

Splicing (składanie) pre-mRNA jest procesem, w którym niekodujące segmenty, tzw. introny, są usuwane z cząsteczek prekursorowego mRNA (pre-mRNA). Ten proces, niezbędny dla ekspresji prawie wszystkich ludzkich genów, podlega ścisłej kontroli i jest powiązany z transkrypcją i innymi etapami obróbki transkryptów pre-mRNA. Splicing pre-mRNA jest katalizowany przez spliceosom, dużą i dynamicznie zmieniającą się makromolekularną maszynę. Struktury spliceosomu uzyskane niedawno przez grupy pod kierownictwem R. Luhrmanna, K. Nagai i Y. Shi, zrewolucjonizowały badania w obszarze splicingu, dostarczając ogromną ilość fascynujących informacji na temat zróżnicowania kompleksów spliceosomowych przedstawionych na różnych etapach procesu powstawania i funkcjonowania spliceosomu.

Na podstawie informacji uzyskanych ze struktur oraz naszej dokładnej analizy postawiliśmy kilka hipotez, których słuszność będziemy testować. Długofalowym, generalnym celem tego projektu jest zrozumienie oddziaływań i przekształceń komponentów spliceosomu i substratu RNA prowadzących do katalizy. Badanie różnych etapów splicingu wyjaśni oddziaływania i przekształcenia zachodzące pomiędzy składnikami centrum katalitycznego spliceosomu, pozwalając na lepszy opis jego funkcji i ostatecznie pomagając w przewidywaniu przebiegu alternatywnego splicingu.

Niniejszy projekt skupia się na badaniu mechanizmów, dzięki którym trzy składniki spliceosomu: katalityczny tripleks, rejon białka Prp8 położony w pobliżu miejsca aktywnego i N-końcowa domena białka Cwc25, wpływają na funkcję centrum katalitycznego. Mimo że struktury uzyskane przy użyciu mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM) przedstawiają centrum katalityczne jako niezmiennie, badania spliceosomu z wykorzystaniem genetyki drożdży oraz badania strukturalne intronów grupy II sugerują, że centrum katalityczne może podlegać istotnym zmianom konformacyjnym w trakcie katalitycznej części procesu. W naszych doświadczeniach będziemy sprawdzać czy katalityczny tripleks, istotna część centrum katalitycznego, podlega zmianom konformacyjnym w trakcie splicingu. Opierając się na przykładzie intronów grupy II, będziemy analizować wiele kombinacji nukleotydów mogących potencjalnie tworzyć katalityczny tripleks i badać ich funkcjonalność *in vivo*. Badania te pomogą wyjaśnić zakres dynamicznych zmian w centrum katalitycznym, potencjalnie prowadząc do re-ewaluacji obecnego modelu centrum katalitycznego na drugim etapie splicingu. Będziemy również badać wpływ modyfikacji/mutacji wprowadzonych w obrębie katalitycznego tripleksu (poprawiających pierwszy lub drugi etap splicingu) na globalny przebieg reakcji (Cel 1).

Będziemy również analizować rolę wysoce zakonserwowanego rejonu białka Prp8 znajdującego się w pobliżu centrum katalitycznego spliceosomu. Struktury otrzymane techniką mikroskopii krioelektronowej sugerują, że ten rejon białka przybliży do siebie kilka elementów centrum katalitycznego. Region ten zawiera kilka nowo zidentyfikowanych przez nas alleli *prp8*, które wydają się wpływać raczej na samą katalizę, niż na przejście między dwoma etapami, reprezentując nową mechanistycznie klasę mutantów wpływających na splicing. Sprawdzimy zaangażowanie tego regionu Prp8 w splicing, biorąc pod uwagę możliwość, że koordynuje on elementy centrum katalitycznego oraz ich wzajemne położenie względem siebie umożliwiające przeprowadzenia katalizy (Cel 2).

Zajmiemy się także jednym z podstawowych, aczkolwiek wciąż niezrozumiałych zagadnień splicingu: selekcji i odpowiedniego ustawienia jednego z reagentów pierwszej reakcji splicingu - adenozy w tzw. miejscu rozgałęzienia (BS-A). Miejsce rozgałęzienia (BS) rozpoznawane jest przez parowanie z regionem komplementarnym w U2 snRNA, a BS-A jest wypychane z dupleksu. Nie jest jednak jasne w jaki sposób zachodzi decyzja o tym, który nukleotyd jest wypychany, a w szczególności, który z dwóch następujących po sobie nukleotydów adeninowych jest wybierany jako BS-A. Aby lepiej zrozumieć wybór i pozycjonowanie BS-A do katalizy, skupimy się na N-końcowej domenie białka Cwc25, która oddziałuje z dupleksem U2:BS. W szczególności zbadamy, czy ujemnie naładowana reszta aminokwasowa *cwc25-D5* bierze udział w definiowaniu adenozy w miejscu BS. Równolegle zbadamy sugerowaną wcześniej rolę modyfikacji urydyny do pseudourydyny w pozycji 35 w U2 snRNA (U2-U35). Badania te będą ułatwione dzięki opracowanemu wcześniej systemowi ortogonalnemu, w którym sekwencje U2:BS można dowolnie zmieniać, umożliwiając szczegółową analizę mechanizmu wyboru miejsca rozgałęzienia (Cel 3).

Nasze badania opierają się na najnowszych informacjach dostarczonych przez struktury otrzymane techniką mikroskopii krioelektronowej i pomogą zweryfikować ich przewidywania poszerzając informacje strukturalne o bardziej szczegółową, funkcjonalną analizę kilku podstawowych aspektów splicingu. U ludzi ekspresja prawie wszystkich transkryptów mRNA wymaga zajęcia procesu składania pre-mRNA. Zazwyczaj ludzkie transkrypty pre-mRNA podlegają bardziej skomplikowanemu niż splicing standardowy, splicingowi alternatywnemu, który umożliwia otrzymanie wielu różnych mRNA z pojedynczej cząsteczki prekursorowej. Jeżeli chcemy lepiej zrozumieć ten proces i być w stanie przewidzieć złożone alternatywne wzory splicingu, potrzebujemy szczegółowych informacji z badań mechanistycznych i funkcjonalnych, takich jak zaproponowane w tym projekcie.