

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



**Formování sestřihového komplexu v kontextu
buněčného jádra**

Autoreferát dizertační práce

Eva Stejskalová

2014

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady:

Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště:

Oddělení biologie RNA, Ústav molekulární genetiky AVČR, v. v. i.

Autorka:

Eva Stejskalová

Školitel:

doc. Mgr. David Staněk, PhD

S dizertací je možno se seznámit v knihovně Přírodovědecké fakulty
Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH

Abstrakt.....	2
Úvod	3
Cíle práce.....	7
Materiál a metody	8
Výsledky	9
Diskuze	10
Závěr	14
Použitá literatura:.....	15
Životopis.....	17

ABSTRAKT

Většina genů kódujících proteiny vyšších eukaryot obsahuje introny, které musí být odstraněny z primárních transkriptů. Vznikající mRNA může být poté použita jako templát pro syntézu proteinů. Sestřih intronů probíhá za pomoci složitého sestřihového komplexu, který se skládá z malých jaderných ribonukleoproteinových částic (snRNPs). snRNPs vznikají během složitých drah odehrávajících se jak v jádře, tak v cytoplasmě. Sestřihový komplex se poté postupně skládá na molekule pre-mRNA. Jedná se o velmi dynamický a přesně regulovaný proces, který je řízen nejenom sekvencí samotné pre-mRNA, ale záleží i na stavu celého jádra, např. na modifikacích chromatinu.

Mezi základní nezodpovězené biologické otázky patří například: Jak buňky řídí, kdy a kde se sestřihový komplex poskládá? Co předurčuje, které introny budou vystřiženy? V této práci zkoumáme sestřihový komplex a jeho skládání v kontextu buněčného jádra z několika různých úhlů pohledu.

Za prvé se věnujeme neočekávané souvislosti mezi sestřihovým faktorem U1-70K a komplexem SMN (z angl. *survival of motor neurons*), který je hlavním účastníkem biosyntetické dráhy malých jaderných ribonukleoproteinových částic. Podařilo se nám odhalit, že protein U1-70K interaguje s komplexem SMN a že tato interakce je klíčová pro stabilitu gem, malých nemembránových jaderných organel, jejichž absence souvisí se vznikem neurodegenerativních onemocnění.

Za druhé jsme zkoumali úlohu proteinu RBM39 (z angl. *RNA binding motif 39*) v regulaci alternativního sestřihu genu pro vaskulární endoteliální růstový faktor. Ukázali jsme, že RBM39 je součástí časného sestřihového komplexu, kde interaguje s proteiny U1-70K a U2AF35.

Nakonec jsme popsali interakce proteinu Brd2, který váže acetylované histony, s acetylovaným chromatinem *in vivo*.

ÚVOD

Geny vyšších eukaryot jsou tvořeny exprimovanými sekvencemi (exony), mezi kterými se nachází intervenující sekvence (introny). Aby mohla vzniknout maturovaná messenger RNA (mRNA), musí dojít k odstranění intronů z nascentních transkriptů pre-mRNA a spojení exonů. Tento pro expresi genů klíčový proces se označuje jako sestřih pre-mRNA a je vykonáván složitým makromolekulárním sestřihovým komplexem, který se skládá z pěti malých jaderných ribonukleoproteinových částic (snRNPs), bohatých na uridin.

Každá snRNP se skládá z malé jaderné RNA (U1, U2, U5 a U4/U6 snRNA) a sady specifických proteinů. U všech snRNP se však vyskytuje jeden společný motiv – kruh sedmi malých Sm proteinů (v případě U6 jsou to LSm proteiny) navázaných na konzervovaný sekvenční motiv bohatý na uridin. Všechny snRNA jsou přepisovány RNA polymerázou II, s výjimkou U6 snRNA, která je přepisována RNA polymerázou III (shrnutí v [1]). Po transkripci jsou nascentní snRNA exportovány do cytoplazmy, kde jsou navázány komplexem SMN, který nakládá kruh Sm proteinů na jejich rekogniční sekvenci (tzv. Sm místo). Kruh Sm proteinů chrání snRNA před degradací nukleázami a jeho navázání spouští další úpravy, po kterých jsou nascentní snRNP transportovány zpět do jádra. SMN komplex je pravděpodobně importován spolu s snRNPs a soudí se, že se od nich odpojuje krátce po příchodu do jádra (shrnutí v [2]).

Nově importované snRNPs lokalizují v Cajalových těliscích (CB), bezmembránových jaderných organelách, kde jsou dále modifikovány. CB hrají roli jak v *de novo* skládání, tak v recyklaci U4/U6 di-snRNP a U4/U6·U5 tri-snRNP (shrnutí v [3]). Další důležitá bezmembránová tělíska, zvaná gemy, se často vyskytují v blízkosti CB a jsou bohatá na proteiny účastnící se

transkripce a úprav RNA. Také v nich lokalizuje jaderná populace SMN komplexu. Fyziologická funkce gem dosud nebyla plně objasněna, ale ví se, že jejich ztráta z jádra koreluje se závažností neurodegenerativních chorob, jako je například spinální svalová atrofie nebo amyotrofická laterální skleróza (shrnutí v [4]).

Plně maturované snRNP jsou připraveny účastnit se sestřihu pre-mRNA. Sestřihový komplex se postupně skládá přímo na molekule pre-mRNA a poté katalyzuje dvě transesterifikační reakce vedoucí k odstranění intronu a spojení přilehlých exonů. Skládání sestřihového komplexu (shrnutí v [5]) začíná interakcí U1 snRNP s 5' sestřihovým místem, čímž se vytvoří časný sestřihový komplex (E-komplex). 3' sestřihové místo je rozpoznáno heterodimerním proteinem U2AF a sestřihovým faktorem 1. DexD/H helikázové proteiny poté katalyzují připojení U2 snRNP k E-komplexu za spotřeby ATP a dochází k ustavení sestřihového A-komplexu. Připojením předem složeného U4/U6·U5 tri-snRNPu se vytvoří B-komplex. Poté dochází k několika konformačním přesmykům, U1 a U4 snRNP opouští sestřihový komplex a ustaví se katalyticky aktivní B*-komplex, který následně katalyzuje první transesterifikační reakci. Po jejím proběhnutí vzniká sestřihový C-komplex a během druhé trans-esterifikace dochází k ligaci exonů a vyštěpení intronu ve formě lasovité smyčky. Maturovaná mRNA poté opouští sestřihový komplex a U2, U5 a U6 snRNP disociují z lasovité smyčky a jsou recyklovány pro další použití.

Rozpoznávání intronů (shrnutí v [6]) nezávisí pouze na konsenzuálních sekvencích sestřihových míst, ale je zpřesňováno pomocí dalších cis-elementů v sekvenci pre-mRNA. Tyto elementy jsou vázány regulačními proteiny, které dále vážou různé součásti sestřihového komplexu. Na zesilující sekvence se obvykle váží proteiny z rodiny bohaté na serin/arginin (SR), kdežto umlčující sekvence jsou vázány heterogenními jadernými ribonukleoproteiny (hnRNP).

Pokud jde o krátké introny (do cca 250 nukleotidů), ustavuje se E-komplex mezi 5' a 3' sestřihovými místy stejného intronu. Většina pre-mRNA vyšších eukaryot ovšem obsahuje mnoho intronů různých délek (až tisíce nukleotidů), kdežto délka exonů je poměrně stabilní (průměrně cca 120 nukleotidů). Proto se v případě dlouhých intronů sestřihový E-komplex ustavuje nejprve mezi sestřihovými místy na stejném exonu. Takováto definice exonu je umožněna sítí protein-proteinových interakcí mezi SR proteiny, které stabilizují E-komplex definovaný přes exon. Exon-definovaný E-komplex se poté přesmykuje na sestřihový komplex mezi sestřihovými místy na stejném intronu. Mechanismus tohoto přesmyku není znám.

Nedávno byla popsána síť protein-proteinových interakcí, která podmiňuje rozpoznávání intronů v kvasince *S. pombe* [7]. Autoři studie identifikovali protein Rsd1 jako můstkující faktor mezi U1 a U2 snRNP. Lidský homolog proteinu Rsd1, RNA-vazebný protein 39 (RBM39), se účastní sestřihových aktivit [8]. RBM39 byl detekován v sestřihovém E-komplexu pomocí hmotnostní spektrometrie [9] a bylo popsáno, že reguluje alternativní sestřih genu pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) [10, 11]. Molekulární mechanismus této regulace však není znám.

Většina genů vyšších eukaryot (téměř 95% u savčích genů) podléhá alternativnímu sestřihu, pomocí kterého vznikají různé isoformy mRNA dávající vznik proteinům s různými funkcemi (shrnuto v [12]). Regulace skládání sestřihového komplexu je zajištěna spoluprací mnoha faktorů (sekvence pre-mRNA, proteinové faktory, vazba sestřihu a transkripce a epigenetické faktory). Modifikace histonů také ovlivňují výsledek alternativního sestřihu daného genu, neboť jsou schopny rekrutovat adaptérové proteiny, které dále rekrutují sestřihové faktory. Zdá se, že modifikace histonů nepodmiňují výsledky alternativního sestřihu, ale slouží spíše k jejich jemnému ladění [13].

Je známo, že acetylace histonů reguluje alternativní sestřih [14], nicméně neví se, jakou roli hrají v tomto procesu proteiny rozpoznávající acetylaci histonů. Proteinová rodina BET (z angl. *Bromodomain extra-terminal*) patří mezi proteiny rozpoznávající acetylaci pomocí dvou konzervovaných bromodomén [15]. Proteiny rodiny BET se účastní regulace transkripce a možná i sestřihu [16]. Jeden ze členů rodiny BET, protein Brd2, je produktem esenciálního genu, jehož delece vede k závažným poškozením vývoje mozku u myší [17, 18]. Brd2 je členem mnoha různých proteinových komplexů, asociuje např. s RNA polymerázou II, acetylázami histonů a chromatin-remodelujícími faktory [19]. Je také známo, že Brd2 usnadňuje průchod RNA polymerázy II skrz acetylovaný chromatin *in vitro* [16]. Vzhledem k těmto datům jsme se rozhodli otestovat chromatin-vazebné vlastnosti proteinu Brd2 jakožto možného regulátoru alternativního sestřihu.

CÍLE PRÁCE

V této práci se zaměřujeme na formování sestřihového komplexu. Studujeme interakce mezi složkami sestřihového komplexu a procesy odehrávající se při regulaci sestřihu. Používáme různé biochemické a mikroskopické přístupy, abychom zodpověděli tyto hlavní otázky:

- jakou úlohu hraje sestřihový faktor U1-70K v tvorbě a udržování jaderných gem? Jaké jsou jeho interakce s komplexem SMN?
- jakou roli hraje protein RBM39 v regulaci alternativního sestřihu a jaké jsou jeho interakce?
- jak protein Brd2 interaguje s acetylovaným chromatinem v živých buňkách?

MATERIÁL A METODY

V této práci jsme použili biochemické metody, jako co-imunoprecipitaci a westernový přenos, a techniky molekulárního klonování pro charakterizaci protein-proteinových a RNA-proteinových interakcí. Mikroskopicky jsme sledovali interakce proteinů *in situ* ve fixovaných buňkách pomocí Försterova rezonančního přenosu energie. Pro výzkum fyziologických funkcí proteinů našeho zájmu jsme využili RNA interferenci s použitím siRNA. Analýzu alternativního sestřihu jsme prováděli s využitím izolace RNA následované reverzní transkripcí a polymerázovou řetězovou reakcí.

Tyto metody jsme doplnili pokročilou fluorescenční mikroskopií, jako například strukturní iluminací, rastrovací korelační mikroskopií a kinetickými metodami, jako je např. FRAP (z angl. *Fluorescence recovery after photo-bleaching*).

VÝSLEDKY

V prvním projektu jsme ukázali novou interakci mezi proteinem U1-70K a komplexem SMN, a také důležitost této interakce pro integritu jaderných gem. Zjistili jsme, že sestřihový faktor U1-70K lokalizuje do jaderných gem pomocí své N-koncové domény (aminokyseliny 1-60). Dále jsme ukázali, že právě tato doména zprostředkovává interakci s komplexem SMN. Po depleci proteinu U1-70K dochází ke ztrátě jaderných gem. Tento fenotyp je zachráněn exogenní expresí N-koncové domény proteinu U1-70K nebo proteinu SMN.

V rámci druhého projektu jsme zkoumali interakce proteinu RBM39 a jeho úlohu v regulaci alternativního sestřihu. Potvrdili jsme, že RBM39 reguluje alternativní sestřih pre-mRNA vaskulárního endoteliálního růstového faktoru. Ukázali jsme, že RBM39 asociuje se sestřihovým komplexem E a interaguje s proteiny U2AF35 a U1-70K. Tyto interakce jsou zprostředkovány doménou RS proteinu RBM39.

Ve třetím projektu jsme popsali interakce proteinu Brd2 s chromatinem pomocí technik pokročilé fluorescenční mikroskopie a matematického modelování. Ukázali jsme, že mutace, které byly publikovány jako zničující pro interakci proteinu Brd2 s acetylovaným histonem H4 [15], úplně nebrání interakci bromodomén s acetylovaným chromatinem, ale spíše snižují jejich vazebný potenciál. Naše analýzy ukázaly, že za normálních podmínek je dynamické chování proteinu Brd2 podmíněno zejména interakcemi jeho C-koncové domény, která se podílí i na vazbě na chromatin. Za normálních okolností se na chromatin váže pouze přibližně 40% přítomných bromodomén. V případě hyperacetylace histonů se tento podíl zvýší na téměř 85% a vazebný čas se prodlouží téměř sedmkrát.

DISKUZE

Primární transkripty většiny genů vyšších eukaryot obsahují množství intronů, které se však v maturované mRNA nevyskytují. Vystřížení těchto intronů z pre-mRNA zajišťuje dynamická síť sestřihových snRNP, které se skládají během složitých drah. Klíčovým prvkem těchto drah je multiproteinový komplex SMN, v jehož centru se nachází stejnojmenný protein. Nedostatek proteinu SMN v organismu způsobuje neurodegenerativní onemocnění, spinální svalovou atrofií, která se projevuje progresivním odumíráním motorických neuronů. V současné době není známo, co způsobuje tkáňově specifické projevy této nemoci.

Počet jaderných gem v buňkách pacientů se spinální svalovou atrofií je všeobecně přijímaným indikátorem hladiny proteinu SMN v těchto buňkách a pokles počtu gem koreluje se závažností spinální svalové atrofie. Nedávno se ukázalo, že ztráta gem je buněčným markerem i jiného neurodegenerativního onemocnění, amyotrofické laterální sklerózy (ALS). Velká část pacientů s ALS má mutace v genech pro proteiny účastníci se zpracování pre-mRNA. Naše práce ukázala, že sestřihový faktor U1-70K patří k proteinům, jejichž deplece vede ke ztrátě jaderných gem. Pokud víme, mutace v genu pro protein U1-70K nebyly dosud u ALS pacientů identifikovány [20]. Nicméně, výsledky naší práce nasvědčují tomu, že právě protein U1-70K by mohl být zajímavým kandidátem pro screening mutací v případech ALS s dosud neidentifikovanou genetickou příčinou.

Naše data také popisují U1-70K jako dosud neznámého interakčního partnera komplexu SMN. Komplex SMN byl nedávno objeven v časných sestřihových komplexech v lidských buňkách [21] a soudí se, že napomáhá recyklaci post-sestřihových komplexů a přímo se účastní sestřihu v podmínkách *in vitro* [22]. Vzhledem k tomu, že sestřihový faktor U1-70K se

vyskytuje právě v časných sestřihových komplexech, naše data mohou vysvětlit, jakým způsobem komplex SMN asociuje se sestřihovým komplexem.

Sestřihový komplex se postupně skládá přímo na molekule pre-mRNA. Toto skládání musí být přísně kontrolováno, protože využívání správných sestřihových míst je klíčové pro přežití organismu. Proteiny překládané ze špatně sestřižených transkriptů by byly vadné nebo nefunkční. Sestřihový komplex proto musí být schopen vystřihovat introny zároveň rychle a velmi přesně, což představuje nelehký úkol, vzhledem k tomu, že introny obvykle bývají o mnoho delší než exony a že genom obsahuje velké množství kryptických sestřihových míst.

Na počátku genomické éry se soudilo, že introny patří do skupiny tzv. „odpadní“ DNA. K nezodpovězeným otázkám proto patřilo, proč si buňka ponechává v genomu nekódující sekvence, které je třeba replikovat, přepisovat, sestřihovat a odbourávat se značnými metabolickými náklady. Později začalo být zjevné, že složité organismy získaly evoluční výhodu díky možnosti vyrábět pomocí jednoho transkriptu různé proteinové produkty s využitím alternativního sestřihu. Alternativní sestřih umožňuje významné obohacení transkriptomu a proteomu bez nutnosti rozšiřování genomu a také umožňuje regulovat expresi proteinů v závislosti na buněčném typu, vývojovém stádiu a dalších signálech.

V této práci jsme ukázali, že protein RBM39 reguluje alternativní sestřih pre-mRNA vaskulárního endoteliálního růstového faktoru v buněčných liniích odvozených z nádorových buněk. Protein RBM39 byl detekován v lidských časných sestřihových komplexech [9, 23, 24] a bylo objeveno, že se účastní sestřihu v kvasinkách [7], *Drosophila* [25] a u lidí [10]. Kvasinkový homolog RBM39, protein Rsd1, spojuje U1 a U2 snRNP pomocí sítě interakcí probíhající přes proteiny U1A, Rsd1, SpPrp5 a podjednotku b sestřihového faktoru SF3

[7]. Byla popsána interakce mezi lidským proteinem RBM39 a heterodimerním proteinem U2AF [26] a také mezi RBM 39 a sestřihovým faktorem SF3b155 [27]. Potenciální interakční partner RBM39 v U1 snRNP ovšem není znám.

Naše práce ukázala, že RBM39 interaguje s proteinem U1-70K a že tato interakce je zprostředkována C-koncovou RS doménou proteinu RBM39. Nedávno bylo popsáno, že N-koncová UHM doména proteinu RBM39 je klíčová pro jeho interakci s proteinem SF3b155 z U2 snRNP [27]. Bylo by lákavé spekulovat, že RBM39 interaguje s proteiny U1-70K a SF3b155 zároveň a funguje tedy jako můstek mezi U1 a U2 snRNP ve vznikajícím sestřihovém komplexu. Nicméně pro bližší prozkoumání interakcí RBM39 v čase a prostoru je třeba dalších experimentů.

Vzhledem k tomu, že sestřih většiny pre-mRNA se odehrává za podmínek stále probíhající transkripce, výsledek sestřihu neovlivňují jenom regulační elementy v sekvenci pre-mRNA, ale i chromatinové modifikace. Nedávno bylo popsáno úzké spojení mezi modifikacemi histonů a regulací alternativního sestřihu [28]. Zatím však bylo identifikováno jen několik chromatin vazebných proteinů, které by přímo ovlivňovaly alternativní sestřih (shrnutí v [13]).

Bylo popsáno, že acetylace histonů reguluje alternativní sestřih [14], nicméně, jak se tohoto procesu účastní proteiny, které vážou acetylované histony, není známo. V této práci charakterizujeme potenciální regulátor alternativního sestřihu, protein z rodiny BET, Brd2. Brd2 interaguje s acetylovanými histony a asociuje s mnoha různými proteinovými komplexy, např. s RNA polymerázou II, transkripčními faktory, acetylázami histonů a chromatin-remodelujícími komplexy. Bromodomény proteinu Brd2 selektivně rozpoznávají specifické acetylované lysiny na histonu H4. C-koncová ET

doména proteinů rodiny BET interaguje s proteiny remodelujícími chromatin, např. methyltransferázou NSD3 a hydroxylázou JMJD6 [29, 30].

V naší práci jsme ukázali, že vazba proteinu Brd2 na chromatin není řízena jen bromodomény, ale je modulována C-koncovou doménou, která pravděpodobně interaguje buď přímo s chromatinem, nebo s jinými proteiny vázajícími chromatin. Nicméně, v případě hyperacetylace chromatinu převládne interakce bromodomén s acetylovanými histony, která poté podmiňuje celkovou interakci Brd2 s chromatinem.

Protein Brd2 ovlivňuje jak transkripci, tak alternativní sestřih, a tím se zařazuje do sítě funkčně propojující transkripci a sestřih. Gen pro protein Brd2 je esenciální a jeho mutace jsou u lidí spojovány s epilepsií. Jedno z možných vysvětlení by mohlo být, že nedostatek proteinu Brd2 v neuronech, které jsou silně závislé právě na alternativním sestřihu, se projeví nefunkčností regulačních proteinů nutných pro komunikaci mezi neurony.

ZÁVĚR

V předložené dizertační práci jsme se zaměřili na formování sestřihového komplexu v kontextu buněčného jádra z několika různých úhlů pohledu.

V rámci prvního projektu jsme popsali neočekávanou interakci mezi proteinem U1-70K a komplexem SMN. Tuto interakci jsme zmapovali, identifikovali jsme N-koncovou doménu U1-70K jako klíčovou pro tuto interakci a pro cílení proteinu U1-70K do jaderných gem. Ukázali jsme, že po depleci U1-70K dochází ke ztrátě jaderných gem, která je zachráněna exogenní expresí N-koncové domény U1-70K. Naše pozorování nasvědčují tomu, že protein U1-70K má kromě funkce v sestřihu pre-mRNA také úlohu ve vzniku a/nebo udržování jaderných gem.

Během druhého projektu jsme potvrdili, že protein RBM39 reguluje alternativní sestřih genu pro vaskulární endoteliální růstový faktor. Popsali jsme interakce RBM39 a proteiny U2AF a U1-70K v časném sestřihovém komplexu. Obě tyto interakce jsou zprostředkovány RS doménou RBM39. Naše výsledky nasvědčují tomu, že RBM39 reguluje alternativní sestřih prostřednictvím interakcí se sestřihovým komplexem E.

Ve třetím projektu jsme zkoumali regulaci alternativního sestřihu. Popsali jsme interakce chromatin vázajícího proteinu Brd2 s chromatinem. Ukázali jsme, že dynamika proteinu Brd2 je za normálních podmínek řízena interakcemi zprostředkovanými C-koncovou doménou a že mutace, které byly publikovány jako destruktivní pro interakci Brd2 s acetylovanými histony, pouze snižují afinitu bromodomén proteinu Brd2 k chromatinu v podmínkách *in vivo*. Také jsme ukázali, že jednotlivé bromodomény jsou schopny interagovat s acetylovaným chromatinem nezávisle a tato interakce je silnější u bromodomény 1.

POUŽITÁ LITERATURA:

1. Matera, A.G. and Z. Wang, *A day in the life of the spliceosome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 108-21.
2. Battle, D.J., et al., *The SMN complex: an assembly machine for RNPs*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 313-20.
3. Machyna, M., P. Heyn, and K.M. Neugebauer, *Cajal bodies: where form meets function*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(1): p. 17-34.
4. Achsel, T., et al., *The intriguing case of motor neuron disease: ALS and SMA come closer*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(6): p. 1593-7.
5. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosome structure and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
6. Matlin, A.J., F. Clark, and C.W. Smith, *Understanding alternative splicing: towards a cellular code*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 386-98.
7. Shao, W., et al., *A U1-U2 snRNP interaction network during intron definition*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(2): p. 470-8.
8. Imai, H., et al., *Novel nuclear autoantigen with splicing factor motifs identified with antibody from hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2419-26.
9. Hartmuth, K., et al., *Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16719-24.
10. Dowhan, D.H., et al., *Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 429-39.
11. Huang, G., et al., *CAPER-alpha alternative splicing regulates the expression of vascular endothelial growth factor(1)(6)(5) in Ewing sarcoma cells*. Cancer, 2012. **118**(8): p. 2106-16.
12. Kornblihtt, A.R., et al., *Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(3): p. 153-65.
13. Luco, R.F., et al., *Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing*. Cell, 2011. **144**(1): p. 16-26.
14. Hnilicova, J., et al., *Histone deacetylase activity modulates alternative splicing*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16727.
15. Kanno, T., et al., *Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 33-43.
16. LeRoy, G., B. Rickards, and S.J. Flint, *The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription*. Mol Cell, 2008. **30**(1): p. 51-60.
17. Gyuris, A., et al., *The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(5): p. 413-21.
18. Shang, E., et al., *Double bromodomain-containing gene Brd2 is essential for embryonic development in mouse*. Dev Dyn, 2009. **238**(4): p. 908-17.
19. Denis, G.V., et al., *Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 502-11.
20. Finsterer, J. and J.M. Burgunder, *Recent progress in the genetics of motor neuron disease*. Eur J Med Genet, 2014. **57**(2-3): p. 103-12.

21. Makarov, E.M., et al., *Functional mammalian spliceosomal complex E contains SMN complex proteins in addition to U1 and U2 snRNPs*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(6): p. 2639-52.
22. Meister, G., et al., *Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(13): p. 1977-86.
23. Behzadnia, N., et al., *Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes*. Embo j, 2007. **26**(6): p. 1737-48.
24. Bessonov, S., et al., *Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core*. Nature, 2008. **452**(7189): p. 846-50.
25. Park, J.W., et al., *Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15974-9.
26. Ellis, J.D., et al., *Spatial mapping of splicing factor complexes involved in exon and intron definition*. J Cell Biol, 2008. **181**(6): p. 921-34.
27. Loerch, S., et al., *Cancer-relevant Splicing Factor CAPER α Engages the Essential Splicing Factor SF3b155 in a Specific Ternary Complex*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(25): p. 17325-17337.
28. Hnilicova, J. and D. Stanek, *Where splicing joins chromatin*. Nucleus, 2011. **2**(3): p. 182-8.
29. Webby, C.J., et al., *Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing*. Science, 2009. **325**(5936): p. 90-3.
30. Rahman, S., et al., *The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(13): p. 2641-52.

ŽIVOTOPIS

Vzdělání:

2011 – nyní:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie, doktorský studijní program, Karlova Univerzita v Praze

2009 – 2011:

Biomolekulární chemie, magisterský studijní program, Masarykova univerzita, Brno

2006 – 2009:

Chemie, bakalářský studijní program, Masarykova univerzita, Brno

Pracovní zkušenosti:

Diplomantka (2006/10 – 2011/06)

Biofyzikální ústav AVČR, Brno

Projekt: Elektrochemická analýza jednonukleotidových polymorfismů

Užívané techniky:

- elektroanalytické metody, primer extension, PCR, gelová elektroforéza, práce s radioaktivitou

Doktorandka (2011/09 – nyní)

Ústav molekulární genetiky AVČR, Praha

Projekt: Formování sestřihového komplexu v kontextu buněčného jádra

Užívané techniky:

- pokročilá fluorescenční mikroskopie (FRET, FRAP, RICS, SIM), tkáňové kultury, molekulární klonování, qPCR, imunoprecipitační techniky

PUBLIKACE:

Publikace relevantní pro dizertační práci:

Simkova, E. and Stanek, D. (2012). Probing Nucleic Acid Interactions and Pre-mRNA Splicing by Forster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 14929-14945.

Hnilicova, J., Hozeifi, S., Stejskalova, E., Duskova, E., Poser, I., Humpolickova, J., Hof, M. and Stanek, D. (2013). The C-terminal domain of Brd2 is important for chromatin interaction and regulation of transcription and alternative splicing. *Mol. Biol. Cell* **24**, 3557-3568.

Stejskalova, E. and Stanek, D. (2014). The splicing factor U1-70K interacts with the SMN complex and is required for nuclear gem integrity. *J. Cell Sci.* **15**, 3909-3915.

Ostatní publikace:

Horakova, P., Simkova, E., Vychodilova, Z., Brazdova, M. and Fojta, M. (2009). Detection of single nucleotide polymorphisms in p53 mutation hotspots and expression of mutant p53 in human cell lines using an enzyme-linked electrochemical assay. *Electroanalysis* **21**, 1723-1729.

Huang, Z., Kaltenbrunner, S., Simkova, E., Stanek, D., Lukes, J. and Hashimi, H. (2014). The Dynamics of Mitochondrial RNA-binding Protein Complex in Trypanosoma brucei and its Petite Mutant Under Optimized Immobilization Conditions. *Eukaryot. Cell.* **13**, 1232-1240.

Stejskalova, E., Horakova, P., Vacek, J., Bowater, RP. and Fojta, M. (2014). Enzyme-linked electrochemical DNA ligation assay using magnetic beads. *Anal. Bioanal. Chem.* **17**, 4129-4136.

PŘEDNÁŠKY NA KONFERENCÍCH:

Simkova, E. and Stanek, D. (2013). Exon recognition and early spliceosome assembly.

The Student Scientific Conference on Biotechnology and Biomedicine 2013, Brno, Česká republika

Stejskalova, E. and Stanek, D. (2014). N-terminal domain of splicing factor U1-70K interacts with SMN complex and is essential for nuclear gems integrity.

XIV. mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Milovy, Česká republika

Stejskalova, E. and Stanek, D. (2014). Splicing factor U1-70K is essential for nuclear gems integrity.

DNA Analýza XI, Praha, Česká republika

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ:

Simkova, E. and Stanek, D. (2012). The dynamics of spliceosome assembly.

Prague Nobel Get-Together, Praha, Česká republika

Simkova, E. and Stanek, D. (2012). Exon recognition and early spliceosome assembly.

RNA Club 2012, Praha, Česká republika

Stejskalova, E. and Stanek, D. (2013). Exon recognition and early spliceosome assembly.

EMBO Conference Nuclear structure and dynamics, L'Isle-sur-la-Sorgue, Francie