

## **CHARAKTERYSTYKA INTRONÓW NIEKONWENCJONALNYCH W GENACH JĄDROWYCH EUGLENIN**

Geny jądrowe eukariontów zawierają introny usuwane przez spliceosom, a zdecydowana większość z nich charakteryzuje się obecnością konserwowanych sekwencji złączy GT-AG. Konwencjonalne introny spliceosomalne występują także w genach jądrowych euglenin (Euglenida, Euglenozoa, Excavata), jednak nie jest to jedyny typ intronów w tej grupie. W genach jądrowych euglenin występują także introny niekonwencjonalne, które nie posiadają konserwowanych sekwencji złączy, tworzą za to stabilną strukturę drugorzędową zbliżającą końce intronów i egzony na poziomie RNA. Mechanizm wycinania tego typu intronów nie został dotąd poznany. Celem projektu jest dokładniejsze scharakteryzowanie intronów niekonwencjonalnych. Wstępne badania sugerują, że introny niekonwencjonalne nie są usuwane tak jak konwencjonalne w formie lariaty, ale jako cząsteczki liniowe lub koliste. Badania te wskazują także, że są one usuwane później niż introny konwencjonalne, co jest sprzeczne z danymi literaturowymi.

W celu weryfikacji wstępnych wyników wskazujących, że introny niekonwencjonalne są usuwane w formie liniowej lub kolistej zostanie przeprowadzona seria eksperymentów opierających się na trawieniach RNA egzo- i endonukleazami, elektroforezie RNA w żelach akrylamidowych, hybrydyzacji Northern z wykorzystaniem sond korespondujących do wybranych intronów. W celu weryfikacji danych sugerujących, że introny niekonwencjonalne są usuwane później niż konwencjonalne zostanie przeprowadzona analiza pośrednich produktów splicingu z wykorzystaniem odwrotnej transkrypcji, amplifikacji PCR, analizy produktów i sekwencjonowania. Przeprowadzona zostanie również próba określenia lokalizacji procesu splicingu niekonwencjonalnego w oparciu o analizę obecności wyciętych intronów w różnych frakcjach komórkowych oraz z wykorzystaniem metody FISH.

Introny niekonwencjonalne w genach jądrowych euglenin są jedynymi intronami, dla których mechanizm wycinania nie został dotąd poznany. Co więcej, występują one tylko w stosunkowo niewielkiej, dobrze wyodrębnionej grupie eukariontów. Dokładna charakterystyka tego typu intronów zbliży nas do odpowiedzi na takie pytania: (1) jaki jest mechanizm ich usuwania; (2) jaki był sens ich powstania; (3) jaki jest sens ich utrzymywania w genomach. Przeprowadzone badania poszerzą także znacząco naszą wiedzę na temat molekularnych mechanizmów dojrzewania mRNA, które często są odmienne w różnych grupach organizmów, a pozostają niezbadane ze względu na zainteresowanie badaczy jedynie konkretnymi gatunkami modelowymi o dobrze opracowanych schematach postępowania. Wyniki przeprowadzonych badań będą miały także znaczenie bardziej uniwersalne – poszerzą one naszą ogólną wiedzę na temat intronów i ich roli u organizmów eukariotycznych, która ciągle nie została jeszcze jednoznacznie zdefiniowana.