k syntéze adeninu. U hladovění kvasinkových kmenů na histidin nemůže dojít jakkoliv jinak k iniciaci transkripce než pomocí Gal4p. To by mohlo odpovědět na nižší růst kvasinkových kmenů obsahujících vektor 73 na médiu -UH oproti médiu -UA. Avšak připomínám, že opravdu přesně nevíme, jak vypadá sekvence dané regulační oblasti. Bylo by potřeba příslušnou oblast genomu kvasinky pJ69-4A osekvenovat.

7.3 Vliv modifikací rRNA na iniciaci translace nezávislé na IRES elementu

Testování delečních kmenů s vektory testujícími ne-AUG iniciaci translace a pročitání otevřených čtecích rámců („*leaky scanning*“) je pilotní a je potřeba získané výsledky zopakovat. Zdá se ale, že u delečních kmenů $\Delta 70$ a $\Delta 70/51$ dochází k častějšímu pročení čtecího rámce. Deleční kmen $\Delta 70/51$ má zvýšenou četnost iniciace translace jak na AUG kodónu tak i na jiných kodónech (UUG a AUU). Otázkou je, zda je možné, aby jeden nukleotid ovlivnil rozpoznávání AUG kodónu. Mutace A1152, A1193, nebo G875 18S rRNA u kvasinky *S. cerevisiae* zvyšují frekvenci „*leaky scanning*“ (Dong *et al* 2008, Nemoto *et al* 2010). Všechny tři nukleotidy se vyskytují v centrální části malé podjednotky ribosomu. Zdá se tedy, že by nepřítomnost modifikace Cm1639 mohla ovlivňovat nerozpoznání AUG kodónu. Dong a kolektiv (2008) používali podobný testovací systém, kterým studovali iniciaci translace na *GCN4* genu s jeho regulační oblastí, neboli obsahující ORF1 anebo ORF4, jako mnou používané vektory 466, 467 a 490.

8. Souhrn

- Podařilo se mi vytvořit tři deleční kmeny $\Delta 70$, $\Delta 51$ a $\Delta 70/51$.
- Do delečních kmenů a kmene původního jsem vnesla sadu vektorů pFGAL4h-X.
- Se všemi kmeny jsem provedla sérii kapkových testů pro sledování auxotrofních požadavků jednotlivých kmenů.
- Upravila jsem selekční podmínky pro sledování auxotrofních požadavků u kmenů obsahujících vektor pFGAL4^{A/UUG}h-HCV^{A/UUG}.
- U kmenů obsahujících vektor pFGAL4^{A/UUG}h-HCV^{A/UUG} jsem stanovila růstové vlastnosti v tekutých médiích.
- Porovnála jsem růst testovaných kmenů obsahujících vektor pFGAL4^{A/UUG}h-HCV^{A/UUG} na médiu s vysokou koncentrací 3-AT.
- Změřila jsem aktivity β -galaktosidas u kvasinkových kmenů s vybranými vektory pFGAL4h-X.
- Z výše zmíněných pokusů a jejich výsledků vyplývá, že iniciace translace závislé na HCV IRES struktuře může být ovlivněna přítomností modifikace Cm1639 18S rRNA.
- U delečních kmenů $\Delta 51$ a $\Delta 70/51$ byl pozorován vliv na translaci.

9. Seznam literatury

- Allmang C, Tollervey D. 1998. The role of the 3' external transcribed spacer in yeast pre-rRNA processing. *Journal of molecular biology* 278: 67-78
- Armistead J, Khatkar S, Meyer B, Mark BL, Patel N, Coghlan G, Lamont RE, Liu S, Wiechert J, Cattini PA, Koetter P, Wrogemann K, Greenberg CR, Entian KD, Zelinski T, Triggs-Raine B. 2009. Mutation of a gene essential for ribosome biogenesis, EMG1, causes Bowen-Conradi syndrome. *American journal of human genetics* 84: 728-39
- Badis G, Fromont-Racine M, Jacquier A. 2003. A snoRNA that guides the two most conserved pseudouridine modifications within rRNA confers a growth advantage in yeast. *Rna* 9: 771-9
- Balakin AG, Smith L, Fournier MJ. 1996. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 86: 823-34
- Baudin-Baillieu A, Fabret C, Liang XH, Piekna-Przybylska D, Fournier MJ, Rousset JP. 2009. Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *Nucleic acids research* 37: 7665-77
- Baxter-Roshek JL, Petrov AN, Dinman JD. 2007. Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. *PloS one* 2: e174
- Bellodi C, Kopmar N, Ruggero D. 2010a. Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. *The EMBO journal* 29: 1865-76
- Bellodi C, Krasnykh O, Haynes N, Theodoropoulou M, Peng G, Montanaro L, Ruggero D. 2010b. Loss of function of the tumor suppressor DKC1 perturbs p27 translation control and contributes to pituitary tumorigenesis. *Cancer research* 70: 6026-35
- Bonnerot C, Pintard L, Lutfalla G. 2003. Functional redundancy of Spb1p and a snR52-dependent mechanism for the 2'-O-ribose methylation of a conserved rRNA position in yeast. *Molecular cell* 12: 1309-15
- Bousquet-Antonelli C, Henry Y, G'Elugne J P, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. 1997. A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. *The EMBO journal* 16: 4770-6
- Bousquet-Antonelli C, Vanrobays E, Gelugne JP, Caizergues-Ferrer M, Henry Y. 2000. Rrp8p is a yeast nucleolar protein functionally linked to Gar1p and involved in pre-rRNA cleavage at site A2. *Rna* 6: 826-43
- Decatur WA, Fournier MJ. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences* 27: 344-51
- Dokal I. 2000. Dyskeratosis congenita in all its forms. *British journal of haematology* 110: 768-79
- Dong J, Nanda JS, Rahman H, Pruitt MR, Shin BS, Wong CM, Lorsch JR, Hinnebusch AG. 2008. Genetic identification of yeast 18S rRNA residues required for efficient recruitment of initiator tRNA(Met) and AUG selection. *Genes & development* 22: 2242-55
- Ender C, Krek A, Friedlander MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, Pfeffer S, Rajewsky N, Meister G. 2008. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular cell* 32: 519-28
- Esguerra J, Warringer J, Blomberg A. 2008. Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping. *Rna* 14: 649-56

- Fatica A, Tollervey D. 2003. Insights into the structure and function of a guide RNP. *Nature structural biology* 10: 237-9
- Ganot P, Bortolin ML, Kiss T. 1997a. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89: 799-809
- Ganot P, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. 1997b. The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes & development* 11: 941-56
- Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic acids research* 30: e23
- Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nature genetics* 19: 32-8
- Henras A, Henry Y, Bousquet-Antonelli C, Noaillac-Depeyre J, Gelugne JP, Caizergues-Ferrer M. 1998. Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *The EMBO journal* 17: 7078-90
- Hoyeraal HM, Lamvik J, Moe PJ. 1970. Congenital hypoplastic thrombocytopenia and cerebral malformations in two brothers. *Acta paediatrica Scandinavica* 59: 185-91
- Jack K, Bellodi C, Landry DM, Niederer RO, Meskauskas A, Musalgaonkar S, Kopmar N, Krasnykh O, Dean AM, Thompson SR, Ruggero D, Dinman JD. 2011. rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Molecular cell* 44: 660-6
- Joung JK, Ramm EI, Pabo CO. 2000. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7382-7
- Kimura S, Suzuki T. 2010. Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the Escherichia coli 16S rRNA. *Nucleic acids research* 38: 1341-52
- King TH, Liu B, McCully RR, Fournier MJ. 2003. Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Molecular cell* 11: 425-35
- Kishore S, Stamm S. 2006. Regulation of alternative splicing by snoRNAs. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71: 329-34
- Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, Aalfs CM, McMahan C, Richmond P, Jones A, Hennekam RC, Poustka A, Mason PJ, Dokal I. 1999. Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. *British journal of haematology* 107: 335-9
- Lafontaine D, Delcour J, Glasser AL, Desgres J, Vandenhoute J. 1994. The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *Journal of molecular biology* 241: 492-7
- Lafontaine D, Vandenhoute J, Tollervey D. 1995. The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes & development* 9: 2470-81

- Lafontaine DL, Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Caizergues-Ferrer M, Tollervey D. 1998a. The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes & development* 12: 527-37
- Lafontaine DL, Preiss T, Tollervey D. 1998b. Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Molecular and cellular biology* 18: 2360-70
- Lafontaine DL, Tollervey D. 2000. Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Molecular and cellular biology* 20: 2650-9
- Lapeyre B, Purushothaman SK. 2004. Spb1p-directed formation of Gm2922 in the ribosome catalytic center occurs at a late processing stage. *Molecular cell* 16: 663-9
- Liang XH, Liu Q, Fournier MJ. 2007. rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Molecular cell* 28: 965-77
- Liang XH, Liu Q, Fournier MJ. 2009. Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *Rna* 15: 1716-28
- Liang XH, Liu Q, King TH, Fournier MJ. 2010. Strong dependence between functional domains in a dual-function snoRNA infers coupling of rRNA processing and modification events. *Nucleic acids research* 38: 3376-87
- Lowe TM, Eddy SR. 1999. A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science* 283: 1168-71
- Lowry RB, Innes AM, Bernier FP, McLeod DR, Greenberg CR, Chudley AE, Chodirker B, Marles SL, Crumley MJ, Loredó-Osti JC, Morgan K, Fujiwara TM. 2003. Bowen-Conradi syndrome: a clinical and genetic study. *American journal of medical genetics. Part A* 120A: 423-8
- Masek T, Vopalensky V, Horvath O, Vortelova L, Feketova Z, Pospisek M. 2007. Hepatitis C virus internal ribosome entry site initiates protein synthesis at the authentic initiation codon in yeast. *The Journal of general virology* 88: 1992-2002
- Meyer B, Wurm JP, Kotter P, Leisegang MS, Schilling V, Buchhaupt M, Held M, Bahr U, Karas M, Heckel A, Bohnsack MT, Wohnert J, Entian KD. 2011. The Bowen-Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of Psi1191 in yeast 18S rRNA. *Nucleic acids research* 39: 1526-37
- Mokrejs M, Masek T, Vopalensky V, Hlubucek P, Delbos P, Pospisek M. 2010. IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic acids research* 38: D131-6
- Nemoto N, Singh CR, Udagawa T, Wang S, Thorson E, Winter Z, Ohira T, Li M, Valasek L, Brown SJ, Asano K. 2010. Yeast 18 S rRNA is directly involved in the ribosomal response to stringent AUG selection during translation initiation. *The Journal of biological chemistry* 285: 32200-12
- Oeffinger M, Tollervey D. 2003. Yeast Nop15p is an RNA-binding protein required for pre-rRNA processing and cytokinesis. *The EMBO journal* 22: 6573-83
- Ofengand J. 2002. Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS letters* 514: 17-25
- Ono M, Yamada K, Avolio F, Scott MS, van Koningsbruggen S, Barton GJ, Lamond AI. 2010. Analysis of human small nucleolar RNAs (snoRNA) and the development of

- snoRNA modulator of gene expression vectors. *Molecular biology of the cell* 21: 1569-84
- Peifer C, Sharma S, Watzinger P, Lamberth S, Kotter P, Entian KD. 2013. Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic acids research* 41: 1151-63
- Piekna-Przybylska D, Decatur WA, Fournier MJ. 2007. New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA. *Rna* 13: 305-12
- Piekna-Przybylska D, Przybylski P, Baudin-Baillieu A, Rousset JP, Fournier MJ. 2008. Ribosome performance is enhanced by a rich cluster of pseudouridines in the A-site finger region of the large subunit. *The Journal of biological chemistry* 283: 26026-36
- Rakauskaite R, Dinman JD. 2008. rRNA mutants in the yeast peptidyltransferase center reveal allosteric information networks and mechanisms of drug resistance. *Nucleic acids research* 36: 1497-507
- Rashid R, Liang B, Baker DL, Youssef OA, He Y, Phipps K, Terns RM, Terns MP, Li H. 2006. Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita. *Molecular cell* 21: 249-60
- Ruggero D, Grisendi S, Piazza F, Rego E, Mari F, Rao PH, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. 2003. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science* 299: 259-62
- Samarsky DA, Fournier MJ. 1999. A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 27: 161-4
- Sharma S, Watzinger P, Kotter P, Entian KD. 2013. Identification of a novel methyltransferase, Bmt2, responsible for the N1-methyl-adenosine base modification of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*
- Schattner P, Decatur WA, Davis CA, Ares M, Jr., Fournier MJ, Lowe TM. 2004. Genome-wide searching for pseudouridylation guide snoRNAs: analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic acids research* 32: 4281-96
- Sumita M, Desaulniers JP, Chang YC, Chui HM, Clos L, 2nd, Chow CS. 2005. Effects of nucleotide substitution and modification on the stability and structure of helix 69 from 28S rRNA. *Rna* 11: 1420-9
- Thomas SR, Keller CA, Szyk A, Cannon JR, Laronde-Leblanc NA. 2011. Structural insight into the functional mechanism of Nep1/Emg1 N1-specific pseudouridine methyltransferase in ribosome biogenesis. *Nucleic acids research* 39: 2445-57
- Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC. 1993. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72: 443-57
- Venema J, Tollervey D. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* 33: 261-311
- Vitali P, Basyuk E, Le Meur E, Bertrand E, Muscatelli F, Cavaille J, Huttenhofer A. 2005. ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *The Journal of cell biology* 169: 745-53
- Watkins NJ, Bohnsack MT. 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 3: 397-414
- Watkins NJ, Gottschalk A, Neubauer G, Kastner B, Fabrizio P, Mann M, Luhrmann R. 1998. Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding

- protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *Rna* 4: 1549-68
- White J, Li Z, Sardana R, Bujnicki JM, Marcotte EM, Johnson AW. 2008. Bud23 methylates G1575 of 18S rRNA and is required for efficient nuclear export of pre-40S subunits. *Molecular and cellular biology* 28: 3151-61
- Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D. 2006. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* 312: 902-6
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883-96