

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ FYZIOLOGIE BUŇKY

ÚLOHA PROTEINU SLU7 V SESTŘIHU HETEROGENNÍ JADERNÉ RNA

ANNA STEINBAUEROVÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. František PŮTA, CSc

PRAHA 2006

Úvodem bych chtěla poděkovat celému kolektivu oddělení Fyziologie buňky Univerzity Karlovy, zvláště RNDr. Františku Půtovi CSc.

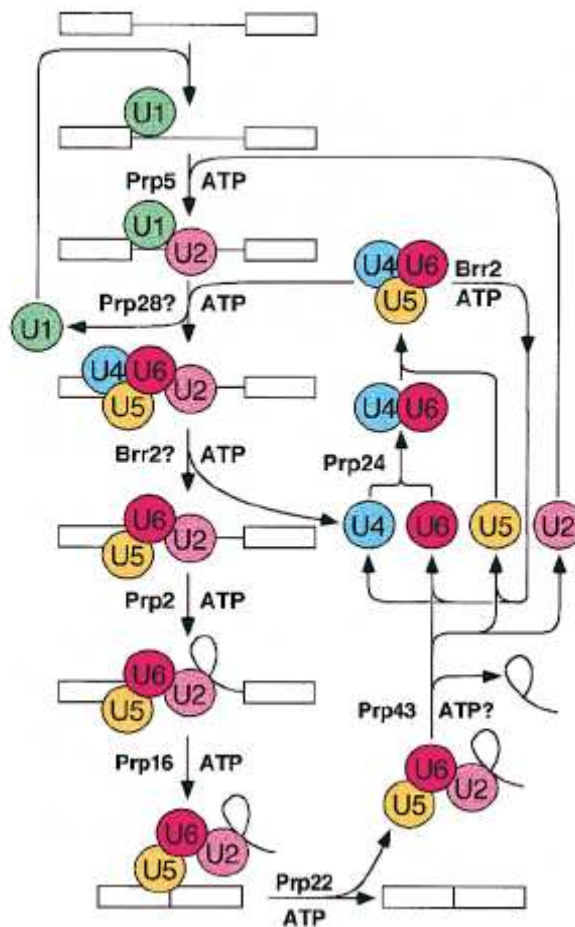
OBSAH

1. Sestřih.....	3
2. Slu7p.....	6
3. Použité zkratky.....	12
4. Seznam citací.....	13

1. Sestřih

Eukaryotní mRNA je syntetizována v podobě prekurzoru (pre-mRNA), který dříve než je transportován z jádra podléhá několika posttranskripčním úpravám: přidání čepičky, polyadenylaci a sestřihu.

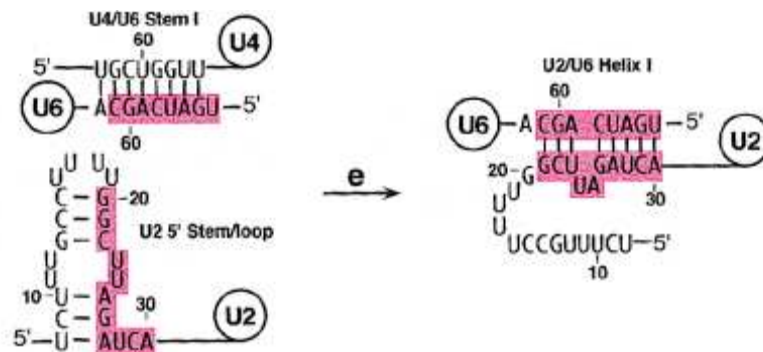
Sestřih pre-mRNA je katalyzován ve spliceosomu, který se skládá z snRNAs, tvořených U1, U2, U4, U5 a U6 snRNA a k nim vázaných proteinů, a volně asociujících proteinových faktorů. Sestřih je vysoce koordinovaný proces, jehož schéma představuje obr. 1.



Obr. 1 Sestřihový cyklus *Saccharomyces cerevisiae* (Grainger a Beggs, 2005)

Výstavba spliceosomu začíná připojením U1 snRNP k 5' sestřihovému místu (5' ss) intronu pre-mRNA. Po odstranění proteinu vážícího se do místa větvení (BBP) dojde k navázání U2 snRNP do oblasti místa větvení (branch point). Tento krok vyžaduje ATP a protein Prp5. U5 snRNP obsahující Prp8p se připojí k U4/U6 di-snRNP a společně vytvoří U4/U6/U5 tri-snRNP. Po navázání U4/U6/U5 tri-snRNP k U2 snRNP, dojde pomocí proteinu Prp28 za přítomnosti

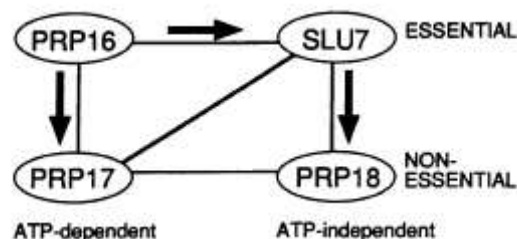
ATP k destabilizaci vazby U1 snRNP, která následně opouští komplex. Pomocí DExD/H box proteinu Brr2, který působí při kritickém přeuspořádání vazeb jednotlivých RNA, dojde k přerušení U4/U6 a vytvoření U2/U6 di-snRNP (obr. 2). U4 snRNP odstupuje ze spliceosomu a spliceosom se stává aktivním.



Obr. 2 Přerušení U4/U6 a vytvoření vazby U2/U6 (Staley a Guthrie, 1998)

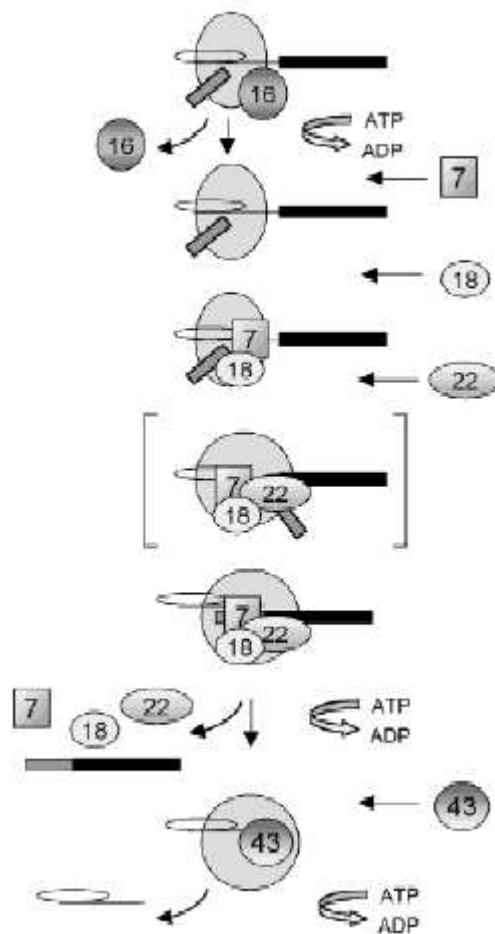
Vlastní sestřih probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku, je pre-mRNA štěpena v 5' ss a vznikají exon1 a lariát-exon2. Ve druhém kroku dochází k štěpení 3' ss. Dojde k uvolnění lariátu a spojení exonu1 a exonu2. Při těchto krocích je potřeba řada proteinů. Například v prvním kroku působí Prp2p, RNA-závislá NTPáza a domnělá RNA helikáza, která přechodně interaguje se spliceosomem a aktivuje ho (Staley a Guthrie, 1998). Ve druhém kroku je to Prp16p, další RNA-závislá NTPáza.

Funkce Prp16p a Prp17p vyžaduje přítomnost ATP, funkce Slu7p stejně tak jako Prp18p je na přítomnosti ATP nezávislá (obr. 3; Jones et al., 1995).



Obr. 3 Genetické interakce mezi sestřihovými faktory 2. kroku. Linie mezi faktory znázorňuje synteticky letální interakci, zatímco šipka znázorňuje skutečnost, že mutovaná alela genu k němuž směřuje šipka může být potlačena velmi silnou expresí genu od něhož vychází šipka (Jones et al., 1995).

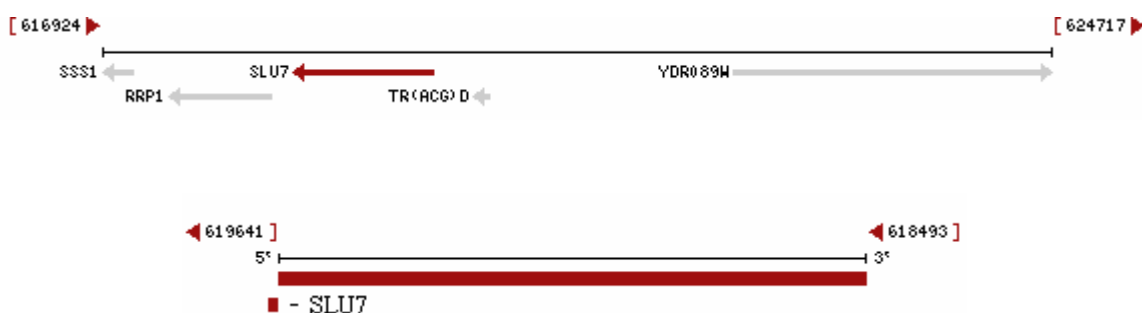
Protein Slu7 se váže do spliceosomu již obsahujícího Prp16p (obr. 4). Následuje uvolnění Prp16p ze spliceosomu, zatímco Slu7p zůstane se spliceosomem spojen. Dále se do spliceosomu připojí další dva proteiny Prp18 a Prp22. Prp22p při ATP-závislé reakci uvolní ze spliceosomu maturovanou mRNA. Dále se uvolní ze sestřihového komplexu, obsahujícího lariát-intron, proteiny Slu7, Prp18 a Prp22. V tomto stádiu dojde k navázání Prp43p, RNA-závislé ATPázy, do zbývajících komplexu. Prp43p uvolní lariát-intron (Zhang et al., 1997). Po ukončení sestřihu je mRNA transportována do cytoplasmy.



Obr. 4 Posloupnost vstupu sestřihových faktorů do sestřihového komplexu (James et al., 2002): 16- Prp16p, 7- Slu7p, 18- Prp18p, 22- Prp22p a 43- Prp43p

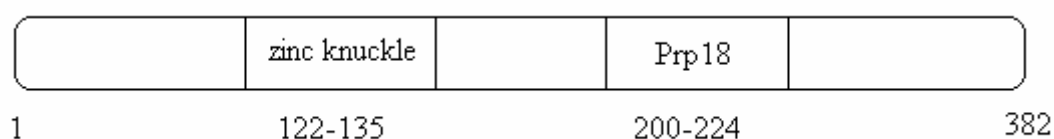
Obr. 5: Alignment Slu7p proteiní rodiny eukaryotních organismů (*Homo sapiens*, *Oryza sativa*, *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*): * shoda, : místa výskytu aminokyselinových zbytků stejného charakteru, · vysoká podobnost, červené orámování – zinc knuckle motiv, zelené orámování - prp18-interakční oblast (*Saccharomyces cerevisiae*), modré orámování – oblast bohatá na lyzín (*Homo sapiens*), podtrženo růžově - jaderný lokalizační signál (*Homo sapiens*), podtrženo oranžově – zbytky leucinu resp. isoleucinu v sekvenci lidského homologa.

Gen SLU7 byl nalezen při hledání synergicky letálních mutací v U5 snRNA a podle toho byl také pojmenován (Frank et al., 1992). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je lokalizován na chromozomu IV v úseku od 618493 do 619641 bp (obr. 6). Slu7p je esenciální (Frank a Guthrie, 1992) a je vyžadován ve druhém kroku sestřihu *in vitro* (Ansari a Schwer, 1995). Pomocí dvouhybridního testování byly nalezeny fyzické interakce proteinu Slu7 s proteiny Brr2, Prp18 a Prp22 (Nues a Beggs, 2001).



Obr. 6: Lokus genu SLU7 na chromozomu IV *Saccharomyces cerevisiae*

Protein Slu7 je složen z 382 aminokyselin a obsahuje dva funkční motivy: tzv. zinc knuckle motiv a Prp18-interakční oblast (obr. 7). Prp18-interakční oblast obsahuje několik alaninů a přispívá k funkci Slu7p *in vivo* (James et al., 2002). Zinc knuckle je vysoce konzervovaným motivem, vyskytuje se u retrovirových gag proteinů, ale je známý i u eukaryot, kde se účastní genové regulace. U všech se vyskytuje v podobě CX₂CX₄HX₄C. Ačkoliv je vysoce konzervovaný, mutační studie genu SLU7 ukázaly, že není esenciální pro růst buňky (Frank a Guthrie, 1992; Zhang a Schwer, 1997; Chua a Reed, 1999).



Obr. 7: Schéma struktury proteinu Slu7

Studiu funkční struktury proteinu Slu7 se dlouhodobě věnuje laboratoř dr. Schwer, Cornell University, NY. Nejprve testovali jaký vliv má na funkci proteinu Slu7 odstranění některých úseků aminokyselin. Odstranili 39 a 80 aminokyselinových zbytků od N-konce a zjistili, že odstranění těchto úseků neovlivnilo růst buněk při kultivační teplotě 17, 25, 30, 32 ani při 37°C. Poté co odstranili z proteinu 124, 162, 183 a 199 N-koncových aminokyselinových zbytků, buňky byly na teplotu citlivé. Po odstranění 221 aminokyselinových zbytků buňky nerostly. Poté se zaměřili na odstranění aminokyselinových zbytků od C-konce a zjistili, že odstraněním více než 47 aminokyselin buňky ztratily schopnost růst. Určili tak minimální esenciální oblast proteinu Slu7, která byla v úseku 200-361 aminokyselin.

Pomocí výše uvedených deletantů určili úsek Slu7p, který je vyžadován pro interakci s Prp18p *in vivo* (200-224). Dále zjistili, že pokud je Slu7p přítomen v nadbytku, Prp18p není striktně vyžadován ve druhém kroku sestřihu *in vitro* (Zhang a Schwer, 1997).

Testováním sestřihových aktivit deletantů $\Delta 80$, $\Delta 124$, $\Delta 162$, $\Delta 183$, $\Delta 199$ a $\Delta 221$ proteinu Slu7 *in vitro*, zjistili, že v nepřítomnosti Prp18p se vytváří mRNA pouze u divoké varianty Slu7p. V přítomnosti Prp18p vytvářeli mRNA všichni deletanti kromě $\Delta 221$. Dále si vytvořili mutanty proteinu Slu7, ve kterých ve vytipovaných motivech cíleně zaměnili aminokyselinové zbytky, a otestovali jejich funkci *in vitro* a *in vivo*. Zjistili, že zinc knuckle motiv je zapojen ve vazbě Slu7p do spliceosomu a že je esenciální pro funkci Slu7p *in vitro* v nepřítomnosti Prp18p (James et al., 2002).

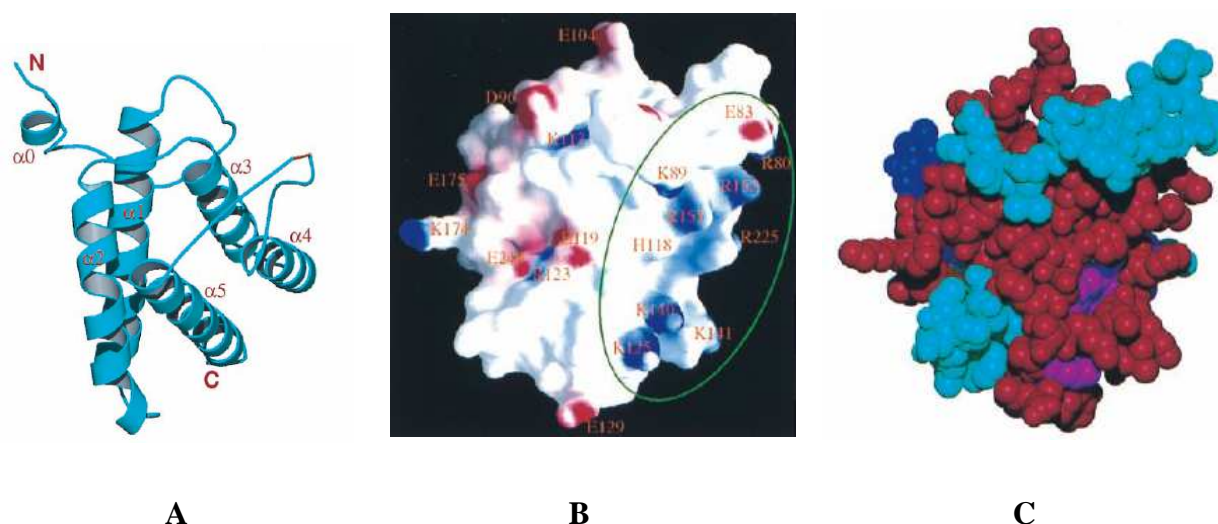
Brys a dr. Schwer testovali jaký vliv má nepřítomnost Slu7p na sestřih aktinové pre-mRNA a pre-U3 RNA. Zjistili, že sestřih U3 prekurzorové RNA nebyl závislý na přítomnosti Slu7p, na rozdíl od aktinové pre-mRNA. Aktinová pre-mRNA má vzdálenost branchpointu a 3' ss 38 nt, pre-U3 RNA je tato vzdálenost 7 nt. Autoři si proto vytvořili varianty aktinové pre-mRNA, ve kterých byla různá vzdálenost bodu větvení a 3' ss (od 7 do 15 nt). Experimentálně zjistili, že u aktinové pre-mRNA, u které byla vzdálenost branchpointu a 3' ss rovna a větší 12 nt, byl sestřih závislý na přítomnosti Slu7p, kratší varianty byly sestřiženy. Aby ověřili, že tato závislost platí obecně, vytvořili pre-U3 RNA se vzdáleností branchpointu a 3' ss 15 nt. U této U3 prekurzorové RNA sestřih proběhl pouze v přítomnosti Slu7p (Brys a Schwer, 1996).

Dále se v laboratoři dr. Schwer zabývali možností, že Prp18p a Slu7p se v sestřihu funkčně zastupují. Použili opět aktinové pre-mRNA s různou vzdáleností branchpointu a 3' ss a zjistili, že sestřih pre-mRNA v nepřítomnosti proteinů Prp18 a Slu7 neproběhne ani je-li u nejkratší varianty se vzdáleností branchpointu a 3' ss rovnou 7 nt. Z toho usoudili, že oba proteiny Prp18 i Slu7, jsou vyžadovány k sestřihu pre-mRNA, ve které je vzdálenost

branchpointu a 3' ss ≥ 12 nukleotidů, ale nejsou potřeba, když je tato vzdálenost ≤ 9 nukleotidů, ve své funkci se však nezastupují (Zhang a Schwer, 1997).

N-koncová zkrácená varianta (Prp18 Δ 79), která je zcela aktivní v sestřihu kvasinek *in vitro*, byla úspěšně krystalizována. Z krystalické struktury je patrné, že jedna strana Prp18 Δ 79 interaguje se Slu7p (obr. 8B- zelená oblast, 8C- červená oblast), zatímco více evolučně konzervované aminokyseliny vytvoří protější stranu (Jiang et al., 2000).

Jádro struktury Prp18 Δ 79 se skládá z pěti α -helixů, označených $\alpha 1 - \alpha 5$. Tyto helixy jsou sbaleny do ucelené globulární struktury. Helix $\alpha 1$ je spojený k přidanému malému N-koncovému helixu $\alpha 0$. $\alpha 1$ a $\alpha 2$ jsou antiparalelní a jsou sbaleny v přibližně 50° úhlu ke svazku tří helixů $\alpha 3$, $\alpha 4$ a $\alpha 5$ (Jiang et al., 2000).



Obr. 8 Prp18 Δ 79 (A, B a C) (Jiang et al., 2000)

A. Celková struktura Prp18 Δ 79 znázorňující $\alpha 1 - \alpha 5$.

B. Povrch struktury Prp18 Δ 79. Pozitivní náboje jsou znázorněny modře a negativní náboje červeně. Zelený kruh identifikuje navrženou Slu7-interakční oblast.

C. Zbytky zapletené v interakci se Slu7p pomocí dvouhybridní metody jsou zbarveny červeně. Konzervované zbytky jsou znázorněny modře, konzervované zbytky, které leží uvnitř Slu7-interakční oblasti jsou zbarveny fialově a všechny další jsou zbarveny azurově.

V laboratoři dr. Reed izolovali cDNA kódující lidského homologa kvasinkového proteinu Slu7 (Chua a Reed, 1999a). Tato cDNA o délce 1758 bp kódovala 586 aminokyselin dlouhý protein s předpokládanou molekulovou hmotností 68 kD. hSlu7p je tak o 204 aminokyselin delší než kvasinkový Slu7p. Porovnáním kvasinkového a lidského proteinu Slu7 se aminokyselinové sekvence proteinů shodují z 24 %, nejvyšší podobnost je v tzv. zinc knuckle motivu.

Lidský protein hSlu7 obsahuje tři funkční motivy, které mají odlišné role v buněčné lokalizaci: jaderné lokalizační signály (NLS), zinc knuckle a lysin bohatou oblast, také obsahuje čtyři jaderné exportní signály (NES), které jsou charakteristické několika úseky leucinů (obr. 9; Shomron et al., 2004).

Lysin bohatá oblast je spojována s několika buněčnými funkcemi například vazba nukleových kyselin, usnadňuje interakci mezi dvěma proteiny, jaderná translokace (Shomron et al., 2004).



Obr. 9: Schématické znázornění hSlu7p motivů (Shomron et al., 2004): Zinc knuckle – černá plocha, NLS – plocha s diagonálním šrafováním, Lys rich (lysin bohatá oblast) - plocha s tečkami, Leu (leucinová oblast) – šedá plocha

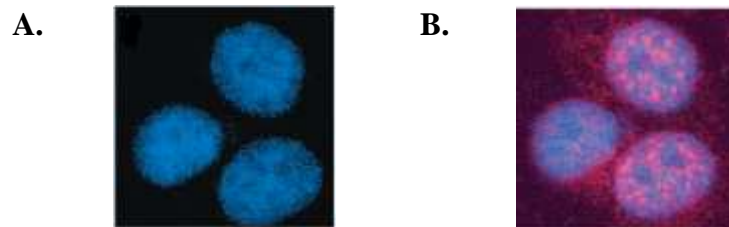
Zinc knuckle motiv lidského proteinu hSlu7 je uložený v NLS a vytváří tak ojedinělou funkční strukturu, která není vyžadovaná pro vstup hSlu7p do jádra, ale k udržení tohoto proteinu uvnitř jádra. NLS motiv tedy určuje buněčnou lokalizaci proteinu hSlu7 přes jadernocytoplasmatickou rovnováhu (Shomron et al., 2004).

Stejně jako kvasinkový Slu7p je hSlu7p sestřihovým faktorem, který se účastní druhého kroku sestřihu po Prp16p/hPrp16p a Prp17p/hPrp17p. Je zapojený ve výběru správného AG 3' ss intronu (Chua a Reed, 1999b).

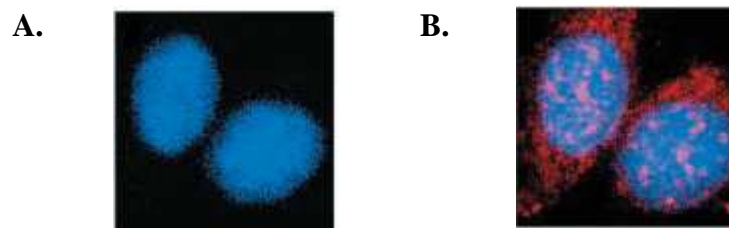
Titéž autoři dále za použití pre-mRNA genů AdML a α -TM zjišťovali, kdy se hSlu7p spojí se spliceosomem. Zjistili, že v případě AdML pre-mRNA se produkty kroku I vytvořily a hSlu7p se připojil ke spliceosomu po 25 minutách. Po 35 minutách se vytvořila mRNA a hSlu7p se nahromadil v jádře. V případě α -TM pre-mRNA se hSlu7p připojil ke spliceosomu a vytvořil se lariát-exon2 po 45 minutách. Po 60 minutách došlo ke zvětšení množství hSlu7p v jádře, ale stále nedošlo k vytvoření mRNA. Autoři tak ukázali, že hSlu7p se spojí se spliceosomem po realizaci prvního kroku sestřihu (Chua a Reed, 1999a).

V nepřítomnosti hSlu7p v jaderném extraktu (Δ hSlu7) dojde po 45 minutách k hromadění spliceosomového komplexu tzv. C_{Δ hSlu7 komplexu. Pokud je přidán hSlu7p do depletovaného extraktu dojde po 45 minutách k vytvoření C komplexu. Autoři proto předpokládají, že C_{Δ hSlu7 komplex může reprezentovat stádia v přechodu mezi kroky I a II (Chua a Reed, 1999a).

Zajímavé je zjištění, že stres mění buněčnou distribuci proteinu hSlu7 a že také ovlivňuje alternativní sestřih. Autoři zjistili, že UV-C a teplotní šok (42°C, 1 hodina), na rozdíl od peroxidázy, sorbitolu, cis-platiny a neocarzinostatinu, ovlivňují buněčnou lokalizaci proteinu hSlu7 (obr. 10 a 11; Shomron et al., 2005).



Obr. 10: Teplotní šok a hromadění proteinu hSlu7 v cytoplazmě HeLa buněk (Shomron et al., 2005): A. barveno DAPI, B. barveno DAPI a antibody hSlu7p (červená oblast – hSlu7p, modrá oblast – jaderná DNA)



Obr. 11: UV-C (0,9 J/cm²) a hromadění proteinu hSlu7 v cytoplazmě HeLa buněk (Shomron et al., 2005): A. barveno DAPI, B. barveno DAPI a antibody hSlu7p (červená oblast – hSlu7p, modrá oblast – jaderná DNA)

Sestřihový faktor hSlu7p hraje důležitou roli ve výběru 3' ss během druhého kroku sestřihu *in vitro* a ovlivňuje alternativní sestřih *in vivo* (Shomron et al., 2005). Stres stimuluje vyvolané změny v alternativním sestřihu a hSlu7p má na něj velký vliv.

Alternativní sestřih je proces, kterým identické pre-mRNA molekuly jsou sestřiženy různým způsobem, což zajistí vytvoření proteinové různorodosti v komplexu organismů. Alternativní sestřih byl nalezen ve spojitosti s řadou onemocnění, které zahrnuje Cystickou fibrózu, Frasierův syndrom, Parkinsonovo onemocnění, svalovou dystrofii, onemocnění sítnice (retinis pigmentosa) a rakovinu. Tyto příklady zahrnují u alternativního sestřihu použití alternativních sestřihových míst, alternativních exonů a alternativních intronů (Venables, 2004).

3. Použité zkratky

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

RNA – Ribonukleová kyselina

hnRNA – heterogenní jaderná RNA

pre-mRNA – prekurzorová RNA

pre-U3 RNA – U3 prekurzorová RNA

snRNP – malá jaderná ribonukleoproteinová částice

cDNA – komplementární DNA

ATP – Adenosintrifosfát

ADP – Adenosindifosfát

BBP – z anglického překladu bbranch point binding protein (protein vážící se do místa větvení)

Leu – Leucin

NLS – Jaderný lokalizační signál

NES – Jaderný exportní signál

UV-C – ultrafialové záření typu C

Slu7p – synteticky lethalní s U5 snRNA

Prp – z anglického pre-mRNA processing (Prp8p, Prp16p, Prp17p, Prp18p, Prp22p, Prp43p, Prp44p)

Brr2p – alias Prp44p

nt – nukleotidy

bp – páry bazí

ss – sestřihové místo

AdML – z anglického překladu adenovirus major late

α -TM – α -Tropomyosin

4. Seznam citací

Ansari A, Schwer B. (1995) SLU7 and a novel activity, SSF1, act during the PRP16-dependent step of yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **14**(16) : 4001-4009

Bacikova D, Horowitz DS. (2002) Mutational analysis identifies two separable roles of the *Saccharomyces cerevisiae* splicing factor Prp18. *RNA* **8**(10) : 1280-1293

Brys A, Schwer B. (1996) Requirement for SLU7 in yeast pre-mRNA splicing is dictated by the distance between the branchpoint and the 3' splice site. *RNA* **2**(7) : 707-717

Chawla G, Sapra AK, Surana U, Vijayraghavan U. (2003) Dependence of pre-mRNA introns on PRP17, a non-essential splicing factor: implications for efficient progression through cell cycle transitions. *Nucleic Acids Res.* **31**(9) : 2333-2343

Chua K, Reed R. (1999a) Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the spliceosome between the catalytic steps of splicing. *Genes Dev.* **13**(7) : 841-850

Chua K, Reed R. (1999b) The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. *Nature* **402**(6758) : 207-210

Coster F, Jonniaux JL, Goffeau A. (1995) Analysis of a 32.8 kb segment of yeast chromosome IV reveals 21 open reading frames, including TPS2, PPH3, RAD55, SED1, PDC2, AFR1, SSS1, SLU7 and a tRNA for arginine. *Yeast* **11**(7) : 673-679

Frank D, Patterson B, Guthrie C. (1992) Synthetic lethal mutations suggest interactions between U5 small nuclear RNA and four proteins required for the second step of splicing. *Mol Cell Biol.* **12**(11) : 5197-5205

Frank D, Guthrie C. (1992) An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev.* **6**(11) : 2112-2124

Grainger RJ, Beggs JD. (2005) Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA* **11**(5) : 533-557

Hu J, Xu Y, Schappert K, Harrington T, Wang A, Braga R, Mogridge J, Friesen JD. (1994) Mutational analysis of the PRP4 protein of *Saccharomyces cerevisiae* suggests domain structure and snRNP interactions. *Nucleic Acids Res.* **22**(9) : 1724-1734

James SA, Turner W, Schwer B. (2002) How Slu7 and Prp18 cooperate in the second step of yeast pre-mRNA splicing. *RNA* **8**(8) : 1068-1077

Jiang J, Horowitz DS, Xu RM. (2000) Crystal structure of the functional domain of the splicing factor Prp18. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7) : 3022-3027

Jones MH, Frank DN, Guthrie C. (1995) Characterization and functional ordering of Slu7p and Prp17p during the second step of pre-mRNA splicing in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21) : 9687-9691

McPheeters DS, Schwer B, Muhlenkamp P. (2000) Interaction of the yeast DExH-box RNA helicase prp22p with the 3' splice site during the second step of nuclear pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* **28**(6) : 1313-1321

Shomron N, Alberstein M, Reznik M, Ast G. (2005) Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. *J Cell Sci.* **118**(Pt 6) : 1151-1159

Shomron N, Reznik M, Ast G. (2004) Splicing factor hSlu7 contains a unique functional domain required to retain the protein within the nucleus. *Mol Biol Cell* **15**(8) : 3782-3795

Staley JP, Guthrie C. (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**(3) : 315-326

Umen JG, Guthrie C. (1995) Prp16p, Slu7p, and Prp8p interact with the 3' splice site in two distinct stages during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **1**(6) : 584-597

Umen JG, Guthrie C. (1995) The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **1**(9) : 869-885

van Nues RW, Beggs JD. (2001) Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**(4) : 1451-1467.

Venables JP. (2004) Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res.* **64**(21) : 7647-7654

Xu D, Field DJ, Tang SJ, Moris A, Bobeckko BP, Friesen JD. (1998) Synthetic lethality of yeast slt mutations with U2 small nuclear RNA mutations suggests functional interactions between U2 and U5 snRNPs that are important for both steps of pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol.* **18**(4) : 2055-2066

Xu D, Friesen JD. (2001) Splicing factor slt11p and its involvement in formation of U2/U6 helix II in activation of the yeast spliceosome. *Mol Cell Biol.* **21**(4) : 1011-1023

Zhang X, Schwer B. (1997) Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res.* **25**(11) : 2146-2152

Zhou Z, Reed R. (1998) Human homologs of yeast prp16 and prp17 reveal conservation of the mechanism for catalytic step II of pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17**(7) : 2095-2106