

Procesiranje RNA: Izrezovanje in spajanje

- Viri:
 - Poglavlje: 11.4, Strachan and Read
 - Pregledni članki
 - Hammond and Wood, Trends in Genetics 2011
 - Licatalosi and Darnell, Nature Review Genetics 2010
 - Singh and Cooper, Trends in Molecular Medicine 2012
 - Shepard and Hertel, Genome Biology 2009

En gen = več proteinov

- 1,5% človeškega genoma kodira proteine \leq \geq 98,5% ne kodira!
- ~ 30.000 genov kodira za 100.000 – 200.000 proteinov
ENCODE (**E**ncyclopedia Of **D**N **A** **E**lements)
- 487 lokusov proizvede 2608 transkriptov – 5.4/locus.
- Kako je to možno?
 - Več promotorjev
 - Alternativno spajanje
 - RNA editiranje
 - Ig in TCR geni (rekombinacija)
 - Alternativni start kodoni

Geni z več promotorji

Geni z več promotorji

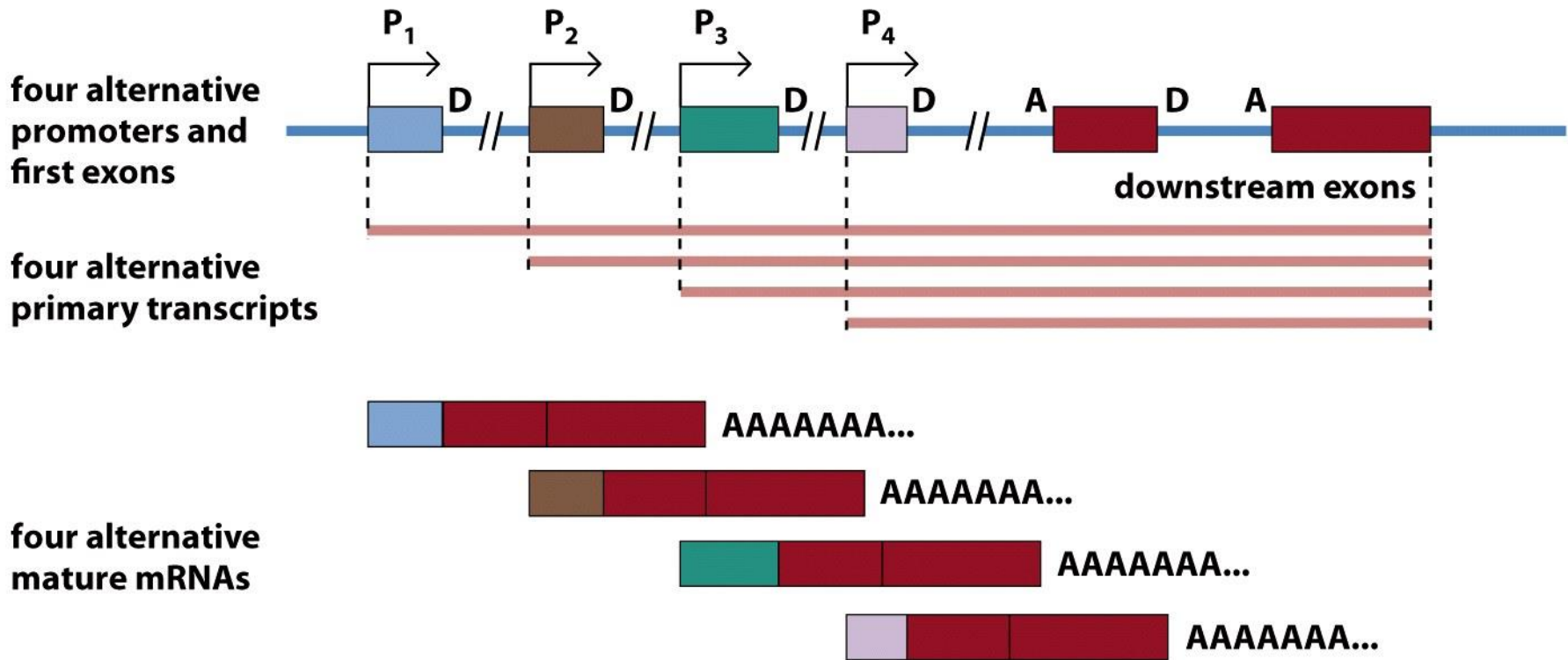


Figure 11.26 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

- 3' konec vsakega prvega eksona ima donorsko mesto, vendar 5' konec nima akceptorskega mesta.
- Dve vlogi:
 - Lahko vsebujejo različne regulatorne elemente.
 - Lahko kodirajo različne N-terminalne oblike proteinov.

Geni z več promotorji (različni regulatorni elementi)

- Tkivno ali razvojno- specifični alternativni promotorji dovolijo različno uravnavanje izražanja genov pri različnih pogojih.
- Prvi intron je pogosto najdaljši (povprečno 14.168 bp; ostali introni – 4847 bp).
- Promotorji so lahko locirani daleč pred ostalim delom gena.
- Alternativni promotorji so daleč narazen.
- Novo odkriti prvi eksoni ENCODE projekta ležijo povprečno 186 kb pred prvotnimi prvimi eksoni.
- Taki promotorji se nahajajo v drugačnem lokalnem okolju (drugačno kromatinsko okolje ali v različni kromosomski zanki).

Geni z več promotorji (različna N-terminalna zaporedja proteinov)

- Izooblike proteinov z različnimi lastnostimi.
- Različna znotrajcelična lokalizacija proteina (npr. prosti ali vezani na membrano).
- Različne funkcije.
- **PRIMER: progesteronski receptor**
 - Dve izoobliki, PRA in PRB, ki se razlikujeta v 165 ak na N-koncu.
 - Oba sta transkripcijska faktorja, vendar uravnavata izražanje različnih genov – imata različen fiziološki učinek.

Alternativni promotorji distrofina

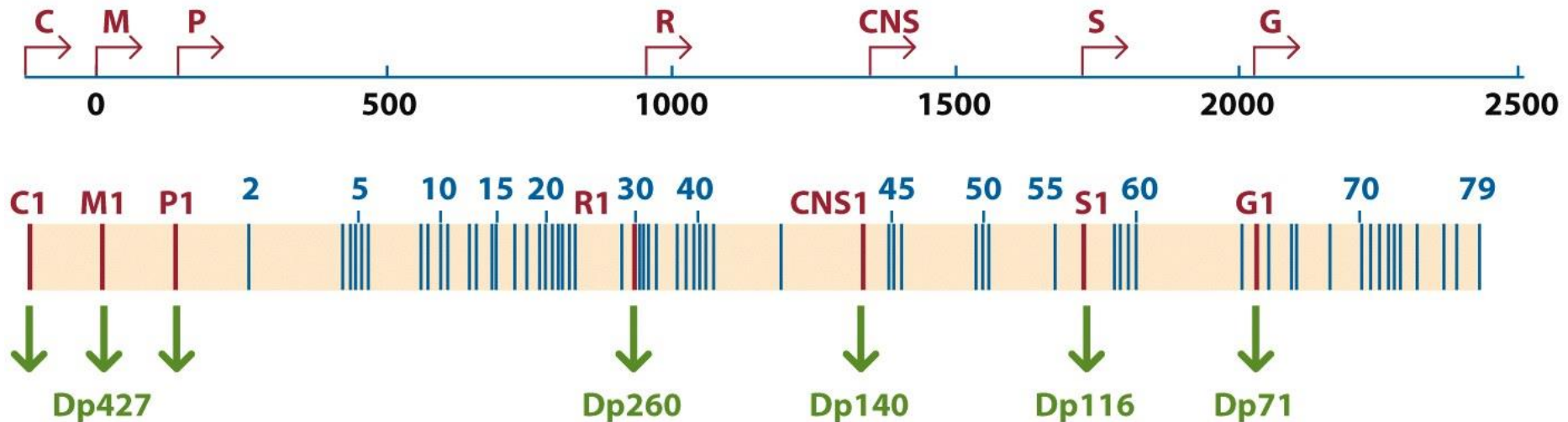


Figure 11.27 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

- Gen vsebuje 79 exonov v 2,4 Mb DNA na Chr X.
- Ima vsaj 7 različnih promotorjev.
- Trije so v bližini konvencionalnega začetka – tvorijo Dp427.
 - (C) kortikalni; (M) mišični; (P) Purkinje celice.
 - Razlike v N-koncu.
- Vsaj štirje alternativni promotorji še v:
 - (R) retina, možgani, srčna mišica; (CNS) centralno živčevje; (S) Schvanove celice; (G) splošna izooblika, ki se izraža skoraj povsod.

CDKN2A: en gen vsebuje zapis za dva proteina (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

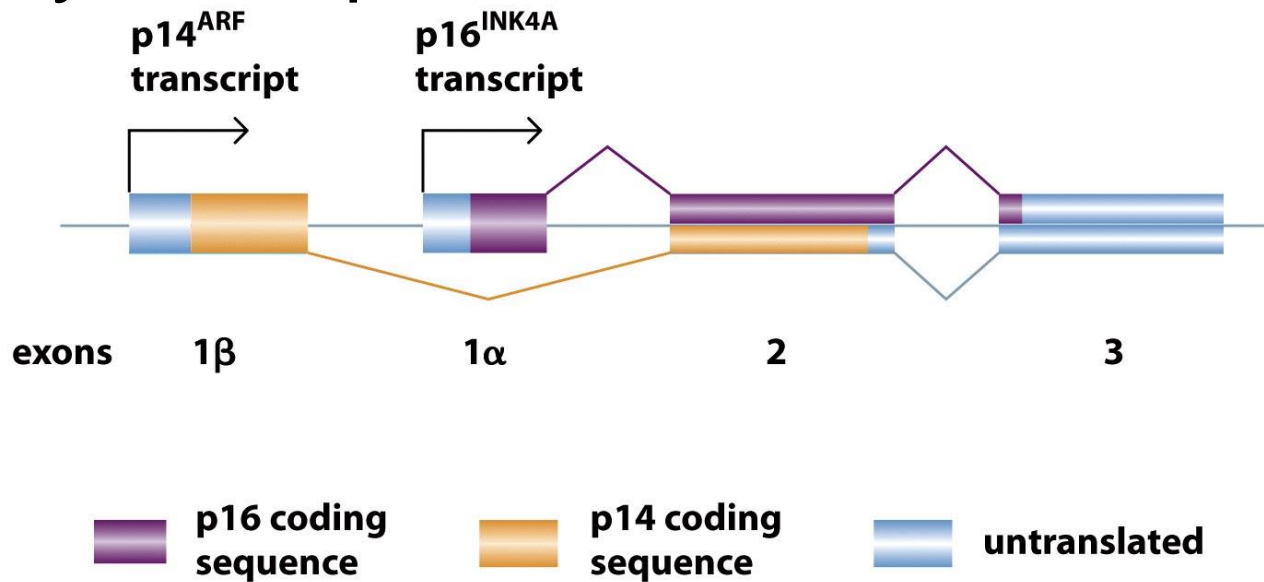


Figure 17.16 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

- E1 α , E2 in E3 kodirajo za p16^{INK4A}
 - Tumor-supresorski protein, ki je inhibitor Cdk4/6
- E1 β , E2 in E3 kodirajo za p14^{ARF} (ARF = alternative reading frame)
 - Destabilizira Mdm2, onkoprotein, ki uravnava količino p53
 - Tumor-supresorski protein
- Redke dedne mutacije *CDKN2A* (v družinah z obliko melanoma)
- Bolj pogoste somatske mutacije - homozigotna delecija pogosta pri tumorjih.

Alternativno RNA izrezovanje in spajanje

Pregled

- Proces izrezovanja in spajanja
- Alternativno spajanje
- Ugotavljanje alternativnega spajanja
- Bolezni alternativnega spajanja
- Zdravljenje bolezenskega alternativnega spajanja

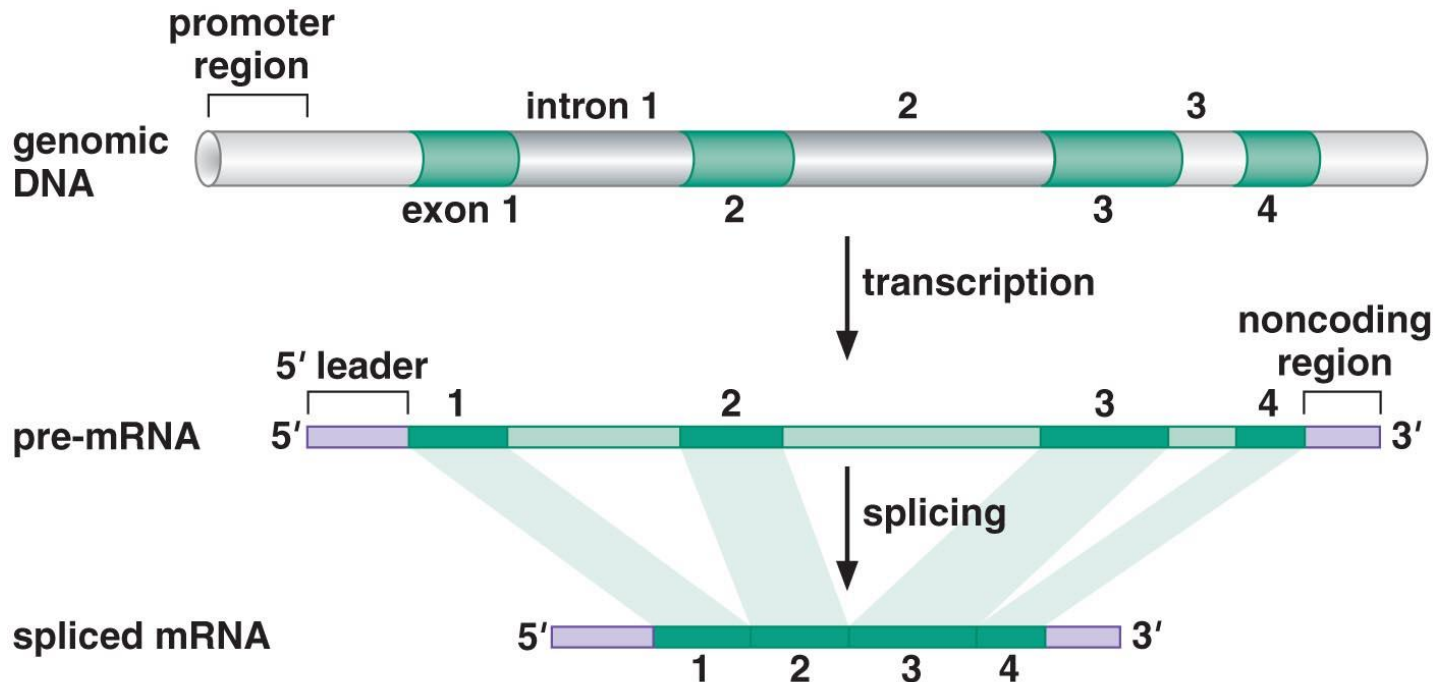
RNA izrezovanje in spajanje

RNA izrezovanje in spajanje

Večina evkariontskih genov je razdeljena na eksone in introne.

Eksoni so zaporedja, ki se prenesejo v dozorelo RNA.

Introni so vmesna zaporedja, ki se izrežejo med procesiranjem primarnega transkripta.



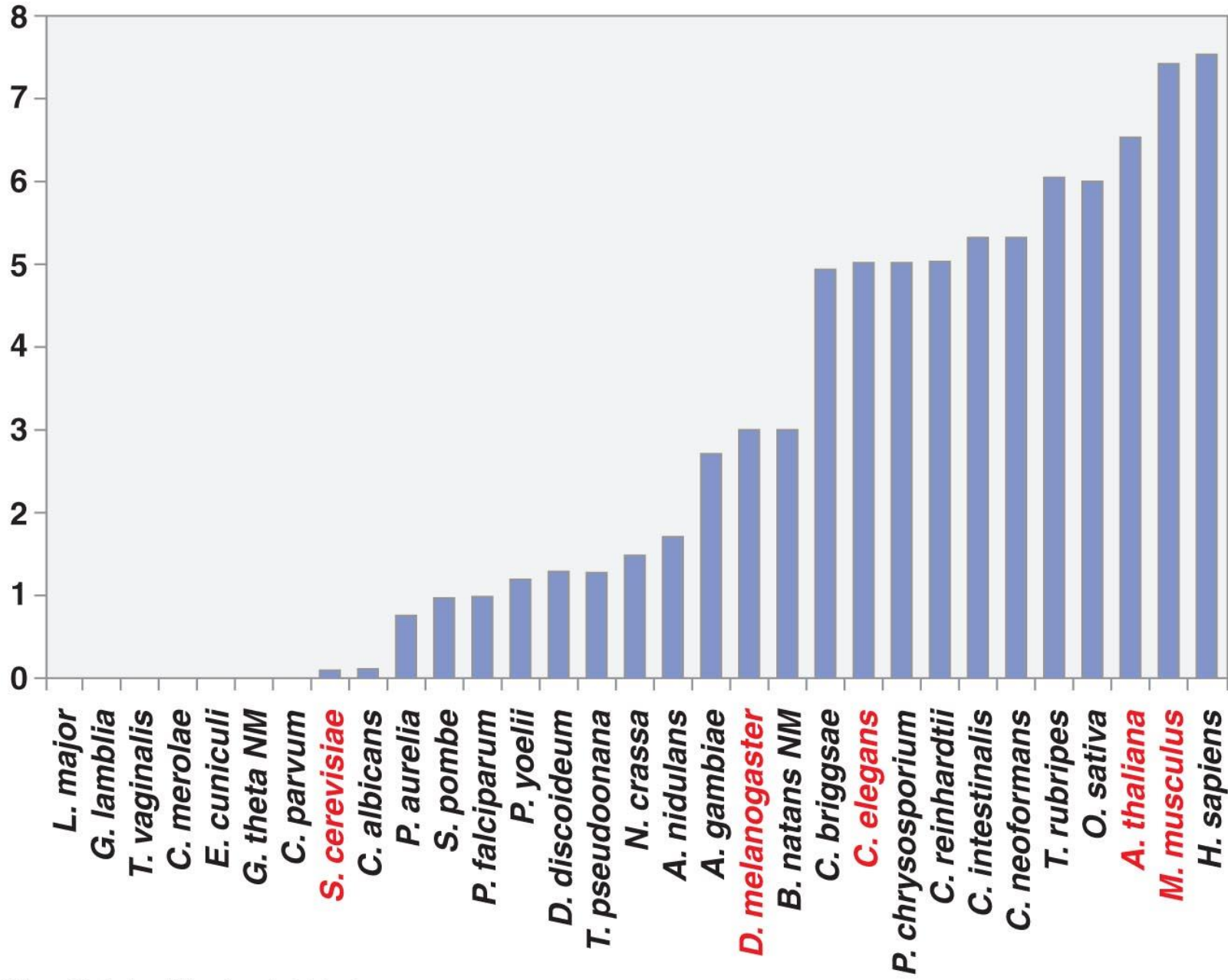
Eksonska in intronska statistika

- Povprečno število intronov v genu je večje pri višjih organizmih kot pri nižjih.
- Število intronov v enem genu je lahko od 1 do 363.
- Povprečna velikost eksonov: 150 nt
Velikost intronov: okrog 3.000 nt, tudi do 800.000 nt

Primarni transkript (**pre-mRNA**) je lahko zelo dolg na račun intronov
npr. Gen za človeški distrofin: 2.400 kb (40 nt/sek = 17 ur za prepis)

- Izrezovanje in spajanje RNA mora biti natančno. Če ni, laho pride do sprememb
bralnega okvirja.
- Nekatere pre-mRNA se procesirajo na različne načine in tvorijo izooblike.
- Do 75% človeških genov lahko tvori take izooblike.
- Npr. DSCAM gen vinske mušice ima 38.000 kombinacij exonov.

Average number of introns per gene



Kemija izrezovanja in spajanja

- Zaporedja na RNA določajo mesto izrezovanja in spajanja.
- Meje med eksoni in introni so označene s specifičnimi zaporedji.
 - **5' mesto izrezovanja** na 5' koncu introna
 - **3' mesto izrezovanja** na 3' koncu introna
 - **Mesto razvejitve** je blizu 3' konca. Vmes je polipirimidinski trakt

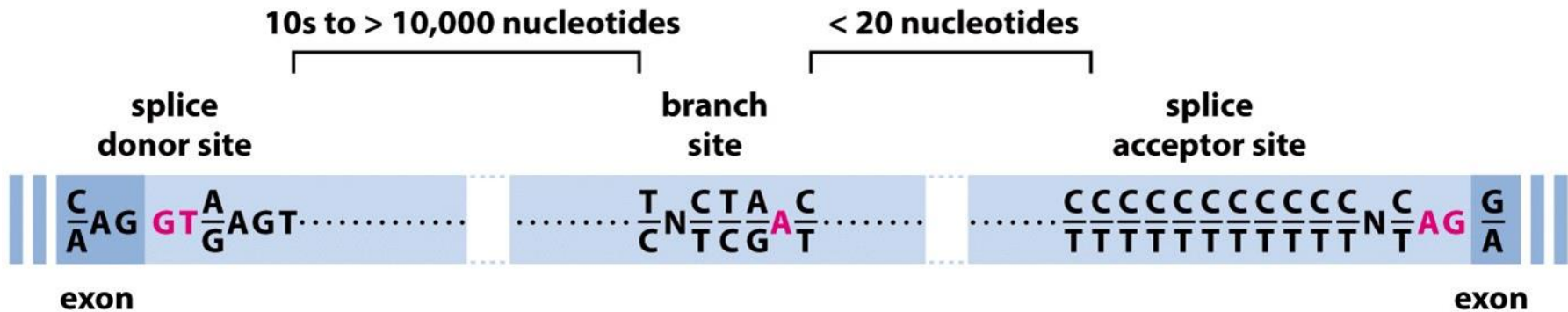


Figure 1.17 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

Kemija izrezovanja in spajanja

- Intron se odstrani z dvema transesterifikacijskima reakcijama.
- Pri transesterifikaciji pride do cepitve fosfodiesterskih vezi v pre-mRNA in tvorbe novih vezi.
- 2'-OH skupina adenina na mestu razvejitve (branch site) napade (nukleofilni napad) fosforilno skupino gvanina na 5' spojitvenem mestu.
- 3'-OH skupina 5' eksona napade fosforilno skupino na 3' spojitvenem mestu.
- Izrezani intron ima obliko zanke (lariat).
- Ni potrebe po energiji zato ker ni novih kemičnih vezi. ATP se uporabi pri tvorbi in delovanju spliceosomnega kompleksa.
- Kaj zagotavlja, da izrezovanje in spajanje potekata v pravi smeri?
 1. povečanje entropije
 2. hitra razgradnja izrezanih intronov.

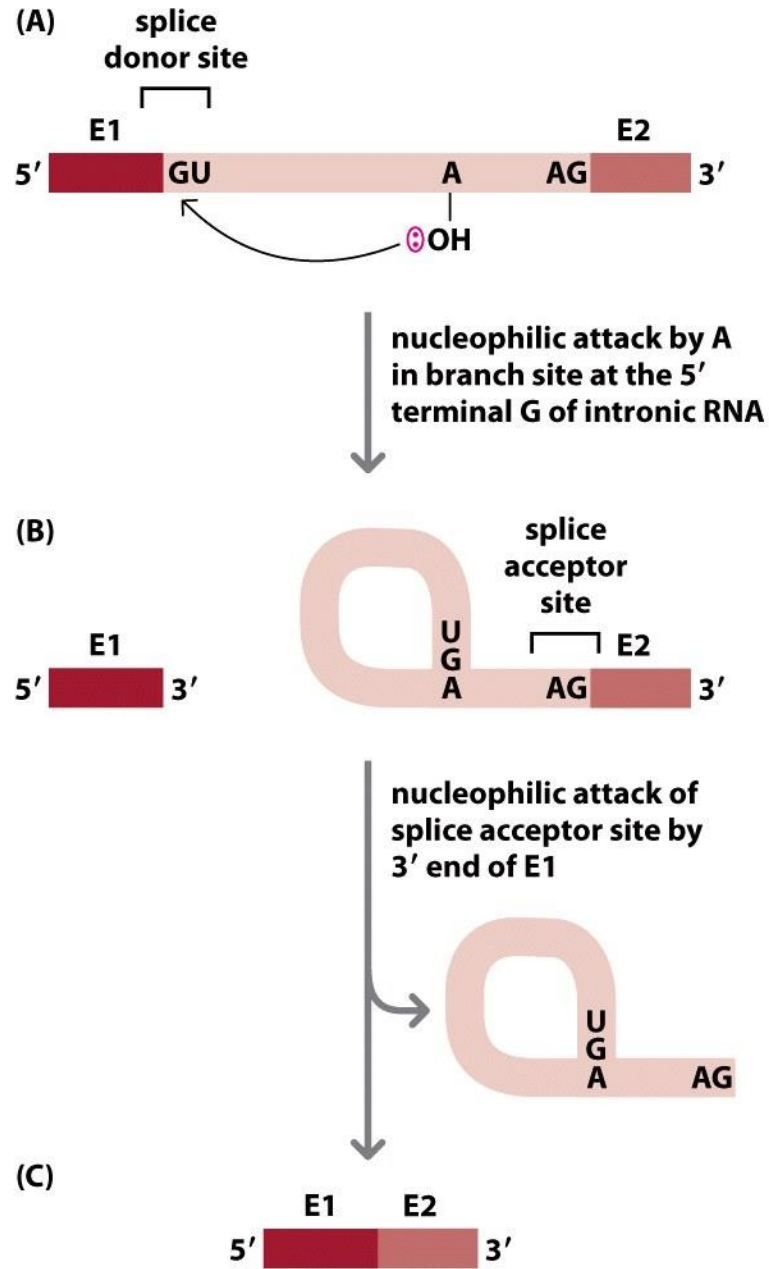


Figure 1.18 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

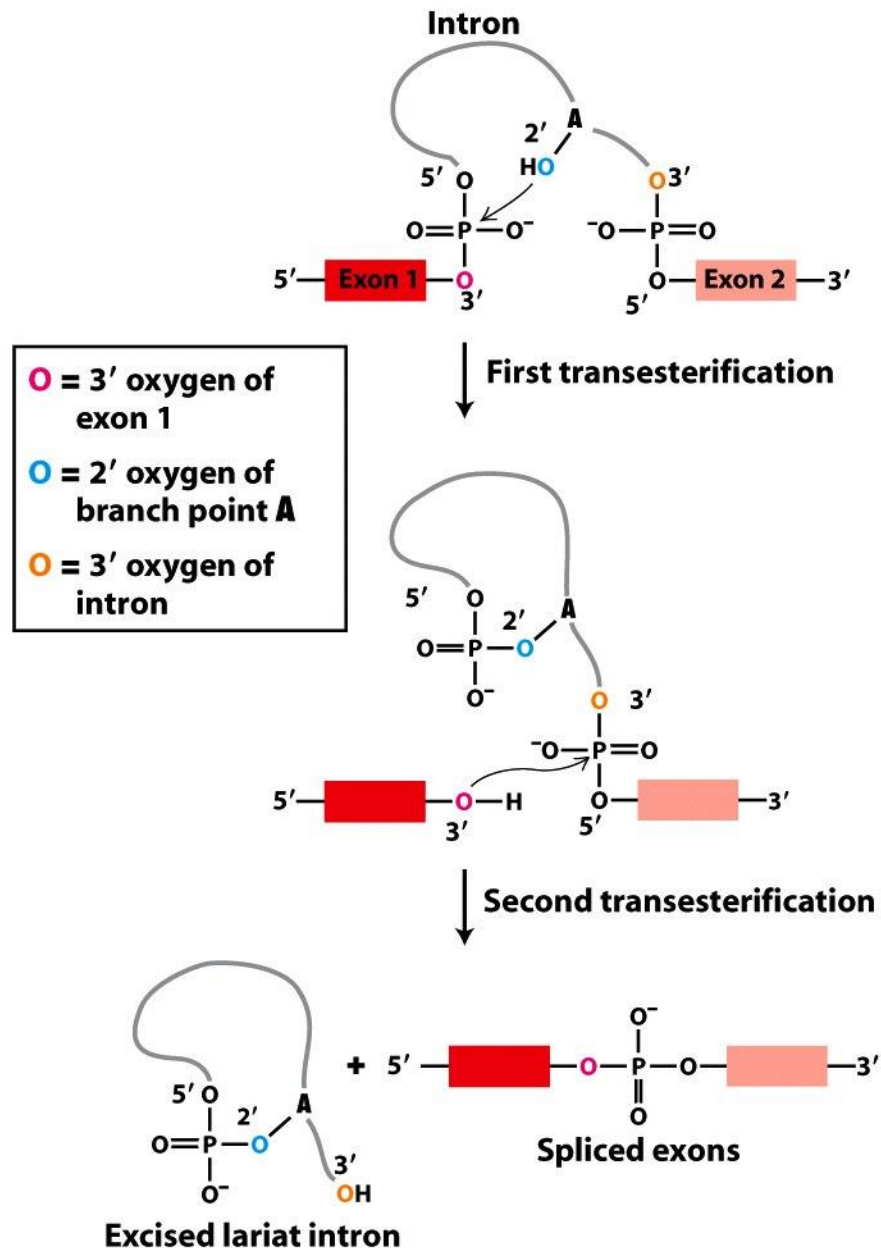


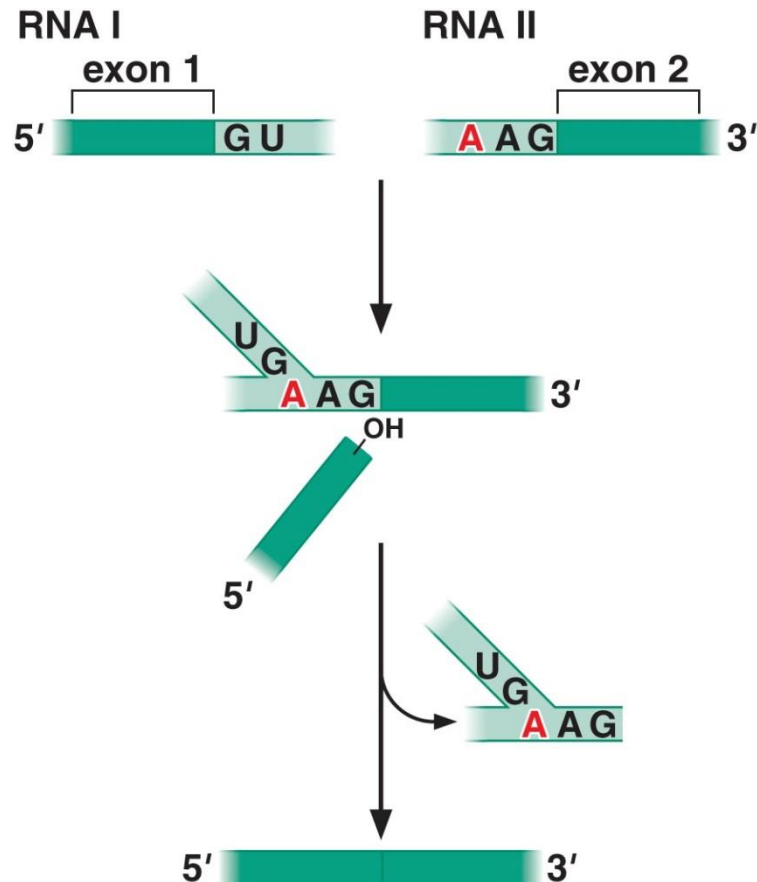
Figure 8-8
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Spajanje eksonov različnih RNA

S procesom trans-spajanja lahko povežemo različne RNA.

Poteka pri *trypanosomah* in črvih *C. elegans*

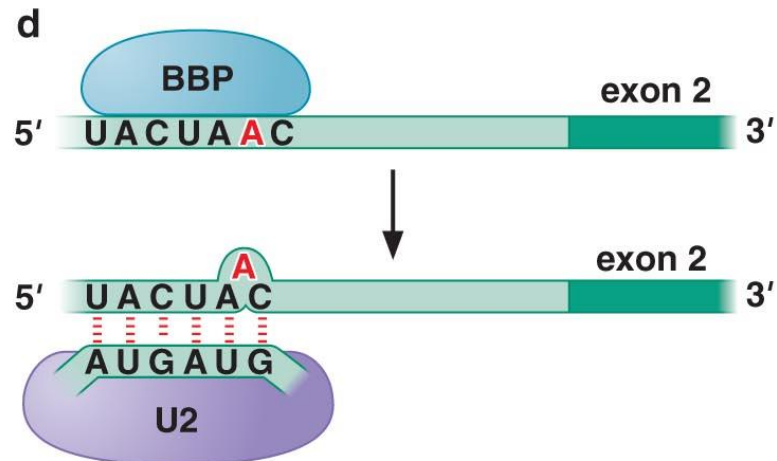
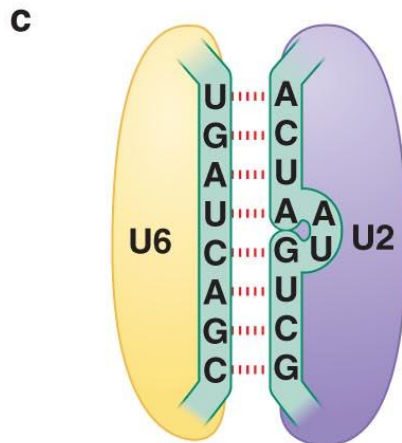
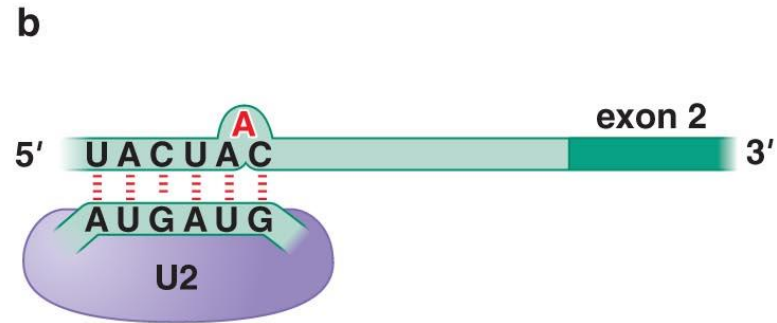
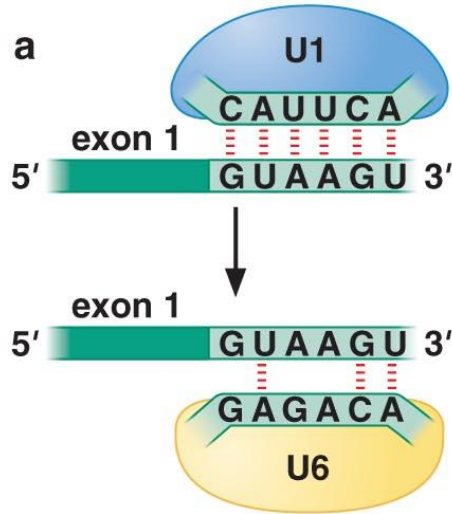
Pri človeku ni dokazano, a je zanimivo za terapijo.



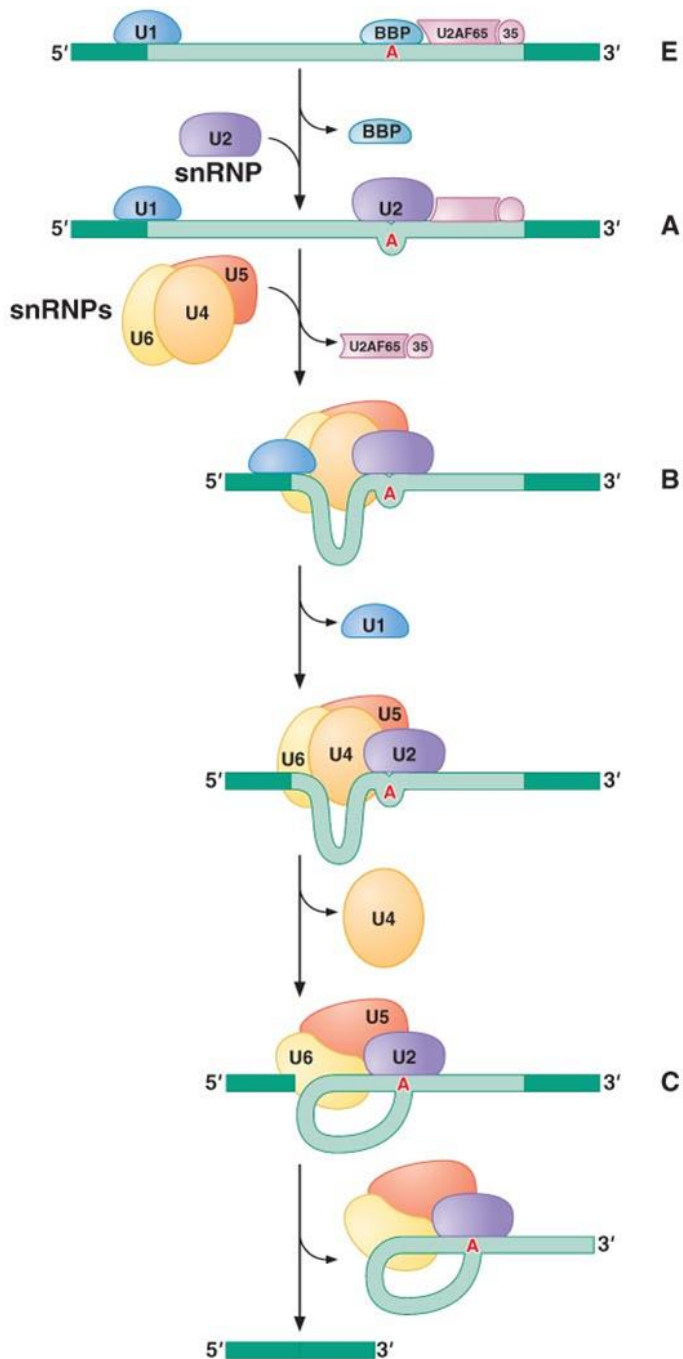
Spliceosom (spajalno telesce)

- Spliceosom je velik kompleks, ki izrezuje in spaja RNA.
- Vsebuje približno 150 proteinov in 5 snRNA. Velik je podobno kot ribosom.
- Vsaka reakcija potrebuje nekaj ATP molekul.
- Pri sami katalizi reakcije sodeluje tudi RNA.
- Male jedrne RNA (**snRNAs**) so dolge 100-300 nt. Skupaj s proteini tvorijo male jedrne ribonukleoproteine (small nuclear ribonucleoproteins - **snRNPs**)
- Posamezne komponente spliceosoma se spreminjajo glede na stadij reakcije.
- Med procesom izrezovanja in spajanja so pomembne tudi RNA-RNA interakcije.
- Vključeni so tudi U2AF, BBP (‘branchpoint bridging protein’), RNA vezavni proteini in DEAD box helikaze.

RNA-RNA interakcije med različnimi snRNPji ter med snRNPji in pre-mRNA



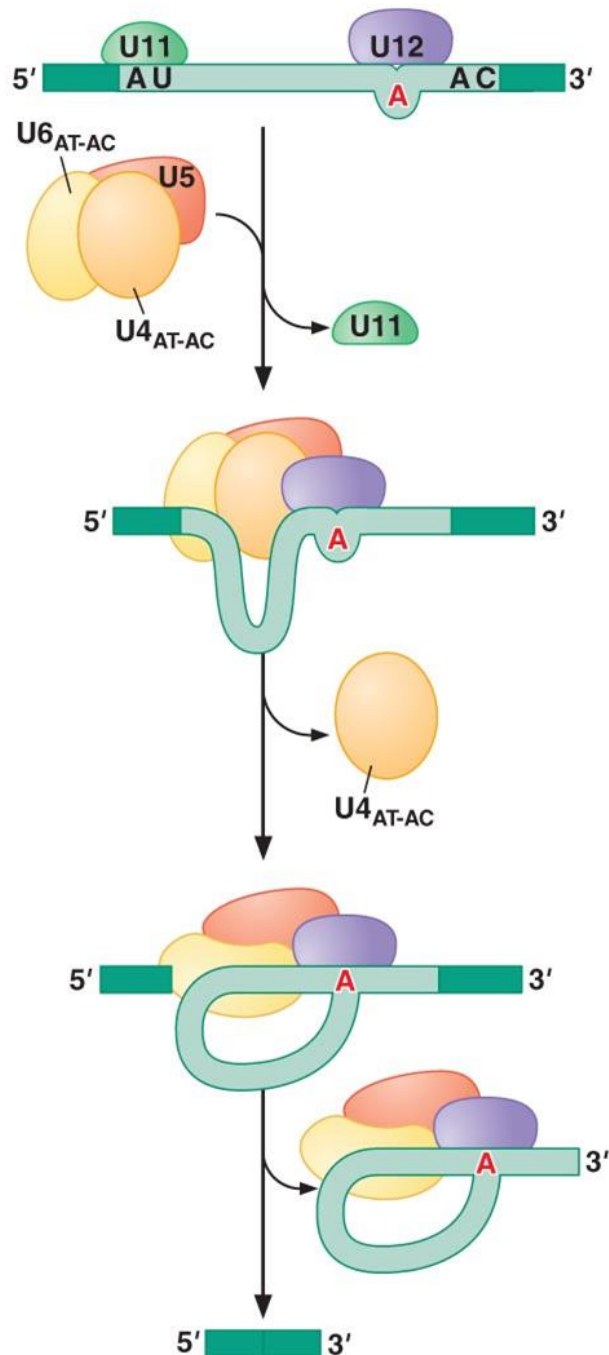
E Proces izrezovanja in spajanja



1. U1 snRNP se veže na 5' spojitveno mesto.
2. U2AF se veže na pirimidinsko zaporedje in 3' spojitveno mesto. Pomaga pri vezavi BBP (branch point binding protein).
3. U2 snRNP zamenja BBP.
4. U2AF zapusti kompleks. U4, U5, in U6 snRNPji se pridružijo kompleksu.
5. U1 zapusti kompleks. U6 ga nadomesti na 5' spojitvenem mestu.
6. U4 zapusti kompleks. RNA komponenti U2 in U6 tvorita aktivno mesto. U5 ju povezuje.
7. Vezava eksonov sprosti U2, U5, in U6 kompleks skupaj z intronsko zanko.

Stranski spliceosom

- Manjša skupina intronov se izreže z alternativnim spliceosomom, ki ima drugačen komplet snRNPjev.
- Nekateri pre-mRNA pri višjih evkariontih uporabljajo AT-AC spliceosom.
- AT-AC spliceosom vsebuje drugačne podenote: U11 in U12 ter ekvivalenta U4 and U6.
- Prepoznavata AT-AC konce, ki so drugačni od GT-AG koncev glavnega spliceosoma.
- Uporablja enako kemično pot.



Kemija izrezovanja in spajanja

Samoizrezovanje

- Trije razredi spajanja: jedrno pre-mRNA izrezovanje in spajanje ter samoizrezovanje skupine I in II.
- Samoizrezovanje intronov pomeni, da lahko RNA sama katalizira izrezovanje in spajanje.
- Pri samoizrezovanju se intron zvije v posebno konformacijo in katalizira lasten izrez. Ni potrebe po proteinih.
- Ni pravi encim, ker katalizira samo enkratno (lastno) reakcijo.
- Pri intronih skupine II je kemijski potek izrezovanja podoben poteku na spliceosomih.

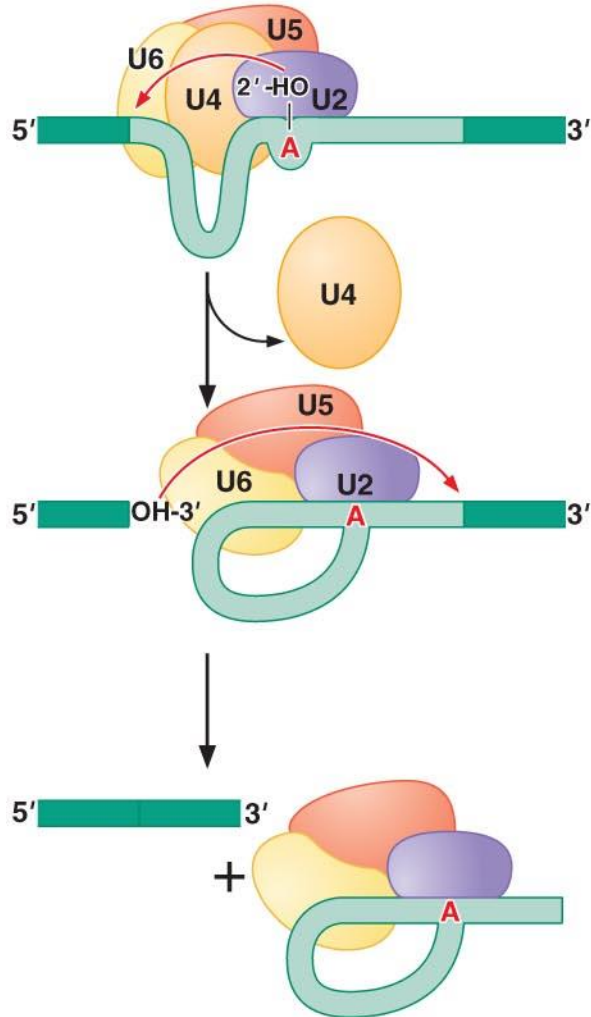
Trije tipi RNA izrezovanja in spajanja

TABLE 13-1 Three Classes of RNA Splicing

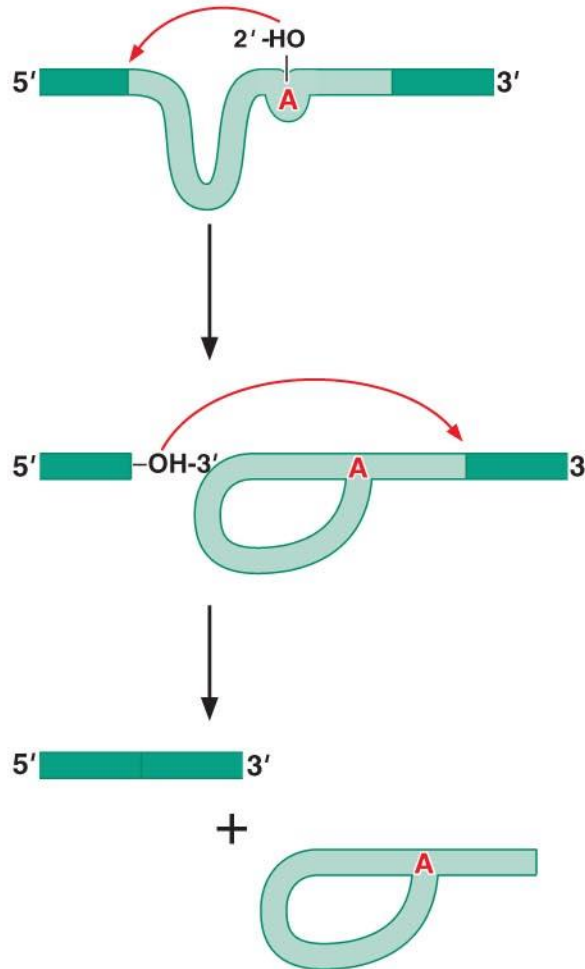
Class	Abundance	Mechanism	Catalytic Machinery
Nuclear pre-mRNA	Very common; used for most eukaryotic genes	Two transesterification reactions; branch site A	Major and minor spliceosomes
Group II introns	Rare; some eukaryotic genes from organelles and prokaryotes	Same as pre-mRNA	RNA enzyme encoded by intron (ribozyme)
Group I introns	Rare; nuclear rRNA in some eukaryotes, organelle genes, and a few prokaryotic genes	Two transesterification reactions; branch site G	Same as group II

Trije tipi RNA izrezovanja in spajanja

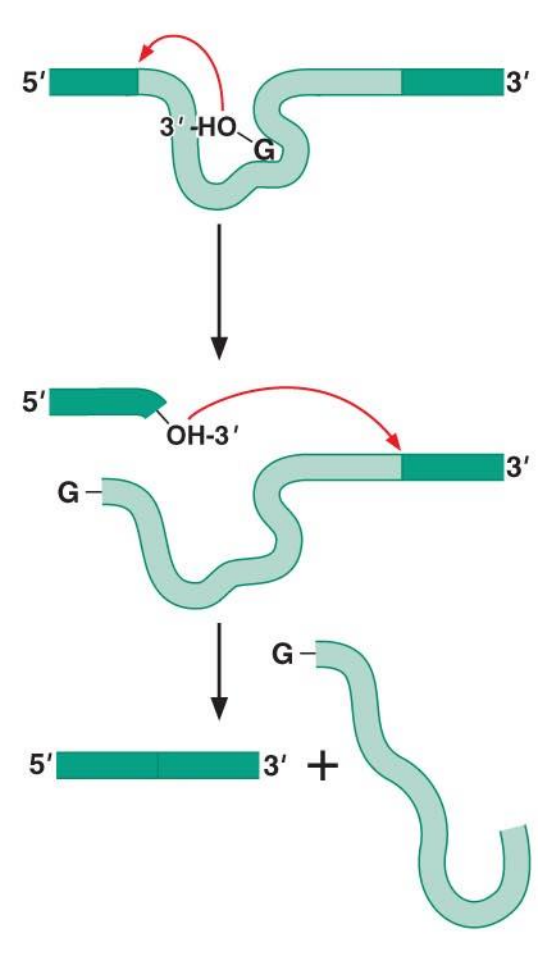
a pre-mRNA spliceosome



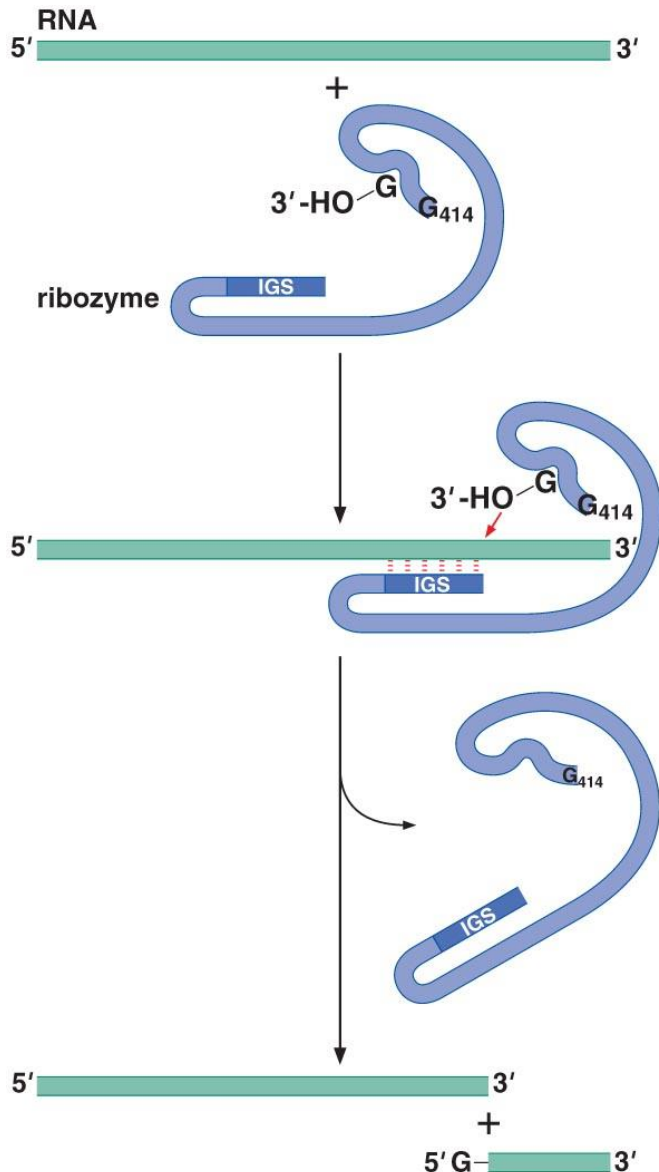
b group II self-splicing



c group I self-splicing



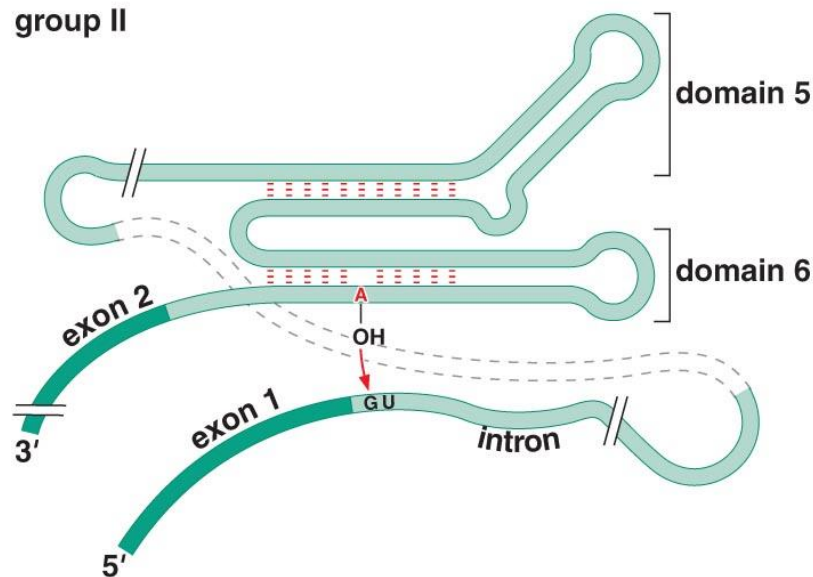
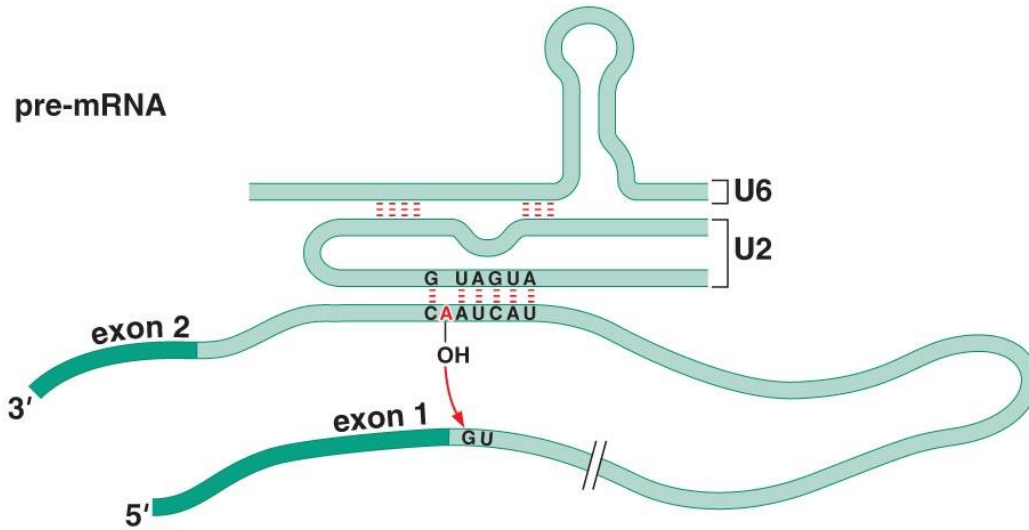
Introni I skupine



- Introni I skupine izrežejo linearni intron namesto intronske zanke.
- Pri katalizi uporabljajo prost G nukleotid ali nukleozid.
- Imajo mesto vezave G nukleotida in interno vodilno zaporedje (internal guide sequence), ki se veže s zaporedjem 5' spojitvenega mesta.
- Imajo ohranjeno sekundarno strukturo.

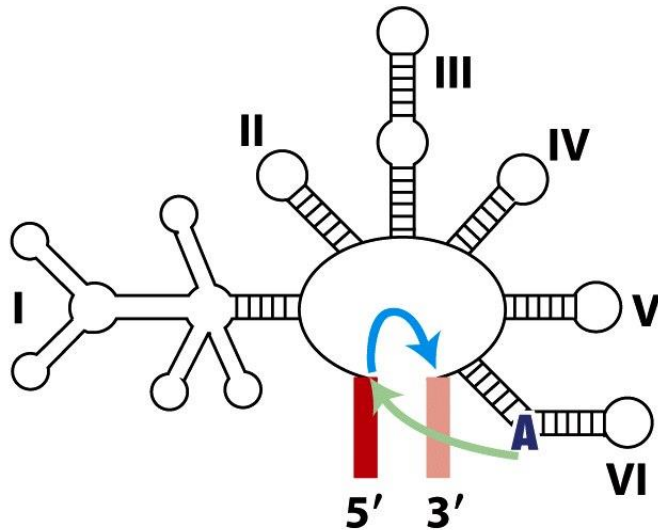
Introni II skupine

- Podobnosti pri zvijanju RNA katalitičnih regij intronov skupine II in spliceosomalnega kompleksa pre-mRNA.



Introni II skupine

(a) Group II intron



(b) U snRNAs in spliceosome

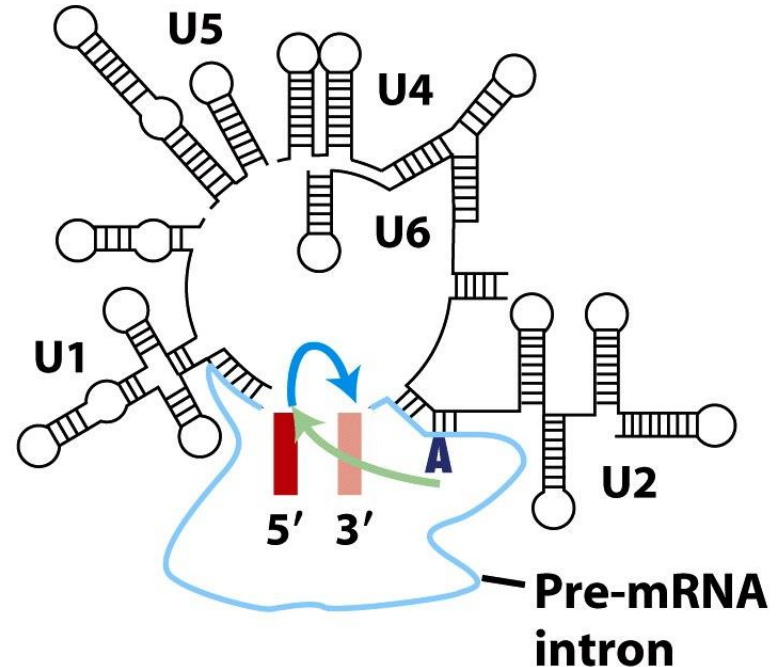


Figure 8-14
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

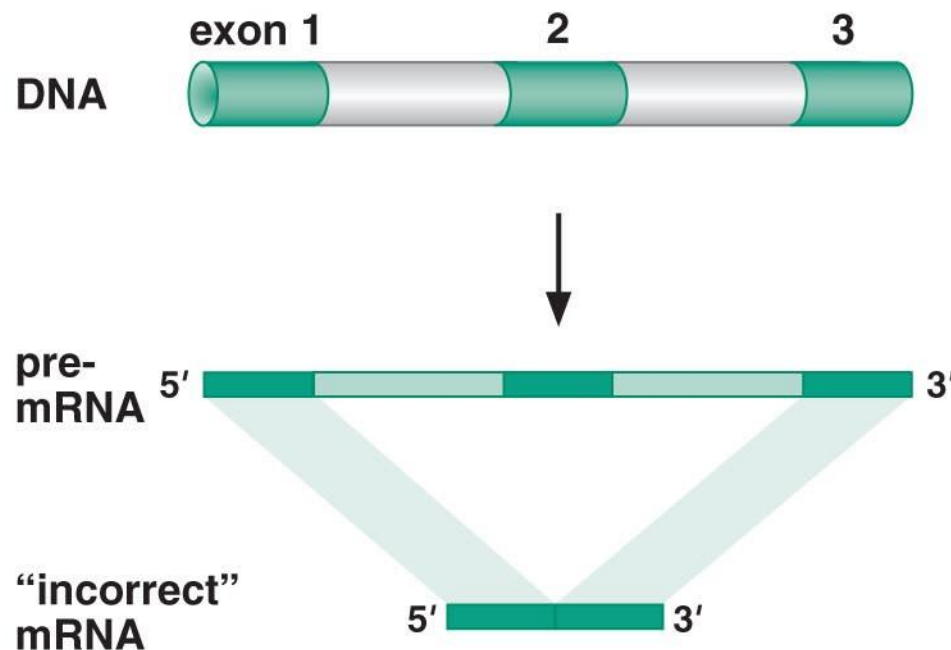
- Introni II skupine so začetna stopnja evolutivnega razvoja izrezovanja in spajanja pre-mRNA.
- Evolucijska pot

Intron II skupine → AT-AC spliceosom → GT-AG spliceosom

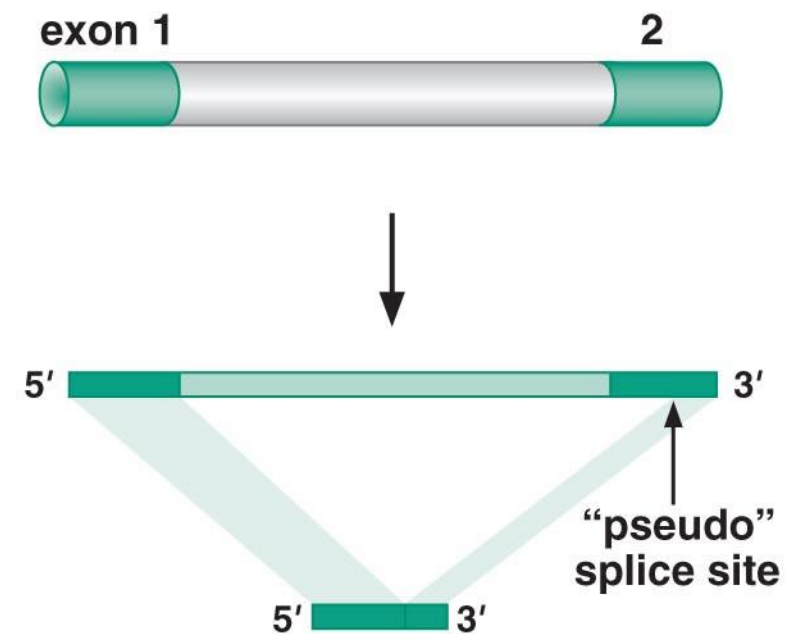
Kako spliceosomi najdejo spojitelna mesta?

- Izbira spojitelnega mesta je natančna. Pri tvorbi spliceosoma številni elementi prepoznajo spojitelno mesto.
- Izbira pravega spojitelnega mesta ni enostavna.
- Pogosti napaki prepoznavanja spojitelnega mesta sta preskakovanje eksonov ali uporaba navideznega spojitelnega mesta.

a exon skipping

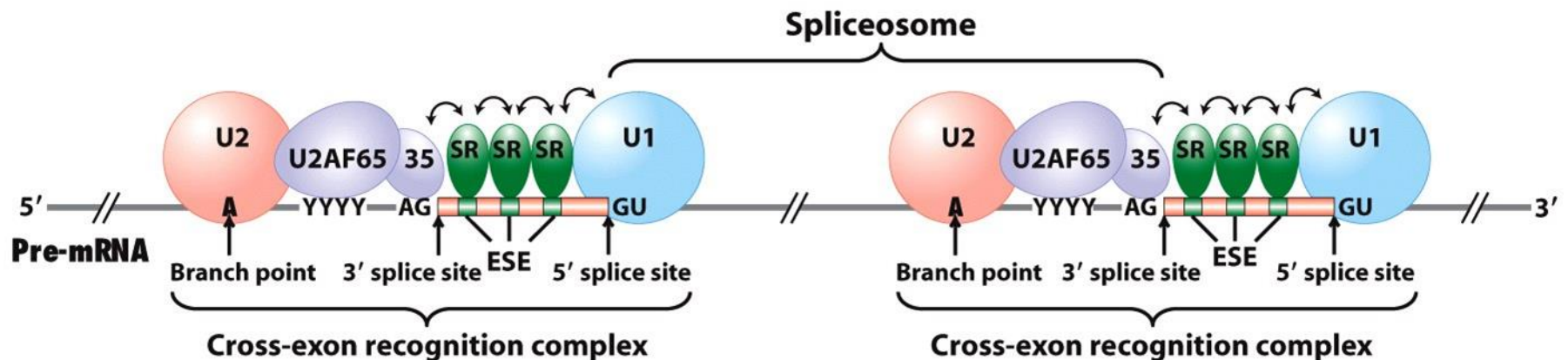


b pseudo splice-site selection



Kako povečati natančnost izbire spojitvenih mest?

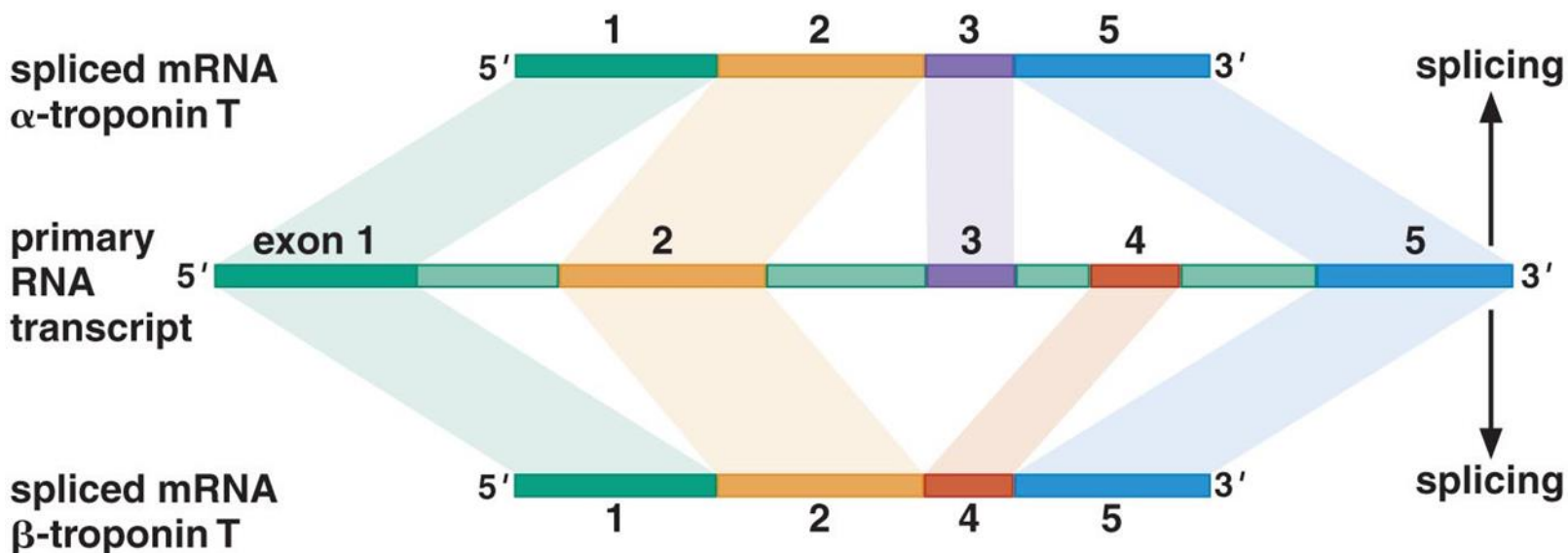
- Dva načina povečanja natančnosti:
 - 1) Kotranskripcijsko nalaganje: proteini, vezanimi na 5' mesto, interagirajo s proteini, ki se vežejo na naslednje 3' mesto.
 - 2) SR proteini se vežejo na ESE – eksonske ojačevalce izrezovanja in spajanja, in rekrutirajo podskupine spliceosoma. Zagotavljajo prepoznavanje najbližjih spojitvenih mest.
- SR proteini uravnava tudi alternativno izrezovanje in spajanje.



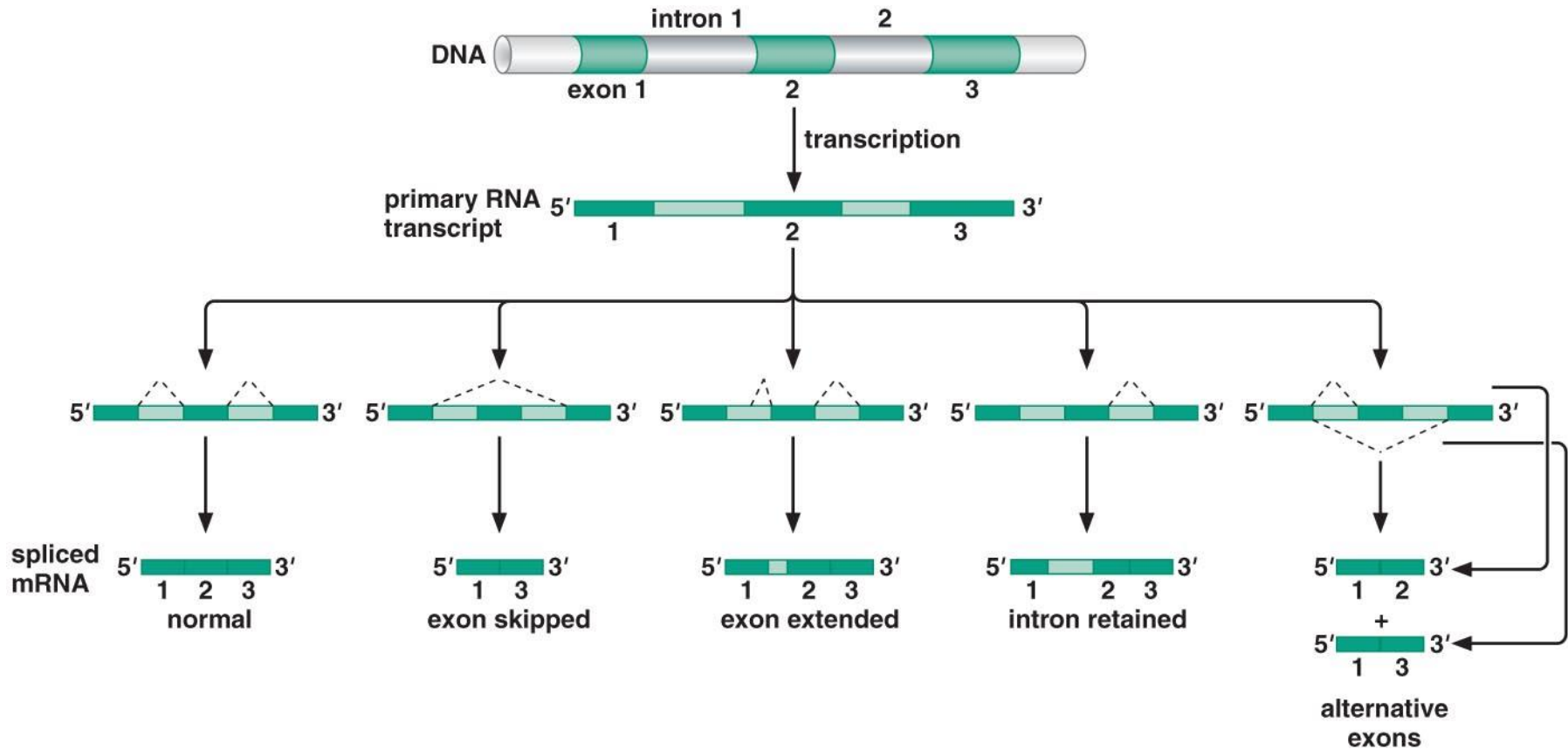
Alternativno izrezovanje in spajanje

Alternativno izrezovanje in spajanje

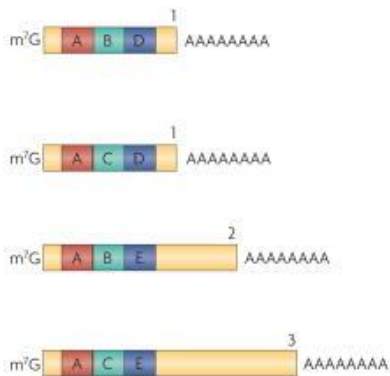
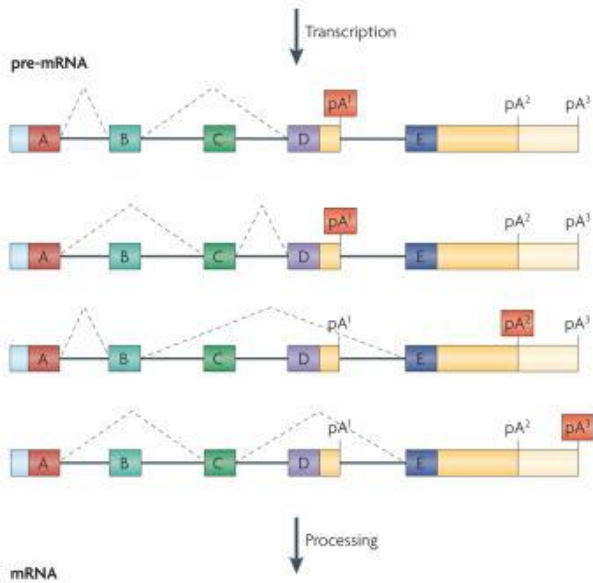
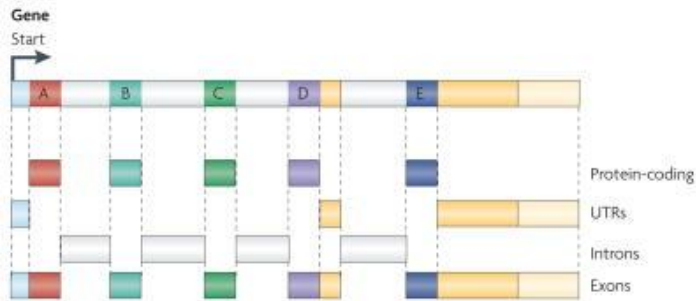
- Z alternativnim spajanjem lahko posamezni geni producirajo več proteinov.
- 75 % človeških genov ima več izooblik.
- Pri alternativnem izrezovanju in spajanju se preskočijo ali podaljšajo eksoni, obdržijo introni, izberejo alternativni eksoni.



Pet načinov izrezovanja in spajanja



Več različnih 3' koncev



- Različni C-terminalni deli proteina.
- Različno zaporedje/dolžina 3'UTR vpliva na:
 - Transport in lokalizacijo mRNA.
 - Razgradnjo mRNA.

Več različnih 3' koncev

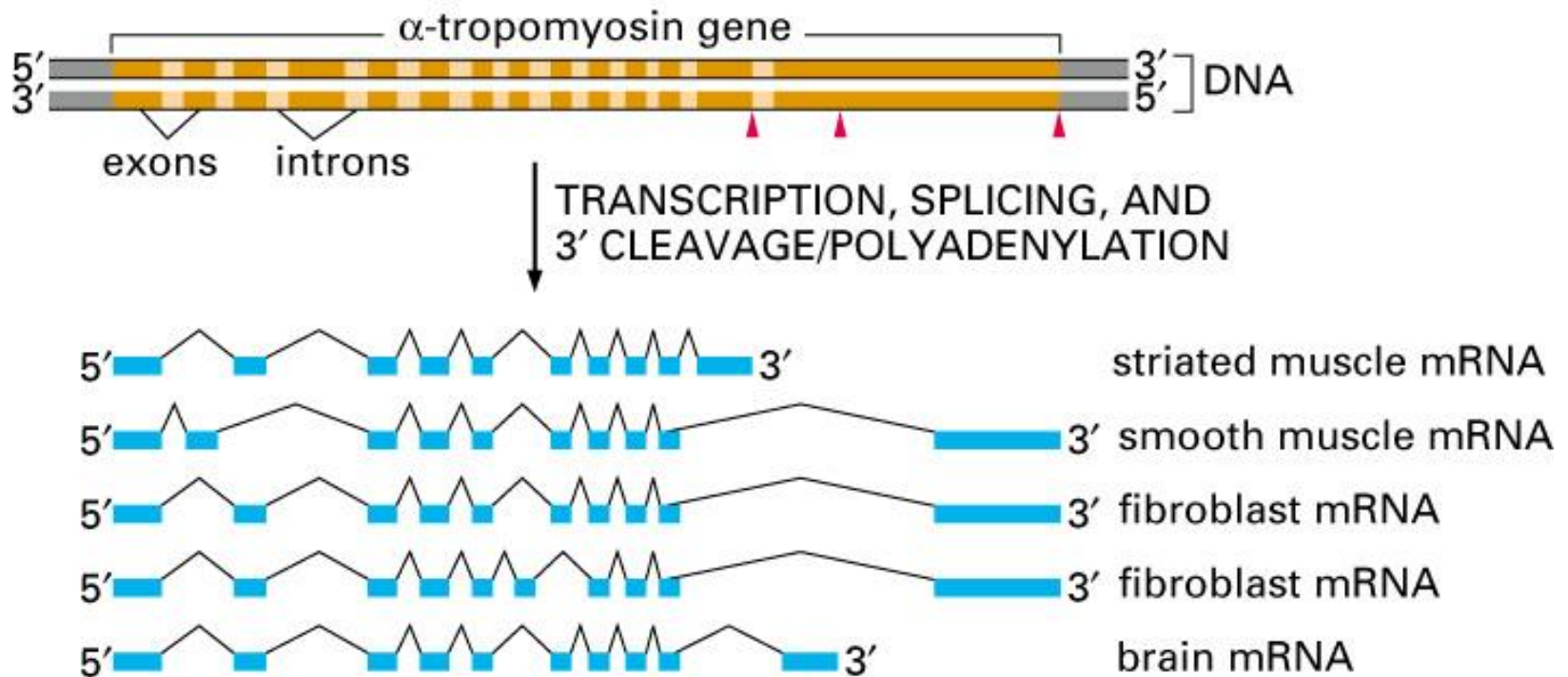


Figure 6-27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Alternativno izrezovanje in spajanje nevreksina-3

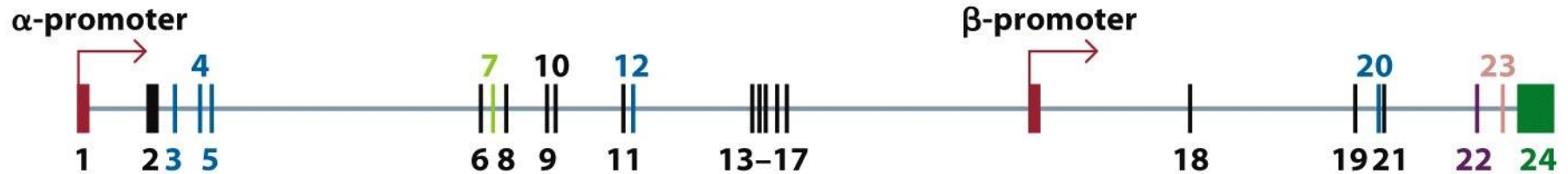


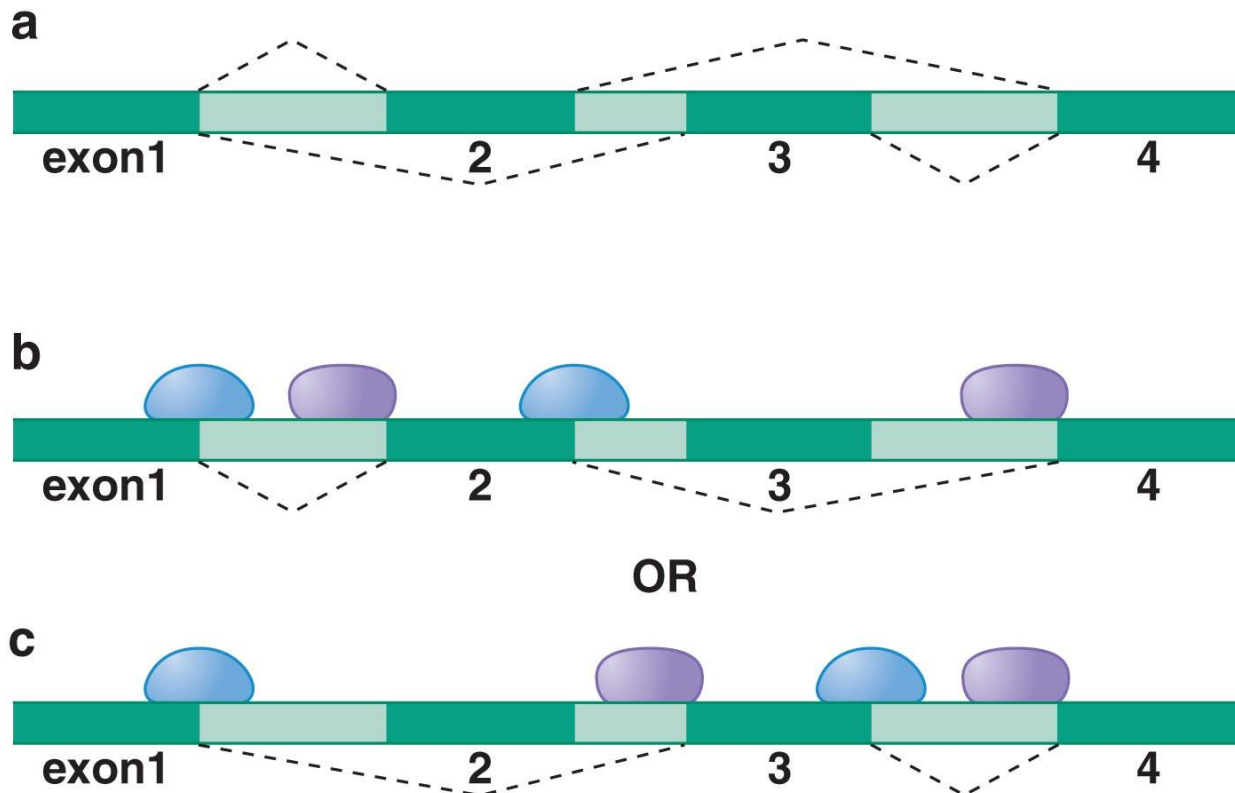
Figure 11.29 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

- Nevreksin-3 je pomemben v medcelični povezavi. Je tudi receptor in se nahaja v sinapsah.
- *NRXN3* gen ima dva promotorja.
- E3, 4, 5, 12 in 20 so lahko vključeni ali ne.
- E7 je lahko vključen z dveh alternativnih 5' spojitvenih mest ali je preskočen.
- E22 ima dve različni 3' spojitveni mesti.
- E23 ima dve različni 5' spojitveni mesti, ki imata različen bralni okvir. Pri enem pride do terminacije translacije v E23. Ta izooblika nima transmembranske in citoplazemske domene, ki jo kodira E24.
- E24 ima tri alternativna 5' spojitvenva mesta
- NASTANE LAHKO DO 1000 RAZLIČNIH PROTEINOV!!!!

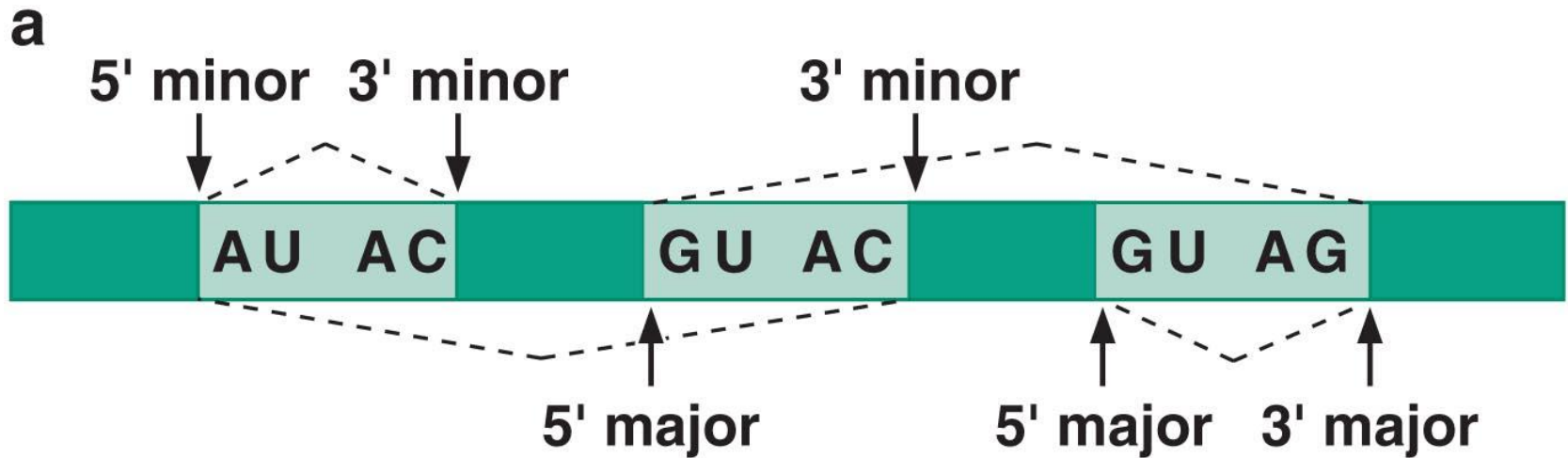
Mehanizmi, ki zagotavljajo medsebojno izključujoče spajanje

Najbolj pogosta oblika alternativnega spajanja je z alternativnimi eksoni.

Medsebojno izključujoče spajanje se lahko zgodi, ko sta spojitveni mesti znotraj introna preblizu. Nastanejo sterične ovire.



Kombinacija glavnih in stranskih spojitvenih mest

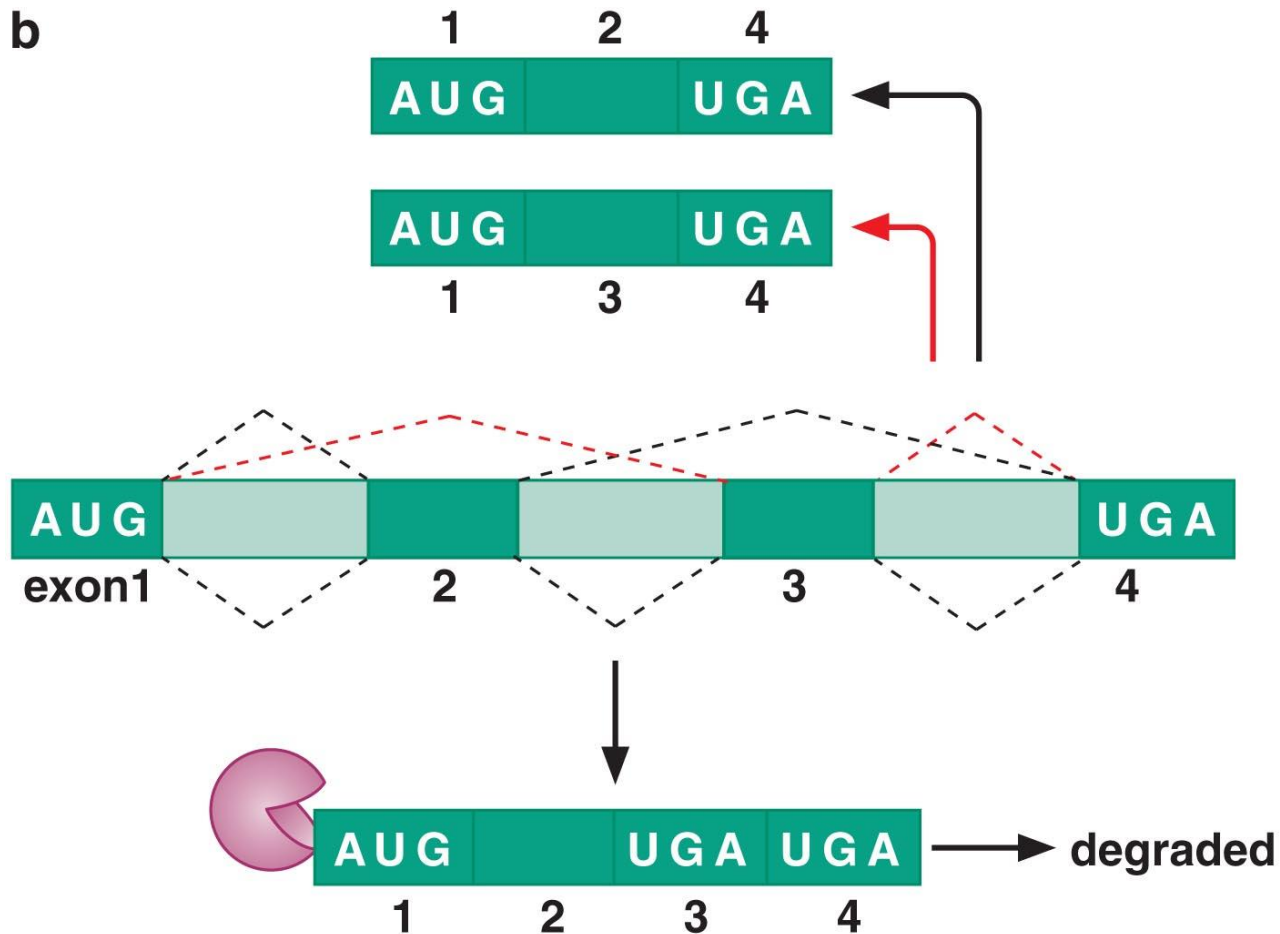


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Človeški JNK1 je primer takega tipa medsebojno izključenega spajanja.

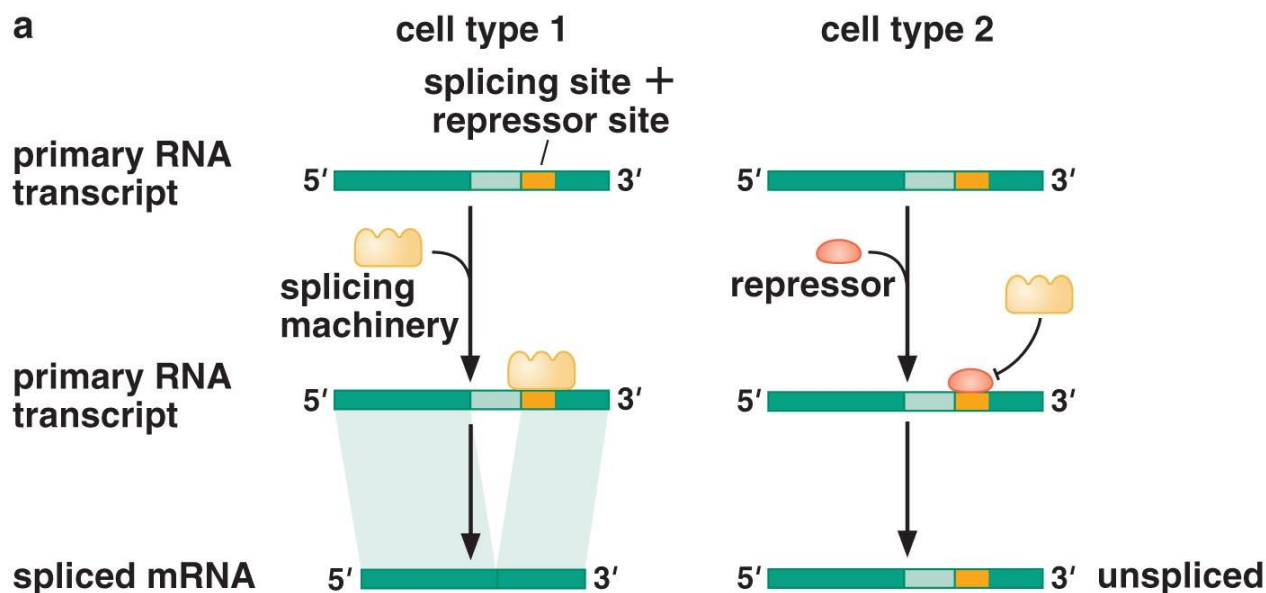
Nesmisleno voden razpad

‘Nonsense-mediated decay’ – razgradnja RNA, ki nosi prezgodnje stop kodone.
mRNA, ki imajo en ali drugi ekson (nikoli oba ali nobenega) preživijo NMD, ker nimajo prezgodnjega stop signala.

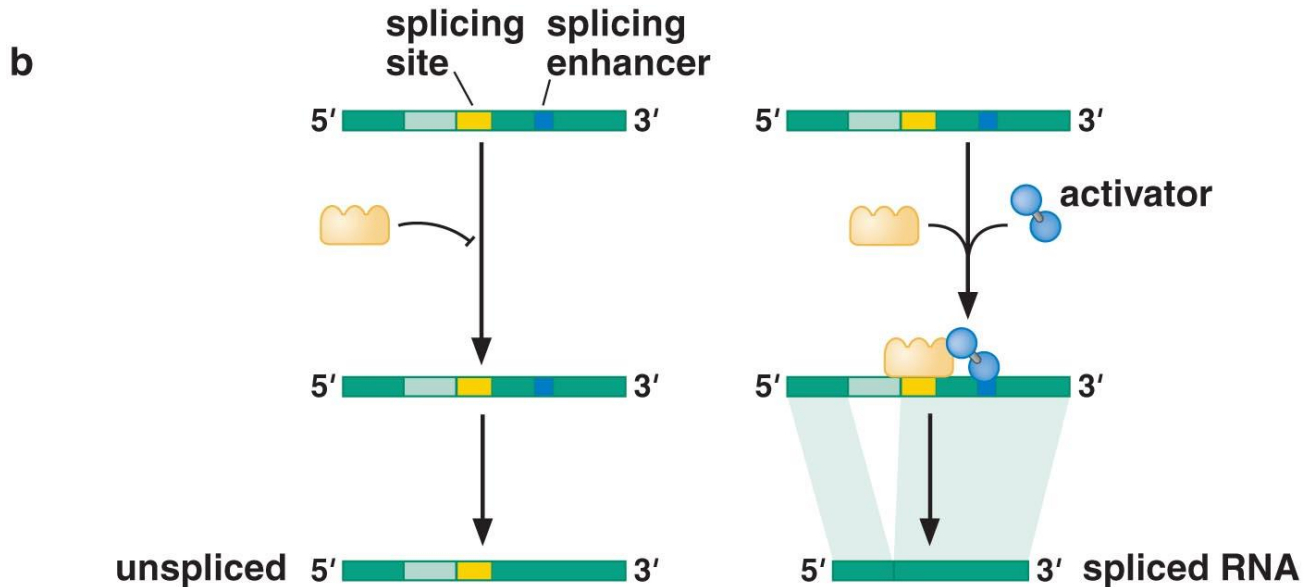


Alternativno izrezovanje in spajanje uravnavaajo aktivatorji in represorji

Spojivni dejavniki se vežejo na eksonske ali intronske ojačevalce (ESE ali ISE) ali utiševalce (ESS ali ISS).



Alternativno izrezovanje in spajanje uravnavajo aktivatorji in represorji



Aktivatorji in represorji

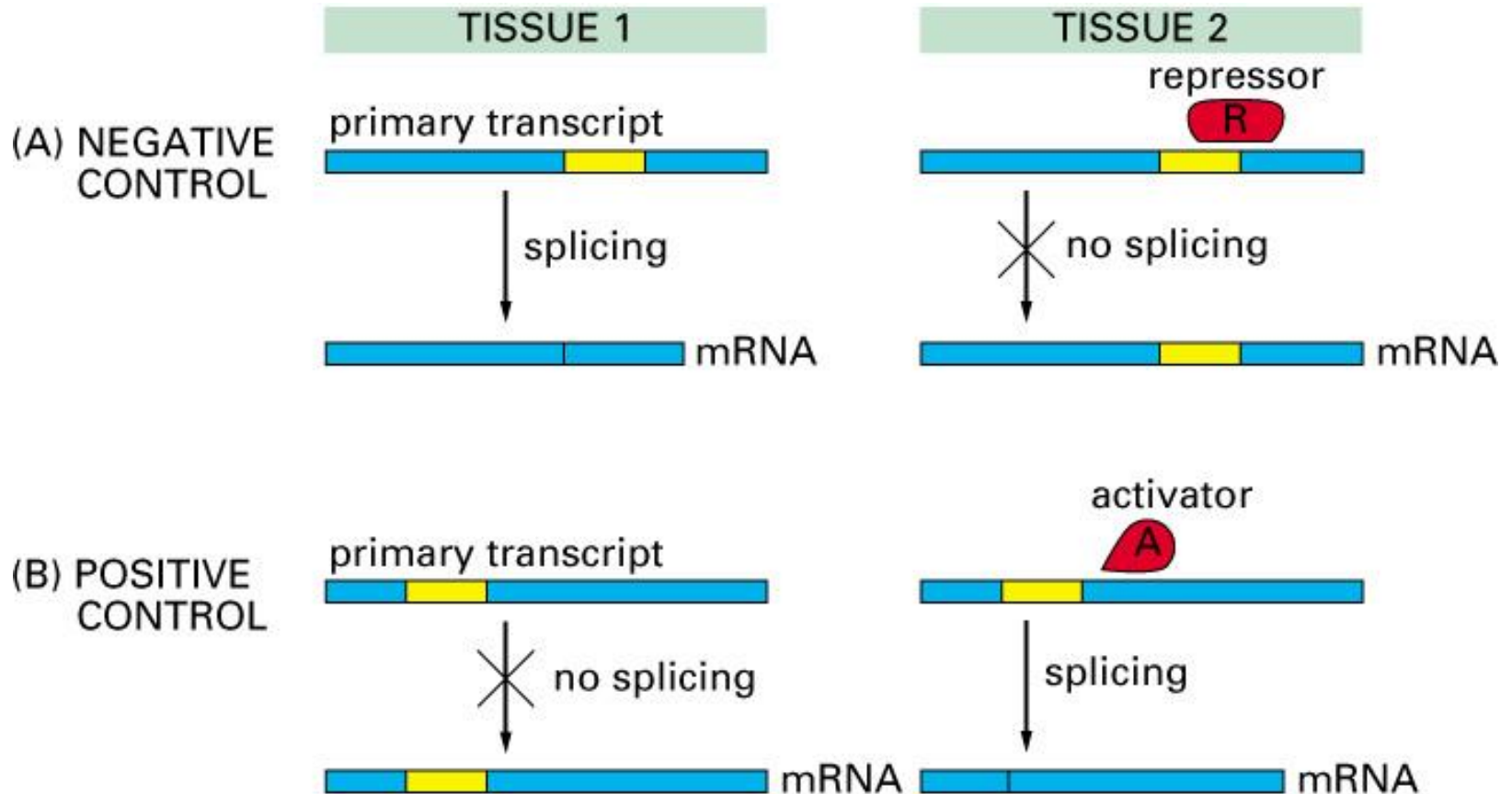


Figure 7-90. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Aktivatorji in represorji

SR proteini se vežejo na ojačevalce izrezovanja in spajanja.

Dve pomembni domeni:

1. RNA prepoznavna domena (RRM), ki veže RNA.
2. RS domena posreduje vezavo med SR proteinom in proteini v spliceosomu in pomaga pri rekrutaciji spliceosoma na spojitveno mesto v neposredni bližini.

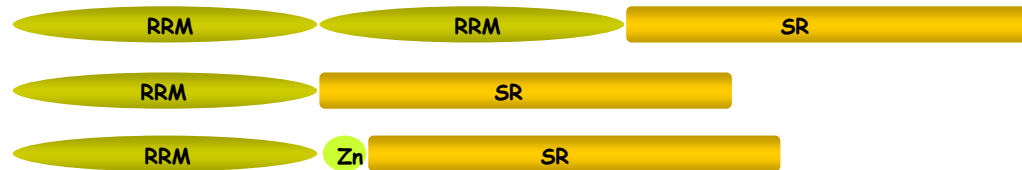
hnRNP proteini prepoznavajo utiševalce izrezovanja in spajanja.

Nimajo RS domen in blokirajo spojitvena mesta.

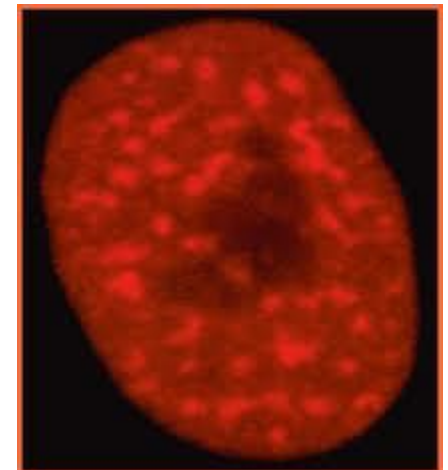
Npr. hnRNPA1 se veže na ESS ekson HIV TAT pre-mRNA. Blokira vezavo aktivatorja SC35 na ESE mesto v neposredni bližini.

Vendar, SF2/ASF lahko premaga to represijo, ker ima večjo afiniteto vezave v primerjavi s SC35.

SR proteini

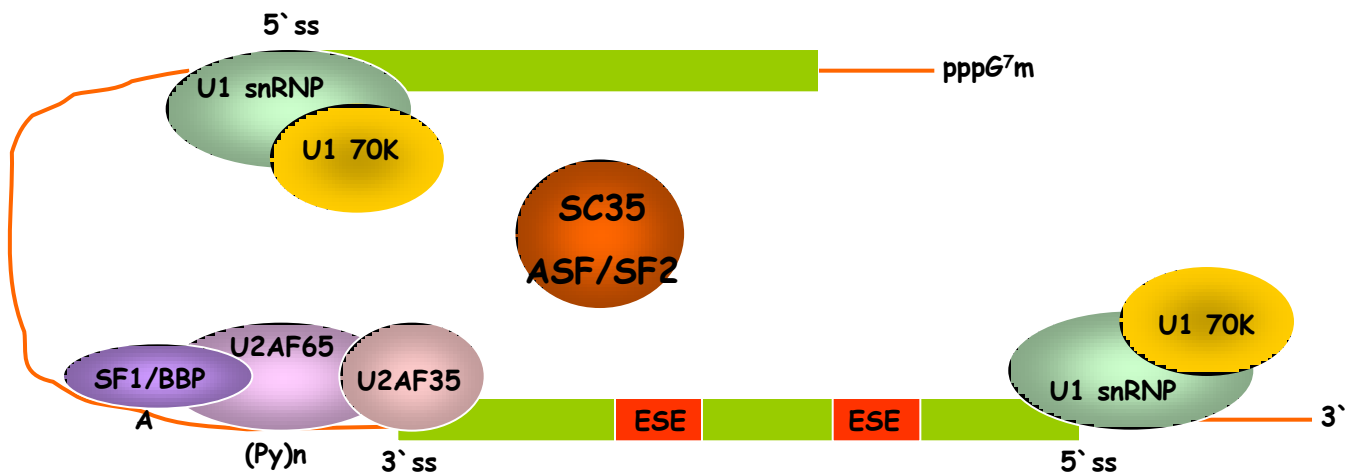


- Jedrni fosfoproteini, ki se nahajajo v jedrnih pikicah (‘nuclear speckles’).
- Fosforilacija uravnava njihovo znotrajcelično lokalizacijo ter protein-proteinske interakcije.

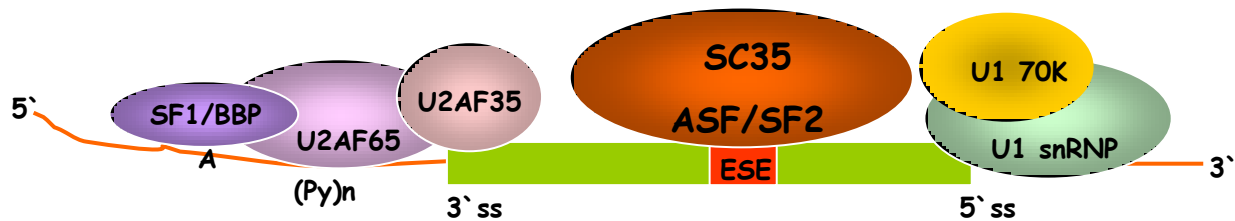


Izbira 5` in 3` spojivvenega mesta

Neodvisno od zaporedja



Odvistno od zaporedja



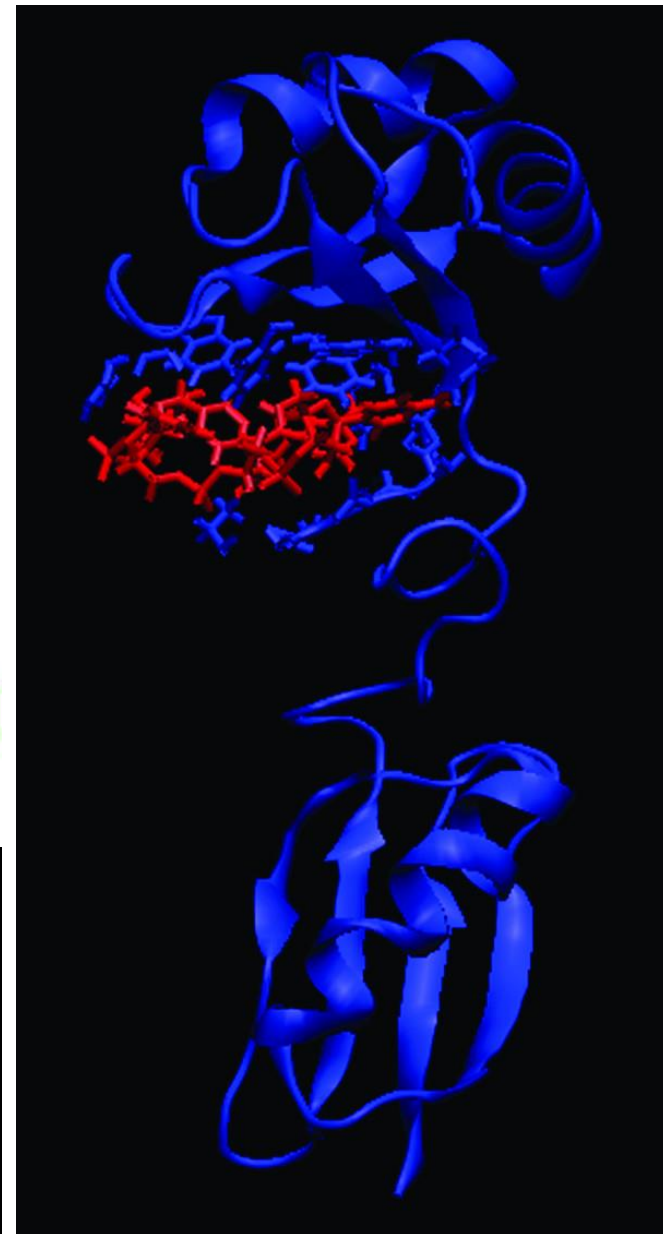
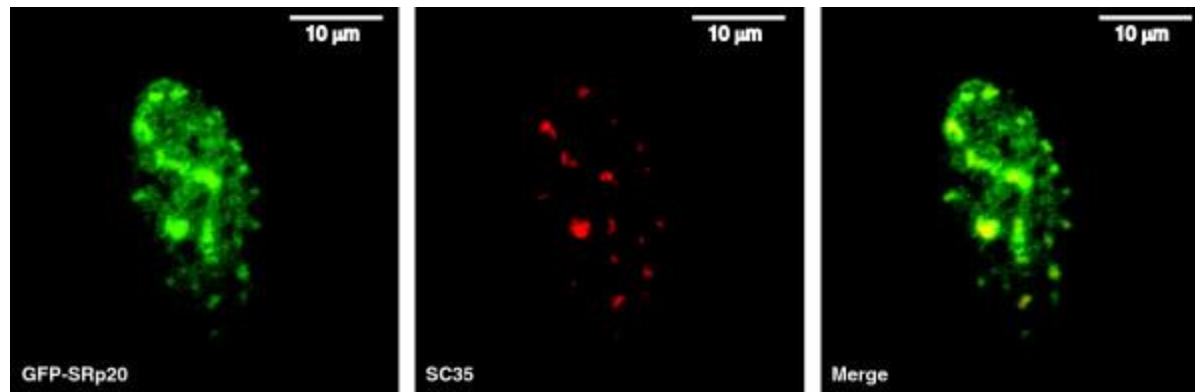
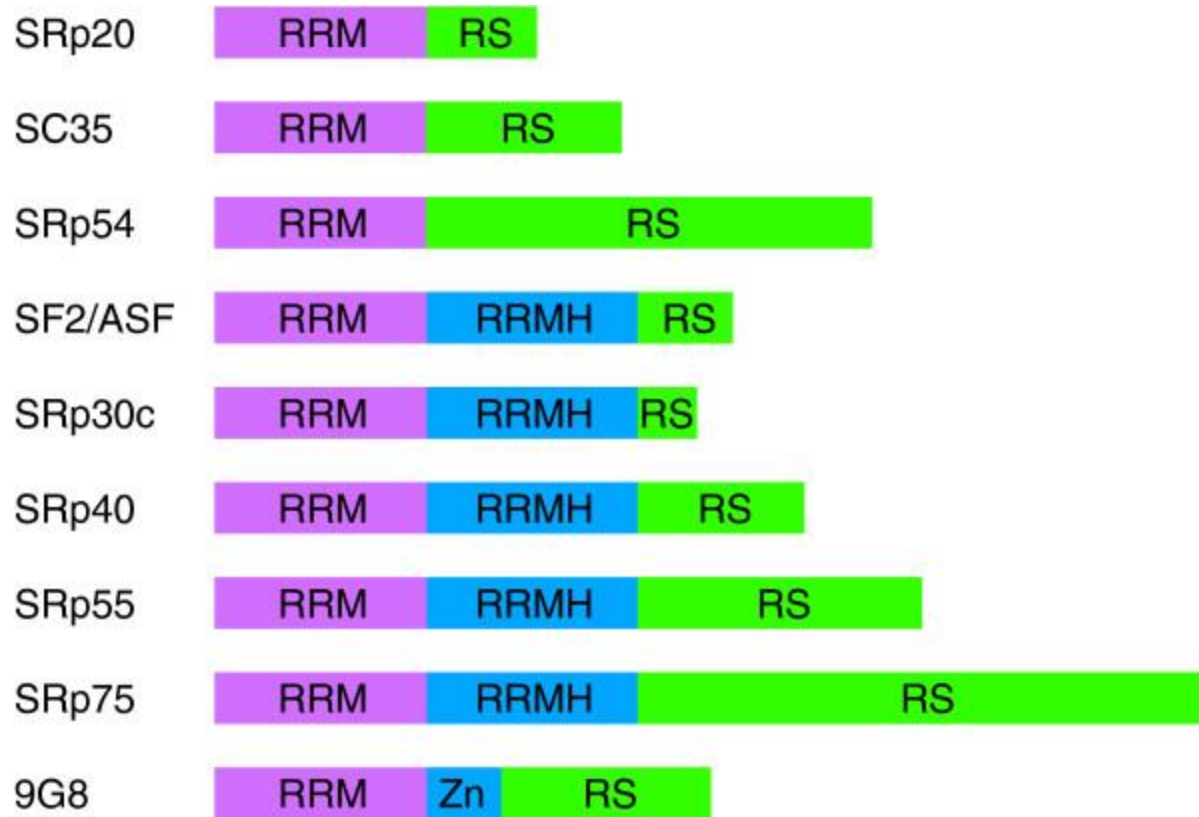
Rekrutiranje U2AF



SR protein se veže na ESE in pomaga pri vezavi U2AF na Py zaporedje. Pride do aktivacije sosednjega 3' spojitvenega mesta.

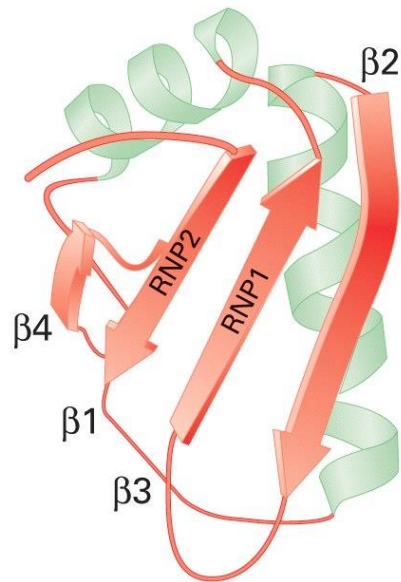
Proces je posredovan z interakcijo RS domene SR proteina z malo podenoto U2AF - U2AF35.

Človeški SR proteini

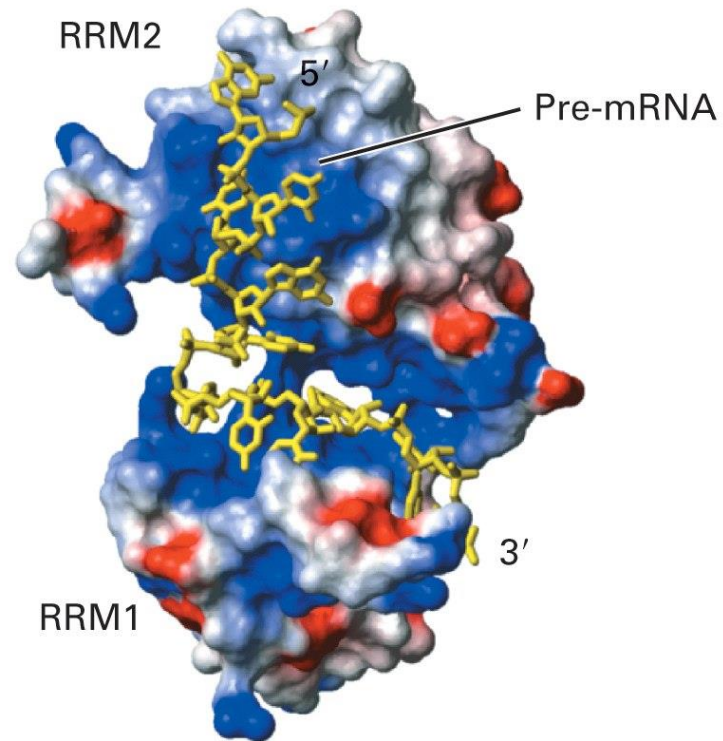


3D structure RRM domen

(a) RNA recognition motif (RRM)

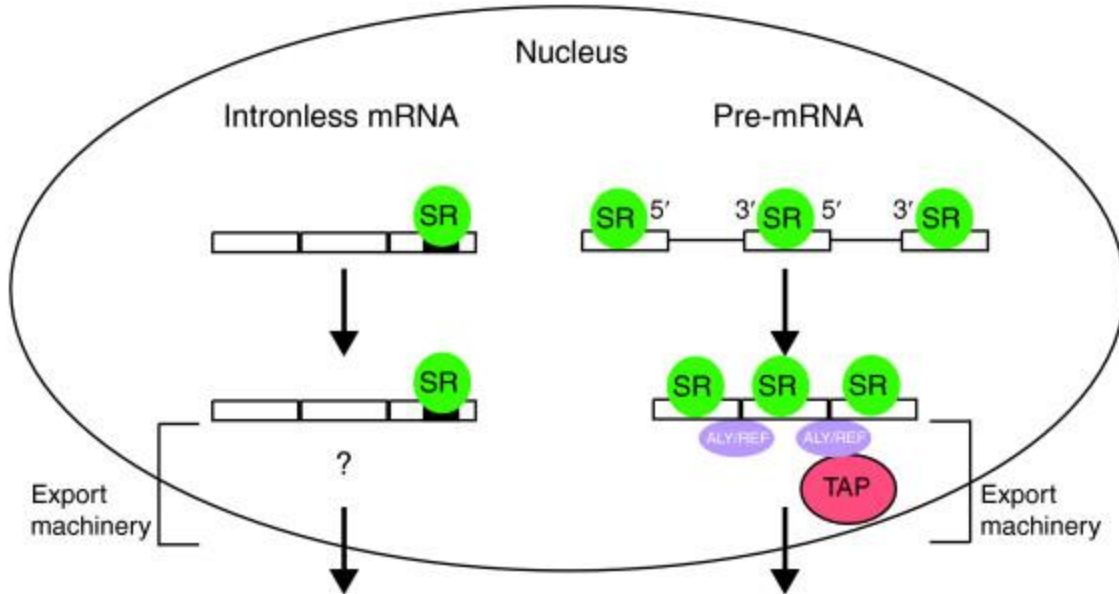


(b) Sex-lethal RRM domains



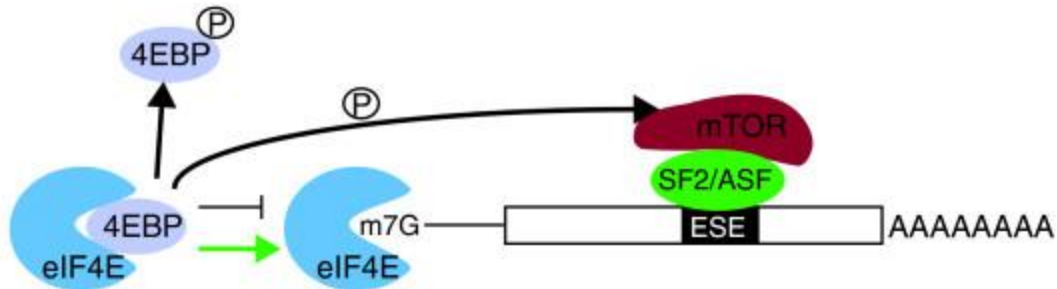
Druge funkcije SR proteinov

(a)



- Izvoz mRNA iz jedra.

(b)



- Inicijacija translacije.

Heterogeni jedrni ribonukleoproteini (hnRNP)

- Novo nastale RNA v jedru so obdane s številnimi proteini.
- hnRNPji onemogočijo nastajanje sekundarnih struktur znotraj pre-mRNA.
- hnRNP proteini so multidomenski. Imajo eno ali več RNA vezavnih domen in vsaj eno domeno za interakcijo z drugimi proteini.
- Dve najbolj pogosti domeni sta RRM ter RGG box (pet Arg-Gly-Gly ponovitev z vmesnimi aromatičnimi aminokislinami).

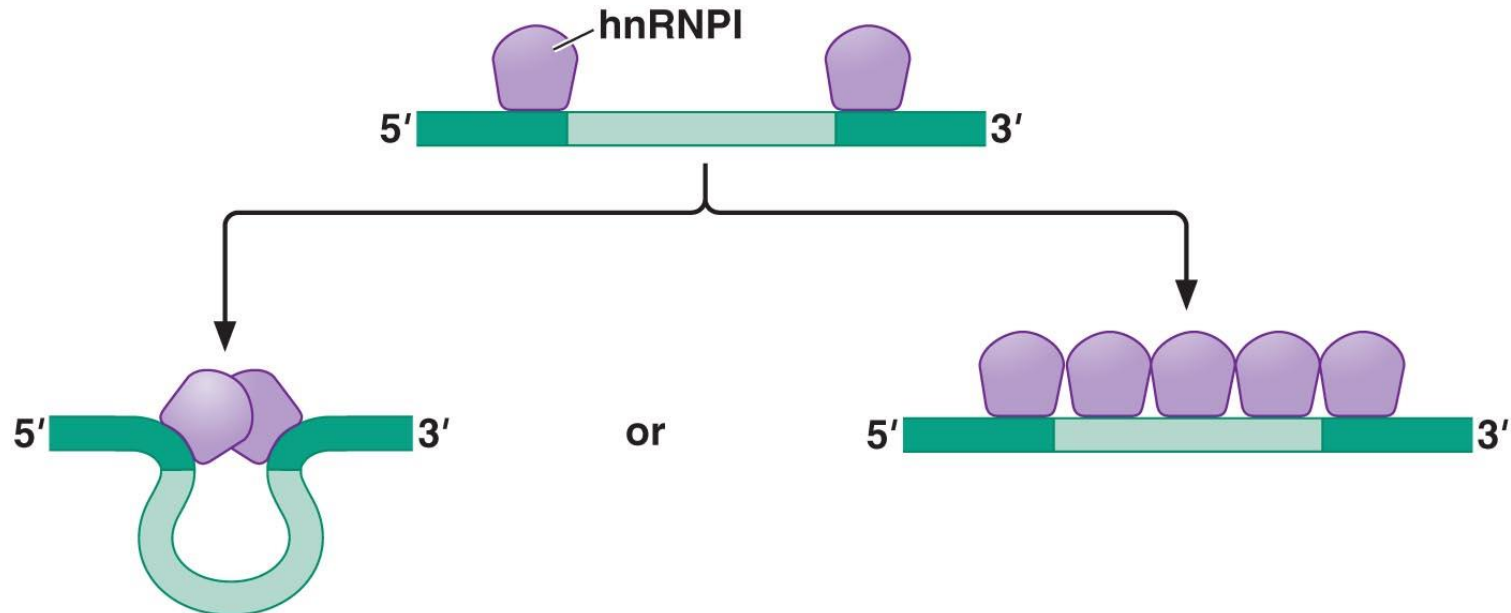
TABLE 1. Major hnRNP proteins

Protein	Molecular weight (kDa)	Domain/functional motif	Preferred binding sequence	Reported function	Shuttling capacity
A1	34	2X RBD, RGG	UAGGG(AU)	Splicing Export Telomere biogenesis	+
A2/B1	36/38	2X RBD, RGG	(UUAGGG) _N	Splicing Localization	+
C1/C2	41/43	1X RBD	U6	Splicing Stability	–
D (AUF)	44–48	2X RBD, RGG	AU rich	Telomere biogenesis Stability Recombination	+
E1/E2/E3/E4 (αCP1-4 or PCBP1-4)	38, 39	3X KH	C rich	Stability Translation	+
F	53	3X RBD	GGGA	Splicing	Not known
G	43	1X RBD, RGG	CC(A/C)	Splicing	–
H/H' (DSEF-1)	56	3X RBD	GGGA	Splicing Polyadenylation	Not known
I (PTB)	59	4X RBD	UCUUC	Splicing Localization Polyadenylation	+
K/J	62	3X KH, RGG	C rich	Transcription Stability Translation	+
L	68	4X RBD	CA repeat	Export Stability Riboswitch	Not known
M	68	4X RBD	G or U rich	Splicing	+
P2(FUS/TLS)	72	RBD	GGUG	Avid binding to poly(A) Autoantibody target	+
Q1NSAP	55–70	3X RBD, RGG	GAIT element	Splicing Translation	+
R1/R2	82	RBD	Not known	Retinal development	+
U	120	RGG	Not known	Nuclear retention	–

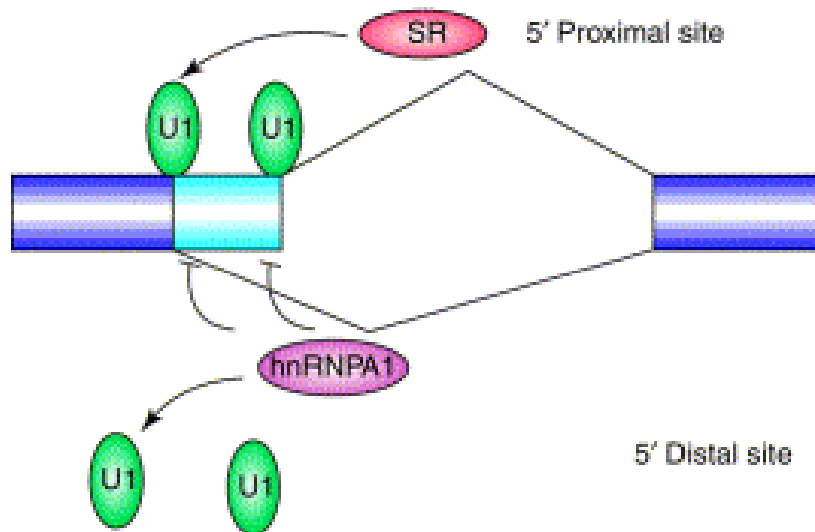
Alternative names have been included in parentheses. RBD, RNA-binding domain or RNA recognition motif (RRM); RGG, arginine/glycine-rich box; KH-K homology domain; EJC, exon junction complex; GAIT, interferon- γ -activated inhibitor of translation. Molecular mass (kDa) has been determined from SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Pinol-Roma et al. 1988; Dreyfuss et al. 1993, 2002; Hassfeld et al. 1998; Krecic and Swanson 1999; Guil et al. 2003; Singh and Valcarcel 2005; Hovhannisyan and Carstens 2007; Heinrich et al. 2009; Ray et al. 2009; Anderson 2010).

Represija izrezovanja in spajanja s hnRNP I (PTB)

- 4 RRM, 3 izooblike
- hnRNPI se veže na Py zaporedje (PTB) in inhibira vezavo spojitvenega telesca.
- V drugih primerih izključi ekson z mehanizmom z zanko ali tako, da pokrije ves ekson s kooperativno vezavo.

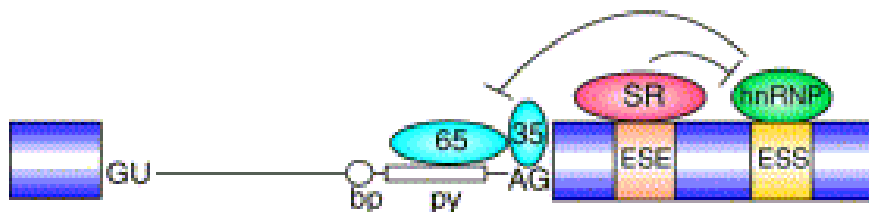


Funkcionalni antagonizem SF2/ASF in hnRNP A1 pri izbiri spojitvenega mesta I



- Presežek hnRNP A1 pogojuje uporabo distalnega 5' spojitvenega mesta.
- Mehanizem:
 - SF2/ASF ovira vezavo hnRNP A1 in ojača vezavo U1 snRNP na obeh 5' sm.
 - Simultana zasedba obeh 5' sm pripelje do selekcije proksimalne 5'sm
 - hnRNP A1 se kooperativno veže na pre-mRNA in moti vezavo U1 snRNP na obeh mestih. Uporablja se distalno 5' spojitveno mesto.

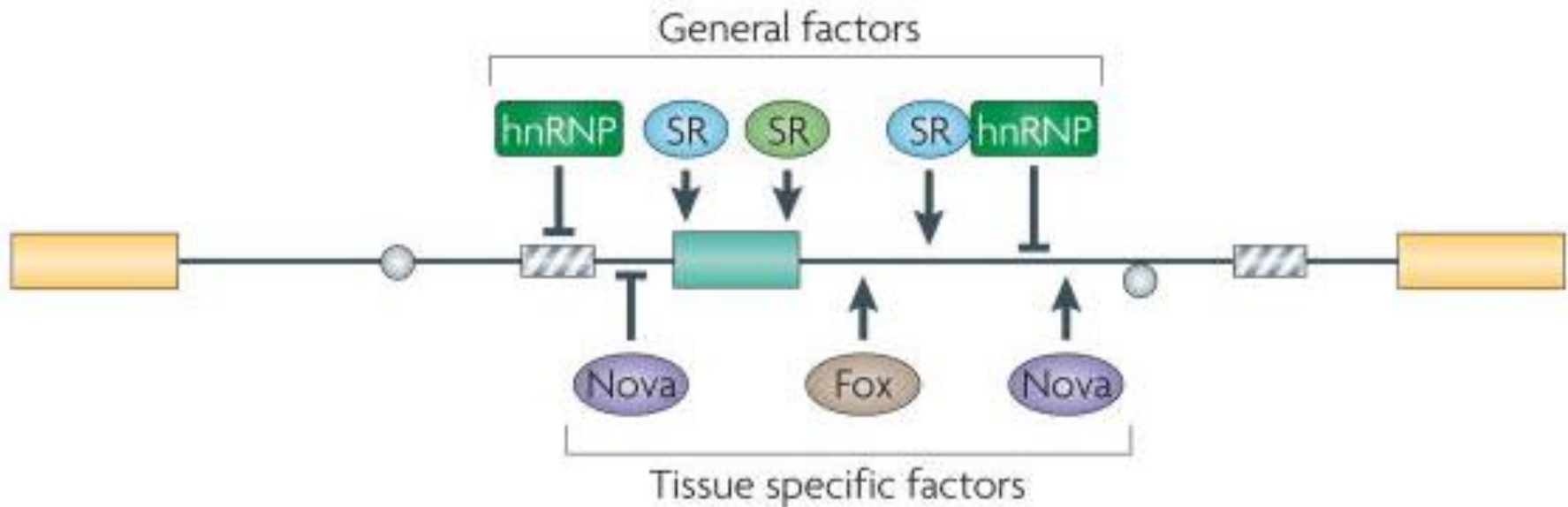
Funkcionalni antagonizem SF2/ASF in hnRNP A1 pri izbiri spojitvenega mesta II



- Ojačevalci spajanja lahko zmanjšajo negativno aktivnost hnRNP, ki je vezan na ESS.
- SR protein se veže na ESE, hnRNP A1 pa na ESS.
- Prvotna vezava RNP A1 na utiševalec povzroča dodatno vezavo hnRNP A1 v zgornjem zaporedju eksona. Vezava SF2/ASF na ESE prepreči vezavo hnRNP A1.
- SC35 ne upliva na vezavo hnRNP A1.

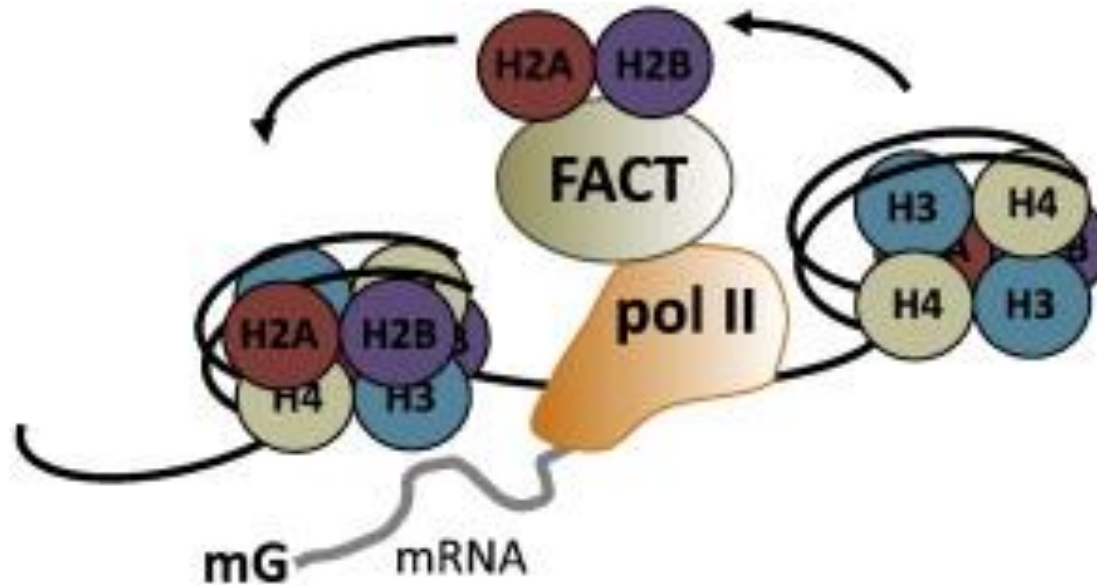
Dodatni dejavniki, ki vplivajo na izrezovanje in spajanje

b Splicing regulation through combinations of auxiliary factors



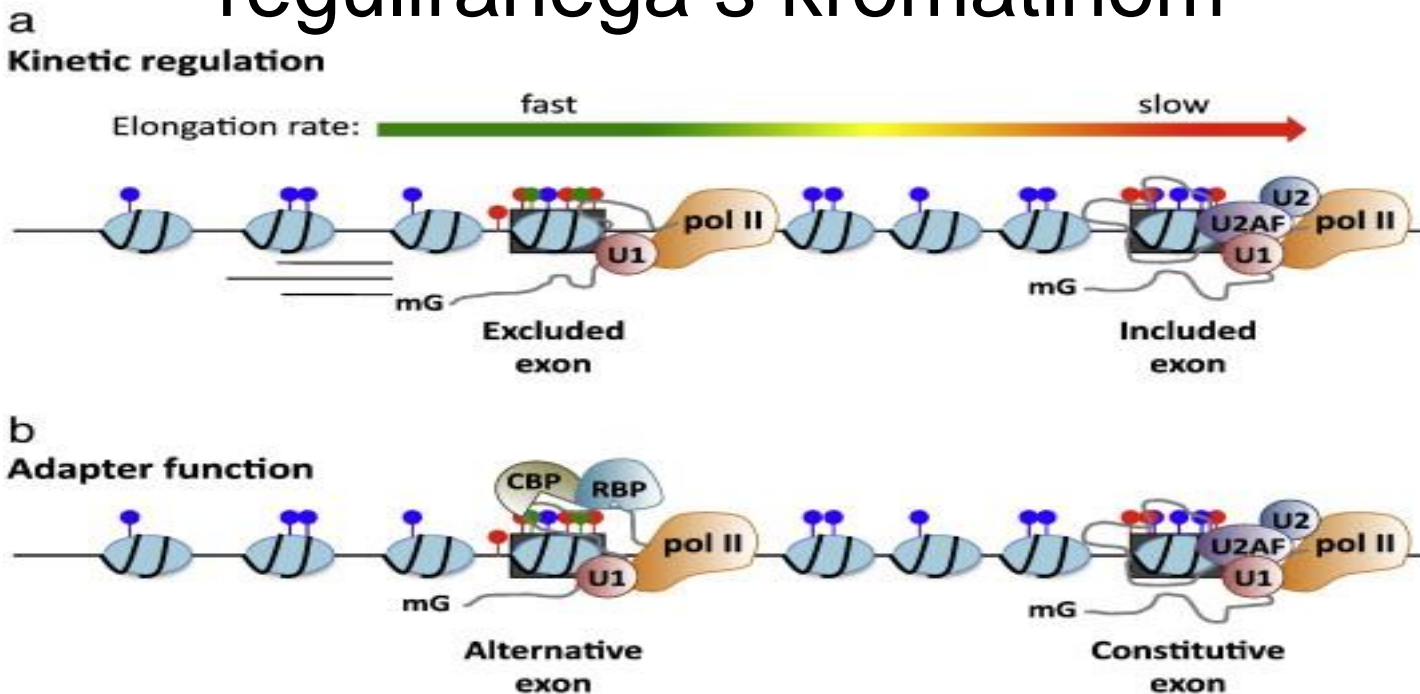
- **FOX** („Forkhead box“) proteini so družina transkripcijskih faktorjev, ki imajo vlogo pri uravnavanju celične rasti, delitvi in dolgoživosti.
- **Nova** („Neuro-oncological ventral antigen“) družina proteinov. Nova proteine prepoznajo paraneoplastična protitelesa, ki jih najdemo v serumih bolnikov s paraneoplastičnim opsoklonusom-ataksijo in določenih rakih.

Kotranskripcijska regulacija alternativnega spajanja pre-mRNA



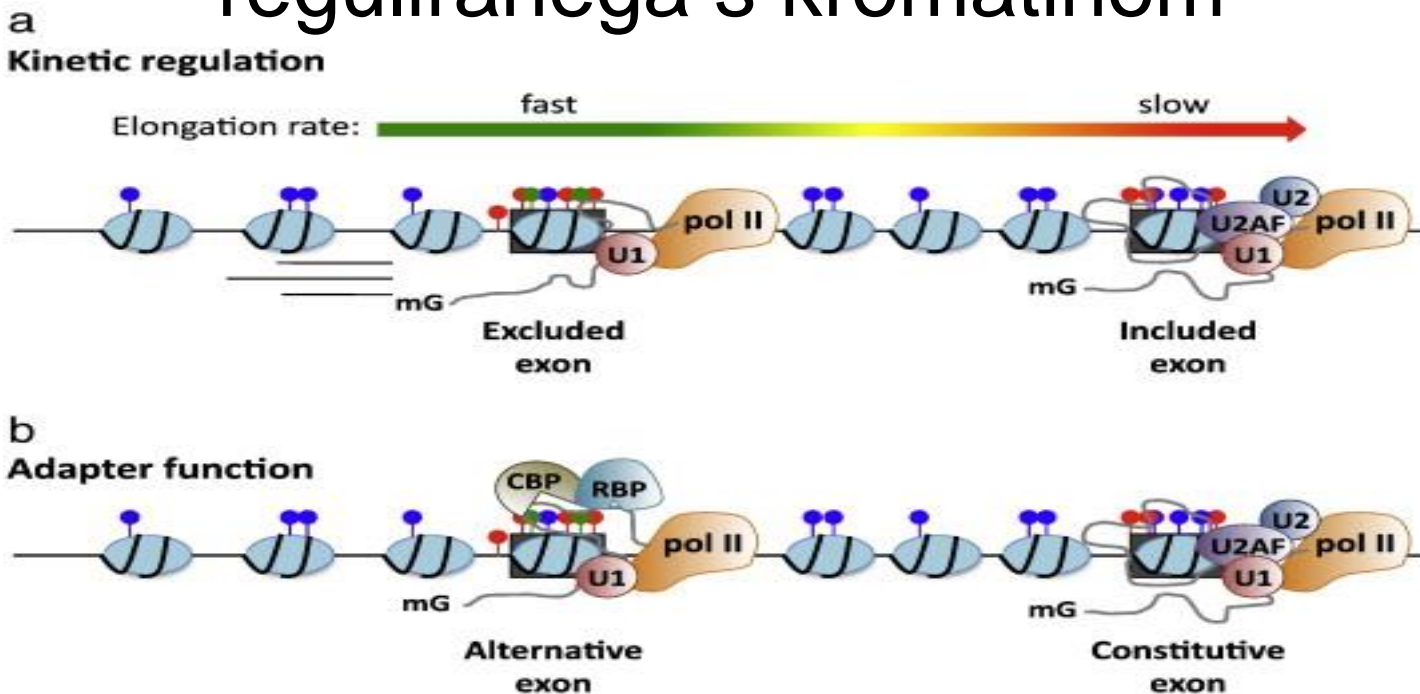
- Prihaja do kotranskripcijskega remodeliranja nukleosomov, ker je veriga nukleosomov ovira elongaciji s pol II.
 - 1) Fosforilacija serina 2 na CTD pol II rekrutira histonski šaperon FACT.
 - 2) Z odstranitvijo enega H2A/H2B dimera FACT destabilizira nukleosome pred pol II.
 - 3) FACT tudi prepreči prikrito transkripcijo, s tem da prenese histonski dimer za pol II ter podpira ponovno sestavljanje nukleosoma.

Mehanizma sestave spliceosomov, reguliranega s kromatinom



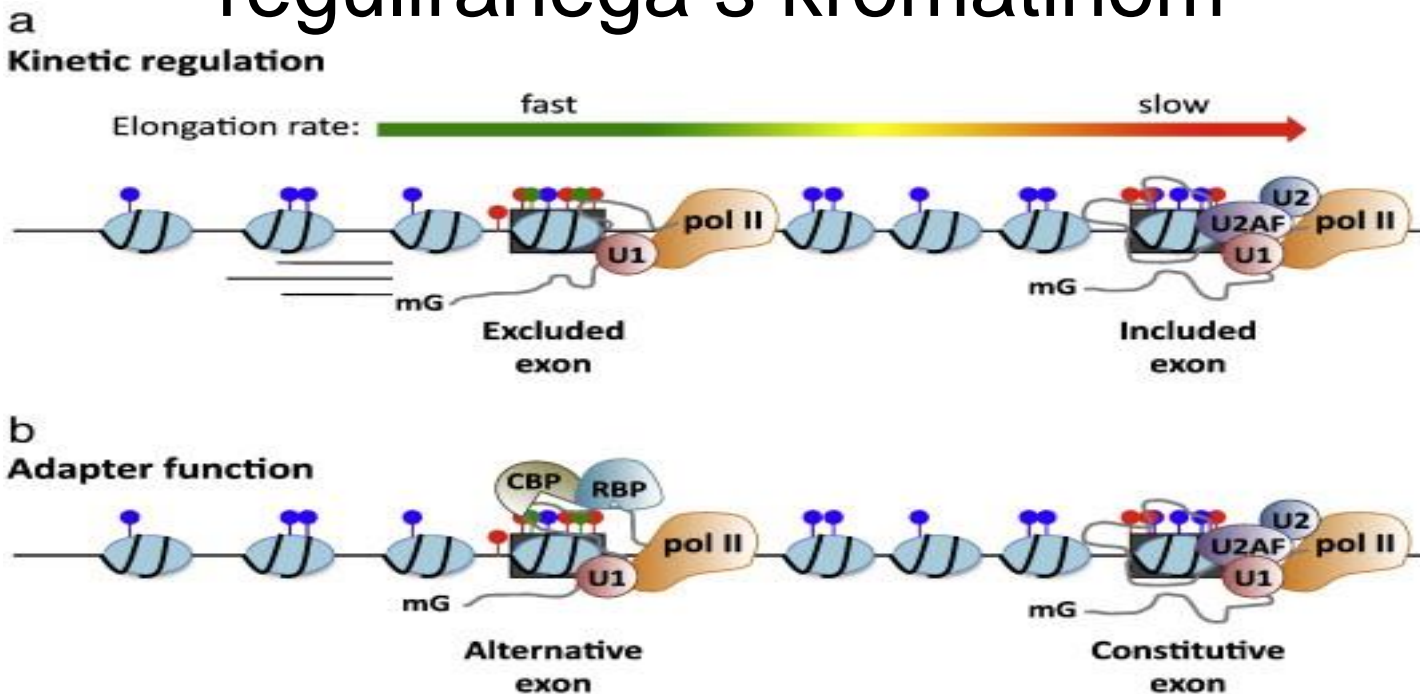
- Eksoni so v primerjavi z introni bolj zasedeni z nukleosomi, imajo več posebnih modifikacij histonov in bolj metilirano DNA.
- Te modifikacije lahko vplivajo na izbiro mesta izrezovanja z uravnavanjem elongacije (a) ali z direktnim rekrutiranjem pomožnih dejavnikov (b).

Mehanizma sestave spliceosomov, reguliranega s kromatinom



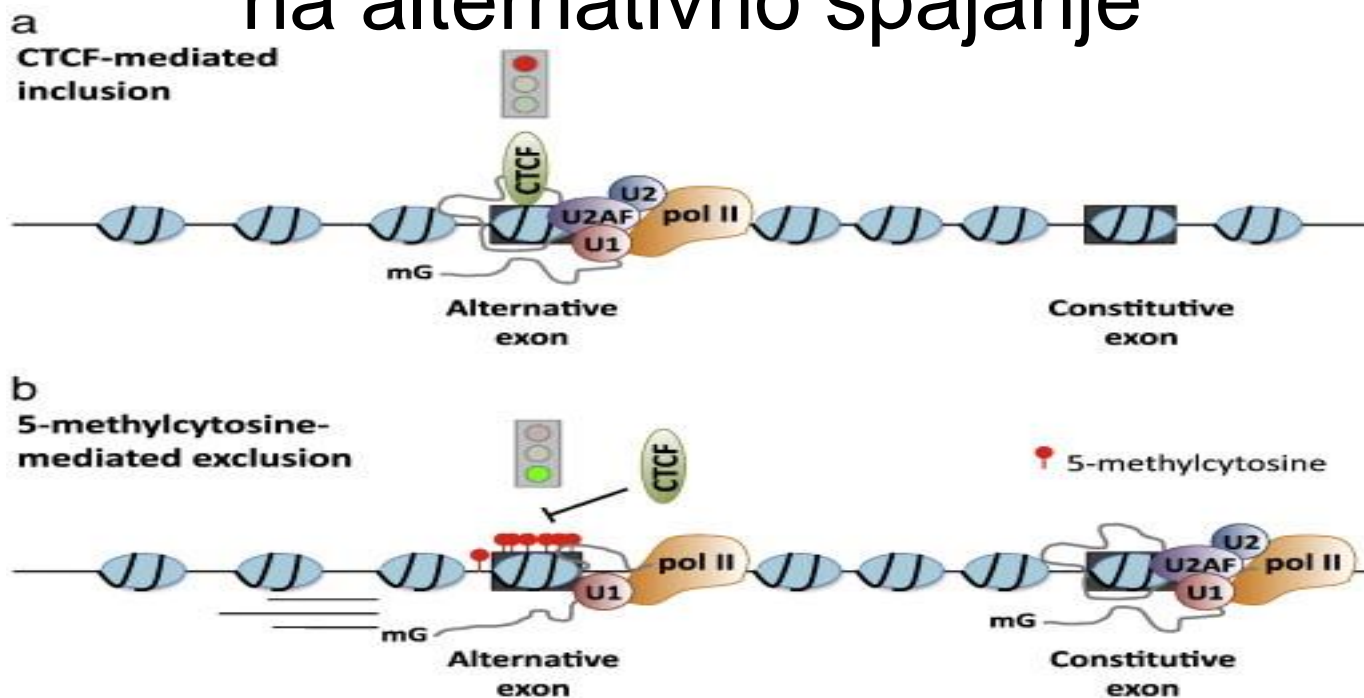
- Kinetična regulacija (a). Počasna elongacija daje prednost sestavljanju spliceosomalnega kompleksa pri ‚šibkih‘ eksonih.
- Nasprotno, hitra elongacija, najbrž ne dopusti zadosti prostora in časa, ker pride do tvorbe konkurenčnega spojitvenega mesta.
- Struktura intergenskega kromatina lahko modulira lokalno hitrost elongacije. V sliki (a) je zgornji ekson izključen zaradi hitre elongacije in posledičnega prenosa sestavljanja spliceosomalnega kompleksa na spodnji ekson.

Mehanizma sestave spliceosomov, reguliranega s kromatinom



- Regulacija z adapterji (b).
- Modifikacije kromatina lahko na eksonsko DNA rekrutirajo proteine, ki vežejo kromatin (CBP – ‚chromatin binding proteins‘).
- CBP-ji nato vežejo RBP-je (‚RNA binding proteins‘), ki podpirajo ali ovirajo sestavljanje spliceosoma.
- Slika (b) prikazuje vezavo CBP na zgornji ekson, rekrutacijo RBP represorja in posledično prenos sestavljanja spliceosomalnega kompleksa na spodnji ekson.

Nasprotujoči vpliv CTCF in 5-metilcitozina na alternativno spajanje



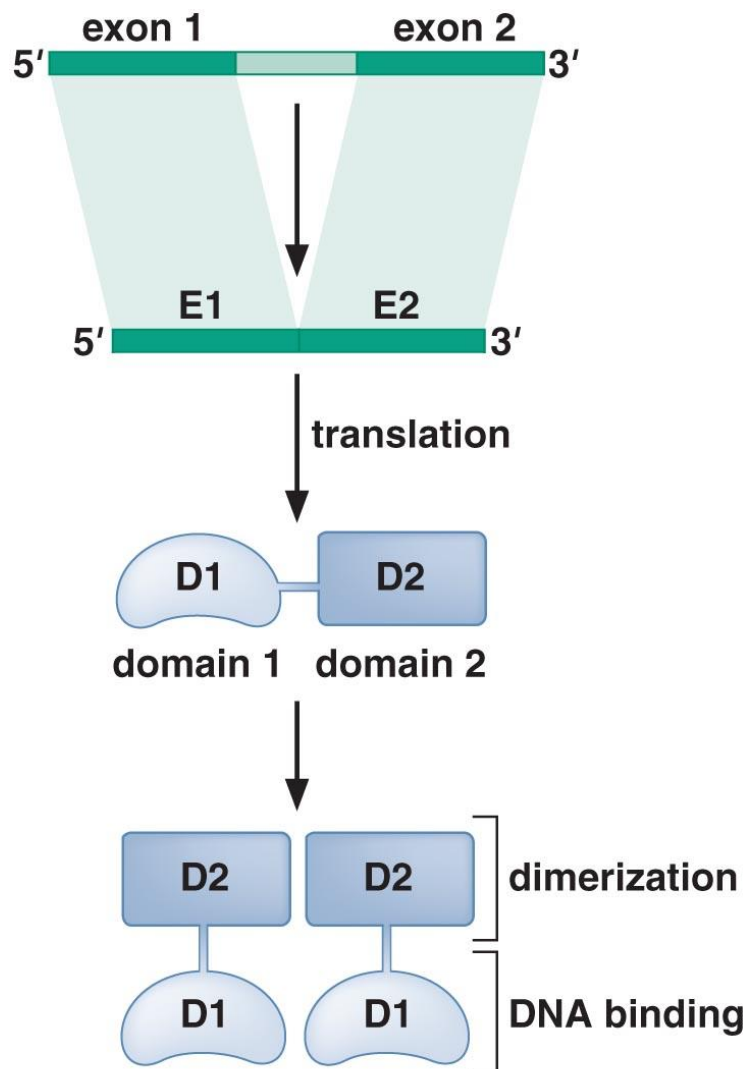
- Intragensko vezani CTCF in 5-metilcitozin nasprotno vplivata na vključitev eksonov pri kotranskripcijskem splicingu pre-mRNA.

(a) CTCF deluje kot ovira pol II ter povzroča ustavljanje elongacije. Omogoča sestavljanje spliceosoma na šibkem zgornjem spojitvenem mestu.

(b) Metilacija DNA inhibira vezavo CTCF.

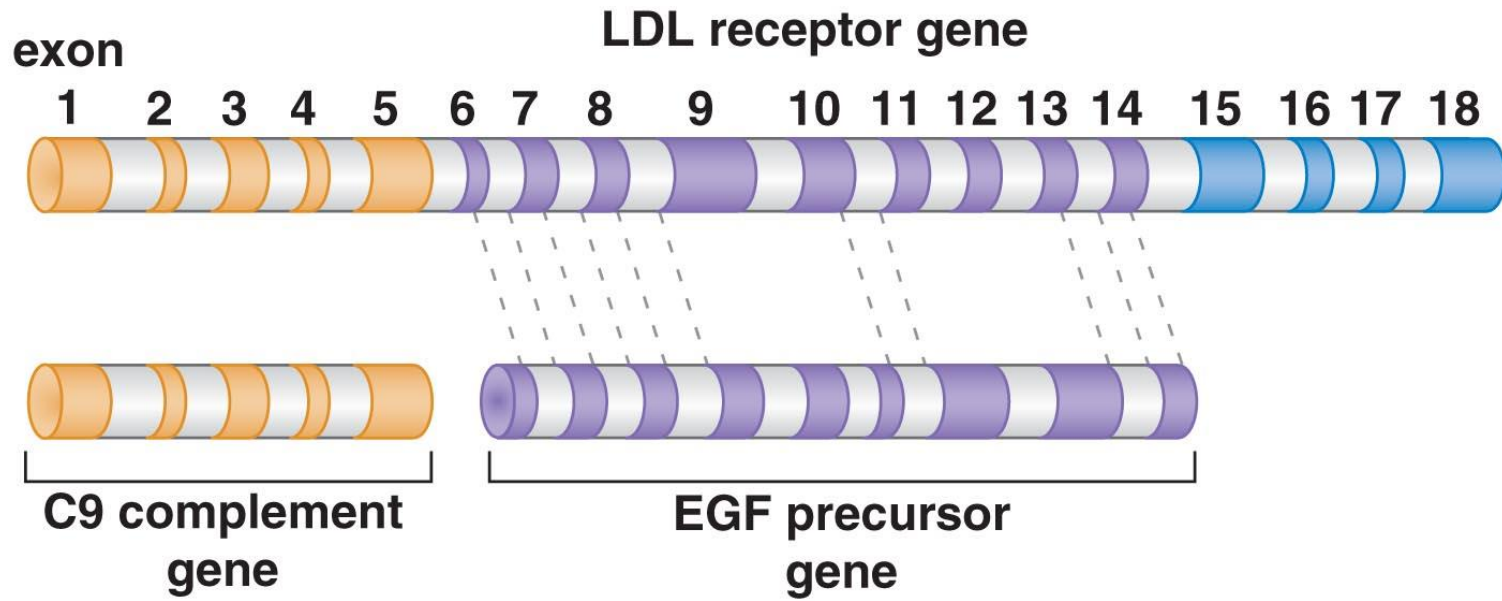
Premeščanje eksonov

- Dve teoriji o nastanku intronov:
 1. Pri modelu zgodnjih intronov, so introni prvotno obstajali pri vseh organizmih, vendar so jih bakterije izgubile zaradi pritiska povečane hitrosti delitve.
 2. Pri modelu poznih intronov, so introni nastali kasneje in se razširili s transpozonskim mehanizmom.
- Kakšne so prednosti obstoja intronov ter izrezovanja in spajanja?
 - Alternativno spajanje tvori več proteinov iz enega gena.
 - S premeščanjem eksonov lahko nastanejo novi geni.
- S rekombinacijo pride do premeščanja eksonov in tvorbe novih proteinov.
 1. Posamezni eksoni pogosto kodirajo eno celotno podenoto.
 2. Mnogo genov je nastalo skozi duplikacijo eksonov in širjenjem raznolikosti.



3. Sorodne eksone lahko najdemo v nesorodnih genih.

Podvojeni ekseni se ponovno uporabijo v novih genih.

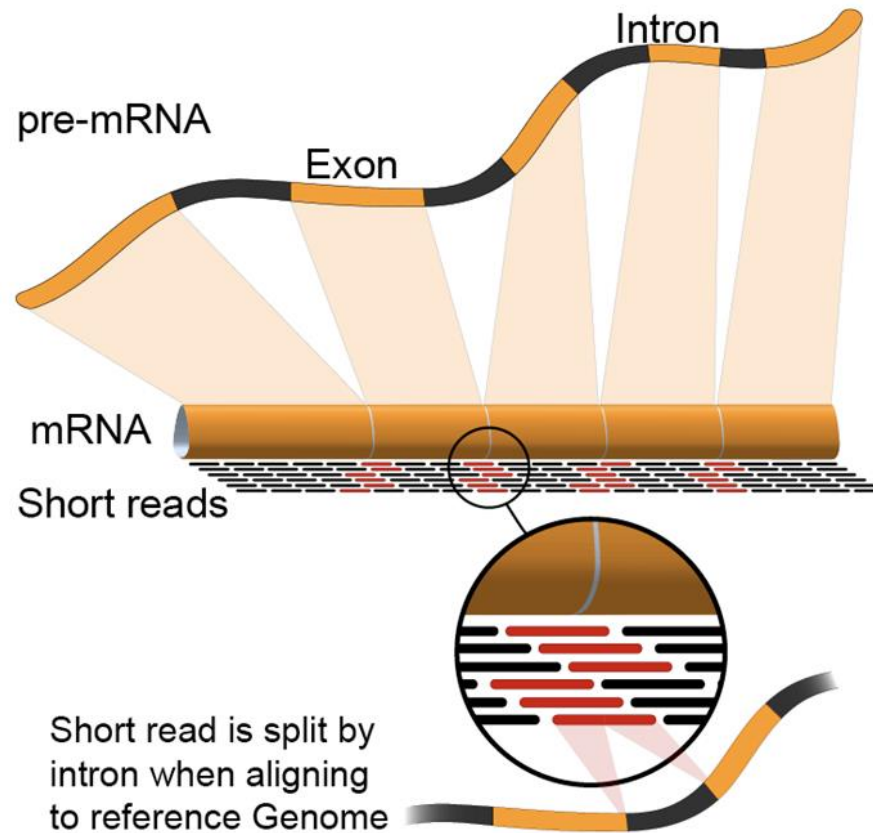


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Razmerje v velikosti (dolžini) med introni in eksoni zagotavlja, da je večina rekombinacij znotraj intronov.

Alternativno spajanje dovoli izprobavanje novih eksonov.

Ugotavljanje alternativnega procesiranja RNA

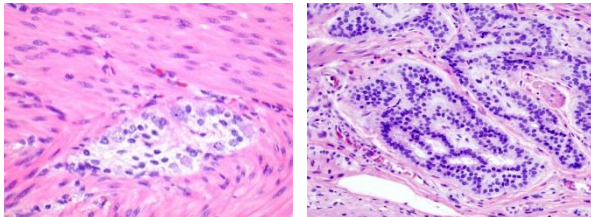


Določanje zaporedja RNA - RNAseq

- Bolj občutljivo kot mikromreže.
- Ni odvisno od hibridizacije (No hybridization bias).
- Illumina HiSeq sedaj naredi 200-500 million odčitkov na en poskus.
- Dobimo podatke o malih RNA, izražanjih nedefiniranih eksonov, alternativnem spajanju...

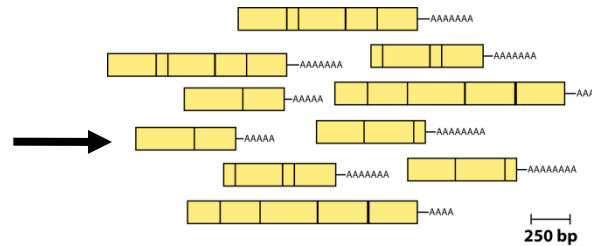
Sekveniranje RNA

Poskusni vzorci

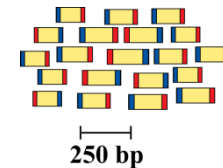


normalno črevo črevesni tumor

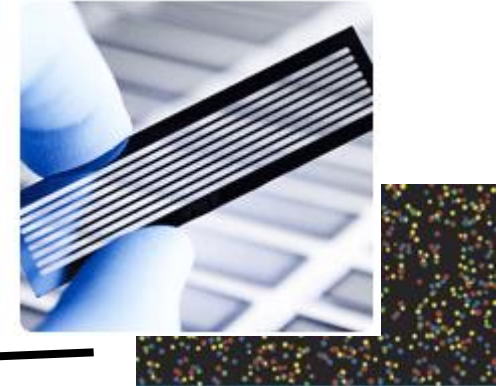
Izolacija RNA



Tvorba cDNA, fragmentacija, dodaja linkerjev

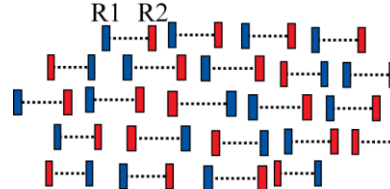


Sekveniranje koncev



Paired-end reads

(e.g. 2 x 100 bp)



Kartiranje na genom,
transkriptom in
predvidene E/E meje

Navzdoljne analize

Več 100 milijonov odčitkov z obeh koncev

Več 10 milijard baz

Zakaj določati zaporedje RNA namesto DNA?

- Raziskave funkcij
 - Genom je nespremenljiv – različni procesi vplivajo na izražanje genov.
 - npr. vpliv različnih spojin (zdravil) na transkriptom (primerjava ‚zdravljenega‘ transkriptoma z ne-tretiranimi)
 - npr. ugotavljanje funkcije določenega gena s primerjavo k/o mišk z normalnim.
- Nekateri molekularni spremembe lahko ugotovimo samo na nivoju RNA.
 - Alternativni transkripti
 - RNA editiranje
 - fuzijski transkripti

Zakaj določati zaporedje RNA namesto DNA?

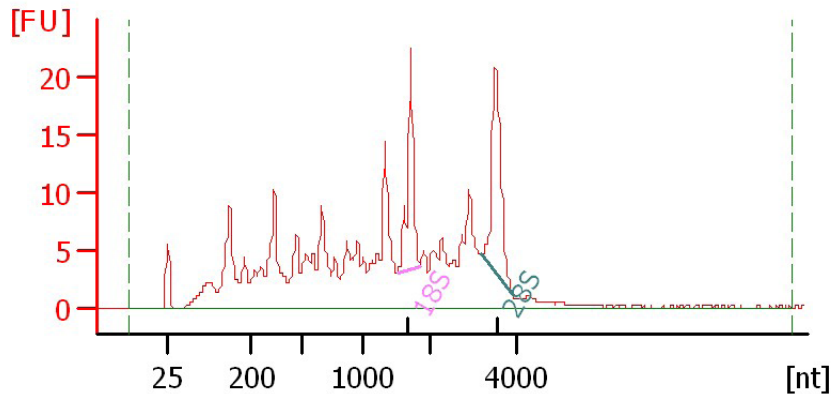
- Interpretacija mutacij, ki nimajo očitnega vpliva na zaporedje proteinov
 - ‘Regulatorne’ mutacije, ki vplivajo na to, katere izoforme se izražajo in na njihovo količino
 - mesta za izrezovanje, promotorji, ekson/intron motivi za izrezovanje...

Izzivi

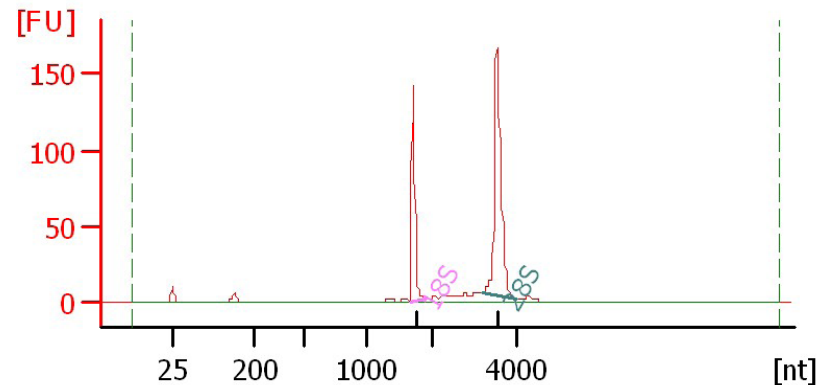
- Vzorec
 - čistost?, količina?, kvaliteta?
- RNA molekule s kratkimi eksoni in dolgimi introni.
 - Kartiranje zaporedij na genomu je lahko komplicirano.
- Relativna količina RNA močno variira.
 - Razlike v številu molekul so do 10^7 kratne.
 - Določanje RNA zaporedja temelji na naključnem izboru molekul, zato lahko majhna količina močno izraženih genov prevzame večino branj zaporedij.
 - Ribosomalni in mitohondrijski geni.
- RNA molekule so različnih velikosti.
 - Male RNA molekule se izolirajo ločeno.
 - S selekcijo (izolacijo) velikih RNA s pomočjo poliA repa se RNA brez 3' konca ne izolirajo.
- RNA je manj stabilna od DNA (hitro se razgradi).

Agilent-ov bioanalyser

- Določanje kvalitete vzorca RNA.
- 'RIN' = RNA integrity number.
 - 0 (slabo) do 10 (dobro)



RIN = 6.0



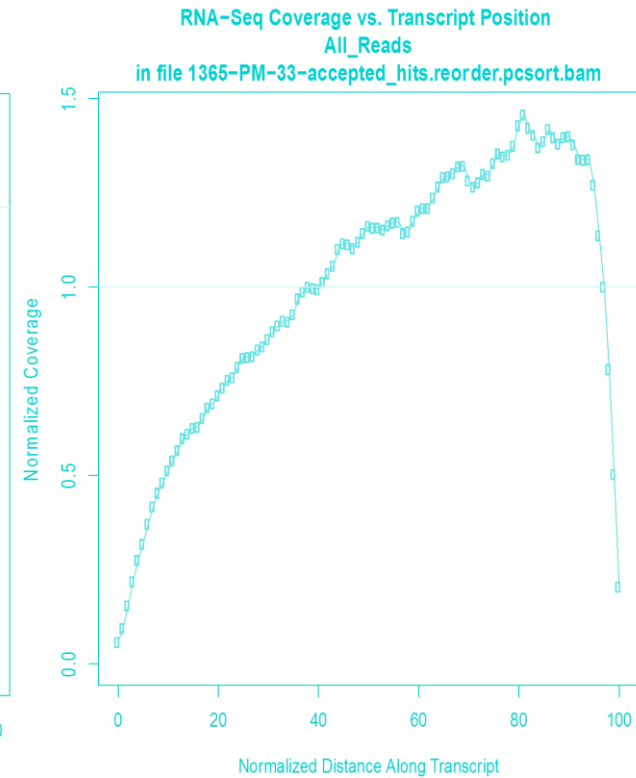
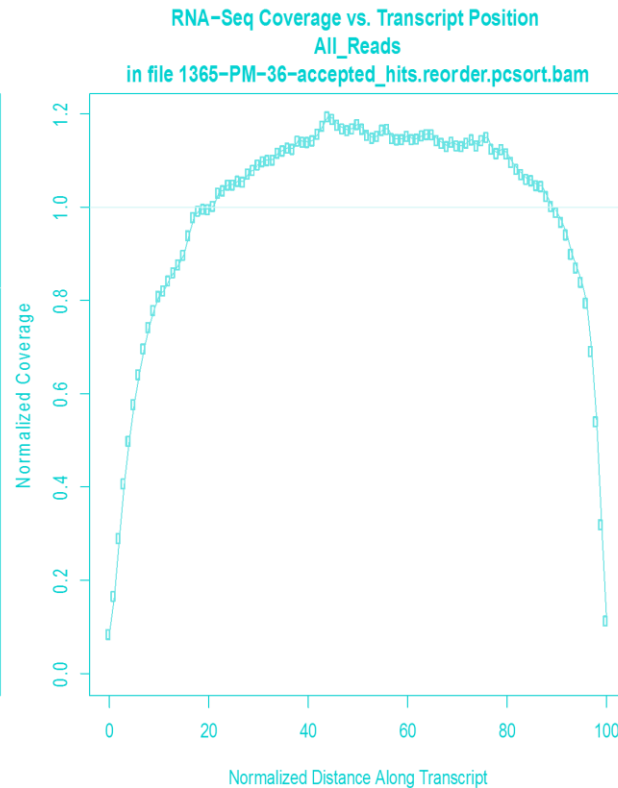
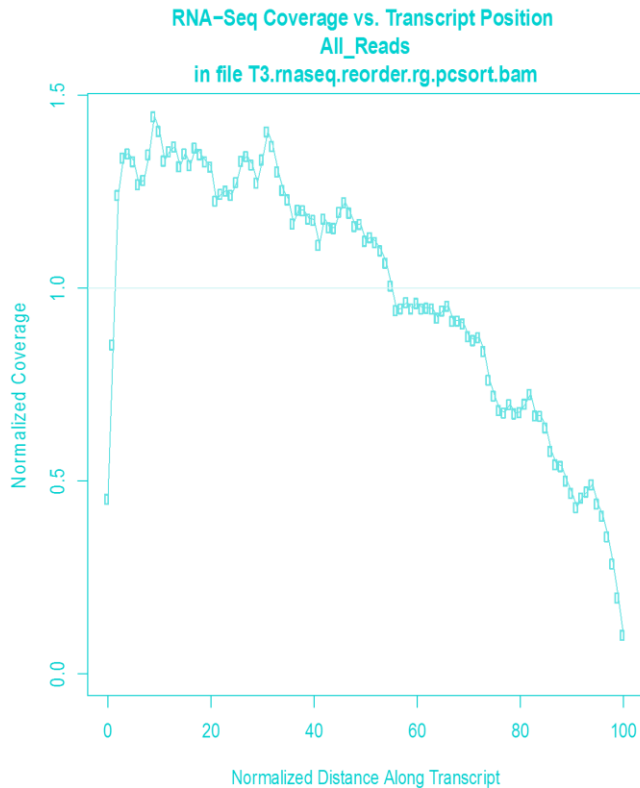
RIN = 10

Priprava vzorca lahko preferenčno vodi v analizo določene vrste molekul (3' ali 5' konci)

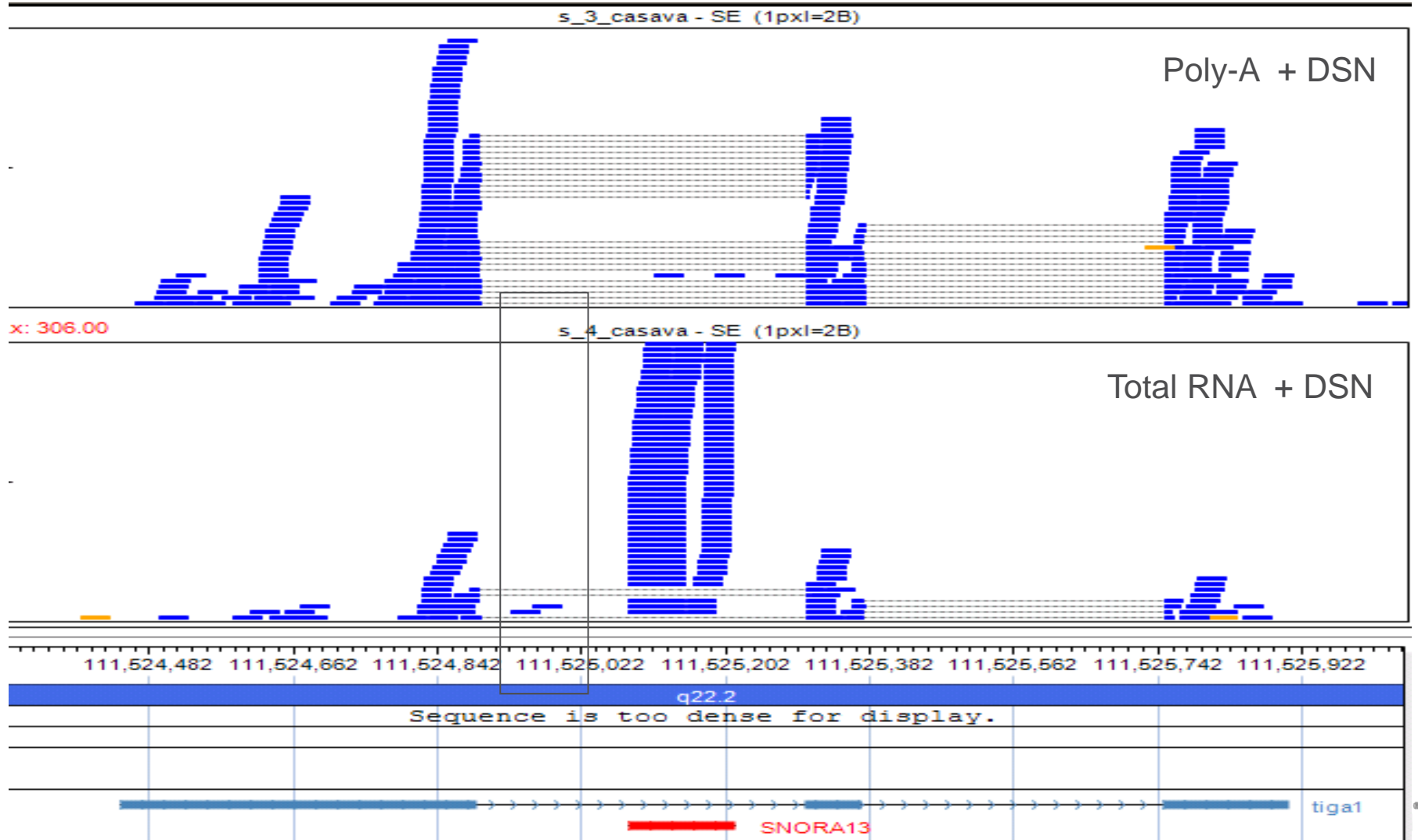
5' nagnjenost

Ni nagnjenosti
(nizka pokritost na koncih)

3' nagnjenost
(poli(A) selekcija)



Detekcija malih RNA molekul je odvisna od priprave vzorca.



Pogosti cilji RNA-Seq analiz (kaj lahko izvemo iz podatkov?)

- Izražanje genov in diferencialno izražanje.
- Analize alternativnega izražanja.
- Določanje transkriptov in njihova obdelava.
- Specifično izražanje alelov.
 - Povezano s SNP ali mutacijami
- Odkrivanje mutacij.
- Odkrivanje fuzijskih transkriptov.
- RNA editing.

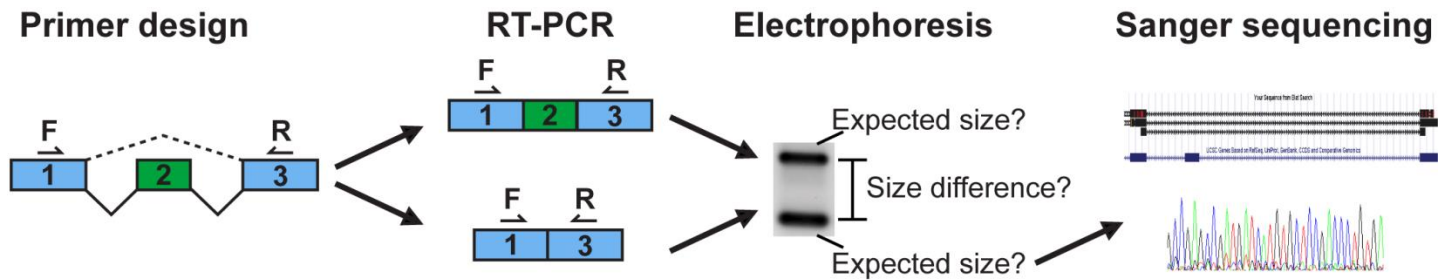
Potek dela pri RNA-seq

- Vsak tip RNA-seq analize ima svoje potrebe in izzive (težave), imajo pa tudi skupne stopnje dela:
 1. Pridobiti surove podatke (convert format).
 2. Poravnati/sestaviti odčitke.
 3. Obdelati poravnavo z ustreznimi orodji .
 - ‚cufflinks‘ za analizo izražanja, ‚defuse‘ za detekcijo fuzij...
 4. Post-procesiranje.
 - Podatke vnesemo v ‚downstream‘ software (R, Matlab, Cytoscape, Ingenuity...)
 5. Povzeti rezultate in vizualizacija.
 - Ustvariti sezname genov, določiti kandidate za nadaljnjo validacijo...

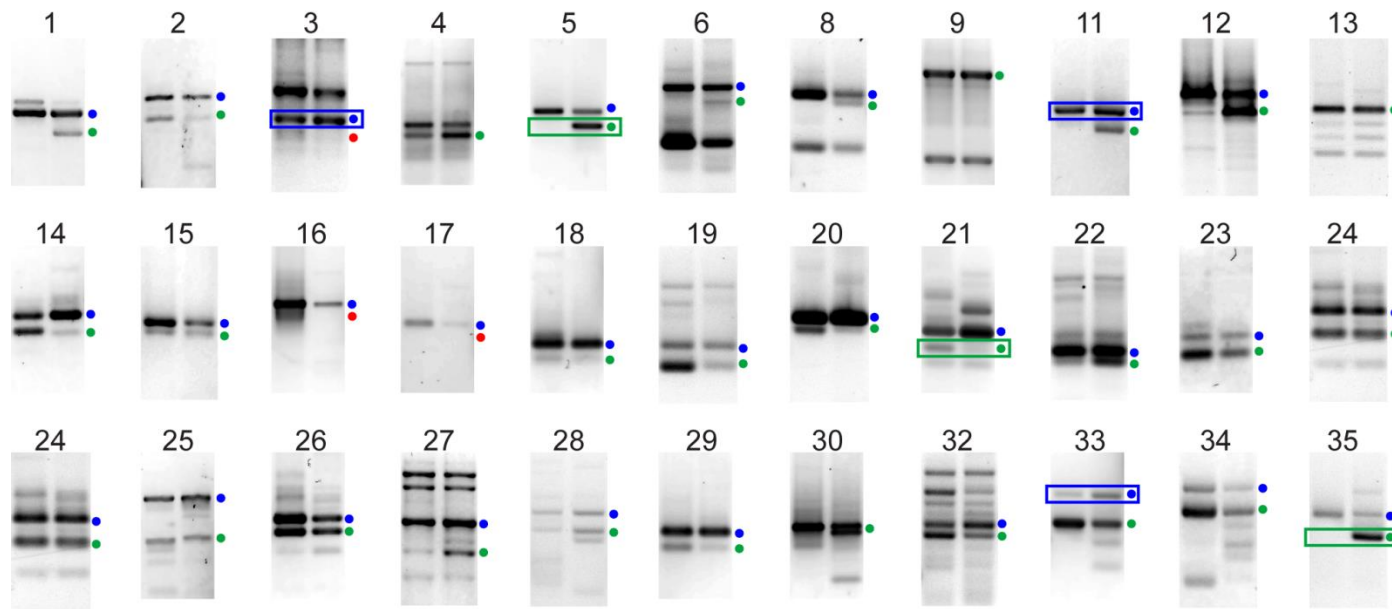
Kako zanesljive so napovedi o izražanju iz RNA-seq?

- Ali so nova ekson-ekson stičišča prava?
- Ali so diferencialne/alternativne spremembe izražanja med tkivi pravilne?
- validacije
 - qPCR, RT-PCR, Sanger sequencing

Validacija (kvalitativna)

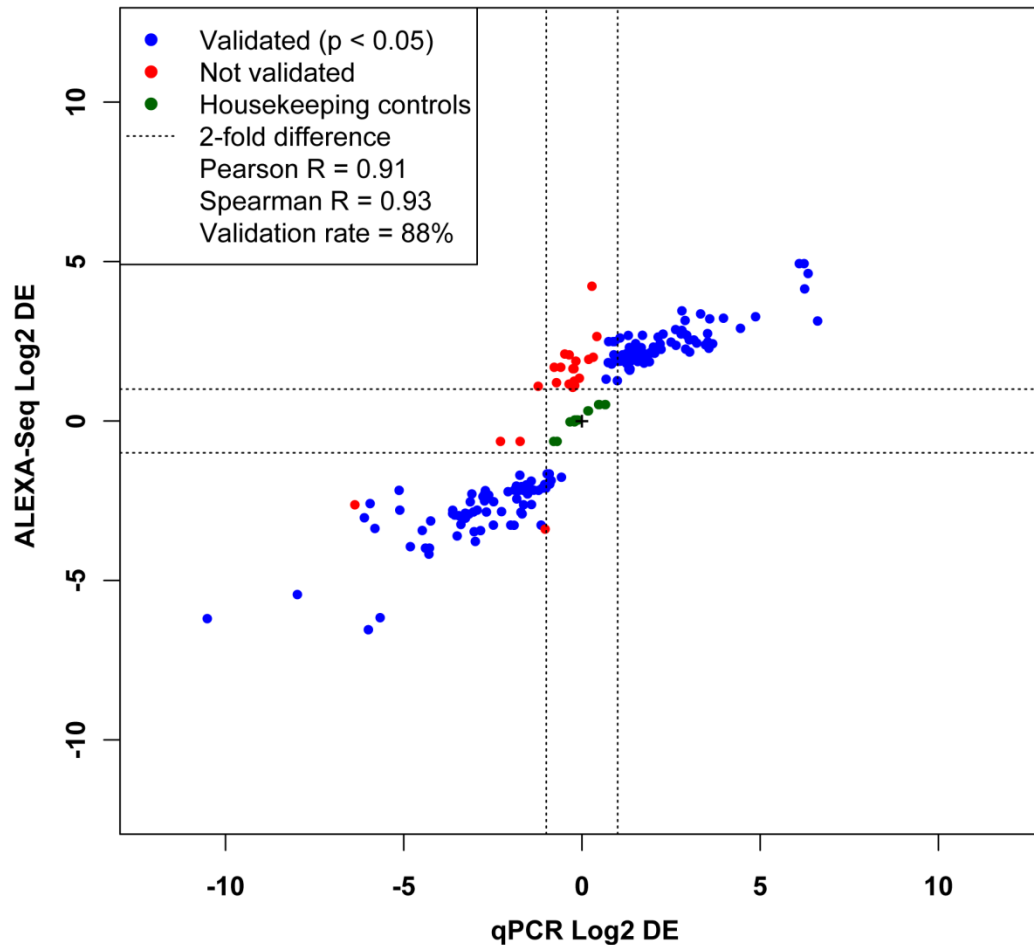
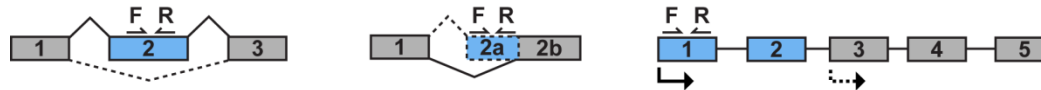


● Canonical isoform ● Alternative isoform ● Failure (missing band)



Prikazano je 33 testov od 192. Stopnja validacije = 85%

Validacija (kvantitativna)



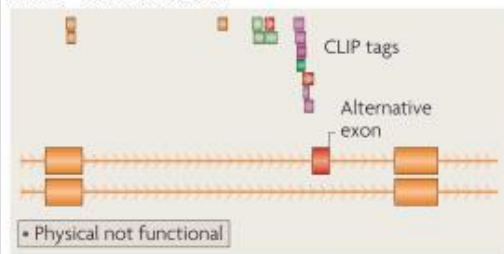
qPCR 192 eksonov,
ki so bili določeni z
ALEXA-Seq kot
alternativno izraženi.

**Stopnja validacije =
88%**

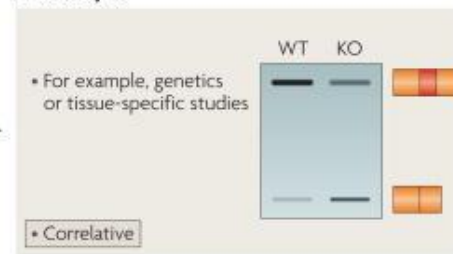
RNA-seq informatika

- Izločimo rRNA, tRNA, mitoRNA.
- Poravnamo na genom.
- Poiščemo stičišča spojenih fragmentov (združimo eksone).
- Diferencialno izražanje.
- Alternativno spojeni transkripti.
- Novi geni/eksoni.
- Variante zaporedij (SNP, indels, translokacije).
- Alelno-specifično izražanje.

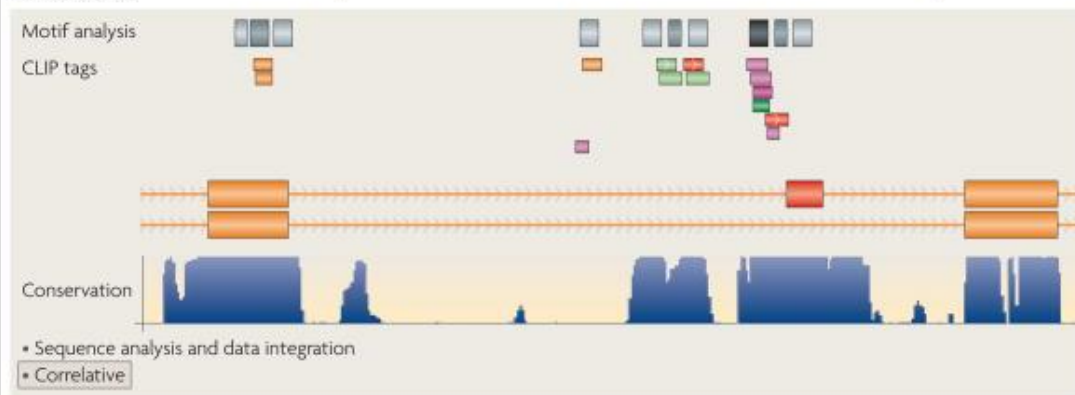
RNABP-RNA interactions



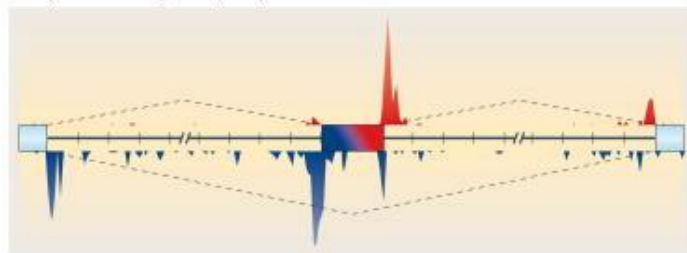
RNA analysis



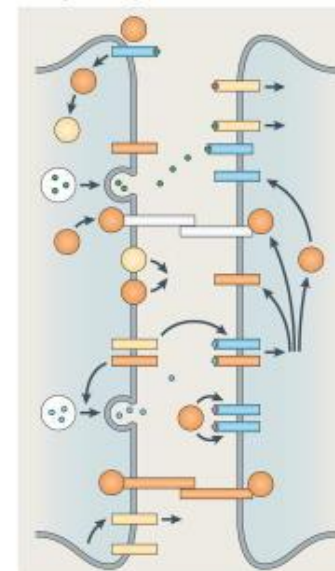
Bioinformatics



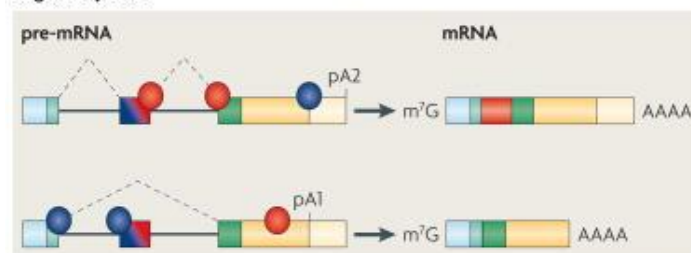
Compiled RNA regulatory map



Biological insights



Regulatory rules



Bolezni spajanja

Nevrolške bolezni spajanja

Table 1. Neurologic Disorders with Links to Alternative Splicing

Disease	Link to alternative splicing
Ataxia-telangiectasia	Point mutations within the <i>ATM</i> gene cause aberrant splicing of <i>ATM</i> transcripts
Fascioscapulohumoral dystrophy (FSHD)	Loss of FRG1 leads to altered splicing of many pre-mRNAs
Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)	Premutation CGG repeat expansions in the <i>FMR1</i> gene result in the sequestration of RNA-binding splicing factors
Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)	Point mutations within the <i>MAPT</i> gene result in altered levels of <i>MAPT</i> transcripts containing the alternatively spliced exon 10
Duschenne muscular dystrophy; Becker's muscular dystrophy	Altered splicing of <i>dystrophin</i> transcripts due to deletions and mutations in the <i>dystrophin</i> gene
Myotonic dystrophy (DM)	
DM1	CUG expansion in the 3'UTR of <i>DMPK</i> results in the misregulation of the MBNL splicing factor and consequent missplicing of MBNL target pre-mRNAs
DM2	CCUG expansion in <i>ZNF9</i> intron leading to misregulation of the CUG-BP1 splicing factor and missplicing of CUG-BP1 target pre-mRNAs
Neurofibromatosis type 1 (NF1)	Numerous mutations in the <i>NF1</i> gene, including mutations that result in aberrant splicing
Paraneoplastic neurologic disorders (PND)	
Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus-ataxia (POMA)	Autoimmune antibodies recognize the Nova family of neuron-specific RNA-binding splicing factors; <i>Nova</i> knockout mice phenocopy POMA
Hu syndrome (PEM/SN; paraneoplastic encephalomyelitis / sensory neuronopathy)	Autoimmune antibodies recognize the Hu family of RNA-binding factors related to the <i>Drosophila</i> splicing factor ELAV
Prader Willi syndrome	Loss of a splicing regulatory snoRNA that is complementary to a splicing silencer element implicated in regulating the alternative splicing of serotonin receptor <i>5-HT_{2c}R</i> transcripts
Psychiatric disorders	Accumulation of aberrantly spliced transcripts in schizophrenic patients
Retinitis pigmentosa	Mutation of genes encoding U snRNP-associated proteins
Rett syndrome	Mutation of the gene encoding MeCP2, which interacts with the YB-1 RNA binding protein; mouse model of Rett syndrome shows aberrant pre-mRNA splicing
Spinal muscular atrophy	Deletion/mutation of the <i>SMN1</i> gene, and the loss of a splicing regulatory element in <i>SMN2</i> results in insufficient levels of SMN, which is involved in snRNP biogenesis
Spinocerebellar ataxias	
SCA2, SCA8, SCA10, and SCA12	Possible RNA gain of function due to triplet repeat expansions; direct and indirect interactions with RNA-binding splicing factors

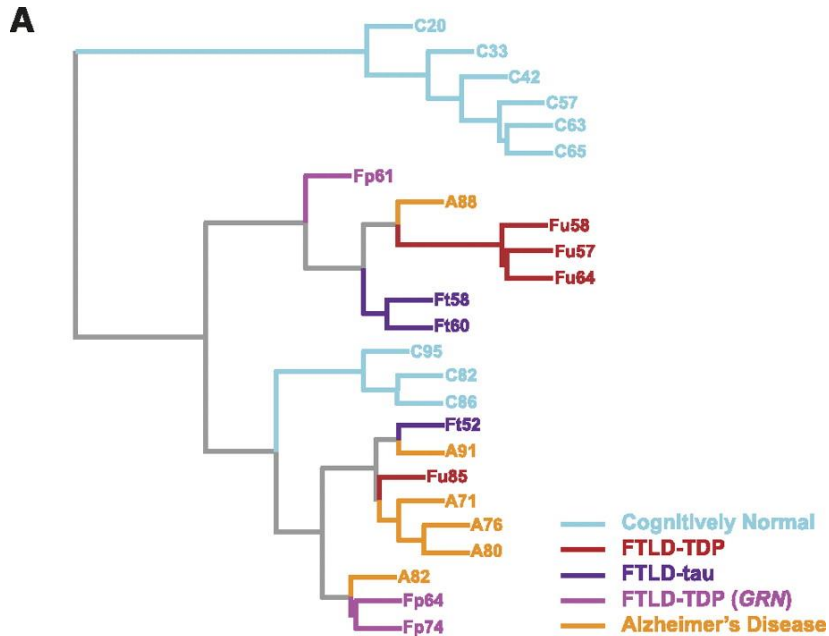
Analysis of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain

James R. Tollervey,¹ Zhen Wang,¹ Tibor Hortobágyi,² Joshua T. Witten,¹ Kathi Zarnack,³ Melis Kayikci,¹ Tyson A. Clark,⁴ Anthony C. Schweitzer,⁴ Gregor Rot,⁵ Tomaž Curk,⁵ Blaž Zupan,⁵ Boris Rogelj,² Christopher E. Shaw,² and Jernej Ule^{1,6}

¹MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 0QH, United Kingdom; ²MRC Centre for Neurodegeneration Research, King's College London, Institute of Psychiatry, De Crespigny Park, London SE5 8AF, United Kingdom; ³EMBL–European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, United Kingdom; ⁴Expression Research, Affymetrix, Inc., Santa Clara, California 95051, USA; ⁵Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

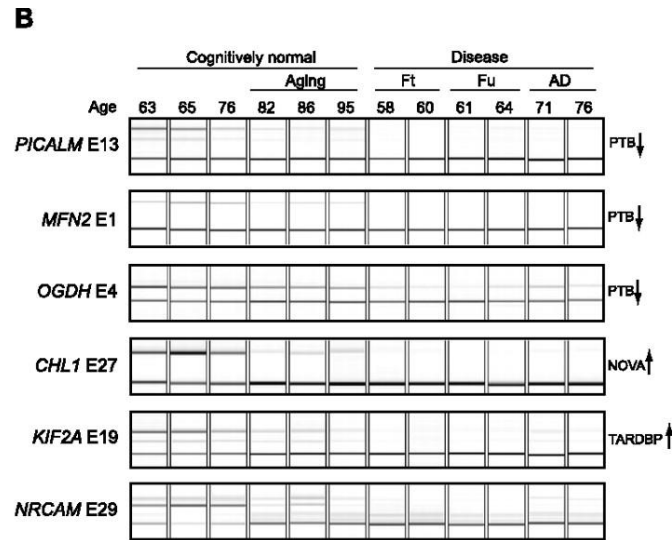
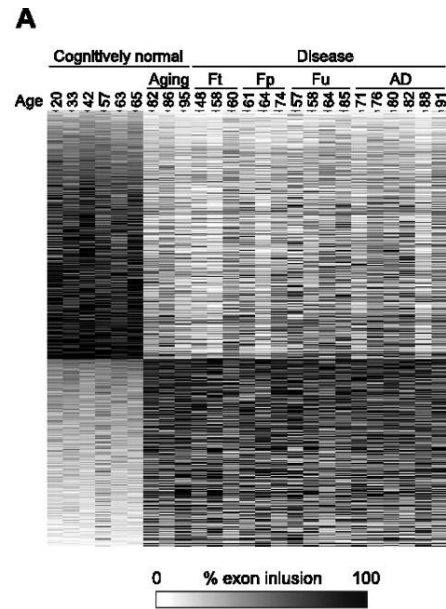
Age is the most important risk factor for neurodegeneration; however, the effects of aging and neurodegeneration on gene expression in the human brain have most often been studied separately. Here, we analyzed changes in transcript levels and alternative splicing in the temporal cortex of individuals of different ages who were cognitively normal, affected by frontotemporal lobar degeneration (FTLD), or affected by Alzheimer's disease (AD). We identified age-related splicing changes in cognitively normal individuals and found that these were present also in 95% of individuals with FTLD or AD, independent of their age. These changes were consistent with increased polypyrimidine tract binding protein (PTB)-dependent splicing activity. We also identified disease-specific splicing changes that were present in individuals with FTLD or AD, but not in cognitively normal individuals. These changes were consistent with the decreased neuro-oncological ventral antigen (NOVA)-dependent splicing regulation, and the decreased nuclear abundance of NOVA proteins. As expected, a dramatic down-regulation of neuronal genes was associated with disease, whereas a modest down-regulation of glial and neuronal genes was associated with aging. Whereas our data indicated that the age-related splicing changes are regulated independently of transcript-level changes, these two regulatory mechanisms affected expression of genes with similar functions, including metabolism and DNA repair. In conclusion, the alternative splicing changes identified in this study provide a new link between aging and neurodegeneration.

Pregled analiz splicing profilov

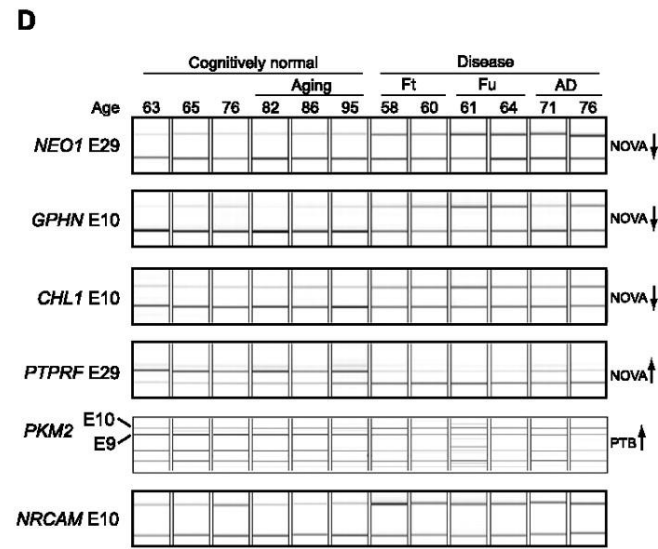
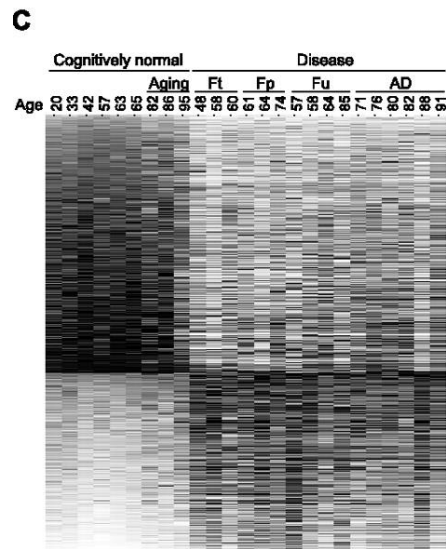


- Dendrogram hierarhičnega grupiranja podatkov z mikromrež.
- Starost osebkov je pripisana ob oznaki bolezni.
- Mlajši zdravi ljudje sestavljajo svojo skupino.

Analiza alternativnega splicinga pri staranju in boleznih



- A. Prikaz inkluzije 2064 eksonov pri staranju.
- B. Validacija z RT-PCR.



- C. Prikaz inkluzije 2064 eksonov pri neurodegeneraciji.
- D. Validacija z RT-PCR.

Bolezenske spremembe v izražanju regulatorjev splicinga

Table 1. Splicing regulators with significant disease-related changes in transcript levels

Gene symbol	Gene description	Disease fold change (log ₂)	Aging fold change (log ₂)	Disease/aging fold change ratio
<i>PTBP1</i>	Polypyrimidine tract-binding protein 1	0.6	0.7	1.0
<i>ESRP2</i>	RNA-binding protein 35B	1.1	0.9	0.9
<i>ESRP1</i>	RNA-binding protein 35A	1.5	0.9	0.7
<i>RAVER1</i>	Ribonucleoprotein PTB-binding 1	1.2	0.6	0.7
<i>UHMK1</i>	Serine/threonine-protein kinase Kist	-1.3	-1.3	1.0
<i>DHX15</i>	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	-1.1	-1.1	1.0
<i>HNRNPK</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	-1.1	-0.9	0.9
<i>SLU7</i>	Pre-mRNA-splicing factor SLU7	-1.2	-1.0	0.9
<i>ROD1</i>	Regulator of differentiation 1	-1.1	-0.9	0.9
<i>PTBP2</i>	Polypyrimidine tract-binding protein 2	-1.1	-0.8	0.8
<i>PLRG1</i>	Pleiotropic regulator 1	-1.2	-1.0	0.8
<i>SNRPD3</i>	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	-1.1	-0.8	0.8
<i>SNRNP40</i>	WD-repeat-containing protein 57	-1.0	-0.8	0.8
<i>CUGBP1</i>	CUG-BP- and ETR-3-like factor 1	-1.1	-0.8	0.8
<i>SFRS2</i>	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	-1.0	-0.7	0.8
<i>SRPK1</i>	Serine/threonine-protein kinase SRPK1	-1.2	-0.8	0.8
<i>SRPK2</i>	Serine/threonine-protein kinase SRPK2	-1.3	-0.9	0.8
<i>TXNL4A</i>	Thioredoxin-like protein 4A	-1.0	-0.6	0.7
<i>WBP11</i>	WW-domain-binding protein 11	-1.1	-0.6	0.7
<i>SNRPB2</i>	U2 small nuclear ribonucleoprotein B"	-1.3	-0.8	0.7
<i>MAGOH</i>	Protein mago nashi homolog	-1.1	-0.5	0.7
<i>NUDT21</i>	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	-1.6	-1.1	0.7
<i>PPIH</i>	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase H	-1.2	-0.6	0.6
<i>NOVA1</i>	RNA-binding protein Nova-1	-1.2	-0.5	0.6
<i>KHDRBS3</i>	KH-domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	-1.2	-0.6	0.6
<i>NHP2L1</i>	NHP2-like protein 1	-1.2	-0.4	0.6
<i>RNPS1</i>	RNA-binding protein with serine-rich domain 1	-1.3	-0.5	0.5
<i>RBM9</i>	RNA-binding protein 9	-2.1	-1.3	0.5
<i>CDC40</i>	Pre-mRNA-processing factor 17	-1.6	-0.7	0.5
<i>SNRPN</i>	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	-1.9	-0.7	0.4
<i>A2BP1</i>	Fox-1 homolog A	-2.5	-1.3	0.4

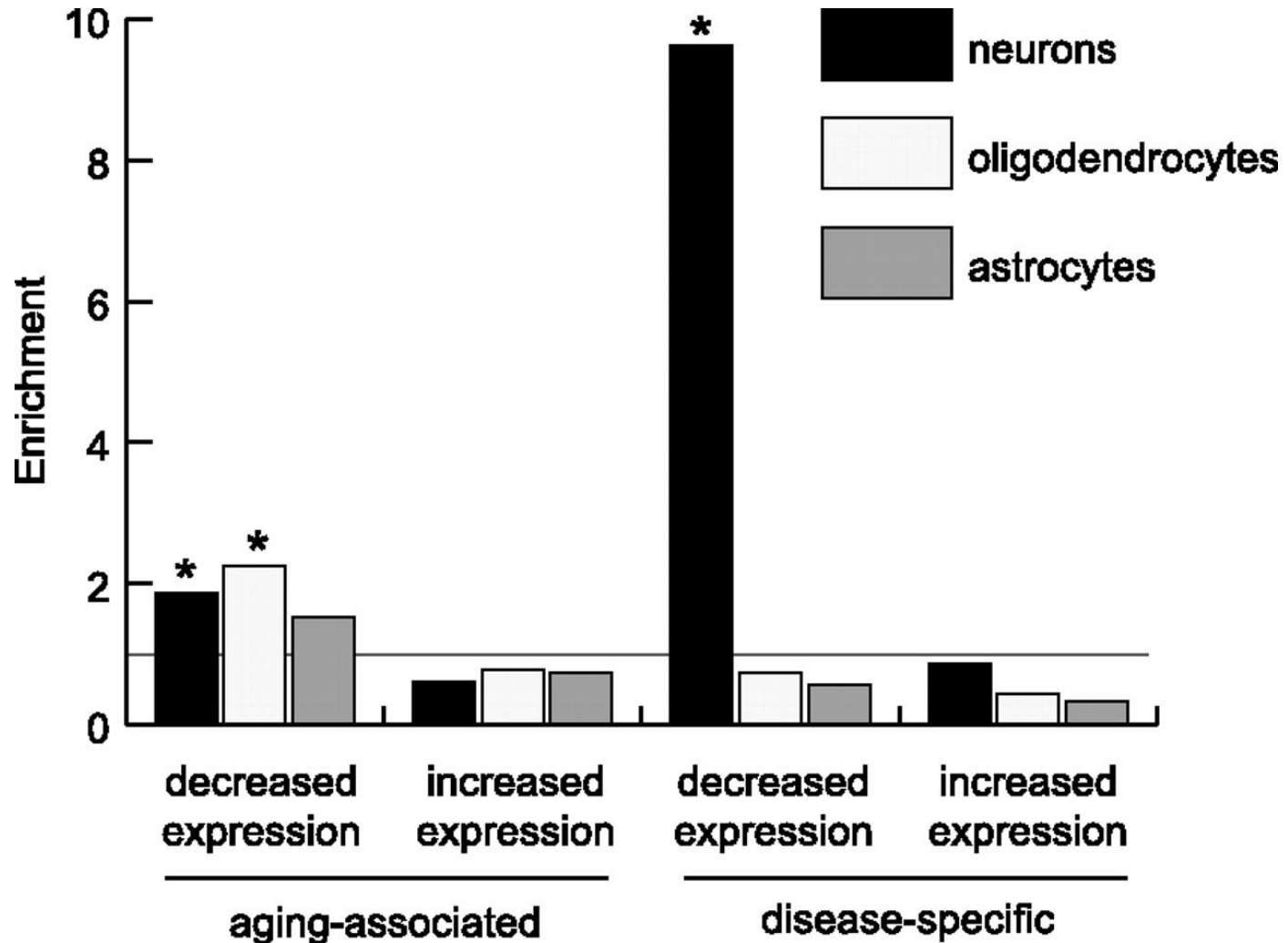
The fold changes in transcript levels were determined by microarray.

Funkcije genov, ki spreminjajo izražanje pri staranju in nevrodegeneraciji

Table 2. GO terms enriched in genes with age-related or disease-specific expression changes

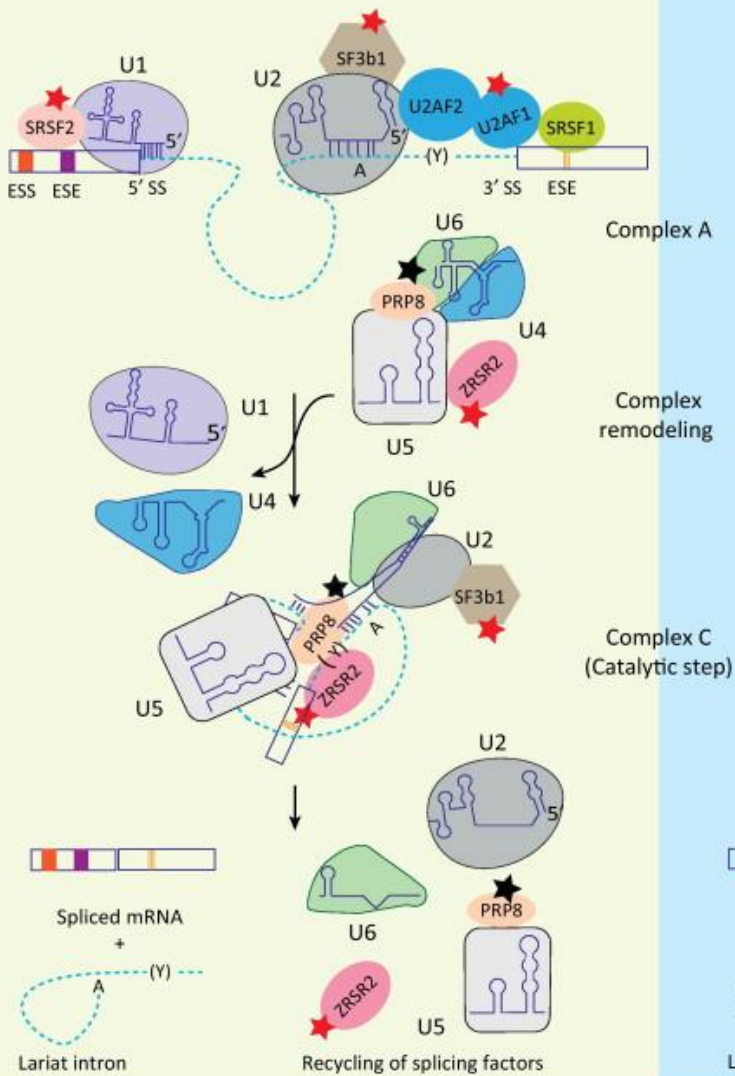
GO term	Age-related				Disease-specific			
	Transcript-level decrease		Splicing change		Transcript-level decrease		Splicing change	
	P-value	Fold	P-value	Fold	P-value	Fold	P-value	Fold
Anion transport	0.012	3.2		1.2		0.8		0.9
Mitochondrial electron transport NADH to ubiquinone	0.013	5.3		1.2		2.2		2.4
Ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	0.023	4.8		1.1		0		0.9
Modification-dependent protein catabolic process	<0.001	4.1		1.3		0.8		0.7
ER to Golgi vesicle-mediated transport	0.024	3.3	0.027	2.0		0		1.2
S phase		0	0.030	5.1		0		0.3
tRNA metabolic process		0.9	<0.001	2.1		0		1.0
G ₁ phase		0	0.002	2.9		0		0
Nucleotide-sugar metabolic process		2.0	0.008	3.2		0		0.6
Non-recombinational repair		0	0.011	3.0		0		1.1
Mismatch repair		0	0.030	2.4		0		0.9
Protein heterooligomerization		1.8	0.034	2.0		1.5		1.9
Isoprenoid biosynthetic process		3.5	0.047	2.4		0		2.1
Transmission of nerve impulse		1.0		1.1	<0.001	7.4	<0.001	2.0
Neurological system process		0.9		0.9	<0.001	4.5	<0.001	1.5
Monovalent inorganic cation transport		0.8		1.1	<0.001	5.4	0.029	1.5
Synaptic vesicle endocytosis		0		1.6	<0.001	14	<0.001	4.7
Regulation of transport		0.8		0.5	<0.001	3.4	0.001	1.6
Chemical homeostasis		1.2		0.7	<0.001	3.5	0.043	1.3
Potassium ion transport		0.4		0.8	<0.001	6.5	0.034	1.8
Response to metal ion		0.5		0.8	0.008	3.0	<0.001	2.1
Positive regulation of synaptic transmission		2.1	0.007	3.3	<0.001	13		2.5
Sensory perception of pain		1.7		1.5	<0.001	13		0.5
Actin polymerization or depolymerization		1.3		0.5		2.2	<0.001	2.5
Isoprenoid metabolic process		2.9		1.9		0	0.034	2.3
Peptidyl-threonine phosphorylation		4.0	0.029	2.7		6.6	0.002	4.1

Analiza izražanja genov, ki so specifični za določen tip možganskih celic

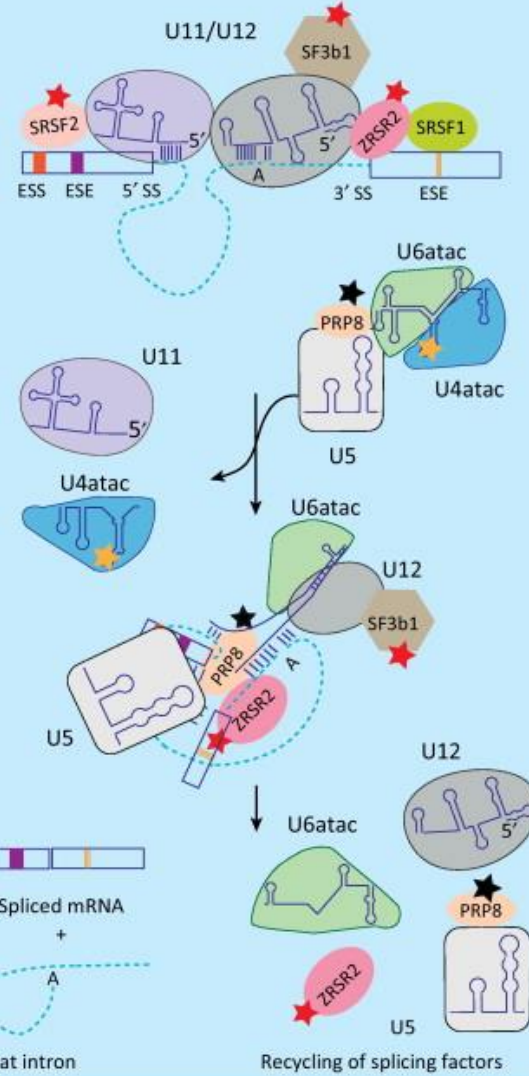


Mutacije komponent spliceosoma

Major spliceosome assembly



Minor spliceosome assembly



* Mutacije pri neoplazijah.

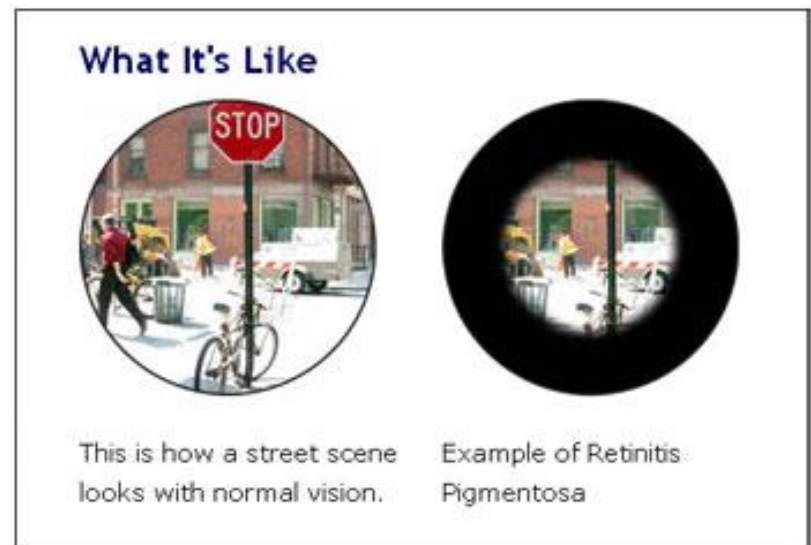
* Mutacije pri MOPD1.

* Retinitis pigmentosa.

Key: ★ Mutations in neoplasias ★ Mutations in TALS or MOPD ★ Retinitis pigmentosa mutations

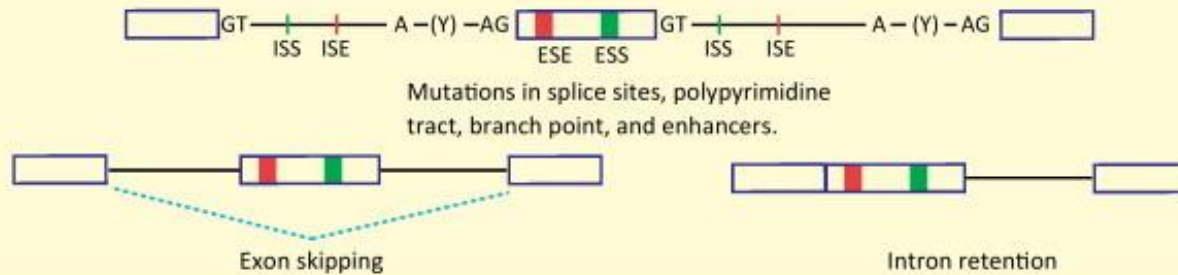
Mutacije komponent spliceosoma

- Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type 1 (MOPD1)
- Genska bolezen z upočasnjeno rastjo, majhno glavo in nenormalno rastjo kosti.
- Slaba prognoza. Večina umre v prvem letu.
- Retinitis pigmentosa (RP) je dedna bolezen, ki prizadene 1:4000 ljudi.
- Simptomi so nočna slepota, periferna slepota.

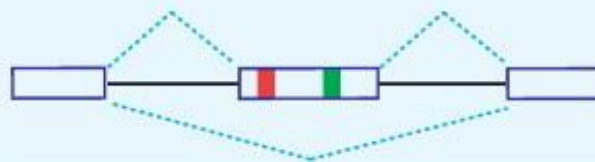


Štiri kategorije izrezovalnih mutacij

(a) Mutations affecting constitutive exon usage

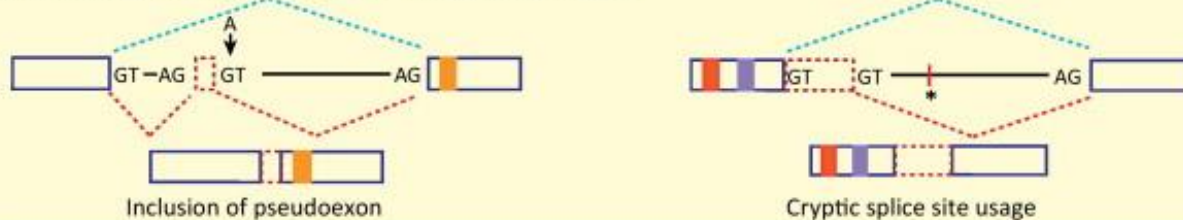


(b) Mutations affecting the ratio of alternative exons

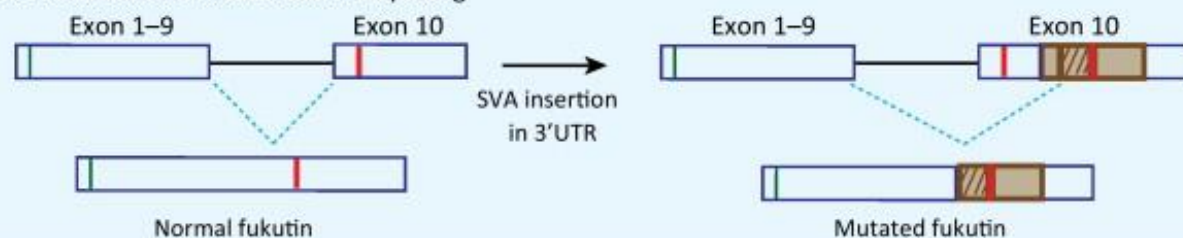


Normal	Mutations in silencers	Mutations in enhancers
70%	90%	30%
30%	10%	70%

(c) Mutations leading to inclusion of intronic sequences



(d) SVA-insertion mediated altered splicing



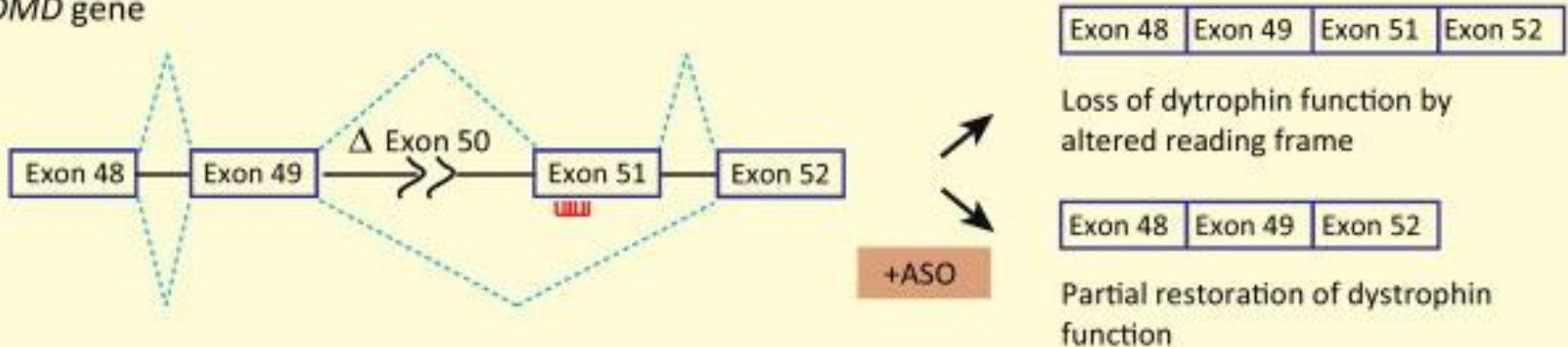
Zdravljenje bolezenskega alternativnega spajanja

Table 1. Current genetic treatments of mis-splicing disorders

Disorder	Genetic target	Genetic therapy	Most recent studies	Refs
Ataxia telangiectasia	<i>ATM</i>	AON (PMO) for splice correction	Treatment of cell lines carrying homozygous mutations of patient-derived mutations	[29]
Atherosclerosis	<i>APOB</i>	AON (2'OMePS) to induce a splice variant through exon skipping	Human liver carcinoma cell line	[13]
β -Thalassemia	β -Globin	AON (CPP-PMO) to block recognition of cryptic splice sites	Mouse model of intron 2 cryptic splice site Isolated mononuclear cells from patients	[12] [62]
Congenital disorder of glycosylation	<i>PMM2</i>	AON (PMO) to block recognition of cryptic splice sites	Correction of splicing in patient fibroblasts	[63]
Duchenne muscular dystrophy	<i>DMD</i>	AON (2'OMePS) for skipping of exon 51	Clinical trial phase IIIa	[60]
		AON (PMO) for skipping of exon 51	Clinical trial phase IIIa	[61]
		Bifunctional U7 targeting exon 51 and recruiting hnRNPA1 for exon skipping	Patient-derived myoblasts	[64]
		U1 snRNA targeting mouse dystrophin for exon skipping	Systemic correction of splicing in mouse model for DMD	[42]
Dysferlinopathies	<i>DYSF</i>	AON for exon skipping	Patient-derived myoblast cultures	[65]
		U7 antisense delivery	Patient-derived myoblast cultures	[65]
Dystrophin epidermolysis bullosa	<i>COL7A1</i>	AON (2'OMePS) to skip premature termination codon containing exon	Induction of exon skipping within human skin transplanted onto nude rats and injected with AON	[66]
Frontotemporal dementia and Parkinsonism associated with chromosome 17	<i>MAPT</i>	Trans-splicing	Minigene co-cultured cells with trans-splicing vector	[67]
		AON (2'OMePS) to block recognition of 5' and 3' of alternative splicing exon 10	Minigene transfected cell lines co-cultured with AON	[35]
Hutchinson–Gilford progeria syndrome	<i>LMNA</i>	AON (PMO) to block recognition of cryptic splice site	Splice correction in patient-derived fibroblasts	[68]
		AON (2'OMePS) to induce a splice variant through exon skipping	Exon skipping from minigene systems and within endogenous expression of multiple cultured cell lines	[35]
Methylmalonic aciduria	<i>MUT</i>	AON (PMO) to block recognition of pseudoexon	Correction of splicing through steric blocking of cryptic splice site in patient fibroblasts	[32,33]
Niemann–Pick disease	<i>NPC1</i>	AON (PMO) to block recognition of cryptic splice site producing a pseudoexon	Correction of splicing in patient fibroblasts	[5]
Neurofibromatosis type I	<i>NF1</i>	AON (PMO) to block recognition of cryptic 5' splice site	Correction of splicing in patient-derived lymphocytes	[69]
Ocular albinism type I	<i>GPR143</i>	AON (PMO) to block recognition of <i>de novo</i> splice enhancer	Correction of splicing in patient melanocytes	[70]
Propionic acidemia	<i>PCCA, PCCB</i>	AON (PMO) to block recognition of pseudoexon	Correction of splicing through steric blocking of cryptic splice site in patient fibroblasts	[33]
Spinal muscular atrophy	<i>SMN2</i>	AON (2'OMePS) for exon inclusion	Correction of splicing through steric blocking of intron splice silencer in severe mouse model	[11,71]
		Bifunctional U7 targeting exon 7 and recruiting SR protein splice enhancers	Bifunctional U7 in a severe mouse model of SMA to correct splicing and phenotype	[48,49]
		U7 antisense delivery	Correction of splicing in patient-derived fibroblasts	[44]
		Trans-splicing	Injection of dual vector (PTM and AON) into the intracerebral-ventricular space of severe SMA mouse models	[55,56]

ASO terapije spajanja I

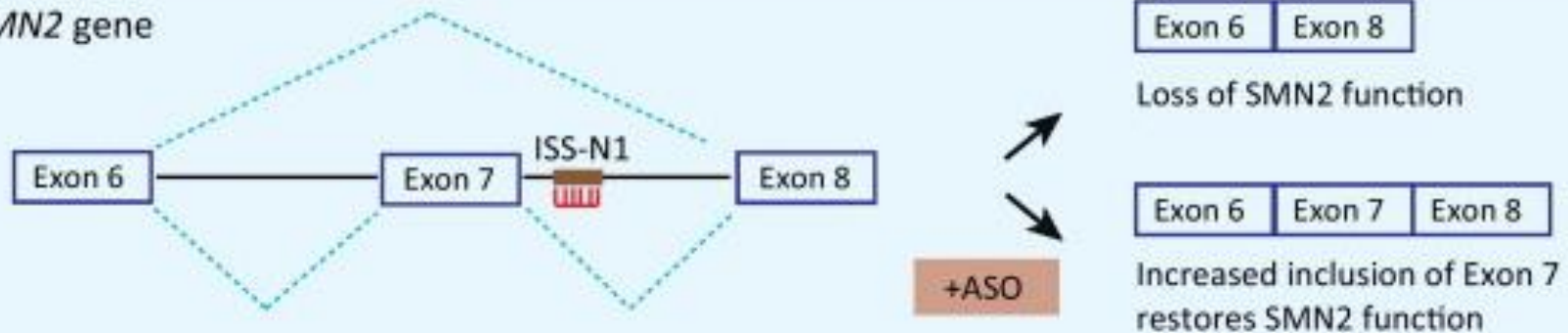
(a) DMD gene



- Duchennova mišična distrofija (DMD)
- Pri DMD pride do izgube distrofina, ki je strukturna beljakovina sarkoleme (celične membrane mišičnih celic). Brez distrofina je sarkolema nestabilna, celična homeostaza je porušena.
- DMD je najpogostejša živčno mišična bolezen v otroštvu (63/1.000.000)
- Smrt ponavadi nastopi pred 30 letom starosti.
- ASO terapija:
 - $\Delta E50 \rightarrow \Delta$ bralnega okvirja
 - $+ \Delta E51 \rightarrow$ orig. bralni okvir

ASO terapije spajanja II

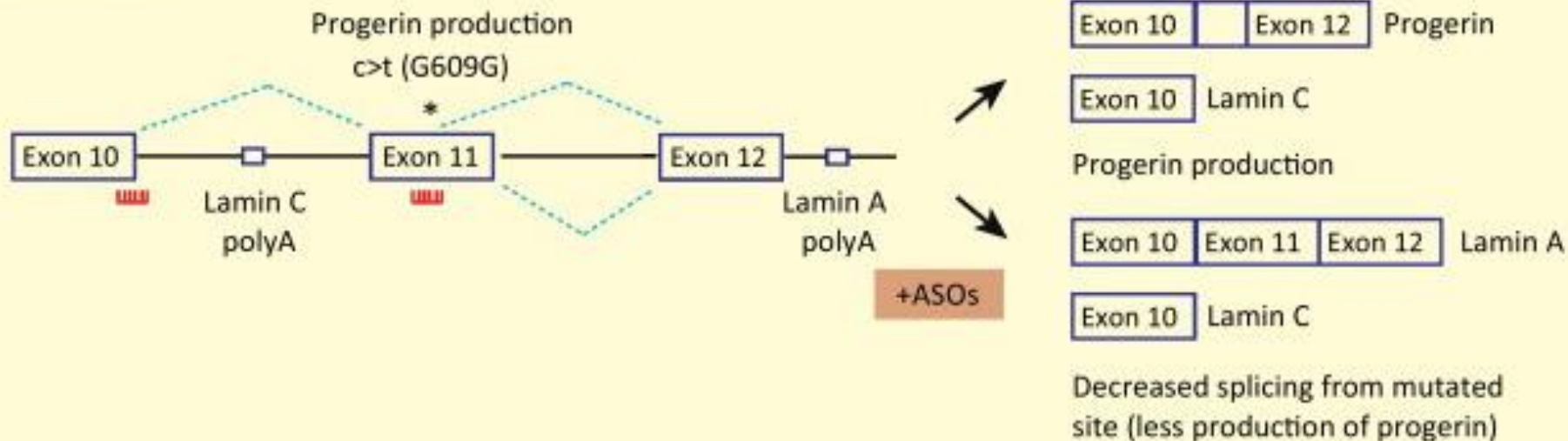
(b) SMN2 gene



- Spinalna mišična atrofija (SMA).
- Okvara motoričnih živčnih celic v hrbtenjači.
- Štiri oblike glede na starost nastopanja (infantilna, intermediarna, juvenilna in odrasla)
- Večina SMA je avtosomno recesivno dednih.
- Pri skoraj vseh bolnikih s SMA tip 1-3 so prisotne mutacije v E7 ali E8 pri »survival motor neuron« gena (SMN1)
- ASO terapija:
 - LOF (‘loss of function‘) mutacije SMN1 proteina
 - ASO vezava na ISS na SMN2 vodi do vključitve E7 – podoben SMN1

ASO terapije spajanja III

(c) *Lmna* gene

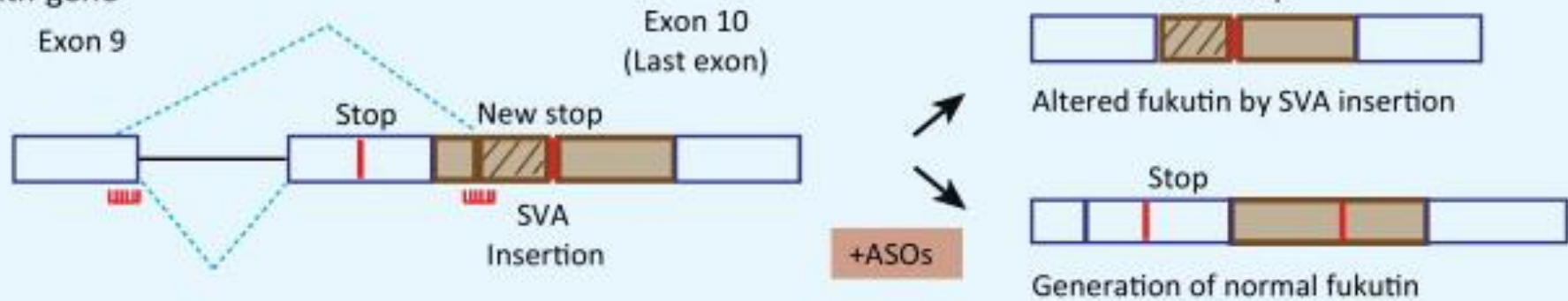


- Hutchinson-Gilford progeria (HGPS) – bolezen hitrega staranja (10x hitreje)
- Tiha mutacija C>T (G609G) na genu za lamin tvori novo 5' spojivno mesto na E11.
- Tvori se toksičen protein progerin.
- ASO terapija:
 - Kombinacija dveh ASO inhibira nastajanje progerina.
 - Blokiranje 3' spojivnega mesta E10
 - Blokiranje novega spojivnega mesta na E11



ASO terapije spajanja IV

(d) *Fktn* gene

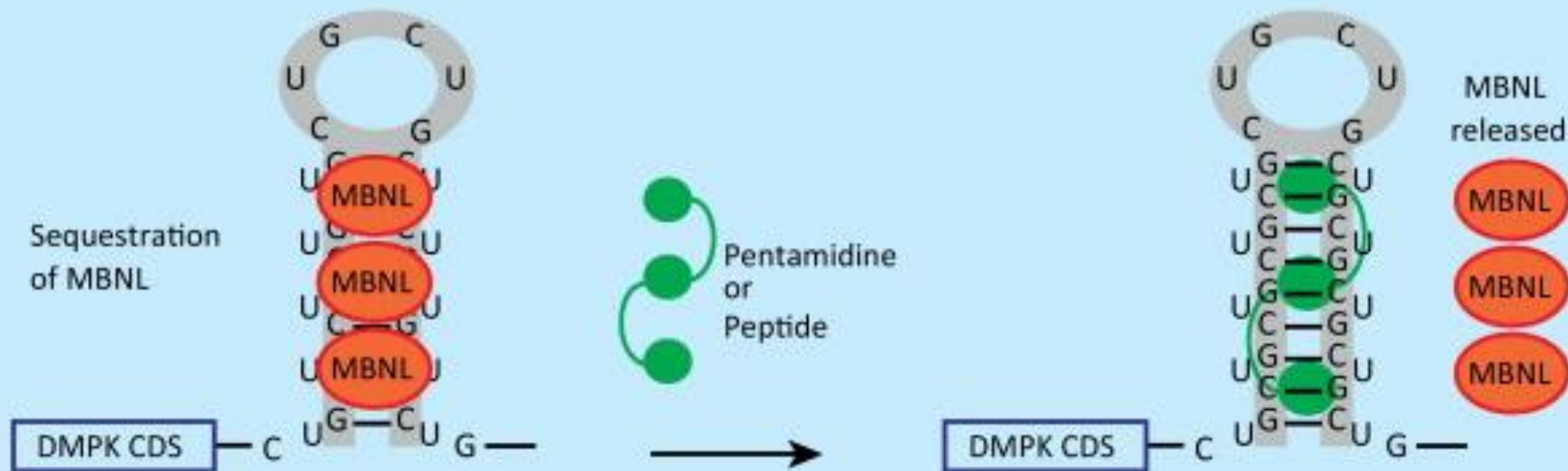


TRENDS in Molecular Medicine

- Fukuyama mišična distrofija (FCMD)
- Autosomno recesivno dedna bolezen prizadene mišice, možgane in oči.
- Predvsem na Japonskem (2-4/100.000). Druga najbolj pogosta MD.
- Mutacija vodi v izgubo funkcije fukutin proteina.
- Insercija transpozicijskega elementa (SVA) aktivira skrito 5' spojitevno mesto na E9 ter uporabo 3' spojitvenega mesta na SVA.
- ASO terapija:
 - Kombinacija treh ASO blokira 1) napačno 3' spojitevno mesto, 2) ESE v bližini ter 3) ISE v bližini 5' spojitvenega mesta.

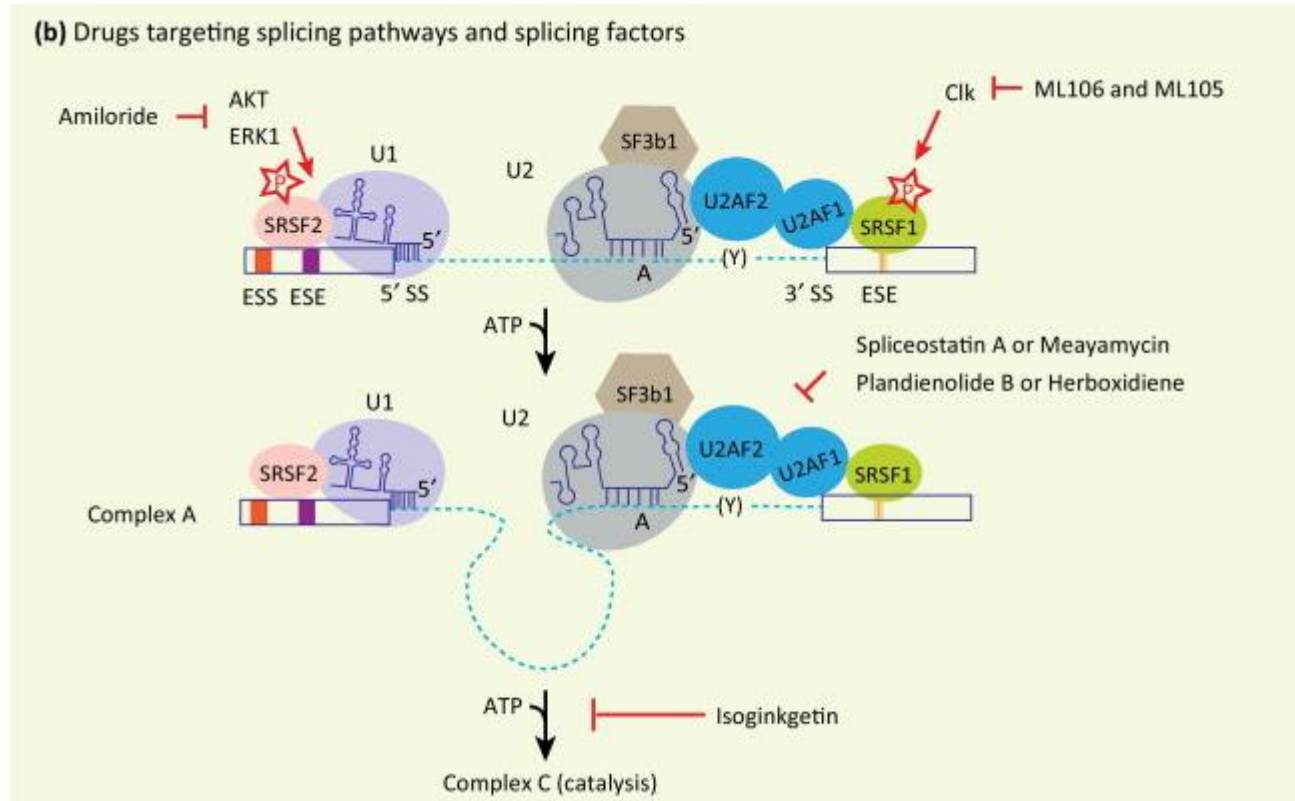
Blokiranje bolezenskih protein-RNA interakcij

(a) Molecules disrupting RNA-protein interactions in myotonic dystrophy



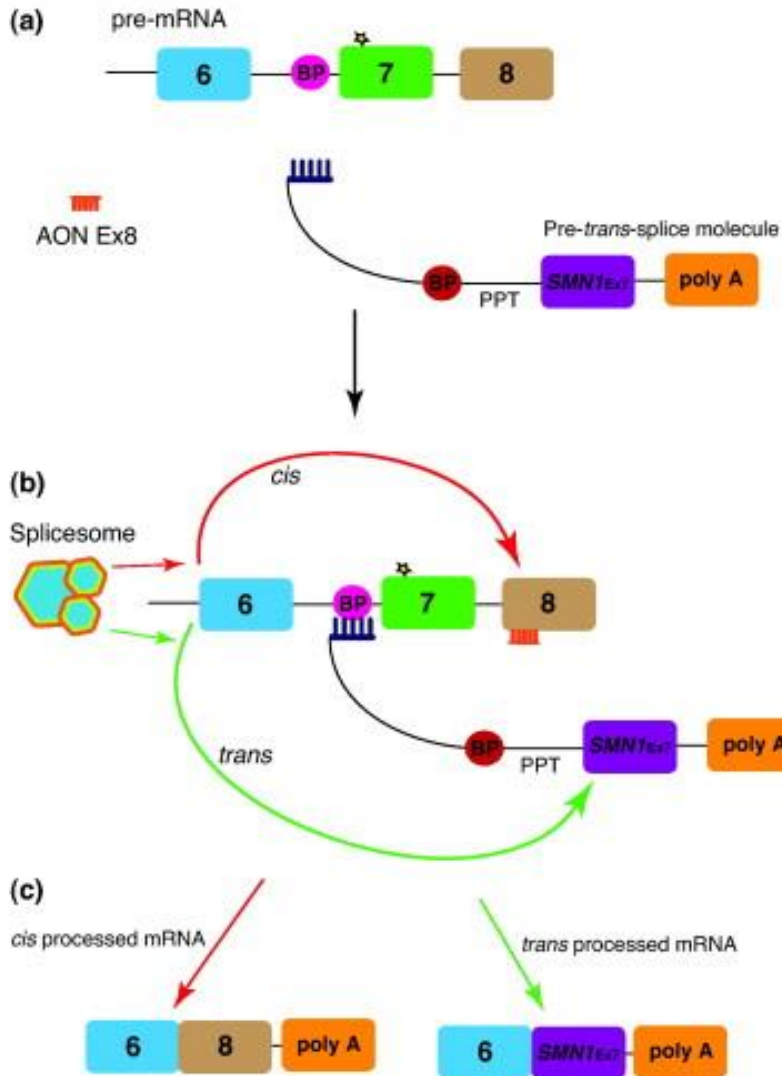
- Miotonična distrofija (DM) je najpogostejša distrofija odrasle dobe.
- Autosomno dominantna bolezen, kjer je oslabelost najizrazitejša v mišicah obraza, jezika, žrela, in mišicah obračalkah glave. Lahko so prizadeta še druga tkiva, kot srce, endokrine žleze in očesna leča.
- Dve obliki DM1 in DM2. Pri DM1 pride do povečanja ponavljanja CTG zaporedja (čez 50x) v genu DMPK.
- CTG zaporedje tvori lasnično zanko, na katero se veže protein MBNL, ki ima vlogo pri izrezovanju in spajanju.
- Terapija: male molekule, ki ločijo MBNL od lasnice, povrnejo funkcijo MBNL.

Protitumorska zdravila



- Protitumorska zdravila, ki inhibirajo različne stopnje izrezovanja in spajanja.
- Z vezavo na SF3b kompleks, **meyamycin**, **plandienolid B** ter **herboxidien**, inhibirajo tvorbo kompleksa A.
- Isoginketin prepreči tvorbo kompleksa C.
- Amilorid inhibira Akt1 in Erk1 kinazi, ki fosforilirata tudi SR proteine.
- ML105 in ML106 inhibirata Clk kinaze, ki tudi fosforilirajo SR proteine.

Terapija s trans-izrezovanjem in spajanjem (trans-splicing)



- Z uporabo spliceosomalnega kompleksa in terapevtske pre-trans-splice molekule (PTM) zamenjamo mutirani del zaporedja.
- Zvezdica v E7 pri SMN2 je ESS.
- Zamenjamo E7 SMN2 z E7 SMN1, ki ima ESE.