

Souhrn

Sestřih pre-mRNA je jedním z klíčových kroků genové exprese, který probíhá v buněčném jádře. Je katalyzován multiproteinovým komplexem zvaným spliceosome, který je formován z pěti hlavních malých jaderných ribonukleoproteinových částic U1, U2, U4, U5 a U6 snRNP a dalších asociovaných proteinů. Rozpoznání a vystřížení intronů z pre-mRNA a následné spojení exonů za tvorby mRNA je doprovázeno mnoha konformačními změnami mezi jednotlivými částicemi spliceosomu. Kompletní sestřihová mašinerie se sice nachází v jádře, ale některé důležité kroky snRNP maturace se odehrávají v cytoplazmě. snRNP cyklují kontinuálně přes nukleoplazmu a jaderné kompartmenty, kde vykonávají své funkce. V Cajalových tělískách probíhají posttranskripční modifikace jednotlivých snRNA a některé snRNP se tady skládají do větších komplexů jako U4/U6 di-snRNP a U4/U6.U5 tri-snRNP.

Pre-mRNA sestřih probíhá za postupné asistence jednotlivých snRNP. V této práci jsem ukázala, že asociace U1 snRNP s 5' sestřihovým místem probíhá řádově v sekundách. U2 snRNP pak rozeznává 3' sestřihové místo a takto je intron definován. Za účasti U4/U6.U5 tri-snRNP vznikne katalytické jádro spliceosomu U2.U5.U6. Ukázala jsem, že samotná sestřihová reakce až do uvolnění spliceosomu trvá přibližně 30 sekund a ve srovnání s dynamikou rozeznání intronu určuje rychlost celého procesu.

Uvolněné snRNP se recyklují, aby se mohly znovu účastnit sestřihu. Ukázali jsme, že opakované skládání U4/U6.U5 tri-snRNP komplexů probíhá převážně v Cajalových tělískách, kde U5 snRNP asociuje s U4/U6 di-snRNP komplexem. Tento proces je dynamický a vyžaduje produktivní interakci mezi specifickými proteiny U5 a U4/U6 snRNP, hPrp6 a hPrp31. Myší knockout proteinu hPrp31 je letální a RNAi znemožní zformování tri-snRNP komplexu a vede ke zvětšení Cajalových tělísek.

Některé mutace hPrp31 proteinu se vážou k onemocnění retinitis pigmentosa, které ovlivňuje specifické buňky v retině a může vést k úplné slepotě. Ukázala jsem, že mutace A1a216Pro (AD29) brání integraci tohoto proteinu do U4/U6 di-snRNP komplexu, ale zvyšuje jeho interakci s hPrp6 proteinem. Další studium AD29 interakcí s proteiny a snRNA z U4/U6.U5 tri-snRNP komplexu by mohlo prohloubit naše poznatky o molekulárním mechanismu, který spouští toto onemocnění.

Technika RB-FRET, kterou jsem zavedla, by v tomto případě byla ideálním nástrojem pro analýzu interakcí mezi RNA a proteiny v živých buňkách.