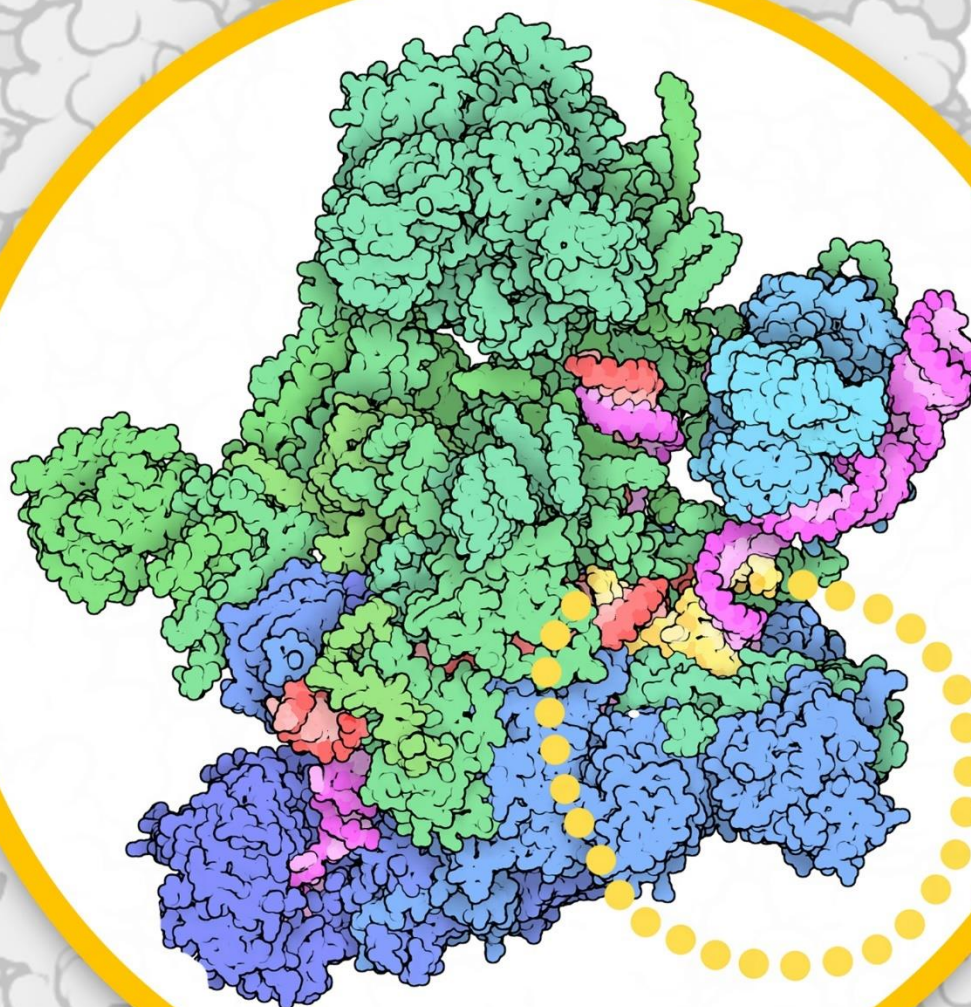


EL ESPLICEOSOMA

LA MAQUINARIA NECESARIA PARA LA VIDA

MARTÍN SOLA RAMÍREZ



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA



EL ESPLICEOSOMA: LA MAQUINARIA NECESARIA PARA LA VIDA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Revisión Bibliográfica

Autor: Martín Sola Ramírez

Tutor: Martiniano Santiago Pavón

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

Grado en Farmacia

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla



LISTADO DE ABREVIATURAS

- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **snRNPs:** Ribonucleoproteínas pequeñas celulares
- **5'SS:** Zona de splicing 5'
- **BPS:** Punto de ramificación
- **3'SS:** Zona de splicing 3'
- **ATP:** Adenosín trifosfato
- **ISL:** Curva interna
- **RES:** Complejo de retención y corte de pre-RNAm
- **ASO:** Oligonucleotido antisentido
- **VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular
- **BCLX:** gen del linfoma extragrande de la célula B
- **AME:** Atrofia muscular espinal
- **SMN:** Gen de supervivencia de las neuronas motoras
- **FDA:** Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos

RESUMEN

Para que el material genético de una célula pueda pasar de ADN a proteínas, primero debe darse la transcripción a ARN en el núcleo celular. El ARNm es la molécula que abandona el núcleo para poder ser traducida a proteína en el citoplasma. Sin embargo, este ARNm requiere de un procesamiento, ya que no todo el material genético transcrito es codificante. Por lo tanto, podemos decir que el material genético está compuesto por exones, zonas que sí codifican proteínas, e intrones, regiones que no tienen valor ninguno en la traducción. La maquinaria encargada de realizar ese procesamiento se conoce como espliceosoma y el procedimiento por el cual se cortan y eliminan los intrones y se empalman los exones recibe el nombre de splicing. El espliceosoma es un complejo formado por diferentes subunidades diferenciadas, con más de cien proteínas que participan en el proceso, ya sea de forma estructural o favoreciendo que se dé la reacción de transesterificación.

El splicing consta de una serie de etapas, entre las que se encuentra el ensamblaje de las subunidades (el espliceosoma se ensambla en el momento del splicing y luego se vuelve a disociar), la activación del complejo, la fase catalítica, en la cual se da la reacción química, y la disociación de los diferentes componentes, obteniéndose el ARNm ya preparado para la traducción.

El espliceosoma y, en particular, el splicing alternativo de intrones y exones, es uno de los elementos que se están estudiando actualmente para poder encontrar respuestas sobre los orígenes y desarrollo del cáncer y también como diana terapéutica para enfermedades degenerativas, como es el caso de la atrofia medular espinal.

Palabras clave: espliceosoma, splicing, ATPasa, splicing alternativo, atrofia medular espinal.

ABSTRACT

In order for the cell's genetic material to go from DNA to protein, it must first undergo transcription to RNA in the cell nucleus. mRNA is the molecule that leaves the nucleus to be translated into protein in the cytoplasm. However, this mRNA requires processing, since not all the transcribed genetic material codes for protein. Therefore, we can say that the genetic material is made up of exons, areas that do code for proteins, and introns, regions that have no value in translation.

The machinery in charge of carrying out this processing is known as the spliceosome, and the procedure by which introns are cut and removed and exons are spliced is called splicing. The spliceosome is a complex formed by different subunits and more than one hundred proteins participate in the process, either structurally or by favouring the transesterification reaction. Splicing consists of a methodical series of steps, including the assembly of the subunits (the spliceosome is assembled at the time of splicing and then dissociates again), the activation of the complex, the catalytic phase in which the chemical reaction occurs and the dissociation of the different components, obtaining a mRNA molecule ready to be translated.

The spliceosome and, particularly, the alternative splicing of introns and exons is one of the pathways that are currently being studied in order to find answers about the origins and the development of cancer and also as a therapeutic target for degenerative diseases, as is the case of spinal muscular atrophy.

Key words: spliceosome, splicing, ATPase, alternative splicing, spinal muscular atrophy.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Intrones y exones	4
1.2 ¿Qué es el espliceosoma?	6
2. OBJETIVOS	8
3. METODOLOGÍA	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1 Ensamblaje del espliceosoma	10
4.1.1 Formación del complejo E	10
4.1.2 Formación del complejo A	10
4.1.3 El complejo tri- snRNP	11
4.1.4 Unión de preespliceosoma y tri-snRNP y complejo pre-B	13
4.2 Activación del espliceosoma	14
4.2.1 El complejo B	14
4.2.2 El sitio activo del espliceosoma	15
4.2.3 La remodelación del espliceosoma para su activación	17
4.3 Catálisis	18
4.3.1 El primer paso en la catálisis	18
4.3.2 El segundo paso en la catálisis	20
4.4 Disociación del espliceosoma	22
4.4.1 Salida de los exones ligados	22
4.4.2 Disgregación de los componentes del espliceosoma	22
4.5 Splicing alternativo y cáncer	23
4.5 Nusinersén, una nueva esperanza	24
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Intrones y exones

El transcrito primario se puede definir como la molécula de ARN obtenida inmediatamente después de la transcripción. El transcrito primario del ARNm en una célula eucariota contiene la secuencia transcrita de un gen concreto, aunque es muy probable que las secuencias que codifican al producto génico funcional no sean contiguas (Nelson and Cox, 2017)). Estas zonas no codificantes del transcrito primario se denominan intrones y los segmentos codificantes se llaman exones (Nelson and Cox, 2017)

Los genes eucariotas son transcritos como precursores que requieren de un proceso de maduración antes de que puedan salir del núcleo hacia el citoplasma y, finalmente, ser traducidos a proteína. El procesado de esta molécula se conoce como “splicing”, fase en la que se cortan y eliminan los intrones y se acoplan los exones para formar un ARNm maduro y funcional (Bonnal et al., 2012).

Actualmente sabemos que existen cuatro clases de intrones. Los intrones pertenecientes a los grupos I y II son autocatalíticos, es decir, que tienen capacidad propia de corte y empalme. Este mecanismo no necesita un aporte energía, sino que el proceso de eliminación solo requiere de dos reacciones de transesterificación (Nelson and Cox, 2017).

Los intrones del grupo I se encuentran en genes nucleares, mitocondriales y de cloroplastos que codifican para ARNm, ARN ribosómico y ARN transferente (Lee et al., 2018). Este grupo de intrones requiere una guanosina, pero no como fuente de energía, sino para que se lleve a cabo la reacción. Esta reacción ocurre porque el grupo 3'-OH se utiliza como nucleófilo en el primer paso de la reacción de corte y empalme (Lee et al., 2018). Este grupo hidroxilo ataca al fosfato en el sitio 5' del intrón y, posteriormente, el grupo 3'-OH del exón que es desplazado en la reacción anterior, actúa como nucleófilo en el extremo 3' del intrón, dándose así el splicing completo y preciso (Figura 1) (Nelson and Cox, 2017).

En cambio, los intrones pertenecientes al grupo II se encuentran en transcritos primarios de ARNm de mitocondrias y de cloroplastos en hongos, plantas y algas.

Tanto los del grupo I como los del grupo II se pueden encontrar a su vez en los pocos genes bacterianos que presentan intrones (Pyle, 2016). Los intrones del grupo II tienen un mecanismo de acción similar a los del grupo I y se diferencian en que el grupo que actúa como nucleófilo, inicialmente, es el grupo 2'-OH de la adenina localizada dentro del propio intrón (Pyle, 2016). El grupo 2'-OH de una adenosina específica del intrón ataca al sitio de corte y empalme 5' para formar una estructura en lazo. La adenosina de la estructura en lazo contiene tres enlaces fosfodiéster y, finalmente, el 3'-OH del exón 5' actúa como nucleófilo, completando así la reacción (Figura 1) (Nelson and Cox, 2017).

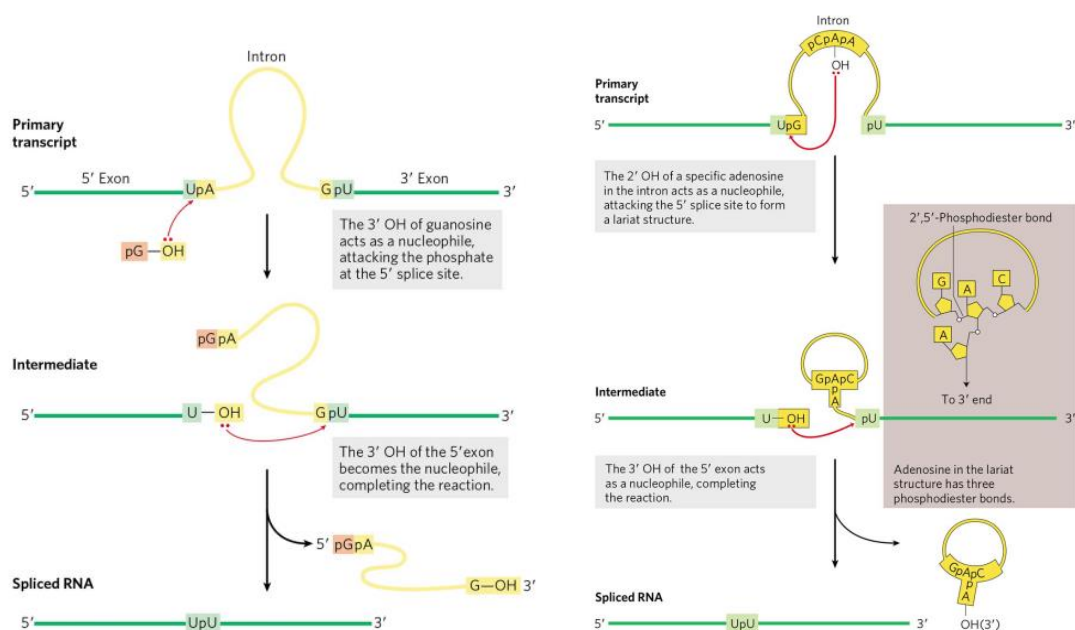


Figura 1. Mecanismos de splicing de los intrones tipo I y II (Nelson and Cox, 2017).

Hay otro tipo de intrones algo más desconocido, que se presenta solamente en ciertos ARNts y requiere, para su escisión, de una endonucleasa y de ATP. La endonucleasa corta los dos enlaces fosfodiéster finales del intrón y los dos exones restantes son ligados con un mecanismo similar al de la ADN ligasa (Nelson and Cox, 2017).

Sin embargo, el tipo de intrones que nos ocupa en este trabajo se encuentra en ARNm que codifica para proteínas y, aunque siguen un mecanismo con un cierto parecido al de los tipo II, requiere de una maquinaria celular muy específica. Todo el proceso de corte y empalme de estos intrones y exones ocurre dentro de una gran estructura

formada principalmente por ribonucleoproteínas (RNPs) llamada espliceosoma (Will and Lührmann, 2011).

En los seres humanos hay aproximadamente 20.000 genes que codifican para proteínas y, de media, suelen contener 8 intrones cada uno con una longitud de alrededor de 1 kb (Hong et al., 2006). Por todo ello, tanto la identificación y eliminación de las regiones no codificantes, como la identificación y empalme de los exones contenidos en los genes, suponen un gran desafío para la célula. A este reto se le debe añadir que aproximadamente el 95% de los genes humanos pueden sufrir splicing alternativo (Wilkinson et al., 2019). Por lo tanto, esto significa que de un solo gen se pueden traducir diferentes isoformas de una misma proteína, simplemente, incluyendo o eliminando ciertos exones, lo que amplía mucho el proteoma de los seres humanos.

1.2 ¿Qué es el espliceosoma?

El espliceosoma es una de las maquinarias celulares más complejas, compuesta por cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, o según sus siglas en inglés, snRNPs, que también se puede escribir como “snurps” (Bonnal et al., 2012). Sin embargo, en el núcleo del complejo espliceosomal actúan alrededor de 20 componentes diferentes, entre los que se encuentran las subunidades U1, U2, U5 y U4/U6, que son las “snurps” y las grandes protagonistas del proceso, y también numerosas proteínas no “snurps” como pueden ser las helicasas/ATPasas DExD/H-box y DEAH-box (Zhang et al., 2017). En total, contando todos los elementos implicados, la suma se eleva a más de 100 proteínas participantes en este proceso (Wilkinson et al., 2019).

Sin embargo, el espliceosoma no es una estructura que se encuentre de forma permanente en la célula (Wilkinson et al., 2019). De hecho, las subunidades que lo forman no se unen formando el complejo hasta que no llega la hora de efectuar el splicing al producirse la interacción de estas subunidades con el intrón, a lo que se suman varios otros factores de splicing (Will and Lührmann, 2011).

Para comprender cómo se unen las diferentes subunidades, primero debemos hablar sobre los puntos de reconocimiento que se conservan en los intrones. Serán estos

puntos los que van a ser reconocidos por las subunidades, componiendo así el complejo pre-esplíceosomal. Un intrón contiene tres elementos conservados, es decir, tres secuencias reconocibles: la zona 5'SS, la zona BPS y la zona 3'SS (Figura 2) (Wan et al., 2019b). Cada ciclo de la reacción de splicing requiere de un reconocimiento exhaustivo de alguna de estas tres secuencias por parte de los componentes del espliceosoma.

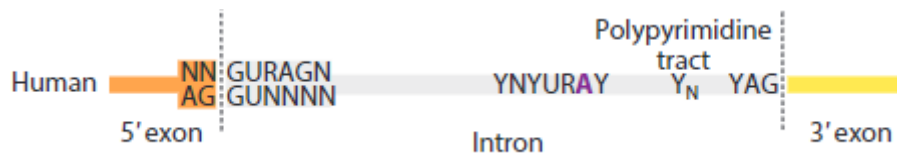


Figura 2. Representación de las tres secuencias conservadas de los intrones. De izquierda a derecha, 5'SS, BPS (representado por la A de color morado) y 3'SS (Wilkinson et al., 2019).

El papel del espliceosoma en el splicing es de vital importancia para la célula y, por extensión, para el organismo. Este proceso se puede separar en 4 pasos fundamentales, que a su vez se pueden subdividir en diferentes etapas: ensamblaje, activación, catálisis y desacoplamiento (Wan et al., 2019b). Dada su magnitud, el estudio de cada etapa cobra verdadera relevancia en diversas líneas de investigación actuales para comprender mejor el proceso e intentar aplicar estos conocimientos para la búsqueda de nuevas terapias contra algunas enfermedades en las que el espliceosoma se encuentra implicado.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en realizar una revisión bibliográfica que recopile la información disponible actualmente al respecto del espliceosoma y de varias enfermedades que tienen una relación directa con esta maquinaria celular. Para conseguir este objetivo, en este trabajo vamos a:

- Exponer las diferentes etapas por las que pasa el espliceosoma para poder realizar su función, desde el ensamblaje hasta su disociación, pasando por la activación y la etapa catalítica.
- Comentar en profundidad gran parte de las proteínas y otras enzimas asociadas a las distintas etapas del espliceosoma.
- Ofrecer una visión general sobre las consecuencias del splicing alternativo de genes en el caso concreto del cáncer.
- Abordar el caso del nusinersén y la atrofia muscular espinal como un ejemplo del papel que juega el splicing en la salud y la novedosa terapia para su tratamiento.

3. METODOLOGÍA

Para la confección de este Trabajo de Fin de Grado de carácter bibliográfico se ha realizado una búsqueda bibliográfica exhaustiva con el objetivo de recaudar la mayor cantidad de información posible.

En primer lugar, se buscaron revisiones de artículos en la página web de Annual Reviews of Biochemistry. A partir de, principalmente, dos revisiones se empezó a elaborar el trabajo, ya que, a partir de ellos, se recopilaron tanto numerosas fuentes bibliográficas como diferentes figuras y demás material complementario. También se utilizaron con frecuencia fuentes como libros y revistas especializadas en Bioquímica.

Los nuevos artículos bibliográficos fueron buscados en diferentes bases de datos, entre ellas: PubMed, Medline, Scopus y Annual Reviews. Para ello, en un primer momento se usaron como palabras clave “spliceosome”, “splicing” y los nombres de las diferentes subunidades y complejos como “U1”, “U5” o “B complex”. A partir de estos artículos se realizó una búsqueda más en profundidad sobre algunas de las diferentes proteínas y enzimas importantes, como pueden ser “Prp8” o “Prp16”.

Por último, para la elaboración de la parte final de las discusiones, dónde se trata el tema de las enfermedades relacionadas, se realizó una búsqueda de diferentes términos como “diseases” o “treatment” seguido de la palabra clave “spliceosome”. También fueron clave las palabras “nusinersen”, “antisense oligonucleotides” y “spinal muscular atrophy”.

Todos los artículos referenciados fueron almacenados en la herramienta Mendeley, para facilitar su inclusión en el trabajo por medio de las citas. Todo esto se pudo realizar gracias a los convenios de la Universidad de Sevilla, que permitían la consulta y descarga de los artículos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensamblaje del espliceosoma

En esta etapa es esencial el reconocimiento de la secuencia 5'SS y de la secuencia BPS. En eucariotas, este punto se considera el determinante para la selección del sitio de corte durante el splicing alternativo (Ule and Blencowe, 2019).

4.1.1 Formación del complejo E

Todo comienza con la unión de la snurp U1 a la secuencia 5'SS del intrón mediante apareamiento de bases entre la zona 5'SS y el extremo 5' de la subunidad U1 del espliceosoma (Plaschka et al., 2018). Esta interacción está estabilizada por la presencia de unas proteínas específicas que se encuentran dentro de U1. Estas proteínas son el llamado anillo Sm, U1-70k, U1A y U1C y es, precisamente, esta última la que contiene un dominio de dedos de zinc, que estabiliza el doblete 5'SS (Muto et al., 2004). Al mismo tiempo, la BPS es reconocida por la proteína SF1, a la que también se une el dímero U2AF65-U2AF35 que, a su vez, reconoce el extremo 3'SS del intrón (Kent et al., 2005).

4.1.2 Formación del complejo A

Posteriormente, la helicasa Prp5 recluta a la snurp U2 para unirse a la zona BPS, desplazando de esta forma a SF1 y U2AF, formándose de esta forma el complejo A, también conocido como preespliceosoma (Liang and Cheng, 2015). La subunidad U2 tiene una estructura bilobulada. El subcomplejo SF3b se localiza en el extremo 5' de la subunidad, posicionándose cerca del punto BPS del intrón que va a ser eliminado. En el otro extremo, el 3', se agrupan una serie de subcomplejos como las proteínas Sm y U2A'-U2B'. Ambos extremos están conectados por un puente llamado SF3a (Wilkinson et al., 2019) La unión de U2 provoca que una adenosina del BPS sea reconocida y encapsulada por parte de SF3b, formando una hélice que protege el 2'OH de este nucleótido, que actuará como nucleófilo en la primera reacción necesaria para la eliminación del intrón. Por ello, la eliminación posterior de SF3b es un requisito indispensable para que ocurra el procesamiento del ARNm (Plaschka et al., 2017).

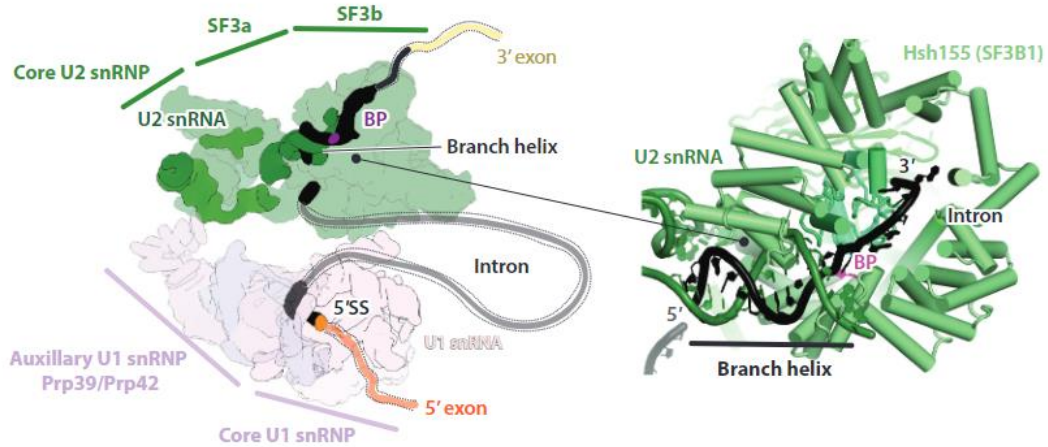


Figura 3. Unión de U2 a la región BPS y formación del complejo A (Wilkinson et al., 2019)

4.1.3 El complejo tri- snRNP

Las subunidades U4, U5 y U6 no se unen una tras otra al complejo A, como si vimos que era el caso de las subunidades U1 y U2. Por el contrario, estas tres subunidades se unen entre sí, formando el complejo preespliceosomal más grande de todos, conocido como complejo tri-snRNP, ya que alberga tres ribonucleoproteínas pequeñas nucleares. Sin embargo, el tri-snRNP no sólo consiste en el agregado de éstas, sino que también forman parte de él unas treinta proteínas, entre ellas, algunas que jugarán un papel crucial, como son Prp8, Brr2 o Snu114 (Nguyen et al., 2015).

En este complejo tri-snRNP, la subunidad U4 se encuentra muy unida a la subunidad U6, actuando la primera como una especie de chaperona de la segunda, para que la subunidad U6 mantenga su forma precatalítica (Will and Lührmann, 2011).

En la subunidad U5 hay una zona que tiene una gran relevancia, llamada loop 1. Esta estructura permite la unión del 5'SS durante la catálisis y también se encarga de alinear 5'SS y 3'SS durante la unión de los exones (Kastner et al., 2019). Tanto las proteínas como las subunidades que forman el tri-snRNP se encuentran reunidas dentro de un exoesqueleto que impide cambios de conformación y estructurales antes de que se una el ARNm que va a ser procesado.

Algunas de estas proteínas permanecerán, mientras que otras se van separando del conglomerado una vez hacen su función (Kastner et al., 2019).

Prp8 es el factor de splicing más grande que se encuentra en el espliceosoma, ocupando una posición central entre la estructura que fue el preespliceosoma y la del tri-snRNP (Grainger and Beggs, 2005). La proteína Prp8 contiene cuatro dominios: el amino-terminal, el grande, el RNaseH y el Jab1, que actúan como puntos de unión para otros factores de splicing. La función de Prp8 no es otra que la de mantener la funcionalidad estructural del espliceosoma y, a la vez, acomoda el ARN activado en su dominio grande después de la activación del espliceosoma, gracias a que guarda cierto parentesco con los intrones de tipo II que vimos anteriormente (Wilkinson et al., 2019).

Morfológicamente, podría decirse que el tri-snRNP tiene tres lóbulos, siendo uno de ellos el conocido como dominio pie (foot domain). Este dominio pie está conformado por el dominio amino-terminal de Prp8 y por parte de U5, asociándose esta proteína al anillo Sm de esta subunidad y a Snu114, que es una GTPasa (Green et al., 2019). El loop 1 de la U1 se encuentra acomodado dentro del dominio amino-Terminal de Prp8 y el dominio grande se sitúa en el centro del complejo tri-snRNP. El dominio RNaseH, que se sitúa en el extremo C-terminal del dominio grande, es muy móvil y su conformación variará dependiendo de los demás elementos que se unan y de las etapas del proceso de splicing (Grainger and Beggs, 2005).

Por último, Jab1 une con fuerza a Brr2, una estructura formada por dos helicasas, siendo sólo la terminal catalíticamente activa, que es responsable de la activación del espliceosoma. U6 será la subunidad que formará la zona donde se unirán los iones metálicos que darán lugar a la catálisis de la reacción, pero, de momento, aún se encuentra tapada por la subunidad U4. A través del dominio grande y el dominio RNaseH, se conectan las tres subunidades del tri-snRNP, lo que se conoce como complejo U4/U6·U5 (Green et al., 2019).

Por último, es muy importante la caja ACAGAGA de U6. Se encarga de recibir 5'SS de la U1 y luego lo emplaza exactamente en el lugar donde se encuentran los iones metálicos que producen la catálisis, exactamente en la zona M1 (Will and Lührmann, 2011).

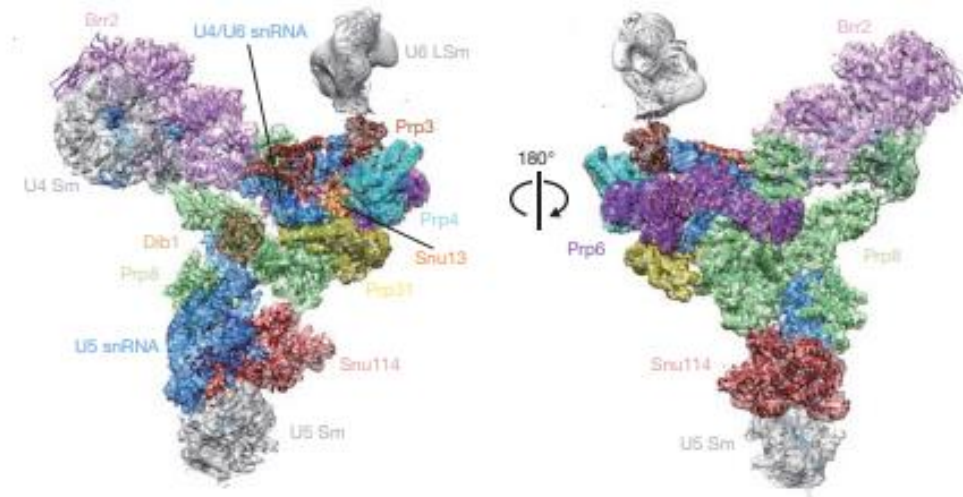


Figura 4. Visión detallada del complejo tri-snRNP y detalle de las diferentes regiones y componentes proteicos (Nguyen et al., 2015).

4.1.4 Unión de preespliceosoma y tri-snRNP y complejo pre-B

La unión del preespliceosoma con el tri-snRNP provoca lo que se conoce como complejo pre-B y ya, por fin, podemos hablar de espliceosoma propiamente dicho. La unión de estas dos estructuras no provoca demasiados cambios en la estructura individual de cada uno de los componentes (Bai et al., 2018).

Cuando se une U2 a la zona BPS en la formación del preespliceosoma, se libera el extremo 5' terminal de U2, lo que permite la unión específica de U2 con U6, que también tiene una región 5' libre (Hausner et al., 1990). Además, la extensión C-terminal del componente SF3A de U2 interactúa con U4/U6, favoreciendo la unión entre componentes.

Al reunir todo el complejo pre-B se ha conseguido aunar, en un solo complejo, todos los elementos necesarios para pasar de la fase de ensamblaje a la de activación del espliceosoma (Figura 5). Sin embargo, hemos de recordar que la subunidad U6 aún tiene la chaperona formada por U4 y que la subunidad U1 sigue unida al punto 5'SS del intrón (Wilkinson et al., 2019).

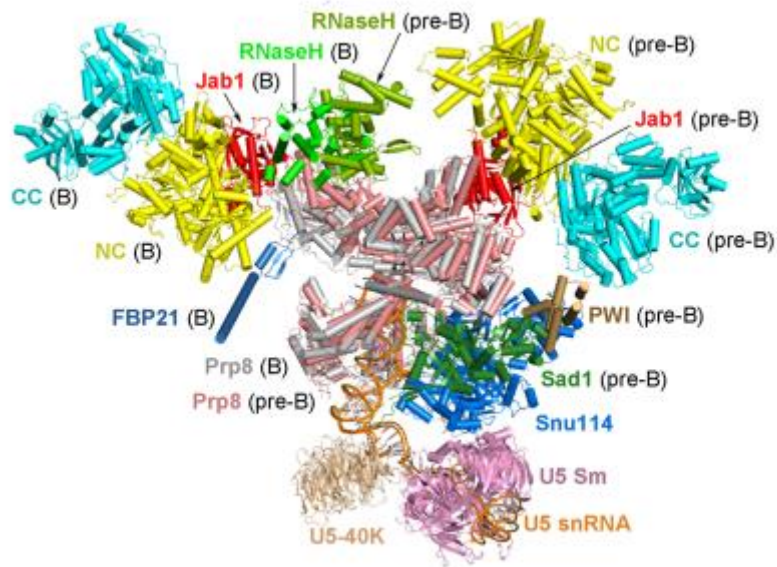


Figura 5. Estructura 3D del complejo pre-B una vez se han unido el preespliceosoma y el complejo tri-snRNP con detalle a las diferentes regiones y proteínas que lo forman (Zhan et al., 2018).

4.2 Activación del espliceosoma

4.2.1 El complejo B

Prp28 es el iniciador de todo el proceso de activación. Su presencia rompe el enlace entre U1 y la zona 5'SS, facilitando que esta zona del intrón entre en contacto con U5 y U6. Prp28 se une de forma estable en el dominio amino-terminal de lo que conocimos como dominio pie del tri-snRNP, posicionando su dominio catalítico conocido como RecA de forma adyacente a la caja ACAGAGA de U6 y al loop 1 de U5 (Wilkinson et al., 2019). Será el loop 1 de U5 quién se aparee con los nucleótidos 5' terminales del intrón, pero como esta zona no está altamente conservada, parece ser que hay consenso sobre que este loop 1 puede ser algo promiscua, es decir, que puede aparearse con diferentes nucleótidos. Por ello, de momento, esta zona se encuentra bloqueada por un péptido de Prp28 que mimetiza la región 5' terminal del intrón, protegiendo y evitando que el loop 1 se una inespecíficamente a ARNs aleatorios (Nancollis et al., 2013).

RecA consume ATP para acercarse a 5'SS y acaba rompiendo el enlace de éste con U1, lo que aprovecha la caja ACAGAGA para unirse a ello. Todo esto provoca un cambio de configuración importante en el espliceosoma. El dominio RNaseH de Prp8 rota sobre sí mismo 180° y Brr2 se libera pudiendo atacar la zona de U4, permitiendo la rotura de su enlace con U6, formando la zona activa del espliceosoma. La transferencia de 5'SS a U6 va acompañada de la salida de Prp28 y de U1 y también de la entrada de diferentes proteínas que estabilizan el proceso (Zhan et al., 2018).

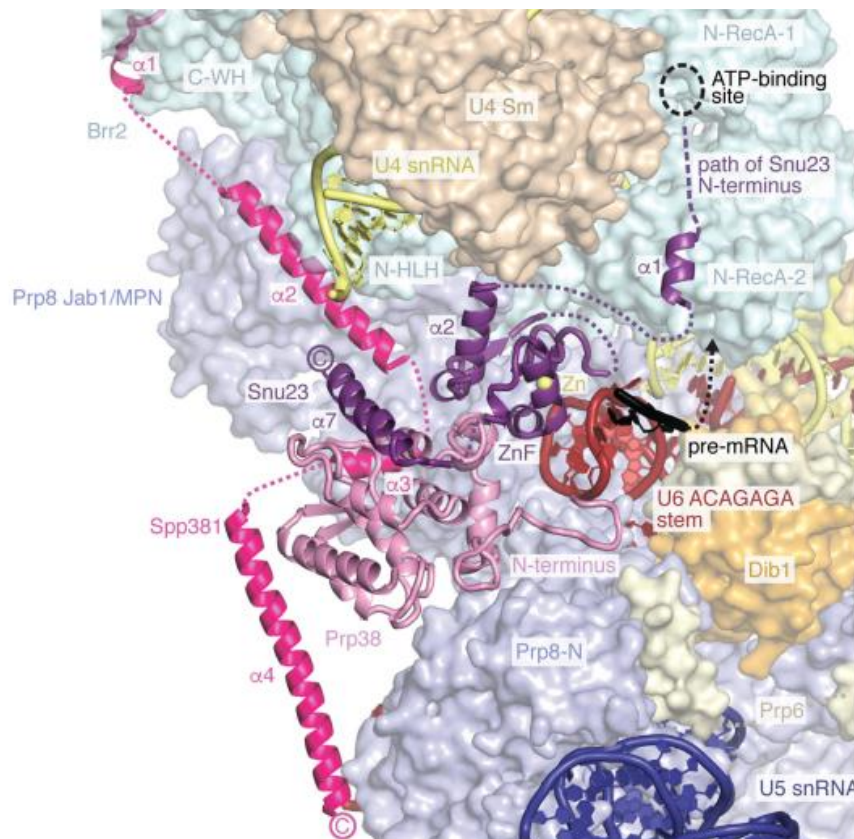


Figura 6. Imagen que muestra las diferentes regiones y proteínas que intervienen en este proceso, a destacar, RecA (la zona donde se une el ATP se encuentra señalada) y la región ACAGAGA (Plaschka et al., 2017).

4.2.2 El sitio activo del espliceosoma

Gracias a Brr2, la U4 se separa de U6, dejándola libre para interactuar con U2 y dar lugar a la llamada hélice II, una zona donde el ARN de ambas subunidades se encuentran emparejados. También se forman las hélices Ia y Ib entre ambas

subunidades, que son adyacentes a un dominio conocido ISL (Mefford and Staley, 2009).

Posteriormente, un triplete formado por una zona específica de U6 (en levaduras se denomina U80) (Rauhut et al., 2016), que se encuentra englobada dentro de ISL, y la hélice Ib acerca dos fosfatos provenientes de ISL a dos fosfatos provenientes de la hélice Ib. Dentro de estos cuatro fosfatos encontramos cinco átomos de oxígeno que van a coordinarse con los dos iones metálicos catalíticos que, a su vez, activarán a los nucleófilos y estabilizarán a los grupos salientes durante las dos reacciones de transesterificación (Butcher, 2011). El tercer miembro de este triplete será la hélice la (Figura 7).

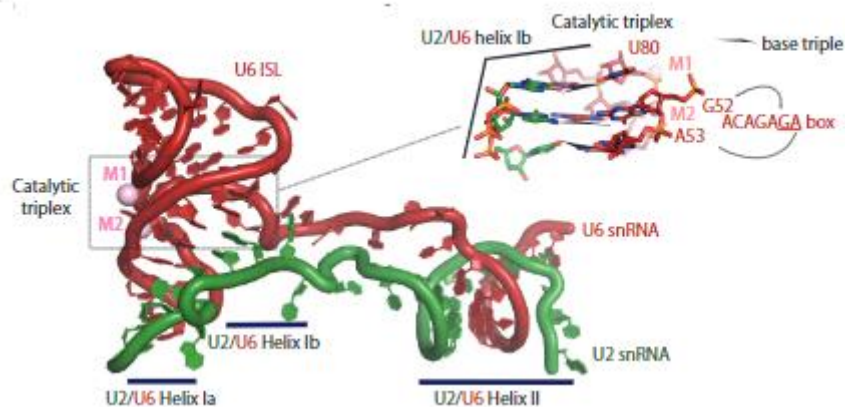


Figura 7. El sitio activo del espliceosoma con detalle del triplete catalítico (Wilkinson et al., 2019).

Debido al acercamiento de U2 y U6, zonas como la región ACAGAGA de U6 son capaces de colocar la zona 5'SS en el lugar de catálisis por medio de los iones metálicos y U2 se empareja con la zona BPS del intrón (Hausner et al., 1990).

Para acabar de dar forma al sitio activo del espliceosoma, el loop 1 de la subunidad U5 se une al extremo 5' del intrón, inmediatamente después de la región 5'SS. Esta unión se mantendrá de forma estable durante prácticamente todo el proceso, fijando el extremo 5' del intrón. De esta forma, ya se ha formado el sitio catalítico del espliceosoma, que también se mantendrá durante los pasos siguientes (Nancollis et al., 2013).

Es de destacar también el papel de las proteínas NTC y NTR , que forman una estructura externa que comprende a las subunidades U2 y U5 que, a su vez, estabilizan el núcleo catalítico del espliceosoma (Ohi et al., 2005). Las proteínas NTR (Cwc2, Ecm2, Bud31, Cwc15, Prp45, Prp46...) forman, tanto una unidad que se adhiere al extremo 5' de U6 cuando sale del sitio activo del espliceosoma, como una serie de hélices y curvaturas próximas a este sitio activo. Por el contrario, las proteínas NTC (Prp19, Cef1, Clf1, Syf1, Syf2, Ntc20 Snt309...) se posicionan de forma opuesta al dominio grande de Prp8 en el sitio activo, fijando las subunidades U2 y U5 y formando arcos y hélices que terminan de dar forma al sitio catalítico del espliceosoma (Chan et al., 2003).

4.2.3 La remodelación del espliceosoma para su activación

En la situación actual, el espliceosoma se encuentra ya formado y el sitio activo listo para empezar a actuar. Sin embargo, aún se encuentra inhibido y no puede ejercer su función. Aunque la región 5'SS se encuentra ya en el sitio catalítico, el 2'OH de la región BPS, que es el que actuará como nucleófilo en la reacción de empalme, se encuentra alejado de este lugar, ya que está encapsulado por SF3B1 (Haselbach et al., 2018). Además, 5'SS se encuentra, a su vez, protegido por la proteína SF3A2 y la proteína específica Cwc24 que lo comprime por medio de unos dominios de dedos de zinc (Wu et al., 2017). Por lo tanto, las dos piezas claves para que se inicie la reacción no se encuentran disponibles para poder encontrarse libremente en el espacio catalítico que ya ha formado el espliceosoma. Toda esta conformación que podemos llamar 'inhibida' viene estabilizada por la presencia de Brr2, que se conecta con SF3b e impide su movimiento. A SF3b también lo retiene el conocido como RES (Bao et al., 2017), que ancla SF3b al dominio grande de Prp8.

Para poder desinhibir al espliceosoma, que en estos momentos se encuentra en su fase de complejo B act, es preciso que los enlaces que comentamos anteriormente se rompan. Para ello, actúa la Prp2, la primera de las cuatro ATPasas que van a actuar en el entorno del espliceosoma (Bai et al., 2021).

Estas ATPasas tienen dos dominios RecA, que van a actuar como helicasas, y un dominio C terminal, que va a asegurar el anclaje de estas proteínas al ARN que conforma el espliceosoma. Aún no se conoce con exactitud cómo actúan, pero se sospecha que puede forzar la liberación de la adenosina de BPS tirando del ARNm que va a ser procesado, moviendo así los enlaces con SF3b (Figura 8) (Bai et al., 2021).

Por acción de Prp2 todos los complejos relacionados con U2, como son SF3a y SF3b, se liberan del espliceosoma, quedando unido sólo el núcleo de U2. Es muy probable que esta ATPasa sea la encargada de la disociación del complejo RES y, a su vez, una vez ha roto todos los enlaces, se separa del espliceosoma (Bai et al., 2021).

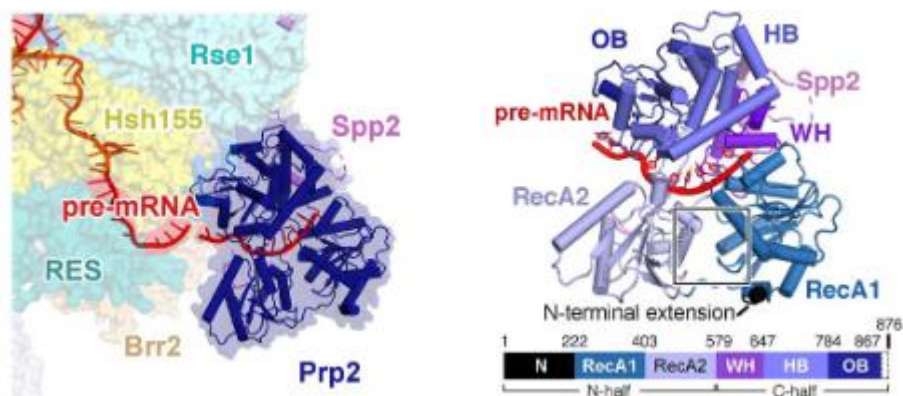


Figura 8. Estructura de la ATPasa/helicasa Prp2 en el complejo B act y visión de su interacción con el resto de componentes (Bai et al., 2021).

4.3 Catálisis

4.3.1 El primer paso en la catálisis

El resultado de la acción de Prp2 y la liberación de las piezas que serán clave en la catálisis deja al espliceosoma en su estado B*, en el que está todo listo para el primer paso de la reacción. En realidad, este momento está a caballo entre dos fases, la fase de activación y la fase catalítica, por lo que se habla casi indistintamente entre complejo B* y complejo C. La diferencia entre ambos complejos es mínima y radica solamente en si el grupo fosfato del primer nucleótido del intrón se encuentra unido al grupo 3'OH del exón localizado en 5', como ocurre en el complejo B*, o si se encuentra

unido al 2'OH de la región BPS, cuando hablaríamos de complejo C (Wilkinson et al., 2019).

Para que el espliceosoma pase de un complejo al siguiente, es necesaria la acción de los llamados factores de empalme (Yju2, Cwc25 e Isy1), que son unos componentes de las proteínas NTC (Wan et al., 2019a). En la ausencia de éstos, la hélice de empalme es demasiado móvil y no logra colocar la adenosina en el lugar adecuado.

Yju2, con la ayuda de Isy1, se coloca alrededor de la hélice y la empuja hacia el estrecho espacio catalítico, pero aun así no es suficiente, porque todavía se encuentra alejado unos pocos Å del lugar catalítico. Es por ello que la presencia de Cwc25 es indispensable, ya que rigidifica la estructura y provoca que se encuentre en el lugar adecuado para que se dé la reacción de transesterificación (Figura 9) (Chiu et al., 2009).

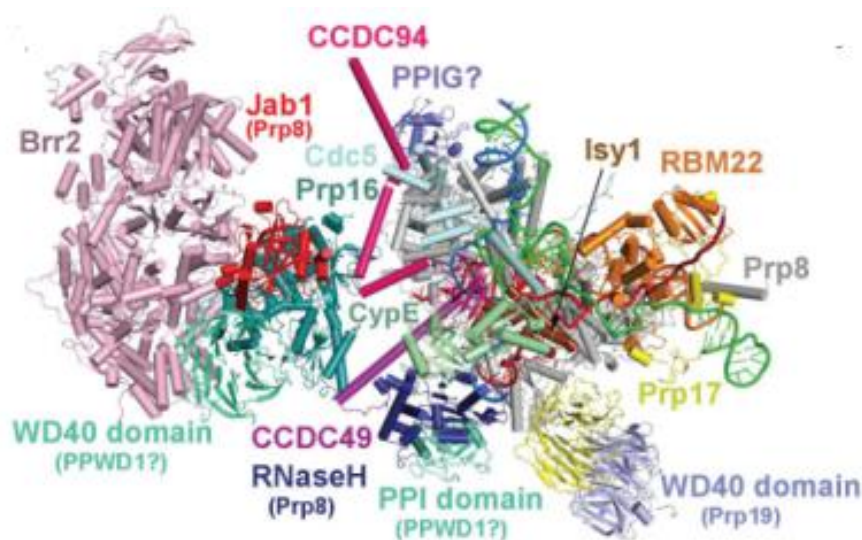


Figura 9. Visión general de los diferentes componentes que rodean el sitio catalítico, entre los que se encuentran los factores de empalme (Zhan et al., 2018)

Como resultado, se produce la primera reacción: se rompe la conexión entre el intrón y el exón por la zona de 5'SS, dándose una reacción de transesterificación 2'-5' entre la región 5'SS y la región BPS (Figura 10) (Zhan et al., 2018).

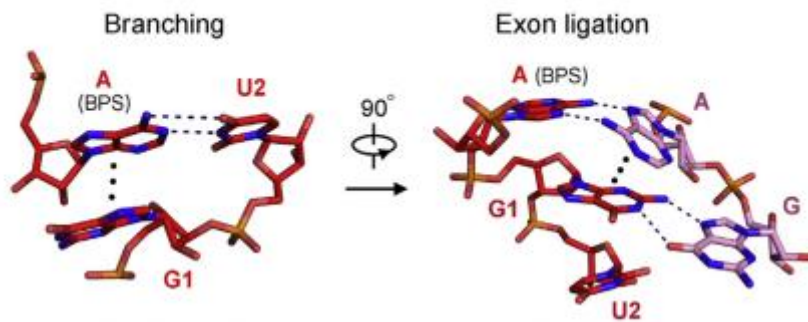


Figura 10. Primera reacción catalítica en la cual se rompe la conexión entre el intrón y el exón por la zona de 5'SS, dándose una reacción de transesterificación 2'-5' entre la región 5'SS y la región BPS (Wan et al., 2019).

4.3.2 El segundo paso en la catálisis

El segundo paso de la catálisis se realizará en el mismo sitio activo en el que se aconteció el primero. Sin embargo, para que este segundo paso pueda ocurrir, es necesario que los elementos que ahora se encuentran aquí presentes sean desplazados del sitio catalítico para que puedan entrar los siguientes. Es en este momento en el que entra en juego la segunda ATPasa que actúa como helicasa, Prp16 (Tseng et al., 2011).

El rol que juega la helicasa Prp16 es clave para que la reacción pueda seguir adelante. Actúa uniéndose al intrón y tirando de la región 3'SS, lo cual provoca que los factores que mediaban en el primer paso de la catálisis salgan del espliceosoma. Esta salida de factores, cuya función era estabilizar, provocan que la hélice de empalme se desacople y cambie de conformación, a lo que ahora llamaremos complejo C* (Semlow et al., 2016).

En el sitio catalítico, ahora vacío, se introduce la región 3'SS del intrón y se estabiliza con la ayuda de Prp18 y Slu7. En esta región están muy conservados dos nucleótidos, una adenina y una guanina. La adenina va a unirse a una adenosina de BPS y la guanina va a unirse a otra guanina de 5'SS, formando una estructura característica en el intrón conocida como lazo (Wan et al., 2017). Por otro lado, los dos exones entre los que se

encontraba el intrón están finalmente ligados entre sí, dando continuidad a la cadena de ARN con valor real para la traducción.

Es interesante hablar del papel de Prp18 y Slu7. Prp18 se une a Prp8 específicamente por la región RNaseH y, debida su forma con muchos bucles y hélices, podemos decir que sujeta la región 3'SS en el sitio catalítico. Prp18 y Slu7 están coordinados entre sí y los también numerosos bucles de Slu7 sirven como el lugar donde se va a adentrar y quedar fijada la región 3'SS después de la remodelación que provoca Prp16 en el espliceosoma (Fica et al., 2017).

Una vez se ha producido la segunda reacción, tenemos lo que se conoce como complejo P del espliceosoma. Como hemos visto, del complejo B* al C y del C* al P no hay apenas diferencia, sólo que se ha producido la reacción de transesterificación. En estos momentos, el intrón se encuentra cortado completamente y con forma de lazo, separado del exón, aunque aún no ha salido del espliceosoma (Figura 11) (Liu et al., 2017).

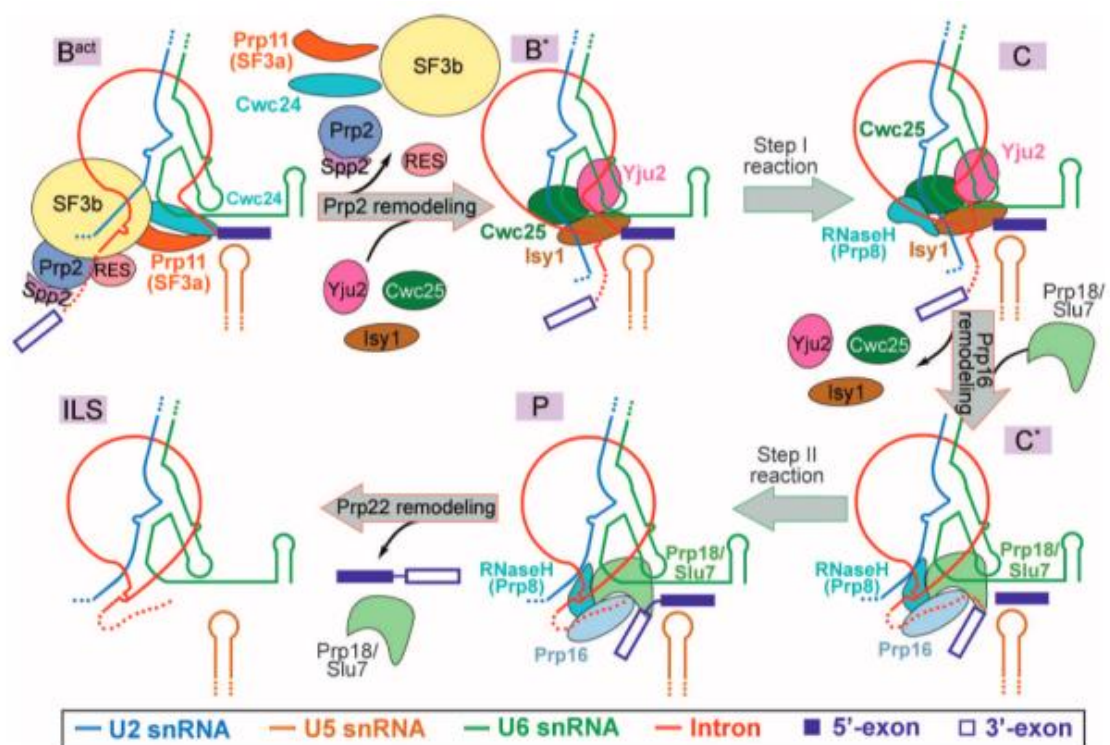


Figura 11. Modelo del proceso de splicing. En la imagen se engloba desde el complejo B hasta el complejo P y la posterior salida de ILS (Yan et al., 2017).

4.4 Disociación del espliceosoma

4.4.1 Salida de los exones ligados

Como hemos comentado anteriormente, en este preciso instante tenemos los exones unidos entre sí y al intrón formando una estructura de lazo, unido consigo mismo. El siguiente paso, para que la traducción del ARNm en proteína pueda seguir su curso, será la salida del complejo P del espliceosoma por parte de los exones ligados.

Será en este momento en el que entre en juego la penúltima de las helicasas, Prp22. Prp22 consume ATP y se transloca a través de la cadena de ARNm, desplazando así a los factores de splicing que se encontraban unidos, como son Slu7 y Prp18 (Schwer, 2008).

De esta manera, el ARNm ya procesado y libre de intrones puede salir del espliceosoma, al no encontrar ninguna estructura externa que lo mantenga dentro de éste. El ARNm ahora sí se encuentra listo para salir del núcleo de la célula y entrar en el citosol, dónde será traducido hasta proteína.

4.4.2 Disgregación de los componentes del espliceosoma

Una vez ha salido del espliceosoma el ARNm, sólo quedan los diferentes componentes que lo formaban y la estructura de lazo en la que se ha convertido el intrón tras las reacciones ocurridas en la fase catalítica. A la suma de estos dos elementos se le conoce como ILS (Fica et al., 2019). El objetivo de la disociación del espliceosoma es el reciclaje de las diferentes proteínas y subunidades para las siguientes rondas de splicing y la degradación final del intrón.

Este proceso está mediado por la última de las helicasas que vamos a ver, Prp43. Para que actúe la helicasa, en primer lugar, se debe unir al complejo Ntr1, que no debemos confundir con las proteínas NTR que vimos anteriormente (Tanaka et al., 2007). Ntr1 une a Prp43 por su dominio amino-terminal y promueve su actividad como helicasa, provocando el desmembramiento del espliceosoma en U6, U2, U5 y de las diferentes proteínas individuales pertenecientes al complejo NTC (Tanaka et al., 2007).

Aunque no se conoce con exactitud qué es lo que provoca la unión de Ntr1 y Prp43 para la disociación del espliceosoma, sí que parece ser que está relacionado con la unión de esta última proteína a la subunidad U6 del espliceosoma (Toroney et al., 2019). Lo que sí se sabe es que este mecanismo está muy controlado para evitar uniones tempranas que pudieran interferir con el proceso de splicing.

Hasta aquí ha llegado el proceso de splicing mediado por el espliceosoma, una función de vital importancia para el correcto funcionamiento de la maquinaria vital, ya que se produce el ARNm que codificará a proteínas. Sin embargo, no siempre resulta todo bien. En ocasiones ocurren fallos, lo que puede dar lugar a diferentes patologías y enfermedades, algunas de las cuales veremos brevemente a continuación.

4.5 Splicing alternativo y cáncer

El splicing alternativo del ARNm es importante para el desarrollo normal de las células y su diferenciación, porque permite la producción de diferentes isoformas de una misma proteína y que esas isoformas se encuentren preferentemente en un tejido o en otro. Sin embargo, alteraciones en los patrones de splicing a menudo causan enfermedades, incluido el cáncer (Kalsotra and Cooper, 2011). Esta desregulación contribuye a varios aspectos importantes relacionados con la progresión del cáncer, incluyendo el control de la proliferación y la muerte celular programada, el metabolismo de la célula cancerígena, la angiogénesis y la metástasis (Bonnal et al., 2012)

Un ejemplo de esto lo podemos encontrar en el gen BCLX (también conocido como BCL2L1). Sitios de corte alternativos en la región 5' del gen determinan la producción de ARNm que pueden codificar para proteínas que se asocian a la membrana de la mitocondria y provocan la apoptosis, o para una isoforma de un tamaño mucho mayor que promueve la supervivencia de la célula (Coomer et al., 2019)

A su vez, de la misma forma se ve implicado VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular). Splicing alternativos en la región 3' del ARNm que debe ser procesado van a dar lugar a factores de crecimiento que van a facilitar o a inhibir la formación de vasos

sanguíneos, lo que es de vital importancia para el crecimiento de los tejidos cancerígenos (Harper and Bates, 2008).

Sin embargo, en la gran mayoría de casos el patrón que se repite es el de la delección o adición de exones propios del ARNm. El splicing alternativo del exón 6 del receptor FAS (también conocido como CD95) lleva al ARNm a codificar para una isoforma estable que se une a la membrana y transmite señales pro-apoptóticas o a una isoforma del receptor soluble en el citosol, lo que previene la muerte celular (Cheng et al., 1994).

Debido a la importancia del splicing en estas patologías, es por lo que se han intentado desarrollar numerosas terapias para evitar que ocurran estas reacciones. Se conocía que los productos de fermentación de algunas cepas de *Pseudomonas* spp. y de *Streptomyces* spp. poseen un efecto citotóxico en líneas de cultivos celulares, provocando la parada del ciclo celular en la fase G1 y G2/M (Bonnal et al., 2012).

Diferentes estudios han dilucidado cómo actúan estos productos de fermentación y todo apunta a que interactúan con el U2 del espliceosoma, alterando, de esta forma, el sitio de splicing en la región 3' del intrón (Corrionero et al., 2011). Se unen con fuerza a la región SF3B, desestabilizando U2 e impidiendo que se continúe con la cascada de reacciones para el ensamblaje del espliceosoma. Aunque se permite la interacción de pares de bases entre los componentes de U2 y el pre-ARNm, en presencia de estos compuestos se produce una desestabilización de SF3B1 y, por lo tanto, que el ARN no pueda ser procesado (Roybal and Jurica, 2010).

Sin embargo, el mejor ejemplo de terapia enfocada a la utilidad que ofrece la modulación del splicing del ARNm se encuentra en los oligonucleótidos antisentido y su uso en la atrofia muscular espinal.

4.5 Nusinersén, una nueva esperanza

Los oligonucleótidos antisentido (ASOs) son oligonucleótidos sintéticos que generalmente tienen un tamaño de entre 12 y 30 nucleótidos de longitud y son diseñados, específicamente, para unirse al ARN por medio de la complementariedad de bases de Watson y Crick. Tras unirse al ARN, los ASOs tienen la capacidad de modular la función de dicha cadena por medio de diferentes mecanismos (Crooke et

al., 2018). Los ASOs pueden ser diseñados para modular el procesado del ARNm, es decir, para modular el splicing, lo que supone una terapia muy interesante para ciertas enfermedades, como es el caso de la atrofia muscular espinal (AME) (Kole et al., 2012).

La AME es una enfermedad neuromuscular autosómica recesiva muy rara causada por deleciones o mutaciones puntuales en el gen telomérico SMN1. La enfermedad presenta un espectro variado de fenotipos, siendo la más severa la AME de tipo I. Los enfermos que sufren este fenotipo de la enfermedad presentan debilidad muscular generalizada e hipotonía muscular durante su breve periodo de vida. Estos niños ni siquiera pueden mantenerse sentados por sí mismos y, sin apoyo respiratorio o suministro de comida, mueren a los dos años de vida (Bennett et al., 2019).

En la AME de tipo II, los niños son capaces de sentarse e incluso mantenerse erguidos por sí mismos, pero les resulta imposible andar sin ayuda y su esperanza de vida es reducida, aunque suelen llegar a adultos. En el caso de la tipo III, los pacientes poseen la capacidad de sentarse, estar erguidos, andar sin ayuda y tienen una esperanza de vida normal. Sin embargo, a medida que envejecen la enfermedad da la cara y pierden función muscular, convirtiéndose en usuarios de sillas de ruedas. Por último, la tipo IV es la llamada AME adulta, en la que los pacientes tienen una vida normal, pero desarrollan debilidad muscular con la edad avanzada (Kolb and Kissel, 2015).

La región del cromosoma donde se encuentra SMN1 sufrió duplicación en la evolución de los primates, resultando en el gen SMN2, prácticamente idéntico a SMN1. La diferencia entre ambos radica en una región de 5 a 13 nucleótidos, en la que se produce una transición de citosina a timina en el exón 7 de SMN2. Este cambio es de gran importancia, porque resulta en el salto de este exón en la gran mayoría de transcritos de SMN2 (Butchbach, 2021).

Como estos genes se encuentran en la región del telómero, una región muy variable, hay variedad en el número de copias que presenta cada individuo. No obstante, se conoce que los pacientes con la AME de tipo I típicamente presentan dos copias del gen SMN2, los pacientes con la enfermedad de tipo II tienen tres copias y los que presentan la tipo III poseen cuatro copias (Wirth et al., 2013). Esto es muy significativo, ya que dio lugar a la idea de que el número de copias de SMN2 modifica la gravedad

de esta enfermedad, pasando de una muerte muy prematura en la tipo I a una vida prácticamente normal hasta la vejez en la tipo III (Prior et al., 2009).

Con todos estos datos se desarrolló el nusinersén, un ASO diseñado para incrementar la expresión de SMN modulando el splicing del precursor del ARNm que cofidica para SMN2 (Prior et al., 2009). Nusinersén tiene como diana el exón 7, aproximadamente, a unos diez nucleótidos de la región 5'SS (Figura 12). En modelos de ratones transgénicos con el gen SMN2 humano, se demostró una inclusión dependiente de la dosis del exón en los tejidos periféricos, cuando se administró de forma sistémica, y una inclusión del mismo exón en los tejidos del sistema nervioso central cuando se inyectó en el líquido cefalorraquídeo (Hua et al., 2015).

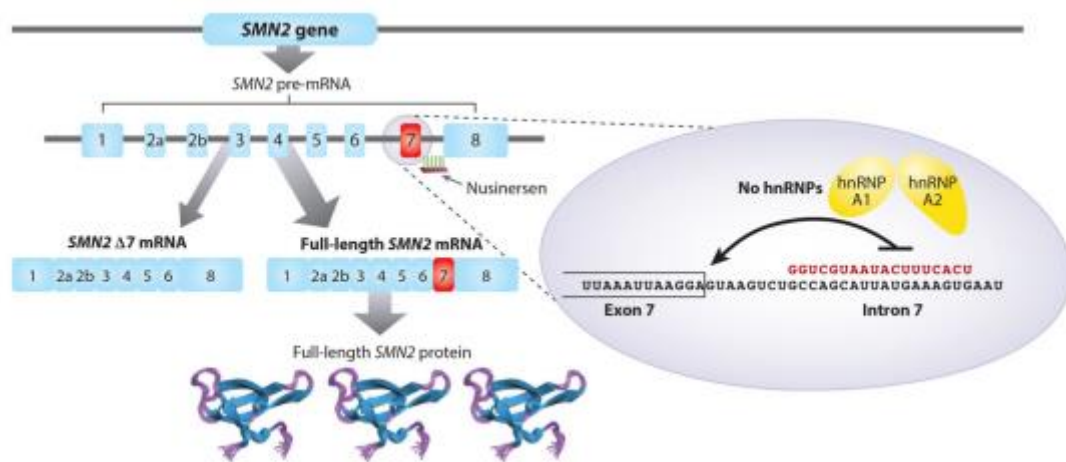


Figura 12. El nusinersén se une específicamente a su diana en el exón 7, facilitando el reconocimiento de esta zona por el espliceosoma y, de esta forma, provocando su inclusión en el ARNm (Bennett et al., 2019)

Además, se observó que en estos modelos el nusinersén prolongaba la esperanza de vida, prevenía las patologías musculares y aumentaba la fuerza de los músculos al inyectarse directamente al líquido cefalorraquídeo (Hua et al., 2015). Basándose en estos alentadores resultados, se aprobó su pase a las siguientes etapas de los ensayos clínicos, obteniéndose resultados muy esperanzadores en la fase 3 de los mismos. Por todo ello, y gracias a una abrumadora evidencia a favor de la evaluación beneficios/riesgo, la FDA aprobó su comercialización bajo el nombre de Spinraza. Actualmente, se encuentra comercializado en más de 40 países (entre ellos España) y

se utiliza en pacientes, tanto adultos, como pediátricos, con cualquier tipo de AME (Bennett et al., 2019).

Nusinersén fue el primer tratamiento aprobado para la AME, abrió la puerta a demostrar que las enfermedades degenerativas son tratables y que pueden llegar a mejorar. A su vez, también ha abierto la puerta a nuevas líneas de investigación centradas en el splicing y el espliceosoma para este tipo de enfermedades, lo que podría ser la esperanza de muchos pacientes.

5. CONCLUSIONES

Tras realizar el ejercicio de revisión bibliográfica, necesario para la elaboración de este trabajo de fin de grado, podemos decir que hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- El ARNm que sale del núcleo sufre anteriormente un proceso de splicing de intrones que es llevado a cabo por el espliceosoma, una maquinaria celular de vital importancia para la obtención de proteínas plenamente funcionales.
- El espliceosoma es un complejo formado por seis subunidades diferentes, que a su vez son snurps. Estas subunidades se unen sólo en el momento del splicing, comenzando con la unión de U1 y U2 al ARN que va a ser procesado y la posterior suma del complejo llamado tri-snRNP, compuesto por las subunidades U4, U5 y U6.
- Además de las subunidades, del complejo del espliceosoma también forman parte más de un centenar de proteínas, cuyo papel en el proceso es fundamental. Entre ellas, se encuentran las ATPasas con función helicasa, que provocarán los diferentes cambios conformacionales que propician la formación del espacio catalítico y el movimiento de la molécula de ARN para su procesado.
- Tanto las subunidades como las proteínas van entrando y saliendo del complejo a medida que avanza la reacción. Tras la etapa final de la catálisis se produce la disociación del espliceosoma. Como resultado de esta disociación se obtienen las diferentes piezas que restaban en el complejo, que serán utilizadas de nuevo cuando sea necesario, la molécula de ARNm sin intrones y lista para salir al citoplasma y el intrón formando una estructura característica en forma de lazo, que será degradado.
- Las diferentes posibilidades que tiene el espliceosoma para reconocer y cortar los intrones y exones permiten lo que se conoce como splicing alternativo. Este splicing alternativo es el origen de ciertas enfermedades y está muy ligado a ciertos aspectos del cáncer, como bien son la represión de la apoptosis y la angiogénesis exagerada en el tejido tumoral.
- El splicing alternativo y la función del espliceosoma son foco de investigación para conocer el por qué de algunas enfermedades, como es el caso de la AME. Los oligonucleótidos antisentido y, entre ellos el nusinersén, son una gran herramienta terapéutica para este tipo de enfermedades degenerativas y han dado buenos resultados en su uso en clínica.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bai R, Wan R, Yan C, Jia Q, Lei J, Shi Y. Mechanism of spliceosome remodeling by the ATPase/helicase Prp2 and its coactivator Spp2. *Science* 2021;371.
2. Bao P, Will CL, Urlaub H, Boon KL, Lührmann R. The RES complex is required for efficient transformation of the precatalytic B spliceosome into an activated Bact complex. *Genes and Development* 2017;31:2416–29.
3. Bennett C, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Neuroscience* 2019;42:385–406.
4. Bonnal S, Vigevani L, Valcárcel J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012;11:847–59.
5. Butchbach ME. Molecular Sciences Genomic Variability in the Survival Motor Neuron Genes (SMN1 and SMN2): Implications for Spinal Muscular Atrophy Phenotype and Therapeutics Development Genomic Variability in the Survival Motor Neuron Genes 2021.
6. Butcher SE. The spliceosome and its metal ions. *Metal Ions in Life Sciences* 2011;9:235–51.
7. Chan S-P, Kao D-I, Tsai W-Y, Cheng S-C. The Prp19p-Associated Complex in Spliceosome Activation. 2003.
8. Cheng J, Zhou T, C Liu, Shapiro J, Brauer M, Kiefer M, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263:1759–62.
9. Chiu Y-F, Liu Y-C, Chiang T-W, Yeh T-C, Tseng C-K, Wu N-Y, et al. Cwc25 Is a Novel Splicing Factor Required after Prp2 and Yju2 To Facilitate the First Catalytic Reaction. *Molecular and Cellular Biology* 2009;29:5671–8.
10. Coomer AO, Black F, Greystoke A, Munkley J, Elliott DJ. Alternative splicing in lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 2019;1862.
11. Corriero A, Miñana B, Valcárcel J. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes and Development* 2011;25:445–59.
12. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metabolism* 2018;27:714–39.
13. Fica SM, Oubridge C, Galej WP, Wilkinson ME, Bai XC, Newman AJ, et al. Structure of a spliceosome remodelled for exon ligation. *Nature* 2017;542:377–80.
14. Fica SM, Oubridge C, Wilkinson ME, Newman AJ, Nagai K. A human postcatalytic spliceosome structure reveals essential roles of metazoan factors for exon ligation. *Science* 2019;363:710–4.

15. Grainger RJ, Beggs JD. Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *RNA* 2005;11:533–57.
16. Green CM, Li Z, Smith AD, Novikova O, Bacot-Davisid VR, Gaoid F, et al. Spliceosomal Prp8 intein at the crossroads of protein and RNA splicing 2019.
17. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: The key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature Reviews Cancer* 2008;8:880–7.
18. Haselbach D, Komarov I, Agafonov D, Kastner B, Lührmann R, Stark H. Structure and Conformational Dynamics of the Human Spliceosomal Bact Complex. *Cell* 2018;172:454–64.
19. Hausner T-P, Giglio LM, Weiner AM. Evidence for base-pairing between mammalian U2 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. 1990.
20. Hong X, Scofield DG, Lynch M. Intron size, abundance, and distribution within untranslated regions of genes. *Molecular Biology and Evolution* 2006;23:2392–404.
21. Hua Y, Liu YH, Sahashi K, Rigo F, Bennett CF, Krainer AR. Motor neuron cell-nonautonomous rescue of spinal muscular atrophy phenotypes in mild and severe transgenic mouse models. *Genes Dev* 2015;29:288–97.
22. Kalsotra A, Cooper TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nature Reviews Genetics* 2011;12:715–29.
23. Kastner B, Will CL, Stark H, Lührmann R. Structural insights into nuclear pre-mRNA splicing in higher eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2019;11.
24. Kent OA, Ritchie DB, MacMillan AM. Characterization of a U2AF-Independent Commitment Complex (E') in the Mammalian Spliceosome Assembly Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25:233–40.
25. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurologic Clinics* 2015;33:831–46.
26. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: Beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012;11:125–40.
27. Lee CH, Han SR, Lee SW. Group I Intron-Based Therapeutics Through Trans-Splicing Reaction. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2018;159:79–100.
28. Liang WW, Cheng SC. A novel mechanism for Prp5 function in prespliceosome formation and proofreading the branch site sequence. *Genes and Development* 2015;29:81–93.
29. Liu S, Li X, Zhang L, Jiang J, Hill RC, Cui Y, et al. Structure of the yeast spliceosomal postcatalytic P complex. *Science (1979)* 2017;358:1278–83.
30. Mefford MA, Staley JP. Evidence that U2/U6 helix I promotes both catalytic steps of pre-mRNA splicing and rearranges in between these steps. *RNA* 2009;15:1386–97.

31. Muto Y, Krummel DP, Oubridge C, Hernandez H, Robinson C v., Neuhaus D, et al. The Structure and Biochemical Properties of the Human Spliceosomal Protein U1C. *Journal of Molecular Biology* 2004;341:185–98.
32. Nancollis V, Ruckshanthi JPD, Frazer LN, O’Keefe RT. The U5 snRNA internal loop 1 is a platform for Brr2, Snu114 and Prp8 protein binding during U5 snRNP assembly. *Journal of Cellular Biochemistry* 2013;114:2770–84.
33. Nelson DL (David L, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. In: Cox MM, Lehninger AL, editors. *Lehninger principles of biochemistry*. Seventh edition, New York: W.H. Freeman; 2017.
34. Nguyen THD, Galej WP, Bai XC, Savva CG, Newman AJ, Scheres SHW, et al. The architecture of the spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP. *Nature* 2015;523:47–52.
35. Ohi MD, Kooi CW vander, Rosenberg JA, Ren L, Hirsch JP, Chazin WJ, et al. Structural and Functional Analysis of Essential pre-mRNA Splicing Factor Prp19p. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25:451–60.
36. Plaschka C, Lin PC, Charenton C, Nagai K. Prespliceosome structure provides insights into spliceosome assembly and regulation. *Nature* 2018;559:419–22.
37. Plaschka C, Lin PC, Nagai K. Structure of a pre-catalytic spliceosome. *Nature* 2017;546:617–21.
38. Prior TW, Krainer AR, Hua Y, Swoboda KJ, Snyder PC, Bridgeman SJ, et al. A Positive Modifier of Spinal Muscular Atrophy in the SMN2 Gene. *American Journal of Human Genetics* 2009;85:408–13.
39. Pyle AM. Group II Intron Self-Splicing. *Annual Review of Biophysics* 2016;45:183–205.
40. Rauhut R, Fabrizio P, Dybkov O, Hartmuth K, Pena V, Chari A, et al. Molecular architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* activated spliceosome. *Science* (1979) 2016;353:1399–405.
41. Roybal GA, Jurica MS. Spliceostatin A inhibits spliceosome assembly subsequent to prespliceosome formation. *Nucleic Acids Research* 2010;38:6664–72.
42. Schwer B. A Conformational Rearrangement in the Spliceosome Sets the Stage for Prp22-Dependent mRNA Release. *Molecular Cell* 2008;30:743–54.
43. Semlow DR, Blanco MR, Walter NG, Staley JP. Spliceosomal DEAH-Box ATPases Remodel Pre-mRNA to Activate Alternative Splice Sites. *Cell* 2016;164:985–98.
44. Tanaka N, Aronova A, Schwer B. Ntr1 activates the Prp43 helicase to trigger release of lariat-intron from the spliceosome. *Genes and Development* 2007;21:2312–25.

45. Toroney R, Nielsen KH, Staley JP. Termination of pre-mRNA splicing requires that the ATPase and RNA unwindase Prp43p acts on the catalytic snRNA U6. *Genes Dev* 2019;33:1555–74.
46. Tseng CK, Liu HL, Cheng SC. DEAH-box ATPase Prp16 has dual roles in remodeling of the spliceosome in catalytic steps. *RNA* 2011;17:145–54.
47. Ule J, Blencowe BJ. Alternative Splicing Regulatory Networks, Functions, Mechanisms, and Evolution. *Molecular Cell* 2019;76:329–45.
48. Wan R, Bai R, Yan C, Lei J, Shi Y. Structures of the Catalytically Activated Yeast Spliceosome Reveal the Mechanism of Branching. *Cell* 2019a;177:339–51.
49. Wan R, Bai R, Zhan X, Shi Y. Annual Review of Biochemistry How Is Precursor Messenger RNA Spliced by the Spliceosome? 2019b.
50. Wan R, Yan C, Bai R, Lei Jianlin, Shi Y. Structure of an Intron Lariat Spliceosome from *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 2017;171:120–32.
51. Wilkinson ME, Charenton C, Nagai K. Annual Review of Biochemistry RNA Splicing by the Spliceosome 2019.
52. Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2011;3:1–2.
53. Wirth B, Garbes L, Riessland M. How genetic modifiers influence the phenotype of spinal muscular atrophy and suggest future therapeutic approaches. *Current Opinion in Genetics & Development* 2013;23:330–8.
54. Wu N-Y, Chung C-S, Cheng S-C. Role of Cwc24 in the First Catalytic Step of Splicing and Fidelity of 5' Splice Site Selection. *Molecular and Cellular Biology* 2017;37.
55. Zhan X, Yan C, Zhang X, Lei J, Shi Y. Structures of the human pre-catalytic spliceosome and its precursor spliceosome. *Cell Research* 2018;28:1129–40.