



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vliv rostlinných hormonů na alternativní
sestřih**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Alena Dudková
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Barbara Nardelliová
Konzultant:	Mgr. Jiří Voller, PhD.
Termín odevzdání práce:	2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Alena Dudková
Název práce	Vliv rostlinných hormonů na alternativní sestřih
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Barbara Nardelliová
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Poruchy sestřihu pre-mRNA jsou příčinou řady dědičných onemocnění. Jedním z nich je familiární dysautonomie (FD), sensorická neuropatie způsobená mutacemi genu IKBKAP. V důsledku mutace IVS20+6T>C dochází k tvorbě transkriptů bez exonu 20, které nejsou překládány ve funkční protein. Kinetin, fytohormon ze skupiny cytokininů, je schopen obnovit schopnost sestřihového aparátu rozpoznat exon 20 v přítomnosti mutace. Testovala jsem, zda tuto aktivitu nemají další přírodní cytokininy a syntetické deriváty kinetinu. Pomocí PCR po reverzní transkripci jsem sledovala vliv látek na koncentraci normální a patologické formy mRNA ve fibroblastech získaných z pacientů s FD. Mezi testovanými sloučeninami jsem identifikovala několik aktivních. Zjistila jsem také, že nízkomolekulární inhibitory některých proteinkinas regulujících sestřih pre-mRNA na aberantní sestřih IKBKAP nemají vliv. Součástí práce je i rešerše literatury o nízkomolekulárních modulátorech aberantního sestřihu.
Klíčová slova	sestřih pre-mRNA, alternativní sestřih, familiární dysautonomie, IKBKAP, cytokininy, kinetin
Počet stran	108
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Alena Dudková
Title of thesis	Effects of phytohormones on alternative splicing
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Barbara Nardelliová
The year of presentation	2015
Abstract	Hereditary disorders are often caused by aberrant splicing of pre-mRNA. Familial dysautonomia (FD), a sensoric neuropathy, is caused by mutations affecting splicing of IKBKAP gene. The IVS20+6T>C mutation leads to production of transcripts without the exon 20 which are not translated into functional protein. Kinetin, a phytohormone from cytokinin family, is able to restore the ability of the spliceosome to recognize the exon 20 in the presence of the mutation. In this thesis, I tested other natural cytokinins and synthetic kinetin derivatives to find out whether they also possess this activity. Reverse transcription followed by PCR was used to evaluate the effects of the compounds on concentrations of wild-type and pathological mRNA isoforms in fibroblasts derived from FD patients. Several active compounds were identified using this approach. However, small-molecule inhibitors of certain protein kinases regulating pre-mRNA splicing didn't have any effect on the IKBKAP aberrant splicing.
Keywords	splicing of pre-mRNA, alternative splicing, familial dysautonomia, IKBKAP, cytokinins, kinetin
Number of pages	108
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Barbaře Nardelliové za její čas a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Dominice Hájkové za praktickou výpomoc a Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za jeho odborné rady, které mi poskytl při řešení zadané problematiky. Také bych ráda poděkovala zaměstnancům Laboratoře růstových regulátorů, kteří mi vždy byli nápomocni.

OBSAH

	SEZNAM ZKRATEK	8
1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1	Sestřih prekursorové mRNA	11
2.1.1	Malé jaderné RNA	12
2.1.2	Průběh sestřihu prekursorové mRNA	13
2.2	Alternativní sestřih prekursorové mRNA	16
2.3	Mutace ovlivňující sestřih prekursorové mRNA	18
2.4	Regulace sestřihu prekursorové mRNA	19
2.4.1	SR proteiny	20
2.4.2	Heterogenní ribonukleoproteiny	21
2.5	Farmakologické ovlivnění sestřihu prekursorové mRNA	21
2.5.1	Antisense oligonukleotidy	21
2.5.2	Nízkomolekulární modulátory	22
2.5.2.1	Obecné inhibitory sestřihu prekursorové mRNA	23
2.5.2.1.1	Inhibitory zrání a funkce spliceosomu	23
2.5.2.1.2	Inhibitory SF2/ASF-závislého sestřihu	28
2.5.2.1.3	Inhibitory histonových deacetylase a histonových acetyltransferas	29
2.5.2.2	Modulátory alternativního sestřihu	31
2.5.2.2.1	Insulinový receptor	31
2.5.2.2.2	Neurogeny	32
2.5.2.2.3	Onkogeny a geny tumorových supresorů	50
2.5.2.2.4	Transkripty HIV-1	58
3	MATERIÁLY A METODY	60
3.1	Seznam použitých přístrojů, zařízení a chemikálií	60
3.1.1	Kultivační plasty	60
3.1.2	Přístroje a zařízení	60
3.1.3	Chemikálie	61
3.1.4	Roztoky	62
3.1.5	Testované látky	63
3.1.6	Protilátky	63
3.1.7	Primery	63
3.1.8	Buněčné linie	63

3.2	Použité metody	64
3.2.1	Kultivace buněk a příprava buněk na experimenty	64
3.2.2	Sklízení buněk pro analýzu RNA a izolace RNA	65
3.2.3	Reverzní transkripce	66
3.2.4	Polymerázová řetězová reakce	67
3.2.5	Elektroforetická separace produktů PCR a jejich detekce a vizualizace	68
3.2.6	Sklízení buněk pro analýzu proteinů	68
3.2.7	Příprava proteinových lyzátů	69
3.2.8	Elektroforetická separace proteinů, Western blotting a imunodetekce	69
3.2.9	Generování chemických vzorců	71
4	VÝSLEDKY	72
4.1	Optimalizace podmínek pro sledování vlivu cytokininů na sestřih IKBKAP pre-mRNA pomocí PCR po reverzní transkripci	72
4.1.1	Vliv počtu cyklů a volba primerů	72
4.1.2	Volba buněčných linií a vliv doby kultivace s testovanými látkami	74
4.2	Testování vlivu cytokininů na sestřih IKBKAP pre-mRNA	75
4.3	Srovnání vlivu kinetinu a 1796 na sestřih IKBKAP pre-mRNA	83
4.4	Vliv kinetinu na hladinu proteinu IKAP	85
5	DISKUSE A ZÁVĚR	88
	POUŽITÁ LITERATURA	90

SEZNAM ZKRATEK

APP	amyloidní prekurzorový protein
AS	alternativní sestřih
ASO	antisense oligonukleotidy
BAP	benzylaminopurin
C	kontrola
Clk	Cdc2-podobné kinasy (<i>Cdc2-like</i>)
DMD	Duchennova svalová dystrofie
DMSO	dimethylsulfoxid
EGCG	epigallokatechin galát
EIPA	5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amilorid
FD	familiární dysautonomie
HACT	histonové acetyltransferasy
HDAC	histonové deacetylasy
hnRNP	heterogenní ribonukleoproteiny
GABA _A	receptor γ -aminomáselné kyseliny typu A
GM-CSF	granulocyty a makrofágy stimulující faktor
GSK-3	glykogen synthasa-kinasa 3
IDC	indolové deriváty
IKAP	proteinový produkt genu IKBKAP
iP	isopentenylaminopurin
K	kinetin
KR	kinetin ribosid
LSm	Sm-podobné (<i>Sm-like</i>)
MD1	myotonická dystrofie typu 1
mT	m-topolin
MUT	mutovaná patologická forma
NMDA	N-methyl-D-aspartátový receptor
nt	nukleotid
oT	o-topolin
PCR	polymerázová řetězová reakce
PF	PF-670462
PHB	prohibitin
PK	N ⁹ -tetrahydropyranil kinetin
PKC	proteinkinasa C
PP1	proteinová fosfatasa 1
PP2A	proteinová fosfatasa 2A
pre-mRNA	prekurzorová mRNA
pT	p-topolin
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAHA	suberoylanilid hydroxamová kyselina

SMA	spinální svalová atrofie
snRNA	malá jaderná RNA
snoRNA	jadéřková RNA
SR2c	serotoninový receptor 2c
TG	TG003
topo I	topoisomerasa I
topo II	topoisomerasa II
TPA	12-O-tetradekanoylforbol 13-acetát
tZ	trans-zeatin
WT	standardní forma (<i>wild-type</i>)

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Prekurzorová mRNA prochází sestřihem, který je katalyzován spliceosomem. Z primárního transkriptu se při něm odstraní nekódující sekvence, introny, zatímco kódující sekvence, exony, spojením vytvoří finální transkript. Pomocí alternativního sestřihu je možné vytvořit různé transkripty lišící se přítomností některých exonů. Z jednoho genu tak může vzniknout více proteinů.

Sestřih pre-mRNA je složitý proces regulovaný na mnoha úrovních, aby nedocházelo k tvorbě transkriptů, které nedávají vzniknout proteinovým produktům, případně transkriptů kódujících proteiny narušujících homeostázu. Asi 15 % dědičných onemocnění je způsobeno právě aberantním sestřihem pre-mRNA. Mezi tato onemocnění se řadí např. spinální svalová atrofie, neurofibromatóza typu 1 nebo familiární dysautonomie. Současná terapie je především symptomatická. Snahou je nalézt látky, které mají schopnost korigovat sestřih tak, aby vznikal funkční produkt. Jedním z mála známých modulátorů sestřihu je kinetin, rostlinný hormon ze skupiny cytokininů. Kinetin má vliv na sestřih mutantní pre-mRNA pro IKBKAP a je proto potenciálním léčivem na familiární dysautonomii.

Cílem bakalářské práce bylo zpracování rešerše na téma sestřih pre-mRNA a možnosti jeho farmakologického ovlivnění. Experimentální část je zaměřena na testování vlivu přirozených i syntetických cytokininů, zejména derivátů kinetinu, na sestřih IKBKAP pre-mRNA.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Sestřih prekurzorové mRNA

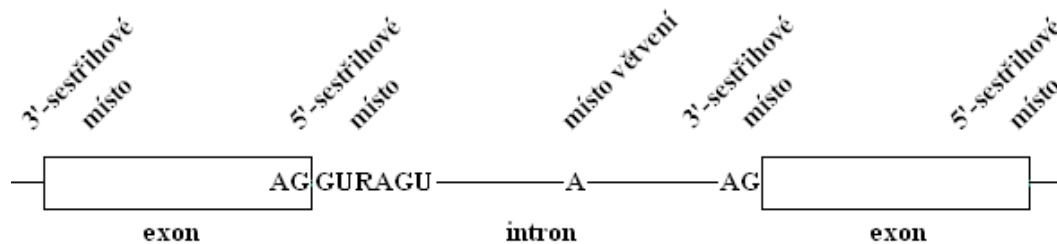
Většina genů kódujících proteiny vyšších eukaryotických organismů je ze sekvence DNA prepisována do prekurzorové mRNA (pre-mRNA), ve které jsou exony kódující sekvenci proteinu přerušovány nekódujícími introny. Sestřih je proces, při kterém se v pre-mRNA odstraní introny a exony se spojí ligací (Berget *et al.*, 1977; Chow *et al.*, 1977). Celý proces je katalyzován složitým ribonukleoproteinovým komplexem spliceosomem (Lerner *et al.*, 1980).

K sestřihu dochází v místech pre-mRNA, která mají typické znaky. Na rozhraní 3'-konce exonu a 5'-konce intronu se nachází 5'-sestřihové místo, jehož obecná konsenzuální sekvence je u obratlovců AG/GURAGU, tzn. na 3'-konci exonu je AG a intron začíná bázemi GU, ale pouze první báze je v sekvenci intronu vždy striktně zachována. Sekvence 3'-sestřihového místa, které je na 3'-konci intronu, končí bázemi AG.

Sestřihová místa jsou sestřihovým aparátem rozpoznávána s různou frekvencí, podle toho do jaké míry se jejich sekvence liší od sekvence konsenzuální. Pokud je sekvence shodná nebo téměř shodná s konsenzuální sekvencí, sestřih zde často probíhá konstitutivně. Pokud se sekvence liší, probíhá zde alternativní sestřih (AS).

Důležitou částí intronu je místo větvení, které obvykle bývá ve vzdálenosti 20-50 nukleotidů (nt) od 3'-sestřihového místa směrem k 5'-konci intronu. Nachází se zde adenosin nezbytný pro první transesterifikační reakci. Narozdíl od některých jiných eukaryot je sekvence místa větvení u člověka vysoce degenerovaná (YNYUNAY). Ve vyšších eukaryotických organismech je místo větvení následováno polypyrimidinovým úsekem.

Některé pre-mRNA obsahují exonové nebo intronové zesilovače/zeslabovače, sekvence, které ovlivňují konstitutivní i alternativní sestřih tím, že umožňují navázání regulačních proteinů, které buď stimulují tvorbu spliceosomu nebo znemožňují jeho sestavení.



Obr. 1: Umístění sekvencí důležitých pro sestřih pre-mRNA.

2.1.1 Malé jaderné RNA

Malé jaderné RNA (snRNA) jsou nekódující transkripty, z nichž některé se podílí na rozpoznávání sekvencí definujících místa sestřihu a jsou součástí spliceosomu. Samotná snRNA tvoří komplex s proteiny. Tento komplex se pak nazývá malá jaderná ribonukleoproteinová částice (snRNP). Výjimku tvoří U4 a U6 snRNA, které jsou k sobě komplementární a tvoří U4/U6 snRNP (Bringmann *et al.*, 1984, Hashimoto a Steitz, 1984). Mezi snRNP proteiny řadíme Sm-proteiny, Sm-podobné proteiny (*Sm-like*, LSm) a specifické snRNP proteiny. Na sestřihu se také podílí non-snRNP proteiny.

Malé jaderné RNA se dělí do dvou skupin podle obecných znaků sekvence a proteinových kofaktorů na Sm RNA a LSm RNA (Matera *et al.*, 2007).

První třídou jsou Sm RNA, pro které je typická 5'-trimethylguanosiновая čepička, vlásenka se smyčkou (*stem-loop*) na 3'-konci a místo pro navázání sedmi Sm-proteinů, které tvoří heteroheptamerní prstencovitou strukturu (Kambach *et al.*, 1999). Mezi Sm RNA se řadí U1, U2, U4, U4_{atac}, U5, U7, U11 a U12 RNA. Z uvedených Sm RNA není součástí spliceosomu pouze U7 RNA, která se podílí se na tvorbě 3'-konce histonové pre-mRNA (Galli *et al.*, 1983; Strub *et al.*, 1984).

Geny Sm RNA jsou přepisovány specializovanou formou RNA polymerasy II, která je funkčně podobná polymerase, která se uplatňuje při přepisu savčích genů kódujících proteiny. Po transkripci a úpravě 3'-konce je snRNA s 7-methylguanosiновой čepičkou exportována z jádra do cytoplasmy. Ribonukleoproteinová částice vzniká díky SMN

proteinovému komplexu (Fischer *et al.*, 1997). Čepička je hypermethylovaná na 2,2,7-trimethylguanidinovou čepičku (Mouaikel *et al.*, 2002). Do jádra se snRNP vrací pomocí importinu- β (Palacios *et al.*, 1997), pak jsou krátkou dobu v Cajalových tělících předtím, než se nahromadí v perichromatinových fibrilách a interchromatinových shlucích (Sleeman a Lamond, 1999).

Druhou třídou jsou LSm RNA, které mají 5'-methylguanidinovou čepičku, vlásenku se smyčkou na 3'-konci, která končí úsekem uridinů, které tvoří místo pro navázání jiného heteroheptamerického prstence složeného z LSm proteinů (Achsel *et al.*, 1999). Mezi LSm RNA se řadí U6 a U6_{atac}. Geny LSm RNA jsou přepisovány RNA polymerasou III a při transkripci jsou využívány externí promotory. Narozdíl od Sm RNA, LSm snRNA po svém vzniku vůbec neopouští jádro.

2.1.2 Průběh sestřihu prekurzorové mRNA

Jednotkou rozpoznávanou sestřihovým aparátem může být buď intron nebo exon. Evoluční výběr mezi rozpoznáním exonu nebo intronu mj. závisí na délkách intronů a exonů v daném genomu. Většina genů obratlovců má krátké exony, které jsou odděleny delšími introny, zatímco nižší eukaryotické organismy mají delší exony a kratší introny (Hawkins, 1988).

Pokud je intron delší než 200 nt, dochází v organismu především k rozpoznávání exonu, zatímco když je intron kratší než 200 nt, dochází především k rozpoznávání intronu (Fox-Walsh *et al.*, 2005; McGuire *et al.*, 2008). Rozpoznání exonu se uplatňuje u živočichů, zejména savců, zatímco rozpoznání intronu u hub a protist (Xiao *et al.*, 2007; McGuire *et al.*, 2008). Alespoň u některých druhů organismů včetně člověka se uplatňují různou měrou oba mechanismy (McGuire *et al.*, 2008). O tom, který z nich bude hrát roli v sestřihu konkrétního sestřihového místa, rozhoduje délka jednotlivých exonů a intronů.

Rozpoznání exonu zahrnuje interakce mezi faktory, které rozeznávají 5'-sestřihové místo a předcházející 3'-sestřihové místo, tj. sestřihová místa intronů ohraničujících exon

(Robberson *et al.*, 1990). Naproti tomu při rozpoznávání intronu dochází k interakcím mezi faktory rozeznávajícími 5'-sestřihové místo a následující 3'-sestřihové místo, tj. sestřihová místa téhož intronu. Při rozeznání prvního exonu dochází k vazbě proteinů na 7-methylguanosin trifosfátovou čepičkou na 5'-konci transkriptu a rozeznání posledního exonu je umožněno prostřednictvím 3'-sestřihového místa a polyadenylaci 3'-konce transkriptu (Izaurrealde *et al.*, 1994).

U většiny eukaryotních organismů se vyskytují dva typy spliceosomů: U2-dependentní (tzv. majoritní spliceosom) a U12-dependentní (tzv. minoritní spliceosom).

U2-dependentní spliceosom se účastní tzv. kanonického sestřihu, který katalyzuje sestřih U2-typu intronů, které obsahuje většina genů. U2-dependentní spliceosom se skládá z U1, U2, U4, U5 a U6 snRNA.

U12-dependentní spliceosom katalyzuje sestřih U12-typu intronů, jejichž výskyt je vzácnější. U člověka je asi 700 intronů typu U12 (Sheth *et al.*, 2006; Alioto, 2007). U některých eukaryot se minoritní spliceosom vůbec nevyskytuje (Sheth *et al.*, 2006). U12-dependentní spliceosom obsahuje U11, U12, U4_{atac}, U5, U6_{atac} snRNA.

Následující popis průběhu sestřihu se týká U2-dependentního spliceosomu.

Sestřih je zahájen vazbou U1 snRNP na 5'-sestřihové místo. U1 snRNA obsahuje vysoce konzervovanou sekvenci šesti nukleotidů, které se párují s 5'-sestřihovým místem pre-mRNA (Zhuang a Weiner, 1986). Tento komplex se nazývá E komplex, který je velmi nestabilní.

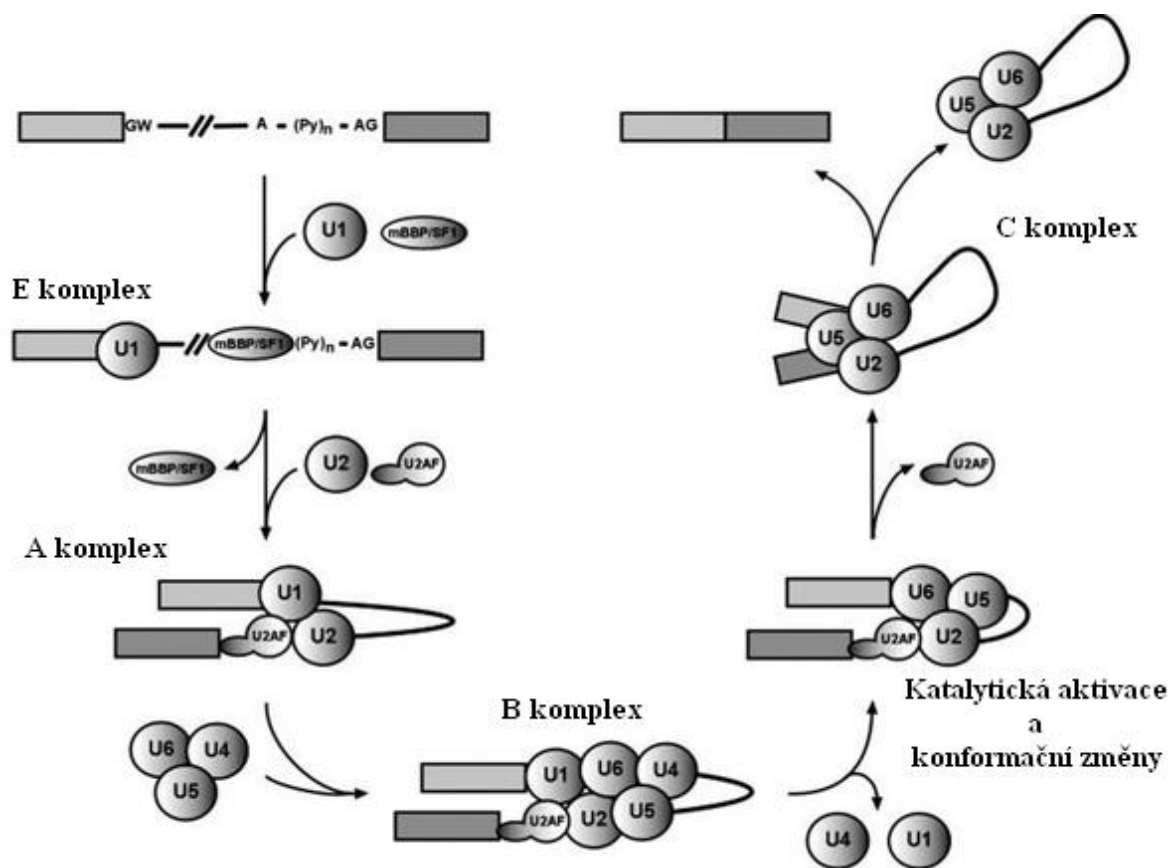
U2 snRNP, sestřihový faktor SF1 a pomocný faktor U2AF rozeznávají 3'-sestřihové místo. SF1 se váže na místo větvení (Berglund *et al.*, 1997). U2AF je heterodimer skládající se z U2AF65 a U2AF35. U2AF65 se váže na polypyrimidinový úsek (Zamore a Green, 1989) a U2AF35 rozeznává adenin a guanin ve 3'-sestřihovém místě (Wu *et al.*, 1999). U2AF umožňuje vznik komplementárního párování U2 snRNA a sekvence místa větvení (Parker *et al.*, 1987; Ruskin *et al.*, 1988), při kterém U2 snRNA nahrazuje SF1. Tento proces je ATP-dependentní (Zamore a Green, 1989). Vzniklý komplex se nazývá A komplex. Další

struktura vzniká připojením U4/U6 a U5 tri-snRNP. Celý komplex se pak nazývá B komplex.

Dále dochází ke změnám RNA-RNA interakcí a RNA-proteinových interakcí. Párování mezi U4 a U6 snRNA je narušeno spárováním U6 a U2 snRNA (Hausner *et al.*, 1990). Tím se uvolní 5'-konec U6 snRNA, který se následně páruje s 5'-sestřihovým místem, kde nahrazuje U1 snRNA. Komplex již neobsahuje ani U1 snRNA, ani U4 snRNA. Tyto změny umožňují těsné přiblížení 5'-sestřihového místa a místa větvení, mezi kterými dochází k první transesterifikaci. Destabilizace umožňuje vznik aktivovaného spliceosomu, B^{akt} komplexu.

Z aktivovaného B komplexu vzniká B* komplex, který katalyzuje první krok sestřihu. Poté vzniká C komplex, který sestává z jednoho volného exonu a lasovité struktury intron-exon (*lariat*). Komplex C katalyzuje druhý krok sestřihu. Poté spliceosom disociuje.

Sestřih sestává ze dvou transesterifikačních reakcí, které vyžadují ATP. První transesterifikací vzniká 2'-5'-fosfodiesterová vazba mezi 2'-hydroxylovou skupinou adenosinu v místě větvení a 5'-hydroxylovou skupinou guanosinu v 5'-sestřihovém místě. Touto reakcí vzniká lasovitá struktura (Grabowski *et al.*, 1984; Padgett *et al.*, 1984; Ruskin *et al.*, 1984). Druhá transesterifikační reakce probíhá mezi 3'-hydroxylovou skupinou na 3'-konci exonu, který se nachází před odstraňovaným intronem, a posledním nukleosidem v 3'-sestřihovém místě. Uvolněné exony se tak spojí ligací.



Obr. 2: Průběh sestřihu pre-mRNA (převzato a upraveno z Zaharieva et al., 2012).

Pro vytvoření spliceosomu jsou nezbytné SR proteiny. Tyto proteiny obsahují RNA-rozpoznávající oblast, která je následována doménou bohatou na Ser a Arg. Dalšími důležitými faktory jsou heterogenní ribonukleoproteiny (hnRNP).

2.2 Alternativní sestřih prekurzorové mRNA

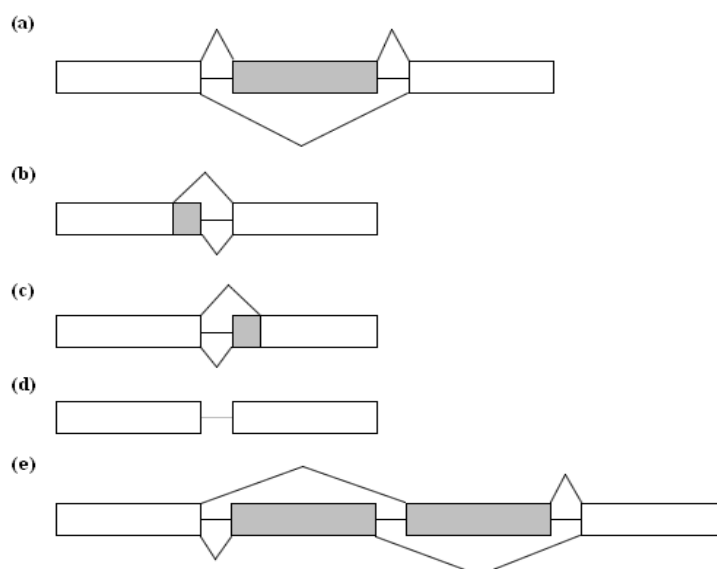
Některé exony se v mRNA vyskytují vždy a jejich sestřih je konstitutivní, jiné exony se v mRNA vyskytují pouze alternativně. Alternativní sestřih znamená, že z jednoho genu (jedné pre-mRNA) může vzniknout více různých isoform mRNA, které - pokud kódují proteiny - přispívají k rozmanitosti proteomu a diverzitě fenotypu.

Alternativní sestřih je častým jevem, dochází k němu až u 95 % multiexonových genů (Pan et al., 2008). Prostřednictvím AS může být jeden gen různě exprimován v závislosti

na tom, v jaké tkáni se nachází (Johnson *et al.*, 2003). Vytvářené isoformy jsou nejen tkáňově, ale i vývojově specifické, tzn. isoformy jsou potřebné v různém zastoupení v závislosti na stupni diferenciaci. Produkce tkáňově specifické isoformy je zajištěna sestřihovými faktory typickými pro danou tkáň. Příkladem takového faktoru může být NOVA-1, který je exprimován v různých oblastech mozku v různých koncentracích. Alternativní sestřih je také ovlivnitelný aktuálním stavem buňky, příkladem může být vznik alternativního transkriptu genu XBP-1 při ER-stresu. Zajímavé je, že AS v některých případech vede ke vzniku produktů s opačnou aktivitou (např. pro- a anti-apoptické varianty FAS, APAF-1, BCL-2 a některých kaspas). Volba mezi různými sestřihovými variantami hraje také roli v mezidruhové specifitě, tzn. u různých organismů se vytváří z jednoho genu mRNA s jinou exonovou strukturou a tedy i strukturně jiný protein.

Mechanismy vzniku alternativních transkriptů jsou: vynechání nebo zahrnutí alternativního exonu, retence intronu, využití alternativních sestřihových míst, navzájem se vylučující exony a alternativní první nebo poslední exon.

Alternativní exony vznikají duplikací již existujícího exonu v rámci jednoho genu, použitím mobilního elementu jako exonu, nebo změnou konstitutivního exonu na alternativní (Lev-Maor *et al.*, 2003; Lev-Maor *et al.*, 2007). Na výběru sestřihového místa se kromě zastoupení sestřihových faktorů a regulace jejich aktivity podílí také sekundární struktura pre-mRNA nebo jadéřková RNA (snoRNA).



Obr. 3: Mechanismy alternativního sestřihu: (a) alternativní exon, (b) alternativní 5'-sestřihové místo, (c) alternativní 3'-sestřihové místo, (d) retence intronu, (e) vzájemně se vylučující exony.

2.3 Mutace ovlivňující sestřih prekurzorové mRNA

Zatímco AS je přirozený jev, mutace genu mohou vést ke změněnému využití exonů v příslušné mRNA, tzv. aberantnímu sestřihu. Mutace mohou také narušit poměr zastoupení různých alternativních transkriptů.

Odhaduje se, že ze všech mutací, které vyvolávají onemocnění, je nejméně 15 % mutací, které mají vliv na sestřih pre-mRNA (Faustino a Cooper, 2003). Aberantní sestřih může být i důsledkem pozměněné koncentrace nebo funkce proteinů, které se na sestřihu podílejí. Je známo, že zastoupení alternativních transkriptů je významně pozměněno v případě některých nádorů.

Mutace se mohou vyskytnout kdekoli v sekvenci pre-mRNA a ovlivnit tak *cis*-faktory sestřihu. Mutace vyskytující se v sestřihových místech nebo místě větvení způsobují nedostatečnou komplementaritu podjednotek spliceosomu, nedojde tedy k vymezení exonu či intronu a na tomto elementu sestřih neproběhne. Mutace v sekvenci místa větvení vyvolávají retenci intronu nebo vynechání exonu. Tyto mutace jsou poměrně vzácné, stejně jako mutace v polypyrimidinovém úseku. Může ale také dojít k aktivaci tzv. kryptického

sestřihového místa, které je za fyziologických okolností sestřihovým aparátem ignorováno. V tomto případě pak vzniká exon s abnormální délkou. Mutace mohou způsobit nejen zánik místa sestřihu, ale i jeho vznik.

Pokud mutace proběhne v sekvenci zesilovače nebo zeslabovače, vede to ke snížení, resp. zvýšení pravděpodobnosti zahrnutí exonu do mRNA. Mutace v jiných sekvencích mohou také vytvořit zesilovač nebo zeslabovač.

V mRNA se může objevit pseudoexon, který vzniká sestřihem segmentu intronu. K tomu může dojít v důsledku vzniku sekvence odpovídající hranici intron-exon ve vhodné vzdálenosti od již přítomné kompatibilní sekvence schopné ohraničit exon, případně v důsledku zániku zeslabovače sestřihu.

Mutace můžou ovlivnit i *trans*-faktory sestřihu, což ovlivní větší množství genů, než mutace v *cis*-sestřihových faktorech, protože *trans*-faktory se podílejí na sestřihu pre-mRNA všech transkriptů nebo alespoň některých tříd.

Typ AS vyvolaného mutacemi ovlivňuje také to, zda je při sestřihu pre-mRNA rozpoznáván exon nebo intron. U organismů, u nichž preferenčně dochází k rozpoznání exonu, dochází často k AS v podobě vložených exonů, zatímco u organismů, u nichž dochází častěji k rozpoznání intronu, je nejčastějším typem AS retence intronu v sekvenci mRNA (McGuire *et al.*, 2008).

2.4 Regulace sestřihu prekurzorové mRNA

Sestřih je regulován *cis*-faktory sestřihu a *trans*-faktory sestřihu. Mezi *cis*-faktory sestřihu patří RNA elementy, které slouží buď jako zesilovače nebo zeslabovače. Dělí se na exonové sestřihové zesilovače a zeslabovače a na intronové sestřihové zesilovače a zeslabovače.

Přítomnost zeslabovačů snižuje pravděpodobnost zahrnutí exonu do mRNA, zatímco přítomnost zesilovačů tuto pravděpodobnost zvyšují. Tyto sekvence umožňují navázání *trans*-faktorů sestřihu, které aktivují nebo potlačují sestřih. Většina zesilovačů umožňuje

navázání SR proteinů a zeslabovače umožňují vazbu s hnRNP. Další *trans*-faktory sestřihu jsou tkáňově-specifické, např. zmiňovaný NOVA-1.

U většiny genů dochází k sestřihu pre-mRNA ko-transkripčně. Z toho plyne, že regulace sestřihu pre-mRNA může být zprostředkována i epigenetickou modifikací chromatinu, např. DNA methylací nebo acetylací a deacetylací histonů.

2.4.1 SR proteiny

SR proteiny, proteiny bohaté na Ser a Arg, mají vliv jak na konstitutivní, tak na alternativní sestřih. Obsahují jeden nebo dva N-terminální motivy rozpoznávající RNA a variabilně dlouhou a bohatě fosforylovanou C-terminální doménu bohatou na aminokyseliny Arg a Ser, tj. RS doménu. Zatímco motiv rozpoznávající RNA zajišťuje interakci se sekvencemi v pre-mRNA, RS doména umožňuje protein-proteinové interakce, které jsou důležité pro sestavení spliceosomu.

SR proteiny většinou pozitivně regulují sestřih, ale mohou mít také negativní aktivitu. Vazba na exonový zesilovač má za následek zahrnutí exonu do mRNA, vazba na intronovou sekvenci má opačný efekt, tj. způsobuje vynechání exonu (Dembowski *et al.*, 2012; Erkelenz *et al.*, 2013). Regulace aktivity SR proteinů probíhá pomocí methylace, acetylace a fosforylace.

Gen pro SR protein SF2/ASF je řazen mezi proto-onkogeny (Karni *et al.*, 2007). SF2/ASF je v některých nádorech exprimován ve zvýšené míře, přičemž gen, který ho kóduje, je amplifikován. SF2/ASF se podílí například na vzniku anti-apoptických mRNA isoform genů BIN1, Bim (Anczuków *et al.*, 2012) a kaspasy 9 (Shultz *et al.*, 2011) nebo na angiogenezi, jelikož SF2/ASF reguluje VEGF isoformy (Amin *et al.*, 2011).

2.4.2 Heterogenní ribonukleoproteiny

Heterogenní ribonukleoproteiny (hnRNP) se dělí na tři skupiny: A, B a C. Obsahují různé motivy rozpoznávající RNA i domény bohaté na Gly nebo jiné aminokyseliny, které slouží jak k vazbě s RNA, tak k protein-proteinovým interakcím. Patří sem např. hnRNP A1 nebo protein vázající se na polypyrimidinový úsek (PTB). Jejich funkce je rozdílná od SR proteinů spíše negativní.

2.5 Farmakologické ovlivnění sestřihu prekurzorové mRNA

Aberantní sestřih v důsledku mutací je příčinou mnoha nemocí, pro které většinou dodnes neexistuje léčba. V některých případech je ale možné defekt korigovat farmakologicky. Většinou jde o pozorování *in vitro*, ale některé látky jsou již v klinickém hodnocení. Farmakologicky lze ovlivnit jak expresi jednotlivých genů, ve kterých je mutace příčinou aberantního sestřihu, tak aberantní sestřihový aparát. Značně neprobádanou oblastí je role (alternativního) sestřihu v toxickém působení xenobiotik (Zaharieva *et al.*, 2012).

2.5.1 Antisense oligonukleotidy

Jednou z možností ovlivnění sestřihu je použití antisense oligonukleotidů (ASO). Léčba pomocí ASO využívá 15-20 nt dlouhé oligonukleotidy, které se komplementárně vážou na pre-mRNA a blokují sekvence, které jsou pak nedostupné pro spliceosom. Antisense oligonukleotidy, které se vážou na sestřihová místa nebo zesilovače, způsobují vynechání exonu a ASO vázající se na zesilovač způsobují zahrnutí exonu do mRNA.

Obecným problémem podávání ASO je jejich biologická dostupnost. Některé orgány jsou s použitím současných technologií daleko přístupnější než jiné (játra vs. mozek). K dosažení dostatečných koncentrací v místě účinku mohou být oligonukleotidy inkorporovány do liposomů nebo konjugované s faktory, které rozpoznávají buněčný povrch. Alternativou je transport pomocí virových vektorů.

Terapie využívající ASO je v klinických testech pro léčbu spinální svalové atrofie (SMA), jejíž příčinou je mutace v genu SMN1. V genomu se nachází i gen SMN2, jehož transkript ale nezahrnuje exon 7. Byl například navržen oligonukleotid ASO-10-27, který se váže na intronový zeslabovač SMN2, což způsobí zahrnutí exonu 7 mRNA *in vivo* v myším SMA modelu (Hua *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2011).

U Duchennovy svalové dystrofie (DMD) je mutovaný gen pro dystrofin, který spojuje cytoskelet a extracelulární matrix svalových vláken. Vzniklý protein je nefunkční díky bodové mutaci a posunu čtecího rámce. Pro některé frekventované mutace se vyvíjí terapie, které brání rozpoznání určitého exonu spliceosomem. Vynechání tohoto exonu vede k obnově čtecího rámce a částečnému obnovení funkce proteinu. V klinickém hodnocení se nachází ASO vážící se na exon 51: 2'-O-methyl fosforothionát a fosfordiamidát morfolinové oligomery (Kinali *et al.*, 2009; van Deutekom *et al.*, 2007).

2.5.2 Nízkomolekulární modulátory

Další možností farmakologického ovlivnění sestřihu pre-mRNA jsou nízkomolekulární modulátory. Modulátory sestřihu se dělí na obecné a specifické.

Obecné regulátory ovlivňují sestavení spliceosomu, případně modulují kinetiku sestřihové reakce. Ovlivňují tak nejen AS ale i konstitutivní sestřih. Látky se uplatňují ve studiu spliceosomu nebo jako protinádorová léčiva. Předpokládá se, že nádorové buňky budou k inhibici sestřihu citlivější. Nádorové buňky mají významně dysregulovaný sestřih, přičemž prostřednictvím AS se tvoří isoformy mRNA, které vedou k proliferaci, potlačují apoptózu a vedou k rezistenci k terapii.

Specifické modulátory mají vliv na AS určitého genu nebo třídy genů se společným mechanismem regulace AS. Mohou bránit rozpoznání alternativních exonů nebo bránit vazbě některých sestřihových faktorů. Díky specifitějšímu působení mohou tyto látky najít uplatnění v onemocněních způsobených aberantním sestřihem konkrétních genů např. v důsledku mutace.

Následující podkapitoly čerpají z prací Zaharieva *et al.* (2012), Bonnal *et al.* (2012) a Ohe a Hagiwara (2015). Přehled modulátorů z těchto článků byl doplněn o další, zejména později objevené modulátory. Pro jednotlivé modulátory byly vyhledány aktuální informace zejména o mechanismu účinku.

2.5.2.1 Obecné inhibitory sestřihu prekurzorové mRNA

Obecné inhibitory ovlivňují procesy účastníci se sestřihu všech nebo alespoň podstatné části multiexonových genů. Patří sem inhibitory maturace a funkcí spliceosomu, z nichž mnohé se vážou na podjednotku SF3b U2-snRNP. Jiné látky ovlivňují aktivitu obecných sestřihových faktorů jako je SF2/ASF. Vzhledem k tomu, že k sestřihu dochází ko-transkripčně, velké množství transkriptů je ovlivněno i látkami modulujícími acetylaci histonů.

2.5.2.1.1 Inhibitory zrání a funkce spliceosomu

Do této skupiny se řadí FR901464 a jeho deriváty (spliceostatin A, meayamycin), pladienolid a jeho deriváty (FD-895, E7107), tetrocarcin A a jeho indolový a naftazarinový derivát, thailanstatiny a další látky jako isoginkgetin a herboxidien.

FR901464 je přírodní látka izolovaná z *Pseudomonas* sp., která má protinádorovou aktivitu *in vitro* a *in vivo* (Nakajima *et al.*, 1996a; Nakajima *et al.*, 1996b). Spliceostatin A je stabilnější methylovaný derivát FR901464. Obě molekuly inhibují sestřih *in vitro* tím, že se vážou na SF3b, součást U2 a U12 snRNP (Kaida *et al.*, 2007). Spliceostatin A vazbou na SF3b zamezuje přeměně komplexu A na komplex B (Roybal a Jurica, 2010). Interakce SF3b s pre-mRNA je nutná pro plnohodnotnou vazbu U2 snRNA v místě větvení a spliceostatin A brání správnému rozpoznání místa větvení (Corrionero *et al.*, 2011). Komplementarita U2 RNA a sekvence místa větvení ovlivňuje citlivost jednotlivých sestřihových míst k spliceostatinu A. Protinádorový účinek je pravděpodobně důsledkem inhibice sestřihu některých regulátorů buněčného cyklu (Corrionero *et al.*, 2011). Meayamycin je stabilnější derivát FR901464 s antiproliferativními účinky v nádorových

liniích (Albert *et al.*, 2007), které jsou způsobeny inhibicí sestřihu pre-mRNA prostřednictvím inhibice sestavení komplexu A (Albert *et al.*, 2009).

Pladienolid je přirozený makrolid, který byl izolován z *Streptomyces platensis* a který má antiproliferativní a protinádorovou aktivitu jak *in vitro*, tak *in vivo* (Mizui *et al.*, 2004). Váže se na SF3b komplex, konkrétně na podjednotku SF3b1 (SAP130), což je příčinou jeho protinádorové aktivity (Kotake *et al.*, 2007; Yokoi *et al.*, 2011). Hodnoty IC₅₀ v testech toxicity na některých nádorových liniích se pohybovaly v jednotkách nanomolů (Sato *et al.*, 2014). FD-895 byl izolován z *Streptomyces hygroscopicus* (Seki-Asano *et al.*, 1994). Pladienolid B a FD-895 modulují sestřih *in vivo* v myších lymfomech (Kashyap *et al.*, 2015).

E7107, syntetický derivát pladienolidu D, reguluje rovnováhu mezi dvěma konformacemi U2 snRNA, což má vliv na vazbu na pre-mRNA (Folco *et al.*, 2011). E7017 byl testován v klinických zkouškách jako potenciální lék na solidní nádory, při kterých se objevil nežádoucí účinek v podobě ztráty zraku (Hong *et al.*, 2014).

Sudemyciny jsou syntetické látky, které v molekule obsahují předpokládaný společný farmakofor FR901464 a pladienolidu B. Inhibují sestřih *in vitro* a *in vivo*, zastavují buněčný cyklus a mění lokalizaci sestřihových faktorů (Lagisetti *et al.*, 2008; Lagisetti *et al.*, 2009). Sudemycin C1 má vliv na sestřih genu kódujícího MDM2, kaspasu 9 a kaspasu 2 (Fan *et al.*, 2011). Interakci sudemycinu s předpokládaným cílem prokázal Convertini *et al.* (2014): sudemycin E se vázal na SF3b1 podjednotku U2 snRNP a způsoboval disociaci komplexu U2 snRNP.

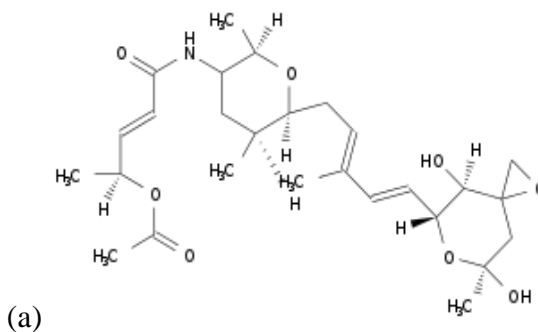
Tetrocarcin A je přírodní antibiotikum s protinádorovou aktivitou (Tomita *et al.*, 1980), NSC635326 je indolový derivát a NSC659999 je naftazarinový derivát, který má také protinádorovou aktivitu. Všechny tři látky inhibují sestřih pre-mRNA *in vitro*: tetrocarcin A způsobuje kumulaci komplexu A, indolový derivát zamezuje vzniku všech stádií spliceosomu a naftazarinový derivát způsobuje kumulaci komplexu B (Effenberger *et al.*, 2013). Mechanismus účinku NSC659999 zřejmě zahrnuje vznik

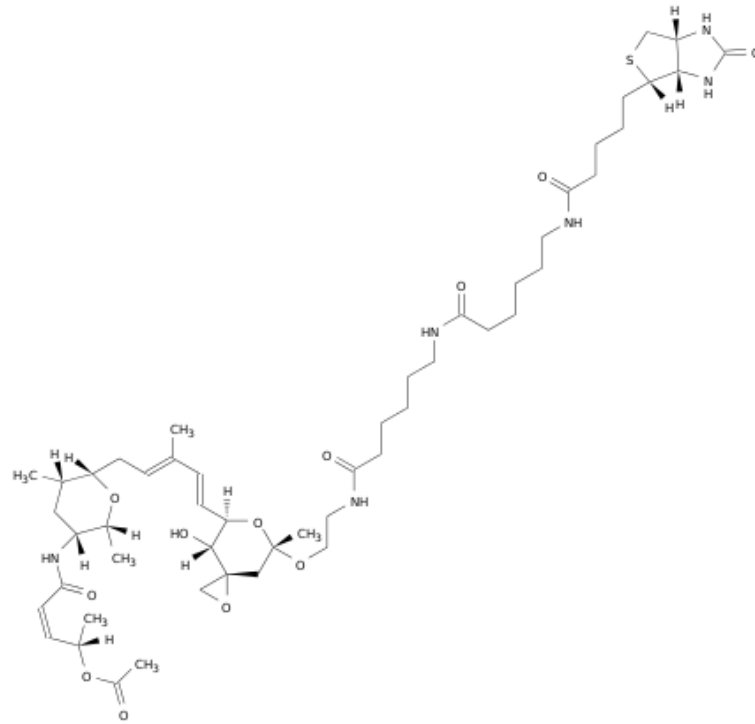
reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou inaktivovat proteinovou fosfatasu 2A (PP2A) (Effenberger *et al.*, 2013).

Thailanstatiny A, B a C byly izolovány z *Burkholderia thailandensis*. *In vitro* mají antiproliferativní účinek a inhibují sestřih pre-mRNA, z nichž největší inhibiční aktivitu má thailanstatin A, jehož aktivita je srovnatelná s aktivitou FR901464 (Liu *et al.*, 2013a).

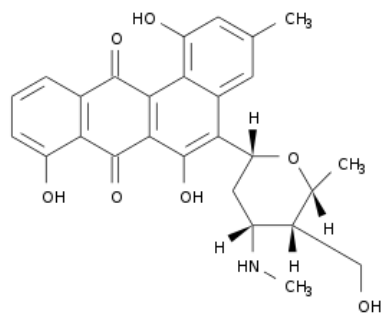
Isoginkgetin je přirozeně se vyskytující biflavonoid, který je možno nalézt např. v Jinanu dvoulaločném (*Ginkgo biloba*). Má protinádorový účinek a inhibuje buněčnou invazi (Yoon *et al.*, 2006). Isoginkgetin ovlivňuje U2- i U12-dependentní sestřih. Inhibuje vznik komplexu B pravděpodobně tím, že brání spojení U4/U6 a U5 tri-snRNP a komplexu A a komplex A se poté kumuluje (O'Brien *et al.*, 2008). Účinek byl pozorován v mikromolárních koncentracích jak *in vitro*, tak v lidských ledvinových embryonálních buňkách (HEK-293) (O'Brien *et al.*, 2008). Inhibice sestřihu je zřejmě mechanismem jeho protinádorové aktivity (O'Brien *et al.*, 2008).

Herboxidien byl izolován ze *Streptomyces chromofuscus* (Miller-Wideman *et al.*, 1992). Váže se na podjednotku SF3b1 (SAP155) a má protinádorovou aktivitu (Hasegawa *et al.*, 2011).

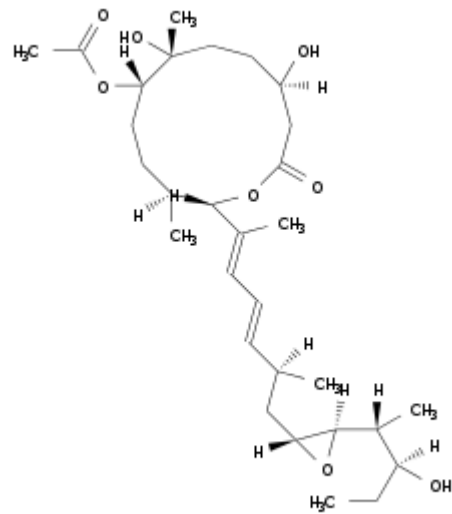




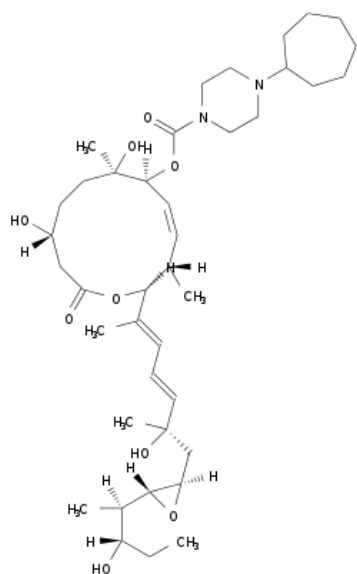
(b)



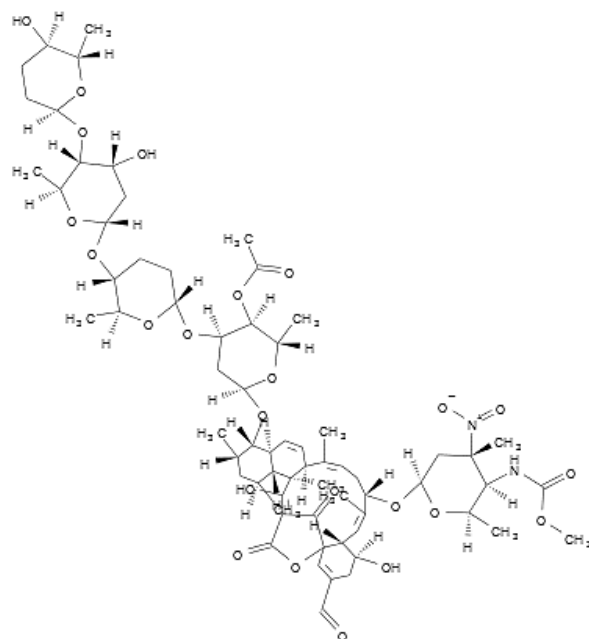
(c)



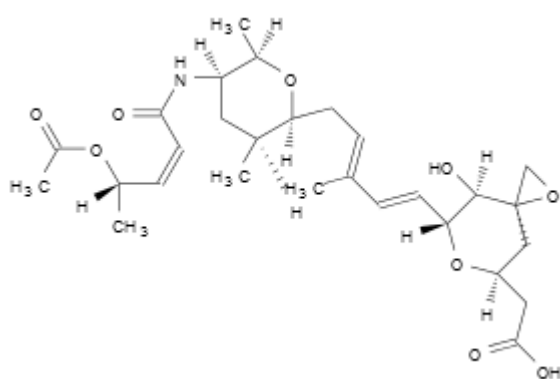
(d)



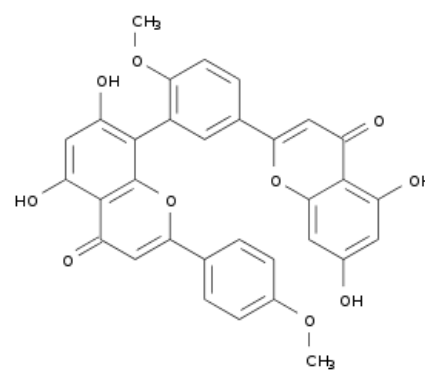
(e)



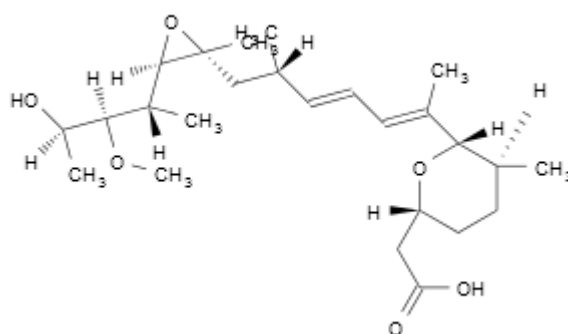
(f)



(g)



(h)



(ch)

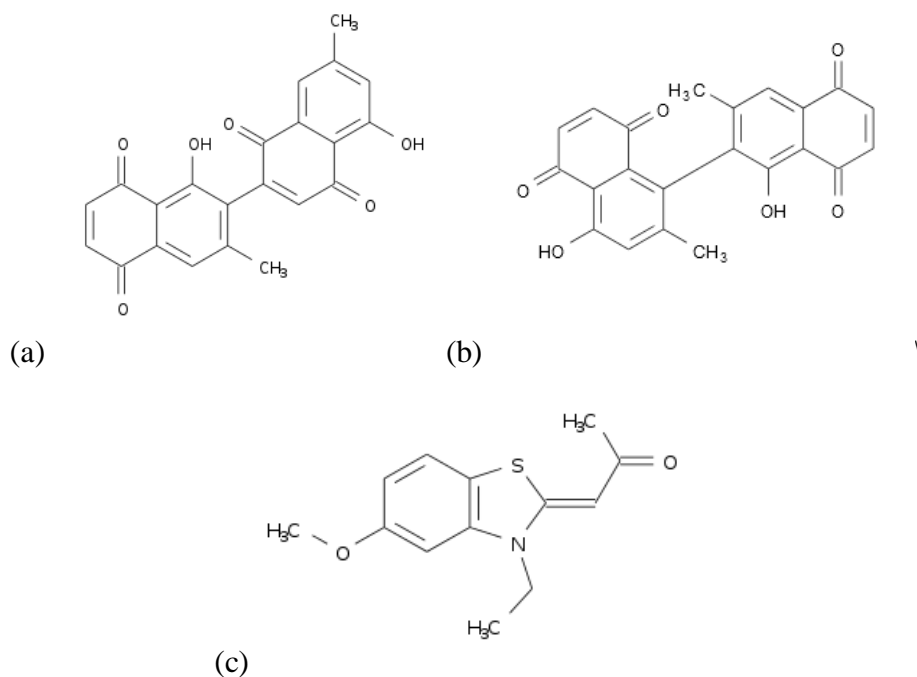
Obr. 4: Inhibitory zrání a funkce spliceosomu: (a) FR901464, (b) spliceostatin A, (c) meayamycin, (d) pladienolid B, (e) E7107, (f) tetrocarcin A, (g) thailanstatin A, (h) isoginkgetin, (ch) herboxidien.

2.5.2.1.2 Inhibitory SF2/ASF-závislého sestřihu

Do této skupiny patří deriváty diospyrinu a TG003.

Diospyrin je přírodní bisnaftochinoid získaný z borky *Diospyros montana* Roxb. (Hazra *et al.*, 1984), který inhibuje topisomerasu I (topo I) (Ray *et al.*, 1998). Isodiospyrin se získává z *Diospyros morrisiana* a také inhibuje topo I (Ting *et al.*, 2003). Diospyrin a jeho syntetické deriváty způsobují apoptózu v různých typech nádorových buněk (Chakrabarty *et al.*, 2002). Diospyrin a jeho hydrochinonový derivát inhibují fosforylaci SF2/ASF a inhibují sestřih pre-mRNA (Tazi *et al.*, 2005). Diospyrin brání navázání U4/U6 a U5 tri-snRNP, hydrochinonový derivát inhibuje sestřih v jeho prekatalytickém kroku (Tazi *et al.*, 2005). Jiné deriváty diospyrinu znemožňují druhý katalytický krok (Tazi *et al.*, 2005).

TG003 je derivát benzathiazolu, který inhibuje kinasovou aktivitu Clk1/Sty a Clk4 *in vitro* a v buněčných liniích (Muraki *et al.*, 2004). Clk1/Sty kinasy jsou podtřídou Cdc2-podobných kinas (*Cdc2-like*, Clk) podílející se na fosforylaci SR proteinů *in vitro* a SF2/ASF *in vivo* (Nayler *et al.*, 1997). TG003 inhibuje SF2/ASF-závislý sestřih *in vitro* prostřednictvím inhibice Clk (Muraki *et al.*, 2004). Clk1/Sty má vliv na AS vlastní pre-mRNA, při níž indukuje vznik isoformy, která neobsahuje exon 2, ze které vzniká nefunkční protein. TG003 má vliv na AS Clk1/Sty a inhibuje vynechání exonu a způsobuje vznik delší isoformy Clk1/Sty mRNA (Muraki *et al.*, 2004). TG003 prokázal také pozitivní účinky v buněčných liniích odvozených od pacientů s DMD. TG003 selektivně indukoval vynechání exonu 31 u jednoho pacienta a exonu 27 u jiného pacienta s bodovými mutacemi, které narušují regulační sekvenci (exon 31), resp. způsobují vznik stop kodonu (exon 27); TG003 ale nemá vliv na exony 27 a 31 bez bodové mutace (Nishida *et al.*, 2011).



Obr. 5: Modulátory SF2/ASF-závislého sestřihu: (a) diospyrin, (b) isodiospyrin, (c) TG003.

2.5.2.1.3 Inhibitory histonových deacetylás a histonových acetyltransferás

Histonové deacetylasy (HDAC) regulují genovou transkripci deacetylací Lys v histonech. Deacetylace způsobuje nepřístupnost chromatinu pro transkripci, opačnou funkci mají histonové acetyltransferasy (HACT).

Modifikací histonů lze přímo ovlivnit AS (Luco *et al.*, 2011; Hnilicová *et al.*, 2011). Je to dáno mj. i tím, že rozpoznání exonů a sestřih probíhá ko-transkripčně na nascentní pre-mRNA. Kromě toho mohou HDAC a HACT modulovat expresi regulátorů sestřihu, případně jejich acetylaci.

Mezi inhibitory HDAC patří dihydrokumarin, splitomicin jako zástupci NAD-dependentních HDAC (Olaharski *et al.*, 2005; Bedalov *et al.*, 2001) a vorinostat (suberoylanilid hydroxamová kyselina, SAHA), který inhibuje Zn²⁺-dependentní třídu HDAC (Richon *et al.*, 1998).

Suberoylanilid hydroxamová kyselina (SAHA) je významné protinádorové léčivo vorinostat, dihydrokumarin je kosmetické a potravinové aditivum, které je obsaženo

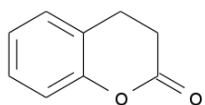
v Komonici lékařské (*Melilotus officinalis*) a splitomicin je syntetický inhibitor Sirt2 v kvasinkách (Bedalov *et al.*, 2001).

U2- i U12-dependentní sestřih pre-mRNA je *in vitro* inhibován těmito třemi látkami před první katalytickou reakcí: vzniká komplex B, který ale není aktivovaný (Kuhn *et al.*, 2009). Sestřih ovlivňují i další hydroxamové kyseliny a jejich estery inhibující HDAC: MS-275, scriptaid, trichostatin A (Kuhn *et al.*, 2009), které jsou také HDAC (Saito *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 1990).

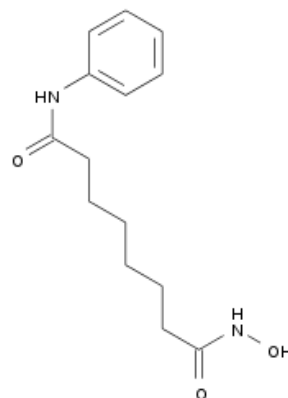
Existují i další inhibitory HDAC, které ovlivňují sestřih daleko selektivněji. O těchto modulátorech pojednává podkapitola Modulátory alternativního sestřihu.

Mezi inhibitory HACT, které inhibují sestřih, patří antibakteriálně aktivní anakardová kyselina, antioxidant garcinol a protinádorové léčivo butyrolakton 3. Anakardová kyselina a garcinol jsou inhibitory dvou skupin HACT, a to p300/CBP a Gcn5/PCAF (Balasubramanyam *et al.*, 2003, Balasubramanyam *et al.*, 2004), zatímco butyrolakton 3 specificky inhibuje pouze Gcn5/PCAF (Biel *et al.*, 2004).

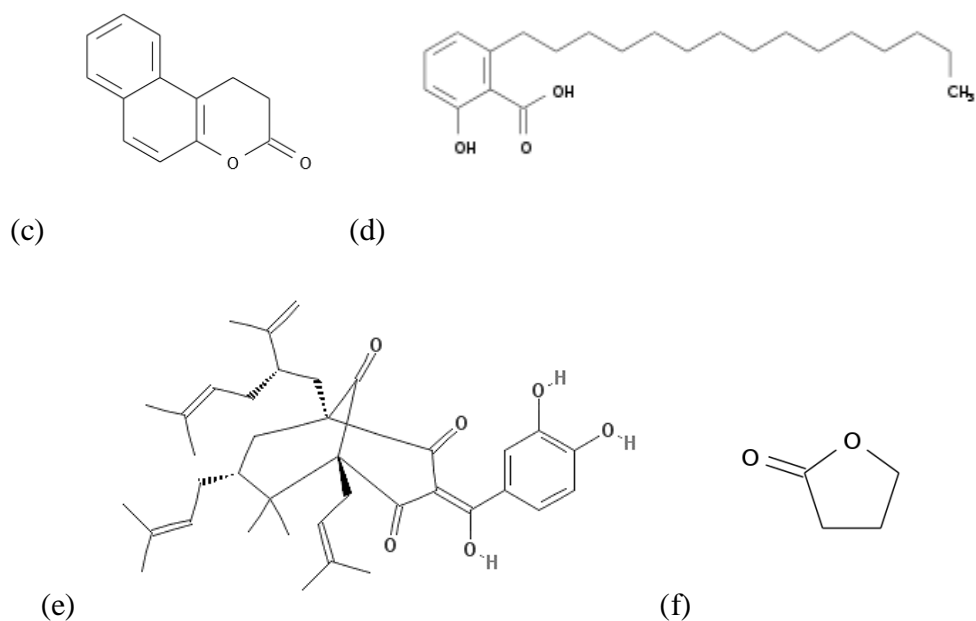
Všechny tři látky *in vitro* inhibují spliceosom před první katalytickou reakcí a ovlivňují sestřih U2- i U12-typ intronů (Kuhn *et al.*, 2009). V přítomnosti kyseliny anakardové dochází k hromadění komplexu A, což naznačuje buď inhibici vzniku komplexu B nebo destabilizaci komplexu B po jeho vzniku, garcinol umožňuje vznik komplexu A, který ale není stabilní a butyrolakton 3 umožňuje vznik komplexu B, ale nedochází k jeho aktivaci (Kuhn *et al.*, 2009).



(a)



(b)



Obr. 6: Inhibitory zrání a funkce spliceosomu – inhibitory HDAC a HACT: (a) dihydrokumarin, (b) SAHA, (c) splitomicin, (d) anakardová kyselina, (e) garcinol, (f) butyrolakton 3.

2.5.2.2 Modulátory alternativního sestřihu

Tato kapitola se zabývá především látkami modulujícími AS. Tyto látky jsou obvykle daleko specifitější než látky v předešlé kapitole a je možné je potenciálně použít v terapii konkrétních onemocnění. V řadě případů je cílem terapie zvýšit zastoupení jedné ze sestřihových variant. Materiál je členěn podle jednotlivých cílů modulace. Pokud je daný cíl modulován některou z látek z předešlé kapitoly, je to také zmíněno.

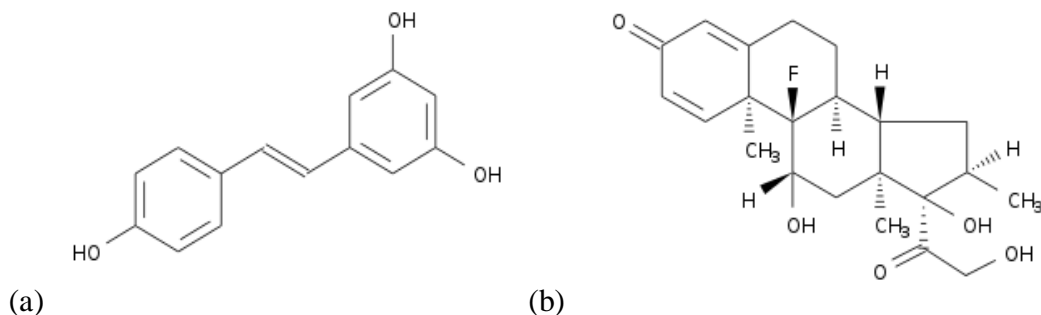
2.5.2.2.1 Insulinový receptor

Gen pro lidský insulinový receptor se nachází na chromosomu 19 (Yang-Feng *et al.*, 1985). Receptor má dvě isoformy, A a B: isoforma B vzniká z mRNA, která obsahuje exon 11 narozdíl od mRNA, která tvoří receptorovou isoformu A (Seino a Bell, 1989).

U pacientů s myotonicou dystrofií typu 1 (MD1) dochází ke vzniku isoformy neobsahující exon 11, která tvoří receptor s nižší afinitou k inzulinu, což vede ke vzniku

glukosové intolerance u těchto pacientů (Savkur *et al.*, 2001). Resveratrol zvyšuje množství transkriptu, který obsahuje exon 11 v MD1 fibroblastech (Takarada *et al.*, 2014).

Dexamethason je kortikosteroid, který zvyšuje množství mRNA insulinového receptoru a podíl isoformy B receptoru pro insulin v lidské hepatomální buněčné linii (Kosaki a Webster, 1993).



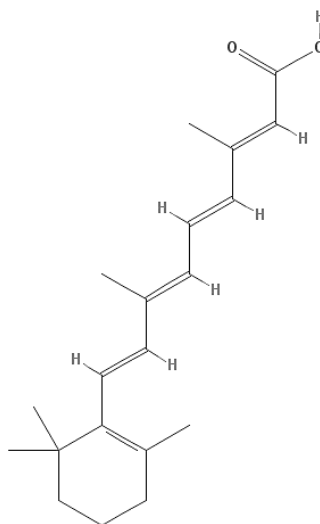
Obr. 7: Modulátory sestřihu genu pro insulinový receptor: (a) resveratrol, (b) dexamethason.

2.5.2.2.2 Neurogeny

Mezi neurogeny, jejichž AS lze farmakologicky ovlivnit patří gen pro amyloidní prekurzorový protein, CHRNA1, dopaminový receptor D2, IKBKAP, gen pro kanál pro vápenaté ionty, MAPT, gen pro neurální buněčnou adhezni molekulu, NF1, gen pro N-methyl-D-aspartátový receptor, gen pro GABA receptor typu A, Slo, gen pro serotoninový receptor 2c a SMN2.

Amyloidní prekurzorový protein

Nadbytek amyloidního prekurzorového proteinu (APP) je spojován s Alzheimerovou chorobou. Dimethylsulfoxid (DMSO), polární rozpouštědlo, zvyšuje celkové množství APP a množství isoformy APP 695, zatímco snižuje množství isoformy APP 770 (Pan *et al.*, 1993). Opačný efekt má retinová kyselina (Pan *et al.*, 1993).

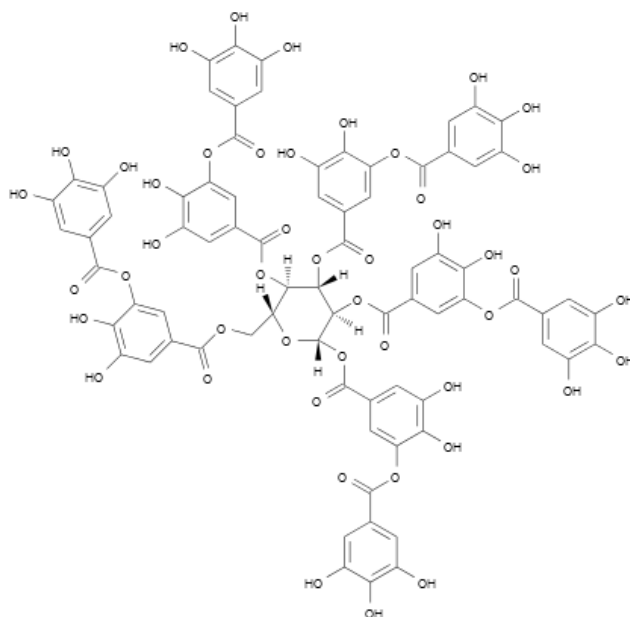


Obr. 8:Modulátor sestřihu genu pro amyloidní prekurzorový protein: retinová kyselina.

CHRNA1

Kongenitální myastenický syndrom je způsoben intronovou mutací IVS3-8G>A v genu CHRNA1, který kóduje α -podjednotku svalového nikotin-acetylcholinového receptoru (Masuda *et al.*, 2008). Mutace zamezuje navázání hnRNP H, což vede k zahrnutí P3A exonu (Masuda *et al.*, 2008). Takto vzniklá mRNA nekóduje funkční protein. Pokud se na polypyrimidinový úsek naváže PTB, exon P3A není rozpoznán a do finálního transkriptu není zahrnut (Bian *et al.*, 2009).

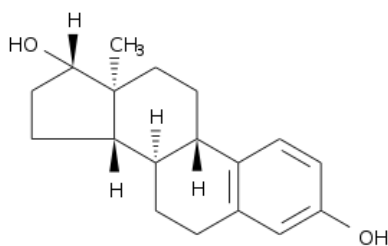
Tříslová kyselina patří do skupiny tříslovin (taninů), což jsou polyfenoly rostlinného původu, které se nacházejí v oříšcích, čaji, kávě a červeném víně. Tříslová kyselina zvyšuje expresi PTB, což vede k vynechání exonu P3A (Bian *et al.*, 2009).



Obr. 9: Modulátor sestřihu genu *CHRNA1*: tříslová kyselina.

Dopaminový receptor D2

Mediátorová RNA pro dopaminový D2 receptor se vyskytuje ve dvou isoformách: kratší D2S a delší D2L, která obsahuje exon 6 (Dal Toso *et al.*, 1989; Giros *et al.*, 1989). Ethanol a estradiol zvyšuje zastoupení isoformy D2L a snižuje množství D2S v primární hypofyzární buněčné linii i v krysím předním laloku hypofýzy (Guivarc'h *et al.*, 1998; Oomizu *et al.*, 2003).



Obr. 10: Modulátor sestřihu genu pro dopaminový receptor D2: estradiol.

IKBKAP

Familiární dysautonomie (FD), nazývaná také Riley-Day syndrom, je dědičnou autosomálně recesivní senzoričnou neuropatií typu III. Příčinou onemocnění jsou mutace, ke kterým dochází v genu IKBKAP, který se nachází na chromosomu 9q31 (Blumenfeld *et al.*, 1993). Onemocnění má vysoké zastoupení u židovské populace Aškenázů (Maayan *et al.*, 1987).

Jako samostatné onemocnění byla FD poprvé popsána roku 1949 a jako hlavní projevy byly uvedeny: omezená tvorba slz, pocení, nadměrné slinění a zvýšení krevního tlaku při úzkostných stavech, tvorba ostře ohraničených zarudlých kožních skvrn, tachykardie, zvracení, emocionální labilita (Riley *et al.*, 1949). Dalšími projevy je snížená citlivost k bolesti a teplotě, kardiovaskulární potíže a gastrointestinální dysfunkce (Axelrod *et al.*, 1974; Axelrod 1996). Familiární dysautonomie ovlivňuje rozvoj senzoričnou, sympatických a parasympatických neuronů.

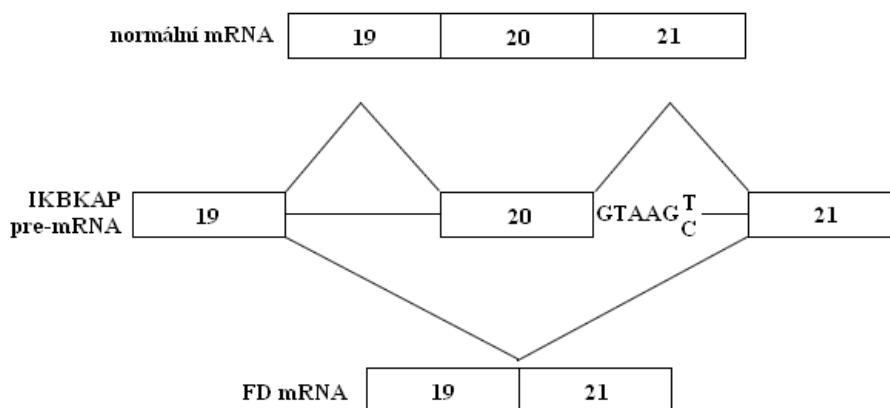
Gen IKBKAP kóduje protein, který byl pojmenován jako s IκB kinasovým komplexem asociovaný protein neboli IKAP (Cohen *et al.*, 1998), ale později byla tato interakce vyloučena (Krappmann *et al.*, 2000). IKBKAP se podílí na expresi genů v oligodendrocytech a vzniku myelinu, což vysvětluje demyelinaci při ztrátě funkce IKBKAP (Cheishvili *et al.*, 2007).

IKAP má mnoho funkcí, které plní jak v jádře, tak v cytoplasmě. IKAP je podjednotkou Elongátoru, který se podílí na transkripční elongaci (Hawkes *et al.*, 2002). Jaderný IKAP je lidský elongační protein hELP1, který se řadí do rodiny ELP1/IKA1 a jeho molekulová hmotnost je 150 kDa. Snížením množství IKAP a tedy i Elongátoru vede k omezené elongaci při transkripci několika genů, např. těch, které se podílejí na motilitě buněk (Close *et al.*, 2006). Ve fibroblastech odvozených od FD pacientů je redukována acetylace histonu H3 (Hawkes *et al.*, 2002).

Cytoplasmatický IKAP se podílí na regulaci a aktivaci odpovědi na stres prostřednictvím c-Jun N-terminální kinasové signální dráhy (Holmberg *et al.*, 2002). Váže se také na NF-κ-B-indukující kinasu (NIK) a IκK. Podílí se na regulaci exocytosy a

modifikaci tRNA v kvasinkách (Jablonowski *et al.*, 2006; Rahl *et al.*, 2005). Fibroblasty odvozené od FD pacientů a mozek FD pacientů obsahuje snížené množství mcm⁵s²U nukleosidů v tRNA (Karlsborn *et al.*, 2014). IKAP se podílí na acetylaci α -tubulinu, migraci a rozvětvení krysích korových neuronů (Creppe *et al.*, 2009). IKAP ovlivňuje propojení neuronů v kultuře dorsálních kořenových ganglií (Abashidze *et al.*, 2014).

Pacienti mají alespoň v jedné kopii IKBKAP mutaci IVS20+6T>C a ve většině případů jsou homozygoté. Mutace IVS20+6T>C se nachází v intronu 20 v donorovém 5'-sestřihovém místě. Mutace zřejmě znemožňuje interakci s U1 snRNA a vede k vynechání exonu 20 při sestřihu (Anderson *et al.*, 2001; Slaugenhaupt *et al.*, 2001). Vytváří se dvě isoformy mRNA, z nichž jedna postrádá exon 20, který je z pre-mRNA odstraněn spolu s okolními introny. Vynechání exonu 20 posunuje čtecí rámec a vytvoří se předčasný terminační kodon v exonu 21.



Obr. 11: Sestřih IKBKAP pre-mRNA a vznik dvou různých isoform mRNA.

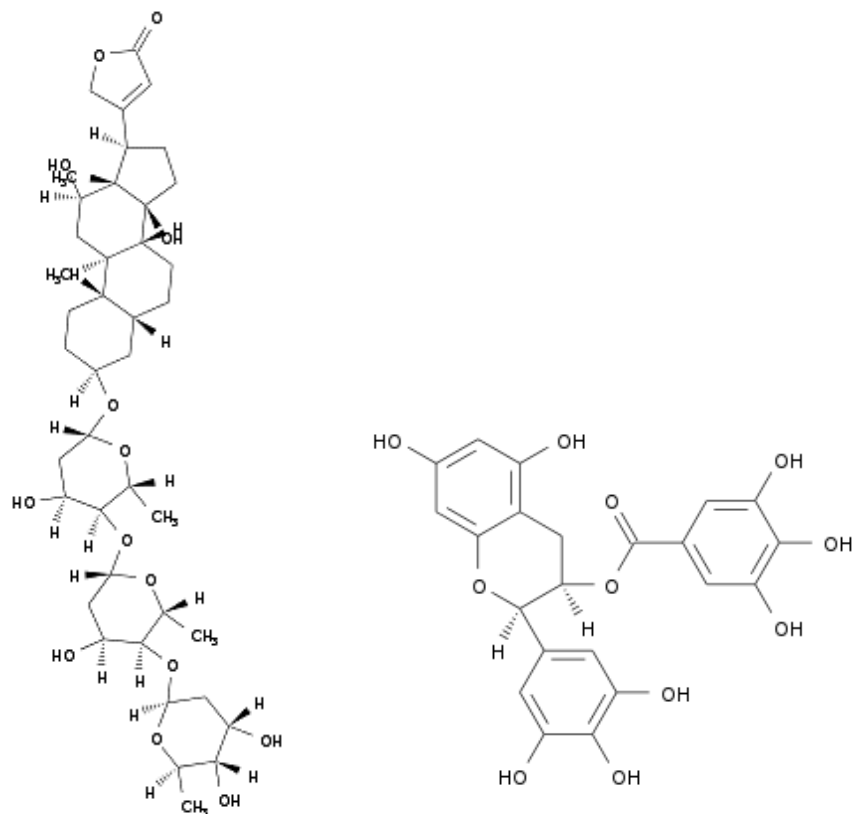
Druhou vzácnější mutací je bodová transverze 2390G->C v exonu 19. Výsledkem této mutace je Arg>Pro v aminokyselinovém zbytku 696 proteinu IKAP (R696P) a přerušení místa pro fosforylaci Ser/Thr kinasou.

Třetí popsanou mutací je Pro>Leu mutace v exonu 26, která zřejmě také znemožňuje fosforylaci (Leyne *et al.*, 2003).

Digoxin se používá při léčbě selhání srdce a atriální fibrilace. Zvyšuje množství IKAP proteinu a IKBKAP mRNA v plné délce za současného snižování množství transkriptu, který neobsahuje exon 20 ve fibroblastech odvozených od FD pacientů prostřednictvím snížením exprese SRp20 (Liu *et al.*, 2013b).

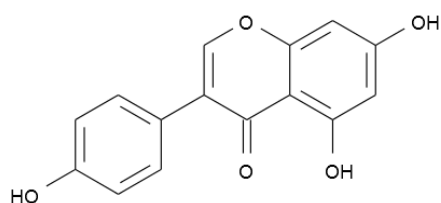
Epigallokatechin galát (EGCG) je polyfenolový antioxidant, který se vyskytuje v zeleném čaji. Zvyšuje hladinu IKBKAP mRNA v plné délce a množství IKAP proteinu ve fibroblastových liniích odvozených od FD pacientů (Anderson *et al.*, 2003a). Snižuje hladinu hnRNP A2/B1 (Fujimoto *et al.*, 2002), což zřejmě umožňuje využití 5'-sestřihového místa bližšího k intronu a způsobuje zahrnutí exonu 20 do transkriptu (Anderson *et al.*, 2003a). Stejnou funkci má i genistein, který moduluje i sestřih, kterého se účastní Clk1 a IHPK2 (Anderson *et al.*, 2003a; Anderson *et al.*, 2012).

Kinetin je rostlinný hormon ze skupiny cytokininů, který se používá v kosmetických produktech pro jeho "anti-aging" aktivitu (Rattan a Clark, 1994). Kinetin také chrání před oxidativním stresem DNA i proteiny (Olsen *et al.*, 1999; Verbeke *et al.*, 2000). Zvyšuje množství IKBKAP mRNA v plné délce a IKAP proteinu v lymfoblastových a fibroblastových liniích odvozených od FD pacientů (Slaugenhaupt *et al.*, 2004). Podobný, ale méně významný, efekt má i benzylaminopurin (Slaugenhaupt *et al.*, 2004). Mechanismus účinku kinetinu není znám, ale jeho aktivita je závislá na motivu CAA na 3'-konci exonu 20 v donorovém 5'-sestřihovém místě (Hims *et al.*, 2007). Tento motiv je obsažen i v pre-mRNA genu ABI2 (exon 2) a genu BMP2K (exonu 14), jejichž sestřih kinetin také ovlivňuje (Hims *et al.*, 2007). Kinetin může ovlivňovat vazbu U1 snRNP (Hims *et al.*, 2007). Orální podání kinetinu mění AS IKBKAP a zvyšuje množství IKAP v mozku i somatických tkáních *in vivo* v myším modelu (Shetty *et al.*, 2011). *In vivo* reguluje sestřih IKBKAP a při orálním podání pacientům byl nejčastější nežádoucí účinek nevolnost (Gold-von Simson *et al.*, 2009). U pacientů zvyšuje množství transkriptu v plné délce v bílých krvinkách (Axelrod *et al.*, 2011).

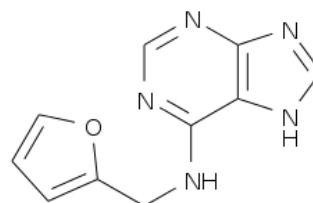


(a)

(b)



(c)



(d)

Obr. 12: Modulátory sestřihu IKBKAP: (a) digoxin, (b) epigallokatechin galát, (c) genistein, (d) kinetin.

Kanál pro vápenaté ionty

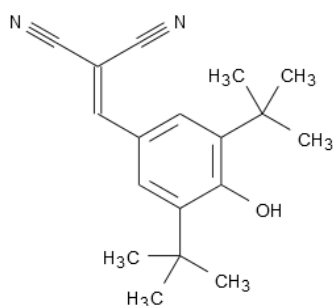
Chronický přísun ethanolu zvyšuje množství kanálů pro vápenaté ionty typu N v buněčné linii PC12, hippocampu a čelní mozkové kůře myši (McMahon *et al.*, 2000). Ethanol zvyšuje množství mRNA α 12.2, ve které chybí exon 31a, a snižuje množství mRNA, která tento exon obsahuje v PC12 (Newton *et al.*, 2005).

MAPT

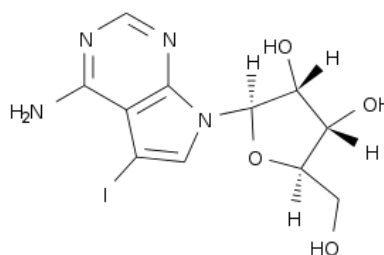
Frontotemporální demence s parkinsonismem je dědičné neurodegenerativní onemocnění spojené s genem kódující s mikrotubuly-asociovaný protein Tau neboli MAPT, který je umístěn na chromosomu 17 (D'Souza a Schellenberg, 2005). Prostřednictvím AS vznikají různé isoformy mRNA, které se liší obsahem exonu 2, 3 nebo 10.

Tyrfostin-9 je inhibitor určitých Tyr-kinas a 5-jodotubercidin je inhibitorem několika Ser/Tyr-kinas (Yaish *et al.*, 1988; Massillon *et al.*, 1994). Digoxin a tyrfostin-9 způsobují zahrnutí exonu 10 do MAPT mRNA *in vitro* a v neuroblastomových liniích, zatímco 5-jodotubercidin zahrnutí exonu 10 do MAPT mRNA inhibuje (Stoilov *et al.*, 2008). Mechanismus účinku těchto látek je neznámý, je však pravděpodobné, že pro každou z nich bude jiný.

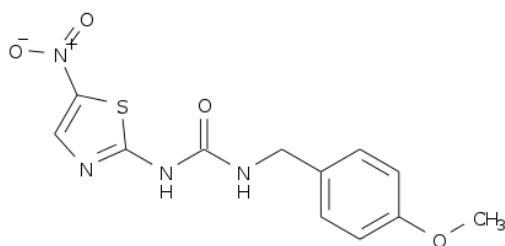
Glykogen synthasa-kinasa 3 (GSK-3) je Ser/Thr kinasa, která reguluje AS exonu 10 MAPT pre-mRNA (Hernández *et al.*, 2004). V exonu 10 jsou přítomny dva zesilovače, z nichž jeden zřejmě interaguje s SRp30b (D'Souza a Schellenberg, 2002). GSK-3 β fosforyluje tento SR protein *in vitro* (Hernández *et al.*, 2004). Inhibice GSK-3 způsobuje zahrnutí exonu 10 do MAPT mRNA (Bhat *et al.*, 2003). Mezi inhibitory GSK-3, které tuto funkci mají, se řadí lithium (Klein a Melton, 1996) a AR-A014418 (Bhat *et al.*, 2003). Také butyrát sodný indukuje zahrnutí exonu 10 do MAPT mRNA (Hnilicová *et al.*, 2010).



(a)



(b)



(c)

Obr. 13: Modulátory sestřihu MAPT: (a) tyrfostin-9, (b) 5-jodotubercidin, (c) AR-A014418.

N-methyl-D-aspartátový receptor

N-methyl-D-aspartátový receptor (NMDA) sestává z podjednotek NR1 a NR2. Ethanol reguluje AS NMDA (Winkler *et al.*, 1999), při kterém snižuje množství mRNA, která obsahuje exon 5 a která dává vznik NR1 podjednotce receptoru NMDA v krysích kortikálních neuronech (Kumari, 2001).

Neurální buněčná adhezní molekula

Dimethylsulfoxid má v buněčných liniích vliv na zařazení neurospecifického exonu 18 do mRNA neurální buněčné adhezní molekuly (NCAM) a zařazení alternativního exonu 7B do hnRNP A1 mRNA (Bolduc *et al.*, 2001). *In vitro* má vliv na výběr 3'- i 5'-sestřihového místa a přidavkem DMSO se více využívají proximální sestřihová místa (Bolduc *et al.*, 2001). Dimethylformamid a formamid mají také vliv na výběr 5'-sestřihového místa (Bolduc *et al.*, 2001). Tato rozpouštědla zřejmě zlepšují iontové interakce mezi SR proteiny a *cis*-elementy, což rozhoduje o výběru sestřihového místa (Bolduc *et al.*, 2001). Dimethylsulfoxid má také vliv na AS amyloidního prekurzorového proteinu (Pan *et al.*, 1993), mRNA serotoninového 5-HT3 receptoru (Emerit *et al.*, 1995) a p53 (Bendori *et al.*, 1987; Klinken *et al.*, 1988).

NF1

Neurofibromatózy jsou heterogenní skupina onemocnění, pro které je typický vznik nádorů centrálního a periferního nervového systému. Neurofibromatóza typu 1 je

autosomálně dominantní onemocnění, které vzniká mutacemi genu NF1, které mohou ovlivňovat správný sestřih NF1 pre-mRNA. Onemocnění je spojováno s nesprávnou funkcí RAS/MAPK signální transdukční dráhou, která ovlivňuje proliferaci.

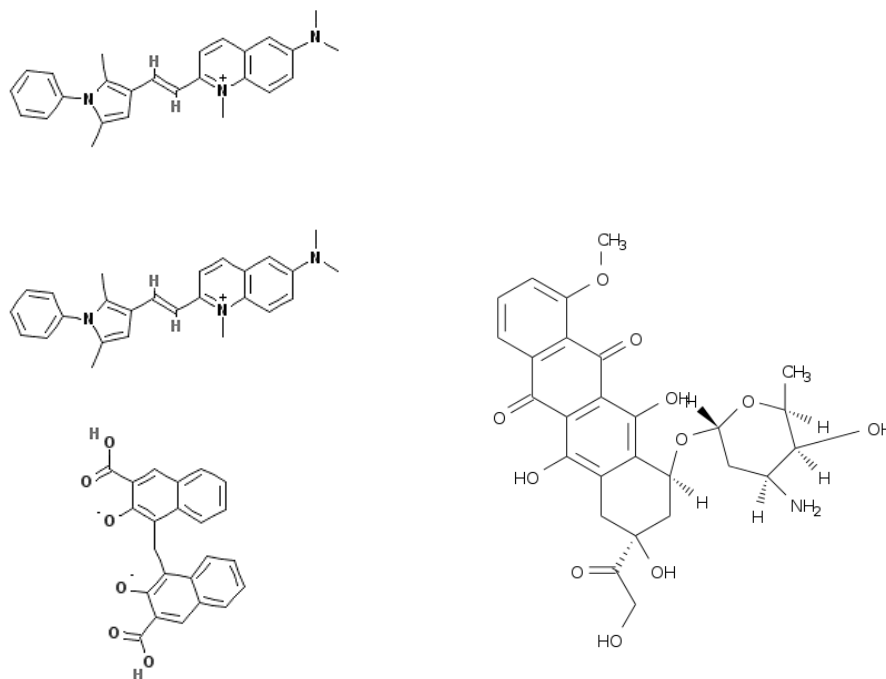
Kinetin způsobuje pokles hladiny mutantní mRNA zahrnutím exonu 7, 18, 36 nebo 37 do NF1 mRNA v buněčných liniích odvozených od NF1 pacientů (Hims *et al.*, 2007; Pros *et al.*, 2010). V 5'-sestřihovém místě exonu 36 byl nalezen motiv CAAG, který se zřejmě podílí na regulaci sestřihu (Hims *et al.*, 2007). Vliv kinetinu na ostatní exony je zatím nejasný.

Receptor γ -aminomáselné kyseliny typu A

Receptor γ -aminomáselné kyseliny typu A (GABA_A) se skládá z několika podjednotek, z nichž jedna, $\gamma 2$, se vyskytuje ve dvou isoformách $\gamma 2L$ a $\gamma 2S$. Tento receptor zprostředkovává efekt ethanolu na centrální nervovou soustavu (Deitrich *et al.*, 1989). Přísun ethanolu snižuje množství $\gamma 2L$ mRNA v krysím hippocampu (Petrie *et al.*, 2001).

Serotoninový receptor 2c

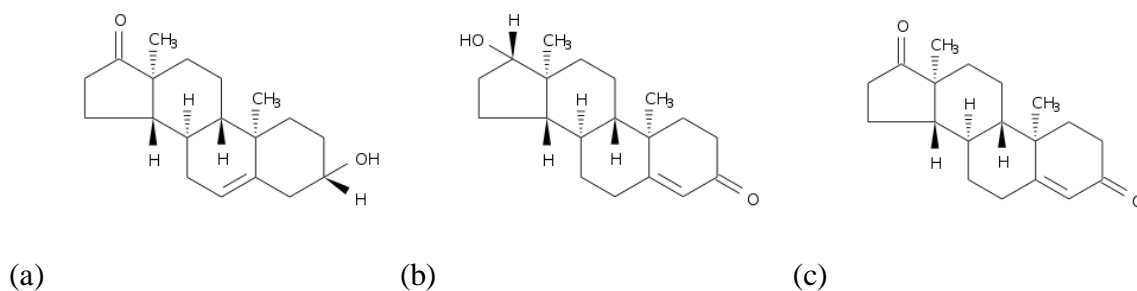
V mRNA serotoninového receptoru 2c (SR2c) dochází k AS exonu Vb. Pouze pokud je exon Vb zahrnut do mRNA, tvoří se funkční receptor. Pyrvinium pamoát indukuje zahrnutí exonu Vb do SR2c mRNA tím, že se přímo naváže na pre-mRNA, čímž způsobí konformační změnu, která zpřístupní 5'-sestřihové místo pro vazbu s U1 snRNP (Shen *et al.*, 2013). Zahrnutí exonu indukuje i doxorubicin, efekt byl ale při porovnání s pyrviniem pamoátem menší (Shen *et al.*, 2013).

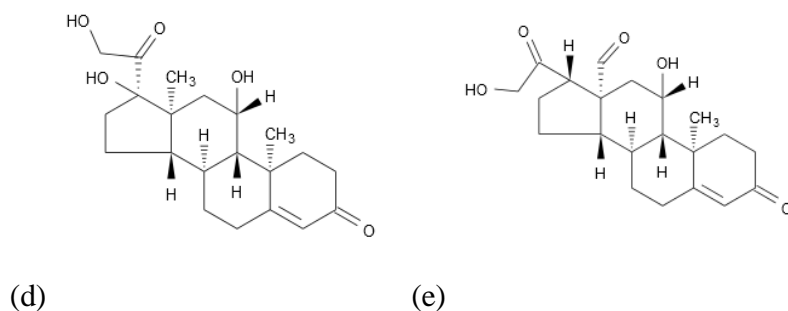


Obr. 14: Modulátory sestřihu genu pro serotoninový receptor 2c: (a) pyrvinium pamoát, (b) doxorubicin.

Slo

Gen Slo kóduje kanály pro draselné ionty (BK kanály, *big potassium*), jejichž mRNA se vyskytuje ve dvou isoformách a které se liší přítomností alternativního exonu. Dehydroepiandrosteron, testosteron a androstenedion jsou androgeny, které zvyšují zastoupení delší isoformy *in vitro*, zatímco kortikoidy dexamethason, kortisol a aldosteron její zastoupení snižují (Lai a McCobb, 2002).





Obr. 15: Modulatory sestřihu Slo: (a) dehydroepiandrosteron, (b) testosteron, (c) androstenedion, (d) kortisol, (e) aldosteron.

SMN2

Spinální svalová atrofie je autosomálně recesivní onemocnění spojené s degenerací buněk předních rohů míchy vedoucí k ochrnutí a atrofii svalů. Existují tři základní typy SMA a u většiny pacientů se vyskytuje homozygotní ztráta (funkce) SMN1 genu (Lefebvre *et al.*, 1995; Wirth 2000). Telomerický gen SMN1 je umístěn na chromosomu 5q13 stejně jako jeho téměř identická centromerická kopie SMN2 (Lefebvre *et al.*, 1995). Expresí obou genů vzniká SMN protein, ale produkt genu SMN2 omezeně tvoří homooligomery (Lorson *et al.*, 1998). SMN protein v jádře tvoří shluky, které se nazývají gemy.

Z genu SMN1 primárně vzniká transkript v plné délce, zatímco SMN2 poskytuje především isoformu, které chybí exon 3, 5 nebo nejčastěji exon 7. Transkript v plné délce vzniká pouze v omezeném - a pro organismus nedostačujícím - množství (Lefebvre *et al.*, 1995; Coover *et al.*, 2007; Lefebvre *et al.*, 1997; Lorson *et al.*, 1998). Je to způsobeno tím, že v pozici +6 exonu 7 SMN2 došlo k tranzici C>T. V této oblasti se předpokládá přítomnost zesilovače sestřihu, který je mutací poškozen, a proto dochází ke snížení frekvence zařazení exonu 7 do finálního transkriptu (Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999). Zahrnutí exonu 7 je regulováno i pomocí dalšího exonového zesilovače, se kterým interaguje Htra2-β1 (Singh *et al.*, 2004;

Hofmann *et al.*, 2000). Ovlivněním jeho aktivity například zvýšením exprese Htra2- β 1 je možné zvýšit množství transkriptů SMN2 obsahujících exon 7 (Hofmann *et al.*, 2000).

Na AS genu SMN2 mají vliv inhibitory HDAC, aktivátory a inhibitory proteinových fosfatas, donory oxidu dusnatého, přírodní polyfenoly, amilorid, ortho-vanadát a PTK-SMA1.

A) *Inhibitory histonových deacetylas*

Mezi inhibitory HDAC se řadí butyrát (Candido *et al.*, 1978), 4-fenylbutyrát (Lea a Tulsyan, 1995), valproát (Göttlicher *et al.*, 2001; Phiel *et al.*, 2001), M-344 (Jung *et al.*, 1999), akklarubicin, SAHA (Richon *et al.*, 1998) a kávová kyselina (Waldecker *et al.*, 2008).

Aklarubicin (aclacinomycin A) je antracyklinové antibiotikum, které se používá jako chemoterapie a které je extrémně cytotoxické (Van Echo *et al.*, 1982). Zvyšuje množství SMN2 mRNA obsahující exon 7, množství proteinu SMN a počet gem ve fibroblastech odvozených od pacientů SMA typu I (Andreassi *et al.*, 2001). Velkou nevýhodou je zmíněná cytotoxicita, díky níž je pro terapii SMA nevhodný (Andreassi *et al.*, 2001).

Butyrát sodný se používá při léčbě srpkovité anémie a thalasémie (Collins *et al.*, 1995; Sher *et al.*, 1995). Zvyšuje množství SMN2 mRNA, která obsahuje exon 7 v lymfoidních buněčných liniích odvozených od pacientů SMA typu I, II a III a zvyšuje množství SMN proteinu změnou AS (Chang *et al.*, 2001). *In vivo* v myších SMA typu I a II zvyšuje množství SMN proteinu v různých tkáních, např. v motorických neuronech míchy (Chang *et al.*, 2001). Alternativní sestřih je modifikován indukcí SR proteinů SF2/ASF a SRp20 a SR-podobného (*SR-like*) proteinu Htra2- β 1 (Chang *et al.*, 2001; Brichta *et al.*, 2003).

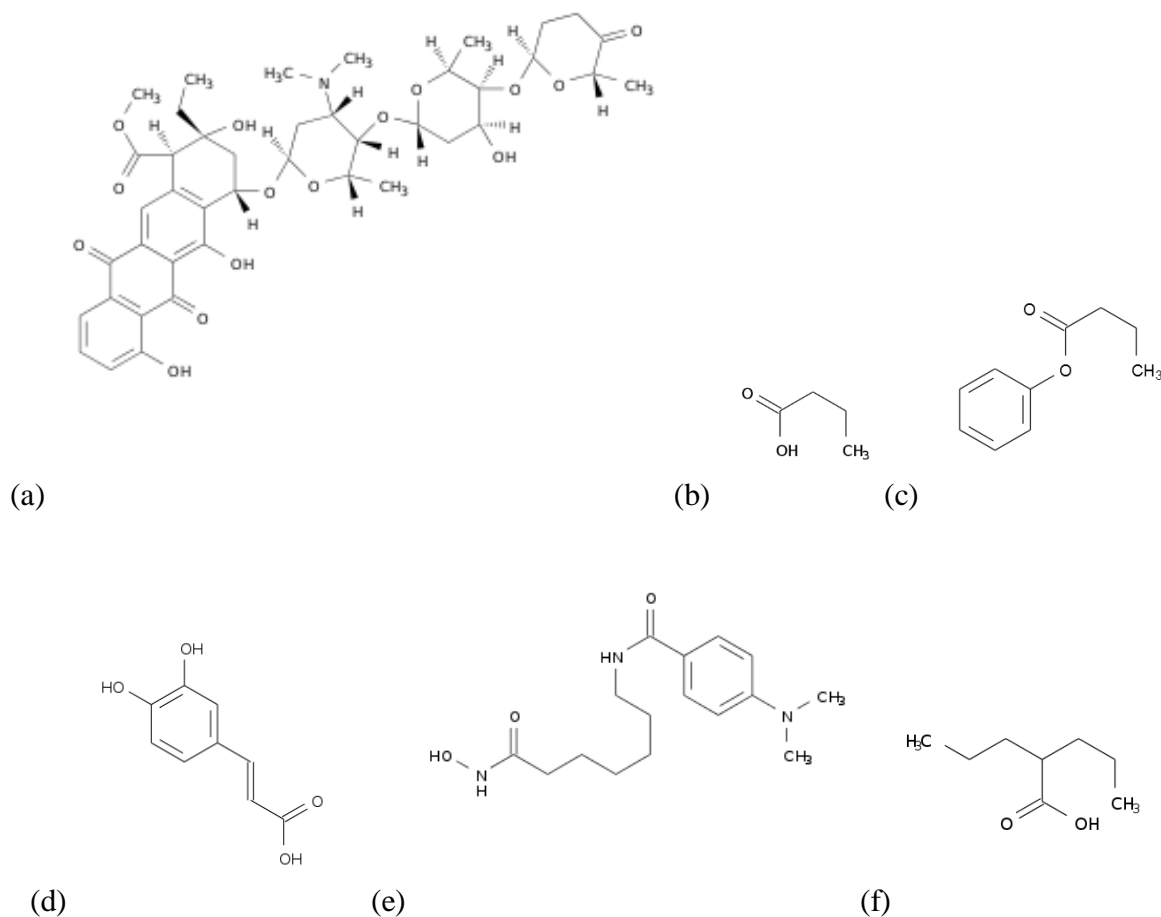
Fenylbutyrát je léčivo, které se používá při poruchách močovinového cyklu (Maestri *et al.*, 1996). Zvyšuje množství transkriptů SMN2 v plné délce a množství SMN proteinu ve fibroblastových buněčných liniích odvozených od SMA pacientů typu I, II a III (Andreassi *et al.*, 2004). U dětských SMA pacientů typu II zlepšuje motorické funkce (Mercuri *et al.*, 2004).

Kávová kyselina se vyskytuje v ovoci a kávě a má antioxidační a protizánětlivou aktivitu. Zvyšuje zastoupení SMN2 mRNA v plné délce ve fibroblastech odvozených od SMA pacientů (Dayangac-Erden *et al.*, 2011).

Benzamid M-344 zvyšuje množství SMN proteinu, množství gem a množství SMN2 mRNA v plné délce prostřednictvím zvýšení transkripce SMN2 i změnou AS, tj. zahrnutí exonu 7 do mRNA, což je umožněno zvýšenou expresí Htra2- β 1 a SRp20 ve fibroblastových liniích odvozených od SMA pacientů typu I, II a III (Riessland *et al.*, 2006; Hahnen *et al.*, 2006). V hippokampálních mozkových řezech zvyšuje množství transkriptu SMN2 v plné délce a množství SMN proteinu (Hahnen *et al.*, 2006).

Suberoylanilid hydroxamová kyselina je léčivo, které přestupuje přes hematoencefalickou bariéru. Zvyšuje množství transkriptu SMN2 v plné délce a množství SMN proteinu ve fibroblastových liniích odvozených od SMA pacientů a *ex vivo* v krysí a lidské mozkové tkáni (hippokampus) prostřednictvím aktivace transkripce i alterace AS, tj. zahrnutím exonu 7 do mRNA (Hahnen *et al.*, 2006). *In vivo* v SMA myším modelu zvyšuje tvorbu obou isoform transkriptu a SMN proteinu, což zlepšuje motorické funkce i vaskulární defekty kosterního svalstva (Riessland *et al.*, 2010; Somers *et al.*, 2013).

Valproová kyselina se používá při léčbě epilepsie, má pozitivní vliv na migrény, poruchy nálad a má i protinádorovou aktivitu. Ve fibroblastech odvozených od SMA pacientů typu I, II a III a *ex vivo* v řezech krysího a lidského hippocampu zvyšuje množství transkriptu SMN2 v plné délce a zastoupení SMN proteinu prostřednictvím zvýšení transkripce SMN2 i prostřednictvím změny AS (Brichta *et al.*, 2003; Sumner *et al.*, 2003; Hahnen *et al.*, 2006). Mechanismem účinku změny AS je indukce exprese SF2/ASF, SRp20 a Htra2- β 1 (Brichta *et al.*, 2003). V myších modelech SMA typu III zamezuje odumírání motorických neuronů a zvyšuje množství SMN proteinu (Tsai *et al.*, 2006). U dětských SMA pacientů typu II a III se v rámci ročního testování nedostavily žádné nežádoucí účinky a u pacientů SMA typu II došlo ke zlepšení motorických schopností (Darbar *et al.*, 2011). Při podání valproové kyseliny pacientům ale byl pozorován i pokles transkriptu v plné délce (Brichta *et al.*, 2006).

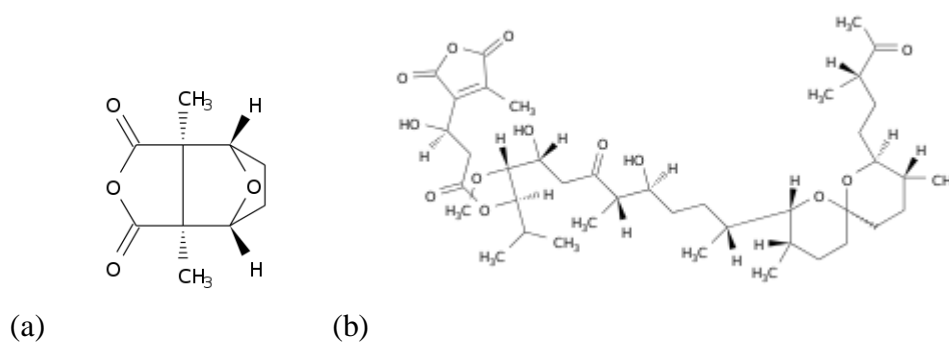


Obr. 16: Modulátory sestřihu SMN2 - inhibitory histonových deacetylaz: (a) akklarubicin, (b) butyrát (c) 4-fenylbutyrát, (d) kávová kyselina, (e) M-344, (f) valproová kyselina.

B) Inhibitory a aktivátory proteinových fosfatů

Aktivita SR proteinů a SR-podobných proteinů je regulována např. fosforylací a defosforylací. Například defosforylace SF2/ASF je nezbytná pro transesterifikační reakci *in vitro* (Cao *et al.*, 1997). Proteinová fosfatasa 1 (PP1) defosforyluje Htra2- β 1 *in vitro* a v embryonálních ledvinových liniích a tím znemožňuje jeho regulační efekt na sestřih pre-mRNA (Novoyatleva *et al.*, 2008). Inhibice PP1 indukuje zahrnutí exonu 7 do SMN2 mRNA v buněčných liniích odvozených od SMA pacientů a v myším SMA modelu (Novoyatleva *et al.*, 2008). Mezi inhibitory a aktivátory proteinových fosfatů patří cantharidin, tautomycin (Honkanen, 1993; MacKintosh a Klumpp, 1990), isocantharidin a pseudocantharidiny (Zhang *et al.*, 2011).

Tautomycin zvyšuje množství SMN2 mRNA v plné délce, množství proteinu SMN a počet gem ve fibroblastech odvozených od SMA pacientů typu I, II a III (Novoyatleva *et al.*, 2008). Tautomycin i cantharidin umožňují vznik SMN proteinu v míše myších modelů SMA (Novoyatleva *et al.*, 2008). Pseudocantharidin A a isocantharidin, inhibitory proteinových fosfatů PP1 a PP2A, způsobují zahrnutí exonu 7 do mRNA a tvorbu SMN proteinu ve fibroblastech odvozených od SMA pacientů, pseudocantharidin B a C aktivují PP2A, která defosforyluje Thr-33 v Htra2β1, a pseudocantharidin D nemá vliv na PP1 ani PP2A, ale i přesto způsobuje zahrnutí exonu 7 do SMN2 mRNA (Zhang *et al.*, 2011). Inhibice PP1 a PP2A zvyšuje fosforylací SAP130, podjednotky U2 snRNP (Zhang *et al.*, 2011). Výhodou pseudocantharidinu B a D oproti cantharidinu je nižší toxicita (Zhang *et al.*, 2011).

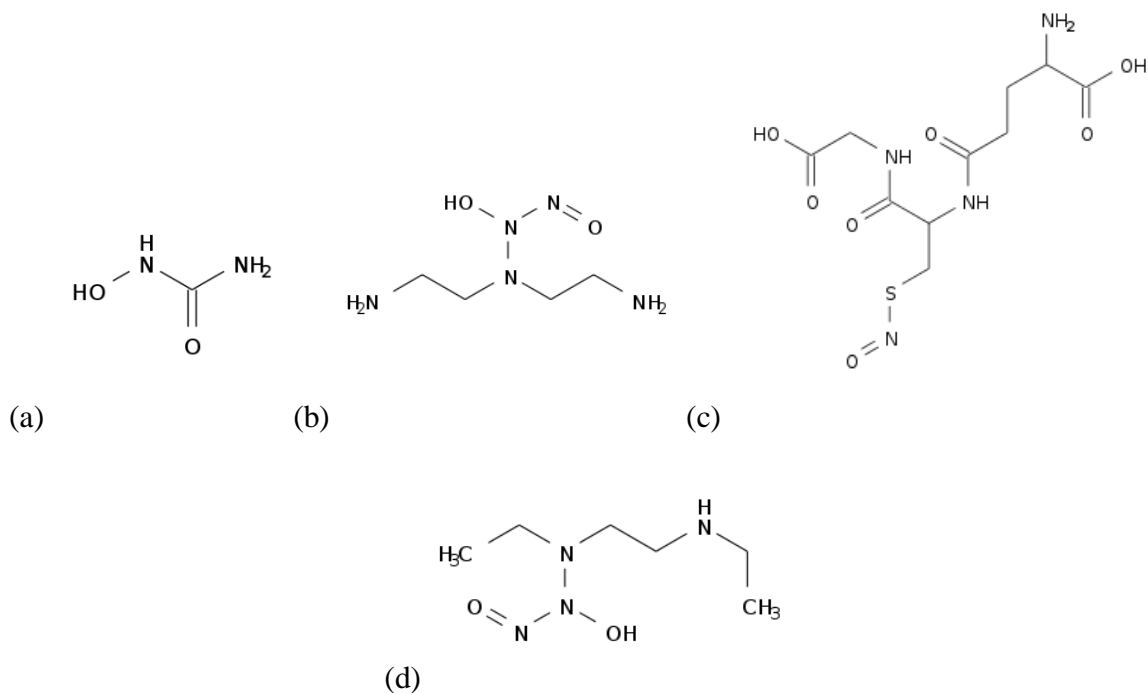


Obr. 17: Modulátory sestřihu SMN2 – inhibitory a aktivátory fosfatů: (a) cantharidin, (b) tautomycin.

C) Donory oxidu dusnatého

Hydroxymočovina je protinádorové léčivo, které inhibuje DNA syntézu (Sinha a Snustad, 1972) a používá se i při léčbě srpkovité anémie. V lymfocytové linii hydroxymočovina zvyšuje podíl transkriptu SMN2 v plné délce (Grzeschik *et al.*, 2005). Snižuje expresi hnRNP A1 v lymfocytových liniích odvozených od SMA pacientů a zvyšuje počet gem ve fibroblastech odvozených od SMA pacientů (Liang *et al.*, 2008) Účinek je zprostředkován metabolitem hydroxymočoviny oxidem dusnatým, jelikož stejný účinek jako hydroxymočovina mají i další donory oxidu dusnatého např. Deta-NONOát,

S-nitroglutation a NOC-12 v lymfocytových buněčných liniích odvozených od SMA pacientů typu I, II i III (Xu *et al.*, 2011).



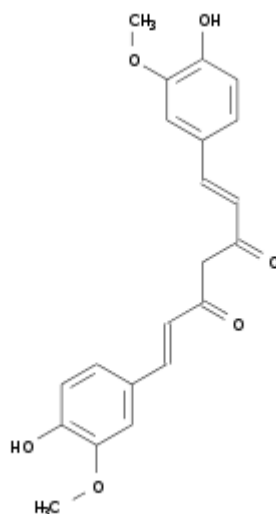
Obr. 18: Modulátory sestřihu SMN2 – donory oxidu dusnatého: (a) hydroxymočovina, (b) Deta-NO, (c) S-nitroglutation, (d) NOC-12.

D) Přírodní polyfenoly

Do této skupiny patří např. EGCG, kurkumin a resveratrol. Epigallokatechin galát je hlavním polyfenolem v zeleném čaji, kurkumin je přítomný v Kurkumovníku dlouhém (*Curcuma longa*) a resveratrol je přítomný ve slupkách a semenech plodu vinné révy. Kurkumin je využíván především jako koření a přírodní barvivo, ale má i protizánětlivé, protinádorové a antioxidační vlastnosti.

Všechny tři sloučeniny způsobují zahrnutí exonu 7 do mRNA a tím zvyšují množství SMN2 mRNA v plné délce, SMN proteinu a zvyšují i počet gem ve fibroblastech odvozených od pacientů SMA typu I (Sakla a Lorson, 2008). Kurkumin zvyšuje expresi genů, které kódují SR proteiny SRp30b, SRp20 a SRp55 (Skommer *et al.*, 2007). Resveratrol má vliv na AS pre-mRNA pro SRp20 a zvyšuje expresi SF2/ASF, hnRNP A1 a HuR

(Markus *et al.*, 2011), z nichž SF2/ASF a hnRNP A1 se podílejí na sestřihu SMN2 (Cartegni *et al.*, 2006).



Obr. 19: Modulátor sestřihu SMN2 – přírodní polyfenoly: kurkumin.

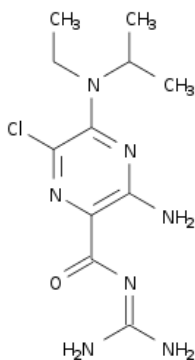
E) Další modulátory

Amilorid 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amilorid (EIPA) je inhibitor Na^+/H^+ antiporteru. Inhibicí tohoto antiporteru se mění pH, jehož hodnota je důležitá pro sestřih (Borsi *et al.*, 1995). Amilorid EIPA podporuje zahrnutí exonu 7 do SMN mRNA, zvyšuje produkci SMN proteinu i počet gem v lymfoidních liniích odvozených od SMA pacientů typu I, II a III (Yuo *et al.*, 2008). Také zvyšuje expresi SR faktoru SRp20, což je kromě vlivu na pH dalším možným mechanismem účinku ovlivnění sestřihu SMN2 pre-mRNA (Yuo *et al.*, 2008).

Ortho-vanadát sodný ovlivňuje AS SMN2 pre-mRNA a způsobuje zahrnutí exonu 7 do mRNA ve fibroblastech odvozených od SMA pacientů typu I (Zhang *et al.*, 2001). Nelze jej použít jako léčivo, protože inhibuje ATPasu, alkalickou a Tyr fosfátasu i další fosfatasy, čímž je pro buňku toxický.

PTK-SMA1 je syntetický derivát tetracyklinu, který je strukturálně podobný akklarubicinu, který je pro terapii SMA nevhodný z důvodu toxicity. PTK-SMA1 je tetracyklin substituovaný na C7 a právě tato změna je zodpovědná za vliv na sestřih

(Hastings *et al.*, 2009). Zvyšuje množství SMN2 mRNA v plné délce a množství SMN proteinu *in vitro*, ve fibroblastech odvozených od SMA pacientů i myším modelu SMA typu I i III (Hastings *et al.*, 2009). PTK-SMA1 neprostupuje přes hematoencefalickou bariéru, takže jej není možné použít jako léčivo bez derivatizace (Hastings *et al.*, 2009).



Obr. 20: Modulátor sestřihu SMN2: EIPA.

2.5.2.2.3 Onkogeny a geny tumorových supresorů

Kaspasa 2

Gen kaspasy 2 kóduje proteolytický enzym, který se podílí na procesu apoptózy. Prostřednictvím AS vznikají dvě mRNA isoformy: kaspasa-2L, která kóduje pro-apoptotický protein, a kaspasa-2S, která obsahuje exon 9 a kóduje isoformu s anti-apoptotickou funkcí (Wang *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1998). Vynechání exonu 9 je způsobeno sekvencí v intronu 9 genu kaspasy 2, který se chová jako 3'-sestřihové místo (Côté *et al.*, 2001a). Zahrnutí exonu 9 do sekvence podporuje hnRNP A1, zatímco PTB protein a SR proteiny SF2/ASF a SRp30b podporuje jeho vynechání (Côté *et al.*, 2001b; Jiang *et al.*, 1998).

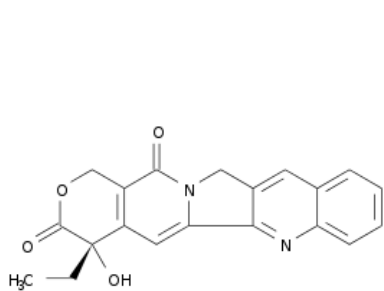
Na AS genu pro kaspasu 2 mají vliv inhibitory topoisomeras, chlorhexidin, taxol, staurosporin a cyklohexamid.

A) Inhibitory topoisomeras

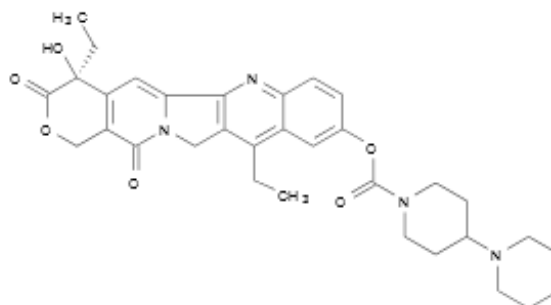
Topoisomerasy kromě schopnosti regulovat helicity DNA mají i kinasovou aktivitu. Nejspíše modulují aktivitu SR proteinů pomocí fosforylace, což bylo prokázáno pro topo I

(Rossi *et al.*, 1996). Mezi látky, které mají vliv na AS kaspasy 2, patří inhibitory topo I: camptothecin, irinotecan, homocamptothecin, diflomotecan, inhibitory topo II: etoposid, amsacrin, doxorubicin, mitoxantron a inhibitory topo I a II: elemotecan, TAS-103.

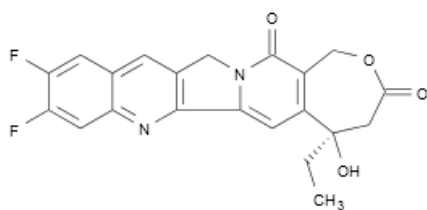
Všechny tyto látky indukují zahrnutí exonu 9 do mRNA v leukemických buňkách a snižují tak množství kaspasy-2L mRNA (Wotawa *et al.*, 2002; Solier *et al.*, 2004). Účinek etoposidu je závislý na PP1 a na *de novo* syntéze ceramidů (Iwanaga *et al.*, 2005).



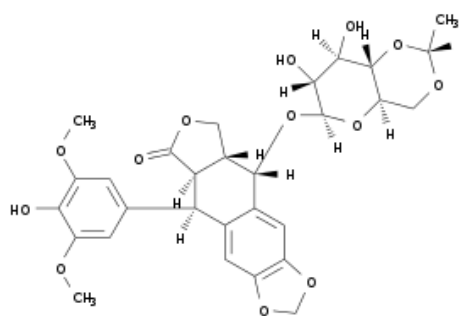
(a)



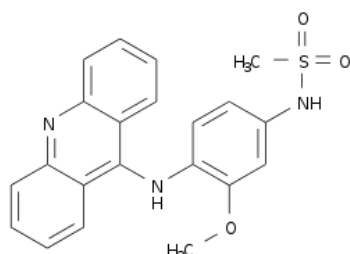
(b)



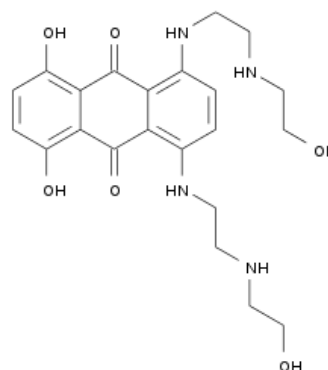
(c)



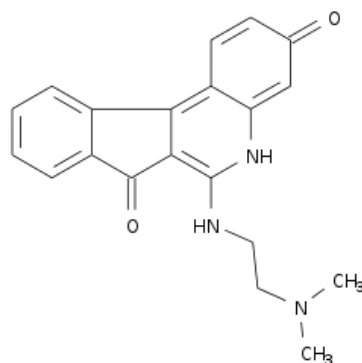
(d)



(e)



(f)



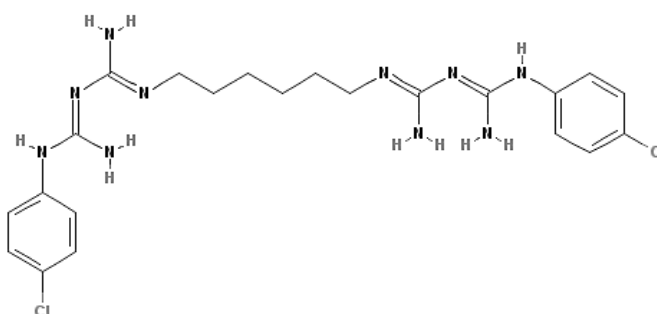
(g)

Obr. 21: Modulátory sestřihu kaspasy 2 – inhibitory topoisomeras: (a) camptothecin, (b) irinotecan, (c) diflomotecan, (d) etoposid, (e) amsacrin, (f) mitoxantron, (g) TAS-103.

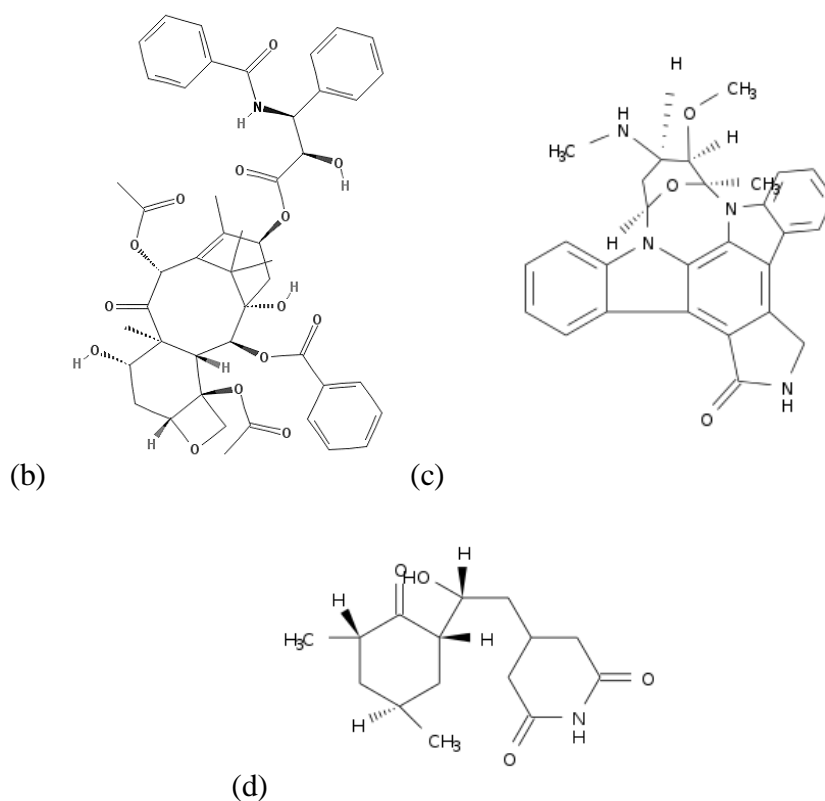
B) Další modulátory

Chlorhexidin je látka s antibakteriálním a protikvasinkovým účinkem. Selektivně inhibuje Clk a zamezuje fosforylaci SR proteinů, konkrétně SRp75, SRp55, SRp40 a SRp30 (Younis *et al.*, 2010). Moduluje také sestřih exonu 11 genu Ron a kaspasy 9 v HeLa buňkách (Younis *et al.*, 2010).

Taxol, mikrotubulární inhibitor, staurosporin, inhibitor proteinkinasy C (PKC) a cykloheximid způsobují zahrnutí exonu 9 do mRNA a zvyšuje poměr kaspasa-2S/kaspasa-2L mRNA v leukemických liniích (Iwanaga *et al.*, 2005).



(a)



Obr. 22: Modulátory sestřihu kaspasy 2: (a) chlorhexidin, (b) taxol, (c) staurosporin, (d) cykloheximid.

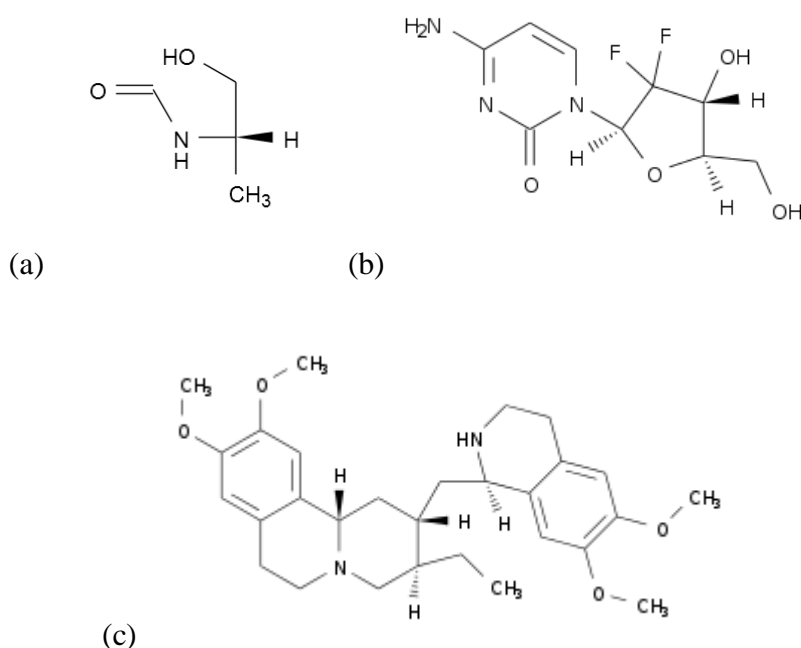
Kaspasa 9

Kaspasa 9 má dvě sestřihové isoformy: pro-apoptotickou delší kaspasu-9a a anti-apoptotickou kratší kaspasu-9b. Isoformy jsou tvořeny zahrnutím/vynecháním exonů 3, 4, 5 a 6. Alternativní sestřih pre-mRNA kaspasy 9 je specificky regulován faktorem SF2/ASF, který je nezbytný pro zahrnutí exonů do mRNA (Massiello a Chalfant, 2006).

Ceramidy indukují apoptózu a zvyšují expresi pro-apoptotických proteinů. Aktivují PP1 a PP2A *in vitro*, což reguluje aktivitu SR proteinů (Chalfant *et al.*, 2001). D-erythro-C6 ceramid zvyšuje poměr kaspasa 9a/kaspasa 9b a zvyšuje množství proteinu kaspasy 9a v adenokarcinomové buněčné linii prostřednictvím ovlivnění AS (Chalfant *et al.*, 2002). Gemcitabin aktivuje *de novo* syntézu ceramidů sfingolipidovou dráhou (Chalfant *et al.*, 2002). PP1 aktivovaná ceramidy způsobuje defosforylaci

SR proteinů *in vitro* (Chalfant *et al.*, 2001), což je možným mechanismem účinku ceramidů na AS (Chalfant *et al.* 2002).

Emetin je alkaloid získaný z kořene *Carapichea ipecacuanha* a používá se jako antibiotikum a chemoterapeutikum. Je potenciálním inhibítozem proteosyntézy v eukaryotických buňkách (Grollman, 1968). V některých nádorových buněčných liniích (PC3) indukuje vznik delší isoformy a snižuje množství kratší isoformy, v některých nádorových liniích (C33A, MCF-7) má ale opačný efekt (Pan *et al.*, 2011). Efekt je zprostředkován PP1 (Pan *et al.*, 2011).



Obr. 23: Modulátory sestřihu kaspasy 9: (a) ceramid, (b) gemcitabin, (c) emetin.

Bcl-x

Bcl-x patří do rodiny BCL-2, která se podílí na regulaci apoptózy. Při alternativním výběru 5'-sestřihového místa v exonu 2 dochází ke vzniku dvou isoform: isoforma Bcl-xS indukuje apoptózu, zatímco transkript v plné délce Bcl-xL ji inhibuje (Boise *et al.*, 1993).

Na AS Bcl-x má vliv gemcitabin, ceramidy, NB-506, emetin, staurosporin, calfostin C, Gö6976, tamoxifen, CX-4945, interleukin 6, granulocyty a makrofágy stimulující faktor (GM-CSF) a některá nádorová léčiva.

Gemcitabin stimuluje vznik ceramidů prostřednictvím *de novo* sfingolipidové dráhy a ceramidy snižují poměr Bcl-xL/Bcl-xS i množství proteinu Bcl-xL a zvyšují množství proteinu Bcl-xS v adenokarcinomové buněčné linii prostřednictvím ovlivnění AS (Chalfant *et al.*, 2002). Stejně jako v případě kaspasy 9 je efekt zprostředkován PP1 (Chalfant *et al.*, 2002).

NB-506 je glykosylovaný derivát rebeccamycinu s protinádorovou aktivitou. Inhibuje *in vitro* sestavení spliceosomu a sestřih inhibicí fosforylace SR proteinů, konkrétně SF2/ASF, prostřednictvím inhibice kinasové aktivity topo I (Pilch *et al.*, 2001). V leukemických buněčných liniích specificky inhibuje fosforylaci SR proteinů, snižuje hladinu Bcl-xL mRNA a hladinu mRNA CD44, SRp30b a ovlivňuje také sestřih genu Clk/Sty (Pilch *et al.*, 2001).

Emetin zvyšuje hladinu Bcl-xS a snižuje hladinu Bcl-xL v nádorových buněčných liniích (Boon-Unge *et al.*, 2007). Mechanismem účinku je PP1-dependentní defosforylace SR proteinů (Boon-Unge *et al.*, 2007).

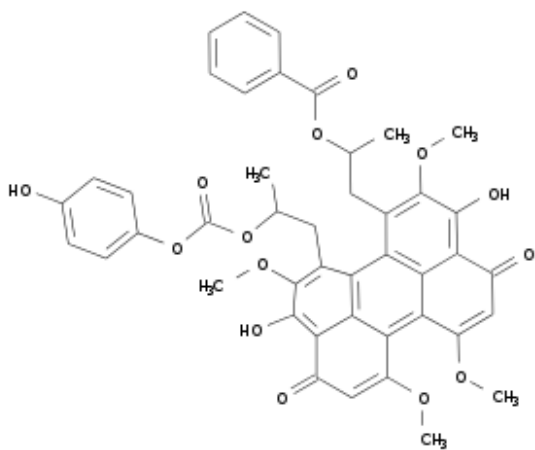
Staurosporin je inhibitor PKC a induktor apoptózy (Gschwendt *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2004). Snižuje poměr Bcl-xL/Bcl-xS v ledvinové embryonální buněčné linii (Revil *et al.*, 2007). Podobný účinek jako staurosporin má calfostin C, Gö6976 a tamoxifen (Revil *et al.*, 2007), což jsou také inhibitory PKC (Kobayashi *et al.*, 1989; O'Brian *et al.*, 1990). Inhibicí 5'-sestřihového místa Bcl-xS zprostředkovává element SB1, zeslabovač přítomný v první polovině exonu 2, a staurosporin tuto represí ruší (Revil *et al.*, 2007). Předpokládá se, že staurosporin inhibicí PKC znemožní fosforylaci proteinu, který je nezbytný pro funkci SB1 (Revil *et al.*, 2007). Staurosporin a Gö6976 má také vliv na AS genu Axl (Revil *et al.*, 2007).

Interleukin 6 a GM-CSF snižují množství Bcl-xL v leukemických liniích a 12-O-tetradekanoylforbol 13-acetát (TPA) zvyšuje množství Bcl-xL v gliomové buněčné linii, přičemž TPA zřejmě spouští PKC dráhu (Li *et al.*, 2004).

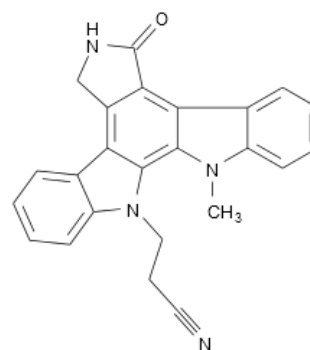
CX-4945 je inhibitor kasein kinasy 2 a je v klinických testech jak antineoplastikum (Siddiqui-Jain *et al.*, 2010). Inhibuje Clk *in vitro*, což moduluje fosforylaci SR proteinů

(Kim *et al.*, 2014). Má vliv na alternativní sestřih Bcl-x, Ron, Clk1/Sty pre-mRNA (Kim *et al.*, 2014).

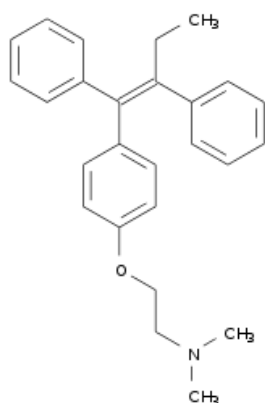
Hladinu Bcl-xS v buněčných liniích zvyšují i protinádorová léčiva cisplatina, oxaliplatina, epirubicin, methotrexát, etoposid, daunorubicin, fluorouracil, cyklofosamid a daktinomycin (Rohrbach *et al.*, 2005; Shkreta *et al.*, 2008). Cisplatina a oxaliplatina způsobily efekt v největším množství buněčných linií (Shkreta *et al.*, 2008). Efekt oxaliplatiny je závislý na ATM, CHK2 a p53, což značí, že signální dráha odpovědi na DNA poškození má vliv na AS Bcl-x (Shkreta *et al.*, 2011). Oxaliplatina zřejmě způsobuje dvouřetězcové zlomy DNA, což aktivuje ATM/ATR a CHK2 kinasy, které aktivují p53, který zvyšuje expresi Tyr-fosfatasy, která následně antagonisticky ovlivňuje SB1 (Shkreta *et al.*, 2011).



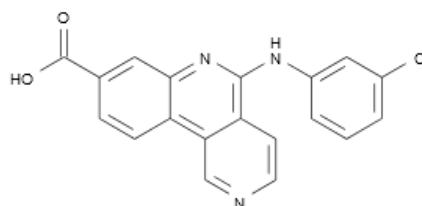
(a)



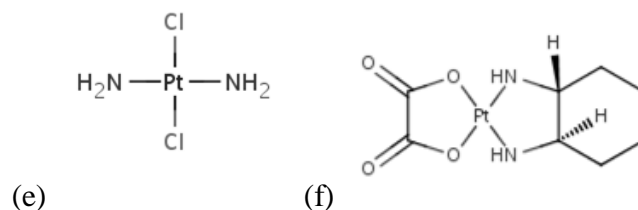
(b)



(c)



(d)

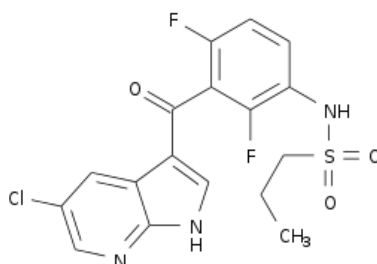


Obr. 24: Modulátory sestřihu genu *Bcl-x*: (a) calfostin C, (b) Gö6976 (c) tamoxifen, (d) CX-4945, (e) cisplatina, (f) oxaliplatina.

Bim

Bim inhibuje RAF/MEK/ERK dráhu. Z pre-mRNA Bim vznikají prostřednictvím AS tři isoformy: Bim_{EL}, Bim_L a Bim_S. Bim_S je kódován exony 2, 5 a 6, Bim_L exony 2, 4, 5, 6 a Bim_{EL} exony 2, 3, 4, 5 a 6. Bim_S je nejefektivnější pro-apoptotická isoforma.

PLX4720 je protinádorové léčivo, inhibitor B-RAF, přesněji jeho mutantní formy B-RAF^{V600E}. PLX4720 preferenčně zvyšuje množství Bim_S mechanismem regulovaným SRp55 v B-RAF^{V600E} melanomové buněčné linii (Jiang *et al.*, 2010).



Obr. 25: Modulátor sestřihu genu *Bim*: PLX4720.

Ron

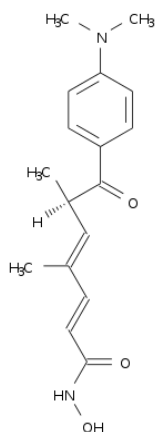
Ron je proto-onkogen ze skupiny Tyr-kinasových receptorů (Ronsin *et al.*, 1993). Má vliv na motilitu, adhezi, proliferaci, apoptózu a řídí epiteliálně-mesenchymální tranzici (Camp *et al.*, 2005; Polyak a Weinberg, 2009). Z pre-mRNA se tvoří čtyři isoformy, z nichž isoforma Ron_{Δ165} postrádající exon 11 aktivuje epiteliálně-mesenchymální tranzici, která zvyšuje buněčnou motilitu a umožňuje metastázování (Collesi *et al.*, 1996). Zahrnutí nebo vynechání exonu 11 závisí na množství SF2/ASF, který se váže na zesilovač v exonu 12 (Ghigna *et al.*, 2005).

Indolové deriváty (IDC) selektivně inhibují některé SR proteiny podílející se na sestřihu závislém na použití exonového zesilovače. Indolové deriváty IDC48, 78 a 92 inhibují vynechání exonu 11 v nádorových buněčných liniích (Ghigna *et al.*, 2010). Tyto IDC mají vliv na SF2/ASF (Soret *et al.*, 2005). Sestřih exonu 11 reguluje i chlorhexidin (Younis *et al.* 2010).

Prohibitin

Protein prohibitin (PHB) inhibuje pyruvát karboxylasu (Vessal *et al.*, 2006) a plní funkci chaperonu (Nijtmans *et al.*, 2000). Z pre-mRNA PHB vznikají dvě isoformy mRNA: delší isoforma, která obsahuje 3'-nepřekládanou oblast, a kratší isoforma, která končí exonem 5. Delší isoforma má anti-proliferační aktivitu (Jupe *et al.*, 1996).

Trichostatin A a butyrát sodný zvyšují množství delší mRNA PHB a snižují množství krátké mRNA v lidských thyroidních nádorových liniích (Puppin *et al.*, 2011).

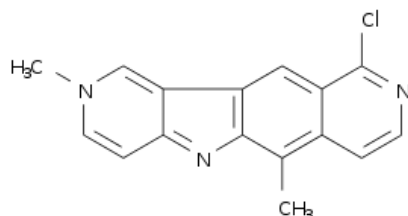


Obr. 26: Modulátor sestřihu genu pro prohibitin: trichostatin A.

2.5.2.2.4 Transkripty HIV-1

Virus HIV tvoří klíčové virové proteiny v různých isoformách pomocí AS. Alternativními 5'- a 3'-sestřihovými místy vzniká až 40 různých mRNA z jedné pre-mRNA (Stoltzfus a Madsen, 2006). Při sestřihu HIV-1 pre-mRNA hraje důležitou roli SR protein SF2/ASF.

IDC16 je derivát indolu je inhibitor sestřihu, kterého se účastní ASF/SF2 (Soret *et al.*, 2005). IDC16 interaguje se substráty, na které se za normálních podmínek váže SF2/ASF a tím potlačuje vznik klíčových virálních proteinů a má tedy vliv na sestřih HIV-1 pre-mRNA (Bakkour *et al.*, 2007). IDC16 inhibuje využití 3'-sestřihového místa, které jsou při sestřihu pre-mRNA závislé na přítomnosti SR proteinů (Bakkour *et al.*, 2007).



Obr. 27: Modulátor sestřihu HIV-1: IDC16.

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 Seznam použitých přístrojů, zařízení a chemikálií

3.1.1 Kultivační plasty

Všechny kultivační plasty pochází od firmy TPP.

- Kultivační lahve 75 cm²
- Kultivační lahve 25 cm²
- Kultivační misky
- Škrabky na sklízení buněk

3.1.2 Přístroje a zařízení

analyzátor luminiscence FLA-7000	FUJIFILM
analyzátor luminiscence LAS-4000	FUJIFILM
automatické pipety	Eppendorf
Bürkerova komůrka	Marienfeld
centrifuga BR4i	Jouan
CO ₂ inkubátor MCO-18AIC	SANYO
cykler DNA Engine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad
elektroforetický zdroj EC 105	E-C Apparatus Laboratories
elektroforetický zdroj EC 3000P	E-C Apparatus Laboratories
flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48	Gelaire, Flow Laboratories
NanoDrop 1000 Spectrophotometr	Thermo Scientific
pH metr pH 50	XS Instruments
sestava pro elektroforézu a blot Mini-PROTEAN	
Tetra System	Bio-Rad
stolní centrifuga Mini Spin	Eppendorf
třepací inkubátor Mixing Block MB-102	BIOER
třepačka KS 260 Basic	IKA
ultrazvuk HD 2200	BANDELIN SONOPLUS
ultrazvuková lázeň RK31	BANDELIN SONOREX
váhy 440-33N	Kern
vortex Minishaker MS2	IKA
vývěva KIF LAB	Laboport

3.1.3 Chemikálie

2-merkaptoethanol	SERVA
acetát sodný	Sigma
agarosa	Sigma
akrylamid (AA)	SERVA Electrophoresis
aprotinin	Sigma-Aldrich
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
destilovaná voda	LRR Olomouc
dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
dodecylsírán sodný (SDS)	Lach Ner s.r.o.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
ECL femto	Thermo Scientific
ethanol 70%	Lach Ner s.r.o.
ethanol 96%	Lach Ner s.r.o.
ethidium bromid roztok	Sigma
ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma Aldrich
ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA)	Sigma-Aldrich
fenol	Sigma-Aldrich
fetální sérum	Sigma
glutamin	Sigma
glycerol	Sigma
glycin	Sigma-Aldrich
guanidin thiokyanát	Sigma
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
chlorid sodný	Penta
chloroform	Sigma-Aldrich
isopropanol	Sigma
JumpStart™ Taq DNA polymerasa	Sigma-Aldrich
kyselina chlorovodíková	Penta
kyselina octová	Penta
Large DNA ladder	BioSystems
luminol substrát	Thermo Scientific
methanol	Penta
n-butanol	Sigma-Aldrich
N,N'-metylenbisakrylamid (Bis)	SERVA Electrophoresis
penicilin-streptomycin roztok	Sigma
persírán amonný (APS)	SERVA Electrophoresis
Ponceau S	Sigma-Aldrich
ProtoScript® First Strand cDNA Syntesis Kit	New England Biolabs
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Life Technologies
tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich

thiokyanát amonný	Sigma-Aldrich
tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	SERVA Electrophoresis
TRITON X-100	Sigma-Aldrich
trypsin	Sigma-Aldrich
Tween 20	MP

3.1.4 Roztoky

- AA+Bis roztok (200 ml): 58,4 g AA; 1,6 g Bis+AA (rozpuštěno v objemu 200 ml H₂O)
- APS 10%: 0,1 g APS; 1 ml H₂O
- blotovací pufr 10×: 30,3 g TRIS; 144 g glycin; 1 l H₂O
- DNA nanášecí pufr 10×: 25 mg bromfenolová modř; 1 ml 10% SDS; 7 ml H₂O; 3 ml glycerol
- EDTA 0,5 mM (500 ml): 0,073 g EDTA; 450 ml PBS
- EGTA 0,5% (500 ml): 2,5 g EGTA; 500 ml PBS; úprava pH na 7,2; přefiltrováno přes 0,22 µm filtr
- ELFO pufr 10× (1 l): 30,24 g TRIS; 144 g glycin; 10 g SDS
- kultivační médium DMEM 10% (500 ml): 440 ml DMEM; 50 ml fetální sérum; 5 ml penicilin-streptomycin roztok; 5 ml glutamin
- lyzační pufr: 1 ml RIPA pufr; 1 µl 1000× leupeptin; 1 µl 1000× aprotinin; 10 µl 100× PMSF; 1 µl 1M DDT
- odbarvovací roztok: 100 ml methanol; 100 ml kyseliny octové; 800 ml H₂O
- PBS (1 l): 3,58 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 950 ml H₂O; úprava pH na hodnotu 7,4; doplnění do 1 l, přefiltrování přes 0,22 µm filtr
- SDS 10%: 5 g SDS; 50 ml H₂O
- SDS 5× (10 ml): 3,1 ml 1M TRIS pH 6,8; 1 g SDS; 5 ml glycerol; 0,5 ml 1% BPB; 0,5 ml 2-merkaptoethanol
- TAE pufr 10× (0,5 l): 199,8 ml 1M TRIS pH 8,8; 8 ml koncentrované ledové octové kyseliny; 10 ml 0,5M EDTA (úprava pH na hodnotu 8 a doplnění H₂O do 0,5 l)
- TBS: 4,84 g TRIS; 58,44 g NaCl; 1 l voda; úprava pH na hodnotu 7,5; doplnění do 2 l
- TRIS pH 6,8: 24,23 g 1M TRIS; 200 ml HCl
- TRIS pH 8,8: 48,46 g 1M TRIS; 400 ml HCl
- trizol (100 ml): 40,65 g fenol; 9,46 g guanidine thiokyanát; 3,16 g thiokyanát amonný; 3,33 ml 3M acetát sodný (pH 5); 5 ml glycerol

3.1.5 Testované látky

V rámci praktické části bakalářské práce byly testovány cytokininy N⁹-tetrahydropyranyl kinetin (PK), benzylaminopurin (BAP), isopentenylaminopurin (iP), kinetin (K), kinetin ribosid (KR), m-topolin (mT), o-topolin (oT), p-topolin (pT), trans-zeatin (tZ), 859, 861, 1639, 1641, 1651, 1796, 1828, 1830, 1852, 1890, 1891, 1892, 1895, 1896, 1914, 1925, 2044, 2106, 3174, 3423, 3688, 4031, 4380.

Testované látky pocházely z chemické knihovny Laboratoře růstových regulátorů.

Dále byly testovány inhibitory kinas PF-670462 (Cayman, 14588) a TG003 (Cayman, 10398).

3.1.6 Protilátky

- anti-IKAP (CT) – králičí protilátka (Anaspec, AS-54494), ředění 1:500 v 5% BSA
- koží protilátka proti králičímu IgG s navázanou křenovou peroxidasou (Santa Cruz, sc-2030), ředění 1:5000 v 5% BSA

3.1.7 Primery

- FD_2productsA1_F: 5'-GTTCTGCGGAAAGTGGAGA-3' (Sigma) - T_m = 63,1 °C
- FD_2productsC_F: 5'-CAGGTGTCGCTTTTTCATCA-3' (Sigma) - T_m = 63,8 °C
- FD_2productsA_R: 5'-CATGCATTCAAATGCCTCTTT-3' (Sigma) - T_m = 63,8 °C
- FDwt1r: 5'-CATTTCCAAGAAACACCTTAGGG-3' (Sigma) - T_m = 64,4 °C

3.1.8 Buněčné linie

Primární linie:

- BJ – lidské kožní fibroblasty, adherentní (ATTC)
- GM00850 – lidské fibroblasty, adherentní (Coriell)
- GM02343 – lidské fibroblasty, adherentní (Coriell)
- GM04663 – lidské fibroblasty, adherentní (Coriell)

3.2 Použité metody

3.2.1 Kultivace buněk a příprava buněk na experimenty

Buněčné linie byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích T75 (75 cm²) nebo kultivačních miskách, jejichž povrch umožňuje přichycení adherentních buněk. Kultivace probíhala v živném médiu DMEM, které obsahovalo 10 % bovinního fetálního séra, glutamin o finální koncentraci 3,97 M, penicilin (100 IU/ml) a streptomycin (100 µg/ml). Médium obsahovalo dostatek vitaminů, solí, aminokyselin a hodnota pH se pohybovala okolo 7,4. Kultivace proběhla v inkubátoru udržujícím teplotu 36,5-37,5 °C, 5-5,5 % CO₂ a 100% relativní vzdušnou vlhkost. Buňky byly pasážovány při asi 80% konfluenci. Manipulace s buněčnými kulturami probíhala za sterilních podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu.

Pro přípravu experimentu bylo nejprve nutné spočítat buňky pro jejich přesné rozdělení do nových kultivačních lahví či misek. Z kultivačních lahví bylo odsáto médium a zbytek média byl odmyt 1,5 ml EGTA (0,5 mM). Po odsátí EGTA byl přidán 1 ml trypsinu (0,5 g prasečí protein/1 l média). Po dobu působení trypsinu byly lahve umístěny zpět do inkubátoru. Proces uvolňování buněk byl kontrolován pomocí světelného mikroskopu. Po uvolnění adherentních buněk ze dna byla láhev opláchnuta médiem a buňky byly přesunuty do zkumavky. Zkumavka byla zcentrifugována (1 000 g, 5 min, laboratorní teplota). Médium s trypsinem bylo odsáto a byl přidán přesný objem média (5 ml). Pro spočítání buněk byla použita Bürkerova komůrka, kam bylo přeneseno 10 µl suspenze. Suspenze byla následně vhodně zředěna a buňky byly nasazeny do kultivačních lahví nebo misek v požadovaném počtu. Médium a roztoky byly vždy vytemperovány na 37 °C.

Následující den bylo do kultivačních lahví či misek přidána testovaná látka rozpuštěná v DMSO. Obsah DMSO byl obvykle nižší než 0,1 %. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze DMSO ve stejném objemu jako testované látky. Buňky byly s testovanou látkou inkubovány požadovanou dobu (24-94 hodin).

3.2.2 Sklizení buněk pro analýzu RNA a izolace RNA

Z kultivačních nádob bylo odsáto médium a ihned byl přidán 1 ml trizolu. Buňky byly do trizolu seškrábány škrabkou a přemístěny do 1,5 ml mikrozkuřavky. Následujících 5 minut se v trizolu buňky inkubovaly. Poté byly vzorky buď rovnou zpracovány nebo uloženy v -80 °C. Po izolaci byla koncentrace a kvalita RNA vyhodnocena na základě měření na NanoDropu. Poměr hodnot naměřených při 260 a 280 nm, který udává čistotu RNA, se vždy nacházel mezi hodnotami 1,9-2,1.

Izolace RNA klasickou metodou

Ke vzorku v 1 ml trizolu bylo přidáno 200 µl chloroformu. Mikrozkuřavka byla zvortexována po dobu 30 s a následně byla inkubována při pokojové teplotě 10 minut. Následně byl vzorek stočen na centrifuze (12 557 g, 15 min, 4 °C). Vodná část obsahující RNA umístěná po stočení nad prstencem DNA, byla přemístěna do nové sterilní 1,5 ml mikrozkuřavky. Po stěně bylo přidáno stejné množství vychlazeného isopropanolu. Roztoky byly promíchány krátkým a opakovaným protřepáním. Mikrozkuřavka byla inkubována při pokojové teplotě 5 minut a následně zcentrifugována (12 557 g, 10 min, 4 °C). Po centrifugaci byl od peletu oddělen supernatant. K peletu byl přidán 1,5 ml 70% ethanolu a vzorek byl zvortexován tak, aby se pelet odlepil ode dna. Po zvortexování byl vzorek zcentrifugován (12 557 g, 5 min, 4 °C). Poté byl odstraněn supernatant. Pelet byl usušen v otevřených mikrozkuřavkách v laminárním boxu, dokud pelet nezprůhledněl. K peletu bylo následně přidána sterilní voda v množství přizpůsobeném velikosti peletu (25-100 µl). Vzorek byl inkubován v 60 °C po dobu 10 minut a následně byl ochlazen na ledu. Vzorek byl zamražen v -80 °C.

Izolace RNA pomocí kolonek

K izolaci byl použit PureLink® RNA Mini kitu (Ambion, Life Technologies). Ke vzorku v 1 ml trizolu bylo přidáno 200 µl chloroformu. Mikrozkuřavka byla řádně protřepána asi 15 s. Mikrozkuřavky se inkubovaly 3 minuty při laboratorní teplotě a následně byly zcentrifugovány (12 557 g, 15 min, 4 °C). Vodná fáze nad prstencem DNA

byla přenesena do nové mikrozkuřavky, kam bylo následně přidáno stejné množství 70% ethanolu. Mikrozkuřavky byly promíchány pomocí vortexu. Vzorky byly naneseny na kolonku a mikrozkuřavky byly zcentrifugovány při laboratorní teplotě (12 000 g, 15 s). Kolonka byla následně promyta 700 μ l promývacího pufru I, po promytí byla mikrozkuřavka zcentrifugována při laboratorní teplotě (12 000 g, 15 s). Kolonka byla následně dvakrát promyta 500 μ l promývacího pufru II, který byl předem pětkrát zředěn 96% ethanolem. Po každém promytí byla mikrozkuřavka zcentrifugována při laboratorní teplotě (12 000, 15 s). Následně byla mikrozkuřavka s kolonkou zcentrifugována za účelem proschnutí membrány za laboratorní teploty (12 000 g, 1 min). Na kolonku se následně aplikovalo 30 μ l sterilní vody (RNase-free), kolonka se s vodou inkubovala 1 minutu a následně byla mikrozkuřavka zcentrifugována při laboratorní teplotě (12 000, 2 min).

3.2.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce (RT) byla provedena pomocí ProtoScript® First Strand cDNA Syntesis kitu.

Tab. 1: Složení RT-PCR směsi.

	Objem na 1 reakci (μ l)
2× reakční pufr	10
10× enzymový mix	2
50 μM d(T)₂₃ VN	2
RNA	podle koncentrace
RNase-free voda	podle objemu RNA

Koncentrace RNA je před provedením RT změřena na NanoDropu a je vhodně zředěna do RT reakce tak, aby její koncentrace byla maximálně 1 μ g/ μ l a celkový objem v reakci nepřesáhl 6 μ l. Pokud je přidávané množství RNA menší než 6 μ l, je celý objem směsi RT doplněn do 20 μ l sterilní RNase-free vodou.

Reakce probíhala v termobloku. Před reakcí proběhla počáteční denaturací při 60 °C po dobu 5 minut. Samotná reakce probíhala při 42 °C po dobu 1 h. Poté byla teplota na

5 minut zvýšena na 80 °C. Po skončení RT byly vzorky zamrazeny v -20 °C nebo ihned použity pro polymerasovou řetězovou reakci.

3.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena podle následujícího rozpisu s využitím JumpStart polymerasy (Sigma) a přiloženého 10× PCR pufru. Před přípravou byly všechny komponenty rozmrazeny na ledě. Při přípravě PCR směsi bylo vše uchováváno na ledě.

Tab. 2: Složení PCR směsi.

	Objem na 1 reakci (μl)
sterilní voda	14,52
10× PCR pufr	2
10 mM deoxynukleotidy	0,72
forward primer	0,18
reverse primer	0,18
JumpStart polymerasa	0,40
cDNA	2

Všechny složky byly napipetovány sterilními špičkami do sterilních stripů. Stripy byly zcentrifugovány (500 g, 5 s) a umístěny do cykleru, na kterém byly nastaveny následující podmínky.

Tab. 3: Teplota a doba jednotlivých kroků PCR.

	Teplota (°C)	Čas (s)
Počáteční denaturace	94	300
Denaturace	94	40
Annealing	podle použitých primerů	30
Extenze	72	90
Finální extenze	72	300

Teplota annealingu byla spočítána jako průměr T_m F a R primeru. Celkově bylo provedeno podle potřeby 25-40 cyklů. Po skončení finální extenze byly stripy v cykleru ochlazeny na 4 °C. Stripy byly uloženy na led.

3.2.5 Elektroforetická separace produktů PCR a jejich detekce a vizualizace

Elektroforetická separace probíhala v horizontálním uspořádání v 1% agarosovém gelu.

Agarosa byla dokonale rozvařena a po zchladnutí na 60°C byl přidán roztok ethidium bromidu (výsledná koncentrace 0,5 µg/ml). Po ztuhnutí gelu ve vaničce s hřebínkem byl hřebínek vyjmut a gel spolu s vaničkou umístěn do elektroforetické vany, která byla následně naplněna vychlazeným 1× TAE pufrem tak, aby hladina byla cca 5 mm na gelem.

Do první jamky bylo napipetováno 3 µl markeru molekulové hmotnosti (Large DNA ladder). Do dalších jamek bylo napipetováno 5 nebo 10 µl z PCR produktu. Vzorky byly naneseny spolu s 10× DNA nanášecím pufrem. Elektroforéza probíhala cca 20-30 minut při napětí 100 V.

Detekce a vizualizace nukleových kyselin probíhala v UV-transiluminátoru FLA-4000 (Fujifilm). Detekce byla založena na tom, že ethidium bromid interkaluje do DNA a po absorpci UV záření emituje záření o vlnové délce 605 nm. Byly pořízeny fotografie gelů se zviditelněnými nukleovými kyselinami.

3.2.6 Sklizení buněk pro analýzu proteinů

Celý proces sklizení buněk probíhal na ledu. Po odsátí média z kultivačních lahví bylo do lahve přidáno 10 ml vychlazeného PBS. Buňky byly seškrábány do ledového 1× PBS a přeneseny do zkumavek. Zkumavky byly stočeny na centrifuze (460 g, 5 min, 4 °C). Supernatant byl odsán a pelet resuspendován v 10 ml PBS. Zkumavky byly znovu stočeny (460 g, 5 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu byl pelet resuspendován v 1 ml PBS a přenesen do mikrozukmavky. Mikrozukmavky byly stočeny (460 g, 5 min, 4 °C). Supernatant byl odsán a pelet byl zamražen v -80 °C nebo byl rovnou zlyzován.

3.2.7 Příprava proteinových lyzátů

Mikrozkumavky s buněčným peletem byly stočeny na centrifuze (460 g, 45 s) a byl odsán veškerý zbylý supernatant. Pro lýzování buněk byl připraven lyzační pufr. Veškerá manipulace proběhla na ledu.

Tab. 4: Složení lyzačního pufu.

	Objem (μl)
RIPA	1 000
1M DTT	1
1M fluorid sodný	2
1000× aprotinin	1
1000× leupeptin	1
100 mM PMSF	10

K peletu bylo přidáno 10-20 μl lyzačního pufu. Buňky byly sonifikovány ultrazvukovou sondou (10 s, 3 cykly). Mikrozkumavky byly stočeny na centrifuze (22 324 g, 30 min, 4 °C). Supernatant byl odpipetován do nových zkumavek a jeho přesné množství zaznamenáno. Koncentrace proteinů byla zjištěna metodou Bradfordové. Ke vzorkům byl přidán 4× SDS s merkaptoethanolem a lyzační pufr, kromě vzorku s nejnižší absorbancí, ke kterému se přidal pouze 4× SDS s merkaptoethanolem, tak, aby všechny připravené proteinové vzorky měly stejnou koncentraci.

3.2.8 Elektroforetická separace proteinů, Western blotting a imunodetekce

Mikrozkumavky s buněčnými lyzáty byly umístěny na 2 minuty do termobloku vytemperovaného na 95.5 °C. Buněčné lyzáty byly separovány pomocí vertikální elektroforézy s 12.5% dělicím gelem a 5% zaostřovacím gelem. Mezi skla byl nejprve nalit dělicí gel, který byl převrstven n-butanolem. Po ztuhnutí dělicího gelu byl n-butanol odmyt a na dělicí gel nalit zaostřovací gel. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byla sestavena elektroforetická aparatura. Do komůrky byl nalit 1× ELFO pufr. Do první jamky gelu byl aplikován proteinový hmotnostní standard. Do dalších jamek byly aplikovány denaturované

vzorky. Objem aplikovaného vzorku se odvíjel od koncentrace proteinů, přičemž do jamek bylo aplikováno 25–40 μg proteinů. Elektroforéza probíhala po dobu cca 1 hodiny při 80 V, následně bylo napětí zvýšeno na 120 V a elektroforéza pokračovala další hodinu.

Tab. 5: Složení 12,5% dělicího gelu.

	Objem (μl)
AA+Bis	1 560
H₂O	775
TRIS pH 8.8	1 400
10% SDS	37,5
Temed	2,5
10% APS	15

Tab. 6: Složení 5% zaostřovacího gelu.

	Objem (μl)
AA+Bis	417,5
H₂O	1 757,5
TRIS pH 6.8	312,5
10% SDS	25
Temed	2,5
10% APS	15

Po dokončení elektroforézy byl gel přesunut do blotovací kazety. Blotovací kazeta obsahovala porézní podložku, 2 kusy v blotovacím pufru namočených filtračních papírů, gel, blotovací nitroceluloseovou membránu, 2 kusy namočených filtračních papírů a druhou porézní podložku. Blotovací kazeta byla umístěna do blotovací komůrky, která byla následně naplněna 1 \times blotovacím pufrem. Do komůrky byla umístěna i kazeta s ledem a magnetické míchátko. Komůrka byla uzavřena a umístěna na magnetickou míchačku. Blotování probíhalo 2 hodiny při 270 mA. Po blotování byla membrána 5 minut barvena v roztoku

Ponceau S, následně několikrát opláchnuta destilovanou vodou. Po dokonalém opláchnutí byla membrána usušena.

Následovala imunodetekce na membráně. Membrána byla vhodně ořezána dle velikosti cílového proteinu a poté na třepačce opláchnuta v PBS do úplného odbarvení. Poté byla membrána blokována na kývačce v roztoku 5% BSA v TBS s 0,1% Tween po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Membrána byla omyta v PBS. Poté byla umístěna na parafilm a na membránu byla nanесena primární protilátka naředěná v roztoku BSA (500-5000×). Inkubace probíhala přes noc v lednici v uzavřené vlhké komůrce. Po ukončení inkubace byla membrána promyta na kývačce 5 minut v PBS, 5 minut v PBS s Tweenem, 5 minut v PBS a 10 minut v PBS. Promytá membrána byla umístěna na parafilm a byla na ni aplikována sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou naředěná v PBS s Tweenem, se kterou se membrána inkubovala 1 hodinu. Po inkubaci probíhalo stejné promývání jako po aplikaci primární protilátky. Detekce byla provedena chemiluminiscencí. Na osušenou membránu byl aplikován komerční roztok peroxidu a luminolu (1:1). Chemiluminiscence byla pozorována pomocí přístroje LAS-4000. Byly pořízeny fotografie membrány v různých časech (1 s-1 h) pomocí CCD kamery.

3.2.9 Generování chemických vzorců

Vzorci byly vygenerovány v programu Open Babel (www.openbabel.org) ze SMILES, které byly získány z databáze Pubchem.

4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace podmínek pro sledování vlivu cytokininů na sestřih IKBKAP pre-mRNA pomocí PCR po reverzní transkripci

Použita byla PCR po reverzní transkripci následovaná elektroforézou v agarosovém gelu. Mediátorová RNA pocházela ze tří linií fibroblastů GM00850, GM02343 a GM04663, které jsou homozygotní pro mutaci IVS20+6T>C. Ta snižuje schopnost sestřihového aparátu rozpoznat exon 20. Ten pak v části populace mRNA chybí.

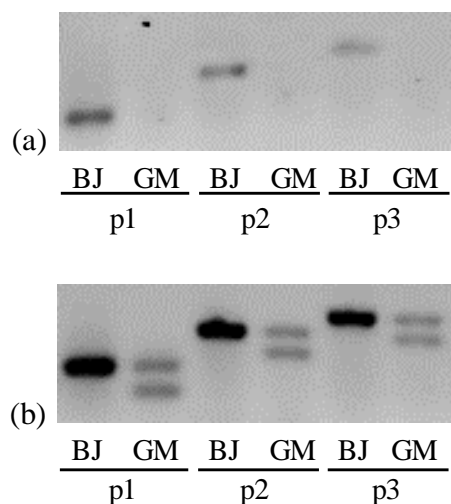
Jako kontrola sloužily fibroblasty BJ bez mutace. Primery ohraničovaly exon 20, mohly tedy vznikat dva PCR produkty odpovídající transkriptu obsahujícím exon 20 (WT) a mutantovi (MUT), lišící se o 74 nt. Kvantifikace standardního a aberantního transkriptu byla z fotografií provedena denzitometricky v programu ImageJ.

4.1.1 Vliv počtu cyklů a volba primerů

Při optimalizaci byly testovány následující páry primerů:

- FD_2productsC_F a FDwt1r, které tvoří 422 nt (WT) a 348 nt (MUT) produkty,
- FD_2productsC_F a FD_productsA_R, které tvoří 358 nt (WT) a 284 nt (MUT) produkty,
- FD_2productsA1_F a FDwt1r, které tvoří 241 nt (WT) a 167 nt (MUT) produkty.

Pro optimalizaci počtu cyklů a volbu párů primerů byla použita linie GM00850, tři páry primerů a 25 a 30 PCR cyklů.



Obr. 28: Optimalizace počtu cyklů a volba párů primerů. (a) 25 cyklů, (b) 30 cyklů. Primery: *FD_2productsA1_F* a *FDwt1r* (p1), *FD_2productsC_F* a *FD_productsA_R* (p2), *FD_2productsC_F* a *FDwt1r* (p3).

Všechny tři kombinace primerů poskytovaly produkt odpovídající standardnímu typu (WT) v případě linie BJ, u linií nesoucích mutaci byl navíc přítomen produkt menší (Obr. 28).

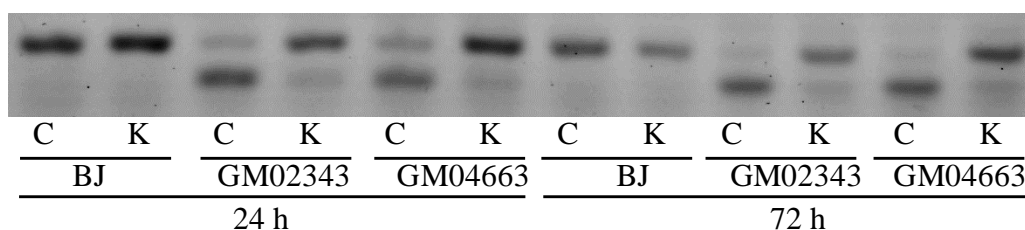
Primery *FD_2productsA1_F* s *FDwt1r* vykazovaly nescifické nasedání i při zvýšené teplotě, a proto je nebylo možné použít při více jak 30 PCR cyklech. Nejlepší výsledky poskytovaly páry primerů *FD_2prouctsC_F* s *FD_productsA_R* a *FD_2productsC_F* s *Fdwt1r*. Ty byly následně použity pro sledování vlivu cytokininů na sestřih *IKBKAP* pre-mRNA.

Z experimentu je také patrné, že je třeba použít více než 25 PCR cyklů, protože v tomto počtu PCR cyklů nedošlo k dostatečné amplifikaci v PCR reakci s GM00850 (Obr. 28).

4.1.2 Volba buněčných linií a vliv doby kultivace s testovanými látkami

Ve všech následujících experimentech s testovanými látkami byl použit minimálně jeden kontrolní vzorek (C), který místo testované látky obsahoval rozpouštědlo DMSO v objemu odpovídajícím přidávanému objemu roztoku testované látky. Jako pozitivní kontrola sloužil K (100 μ M), u něhož již bylo prokázáno, že zvyšuje množství WT IKBKAP mRNA za současného snižování množství MU IKBKAP mRNA (Slaugenhaupt *et al.*, 2004).

V následujícím experimentu byly použity fibroblasty bez mutace BJ a dvě linie s mutací: GM02343 a GM04663. V experimentu byl sledován vliv doby inkubace s pozitivní kontrolou K na poměr mezi normální (WT) a mutantní (MUT) mRNA, která neobsahuje exon 20. Bylo provedeno 30 PCR cyklů s primery FD_2productsA1_F a FDwt1r.



Obr. 29: Elektroforéza produktů PCR - vliv délky kultivace s testovanou látkou. C - kontrola, K - kinetin (100 μ M). Bylo použito 30 PCR cyklů s primery FD_2productsA1_F a FDwt1r.

Výrazný efekt kinetinu na sestřih IKBKAP pre-mRNA byl pozorován v obou liniích, a proto byly i nadále používány v následujících experimentech (Obr. 29).

Doba 24 hodin pro kultivaci buněčných linií s testovanými látkami byla dostačující pro dosažení efektu, protože při delší době (72 hodin) nedošlo k výraznějším změnám (Obr. 29). V dalších experimentech byla používána 24 hodinová inkubace.

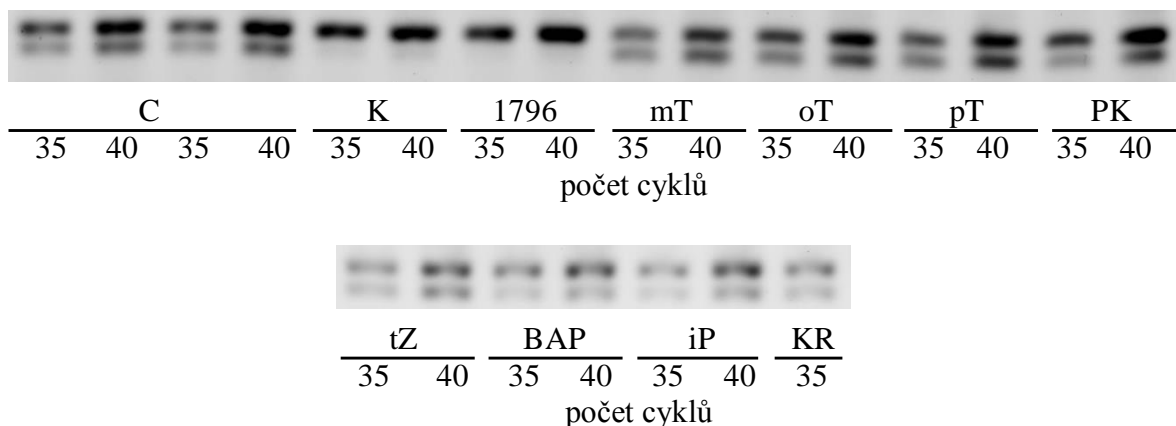
4.2 Testování vlivu cytokininů na sestřih IKBKAP pre-mRNA

V následujících experimentech byla testována aktivita přírodních cytokininů (mT, oT, pT, PK, tZ, BAP, iP, K), série dvaceti tří syntetických derivátů kinetinu a také dvou inhibitorů vybraných kinas regulujících sestřih (TG003 (TG) pro Clk1/4 a PF-670462 (PF) pro CSNK1D). S výjimkou inhibitorů kinas, které byly testovány jako 10 μM a KR, který byl testován jako 3 μM , byly látky testovány v 100 μM koncentraci.

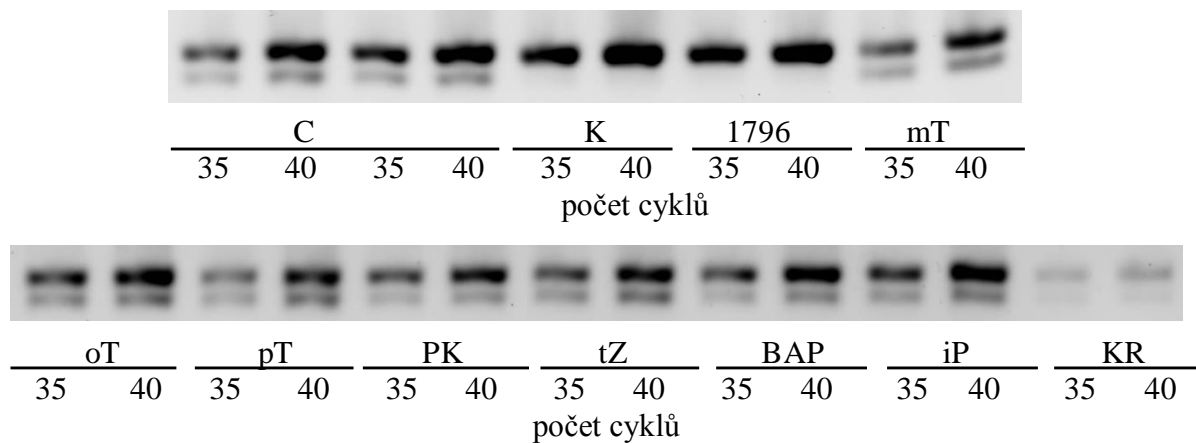
Fibroblasty byly s testovanými látkami kultivovány 24 hodin.

Efekt přírodních cytokininů mT, oT, pT, PK, tZ, BAP, iP, KR a kinetinového derivátu 1796 byl sledován v linii GM04663.

PCR byla provedena s dvěma různými páry primerů. PCR byla po 35 cyklech přerušena a část vzorku odebrána. Poté proběhlo dalších 5 cyklů. Mediátorová RNA v obou PCR reakcích pocházela z téhož pokusu a izolace. Smyslem použití dvou páru primerů a různého počtu PCR cyklů bylo posoudit vliv podmínek reakce na poměr sledovaných transkriptů.



Obr. 30: Elektroforéza PCR produktů vytvořených s primery *FD_2productsC_F* a *FD_productsA_R*. Vzorky v první jamce jsou vždy PCR produkty 35 cyklů, v následující jamce PCR produkt 40 cyklů. Poslední vzorek je pouze PCR produkt 35 cyklů. C - kontrola.

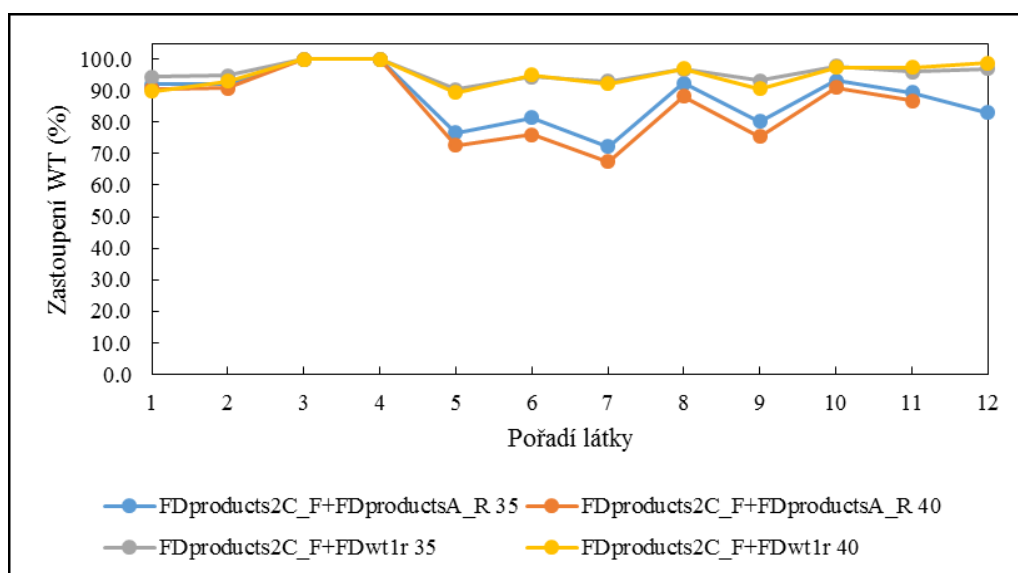


Obr. 31: Elektroforéza PCR produktů vytvořených s primery *FD_2productsC_F* a *FDwt1r*. Vzorky byly tak, že, v první jamce je vždy PCR produkt 35 cyklů, v následující jamce PCR produkt 40 cyklů. C - kontrola.

Pomocí programu ImageJ byly fotografie gelů vyhodnoceny a bylo vypočítáno zastoupení WT jako poměr plochy píku elektroforegramu pro WT a součtu ploch píků WT a MUT (celkové množství transkriptů).

Tab. 7: Hodnocení vlivu počtu cyklů a použitých párech primerů na denzitometrické stanovení zastoupení WT.

Primery	FD_2productsC_F+FD_productsA_R	FD_2productsC_F+FDwt1r			
Počet cyklů	35	40			
Pořadí	Látka	Zastoupení WT (%)			
1	DMSO	91,9	90,5	94,5	89,9
2	DMSO	92,2	90,8	94,7	93,0
3	K	99,9	99,9	99,9	99,9
4	1796	99,9	99,9	99,9	99,9
5	mT	76,7	72,7	90,3	89,5
6	oT	81,4	76,1	94,4	94,9
7	pT	72,3	67,5	93,0	92,1
8	PK	92,3	88,2	96,8	96,9
9	tZ	80,3	75,4	93,3	90,5
10	BAP	93,2	91,0	97,8	97,3
11	iP	89,4	86,9	95,9	97,3
12	KR	83,0	-	97,0	98,8



Obr. 32: Grafické znázornění vlivu použitých primerů a počtu cyklů na denzitometrické stanovení zastoupení WT.

Z grafického znázornění vlivu použitých primerů a počtu cyklů (Obr. 32) je patrné, že v tomto experimentu na relativní množství WT produktu měl vliv především výběr primerů. Zvýšení počtu cyklů PCR zastoupení buď neovlivňovalo, nebo v případě primerů FD_2productsC_F a FD_productsA_R mírně snižovalo zastoupení WT formy. Důvody případné přednostní amplifikace jedné z variant jsou nejasné. Opakované a detailnější studium vlivu podmínek nebylo provedeno z časových důvodů. V dalších experimentech byly používány primery FD_2productsC_F s FD_productsA_R, které pravděpodobně umožňují lépe pozorovat rozdíly mezi aktivitou různých látek.

Tab. 8: Hodnocení vlivu testovaných látek na IKBKAP pre-mRNA sestřih v linii GM04663. Kvantifikace byla provedena z jednoho opakování pomocí programu ImageJ a fotografie gelu z elektroforézy PCR produktů, které byly vytvořeny s primery FD_2productsC_F a FD_productsA_R (Obr. 30). Zastoupení WT je vypočítáno jako průměr procentuálního zastoupení WT při 35 a 40 PCR cyklech.

Testovaná látka	Koncentrace (μM)	Zastoupení WT (%)
DMSO	-	91,2
DMSO	-	91,5
K	100	99,9
1796	100	99,9
mT	100	74,7
oT	100	78,8
pT	100	69,9
PK	100	90,3
tZ	100	77,8
BAP	100	92,1
iP	100	88,1
KR	3	83,0

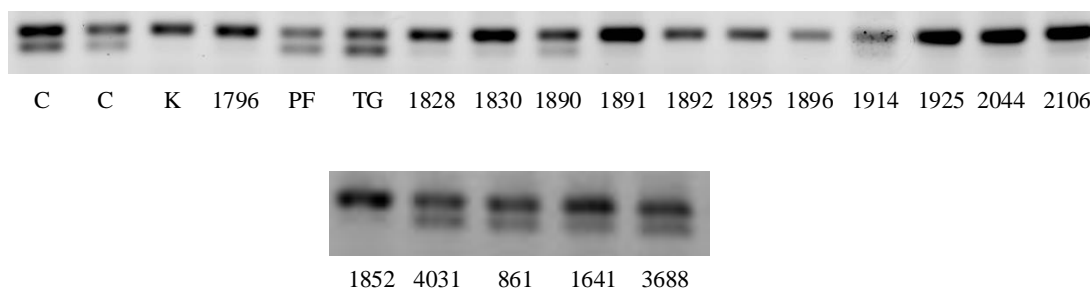
Tab. 9: Hodnocení vlivu testovaných látek na IKBKAP pre-mRNA sestřih v linii GM04663. Kvantifikace byla provedena z jednoho opakování pomocí programu ImageJ a fotografie gelu z elektroforézy PCR produktů, které byly vytvořeny s primery FD_2productsC_F a FDwt1r (Obr. 31). Zastoupení WT je vypočítáno jako průměr procentuálního zastoupení WT při 35 a 40 PCR cyklech.

Testovaná látka	Koncentrace (μM)	Zastoupení WT (%)
DMSO	-	92,2
DMSO	-	93,9
K	100	99,9
1796	100	99,9
mT	100	89,9
oT	100	94,7
pT	100	92,5
PK	100	96,9
tZ	100	91,9
BAP	100	97,5
iP	100	96,6
KR	3	97,9

Porovnáním zastoupení WT v kontrole a ve vzorcích byla vybrána nejefektivnější látka 1796. BAP má podle literatury na sestřih IKBKAP pre-mRNA také vliv (Slaugenhaupt *et al.*, 2004), v tomto experimentu ale pozorován nebyl.

Dále byly v linii GM04663 testovány látky: PF, TG, 861, 1641, 1828, 1830, 1852, 1890, 1891, 1892, 1895, 1896, 1914, 1925, 2044, 2106, 3688 a 4031.

Použitý použit 35 PCR cyklů s primery FD_2productsC_F a FD_productsA_R. Jako pozitivní kontrola sloužil K a 1796.



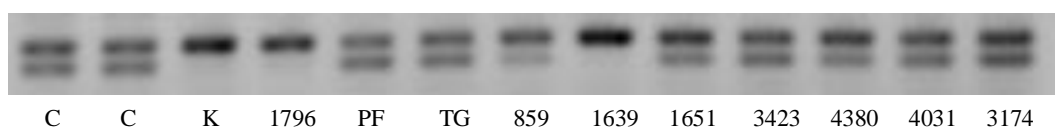
Obr. 33: Elektroforéza PCR produktů. Bylo provedeno 35 PCR cyklů s primery FD_2productsC_F a FD_productsA_R. C - kontrola.

Tab. 10: Hodnocení vlivu testovaných látek na IKBKAP pre-mRNA sestřih. Kvantifikace byla provedena z technických duplikátů pomocí programu ImageJ a fotografie gelu (Obr. 33).

Testovaná látka	Koncentrace (μM)	Zastoupení WT (%)
DMSO	-	88,7
DMSO	-	93,5
PF	10	74,8
TG	10	61,4
861	25	92,6
1641	50	94,3
1828	100	99,9
1830	100	99,9
1852	50	99,9
1890	100	97,3
1891	100	99,9
1892	100	99,9
1895	100	99,9
1896	100	99,9
1914	100	99,9
1925	100	99,9
2044	100	99,9
2106	100	99,9
3688	50	93,6
4031	100	87,1

V tomto experimentu byly aktivní následující látky: 1828, 1830, 1852, 1891, 1892, 1895, 1896, 1914, 1925, 2044, 2106.

V následujícím experimentu byla použita linie GM02343 a 35 PCR cyklů s primery FD_2productsC_F a FD_productsA_R.



Obr. 34: Elektroforéza PCR produktů. Bylo provedeno 35 PCR cyklů s primery FD_2productsC_F a FD_productsA_R. C - kontrola.

Tab. 11: Hodnocení vlivu testovaných látek na IKBKAP pre-mRNA sestřih v linii GM02343. Kvantifikace byla provedena z jednoho opakování pomocí programu ImageJ a fotografie gelu (Obr. 34).

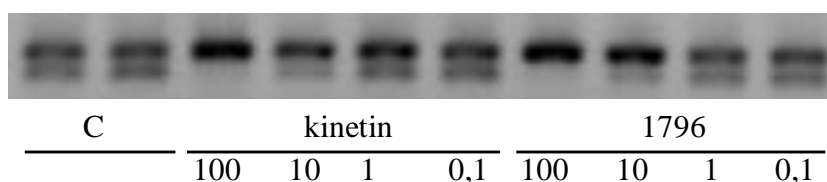
Testovaná látka	Koncentrace (μM)	Zastoupení WT (%)
DMSO	-	69,4
DMSO	-	73,2
K	100	99,9
SK	100	99,9
PF	10	53,7
TG	10	64,6
859	100	93,0
1639	50	99,9
1651	100	86,3
3423	100	66,1
4380	100	85,1
4031	100	72,1
3174	100	68,3

V tomto experimentu byla nalezena látka 1639, která má srovnatelnou aktivitu jako K a 1796.

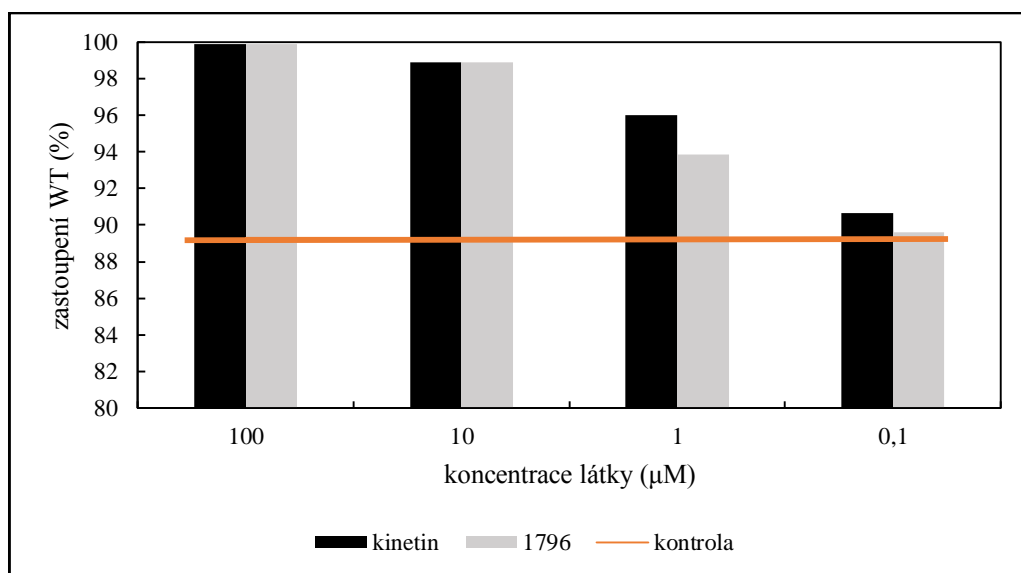
Celkově bylo nalezeno třináct látek, které v koncentraci 50 nebo 100 μM mají srovnatelný vliv na sestřih IKBKAP pre-mRNA jako ekvimolární kinetin. Jedná se o deriváty kinetinu 1639, 1828, 1830, 1852, 1891, 1892, 1895, 1896, 1914, 1925, 2044, 2106. Žádný další přírodní cytokinin aberantní sestřih nekorigoval.

4.3 Srovnání vlivu kinetinu a 1796 na sestřih IKBKAP pre-mRNA

V experimentu byly použity čtyři různé koncentrace K a 1796 a bylo sledováno, jak se liší jejich aktivita. V tomto experimentu byla použita linie GM04663 a 35 PCR cyklů s primery FD_2productsC_F a FD_productsA_R. Ke kontrolnímu vzorku byl přidán DMSO ve stejném objemu jako testované látky.



Obr. 35: Elektroforéza PCR produktů – srovnání aktivity kinetinu a 1796. Bylo provedeno 35 PCR cyklů s primery FD_2productsC_F a FD_productsA_R. Kontrolní vzorky jsou v duplikátu. Koncentrace je uvedena v μM . C - kontrola.



Obr. 36: Srovnání aktivity kinetinu a 1796. Oranžová čára značí průměrnou hodnotu zastoupení WT u kontrolních vzorků.

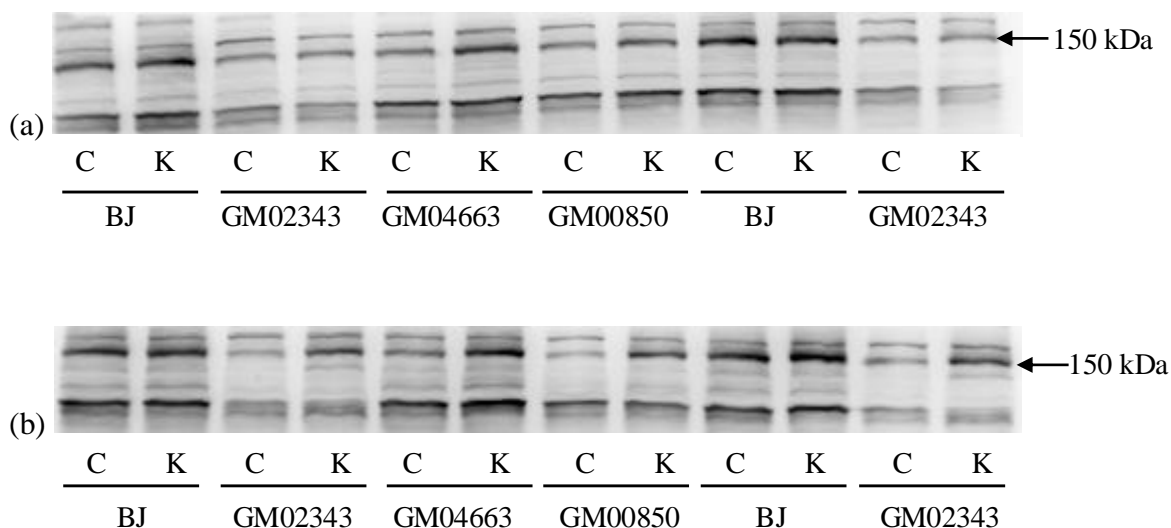
Z experimentu srovnávajícího aktivity K a 1796 se zdá, že obě látky mají srovnatelnou aktivitu při koncentracích 100 μM a 10 μM . U koncentrací 1 μM a 0,1 μM byl kinetinu na sestřih IKBKAP pre-mRNA je větší, molekula 1796 v koncentraci 0,1 μM nemá v porovnání s kontrolami žádný efekt (Obr. 36), přičemž u dvou kontrolních vzorků bylo zastoupení WT 87,6 a 91 %.

Tento experiment byl proveden pouze jednou a jednotlivé podmínky nebyly replikovány. Výsledky ale umožňují učinit závěr, že mnou objevený modulátor sestřihu 1796 pravděpodobně není aktivnější než známý modulátor kinetin.

4.4 Vliv kinetinu na hladinu proteinu IKAP

Gen IKBKAP kóduje protein IKAP, který má 150 kDa. Transkripty bez exonu 20 nejsou schopny poskytnout proteinový produkt, hladiny IKAP v buňce jsou pak nižší. Množství proteinu bylo detekováno pomocí imunoblotu po denaturační elektroforéze v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Snímky byly hodnoceny denzitometricky v programu ImageJ.

Jako kontrola množství proteinu sloužila imunodetekce aktinu případně tubulinu. Ke sledování efektu K (100 μ M) byly použity fibroblastové linie GM02343, GM04663 a GM00850 nesoucí mutaci a kontrolní linie BJ. Byly testovány tři různě dlouhé doby kultivace buněčných linií s K a to 24h, 72h a 94 hodin. Výsledky jsou ukázány na Obr. 37 a 38.



Obr. 37: Imunodetekce IKAP: (a) 24 h, (b) 94 h. IKAP 150 kDa, C - kontrola, K - kinetin.

V tomto experimentu se z technických důvodů nepodařila detekce aktinu.

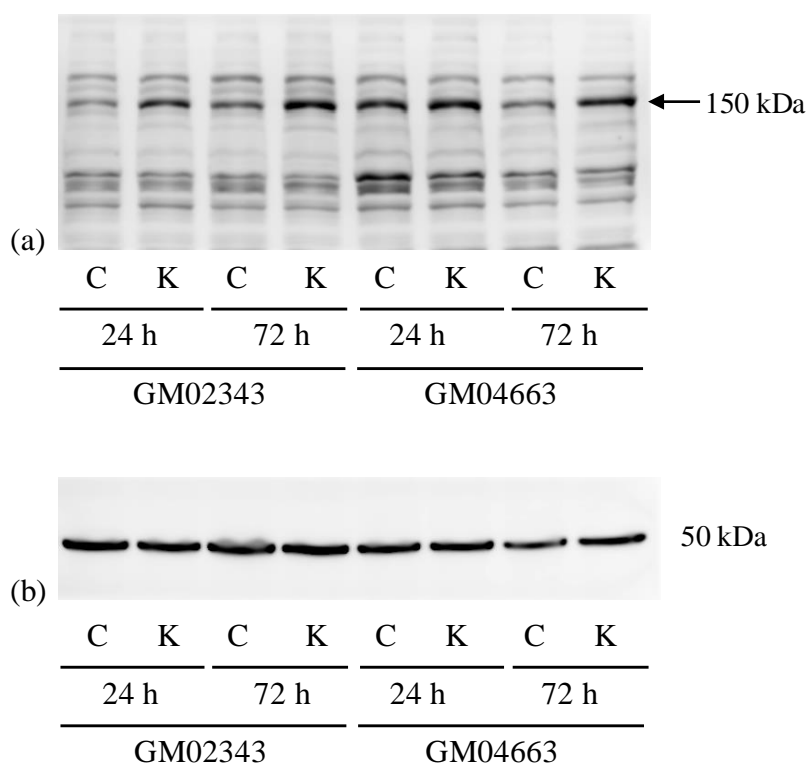
Pro použitou protilátkou anti-*IKAP* (Anaspec, AS-54494) výrobce uvádí, že detekovaný produkt má velikost 100 kDa. V literatuře a databázích se obvykle uvádí, velikost *IKAP* 150 kDa (Uniprot: O95163). Protilátka je schopna detekovat protein o této velikosti i podle literatury (Cohen-Kupiec *et al.*, 2010). Za směrodatný byl považován proužek o této velikosti.

Pomocí programu ImageJ byl vyhodnoceno zvýšení množství proteinu IKAP jako poměr plochy píku bandu IKAP ovlivněným kinetinem/plocha píku bandu kontrolního IKAP bez přidaného kinetinu (poměr K/C).

Tab. 12: Vliv kinetinu na hladinu IKAP. Poměr K/C vyjadřuje kolikrát je zvýšená hladina IKAP při použití 100 μ M kinetinu oproti kontrole s DMSO.

Linie	Poměr K/C po	
	24h	94h
BJ	1,29	1,05
BJ	1,00	1,14
GM02343	0,75	2,04
GM02343	0,93	1,98
GM04663	1,87	1,82

Kinetin o koncentraci 100 μ M zvýšil hladinu IKAP a to konkrétně 2krát v GM02343, 1,8krát v GM04663 po 94 hodinové kultivaci s K. Po 24 hodinách kultivace s K zvýšil hladinu IKAP pouze v linii GM04663.



Obr. 38: Imunodetekce IKAP – vliv doby kultivace s 100 μ M kinetinem. (a) IKAP 150 kDa, (b) tubulin 50 kDa. C - kontrola, K - kinetin.

Tab. 13: Vliv kinetinu na hladinu IKAP – srovnání doby kultivace 24h a 72h. Poměr K/C vyjadřuje kolikrát je zvýšená hladina IKAP při použití 100 μ M kinetinu oproti kontrole s DMSO.

Linie	Poměr K/C	Poměr K/C
	po 24h	po 72h
GM02343	1,69	1,70
GM04663	1,15	2,05

Kinetin o koncentraci 100 μ M zvýšil hladinu IKAP v obou testovaných liniích, konkrétně 1,7krát v GM02343 a 2krát v GM04663 po 72 hodinové kultivaci s K. Oproti předchozímu experimentu zde došlo pouze k mírnému zvýšení hladiny IKAP v GM04663 a hladina IKAP byla zvýšena 1,7krát v GM02343.

Kinetin zvyšoval intenzitu proužku o velikosti 150 kDa, o kterém předpokládáme, že je cílovým proteinem. Efekt byl pozorován v několika liniích a časech. Použití více replikátů a následné statistické zpracování by zvýšilo důvěryhodnost těchto pozorování.

5 DISKUSE A ZÁVĚR

Familiární dysautonomie je autosomálně recesivní periferní neuropatie způsobena mutacemi v IKBKAP genu. Nejčastěji se vyskytuje mutace IVS20+6T>C, která způsobuje vynechání exonu 20 při sestřihu pre-mRNA. Efekt není absolutní, v buňkách se stále tvoří i standardní transkript, ale v nižším množství. Podobně jako v případě dalších onemocnění způsobených aberantním sestřihem je současná léčba symptomatická. Ve vývoji jsou ale látky, které jsou schopné zvyšovat koncentraci transkriptu v plné délce a jednou z nich je cytokinin kinetin.

Práce se zabývá optimalizací metod pro sledování vlivu cytokininů na expresi v IKBKAP v liniích pocházejících z pacientů homozygotních pro mutaci IVS20+6T>C. PCR po reverzní transkripci byla použita ke sledování sestřihu IKBKAP. Za tímto účelem jsem optimalizovala PCR s několika páry primerů nasedajícími na oblast cDNA ohraničující exon 20. U postižených liniích pak vznikají 2 produkty, kromě standardního transkriptu i kratší varianta, která postrádá exon 20. Zastoupení jednotlivých variant je možné hodnotit pomocí denzitometrie po separaci v agarosovém gelu. Několik dvojic primerů jsem testovala proto, že jsem chtěla získat představu, jaký vliv to bude mít na poměr transkriptů. Aplikace kinetinu (100 μ M), který byl použit jako pozitivní kontrola, vedla k vymizení aberantního transkriptu ve třech různých liniích: GM00850, GM02343 a GM04663.

Optimalizovaná metoda byla použita pro testování dalších látek, což je popsáno níže. Důsledkem aberantního sestřihu je snížení produkce proteinu IKAP. Efekt kinetinu na jeho hladiny jsem testovala pomocí imunodetekce po elektroforéze (SDS-PAGE) a westernovém přenosu. Ve vzorcích ovlivněných kinetinem jsem pozorovala zvýšení intenzity proužku o velikosti asi 150 kD, což odpovídá molekulové hmotnosti IKBKAP. Efekt byl patrný v několika liniích a časech. Výsledky je zatím nutno považovat za předběžné, mj. i kvůli nízké replikaci. Tato metoda bude v budoucnu použita pro ověření efektu látek, u kterých bude pozorován pozitivní efekt na úrovni RNA.

Pomocí optimalizované PCR po reverzní transkripci jsem se pokusila vyhledat i další aktivní látky v knihovně Laboratoře růstových regulátorů. Zatímco žádný z přirozených cytokininů neměl pozitivní efekt, mezi syntetickými deriváty kinetinu jsem identifikovala 13 aktivních látek. Schopnost látky 1639 (2-chlorokinetin) byla bohužel nezávisle popsána v roce 2015 japonskými autory (Yoshida *et al.*, 2015). Zatímco pozitivní efekt kinetinu a látek 1796 a 1639 jsem pozorovala opakovaně, pokus s ostatními látkami byl proveden jen jednou. Výsledky jsou tedy předběžné. Také jsem testovala efekt TG003 a PF-670462, inhibitorů kinas a Clk1/4 a CSNK1D, které hrají roli v regulaci sestřihu. Látky neovlivňovaly tvorbu aberantního transkriptu. Cytokininy tedy působí jiným molekulárním mechanismem.

Přestože PCR po reverzní transkripci následovaná dělením v agarosovém gelu mi umožnila získat užitečné výsledky, metoda je poměrně neefektivní. Rychlejší alternativou by mohla být detekce využívající real-time PCR. V jedné reakci by se kvantifikoval standardní a v druhé mutantní transkript. Mediátorovou RNA jsem získávala z kultur na Petriho miskách, zde se nabízí prostor pro miniaturizaci: existují systémy pro paralelní izolaci vzorků přímo z 96-jamkových desek. Ideální možnosti skrínování větší knihovny látek nabízí linie exprimující vektor umožňující sledovat sestřihovou reakci. Je možné, že ke skíninku by se dalo využít i některých vlastností fibroblastů odvozených z pacientů s familiární dysautonií: je například známo, že pomaleji migrují a že mají změněnou fosforylaci některých histonů. Systém s vyšším průtokem by byl výhodný i pro sestavení dávkových křivek jednotlivých inhibitorů.

Zavedením alespoň některých z těchto metod se bude zabývat navazující diplomová práce.

Součástí práce je také rešerše možností farmakologického ovlivnění sestřihu. Ta poslouží jako podklad pro vypracování databáze nízkomolekulárních modulátorů sestřihu.

Cíle bakalářské práce byly splněny.

POUŽITÁ LITERATURA

- Abashidze, A., Gold, V., Anavi, Y., Greenspan, H., Weil, M. (2014) Involvement of IKAP in peripheral target innervation and in specific JNK and NGF signaling in developing PNS neurons. *PLoS One* **9**, e113428.
- Achsel, T., Brahms, H., Kastner, B., Bachi, A., Wilm, M., Lührmann, R. (1999) A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation *in vitro*. *EMBO J.* **18**, 5789-5802.
- Albert, B. J., McPherson, P. A., O'Brien, K., Czaicki, N. L., Destefino, V., Osman, S., Li, M., Day, B. W., Grabowski, P. J., Moore, M. J., Vogt, A., Koide, K. (2009) Meayamycin inhibits pre-messenger RNA splicing and exhibits picomolar activity against multidrug-resistant cells. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2308-2318.
- Albert, B. J., Sivaramakrishnan, A., Naka, T., Czaicki, N. L., Koide, K. (2007) Total syntheses, fragmentation studies, and antitumor/antiproliferative activities of FR901464 and its low picomolar analogue. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2648-2659.
- Alioto, T. S. (2007) U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res.* **35**, D110-D115.
- Amin, E. M., Oltean, S., Hua, J., Gammons, M. V. R., Hamdollah-Zadeh, M., Welsh, G. I., Cheung, M.-K., Ni, L., Kase, S., Rennel, E. S., Symonds, K. E., Nowak, D. G., Royer-Pokora, B., Saleem, M. A., Hagiwara, M., Schumacher, V. A., Harper, S. J., Hinton, D. R., Bates, D. O., Lodomery, M. R. (2011) WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* **20**, 768-780.
- Anczuków, O., Rosenberg, A. Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., Muthuswamy, S. K., Krainer, A. R. (2012) The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 220-228.
- Anderson, S. L., Coli, R., Daly, I. W., Kichula, E. A., Rork, M. J., Volpi, S. A., Ekstein, J., Rubin, B. Y. (2001) Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 753-758.
- Anderson, S. L., Liu, B., Qiu, J., Sturm, A. J., Schwartz, J. A., Peters, A. J., Sullivan, K. A., Rubin, B. Y. (2012) Nutraceutical-mediated restoration of wild-type levels of IKBKAP-encoded IKAP protein in familial dysautonomia-derived cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 570-579.
- Anderson, S. L., Qiu, J., Rubin, B. Y. (2003a) EGCG corrects aberrant splicing of IKAP mRNA in cells from patients with familial dysautonomia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 627-633.
- Anderson, S. L., Qiu, J., Rubin, B. Y. (2003b) Tocotrienols induce IKBKAP expression: a possible therapy for familial dysautonomia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 303-309.

- Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F. D., Vitali, T., De Vincenzi, E., Boninsegna, A., Villanova, M., Bertini, E., Pini, A., Neri, G., Brahe, C. (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression *in vitro*: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 59-65.
- Andreassi, C., Jarecki, J., Zhou, J., Coover, D. D., Monani, U. R., Chen, X., Whitney, M., Pollok, B., Zhang, M., Androphy, E., Burghes, A. H. (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2841-2849.
- Axelrod, F. B., Goldstein, D. S., Holmes, C., Berlin, D., Kopin, I. J. (1996) Pattern of plasma levels of catecholamines in familial dysautonomia. *Clin. Auton. Res.* **6**, 205-209.
- Axelrod, F. B., Liebes, L., Gold-Von Simson, G., Mendoza, S., Mull, J., Leyne, M., Norcliffe-Kaufmann, L., Kaufmann, H., Slaugenhaupt, S. A. (2011) Kinetin improves IKBKAP mRNA splicing in patients with familial dysautonomia. *Pediatr. Res.* **70**, 480-483.
- Axelrod, F. B., Nachtigal, R., Dancis, J. (1974) Familial dysautonomia: diagnosis, pathogenesis and management. *Adv. Pediatr.* **21**, 75-96.
- Bakkour, N., Lin, Y.-L., Maire, S., Ayadi, L., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C. H., Mettling, C., Portales, P., Grierson, D., Chabot, B., Jeanteur, P., Branlant, C., Corbeau, P., Tazi, J. (2007) Small-molecule inhibition of HIV pre-mRNA splicing as a novel antiretroviral therapy to overcome drug resistance. *PLoS Pathog.* **3**, 1530-1539.
- Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R. A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P. P., Kundu, T. K. (2004) Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 33716-33726.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A., Kundu, T. K. (2003) Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J. Biol. Chem.* **278**, 19134-19140.
- Bedalov, A., Gatabont, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E., Simon, J. A. (2001) Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15113-15118.
- Bendori, R., Resnitzky, D., Kimchi, A. (1987) Changes in p53 mRNA expression during terminal differentiation of murine erythroleukemia cells. *Virology* **161**, 607-611.
- Berget, S. M., Moore, C., Sharp, P. A. (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3171-3175.
- Berglund, J. A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., Rosbash, M. (1997) The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**, 781-787.
- Bhat, R., Xue, Y., Berg, S., Hellberg, S., Ormö, M., Nilsson, Y., Radesäter, A.-C., Jerning, E., Markgren, P.-O., Borggård, T., Nylöf, M., Giménez-Cassina, A., Hernández, Fé., Lucas, J. J., Daz-Nido, J., Avila, J. (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J. Biol. Chem.* **278**, 45937-45945.

- Bian, Y., Masuda, A., Matsuura, T., Ito, M., Okushin, K., Engel, A. G., Ohno, K. (2009) Tannic acid facilitates expression of the polypyrimidine tract binding protein and alleviates deleterious inclusion of CHRNA1 exon P3A due to an hnRNP H-disrupting mutation in congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1229-1237.
- Biel, M., Kretsovali, A., Karatzali, E., Papamatheakis, J., Giannis, A. (2004) Design, synthesis, and biological evaluation of a small-molecule inhibitor of the histone acetyltransferase Gcn5. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 3974-3976.
- Blumenfeld, A., Slaugenhaupt, S. A., Axelrod, F. B., Lucente, D. E., Maayan, C., Liebert, C. B., Ozelius, L. J., Trofatter, J. A., Haines, J. L., Breakefield, X. O. (1993) Localization of the gene for familial dysautonomia on chromosome 9 and definition of DNA markers for genetic diagnosis. *Nat. Genet.* **4**, 160-164.
- Boise, L. H., González-Garca, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nuñez, G., Thompson, C. B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**, 597-608.
- Bolduc, L., Labrecque, B., Cordeau, M., Blanchette, M., Chabot, B. (2001) Dimethyl sulfoxide affects the selection of splice sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 17597-17602.
- Bonnal, S., Vigevani, L., Valcárcel, J. (2012) The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 847-859.
- Boon-Unge, K., Yu, Q., Zou, T., Zhou, A., Govitrapong, P., Zhou, J. (2007) Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem. Biol.* **14**, 1386-1392.
- Borsi, L., Balza, E., Gaggero, B., Allemanni, G., Zardi, L. (1995) The alternative splicing pattern of the tenascin-C pre-mRNA is controlled by the extracellular pH. *J. Biol. Chem.* **270**, 6243-6245.
- Brichta, L., Hofmann, Y., Hahnen, E., Siebzehrubl, F. A., Raschke, H., Blumcke, I., Eyupoglu, I. Y., Wirth, B. (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2481-2489.
- Brichta, L., Holker, I., Haug, K., Klockgether, T., Wirth, B. (2006) *In vivo* activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann. Neurol.* **59**, 970-975.
- Bringmann, P., Appel, B., Rinke, J., Reuter, R., Theismen, H., Lührmann, R. (1984) Evidence for the existence of snRNAs U4 and U6 in a single ribonucleoprotein complex and for their association by intermolecular base pairing. *EMBO J.* **3**, 1357-1363.
- Camp, E. R., Liu, W., Fan, F., Yang, A., Somcio, R., Ellis, L. M. (2005) RON, a tyrosine kinase receptor involved in tumor progression and metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* **12**, 273-281.
- Candido, E. P., Reeves, R., Davie, J. R. (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **14**, 105-113.
- Cao, W., Jamison, S. F., Garcia-Blanco, M. A. (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing *in vitro*. *RNA* **3**, 1456-1467.

- Cartegni, L., Hastings, M. L., Calarco, J. A., de Stanchina, E., Krainer, A. R. (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 63-77.
- Chakrabarty, S., Roy, M., Hazra, B., Bhattacharya, R. K. (2002) Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinoid, and its synthetic derivatives. *Cancer Lett.* **188**, 85-93.
- Chalfant, C. E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B. J., Pettus, B. J., Hannun, Y. A. (2001) FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the *de novo* generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 44848-44855.
- Chalfant, C. E., Rathman, K., Pinkerman, R. L., Wood, R. E., Obeid, L. M., Ogretmen, B., Hannun, Y. A. (2002) *De novo* ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 12587-12595.
- Chang, J. G., Hsieh-Li, H. M., Jong, Y. J., Wang, N. M., Tsai, C. H., Li, H. (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9808-9813.
- Cheishvili, D., Maayan, C., Smith, Y., Ast, G., Razin, A. (2007) IKAP/hELP1 deficiency in the cerebrum of familial dysautonomia patients results in down regulation of genes involved in oligodendrocyte differentiation and in myelination. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2097-2104.
- Chow, L. T., Gelinias, R. E., Broker, T. R., Roberts, R. J. (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1-8.
- Close, P., Hawkes, N., Cornez, I., Creppe, C., Lambert, C. A., Rogister, B., Siebenlist, U., Merville, M.-P., Slaugenhaupt, S. A., Bours, V., Svejstrup, J. Q., Chariot, A. (2006) Transcription impairment and cell migration defects in elongator-depleted cells: implication for familial dysautonomia. *Mol. Cell.* **22**, 521-531.
- Côté, J., Dupuis, S., Jiang, Z., Wu, J. Y. (2001a) Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: Identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 938-943.
- Côté, J., Dupuis, S., Wu, J. Y. (2001b) Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion. *J. Biol. Chem.* **276**, 8535-8543.
- Cohen, L., Henzel, W. J., Baeuerle, P. A. (1998) IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex. *Nature* **395**, 292-296.
- Cohen-Kupiec, R., Weinstein, S., Kantor, G., Peer, D., Weil, M. (2010) IKAP/hELP1 down-regulation in neuroblastoma cells causes enhanced cell adhesion mediated by contactin overexpression. *Cell Adh. Migr.* **4**, 541-550.
- Collesi, C., Santoro, M. M., Gaudino, G., Comoglio, P. M. (1996) A splicing variant of the RON transcript induces constitutive tyrosine kinase activity and an invasive phenotype. *Mol. Cell Biol.* **16**, 5518-5526.

- Collins, A. F., Pearson, H. A., Giardina, P., McDonagh, K. T., Brusilow, S. W., Dover, G. J. (1995) Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous β thalassemia: a clinical trial. *Blood* **85**, 43-49.
- Convertini, P., Shen, M., Potter, P. M., Palacios, G., Lagisetti, C., de la Grange, P., Horbinski, C., Fondufe-Mittendorf, Y. N., Webb, T. R., Stamm, S. (2014) Sudemycin E influences alternative splicing and changes chromatin modifications. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4947-4961.
- Coovert, D. D., Le, T. T., McAndrew, P. E., Strasswimmer, J., Crawford, T. O., Mendell, J. R., Coulson, S. E., Androphy, E. J., Prior, T. W., Burghes, A. H. (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1205-1214.
- Corrionero, A., Miñana, B., Valcárcel, J. (2011) Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes Dev.* **25**, 445-459.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.-L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., Belachew, S., Malgrange, B., Chapelle, J.-P., Siebenlist, U., Moonen, G., Chariot, A., Nguyen, L. (2009) Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* **136**, 551-564.
- D'Souza, I., Schellenberg, G. D. (2005) Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim. Biophys. Acta.* **1739**, 104-115.
- Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D. B., Bach, A., Shivers, B. D., Seeburg, P. H. (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J.* **8**, 4025-4034.
- Darbar, I. A., Plaggert, P. G., Resende, M. B. D., Zanoteli, E., Reed, U. C. (2011) Evaluation of muscle strength and motor abilities in children with type II and III spinal muscle atrophy treated with valproic acid. *BMC Neurol.* **11**, 36.
- Dayangac-Erden, D., Bora-Tatar, G., Dalkara, S., Demir, A. S., Erdem-Yurter, H. (2011) Carboxylic acid derivatives of histone deacetylase inhibitors induce full length SMN2 transcripts: a promising target for spinal muscular atrophy therapeutics. *Arch. Med. Sci.* **7**, 230-234.
- Deitrich, R. A., Dunwiddie, T. V., Harris, R. A., Erwin, V. G. (1989) Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacol. Rev.* **41**, 489-537.
- Dembowski, J. A., An, P., Scoulos-Hanson, M., Yeo, G., Han, J., Fu, X.-D., Grabowski, P. J. (2012) Alternative Splicing of a Novel Inducible Exon Diversifies the CASK Guanylate Kinase Domain. *J. Nucleic Acids.* **2012**, 816237.
- Effenberger, K. A., Perriman, R. J., Bray, W. M., Lokey, R. S., Ares Jr, M., Jurica, M. S. (2013) A high-throughput splicing assay identifies new classes of inhibitors of human and yeast spliceosomes. *J. Biomol. Screen.* **18**, 1110-1120.
- Emerit, M. B., Martres, M. P., Miquel, M. C., el Mestikawy, S., Hamon, M. (1995) Differentiation alters the expression of the two splice variants of the serotonin 5-HT₃ receptor-A mRNA in NG108-15 cells. *J. Neurochem.* **65**, 1917-1925.

- Erkelenz, S., Mueller, W. F., Evans, M. S., Busch, A., Schöneweis, K., Hertel, K. J., Schaal, H. (2013) Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA* **19**, 96-102.
- Fan, L., Lagisetti, C., Edwards, C. C., Webb, T. R., Potter, P. M. (2011) Sudemycins, novel small molecule analogues of FR901464, induce alternative gene splicing. *ACS Chem. Biol.* **6**, 582-589.
- Faustino, N. A., Cooper, T. A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* **17**, 419-437.
- Fischer, U., Liu, Q., Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **90**, 1023-1029.
- Folco, E. G., Coil, K. E., Reed, R. (2011) The anti-tumor drug E7107 reveals an essential role for SF3b in remodeling U2 snRNP to expose the branch point-binding region. *Genes Dev.* **25**, 440-444.
- Fox-Walsh, K. L., Dou, Y., Lam, B. J., Hung, S.-p., Baldi, P. F., Hertel, K. J. (2005) The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16176-16181.
- Fujimoto, N., Sueoka, N., Sueoka, E., Okabe, S., Suganuma, M., Harada, M., Fujiki, H. (2002) Lung cancer prevention with (-)-epigallocatechin gallate using monitoring by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1. *Int. J. Oncol.* **20**, 1233-1239.
- Galli, G., Hofstetter, H., Stunnenberg, H. G., Birnstiel, M. L. (1983) Biochemical complementation with RNA in the *Xenopus* oocyte: a small RNA is required for the generation of 3' histone mRNA termini. *Cell* **34**, 823-828.
- Ghigna, C., De Toledo, M., Bonomi, S., Valacca, C., Gallo, S., Apicella, M., Eperon, I., Tazi, J., Biamonti, G. (2010) Pro-metastatic splicing of Ron proto-oncogene mRNA can be reversed: therapeutic potential of bifunctional oligonucleotides and indole derivatives. *RNA Biol.* **7**, 495-503.
- Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P. M., Green, M. R., Riva, S., Biamonti, G. (2005) Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol. Cell.* **20**, 881-890.
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M. P., Riou, J. F., Emorine, L. J., Schwartz, J. C. (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* **342**, 923-926.
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., Heinzl, T. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**, 6969-6978.
- Gold-von Simson, G., Goldberg, J. D., Rolnitzky, L. M., Mull, J., Leyne, M., Voustantiouk, A., Slaugenhaupt, S. A., Axelrod, F. B. (2009) Kinetin in familial dysautonomia carriers: implications for a new therapeutic strategy targeting mRNA splicing. *Pediatr. Res.* **65**, 341-346.
- Grabowski, P. J., Padgett, R. A., Sharp, P. A. (1984) Messenger RNA splicing *in vitro*: an excised intervening sequence and a potential intermediate. *Cell* **37**, 415-427.

- Grollman, A. P. (1966) Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **56**, 1867-1874.
- Grzeschik, S. M., Ganta, M., Prior, T. W., Heavlin, W. D., Wang, C. H. (2005) Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression in spinal muscular atrophy cells. *Ann. Neurol.* **58**, 194-202.
- Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H. J., Johannes, F. J. (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* **392**, 77-80.
- Guivarc'h, D., Vincent, J. D., Vernier, P. (1998) Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptors in the MMQ prolactin cell line. *Endocrinology* **139**, 4213-4221.
- Hahnen, E., Eyüpoglu, I. Y., Brichta, L., Haastert, K., Tränkle, C., Siebzehnrübl, F. A., Riessland, M., Hölker, I., Claus, P., Romstöck, J., Buslei, R., Wirth, B., Blümcke, I. (2006) *In vitro* and *ex vivo* evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J. Neurochem.* **98**, 193-202.
- Hasegawa, M., Miura, T., Kuzuya, K., Inoue, A., Won Ki, S., Horinouchi, S., Yoshida, T., Kunoh, T., Koseki, K., Mino, K., Sasaki, R., Yoshida, M., Mizukami, T. (2011) Identification of SAP155 as the target of GEX1A (Herboxidiene), an antitumor natural product. *ACS Chem. Biol.* **6**, 229-233.
- Hashimoto, C., Steitz, J. A. (1984) U4 and U6 RNAs coexist in a single small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res.* **12**, 3283-3293.
- Hastings, M. L., Berniac, J., Liu, Y. H., Abato, P., Jodelka, F. M., Barthel, L., Kumar, S., Dudley, C., Nelson, M., Larson, K., Edmonds, J., Bowser, T., Draper, M., Higgins, P., Krainer, A. R. (2009) Tetracyclines that promote SMN2 exon 7 splicing as therapeutics for spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.* **1**, 5ra12.
- Hausner, T. P., Giglio, L. M., Weiner, A. M. (1990) Evidence for base-pairing between mammalian U2 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Genes Dev.* **4**, 2146-2156
- Hawkes, N. A., Otero, G., Winkler, G. S., Marshall, N., Dahmus, M. E., Krappmann, D., Scheidereit, C., Thomas, C. L., Schiavo, G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J. Q. (2002) Purification and characterization of the human elongator complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 3047-3052.
- Hawkins, J. D. (1988) A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9893-9908.
- Hazra, B., Sur, P., Roy, D. K., Sur, B., Banerjee, A. (1984) Biological activity of diospyrin towards Ehrlich ascites carcinoma in Swiss A mice. *Planta Med.* **50**, 295-297.
- Hernández, Fé., Pérez, M., Lucas, J. J., Mata, A. M., Bhat, R., Avila, J. (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279**, 3801-3806.
- Hims, M. M., Ibrahim, E. C., Leyne, M., Mull, J., Liu, L., Lazaro, C., Shetty, R. S., Gill, S., Gusella, J. F., Reed, R., Slaugenhaupt, S. A. (2007) Therapeutic potential and

- mechanism of kinetin as a treatment for the human splicing disease familial dysautonomia. *J. Mol. Med.* **85**, 149-161.
- Hnilicová, J., Hozeifi, S., Dušková, E., Icha, J., Tománková, T., Staněk, D. (2011) Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS One* **6**, e16727.
- Hofmann, Y., Lorson, C. L., Stamm, S., Androphy, E. J., Wirth, B. (2000) Htra2- β 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9618-9623.
- Holmberg, C., Katz, S., Lerdrup, M., Herdegen, T., Jäättelä, M., Aronheim, A., Kallunki, T. (2002) A novel specific role for I kappa B kinase complex-associated protein in cytosolic stress signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 31918-31928.
- Hong, D. S., Kurzrock, R., Naing, A., Wheler, J. J., Falchook, G. S., Schiffman, J. S., Faulkner, N., Pilat, M. J., O'Brien, J., LoRusso, P. (2014) A phase I, open-label, single-arm, dose-escalation study of E7107, a precursor messenger ribonucleic acid (pre-mRNA) spliceosome inhibitor administered intravenously on days 1 and 8 every 21 days to patients with solid tumors. *Invest New Drugs* **32**, 436-444.
- Honkanen, R. E. (1993) Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett.* **330**, 283-286.
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L. F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**, 14873-1487.
- Hua, Y., Sahashi, K., Hung, G., Rigo, F., Passini, M. A., Bennett, C. F., Krainer, A. R. (2010) Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* **24**, 1634-1644.
- Hua, Y., Sahashi, K., Rigo, F., Hung, G., Horev, G., Bennett, C. F., Krainer, A. R. (2011) Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* **478**, 123-126.
- Iwanaga, N., Kamachi, M., Aratake, K., Izumi, Y., Ida, H., Tanaka, F., Tamai, M., Arima, K., Nakamura, H., Origuchi, T., Kawakami, A., Eguchi, K. (2005) Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an intracellular signaling pathway in response to pro-apoptotic stimuli. *J. Lab. Clin. Med.* **145**, 105-110.
- Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., Mattaj, I. W. (1994) A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78**, 657-668.
- Jablonowski, D., Zink, S., Mehlgarten, C., Daum, G., Schaffrath, R. (2006) tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast. *Mol. Microbiol.* **59**, 677-688.
- Jiang, C. C., Lai, F., Tay, K. H., Croft, A., Rizos, H., Becker, T. M., Yang, F., Liu, H., Thorne, R. F., Hersey, P., Zhang, X. D. (2010) Apoptosis of human melanoma cells induced by inhibition of B-RAFV600E involves preferential splicing of bimS. *Cell Death Dis.* **1**, e69.
- Jiang, Z. H., Zhang, W. J., Rao, Y., Wu, J. Y. (1998) Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9155-9160.

- Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engle, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R., Shoemaker, D. D. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* **302**, 2141-2144.
- Jung, M., Brosch, G., Kölle, D., Scherf, H., Gerhäuser, C., Loidl, P. (1999) Amide analogues of trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation. *J. Med. Chem.* **42**, 4669-4679.
- Jupe, E. R., Liu, X. T., Kiehlbauch, J. L., McClung, J. K., Dell'Orco, R. T. (1996) Prohibitin in breast cancer cell lines: loss of antiproliferative activity is linked to 3' untranslated region mutations. *Cell Growth Differ.* **7**, 871-878.
- Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., Yoshida, M. (2007) Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 576-583.
- Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J. M., de la Fortelle, E., Raker, V. A., Lührmann, R.; Li, J., Nagai, K. (1999) Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**, 375-387.
- Karlsborn, T., Tükenmez, H., Chen, C., Byström, A. S. (2014) Familial dysautonomia (FD) patients have reduced levels of the modified wobble nucleoside mcm(5)s(2)U in tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**, 441-445.
- Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S. W., Sinha, R., Mu, D., Krainer, A. R. (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 185-193.
- Kashyap, M. K., Kumar, D., Villa, R., La Clair, J. J., Benner, C., Sasik, R., Jones, H., Ghia, E. M., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Burkart, M. D., Castro, J. E. (2015) Targeting the spliceosome in chronic lymphocytic leukemia with the macrolides FD-895 and pladienolide B. *Haematologica*
- Kim, H., Choi, K., Kang, H., Lee, S.-Y., Chi, S.-W., Lee, M.-S., Song, J., Im, D., Choi, Y., Cho, S. (2014) Identification of a novel function of CX-4945 as a splicing regulator. *PLoS One* **9**, e94978.
- Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., Garralda, M. E., Rutherford, M., McCulley, C., Popplewell, L., Graham, I. R., Dickson, G., Wood, M. J. A., Wells, D. J., Wilton, S. D., Kole, R., Straub, V., Bushby, K., Sewry, C., Morgan, J. E., Muntoni, F. (2009) Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet. Neurol.* **8**, 918-928.
- Klein, P. S., Melton, D. A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8455-8459.
- Klinken, S. P., Holmes, K. L., Morse 3rd, H., Thorgeirsson, S. S. (1988) Transcriptional and post-transcriptional regulation of c-myc, c-myb, and p53 during proliferation and differentiation of murine erythroleukemia cells treated with DFMO and DMSO. *Exp. Cell Res.* **178**, 185-198.

- Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M., Tamaoki, T. (1989) Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 548-553.
- Kosaki, A., Webster, N. J. (1993) Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 21990-21996.
- Kotake, Y., Sagane, K., Owa, T., Mimori-Kiyosue, Y., Shimizu, H., Uesugi, M., Ishihama, Y., Iwata, M., Mizui, Y. (2007) Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 570-575.
- Krappmann, D., Hatada, E. N., Tegethoff, S., Li, J., Klippel, A., Giese, K., Baeuerle, P. A., Scheidereit, C. (2000) The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component. *J. Biol. Chem.* **275**, 29779-29787.
- Kuhn, A. N., van Santen, M. A., Schwienhorst, A., Urlaub, H., Lührmann, R. (2009) Stalling of spliceosome assembly at distinct stages by small-molecule inhibitors of protein acetylation and deacetylation. *RNA* **15**, 153-175.
- Kumari, M. (2001) Differential effects of chronic ethanol treatment on N-methyl-D-aspartate R1 splice variants in fetal cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **276**, 29764-29771.
- Lagiseti, C., Pourpak, A., Goronga, T., Jiang, Q., Cui, X., Hyle, J., Lahti, J. M., Morris, S. W., Webb, T. R. (2009) Synthetic mRNA splicing modulator compounds with *in vivo* antitumor activity. *J. Med. Chem.* **52**, 6979-6990.
- Lagiseti, C., Pourpak, A., Jiang, Q., Cui, X., Goronga, T., Morris, S. W., Webb, T. R. (2008) Antitumor compounds based on a natural product consensus pharmacophore. *J. Med. Chem.* **51**, 6220-6224.
- Lai, G.-J., McCobb, D. P. (2002) Opposing actions of adrenal androgens and glucocorticoids on alternative splicing of Slo potassium channels in bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7722-7727.
- Lea, M. A., Tulsyan, N. (1995) Discordant effects of butyrate analogues on erythroleukemia cell proliferation, differentiation and histone deacetylase. *Anticancer Res.* **15**, 879-883.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**, 155-165.
- Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., Melki, J. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **16**, 265-269.
- Lerner, M. R., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. L., Steitz, J. A. (1980) Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**, 220-224.
- Lev-Maor, G., Goren, A., Sela, N., Kim, E., Keren, H., Doron-Faigenboim, A., Leibman-Barak, S., Pupko, T., Ast, G. (2007) The "alternative" choice of constitutive exons throughout evolution. *PLoS Genet.* **3**, e203.
- Lev-Maor, G., Sorek, R., Shomron, N., Ast, G. (2003) The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science* **300**, 1288-1291.

- Leyne, M., Mull, J., Gill, S. P., Cuajungco, M. P., Oddoux, C., Blumenfeld, A., Maayan, C., Gusella, J. F., Axelrod, F. B., Slaugenhaupt, S. A. (2003) Identification of the first non-Jewish mutation in familial Dysautonomia. *Am. J. Med. Genet. A*. **118A**, 305-308.
- Li, C. Y., Chu, J. Y., Yu, J. K., Huang, X. Q., Liu, X. J., Shi, L., Che, Y. C., Xie, J. Y. (2004) Regulation of alternative splicing of Bcl-x by IL-6, GM-CSF and TPA. *Cell Res.* **14**, 473-479.
- Liang, W.-C., Yuo, C.-Y., Chang, J.-G., Chen, Y.-C., Chang, Y.-F., Wang, H.-Y., Ju, Y.-H., Chiou, S.-S., Jong, Y.-J. (2008) The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients. *J. Neurol. Sci.* **268**, 87-94.
- Liu, B., Anderson, S. L., Qiu, J., Rubin, B. Y. (2013b) Cardiac glycosides correct aberrant splicing of IKBKAP-encoded mRNA in familial dysautonomia derived cells by suppressing expression of SRSF3. *FEBS J.* **280**, 3632-3646.
- Liu, X., Biswas, S., Berg, M. G., Antapli, C. M., Xie, F., Wang, Q., Tang, M.-C., Tang, G.-L., Zhang, L., Dreyfuss, G., Cheng, Y.-Q. (2013a) Genomics-guided discovery of thailanstatins A, B, and C As pre-mRNA splicing inhibitors and antiproliferative agents from *Burkholderia thailandensis* MSMB43. *J. Nat. Prod.* **76**, 685-693.
- Lorson, C., Pearson, J., Burger, L., Pintel, D. J. (1998) An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice. *Virology* **240**, 326-337.
- Lorson, C. L., Androphy, E. J. (1998) The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1269-1275.
- Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6307-6311.
- Lorson, C. L., Strasswimmer, J., Yao, J. M., Baleja, J. D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A. H., Androphy, E. J. (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* **19**, 63-66.
- Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., Misteli, T. (2011) Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**, 16-26.
- Maayan, C., Kaplan, E., Shachar, S., Peleg, O., Godfrey, S. (1987) Incidence of familial dysautonomia in Israel 1977-1981. *Clin. Genet.* **32**, 106-108.
- MacKintosh, C., Klumpp, S. (1990) Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. *FEBS Lett.* **277**, 137-140.
- Maestri, N. E., Brusilow, S. W., Clissold, D. B., Bassett, S. S. (1996) Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **335**, 855-859.
- Markus, M. A., Marques, F. Z., Morris, B. J. (2011) Resveratrol, by modulating RNA processing factor levels, can influence the alternative splicing of pre-mRNAs. *PLoS One* **6**, e28926.
- Massiello, A., Chalfant, C. E. (2006) SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness. *J. Lipid Res.* **47**, 892-897.

- Massillon, D., Stalmans, W., van de Werve, G., Bollen, M. (1994) Identification of the glycogenic compound 5-iodotubercidin as a general protein kinase inhibitor. *Biochem. J.* **299** (Pt 1), 123-128.
- Masuda, A., Shen, X.-M., Ito, M., Matsuura, T., Engel, A. G., Ohno, K. (2008) hnRNP H enhances skipping of a nonfunctional exon P3A in CHRNA1 and a mutation disrupting its binding causes congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 4022-4035.
- Matera, A. G., Terns, R. M., Terns, M. P. (2007) Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 209-220.
- McGuire, A. M., Pearson, M. D., Neafsey, D. E., Galagan, J. E. (2008) Cross-kingdom patterns of alternative splicing and splice recognition. *Genome Biol.* **9**, R50.
- McMahon, T., Andersen, R., Metten, P., Crabbe, J. C., Messing, R. O. (2000) Protein kinase C epsilon mediates up-regulation of N-type calcium channels by ethanol. *Mol. Pharmacol.* **57**, 53-58.
- Mercuri, E., Bertini, E., Messina, S., Pelliccioni, M., D'Amico, A., Colitto, F., Mirabella, M., Tiziano, F. D., Vitali, T., Angelozzi, C., Kinali, M., Main, M., Brahe, C. (2004) Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 130-135.
- Miller-Wideman, M., Makkar, N., Tran, M., Isaac, B., Biest, N., Stonard, R. (1992) Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces chromofuscus* A7847. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **45**, 914-921.
- Mizui, Y., Sakai, T., Iwata, M., Uenaka, T., Okamoto, K., Shimizu, H., Yamori, T., Yoshimatsu, K., Asada, M. (2004) Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. III. In vitro and in vivo antitumor activities. *J. Antibiot.* **57**, 188-196.
- Monani, U. R., Lorson, C. L., Parsons, D. W., Prior, T. W., Androphy, E. J., Burghes, A. H., McPherson, J. D. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1177-1183.
- Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J., Bordonné, R. (2002) Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol. Cell.* **9**, 891-901.
- Muraki, M., Ohkawara, B., Hosoya, T., Onogi, H., Koizumi, J., Koizumi, T., Sumi, K., Yomoda, J.-I., Murray, M. V., Kimura, H., Furuichi, K., Shibuya, H., Krainer, A. R., Suzuki, M., Hagiwara, M. (2004) Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J. Biol. Chem.* **279**, 24246-24254.
- Nakajima, H., Hori, Y., Terano, H., Okuhara, M., Manda, T., Matsumoto, S., Shimomura, K. (1996b) New antitumor substances, FR901463, FR901464 and FR901465. II. Activities against experimental tumors in mice and mechanism of action. *J. Antibiot.* **49**, 1204-1211.
- Nakajima, H., Sato, B., Fujita, T., Takase, S., Terano, H., Okuhara, M. (1996a) New antitumor substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy,

- fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* **49**, 1196-1203.
- Nayler, O., Stamm, S., Ullrich, A. (1997) Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases. *Biochem. J.* **326** (Pt 3), 693-700.
- Newton, P. M., Tully, K., McMahon, T., Connolly, J., Dadgar, J., Treistman, S. N., Messing, R. O. (2005) Chronic ethanol exposure induces an N-type calcium channel splice variant with altered channel kinetics. *FEBS Lett.* **579**, 671-676.
- Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der Spek, H., Grivell, L. A. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* **19**, 2444-2451.
- Nishida, A., Kataoka, N., Takeshima, Y., Yagi, M., Awano, H., Ota, M., Itoh, K., Hagiwara, M., Matsuo, M. (2011) Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nat. Commun.* **2**, 308.
- Novoyatleva, T., Heinrich, B., Tang, Y., Benderska, N., Butchbach, M. E. R., Lorson, C. L., Lorson, M. A., Ben-Dov, C., Fehlbaum, P., Bracco, L., Burghes, A. H. M., Bollen, M., Stamm, S. (2008) Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 52-70.
- O'Brian, C. A., Ioannides, C. G., Ward, N. E., Liskamp, R. M. (1990) Inhibition of protein kinase C and calmodulin by the geometric isomers cis- and trans-tamoxifen. *Biopolymers* **29**, 97-104.
- O'Brien, K., Matlin, A. J., Lowell, A. M., Moore, M. J. (2008) The biflavonoid isoginkgetin is a general inhibitor of Pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **283**, 33147-33154.
- Ohe, K., Hagiwara, M. (2015) Modulation of alternative splicing with chemical compounds in new therapeutics for human diseases. *ACS Chem. Biol.* **10**, 914-924.
- Olaharski, A. J., Rine, J., Marshall, B. L., Babiarz, J., Zhang, L., Verdin, E., Smith, M. T. (2005) The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. *PLoS Genet.* **1**, e77.
- Olsen, A., Siboska, G. E., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1999) N(6)-Furfuryladenine, kinetin, protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 499-502.
- Oomizu, S., Boyadjieva, N., Sarkar, D. K. (2003) Ethanol and estradiol modulate alternative splicing of dopamine D2 receptor messenger RNA and abolish the inhibitory action of bromocriptine on prolactin release from the pituitary gland. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**, 975-980.
- Padgett, R. A., Konarska, M. M., Grabowski, P. J., Hardy, S. F., Sharp, P. A. (1984) Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* **225**, 898-903.
- Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A., Mattaj, I. W. (1997) Nuclear import of U snRNPs requires importin β . *EMBO J.* **16**, 6783-6792.
- Pan, D., Boon-Unge, K., Govitrapong, P., Zhou, J. (2011) Emetine regulates the alternative splicing of caspase 9 in tumor cells. *Oncol. Lett.* **2**, 1309-1312.

- Pan, J. B., Monteggia, L. M., Giordano, T. (1993) Altered levels and splicing of the amyloid precursor protein in the adult rat hippocampus after treatment with DMSO or retinoic acid. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **18**, 259-266.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J., Blencowe, B. J. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**, 1413-1415.
- Parker, R., Siliciano, P. G., Guthrie, C. (1987) Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell* **49**, 229-239.
- Petrie, J., Sapp, D. W., Tyndale, R. F., Park, M. K., Fanselow, M., Olsen, R. W. (2001) Altered gabaa receptor subunit and splice variant expression in rats treated with chronic intermittent ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **25**, 819-828.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Klein, P. S. (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* **276**, 36734-36741.
- Pilch, B., Allemand, E., Facompré, M., Bailly, C., Riou, J. F., Soret, J., Tazi, J. (2001) Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506. *Cancer Res.* **61**, 6876-6884.
- Polyak, K., Weinberg, R. A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 265-273.
- Pros, E., Fernández-Rodríguez, J., Benito, L., Ravella, A., Capellá, G., Blanco, I., Serra, E., Lázaro, C. (2010) Modulation of aberrant NF1 pre-mRNA splicing by kinetin treatment. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 614-617.
- Puppin, C., Passon, N., Franzoni, A., Russo, D., Damante, G. (2011) Histone deacetylase inhibitors control the transcription and alternative splicing of prohibitin in thyroid tumor cells. *Oncol. Rep.* **25**, 393-397.
- Rahl, P. B., Chen, C. Z., Collins, R. N. (2005) Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol. Cell.* **17**, 841-853.
- Rattan, S. I., Clark, B. F. (1994) Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 665-672.
- Ray, S., Hazra, B., Mitra, B., Das, A., Majumder, H. K. (1998) Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Mol. Pharmacol.* **54**, 994-999.
- Revil, T., Toutant, J., Shkreta, L., Garneau, D., Cloutier, P., Chabot, B. (2007) Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* **27**, 8431-8441.
- Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., Marks, P. A. (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3003-3007.
- Riessland, M., Ackermann, B., Förster, A., Jakubik, M., Hauke, J., Garbes, L., Fritzsche, I., Mende, Y., Blumcke, I., Hahnen, E., Wirth, B. (2010) SAHA ameliorates the SMA

- phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1492-1506.
- Riessland, M., Brichta, L., Hahnen, E., Wirth, B. (2006) The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum. Genet.* **120**, 101-110.
- Riley, C. M., Day, R. L., Greeley, D. M., Langford W. S. (1949) Central autonomic dysfunction with defective lacrimation; report of five cases. *Pediatrics* **3**, 468-478.
- Robberson, B. L., Cote, G. J., Berget, S. M. (1990) Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol. Cell Biol.* **10**, 84-94.
- Rohrbach, S., Muller-Werdan, U., Werdan, K., Koch, S., Gellerich, N. F., Holtz, J. (2005) Apoptosis-modulating interaction of the neuregulin/erbB pathway with anthracyclines in regulating Bcl-xS and Bcl-xL in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **38**, 485-493.
- Ronsin, C., Muscatelli, F., Mattei, M. G., Breathnach, R. (1993) A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene* **8**, 1195-1202.
- Rossi, F., Labourier, E., Forné, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J. F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C., Tazi, J. (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**, 80-82.
- Roybal, G. A., Jurica, M. S. (2010) Spliceostatin A inhibits spliceosome assembly subsequent to prespliceosome formation. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6664-6672.
- Ruskin, B., Krainer, A. R., Maniatis, T., Green, M. R. (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* **38**, 317-331.
- Ruskin, B., Zamore, P. D., Green, M. R. (1988) A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell* **52**, 207-219.
- Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T., Nakanishi, O. (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked *in vivo* antitumor activity against human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4592-4597.
- Sakla, M. S., Lorson, C. L. (2008) Induction of full-length survival motor neuron by polyphenol botanical compounds. *Hum. Genet.* **122**, 635-643.
- Sato, M., Muguruma, N., Nakagawa, T., Okamoto, K., Kimura, T., Kitamura, S., Yano, H., Sannomiya, K., Goji, T., Miyamoto, H., Okahisa, T., Mikasa, H., Wada, S., Iwata, M., Takayama, T. (2014) High antitumor activity of pladienolide B and its derivative in gastric cancer. *Cancer Sci.* **105**, 110-116.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., Cooper, T. A. (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **29**, 40-47.
- Seino, S., Bell, G. I. (1989) Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 312-316.
- Seki-Asano, M., Okazaki, T., Yamagishi, M., Sakai, N., Takayama, Y., Hanada, K., Morimoto, S., Takatsuki, A., Mizoue, K. (1994) Isolation and characterization of a new 12-membered macrolide FD-895. *J. Antibiot.* **47**, 1395-1401.
- Shen, M., Bellaousov, S., Hiller, M., de La Grange, P., Creamer, T. P., Malina, O., Sperling, R., Mathews, D. H., Stoilov, P., Stamm, S. (2013) Pyrvinium pamoate changes

- alternative splicing of the serotonin receptor 2C by influencing its RNA structure. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3819-3832.
- Sher, G. D., Ginder, G. D., Little, J., Yang, S., Dover, G. J., Olivieri, N. F. (1995) Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with β -hemoglobinopathies. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1606-1610.
- Sheth, N., Roca, X., Hastings, M. L., Roeder, T., Krainer, A. R., Sachidanandam, R. (2006) Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3955-3967.
- Shetty, R. S., Gallagher, C. S., Chen, Y.-T., Hims, M. M., Mull, J., Leyne, M., Pickel, J., Kwok, D., Slaughter, S. A. (2011) Specific correction of a splice defect in brain by nutritional supplementation. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4093-4101.
- Shkreta, L., Froehlich, U., Paquet, E. R., Toutant, J., Elela, S. A., Chabot, B. (2008) Anticancer drugs affect the alternative splicing of Bcl-x and other human apoptotic genes. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1398-1409.
- Shkreta, L., Michelle, L., Toutant, J., Tremblay, M. L., Chabot, B. (2011) The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* **286**, 331-340.
- Shultz, J. C., Goehle, R. W., Murudkar, C. S., Wijesinghe, D. S., Mayton, E. K., Massiello, A., Hawkins, A. J., Mukerjee, P., Pinkerman, R. L., Park, M. A., Chalfant, C. E. (2011) SRSF1 regulates the alternative splicing of caspase 9 via a novel intronic splicing enhancer affecting the chemotherapeutic sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **9**, 889-900.
- Siddiqui-Jain, A., Drygin, D., Streiner, N., Chua, P., Pierre, F., O'Brien, S. E., Bliesath, J., Omori, M., Huser, N., Ho, C., Proffitt, C., Schwaebe, M. K., Ryckman, D. M., Rice, W. G., Anderes, K. (2010) CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res.* **70**, 10288-10298.
- Singh, N. N., Androphy, E. J., Singh, R. N. (2004) The regulation and regulatory activities of alternative splicing of the SMN gene. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **14**, 271-285.
- Sinha, N. K., Snustad, D. P. (1972) Mechanism of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by hydroxyurea. *J. Bacteriol.* **112**, 1321-1324.
- Skommer, J., Wlodkowic, D., Pelkonen, J. (2007) Gene-expression profiling during curcumin-induced apoptosis reveals downregulation of CXCR4. *Exp. Hematol.* **35**, 84-95.
- Slaughter, S. A., Blumenfeld, A., Gill, S. P., Leyne, M., Mull, J., Cuajungco, M. P., Liebert, C. B., Chadwick, B., Idelson, M., Reznik, L., Robbins, C., Makalowska, I., Brownstein, M., Krappmann, D., Scheidereit, C., Maayan, C., Axelrod, F. B., Gusella, J. F. (2001) Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 598-605.
- Slaughter, S. A., Mull, J., Leyne, M., Cuajungco, M. P., Gill, S. P., Hims, M. M., Quintero, F., Axelrod, F. B., Gusella, J. F. (2004) Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 429-436.

- Sleeman, J. E., Lamond, A. I. (1999) Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol.* **9**, 1065-1074.
- Solier, S., Lansiaux, A., Logette, E., Wu, J., Soret, J., Tazi, J., Bailly, C., Desoche, L., Solary, E., Corcos, L. (2004) Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol. Cancer Res.* **2**, 53-61.
- Somers, E., Riessland, M., Schreml, J., Wirth, B., Gillingwater, T. H., Parson, S. H. (2013) Increasing SMN levels using the histone deacetylase inhibitor SAHA ameliorates defects in skeletal muscle microvasculature in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Neurosci. Lett.* **544**, 100-104.
- Soret, J., Bakkour, N., Maire, S., Durand, Sé., Zekri, L., Gabut, M., Fic, W., Divita, G., Rivalle, C., Dauzonne, D., Nguyen, C. H., Jeanteur, P., Tazi, J. (2005) Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8764-8769.
- Stoilov, P., Lin, C.-H., Damoiseaux, R., Nikolic, J., Black, D. L. (2008) A high-throughput screening strategy identifies cardiotoxic steroids as alternative splicing modulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11218-11223.
- Stoltzfus, C. M., Madsen, J. M. (2006) Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr. HIV Res.* **4**, 43-55.
- Strub, K., Galli, G., Busmlinger, M., Birnstiel, M. L. (1984) The cDNA sequences of the sea urchin U7 small nuclear RNA suggest specific contacts between histone mRNA precursor and U7 RNA during RNA processing. *EMBO J.* **3**, 2801-2807.
- Su, G. H., Sohn, T. A., Ryu, B., Kern, S. E. (2000) A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer Res.* **60**, 3137-3142.
- Sumner, C. J., Huynh, T. N., Markowitz, J. A., Perhac, J. S., Hill, B., Coovert, D. D., Schussler, K., Chen, X., Jarecki, J., Burghes, A. H. M., Taylor, J. P., Fischbeck, K. H. (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann. Neurol.* **54**, 647-654.
- Takarada, T., Nishida, A., Takeuchi, A., Lee, T., Takeshima, Y., Matsuo, M. (2014) Resveratrol enhances splicing of insulin receptor exon 11 in myotonic dystrophy type 1 fibroblasts. *Brain. Dev.*
- Tazi, J., Bakkour, N., Soret, J., Zekri, L., Hazra, B., Laine, W., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Bailly, C. (2005) Selective inhibition of topoisomerase I and various steps of spliceosome assembly by diospyrin derivatives. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1186-1194.
- Ting, C.-Y., Hsu, C.-T., Hsu, H.-T., Su, J.-S., Chen, T.-Y., Tarn, W.-Y., Kuo, Y.-H., Whang-Peng, J., Liu, L. F., Hwang, J. (2003) Isodiospyrin as a novel human DNA topoisomerase I inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1981-1991.
- Tomita, F., Tamaoki, T., Shirahata, K., Kasai, M., Morimoto, M., Ohkubo, S., Mineura, K., Ishii, S. (1980) Novel antitumor antibiotics, tetrocarcins. *J. Antibiot.* **33**, 668-670.
- Tsai, L.-K., Tsai, M.-S., Lin, T.-B., Hwu, W.-L., Li, H. (2006) Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* **24**, 286-295.

- van Echo, D. A., Whitacre, M. Y., Aisner, J., Applefeld, M. M., Wiernik, P. H. (1982) Phase I trial of aclacinomycin A. *Cancer Treat. Rep.* **66**, 1127-1132.
- van Deutekom, J. C., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Frankhuizen, W. S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J. T., Koop, K., van der Kooi, A. J., Goemans, N. M., de Kimpe, S. J., Ekhardt, P. F., Venneker, E. H., Platenburg, G. J., Verschuuren, J. J., van Ommen, G.-J. B. (2007) Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2677-2686.
- Verbeke, P., Siboska, G. E., Clark, B. F., Rattan, S. I. (2000) Kinetin inhibits protein oxidation and glycooxidation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1265-1270.
- Vessal, M., Mishra, S., Moulik, S., Murphy, L. J. (2006) Prohibitin attenuates insulin-stimulated glucose and fatty acid oxidation in adipose tissue by inhibition of pyruvate carboxylase. *FEBS J.* **273**, 568-576.
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., Schrenk, D. (2008) Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 587-593.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., Yuan, J. (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* **78**, 739-750.
- Winkler, A., Mahal, B., Zieglgänsberger, W., Spanagel, R. (1999) Accurate quantification of the mRNA of NMDAR1 splice variants measured by competitive RT-PCR. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **4**, 69-81.
- Wirth, B. (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.* **15**, 228-237.
- Wotawa, A., Solier, S., Logette, E., Solary, E., Corcos, L. (2002) Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. *Cancer Lett.* **185**, 181-189.
- Wu, S., Romfo, C. M., Nilsen, T. W., Green, M. R. (1999) Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**, 832-835.
- Xiao, X., Wang, Z., Jang, M., Burge, C. B. (2007) Coevolutionary networks of splicing cis-regulatory elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18583-18588.
- Xu, C., Chen, X., Grzeschik, S. M., Ganta, M., Wang, C. H. (2011) Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression through nitric oxide release. *Neurogenetics* **12**, 19-24.
- Yaish, P., Gazit, A., Gilon, C., Levitzki, A. (1988) Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* **242**, 933-935.
- Yang-Feng, T. L., Francke, U., Ullrich, A. (1985) Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia. *Science* **228**, 728-731.
- Yokoi, A., Kotake, Y., Takahashi, K., Kadowaki, T., Matsumoto, Y., Minoshima, Y., Sugi, N. H., Sagane, K., Hamaguchi, M., Iwata, M., Mizui, Y. (2011) Biological validation that SF3b is a target of the antitumor macrolide pladienolide. *FEBS J.* **278**, 4870-4880.

- Yoon, S. O., Shin, S., Lee, H. J., Chun, H. K., Chung, A. S. (2006) Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2666-2675.
- Yoshida, M., Kataoka, N., Miyauchi, K., Ohe, K., Iida, K., Yoshida, S., Nojima, T., Okuno, Y., Onogi, H., Usui, T., Takeuchi, A., Hosoya, T., Suzuki, T., Hagiwara, M. (2015) Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2764-2769.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174-17179.
- Younis, I., Berg, M., Kaida, D., Dittmar, K., Wang, C., Dreyfuss, G. (2010) Rapid-response splicing reporter screens identify differential regulators of constitutive and alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* **30**, 1718-1728.
- Yuo, C. Y., Lin, H. H., Chang, Y. S., Yang, W. K., Chang, J. G. (2008) 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride enhances SMN2 exon 7 inclusion and protein expression in spinal muscular atrophy cells. *Ann. Neurol.* **63**, 26-34.
- Zaharieva, E., Chipman, J. K., Soller, M. (2012) Alternative splicing interference by xenobiotics. *Toxicology* **296**, 1-12.
- Zamore, P. D., Green, M. R. (1989) Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9243-9247.
- Zhang, H., Wang, J. C., Liu, L. F. (1988) Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1060-1064.
- Zhang, M. L., Lorson, C. L., Androphy, E. J., Zhou, J. (2001) An *in vivo* reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA. *Gene Ther.* **8**, 1532-1538.
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K., Hersey, P. (2004) Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 187-197.
- Zhang, Z., Kelemen, O., van Santen, M. A., Yelton, S. M., Wendlandt, A. E., Sviripa, V. M., Bollen, M., Beullens, M., Urlaub, H., Lührmann, R., Watt, D. S., Stamm, S. (2011) Synthesis and characterization of pseudocantharidins, novel phosphatase modulators that promote the inclusion of exon 7 into the SMN (survival of motoneuron) pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **286**, 10126-10136.
- Zhuang, Y., Weiner, A. M. (1986) A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**, 827-835.