

RNA editiranje, transport, lokalizacija in  
degradacija

# Literatura

Pregledni članki:

Savva et al., Genome Biology 2012

Conticello, Genome Biology 2008

Hoshino, WIREs RNA 2012

Erickson, JCS 2011

Siddiqui, WIREs RNA 2011

Ramaswami, Cell 2013

# RNA editiranje

# Kaj je RNA editiranje?

- RNA editiranje je insercija, delecija ali modifikacija specifičnega nukleotida v primarnem transkriptu.
- Pogost pojav v mitohondrijih in kloroplastih
- Pri sesalcih samo modifikacije:
- A->I, C->U in U->C

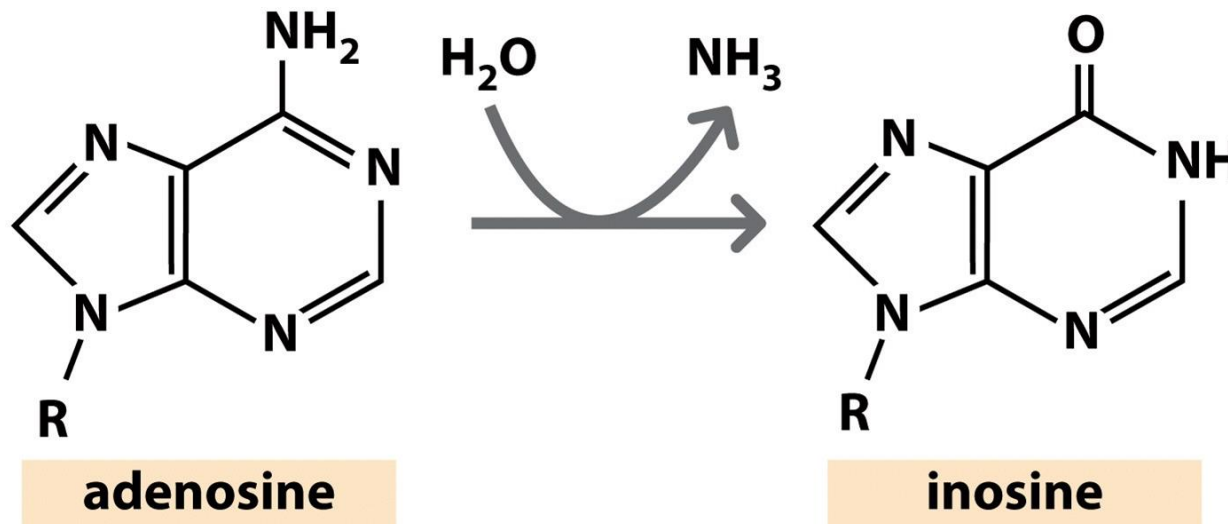
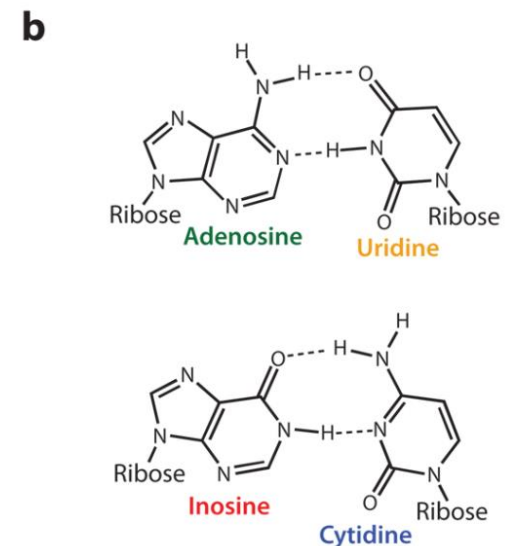
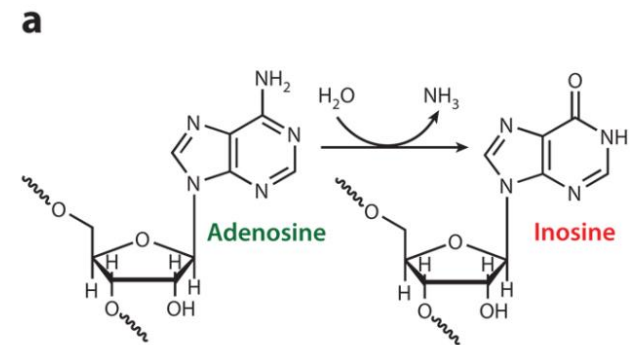
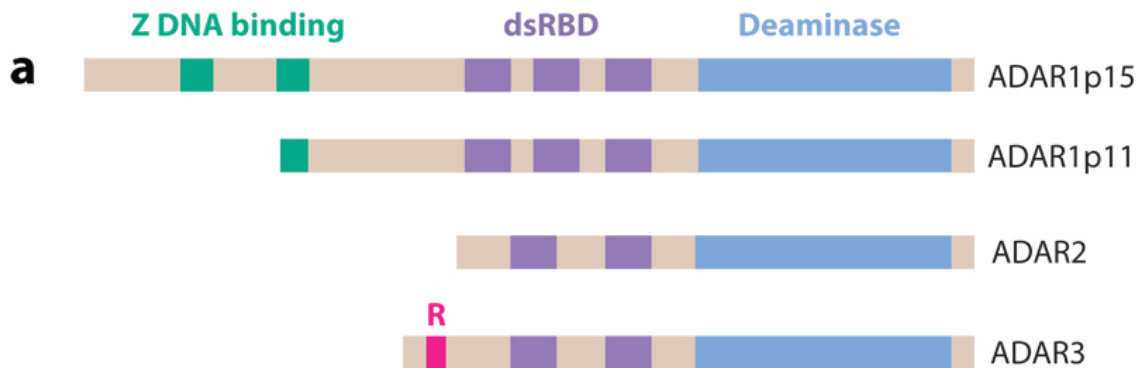


Figure 11.31 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

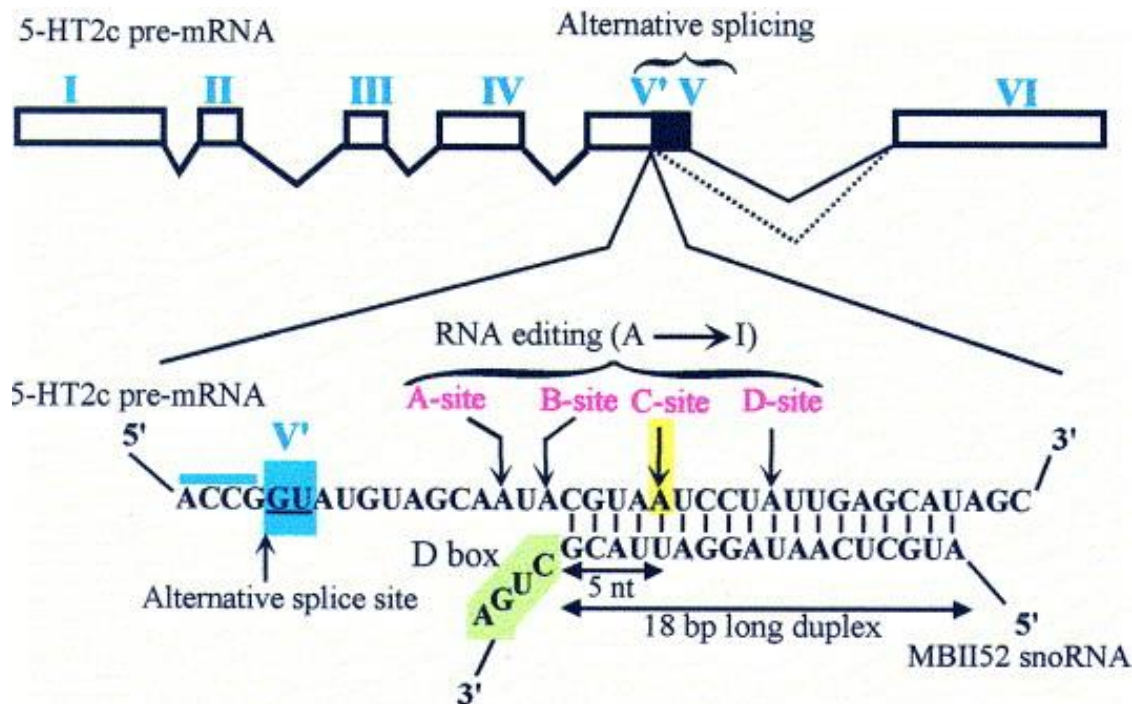
# A->I modifikacija

- Človeška ADAR družina (adenosine deaminases acting on RNA) vsebuje produkte treh genov.
- Z deaminacijo se iz adenzina tvori inozin, ki se pari s citozinom namesto s timinom



# A->I modifikacija pri kodirajočih genih

- Pogosto pride do modifikacije CAG (Gln) v CIG (Arg) – Q/R editiranje.
- V živčevju so Q/R modifikacije pogoste pri receptorjih nevrottransmitterjev ter pri ionskih kanalčkih.
- Pri serotoninem receptorju 5-HT<sub>2C</sub> A->I modifikacija uravnava alternativno izrezovanje in spajanje.



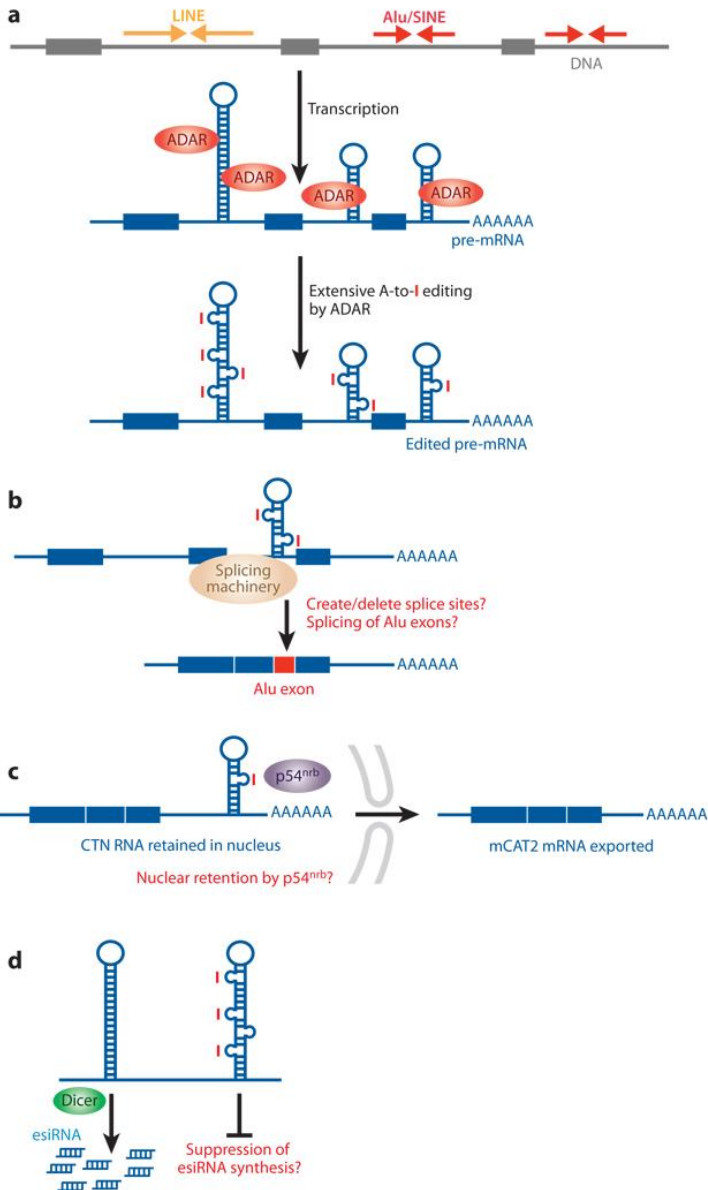
# A->I modifikacija lahko spremeni kod transkripta

- Modifikacija je lahko sinonimna ali nesinonimna.
- Poleg sprememb ak lahko pride tudi do spremembe STOP kodona v Trp in posledičnega podaljšanja polipeptida.

		2nd base			
		U	C	A	G
1st base	U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA STOP UAG STOP	UGU Cys UGC Cys UGA STOP UGG Trp ↓
	C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg
	A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met ↓	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg ↓
	G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val ↓	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala ↓	GAU Asp GAC Asp GAA Gln GAG Gln ↓	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly ↓

nonpolar  
polar  
basic  
acidic

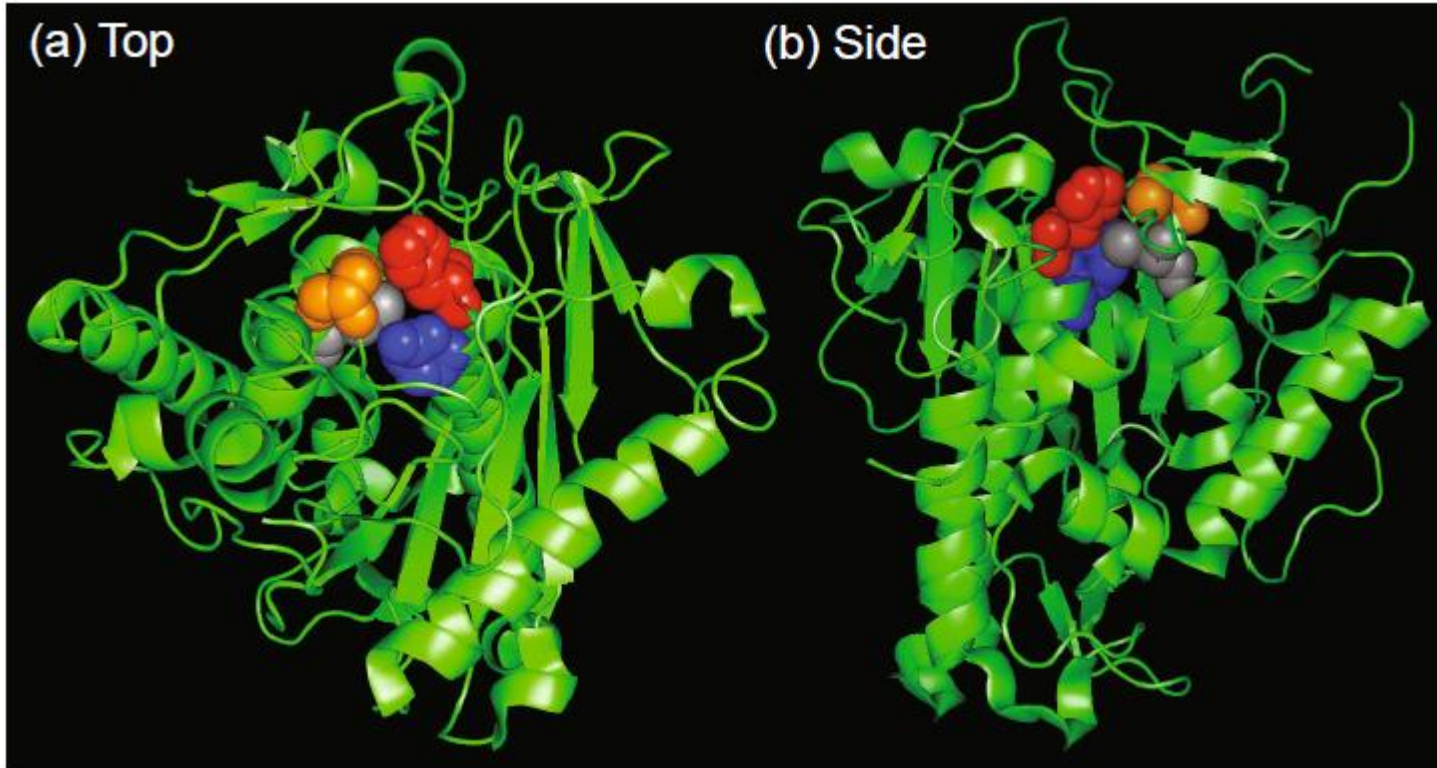
# A->I modifikacija pri nekodirajočih genih



- Obrnjene ponovitve Alu in LINE v intronih ali UTR tvorijo RNA duplekse, na katerih prihaja do obsežnih A->I modifikacij.
- Pri izrezovanju in spajanju se I bere kot G. Lahko pride do tvorbe novega mesta izrezovanja.
- Modifikacija obrnjene ponovitve SINE v 3'UTR mRNA CAT2 obdrži to RNA v jedru. Ob stresu se modificirana mRNA prereže pred lasnico, ponovno poliadenilira in se prevede v CAT2 protein.
- Modifikacije Alu ali LINE duplesov lahko preprečijo tvorbo esiRNA in posledično zmanjšajo utišanje retrotransposonov.

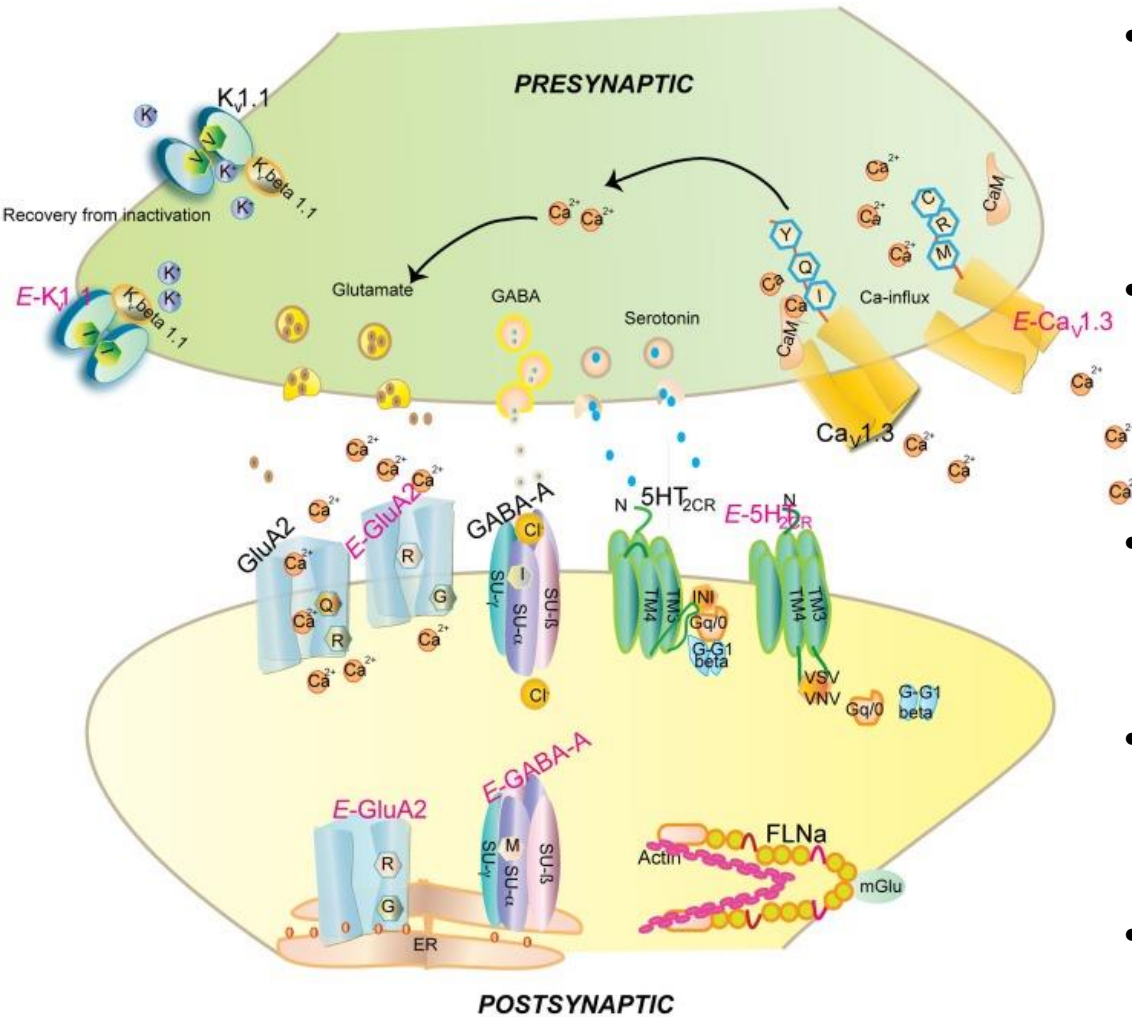


# Struktura ADAR2



# Vpliv editinga na živčne proteine in receptorje

Receptorji in kanalčki v normalni (črna) in editirani (roza) verziji.



- Podenota ionotropičnega glutamatnega receptorja GluA2, zmanjša prepustnost za Ca<sup>2+</sup>.
- Alfa 3 podenota GABA<sub>A</sub> receptorja zmanjša njegovo membransko mobilnost.
- serotonin 5-HT<sub>2c</sub> receptor zmanjša vezavo G-proteinov.
- Pri kalijevih kanalčkih Kv1.1 se spremeni interakcija s Kv β1.1.
- Cav1.3 se ne veže več na kalmodulin.

# Fiziološki pomen A->I editiranja

- Pri človeku in drugih vrstah so opaženi različni fenotipi zaradi nepravilnega A->I editiranja (večinoma v živčevju).
- Pri homozigotnih miškah z izbitim ADAR2, pride do pomanjkljivega editiranja GluR receptorjev, kar omogoči povečan pretok  $Ca^{2+}$  v celice. Sledi umiranje živčnih celic, epileptični napadi in smrt nekaj tednov po rojstvu.
- Pomanjkanje ADAR1 pri miškah vodi v napake pri hematopoezi, v apoptozo in v razpad jeter. Smrt nastopi v fazi zarodka.
- Haploinsuficienca ADAR1 vodi do dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH).
- Nenormalno editiranje 5-HT<sub>2</sub>CR v prefrontalnem korteksu je povezana z depresijo in samomorom.
- Pomanjkljivo editiranje GluR receptorjev je mogoče povezano tudi z umiranjem motoričnih nevronov pri amiotrofični lateralni sklerozi (ALS) ter apoptotičnim umiranjem nevronov po ishemiji.

# DSH

(dyschromatosis symmetrica hereditaria)

- Je avtosomno dominantna dedna bolezen z visoko penetranco.
- Najbolj razširjena je v vzhodni Aziji (Japonska, Kitajska, Tajvan).
- Na Japonskem 1,5:100.000.
- Čez 100 mutacij ADAR1 je povezanih z DSH.
- Svetli ali temni madeži na koži okončin in pegavost obraza.
- Možne so nevrološke težave.



# C->U modifikacija

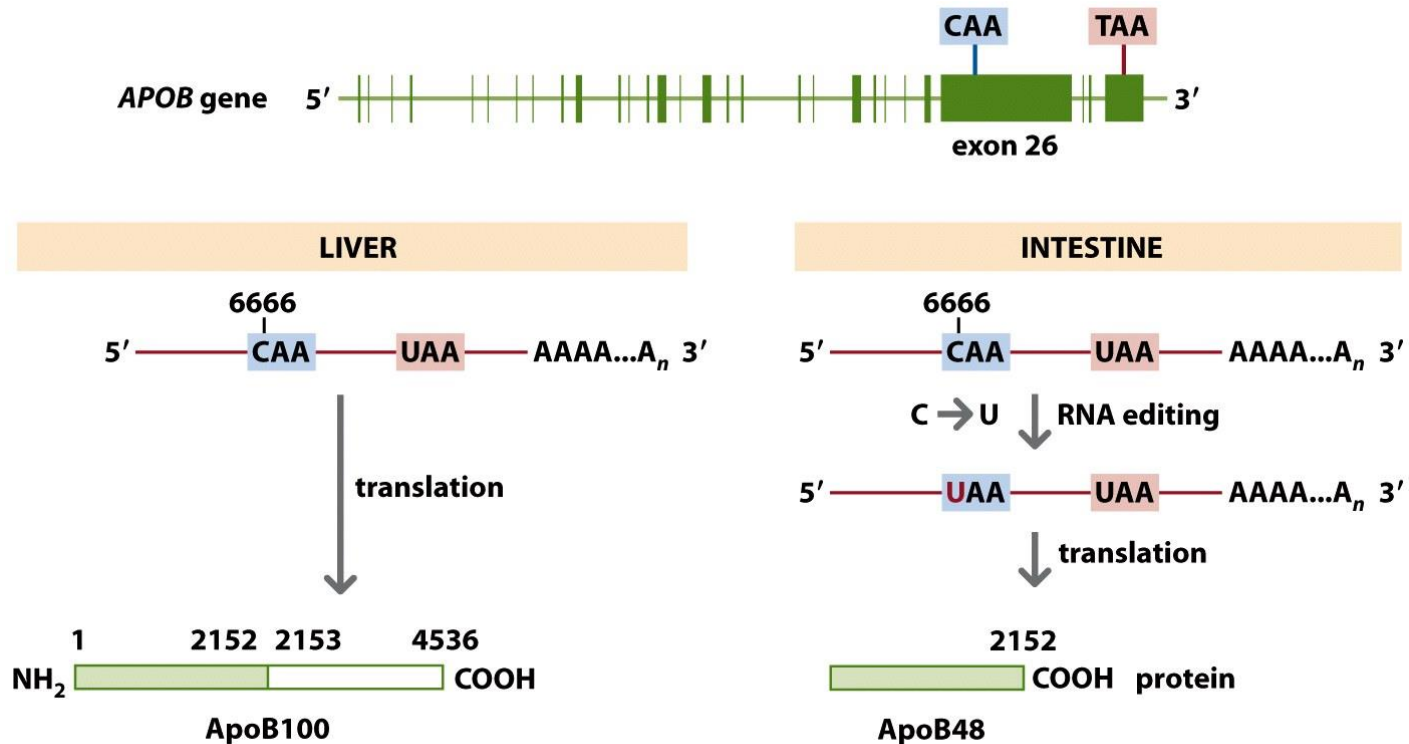


Figure 11.30 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

- V jetrih ApoB (apolipoprotein B) mRNA kodira 4536 ak protein
- V črevesju citidin deaminaza APOBEC1 pretvori C->U na mestu 6666. Iz CAA kodona (glutamin) nastane UAA (STOP).
- Črevesni ApoB je 2152 ak.
- Podobno se dogaja z genom za nevrofibromin (*NF1*).

# Človeški APOBEC

## Human AID/APOBEC paralogs

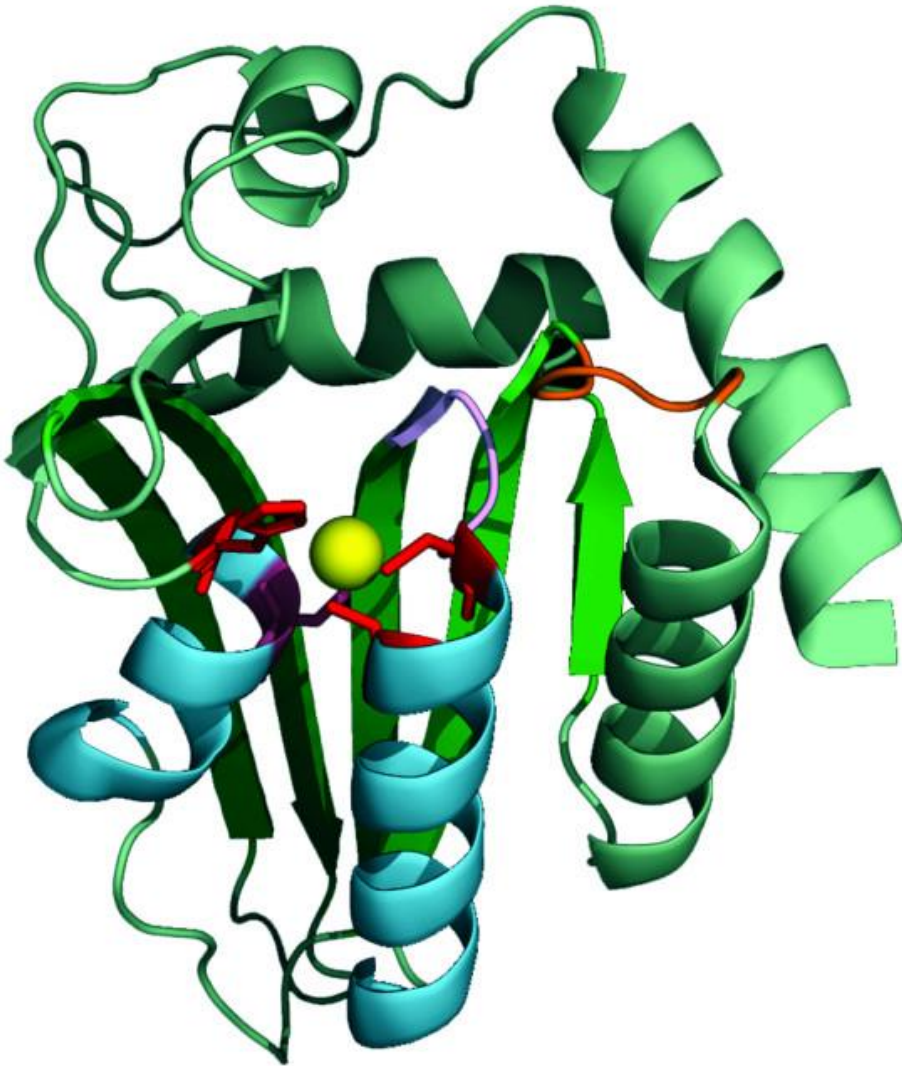
Name	Genomic location	Exons	Deaminase domains	Expression	Cellular localization	Editing activity	Target
AID	12p13	5	1	Activated B cells, Testis	Mainly cytoplasmic, acts in the nucleus	DNA	Immunoglobulin gene
APOBEC1	12p13.1	5	1	Small intestine	Cytoplasmic/nuclear, acts in the nucleus	RNA, DNA	Apolipoprotein B mRNA
APOBEC2	6p21	3	1	Skeletal muscle, heart	Cytoplasmic/nuclear	Unknown	Unknown
APOBEC3A	22q13.1	5	1	Keratinocytes, blood	Cytoplasmic/nuclear	DNA	Adeno-associated virus, retrotransposons
APOBEC3B	22q13.1	8	2	Intestine, uterus, mammary gland, keratinocytes, other	Predominantly nuclear	DNA	Retroviruses, retrotransposons, HBV
APOBEC3C	22q13.1	4	1	Many tissues	Cytoplasmic/nuclear	DNA	Retroviruses, retrotransposons, HBV
APOBEC3DE	22q13.1	7	2	Thyroid, spleen, blood	Unknown	DNA	Retroviruses
APOBEC3F	22q13.1	8	2	Many tissues	Cytoplasmic	DNA	Retroviruses, retrotransposons, HBV
APOBEC3G	22q13.1	8	2	Many tissues, T cells	Cytoplasmic	DNA	Retroviruses, retrotransposons, HBV
APOBEC3H	22q13.1	5	1	Blood, thymus, thyroid, placenta	Unknown	DNA	Retroviruses
LOC196469*	12q23	1	2	Pseudogene	-	-	-
APOBEC4	1q25.3	2	1	Testis	Unknown	Unknown	Unknown

\*This pseudogene originated from a recent retrotranspositional event. HBV, hepatitis B virus.

Coticello *Genome Biology* 2008 9:229 doi:10.1186/gb-2008-9-6-229

- Samo APOBEC1 in AID lahko deaminirata citozin na RNA.

# Struktura APOBEC2



- $\alpha$ -heliksa 2 in 3 vsebujeta His in Cys in tvorita katalitski žepek.
- Zn atom je koordinativno vezan z ak na koncih  $\alpha$ -heliksa 2 in 3.
- Glutamat, ki je donor protona za reakcijo, se nahaja pod Zn.
- Oranažna in roza zanka sta pomembni pri prepoznavi substrata.
- Funkcija APOBEC2 ni znana.

# APOBEC3 družina

- APOBEC3 družina je del prirojenega imuskega odgovora. Zavira retroviruse, mobilne genetske elemente kot so retrotransposoni in endogene retroviruse.
- Npr. APOBEC3G imajo antiretrovirusno funkcijo, zlasti proti HIVu. Predvsem motijo normalno pomnoževanje. Vendar HIV in drugi lentivirusi izražajo tudi faktor virusne infektivnosti (Viral infectivity factor, Vif). Vif se veže na APOBEC3G ter sproži njegovo ubikvitinacijo in degradacijo s proteosomalnim sistemom.



# Druge modifikacije mRNA

## The RNA Modification Database

HOME INTRODUCTION SEARCH LINKS MASSPEC TOOLBOX CONTACT US

< back

search results

#	symbol	common name
003	m <sup>5</sup> A	N <sup>5</sup> -methyladenosine
004	Am	2'-O-methyladenosine
088	m <sup>6</sup> Am	N <sup>6</sup> ,2'-O-dimethyladenosine
089	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> Am	N <sup>6</sup> ,N <sup>6</sup> ,2'-O-trimethyladenosine
021	m <sup>5</sup> C	5-methylcytidine
022	Cm	2'-O-methylcytidine
031	m <sup>7</sup> G	7-methylguanosine
032	Gm	2'-O-methylguanosine
090	m <sup>2,7</sup> G	N <sup>2</sup> ,7-dimethylguanosine
091	m <sup>2,2,7</sup> G	N <sup>2</sup> ,N <sup>2</sup> ,7-trimethylguanosine
017	I	inosine
053	Um	2'-O-methyluridine
092	m <sup>3</sup> Um	3,2'-O-dimethyluridine

< back

13 hits

<http://rna-mdb.cas.albany.edu/RNAmods/>

Transport RNA iz jedra

# Prenos RNA v citoplazmo

- mRNA, tRNA in ribosomske podenote se prenesjo v citoplazmo skozi jedrno poro (NPC – nuclear pore complex).
- Iste jedrne pore se uporabljajo tudi za transport proteinov.
- Izvoz RNA potrebuje energijo.
- Vsak razred RNA rabi drugačne transportne proteine za prenos v citoplazmo.

Nuclear Pore Complexes in the Nuclear Envelope

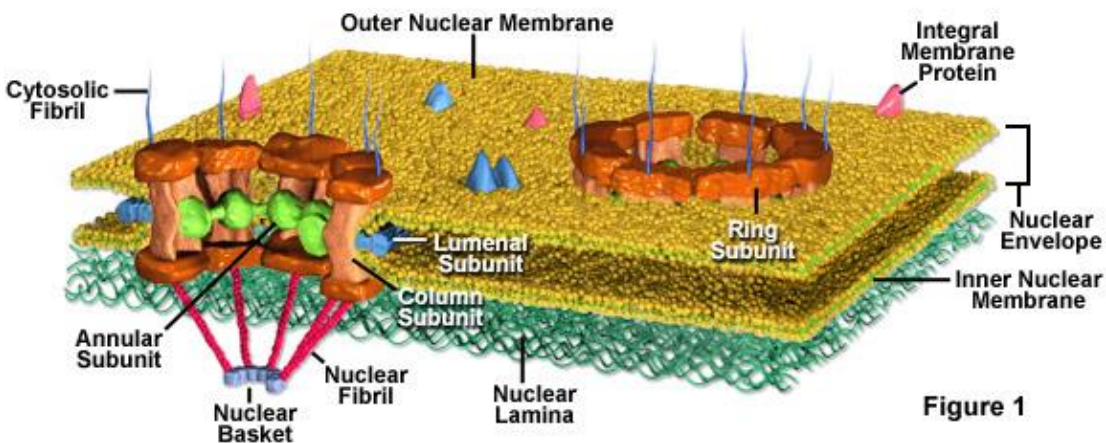
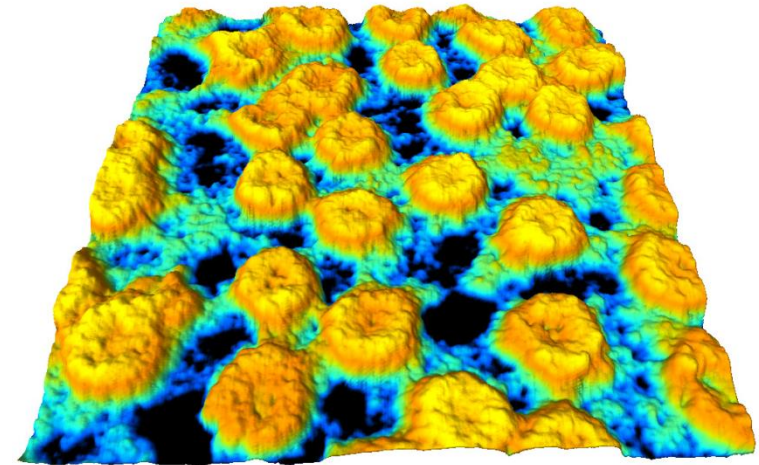
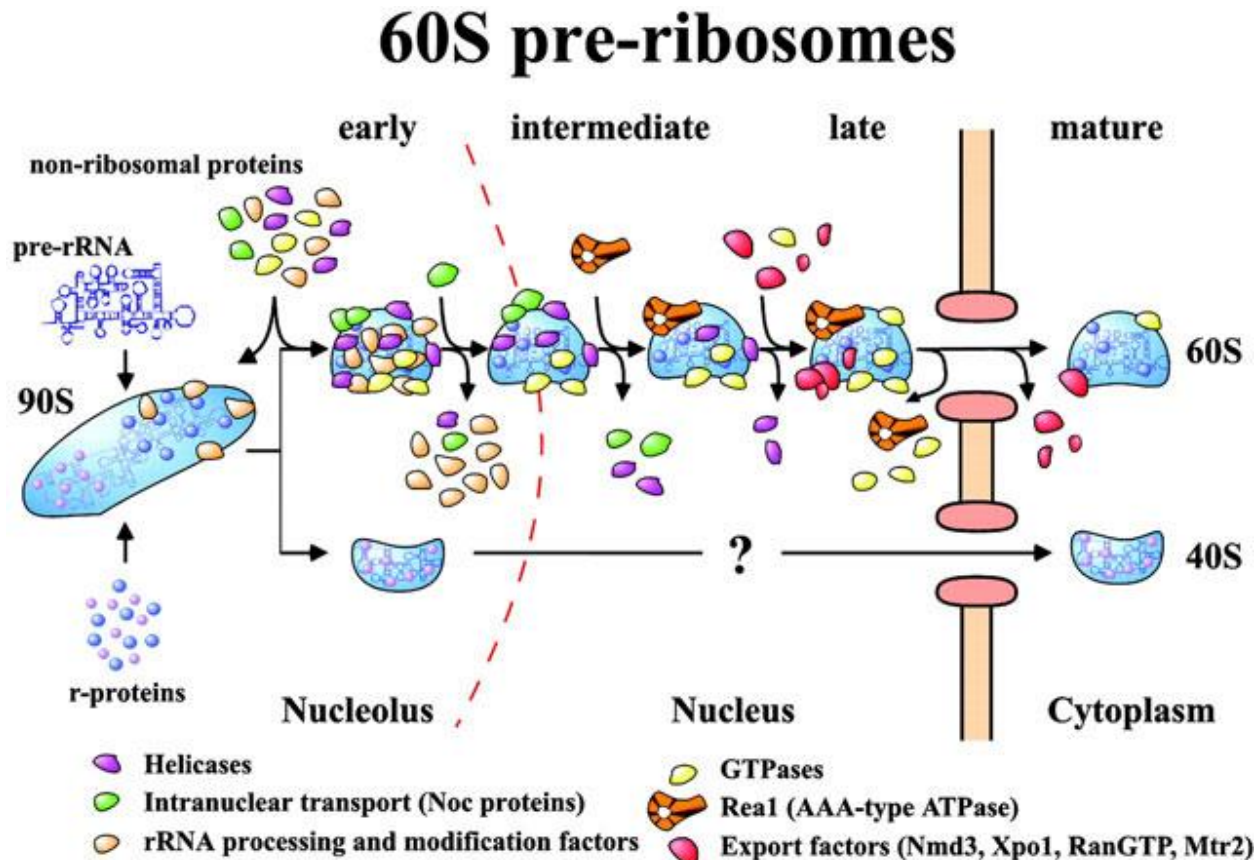


Figure 1

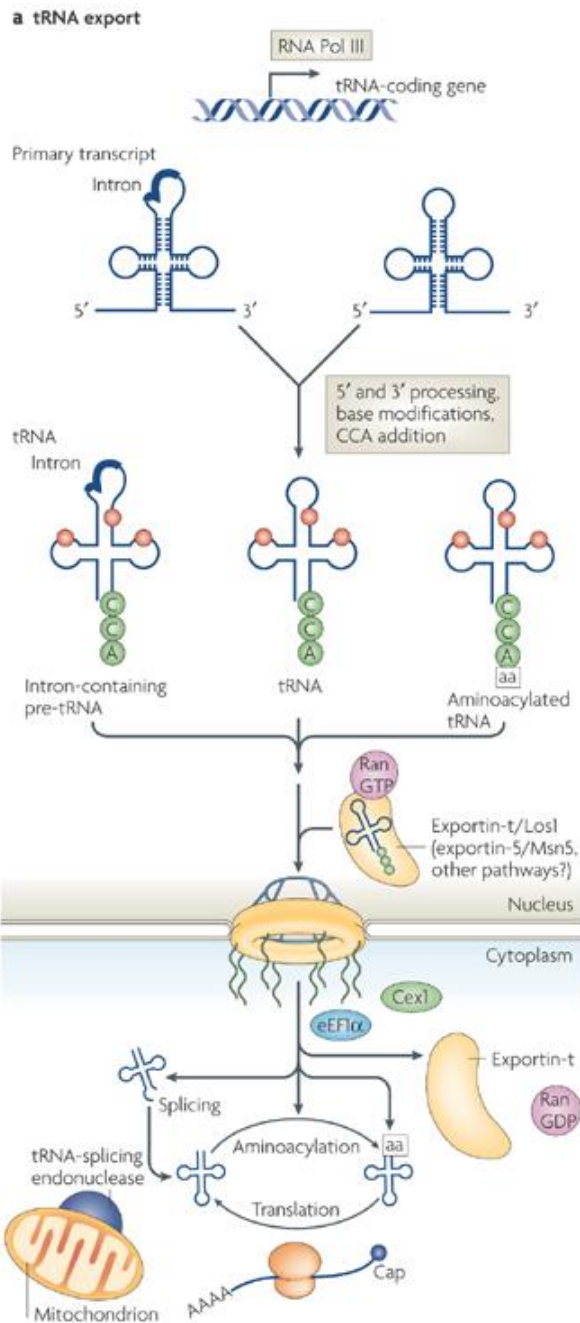


# Prenos rRNA v citoplazmo

- Ribosomske podenote se sestavijo v jedrcu (nukleolus), kjer tudi poteka transkripcija rRNA.
- Ribosomski protein se iz citoplazme prenesejo v jedro.
- Pri prenosu v citoplazmo sodelujejo proteini prenašalci, porablja se energija.



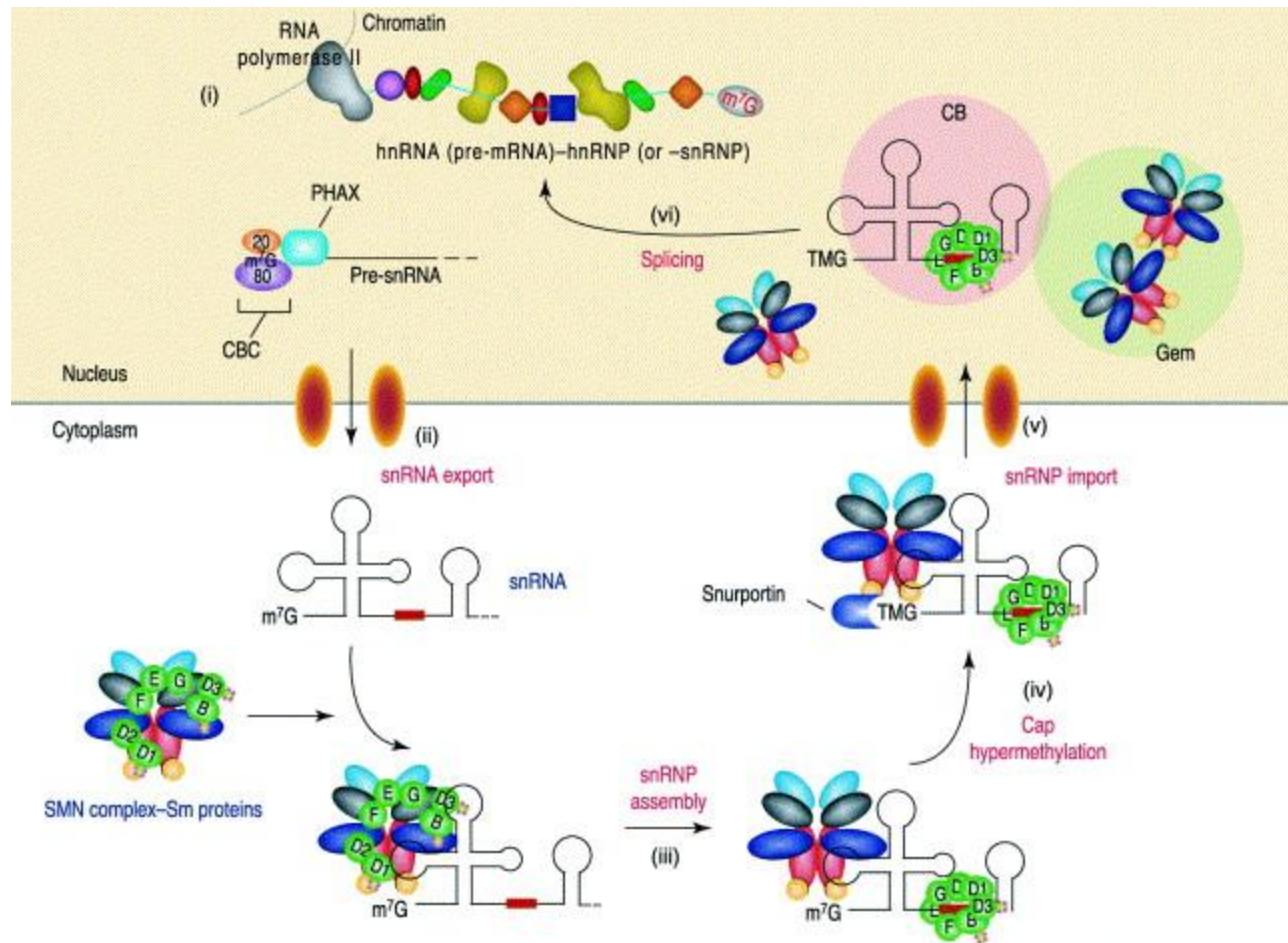
# tRNA-ji se iz jedra prenesejo z eksportinom t



- Eksportin t je prenašalec tRNA.
- tRNA za izvoz potrebujejo energijo.
- Modifikacije tRNA lahko vplivajo na izvoz tRNA.
- tRNA se lahko tudi prenesejo v jedro.

# Transport snRNA

- U snRNA se prenese v citoplazmo, kjer se nanjo vežejo Sm proteini, tvori se snRNP.
- snRNP se vrne v jedro in sodeluje pri spajanju.



# mRNA transport

- Po spajanju in editiranju se mRNA spakira in prenese iz jedra v citoplazmo, kjer poteka translacija.
- Na zrelo mRNA so vezani številni proteini, ki jo zapakirajo in označijo za prenos v citoplazmo. Večinoma so to proteini, ki se vežejo na mRNA v procesu transkripcije in procesiranja. Tvorijo se **mRNP**.
- Večina proteinov, vezanih na mRNA, se odstrani po prehodu v citoplazmo. Nekateri pa se odstranijo tik pred prehodom.
- Transport mRNA je aktiven proces.
- Prenos poteka skozi jedrno poro.

# 3 koraki mRNP transporta

1. **Nastanek** mRNP kompleksa za prenos iz jedra.
2. **Prenos skozi jedrno poro.**
3. **Razdružitev** mRNP kompleksa za prehod iz jedra.



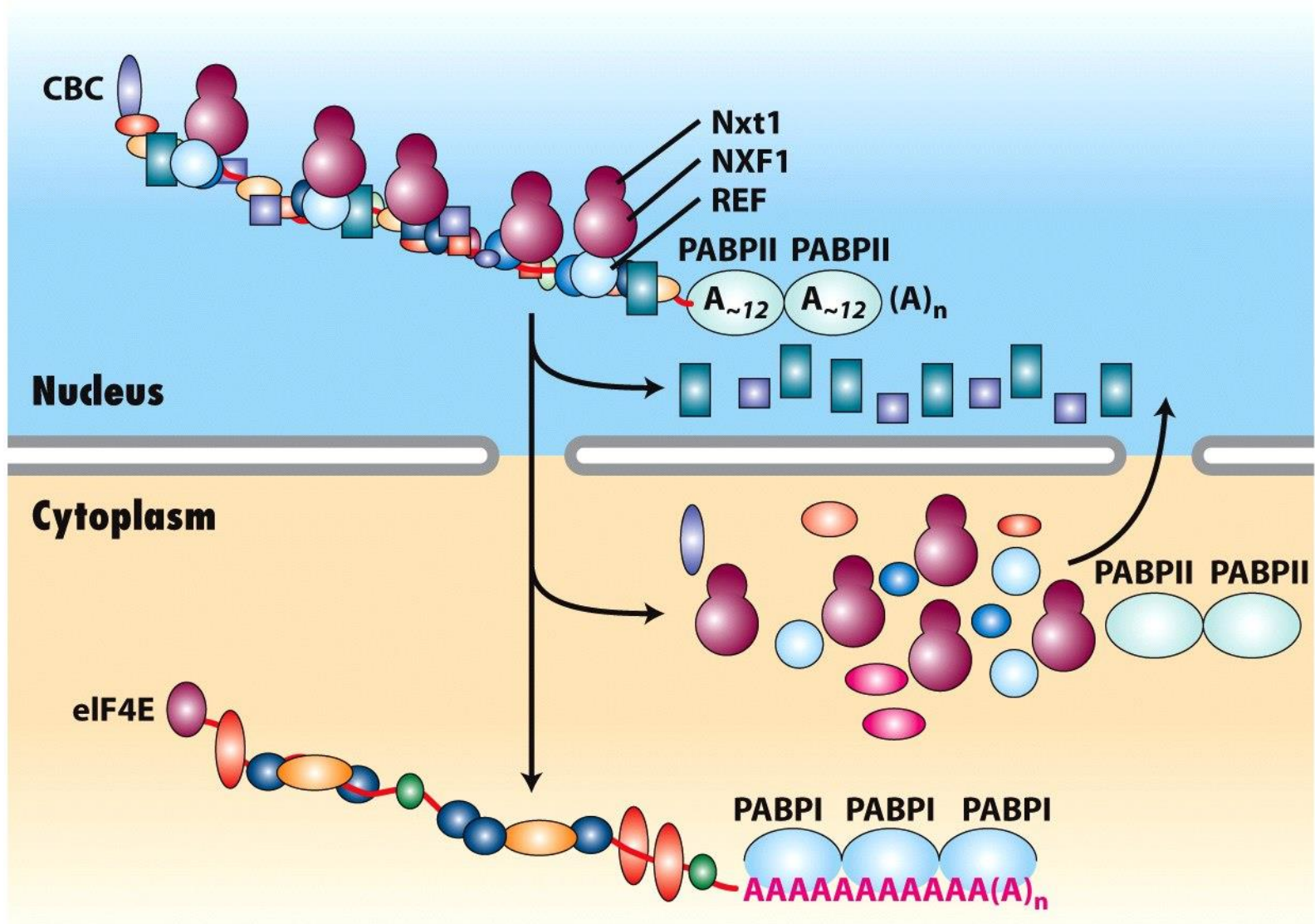
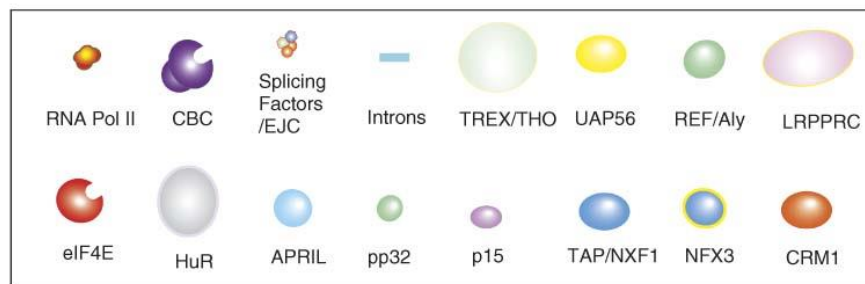
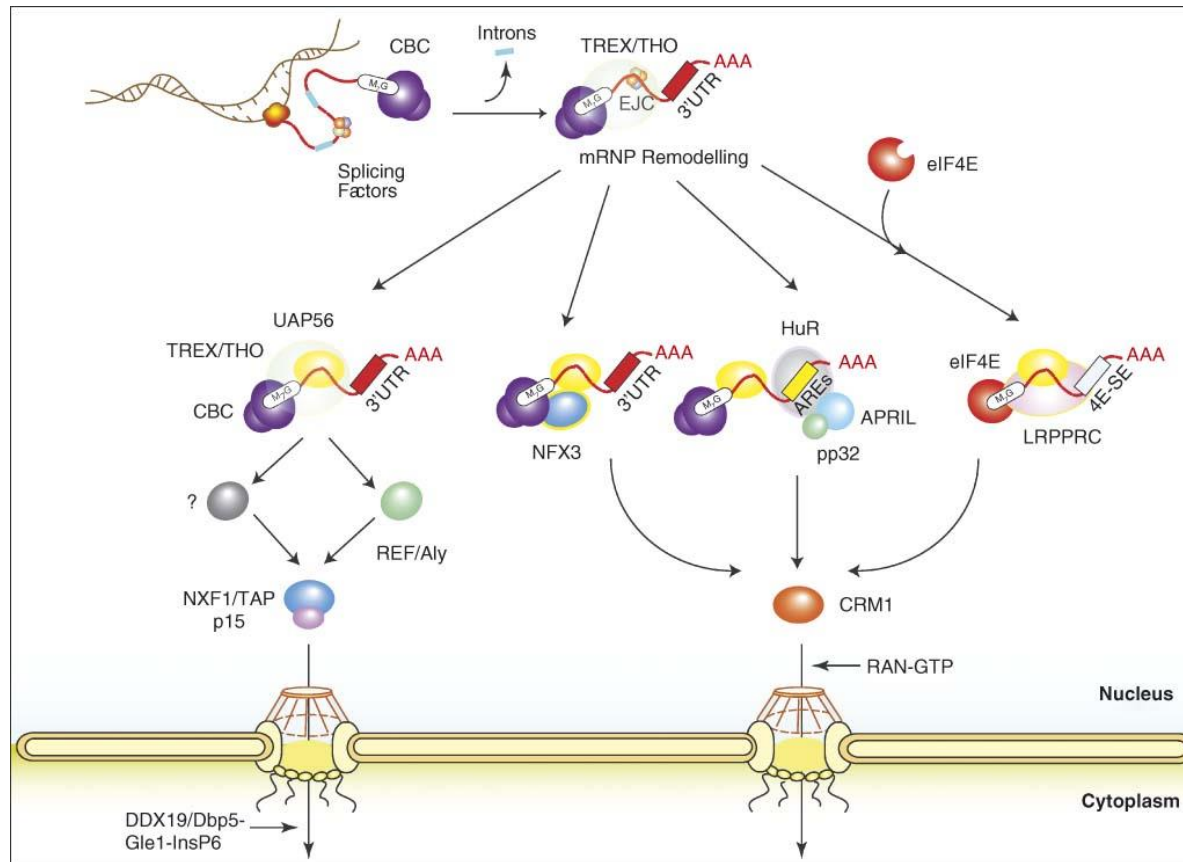
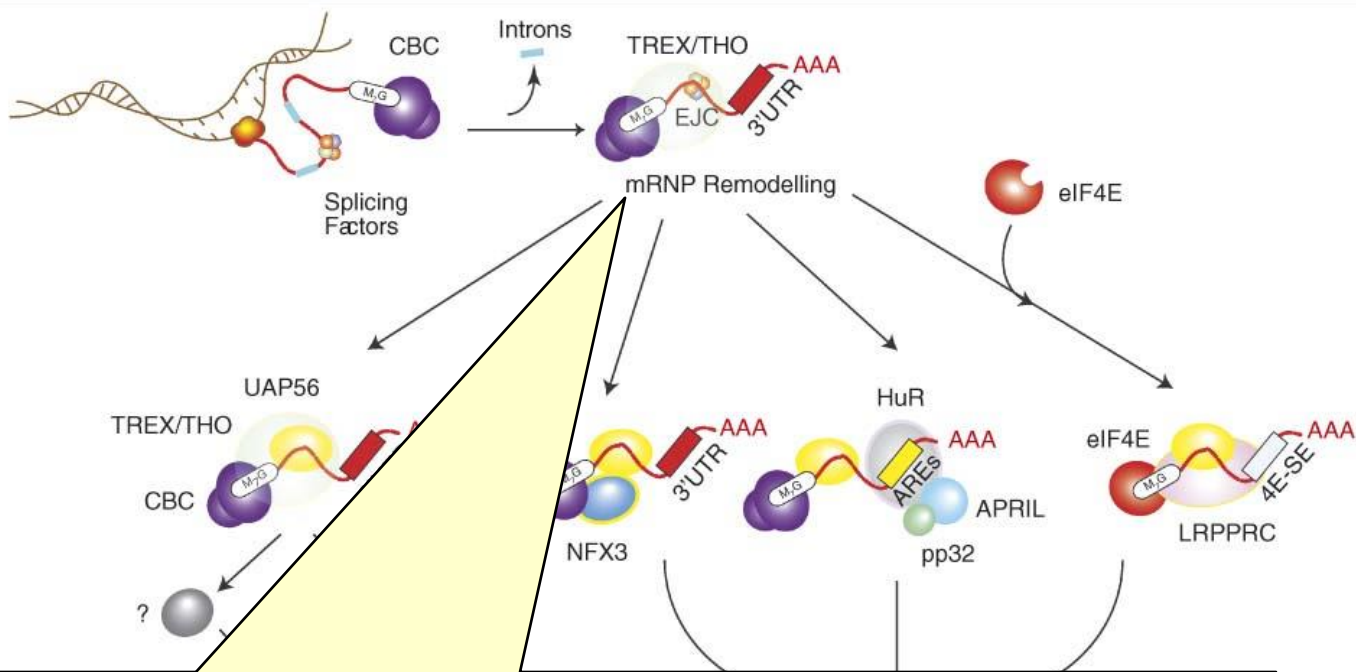


Figure 8-21  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W.H. Freeman and Company

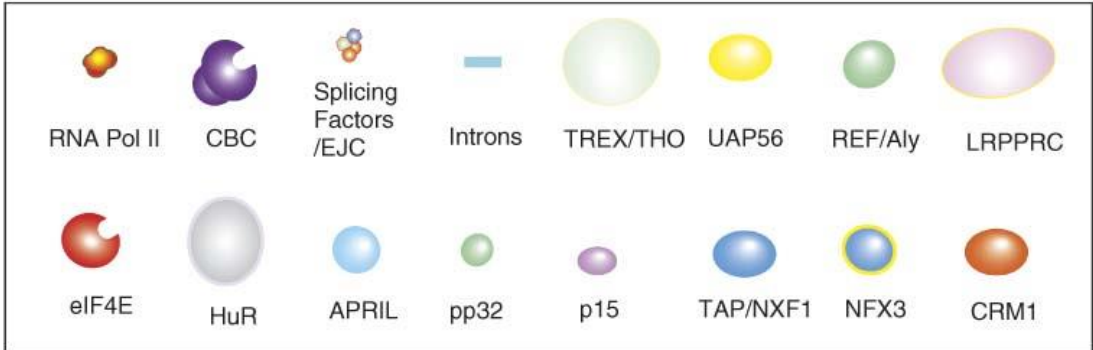
# Dve vrsti prenosa mRNA v citoplazmo

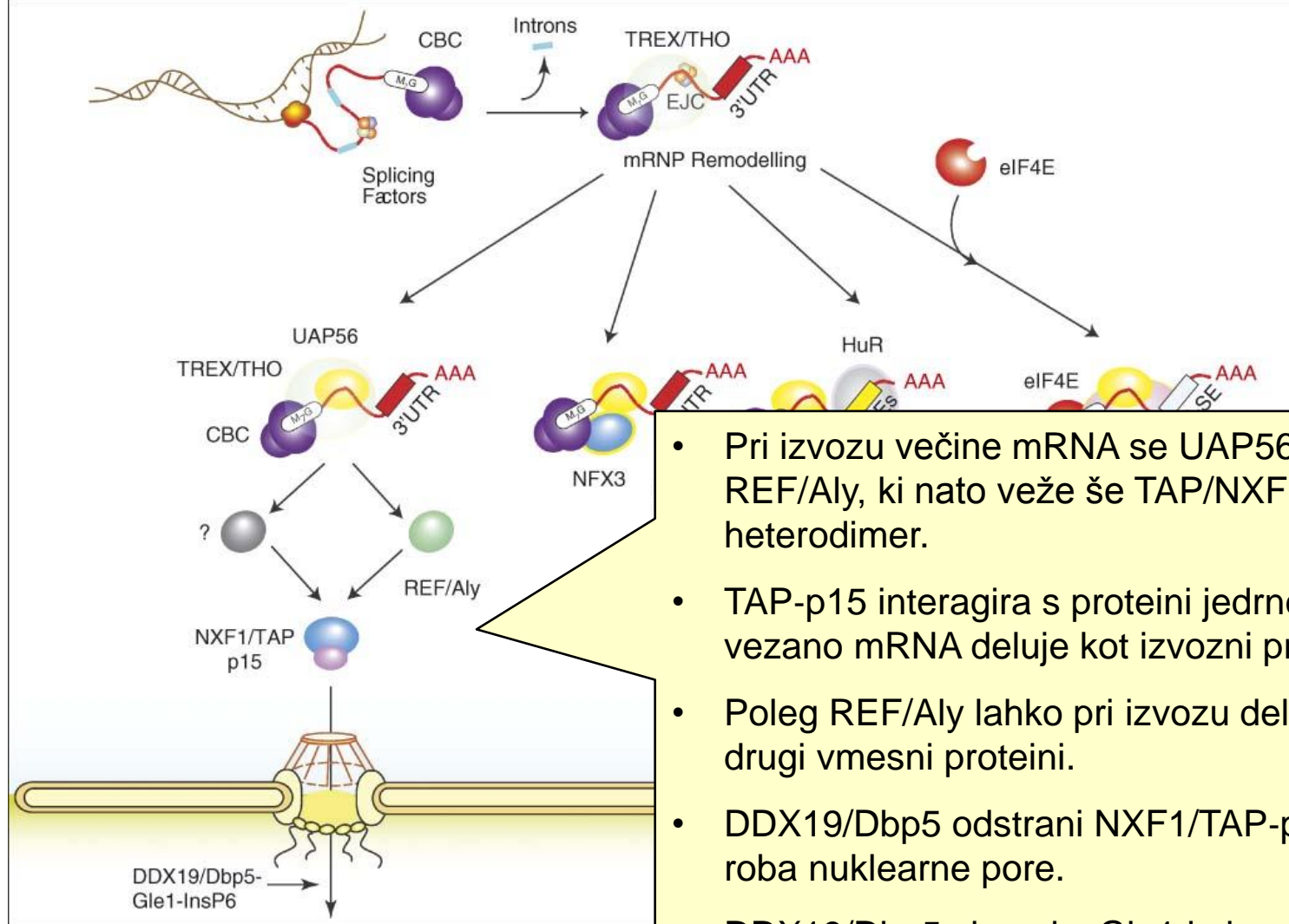
Primerjava med NXF1/TAP in CRM1 potema.



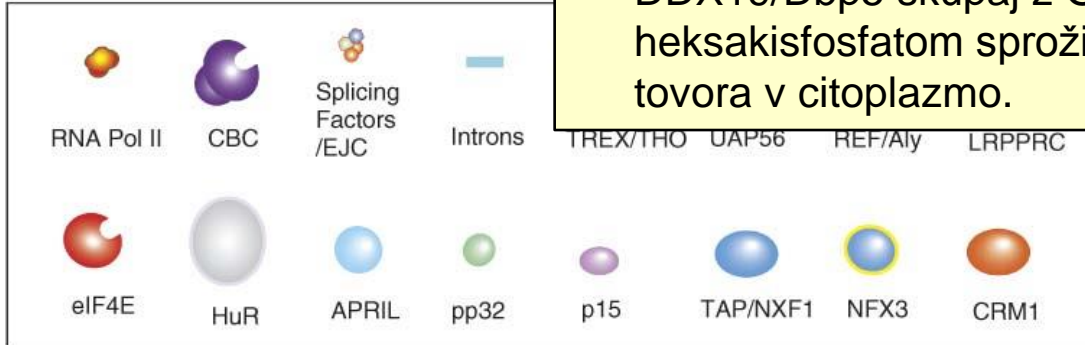


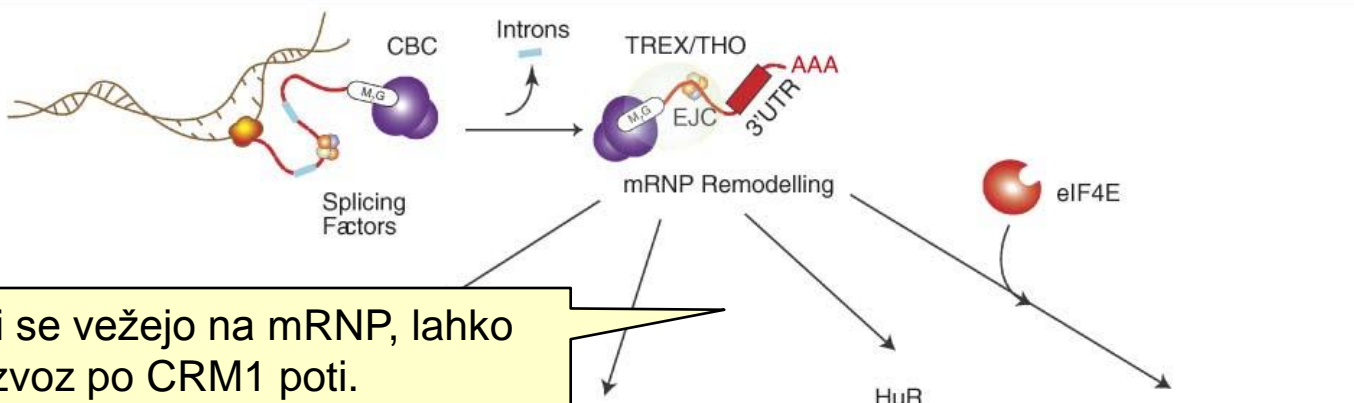
- Izvoz mRNA se začne že s serijo posttranskripcijskih modifikacij, kot so dodajanje 5' kape in 3' poli(A) repa ter izrezovanje in spajanje.
- TREX/THO kompleks z UAP56 se veže na procesirano mRNA
- Na RNA se tudi vežejo drugi proteini, ki sodelujejo pri izvozu in preoblikovanja mRNP pred vstopom v specifično pot izvoza.



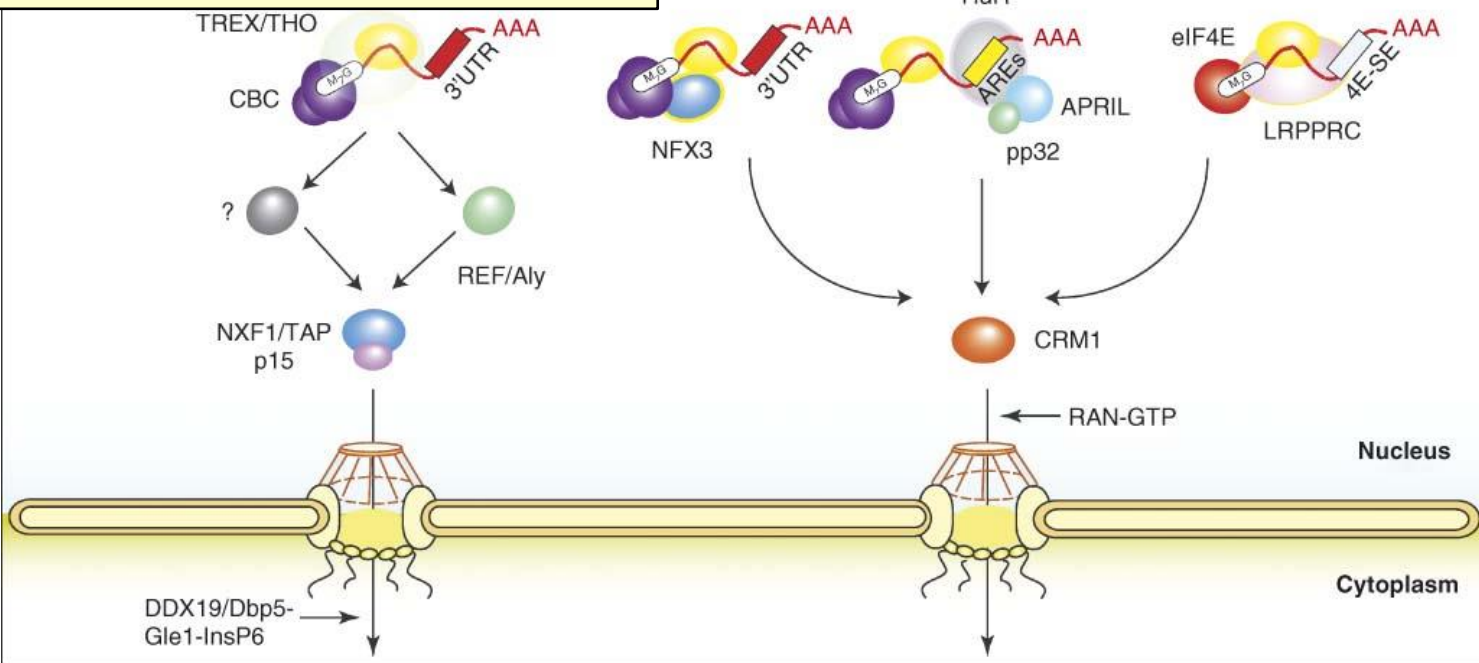


- Pri izvozu večine mRNA se UAP56 veže na REF/Aly, ki nato veže še TAP/NXF1-p15 heterodimer.
- TAP-p15 interagira s proteini jedrne pore. Za vezano mRNA deluje kot izvozni protein.
- Poleg REF/Aly lahko pri izvozu delujejo še drugi vmesni proteini.
- DDX19/Dbp5 odstrani NXF1/TAP-p15 od roba nuklearne pore.
- DDX19/Dbp5 skupaj z Gle1 in inositol-heksakisfosfatom sproži sprostitvev mRNA tovara v citoplazmo.

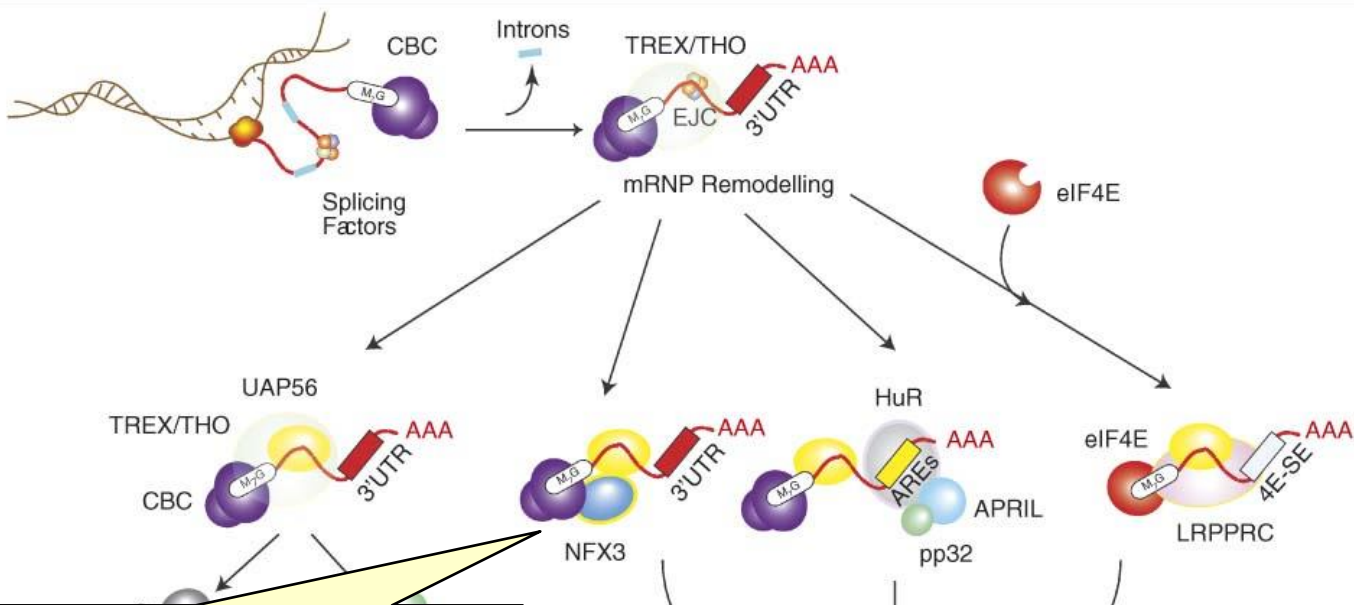




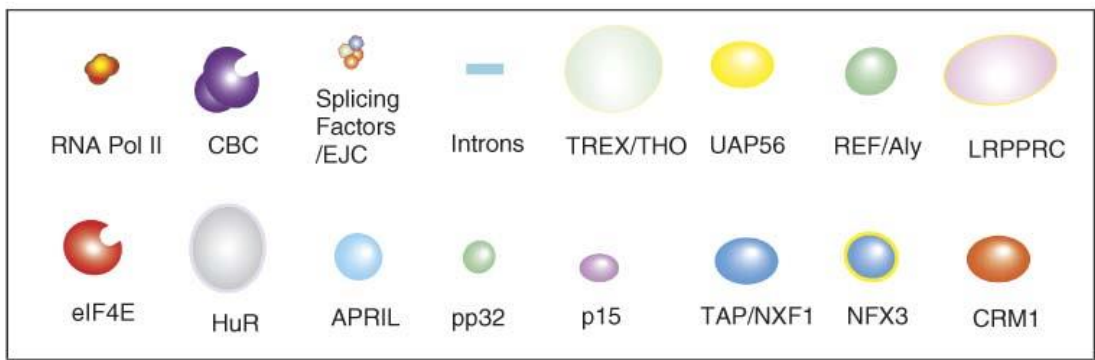
Proteini, ki se vežejo na mRNP, lahko usmerijo izvoz po CRM1 poti.

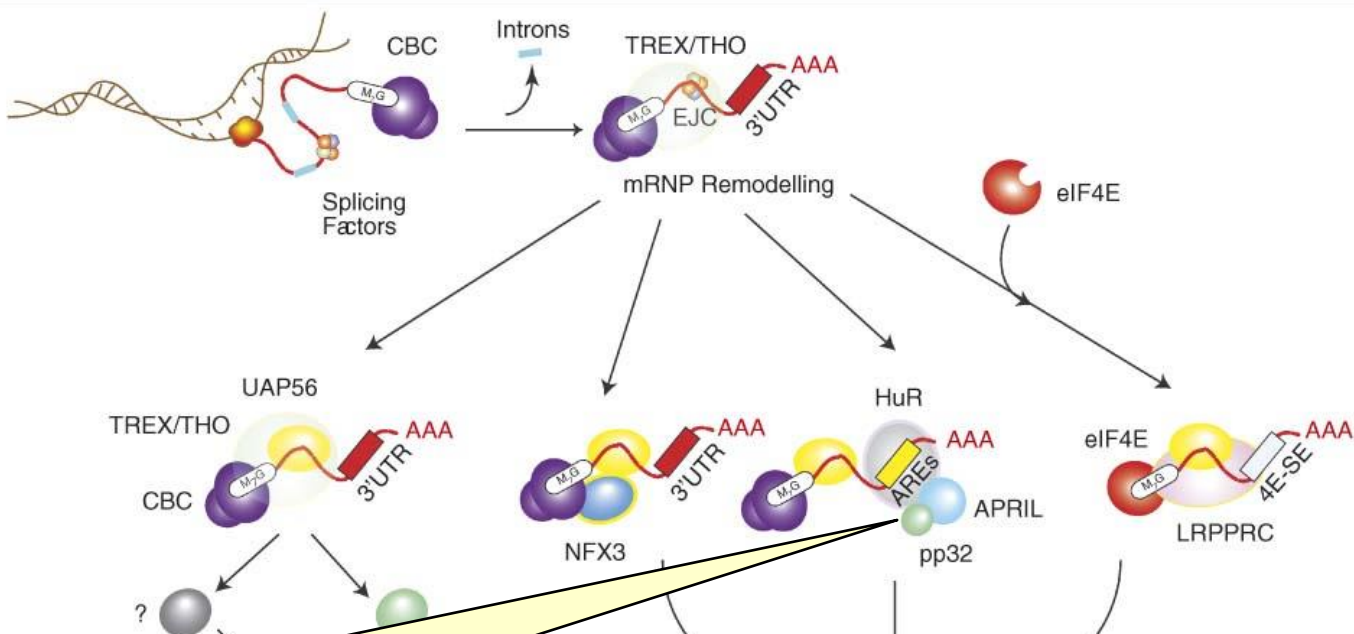


RNA Pol II	CBC	Splicing Factors /EJC	Introns	TREX/THO	UAP56	REF/Aly	LRPPRC
eIF4E	HuR	APRIL	pp32	p15	TAP/NXF1	NXF3	CRM1



NXF3, ki ima NES, služi kot tkivno-specifičen adapter za CRM1 pri izvozu določenih mRNA (te mRNA niso definirane).

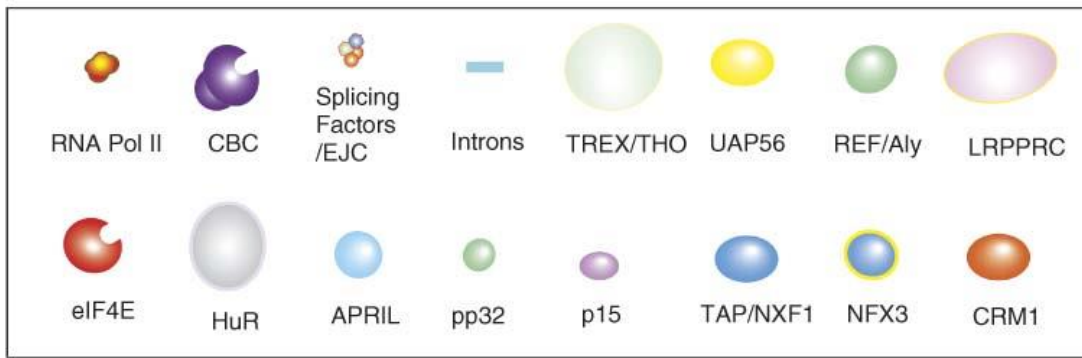
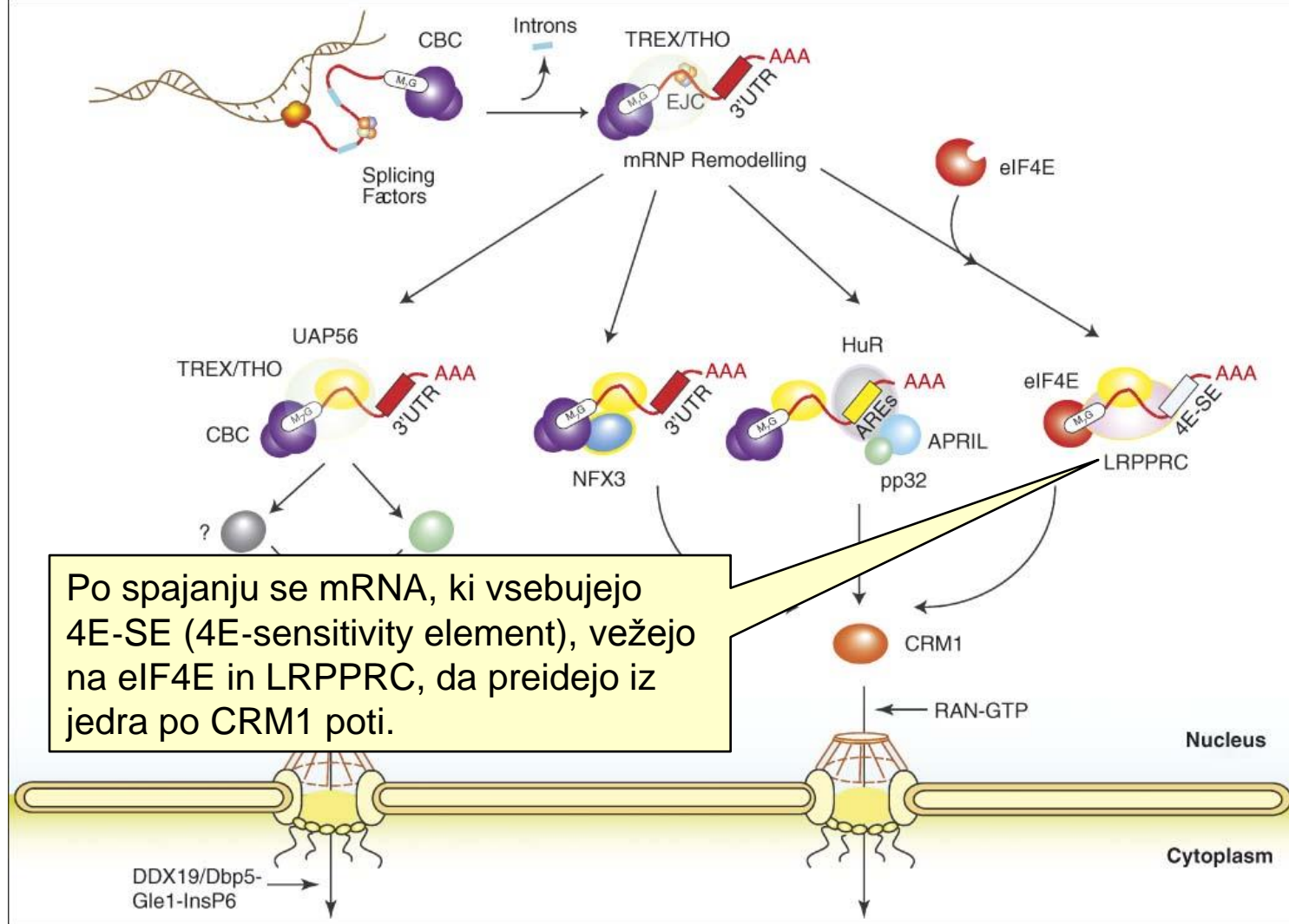




APRIL in pp32 sta faktorja, ki imata NES, in delujeta kot most med HuR in CRM1 pri izvozu specifičnih (AU bogatih) mRNA.



RNA Pol II	CBC	Splicing Factors /EJC	Introns	TREX/THO	UAP56	REF/Aly	LRPPRC
eIF4E	HuR	APRIL	pp32	p15	TAP/NXF1	NFX3	CRM1





# mRNP transport je evolucijsko ohranjen

- Večina vpletenih proteinov ima ortologe.

## kvasovke

Mex67p

Mtr2

Yra1p

Sub2p

THO

TREX

–

Dbp5p

...

## vretenčarji

NXF1/TAP

p15

Aly/REF

UAP56/HEL

THO

TREX

EJC

Dbp5

...

# Fiziološke posledice napak pri transportu mRNA

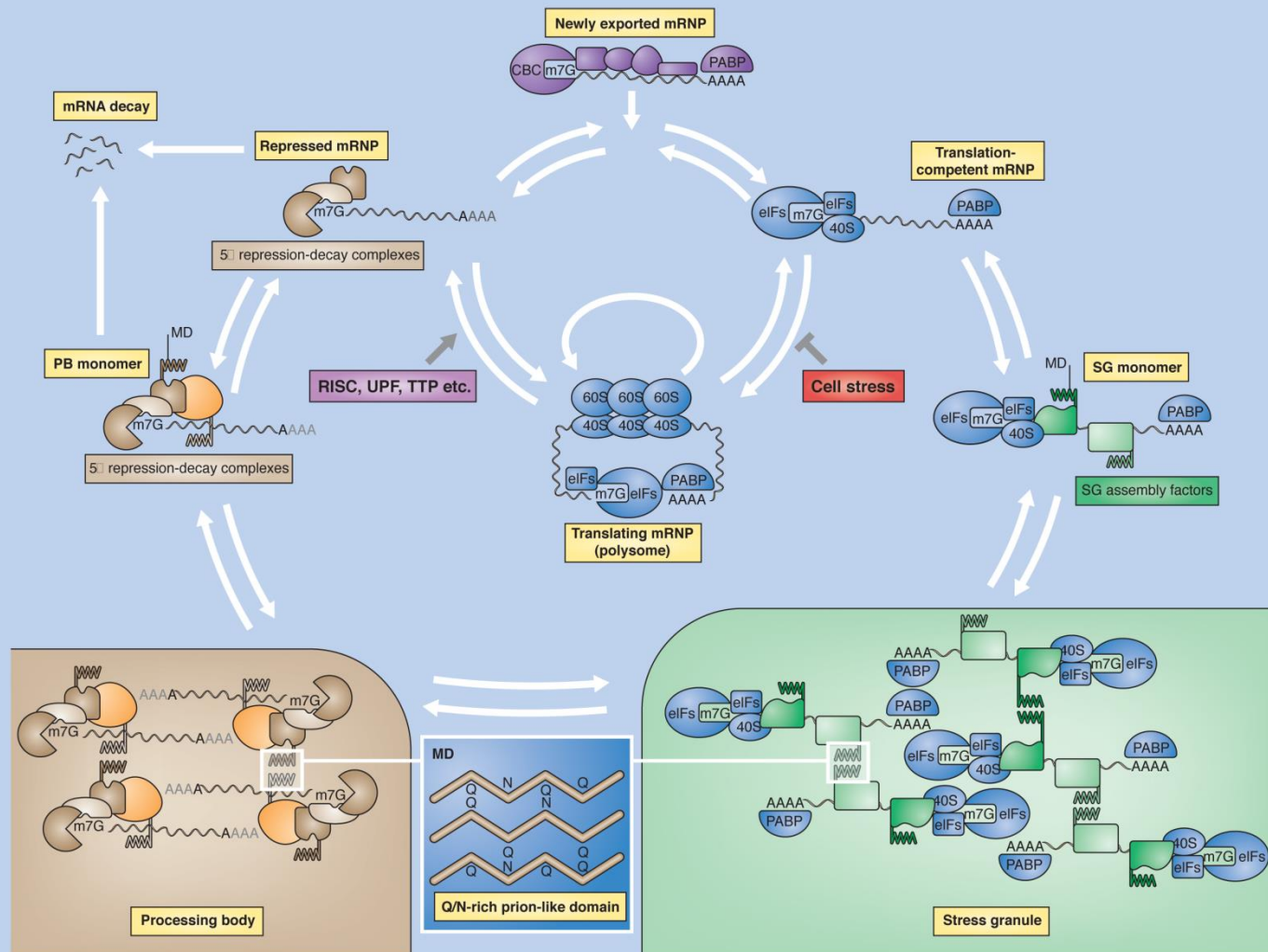
- Napake pri izvozu mRNA prispevajo pri določenih genetskih boleznih.
- **Osteogenesis imperfecta tip I** – bolezen krhkih kosti
  - Mutacija spajanja v genu za kolagen COL1A1 pripelje do zmanjšane proizvodnje kolegena. Mutacija vpliva na vezavo proteinov izvoza (npr. UAP56). V jedru pride do nabiranja in razgradnje mutirane mRNA.
- **Miotonična distrofija (DM) tip I**
  - Najbolj pogosta oblika DM. Pride do podaljšanja CUG ponovitev v 3'-UTR mRNA DM kinaze. DMPKcug+ mRNA se obdrži v jedru in tvori jedrne agregate.
  - Pri najbolj hudi obliki so tudi napake pri REF/Aly. Ker se REF/Aly veže na adapter izvoza NXF1/TAP, zmanjšanje njegove funkcije vodi do zmanjšanja izvoza DMPKcug+ transkriptov.

# Fiziološke posledice napak pri transportu mRNA

- **LCCS1 (lethal congenital contracture syndrome 1) in LAAHD (lethal arthrogryposis with anterior horn cell disease).**
  - Pri obeh pride do izgube motoričnih nevronov in atrofije skeletnih mišic.
  - Mutacije Gle1. Gle1 in DDX19/Dbp5 katalizirajo sprostitvev mRNP v citoplazmo. Mutacije v tem genu mogoče vodijo do zadrževanja določenih mRNPjev.
- Pri treh predstavljenih primerih bolezen nastane zaradi napačne interakcije mutirane RNA s specifičnim izvoznim proteinom ali mutacij v samih izvoznih proteinih, zaradi katerih se mRNA ne prenese v citoplazmo.
- Številne napake pri prehodu iz jedra se izrazijo v raku.

RNA zrnca

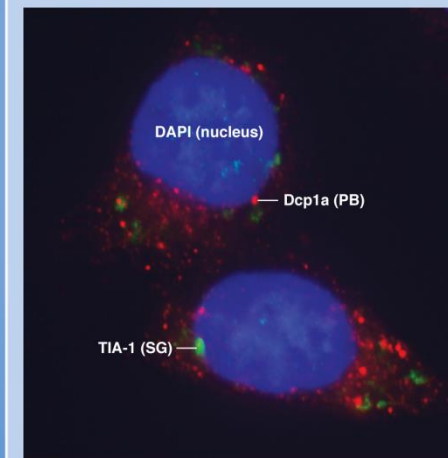
## The cytoplasmic mRNP cycle



## Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

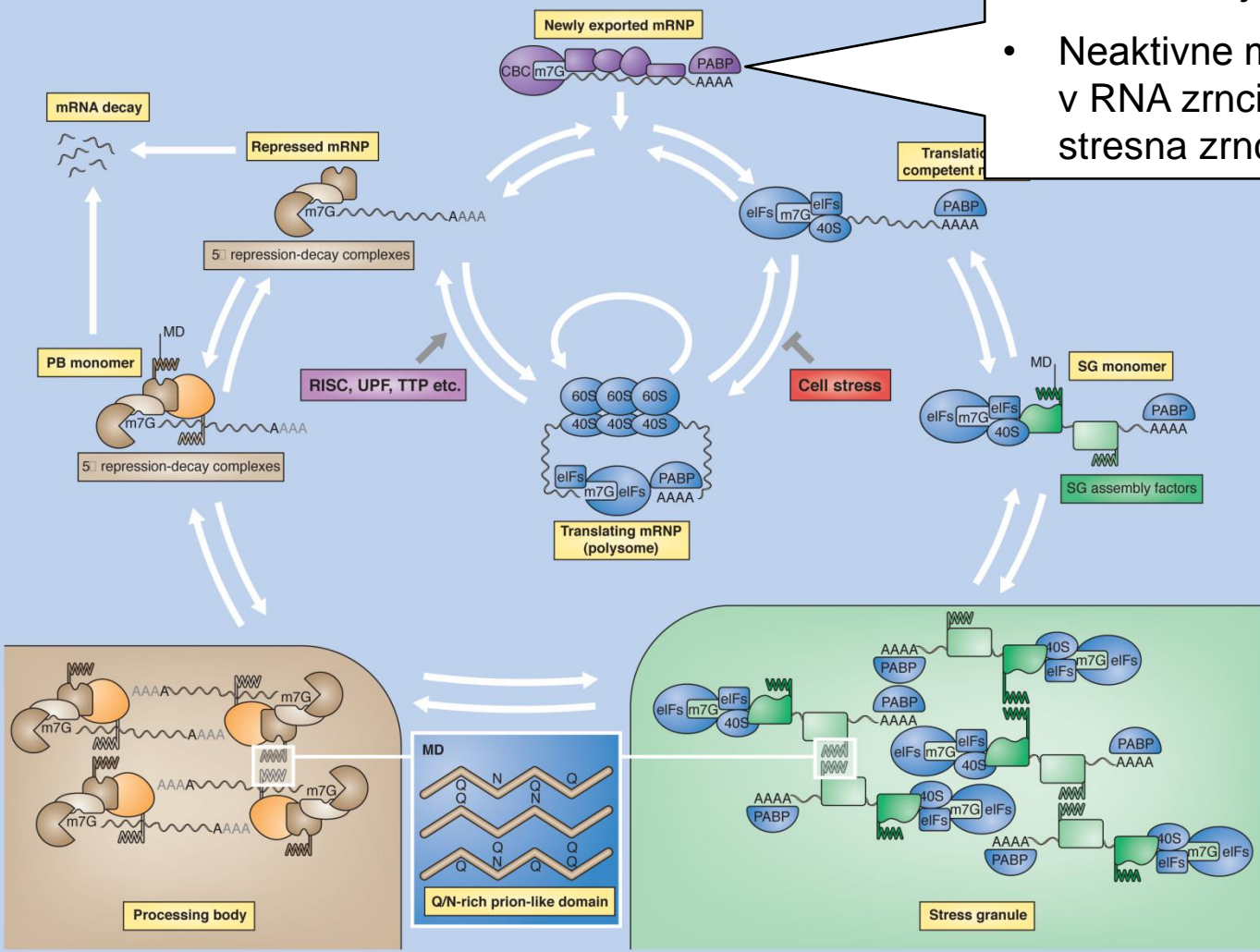
## Morphology of PBs and SGs



HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

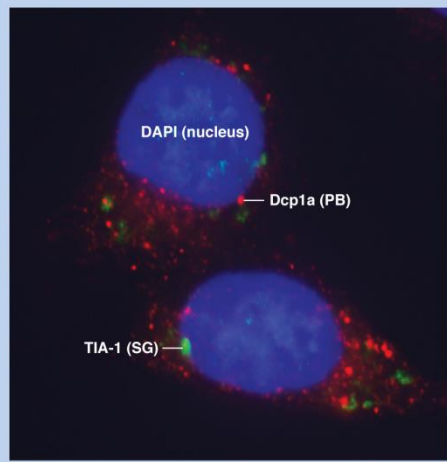
- Proteinske komponente, vezane na mRNA, ob prehodu v citoplazmo določajo ali pride do translacije, skladiščenja ali degradacije mRNA.
- Neaktivne mRNP se lahko skladiščijo v RNA zrcih kot so P-telesca (PB) ali stresna zrnca (stress granules - SG).

## The cytoplasmic mRNP cycle



DDX6, LSM1-7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

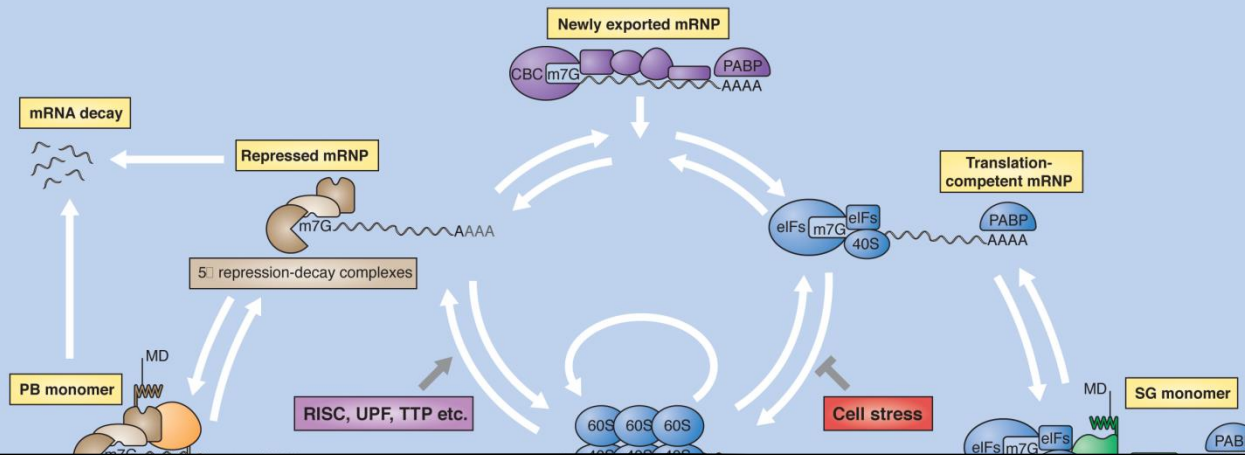
## Morphology of PBs and SGs



HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

**Abbreviations:** 4E-T, eukaryotic translation initiation factor 4E transporter; 40S, small ribosomal subunit; 60S, large ribosomal subunit; AAAAA, polyadenylate tail; CBC, nuclear cap binding complex; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; DCP1 and 2, decapping 1 and 2; DDX6, DEAD (asparagine-glutamine-alanine-asparagine) box polypeptide 6; EDC3 and 4, enhancer of decapping 3 and 4; eIFs, eukaryotic translation initiation factors; G3BP, RasGAP SH3-domain-binding protein; GW182, glycine-tryptophan protein of 182 kilodaltons; LSM1-7, Sm-like 1-7; m7G, 7-methylguanosine cap; MD, multimerization domain; mRNA, messenger ribonucleic acid; mRNP, messenger ribonucleo-protein; PABP, polyadenylate-binding protein; PATL1, protein associated with topoisomerase II homolog L1; PB, processing body; Q/N-rich, glutamine/asparagine-rich; RAP55, ribonucleic-acid-associated protein 55; RISC, ribonucleic-acid-induced silencing complex; SG, stress granule; TIA-1 and TIAR, T-cell-restricted intracellular antigen 1 and TIA related; TTP, tristetraprolin; UPF1, up frameshift 1; XRN1, exoribonuclease 1.

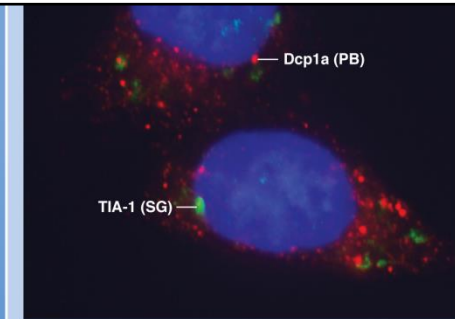
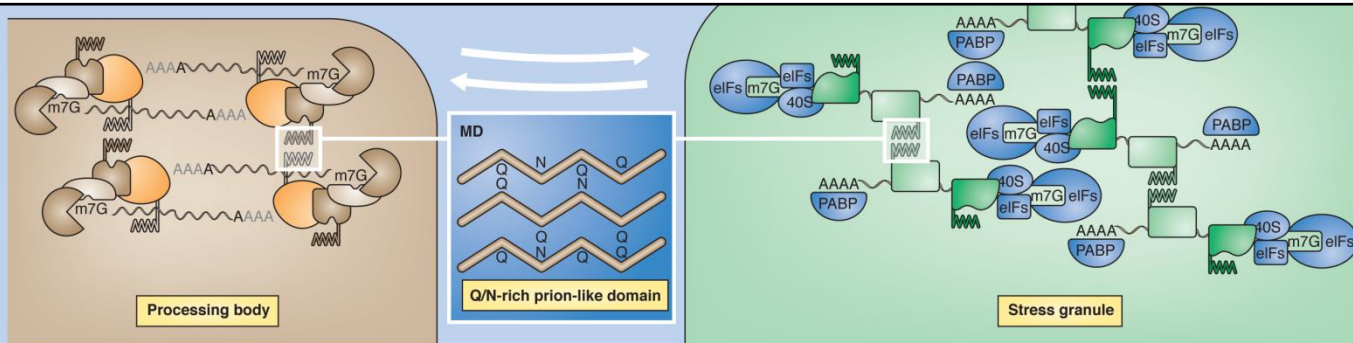
## The cytoplasmic mRNP cycle



## Key mRNP granule assembly factors (human)

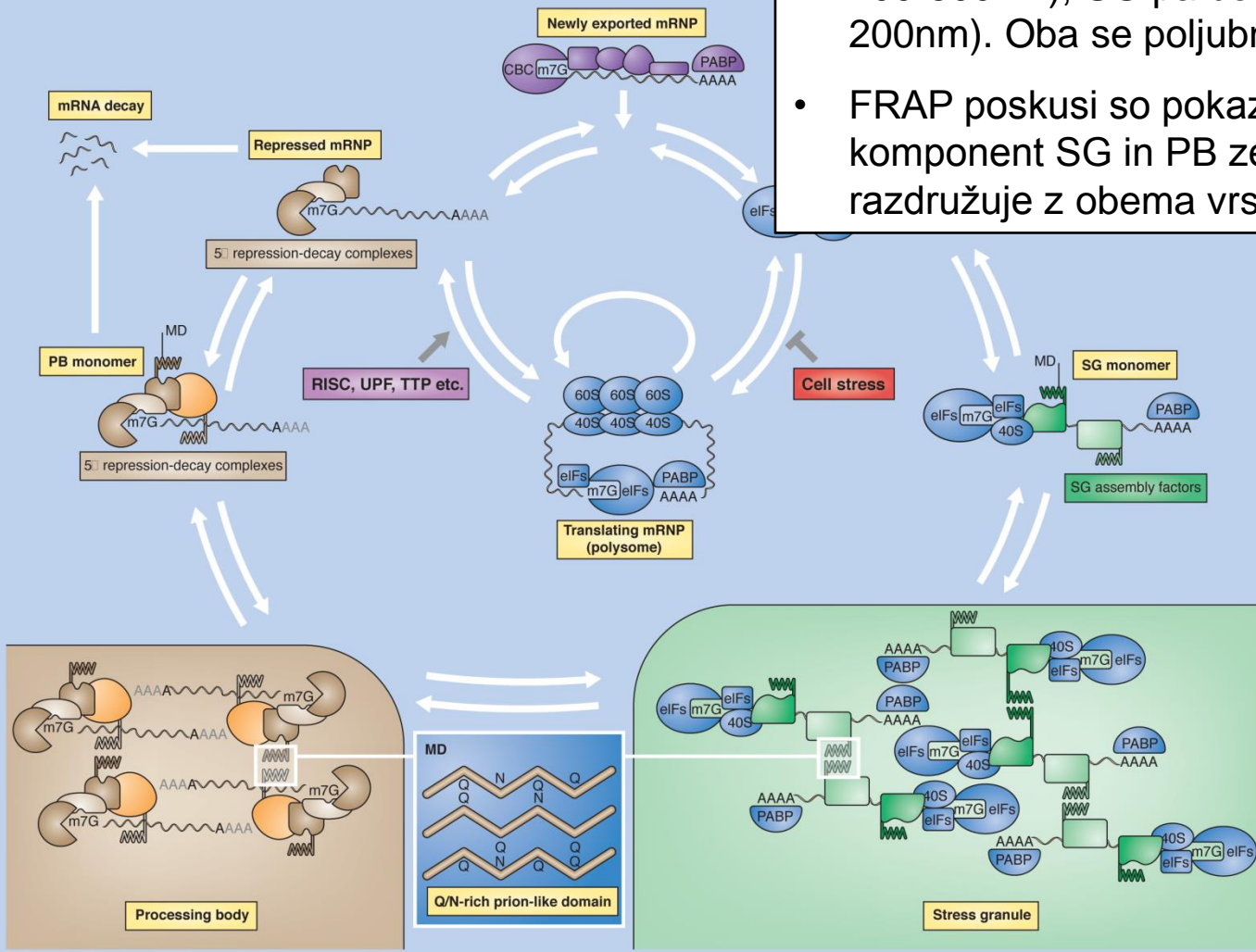
Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

- PG in SG sta zelo dinamični citoplazemski strukturi, ki vsebujeta translacijsko neaktivne mRNP.
- PB so prisotna v celicah pri skoraj vseh pogojih.
- SG so opazna predvsem ob stresu.



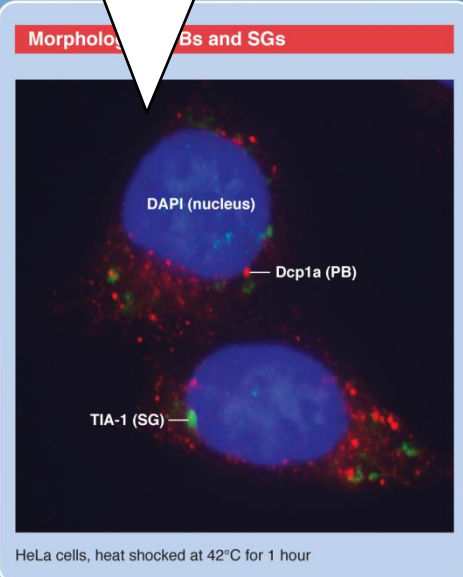
HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

The cytoplasmic mRNP cycle



- PB so morfološko okrogla in definirana (velikosti 100-300nm), SG pa bolj difuzna (velikosti 100-200nm). Oba se poljubno premikata v citoplazmi.
- FRAP poskusi so pokazali, da se večina komponent SG in PB zelo dinamično združuje in razdružuje z obema vrstama RNA zrcn.

G3BP	...
Stress granule	...
TIA-1	...
G3BP	...



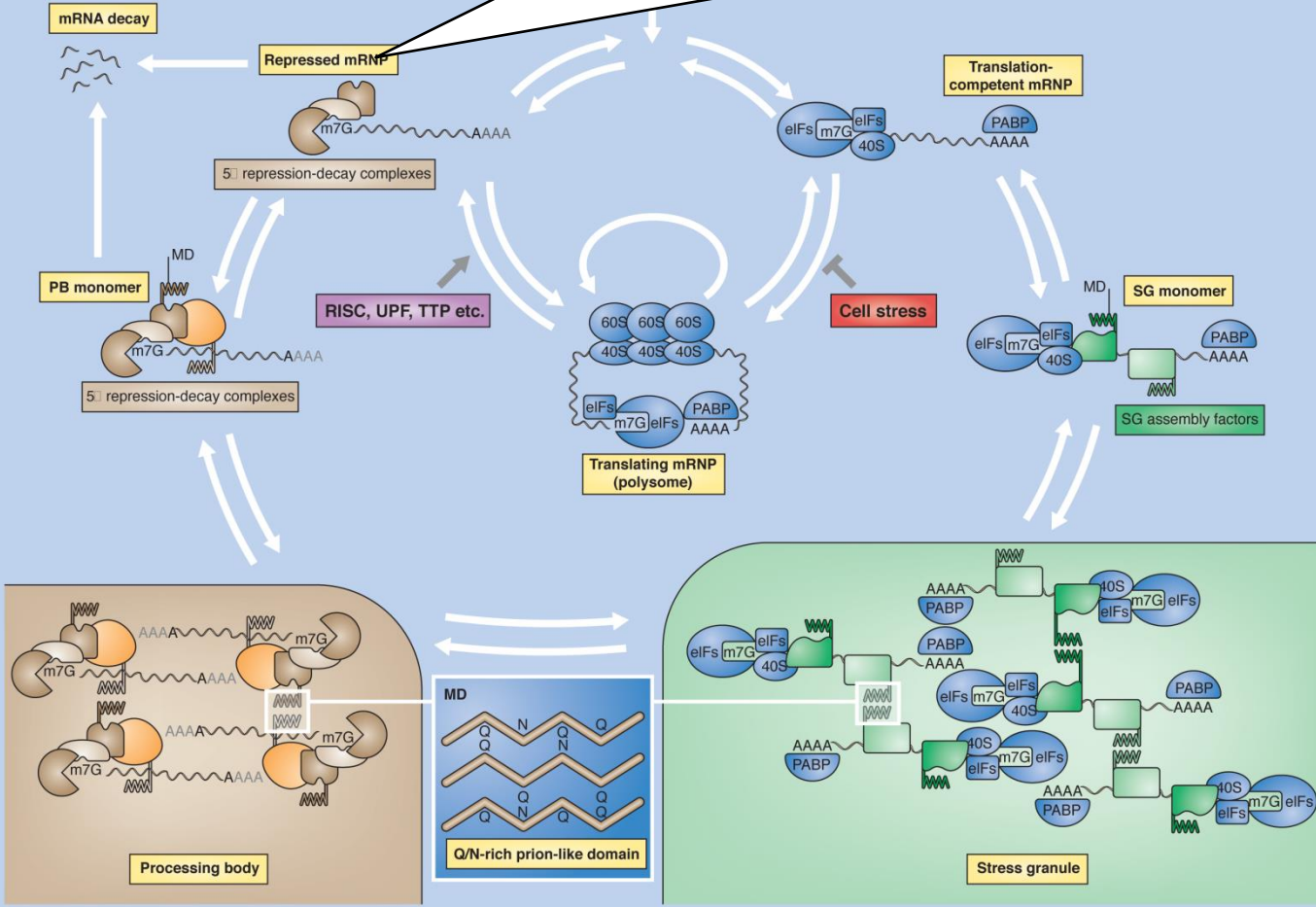
**Abbreviations:** 4E-T, eukaryotic translation initiation factor 4E transporter; 40S, small ribosomal subunit; 60S, large ribosomal subunit; AAAA, polyadenylate tail; CBC, nuclear cap binding complex; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; DCP1 and 2, decapping 1 and 2; DDX6, DEAD (asparagine-glutamine-alanine-asparagine) box polypeptide 6; EDC3 and 4, enhancer of decapping 3 and 4; eIFs, eukaryotic translation initiation factors; G3BP, RasGAP SH3-domain-binding protein; GW182, glycine-tryptophan protein of 182 kilodaltons; LSM1-7, Sm-like 1-7; m7G, 7-methylguanosine cap; MD, multimerization domain; mRNA, messenger ribonucleic acid; mRNP, messenger ribonucleo-

protein; PABP, polyadenylate-binding protein; PATL1, protein associated with topoisomerase II homolog 1; PB, processing body; Q/N-rich, glutamine/asparagine-rich; RAPS5, ribonucleic-acid-associated protein 55; RISC, ribonucleic-acid-induced silencing complex; SG, stress granule; TIA-1 and TIAR, T-cell-restricted intracellular antigen 1 and TIA related; TTP, tristetraprolin; UPF1, up frameshift 1; XRN1, exoribonuclease 1.



- Pri tvorbi PB je pomembna vezava proteinov, ki odstranjujejo kapo (DCP 1 in 2) in proteinov, ki ustavijo iniciacijo translacije, aktivirajo odstranitev kape ter vodijo v 5' proti 3' razgradnjo mRNA.

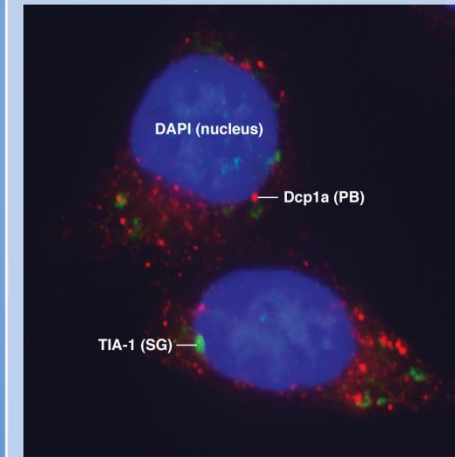
## The cytoplasmic mRNP cycle



## Key mRNP granule assembly factors (human)

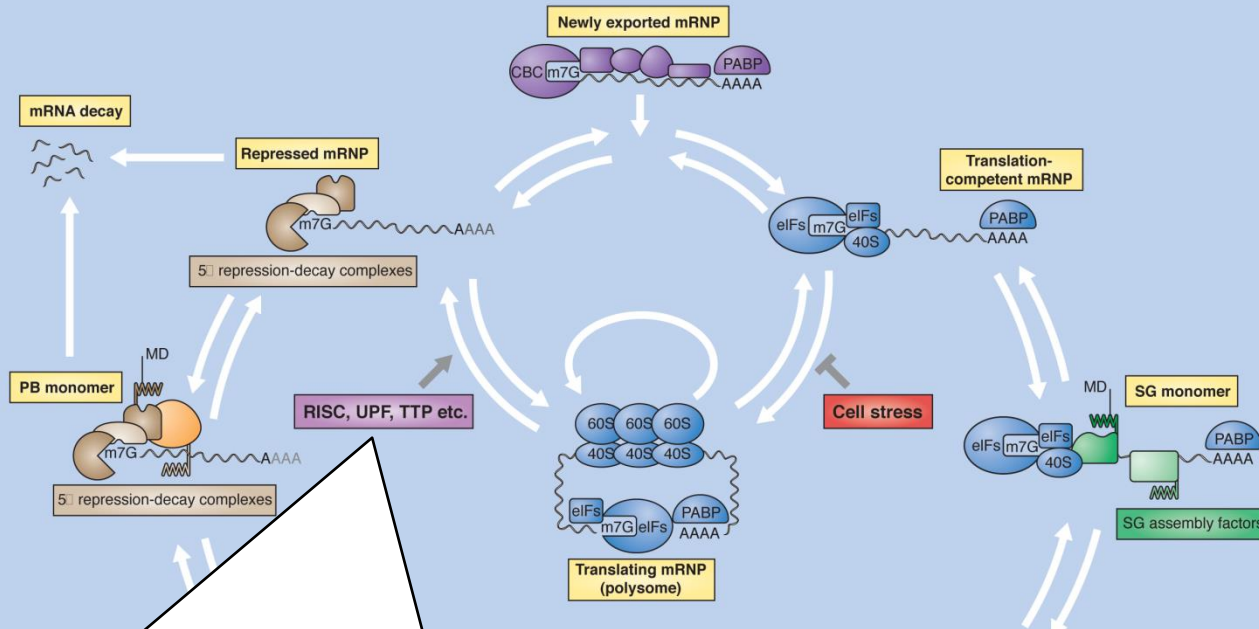
Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

## Morphology of PBs and SGs



HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

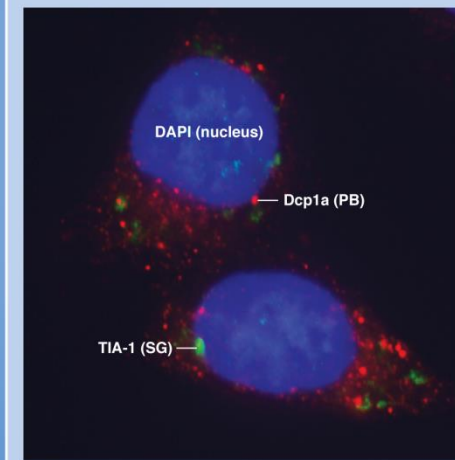
## The cytoplasmic mRNP cycle



## Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

## Morphology of PBs and SGs

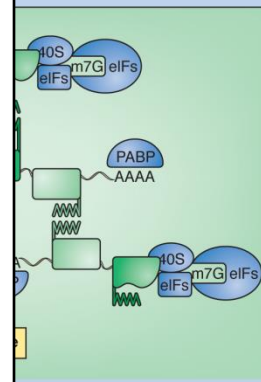


HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

Rekrutiranje 5' represijskih ali razgradnih kompleksov na mRNP.

5' represijski ali razgradni kompleks se najbolj pogosto veže z mRNA kompleksi, ki sodelujejo pri inhibiciji translacije in/ali razgradnji. Npr:

- RISC kompleks, ki utiša mRNA z miRNA ali siRNA
- Upf kompleks, ki sodeluje pri NMD
- Tristetraprolin (TTP) se veže na mRNA, ki so bogate z AU zaporedji (ARE) in jih označi za razgradnjo.



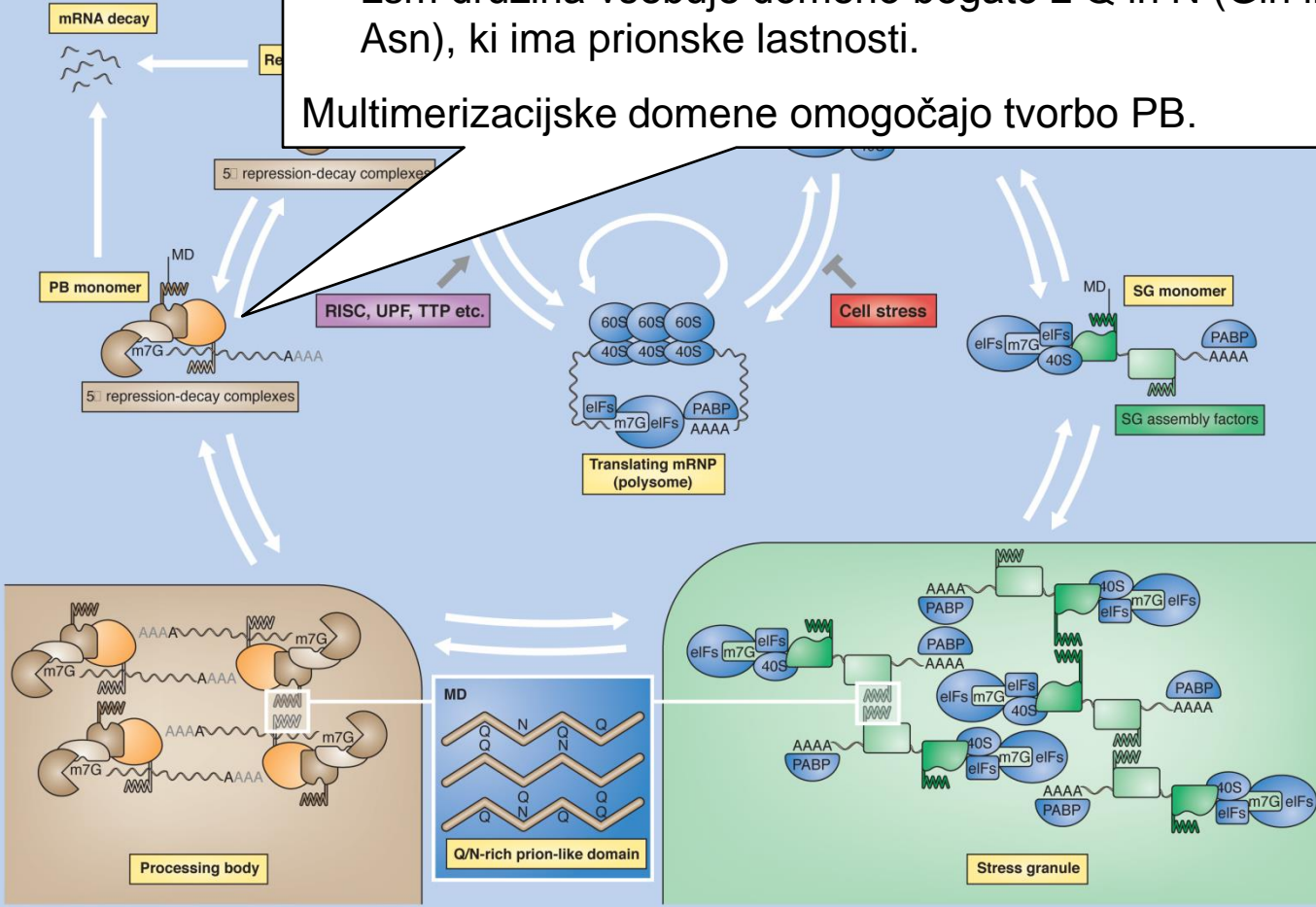
ucleo-  
e II  
>  
granule;  
UPF1,

Po odstranitvi ribosoma se na mRNA vežejo proteini, ki vsebujejo domene, ki lahko multimerizirajo.

- Lsm družina vsebuje domeno bogato z Q in N (Gln in Asn), ki ima prionske lastnosti.

Multimerizacijske domene omogočajo tvorbo PB.

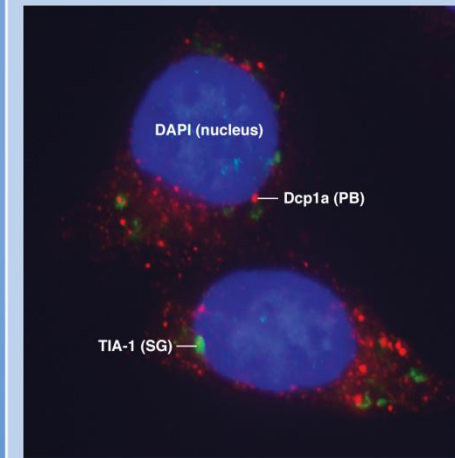
## The cytoplasmic mRNP cycle



## Key mRNP granule assembly factors (human)

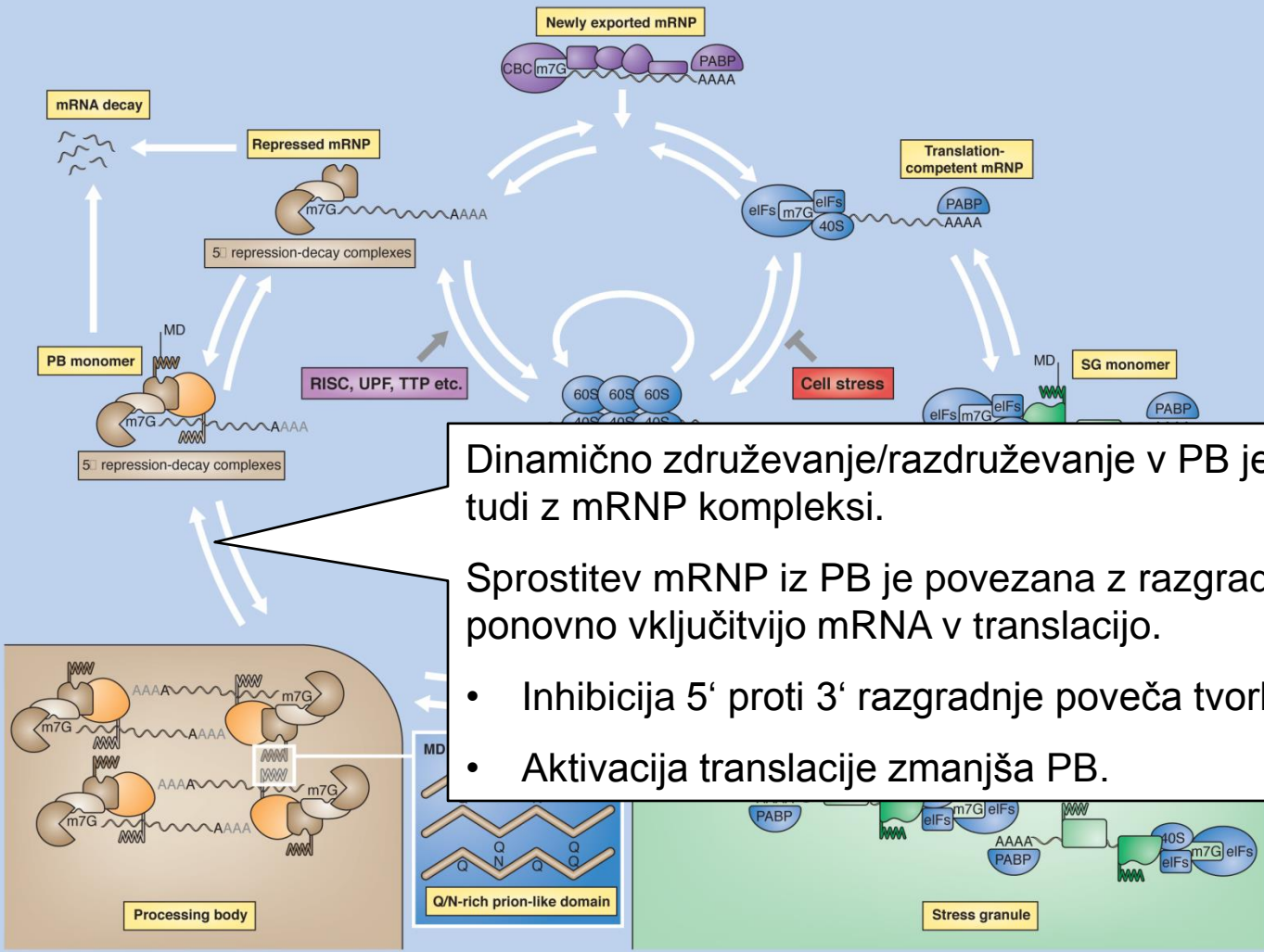
Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

## Morphology of PBs and SGs



HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

## The cytoplasmic mRNP cycle



Dinamično združevanje/razdruževanje v PB je opazno tudi z mRNP kompleksi.

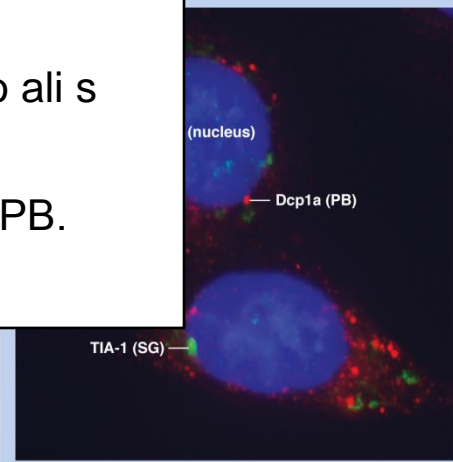
Sprostitev mRNP iz PB je povezana z razgradnjo ali s ponovno vključitvijo mRNA v translacijo.

- Inhibicija 5' proti 3' razgradnje poveča tvorbo PB.
- Aktivacija translacije zmanjša PB.

## Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

## Processing bodies and SGs

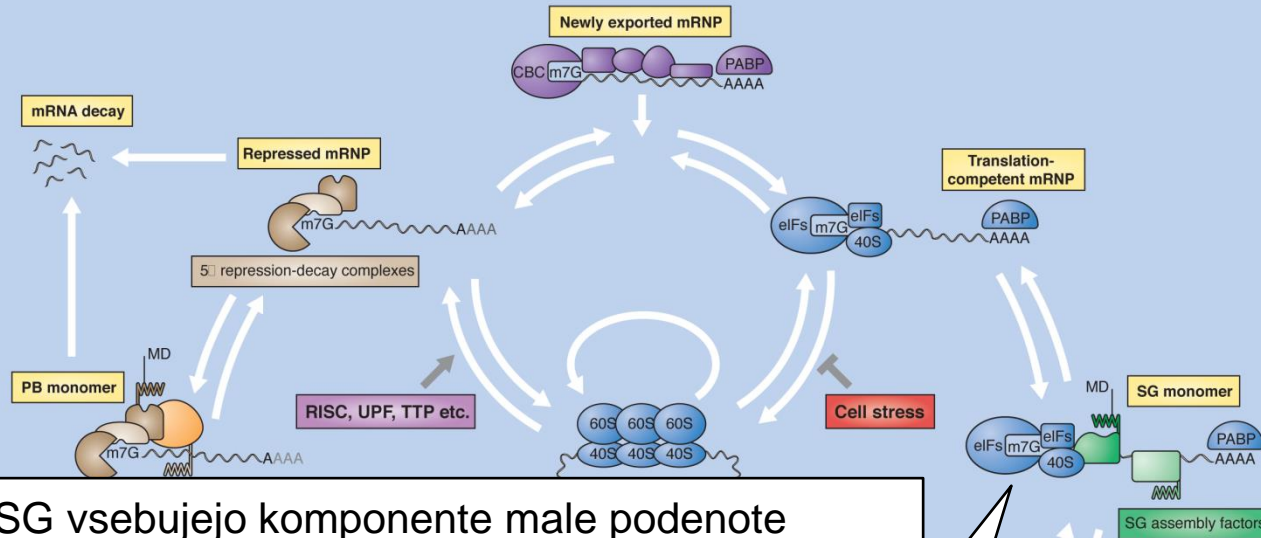


HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

**Abbreviations:** 4E-T, eukaryotic translation initiation factor 4E transporter; 40S, small ribosomal subunit; 60S, large ribosomal subunit; AAAA, polyadenylate tail; CBC, nuclear cap binding complex; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; DCP1 and 2, decapping 1 and 2; DDX6, DEAD (asparagine-glutamine-alanine-asparagine) box polypeptide 6; EDC3 and 4, enhancer of decapping 3 and 4; eIFs, eukaryotic translation initiation factors; G3BP, RasGAP SH3-domain-binding protein; GW182, glycine-tryptophan protein of 182 kilodaltons; LSM1–7, Sm-like 1–7; m7G, 7-methylguanosine cap; MD, multimerization domain; mRNA, messenger ribonucleic acid; mRNP, messenger ribonucleo-

protein; PABP, polyadenylate-binding protein; PATL1, protein associated with topoisomerase II homolog L1; PB, processing body; Q/N-rich, glutamine/asparagine-rich; RAP55, ribonucleic-acid-associated protein 55; RISC, ribonucleic-acid-induced silencing complex; SG, stress granule; TIA-1 and TIAR, T-cell-restricted intracellular antigen 1 and TIA related; TTP, tristetraprolin; UPF1, up frameshift 1; XRN1, exoribonuclease 1.

## The cytoplasmic mRNP cycle



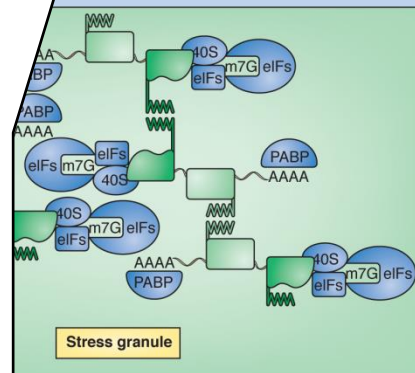
SG vsebujejo komponente male podenote ribosoma, nekaj proteinov, ki sodelujejo pri iniciaciji translacije, ter PABP proteine.

mRNPji se torej združijo v SG, če se ustavi iniciacija translacije.

Različni dejavniki, ki ustavijo iniciacijo translacije, sprožijo tvorbo SG:

- Pomanjkanje proteinov iniciacije
- Celični stres
- Spojine, ki ustavijo iniciacijo ali razdružijo ribosom

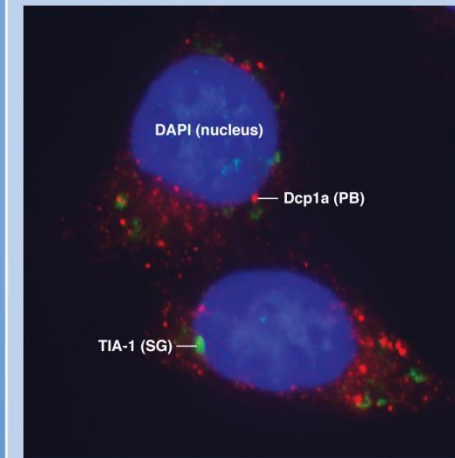
Brez eIF3 ne pride do tvorbe SG.



## Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

## Morphology of PBs and SGs



HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

Ab sub DAI glut eIF  
glycine-tryptophan protein of 182 kilodaltons; LSM1–7, Sm-like 1–7; m7G, 7-methylguanosine cap; up frameshift 1; XRN1, exonuclease 1

1; mRNP, messenger ribonucleo- associated with topoisomerase II ne-rich; RAP55, ribonucleo- encoding complex; SG, stress granule; related; TTP, tristetraprolin; UPF1,

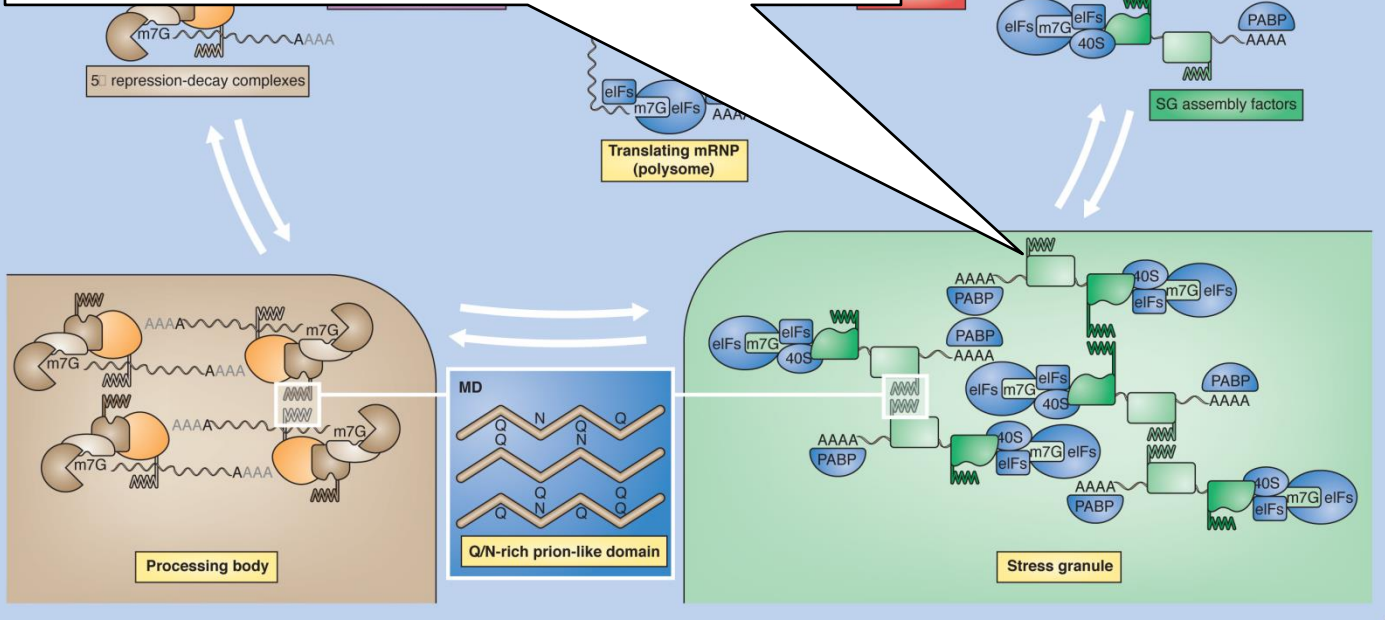
and Jens Lykke-Andersen

TIA-1, TIAR in G3BP, ki so značilni proteini za SG, pomagajo pri vezavi mRNP-jev v SG.

Utišanje ali povečanje njihovega izražanja vpliva na tvorbo SG.

TIA-1 in TIAR imajo prionom-podobne Q/N domene in so ključnega pomena za tvorbo SG.

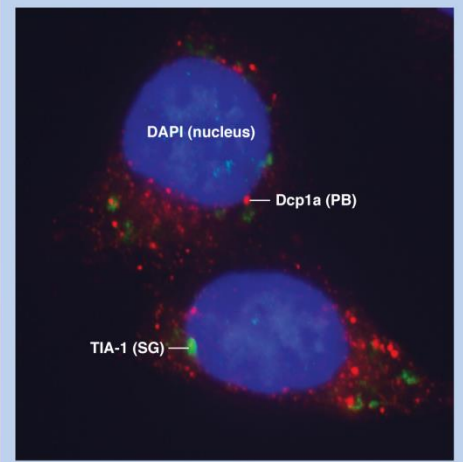
TIA-1 se z RNA vezavno domeno veže na mRNA.



### Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

### Morphology of PBs and SGs



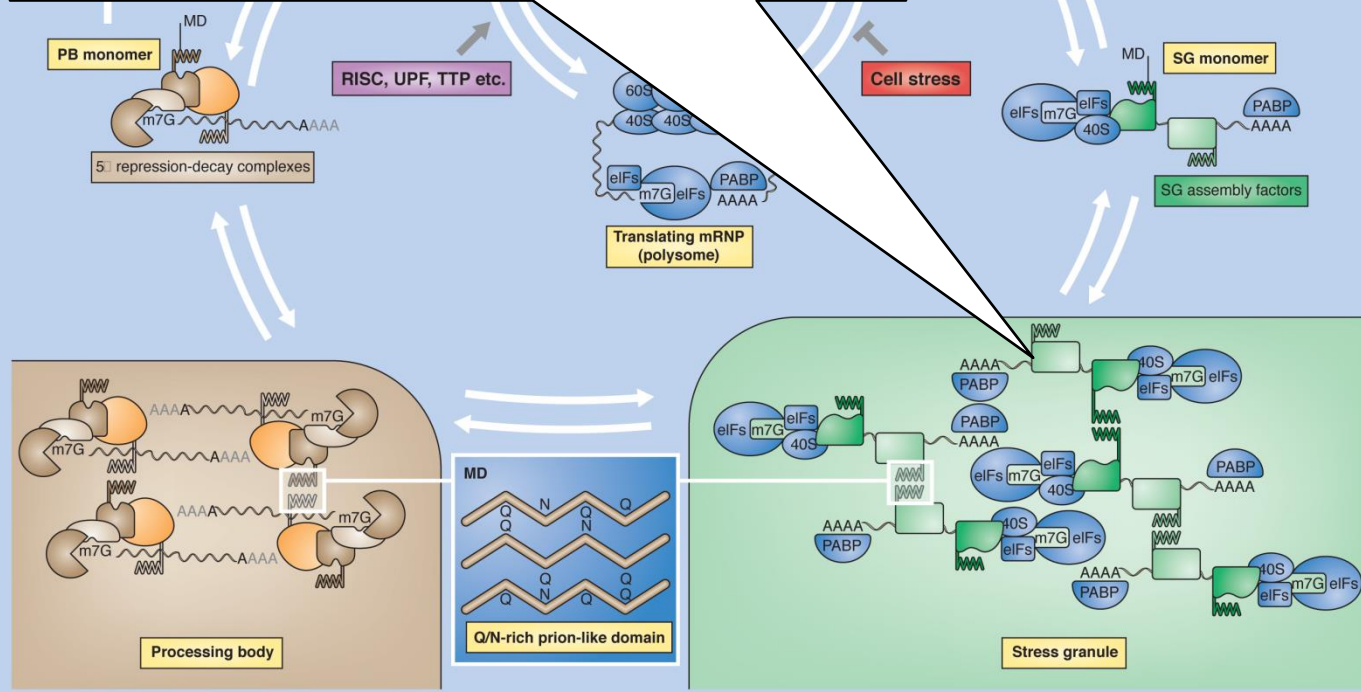
HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

**Abbreviations:** 4E-T, eukaryotic translation initiation factor 4E transporter; 40S, small ribosomal subunit; 60S, large ribosomal subunit; AAAA, polyadenylate tail; CBC, nuclear cap binding complex; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DCP1 and 2, decapping 1 and 2; DDX6, DEAD (asparagine-glutamine-alanine-asparagine) box polypeptide 6; EDC3 and 4, enhancer of decapping 3 and 4; eIFs, eukaryotic translation initiation factors; G3BP, RasGAP SH3-domain-binding protein; GW182, glycine-tryptophan protein of 182 kilodaltons; LSM1–7, Sm-like 1–7; m7G, 7-methylguanosine cap;

MD, multimerization domain; mRNA, messenger ribonucleic acid; mRNP, messenger ribonucleo-protein; PABP, polyadenylate-binding protein; PATL1, protein associated with topoisomerase II homolog L1; PB, processing body; Q/N-rich, glutamine/asparagine-rich; RAP55, ribonucleic-acid-associated protein 55; RISC, ribonucleic-acid-induced silencing complex; SG, stress granule; TIA-1 and TIAR, T-cell-restricted intracellular antigen 1 and TIA related; TTP, tristetraprolin; UPF1, up frameshift 1; XRN1, exoribonuclease 1.

Post-translacijske modifikacije vplivajo na tvorbo SG. Npr:

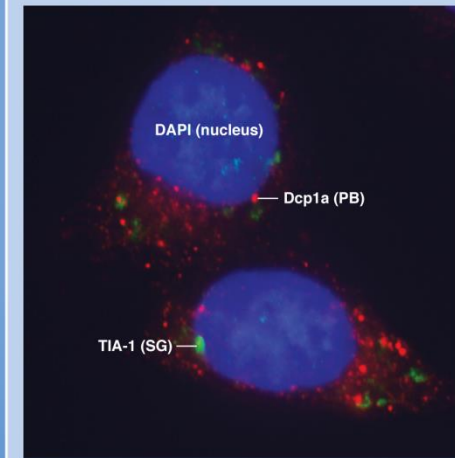
- O-GlcNac
- Deacetiliran lizin
- Metiliran arginin
- Deubikvitinacija



### Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

### Morphology of PBs and SGs

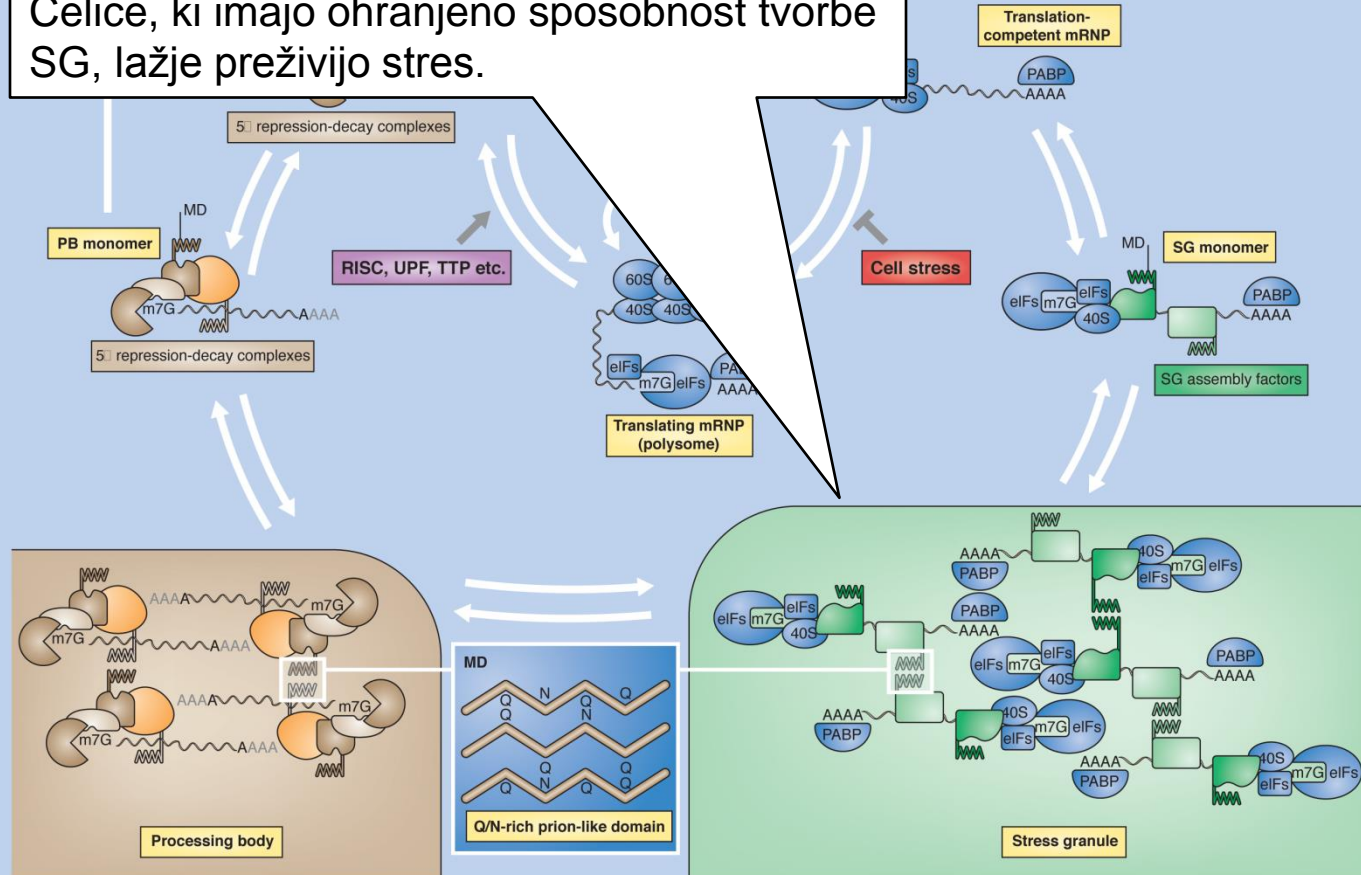


HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

## The cytoplasmic mRNP cycle

Funkcija SG naj bi bila shranjevanje mRNP v času celičnega stresa.

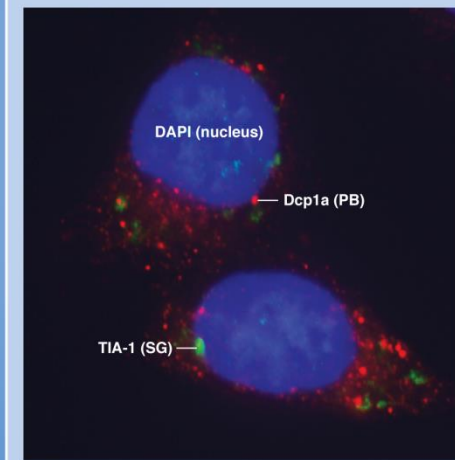
Celice, ki imajo ohranjeno sposobnost tvorbe SG, lažje preživijo stres.



## Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

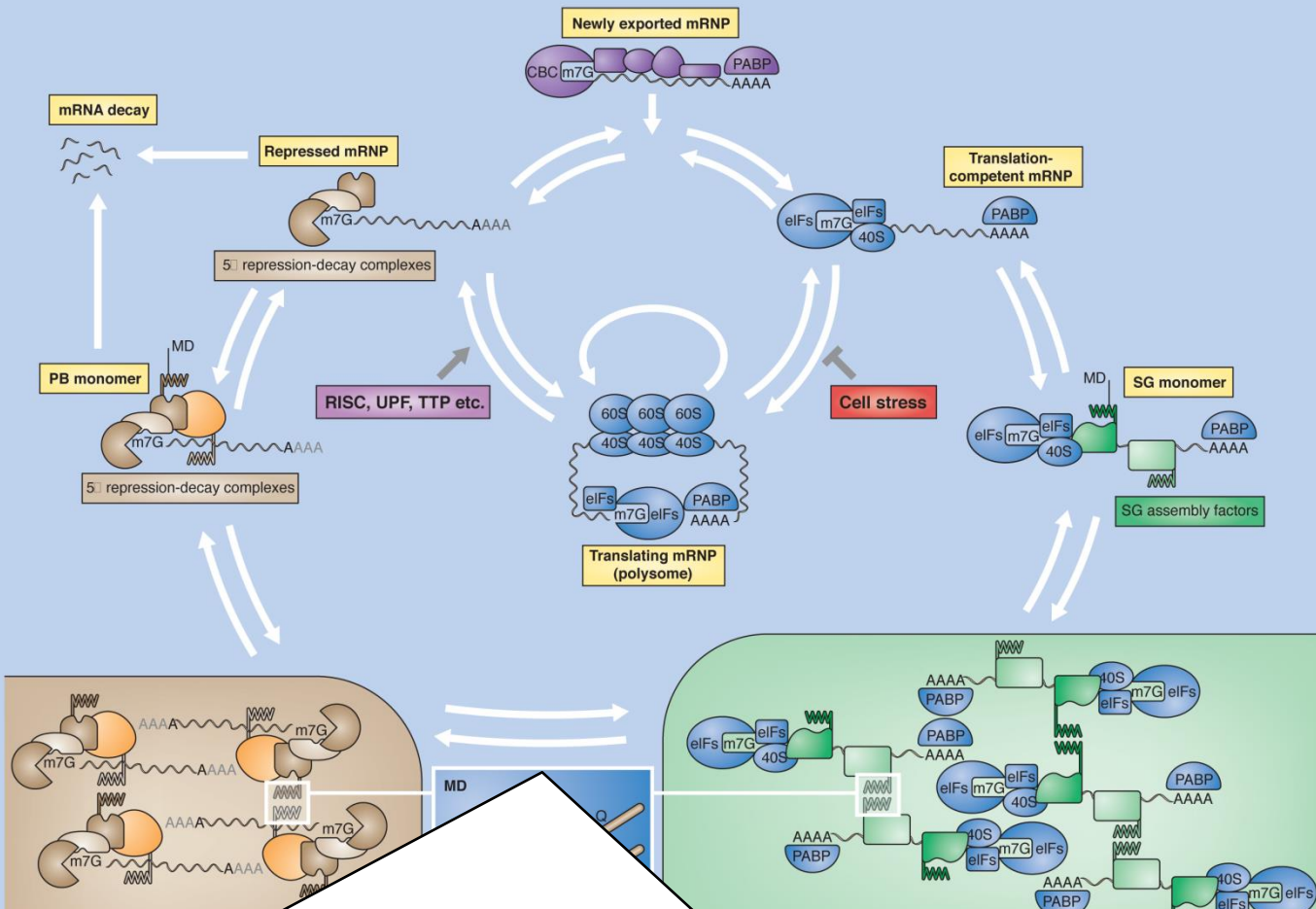
## Morphology of PBs and SGs



HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour



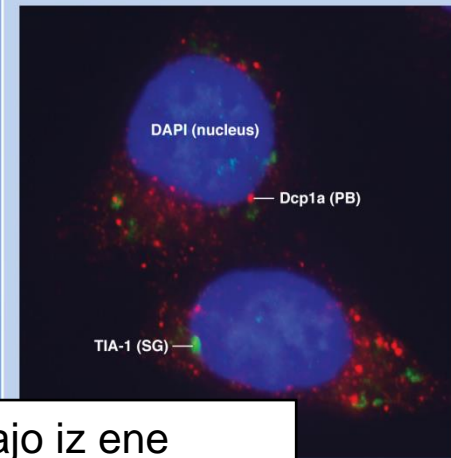
## The cytoplasmic mRNP cycle



## Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
RAP55, 4E-T	Translation repressors
GW182	RISC component
<b>Stress granules</b>	
TIA-1, TIAR	Translation repressors
G3BP	RasGAP-associated endoribonuclease

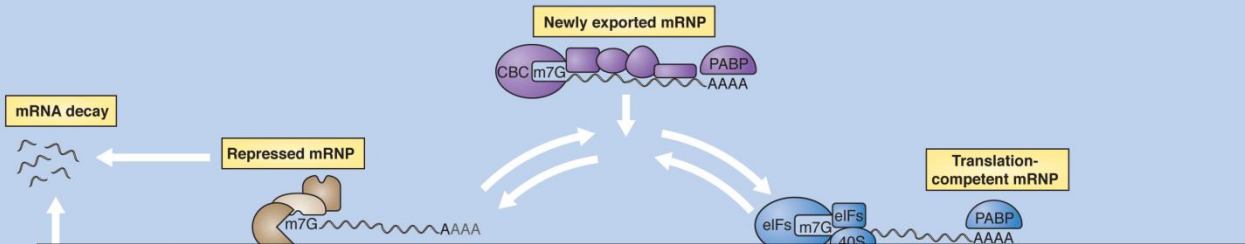
## Morphology of PBs and SGs



SG in PB se lahko nahajajo blizu drug drugega v celici. Zrnca tudi prehajajo iz ene oblike v drugo.

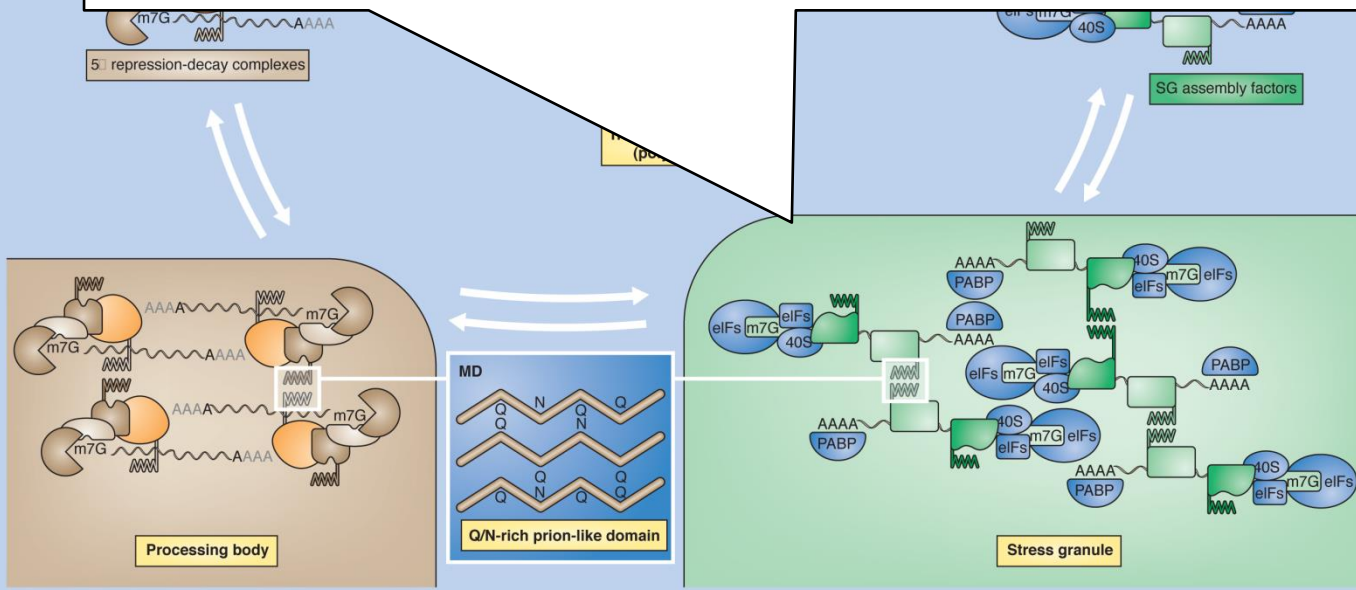
**Hipoteza: mRNP-ji v PB, SG in polisomih predstavljajo različne stopnje cikla med translacijsko utišanimi in translacijsko aktivnimi mRNP.**

## The cytoplasmic mRNP cycle



## Bolezen!

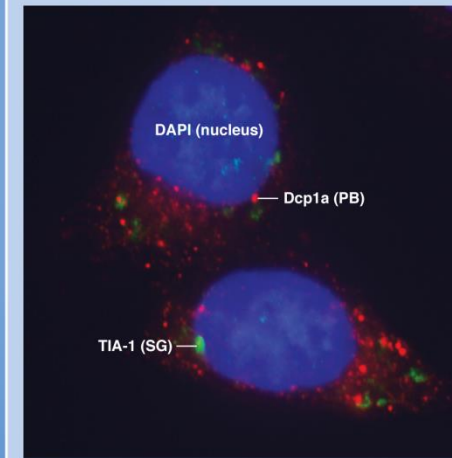
Proteina TDP-43 in FUS, ki sta povezana z amiotrofično lateralno sklerozo in frontotemporalno demenco, se nahajata v SG.



## Key mRNP granule assembly factors (human)

Factor	Function
<b>Processing bodies</b>	
DCP2–DCP1	Decapping complex
XRN1	5' to 3' exonuclease
EDC3, EDC4	Enhancers of decapping
DDX6, LSM1–7, PATL1	Translation initiation repressors and decapping enhancers
PABP	Translation enhancer
<b>Stress granules</b>	
eIF4E	Translation initiation factor
eIF4G	Translation initiation factor
eIF5	Translation initiation factor
eIF5B	Translation initiation factor
eIF6	Translation initiation factor
40S	Small ribosomal subunit
PABP	Polyadenylate-binding protein
5.8S	5.8S ribosomal RNA
18S	18S ribosomal RNA
28S	28S ribosomal RNA
58S	58S ribosomal RNA
60S	60S ribosomal subunit
80S	80S ribosome
43K	43K protein
48K	48K protein
54K	54K protein
58K	58K protein
62K	62K protein
66K	66K protein
70K	70K protein
75K	75K protein
80K	80K protein
85K	85K protein
90K	90K protein
95K	95K protein
100K	100K protein
105K	105K protein
110K	110K protein
115K	115K protein
120K	120K protein
125K	125K protein
130K	130K protein
135K	135K protein
140K	140K protein
145K	145K protein
150K	150K protein
155K	155K protein
160K	160K protein
165K	165K protein
170K	170K protein
175K	175K protein
180K	180K protein
185K	185K protein
190K	190K protein
195K	195K protein
200K	200K protein

## Morphology of PBs and SGs

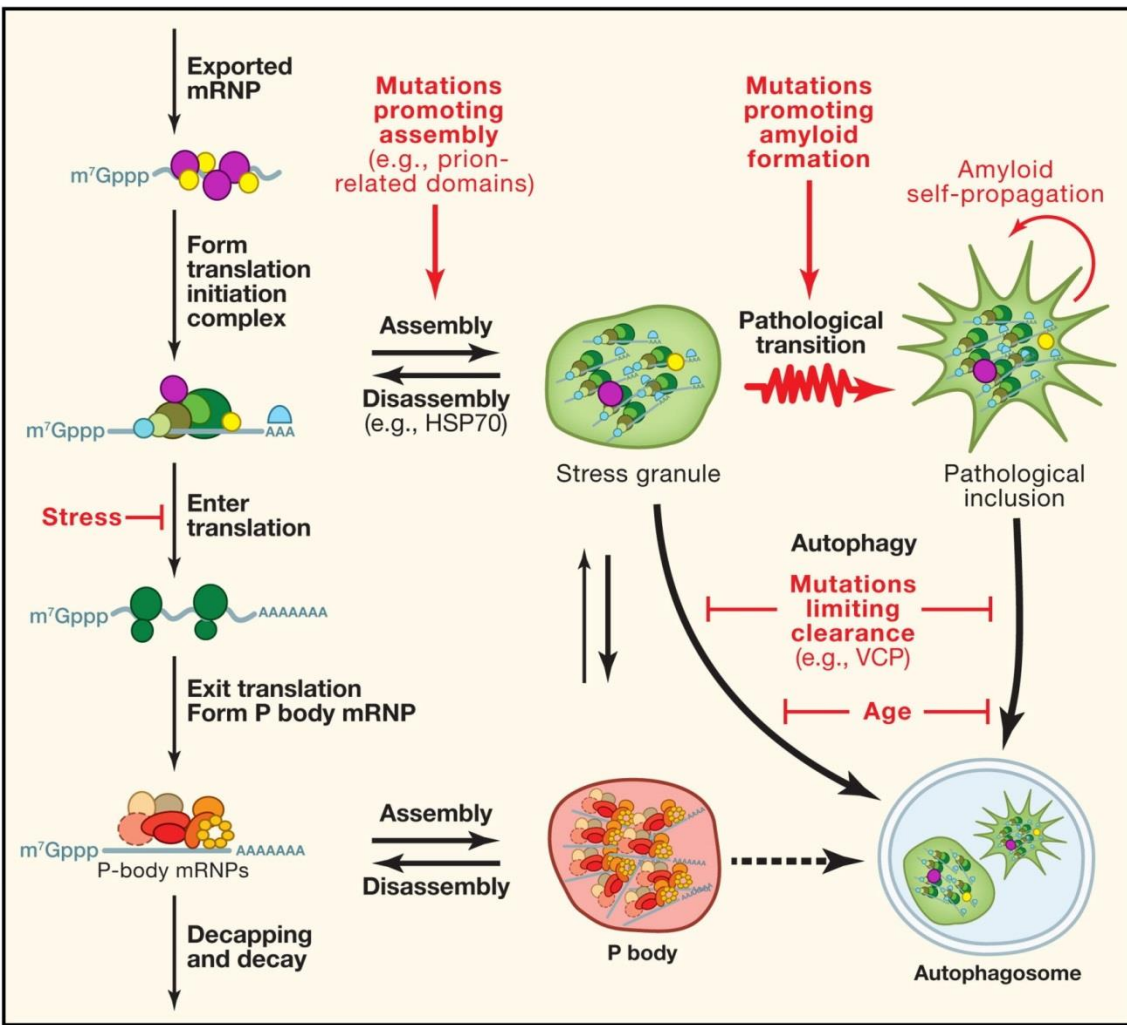


HeLa cells, heat shocked at 42°C for 1 hour

# Spremembe ribostaze pri degenerativnih boleznih

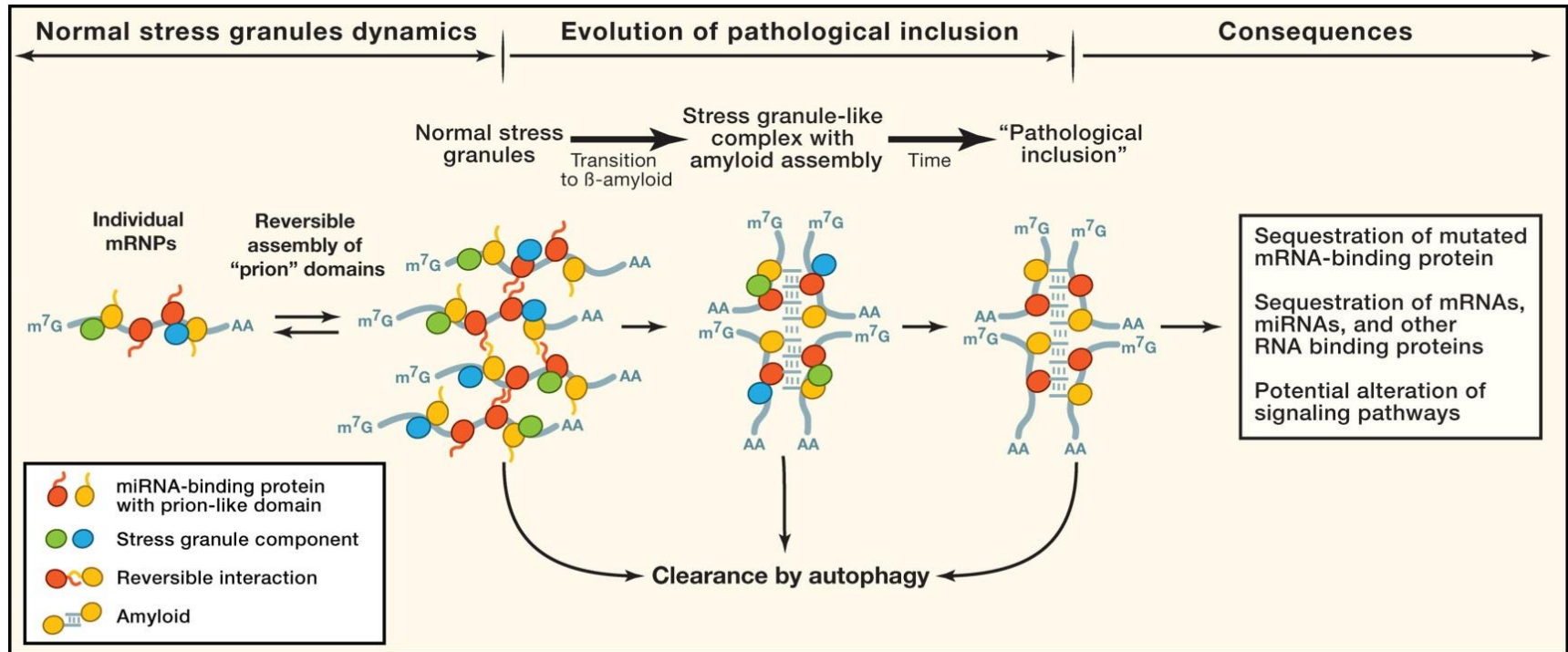
- Kaj je ribostaza?
- Regulirana biosinteza in razgradnja transkriptoma – homeostaza RNA.
- Vpliva na proteostazo.
- RNA granule se lahko prekomerno in neregulirano kopičijo ter so lahko izhodišče za nastanek agregatov, ki so simptomatski za nevrodegenerativne in druge degenerativne bolezni.

# Remodeliranje in agregacija mRNPjev



- RBP-ji in mRNA tvorijo mRNP, ki se transportira v citoplazmo, kjer RBP-ji določijo lokalizacijo in translacijski potencial mRNA.
- Ob ustavljanju translacijskega kompleksa se tvorijo SG.
- mRNP-ji v SG se lahko vrnejo v translacijo ali degradirajo z avtofagijo.
- Po translaciji se mRNA lahko razgradi ali tvori PB.
- mRNA v PB se lahko razgradi ali gre nazaj v translacijo preko SG.
- Pri proteinih SG lahko pride do patoloških sprememb, kjer ohlapna povezanost prionsko-podobnih domen preide v ireverzibilne  $\beta$  amiloide.

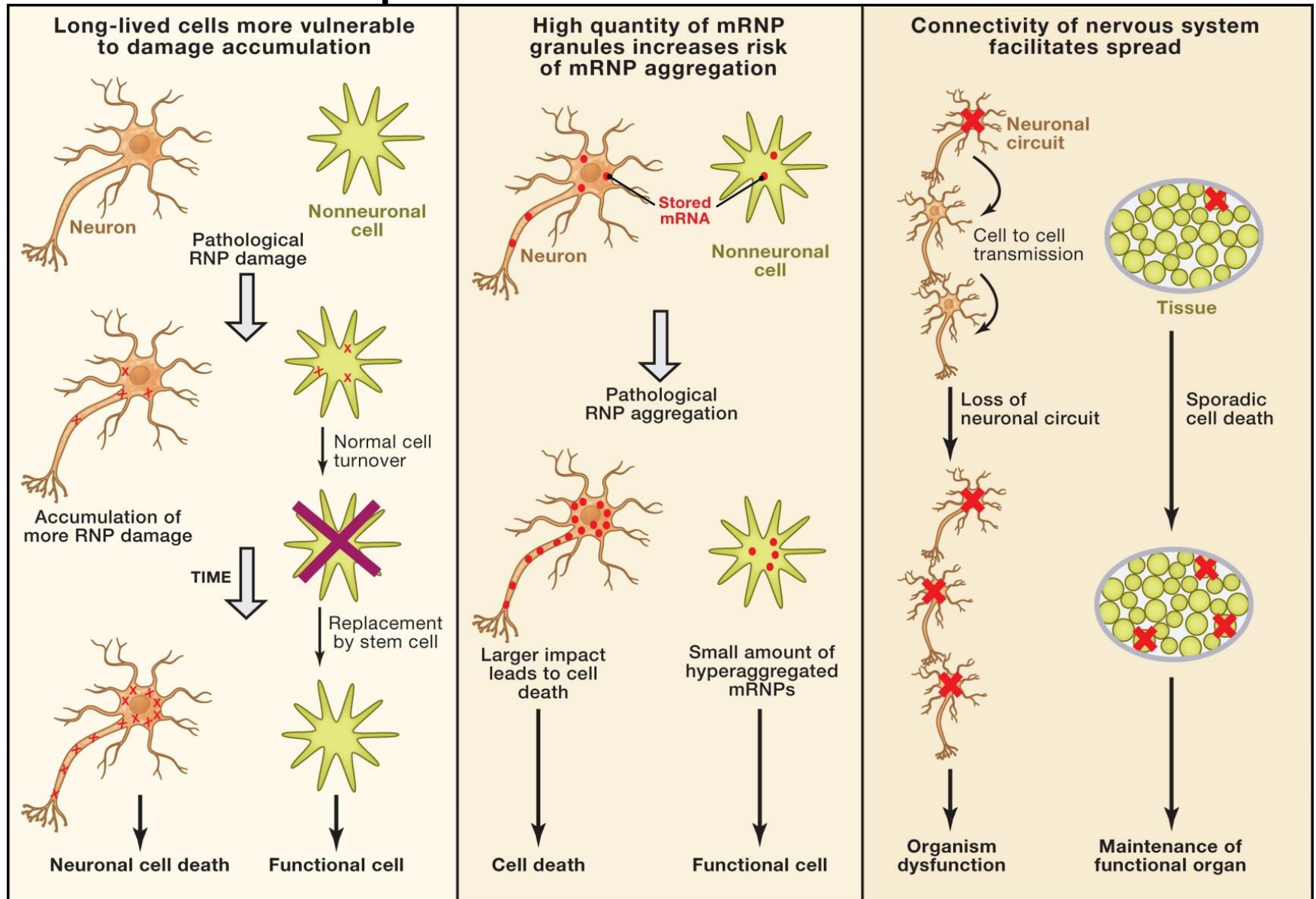
# Stresne granule in tvorba patogenih inkluzij



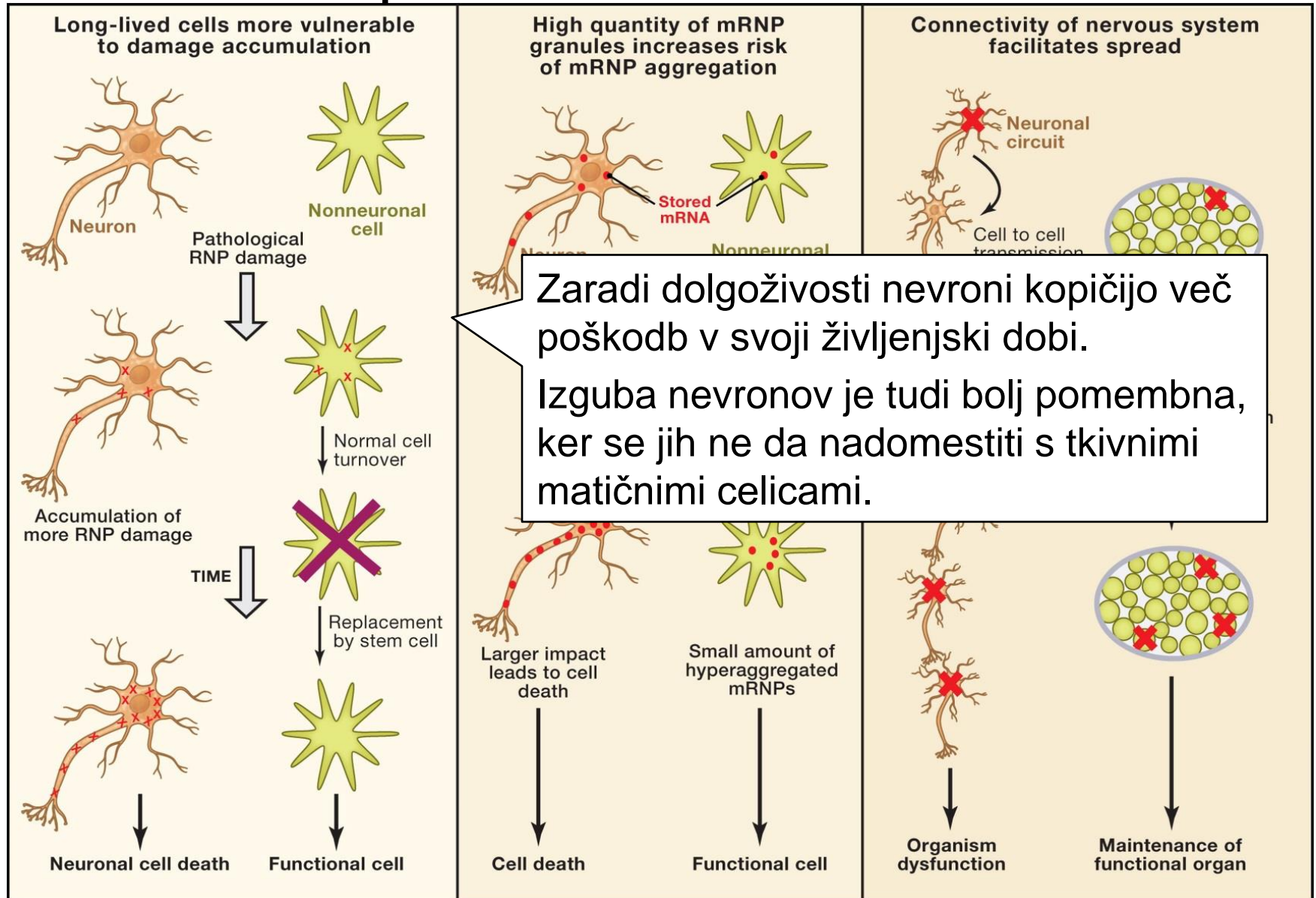
- Pri normalnem metabolizmu prihaja do reverzibilne tvorbe SG in PB, ali pa se bolj trdožive strukture razgradijo z avtofagijo. Na ta način se regulira količina mRNA, ki je v procesu translacije.
- S stohastičnim procesom lahko SG preidejo v amiloidne strukture. Verjetnost tranzicije se poveča z mutacijami RBP-jev ali povečanim številom oz. življensko dobo SG ( $t_{1/2} = 30s$ ).
- S časom ,trdožive' strukture prehajajo v patološke inkluzije, ki lahko tudi ovirjao ribostazo zaradi sekvestracije mRNA in RBP-jev.

Zakaj so nevroni bolj občutljivi?

# Trije modeli selektivne občutljivosti nevronov na spremembe ribostaze



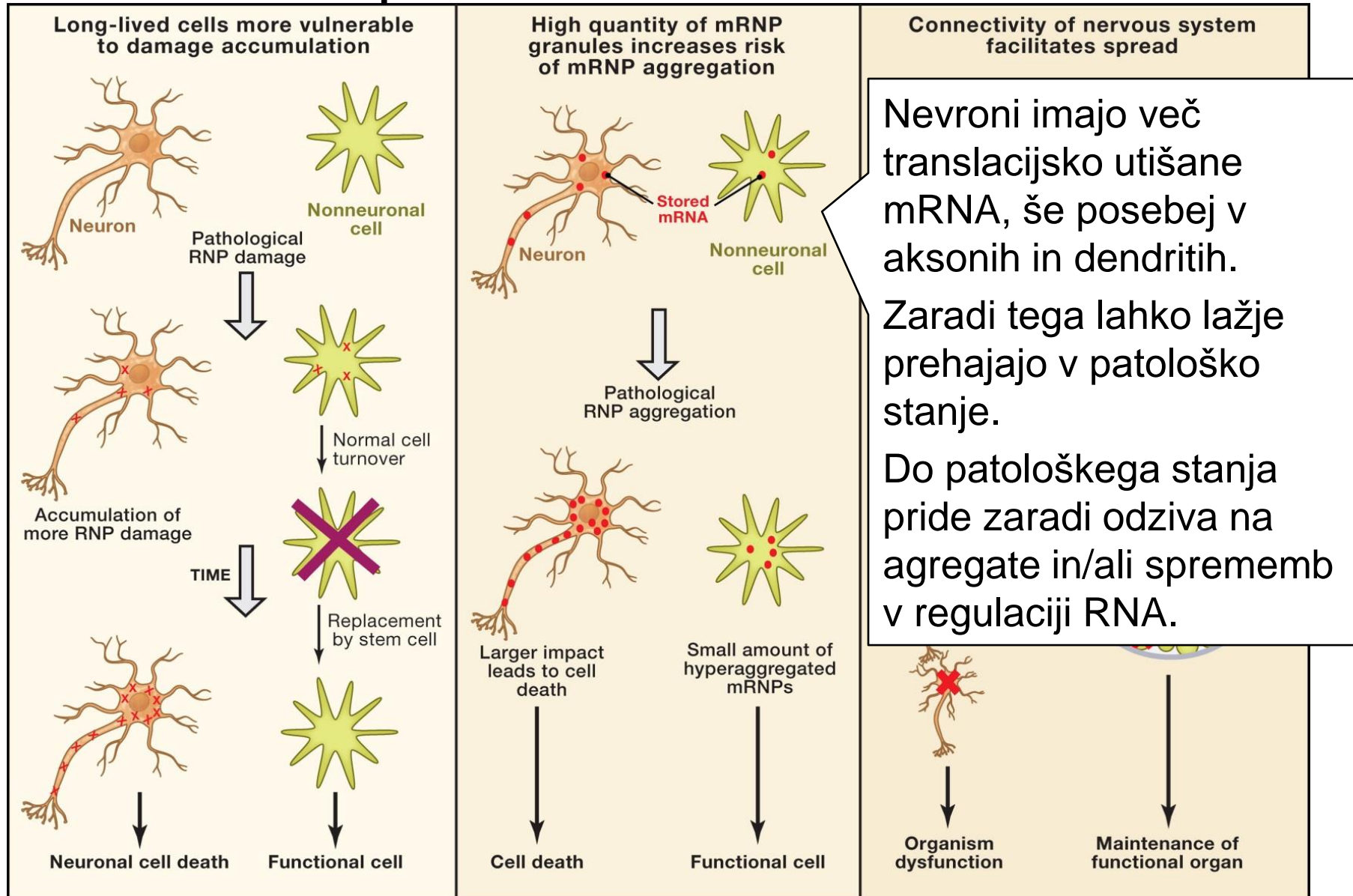
# Trije modeli selektivne občutljivosti nevronov na spremembe ribostaze



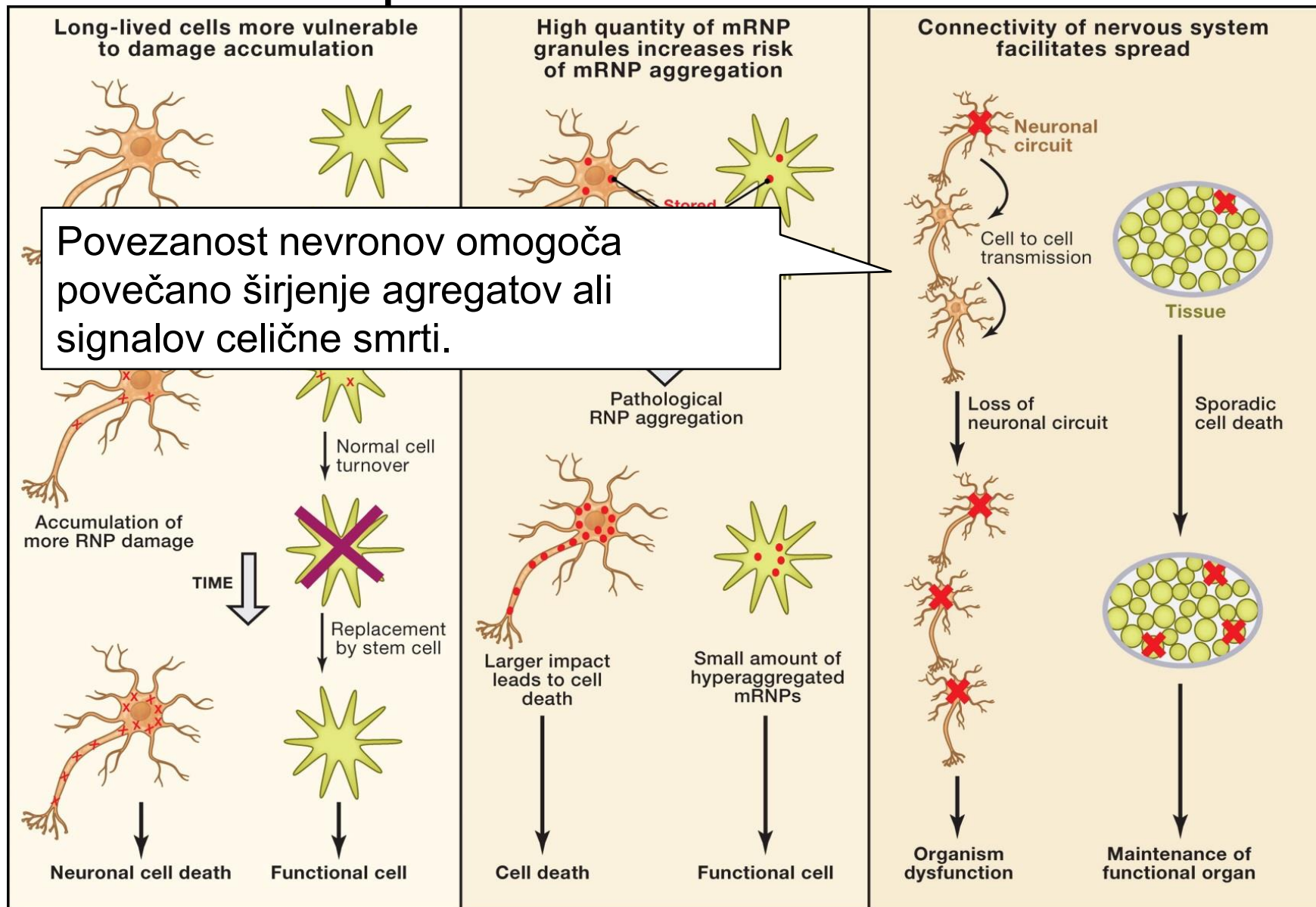
Zaradi dolgoživosti nevroni kopičijo več poškodb v svoji življenjski dobi. Izguba nevronov je tudi bolj pomembna, ker se jih ne da nadomestiti s tkivnimi matičnimi celicami.



# Trije modeli selektivne občutljivosti nevronov na spremembe ribostaze

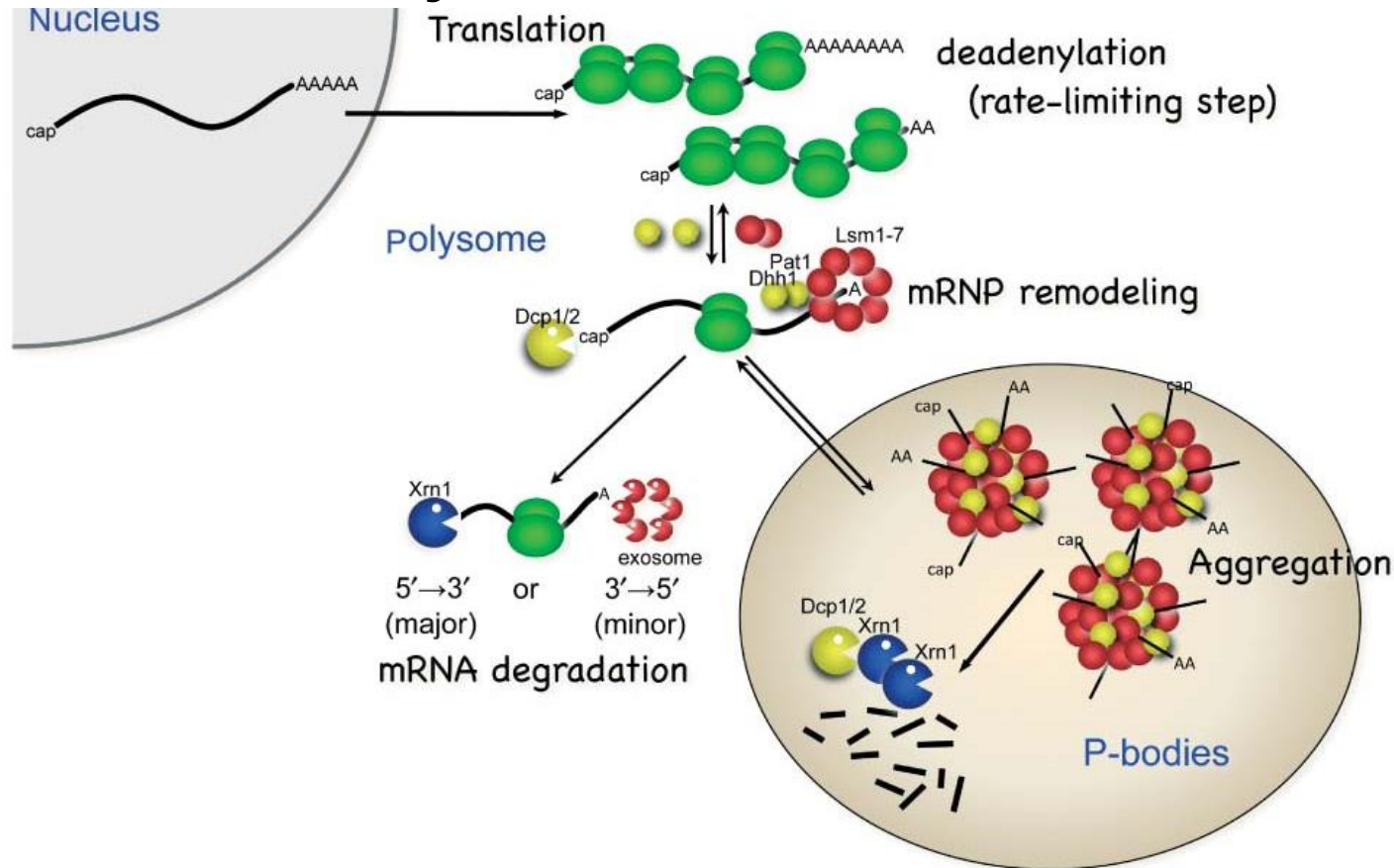


# Trije modeli selektivne občutljivosti nevronov na spremembe ribostaze



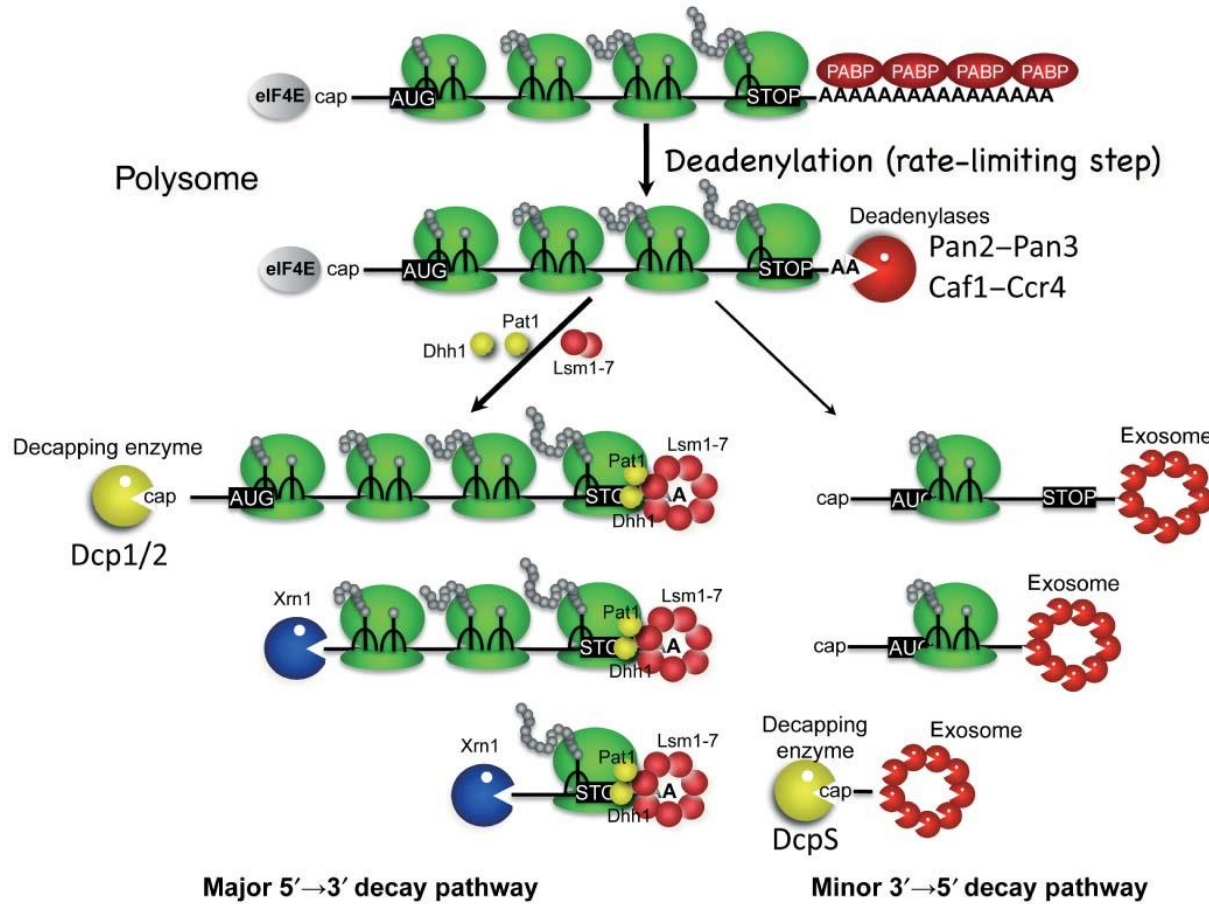
# Razgradnja mRNA

# Življenski cikel mRNA

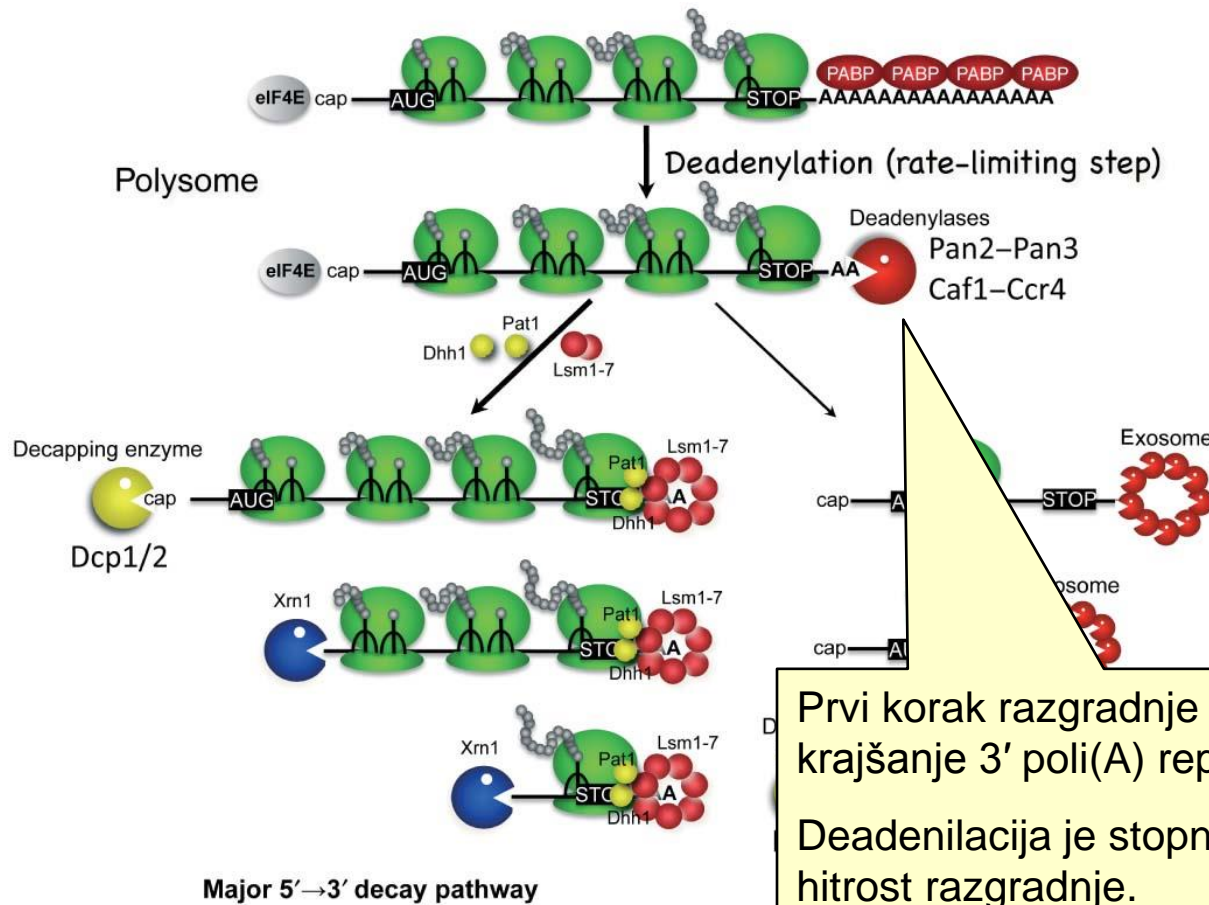


- Razgradnja mRNA se lahko odvija ob translaciji.
- V prvem koraku pride do ko-translacijskega krajšanja 3' poly(A) repa.
- Na polisomih pride tudi do odstranitve kape in 5' proti 3' razgradnje.
- V nekaterih primerih se mRNA prenese v P-telesca, kjer se shrani. Lahko se vrne nazaj v translacijo ali pa se razgradi.

# Splošna mRNA razgradnja



# Splošna mRNA razgradnja

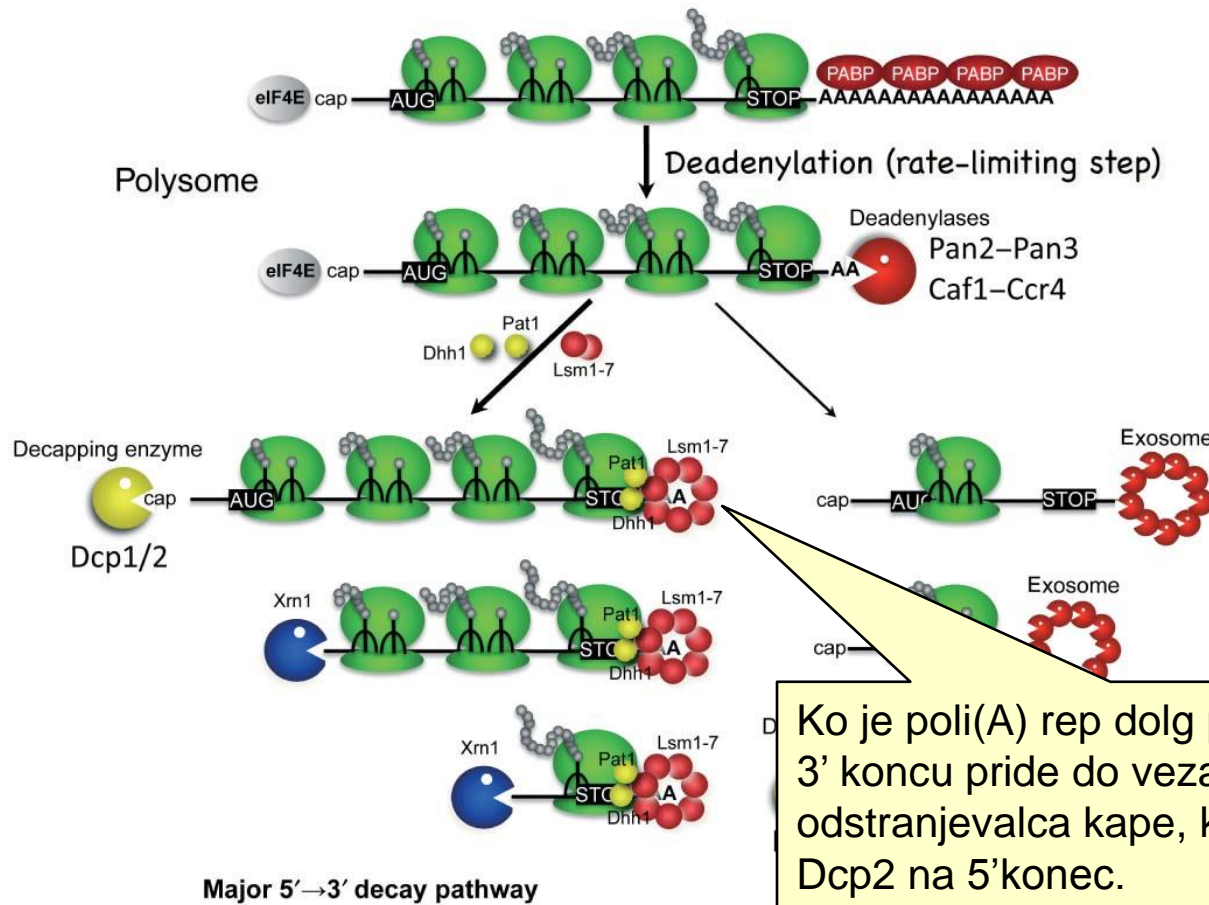


Prvi korak razgradnje mRNA je krajšanje 3' poli(A) repa.

Deadenilacija je stopnja, ki uravnava hitrost razgradnje.

Deadenilacijo katalizirata kompleksa Pan2-Pan3 in Caf1-Ccr4.

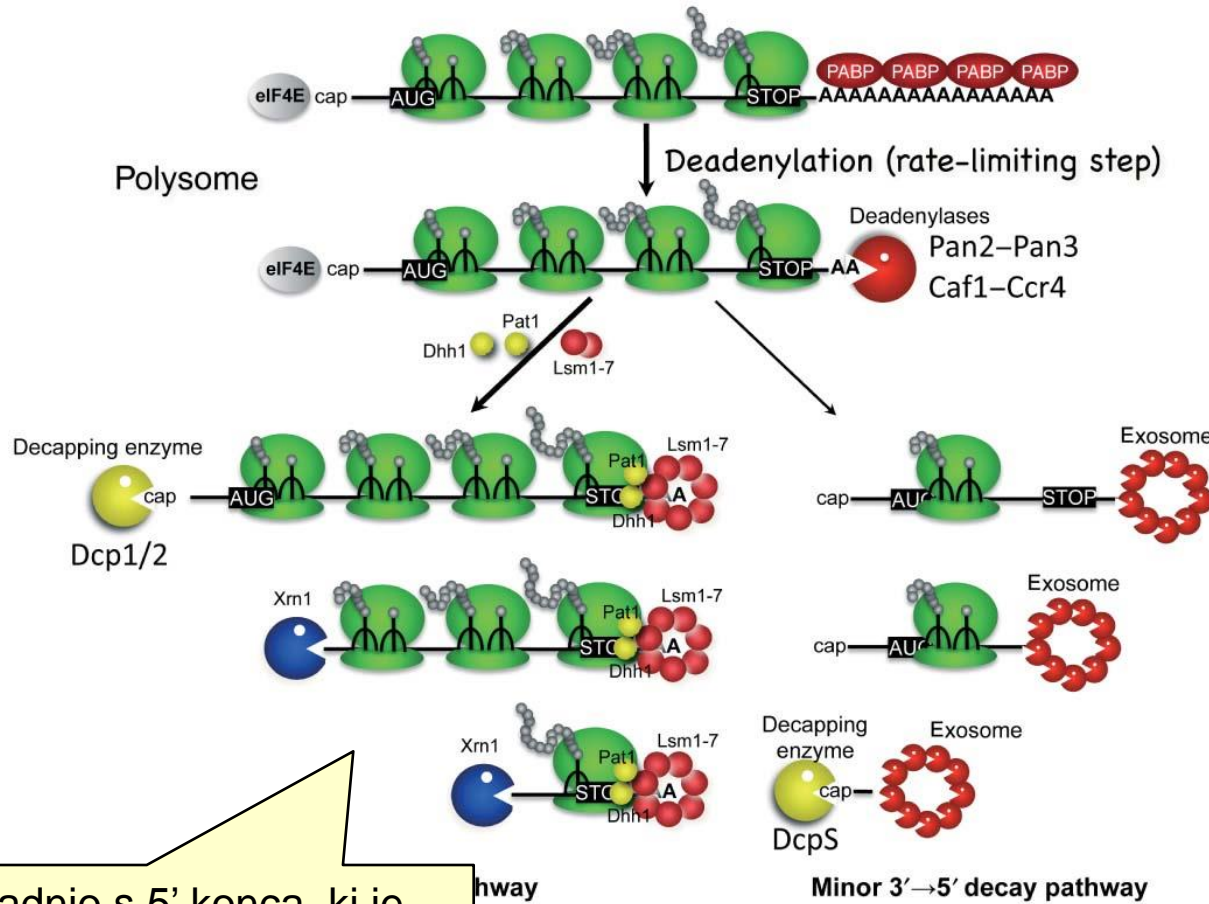
# Splošna mRNA razgradnja



Ko je poli(A) rep dolg približno 10 nt, na 3' koncu pride do vezave aktivatorjev odstranjevalca kape, ki rekrutirajo Dcp1-Dcp2 na 5' konec.

Lsm1-7, Pat1 in Dhh1 kompleks na 3' koncu blokira razgradnjo z eksosomom.

# Splošna mRNA razgradnja

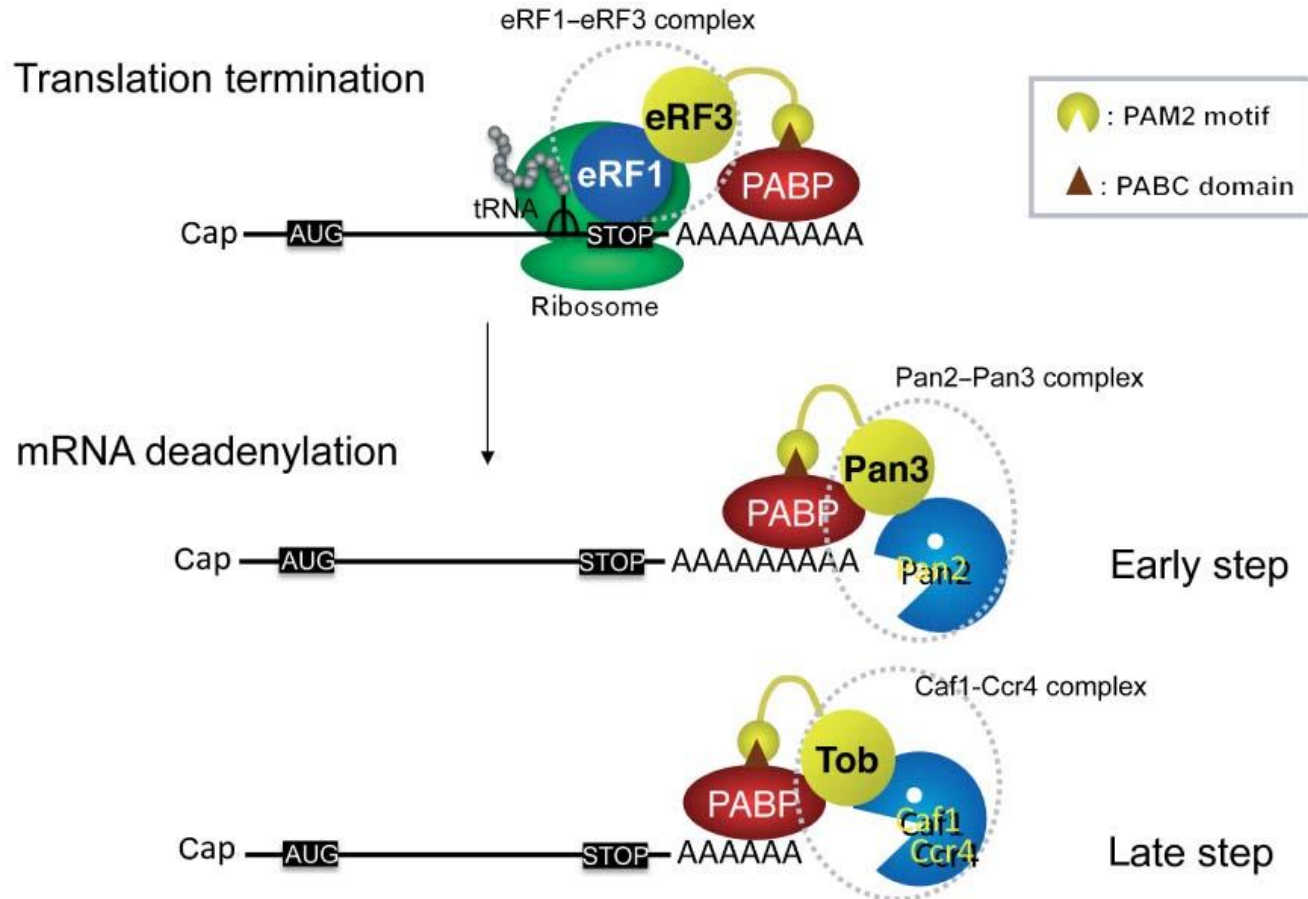


Xrn1 vodi razgradnjo s 5' konca, ki je glavna pot razgradnje.

5' proti 3' pot omogoča, da tudi zadnji ribosom izpelje translacijo do konca.



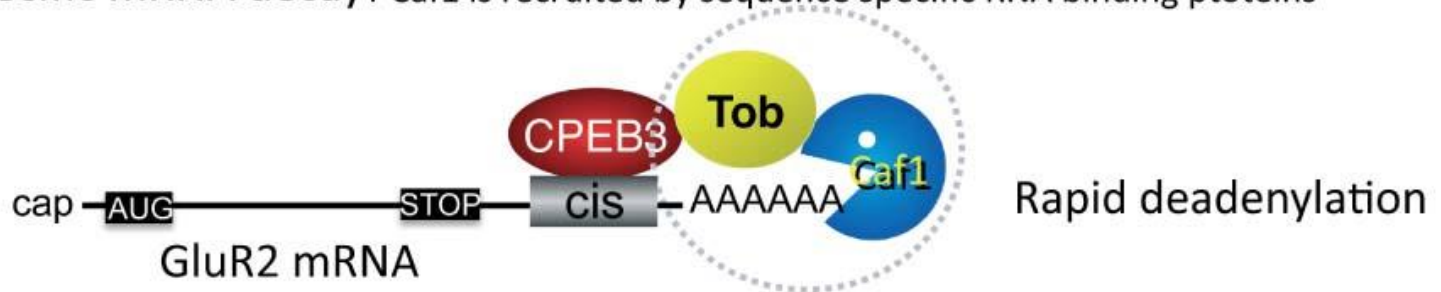
# Iniciacija razgradnje mRNA



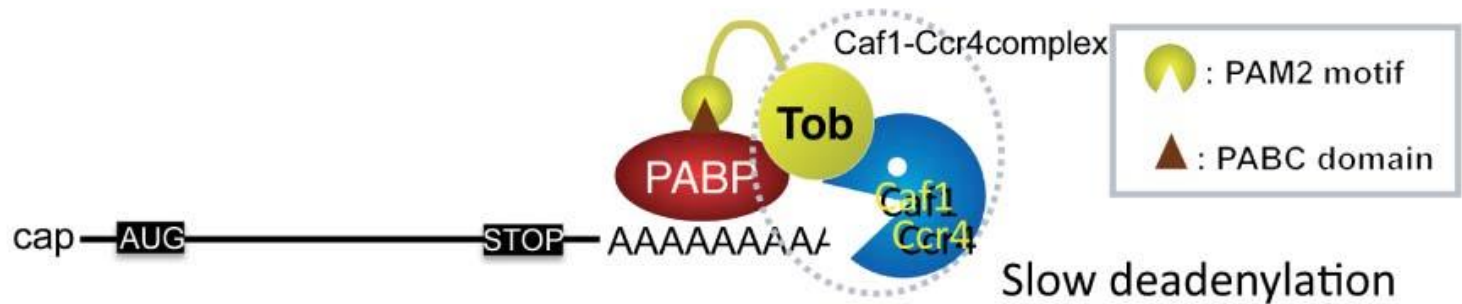
- Faktorja terminacije translacije, eRF3–eRF1, in dva glavna deadenilazna kompleksa, Caf1–Ccr4 in Pan2–Pan3, imajo PABP-vezavni motiv in si konkurirajo pri vezavi na PABP.
- Med translacijo ali po končani translaciji, se eRF1–eRF3 sprosti s PABP, na katerega se nato vežeta Pan2–Pan3 ali Caf1–Ccr4. To vodi do aktivacije deadenilaz in krajšanja poli(A) repa med translacijo.

# Iniciacija razgradnje specifičnih mRNA

(a) Transcript-specific mRNA decay: Caf1 is recruited by sequence specific RNA binding proteins

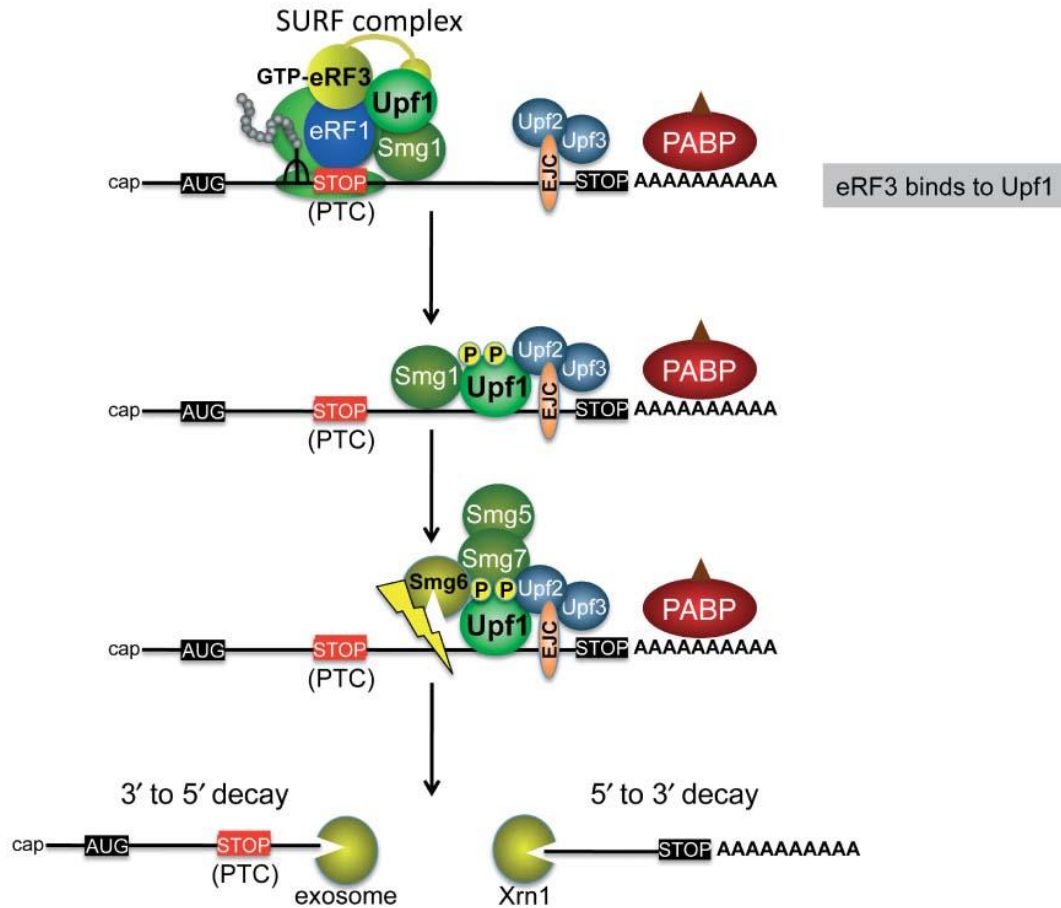


(b) General mRNA decay: Caf1 is recruited by the general RNA binding protein PABP



- Pri večini mRNA Tob posreduje pri rekrutaciji Caf1–Ccr4 na PABP. Terminacija translacije sproži to rekrutacijo ter počasno deadenilacijo.
- Pri razgradnji specifične mRNA Tob posreduje pri rekrutaciji Caf1 deadenilaze na RNA-vezavni protein CPEB. Z ojačano razgradnjo poli(a) repa pride do zmanjšanja izražanja gena.
- Torej, cis elementi v 3'UTR in njihovi trans proteini, lahko učinkovito uravnavajo presnovo mRNA.

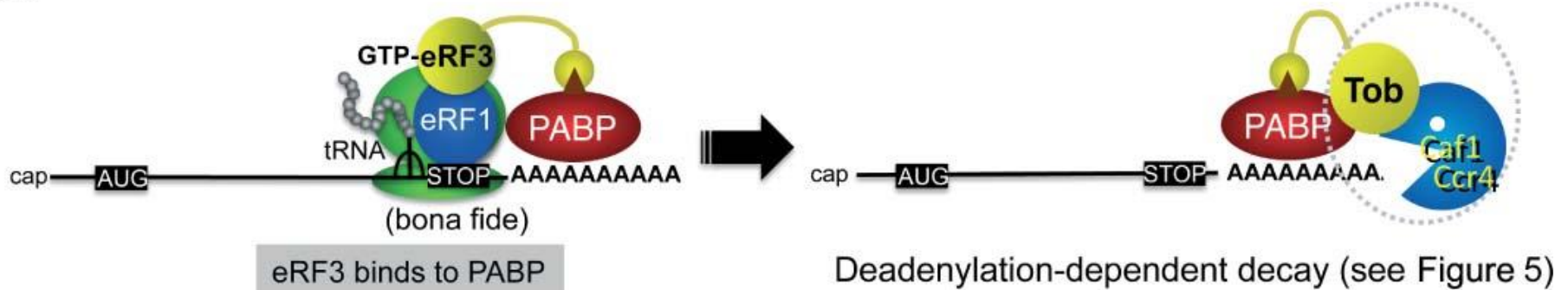
# Razgradnja nesmislene mRNA (NMD)



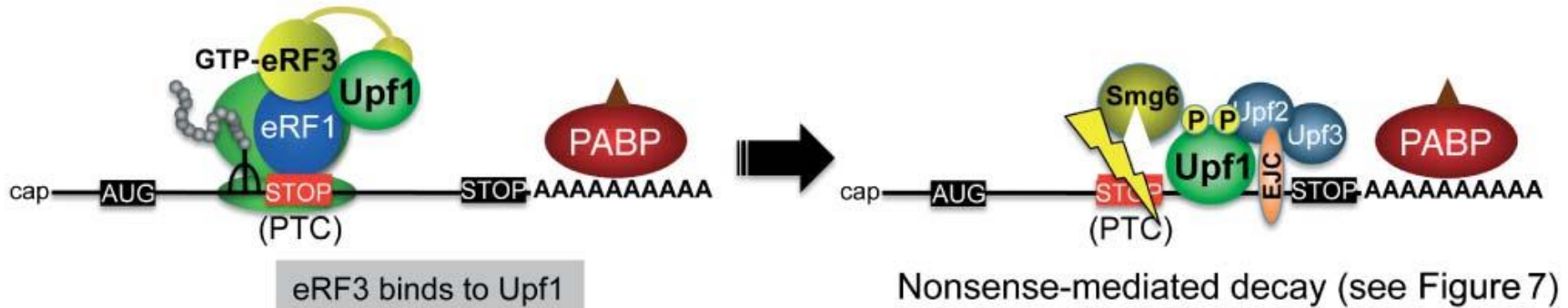
- Ko ribosom pride do prezgodnjega stop kodona (PTC), terminacijska proteina eRF3–eRF1 v kompleksu z Upf1 prepoznata terminacijski kodon v mestu A ribosoma. SMG1 katalizira fosforilacijo Upf1.
- Kompleks eksonske vezave, katerega ponavadi izpodrine ribosom, ostane vezan na mRNA. Ojača fosforilacijo UPF1.
- Fosforilirani Upf1 rekrutira endonukleazo SMG6, ki cepi mRNA.

# Kako se izbere tip razgradnje?

## (a) General mRNA



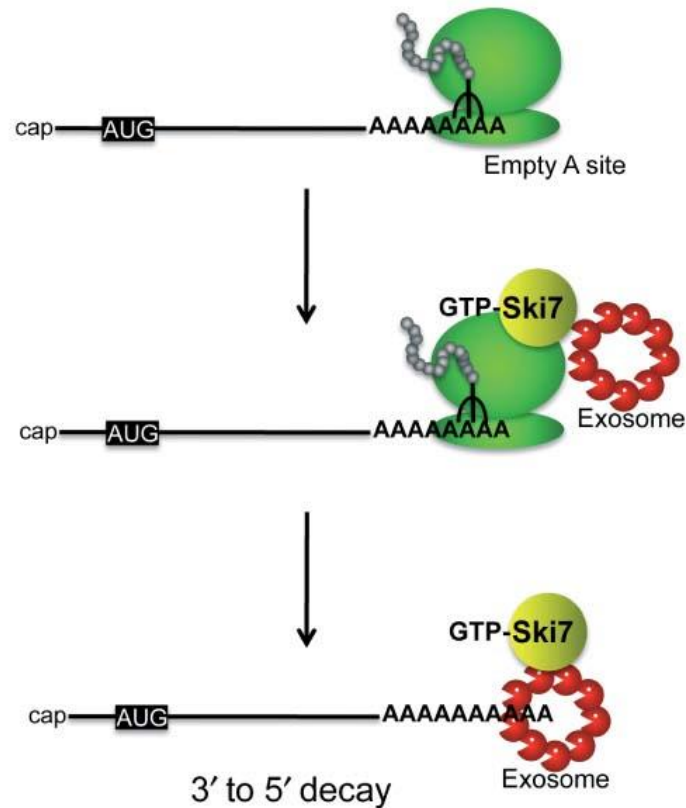
## (b) mRNA with premature termination codon



- (a) Splošna mRNA razgradnja: Pri pravem STOP kodonu se eRF3 lahko poveže s PABP in sproži razgradnjo odvisno od deadenilacije.
- (b) NMD: Ker je PTC daleč od 3' poli(A) repa, je interakcija med eRF3 in PABP manj učinkovita. eRF3 zato veže Upf1 ter sproži NMD.

# Non-stop razgradnja (NSD)

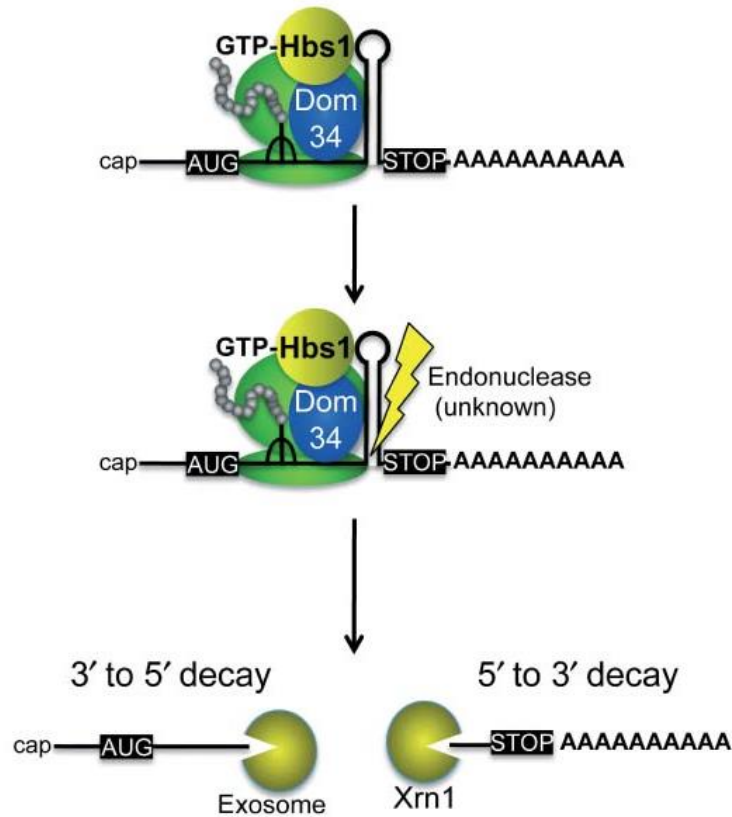
(a) NSD (nonstop decay)



- NSD: Ko pride do translacije transkripta brez STOP kodona, ribosom prevede tudi poli(A) rep in se ustavi na 3' koncu. Ski7 ali Hbs1-Dom34 prepoznajo prazno A mesto na ribosomu in sprostijo ribosom. Eksosom se rekrutira in začne se razgradnja transkripta 3' proti 5'.

# No-go razgradnja (NGD)

(b) NGD (no-go decay)

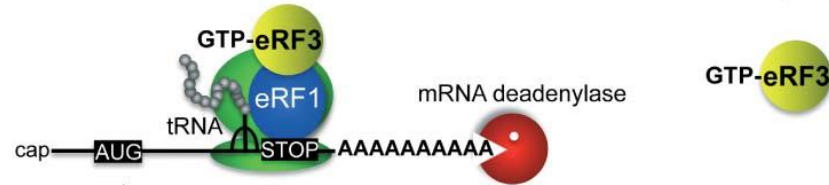


- NGD: Ko pride do ustavljanja ribosoma na transkriptu, ki ima močno sekundarno strukturo, Hbs1–Dom34 prepoznajo A mesto ustavljenega ribosoma.
- Hbs1–Dom34 sprostita ustavljen ribosom.
- Transkript se reže z neznano endonukleazo.

# eRF3 G proteini in razgradnja mRNA

(a) General mRNA decay --- mRNA with the bona fide termination codon

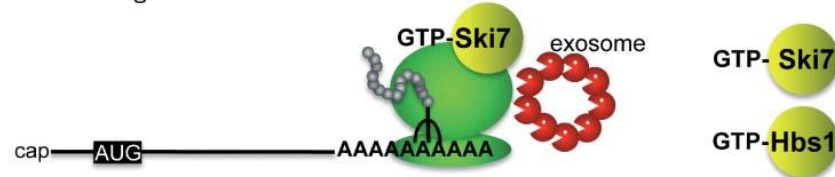
eRF3 family G proteins



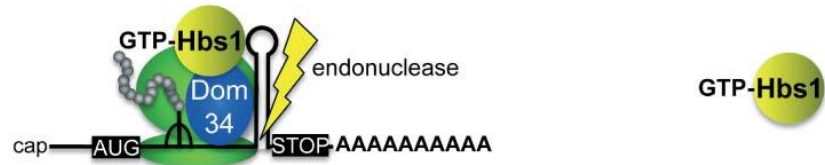
(b) NMD (nonsense-mediated mRNA decay) --- mRNA with the premature termination codon



(c) NSD (non stop decay) --- mRNA lacking the termination codon



(d) NGD (no-go decay) --- mRNA with the structural propensity to cause the ribosome to stall



- eRF3 družina ima ključno vlogo pri sprožitvi (začetku) razgradnje navadne in napačne mRNA.

# Razgradnja z RNA interferenco

- Naslednič...