

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Zuzana Cihlářová**

Je sestřih pre-mRNA v kvasince *S. cerevisiae* procesem ko- nebo postranskripčním?

Does the pre-mRNA splicing occur in *S. cerevisiae* co- or posttranscriptionally?

**Bakalářská práce**

Školitel: doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha, 2014

Své upřímné poděkování bych ráda věnovala svému školiteli doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc., za cenné rady a trpělivost při odborném vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Anně Valentové, Mgr. Martině Hálové, Bc. Anně Jordákové i všem ostatním členům laboratoře za pomoc a podporu.

**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 Doksech dne 13. 8. 2014

Zuzana Cihlářová

## Abstrakt

Donedávna se pohlíželo na sestřih a transkripci jako na téměř nezávislé procesy. Dnes však řada studií přináší mnoho důkazů o jejich propojení, a to i u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Propojení těchto procesů je zprostředkováno zejména C-terminální doménou RNA polymerázy II, kterou tvoří tandemově se opakující heptapeptidové sekvence – YSPTSPS. Aminokyselinové zbytky heptapeptidové sekvence jsou v průběhu transkripce specificky fosforylovány, což reguluje samotný průběh transkripce a vazbu faktorů, mj. nezbytných pro úpravu vznikajícího transkriptu. Úpravy primárního transkriptu tak probíhají u vyšších eukaryot zejména kotranskripčně, tzn. před ukončením transkripce a uvolněním funkční mRNA.

Názor na problematiku kotranskripčního sestřihu se u *S. cerevisiae* v posledních letech značně změnil. Nicméně dnes se pohlíží na sestřih pre-mRNA většiny genů *S. cerevisiae* jako na kotranskripční proces. RNA polymeráza II zpomaluje v oblasti terminálního exonu, což poskytuje jednotlivým komponentám spliceosomu dostatek času pro jejich sestavení na pre-mRNA a pro katalýzu sestřihu ještě před dokončením transkripce.

**Klíčová slova:** kotranskripční sestřih, RNA polymeráza II, *Saccharomyces cerevisiae*, U snRNP, spliceosom, pre-mRNA

## **Abstract**

Until recently, the splicing and transcription were seen as almost independent processes. However, today a lot of studies provide plenty of evidence about their connection, even in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The connection of these processes is particularly mediated by C-terminal domain of RNA polymerase II, which is consisted of tandemly repeated heptapeptide sequence – YSPTSPS. Amino acid residues of this heptapeptide sequence are specifically phosphorylated during transcription, which regulates transcription process and also the binding of specific factors. These factors are necessary for processing of the nascent transcript. Modifications of the primary transcript occur especially cotranscriptionally in higher eukaryotes, thus before the transcription is terminated and also before the functional mRNA is released.

Opinion on cotranscriptional splicing in *S. cerevisiae* were significantly changed in the last years. However, nowadays the splicing of pre-mRNA of most genes in *S. cerevisiae* is seen as cotranscriptional process. RNA polymerase II pauses within the terminal exons and this pausing event provides sufficient time for each spliceosomal component to assemble on the pre-mRNA and also for catalysis of splicing before the transcription termination.

**Keywords:** cotranscriptional splicing, RNA polymerase II, *Saccharomyces cerevisiae*, U snRNP, spliceosome, pre-mRNA

# Obsah

Seznam použitých zkratek.....	1
1. Úvod.....	2
2. Transkripce u <i>S. cerevisiae</i> .....	3
2.1 RNA polymeráza II.....	3
2.1.1 CTD.....	3
2.1.2 Elongační rychlost.....	5
3. Úpravy pre-mRNA.....	9
3.1 Sestřih pre-mRNA u <i>S. cerevisiae</i> .....	10
3.2 Kotranskripční sestřih.....	12
4. Vývoj názoru na problematiku kotranskripčního sestřihu u <i>S. cerevisiae</i> .....	13
4.1 První zmínka o kotranskripčním sestřihu u <i>S. cerevisiae</i> .....	13
4.2 Kotranskripční vyvazování U1 snRNP.....	13
4.3 Důkazy kotranskripčního sestavování spliceosomu a sestřihu u vybraných genů.....	14
4.4 Sestavování spliceosomu a sestřih probíhají převážně posttranskripčně.....	16
4.5 Sestřih je kotranskripční v důsledku zpomalení RNAP II v oblasti exonu 2.....	17
4.6 Globální pohled na kinetiku sestřihu umělého konstruktů <i>Ribo1</i> u <i>S. cerevisiae</i> .....	19
5. Závěr.....	21
Seznam použité literatury.....	22

## Seznam použitých zkratk

<b>BS</b>	místo větvení
<b>bp</b>	pár bází
<b>CBC</b>	komplex vázající čepičku
<b>CTD</b>	C-terminální doména RNA polymerázy II
<b>EF</b>	exportní faktor
<b>ChIP</b>	chromatinová imunoprecipitace
<b>kb/min</b>	kilo báze za minutu
<b>m<sup>7</sup>G</b>	7-methylguanosin
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b>ncRNA</b>	nekódující RNA
<b>nt</b>	nukleotid
<b>NTC</b>	komplex proteinů asociovaných s Prp19
<b>pre-mRNA</b>	prekurzor mediátorové RNA
<b>pSer<sub>2</sub></b>	fosforylovaný serin CTD v pozici 2
<b>pSer<sub>5</sub></b>	fosforylovaný serin CTD v pozici 5
<b>RNAP I</b>	RNA polymeráza I
<b>RNAP II</b>	RNA polymeráza II
<b>RNAP III</b>	RNA polymeráza III
<b>rRNA</b>	ribosomální RNA
<b>snRNA</b>	malá jaderná RNA
<b>snRNP</b>	malá jaderná ribonukleoproteinová partikule
<b>tRNA</b>	transferová RNA
<b>3'SS</b>	3' sestřihové místo
<b>5'SS</b>	5' sestřihové místo

## 1. Úvod

Kvasinka *S. cerevisiae* je jeden z nejjednodušších eukaryotních organismů. Tento organismus se v některých buněčných pochodech a jejich regulacích může podobat vyšším eukaryotům. Díky této skutečnosti je možné některé výsledky, které byly získány studiem *S. cerevisiae*, využít pro objasnění mechanismů u složitějších organismů. *S. cerevisiae* se mimo jiné využívá pro studium sestřihu, kterého se u kvasinky účastní přibližně 90 proteinů a téměř všechny mají své homology u vyšších eukaryot (Fabrizio *et al.*, 2009). Z toho důvodu je vhodné pro studium sestřihu u vyšších eukaryot nejprve dosáhnout detailních znalostí sestřihu u *S. cerevisiae*. Její genom se skládá z 5850 funkčních genů, z nichž pouze 5 % obsahuje intron (přibližně 270 genů) a jen několik genů obsahuje více než jeden intron (Schwartz *et al.*, 2008).

Transkripce RNA polymerázou II vzniká primární transkript (pre-mRNA), který dále podstupuje řadu úprav vedoucích ke vzniku funkční mRNA. Mezi tyto úpravy patří syntéza čepičky, sestřih a polyadenylace. Transkripce a úpravy pre-mRNA byly tradičně studovány a chápány odděleně, dnes je však jasné, že dochází k jejich vzájemnému funkčnímu a regulačnímu provázání.

Tato bakalářská práce se zaměřuje zejména na problematiku provázání transkripce a sestřihu u *S. cerevisiae*. Sestřih je proces, který může probíhat buď před dokončením transkripce – kotranskripčně, nebo až po jejím dokončení – posttranskripčně. Otázkou zůstává, který z těchto mechanismů převažuje u kvasinky *S. cerevisiae*. Tato problematika je u vyšších eukaryot mnohem detailněji prostudována a je obecně přijímáno, že v případě vyšších eukaryot sestřih probíhá převážně kotranskripčně. Nicméně názor na tuto problematiku se u kvasinky *S. cerevisiae* v posledních letech značně měnil.

## 2. Transkripce u *S. cerevisiae*

Transkripce je proces, během kterého dochází k přepisu určité části nukleotidové sekvence DNA do sekvence RNA. Dává vzniknout transkriptu, který je komplementární k jednomu z řetězců DNA a který se označuje jako pre-mRNA. Transkripce se skládá ze tří na sebe navazujících fází, jsou to iniciace, elongace a terminace. Tento proces je katalyzován třemi strukturně příbuznými DNA-dependentními RNA polymerázami: RNA polymeráza I (RNAP I), RNA polymeráza II (RNAP II) a RNA polymeráza III (RNAP III). Každá z polymeráz působí na různé skupiny genů. RNAP I slouží k syntéze ribozomální RNA (rRNA), RNAP III syntetizuje transferovou RNA (tRNA), 5S rRNA a jiné malé nekódující RNA. RNAP II je zodpovědná za transkripci všech genů kódujících proteiny (mRNA), ale i některých nekódujících RNA (ncRNA).

### 2.1 RNA polymeráza II

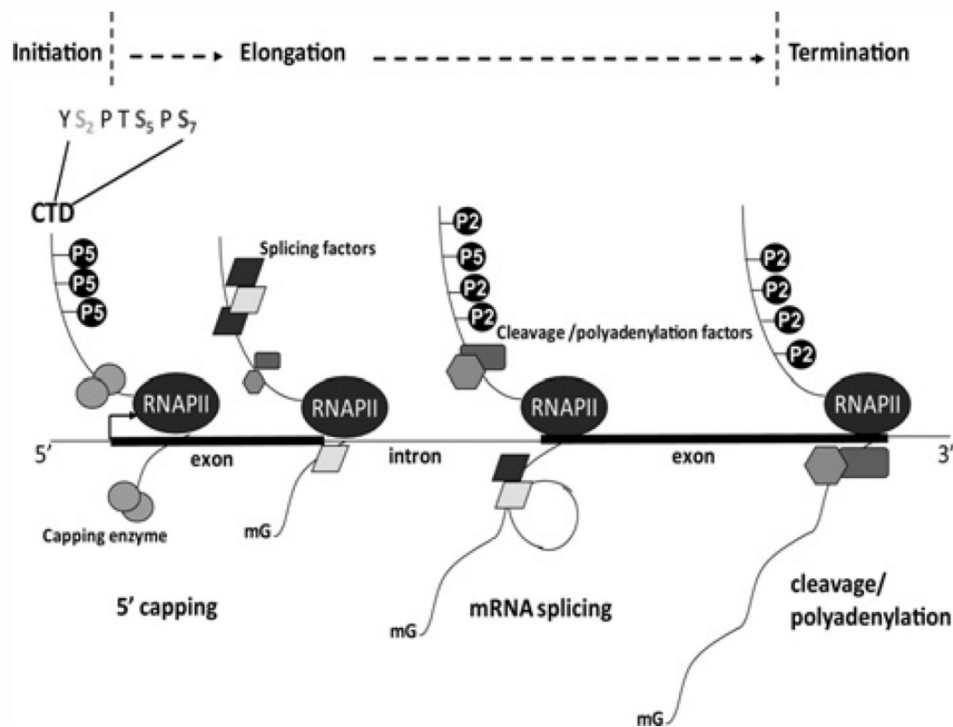
#### 2.1.1 CTD

Nejvíce studovanou polymerázou je RNAP II. Jedná se o multi-podjednotkový enzym, který v kvasince zahrnuje 12 polypeptidů (Rpb1-Rpb12). Největší z nich, Rpb1, nese enzymatickou katalytickou aktivitu. Součástí Rpb1 je C-terminální doména (CTD), kterou tvoří tandemově se opakující heptapeptidové sekvence – YSPTSPS. Množství repetitivních domén CTD se liší mezi jednotlivými druhy eukaryot. Kvasinka *S. cerevisiae* obsahuje 26 těchto repetitivních domén (Allison *et al.*, 1985), zatímco u savců jich nalezneme 52 (Corden, 1990). CTD slouží jako „vazebná plošina“ pro řadu proteinových faktorů, čímž usnadňuje jejich kotranskripční vazbu a působení na pre-mRNA (Kornblihtt *et al.*, 2004). Specifita a časování vazby je zajištěno „CTD kódem“, který představují posttranslační modifikace jednotlivých aminokyselin heptapeptidové sekvence (Buratowski, 2003; Corden, 2007).

Nejčastější modifikací CTD je fosforylace. Může k ní docházet na pěti aminokyselinách heptapeptidu, Tyr<sub>1</sub>, Ser<sub>2</sub>, Thr<sub>4</sub>, Ser<sub>5</sub> a Ser<sub>7</sub>, přičemž nejvýznamnější je fosforylace na Ser<sub>2</sub> a Ser<sub>5</sub>. V jednotlivých fázích transkripce se stav fosforylace CTD mění (shrnuto v Buratowski, 2009). Na promotor se obvykle váže polymeráza v hypofosforylovaném stavu. Po iniciaci transkripce dochází k fosforylaci Ser<sub>5</sub> (pSer<sub>5</sub>), což umožňuje uvolnění RNAP II z promotoru a počátek elongace (Schroeder *et al.*, 2000). Fosforylace Ser<sub>5</sub> je nezbytná pro vazbu enzymů, které se podílejí na tvorbě 7-methylguanosinové (m<sup>7</sup>G) čepičky na 5'-konci



primárního transkriptu (Cho *et al.*, 1997). Během elongace postupně ubývá fosforylace na Ser<sub>5</sub> a naopak dochází ke zvýšené fosforylaci Ser<sub>2</sub> (pSer<sub>2</sub>; Komarnitsky *et al.*, 2000), což umožňuje navázání faktorů pro maturaci 3'-konce transkriptu (Obr. 1; Licatalosi *et al.*, 2002). Po úpravách 3'-konce primárního transkriptu se defosforyluje i pSer<sub>2</sub>. Během transkripce dochází také k fosforylaci Ser<sub>7</sub> (pSer<sub>7</sub>), přičemž dynamika fosforylace je podobná modifikaci na Ser<sub>5</sub>. U savců je pSer<sub>7</sub> nezbytný pro efektivní transkripci malých jaderných RNA (snRNA) a jejich následné úpravy. Nicméně funkce pSer<sub>7</sub> u *S. cerevisiae* ještě nebyla odhalena (Kim *et al.*, 2009).



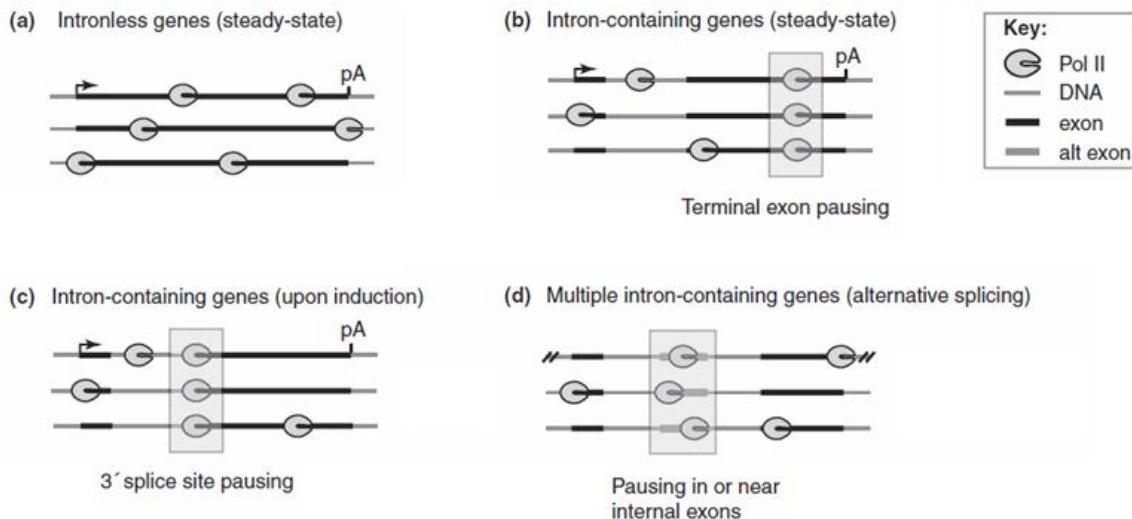
**Obr. 1: Stav CTD v jednotlivých fázích transkripce.** Dynamika fosforylace serinu 2, 5 a 7 je nezbytná pro následnou vazbu faktorů, které se podílejí na maturaci pre-mRNA. Obrázek znázorňuje vazbu faktorů nutných pro syntézu m<sup>7</sup>G čepičky, vazbu sestřihových faktorů a faktorů pro maturaci 3' konce primárního transkriptu (převzato z Alexander and Beggs, 2010).

V roce 2010 skupina Jean Beggsové studovala dynamiku fosforylace serinů CTD u konkrétního genu *S. cerevisiae* – *APE2* a umělého konstruktu *Ribo1*. Detekovali určité odchylky od obecného schématu. Zásadním rozdílem bylo zjištění, že Ser<sub>5</sub> je fosforylován na promotoru a v okolí 3' sestřihového místa (3'SS), nicméně mezi těmito oblastmi se pSer<sub>5</sub> nevyskytoval. Skupina Jean Beggsové se tudíž domnívala, že musí být Ser<sub>5</sub> znovu fosforylován ve chvíli, kdy polymeráza transkribuje oblast 3'SS. Fosforylovaný Ser<sub>2</sub> se poprvé objevuje také na 3'SS a jeho množství postupně roste směrem k 3'-konci genu. Na rozdíl od promotoru

jsou tedy seriny CTD ve chvíli, kdy se RNAP II vyskytuje v oblasti 3'SS v hyperfosforylovaném stavu. Autoři předpokládají, že 3'SS slouží jako jakýsi transkripční kontrolní bod pro RNAP II a ovlivňuje její chování. Dále došli k závěru, že fosforylace Ser<sub>5</sub> souvisí s iniciací transkripce, podílí se na zpomalení RNAP II v blízkosti promotoru a v okolí 3'SS. Na druhé straně pSer<sub>2</sub> ovlivňuje elongaci a pravděpodobně uvolnění z kontrolního bodu (Alexander *et al.*, 2010; Buratowski, 2009). *S. cerevisiae* však obsahuje většinu genů bez intronů, kde průběh fosforylace CTD odpovídá obecnému schématu popsanému v předchozím odstavci.

### 2.1.2 Elongační rychlost

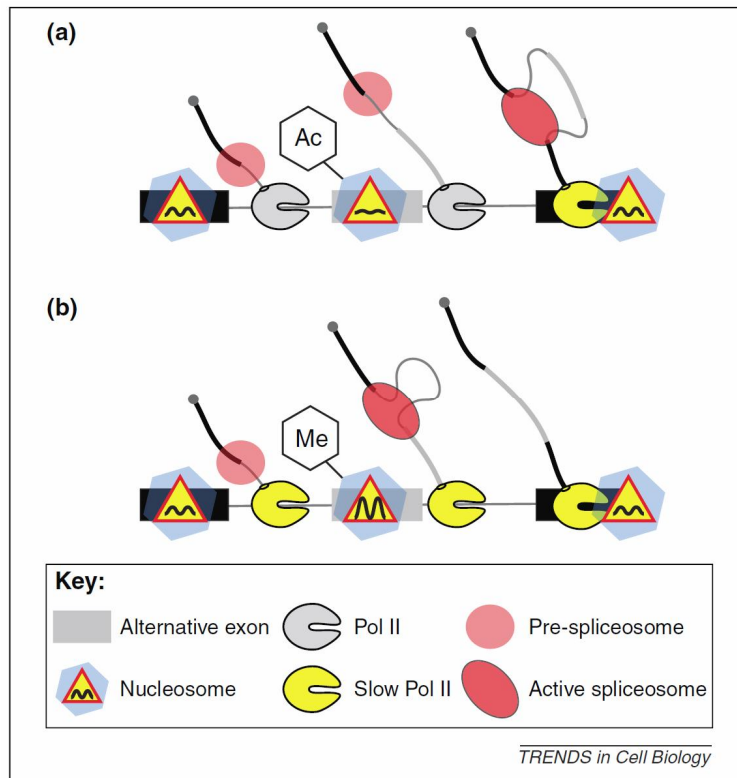
Rychlost elongace se pohybuje v rozmezí 1 až 4,5 kb/min a částečně se liší mezi jednotlivými geny a druhy organismů (Zenklusen *et al.*, 2008). V minulosti se předpokládalo, že elongace probíhá určitou téměř stálou rychlostí a že pohyb RNAP II může být během elongace přerušen pouze náhodnými pauzami. Dnes je však jasné, že rychlost elongace není uniformní, a proto uvádění průměrné rychlosti může být matoucí a zavádějící. RNAP II během transkripce zpomaluje nebo se zastavuje („pauzuje“) na konkrétních oblastech genu. Tyto pauzy pak vytvářejí dostatek času pro kotranskripční úpravy pre-mRNA. RNAP II kvasinky *S. cerevisiae* zpomaluje před terminací transkripce v oblasti exonu 2, přibližně 200 nt „downstream“ od 3'SS a 250 nt „upstream“ od 3' konce transkriptu (Oesterreich *et al.*, 2010). Další pauza byla detekována v oblasti 3'SS (Obr. 2). Zde dochází k přechodné akumulaci RNAP II, která je zde fosforylována na Ser<sub>2</sub> a Ser<sub>5</sub> domény CTD (Alexander *et al.*, 2010). Výše popsané pauzy se však vyskytují u *S. cerevisiae* pouze při transkripci genů, které obsahují intron.



**Obr. 2: Tři pauzy RNAP II během transkripce.** (a) Náhodné pauzy u genů bez intronu. (b) Pauza během transkripce terminálního exonu. (c) Pauza v oblasti 3' SS. (d) U vyšších eukaryot dochází k akumulaci RNAP II v oblasti vnitřního exonu (převzato a upraveno dle Oesterreich *et al.*, 2011).

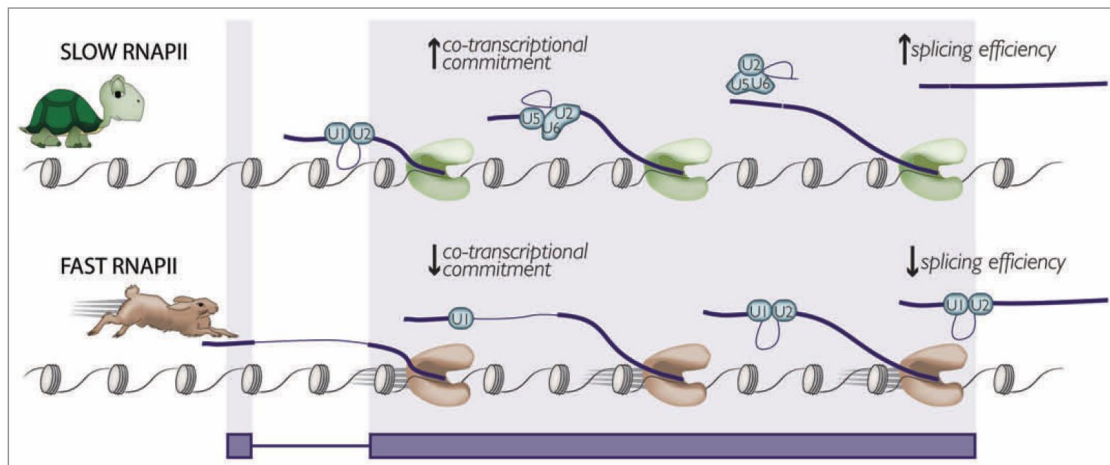
U vyšších eukaryot existuje několik možných vysvětlení, jak dochází k zpomalení RNAP II. Jedna z hypotéz říká, že kinetika elongace může být ovlivněna pozicí nukleozómů, které s největší pravděpodobností fungují jako bariéra průběhu transkripce (Hodges *et al.*, 2009). Jejich přítomnost vede k zpomalení RNAP II nebo k jejímu sklouznutí v opačném směru transkripce („backtracking“) a uvolnění 3'-konce primárního transkriptu z aktivního místa (Churchman and Weissman, 2011; Kireeva *et al.*, 2005). Transkripce se dočasně zastaví a RNAP II se následně buď může vrátit zpět do výchozí pozice, nebo dochází k předčasnému uvolnění transkriptu (Shaevitz *et al.*, 2003). Hustota nukleozómů se mezi introny a exony liší, nejvíce se jich nachází v oblasti exonů, a to může způsobovat zpomalení RNAP II v této oblasti (Schwartz *et al.*, 2009). Elongační rychlost je s největší pravděpodobností ovlivněna také histonovými modifikacemi. Acetylace histonů vede k rozvolnění chromatinu a snížení zpomalovací schopnosti nukleosómů, čímž je zajištěna vyšší rychlost elongace. Naproti tomu metylace histonů umožňuje kondenzaci chromatinu a způsobuje zpomalení RNAP II (Obr. 3; shrnuto v Oesterreich *et al.*, 2011).

Dosud nebylo prokázáno, že histonové modifikace pauzu RNAP II opravdu způsobují. Je však obecně přijímáno, že ovlivňují alternativní sestřih u vyšších eukaryot, jejichž geny obsahují více intronů. Alternativní sestřih pre-mRNA je proces, během kterého vzniká velké množství různých primárních transkriptů z omezeného množství genů, čímž se jednak výrazně zvyšuje kódující potenciál genomu, jednak mohou určité sestřihové varianty vznikat v určitých typech buněk a tkání, čímž mohou být podkladem či materiálem pro buněčnou, tkáňovou a orgánovou diferenciaci. Různé primární transkripty mohou vznikat v důsledku vystřížení některého z exonů nebo v důsledku ponechání sekvence intronu ve finální mRNA, mimoto se může uplatnit výběr alternativního 5' a 3' sestřihového místa (shrnutí v Chen and Manley, 2009). Na základě řady studií autoři předpokládají, že k regulaci alternativního sestřihu dochází také prostřednictvím změny elongační rychlosti RNAP II během transkripce v konkrétních oblastech genu (shrnutí v Oesterreich *et al.*, 2011). Jednotlivá sestřihová místa jsou totiž rozeznávána komponentami spliceosomu s různou afinitou bezprostředně po transkripci (Roberts *et al.*, 1998). Autoři popisují model alternativního sestřihu u vyšších eukaryot, ve kterém zpomalení RNAP II může poskytnout slabému 3' splice site (3'SS) dostatek času pro jeho rozeznání komponentami spliceosomu ještě před tím než se v sekvenci nascentního transkriptu objeví konkurenční silné 3'SS. Pokud by nedošlo ke zpomalení, vzniklo by a bylo rozpoznáno konkurenční silné 3'SS místo slabého, a tím by byl mezilehlý exon vystřížen spolu s přilehlými introny a ve finální mRNA by tak chyběl (Obr. 3; Kornblihtt, 2006; de la Mata *et al.*, 2003). Podobný model byl pozorován také u kvasinky *S. cerevisiae* při testování genu *DYN2* (Howe *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že u *S. cerevisiae* nalezneme pouze několik genů, které obsahují více než jeden intron (Blandin *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000), dlouhou dobu byli vědci přesvědčeni, že *S. cerevisiae* alternativní sestřih téměř nevyužívá. Nicméně v posledních několika letech se ukazuje, že i tento organismus dokáže měnit genovou expresi na úrovni sestřihu v závislosti na vnějších podmínkách (Pleiss *et al.*, 2007).



**Obr. 3: Histonové modifikace ovlivňují transkripci a sestřih u vyšších eukaryot.** (a) Zvýšení elongační rychlosti RNAP II v důsledku acetylace histonů a nízké hustoty nukleosomů v oblasti alternativního exonu snižuje množství času pro rozeznání sestřihového místa daného exonu komponentami spliceosomu, což vede k jeho vystřížení z mRNA. (b) Zpomalení elongační rychlosti RNAP II vlivem metylace histonů a vysoké hustoty nukleosomů v oblasti alternativního exonu poskytuje komponentám spliceosomu více času pro rozeznání sestřihových míst alternativního exonu a jeho začlenění do mRNA (převzato z Oesterreich *et al.*, 2011).

Zajímavé závěry přinesla studie vzniklá pod vedením Christin Guthrie. Ta dokládá, že i když změna elongační rychlosti RNAP II nemá velký vliv na alternativní sestřih u *S. cerevisiae*, pravděpodobně významně ovlivňuje efektivitu sestřihu. Podle autorů elongační rychlost RNAP II ovlivňuje účinnost sestřihu mnoha pre-mRNA *S. cerevisiae*. Pokud se sníží elongační rychlost RNAP II, zvýší se efektivita sestřihu a obráceně (Obr. 4). Autoři pomocí techniky chromatinové imunoprecipitace (ChIP) zjistili, že rychlost elongace může ovlivňovat mimo jiné i vazbu sestřihových faktorů na pre-mRNA. Zrychlení RNAP II způsobuje přítomnost nižšího množství sestřihových faktorů na pre-mRNA, naopak zpomalení RNAP II umožňuje vazbu většího množství sestřihových faktorů (Obr. 4; Moehle *et al.*, 2014).



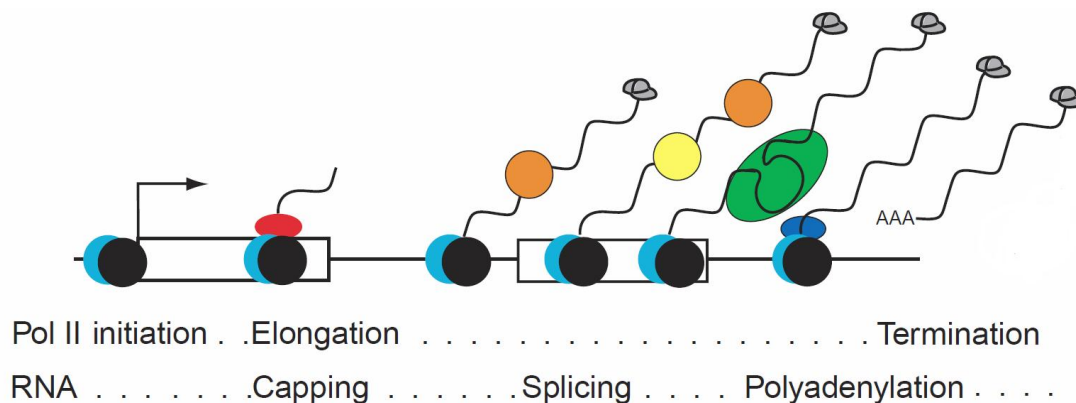
**Obr. 4:** Hypotetický model, který znázorňuje, jak elongační rychlost RNAP II ovlivňuje u většiny pre-mRNA *S. cerevisiae* efektivitu sestřihu a vazbu sestřihových faktorů. Snížení elongační rychlosti RNAP II zvyšuje efektivitu sestřihu a přítomnost sestřihových faktorů na pre-mRNA. Naopak zvýšení elongační rychlosti RNAP II efektivitu sestřihu snižuje, stejně tak je snížena i hustota sestřihových faktorů na pre-mRNA (převzato z Moehle *et al.*, 2014).

### 3. Úpravy pre-mRNA

Pre-mRNA je postupně modifikována za vzniku mRNA, která je následně exportována z jádra. Kromě sestřihu patří mezi úpravy primárního transkriptu syntéza  $m^7G$  čepičky na 5'-konci. Další významnou modifikací je štěpení a polyadenylace, na 3'-konci pre-mRNA. Transkripce a modifikace pre-mRNA byly tradičně studovány odděleně. Předpokládalo se, že probíhají postupně a téměř nezávisle. Nicméně ve většině případů dochází k jejich funkční interakci. Jedná se tudíž o procesy, které mohou probíhat současně a mohou se vzájemně ovlivňovat (Bentley, 2002). Takové modifikace se potom označují jako kotranskripční, tj. modifikace probíhající ještě před dokončením transkripce (Obr. 5).

RNA-polymeráza II váže v průběhu transkripce na svou C-terminální doménu faktory, které jsou nezbytné pro úpravy pre-mRNA. Tyto faktory představují jedno z hlavních propojení mezi transkripcí a modifikacemi pre-mRNA. Jakmile primární transkript dosáhne velikosti 20-30 nukleotidů, spustí se syntéza čepičky na jeho 5'-konci (Rasmussen and Lis, 1993). K syntéze tedy dochází krátce po iniciaci/zahájení transkripce, kotranskripčně. Sestřih pre-mRNA může probíhat buď během transkripce, kotranskripčně, nebo po jejím skončení, posttranskripčně. V okamžiku, kdy se RNAP II nachází na 3'-konci transkribovaného genu,

syntetizuje specifické sekvence, které spouští štěpení a polyadenylaci v této oblasti, k této modifikaci pre-mRNA dochází posttranskripčně (Neugebauer, 2002).



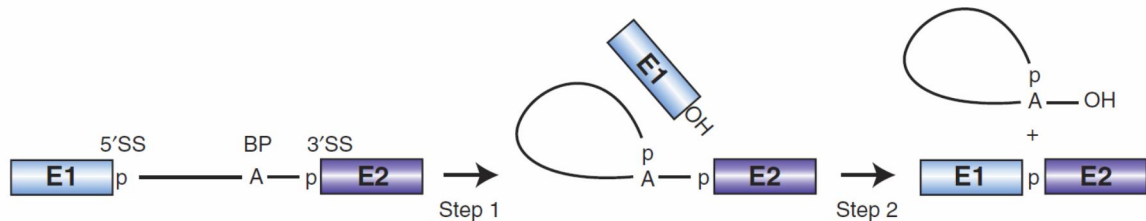
**Obr. 5: Posttranskripční modifikace primárního transkriptu** (převzato z Neugebauer, 2002).

### 3.1 Sestřih pre-mRNA u *S. cerevisiae*

Většina genů eukaryotických organismů se skládá z úseků kódujících proteiny – exonů, které jsou odděleny protein nekódujícími oblastmi – introny. Množství a charakter intronů se významně liší mezi jednotlivými organismy. U vyšších eukaryot obsahuje většina genů zpravidla větší počet intronů. Genom kvasinky *S. cerevisiae* se skládá z 5850 funkčních genů, z nichž přibližně 270 obsahuje intron, tj. méně než 5 %. Kromě toho, více než jeden intron se vyskytuje pouze u 0,2 % genů (Schwartz *et al.*, 2008).

Na pre-mRNA se v jádře dynamicky sestavuje ribonukleoproteinový komplex, tzv. spliceosom, který katalyzuje dvě transesterifikační reakce, jimiž je intron z pre-mRNA vystřižen. Hlavními komponentami spliceosomu jsou malé, jaderné RNA, bohaté na uracil, které se označují jako U1, U2, U4, U5 a U6 snRNA. Každá snRNA je asociována s několika specifickými proteiny, a vytváří tak ribonukleoproteinové partikule (snRNP). Vedle snRNP jsou součástí spliceosomu také desítky „non-snRNP“ proteinů (Lamm and Lamond, 1993). Spliceosom rozeznává intronové oblasti na pre-mRNA pomocí tří esenciálních sekvencí: hranic intronu, tzv. 5' a 3' sestřihová místa (5'SS, 3'SS), a oblasti větvení (BS), která se nachází uvnitř intronu. Tyto sekvence jsou u *S. cerevisiae* velmi dobře konzervovány: 75 % 5'SS obsahuje sekvenci GUAUGU, 92 % BS obsahuje sekvenci UACUAAC a 3'SS nese zcela konzervovanou oblast AG (Bon *et al.*, 2003; Spingola *et al.*, 1999).

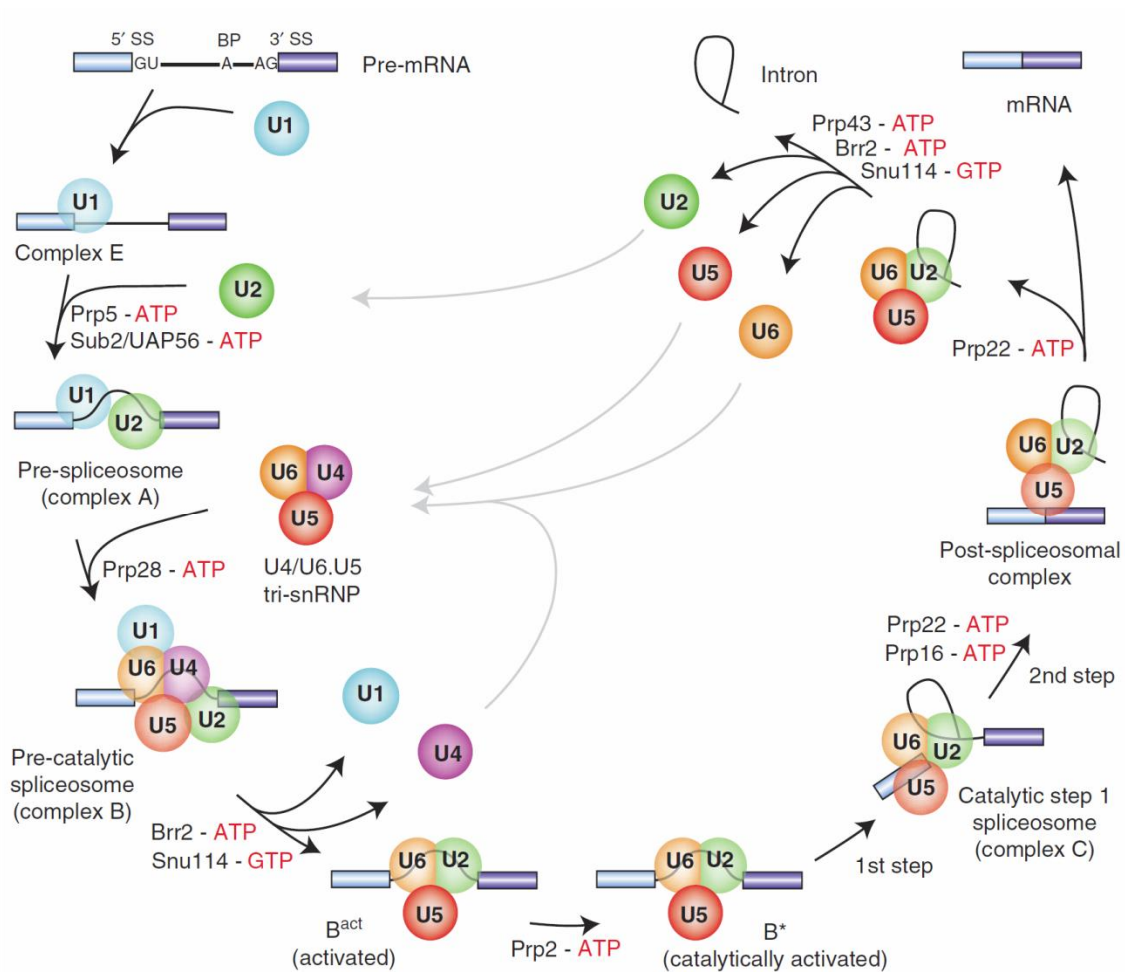
Na počátku transesterifikace 2'hydroxylová skupina adenosinu z oblasti BS nukleofilně napadá fosfodiesterovou vazbu v 5'SS. Dochází k tvorbě volného exonu 1 a lasovité struktury, která se skládá z intronu a exonu 2. Ve druhém kroku sestřihu pak 3'hydroxylová skupina na konci exonu 1 narušuje fosfodiesterovou vazbu v 3'SS, a tím dochází ke spojení exonů a uvolnění intronu (Obr. 6).



**Obr. 6: Schéma sestřihu pre-mRNA** Sestřih pre-mRNA probíhá ve dvou krocích, transesterifikačních reakcích. Tyto kroky jsou katalyzovány spliceosomem a dávají vzniknout mRNA a intronu ve formě lariátu (převzato dle Will and Lührmann, 2011).

Formování spliceosomu začíná interakcí U1 snRNP s 5'sestřihovým místem a vazbou heterodimeru Msl5•Mud2 do oblasti větvení (Abovich and Rosbash, 1997). Tyto komponenty společně tvoří komplex E, podílí se na stabilizaci a umožňují pozdější vznik interakce mezi U2 snRNP a BS (Chang *et al.*, 2012; Rutz and Séraphin, 1999). Vazba U2 snRNP vytěsňuje proteiny Msl5 (BBP) a Mud2 a dává vzniknout komplexu A (pre-spliceosomu). Mimoto oblast BS interakcí s U2 snRNP vytváří helix, z jehož střední části vyčnívá nepárující adenosin, který se později podílí na prvním kroku sestřihové reakce (Query *et al.*, 1994). Dále dochází k připojení U4/U6•U5 tri-snRNP, tím vzniká komplex B. Následují rozsáhlé konformační změny: uvolnění U1 snRNP, rozvolnění interakce mezi U4 a U6 snRNP a disociace U4 snRNP. Spliceosom tak přechází do aktivního stavu a je zahájen první krok sestřihu. Následuje spárování U2 a U6 snRNP, což má za následek přiblížení 5'SS a BP, a průběh první transesterifikační reakce a vznik komplexu C. U6 snRNP vytváří během reakce smyčku, která se podílí na uvolnění U1 snRNP a pravděpodobně na katalýze sestřihu (McManus *et al.*, 2007; shrnuto v Will and Lührmann, 2011). Vše je zakončeno druhou transesterifikační reakcí, tj. spojením obou exonů za vzniku mRNA, a rozpadem spliceosomu (Obr. 7).





**Obr. 7: Schématické znázornění cyklu výstavby a rozpadu spliceosomu a sestřihu pre-mRNA.** Znázorněna vazba a recyklace jednotlivých U snRNP a některých sestřihových faktorů během sestřihu (převzato dle Will and Lührmann, 2011).

### 3.2 Kotranskripční sestřih

Jeden z prvních experimentů, který přinesl důkaz, že sestřih probíhá současně s transkripcí, byl proveden na chorionových genech *Drosophily melanogaster*. Bylo zjištěno, že dochází ke zkrácení transkriptu, zatímco ten je stále spojen s RNAP II. Autoři předpokládali, že sestřih probíhá alespoň z části kotranskripčně (Osheim *et al.*, 1985). Další práce přinesla myšlenku, že komplex A (prespliceosom) je sestavován kotranskripčně, zatímco samotný sestřih už tak často kotranskripčně neprobíhá (Beyer and Osheim, 1988). Dnes víme, že sestřih pre-mRNA může probíhat kotranskripčně, ale i postraskripčně. Zůstává otázkou, který z těchto mechanismů převažuje u jednotlivých organismů.

## 4. Vývoj názoru na problematiku kotranskripčního sestřihu u *S. cerevisiae*

### 4.1 První zmínka o kotranskripčním sestřihu u *S. cerevisiae*

Jedna z prvních studií týkající se kotranskripčního sestřihu u *S. cerevisiae* dokládá existenci dvou populací pre-mRNA testovaného genu *RP51A*, které mají rozdílnou kinetiku sestřihu. Autoři se domnívali, že většina primárních transkriptů je sestřižena velice rychle – dosahuje průměrné délky života ~ 2 s. Na základě odvozené elongační rychlosti předpokládali, že sestřih probíhá bezprostředně po syntéze 3'SS, tedy kotranskripčně. U druhé populace pre-mRNA buď nedochází k jejímu sestřihu, a je tedy následně degradována, nebo je sestřižena velice pomalu (Elliott and Rosbash, 1996).

V roce 2000 se Lopez a Séraphin zabývali problematikou koordinace mezi sestřihem a transkripcí. Autoři chtěli ověřit hypotézu, že rozeznání intronové sekvence a sestavení spliceosomu nemusí být u *S. cerevisiae* úzce propojeno s transkripcí. Pro zkoumání vztahu mezi transkripcí a sestřihem vytvořili řadu genových konstruktů s vloženým syntetickým intronem do oblasti 5'SS. Vložený intron rozdělil sekvenci 5'SS původního intronu, a pro rozeznání původního 5'SS komponentami spliceosomu bylo tudíž nezbytné, aby byl nejprve tento uměle vložený intron odstraněn. Autoři očekávali, že pokud by opravdu bylo rozeznání intronu zcela závislé na transkripci, došlo by během transkripce pouze k vystřížení uměle vloženého intronu a původní by zůstal součástí transkriptu. Nicméně oba introny, jak původní, tak uměle vložený, byly efektivně odstraněny z pre-mRNA. Tato skutečnost jednoznačně potvrdila jejich hypotézu, že sekvence intronu může být efektivně rozeznána zcela nezávisle na transkripci, tedy posttranskripčně (Lopez and Séraphin, 2000).

### 4.2 Kotranskripční vyvazování U1 snRNP

Vědecká skupina pod vedením Karly Neugebauer se zabývala zejména kotranskripčním vyvazováním U1 snRNP k primárnímu transkriptu (Kotovic *et al.*, 2003). Partikule U1 snRNP rozeznává sekvenci 5'SS a je součástí komplexu A. Tato studie naznačuje, že se váže na pre-mRNA během transkripce a místo její vazby koreluje s pozicí intronu. Přítomnost intronu je tedy nezbytná pro kotranskripční vazbu U1 snRNP a určuje i samotnou vazebnou oblast. Dále byl testován gen *ADHI*, který intron neobsahuje. U tohoto genu byla v celé jeho délce detekována rovnoměrná asociace s U1 snRNP. Autoři proto nevylučovali možnost, že se U1 snRNP nespecificky váže na některé vysoce transkribované geny, které neobsahují in-

tron (Kotovic *et al.*, 2003). V roce 2010 bylo na základě studie u vyšších eukaryot zjištěno, že U1 snRNP kromě funkce při sestavování spliceosomu, s největší pravděpodobností také chrání primární transkript před předčasnou terminací transkripce. Tato její funkce vysvětluje nadbytek U1 snRNP oproti ostatním snRNP v lidských buňkách (Kaida *et al.*, 2010). Mimoto další studie ukázala, že U1 snRNP je jediná snRNP partikule, která interaguje i s transkripty, v nichž se intron nenachází (Brody *et al.*, 2011).

#### 4.3 Důkazy kotranskripčního sestavování spliceosomu a sestřihu u vybraných genů

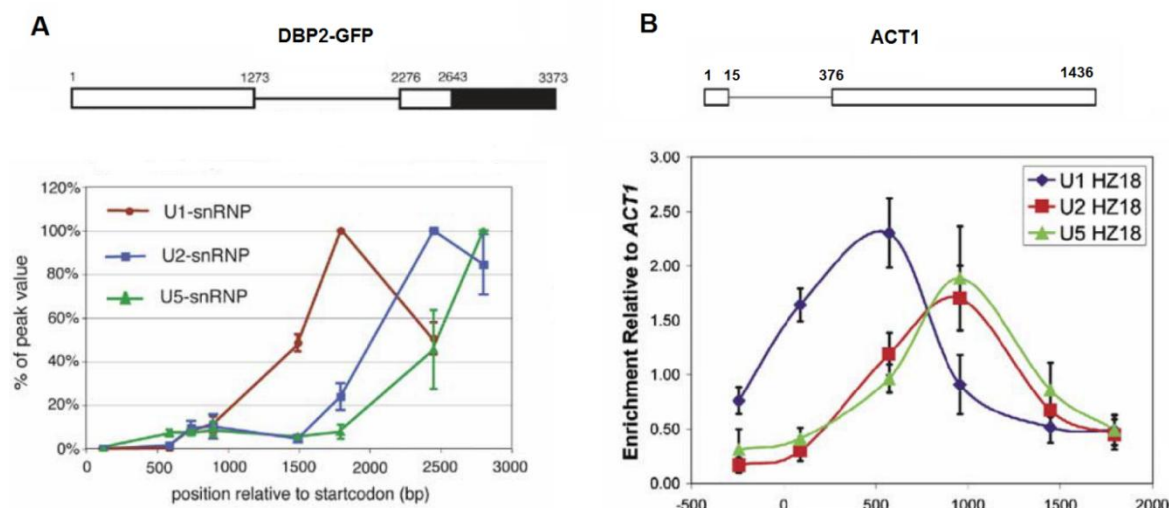
Řada autorů se zaměřila na mechanismus kotranskripčního sestavování spliceosomu a na souslednost vyvazování snRNP. Jeden z možných mechanismů byl založen na hypotéze, že snRNP nejprve vytvoří komplex penta-snRNP a poté se společně navážou na pre-mRNA (Stevens *et al.*, 2002). Nicméně ve dvou zásadních studiích z roku 2005 od Karly Neugebauer a Michaela Rosbasha byla tato hypotéza na základě dále popsanych výsledků vyvrácena. Obě skupiny předpokládali, že u většiny genů *S. cerevisiae* probíhá vyvazování jednotlivých snRNP postupně a kotranskripčně (Görnemann *et al.*, 2005; Lacadie and Rosbash, 2005). Sledovali sestavování spliceosomu u vybraných genů technikou ChIP. Společným znakem testovaných genů byl poměrně dlouhý terminální exon, nicméně u obou autorů se částečně lišily oblasti genů, při jejichž syntéze docházelo k akumulaci jednotlivých komponent spliceosomu.

Výsledky získané v laboratoři Karly Neugebauer dokládají, že partikule U1 snRNP se váže do oblasti 5'SS vznikajícího transkriptu po syntéze přibližně poloviny intronové sekvence genu *DBP2-GFP*. Dále autoři detekovali maximum akumulace U2 snRNP po syntéze přibližně 200 bp distálně od 3'SS. U5 snRNP se stává součástí spliceosomu ve chvíli, kdy se RNAP II nachází v exonu 2 přibližně 500 bp za 3'SS. Mezi detekcí maxima akumulace U1 a U5 snRNP tak RNAP II ve většině případů dokáže nasyntetizovat nejméně 1 kb transkriptu. Vyvazování jednotlivých snRNP je tedy časově a pozičně oddělené (Obr. 8; Görnemann *et al.*, 2005).

V roce 2005 se také Michael Rosbash a jeho spolupracovníci zabývali sestavováním spliceosomu na pre-RNA genu *ACT1* rovněž za použití techniky ChIP. Autoři došli k závěrům, že se U1 snRNP akumuluje bezprostředně po syntéze celého intronu, dále pak že se vyvazování U2 a U5 snRNP vzájemně prolíná a jeho maximum je detekovatelné v okamžiku, kdy se RNAP II vyskytuje přibližně 500 bp distálně od 3'SS. Autoři diskutují

možnost, že vybrané geny v této studii nejsou pro testování zcela optimální, protože se časově liší oblasti akumulace U1, U2 a U5 snRNP v porovnání s výsledky, které byly získány v laboratoři Karly M. Neugebauer, jež se zabývala stejnou problematikou u jiných genů ve stejném roce (Lacadie and Rosbash, 2005). Tyto rozdíly ve vazbě jednotlivých komponent spliceosomu na pre-mRNA jsou zřetelné na obrázku 8.

Oba tyto články nicméně dokazují, že ve většině případů jsou jednotlivé komponenty spliceosomu vyvazovány postupně a v průběhu transkripce. Jak již bylo poznamenáno, autoři těchto dvou zásadních studií testovali geny, jejichž primární transkript obsahuje relativně dlouhý terminální exon (>1 kb; Görnemann *et al.*, 2005; Lacadie and Rosbash, 2005). Tato skutečnost se později ukázala jako poněkud problematická, protože nativní geny *S. cerevisiae* obsahují nejčastěji exon 2 dlouhý 300 – 400 bp. O rok později skupina pod vedením Michaela Rosbasha formulovala hypotézu, že takto krátký exon 2 poskytuje spliceosomu málo času na kotranskripční sestavení a katalýzu sestřihu (Tardiff *et al.*, 2006).



**Obr. 8: Detekce postupné vazby jednotlivých komponent spliceosomu technikou ChIP.** Srovnání dat, která byla získána ve dvou výše zmíněných studiích. (A) Gen *DBP2-GFP*; Z grafu ze studie Karly M. Neugebauer je patrné, že vyvazování jednotlivých snRNP je časově a pozičně oddělené. (B) Gen *ACT1*; Na grafu, který byl publikován ve studii od Michaela Rosbasha, je znázorněno oddělené vyvazování U1 a U2/U5 snRNP. Nicméně akumulace U2 a U5 snRNP se vzájemně prolíná ve stejné oblasti transkripce (převzato a upraveno dle Görnemann *et al.*, 2005; Lacadie and Rosbash, 2005).

Komplex NTC (komplex asociovaný s Prp19) je nezbytný pro sestavení a aktivaci spliceosomu a stabilizuje vazbu U5 a U6 snRNP po uvolnění U4 snRNP (Chan *et al.*, 2003). Skupina pod vedením Karly Neugebauer detekovala mimo jiné akumulaci NTC ve chvíli, kdy se polymeráza nacházela v exonu 2 přibližně 500 bp za 3'SS, což naznačuje, že katalýza sestřihu by mohla také probíhat kotranskripčně. Autoři dále zjistili, že pro kotranskripční sestavení spliceosomu je nezbytný komplex vázající čepičku (CBC). Tento komplex váže m<sup>7</sup>G čepičku na 5'-konec pre-mRNA krátce po iniciaci transkripce. Ukázalo se, že v některých případech hraje roli při vazbě komponent spliceosomu na primární transkript. U většiny genů se však tento komplex podílí na disociaci U1 snRNP z 5'SS, je tedy pravděpodobně nutný pro funkční propojení sestřihu a transkripce (Görnemann *et al.*, 2005).

O rok později detekovali v laboratoři Sebastiana Kadenera metodou CHIP frakci sestřižené mRNA ve chvíli, kdy se RNAP II vyskytovala přibližně 1 kb distálně od 3'SS genu *HZ18*. Navrhli tedy, že s největší pravděpodobností probíhá sestřih pre-mRNA u *S. cerevisiae* kotranskripčně. Pro potvrzení tohoto závěru vložili do oblasti intronu genu *HZ18* sekvenci „hammerhead ribozyme“ (RZ sekvenci), která může katalyzovat štěpení primárního transkriptu. Autoři dokázali, že kotranskripční sestavení spliceosomu, a to zejména vazba heterodimeru Msl5•Mud2 do oblasti větvení, efektivně inhibuje aktivitu ribozymu. Zjistili vznik funkční nerozštěpené mRNA, což indikuje, že sekvence ribozymu byla společně s celým intronem kotranskripčně odstraněna. Na základě této skutečnosti argumentují, že sestřih většiny pre-mRNA *S. cerevisiae* probíhá již během transkripce (Lacadie *et al.*, 2006).

#### **4.4 Sestavování spliceosomu a sestřih probíhají převážně posttranskripčně**

V roce 2006 byly publikovány experimenty, které přinesly překvapivé výsledky, které ukázaly, že vazba U2 a U5 snRNP, stejně jako kotranskripční dokončení sestřihu, závisí na délce exonu 2. Naopak vyvazování U1 snRNP je na délce terminálního exonu nezávislé a pravděpodobně pouze optimalizuje efektivitu sestřihu (Tardiff *et al.*, 2006). Kvasinka *S. cerevisiae* obsahuje geny s odlišnou délkou terminálního exonu, přičemž nejvíce genů má exon 2 dlouhý 300 - 400 bp. Průměrná délka exonu 2 pak činí 434 bp. Většina genů tedy nese mnohem kratší terminální exon oproti těm, které byly testovány v předchozích studiích. Na základě této skutečnosti autoři tvrdí, že pouze pro malou část genů *S. cerevisiae* platí mechanismus sestavování spliceosomu popsáný v pracích Karly Neugebauer a Michaela Rosbasha z roku 2005. Ke kompletnímu sestavení spliceosomu a sestřihu jednontronových

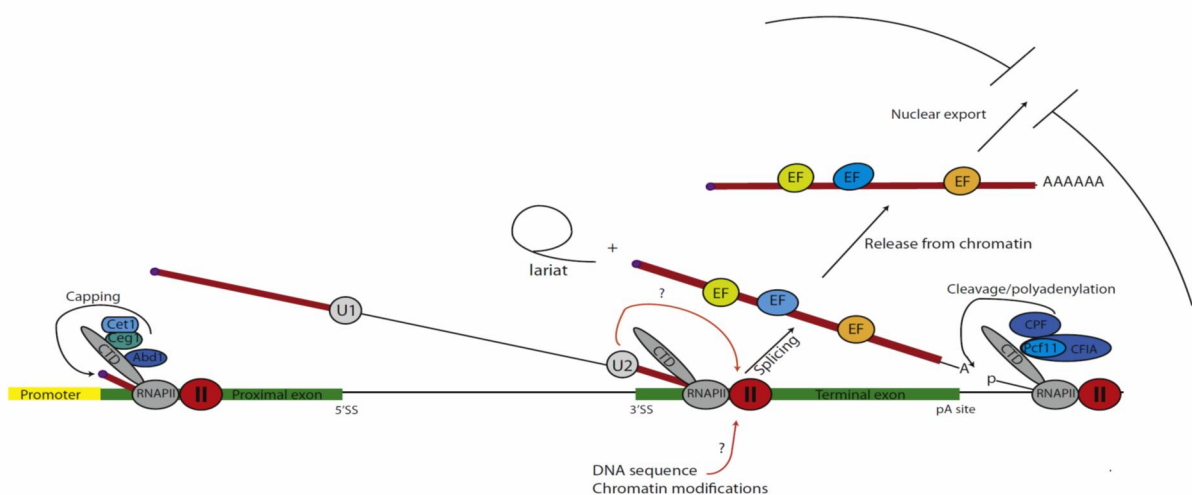
pre-mRNA, totiž dochází až po transkripci celého intronu, což poskytuje pouze omezené množství času (Tardiff *et al.*, 2006). Sestřih začíná 600 bp po syntéze 3'SS a maxima dosahuje přibližně 1000 bp po syntéze 3'SS (Lacadie *et al.*, 2006). Autoři tedy předpokládali, že ke kotranskripčnímu sestavení spliceosomu a sestřihu dochází pouze u genů, jejichž exon 2 je dlouhý alespoň 600 bp, neboť pouze u těchto genů poskytuje dlouhý terminální exon dostatek času pro kotranskripční průběh. Na závěr autoři dodávají, že na základě jejich výsledků je pravděpodobné, že u více než 90 % genů *S. cerevisiae* probíhá sestavení spliceosomu a sestřih posttranskripčně (Tardiff *et al.*, 2006).

#### 4.5 Sestřih je kotranskripční v důsledku zpomalení RNAP II v oblasti exonu 2

Karla Neugebauer se spolupracovníky v práci z roku 2010 zpochybňuje předchozí výsledky, když tvrdí, že kotranskripční sestřih je u genů *S. cerevisiae* normou (Oesterreich *et al.*, 2010). Tento závěr je v souladu s výsledky skupiny pod vedením Jean Beggsové (Alexander *et al.*, 2010). Obě skupiny prokazují, že sestřih probíhá kotranskripčně, a to v důsledku zpomalení RNAP II v oblasti terminálního exonu (Obr. 9; Alexander *et al.*, 2010; Oesterreich *et al.*, 2010).

První z výše zmíněných skupin testovala technikou „high-density tiling arrays“ 122 genů *S. cerevisiae*, z nichž každý obsahoval jeden intron. Podle získaných výsledků je intron přibližně u 74 % testovaných genů odstraněn kotranskripčně (Oesterreich *et al.*, 2010). Tato hodnota byla překvapivě vysoká vzhledem k závěrům studie pod vedením Michaela Rosbasha z roku 2006, a to i přes velký podíl testovaných genů s krátkým exonem 2. Autoři na základě vlastních výsledků argumentují, že sestřiženou mRNA lze detekovat již ve chvíli, kdy se RNAP II vyskytuje přibližně 250 bp „upstream“ od 3'-konce genu. V tomto okamžiku také zjistili zvýšení hustoty RNAP II, což se dá nejlépe vysvětlit jejím zpomalením/pauzou v tomto místě. Vyloučili tak obecnou představu, že transkripce exonu 2 probíhá stálou rychlostí (Oesterreich *et al.*, 2010). Mimoto je obecně přijímáno, že ke zpomalení RNAP II dochází také při maturaci 3'-konce transkriptu (shrnutí v Venters and Pugh, 2009). Nicméně podle autorů jsou výše popsané pauzy kvalitativně odlišné a pauza, ke které dochází přibližně 250 bp „upstream“ od 3'-konce genu, není ovlivněna akumulací RNAP II v oblasti 3'-konce transkriptu (Oesterreich *et al.*, 2010).

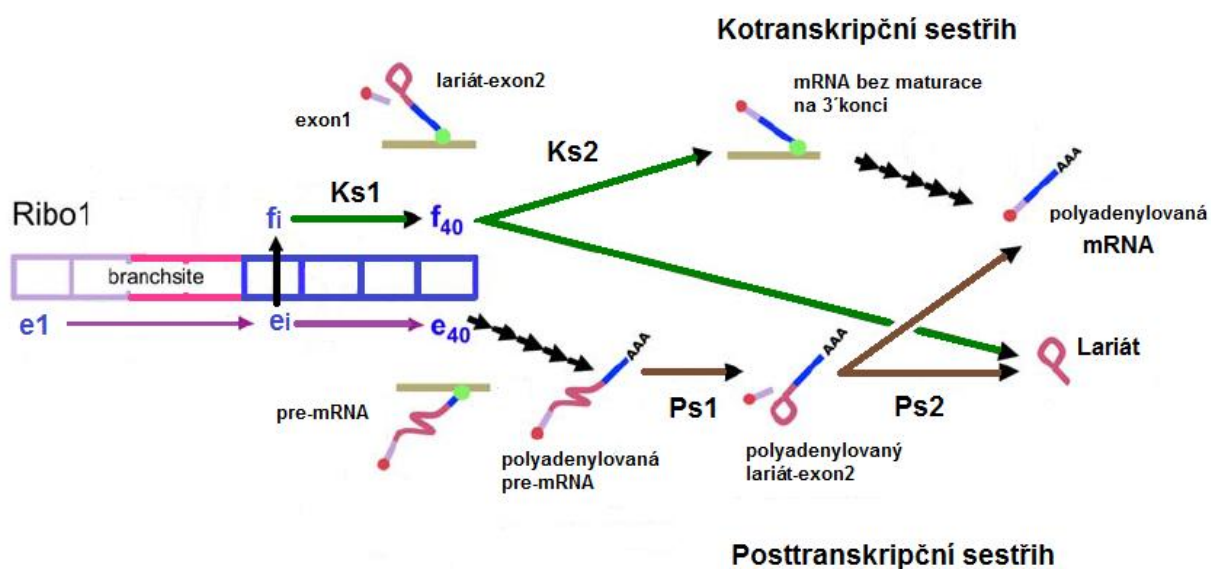
Výzkumný tým pod vedením Jean Beggsové popisuje přechodné zpomalení RNAP II v úseku přibližně 180 bp kolem 3'SS. V tomto úseku dochází k fosforylaci C-terminální domény na Ser<sub>2</sub> a Ser<sub>5</sub> a k vazbě sestřihových faktorů. Stejně jak je popsáno v předchozím odstavci, autoři detekovali sestřiženou mRNA ve chvíli, kdy se polymeráza dostane do této oblasti. Navrhují model regulace pohybu RNAP II, ve kterém je oblast kolem 3'SS jakýmsi transkripčním kontrolním bodem. Model předpokládá, že zde dochází k akumulaci RNAP II díky její fosforylaci na Ser<sub>5</sub>; naopak fosforylace na Ser<sub>2</sub> ve stejné oblasti genu je nejspíš spojená s uvolněním z tohoto kontrolního bodu. Zpomalení RNAP II je závislé na přítomnosti intronu a na produktivním sestřihu (Alexander *et al.*, 2010). Snížením elongační rychlosti si *S. cerevisiae* vytváří dostatek času pro katalýzu sestřihu před ukončením transkripce, a to i tehdy, kdy je terminální exon krátký (Obr. 9). Specifické elementy nebo chromatinové modifikace, které by se vyskytovaly pouze u genů s krátkým exonem, a vysvětlovaly tak pauzu RNAP II, nebyly zatím identifikovány. V rámci těchto dvou studií pod vedením Karly M. Neugebauer a Jean Beggsové byly testovány vysoce transkribované geny. Je tedy možné, že pauza v oblasti exonu 2 je specifická pro geny, které jsou vysoce přepisovány (Alexander *et al.*, 2010; Oesterreich *et al.*, 2010).



**Obr. 9: Schematické znázornění oblasti zpomalení RNA polymerázy II a zpracování pre-mRNA.** K první pauze dochází v blízkosti promotoru, k poslední na 3'-konci transkriptu. Tyto pauzy jsou nezbytné pro maturaci konců pre-mRNA, vazbu m<sup>7</sup>G čepičky a polyA sekvence. U většiny genů *S. cerevisiae* dochází také k pauze v oblasti terminálního exonu, což poskytuje dostatek času pro kotranskripční průběh sestřihu. Během transkripce dochází k vazbě řady faktorů na C-terminální doménu RNAP II. Ty se podílejí na maturaci pre-mRNA a exportu mRNA ven z jádra (převzato z Andersen and Jensen, 2010).

#### 4.6 Globální pohled na kinetiku sestřihu umělého konstruktu *Ribo1* u *S. cerevisiae*

V roce 2011 navrhli Jean Beggsová a její spolupracovníci model pro *S. cerevisiae*, který říká, že pokud pre-mRNA podstoupí první sestřihový krok během transkripce, je již zcela sestřižena kotranskripčně (Obr. 10; Aitken *et al.*, 2011). Tato představa sestřihu se liší od savčího modelu, kde se předpokládá, že v takovém případě může být sestřih dokončen i po maturaci 3'-konce transkriptu (Rigo and Martinson, 2009). Autoři dále popírají obecnou představu, že elongační fáze transkripce umělého konstruktu *Ribo1* je jednoduchou, jedнокrokovou reakcí. Jejich model sestřihu v kontextu transkripce je definován jako reakce, která zahrnuje 40 elongačních kroků, dva kroky sestřihu a úpravy 3'-konce transkriptu (Obr. 10; Aitken *et al.*, 2011).



**Obr. 10: Schematické znázornění sestřihu v kontextu transkripce.** Po iniciaci transkripce umělého konstruktu *Ribo1* začíná elongace v sekci e1. Na počátku exonu 2 může být aktivován kotranskripční sestřih (fi; tmavě zelená), nebo může pokračovat elongace bez aktivace sestřihu (ei, fialová). Transkripce je zastavena buď v sekci f40, poté co již proběhl první krok sestřihu (Ks1), nebo je zakončena v sekci e40 bez aktivace sestřihové reakce. Pokud nedojde k aktivaci sestřihu během transkripce, následuje štěpení a polyadenylace na 3'-konci pre-mRNA a vše je zakončeno dvěma transesterifikačními reakcemi posttranskripčního sestřihu (Ps1 a Ps2, tmavě hnědá). V případě kotranskripčního sestřihu, v sekci f40, následuje druhá transesterifikační reakce (Ks2), a teprve poté dochází k maturaci 3'-konce transkriptu (převzato a upraveno dle Aitken *et al.*, 2011).



Autoři exprimovali pre-mRNA *Ribo1* z doxycyklinem ovládaného promotoru. Zavedli bodovou mutaci do oblasti 3'SS umělého konstruktů *Ribo1*, čímž byl znemožněn druhý sestřihový krok. Mutace v 3'SS měla za následek snížení pravděpodobnosti další iniciace transkripce a pravděpodobnosti že první krok sestřihu proběhne kotranskripčně. Tato skutečnost přináší další důkaz pro funkční propojení kotranskripčního sestřihu a transkripce (Aitken *et al.*, 2011).

Pokud autoři exprimovali pre-mRNA *Ribo1* bez zavedené mutace, byl druhý krok sestřihu prvních transkriptů dokončen až za 110 s, přičemž syntéza exonu 2 trvala přibližně 11 s; sestřih tedy musel probíhat posttranskripčně. Nicméně zhruba 10 min po indukci transkripce byl čas potřebný pro druhý sestřihový krok redukován na 5,5 s; sestřih byl dokončen již během transkripce. Autoři tedy předpokládali, že kotranskripční sestřih je „aktivován“ se zpožděním. Tato skutečnost je s největší pravděpodobností způsobena tzv. „pozitivní zpětnou vazbou“, která ovlivňuje rychlost druhého kroku sestřihu (Aitken *et al.*, 2011). Podle autorů je jedno z možných vysvětlení tohoto mechanismu recyklace jednotlivých snRNP, které se po indukci sestřihu nacházejí v těsné blízkosti aktivního genu, a urychlují tak sestavení spliceosomu na nově syntetizované pre-mRNA (Rino and Carmo-Fonseca, 2009). Mezi další možná vysvětlení patří postupná koordinace vyvazování sestřihových faktorů, usnadnění sestřihu zpomalením RNA polymerázy II (Alexander *et al.*, 2010; Oesterreich *et al.*, 2010) nebo dynamické modifikace chromatinu (Alexander and Beggs, 2010).

## 5. Závěr

V současnosti je obecně přijímáno, že sestřih většiny genů kvasinky *S. cerevisiae* probíhá kotranskripčně. V průběhu transkripce se RNAP II nepohybuje stálou rychlostí, ale dochází k jejímu zpomalení v konkrétních oblastech genu. Pro kotranskripční sestřih je významné zejména zpomalení v oblasti terminálního exonu, které poskytuje spliceosomu dostatek času pro jeho sestavení a pro katalýzu sestřihu před ukončením transkripce a maturací 3'-konce transkriptu (Alexander *et al.*, 2010; Oesterreich *et al.*, 2010).

Dosud není zcela jasné, na základě jakého mechanismu k tomuto zpomalení RNAP II dochází. U testovaných genů *S. cerevisiae* nebyly až dosud identifikovány žádné specifické elementy nebo chromatinové modifikace, které by zpomalení způsobovaly. Nicméně geny obsahující intron, tedy přibližně 5 % genů *S. cerevisiae*, jsou vysoce transkribovány a dávají vzniknout přibližně 30 % celkové mRNA v buňce (Ares *et al.*, 1999). Je tedy možné, že právě vysoká transkripční aktivita je jednou ze skutečností, která se zpomalením RNAP II úzce souvisí (Andersen and Jensen, 2010).

Otázkou zůstává, v čem je pro *S. cerevisiae* výhodnější kotranskripční sestřih. Jednou z výhod kotranskripčního sestřihu je jeho vyšší efektivita oproti posttranskripčnímu průběhu (Aitken *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2010). Zvýšení efektivity sestřihu je pravděpodobně způsobeno zpomalením RNAP II v oblasti exonu 2, což dokazuje také studie z letošního roku, která dokládá, že efektivita sestřihu roste se snižující se rychlostí elongace (Moehle *et al.*, 2014). Kromě toho může hrát významnou roli také urychlení exportu mRNA z jádra po kotranskripčním sestřihu (Andersen and Jensen, 2010). V průběhu sestřihu s největší pravděpodobností dochází k přípravě pre-mRNA na export z jádra a k navázání exportních faktorů na mRNA (EF; Luo and Reed, 1999; Reed, 2003).

## Seznam použité literatury

**Abovich, N, and M Rosbash. 1997.** “Cross-Intron Bridging Interactions in the Yeast Commitment Complex Are Conserved in Mammals.” *Cell* 89(3): 403–12.

**Aitken, Stuart, Ross D. Alexander, and Jean D. Beggs. 2011.** “Modelling Reveals Kinetic Advantages of Co-Transcriptional Splicing.” *PLoS Computational Biology* 7(10): e1002215.

**Alexander, Ross, and Jean D Beggs. 2010.** “Cross-Talk in Transcription, Splicing and Chromatin: Who Makes the First Call?” *Biochemical Society transactions* 38(5): 1251–56.

**Alexander, Ross D, Steven a Innocente, J David Barrass, and Jean D Beggs. 2010.** “Splicing-Dependent RNA Polymerase Pausing in Yeast.” *Molecular cell* 40(4): 582–93.

**Allison, L a, M Moyle, M Shales, and C J Ingles. 1985.** “Extensive Homology among the Largest Subunits of Eukaryotic and Prokaryotic RNA Polymerases.” *Cell* 42(2): 599–610.

**Andersen, Pia K, and Torben Heck Jensen. 2010.** “A Pause to Splice.” *Molecular cell* 40(4): 503–5.

**Ares, Manuel, Leslie Grate, and Michelle H. Pauling. 1999.** “A Handful of Intron-Containing Genes Produces the Lion’s Share of Yeast mRNA.” *RNA (New York, N.Y.)* 5(9): 1138–39.

**Bentley, David. 2002.** “The mRNA Assembly Line: Transcription and Processing Machines in the Same Factory.” *Current opinion in cell biology* 14(3): 336–42.

**Beyer, a L, and Y N Osheim. 1988.** “Splice Site Selection, Rate of Splicing, and Alternative Splicing on Nascent Transcripts.” *Genes & development* 2(6): 754–65.

**Blandin, G, P Durrens, F Tekaia, M Aigle, M Bolotin-Fukuhara, E Bon, S Casarégola, J de Montigny, C Gaillardin, a Lépingle, B Llorente, a Malpertuy, C Neuvéglise, O Ozier-Kalogeropoulos, a Perrin, S Potier, J Souciet, E Talla, C Toffano-Nioche, M Wésolowski-Louvel, C Marck, and B Dujon. 2000.** “Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 4. The Genome of *Saccharomyces Cerevisiae* Revisited.” *FEBS letters* 487(1): 31–36.

**Bon, Elisabeth, Serge Casaregola, Gaëlle Blandin, Bertrand Llorente, Cécile Neuvéglise, Martin Munsterkotter, Ulrich Guldener, Hans-Werner Mewes, Jacques Van Helden, Bernard Dujon, and Claude Gaillardin. 2003.** “Molecular Evolution of Eukaryotic Genomes: Hemiascomycetous Yeast Spliceosomal Introns.” *Nucleic acids research* 31(4): 1121–35.

**Brody, Yehuda, Noa Neufeld, Nicole Bieberstein, Sebastien Z Cause, Eva-Maria Böhnlein, Karla M Neugebauer, Xavier Darzacq, and Yaron Shav-Tal. 2011.** “The in Vivo Kinetics of RNA Polymerase II Elongation during Co-Transcriptional Splicing.” *PLoS biology* 9(1): e1000573.

**Buratowski, Stephen. 2003.** “The CTD Code.” *Nature structural biology* 10(9): 679–80.

**Buratowski, Stephen. 2009.** “Progression through the RNA Polymerase II CTD Cycle.” *Molecular cell* 36(4): 541–46.

- Carrillo Oesterreich, Fernando, Nicole Bieberstein, and Karla M Neugebauer. 2011.** “Pause Locally, Splice Globally.” *Trends in cell biology* 21(6): 328–35.
- Carrillo Oesterreich, Fernando, Stephan Preibisch, and Karla M Neugebauer. 2010.** “Global Analysis of Nascent RNA Reveals Transcriptional Pausing in Terminal Exons.” *Molecular cell* 40(4): 571–81.
- Corden, J L. 1990.** “Tails of RNA Polymerase II.” *Trends in biochemical sciences* 15(10): 383–87.
- Corden, Jeffrey L. 2007.** “Transcription. Seven Ups the Code.” *Science (New York, N.Y.)* 318(5857): 1735–36.
- Davis, C a, L Grate, M Spingola, and M Ares. 2000.** “Test of Intron Predictions Reveals Novel Splice Sites, Alternatively Spliced mRNAs and New Introns in Meiotically Regulated Genes of Yeast.” *Nucleic acids research* 28(8): 1700–1706.
- Egloff, Sylvain, and Shona Murphy. 2008.** “Cracking the RNA Polymerase II CTD Code.” *Trends in genetics : TIG* 24(6): 280–88.
- Elliott, D J, and M Rosbash. 1996.** “Yeast Pre-mRNA Is Composed of Two Populations with Distinct Kinetic Properties.” *Experimental cell research* 229(2): 181–88.
- Fabrizio, Patrizia, Julia Dannenberg, Prakash Dube, Berthold Kastner, Holger Stark, Henning Urlaub, and Reinhard Lührmann. 2009.** “The Evolutionarily Conserved Core Design of the Catalytic Activation Step of the Yeast Spliceosome.” *Molecular cell* 36(4): 593–608.
- Görnemann, Janina, Kimberly M Kotovic, Katja Hujer, and Karla M Neugebauer. 2005.** “Cotranscriptional Spliceosome Assembly Occurs in a Stepwise Fashion and Requires the Cap Binding Complex.” *Molecular cell* 19(1): 53–63.
- Hodges, Courtney, Lacramioara Bintu, Lucyna Lubkowska, Mikhail Kashlev, and Carlos Bustamante. 2009.** “Nucleosomal Fluctuations Govern the Transcription Dynamics of RNA Polymerase II.” *Science (New York, N.Y.)* 325(5940): 626–28.
- Howe, Kenneth James, Caroline M Kane, and Manuel Ares. 2003.** “Perturbation of Transcription Elongation Influences the Fidelity of Internal Exon Inclusion in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *RNA (New York, N.Y.)* 9(8): 993–1006.
- Chan, Shih-Peng, Der-I Kao, Wei-Yü Tsai, and Soo-Chen Cheng. 2003.** “The Prp19p-Associated Complex in Spliceosome Activation.” *Science (New York, N.Y.)* 302(5643): 279–82.
- Chang, Jonathan, Beate Schwer, and Stewart Shuman. 2012.** “Structure-Function Analysis and Genetic Interactions of the Yeast Branchpoint Binding Protein Msl5.” *Nucleic acids research* 40(10): 4539–52.
- Chen, Mo, and James L Manley. 2009.** “Mechanisms of Alternative Splicing Regulation: Insights from Molecular and Genomics Approaches.” *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(11): 741–54.
- Cho, E J, T. Takagi, C. R. Moore, and S. Buratowski. 1997.** “mRNA Capping Enzyme Is Recruited to the Transcription Complex by Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain.” *Genes & development* 11(24): 3319–26.

- Churchman, L Stirling, and Jonathan S Weissman. 2011.** “Nascent Transcript Sequencing Visualizes Transcription at Nucleotide Resolution.” *Nature* 469(7330): 368–73.
- Kaida, Daisuke, Michael G Berg, Ihab Younis, Mumtaz Kasim, Larry N Singh, Lili Wan, and Gideon Dreyfuss. 2010.** “U1 snRNP Protects Pre-mRNAs from Premature Cleavage and Polyadenylation.” *Nature* 468(7324): 664–68.
- Kim, Minkyu, Hyunsuk Suh, Eun-Jung Cho, and Stephen Buratowski. 2009.** “Phosphorylation of the Yeast Rpb1 C-Terminal Domain at Serines 2, 5, and 7.” *The Journal of biological chemistry* 284(39): 26421–26.
- Kireeva, Maria L, Brynne Hancock, Gina H Cremona, Wendy Walter, Vasily M Studitsky, and Mikhail Kashlev. 2005.** “Nature of the Nucleosomal Barrier to RNA Polymerase II.” *Molecular cell* 18(1): 97–108.
- Komarnitsky, P., E J Cho, and S Buratowski. 2000.** “Different Phosphorylated Forms of RNA Polymerase II and Associated mRNA Processing Factors during Transcription.” *Genes & development* 14(19): 2452–60.
- Kornblihtt, Alberto R. 2006.** “Chromatin, Transcript Elongation and Alternative Splicing.” *Nature structural & molecular biology* 13(1): 5–7.
- Kornblihtt, Alberto R, Manuel de la Mata, Juan Pablo Fededa, Manuel J Munoz, and Guadalupe Nogues. 2004.** “Multiple Links between Transcription and Splicing.” *RNA (New York, N.Y.)* 10(10): 1489–98.
- Kotovic, KM, and Daniel Lockshon. 2003.** “Cotranscriptional Recruitment of the U1 snRNP to Intron-Containing Genes in Yeast.” *Molecular and cellular ...* 23(16): 5768–79.
- De la Mata, Manuel, Claudio R Alonso, Sebastián Kadener, Juan P Fededa, Matías Blaustein, Federico Pelisch, Paula Cramer, David Bentley, and Alberto R Kornblihtt. 2003.** “A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing in Vivo.” *Molecular cell* 12(2): 525–32.
- Lacadie, Scott a, and Michael Rosbash. 2005.** “Cotranscriptional Spliceosome Assembly Dynamics and the Role of U1 snRNA:5’ss Base Pairing in Yeast.” *Molecular cell* 19(1): 65–75.
- Lacadie, Scott a, Daniel F Tardiff, Sebastian Kadener, and Michael Rosbash. 2006.** “In Vivo Commitment to Yeast Cotranscriptional Splicing Is Sensitive to Transcription Elongation Mutants.” *Genes & development* 20(15): 2055–66.
- Lamm, G M, and a I Lamond. 1993.** “Non-snRNP Protein Splicing Factors.” *Biochimica et biophysica acta* 1173(3): 247–65.
- Licatalosi, Donny D, Gabrielle Geiger, Michelle Minet, Stephanie Schroeder, Kate Cilli, J Bryan McNeil, and David L Bentley. 2002.** “Functional Interaction of Yeast Pre-mRNA 3’ End Processing Factors with RNA Polymerase II.” *Molecular cell* 9(5): 1101–11.
- Lopez, P J, and B Séraphin. 2000.** “Uncoupling Yeast Intron Recognition from Transcription with Recursive Splicing.” *EMBO reports* 1(4): 334–39.
- Luo, M. J., & Reed, R. (1999).** Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 14937–42.

- McManus, C Joel, Matthew L Schwartz, Samuel E Butcher, and David A Brow. 2007.** “A Dynamic Bulge in the U6 RNA Internal Stem-Loop Functions in Spliceosome Assembly and Activation.” *RNA (New York, N.Y.)* 13(12): 2252–65.
- Moehle, Erica A, Hannes Braberg, Nevan J Krogan, and Christine Guthrie. 2014.** “Adventures in Time and Space: Splicing Efficiency and RNA Polymerase II Elongation Rate.” *RNA biology* 11(4): 313–19.
- Neugebauer, Karla M. 2002.** “On the Importance of Being Co-Transcriptional.” *Journal of cell science* 115(Pt 20): 3865–71.
- Osheim, Y N, O L Miller, and a L Beyer. 1985.** “RNP Particles at Splice Junction Sequences on Drosophila Chorion Transcripts.” *Cell* 43(1): 143–51.
- Pleiss, Jeffrey A, Gregg B Whitworth, Megan Bergkessel, and Christine Guthrie. 2007.** “Rapid, Transcript-Specific Changes in Splicing in Response to Environmental Stress.” *Molecular cell* 27(6): 928–37.
- Query, C C, M J Moore, and P a Sharp. 1994.** “Branch Nucleophile Selection in Pre-mRNA Splicing: Evidence for the Bulged Duplex Model.” *Genes & development* 8(5): 587–97.
- Rasmussen, E B, and J T Lis. 1993.** “In Vivo Transcriptional Pausing and Cap Formation on Three Drosophila Heat Shock Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(17): 7923–27.
- Reed, Robin. 2003.** “Coupling Transcription, Splicing and mRNA Export.” *Current opinion in cell biology* 15(3): 326–31.
- Rigo, Frank, and Harold G Martinson. 2009.** “Polyadenylation Releases mRNA from RNA Polymerase II in a Process That Is Licensed by Splicing.” *RNA (New York, N.Y.)* 15(5): 823–36.
- Rino, José, and Maria Carmo-Fonseca. 2009.** “The Spliceosome: A Self-Organized Macromolecular Machine in the Nucleus?” *Trends in cell biology* 19(8): 375–84.
- Roberts, G C, C Gooding, H Y Mak, N J Proudfoot, and C W Smith. 1998.** “Co-Transcriptional Commitment to Alternative Splice Site Selection.” *Nucleic acids research* 26(24): 5568–72.
- Rutz, B, and B Séraphin. 1999.** “Transient Interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the Splicing Machinery Affects the Kinetics of Spliceosome Assembly.” *RNA (New York, N.Y.)* 5(6): 819–31.
- Shaevitz, Joshua W, Elio a Abbondanzieri, Robert Landick, and Steven M Block. 2003.** “Backtracking by Single RNA Polymerase Molecules Observed at near-Base-Pair Resolution.” *Nature* 426(6967): 684–87.
- Schroeder, S. C., B Schwer, S Shuman, and D Bentley. 2000.** “Dynamic Association of Capping Enzymes with Transcribing RNA Polymerase II.” *Genes & development* 14(19): 2435–40.
- Schwartz, Schraga H, João Silva, David Burstein, Tal Pupko, Eduardo Eyras, and Gil Ast. 2008.** “Large-Scale Comparative Analysis of Splicing Signals and Their Corresponding Splicing Factors in Eukaryotes.” *Genome research* 18(1): 88–103.
- Schwartz, Schraga, Eran Meshorer, and Gil Ast. 2009.** “Chromatin Organization Marks Exon-Intron Structure.” *Nature structural & molecular biology* 16(9): 990–95.

**Spingola, Marc, Leslie Grate, David Haussler, and Manuel Ares. 1999.** “Genome-Wide Bioinformatic and Molecular Analysis of Introns in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *RNA (New York, N.Y.)* 5(2): 221–34.

**Stevens, Scott W, Daniel E Ryan, Helen Y Ge, Roger E Moore, Mary K Young, Terry D Lee, and John Abelson. 2002.** “Composition and Functional Characterization of the Yeast Spliceosomal Penta-snRNP.” *Molecular cell* 9(1): 31–44.

**Tardiff, Daniel F, Scott a Lacadie, and Michael Rosbash. 2006.** “A Genome-Wide Analysis Indicates That Yeast Pre-mRNA Splicing Is Predominantly Posttranscriptional.” *Molecular cell* 24(6): 917–29.

**Venters, Bryan J, and B Franklin Pugh. 2009.** “How Eukaryotic Genes Are Transcribed.” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44(2-3): 117–41.

**Will, Cindy L, and Reinhard Lührmann. 2011.** “Spliceosome Structure and Function.” *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(7).

**Yu, Yong, Rita Das, Eric G Folco, and Robin Reed. 2010.** “A Model in Vitro System for Co-Transcriptional Splicing.” *Nucleic acids research* 38(21): 7570–78.

**Zenklusen, Daniel, Daniel R Larson, and Robert H Singer. 2008.** “Single-RNA Counting Reveals Alternative Modes of Gene Expression in Yeast.” *Nature structural & molecular biology* 15(12): 1263–71.