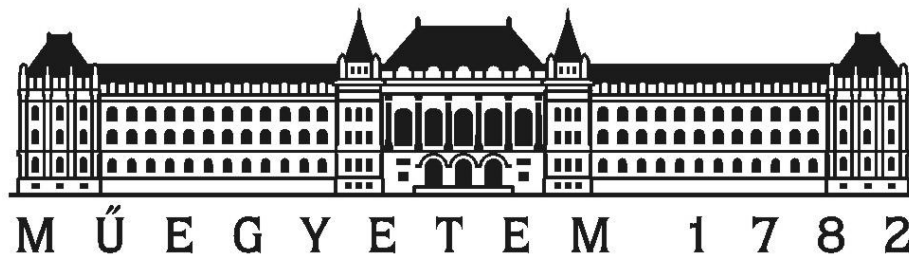


# Sejtszintű biológiai szabályozás

## Szabályozás élő rendszerekben



2018 ősz

# **Az RNSeK világa (részletek)**

2018. november 5.

# **Génexpresszió szabályozása**

## **mRNS érés, kis RNS-ek szerepei**

# Szabályozási lehetőségek és szintek a génkifejeződésben

**Transzkripció szabályozása:** mikor mely génekről indulhat meg az mRNS átírása

- represszorok, inducerek, transzkripciós faktorok
- kromatin szerkezet – epigenetika: a DNS és az őt körülvevő fehérjék kódja

**Poszttranszkripcionális szabályozási lehetőségek:**

mRNS stabilitás

 mRNS érés

 **Kis RNS-ek szerepei**

Az RNS-ek sokszínű molekulák, kicsit ellentétben a DNS-el

Gyakran fehérjékkel együtt komplexet alkotnak

Lehet katalitikus aktivitásuk (Tom Czech, Nobel díj)

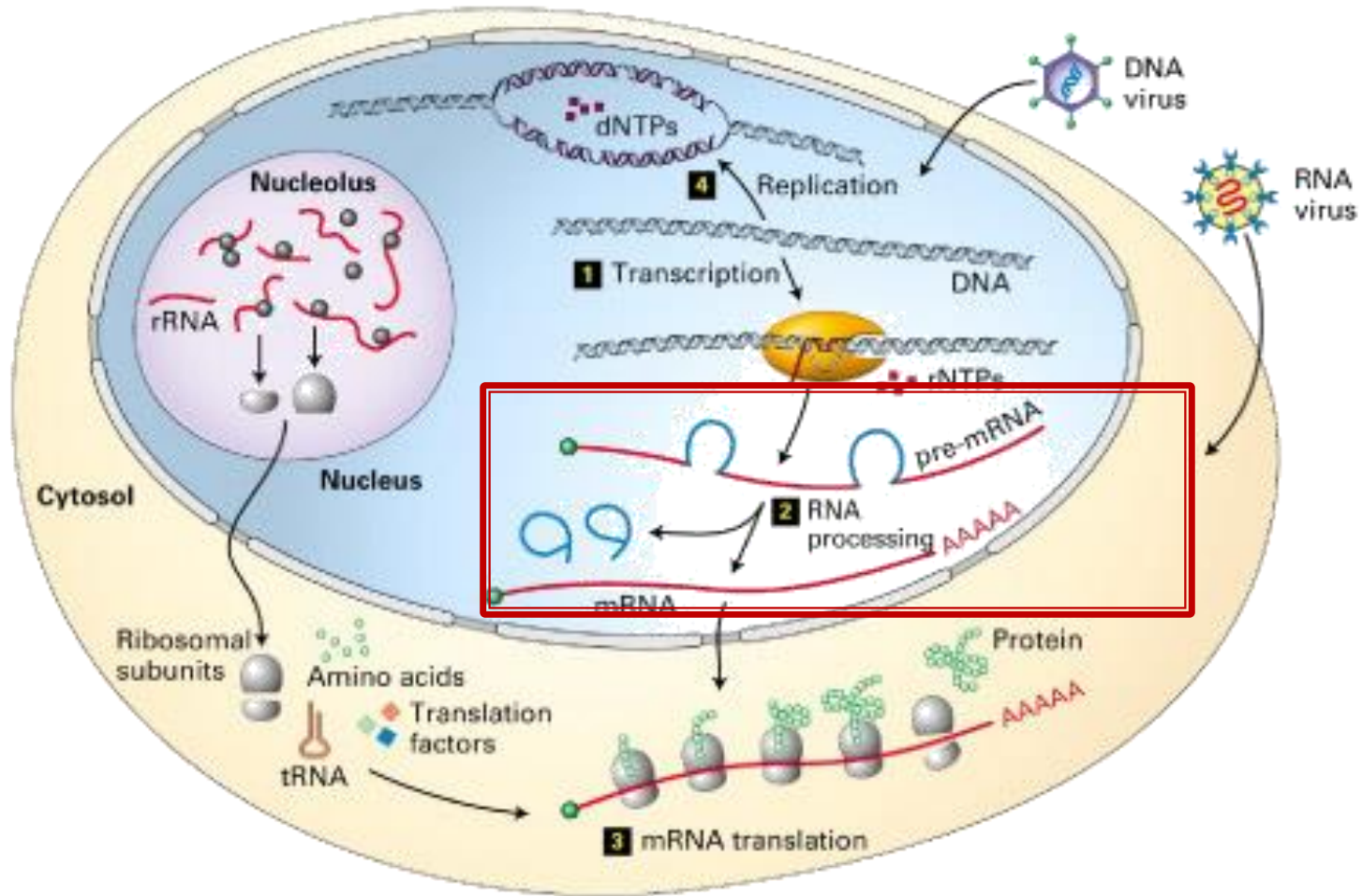
Sokféleképpen feltekeredhetnek 3D-ben - analógia a fehérjékkel

Számos kémiai módosításon átेशhetnek

Sokfelé lokalizálódhatnak (sejtmag, nukleólusz, citoplazma, riboszóma, P-body, Ago komplexek)

Számos módon befolyásolhatják a génexpressziót: érés, splicing, miRNS, siRNS

# Szokványos RNS molekulák



# RNS definíció

## ▶ Ribonukleinsav

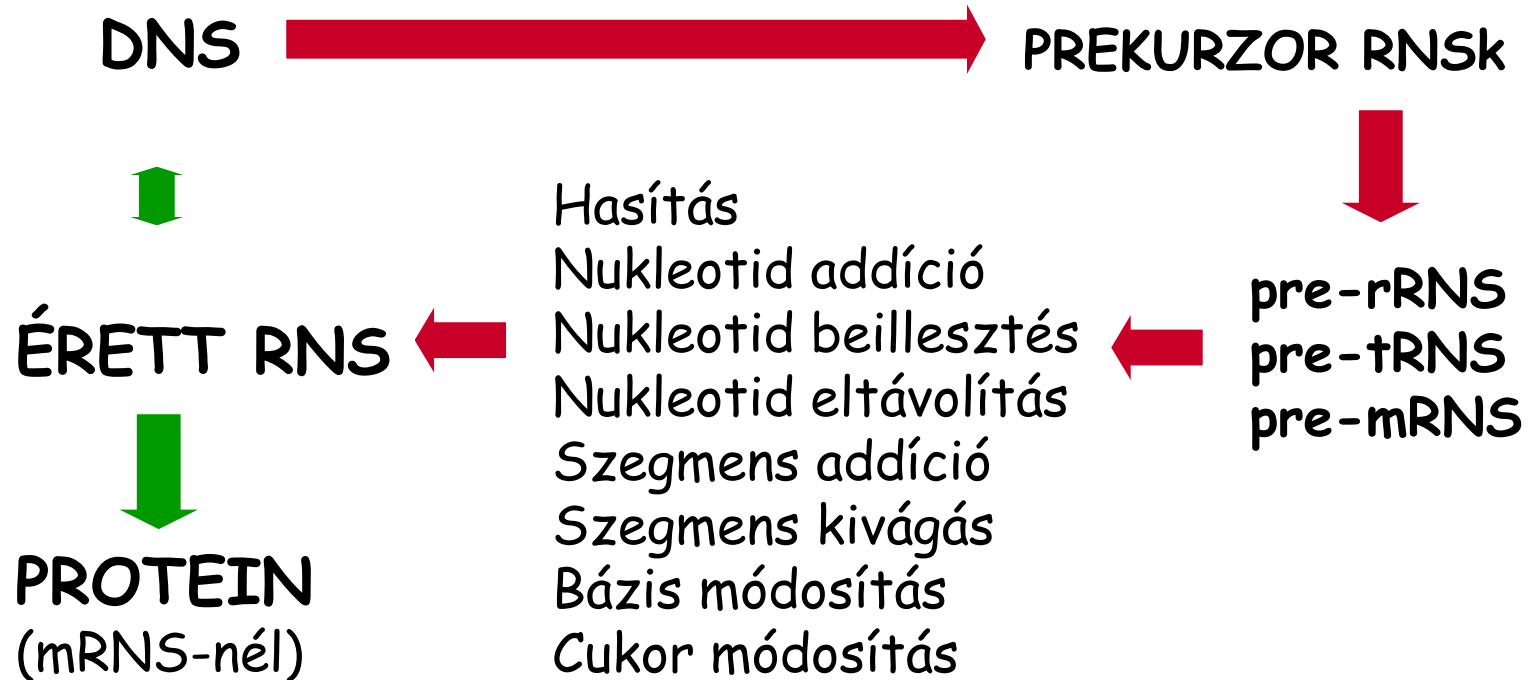
- Ribonukleotidok (Ribóz, bázis, foszfát)

## ▶ Típusok

- Kódoló: messenger RNA (mRNA)
- Nem-kódoló:
  - Riboszomális RNS (rRNS)
  - Transzfer RNS (tRNS)
  - Small nuclear RNS (snRNS)
  - Small nucleolar RNS (snoRNS)
  - Interference RNS (RNSi)
  - Short interfering RNS (siRNS)
  - Micro RNS (miRNS)

# RNS processzálas

---



**Egyéb faktorok, amik az RNS-jellegű molekulák expresszióját befolyásolják:**  
koncentráció (transzkripció és degradáció eredője)  
lokalizáció  
riboszómához kötés



# RNS-formáló RNSk és komplexek

---

<b>rRNS</b> <b>snoRNSk</b>	<b>riboszomális RNS</b> fehérjével komplexálnak, nukleotidokat módosítanak
<b>tRNS</b> <b>RNáz P</b> <b>snoRNS</b>	<b>transzfer RNS</b> fehérje + RNS fehérjével komplexálnak, nukleotidokat módosítanak
<b>mRNS</b> <b>snRNS</b>	<b>hírvivő RNS</b> U1,2,4,5,6 → spliceoszómák (sok fehérjével)
<b>gRNS</b> <b>miRNS</b> <b>siRNS</b>	RNS felismerő szekvencia info génexpr szabályozás génexpr szabályozás

sno, small nucleolar

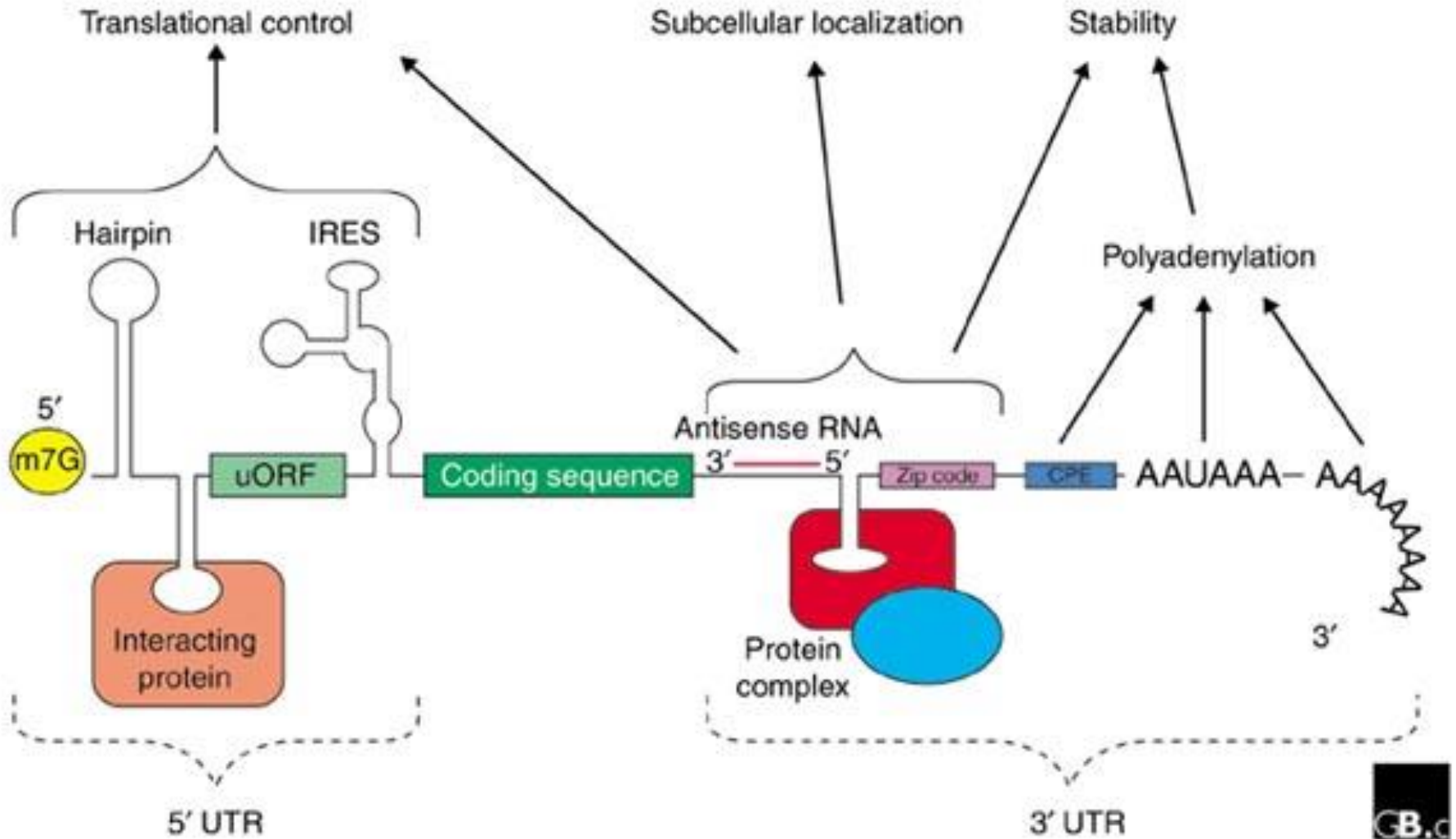
sn, small nuclear

gRNS - guide RNS - CRISPR

# mRNS szerkezet

- Kódoló szakasz
- Untranslated szakasz
  - 5' UTR
    - 7metil-G cap : sapka
      - cap binding proteins
    - Transzláció szabályozás
  - 3' UTR
    - Stabilitási elemek
    - Szubcelluláris lokalizáció (irányítószámok)
    - poli(A) vég

# mRNS



# mRNA processzálas

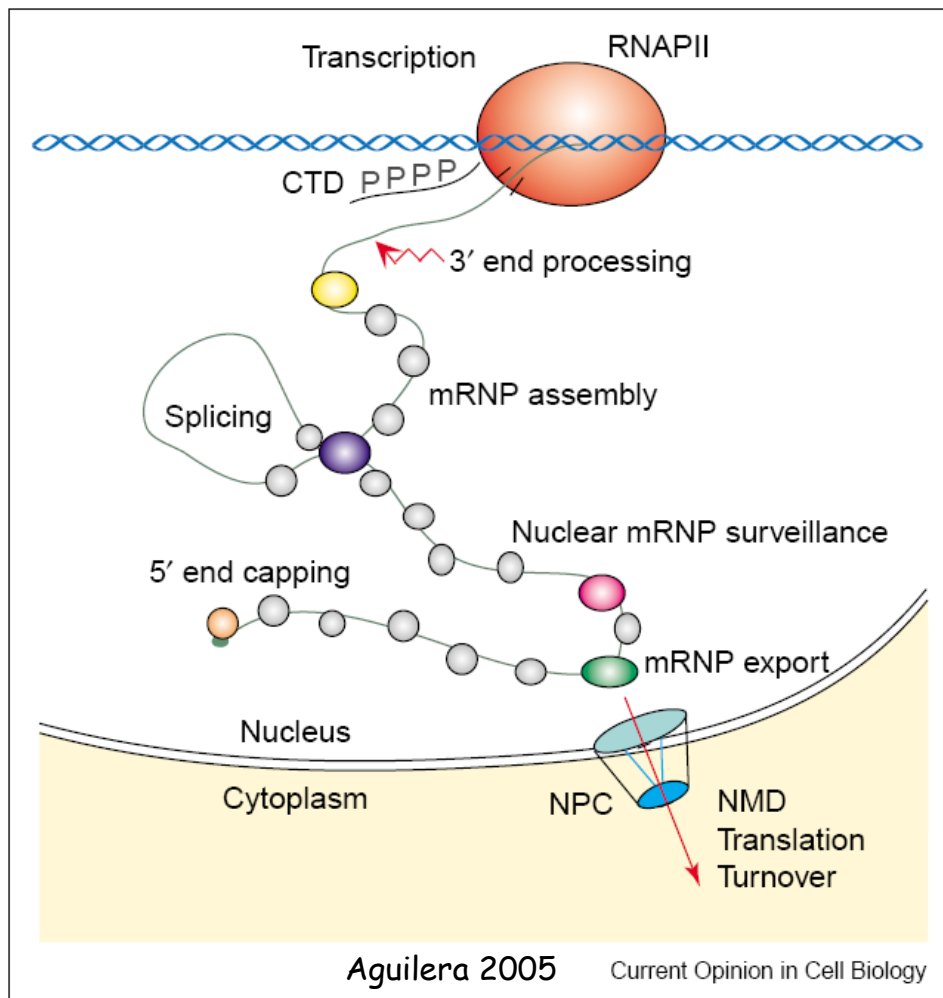
Érés  
folya-  
matok

Cap hozzáadása  
Splicing : hasítások,  
átrendeződések  
Poli-adeniláció  
Editálás (szerkesztés)

Érett  
RNS  
további  
sorsa

Export  
Lokalizációs változások  
Transzláció  
Lebomlás

Az mRNS keletkezésétől fogva egészen a lebomlásáig különböző fehérjékkel és egyéb RNS-ekkel áll fizikai kapcsolatban (komplexek). Ezek a kapcsolatok meghatározzák az mRNS kémiai módosításait és sorsát.



mRNP (messenger ribonucleoprotein particle):  
mRNS + hozzá kötött fehérjék

# mRNS processzálas: „capping”

## 5' capping: a 5'-végre 7MeG kerül

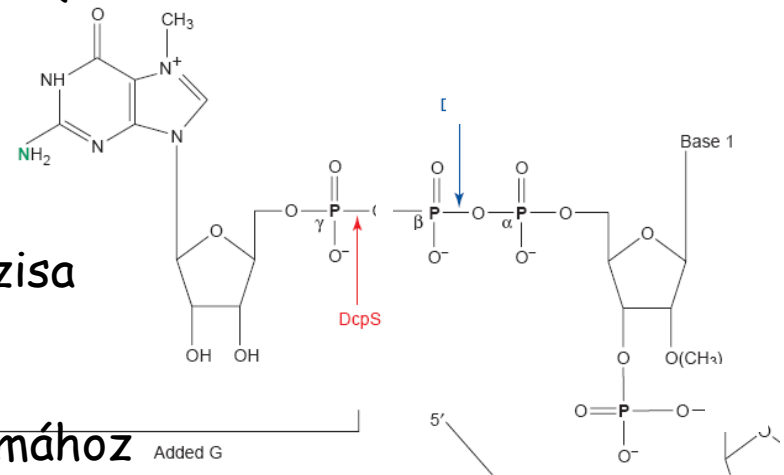
Eukarióta mRNS transzlációjához elengedhetetlen  
A riboszómához kötődést iniciálja

Mihelyst az mRNS lekerül az RNS polimeráizról (RNS polII), ráépül a **7-metil-guanozin sapka**  
**Speciális kötés: 5'-5' pirofoszfát!!!**

Metilálás a ráépülést követi

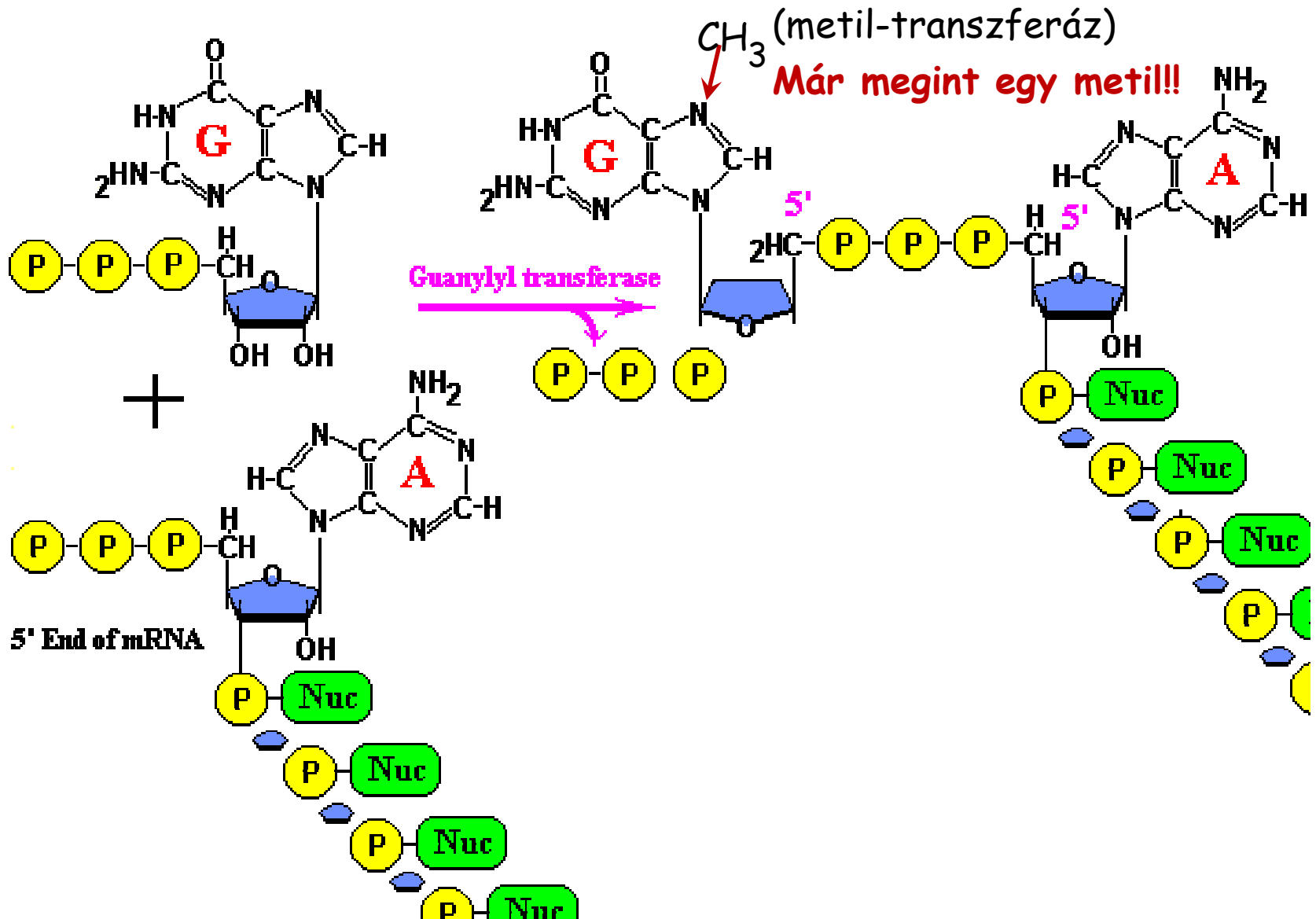
Az mRNS néhány további 5'-véghez közeli bázisa szintén metilálódhat

A sapkával ellátott mRNS tud majd a riboszómához kötni



# Leitmotif - metilálás

## 5'-sapka addíciója



# mRNS processzálas: „splicing”

---

- Nem-kódoló szakaszok (intronok) eltávolítása ÉS (!!)

„visszamaradó” exonok összekötése (ligálása): „exon junction” (EJC)  
(PROKARIÓTÁKBAN NINCSENEK INTRONOK!)

- Spliceosome: splice-szoszóma:

Itt történik a splicing, ez katalizálja a szükséges reakciókat

Öt snRNP komplexből áll

Ezeken belül hatféle snRNS van (small nuclear = kis magi) : U1, U2, U4, U5, or U6, plusz mindegyikben vannak fehérjék.

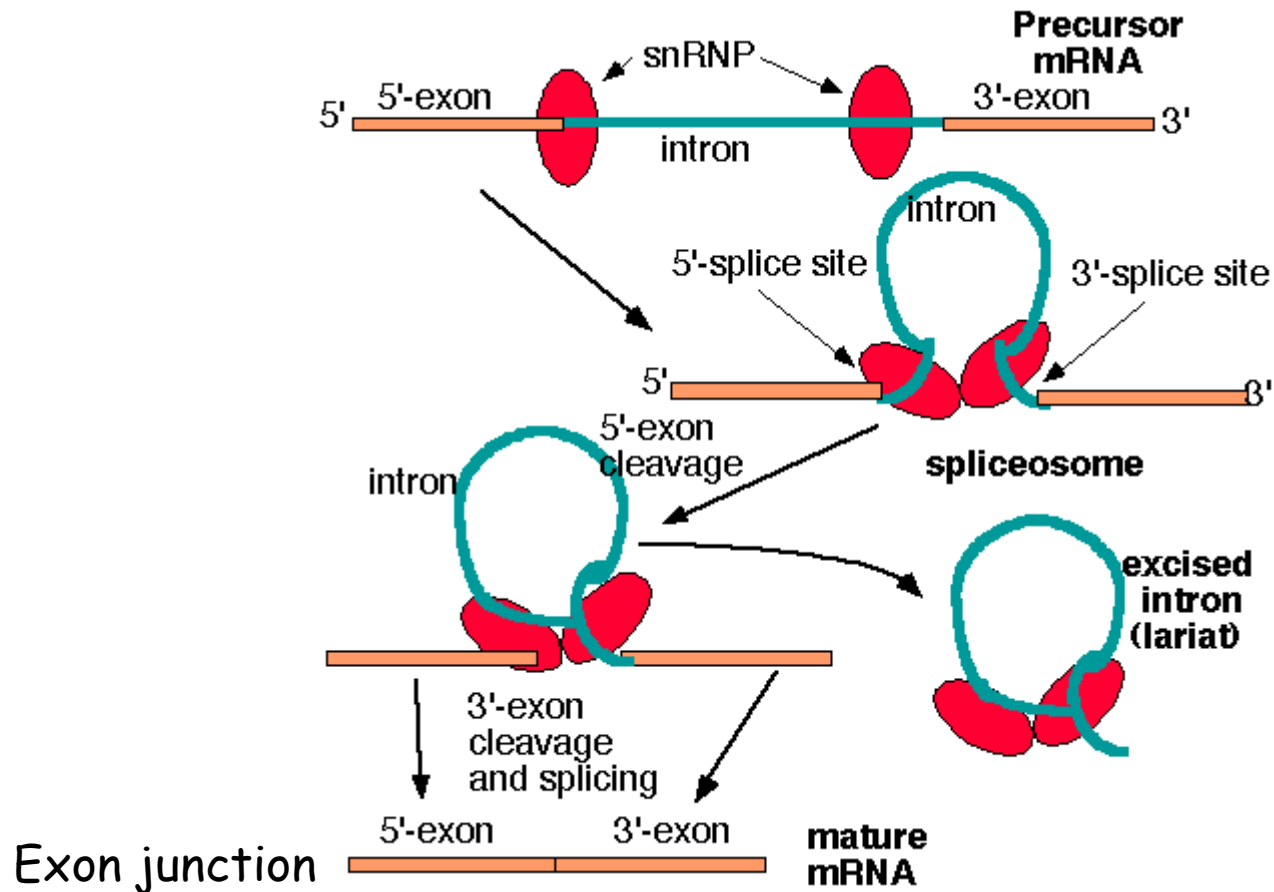
Vannak az összes snRNP-ben közös fehérjék, és vannak olyanok is, melyek az egyes snRNP-kre specifikusak

- Splicing kémiai véghezvitele: transzészterifikáció  
(lényeg, hogy ebben NINCS SZÜKSÉG nagyenergiájú foszfátészterekre)

**cis-splicing:** mindkét exon ugyanazon az mRNS-en

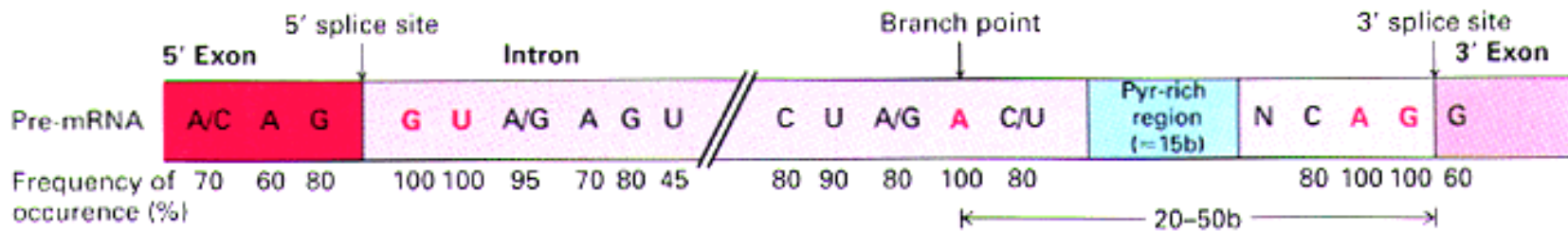
**trans-splicing:** különböző RNS-ne lévő exonok aztán össze lesznek kötve!!!! VARIÁCIÓS LEHETŐSÉG!

# Intronok eltávolítása: splicing





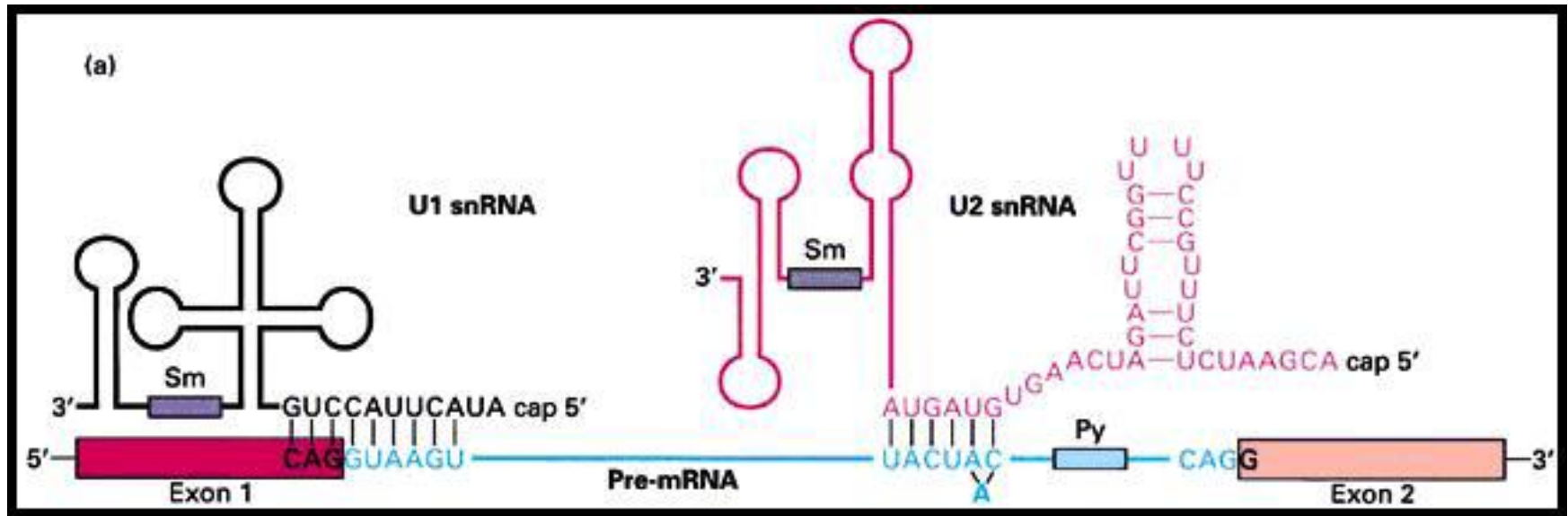
# Splicing komplex: felismeri a részlegesen konzervált szekvenciákat



5' splice és 3' splice helyek: némi konzerváltság (5' SS: 5' Splice Site)  
Intron végein: némi konzerváltság  
Intronon belül: pirimidin gazdag rész (15 bp)

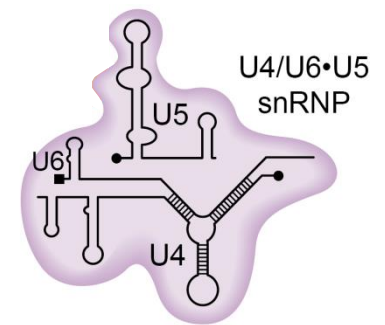
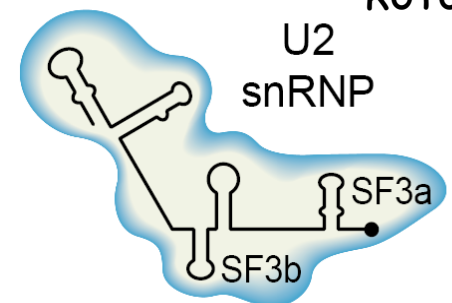
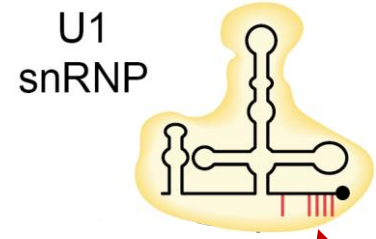
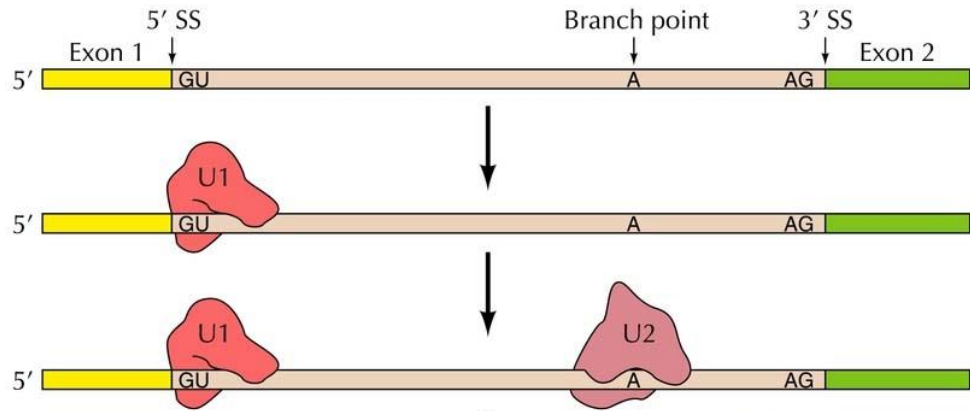
MIRE KELL ITT VIGYÁZNI?? **HÁT A LEOLVASÁSI KERETRE!**

# Splicing – spliceosome: több fehérje és snRNSek



Két snRNS-t látunk, melyek a pre-mRNS-hez kötnek részleges hibridizációval.  
U1: 5' exon-nál, U2: 3' exon körül (itt van az “A” hely)

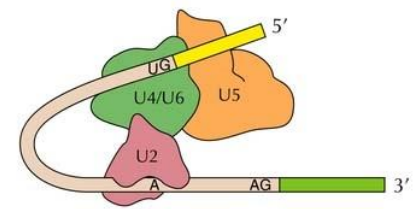
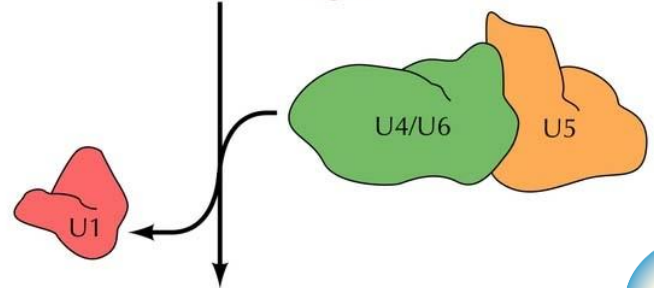
**Részleges hibridizáció - leitmotif**  
**Hol láttunk már ilyet?**



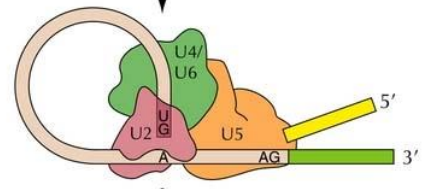
A splicing lépései:

U1 és a további U2..6:  
ezek az snRNP komplexek

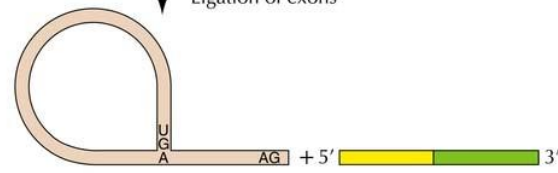
Lariat: a sajátos összehurkolt  
kivasadó intron szerkezet neve



Formation of  
lariat-like intermediate



Excision of intron  
Ligation of exons



# RNA splicing - a diverzitást segíti

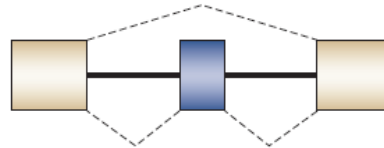
- Alternatív splicing
- Alternatív promóterek
- Alternatív poliadenilációs helyek

A splicing révén lehetőségessé válik az alternatív promóterek használata.

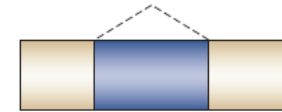
Erre egy példa:  
Magi izoforma sejtciklusfüggő promóter irányítása alatt,  
Mitokondriális izoforma: konstitutív promóterrel.

Extrém példa: Drosophila Dscam gén: elvileg 38016 lehetséges mRNS-e van

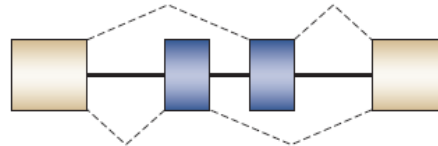
**Ba** Cassette exons



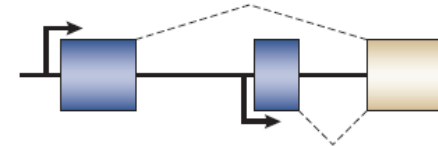
**Be** Retained intron



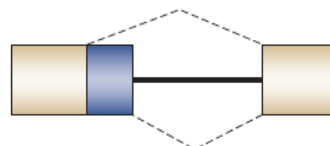
**Bb** Mutually exclusive exons



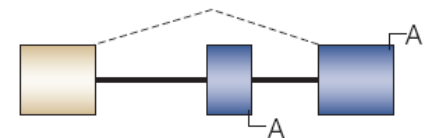
**Bf** Multiple promoters



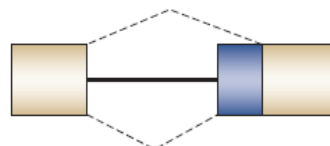
**Bc** Competing 5' splice sites



**Bg** Multiple poly(A) sites



**Bd** Competing 3' splice sites



# Genomi DNS vs cDNS

(vs: versus: összehasonlítás)

Hogyan klónoznánk meg egy emberi fehérjét?

cDNS: az mRNS készletről reverz transzkripcióval visszaírt DNS

Milyen enzim kell ehhez?

Reverz transzkriptáz - ami RNS templátról DNS-t szintetizál

Honnan szerezhethetünk ilyen enzimet?

(retrovírusokból, még jó, hogy ezek is léteznek).

Gondolkodjunk:

mi lehet a különbség a genomi DNS és a cDNS infotartalma között?

# RNS splicing - szabályozás

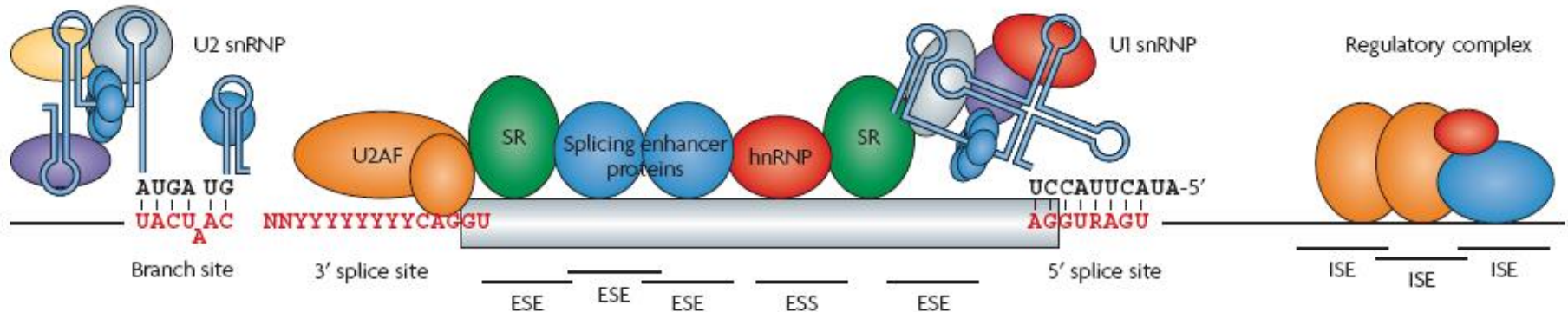
A splicing-ot is lehet persze szabályozni!

Enhancer (segítő) fehérjék és/vagy gátló fehérjék köthetnek az intron vagy az exon szekvenciákra

Léteznek is ezeken belül „konszenzus” szekvenciák (amik gyakran kötnek ilyen szabályozó fehérjéket):

- ESE exon splicing enhancer
- ESS exon splicing suppressor
- ISE intron splicing enhancer
- ISS intron splicing suppressor

Exon-irányított splicing: egy intron 5' splice-helyét az előző intron 3' splice helye koordinálhatja (nem pedig a saját intron 3' splice helye)



# mRNS splicing - poliadeniláció, a transzkripció vége (termináció)

---

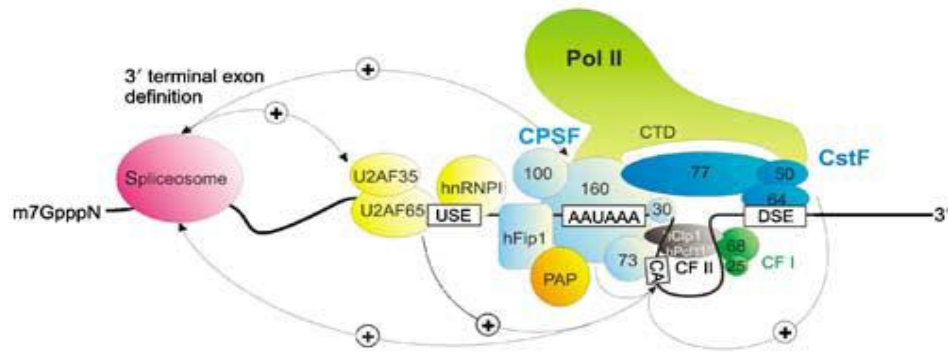
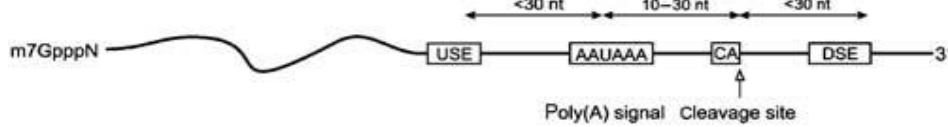
A legtöbb eukarióta mRNS esetén az érett 3' vég hasítással generálódik (tehát a transzkripció továbbmegy, mint az érett mRNS vége, és aztán levágódik a felesleges rész)

A vágó enzim: 3'-végre specifikus endonukleáz (nem exonukleáz!!)

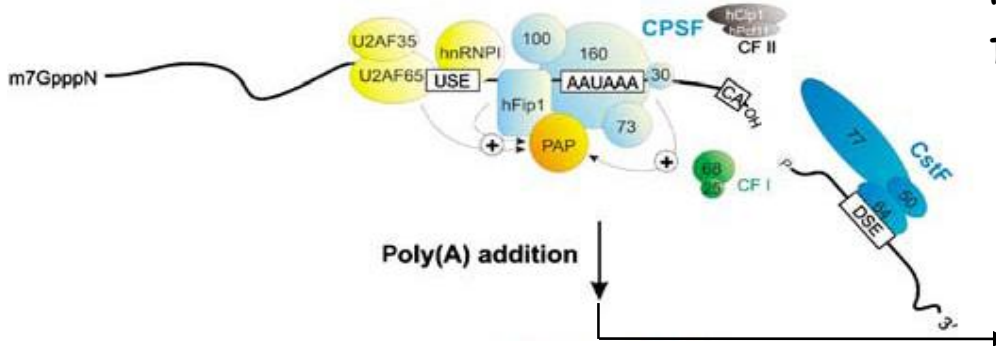
Vágás után következik a poliadeniláció és az export a citoplazmába (mRNP formában - tehát az mRNS fehérjével komplexált formában exportálódik a sejtmagból a citoplazmába)

# mRNS splicing - polyadenylation/3' end formation

A



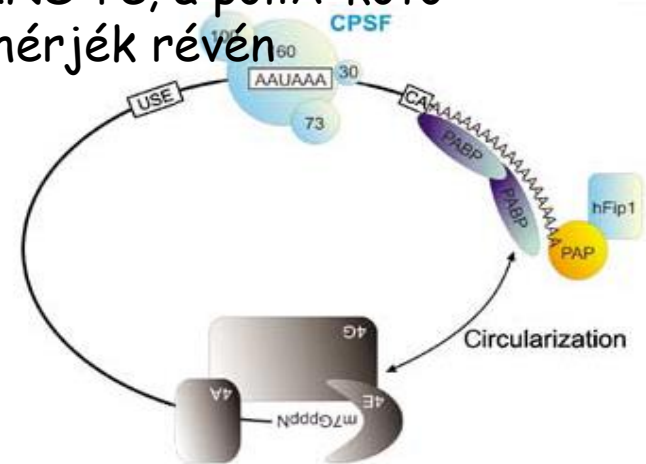
Cleavage



Poly(A) addition

Az mRNS 3' végének kialakítása emlősökben:

- poli(A) szignál AAUAAA kell
- a vágás a CA dinukleotid után következik be
- a vágást katalizáló fehérje komplex hozzáköt a 3' splice site fehérjeihez
- a poliA vég gyakran cirkularizálva épül rá az mRNS-re, a poliA-kötő fehérjék révén



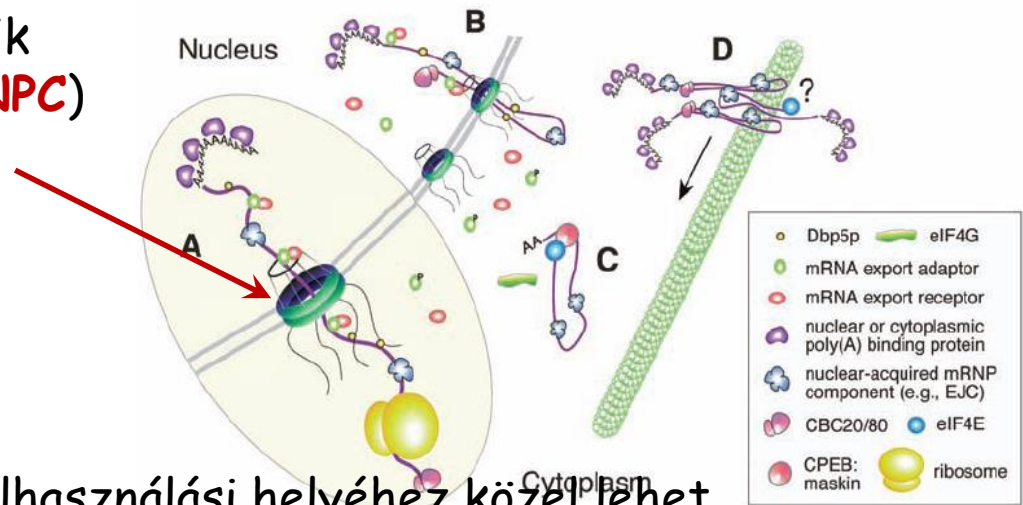
Circularization



# RNS export

## mRNP export a sejtmagból:

Adaptor fehérjék révén történik a **nukleáris pórus komplexen (NPC)** keresztül  
(erről volt szó a sejten belüli Transzport előadáson!)



## lokalizáció

mRNS transzláció: a fehérje felhasználási helyéhez közel lehet  
Egymással kapcsolatba lépő fehérjék mRNS-ei egymáshoz közel transzlálódhatnak

## transzláció

-követheti rögvest az mRNS citoplazmába érkezését

VAGY

- az mRNS-t tárolni lehet, amíg át nem íródik (P-body) - miRNS is ezt használta

turnover (ez is a P-body-ban történik)

nonsense-mediated decay: fontos, hogy a túl korai STOP kodonokat tartalmazó mRNS-eket lebontja az eukarióta sejt (mert az a „feltevés”, hogy ezeknél mutáció történt. **Gondolkodjunk: mi alapján lehet egy STOP kodonról eldönteni, hogy „túl korai”???**)

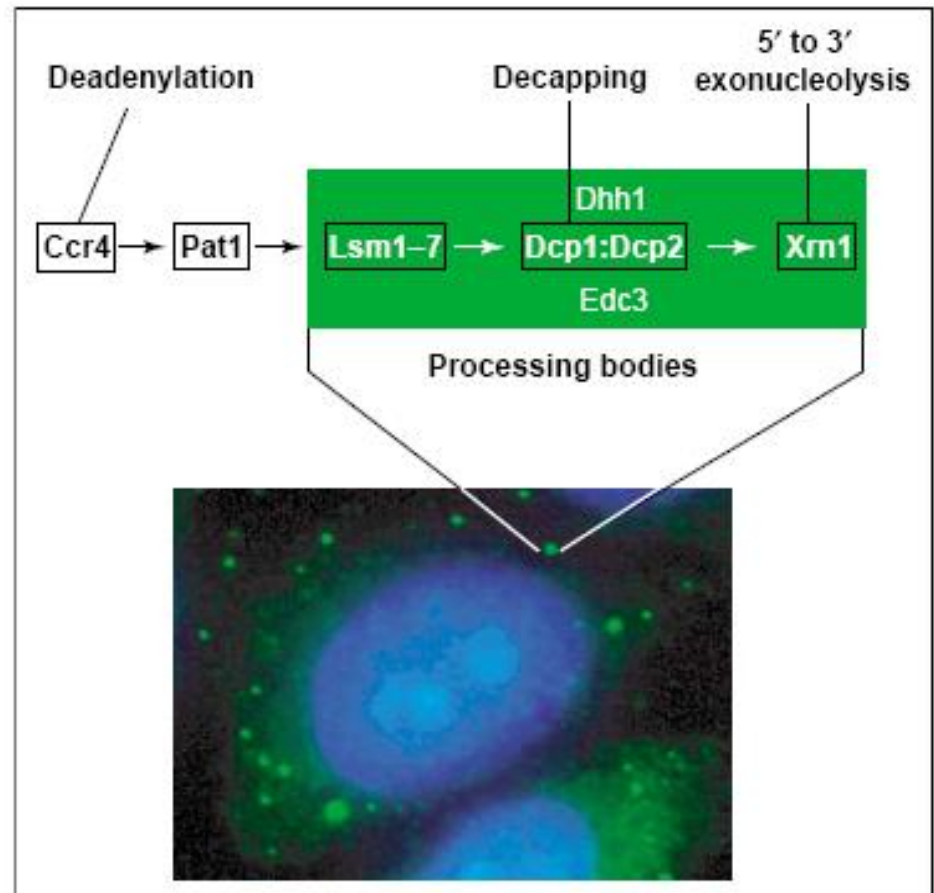
# RNS tárolás és turnover

## P-testecskék P-bodies

Ezeken belül levágódhat az mRNS-ről a poliA vég ill a 5'-sapka  
**DECAPPING!**  
**DEADENYLATION!**

Ezután a lebomlás könnyebben megy

miRNS is ide kerülhet!



# RNSk RNS-formáló (processzáló) funkciói

---

Bázispárosodás: a HELY meghatározása, ahol a folyamat történik (itt jól ki lehet használni, hogy mind a felismerendő, mind a felismerő szakasz nukleinsav!!)

Katalízis: vagy kapcsolt fehérje vagy az RNS maga

## FONTOS!

némely RNSk—ribozimek: önmaguk enzimek

## PÉLDÁK

self-splicing intron *Tetrahymena* rRNS

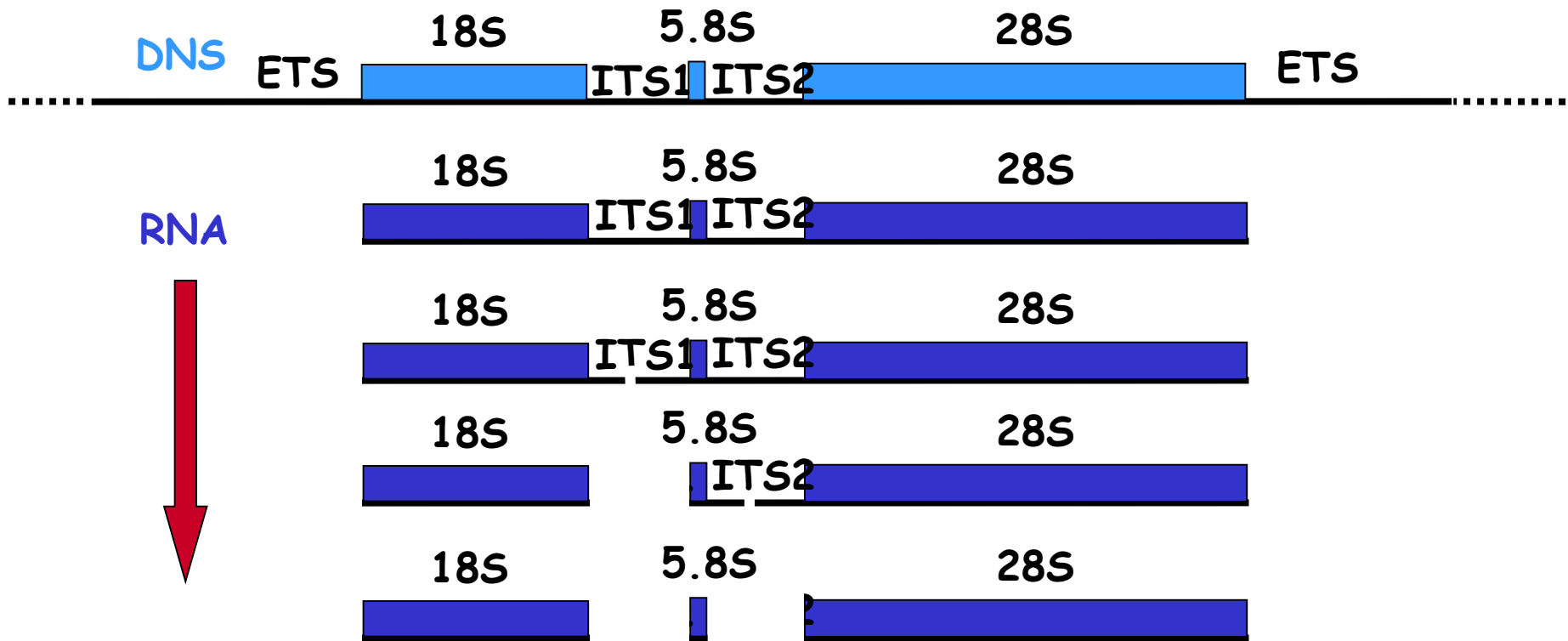
'hammerhead' ribozimek: önmagukat hasítják

snRNSk: splicingban katalitikus aktivitás

**Leitmotif - RNS katalitikus aktivitás**

# rRNS processzálas

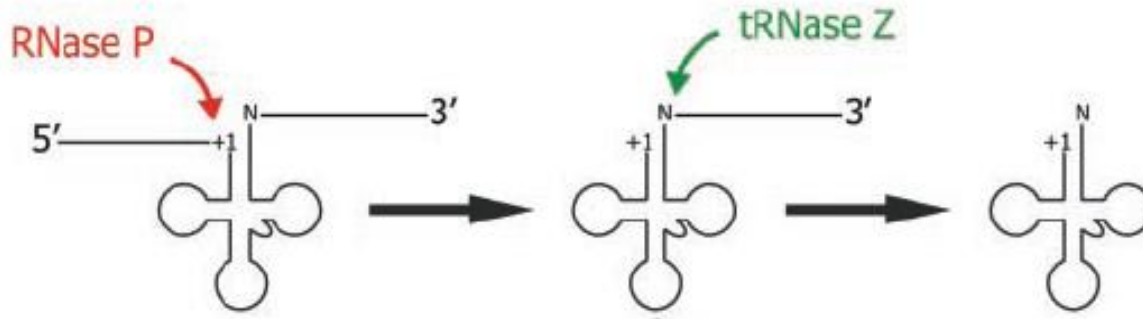
**Hasítás:** Pre-rRNS → **18S, 5.8S, 28S rRNSk**;  
minden fajban pontosan meghatározott helyeken  
kell darabolni a pre-rRNS-t



**ITS** (for internal transcribed spacer)  
**ETS** (for external transcribed spacer)

# tRNS processzálas

SOK MÓDOSÍTOTT NUKLEOTID!



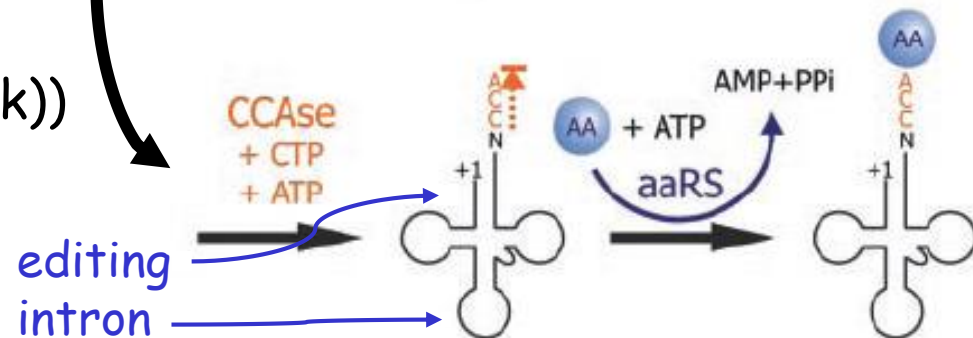
5' leader és 3' trailer levágás;  
sorrend változhat, két tRNS hasító  
enzim kell (tRNáz)

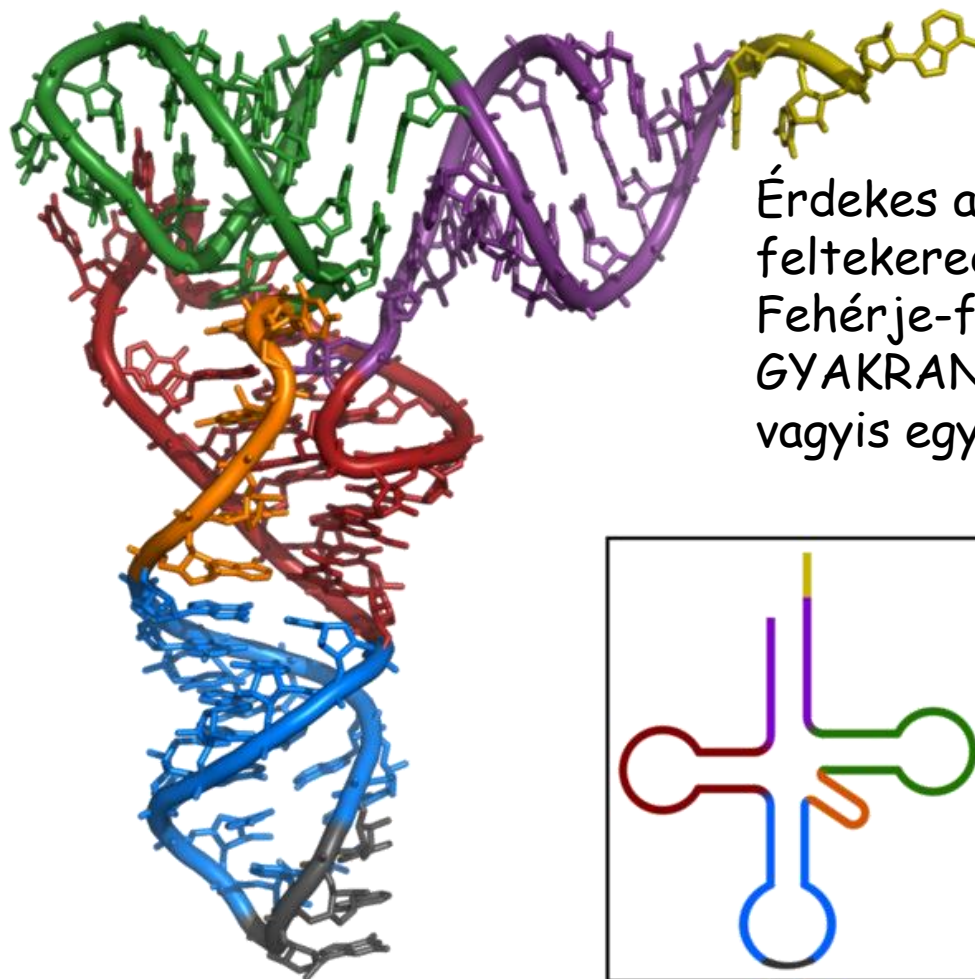
CCA vagy encoded (eleve ott van a  
tRNS génen kódolva -  
prokariótákban) vagy  
poszt-transzkripcós (eukarióták))

Acceptor stem: néha editált

tRNSnek lehetnek intronjai az  
antikodon hurokban

végül még egy „AA”  
dinukleotid is rákerül





Érdekes analógia a fehérje-  
feltekeredéssel  
Fehérje-folding - RNS folding  
GYAKRAN co-folding!  
vagyis együtt tekerednek fel!

tRNS térszerkezet

*CCA tail sárga, Acceptor stem lila, Variable loop narancs, D arm piros, Anticodon arm kék, Anticodon szürke, T arm zöld.*

# rRNS/tRNS processzálas : nukleólusz

---

**Módosítások** : mind a bázison, mind a cukorgyűrűn előfordulhatnak

**rRNS** ~100 ribóz 2'O-metilált  
10 bázis metilált  
95 U (uracil) pszeudoU-t ( $\psi$ - ez a jele) képez  
ezek a módosulások a riboszóma felépülése előtt történnek

**tRNS** ~100-féle módosult nukleotid  
ezek közül néhány a transzkripció során kerül ide  
mások a transzkripció után módosulnak

**snoRNS**: ezek a snoRNS-k felelősek sok módosításért  
(tehát a módosítások helye a nukleólusz)

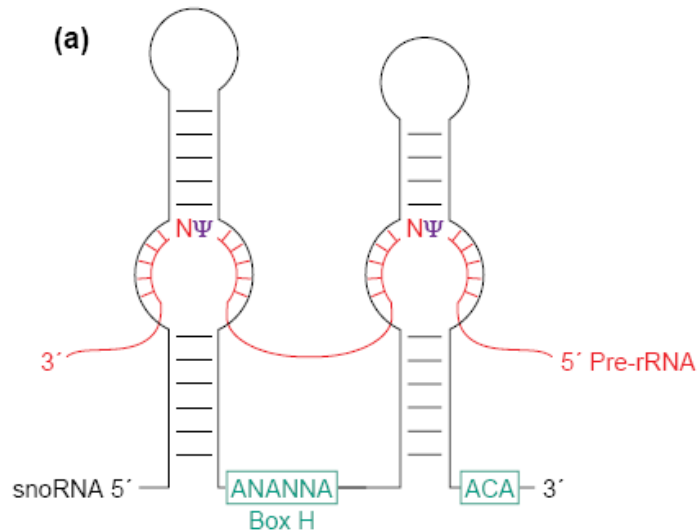
# RNS módosítások

## snoRNS

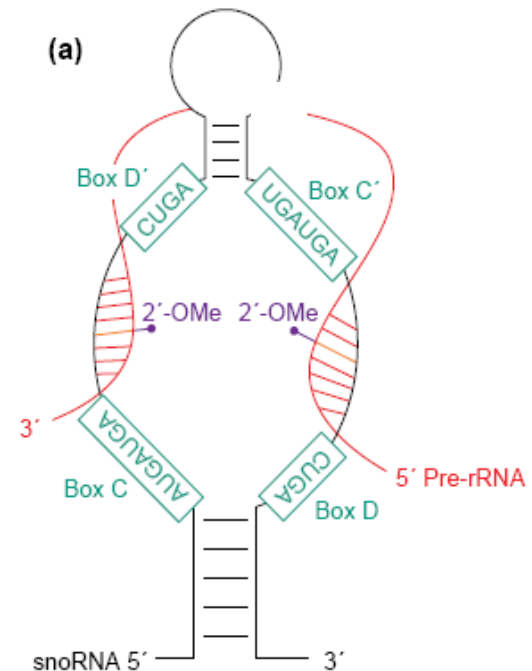
rRNS, tRNS, miRNS, siRNS és mRNS módosítása mind lehetséges a snoRNS-k által

Egyre több snoRNS-t azonosítanak

Méretük: ~60 - ~300 nt



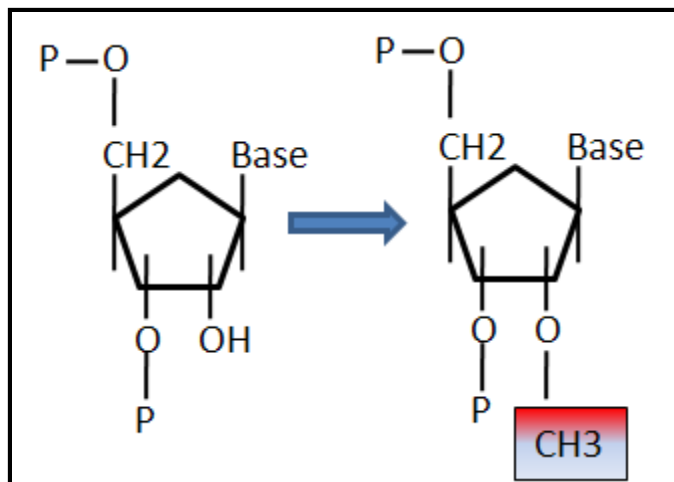
H/ACA snoRNS:  
Pszéudouridilációért felelős



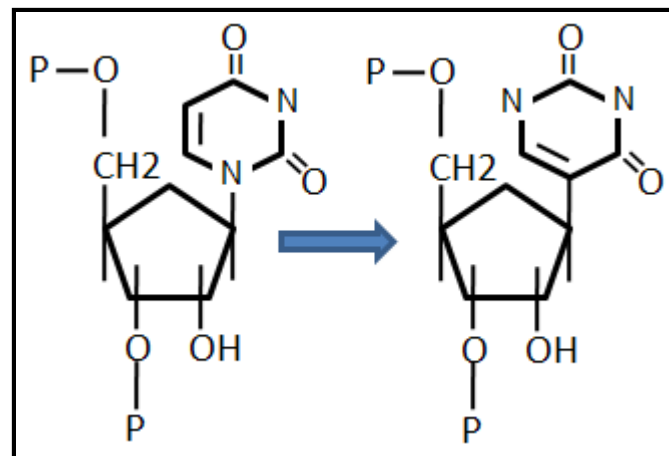
C/D snoRNS:  
Metilációért felelős



## 2'-O-methylation

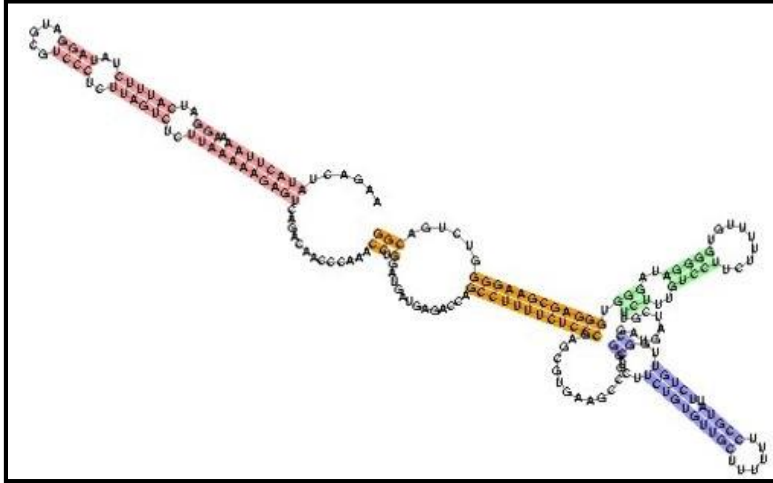


## Pseudouridylation



# snoRNSk felfedezése

U3 snoRNA



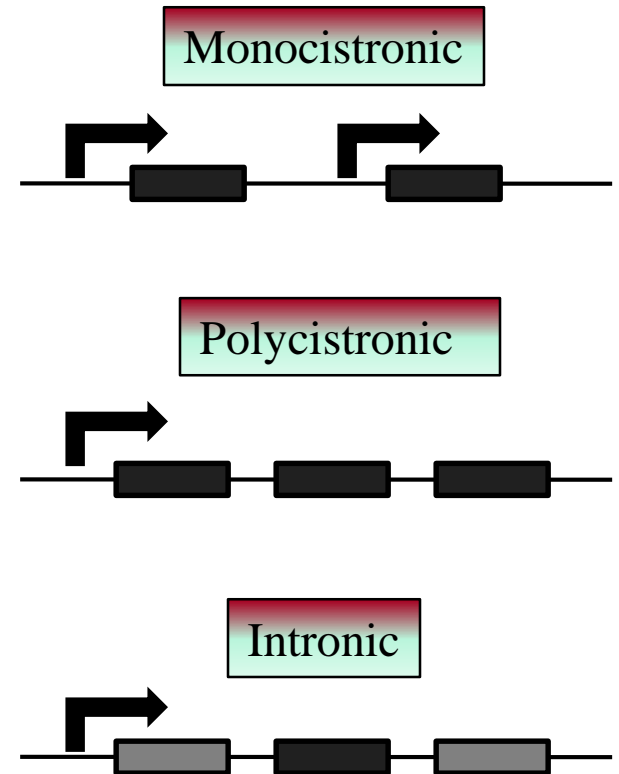
Wikipedia

- U3: 60-as évek
- Patkány sejtmagokban festődés
- Név oka: sok uridin

# snoRNS bioszintézis

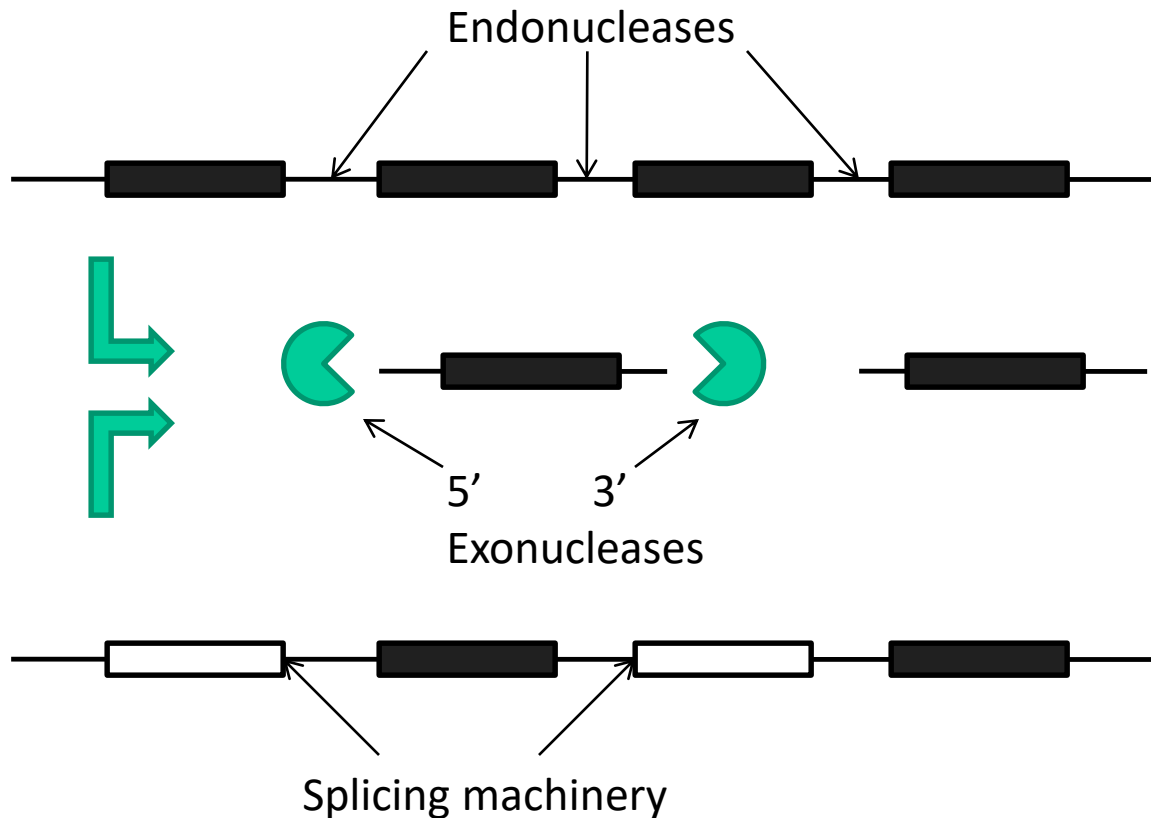
- Élesztőben:  
monocisztronos snoRNS-k  
jellemzőek (mi is az a  
monocisztronos?)
- Növényekben:  
policisztronos snoRNS-k
- Gerincesekben: snoRNS  
gyakran van az rRNS  
processzálo fehérjék  
intronjain belül

(érdekes példa arra, hogy az  
intron információt hordoz



# snoRNA bioszintézis

- Policisztronos és intronikus snoRNS-eknél kell a processzálni, ahhoz, hogy funkcionálisak legyenek



# RNS „editing” - Szerkesztés - info módosítás

---

Az RNS editing megváltoztatja az RNS szekvenciát és kódolást

Először azt gondolták, nagyon ritka

Mára kiderült, hogy általánosan előforduló jelenség (gombák/prokarióták kivételével mindenhol találtak már ilyen példát)

Két fő típus:

1. Bázis módosítás: dezaminálás:  $C \rightarrow U$ ,  $A \rightarrow I$

2. Inszerció/delécio (ettől a leolvasási keret is változhat)

# Leitmotif - bázisok dezaminálása

## A → I RNS editing

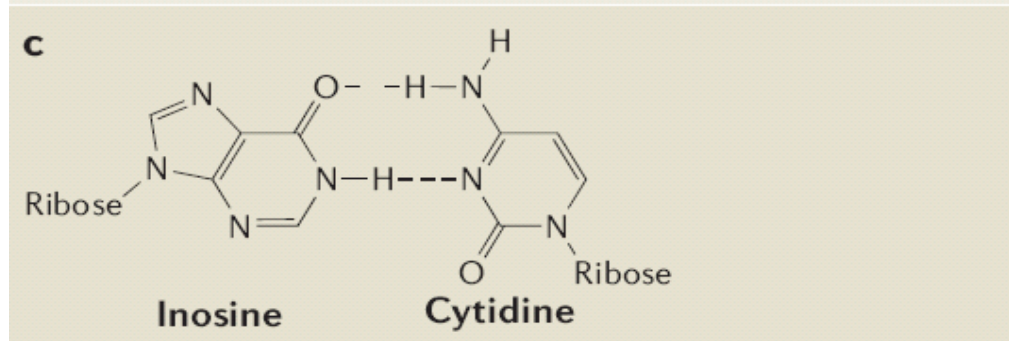
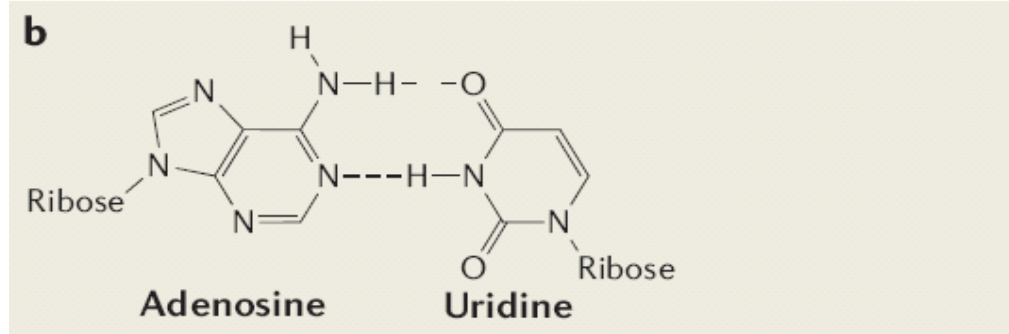
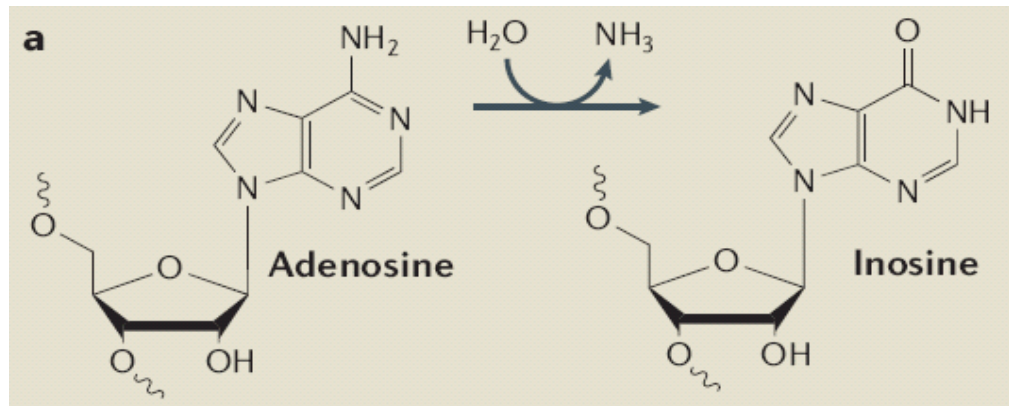
dezaminálás

I : C-vel párosodik

míg A : G-vel

Az A → I hatása tehát  
egy pontmutáció

Nishikura 2006



C → U:

Ez is pontmutációt fog jelenteni

Gyakori az immunoglobulin géneknél