

Ondřej Gahura, Dizertační práce 2011

Regulace sestřihu pre-mRNA v *S. cerevisiae*: kooperace RNA a proteinů

Abstrakt

Odstraňování intronů z transkriptů probíhá prostřednictvím sestřihu v reakci katalyzované velkým jaderným komplexem – spliceosomem. Sestřih je nesmírně komplikovaný a dynamický proces, v němž koordinované fungování pěti malých molekul RNA a řady proteinů zajišťuje splnění požadavků na extrémní přesnost a flexibilitu. Pro důkladné pochopení sestřihu pre-mRNA je nezbytné rozklíčovat role jednotlivých komponent spliceosomu a porozumět všem dílčím mechanismům.

První část práce se zabývá rolí sestřihového faktoru Prp45 v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Mapování genetických interakcí alely *prp45*(1-169) ukazuje na vztah mezi Prp45, NTC komplexem a druhým sestřihovým krokem. Analýza interakcí pomocí dvouhybridního systému a purifikace sestřihových komplexů dokladuje roli C-koncové části Prp45 v regulaci a/nebo vyvazování helikázy Prp22 do spliceosomu. Experimenty s reportérovými substráty prokazují, že Prp45 je vyžadován pro efektivní sestřih určité skupiny intronů. Naše pozorování podporují hypotézu, že role Prp45 v sestřihu je konzervována v evoluci.

Druhá část práce je věnována studiu vlivusekundárních struktur intronů na identifikaci 3' sestřihových míst (3' splice site; 3'ss). Ukázali jsme, že „stem-loop“ struktura tvořená sekvencí následující za místem větvení (branch point; BP) je nebytná pro sestřih intronů *COF1* a *UBC13*, které mají extrémně dlouhou vzdálenost mezi BP a 3'ss. Identifikované struktury přispívají k efektivnímu nalezení 3'ss jednak přiblížením vzdálených akceptorových sekvencí do blízkosti BP a jednak maskováním dinukleotidů AG, chovajících se jako kryptická sestřihová místa. Naše analýzy jednoznačně podporují hypotézu, že sekundární struktury jsou využívány při nacházení 3'ss ve většině intronů se vzdálenými 3'ss u kvasinky *S. cerevisiae*, a pravděpodobně také v jiných kvasinkových organismech ze skupiny *Saccharomycotina*.