

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie, genetika a virologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Bc. Adriana Roithová

Transport U2 snRNA do Cajalových tělísek

U2 snRNA targeting to Cajal bodies

Diplomová práce

Školitel: Doc.Mgr. David Staněk Ph.D

Praha, 2014

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, 30. 4. 2014

Podpis

Tímto bych chtěla poděkovat Doc. Davidu Staňkovi za umožnění prostředků pro vypracování mé diplomové práce a za užitečné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře Biologie RNA v Ústavu molekulární genetiky AV za pomoc při řešení technických problémů.

Abstrakt:

V jádře buňky můžeme nalézt velké množství malých nekódujících RNA, které zastávají nejrůznější důležité funkce. Mezi ně řadíme i malé jaderné RNA bohaté na uridin zvané U snRNA, které společně s proteiny tvoří U snRNP. Tyto částice hrají velmi důležitou roli v sestřihu pre-mRNA. Při tomto procesu jsou odstraňovány nekódující sekvence zvané introny a spojovány kódující sekvence zvané exony. Vše je katalyzováno sestřihovým komplexem, jehož jádro je tvořeno U1, U2, U4, U5 a U6 snRNP. Tyto částice jsou pro tuto posttranskripční úpravu zcela nepostradatelné.

Některé kroky formování těchto U snRNP probíhají v jaderných strukturách zvaných Cajalovo tělísko (CB). V mé práci jsem se zaměřila na faktory, které jsou důležité pro cílení snRNA do Cajalových tělísek. Jako modelovou snRNA jsem použila U2 snRNA.

Pomocí mikroinjekce fluorescenčně značených zkrácených U2 snRNA jsem zjistila, že pro cílení do CB je nezbytná sekvence, na kterou se váží Sm proteiny. Deplece Sm proteinu SmB/B' nám ukázala, že Sm proteiny jsou pro lokalizaci U2 snRNA do CB esenciální.

Sm proteiny jsou formovány na U2 snRNA pomocí SMN komplexu. Odstranění sekvence v U2 snRNA, na kterou se SMN komplex váže, mělo stejný inhibiční efekt na cílení do CB jako deplece Sm proteinu.

Z čehož vyplývá, že Sm proteiny a SMN komplex jsou nezbytné pro U2 snRNA biogenezi především pro transport U2 snRNA do Cajalova tělíska.

Klíčová slova: U snRNP, Cajalovo tělísko, U snRNA, buněčné jádro, Sm proteiny

Abstract:

In the cell we can find a lot of small noncoding RNAs, which are important for many processes. Among those RNAs are small nuclear RNA uridin rich, which with proteins create U snRNP. These particles play important role in pre-mRNA splicing. In this process are noncoding sequences (introns) removed and coding sequences (exons) are joined. It is catalyzed by spliceosome. The core of this spliceosome is created by U1, U2, U4, U5 and U6 snRNP. They are essential for this process.

Some steps of U snRNP biogenesis proceed in nuclear structures called Cajal bodies (CB). In my thesis I focused on factors, which are important for targeting U snRNA into CB. I used U2 snRNA like a model.

With the aid of microinjection of fluorescently labeled U2 snRNA mutants I found, that the Sm binding site on U2 snRNA is essential for targeting to CB. Knock down of Sm B/B' showed us, that Sm proteins are necessary for transport U2 snRNA to CB.

Sm proteins are formed on U2 snRNA by SMN complex. Deletion of SMN binding site on U2 snRNA had the same inhibition effect.

From these results we can see, that Sm proteins and SMN complex are important for U2 snRNA biogenesis especially for targeting into CB.

Key words: U snRNP, Cajal body, U snRNA, cell nucleus

Seznam zkratek:

zkratka	anglický název	Český název/funkce
U snRNP	U rich ribonucleoprotein partcile	Ribonukleoproteinová částice
CRM1	Chromosomal maintance 1	Protein důležitý pro export U snRNA do cytoplasmy
PHAX	Phosphorylated adaptor for RNA export	Protein důležitý pro export U snRNA do cytoplasmy
TGS1	Trimethylguanosin synthase 1	Trimetylguanosin syntáza 1
SMN	Survival of Motor Neuron	Protein důležitý pro motorické neurony
CBC	Cap binding complex	Complex vázající čepičku
scaRNA	Specific Cajal bodies RNA	RNA specifické pro Cajalovo tělísko
snoRNA	Small nucleolar RNA	Malé jadéřkové RNA
RRM	RNA recognition motif	Doména rozpoznávající RNA
PRMT 5	Protein arginine methyltransferase	Protein arginine metyltransferáza
pICln	Chloride conductance regulatory protein	Protein regulující uspořádání U snRNP
MEP50	Methylosome protein 50	Protein metylosomu
WD45	WD repeat protein 45	Protein s WD repeticemi 45

ATP	Adenosinetriphosphate	Adenosintrifosfát
PML	Promyelocytic leukemia protein	Promyelocytický protein
TBP	TATA binding protein	TATA vázající protein
TFIIH	Transcription factor II H	Transkripční factor II H

Obsah:

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam zkratek.....	6
1. Úvod.....	10
2. Přehled literatury.....	11
2.1. U snRNP.....	11
2.1.1. Biogeneze U snRNP.....	12
2.1.2. U2 snRNP.....	15
2.1.2.1. Proteiny U2 snRNP.....	17
2.1.2.1.1. U2 specifické proteiny A' a B''.....	17
2.1.2.1.2. Sestřihový faktor 3b.....	18
2.1.2.1.3. Sestřihový factor 3a.....	20
2.1.2.1.4. Sm proteiny.....	21
2.2. SMN complex.....	25
2.3. Cajalovov tělísko.....	29
2.3.1. Coilin.....	31
3. Cíle práce.....	34
4. Materiály a metody.....	35
4.1. Materiály.....	35
4.1.1. Přístroje.....	35
4.1.2. Buněčné linie.....	36
4.1.3. Bakteriální kmeny.....	36
4.1.4. Plasmidy.....	36
4.1.5. Protilátky.....	36
4.1.6. Primery.....	37
4.1.7. siRNA.....	38
4.2. Metody.....	40
4.2.1. Transformace kompetentních DH5α bakterií tepelným šokem.....	40
4.2.2. Izolace plasmidové DNA z bakterií.....	40
4.2.3. PCR.....	41
4.2.4. In vitro transkripce.....	42
4.2.5. Mikroinjekce.....	42
4.2.6. Fluorescenční barvení.....	43
4.2.7. SDS-PAGE elektroforéza.....	43
4.2.8. Western blot.....	45
4.2.9. Horizontální agarózová elektroforéza.....	46
4.2.10 Transfekce HeLa buněk pomocí siRNA.....	47

4.2.11 Příprava heterokaryonu.....	47
5. Výsledky.....	48
5.1. Sekvence U2 snRNA má vliv na její akumulaci v Cajalových tělískách.....	48
5.2. Sm protein jsou důležité pro transport do Cajalových tělísek.....	53
5.3. U2 snRNA bez Sm proteinů lokalizuje do P tělísek.....	56
5.4. 3'koncová část U2 snRNA je dostačující pro transport do Cajalových tělísek.....	58
5.5. Trimetylace čepičky není pro U2 snRNA důležitá.....	59
6. Diskuze.....	61
7. Reference.....	64

1. Úvod:

Jedním z nejdůležitějších procesů odehrávající se v buňce je sestřih pre-mRNA. Tato posttranskripční modifikace probíhá v jádře a je katalyzována sestřihovým komplexem. Tento komplex se skládá z U snRNP a specifických proteinů. Jádro komplexu je tvořeno U1, U2, U4, U5 a U6 snRNP, které zde katalyzují dvě esterifikační reakce, jejichž výsledkem je odstranění nekódující části pre-mRNA (intronu) a spojení kódujících částí (exonů).

Tyto U snRNP se skládají z RNA, Sm proteinů a z proteinů, které jsou specifické pro každý U snRNP. U snRNA jsou transkribovány RNA polymerázou II (kromě U6, která má odlišnou biogenezi). Po transkripci je pre-snRNA transportována pomocí komplexu PHAX/CRM1/RanGTP z jádra do cytoplasmy, kde je U snRNA upravována dvěma modifikacemi. Nejprve se pomocí SMN komplexu vytvoří kolem Sm vazebné sekvence sedmičlenný kruh Sm proteiny. Dále se trimetyluje čepička na 5'konci pomocí enzymu TGS1. Po těchto dvou modifikacích se U snRNA vrací zpět do jádra pomocí Snurportinu 1 a importinu β . V jádře jsou cíleny do Cajalova tělíska, kde probíhají finální úpravy, pseudouridylyace a 2'-O-metylace snRNA a navázání protein specifických pro jednotlivé snRNP. Po těchto úpravách snRNP opouští Cajalovo tělísko a stává se součástí sestřihového komplexu.

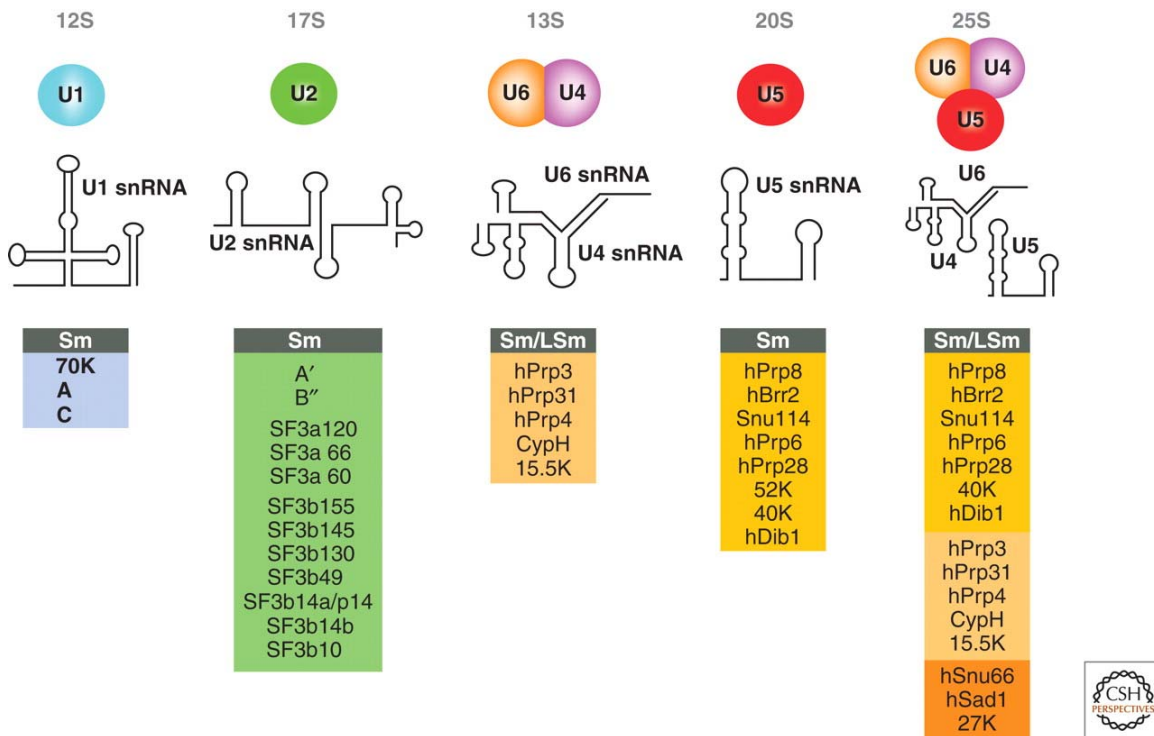
Plně maturovaná 17S částice obsahuje Sm proteiny, U2A', U2B'', SF3b a SF3a. Tato část biogeneze, kde jsou U snRNA cíleny do Cajalova tělíska nebyla ještě zcela prostudována.

V mé práci jsme hledali odpověď na otázku, jaké sekvence či proteiny jsou zodpovědné za transport U2 snRNA do Cajalova tělíska, místa jejich finální maturace.

2. Přehled literatury:

2.1. U snRNP

U snRNP, neboli malé jaderné ribonukleoproteinové částice obsahující snRNA bohatou na uridin, byly objeveny již v roce 1979 (Lerner et al. 1979). Jsou nepostradatelnou součástí sestřihového komplexu, který katalyzuje jeden z nejdůležitějších procesů v jádře buňky, sestřih pre-mRNA. V tomto procesu dochází k odstranění nekódující části, neboli intronu, z pre-mRNA a spojení kódujících sekvencí, neboli exonů (Will et al. 2001). Každý U snRNP se skládá z RNA a Sm proteinů (kromě U6 snRNA, která má LSm proteiny)(Pettersen et al. 1983) a proteinů, které jsou pro každý snRNP specifické (Obr. č. 2. 1)



Will C L and Lührmann R Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:a003707

Obr. č. 2. 1. Malé jaderné ribonukleoproteinové částice, U snRNP

V buňce existuje 5 základních U snRNP U1, U2, U4, U5, U6 (Obr. č. 2.1), které jsou zodpovědné za sestřih většiny pre-mRNA intronů, také nazývané U2 typ introny. Dále však v buňce najdeme i méně početné U snRNP U11, U12, U4atac, U6atac a U5, které tvoří tzv. minoritní sestřihový komplex. Tento komplex je zodpovědný za sestřih tzv. U12 typ intronů. Obě třídy U snRNP jsou si však velmi podobné.

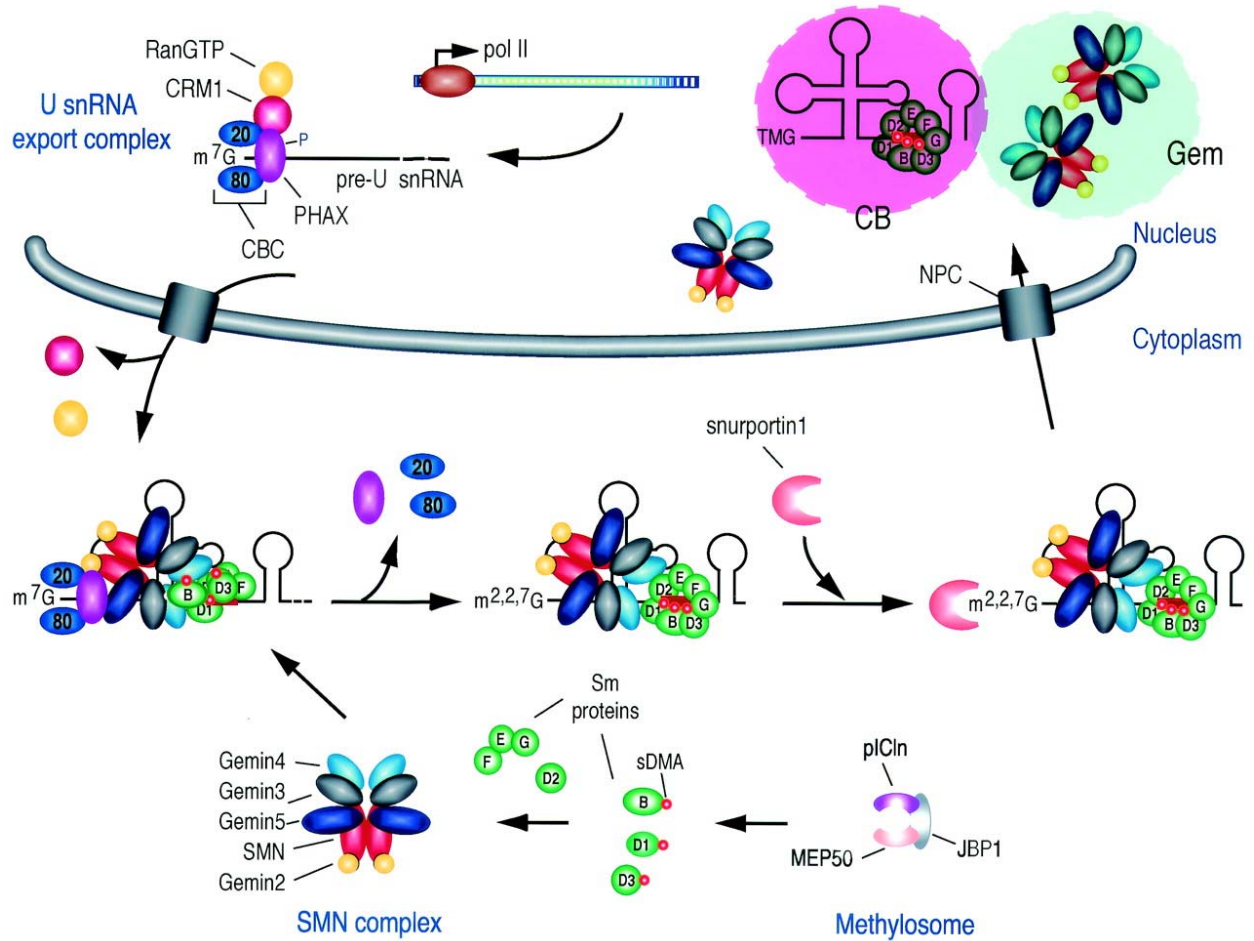
2.1.1. Biogeneze U snRNP

Biogeneze U snRNP je komplexní proces, který není zcela prozkoumán. Ještě méně je toho známo o biogenezi minoritních U snRNP. Následující popis bude tedy zaměřen na majoritní U snRNP (U1, U2, U4 a U5). U6 snRNP má odlišnou biogenezi, kterou se zde nebudu podrobněji zabývat.

U snRNP jsou přepisovány z DNA pomocí RNA polymerázy II (Monstein et al. 1982, Busch et al. 1982). Všechny transkripty mají na 5'konci monometylovanou čepičku, která je nezbytná pro jejich transport do cytoplasmy (Hamm et al. 1990). Export do cytoplasmy, který nastává po přepisu RNA, je závislý na monometylované čepičce, CBCf, PHAX, CRM1/Xpo1 a na RanGTP (Ohno et al. 2000, Fornerod et al. 1997, Moore et al. 1993). Nejprve na monometylovanou čepičku nasedne CBC a dále pak PHAX, který je specifický pro U snRNA a zprostředkuje interakci mezi CBC/U snRNA a CRM1/RanGTP, čímž se vytvoří komplex, který zajistí export U snRNA do cytoplasmy přes jaderný pór (Obr. č. 2.2).

V jádře je PHAX ve fosforylované formě, která je důležitá pro tvorbu exportního komplexu a po přechodu do cytoplasmy se PHAX defosforyluje a komplex se rozpadá, přičemž PHAX se vrací zpět do jádra, kde je opět fosforylován a tvoří další exportní komplex pro U snRNA (Ohno et al. 2000). Dále se zde také hydrolyzuje RanGTP na

RanGDP a také se vrací do jádra, kde je opět přeměněn na Ran GTP a naváže se na další exportní komplex (Moore et al. 1993).



Obr. č. 2.2. Biogeneze U snRNP

Pellizzoni et al. 2002, Molecular and Cellular Biology

V cytoplasmě probíhá další etapa biogeneze, ve které se, za účasti SMN komplexu, na U snRNA naváže 7 Sm proteinů (B/B', D3, D2, D1, E, F a G) kolem specifické sekvence (PuAU₄₋₆GPU). Tato sekvence je velmi konzervovaná a obvykle ji nalezneme mezi dvěma smyčkami U snRNA (Fischer et al. 1997, Charroux et al. 1999, Charroux et al. 2000, Baccon

et al. 2002). Formaci tohoto sedmičlenného kruhu zprostředkovává SMN komplex, který přímo váže Sm proteiny a U snRNA (Pellizzoni et al. 2002). Jeho vlastnosti a funkce budou podrobněji popsány v další kapitole.

Dalším krokem biogeneze snRNP je trimetylace čepičky, která probíhá také v cytoplasmě (Mattaj et al. 1986, 1990). Tuto modifikaci provádí TGS1, což je metyltransferáza, která byla objevena ve vyšších eukaryotech i v kvasinkách (Mouaikel et al. 2002). Hypermetylace čepičky je úzce spojená s tvorbou Sm kruhu kolem U snRNA, hlavně s proteiny Sm B/B' a D3, které jsou pro hypermetylaci nezbytné (Luhrmann et al. 1996).

Tyto dvě modifikace, tvorba Sm jádra a trimetylace čepičky, tvoří jaderný lokalizační signál, díky kterému se U snRNA vrací zpět do jádra (Obr. č. 2.2). Na trimetylovanou čepičku se váže Snurportin 1, respektive na trimetylguanosid, který tvoří část čepičky (Huber et al. 1998, Bahia et al. 2006). Snurportin 1 je tvořen ze dvou domén, z NH₂ terminální domény, na kterou se váže importin β (IBB) a z COOH terminální části, která je důležitá pro vazbu trimetylované čepičky. Snurportin 1 tedy tvoří jakési spojení mezi čepičkou U snRNA a importinem β (Huber et al. 1998). Bylo ukázáno, že importin β je schopný vázat se i na SMN komplex, avšak není jasné jak s ním interaguje, protože mu chybí IBB doména (Narayan et al. 2002). Stejná práce Narayan (2002) ukázala, že i TGS1 interaguje s SMN a se stejnou částí SmB/B' proteinu jako SMN protein. Je tedy možné, že interakcí SMN a TGS1 se změní konformace U snRNA, SMN se uvolní z C-konce SmB/B' proteinu a místo něj se zde naváže TGS1, která následně interaguje s čepičkou a hypermatyluje ji. Poté se na čepičku naváže Snurportin 1, což by mohlo zapříčinit uvolnění TGS1 z U snRNA. Ukazuje se tedy, že SMN má svou úlohu i v importu U snRNA zpět do jádra.

V jádře jsou nové snRNP dále směřovány do Cajalových tělísek (CB) (Sleeman et al. 1999), kde probíhají jejich post-transkripční modifikace (2-O-metylace a pseudouridylylace), za které jsou zodpovědné scaRNA (Darzacq et al. 2002). Tyto malé RNA specifické pro Cajalova tělíška jsou velmi podobné malým jadérkovým RNA (snoRNA), které provádí stejné úpravy nukleotidů (2-O-metylace a pseudouridylylace) v ribosomální

RNA (rRNA) v jadérku (Balakin et al. 1996, Kiss et al. 1996). V Cajalových tělískách jsou posttranskripčně upravovány pouze U1, U2, U4 a U5. U6 snRNA je upravována v jadérku pomocí snoRNA (Jády et al. 1999).

Po těchto úpravách se na U snRNA naváží proteiny, které jsou specifické pro jednotlivé U snRNA (Obr. č. 2.1). Navázáním proteinů vzniknou plně maturované snRNP, které dále tvoří v nukleoplasmě sestřihový komplex, který je nezbytný pro sestřih.

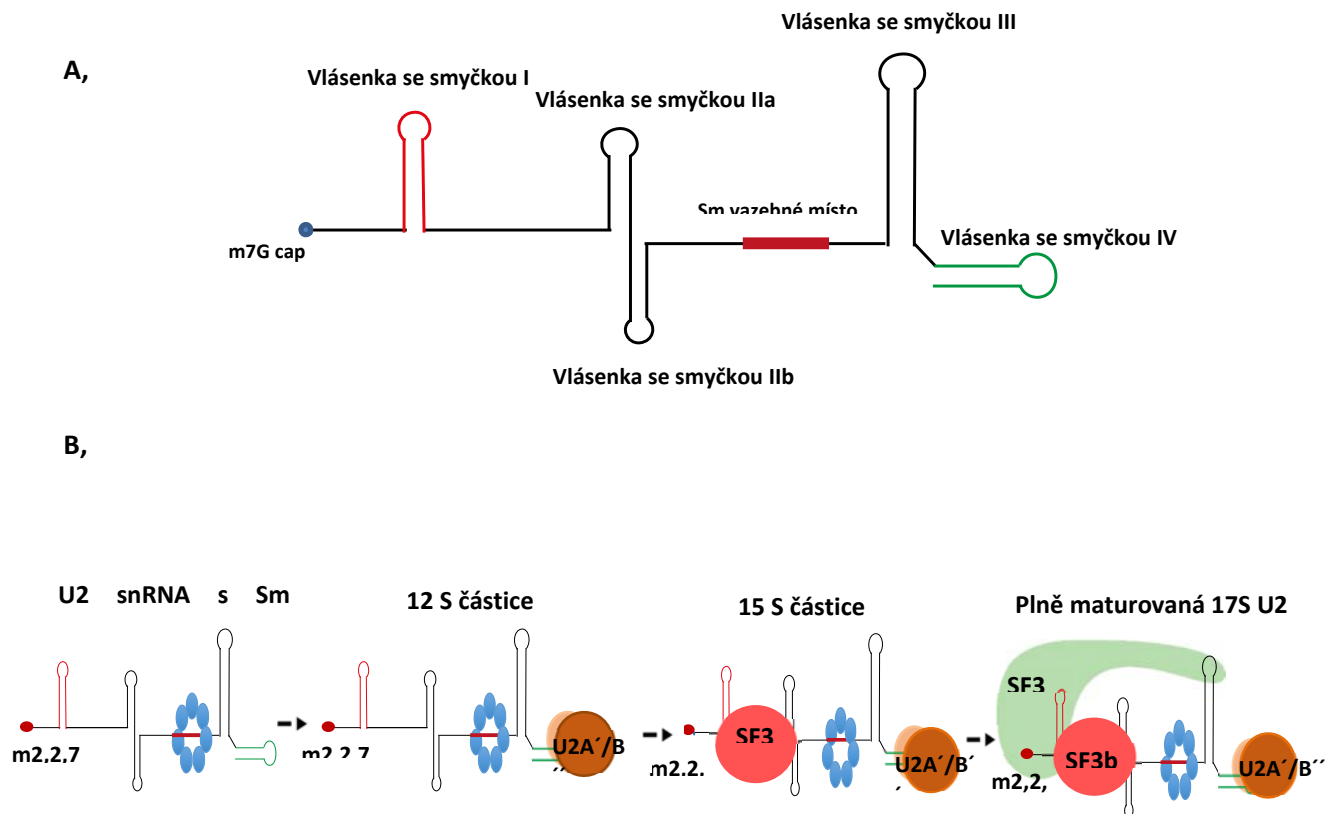
2.1.2. U2 snRNP

V mé diplomové práci se zaměřuji na U2 snRNP a proto tuto částici a její biogenezi popíši detailněji.

U2 snRNA je malá jaderná nekódující RNA, která patří mezi základní U snRNA (Obr. č. 2.1), které jsou zodpovědné za sestřih většiny pre-mRNA intronů, nebo také nazývaných U2 typ intronů. Je 186 bp dlouhá a tvořená 4 vlásenkami a jednořetězovými regiony, které váží U6 snRNA, větvíci se místo intronu a proteiny (Sashital et al. 2007). Její biogeneze je popsána v předešlé kapitole. V cytoplasmě se na U2 snRNA naváží Sm proteiny a trimetyluje se čepička na 5'konci. Po importu U2 snRNA zpátky do jádra míří do Cajalových tělísek, kde probíhá její plná maturace a úpravy pomocí scaRNA, které provádí 10 2'-O- metylací a pseudouridylací 13 uridinů. Tyto úpravy se vyskytují hlavně v blízkosti 5'konce na vlásenkové smyčce I, poblíž které se také nachází vazebné místo pro větvíci se část intronu. Tyto modifikace jsou nezbytné pro navázání specifických proteinů a pro formaci sestřihového komplexu A (Yu et al. 1998).

V Cajalově tělísku se dále na U2 snRNA naváží U2 specifické proteiny A' a B''. Této formě U2 snRNP se říká 12S (Kleinschmidt et al. 1989). Dále se naváže sestřihový faktor 3b (SF3b) a z 12S U2 snRNA se stane 15S pre-maturovaná U2 snRNP (Will et al. 2002). Na tento meziprodukt se však ihned váže další sestřihový faktor 3a (SF3a) a vzniká plně maturovaná 17S částice (Obr. č. 2.3) (Behrens et al. 1993). O sestavování komplexu a o proteinech, které tento komplex tvoří je známo velmi málo. Tato 17S maturovaná U2 snRNP, jak již bylo zmíněno, plní jednu z klíčových rolí při sestřihu, kde je

nepostradatelnou součástí sestřihového komplexu rozpoznávající větvičí místo v intronu. Pro tuto interakci jsou nezbytné sestřihové komplexy 3a a 3b. Pomáhají v navázání U2 snRNP na pre-mRNA a interakci také stabilizují (Brosi et al. 1993). Bylo však ukázáno, že v pozdějších fázích sestřihu sestřihový komplex opouští (Bessonov et al. 2008).



Obr. č. 2.3. A, Sekundární struktura U2 snRNA , červená smyčka- vazebné místo pro SF3a, zelená smyčka- vazba proteinu U2B'' B, Maturace U2 snRNP

2.1.2.1. Proteiny U2 snRNP

Plně maturovaná 17S U2 snRNP obsahuje proteiny, které se dají rozdělit do 2 kategorií. První jsou proteiny, které se nachází ve všech U snRNA. Mezi ně řadíme Sm proteiny. Do druhé kategorie patří proteiny, které jsou specifické pro jednotlivé U snRNP (Obr. č. 2.1). V případě U2 snRNA se jedná o U2 specifické proteiny U2A' a U2B'', sestřihový faktor 3a a 3b (Obr. č. 2.3).

2.1.2.1.1. U2 specifické proteiny A' a B'' - U2A' a U2B''

U2A' a U2B'' proteiny jsou společně s Sm proteiny součástí 12S U2 snRNA (Obr. č. 2.3). Zatímco Sm proteiny jsou společné pro všechny U snRNP, U2A' a U2B'' jsou specifické jen pro U2 snRNA a jsou velmi důležité pro maturaci U2 snRNP v Cajalově tělísku. Po jejich translaci v cytoplasmě jsou importovány přes jaderný pór do jádra nezávisle na U2 snRNA. V jádře tvoří heterodimer, který se poté naváže na čtvrtou smyčku U2 snRNA přes U2B''. U2A' se váže velmi silně k U2B'' pomocí své N-koncové části, která je bohatá na leucin a k U2 snRNA se váže až přes U2B'' (Scherly et al. 1990). U2B'' stejně jako U1 70K či U1A (specifické proteiny pro U1 snRNA) mají ve své struktuře RNA vazebnou doménu neboli RNA rozpoznávající motif (RRM), který obsahuje segment 8 vysoce konzervovaných aminokyselin nazývaný se RNP sekvence (Adam et al. 1986, Query et al. 1989). Avšak U2B'' potřebuje k vazbě na U2 snRNA U2A' protein, čímž se liší od zmiňovaných proteinů U170K a U1A, které se váží k U1 snRNA samy. Pokud U2A' není přítomno, U2B'' se váže nespecificky k RNA (Scherly et al. 1990). U2A' ke specifitě přispívá i svou inhibicí vazby mezi U2B'' a U1 snRNA (Scherly et al. 1990). Podobný protein, který patří do stejné proteinové rodiny jako U1A a U2B'' byl nalezen i u *Drosophilla melanogaster* a nazývá se Sans-Fille protein (SNF), který však není nezbytný pro U2 snRNP (Mattaj et al. 1996). Zatímco u člověka či rostlin je U2B'' nezbytný pro maturaci U2 snRNP, tak u *Drosophilly* bylo ukázáno, že pro tuto maturaci je

nepostradatelný U2A'protein (Nagengast et al. 2001). Homology těchto proteinů byly zkoumány i v rostlinách, kde našli stejné vlastnosti U2B'' a U2A' jako u člověka. V kvasinkách byly nalezeny homology U2A' i U2B'', které se váží na smyčku IV U2 snRNA. Nazývají se Lea1p (U2A') a Yib9p (U2B'') (Mattaj et al. 1996). Yib9p se od lidského U2B'' proteinu liší počtem RRM domén, kde U2B'' má 2 domény, jednu na N-konci a druhou na C-konci. Yib9p má pouze jednu na N-konci (Mattaj et al. 1996). Studie odhalily, že Yib9p je schopný se vázat na U2 snRNA bez dalších proteinů. Je tedy více podobný U1A proteinu. Lea1p protein, homolog U2A', neovlivňuje tuto vazbu a jeho funkce je spíše v sestřihu. V kvasinkách jsou tedy na sobě tyto 2 proteiny zcela nezávislé (Caspary et al. 1998).

2.1.2.1.2. Sestřihový faktor 3b – SF3b

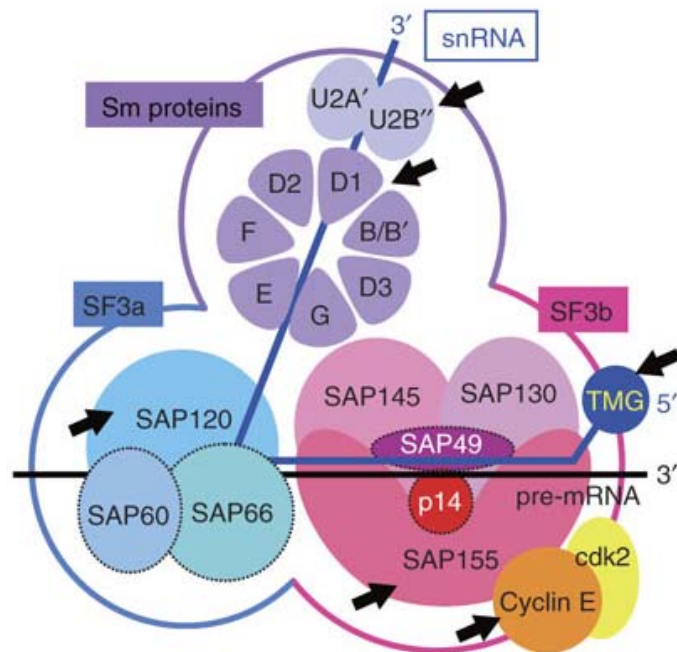
SF3b je multiproteinový komplex, který je součástí 15S U2 snRNP, U11/U12 di-snRNP (Will et al. 2002). Tento 450 kDa komplex je tvořen 7 proteiny (SF3b155, SF3b49, p14, SF3b130, SF3b145, SF3b14b, SF3b10) (Biplab et al. 1999, Will et al. 2001, Will et al. 2002). SF3b je pro maturaci U2 snRNP nezbytný stejně jako pro sestřih pre-mRNA, kde hraje esenciální roli při tvorbě sestřihového komplexu a rozpoznávání větvičího místa intronu (Gozani et al. 1996). Protein p14 se váže pomocí své RRM domény blízko sekvence vazebného místa pro větvičí se místo intronu na U2 snRNA a také se přímo váže na pre-mRNA. Dále se váže k SF3b155, který je největší podjednotkou celého komplexu (Will et al. 2001) a k adenosinu větvičího se místa intronu. 2 RRM domény byly nalezeny u SF3b49, který se také váže na U2 snRNA poblíž vazebného místa pro větvičí se místo intronu a dále váže další podjednotku komplexu, SF3b145 (Reed et al. 1994). Tato interakce vyžaduje N-koncovou část SF3b49, ve které se tyto RRM domény nachází.

V roce 2002 byl objeven další protein SF3b komplexu, který patří do DEAD-box proteinové rodiny a nazývá se SF3b125. Ukázalo se však, že tato podjednotka disociuje z komplexu po vytvoření maturované 17S U2 snRNP. Jeho funkcí by mohla být pomoc při

maturaci U2 snRNP, buď při tvorbě 15S částice, či 17S U2 snRNP. Další 2 proteiny, které byly objevené ve stejné studii, SF3b10 a SF3b14b jsou vysoce konzervovanými proteiny v eukaryotech a zřejmě také umožňují vazbu U2 snRNP k větvicímu se místu intronu.

V kvasinkách se tento sestřihový faktor nalézá také a zastupuje zde i stejnou funkci jako SF3b u savců. Byly nalezeny homology podjednotek tohoto multiproteinového komplexu (Hsh155p/SF3b155, Cus1p/SF3b145, Rse1p/SF3b14b, Ist3p/p14 a Rcp10p/p10). Ukázalo se, že protein Rcp10p, homolog p10, je pro sestřih nepostradatelný a je vyžadován pro formaci SF3b komplexu v kvasinkách (Wang et al. 2005). Role p10 u vyšších eukaryot nebyla dosud popsána.

Místem maturace U2 snRNP by měla být Cajalova tělíska, avšak bylo pozorováno, že SF3b155 a SF3a120 (sestřihový faktor 3a 120, o kterém se budu zmiňovat v následující kapitole) se neakumulují v Cajalových tělískách ale spíše v jaderných skvrnách či nukleoplasmě. Bylo však ukázáno, že komponenty 12S částice a SF3b125 (i ostatní mimo SF3b155) i SF3a60 a 66 se v Cajalových tělískách akumulují (Will et al. 2002). To by se zřejmě dalo vysvětlit tím, že místem formování konečné 17S částice nejsou Cajalova tělíska, ale jiné jaderné domény jako například již zmíněné jaderné skvrny. Je zde stále mnoho otázek ohledně formování tohoto komplexu a maturace U2 snRNP.



Obr. č. 2.4. U2 snRNA se specifickými proteiny U2A', U2B'', SF3a SF3b, Sm proteiny

Yoshihiko et al. 2007, Nature chemical biology

2.1.2.1.3. Sestřihový faktor 3a – SF3a

Tento sestřihový multimerický komplex je tvořen 3 podjednotkami, SF3a60, SF3a66 a SF3a120. Po jejich navázání na 15S U2 snRNP se U2 snRNP mění na plně maturovanou 17S částici (Behrens et al. 1993), která dále plní funkci v sestřihu nekódujících sekvencí pre-mRNA. Její vazebné místo je na první a částečně i na třetí smyčce U2 snRNA (Obr.č. 2.3)(Dybkov et al. 2006). SF3a60 obsahuje na svém C-konci vysoce konzervovanou U1C-tyt Cys₂His₂ zinc-finger doménu a SF3a66 ji má také. Tyto domény jsou důležité pro vazbu U2 snRNA. Je zde i hypotéza, že by mohly interagovat s Sm proteiny, protože stejná

doména byla nalezena i u U1C proteinu, který je specifický pro U1 snRNA a váže se k Sm proteinům (Nesic et al. 2001). Podjednotka SF3a120 je charakterizována dvěma SURP doménami. Tato doména je velmi důležitá pro vazbu k SF3a60 (Kramer et al. 1995). Tento SF3a komplex se nemůže sám vázat k SF3b komplexu ani k 12S U2 snRNP. Může vázat jen 15S částici, hlavně její 5' koncovou část. S 15S U2 snRNP interaguje pouze se SF3a60.

Bylo ukázáno, že tvorba SF3a heterotrimeru se děje již v cytoplasmě. Poněvadž pro tvorbu jaderného lokalizačního signálu je potřeba všech 3 podjednotek. Tento heterotrimer vstupuje do jádra nezávisle na U2 snRNA či SF3b komplexu (Huang et al. 2011). Složení heterotrimeru v cytoplasmě a následný transport do jádra předpokládá navázání se na 15S částici v Cajalově tělísku, avšak práce Will et al. 2002 ukázala, že SF3a120 a SF3b155 se v Cajalových tělískách nenachází, což neodpovídá transportu celého heterotrimeru do jádra a následné vazby na 15S částici v Cajalově tělísku. Další možnost je, že se protilátky proti SF3a 120 a SF3b155 nemohly na proteiny v Cajalově tělísku navázat nebo k dokončení maturace dochází jinde v jádře.

SF3a komplex je pro životaschopnost buňky nepostradatelný. Snížená hladina SF3a60 a 66 nejprve zapříčinila akumulaci 12S U2 snRNP v Cajalových tělískách a následnou nekrotickou buněčnou smrt (Tanakovic et al. 2005). Zastavením maturace U2 snRNP se zastavil sestřih pre-mRNA a transkripce v buňce.

V kvasinkách se také našly homology podjednotek SF3a komplexu, SF3a 60/Prp9, SF3a 66/Prp11, SF3a 120/Prp21, které se však preferenčně váží k druhé smyčce U2 snRNA na rozdíl od savců, kde se váže na první a třetí smyčku. Stejně jako u člověka, Prp9, obsahuje U1C-tyt Cys₂His₂ zinc-finger doménu, přes kterou se váže k U2 snRNA a Prp21 má ve své struktuře SURP doménu, která je důležitá pro vazbu Prp9. Prp11 a 9 se spolu váží přes Prp21, stejně jako u savců (Kramer et al. 1995). Domény obsažené v těchto proteinech jsou vysoce konzervované a nalezneme je jak u kvasinek, tak i v člověku.

2.1.2.1.4. Sm proteiny

Protilátky proti Sm proteinům byly poprvé objeveny v roce 1979 u pacientů trpících autoimunním onemocněním Systémový lupus erythematosus (SLE) (Lerner et al. 1979). Sm proteiny tvoří rodinu vysoce konzervovaných proteinů, které váží RNA. Najdeme je u eukaryot, prokaryot i u Archea (Salgado-Garrido et al. 1999, Valentin-Hansen et al. 2004). V bakteriích a v Archea se nachází homology, které tvoří kruhy skládající se z homohexamerních jednotek například Sm2 či Hfq nebo z homoheptamerních jednotek jako jsou Sm1 (Basquin et al. 2002, Sauter et al. 2003). Sm1 a Sm2 proteiny, které se nachází u Archea, se stejně jako u eukaryot váží na uridin bohaté sekvence malých RNA. Předpokládá se, že fungují jako platforma pro interakci snRNA a pre-mRNA (Thore et al. 2003). U bakterií se nachází Hfq protein, který byl poprvé objeven u *Escherichia coli*. Tvoří homohexamerní kruhy a také se váže na A/U bohaté sekvence regulačních RNA. Zřejmě v buňce funguje jako chaperon, který uspořádává regulační RNA a jejich cíle k usnadnění jejich interakce (Sauter et al. 2003).

U eukaryot se nachází nejméně 18 různých Sm a LSM proteinů, jež jsou zahrnuty do pre-mRNA sestřihu, maturaci histonů, údržbě telomer a RNA degradaci. LSM proteiny formují dva různé heteroheptamerické komplexy. LSM 1-7 proteiny se v cytoplazmě váží přímo na 3' konec mRNA a pomáhají při mRNA degradaci (Tharun et al. 2001). V jádře se LSM proteiny 2-8 váží na 3'konec U6 snRNA a U6atac snRNA, kde se nachází specifická sekvence bohatá na uridin (Vidal et al. 1999). Určují jadernou lokalizaci U6 snRNA a stabilizují ji (Spiller et al. 2007).

Začíná se ukazovat, že Sm proteiny mají i jiné funkce než jen v biogenezi snRNP. V *Caenorhabditis elegans* lokalizují Sm proteiny do P granul a jsou vyžadovány pro jejich integritu. Tyto zárodečná granula se účastní post-transkripčních úprav RNA během embryogeneze (Barbee et al. 2006, Updike et al. 2010). U *Drosophila melanogaster* jsou SmB a SmD3 bohatě zastoupené v posteriólní části vyvíjejícího se oocyty. Mutace SmD3

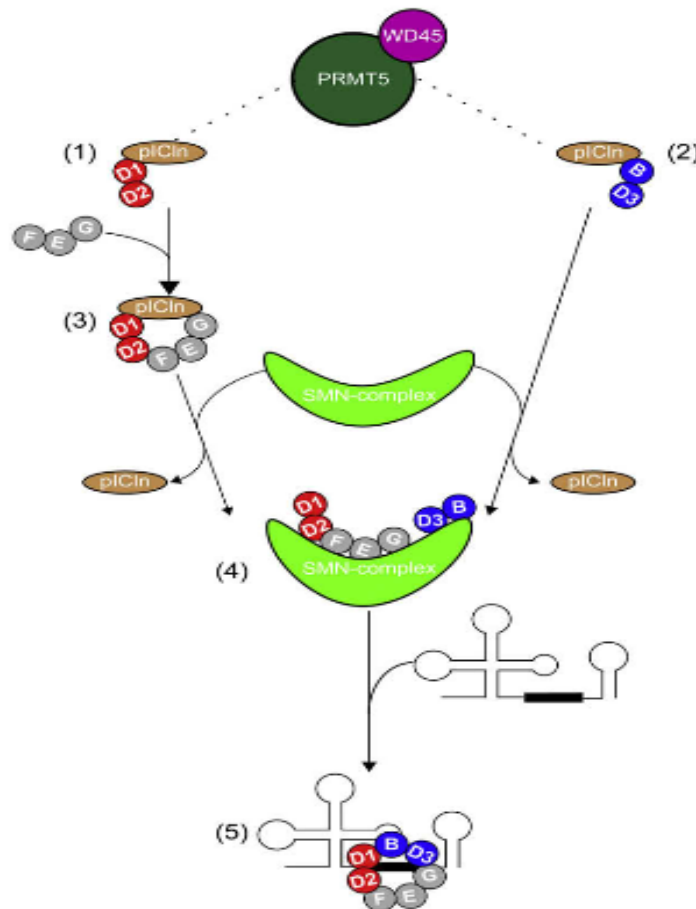
způsobila špatnou lokalizaci oskar mRNP, která je důležitá pro formaci pólů. Byly pozorovány výrazné defekty ve specifikaci zárodečných buněk. Tyto defekty však nebyly způsobeny špatným sestřihem pre-mRNA (Gonsalvez et al. 2010). U obratlovců jsou Sm proteiny hojně zastoupeny v mitochondriálním pojivu a v nuage, ve strukturách, které obsahují hodně komponent jako zárodečná plasma bezobratlých (Bilinski et al. 2004).

U snRNP mají v eukaryotech i jiné funkce než jen jako komponenty sestřihového komplexu. Například U1 snRNP chrání pre-mRNA před předčasnou polyadenylací v krytickém poly A místě intronu (Kaida et al. 2010). Dále její první smyčka inhibuje HIV polyadenylaci (Ashe et al. 2000). U2 a U12 snRNPs hrají důležitou roli ve zpracování lidských histonových mRNA, které neobsahují introny. Stimulují zde štěpení závislé na U7 snRNP (Friend et al. 2007).

V mé diplomové práci se zaměřuji na U2 snRNP a její biogenezi, jejíž součástí jsou Sm proteiny SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmG a SmF, které v cytoplasmě formují heptamerický kruh kolem specifické sekvence AUUUUUG na U1, U2, U4 a U5 snRNP. Tato sekvence je většinou umístěna mezi 2 vláskami se smyčkou (Branlant et al. 1982). Formace sedmičlenného kruhu je velmi regulovaný proces závislý na SMN komplexu, který se také nachází převážně v cytoplasmě (Meister et al. 2001). SMN komplex interaguje se symetricky metylovanými argininy přes svou tudor doménu.

Proteiny SmD1, SmD3 a SmB/B' obsahují na C-konci Sm domény RG motivy bohaté na arginin a glycin. Arginin je zde symetricky metylován N-metyltransferázou PRMT5, čímž se zvyšuje afinita pro SMN komplex. PRMT5 patří do méně početné skupiny metyltransferáz II, které katalyzují vznik monometylargininů a symetricky metylovaných argininů (Branscombe et al. 2001). Mezi její cíle patří i myelinový bazický protein (Ghosh et al. 1988) či histony (Pal et al. 2004). PRMT5 funguje jako multiproteinový komplex složený z proteinů, které přispívají k její lokalizaci a substrátové specifitě. Za metylaci Sm proteinů je zodpovědný metylosom neboli 20S metyltransferázový komplex, který je sestaven z PRMT5 a PRMT5 interagujících proteinů pICln a MEP50/WD45/IBP42 (Friesen et al. 2001, Meister et al. 2001). V obou procesech, metylaci Sm proteinů a uspořádání U

snRNP, hraje důležitou roli 26 kDa vysoce konzervovaný protein piCln. Tento protein se přímo váže k Sm proteinům a k SMN komplexu. Studie také ukázaly, že inhibuje spontánní uspořádání Sm proteinů kolem U snRNP (Meister et al. 2001). Byl tedy navržen model, kde piCln funguje jako chaperon, který brání předčasné či nespecifické interakci Sm proteinů a U snRNP. Chari et al. ukázali, že piCln uspořádává a stabilizuje meziprodukt složený z SmD1/D2 a SmE/F/G tzv. 6S meziprodukt. Proteiny drží v otevřeném kruhu (Obr. č. 5). V této podobě nemohou Sm proteiny samy tvořit kruh, protože mají navzájem velmi slabou afinitu (Raker et al. 1996). Dále ukázali, že piCln formoval další komplex s SmB a D3. SMN komplex poté interaguje přímo s piCln a přijímá Sm proteiny z obou komplexů, z 6S a piCln/SmB/D3 a piCln disociuje pryč (obrázek č. 2.5) (Chari et al. 2008).



Obr. č. 2.5. Model uspořádání Sm proteinů kolem U snRNP

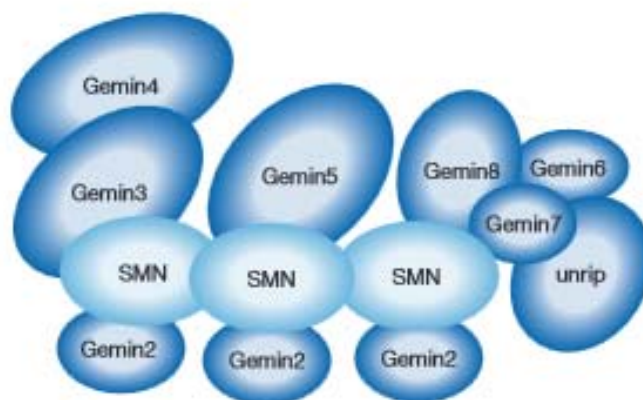
Chari et al 2008, Cell

SMN se následně váže na SMN vazebné místo U snRNA, které leží poblíž Sm místa a skládá Sm proteiny do heptamerického kruhu. Tato část biogeneze U snRNP je nepostradatelnou částí, po které následuje trimetylace čepičky na 5'konci snRNP a následný návrat do jádra (Obr. č. 2.2).

2.2. SMN komplex:

SMN protein se skládá z 294 aminokyselin a je produkován ve všech metazoi a ve všech buněčných typech obratlovců. Nachází se v cytoplasmě i v jádře, hlavně v Cajalových tělískách a tzv. gems (Liu et al. 1996). Mutace genu pro SMN protein způsobuje autosomálně recesivní onemocnění zvané spinální svalová atrofie (SMA), která je charakterizovaná degenerací motorických neuronů vedoucí k progresivní paralýze a následné svalové atrofii (Lefevbre et al. 1995). Lidský genom obsahuje 2 geny pro SMN protein, SMN1 a SMN2, které se od sebe liší záměnou C→T v exonu 7, což vede ke změně sestřihu SMN2 genu, která snižuje stabilitu SMN2 proteinu. Pacienti trpící SMA mají velmi nízkou hladinu SMN proteinu, která je způsobena defektem v SMN1 genu a pouze gen SMN2 je přepisován. U myši tento gen SMN2 nenajdeme, proto delece genu pro SMN protein je letální v brzkém embryonálním stadiu (Lorson et al. 1999). Nikdo však dosud neví, jakou roli hraje SMN protein v ochraně těchto neuronů před jejich degradací. Někteří si myslí, že je to právě špatná biogeneze U snRNP.

SMN protein se v buňce nenachází samostatně, ale je vždy asociován s přidavnými proteiny, se kterými tvoří komplex (Kolb et al. 2007). Je tvořen SMN proteinem, proteinem Gemin 2-8 a proteinem Unrip (Liu et al. 1996, Liu et al. 1997, Charroux et al. 1999, Charroux et al. 2002, Pellizzioni et al. 2002, Baccon et al. 2002, Gubitza et al. 2002, Carissimi et al. 2006)(Obr.č. 2.6).



Obr. č. 2.6: SMN komplex

Pellizoni et al. 2007, Embo reports

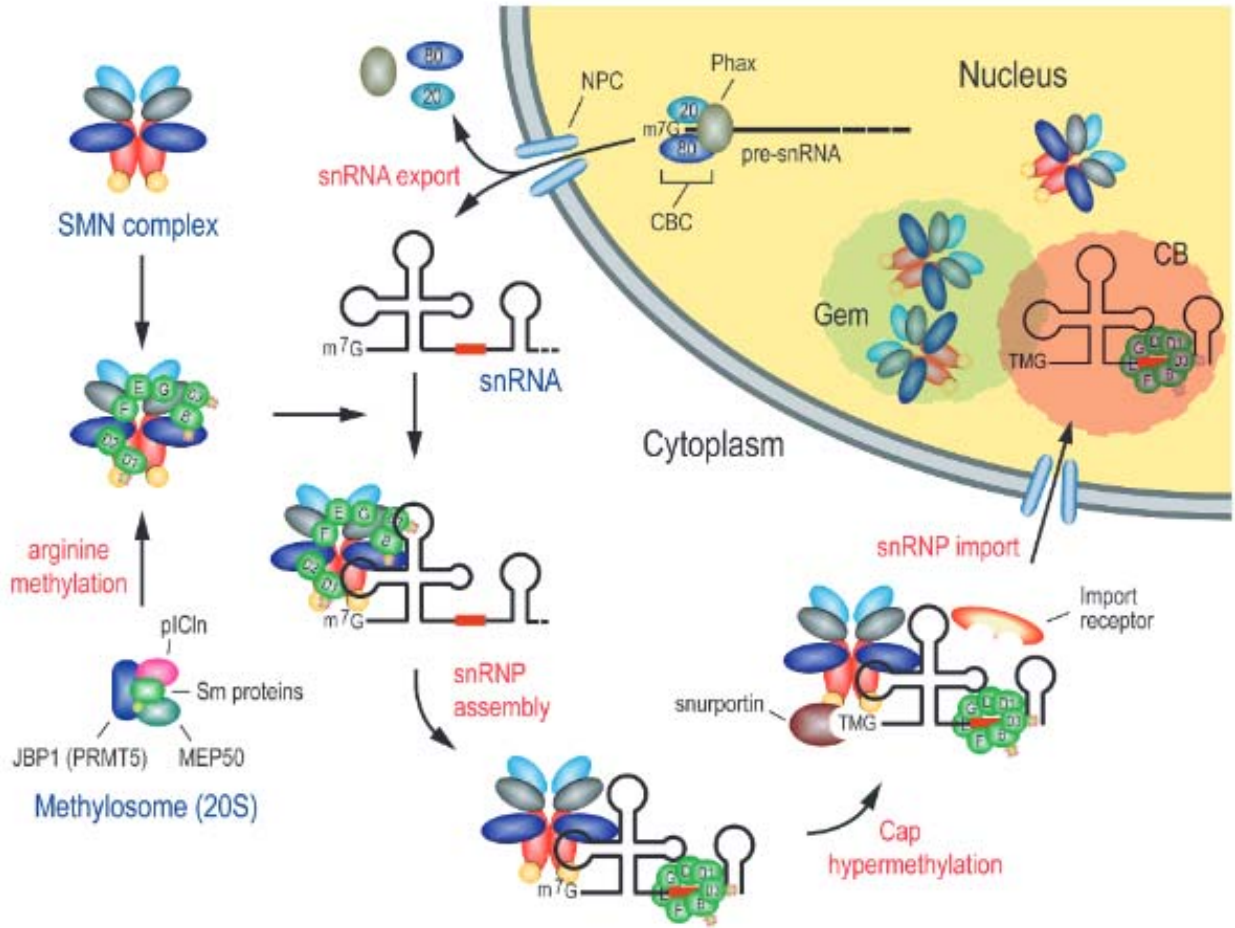
SMN oligomerizuje přes svůj C-konec a vždy je úzce spojen s Gemin 2, tento komplex interaguje s pentametrem Sm proteinů (D1, D2, E, F a G) a spolu tvoří komplex 8S při biogenezi snRNP (Zhang et al. 2011). Zdá se, že Gemin 2 je klíčový protein v U snRNA biogenezi a je důležitý pro životaschopnost eukaryotických organismů. Delece genu pro Gemin2 u myši způsobila letalitu embryonálních buněk dříve než delece SMN proteinu (Shpargel et al. 2005). Dále s komplexem SMN- Gemin2 interaguje komplex Gemin 6, Gemin 7 a Gemin 8 a protein Unrip. Je zajímavé, že u Gemin 6 a 7 byla nalezena doména, která je stejně složená jako Sm doména (Baccon et al. 2002). A na tyto 2 proteiny se poté přímo váže Gemin 8, který má prozatím neznámou funkci (Carissimi et al. 2006), avšak v Cajalových tělískách přímo interaguje s protein fosfatázou PP1 γ . SMN komplex je defosforylován v nukleoplasmě, což pomáhá jeho stabilitě v Cajalových tělískách. SMN protein obsahuje 16 fosfoserinů, které by mohly být potenciální kandidáti defosforylace pomocí PP1 γ (Renvoisé et al. 2012).

Dále s SMN interaguje Gemin 3, u něhož se předpokládá, že jde o DEAD box RNA helikázu (Charroux et al. 1999), která by mohla pomáhat se správným sbalením U snRNA pro navázání Sm proteinů. Jeho funkce není zcela jasná, avšak snížením jeho hladiny dochází

k chybám při tvorbě Sm kruhu (Matera et al. 2005). Podobný defekt vykazuje i deplece proteinu Gemin 4, se kterým přímo interaguje. Většina podjednotek SMN komplexu je vyžadována pro uspořádání Sm kruhu kolem snRNA. Specifitu komplexu k U snRNA zprostředkovává protein Gemin 5, který obsahuje WD repetice (Yong et al. 2010) a rozpoznává 50 – 60 nukleotidový úsek U snRNA tzv. snRNA kód. Tento úsek zahrnuje vazebné místo pro Sm proteiny a vlásenkovou strukturu na 3'konci U snRNA. Byl nalezen u všech pre-snRNA a odděluje je od jiných tříd RNA (Golembe et al. 2005). Po depleci proteinu Gemin 5 nebyly pozorovány žádné defekty při tvorbě Sm kruhu (Matera et al. 2005).

SMN komplex tedy přímo interaguje s Sm proteiny a s U snRNA. Všechny proteiny v SMN komplexu jsou schopné vázat Sm proteiny. K zesílení vazby je v SmB/B', D1 a D3 na C-konci úsek bohatý na arginin a glycin. V tomto úseku jsou argininy symetricky metylovány pomocí metyltransferázy PRMT5 v 20S metylosomu a SMN se přímo váže k těmto argininům přes svou tudor doménu. Nezávisle na této vazbě poté váže U snRNA a spolu s ní je transportován do jádra (Obr. č. 2.7).

V jádře je SMN cíleno do Cajalových tělísek, avšak faktory, které tomuto cílení pomáhají, nebyly stále ještě popsány. SMN interaguje s coilinem, hlavním proteinem Cajalových tělísek. Studie odhalily RG box na C-konci coilinu, který je podobný RG boxu Sm proteinů B/B', D1 a D3, které také přímo interagují s SMN (Hebert et al. 2001). Zdá se tedy, že SMN protein a Sm proteiny jsou klíčové pro cílení U snRNP do Cajalových tělísek.



Obr. č. 2.7: SMN komplex a biogeneze U snRNP

Battle et al. 2006, Cold Spring Harbor laboratory press

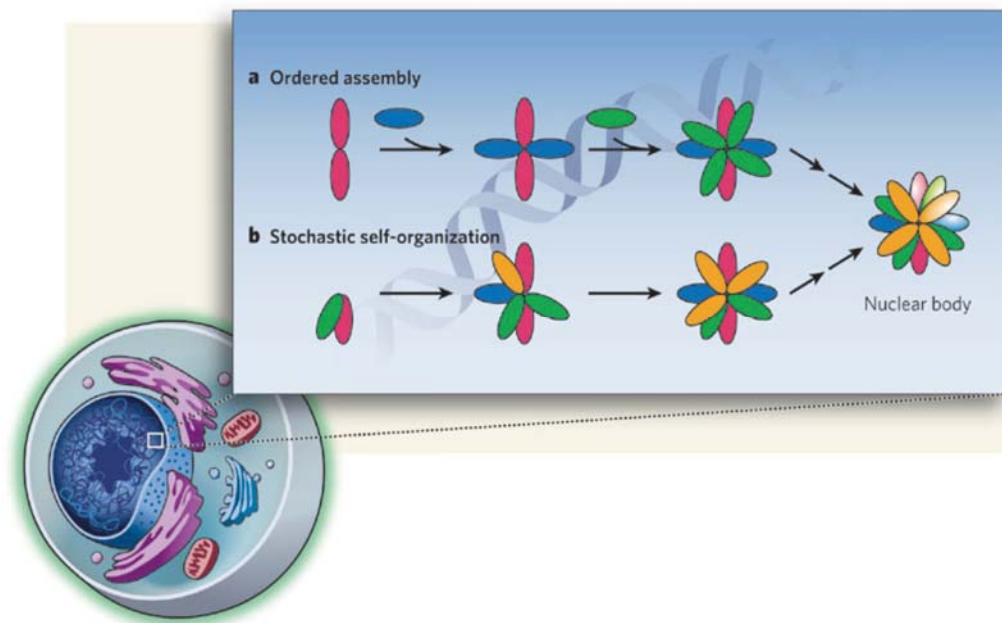
2.3. Cajalovo tělísko:

Jak již bylo popsáno, finální maturace snRNP probíhá v jaderné struktuře zvané Cajalovo tělísko. Poprvé toto tělísko bylo popsáno roku 1903 profesorem Ramónem Y Cajalem. Ten toto tělísko nazval jako přídatné tělísko (accessory body), protože ho v neuronech pozoroval vždy v blízkosti nebo přímo spojené s jadérkem. Po 60 letech byla tato tělíska objevena dvojicí Monneronem a Bernhardem, kteří jej pozorovali i mimo neurální tkáň. Podle jejich tvaru je nazvali svinutá tělíska (coiled bodies) (Monneron et al. 1969). V roce 1991 byla identifikována protilátka z lidského autoimunního séra, která reagovala s novým antigenem v interfázi savčích buněk. Tento 80 kDa antigen pojmenovali p80 coilin (Raška et al. 1991). Vyskytoval se hojně v těchto tělískách a dodnes je využíván jako jejich marker. V roce 1999 se svinutá tělíska změnila podle jejich objevitele na Cajalova tělíska (CB) (Gall et al. 1999). Funkce CB je hlavně v sestavování komponent důležitých pro sestřih pre-mRNA. Jsou místem modifikací snRNA, tvorby U4/U6 di-snRNP a U4/U6·U5 tri-snRNP a zřejmě i místem jejich recyklace.

Jejich velikost se pohybuje mezi 0,2 μm - 2 μm v průměru, avšak mohou být i větší. Normální počet CB v jádře je od 1 do 6 a mění se během buněčného cyklu. Nejvyššího počtu dosahují v přechodu z mitózy do G1 fáze. V syntetické (S) a G2 fázi jsou CB větší a v menším počtu, což může být způsobeno fúzováním menších CB do větších. Jejich počet a velikost je tedy závislá na buněčném cyklu a transkripční aktivitě (Andrade et al. 1993). V poslední době se ukazuje, že na formování CB má také velký vliv modifikace coilinu, například jeho fosforylace (Hebert et al. 2011). Byly vytvořeny dvě fundamentální hypotézy formování CB (Obrázek č.2.8) (Misteli 2008). První hypotéza tvrdí, že tělíska jsou tvořena náhodně tzv. Stochastic self-organization model, kdy se komponenty spojují v nahodilém pořadí. Tato hypotéza byla podpořena prací Kaiser (2008), ve které demonstrovali formaci CB de novo pomocí lac represor/operator systému. Nově vzniklé CB vykazovaly podobnou velikost jako endogenní CB a velmi podobnou disociační

kinetiku. Hlavní výsledek této práce byl, že jakákoli komponenta CB, která byla imobilizovaná na Lac lokusu, mohla iniciovat formaci CB. Jiná práce White (2011) však objevila, že ne všechny kroky formace jaderných tělísek jsou náhodné. Identifikovali faktory Mxc a FLASH u *Drosophily melanogaster*, které se uspořádají v raném embryu během 10. buněčného cyklu a až v 11. cyklu se k nim naváží další komponenty. Tento nenáhodný krok však nebyl pozorován u savčích buněk.

Druhý model ukazuje, že formování CB je vysoce kontrolovaná série kroků, ve kterých se komponenty spojují v přesném pořadí tzv. The ordered assembly model (Misteli 2008).



Obr. č.:2.8 Modely formování Cajalových tělísek

Misteli et al. 2008, Nature

Pomocí p80 coilinu značeného GFP bylo pozorováno, že CB se pohybují přes nukleoplasmu společně či jednotlivě nebo od periferie jádra směrem k jadérku. Dále byla pozorována separace menších CB ($\leq 0,2 \mu\text{m}$) od větších CB ($\geq 0,4 \mu\text{m}$). Můžou se pohybovat až $0,9 \mu\text{m}/\text{min}$ (Platani et al. 2000). Nepohybují se však současně. Často setrvávají v omezeném jaderném prostoru, zřejmě díky interakcím se specifickými regiony chromatinu. Jejich pohyb je tedy omezený a zahrnuje asociaci s chromatinem a

volnou difúzi v interchromatinovém prostoru (Cioce et al. 2005). Pohyb se zvyšuje vyčerpáním ATP a inhibicí transkripce. Je tedy zřejmé, že asociace CB a chromatinu vyžaduje ATP a aktivní transkripci (Platani et al. 2002).

Interakce CB s chromatinem byla popsána v práci Matera (2001), která popisuje interakci CB s genovými místy pro U2 snRNA. Ukazuje, že asociace s CB závisí na transkripční aktivitě genu a vyžaduje přítomnost nascentních U snRNA transkriptů i U2 snRNPs v CB. Je možné, že CB můžou hrát roli v regulaci exprese těchto genů. Přítomnost nascentních U2 snRNA, která je vyžadována pro interakci, může ukazovat spojení mezi asociací se specifickými genovými místy a doručení snRNA pro zpracování a maturaci nascentních transkriptů (Lamond et al. 2005). Další studie ukazují, že do CB jsou směřovány podjednotky RNA polymerázy II (RPB6 a 9) a jiné transkripční faktory jako TBP, TFIIH a PTF-Y, které jsou zde nejprve sestaveny a poté jsou transportovány do místa transkripce na chromosomu a v jadérku (Morgan et al. 2000, Gall et al. 2001). Tyto studie však nebyly potvrzeny u savčích buněk, ale pouze v buňkách *Xenopus laevis*.

Poblíž CB nalezneme i jiná jaderná tělíska jako jsou např. štěpící tělíska (cleavage bodies) (Grande et al. 1996) nebo Gemini of coiled bodies neboli gems, které s nimi mohou i přímo asociovat. Jak jsem již dříve zmínila, v gems se nachází SMN protein, který hraje velmi důležitou úlohu v U snRNP biogenezi. Také se u CB nachází PML tělíska, která se účastní různých biologických funkcí včetně kontroly apoptózy, odpovědi na poškození DNA, antivirové odpovědi a transkripční modulace. Bylo ukázáno, že coilin se přímo váže k PIASy (protein PML tělísek). Všechny tyto interakce ukazují na roli CB v organizaci jádra (Sun et al. 2005).

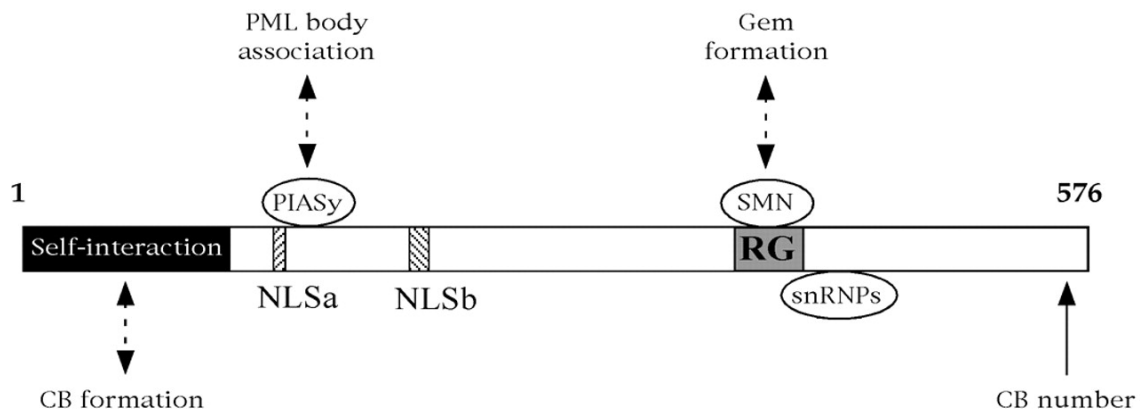
Tato tělíska jsou evolučně velmi konzervované jaderné struktury, které byly pozorovány v buňkách obratlovců, bezobratlých i rostlinných. Analogy CB u *Xenopus laevis* se nazývají sférové organely, které byly prvně popsány v roce 1954. Podobně jako CB nejsou obalené membránou a obsahují snRNP, snoRNP, Nopp140 a faktory pro zpracování 3' konce mRNA (Gall et al. 1993). Na rozdíl od savčích CB se jejich velikost pohybuje kolem 100 µm v průměru a jejich počet je od 50 do 100. Nachází se hlavně v germinálních vesikulech

oocytů, což je komplex tvořený z 3 částí: z C snurposomu, z již zmíněného sférického tělíška a z 1 a více menších sférických struktur na povrchu, které nazýváme B snurposomy. Ve sférových organelách, které jsou analogy savčích CB, se nachází protein SPH-1, který má z 75% podobnou aminokyselinovou sekvenci jako p80 coilin (Tuma et al. 1993). Sférické organely se od CB liší nejen ve velikosti a v počtu, ale také v některých komponentách, které obsahují. Práce Hoffmann (2002) ukázala, že se zde nachází symplenkin. Protein, který je zapojen do zpracování mRNA. Váže se na podjednotky štěpícího (Cstf) a polyadenylačního specifického faktoru (Cpstf), které také najdeme v těchto organelách (Schul et al. 1996). Dále jsou v nich lokalizované všechny komponenty polymerázového komplexu (Lamond et al. 2005).

Identifikace CB u *Drosophila melanogaster* byla obtížnější. Použití coilinu jako markeru CB bylo víceméně neúspěšné. Proto se k jejich lokalizaci musely použít jiné markery jako například snRNA, fibrillarin nebo scaRNA U85 (Liu et al. 2006). Později byl objeven gen pro coilin CG870, což je ortolog savčího coilinu. Je dlouhý 634 aminokyselin s molekulární hmotností 70,6 kDa (Liu et al. 2009). Zajímavé bylo, že se vyskytoval nejméně u dvou jaderných tělíšek. V CB, které obsahují komponenty potřebné pro sestřih a v tělíškách, která byla separovaná a obsahovala U7 snRNP a faktory potřebné pro zpracování pre-mRNA v oblastech histonů. Byla pojmenována jako HLB (histone locus body). Jejich velikost se pohybuje kolem 0.5-1 μm (Gall et al. 2010). Stejná práce Gall (2010) ukazuje změnu morfologie a složení jaderných tělíšek během oogeneze. Nejprve se v jádře nachází oba typy tělíšek a v pozdější fázi oogeneze tělíško obsahující coilin asociuje s histonovými geny. Další experimenty ukázaly, že tato tělíška (HLB) obsahují podjednotky RNA polymerázy II stejně jako u *Xenopus laevis* (Gall et al. 2010). Je možné, že se jedná o původní tělíška a savčí CB se v průběhu evoluce proměnila a ztratila funkce, které začaly vykonávat jiné organely a vytvořily se jiné mechanismy, které jsou pro buňku výhodnější.

2.3.1.1. Coilin

Lidský coilin je specifický jaderný fosfoprotein skládající se z 576 aminokyselin, který je modifikován fosforylací serinů (Carmo-Fonseca et al. 1993) a symetrickou dimetylací argininů. Tyto argininy se nachází u C-konce v oblasti RG boxu, ke kterému se váže SMN protein přes svou tudor doménu. Na N-konci se nachází doména, díky níž interaguje sám se sebou a tvoří oligomery (obr.č. 2. 9). Ukázalo se, že tato doména je nezbytná pro lokalizaci coilinu do CB (Hebert et al. 2010).



Obr. č.: 2.9 schéma coilinu a jeho jaderná organizace

Sun J et al. J Cell Sci 2005

Coilin je dále schopný interagovat s Sm a LSm proteiny, které interagují s jeho C-koncem. Také váže U4, U5 a U6 snRNP, avšak není schopný vázat U1 a U7 snRNP (Xu et al. 2005).

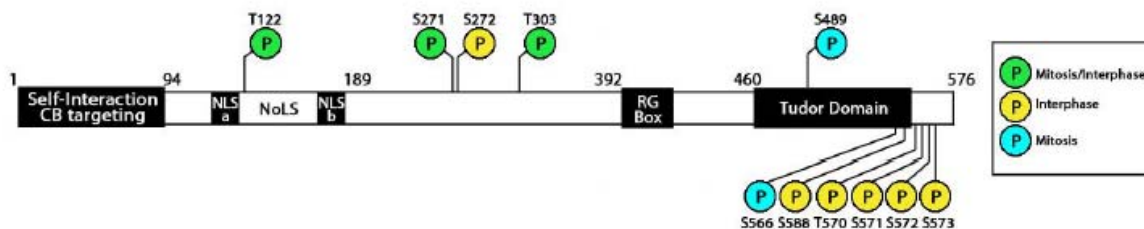
Coilin může existovat v CB ve 2 fosfoisoformách. Jedna, která obsahuje zbytky v místě, kde coilin interaguje s SMN proteinem (v RG boxu) a Sm proteiny. Interakce mezi SMN a fosforylovaným coilinem oddělí snRNP od SMN komplexu. Uvolněné U snRNP se můžou vázat na hyperfosforylovaný coilin, který umožňuje snRNA modifikace. Fosforylace

coilinu může podporovat uvolnění SMN z CB a během fosfatázové aktivity uvolňovat snRNPs (Hebert et al. 2010).

Coilin se nachází v celém jaderném prostoru, ale především se koncentruje do CB, které jsou poté viděny pomocí imunofluorescence jako zářivá jaderná ohniska (Santama et al. 2005). Za fosforylaci coilinu je zodpovědná CDK2/cyklin E.

Na formování CB má velký vliv modifikace coilinu. Odstraněním C-konce coilinu se v buňkách tvořily nefunkční tzv. pseudo-CB, které neplnily svou funkci (Bohmann et al. 1995). Bylo ukázáno, že C-konec obsahuje doménu bohatou na fosfoserinové zbytky a reguluje počet CB v buňce. Coilin vykazuje různý regulační potenciál v různých buňkách. Například myší coilin, produkovaný ve vysokých hladinách, tvoří v HeLa buňkách početná ohniska, avšak v myších buňkách vede ke špatné formaci CB (Shpargel et al. 2002).

Defosforylace je také velmi důležitá pro normální formaci CB. Zabráněním defosforylace se coilin a snRNP akumuluje v jadérku (Lyon et al. 1997). Další modifikací coilinu, která reguluje formaci CB je jeho metylace. Lidský coilin obsahuje argininy 397, 410, 413 a 415, které jsou dimetylovány in vivo (Boisvert et al. 2002). Tyto argininy se nachází v GAR regionu. Coilin obsahuje sDMA zbytky ve svém RG boxu, který je zodpovědný za vazbu k SMN. Mutace tohoto boxu způsobila formaci gems. Inhibicí metylace se značně snížila vazba k SMN (Hebert et al. 2002). Ukazuje se, že metylace coilinu je velmi důležitá pro udržení SMN v CB.



Obr. č. 2.10: Schéma lidského coilinu s místy fosforylace

Hebert et al. 2011, Plos One

3. Cíle práce

- Vytvořit U2 snRNA mutanty s T7 promotorem
- Mikroinjekce mutantů do jádra a cytoplasmy HeLa buněk
- Pozorovat lokalizaci U2 snRNA mutantů užitím fluorescenční mikroskopie

4. Materiály a metody

4.1. Materiály:

4.1.1. Přístroje:

Centrifuga (Biofuge)

Centrifuga (Eppendorf)

CO2 inkubátor (Jouan)

Gel Dox XR+ (Biorad)

Horizontální elektroforéza (Biorad)

Kývačka (Biosan)

Laminární box (Jouan)

LightCycler 480 Systém (Roche)

Minitřepačka Vortex (Scientiis)

Napěťové zdroje (Biorad)

PCR cyklér MJ Mini Gradient (Biorad)

Polosuchý blot Trans-Blot SD (Biorad)

Rotující platforma (Biosan)

Termobloček (Biosan)

Třepačka 37°C (Lab. Companion)

Vertikální elektroforéza (Biorad)

ScanR system Olympus

Delta vision

Femtojet (Eppendorf)

4.1.2. Buněčné linie:

Pro experimenty jsem používala HeLa buňky, které byly pasážovány v DMEM médiu (4,5 g/l glukózy) s 10% fetálním sérem s antibiotiky streptomycinem a penicilinem (Invitrogen). Hustota buněk na sklíčku byla kolem 50 000 buněk/sklíčko.

4.1.3. Bakteriální kmeny

One Shot Max Efficiency E.coli DH5 α -T1R kompetentní bakterie (Invitrogen)

Genotyp: F- Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-,mk+)*phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

Bakterie rostly ve sterilních podmínkách v LB médiu (tekutém či pevném). K selekci pozitivních kolonií jsme použili antibiotikum ampicillin (Serva) v koncentraci 50 μ g/ml

4.1.4. Plasmidy

U2 snRNA byla vložena v plasmidu p65 s SP6 promotorem a s ampicilinovou rezistencí (Invitrogen).

4.1.5. Protilátky

Primární protilátky:

Anti- coilin (myší polyklonální)

Anti – SMN (myší, polyklonální)

Y 12 (myší)

Anti- β actin (myší)

Sekundární protilátky:

Cy5 goat Anti-mouse IgG (Jackson imuno research)

Peroxidase anti-mouse goat

4.1.6. Primery

Název primeru	sekvence	Popis
U2 R	5'TGGTGCACCGTTCCTGGAGGT3'	U2 snRNA reverse
U2-del-stem-I-F-T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG/TGTAGTATCTGTTCTTATCAG3'	Mutant U2 Δ stem loop I s T7 promotorem
U2-del-stem IV R	5'GGAGTGGACGGAGCAAGCTC3'	Mutant U2 Δ stem loop IV reverse
U2 del Sm F	5'(phos)GAGCAGGGAGATGGAATAG3'	U2 snRNA bez Sm vazebného místa forward
U2 del Sm R	5'(phos)CCATTTAATATATTGTCCTCGG3'	U2 snRNA bez Sm vazebného místa reverse

U2 del stem loop III F	5'(phos)GCATCGACCTGGTATTGCAG3'	Mutant U2 Δ stem loop III forward
U2 del stem loop III R	5'(phos) TGCTCCAAAAATCCATTTAA3'	Mutant U2 Δ stem loop III reverse
U2 SL 4+5 F	5'TAATACGACTCACTATAGGG/ATATTAATGGATTTTTGGAAC AG3'	U2 snRNA pouze se smyčkami III a IV a s Sm vazebným místem
U2del120 -142 R	5'CGATGCGTGGAGTATCTCCCTATT3'	Mutant U2 snRNA s delecí 120-140 nt reverse

Tabulka 4.1.: Seznam použitých primerů (Sigma- Aldrich)

4.1.7. siRNA

Silencer®select pre-designed SNRPB (Invitrogen)

Sekvence 5' → 3': UGGUCUCAAUGACAGUAGAtt

esiRNA SMN1 human (Sigma-Aldrich)

Sekvence 5' → 3':

CCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAGCATATGATAAA

4.2. Metody

4.2.1. Transformace kompetentních DH5 α bakterií tepelným šokem

Kompetentní bakterie DH5 α jsem nechala po vyjmutí z -80°C roztát 10 minut na ledu. K bakteriím jsem přidala svou připravenou ligaci a nechala opět 10 minut na ledu. Poté jsem bakterie vložila na 45 s do 42°C vodní lázně a přidala k nim SOC medium. Bakterie jsem nechala třepat v 37°C 60 minut. Nakonec jsem je vysela na agarové plotny s příslušným antibiotikem a 2. den jsme mohli pozorovat narostlé kolonie.

Složení SOC media: 2g tryptone

0,5g kvasinkový extract

0,25 ml 1M KCl

1 ml 1M NaCl

1ml 1M MgSO₄

1ml 1M MgCl₂

1ml 2M glukózy

4.2.2. Izolace plasmidové DNA z bakterií

Do 2 ml LB media s odpovídajícím antibiotikem, jsem zaočkovala vybrané kolonie. Miniprep jsem přemístila do třepačky a nechala 16-24 hodin třepat při 37°C. Poté jsme z bakterií izolovali vnesený plasmid pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Plasmidovou DNA jsme eluovali do 50 μ l elučního pufru a koncentraci jsme změřili pomocí Nanodropu. Pro ověření úspěšné ligaci jsme provedli restrikční analýzu. Produkty štěpení jsme nanесли na 1% agarosový gel a ověřili velikost vyštěpených fragmentů.

4.2.3. PCR

Metodou PCR jsem získala potřebné mutant y U2 snRNA a wt U2 snRNA z plasmidové DNA. Pro přípravu wt U2 snRNA a mutant U2 snRNA Δ stem loop I, U2 snRNA Δ stem loop IV a U2 snRNA Δ stem loop I a IV jsem použila Taq polymerázu a pro přípravu ostatních mutant jsem použila Phusion polymerázu. Reakční směs jsem připravila dle tabulek 4.2 a 4.3. Deoxyribonukleotidy (Fermentas) jsem naředila 10x na výslednou koncentraci 10mM. Namíchanou PCR směs jsem vložila do PCR cyklér (BioRad) a amplifikovala jsem DNA, kterou jsem po amplifikaci izolovala pomocí QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). DNA jsem eluovala do 50 μ l elučního pufru a koncentraci jsem změřila na nanodropu.

cDNA	0,5 μ l
10xTaq pufr s KCl	5 μ l
25 mM MgCl ₂	2,5 μ l
10 mM dNTP	0,5 μ l
100 μ M primery (F+R)	0,5 μ l
Taq Polymerasa (Thermo Scientific)	0,5 μ l
ddH ₂ O	40,5 μ l

Tabulka č.4.2. PCR s Taq polymerasou

cDNA	0,5 μ l
5x phusion HF pufr	10 μ l
50% DMSO	1,5 μ l
10 mM dNTP	0,5 μ l
100 μ M primery (F+R)	0,5 μ l
Phusion polymerase (Bio Labs)	0,5 μ l
ddH ₂ O	36,5 μ l

Tabulka č.4.3. PCR s Phusion polymerasou

4.2.4 In vitro transkripce

Pomocí této metody jsem si z amplifikované DNA vyrobila příslušnou RNA. Připravila jsem si reakční směs podle tabulky 4.4. Ribonukleotidy jsem naředila na 7,5x na výslednou koncentraci 10mM (Fermentas). Ke značení RNA jsem použila Alexa 488-UTP (1mM v TE pufru) (Life Technologies). Namíchanou směs jsem dala přes noc do 37°C. Poté jsem k směsi přidala DNázu I a opět vložila na 15 minut do 37°C, čímž jsem degradovala DNA. Následně jsem RNA izolovala pomocí RNAeasy Mini Kit (QIAGEN). RNA jsem eluovala do 50 μ l RNase-free vody. Výslednou koncentraci jsem změřila na nanodropu.

DNA (500ng)	X μ l
10mM GTP,CTP,ATP	Po 1 μ l
10 mM UTP	0,75 μ l
Alexa 488-5-UTP	0,25 μ l
40 mM Cap analog	1 μ l
RNasin (Promega)	0,5 μ l
Pyrofosfatasa (BioLabs)	1 μ l
10x BSA	0,5 μ l
T7 RNA polymerase (BioLabs)	1 μ l
ddH ₂ O	X μ l (doplnit do 30 μ l)

Tabulka č. 4.4.: Master mix

4.2.5 Mikroinjekce

Izolovanou RNA jsem smíchala s Tritc-dextranem (70 kDa, Sigma- Aldrich) 1:1. Výsledná koncentrace byla kolem 200 ng/ μ l. Buňky jsem mikroinjkovala manuálně pomocí femtotips II (Eppendorf), femtojetu (Eppendorf) a mikromanipulátoru (Narishige).

Injekční tlak byl 150 hPa a kompenzační tlak 50 hPa. Po mikroinjekci jsem buňky inkubovala v 37°C 60 - 90 minut.

4.2.6. Fluorescenční barvení

Buňky jsem po inkubaci promyla v PBS a zafixovala 4% paraformaldehydem. Poté jsem je opět promyla PBS a 20 minut jsem je blokovala pomocí kozího séra (Jackson ImmunoResearch), které jsem naředila 500x. Opět jsem buňky omyla pomocí PBS a vložila na primární protilátku, se kterou jsem buňky inkubovala 1 hodinu. Před inkubací se sekundární protilátkou, jsem buňky opět promyla v PBS a se sekundární protilátkou jsem je inkubovala 1 hodinu. Nakonec jsme buňky zamontovala na podložní sklíčko pomocí DAPI-Fluoromont-G (Southern Biotech).

4.2.7. SDS-PAGE elektroforéza

Tuto metodu jsem využila pro kontrolu účinnosti siRNA, pomocí kterých jsem udělala transfekci HeLa buněk. Z buněk jsem odsála medium a opláchla je PBS. Poté jsem na ně napipetovala 300 µl vzorkového pufru a přenesla je do mikrozkušavky. Buňky jsem vložila na 5 minut do 95°C. Připravila jsem si 12% polyakrylamidový gel. Nejprve jsme očistila skla (75 mm spacer BioRad)jarem s vodou a etanolem, do kterých jsem potom nalévala gel. Namíchala jsem si separační gel dle tabulky 4.5. a nalila ho mezi skla. Poté jsem gel převrstvila vodou a nechala ho 45 minut polymerovat. Poté jsem odsála vodu a namíchala jsem si zaostřovací gel dle tabulky 4.5 a nalila ho na separační gel a strčila do něj hřebínek. Opět jsem gel nechala zpolymerovat. Skla s gelem jsem přenesla do těla elektroforézy a zalila jsem ho dělicím puftrem. Poté jsem opatrně vyndala hřebínek a před nanesením vzorků jsem jamky propláchla destilovanou vodou. Nanesla jsem do každé

jamky 10 μ l vzorku a do 1. jamky jsem nanesla 4 μ l marker Page Ruler Plus (Thermo scientific). Zařizování jsem připojila ke zdroji napětí. Pro zaběhnutí proteinů do zaostřovacího gelu jsem použila 60V 15 minut a poté jsem napětí zvýšila na 90V a nechala elektroforézu běžet asi 80 minut, dokud čelo s bromfenolovou modří nedosáhlo konce skla.

12% polyakrylamidový gel			
separační		zaostřovací	
voda	2,17 ml	voda	1,83 ml
40% akrylamidový mix	1,5 ml	40% akrylamidový mix	0,31 ml
1,5M TRIS(pH 8,8)	1,25 ml	1,5M TRIS(pH 6,8)	0,31 ml
10% SDS	0,025 ml	10% SDS	0,013 ml
10% APS	0,05 ml	10% APS	0,025 ml
TEMED	0,002 ml	TEMED	0,003 ml

Tabulka č.: 4.5. Směsi pro přípravu gelů pro SDS-PAGE elektroforézu

Dělicí pufr	192mM glycin
	25 mM Tris
	0,1% SDS

Tabulka č.:4.6. Směs na přípravu dělicího pufru

Vzorkový pufr	glycerol
	10% SDS
	1M Tris-HCl(pH 6,8)
	Bromfenolová modř
	DTT
	dH ₂ O
	β merkaptoetanol

Tabulka č.: 4.7. Směs pro přípravu vzorkového pufru

4.2.8 Western blot

Po dokončení SDS – PAGE elektroforézy jsem si připravila 12 filtračních papírů (Whatman) a jednu nitrocelulóзовou membránu. Gel jsme vyjmuli z aparatury pro elektroforézu. Na blotování jsem použila polosuchý blotovací systém (BioRad). Na anodu jsem vyskládala 6 filtrovací papírů namočených do přenosového pufru, na ně dala namočenou nitrocelulóзовou membránu, na ní gel a nakonec jsem dala namočených 6 filtračních papírů. Vše jsem ještě přelila přenosovým pufrem a skleněnou zkumavkou jsem se zbavila nechtěných vzduchových bublin. Tento “sendvič” jsem přiklopila katodou a celé zařízení jsem připojila ke zdroji napětí. K přenosu protein z gelu na membránu jsem použila 15V 60 minut. Po skončení přenosu protein, jsem membránu přenesla do 0,1% roztoku Poncaeu na 10 minut. Poté jsme membránu rozstříhla na dvě části podle potřebné velikosti protein a promývala PBS-T tak dlouho, dokud se neodbarvila. Po odbarvení jsem ji blokovala 30 minut v 10% mléku za stálého kývání. K membráně jsem přidala 5 ml 1% mléka s primární myší protilátkou Y12 k jedné části a k druhé jsem přidala anti β actin myší protilátku (Abcam 8227). S primární protilátkou jsem membránu inkubovala 1 hodinu při pokojové teplotě za stálého kývání a poté jsem ji 3x 10 minut

promývala v PBST. Dále jsem k nim přidala sekundární protilátku peroxidase anti-mouse goat naředěnou 1:10000 v 1% mléce a inkubovala jsem 1 hodinu při pokojové teplotě za stálého kývání. Po inkubaci jsem opět promývala 3x10 minut v PBS-T. Poté jsem membránu osušila a pro vyvolání jsem použila SuperSignal West Femto Substrate Trial Kit (Thermo scientific) a vyvolala jsem ji pomocí LAS 3000.

Přenosový pufr	192 mM glycin
	25 mM Tris
	10% Metanol

Tabulka č.:4.8. Směs pro přípravu přenosový pufr

PBS-T	1x PBS
	0,05% Tween

Tabulka č.:4.9. Příprava PBS-T

4.2.9. Horizontální agarózová elektroforéza

Pro dělení DNA a RNA podle velikosti jsem použila agarózovou elektroforézu v horizontálním uspořádání. DNA jsem dělila v 1% agaróze (3g agarózy + 300 ml TBE pufru). Ke zviditelnění DNA či RNA jsem použila gel star (Cambrex), která byla naředěná 1:10000 v 1% agaróze. Poté jsem gel nalila do připravené aparatury a nechala ztuhnout. Po ztuhnutí jsem gel zalila TBE pufrem a vytáhla hřebínek. Do každé jamky jsem poté nanasla vzorek smíchaný s 6x DNA loading dye (Fermentas). Aparaturu jsem pomocí víka připojila ke zdroji napětí. Vzorky jsem dělila asi 45 minut při napětí 90 V. Doba, závisela na velikosti DNA, kterou jsem potřebovala rozdělit. Poté jsem gel vyfotila pomocí Gel Doc XR+ (BioRad).

10x TBE pufr	0,89M Tris-báze
	0,89M kyselina boritá
	20mM EDTA

Tabulka č.: 4.10. Příprava 10x TBE pufru, který jsem před použitím naředila na 1x TBE pufr

4.2.10. Transfekce HeLa buněk pomocí siRNA

HeLa buňky jsem transfekovala 25 nM siRNA. Transfekci jsem provedla v laminárním boxu. Nejprve jsem si připravila 2 mikrozkušavky. Do jedné jsem dala Optimem (Sigma Aldrich) a siRNA. Do druhé mikrozkušavky jsem dala oligofektamin (Sigma Aldrich) a Optimem. Vše jsem důkladně promíchala a nechala stát 5 minut při pokojové teplotě. Poté jsem mikrozkušavky dala dohromady, opět jsem je promíchala a nechala inkubovat 20 minut při pokojové teplotě. Po této době jsem směs přidala k HeLa buňkám, které jsem následně inkubovala v 37°C 48 hodin.

4.2.11. Příprava Heterokaryonů

HeLa buňky v 3 cm Petriho misce jsem opláchla 1x PBS a přidala k nim 1 ml 50% PEG (polyetylenglykol). Buňky jsem inkubovala 3 minuty v 37°C. Poté jsem PEG odsála a 3x jsem je opláchla v 1x PBS. Dále jsem je inkubovala přes noc v 37°C v DMEM médiu (4,5 g/l glukózy) s 10% fetálním sérem s antibiotiky streptomycinem a penicilinem (Invitrogen).

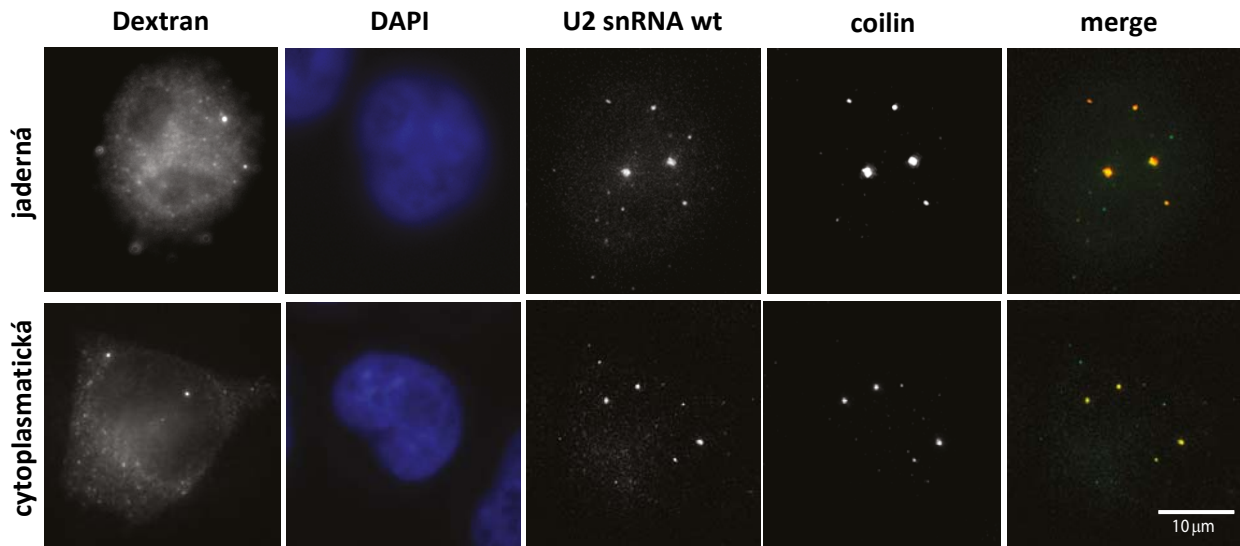
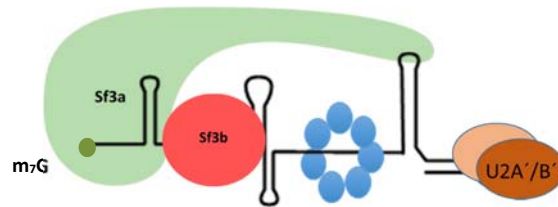
5. Výsledky

5.1. Sekvence U2 snRNA mající vliv na její akumulaci v Cajalových tělískách

Víme, že pro návrat U snRNP zpět do jádra je potřebná trimetylovaná čepička a Sm kruh. Nevíme však jaký protein či sekvence je zodpovědná za cílení U snRNP do Cajalova tělíska. Nejprve jsme se tedy zaměřili na sekvence, na které se váží proteiny specifické pro U2 snRNP (U2A', U2B'', SF3b a SF3a) a tyto sekvence jsme z ní postupně odstranili. Připravili jsme si pomocí PCR a in vitro transkripce sadu mutantů, které byly fluorescenčně značené Alexa 488-5-UTP a na 5'konci měly monometylovanou čepičku. Značenou U2 snRNA jsme mikroinjikovali společně s 70 kDa dextranem označený TRITC, který díky své velikosti nemůže procházet jaderným pórem a slouží tak jako indikátor jaderné či cytoplasmatické mikroinjekce. Po mikroinjekci jsme HeLa buňky po hodinové inkubaci zafixovali, ozančili pomocí nepřímého fluorescenčního značení coilin, jako marker CB, a pozorovali lokalizaci U2 snRNA mutant v fluorescenčním mikroskopu.

Normální nemutovaná U2 snRNA lokalizovala do CB, jak po mikroinjekci do jádra I po mikroinjekci do cytoplasmy (obr. 5.1).

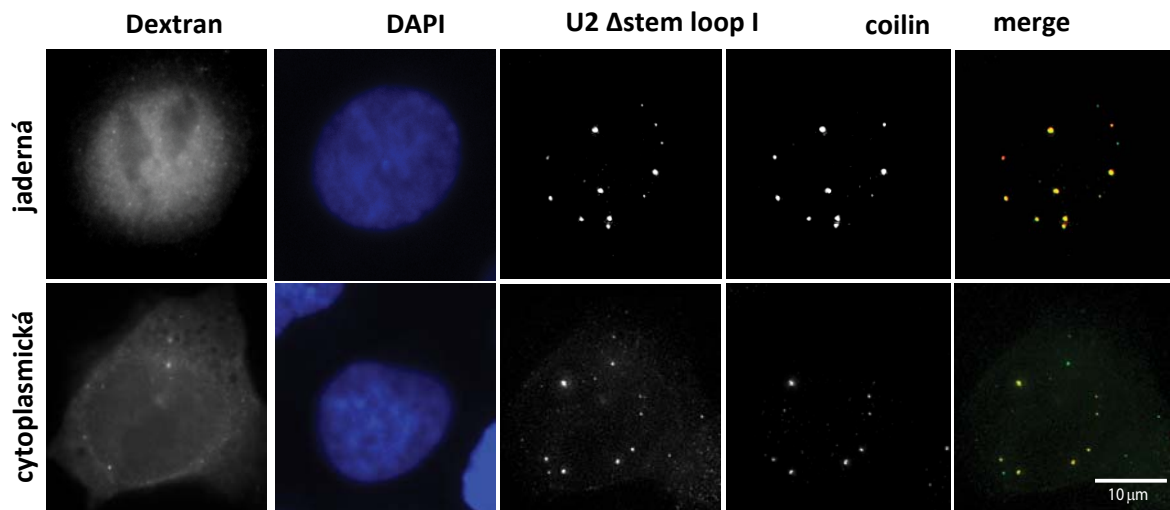
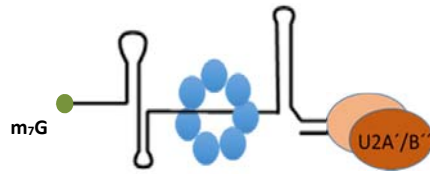
U2 snRNA wt



Obr. č. 5.1 Mikroinjekce U2 snRNA wt do jádra a do cytoplasmy. V obou případech U2 snRNA byla cílena do Cajalových tělísek značených pomocí coilinu. U2 snRNP značená Alexa 488. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce.

U následujících mutant U2 snRNA předpokládáme, že odstraněním vazebných míst pro SF3a, SF3b a U2A', U2B'', nejsou proteiny schopny se na U2 snRNA navázat.

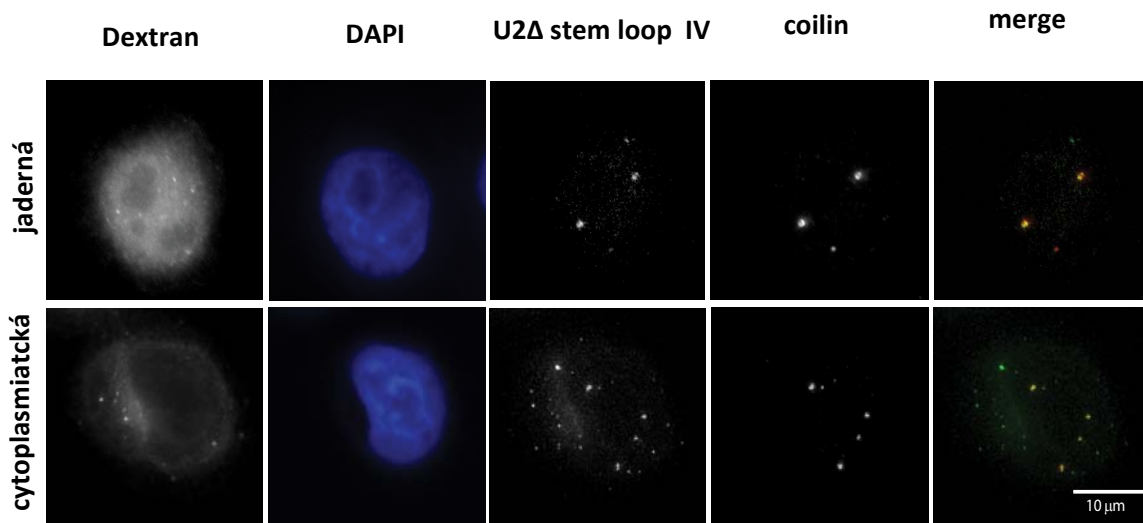
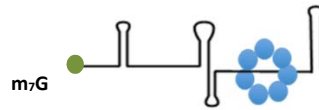
U2Δstem loop I snRNA



Obr. č. 5.2. Mikroinjekce U2Δstem loop I snRNA do jádra a do cytoplasmy. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značeny pomocí coilinu.

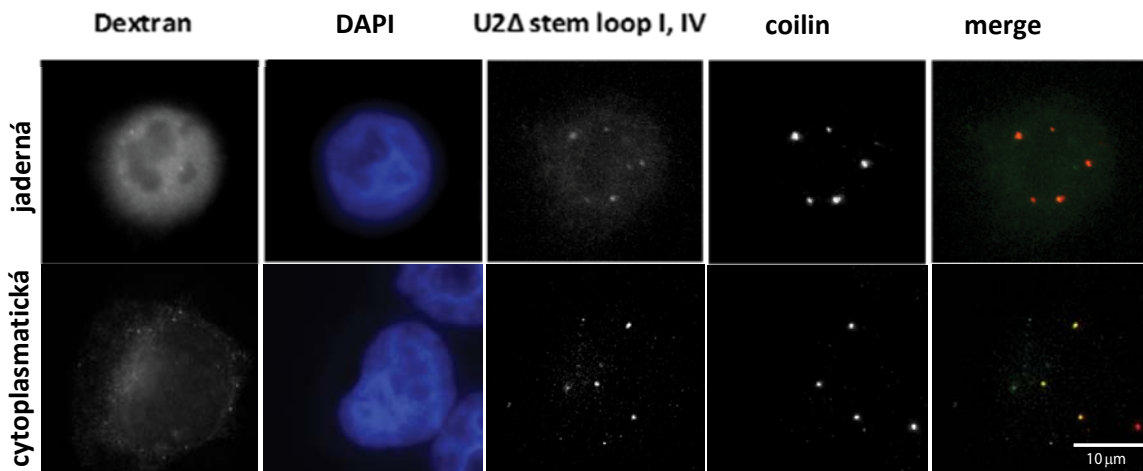
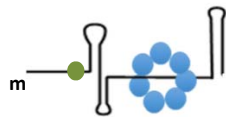
Tento první mutant, kterému byla odstraněna první smyčka, která je vazebným místem pro SF3a, neměl žádné problémy s transportem z cytoplasmy do jádra ani do Cajalových tělísek v obou případech mikroinjekce.

U2Δstem loop IV snRNA



Obrázek č. 5.3: Mikroinjekce U2Δstem loop IV snRNA do jádra a do cytoplasmy. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značeny pomocí coilinu.

U2Δstem loops I, IV snRNA

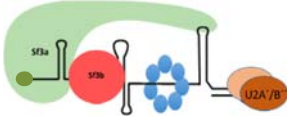
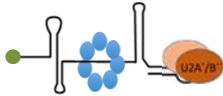
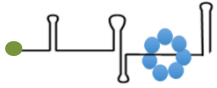
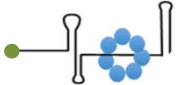


Obrázekč.5.4: Mikroinjekce U2Δstem loops I, IV snRNA do jádra a do cytoplasmy.

Mutanty U2 Δ stem loop IV snRNP a U2 Δ stem loops I, IV snRNA také byly transportovány z cytoplasmy do jádra a do Cajalových tělísek, avšak při mikroinjekci do cytoplasmy část U2 snRNA nebyla importována do jádra a vytvořila v cytoplasmě početná ohniska. Abych kvantifikovala akumulaci mikroinjikované snRNA v CB, změřila jsem pomocí programu Image J intenzitu fluorescence snRNA v CB vůči okolní nukleoplasmě. K měření jsem použila minimálně 200 buněk a výsledky jsou shrnuty v obr. 5.5.

U2 snRNA konstrukty

lokalizace U2 snRNA do CB

		Mikroinjekce:	
		<u>Jádro</u>	<u>cytoplasma</u>
Wt		++	++
Δ stem loop I		+++	+++
Δ stem loop IV		++	++
Δ stem loops I, IV		+	+++

Obrázek č. 5.5.: Grafické znázornění akumulace U2 snRNA v Cajalových tělískách. Intenzita fluorescence byla vyhodnocena pomocí softwaru ImageJ. +++ nejvíce (>4), ++ (kolem 2), + (1-2) +/- (kolem 1)

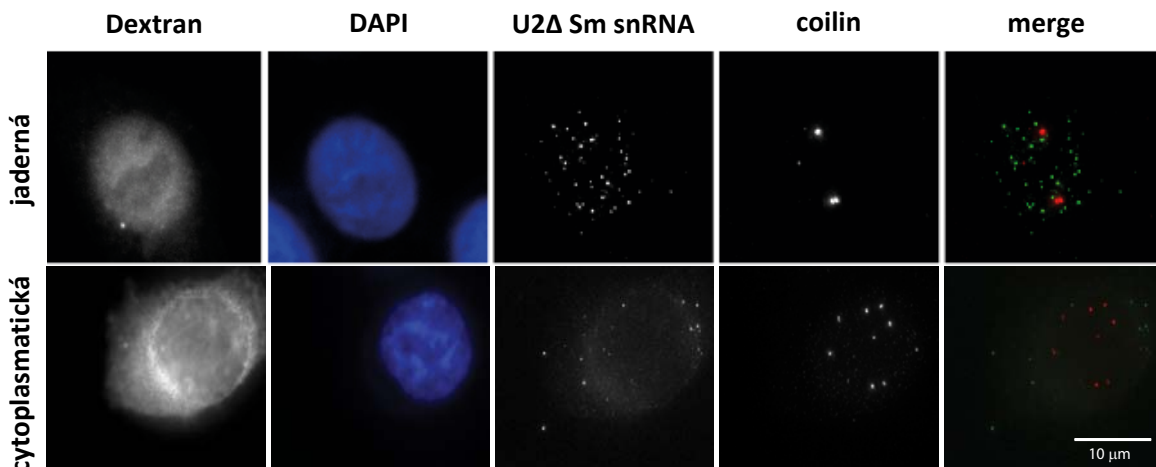
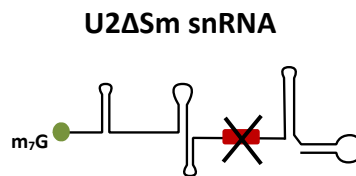
Z výsledku měření fluorescence jsme zjistili, že nejvíce se v Cajalových tělískách akumuluje mutant bez první smyčky, tedy bez vazebního místa pro SF3a. To potvrzuje výsledky Tanakovic (2005), kde depletovali protein SF3a60 a SF3a66 a pozorovali

zvýšenou akumulaci nehotových U2 snRNP částic v Cajalových tělískách. U posledního konstruktů bez první a poslední smyčky byl problém s transportem do Cajalových tělísek při mikroinjekci do jádra, avšak důvod nám není zcela jasný. Předpokládáme, že odebráním vazebného místa jsme zabránili vazbě specifických proteinů na U2 snRNA, avšak jejich přítomnost jsme netestovali.

5.2. Sm proteiny jsou důležité pro transport do Cajalových tělísek

Dále jsme zjistili, že pro transport do Cajalových tělísek je důležitá prostřední část U2 snRNA, kde se nachází smyčky 2 a 3 a vazebné místo pro Sm proteiny a částečně vazebné místo pro SMN komplex, který se váže na třetí a čtvrtou smyčku.

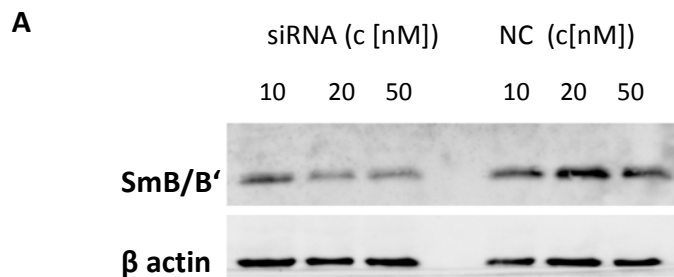
Nejprve jsem se zaměřila na Sm proteiny, které jsou důležité pro import z cytoplasmy do jádra, a odstranila jsem jejich vazebné místo.



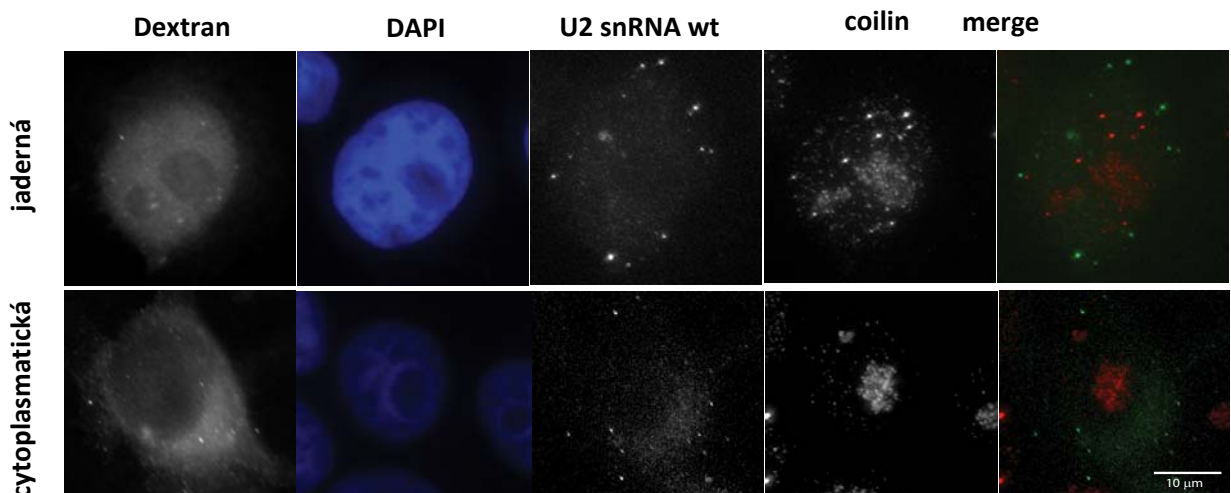
Obrázek č. 5.6: Mikroinjekce U2 snRNA bez vazebného místa pro Sm proteiny do jádra a do cytoplasmy. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značeny pomocí coilinu.

Tento konstrukt bez vazebného místa pro Sm proteiny zůstal v cytoplasmě při mikroinjekci do cytoplasmy, což potvrdilo, že Sm proteiny jsou pro import do jádra nepostradatelné. Při mikroinjekci do jádra nebyly také transportovány do Cajalových tělísek a v jádře tvořily neidentifikovaná ohniska. Což ukazuje, že Sm proteiny hrají úlohu v cílení U snRNP do Cajalových tělísek. Dále nás zajímalo, zda jsou důležité přímo Sm proteiny nebo sekvence tvořící jejich vazebné místo, na kterou by se mohly eventuálně vázat LSm proteiny, které se váží na U6 snRNA v jádře a jejich vazebné místo je velmi podobné vazebnému místu pro Sm proteiny.

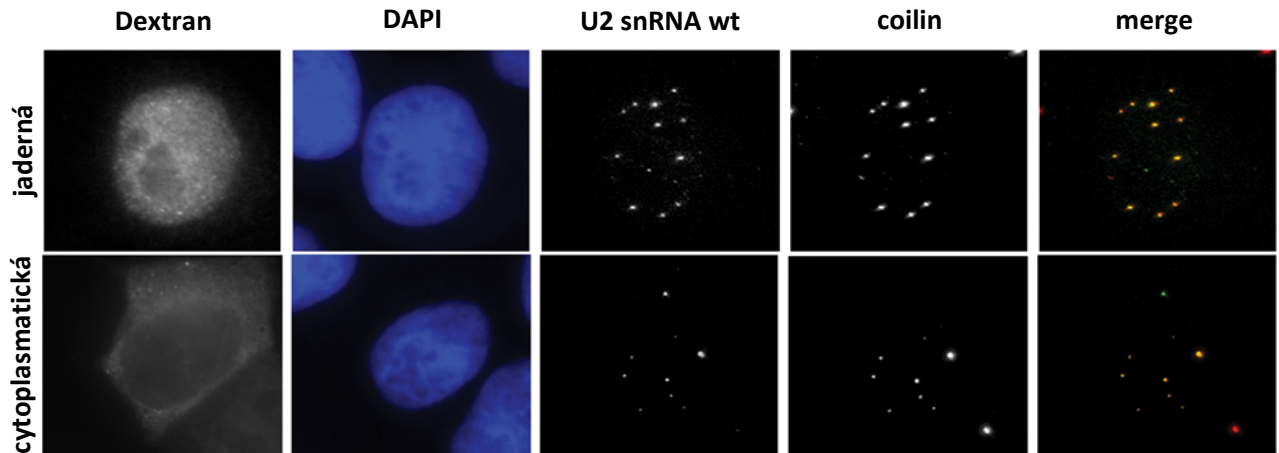
Depletovali jsme tedy SmB/B' protein, čímž jsme zabránili formaci Sm kruhu.



B SmB/B' siRNA



C



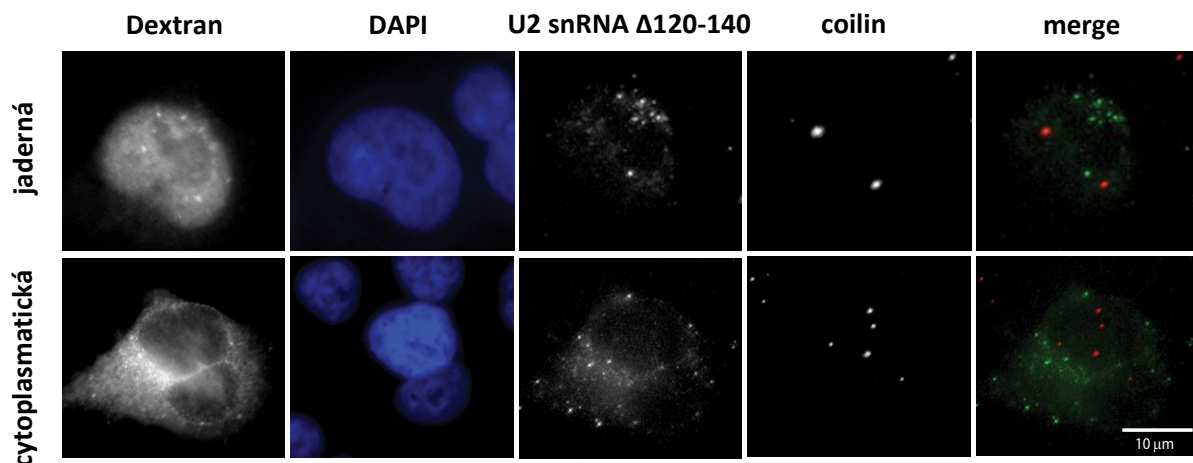
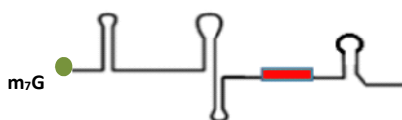
Obrázek č. 5.7: A, western blot pro kontrolu účinnosti siRNA proti SmB/B'proteinu B, Mikroinjekce U2 snRNA wt po 48h transfekci siRNA. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značený pomocí coilinu. C, Negativní kontrola siRNA

Mikroinjekce U2 snRNA wt do HeLa buněk se sníženou hladinou SmB/B'proteinu ukázala, že Sm kruh je nepostradatelný pro cílení U2 snRNA do Cajalových tělísek a také pro import do jádra. Dále jsme pozorovali, že Cajalova tělíčka se rozpadala a coilin byl transportován do jádra. Navíc se zdá, že po odstranění SmB proteinu se U2 snRNA mikroinjikovaná do jádra v jádře neudržela a objevila se v cytoplasmě.

Abychom dále potvrdili důležitost Sm kruhu pro transport U2 snRNA do CB, soustředili jsme se na SMN komplex, který Sm kruh na snRNA skládá.

Bylo ukázáno, že Sm kruh je formován v cytoplasmě pomocí SMN komplexu (Fisher et al. 1997). Gemin 5 má RRM doménu, kterou se váže k snRNA a je důležitý pro specifitu SMN komplexu k snRNA (Yong et al. 2010). V případě U2 snRNA bylo ukázáno, že se protein Gemin 5 váže na poslední dvě smyčky III a IV. Abychom zjistili, zda vazba SMN komplexu je pro cílení U2 snRNA do CB důležitá, odstranila jsem smyčky III a IV a nahradila je umělou vlásenkou.

U2 snRNA Δ 120-140



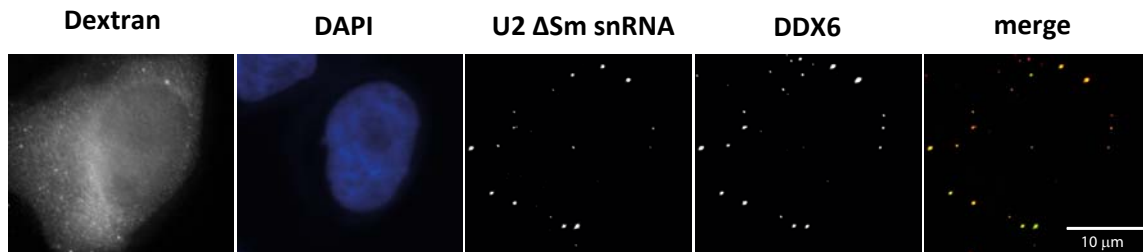
Obrázek č. 5.8: Mikroinjekce U2 snRNA s umělou smyčkou na 3'konci. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značeny pomocí coilinu.

Zde jsme pozorovali stejný výsledek jako u delece Sm vazebného místa a u snížení hladiny SmB/B' proteinu. SMN komplex je tedy také důležitý pro lokalizaci U2 snRNA do CB, buď přímo či nepřímo, přes formování Sm kruhu.

5.3. U2 snRNA bez Sm proteinů lokalizuje do P tělísek

V jádře nám však není znám mechanismus tvorby Sm kruhu. Po depleci Sm proteinu B/B' a po odstranění Sm a SMN vazebného místa jsme pozorovali v cytoplasmě i v jádře četná ohniska, která byla tvořena U2 snRNA. Zjistili jsme pomocí imunofluorescence, že U2 snRNA kolokalizuje s P tělísky v cytoplasmě. V těchto tělískách dochází k degradaci RNA v buňce. Jako marker P tělísek jsme použili DDX6, který jsme obarvili Cy5. DDX6 je

ATP dependentní helikáza z DEAD box rodiny. Hojně se nalézá ve zmíněných tělíkách, kde se účastní degradace mRNA.



Obrázek č. 5.9: Mikroinjekce U2 Δ Sm snRNA do cytoplasmy HeLa buňky. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. P tělíka byla značená pomocí DDX6.

Také jsme se pokusili identifikovat vzniklá ohniska v jádře. V jádře jsme obarvili PML tělíška. Jako marker jsme použili PML protein.



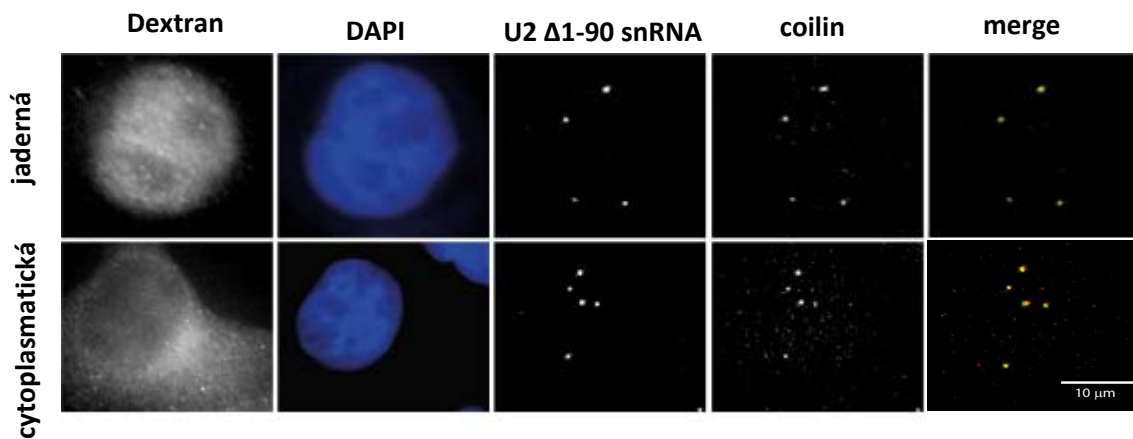
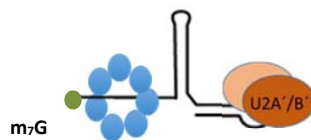
Obrázek č. 4.10: Mikroinjekce U2 Δ Sm snRNA do jádra HeLa buňky. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. PML tělíška byla značená pomocí PML proteinu Cy5.

U2 snRNA bez Sm vazebného místa nekolokalizovala s PML tělísky. Značení na jiná jaderná tělíška jsme nepoužili.

5.4. 3'koncová polovina U2 snRNA je dostačující pro transport do Cajalových tělísek

Dále jsem se zaměřila pouze na polovinu U2 snRNA, kde leží vazebná místa pro Sm proteinu a SMN komplex a chtěla jsem zjistit, zda pouze tato malá část stačí pro transport do Cajalových tělísek. Pomocí PCR metody a in vitro transkripce jsem připravila konstrukt, který obsahoval pouze Sm vazebné místo a poslední 2 smyčky, na kterých se nachází vazebné místo pro SMN komplex a opět jsem ho mikroinjikovala do HeLa buněk. Tento minimální konstrukt byl správně cílen do CB, jak v případě jaderné, tak i cytoplasmatické mikroinjekce.

U2 snRNA Δ 1-90

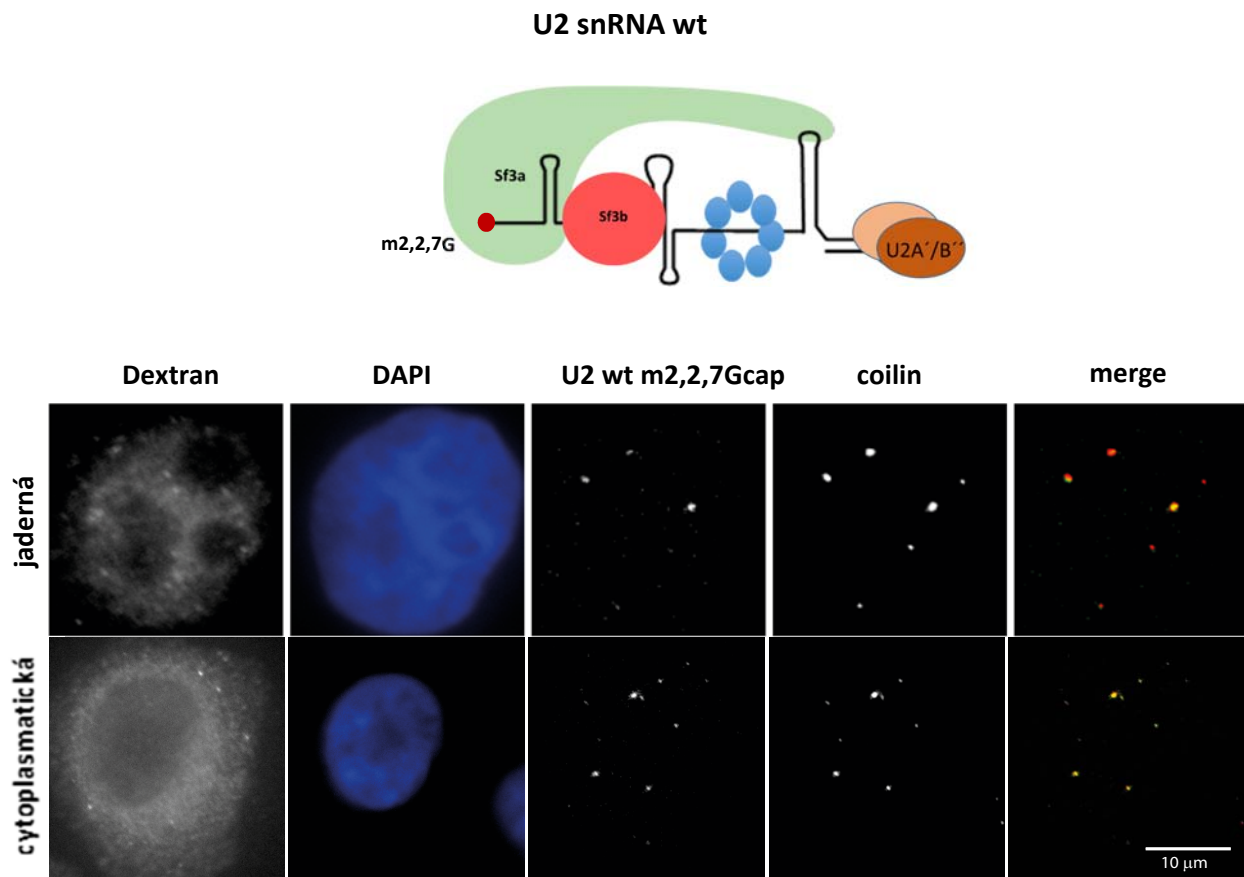


Obrázek č. 5.9: Mikroinjekce U2 Δ 1-90 snRNA. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značeny pomocí coilinu.

Zjistili jsme tedy, že nepostradatelnou částí pro transport do Cajalových tělísek je druhá polovina U2 snRNA.

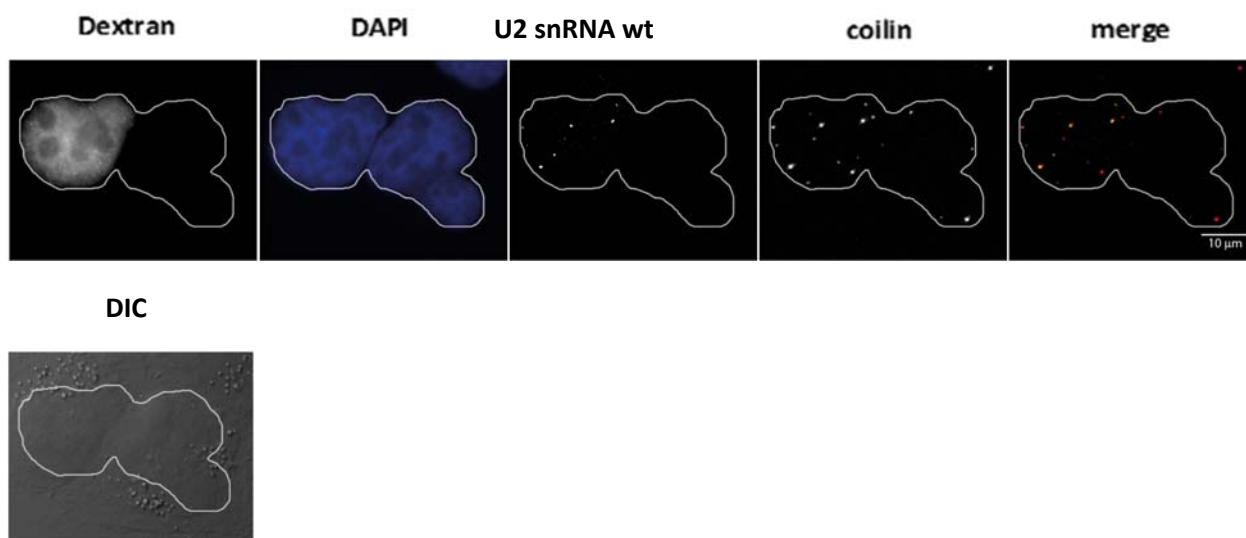
5.5. Trimetylace čepičky není pro U2 snRNA důležitá

Jak jsem zmínila na začátku, všechny konstrukty byly připravovány pomocí in vitro transkripce, ve které jsem používala monometylovanou čepičku. Avšak pro biogenezi U snRNA je velmi důležitá trimetylace čepičky. Tato modifikace se vyskytuje v cytoplasmě. Z našich výsledků je však patrné, že U2 snRNA byla cílena do Cajalových tělísek i po mikroinjekci do jádra, kde se monometylovaná čepička nemetyluje. Jako pozitivní kontrolu jsem dále připravila U2 snRNA wt s trimetylovanou čepičkou (m^{2,2,7}G cap) a injikovala do HeLa buněk.



Obrázek č. 5.10: Mikroinjekce U2 snRNA wt m^{2,2,7}G čepičkou. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značeny pomocí coilinu.

Zde vidíme, že U2 snRNA byla bez problému cílená do Cajalových tělísek. Pro kontrolu, zda U2 snRNA nemůže být po jaderné mikroinjekci transportovaná do cytoplasmy, kde by proběhly potřebné modifikace (navázání Sm proteinů a trimetylace čepičky), jsem připravila pomocí 50% PEG heterokaryony a mikroinjkovala U2 snRNA wt do jednoho z jader. U2 snRNA se ani po hodinové inkubaci neobjevila v druhém jádře.



Obrázek 5.11: Mikroinjekce U2 snRNA wt do jednoho jádra heterokaryonu. Dextran 70 kDa značený TRITC užíván pro kontrolu lokalizace mikroinjekce. CB značeny pomocí coilinu. Bílá čára označuje jádra heterokaryonu.

6. Diskuze

U snRNP jsou nepostradatelnou součástí sestřihového komplexu, avšak jejich biogeneze není ještě stále dobře prozkoumána.

Cílem mojí diplomové práce bylo najít jaké sekvence či proteiny jsou zodpovědné za cílení U2 snRNA do Cajalových tělísek. Nejprve jsem si připravila deleční mutanty U2 snRNA, na které se nemohly vázat její specifické proteiny, SF3a, U2A' a U2B''. Z výsledků mikroinjekce, jsme pozorovali, že všechny konstrukty byly cíleny do Cajalových tělísek a navíc se některé v nich akumulovaly více a některé méně. Největší akumulace byla pozorována u deleční mutanty bez první smyčky, kde se nachází vazebné místo pro SF3a, který je součástí 17S U2 snRNA (Behrens et al. 1993). Tyto výsledky potvrzují práci Tanakovicz (2005), kde po depleci SF3a60 pozorovali zvýšenou akumulaci U2 snRNA v Cajalových tělískách. Zde se ukazuje, že Cajalova tělíška zřejmě vykazují kontrolní aktivitu nesprávně sestavených U snRNP. Tento kontrolní mechanismus zřejmě kontroluje správné složení plně maturované 17S částice a zadržuje 15S částici, dokud 17S není dokončena.

Pomocí delečních mutant jsme zjistili, že smyčky I a IV nemají vliv na cílení U2 snRNA do Cajalových tělísek, ale pouze ovlivňují její akumulaci v nich.

Delece 5'koncové části (smyčky I, IIa a IIb) nám ukázala, že 3'koncová část (Sm vazebné místo, smyčky III a IV) je dostačující pro transport U2 snRNA do Cajalových tělísek. Zaměřili jsme se nejprve na Sm vazebné místo a připravili jsme deleční mutant, kterému toto místo chybělo. Zjistili jsme, že v obou případech mikroinjekce, jaderné i cytoplasmatické, nebyl konstrukt transportován do Cajalových tělísek. V případě cytoplasmatické mikroinjekce nebyl transportován do jádra, ale akumuloval se v P tělískách, které slouží k degradaci mRNA.

Je tedy možné, že zablokováním tvorby Sm kruhu se aktivují zatím neznámé kontrolní mechanismy, které snRNA bez Sm proteinů identifikují a přenesou do P tělísek, kde je tato snRNA následně degradována.

Již dříve bylo ukázáno, že Sm proteiny jsou důležité pro transport z cytoplasmy do jádra, kde tvorba Sm kruhu pomocí SMN komplexu, tvoří společně s trimetylací čepičky na 5'konci jaderný lokalizační signál (Mattaj et al. 1986, Fisher et al. 1997). Chtěli jsme tedy vědět, zda jsou pro cílení do Cajalových tělísek důležité Sm proteiny. Depletovali jsme tedy SmB/B' protein pomocí siRNA a získali jsme stejné výsledky jako v případě delece Sm vazebného místa.

Víme, že Sm kruh je v cytoplasmě formován pomocí SMN komplexu, jehož vazebné místo se nachází na smyčce III a IV. Připravila jsem tedy konstrukt, ve kterém jsem nahradila tyto dvě smyčky umělou vlásenkou. Po mikroinjekci jsme pozorovali stejný fenotyp jako u delece Sm vazebného místa i deplece smB/B' proteinu. V případě cytoplasmatické mikroinjekce se konstrukt opět akumuloval v P tělískách.

Z našich výsledků je zřejmé, že pro lokalizaci do Cajalových tělísek jsou důležité Sm proteiny a SMN komplex. Před několika lety bylo ukázáno, že Sm protein interagují s coilinem in vitro, ale vliv této vazby na lokalizaci snRNP do CB nebyl nikdy testován (Xu et al. 2005). Naše výsledky ukazují, že Sm kruh je naprosto nezbytný pro lokalizaci do CB. Na základě našich a předchozích výsledků proto spekulujeme, že právě vazba mezi Sm protein a coilinem je klíčová pro cílení snRNP do CB. Z toho vyplývá, že Sm kruh je schopen se vytvořit i v jádře, protože snRNA se byla schopna lokalizovat do CB po mikroinjekci do jádra, což předpokládá správné složení Sm kruhu. Jelikož pro lokalizaci do CB byly nezbytné U2 snRNA sekvence, které váží SMN komplex, předpokládáme, že SMN komplex je schopný sestavit Sm kruh v jádře a ne jen v cytoplasmě, jak bylo dříve předpokládáno.

Transport do CB neovlivnila ani čepička, která v našich konstruktech byla monometylována. Avšak již dříve bylo ukázáno, že import U2 snRNA do jádra je nezávislý na trimetilaci čepičky (Frey et al. 2001).

Z mojí práce vyplývá, že Sm proteiny společně s SMN komplexem hrají esenciální roli v biogenezi U2 snRNA, u které jsme dále zjistili, že nemusí zahrnovat jadernou fázi biogeneze, avšak tato část není ještě dobře prostudována.

7. Reference:

- Adam, S.A., T. Nakagawa, M.S. Swanson, T.K. Woodruff, and G. Dreyfuss. 1986. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol.* 6:2932-2943.
- Andrade, L.E., E.K. Chan, I. Raska, C.L. Peebles, G. Roos, and E.M. Tan. 1991. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med.* 173:1407-1419.
- Andrade, L.E., E.M. Tan, and E.K. Chan. 1993. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:1947-1951.
- Ashe, M.P., A. Furger, and N.J. Proudfoot. 2000. Stem-loop 1 of the U1 snRNP plays a critical role in the suppression of HIV-1 polyadenylation. *RNA.* 6:170-177.
- Baccon, J., L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. 2002a. Identification and Characterization of Gemin7, a Novel Component of the Survival of Motor Neuron Complex. *Journal of Biological Chemistry.* 277:31957-31962.
- Baccon, J., L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. 2002b. Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem.* 277:31957-31962.
- Bahia, D., A. Avino, E. Darzynkiewicz, R. Eritja, and M. Bach-Elias. 2006. Trimethylguanosine nucleoside inhibits cross-linking between Snurportin 1 and m3G-CAPPED U1 snRNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25:909-923.
- Balakin, A.G., L. Smith, and M.J. Fournier. 1996. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell.* 86:823-834.
- Barbee, S.A., and T.C. Evans. 2006. The Sm proteins regulate germ cell specification during early *C. elegans* embryogenesis. *Dev Biol.* 291:132-143.
- Battle, D.J., C.K. Lau, L. Wan, H. Deng, F. Lotti, and G. Dreyfuss. 2006. The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol Cell.* 23:273-279.
- Behrens, S.E., K. Tyc, B. Kastner, J. Reichelt, and R. Luhrmann. 1993. Small nuclear ribonucleoprotein (RNP) U2 contains numerous additional proteins and has a bipartite RNP structure under splicing conditions. *Mol Cell Biol.* 13:307-319.
- Bessonov, S., M. Anokhina, C.L. Will, H. Urlaub, and R. Luhrmann. 2008. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature.* 452:846-850.
- Bilinski, S.M., M.K. Jaglarz, B. Szymanska, L.D. Etkin, and M. Kloc. 2004. Sm proteins, the constituents of the spliceosome, are components of nuage and mitochondrial cement in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res.* 299:171-178.
- Bohmann, K., J.A. Ferreira, and A.I. Lamond. 1995. Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J Cell Biol.* 131:817-831.
- Boisvert, F.M., J. Cote, M.C. Boulanger, P. Cleroux, F. Bachand, C. Autexier, and S. Richard. 2002. Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol.* 159:957-969.
- Branscombe, T.L., A. Frankel, J.H. Lee, J.R. Cook, Z. Yang, S. Pestka, and S. Clarke. 2001. PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J Biol Chem.* 276:32971-32976.

- Brosi, R., K. Groning, S.E. Behrens, R. Luhrmann, and A. Kramer. 1993. Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9. *Science*. 262:102-105.
- Carissimi, C., L. Saieva, F. Gabanella, and L. Pellizzoni. 2006. Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex. *J Biol Chem*. 281:37009-37016.
- Carmo-Fonseca, M., R. Pepperkok, M.T. Carvalho, and A.I. Lamond. 1992. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol*. 117:1-14.
- Carrero, Z.I., V. Velma, H.E. Douglas, and M.D. Hebert. 2011. Coilin phosphomutants disrupt Cajal body formation, reduce cell proliferation and produce a distinct coilin degradation product. *PLoS One*. 6:e25743.
- Caspary, F., and B. Seraphin. 1998. The yeast U2A¹/U2B complex is required for pre-spliceosome formation. *EMBO J*. 17:6348-6358.
- Champion-Arnaud, P., and R. Reed. 1994. The prespliceosome components SAP 49 and SAP 145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site. *Genes Dev*. 8:1974-1983.
- Chari, A., M.M. Golas, M. Klingenhäger, N. Neuenkirchen, B. Sander, C. Englbrecht, A. Sickmann, H. Stark, and U. Fischer. 2008. An Assembly Chaperone Collaborates with the SMN Complex to Generate Spliceosomal SnRNPs. *Cell*. 135:497-509.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R.A. Perkinson, A. Shevchenko, M. Mann, and G. Dreyfuss. 1999. Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J Cell Biol*. 147:1181-1194.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R.A. Perkinson, J. Yong, A. Shevchenko, M. Mann, and G. Dreyfuss. 2000. Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol*. 148:1177-1186.
- Cioce, M., and A.I. Lamond. 2005. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:105-131.
- Darzacq, X., B.E. Jady, C. Verheggen, A.M. Kiss, E. Bertrand, and T. Kiss. 2002. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2¹-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J*. 21:2746-2756.
- Das, B.K., L. Xia, L. Palandjian, O. Gozani, Y. Chyung, and R. Reed. 1999. Characterization of a Protein Complex Containing Spliceosomal Proteins SAPs 49, 130, 145, and 155. *Mol Cell Biol*. 19:6796-6802.
- Dybkov, O., C.L. Will, J. Deckert, N. Behzadnia, K. Hartmuth, and R. Luhrmann. 2006. U2 snRNA-protein contacts in purified human 17S U2 snRNPs and in spliceosomal A and B complexes. *Mol Cell Biol*. 26:2803-2816.
- Fischer, U., Q. Liu, and G. Dreyfuss. 1997. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*. 90:1023-1029.
- Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I.W. Mattaj. 1997. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell*. 90:1051-1060.
- Frey, M.R., and A.G. Matera. 2001. RNA-mediated interaction of Cajal bodies and U2 snRNA genes. *J Cell Biol*. 154:499-509.
- Friend, K., A.F. Lovejoy, and J.A. Steitz. 2007. U2 snRNP binds intronless histone pre-mRNAs to facilitate U7-snRNP-dependent 3' end formation. *Mol Cell*. 28:240-252.

- Friesen, W.J., S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G.S. Pesiridis, G. Van Duyne, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. 2001. The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified Sm Proteins. *Mol Cell Biol.* 21:8289-8300.
- Gall, J.G., M. Bellini, Z. Wu, and C. Murphy. 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol Biol Cell.* 10:4385-4402.
- Ganot, P., B.E. Jady, M.L. Bortolin, X. Darzacq, and T. Kiss. 1999. Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol Cell Biol.* 19:6906-6917.
- Ghosh, S.K., W.K. Paik, and S. Kim. 1988. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J Biol Chem.* 263:19024-19033.
- Golembe, T.J., J. Yong, and G. Dreyfuss. 2005. Specific sequence features, recognized by the SMN complex, identify snRNAs and determine their fate as snRNPs. *Mol Cell Biol.* 25:10989-11004.
- Gonsalvez, G.B., T.K. Rajendra, Y. Wen, K. Praveen, and A.G. Matera. 2010. Sm proteins specify germ cell fate by facilitating oskar mRNA localization. *Development.* 137:2341-2351.
- Gozani, O., R. Feld, and R. Reed. 1996. Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes Dev.* 10:233-243.
- Grande, M.A., I. van der Kraan, B. van Steensel, W. Schul, H. de The, H.T. van der Voort, L. de Jong, and R. van Driel. 1996. PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem.* 63:280-291.
- Gubitz, A.K., Z. Mourelatos, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. 2002. Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem.* 277:5631-5636.
- Hamm, J., E. Darzynkiewicz, S.M. Tahara, and I.W. Mattaj. 1990. The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal. *Cell.* 62:569-577.
- Hamm, J., and I.W. Mattaj. 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell.* 63:109-118.
- Hebert, M.D., K.B. Shpargel, J.K. Ospina, K.E. Tucker, and A.G. Matera. 2002. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev Cell.* 3:329-337.
- Hebert, M.D., P.W. Szymczyk, K.B. Shpargel, and A.G. Matera. 2001. Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev.* 15:2720-2729.
- Hofmann, I., M. Schnolzer, I. Kaufmann, and W.W. Franke. 2002. Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Biol Cell.* 13:1665-1676.
- Huang, C.J., F. Ferfaglia, F. Raleff, and A. Kramer. 2011. Interaction domains and nuclear targeting signals in subunits of the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle-associated splicing factor SF3a. *J Biol Chem.* 286:13106-13114.
- Huber, J., U. Cronshagen, M. Kadokura, C. Marshallsay, T. Wada, M. Sekine, and R. Luhrmann. 1998. Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* 17:4114-4126.

- Kaida, D., M.G. Berg, I. Younis, M. Kasim, L.N. Singh, L. Wan, and G. Dreyfuss. 2010. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*. 468:664-668.
- Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry, J.P. Bachellerie, M. Caizergues-Ferrer, and T. Kiss. 1996. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*. 85:1077-1088.
- Kleinschmidt, A.M., J.R. Patton, and T. Pederson. 1989. U2 small nuclear RNP assembly in vitro. *Nucleic Acids Res*. 17:4817-4828.
- Kolb, S.J., D.J. Battle, and G. Dreyfuss. 2007. Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol*. 22:990-994.
- Kramer, A., F. Mulhauser, C. Wersig, K. Groning, and G. Bilbe. 1995. Mammalian splicing factor SF3a120 represents a new member of the SURP family of proteins and is homologous to the essential splicing factor PRP21p of *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 1:260-272.
- Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani, and et al. 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 80:155-165.
- Lerner, M.R., and J.A. Steitz. 1979. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:5495-5499.
- Liu, Q., and G. Dreyfuss. 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J*. 15:3555-3565.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang, and G. Dreyfuss. 1997. The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, SMN, and Its Associated Protein SIP1 Are in a Complex with Spliceosomal snRNP Proteins. *Cell*. 90:1013-1021.
- Lorson, C.L., E. Hahnen, E.J. Androphy, and B. Wirth. 1999. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:6307-6311.
- Lyon, C.E., K. Bohmann, J. Sleeman, and A.I. Lamond. 1997. Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Exp Cell Res*. 230:84-93.
- Mattaj, I.W. 1986. Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell*. 46:905-911.
- Meister, G., D. Buhler, R. Pillai, F. Lottspeich, and U. Fischer. 2001a. A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat Cell Biol*. 3:945-949.
- Meister, G., C. Eggert, D. Buhler, H. Brahms, C. Kambach, and U. Fischer. 2001b. Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol*. 11:1990-1994.
- Misteli, T. 2008. Cell biology: Nuclear order out of chaos. *Nature*. 456:333-334.
- Monneron, A., and W. Bernhard. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res*. 27:266-288.
- Moore, M.S., and G. Blobel. 1993. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*. 365:661-663.
- Mouaikel, J., C. Verheggen, E. Bertrand, J. Tazi, and R. Bordonné. 2002. Hypermethylation of the Cap Structure of Both Yeast snRNAs and snoRNAs Requires a Conserved Methyltransferase that Is Localized to the Nucleolus. *Molecular cell*. 9:891-901.

- Nagengast, A.A., and H.K. Salz. 2001. The Drosophila U2 snRNP protein U2A' has an essential function that is SNF/U2B" independent. *Nucleic Acids Res.* 29:3841-3847.
- Narayanan, U., J.K. Ospina, M.R. Frey, M.D. Hebert, and A.G. Matera. 2002. SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet.* 11:1785-1795.
- Nesic, D., and A. Kramer. 2001. Domains in human splicing factors SF3a60 and SF3a66 required for binding to SF3a120, assembly of the 17S U2 snRNP, and prespliceosome formation. *Mol Cell Biol.* 21:6406-6417.
- Nizami, Z., S. Deryusheva, and J.G. Gall. 2010. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000653.
- Ohno, M., A. Segref, A. Bachi, M. Wilm, and I.W. Mattaj. 2000. PHAX, a Mediator of U snRNA Nuclear Export Whose Activity Is Regulated by Phosphorylation. *Cell.* 101:187-198.
- Pal, S., S.N. Vishwanath, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Sif. 2004. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol.* 24:9630-9645.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. 2002. Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J Biol Chem.* 277:7540-7545.
- Pettersson, I., M. Hinterberger, T. Mimori, E. Gottlieb, and J.A. Steitz. 1984. The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. Identification of multiple protein components reactive with anti-(U1)ribonucleoprotein and anti-Sm autoantibodies. *Journal of Biological Chemistry.* 259:5907-5914.
- Platani, M., I. Goldberg, A.I. Lamond, and J.R. Swedlow. 2002. Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol.* 4:502-508.
- Platani, M., I. Goldberg, J.R. Swedlow, and A.I. Lamond. 2000. In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J Cell Biol.* 151:1561-1574.
- Polycarpou-Schwarz, M., S.I. Gunderson, S. Kandels-Lewis, B. Seraphin, and I.W. Mattaj. 1996. Drosophila SNF/D25 combines the functions of the two snRNP proteins U1A and U2B' that are encoded separately in human, potato, and yeast. *RNA.* 2:11-23.
- Query, C.C., R.C. Bentley, and J.D. Keene. 1989. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell.* 57:89-101.
- Raker, V.A., G. Plessel, and R. Luhrmann. 1996. The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J.* 15:2256-2269.
- Renvoise, B., G. Querol, E.R. Verrier, P. Burlet, and S. Lefebvre. 2012. A role for protein phosphatase PP1gamma in SMN complex formation and subnuclear localization to Cajal bodies. *J Cell Sci.* 125:2862-2874.
- Salgado-Garrido, J., E. Bragado-Nilsson, S. Kandels-Lewis, and B. Séraphin. 1999. Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J.* 18:3451-3462.
- Santama, N., S.C. Ogg, A. Malekkou, S.E. Zographos, K. Weis, and A.I. Lamond. 2005. Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAF1ID32 locus. *J Biol Chem.* 280:36429-36441.
- Sashital, D.G., V. Venditti, C.G. Angers, G. Cornilescu, and S.E. Butcher. 2007. Structure and thermodynamics of a conserved U2 snRNA domain from yeast and human. *RNA.* 13:328-338.

- Sauter, C., J. Basquin, and D. Suck. 2003. Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 31:4091-4098.
- Scherly, D., N.A. Dathan, W. Boelens, W.J. van Venrooij, and I.W. Mattaj. 1990. The U2B'' RNP motif as a site of protein-protein interaction. *EMBO J.* 9:3675-3681.
- Shpargel, K.B., and A.G. Matera. 2005. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:17372-17377.
- Sleeman, J.E., and A.I. Lamond. 1999. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr Biol.* 9:1065-1074.
- Spiller, M.P., K.L. Boon, M.A. Reijns, and J.D. Beggs. 2007. The Lsm2-8 complex determines nuclear localization of the spliceosomal U6 snRNA. *Nucleic Acids Res.* 35:923-929.
- Tanackovic, G., and A. Kramer. 2005. Human splicing factor SF3a, but not SF1, is essential for pre-mRNA splicing in vivo. *Mol Biol Cell.* 16:1366-1377.
- Tharun, S., and R. Parker. 2001. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol Cell.* 8:1075-1083.
- Thore, S., C. Mayer, C. Sauter, S. Weeks, and D. Suck. 2003. Crystal Structures of the *Pyrococcus abyssi* Sm Core and Its Complex with RNA: COMMON FEATURES OF RNA BINDING IN ARCHAEA AND EUKARYA. *Journal of Biological Chemistry.* 278:1239-1247.
- Tuma, R.S., J.A. Stolk, and M.B. Roth. 1993. Identification and characterization of a sphere organelle protein. *J Cell Biol.* 122:767-773.
- Updike, D., and S. Strome. 2010. P granule assembly and function in *Caenorhabditis elegans* germ cells. *J Androl.* 31:53-60.
- Valentin-Hansen, P., M. Eriksen, and C. Udesen. 2004. MicroReview: The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Molecular Microbiology.* 51:1525-1533.
- Vidal, V.P., L. Verdone, A.E. Mayes, and J.D. Beggs. 1999. Characterization of U6 snRNA-protein interactions. *RNA.* 5:1470-1481.
- Wang, Q., J. He, B. Lynn, and B.C. Rymond. 2005. Interactions of the yeast SF3b splicing factor. *Mol Cell Biol.* 25:10745-10754.
- Will, C.L., C. Schneider, A.M. MacMillan, N.F. Katopodis, G. Neubauer, M. Wilm, R. Lührmann, and C.C. Query. 2001. A novel U2 and U11/U12 snRNP protein that associates with the pre-mRNA branch site. *EMBO J.* 20:4536-4546.
- Will, C.L., H. Urlaub, T. Achsel, M. Gentzel, M. Wilm, and R. Lührmann. 2002. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *EMBO J.* 21:4978-4988.
- Xu, H., R.S. Pillai, T.N. Azzouz, K.B. Shpargel, C. Kambach, M.D. Hebert, D. Schumperli, and A.G. Matera. 2005. The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma.* 114:155-166.
- Yong, J., M. Kasim, J.L. Bachorik, L. Wan, and G. Dreyfuss. 2010. Gemin5 Delivers snRNA Precursors to the SMN Complex for snRNP Biogenesis. *Molecular cell.* 38:551-562.
- Yu, Y.T., M.D. Shu, and J.A. Steitz. 1998. Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 17:5783-5795.
- Zhang, R., Byung R. So, P. Li, J. Yong, T. Glisovic, L. Wan, and G. Dreyfuss. 2011. Structure of a Key Intermediate of the SMN Complex Reveals Gemin2's Crucial Function in snRNP Assembly. *Cell.* 146:384-395.

