

Molekularny i strukturalny wgląd w ludzką syntazę pseudourydynową 3

Cel projektu. Naszym celem jest zrozumienie podstawowej roli długo lekceważonego enzymu modyfikującego RNA, ludzkiej syntazy pseudourydyny 3 (hPus3), w reakcji z potencjalnymi substratami mRNA. Będziemy wykorzystywać metody biologii strukturalnej w celu wyznaczenia wysokorozdzielczej struktury hPus3, a także metody biochemiczne do określenia jej reakcji katalitycznej z użyciem różnych substratów RNA.

Opis badań. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, cząsteczka RNA odgrywa ważną rolę w przekładaniu kodu DNA na funkcjonalne białka. Składa się ona z czterech podstawowych nukleotydów A, U, C, G, które mogą być dodatkowo modyfikowane różnymi grupami chemicznymi. Do tej pory zidentyfikowano ponad 170 różnych rodzajów zmodyfikowanych nukleotydów RNA, jednak nas szczególnie interesuje pseudourydyna (Ψ , 5-rybosyluracyl). Jest to izomer U, jeden z najliczniejszych zmodyfikowanych nukleotydów w transferowych RNA (tRNA) lub rybosomalnych RNA (rRNA), występujący we wszystkich trzech domenach życia. Co równie istotne, modyfikacja Ψ na tych niekodujących cząsteczkach RNA jest trwała. Obecność Ψ pomaga w prawidłowym fałdowaniu RNA, a usztywnienie struktury cząsteczki RNA w znacznym stopniu przyczynia się do jej stabilności molekularnej i poprawnego funkcjonowania, jak na przykład regulacja translacji białka przez tRNA. Co więcej, ostatnie badania uzupełniły naszą wiedzę na temat Ψ o jej rolę w regulacji genów. W kilku wybitnych pracach wykorzystujących metodę wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji opisano nieznane dotąd cząsteczki posiadające modyfikację Ψ . Nieoczekiwanie stwierdzono, że wśród nich znalazło się wiele cząsteczek mRNA. Co ważniejsze, te nowo zidentyfikowane miejsca występowania Ψ są dynamiczne, co oznacza, że ta modyfikacja jest indukowalna w odpowiedzi na zewnętrzną stymulację. To ważne odkrycie silnie przemawia za tym, że indukowana forma modyfikacji Ψ wiąże się z regulacją genów, co pokazuje jej dodatkową rolę w kontroli prawidłowego funkcjonowania komórki.

Powody podjęcia określonego tematu badawczego. U eukariontów zidentyfikowano wiele syntaz pseudourydynowych, w tym dziesięć u ludzi (hPus1-10). Białka te samodzielnie (bez udziału innych powiązanych cząsteczek lub białek) katalizują reakcję pseudourydylacji rozpoznając substraty o określonych sekwencjach lub strukturach drugorzędowych. Większość wiedzy na temat aktywności, struktury i właściwości biochemicznych tych enzymów została zdobyta na układach drożdżowych i niewiele wiadomo o ich ludzkich odpowiednikach. Co więcej, niektóre schorzenia ludzkie zostały powiązane z mutacjami w genach kodujących ludzkie białka Pus: miopatia mitochondrialna i niedokrwistość syderoblastyczna (MLASA) są spowodowane mutacjami w hPus1, podczas gdy autosomalne recesywne upośledzenie umysłowe (MRT55) jest powiązane z mutacjami hPus3. Szczególnie interesuje nas charakterystyka hPus3, ponieważ może ono regulować ekspresję niektórych genów zaangażowanych w rozwój neuronów. Dwoma głównymi pytaniami, na które chcemy odpowiedzieć w niniejszym badaniu jest jak hPus3 rozpoznaje te konkretne substraty i czy te substraty posiadające modyfikację Ψ wpływają na rozwój neuronów.

Oczekiwane znaczące wyniki. Aby odpowiedzieć na dwa główne pytania zawarte w niniejszym wniosku, proponujemy wyprodukowanie hPus3 do badań biochemicznych i biofizycznych *in vitro* oraz zastosowanie metod krystalografii białek i krio-EM do uzyskania pełnej charakterystyki strukturalnej tego białka. Podsumowując, spodziewamy się zaprezentować kompleksowe zrozumienie hPus3-zależnej pseudourydylacji na różnych substratach RNA i jej roli w utrzymywaniu funkcji komórkowej, szczególnie w powiązaniu z rozwojem neuronów i początkiem niektórych zaburzeń intelektualnych.