

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE**

Oddělení fyziologie a biochemie buňky

Praha 2006

**Bakalářská práce**

**RNA HELIKÁZY RODINY DEAH**

Valentová Anna

školitel: RNDr. František Půta, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, na základě konzultací se svým školitelem a s pomocí citované literatury.

Květen 2006

Valentová Anna

## Obsah

1. Úvod .....	3
2. Helikázy .....	4
3. Mechanismus působení helikáz .....	6
4. DExD/H box proteiny tvoří podskupinu SF2 helikáz .....	9
5. Role DExD/H box proteinů při sestřihu pre-mRNA .....	11
5.1 Sestřih pre-mRNA (splicing) .....	11
5.2 Transesterifikace .....	11
5.3 Průběh sestřihu .....	12
6. RNA helikázy rodiny DEAH .....	14
6.1 Prp2p aktivuje spliceosom v prvním kroku .....	16
6.2 Druhý krok pre-mRNA sestřihu a vztahy mezi jednotlivými faktory .....	18
6.3 Prp16p působí před druhým transesterifikačním krokem .....	20
6.4 Prp22p má dvě funkce při sestřihu .....	23
6.5 Prp43p pomáhá při rozvolnění spliceosomu .....	26
7. Závěr .....	28
8. Přehled literatury .....	29

## 1. Úvod

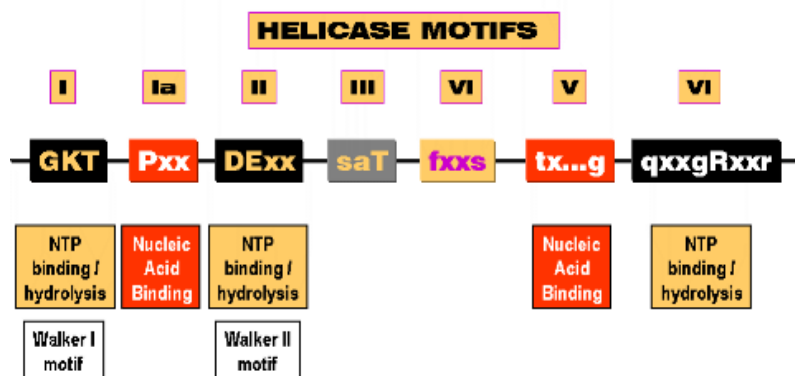
RNA produkty u eukaryotních buněk, které jsou vytvořeny při transkripci, podléhají před vstupem z jádra do cytoplazmy několika úpravám. Sestřih pre-mRNA představuje jednu z kotranskripčních a postranskripčních modifikací. Základním cílem sestřihu je vystřížení intronů a následné spojení exonů za tvorby zralé mRNA. Tento proces probíhá dvěma transesterifikačními kroky za přítomnosti ribonukleoproteinového spliceosomálního komplexu. Během sestřihu dochází k mnoha dynamickým přestavbám sekundární struktury RNA a tyto změny jsou katalyzovány RNA helikázami.

U *Saccharomyces cerevisiae* bylo nalezeno celkem osm esenciálních RNA helikáz, které patří k DExD/H box proteinům a katalyzují konformační přestavby jednotlivých RNA-RNA a RNA-proteinových interakcí v rámci spliceosomu. DExD/H box proteiny se dělí na tři základní rodiny, DEAH, DEAD a DExH. Tato práce se zaměřila na vlastnosti a funkce RNA helikáz z rodiny DEAH účastnících se sestřihu pre-mRNA.

## 2. Helikázy

Helikázy představují rozsáhlou rodinu enzymů, které dokáží od sebe oddělit jednotlivé řetězce nukleových kyselin. Tyto enzymy byly nalezeny u všech organismů a účastní se mnoha důležitých procesů probíhajících v buňce. Jejich hlavní funkcí je katalyzovat reakce, při kterých je hydrolyza nukleosidtrifosfátu (obvykle ATP) spojena s odvíjením duplexů nukleových kyselin ve směru 3'→5', 5'→3' nebo oběma směry. Helikázová aktivita je často vyžadována u procesů, které se týkají zejména metabolismu nukleových kyselin v buňce včetně replikace chromosomů či plazmidů, dále pak při transkripci, translaci, tvorbě RNA a také při rekombinaci a reparaci DNA (Schmid a Linder, 1992).

Odhaduje se, že více než-li 2% genomu *Saccharomyces cerevisiae* představují sekvence kódující helikázy či helikázám příbuzné proteiny (Shiratori *et al.*, 1999). Vlastní helikázy mohou být tříděny mnoha způsoby, jedním z nejčastěji používaných je dělení na základě sekvenční podobnosti. Tímto způsobem bylo vytvořeno pět hlavních skupin (Gorbalenya a Koonin, 1993). Mezi největší patří superrodina 1 a 2 (SF1 a SF2), z nichž většina působí při disociaci duplexů ve směru 3'→5'. Pro tyto dvě hlavní skupiny je charakteristické, že mají helikázovou doménu obsahující sedm motivů nazývaných I, Ia, II, III, IV, V a VI (viz obr. 1). Tato doména je u SF2 helikáz ze 75% konzervována (Gorbalenya a Koonin, 1993). Další motivy jsou méně konzervované a liší se mezi SF1 a SF2 proteiny.



Obr. 1. SF2 helikázy obsahují sedm konzervovaných helikázových domén. Aminokyselinové zbytky konzervované minimálně z 80% jsou označeny velkým písmenem a konzervované mezi 50-79% jsou písmenem malým, x představuje jakýkoliv aminokyselinový zbytek (převzato podle Jankowsky a Jankowsky, 2000; [www.helicase.net/dexhd/about-p.htm](http://www.helicase.net/dexhd/about-p.htm)).

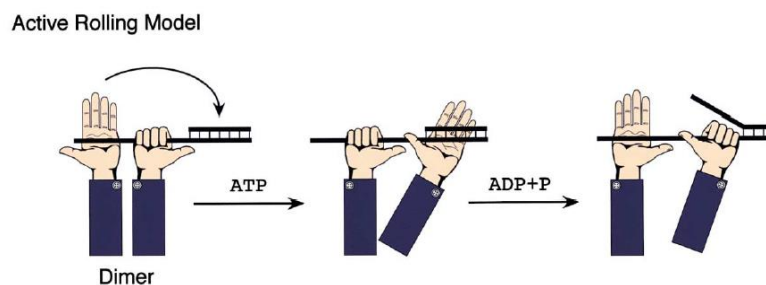
Třetí skupinou jsou helikázy označované SF3, nejčastěji nalezené u DNA a RNA virů, které obsahují pouze tři konzervované motivy I, II a III. Čtvrtou odlišnou skupinou jsou helikázy podobné *E. coli* DnaB hexamerní helikáze (*Dna B-like hexameric helicases*) a pátá velmi malá skupina obsahuje enzymy zastoupené např. bakteriálním transkripčním terminačním faktorem Rho (*Bacterial transcription termination factor Rho-like helicases*).

Při bližší analýze sekvencí jednotlivých genomů u různých organismů bylo identifikováno značné množství otevřených čtecích rámců (ORF), které obsahují některé či všechny charakteristické helikázové motivy. U některých takto identifikovaných proteinů byly dále studovány biochemické vlastnosti *in vitro* a vyšlo najevo, že pouze nepatrná část skutečně vykazuje helikázovou aktivitu. Jedním z možných vysvětlení je, že helikázy *in vivo* se stávají funkčními pouze za předpokladu, že tvoří součást multiproteinového komplexu nebo mohou vyžadovat předchozí aktivaci např. fosforylací (Singleton a Wigley, 2002, minireview).

### 3. Mechanismus působení helikáz

Přesné detaily helikázové aktivity nejsou doposud zcela známy. Není jisté, jestli odvíjení duplexu je aktivní či pasivní s ohledem na hydrolyzu nukleosidtrifosfátů, a zda-li je volná energie takto získaná použita pro posunutí a oddělení duplexu či pouze pro pouhé posunutí helikázy podél řetězce. Studie provedené v posledních letech prokázaly, že minimálně některé helikázy aktivně destabilizují duplexy nukleových kyselin v místě jedno a dvouřetězcového spojení a volná energie získaná z hydrolyzy nukleosidtrifosfátů pokrývá oba kroky, posun helikázy i odvíjení řetězců (Soulтанas *et al.*, 2000). Volná energie získaná z hydrolyzy ATP za přirozených podmínek,  $\Delta G^\circ$ , je přibližně -10kCal/mol a k disociaci AT či GC páru je v průměru potřeba +1,6 Kcal/mol, z čehož bylo odvozeno spojení mezi hydrolyzou ATP a posunutím helikázy o několik nukleotidů (Singleton a Wigley, 2002, minireview).

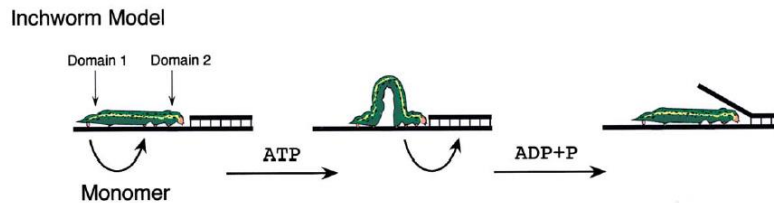
Mechanismus, kterým helikázy rozvolňují duplexy nukleových kyselin, byl studován biochemickými a strukturními metodami. Byly navrženy celkem dva modely *Active rolling model* a *Inchworm model* (Soulтанas *et al.*, 2000; Tanner a Linder, 2001, review). *Active rolling model* je určen pro helikázy tvořící dimerní molekuly a každý dimer se vyskytuje ve dvou odlišných konformačních stavech. První stav je charakterizován vysokou afinitou pro jednořetězcové formy RNA nebo DNA, druhý naopak váže silněji nukleové kyseliny ve dvouřetězcovém uspořádání. Vzájemný přechod z jednoho konformačního stavu do druhého je umožněn vazbou a hydrolyzou NTP. Helikázový dimer tedy působí mechanismem „hand-over-hand“.



Obr.2. *Active rolling model* působení helikáz (Tanner a Linder, 2001).

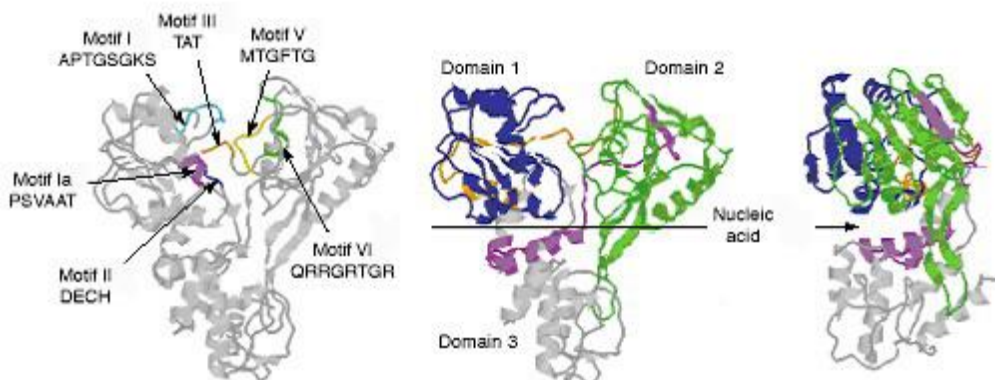
*Inchworm model* lze aplikovat jak na monomerní tak také na oligomerní uspořádání molekul, kdy helikáza podstupuje konformační změny asociované s vazbou a hydrolyzou NTP, které přibližují nebo oddalují určité části proteinu, které jsou odpovědné za vazbu k substrátu. Helikáza nasedá na 3' nebo 5'volný přesahující konec a postupně odstraňuje navázané faktory. Mezi tyto faktory se řadí nejen druhý řetězec odvinovaného duplexu, ale i různé asociované proteiny. Mechanismu byl studován hlavně na SF1 a SF2 enzymech,

protože představují monomerní zástupce helikáz, a předpokládá se, že jeho modifikovaná verze je aplikovatelná i na hexamerní uspořádání. V současnosti se tímto modelem vysvětluje nejčastěji mechanismus RNA helikázové aktivity.



Obr.3. *Inchworm model* působení helikáz (Tanner a Linder, 2001).

Na základě krystalové struktury RNA helikázy NS3 pocházející z viru hepatitidy C a patřící k SF2 helikázám (DEXH helikáza), byl vytvořen strukturní model působení RNA helikáz. Celkem byly získány dva tyto strukturní modely závislé na přítomnosti nebo nepřítomnosti jednořetězcového polynukleotidu (Kim *et al.*,1998). NS3 protein je tvořen N-koncovou serin proteázovou částí pokrývající 181 aminokyselinových zbytků a C-koncová část dlouhá 456 aminokyselinových zbytků představuje RNA helikázu. Bylo prokázáno, že tyto dvě části mohou být na sobě nezávisle exprimovány. Při tvorbě krystalové struktury byla proto použita pouze ta oblast, která pokrývá vlastní helikázovou aktivitu. Tato oblast sestává ze tří globulárních domén, jejichž terciální struktura vytváří tvar písmene Y. N-koncová doména 1 obsahuje NTPázový motiv I (APTGSGKS) a II (DECH). Doména 2 rozeznává



Obr. 4. Struktura NS3 RNA helikázy (HCV): pohled zepředu a ze strany; doména 1(modře), flexibilní oblast (oranžově), doména 2 (zeleně), doména 3 (fialově) (převzato a upraveno podle Kim *et al.*, 1998).



RNA a obsahuje motiv VI (QRRGRTGR). Postranní řetězce aminokyselin v motivech I a II koordinují dvojmocný kation hořčíku  $Mg^{2+}$  a váží  $\beta$  fosfát ATP, zatímco argininy z motivu VI váží  $\alpha$  a  $\gamma$  fosfáty ATP (viz obr.1 a 4). Doména 1 a doména 2 jsou spojeny prostřednictvím flexibilní oblasti, která obsahuje motiv III (TAT). Při uspořádání proteinu do terciální struktury se vytvoří malá štěrbina umístěná mezi těmito dvěma doménami. Velikost štěrbinu umožňuje helikáze vázat pouze jednořetězcovou formu nukleové kyseliny. Při vazbě ATP a nukleové kyseliny dochází ke konformační změně, která štěrbinu uzavře. Po hydrolyze ATP uvolněná energie způsobí její otevření a následný posun proteinu o několik bazí podél polynukleotidu ve směru 3' -> 5' (Kim *et al.*, 1998).

#### 4. DExD/H box proteiny tvoří podskupinu SF2 helikáz

Obecně lze helikázy rozdělit do tří skupin podle typu substrátu, který stimuluje jejich aktivitu, DNA helikázy, RNA helikázy a helikázy stimulované oběma typy nukleových kyselin.

Molekuly RNA představují skupinu nukleových kyselin, které nesou informační, strukturální a katalytickou funkci a mají schopnost tvorby intermolekulárních interakcí, které hrají významnou úlohu při sestavení např. spliceosomu či biogenezi ribosomu. Při těchto procesech dochází k tvorbě různých RNA-RNA interakcí, přičemž některé jiné RNA-RNA interakce, které jsou nezbytné k dokončení dané reakce, jsou vzájemně vylučné s původně vytvořenými interakcemi. K tomu, aby mohlo dojít k přeměnám těchto jednotlivých vazeb, slouží v buňce RNA helikázy. Nedávná studie odhalila, že některé tyto helikázy mohou sloužit i jako RNPázy, nebo-li enzymy schopné přerušit interakci mezi RNA a proteiny (Jankowsky *et al.*, 2001). Na rozdíl od DNA helikáz, které jsou označovány jako *processive DNA helicases*, většina RNA helikáz dokáže rozvolnit pouze kratší duplexní oblasti a k této reakci je vyžadována přítomnost většího množství enzymu než-li je substrátu. Také samotný mechanismus působení RNA helikáz není přesně znám, proto se používá označení *putative RNA helicases*.

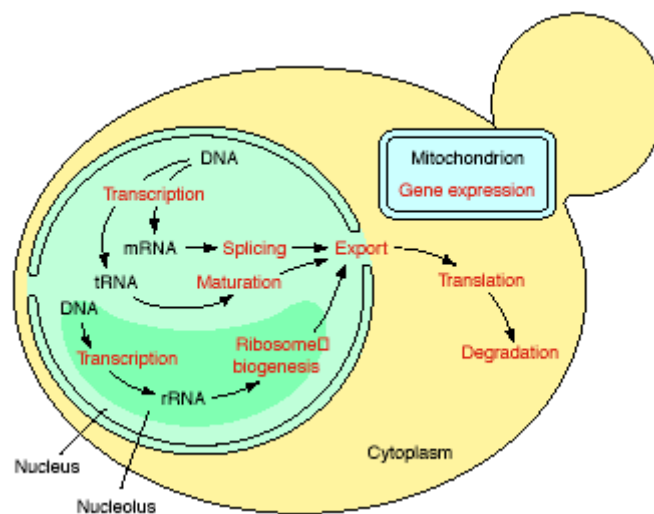
DExD/H box proteiny představují helikázy, které se řadí do SF2 skupiny a hrají roli v mnoha procesech probíhajících v buňce (de la Cruz *et al.*, 1999). Při bližším studiu genomu *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno na základě sekvenční homologie, že minimální počet DExD/H box helikáz se pohybuje kolem čtyřiceti zástupců. RNA helikázová aktivita byla prokázána minimálně u dvacetišesti členů. Tyto proteiny sdílí vysoce konzervovanou helikázovou doménu, která obsahuje motiv DExD/H (označení aminokyselin typických pro tento motiv), na jehož základě se tyto proteiny dělí do jednotlivých rodin označovaných DEAD, DEAH a DExH (Staley a Guthrie, 1998; Gorbalenya a Koonin, 1993). Helikázová doména u DExD/H box proteinů obsahuje nejčastěji sedm až devět konzervovaných motivů, které jsou nezbytné pro vazbu a hydrolyzu ATP, vazbu k RNA a k vlastní helikázové aktivitě. Charakteristické sekvenční motivy jsou konzervované od bakterií až po člověka (Schmid a Linder, 1992).

	motiv						
	I.	I.a	II.	III.	IV.	V.	VI.
<b>DEAH</b>	GETGSGKT	TQPRRVAA	DEAH	SAT	LxFxTG	TNIAETSxT	QRxGRAGR
<b>DEAD</b>	TGTGKT	PTRELA	DEAD	SAT	VIF	RGL	HRxGRxGR
<b>DExH</b>	TGxGKT	PxxAL	DExH	S/TAT	FxxS	T	QRxGRxGR

Tab. 1. Charakteristické sekvenční motivy DEAH, DEAD a DExH proteinů. Velkým písmem jsou označeny identické aminokyselinové zbytky, x představuje rozdílné (převzato a upraveno podle Jankowsky a Jankowsky, 2000).

Mnoho DExD/H box proteinů obsahuje mimo vlastní helikázové domény i některé jiné. Těmito dodatečnými doménami interagují s určitými proteiny, které mají pravděpodobně regulační roli a představují kofaktory. Při studiu aktivity těchto helikáz *in vitro* byla nalezena velmi malá substrátová specifita pro odvíjení RNA duplexů. Vzhledem k tomu, že RNA helikázy se účastní mnoha buněčných procesů, tyto proteinové kofaktory pravděpodobně určují jejich specifitu k vhodnému komplexu a řídí jejich helikázovou aktivitu (Silverman *et al.*, 2003).

Jednotliví zástupci DExD/H box proteinů hrají určitou roli v různých stádiích metabolismu RNA, např. při transkripci, v kotranskripčních a posttranskripčních úpravách pre-mRNA, RNA editingu, při exportu z jádra do cytoplazmy, stabilitě RNA, dále pak při translaci a biogenezi ribozomu a také při RNA interferenci. RNA helikázy odvíjejí krátké duplexy RNA, přerušují RNA-proteinové interakce nebo působí jako pomocné chaperony při uspořádávání RNA do sekundární struktury (viz obr. 5).



Obr. 5. Buněčné procesy vyžadující přítomnost RNA helikáz (převzato podle de la Cruz *et al.*, 1999).

## 5. Role DExD/H box proteinů při sestřihu pre-mRNA

### 5.1 Sestřih pre-mRNA (splicing)

Při transkripci pomocí RNA polymerázy II vzniká primární transkript (neboli heterogenní jaderná RNA, hnRNA). HnRNA dále podstupuje několik úprav, na jejichž základě vzniká funkční mRNA. Tyto kotranskripční a posttranskripční úpravy RNA (pre-mRNA processing) probíhají v jádře a sestávají z přidání čepičky k 5'konci (RNA capping), polyadenylaci 3'konce a odstranění intronů sestřihem pre-mRNA (RNA splicing).

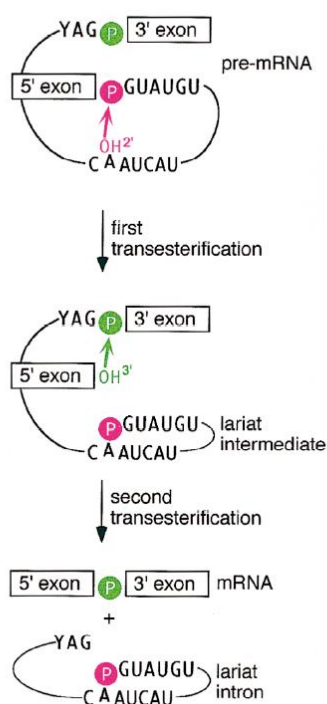
Základním cílem sestřihu je vystřížení intronů z primárního transkriptu a následné spojení exonů. U *Saccharomyces cerevisiae* byly introny nalezeny u 235 genů z celkového počtu přibližně 6000 genů. V nascentní pre-mRNA jsou intronové oblasti specifikovány pomocí tří krátkých konzervovaných sekvencí nacházejících se v okolí 5' a 3'konců intronu. U kvasinek jsou tyto sekvence určeny takto: 5'sestřihové místo R/GUAUGU, branch site s branchpointem UACUAAC a 3'sestřihové místo YAG. Tyto sekvence jsou rozpoznány během sestavení spliceosomu, který představuje ribonukleoproteinový komplex skládající se z pěti U snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles), U1, U2, U4/U6.U5 a nejméně z dalších 80 non snRNP proteinů. U snRNP partikule jsou složeny z šesti až deseti proteinů, které obsahují různé vazebné motivy, a U snRNA, které patří do podrodiny snRNA bohatých na uracil. Hlavní funkcí těchto partikulí je přiblížení obou konců intronu při sestřihu.

### 5.2 Transesterifikace

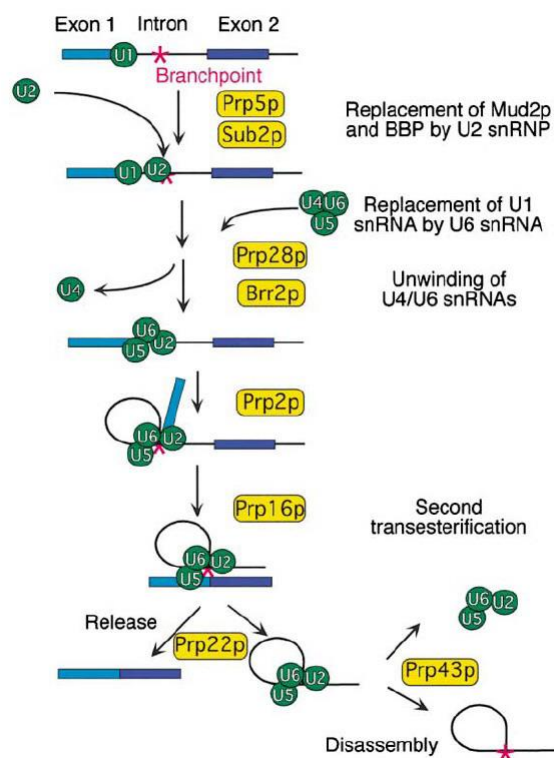
Jaderný sestřih pre-mRNA probíhá dvěma následnými transesterifikačními reakcemi (Staley a Guthrie, 1998). Transesterifikace je proces, při kterém je v každé reakci jedna fosfodiesterová vazba vyměněna za jinou, to znamená, že celkový počet vazeb zůstává zachován. Energie uvolněná při rozštěpení vazby mezi nukleotidy je využita k tvorbě jiné vazby, tedy pro samotnou transesterifikaci není vyžadováno dodání energie z vnějšku. V prvním katalytickém kroku 2'volná hydroxylová skupina posledního adenosinu (branchpointu) v konzervované sekvenci (UACUAAC) nukleofilně napadá fosfodiesterovou vazbu v 5'sestřihovém místě. Dochází k tvorbě lasovité struktury spojené s 3'koncem druhého exonu. V druhém katalytickém kroku 3'hydroxylová skupina 5'koncového prvního exonu opět nukleofilně napadne fosfodiesterovou vazbu tentokrát v 3'sestřihovém místě a dojde k spojení dvou exonů (viz obr. 6). Lasovitá struktura je pomocí debranching enzymu linearizována hydrolýzou 5'-2'fosfodiesterové vazby v branchpointu a takto vzniklý lineární intron je poté odstraněn pomocí specifických RNáz.

### 5.3 Průběh sestřihu

Před prvním transesterifikačním krokem se U1 snRNP váže k 5'sestřihovému místu a specifita této vazby je zajištěna párováním mezi sekvencí intronu v této oblasti a U1 snRNA .



Obr. 6. Průběh dvou transesterifikačních kroků při sestřihu pre-mRNA. První transesterifikační krok je znázorněn červeně, druhý zeleně (převzato podle Staley a Guthrie, 1998).



Obr. 7. Průběh sestřihu pre-mRNA a RNA helikázy DExD/H box proteinů a jejich role při jednotlivých fázích (převzato a upraveno podle de la Cruz, *et al.*, 2003).

Tato počáteční interakce je na ATP nezávislá, ale každý následující krok je už zcela závislý na hydrolýze ATP potřebné k přestavbám uvnitř spliceosomu. Tyto přestavby umožňují vzájemný kontakt jednotlivých komponent nezbytných při sestřihu. Oblast mezi branchpointem a 3'sestřihovým místem je rozeznána vazbou BBP (branchpoint binding protein) a Mud2p, který představuje kvasinkový ortholog savčího sestřihového faktoru U2AF<sup>65</sup> (Abovich *et al.*, 1994). Výběr 3'sestřihového místa pro druhý transesterifikační krok je

úzce spjat s předchozím rozpoznáním sekvence nacházející se v okolí branchpointu. Jako 3'sestřihové místo je určen první dinukleotid AG od branchpointu s optimální vzdáleností osmnácti až dvacetidvou nukleotidů (Chen *et al.*, 2000). Po vazbě U1 snRNP se váže další partikule U2 snRNP k sekvenci v blízkosti branchpointu. Samotný adenosin je z této interakce vynechán, neboť později působí při nukleofilním napadení 5'sestřihového místa.

Poté následuje vazba U4/U6.U5 tri snRNP a dochází k rozsáhlým konformačním změnám. Uvolní se U4 snRNP, která doposud sloužila k udržení U6 snRNA v neaktivním stavu, protože tato podjednotka tvoří vlastní katalytické centrum spliceosomu. Následuje párování U2 s U6 snRNP (vedení U6 snRNA do aktivního stavu), uvolnění U1 snRNP a interakce 5'sestřihového místa s U5 a U6 snRNP. Čistě proteinový NTC komplex, který se váže k spliceosomu po uvolnění U1 a U4 snRNP, umožní stabilní asociaci U5 a U6 snRNP se spliceosomem (Chan *et al.*, 2003). Tento esenciální NTC komplex (NineTeen Complex) sestává minimálně z jedenácti proteinů. Prvně byl popsán v roce 1994 a nazván podle kvasinkového sestřihového faktoru Prp19p (Tarn *et al.*, 1994).

Během sestřihu jsou dynamické přestavby sekundární struktury RNA uvnitř spliceosomu důležité pro správné rozpoznání intronu a pro vytvoření katalytického jádra. Proteiny patřící do DExD/H box rodiny hrají důležitou roli v řízení těchto přestaveb pomocí rozvolnění RNA duplexů vytvořených během sestřihu např. mezi jednotlivými snRNA či mezi snRNA a pre-mRNA. Ačkoliv vlastní sestřih nevyžaduje energii, k těmto přestavbám v rámci spliceosomu je vyžadována energie získaná hydrolýzou ATP, a proto se tyto proteiny označují jako RNA-závislé NTPázy/RNA helikázy. U *Saccharomyces cerevisiae* bylo doposud nalezeno celkem osm esenciálních proteinů z DExD/H box rodiny (viz obr.7), které se účastní této reakce: Brr2p (znám také pod názvy Snu246p, Rss1p a Slt22p), Prp2p, Prp5p, Prp16p, Prp22p, Prp28p, Prp43p<sup>1</sup>, Sub2p (review Silverman *et al.*, 2003). Hydrolýza ATP je vyžadována pro sestavení spliceosomu, pro oba katalytické kroky a pro uvolnění mRNA a následný rozpad zbylého spliceosomálního komplexu.

---

<sup>1</sup> Zkratka Prp (pre-mRNA processing) označuje proteiny účastnící se sestřihu u *Saccharomyces cerevisiae*, které se uplatňují při vazbě snRNP částic k RNA nebo vykazují helikázovou aktivitu.

## 6. RNA helikázy rodiny DEAH

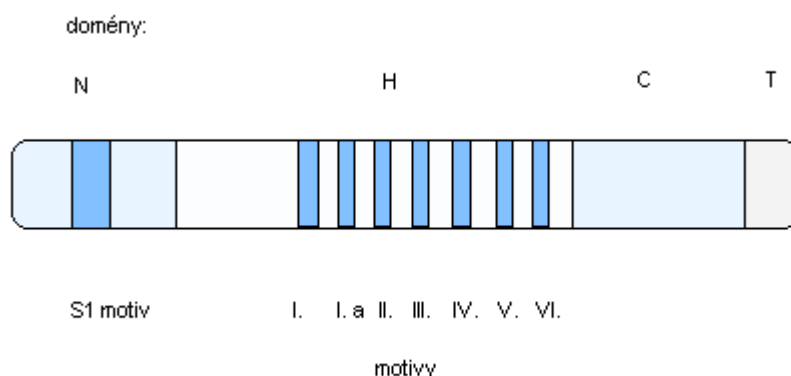
DEAH rodina představuje helikázy náležející do DExD/H box proteinů a tvoří sesterskou skupinu DEAD a DExH helikáz. Vlastní název vychází z II motivu (DEAH) v helikázové doméně, který označuje konzervované aminokyseliny zastoupené u všech helikáz z této rodiny (Staley a Guthrie, 1998; Gorbalenya a Koonin, 1993).

Helikázy rodiny DEAH u *Saccharomyces cerevisiae* představují skupinu sedmi členů (dle Saccharomyces Genome Database) a účast při sestřihu pre-mRNA byla potvrzena pro čtyři její zástupce, Prp2p, Prp16p, Prp22p a Prp43p. Ostatní tři, Ecm16p, Dhr2p a Mph1p, se podílí na jiných buněčných procesech vyžadujících přítomnost těchto helikáz.

Ecm1p je esenciální ATP-závislá RNA helikáza specifická pro U3 snoRNP, převážně lokalizovaná v jadérku a vyžadovaná pro syntézu 18S rRNA (Shiratori *et al.*, 1999). Dhr2p je RNA-závislá helikáza působící také při syntéze 18S rRNA (Colley *et al.*, 2000). Mph1p je DNA i RNA helikáza, která chrání genomovou DNA před spontánně a chemicky indukovaným poškozením (Scheller *et al.*, 2000).

Ostani čtyři helikázy této rodiny se účastní různých fází sestřihu pre-mRNA. Prp2p aktivuje spliceosom před prvním transesterifikačním krokem (Kim *et al.*, 1996), Prp16p působí před druhým transesterifikačním krokem (Schwer a Guthrie, 1992), Prp22p hraje roli při druhém transesterifikačním kroku sestřihu a při uvolnění mRNA ze spliceosomu (Company *et al.*, 1991; Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998) a Prp43p se podílí na rozvolnění spliceosomu a uvolnění lariátové struktury (Arenas a Abelson, 1997; Martin *et al.*, 2002).

Na RNA závislá ATPásová aktivita byla zjištěna u Prp2p, Prp16p, Prp22p i u Prp43p, ale pouze pro Prp16p a Prp22p byla prokázána spojitost mezi energií získanou při hydrolyze



Obr. 8. Schematické znázornění jednotlivých domén a motivů, které se vyskytují u RNA helikáz rodiny DEAH účastnících se sestřihu pre-mRNA (S1 motiv je přítomen pouze u Prp22p a T doména není u Prp2p).

ATP a následným odvinutím duplexů RNA *in vitro* (Schwer a Guthrie, 1991; Kim *et al.*, 1992; Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998, Martin *et al.*, 2002).

Všechny tyto helikázy obsahují tři základní domény: N-koncovou unikátní doménu, H-helikázovou/ATPázovou doménu, která sestává ze sedmi motivů a je vysoce konzervovaná u všech DExD/H box proteinů (Tab. 2), a C-koncovou doménu, pro níž je typická konzervovanost právě uvnitř rodiny DEAH. U helikáz zastoupených Prp16p, Prp22p a Prp43p je za C-koncovou doménou přítomna ještě T (tail) doména (viz obr. 8).

<b>H-helikázová/ATPázová doména</b>				
<b>motiv</b>	<b>Prp2p</b> ( 876 aa)	<b>Prp16p</b> (1071 aa)	<b>Prp22p</b> (1145 aa)	<b>Prp43p</b> (767 aa)
I. (GETGSGKT)	246-253	373-380	506-513	116-123
I.a (TQPRRVAA)	276-283	403-410	534-541	146-153
II. (DEAH)	346-349	473-476	603-606	215-218
III. (SAT)	378-380	505-507	635-637	247-249
IV. (LxFxTG)	439-444	567-572	695-700	307-312
V. (TNIAETSxT)	501-509	638-646	757-765	376-384
VI. (QRxGRAGR)	548-555	685-692	804-811	423-430

Tab. 2. Struktura H-helikázové/ATPázové domény sestřihových RNA helikáz rodiny DEAH se sedmi konzervovanými motivy. Identické aminokyselinové zbytky jsou označeny velkým písmenem, x představuje jakýkoliv aminokyselinový zbytek (data získána ze sekvencí RNA helikáz rodiny DEAH u *Saccharomyces cerevisiae* z databáze [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) a tyto sekvence byly srovnány za pomoci programu Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW, [www.align.genome.jp](http://www.align.genome.jp)).



## 6.1 Prp2p aktivuje spliceosom v prvním kroku

Sestřihový faktor Prp2p (100 KDa, 876 aa) je RNA dependentní ATPáza, která aktivuje spliceosom před prvním transesterifikačním krokem (Kim *et al.*, 1996). Gen PRP2 je u *Saccharomyces cerevisiae* umístěn na XIV. chromosomu. Po interakci Prp2p se spliceosomem dochází k vazbě a hydrolýze ATP a spliceosom podstupuje několik strukturálních změn, které jsou katalyzovány pomocí této helikázy. Dochází k aktivaci spliceosomu a uvolnění RNA helikázy.



Obr. 9. Struktura Prp2p (876 aa). N-koncová doména (245 aa) je znázorněna barvou černou, H-helikázová/ATPázová doména červenou a C-koncová doména (321 aa) je modře, u Prp2p není přítomna T-doména (převzato a upraveno podle Wang *et al.*, 1998).

Prp2p hydrolyzuje všechny běžné NTP a dNTP a tato schopnost byla prokázána i pro příbuzné DEAH helikázy Prp16p a Prp22p (Schwer a Guthrie, 1991; Kim *et al.*, 1992; Schwer a Gross, 1998; Wang *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2004).

Bylo zjištěno, že Prp2p se váže k spliceosomu prostřednictvím malého proteinu Spp2p (23 KDa, 185 aa). Spp2p je základní sestřihový faktor a původně byl izolován jako genetický supresor *prp2* (Last *et al.*, 1987). Pomocí dvouhybridní analýzy s použitím Prp2p jako návnady byla potvrzena interakce těchto dvou proteinů a tato vazba byla dále studována jak genetickými tak i biochemickými metodami (Roy *et al.*, 1995). Při následném opakování tohoto pokusu s užitím Spp2p jako návnady, byla zachycena C-koncová polovina Prp2p. Vytvořené mutace v této části proteinu zapříčinily defekt ve vazbě helikázy k spliceosomu pravděpodobně v důsledku přerušené interakce mezi Spp2p a Prp2p (Silverman *et al.*, 2004). Deleční studie 42 C-koncových aminokyselinových zbytků způsobila neschopnost interakce proteinu se spliceosomem *in vitro* i *in vivo* (Gilbert *et al.*, 2004) a potvrdila předchozí nálezy.

Spp2p obsahuje konzervovaný motiv jedenácti aminokyselinových zbytků bohatých hlavně na glycin (G patch motiv). Tento motiv byl nalezen u mnoha RNA vazebných proteinů. Dále byla identifikována pomocí záměnových mutací jedenáctimerní oblast D<sup>845</sup>C<sup>846</sup>-W<sup>855</sup>L<sup>856</sup> v C-koncové části Prp2p, která je důležitá pro funkci proteinu *in vivo*. Z těchto pozorování vyplývá, že interakce mezi C-koncovou částí Prp2p (DC-WL oblast) a Spp2p (G patch motiv) je esenciální pro sestřih a tedy i životaschopnost buňky. Vlastní DC dipeptid a k němu přilehající aminokyselinové zbytky (845.-853.) se značně liší u jiných DEAH sestřihových

helikáz, ale v rámci kvasinkového rodu *Saccharomyces* u Prp2p proteinů je tato sekvence vysoce konzervovaná. Stejně tak i přítomnost proteinu Spp2p, jehož homolog nebyl doposud identifikován u jiných organismů. Spp2p tedy představuje určitý kofaktor pro Prp2p *Saccharomyces cerevisiae* pro vazbu k spliceosomu. U ostatních DEAH helikáz účastnících se sestřihu je přítomna ještě T (tail) doména za C-koncovou doménou, která je bohatá na pozitivně nabitě aminokyseliny. Protože protein Spp2p je také vysoce nabitý, může představovat pro Prp2p to, co pro ostatní helikázy N a T-doména (Silverman *et al.*, 2004).

Při delečních studiích byla prokázána esencialita C-koncové domény (viz řečeno dříve). Naproti tomu studium N-koncové části odhalilo postradatelnost 206 aminokyselinových zbytků *in vitro* i *in vivo* (kromě úseku mezi 83.-88. aminokyselinovým zbytkem, kdy tato část je odpovědná za jadernou lokalizaci) (Gilbert *et al.*, 2004).

K homologním proteinům Prp2p náleží HrpAp identifikovaný u *Escherichie coli* (Moriya *et al.*, 1995) a lidský homolog hDbp2p (Imamura *et al.*, 1998).

<b>Affinity capture-MS<sup>2</sup></b>	Cef1p, Taf4p, Hsp82p, Prp6p, Lsm6p, Prp3p, Prp31p, Prp8p, Sme1p, Prp4p, Smx3p, Rrp12p, Spp2p
<b>Two hybrid<sup>3</sup></b>	Cin2p, Brr2p, Spp2p
<b>Dosage rescue<sup>4</sup></b>	Sar1p, Reg1p
<b>Phenotypic enhancement<sup>5</sup></b>	Ski6p, Rrp6p, Rat1p, Kem1p
<b>Synthetic growth defect<sup>6</sup></b>	Elp2p, Elp4p, Elp6p,
<b>Synthetic lethality<sup>7</sup></b>	Snu114p
<b>Synthetic rescue<sup>8</sup></b>	Prs1p, Prp3p, Prp4p

Tab. 3. Proteiny se kterými Prp2p vstupuje do fyzické nebo genetické interakce (dle *Saccharomyces Genome Database*, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Anglické označení interakcí je vysvětleno a uvedeno níže.

<sup>2</sup> Protein-návnada je afinitně vytažen z buněčného extraktu pomocí polyklonálních protilátek nebo za využití epitopového tagu. Asociované proteiny s proteinem-návnadou jsou poté identifikovány metodou MS.

<sup>3</sup> Protein-návnada je fúzovaný s DNA-vazebnou doménou, protein-kořist (nejčastěji představuje knihovnu proteinů) je fúzovaný s DNA-aktivační doménou. Specifická interakce mezi těmito dvěma částmi umožní aktivaci transkripce určitého selekčního nebo detekčního genu.

<sup>4</sup> Protein suprimuje lethální efekt delece genu, je-li nadprodukován.

<sup>5</sup> Mutace nebo nadprodukce určitého genu způsobí zesílení fenotypu spojeného s mutací nebo nadprodukcí genu jiného.

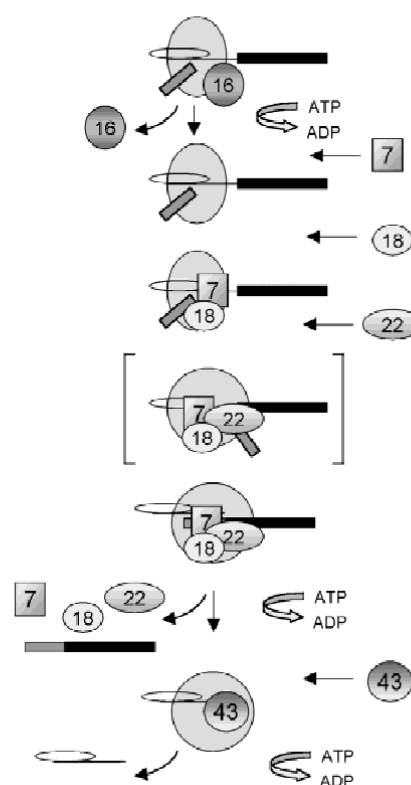
<sup>6</sup> Mutace v oddělených genech, kdy každý jimi produkováný protein sám o sobě způsobuje minimální fenotyp, zapříčiní závažný růstový defekt při kombinaci obou těchto mutací.

<sup>7</sup> Je situace, kdy kombinace dvou mutací je pro buňku lethální, přestože samotný výskyt každé z nich lethality nezpůsobí.

<sup>8</sup> Mutace nebo delece jednoho genu zachrání buňku nesoucí jinak lethální mutaci nebo deleci genu jiného.

## 6.2 Druhý krok pre-mRNA sestřihu a vztahy mezi jednotlivými faktory

Druhého kroku pre-mRNA sestřihu u *Saccharomyces cerevisiae* se účastní několik významných proteinů, např. Prp8p, Prp16p, Prp17p, Slu7p, Prp18p a Prp22p, kdy esenciální jsou Prp8p, Prp16p a Prp22p (Schwer a Gross, 1998; Umen a Guthrie, 1995a). Pro čtyři proteiny, Prp8p, Prp16p, Prp22p a Slu7p, byla prokázána interakce se 3'sestřihovým místem nebo v jeho těsné blízkosti (McPheeters *et al.*, 2000; Teigelkamp *et al.*, 1995a a 1995b; Umen a Guthrie, 1995b). Rozpoznání 3'sestřihového místa pro druhý krok je určeno U5 snRNA, Prp8p (U5 snRNP asociovaný protein) a dalšími faktory (Umen a Guthrie, 1995b). Faktor Prp8p (29KDa, 2413 aa) působí během sestavení spliceosomu a při transesterifikačních krocích sestřihu. V druhém kroku stabilizuje slabou interakci mezi konzervovanou smyčkou v U5 snRNA a sekvencí následného exonu, kdy tato vazba je sekvencně nespecifická (Teigelkamp *et al.*, 1995a). Také se předpokládá, že Prp8p pomáhá stabilizovat terciální strukturu při vazbě U6 snRNA s 5' a 3'sestřihovým místem (Collins a Guthrie, 1999).



Obr. 10. Model působení jednotlivých faktorů při druhém kroku sestřihu (převzato a upraveno podle James *et al.*, 2002).

Za účasti hydrolýzy ATP RNA helikáza Prp16p katalyzuje konformační změny týkající se 3'sestřihového místa a tyto změny vedou k ochraně této části

před působením RNázy H. Tento proces se odehrává ve dvou fázích, kdy první je na ATP závislá a působí při ní Prp16p a Prp17p, zatímco druhá fáze je na ATP nezávislá a vztahuje se na proteiny Prp18p, Slu7p a Prp22p (Schwer a Gross, 1998; Umen a Guthrie, 1995a). Samotná ochrana 3'sestřihového místa před působením RNázy H je dána prostřednictvím vazby Prp22p s tímto místem a tato interakce je iniciována Prp16p (McPheeters *et al.*, 2000). Proteiny Prp18p, Slu7p a Prp22p, vyžadované v ATP nezávislé fázi, jsou neesenciální *in vitro* při kratší vzdálenosti branchpointu a 3'sestřihového místa, protože 3'sestřihové místo je umístěno uvnitř spliceosomálního komplexu a tím je chráněno před působením RNázy H. Při

vzdálenosti dvanácti a více nukleotidů je nezbytná přítomnost Slu7p a Prp18p, zatímco Prp22p je vyžadována až při vzdálenosti dvacetijedna a více nukleotidů. Předpokládá se, že tyto proteiny tvoří spojovací most nebo stabilizují vazbu jiných faktorů k těmto místům (Bryson a Schwer, 1996; Schwer a Guthrie, 1992; Zhang a Schwer, 1997). Vazba Prp22p je omezena na posledních osm nukleotidů intronu a Prp16p se váže k posledním čtyřem nukleotidům v intronu a minimálně k dalším třinácti v následném exonu (McPheeters a Muhlenkamp, 2003).

Po prvním kroku Prp16p interaguje s 3' sestřihovým místem a Prp8p a Slu7p se váží slaběji. Hydrolyza ATP vyvolá konformační změnu, která sníží sílu vazby Prp16p a ten se následně uvolní, ale zvýší naopak vazbu Prp8p a Slu7p k spliceosomu. Tato silnější interakce vyžaduje přítomnost dvou proteinů Prp17p a Prp18p, které pomáhají v stabilizaci vazby Slu7p (Umen a Guthrie, 1995a). Dále následuje vazba Prp22p, kdy bylo za využití dvouhybridní analýzy zjištěno, že tato helikáza je pravděpodobně vázána k spliceosomu za podpory Slu7p (van Nues a Beggs, 2001). Proběhne druhý transesterifikační krok a Prp22p katalyzuje uvolnění mRNA (Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998). Zároveň s uvolněním mRNA dochází i k disociaci Slu7p, Prp18p a Prp22p. K zbývajcímu sestřihovému komplexu se v tento okamžik váže Prp43p a katalyzuje uvolnění lariátové struktury a rozpad zbylého spliceosomálního komplexu (Martin *et al.*, 2002).

Slu7p (44KDa, 382 aa) byl identifikován při hledání proteinů, které jsou synteticky lethální s U5 snRNA (Frank *et al.*, 1992). Tento faktor obsahuje dva motivy, zinek knuckle a PRP18 interakční motiv (James *et al.*, 2002). Prp17p (52KDa, 455 aa) a Prp18p (29KDa, 251 aa) jsou neesenční proteiny sestřihu, ale při nepřítomnosti obou dochází k částečné blokaci druhého kroku (Horowitz a Abelson, 1993).

### 6.3 Prp16p působí před druhým transesterifikačním krokem

Prp16p (121 kDa, 1071aa) je esenciální RNA stimulovaná ATPáza a na ATP závislá RNA helikáza (Wang *et al.*, 1998). Gen PRP16 se nachází na XI. chromosomu *Saccharomyces cerevisiae*. Tato helikáza je vyžadována při strukturálních změnách odehrávajících se před druhým katalytickým krokem pre-mRNA sestřihu (Schwer a Guthrie, 1991). Prp16p byl identifikován při hledání faktorů, které dovolí sestřih pre-mRNA, která obsahuje mutaci v branchpointu (Burgess *et al.*, 1990). Při samotné reakci je nezbytná přítomnost 10-40krát většího množství enzymu než-li substrátu (Wang *et al.*, 1998).

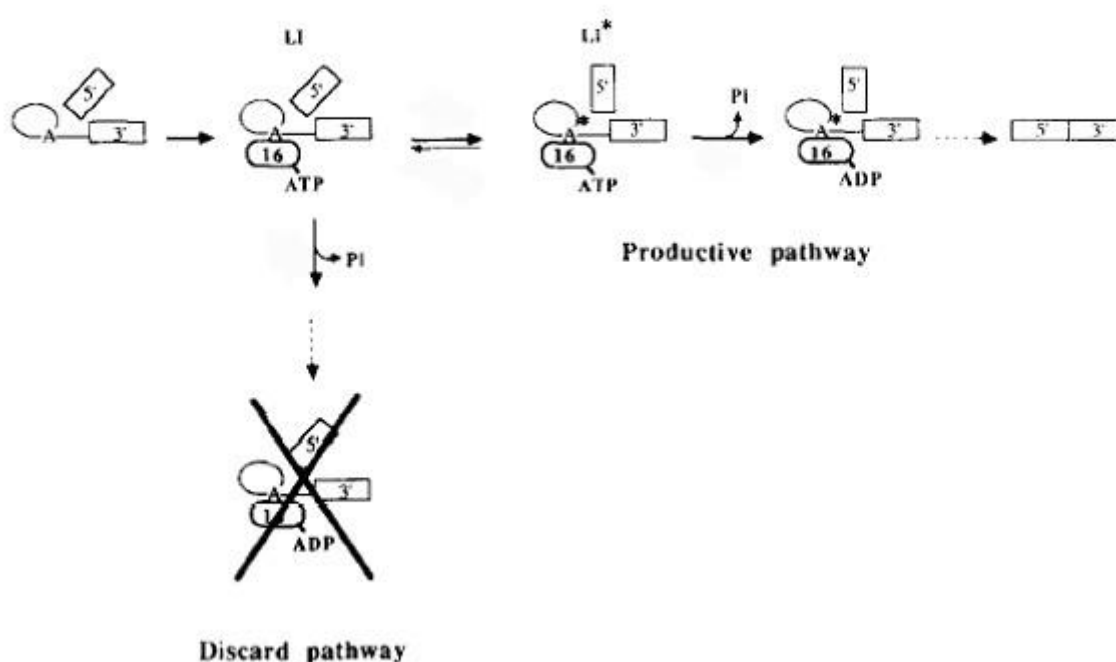


Obr. 11. Struktura Prp16p (1071 aa). N-koncová doména (372 aa) je znázorněna barvou černou, H-helikázová/ATPázová doména červenou, C-koncová doména je modře a dodatečná T-doména (C+T dohromady 379 aa) je černě (převzato a upraveno podle Wang *et al.*, 1998).

Dle modelu, navrženému Burgessem a Guthrie v roce 1993, je hydrolyza ATP pomocí Prp16p kontrolním krokem. Během doby, kdy je tento enzym asociován se spliceosomem, lariátový intermediát podstupuje řadu změn nezbytných k pokračování v druhém kroku. V buňce musí být zajištěn kontrolní mechanismus, který zajistí výběr řádného 5' a 3' sestřihového místa a branchpointu. Prp16p tedy slouží ke kontrole správně zvoleného branchpointu. Lariátový intermediát vzniklý při prvním kroku sestřihu může podstoupit dva rozdílné osudy, kdy jeden je produktivní a druhý nikoliv. Konformační přeměna lariátového intermediátu způsobí následné uvolnění Prp16p a pokračování v druhém kroku. Dojde-li však k hydrolyze ATP dříve, než-li stačí lariátový intermediát podstoupit konformační změnu, je odstraněn a degradován (viz obr.12.). Prp16p tedy působí jako časový regulátor s přesně definovanou dobou, po kterou probíhají spontánní konformační změny související s nalezením branchpointu. Tento model předpokládá, že jakékoliv nepříznivé interakce mezi mutovaným branchpointem a některými sestřihovými faktory překáží strukturálním změnám. Při použití *prp16p* mutovaného v helikázové doméně, kdy tato mutace způsobí snížení ATPázové aktivity, nedochází k degradaci abnormálního lariátového intermediátu. Vlivem pomalého procesu hydrolyzy ATP se prodlouží čas nezbytný k podstoupení strukturálních změn vedoucích ke konformační přeměně, proto je mutovaný substrát uchráněn před degradací.

V roce 2005 byla objevena interakce malého proteinu Isy1p (235 aa, 28 kDa) s Prp16p (Villa a Guthrie, 2005). Isy1p (Interactor of Syf1p) je neesenciální protein, který tvoří

komponentu NTC komplexu (NineTeen Complex) (Tarn *et al.*, 1994). Přesná role Isy1p při sestřihu nebyla doposud určena, ale předpokládá se jeho spolupráce s U6 snRNA při tvorbě příznivé konformace pro první transesterifikační krok. Při jeho delecii dochází k redukci průběhu prvního kroku a přesnosti v rozpoznání 3'sestřihového místa. Proto Isy1p pravděpodobně působí i při konformačních změnách katalyzovaných helikázou Prp16p v přechodu mezi prvním a druhým krokem sestřihu (Villa a Guthrie, 2005). Funkce Isy1p může spočívat v stabilizaci lariátového intermediátu před konformační změnou, nebo destabilizací lariátového intermediátu po prodělání této změny, také však může představovat negativní regulátor pro Prp16p (Villa a Guthrie, 2005).



Obr. 12. Model působení Prp16p navržený Burgessem a Guthrie v roce 1993, upraveno.

S využitím dvouhybridní analýzy a koimmunoprecipitace byla potvrzena přítomnost přímé či nepřímé vazby DExH helikázy Brr2p (U5 snRNA asociované) a Prp16p u *Saccharomyces cerevisiae*. Lze usuzovat, že vazba helikázy Prp16p k spliceosomu je v kvasinkách zprostředkována interakcí s Brr2p (van Nues a Beggs, 2001). U lidského homologa, hPrp16p, byl nalezen v N-koncové části proteinu RS motiv (arginin a serin bohatá oblast), který je charakteristický pro některé sestřihové faktory, např. členy SR proteinové rodiny. Stejný motiv je přítomen i u lidského homologa RNA helikázy hPrp22p (Ono *et al.*, 1994; Zhou a Reed, 1998). Skrze tento motiv dochází pravděpodobně k interakci s SR proteiny, které obsahují RNA vazebný motiv. Není zcela jisté, jestli tento motiv sám o sobě je

schopen umožnit vazbu k spliceosomu skrze interakci s SR proteiny, nebo vazbu k spliceosomu pouze reguluje prostřednictvím fosforylace/ defosforylace tohoto motivu. Byla provedena studie s použitím lidského hPrp16p v kvasince deletované v genu PRP16. Plná délka lidského homologu nebyla schopna nahradit funkci nepřítomného Prp16p, ale chimerický protein s N-koncovou doménou kvasinkového Prp16p a H, C a T doménou hPrp16p tuto funkci obnovil (Zhou a Reed, 1998). Katalytická schopnost je u tohoto enzymu konzervovaná od kvasinek až po člověka, ale specifita interakce k spliceosomu je odlišná.

Při studiu minimální esenciální délky proteinu bylo zjištěno, že 204 aminokyselinových N-koncových a 100 aminokyselinových C-koncových zbytků je neesenciálních pro funkci *in vivo* (Hotz a Schwer, 1998). Pro plnou životaschopnost buňky je zbývající část N-koncové domény potřebná a je vyžadována pro jadernou lokalizaci (Wang a Guthrie, 1998). C a T domény hrají roli v stabilizaci vazby mezi N-koncovou částí a spliceosomem. N-koncová a zbývající část proteinu mohou fungovat i při expresi v *trans*, kdy tyto dvě oblasti tvoří dva strukturně oddělené moduly, které spolu fyzicky interagují a jsou funkčně svázané (Hotz a Schwer, 1998).

<b>Affinity capture-MS</b>	Pil1p, Nop13p, Brr2p
<b>Two hybrid</b>	Brr2p, Prp16p
<b>Dosage rescue</b>	Cdc40p , Slu7p
<b>Synthetic growth defect</b>	Clf1p
<b>Synthetic lethality</b>	Cdc40p, Nip7p, Nop1p, Sec15p, Slit2p, Prp8p, Slu7p, Ecm2p
<b>Synthetic rescue</b>	Gst1p, Prp8p

Tab. 4. Proteiny se kterými Prp16p vstupuje do fyzické nebo genetické interakce (dle *Saccharomyces Genome Database*, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

## 6.4 Prp22p má dvě funkce při sestřihu

Protein Prp22p (130 KDa, 1145 aa) je důležitý sestřihový faktor druhého transesterifikačního kroku. Gen PRP22 je umístěn na V. chromosomu *Saccharomyces cerevisiae*. Prp22p je RNA stimulovaná ATPáza a na ATP závislá helikáza (Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998). Původně byla izolován při hledání *ts*<sup>9</sup> mutací genů, jejichž produkty se účastní pre-mRNA sestřihu (Vijayraghavan *et al.*, 1989).



Obr. 13. Struktura Prp22p (1145 aa). N-koncová doména (505 aa) je znázorněna barvou černou (přítomen S1 motiv), H-helikázová/ATPázová doména červenou, C-koncová doména je modře a dodatečná T-doména (C+T dohromady 334aa) je černě (převzato a upraveno podle Wang *et al.*, 1998).

Pro odvíjení duplexů je vyžadován 3' RNA přesah, zatímco komplementární řetězec může být jak RNA tak i DNA (Tanaka a Schwer, 2005). U helikázy Prp16p je také upřednostňován 3'přesahující konec substrátu, ale dokáže odvinout s nižší účinností i substráty s 5'přesahem (Wang *et al.*, 1998). Síla vazby mezi Prp22p a jednořetězcovou RNA je dvacetinásobně větší, než-li je tomu v přítomnosti jednořetězcové DNA nebo duplexu nukleových kyselin. Interakce je také ovlivněna vlastní délkou RNA duplexu, kdy optimum je mezi dvaceti a třiceti nukleotidy (Tanaka a Schwer, 2005). Závislost délková může mít souvislost s širším vazebným místem pro Prp22p, nebo potřebou asociace dalších proteinů esenciálních pro funkci Prp22p. Přítomností RNA dochází k zvýšení helikázové aktivity 2,5-4krát, ale ve srovnání s Prp2p a Prp16p je tato hodnota velice nízká (Wagner *et al.*, 1998).

Prp22p má dvě funkce při pre-mRNA sestřihu. První se týká druhého transesterifikačního kroku, je nezávislá na ATP a neesenciální při vzdálenosti branchpointu a 3'sestřihového místa kratší než dvacet nukleotidů. Druhá role je esenciální, závislá na ATPázové a helikázové aktivitě, neboť Prp22p uvolňuje sestřiženou mRNA ze spliceosomu. Po hydrolýze ATP dochází k oslabení vazby a následné disociaci Prp22p (Schwer a Gross, 1998; Wagner *et al.*, 1998).

Prp22p užívá energii získanou z hydrolýzy ATP k přerušení vazeb mezi sestřiženou mRNA a některými komponenty spliceosomu, tyto vazby mohou představovat RNA-RNA nebo RNA-proteinové interakce. Při hledání extragenových supresorů mutace *prp22* působící defekt v helikázové aktivitě byla objevena mutovaná forma *prp8p*, která nedokáže efektivně stabilizovat sekvenčně nespecifickou interakci mezi U5 snRNA a sekvencí

<sup>9</sup> *ts* proteiny jsou proteiny, které jsou při vyšší teplotě nefunkční.



následného exonu. V tomto případě může dojít k uvolnění mRNA ze spliceosomu, protože interakce U5 snRNA se sekvencí následného exonu není dostatečně stabilizována mutovanou formou *prp8p* a proto není ani vyžadována helikázová aktivita mutovaného *prp22p* (Schwer a Meszaros, 2000; Schneider *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004).

U Prp22p je přítomen S1 motiv v N-koncové části proteinu (pozice aminokyselinových zbytků 177.-256.), který je postradatelný pro funkci *in vivo* i *in vitro* (Schneider a Schwer, 2001). S1 motiv je přítomen u mnoha rozdílných proteinů asociovaných s RNA a byl nalezen u ribosomálního S1 proteinu a polynukleotidové fosforyláze u *Escherichia coli*. Bylo potvrzeno, že S1 motiv u Prp22p tvoří RNA vazebnou doménu a je přítomen i u homologních proteinů u *S. pombe*, *C. elegans* a *H. sapiens* (Company, 1991).

Pomocí delečních mutant byla studována délka esenciální části proteinu (Schneider a Schwer, 2001). Byla určena minimální funkční část pokrývající oblast aminokyselinových zbytků 262.-1145. od N konce, která je dostatečná pro aktivitu *in vivo* i *in vitro*. Při delecí 350 aminokyselinových zbytků (protein sestává z 351.-1145. aminokyselinového zbytku) je buňka schopna žít pouze za produkce většího množství této zkrácené formy. Lze tedy předpokládat, že úsek od 262.-350. aminokyselinový zbytek je zodpovědný za směřování proteinu k spliceosomu. Při další delecí, kdy protein sestává pouze z 466.-1145. aminokyselinového zbytku, již nedochází k růstu buňky, ale samotná zkrácená forma je schopná hydrolyzovat ATP, vázat RNA, odvinovat duplexy *in vitro* a pomocí GFP značení *in vivo* byla také zjištěna její lokalizace v jádře. U této zkrácené formy byla prokázána vyšší aktivita oproti nezkrácené verzi, proto deletovaný úsek 465 aminokyselinových zbytků pravděpodobně slouží k regulaci aktivity Prp22p. Při koexpresi úseku 1.-480. aminokyselinového zbytku s úsekem 466.-1145. aminokyselinového zbytku v *trans* dochází k obnovení plné funkce proteinu *in vivo* v rozmezí teplot 25-34°C. Studie, která by objasnila minimální esenciální C-koncovou část, nebyla prozatím dokončena.

Byl nalezen lidský homologní zástupce kvasinkového PRP22 genu DHX8/hPRP22/HRH1 (human RNA helicase 1) (Ono *et al.*, 1994). Vzájemná shoda v sekvencích v helikázové a C-koncové doméně mezi lidskou a kvasinkovou verzí je 69 a 50%. Při expresi hPrp22p v kvasinkovém kmeni vykazujícím *ts* fenotyp způsobený mutovanou formou *prp22p*, dochází k částečnému obnovení růstu při zvýšení teploty z 29 na 32°C (Ono *et al.*, 1994). Lidská forma však obsahuje navíc v N-koncové doméně RS motiv, který je charakteristický pro některé sestřihové faktory, např. členy SR proteinové rodiny (více viz kap. 6.3). Pomocí dvouhybridní analýzy v kvasinkách byla prokázána interakce HRH1 s SR proteiny prostřednictvím RS motivu. RS motiv u HRH1 slouží i jako jaderný lokalizační signál (Ohno a Shimura, 1996).

Při hledání esenciálních genů nezbytných pro buněčné dělení byl pomocí metody esiRNA (endoribonuclease-prepared si RNA) nalezen i lidský homolog hPrp22/HRH1/DHX8,

při jehož umlčení dochází k poruchám buněčného dělení (Kittler *et al*, 2004). Buňky vstoupí do mitózy, ale po určité době z této fáze buněčného dělení opět vystoupí bez jakékoliv známky rozdělení jádra. Dochází k ztrátě viditelnosti jadérka a tvorbě buněk částečně zbavených chromatinu. Souvislost mezi zastavením sestřihu, vlivem nedostatečného množství esenciální hPrp22p helikázy a z toho plynoucí nedostatečnou tvorbou proteinů vyžadovaných pro buněčné dělení, se nepředpokládá. Naopak se dnes více podporuje hypotéza účasti některých sestřihových faktorů v buněčném dělení (Kittler *et al*, 2004). Avšak žádná další spojitost této helikázy s dělením buněk nebyla prozatím publikována.

<b>Affinity capture-MS</b>	Cef1p, Cdc5p, Prp19p, Ubp1p, Sok2p
<b>Two hybrid</b>	Prp16p, Clf1p, Slu7p, Prp45p, Pmi40p, Dbp7p, Msl5p
<b>Synthetic growth defect</b>	Clf1p
<b>Synthetic lethality</b>	Cdc40p, Snu114p,
<b>Synthetic rescue</b>	Prp8p

Tab. 5. Proteiny se kterými Prp22p vstupuje do fyzické nebo genetické interakce (dle *Saccharomyces Genome Database*, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

## 6.5 Prp43p pomáhá při rozvolnění spliceosomu

Protein označovaný Prp43p (88 KDa, 767 aa) je RNA dependentní ATPázou a tato ATPázová aktivita je nezbytná pro funkci *in vivo* (Martin *et al.*, 2002). Gen kódující Prp43p je umístěn na VII. chromosomu *Saccharomyces cerevisiae*. V roce 1991 byli identifikováni dva dodateční členové DEAH rodiny helikáz, kteří byli označeni JA1 a JA2 (Company *et al.*, 1991). Poté byla analyzována jejich funkce a v roce 1997 bylo zjištěno, že protein JA1 hraje roli při sestřihu pre-mRNA a byl přejmenován na PRP43 (Arenas a Abelson, 1997). V roce 2005 byla objevena účast tohoto proteinu také při biogenezi ribozomu. Z tohoto zjištění lze usuzovat, že sestřih pre-mRNA a biogeneze ribozomu mohou být vzájemně regulovány. Při objevení další funkce Prp43p již nelze s jistotou určit jeho esencialitu při sestřihu *in vivo* (Lebaron *et al.*, 2005; Leeds *et al.*, 2006), i když byla potvrzena *in vitro* (Martin *et al.*, 2002).



Obr. 14. Struktura Prp43p (767 aa). N-koncová doména (115 aa) je znázorněna barvou černou, H-helikázová/ATPázová doména červenou, C-koncová doména je modře a dodatečná T-doména (C+T dohromady 337 aa) je černě (převzato a upraveno podle Wang *et al.*, 1998).

Prp43p působí v pozdní fázi sestřihu po uvolnění mRNA. Jeho role spočívá v rozvolnění spliceosomu a uvolnění lariátové struktury (Martin *et al.*, 2002; Arenas a Abelson, 1997). Později byla prokázána interakce *in vivo* nejen s vystřiženým intronem, ale také s U2/U6.U5 snRNP komplexem v postsestřihové konfiguraci (Lebaron *et al.*, 2005; Leeds *et al.*, 2006).

Při studiu minimální potřebné délky proteinu vyžadované pro funkci *in vivo* bylo identifikováno, že 90 krajních N-koncových a 45 C-koncových aminokyselinových zbytků je neesenciálních (Martin *et al.*, 2002). Vlastní N-koncová část je oproti ostatním DEAH helikázám u Prp43p kratší, obsahuje pouze 115 aminokyselinových zbytků. U Prp16p a Prp22p je tato doména zodpovědná za vazbu k spliceosomu a jejich C-koncová část pomáhá v stabilizaci této interakce. Lze tedy předpokládat, že zbylých 25 aminokyselinových zbytků je potřebných pro vazbu k spliceosomu. Immunoprecipitační analýzou byly odhaleny dva proteiny Ntr1p a Ntr2p, které pravděpodobně hrají roli při interakci Prp43p se spliceosomem (Tsai *et al.*, 2005). Ntr1p a Ntr2p jsou sestřihové faktory vyžadované pro rozvolnění spliceosomu u kvasinek. Původně byly nalezeny jako slabě asociované komponenty NTC komplexu (NineTeen Complex) (Tarn *et al.*, 1994), odtud také pochází jejich označení Ntr1p a Ntr2p (NineTeen complex-Related proteins).

V nepřítomnosti Ntr1p nebo Ntr2p při sestřihu nedochází k zasažení funkce NTC komplexu, který působí při aktivaci spliceosomu, ale hromadí se lariátové struktury v pozdějších fázích sestřihu. Ntr1p obsahuje v blízkosti N konce G-patch motiv (viz kap. 6.1), pomocí kterého interaguje s Prp43p, a s Ntr2p se váže prostřednictvím centrální oblasti. Ntr2p a Prp43p se váží pouze s Ntr1p. Tyto tři proteiny tvoří stabilní heterotrimerický komplex označovaný NTR, který katalyzuje rozvolnění spliceosomu, oddělení U2/U6.U5 snRNP komplexu, NTC komplexu a uvolnění lariátové struktury. NTR komplex se nachází v buňce ve třech různých formách, kdy Ntr1p a Ntr2p jsou vždy asociovány spolu a tvoří heterodimer, zatímco Prp43p se ze 30% nachází volně. Plně funkční formou je pouze trimerický komplex.

Přestože je Prp43p evolučně konzervovaný a jeho homology byly nalezeny např. u myši mDEAH9 (Gee *et al.*, 1997) nebo u člověka hPRP43/DDX8 (Fouraux *et al.*, 2002), nebyly doposud nalezeny proteinové homology Ntr1p a Ntr2p u jiných organismů. Předpokládá se, že u vyšších eukaryot je přítomen jiný mechanismus interakce se spliceosomem. Tuto domněnku potvrzuje vysoce nabitá N-koncová doména u vyšších eukaryot. U lidského homologa hPRP43/ DDX8 byla také nalezena asociace s 12S U2 snRNA a pomocí imunofluorescence jeho lokalizace v jádře i jadérku (Fouraux *et al.*, 2002), zatímco u kvasinek je Prp43p obsažen především v jadérku (Huh *et al.*, 2003).

<b>Affinity capture-MS</b>	Cwc2p, Ntr1p, Cef1p, Ceg1p, Ipp1p, Mrpl9p, Clf1p, Nop1p, Prp46p, Snu114p, Sro9p, Cwc23p, Ynl224cp, Prp45p, Prp8p, Pwp2p, Smx3p, Yju2p, Asc1p, Bud20p, Nop6p, Erb1p, Nop58p, Cic1p, Urb1p, Gbp2p, Rps16ap, Rps22ap, Rps4ap, Rps7ap, Rps9bp, Rpl12ap, Rps10bp, Rps8ap, Rps9ap, Sbp1p, Smb1p, Brr2p, Rps11ap, Imd3p, Imd4p, Kem1p, Pab1p, Yra1p, Ntr2p, Stm1p, Kri1p, Pap2p, Mtr4p, Srp40p, Rrp43p, Esf2p, Noc2p
<b>Two hybrid</b>	Sas10p

Tab. 6. Proteiny se kterými Prp43p vstupuje do fyzické nebo genetické interakce (dle *Saccharomyces Genome Database*).

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout a uspořádat doposud známé i předpokládané vlastnosti a funkce RNA helikáz rodiny DEAH účastnících se pre-mRNA sestřihu u *Saccharomyces cerevisiae*. K RNA helikázám rodiny DEAH patří čtyři z osmi sestřihových helikáz náležících k DExD/H box proteinům. Pro všechny čtyři členy této rodiny je charakteristická ATPázová aktivita, ale vlastní helikázová schopnost byla doposud prokázána pouze u Prp16p a Prp22p *in vitro*.

Proteiny Prp2p a Prp16p působí při prvním a druhém transesterifikačním kroku, Prp22p a Prp43p jsou vyžadovány pro uvolnění sestřižené mRNA a lariátové struktury ze spliceosomu a následné rozvolnění zbylého komplexu. Pro rodinu DEAH platí vysoká homologie v rámci H-helikázové/ATPázové a C-koncové domény, proto se předpokládalo, že specifita těchto RNA helikáz k spliceosomu v dané fázi sestřihu bude vycházet z unikátní N-koncové domény. Při bližším studiu struktury u jednotlivých zástupců této rodiny se tyto předpoklady nepodařilo prokázat u všech, naopak je dnes více podporována představa interakce helikáz se spliceosomem pomocí specifických kofaktorů.

## 8. Přehled literatury

- Abovich, N., Liao, X. and Rosbash, M.** 1994. The yeast MUD2 protein: na interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition. *Genes Dev.* **8**: 843–854.
- Arenas, J. E. and Abelson, J. N.** 1997. Prp43: An RNA helicaselike factor involved in spliceosome disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 11798–11802.
- Brys, A. and 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**: 707-717.
- Burgess, S., Couto, J. R. and Guthrie, C.** 1990. A putative ATP binding protein influences the fidelity of branchpoint recognition in yeast splicing. *Cell* **60**: 705–717.
- Burgess, S. and Guthrie, C.** 1993. Beat the clock: paradigms for NTPases in the maintenance of biological fidelity. *Trends Biochem Sci.* **18**: 381-384. Review.
- Chan, S. P., Kao, D. I., Tsai, W. Y. and Cheng, S. C.** 2003. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* **302**: 279–282.
- Chen, S., Anderson, K. and Moore M. J.** 2000. Evidence for a linear search in bimolecular 3 splice site AG selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 593–598.
- Collins, C. A. and Guthrie, C.** 1999. Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function for Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. *Genes & Dev.* **13**: 1970–1982.
- Colley, A., Beggs, J. D., Tollervey, D. and Lafontaine, D. L.** 2000. Dhr1p, a putative DEAH-box RNA helicase, is associated with the box C+D snoRNP U3. *Mol Cell Biol* **20**: 7238-7246.
- Company, M., Arenas, J. and Abelson, J.** 1991. Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* **349**: 487–493.
- de la Cruz J., Kressler, D. and Linder P.** 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 192-198.
- Edwalds-Gilbert, G., Kim, D. H., Kim, S. H., Tseng, Y. H., Yu, Y. and Lin, R. J.** 2000. Dominant negative mutants of the yeast splicing factor Prp2 map to a putative cleft region in the helicase domain of DEXD/H-box proteins. *RNA* **6**: 1106–1119.
- Edwalds-Gilbert, G., Kim, D. H., Silverman, E. and Lin, R. J.** 2004. Definition of a spliceosome interaction domain in yeast Prp2 ATPase. *RNA* **10**: 210–220.
- Fouraux, M. A., Kolkman, M. J., van der Heijden, A., De Jong, A. S., van Verooij, W. J. and Pruijn, G. J.** 2002. The human La (SS-B) autoantigen interacts with DDX15/hPrp43, a putative DEAH-box RNA helicase. *RNA* **8**: 1428–1443.
- Frank, D., Patterson, B. and 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**: 5197-5205.
- Gee, S., Krauss, S. W., Miller, E., Aoyagi, K., Arenas, J. and Conboy, J. G.** 1997. Cloning of mDEAH9, a putative RNA helicase and mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* splicing factor Prp43. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11803–11807.
- Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V.** 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 419-429.

- Horowitz, D. S. and Abelson, J.** 1993. A U5 small nuclear ribonucleoprotein particle protein involved only in the second step of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **13**: 2959-2970.
- Hotz, H. R. and Schwer, B.** 1998. Mutational analysis of the yeast DEAH box splicing factor Prp16. *Genetics* **149**: 807-815.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K.** 2003. *Nature*. Global analysis of protein localization in budding yeast. **425**: 686-691.
- Imamura, O., Saiki, K., Tani, T., Ohshima, Y., Sugawara, M. and Furuichi, Y.** 1998. Cloning and characterization of a human DEAH-box RNA helicase, a functional homolog of fission yeast Cdc28/Prp8. *Nucl. Acids. Res.* **26**: 2063-2068.
- James, S. A., Turner, W. and Schwer, B.** 2002. How Slu7 and Prp18 cooperate in the second step of yeast pre-mRNA splicing. *RNA* **8**: 1068-1077.
- Jankowsky, E. and Jankowsky, A.** 2000. The DEXH/D protein family database. *Nucleic Acids Res.* **28**: 333-334.
- Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S. and Pyle, A. M.** 2001. Active disruption of an RNA-protein interaction by a DEXH/D RNA helicase. *Science* **291**: 121-125.
- Kim, S. H., Smith, J., Claude, A. and Lin, R. J.** 1992. The purified yeast pre-mRNA splicing factor PRP2 is an RNA-dependent NTPase. *EMBO J.* **11**: 2319-2326.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C. and Caron, P. R.** 1998. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* **6**: 89-100.
- Kim, S. H. and Lin, R. J.** 1996. Spliceosome activation by PRP2 ATPase prior to the first transesterification reaction of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6810-6819.
- King, D. S. and Beggs, J. D.** 1990. Interactions of PRP2 protein with pre-mRNA splicing complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6559-6564.
- Kittler, R., Putz, G., Pelletier, L., Poser, I., et al.** 2004. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* **432**: 1036-1040.
- Last, R. L., Maddock, J. R. and Woolford, J. L.** 1987. Evidence for related functions of the RNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **117**: 619-631.
- Lebaron, S., Froment, C., Fromont-Racine, M., Rain, J. Ch., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M. and Henry, Y.** 2005. The splicing ATPase Prp43p is a component of multiple preribosomal particles. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 9269-9282.
- Leeds, N. B., Small, E. C., Hiley, S. L., Hughes, T. R. and Staley, J. P.** 2006. The splicing factor Prp43p, a DEAH box ATPase, functions in ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 513-522.
- Martin, A., Schneider, S. and Schwer, B.** 2002. Prp43 is an essential RNA dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem.* **277**: 17743-17750.
- McPheeters, D. S. and Muhlenkamp, P.** 2003. Spatial organization of protein-RNA interactions in the branch site-3 splice site region during pre-mRNA splicing in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 4174-4186.
- McPheeters, D. S., Schwer, B. and Muhlenkamp, P.** 2000. Interaction of the yeast DEXH-box RNA helicase Prp22p with the 3' splice during the second step of nuclear pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1313-1321.

- Moriya, H., Kasai, H. and Isono, K.** 1995. Cloning and characterization of the hrpA gene in the terC region of Escherichia coli that is highly similar to the DEAH family RNA helicase genes of Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res.* **23**: 595-598.
- Ono, Y., Ohno, M. and Shimura, Y.** 1994. Identification of a Putative RNA Helicase (HRH1) a Human Homolog of Yeast Prp22. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7611-7620.
- Ohno, M. and Shimura, Y.** 1996. A human RNA helicase-like protein, HRH1, facilitates nuclear export of spliced mRNA by releasing the RNA from the spliceosome. *Genes Dev.* **10**: 997-1007.
- Roy, J., Kim, K., Maddock, J. R., Anthony, J. G. and Woolford Jr., J. L.** 1995. The final stages of spliceosome maturation require Spp2p that can interact with the DEAH box protein Prp2p and promote step 1 of splicing. *RNA* **1**: 375-390.
- Scheller, J., Schurer, A., Rudolph, C., Hettwer, S. and Kramer, W.** 2000. MPH1, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage. *Genetics* **155**: 1069-1081.
- Schmid, S. R. and Linder, P.** 1992. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol.* **6**: 283-292.
- Schneider, S. and Schwer, B.** 2001. Functional domains of the yeast splicing factor Prp22p. *J. Biol. Chem.* **276**: 21184-21191.
- Schneider, S., Hotz, H. R. and Schwer, B.** 2002. Characterization of dominant-negative mutants of the DEAH-box splicing factors Prp22 and Prp16. *J. Biol. Chem.* **277**: 15452-15458.
- Schneider, S., Campodonico, E. and Schwer, B.** 2004. Motifs IV and V in the DEAH box splicing factor Prp22 are important for RNA unwinding, and helicase-defective Prp22 mutants are suppressed by Prp8. *J. Biol. Chem.* **279**: 8617-8626.
- Schwer, B. and C. H. Gross.** 1998. Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **17**: 2086-2094.
- Schwer, B. and Guthrie, C.** 1991. PRP16 is an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. *Nature* **349**: 494-499.
- Schwer, B. and C. Guthrie.** 1992. A conformational rearrangement in the spliceosome is dependent on PRP16 and ATP hydrolysis. *EMBO J.* **11**: 5033-5039.
- Schwer, B. and Meszaros, T.** 2000. RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing, *EMBO J.* **19**: 6582-6591.
- Shiratori, A., Shibata, T., Arisawa, M., Hanaoka, F., Murakami, Y. and Eki, T.** 1999. Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in Saccharomyces cerevisiae by gene disruption and Northern analysis. *Yeast* **15**: 219-253.
- Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G. and Lin, R. J.** 2003. DEXD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**: 1-16.
- Silverman, E. J., Maeda, A., Wei, J., Smith, P., Beggs, J. D. and Lin, R. J.** 2004. Interaction between a G-patch protein and a spliceosome DEXD/H-box ATPase that is critical for splicing. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 10101-10110.
- Singleton, M. R. and Wigley, D. B.** 2002. Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *J Bacteriol.* **184**:1819-1826. Review.



- Soultanas, P., Dillingham, M. S., Wiley, P., Webb, M. R. and Wigley, D. B.** 2000. Uncoupling DNA translocation and helicase activity in PcrA: direct evidence for an active mechanism. *EMBO J.* **19**: 3799–3810.
- Staley, J. P. and Guthrie, C.** 1998. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**: 315-326.
- Tanaka, N. and Schwer, B.** 2005. Characterization of the NTPase, RNA-binding, and RNA helicase activities of the DEAH-box splicing factor Prp22. *Biochemistry* **44**: 9795-9803.
- Tanner, N. K. and Linder, P.** 2001. DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell.* **8**: 251-262.
- Tarn, W. Y., Hsu, C. H., Huang, K. T., Chen, H. R., Kao, H. Y., Lee, K. R. and Cheng, S. C.** 1994. Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J.* **13**: 2421–2431.
- Teigelkamp, S., Newman, A. J. and Beggs, J. D.** 1995a. Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *EMBO J.* **14**: 2602–2612.
- Teigelkamp, S., Whittaker, E. and Beggs, J. D.** 1995b. Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing. *Nucleic Acids Res.* **23**: 320–326.
- Tsai, R. T., Fu, R. H., Yeh, F. L., Tseng, Ch. K., Lin, Y. Ch., Huang, Y. and Cheng, S. Ch.** 2005. Spliceosome disassembly catalyzed by Prp43 and its associated components Ntr1 and Ntr2. *Genes & Dev.* **19**: 2991-3003.
- Umen, J. G. and Guthrie, C.** 1995a. 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**: 584–597.
- Umen, J. G. and Guthrie, C.** 1995b. The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **1**: 869-885.
- van Nues, R. W. and Beggs, J. D.** 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**: 1451–1467.
- Vijayraghavan, U., Company, M. and Abelson, J.** 1989. Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **3**: 1206-1216.
- Villa, T. and Guthrie, Ch.** 2005. The Isy1p component of the NineTeen Complex interacts with the ATPase Prp16p to regulate the fidelity of pre-mRNA splicing. *Genes & Dev.* **19**: 1894-1904.
- Wang, Y., Wagner, J. D. and Guthrie, C.** 1998. The DEAH-box splicing factor Prp16 unwinds RNA duplexes in vitro. *Curr. Biol.* **8**: 441-451.
- Wagner, J. D., Jankowsky, E., Company, M., Pyle, A. M. and Abelson, J. N.** 1998. The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATP-dependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes. *EMBO J.* **17**: 2926–2937.
- Wang, Y. and Guthrie, C.** 1998. PRP16, a DEAH-box RNA helicase, is recruited to the spliceosome primarily via its nonconserved N-terminal domain. *RNA* **4**:1216–1229.
- Zhang, X. and Schwer, B.** 1997. Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2146-2152.
- Zhou, Z. and 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**: 2095-2106.

