

Hledání interakčních partnerů asociovaných s transkripčním aparátem kvasinkových lineárních plasmidů

Searching for interaction partners associated with the transcriptional apparatus of yeast linear plasmids

Klíčová slova (*keywords*):

lineární plasmidy, kvasinky, transkripce, RNA polymeráza, pull-down, hmotnostní spektrometrie, dvouhybridový systém, protein-proteinové interakce

linear plasmids, yeast, transcription, RNA polymerase, pull-down, mass spectrometry, two-hybrid system, protein-protein interactions

Abstrakt:

Cílem tohoto magisterského projektu je prohloubení znalostí a detailní charakterizace transkripčního aparátu kódovaného cytoplasmatickými lineárními plasmidy kvasinky (nazvanými pGKL 1 a pGKL2) *Kluyveromyces lactis*. Přesné složení tohoto unikátního transkripčního aparátu bylo popsáno teprve nedávno, stejně tak jako velká podobnost transkripčního aparátu výše uvedené kvasinky s transkripčním aparátem viru vakcinie (Sýkora *et al.*, 2018; Vopálenský *et al.*, 2019), což rázem činí kvasinkový model cytoplasmatické transkripce atraktivnějším. Ačkoliv se zdá, že lineární plasmidy *K. lactis* kódují veškeré komponenty tohoto transkripčního aparátu [dvoupodjednotkovou RNA polymerázu (RNAP), enzym syntetizující čepičku na 5' koncích mRNA (*capping* enzym) a RNA helikázu] ve svém genomu, naše předběžné výsledky naznačují, že s tímto transkripčním komplexem mohou být asociované také některé buněčné transkripční faktory. A právě hledání těchto faktorů, pro které bude využito již připraveného kmene *K. lactis* obsahujícího plasmid pGKL2 nesoucí jednu podjednotku RNA polymerázy fúzanou s EGFP proteinem s následnými *pull-down* experimenty a hmotnostní spektrometrií, je jedním z hlavních cílů této práce. Dalším cílem je ověření interakce jednotlivých komponent transkripčního aparátu *in vitro* a *in vivo*, pomocí *pull-down* experimentů s proteiny produkovanými v bakteriálním expresním systému (v případě *in vitro* přístupu) či s využitím kvasinkového dvouhybridového systému (v případě *in vivo* přístupu).

1/ Vopálenský V, Sýkora M, Mašek T, Pospíšek M. (2019) Messenger RNAs of Yeast Virus-Like Elements Contain Non-templated 5' Poly(A) Leaders, and Their Expression Is Independent of eIF4E and Pab1. *Front Microbiol.* 2019 Oct 30;10:2366. doi: 10.3389/fmicb.2019.02366. eCollection 2019.

2/ Sykora M, Pospisek M, Novak J, Mrvova S, Krasny L, Vopalensky V (2018) Transcription apparatus of the yeast virus-like elements: Architecture, function, and evolutionary origin. *PLOS PATHOGENS* Volume: 14 Issue: 10 Article Number: e1007377 Published: OCT 2018