

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Charles University, Faculty of Sciences

Department of Genetics and Microbiology

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Doctoral study programme: Molecular and cellular biology, Genetics and Virology

Autoreferát disertační práce

Summary of the Doctoral Thesis



Role sestřihu pre-mRNA při rozvoji lidských dědičných onemocněních

The role of pre-mRNA splicing in human hereditary diseases

Anna Malinová

Školitel/Supervisor: doc. Mgr. David Staněk, Ph.D.

Praha, 2017

ABSTRACT

U5 small ribonucleoprotein particle (U5 snRNP) is a crucial component of the spliceosome, the complex responsible for pre-mRNA splicing. Despite the importance of U5 snRNP, not much is known about its biogenesis. When we depleted one of the core U5 components, protein PRPF8, the other U5-specific proteins do not associate with U5 snRNA and the incomplete U5 was accumulated in nuclear structures known as Cajal bodies. To further clarify the role of PRPF8 in U5 snRNP assembly, we studied PRPF8 mutations that cause an autosomal dominant retinal disorder, retinitis pigmentosa (RP). We prepared eight different PRPF8 variants carrying RP-associated mutations and expressed them stably in human cell culture. We showed that most mutations interfere with the assembly of snRNPs which consequently leads to reduced efficiency of splicing. The mutant PRPF8 together with EFTUD2 are stalled in the cytoplasm in a form of U5 snRNP assembly intermediate. Strikingly, we identified several chaperons including the HSP90/R2TP complex and ZNHIT2 as new PRPF8's interactors and potential U5 snRNP assembly factors. Our results further imply that these chaperons preferentially bind the unassembled U5 complexes and that HSP90 is required for stability of U5 proteins PRPF8 and SNRNP200. Finally, we provide evidence that the R2TP complex is important for proper maturation of U5 snRNPs and it is responsible for retention of mutated PRPF8 in the cytoplasm. We propose that the HSP90/R2TP chaperone system both promotes and controls the assembly U5 snRNP particles.

INTRODUCTION

Splicing of pre-mRNA is a crucial step of gene expression in eukaryotes. During splicing, the non-coding sequences (introns) are removed from the pre-mRNA and coding sequences (exons) are joined to form the final mRNA. Splicing is catalyzed by a huge molecular machinery, spliceosome. The major building blocks of the spliceosome are five small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs) that each consists of a uridine-rich snRNA (U1, U2, U4, U5 or U6 snRNA), a ring of 7 Sm or LSm proteins and a set of specific proteins (for review, see Matera & Wang, 2014).

With large number of components, snRNP assembly is a complex process that involves, with the exception of the U6 snRNP, both cytoplasmatic and nuclear phase. SnRNAs are transcribed by RNA polymerase II and soon after transcription exported to the cytoplasm where snRNAs acquire the ring of Sm proteins. The assembled core snRNP is re-imported to the nucleus where it first appears in the nuclear structures called Cajal bodies (CBs). Here the final stages of snRNP biogenesis, namely snRNA modifications and addition of some specific proteins, occur. Finally, the mature snRNPs form higher complexes like tri-snRNP (U4/U6-U5 snRNP) and leave CBs (reviewed in Staněk, 2016).

The unifying element of my work is the U5 snRNP, a crucial component of the splicing machinery. U5 particle occupies a central position in the activated human spliceosome as confirmed by recent structural studies (Bertram *et al.*, 2017). Protein PRPF8 is particularly important in this context as it is the main U5-specific scaffolding protein and its large central cavity forms the catalytic center of the spliceosome (Galej *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2015; Agafonov *et al.*, 2016). PRPF8 attracts a great deal of attention also because mutations in the gene encoding this

protein cause an inherited human disease, retinitis pigmentosa (RP). PRPF8 mutation were studied mainly in yeast and brought the first insights not just into the mechanism of these mutations but also into the biogenesis of the U5 particle. However, not much is known about the maturation of the PRPF8 and about the assembly of the human U5 snRNPs. In particular, we have little information regarding the order in which proteins join the U5 snRNA, whether they come alone or as pre-assembled complexes, or which chaperone systems are involved in human U5 snRNP assembly, if any. We have decided to address these questions and to start by analysis of the RP-associated PRPF8 mutations in human cells.

AIMS

The main goal of this work is to gain a deeper insight into the intricate machinery of the spliceosomal complex. We aim to extend our knowledge about the formation of this machinery and we try to address the question using a cellular model of a human hereditary disease, retinitis pigmentosa. We focus on three main goals:

- to decipher molecular mechanisms underlying retinitis pigmentosa mutations in spliceosomal protein PRPF8
- to better characterize the step-wise assembly of the U5 snRNP particle in human cells
- to identify factors involved in the biogenesis of U5 snRNP particles and to outline their possible means of action

MATERIAL AND METHODS

The following biochemical and microscopic approaches were used in the thesis:

- RNA isolation
- transfection of plasmids
- Red/ET recombeneering and stable cell line preparation
- siRNA mediated-depletion
- immunofluorescence staining (IF)
- fluorescence in situ hybridization (FISH)
- fluorescence microscopy techniques including live-cell imaging and high-throughput microscopy
- immuoprecipitation (IP) and Western blotting (WB)
- PCR, quantitative PCR (qPCR), colony PCR
- SILAC-IP and proteomic analysis (performed by our collaborators from Montpellier (France))

RESULTS AND DISCUSSION

RP is a hereditary eye disorder causing gradual damage of retinal cells and consequently severe vision impairments. RP is a monogenic disease and it has been associated with more than 80 genes, including those that encode tri-snRNP-specific proteins. Here, we studied eight RP-associated missense mutations in the spliceosomal U5 snRNP-specific protein, PRPF8. We stably expressed LAP-tagged PRPF8 mutant variants in human cells and showed that none of the mutations is able to rescue the splicing defects caused by depletion of the endogenous protein and that all of them impair nuclear translocation of PRPF8-LAP. For most mutants, that can be explained by defects in spliceosome formation (Fig. 1).

All the RP mutations currently known are found at different positions within the C-terminal Jab1 domain of PRPF8 (Mozaffari-Jovin et al., 2013). The herein studied mutations in a globular region of the Jab1 domain exhibit the strongest assembly defects as well as more pronounced effects on splicing efficiency, faster degradation rate of the protein and increased cytoplasmic localization compared to other tested mutants. These data are consistent with other studies done in yeast where most RP-related PRPF8 mutations reduce association with U5-specific proteins (Boon et al., 2007; Maeder et al., 2009; Mozaffari-Jovin et al., 2013). Likewise, mutations in other snRNP genes are also often associated with reduced assembly of snRNP particles (Gonzalez-Santos et al., 2008; Huranová et al., 2009; Linder et al., 2014; Tanackovic et al., 2011b). However, the herein studied Y2334N mutation from the very end of the Jab1 domain does not interfere with spliceosome assembly. Similarly, mutations in another U5-specific splicing factor SNRNP200 were shown to have no effect on the spliceosome formation (Cvačková et al., 2014). These results therefore suggest that the common mechanism of RP mutations in spliceosomal proteins is not the inhibition of a putative retina-specific

function of the tri-snRNP but rather the defects in pre-mRNA splicing efficiency and fidelity. As our results suggest, these defects are rather general and retina cells might be specifically sensitive to it due to their high demand for splicing (Tanackovic et al., 2011).

RP mutations compromise U5 snRNP assembly but little is known about how the U5 snRNP biogenesis actually works in human cells. We showed that the RP-associated PRPF8 mutants are stalled together with proteins EFTUD2 and AAR2 in the cytoplasm and we believe that formation of the PRPF8/EFTUD2/AAR2 complex is the first step of the U5 snRNP assembly pathway (Fig. 1). In contrast to yeast however (Boon et al., 2007), the PRPF8/EFTUD2/AAR2 complex does not interact with the core U5 snRNP. Instead, SNRNP200 and SNRNP40 associate to the complex which probably triggers conformational changes and leads to AAR2 release. It is not clear in which moment the remaining U5 proteins join the particle. At the end, the complex binds the core U5 snRNP in Cajal bodies (Fig. 1). CBs likely work as a final checkpoint of the biogenesis since we observed accumulation of snRNAs in these structures when U5 snRNP formation was halted by PRPF8 knock down. Accumulation of snRNAs in CBs was already reported by Schaffert et al. (2004) after inhibition of tri-snRNP formation. These findings support the hypothesis that CBs retain the incomplete snRNPs until all the specific proteins are loaded and tri-snRNP is formed, which might be a mechanism to prevent immature snRNPs escape and interfere with splicing.

Finally, using quantitative proteomic approach we identified several factors involved in the assembly of human U5 snRNP. Apart from AAR2, which is already known from yeast (Boon et al., 2007), we showed that the HSP90/R2TP machinery plays an important role during U5 snRNP biogenesis. The HSP90/R2TP complex is known to be involved in the biogenesis of many different ribonucleoproteins

including U4 snRNP (Bizarro *et al.*, 2015), but nothing is known about its role in the maturation of U5 snRNP. According to our data, HSP90 and the R2TP complex promote and control folding of U5 snRNP-specific proteins, help to form intermediate complexes by bridging their protein components (PRPF8, EFTUD2, AAR2 and SNRNP200) and facilitate the AAR2-SNRNP200 exchange on PRPF8. Finally, our experiments suggest that the R2TP complex is involved in quality control, interacts with misassembled proteins, supervises biogenesis of U5-specific proteins and inhibits nuclear translocation of improperly assembled complexes and/or proteins. Furthermore, SILAC IP experiments revealed a plenty of other proteins interacting with PRPF8 that are not part of the mature U5 particle. We propose that ECD and ZNHIT2 serve as bridging factors between the R2TP complex and U5 proteins. The role of the other potential factors remains to be elucidated.

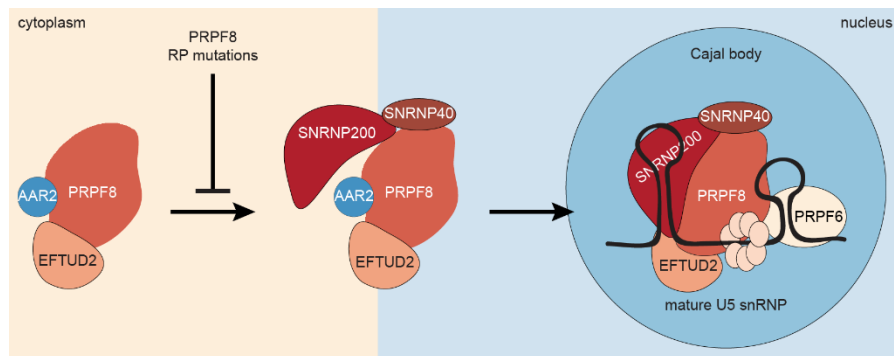


Fig. 1: Proposed model of the U5 snRNP biogenesis in human

CONCLUSIONS

In this PhD thesis, I focused on the assembly process of human U5 snRNP particles. A special attention was paid to the protein PRPF8, U5-specific protein which occupies a central position in the catalytic core of the spliceosome. Multiple biochemical and microscopic approaches were used to address the main questions.

We started by analysis of the retinitis pigmentosa-associated PRPF8 mutations in human cells. We showed that the splicing defects caused by herein studied RP mutations in PRPF8 gene are the main mechanism underlying RP phenotype and that in most cases can be explained by disrupted assembly of snRNP particles. We found out that the step-wise assembly of the U5 snRNP in human cells differs from that in yeast, and that Cajal bodies are an important quality control checkpoint of the tri-snRNP biogenesis. Finally, we identified several novel U5 snRNP assembly factors, including AAR2, ZNHIT2 and the HSP90/R2TP complex.

ABSTRAKT

Malá jaderná ribonukleoproteinová částice U5 (U5 snRNP) je jednou z hlavních komponent spliceozomu, komplexu který katalyzuje sestřih pre-mRNA. U5 snRNP je tvořena molekulou RNA a několika proteiny, nicméně o tom jak jsou jednotlivé díly postupně skládány v maturovanou částici, se mnoho neví. Ukázali jsme, že po depleci proteinu PRPF8, jedné z klíčových složek U5 snRNP, se částice správně neskládají a akumulují se v jaderných strukturách zvaných Cajalova tělíska. K objasnění role PRPF8 v biogenezi U5 snRNP jsme se dále rozhodli využít mutace tohoto proteinu, které byly identifikovány u pacientů s degenerativním onemocněním oční sítnice, retinitis pigmentosa (RP). Vytvořili jsme stabilní buněčné linie exprimující mutantní varianty proteinu PRPF8 a ukázali jsme, že RP mutace narušují skládání U5 snRNP, což následně vede ke snížení efektivity sestřihu pre-mRNA v buňkách. Mutantní PRPF8 se spolu s proteinem EFTUD2 hromadí v cytoplasmě a vytvoření tohoto komplexu je, zdá se, prvním krokem skládání U5 snRNP. Dále jsme s využitím proteomických metod identifikovali řadu nových faktorů včetně komplexu HSP90/R2TP a proteinu ZNHIT2, které se váží na U5 snRNP. Naše výsledky ukazují, že tyto faktory preferenčně interagují s nehotovými U5 snRNP včetně komplexů s mutantními PRPF8 proteiny. Prokázali jsme, že chaperon HSP90 se podílí na udržení stability některých proteinů specifických pro U5 snRNP částici, konkrétně proteinů PRPF8 a SNRNP200. V neposlední řadě ukazujeme, že komplex R2TP je nezbytný pro správné formování U5 snRNP a je zodpovědný za zadržování mutantních proteinů PRPF8 v cytoplasmě. Z našich výsledků vyplývá, že komplex HSP90/R2TP se nejen přímo podílí na skládání U5 snRNP částic, ale také dohlíží na správný průběh tohoto procesu.

ÚVOD

Sestřih prekurzorové mRNA (pre-mRNA) je jedním z klíčových kroků genové exprese u eukaryot. Při sestřihu jsou z pre-mRNA odstraněny nekódující sekvence, introny. Kódující sekvence, exony, jsou následně spojeny za vzniku maturované mRNA. Tento proces je katalyzován sestřihovým komplexem, tzv. spliceozomem, jehož hlavními stavebními kameny jsou malé jaderné ribonukleoproteinové částice (U1, U2, U4, U5 a U6 snRNP). Každá snRNP částice se skládá z malé jaderné RNA (snRNA), sedmi proteinů Sm nebo LSm, a dále z proteinů specifických pro danou snRNP částici.

Vzhledem k velkému množství dílčích komponent je skládání snRNP částic složitý proces, který zahrnuje jak cytoplazmatiku tak jadernou fázi (s výjimkou U6 snRNP). SnRNA jsou syntetizovány v jádře RNA polymerázou II, poté jsou transportovány do cytoplazmy, kde proběhne tri-methylace jejich 5' konce, úprava 3' konce a sestavení heptamerového kruhu proteinů Sm, které tvoří jádro snRNP částice. Následně jsou snRNP částice transportovány zpět do jádra. Finální maturace snRNP částic probíhá především v jaderných strukturách zvaných Cajalova tělíska (CB). Zde jsou částice finálně modifikovány, dále jsou skládány do větších komplexů (U4/U6 di-snRNP a U4/U6.U5 tri-snRNP) a opouští CB, aby se mohly zapojit do sestřihu pre-mRNA.

U5 snRNP částice je jednotčím prvkem mé disertační práce a klíčovou součástí sestřihového komplexu. Strukturální data prokazují, že tato částice zaujímá výjimečné centrální postavení v rámci aktivovaného spliceozomu (Bertram et al., 2017). Protein PRPF8 je v tomto kontextu obzvláště důležitý, neboť je ústředním proteinem U5 snRNP částice a jeho velká centrální dutina tvoří katalytické centrum spliceozomu (Galej et al., 2013, Yan et al., 2015, Agafonov et al. 2016). Protein

PRPF8 přitahuje velkou pozornost také proto, že mutace v genu kódujícím tento protein způsobují lidské dědičné onemocnění, retinitis pigmentosa (RP). Mutace proteinu PRPF8 byly studovány především v kvasinkách a přinesly první poznatky nejen o mechanismu působení těchto mutací, ale také o biogenezi U5 snRNP částice. O maturaci proteinu PRPF8 a o skládání U5 snRNP částice v lidských buňkách toho zatím není mnoho známo. Není například jasné, v jakém pořadí se jednotlivé proteiny připojují k jádru U5 snRNP částice, jestli se přidávají samostatně nebo jako předem sestavené komplexy, či zda se na skládání snRNP částic podílí další pomocné faktory. Rozhodli jsme se tyto otázky zodpovědět a začali jsme analýzou RP mutant proteinu PRPF8 v lidských buňkách.

CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce je hlouběji porozumět fungování tak složitého molekulárního komplexu jako je sestřihový aparát. Zaměřujeme se na otázku formování tohoto komplexu. Studujeme zejména biogenezi částice U5 snRNP a využíváme k tomu buněčný model lidského dědičného onemocnění, retinitis pigmentosa. V rámci této disertační práce si klademe tři hlavní cíle:

- objasnit molekulární mechanismy, které stojí za rozvojem retinitis pigmentosa v případě mutací sestřihového faktoru PRPF8
- blíže popsat jak probíhá postupné skládání částic U5 snRNP v lidských buňkách
- identifikovat faktory, které jsou zapojeny do biogeneze částice U5 snRNP, a pokusit se blíže určit jejich funkci

MATERIÁL A METODY

Data uvedená v této práci byla získána s využitím následujících biochemických a mikroskopických metod:

- izolace RNA
- transfekce plasmidové DNA
- Red/ET recombeneering a příprava stabilních buněčných linií
- posttranskripční umlčení genů pomocí siRNA
- barvení buněk pomocí imunofluorescence
- barvení buněk pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)
- fluorescenční mikroskopické techniky včetně focení živých buněk a využití vysoce výkonných screeningových metod
- imunoprecipitace (IP) a immunoblot (Western blot)
- PCR, kvantitativní PCR (qPCR), PCR bakteriálních kolonií
- SILAC-IP a proteomická analýza (ve spolupráci s kolegy z Montpellier (France))

VÝSLEDKY A DISKUSE

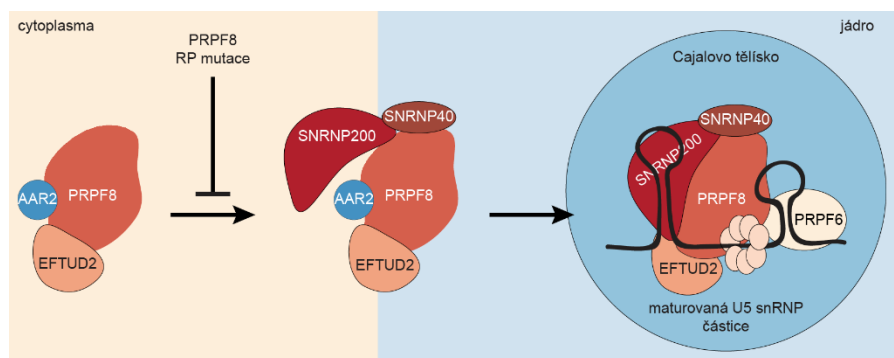
RP je dědičné oční onemocnění, které způsobuje postupné odumírání retinálních buněk a následně závažné poškození zraku. Jedná se o monogenní chorobu, která je ovšem spojována s mutacemi ve více než 80 různých genech, včetně těch, které kódují proteiny specifické pro tri-snRNP částici. V rámci této disertační práce jsme studovali osm substitučních bodových mutací v proteinu PRPF8, který je ústředním proteinem U5 snRNP částice. Vytvořili jsme stabilní lidské buněčné linie exprimující mutované a nemutované varianty proteinu PRPF8-LAP. Ukázali jsme, že žádná z mutant není schopna zachránit defekty v sestřihu pre-mRNA způsobené deplecí endogenního proteinu, a že všechny mutanty narušují transport proteinů PRPF8-LAP do jádra. U většiny mutant můžou být problémy sestřihu vysvětleny poruchou formování sestřihového aparátu (Obr. 1).

Všechny známé RP mutace proteinu PRPF8 se vyskytují v C-terminální doméně Jab1 (Mozaffari-Jovin et al., 2013). Ze zkoumaných mutací mají ty, které se nachází v globulární oblasti domény Jab1, nejvýraznější problémy se skládáním spliceozomu, největší vliv na efektivitu sestřihu, jsou nejrychleji degradovány a nejvíce akumulovány v cytoplazmě. Naše výsledky jsou konzistentní s výsledky výzkumů prováděných na kvasinkách, kde většina RP mutací negativně ovlivňuje proteinové interakce proteinu PRPF8 (Boon et al., 2007, Maeder et al., 2009; Mozaffari-Jovin a kol., 2013). Stejně tak RP mutace v genech kódujících jiné snRNP proteiny jsou také často spojovány s problémy skládání tri-snRNP částice (Gonzalez-Santos et al., 2008; Huranová et al., 2009; Linder et al., 2014; Tanackovic et al., 2011b). Avšak mutace Y2334N, která se nachází na samém konci domény Jab1, skládání snRNP neovlivňuje a podobně je tomu i u mutací jiného sestřihového faktoru, SNRNP200 (Zhao et al., 2009, Cvačková et al., 2014). Tyto výsledky proto

naznačují, že společným znakem RP mutací sestřihových faktorů není problém se skládáním tri-snRNP částice a s narušením její potenciální specifické funkce v retině, ale spíše problém se samotným sestřihem, jeho přesností a efektivností. Testovali jsme efektivitu sestřihu jak běžně exprimovaných genů tak genů specifických pro retinu, a zdá se, že negativní vliv RP mutace není genově specifický. Retinální buňky mohly být k těmto problémům se sestřihem obzvláště citlivé, protože mají velmi vysoký obrat proteinů v buňce a tím pádem vysoké nároky na sestřihový aparát (Tanackovic et al., 2011).

Studované RP mutace narušují skládání U5 snRNP částice, ale o tom jak toto skládání ve skutečnosti funguje v lidských buňkách se mnoho neví. Ukázali jsme, že proteiny PRPF8 nesoucí RP mutace jsou zadržovány v cytoplasmě v komplexu s proteiny EFTUD2 a AAR2. Zdá se, že vytvoření komplexu PRPF8/EFTUD2/AAR2 je prvním krokem biogeneze U5 snRNP částice (Obr. 1), narozdíl od kvasinek (Boon et al., 2007) však tento komplex neinteraguje s U5 snRNA. Namísto toho se na komplex váží proteiny SNRNP200 a SNRNP40, což pravděpodobně spouští sérii konformačních změn, které vedou k uvolnění proteinu AAR2. Není zcela jasné, kdy se ke komplexu připojí zbývající specifické proteiny. Na závěr se preformovaný komplex naváže na jádro U5 snRNP, tento proces probíhá v Cajalových tělískách (Obr. 1). CB pravděpodobně fungují jako finální kontrolní bod biogeneze snRNP částic, protože když biogeneze narušena pomocí deplece proteinu PRPF8 dochází k akumulaci snRNA v těchto strukturách. Jak již bylo popsáno dříve, k akumulaci snRNA v CB dochází také po zablokování formování tri-snRNP částice (Schaffert et al. (2004). Tato zjištění podporují hypotézu, že CB zadržují snRNP částice až do okamžiku, kdy jsou plně maturované a vytvoří tri-snRNP komplex. Tento mechanismus by tak mohl bránit špatně nebo neúplně složeným částicím zapojit se do procesu sestřihu a narušit jeho správný průběh.

S využitím kvantitativní proteomické analýzy interakčních partnerů proteinu PRPF8 jsme identifikovali řadu faktorů, které se podílí na skládání U5 snRNP částice v lidských buňkách. Mezi tyto faktory patří mezi jinými proteiny komplexu R2TP a chaperon HSP90. Komplex HSP90/R2TP se účastní skládání mnoha různých ribonukleoproteinů v buňce včetně U4 snRNP (Bizarro et al., 2015), ale o jeho roli v biogenezi U5 snRNP částice není zatím nic známo. Z našich výsledků vyplývá, že komplex HSP90/R2TP pomáhá skládání klíčových proteinů U5 snRNP částice. Propojuje také jednotlivé komponenty (PRPF8, EFTUD2, AAR2 a SNRNP200), čímž usnadňuje formování dílčích meziproductů a umožňuje výměnu proteinu AAR2 za SNRNP200. Naše výsledky dále naznačují, že komplex R2TP je zapojen do kontroly kvality správného formování U5 snRNP částice, jelikož rozpoznává mutované proteiny PRPF8, preferenčně s nimi interaguje a brání jejich transportu do jádra. Kromě komplexu HSP90/R2TP odhalily naše SILAC IP experimenty ještě množství dalších proteinů, které interagují s PRPF8, ale nejsou součástí U5 snRNP částice. Například proteiny ECD a ZNHIT2, které by mohly sloužit jako faktory propojující R2TP komplex s proteiny U5. Úloha zbývajících identifikovaných faktorů zůstává neobjasněna a bude předmětem dalšího výzkumu.



Obr. 1: Navrhovaný model biogeneze U5 snRNP částice v lidských buňkách

ZÁVĚRY

V rámci této práce jsem se zaměřila na částici U5 snRNP a především pak na protein PRPF8, který je ústředním proteinem nejen U5 snRNP částice, ale i celého spliceozomu. K zodpovězení hlavních položených otázek jsme využili řadu biochemických a mikroskopických metod.

Nejdříve jsme analyzovali mutace proteinu PRPF8, které způsobují onemocnění retinitis pigmentosa. Naše výsledky naznačují, že za rozvojem RP stojí v případě studovaných mutací nižší efektivita sestřihu pre-mRNA, což můžeme ve většině případů přičíst problémům se skládáním sestřihového komplexu. Dále jsme zjistili, že postup skládání U5 snRNP částic v lidských buňkách se liší od toho v kvasinkách, a že Cajalova tělíska jsou důležitým kontrolním bodem biogeneze tri-snRNP částic. V neposlední řadě jsme identifikovali řadu nových faktorů podílejících se na skládání U5 snRNP částice, mimo jiné proteiny AAR2, ZNHIT2 a komplex HSP90/R2TP.

POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

- Agafonov, D. E., Kastner, B., Dybkov, O., Hofele, R. V., Liu, W., Urlaub, H. (2016). Molecular architecture of the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *Science*, 2085, 1–11.
- Bertram, K., Agafonov, D. E., Liu, W.-T., Dybkov, O., Will, C. L., Hartmuth, K., ... Lu Hrmann, R. (2017). Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. *Nature*, 542, 1–22.
- Bizarro, J., Dodré, M., Huttin, A., Charpentier, B., Schlotter, F., Branlant, C., ... Bertrand, E. (2015). NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Research*, 43(18), 8973–89.
- Boon, K.L., Grainger, R. J., Ehsani, P., Barrass, J. D., Auchynnikava, T., Inglehearn, C. F., Beggs, J. D. (2007). prp8 mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(11), 1077–1083.
- Cvačková, Z., Matějů, D., Staněk, D. (2014). Retinitis pigmentosa mutations of SNRNP200 enhance cryptic splice-site Recognition. *Human Mutation*, 35(3), 308–317.
- Galej, W. P., Oubridge, C., Newman, A. J., Nagai, K. (2013). Crystal structure of Prp8 reveals active site cavity of the spliceosome. *Nature*, 493(7434), 638–43.
- Gonzalez-Santos, J. M., Cao, H., Duan, R. C., Hu, J. (2008). Mutation in the splicing factor Hprp3p linked to retinitis pigmentosa impairs interactions within the U4/U6 snRNP complex. *Human Molecular Genetics*, 17(2), 225–239.
- Huranová, M., Hnilicová, J., Fleischer, B., Cvačková, Z., Staněk, D. (2009). A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs. *Human Molecular Genetics*, 18(11), 2014–2023.
- Linder, B., Hirmer, A., Gal, A., Rother, K., Bolz, H. J., Winkler, C., ... Fischer, U. (2014). Identification of a PRPF4 loss-of-function variant that abrogates U4/U6.U5 Tri-snRNP integration and is associated with retinitis pigmentosa. *PLoS ONE*, 9(11), 1–8.
- Maeder, C., Kutach, A. K., Guthrie, C. (2009). ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16(1), 42–48.

- Matera, A. G., Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(2), 108–21.
- Mozaffari-Jovin, S., Wandersleben, T., Santos, K. F., Will, C. L., Lührmann, R., Wahl, M. C. (2013). Inhibition of RNA Helicase Brr2 by the C-Terminal Tail of the Spliceosomal Protein Prp8. *Science*, 341, 80–84.
- Schaffert, N., Hossbach, M., Heintzmann, R., Achsel, T., Lührmann, R. (2004). RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *The EMBO Journal*, 23(15), 3000–3009.
- Staněk, D. 2016. Cajal body and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biol.* 14:1-9.
- Tanackovic, G., Ransijn, A., Thibault, P., Elela, S. A., Klinck, R., Berson, E. L., ... Rivolta, C. (2011). PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics*, 20(11), 2116–2130.
- Yan, C., Hang, J., Wan, R., Huang, M., Wong, C. C. L., Shi, Y. (2015). Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6253), 1182-91.

CURRICULUM VITAE

Education:

- 2007 – 2010 Faculty of Science, Charles University in Prague
BSc. program: Biology
- winter 2009/10 ERASMUS – Universidad Complutense de Madrid
- 2010 – 2012 Faculty of Science, Charles University in Prague
MSc. program: Genetics, Molecular Biology and Virology
- 2012 – now Faculty of Science, Charles University in Prague
Institute of Molecular Genetics AS CR
Department of RNA biology
Ph.D. program: Molecular and cellular biology, genetics and virology

Research experience:

- 2009 – 2012 First Faculty of Medicine, Charles University in Prague
Diploma thesis: Incidence and molecular typing of *Clostridium difficile* strains in the Czech Republic
supervisor: RNDr. Alena Jirásková, Ph.D.
- 2012 – 2016 Department of RNA Biology, IMG AS CR
Ph.D. project: The role of pre-mRNA splicing in human hereditary diseases
supervisor: doc. Mgr. David Staněk, Ph.D.
- 2016 – now Light Microscopy and Flow Cytometry Facility, IMG AS CR

SEZNAM PUBLIKACÍ/PUBLICATIONS

Publications related to the thesis:

Malinová, A., Cvačková, Z., Matějů, D., Hořejší, Z., C., Vandermoere, F., Bertrand, E., Staněk, D., Verheggen, C. (2017). Assembly of the PRPF8 module of U5 snRNP is controlled by the HSP90/R2TP chaperone system. *J. Cell Biol.* accepted.

Novotný, I., Malinová, A., Stejskalová, E., Matějů, D., Klimešová, K., Roithová, A., Švéda, M., Knejzlík, Z., Staněk, D. (2015). SART3-Dependent Accumulation of Incomplete Spliceosomal snRNPs in Cajal Bodies. *Cell Reports*, 10(3), 429–440.

Other publications:

Goldová, J., Malinová, A., Indra, A., Víttek, L., Branny, P., Jirásková, A. (2012): Clostridium difficile in piglets in the Czech Republic. *Folia Microbiol. (Praha)*, 57(2), 159-61.