

TOMASZ GULANICZ

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Zakład Biologii Komórki
Lwowska 1, 87-100 Toruń
E-mail: tomgulanicz@gmail.com*

WSPÓŁCZESNE SPOJRZENIE NA PROCES SPLICINGU ORAZ MECHANIZMY JEGO REGULACJI

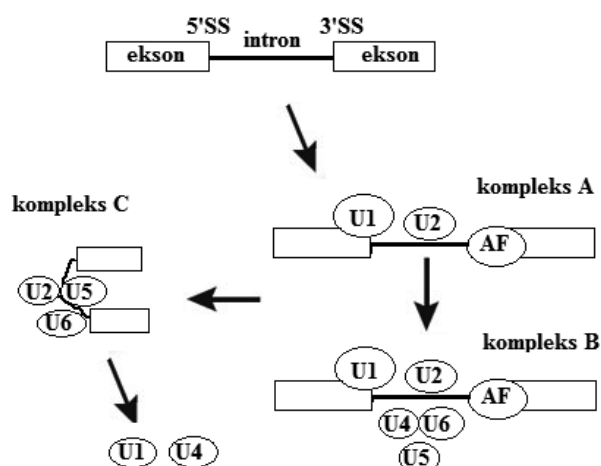
WSTĘP

Jądro komórkowe jest strukturą dobrze zorganizowaną. W nukleoplazmie występują liczne jądrowe kompartmenty i domeny, które wyspecjalizowane są w pełnieniu określonych funkcji. W przeciwieństwie do prokariotów, geny komórek eukariotycznych transkrybowane są w postaci prekursorowego mRNA (pre-mRNA), które składa się z eksonów, czyli sekwencji kodujących kolejne aminokwasy w białku, oraz intronów, które nie kodują sekwencji polipeptydu. Ze względu na obecność sekwencji niekodujących, matryca pre-mRNA nie może być bezpośrednio wykorzystana w procesie translacji, ale wymaga modyfikacji potranskrypcyjnych. Wycinanie intronów ma miejsce w procesie splicingowym, nazywanym także składaniem mRNA lub dojrzewaniem pre-mRNA. Jest to proces wieloetapowy, katalizowany przez wielofunkcjonalny kompleks zwany spliceosomem, w skład którego wchodzi białka i kwasy nukleinowe. U drożdży spliceosom składa się z pięciu UsnRNA (U1, U2, U4/U6*U5) oraz około 100 różnych polipeptydów. W komórkach człowieka liczba asocjujących białek wynosi około 300 (HOSKINS i MOORE 2009). Komórki eukariotyczne, w przeciwieństwie do prokariotów, wyposażone są także w „mały” spliceosom, w skład którego wchodzi U11, U12, U4atac, U5, U6atac snRNA (STEITZ i współaut. 2008).

Mechanizm wycinania intronów oparty jest na reakcjach cięcia hydrolytycznego na granicy ekson-intron, w efekcie których

następuje wycięcie intronu i połączenie ze sobą wolnych końców eksonów. Jest to proces wieloetapowy, w trakcie którego formują się kolejne kompleksy spliceosomalne (E, A, B, C) w wyniku asocjacji czynników splicingowych snRNP z pre-mRNA. Energia potrzebna do przeprowadzenia zmian konformacyjnych pochodzi z hydrolizy ATP. Splicing rozpoczyna się od rozpoznania miejsca 5' splicingowego intronu przez U1snRNP. Powstaje wówczas kompleks E. Przyłączenie U2snRNP do punktu rozgałęzienia intronu przekształca kompleks E w kompleks A. W dalszym etapie z pre-mRNA asocjuje triplet U4/U6-U5snRNP tworząc kompleks B, w którym zmiany strukturalne prowadzą do dysocjacji U1 i U4snRNP oraz translokacji U4, U6 i U2snRNP, wchodzących w bezpośredni kontakt (Ryc. 1). Usunięcie intronów odbywa się na drodze dwóch cięć w miejscach splicingowych. Pierwsze cięcie następuje w miejscu 5', natomiast drugie w miejscu 3' splicingowym. W efekcie intron zostaje wycięty, a wolne końce eksonów połączone ze sobą (SMOLIŃSKI i współaut. 2003). Splicing prowadzi zatem do powstania kompletnej matrycy, wykorzystywanej następnie w procesie translacji.

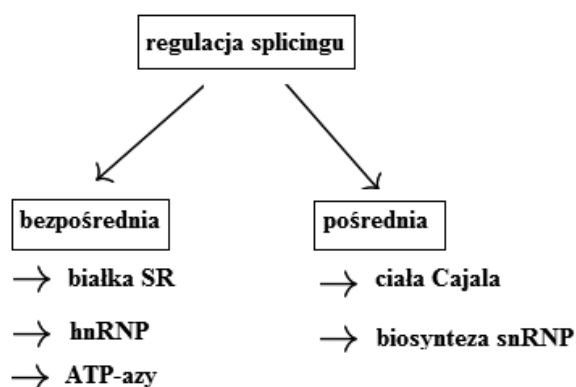
Jeszcze kilkanaście lat temu w biologii molekularnej panowało przekonanie, że jeden gen umożliwia powstanie jednego białka. Współczesna wiedza, zarówno z zakresu cytologii, jak i genetyki, pozwala odrzucić to założenie i spojrzeć na proces ekspresji ge-



Ryc. 1. Powstawanie kompleksów katalitycznych w procesie splicingowym.

nów z zupełnie nowej perspektywy. W procesie splicingowym niektóre introny mogą zostać zachowane (retencja intronu). Jest to „alternatywny splicing”. W rezultacie transkrypcja jednego genu umożliwia powstanie różnych mRNA kodujących białka. Ma to kolosalne znaczenie dla funkcjonowania komórki, która jest w stanie syntetyzować ogromną liczbę różnorodnych białek, bez konieczności zwielokrotnienia genów, co wiązałaby się ze zwiększeniem ilości DNA w jądrze komórkowym.

Proces splicingowy (Ryc. 1), pomimo korzyści jakie niesie, wymaga precyzyjnego kontrolowania. Pozostawienie intronu w mRNA z jednej strony umożliwia powstanie różnych białek z jednego genu, jednak w niektórych przypadkach może stanowić także poważne zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Błędy w trakcie procesu splicingowego prowadzą do powstania mRNA,



Ryc. 2. Sposoby regulacji procesu splicingowego.

które zawiera w swojej sekwencji dodatkowe nukleotydy lub jest krótsze, w porównaniu z mRNA prawidłowym. W efekcie następuje przesunięcie ramki odczytu w procesie translacji, które może powodować zmianę sekwencji aminokwasowej w białku lub przedwczesne wystąpienie kodonu STOP. W takiej sytuacji powstające białko jest niefunkcjonalne, a w niektórych przypadkach może także poważnie upośledzać metabolizm komórki lub indukować procesy nowotworzenia.

W komórce wiele białek występuje w postaci różnych izoform. Proces alternatywnego splicingu, w trakcie którego część intronów pozostaje w mRNA, prowadzi do powstania białek różniących się zarówno sekwencją aminokwasową, jak i właściwościami. Jako przykład może posłużyć gen *BCL-x*, z którego mogą powstać dwie izoformy białka: *BCL-x(L)*, posiadające właściwości antyapoptotyczne, oraz *BCL-x(S)*, które indukuje proces apoptozy. W komórce obie formy białka występują w stanie równowagi. Błędy w procesie splicingowym mogą jednak spowodować przesunięcie wzajemnej równowagi i wzrost ilości izoformy *BCL-x(L)*. W takiej sytuacji komórka staje się niewrażliwa na sygnały indukujące apoptozę (MINN i współaut. 1996).

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku białka kaspazy-2. Najczęściej występuje ona w formie długiej [kaspaza-2(L)], posiadającej właściwości proapoptotyczne. W mózgu i mięśniach szkieletowych kaspaza-2 mRNA ma dodatkowy, 61-nukleotydowy ekson, który powoduje przesunięcie ramki odczytu w trakcie translacji i przedwczesne wystąpienie kodonu STOP. W rezultacie pojawia się krótka forma kaspazy, która szybko ulega rozpadowi dzięki procesowi kontroli (ang. nonsense-mediated decay, NMD) (SOLIER i współaut. 2005). Rola krótkiej izoformy nie została dokładnie poznana. W niektórych sytuacjach kaspaza-2(S) mRNA jest stabilizowane i ulega translacji. Zaprezentowane przykłady przemawiają za tym, że błędy powstające w procesie splicingowym, np. poprzez niewłaściwy wybór miejsca splicingowego, mają bezpośredni wpływ na funkcjonowanie komórki. Oczywiście, konsekwencje wspomnianych błędów nie ograniczają się tylko do apoptozy. Białka uczestniczą w wielu procesach metabolicznych, zarówno w roli białek enzymatycznych, jak i czynników regulatorowych. Dojrzewanie pre-mRNA musi być zatem ściśle kontrolowane (Ryc. 2), aby nie doprowadzić do pojawienia się stanów patologicznych. Regulacja procesu splicingowego odbywa się w

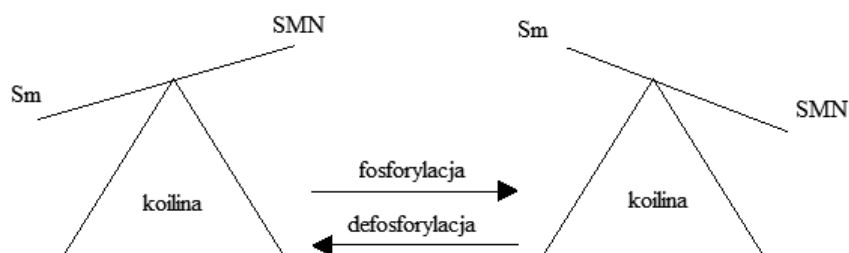
sposób bezpośredni i pośredni. Bezpośrednia kontrola oparta jest na regulacji aktywności białek regulatorowych, takich jak białka SR i białka heterogenicznego RNA (hnRNP), oraz ilości ATP, którego hydroliza dostarcza energii potrzebnej do zainicjowania zmian konformacyjnych w kolejnych kompleksach

spliceosomalnych. Mechanizm pośredniej regulacji oparty jest na kontroli kolejnych etapów biosyntezy cząsteczek UsnRNP, które odpowiedzialne są za wycinanie intronów i łączenie eksonów oraz ciał jądrowych (ciała Cajala), w których zachodzi ich dojrzewanie (patrz Ryc. 4).

WPLYW FOSFORYLACJI/DEFOSFORYLACJI BIAŁEK NA BIOSYNTĘZĘ SNRNP

Biosynteza U-snRNP jest procesem wieloetapowym, który odbywa się zarówno w nukleoplazmie, jak i w cytoplazmie. Geny *U1*, *U2*, *U4* i *U5 snRNA* transkrybowane są przez polimerazę II. Następnie transkrypty transportowane są za pośrednictwem eksportera CRM1 do cytoplazmy, gdzie asocjują z kompleksem SMN i białkami rdzeniowymi Sm (B/B", D1, D2, D3, E, F, G) tworząc cząsteczki UsnRNP. Powstałe w cytoplazmie cząsteczki UsnRNP podlegają transportowi zwrotnemu do nukleoplazmy, gdzie akumulują się w ciałach Cajala (CB), w których odbywa się ich dojrzewanie oparte na metylacji i pseudouracylowaniu nukleotydów w UsnRNA za pośrednictwem scaRNA (ang. specific Cajal bodies RNA). Ze względu na to, że dojrzewanie cząsteczek UsnRNP jest konieczne dla ich katalitycznych właściwości, zmiany strukturalne i funkcjonalne w ciałach Cajala mogą pośrednio wpływać na proces splicingowy poprzez regulowanie ilości dostępnych „cząsteczek efektorowych”, bez których wycinanie intronów nie byłoby możliwe. W tym miejscu warto więc poświęcić trochę uwagi wspomnianym ciałom jądrowym, które są nie tylko miejscem dojrzewania cząsteczek UsnRNP, ale także akumulacji licznych czynników splicingowych. Ciała Cajala (CB) są strukturami jądrowymi obecnymi w komórkach roślinnych i zwierzęcych (DUNDR i MISTELI 2010). Najczęściej zlokalizowane są w pobliżu jąderka. Ich białkiem strukturalnym jest koilina, często wykorzystywana jako molekularny marker ciał Cajala. Jest to białko domenowe, zdolne do interakcji z kompleksem SMN i białkami Sm (MAKAROV i współaut. 2013). W strukturze koiliny wyodrębniono cztery domeny: sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) i jąderkowej (NoLS), domenę bogatą w reszty argininowe i glicynowe (RG box), domenę *Tudor* oraz C-koniec (koniec karboksylowy) zawierający liczne reszty serynowe. Obecność domeny NLS i NoLS umożliwia akumulację białka zarówno w nukleoplazmie jak i w jąderku. Aktywność biologiczna

koiliny regulowana jest na drodze fosforylacji i symetrycznej dimetylowania argininy. Fosforylacja jest możliwa w przynajmniej 17 miejscach. Jest to stan dynamiczny, zależny od cyklu komórkowego (CARRERO i współaut. 2011). W jądrze komórkowym koilina, kompleks SMN i białka Sm kolokalizują ze sobą w ciałach Cajala. Zmiana stopnia fosforylacji białek może jednak modyfikować wzajemne interakcje pomiędzy nimi. Fosforylacja domeny *Tudor* w początkowych stadiach mitozy hamuje zdolność cząsteczek koiliny do wzajemnego sieciowania, prowadząc do rozpadu ciał Cajala w czasie podziału jądra komórkowego. Trwała defosforylacja seryny w pozycji 571 oraz tyrozyny w pozycji 572 w obrębie C-końca zwiększa natomiast ilość powstających kompleksów koilina-SMN, przy jednoczesnym spadku ilości powstałych kompleksów koilina-białka Sm. Intensywność wiązania białek Sm wzrasta, gdy koilina utrzymywana jest w stanie niskiej fosforylacji (TOYOTA i współaut. 2010). W przeciwieństwie do pojedynczych fosforylacji/defosforylacji, które modyfikują wzajemne interakcje pomiędzy białkami, trwała fosforylacja wszystkich reszt serynowych obecnych w łańcuchu polipeptydowym koiliny prowadzi do całkowitej supresji powstawania kompleksów SMN-koilina. Zmiana stopnia fosforylacji nie tylko determinuje zatem intensywność oddziaływań pomiędzy koiliną i kompleksem SMN, ale także może je całkowicie hamować. W takiej sytuacji koilina występuje w stanie rozproszonym na terenie nukleoplazmy, natomiast kompleks SMN tworzy struktury nazywane Gem's, które są ciałami jądrowymi zawierającymi kompleks SMN i cząsteczki UsnRNP, ale pozbawione koiliny. Brak koiliny stanowi cechę odróżniającą ciała Gem's od ciał Cajala. Podobny obraz fenotypowy pojawia w przypadku obecności reszt fosforanowych w pozycjach 271 i 272, co sugeruje, że wspomniane reszty serynowe pełnią kluczową rolę w interakcji koiliny z kompleksem SMN. Interesujące zmiany w lokalizacji koiliny pojawiają



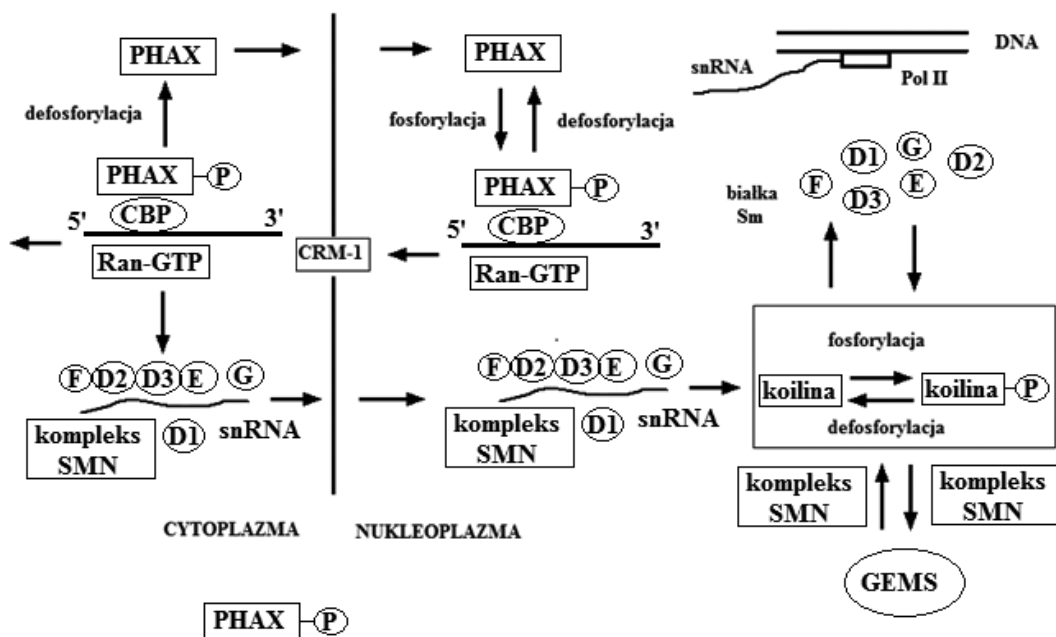
Ryc. 3. Regulacja intensywności wiązania kompleksu SMN i białek Sm przez koilinę na drodze fosforylacji/defosforylacji C-końca koiliny.

się także w przypadku pojedynczej fosforylacji w pozycji 489, która prowadzi do akumulacji koiliny w jąderku (CARRERO i współaut. 2011), redukuje jej właściwości nukleolityczne oraz osłabia siłę wiązania kwasów nukleinowych takich jak U1 i U2snRNA, scaRNA, hTR (RNA ludzkiej telomerazy), 47/45S rRNA oraz 5,8S rRNA (BROOME i współaut. 2013). Warto również wspomnieć, że mitotyczna koilina ma słabszą aktywność RNA-zową w porównaniu z koiliną interfazową. Mechanizm powstawania kompleksu SMN-koilina-Sm oparty jest więc na regule wzajemnego wykluczania się, zgodnie z którą kompleks SMN preferuje stan niskiej fosforylacji koiliny, podczas gdy białka Sm silniej wiążą się z koiliną w stanie jej wysokiej fosforylacji (TOYOTA i współaut. 2010). Osłabienie inte-

rakcji koiliny z kompleksem SMN powoduje akumulację kompleksu SMN w ciałach Gem's lub jego transport do cytoplazmy, natomiast intensyfikacja oddziaływań koiliny z białkami Sm umożliwia ich retencję w obrębie CB. Fosforylacja modyfikuje zatem intensywność krążenia kompleksu SMN i białek Sm między cytoplazmą i nukleoplazmą, pośrednio wpływając na ich

dostępność w procesie składania cząsteczek UsnRNP w cytoplazmie (Ryc. 3).

Zmiana stopnia fosforylacji nie tylko modyfikuje wzajemne interakcje zachodzące pomiędzy elementami odpowiedzialnymi za utrzymanie integralności i funkcjonalności ciał Cajala, ale także stanowi mechanizm regulujący transport UsnRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Eksport powstałego w procesie transkrypcji UsnRNA do cytoplazmy, gdzie następuje składanie spliceosomu, wymaga obecności sekwencji eksportu jądrowego (NES) bogatej w reszty leucynowe oraz monometylacji końca 5'. Transport odbywa się z udziałem eksporterka CRM-1 z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy Ran-GTP. SnRNA nie łączy się jednak bezpośrednio z CRM-1, ale wymaga obecności dwóch



Ryc. 4. Regulacja biosyntezy snRNP na drodze fosforylacji/defosforylacji białek.

białek adaptorowych: CBP i PHAX. Białko CBP (ang. cap binding protein) jest jądrowym kompleksem zbudowanym z dwóch podjednostek CBP80 i CBP20, który wiąże czapkę monometylową na końcu 5' UsnRNA (OHNO i współaut. 1990, IZAURRALDE i współaut. 1995), natomiast PHAX jest fosforylowanym adaptorem dla eksportu RNA (ang. phosphorylated adaptor for RNA export). Transport kompleksu snRNA-CBP-PHAX z nukleoplazmy do cytoplazmy regulowany jest na drodze fosforylacji PHAX i hydrolizy Ran-GTP do Ran-GDP (OHNO i współaut. 2000). W jądrze komórkowym PHAX ulega aktywacji w wyniku dołączenia reszt fosforanowych przez kinazę CK2 (ang. casein kinase 2). Następnie łączy się z CBP i UsnRNA tworząc trimeryczny pre-kompleks, który wiąże się z eksporterem CRM-1 i Ran-GTP. Po przetransportowaniu kompleksu do cytoplazmy następuje hydroliza Ran-GTP do Ran-GDP oraz defosforylacja PHAX za pośrednictwem białkowej fosfatazy 2A (ang. protein phosphatase 2A, PP2A), prowadząc do rozpadu kompleksu i uwolnienia snRNA. W cytoplazmie rozpoczyna się składanie cząsteczek UsnRNP poprzez asocjację snRNA z

kompleksem SMN i białkami rdzeniowymi Sm (D1, D2, D3, E, F, G). Koniec 5' snRNA ulega także dalszej metylacji do postaci czapki trimetyloguanozyny (TMG cap), która jest częścią sygnału importu jądrowego. W nukleoplazmie następuje ponowna fosforylacja PHAX do postaci aktywnej (KITAO i współaut. 2008). Transport UsnRNA z jądra do cytoplazmy regulowany jest także z udziałem kompleksu białkowego zwanego integratorem, który zaangażowany jest w potranskrypcyjną modyfikację końca 3' snRNA. Zablockowanie ekspresji INTS4, jednej z podjednostek integratora, prowadzi do pojawienia się ciał cytoplazmatycznych składających się z białek Sm i kompleksu SMN, natomiast snRNA akumuluje się w jądrze komórkowym, jednak bez kolokalizacji z koiliną. Powstałe w wyniku zablockowania ekspresji INTS4 ciała jądrowe, ze względu na brak obecności koiliny, nie są odpowiednikiem ciał Cajala. Podobny fenotyp pojawia się w przypadku zastosowania leptomycyny B, która jest inhibitorem transportu jądrowego za pośrednictwem eksportera CRM-1 oraz siRNA wyciszającego ekspresję PHAX (TAKATA i współaut. 2011) (Ryc. 4).

REGULACJA BIOSYNTETY SNRNP NA DRODZE SYMETRYCZNEJ DIMETYLACJI ARGININY

Drugim mechanizmem regulującym biosyntezę UsnRNP oraz wzajemne interakcje pomiędzy koiliną, kompleksem SMN i białkami Sm jest symetryczna dimetylacja argininy. Jest to modyfikacja potranslacyjna, katalizowana przez białkowy kompleks nazywany metylosomem, w skład którego wchodzi białkowa metylotransferaza argininowa (ang. protein arginine methyltransferase, PRMT) i białko metylosomu 50 (MEP50) (FRIESEN i współaut. 2002). Metylotransferazy argininowe (PRMTs) są enzymami odpowiedzialnymi za tworzenie asymetrycznej (typ I PRMT) lub symetrycznej (typ II PRMT) dimetylacji argininy. Różnica pomiędzy symetryczną lub asymetryczną dimetylacją dotyczy lokalizacji grupy metylowej w stosunku do grupy guanidynowej argininy. Jako donor grup metylowych wykorzystywana jest S-adenozyno-L-metionina (ang. S-adenosyl-L-methionine, AdoMet). Symetryczna metylacja katalizowana jest przez metylotransferazę PRMT 5 i 7, podczas gdy asymetryczna przez PRMT 1, 2, 3, 4, 6 i 8 (YU 2011). Wśród cząsteczek budujących rdzeń UsnRNP symetrycznej dimetylacji ulega kompleks SMN i białka rdzenio-

we D1, SmB/B' i Lsm4 (ang. Sm-like protein 4), wchodzący w skład cząsteczki U6snRNP. Grupy metylowe dołączane są do argininy i glicyny w obrębie domeny RG. Wzajemna interakcja pomiędzy MEP50 i SmD2, który nie jest specyficznym substratem dla symetrycznej dimetylacji (FRIESEN i współaut. 2002) sugeruje, że komponenty metylosomu, inne niż metylotransferazy, mogą pełnić funkcję regulacyjną przyspieszając lub spowalniając metylację, która niezbędna jest dla asocjacji białek Sm z kompleksem SMN w trakcie biosyntezy UsnRNP w cytoplazmie. Poza kompleksem SMN i białkami Sm, także koilina ulega dimetylacji w pozycji 397, 410, 413, 415 w regionie bogatym w reszty glicynowe i argininowe (region GAR) (ang. Gly/Arg-rich) (GARY i CLARKE 1998). Poziom metylacji koiliny prawdopodobnie skorelowany jest z metylacją białek Sm. Obecność sDRM (ang. symmetrical diarginine methylation) jest niezbędna także dla interakcji koiliny z kompleksem SMN. W żywych komórkach kompleks SMN i koilina kolokalizują ze sobą w CB. Potraktowanie komórek HeLa inhibitorem metylacji MTA (ang. methylation inhibitor 5-deoxy-5-methylthio-

adenosine) powoduje akumulację kompleksu SMN w Gem's, podczas gdy koilina pozostaje w ciałach Cajala (BOISVERT i współaut. 2002). Akumulacja kompleksu SMN w postaci Gem's może wskazywać zatem na spadek intensywności procesu metylacji w żywych komórkach. Podobne zmiany w fenotypie pojawiają się także po zastosowaniu siRNA blokującego ekspresję PRMT5, PRMT7 oraz MEP50. Wyciszenie ekspresji genów kodujących PRMT5 i PRMT7 przerywa proces składania rdzenia snRNP, spadek dynamiki formowania się ciał Cajala i zwiększa lokalizację koiliny w części peryferycznej jąderka. Symetryczna dimetylacja argininy nie wpływa jednak na transport jądrowy. W przypadku traktowania komórek HeLa inhibitorem MTA nadal obserwuje się obecność białek Sm oraz kompleksu SMN

w nukleoplazmie i cytoplazmie (GONSALVEZ i współaut. 2007). Symetryczna dimetylacja argininy, podobnie jak fosforylacja, wpływa na stabilność, strukturę i funkcjonalność ciał Cajala oraz bezpośrednio modyfikuje biosyntezę UsnRNP poprzez zmianę wzajemnych oddziaływań pomiędzy koilina, kompleksem SMN i białkami Sm. W przeciwieństwie do symetrycznej metylacji, asymetryczna metylacja (aDRM) jest obecna w białkach Sm selektywnie. Prawdopodobnie nie jest wymagana dla asocjacji białek Sm z kompleksem SMN oraz ich transportu jądrowego. Ten rodzaj potranslacyjnej modyfikacji może jednak odgrywać rolę w lokalizacji białek Sm w obrębie jądra komórkowego lub regulować splicing pre-mRNA (GONSALVEZ i współaut. 2007).

REGULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁEK SR I HNRNP

Fosforylacja/defosforylacja nie tylko determinuje wzajemne interakcje pomiędzy koilina, białkami Sm, kompleksem SMN i PHAX, regulując tym samym biosyntezę cząsteczek snRNP, ale modyfikuje także aktywność biologiczną białek posiadających zdolność wiązania RNA (ang. RNA binding protein, RBP), które pełnią rolę czynników regulatorowych oraz determinują wybór miejsca splicingowego przez spliceosom. Do rodziny białek RBA zaliczamy między innymi białka SR oraz białka heterogenicznego RNA (ang. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP). Białka SR charakteryzują się obecnością domeny rozpoznającej RNA (ang. RNA recognition motif, RRM) na N-końcu oraz domeny bogatej w reszty serynowe i argininowe (RS domain) na C-końcu. Fosforylacja domeny RS modyfikuje zdolność rozpoznawania mRNA przez białka SR (SANFORD i współaut. 2005), asocjację z innymi białkami oraz determinuje ich wewnątrzkomórkową lokalizację. Klasycznym przykładem, który pozwoli zilustrować, w jaki sposób fosforylacja wpływa na proces splicingowy, jest białko SRSF10. W postaci ufosforylowanej pełni ono funkcję specyficznego aktywatora splicingu, ułatwiając przyłączenie U1 i U2snRNA do ich miejsc docelowych na pre-mRNA w pobliżu sekwencji ESE (ang. exonic splicing enhancer) zależnych od SRSF10 (FENG i współaut. 2008). Defosforylacja SRSF10 przez fosfatazę PP1, która pojawia się w wyniku szoku cieplnego, aktywuje funkcje represorowe SRSF10. W takiej formie SRSF10 nadal wiąże się z U1snRNP,

jednak hamuje jego asocjację z miejscem 5' splicingowym. Podobny mechanizm występuje w przypadku białek SF1 i SRSF1. Fosforylacja stymuluje ich asocjację z U2AF65 i U1snRNP, tym samym modyfikując tempo składania spliceosomu (MANCEAU i współaut. 2006). Poza modyfikacją aktywności białek SR, fosforylacja/defosforylacja domeny RS determinuje także ich lokalizację w jądrze komórkowym oraz reguluje transfer białek SR z nukleoplazmy do cytoplazmy. W trakcie interfazy białka SR akumulują się głównie w skupiskach jądrowych (ang. nuclear speckles) razem z czynnikami splicingowymi oraz białkami zaangażowanymi w transport RNA. W warunkach *in vivo* fosforylacja stymuluje rekrutację białek SR ze skupisk jądrowych do miejsc splicingowych pre-mRNA (MISTELI i współaut. 1998), natomiast defosforylacja domeny RS odpowiedzialna jest za ich translokację do cytoplazmy (LAI i współaut. 2001). Dołączenie reszty fosforanowej w cytoplazmie indukuje powrót białek SR do jądra komórkowego, regulując tym samym cyrkulację białek SR pomiędzy nukleoplazmą a cytoplazmą. Defosforylacja zwiększa także powinowactwo białek SRSF1 i SRSF7 względem białka transportowego TAP, który zaangażowany jest w eksport mRNA (HUANG i współaut. 2004).

W przypadku białek hnRNP, wpływ fosforylacji/defosforylacji na proces splicingowy może zostać zobrazowany na przykładzie białka SAM68, które należy do rodziny białek STAR (ang. signal transduction and acti-

vation of RNA). Fosforylacja tyrozyny przez kinazę SRK powoduje jego akumulację w ciałach jądrowych nazywanych SNB (ang. SAM68 nuclear bodies) (LUKONG i współaut. 2005, PARONETTO i współaut. 2007) oraz negatywnie wpływa na zdolność interakcji SAM68 z hnRNP A1 i BCL-X mRNA. Osłabienie interakcji SAM68 z mRNA hamuje zatem aktywność splicingową względem docelowych genów (PARONETTO i współaut. 2007). Odmienne mechanizmy regulacyjne zachodzi w przypadku hnRNP A1, gdzie fosforylacja przez kinazę MAPK p39 (ang. mitogen-activa-

ted protein kinase) w warunkach stresowych szoku cieplnego nie powoduje akumulacji białka w postaci ciał jądrowych, jak w przypadku SAM68, ale jego translokację do cytoplazmy, gdzie hnRNP A1 wpływa na etapy procesu splicingowego zależne od hnRNP A1 (VAN OORDT i współaut. 2000, GUIL i współaut. 2006). Tak więc, mechanizm regulacyjny oparty na fosforylacji i defosforylacji, w przypadku białek hnRNP i SR, nie jest systemem jednorodnym, ale może wywierać różnorodny efekt na aktywność białek, zależnie od rodzaju i miejsca fosforylacji.

ROLA ATP-AZ W REGULACJI PROCESU SPLICINGOWEGO

Kolejne kompleksy katalityczne, w których odbywa się wycinanie intronów, nie powstają *de novo*, ale w wyniku zmian konformacyjnych, które prowadzą do przekształcenia jednego kompleksu w kolejny. Energia potrzebna do przeprowadzenia tych zmian pochodzi z hydrolizy ATP. W takim kontekście czynnikami regulującymi proces splicingowy może być odpowiednia ilość ATP, wystarczająca na pokrycie potrzeb energetycznych, oraz obecność specyficznych ATPaz. W procesie dojrzewania mRNA biorą udział ATPazy należące do rodziny białek DExD/H-box Prp, których obecność jest niezbędna dla kontynuacji splicingu. Termiczna inaktywacja ATPazy Prp2 u drożdży zatrzymuje splicing na poziomie kompleksu B (YEAN i współaut. 1991). Przeprowadzenie cięcia w miejscu 5' splicingowym i ligacja eksonów wymaga także obecności przynajmniej sześciu czynników splicingowych: Spp2, Cwc25, Prp 16, Prp18, Prp22 i Slu7 oraz odpowiedniego stężenia ATP (HOSKINS i MOORE 2009).

Współczesne spojrzenie na mechanizm regulacji splicingu zakłada kinetyczną rywalizację pomiędzy dwoma możliwymi scenariuszami: powstaniem kolejnego kompleksu spliceosomalnego lub otwarciem przez ATPa-

zy szlaków prowadzących do rozpadu spliceosomu (ang. discard pathways). Przykładem ATPazy, która powoduje rozpad kompleksu C, jest Prp16. W warunkach *in vitro* jest to proces odwracalny. Spliceosomy mogą wielokrotnie wchodzić i wychodzić z drogi rozpadu indukowanej przez Prp16 (KODATHINGAL i współaut. 2010). Podobną rolę pełni Prp22. Jeśli jest to proces odwracalny, to nasuwa się pytanie, dlaczego spliceosomy, które weszły na drogę rozpadu, w większości przypadków nie kontynuują już procesu splicingowego. Staley i jego współpracownicy wykazali, że nieodwracalność tego procesu uwarunkowana jest przez obecność ATPazy Prp43, dla której substratem są kompleksy spliceosomalne biorące udział w cięciu 5'SS oraz ligacji eksonów (KODATHINGAL i współaut. 2010, MAYAS i współaut. 2010). ATPaza Prp43 powoduje destrukcję spliceosomu w warunkach niedoboru Prp16, uniemożliwiając tym samym wycofanie się spliceosomów z drogi rozpadu. Splicing może być zatem regulowany zarówno na poziomie powstawania kolejnych kompleksów katalitycznych przy udziale specyficznych ATPaz, jak również poprzez odwracalność/nieodwracalność wejścia na szlak rozpadu.

PODSUMOWANIE

Regulacja procesu splicingowego odbywa się na różnych poziomach procesu dojrzewania mRNA. Jednym z mechanizmów kontrolnych jest modyfikacja biosyntezy cząsteczek UsnRNP, które bezpośrednio zaangażowane są w wycinanie sekwencji intronowych i łączenie wolnych końców eksonów. Biosynteza UsnRNP jest procesem wieloetapowym i

obejmuje fazę jądrową, gdzie geny U1, U2, U4 i U5snRNA podlegają transkrypcji przez polimerazę II oraz fazę cytozolową, w której następuje formowanie się cząsteczek UsnRNP poprzez asocjację UsnRNA z kompleksem SMN i białkami rdzeniowymi Sm. Dalsze etapy dojrzewania UsnRNP odbywają się w ciałach Cajala, dla których koilina jest

białkiem strukturalnym. Zmiana wzajemnych oddziaływań w układzie SMN-Sm-koilina poprzez fosforylację i symetryczną dimetylację argininy wpływa na tempo składania snRNP, regulując tym samym ilość „cząsteczek efektorowych”. Proces spliceosomalny kontrolowany jest także na etapie formowania się kompleksów katalitycznych, które dla swojej aktywności wymagają energii pochodzącej z hydrolizy ATP i specyficznych ATPaz Prp.

Utrzymanie właściwej równowagi pomiędzy ATP i ATPazami Prp decyduje o kontynuacji procesu splicingowego lub skierowaniu spliceosomów na drogę rozpadu. Fosforylacja/defosforylacja wpływa także na aktywność białek SR i hnRNP, które mogą regulować zdolność rozpoznawania miejsc splicingowych przez UsnRNP lub pełnić funkcję induktorów oraz represorów.

WSPÓŁCZESNE SPOJRZENIE NA PROCES SPLICINGOWY ORAZ MECHANIZMY JEGO REGULACJI

Streszczenie

W komórkach eukariotycznych wiele genów transkrybowanych jest w postaci prekursorowego mRNA zawierającego sekwencje kodujące (eksony) i niekodujące (introny), które zostają wycięte w procesie splicingowym, dostarczając kompletnej matrycy do syntezy białka. Komórka dysponuje dwoma rodzajami splicingu: konstytutywnym oraz alternatywnym, w trakcie którego część intronów pozostaje w mRNA. Splicing umożliwia zatem otrzymanie wielu mRNA z jednego genu. Proces splicingowy jest wieloetapowy i pełni w komórce liczne funkcje. Z tego powodu musi być ściśle kontrolowany. Błędy pojawiające się w czasie splicingu mogą wpływać w negatywny sposób na metabolizm komórki, apoptozę i cykl komórkowy, w niektórych przypadkach induku-

jąc także proces nowotworzenia. Regulacja splicingu odbywa się w sposób bezpośredni poprzez modyfikację aktywności katalitycznej białek regulatorowych z rodziny białek Sr i hnRNP na drodze fosforylacji/defosforylacji oraz zmianę stężenia ATP i ATPaz Prp, które niezbędne są dla powstania zmian konformacyjnych w kompleksach spliceosomalnych. Regulacja pośrednia oparta jest na dostępności cząsteczek snRNP oraz utrzymaniu integralności oraz funkcjonalności ciał Cajala, które biorą udział w biosyntezie snRNP. Właściwa integralność ciał Cajala utrzymywana jest poprzez wzajemne interakcje pomiędzy koiliną, białkami rdzeniowymi Sm oraz kompleksem SMN, których aktywność modyfikowana jest na drodze fosforylacji i symetrycznej dimetylacji argininy.

NEW INSIGHT INTO THE SPLICING PROCESS AND MECHANISM OF ITS REGULATION

Summary

In eukaryotic cells many genes are transcribed in the form of pre-mRNA containing coding (exon) and non-coding (intron) sequences. In the splicing process, introns are removed and exons ligated providing thus complete template for protein translation. Despite constitutive splicing there occurs also an alternative splicing within which not all introns are taken out. Splicing leads thus to production of multiple copies of mRNA from a single gene. The splicing as a multi-functional and step-wise process needs to be tightly regulated. Many cellular malfunctions are effected by errors occurring during constitutive and alternative splicing. These malfunctions encompass metabolism, apoptosis and cell cycle control; in some cases they may lead to cancerogenesis.

Splicing could be regulated directly by modifying activity of splicing factors such as SR proteins and RNA-binding proteins (RBPs) by phosphorylation/dephosphorylation and changes in concentration of ATP and ATPases Prp involved into conformational changes in of spliceosomal complexes. Indirect pathway of splicing regulation is based on accessibility of snRNP particles and control of the integrity and functionality of Cajal bodies (CB) participating in snRNP biogenesis. The integrity of CB is maintained by mutual interactions between SMN complex, coilin protein and core proteins Sm, the activity of which activity is regulated by phosphorylation and symmetrical arginine dimethylation.

LITERATURA

- BOISVERT F. M., CÔTÉ J., BOULANGER CH. M., CLÉROUX P., BACHAND F., AUTEXIER CH., RICHARD S., 2002. *Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing*. J. Cell Biol. 159, 957-969.
- BROOME H. J., ZUNAMYS I., CARRERO, DOUGLAS H. E., HEBERT M. D., 2013. *Phosphorylation regulates coilin activity and RNA association*. Biolo. Open 2, 407-415.
- CARRERO Z. I., VENKATRAMREDDY V., DOUGLAS H. E., HEBERT M. D., 2011. *Coilin phosphomutants disrupt Cajal body formation, reduce cell proliferation and produce a distinct coilin degradation product*. Public Library Sci. 6, e25743.
- DUNDR M., MISTELI T., 2010. *Biogenesis of Nuclear Bodies*. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 2, a000711.
- FENG Y., CHEN M., MANLEY J. L., 2008. *Phosphorylation switches the general splicing repressor*

- SRp38 to a sequence-specific activator*. Nat. Struct. Mol. Biol. 15, 1040–1048.
- FRIESEN W. J., WYCE A., PAUSHKIN S., ABEL L., RAPPSILBER J., MANN M., DREYFUSS G., 2002. *A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins*. J. Biol. Chem. 277, 8243–8247.
- GARY J. D., CLARKE S., 1998. *RNA and protein interaction modulated by protein arginine methylation*. Molecular Biology Institute and Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles.
- GONSALVEZ G. B., TIAN L., OSPINA J. K., FRANÇOIS-MICHEL BOISVERT, LAMOND A I., MATERA A G., 2007. *Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins*. J. Cell Biol. 178, 733–740.
- GUIL S., LONG J. C., C´ACERES J. F., 2006. *HnRNP A1 relocation to the stress granules reflects a role in the stress response*. Mol. Cell. Biol. 26, 5744–5758.
- HOSKINS A. A., MOORE M. J., 2009. *The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine*. Trends Biochem. Sci. 37, 179–188.
- HUANG Y., YARIO T. A., STEITZ J. A., 2004. *A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 9666–9670.
- IZAURRALDE, E., LEWIS J., GAMBERI C., JARMOLOWSKI A., MCGUIGAN C., MATTAJ I. W., 1995. *A cap-binding protein complex mediating U snRNA export*. Nature 376, 709–712.
- KITAO S., SEGREF A., KAST J., WILM M., MATTAJ I. W., OHNO M., 2008. *A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleus*. Mol. Cell. Biol. 28, 487–497.
- KOODATHINGAL P., PICCIRILLI J. A., STALEY J. P., 2010. *The DEAH box ATPases Prp16 and Prp43 cooperate to proofread 5' splice site cleavage during pre-mRNA splicing*. Mol. Cell 39, 385–395.
- LAI M.-C., LIN R.-I., TARN W.-Y., 2001. *Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10154–10159.
- LUKONG K. E., LAROCQUE T., TYNER A. L., RICHARD S., 2005. *Tyrosine phosphorylation of Sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression*. J. Biol. Chem. 280, 38639–38647.
- MAKAROV V., RAKITINA D., PROTOPOPOVA A., YAMINSKY I., ARUTIUNIAN A., LOVE A. J., TALIANSKY M., KALININA N., 2013. *Plant Coilin: Structural Characteristics and RNA-Binding Properties*. Public Library Sci. 8, e53571.
- MANCEAU V., SWENSON M., LE CAER J. -P., A. KIELKOPF S. C. L., MAUCUER A., 2006. *Major phosphorylation of SF1 on adjacent Ser-Pro motifs enhances interaction with U2AF65*. FEBS J. 273, 577–587.
- MAYAS R. M., HIROSHI M., STALEY J. P., 2010. *Spliceosome discards intermediates via the DEAH box ATPase Prp43p*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 10020–10025.
- MINN A. J., BOISE L. H., THOMPSON C. B., 1996. *Bcl-x Antagonizes the Protective Effects of BCL-x*. J. Biol. Chem. 271, 6306–6312.
- MISTELI T., C´ACERES J. F., CLEMENT J. Q., KRAINER A. R., WILKINSON M. F., SPECTOR D. L., 1998. *Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo*. J. Cell Biol. 143, 297–307.
- OHNO M., KATAOKA N., SHIMURA Y., 1990. *A nuclear cap binding protein from HeLa cells*. Nucl. Acids Res. 18, 6989–6995.
- OHNO M., SEGREF A., BACHI A., WILM M., MATTAJ I. W., 2000. *PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation*. Cell 101, 187–198.
- PARONETTO M. P., ACHSEL T., MASSIELLO A., CHALFANT C. E., SETTE C., 2007. *The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x*. J. Cell Biol. 176, 929–939.
- SANFORD J. R., ELLIS J. D., CAZALLA D., C´ACERES J. F., 2005. *Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 15042–15047.
- SMOLIŃSKI D. J., WRÓBEL B., ZIENKIEWICZ K., NIEDOJADŁO J., 2003. *Organizacja systemu splicingowego w komórkach linii generatywnej*. Kosmos 52, 481–492.
- SOLIER S., LOGETTE E., DESOCHE L., SOLAR E., CORCOS L., 2005. *Nonsense-mediated mRNA decay among human caspases: the caspase-2S putative protein is encoded by an extremely short-lived mRNA*. Cell Death Different. 12, 687–689.
- STEITZ J. A., DREYFUSS G., KRAINER A. R., LAMOND A. I., MATERA A. G., PADGET R. A., 2008. *Where in the cell is the minor spliceosome?* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 8485–8486.
- TAKATA H., NISHIJIMA H., MAESHIMA K., SHIBAHARA K., 2011. *The integrator complex is required for integrity of Cajal bodies*. J. Cell Sci. 125, 166–175.
- TOYOTA C. G., DAVIS M. D., COSMAN A. M., HEBERT M. D., 2010. *Coilin phosphorylation mediates interaction with SMN and SmB'*. Chromosoma 119, 205–215.
- VAN OORDT W. V. D. H., DIAZ-MECO M. T., LOZANO J., KRAINER A. R., MOSCAT J., C´ACERES J. F., 2000. *The MKK(3/6)-p38- signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation*. J. Cell Biol. 149, 307–316.
- YEAN S. L., LIN R. J., 1991. *U4 small nuclear RNA dissociates from a yeast spliceosome and does not participate in the subsequent splicing reaction*. Mol Cell Biol. 11, 5571–5577.
- YU M. C., 2011. *The role of protein arginine methylation in mRNP dynamics*. Mol. Biol. Internat. 2011, 1–10.