

Wyjaśnienie molekularnych mechanizmów regulacyjnych niezależnych syntaz pseudourydynowych w odniesieniu do ich substratów RN A.

Cel projektu.

RNA jest cząsteczką będącą w centrum wszystkich procesów życiowych (również chorób) a sposób funkcjonowania cząsteczek RNA jest regulowany przez działanie białek zwanych enzymami. Jedną z ważnych grup takich enzymów są syntazy pseudourydynowe (PUS). Zostały zidentyfikowane w latach 70. ubiegłego wieku, ale nie poświęcano im należytej uwagi, gdyż nie rozumiano ich ważnej roli. Obecnie nowe techniki analityczne zaczęły pokazywać, że enzymy PUS odgrywają ważną rolę w biologii RNA, zmieniając jego skład i w rezultacie modulując wiele innych ważnych procesów komórkowych. Wraz z pojawieniem się metod mapowania pozycji RNA modyfikowanych przez PUSy, funkcja tych enzymów zaczęła nabierać znaczenia. W tym projekcie staramy się zrozumieć, w jaki sposób enzymy PUS oddziałują z różnymi typami RNA i jak ta wiedza może doprowadzić nas do zrozumienia mechanizmów ich nieprawidłowego działania w chorobach.

Opis badań.

Uproszczona wersja tzw. "centralnego dogmatu" biologii molekularnej, jest taka, że DNA koduje białka, które realizują funkcje życiowe. RNA pełni w tym procesie kluczową rolę, gdyż występuje w różnych formach, m.in. jako matrycowe RNA, transferowe RNA czy rybosomalne RNA, z których każda przyczynia się do ekspresji genów i procesu translacji białek. rRNA to serce katalityczne odpowiedzialne za rzeczywiste konstruowanie białek zakodowanych w DNA. mRNA przenosi instrukcje z DNA do miejsca syntezy białek, natomiast tRNA dostarcza budulca białek do rybosomu. RNA składa się z czterech prostych zasad nukleotydowych (G, U, A i C). Obecnie wiadomo, że te zasady mogą być dekorowane (różne modyfikacje chemiczne mogą być dodawane przez enzymy) i że w zależności od rodzaju i miejsca tych modyfikacji, funkcjonalność RNA może być znacząco zmieniona. W zdrowych komórkach modyfikacje zasad RNA mają za zadanie zapewnić, że białka wytwarzane w komórce są produkowane we właściwym czasie i ilości oraz mają właściwą strukturę. Jednym z ważnych zmodyfikowanych nukleotydów jest pseudourydyna (Ψ). Występuje ona we wszystkich klasach RNA i jej obecność ma szereg konsekwencji, w tym istotny wpływ na stabilność RNA, okres półtrwania mRNA i translację białek. Urydyna (U) w RNA jest przekształcana w Ψ przez enzymy PUS. U człowieka zidentyfikowano 13 enzymów PUS. Większość wiedzy o białkach PUS pochodzi z badań na modelowych organizmach bakteryjnych i drożdżowych, a informacje o ludzkim systemie są nieliczne. Enzymy PUS wykazują wysoką homologię struktury i katalizują reakcję przy użyciu konserwowanej reszty asparaginowej w centrum katalitycznym. Pomimo tego podobieństwa, różne ludzkie enzymy PUS wykazują preferencje do wiązania i modyfikowania różnych typów RNA. Nasuwa się zatem pytanie, w jaki sposób różne enzymy PUS mogą być tak specyficzne i jaki jest dokładnie mechanizm konwersji U do Ψ ? Ponadto, jak wadliwe działanie PUS prowadzi do choroby? Odpowiedzi na te i inne pytania mamy nadzieję znaleźć w tym projekcie.

Powody podjęcia konkretnego tematu badawczego.

Zrozumienie jak działa i jak jest regulowane RNA jest kluczowe dla naszego zrozumienia procesów życiowych. Ponadto, wiemy obecnie, że PUS jest zaangażowany w wiele poważnych chorób: badania kliniczne powiązały patogenne warianty enzymów PUS1, PUS3 i PUS7 z zaburzeniami rozwoju neuronów. Nie rozumiemy jeszcze mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska, ale wiemy, że niektóre enzymy PUS, np. PUS1 i PUS7, regulują ekspresję genów poprzez dodawanie Ψ na mRNA, a ich utrata może wpływać na aktywność komórkową za równo poprzez osłabienie translacji wykonywanej przez rybosomy i jak i zaburzenie metabolizmu mRNA. Jesteśmy zainteresowani kompleksową charakterystyką wszystkich struktur PUS-RNA, jak również oznaczeniami biochemicznymi Ψ w RNA. Pozwoli nam to odpowiedzieć na następujące pytania: i) Jak poszczególne białka PUS rozpoznają swoje substraty? ii) Jaka jest specyficzna rola poszczególnych Ψ ?

Istotne oczekiwane rezultaty.

Używając jednej z najbardziej zaawansowanych technik obrazowania molekularnego, kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM), chcemy "zobaczyć" cząsteczki białek i RNA z niemal atomową dokładnością. Uzyskane w ten sposób obrazy struktur PUS-RNA, dostarczą nam szczegółowych informacji strukturalnych, które pozwolą nam zrozumieć naturę interakcji PUS-RNA a tym samym odpowiedzieć na pytanie w jakich regionach te dwie cząsteczki specyficznie się rozpoznają. Następnie, przeprowadzimy dokładne pomiary biochemiczne i biofizyczne, aby na poziomie atomowym zrozumieć, jak dane białko PUS wybiera swojego specyficznego partnera RNA i przeprowadza reakcję modyfikacji. Jedną z hipotez zakłada, że RNA musi przyjąć określoną konformację, aby zostać rozpoznany przez PUS. Podsumowując, nasze wyniki pozwolą nam kompleksowo wyjaśnić, w jaki sposób PUS wybiera i modyfikuje określone urydyny na specyficznych RNA. Poszerzy to nasze podstawowe zrozumienie biologii RNA i jego roli w regulacji produkcji białek. Ponadto wyniki te będą miały zastosowanie praktyczne - uzyskane dane mogą dostarczyć informacji na temat tego, w jaki sposób klinicznie istotne warianty PUS prowadzą do zaburzeń czynności komórkowych.