
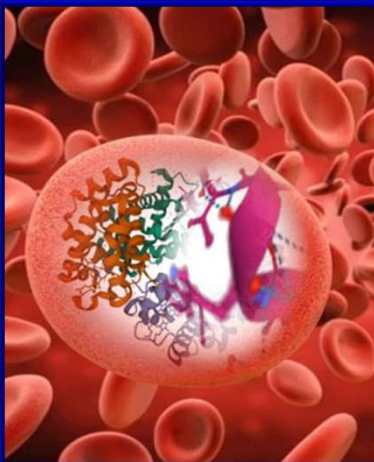




Kontrola translacji

1. Czynniki kontrolujące translację
 - Czas trwania RNA
 - Białka wiążące RNA
2. Kontrola inicjacji translacji
 - Kompleks preinicjacyjny
 - Rozpoznanie kodonu START
 - Elementy kontroli
3. Regulacja post-translacyjna
 - Definicja
 - Ewolucja
 - Przykłady
4. Epigenetyka i epigenom
 - Definicja
 - Modyfikacje epigenetyczne



Kontrola translacji

Regulacja po-transkrypcyjna obejmuje kilka procesów. Decydują one o skuteczności przekształcenia mRNA na białko – translacji.

Regulacja na etapie translacji

- mRNA szybko podlega degradacji, translacja wymaga połączenia mRNA z białkami wiążącymi RNA – RBP.
- Regulacja po-transkrypcyjna odbywa się na poziomie:
 - eksportu RNA i jego lokalizacji w cytoplazmie;
 - tempa degradacji;
 - inicjacji i tempa translacji.
- Modyfikacje potranslacyjne zmieniają właściwości białek po zakończonej ich syntezie.

mRNA połączony z białkami RBP - **transkrypt**

Eksport RNA, lokalizacja

Modyfikacje potranslacyjne

Regulacja na poziomie translacji i po translacji jest procesem wieloetapowym, jest ona często związana z odpowiedzią na stres.

Kontrola translacji

Kontrola translacji jest związana z mechanizmami degradacji mRNA przy udziale 3'-5' egzo- i endonukleolitycznego egzozomu RNA.

Budowa egzozomu

- Jest to wielobiałkowy kompleks występujący w jądrze i cytoplazmie.
- Budowa:
 - 9 białek EXO-9,
 - aktywność katalityczna wymaga obecności rybonukleaz hRRP6/Rrp6p, hRR44 (DIS3)/Rrp44p oraz helikaz (SK12, hMTR4).
- Białka wiążące się z RNA pośredniczą w reakcji między RNA a egzozomem.
- Egzozom jest strukturą konserwatywną.

S. cerevisiae Human

Nucleoplasm Nucleolus Nucleoplasm

hMTR4-Mtr4p	hRRP6-Rrp6p	hRRP44-Rrp44p	EXO-9	hTRAMP and TRAMP4/5	NNS	hMTR4-Mtr4p	NEXT	PAXT
	CTD				Nrd1p		hMTR4	hMTR4
	Rrp47p				Nab1p	+	ZCCH8	ZCCH8
	MPP6				Sm11p	WDK74-Nsa1p?	FBM7	ZCCH11
	Mpp6p					UTP18-Utp18p		PABP1
						PCT11-Nop53p		
						DGCR8?		

Egzozom RNA (EXO-9) i współpracujące białka (adaptery). Porównanie drożdży i człowieka. Białka hMTR4 (zielone) to główne punkty łączące egzozom z adapterami. Kolor czerwony oznacza RNA.

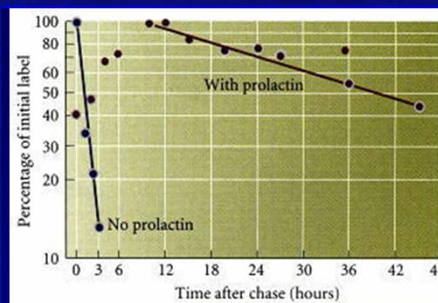
Egzozom uczestniczy w obróbce wszystkich typów RNA. Rozpoznawanie substratów RNA umożliwia białka wiążące RNA.

1. Czynniki: czas trwania RNA

Im **dluższy** jest okres półtrwania RNA, tym **więcej** białka jest produkowane. Czas półtrwania RNA zależy od **dlugości** polyA.

Czas półtrwania RNA

- 1,1 h to czas półtrwania mRNA dla kazeiny w gruczole mlekowym ssaków. W okresie laktacji, w obecności prolaktyny czas półtrwania zwiększa się do 28 h.
- Oocyty zawierają RNA, który jest wykorzystywany po zapłodnieniu. Indukcja następuje pod wpływem sygnałów jonowych. Przykłady: mRNA dla cyklin, aktyny, tubuliny, histonów, kadheryn.
- Stosunek 1:1 α - i β -globin we krwi osób dorosłych wynika ze zróżnicowanej translacji odpowiednich genów.



Czas półtrwania mRNA dla kazeiny w obecności i przy braku prolaktyny. Do kultury komórkowej dodano radioaktywne prekursorsy RNA. Po określonym czasie usunięto je i zastąpiono je nieradioaktywnymi prekursorami. W obecności prolaktyny czas półtrwania mRNA wydłuża się.

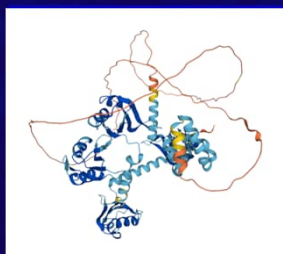
Długość polyA zależy od sekwencji w regionie 3'UTR, ale także od tkanki i okresu rozwojowego.



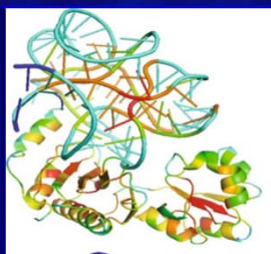
1. Czynniki: Białka wiążące RNA

Białka wiążące RNA (RBP): grupa białek łącząca się z RNA i regulująca wszystkie procesy związane z RNA.

Rodzaje białek wiążących się z RNA



PABP: białka wiążące się z łańcuchem poliadenylowym.



RBP: białka wiążące się z RNA. Struktura ludzkiego białka RBP wraz z widocznym RNA.



EJC: białka wiążące się z stykami egzon-intron.

Mechanizmy wiązania się RBP z RNA, ich regulacji oraz konsekwencje fizjologiczne są zróżnicowane i słabo poznane.



1. Czynniki: Białka wiążące RNA, PABP

PABP: białka wiążące się z łańcuchem polyA, wpływają na długość polyA, transport mRNA przez pory jądrowe oraz inicjację translacji.

Białka PABP

- Pokrywają polyA o długości 250 bp u człowieka.
- Pełnią podwójną funkcję:
 - Chronią RNA przed atakiem nukleolitycznym w jądrze i kierują RNA do cytoplazmy.
 - Mogą rozpoczynać degradację poprzez pozyskanie aktywności nukleolitycznej – zapewnia to eliminację transkryptów, które nie opuściły jądra.
- Czynniki decydujące o roli ochronnej lub degradacji nie są poznane.

PABP występują w jądrze i cytoplazmie. Często przemieszczają się pomiędzy tymi strukturami komórkowymi.

Meola i Jensen 2017

1. Czynniki: Białka wiążące RNA, RBP

RBP: białka, które wiążą się z RNA w trakcie jego obróbki i regulują metabolizm RNA na różnych etapach.

Domeny RBP (RBD)

- Są to domeny w białkach RBP odpowiedzialne za wiązanie z RNA.
- W białku może występować kilka domen RBD.
- Regiony o zaburzonej strukturze białek RBP również funkcjonują jako RBD.
- RBD reagują z sekwencjami 4-8 nukleotydów.
- Tylko niektóre domeny są specyficzne dla sekwencji RNA.
- Większość RBD reaguje ze szkieletem cukrowo-fosforanowym.

Białka RBP wiążą się z krótkimi fragmentami RNA, które rozpoznawane są jako struktury jednoniciowe lub helikalnie skrócone.

<p>RS REPEATS</p>	<p>Domeny zawierające powtórzenia bogate w arginę i serynę (RS). Wiązanie jest niespecyficzne. Przykład: NF-kappa-B, które uczestniczy w rozwoju limfocytów T.</p>
<p>RG[G] REPEATS</p>	<p>Domeny zawierające powtórzenia bogate argininę i glicynę (RG). Przykład: Czynniki NXF1 uczestniczący w transporcie RNA z jądra do cytoplazmy.</p>
<p>K/R BASIC PATCHES</p>	<p>Domeny zawierające powtórzenia bogate lizynę lub argininę (K/R). Przykład: motywy ARM w białkach wirusowych.</p>

Strzałki pokazują regiony zaangażowane w wiązanie z RNA.

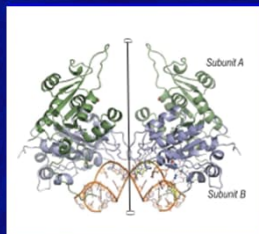
Jarveli et al. 2016

1. Czynniki: Białka wiążące RNA, RBP

Białka wiążące RNA należące do rodziny ZC3H12 występują u wszystkich Metazoa i są związane z odpowiedzią przeciwwirusową.

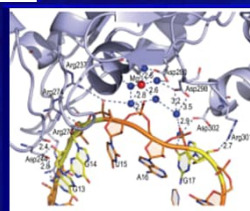
Cechy ZC3H12

- Rozpoznają komórkowe lub wirusowe RNA, które nie uległo splicingowi i powinno być zdegradowane.
- Wykazują aktywność endonukleaz RNA dzięki domenom: C3H1 i PIN.
- Są dimerami z jonami Mg^{2+} w każdym miejscu aktywnym.
- RNA zajmuje tylko jedno miejsce aktywne lecz kontakt między dimerami zapewniają dwa łańcuchy RNA, które wchodzą w interakcję.
- RNA łączy się w pobliżu Mg^{2+} poprzez sekwencję GGUAG.



Struktura krystaliczna ZC3H12 człowieka. Pokazana jest domena PIN. Każdy dimer składa się z dwóch monomerów, które tworzą podjednostkę A (zielona) i B (niebieska). Dwa łańcuchy RNA wchodzą w interakcję zapewniając kontakt między dimerami.

Grupy fosforanowe U15, A16 i G17 wchodzą w interakcję z Mg^{2+} (czerwone koło) poprzez 5 cząsteczek wody (niebieskie koło), które następnie reagują z tlenem w aminokwasach Asp280, Asp195 oraz Asp298. Pozycja Mg^{2+} jest zaburzona, przesuwa się on w kierunku RNA.



Funkcja białek RBP nie jest dostatecznie poznana, wiele z nich uczestniczy w procesach fizjologicznych innych niż metabolizm RNA.

Joima et al. 2020



1. Czynniki: Białka wiążące RNA, EJC

EJC: kompleks białkowy wiążący się w pobliżu granicy egzonów podczas obróbki mRNA.

Funkcja EJC

- Przyłącza się po wycięciu intronów, znakuje miejsce intronów.
- Zapobiega splicingowi miejsc krytycznych 5' i 3' w obrębie egzonów poprzez łączenie z kompleksem PSAP.
- Ułatwia transport mRNA z jądra do cytoplazmy poprzez interakcję z czynnikami eksportu, np. TREX.
- Ułatwia translację współdziałając z czynnikami inicjującymi. Powoduje to efektywniejszą translację mRNA, który podlegał splicingowi niż mRNA, który nie podlegał splicingowi.

MAGOH: dwa homologiczne białka kodowane przez dwa geny.

RBM8A: wraz z MAGOH tworzy heterodimer, utrzymuje wiązanie EIF4A3 z mRNA.

EIF4A3: główny element kompleksu wiążącego się z RNA.



EJC lokuje się 20-24 bp upstream styku egzonów. Zbudowany z trzech białek rdzenia: MAGOH, RB8A, EIF4A3.

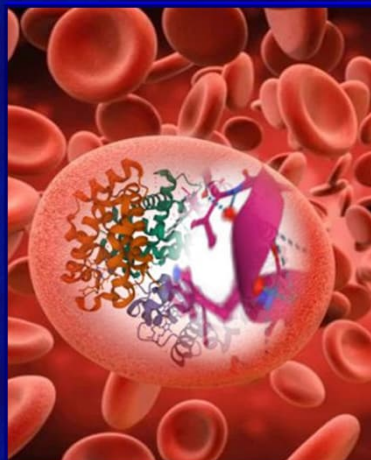
Kompleks EJC jest związany z mRNA cały czas, w jądrze, cytoplazmie, dostarcza informacji o pozycji intronów i splicingu.

Schlautmann i Gehring 2020



Kontrola translacji

1. Czynniki kontrolujące translację
 - Czas trwania RNA
 - Białka wiążące RNA
2. Kontrola inicjacji translacji
 - Kompleks preinicjacyjny
 - Rozpoznanie kodonu START
 - Elementy kontroli
3. Regulacja post-translacyjna
 - Definicja
 - Ewolucja
 - Przykłady
4. Epigenetyka i epigenom
 - Definicja
 - Modyfikacje epigenetyczne

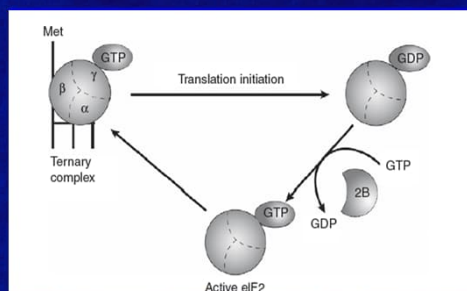


2. Kontrola inicjacji translacji: preinicjacja

Efektywność translacji uzależniona jest głównie od inicjacji. Elongacja i terminacja mają ograniczony wpływ na efektywność.

Kompleks preinicjacyjny (43S)

- Warunkiem inicjacji translacji jest obecność wolnych podjednostek rybosomalnych, które ulegają asocjacji na początku procesu.
- Wolne podjednostki rybosomalne powstają poprzez dysocjację po zakończeniu translacji.
- Dysocjacja jest wspomagana działaniem czynników inicjujących eIF.
- Pierwszym etapem jest tworzenie kompleksu preinicjacyjnego będącego heterotrimerem zbudowanym z trzech różnych białek (ternary complex).



Tworzenie aktywnego kompleksu preinicjacyjnego. Kompleks zbudowany jest z 3 podjednostek α , β , γ czynników eIF, tRNA dla metioniny, która jest zazwyczaj kodonem start, GTP. Po rozpoznaniu kodonu AUG, hydroliza GTP dostarcza energii niezbędnej do inicjacji translacji.

Inhibitory elongacji tylko nieznacznie ograniczają syntezę białek. Skuteczność translacji większości cząsteczek mRNA nie zmienia się.

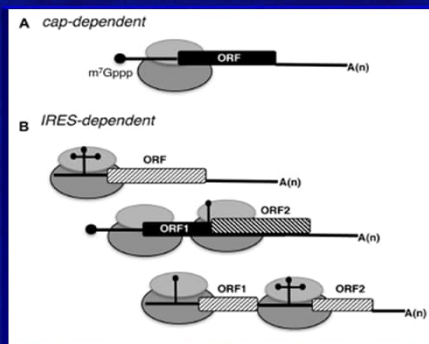


Kontrola inicjacji translacji: kodon START

Kompleks preinicjacyjny skanuje mRNA pod kątem obecności kodonu START – AUG.

Rozpoznanie kodonu START

- Po rozpoznaniu kodonu START powstaje stabilny, aktywny kompleks inicjacyjny 48S.
- Selekcja kodonu AUG zależy od czynnika eIF1.
- Inicjacja translacji uwarunkowana jest obecnością CAP na końcu 5'.
- Czasami może zachodzić inicjacja niezależna od CAP poprzez miejsce IRES (Internal ribosomal entry sites) w rybosomach.
- IRES: silnie ustrukturyzowana sekwencja w obrębie 5'UTR, nie jest konserwatywna. Uczestniczy w rekrutacji podjednostki 40S.



Inicjacja translacji zależna od CAP, oraz zależna od IRES. Różne fragmenty RNA, które tworzą pętle mogą pełnić funkcję IRES (np. u wirusów RNA).

Kodon START jest rozpoznawany na podstawie parowania pomiędzy zasadami w pętli antykodonu tRNA oraz sekwencją AUG w mRNA.

Martinez-Salas 2018

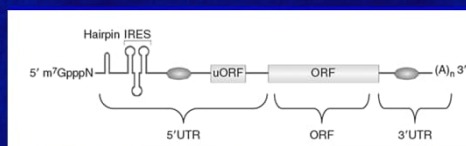


2. Kontrola inicjacji translacji: elementy

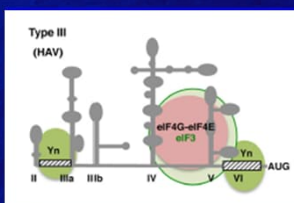
Regulacja na poziomie inicjacji translacji obejmuje czynniki inicjacyjne, mRNA oraz rybosomy.

Przykłady elementów podlegających regulacji

- Czynniki inicjacyjne: głównie eIF4E, który łączy się z CAP. Inhibitory eIF4E hamują przyłączenie do CAP uniemożliwiając inicjację translacji. Regulacja ma na ogół charakter globalny.
- mRNA: elementy *cis* w obrębie mRNA mogą być wiązane przez elementy *trans* wspomagające lub hamujące inicjację translacji. Jest to regulacja specyficzna.
- Rybosomy: fosforylacja niektórych białek (np. rpS6) może indukować inicjację. Regulacja globalna.



Elementy *cis* to CAP oraz polyA. Elementy IRES mogą wpływać na translację w połączeniu z elementami *trans*. Struktury „szpilki do włosów” hamują translację poprzez IRES.



Przykład drugorzędowych struktur IRES u Picoviridae.

Regulacja globalna dotyczy całego procesu translacji w komórce.
Regulacja specyficzna dotyczy określonego typu RNA.

Martinez-Salas 2018

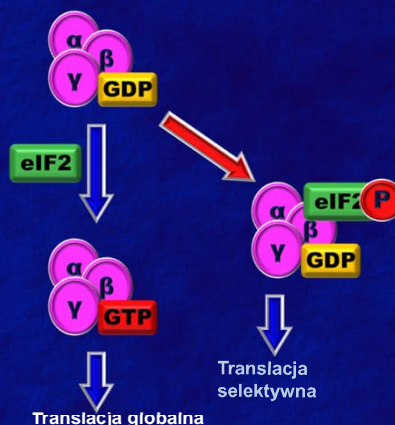


2. Kontrola inicjacji translacji: elementy

Ekspozycja komórki na stres najczęściej prowadzi do inhibicji translacji na skutek fosforylacji czynników inicjujących.

Fosforylacja czynnika eIF2

- Czynniki eIF2 warunkuje przekształcenie GDP w GTP, reakcji niezbędnej do powstania kompleksu preinicjacyjnego (ternary).
- Pod wpływem stresu podjednostka α czynnika eIF2 ulega fosforylacji.
- Fosforylacja blokuje przekształcenie GDP w GTP i w konsekwencji blokuje tworzenie aktywnego kompleksu preinicjacyjnego (ternary).
- Stresy: niedobór aminokwasów, UV, wirusy, stres osmotyczny, niedotlenienie.



Czynnik eIF2 α jest fosforylowany poprzez serynę w pozycji 51. Uczestniczą kinazy aktywowane przez dwuniciowy RNA (PKR).

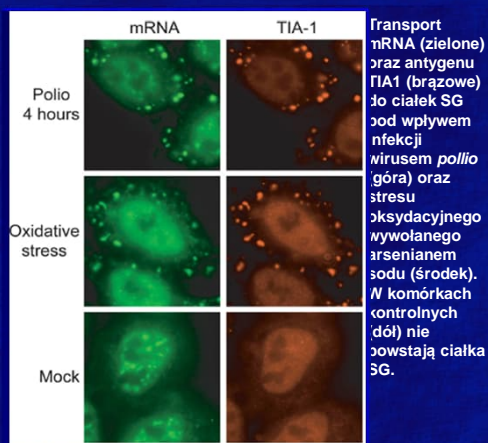


2. Kontrola inicjacji translacji: elementy

mRNA występuje w dwóch postaciach: aktywnej translacyjnie oraz nieaktywnej translacyjnie.

Magazynowanie mRNA

- Pod wpływem stresu komórki ssaków hamują translację i magazynują komórkowy mRNA w ciałkach stresowych (SG).
- Ciałka SC mają 50-200 nm, nie są otoczone błoną i wyraźnie różnią się od ciałek P.
- Tworzenie SG uwarunkowane jest obecnością antygenu limfocytów T (TIA1) oraz białka wiążącego się z domeną SH3 (RasGAP).
- Czynniki stabilizujące mRNA na polisomach hamują tworzenie SG.



Transport mRNA (zielone) oraz antygenu TIA1 (brązowe) do ciałek SG pod wpływem infekcji wirusem polio (góra) oraz stresu oksydacyjnego wywołanego arsenianem sodu (środek). W komórkach kontrolnych (dół) nie powstają ciałka SG.

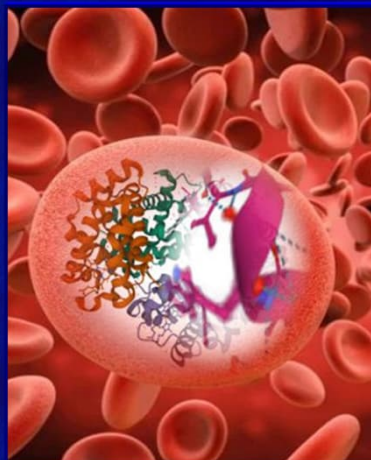
mRNA nieaktywny translacyjnie jest magazynowane w ciałkach P oraz w ciałkach stresowych (stress granules, SG).

Piotrowska et al. 2010



Kontrola translacji

1. Czynniki kontrolujące translację
 - Czas trwania RNA
 - Białka wiążące RNA
2. Kontrola inicjacji translacji
 - Kompleks preinicjacyjny
 - Rozpoznanie kodonu START
 - Elementy kontroli
3. Regulacja post-translacyjna
 - Definicja
 - Ewolucja
 - Przykłady
4. Epigenetyka i epigenom
 - Definicja
 - Modyfikacje epigenetyczne



3. Regulacja post-translacyjna: definicja

Regulacja post-translacyjna dotyczy kontroli poziomu aktywnych białek za pomocą odwracalnych lub nieodwracalnych modyfikacji.

Charakterystyka modyfikacji

- Modyfikacje post-translacyjne dotyczą łańcuchów bocznych aminokwasów.
- Występuje około 620 typów modyfikacji post-translacyjnych, które dotyczą różnych aspektów funkcjonalnych białek.
- Modyfikacje zmieniają właściwości białek poprzez dodanie grup: acetylowych, fosforylowych, glikozylowych, metylowych etc.
- Modyfikacja odwracalna polega na kowalentnym dodaniu grupy.
- Modyfikacja nieodwracalna polega na proteolizie.

Modyfikacje post-translacyjne: kowalentne, enzymatyczne modyfikacje białek po zakończeniu biosyntezy.

PTM	Frequency (log10 scale)
Phosphorylation	5.76
Acetylation	5.14
Ubiquitination	5.07
Succinylation	4.25
Methylation	4.24
Malonylation	3.94
N-linked Glycosylation	3.89
O-linked Glycosylation	3.80
Sumoylation	3.74
S-nitrosylation	3.62
Glutathionylation	3.62
Amidation	3.46
Hydroxylation	3.24
Palmitoylation	3.04
Pyrrolidone carboxylic acid	2.96
Glutarylation	2.88
Gamma-carboxyglutamic acid	2.64
Crotonylation	2.57
Oxidation	2.56
Myristoylation	2.45
C-linked Glycosylation	2.41
Sulfation	2.40
Formylation	2.40
Citrullination	2.09

Najczęstsze modyfikacje post-translacyjne w komórkach Eukariota.



3. Regulacja post-translacyjna: definicja

Modyfikacje post-translacyjne mogą dotyczyć tylko jednego aminokwasu lub mogą obejmować wiele aminokwasów.

Typy modyfikacji

- Grupa 1: dodanie prostych lub złożonych grup chemicznych do łańcuchów bocznych aminokwasów, np. fosforylacja, metylacja, glikozylacja, prenylacja, myristoilacja, palmitoilacja.
- Grupa 2: dodanie do łańcuchów bocznych polipeptydów, np. ubikwitynacja, SUMOilacja.
- 90% wszystkich modyfikacji stanowią: fosforylacja, acetylacja i ubikwitynacja.
- Modyfikacje mogą wpływać na funkcję enzymu, lokalizację, interakcję, czas półtrwania.

Amino Acid	Frequency (log10 scale)
Ser(S)	5.59
Lys(K)	5.46
Thr(T)	5.11
Tyr(Y)	4.79
Cys(C)	3.99
Arg(R)	3.95
Asn(N)	3.9
Met(M)	3.23
Ala(A)	3.22
Pro(P)	3.19
Gln(Q)	3.03
Leu(L)	2.92
Phe(F)	2.9
Glu(E)	2.8
Gly(G)	2.79
Val(V)	2.74
Trp(W)	2.68
Ile(I)	2.37
Asp(D)	2.28
His(H)	2.25

Najczęściej modyfikowane aminokwasy.

Modyfikacje post-translacyjne występują w białkach pełniących ważne funkcje, np., wydzielnicze, błonowe, histony.

Ramazi i Zahiri 2021.

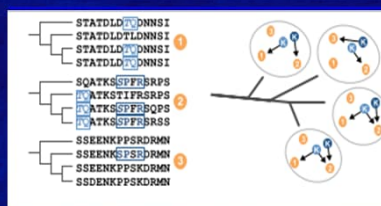


3. Regulacja post-translacyjna: ewolucja

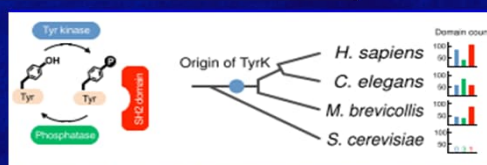
Wiele modyfikacji post-translacyjnych występuje we wszystkich domenach drzewa życia.

Przykłady ewolucji modyfikacji post-translacyjnych

- Acetylacja lizyny: związana z sirtuinami u Pro- i Eukariota. Odpowiadają za de-acetylację enzymów, np. acetylo-CoA syntetazy.
- Ubikwitynacja: utrzymuje homeostazę białkową, uczestniczy w naprawie DNA i szlakach sygnałowych. Proces analogiczny do bakteryjnej aktywacji siarczanowej glicyny na końcach C.
- Kinazy białkowe: zawierają konserwatywne motywy strukturalne.



Ewolucja kinazy białkowej polegająca na zróżnicowaniu substratów. Na niebiesko zaznaczone są fragmenty odpowiedzialne za zróżnicowanie.



Koevolucja kinazy tyrozynowej oraz fosfatazy. We wszystkich białkach obecne są trzy domeny. Zróżnicowanie dotyczy mutacji w miejscach aktywnych odpowiedzialnych za interakcję.

We wczesnych etapach ewolucji modyfikacje post-translacyjne były odpowiedzialne na dostępność składników odżywczych.

Beltrao et al., 2013

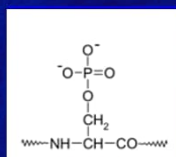


3. Regulacja post-translacyjna: przykłady

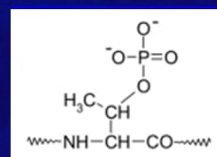
Fosforylacja: dodawanie grup fosforanowych (PO_4) do łańcuchów bocznych aminokwasów przy pomocy enzymów – kinaz białkowych.

Fosforylacja

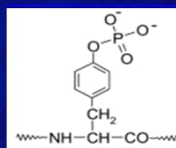
- Odwracalny mechanizm regulatorowy uczestniczący w transdukcji sygnału.
- ATP - donator grup fosforanowych.
- Najczęściej fosforylacji ulegają: Thr, Tyr, His, Ser, a także Pro, Arg, Asp, Cys.
- Zmiana funkcji białka wynika z:
 - regulacji allosterycznej związanej ze zmianą konformacji;
 - przyłączeniu ligandu do domeny uczestniczącej w interakcji.



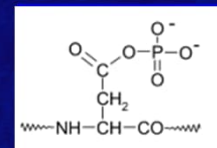
Fosforylacja seryny, przyłączenie do grupy bocznej CH_2OH .



Fosforylacja treoniny, przyłączenie do grupy bocznej CH-OH-CH_3 .



Fosforylacja tyrozyny, przyłączenie do OH pierścienia bocznej.



Fosforylacja kwasu asparaginowego, przyłączenie do łańcucha bocznej $\text{CH}_2\text{-COOH}$.

Defosforylacja: usuwanie grup fosforanowych z łańcuchów bocznych aminokwasów przy pomocy fosfataz.

Knorre et al., 2009.

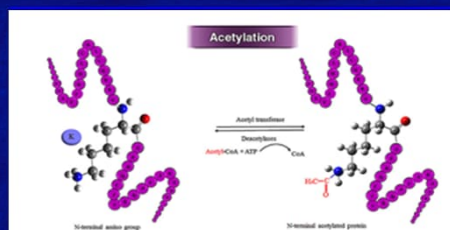


3. Regulacja post-translacyjna: przykłady

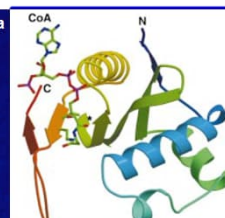
Acetylacja: dodanie grupy acetylowej (CH_3CO) do grupy ϵ -aminowej łańcucha bocznego aminokwasów za pomocą acetylotransferaz.

Acetylacja

- Występują trzy formy: nieodwracalna $\text{N}\alpha$ -acetylacja oraz odwracalne $\text{N}\epsilon$ -acetylacja i O-acetylacja.
- Acetyl-CoA - Donor grup acetylowych
- Najczęściej dotyczy lizyny, ale także Ala, Arg, Asp, Cys, Gly, Glu, Met, Pro, Ser, Thr, Val.
- Histony: acetylacja lizyny umożliwia selektywny dostęp czynników transkrypcyjnych.
- Rola w kontroli cyklu komórkowego, metabolizmu i transportu jądrowego.



Acetylacja: reakcja katalizowana przez acetyl transferazę. Ładunek dodatni grupy aminowej jest neutralizowany, dochodzi do redystrybucji ładunków w białku, wzrostu hydrofobowości i rozmiarów łańcucha bocznego. Struktura ludzkiej acetylo -CoA transferazy. N – N koniec, C – C koniec. Widoczny acetylo CoA.



De-acetylacja: usuwanie grupy acetylowej z łańcucha bocznego aminokwasów za pomocą deacetylaz.

Knorre et al., 2009; Ramazi i Zahirii 2021

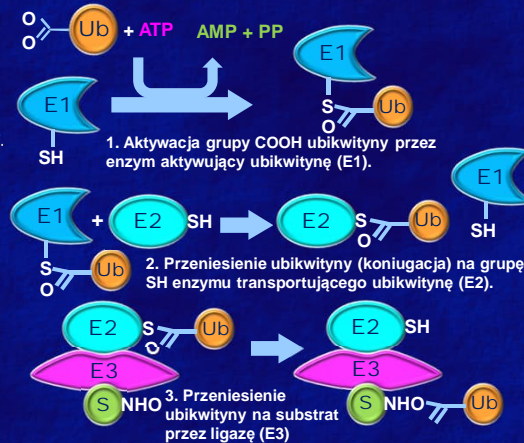


3. Regulacja post-translacyjna: przykłady

Ubikwitynacja: dołączanie ubikwityny do białka w trzy-etapowym procesie: aktywacji, koniugacji i ligacji.

Ubikwitynacja

- Najczęściej dotyczy lizyny.
- Proces jest odwracalny, ubikwityna może być usunięta przez wyspecjalizowane enzymy.
- Typy: monoubikwitynacja i poliubikwitynacja.
- Ubikwitynacja oznacza białka przeznaczone do degradacji, uczestniczy w proliferacji komórek, regulacji transkrypcji, replikacji, transdukcji sygnału, odpowiedzi immunologicznej.
- Zaburzenia ubikwitynacji prowadzą do nowotworów, stanów zapalnych.



Ubikwityna: małe białko regulatorowe (76 aa) większości Eukariota, u człowieka są 4 geny kodujące ubikwitynę (UBB, UBC, UBA52, RPS27A)

Knorre et al., 2009; Ramazi i Zahir 2021

3. Regulacja post-translacyjna: przykłady

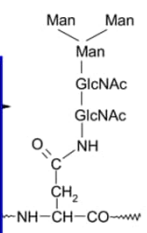
Glikozylacja: przyłączenie reszty cukrowej do łańcuchów bocznych w białkach poprzez wiązanie glikozydowe.

Glikozylacja

- Jest to złożona modyfikacja, dotyczy co najmniej 50% białek.
- Oligosacharydy przyłączane są poprzez wiązanie kowalencyjne.
- Enzym: glikozylotransferaza.
- Typy: N-glikozylacja, O-glikozylacja, C-glikozylacja, S-glikozylacja, fosfoglikozylacja.
- Najczęściej ulegają glikozylacji: Ser, Thr, Asn, Trp.
- Pełni funkcję w przyleganiu komórek, aktywacji receptorów, wpływa na rozpuszczalność, strukturę przestrzenną białek.



Glikozylotransferaza ssaków. Pokazane jest powiązanie oligosacharydu oraz jonów magnezu.



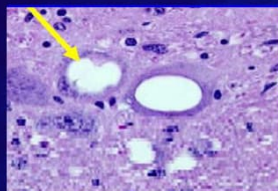
Glikozylacja kwasu asparaginowego.

Glikoproteiny powstają w wyniku kilku rund glikozylacji i deglikozylacji. Glikozylacja jest powszechną modyfikacją białek.

Knorre et al., 2009; Ramazi i Zahir 2021

3. Regulacja post-translacyjna: choroby

Mutacje, które prowadzą do zmiany miejsc podlegających modyfikacjom post-translacyjnym mogą powodować choroby.



Uszkodzenie mózgu w encefalopatii gąbczastej. Jedną z przyczyn jest mutacja T183A (zamiana treoniny na alaninę) powodująca utratę miejsca N-glikozylacji w białku prionowym (PRNP). Symptomy: demencja, atrofia kory mózgowej, hypometabolizm.



Choroba Kennedy'ego (opuszkowordzeniowy zanik mięśni) sprzężona z X. Przyczyną jest utrata miejsca acetylacji w receptorze androgenów (AR) na skutek substytucji lizyny na alaninę w pozycji 630 (K630A) lub jednocześnie 632 (K632A) i 633 (K633A). Mutanty tworzą agregaty z innymi białkami.



PER2: białko odpowiedzialne za rytm dobowy. Insercja seryny w pozycji 662 dostarcza dodatkowego miejsca fosforylacji co powoduje przesunięcie fazy snu od ok. 19:30 do 4:30 (efekt skowronka). Fosforylacja S662 hamuje fosforylację innych aminokwasów – hyporfosforylacja.

Choroby związane z modyfikacją miejsc post-translacyjnych stanowią około 5% chorób uwarunkowanych mutacjami punktowymi.

Li et al., 2010



3. Regulacja post-translacyjna: choroby

Zidentyfikowano 275 typów chorób, które związane są z zaburzeniami w modyfikacjach post-translacyjnych.

Choroby związane z modyfikacjami post-translacyjnymi

- 26 typów, w tym zaburzenia neurologiczne (choroba Alzheimer'a), nowotwór piersi, choroby krwi, płuc.
- 40% zaburzeń polegało na wyższym poziomie modyfikacji, 10% to obniżony poziom modyfikacji w stanach chorobowych.
- W 38% choroba jest związana z dodatkową modyfikacją, a 5% z jej brakiem.



Typy chorób związanych z modyfikacjami post-translacyjnymi i ich częstość.

Natężenie zmian w poszczególnych typach chorób: U – wzrost modyfikacji, D – niższy poziom modyfikacji, P/A – obecność/brak modyfikacji, N – mutacja likwidująca miejsce modyfikacji, C – mutacja tworząca miejsce modyfikacji.

Different diseases	Different types of PDAs					
	U	P	D	N	A	C
Immunity	-	-	-	-	-	-
Vascular	-	-	-	-	-	-
Muscle	-	-	-	-	-	-
Immunodeficiency	-	-	-	-	-	-
Neuromuscular	-	-	-	-	-	-
Thyroid	-	-	-	-	-	-
Bone	-	-	-	-	-	-
Bladder	-	-	-	-	-	-
Oral	-	-	-	-	-	-
Brain	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-
Cervica	-	-	-	-	-	-
Diabetes	-	-	-	-	-	-
Gastric	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-
Pancreatic	-	-	-	-	-	-
Ovarian	-	-	-	-	-	-
Skin	-	-	-	-	-	-
Liver	-	-	-	-	-	-
Prostate	-	-	-	-	-	-
Intestine	-	-	-	-	-	-
Lung	-	-	-	-	-	-
Other	-	-	-	-	-	-
Blood	-	-	-	-	-	-
Breast	-	-	-	-	-	-
Neurologic	-	-	-	-	-	-

Najczęściej zaburzenia dotyczą fosforylacji (89,5%). Zaburzenia najczęściej powodowały choroby neurodegeneracyjne (18,3%).

Ku et al., 2018

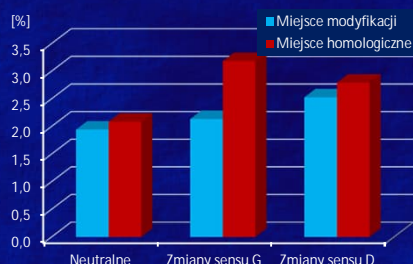


3. Regulacja post-translacyjna: choroby

Około 4,5% mutacji zmiany sensu oraz 2% mutacji synonimicznych (neutralnych) wpływa na modyfikacje post-translacyjne.

Mutacje wpływające na modyfikacje post-translacyjne

- Mutacje synonimiczne, nie mające wpływu na modyfikację stanowią 1,9-2,1% wszystkich mutacji neutralnych zidentyfikowanych w genach białek podlegających modyfikacji post-translacyjnej.
- Mutacje zmiany sensu prowadzące do choroby genetycznej związanej z obróbką post-translacyjną stanowią 2,1-3,2% wszystkich substytucji prowadzących do chorób genetycznych oraz 2,5-2,8% substytucji prowadzących do chorób somatycznych (niedziedzicznych).



Częstość mutacji synonimicznych (neutralnych) oraz niesynonimicznych (zmiany sensu) w miejscach podlegających modyfikacji post-translacyjnej oraz w miejscach homologicznych do miejsc modyfikacji.

Większość mutacji w miejscach obróbki post-translacyjnej zmieniała ładunek, polarność i hydrofobowość białka.

Li et al., 2010



3. Regulacja post-translacyjna: choroby

PTMD: baza danych umożliwiająca analizę chorób człowieka związanych z zaburzeniami modyfikacji post-translacyjnych.

Baza PTMD

- Zawiera opis 278 chorób, 749 związanych z nimi białek i 1950 różnych modyfikacji.
- Możliwe jest przeszukiwanie na podstawie typu modyfikacji lub choroby.
- Przykład: metylacja leucyny, metylacja białka PP2A związana jest z hypermetylacją tau w chorobach neurodegeneracyjnych.
- Przykład: choroby immunologiczne, choroby autoimmunologiczne, modyfikacja post-translacyjna produktu genu TREX1, egzonukleazy rozpoznającej ssDNA.

Przeszukiwanie na podstawie metylacji.

Przeszukiwanie na podstawie chorób immunologicznych.

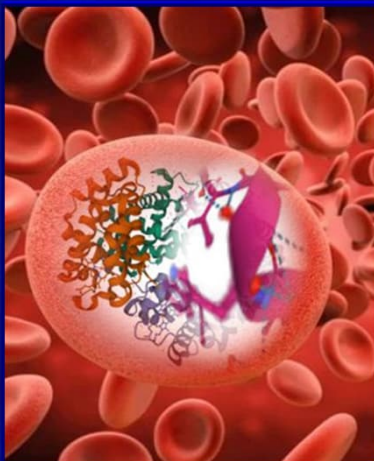

Baza PTMD jest narzędziem umożliwiającym analizę modyfikacji post-translacyjnych oraz sieci powiązań prowadzących do chorób.

Xu et al., 2018



Kontrola translacji

1. Czynniki kontrolujące translację
 - Czas trwania RNA
 - Białka wiążące RNA
2. Kontrola inicjacji translacji
 - Kompleks preinicjacyjny
 - Rozpoznanie kodonu START
 - Elementy kontroli
3. Regulacja post-translacyjna
 - Definicja
 - Ewolucja
 - Przykłady
4. Epigenetyka i epigenom
 - Definicja
 - Modyfikacje epigenetyczne

4. Epigenetyka i epigenom: definicja

Epigenetyka odnosi się do odwracalnych zmian wywołanych czynnikami środowiskowymi, które nie zmieniają sekwencji DNA.

Epigenetyka

- Epi + genetyka oznacza poza, inne niż zmiany genetyczne.
- Najczęściej dotyczy zmian ekspresji genów.
- Zmiany mogą być wywołane czynnikami środowiskowymi.
- Nie zmienia się sekwencja nukleotydów.
- Profil epigenetyczny jest charakterystyczny dla komórki, stadium rozwojowego, danej choroby.



Różnice w diecie doprowadziły do zmiany metylacji DNA i w dalszej konsekwencji w różnicy w kolorze sierści.



Wzór metylacji ujawniony za pomocą enzymów restrykcyjnych. Brak prążka (strzałka) świadczy o metylacji.



Metylacja u roślin transgenicznych.

Strzałka wskazuje miejsce cięcia enzymem wrażliwym na metylację. W kontroli prążek jest w obu ścieżkach, w GMO brak prążka w jednej ścieżce wskazuje na metylację sekwencji.

Epigenom: zespół związków chemicznych, które modyfikują, znakują genom lub zmieniają jego działanie.



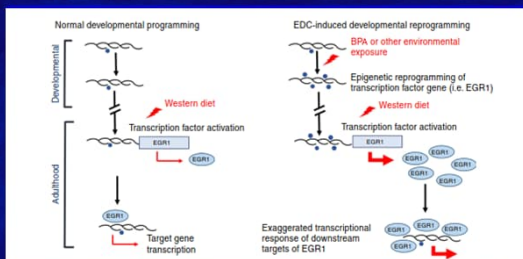
4. Epigenetyka i epigenom: modyfikacje

Regulacja epigenetyczna obejmuje szereg procesów na poziomie upakowania DNA, transkrypcji, translacji.

Modyfikacje epigenetyczne

- Metylacja DNA: znaczenie w wyciszeniu genów.
- Hydroksymetylacja: powstaje podczas embriogenezy.
- Modyfikacja histonów: remodelowanie chromatyny, które związane jest z dostępem do DNA w trakcie transkrypcji, ochroną przed uszkodzeniami.
- Transkrypcja prowadząca do ncRNA, w tym miRNA, lncRNA. ncRNA uczestniczy w regulacji ekspresji, splicingu.

Środowisko ma istotny wpływ na epigenom.



Wpływ diety oraz związków endokrynnie czynnych na epigenom. Ekspozycja na „dięty zachodnią” (wysokotłuszczowa, fruktoza) powoduje aktywację czynnika EGR1 w wątrobie, który wpływa na starzenie komórek. Ekspozycja na związki endokrynnie czynne (np. bisfenol) w okresie rozwojowym, po włączeniu „dięty zachodniej” prowadzi do nadprodukcji EGR1, zahamowaniu transkrypcji 87% genów, w efekcie dochodzi do przyspieszonego starzenia epigenomu wątroby, co skutkuje chorobami metabolicznymi.

Zmiany epigenetyczne mogą być dziedziczne, jednakże zawsze są odwracalne. Odwracalność jest cechą charakterystyczną epigenomu.

Trevino et al., 2020

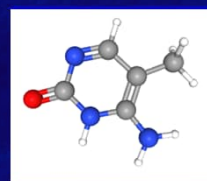


4. Epigenetyka i epigenom: modyfikacje

Metylacja DNA: dodawanie grup metylowych do DNA. Metylacja na ogół prowadzi do represji transkrypcji.

Metylacja DNA u człowieka

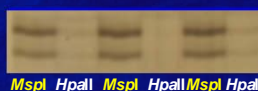
- Występuje głównie w parach cytozyna-guanina (CpG dwunukleotydy).
- Grupa metylowa CH₃ jest kowalentnie przyłączana do atomu węgla w pozycji 5 cytozyny.
- W genomie ludzkim jest 28 mln. par CpG, co stanowi 0,9% genomu.
- 60-90% par CpG jest zmetylowana.
- Niemetylowane pary CpG tworzą wyspy CpG (CGIs).
- Wyspy CpG występują w regionach promotorowych 70% genów ludzkich.



5-metylocytozyna (mC)

5'mCpG3'
3'GpmC5'

Zapis metylacji z uwzględnieniem struktury dwuniciowej



MspI i HpaII rozpoznają i trawią sekwencję CCGG. Jeżeli druga cytozyna jest zmetylowana to HpaII nie trawi sekwencji CmCGG, co jest widoczne jako brak prążka.

Hydroksymetylacja: oksydacja 5-metylocytozyny. Występuje w promotorach, wzmacniaczach transkrypcji, aktywuje ekspresję genów.

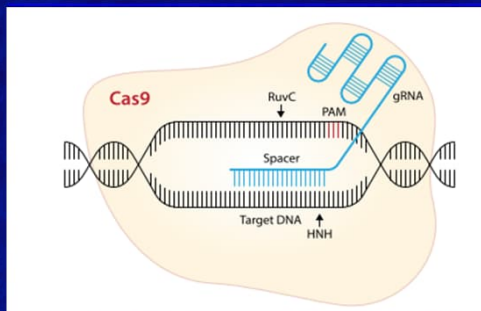


4. Epigenetyka i epigenom: modyfikacje

Manipulacje regulacją epigenetyczną za pomocą sztucznych systemów mogą być wykorzystane w terapiach.

Metody inżynierii epigenetycznej

- Epileki: metylotransferaza DNA, histonowa, itp. – działają globalnie.
- Sztuczne czynniki transkrypcyjne (ATF) w celu aktywacji lub represji genów.
- Efektory transkrypcji (TALE) o lepszych właściwościach selektywnych.
- CRISPR/Cas: przewodnikowy RNA (gRNA) ukierunkowuje nukleazę Cas (Cas9 lub Cas12a), która trawi sekwencję DNA komplementarną do gRNA.



Nukleaza Cas9 jest ukierunkowywana za pomocą gRNA. Domeny aktywne Cas9, RuvC i HNH są zmutowane, jednakże zdolne do trawienia pojedynczej nici DNA. Specyfikę zapewnia fragment 20 bp gRNA, który łączy się z DNA na zasadzie komplementarności w docelowym regionie znajdującym się w kierunku 5' przylegającego motywu protospacera (PAM). Podczas naprawy wykorzystywana jest sekwencja gRNA.

Inżynieria epigenetyczna wymaga oceny długofalowego bezpieczeństwa, jednakże jej zaletą jest odwracalność wprowadzanych zmian.

Sgro i Blancafort 2020



Piśmiennictwo

- Beltrao P, Bork P, Krogan NJ, van Noort V. 2013. Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol Sys Biol* 9:714. DostępDOI 10.1002/msb.201304521
- Jarvelin AI, Noerenberg M, Davis I, Castello A. 2016. The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Com Signal* 14:9. Dostęp: DOI 10.1186/s12964-016-0132-3
- Jolma A, Zhang J, Mondragon E, Morgunova E, Kivioja T, Laverty KU, Yin Y, Zhu F, Bourenkov G, Morris Q et al. 2020. Binding specificities of human RNA-binding proteins toward structured and linear RNA sequences. *Gen Res* 30:962-973. Dostęp: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.258848.119>
- Knorre DG, Kudryashova NV, Godovikova TS. 2009. Chemical and functional aspects of posttranslational modification of proteins. *Acta Naturae* 3:29-51.
- Li S, Iakoucheva LM, Mooney SD, Radivojac P. 2010. Loss of post-transcriptional modification sites and diseases. *Pac Symp Biocomput* 2010:337-347.
- Martinez-Salas E, Francisco-Velilla R, Fernandez-Chamorro J, Embarck ZA. 2018. Insights into structural and mechanistic features of viral IRES elements. *Front Microbiol* 8:2629. Dostęp doi:10.3389/fmicb.2017.02629
- Meola N, Jensen TH. 2017. Targeting the nuclear RNA exosome: polyA binding proteins enter the stage. *RB+NA Biol* 14:820-826. Dostęp: <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1312227>
- Piotrowska J, Hansen SJ, Park N, Jamka K, Sarnow P, Gustin KE. 2010. Stable Formation of Compositionally Unique Stress Granules in Virus-Infected Cells. *J Virol* 84:3654-3655. Dostęp: doi:10.1128/JVI.01320-09
- Ramazi S, Zahiri J. 2021. Post-translational modification in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database* 2021. Dostęp: doi:10.1093/database/baab012
- Schlautmann LP, Gehring NH. 2020. A day in the life of the exon junction complex. *Biomolecules* 10:866. Dostęp: doi:10.3390/biom10060866
- Sgro A, Blancafort P. 2020. Epigenome engineering: new technologies for precision medicine. *NAR* 48: 12453-12482.
- Treviño L, Dong J, Kaushal A, Katz TA, Jangid RK, Robertson MJ, Grimm SL, Ambati CSR, Putluri V, Cox AR et al. 2020. Epigenome environment interactions accelerate epigenomic aging and unlock metabolically restricted epigenetic reprogramming in adulthood. *Nat Comm* 11:2316. Dostęp: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15847-z>
- Xu H, Wang Y, Lin S, Deng W, Di Peng, Cui Q, Xue Y. 2018. PTMD: A database of human disease-associated post-translational modifications. *Gen Prot Bioinf* 16:244-251. Dostęp: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.06.004>



Zagadnienia 1-3

1. Kontrola translacja
 - Na jakich poziomach odbywa się regulacja po-transkrypcyjna?
 - Na jakim etapie syntezy białka zachodzą modyfikacje potranslacyjne?
 - Co decyduje o degradacji lub translacji mRNA?
 - Co to jest egzosom?
 - Z jakim procesem związany jest egzosom?
 - Proszę omówić budowę egzosomu.
2. Czynniki kontrolujące translację, czas trwania RNA
 - Od czego zależy czas półtrwania RNA?
 - Jaki czynnik wpływa na długość polyA?
 - Jak prolaktyna wpływa na czas półtrwania mRNA? Proszę omówić na przykładzie.
 - Co jest sygnałem indukującym RNA w oocytach po zapłodnieniu?
 - Jaki efekt wywołuje zróżnicowana translacja genów α - i β -globin?
3. Czynniki kontrolujące translację, białka wiążące RNA
 - Proszę podać definicję białek wiążących RNA.
 - Jaki wyróżniamy typy białek wiążących RNA?
 - Proszę zdefiniować białka PABP?
 - Na czym polega podwójna funkcja białek PABP?
 - Gdzie zlokalizowane są białka PABP?



Zagadnienia 3-4

3. Czynniki kontrolujące translację, białka wiążące RNA, cd.
 - Jaką funkcję pełnią białka RBP?
 - Jaka jest różnica między białkami RBP, a domenami RBP (RBD)?
 - Z jakim elementem RNA reaguje większość RBD?
 - Proszę wymienić typy domen RBD i je scharakteryzować.
 - Jaki typ domeny RBD występuje w czynniku NF-kappa-B?
 - Jaki typ domeny RBD występuje w motywach ARM białek wirusowych?
 - Proszę podać przykład czynnika zawierającego domenę RBD typu RG?
 - Jaką ogólną funkcję pełnią białka należące do rodziny ZC3H12?
 - Ile cząsteczek RNA jest niezbędnych do prawidłowej funkcji białek ZC3H12?
 - Jaki metal występuje w miejscu aktywnym białek ZC3H12?
 - Proszę omówić budowę białek ZC3H12.
 - Co oznacza skrót EJC?
 - W jakim miejscu mRNA przyłącza się kompleks EJC?
 - Jaką funkcję pełni kompleks EJC?
4. Kontrola inicjacji, preinicjacja, kodon START
 - Który etap translacji najsilniej wpływa na jej efektywność?
 - Czy podjednostki rybosomów w momencie inicjacji translacji są połączone?
 - Jak zbudowany jest kompleks preinicjacyjny?
 - Kiedy powstaje stabilny, aktywny kompleks inicjacyjny?
 - Od czego zależy selekcja AUG?
 - Co to jest miejsce IRES?



Zagadnienia 5-6

5. Kontrola inicjacji, preinicjacja, elementy kontroli
 - Jakie elementy uczestniczą w kontroli translacji?
 - Jaka jest funkcja czynnika eIF4E?
 - Czym różni się kontrola *cis* od kontroli *trans*?
 - Proszę podać przykłady elementów *cis*.
 - Czym różni się regulacja globalna od specyficznej?
 - Jaki efekt wywołuje ekspozycja komórki na stres?
 - Jak zmienia się zachowanie czynnika eIF2 w translacji globalnej i selektywnej?
 - W jakim miejscu dochodzi fosforylacji czynnika eIF2?
 - W jakich postaciach występuje mRNA przed translacją?
 - Co dzieje się z mRNA komórkowym pod wpływem stresu?
 - Jaka jest rola antygenu TIA1 limfocytów T w związku z mRNA?
6. Regulacja post-translacyjna, definicja, ewolucja
 - Proszę zdefiniować regulację post-translacyjną?
 - Jaka część białka jest poddawana regulacji post-translacyjnej?
 - Czym różni się modyfikacja odwracalna od nieodwracalnej?
 - Proszę wymienić cztery najczęstsze modyfikacje post-translacyjne?
 - Jak dwie grupy modyfikacji post-translacyjnych możemy wyróżnić?
 - Jaka liczba aminokwasów może być objęta modyfikacją?
 - Czy modyfikacje post-translacyjne są unikalne dla człowieka?
 - Jaki typ modyfikacji uczestniczy w naprawie DNA?
 - Na czym polegała ewolucja kinazy białkowej?



Zagadnienia 7

7. Regulacja post-translacyjna, przykłady
 - Na czym polega fosforylacja?
 - Jaka cząstka jest donorem grup fosforanowych?
 - Jakie aminokwasy ulegają najczęściej fosforylacji?
 - Z czego wynika zmiana funkcji białka po fosforylacji?
 - Na czym polega acetylacja?
 - Jakie formy acetylacji wyróżniamy?
 - Jaki związek jest donorem grup acetylowych?
 - Jaką funkcję pełni acetylacja?
 - Na czym polega ubikwitynacja?
 - Jakiego aminokwasu najczęściej dotyczy ubikwitynacja?
 - Jaka jest funkcja ubikwitynacji?
 - Proszę omówić etapy ubikwitynacji.
 - Co to jest ubikwityna?
 - Na czym polega glikozylacja?
 - Jak częsta jest glikozylacja?
 - Jakie wyróżniamy typy glikozylacji?
 - Jaka jest funkcja glikozylacji?
 - Jakie aminokwasy ulegają najczęściej glikozylacji?



Zagadnienia 8

8. Regulacja post-translacyjna, choroby

- Jaki jest udział chorób związanych z modyfikacjami post-translacyjnymi wśród chorób wywołanych mutacjami punktowymi?
- Jaki typ zmiany wywołują mutacje prowadzące do zaburzeń modyfikacji post-translacyjnych?
- Jak jest przyczyna encefalopatii gąbczastej?
- Na czym polega i co wywołuje chorobę Kennedy'ego?
- Z czym związany jest tzw. „efekt skowronka”?
- Ile typów chorób może być związanych z modyfikacjami post-translacyjnymi?
- Czy częściej występują choroby związane z dodatkową modyfikacją post-translacyjną czy z jej brakiem? Proszę uzasadnić.
- Jaka jest częstość mutacji niesynonimicznych, a jaki synonimicznych wywołujących modyfikacje post-translacyjne?
- Wśród mutacji niesynonimicznych prowadzących do chorób związanych z obróbką post-translacyjną, jaki jest udział mutacji niedziedzicznych?
- Jakie właściwości białka zmieniają się na skutek mutacji w miejscach obróbki post-translacyjnej?
- Gdzie można znaleźć dane dotyczące chorób człowieka związanych z modyfikacjami post-translacyjnymi?



Zagadnienia 9

9. Epigenetyka i epigenom

- Proszę podać definicję epigenetyki i epigenomu?
- Jakie czynniki wpływają na zmiany epigenetyczne?
- Jak można stwierdzić czy pod wpływem jakiegoś czynnika doszło do zmiany wzoru metylacji?
- Na jakich poziomach występuje regulacja epigenetyczna?
- Proszę wymienić typy modyfikacji epigenetycznych?
- Jakie zmiany epigenetyczne i w jakich warunkach zachodzą pod wpływem tzw. „diety zachodniej”?
- Na czym polega metylacja DNA?
- Co to są wyspy CpG?
- Jakie metody inżynierii epigenetycznej wykorzystuje się w terapiach?
- Proszę podać przykład epileków.
- Proszę omówić mechanizm edytowania DNA przy pomocy systemu CRISPR/CAS.
- Co jest główną zaletą inżynierii epigenetycznej?



Centre for Evolution, Genomics
and Biomathematics, e-Gene



polokkornelia@gmail.com

<https://www.matgen.pl>