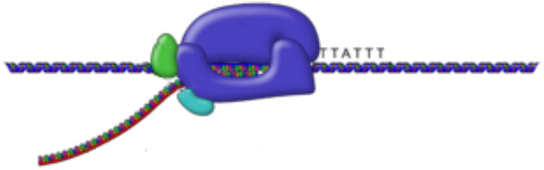
Gen eukariotyczny

Działanie i regulacja – etapy posttranskrypcyjne

Literatura

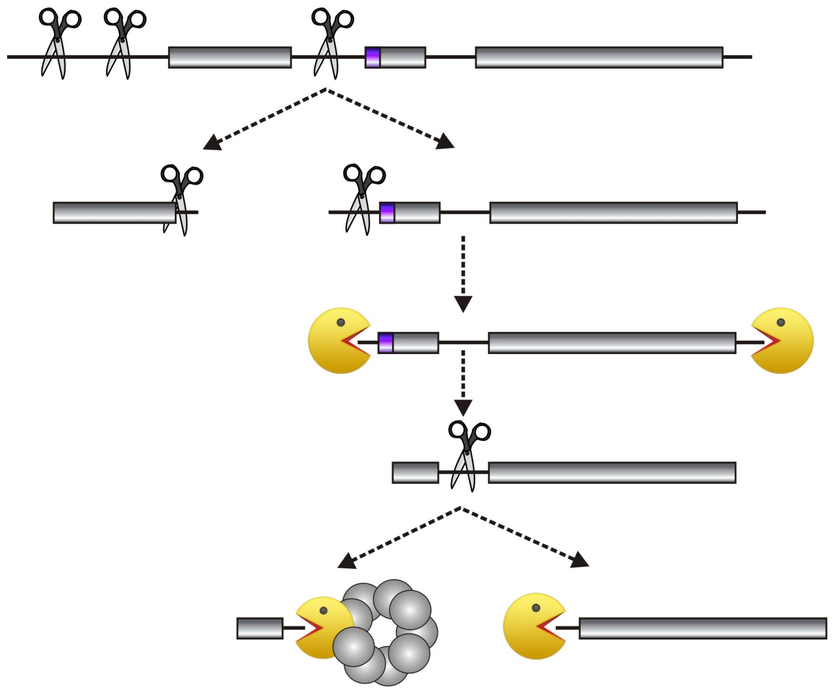
- Allison, r. 13
- Brown, r. 12
-

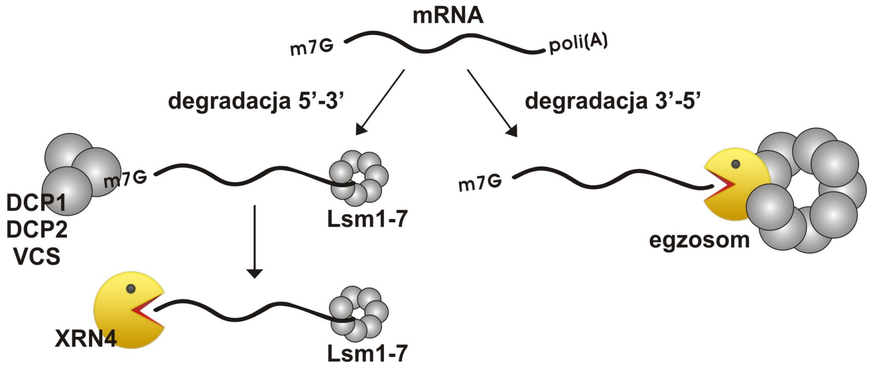
Poziom RNA w komórce



synteza

dojrzewanie/obróbka





degradacja

Rys. © dr Monika Zakrzewska-Płaczek, IGiB UW

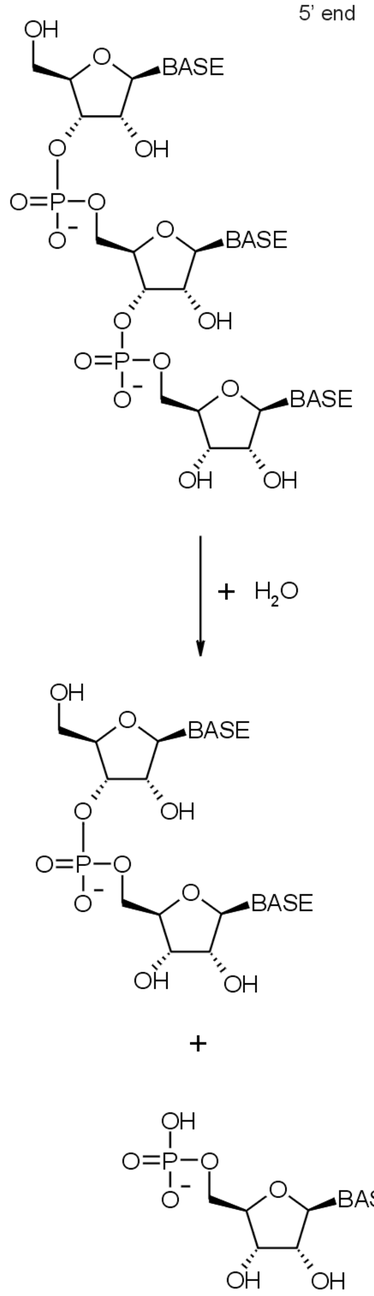
Rybonukleazy

- **Egzorybonukleazy** - odrywają nukleotydy od końca 3’ lub 5’ RNA

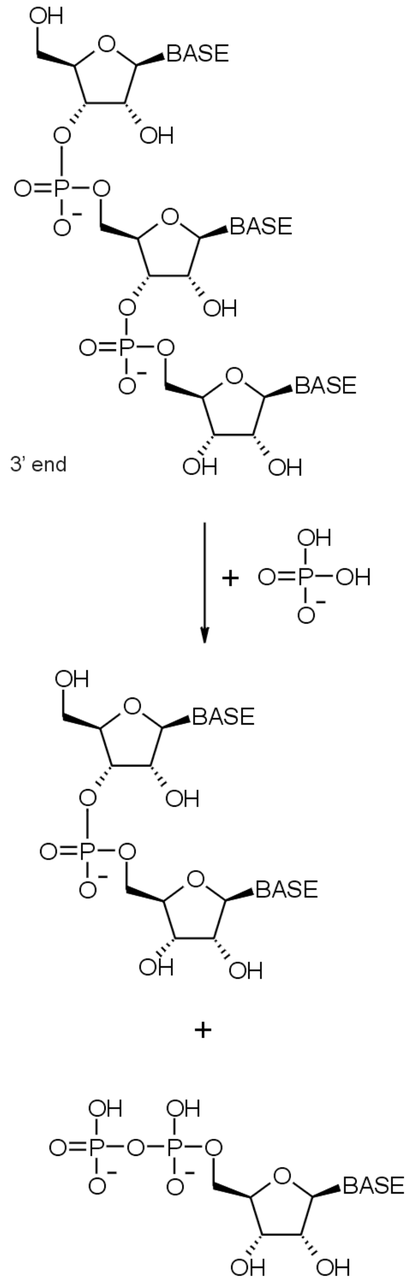
- **Endorybonukleazy** - przecinają cząsteczkę RNA

- Różne mechanizmy katalityczne
  - hydroliza
  - fosforoliza

hydroliza



fosforoliza

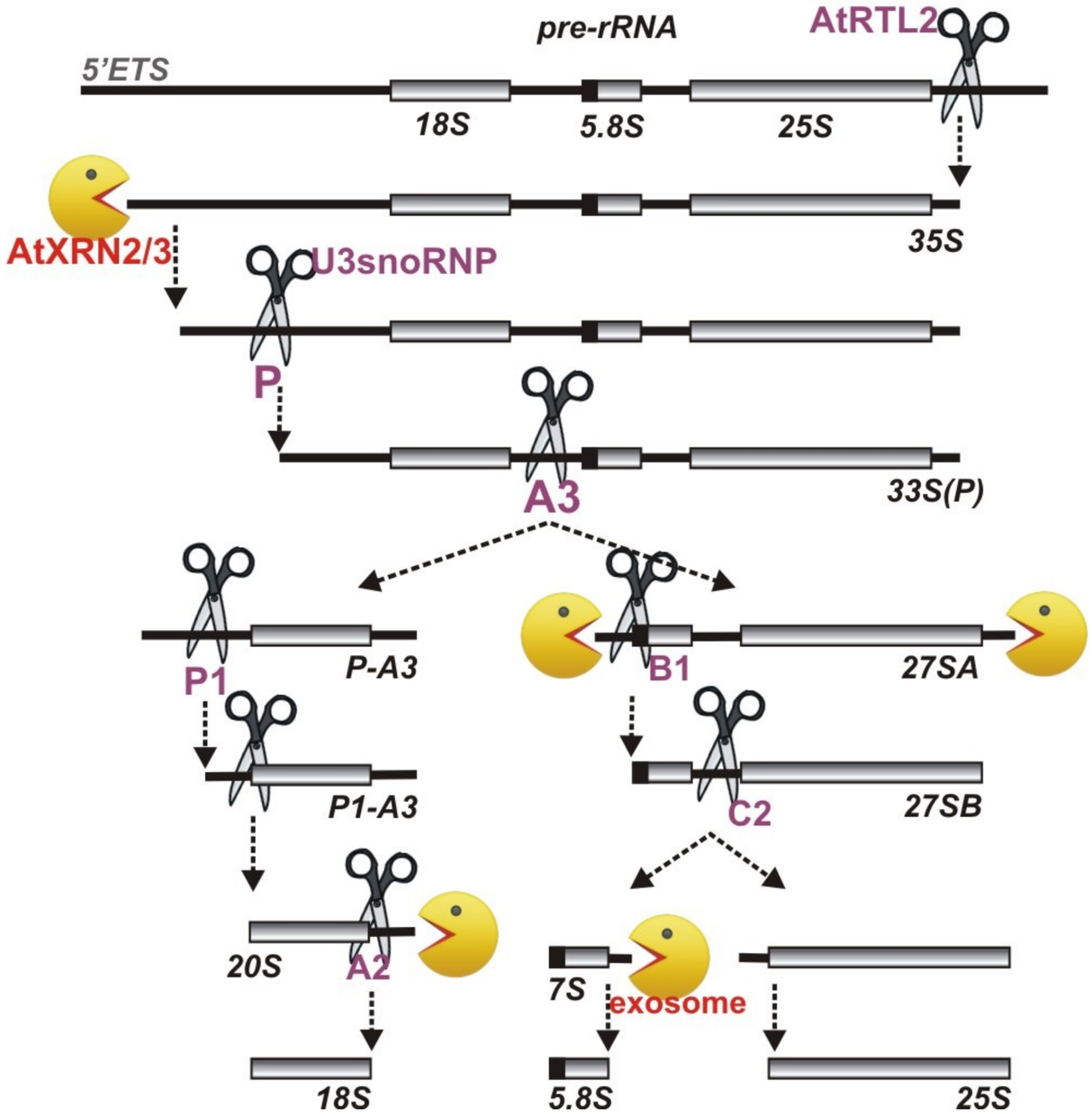


Obróbka transkryptów pol I i pol III

- Wieloetapowe mechanizmy cięcia
- rRNA – jedna jednostka transkrypcyjna, złożona obróbka
- tRNA – cięcie prekursora na końcu 3’ (RNaza Z) i 5’ (RNaza P)

Obróbka prekursora rRNA

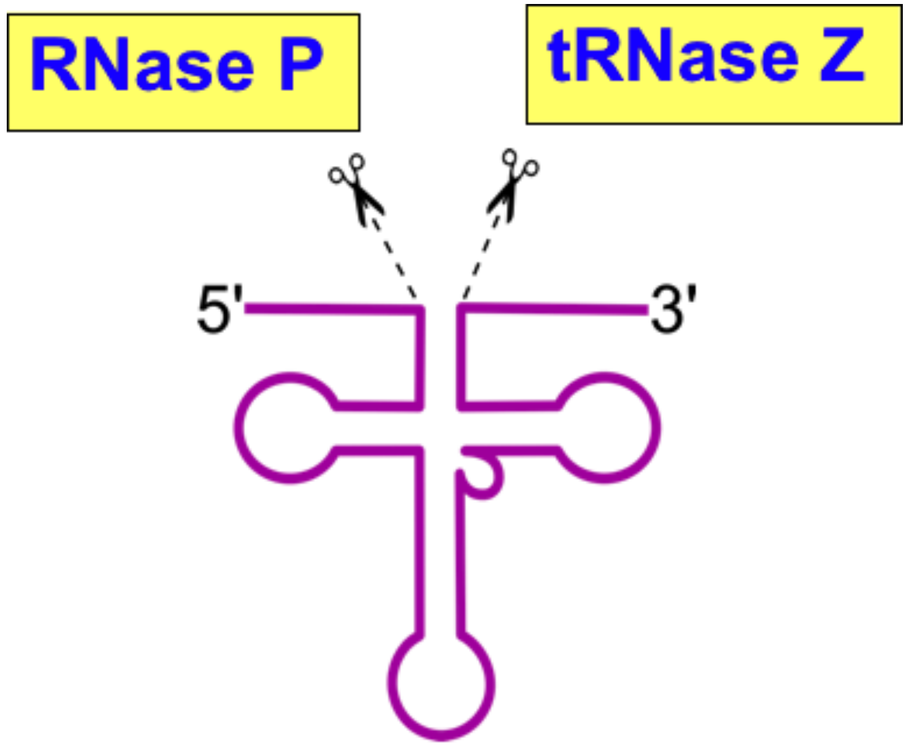
- Zachodzi w jąderku
- Uczestniczą liczne RNazy i kompleksy białek i snoRNA: **snoRNP** (small nucleolar RNP)



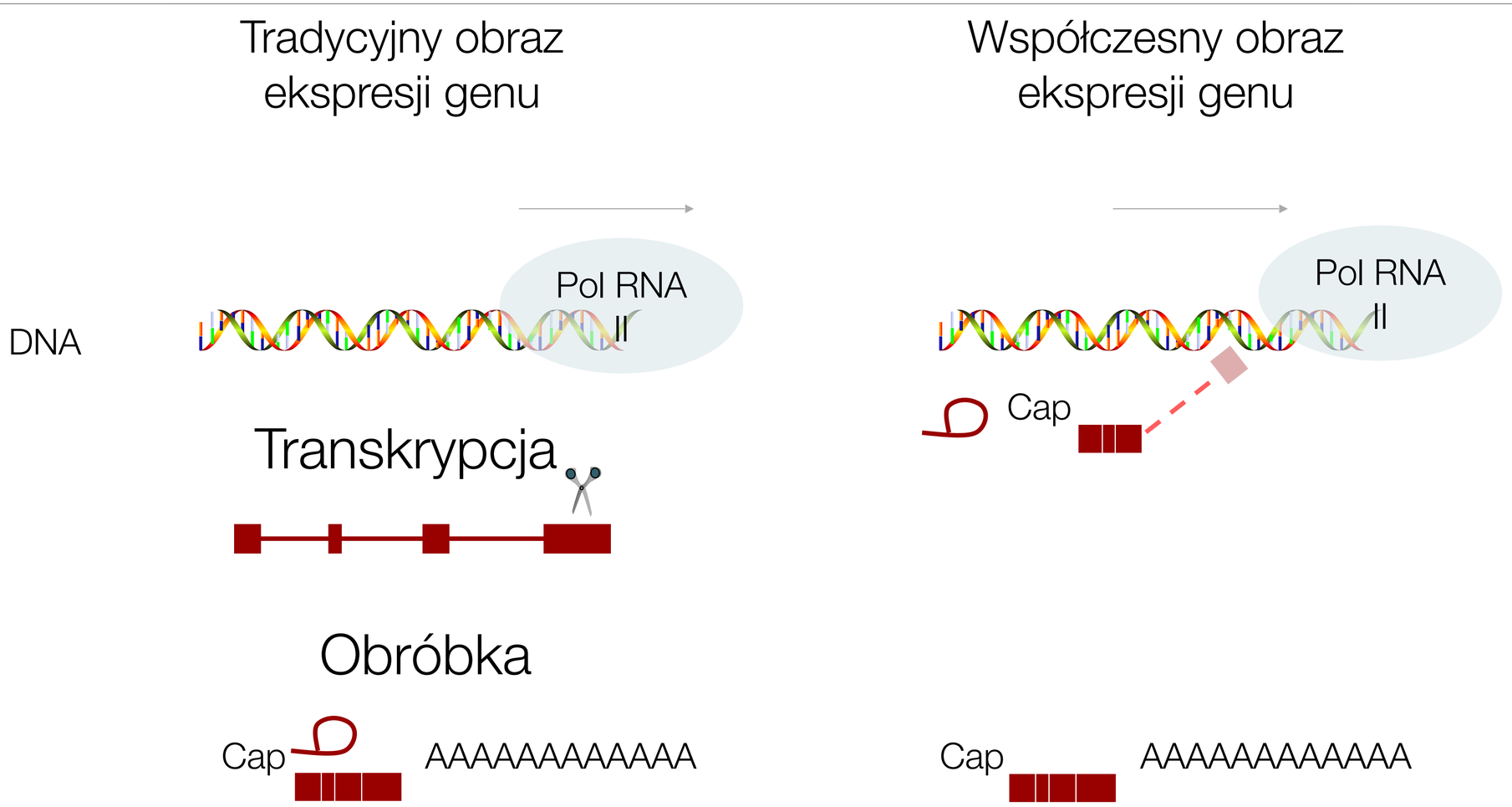
Zakrzewska-Płaczek et al., Nucleic Acids Res. 2010

Obróbka pre-tRNA

- Dwie endonukleazy: RNaza P i tRNaza Z
- posttranskrypcyjnie dodana sekwencja CCA na końcu 3’
- liczne modyfikacje zasad (metylacja itp.)



Transkrypcja i obróbka RNA są sprzężone



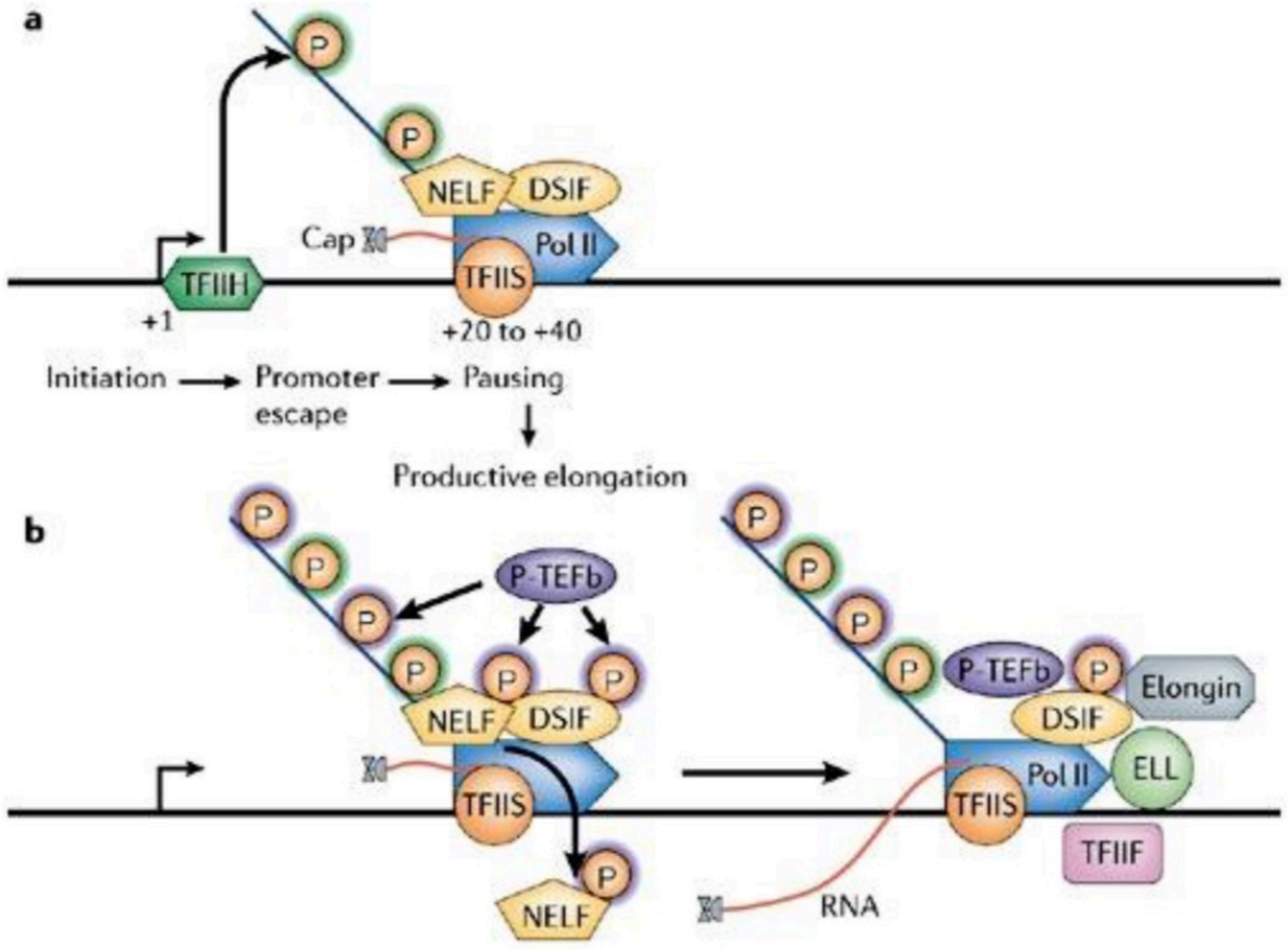
Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Sprzężenie transkrypcji i obróbki RNA

- Na poszczególnych etapach tworzą się kompleksy różnych białek z polimerazą RNA II
  - Inicjacja/synteza czapeczki
  - Elongacja/splicing
  - Terminacja/poliadenylacja
- Kluczowym obszarem jest **C-koniec polimerazy II (CTD)** – regulacja przez fosforylację

Przejście inicjacja - elongacja

- **C-końcowa domena polimerazy** (CTD) zawiera sekwencję z powtórzeniami YSPTSPS
- Fosforylacja CTD reguluje przejście od kompleksu inicjacji do kompleksu elongacji
- Uwolnienie się z promotora i przejście do produktywnej transkrypcji
- Zmienia się skład towarzyszących polimerazie białek
  - inicjacja + przyłączanie czapeczki 5’ (kapu)
  - elongacja + składanie (splicing)



Saunders et al. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 557–567, 2006

Czapeczka (kap) 5’

- Synteza tuż po inicjacji transkrypcji
- Istotna dla eksportu i translacji mRNA
- Chroni przed degradacją przez egzorybonukleazy 5’-3’ z rodziny Xrn

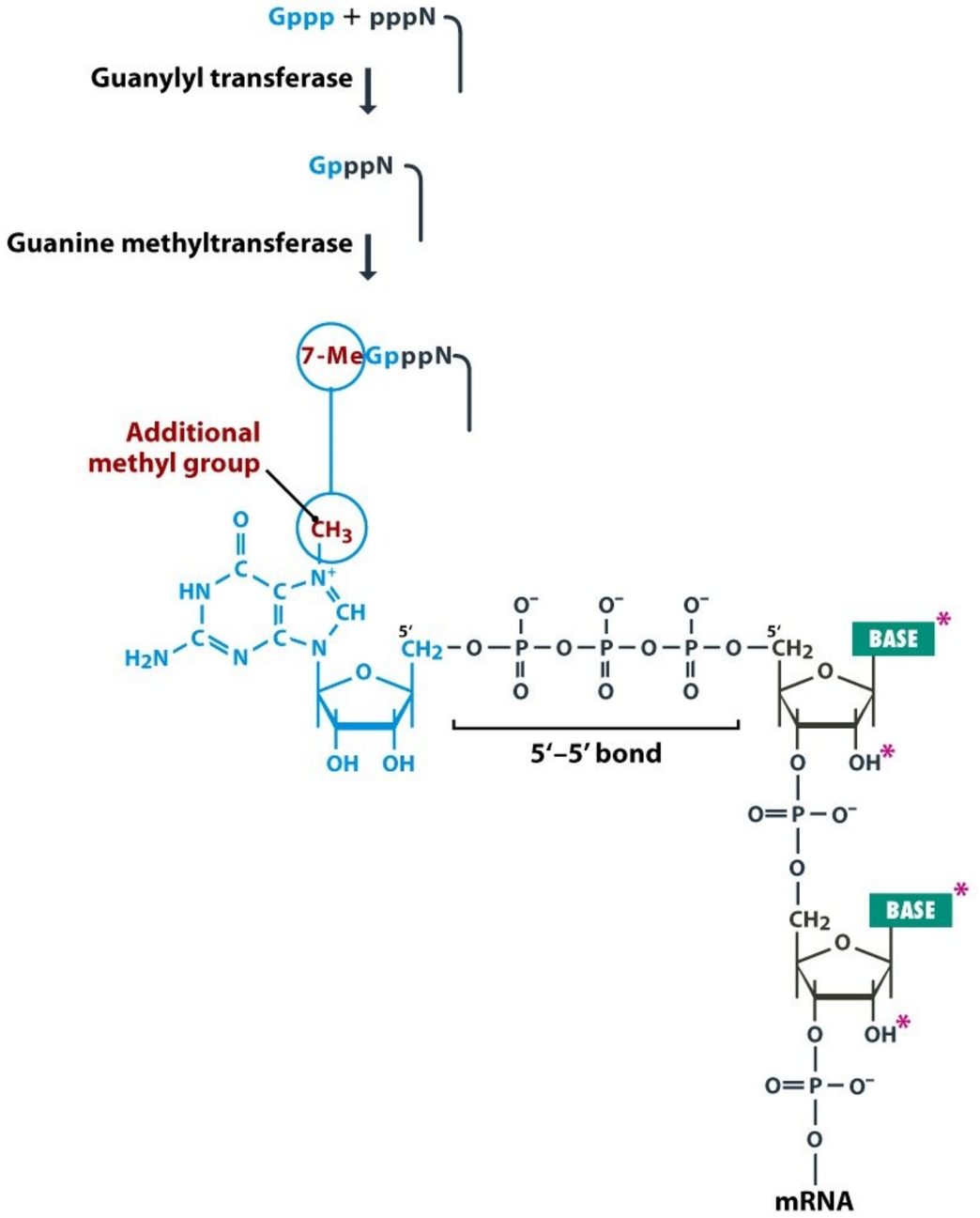


Figure 12-21 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Terminacja i poliadenylacja

cleavage-polyadenylation specificity factor - CPSF

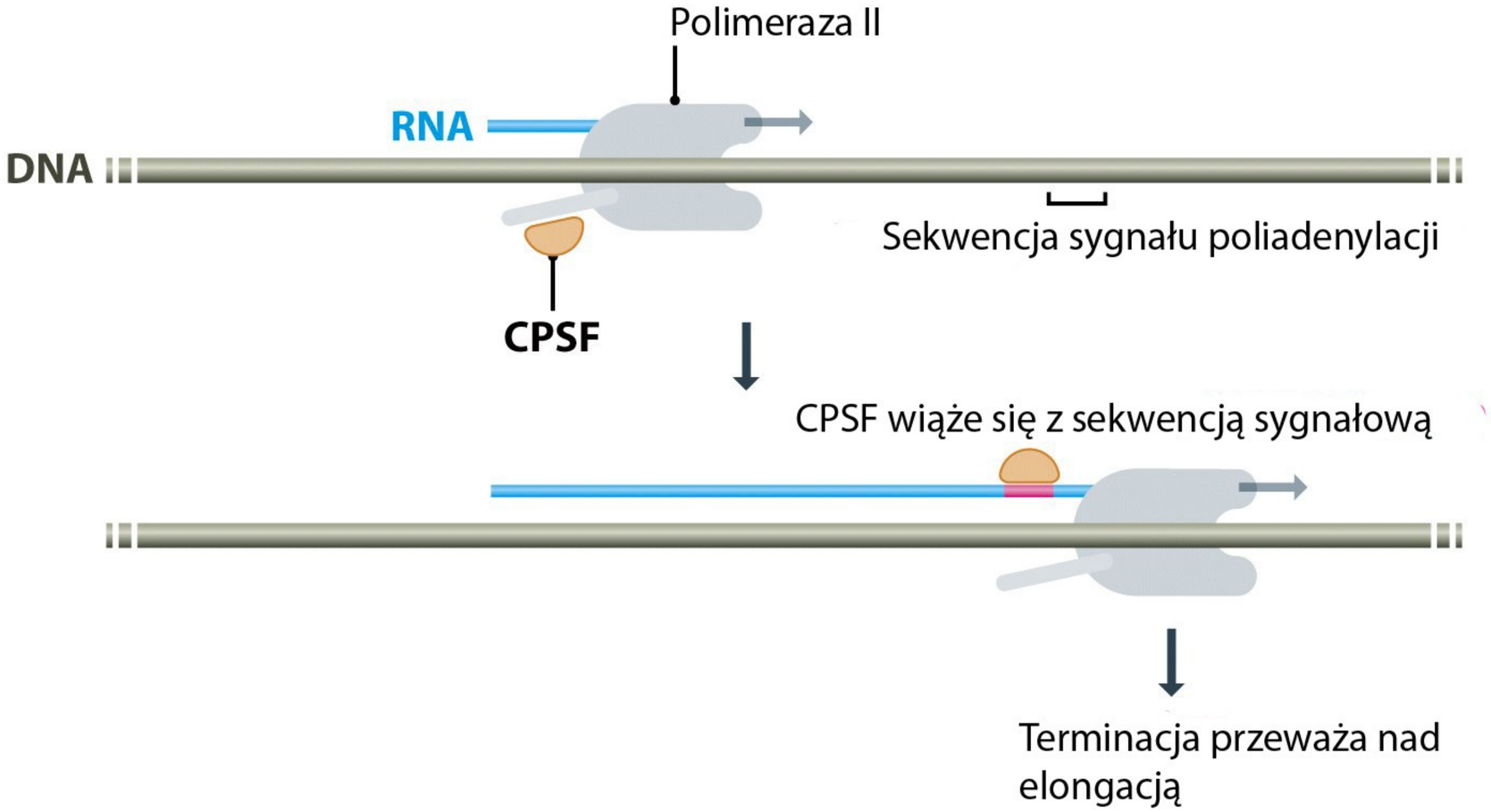


Figure 12-23 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Terminacja i poliadenylacja

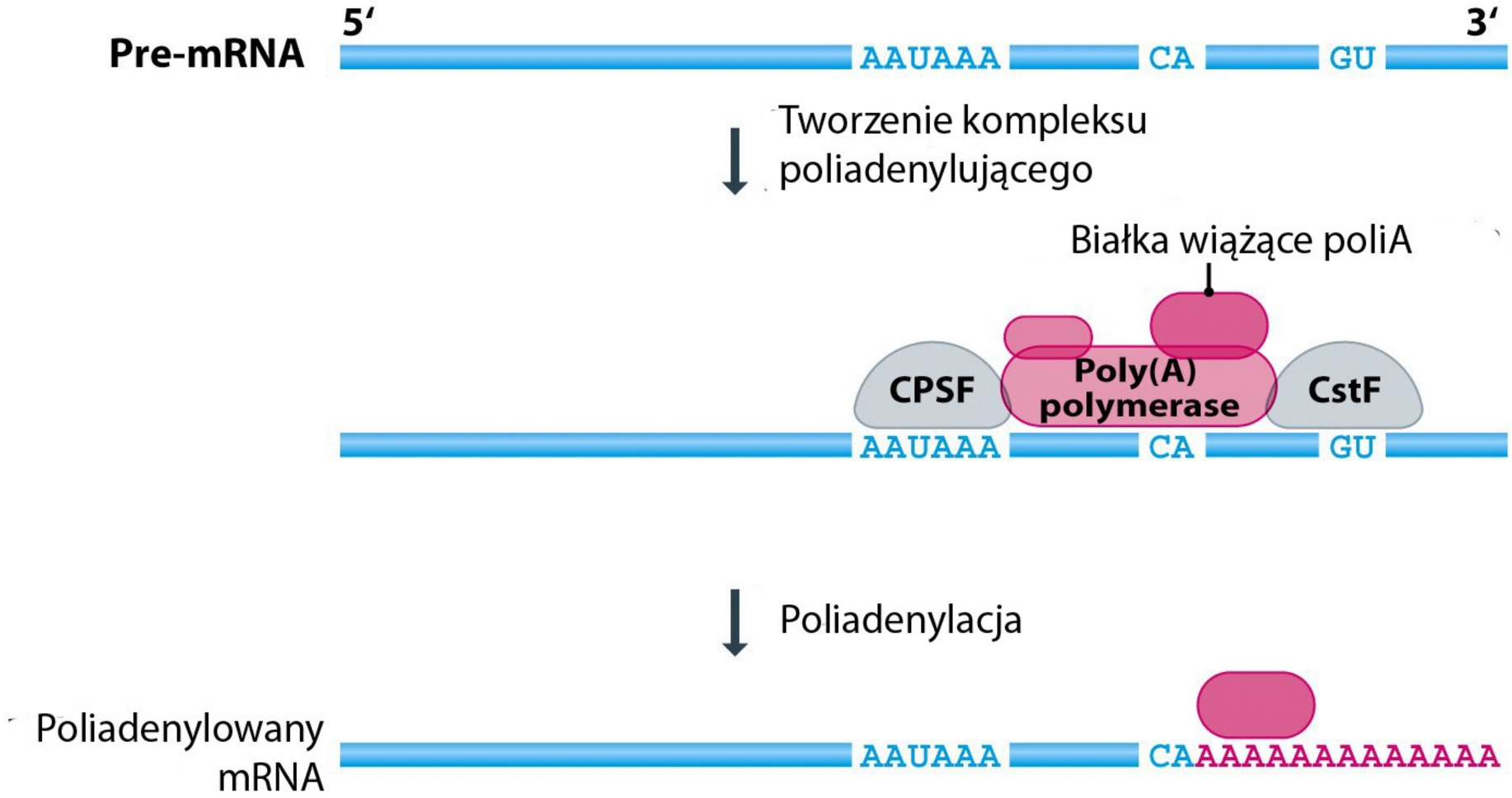
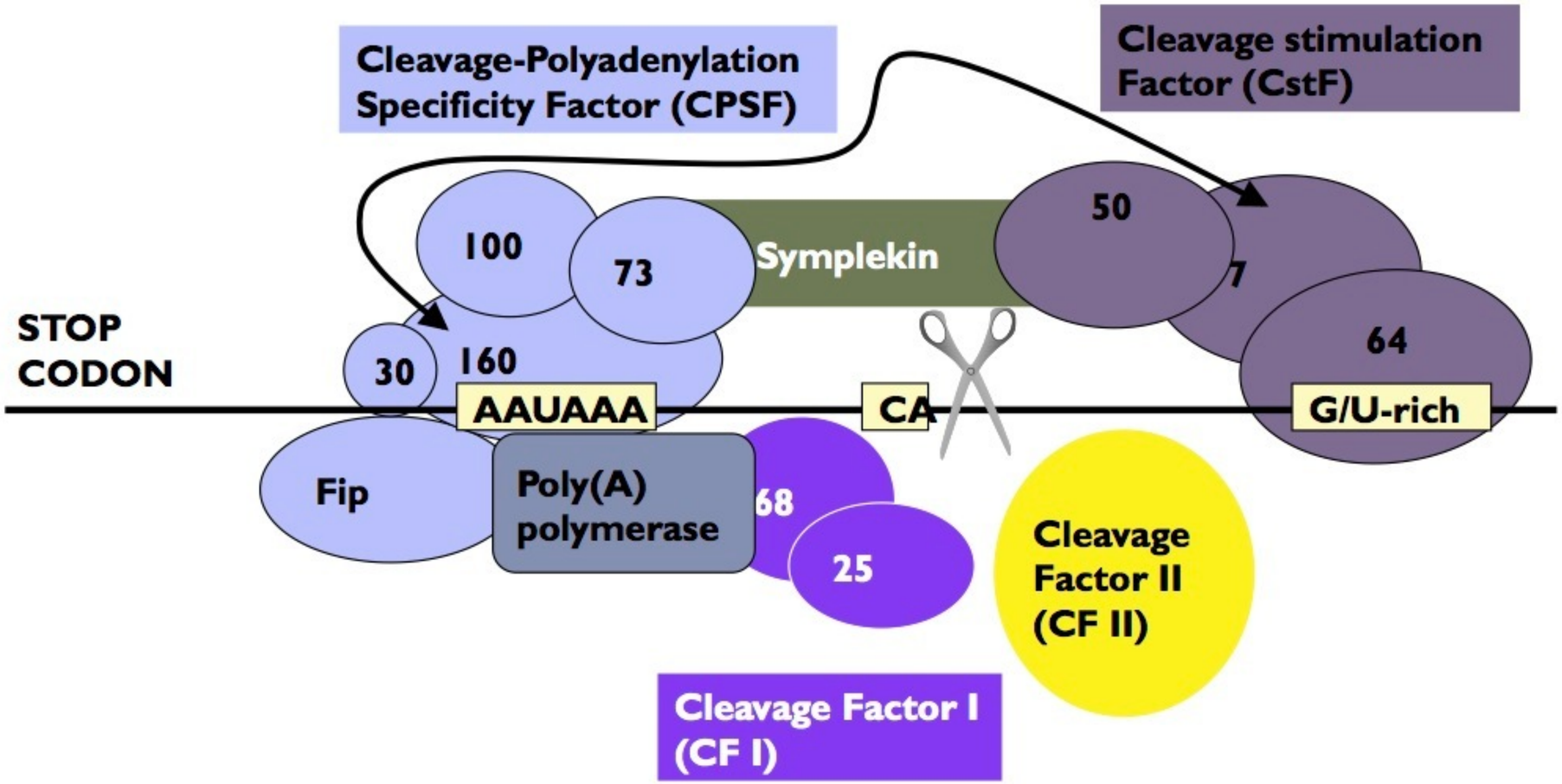


Figure 12-22 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

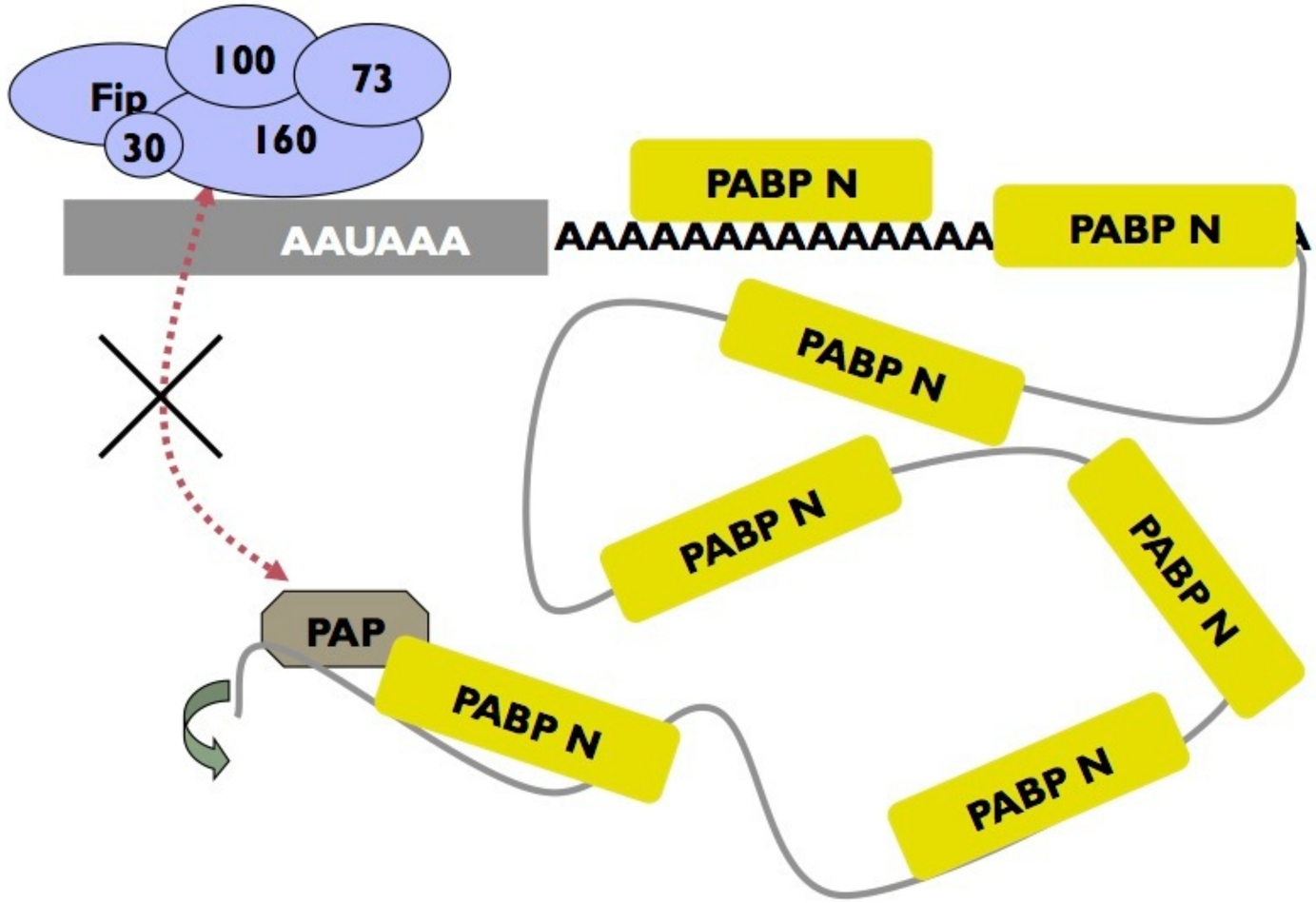
Kompleks cięcia i poliadenylacji



Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

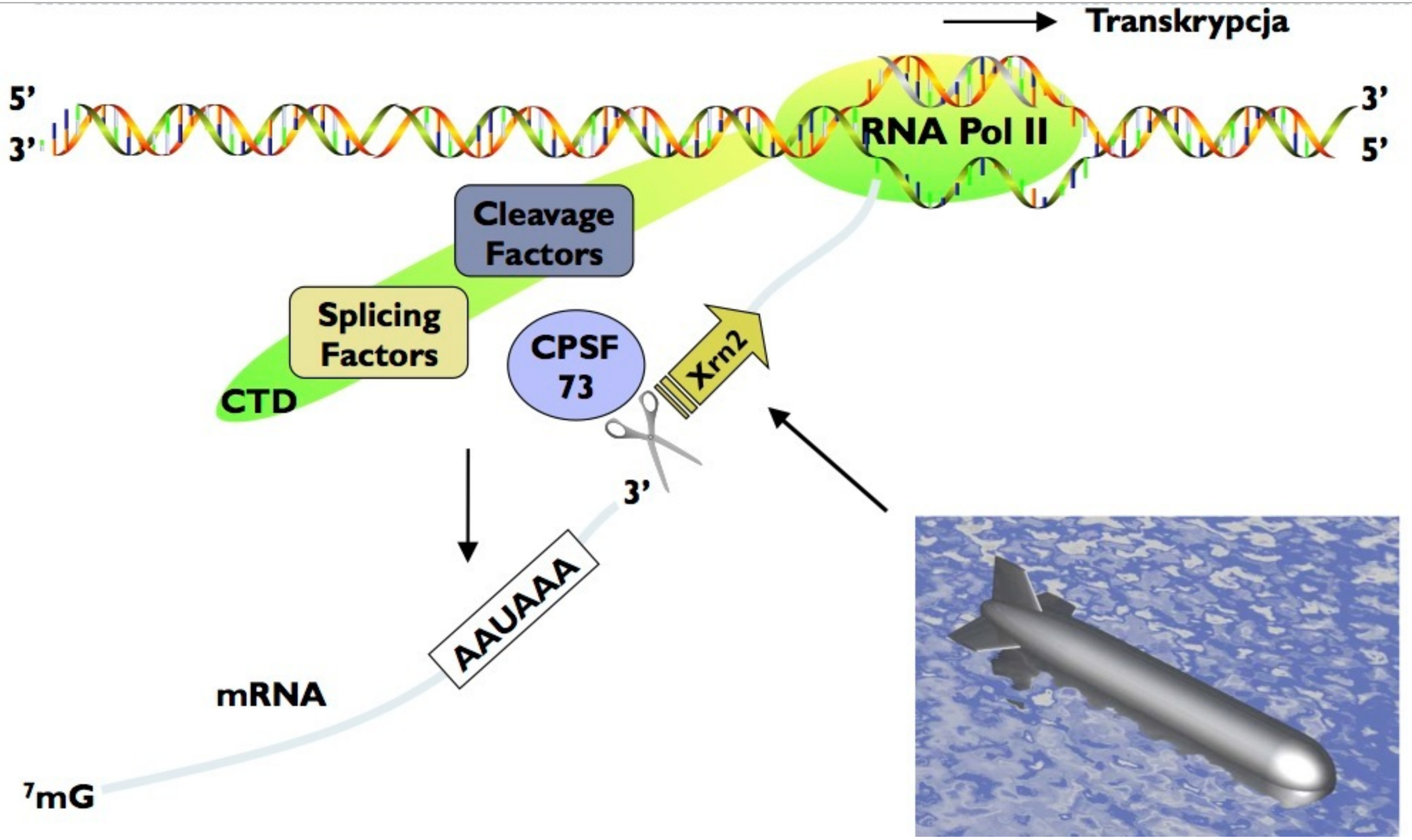
Wydłużanie ogona poliA

Koniec gdy PAP utraci kontakt z CPSF



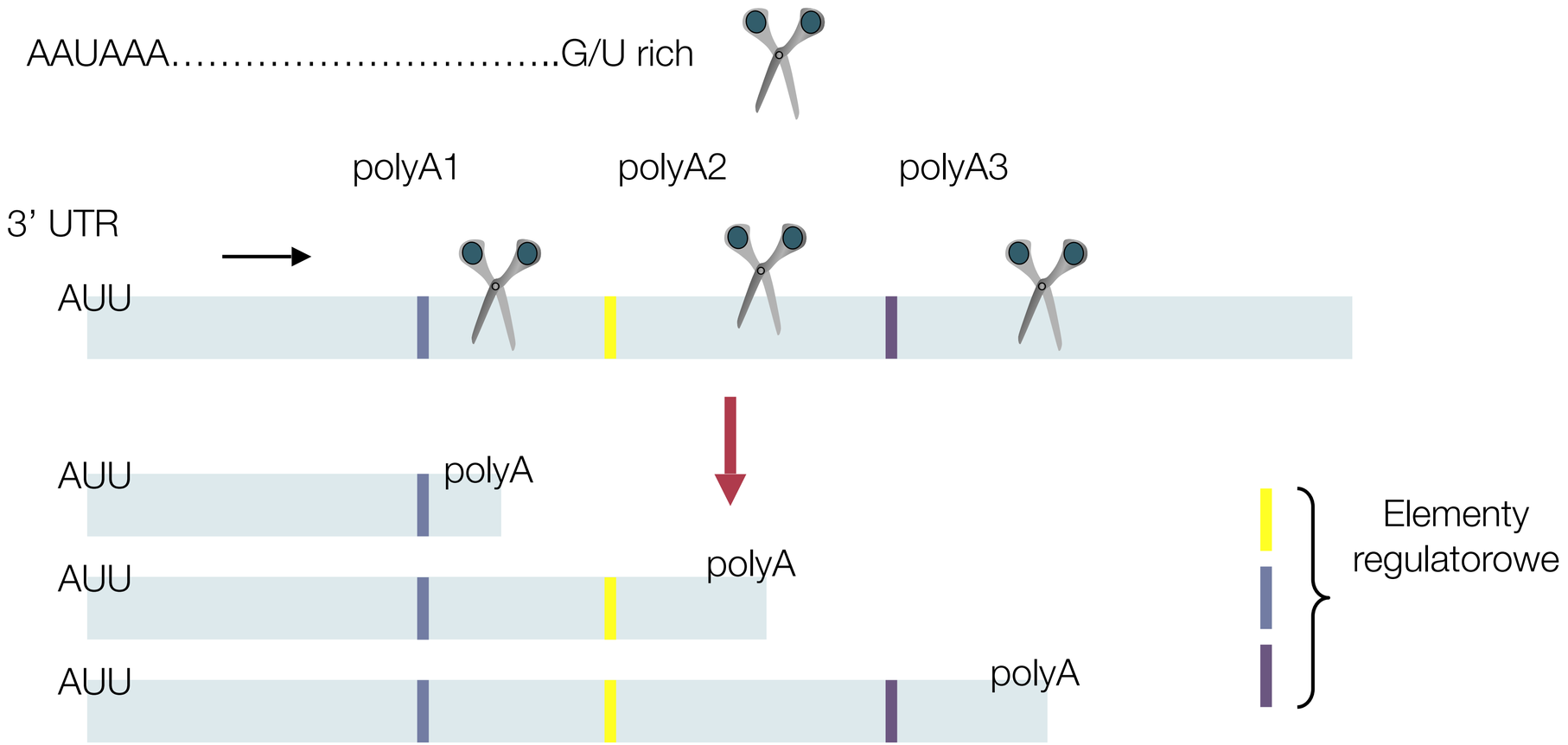
Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Terminacja – mechanizm “torpedy”



Po przecięciu przez CPSF, koniec 5’ niechroniony przez czapeczkę jest degradowany przez egzorybonukleazę Xrn2

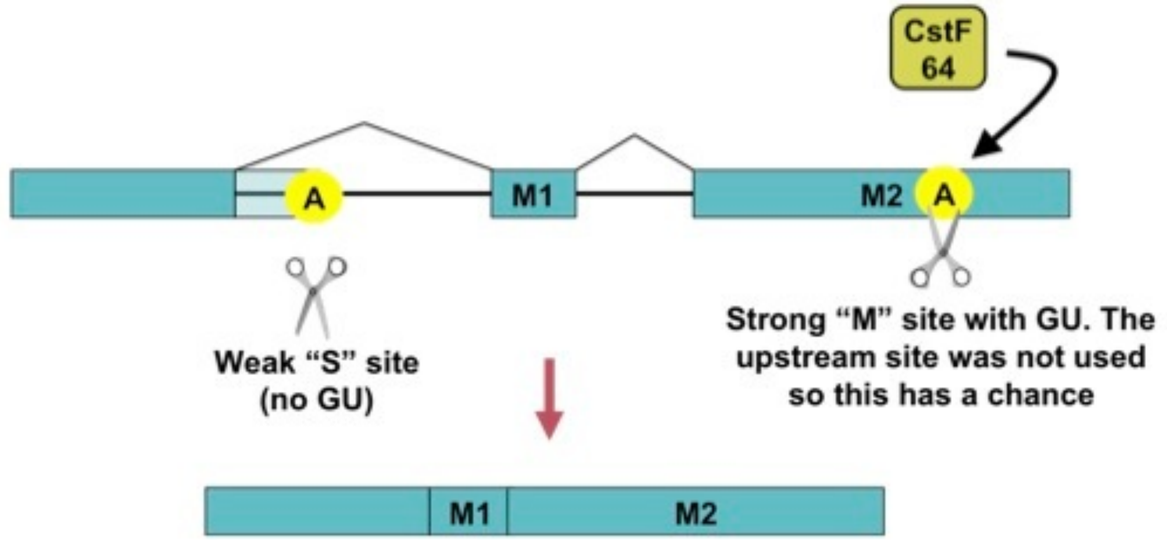
Alternatywne miejsca terminacji/poliadenylacji

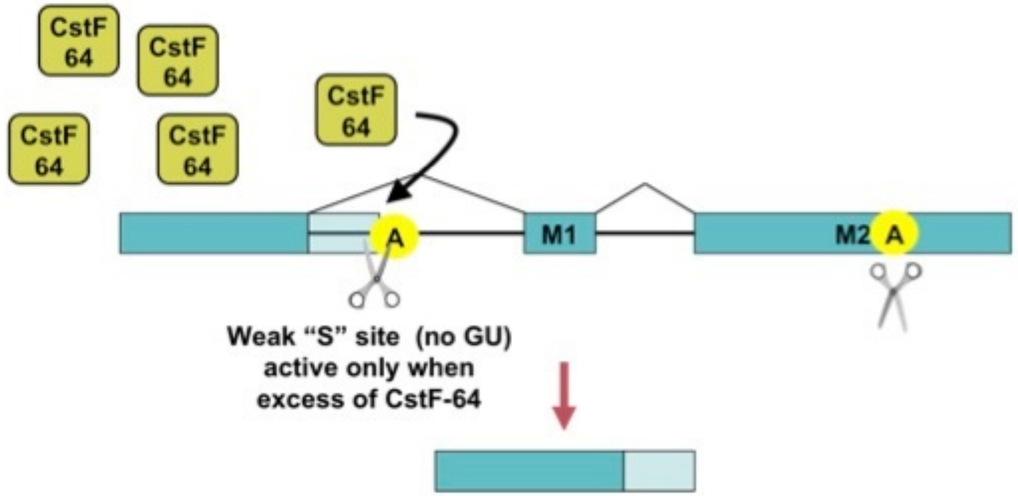


Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Alternatywna poliadenylacja

- IgM
  - forma błonowa (limfocyty B – wczesna faza dojrzewania)
  - forma rozpuszczalna (późna faza dojrzewania limfocyty w osoczu)

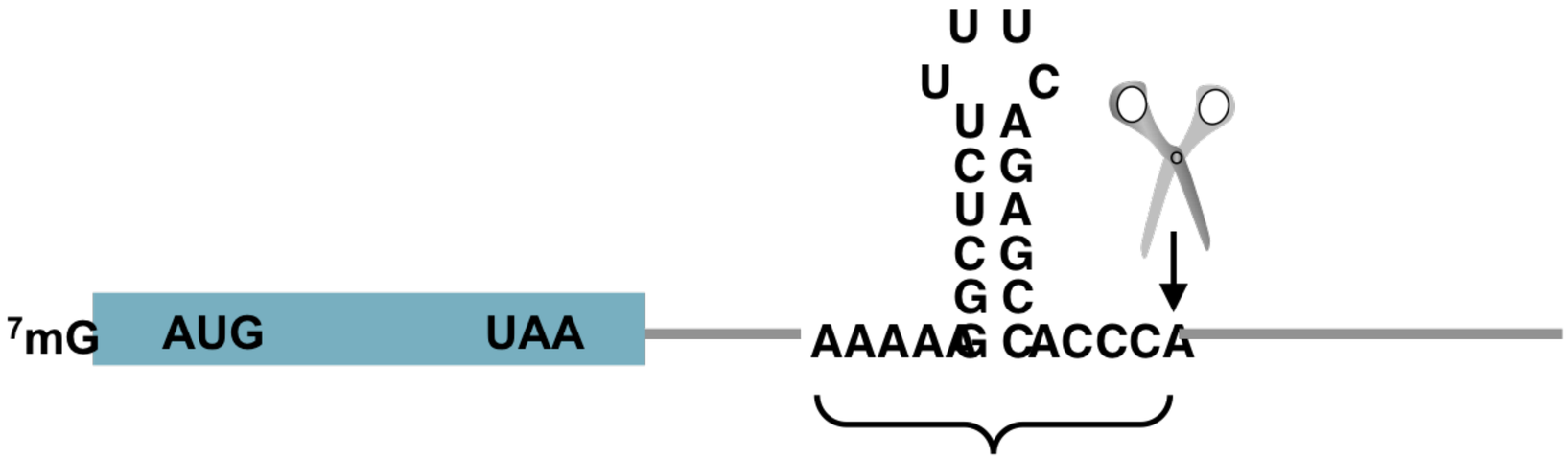




Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Poliadenylacja

- Kontroluje (zwiększa) stabilność mRNA
- Niezbędna do eksportu z jądra
- Dotyczy większości mRNA, wyjątkiem są mRNA kodujące histony



mRNA histonów stabilne w fazie S, pod koniec szybko degradowane – synchroniczna regulacja

Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

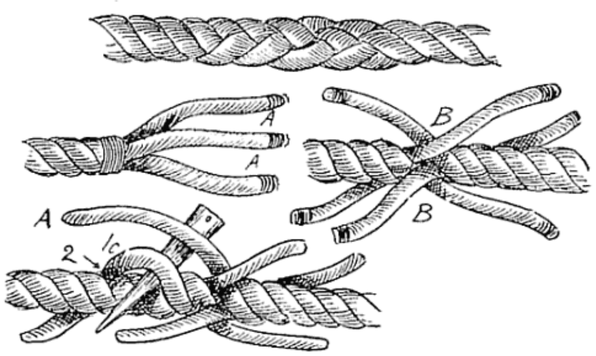
Składanie (splicing)

- **Introny** – fragmenty pierwotnego transkryptu, które są wycinane i nie występują w dojrzałym transkrypcie

- Większość genów większości eukariontów zawiera introny, w przeciętnym genie stanowią przeważającą większość sekwencji transkrybowanej

  - wyjątek: np. drożdże (pojedyncze introny w ~2% genów)

- Alternatywne składanie – różne kombinacje eksonów dają różne ostateczne transkrypty tego samego genu



Nazwy

- **Intron** - od ang. *intervening sequence*
- **Ekson** - od ang. *expressed sequence* - dlatego nie “egzo”!
- Introny nie zawsze odpowiadają sekwencjom niekodującym, a eksony nie zawsze odpowiadają sekwencjom kodującym!

Składanie mRNA jądrowego

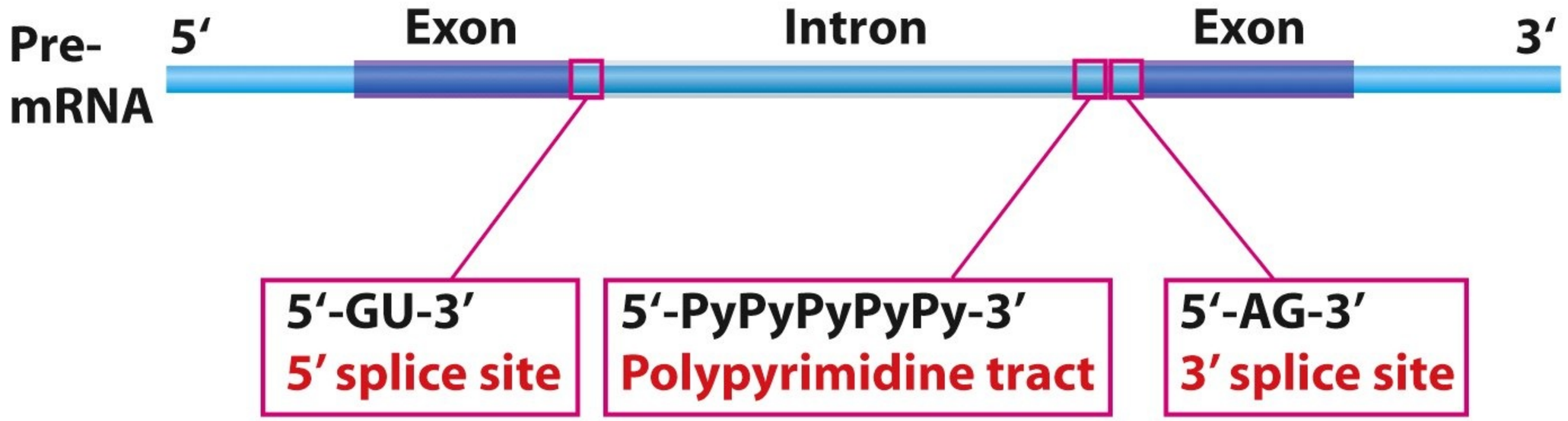


Figure 12-26 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Stąd nazwa: introny typu GU-AG

Mechanizm składania u Eukaryota

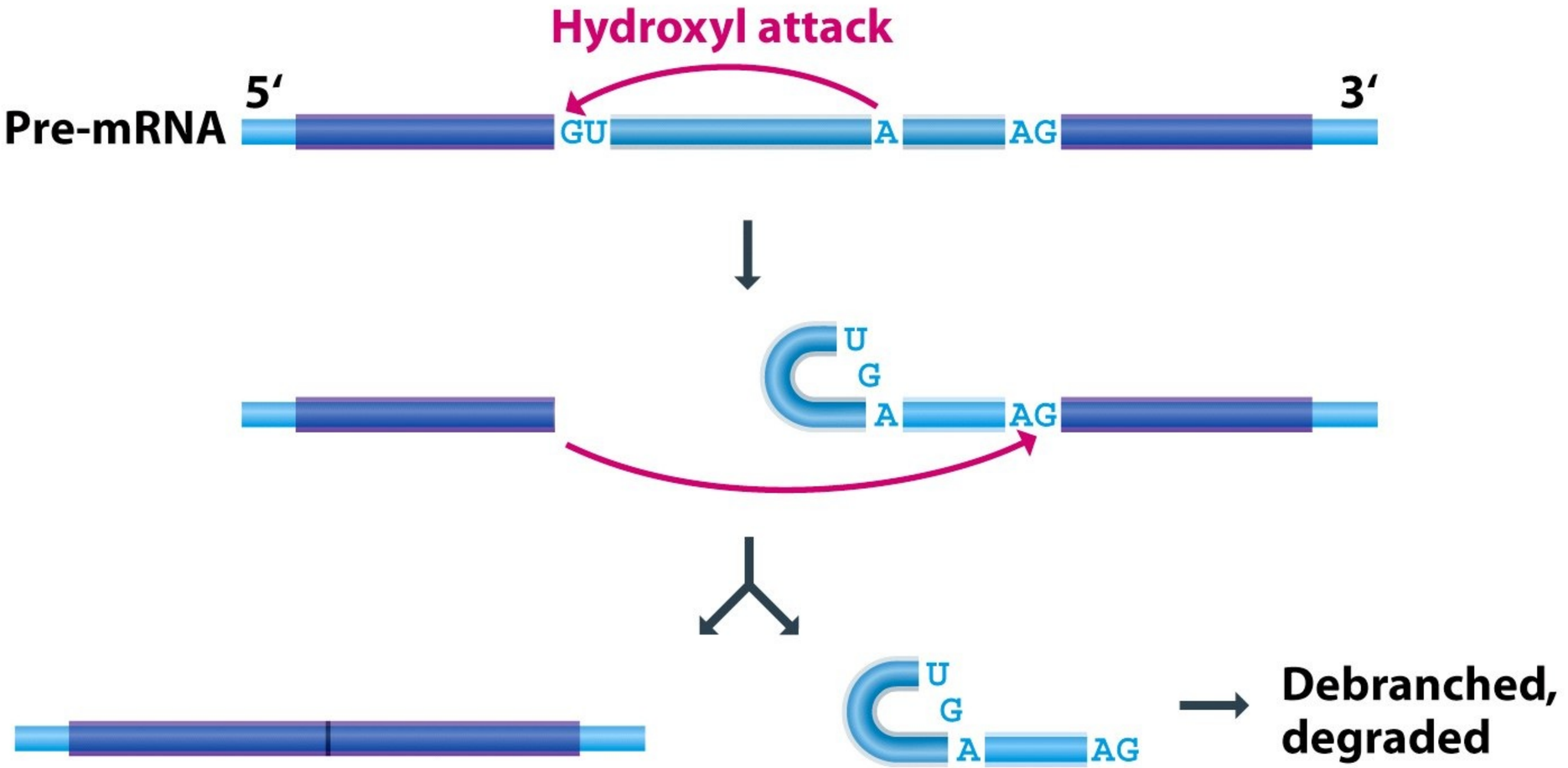


Figure 12-27 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Składanie mRNA

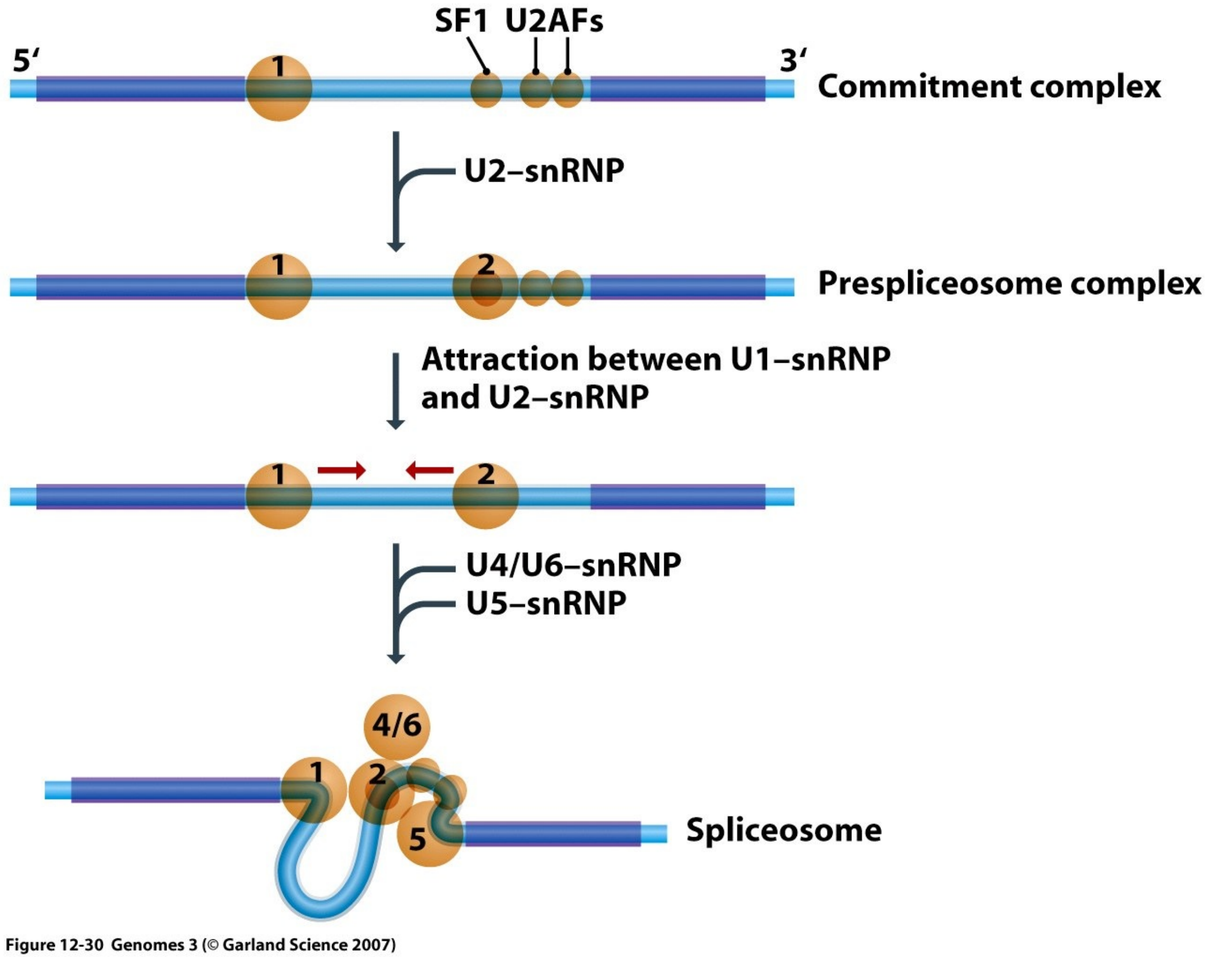
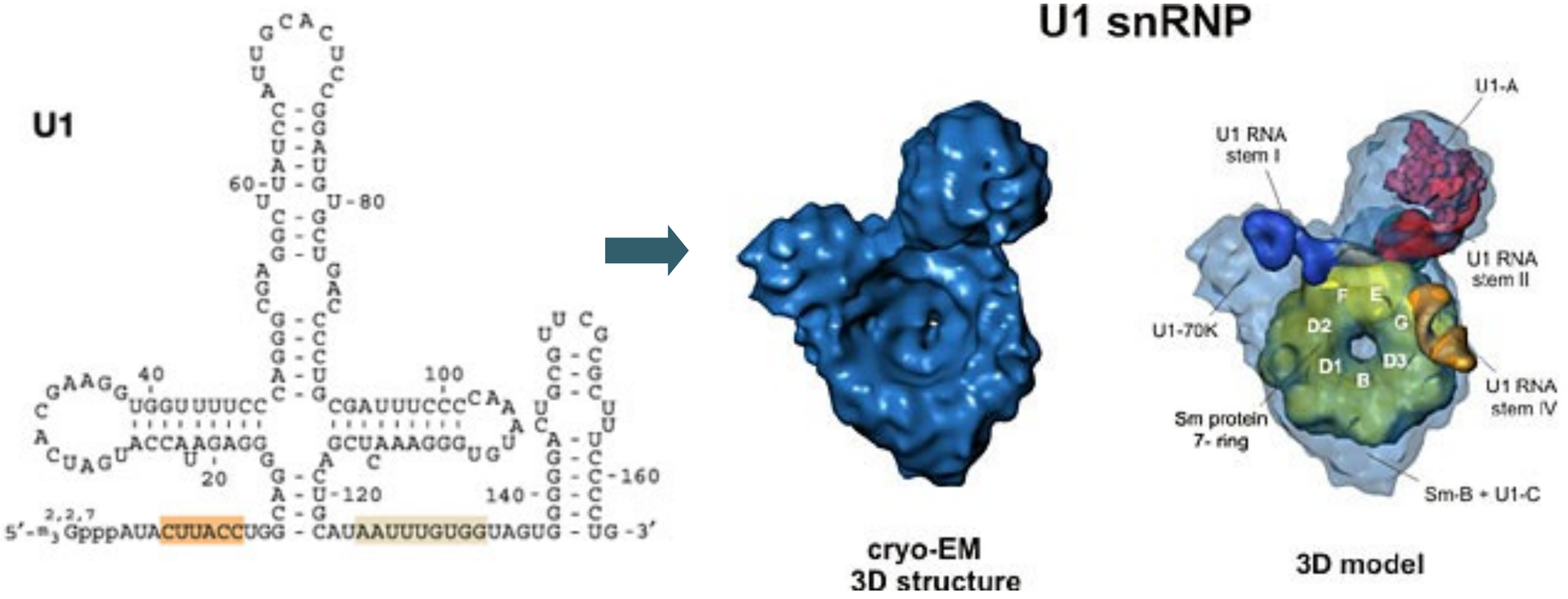


Figure 12-30 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

W składaniu uczestniczą kompleksy białek i snRNA: **snRNP**

snRNP - small nuclear RNP



Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Spliceosom

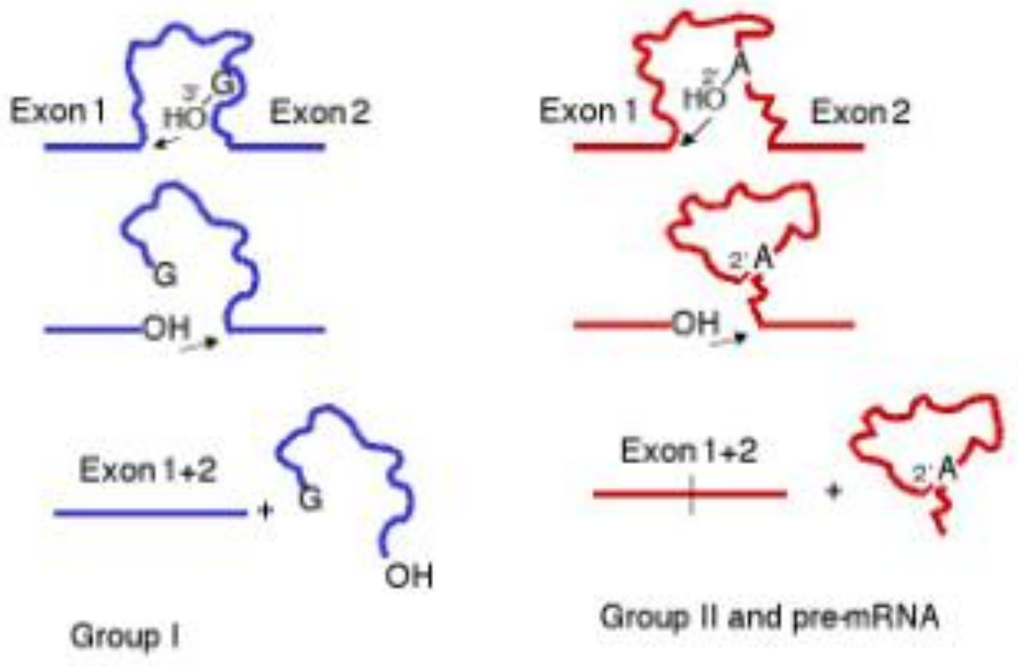
Structure of the spliceosomal U4 snRNP core domain and its implication for snRNP biogenesis

Adelaine K. W. Leung[1]†, Kiyoshi Nagai[1] & Jade Li[1]

536 | NATURE | VOL 473 | 26 MAY 2011

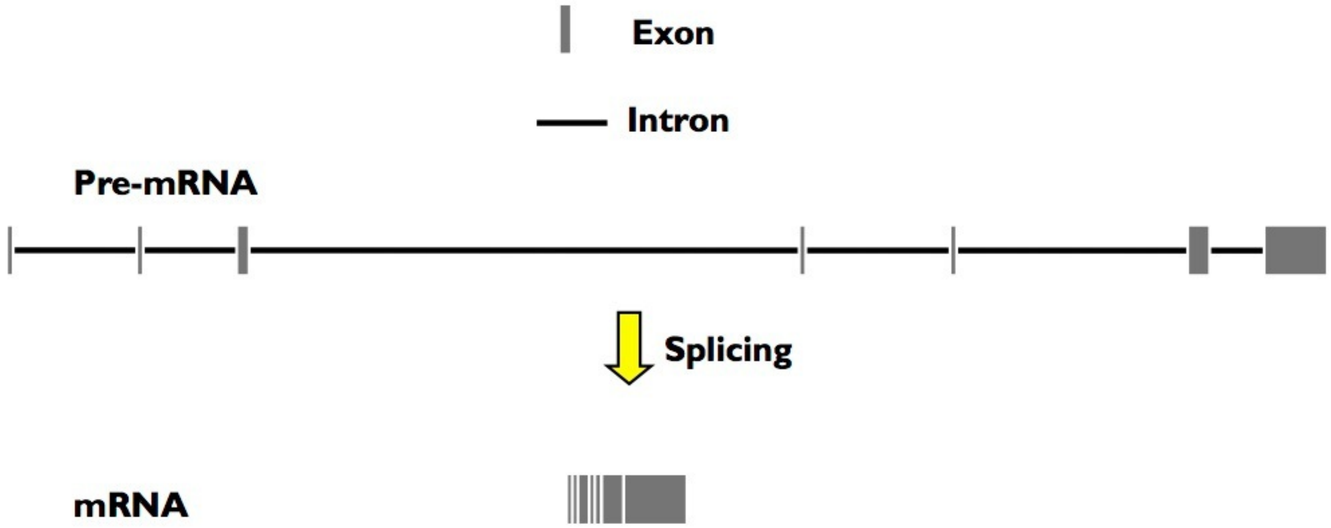
Nie tylko u Eukaryota

- Introny prokariotyczne – inne mechanizmy składania
  - introny grupy I i II
  - autokatalityczne
- Introny eukariotyczne prawdopodobnie pochodzą od intronów grupy II
- Uwaga: w komórkach eukariotycznych występują również introny prokariotyczne
  - w genomach organellarnych (mitochondria, chloroplasty)



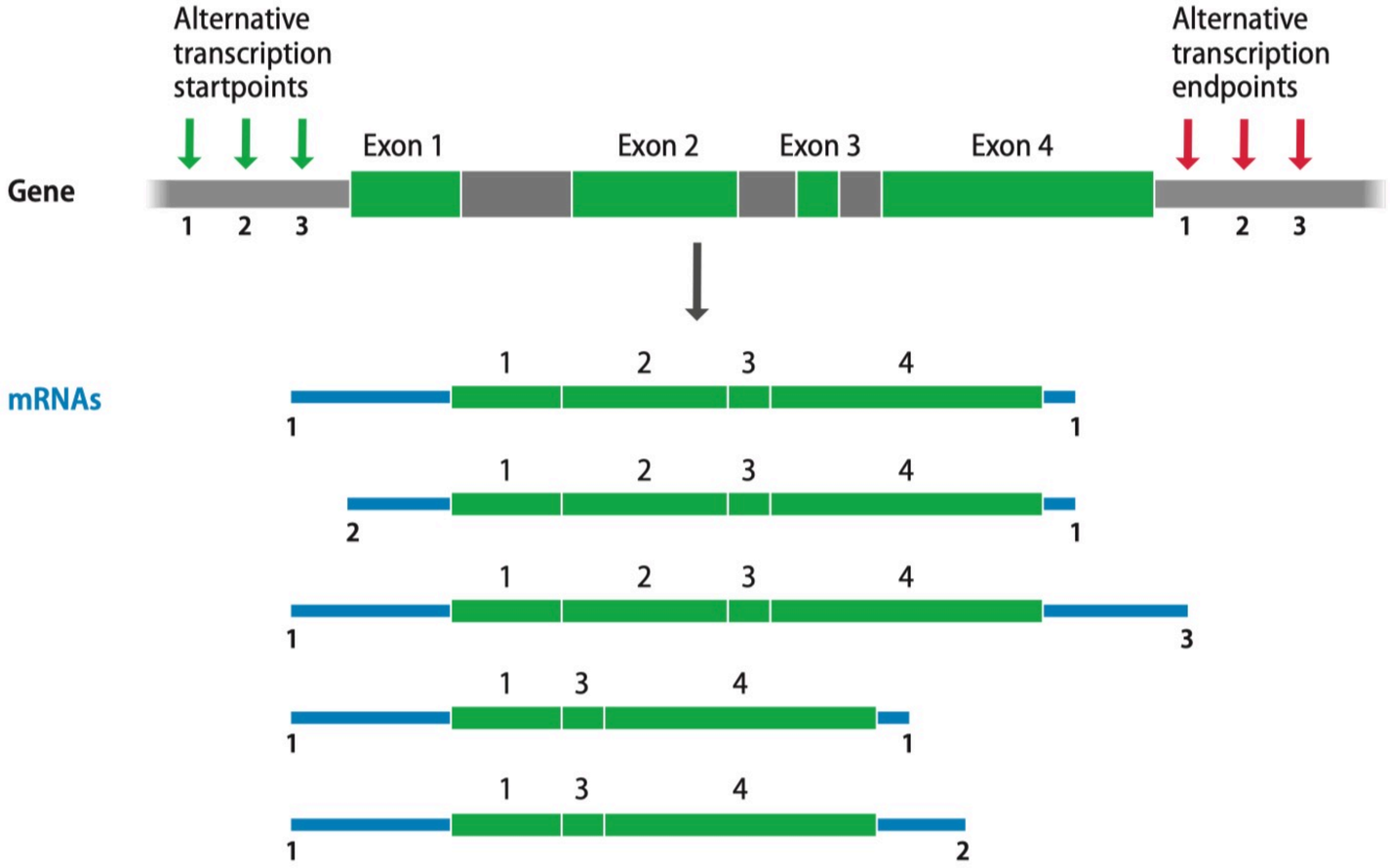
Geny wyższych Eukaryota składają się głównie z intronów

- Średni transkrypt: 27 000 nt/ 9 eksonów
- Eksony średnio stanowią 5% genu
- Średni ekson – 145 nt
- Średni intron 3500 nt

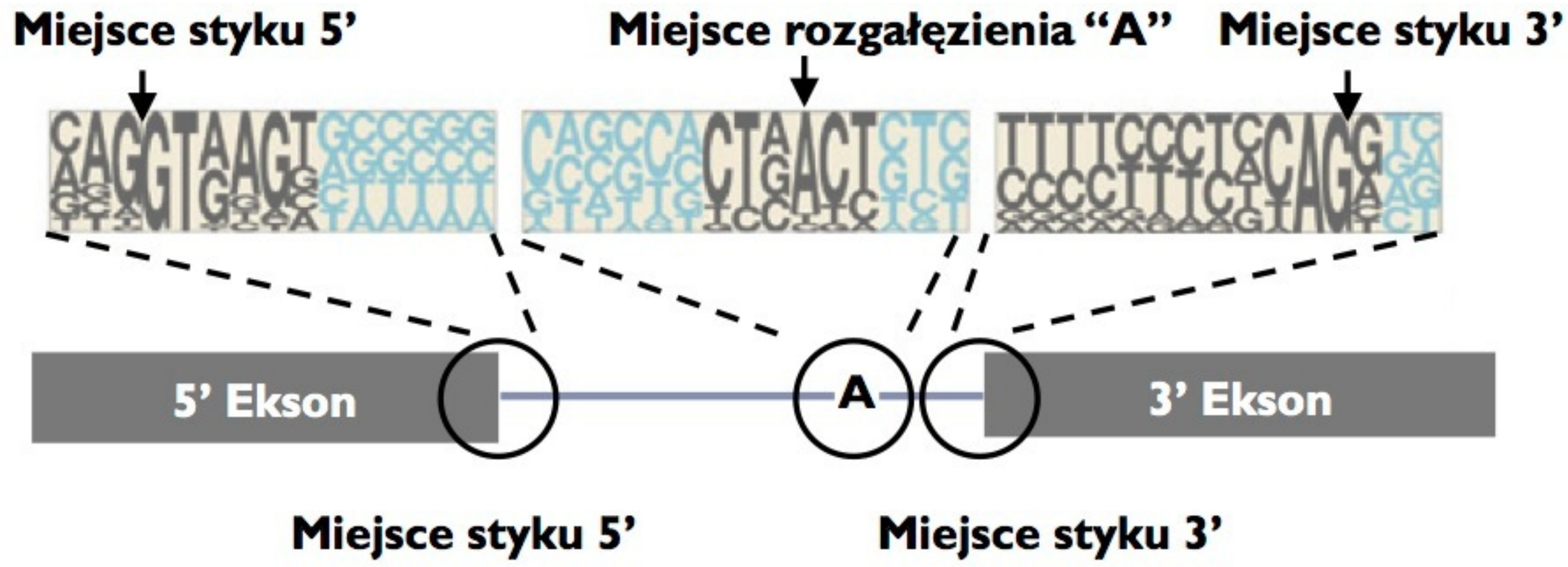


Alternatywne składanie

- Wybór różnych miejsc łączenia (tzw. miejsca kryptyczne)
- Składanie różnych kombinacji eksonów
- Jeden gen – wiele białek
- Często tkankowo-specyficzne
- Może powodować wstawienie przedwczesnego STOP – mechanizm regulacji



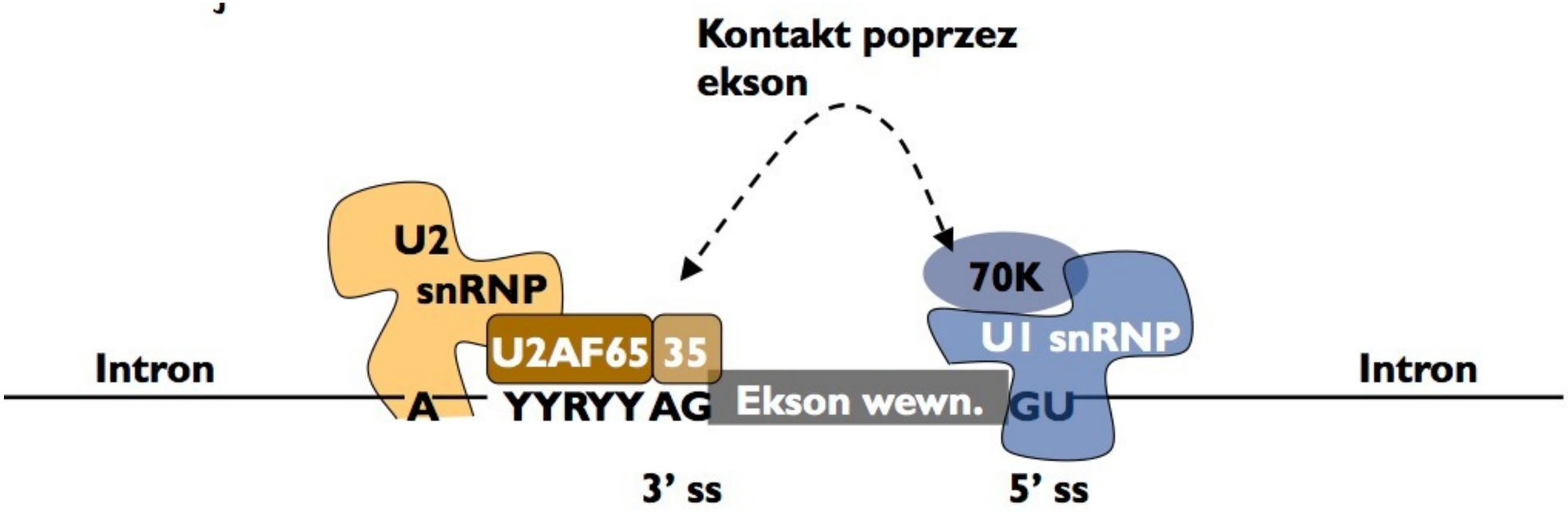
Jak znaleźć ekson?



Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Mechanizm “definicji eksonu”

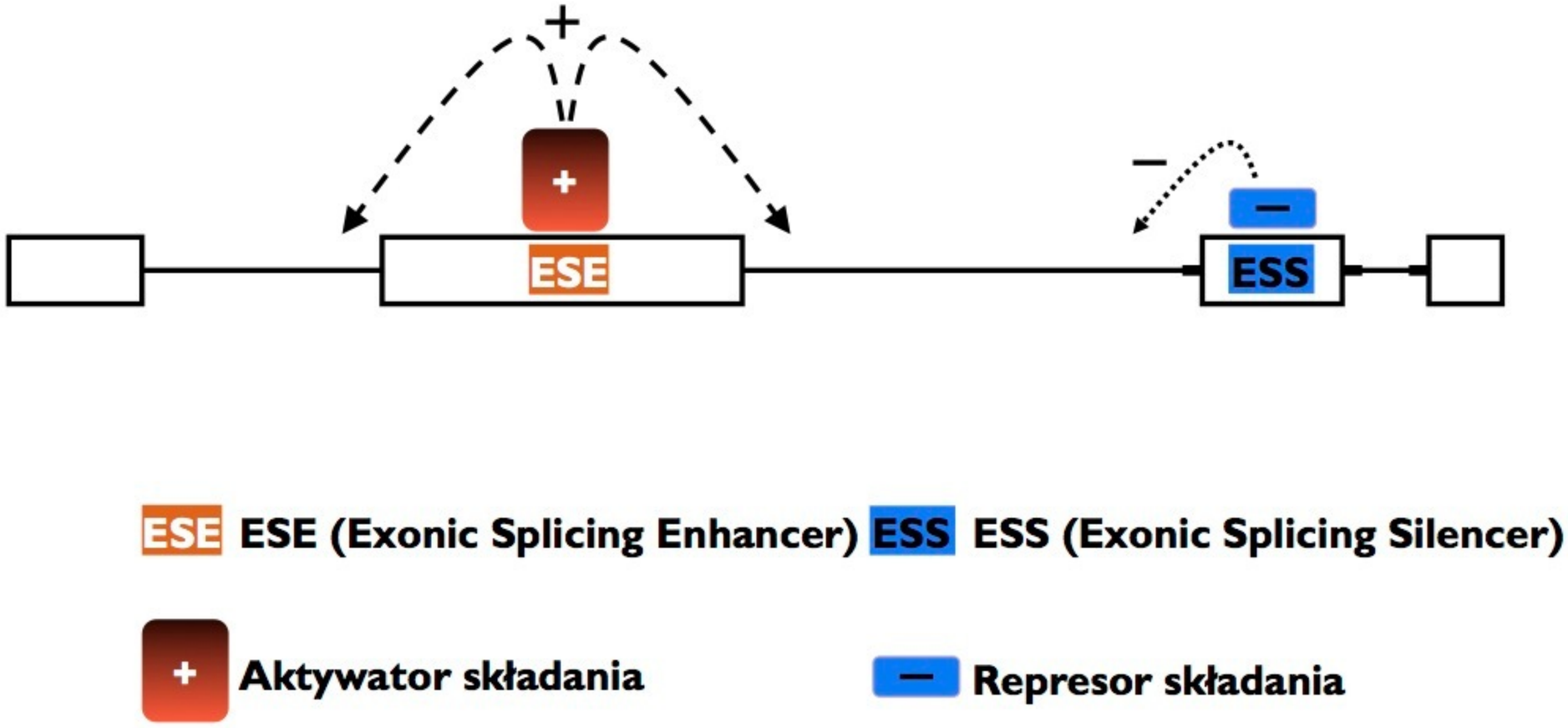
U wyższych eukariontów - rozpoznawany ekson (krótki)



U niższych eukariontów (np. grzyby) - rozpoznawany intron (krótki)

Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

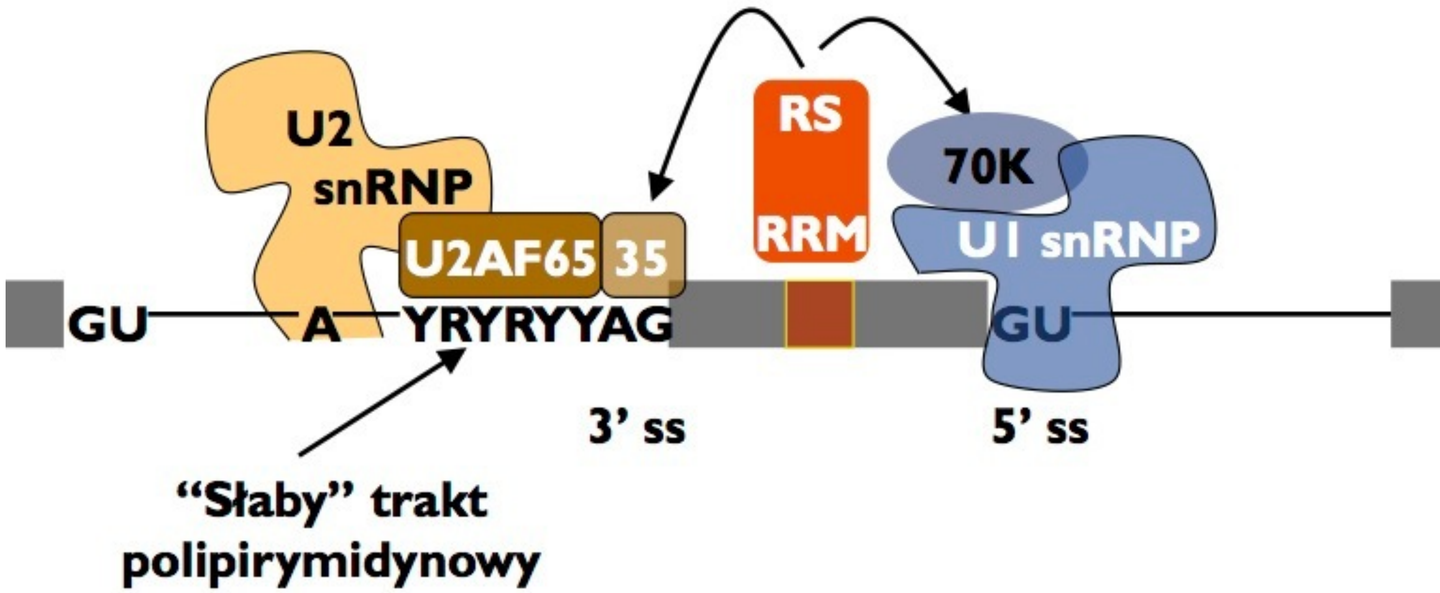
Sekwencje *cis* wzmacniające/hamujące splicing



Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Czynniki *trans*

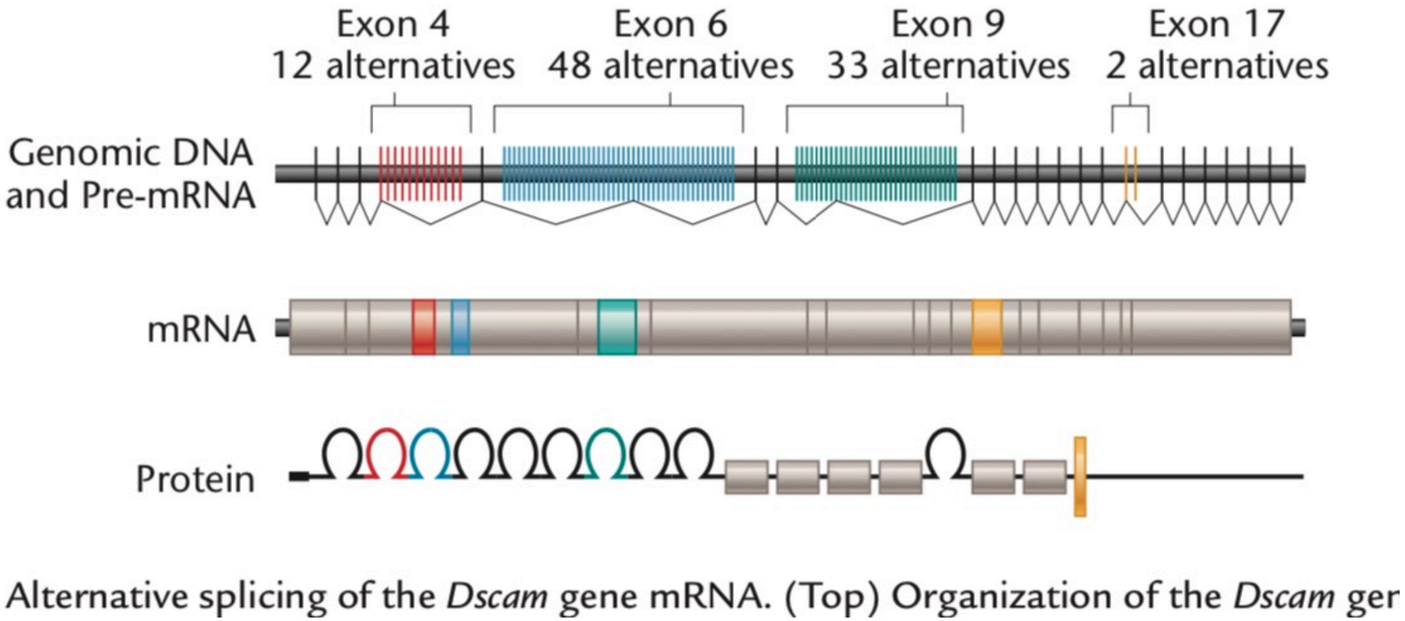
- **Białka SR** – aktywatory, wiążą ESE
  - wiązanie powoduje, że **fragment jest traktowany jako ekson**
- Białka **hnRNP** – represory, wiążą ESS
  - wiązanie powoduje, że **fragment jest traktowany jako część intronu**



Rys. © dr Zbigniew Domiński, University of North Carolina at Chapel Hill

Alternatywne składanie - przykłady

- Bardzo wiele genów człowieka
  - nawet ~94%
  - 1 gen średnio 3 końcowe transkrypty
  - Rekordy
    - Neurexin 3 (człowiek) – 2000 alternatywnych transkryptów
    - DSCAM (*Drosophila*) – 40 000 form!!!

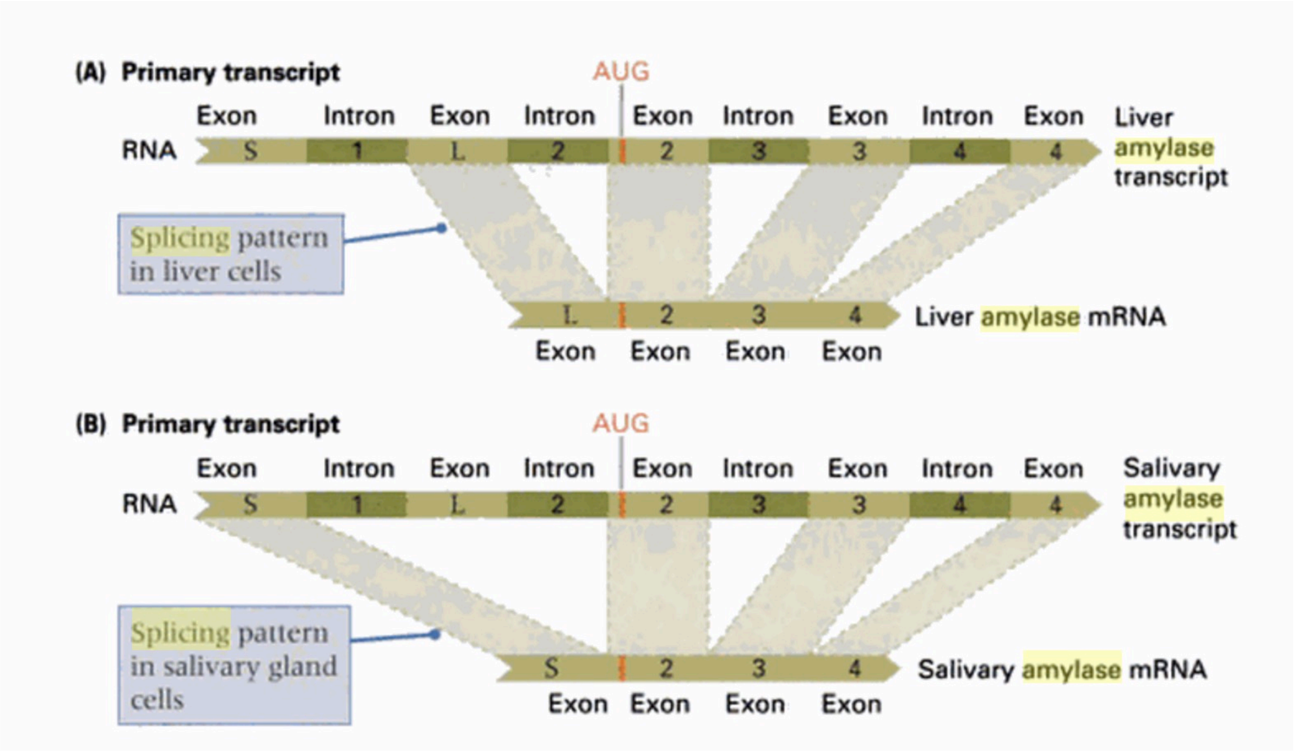


Alternative splicing of the *Dscam* gene mRNA. (Top) Organization of the *Dscam* ger

Klug, Cummings, Spencer, Palladino, Concepts of Genetics 11th ed. ©Pearson

Alternatywne składanie - przykłady

- Amylaza śliniankowa i wątrobowa
- Tachykininy:
  - neurotransmitery w narządach zmysłów
  - neuropeptyd P w układzie nerwowym
  - neuropeptyd K w tarczycy i jelicie
- Determinacja płci *Drosophila*



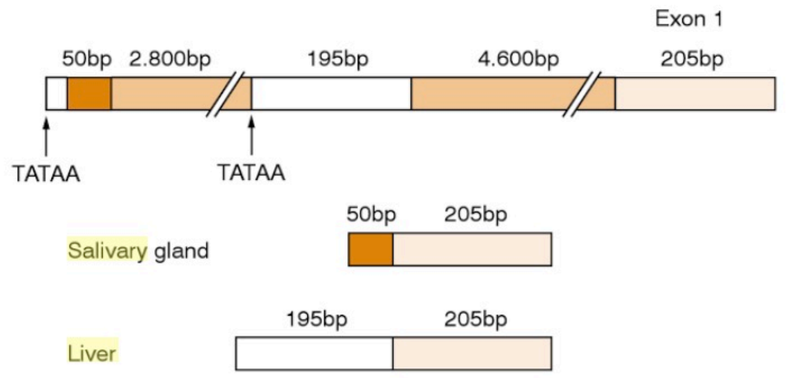


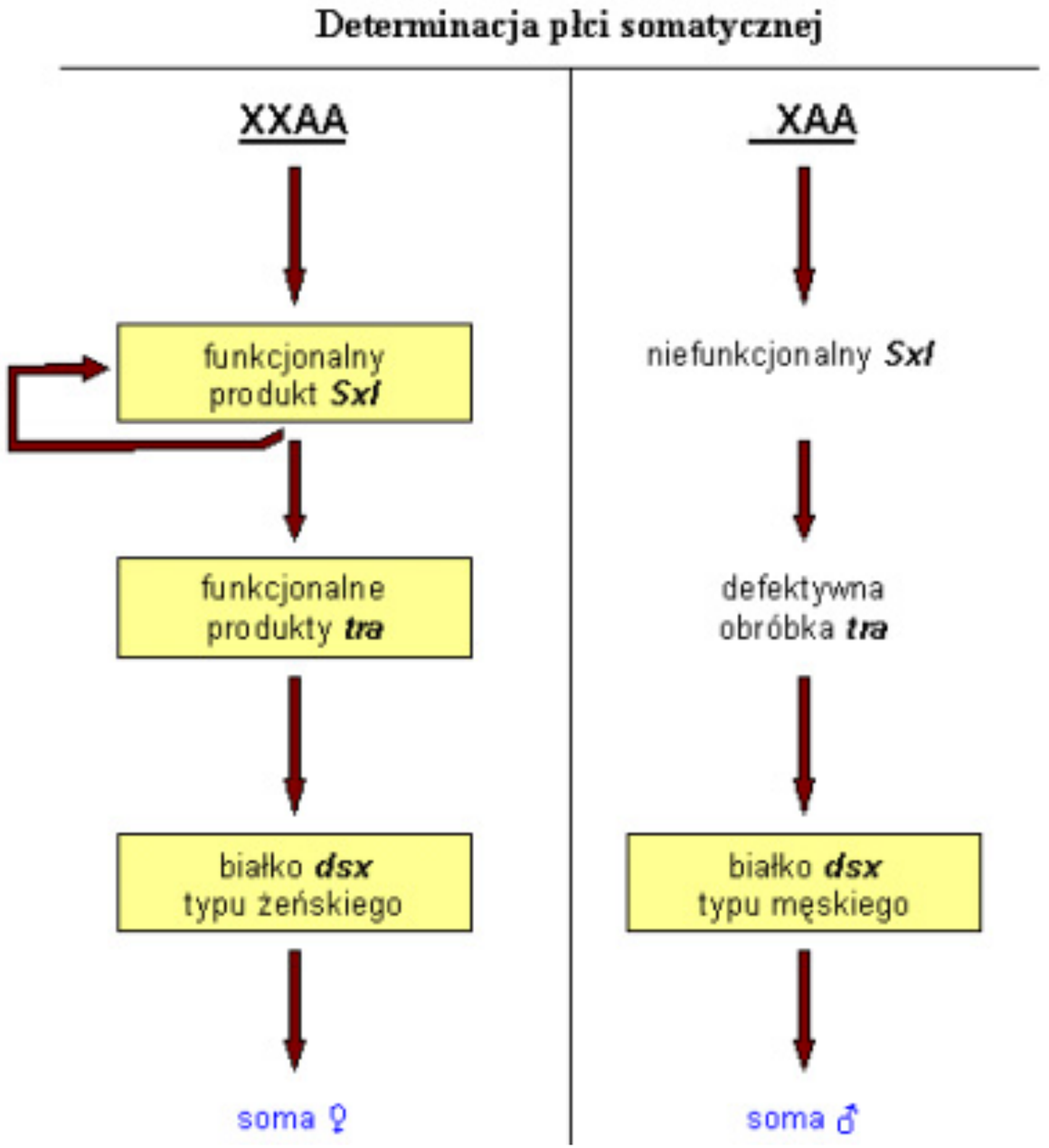
Figure 5.3

Alternative splicing at the 5′ end of α-amylase transcripts in the liver and salivary gland. The two alternative start sites for transcription are indicated (TATAA) together with the 5′ region of the mRNAs produced in each tissue.

Gene Regulation
Fifth Edition
David S. Latchman

Przełączniki posttranskrypcyjne

- Przełączniki genetyczne mogą być oparte na mechanizmach post-transkrypcyjnych
  - Np. alternatywne składanie (splicing) i alternatywna poliadenylacja/terminacja w limfocytach (przeciwciała)
  - Determinacja płci *Drosophila*
  - Decyduje aktywność SXL w zarodku



Kaskada przełączników alternatywnego składania

- Ekson 3 zawiera kodon STOP – degradacja NMD
- Białko SXL aktywuje “żeński” tryb składania transkryptu SXL – dodatnie sprzężenie zwrotne
- Początkowa aktywność systemu: białka regulatorowe kodowane na X i kodowane na autosomach, tworzą dimery
  - przewaga autosomów – dimery nieaktywne (aktywatory kodowane na X wymiareczkowane)
  - równowaga (X:A=1) – aktywacja transkrypcji SXL przez białka kodowane na X

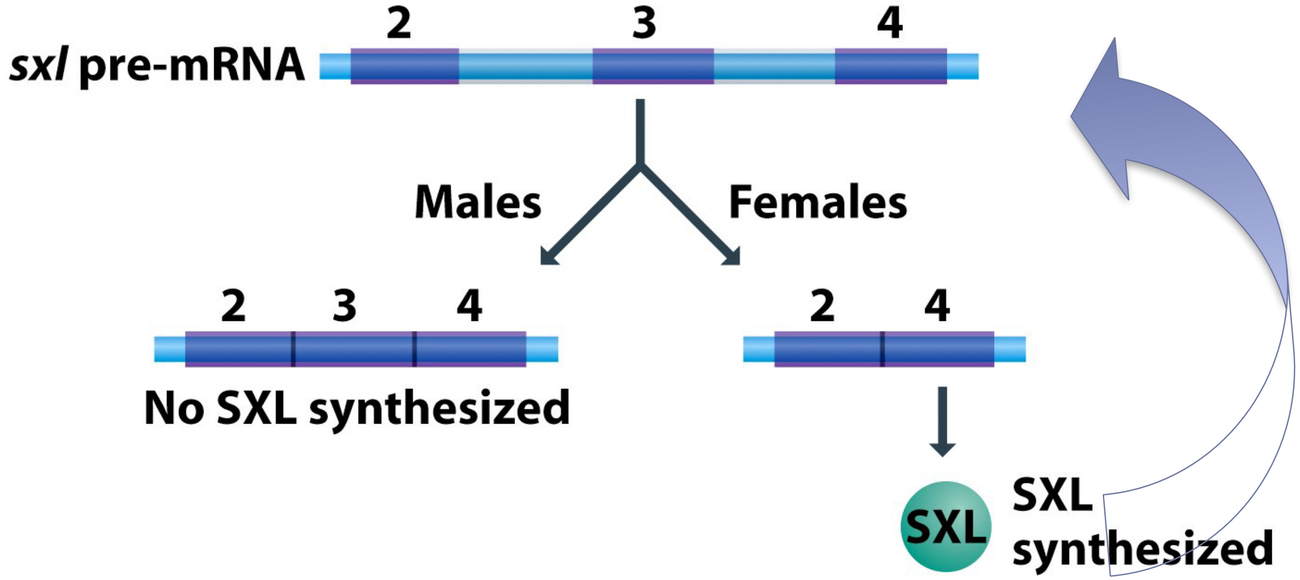
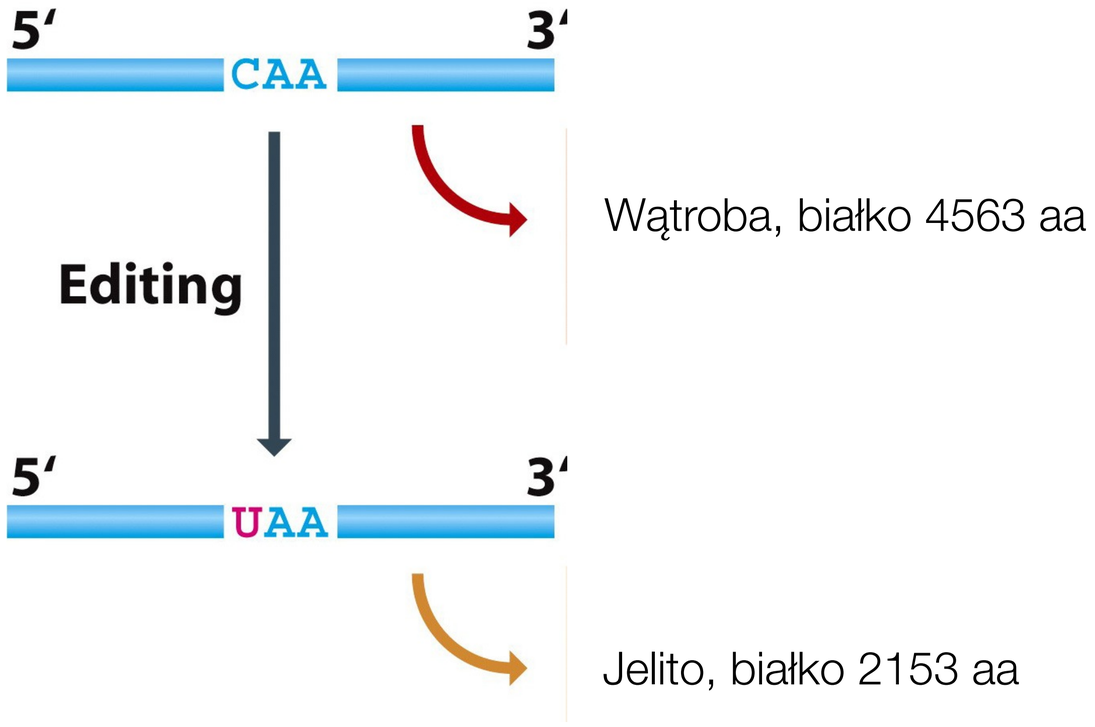


Figure 12-33a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

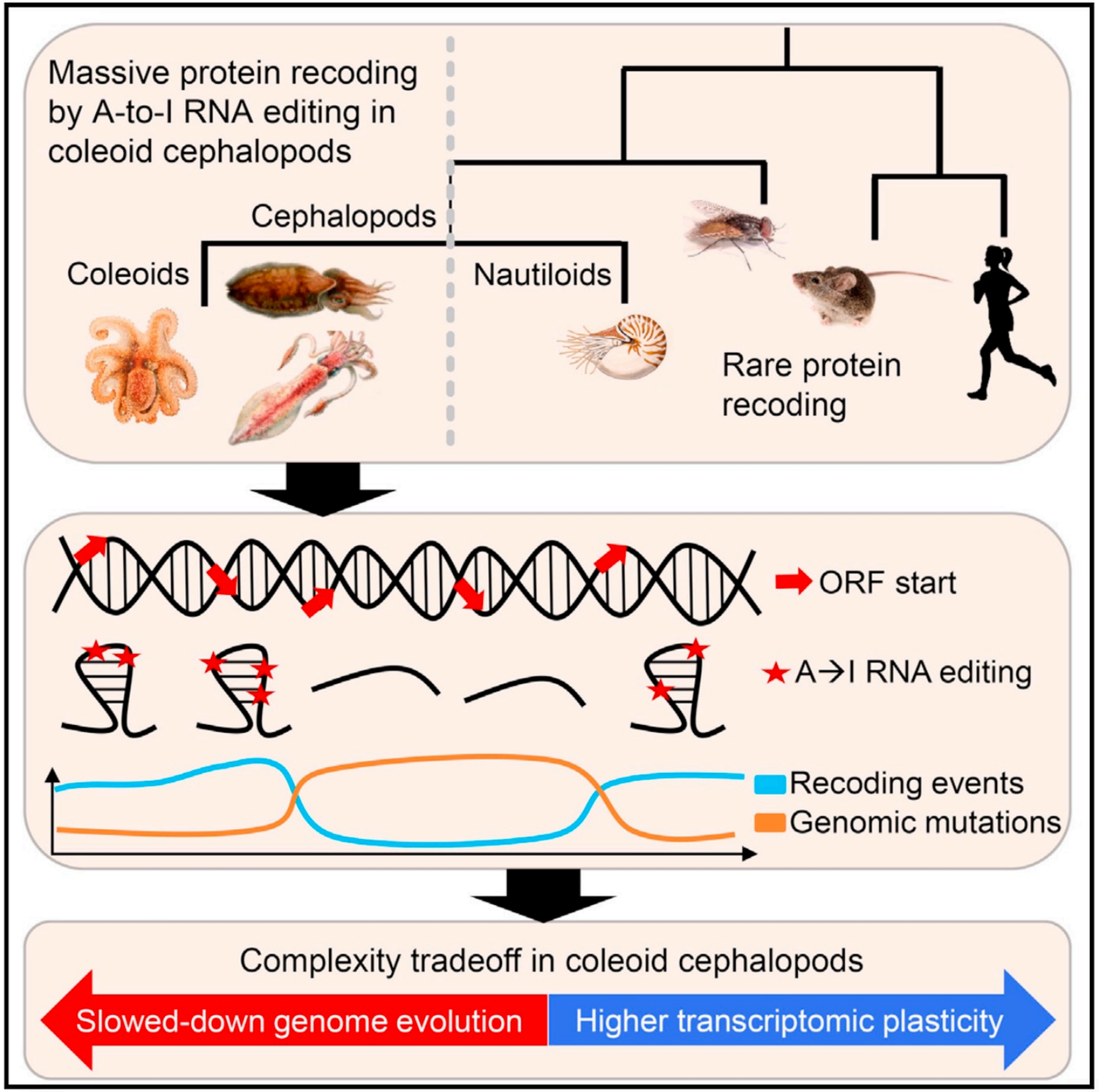
Redagowanie (editing)

- Zmiana konkretnego nukleotydu w RNA po transkrypcji
- Częste w organellach roślin i protistów
- U człowieka, np. apolipoproteina B



Redagowanie transkryptów u głowonogów

- U głowonogów (ośmiornice) bardzo częste redagowanie
  - u człowieka ~3% mRNA
  - u głowonogów ~100 000 miejsc, z czego ~10% zmienia sekwencję białka
  - miejsca redagowania zachowawcze w ewolucji
- Zwiększenie różnorodności w ewolucji
- Kosztem wolniejszej ewolucji genomu
  - konieczna konserwacja sekwencji otaczających miejsce redagowania



Trade-off between Transcriptome Plasticity and Genome Evolution in Cephalopods

Liscovitch-Brauer et al., 2017, Cell *169*, 191–202
April 6, 2017 © 2017 Elsevier Inc.
http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.025

Degradacja RNA

- Stała (obrót RNA)
  - Głównie w cytoplazmie
- Regulowana
  - Przez małe RNA (siRNA, miRNA)
  - Przez białka
  - Cytoplazma i jądro
- Kontrola jakości
  - W jądrze (RNA niekodujące)
  - W jądrze i cytoplazmie (mRNA)

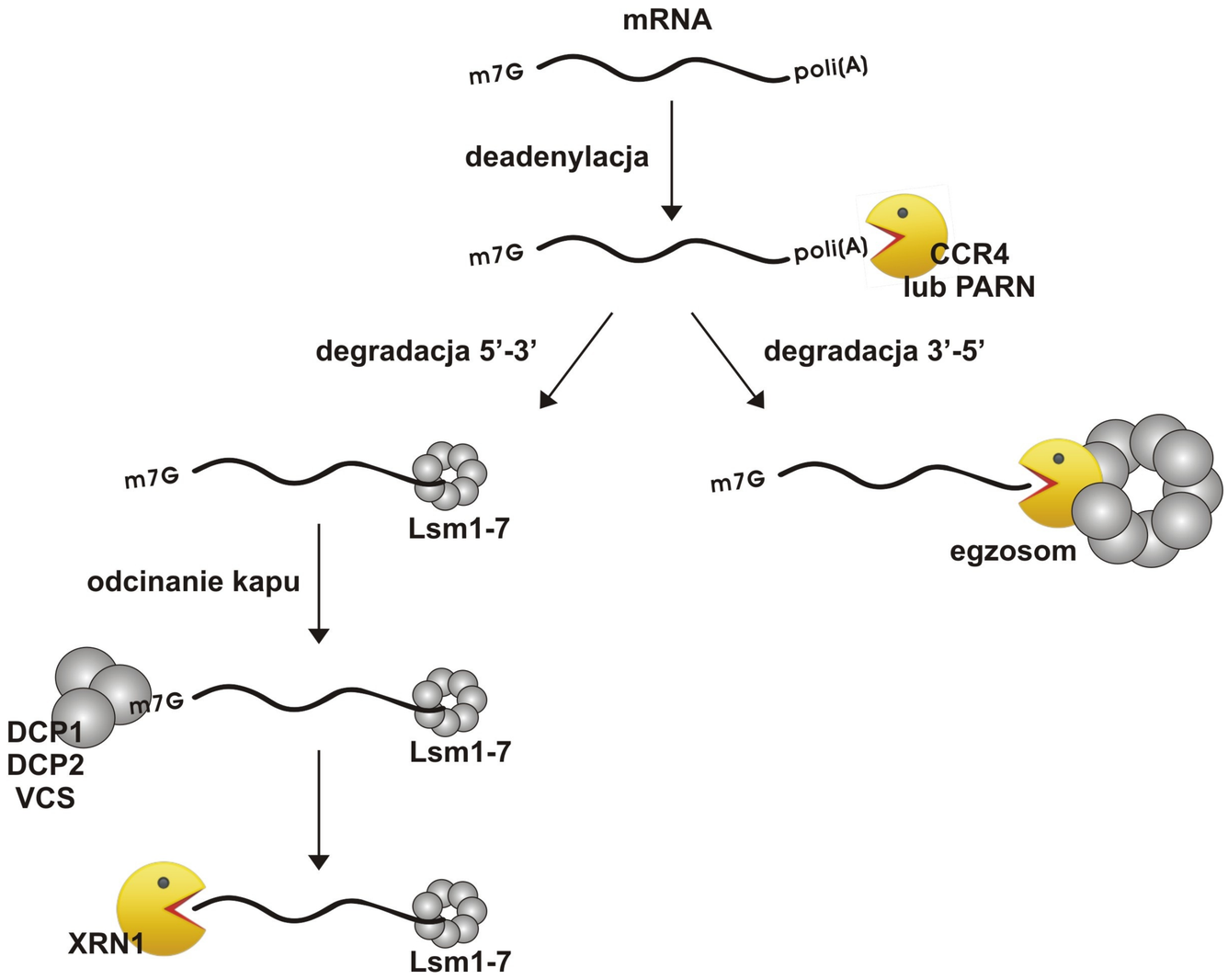
Degradacja mRNA

- Czas życia mRNA jest krótki (średnio 10-20 min. drożdże, kilka godzin ssaki)
- Różne ścieżki degradacji
  - 3’-> 5’ (egzosom)
    - pierwszym etapem jest deadenylacja
  - 5’-> 3’ (Xrn)
    - pierwszym etapem usunięcie czapeczki, egzonukleaza 5’->3’
- Na stabilność wpływają sekwencję nie podlegające translacji (UTR) i poliA
- Może podlegać regulacji przez czynniki *trans*

Degradacja mRNA

W CYTOPLAZMIE:

stały rozkład mRNA



Rys. © dr Monika Zakrzewska-Płaczek, IGiB UW

Kontrola jakości RNA

- Tylko w pełni obrobione (czapeczka, poliadenylacja, składanie) transkrypty są eksportowane z jądra
- Transkrypty nieprawidłowo obrobione są degradowane
- Degradacja transkryptów z przedwczesnym kodonem STOP (NMD – *nonsense mediated decay*) – wykrywane nieprawidłowe położenie STOP względem miejsc styku intron/ekson

Mechanizmy kontroli jakości RNA

- degradacja mRNA zawierających przedwczesne kodony stop (NMD- *nonsense mediated decay*)
- degradacja mRNA z brakującymi kodonami stop (NSD- *non-stop decay*)
- degradacja jądrowych mRNA i pre-mRNA, które:
  - nie uległy prawidłowemu dojrzewaniu (tj. składaniu, dojrzewaniu 3’ końca)
  - nie zostały wyeksportowane do cytoplazmy
- degradacja wadliwych stabilnych RNA (np. rRNA) i ich prekursorów

Miejsce degradacji RNA

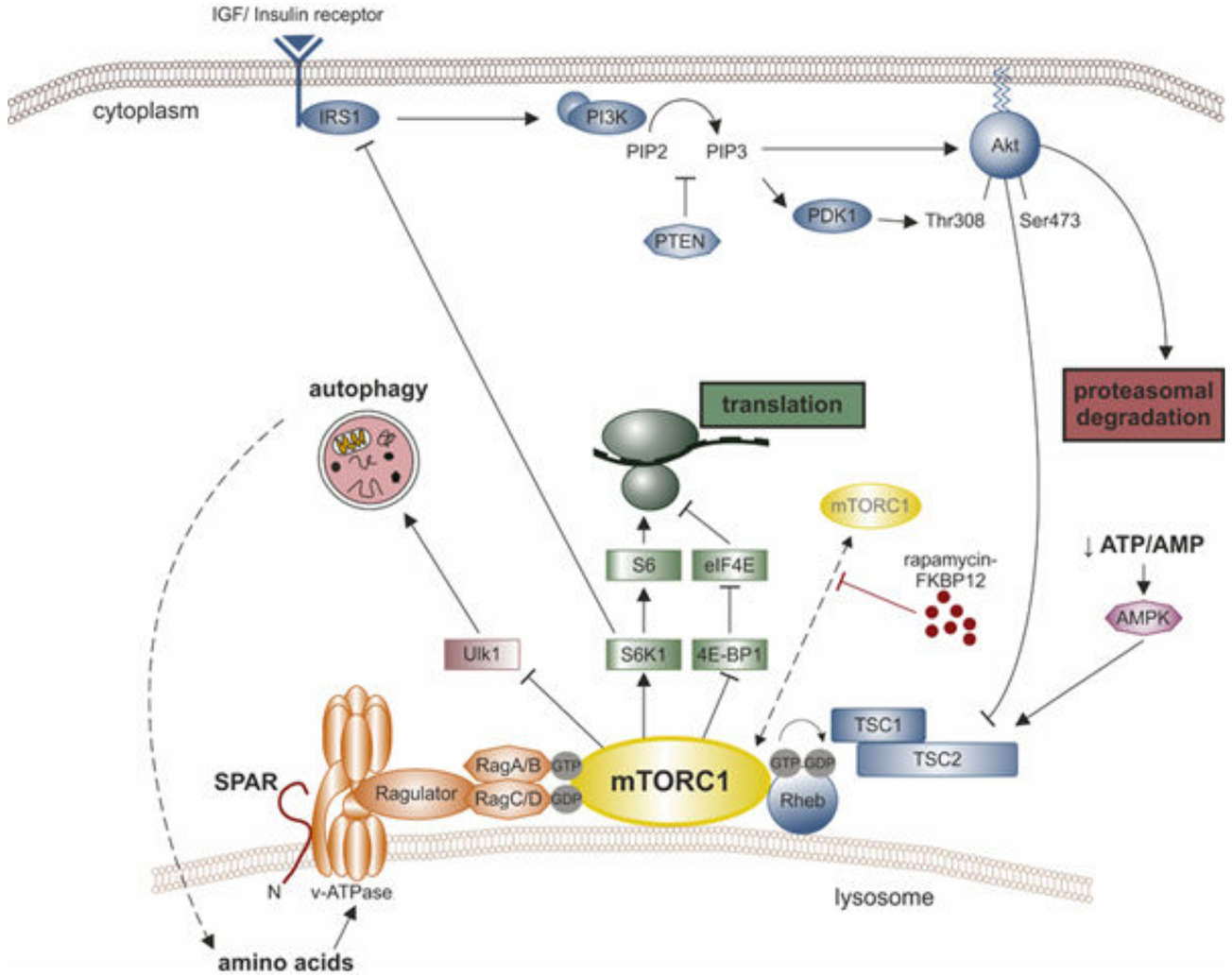
Cytoplazma	**Jądro**
stały rozkład mRNA	kontrola jakości pre-mRNA/mRNA
systemy kontroli ekspresji genów	degradacja wadliwych tRNA i rRNA
	degradacja długich niekodujących RNA
Degradacja intermediatów szlaku RNAi	

Długie niekodujące RNA - lncRNA

- Niedawno odkryte – funkcje często nieznane
  - funkcje regulatorowe, poprzez strukturę chromatyny – np. gen *FLO11* drożdży
- *Cryptic Unstable Transcripts*
  - Transkrypcji podlegają długie obszary międzygenowe
  - Często z promotorów genów, tylko w przeciwnym kierunku
  - Szybko degradowane przez egzosom (3’->5’ exo)
  - Rola nieznana, możliwe zaangażowanie w wyciszanie transpozonów, modyfikacje histonów zależne od transkrypcji, regulację (związek z RNAi?)

lncRNA - “*noncoding*”?

- lncRNA mogą kodować bardzo krótkie peptydy
- znaczenie regulatorowe - np. peptyd SPAR (90 aa, produkt translacji LINC00961) regulujący aktywność białka mTORC1



mTORC1 controls cell growth and is regulated by the lncRNA-encoded polypeptide SPAR.

LncRNA-encoded peptides: More than translational noise?

Nathalie Rion & Markus A Rüegg ✉

Cell Research **27**, 604–605 (2017)

Wszechobecna transkrypcja

- *pervasive transcription*
- większość genomu ulega transkrypcji, “klasyczne” transkrypty wyróżniają się stabilnością
- transkrypty wykryto dla >85% genomu człowieka
- z tego większość to sekwencje niekodujące
- nie można zakładać, że wszystkie te transkrypty mają znaczenie funkcjonalne
  - “junk RNA”?

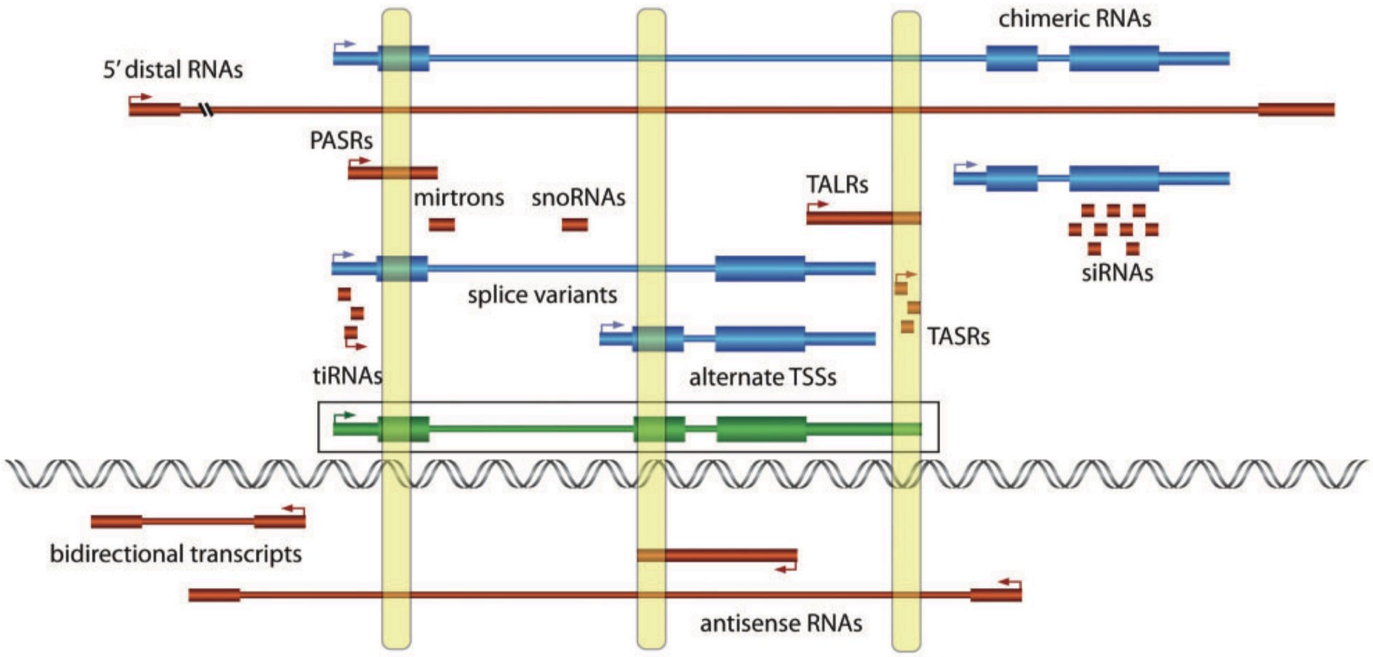


Figure 1: Overview of pervasive transcription and its implications on the gene concept. A representation of a traditional gene (boxed) shown in context with associated coding and non-coding transcripts identified in various transcriptomic analyses. The highlighted sections exemplify how experimental approaches targeting regions within one ‘gene’ may inadvertently target other intersecting transcripts and thereby yield confounding results. Abbreviations: PASRs, promoter-associated small RNAs; TALRs, terminal-associated long RNAs; tiRNAs, tiny RNAs.

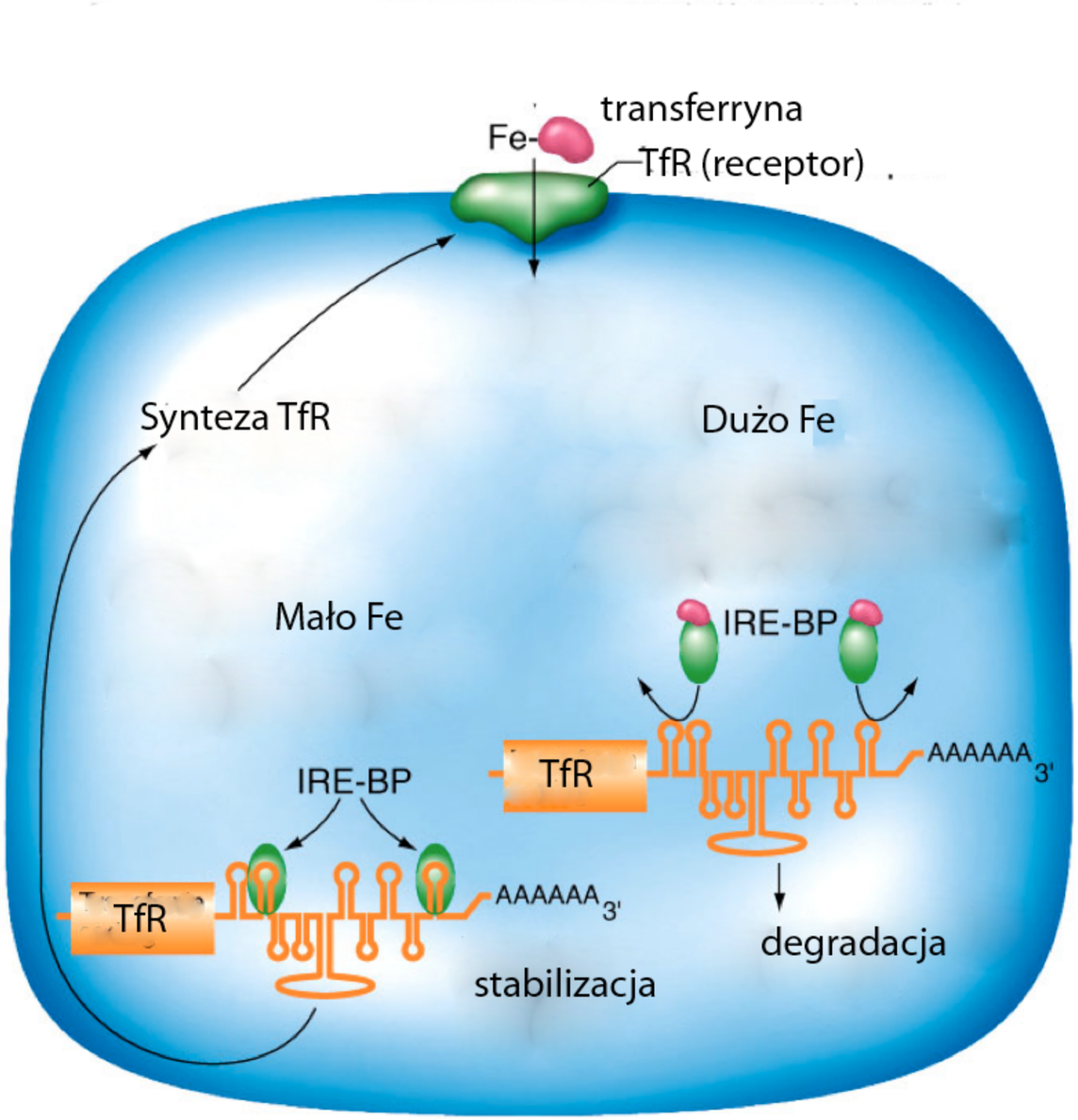
BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS. VOL 8. NO 6. 407–423 doi:10.1093/bfgp/elp038

Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications

Marcel E. Dinger, Paulo P. Amaral, Timothy R. Mercer and John S. Mattick

Regulowana degradacja RNA

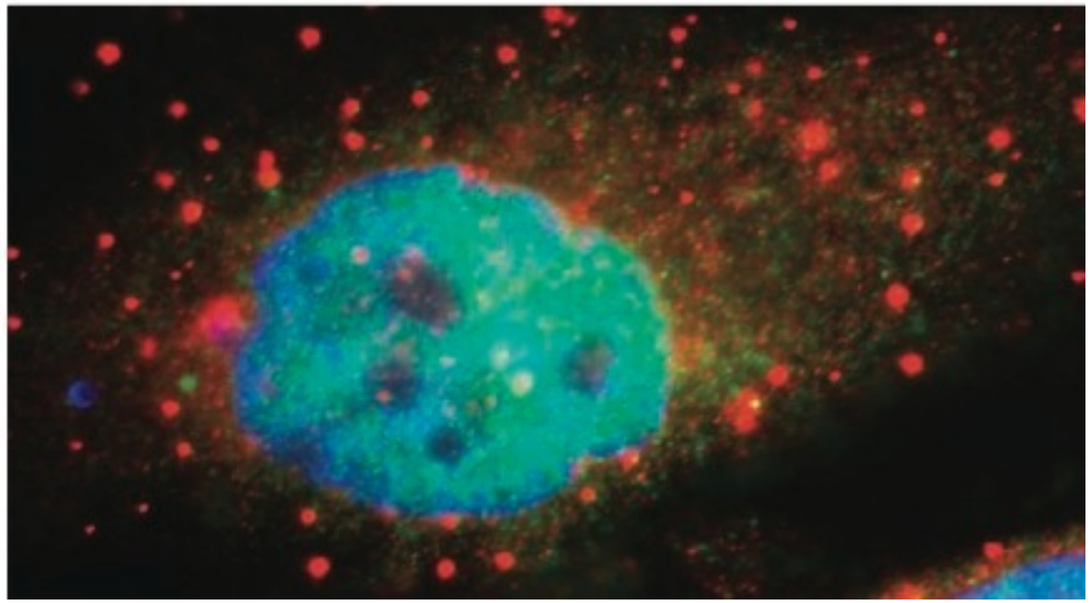
- O stabilności transkryptu decydują sekwencje 3’ UTR
- Wiązanie białek z 3’UTR reguluje stabilność/degradację
- Np. IRE-BP - wiąże się z 3’UTR genu receptora transferryny gdy w komórce jest mało jonów żelaza



Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver, Veres. Genetics. From Genes to Genomes. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

Ciałka P (P-bodies)

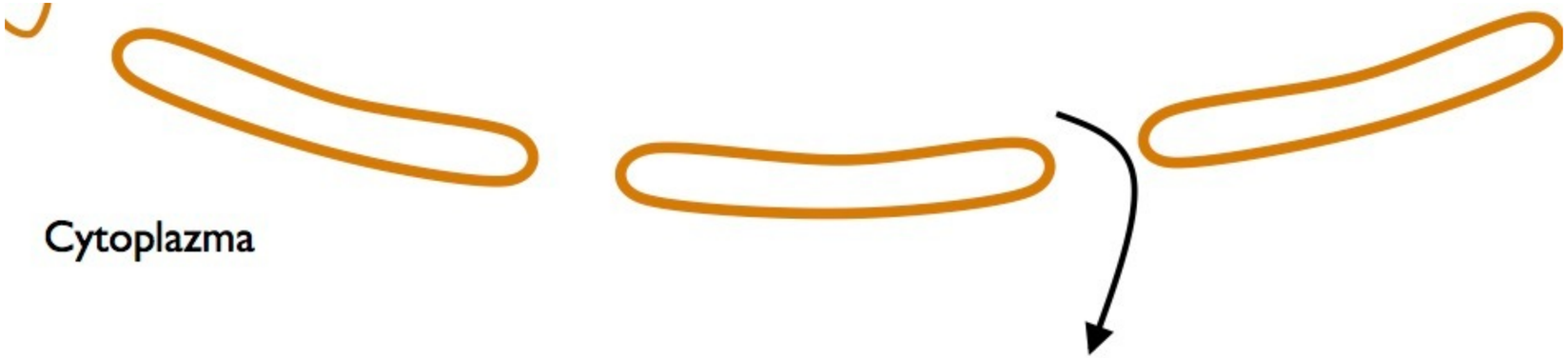
- Struktury w cytoplazmie, w których zachodzi degradacja mRNA
  - decapping
  - przechowywanie nieaktywnych translacyjnie mRNA

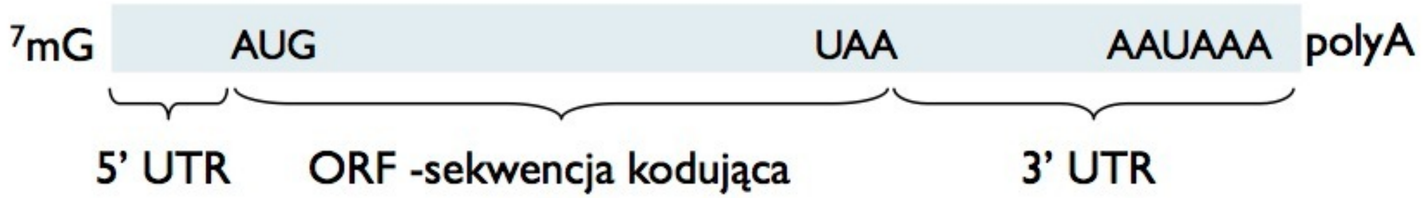


Marx J (2005), Science 310: 764-5

Po zakończeniu obróbki

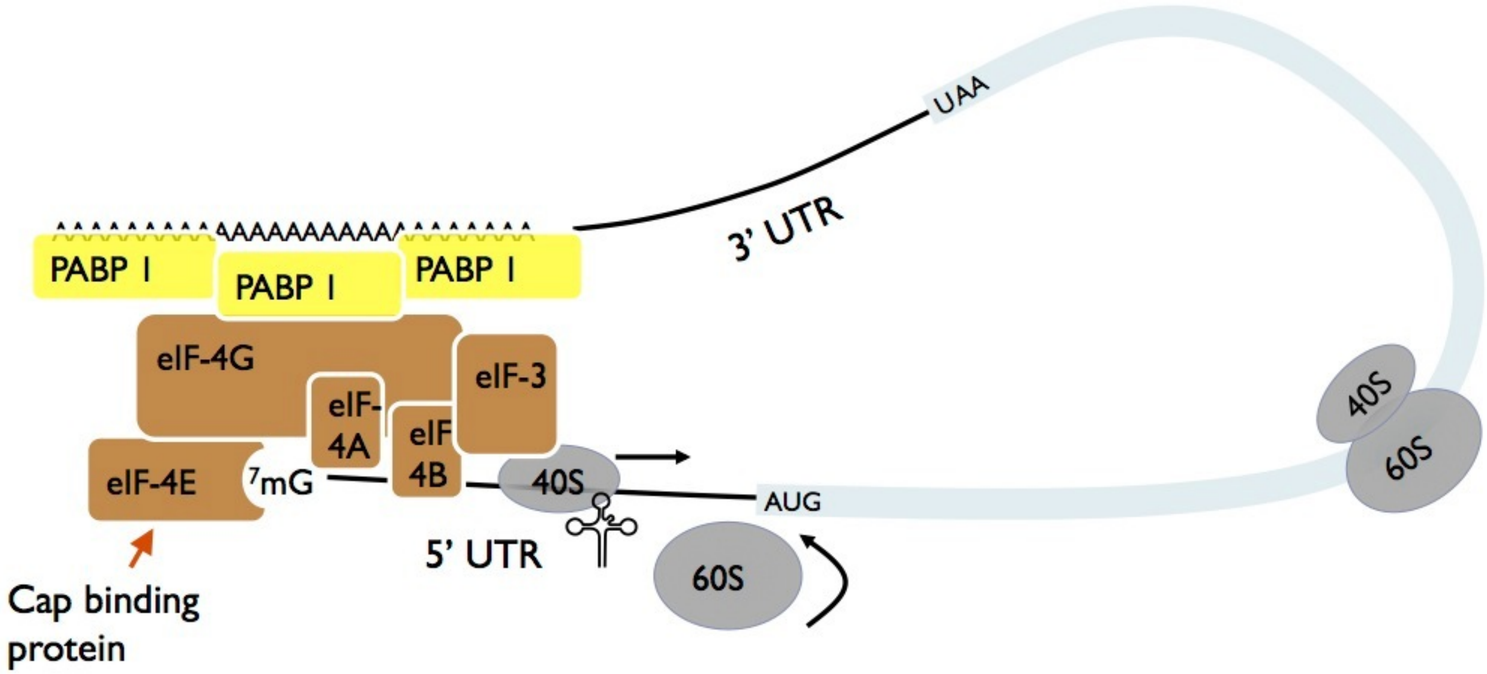
- mRNA jest transportowany do cytoplazmy
- tam ulega translacji
- kluczowe są białka wiążące poliA





Model pętli

- Aktywne translacyjnie mRNA tworzą pętlę
- Kluczowe są białka z rodziny eIF (eukariotyczne czynniki inicjujące translację), zwłaszcza eIF-4G
- Tylko prawidłowe mRNA (z poli A) podlegają translacji



Translacja

- Regulowany może być każdy etap translacji
  - Wybór kodonu AUG (nie ma sekwencji S-D, decydują oddziaływania z białkami wiążącymi 5’ UTR)
  - Inicjacja
  - Elongacja
  - Terminacja

Małe regulatorowe RNA

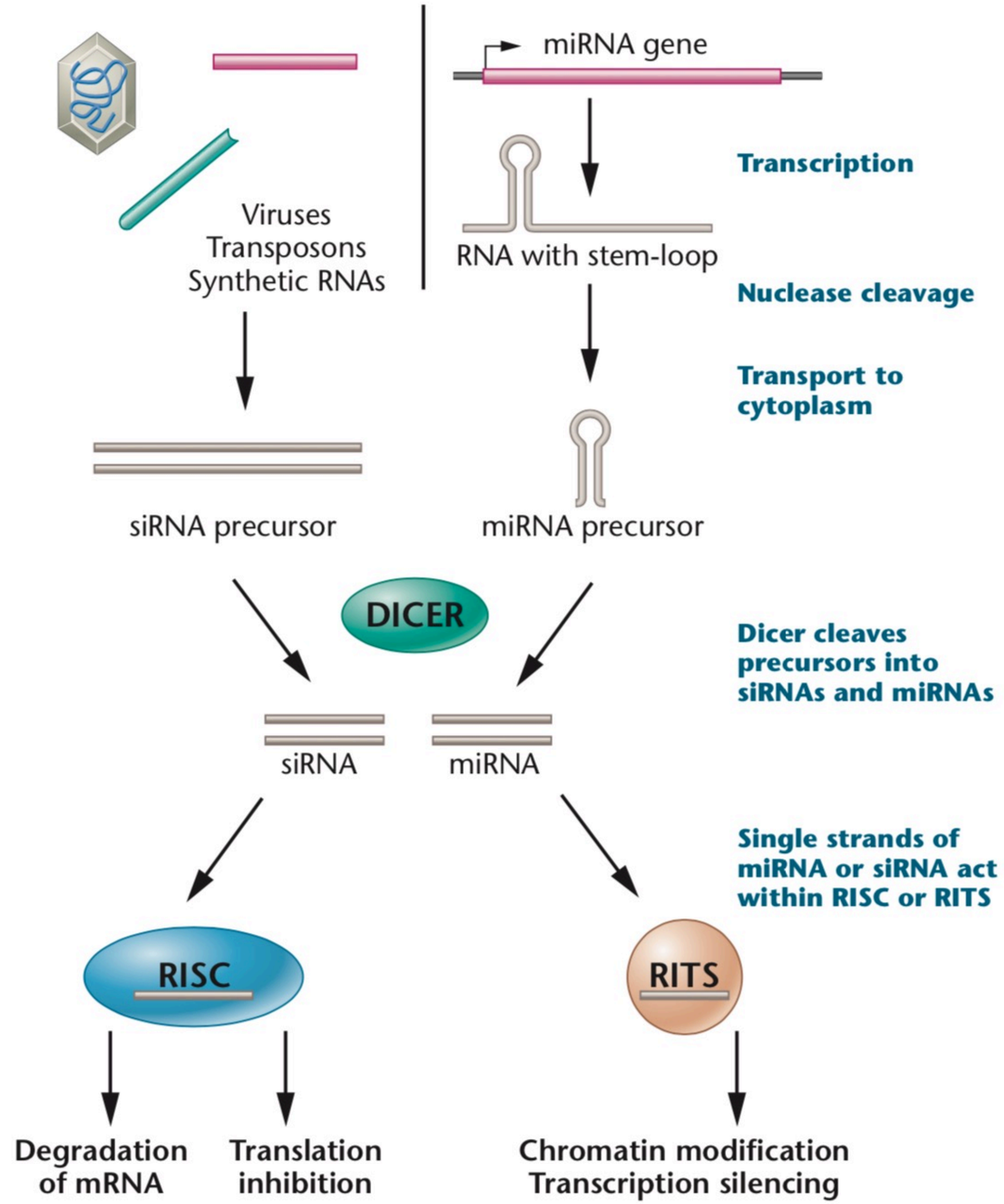
Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny 2006, za odkrycie mechanizmu interferencji RNA
A. Fire i C. Mello

Interferencja RNA

- Wyciszanie ekspresji genów przez krótkie dwuniciowe RNA homologiczne do sekwencji genu
- Może działać na różnych etapach
  - **PTGS – posttranskrypcyjne wyciszanie genów**
    - hamowanie translacji
    - degradacja RNA
  - **TGS – transkrypcyjne wyciszanie genów**
    - wpływ na strukturę chromatyny
    - zmiana aktywności czynników transkrypcyjnych

siRNA i miRNA

- **siRNA** (short interfering RNA) – pochodzą z dwuniciowych cząsteczek, głównie egzogenne (np. wirusy RNA, transpozony)
- **miRNA** (micro RNA) – pochodzą z cząsteczek o strukturze szpilki do włosów, kodowane w genomie
- Dwuniciowe RNA są w cytoplazmie fragmentowane przez endonukleazę Dicer
- Następnie po rozpleceniu na pojedyncze nici tworzą kompleksy efektorowe, w których istotną rolę odgrywają białka z rodziny Argonaute
- **Kompleks RISC** - PTGS (RITS w TGS)



Klug, Cummings, Spencer, Palladino, Concepts of Genetics 11th ed. ©Pearson

siRNA a miRNA

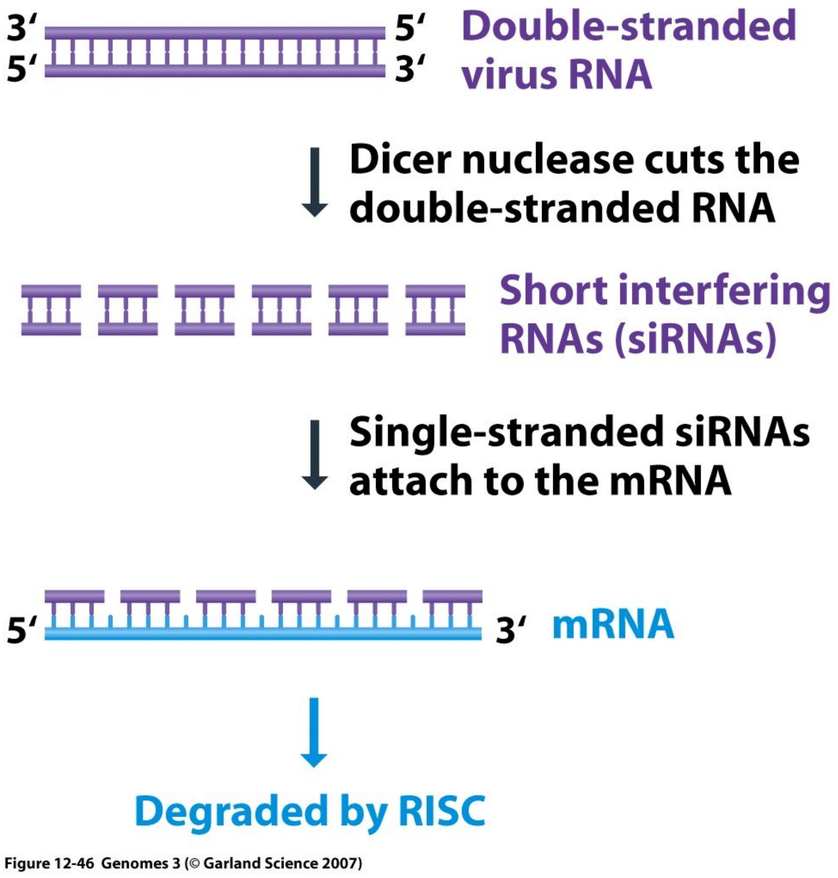


Figure 12-46 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

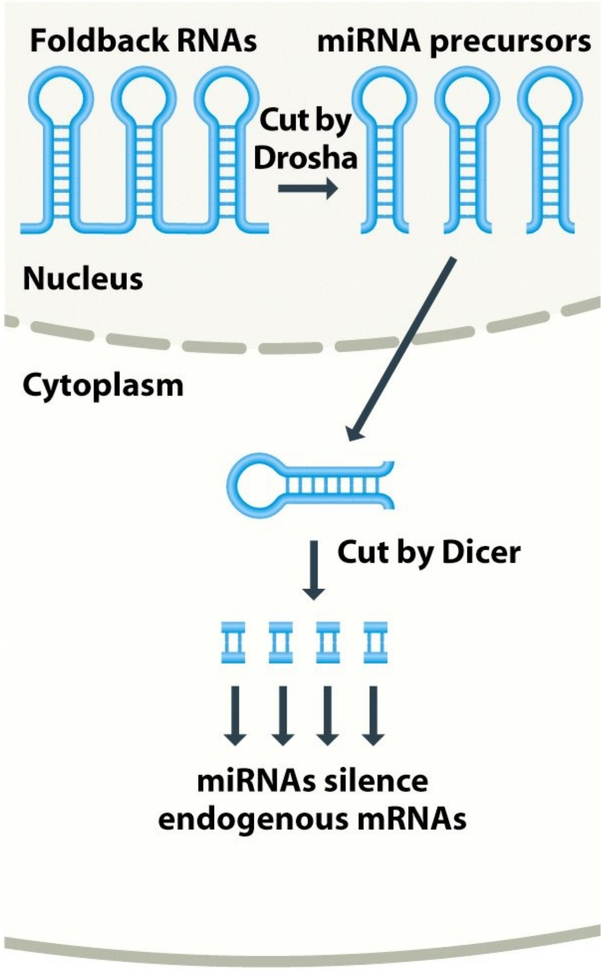
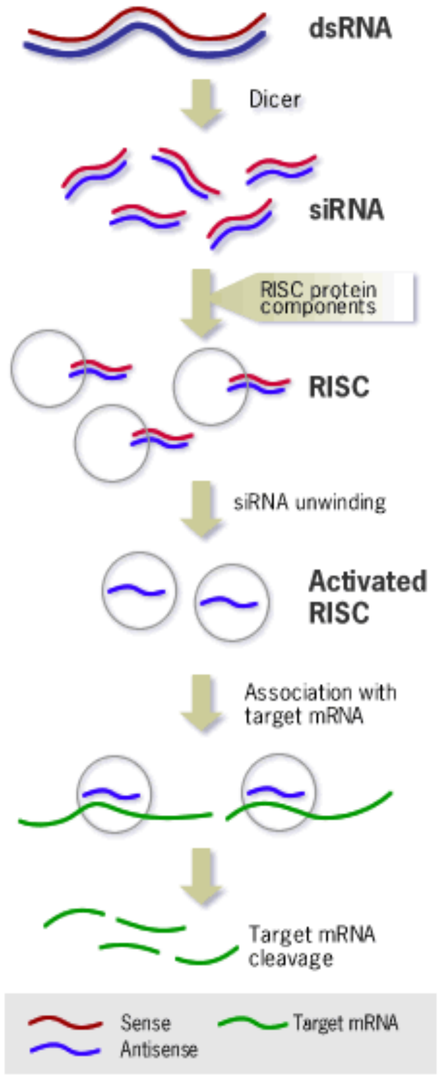


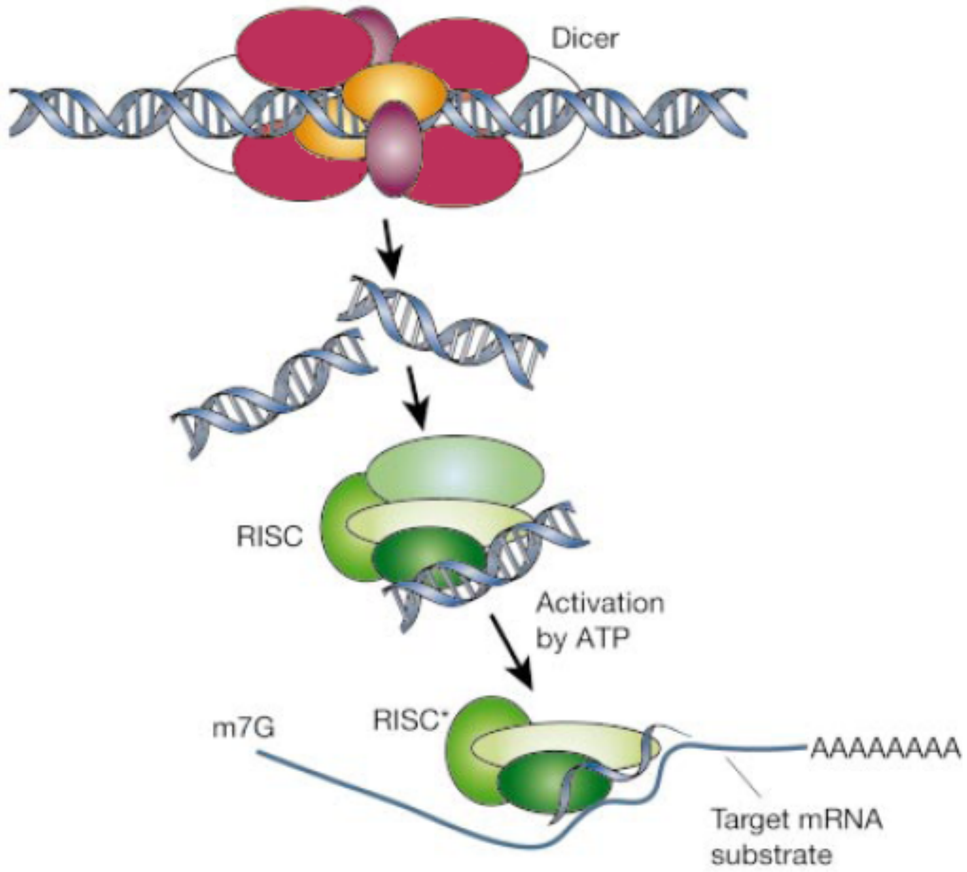
Figure 12-48 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

siRNA – egzogenny dsRNA (np. wirusa)

miRNA – endogenny dsRNA

siRNA - jak to działa?





dsRNA jest egzogenny

Efekt – najczęściej degradacja mRNA

Hannon G.J.: ‘RNA interference’, Nature 418, July 11, 2002

miRNA – jak to działa?

- dsRNA kodowany w genomie

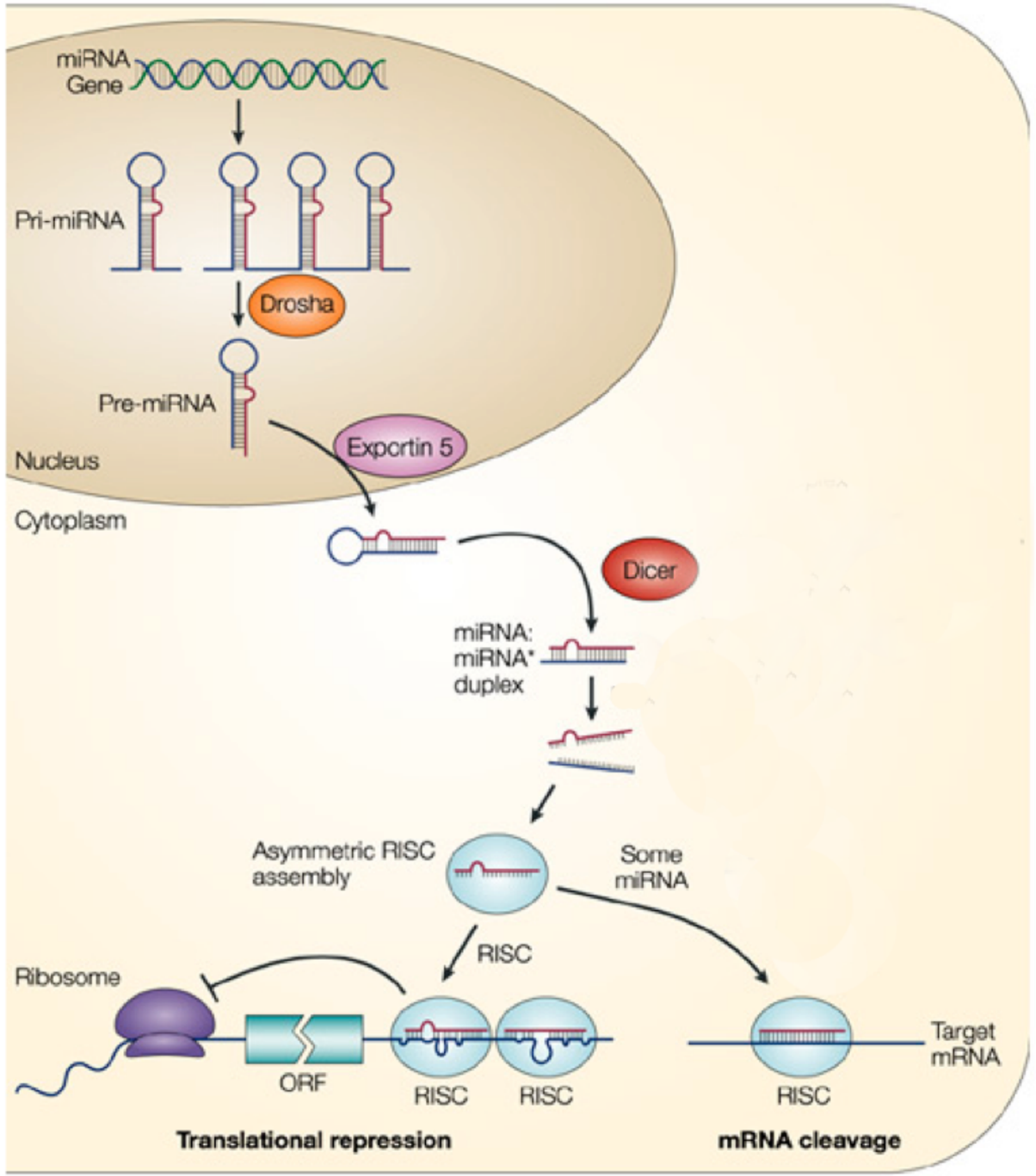
- Efekt:

  degradacja mRNA przez kompleks RISC (pełna komplementarność)

  lub

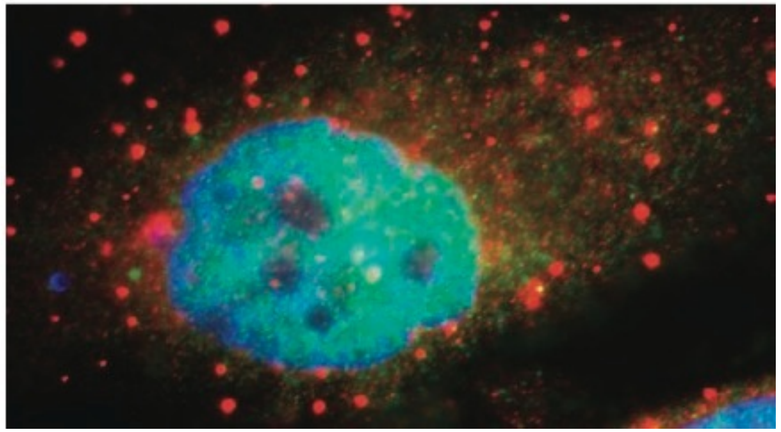
  hamowanie translacji (częściowa komplementarność)

  – rozbicie struktury pętli



Ciałka P (P-bodies)

- przechowywanie nieaktywnych translacyjnie mRNA po miRNA
- degradacja
- niekiedy możliwe “odzyskanie” nieaktywnych mRNA

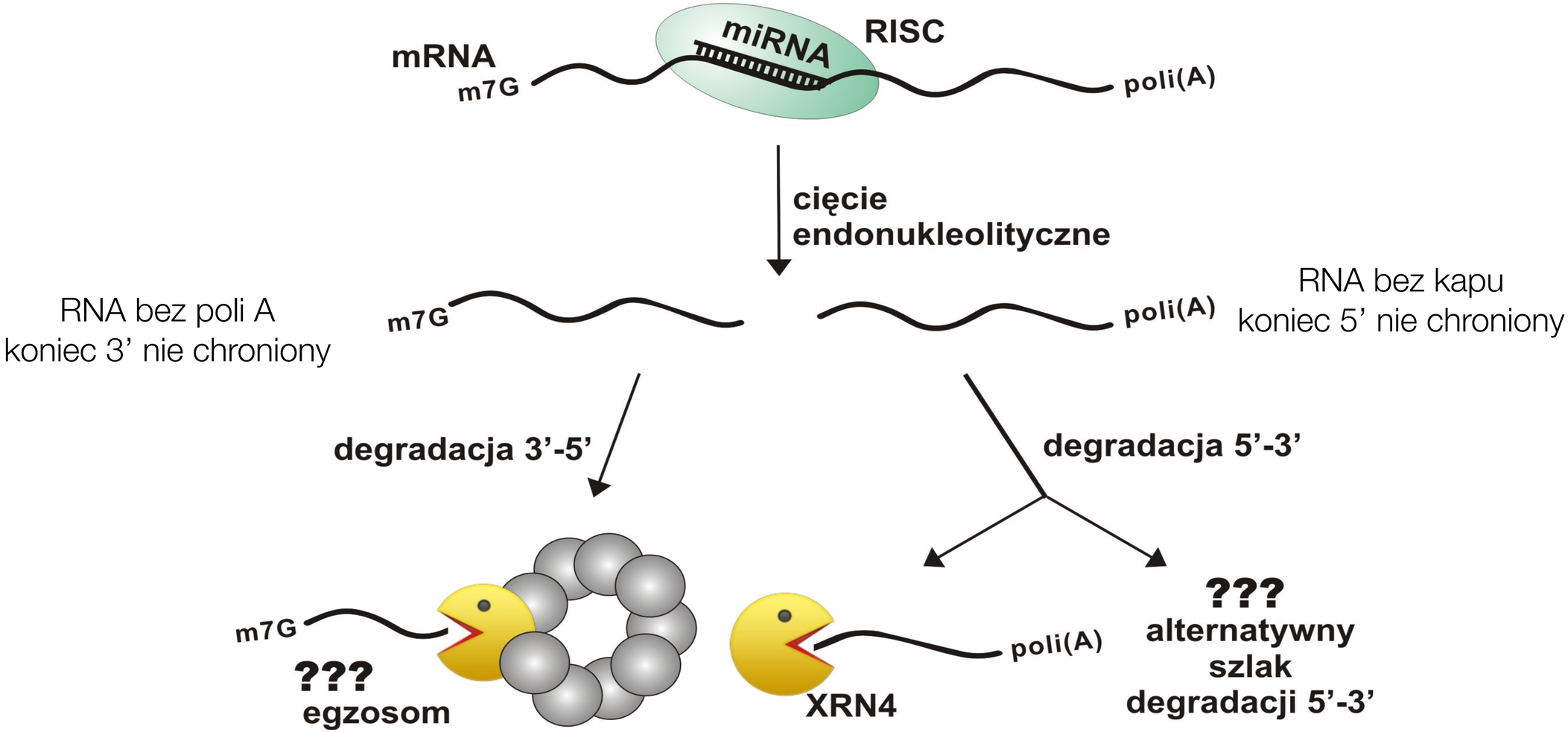


Marx J (2005), Science 310: 764-5

miRNA

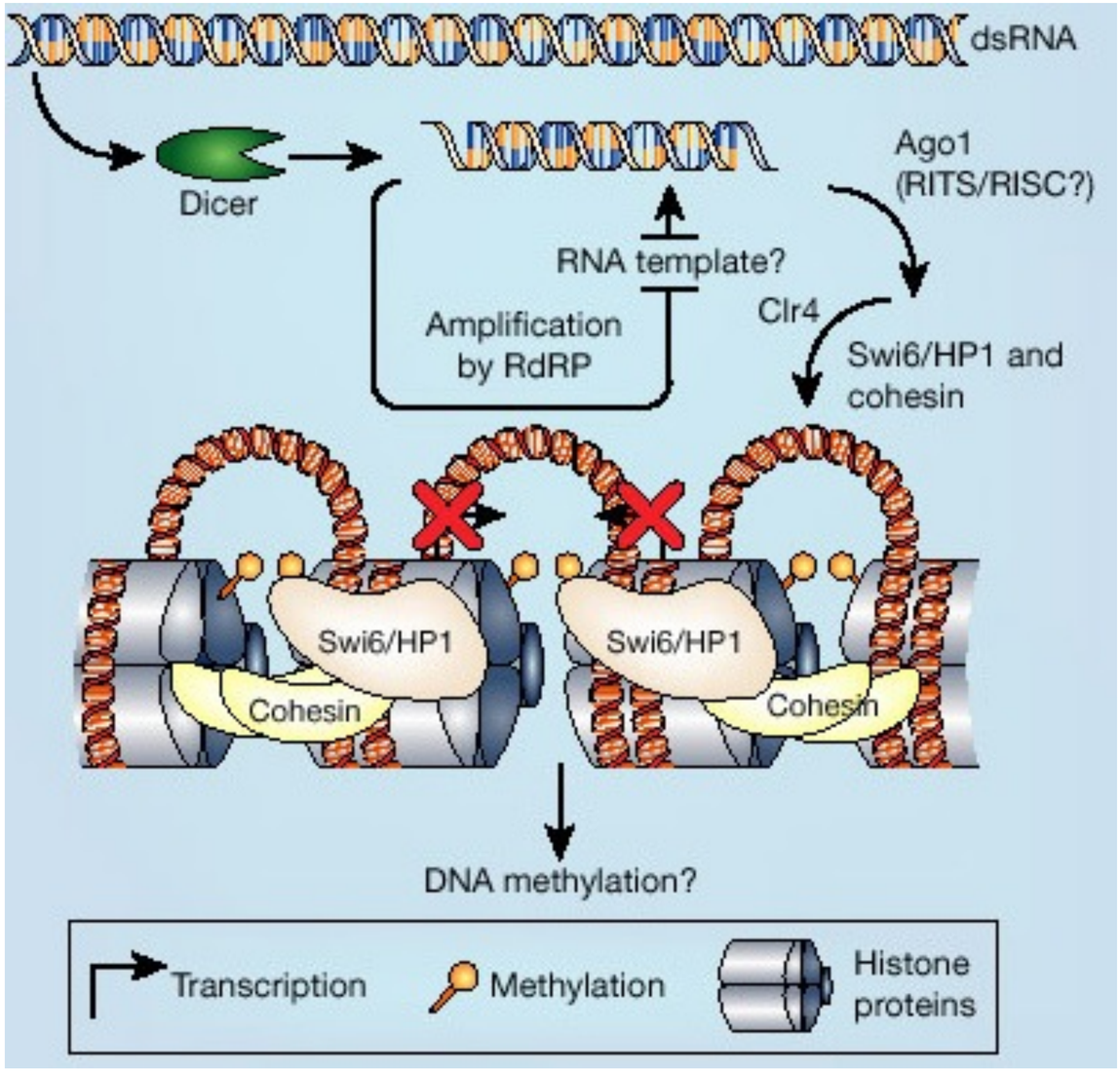
- Powszechny mechanizm regulacyjny
  - Co najmniej 1000 miRNA kodowanych w genomie człowieka
  - Co najmniej 10 000 docelowych transkryptów – 1/3 transkryptomu
- Nie jest wymagana pełna komplementarność
  - Ogólna regulacja: dany miRNA działa na wiele docelowych transkryptów
    - np. procesy rozwojowe
    - przerzuty nowotworów

Degradacja po cięciu przez RISC



Rys. © dr Monika Zakrzewska-Płaczek, IGiB UW

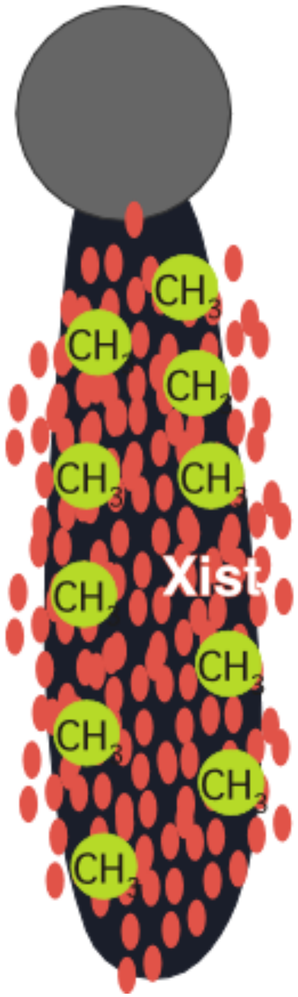
Regulacyjne RNA działają też na transkrypcję



Efekt:
kondensacja chromatyny

RNA też może modyfikować ekspresję chromosomu

- Wyciszanie jednej kopii chromosomu X u samic ssaków przez RNA XIST (*X-Inactive Specific Transcript*)
- Ekspresja i wiązanie transkryptu XIST indukuje metylację DNA (CpG) i zamykanie chromatyny



silencing of X-linked genes

Xist expression

methylation on CpG islands

replication during late S-phase

hypoacetylation of histone H4

association with macrohistone H2A1.2

CH_3 methyl groups

Xist RNA paint

Zastosowania

- Badanie funkcji genów (“odwrotna genetyka”) - szczególnie skuteczne u nicienia *Caenorhabditis*, ale działa też w komórkach owadów, ssaków i roślin

- Hamowanie ekspresji genów jako metoda leczenia (np. zwalczania wirusów czy nowotworów)