

Proces splicingu polega na usuwaniu niekodujących sekwencji (intronów) z pre-mRNA, i generowania matrycy mRNA do produkcji białka. Splicing obejmuje dwie następujące po sobie reakcje katalityczne, obie katalizowane przez spliceosom w jednym centrum katalitycznym. Tak więc, po zakończeniu pierwszej reakcji, wytworzony produkt pośredni w formie lariaty musi zmienić położenie w centrum katalitycznym, aby zrobić miejsce dla drugiej reakcji, w której 3'SS musi zostać umieszczony w miejscu aktywnym. Oczywiście każdy błąd w doborze dokładnych granic intronów (miejsca składania 5' i 3'SS) prowadzi do nieprawidłowej produkcji mRNA, powodując poważne problemy dla komórki. Interesują nas mechanizmy, za pomocą których spliceosom wybiera 3'SS i odpowiednio ustawia go w centrum katalitycznym. W szczególności chcielibyśmy zrozumieć, co się dzieje, gdy słaby lub zmutowany 3'SS wchodzi do spliceosomu i jak możemy modulować te zdarzenia.

Ponieważ struktura i funkcja centrum katalitycznego są silnie zakonserwowane u wszystkich eukariontów, zdecydowaliśmy się zbadać te zagadnienia u drożdży, pamiętając, że uzyskane wyniki opisują również funkcję ludzkich spliceosomów. Opieramy się na prostych, ale precyzyjnych metodach analizy genetycznej drożdży, co pozwala na monitorowanie dynamicznych procesów splicingu w żywej komórce.

Zauważyliśmy, że w obecności wysokiego poziomu zmutowanych intronów 3'SS, komórki drożdży wykazują znaczne defekty wzrostu. Sugerujemy, że dzieje się tak, ponieważ spliceosomy przetwarzające takie zmutowane introny 3'SS są uwięzione w konformacji zgodnej z pierwszą z dwóch reakcji, ale nie są w stanie przejść do drugiej. Zmniejszałoby to pulę spliceosomów dostępnych do składania endogennych intronów, powodując defekty wzrostu.

Przetestujemy tę hipotezę i poszukamy sposobów na naprawienie tych wad. Jednym z sposobów byłoby zmniejszenie liczby intronów 3'SS, innym sposobem byłaby pomoc spliceosomom w odrzuceniu tych „trujących” intronów. Przypuszczamy, że spliceosomy uwięzione przez zmutowane półprodukty lariaty 3'SS można uratować za pomocą systemu kontroli jakości, w którym specyficzne oddziaływania RNA:RNA w centrum katalitycznym konkurują z wiązaniem intronu, odrzucając zmutowane introny. Aby zbadać ten mechanizm odrzucania, zmienimy wybrane motywy RNA brane pod uwagę w procesie odrzucania zmutowanych intronów 3'SS.

Nasze wyniki sugerują, że motyw 3'SS, PyAG, jest rozpoznawany i umieszczany w centrum katalitycznym dwukrotnie: najpierw w „poczekalni” przed drugim etapem, podczas pierwszej reakcji katalitycznej, a następnie ponownie podczas drugiej reakcji, kiedy jest umieszczony w miejscu aktywnym katalizy. Zidentyfikujemy i scharakteryzujemy te miejsca wiązania dla 3'SS w centrum katalitycznym, aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób spliceosom kontroluje wierność wyboru miejsca składania.

Nasze eksperymenty zbadają istnienie nieznanych wcześniej interakcji RNA:RNA i ich możliwą funkcję w odrzucaniu półproduktów lariaty, a także tych, które rozpoznają i pozycjonują 3'SS w centrum katalitycznym. Jeśli zostaną potwierdzone, odkrycia te będą stanowić ważne odkrycie o znaczących implikacjach dla kontroli wierności splicingu. Zaproponowany model kontroli jakości splicingu w fazie katalitycznej reprezentuje zupełnie nowe spojrzenie na proces, nigdy wcześniej nie badane. Defekty wzrostu spowodowane przez uwięzione spliceosomy mogą w pewnych warunkach reprezentować ogólny typ defektów w komórkach eukariotycznych. Zatem nasza praca może sugerować „leczenie” tego problemu i może być wykorzystana w rozwoju nowych strategii terapeutycznych dla chorób genetycznych opartych na analogicznych mechanizmach, torując drogę do nowej klasy ogólnych rozwiązań terapeutycznych dla różnych chorób opartych na splicingu.