

Wykorzystanie rzadkiego Polimorfizmu Pojedynczego Nukleotydu ludzkiego białka WDR61 do identyfikacji nowego kompleksu związanego ze składowymi SF3A/B podjednostki U2 spliceosomu

Różnorodność genetyczna zazwyczaj wzmacnia ogólny stan zdrowia populacji. Są jednak przykłady chorób rozwijających się na tle pojedynczych lub mnogich mutacji genetycznych. Patogenne mutacje pozostają ukryte w zdrowej populacji, a zwłaszcza takiej która jest etnicznie różnorodna i ujawniają się w warunkach obniżenia liczebności populacji i zawierania związków z najbliższymi krewnymi. Zmienność genetyczna każdej populacji jest silna w obszarach genomu nie kodujących białek, gdzie nawet znaczne delecje mogą nie wpływać na zdrowie osobników. Natomiast mutacje w regionach kodujących białka, a szczególnie w rejonach odpowiedzialnych za funkcje tych białek mogą skutkować poważnymi chorobami. W trakcie ustalania sekwencji genomu każdego człowieka identyfikuje się wiele wariantów genetycznych i wskazanie mutacji odpowiedzialnej za rozwój choroby może nie być jednoznaczne, jeśli zachodzi ona w białku do tej pory nie związanym z żadną opisaną jednostką chorobową. W takim wypadku dodatkowe analizy funkcjonalne są wymagane, aby postawić ostateczną diagnozę, która być może umożliwi wybór metody leczenia lub łagodzenia objawów choroby.

Ludzkie białko WDR61 jest podjednostką dwóch kompleksów, SKI oraz PAF. Kompleks SKI działa w cytoplazmie i reguluje degradację nieprawidłowych mRNA. Kompleks PAF jest aktywny w jądrze komórkowym i reguluje syntezę mRNA przez RNA polimerazę II. Mutacje w dwóch pozostałych podjednostkach SKI skutkują zespołem włosowo-wątrobowo-jelitowym (ang. Trichohepatoenteric Syndrome, THE), zaś mutacje w podjednostce CDC73 kompleksu PAF zespołem nadczynności przytarczyc i guza szczęki lub żuchwy (ang. hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome, HPT-JT). Zespół THE jest często skutkiem całkowitej inaktywacji kompleksu SKI. W drożdżach okazano zaś, że białko WDR61 jest niezbędne do zachowania integralności strukturalnej kompleksu SKI. Mimo to do tej pory nie opisano w literaturze patogennych mutacji białka WDR61. Rozpoczęliśmy analizę funkcjonalną białka WDR61 po identyfikacji mutacji punktowej u pacjenta cierpiącego na niezdiagnozowaną chorobę genetyczną. W ramach badań wstępnych pokazaliśmy, że mutacja skutkuje ograniczeniem oddziaływania białka WDR61 zarówno z kompleksem SKI jak i PAF. Ponadto pokazaliśmy, że białko WDR61 jest częścią nowej do tej pory nie opisanej sieci oddziaływań białkowych, skupionych wokół dwóch białek strukturalnych o nieznannej funkcji, CCDC97 oraz TTC33, które są ewolucyjnie specyficzne dla kręgowców. Pokazaliśmy, że WDR61 jest istotny dla stabilności dwóch białek niezbędnych dla funkcjonowania kompleksów SKI oraz PAF. Utrata aktywnego WDR61 skutkuje zatem zniesieniem aktywności dwóch, być może trzech kompleksów wskazując na istotną rolę tego strukturalnego białka dla fizjologii komórki. Co zaskakujące usunięcie białka WDR61 w liniach komórkowych nie spowalnia wzrostu komórek, w przeciwieństwie do utraty białka CTR9, które jest główną podjednostką strukturalną kompleksu PAF. To może sugerować istnienie mechanizmu kompensacji utraty kompleksu PAF poprzez jednoczesne zaburzenie aktywności SKI lub nowego kompleksu, który zidentyfikowaliśmy w naszych badaniach wstępnych, w wyniku utraty WDR61.

Celem naszego projektu jest poznanie architektury nowego kompleksu z użyciem serii biochemicznych testów oraz ustalenie jego funkcji. WDR61 oraz dwa nowe białka strukturalne oddziałują z białkami, które odgrywają rolę w splicingu, regulują aktywność kompleksu PAF oraz biorą udział w naprawie DNA. To są istotne procesy, i mutacje w białkach biorących w nich udział, często prowadzą do rozwoju poważnych chorób. Kontrola alternatywnego splicingu jest zaangażowana w aktywację programów rozwoju organizmów wyższych. Naprawa DNA chroni przed nowotworzeniem poprzez znoszenie efektów mutagennych substancji genotoksycznych. Większość naszych testów funkcjonalnych będzie nakierowana na ustalenie wpływu dwóch nowych białek strukturalnych na te znane ścieżki.

Nasze podejście eksperymentalne do mutacji punktowej białka W20C WDR61 pokazało patogeny potencjał tego wariantu oraz zaowocowało zidentyfikowaniem nowej sieci oddziaływań. Pragniemy użyć naszego doświadczenia do systematycznej analizy wariantów zidentyfikowanych u pacjentów z chorobami genetycznymi. W tym celu rozwiniemy naszą współpracę z grupą prof. Rafała Płoskiego na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, która wstępnie zidentyfikowała wariant WDR61. Poddamy biochemicznej i funkcjonalnej analizie około 5 wariantów genetycznych w miarę ich identyfikacji, co może pozwolić ustalić przyczyny choroby i być może zasugeruje odpowiednie leczenie.