

## REGULACJA ALTERNATYWNEGO SPLICINGU

### REGULATION OF ALTERNATIVE SPLICING

Michał SZCZEŚNIAK, Zofia SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA

Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,  
Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie:* Alternatywny splicing to proces, w którym z jednego pre-mRNA powstaje więcej niż jedna izoforma mRNA. Rodzaj powstającej izoformy mRNA jest wynikiem działania dość skomplikowanych mechanizmów regulacyjnych, które pozwalają na uzyskanie na przykład tkankowo-specyficznego wzoru splicingu bądź zmian komórkowego profilu splicingu na różnych etapach rozwoju. Jest to możliwe dzięki współdziałaniu szeregu elementów, spośród których należy wymienić: sekwencję nukleotydową oraz strukturę drugorzędową pre-mRNA, czynniki splicingowe oraz dodatkowe czynniki białkowe i niebiałkowe. Oprócz podstawowych sygnałów splicingowych (miejsca splicingowe, miejsce rozgałęzienia, trakt polipirymidynowy), w pre-mRNA ulegającym alternatywnemu splicingowi znajdują się elementy regulatorowe. Należą tutaj intronowe sekwencje wzmacniające (ISE) i wyciszające (ISS) oraz egzonowe sekwencje wzmacniające (ESE) i wyciszające (ESS). Ich funkcja w regulacji alternatywnego splicingu najogólniej polega na wiązaniu odpowiednich czynników działających w trans, które z kolei wpływają na wybór miejsca splicingowego przez spliceosom. Struktura drugorzędowa pre-mRNA wpływa na alternatywny splicing, decydując o dostępności cząsteczki dla czynników splicingowych. Po pierwsze, utworzenie struktury drugorzędowej wiąże się z powstaniem dwuniciowych fragmentów RNA, które są rozpoznawane przez niektóre czynniki działające w trans. Poza tym struktura drugorzędowa zmienia wzajemne ułożenie elementów cis w przestrzeni, co stwarza dodatkowe możliwości regulatorowe. Podstawową rolę w regulacji alternatywnego splicingu spełniają jednak czynniki działające w trans. Należą do nich między innymi białka SR i hnRNP. Białka SR przyłączają się przeważnie do sekwencji wzmacniających, pełniąc rolę aktywatorów splicingu. Stopień fosforylacji tych białek zmienia się wraz z przebiegiem splicingu i jest przedmiotem złożonej regulacji. Białka hnRNP przyłączają się do sekwencji wyciszających i są inhibitorami splicingu. Ich najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem jest białko PTB, które – jako inhibitor splicingu – uczestniczy przede wszystkim w splicingu tkankowo-specyficznym. W rzeczywistości białka aktywatorowe i inhibitorowe splicingu działają jednocześnie, a ostatecznie o wzorze splicingu decyduje rodzaj związanych białek, ich zdolność do oddziaływania z innymi białkami (w tym ze składnikami spliceosomu), jak również czynniki pozasplicingowe. Transkrypcja jest procesem dość silnie sprzężonym z alternatywnym splicingiem. Główną rolę odgrywa tutaj polimeraza RNA II, a zwłaszcza jej domena C-końcowa: CTD. Domena ta jest odpowiedzialna m.in. za rozmieszczenie czynników splicingowych i transkrypcyjnych w jądrze. Poznano szereg czynników białkowych sprzęgających splicing i transkrypcję poprzez regulowanie stopnia ufosforylowania domeny CTD. Funkcje polimerazy RNA II w splicingu zależą ponadto od rozpoznanego przez nią promotora transkrybowanego genu. Promotor może bowiem decydować o zdolności białek SR do wiązania domeny CTD lub o

procesywności polimerazy RNA II (procesywność polimerazy niekiedy wpływa na przebieg splicingu). Wzajemna regulacja splicingu i transkrypcji jest możliwa dzięki czasowemu i przestrzennemu sprzężeniu obu procesów. Splicing zostaje zahamowany podczas mitozy; efekt ten jest w głównej mierze skutkiem zmian stopnia ufosforylowania niektórych czynników splicingowych. Na przykład białko SRp38 ulega defosforylacji wraz z początkiem mitozy i w tej postaci zakłóca funkcje białek SR na wczesnym etapie splicingu. Fosforylacja tego czynnika już po zakończeniu mitozy, przywraca komórce zdolność do przeprowadzania splicingu. Splicing jest regulowany przez jeszcze inne procesy w komórce. Na przykład niektóre czynniki splicingowe wykorzystują proces degradacji mRNA niosących przedwczesny kodon stop do regulacji poziomu swojej ekspresji, jak ma to miejsce w przypadku białka PTB. Na komórkę działają różnego rodzaju bodźce zewnątrzkomórkowe, jak na przykład czynniki wzrostu, hormony i czynniki wywołujące depolaryzację błony komórkowej. Jedną z odpowiedzi komórki na te bodźce jest zmiana profilu splicingu alternatywnego. Angażowane są tutaj szlaki przekazywania sygnałów, które zmieniają stopień ufosforylowania odpowiednich czynników działających w trans (głównie białek SR). Splicing można regulować poprzez wprowadzanie do komórki pewnych związków chemicznych. Należą tutaj niskocząsteczkowe inhibitory splicingu – związki te hamują splicing na różnych jego etapach i pewne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem ich w leczeniu schorzeń wywołanych nieprawidłowym splicingiem.

*Słowa kluczowe:* alternatywny splicing, białka SR, hnRNP, transkrypcja.

*Summary:* Alternative splicing is a process in which more than one isoform of mRNA can be produced from one pre-mRNA. Quite complex regulatory mechanisms decide which isoform is produced in a given case. These mechanisms lead e.g. to a tissue-specific or stadium-dependent splicing, which is possible due to cooperation of regulatory factors. These factors can be considered (though somewhat artificially) at several levels: pre-mRNA sequence, secondary structure of pre-mRNA, trans-acting factors and additional protein and non-protein factors. The pre-mRNA molecule apart from such splicing signals as splicing sites, branch site or polypyrimidine tract, contains cis-acting regulatory elements. These include Intron Splicing Enhancers (ISE), Intron Splicing Silencers (ISS), Exon Splicing Enhancers (ESE) and Exon Splicing Silencers (ESS). In the splicing regulation they are bound by the trans-acting factors, which in turn affect the splice site recognition by the spliceosom. The role of the secondary structure of pre-mRNA in the regulation of alternative splicing is that it modulates the accessibility of cis-acting elements for trans-acting factors. Firstly, some RNA-binding factors recognize only double-stranded fragments of RNA and changes of the secondary structure modulate their function. Secondly, the secondary structure changes the localization of cis-acting elements in space which is another possibility for splicing regulation. However, trans-acting factors play a central role in alternative splicing. They include among others SR and hnRNP proteins. SR proteins usually bind to enhancers, being splicing activators. Phosphorylation state of SR proteins changes throughout the splicing process and is subject to a complex modulation. hnRNP proteins bind to silencers, playing a role of splicing inhibitors. Their best known member is probably PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein), a splicing inhibitor that is engaged mainly in tissue-specific splicing. In fact splicing activators and inhibitors act together in splicing regulation and the final effect depends on the amounts of these factors, their ability to interact with other proteins (including the components of spliceosom) and even proteins engaged in other cellular processes. Transcription is quite tightly coupled with alternative splicing. RNA Pol II plays a central role there, especially its C-Terminal Domain (CTD). CTD is responsible for the nuclear localization of splicing and transcription factors. Multiple factors coupling splicing and transcription are known – they usually phosphorylate or dephosphorylate the CTD domain. The function of RNA Pol II in splicing depends also on the promoter it recognizes. The promoter may decide about the ability of SR proteins to bind to CTD or about the processivity of polymerase (that in some cases affects splicing as well). Such a co-regulation of splicing and transcription is possible due to spatial and temporal coupling of the processes. Splicing is inhibited during mitosis; this effect is achieved mainly through changes in phosphorylation state of some splicing factors. For example SRp38 protein is dephosphorylated at the beginning of mitosis and in this form (as dSRp38) it can affect proper function of SR proteins at an early stage of splicing. Phosphorylation of dSRp38 after mitosis makes a cell able to conduct splicing again. Splicing is modulated by even more cellular processes. For example Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) is a way of degradation of alternative splicing products that contain Premature Termination Codon (PTC).

Some splicing factors use NMD to regulate the level of its own expression, e.g. PTB. The cell is affected by extracellular stimuli, such as growth factors, hormones and factors leading to the depolarisation of a cell membrane. The modulation of alternative splicing is one of the ways a cell can use to respond to these factors. Signal transduction pathways are engaged in this process, changing the phosphorylation state of trans-acting factors (mainly SR proteins). Splicing can also be regulated artificially through the introduction of chemical compounds to the cell. These factors include low molecular weight splicing inhibitors that affect splicing at different stages of the process. Such inhibitors seem to be promising in treatment of diseases caused by abnormal splicing.

*Key words:* alternative splicing, SR proteins, hnRNP, transcription.

*Wykaz skrótów:* **ASF/SF2** (*Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2*) – czynnik splicingowy; **Clk** (*CDC-like kinase*) – kinaza Clk; **DCL1** (*Dicer-Like 1*) – rybonukleaza DCL 1; **DSCAM** (*Down Syndrome Cell Adhesion Molecule*) – receptor DSCAM; **FGF** (*Fibroblast Growth Factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; **hnRNP** (*heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein*) – heterogeniczna jądrowa rybonukleoproteina; **HYL1** (*HYponastic Leaves 1*) – białko HYL 1; **snRNP** (*small nuclear Ribonucleoprotein*) – mała jądrowa rybonukleoproteina.

## WSTĘP

*Splicing* pre-mRNA, jest jednym z etapów ekspresji genów. Zachodzi w jądrze i występuje prawdopodobnie u wszystkich Eukaryota. Polega na wycinaniu odpowiednich fragmentów pre-mRNA i łączeniu pozostałych elementów z utworzeniem cząsteczki mRNA. W przypadku tzw. *konstytutywnego splicingu*, elementami wycinanymi są zawsze introny, zaś mRNA jest składany z egzonów. Podstawowe informacje na temat budowania kompleksu splicingowego i przebiegu reakcji splicingowych można znaleźć w podręcznikach biochemii [30].

*Alternatywny splicing*, w odróżnieniu od konstytutywnego, może generować różne izoformy mRNA z tego samego pre-mRNA. Wyróżnia się następujące rodzaje alternatywnego splicingu:

- zachowanie intronu lub wycięcie egzonu;
- alternatywne miejsce splicingowe 5' lub 3';
- alternatywny egzon pierwszy (alternatywne miejsce inicjacji transkrypcji);
- alternatywny egzon terminalny (alternatywne miejsce poliadenylacji).

Ocenia się, że pre-mRNA 20–30% genów u roślin, a ponad 60% u człowieka, podlega alternatywnemu splicingowi [11, 26, 29, 32]. Proces ten odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji genów: wpływa na jakościowy i ilościowy profil białek. Jednocześnie sam alternatywny splicing jest przedmiotem wieloczynnikowej regulacji, która może zachodzić na różnych etapach procesu. Zasadniczo splicing jest regulowany przez czynniki działające w trans, które wiążą się z substratowym pre-mRNA i zmieniają zdolność spliceosomu do rozpoznawania odpowiednich miejsc cięcia.

Funkcje cząsteczki pre-mRNA i czynników splicingowych w regulacji alternatywnego splicingu są modyfikowane przez dodatkowe czynniki sprzęgające splicing z innymi procesami komórkowymi i reakcją na działanie bodźców zewnątrzkomórkowych.

## STRUKTURA pre-mRNA A ALTERNATYWNY SPLICING

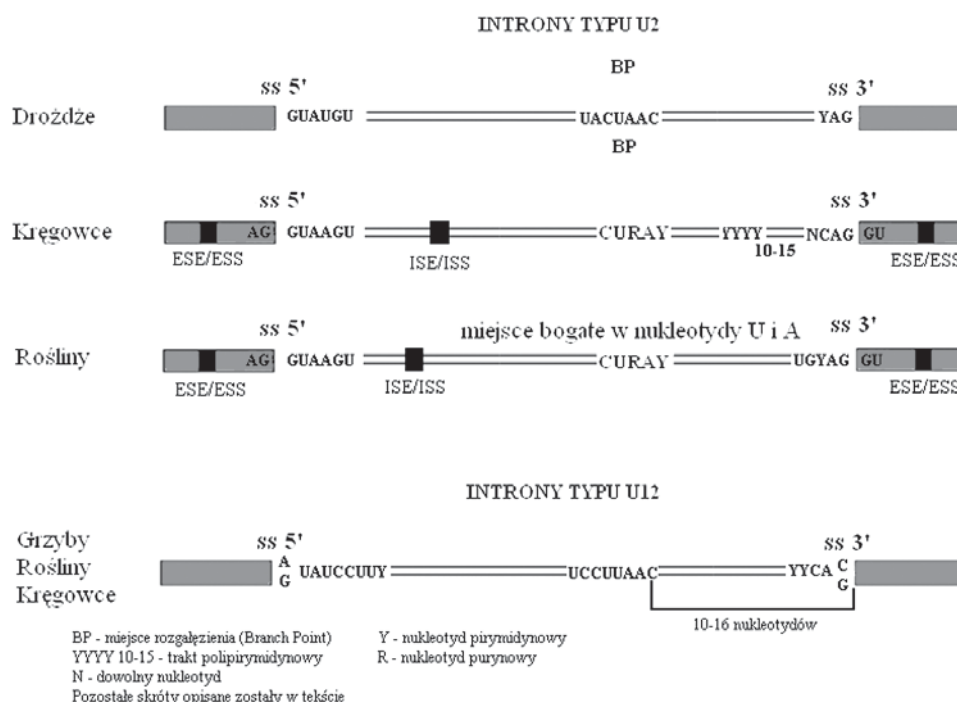
Cząsteczka pre-mRNA zawiera szereg motywów sekwencyjnych i strukturalnych, które są nieodzowne w przebiegu splicingu tak konstytutywnego, jak i alternatywnego. Motywy te są zlokalizowane w intronach i w egzonach. Należą tutaj przede wszystkim miejsca splicingowe po stronie 5' intronu (5' ss) oraz po jego stronie 3' (3' ss), miejsce rozgałęzienia czy też trakt polipirymidynowy. Istotą alternatywnego splicingu jest wykorzystywanie konkurujących miejsc splicingowych. W wyborze tych miejsc uczestniczą obecne w intronach i egzonach czynniki działające w cis, określane mianem SRE (ang. *Splicing Regulatory Elements*). Moduluje one przebieg splicingu, oddziałując z odpowiednimi czynnikami działającymi w trans (m.in. białka SR i hnRNP). Do elementów SRE zalicza się:

- ISE (ang. *Intron Splicing Enhancer*) i ESE (ang. *Exon Splicing Enhancer*), stanowiące odpowiednio sekwencje wzmacniające obecne w intronach (ISE) i egzonach (ESE);
- intronowy element ISS (ang. *Intron Splicing Silencer*) oraz egzonowy element ESS (ang. *Exon Splicing Silencer*), pełniące funkcje sekwencji wyciszających (ryc. 1) [1, 29, 32, 35].

W regulacji alternatywnego splicingu sekwencje wzmacniające oddziałują głównie z białkami SR, zaś sekwencje wyciszające z białkami hnRNP. Sytuacja może nie być tak jednoznaczna, gdyż na przykład niektóre białka SR wiążą się do sekwencji wyciszających [32]. Oprócz tego udowodniono, że na różnych etapach splicingu powinowactwo białek do elementów SRE może ulegać zmianie (wskutek np. wzajemnego oddziaływania czynników splicingowych działających w trans) [32]. Funkcje elementów SRE w regulacji alternatywnego splicingu zależą w różnym stopniu również od innych procesów komórkowych oraz od reakcji na działanie bodźców zewnątrzkomórkowych.

W przypadku alternatywnego splicingu polegającego na wycinaniu egzonów lub zatrzymywaniu intronów w transkrypcie, kluczową rolę spełnia definiowanie fragmentów sekwencji pre-mRNA jako introny lub egzony. U ssaków, gdzie egzony są z reguły znacznie krótsze niż introny, przeważa definiowanie tych pierwszych i obserwuje się częstsze przypadki usuwania z transkryptu egzonu niż zachowywania intronu. U większości pozostałych Metazoa, w tym u roślin, przeważa natomiast definiowanie intronów, a alternatywny splicing polega częściej na zatrzymywaniu intronu w mRNA [31, 32].

Cząsteczka pre-mRNA moduluje przebieg alternatywnego splicingu w jeszcze jeden sposób – poprzez zmiany konformacyjne [14, 24, 26]. Istnieje kilka mechanizmów wyjaśniających to zjawisko. Zgodnie z pierwszym mechanizmem, struktura drugorzędowa pre-mRNA wpływa na dostępność miejsc splicingowych oraz elementów działających w cis dla czynników splicingowych i dla samego spliceosomu. Wykazano wpływ struktury drugorzędowej pre-mRNA na wiązanie czynników regulujących alternatywny splicing (B52, SRp55, NOVA-1) [4]. Niektóre sekwencje wyciszające tworzą strukturę drugorzędową pre-mRNA, która utrudnia rozpoznanie



RYCINA 1. Elementy działające w cis obecne w pre-mRNA i istotne z punktu widzenia alternatywnego splicingu [1]. W splicingu intronów mogą uczestniczyć dwa różne spliceosomy: spliceosom typu U2 i typu U12; introny typu U12 stanowią mniej niż 0,4% wszystkich intronów i są słabiej scharakteryzowane niż introny typu U2 [13] (wg [1], zmodyfikowane)

FIGURE 1. Cis-elements present in pre-mRNA, crucial in alternative splicing regulation [1]. Two types of spliceosomes can participate in intron splicing - type U2 and U12. The latter is much less prevalent and participates in less than 0.4% of all splicing events [13] (according to [1], changed)

sąsiednich sekwencji wzmacniających przez białka SR [29]. Inny mechanizm zakłada natomiast, że poprzez przyjęcie przez pre-mRNA odpowiedniej struktury drugorzędowej, elementy działające w cis, położone stosunkowo daleko na nici pre-mRNA mogą zostać przybliżone do kompleksu splicingowego, co umożliwia im pełnienie odpowiednich funkcji w regulacji splicingu [21].

## CZYNNIKI DZIAŁAJĄCE W TRANS W REGULACJI ALTERNATYWNEGO SPLICINGU

Podstawowymi czynnikami działającymi w trans w regulacji alternatywnego splicingu są białka SR oraz białka hnRNP. U podstaw ich funkcji leży oddziaływanie z elementami działającymi w cis. Białka SR uczestniczą zarówno w konstytutywnym, jak i alternatywnym splicingu. U *A. thaliana* zidentyfikowano 19 białek SR, prawie dwukrotnie więcej niż u człowieka [26, 31, 36]. Oddziałując z elementami ISE i ESE

pełnią one funkcje aktywatorów splicingu. Uczestniczą przy tym na różnych etapach formowania spliceosomu, jak również w samych reakcjach splicingowych. Białka SR promują powstanie tzw. kompleksu E (ang. *Early complex*), zawierającego U1 snRNP oraz białko wiążące się z traktem polipirymidynowym – U2AF (ang. *U2 snRNP Auxiliary Factor*). Poprzez stymulację przyłączania U1 snRNP, białka te wpływają na wybór miejsca splicingowego 5'. Natomiast promując wiązanie U2AF, uczestniczą w wyborze 3' ss [15, 21, 28]. Dodatkowo białka SR przyłączone do egzonowych sekwencji wzmacniających wpływają na interakcję U2 snRNP z miejscem rozgałęzienia [25]. Białka SR uczestniczą także w przyłączaniu U4/U6/U5 snRNP do pre-mRNA, czemu towarzyszy przejście pre-spliceosomu w spliceosom (w tych oddziaływaniach, jak i wielu innych z udziałem białek SR, pośredniczy obecna w tych białkach domena RS bogata w powtórzenia serynowo-argininowe) [15]. Decydujące znaczenie dla funkcji białek SR ma ich stopień ufosforylowania. Fosforylacja tych białek zachodzi głównie w obrębie reszt seryny, w domenie RS; zmienia ona charakter oddziaływań typu białko-białko i białko-RNA, jak również rozmieszczenie białek SR w komórce, czego konsekwencją jest odpowiednia zmiana przebiegu alternatywnego splicingu [29]. Kolejne zmiany stanu ufosforylowania poszczególnych białek SR warunkują przejście z jednego etapu splicingu do drugiego. O ile ufosforylowane białka SR zapewniają prawidłowy charakter oddziaływań między białkami na wczesnym etapie splicingu, to gdy funkcjonalny spliceosom jest już uformowany, zachodzi defosforylacja większości białek SR [10].

Białka hnRNP są czynnikami działającymi *in trans*, związanymi z sekwencjami wyciszającymi. Stanowią dość dużą grupę regulatorów splicingu i charakteryzują się zróżnicowanym sposobem działania. Często obserwuje się oddziaływanie białek hnRNP (zwykle o charakterze antagonistycznym) z innymi czynnikami splicingowymi, takimi jak: SC35 i ASF/SF2 u człowieka [21].

Najlepiej poznanym przedstawicielem białek hnRNP jest białko PTB (ang. *Polypyrimidine Tract Binding protein*), zwane również hnRNP I. PTB jest represorem splicingu. Przyłącza się do fragmentów pre-mRNA bogatych w reszty C i U (np. UUCU i UCUCU). Lokalizacja tych bogatych w zasady pirymidynowe elementów w pre-mRNA ma wpływ na przebieg splicingu. Przykładowo funkcja PTB jako represora splicingu jest słaba, jeśli miejsce wiązania dla PTB znajduje się przy końcu 3' alternatywnie wycinanego egzonu [2]. Skuteczne hamowanie splicingu przez PTB wymaga czasami obecności drugiego miejsca wiązania, na przykład w obrębie regulowanego egzonu. To drugie miejsce, nawet jeśli PTB nie ma do niego wysokiego powinowactwa, może zainicjować powstanie kompleksu wielu cząsteczek PTB, który skuteczniej hamuje splicing. Z drugiej strony, dla egzonów podlegających mało wydajnemu splicingowi, represja splicingu za pośrednictwem PTB może mieć miejsce już w obecności pojedynczego miejsca wiążącego to białko [2].

U ssaków znanych jest wiele egzonów, których obecność w dojrzałym mRNA jest kontrolowana działaniem PTB, m.in. w przypadku pre-mRNA aktywniny, tropomiozyny, troponiny, c-src, receptorów FGF1 i 2 oraz IgM [2]. W przypadku pre-mRNA c-src regulacji przez PTB ulega egzon N1. W komórkach innych niż nerwowe, wycięciu egzonu N1 z transkryptu zapobiega białko PTB. W komórkach

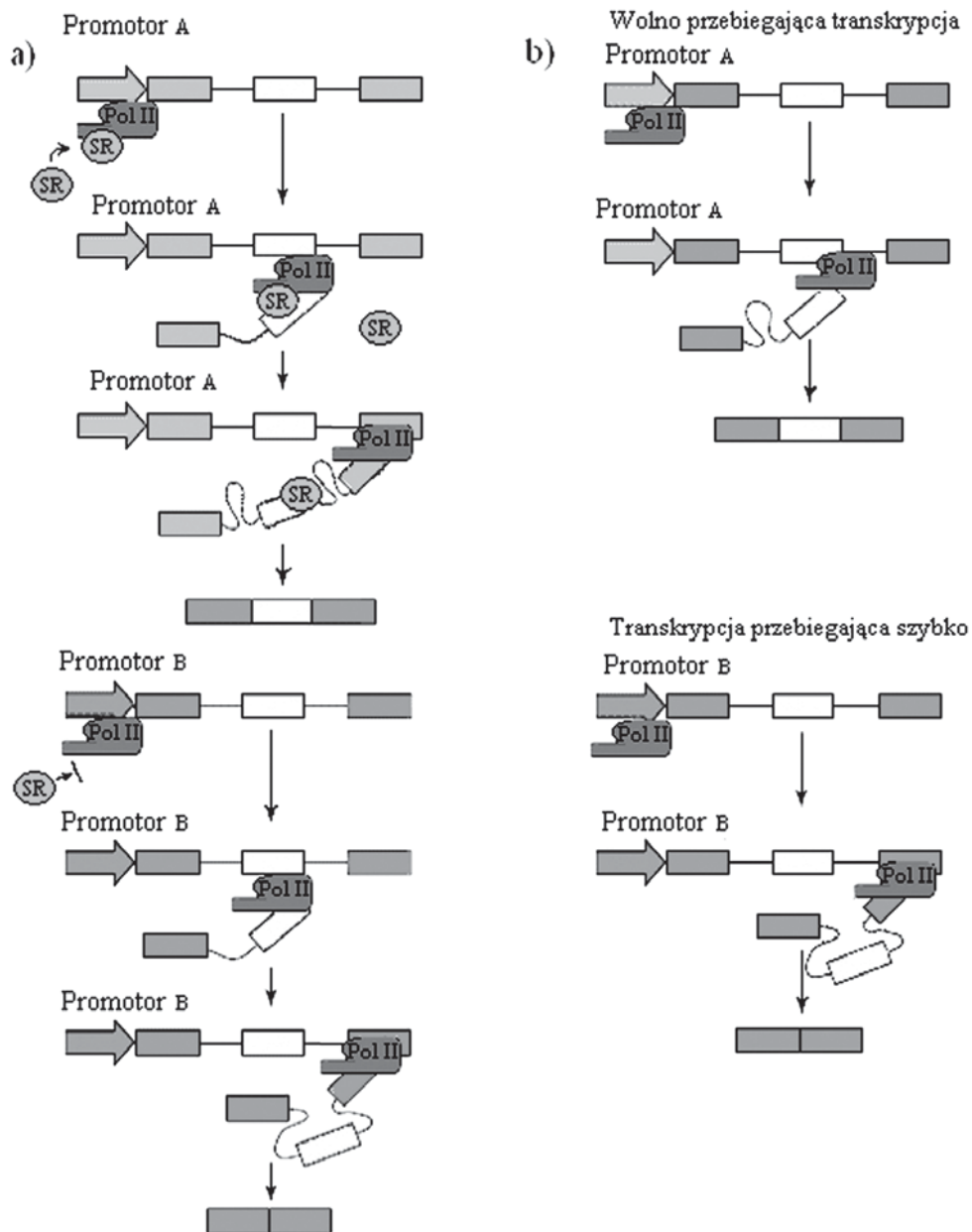
nerwowych natomiast, gdzie egzon N1 jest tracony, zlokalizowano białko nPTB (neuronowe PTB) o działaniu przeciwnym do PTB [2, 34].

Oprócz białek SR i hnRNP zidentyfikowano szereg dodatkowych czynników działających w trans i uczestniczących w regulacji alternatywnego splicingu, np. białka z rodziny CELF (ang. *CUG-BP and ETR-3 Like Factors*) u zwierząt. Białka CELF, zwane również białkami Brunopodobnymi (ang. *Bruno-like proteins*) mogą pełnić funkcję represorów bądź aktywatorów splicingu – podobna prawidłowość dotyczy, w mniejszym lub większym stopniu, także innych czynników działających w trans. U podstaw antagonistycznej funkcji czynników splicingowych stoi konkrowanie o miejsce wiązania w obrębie pre-mRNA. Przykładem jest interakcja białek ASF/SF2 i hnRNP A1. ASF/SF2 zwiększa powinowactwo U1 snRNP do 5' ss. Pod nieobecność hnRNP A1, U1 snRNP przyłącza się do obu alternatywnych 5' ss intronu. W tej sytuacji splicing zachodzi w tym 5' ss, które generuje krótszy intron. Obecność hnRNP A1 przeważnie przeszkadza w wiązaniu U1 snRNP i wówczas dochodzi do wyboru drugiego miejsca splicingowego 5' [37].

Prawidłowy przebieg alternatywnego splicingu wymaga precyzyjnej współpracy wielu czynników splicingowych; współpraca ta jest zaburzona w przypadku niektórych chorób genetycznych człowieka. Przykładem jest dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1). U chorych na DM1 obserwuje się mutację w genie białka DMPK (ang. *Dystrophia Myotonica-Protein Kinase*), polegającą na pojawieniu się wielokrotnie powtórzonego elementu CTG w 3' UTR tego genu [20,27]. Transkrypty zmutowanego genu kumulują się w jądrze, zamiast być transportowane do cytoplazmy. Wówczas czynniki splicingowe, które wykazują powinowactwo do powtórzeń CUG (np. białka z rodziny MBNL), przyłączają się do zmutowanego RNA zamiast do swojego substratowego pre-mRNA. Skutkuje to zmianą we wzorze splicingu kilkudziesięciu do kilkuset pre-mRNA i produkcją białek, które normalnie nie występują w danym typie tkanki [27]. W konsekwencji pojawiają się u chorego takie objawy, jak: zanik mięśni, powstawanie katarakty czy oporność na insulinę. W powyższym przykładzie zwraca uwagę fakt, że białkiem, którego dysfunkcja tak znacząco zmienia komórkowy profil splicingu jest kinaza białkowa (DMPK), a nie czynnik splicingowy.

## MODULOWANIE PRZEBIEGU ALTERNATYWNEGO SPLICINGU PRZEZ PROCESY WEWNĄTRZKOMÓRKOWE

Podstawowe znaczenie w przebiegu alternatywnego splicingu ma sekwencja nukleotydowa substratowego pre-mRNA (obecność miejsc wiązania dla czynników splicingowych czy struktura drugorzędowa) oraz funkcje czynników splicingowych działających w trans. Nie są to jednak jedyni gracze w regulacji splicingu – coraz więcej dowodów świadczy o tym, że alternatywny splicing jest silnie sprzężony z różnymi procesami komórkowymi, takimi jak: transkrypcja, mitoz i degradacja mRNA, niosącymi przedwczesny kodon stop.



RYCINA 2. Dwa modele regulowania alternatywnego splicingu przez polimerazę RNA II. Pierwszy (a) zakłada, że wybór jednego z alternatywnych promotorów decyduje o przyłączeniu białek SR. W drugim (b) wybór jednego z alternatywnych promotorów decyduje o szybkości i procesywności polimerazy RNA II (wg [14], zmodyfikowane)

FIGURE 2. Two models for regulation of alternative splicing by RNA Polymerase II. In the first one (a), alternative promoters have different effect on ability of SR proteins to bind to pre-mRNA molecule. According to the second model (b), chosen promoter decides about processivity of RNA Pol II (according to [14], changed)



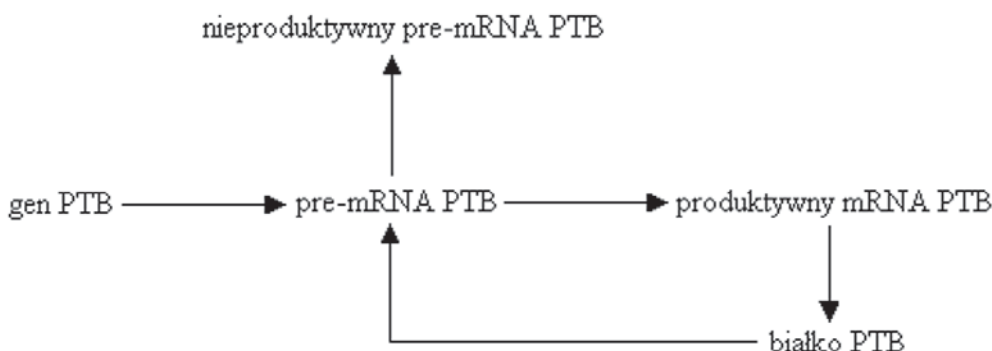
Główną rolę w sprzężeniu alternatywnego splicingu i transkrypcji pełni stopień ufosforylowania domeny C-końcowej – CTD (ang. *C-Terminal Domain*) polimerazy RNA II. W sprzężeniu tym uczestniczy szereg białek, z kinazami na czele (np. kinazy KIN28, CTK1, BUR1 i SRB10 u *S. cerevisiae*) [33]. Domena CTD ma wpływ przede wszystkim na rozmieszczenie czynników splicingowych i transkrypcyjnych w jądrze. Inicjacja transkrypcji z udziałem polimerazy RNA II powoduje nagromadzenie czynników splicingowych (m.in. białek SR) w miejscach, w których zachodzi transkrypcja. Podobnego przemieszczenia czynników splicingowych nie obserwuje się po usunięciu bądź skróceniu domeny CTD, ma wówczas miejsce znaczne ograniczenie wydajności splicingu. Poza tym, przeciwciała skierowane przeciwko Pol RNA II bądź samej domenie CTD powodują koimmunoprecypitację białek SR, hamując splicing [5, 11].

Funkcje polimerazy RNA II w regulacji alternatywnego splicingu należy rozpatrywać również w kontekście alternatywnych promotorów transkrypcji. Znane są tu przynajmniej dwa modele. W pierwszym modelu przyjmuje się, że wybór danego promotora decyduje o zdolności białek SR do wiązania się z domeną CTD polimerazy RNA II (ryc. 2a). Drugi model zakłada zaś zróżnicowaną procesywność polimerazy: jeśli wybrany promotor powoduje małą procesywność enzymu, to częstszym efektem może być usuwanie alternatywnego intronu, z jednoczesnym zachowaniem alternatywnego egzonu. W przeciwnym wypadku wydajne miejsce 3' ss intronu położonego poniżej skutecznie konkuruje z mało wydajnym miejscem 3' ss intronu leżącego powyżej, co skutkuje usunięciem alternatywnego egzonu (ryc. 2b) [14]. Oba te modele nie wykluczają się wzajemnie. Możliwe że w niektórych przypadkach uwzględnienie ich obu okaże się kluczowe w zrozumieniu mechanizmu regulacji alternatywnego splicingu.

Splicing podlega również regulacji związanej z przebiegiem cyklu komórkowego. Należy tu przede wszystkim mitotyczna inhibicja splicingu, z którą u człowieka wiąże się defosforylacja białka SRp38 – czynnika splicingowego z rodziny białek SR [3]. SRp38 jest nietypowym przedstawicielem rodziny białek SR – w stanie nieufosforylowanym jest inhibitorem splicingu. Na wczesnym etapie mitozy SRp38 ulega defosforylacji (powstaje dSRp38). dSRp38 wchodzi w słabe oddziaływania z innymi białkami SR, zakłócając ich funkcje na wczesnym etapie splicingu. Wskutek tego nie powstaje kompleks prespliceosomowy i dochodzi do blokady splicingu. Dopiero zadziałanie odpowiedniej kinazy po zakończeniu mitozy, fosforylującej dSRp38, może przywrócić komórce zdolność do przeprowadzania reakcji splicingowych [3].

Przypuszcza się, że niektóre z pozostałych białek SR, których stan ufosforylowania zmienia się podczas mitozy, mogą pełnić podobną funkcję. Co więcej, SRp38 nie jest białkiem powszechnie występującym u organizmów, co sugeruje istnienie innych czynników hamujących splicing podczas mitozy.

Splicing jest powiązany z procesem degradacji mRNA niosących przedwczesny kodon stop – NMD (ang. *Nonsense-Mediated Decay*) [6, 7, 17]. W procesie tym degradacji ulegają nieprawidłowe izoformy mRNA. Niektóre czynniki splicingowe wykorzystują NMD do regulowania poziomu swojej ekspresji np. białko PTB (ryc.



RYCINA 3. Autoregulacja alternatywnego splicingu na przykładzie białka PTB  
 FIGURE 3. PTB protein – an example of splicing autoregulation

3) [25]. Wykazano również związek między (alternatywnym) splicingiem a kompleksem białek wiążących się z *Cap* – CBC (ang. *Cap-Binding Complex*), który stanowi rusztowanie, ułatwiające formowanie spliceosomu. CBC uczestniczy na przykład w rozpoznawaniu miejsc 5' ss przez U1 snRNP podczas formowania spliceosomowego kompleksu E [12]. Ponadto u *A. thaliana* dostrzeżono wpływ białka SE (SERRATE) na splicing – czynnika uczestniczącego ponadto w obróbce pri-miRNA, obok DCL1 i HYL1 [12]. Powyższe wybrane przykłady obrazują jak bardzo przebieg splicingu zależy od innych procesów – w ten sposób komórka sprawniej dostosowuje wzór splicingu do bieżących potrzeb.

## CZYNNIKI POZAKOMÓRKOWE WPŁYWAJĄCE NA PRZEBIEG ALTERNATYWNEGO SPLICINGU

Alternatywny splicing może być modulowany przez różnorodne czynniki zewnętrzne, takie jak: hormony, czynniki wzrostu, odpowiedź immunologiczna, czynniki wywołujące depolaryzację błony komórkowej czy stres komórkowy. Zachodzi to poprzez zmiany w syntezie i degradacji białek regulatorowych splicingu, ich komórkowej lokalizacji, jak również zdolności do tworzenia funkcjonalnych kompleksów [11, 23].

Jednym z najlepiej poznanych przykładów jest wpływ insuliny na alternatywny splicing pre-mRNA kinazy białkowej C – PKC (ang. *Protein Kinase C*) u ssaków. Białka PKC $\beta$ I i PKC $\beta$ II są produktami jednego genu i różnią się 50–52 C-końcowymi aminokwasami. Aktywacja receptora insuliny przez insulinę indukuje u szczura fosforylację białka SRp40. Białko to przyłącza się wówczas do pre-mRNA kinazy PKC poniżej regulowanego egzonu i egzon ten zostaje wycięty z transkryptu: powstaje PKC $\beta$ I [9]. W przeciwnym wypadku, gdy nie dochodzi do aktywacji receptora insuliny, ma miejsce zatrzymanie egzonu i powstaje mRNA kodujący

C-końcowy fragment PKC $\beta$ II (który decyduje o lokalizacji komórkowej i specyficzności substratowej białka) [22].

Udaje się również zmieniać wzór alternatywnego splicingu, wprowadzając do komórki niskocząsteczkowe inhibitory kinaz białkowych i innych regulatorów splicingu. Przykładowo, oparty na benzotiazolu związek o numerze katalogowym TG003 jest inhibitorem kinazy Clk1, przez co hamuje zależny od Clk1 splicing w komórkach ssaków. Poza tym związek ten zatrzymuje fosforylację białek SR. Stwierdzono, że TG003 obniża procesy fosforylacji zachodzące z udziałem kinaz Clk u żab z rodzaju *Xenopus*. Stwarza to szansę na ewentualne wykorzystanie tego związku w terapii niektórych schorzeń człowieka, u których podstaw stoi nieprawidłowy splicing z udziałem kinaz Clk [9].

Dla kinaz SRPK (ang. *SR Protein Kinase*) zidentyfikowano natomiast inhibitor o nazwie SRPIN340, zaś NB-506 (pochodna indolokarbazolu) jest inhibitorem topoizomerazy DNA I i hamuje fosforylację czynnika splicingowego ASF/SF2. Traktowanie komórek mysiej linii komórkowej p388 związkiem NB-506 zmienia wzór splicingu pre-mRNA wielu białek [9]. Co więcej możliwa jest regulacja splicingu z użyciem syntetycznych oligonukleotydów RNA. Takie oligonukleotydy przyłączają się do miejsc zawierających miejsca splicingowe na pre-mRNA i specyficznie hamują alternatywny splicing. Być może podobny mechanizm występuje w naturze – taka obserwacja mogłaby pomóc w lepszym zrozumieniu regulacji alternatywnego splicingu, jako że obecna wiedza zdaje się nie wyjaśniać całej złożoności procesu wyboru miejsc splicingowych [8, 16].

## PODSUMOWANIE

Splicing jest procesem regulowanym w sposób niezwykle złożony – zaangażowane są tutaj różnorodne czynniki, powiązane częstokroć siecią wzajemnych oddziaływań. Pozwala to na precyzyjne dostosowanie profilu powstających cząsteczek mRNA do bieżących potrzeb komórki. Wiąże się to z wyborem jednej lub kilku form splicingowych, a bywa, że liczba przewidzianych bioinformatycznie izoform mRNA (uzyskiwanych z jednego pre-mRNA) sięga dziesiątek, a nawet tysięcy. Klasycznym przykładem jest tutaj pre-mRNA białka DSCAM u *D. melanogaster*, gdzie liczba potencjalnych izoform mRNA sięga 38 000 [10, 11]. W przypadku błędów w regulacji alternatywnego splicingu (spowodowanych np. mutacjami punktowymi w elementach SRE) mogą powstawać białka nefunkcjonalne, białka o funkcji zmienionej bądź wręcz przeciwnej. U człowieka nieprawidłowy splicing prowadzi do szeregu chorób, włączając nowotwory [10, 18, 19, 20, 27, 29]. Dobre zrozumienie regulacji alternatywnego splicingu być może pozwoli na szerokie wykorzystanie tego procesu w medycynie i biotechnologii.

## LITERATURA

- [1] AKERMAN M, MANDEL-GUTFREUND Y. Alternative splicing regulation at tandem 3' splice sites. *Nucl Acids Res* 2006; **34**: 23–31.
- [2] AMIR-AHMADY B, BLACK DL. Exon repression by polypyrimidine tract binding protein. *RNA* 2005; **11**(5): 699–716.
- [3] BLENCOWE BJ. Splicing Regulation: The Cell Cycle Connection. *Curr Biol* 2003; **13**: 149–151.
- [4] BURATTI E, BARALLE FE. Influence of RNA Secondary Structure on the pre-mRNA Splicing Process. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 10505–10514.
- [5] CACERES JF, KORNBLIHTT AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 2002; **18**: 186–193.
- [6] CUCCURESE M, RUSSO G. Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression. *Nucl Acids Res* 2005; **33**(18): 5965–5977.
- [7] DZIKIEWICZ A, SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z. Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD) – na straży jakości mRNA. *Post Biochemii* 2006; **52**(4): 390–398.
- [8] GENDRON D, CHABOT B. Modulation of 5' splice site selection using tailed oligonucleotides carrying splicing signals. *BMC Biotechnol* 2006; **6**: 5.
- [9] HAGIWARA M. Alternative splicing: A new drug target of the post-genome era. *Biochem Biophys Acta* 2005; **1754**: 324–331.
- [10] HÄSLER J, STRUB K. Alu elements as regulators of gene expression. *Nucl Acids Res* 2006; **34**(19): 5491–5497.
- [11] KORNBLIHTT AR, NOGUÉS G. Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 2004; **10**(10): 1489–1498.
- [12] LAUBINGER S, WEIGEL D. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**(25): 8795–8800.
- [13] LEWANDOWSKA D, JARMOŁOWSKI A. Determinants of plant U12-dependent intron splicing efficiency. *Plant Cell* 2004; **16**: 1340–1352.
- [14] LIAN Y, GARNER HR. Evidence for the regulation of alternative splicing via complementary DNA sequence repeats. *Bioinformatics* 2005; **21**(8): 1358–1364.
- [15] MAKAROVA O, LÜHRMANN R. The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6-U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J* 2001; **20**: 2553–2563.
- [16] MATTICK JS. A new paradigm for developmental biology. *J Exp Biol* 2007; **210**: 1526–1547.
- [17] METZSTEIN M, KRASNOW M. Functions of the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway in *Drosophila* Development. *PLoS Genet* 2006; **2**(12): e180.
- [18] MÖRÖY T, HEYD F. The impact of alternative splicing *in vivo*: Mouse models show the way. *RNA* 2007; **13**(8): 1155–1171.
- [19] ORENGO JP, COOPER TA. Alternative splicing in disease. *Adv Exp Med Biol* 2007; **623**: 212–223.
- [20] OSBORNE RJ, THORNTON CA. RNA-dominant diseases. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 162–169.
- [21] PARK J, PARISKY K. Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**(45):15974–15979.
- [22] PATEL NA, COOPER D. Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C (PKC)  $\beta$ II through a PI-3 kinase dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2001; **276**(25): 22648–22654.
- [23] PELISCH F, SREBROW A. Cross-talk between Signaling Pathways Regulates Alternative Splicing. *J Biol Chem* 2005; **280**(27): 25461–25469.
- [24] POZZOLI U, SIRONI M. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 1579–1604.
- [25] ROOKE N, BLACK DL. Roles for SR Proteins and hnRNP A1 in the Regulation of c-src Exon N1. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(6): 1874–1884.
- [26] SCHINDLER S, REDDY A SN. Alternative splicing at NAGNAG acceptors in *Arabidopsis thaliana* SR and SR-related protein-coding genes. *BCM Genomics* 2008;
- [27] SMITH KP, LAWRENCE JB. Defining early steps in mRNA transport: mutant mRNA in myotonic dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains. *J Cell Biol* 2007; **178**: 951–964.

- [28] SMOLIŃSKI D, WRÓBEL B. Organizacja systemu splicingowego w komórkach linii generatywnej. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych* 2003; **52**: 481–492.
- [29] SREBROW A, KORNBLIHTT AR. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* 2006; **119**(13): 2635–2641.
- [30] TYMOCZKO JL, BERG JM, STRYER L. *Biochemia*. Warszawa 2005.
- [31] WANG B, BRENDEL V. Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 2006; **103**: 7175–7180.
- [32] WANG Z, BURGE C. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 2008; **14**: 802–813.
- [33] WILCOX C, HANES SD. Genetic Interactions With C-Terminal Domain (CTD) Kinases and the CTD of RNA Pol II Suggest a Role for ESS1 in Transcription Initiation and Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2004; **167**: 93–105.
- [34] WOODLEY L, VALCARCEL J. Regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Brief Funct Gen Prot* 2002; **1**: 266–277.
- [35] ZAHLER A. Alternative splicing in *C. elegans*. *WormBook* 2005; **26**: 1–13.
- [36] ZHANG Z, KRAINER A. Involvement of SR Proteins in mRNA Surveillance. *Mol Cell* 2004; **16**: 597–607.
- [37] [www.eurasnet.info/files/presentations/RNA%20Splicing.ppt](http://www.eurasnet.info/files/presentations/RNA%20Splicing.ppt).

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 12.05.2008 r.*

*Przyjęto: 08.12. 2008 r.*

*Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,  
Wydział Biologii, Uniwersytet im A. Mickiewicza w Poznaniu,  
ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań,  
e-mail: zofszwey@amu.edu.pl*

