

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Buněčná biologie

Studijní obor: Buněčná biologie



**Alexandra Gredová**

Komparativní analýza RNA vazebných schopností proteinů Rpl22  
Comparative analysis of RNA binding properties of Rpl22 proteins

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Abrhánová, Ph.D.

Praha, 2023

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své školitelce Katce Abrhánové za soucitnost, vstřícnost a za neskutečnou ochotu mi pomoci za jakýchkoliv okolností. Dále také panu doc. RNDr. Petrovi Folkovi, CSc. za podporu, laskavost, veškeré konzultace a za všechny darty. Obzvláště bych chtěla poděkovat Káje a Evě, bez kterých by život nebyl ten pravý ořechový. Mé poděkování patří i ostatním členům laboratoře za vytvoření kamarádského kolektivu a příjemné pracovní atmosféry. Největší díky ovšem patří mé babičce, která vytrvala a neustále mě zásobila humorem, ale stejně tak Jirince za péči, trpělivost a za upřímné povzbuzení v nejtěžších časech.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 27.4.2023

Alexandra Gredová

# 1 Abstrakt

Po události celogenomové duplikace (WGD) ztratila *Saccharomyces cerevisiae* 90 % paralogů. 59 genů pro ribozomální proteiny (RPG) si zachovalo duplikovanou kopii. Buňka je schopna v rámci adaptace na měnící se podmínky balancovat expresi RPG, a zajišťovat tak produkci ribozomálních proteinů (RP) ve správném poměru. RPG navíc obsahují 1/3 veškerých intronů vyskytujících se v genomu *S. cerevisiae*.

Rpl22A/B jsou součástí velké ribozomální podjednotky, kde kontaktují 25S rRNA. Delece těchto RPG vede k 2X pomalejšímu růstu v porovnání s buňkami WT. Rpl22A/B jsou v rámci své extraribozomální funkce schopny intragenově a intergenově regulovat svoji expresi. Výsledkem vazby Rpl22A/B na intron pre-mRNA *RPL22A* nebo *RPL22B* je inhibice sestřihu, která je silnější v případě intronu *RPL22B* (*RPL22Bi*). Přesný mechanismus ovšem není známý.

Víme, že Rpl22 z různých organismů vážou strukturu vlásenky, která se vyskytuje mimo jiné i v 25S rRNA. Jelikož predikovaná struktura *RPL22Bi* vlásenku neobsahuje, vyvolává to otázku, zda je RNA vazebný povrch Rpl22A/B odlišný nebo rozsáhlejší než ten, kterým kontaktuje 25S rRNA. Porovnali jsme schopnost Rpl22 z různých organismů zastoupit funkce Rpl22A/B. Tyto Rpl22 mají substituci v několika pozicích aminokyselin (AK). Tato práce rozebírá vliv odlišného složení AK Rpl22 na funkce Rpl22A/B. Zjistili jsme, že většina testovaných Rpl22 je schopná komplementovat růstový defekt buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*, a že i přes toxické působení některých Rpl22 v buňkách *S. cerevisiae* jsou všechny Rpl22 schopné do určité míry inhibovat sestřih *RPL22Bi*.

Klíčová slova: Rpl22, ribozomální protein, paralogy, extraribozomální funkce, vazba RNA, struktura proteinů

## 2 Abstract

After the whole genome duplication event, *Saccharomyces cerevisiae* lost 90 % of its paralogs. 59 ribosomal protein genes (RPG) retained a duplicated form. The cell has to balance expression of RPGs as a part of adaptation to changing conditions, thus ensuring the production of the right ratio of ribosomal proteins (RP). In addition, RPGs contain 1/3 of all introns found in the *S. cerevisiae* genome.

Rpl22A/B are part of the large ribosomal subunit where they contact 25S rRNA. Deletion of these RPGs results in 2X slower growth in comparison with WT cells. Within their extraribosomal function Rpl22A/B are able to intragenically and intergenically regulate their expression. Binding of Rpl22A/B to the intronic part of pre-mRNA of *RPL22A* or *RPL22B* results in splicing inhibition, which is stronger in the case of the *RPL22B* intron (*RPL22Bi*). However, the exact mechanism is not known.

We know that Rpl22s from various organisms bind a hairpin structure that can be found in 25S rRNA also. Since the predicted structure of *RPL22Bi* does not contain this binding motif, it rises a question of whether the RNA binding surface of Rpl22A/B is different or more extensive than the one with which Rpl22 contacts 25S rRNA. We compared the ability of Rpl22 from different organisms to complement the functions of Rpl22A/B. These Rpl22s differ at several amino acid (AA) positions. We found that most of the Rpl22s tested are able to complement the growth defect of *rpl22aΔrpl22bΔ* cells, and that despite of some Rpl22s acting toxic in *S. cerevisiae* cells, all Rpl22s are able to inhibit *RPL22Bi* splicing to some extent. This work analyzes the influence of the different AA composition of Rpl22 on the functions of Rpl22A/B.

Key words: Rpl22, ribosomal protein, paralogs, extraribosomal function, RNA binding, protein structure

### 3 Seznam zkratek

AK	aminokyselina
ES	expanzivní segment
RPG	geny pro ribozomální proteiny
RP	ribozomální protein
WT	divoký kmen (wild type)
<i>RPL22Bi</i>	intron <i>RPL22B</i>
WGD	celogenomová duplikace (whole genome duplication)
40S	malá ribozomální podjednotka
60S	velká ribozomální podjednotka
5'UTR	nepřekládaná oblast na 5'konci
3'UTR	nepřekládaná oblast na 3'konci
Ca	<i>Candida albicans</i>
Cg	<i>Candida glabrata</i>
Dh	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Yl	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Kl	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>
Δ	delece genu
BP	bod větvení (branch point)
NMD	nonsense mediated decay
Xrn1	5'-3' exoribonucleáza 1
RRM	RNA vazebná doména (RNA recognition motif)
EBER1	Epstein-Barr virus-encoded RNA 1
IRE	iron-responsive element
IRP	iron regulatory protein
Y3H	trojhybridní systém (yeast three hybrid system)
PCR	polymerase chain reaction
qPCR	kvantitativní PCR

Leu	leucin
Gln	glutamin
Glu	glutamát
Thr	threonin
Arg	arginin
G	guanin
ASH1	asymmetric synthesis of HO
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
PTB	polypyrimidine tract-binding protein
SR	Serine arginine-rich protein
EBV	Epstein-Barrové virus
HCV	virus hepatitidy C
IRES	internal ribosome entry site
MCM6	Mini-chromosome maintenance protein
CENPA	Centromere protein A
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
CK2	kasein kináza 2
UBF	Upstream binding factor
IME1	Meiosis-inducing protein 1
Cdk4	cyklin dependentní kináza 4
Trm4	tRNA m <sup>5</sup> C-methyltransferáza
m <sup>5</sup> C	5-methylcytosin
Met3	sulfát adenyltransferáza

## 4 Obsah

1	Abstrakt .....	3
2	Abstract .....	4
3	Seznam zkratk .....	5
5	Úvod .....	10
6	Literární přehled .....	11
6.1	Ribozomální proteiny .....	11
6.2	Evoluce paralogů <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
6.3	Rpl22 .....	14
6.3.1	Funkce Rpl22 vyšších eukaryot .....	17
6.3.2	Paralogy Rpl22A a Rpl22B <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
6.4	Regulace exprese RPG <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na úrovni sestřihu .....	22
6.5	Porovnání funkcí homologních Rpl22 .....	26
7	Cíl práce .....	29
8	Materiál .....	30
8.1	Seznam použitých mikroorganismů .....	30
8.1.1	Bakteriální kmeny .....	30
8.1.2	Kvasinkové kmeny .....	30
8.2	Kultivační média .....	31
8.2.1	Bakteriální kultivační média .....	31
8.2.2	Kvasinková kultivační média .....	31
8.2.3	Suplementy kultivačních médií .....	32
8.3	Seznam použitých primerů .....	33
8.4	Seznam použitých plazmidů .....	35
8.5	Seznam použitých enzymů a příslušných pufrů .....	36
8.5.1	Polymerázy .....	36
8.5.2	Restrikční endonukleázy .....	36
8.5.3	Enzymy degradující nukleové kyseliny .....	37
8.5.4	Hydrolázy .....	37
8.5.5	Ligázy .....	37
8.6	Seznam použitých protilátek .....	37
9	Metody .....	38
9.1	Příprava plazmidů kódujících homologní geny <i>RPL22</i> /fragment genu <i>25S rRNA</i> ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
9.1.1	Kultivace kvasinek pro izolaci RNA .....	38



9.1.2	Izolace RNA.....	38
9.1.3	Reverzní transkripce.....	39
9.1.4	PCR.....	39
9.1.5	Horizontální agarózová elektroforéza .....	40
9.1.6	Izolace DNA z agarózového gelu.....	41
9.1.7	Štěpení restrikčními enzymy .....	41
9.1.8	Přečištění DNA od enzymatických reakcí.....	42
9.1.9	Ligace inzertu a vektoru .....	43
9.2	Transformace plazmidové DNA do elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i> ( <i>DH5α</i> ).....	43
9.2.1	Příprava elektrokompetentních kmenů <i>E. coli</i> ( <i>DH5α</i> ).....	43
9.2.2	Transformace plazmidové DNA do <i>DH5α</i> elektroporací.....	44
9.3	Izolace plazmidů z <i>E. coli</i> ( <i>DH5α</i> ) alkalickou metodou .....	44
9.4	Izolace plazmidů z <i>E. coli</i> ( <i>DH5α</i> ) na kolonce .....	45
9.5	Přečištění plazmidů izolovaných alkalickou metodou .....	46
9.6	Ověření klonování homologních genů <i>RPL22</i> /fragmentu genu <i>25S rRNA</i> z <i>S. cerevisiae</i> ...	46
9.7	Příprava kvasinkových kmenů exprimujících homologní geny <i>RPL22</i> /fragment <i>25S rRNA</i> z <i>S. cerevisiae</i> .....	46
9.7.1	Transformace <i>S. cerevisiae</i> s využitím lithium – acetátu .....	46
9.7.2	Uchování kvasinkových kmenů .....	47
9.8	Ověření produkce homologních Rpl22 .....	47
9.8.1	Příprava proteinových extraktů .....	47
9.8.2	Tris – tricínová SDS proteinová elektroforéza.....	48
9.8.3	Přenos proteinů na membránu (Western blot).....	49
9.8.4	Imunodetekce protilátkou.....	50
9.8.5	Vizualizace proteinů na membráně alkalickou fosfatázou.....	50
9.9	Měření rychlosti růstu kvasinkových kmenů .....	50
9.9.1	Výpočet doby zdvojení kvasinek .....	51
9.10	Trojhybridní systém .....	51
9.11	Semikvantitativní PCR.....	52
9.12	Kvantitativní PCR (qPCR).....	52
10	Výsledky .....	54
10.1	Konstrukce plazmidů.....	54
10.2	Rpl22 pocházející z <i>Y. lipolytica</i> a <i>H. sapiens</i> nekomplementují růstový fenotyp <i>S. cerevisiae rpl22aΔrpl22bΔ</i> .....	54
10.3	Vazba Rpl22 z <i>C. albicans</i> a <i>H. sapiens</i> na fragment 25S rRNA nekoreluje se schopností těchto proteinů komplementovat růstový defekt <i>S. cerevisiae rpl22aΔrpl22bΔ</i> .....	58
10.4	Všechny homologní proteiny Rpl22 inhibují sestřih pre-mRNA <i>RPL22B</i> z <i>S. cerevisiae</i> ...	64

10.5	Exprese mRNA endogenního <i>RPL22B</i> z lokusu <i>RPL22B</i> je ovlivněna všemi homologními Rpl22 v buňkách <i>S. cerevisiae rpl22aΔ</i> .....	66
10.6	Fragment I2 je nedostatečný pro ověření schopnosti vazby homologních Rpl22 na intron <i>RPL22Bi</i> v trohybridním systému .....	69
11	Diskuze.....	72
11.1	Rpl22 z <i>Y. lipolytica</i> a <i>H. sapiens</i> nekomplementují růst buněk <i>rpl22aΔrpl22bΔ</i> .....	72
11.2	Rpl22 z <i>Y. lipolytica</i> a z <i>H sapiens</i> se liší schopností vazby 25S rRNA <i>S. cerevisiae</i> .....	75
11.3	Inhibice sestřihu pre-mRNA <i>RPL22B</i> .....	80
11.4	Vazba intronu <i>RPL22B</i> .....	83
11.5	Využití kodonů <i>YIRPL22</i> .....	84
12	Závěr .....	86
13	Reference.....	87

## 5 Úvod

Ribozomy hrají klíčovou roli v syntéze proteinů. Hlavní funkce RP se uplatňuje při vzniku těchto partikulí, kde se RP účastní sestavování jednotlivých ribozomálních podjednotek. RP také podporují správné zaujetí konformace rRNA, což vede ke stabilizaci katalytického centra ribozomu a účinné translaci.

Všechny RPG jsou do určité míry exprimovány synchronizovaně díky signálním drahám, které mohou naráz inhibovat nebo aktivovat expresi RPG (Nosrati et al., 2014; Petibon et al., 2021). Tato synchronizace je důležitá z hlediska správného sestavování ribozomů, protože zajišťuje vhodnou stechiometrickou rovnováhu RP. Kromě obecné regulace RPG, na kterou reagují všechny RP, existují regulační mechanismy specifické pro jednotlivé RPG. Tyto mechanismy udržují poměr RP a upravují ho dle potřeby v reakci na různé podmínky. Např. *S. cerevisiae* reaguje na stres odpovědí, která vede k odlišné produkci jednotlivých paralogů RP. Dvojice paralogů se totiž mohou lišit ve funkci vypořádání se s nepříznivými podmínkami (Gabunilas & Chanfreau, 2016; Ghulam et al., 2020; Ghulam et al., 2022). Expresí konkrétních paralogů RPG také může vést ke vzniku ribozomů se specifickým složením a funkcí, což umožní buňkám se adaptovat. U vyšších eukaryot se v různých tkáních exprese některých RPG liší, což naznačuje, že RP mohou mít specializované role v různých vývojových kontextech. Zachování správného poměru RP je rozhodující mimo jiné i z hlediska dostupnosti RP, které mohou zprostředkovat extraribozomální funkce. Mnoho studií totiž ukázalo, že některé RP mají kromě své primární role v ribozomu také funkce mimo něj. Zahrnují např. regulaci genové exprese, opravy DNA nebo regulaci buněčného cyklu (Warner & McIntosh, 2009).

Některé RPG jsou regulovány smyčkou negativní zpětné vazby, kdy se volné RP se díky svým RNA vazebným schopnostem vážou na jejich vlastní pre-mRNA nebo mRNA a inhibují sestřih či translaci (Fewell & Woolford, 1999; Macías et al., 2008). Nerovnováha v hladinách RP může mít škodlivé účinky na buněčný růst a dělení, což vede u vyšších eukaryot ke vzniku různých onemocnění, včetně rakoviny (De La Cruz et al., 2015). Tato autoregulace se vyvinula také u Rpl22A/B a zahrnuje blokování sestřihu (Gabunilas & Chanfreau, 2016; Abrhánová et al., 2018).

Pochopení mechanismů, které regulují expresi RPG, může doplnit poznatky o základních procesech regulace exprese genů, ale také o dalších rolích RP, které plní navíc, mimo konzervované funkce v proteosyntéze

## 6 Literární přehled

### 6.1 Ribozomální proteiny

Produkce veškerých proteinů v buňce je zajištěna ribozomy. U eukaryot utváří 18S rRNA spolu se 33 RP malou ribozomální podjednotku (40S), zatímco velká podjednotka (60S) sestává z 5S rRNA, 5,8S rRNA, 25S (u kvasinek) /28S rRNA (u člověka) a 46 (u kvasinek)/47 (u člověka) RP (Wilson & Doudna Cate, 2012). Za katalytickou funkci ribozomu je zodpovědná rRNA (Cech, 2000). Správná geometrie peptidyl transferázového centra ribozomu je nezbytná k tomu, aby došlo k esenciálním interakcím mezi atomy rRNA a tRNA vedoucím k tvorbě nové peptidové vazby mezi aminokyselinami (AK) (Polikanov et al., 2014).

RP v ribozomu nemají katalytickou funkci, ale podílí se právě na formování struktury rRNA. Zajistí vznik její složité funkční architektury. RP prostřednictvím interakce s rRNA a případně dalšími RP, udržují tvar této rRNA a stabilizují její konformaci, která je nutná pro účinnost translace. Např. Rpl4 a Rpl17 usměřují nově syntetizovaný peptidový řetězec tím, že omezují, kudy vystupuje z ribozomu. Formují tzv. výstupní kanál pro proteiny, jehož správná struktura je nutná pro zaujetí nativní konformace vznikajícího proteinu. Rps12 se zase uplatňuje v zajištění správné interakce mezi kodonem a antikodonem. Předpokládá se, že Rps3 a Rps30, které lokalizují v místě vstupního kanálu pro mRNA, hrají roli v rozplétání sekundárních struktur translatované mRNA (Wilson & Doudna Cate, 2012).

Další z funkcí, která je klasifikována jako ribozomální, je účast RP v biogenezi ribozomu. RP jsou nejprve syntetizovány v cytoplazmě, odkud musí být následovně lokalizovány zpět do jadérka nebo jádra, kde probíhají počáteční kroky sestavení jednotlivých ribozomálních podjednotek. RP se vážou na rRNA ve specifickém pořadí během biogeneze ribozomu. Vazba RP, které interagují s rRNA nejdříve, je nutná pro tvorbu vhodného vazebného místa pro RP, které asociují s pre-ribozomálními podjednotkami v pozdějších fázích sestavování ribozomu. Spolu s dalšími pomocnými faktory zajišťují RP postupné a přesné skládání rRNA. Síla interakce mezi RP a rRNA se zvyšuje v průběhu zrání ribozomálních podjednotek (De La Cruz et al., 2015).

RP se podílí na regulaci úprav rRNA. 18S rRNA, 28S rRNA a 5,8 rRNA jsou transkribovány Polymerázou I jako jeden prekurzor 47S pre-rRNA, který je následně upraven do podoby 45S pre-rRNA. Výsledkem aktivity endonukleáz a exonukleáz je vznik prekurzorů 30S pre-rRNA a 32S pre-rRNA. 30S pre-rRNA je sledem několika štěpení upravena do podoby 21S pre-rRNA, poté do 18S-E pre-rRNA a následně vzniká maturovaná 18S rRNA. Naopak 32S pre-rRNA je

štěpena na 12S pre-rRNA, ze které vzniká 5,8S rRNA, a na 28,5S pre-rRNA, ze které je vytvořena 28S rRNA (Aubert et al., 2018).

Vazba RP ze 40S na prekurzory 18S rRNA je esenciální z hlediska maturace této rRNA (De La Cruz et al., 2015). Delece Rps6, Rps7, Rps16, Rps24 nebo Rps28 vede k akumulaci 30S rRNA a snížení hladiny 21S rRNA (prekurzory 18S rRNA) v buňce. Naopak následkem delece Rps17 či Rps19 je hromadění 21S rRNA a snížení hladiny 18S-E rRNA (prekurzory 18S rRNA). Rpl7, Rpl14 nebo Rpl26 mají pravděpodobně roli v maturaci rRNA 60S, protože delece těchto jednotlivých RP zamezí vzniku 28S rRNA a 5,8 rRNA. Zároveň se zvýší hladina prekurzorů 45S rRNA a 12S rRNA (Robledo et al., 2008).

RP mají také funkci v udržení integrity jadérka. Delece jednotlivých RP totiž vede k rozrušení jeho struktury. Tento defekt byl pozorován v buňkách HeLa zejména při delecí uL18, uL5, uL1, uL2, eL43, eL21 nebo eL19 (Nicolas et al., 2016).

Ne všechny RP jsou pro buňku esenciální i přesto, že se uplatňují v tak důležitém komplexu jako je ribozom. U *S. cerevisiae* bylo potvrzeno 14 RP, které jsou postradatelné. Buňky s delecí v těchto genech mohou vykazovat růstový defekt, ovšem translace jako taková stále může probíhat (Steffen et al., 2012).

Kromě funkcí ribozomálních některé RP získaly schopnost operovat i mimo ribozom. Pokud se v buňce nachází ve volné formě nebo v nějakém komplexu (bez vazby na ribozom), tak mohou nabývat tzv. extraribozomálních funkcí (Warner & McIntosh, 2009). Teorie světa RNA představuje RNA, jakožto molekulu, která na začátku vzniku života uchovávala genetickou informaci, a také vykonávala funkci katalytickou (Higgs & Lehman, 2015). V průběhu času došlo k vývoji komplexnějších organismů, a ke vzájemnému přizpůsobení proteinů a RNA. Ribozom je jedním z příkladů, kdy se rRNA s katalytickou funkcí a proteiny s funkcí stabilizace rRNA adaptovaly a začaly spolupracovat. Toto je příklad konzervované spolupráce RNA a RP, kterou si zachovaly u všech organismů. Se vznikem složitějších živých systémů získávaly RP nové funkce, které vznikaly na základě přizpůsobení se nejrůznějším podmínkám. Tyto funkce už nejsou tak konzervované, jako ty ribozomální (Warner & McIntosh, 2009).

## 6.2 Evoluce paralogů *Saccharomyces cerevisiae*

Duplikace genu, případně celého genomu, vede ke vzniku paralogů (Wolfe & Shields, 1997). Ihned po vzniku duplikátů jsou paralogní geny identické, co se týče sekvence, struktury a funkce. To může být pro organismus výhodné z hlediska kompenzování funkce v případě

škodlivé mutace či ztráty jedné z kopií. Nevýhoda rozsáhlých duplikací tkví v tom, že vede ke snížení stability genomu. Zvýší se pravděpodobnost delecí, mutací a translokací, čímž mohou být některé funkční geny poškozeny (Mayer & Aguilera, 1990). Postupem času ovšem dochází pod selekčním tlakem k hromadění mutací, které vedou ke vzniku nových funkcí a k diferenciaci duplikovaných genů. Ty paralogy, které poskytují organismu nějakou výhodu jsou zachovány. Paralogy, které buňku znevýhodňují při selekci jsou eliminovány. Selekční tlak na vyšší expresi, popřípadě vznik nové funkce specifické pro jednoho z paralogů podmiňuje, které geny budou zachovány v duplikátu. Navíc původní esenciální funkce genu mohou být rozděleny mezi vzniklé paralogy, a proto je třeba zachovat obě kopie (Seoighe & Wolfe, 1999).

WGD byla před 100 miliony let zodpovědná za vznik paralogů u *S. cerevisiae*. Wolfe a Shields navrhuje, že předek *S. cerevisiae* byla tetraploidní kvasinka, která vznikla fúzí dvou diploidních buněk (alopolyploidie) nebo duplikací genomu v rámci jedné buňky (autopolyploidie). Z tohoto předka se po masivní delecí a několika translokacích fragmentů duplikovaných chromozomů následně vyvinula *S. cerevisiae*, která si zachovala 13 % genů v duplikované formě (Wolfe & Shields, 1997). Cykliny, proteinkinázy a fosfatázy, proteiny glukózového metabolismu či RP patří mezi kategorie proteinů, jejichž geny se udržují u *S. cerevisiae* v duplikované formě (Seoighe & Wolfe, 1999).

Podstatný podíl paralogů *S. cerevisiae* tvoří RPG. Celkově obsahuje genom *S. cerevisiae* 137 RPG a 118 z nich jsou duplikáty (Planta & Mager, 1998). Produkty těchto paralogních genů jsou do jisté míry schopny vzájemně zastoupit své funkce, které zajistí správný růst buněk (Dean et al., 2008; Steffen et al., 2012).

21 párů duplikovaných RPG kóduje proteiny se shodnou sekvencí AK a 14 paralogních RP se liší pouze v 1 AK. Přes tyto sekvenční podobnosti se mohou paralogy v rámci duplikátu lišit v odpovědi na různé podmínky. Navzdory identické sekvenci Rpl23A a Rpl23B buňky reagují odlišně na delecí jednoho z těchto paralogů. Buňky s delecí *RPL23B* (*rpl23bΔ*) rostou výrazně pomaleji než buňky s delecí *RPL23A* (*rpl23aΔ*). Přítomnost tunicamycinu (vyvolává v buňkách stres endoplazmatického retikula) v médiu zpomalí růst *rpl23aΔ* až 3,3X, zatímco *rpl23bΔ* pouze 1,3X oproti podmínkám bez tunicamycinu. Autoři komentují, že tento efekt může být způsoben odlišnou regulací exprese paralogů *RPL23A* a *RPL23B* v reakci na měnící se podmínky prostředí (Steffen et al., 2012).

Několik paralogů RPG (ale ne jejich duplikované kopie) sdílí funkci, která souvisí s lokalizací mRNA *ASH1*. Ash1 se při pučení kvasinek účastní udržení párovacího typu v jádře vznikající

dceřiné buňky. Funguje jako represor genů, které jsou zodpovědné za změnu párovacího typu *S. cerevisiae* (Cosma, 2004). mRNA *ASH1* je v pozdní anafázi v buňkách WT asymetricky rozmístěna ve špičce pupenu. Ukázalo se, že rozmístění mRNA *ASH1* reaguje odlišně na delecí jednoho z paralogů RPG. V buňkách *rpl12bΔ*, *rpl7aΔ*, *rps18bΔ* nebo *rpl22aΔ* je mRNA *ASH1* distribuována spíše po cytoplazmě celého pučícího pupenu, než ve špičce pupenu. mRNA *ASH1* se při delecí *RPL12A*, *RPL7B*, *RPS18A* nebo *RPL22B* koncentruje spíše do míst špičky pupenu (Komili et al., 2007). Autoři Komili et al. navrhovali, zda není za defekt v rozmístění mRNA *ASH1* v buňkách *rpl12bΔ*, *rpl7aΔ*, *rps18bΔ* nebo *rpl22aΔ* zodpovědné snížení celkové hladiny RP kódovaných deletovanými geny. Nadprodukce odpovídajících paralogů ovšem nekomplementovala defekt v distribuci mRNA *ASH1* (Komili et al., 2007).

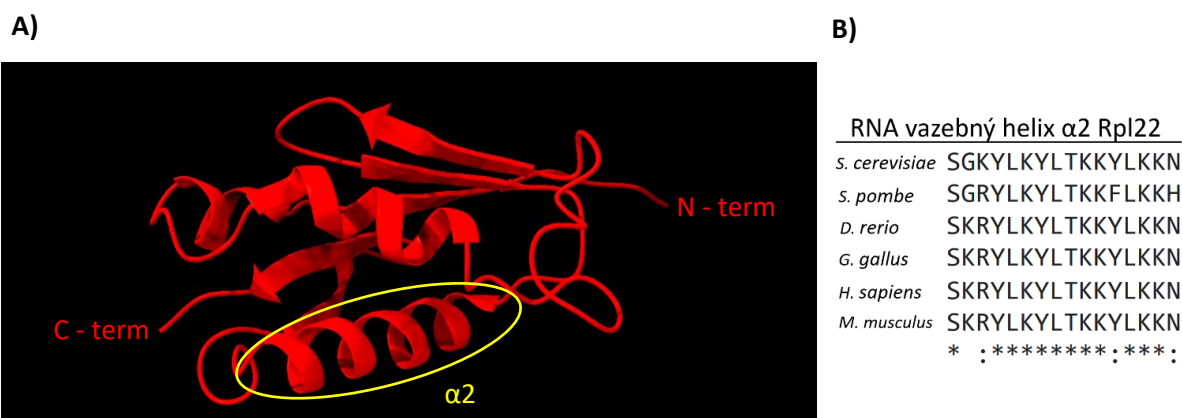
Dalším příkladem duplikovaných RPG se specifickými funkcemi jsou Rpl7A a Rpl7B. Tyto proteiny se liší v 5 AK. Za normálních podmínek je přednostně translatovaný Rpl7A, který je esenciální z hlediska biogeneze 60S. Delece *RPL7A* vede k pomalému růstu buněk a ke snížení poměru mezi 25S rRNA/18S rRNA. Nahrazení *RPL7A* druhou kopií *RPL7B* nezachrání tento fenotyp. Zároveň minoritní Rpl7B má specifickou roli v rezistenci vůči staurosporinu (indukuje apoptózu). Jeho delece nezpůsobí defekt v rychlosti růstu či v biogenezi 60S, ovšem zvýší senzitivitu buněk vůči staurosporinu. Tento fenotyp nezvrátí pouhá nadprodukce Rpl7A v buňkách *rpl7bΔ*. Buňky WT v podmínkách staurosporinu upřednostní expresi *RPL7B* a zvýší jeho inkorporaci do ribozomů (Malik et al., 2022).

Tato pozorování podporují hypotézu o existenci tzv. specializovaných ribozomů. Ta tvrdí, že se v buňce nachází skupiny funkčně odlišných ribozomů, které preferenčně translatují specifické mRNA. Funkční rozdíly těchto ribozomů mohou být podmíněny právě odlišným zastoupením paralogů RP v ribozomu (Genuth & Barna, 2018; Malik et al., 2022).

### 6.3 Rpl22

eRpl22 (Rpl22) je protein 60S, který je specifický pro eukaryotní buňky (Ban et al., 2014). Molekulová hmotnost Rpl22 je přibližně 15 kDa. Značnou část tohoto proteinu utváří globulární jádro. Tento strukturovaný úsek je tvořen pěti  $\beta$  skládanými listy, které jsou ve 3D struktuře obklopeny dvěma  $\alpha$  helixy (obrázek č. 1A) (Ben-Shem et al., 2011). AK vyskytující se v N- a C-terminálních oblastech Rpl22 jsou zodpovědné za vznik nestrukturovaných konců tohoto proteinu (PDB: 7UG6; Yelland et al., 2023). V rámci struktury Rpl22 se nachází RNA vazebný helix, který je konzervován mezi Rpl22 různých eukaryotických organismů (obrázek

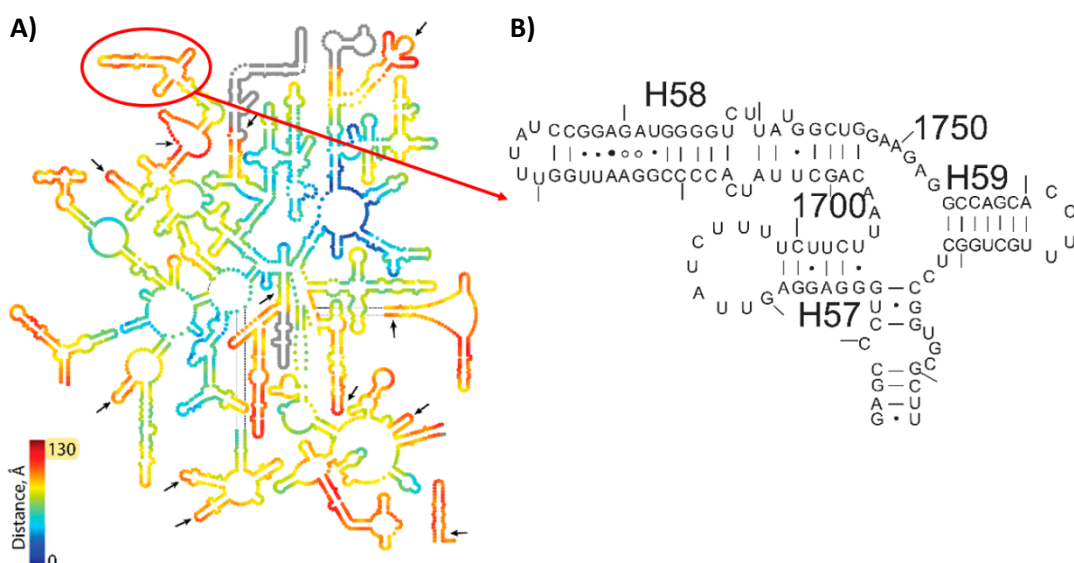
č. 1B). Obsahuje několik klíčových AK, které kontaktují 25S rRNA prostřednictvím vodíkových můstků (obrázek č. 1B).



**Obrázek č. 1 – A) Součástí terciární struktury Rpl22 je RNA vazebný helix.** Červeně je znázorněn Rpl22A *S. cerevisiae*. Žlutě je zvýrazněn konzervovaný  $\alpha$  helix 2 ( $\alpha 2$ ), který je zodpovědný za většinu kontaktu Rpl22 s 25S rRNA. N-term značí N-koncovou oblast Rpl22 a C-term C-koncovou oblast Rpl22. Struktura Rpl22 byla extrahována ze struktury ribozomu (PDB:4V88) (Ben-Shem et al., 2011) v programu ChimeraX (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>) (Pettersen et al., 2021). **B) RNA vazebný helix je konzervovaný u Rpl22 z různých organismů.** Sekvence Rpl22 byla převzata z databáze UniProt (accession no.: P35268).

Z krystalické struktury kvasinkového ribozomu vyplývá, že Rpl22 kontaktuje helix 57 (nt 1676–1690) a helix 59 (nt 1758) 25S rRNA (Ben-Shem et al., 2011). Tento úsek 25S rRNA je jedním z tzv. expanzivních segmentů (ES), které obohacují 25S rRNA oproti bakteriální 23S rRNA (Wilson & Doudna Cate, 2012). Strukturní analýzy ukazují, že ES se vyskytují spíše na povrchu ribozomu (Gómez Ramos et al., 2016) a nezasahují do konzervovaných oblastí ribozomu, jako je např. katalytické centrum (Petrov et al., 2014), rozhraní ribozomálních podjednotek a výstupní kanál pro nově syntetizované proteiny (Wilson & Doudna Cate, 2012). Tomu odpovídá, že Rpl22 se váže v rámci ribozomu na jeho povrch (obrázek č. 2).





**Obrázek č. 2 – Rpl22 kontaktuje helix 57 a 59 25S rRNA.** Barevná škála znázorňuje experimentálně změřenou vzdálenost daných úseků rRNA od úseku rRNA vyskytujícího se v katalytickém centru ribozomu v Å. Tato vzdálenost byla měřena ve 3D struktuře ribozomu (modrá – blíže katalytickému centru ribozomu, červená – dále od katalytického centra ribozomu). Šipky ukazují na některé segmenty rRNA, které jsou expandované u eukaryot v porovnání s bakteriální rRNA. Šedě jsou vyznačeny oblasti, u nichž nebylo možné experimentálně prokázat vzdálenost od katalytického centra ribozomu ve 3D. Červeně je zvýrazněn úsek obsahující vazebné místo pro Rpl22. **A)** 5S rRNA, 5,8S rRNA a 25S rRNA *S. cerevisiae*. **B)** 25S rRNA – helix 57, 58, 59 a okolí (nt 1666–1784). Obrázek A byl převzat z (Petrov et al., 2014) a obrázek B z (Xie et al., 2012) a upraven.

Rpl22 struktura připomíná RNA interagující doménu RRM (RNA recognition motif). RRM je součástí RNA vazebných proteinů, které se účastní maturace RNA jako jsou např. faktory účastnící se sestřihu a alternativního sestřihu (U2AF, hnRNPA1, PTB nebo proteiny SR) (Maris et al., 2005). RRM se skládá ze čtyř  $\beta$  skládaných listů, které jsou ve 3D struktuře obklopeny dvěma  $\alpha$  helixy. Rpl22 a RRM strukturu tedy odlišuje jeden  $\beta$  skládaný list. I přes podobnou konformaci se liší RRM a Rpl22 v mechanismu vazby RNA. Rpl22 interaguje s rRNA prostřednictvím RNA vazebného helixu, zatímco RRM zprostředkuje vazbu na RNA skrz  $\beta$  skládané listy (Ben-Shem et al., 2011; Daubner et al., 2013).

Konkrétní funkce Rpl22 nebyla dosud objasněna. Z hlediska umístění Rpl22 v rámci ribozomu nelze předpokládat, jakou funkcí přispívá účinné translaci. Pravděpodobně udržuje konformaci rRNA, která je důležitá pro plně funkční ribozomy nebo hraje roli v regulaci biogeneze ribozomu. V literatuře může být Rpl22 zaměněn za uRpl22 (ve starších publikacích pouze L22),

který se v ribozomu nachází u výstupního kanálu pro nově syntetizovaný peptid, a je konzervovaný mezi všemi organismy. U kvasinek a člověka je občas také značen jako Rpl17. Dle novější nomenklatury se jedná o uRpl22 (Ban et al., 2014).

V buňce nalezneme Rpl22 zejména v cytoplazmě ve vazbě na ribozom nebo akumulovaný v jadérku, kde dochází k raným krokům biogeneze ribozomu (Toczyski et al., 1994; Houmani & Ruf, 2009). Pro jadernou lokalizaci Rpl22 *Homo sapiens* je esenciální úsek AK 13 – 16, který obsahuje čtyři lysiny. Houmani et al. také navrhuje, že kumulaci Rpl22 v jadérku podmiňuje vazba Rpl22 na 28S rRNA spíše než signální sekvence v rámci Rpl22 (Houmani & Ruf, 2009).

### 6.3.1 Funkce Rpl22 vyšších eukaryot

Rpl22 vyšších eukaryot se uplatňuje kromě své ribozomální funkce v mnoha dalších buněčných procesech. Tyto procesy zahrnují jak regulaci exprese genů, tak regulaci buněčného cyklu. Navíc Rpl22 hraje roli při rozvoji virových a nádorových onemocnění. U mnoha funkcí Rpl22 nebyl popsán přesný mechanismus fungování, ovšem jak uvidíme, pole působení Rpl22 je široké.

U Rpl22 pocházejících z různých organismů bylo popsáno několik extraribozomálních funkcí, které Rpl22 vykonává prostřednictvím vazby na RNA. Důsledek vazby je různý. Např. delece *Rpl22* v myších buňkách způsobí trojnásobné zvýšení hladiny mRNA paralogního *Rpl22like1* v porovnání s kontrolními buňkami. Naopak nadprodukce Rpl22 vede k snížení hladiny mRNA *Rpl22like1* a odpovídajícího proteinu. Rpl22 totiž reguluje expresi svého paralogu *Rpl22like1* prostřednictvím vazby vlásenky mRNA *Rpl22like1*. Tato vazba vede k inhibici translace a snížené produkci *Rpl22like1* (O'Leary et al., 2013). Přesný mechanismus, jak dochází k inhibici translace nebyl popsán.

Regulační vztah Rpl22 vůči *Rpl22like1* může nepřímo ovlivnit, zda se v buňce uplatní některé z funkcí Rpl22. Tyto paralogy totiž mají v některých případech protichůdné funkce. Rpl22 tedy může ovlivnit působení svého antagonisty. Příkladem, kdy Rpl22 a *Rpl22like1* mají opačný efekt v rámci regulace genové exprese, je sestřih pre-mRNA *Smad2* v buňkách raných embryí *Danio rerio*. *Smad2* hraje klíčovou roli v signální dráze TGF- $\beta$ , která se uplatňuje mimo jiné při vývoji (Shaifur Rahman et al., 2015). Rpl22 váže vlásenku v intronu 8 pre-mRNA *Smad2*, což vede při sestřihu k přeskočení exonu 9 a ke vzniku zkrácené mRNA *Smad2*. Takto vzniklá mRNA není translatována a *Smad2* není produkován. Navíc Rpl22 fyzicky interaguje s hnRNP A1 (Zhang et al., 2017), který funguje jako negativní regulátor sestřihu. Výsledkem represe

*Smad2* je defektní vývoj embryí. Imunoprecipitace proteinů kovalentně vázaných na RNA odhalila, že *Rpl22like1* se také váže na vlásenku v intronu 8 pre-mRNA *Smad2*. Autoři v buňkách bez *Rpl22* (které produkují pouze *Rpl22like1*) detekují pouze translatovatelnou formu mRNA *Smad2*, která obsahuje exon 9. V myších embryonálních buňkách byl také pozorován vliv *Rpl22like1* na sestřih pre-mRNA *Smad2*. Absence *Rpl22like1* způsobila přeskočení exonu 7 a 8 v primárním transkriptu *Smad2* a vedla ke vzniku zkrácené mRNA *Smad2*. Autoři navíc ukázali, že delece *Smad2* je po 12 dnech embryonálního vývoje letální. *Rpl22like1* je tedy pravděpodobně esenciální pro zárodečný vývoj (Zhang et al., 2017).

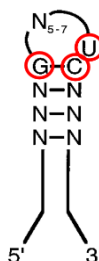
Další z protichůdných funkcí *Rpl22* a *Rpl22like1* se týká regulace exprese *Smad1*. Ten reaguje různě na nadprodukcí *Rpl22* nebo *Rpl22like1* v embryonálních buňkách *Danio rerio*. V buňkách s heterologní expresí *Rpl22* dochází ke snížené produkci proteinu *Smad1*, zatímco u buněk exprimujících *Rpl22like1* tento efekt autoři nepozorují. *Rpl22* i *Rpl22like1* vážou několik vlásenek vyskytující se jak v 5' a 3' netranslatovaných oblastech (UTR) mRNA *Smad1*, tak v kódující sekvenci této mRNA. Ve studii byla prokázána kompetice ve vazbě na 5' UTR mRNA *Smad1* mezi *Rpl22* a *Rpl22like1*. Navíc autoři ukazují, že snížená produkce *Smad1* je zapříčiněna nižším nabohacením mRNA *Smad1* ve frakcích polysomů z buněk s reprimovaným *Rpl22like1* (Zhang et al., 2013). To vede k inhibici signální dráhy BMP, která je důležitá pro vývoj hematopoetických krevních buněk (Shaifur Rahman et al., 2015).

*Rpl22* navíc hraje roli při virových infekcích. *Rpl22* tvoří ribonkuleoproteinový komplex s malou nekódující RNA viru Epstein – Baarové (EBV) EBER1 (Epstein-Barr virus-encoded RNA 1- EBER1) (Toczyski et al., 1994). *In vitro* studie EMSA (Electrophoretic mobility-shift assay) a *in vivo* vazebné studie ukázaly, že až tři molekuly *Rpl22* se mohou vázat na EBER1. EBER1 totiž obsahuje tři vlásenky, které slouží jako vazebná platforma pro *Rpl22* (Fok et al., 2006). V nenapadených buňkách se *Rpl22* vyskytuje v cytoplazmě a v jádru. V B lymfocytech napadených EBV dochází k transportu komplexu *Rpl22* – EBER1 do nukleoplazmy (Toczyski et al., 1994). Houmani et al. diskutují, že EBER1 může vyvazovat *Rpl22*, aby zabránil jeho funkcím v rámci buňky, nebo se *Rpl22* sám účastní virové infekce (Houmani & Ruf, 2009). Byla také potvrzena asociace *Rpl22* s lidskou telomerázou. Autoři diskutují, že by interakce mezi *Rpl22* a EBER1 mohla bránit funkci *Rpl22* ve spojení s telomerázou. Bližší informace ovšem nejsou dostupné (Le et al., 2000).

Kromě interakce mezi *Rpl22* a virovou RNA EBER1 byla objevena vazba *Rpl22* na RNA genom viru hepatitidy C (HCV). *Rpl22* se pravděpodobně účastní regulace translace RNA

genomu HCV. V 5' UTR této RNA se nachází IRES (internal ribosome entry site), které je důležité pro translaci polypeptidu kódovaného genomem HCV (Lukavsky, 2009). Rpl22 váže vlásenku v UTR na 3' konci genomové RNA (3'X). Pokusy s radioaktivně značeným fragmentem 3'X ukazují, že Rpl22 má větší afinitu k vláknu s pozitivní (sense) orientací, ovšem tvoří komplex i s vláknem opačné orientace (antisense). Efekt této vazby se pravděpodobně projeví zvýšenou translací RNA obsahující IRES. Pokusy s reportéry obsahující 5'UTR s IRES a 3'UTR HCV ukazují, že nadprodukce Rpl22 zvýší aktivitu reportérové IRES dvojnásobně (Wood et al., 2001). V buňkách infikovaných HCV vystavených teplotnímu šoku dochází ke zvýšené expresi dlouhé nekódující RNA *Alu*. *Alu* je repetitivní transponovatelný element vyskytující se v genomu primátů ve vysoké míře. Vazbou na cílové mRNA je schopen inhibovat jejich translaci (Stuart et al., 2000). Autoři ukazují korelaci úbytku Rpl22 a zvýšení hladiny *Alu* a diskutují, že *Alu* by vzhledem ke své funkci v inhibici genové exprese mohl být zodpovědný za sníženou produkci Rpl22. Ukazují komplementaritu mezi *Alu* a mRNA *Rpl22* (Farghaly et al., 2018). Vazba těchto dvou molekul ovšem nebyla potvrzena experimentálně.

Výsledky SELEX (Systematic evolution of ligand by exponential enrichment) vedly k popsání vazebného motivu (obrázek č. 3), který byl nalezen ve všech zmíněných RNA vazebných ligandech proteinu Rpl22 a Rpl22like1 (mRNA *Rpl22like1*, mRNA *Smad1*, pre-mRNA *Smad2*, nekódující EBER1, genomová RNA HCV) (Dobbelstein & Shenk, 1995; Wood et al., 2001; O'Leary et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2017). Jelikož se tento motiv nachází i v 25S/28S rRNA je pravděpodobné, že povrch, kterým Rpl22 zprostředkuje vazbu je ve všech těchto případech stejný.



**Obrázek č. 3 – RNA, se kterými Rpl22 a Rpl22like1 interagují obsahují strukturu vlásenky. Vyznačen je minimální sekvenční konsenzus. Převzato od Dobbelstein et al. (1995) a upraveno.**

Při zkoumání nádorových buněk bylo zjištěno, že mutace v genu *Rpl22* jsou frekventované. Cao et al. popisují *Rpl22* jako tumor supresor vzhledem k tomu, že byl nalezen mutovaný v nádorových buňkách s intaktním p53 ve vysoké míře. Za normálních podmínek je v buňce udržována nízká hladina tumor supresoru p53 prostřednictvím Mdm2. Mdm2 ubikvitinyluje p53, což vede k jeho degradaci (Nag et al., 2013). Rpl22 při indukovaném ribozomálním stresu působí v komplexu s Rpl5 a Rpl11 jako nepřímý aktivátor p53. Tento komplex inhibuje vazbou na Mdm2 její ubikvitinylační aktivitu. Inhibicí Mdm2 je v buňce docíleno stabilizace p53 (Cao et al., 2017).

Nezávisle na funkci Rpl22 v aktivaci p53 byla popsána role Rpl22 v buněčném stárnutí. Rpl22 je autory prezentován jako faktor indukující senescenci buněk. Nadprodukce Rpl22 způsobí nízkou proliferaci buněk IMR90 (používaných pro studium senescence), a také buněk rakoviny prostaty s delecí p53. Navíc Rpl22 v IMR90 indukuje markery senescence jako je hypofosforylovaný pRB nebo nízká exprese MCM6 (Mini-chromosome maintenance protein) a CENPA (Centromere protein A). Ukázalo se, že Rpl22 totiž váže Cdk4, cyklin D, ale i komplex Cdk4-Cyklin D. V důsledku vazby nedochází k fosforylaci pRB, což vede k inhibici proliferace (Del Toro et al., 2019).

Např. v buňkách nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) byla potvrzena represe *Rpl22* (Yang et al., 2013). Autoři později ověřili, že Rpl22 *in vitro* inhibuje fosforylační aktivitu katalytické podjednotky kasein kinázy 2 (CK2) prostřednictvím její vazby (Yang et al., 2014). CK2 je Ser/Thr proteinkináza, která má roli v proliferaci buněk (Bierhoff et al., 2008). CK2 také fosforyluje a aktivuje UBF (Upstream binding factor), který aktivuje transkripci rDNA (Lin et al., 2006). Vzhledem k některým funkcím Rpl22 a k tomu, že Rpl22 není esenciální pro translaci a růst buněk vyšších eukaryot (O'Leary et al., 2013), mutace tohoto genu může být výhodná pro nádorové buňky procházející transformací.

### 6.3.2 Paralogy Rpl22A a Rpl22B *Saccharomyces cerevisiae*

Rpl22 je u *S. cerevisiae* stejně jako u vyšších eukaryot kódován dvěma paralogy, *RPL22A* a *RPL22B*. Rpl22A a Rpl22B jsou příkladem jednoho z nejvíce odlišných párů paralogů. Tyto paralogy se liší ve 22 AK. *RPL22A* je exprimovaný více než *RPL22B*, takže tvoří většinu mRNA *RPL22* produkující se v buňkách WT. Představuje 93 % celkového množství mRNA *RPL22*. Hladina proteinu Rpl22A je také vyšší než hladina Rpl22B, produkují se v poměru 96/4 (Rpl22A/Rpl22B) (Abrhánová et al., 2018). Inkorporace Rpl22A do ribozomu je více než 10X vyšší než inkorporace Rpl22B (Maitra et al., 2020).

Při oxidačním stresu je poměr proteinů Rpl22A/Rpl22B ještě vyšší než v normálních podmínkách. Trm4 je methyltransferáza, která katalyzuje metylaci 5. uhlíku cytosinu různých tRNA. Vystavení buněk oxidačnímu stresu vede ke zvýšené tvorbě 5-methylcytosinu ( $m^5C$ ) na tRNA. Zároveň buňky s delecí Trm4 jsou citlivé na přítomnost  $H_2O_2$  v médiu. Trm4 se podílí na vzniku  $m^5C$  na pozici wobble antikodonu tRNA<sup>LEU(CAA)</sup>. Methylace této tRNA se dynamicky mění v odpovědi na oxidační stres. Vystavení buněk  $H_2O_2$  vede ke vzniku  $m^5C$  (C34) tRNA<sup>LEU(CAA)</sup> a k preferenčnímu translatování mRNA, které pro leucin používají kodon UUG (komplementární k CAA). TTG je nejčastěji využívaný kodon pro leucin v RPG *S. cerevisiae*. U *RPL22A* jsou všechny leuciny kódované TTG, zatímco u *RPL22B* tento kodon využívá pouze 38 % leucinů. Odlišné využití kodonů mRNA *RPL22A* a *RPL22B* ovlivní v podmínkách oxidativního stresu produkci Rpl22A a Rpl22B, kdy Rpl22A je translatován ve větší míře. Buňky *rpl22aΔ* vykazují signifikantně vyšší senzitivitu vůči  $H_2O_2$  než buňky *rpl22bΔ* nebo WT. To naznačuje roli Rpl22A ve vypořádávání se buněk s oxidačním stresem (Chan et al., 2012).

Bylo popsáno několik fenotypů buněk s delecí v genech *RPL22*, kdy delece jednoho nebo druhého z paralogů vede odlišnému chování. Delece *RPL22A* (*rpl22aΔ*), kromě zpomalení růstu buněk zároveň prodlouží jejich reprodukční životnost (rozdíl 38,3% oproti buňkám WT) (Steffen et al., 2012). U *S. cerevisiae* je fenotyp prodloužené životnosti způsoben také delecí Met3 (sulfát adenylyltransferáza) (Steffen et al., 2012; McCormick et al., 2015). Hladina Met3 je v buňkách *rpl22aΔ* nižší než v buňkách WT nebo *rpl22bΔ* (v buňkách *rpl22bΔ* je dokonce vyšší než ve WT). Autoři diskutují, že by nízká koncentrace Met3 mohla vysvětlit prodloužení životnosti buněk *rpl22aΔ* (Maitra et al., 2020). Delece *RPL22B* (*rpl22bΔ*) rychlost růstu neovlivní (Steffen et al., 2012). Z hlediska transkriptomu v takových buňkách dochází ke zvýšené expresi genů stresové odpovědi a snížené expresi genů souvisejících s biogenezí ribozomu (Abbrámová et al., 2018).

Delece *RPL22A/B* vede k odlišnému chování buněk i v přítomnosti stresových faktorů. Např. výsledkem indukovaného stresu endoplazmatického retikula tunicamycinem v buňkách *rpl22aΔ* je 1,3X pomalejší růst než v samotném médiu. Stejná koncentrace tunicamycinu zpomalí růst buněk *rpl22bΔ* 2,5X v porovnání s buňkami *rpl22bΔ*, které rostou v samotném médiu. To naznačuje roli, zejména Rpl22B, v rezistenci vůči stresu endoplazmatického retikula (Steffen et al., 2012). Navíc buňky s delecí *rpl22aΔ* v porovnání s WT jsou více tolerantní vůči kyselému pH (pH 4,5). Na rozdíl od buněk WT rostou buňky *rpl22aΔ* v přítomnosti 0,8% kyseliny octové v médiu (An et al., 2015). Kim a Strich ukazují, že Rpl22A je důležitý pro přežití buněk při nízkých teplotách. Kultivace buněk *rpl22aΔ* nebo *rpl22aΔrpl22bΔ* v tekutém

médiu při 4 °C po dobu 24 h následovaná kultivací na tuhém médiu ve 23 °C vede k tomu, že buňky téměř nevyrostou. Buňky WT a *rpl22bΔ* po stejném ošetření rostou. Autoři neudávají, jak dlouho byly buňky inkubovány na tuhém médiu při 23 °C (Kim & Strich, 2016). Buňky *rpl22aΔrpl22bΔ* a *rpl22aΔ* rostou 1,7 – 2X pomaleji než WT (Steffen et al., 2012). Je tedy otázka, zda pro to, aby se projevil růst buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* a *rpl22aΔ* po inkubaci při nízkých teplotách není třeba pouze delší inkubační doba.

Rpl22A/B se také nepřímo účastní meiotického dělení *S. cerevisiae*. Nepříznivé podmínky prostředí vedou u kvasinek ke vstupu do meiózy a k jejich následné sporulaci. Ime1 je esenciální transkripční faktor aktivující expresi meiotických genů *S. cerevisiae*. Je indukovaný při nedostatku dusíku. Delece *IME1* zamezí meióze a buňky zůstávají v diploidním stádiu. Rpl22A/B se účastní translace mRNA *IME1*. V buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* dochází k produkci této mRNA, ale ne k tvorbě proteinu Ime1. V regulaci translace mRNA *IME1* hraje roli 5'UTR. V buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* vede delece úseku 5'UTR ke zvrácení defektu, kdy se produkce Ime1 obnoví. Nízká produkce Ime1 není způsobena malou účinností translace v důsledku delece *RPL22A/B*. Tomu naznačují výsledky inkorporace <sup>35</sup>S-Met a <sup>35</sup>S-Cys do nově syntetizovaných peptidů u *rpl22aΔrpl22bΔ* v porovnání s WT. Autoři navrhuji, že by Rpl22A/B mohl fungovat jako jeden z bodů kontroly množství dusíku v prostředí (Kim & Strich, 2016). Ve studii Mitra et al. pozorují rozdíl mezi buňkami *rpl22aΔrpl22bΔ* a WT v inkorporaci analogu methioninu (L-homo-propargylglycin) do proteinů. Jejich výsledky naznačují, že začlenění analogu do řetězce proteinu je mnohem méně účinné v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* (Maitra et al., 2020). Ovšem rozdíl mezi výsledky Kim a Strich a Mitra et al. může být daný odlišnými podmínkami v kultivaci nebo použité detekční molekule.

#### 6.4 Regulace exprese RPG *Saccharomyces cerevisiae* na úrovni sestřihu

Sestřihový aparát je dynamický ribonukleoproteinový komplex, který se účastní tvorby mRNA. Postupně dochází podjednotkami sestřihového aparátu k rozpoznání 5' sestřihového místa, bodu větvení (branch point – BP) a 3' sestřihového místa na pre-mRNA. Po sestavení katalyticky aktivní konformace sestřihového aparátu dochází k aktivaci komplexu a ke dvěma trans esterifikačním reakcím, které vedou k vyštěpení lariátu a vzniku mRNA (Plaschka et al., 2019).

RPG tvoří významnou skupinu genů, která si u kvasinky zachovala introny. *S. cerevisiae* je obecně organismus s nízkým výskytem intronů v genomu. Asi 75 % intronů je distribuováno ve 102 RPG (99 RPG obsahuje jeden intron, 3 RPG obsahují dva introny) (Planta & Mager, 1998). Výskyt intronů ve většině RPG poukazuje na jejich důležitost v regulaci exprese RPG.

Zachování intronů bylo předpokladem pro vznik dalšího způsobu, jak optimalizovat rovnováhu mezi RP. Buňky jsou schopny díky dalšímu regulačnímu stupni přesněji adaptovat expresi RPG dle potřeby v různých podmínkách a preferenčně vytvářet ribozomy se zastoupením různých paralogů (Parenteau et al., 2011; Malik et al., 2022). Parenteau et al. ukazují, že rychlost růstu kmenů s delecí intronů v RPG v přítomnosti staurosporinu (indukuje apoptózu) je nižší než rychlost růstu kmenů se zachovanými introny v RPG (Parenteau et al., 2011). Introny v RPG tedy zvýhodňují buňky v podmínkách stresu pravděpodobně prostřednictvím regulace RPG.

Příkladem proteinu, který má autoregulační funkci závislou na intronu je *RPL30*. Na pomezí 5' sestřihového místa pre-mRNA *RPL30* se vyskytuje smyčka s tzv. motivem kink-turn (Dabeva & Warner, 1993), která je vázána volným Rpl30. Přítomnost samotného sestřihového místa není pro vazbu Rpl30 esenciální (Macías et al., 2008). Vazba struktury vede k inhibici sestřihu *in vitro* (Vilardell & Warner, 1994) a *in vivo* (Macías et al., 2008). Rpl30 nebrání rozpoznání 5' sestřihového místa, ale nasednutí U2 snRNP, který se váže v místě BP. Mutantní verze esenciálního Rpl30, která má delecí Ile43 ve vysoce konzervovaném hydrofobním úseku ztrácí schopnost regulace sestřihu. Ribozomální funkce Rpl30 v maturaci 25S rRNA, a tedy 60S, je touto mutací také poškozena (Vilardell & Warner, 1994). Později bylo za pomoci hybridního přístupu NMR a krystalografie ukázáno, že Rpl30 se váže na pre-mRNA *RPL30* prostřednictvím smyček, které propojují  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -skládané listy ve struktuře Rpl30 (Chao & Williamson, 2004).

Podobná regulace se vyvinula u genu *RPS14*. Rps14B se váže na strukturu, kterou tvoří konec 3' exonu 1 a počátek intronu pre-mRNA *RPS14B*. Výsledky Y3H ukázaly přímou vazbu Rps14B na fragment pre-mRNA *RPS14B* a 18S rRNA. Delece 11 AK na C-terminálním konci Rps14B zamezila vazbě na pre-mRNA *RPS14B*, a také asociaci Rps14B s 40S. Náhodná mutagenese Rps14B vedla k identifikaci záměn AK blíže N-konci, které oslabují vazbu 18S rRNA, a zároveň zvyšují afinitu k pre-mRNA *RPS14B*. To napovídá, že tento úsek Rpl14B určuje specifitu vazby RNA. Nemutovaný Rps14B má vyšší afinitu k rRNA (Fewell & Woolford, 1999).

Mezi *RPL22A* a *RPL22B* existuje intergenový regulační vztah, který ovšem není rovnocenný (Parenteau et al., 2011; Gabunilas & Chanfreau, 2016; Abrahámová et al., 2018). Volný Rpl22A a Rpl22B inhibují sestřih své vlastní pre-mRNA a pre-mRNA svého paralogu. Inhibované pre-mRNA jsou po rozpoznání dráhou NMD degradovány exonukleázou Xrn1 (Gabunilas & Chanfreau, 2016; Abrahámová et al., 2018).



Inhibiční efekt je silnější v případě pre-mRNA *RPL22B* (Gabunilas & Chanfreau, 2016; Abrahámová et al., 2018). Důkazem toho je, že při vyřazení regulace sestřihu delecí intronu *RPL22A* (*rpl22aΔi*) je zvýšená hladina mRNA *RPL22A* 1,6X, zatímco delece intronu *RPL22B* (*rpl22bΔi*) vede k 5,4X vyšší produkci mRNA *RPL22B*. Nerovnocennost regulačního vztahu je dána odlišností v intronech *RPL22A/B*. Výměna intronů mezi geny vede k prohloubení inhibičního efektu sestřihu pre-mRNA *RPL22A* (obsahující intron B) a ke snížení inhibičního efektu sestřihu pre-mRNA *RPL22B* (obsahujícího intron A). Intron *RPL22B* je tedy citlivější na inhibici sestřihu (Abrahámová et al., 2018).

Nadprodukce proteinů Rpl22A a Rpl22B snižuje expresi mRNA *RPL22A* na 45 % a *RPL22B* na 14 % oproti buňkám WT s prázdným vektorem (Gabunilas & Chanfreau, 2016; Abrahámová et al., 2018). Analýzou sestřihu reportérového *RPL22B* v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* s nadprodukcí Rpl22 z plazmidu byla potvrzena funkce Rpl22 v inhibici sestřihu intronů *RPL22A* a *RPL22B* (*RPL22Ai* a *RPL22Bi*). Rpl22A/B snižuje mRNA reportéru na 50 % oproti buňkám *rpl22aΔrpl22bΔ* s prázdným vektorem (Abrahámová et al., 2018).

Jak bylo popsáno výše v textu, RNA vazebný helix Rpl22 obsahuje šest konzervovaných lysinů, které se uplatňují ve vazbě na 25S rRNA (obrázek č. 4). Mutantní verze Rpl22, které mají tyto lysiny zaměněné za glutamáty (Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub>) ztratí schopnost regulace *RPL22A/B*. Hladina mRNA *RPL22A/B* odpovídá v buňkách WT s nadprodukcí Rpl22A<sub>mut</sub> nebo Rpl22B<sub>mut</sub> hladině této mRNA v buňkách WT s prázdným vektorem. Navíc Rpl22A<sub>mut</sub>/Rpl22B<sub>mut</sub> postrádají schopnost inhibice sestřihu reportéru v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ*. Takové buňky akumulují mRNA reportéru ve stejné míře jako kontrolní buňky s prázdným vektorem. Tento výsledek napovídá tomu, že zachování schopnosti Rpl22 vázat RNA je nutné pro regulaci *RPL22A/B* (Abrahámová et al., 2018).

```

Rpl22B      MAPNTSRKQKVIKTLTVDVSSPTENGVFDPASYSKYLIDHIKVDGAVGNLGNAlEVTEDG
Rpl22A      MAPNTSRKQKIAKTFTVDVSSPTENGVFDPASYAKYLIDHIKVEGAVGNLGNAVTVTEDG
*****: **:*:*****:*****:*****:*****

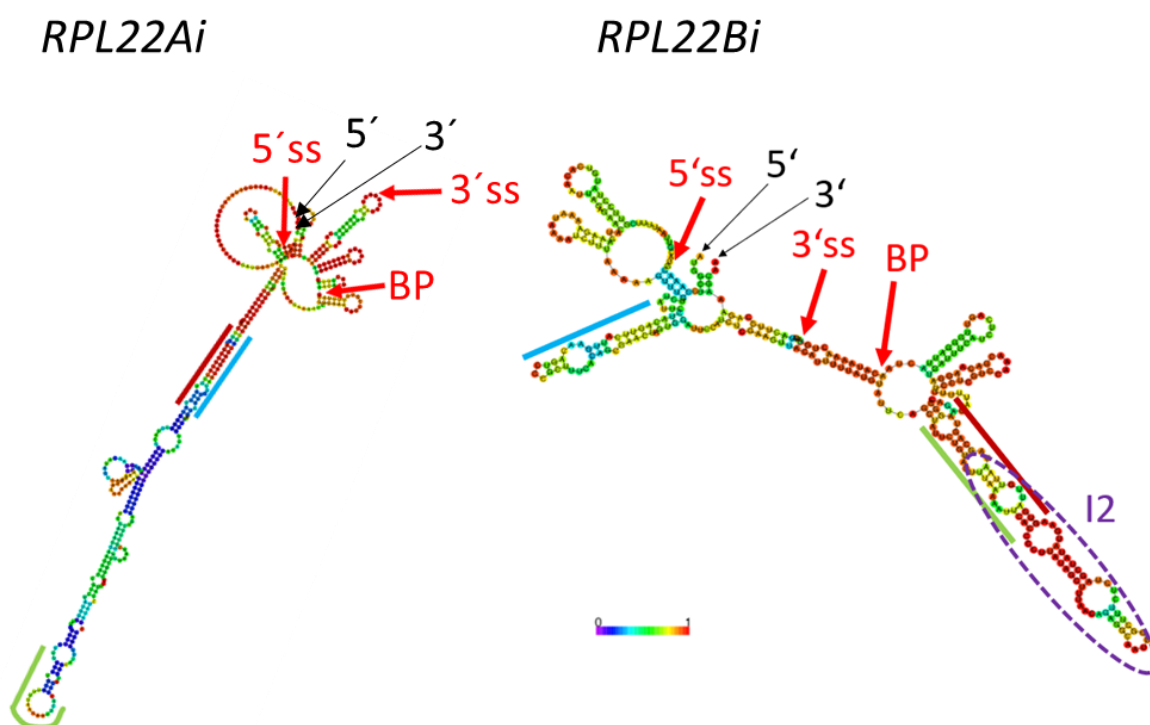
Rpl22B      SIVTVVSSAKFSGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSIRQNQYKLVFYQVTPEDAEEEEDEE 122
Rpl22A      TVVTVVSTAKFSGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSTKTNEYRLAFYQVTPPEEEEEDEE- 121
:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

```

**Obrázek č. 4 – Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> se liší od Rpl22A a Rpl22B v šesti lysinech. Rpl22A a Rpl22B se liší ve 22 AK. 16 záměn AK je konzervovaných („:“). Červeně jsou zvýrazněny lysiny, které jsou zaměněné v Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> za glutamáty. Alignment byl vytvořen za pomoci Clustal Omega MSA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).**

Výsledky trojhybridního systému (Y3H) ukazují, že v rámci své extraribozomální funkce Rpl22A a Rpl22B interagují s *RPL22Bi*. Rpl22A/B se vážou do oblasti, kde se nevyskytují sestřihová místa. Vazba mutantních verzí Rpl22A<sub>mut</sub>/Rpl22B<sub>mut</sub> nebyla v Y3H detekována (Abrhánová et al., 2018). Je zajímavé, že tato struktura dle strukturních predikcí neobsahuje vlásenku, která byla popsána u ostatních interagujících RNA.

V naší laboratoři byla formulována hypotéza, která říká, že introny *RPL22A* a *RPL22B* mohou zaujímat dvě různé konformace, které se stříhají s odlišnou účinností (Abrhánová, nepublikováno). Sekvenční srovnání intronů vedlo ke zjištění, že v rámci *RPL22Ai* a *RPL22Bi* se nachází úsek konzervovaných nukleotidů (Abrhánová et al., 2018). Tento úsek může komplementárně interagovat v rámci intronu se dvěma oblastmi. Podle toho, se kterou komplementární oblastí interaguje, zaujme strukturu, která buď brání sestřihu nebo strukturu, která sestřih umožňuje. Výsledky strukturně predikční analýzy RNashape naznačují, že *RPL22Bi* se nachází spíše v konformaci, která se stříhá s malou účinností, zatímco *RPL22Ai* častěji zaujímá konformaci, která sestřihu nebrání (Abrhánová, nepublikováno– obrázek č. 5).



**Obrázek č. 5 – Rpl22A a Rpl22B se vážou na I2 v Y3H, který se vyskytuje v *RPL22Bi*. Struktury byly generovány za pomoci webového serveru RNAfold (Lorenz et al., 2011).**

Barevné spektrum odpovídá pravděpodobnosti, s jakou párují jednotlivé nukleotidy. Fialově je označený segment *RPL22Bi* – I2 (165-236 nt), který byl již dříve v Y3H identifikován jako vazebné místo pro Rpl22A/B (Abrahámová et al., 2018). Červeně je znázorněný konzervovaný úsek, který páruje s modrým úsekem/zeleným úsekem. Červené šipky značí 5' sestřihové místo (5'ss), 3' sestřihové místo (3'ss) a branch point (BP). Černé šipky značí konec molekuly 5' a 3'.

K. Abrahámová vytvořila sérii konstruktů mutovaných *RPL22Ai/Bi*, které mohou tvořit pouze sestřizitelnou (S) formu nebo nesestřizitelnou (N) formu. Testovala účinnost sestřihu těchto reportérů v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* s nadprodukcí Rpl22A. Z výsledků plyne, že ani v přítomnosti Rpl22A se neakumuluje žádná pre-mRNA formy S. Naopak pre-mRNA formy N se akumuluje jak v podmínkách s nadprodukcí Rpl22A, tak v buňkách s prázdným plazmidem. To naznačuje, že samotná struktura intronu je podstatná pro inhibici sestřihu (Abrahámová, nepublikováno).

Rpl22 má afinitu ke struktuře, jejíž účinnost sestřihu je nízká. Vazbou Rpl22 se konformace intronu pravděpodobně stabilizuje, což zvýší inhibiční efekt struktury intronu vůči sestřihu (Abrahámová, nepublikováno). Domníváme se, že podstatou extraribozomální funkce Rpl22A/B je tedy vazba intronové RNA *RPL22A/B*. Prostřednictvím této vazby dochází k inhibici sestřihu *RPL22Ai/Bi*.

## 6.5 Porovnání funkcí homologních Rpl22

Pro bližší studium interakce Rpl22A/B s 25S rRNA a *RPL22Bi* jsme se rozhodli zvolit přístup komplementační analýzy. Vybrali jsme Rpl22 z různých zástupců kvasinek a z *Homo sapiens*. Všechny zde zmíněné kvasinky z rodiny *Ascomycetae* kódují Rpl22 právě jedením genem. Rpl22 se liší v několika AK (obrázek č. 6A). Využijeme toho, že se tyto proteiny nachází v přírodě přirozeně a jsou stabilní. Kvasinky mají různé evoluční pozadí (obrázek č. 6B) a pochází z odlišných environmentálních prostředí. Tyto rozdílné podmínky vedly ke specifickým adaptacím genomu každé z nich.

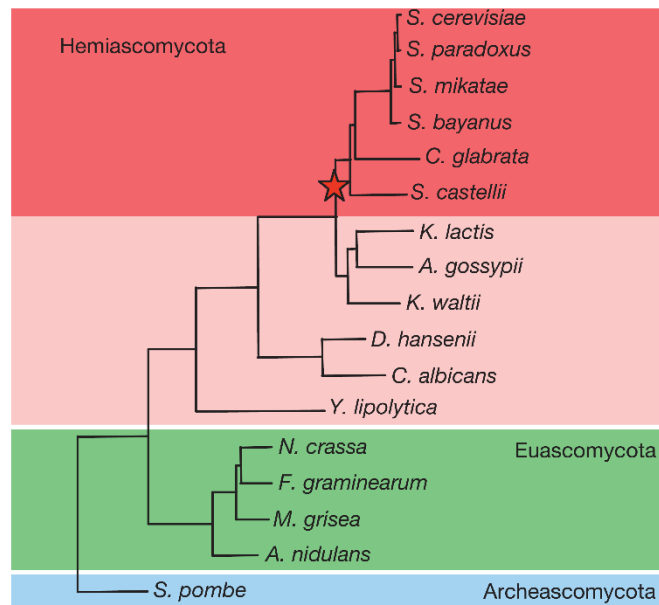
A)

```

Rpl22A  MAPN-----TSRKQKIAKTFTVDVSSPTENGVFDPASYAKYLIDHIKVEGAVGNLGNNAVTVTEDGTV
Rpl22B  MAPN-----TSRKQKVIKLTFTVDVSSPTENGVFDPASYAKYLIDHIKVDGAVGNLGNNAIEVTEEDGSI
KlRpl22 MAPN-----TARKQKITKTFTVDVSSPTENGVFDPASYAKYLIDHIKVEGHVGNLQQAITVEEDGSV
CgRpl22 MAPN-----TARKQKVVKFTFTVDVSAPTENGVFDPASYAKYLIDHIKVENNVGNLGNNAITVEEDGSV
CaRpl22 MAPV-----TSKKSksvKkFVVDVAAPVENDVFDQESYVKYLVEHVKVDGIVGNLGNDISITAESDN
SpRpl22 -----MVKKNTKVSNKYIIDATAAVNDKIFDVAAFEKYLIDRIKVDGKTGNLGSsvSITEEGNK
DhRpl22 MAPI-----TTKNTAAKklVVDTSAPTENGVFDPQESYVKFLIENIKVEGIPGNLGNsIVTIERSKS
HsRpl22 MAPVKKLvVKGgKkKkQVlKfTLDCTHPVEDGIMDAANFEQFLQERIKVNGKAGNLGGGVVVSREGSS
YlRpl22 MAPV-----KTQ---KANKYTVdCKAPSADGIFdVSSFEKFLTERIKVEGRtNQLGEDIKvSSNGDI
          :      .  :*      :  ::*      :  ::*      :  ::**      .  ::**      :
Rpl22A  V---TVVSTAKFSGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSTKTNEYRLAFYQVTPPEDEEEDEE- 121
Rpl22B  V---TVVSSAKFSGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSIRQNQYKLVFYQVTPEDAEEEDDE 122
KlRpl22 V---TIVSTTKFSGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSTKTNEYKLAFYQITPEDEEEEDDEE 122
CgRpl22 V---TIVSTTKFSGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSTKTNSYRLAFYQVTPPEEEEDDEE-- 120
CaRpl22 KVVVVVSGNGSFSGKYLKYLTKKYLKKNQIRDWIRFVSVKQNQYKLQFYAVAEDDEEEEDDEE- 124
SpRpl22 K--IAVIAHIDFSGRYLKYLTKKFLKKHSLRDWLRVSVTKKGVYELRYINVVVGNDEEEQ--- 117
DhRpl22 V---VVSNTKFSGKYLKYLTKRYLKKNQIRDWIRFVSVKQNQYQLQFYSVADDEEEEDDEE-- 120
HsRpl22 K--ITVTSEVPFskRYLKYLTKKYLKKNNLRDwLRVvANSKESYELRYFQINQDEEEEDDED- 128
YlRpl22 V---TVVSTTQFSGKYLKYLTKKYLKKQQLRDWIRVISTSKGNyTLKfYnVVANEEDDEE---- 115
          .  :  .  ** :*****:****:****:*:*  * *  :  :  :  :  :  :

```

B)



**Obrázek č. 6 – A) Rpl22 z různých organismů mají dle strukturních predikcí zachovaný RNA vazebný helix, a v jejich N- a C- terminálních oblastech se pravděpodobně vyskytují nestrukturované konce. Žluté značení odpovídá AK, které se vyskytují v RNA vazebném helixu  $\alpha_2$ . Modře jsou vyznačeny AK, které jsou pravděpodobně součástí nestrukturovaných konců (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022). Alignment byl vytvořen Clustal Omega MSA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). B) Evoluční vztahy kvasinek rodiny *Ascomycetae*. Hvězdička představuje událost celogenomové duplikace (Wapinski et al., 2007).**

Jak byl výše zmíněno, předek *S. cerevisiae* prošel WGD (Wolfe & Shields, 1997). Evoluční studie navrhuje, že *C. glabrata* (Cg) prošla také WGD, ale oddělila se od větve, která se později vyvinula v *S. cerevisiae* ještě dříve, než byl dokončen proces masivní ztráty duplikovaných genů *S. cerevisiae* (Seoighe & Wolfe, 1999). *C. glabrata* ztratila po WGD druhou kopii *RPL22* (Wapinski et al., 2007).

Následující kvasinky neprošly WGD (Wapinski et al., 2007). *Kluyveromyces lactis* (Kl) *RPL22* má autoregulační funkci stejně jako *RPL22 S. cerevisiae*. Inhibuje sestřih vlastního primárního transkriptu. Tuto funkci pravděpodobně sdílel společný předek *S. cerevisiae* a *K. lactis* (Abrahámová et al., 2018). Lidský patogen *C. albicans* (Ca) a halotolerantní a osmotolerantní *D. hansenii* (Dh) sdílí stejný genetický kód, který je odlišný od *S. cerevisiae*. CUG kodon překládají jako serin, zatímco *S. cerevisiae* a ostatní zde zmíněné kvasinky překládají tento kodon jako leucin (Scannell et al., 2007). Genom *C. albicans* je vysoce plastický. Díky častým chromozomovým přestavbám umožňuje adaptaci na různé podmínky (Mba et al., 2022). *D. hansenii* má odlišnou optimální teplotu růstu oproti *S. cerevisiae* (30°C), to je 25°C. Je schopná růst v médiu s 25 % NaCl nebo 18 % glycerolem (Breuer & Harms, 2006). Unikátní fyziologie *Y. lipolytica* (Yl) umožní získávat uhlík metabolizováním nasycených a nenasycených uhlovodíků a lipidů. Geny *Y. lipolytica* mají nízkou sekvenční podobnost (50–60 %) v porovnání s homologními geny *S. cerevisiae*, *K. lactis* nebo *C. albicans* (Barth & Gaillardin, 1997). *S. pombe* (Sp) je známá zejména kvůli způsobu dělení kontrakcí aktinového prstence. Z hlediska struktury chromatinu a chromozomů je velmi podobná vyšším eukaryotům např. oproti *S. cerevisiae*, stejně tak jako v sestřihu (Gu et al., 2022).

Tyto kvasinky byly vybrány kvůli zajímavým odlišnostem, které je tvoří zcela unikátními. Rpl22 z různých prostředí mohou mít funkce vzniklé adaptací organismu na prostředí, které jsou specifické pro daný druh. Navíc jsme schopni tyto kvasinky kultivovat v laboratorních podmínkách.

## 7 Cíl práce

Cílem diplomové práce je porovnat, zda homologní Rpl22 pocházejících z *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *S. pombe*, *K. lactis* a *H. sapiens* jsou schopné zastoupit Rpl22A/B *S. cerevisiae* v jejich funkcích. Testovanými funkcemi jsou komplementace růstového fenotypu buněk *rpl22aΔrpl22bΔ S. cerevisiae*, vazba fragmentu 25S rRNA *S. cerevisiae* v trojhybridním systému, funkce inhibice sestřihu pre-mRNA *RPL22B S. cerevisiae*, vazba fragmentu intronu *RPL22B (I2) S. cerevisiae* v trojhybridním systému. Tyto výsledky budou diskutovány ve strukturně evolučním kontextu Rpl22.

## 8 Materiál

### 8.1 Seznam použitých mikroorganismů

#### 8.1.1 Bakteriální kmeny

Kmen	Popis	Zdroj
<i>DH5α</i>	<i>F-φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(rK -, mK +), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, λ-</i>	Stratagene

Tabulka č. 1 – Elektrokompetentní kmen *E. coli*, který byl použit pro transformaci plazmidů do bakterií.

#### 8.1.2 Kvasinkové kmeny

Zdroj sekvencí RPL22, které byly použity pro strukturní predikce či alignmenty:

SGD (Saccharomyces genome database) – RPL22A: S000004051, RPL22B: S000006436,

CGD (Candida genome database) – Ca: C4\_04390W\_A,

NCBI (National Library of Medicine) – Cg: CAGL0F01683g, Dh: DEHA2B05412g, Kl:

KLLA0\_D05181g,

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) – Yl: YALI0E32208g,

PomBase – Sp: SPAC11E3.15,

UniProt – Hs: P35268.

##### 8.1.2.1 Výchozí kmeny *Saccharomyces cerevisiae*

Kmen	Popis	Zdroj
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
FNY35	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl22aΔ rpl22bΔ</i>	(Nemčko, 2018)
YBZ1	<i>MATa ura3-52 leu2-3, 112 his3-200 trp1-1 ade2 LYS2::(LexA op)-HIS3, ura3::(lexA-op)-lacZ LexA-MS2 coat (N55K)</i>	(Hook et al. 2005)
<i>rpl22aΔ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl22a::kanMX4</i>	EUROSCARF

Tabulka č. 2 – Kmeny *S. cerevisiae*, které byly použity jako výchozí pro transformaci plazmidů do kvasinek.

### 8.1.2.2 Výchozí kmeny ostatních kvasinek

Organismus	Kmen	Zdroj
<i>Candida albicans</i>	SC5314	Hana Sychrová
<i>Candida glabrata</i>	ATCC2001	Hana Sychrová
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS767	Hana Sychrová
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS7504	Hana Sychrová

**Tabulka č. 3 – Seznam dalších kvasinek z oddělení *Ascomycota*.** Kmeny těchto kvasinek byly použity pro primární pro izolaci RNA a byly věnovány RNDr. Hanou Sychrovou, DrSc. (Laboratory of Membrane Transport, AVČR).

## 8.2 Kultivační média

Komponenty médií byly rozpuštěny v ddH<sub>2</sub>O a následně sterilizovány v autoklávu (Tuttnauer 2840EL-D) 20 min při 119 °C. Roztoky aminokyselin, nukleotidů, antibiotika a glukóza byly přidávány do již sterilních médií o teplotě nižší než 65 °C.

### 8.2.1 Bakteriální kultivační média

LB:

10 g/l	Pepton M66 (Merck)
5 g/l	Yeast extract (Formedium)
10 g/l	NaCl (Lach-Ner)
[20 g/l	Agar (Oxoid) – v případě tuhého média]

Dle potřeby byl po rozpuštění v ddH<sub>2</sub>O a sterilizaci přidán 1000x koncentrovaný zásobní roztok Ampicilinu na finální koncentraci 100 µg/ml.

### 8.2.2 Kvasinková kultivační média

YPAD (komplexní médium):

20 g/l	Pepton M66 (Merck)
10 g/l	Yeast Extract (Formedium)
100 mg/l	Adenin-hemisulfát (Sigma-Aldrich)
[20 g/l	Agar (Oxoid) – v případě tuhého média]



Po rozpuštění v ddH<sub>2</sub>O a sterilizaci byl přidán sterilní 20% zásobní roztok glukózy na finální koncentraci 2%.

SD (definované médium):

6,7 g/l	Yeast nitrogen base (YNB) without amino acids (Difco)
1,394 g/l	Synthetic complete amino acid (Kaiser) drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura (Formedium)
[20 g/l	Agar (Oxoid) – v případě tuhého média]

Po rozpuštění v ddH<sub>2</sub>O a sterilizaci byl přidán sterilní 20% zásobní roztok glukózy na finální koncentraci 2%. Dle potřeby byly přidány 100x koncentrované zásobní roztoky aminokyselin a nukleotidů.

### 8.2.3 Suplementy kultivačních médií

Byly připraveny 100x koncentrované zásobní roztoky:

2 g/l	L-Histidin HCl monohydrát (Sigma-Aldrich)
10 g/l	L-Leucin (Sigma-Aldrich)
2 g/l	L-Tryptofan (Sigma-Aldrich)
2 g/l	Uracil (Sigma-Aldrich)
3 g/l	L-Lysin (Sigma-Aldrich)
2 g/l	L-Metionin (Sigma-Aldrich)
10 g/l	Adenin-hemisulfát (Sigma-Aldrich)

Po rozpuštění v ddH<sub>2</sub>O byly roztoky sterilizovány v autoklávu (Tuttnauer 2840EL-D) 20 min při 119 °C.

Byl připraven 20% zásobní roztok glukózy:

198 g/l	Glukóza (Sigma-Aldrich)
---------	-------------------------

Po rozpuštění v ddH<sub>2</sub>O byl roztok sterilizován v autoklávu (Tuttnauer 2840EL-D) 20 min při 119 °C.

Byl připraven 1000x koncentrovaný zásobní roztok selekčního antibiotika:

100 mg/ml Ampicilin (Biotika)

Do injekční lahvičky obsahující 500 mg Ampicilinu bylo bylo přidány 4 ml ddH<sub>2</sub>O a 1 ml 96% EtOH.

### 8.3 Seznam použitých primerů

Název	Sekvence (5' -> 3')	Použití
SG01	CCCCTTTCCATGGCTCCAGTTACTTCTAAGA	Klonování <i>C. albicans_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (F)
SG02	GCCCGTGGATCCTTATTCTTCGTCTTCTTCTTCTTC	Klonování <i>C. albicans_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (R)
SG03	CCCTTCCATGGCTCCAATCACCACCAAG	Klonování <i>D. hansenii_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (F)
SG04	CCCAAGGATCCTTATTCTTCGTCTTCTTCTTCTTCG	Klonování <i>D. hansenii_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (R)
SG05	CCCTTCCATGGCTCCAAACACCGCTAGA	Klonování <i>C. glabrata_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (F)
SG06	CCCTTGGATCCTTATTCTTCATCTTCTTCTTCTTCTCC	Klonování <i>C. glabrata_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (R)
SG07	CCCCTTCCATGGTTAAAAAGAACAATAAGGTTAG	Klonování <i>S. pombe_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (F)
SG08	GCCCGTGGATCCTTATTGCTCCTCTTCGTCATTGC	Klonování <i>S. pombe_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (R)
SG09	CCCTTTCCATGGCTCCCGTTAAGACTCA	Klonování <i>Y. lipolytica_RPL22</i> do pVTU260 a pACT2 (F)
SG10	CCCAACCAAACCTCTGGTTACTCCTCGTCCTCCTCG	Klonování <i>Y. lipolytica_RPL22</i> do pVTU260 (R)

SG11	CCCAAGAATTCTTACTCCTCGTCCTCCTCG	Klonování <i>Y. lipolytica</i> <i>RPL22</i> do pACT2 (R)
SG12	CGTTTGGGAATCACTACAGG	Sekvenace pACT2
KA151B	CCTCGTCATTGTTCTCGTTC	Sekvenace pVTU260
SG13	CCCTTGCATGCGTCGGCGCGAGCCCT	Klonování <i>S. cerevisiae</i> <i>25S rRNA H57-H59</i> do p3HR2 (F)
JL451	CTGGCATGCGCCGTCACAAGCGCACC	Klonování <i>S. cerevisiae</i> <i>25S rRNA H57-H59</i> do p3HR2 (R)
OG71	CGACGTTGTCGATGATGAAG	Semikvantitativní PCR mRNA <i>TOM22</i> (F)
OG72	GCAACGATTCTGTCCAAC	Semikvantitativní PCR mRNA <i>TOM22</i> (R)
KA163	GTAGCACAGTAAACCTATATCGTTTC	Semikvantitativní PCR 5'UTR <i>RPL22B</i> (F)
OG05	GGCATTGGCACTCATGACCTTC	Semikvantitativní PCR <i>RPL22B</i> <i>CUP1</i> (R)
KA104	CTCAAAGCTGGCCAGTAGAA	qPCR mRNA <i>SPT15</i> (F)
KA105	CGTCACACGAACCGACAATA	qPCR mRNA <i>SPT15</i> (R)
KA50	CAACCACAATGGCTCCAAACAC	qPCR mRNA <i>RPL22B</i> (F)
KA51	ACCTCAATGGCGTTCCTAAGT	qPCR mRNA <i>RPL22B</i> (R)
KA140	CAACCACAATGGCTCCAAACGTA	qPCR pre-mRNA <i>RPL22B</i> (F)
KA141	CAATGAACTGTAGGAATAGAAACTT	qPCR pre-mRNA <i>RPL22B</i> (R)

**Tabulka č. 4 – Použité primery.** (F) – přímý primer, (R) – zpětný primer.

#### 8.4 Seznam použitých plazmidů

Seznam plazmidů	Inzert	Zdroj
pVTU260	-	(Melcher, 2000)
pVTU260_ <i>C. albicans</i> RPL22	RPL22 z <i>Candida albicans</i>	Tato studie
pVTU260_ <i>C. glabrata</i> RPL22	RPL22 z <i>Candida glabrata</i>	Tato studie
pVTU260_ <i>D. hansenii</i> RPL22	RPL22 z <i>Debaryomyces hansenii</i>	Tato studie
pVTU260_ <i>Y. lipolytica</i> RPL22	RPL22 z <i>Yarrowia lipolytica</i>	Tato studie
pVTU260_ <i>S. pombe</i> RPL22	RPL22 ze <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tato studie
pVTU260_ <i>K. lactis</i> RPL22	RPL22 z <i>Kluyveromyces lactis</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pVTU260_ <i>H. sapiens</i> RPL22	RPL22 z <i>Homo sapiens</i>	(Libus, nepublikováno)
pVTU260_RPL22A	RPL22A ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pVTU260_RPL22B	RPL22B ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pVTU260_RPL22Amut	RPL22Amut ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pVTU260_RPL22Bmut	RPL22Bmut ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pACT2	-	(SenGupta et al. 1996)
pACT2_ <i>C. albicans</i> RPL22	RPL22 z <i>Candida albicans</i>	Tato studie
pACT2_ <i>C. glabrata</i> RPL22	RPL22 z <i>Candida glabrata</i>	Tato studie
pACT2_ <i>D. hansenii</i> RPL22	RPL22 z <i>Debaryomyces hansenii</i>	Tato studie
pACT2_ <i>Y. lipolytica</i> RPL22	RPL22 z <i>Yarrowia lipolytica</i>	Tato studie
pACT2_ <i>S. pombe</i> RPL22	RPL22 ze <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tato studie
pACT2_ <i>K. lactis</i> RPL22	RPL22 z <i>Kluyveromyces lactis</i>	(Nemčko, 2018)
pACT2_ <i>H. sapiens</i> RPL22	RPL22 z <i>Homo sapiens</i>	(Libus, nepublikováno)
pACT2_RPL22A	RPL22A ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pACT2_RPL22B	RPL22B ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pACT2_RPL22Amut	RPL22Amut ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
pACT2_RPL22Bmut	RPL22Bmut ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Abrhámová et al., 2018)
p3HR2	-	(Stumpf et al. 2008)

p3HR2_H57–H59_25S rRNA_JL	Fragment 25S rRNA (helix 57 až helix 59) – (nt 1658 – 1791)	(Libus, nepublikováno)
p3HR2_H57–H59_25S rRNA_SG	Fragment 25S rRNA (helix 57 až helix 59) – (nt 1658 – 1791)	Tato studie
p3HR2_RPL22B_I2	Intron <i>RPL22B</i> (nt 126 – 237)	(Abrhámová et al., 2018)
p423GPD_RPL22B-CUP1	Fúze části <i>RPL22B</i> (exon1 – intron – 60 nt exonu 2) s <i>CUP1</i>	(Abrhámová et al., 2018)

**Tabulka č. 5 – Použité plazmidy.**

## 8.5 Seznam použitých enzymů a příslušných pufrů

### 8.5.1 Polymerázy

Polymeráza Taq	10X pufr pro polymerázu Taq:	750 mM Tris-HCl pH 8,8
		200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		0,1% Tween 20
		20 mM MgCl <sub>2</sub>
Polymeráza Pfu	10X pufr pro polymerázu Pfu:	200 mM Tris-HCl pH 8,8
		100 mM KCl
		100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		1% Triton X – 100
		1 mg/ml BSA

Reverzní transkriptáza – RevertAid Reverse Transcriptase – 200 U/μl (Thermo Scientific)

5X Reaction Buffer RT (Thermo Scientific)

### 8.5.2 Restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy, které byly použity pro klonování genů *RPL22*/fragmentu 25S rRNA (H57 – H59) do vektorů pVTU260 a pACT2/p3HR2:

NcoI – 10 U/μL (Thermo Scientific)	10X Tango Buffer (Thermo Scientific)
BamHI – 10 U/μL (Thermo Scientific)	10X Tango Buffer (Thermo Scientific)
BstXI – 10 U/μL (Thermo Scientific)	10X Tango Buffer (Thermo Scientific)
EcoRI – 10 U/μL (Thermo Scientific)	10X Tango Buffer (Thermo Scientific)
PaeI (SphI) – 10 U/μL (Thermo Scientific)	10X Buffer B (Thermo Scientific)

### 8.5.3 Enzymy degradující nukleové kyseliny

RNáza – RNase A, DNase and protease-free – 10 mg/ml (Thermo Scientific)

DNáza – DNase I, RNase-free – 1 U/μL (Thermo Scientific)

10X DNase I Buffer

### 8.5.4 Hydrolázy

Alkalická fosfatáza – FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase – 1 U/μl (Thermo Scientific)

### 8.5.5 Ligázy

T4 ligáza – T4 DNA Ligase – 5 U/μl (Thermo Scientific)

10X pufr pro T4 ligázu: 400 mM Tris-HCl pH 7,8

100 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM DTT

5 mM ATP

## 8.6 Seznam použitých protilátek

Název	Použití
6X His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8) (Thermo Scientific)	primární monoklonální protilátka proti značce 6X His (detekce 6X His – Rpl22)
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) – AP Conjugate (BIORAD)	Sekundární protilátka proti myším primárním IgG protilátkám, konjugovaná s alkalickou fosfatázou

**Tabulka č. 6 – Použité protilátky.**

## 9 Metody

### 9.1 Příprava plazmidů kódujících homologní geny *RPL22*/fragment genu *25S rRNA* ze *Saccharomyces cerevisiae*

#### 9.1.1 Kultivace kvasinek pro izolaci RNA

*C. albicans*, *C. glabrata*, *D. hansenii* a *Y. lipolytica* jsou druhy kvasinek, jejichž geny *RPL22* byly v této práci klonovány do plazmidů.

Kvasinkové kmeny byly zaočkovány do 5 ml plného média a za stálého třepání kultivovány přes noc při 30 °C. Ráno byly buňky přeočkovány do 5 ml selekčního média na  $OD_{(600\text{ nm})} = 0,5$  a kultivovány po dobu dvou generací na  $OD_{(600\text{ nm})} = 2$ . Byl odebrán 1,5 ml kultury o  $OD_{(600\text{ nm})} = 2$  a následně centrifugován 30 s při 16 000 g (Eppendorf 5418). Supernatant byl odstraněn a buňky byly uchovány v – 80 °C. Optická denzita buněk byla vždy měřena přístrojem Biowave Cell Density Meter CO8000 (Biochrom WPA).

#### 9.1.2 Izolace RNA

RNA byla purifikována dle doporučeného protokolu MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Lucigen).

Rozmražený buněčný pelet (viz. 9.1.1) byl vortexován po dobu 10 s. Ke každému vzorku bylo přidáno 300 µl premixu obsahujícího 300 µl Extrakčního činidla pro RNA (Extraction Reagent for RNA) a 1 µl Proteinázy K, a poté bylo vše intenzivně vortexováno. Vzorek byl inkubován v 70 °C po dobu 15 min, během této inkubace krátce vortexován každých 5 min. Takto ošetřený vzorek byl chlazen 5 min na ledu, poté bylo přidáno 175 µl MPC precipitačního činidla pro proteiny (MPC Protein Precipitation Reagent) a vše bylo řádně vortexováno 10 s. Následnou centrifugací 5 min při 4 °C a 20 000 g (Eppendorf 5417R) byly usazeny sraženiny. Supernatant byl převeden do čisté mikrokumavky a bylo přidáno 500 µl izopropanolu. Taková zkumavka byla 40X jemně obrácena. Sražené nukleové kyseliny byly usazeny centrifugací 5 min při 4 °C a 20 000 g (Eppendorf 5417R), supernatant byl následně odstraněn.

K peletu bylo přidáno 200 µl premixu obsahujícího 175 µl H<sub>2</sub>O DEPC, 20 µl 10X pufru pro DNázu (10X DNase Buffer) a 5 µl DNázy bez RNáz (RNase-Free DNase I). Vše bylo jemně resuspendováno a inkubováno při 37 °C po dobu 30 min. Poté bylo přidáno 200 µl lyzačního činidla (2X T and C Lysis Solution) a vortexováno 5 s. Dále bylo přidáno 200 µl MPC precipitačního činidla pro proteiny (MPC Protein Precipitation Reagent) a vortexováno 10 s, poté chlazen 5 min na ledu. Sraženiny byly usazeny centrifugací 5 min při 4 °C a 20 000 g (Eppendorf 5417R). Supernatant byl převeden do čisté mikrokumavky a bylo přidáno 500 µl

izopropanolu. Tato zkumavka byla 40X jemně obrácena. Sražená RNA byla usazena centrifugací 5 min při 4 °C a 20 000 g (Eppendorf 5417R) a supernatant byl poté odstraněn. Pelet RNA byl omyt 1 ml 70% EtOH, usazen centrifugací 1 min při 4 °C a 10 000 g (Eppendorf 5417R), EtOH odpipetován, a poté byly zkumavky důkladně vysušeny na vzduchu. RNA byla resuspendována v 30–40 µl H<sub>2</sub>O DEPC.

### 9.1.3 Reverzní transkripce

cDNA byla syntetizována dle doporučeného protokolu RevertAid Reverse Transcriptase – Protocol for First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific).

K 1 µg templátové RNA (viz. 9.1.2) byl přidán 1 µl náhodných hexamerů (zásobní koncentrace 100 µM) a objem byl doplněn H<sub>2</sub>O DEPC do 12,5 µl. Vzorek byl jemně promíchán, krátce centrifugován a inkubován 5 minut při 65 °C, následně ochlazen na ledu a opět krátce centrifugován. Do takto ošetřeného vzorku byly v přesném pořadí přidány 4 µl reakčního pufru pro reverzní transkriptázu (5X Reaction Buffer for RT), 0,5 µl inhibitoru RNáz (Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor – 40 U/µl), 2 µl mixu dNTP (10 mM) a 1 µl reverzní transkriptázy (RevertAid Reverse Transcriptase). Vzorek byl jemně promíchán, krátce centrifugován, a poté inkubován 5 min při 25 °C a následně 60 min při 42 °C. Reakce byla terminována inkubací vzorku v 70 °C po dobu 10 min.

### 9.1.4 PCR

Jako templát pro amplifikaci genů *RPL22* z *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica* a *S. pombe* byla použita cDNA z daných organismů. cDNA *S. pombe* byla věnována Laboratoři genomiky mikroorganismů (vedoucí RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.). Jako templát pro amplifikaci fragmentu genu *25S rRNA S. cerevisiae* byl použit plazmid p3HR2\_25SrRNA\_JL).

Za stálého chlazení byly jednotlivé komponenty reakce přidány v následujícím pořadí:

Složení	Zásobní koncentrace	Objem/množství v jedné reakci
ddH <sub>2</sub> O		24,5 µl
10X Pufr pro polymerázu Pfu		5 µl
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	5 µl
dNTP	2,5 mM	5 µl
Primer 1	10 µM	2,5 µl
Primer 2	10 µM	2,5 µl
Templát		5 µl (40X ředěná cDNA)/ ≈100 ng (plazmidová DNA)
Polymeráza Pfu		0,5 µl

**Tabulka č. 7 – Složení reakce PCR.**



Vše bylo jemně resuspendováno a případné kapky usazené na stěnách zkumavek byly krátce zcentrifugovány. Podmínky, při kterých reakce probíhala byly následující:

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95 °C	2 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	30
Nasedání primerů	55 °C	30 s	
Syntéza DNA	72 °C	40 s/kb	
Syntéza DNA	72 °C	2 min	1
Chlazení	4 °C	15 min	1

**Tabulka č. 8 – Program PCR nastavený na termocykléru (T advanced – Biometra).**

#### 9.1.5 Horizontální agarózová elektroforéza

Pro separaci fragmentů DNA byla použita agarózová elektroforéza s využitím elektroforetických aparatur BlueMarine 100 – Serva nebo BlueMarine 200 – Serva. Byly připraveny 1% - 2,5% agarózové gely dle očekávané velikosti fragmentů. Agaróza (SeaKem LE Agarose – Lonza) byla zcela rozpuštěna v pufru 1X TAE. Ochlazený tekutý agarózový gel byl nalit do formy s hřebínkem, kde byl ponechán dokonalému ztuhnutí. Vzorky DNA byly smíchány se vzorkovým pufrům (6X Orange Loading Dye). 6 µl 50 bp DNA Ladder (GeneRuler)/ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler) bylo použito jako standard pro identifikaci velikosti fragmentů DNA. Elektroforetická vana obsahující pufr 1X TAE, agarózový gel, vzorky DNA a marker byla připojena ke zdroji napětí. Separace fragmentů DNA v 1X TAE pufru probíhala při konstantním napětí 5-10 V/cm (1X TAE). Agarózový gel byl obarven roztokem EtBr (0,5 µg/ml) a fragmenty DNA byly vizualizovány ozářením pod UV lampou.

Alternativně bylo k zcela rozpuštěné agaróze (SeaKem LE Agarose – Lonza) v pufru 1X TAE přidáno barvicí činidlo pro nukleové kyseliny MIDORI Green Advance (6 µl barvy na 100 µl agarózového gelu). Vzorky byly nanášeny a fragmenty rozděleny stejným způsobem, jakým je popsáno v předchozím odstavci. Gel obsahující MIDORI Green Advance nebyl barven v EtBr, ale fragmenty byly rovnou po elektroforéze vizualizovány pod zářením UV lampy.

Pufr 1X TAE byl připraven naředěním pufru 50X TAE. Kompozice 50X TAE:

2 M Tris

1 M kyselina octová

100 mM EDTA

(pH upravit kyselinou octovou na 8,5)

6X Orange vzorkový pufr:

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)

60% glycerol

60 mM EDTA

0,15% Orange G

0,03% Xylene cyanol FF

#### 9.1.6 Izolace DNA z agarózového gelu

Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu byla provedena dle doporučeného protokolu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up – 5.2 DNA extraction from agarose gels (Macherey-Nagel).

Fragmenty DNA zájmu byly skalpelem vyřezány z 1% agarózového gelu tak, aby byl přebytek agarózy co nejmenší. Jednotlivé fragmenty DNA byly zváženy a umístěny do mikrozkušavky. Ke každým 100 mg gelu obsahujícího vzorek DNA bylo přidáno 200  $\mu$ l pufru NTI. Agarózový gel byl následně rozpuštěn inkubací 5-10 min při 50 °C za občasného vortexování. Rozpuštěný roztok byl přenesen do kolonky zasazené ve sběrné zkumavce. Vše bylo centrifugováno 30 s při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus) a kapalina ve sběrné zkumavce byla odstraněna. Pokud byl objem rozpuštěného agarózového gelu obsahujícího DNA větší než 700  $\mu$ l, byl tento krok opakován. Poté byla kolonka s navázanou DNA dvakrát promyta 700  $\mu$ l pufru NT3 a následně centrifugována 30 s při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Obsah sběrné zkumavky byl vždy odstraněn. Pro dosažení úplného vysušení byla kolonka se sběrnou zkumavkou centrifugována 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Následně byla suchá kolonka přemístěna do čisté mikrozkušavky. DNA byla po přidání 15  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O inkubována 1 min při pokojové teplotě. Poté byla DNA eluována centrifugací 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Pro větší výtěžek byl tento krok zopakován. Opět bylo přidáno 15  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O a ponecháno inkubaci 1 min při pokojové teplotě. Kolonka s mikrozkušavkou byla centrifugována 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus).

#### 9.1.7 Štěpení restrikčními enzymy

Byly připraveny reakce o objemu 50  $\mu$ l. Do mikrozkušavky byly přidány v následujícím pořadí:

Složení	Množství
ddH <sub>2</sub> O	Doplnit do 50 µl
10X Pufr odpovídající použité restrikční endonukleáze (či jejich kombinaci)	5 µl
DNA (inzert/vektor)	0,5 µg – 1 µg
Restrikční endonukleáza (či jejich kombinace)	2,5 – 5 U

**Tabulka č. 9 – Složení reakce pro štěpení restrikčními enzymy.**

Vše bylo jemně resuspendováno pipetou a vloženo do termobloku. Reakce probíhala po dobu 2 hodin při teplotě optimální pro danou restrikční endonukleázu. Vzorky štěpeného vektoru byly ošetřeny 0,5 µl alkalické fosfatázy (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase – 1 U/µl) po dobu 15 min. Reakce byla terminována inkubací vzorku 15 – 20 min při vysoké teplotě dle použité restrikční endonukleázy (většinou nad 65°C).

Úspěšnost linearizace vektoru byla ověřena elektroforeticky. Vektorová DNA byla po vyříznutí z gelu očištěna od štěpící reakce dle protokolu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up – 5.2 DNA extraction from agarose gels (Macherey-Nagel) (viz. 9.1.6). Inzertová DNA byla od štěpící reakce přečištěna dle protokolu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up – 5.1 PCR clean-up (Macherey-Nagel) (viz. 9.1.8).

#### 9.1.8 Přečištění DNA od enzymatických reakcí

DNA byla přečištěna od solí a enzymů dle doporučeného protokolu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up – 5.1 PCR clean-up (Macherey-Nagel). Pokud byl objem roztoku menší než 30 µl, byl doplněn do 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

Jeden objem reakce byl smíchán s dvojnásobným objemem pufru NTI. Tento roztok byl přenesen na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce. Vše bylo centrifugováno 30 s při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus) a kapalina ve sběrné zkumavce byla odstraněna. Poté byla kolonka s navázanou DNA dvakrát promyta 700 µl pufru NT3 a následně centrifugována 30 s při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Obsah sběrné zkumavky byl vždy odstraněn. Pro dosažení úplného vysušení byla kolonka se sběrnou zkumavkou centrifugována 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Následně byla suchá kolonka přemístěna do čisté mikrozukavky. DNA byla po přidání 15 µl ddH<sub>2</sub>O inkubována 1 min při pokojové teplotě. Poté byla DNA eluována centrifugací 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Pro větší výtěžek byl tento krok zopakován. Opět bylo přidáno 15 µl ddH<sub>2</sub>O a ponecháno inkubaci 1 min při pokojové teplotě. Kolonka s mikrozukavkou byla centrifugována 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Výsledný objem roztoku DNA byl 30 µl.

### 9.1.9 Ligace inzertu a vektoru

DNA inzert byl ligován do DNA vektoru dle doporučeného protokolu DNA Insert Ligation (sticky-end) into Vector DNA (Thermo Scientific).

Byly připraveny reakce o objemu 10  $\mu$ l. Do zkumavky pro PCR byly přidány v následujícím pořadí:

Složení	Množství
ddH <sub>2</sub> O	Doplnit do 10 $\mu$ l
10X pufr pro T4 ligázu	1 $\mu$ l
Linearizovaná vektorová DNA	50-100 ng
Inzertová DNA	3:1 až 5:1 molární poměr k linearizované vektorové DNA
T4 DNA ligáza	0,2 $\mu$ l

**Tabulka č. 10 – Složení reakce pro ligaci inzertu DNA a plazmidové DNA.**

Vše bylo jemně resuspendováno a ponecháno inkubaci 1 h při pokojové teplotě. Reakce byla terminována při teplotě 70 °C po dobu 5 min.

## 9.2 Transformace plazmidové DNA do elektrokompetentních buněk *E. coli* (DH5 $\alpha$ )

### 9.2.1 Příprava elektrokompetentních kmenů *E. coli* (DH5 $\alpha$ )

Jedna oddělená kolonie DH5 $\alpha$  byla sterilní kličkou zaočkovaná do 250 ml Erlenmayerovy baňky obsahující 25 ml 2X LB média. Kultura byla kultivovaná přes noc na třepačce při 37 °C a 180 rpm. Ráno byla kultura přeočkovaná do 4X 2l Erlenmayerových baněk obsahujících 250 ml LB média s přídatkem thiaminu (0,1 mg/l) na OD<sub>600</sub>= 0,05. Kultura byla kultivovaná na třepačce při 37 °C a 180 rpm na OD<sub>600</sub>= 1. Narostlá kultura byla chlazená na ledu po dobu 15 min. Poté byla přelita do vychlazených 250 ml plastových širokohrdlých centrifugačních zkumavek (Nalgene) a sedimentovány centrifugací 20 min při 3324 g a 4 °C (Eppendorf 5804 R). Supernatant byl odstraněn, buňky byly sterilně resuspendovány v 10 ml vychlazené ddH<sub>2</sub>O a následně byl objem doplněn vychlazenou ddH<sub>2</sub>O do 250 ml. Zkumavky byly opět centrifugovány 20 min při 3324 g a 4 °C (Eppendorf 5804 R) a supernatant byl odstraněn. Poté byly buňky omyty ve 100 ml vychlazené ddH<sub>2</sub>O a usazeny centrifugací 20 min při 3324 g a 4 °C (Eppendorf 5804 R), supernatant byl odstraněn. Následně byly usazené buňky resuspendovány v 10 ml vychlazeného 10% (w/w) glycerolu, přeneseny do 50 ml centrifugačních zkumavek a objem byl doplněn vychlazeným 10% glycerolem na 50 ml. Zkumavky byly centrifugovány 20 min při 3324 g a 4 °C (Eppendorf 5804 R) a supernatant byl

odstraněn. Sediment byl opět resuspendován ve vychlazeném 10% glycerolu (objem 10% glycerolu dle velikosti sedimentu buněk). Tato suspenze byla rozplněna do předem připravených vychlazených 1 ml mikrozkušavek a zmrazena v tekutém dusíku. Dlouhodobě byly mikrozkušavky s buňkami uchovány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 9.2.2 Transformace plazmidové DNA do DH5 $\alpha$ elektroporací

Do 10  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O byly přidány 3  $\mu\text{l}$  ligační směsi (nebo  $\approx 100$  ng plazmidové DNA) a 30  $\mu\text{l}$  čerstvě rozmražených chlazených elektrokompetentních buněk. Vše bylo jemně resuspendováno a přeneseno na dno čistých předem vychlazených elektroporačních kyvet (0,2 cm, BIO-RAD). Manipulace se vzorky probíhala na ledu. Na přístroji GenePulser Xcell (Bio-Rad) byl nastaven protokol 25  $\mu\text{F}$  pro elektrickou kapacitu, 2,5 kV pro napětí a 200  $\Omega$  pro odpor. Osušené kyvety byly vloženy do přístroje a byl aplikován pulz. Žádoucí výsledná časová konstanta by měla být v rozmezí 4 – 5 ms. Po samotné elektroporaci byly buňky co nejrychleji jemně resuspendovány v 700  $\mu\text{l}$  předehřátého LB média obsahujícího 0,5% glukózou a inkubovány v třepacím termobloku 1 h při 37  $^{\circ}\text{C}$  a 1000 rpm. Tyto buňky byly následně vysety na misku s LB médiem, které obsahovalo selekční antibiotikum (Ampicilin – 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Plotny byly inkubovány v termostatu přes noc při 37  $^{\circ}\text{C}$ .

### 9.3 Izolace plazmidů z *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) alkalickou metodou

Jedna oddělená bakteriální kolonie byla sterilním párátkem zaočkovaná do 100 ml Erlenmayerovy baňky obsahující 15 ml LB média se selekčním antibiotikem (Ampicilin – 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Kultura byla kultivovaná přes noc na třepačce při 37  $^{\circ}\text{C}$  a 180 rpm. Ráno byla kultura chlazená 15 min na ledu a poté přenesena do 15 ml centrifugačních zkumavek. Buňky byly usazeny centrifugací 20 min při 3324 g a 4  $^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf 5804 R). Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 700  $\mu\text{l}$  vychlazeného roztoku I. Poté byly zkumavky vyjmuty z ledu a k suspenzi bylo přidáno 1,4 ml roztoku II. Vzorky byly inkubovány 5 min a následně opět přeneseny do ledu. Bylo přidáno 1050  $\mu\text{l}$  vychlazeného roztoku III. Vzorky byly inkubovány 5 min a sražené buněčné zbytky byly sedimentovány centrifugací 15 min při 3324 g a 4  $^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf 5804 R). Supernatant obsahující mimo jiné plazmidovou DNA byl převeden do mikrozkušavek. Nukleové kyseliny byly sraženy přidáním 0,6 objemu izopropanolu a následně usazeny centrifugací 5 min při pokojové teplotě a 18 000 g (Eppendorf 5417R). Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozpuštěn v 300  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. K vodnému roztoku nukleových kyselin bylo přidáno 350  $\mu\text{l}$  10 M LiCl a následně inkubováno 15 min při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sraženina byla sedimentována centrifugací 5 min při pokojové teplotě a 18 000 g (Eppendorf 5417R). Supernatant byl převeden do zkumavky obsahující 750  $\mu\text{l}$  96%

EtOH a vzorek byl inkubován 15 min při – 80 °C. Sraženina byla opět usazena centrifugací 5 min při pokojové teplotě a 18 000 g (Eppendorf 5417R). Supernatant byl odstraněn a pelet byl omyt v 1 ml 70 % EtOH. Následně byl vzorek centrifugován 1 min při pokojové teplotě a 18 000 g (Eppendorf 5417R), supernatant byl odstraněn a poté byl sediment důkladně vysušen na vzduchu. Pelet byl rozpuštěn dle velikosti v 40 – 70 µl ddH<sub>2</sub>O.

Množství izolované DNA bylo ověřeno elektroforeticky (viz. Horizontální agarózová elektroforéza).

Roztok I: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA-NaOH; 1% glukóza

Roztok II: 1% SDS; 0,2 M NaOH

Roztok III: 3 M octan draselný; 2 M kyselina octová (pH 5,4)

#### 9.4 Izolace plazmidů z *E. coli* (DH5α) na kolonce

Plazmidová DNA byla izolována z buněk *E. coli* dle doporučeného protokolu NucleoSpin Plasmid DNA purification – 5.1 Isolation of high copy plasmid DNA from *E. coli* (Macherey-Nagel).

Jedna oddělená bakteriální kolonie byla sterilním párátkem zaočkovaná do 100 ml Erlenmayerovy baňky obsahující 5 ml LB média se selekčním antibiotikem (Ampicilin – 100 µg/ml). Kultura byla kultivovaná přes noc na třepačce při 37 °C a 180 rpm.

Celý objem narostlé kultury byl ráno postupně centrifugován v mikrozkušavce při 11 000 g po dobu 30 s (Eppendorf MiniSpin plus). Supernatant byl po centrifugaci vždy odstraněn. Buněčný pelet byl zcela resuspendován v 250 µl pufru A1. Následně bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru A2, zkumavky byly 8X jemně obráceny a ponechány inkubaci při pokojové teplotě po dobu 5 min. Dále bylo přidáno 300 µl neutralizačního pufru A3 a zkumavky byly opět 8X obráceny. Buněčné zbytky byly usazeny centrifugací 5 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Supernatant obsahující plazmidy byl přenesen na kolonku usazenou ve sběrné zkumavce. DNA byla na kolonku navázána během centrifugace 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Následně bylo přidáno 600 µl pufru A4 a centrifugováno 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Supernatant byl odstraněn a kolonka vložena zpět do prázdné zkumavky. Pro úplné usušení byla prázdná kolonka centrifugována 2 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Suchá kolonka byla přemístěna do čisté mikrozkušavky. Pro rozpuštění plazmidové DNA bylo přidáno 25 µl ddH<sub>2</sub>O a inkubováno při pokojové teplotě 2 min. Zkumavka

s kolonkou byla následně centrifugována 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Bylo přidáno dalších 25 µl ddH<sub>2</sub>O a inkubace s centrifugací byla opakována.

## 9.5 Přečištění plazmidů izolovaných alkalickou metodou

Plazmidová DNA získaná izolací alkalickou metodou (viz. 9.3) byla pro účely následné sekvenace přečištěna od solí a RNA dle doporučeného protokolu NucleoSpin Plasmid DNA purification – 7.2 Plasmid DNA clean-up (Macherey-Nagel).

Jeden objem rozpuštěné plazmidové DNA byl smíchán s dvojnásobným objemem pufru A3. Roztok byl řádně vortexován a přenesen na kolonku uloženou ve sběrné zkumavce. DNA byla na kolonku navázána během centrifugace 1 min při 11 000 g (Eppendorf MiniSpin plus). Obsah sběrné zkumavky byl odstraněn a na kolonku bylo přidáno 600 µl pufru A4. Následující postup se shodoval s postupem po přidání pufru A4 v kapitole Přečištění plazmidů izolovaných alkalickou metodou.

## 9.6 Ověření klonování homologních genů *RPL22*/fragmentu genu *25S rRNA* z *S. cerevisiae*

Plazmidy byly verifikovány kontrolním štěpením kombinací restrikčních endonukleáz (viz. 9.1.7) a následně elektroforeticky. Pro lepší vizualizaci na agarové elektroforéze byly vzorky s fragmenty o očekávané velikosti ~ 400 nt ošetřeny 1 µl 100X ředěné Rnázy A po dobu 20 min před terminací štěpící reakce vysokou teplotou.

Dále byly plazmidy podrobeny ověření sekvenováním v Laboratoři sekvenace DNA (PřF UK). Pro tento účel byly připraveny vzorky, které obsahovaly ~ 280 ng přečištěné plazmidové DNA, 0,5 µl primeru (10 µM) a byly doplněny ddH<sub>2</sub>O na objem 8 µl.

## 9.7 Příprava kvasinkových kmenů exprimujících homologní geny *RPL22*/fragment *25S rRNA* z *S. cerevisiae*

### 9.7.1 Transformace *S. cerevisiae* s využitím lithium – acetátu

Sterilním párátkem byly přeneseny čerstvě narostlé buňky o velikosti špendlíkové hlavičky do mikrozkušavky obsahující 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Zkušavky byly centrifugovány 30 s při 13 000 rpm (Eppendorff 5418) a supernatant byl odstraněn. Buňky byly poté resuspendovány v 1 ml ddH<sub>2</sub>O a po 100 µl byly rozděleny do jednotlivých mikrozkušavek, opět sedimentovány 30 s při 13 000 rpm (Eppendorff 5418) a supernatant byl odstraněn. Nosičová ssDNA (2 mg/ml – Sigma) byla denaturována po dobu 10 min při 95 °C a následně rychle ochlazená na ledu. Buněčné pelety byly jemně resuspendovány v 50 µl čerstvě připravené ssDNA. Poté bylo



přidáno 300 – 500 ng plazmidové DNA a vše bylo zvortexováno. Dále bylo přidáno 240  $\mu$ l 50% PEG, poté následovalo přidání 36  $\mu$ l 1 M LiAc. Zkumavky byly drsně vortexovány po dobu 1 min. Poté byly za občasného otočení 2 hodiny inkubovány v termobloku při 42 °C. Po inkubaci následovala centrifugace 30 s při 13 000 rpm (Eppendorff 5418) a odstranění PEG. Centrifugace byla zopakována a pipetou byl odsát zbylý roztok PEG. Buněčné pelety byly resuspendovány ve 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O a vysety na misky s tuhým selekčním médiem SD. Buňky byly kultivovány 3 dny při teplotě 30 °C.

### 9.7.2 Uchování kvasinkových kmenů

Sterilním párátkem byla nabraná buněčná masa čerstvě narostlá na misce s tuhým médiem. Buňky byly resuspendovány v 1 ml sterilního 30% glycerolu ve zkumavce. Buněčné konzervy byly uchovány v –80 °C.

## 9.8 Ověření produkce homologních Rpl22

### 9.8.1 Příprava proteinových extraktů

Kvasinkové kmeny byly zaočkovány do 5 ml příslušného selekčního média a za stálého třepání kultivovány přes noc při 30 °C. Ráno byly buňky přeočkovány do 10 ml selekčního média na  $OD_{(600\text{ nm})} = 0,5$  a kultivovány po dobu dvou generací na  $OD_{(600\text{ nm})} = 2$ . Bylo odebráno 4,5 ml kultury o  $OD_{(600\text{ nm})} = 2$  a následně centrifugováno 3 min při pokojové teplotě a 1000 g (Eppendorf 5804 R). Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1 ml ddH<sub>2</sub>O a převedeny do mikrozkušavky se šroubovacím víčkem. Buňky byly opět usazeny centrifugací 30 s při pokojové teplotě a 13 000 rpm (Eppendorf 5804 R). Po odstranění supernatantu byly buňky uchovány v – 80 °C.

K peletu buněk bylo přidáno 100  $\mu$ l čerstvě připraveného roztoku 1, 85 M NaOH se 7%  $\beta$ -mercaptoethanolem. Buněčná směs byla homogenizovaná intenzivním vortexováním 4X 30s. Mezi jednotlivými pulzy byly vzorky chlazeny na ledu po dobu 5 min. Následovně byly vzorky promíchány se 100  $\mu$ l 50% TCA, inkubovány 5 min na ledu a poté centrifugovány 10 min při 14 000 g a 4 °C (Eppendorff 5417R). Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 500  $\mu$ l 1M nepufrovaného Tris a ihned centrifugován 1 min při 14 000 g a 4 °C (Eppendorff 5417R). Po odstranění supernatantu byl sediment zcela resuspendován ve 100  $\mu$ l 4X Laemmliho pufru a uchován v – 80 °C. Těsně před nanesením na gel byla přidána 1/20 objemu vzorku 1M DTT. Vše bylo inkubováno 5 min při 95 °C.

4x Laemmli pufr: 277,8 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4,4% SDS; 4,44% glycerol; 0,02% bromfenolová modř



### 9.8.2 Tris – tricinová SDS proteinová elektroforéza

Pro proteiny <20 kDa byla provedena Tris – tricinová SDS PAGE. Byla sestavena a utěsněna nalévací aparatura pro přípravu gelu dle návodu Mini-PROTEAN Tetra Handcast System (BIORAD).

Byl namíchán 10% separační gel, který obsahoval:

Složení	Dva 10% akrylamidové separační gely
30% akrylamid	4 ml
Gelový pufr	4 ml
50% glycerol	4 ml

**Tabulka č. 11 – Složení 10% separačního gelu pro Tris – tricinovou proteinovou elektroforézu.**

Zároveň byl předpřipraven zaostřovací gel, který obsahoval:

Složení	Dva zaostřovací gely
30% akrylamid	0,766 ml
Gelový pufr	1,5 ml
H <sub>2</sub> O	3,732 ml H <sub>2</sub> O

**Tabulka č. 12 – Složení zaostřovacího gelu pro Tris – tricinovou proteinovou elektroforézu.**

Těsně před nalitím bylo do separačního gelu přidáno 160 µl 10% APS a 16 µl TEMED (pro 2 separační gely). Vše bylo promícháno a stříkačkou s ustríženou špičkou pro pipetu bylo nanášeno do připravené aparatury pro nalití gelu do výšky asi 5 mm pod koncem hřebínku. Rychle poté bylo do zaostřovacího gelu přidáno 120 µl 10% APS a 12 µl TEMED (pro 2 separační gely). Vše bylo promícháno a stříčkou s ustríženou špičkou pro pipetu bylo nanášeno navrch ještě neztuhlého separačního gelu. Následovně byl vložen hřebínek (0,75 mm), který byl upevněn skoro ztuhlou 1% agarózou (rozpuštěnou ve vodě) tak, aby nevyplaval a nedocházelo k tvorbě bublin. Gely byly ponechány tuhnout 20 min (občas přes noc). Po vytažení hřebínku byly jamky gelu několikrát promyty katodovým pufrem.

Dále byla sestavena aparatura pro elektroforézu dle návodu Mini-PROTEAN Tetra Handcast System (BIORAD). Její vnitřek byl zaplněn katodovým pufrem tak, aby jednotlivé jamky gelu byly pod hladinou pufru. Do jamek bylo mikrostříkačkou Hamilton nanášeno 15 – 20 µl vzorku (viz. Příprava proteinových extraktů). Mezi nanášením jednotlivých vzorků byla mikrostříkačka proplachovaná katodovým pufrem. 3 µl PageRuler Prestained Protein Ladder

(Thermo Scientific) byly použity jako standard pro identifikaci velikosti proteinů. Aparatura byla zavěšena do elektroforetické vany a vně aparatury byl nalit anodový pufr. Vana byla připojena ke zdroj napětí a byl nastaven konstantní proud 20 mA/gel jak pro zaostření, tak pro separaci vzorku. Po dosažení konce gelu čelem vzorků byl zdroj napětí odpojen. Gel byl použit pro přenos proteinů na membránu.

Separací/zaostřovací akrylamid: 30% akrylamid/bisakrylamid

Gelový pufr: 3 M Tris (pH 8,45); 0,3% SDS

Katodový pufr: 200 mM Tris (pH 8,9)

Anodový pufr: 100 mM Tris; 100 mM Tricine; 0,1% SDS, pH 8,25

### 9.8.3 Přenos proteinů na membránu (Western blot)

Rozměry membrány a dvou filtračních papírů Whatman (3 mm) byly přizpůsobeny velikosti gelu. V přenosovém pufru byly papíry, membrána a těsnící vložky ponechány sycení po dobu 5 min. Z vložek byly válečkem vytlačeny vzduchové bubliny. Aparatura pro přenos proteinů byla složena pod hladinou přenosového pufru. Na černou desku přenosové kazety byla v následujícím pořadí položena: vložka, filtrační papír, gel (viz. Tris-tricinová SDS proteinová elektroforéza), membrána, druhý filtrační papír a druhá vložka. Poté byly opatrně válečkem vytlačeny bubliny vzduchu tak, aby nedošlo k posunutí membrány vůči gelu. Kazeta byla uzavřena a vložena do přenosové vany, která byla následně zalita přenosovým pufrem. Dále byla do vany vložena forma s ledem a magnetické míchátko. Aparatura byla připojena ke zdroji napětí 115 V a míchání bylo zapnuto. Nádoba s ledem byla v průběhu přenosu měněna alespoň dvakrát, aby byly dodrženy podmínky chlazení. Po 1 h 30 min byl přenos ukončen a aparatura byla odpojena od zdroje napětí a rozebrána. Gel byl následně barven 30 min v Commaie Brilliant Blue R 250 a poté odbarven v odbarvovacím roztoku za stálého orbitálního třepání nádoby. Membrána obsahující proteiny byla opláchnuta v pufru TBS. Pro kontrolu přenosu proteinů byla smočena v barvě Ponceau S solution (Sigma) a následně odbarvena v TBS. Poté byla provedena imunodetekce protilátkou (viz. imunodetekce protilátkou).

Přenosový pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin; 20% (v/v) methanol

Odbarvovací roztok: 7% kyselina octová; 5% methanol

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl

#### 9.8.4 Imunodetekce protilátkou

Byl připraven blokovací pufr obsahující 5% odtučněné mléko (Biorad) a 0,1% pufr TTBS. V tomto pufru byla 1 h inkubována membrána, která byla předem opláchnuta v pufru TBS (viz. 9.8.3). Byl připraven roztok primární protilátky ředěné v 5% odtučněném mléce a 0,1% pufru TTBS. Membrána byla spolu s 3,5 ml roztoku primární protilátky zatavena do fólie a inkubována na třepačce hodinu při pokojové teplotě a následně přes noc při 8 °C. Ráno byla membrána oplachována 3X 10 min od primární protilátky v pufru TTBS. Mezitím byl připraven roztok sekundární protilátky ředěné v 3% odtučněném mléce a 0,05% pufru TTBS. Omytá membrána byla zatavena do fólie a inkubována na třepačce 1 h při pokojové teplotě. Dále byla membrána oplachována 4X 10 min od sekundární protilátky v pufru TTBS a následně 2X 5 min v pufru TBS.

TTBS: TBS (viz. 9.8.3) s 0,05% Tween 20 (Serva)

#### 9.8.5 Vizualizace proteinů na membráně alkalickou fosfatázou

Proteiny byly detekovány dle návodu AP Conjugate Substrate Kit (BIORAD).

Byl připraven pufr pro alkalickou fosfatázu (pufr AP), ve kterém byla membrána (viz. 9.8.4) sycena 5 min. Dále bylo připraveno X ml pufru AP se 100X naředěnými substráty A a B, jež jsou součástí soupravy od BIORAD. Membrána byla inkubována v pufru AP obsahujícím substráty ve víčku od 96 jamkové destičky. Signál na membráně byl vyvíjen 2 – 3 h v tmavém šuplíku bez přístupu světla. Reakce byla zastavena opláchnutím a omytím membrány v ddH<sub>2</sub>O.

Pufr AP:

Komerční: 25X colour developer – součástí soupravy AP Conjugate Substrate Kit (BIORAD)

Vyrobený v laboratoři: 100 mM Tris (pH 9); 0,05 mM MgCl<sub>2</sub>

Substrát A: 30 mg NBT v 70% DMF; 100X koncentrovaný; AP Conjugate Substrate Kit (BIORAD)

Substrát B: 15 mg BCIP v H<sub>2</sub>O; 100X koncentrovaný; AP Conjugate Substrate Kit (BIORAD)

### 9.9 Měření rychlosti růstu kvasinkových kmenů

Pro měření rychlosti růstu byl využit přístroj Varioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific).

Kvasinkové kmeny byly zaočkovány do 5 ml příslušného selekčního média a za stálého třepání kultivovány přes noc při 30 °C. Ráno byly buňky přeočkovány do 700 µl (24 jamková destička) nebo 1,4 ml (12 jamková destička) selekčního média na  $OD_{(600\text{ nm})} = 0,1$  do mikrotitrační destičky. Jako prázdný vzorek bylo použito sterilní selekční médium bez buněk. Destička byla vložena do přístroje a byl spuštěn software Skan It. Destička byla třepána při 180 rpm a 30 °C. Přístroj měřil po dobu 100 ms optickou densitu suspenze v jamkách v 10 min intervalech, celkem bylo zaznamenáno 144 měření.

### 9.9.1 Výpočet doby zdvojení kvasinek

Data získaná měřením optické density na přístroji Varioskan byla zpracována do bodového grafu. Osa x odpovídala času, po který byly buňky inkubovány a osa y odpovídala  $\log_2$  naměřené  $OD_{600}$ . Na růstové křivce byl zvýrazněn interval, ve kterém kvasinky rostly exponenciálně a z tohoto intervalu byly odečteny tyto hodnoty:

Doba, po kterou rostly buňky exponenciálně	$T_e$
OD kultury při vstupu do exponenciální fáze růstu	$OD_{\text{poč.}}$
OD kultury při vystoupení z exponenciální fáze růstu	$OD_{\text{konc.}}$

Z těchto hodnot byla vypočítána doba zdvojení T:

$$T = \frac{\ln 2 * T_e}{\ln\left(\frac{OD_{\text{konc.}}}{OD_{\text{poč.}}}\right)}$$

### 9.10 Trojhybridní systém

Na misku s tuhým selekčním médiem byla sterilním párátkem z příslušné zmrzlé buněčné kultury konzervované v glycerolu rozprostřena část buněk. Tyto buňky byly kultivovány 1 den v termostatu při 30 °C.

Další den bylo sterilně do prvního sloupce 96 jamkové destičky přidáno 100 µl ddH<sub>2</sub>O. Do dalších pěti sloupců bylo přidáno 80 µl ddH<sub>2</sub>O. Do 100 µl ddH<sub>2</sub>O bylo sterilně špičkou pipety přidáno malé množství buněk z narostlé kultury na misce se selekčním médiem (velikost o něco menší než špendlíková hlavička). Buňky byly resuspendovány a 20 µl této suspenze bylo přeneseno do jamek vedlejšího sloupce obsahujícího 80 µl ddH<sub>2</sub>O. Buňky byly opět resuspendovány a opět bylo přeneseno 20 µl této suspenze do jamek vedlejšího sloupce. Tento postup se opakoval, dokud všechny sloupce s ddH<sub>2</sub>O nebyly obohaceny o buňky. Kultura tedy byla ředěna 5X v šesti různých koncentracích.

Tiskací nástroj byl pro zajištění sterility omyt v ddH<sub>2</sub>O a 3X namočen v EtOH a opálen nad ohněm. Po vychladnutí byl namočen do promíchané 96 jamkové destičky s buňkami a obtisknut na čerstvě nalité plotny se selekčním médiem. Plotny byly inkubovány 4 – 5 dní v termostatu při 30 °C.

### 9.11 Semikvantitativní PCR

Jako templát pro semikvantitativní PCR byla použita cDNA příslušných kmenů *S. cerevisiae*.

Za stálého chlazení byly jednotlivé komponenty reakce přidány v následujícím pořadí:

Složení	Zásobní koncentrace	Objem/množství v jedné reakci
ddH <sub>2</sub> O		5,8 µl
10 X Pufr pro polymerázu Taq		2 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 µl
dNTP	2,5 mM	2 µl
Primer 1	10 µM	2 µl
Primer 2	10 µM	2 µl
40x ředěná cDNA		5 µl
Polymeráza Taq		0,2 µl

**Tabulka č. 13 – Složení reakce PCR.**

Vše bylo jemně promícháno. Podmínky, při kterých reakce probíhala byly následující:

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95 °C	7 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	24-30
Nasedání primerů	55 °C	30 s	24-30
Syntéza DNA	72 °C	40 s/kb	24-30
Syntéza DNA	72 °C	5 min	1

**Tabulka č. 14 – Program PCR nastavený na termocykléru (T advanced – Biometra).**

### 9.12 Kvantitativní PCR (qPCR)

Pro qPCR byl použit kit 5x HOT FIRE Pol® EvaGreen® qPCR Supermix.

Složení jedné reakční směsi:

Složení	Objem
5X EvaGreen Supermix	2 $\mu$ l
Primer 1 (10 $\mu$ M)	0,3 $\mu$ l
Primer 2 (10 $\mu$ M)	0,3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2,4 $\mu$ l
100X ředěná cDNA	5 $\mu$ l

**Tabulka č. 15 – Složení reakce qPCR.**

Byly pipetovány reakce o objemu 10  $\mu$ l za stálého chlazení na ledu. Na dno destičky (LightCycler Multiwell Plate 384, Roche) bylo za pomoci elektronické pipety (Eppendorf Xplorer) nejprve pipetováno 5  $\mu$ l premixu, který obsahoval 5X EvaGreen Supermix, primery a ddH<sub>2</sub>O. Poté bylo elektronickou pipetou přidáno 5  $\mu$ l 100X ředěné cDNA. Destička byla přelepena těsnící folií (LightCycler 480 Sealing Foil, Roche), vše bylo krátce vortexováno a destička byla centrifugována při 1500 g po dobu 3 min. Poté byla destička se vzorky vložena do přístroje Light Cycler 480 II a byla inkubována dle programu v tabulce 16. Všechny vzorky byly pipetovány v triplikátu.

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Dentaurace	95 °C	5 min	1
Dentaurace	95 °C	10 s	40
Nasedání primerů	58 °C	10 s	
Syntéza DNA (po tomto kroku přístroj odečítá fluorescenční signál)	72 °C	15 s	
Analýza táním	95 °C	5 s	1
	50 °C	1 min	
Chlazení	40 °C	30 s	1

**Tabulka č. 16. – Program qPCR.**

Analýza výsledků byla provedena za pomoci LightCycler® 480 Software Version 1.5 (Roche Applied Science). C<sub>T</sub> (threshold cycle) představuje cyklus qPCR, při kterém byla dosažena prahová hodnota fluorescence. Byly získány hodnoty C<sub>p</sub>, které představovaly průměr C<sub>T</sub> technických triplikátů a směrodatná odchylka každého triplikátu. Data genu zájmu byla normalizovaná na hodnoty *SPT15*. Rozdíl mezi C<sub>p</sub> genu zájmu a C<sub>p</sub> genu *SPT15* byl vyjádřen jako  $\Delta$ C<sub>p</sub>. Následně byly získány hodnoty  $\Delta\Delta$ C<sub>p</sub>, které představovaly rozdíl mezi  $\Delta$ C<sub>p</sub> kmenů produkujících různé Rpl22 a  $\Delta$ C<sub>p</sub> kontrolního kmenu s prázdným plazmidem pVTU260. Násobná změna exprese genu zájmu byla vyjádřena jako  $2^{-\Delta\Delta C_p}$ .

## 10 Výsledky

### 10.1 Konstrukce plazmidů

Pro studium komplementačních vlastností bylo třeba připravit expresní plazmidy nesoucí různé kvasinkové geny *RPL22* nebo fragment 25S rRNA *S. cerevisiae*. cDNA byla syntetizována při reverzní transkripci RNA izolované z jednotlivých kvasinek. Sekvence zájmu byly amplifikovány za pomoci PCR. Použité primery obsahovaly restrikční místa pro jednotlivé endonukleázy (tabulka č. 17). *RPL22* byly následně klonovány do pVTU260 a pACT2 s konstitutivním promotorem *ADHI* (alkoholdehydrogenáza I). Fragment 25S rRNA byl klonován do p3HR2 s promotorem *RPR1* (RNase P ribonukleoprotein).

Vektor	Gen	Restrikční místa použitá pro klonování	Experiment, ve kterém byl plazmid použit
pVTU260	<i>CaRPL22</i>	NcoI, BamHI	Měření rychlosti růstu, sestřihová analýza
pVTU260	<i>CgRPL22</i>	NcoI, BamHI	
pVTU260	<i>DhRPL22</i>	NcoI, BamHI	
pVTU260	<i>YIRPL22</i>	NcoI, BstXI	
pVTU260	<i>SpRPL22</i>	NcoI, BamHI	
pACT2	<i>CaRPL22</i>	NcoI, BamHI	Trojhybridní systém
pACT2	<i>CgRPL22</i>	NcoI, BamHI	
pACT2	<i>DhRPL22</i>	NcoI, BamHI	
pACT2	<i>YIRPL22</i>	NcoI, EcoRI	
pACT2	<i>SpRPL22</i>	NcoI, BamHI	
p3HR2	<i>Sc25S rRNA (H57–H59)</i>	PaeI	

Tabulka č. 17 – Přehled plazmidů vytvořených v této studii.

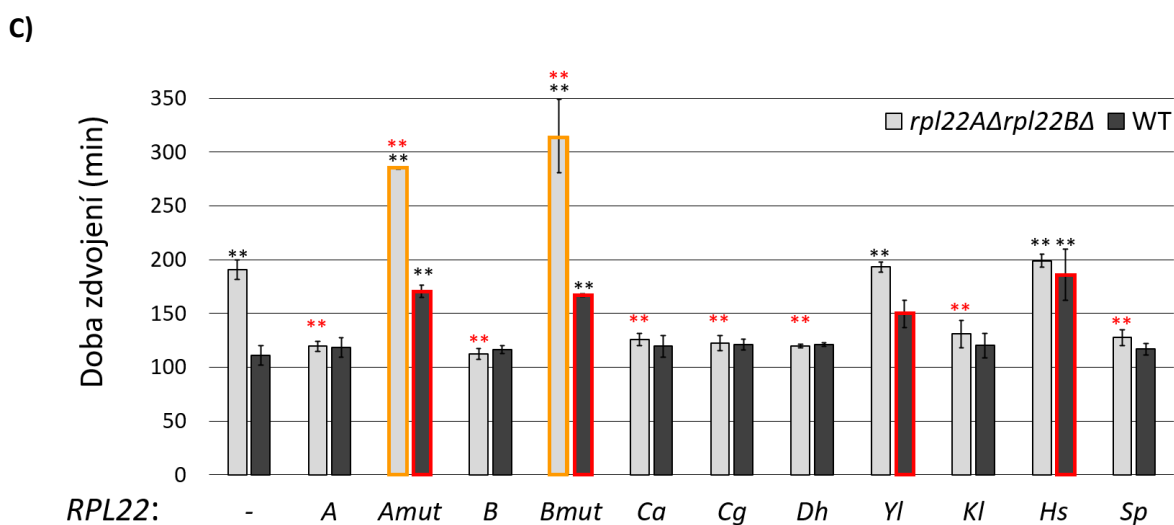
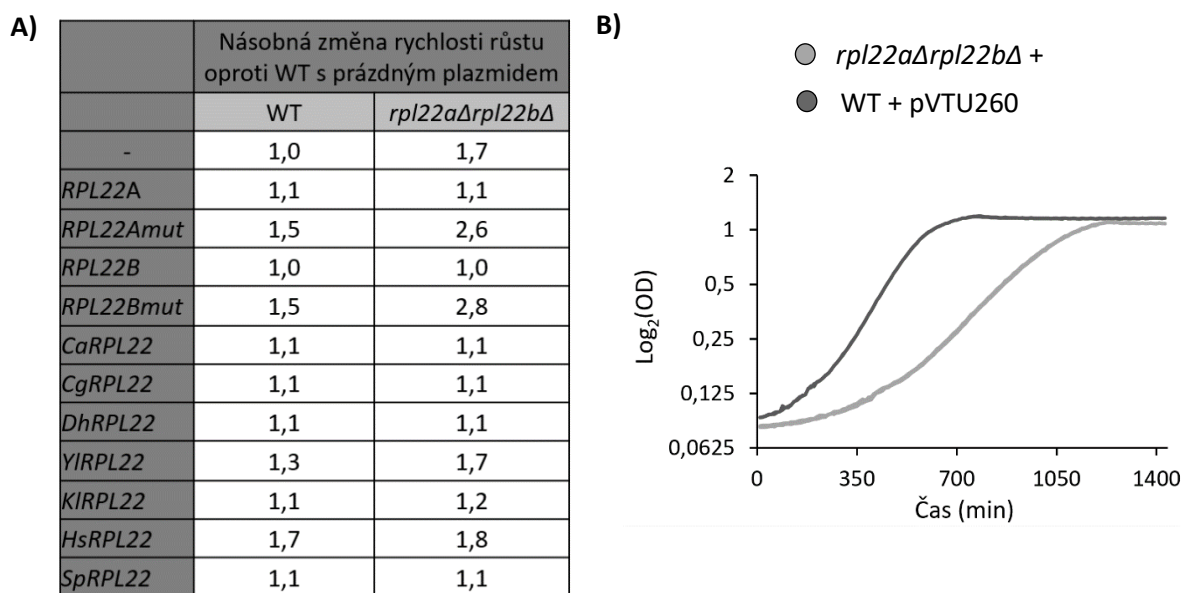
Všechny plazmidy byly pro ověření podrobeny kontrolnímu štěpení restrikčními endonukleázami a následné sekvenaci.

### 10.2 Rpl22 pocházející z *Y. lipolytica* a *H. sapiens* nekomplementují růstový fenotyp *S. cerevisiae rpl22aΔrpl22bΔ*

Delece *RPL22A* a *RPL22B* (*rpl22aΔrpl22bΔ*) u *S. cerevisiae* se projeví 1,7X pomalejším růstem v porovnání s buňkami WT (Steffen et al., 2012, 2008; Nemčko, 2018). V syntetickém médiu je rozdíl mezi generační dobou těchto kmenů přibližně 45 min a v plném médiu přibližně 65 min (Nemčko, 2018). Obnovením exprese *RPL22A/B* z plazmidu pVTU260 v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* dochází ke snížení generační doby na přibližně stejné hodnoty jako u buněk WT (Abrahámová, nepublikováno).

Abychom zjistili, jaký bude mít efekt exprese homologních *RPL22*, transformovali jsme buňky *S. cerevisiae* WT a *rpl22aΔrpl22bΔ* plazmidy pVTU260 nesoucími různé geny *RPL22* nebo prázdným pVTU260. Pozorovali jsme, zda se změní rychlost růstu buněk WT a *rpl22aΔrpl22bΔ* exprimujících různé *RPL22* v porovnání s buňkami nesoucími prázdný plazmid pVTU260 bez *RPL22*. Porovnávali jsme, zda jsou homologní Rpl22 schopné zastoupit endogenní Rpl22A/B a zvrátit tak růstový defekt buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*.

Rychlost růstu příslušných kmenů, a tedy schopnost komplementace růstového fenotypu byly měřeny spektrofotometricky při  $\lambda=600$  nm na přístroji Varioskan LUX. Buňky byly kultivovány v minimálním médiu bez uracilu a bez tryptofanu při 30 °C. Každých 10 min byla po dobu 24 h zaznamenávána optická denzita kultury a z naměřených dat byly vypočteny doby zdvojení jednotlivých kmenů (obrázek č. 7).





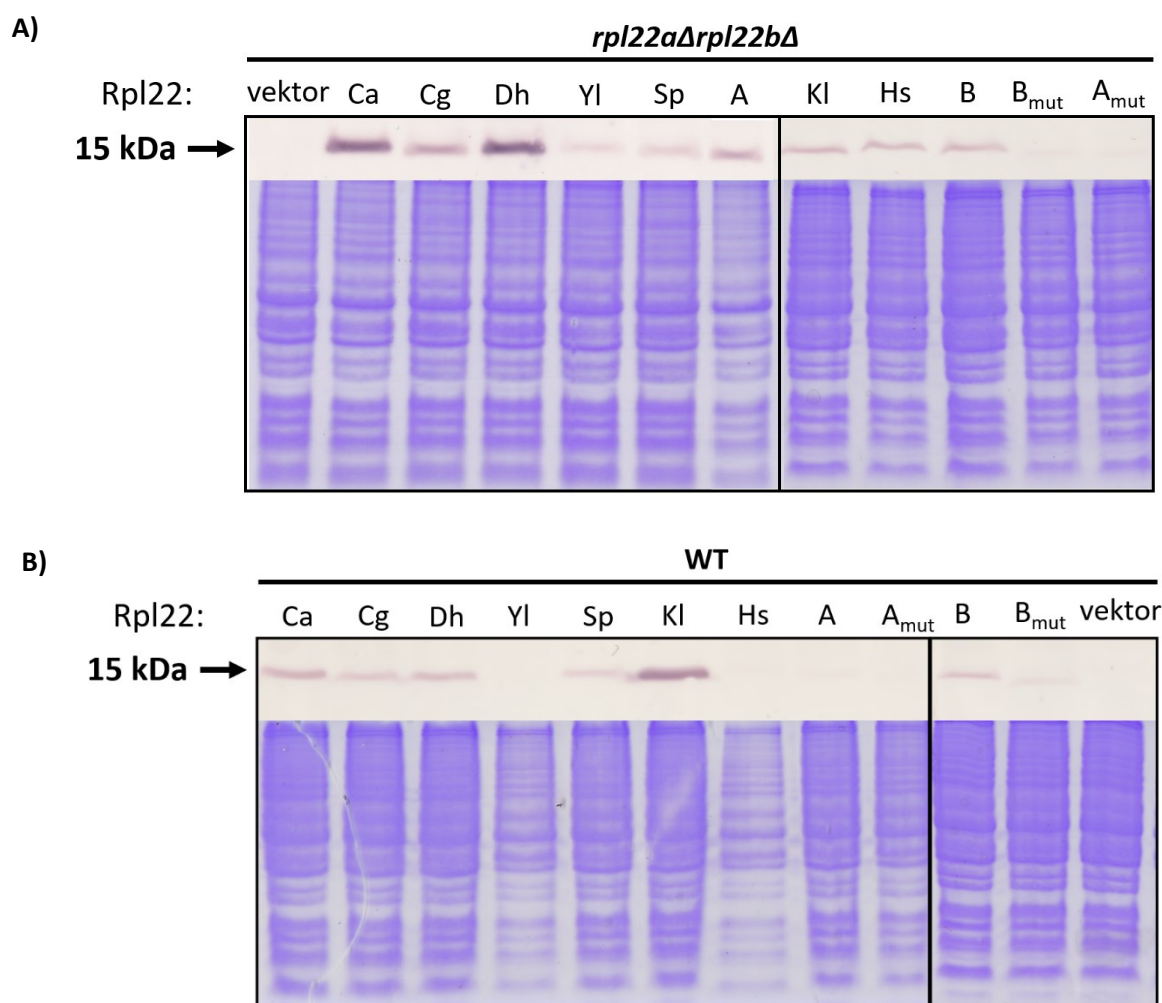
**Obrázek č. 7 – Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B<sub>mut</sub>, YlRpl22 a HsRpl22 působí toxicky v buňkách v buňkách WT. A)** Tabulka znázorňující, kolikanásobně se liší doba zdvojení jednotlivých kmenů v porovnání s buňkami WT s prázdným pVTU260. **B)** Růstové křivky kmenů WT a *rpl22aΔrpl22bΔ* s prázdným pVTU260. Křivky byly měřeny na přístroji Varioskan Lux a znázorňují závislost  $\log_2(\text{OD})$  na čase. **C)** Na ose X jsou vyneseny jednotlivé geny *RPL22* exprimované z pVTU260, osa Y představuje délku generační doby jednotlivých kmenů v min. Vynesené hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky alespoň dvou biologických replikátů. Červeně jsou vyznačeny kmeny, kde *RPL22* působí toxicky v buňkách WT. Oranžově jsou znázorněny kmeny *rpl22aΔrpl22bΔ*, jejichž růstový defekt je prohlouben při nadprodukcí Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub>. Růstové hodnoty buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* exprimujících *KIRPL22* a *HsRPL22*, a buněk WT exprimujících *KIRPL22*, *HsRPL22* a *SpRPL22* naměřila K. Abrhánová (nepublikováno). Statisticky signifikantní rozdíl v rychlosti růstu oproti buňkám WT s prázdným pVTU260 je značen černými hvězdičkami a byl měřen u všech kmenů (Studentův t-test s Bonferroniho korekcí vícenásobného testování;  $P < 0,0002 = **$ ). Statisticky signifikantní rozdíl v rychlosti růstu oproti buňkám *rpl22aΔrpl22bΔ* s prázdným pVTU260 je značen červenými hvězdičkami a byl měřen u kmenů *rpl22aΔrpl22bΔ* (Studentův t-test s Bonferroniho korekcí vícenásobného testování;  $P < 0,0007 = **$ ).

Výsledky ukazují, že většina proteinů Rpl22 je schopna komplementovat růstový fenotyp buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*. Expres takových *RPL22* způsobí, že se hodnota doby zdvojení kmenů *rpl22aΔrpl22bΔ* sníží téměř na hodnoty doby zdvojení buněk WT s prázdným plazmidem. Ovšem generační doba kmenů *rpl22aΔrpl22bΔ* exprimujících *YlRPL22* nebo *HsRPL22* se statisticky významně neliší od generační doby buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* s prázdným plazmidem. Zároveň jsou její hodnoty 1,7 – 1,8X větší než generační doba buněk WT s prázdným plazmidem (obrázek č. 7A). *YlRpl22* a *HsRpl22* tedy nejsou schopny zastoupit funkce endogenního Rpl22A/B v komplementaci rychlosti růstu. Zároveň z výsledků vyplývá, že kmeny WT produkující *YlRpl22*, *HsRpl22*, Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> rostou 1,3X–1,7X pomaleji než buňky WT nesoucí prázdný plazmid, a naznačují tak možnou toxicitu těchto proteinů pro *S. cerevisiae* (obrázek č. 7C – červeně). Dle Studentova t-testu po korekci vícenásobného testování není doba zdvojení buněk WT s *YlRpl22* významně odlišná v porovnání s buňkami WT s prázdným plazmidem ( $P=0,003$ ). Ovšem i při kultivaci pozorujeme jejich pomalejší růst.

Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> působí toxicky i v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* (obrázek č. 7C – oranžově). Doba zdvojení kmenů *rpl22aΔrpl22bΔ* exprimujících *RPL22A<sub>mut</sub>* a *RPL22B<sub>mut</sub>* je dokonce 1,5X větší než generační doba buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* s prázdným plazmidem. Odlišné

elektrostatické vlastnosti povrchu proteinů Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> oproti Rpl22A/B zamezí zprostředkování jejich funkcí.

Pro ověření, zda v buňkách dochází k produkci Rpl22, byly připraveny proteinové extrakty měřených kmenů. Na tris-tricinový gel byly nanесeny vzorky proteinových extraktů, připravených z exponenciálně rostoucích buněk. Obrázek č. 8 ukazuje výsledek přenesu proteinů na membránu a odpovídající tris – tricinové gely po přenosu.



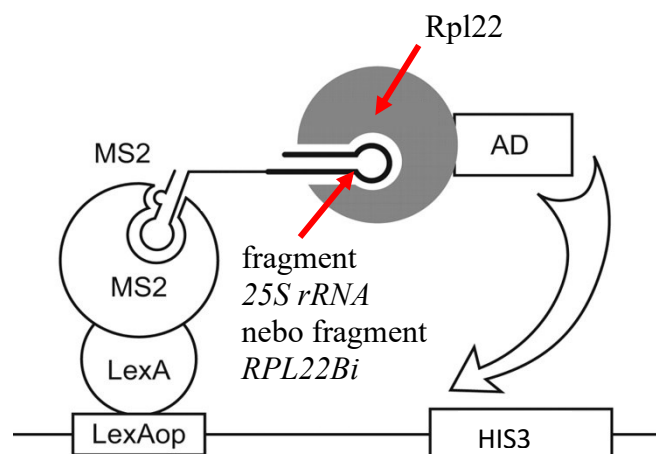
**Obrázek č. 8. – Míra exprese *RPL22* z pVTU260 v buňkách WT a *rpl22aΔrpl22bΔ* není ve všech kmenech stejná.** Pro imunodetekci 6X His – Rpl22 byla použita primární protilátka proti značce 6X His a sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP). Očekávaná velikost detekovaných proteinů byla 15 kDa (viz. šipka). Jako negativní kontrola (NK) byly nanесeny vzorky proteinových extraktů z buněk nesoucích prázdný pVTU260. Pořadí 6X His – Rpl22 na membráně **A) exprese *RPL22* v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ***: 1. – NK (vektor), 2. – CaRpl22, 3. – CgRpl22, 4. – DhRpl22, 5. – YlRpl22, 6. – SpRpl22, 7. – Rpl22A, 8. – KlRpl22,

9. – HsRpl22, 10. – Rpl22B, 11. – Rpl22B<sub>mut</sub>, 12. – Rpl22A<sub>mut</sub>. **B) Expresse *RPL22* v buňkách WT:** 1. – CaRpl22, 2. – CgRpl22, 3. – DhRpl22, 4. – YlRpl22, 5. – SpRpl22, 6. – KlRpl22, 7. – HsRpl22, 8. – Rpl22A, 9. – Rpl22A<sub>mut</sub>, 10. – Rpl22B, 11. – Rpl22B<sub>mut</sub>, 12. – vektor

Z výsledku plyne, že k produkci proteinů Rpl22 v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* dochází, včetně YlRpl22, SpRpl22, Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub>, kde je signál slabší, ale detekovatelný. Nepřímým důkazem produkce YlRpl22, HsRpl22, Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> v buňkách WT je biologický dopad na růst (obrázek č. 7C). Vhodnější alternativou pro detekci Rpl22 by bylo použití sekundární protilátky konjugované s HRP. Signál tvořený protilátkou konjugovanou s AP je méně intenzivní než signál, který produkuje protilátka konjugovaná s Horseradish peroxidázou (HRP).

### 10.3 Vazba Rpl22 z *C. albicans* a *H. sapiens* na fragment 25S rRNA nekoreluje se schopností těchto proteinů komplementovat růstový defekt *S. cerevisiae* *rpl22aΔrpl22bΔ*

Ribosomální funkce Rpl22A/B souvisí se schopností těchto proteinů kontaktovat 25S rRNA. Abychom zjistili, zda homologní Rpl22 budou vázat 25S rRNA *S. cerevisiae*, rozhodli jsme se využít kvasinkového trojhybridního systému (Y3H) (obrázek č. 9).



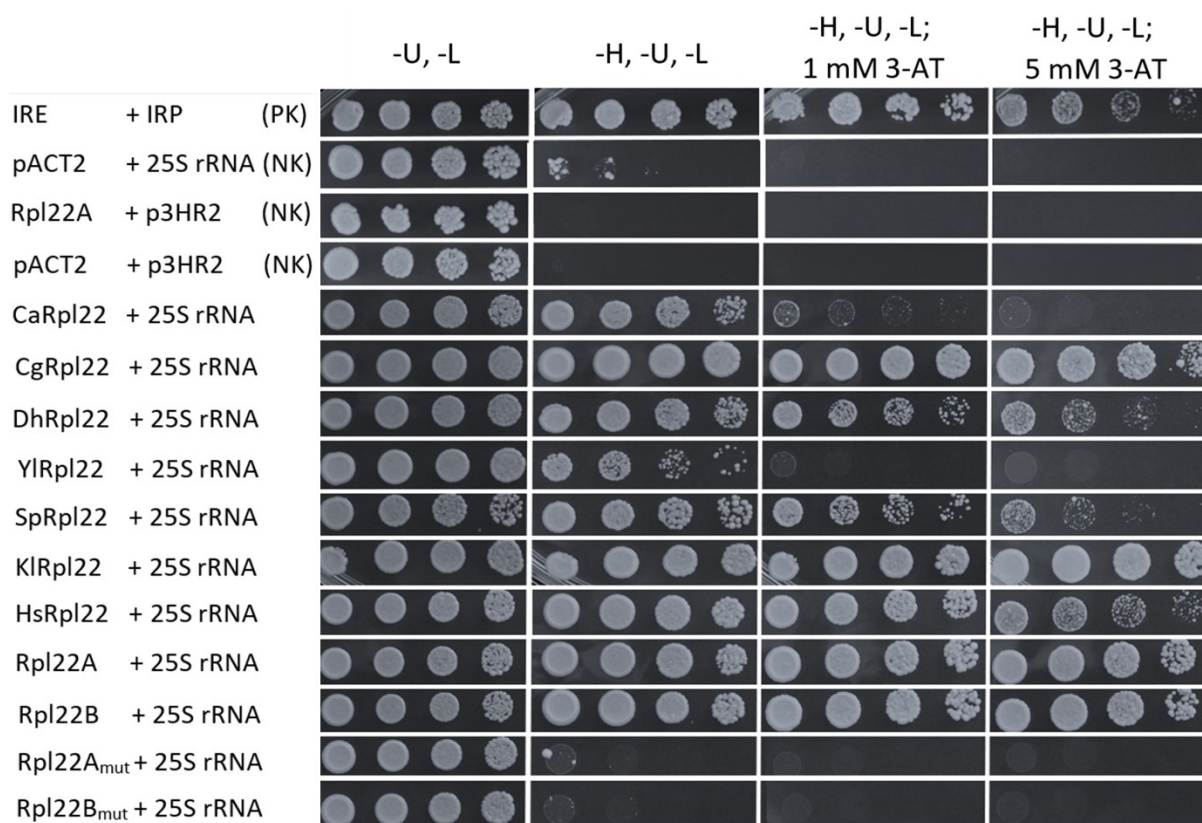
**Obrázek č. 9 – Kvasinkový trojhybridní systém.** Červené šipky značí potenciální interakční partnery – Rpl22 jako protein zájmu a fragment 25S rRNA nebo fragment *RPL22Bi* (I2) jako RNA zájmu. LexAop – operátor LexA, AD – aktivační doména Gal4. Fúzní RNA MS2-fragment 25S rRNA/fragment *RPL22Bi* je exprimována z plazmidu p3HR2 a fúzní protein Rpl22-Gal4 je exprimovaný z plazmidu pACT2. Základní schéma převzato z Hook et al., 2005 a upraveno.

Y3H umožní rychlou detekci vazby mezi RNA zájmu a proteinem zájmu *in vivo* (obrázek č. 9) (SenGupta et al., 1996). Tato metoda je založena na reportérovém systému, který využívá kvasinkový kmen *YBZ1* s inducibilním promotorem pro *HIS3*, který je pod kontrolou operátoru LexA. V takových buňkách je exprimovaná DNA vazebná doména proteinu LexA fúzovaná s RNA vazebným plášťovým proteinem MS2. Dále dochází k expresi hybridní RNA, a to vlásenky MS2 s RNA zájmu. MS2-vazebný protein váže vlásenku MS2 – RNA. Dále je exprimovaný protein zájmu fúzovaný s aktivační doménou Gal4.

Pokud protein a RNA interagují, dojde k přiblížení aktivační domény k promotoru *HIS3* a buňky začnou syntetizovat enzym kódovaný tímto genem. Protože *HIS3* kóduje imidazol-glycerol-fosfát dehydratázu, která se účastní 6. kroku biosyntézy histidinu, buňky, ve kterých dochází k interakci mezi RNA a proteinem zájmu rostou na médiu bez histidinu.

System také umožňuje detekci síly vazby RNA a proteinu. Do média je přidávána zvyšující se koncentraci 3-aminotriazolu (3-AT), což je kompetitivní inhibitor enzymu, který *HIS3* kóduje. Umožní sledovat, jakou koncentraci 3-AT buňky přežijí. Přidáním 3-AT do média je také možné vyřadit falešně pozitivní výsledky. Detailnější popis Y3H uvádí např. Stumpf et al., 2008.

Buňky *YBZ1* byly transformovány plazmidem *p3HR2* kódujícím úsek 25S rRNA (helix 57, 58 a 59 – *p3HR2\_H57-H59\_25 rRNA\_JL*), se kterým Rpl22A/B interaguje v ribozomu *S. cerevisiae* (Ben-Shem et al., 2011). Dále byly transformovány *pACT2* nesoucím různé fúzní varianty *RPL22 – GAL4*. Z čerstvě narostlé kultury na misce byly vytvořeny buněčné suspenze. Ty byly obtisknuty na misky s tuhým médiem s nebo bez histidinu, případně na médium bez histidinu obsahující různé koncentrace 3-AT. Všechny misky byly zároveň bez leucinu a uracilu z důvodu přítomnosti těchto selekčních markerů v plazmidech *pACT2* a *p3HR2*. Následně byly ponechány růstu po dobu 5 dní při 30 °C.



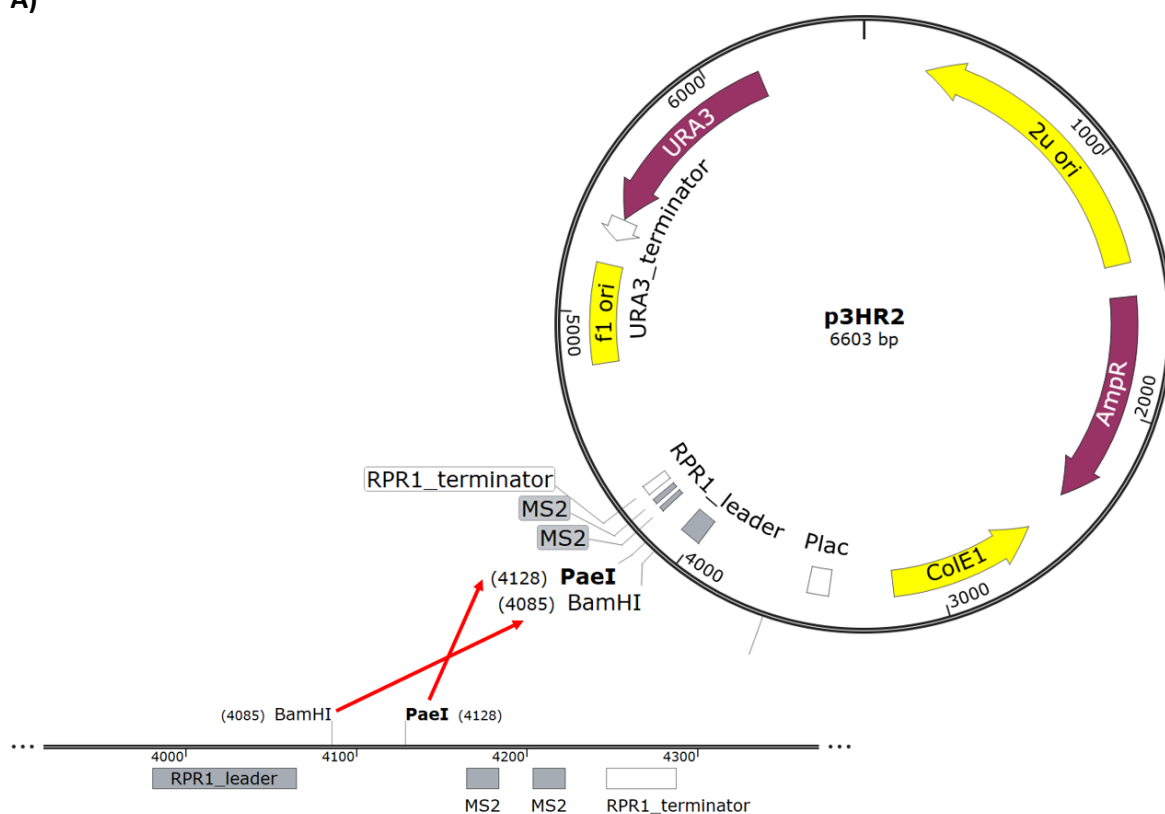
**Obrázek č. 10 – YIRpl22 a CaRpl22 interagují slaběji s fragmentem 25S rRNA<sub>JL</sub> než HsRpl22.** Výsledek vazby různých Rpl22 na fragment 25S rRNA<sub>JL</sub> v Y3H. Jako pozitivní kontrola (PK) byl použit kmen s interakčními partnery iron responsive element (IRE) a iron regulatory protein (IRP), jejichž vazba byla prokázána jako silná (Goforth et al., 2010). Jako NK byl použit kmen s prázdnými plazmidy pACT2 a p3HR2, dále kmen s prázdným pACT2 a p3HR2<sub>H57–H59\_25 rRNA<sub>JL</sub></sub> (v obrázku jen 25S rRNA), a také kmen s prázdným p3HR2 a pACT2<sub>Rpl22A</sub> (v obrázku jen Rpl22A). Buňky byly pro kontrolu obtisknuty na médium s histidinem (-U, -L), a pro selekci na médium bez histidinu (-H, -U, -L), bez histidinu s 1 mM 3-AT (-H, -U, -L; 1 mM 3-AT) a na médium bez histidinu s 5 mM 3-AT (-H, -U, -L; 5 mM 3-AT). Fúzní proteiny Rpl22 – Gal4: CaRpl22, CgRpl22, DhRpl22, YIRpl22, SpRpl22, KIRpl22, HsRpl22, Rpl22A, Rpl22B, Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B<sub>mut</sub>. Kultury byly sériově 5X ředěny. Obrázek reprezentuje výsledek jedno ze tří biologických opakování.

CgRpl22, KIRpl22, Rpl22A a Rpl22B interagovaly s fragmentem 25S rRNA<sub>JL</sub> *S. cerevisiae* nejsilněji. Kmeny produkující tyto proteiny byly schopny růst v přítomnosti 5 mM 3-AT. O něco slaběji interagovaly s fragmentem 25S rRNA<sub>JL</sub> DhRpl22, SpRpl22 a HsRpl22. Kolonie těchto buněk měly o něco menší velikost, ale stále byly schopné růst v médiu s 5 mM 3-AT, stejně tak jako pozitivní kontrola. CaRpl22 vykazoval pouze slabé známky interakce s fragmentem 25S rRNA<sub>JL</sub> už v přítomnosti 1 mM 3-AT. Buňky s YIRpl22 a mutantními

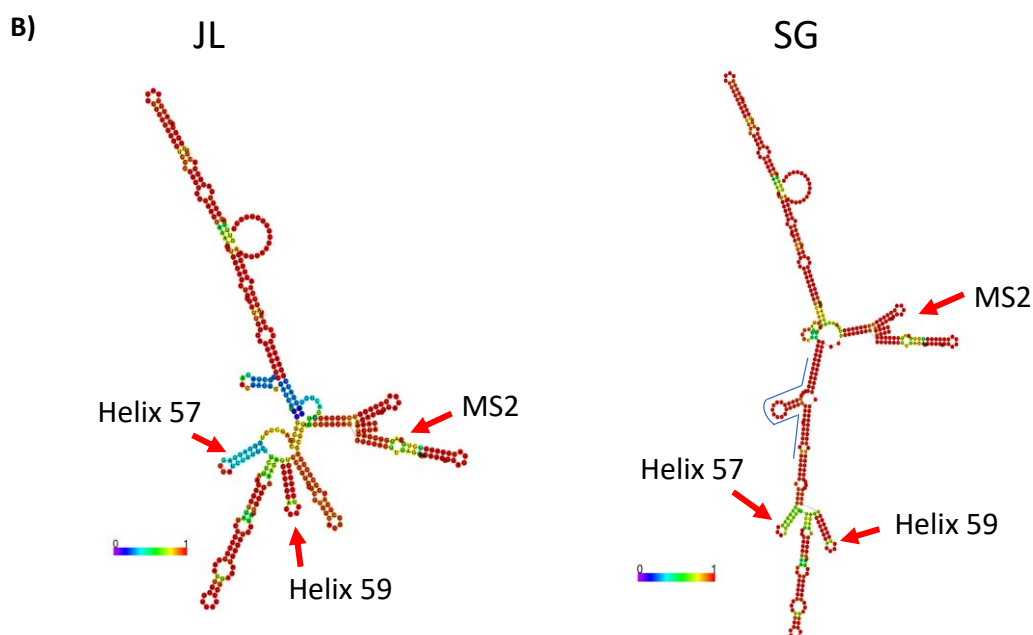
verzemi Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> nerostly ani v přítomnosti 1 mM 3-AT. Výsledek jejich interakce s fragmentem 25S rRNA<sub>JL</sub> odpovídal růstu buněk negativní kontroly.

Plazmid p3HR2<sub>H57-H59\_25 rRNA\_JL</sub> byl vytvořen inzercí 57-59<sub>25S rRNA</sub> přes dvě štěpící místa p3HR2, PaeI a BamHI (obrázek č. 11A). Ztráta 43 nukleotidů mezi BamHI a PaeI se projeví jak na délce krčku RNA smyčky, která je přímo fúzovaná s RNA zájmu, tak na stabilitě helixu 57, jak naznačují strukturní predikce RNA produkované p3HR2<sub>H57-H59\_25 rRNA\_JL</sub>. Proto byl zkonstruován p3HR2<sub>H57-H59\_25 rRNA\_SG</sub>. Predikce struktury RNA produkované tímto plazmidem naznačuje vyšší stabilitu helixu 57 (obrázek č. 11B). Chtěli jsme porovnat, zda výsledky interakce Rpl22 s delší fúzní molekulou RNA, která je potenciálně stabilnější budou odlišné od výsledků vazby Rpl22 na 25S rRNA<sub>JL</sub>.

A)

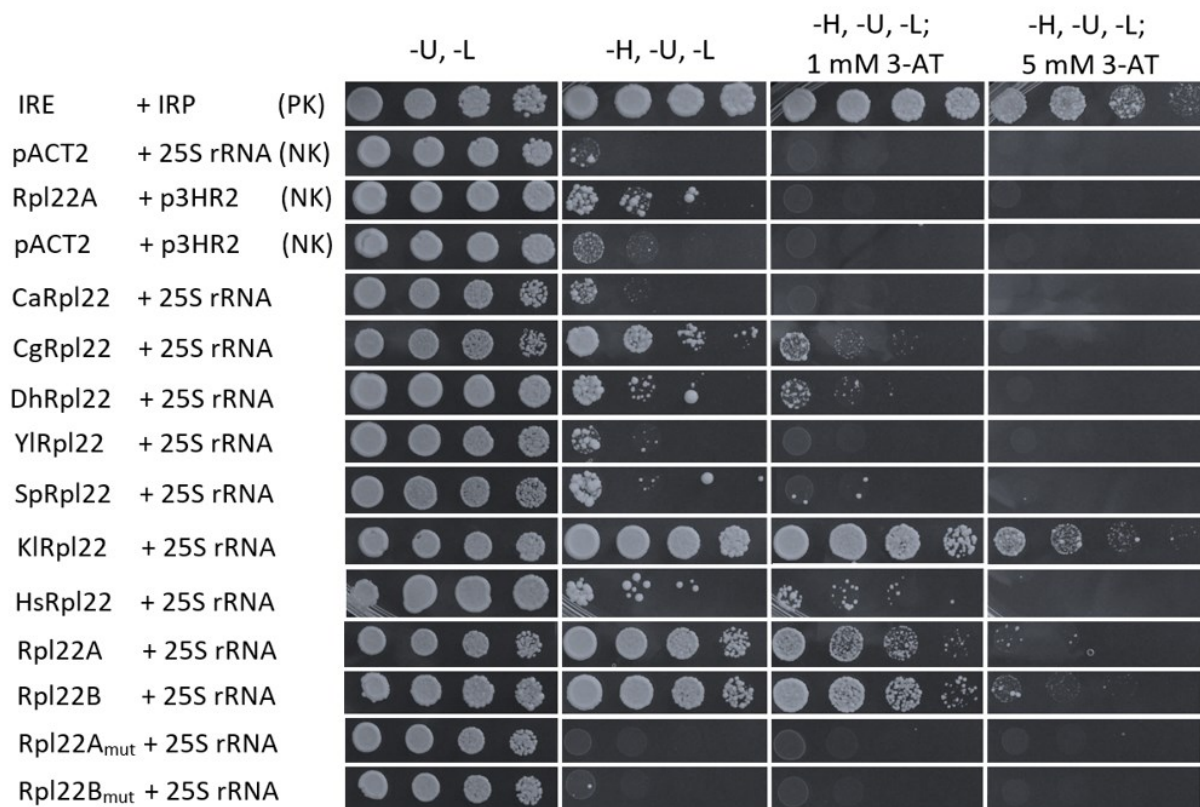






**Obrázek č. 11 – Hybridní RNA exprimovaná z p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_SG je delší než hybridní RNA produkovaná p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_JL. A)** Štěpící místa pro PaeI a BamHI byla použita pro inzerci genu kódujícího fragment 25S rRNA – helix 57 – helix 59 (57-59\_25S rRNA\_JL) do p3HR2. Schéma mapy plazmidu p3HR2 bylo vytvořeno softwarem SnapGene software ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)). **B)** Predikce struktur fúzních RNA exprimovaných plazmidy p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_JL a p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_SG jsou odlišné (RNAfold web server). Červenými šipkami jsou zvýrazněny smyčky MS2, helix 57 – helix 59 25S rRNA a modře 43 nt, které jsou součástí pouze p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_SG. Barevné spektrum odpovídá pravděpodobnosti s jakou párují jednotlivé nukleotidy. Zdroj sekvence fragmentu 25S rRNA (SGDID: S000006484), sekvence p3HR2 (<https://biochem.wisc.edu/labs/wickens/yeast-three-hybrid-system-wickens-lab>).

Buňky YBZ1 byly transformovány plazmidem p3HR2 kódujícím delší fúzní molekulu RNA, p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_SG. Dále byly transformovány pACT2 nesoucím různé fúzní varianty RPL22 – GAL4. Opět byly vytvořeny buněčné suspenze z čerstvě narostlých buněk. Ty byly obtisknuty na misky se stejnými médii jako v případě obrázku č. 10. Následně byly ponechány růstu po dobu 5 dní při 30 °C.



**Obrázek č. 12 – Vazba Rpl22 fragmentu 25S rRNA<sub>SG</sub> je slabší než vazba fragmentu 25S rRNA<sub>JL</sub>.** Výsledek vazby různých Rpl22 na fragment 25S rRNA<sub>SG</sub> v Y3H. Jako PK byl použit kmen s IRE + IRP. Jako NK byl použit kmen s prázdnými plazmidy pACT2 a p3HR2, dále kmen s prázdným pACT2 a p3HR2<sub>H57–H59\_25 rRNA<sub>SG</sub></sub> (v obrázku jen 25S rRNA), a také kmen s prázdným p3HR2 a pACT2<sub>Rpl22A</sub> (v obrázku jen Rpl22A). Buňky byly pro kontrolu obtisknuty na médium s histidinem (-U, -L), a pro selekci na médium bez histidinu (-H, -U, -L), bez histidinu s 1 mM 3-AT (-H, -U, -L; 1 mM 3-AT) a na médium bez histidinu s 5 mM 3-AT (-H, -U, -L; 5 mM 3-AT). Fúzní proteiny Rpl22 – Gal4: CaRpl22, CgRpl22, DhRpl22, YIRpl22, SpRpl22, KIRpl22, HsRpl22, Rpl22A, Rpl22B, Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B<sub>mut</sub>. Kultury byly sériově 5X ředěny. Obrázek reprezentuje výsledek jedno ze tří biologických opakování.

KIRpl22 interagoval s fragmentem 25S rRNA<sub>SG</sub> nejsilněji, stejně jako s fragmentem 25S rRNA<sub>JL</sub> (obrázek č. 10 a 12). Buňky rostly podobně jako pozitivní kontrola. O něco slaběji interagovaly Rpl22A a Rpl22B. V přítomnosti 1 mM 3-AT vyrostly menší kolonie, ale v přítomnosti 5 mM 3-AT už ne, na rozdíl od výsledků interakce s 25S rRNA<sub>JL</sub> (obrázek č. 10). CgRpl22, DhRpl22 a HsRpl22 vykazovaly pouze slabé známky interakce s 25S rRNA<sub>SG</sub> v přítomnosti 1 mM 3-AT. Buňky produkující CaRpl22, SpRpl22, YIRpl22, Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> nerostly ani v přítomnosti 1 mM 3-AT. Výsledek jejich interakce s fragmentem 25S

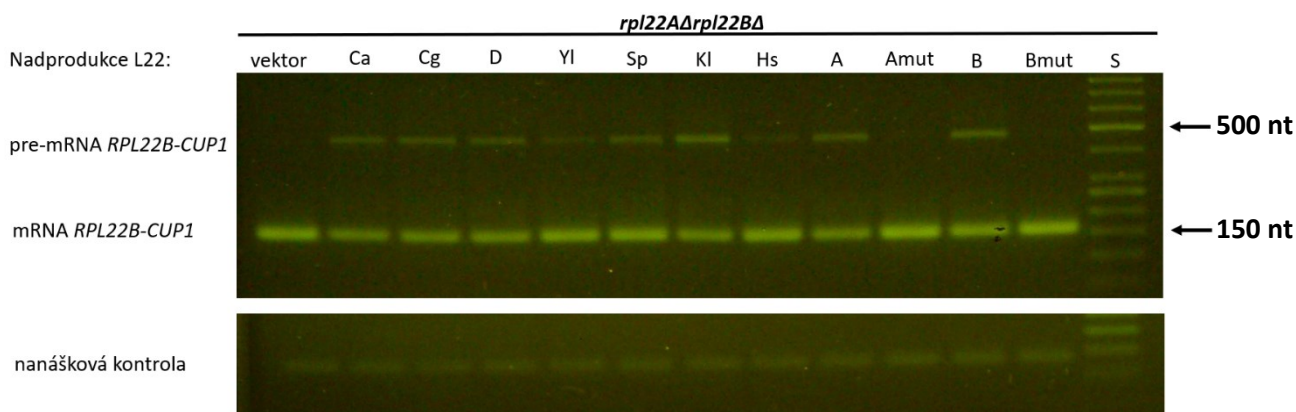


rRNA\_SG odpovídal NK. Relativní schopnost růstu buněk s Rpl22 + 25S rRNA\_SG a *Rpl22* + 25S rRNA\_JL v médiu s 3-AT byla stejná. Ovšem všechny kolonie produkující 25S rRNA\_SG dosahovaly menší velikosti a přestávaly růst již při nižších koncentracích 3-AT. Buňky sloužící jako PK rostly stejně jako na miskách s médiem na obrázku č. 10. Pozorovaný efekt tedy nebyl způsoben nekvalitní kultivační půdou. Je možné, že delší fragment fúzní RNA utváří strukturu, která omezí dostupnost nukleotidů kritických pro vazbu Rpl22 na 25S rRNA. Dalším vysvětlením by mohlo být, že větší vzdálenost mezi MS2 a Rpl22 přispívá k destabilizaci celého komplexu.

#### 10.4 Všechny homologní proteiny Rpl22 inhibují sestřih pre-mRNA *RPL22B* z *S. cerevisiae*

Endogenní Rpl22A/B inhibují sestřih *RPL22Bi*. Nadprodukce Rpl22A nebo Rpl22B v *S. cerevisiae* *rpl22aΔrpl22bΔ* vede k akumulaci reportérové pre-mRNA *RPL22B*. Schopnost Rpl22 z ostatních organismů inhibovat sestřih pre-mRNA *RPL22B* byla testována sestřihovou analýzou. Nepřímo byl zjišťován poměr mezi sestřiženou a nesestřiženou formou reportérové pre-mRNA *RPL22B* v kmenech produkujících různé Rpl22.

Buňky *rpl22aΔrpl22bΔ* byly transformovány plazmidem pVTU260 kódující jeden z homologů *RPL22* a zároveň plazmidem p423GPD nesoucím reportér *RPL22B-CUP1*. Tento reportér obsahuje 5'UTR, exon 1, intron a 60 nt exonu 2 genu *RPL22B* fúzovaného s *CUP1* (Abbrámová et al., 2018). Z exponenciálně rostoucích buněk byla izolována RNA, která byla následně podrobena reverzní transkripci. Specifické primery byly využity k amplifikaci úseků cDNA představujících pre-mRNA nebo mRNA reportéru. Pozorovali jsme, zda dochází v jednotlivých kmenech exprimujících různé *RPL22* k akumulaci delšího produktu PCR odpovídajícího pre-mRNA reportéru (Obrázek č. 13).



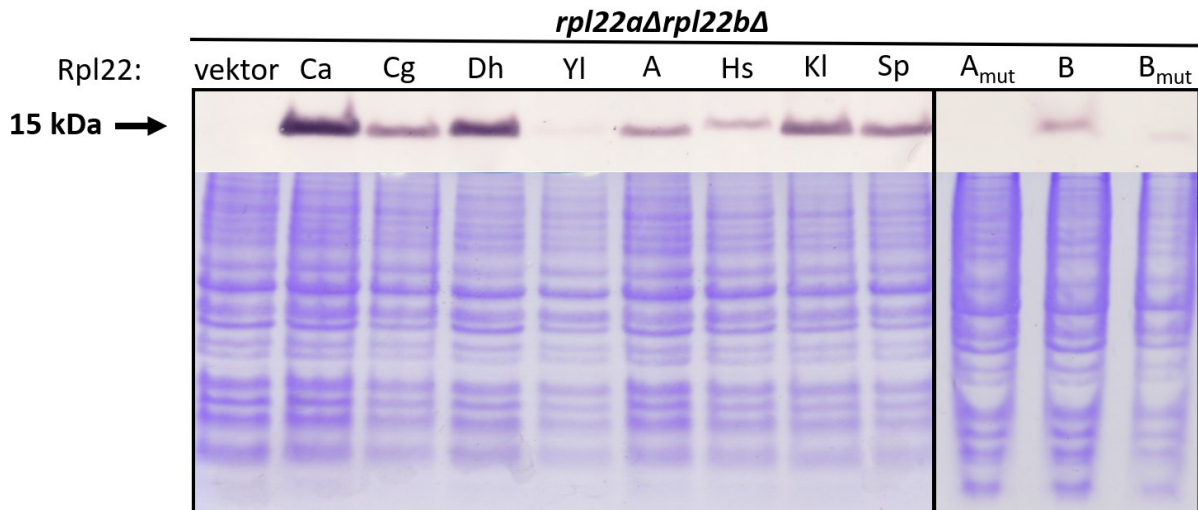
**Obrázek č. 13 – Produkce homologů Rpl22 v buňkách *S. cerevisiae* *rpl22aΔrpl22bΔ* vede k akumulaci reportérové pre-mRNA *RPL22B*. V buňkách *S. cerevisiae* *rpl22aΔrpl22bΔ***

nesoucích reportér *RPL22B-CUPI* byly produkovány proteiny z plazmidu pVTU260: CaRpl22, CgRpl22, DhRpl22, YIRpl22, SpRpl22, KIRpl22, HsRpl22, Rpl22A, Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B, Rpl22B<sub>mut</sub>. Byla provedena PCR a jednotlivé fragmenty byly po 24 cyklech PCR separovány v 2,5% agarózovém gelu 1X TAE. Očekávaná velikost fragmentu odpovídajícího pre-mRNA reportéru byla 487 nt a mRNA reportéru 166 nt. S značí standard velikosti. Jako nanášková kontrola byl použit amplifikovaný *TOM22*. Obrázek reprezentuje výsledek jedno ze tří biologických opakování.

Výsledky sestřihové analýzy jasně ukazují, že všechny homologní Rpl22 jsou do jisté míry schopny zastoupit endogenní Rpl22A/B ve funkci inhibice sestřihu intronu *RPL22B*. V buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* nesoucích prázdný vektor nepozorujeme po 24 cyklech PCR žádné známky pre-mRNA *RPL22B*, stejně tak jako v kmeni exprimujícím *RPL22A<sub>mut</sub>* a *RPL22B<sub>mut</sub>*. Tato data reprodukuje již publikované výsledky Abrahámová et al., 2018. U kmenů produkujících Rpl22 z ostatních organismů je signál pro delší produkt PCR zřejmý, ovšem intenzita signálu se mezi jednotlivými kmeny liší. V kmenech exprimujících *RPL22A*, *RPL22B* a *KIRPL22* dochází k největší akumulaci pre-mRNA reportéru, zatímco v kmenech produkujících YIRpl22 a HsRpl22 dochází k represi sestřihu reportérového *RPL22Bi* nejméně. Všechny homologní Rpl22 tedy komplementují do jisté míry endogenní Rpl22A/B ve funkci inhibice sestřihu pre-mRNA *RPL22B* v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ*.

Množství mRNA reportéru mezi jednotlivými kmeny nelze při tomto počtu cyklů PCR jasně odlišit. Pouze u kmenů *rpl22aΔrpl22bΔ* s prázdným vektorem nebo exprimujících *RPL22A<sub>mut</sub>* a *RPL22B<sub>mut</sub>* se signál kratšího produktu PCR zdá být silnější než v ostatních v kmenech, kde dochází k inhibici sestřihu pre-mRNA *RPL22B*.

Produkce proteinů Rpl22 byla ověřena nanesením vzorků proteinových extraktů ze zkoumaných kmenů na tris-tricinový gel. Obrázek č. 14 ukazuje výsledek detekce Rpl22 na membráně a odpovídající gely po přenosu.



**Obrázek č. 14 – Míra exprese *RPL22* z pVTU260 v buňkách *S. cerevisiae rpl22aΔrpl22bΔ* využitých pro sestřihovou analýzu není ve všech kmenech stejná.** Pro imunodetekci 6X His – Rpl22 byla použita primární protilátka proti značce 6X His a sekundární protilátka konjugovaná s AP. Očekávaná velikost detekovaných proteinů byla 15 kDa (viz. šipka). Jako NK byly naneseny vzorky proteinových extraktů z buněk nesoucích prázdný pVTU260 a plazmid s reportérem p423GPD\_*RPL22B-CUPI*. Pořadí 6X His – Rpl22 na membráně **A) exprese *RPL22* v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ***: 1. – NK (vektor), 2. – CaRpl22, 3. – CgRpl22, 4. – DhRpl22, 5. – YlRpl22, 6. – Rpl22A, 7. – HsRpl22, 8. – KlRpl22, 9. – SpRpl22, 10. – Rpl22A<sub>mut</sub>, 11. –Rpl22B, 12. – Rpl22B<sub>mut</sub>.

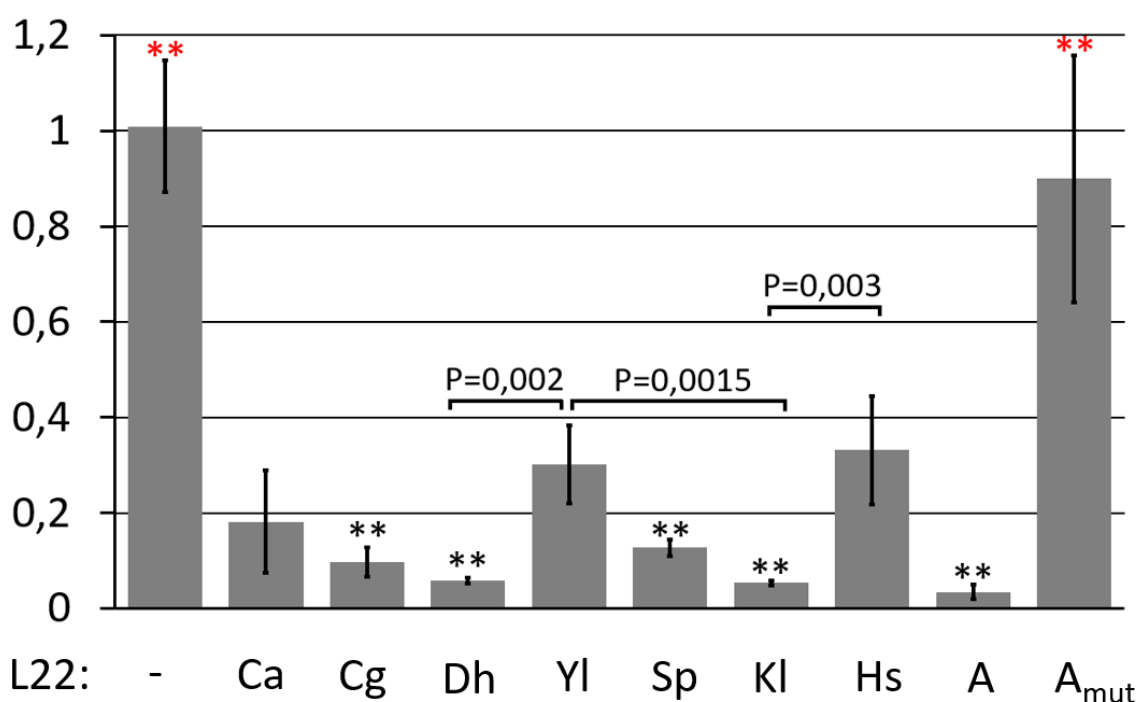
Produkce Rpl22 byla potvrzena u všech kmenů *rpl22aΔrpl22bΔ* exprimujících exogenní *RPL22*, až na kmen nesoucí pVTU260\_*RPL22Amut*. Tento výsledek mohl být do jisté míry ovlivněn kvalitou tris-tricinového gelu. Intenzita signálu YlRpl22 a Rpl22B<sub>mut</sub> na membráně je výrazně nižší než u ostatních proteinů.

### 10.5 Exprese mRNA endogenního *RPL22B* z lokusu *RPL22B* je ovlivněna všemi homologními Rpl22 v buňkách *S. cerevisiae rpl22aΔ*

Výsledky sestřihové analýzy v kapitole 10.4 vypovídají o tom, zda mají jednotlivé Rpl22 funkci represe sestřihu *RPL22Bi*. Porovnáním intenzity fragmentů představujících pre-mRNA reportéru lze odečíst, které Rpl22 jsou zodpovědné za nižší či vyšší míru akumulace této pre-mRNA. Kvůli velké účinnosti sestřihu reportéru *RPL22B-CUPI* a rychlé degradaci inhibované pre-mRNA, je v buňkách *S. cerevisiae rpl22aΔrpl22bΔ* velký nepoměr mezi hladinou mRNA a pre-mRNA reportéru, kdy mRNA je v nadbytku. Z intenzity fragmentů odpovídajících mRNA reportéru nelze v tomto uspořádání odečíst, jak moc se mění hladina mRNA *RPL22B* mezi jednotlivými kmeny produkující testované Rpl22, a tedy ani jak moc je účinná inhibice

sestřihu jednotlivými Rpl22. mRNA je při tomto počtu cyklů PCR saturovaná. Chromatinový kontext reportérového lokusu a endogenního lokusu může být odlišný, což může ovlivnit genovou expresi a regulaci *RPL22B*.

Pro kvantitativní vyjádření hladiny mRNA *RPL22B* mezi jednotlivými kmeny exprimujícími různé *RPL22* byla využita RT – qPCR. Měřili jsme, jak homologní Rpl22 změni míru exprese mRNA endogenního *RPL22B* v buňkách *S. cerevisiae rpl22aΔ*. Tyto buňky neexprimují majoritní paralog *RPL22A* (Abrahámová et al., 2018). Inhibiční efekt, který pozorujeme je způsobený zejména nadprodukovaným Rpl22 z plazmidu. *S. cerevisiae rpl22aΔ* byly transformovány plazmidem pVTU260 kódující jeden z testovaných *RPL22*. Z exponenciálně rostoucích buněk byla izolována RNA, která byla podrobena reverzní transkripci a následně qPCR. Byly použity specifické primery detekující mRNA *RPL22B*, které nejsou komplementární k mRNA testovaných *RPL22*.



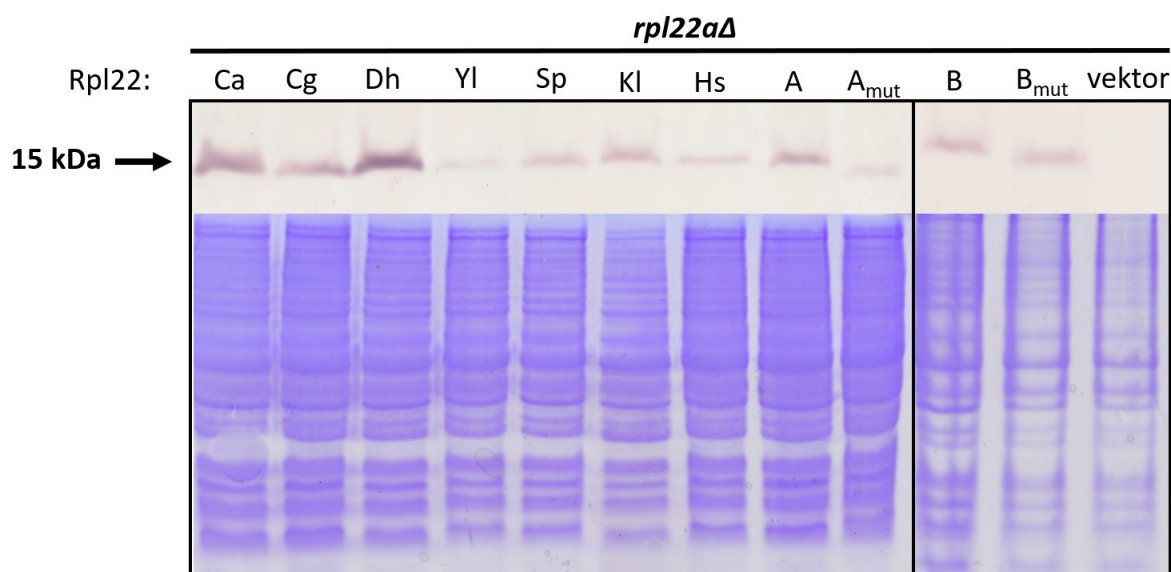
**Obrázek č. 15 – Hladina mRNA endogenního *RPL22B* je snížena alespoň o 60 % ve všech kmenech *S. cerevisiae rpl22aΔ* exprimujících homologní *RPL22*. Míra exprese mRNA *RPL22B* byla stanovena za pomoci qPCR, které předcházela reverzní transkripce cDNA. Graf znázorňuje průměrný násobek změny hladiny mRNA endogenního *RPL22B* v kmenu produkující daný Rpl22 v porovnání s kmenem s prázdným pVTU260. Data byla normalizovaná na expresi *SPT15*. Úsečky odpovídají směrodatným odchylkám třech biologických opakování. V buňkách *S. cerevisiae rpl22aΔ* byly produkovány proteiny**

z plazmidu pVTU260: 1. – NK (-), 2. – CaRpl22, 3. – CgRpl22, 4. – DhRpl22, 5. – YlRpl22, 6. – SpRpl22, 7. – KlRpl22, 8. – HsRpl22, 9. – Rpl22A, 10. – Rpl22A<sub>mut</sub>. Statisticky signifikantní rozdíl relativní exprese mRNA *RPL22B* v porovnání s kmenem s prázdným pVTU260 je značen černými hvězdičkami (Studentův t-test s Bonferroniho korekcí vícenásobného testování;  $P < 0,001 = **$ ). Statisticky signifikantní rozdíl relativní exprese mRNA *RPL22B* v porovnání s kmenem exprimujícím *RPL22A* je značen červenými hvězdičkami (Studentův t-test s Bonferroniho korekcí vícenásobného testování;  $P < 0,0005 = **$ ). Hodnoty P v grafu značí statisticky signifikantní rozdíly relativní exprese mRNA *RPL22B* mezi kmeny produkujícími YlRpl22 nebo HsRpl22 v porovnání s kmeny produkujícími Rpl22, které komplementují růstový fenotyp buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* (viz. kapitola 10.2). Obrázek reprezentuje výsledek jedno ze tří biologických opakování.

Výsledky ukazují, že schopnost Rpl22 snížit hladinu mRNA endogenního *RPL22B* koreluje se schopností proteinů Rpl22 akumulovat pre-mRNA *RPL22B* reportéru (viz. kapitola 10.4). V buňkách produkujících Rpl22A<sub>mut</sub> je hladina relativní exprese mRNA *RPL22B* podobná jako v buňkách s prázdným vektorem. V kmenech *rpl22aΔ* produkujících HsRpl22 nebo YlRpl22 je hladina relativní exprese mRNA *RPL22B* nižší asi o 70 % než u kmenu s prázdným vektorem a zároveň je dle Studentova t-testu signifikantně vyšší než u buněk *rpl22aΔ* s KlRpl22. U ostatních kmenů je relativní exprese mRNA *RPL22B* nižší o více než 80 % oproti kmenu s prázdným pVTU260. Dle Studentova t-testu je rozdíl relativní exprese mRNA *RPL22B* u většiny kmenů statisticky významně nižší v porovnání s kontrolním kmenem *rpl22aΔ* s prázdným pVTU260.

Hladina proteinu Rpl22B v buňkách *rpl22aΔ* dosahuje pouze 17,5 % celkové hladiny Rpl22 vyskytující se v buňkách WT (Abrahámová et al., 2018). Testované homology *RPL22* jsou exprimovány z konstitutivně aktivního silného promotoru *ADHI*. Homologní Rpl22 jsou tedy nadprodukovány oproti endogennímu Rpl22B. Za efekt, který pozorujeme, jsou z většiny zodpovědné Rpl22 pocházející z cizích organismů.

Produkce proteinů Rpl22 byla ověřena nanesením vzorků proteinových extraktů ze zkoumaných kmenů na tris-tricinový gel. Obrázek č. 16 ukazuje výsledek detekce Rpl22 na membráně a odpovídající gely po přenosu.



**Obrázek č. 16 – Míra exprese *RPL22* z pVTU260 v buňkách *S. cerevisiae rpl22aΔ* využitých pro měření rozdílů v expresi mRNA *RPL22B* se liší mezi kmeny.** Pro imunodetekci 6X His – Rpl22 byla použita primární protilátka proti značce 6X His a sekundární protilátka konjugovaná s AP. Očekávaná velikost detekovaných proteinů byla 15 kDa (viz. šipka). Jako NK byly naneseny vzorky proteinových extraktů z buněk nesoucích prázdný pVTU260. Pořadí 6X His – Rpl22 na membráně A) **exprese *RPL22* v *rpl22aΔ***: 1. – CaRpl22, 2. – CgRpl22, 3. – DhRpl22, 4. – YlRpl22, 5. – SpRpl22, 6. – KlRpl22, 7. – HsRpl22, 8. – Rpl22A, 9. – Rpl22A<sub>mut</sub>, 10. – Rpl22B, 11. – Rpl22B<sub>mut</sub>, 12. – vektor.

Produkce Rpl22 byla potvrzena u všech kmenů *rpl22aΔ* exprimujících testované *RPL22*. Intenzita signálu YlRpl22, SpRpl22, HsRpl22 a Rpl22A<sub>mut</sub> je o něco nižší než u ostatních proteinů.

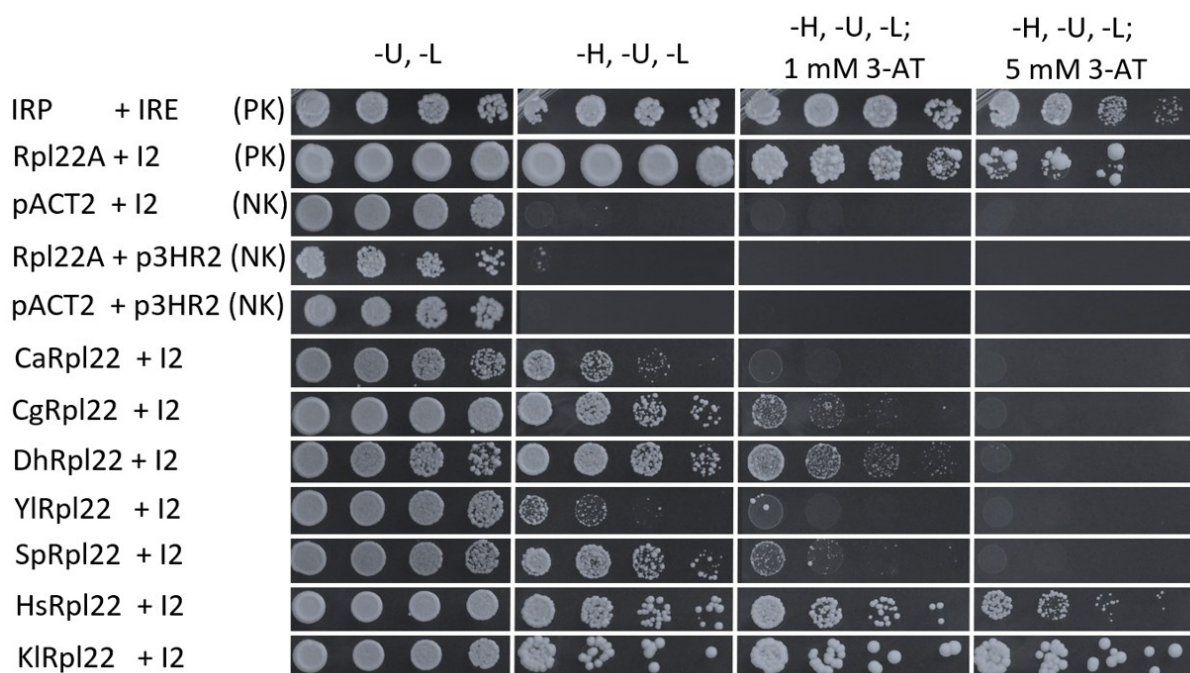
### 10.6 Fragment I2 je nedostatečný pro ověření schopnosti vazby homologních Rpl22 na intron *RPL22B* v trojhybridním systému

Všechny homologní proteiny Rpl22 testované v této práci jsou schopné inhibovat sestřih intronu *RPL22B*. Z publikovaných dat víme, že endogenní Rpl22A/B se v Y3H vážou na úsek intronu *RPL22B* – I2 (Abrahámová et al., 2018). Schopnost homologních Rpl22 reprimovat sestřih pre-mRNA *RPL22B* odráží jejich schopnost vázat intron *RPL22B*.

Vazba Rpl22 z různých organismů na I2 byla testována v Y3H. YBZ1 byl transformován plazmidem p3HR2 kódujícím fúzní RNA molekulu MS2 – I2 a také plazmidem pACT2 kódujícím různé *RPL22* – *GAL4*. Buněčné suspenze byly obtisknuty na misky s tuhým médiem



s nebo bez histidinu, případně na médium bez histidinu obsahující různé koncentrace 3-AT. Následně byly ponechány růstu po dobu 5 dní při 30 °C.



**Obrázek č. 17 – HsRpl22 a KIRpl22 se vážou na fragment I2 nejsilněji.** Výsledek vazby různých Rpl22 na fragment I2 v Y3H. Jako PK byl použit kmen s IRE a IRP, a také kmen s p3HR2\_I2 (v obrázku jen I2) a pACT2\_Rpl22A (v obrázku jen Rpl22A) (Abrhánová et al., 2018). Jako NK byl použit kmen s prázdnými plazmidy pACT2 a p3HR2, dále kmen s prázdným pACT2 a p3HR2\_I2, a také kmen s prázdným p3HR2 a pACT2\_Rpl22A. Buňky byly pro kontrolu obtisknuty na médium s histidinem (-U, -L), a pro selekci na médium bez histidinu (-H, -U, -L), bez histidinu s 1 mM 3-AT (-H, -U, -L; 1 mM 3-AT) a na médium bez histidinu s 5 mM 3-AT (-H, -U, -L; 5 mM 3-AT). Fúzní proteiny Rpl22 – Gal4: CaRpl22, CgRpl22, DhRpl22, YIRpl22, SpRpl22, KIRpl22, HsRpl22, Rpl22A. Kultury byly sériově 5X ředěny. Toto je reprezentativní obrázek jednoho ze tří biologických opakování.

Buňky s HsRpl22 a KIRpl22 byly schopny růst v přítomnosti 5 mM 3-AT. Síla jejich interakce s I2 odpovídala v Y3H síle interakce endogenního Rpl22A s I2 a také IRE s IRP. O něco slaběji interagoval s I2 DhRpl22. Buňky netolerovaly 5 mM koncentraci 3-AT, ale při 1 mM 3-AT byly viditelné menší kolonie ve všech ředěních. Podobné platilo pro buňky s I2 a CgRpl22 nebo SpRpl22. Velmi malé kolonie byly pozorovatelné při 1 mM 3-AT, ale pouze při menším ředění buněk. Zdá se, že proteiny CaRpl22 a YIRpl22 s fragmentem I2 neinteragovaly v Y3H, jejich růst odpovídal v přítomnosti 3-AT růstu buněk použitých jako negativní kontrola.

Z těchto výsledků plyne, že Y3H není dostatečně senzitivní pro zjištění vazby mezi I2 a některými homologními Rpl22. Všechny proteiny komplementují endogenní Rpl22A/B ve funkci inhibice sestřihu pre-mRNA *RPL22B*, ale ne všechny vážou fragment I2 v Y3H. Je také možné, že vazebné místo intronu je širší než I2. Rpl22 z různých organismů mají oproti endogenním Rpl22A/B některé aminokyselinové záměny, které zamezí těmto Rpl22 kontaktovat I2. Pro porovnání toho, zda jsou Rpl22 schopné interagovat s jiným úsekem intronu *RPL22B* by bylo nutné exprimovat delší fragment tohoto intronu. Intron *RPL22B* ovšem obsahuje sekvenci několika U za sebou ihned za úsekem I2. Ta slouží jako terminační signál pro Polymerázu III, která transkribuje fúzní molekulu RNA. Výsledky Y3H s delším fragmentem by mohly být ovlivněny špatnou produkcí fúzní RNA.



## 11 Diskuze

### 11.1 Rpl22 z *Y. lipolytica* a *H. sapiens* nekomplementují růst buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*

Proteosyntéza je proces, který je pro buňku z energetického hlediska náročný. Buňky musí zajistit dostupnost tRNA, AK a ribozomů, a také adekvátní poměry těchto složek (Warner, 1999). Účinnost syntézy proteinů je jedním z faktorů, které limitují rychlost růstu buněk (Metzl-Raz et al., 2017). Schopnost homologních Rpl22 komplementovat růst buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* odráží jejich schopnost zastoupit ribozomální funkce Rpl22A/B.

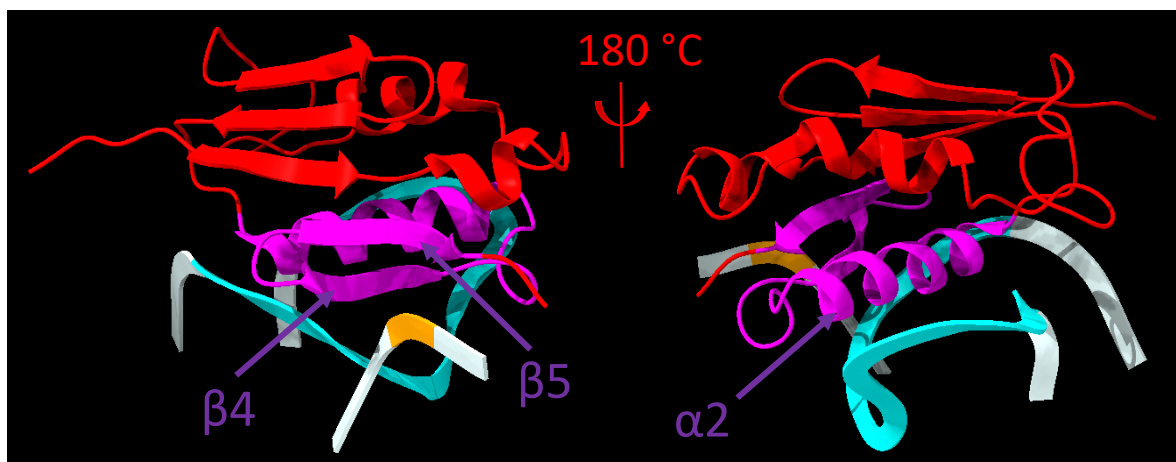
Ukázali jsme, že CaRpl22, CgRpl22, DhRpl22, KlRpl22 a SpRpl22 komplementují růst buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*. YlRpl22, Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B<sub>mut</sub> a HsRpl22 nenavrátily buňkám *rpl22aΔrpl22bΔ* normální fenotyp. Sekvenční podobnost většiny komplementujících proteinů v porovnání s Rpl22A je vyšší než 75% (tabulka č. 18). To je v souladu s tím, že proteiny, které zrychlí růst buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* pochází z kvasinek, které jsou evolučně nejpodobnější *S. cerevisiae* (z kvasinek, jejichž Rpl22 byly testovány v této práci). Jedinou výjimkou je Rpl22 pocházející ze *S. pombe*. Nekomplementující YlRpl22 je sekvenčně podobnější Rpl22A než komplementující SpRpl22. Schopnost zastupovat funkce Rpl22A/B nelze odhadnout pouze ze sekvenční podobnosti mezi Rpl22. V sekvenci YlRpl22 se pravděpodobně nachází substituce AK, které interferují s vykonáním funkce Rpl22A/B.

	Sekvenční podobnost ve srovnání s Rpl22A	Komplementace růstového fenotypu <i>rpl22AΔrpl22BΔ</i>
KlRpl22	95,1 %	+
CgRpl22	94,2 %	+
DhRpl22	80,2 %	+
CaRpl22	76,6 %	+
YlRpl22	67,0 %	-
SpRpl22	63,9 %	+
HsRpl22	62,5 %	-

**Tabulka č. 18 – YlRpl22 má vyšší % sekvenční podobnosti s Rpl22A než SpRpl22.**

Strukturní predikce homologních Rpl22 v AlphaFold ukazují, že sekundární struktura RNA vazebného helixu je zachována u všech zde testovaných Rpl22 (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2021). Efekt, který pozorujeme při produkci Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B<sub>mut</sub> je pravděpodobně kombinací neschopnosti proteinů vázat 25S rRNA, kvůli změně náboje oblasti odpovídající RNA vazebnému helixu, a také jejich toxickým působením v buňce. Sekvenční konzervovanost tohoto helixu je mezi všemi srovnávanými homology Rpl22 68 % s tím, že většinou se jedná o

konzervované substituce AK. Nejvíce záměn v tomto úseku se vyskytuje právě u SpRpl22, poté u HsRpl22, a dále u YIRpl22 a DhRpl22. Co se týče sekvenční konzervovanosti RNA vazebného helixu a jeho bezprostředního okolí (jehož částí kontaktuje 25S rRNA – obrázek č. 18), mezi Rpl22A a CaRpl22, CgRpl22, DhRpl22, YIRpl22 a KlRpl22 je vyšší než 88 %. Stupeň sekvenční konzervovanosti této oblasti klesá mezi Rpl22A a HsRpl22 a SpRpl22 – pouze 74 % a 78 %.



**Obrázek č. 18 – Helix  $\alpha 2$  a skládané listy  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  se nachází na povrchu Rpl22A, který je v ribozomu přivrácený k 25S rRNA.** Struktura Rpl22 a 25 rRNA byla extrahována ze struktury ribozomu (PDB:4V88) (Ben-Shem et al., 2011) v programu ChimeraX (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>) (Pettersen et al., 2021). Fialově je vyznačen helix  $\alpha 2$  a skládané listy  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  Rpl22A. Modře je zvýrazněn helix 57 a oranžově helix 59 25S rRNA.

Zdá se, že pro funkce endogenních Rpl22A/B, na kterých závisí rychlost růstu buněk, je potřebný širší úsek Rpl22 než pouze ten, kterým kontaktuje 25S rRNA. U komplementujících Rpl22 by takový esenciální úsek mohl být zachován. Naopak u YIRpl22 a HsRpl22 se substituce AK projeví změnou tohoto povrchu, která způsobila, že Rpl22 již nebyly schopny zastoupit Rpl22A/B. To vysvětluje, proč i přes relativně vysokou sekvenční konzervovanost úseku vázajícího rRNA mezi Rpl22A a YIRpl22 (88,8 %) není schopný tento cizorodý Rpl22 komplementovat růst, ale SpRpl22 se 77% konzervací je pro zvrácení fenotypu buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* dostatečný.

Dalším vysvětlením by mohlo být, že konkrétní kombinace substitucí u YIRpl22 a HsRpl22 nevyhovuje komplementování funkce Rpl22A/B. Pokud hovoříme o funkci v rámci formování struktury ribozomu, pozměněný povrch YIRpl22 a HsRpl22 by nemusel umožnit těmto proteinům se začlenit do struktury této partikule. Pokud by se i přes částečnou změnu struktury cizorodým Rpl22 podařilo začlenit do ribozomu, mohlo by dojít k nesprávnému sbalení 25S

rRNA a k tvorbě labilní podjednotky 60S. Účinnost translace by mohla být snížena, což by se projeвило zpomaleným růstem buněk.

Je také možné, že nestrukturované konce Rpl22A/B mají funkci při sestavování ribozomálních podjednotek. Při zprostředkování funkce v biogenezi ribozomu může docházet k interakci těchto konců Rpl22 s rRNA. Variabilita v sekvenci a délce nestrukturovaných konců mezi různými Rpl22 může vést k neschopnosti těchto Rpl22 komplementovat roli v biogenezi ribozomu. To se může odrážet na rychlosti růstu buněk.

Buňky WT mají dostatek endogenního Rpl22A/B. Zpomalený růst buněk WT, které produkují YlRpl22, Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B<sub>mut</sub> a HsRpl22 pravděpodobně souvisí s vypořádáváním se buněk se stresem, který cizorodé Rpl22 způsobují. Je možné, že buňky WT jsou zatíženy z metabolického hlediska kvůli degradování nadprodukovaných Rpl22 z plazmidu, které např. tvoří již zmíněné nepřírodně se vyskytující komplexy. Proto také po přenosu na membránu pravděpodobně detekujeme nižší množství těchto Rpl22.

Je nutné brát v potaz, že např. *Y. lipolytica* se značně odlišuje svým metabolismem a fyziologií od ostatních kvasinek (Barth & Gaillardin, 1997; Ariño et al., 2010). Některé efekty, které pozorujeme mohou být ovlivněny chováním nestrukturovaných konců YlRpl22 a HsRpl22. Mohou se chovat nefyziologicky, protože se nachází v nepřírodném prostředí. Intracelulární podmínky *S. cerevisiae* by mohly způsobit tvorbu nežádoucích komplexů.

Lidské proteiny mohou navíc působit toxicky v kvasinkách (Tugendreich et al., 2001). Až 57 % kvasinkových genů nemůže být komplementováno lidskými ortology (Kachroo et al., 2015). Heterologní exprese genu může ovlivnit nežádoucí tvorbu proteinových agregátů. Např. exprese lidského BRCA1 v *S. cerevisiae* vede k tvorbě agregátů, a ke snížení rychlosti růstu buněk 4X v porovnání s buňkami WT s prázdným vektorem (Millot et al., 2011). Rpl22 by se tak mohly shlukovat a vytvářet stres, který by vedl ke zpomalení růstu.

Méně pravděpodobné vysvětlení růstového defektu buněk WT a *rpl22aΔrpl22bΔ* je, že pozměněná struktura YlRpl22 a HsRpl22 interferuje s funkcí, kterou Rpl22A/B zprostředkuje mimo ribozom, ale pro kvasinky je důležitá z hlediska úspěšného růstu.

Jedna z hypotéz, kterou by bylo možné v budoucnu testovat byla formulována na základě faktu, že YlRpl22 a HsRpl22 zpomalují růst v buňkách WT. Pokud by všechny námi testované Rpl22 inhibovaly sestřih obou intronů *RPL22A/B*, mohly by tyto nadprodukované Rpl22 (jejichž gen exprimovaný z plazmidu neobsahuje intron) ve WT potlačit sestřih endogenních pre-mRNA

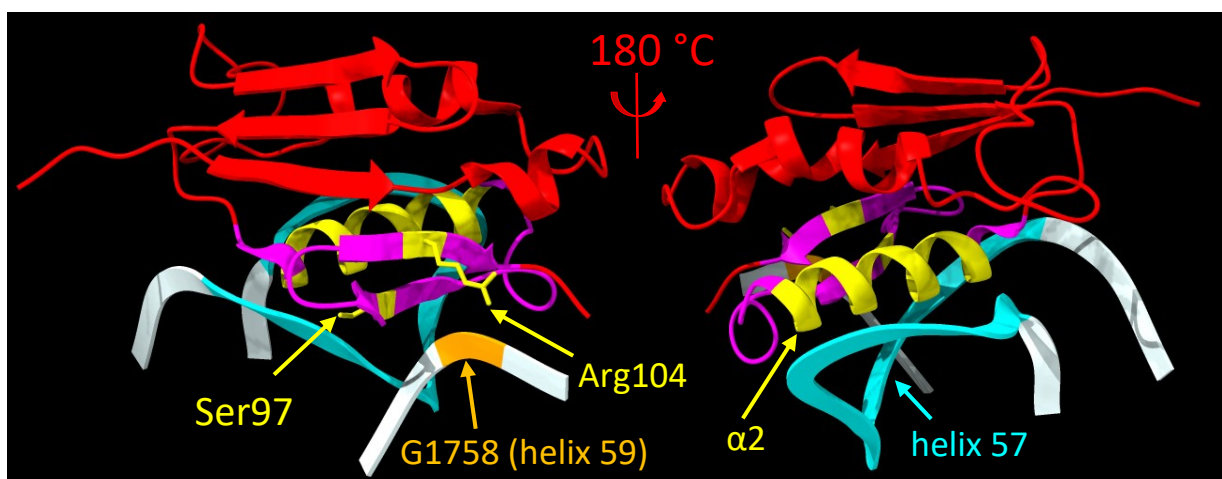
*RPL22A/B*. Testované Rpl22 by pak fungovaly místo Rpl22A/B. Protože YlRpl22 a HsRpl22 nejsou schopné zastoupit funkce spojené s rychlostí růstu v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ*, nebyly by toho schopné ani v buňkách WT, kde by byla potlačena exprese endogenních *RPL22A/B* nadprodukovanými Rpl22 z plazmidu. Pro potvrzení hypotézy by bylo nutné zjistit, zda exogenní Rpl22 inhibují sestřih intronu *RPL22A*. Také bychom mohli kvantitativně určit, jak moc jsou ve WT exprimovány *RPL22A/B* ve srovnání s transgenními *RPL22*.

### 11.2 Rpl22 z *Y. lipolytica* a z *H sapiens* se liší schopností vazby 25S rRNA *S. cerevisiae*

Schopnost vázat 25S rRNA odráží schopnost heterologních Rpl22 zastoupit ribozomální funkci. Může nám pomoci pochopit, proč některé Rpl22 nekomplementují růstový defekt buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*.

Zjistili jsme, že v Y3H interagují nejsilněji s fragmentem 25S rRNA CgRpl22, KlRpl22, menší kolonie utváří buňky produkující DhRpl22, SpRpl22 nebo HsRpl22. CaRpl22 vykazuje nejslabší vazbu na fragment a YlRpl22 neinteraguje vůbec.

Krystalografické studie ribozomu *S. cerevisiae* ukazují, že Rpl22A interaguje s 25S rRNA na dvou místech. Ke kontaktování nukleotidů helixu 57 využívá Rpl22A svůj RNA vazebný helix a Ser97. Helix 59 je v interakci s Arg104, který je součástí  $\beta$  skládaného listu na C- konci (obrázek č. 19). Vazba na helix 57 je zprostředkována větším povrchem Rpl22A než vazba helixu 59.



Obrázek č. 19 – Rpl22A interaguje v ribozomu prostřednictvím RNA vazebného helixu  $\alpha 2$ , Ser97 s helixem 57 a prostřednictvím Arg104 s G1758 25S rRNA. Struktura Rpl22 a 25 rRNA byla extrahována ze struktury ribozomu (PDB:4V88) (Ben-Shem et al., 2011) v programu ChimeraX (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>) (Pettersen et al., 2021). Fialově je

vyznačen povrch Rpl22A, který je přikloněný směrem k ribozomu. Žlutě jsou vyznačeny AK Rpl22A, které interagují s helixem 57 (modře) a s guaninem 1758 (G1758) helixu 59 (oranžově) 25S rRNA.

Substituce AK, které se nachází v sekvenci CgRpl22 a KIRpl22 neovlivní sílu interakce s fragmentem 25S rRNA v porovnání s Rpl22A/B v Y3H. Tento výsledek odpovídá tomu, že CgRpl22 a KIRpl22 pochází z evolučně nejpríbuznějších kvasinek *S. cerevisiae* a z hlediska sekvence jsou ze všech testovaných proteinů nejbližší Rpl22A/B. Od Rpl22A se liší dokonce o méně AK (rozdíl 15 AK) než Rpl22A od svého paralogu Rpl22B (rozdíl 22 AK). Pozice, kterými interaguje Rpl22A s 25S rRNA v ribozomu jsou u těchto homologů konzervovány, až na Arg104, který je u KIRpl22 substituován za Lys104. Jedná se ovšem o konzervativní substituci, která by neměla ovlivnit vazbu na 25S rRNA *S. cerevisiae*.

Rpl22A interaguje zbytkem Arg104 s G1758 (helix 59) prostřednictvím specifického vodíkového můstku. Pro tvorbu vodíkového můstku je důležitá orientace a vzdálenost interagujících atomů. DhRpl22, SpRpl22 a HsRpl22 od ostatních Rpl22 interagujících s 25S rRNA fragmentem odlišuje záměna AK v pozici Arg104 (číslování dle Rpl22A). V sekvenci SpRpl22 a HsRpl22 se na tomto místě nachází negativně nabitý Glu, zatímco u DhRpl22 se vyskytuje polární Gln (obrázek č. 20). Glu/Gln jsou z hlediska velikosti menší AK než Arg. Záměna Arg104 za Glu/Gln by mohla způsobit nevhodnou vzájemnou geometrii interagujících molekul, která by zamezila tvorbě vodíkového můstku, a oslabila tak vazbu Rpl22 a 25S rRNA. Navíc z hlediska elektrostatiky by přítomnost Glu mohla vést k repulzi záporně nabitě rRNA. Odpuzení molekul by vedlo k oslabení vazby s helixem 59. To by vysvětlilo, proč pozorujeme slabší interakci DhRpl22, SpRpl22 a HsRpl22 s fragmentem 25S rRNA.

```

Rpl22A  MAPN-----TSRKQKIAKTFTVDVSSPTENGVDVPASYAKYLIDHIKVEGAVGNLGNVAVTVTEDGTV
Rpl22B  MAPN-----TSRKQKVIKTLTVDVSSPTENGVDVPASYSKYLIDHIKVDGAVGNLGNVAVTVTEDGSI
KlRpl22 MAPN-----TARKQKITKTFTVDVSSPTENGVDVPASYAKYLIDHIKVEGHVGNLGGQAITVEEDGSV
CgRpl22 MAPN-----TARKQKVVKTFFTVDVSAPTENGVDVPASYAKYLIDHIKVENVGNLGNVAVTVTEDGSV
CaRpl22 MAPV-----TSKKSksVKKFVVDVAAPVENDVFDQESYVKYLVEHVKVDGIVGNLGNDISITAESDN
SpRpl22 -----MVKKNTKVSNKYIIDATAAVNDKIFDVAAFEKYLIDRIKVDGKTGNLGGSSVITTEEGNK
DhRpl22 MAPI-----TTKKNNTAAKKLVVDTSAPTENGVDQESYVKFLIENIKVEGIPGNLGNISVITERSKS
HsRpl22 MAPVKKLVVKGGKQVLKFTLDCTHPVEDGIMDAANFEQFLQERIKVNGKAGNLGGGVVVSREGSS
YlRpl22 MAPV-----KTQ---KANKYTVDCAPSADGIFDVSSFEKFLTERIKVEGRTNQLGEDIKVSSNGDI
      :      .      :*      :  :*      :  :*      :  :*      :  :*      :
Rpl22A  V---TVVSTAKESGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSTKTNEYRLAFYQVTPPEDEEEDEE- 121
Rpl22B  V---TVVSSAKESGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSIRQNQYKLVFYQVTPEDADEEEDDE 122
KlRpl22 V---TIVSTTKESGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSTKTNEYRLAFYQITPEDEEEEDDEE 122
CgRpl22 V---TIVSTTKESGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRFVSTKTNSYRLAFYQVTPPEEEEDDEE-- 120
CaRpl22 KVVVVVSGNGSESGKYLKYLTKKYLKKNQIRDWIRFVSVKQNQYKLFYQVAVAEDEEEDEE-- 124
SpRpl22 K--IAVIAHIDESGRYLKYLTKKFLKKNHSLRDWLRVVSSTKKGVELRYYNVVVGNDDEEEQ--- 117
DhRpl22 V---VVVSNTKESGKYLKYLTKRYLKKNNQIRDWIRFVSVKQNQYKLFYQVAVAEDEEEDEE-- 120
HsRpl22 K--ITVTSEVPESKRYLKYLTKKYLKKNNLRDWLRVVSANSKESVLRFYQINQDEEEEDDED- 128
YlRpl22 V---TVVSTTQESGKYLKYLTKKYLKKNQLRDWIRVISTSKGNYTLKFYNVVANEEDDEE---- 115
      :      .      ** :*****:*****:*****:*.::      * *  :  :  :  :  :

```

**Obrázek č. 20 – Záměna Arg104 za Glu/Gln může ovlivnit sílu vazby SpRpl22, DhRpl22 a HsRpl22 na fragment 25S rRNA.** Fialové a žluté značení odpovídá stejnobarevně zvýrazněným úsekům v obrázku 19. Žlutě je vyznačeny AK odpovídající pozicím helixu  $\alpha_2$ , Ser97 a Arg104 u Rpl22A. Červeně jsou vyznačeny AK, které by mohly být zodpovědné za slabší interakce DhRpl22, SpRpl22 a HsRpl22 s fragmentem 25S rRNA v Y3H. Alignment byl vytvořen Clustal Omega MSA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Záměna šesti Lys za Glu v Rpl22A<sub>mut</sub>/B<sub>mut</sub> značně ovlivní Rpl22 z hlediska náboje. Helix, jehož jsou Lys v Rpl22A/B součástí, je konzervovaný mezi všemi testovanými Rpl22. Z krystalografických dat víme, že je důležitý pro vazbu Rpl22 v ribozomu. Můžeme předpokládat, že se helix uplatňuje i v ostatních interakcích s jinými RNA. Pokud tyto Lys zaměníme za negativně nabitý Glu, jako je tomu v případě Rpl22A<sub>mut</sub>/B<sub>mut</sub>, zrušíme schopnost interakce s 25S rRNA. Navíc z výsledků vyplývá, že takový protein není schopen ani komplementovat růst buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*. Helix  $\alpha_2$  tedy zjevně poskytuje náboj nezbytný pro interakci s ribózo-fosfátovou kostrou RNA. Převrácení tohoto náboje mutací lysinů pochopitelně zruší schopnost interagovat s rRNA, což se projeví i ztrátou komplementace růstového fenotypu buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*.

Na tuto problematiku se můžeme zaměřit také z hlediska toho, že testované Rpl22 se pravděpodobně vážou na rRNA v organismech odkud pochází. Detaily vazby Rpl22 a rRNA se v těchto organismech mohou lišit.



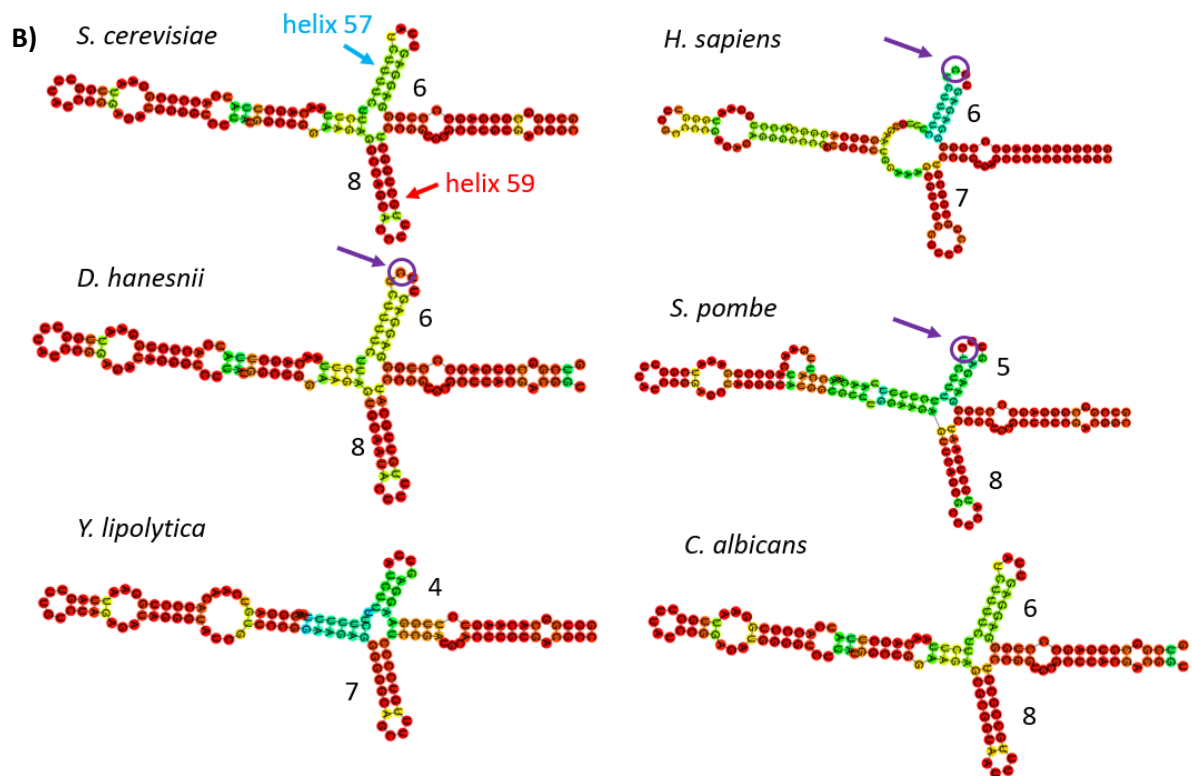
Fragment 25S rRNA *K. lactis* je identický s odpovídajícím úsekem 25S rRNA *S. cerevisiae*. Stejně tak v sekvenci kódující helix 57 a 59 25S rRNA *C. glabrata* se vyskytuje pouze pár nukleotidových substitucí. To je předpokladem pro schopnost vazby KIRpl22 a CgRpl22 na 25S rRNA *S. cerevisiae*, přesně jak pozorujeme v Y3H.

Z porovnání sekvencí rRNA *S. pombe*, *D. hansenii* a *H. sapiens* odpovídajících testovanému fragmentu 25S rRNA *S. cerevisiae* plyne, že se od rRNA ostatních kvasinek odlišují výskytem cytosinu v helixu 57 (obrázek č. 21A). Pozice, kde se cytosin nachází, odpovídá A1683 v 25S rRNA *S. cerevisiae*. Dle predikce sekundární struktury fragmentů rRNA se tento cytosin nachází na vrcholu vlásenky, kterou Rpl22 kontaktuje (obrázek č. 21B). Otázkou je, zda se záměna pyrimidinu za purin projeví na síle vazby homologních Rpl22 na 25S rRNA *S. cerevisiae*. Strukturní data ukazují, že je A1683 kontaktován Lys86 Rpl22A. Tento lysin je konzervován u všech testovaných Rpl22. Je tedy pravděpodobné, že lysin v homologních Rpl22 bude schopen interakce s A1683 25S rRNA *S. cerevisiae*. O slabší vazbě SpRpl22, DhRpl22 a HsRpl22 na fragment 25S rRNA *S. cerevisiae* v Y3H rozhodují jiné specifické interakce s nukleotidy, kterých se tyto Rpl22 pravděpodobně neúčastní.

A)

Fragmenty 25S rRNA

<i>S. cerevisiae</i>	GTCGGCGCGAGCCCTGGAGGAGTTATCTTTCTTCTTAACAGCT-----TATCACCCCGGAATTGGTTT
<i>K. lactis</i>	GTCGGCGCGAGCCCTGGAGGAGTTATCTTTCTTCTTAACAGCT-----TATCACCCCGGAATTGGTTT
<i>C. glabrata</i>	GTCGGCGCGAGCCCTGGAGGAGTTATCTTTCTTCTTAACAGCT-----TATCACCTGGAATTGGTTT
<i>C. albicans</i>	GTCGGCGTGAGCCCTGGAGGAGTTATCTTTCTTCTTAACAGCT-----TATCACCTGGAATTGGTTT
<i>D. hansenii</i>	GTCGGCGTGAGCCCTGGAGGAGTTCTTTCTTCTTAACAGCT-----TATCACCTGGAATTGGTTT
<i>H. sapiens</i>	GCCGGCGGGAGCCCGGGAGAGTTCTTTCTTTGTGAAGGGCA---GGGCGCCCTGGAATGGGTTT
<i>S. pombe</i>	GTCGGCGGGAGCCCTGGGAAGAGTTCTTTCTTTTAAACAAACCATTGAACCTGAAATCGGTTT
<i>Y. lipolytica</i>	GGTGGCACAAGTCTTGGAGGAGTTATCTTTCTTTTAAACGGAGT---CAACACCTGGAATTAGTTT
	*    ***    * * *    * *    * * * * *    * * * * * * * * * *    * *    * * * * *    * * *
<i>S. cerevisiae</i>	ATCCGGAGATGGGGTCTTATGGCTGGAAGAAGCCACACCTTT-GCTGGCTCCGGTGCCTTGTGACGGC
<i>K. lactis</i>	ATCCGGAGATGGGGTCTTATGGCTGGAAGAAGCCAGCACCTTT-GCTGGCTCCGGTGCCTTGTGACGGC
<i>C. glabrata</i>	ATCCGGAGATGGGGTCTTATGGCTGGAAGAAGCGGAGCTCATAT-GCTCGCTCCGGTGCCTTGTGACG--
<i>C. albicans</i>	ATCCGGAGATGGGGTCTTATGGCTGGAAGAAGCGCGGTAATTTT-GCCGCTCCGGTGCCTTGTGACG--
<i>D. hansenii</i>	ATCCGGAGATAGGGTCTTATGGCTGGAAGAAGTCAATACTTTT-GTTGCATCCGGTGCCTTGTGACG--
<i>H. sapiens</i>	GCCCCGAGAGAGGGGCCCTGCCTTGGAAAAGCGTCGCGGTTCCGGCGGCGTCCGGTGCCTTGTGACGGC
<i>S. pombe</i>	ATCCGGAGATAGGGTATGGTGTGGGAAGGTTTCAGCGCTCATGCTGAATCCGGTGCCTTGTGACGGC
<i>Y. lipolytica</i>	GTCTAGAGATAGGGTATCGTTCGGGAAGAGGGGGCAGCTTT--GTCCCCCCCGATGCCTTGTGACG--
	*    * * *    * * *    *    *    *    *    *    * * * * *    * *    *    *    *



**Obrázek č. 21 – A) Fragментy 25S rRNA *S. pombe*, *D. hansenii* a *H. sapiens* sdílí cytosin v helixu 57.** Modře je ohraničen helix 57 a oranžově helix 59 dle predikce sekundární struktury fragmentů 25S rRNA. Zeleně jsou zvýrazněny nukleotidy, které jsou v kontaktu s Rpl22A. Červeně jsou znázorněny nukleotidové záměny vyskytující se pouze v 25S rRNA *S. pombe*, *D. hansenii* a *H. sapiens*. Alignment byl vytvořen Clustal Omega MSA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). **B) Cytosin sdílený 25S rRNA *S. pombe*, *D. hansenii* a *H. sapiens* se nachází na vrcholu helixu 57.** Predikce struktur fragmentů 25S rRNA byla generována za pomoci webového serveru RNAfold (Lorenz et al., 2011). Fialovými šipkami jsou označeny C, které se vyskytují v helixu 57 u 25S rRNA *S. pombe*, *D. hansenii* a *H. sapiens*. Čísla znázorňují počet nukleotidů vyskytující se v krčku vlásenky helixu 57 nebo helixu 59. Barevné spektrum odpovídá pravděpodobnosti, s jakou párují jednotlivé nukleotidy. Predikce sekundární struktury *K. lactis* 25S rRNA není zahrnuta, protože je identická s predikcí 25S rRNA *S. cerevisiae*.

Strukturní predikce 25S rRNA *Y. lipolytica* ukazuje, že u této rRNA je helix 57 i 59 menší než u rRNA ostatních organismů (obrázek 21B). Způsob, jakým se YIRp122 váže na 25S rRNA *Y. lipolytica* se může do určité míry lišit od vazby Rpl22A/B na 25S rRNA *S. cerevisiae*. YIRp122 a 25S rRNA *S. cerevisiae* potom nemusí být dostatečně kompatibilní pro vazbu. Je ovšem nutné brát v potaz, že se jedná pouze o predikci. Sekvenčně se helix 57 mezi 25S rRNA *Y. lipolytica* a 25S rRNA *S. cerevisiae* liší pouze v jednom nukleotidu. Úsek Rpl22 vázající helix 57 je mezi



těmito organismy identický (obrázek 20). Sekvence helixu 59 je dle alignmentu rozdílná. YIRp122 má v pozici Arg104 (číslování dle Rpl22A) Thr, jehož okolí je také sekvenčně odlišné od Rpl22A. Neslučitelnost povrchu YIRp122, který by se měl v ribozomu vyskytovat v blízkosti helixu 59 *S. cerevisiae* může způsobovat natočení proteinu tak, že ani kompatibilní povrch YIRp122 s helixem 57 *S. cerevisiae* nemůže tvořit vodíkové můstky.

Predikce sekundární struktury 25S rRNA *C. albicans* je velmi podobná predikci struktury 25S rRNA *S. cerevisiae* (obrázek č. 21B). Co se týče sekvenční konzervovanosti 25S rRNA *C. albicans*, helix 57 je dle alignmentu a strukturní predikce identický s helixem 57 z *S. cerevisiae*. V helixu 59 25S rRNA *C. albicans* se na místě G1758 (číslování dle *S. cerevisiae*) také vyskytuje guanin. Vše naznačuje tomu, že by CaRpl22 měl s 25S rRNA *S. cerevisiae* interagovat.

Přesto, že CaRpl22 komplementuje růstový fenotyp buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* a v buňkách WT nevykazuje toxický efekt, nedetekujeme silnou vazbu CaRpl22 na fragment 25S rRNA v Y3H. Nejsme schopni přinést argument, proč tomu tak je. Je možné, že aktivační doména Gal4 v kombinaci s CaRpl22 může působit v kvasinkách toxicky. Nadprodukce Gal4 může vést v některých případech k inhibici exprese indukibilního HIS3 (Brent & Finley, 1997; Gill & Ptashne, 1988). Navíc CaRpl22 může interagovat s fúzní RNA odlišným způsobem, který zabrání fungování Y3H. Detaily interakce proteinu a RNA tedy mohou rozhodovat o funkčnosti Y3H. I proto je relevantní ověřit výsledky nezávislou metodou.

YIRp122 a HsRpl22 nekomplementují defektní růst buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*. HsRpl22 v uspořádání Y3H interaguje s fragmentem 25S rRNA, ale YIRp122 ne. YIRp122 se pravděpodobně nemůže začlenit do ribozomu, což ovlivní účinnost translace. To se projeví přetrvávajícím růstovým defektem buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* produkujících YIRp122.

Schopnost vazby Rpl22 na 25S rRNA *S. cerevisiae* v Y3H neodpovídá tomu, zda Rpl22 zastupuje funkce endogenního Rpl22A/B, které souvisí s rychlostí růstu. V našem případě je nízká korelace u výsledků CaRpl22 a HsRpl22 pravděpodobně z části způsobena špatným fungováním CaRpl22 v Y3H. HsRpl22 sice vykazuje vazbu na fragment 25S rRNA, nicméně situace v kontextu celého ribozomu se může lišit.

### 11.3 Inhibice sestřihu pre-mRNA *RPL22B*

Schopnost autoregulace exprese *RPL22* se vyskytuje jak u *S. cerevisiae*, tak u *K. lactis*. Ke vzniku této funkce došlo pravděpodobně již u společného předka těchto kvasinek (Abbrámová

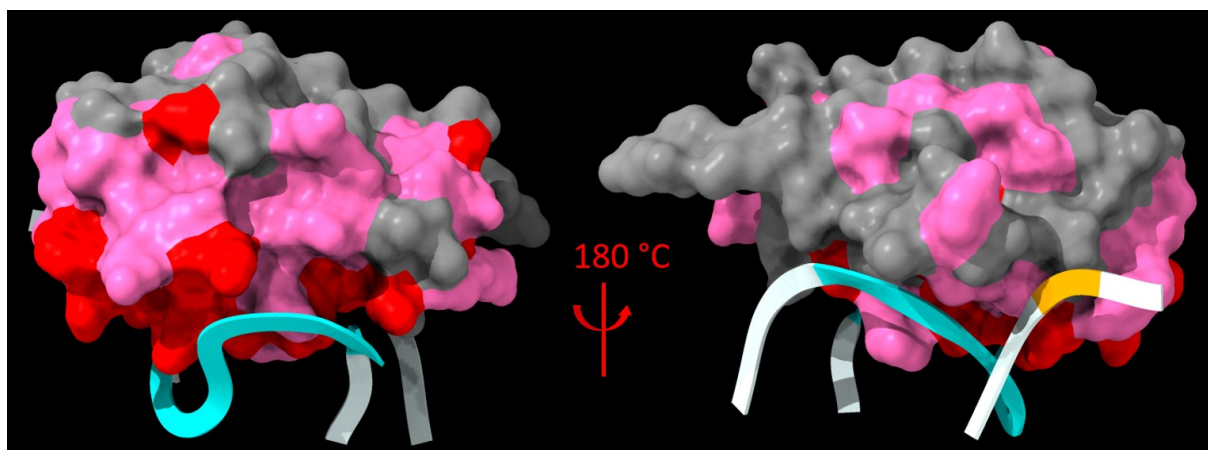
et al., 2018) spíše než k nezávislému vzniku stejné funkce u dvou druhů. Postupem času se společný předek vyvinul v linii, která prošla WGD, a v linii druhou, jejíž genom se neduplikoval (Wolfe & Shields, 1997). Z linie s duplikovaným genomem se později vyvinula *S. cerevisiae*, která některé duplikované geny ztratila. Z linie, která neprošla WGD se vyvinula *K. lactis* (Wapinski et al., 2007). Přes tuto odlišnost v historii vývoje *K. lactis* a *S. cerevisiae* sdílí jejich proteiny Rpl22 stejnou extraribozomální funkci v regulaci sestřihu *RPL22Bi* (Abrahámová et al., 2018). Předek *C. glabrata* také prošel WGD (Wapinski et al., 2007). Z důvodu příbuznosti *S. cerevisiae* a *C. glabrata* lze přepokládat, že CgRpl22 je nejpravděpodobnější kandidát pro komplementování funkce represe sestřihu *RPL22Bi*. Navíc evoluční kontext naznačuje, že u *C. glabrata*, která sama prošla WGD, a je tedy příbuznější *S. cerevisiae* než *K. lactis*, je mechanismus autoregulace CgRPL22 zachovaný. O výskytu inhibiční funkce Rpl22 v ostatních organismech nelze na základě jejich evoluční příbuznosti spekulovat.

Všechny zde testované Rpl22, pocházející z organismů s evolučně odlišným pozadím, jsou schopné zastupovat extraribozomální funkci Rpl22A/B v inhibici sestřihu *RPL22Bi* v *S. cerevisiae*. Různé kombinace substitucí AK jsou pravděpodobně příčinou toho, s jakou efektivitou bude Rpl22 sestřih inhibovat.

V případě Rpl22A, Rpl22B, KlRpl22, DhRpl22 unikátní záměny AK neovlivní schopnost proteinů inhibovat sestřih *RPL22Bi*. Hladina mRNA *RPL22B* v buňkách *rpl22aΔ* s CgRpl22, SpRpl22 a CaRpl22 je o něco vyšší. Substitute, které se vyskytují pouze u CgRpl22, SpRpl22 nebo CaRpl22 (oproti Rpl22A/B, DhRpl22, KlRpl22 a CgRpl22) jsou pravděpodobně zodpovědné za tento efekt. Nejméně výrazný inhibiční efekt pozorujeme v případě exprese *YIRPL22* a *HsRPL22*. Proteiny kódované těmito geny mají nejvíce záměn AK oproti Rpl22A/B v porovnání s ostatními testovanými Rpl22. Navíc se značně liší i samotnou délkou řetězce AK a nestruturovaných konců.

Prvním vysvětlením tedy je, že kombinace substitucí AK v globulární oblasti a v nestruturovaných oblastech YIRpl22 a HsRpl22 jsou zodpovědné za slabší inhibici sestřihu *RPL22Bi*. Alternativní vysvětlení je, že inhibiční efekt v případě YIRpl22 a HsRpl22 není tak výrazný, protože koncentrace těchto proteinů v buňce je nízká, jak ukazují výsledky ověření produkce Rpl22. Inhibiční efekt, který pozorujeme může být také výsledkem prolínání obou vysvětlení.

Zvýrazněním záměn AK všech Rpl22, které mají funkci inhibice sestřihu *RPL22Bi*, na pozadí struktury Rpl22A vidíme, že oblast RNA vazebného helixu je mezi všemi Rpl22 relativně konzervovaná. Oblasti, které se v rámci struktury Rpl22 nachází v blízkosti RNA vazebného helixu a jsou v ribozomu spíše přikloněné k rRNA, mají také některé AK mezi Rpl22 nezměněné. Vyšší variabilita AK mezi Rpl22 se tedy spíše nachází na straně odvrácené od povrchu, než kterým se váže Rpl22A v ribozomu (obrázek č. 22).



**Obrázek č. 22 – Substitute AK mezi Rpl22 neovlivní schopnost proteinů inhibovat sestřih *RPL22Bi*.** Substitute AK Rpl22, které inhibují sestřih *RPL22Bi* byly zvýrazněné na struktuře Rpl22A. Rpl22A je zobrazen červeně. Zvýrazněny byly AK: růžová – vysoce konzervovaná a konzervovaná („:”, „:“), šedá – nekonzervovaná. Modře je zvýrazněný helix 57 a oranžově helix 59 25S rRNA. Struktura Rpl22 a 25 rRNA byla extrahována ze struktury ribozomu (PDB:4V88) (Ben-Shem et al., 2011) v programu ChimeraX (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>) (Pettersen et al., 2021).

Naměřené hodnoty pre-mRNA *RPL22B* jsou u všech buněk relativně nízké, protože v cytoplazmě dochází k jejímu rozpoznání dráhou NMD a k degradaci exonukleázou Xrn1 (Abrahámová et al., 2018). Účinnost degradace se může mezi kmeny produkujícími různé Rpl22 lišit (v důsledku translačního stresu), takže nelze porovnat hladinu pre-mRNA *RPL22B* mezi jednotlivými kmeny. Abychom zjistili, jak moc se v kmenech akumuluje pre-mRNA *RPL22B*, bylo by nutné zopakovat experiment, ale v buňkách *rpl22aΔ* s delecí jednotlivých komponent dráhy NMD, nebo s delecí Xrn1.

## 11.4 Vazba intronu *RPL22B*

Vazba Rpl22 na *RPL22Bi* je předpoklad pro funkci v inhibici sestřihu pre-mRNA *RPL22B*. Rpl22A/B se na rozdíl od svých mutantních verzí v Y3H vážou na segment I2 *RPL22Bi* (Abrahámová et al., 2018).

Všechny testované Rpl22 v jisté míře inhibují pre-mRNA *RPL22B*, přesto jsme nebyli schopni u CaRpl22 a YlRpl22 prokázat jejich vazbu na I2 v Y3H. Slabou interakci s I2 jsme zaznamenali také u DhRpl22, CgRpl22 a SpRpl22. Je možné, že afinita testovaných Rpl22 k I2 je tak nízká, že nejsme schopni ji v Y3H v daném uspořádání detekovat. V takovém případě by bylo třeba zajistit citlivější detekční metodu. Nestrukturovaný kladně nabitý N-konec Rpl22 je navíc v Y3H fúzovaný s aktivační doménou Gal4. Pokud je tento neuspořádaný úsek částečně zodpovědný za kontakt s *RPL22Bi*, mohla by Gal4 ovlivnit jeho funkci.

Dalším možným vysvětlením toho, proč nepozorujeme silné interakce s I2 v Y3H je, že Rpl22A se váže na rozsáhlejší úsek *RPL22Bi*, než je I2. Pro vazbu Rpl22A v Y3H je I2 dostačující, ale pro vazbu I2 ostatními Rpl22 s AK záměnami by byl třeba celý vazebný úsek intronu. Tento model podporuje fakt, že I2 neobsahuje celý konzervovaný úsek, který se v *RPL22Bi* nachází (obrázek č. 23). To, že se v intronu obou paralogů *RPL22A* a *RPL22B*, a také v intronu *RPL22* z jiných kvasinek vyskytuje konzervovaný úsek (Abrahámová, nepublikováno) naznačuje význam tohoto úseku. Je tedy možné, že slouží jako vazebná platforma pro Rpl22A/B. Pokud jeho část chybí, je méně pravděpodobné, že se Rpl22 s obměnami v sekvenci AK budou na intron vázat. K interakci Rpl22A/B a *RPL22Bi* může navíc docházet částečně v konzervovaném úseku, a zčásti i za jeho hranicí, kde může kompatibilita mezi testovanými Rpl22 a *RPL22Bi* klesat. Je pozoruhodné je, že se zmíněný konzervovaný úsek vyskytuje i v sekvenci *CgRPL22i* (obrázek č. 23). Jeho přítomnost a evoluční pozadí *C. glabrata* naznačuje autoregulaci exprese *RPL22* v této kvasince.

	I2	Konzervovaný úsek
<i>RPL22Ai</i>	ATATG	TGATTGTTAATAGCAGTAGGCAACTT
<i>RPL22Bi</i>	TGAAG	TGATTGTTAATAGCAGTAGGCAGAC
<i>KlRPL22i</i>	ATTGA	TGATTGTTAATAGCAGTAGGCTGGTT
<i>CgRPL22i</i>	TGATG	TGATTGTTAATAGCAGTAGAA AATGC
<i>CaRPL22i</i>	GTTACAGATTTGCTCATCATGAGTTTTTGG	
<i>DhRPL22i</i>	TTTCTTAATTGAACGCATATCATTTCTACAT	
<i>YlRPL22i</i>	TTTCTCAAACAAACAGACAGTCTTGCGAGAA	

**Obrázek č. 23 – Konzervovaný úsek se nachází i v sekvenci intronu *CgRPL22*.** Červeně je vyznačený konzervovaný úsek. Modře je vyznačeno, kde se nachází rozhraní fragmentu I2. Alignment byl vytvořen Clustal Omega MSA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Silnou interakci s I2 pozorujeme u KlRpl22 a HsRpl22. I přes silnou vazbu HsRpl22 na I2 v Y3H tento protein nevykazuje tak výrazný inhibiční efekt sestřihu *RPL22Bi*, jako některé jiné Rpl22. Je možné, že interakce mezi HsRpl22 a *RPL22Bi* v kontextu celé pre-mRNA je mnohem slabší. Nebo jsou výsledky inhibice sestřihu *RPL22Bi* ovlivněny nižší mírou produkce HsRpl22 v buňkách *rpl22aΔ*.

Abychom si byli jisti, že výsledky interakce Rpl22 a I2 nejsou ovlivněny nízkou hladinou Rpl22-Gal4, je třeba u všech kmenů Y3H ověřit produkci tohoto fúzního proteinu.

### 11.5 Využití kodonů *YIRPL22*

RPG jsou kvůli své roli v proteosyntéze jedny z nejvíce exprimovaných genů v buňce. Jejich exprese je přísně regulována jak na úrovni transkripce, tak na úrovni sestřihu a translace.

Podařilo se nám dosáhnout různé míry produkce Rpl22. Do jisté míry je tento efekt způsobený kvalitou přenosu proteinů na membránu a jinými technickými okolnostmi. Z výsledků detekce Rpl22 ovšem plyne, že v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* a *rpl22aΔ*, které produkují YIRpl22, Rpl22A<sub>mut</sub> a Rpl22B<sub>mut</sub> pozorujeme vždy výrazně slabší intenzitu signálu, než v buňkách *rpl22aΔrpl22bΔ* a *rpl22aΔ* exprimujících ostatní homology *RPL22* (relativní porovnání signálu pro Rpl22 v rámci jedné membrány vůči nanesenému množství extraktu na gel). Rozmanitost signálů pro SpRpl22, KlRpl22 a HsRpl22 na různých membránách nelze diskutovat vzhledem k jejich kvalitě. Pro potvrzení produkce těchto Rpl22 je výsledek ovšem dostačující.

Možným vysvětlením, proč se YIRpl22 vyskytuje v buňkách v malé míře by mohla být odlišná preference ve využití kodonů mezi *S. cerevisiae* a *Y. lipolytica*. Kodony nejsou využívány geny náhodně. Účinnost translace mRNA s často využívanými kodony je vyšší, kvůli vysoké expresi odpovídajících tRNA. Upřednostnění některých ze synonymních kodonů pro AK je typické pro skupiny vysoce exprimovaných genů jako jsou např. glykolytické geny nebo RPG. Mezi organismy se mohou ovšem preferované kodony lišit, což může vést ke špatné expresi genů pocházejících z jiných organismů (Sharp et al., 1986).

RSCU (relative synonymous codon usage) udává poměr využití daného kodonu ze skupiny synonymních kodonů oproti předpokládanému využití všech synonymních kodonů se stejnou frekvencí (Sharp et al., 1986). Hodnota se pohybuje mezi 0 a počtem synonymních kodonů pro danou aminokyselinu. 6 aminokyselin, které se vyskytují v sekvenci YIRpl22 je kódováno kodonem, který je u RPG v *S. cerevisiae* nejméně využívaný (RSCU < 0,2). Upravení omezení na RSCU < 0,5 odhalí, že méně preferované kodony se vyskytují v 27 % sekvence *YIRPL22* a

*HsRPL22* (tabulka č. 19). Je tedy pravděpodobné, že mRNA *YIRPL22* je znevýhodněná při translaci oproti ostatním mRNA RPG v *S. cerevisiae* kvůli nedostatku příslušných tRNA. To může částečně vysvětlit, proč pozorujeme slabý signál pro YIRpl22 na membráně. Odlišná preference ve využití synonymních kodonů mezi *RPL22A* a *RPL22B* byla diskutována v Chan et al. (2012). Autoři ukázali, že kodon UUG je přednostně translatován při oxidativním stresu před ostatními synonymními kodony pro leucin, a zvyhodňuje tak produkci Rpl22A (Chan et al., 2012).

	Sekvenční podobnost ve srovnání s Rpl22A	Komplementace růstového fenotypu <i>rpl22AΔrpl22BΔ</i>
KIRpl22	95,1 %	+
CgRpl22	94,2 %	+
DhRpl22	80,2 %	+
CaRpl22	76,6 %	+
YIRpl22	67,0 %	-
SpRpl22	63,9 %	+
HsRpl22	62,5 %	-

**Tabulka č. 19 – Kodony využívané *YIRPL22* odpovídají nejméně používaným kodonům RPG *S. cerevisiae*.** Čísla představují počet kodonů využitých homologními *RPL22*, které jsou nejméně preferované RPG *S. cerevisiae*. Hodnoty RSCU RPG *S. cerevisiae* byly získány z databáze Codon Statistics Database (Subramanian et al., 2022) a využití kodonů v *RPL22* z různých organismů bylo generováno za pomoci programu Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2018).

Pro zjištění, zda se některé Rpl22 produkují málo, z důvodu degradace již na úrovni mRNA by bylo potřeba změřit hladinu mRNA homologních *RPL22* za pomoci RT – qPCR. Abychom mohli určit, zda dochází k degradaci na úrovni proteinu, bylo by možné porovnat kinetiku zániku fluorescenčního signálu Rpl22 značených GFP. Regulaci na úrovni sestříhu můžeme vyloučit, protože geny pro tyto Rpl22 nemají v plazmidu kódovaný intron.

## 12 Závěr

Prokázali jsme, že Rpl22A<sub>mut</sub>, Rpl22B<sub>mut</sub> selhává v komplementování všech funkcí Rpl22A/B.

YlRpl22, HsRpl22 nekomplementují růstový fenotyp buněk *rpl22aΔrpl22bΔ*. Navíc zpomalují růst buněk WT. Produkce těchto proteinů v *S. cerevisiae* má nejspíše vedlejší toxické účinky, které by mohly souviset s délkou nestrukturovaných konců Rpl22.

Konstrukt p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_JL je vhodnější pro testování vazby Rpl22 na fragment 25S rRNA než p3HR2\_H57–H59\_25 rRNA\_SG.

Všechny testované Rpl22 komplementují do jisté míry extraribozomální funkci Rpl22A/B v inhibici sestřihu pre-mRNA *RPL22B*. Ovšem pouze KlRpl22 a HsRpl22 vážou I2 v Y3H silou odpovídající Rpl22A. Delší konstrukt *RPL22Bi*, popřípadě citlivější detekční metoda by mohly pomoci přinést spolehlivější výsledky o vazbě Rpl22 na *RPL22Bi*.

CaRpl22 pravděpodobně není vhodným kandidátem pro testování RNA vazebných funkcí v Y3H. Přesto, že komplementuje defekt růstu buněk *rpl22aΔrpl22bΔ* a inhibuje sestřih *RPL22Bi*, nepozorujeme v Y3H vazbu CaRpl22 na fragment 25S rRNA nebo I2.



## 13 Reference

- Abrahámová, K., Nemčko, F., Libus, J., Převorovský, M., Hálová, M., Půta, F., & Folk, P. (2018). Introns provide a platform for intergenic regulatory feedback of RPL22 paralogs in yeast. In *PLoS ONE* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685>
- An, J., Kwon, H., Kim, E., Lee, Y. M., Ko, H. J., Park, H., Choi, I. G., Kim, S., Kim, K. H., Kim, W., & Choi, W. (2015). Tolerance to acetic acid is improved by mutations of the TATA-binding protein gene. *Environmental Microbiology*, 17(3), 656–669. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12489>
- \*Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/membr.00042-09>
- \*Aubert, M., O'donohue, M. F., Lebaron, S., & Gleizes, P. E. (2018). Pre-ribosomal RNA processing in human cells: From mechanisms to congenital diseases. *Biomolecules*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/biom8040123>
- \*Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H. D., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., Lafontaine, D. L. J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J. M., McAlear, M. A., Moore, P. B., Noller, H. F., Ortega, J., Panse, V. G., Ramakrishnan, V., Spahn, C. M. T., Steitz, T. A., Tchorzewski, M., ... Yusupov, M. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 24(1), 165–169. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2014.01.002>
- \*Barth, G., & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(4), 219–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00002-8)
- Ben-Shem, A., De Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062), 1524–1529. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1212642/SUPPL\\_FILE/BEN-SHEM.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1212642/SUPPL_FILE/BEN-SHEM.SOM.PDF)
- Bierhoff, H., Dunder, M., Michels, A. A., & Grummt, I. (2008). Phosphorylation by Casein Kinase 2 Facilitates rRNA Gene Transcription by Promoting Dissociation of TIF-IA from Elongating RNA Polymerase I. *Molecular and Cellular Biology*, 28(16), 4988–4998. <https://doi.org/10.1128/mcb.00492-08>
- \*Brent, R., & Finley, R. L. (1997). Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annual Review of Genetics*, 31, 663–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.31.1.663>
- \*Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Cao, B., Fang, Z., Liao, P., Zhou, X., Xiong, J., Zeng, S., & Lu, H. (2017). Cancer-mutated ribosome protein L22 (RPL22/eL22) suppresses cancer cell survival by blocking p53-MDM2 circuit. *Oncotarget*, 8(53), 90651–90661. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21544>
- Cech, T. R. (2000). The ribosome is a ribozyme. *Science*, 289(5481), 878–879. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.878>



- Chan, C. T. Y., Pang, Y. L. J., Deng, W., Babu, I. R., Dyavaiah, M., Begley, T. J., & Dedon, P. C. (2012). Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nature Communications*, 3(March 2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms1938>
- Chao, J. A., & Williamson, J. R. (2004). Joint X-ray and NMR refinement of the yeast L30e-mRNA complex. *Structure*, 12(7), 1165–1176. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.023>
- \*Cosma, M. P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Reports*, 5(10), 953–957. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400251>
- Dabeva, M. D., & Warner, J. R. (1993). Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates both splicing and translation of its own transcript. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 19669–19674. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36568-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36568-8)
- Daubner, G. M., Cléry, A., & Allain, F. H. T. (2013). RRM–RNA recognition: NMR or crystallography...and new findings. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2012.11.006>
- \*De La Cruz, J., Karbstein, K., & Woolford, J. L. (2015). Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo\*. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Biochem-060614-033917>, 84, 93–129. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060614-033917>
- Dean, E. J., Davis, J. C., Davis, R. W., & Petrov, D. A. (2008). Pervasive and persistent redundancy among duplicated genes in yeast. *PLoS Genetics*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000113>
- Del Toro, N., Fernandez-Ruiz, A., Mignacca, L., Kalegari, P., Rowell, M. C., Igelmann, S., Saint-Germain, E., Benfdil, M., Lopes-Paciencia, S., Brakier-Gingras, L., Bourdeau, V., Ferbeyre, G., & Lessard, F. (2019). Ribosomal protein RPL22/eL22 regulates the cell cycle by acting as an inhibitor of the CDK4-cyclin D complex. *Cell Cycle*, 18(6–7), 759–770. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1593708>
- Dobbelstein, M., & Shenk, T. (1995). In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *Journal of Virology*, 69(12), 8027–8034. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.12.8027-8034.1995>
- Farghaly, H., Guirgis, A. A., & Khalil, H. (2018). Heat shock reduces HCV replication via regulation of ribosomal L22 in Alu-RNA molecule dependent manner. *Hepatoma Research*, 4(8), 41. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2018.30>
- Fewell, S. W., & Woolford, J. L. (1999). Ribosomal Protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* Regulates Its Expression by Binding to RPS14B Pre-mRNA and to 18S rRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 826–834. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.826>
- Fok, V., Mitton-Fry, R. M., Grech, A., & Steitz, J. A. (2006). Multiple domains of EBER 1, an Epstein-Barr virus noncoding RNA, recruit human ribosomal protein L22. *Rna*, 12(5), 872–882. <https://doi.org/10.1261/rna.2339606>
- Gabunilas, J., & Chanfreau, G. (2016). Splicing-Mediated Autoregulation Modulates Rpl22p Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 12(4), 1–35. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005999>

- \*Genuth, N. R., & Barna, M. (2018). The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Molecular Cell*, *71*(3), 364–374. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.07.018>
- Ghulam, M. M., Catala, M., & Abou Elela, S. (2020). Differential expression of duplicated ribosomal protein genes modifies ribosome composition in response to stress. *Nucleic Acids Research*, *48*(4), 1954–1968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1183>
- Gill, G., & Ptashne, M. (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*, *334*(6184), 721–724. <https://doi.org/10.1038/334721a0>
- Goforth, J. B., Anderson, S. A., Nizzi, C. P., & Eisenstein, R. S. (2010). Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. *Rna*, *16*(1), 154–169. <https://doi.org/10.1261/rna.1857210>
- Gómez Ramos, L. M., Smeekens, J. M., Kovacs, N. A., Bowman, J. C., Wartell, R. M., Wu, R., & Williams, L. D. (2016). Yeast rRNA Expansion Segments: Folding and Function. *Journal of Molecular Biology*, *428*(20), 4048–4059. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.008>
- Gu, X., Ye, T., Zhang, X. R., Nie, L., Wang, H., Li, W., Lu, R., Fu, C., Du, L. L., & Zhou, J. Q. (2022). Single-chromosome fission yeast models reveal the configuration robustness of a functional genome. *Cell Reports*, *40*(8), 111237. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111237>
- \*Higgs, P. G., & Lehman, N. (2015). The RNA World: Molecular cooperation at the origins of life. *Nature Reviews Genetics*, *16*(1), 7–17. <https://doi.org/10.1038/nrg3841>
- Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B., & Wickens, M. (2005). RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: Affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *Rna*, *11*(2), 227–233. <https://doi.org/10.1261/rna.7202705>
- Houmani, J. L., & Ruf, I. K. (2009). Clusters of basic amino acids contribute to RNA binding and nucleolar localization of ribosomal protein L22. *PLoS ONE*, *4*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005306>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* *2021* *596*:7873, *596*(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kachroo, A. H., Laurent, J. M., Yellman, C. M., Meyer, A. G., Wilke, C. O., & Marcotte, E. M. (2015). Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science*, *348*(6237), 921–925. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA0769/SUPPL\\_FILE/KACHROO.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA0769/SUPPL_FILE/KACHROO.SM.PDF)
- Kim, S. J., & Strich, R. (2016). Rpl22 is required for IME1 mRNA translation and meiotic induction in *S. cerevisiae*. *Cell Division*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13008-016-0024-3>
- Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., & Silver, P. A. (2007). Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell*, *131*(3), 557–571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.037>

- Le, S., Sternglanz, R., & Greider, C. W. (2000). Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(3), 999–1010. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.999>
- Lin, C.-Y., Navarro, S., Reddy, S., & Comai, L. (n.d.). *CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl581>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26/TABLES/2>
- Lukavsky, P. J. (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Research*, *139*(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2008.06.004>
- Macías, S., Bragulat, M., Tardiff, D. F., & Vilardell, J. (2008). L30 Binds the Nascent RPL30 Transcript to Repress U2 snRNP Recruitment. *Molecular Cell*, *30*(6), 732–742. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.002>
- Maitra, N., He, C., Blank, H. M., Tsuchiya, M., Schilling, B., Kaeberlein, M., Aramayo, R., Kennedy, B. K., & Polymenis, M. (2020). Translational control of one-carbon metabolism underpins ribosomal protein phenotypes in cell division and longevity. *ELife*, *9*, 1. <https://doi.org/10.7554/eLife.53127>
- Malik Ghulam, M., Catala, M., Reulet, G., Scott, M. S., & Abou Elela, S. (2022). Duplicated ribosomal protein paralogs promote alternative translation and drug resistance. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32717-y>
- \*Maris, C., Dominguez, C., & Allain, F. H. T. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *The FEBS Journal*, *272*(9), 2118–2131. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2005.04653.X>
- Mayer, V. W., & Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *231*(2), 177–186. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(90\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(90)90024-X)
- \*Mba, I. E., Nweze, E. I., Eze, E. A., & Anyaegbunam, Z. K. G. (2022). Genome plasticity in *Candida albicans*: A cutting-edge strategy for evolution, adaptation, and survival. *Infection, Genetics and Evolution*, *99*(September 2021). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105256>
- McCormick, M. A., Delaney, J. R., Tsuchiya, M., Tsuchiyama, S., Shemorry, A., Sim, S., Chou, A. C. Z., Ahmed, U., Carr, D., Murakami, C. J., Schleit, J., Sutphin, G. L., Wasko, B. M., Bennett, C. F., Wang, A. M., Olsen, B., Beyer, R. P., Bammler, T. K., Prunkard, D., ... Kennedy, B. K. (2015). A Comprehensive Analysis of Replicative Lifespan in 4,698 Single-Gene Deletion Strains Uncovers Conserved Mechanisms of Aging. *Cell Metabolism*, *22*(5), 895–906. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.008>
- Metzl-Raz, E., Kafri, M., Yaakov, G., Soifer, I., Gurvich, Y., & Barkai, N. (2017). Principles of cellular resource allocation revealed by condition-dependent proteome profiling. *ELife*, *6*, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.28034>
- Millot, G. A., Berger, A., Lejour, V., Boulé, J. B., Bobo, C., Cullin, C., Lopes, J., Stoppa-Lyonnet, D., & Nicolas, A. (2011). Assessment of human nter and cter BRCA1 mutations using growth and

- localization assays in yeast. *Human Mutation*, 32(12), 1470–1480.  
<https://doi.org/10.1002/humu.21608>
- \*Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., & Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *The Journal of Biomedical Research*, 27(4), 254–271. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130030>
- Nicolas, E., Parisot, P., Pinto-Monteiro, C., De Walque, R., De Vleeschouwer, C., & Lafontaine, D. L. J. (2016). Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress. *Nature Communications*, 7(June). <https://doi.org/10.1038/ncomms11390>
- Nosrati, N., Kapoor, N. R., & Kumar, V. (2014). Combinatorial action of transcription factors orchestrates cell cycle-dependent expression of the ribosomal protein genes and ribosome biogenesis. *FEBS Journal*, 281(10), 2339–2352. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12786>
- O’Leary, M. N., Schreiber, K. H., Zhang, Y., Duc, A. C. E., Rao, S., Hale, J. S., Academia, E. C., Shah, S. R., Morton, J. F., Holstein, C. A., Martin, D. B., Kaeberlein, M., Ladiges, W. C., Fink, P. J., MacKay, V. L., Wiest, D. L., & Kennedy, B. K. (2013). The Ribosomal Protein Rpl22 Controls Ribosome Composition by Directly Repressing Expression of Its Own Paralog, Rpl221. *PLoS Genetics*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003708>
- Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J. F., Wellinger, R. J., Chabot, B., & Elela, S. A. (2011). Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes. *Cell*, 147(2), 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.044>
- \*Petibon, C., Malik Ghulam, M., Catala, M., & Abou Elela, S. (2021). Regulation of ribosomal protein genes: An ordered anarchy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 12(3), e1632. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1632>
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hsiao, C., Norris, A. M., Kovacs, N. A., Waterbury, C. C., Stepanov, V. G., Harvey, S. C., Fox, G. E., Wartell, R. M., Hud, N. V., & Williams, L. D. (2014). Evolution of the ribosome at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10251–10256. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1407205111/SUPPL\\_FILE/PNAS.1407205111.SD02.FAS](https://doi.org/10.1073/PNAS.1407205111/SUPPL_FILE/PNAS.1407205111.SD02.FAS)
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 30(1), 70. <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>
- Planta, R. J., & Mager, W. H. (1998). The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(5), 471–477. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980330\)14:5<471::AID-YEA241>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980330)14:5<471::AID-YEA241>3.0.CO;2-U)
- \*Plaschka, C., Newman, A. J., & Nagai, K. (n.d.). *Structural Basis of Nuclear pre-mRNA Splicing: Lessons from Yeast*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032391>
- Polikanov, Y. S., Steitz, T. A., & Innis, C. A. (2014). A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(9), 787–793. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2871>
- Robledo, S., Idol, R. A., Crimmins, D. L., Ladenson, J. H., Mason, P. J., & Bessler, M. (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *Rna*, 14(9), 1918–1929. <https://doi.org/10.1261/rna.1132008>

- \*Scannell, D. R., Frank, A. C., Conant, G. C., Byrne, K. P., Woolfit, M., & Wolfe, K. H. (2007). Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(20), 8397–8402. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608218104>
- SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., & Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(16), 8496–8501. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.16.8496>
- \*Seoighe, C., & Wolfe, K. H. (1999). Yeast genome evolution in the post-genome era. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(5), 548–554. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00015-6)
- \*Shaifur Rahman, M., Akhtar, N., Mohammad Jamil, H., Suvra Banik, R., & Asaduzzaman, S. M. (2015). TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research*, *3*. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.5>
- Sharp, P. M., Tuohy, T. M. F., & Mosurski, K. R. (1986). Codon usage in yeast: Cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Research*, *14*(13), 5125–5143. <https://doi.org/10.1093/nar/14.13.5125>
- Steffen, K. K., McCormick, M. A., Pham, K. M., Mackay, V. L., Delaney, J. R., Murakami, C. J., Kaeberlein, M., & Kennedy, B. K. (2012). Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *191*(1), 107–118. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.136549>
- Stothard, P. (2018). The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. <https://doi.org/10.2144/00286ir01>, *28*(6). <https://doi.org/10.2144/00286IR01>
- Stuart, J. J., Egly, L. A., Wong, G. H., & Kaspar, R. L. (2000). The 3' UTR of Human MnSOD mRNA Hybridizes to a Small Cytoplasmic RNA and Inhibits Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *274*(3), 641–648. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.3189>
- Stumpf, C. R., Opperman, L., & Wickens, M. (2008). Analysis of RNA-Protein Interactions Using a Yeast Three-Hybrid System. *Methods in Enzymology*, *449*(C), 295–315. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02414-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02414-2)
- Subramanian, K., Payne, B., Feyertag, F., & Alvarez-Ponce, D. (2022). The Codon Statistics Database: A Database of Codon Usage Bias. *Molecular Biology and Evolution*, *39*(8), 1–3. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac157>
- Toczyski, D. P., Matera, A. G., Ward, D. C., & Steitz, J. A. (1994). The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(8), 3463–3467. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3463>
- Tugendreich, S., Perkins, E., Couto, J., Barthmaier, P., Sun, D., Tang, S., Tulac, S., Nguyen, A., Yeh, E., Mays, A., Wallace, E., Lila, T., Shivak, D., Prichard, M., Andrejka, L., Kim, R., & Melese, T. (2001). A streamlined process to phenotypically profile heterologous cDNAs in parallel using yeast cell-based assays. *Genome Research*, *11*(11), 1899–1912. <https://doi.org/10.1101/gr.191601>

- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1061>
- Vilardell, J., & Warner, J. R. (1994). Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. *Genes and Development*, *8*(2), 211–220. <https://doi.org/10.1101/gad.8.2.211>
- Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N., & Regev, A. (2007). Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature*, *449*(7158), 54–61. <https://doi.org/10.1038/nature06107>
- \*Warner, J. R., & McIntosh, K. B. (2009). How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Molecular Cell*, *34*(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.03.006>
- \*Warner JR. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(11), 437–440. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01460-7)
- \*Wilson, D. N., & Doudna Cate, J. H. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(5), 251–263. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011536>
- Wolfe, K. H., & Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 1997 387:6634, *387*(6634), 708–713. <https://doi.org/10.1038/42711>
- Wood, J., Frederickson, R. M., Fields, S., & Patel, A. H. (2001). Hepatitis C Virus 3'X Region Interacts with Human Ribosomal Proteins. *Journal of Virology*, *75*(3), 1348–1358. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1348-1358.2001>
- Xie, Q., Wang, Y., Lin, J., Qin, Y., Wang, Y., & Bu, W. (2012). Potential key bases of ribosomal RNA to Kingdom-specific spectra of antibiotic susceptibility and the possible archaeal origin of eukaryotes. *PLoS ONE*, *7*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029468>
- Yang, M., Sun, H., He, J., Wang, H., Yu, X., Ma, L., & Zhu, C. (2014). Interaction of ribosomal protein L22 with casein kinase 2 $\alpha$ : A novel mechanism for understanding the biology of non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, *32*(1), 139–144. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3187>
- Yang, M., Sun, H., Wang, H., Zhang, S., Yu, X., & Zhang, L. (2013). Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer. *Medical Oncology*, *30*(3). <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0646-0>
- Yelland, J. N., Bravo, J. P. K., Black, J. J., Taylor, D. W., & Johnson, A. W. (2023). A single 2'-O-methylation of ribosomal RNA gates assembly of a functional ribosome. *Nature Structural and Molecular Biology*, *30*(1), 91–98. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00891-8>
- Zhang, Y., Duc, A. C. E., Rao, S., Sun, X. L., Bilbee, A. N., Rhodes, M., Li, Q., Kappes, D. J., Rhodes, J., & Wiest, D. L. (2013). Control of hematopoietic stem cell emergence by antagonistic functions of ribosomal protein paralogs. *Developmental Cell*, *24*(4), 411–425. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.018>
- Zhang, Y., O'Leary, M. N., Peri, S., Wang, M., Zha, J., Melov, S., Kappes, D. J., Feng, Q., Rhodes, J., Amieux, P. S., Morris, D. R., Kennedy, B. K., & Wiest, D. L. (2017). Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl221 Control Morphogenesis by Regulating Pre-mRNA Splicing. *Cell Reports*, *18*(2), 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.034>

