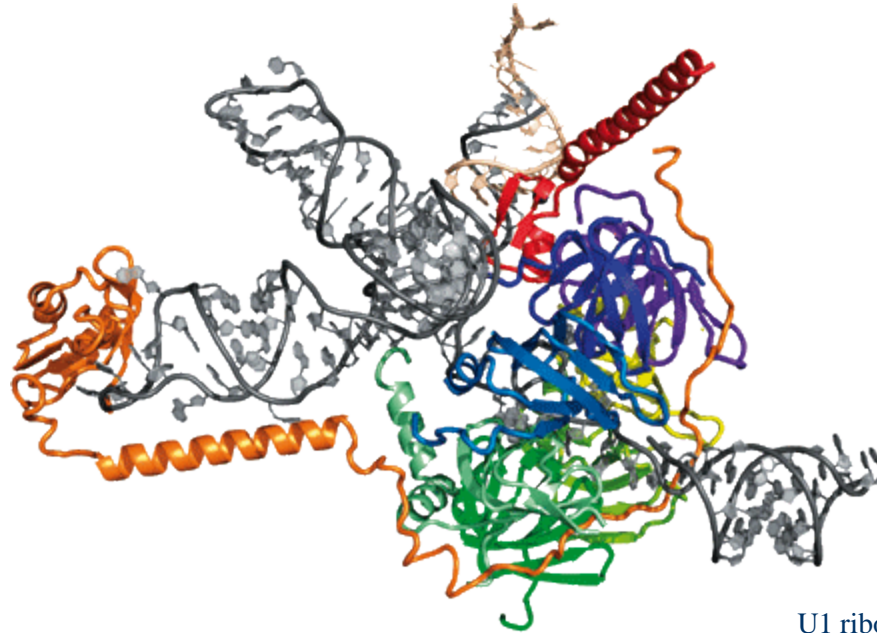


Transkrypcja u eukaryota i jej regulacja (obróbka i losy transkryptów)

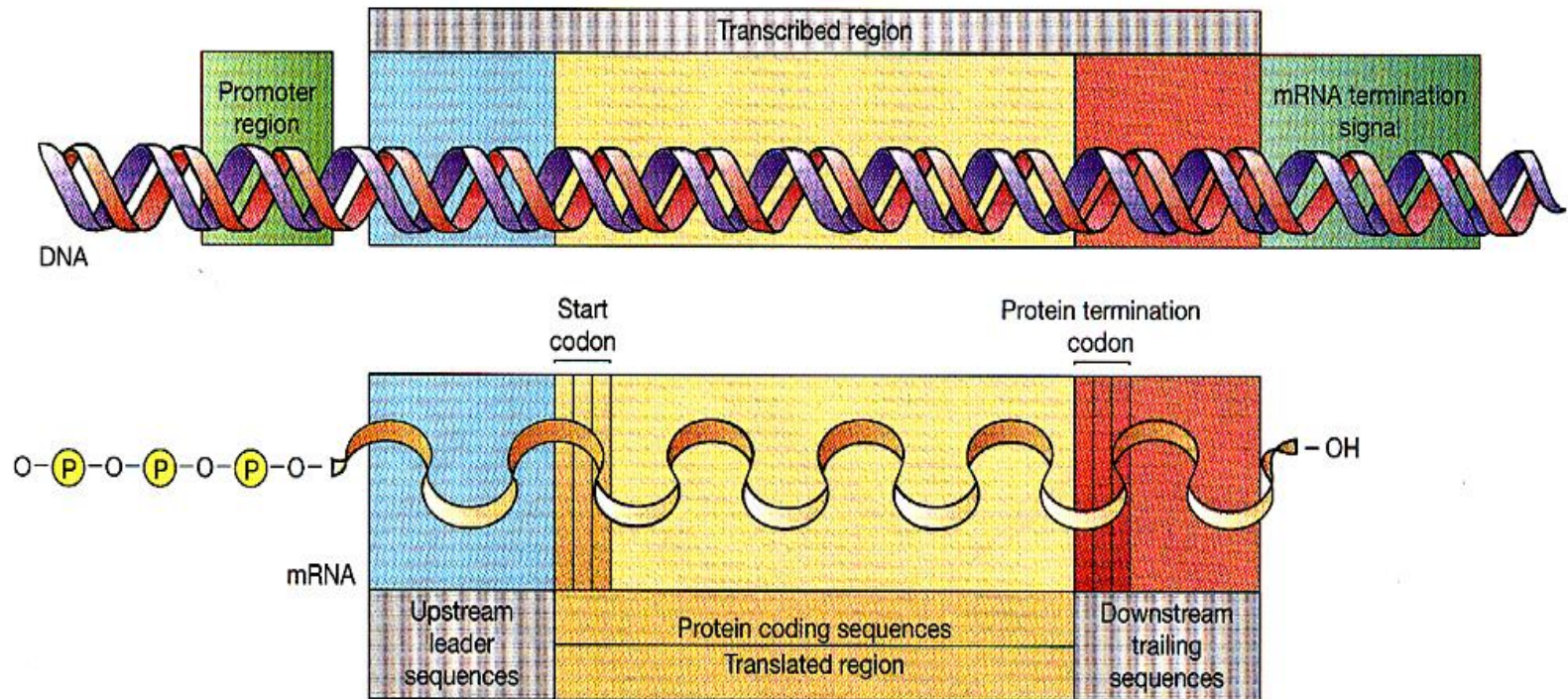


U1 ribonucleoprotein
<http://principlesofproteinstructure.blogspot.com/>

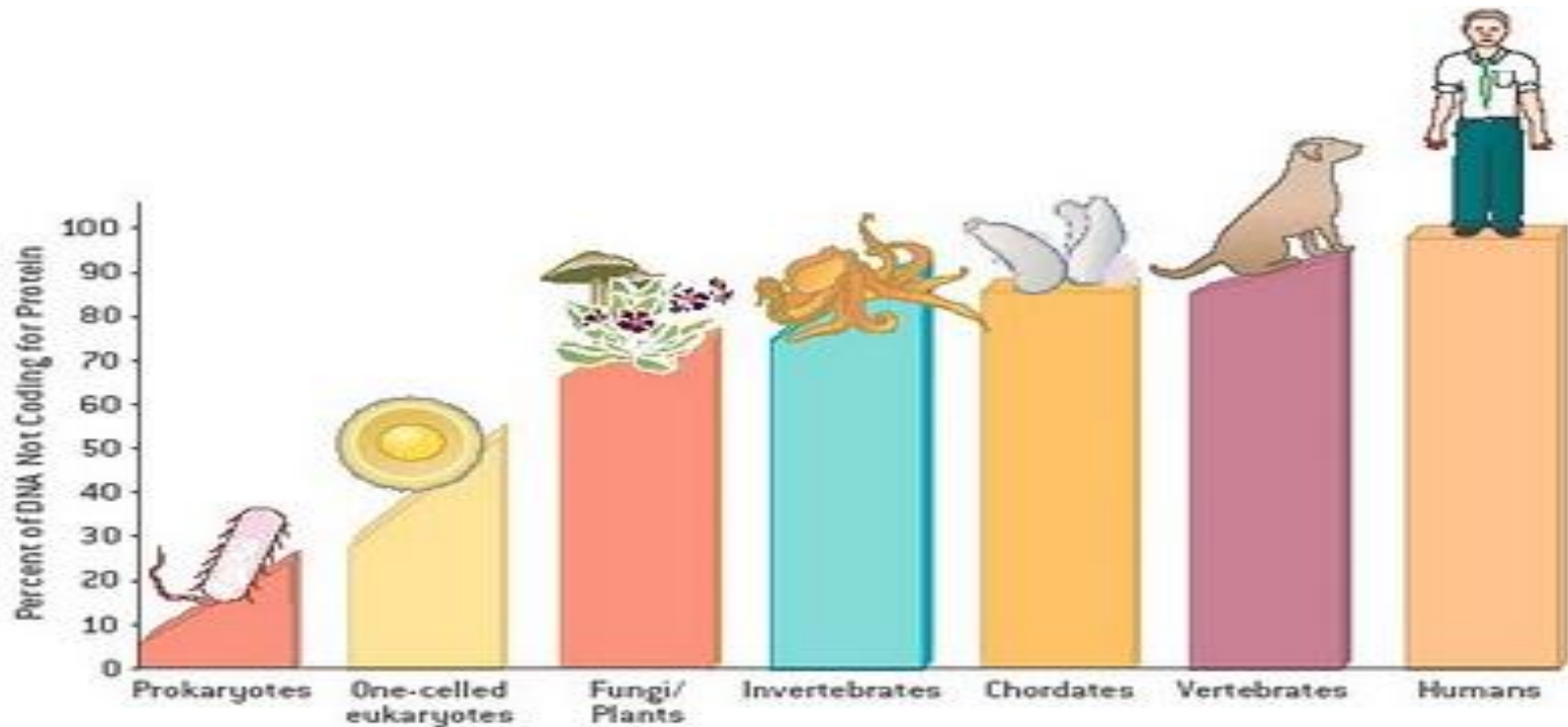
Rafał Archacki

Zakład Biologii Systemów UW

Klasyczne wyobrażenie genu – fragment DNA, który koduje funkcjonalny mRNA



Zawartość nie kodującego białek DNA (jako % całkowitego DNA) u różnych organizmów

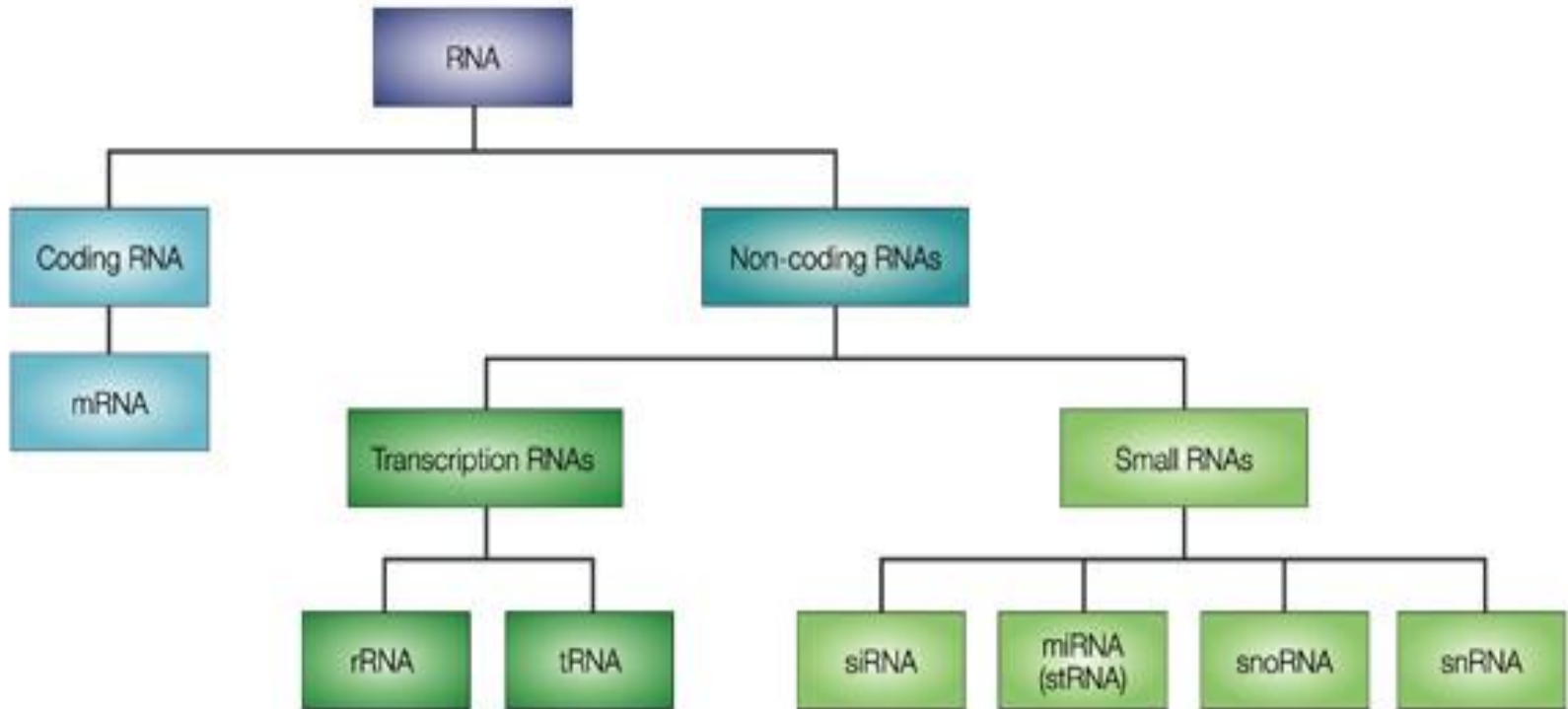


NONPROTEIN-CODING SEQUENCES make up only a small fraction of the DNA of prokaryotes. Among eukaryotes, as their complexity increases, generally so, too, does the proportion of their DNA that does not code for protein. The noncoding sequences have been considered junk, but perhaps it actually helps to explain organisms' complexity.

Rodzaje RNA w komórkach eukariontów

TYPE OF RNA	FUNCTION
mRNAs	messenger RNAs, code for proteins
rRNAs	ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis
tRNAs	transfer RNAs, central to protein synthesis as adaptors between mRNA and amino acids
snRNAs	small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear processes, including the splicing of pre-mRNA
snoRNAs	small nucleolar RNAs, used to process and chemically modify rRNAs
scaRNAs	small cajal RNAs, used to modify snoRNAs and snRNAs
miRNAs	microRNAs, regulate gene expression typically by blocking translation of selective mRNAs
siRNAs	small interfering RNAs, turn off gene expression by directing degradation of selective mRNAs and the establishment of compact chromatin structures
Other noncoding RNAs	function in diverse cell processes, including telomere synthesis, X-chromosome inactivation, and the transport of proteins into the ER

The various types of RNA

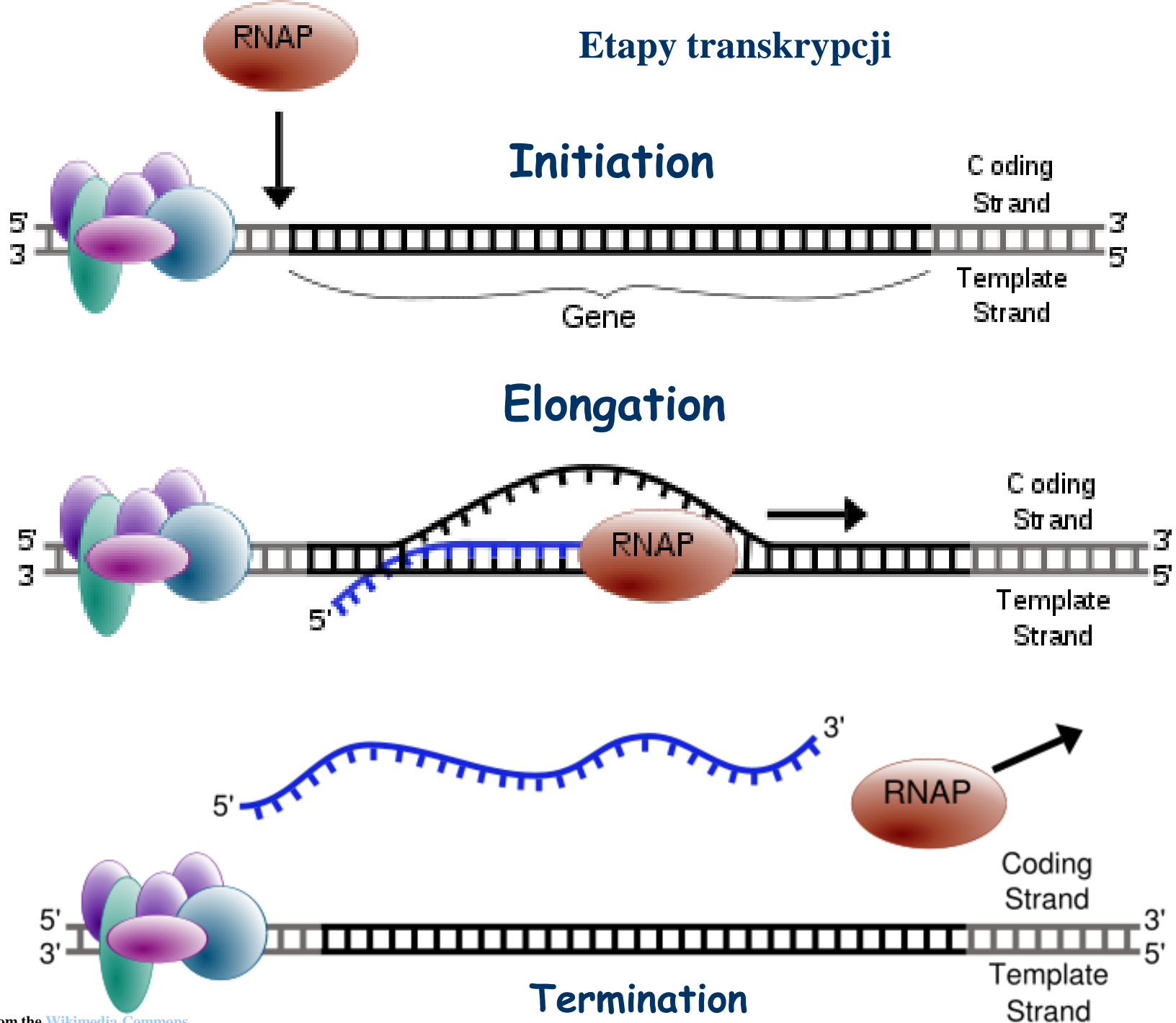


3 (+1) główne polimerazy RNA *Eukaryota*

polimeraza	produkty
Polimeraza I	geny rRNA (18S; 28S; 5,8S)
Polimeraza II	mRNA, większość snRNA (U1, U2, U4, U5), miRNA
Polimeraza III	małe RNA: tRNA, snoRNA, 5S rRNA, U6 snRNA

- Polimeraza mitochondrialna

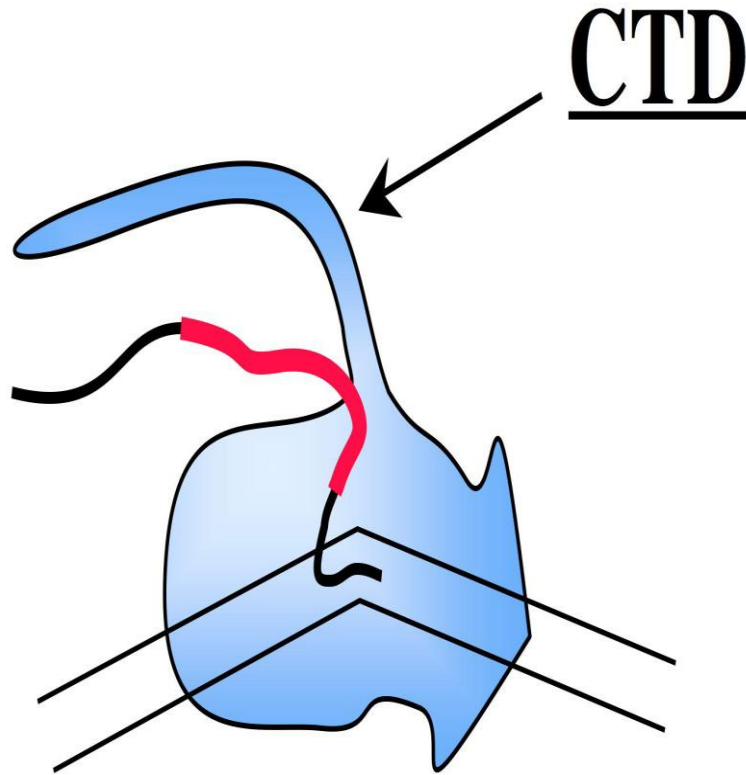
Etapy transkrypcji



Etapy ekspresji/poziomy regulacji

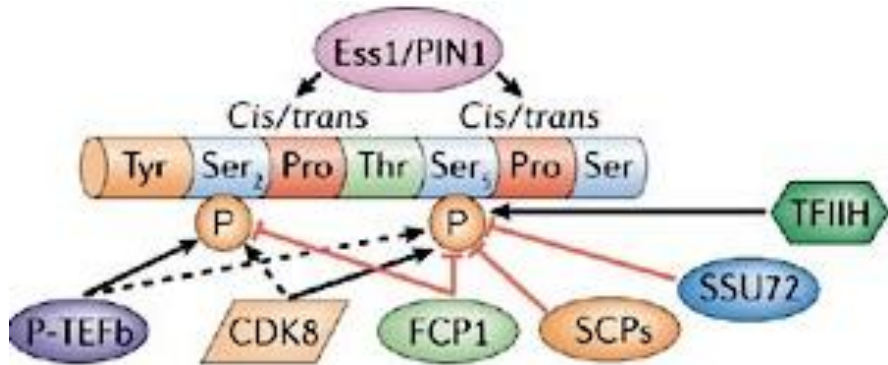
- struktura chromatyny
- transkrypcja
- obróbka i kontrola jakości RNA
- transport RNA
- degradacja RNA
- translacja
- modyfikacje post-translacyjne
- degradacja białka

Kluczowe znaczenie domeny karboksylowej (C-końcowej) RNA Pol II



- “CTD” to domena C-końcowa największej podjednostki RNA polimerazy II.
- U człowieka liczy ponad 350 aminokwasów złożonych z wielokrotnych powtórzeń 7-aminokwasowego motywu o sekwencji konsensusowej: tyr-ser-pro-thr-ser-pro-ser.
- CTD ma kluczowe znaczenie dla mechanizmów, które łączą zdarzenia po-transkrypcyjne z transkrypcją. Na przykład, praktycznie wszystkie kompleksy zaangażowane w obróbkę RNA (RNA processing) zawierają składniki, które wiążą się do CTD.
- Wciąż niewiele wiadomo, jak CTD lokalizuje się przestrzennie w stosunku do głównej części polimerazy. Wiadomo jedynie, że CTD jest bardzo elastyczna i może się dynamicznie przekształcać w trakcie pełnienia swoich licznych funkcji.

CTD koordynuje wydarzenia transkrypcyjne



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

- Hiperfosforylacja nieufosforylowanej CTD determinuje nowy zestaw regulatorów przyłączających się do pol II i zaznacza przejście od inicjacji do elongacji transkrypcji.
- Fosforylacja i defosforylacja Ser₂ i Ser₅ w CTD są regulowane przez złożony system kinaz i fosfataz.

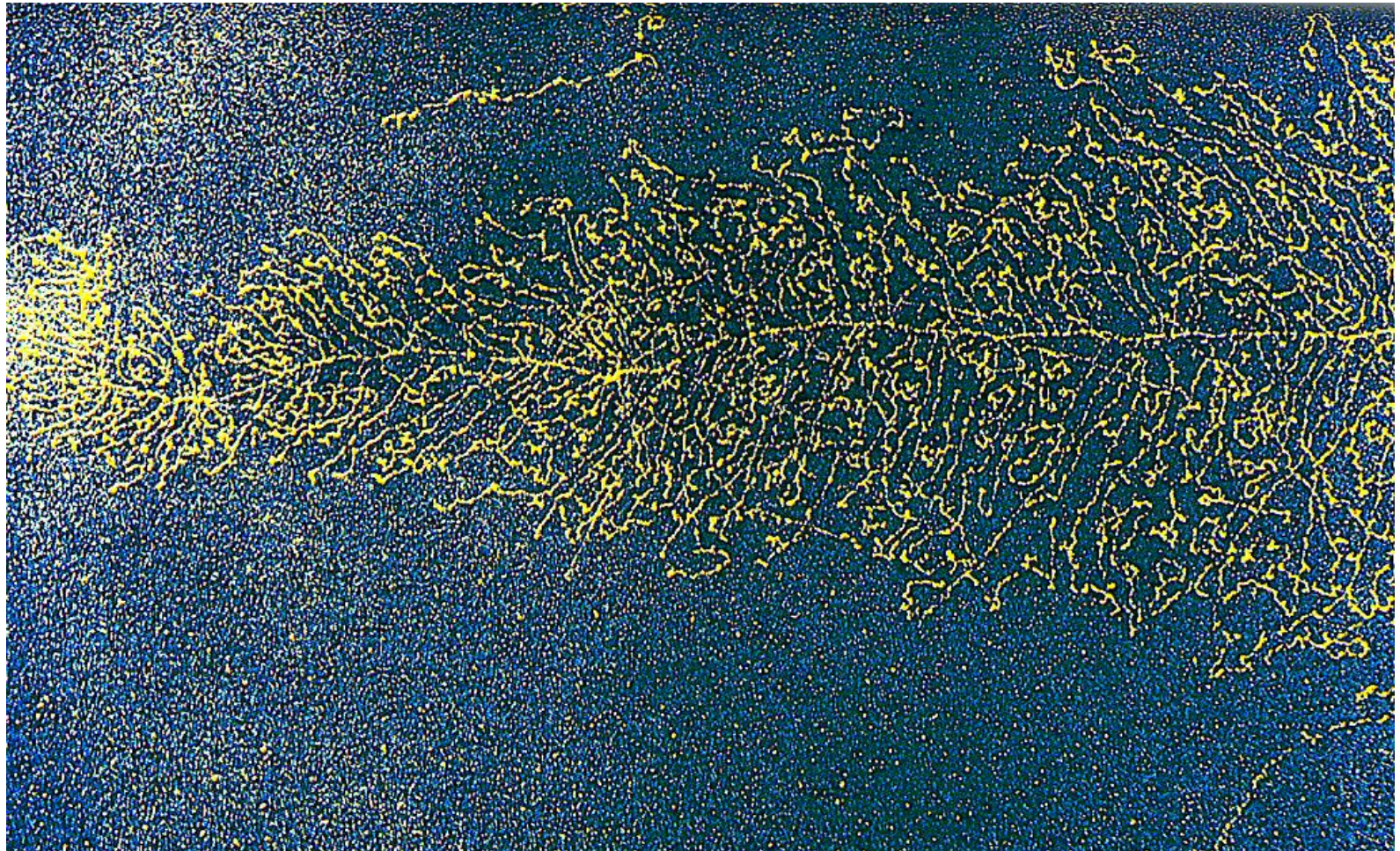
Do czego służy regulacja?

Transkrypcja rRNA – przypadek szczególny

DNA

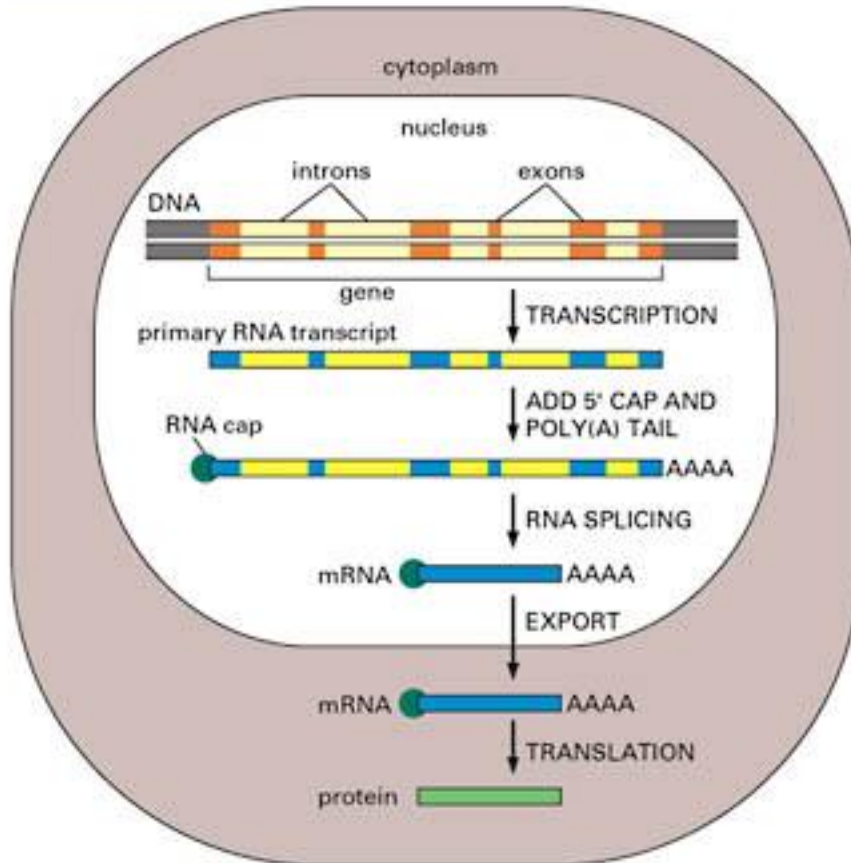


RNA

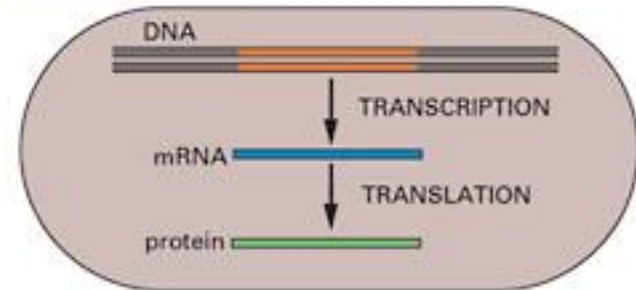


Losy transkryptów u eu- i prokaryota

(A) EUCARYOTES



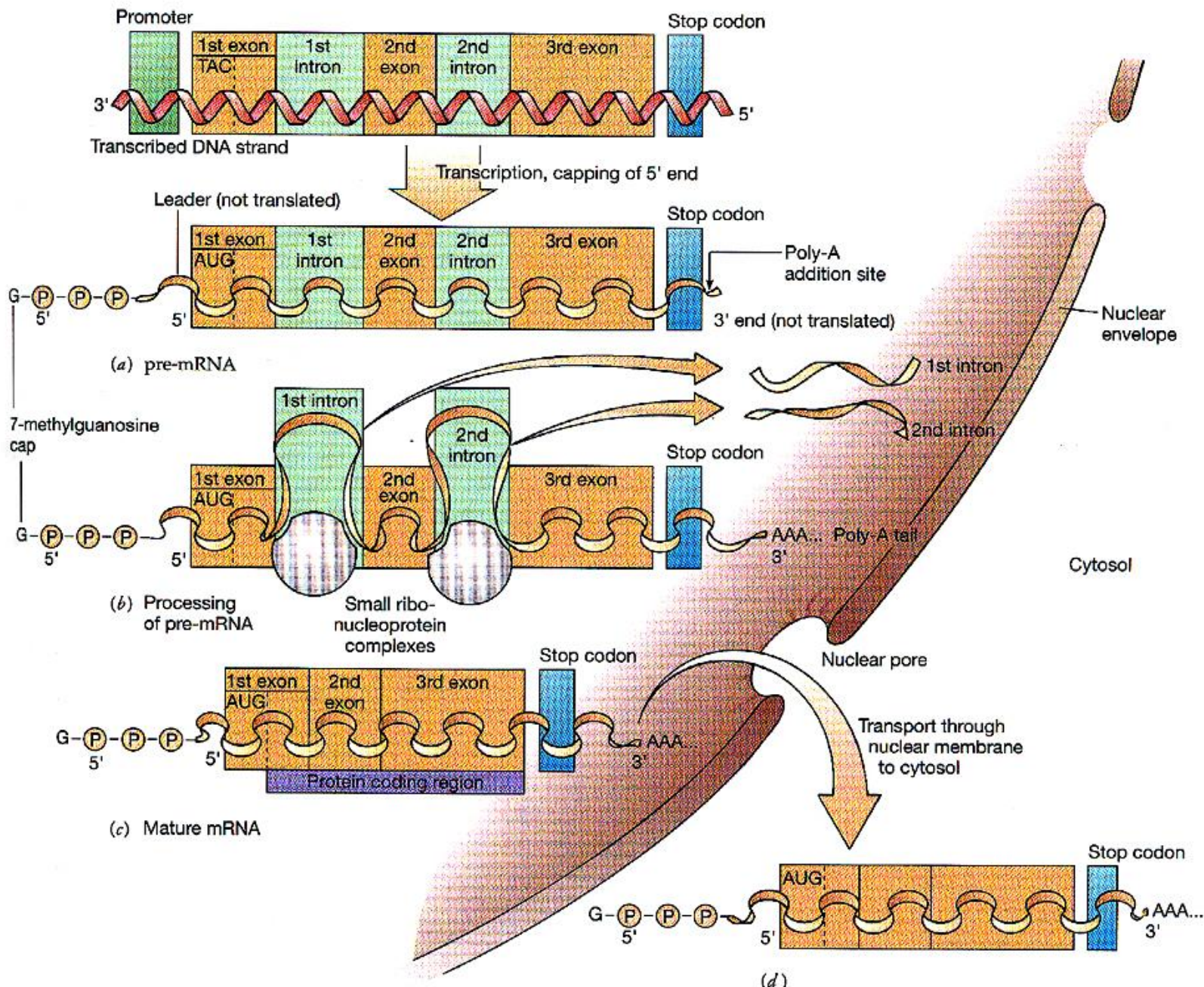
(B) PROCARYOTES



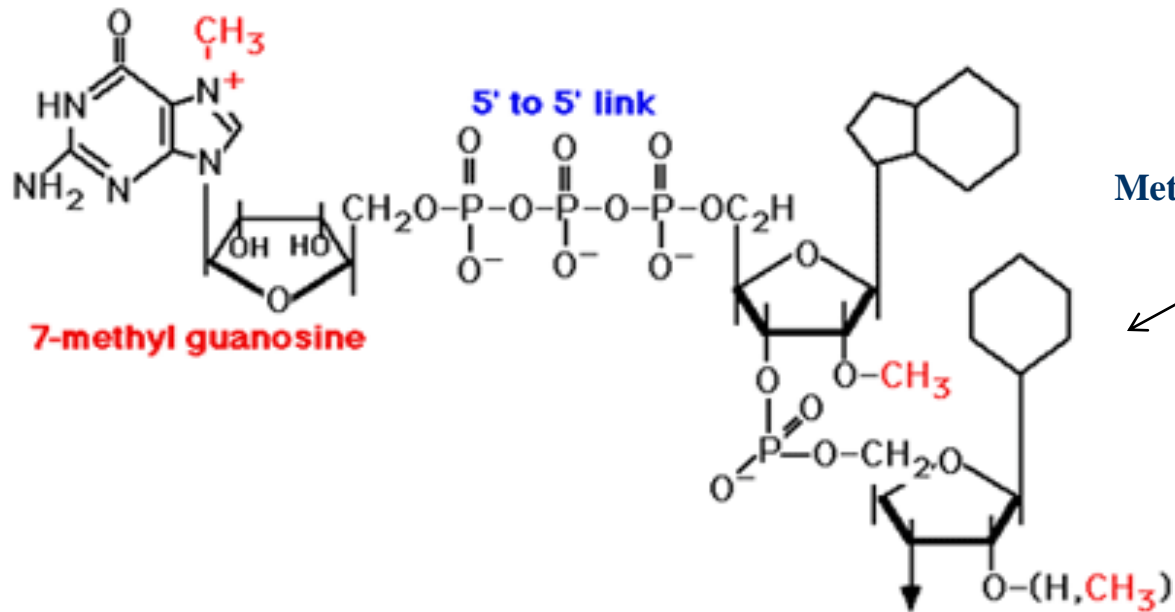
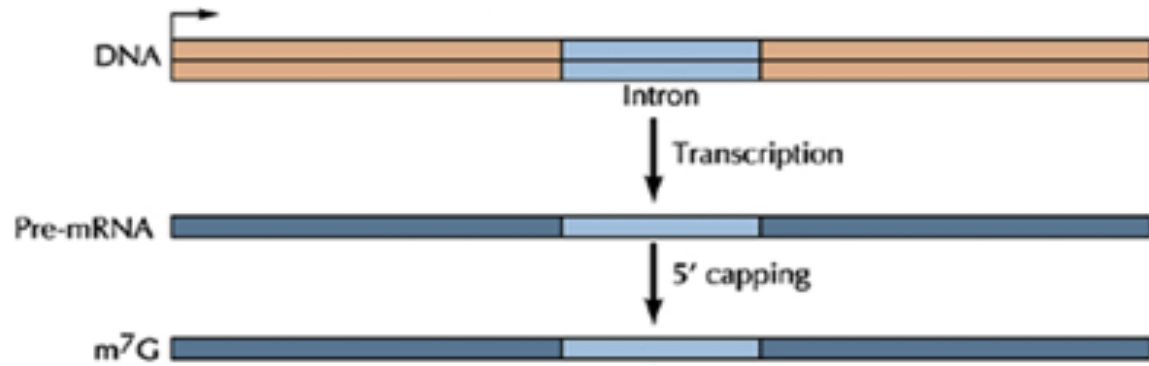
Obróbka nowosyntetyzowanego (prekursorowego) mRNA

- Czapeczka “Cap” jest dodawana na 5’ końcu mRNA
- Introny są usuwane
- Ogon ‘Poli A’ jest dodawany na 3’ końcu mRNA

Obróbka nowosyntetyzowanego mRNA



Dodawanie czapeczki na 5' końcu transkryptu



Funkcje 'CAP'

5' cap pełni 4 główne funkcje:

- **Reguluje eksport z jądra.**
- **Zapobiega degradacji przez egzonukleazy.**
- **Promuje translację.**
- **Promuje wycinanie sąsiadującego z końcem 5' intronu.**

- Eksport RNA z jądra jest regulowany przez Cap Binding Complex (CBC), który przyłącza się wyłącznie do RENA z 'CAP'. CBC jest następnie rozpoznawany przez Kompleks Poru Jądrowego i eksportowany.
- Zapobieganie degradacji 5' końca przez egzonukleazy polega na upodobnieniu tego końca funkcjonalnie do końca 3'. Wydłuża to okres pół-trwania mRNA, co jest niezbędne u eukariontów ze względu na długi czas potrzebny na eksport mRNA z jądra.
- Podczas aktywnej translacji do 'CAP' wiąże się czynnik inicjacji translacji eIF-4E, który następnie przyłącza czynnik eIF-4G i w następstwie, rybosom.
- Usunięcie 'CAP' z mRNA jest katalizowane przez kompleks białkowy (Decapping complex) zawierający czynniki dcp1 i dcp2, które konkurują z eIF-4E o wiązanie z 'CAP'.
- Mechanizm promowania przez 'CAP' wycinania sąsiadującego z 5' końcem intronu obejmuje oddziaływanie ze spliceosomem.

Introny

- U prokaryotów geny są ciągłe, tj. kolinearne z ich mRNA.
- U wyższych eukaryotów geny są nieciągłe, tj. niekolinearne z ich mRNA.
- Części genu ulegające ekspresji noszą nazwę eksonów, zaś sekwencje przedzielające eksony – intronów.

Precyzyjne usuwanie intronów

- Sekwencje konsensusowe oskrzydalaające miejsca:

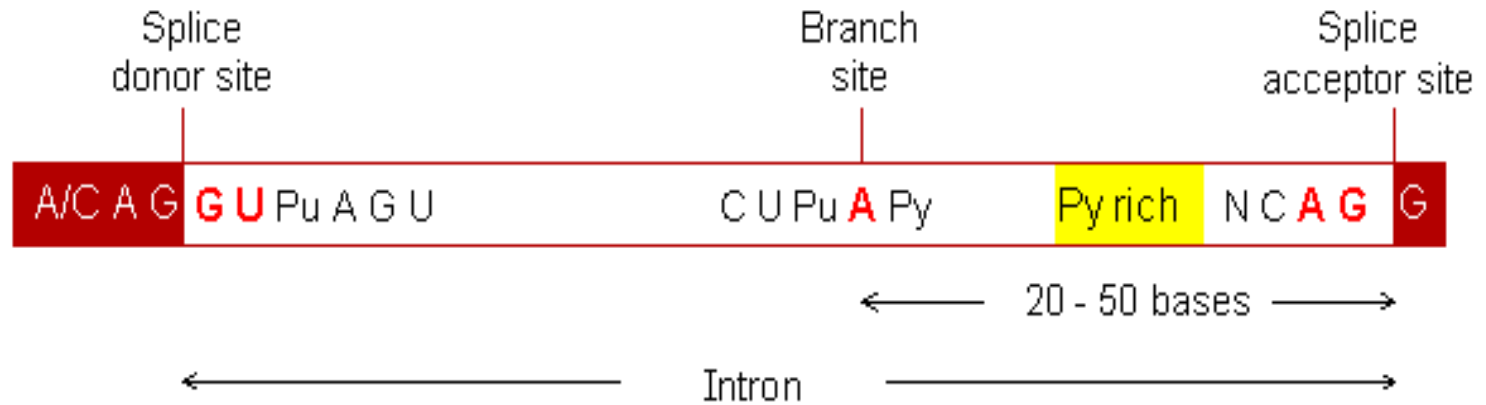
5' donorowe i 3' akceptorowe

nnnnnnG//**GU**n-----nnAnn-----**AG**//Gnnnnn

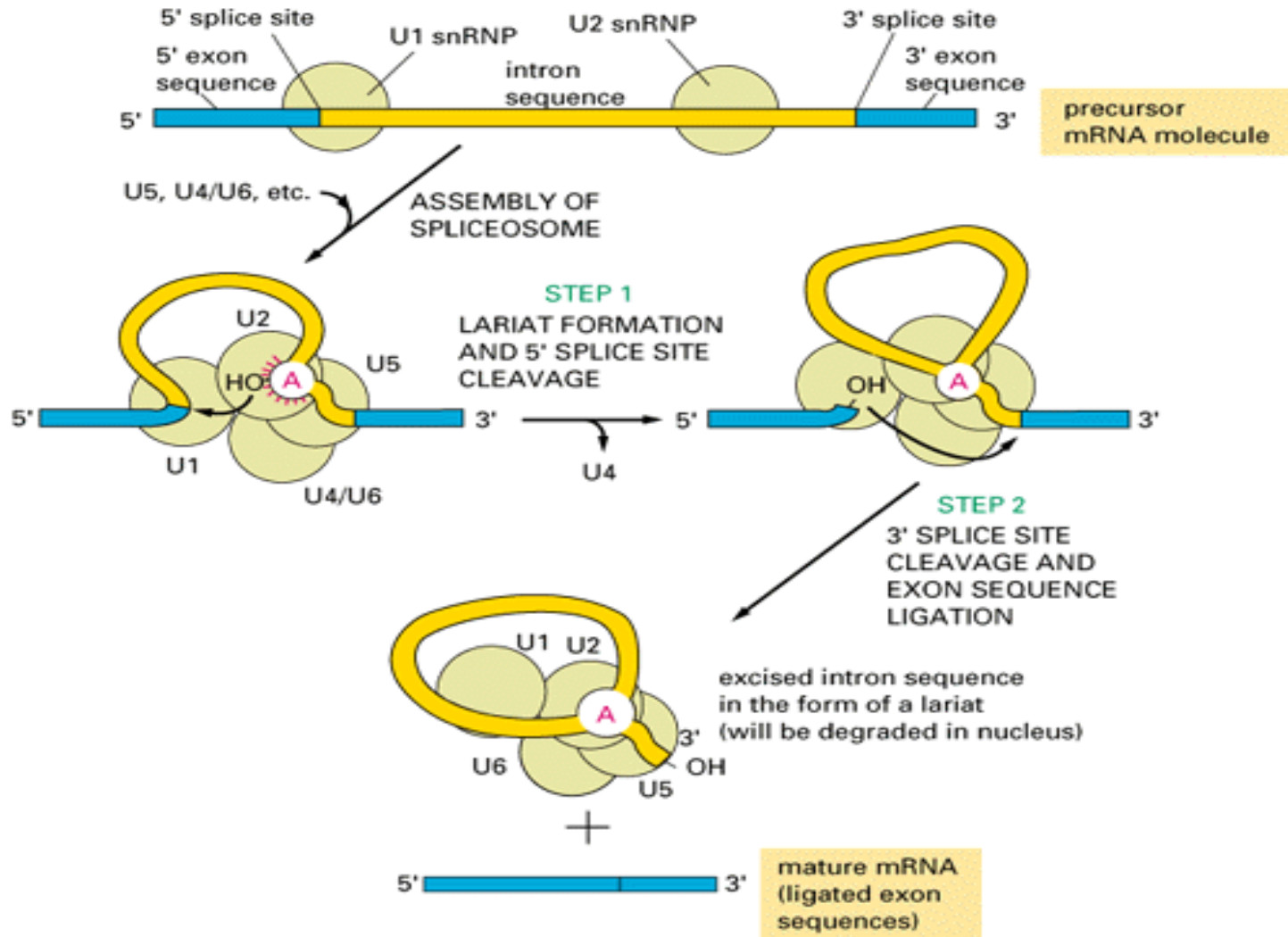
Miejsce 5' donorowe

Miejsce 3' akceptorowe

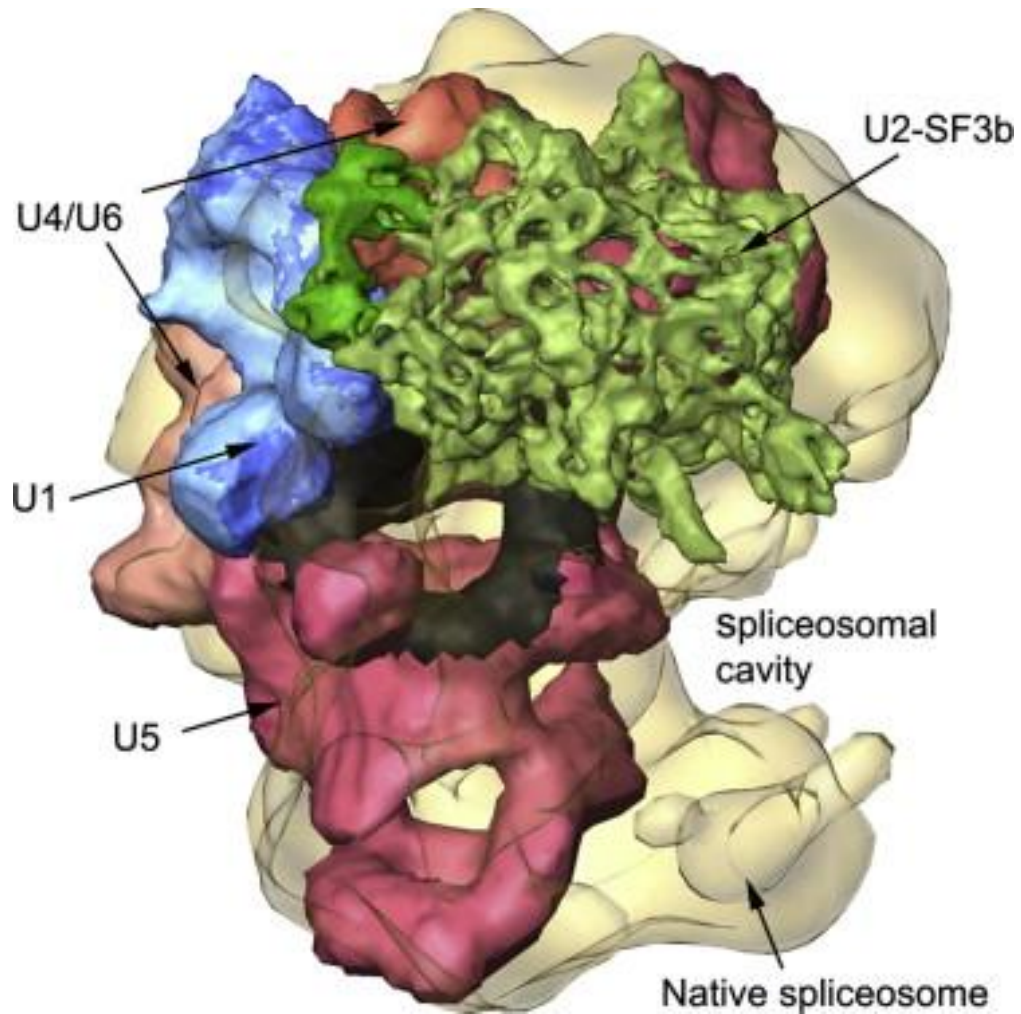
Sekwencje rozpoznawane przez system splicing



Mechanism splicing



Spliceosom



Ziv Frankenstein¹, Joseph Sperling², Ruth Sperling⁴ and Miriam Eisenstein³
A Unique Spatial Arrangement of the snRNPs within the Native Spliceosome Emerges from In Silico Studies

SMaRT RNA therapy

Gerard J McGarrity

Intronn Inc, Gaithersburg, MD, USA



Technological improvements are required for gene therapy to achieve its full potential. RNA re-programming has shown that it can re-write transcripts at the level of pre-mRNA, offering distinct advantages over conventional gene therapy.

More than 100 different genes have been transferred to humans in clinical trials of gene therapy. As of January 2004, 918 gene therapy trials in 24 countries had targeted cancer (~66% of the trials), monogenetic diseases (9.8%) and cardiovascular diseases (8.3%). Two-thirds of the trials have been performed in the US. Despite early optimism, however, clinical successes have been few.

A 1995 report by the National Institutes of Health (NIH), *Report and Recommendations of the Panel to Assess the NIH Investment in Research on Gene Therapy*, made several key recommendations that had an immediate impact on the field. One of its recommendations on basic science research noted that improved gene delivery was urgently needed: "...the Panel endorses vigorous and expanded research aimed at developing improved vectors." Since that time, improvements have been made in both synthetic and viral delivery systems, the latter being used in approximately 70% of trials. A recent publication on the utility of adeno-associated virus (AAV) vector serotype 8 demonstrated physiological levels of FVIII in animals for more than one year. Other delivery systems have also witnessed significant improvements although not on the scale of newer AAV serotypes.

A second critical recommendation of the panel stressed the need to better understand the mechanisms that govern gene expression; "We urge the NIH to give high priority to basic research to elucidate

how recipient cells and particularly stem cells, handle and express foreign DNA sequences." Whereas there has been some progress in regulating gene expression in recipient cells, such as the use of specific promoters, overall regulation is still a challenge. An innovative approach to deal with this issue is to use RNA reprogramming technologies which utilize endogenous regulation of gene expression by targeting transcripts. Among RNA-based therapies the most successful has been Intronn's SMaRT (spliceosome-mediated RNA trans-splicing). SMaRT is a targeted approach, not of the vector, but of the delivered sequences, and functions at the level of pre-messenger RNA (pre-mRNA).

RNA splicing

Splicing of pre-mRNA, resulting in the removal of introns, is one of the most common processes in biology. Introns represent ~90% of the sequences in a representative pre-mRNA, exons ~10%. Exons can be viewed as tiny islands of sequence in a sea of introns. Introns were once thought to be inert but now recognized to have many functions. At any given moment, an average of 63,000 splicing events are occurring in a human cell nucleus. Splicing is mediated by spliceosomes - protein-RNA complexes in the nucleus. The overwhelming majority of splicing is cis-splicing, occurring within a single pre-mRNA molecule, (Figure 1).

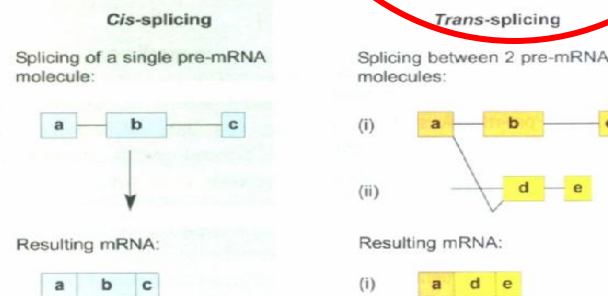


Figure 1. RNA splicing in higher eukaryotes. The predominant splicing of pre-messenger RNA occurs through the cis-splicing pathway, ie, splicing within a single pre-mRNA molecule. An increasing number of genes have been shown to participate in trans-splicing, occurring between two separate pre-mRNA molecules.

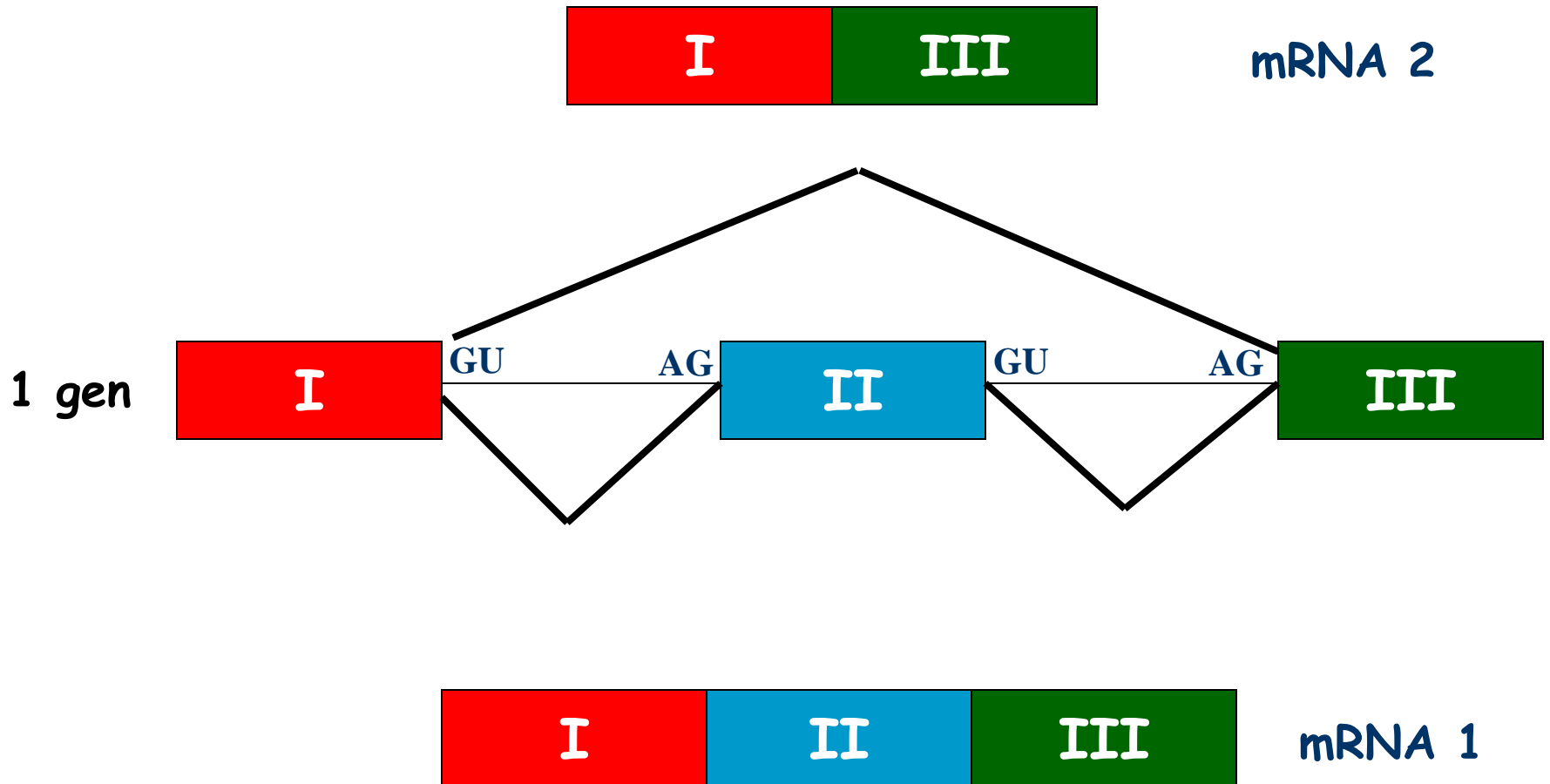
W każdej chwili w jądrze komórki ludzkiej odbywa się średnio 63,000 wydarzeń splicingowych.

Current Drug Discovery
Nov. 2004, page 15

Genom ludzki zawiera 22 tysiące genów, ale koduje ponad 100 tysięcy białek

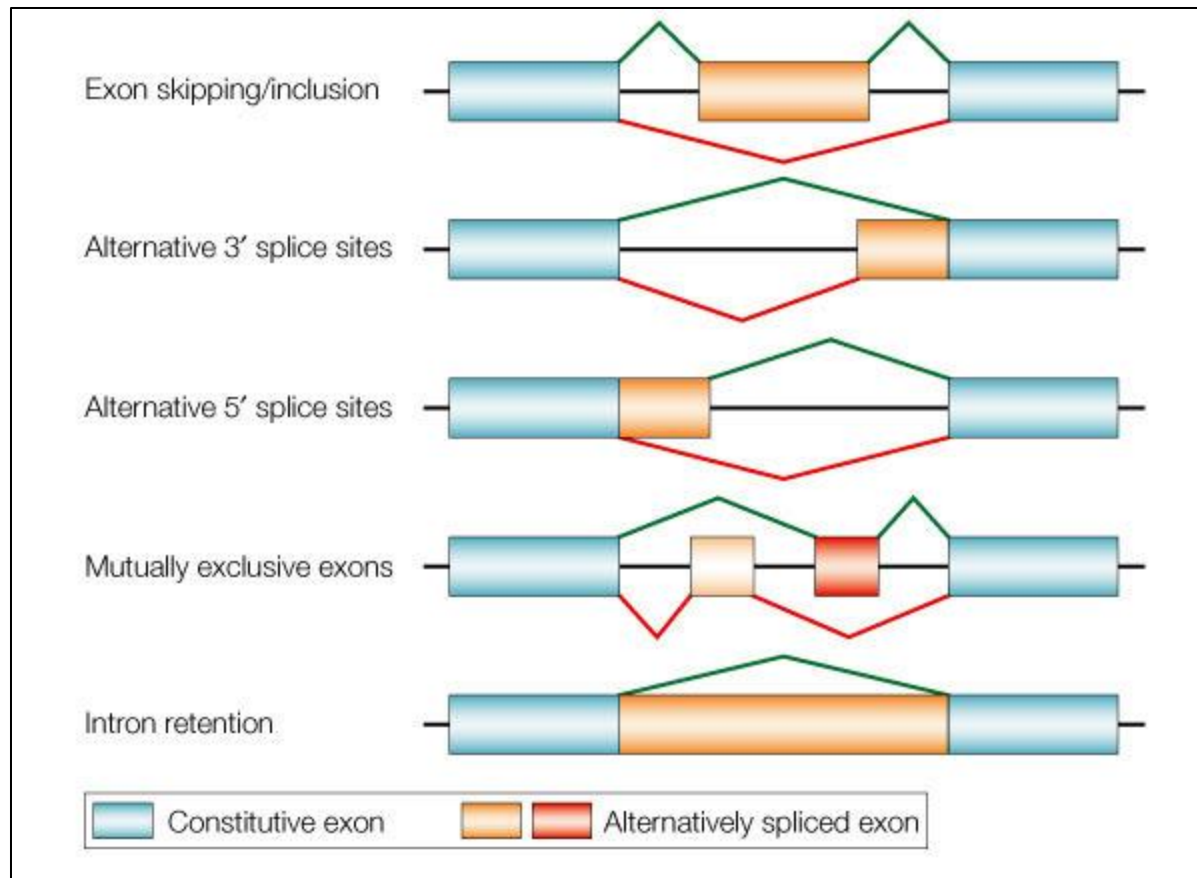
- **Przyczyna?**
- **Alternatywny splicing prekursorów mRNA**

Alternatywny splicing pre-mRNA



Z jednego genu może powstać kilka mRNA
kodujących różne białka

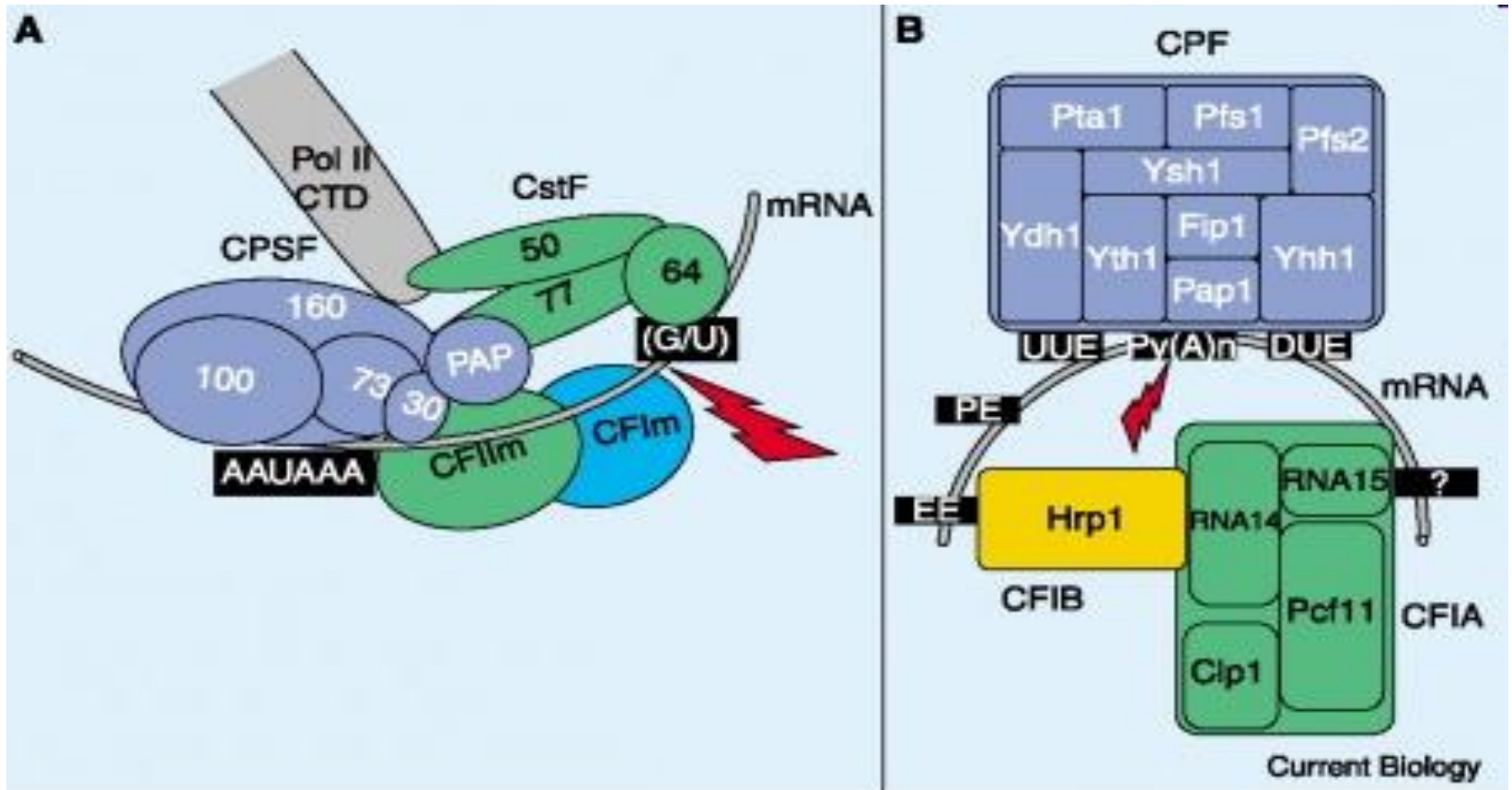
Przykłady alternatywnego splicingu



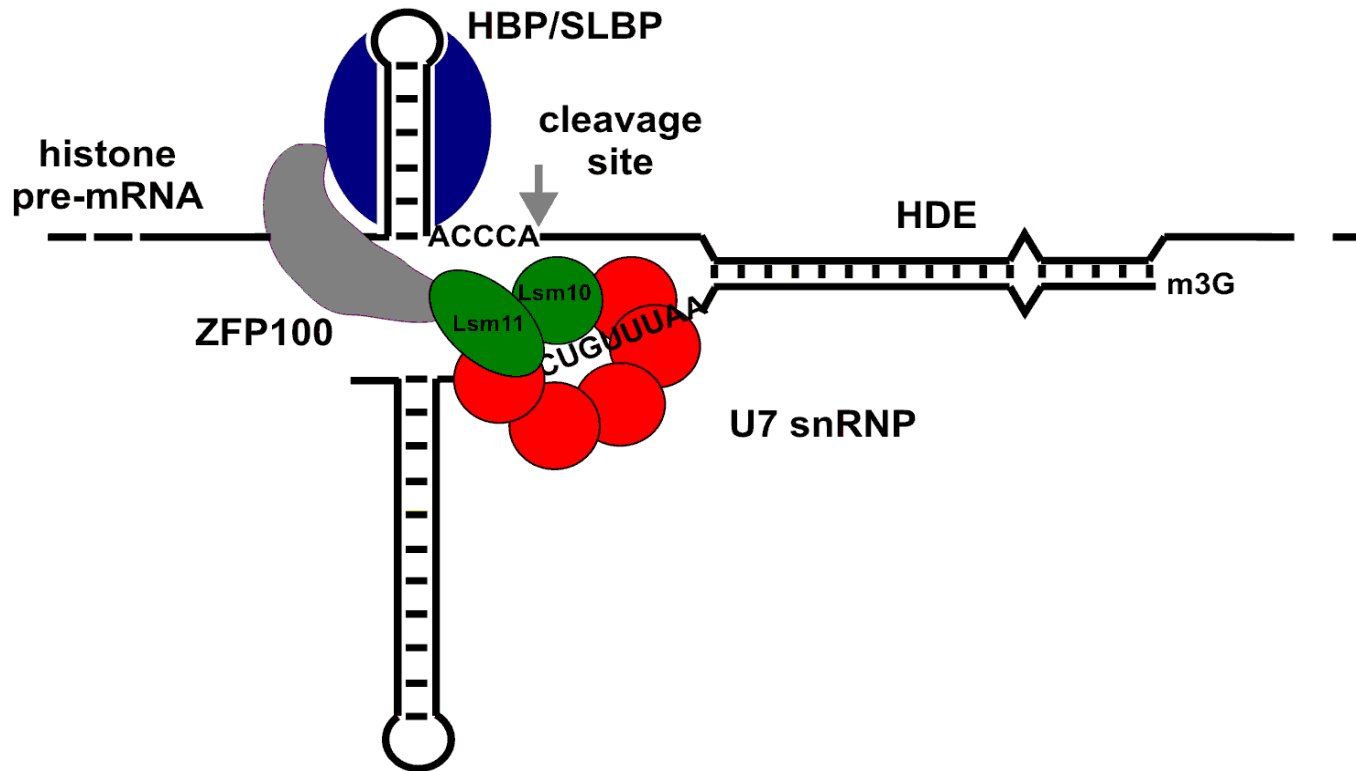
Terminacja – dodawanie poliA

- ...AAUAAA.....

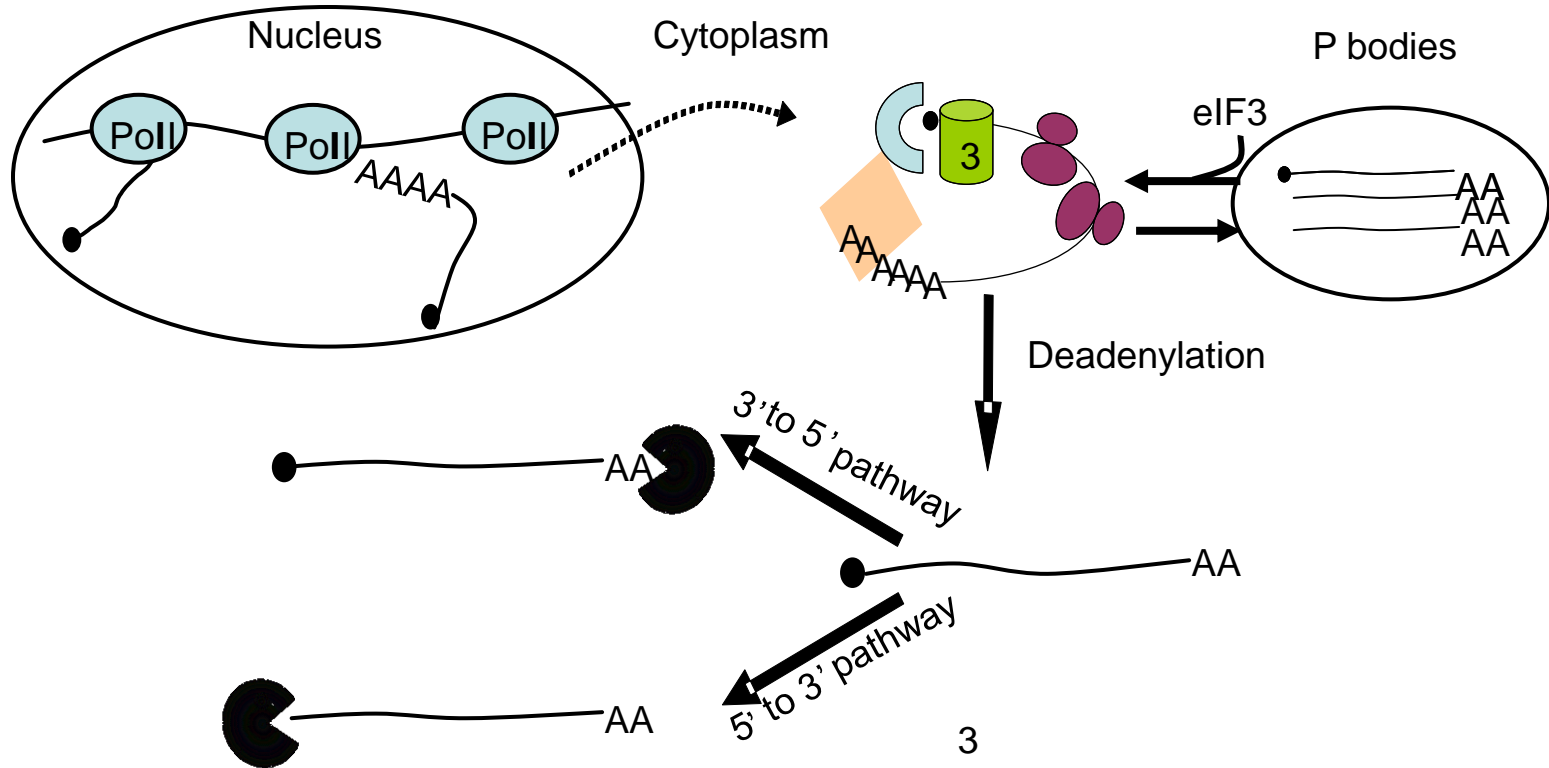
Poliadenylacja 3' końca mRNA u człowieka (A) i drożdży (B)



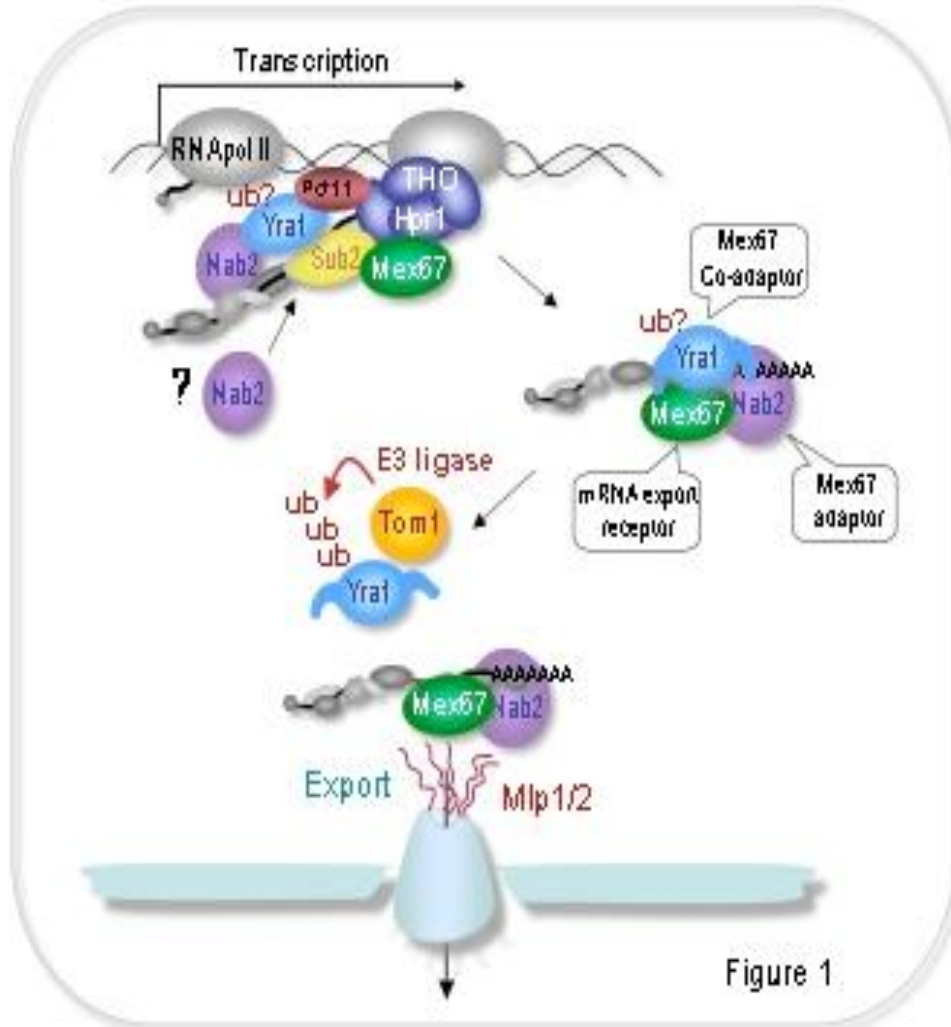
Struktura 3' szpilki w mRNA histonów



Regulacja potranskrypcyjna w cytoplazmie



RNA Pol II a translokacja i eksport mRNA z jądra

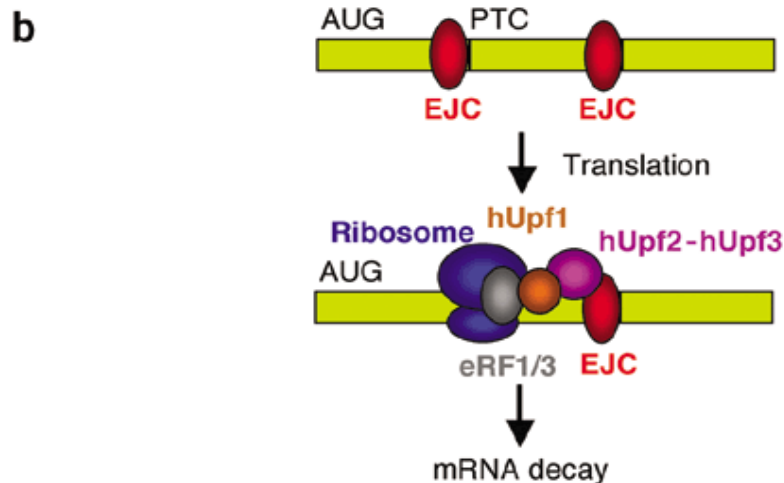
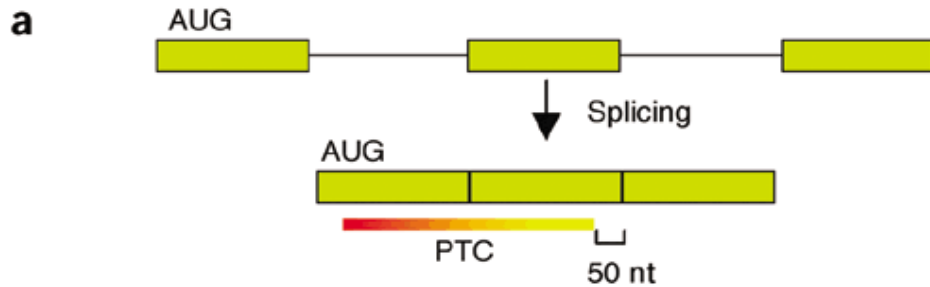


- Różne etapy biogenezy i translokacji mRNA przez pory jądrowe są ściśle sprzężone. Centralna role w tym sprzężeniu gra RNA Pol II, która pośredniczy w ściąganiu czynników kluczowych dla obróbki i eksportu. Ubikwityna i E3 ligaza przyłączają się ko-transkrypcyjnie i uczestniczą w eksporcie kompleksów mRNAP

(Iglesias and Stutz, 2008).

NMD- Nonsense-Mediated Decay

System degradacji nieprawidłowych mRNA, zawierających PTC (Premature Termination Codon) - przedwczesne kodony terminacyjne translacji



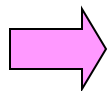
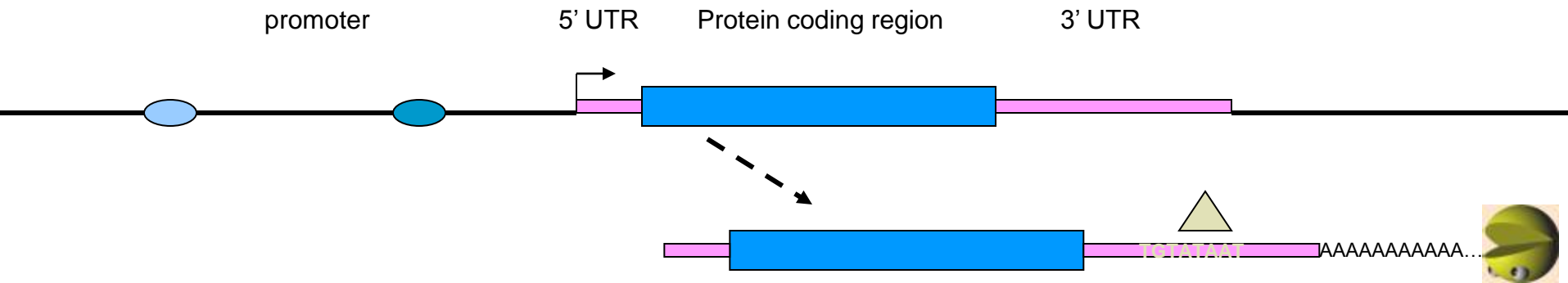
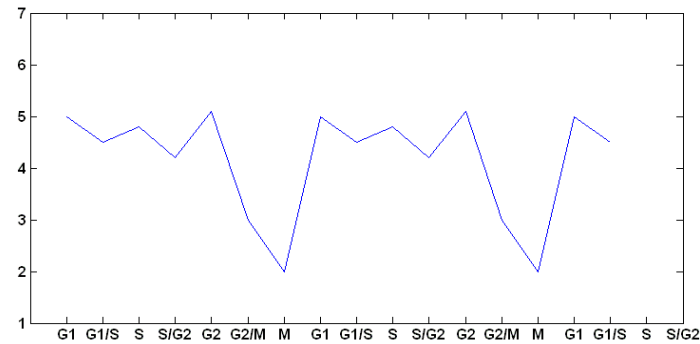
Ścieżka NMD wywiera bezpośredni wpływ na setki zaburzeń genetycznych w populacji ludzkiej. 1/4 wszystkich znanych mutacji u człowieka indukuje NMD

EJC – exon junction complex

The cell transcriptome

gene expression profile

AAATCGGAA**TTGGAGG**TATCGGATCTTGTTGAATATCCAC**CCAATGT**CTTACCCCTGTATTTTA...



Balance between transcription activation and transcript degradation

Functional sequence motifs in 3' UTRs

Finding sequence elements associated with transcript stability derived from 3' UTRs of yeast mRNAs

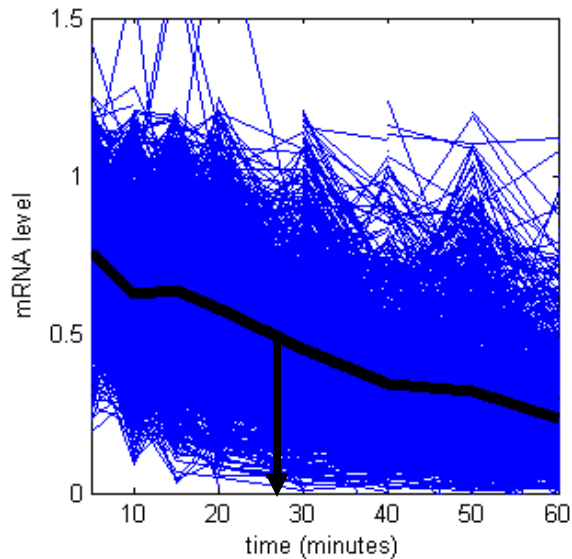
Why 3' UTRs ?

- 3' UTRs were previously inferred to be involved in controlling:
 - Transcript Stability
 - Sub-cellular localization
 - And more...

(Keursten & Goodwin, **The power of the 3' UTR: translational control and development**, Nature Reviews Gen. 2003)

Discovery of stability-associated motifs in yeast 3' UTRs

Yeast mRNA half lives
Calculated from mRNA Decay profiles



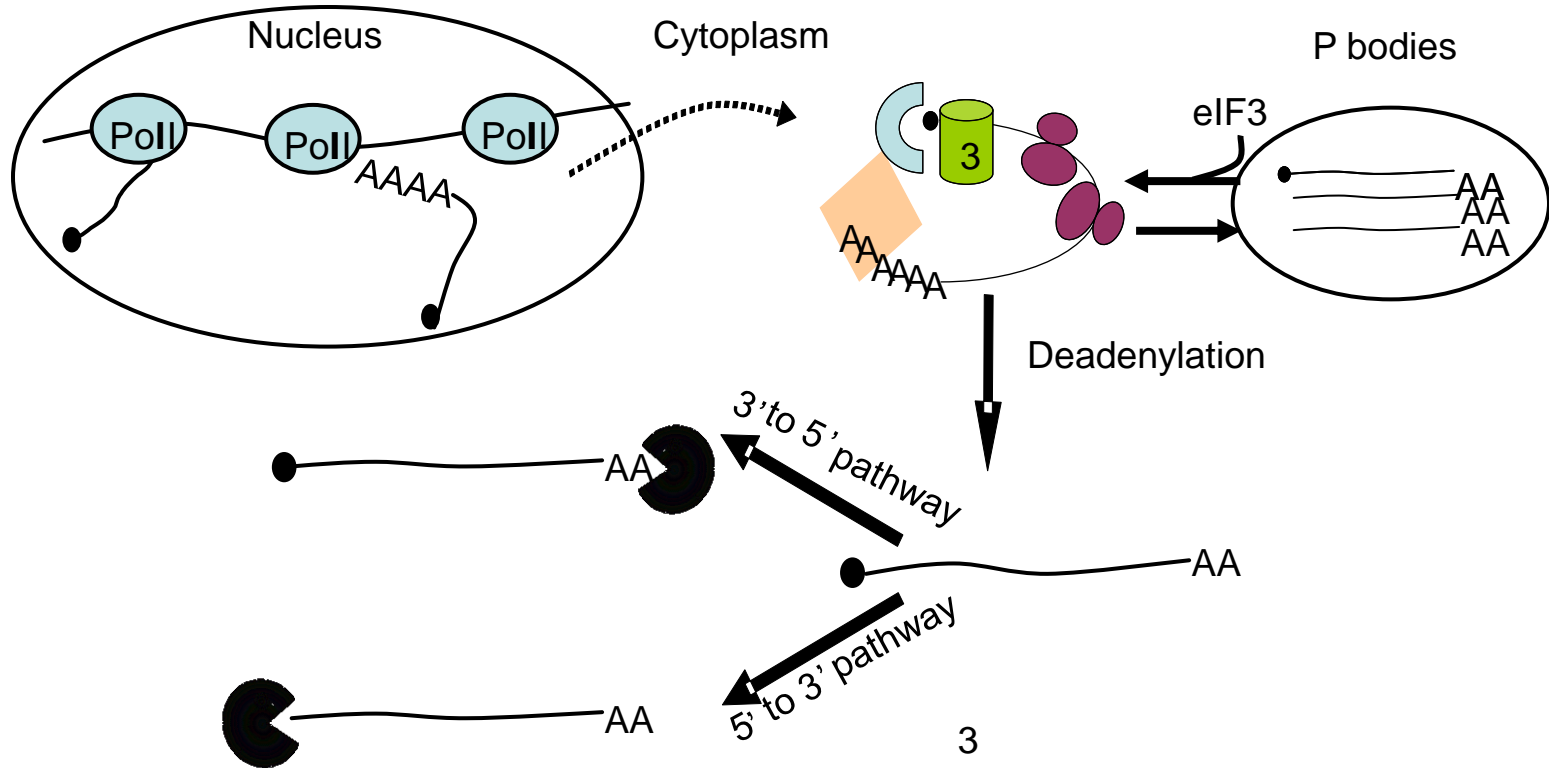
Taken from Wang et al., PNAS 2003

3' UTR sequence

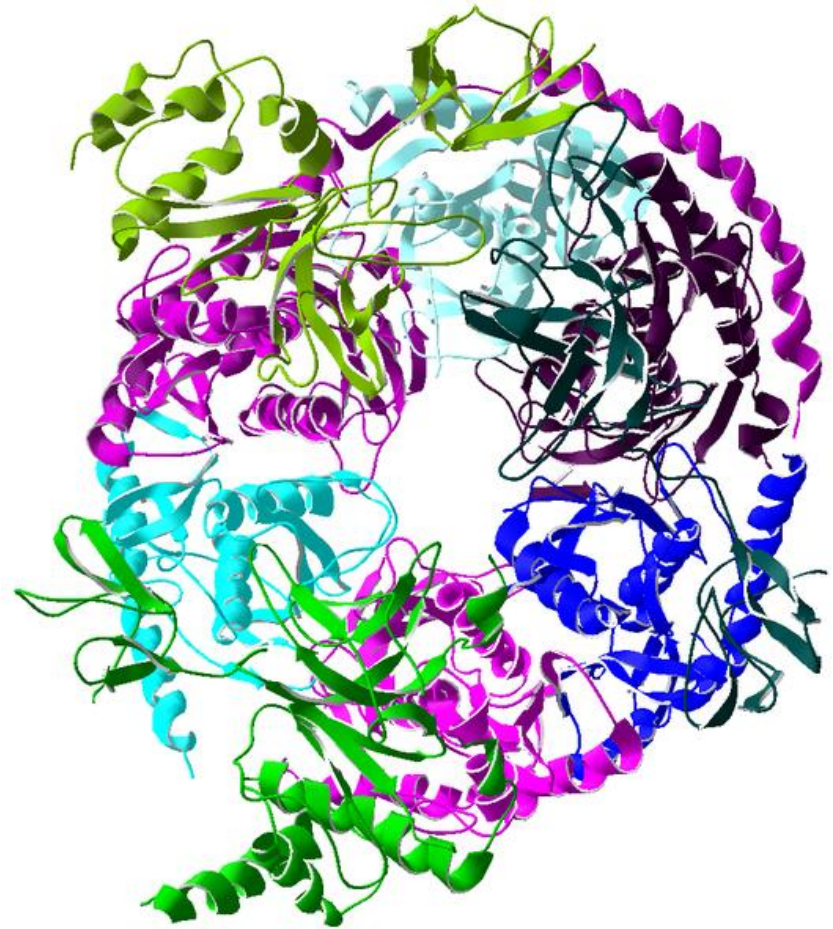
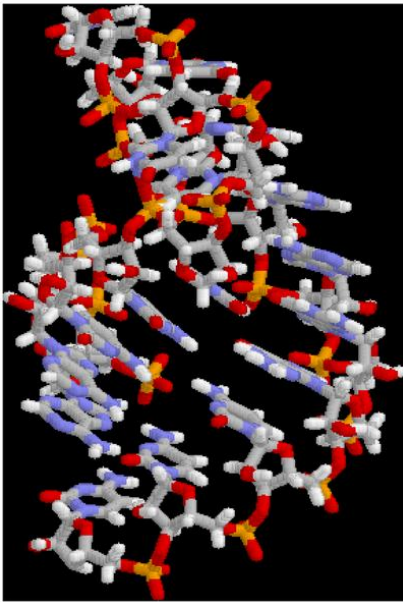
```
ACCAATCACATCGGTCGCGGAAG
CCGTCTGTGTTTCAGCATGATTG
AATCTTGAAATTGAAGAGGTGAC
TACTGTTTTTCGTCTCAGCAGCTC
CAGTACTGGTAGTTGTCTCAGCA
GCTCCAGTATTGGTTGTTGTCTC
ACTGGTAGCACTGTTCATTTTAG
AGCTGACAGACTCTTCATTTCGTA
GTCTGTGGCCTCCATGTTGGATA
GACCGTAACAACATCATTACAG
TAGCCGTGGCCGTCGAAACAATG
GCAGGTGAAGCAGTTTCGGAACA
CACACCAGATTCGCAGGAAGTAA
CAGTAACTAGCGTAGTTTGTTGC
CTCGATTCTGTGGTGGAAATAGG
ACACCATGTCGTGTATTCTGTGG
GGAGTTGTCTCAGCAGCTCCAGT
```

the “virtual northern”
Data by Hurowitz & Brown, 2003

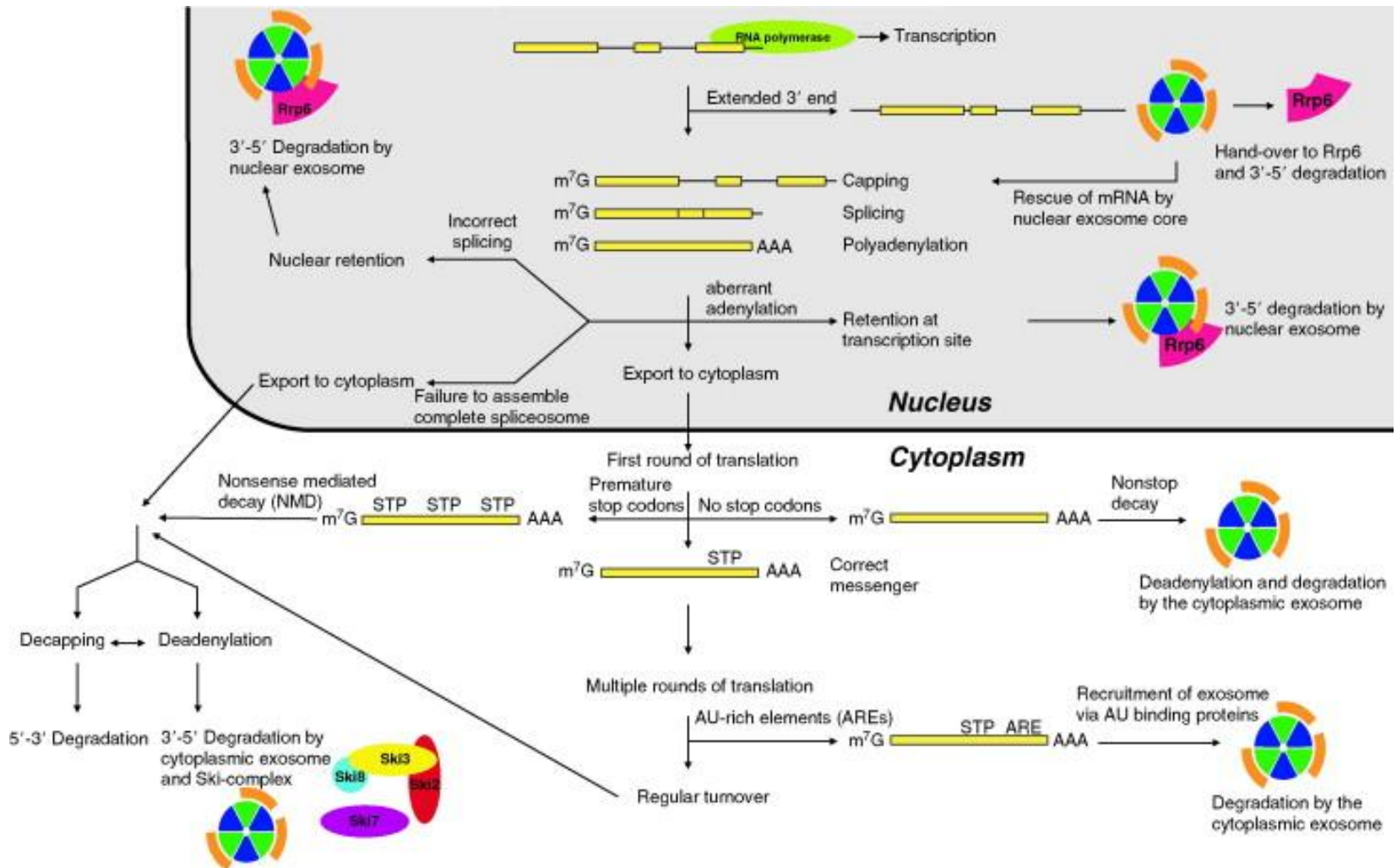
Regulacja potranskrypcyjna w cytoplazmie



The exosome: the RNA degradation machinery

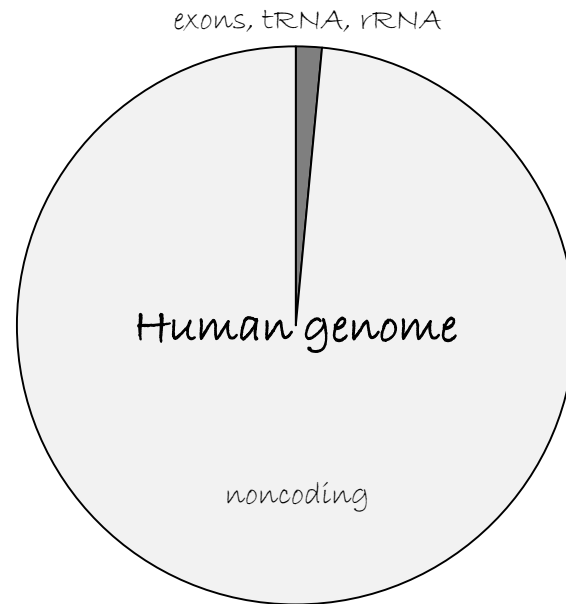


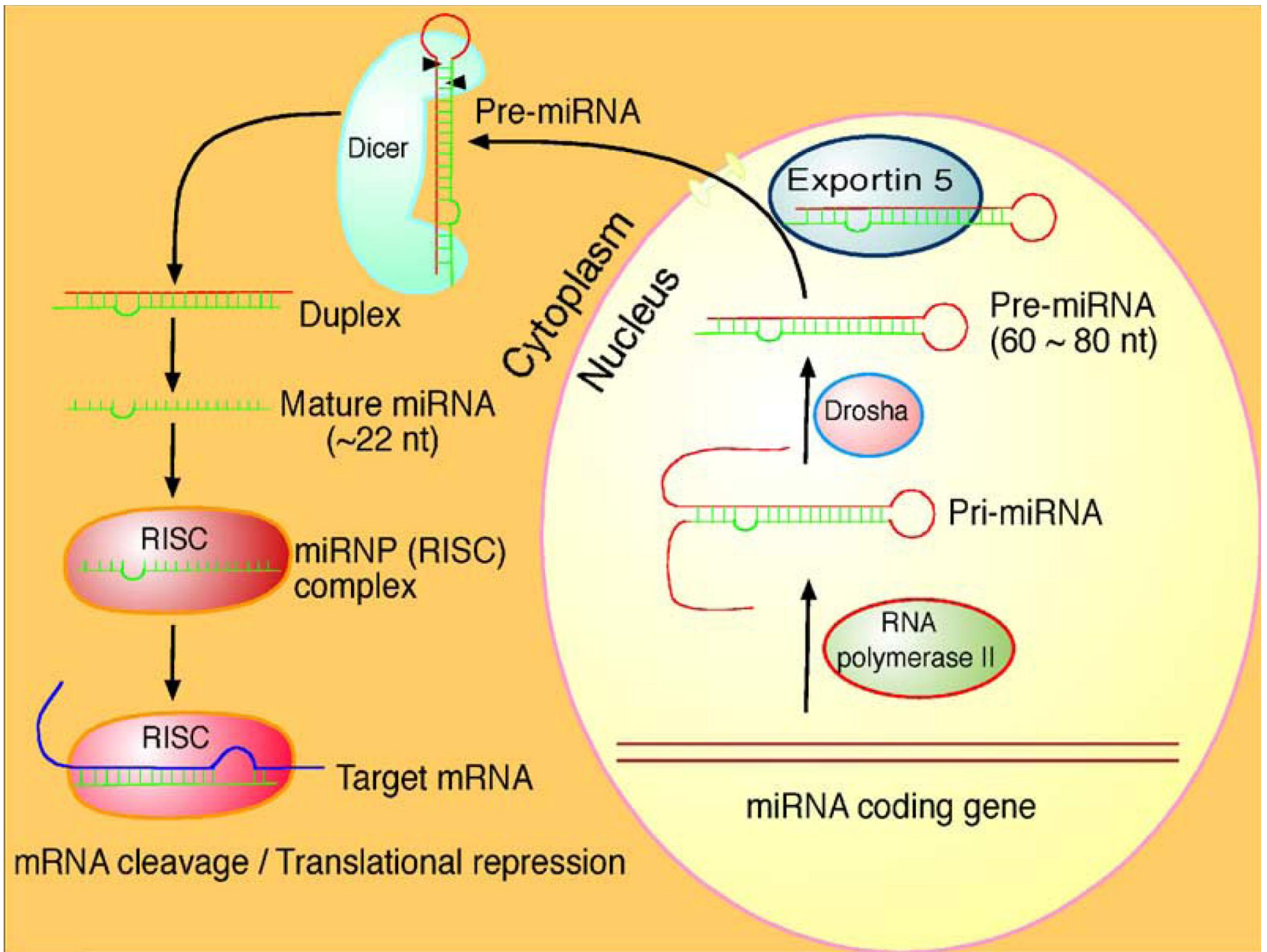
The exosome: the RNA degradation machinery



[Geurt Schilders](#), [Erwin van Dijk](#), [Reinout Raijmakers](#), [Ger J.M. Pruijn](#)
 Cell and Molecular Biology of the Exosome: How to Make or Break an RNA

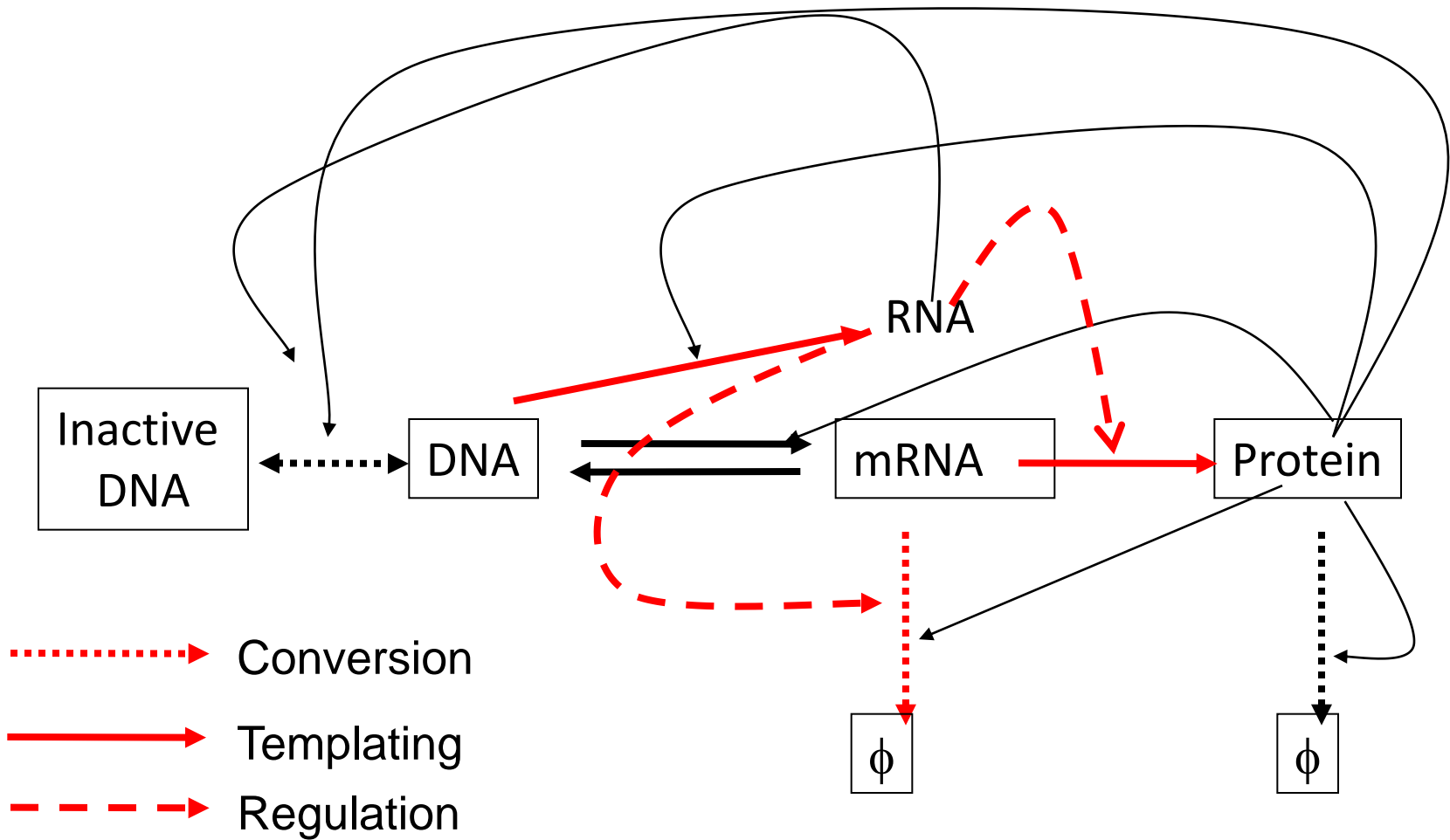
None-coding RNAs - the new revolution in molecular biology





The Central Dogma of Molecular Biology

Expressing the genome



re-definition of a gene

