

lic. Mikołaj Kiraga,
dr Monika Zakrzewska-
Płaczek ✉

Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział
Biologii, Uniwersytet Warszawski

https://doi.org/10.18388/pb.2021_566

✉ autor korespondujący: m.zakrzewska-p@
uw.edu.pl

Słowa kluczowe: U1 snRNP, transkrypcja,
składanie mRNA (*splicing*), *spliceosom*, regula-
cja ekspresji genów, *telescripting*

Wykaz skrótów: CTD (domena) – domena C-
końcowa polimerazy RNA II (ang. *C-terminal domain*); CTD (choroba) – choroba tkanki łącz-
nej (ang. *connective tissue disease*); PAS – sygnał
cięcia i poliadenylacji (ang. *cleavage and polyade-
nylation signal*); PCPA – przedwczesne cięcie i
poliadenylacja (ang. *premature 3'-end cleavage and polyadenylation*); pre-mRNA – prekursor
mRNA; RNAPII – polimeraza RNA II; snR-
NA – mały jądrowy RNA (ang. *small nuclear RNA*); snRNP – mała jądrowa rybonukleoproteina (ang. *small nuclear ribonucleoprotein*); 5'SS – miejsce składania 5' (ang. *5' splice site*); 3'SS – miejsce składania 3' (ang. *3' splice site*)

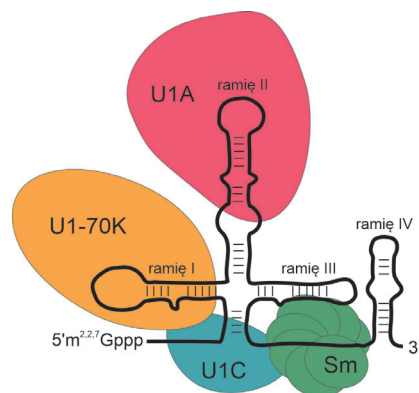
STRESZCZENIE

U1 snRNP (ang. *U1 small nuclear ribonucleoprotein*) to jądrowy kompleks rybonukleo-
-proteinowy zaangażowany w regulację ekspresji genów eukariotycznych na poziomie
transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA II (RNAPII) i procesów współ-transkrypcyj-
nych. U1 snRNP oddziałuje bezpośrednio z RNAPII, dzięki czemu wpływa na syntezę
i dojrzewanie transkryptów w jądrze komórkowym, w tym również formowanie końca 3'
mRNA i poliadenylację. Od dawna badaną i dobrze opisaną rolą tego kompleksu jest udział
w składaniu (ang. *splicing*) prekursora mRNA (pre-mRNA), który jest jednym z najważniej-
szych mechanizmów regulacyjnych. Mniej znany jest wpływ U1 snRNP na inicjację, elon-
gację i terminację transkrypcji, w tym zapobieganie przedwczesnej terminacji w obrębie
wewnątrz-genowych sekwencji cięcia i poliadenylacji (ang. *telescripting*). Na poziomie fi-
zjologii komórki kompleks ten reguluje funkcjonowanie mitochondriów i metabolizm ener-
getyczny. Rdzeń kompleksu U1 snRNP stanowi U1 snRNA, kodowany przez wiele kopii
genów różniących się sekwencją i poziomem ekspresji, przy czym ekspresja części z nich
prowadzi do powstawania wadliwych produktów. Według aktualnych doniesień U1 snRNA
można wykorzystać w celach terapeutycznych do regulacji ekspresji genów i poprawy de-
fektów składania mRNA, będących przyczyną wielu chorób, m. in. przeciwciała anti-U1 są
obecne u pacjentów z różnymi chorobami zapalnymi tkanki łącznej. Niniejsza praca stanowi
przegląd wybranych najnowszych odkryć związanych z U1 snRNP.

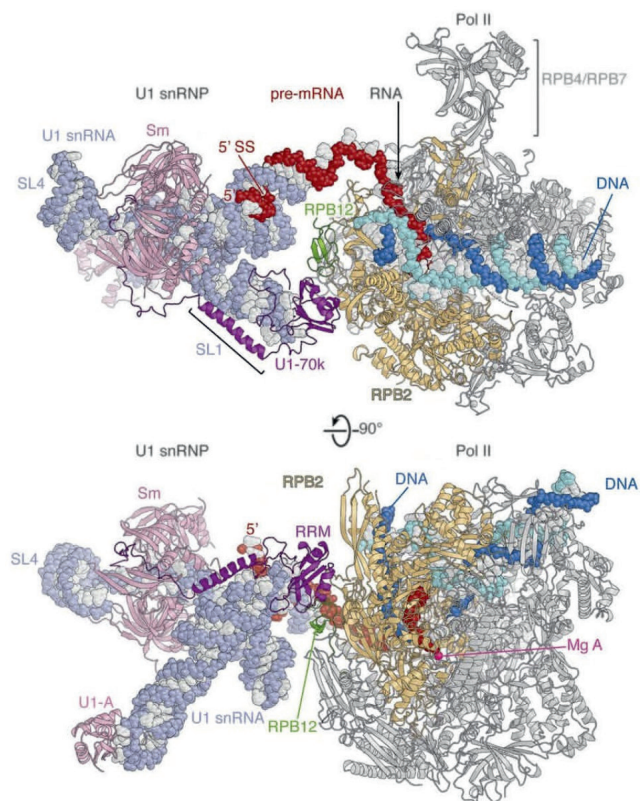
WPROWADZENIE

U1 snRNP (ang. *U1 small nuclear ribonucleoprotein*) należy do grupy małych ją-
drowych rybonukleoprotein. W jego skład wchodzi pojedyncza cząsteczka nie-
kodującego U1 snRNA (ang. *U1 small nuclear RNA*; o długości 164 nukleotydów
u człowieka), stanowiąca szkielet kompleksu. U1 snRNA przyjmuje charakte-
rystyczną strukturę drugorzędową, zbudowaną z trzech ramion o strukturze
spinki (ang. *stem-loop*) ułożonych w kształt liścia koniczyny, z jednoniciowymi
fragmentami po obu stronach i czwartego ramienia na końcu 3' [1,2]. Towarzy-
szy mu kilka specyficznych białek rdzeniowych: U1A, U1-70K, U1C oraz będący
niezbędnym komponentem większości snRNP z rodzin U heptamer Sm (SmB,
SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF, SmG; Ryc. 1) [1,2]. Z rdzeniem U1 snRNP od-
działują białka pomocnicze, m. in. trimer Prp40-Snu71-Luc7 [3,4].

Najważniejszą i najlepiej zbadaną funkcją U1 snRNP jest udział w składaniu
pre-mRNA (ang. *splicing*) [2,7–9]. Proces ten przeprowadza duży wielobiałkowy
kompleks, tzw. *spliceosom*, zbudowany z rybonukleoprotein z rodziny U (U1-6
snRNP) [8,9]. Powstanie tego kompleksu rozpoczyna się od rozpoznania przez
U1 snRNP miejsca składania 5' (5'SS, ang. *5' splice site*) w obrębie intronu w pre-



Rycina 1. Budowa kompleksu U1 snRNP. U1 snRNA, zaznaczony na czarno w formie struktury liścia koniczyny, jest otoczony białkami specyficznymi dla U1 snRNP: U1-70K, U1A, U1C i heptamerem białek Sm (SmB, SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF, SmG). Poszczególne ramiona struktury drugorzędowej U1 snRNA opisano na schemacie. Białka U1A i U1-70K posiadają domeny wiążące RNA: U1A wiąże się z ramieniem II U1 snRNA, natomiast U1-70K oddziałuje z pętlą ramienia I i białkami U1C i Sm. U1C nie wiąże się bezpośrednio z U1 snRNA, ale oddziałuje specyficznie z U1-70K i Sm-D3. m^{2,2'}Gppp reprezentuje specyficzną dla snRNA strukturę trójmietylowanej czapeczki 5' (tzw. czapeczka TMG). Opracowano na podstawie [1,2,5,6].



Rycina 2. Struktura krystaliczna kompleksu ssaczej polimerazy RNA II z U1 snRNP podczas transkrypcji, rozwiązana za pomocą kriomikroskopii elektronowej (Cryo-EM, ang. *cryogenic electron microscopy*). Widoczne są podjednostki polimerazy RNA II (RPB4/RPB7, RPB2, RPB12) i białka U1 snRNP (U1-70K, U1A, Sm). Zaznaczono matrycowy DNA (niebieski), centrum katalityczne polimerazy z jodem magnezu (różowy), pre-mRNA i miejsce 5'SS (czerwony). Widoczne bezpośrednie oddziaływanie między białkiem U1-70K (fioletowy) i podjednostkami polimerazy: RPB2 (złoty) i RPB12 (zielony). Dwie α -helisy motywu rozpoznającego RNA (ang. *RNA recognition motif*, RRM) U1-70K pozostają w kontakcie z domeną RPB2 i motywek palca cynkowego białka RPB12. Dodatkowo naładowany łańcuch boczny motywu RRM białka U1-70K wchodzi w ujemnie naładowaną kieszeń, uformowaną przez RPB2 i RPB12. Ujemnie naładowane reszty Glu124, Glu152 i Asp156 motywu RRM białka U1-70K oddziałują z dodatnio naładowaną domeną RPB2. Rycina za [10], zmodyfikowana.

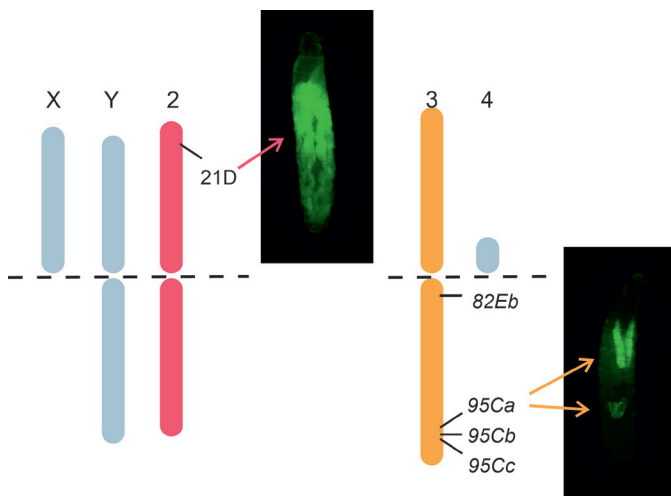
-mRNA. Dzieje się to przez oddziaływanie białka U1C z miejscem 5'SS, po którym następuje bezpośrednie parowanie zasad między pre-mRNA i jednoniciowym fragmentem na końcu 5' RNA U1. W podobny sposób U2 snRNP rozpoznaje miejsce składania na końcu 3' intronu (3'SS, ang. *3' splice site*). Oddziaływania te są względnie słabe i zależą od ATP oraz obecności innych białek, w tym domeny CTD (ang. *C-terminal domain*) polimerazy RNA II (RNAPII). Oddziaływanie między U1 snRNP a polimerazą RNA II zostało potwierdzone rozwiązaniem struktury kompleksu RNAPII-U1 snRNP za pomocą kriomikroskopii elektronowej (Cryo-EM, ang. *cryogenic electron microscopy*; Ryc. 2) [10]. Wykazano, że białko U1-70K wiąże się bezpośrednio z podjednostką RPB2 polimerazy RNA II [10]. Natomiast z wcześniejszych badań wiadomo, że interakcja między RNAPII i U1 snRNP zachodzi również za pośrednictwem białka pomocniczego Prp40, które oddziałuje z domeną CTD tej polimerazy, a także z czynnikami składania SF1 (ang. *splicing factor 1*) i U2 AE (ang. *U2 auxiliary factor*). Oddziaływanie RNAPII-U1 snRNP wpływa zarówno na transkrypcję RNAPII, jak i na współ-transkrypcyjne formowanie *spliceosomu* w miejscach SS nowo-syntetyzowanego pre-mRNA [4,11-14].

Dzięki wszystkim wspomnianym oddziaływaniom powstaje tzw. wczesny kompleks (kompleks E), który przy udziale zależnej od ATP helikazy DExD/H zostaje przekształcony w *pre-spliceosom* (kompleks A). Następnie miejsca składania mRNA 5'SS i 3'SS zostają zbliżone do siebie przestrzennie i U4/U6 oraz U5 snRNP przyłączają się do całego kompleksu z pomocą helikazy DExD/H, przekształcając go w tzw. przed-katalityczny, nieaktywny kompleks B. Dzięki działaniu helikaz RNA (Brr2, Snu114, Prp2) kompleks ulega aktywacji, czemu towarzyszy oddysocjowanie U1 i U4 snRNP. Powstaje wówczas dojrzały, katalityczny *spliceosom* (kompleks C), zawierający jeden wolny ekson i wypętloną strukturę intron-ekson. Następnie, po zajęciu zależnych od ATP przemian strukturalnych, powstaje post-katalityczny kompleks P, zawierający wypętlony intron (tzw. lariat) i złożone razem eksony, które zostają uwolnione ze *spliceosomu* przez helikazę DExD/H. Na koniec następuje zależna od ATP dysocjacja komponentów *spliceosomu* [2,8,9].

Ponieważ U1 snRNP jest niezbędny do identyfikacji intronów, w szczególności rozpoznawania miejsca 5'SS i utworzenia wczesnego kompleksu E, odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genów poprzez alternatywne składanie pre-mRNA (alternatywny *splicing*). Alternatywne składanie opiera się m.in. na wyborze różnych miejsc 5'SS i 3'SS przez komponenty *spliceosomu*, w efekcie prowadząc do powstawania więcej niż jednej izoformy dojrzałego mRNA z jednego genu, co pozwala na syntezę więcej niż jednego białka z jednej sekwencji DNA. W wyniku alternatywnego składania pre-mRNA powstają izoformy białek różniące się właściwościami biochemicznymi i często również funkcją, co znacząco rozszerza potencjał funkcjonalny pojedynczego genu i przyczynia się do powstawania nowych cech organizmów i przyspieszenia zmian ewolucyjnych.

Początkowo trójwymiarowa organizacja przestrzenna komponentów U1 snRNP nie była w pełni znana, ale dzięki rozwojowi technik Cryo-EM w ciągu ostatniej dekady udało się ustalić m.in. rolę U1-70K w przyłączaniu U1C do kompleksu, czy strukturę białek Sm jako pierścieniowego heptameru [15,16]. Opracowanie struktury krystalicznej drożdżowego *spliceosomu* umożliwiło identyfikację białka pomocniczego PrpF39 jako czynnika alternatywnego *splicingu*, odpowiedzialnego za rekrutację U1 snRNP do słabych miejsc 5'SS [17,18]. Ostatecznie rozwój technik Cryo-EM doprowadził do powstania modeli atomowych prawie wszystkich kompleksów *spliceosomu*. Modele strukturalne zapewniły głęboki wgląd zarówno w strukturę, jak i funkcję *spliceosomu*, co zostało niedawno podsumowane w kilku artykułach przeglądowych [9,10,19-25].

Jednak rola U1 snRNP w ekspresji genów znacząco wykracza poza proces składania pre-mRNA, obejmując również regulację samej transkrypcji. U ssaków kompleks ten ma kluczowe znaczenie dla wzmocnienia inicjacji transkrypcji [26-28], regulacji tempa elongacji [29], kontroli kierunkowości promotora [30] oraz zapobiegania przedwczesnej terminacji transkrypcji (ang. *telescripting*) [31,32]. O znaczeniu U1 snRNP dla funkcjonowania organizmu świadczy fakt, że wiele ludzkich chorób genetycznych jest związanych z zaburzeniami rozpoznawania miejsca składa-



Rycina 3. Schematyczna mapa genomu *Drosophila melanogaster* z zaznaczoną lokalizacją genów U1 snRNA w obrębie chromosomów. Poziomo ekspresji genów udokumentowano dzięki ekspresji danego genu w fuzyi ze znacznikiem GFP. Fotografie przedstawiają sygnały fluorescencyjne GFP, pochodzące z ekspresji genów oznaczonych na rycinie: *21D-GFP* (po lewej) i *95Ca-GFP* (po prawej) w larwach *D. melanogaster*. Gen *21D* wykazuje najwyższy poziom ekspresji, niezależnie od tkanki i etapu rozwoju organizmu; sygnał pochodzący z tego genu jest widoczny w większości tkanek embrionu. Nieco niższą ekspresję wykazuje gen *95Ca*, dla którego zaobserwowano sygnał fluorescencyjny głównie w śliniankach i gruczolach męskich. Poziom ekspresji genów *82Eb*, *95Cb* i *95Cc* pozostaje na niskim poziomie. X, Y – chromosomy płci X i Y, 1-4 – autosomy 1-4. Opracowano na podstawie [39].

nia 5'SS przez U1 snRNP [33–35]. Poniżej prezentujemy subiektywny wybór mniej poznanych funkcji U1 snRNP oraz potencjalnych możliwości wykorzystania tego kompleksu w celach naukowych lub terapeutycznych.

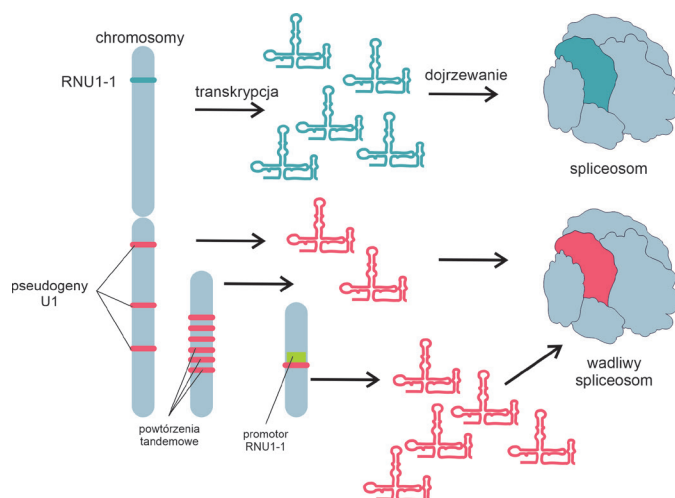
WPŁYW DELEKCJI GENÓW U1 snRNA NA TRANSKRYPCJĘ I FORMOWANIE KOŃCA 3' mRNA

W genomach eukariotycznych małe jądrowe RNA, w tym U1 snRNA, są kodowane przez wiele kopii genów (od 5 kopii genów U1 snRNA w genomie *Drosophila melanogaster* do około 200 kopii U1 i U2 snRNA w genomach ssaków, a nawet do ~1000 kopii snRNA U6 w genomie ludzkim [36–39]), które różnią się sekwencją, poziomem ekspresji i funkcją [2,37,39]. Istnienie tak wielu kopii genów sugeruje, że snRNA odgrywają niezastąpioną rolę zarówno w składaniu pre-mRNA, jak i w innych etapach ekspresji genów i mechanizmach ich regulacji u wyższych eukariontów. Ze względu na dużą liczbę kopii genów i niewielkie różnice w sekwencji między wariantami nie przeprowadzono jeszcze systematycznych badań wszystkich kopii dowolnego określonego genu snRNA w organizmie wyższym. Wyjątek stanowi *Drosophila*, u której występuje znacznie mniejsza w porównaniu z kręgowcami liczba paralogów snRNA - zaledwie pięć genów U1 snRNA. Badania *Drosophila* wykazały, że spośród 5 genów tylko jeden, *21D*, ulega intensywnej, globalnej ekspresji we wszystkich tkankach i stadiach rozwojowych muszki, podczas gdy poziom ekspresji pozostałych zależy od tkanki organizmu: gen *95Ca* ulega specyficznej ekspresji w gruczole ślinowym i męskim gruczole dodatkowym, a pozostałe trzy, *82Eb*, *95Cb* i *95Cc*, w jajnikach i zarodkach (Ryc. 3) [39].

Usunięcie poszczególnych kopii genów U1 snRNA u mutantów *Drosophila* powoduje różnego typu defekty morfologiczne. Analizy wykazały, że takie mutacje miały minimalny wpływ na sam proces składania mRNA, ale co istotne wykryto zmiany w poziomach ekspresji wielu genów (od ~500 genów o zmniejszonej ekspresji w mutantach z delecją genu *21D* lub *95Ca* do ~1000 w mutantach delecyjnych *82Eb* lub *95Cb*) i zwiększoną alternatywną poliadenylacją mRNA. Dotyczyło to przede wszystkim obniżenia ekspresji genów z 1-2 intronami i wykorzystywania wcześniejszych miejsc poliadenylacji na końcu 3' genów [39]. Analizy ontologiczne genów o zmienionej ekspresji (ang. *GO term analysis*) wykazały, że wśród genów powszechnie ulegających obniżeniu w pięciu szczepach delecyjnych dominują peptydazy typu serynowego, hydrolazy, lipazy i transferazy i większość z nich ulega ekspresji w jelicie środkowym [39]. Badania te pokazały, że wszystkie pięć genów kodujących U1 snRNA u *Drosophila* pełni funkcje fizjologiczne podczas rozwoju i odgrywa rolę regulacyjną w transkrypcji i tworzeniu końca 3'.

OBECNOŚĆ U1 snRNA O RÓŻNYCH SEKWENCJACH A SKŁADANIE pre-mRNA

Jak wspomniano wcześniej, U1 snRNA jest kodowany przez wiele genów, ale sekwencje kodujące U1 snRNA mogą również występować w wadliwych pseudogenach. Wiele wariantów genów *U1 snRNA* i pseudogenów nie tylko ulega transkrypcji, ale może również podlegać obróbce takiej jak synteza struktury trójmetylowanej czapeczki 5' (tzw. czapeczka TMG), przyłączenie białek, a nawet powstawanie *spliceosomu*. Jednakże, ponieważ sekwencja i struktura U1 snRNA determinuje skład i budowę kompleksu rybonukleoproteinowego, zdolność *spliceosomów* zawierających wadliwe U1 snRNA do przeprowadzania składania pre-mRNA może być ograniczona. W ludzkim genomie zidentyfikowano 178 kopii genów kodujących U1 snRNA,



Rycina 4. Schemat przedstawiający organizację genów U1 snRNA u człowieka. Gen *RNUI-1* zapewnia wysoki poziom ekspresji prawidłowego U1 snRNA (zaznaczone na turkusowo), powstanie funkcjonalnego *spliceosomu* i przeprowadzenie procesu składania mRNA. Wiele pseudogenów nie ulega transkrypcji, natomiast część prowadzi do powstania niewielkich ilości wadliwego U1 snRNA (zaznaczone na czerwono). Zastosowanie promotora genu *RNUI-1* podnosi poziom U1 snRNA w komórkach, ale w większości nie prowadzi do złożenia fizjologicznego *spliceosomu*. Opracowano na podstawie [40].

część jako tandemowe powtórzenia, a część pojedynczo rozrzuconych na wielu chromosomach, przy czym genem o dominującym poziomie ekspresji jest *RNU1-1* [40]. Ustalono, że 15 wariantów genów kodujących U1 snRNA, spośród wszystkich zidentyfikowanych, ulega ekspresji w tkankach i liniach komórkowych człowieka, ale na znacznie niższym poziomie niż *RNU1-1*. Dodanie do tych genów elementów regulatorowych charakterystycznych dla głównego genu, podnosiło poziom ich ekspresji do zbliżonego do *RNU1-1*. Okazało się jednak, że tylko nieliczne ze skonstruowanych w ten sposób wariantów U1 snRNA, pomimo podniesienia poziomu ekspresji, wpływały na poprawę wydajności procesu składania mRNA (Ryc. 4) [40]. W ten sposób wykazano, że pełna prawidłowa sekwencja genu *RNU1-1* jest niezbędna do funkcjonowania U1 snRNP, a nawet drobne zmiany obecne w pseudogenach U1 snRNA mogą negatywnie wpływać na strukturę kompleksu. Zmiany w sekwencji pętli U1 snRNA mogą zaburzać wiązanie białek specyficznych dla U1 snRNP i skutkować tworzeniem rybonukleoprotein o sub-optymalnej zdolności do oddziaływania z pre-mRNA i innymi białkami spliceosomu [40].

ROLA U1 snRNP W SUPRESJI PRZEDWCZESNEJ TERMINACJI TRANSKRYPCJI POLIMERAZY RNA II

Poza od dawna znaną i dobrze udokumentowaną rolę U1 snRNP w składaniu pre-mRNA dodatkową funkcją tego kompleksu jest zapobieganie przedwczesnej terminacji transkrypcji RNAPII (PCPA, ang. *premature 3'-end cleavage and polyadenylation*). Mechanizm ten, nazywany *telescriptingiem* jest fascynującym procesem, odgrywającym ważną rolę w regulacji transkrypcji genów [31,32]. Aby transkrypcja zakończyła się w odpowiednim miejscu, niezbędne są sekwencje terminacyjne na końcu 3' genu, nazywane sygnałem cięcia i poliadenylacji (PAS, ang. *cleavage and polyadenylation signal*). Niemniej jednak, sekwencje PAS mogą występować również wewnątrz genów, w szczególności w intronach, co może prowadzić do PCPA i powstawania skróconych, wadliwych transkryptów. Kluczową rolę w zapobieganiu PCPA odgrywa U1 snRNP, poprzez *telescripting* umożliwiając prawidłowy przebieg transkrypcji od początku do końca genu, bez zatrzymania w przedwczesnym miejscu PAS [31,32]. Choć dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze w pełni zrozumiany, od dawna było wiadomo, że białko U1-70K, związane z snRNA U1, oddziałuje z polimerazą poli(A) (PAP) i hamuje poliadenylację [41]. Konserwacja ewolucyjna domen w białku U1-70K sugeruje, że regulacja poliadenylacji poprzez hamowanie PAP może być zjawiskiem bardziej rozpowszechnionym w organizmach niż wcześniej sądzono. Obecnie istnieje kilka teorii, które próbują wyjaśnić, w jaki sposób U1 snRNP zapobiega przedwczesnej terminacji transkrypcji.

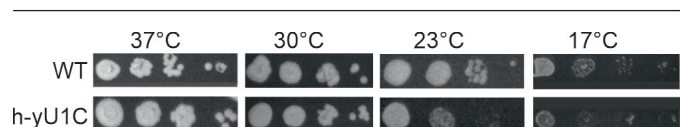
Jedna z teorii sugeruje, że U1 snRNP tworzy kompleks z czynnikami cięcia i poliadenylacji (CPAF, ang. *cleavage and polyadenylation factors*), które są zaangażowane w standardową terminację transkrypcji w prawidłowych miejscach PAS na końcu 3' genu. Kompleks U1-CPAF rozpoznaje miejsca składania mRNA 5'SS lub podobne sekwencje w obrębie intronu, a jednocześnie rozpoznaje niespecyficzne sekwencje PAS, co zapobiega przedwczesnemu zakońc-

niu transkrypcji przez CPAF. Inny model wskazuje, że *telescripting* zachodzi podczas samego procesu transkrypcji. W tym przypadku U1 snRNP tworzy kompleks z białkiem FUS (ang. *fused in sarcoma*), które jest zaangażowane w transkrypcję i obróbkę mRNA. Kompleks U1-FUS współdziała z RNAPII, uniemożliwiając przerwanie transkrypcji po rozpoznaniu niespecyficznej sekwencji PAS i w ten sposób zapobiegając związaniu czynników CPAF z tą sekwencją [42]. Istnieje także model, który sugeruje, że U1 snRNP gromadzi wokół polimerazy RNA II liczne białka, tworząc razem barierę przestrzenną, która blokuje dostęp do niespecyficznych sekwencji PAS czynnikiem CPAF. Dzięki temu polimeraza RNAPII może kontynuować transkrypcję, aż do osiągnięcia właściwego miejsca terminacji [6,31,43-47]. *Telescripting* jest mechanizmem o dużym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania komórki, ponieważ niekontrolowana, przedwczesna terminacja transkrypcji mogłaby prowadzić do produkcji wadliwych i potencjalnie toksycznych białek.

ROLA U1 snRNP W KOMÓRKOWYM METABOLIZMIE ENERGETYCZNYM

Rozpoznanie miejsca 5'SS przez bezpośrednie parowanie zasad między pre-mRNA a U1 snRNA jest kluczowe dla rozpoczęcia składania pre-mRNA. W celu lepszego zrozumienia roli poszczególnych białek kompleksu U1 snRNP w tym procesie, w komórkach drożdżowych przeprowadzono badania polegające na ekspresji ludzkich genów kodujących ortologi tych białek lub zmodyfikowanych genów drożdżowych zawierających domeny pochodzące z białek ludzkich. U drożdży wiązanie U1 snRNA z docelowym RNA jest stabilizowane przez białka U1C i Luc7. We wspomnianych badaniach strukturę palca cynkowego drożdżowego U1C zastąpiono jego ludzkim odpowiednikiem. Spowodowało to zwiększoną wrażliwość na chłód szczepu i umiarkowane defekty składania mRNA (Ryc. 5) [3].

Następnie do białka Luc7 dołączono indukowaną auksyną sekwencję, tzw. degron, kierującą to białko do degradacji. Degrony są rozpoznawane przez enzymy przeprowadzające ubikwitynację, która jest sygnałem do rozkładu danego białka przez proteasom komórkowy. Po dodaniu auksyny okazało się, że drastycznie spadła nie tylko ilość samego białka Luc7, ale także innych białek pomocniczych drożdżowego U1 snRNP: Prp40 i Snu71, co sugerowało ich ścisłe współdziałanie z kompleksem U1 snRNP. Wykazano, że Luc7 jest niezbędne w przyłączeniu trimery białek Luc7-Prp40-Snu71 do kompleksu U1 snRNP [3].

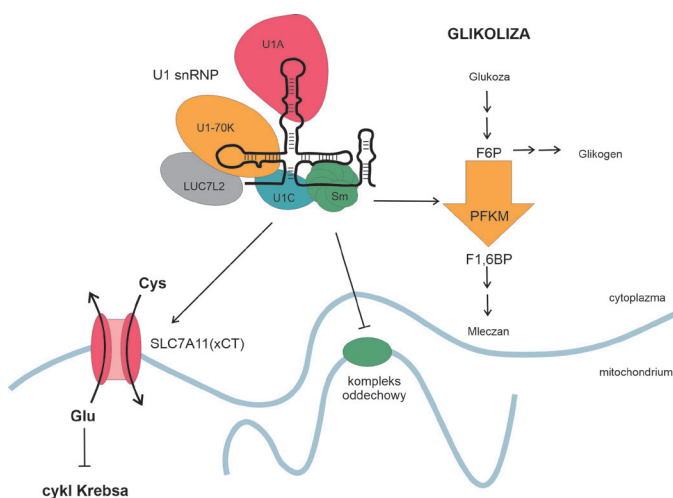


Rycina 5. Podwyższona wrażliwość na chłód szczepów drożdży z ekspresją zmodyfikowanego białka U1C. Hodowla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* typu dzikiego (WT; u góry) i mutantów ze zmodyfikowanym białkiem U1C, zawierającym motyw palca cynkowego pochodzący z ludzkiego ortologu tego białka (h-yU1C; u dołu). W temperaturze 23°C i 17°C szczep h-yU1C wykazuje znacznie gorszy wzrost w porównaniu do warunków kontrolnych (30°C). Zdjęcie pochodzi z [3].

Efektom fizjologicznym wspomnianych wyżej zmian na poziomie molekularnym było nie tylko gwałtowne ograniczenie wzrostu i liczne defekty składania mRNA u badanych szczepów, ale co istotne również dysfunkcja mitochondriów, przypuszczalnie wywołana przez zaburzenia składania. Wskazuje to, że poprawny przebieg *splicingu* ma duże znaczenie w regulacji funkcjonowania mitochondriów u drożdży i tym samym komórkowy metabolizm energetyczny [2,3].

U1 snRNP wpływa na biologię mitochondriów również w komórkach ludzkich, gdzie białko LUC7L2, będące homologiem drożdżowego Luc7 oraz podjednostki rdzenia U1 snRNP, tj. m.in. U1A i U1-70K, zostały zidentyfikowane jako represory fosforylacji oksydacyjnej [48]. Wykazano, że LUC7L2 i U1 snRNP są niezbędne dla prawidłowego składania pre-mRNA enzymu glikolizy PFKM (6-fosfofruktokinaza), który ogranicza syntezę glikogenu oraz antyportera cystyna/kwas glutaminowy SLC7A11(xCT), który ogranicza utlenianie kwasu glutaminowego. LUC7L2 i U1 snRNP hamują także powstawanie mitochondrialnego kompleksu oddechowego (Ryc. 6) [48].

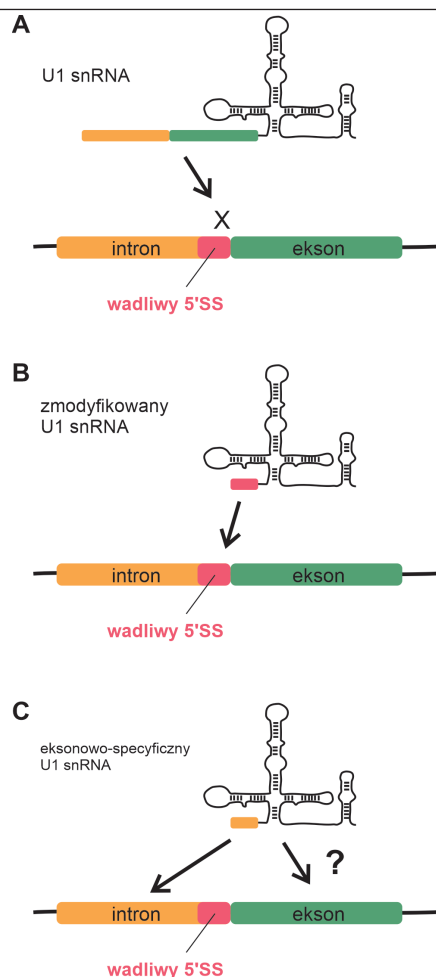
Równowaga między glikolizą a fosforylacją oksydacyjną, głównymi źródłami ATP w komórce, zależy od wielu czynników i jest ściśle regulowana, przy czym pełen zestaw genów wpływających na utrzymanie tego stanu nie został w pełni poznany. Obniżenie ekspresji LUC7L2 i U1 snRNP zmienia źródło pozyskiwania energii z glikolizy na fosforylację oksydacyjną, wskazując, że maszyna składania mRNA jest jednym z elementów wpływających na tę równowagę. Autorzy omawianych badań zasugerowali, że białka z rodziny LUC7, jak również inne składniki U1 snRNP, mogą integrować sygnały, takie jak tlen i składniki odżywcze, aby zrównoważyć aktywność głównych szlaków metabolizmu energetycznego [48].



Rycina 6. Schemat regulacji metabolizmu komórkowego przez LUC7L2. W fizjologicznych warunkach białko LUC7L2: (i) promuje usuwanie kwasu glutaminowego (Glu) przez antyporter Cys/Glu SLC7A11(xCT) z wnętrza mitochondriów i pobieranie cystyny (Cys), hamując cykl Krebsa; (ii) promuje przekształcanie fruktozo-6-fosforanu (F6P) we fruktozo-1,6-bisfosforan (F1,6BP) przez 6-fosfofruktokinazę (PFKM), wspomagając glikolizę; oraz (iii) ogranicza syntezę kompleksu oddechowego. Opracowano na podstawie [48].

ZASTOSOWANIE U1 snRNA W TERAPII CHOROÓB GENETYCZNYCH

Składanie pre-mRNA jest bardzo ważną i niezbędną częścią procesu ekspresji genów eukariotycznych, dlatego podlega ścisłej regulacji na wielu etapach. Nieprawidłowości w tym procesie, w szczególności zaburzenia rozpoznawania 5'SS przez U1 snRNP, są coraz częściej identyfikowane jako przyczyna wielu chorób dziedzicznych [33-35]. W związku z tym, terapie mające na celu naprawę błędów składania pre-mRNA wydają się obiecującym sposobem leczenia niektórych chorób o podłożu genetycznym. Jedną z potencjalnych możliwości jest zastosowanie U1 snRNA jako terapeutycznego RNA, z uwagi na kluczową rolę jaką odgrywa w składaniu – dzięki oddziaływaniu z miejscem 5'SS inicjuje tworzenie spliceosomu we właściwym miejscu i czasie. Do tej pory opracowano dwa rodzaje terapeutycznych U1 snRNA: zmodyfikowany U1 snRNA i eksonowo-specyficzny U1 snRNA, do potencjalnego wykorzystania w leczeniu takich chorób jak fenyloketonuria, hemofilia, atrofia nerwu wzrokowego i wielu innych (Ryc. 7) [49-51].



Rycina 7. Schemat działania terapeutycznych U1 snRNP. A) U1 snRNP nie rozpoznaje nieprawidłowego miejsca 5'SS (na schemacie na czerwono). Dochodzi do błędnej składania mRNA, co prowadzi do powstania nieprawidłowego białka, a w konsekwencji rozwinięcia stanu chorobowego. B) Zmodyfikowany U1 snRNA rozpoznaje wadliwe miejsce 5'SS, umożliwiając złożenie *spliceosomu* i prawidłowy przebieg składania mRNA. C) Eksonowo-specyficzny U1 snRNA został tak skonstruowany, aby rozpoznawał sekwencję w intronie genu w pobliżu niepoprawnego miejsca 5'SS, co umożliwia związanie *spliceosomu* w tym miejscu i przeprowadzenie procesu składania mRNA. Molekularne podłoże tego mechanizmu nie zostało jeszcze zbadane.

Chociaż zmodyfikowane U1 snRNA same w sobie mają potencjał terapeutyczny, opracowano również metody, w których łączy się je z innymi cząsteczkami. Takie podejście zastosowano m. in. w terapii autosomalnej dominującej atrofii nerwu wzrokowego (ADOA, ang. *autosomal dominant optic atrophy*), która jest spowodowana mutacją w miejscu 5'SS w intronie 10 genu *OPA1*, zaburzającą proces składania mRNA [33,51]. W celu naprawy tego defektu wykorzystano zmodyfikowane U1 i U6 snRNA, które wprowadzono do siatkówki myszy posiadających zmutowaną wersję *OPA1*, wykorzystując wektor pochodzenia wirusowego AAV2/8 (ang. *adeno-associated virus*), jedno z szeroko stosowanych narzędzi do dostarczania genów do komórek w terapii genowej [51,52]. U traktowanych myszy wykryto wzrost poziomu transkryptu typu dzikiego, a także prawidłowego białka. Nie wykryto żadnych nieprawidłowości morfologicznych, ani w funkcjonowaniu siatkówki, ani na poziomie genetycznym. Ta eksperymentalna terapia wymaga zweryfikowania pod kątem długoterminowego bezpieczeństwa i skuteczności, niemniej wydaje się obiecującą metodą walki z atrofią nerwu wzrokowego, a także potencjalnie innymi schorzeniami siatkówki o podłożu genetycznym [51].

PRZECIWCIAŁA ANTY-U1 snRNP W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

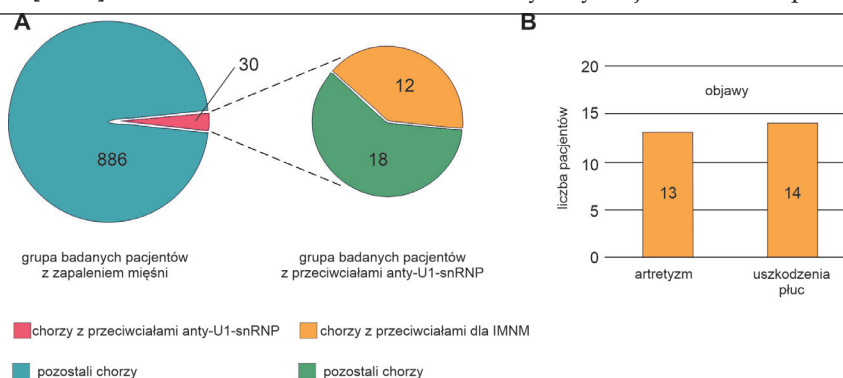
Cząsteczka U1 snRNP może mieć również inne zastosowanie w medycynie, nie tylko jako terapeutyk. Obecność przeciwciał przeciwko rybonukleoproteinom U1 (anty-U1-snRNP) zaobserwowano u pacjentów z wieloma różnymi schorzeniami, m. in. z chorobami układowymi tkanki łącznej (CTD, ang. *connective tissue disease*) [53,54]. Jest to grupa przewlekłych chorób zapalnych o podłożu autoimmunologicznym obejmująca tkanki łączne. Choć poszczególne schorzenia tej grupy mają własne charakterystyczne przeciwciała, analiza ich współwystępowania z przeciwciałami anty-U1-snRNP okazała się obiecującym podejściem, pozwalającym na specyficzną identyfikację danej choroby. Na przykład, z dodatnim wynikiem dla autoprzeciwciał anty-U1-snRNP powiązane jest współwystępowanie u pacjentów schorzenia CTD i idiopatycznej miopatii zapalnej (IIM, ang. *idiopathic inflammatory myopathy*), a identyfikacja tych chorób za pomocą przeciwciał umożliwia dobrą odpowiedź pacjentów na leczenie steroidami i mniejszą częstość występowania zapalenia mięśni [54,55].

Retrospektywną analizę cech klinicznych pacjentów z zapaleniem mięśni i pozytywnym wynikiem obecności przeciwciał anty-U1-snRNP przeprowadziła grupa badaczy z Laboratorium Zapalenia Mięśni szpitala China-Japan Friendship Hospital w Pekinie [54]. Wykonano badanie kohortowe dla 916 chińskich pacjentów z IIM i u około 3% z nich zidentyfikowano przeciwciała anty-U1-snRNP. Według autorów badania ta grupa pacjentów stanowiła charakterystyczną podgrupę chorych na IIM, u których cechy kliniczne i patologiczne były zbliżone do występujących w martwiczym autoimmunologicznym zapaleniu mięśni (IMNM, ang. *immune-mediated necrotizing myopathy*). W tej grupie pacjentów, poza najbardziej charakterystyczną cechą kliniczną, czyli osłabieniem mięśni, najczęstszymi objawami były artretyzm i uszkodzenia płuc typu ILD (ang. *interstitial lung disease*) (Ryc. 8). Co istotne, większość pacjentów z tej grupy dobrze reagowało na immunoterapię [54].

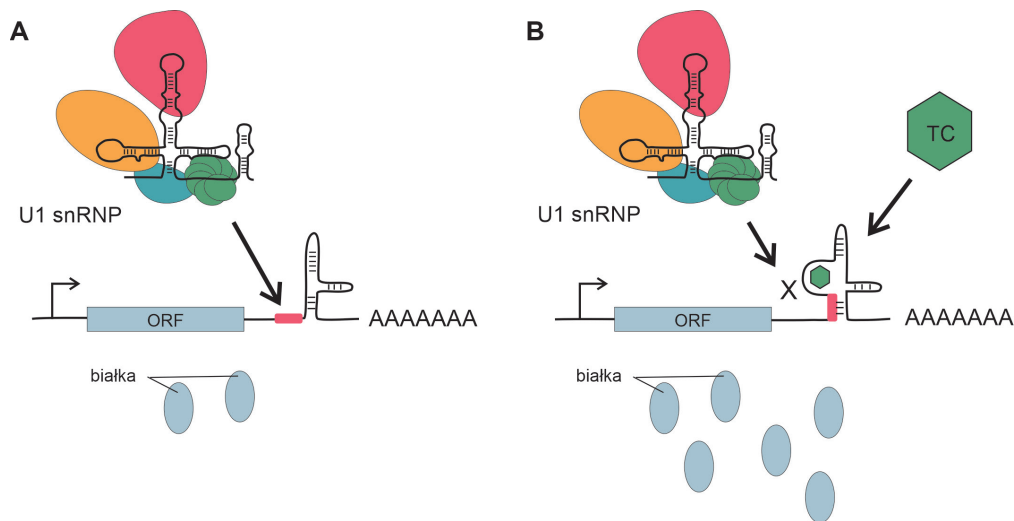
Wykrywanie odpowiednich przeciwciał odgrywa ważną rolę w identyfikacji chorób tkanki łącznej, jednak sama obecność przeciwciał anty-U1-snRNP nie jest jednoznacznym wskaźnikiem występowania CTD. Dlatego w diagnostyce proponuje się zastosowanie mikromacierzy immunologicznych wykrywających zestawy różnych przeciwciał, najczęściej występujących w CTD [40]. Niemniej jednak, wykorzystanie obecności przeciwciał anty-U1-snRNP w diagnostyce tego typu chorób może poprawić precyzję diagnozy, a tym samym umożliwić lepsze dostosowanie terapii do konkretnej choroby indywidualnego pacjenta.

U1 snRNP JAKO RYBOPRZEŁĄCZNIKI

Rybooprzełączniki to struktury RNA znajdujące się głównie w niekodujących regionach mRNA, tj. w sekwencjach 5'UTR, intronach lub 3'UTR, które kontrolują ekspresję genów poprzez bezpośrednie wiązanie małych cząsteczek efektorowych, takich jak metabolity (Ryc. 9). Mechanizm działania rybooprzełączników opiera się na zmianach konformacyjnych RNA, które zachodzą po związaniu ligandu, co prowadzi do regulacji procesów takich jak transkrypcja, translacja, splicing mRNA, czy stabilność mRNA [56–58]. Rybooprzełączniki mogą być potencjalnie wykorzystywane jako narzędzia w regulacji ekspresji genów w celu badania ich funkcjonowania, zarówno u złożonych organizmów eukariotycznych, jak i bakterii, ponieważ mają wiele zalet: są



Rycina 8. Wyniki retrospektywnej analizy kohortowej dla pacjentów z zapaleniem mięśni typu idiopatycznej miopatii zapalnej (IIM, ang. *idiopathic inflammatory myopathy*). A) Liczba pacjentów, u których stwierdzono obecność przeciwciał anty-U1-snRNP i przeciwciał występujących w autoimmunologicznym zapaleniu mięśni (IMNM, ang. *immune-mediated necrotizing myopathy*). B) Najczęstsze objawy występujące wśród pacjentów, u których stwierdzono obecność przeciwciał anty-U1-snRNP. Opracowano na podstawie [54].



Rycina 9. Schemat działania rybołączników U1. A) Sekwencja rybołącznika obecna w 3'UTR genu zawiera region rozpoznawany przez U1 snRNP, zaznaczony na czerwono. Rekrutacja U1 snRNP hamuje poliadenyłację, czym obniża ekspresję genu. B) Dodanie tetracykliny (TC) zmienia konformację rybołącznika, ukrywając sekwencję rozpoznawaną przez U1 snRNP, co uniemożliwia oddziaływanie i w efekcie aktywuje ekspresję genu. Strzałka oznacza promotor genu. ORF - otwarta ramka odczytu genu (ang. *open reading frame*). Opracowano na podstawie [54].

małe, nie wywołują odpowiedzi immunologicznej organizmu, a do regulacji nie potrzebują żadnych dodatkowych zewnętrznych czynników, poza ligandem. Na początku lat dwutysięcznych opracowano system wyciszania ekspresji genów nazwany „interferencją U1 snRNP” (U1i) [57,58], który wykorzystuje zdolność U1 snRNP do hamowania poliadenyłacji dzięki wiązaniu i inhibicji polimerazy PAP przez białko U1-70K. U1i wymaga ekspresji zmodyfikowanego kompleksu U1 snRNP, który specyficznie oddziałuje z genem docelowym poprzez bezpośrednie parowanie zasad powyżej sekwencji PAS. Używając tego systemu wytworzono rybołączniki indukowane tetracykliną (Ryc. 7), które obniżają poziom poliadenyłacji mRNA przez selektywną rekrutację U1 snRNP [58]. Transkrypty niepoliadenylowane są niestabilne i szybko ulegają degradacji, co prowadzi do zahamowania ekspresji genów. Dodanie tetracykliny powoduje nawet 3~4-krotną indukcję ekspresji genu.

Opracowano również technikę systematycznej ewolucji rybołączników przez wykładnicze wzbogacenie (SEREX, ang. *systematic evolution of riboswitches by exponential enrichment*), pozwalającą na otrzymanie rybołączników o podwyższonych parametrach wiązania i aktywności, uzyskując nawet 8-krotną zmianę poziomu ekspresji genu. Z kolei zastosowanie wielu rybołączników w jednym genie pozwoliło na 37-krotne obniżenie jego ekspresji. Autorzy tej techniki zauważyli, że skuteczność rybołączników zależy od ich liczby w danym genie i może odwracalnie regulować ekspresję zarówno genów reporterowych, jak i naturalnie występujących, w kulturach komórkowych a także w modelu mysim. Skonstruowali tym samym obiecujący system kontroli ekspresji genów, z możliwymi zastosowaniami terapeutycznymi, a stworzoną przez nich technikę SEREX uznaje się za doskonałą metodę otrzymywania rybołączników o pożądanych właściwościach [58].

PODSUMOWANIE

Rdzeń U1 snRNP stanowi U1 snRNA, który w genomach kodowany jest przez wiele kopii genów, różniących

się sekwencją i poziomem ekspresji. Aktywność tych genów zależy w dużym stopniu od etapu rozwoju organizmu i/lub od tkanki, w której dany RNA jest syntetyzowany [37,38]. Różne warianty U1 snRNA z różną wydajnością rekrutują białka niezbędne do złożenia *spliceosomu*, mogą również prowadzić do powstawania niefunkcyjnego kompleksu [40]. Obecność wielu kopii genów wskazuje na pełnienie przez U1 snRNA rozmaitych funkcji, na tyle ważnych dla życia komórki, że w toku ewolucji te liczne warianty sekwencji U1 zostały zachowane. Rola kompleksu U1 snRNP jako inicjatora procesu składania pre-mRNA została już do tej pory bardzo dobrze zbadana i opisana [2,7-9]. Ostatnie lata przyniosły liczne odkrycia w zakresie mniej znanych funkcji tej rybonukleoproteiny. Jednym z procesów, w których U1 snRNP bierze udział, jest kluczowy dla regulacji transkrypcji genów *telescripting*, polegający na zapobieganiu przedwczesnej terminacji transkrypcji polimerazy RNA II [31,32]. Dokładne molekularne podstawy tego zjawiska nie są jeszcze do końca wyjaśnione, a mogą obejmować tworzenie kompleksów z czynnikami cięcia i poliadenyłacji (CPAF) lub białkiem FUS, które rozpoznaje i blokuje niespecyficzne sekwencje terminacyjne wewnątrz genu [6,42-44]. Dzięki temu transkrypcja może przebiegać do końca, co zapobiega powstawaniu wadliwych, skróconych transkryptów i produkcji szkodliwych dla prawidłowego funkcjonowania komórki białek. Najnowsze badania pokazują wpływ U1 snRNP nie tylko na ten, ale również na inne procesy związane z regulacją metabolizmu RNA w jądrze komórkowym, takie jak transkrypcja, formowanie końca 3' mRNA i poliadenyłacja. Procesy te wpływają na biologię całej komórki, tj. m.in. metabolizm energetyczny, związany z funkcjonowaniem mitochondriów. U drożdży defekty białka U1C powodują uszkodzenia mitochondriów i większą wrażliwość szczepu na chłód [3], natomiast w komórkach ludzkich, U1 snRNP razem z białkiem LUC7L2 pośrednio pobudza glikolizę, a hamuje cykl Krebsa i łańcuch oddechowy [48].

U1 snRNP okazuje się także obiecującym narzędziem do zastosowania w biotechnologii i medycynie. Rybołącznic-

niki U1 snRNP pozwalają na indukowanie ekspresji genów w odpowiedzi na zastosowany substrat, umożliwiając badanie działania wybranego genu w różnych organizmach [58]. Genowo-specyficzne U1 snRNP, poprawiające defekty składania pre-mRNA poprzez umożliwienie prawidłowego rozpoznania wadliwych miejsc 5'SS, mają potencjał w leczeniu wielu chorób dziedzicznych spowodowanych zaburzeniami składania mRNA [49–51]. Wreszcie przeciwciała anty-U1 snRNP wykrywane u pacjentów mogą okazać się precyzyjnym wskaźnikiem chorób tj. np. CTD, przyspieszając diagnozę i dostosowanie terapii [53,54].

Prace badawcze nad rolą w komórce i mechanizmem działania U1 snRNP są obecnie intensywnie prowadzone, a z uwagi na rolę tej rybonukleoproteiny w regulacji transkrypcji i procesów współ-transkrypcyjnych, a także możliwość wykorzystania w naukach biomedycznych i terapii, wyniki tych badań cieszą się dużym zainteresowaniem. Przedstawione w tym artykule aktualne koncepcje poszerzają naszą wiedzę na temat syntezy i dojrzewania mRNA, jak i wpływu metabolizmu RNA na całe organizmy, a także otwierają granice dla nowych odkryć.

PIŚMIENNICTWO

- Alexander MR, Wheatley AK, Center RJ, Purcell DFJ (2010) Efficient transcription through an intron requires the binding of an Sm-type U1 snRNP with intact stem loop II to the splice donor. *Nucleic Acids Res* 38:3041–53. Doi:10.1093/nar/gkp1224
- Guio J, O'Reilly D (2015) Insights into the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex superfamily. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6:79–92. Doi:10.1002/wrna.1257
- Chalivendra S, Shi S, Li X, Kuang Z, Giovinazzo J, Zhang L, Rossi J, Wang J, Saviola AJ, Welty R, Liu S, Vaeth KF, Zhou ZH, Hansen KC, Taliaferro JM, Zhao R (2024) Selected humanization of yeast U1 snRNP leads to global suppression of pre-mRNA splicing and mitochondrial dysfunction in the budding yeast. *RNA* 30:1070–1088. Doi:10.1261/rna.079917.123
- Becerra S, Andrés-León E, Prieto-Sánchez S, Hernández-Munain C, Suñé C (2016) Prp40 and early events in splice site definition. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7:17–32. Doi:10.1002/wrna.1312
- Hof D, Raats JMH, Pruijn GJM (2005) Apoptotic modifications affect the autoreactivity of the U1 snRNP autoantigen. *Autoimmun Rev* 4:380–8. Doi:10.1016/j.autrev.2005.02.003
- Ran Y, Deng Y, Yao C (2021) U1 snRNP telescripting: molecular mechanisms and beyond. *RNA Biol* 18:1512–23. Doi:10.1080/15476286.2021.1872963
- Enders M, Neumann P, Dickmanns A, Ficner R (2023) Structure and function of spliceosomal DEAH-box ATPases. *Biol Chem* 404:851–66. Doi:10.1515/hsz-2023-0157
- Wahl MC, Will CL, Lührmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701–18. Doi:10.1016/j.cell.2009.02.009
- Wilkinson ME, Charenton C, Nagai K (2020) RNA Splicing by the Spliceosome. *Annu Rev Biochem* 89:359–88. Doi:10.1146/annurev-biochem-091719-064225
- Zhang S, Aibara S, Vos SM, Agafonov DE, Lührmann R, Cramer P (2021) Structure of a transcribing RNA polymerase II-U1 snRNP complex. *Science* 371:305–9. Doi:10.1126/science.abf1870
- Stepien A, Dolata J, Gulanicz T, Bielewicz D, Bajczyk M, Smolinski DJ, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A (2022) Chromatin-associated microprocessor assembly is regulated by the U1 snRNP auxiliary protein PRP40. *Plant Cell* 34:4920–35. Doi:10.1093/plcell/koac278
- Carty SM, Goldstrohm AC, Suñé C, Garcia-Blanco MA, Greenleaf AL (2000) Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9015–20. Doi:10.1073/pnas.160266597
- Morris DP, Greenleaf AL (2000) The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 275:39935–43. Doi:10.1074/jbc.M004118200
- Kang CH, Feng Y, Vikram M, Jeong IS, Lee JR, Bahk JD, Yun D-J, Lee SY, Koiwa H (2009) Arabidopsis thaliana PRP40s are RNA polymerase II C-terminal domain-associating proteins. *Arch Biochem Biophys* 484:30–8. Doi:10.1016/j.abb.2009.01.004
- Kondo Y, Oubridge C, van Roon A-MM, Nagai K (2015) Crystal structure of human U1 snRNP, a small nuclear ribonucleoprotein particle, reveals the mechanism of 5' splice site recognition. *eLife* 4:e04986. Doi:10.7554/eLife.04986
- Pomeranz Krummel DA, Oubridge C, Leung AKW, Li J, Nagai K (2009) Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* 458:475–80. Doi:10.1038/nature07851
- Espinosa S, De Bortoli F, Li X, Rossi J, Wagley ME, Lo H-YG, Taliaferro JM, Zhao R (2022) Human PRPF39 is an alternative splicing factor recruiting U1 snRNP to weak 5' splice sites. *RNA* 29:97–110. Doi:10.1261/rna.079320.122
- Li X, Liu S, Jiang J, Zhang L, Espinosa S, Hill RC, Hansen KC, Zhou ZH, Zhao R (2017) CryoEM structure of *Saccharomyces cerevisiae* U1 snRNP offers insight into alternative splicing. *Nat Commun* 8:1035. Doi:10.1038/s41467-017-01241-9
- Borišek J, Casalino L, Saltalamacchia A, Mays SG, Malcovati L, Magistrato A (2021) Atomic-Level Mechanism of Pre-mRNA Splicing in Health and Disease. *Acc Chem Res* 54:144–54. Doi:10.1021/acs.accounts.0c00578
- Fica SM, Oubridge C, Galej WP, Wilkinson ME, Bai X-C, Newman AJ, Nagai K (2017) Structure of a spliceosome remodelled for exon ligation. *Nature* 542:377–80. Doi:10.1038/nature21078
- Kastner B, Will CL, Stark H, Lührmann R (2019) Structural Insights into Nuclear pre-mRNA Splicing in Higher Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11:a032417. Doi:10.1101/cshperspect.a032417
- Plaschka C, Newman AJ, Nagai K (2019) Structural Basis of Nuclear pre-mRNA Splicing: Lessons from Yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11:a032391. Doi:10.1101/cshperspect.a032391
- Tholen J, Galej WP (2022) Structural studies of the spliceosome: Bridging the gaps. *Curr Opin Struct Biol* 77:102461. Doi:10.1016/j.sbi.2022.102461
- Wan R, Bai R, Shi Y (2019) Molecular choreography of pre-mRNA splicing by the spliceosome. *Curr Opin Struct Biol* 59:124–33. Doi:10.1016/j.sbi.2019.07.010
- Yan C, Wan R, Shi Y (2019) Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing through Structural Biology of the Spliceosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11:a032409. Doi:10.1101/cshperspect.a032409
- Damgaard CK, Kahns S, Lykke-Andersen S, Nielsen AL, Jensen TH, Kjems J (2008) A 5' splice site enhances the recruitment of basal transcription initiation factors in vivo. *Mol Cell* 29:271–8. Doi:10.1016/j.molcel.2007.11.035
- Engreitz JM, Sirokman K, McDonel P, Shishkin AA, Surka C, Russell P, Grossman SR, Chow AY, Guttman M, Lander ES (2014) RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent pre-mRNAs and chromatin sites. *Cell* 159:188–99. Doi:10.1016/j.cell.2014.08.018
- Rose AB (2028) Introns as Gene Regulators: A Brick on the Accelerator. *Front Genet* 9:672. Doi:10.3389/fgene.2018.00672
- Mimoso CA, Adelman K (2023) U1 snRNP increases RNA Pol II elongation rate to enable synthesis of long genes. *Mol Cell* 83:1264–1279. e10. Doi:10.1016/j.molcel.2023.03.002
- Almada AE, Wu X, Kriz AJ, Burge CB, Sharp PA (2013) Promoter directionality is controlled by U1 snRNP and polyadenylation signals. *Nature* 499:360–3. Doi:10.1038/nature12349
- Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, Dreyfuss G (2010) U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* 468:664–8. Doi:10.1038/nature09479
- Di C, So BR, Cai Z, Arai C, Duan J, Dreyfuss G (2019) U1 snRNP Telescripting Roles in Transcription and Its Mechanism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 84:115–22. Doi:10.1101/sqb.2019.84.040451

33. Jüschke C, Klopstock T, Catarino CB, Owczarek-Lipska M, Wissinger B, Neidhardt J (2021) Autosomal dominant optic atrophy: A novel treatment for OPA1 splice defects using U1 snRNA adaption. *Mol Ther Nucleic Acids* 26:1186–97. Doi:10.1016/j.omtn.2021.10.019
34. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6307–11. Doi:10.1073/pnas.96.11.6307
35. Roca X, Olson AJ, Rao AR, Enerly E, Kristensen VN, Børresen-Dale A-L, Andresen BS, AKrainer AR, Sachidanandam R (2008) Features of 5'-splice-site efficiency derived from disease-causing mutations and comparative genomics. *Genome Res* 18:77–87. Doi:10.1101/gr.6859308
37. Lu Z, Matera AG (2014) Developmental analysis of spliceosomal snRNA isoform expression. *G3 Bethesda Md* 5:103–10. Doi:10.1534/g3.114.015735
38. Mabin JW, Lewis PW, Brow DA, Dvinge H (2021) Human spliceosomal snRNA sequence variants generate variant spliceosomes. *RNA* 27:1186–203. Doi:10.1261/rna.078768.121
39. Wang M, Liang A-M, Zhou Z-Z, Pang T-L, Fan Y-J, Xu Y-Z (2023) Deletions of singular U1 snRNA gene significantly interfere with transcription and 3'-end mRNA formation. *PLoS Genet* 19:e1011021. Doi:10.1371/journal.pgen.1011021
40. Wong J, Yellamaty R, Gallante C, Lawrence E, Martelly W, Sharma S (2024) Examining the capacity of human U1 snRNA variants to facilitate pre-mRNA splicing. *RNA* 30:271–80. Doi:10.1261/rna.079892.123
41. Gunderson SI, Polycarpou-Schwarz M, Mattaj IW (1998) U1 snRNP Inhibits Pre-mRNA Polyadenylation through a Direct Interaction between U1 70K and Poly(A) Polymerase. *Mol Cell* 1:255–64. Doi:10.1016/S1097-2765(00)80026-X
42. Masuda A, Kawachi T, Takeda J-I, Ohkawara B, Ito M, Ohno K (2020) tRIP-seq reveals repression of premature polyadenylation by co-transcriptional FUS-U1 snRNP assembly. *EMBO Rep* 21:e49890. Doi:10.15252/embr.201949890
43. Studniarek C, Eglhoff S, Murphy S (2020) Noncoding RNAs Set the Stage for RNA Polymerase II Transcription. *Trends Genet* 37:279–91. Doi:10.1016/j.tig.2020.09.013
44. Venters CC, Oh J-M, Di C, So BR, Dreyfuss G (2019) U1 snRNP Tele-scripting: Suppression of Premature Transcription Termination in Introns as a New Layer of Gene Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11:a032235. Doi:10.1101/cshperspect.a032235
45. Li W, You B, Hoque M, Zheng D, Luo W, Ji Z, Park JY, Gunderson SI, Kalsotra A, Manley JL, Tian B (2015) Systematic profiling of poly(A)+ transcripts modulated by core 3' end processing and splicing factors reveals regulatory rules of alternative cleavage and polyadenylation. *PLoS Genet* 11:e1005166. Doi:10.1371/journal.pgen.1005166
46. Naro C, Pellegrini L, Jolly A, Farini D, Cesari E, Bielli P, de la Grange P, Sette C (2019) Functional Interaction between U1snRNP and Sam68 Insures Proper 3' End Pre-mRNA Processing during Germ Cell Differentiation. *Cell Rep* 26:2929–2941.e5. Doi:10.1016/j.celrep.2019.02.058
47. Berg MG, Singh LN, Younis I, Liu Q, Pinto AM, Kaida D, Zhang Z, Cho S, Sherrill-Mix S, Wan L, Dreyfuss G (2012) U1 snRNP determines mRNA length and regulates isoform expression. *Cell* 150:53–64. Doi:10.1016/j.cell.2012.05.029
48. Jourdain AA, Begg BE, Mick E, Shah H, Calvo SE, Skinner OS, Sharma R, Blue SM, Yeo GW, Burge CB 2, Mootha VK (2021) Loss of LUC7L2 and U1 snRNP subunits shifts energy metabolism from glycolysis to OXPHOS. *Mol Cell* 81:1905–1919.e12. Doi:10.1016/j.molcel.2021.02.033
49. Gonçalves M, Santos JI, Coutinho MF, Matos L, Alves S (2023) Development of Engineered-U1 snRNA Therapies: Current Status. *Int J Mol Sci* 24:14617. Doi:10.3390/ijms241914617
50. Martínez-Pizarro A, Dembic M, Pérez B, Andresen BS, Desviat LR (2018) Intronic PAH gene mutations cause a splicing defect by a novel mechanism involving U1snRNP binding downstream of the 5' splice site. *PLoS Genet* 14:e1007360. Doi:10.1371/journal.pgen.1007360
51. Swirski S, May O, Ahlers M, Wissinger B, Greschner M, Jüschke C, Neidhardt J (2023) In Vivo Efficacy and Safety Evaluations of Therapeutic Splicing Correction Using U1 snRNA in the Mouse Retina. *Cells* 12:955. Doi:10.3390/cells12060955
52. Doria M, Ferrara A, Auricchio A (2013) AAV2/8 vectors purified from culture medium with a simple and rapid protocol transduce murine liver, muscle, and retina efficiently. *Hum Gene Ther Methods* 24:392–8. Doi:10.1089/hgtb.2013.155
53. Gunnarsson R, Hetlevik SO, Lilleby V, Molberg Ø (2016) Mixed connective tissue disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 30:95–111. Doi:10.1016/j.berh.2016.03.002
54. Ge Y, Yang H, Jiang W, Tian X, Lu X, Wang G (2023) Clinical characteristics of myositis patients with isolated anti-U1 ribonucleoprotein antibody resemble immune-mediated necrotizing myopathy. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 15:1759720X231181336. Doi:10.1177/1759720X231181336
55. Oldroyd A, Lilleker J, Chinoy H (2017) Idiopathic inflammatory myopathies – a guide to subtypes, diagnostic approach and treatment. *Clin Med* 17:322–8. Doi:10.7861/clinmedicine.17-4-322
56. Salvail H, Breaker RR (2023) Riboswitches. *Curr Biol* 33:R343–8. Doi:10.1016/j.cub.2023.03.069
57. Abad X, Vera M, Jung SP, Oswald E, Romero I, Amin V, Fortes P, Gunderson SI (2008) Requirements for gene silencing mediated by U1 snRNA binding to a target sequence. *Nucleic Acids Res* 36:2338–52. Doi:10.1093/nar/gkn068
58. Rovira E, Moreno B, Razquin N, Blázquez L, Hernández-Alcoceba R, Fortes P, Pastor F (2023) Engineering U1-Based Tetracycline-Inducible Riboswitches to Control Gene Expression in Mammals. *ACS Nano* 17:23331–46. Doi:10.1021/acsnano.3c01994
59. Alexander MR, Wheatley AK, Center RJ, Purcell DFJ (2010) Efficient transcription through an intron requires the binding of an Sm-type U1 snRNP with intact stem loop II to the splice donor. *Nucleic Acids Res* 38:3041–53. Doi:10.1093/nar/gkp1224
60. Kyriakopoulou C, Larsson P, Liu L, Schuster J, Söderbom F, Kirsebom LA, Virtanen A (2006) U1-like snRNAs lacking complementarity to canonical 5' splice sites. *RNA* 12:1603–11. Doi:10.1261/rna.26506

The role of the U1 snRNP complex in the regulation of gene expression: recent reports

Mikołaj Kiraga, Monika Zakrzewska-Płaczek✉

Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw

✉corresponding author: m.zakrzewska-p@uw.edu.pl

Keywords: U1 snRNP, transcription, mRNA splicing, spliceosome, gene expression regulation, telescripting

SUMMARY

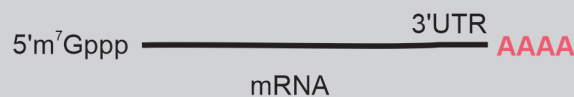
U1 snRNP (U1 small nuclear ribonucleoprotein) is a nuclear ribonucleoprotein complex involved mainly in pre-mRNA splicing, which is a key regulatory process in the eukaryotic gene expression pathway, but also in the process of preventing premature transcription termination (telescripting). U1 snRNP interacts directly with RNA polymerase II, thereby influencing the synthesis and maturation of transcripts in the cell nucleus, including the formation of the 3' end of mRNA and polyadenylation. At the level of cell physiology, it regulates the functioning of mitochondria and energy metabolism. The core of the U1 snRNP complex is U1 snRNA, encoded by many copies of genes that differ in sequence and expression level, and the expression of some of them leads to the formation of defective products. According to current reports, U1 snRNA can be used for therapeutic purposes to regulate gene expression and improve mRNA splicing defects, which are the cause of many diseases. Here we present selected recent discoveries and achievements related to U1 snRNP.

Rola kompleksu U1 snRNP w regulacji ekspresji genów

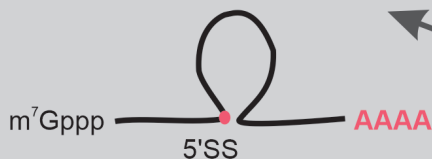
Transkrypcja: inicjacja i elongacja



Terminacja transkrypcji i poliadenylacja



Składanie pre-mRNA



U1 snRNP

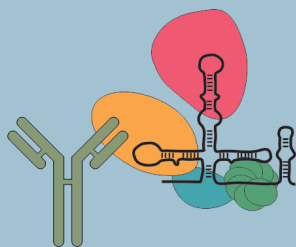
Metabolizm energetyczny

fosforylacja oksydacyjna

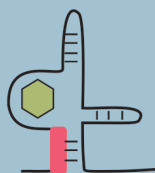


glikoliza

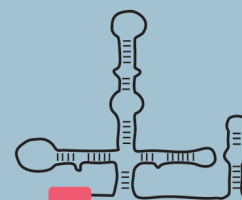
Potencjalne narzędzie w nauce i medycynie



przeciwciała diagnostyczne



ryboprzełączniki



terapeutyczny U1 snRNA