

RNA-Prozessierung

Hans-Georg Kräusslich

Abteilung Virologie

08.05.07

➤ **Hinzufügen von Sequenzen**

- 5' cap
- 3' PolyA
- Einige nt durch Editing

➤ **Entfernen von Sequenzen**

- Splicing von Introns
- Degradation

➤ **Sequenzänderung**

- Editing

➤ **Relokation**

- Kernexport
- Transport innerhalb des Zytoplasmas

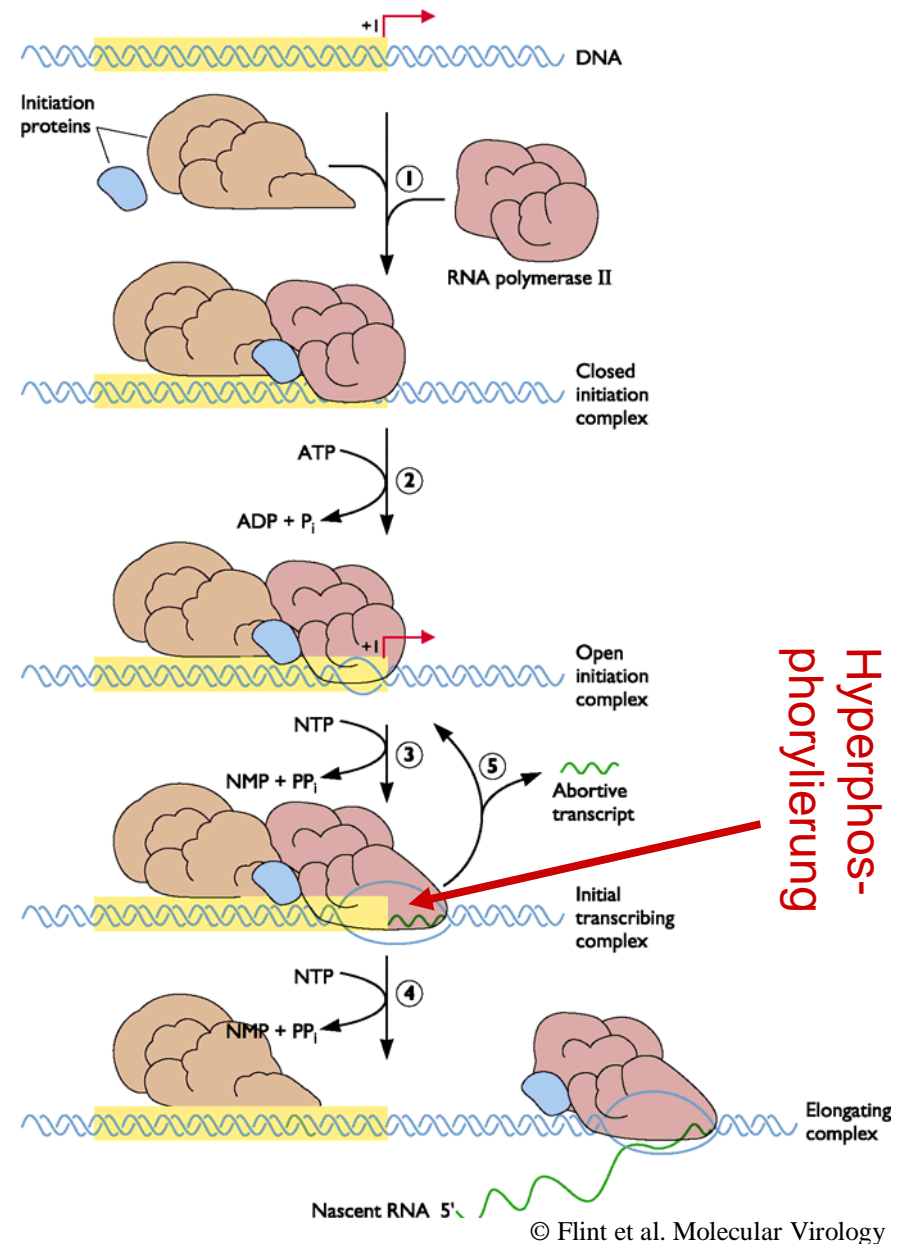
RNA-Prozessierung

RNA-Prozessierung erfolgt weitgehend ko-transkriptionell:

RNA Pol II pausiert nach ca 20 – 30 Nukleotiden:

Hyperphosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) an einer YSPTSPS-Sequenz (52 Kopien)

Phosphorylierung von Ser 5 ist notwendig für Initiation, Phosphorylierung von Ser 2 für Elongation und Rekrutierung von Prozessierungsfaktoren

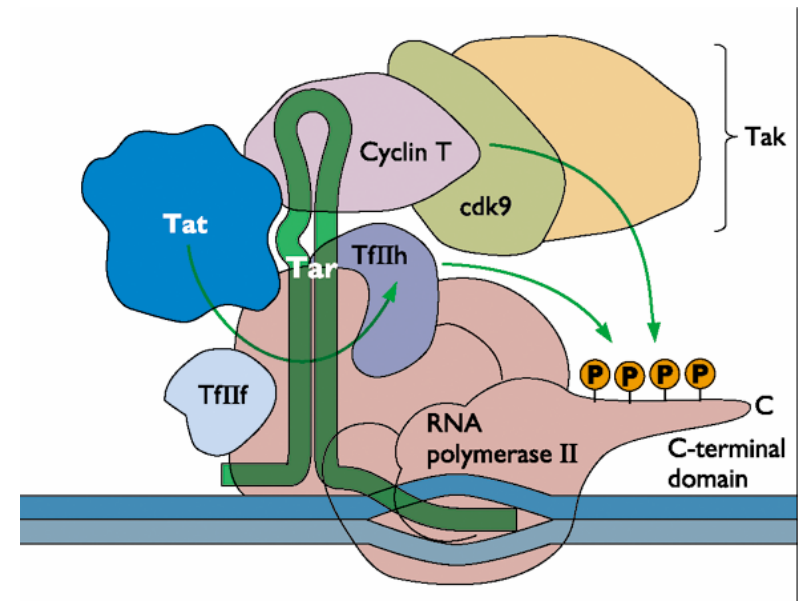
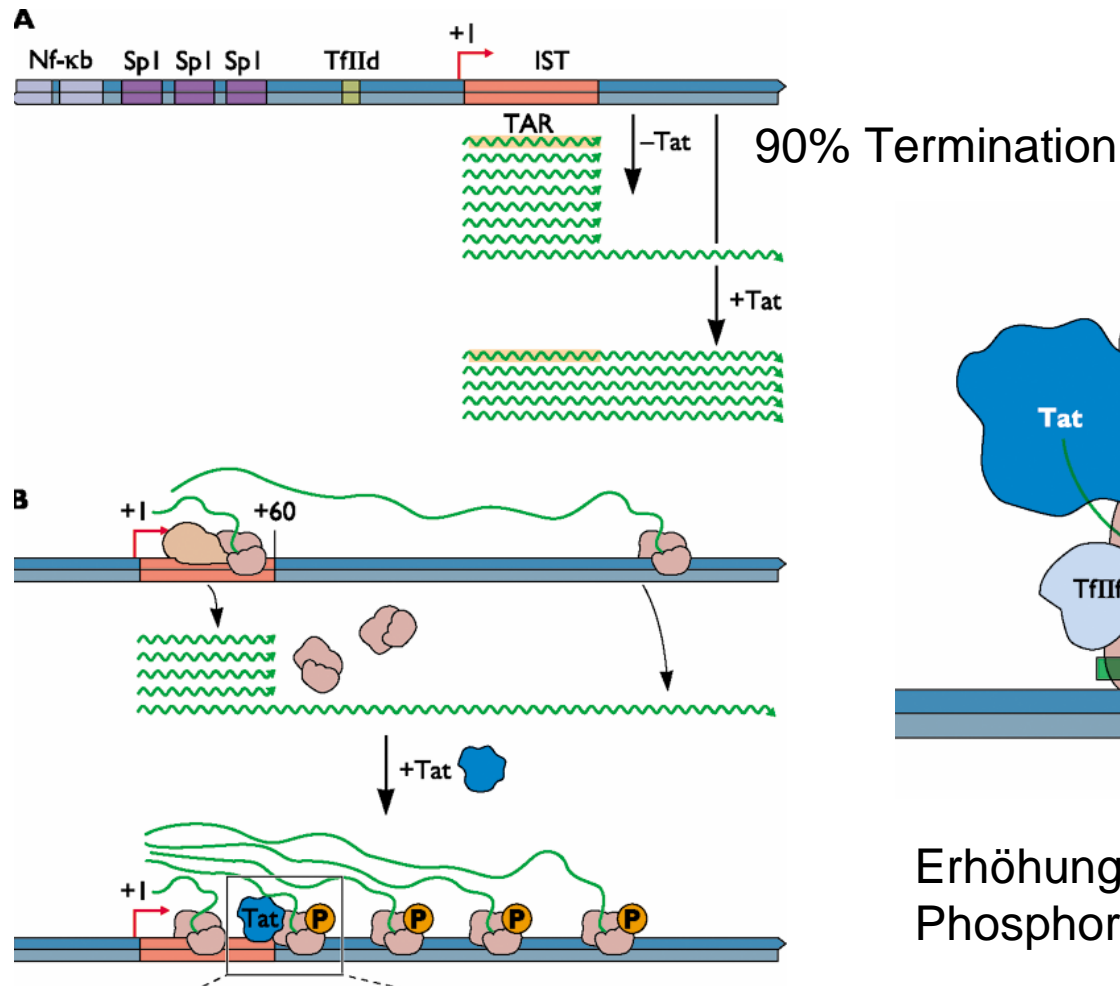


RNA-Prozessierung

Hyperphosphorylierung von Ser in Heptapeptid-Wiederholungen der CTD von RNA Pol II führt zu:

- 1) Stimulierung der Elongation
- 2) Bindung der Capping Enzyme
- 3) Bindung von PolyA-Polymerase
- 4) Rekrutierung von Spleissfaktoren (snRNPs und SR-Proteine)

Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch das HIV Tat-Protein

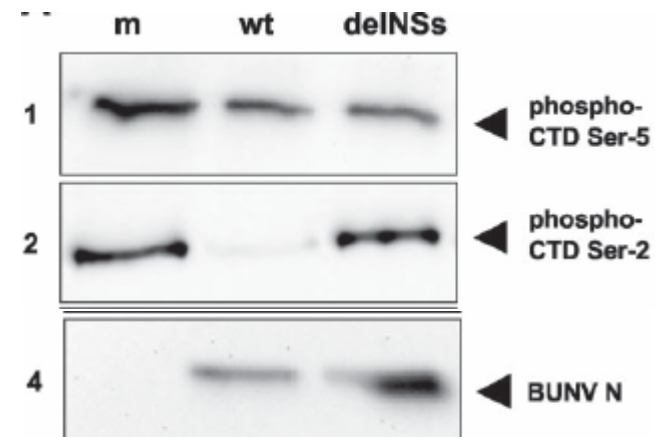
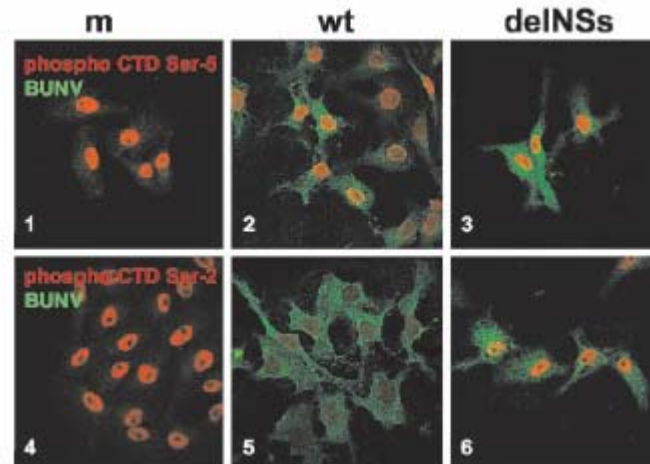


Erhöhung der Prozessivität durch Phosphorylierung der PolII CTD

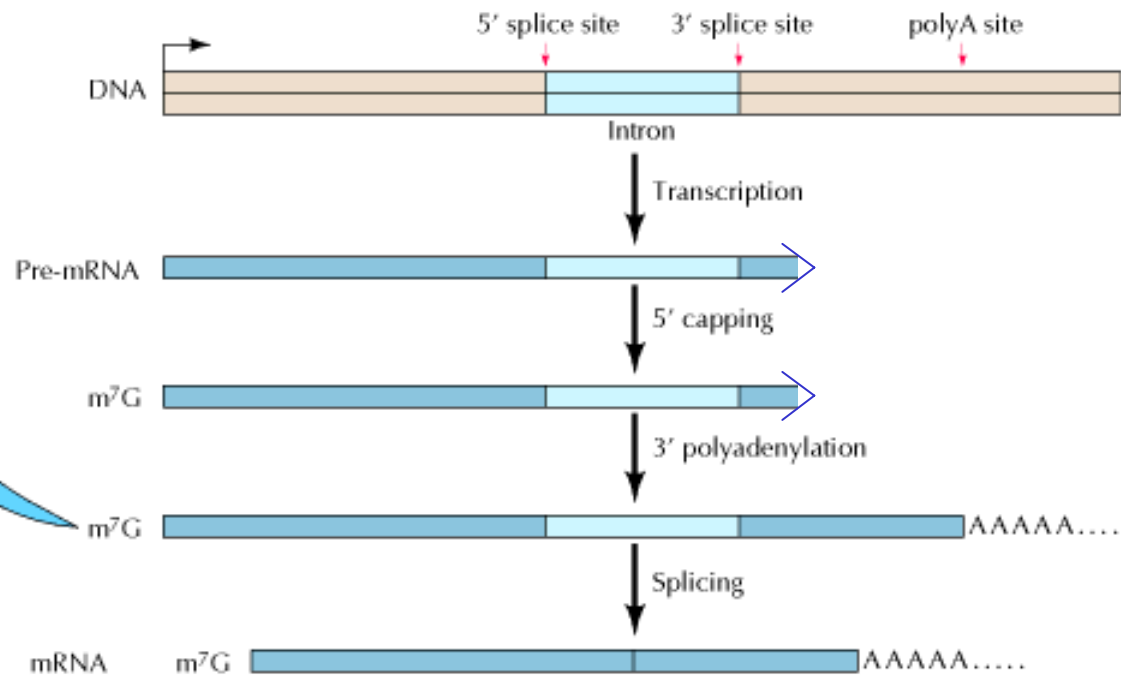
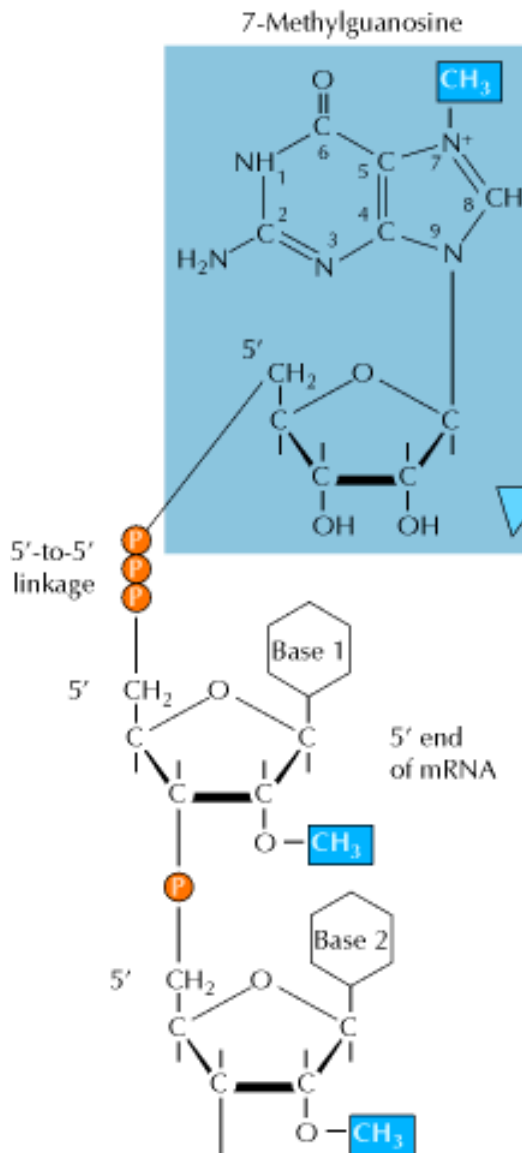
Bunyavirus NSs-Protein hemmt die zelluläre Genexpression durch Blockade der Phosphorylierung von Ser 2 der CTD von Pol II

Bunyaviren (Minus-Strang RNA-Viren) schalten die zelluläre Genexpression ab und hemmen die Produktion von Interferon β . Dies wird durch das virale Protein NSs vermittelt.

NSs Expression führt zu Hemmung der Phosphorylierung von Ser 2 der CTD von Pol II und damit zur Hemmung der zellulären Transkriptions-Elongation. Virale Transkription (im Zellkern) wird nicht beeinflusst.



Prozessierung viraler oder zellulärer mRNA



5' Capping, Spleissen und 3' Polyadenylierung sind mit Transkription gekoppelt

Hyperphosphorylierung der CTD von RNA-Pol II rekrutiert notwendige Faktoren

Capping von mRNA

Funktion:

- Schutz vor **Exonuklease**
- Erkennung des 5' Exons durch **Spliceosome**
- Erkennung der mRNA durch **Translationsfaktoren**

Mechanismen:

Zelluläres Capping Enzym:

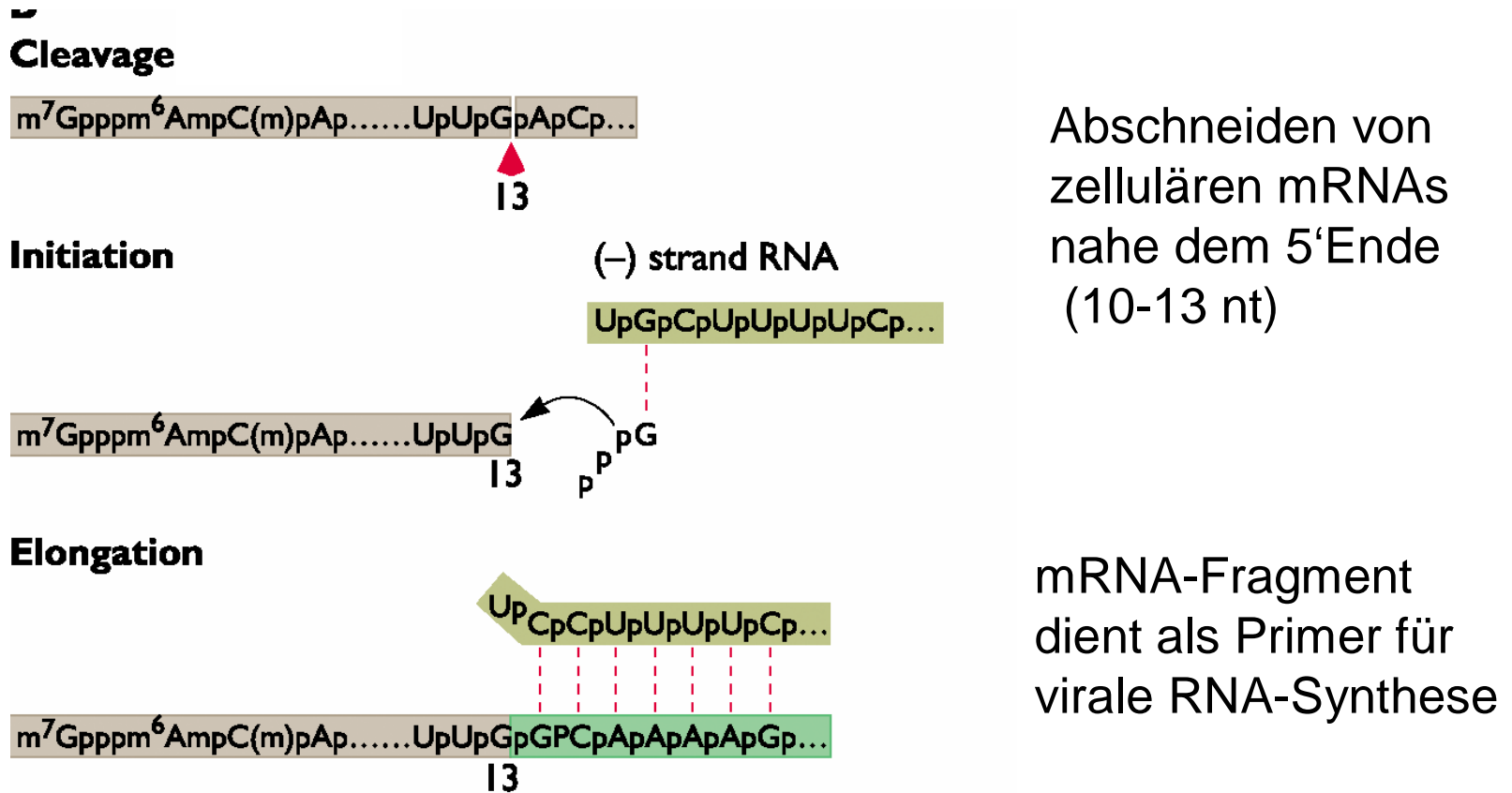
- 1) 5' Triphosphatase
- 2) Guanylyl-Transferase

Viele Viren nutzen zelluläre Capping Funktion
(nukleäre Replikation)

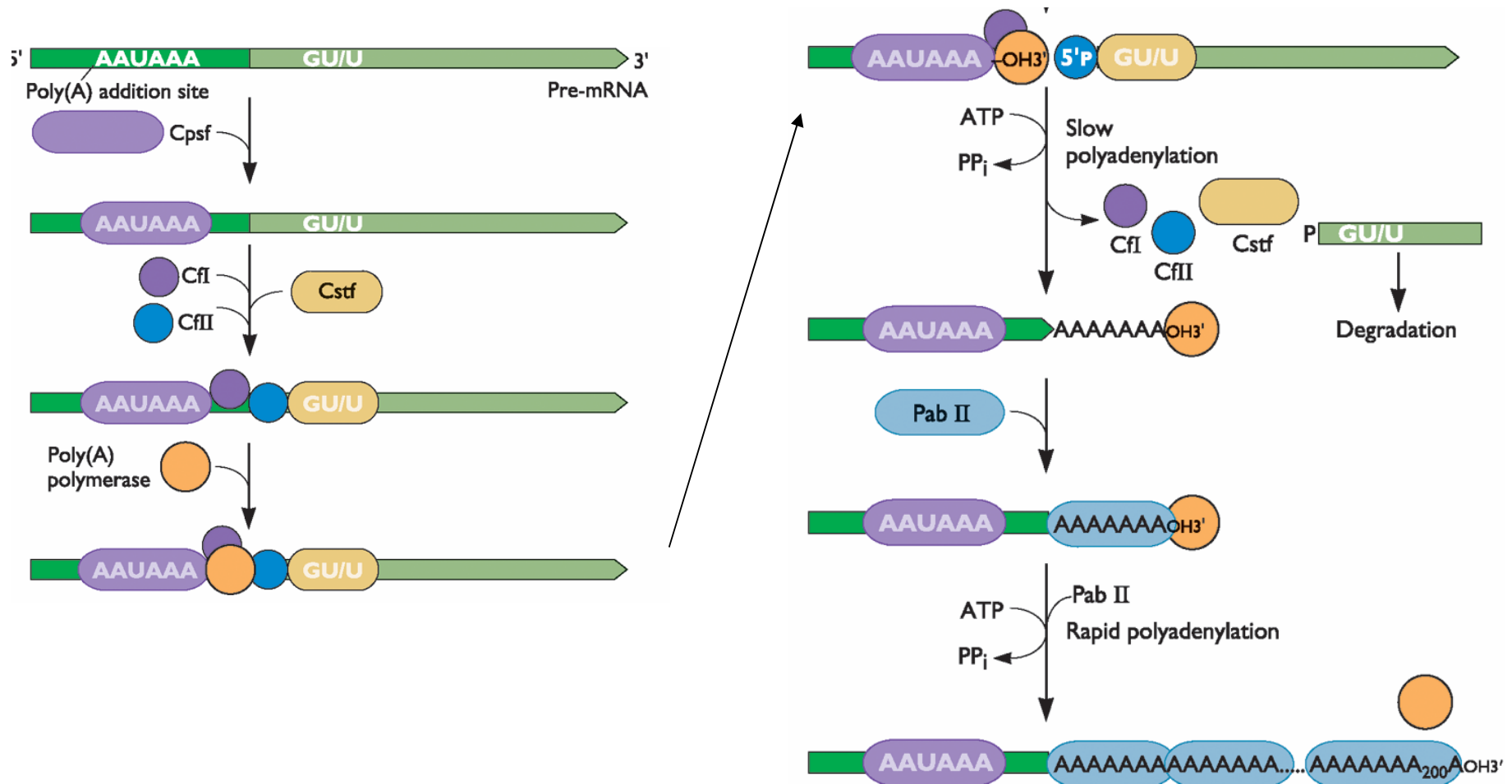
Virale Enzyme (z.B. Vaccinia-, Alpha-, Rhabdo-,
Reoviren) in RNA Pol enthalten oder interagieren
mit RNA Pol

,**cap snatching**' (Influenza-, Bunyaviren)

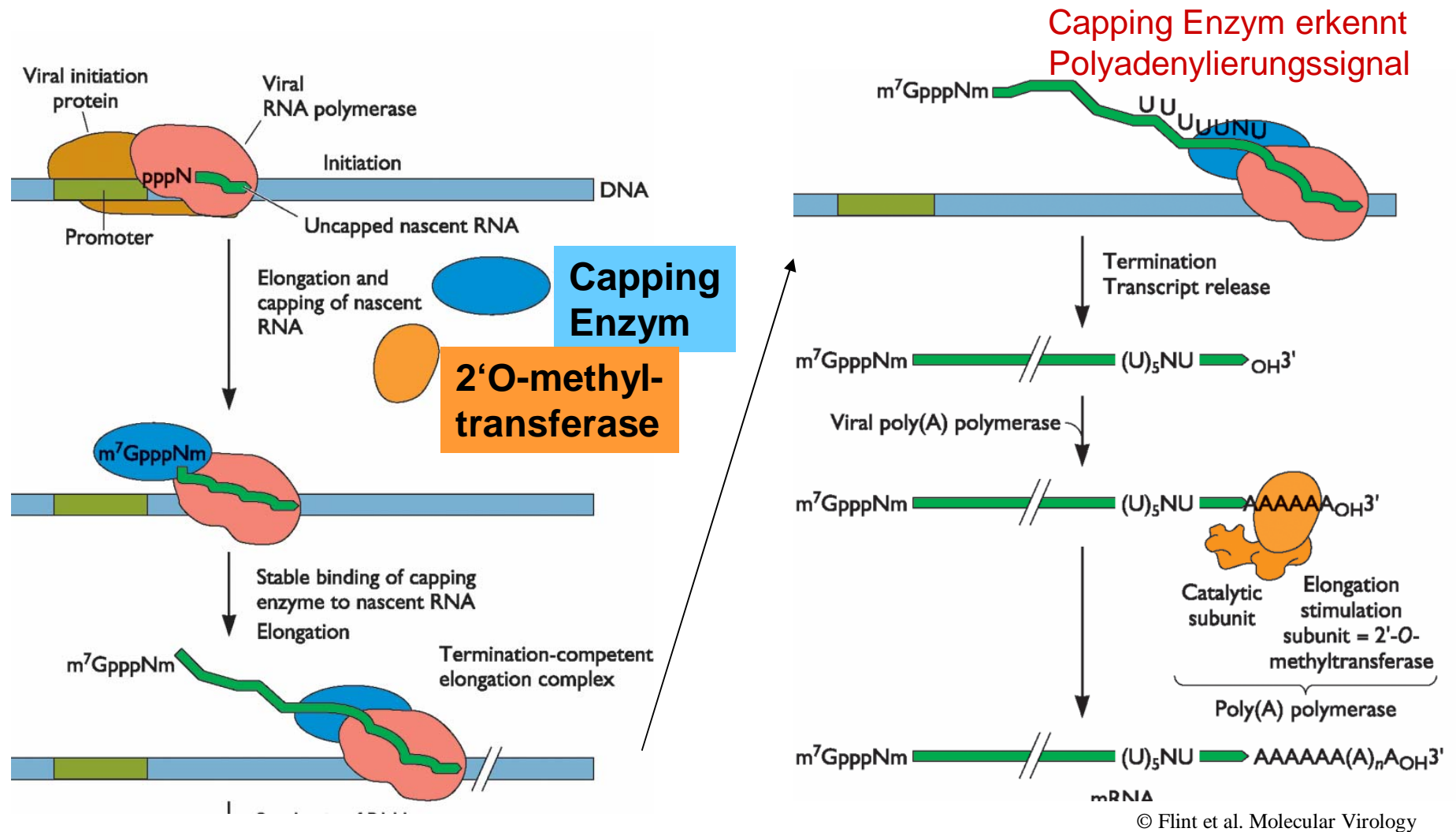
Cap snatching (Influenza)



Schneiden und Polyadenylierung von mRNA bei Vertebraten



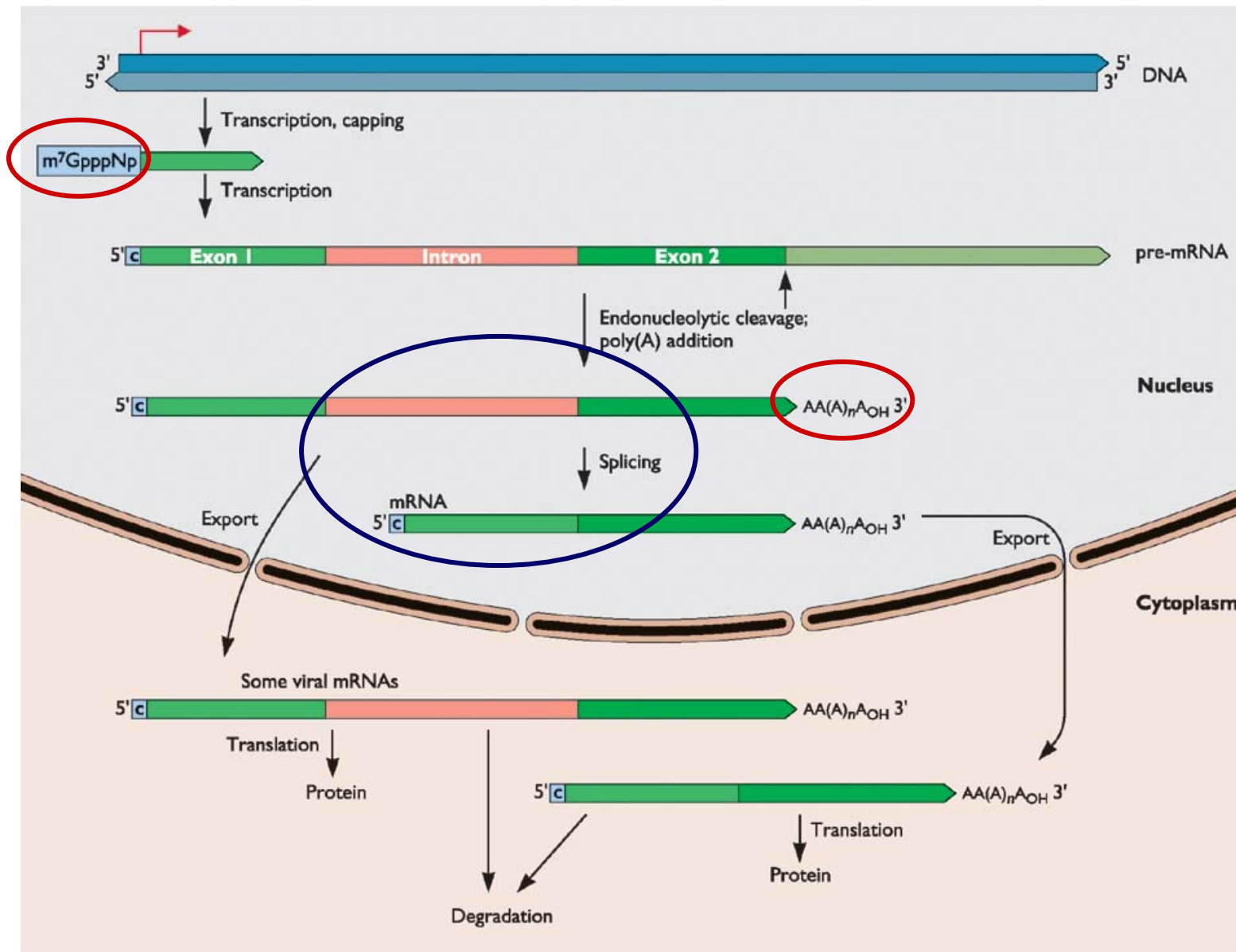
Vaccinia-Virus kodierte Enzyme prozessieren das 5' und das 3' Ende der viralen mRNAs



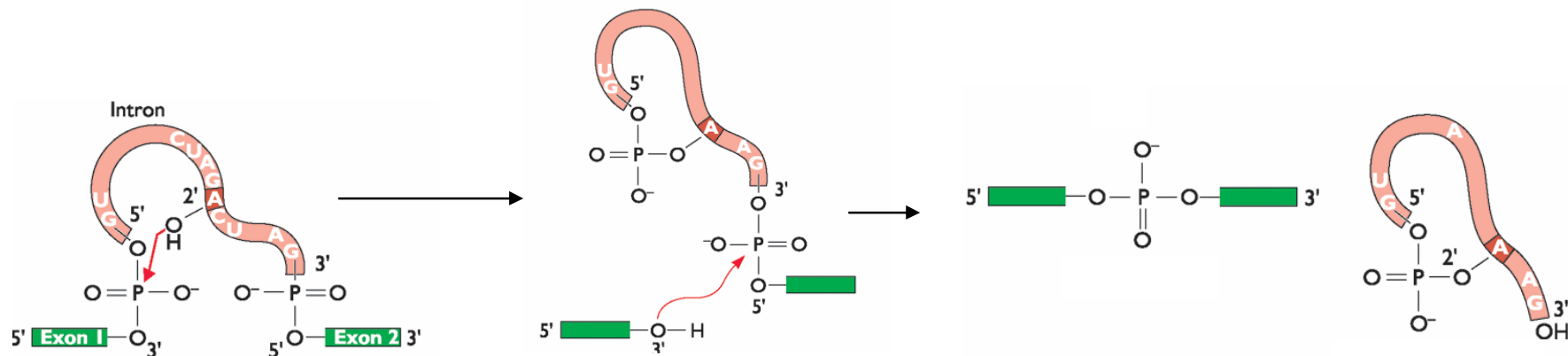
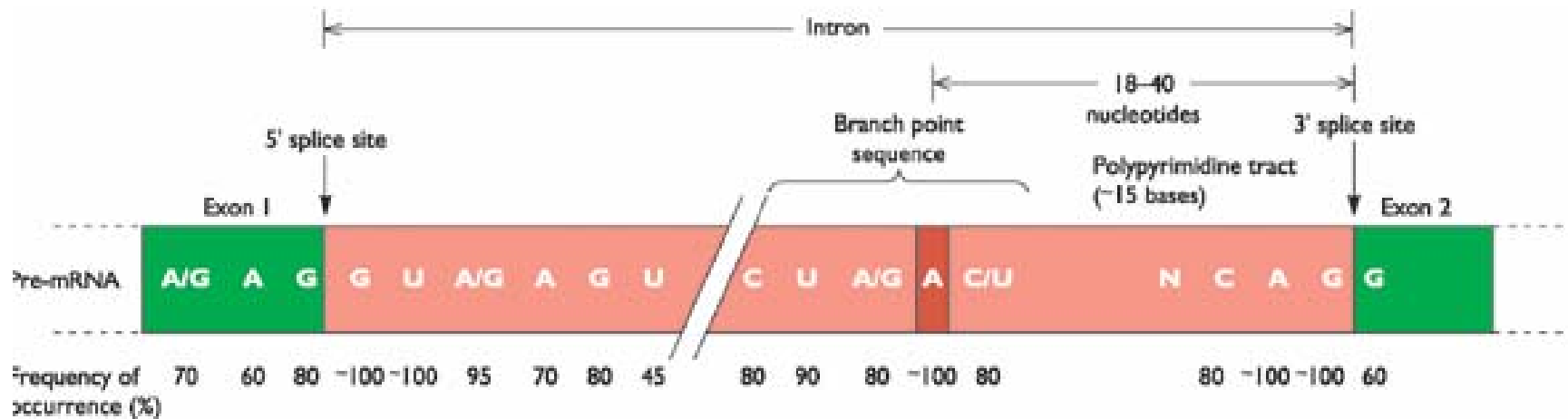
Virale Polyadenylierungsmechanismen

Mechanismus	Enzym	Viren
Während der mRNA-Synthese		
Wiederholtes Kopieren von OligoU Sequenzen im Template	Viral	Rhabdo, Paramyxo, Orthomyxo
Kopieren einer PolyU Sequenz im Template	Viral	Picorna, Toga
Prozessierung der transkribierten mRNA gefolgt von Polyadenylierung	Zellulär	Papova, Adeno, Herpes, Retro, Hepadna
Polyadenylierung nach Transkriptions-Termination	Viral	Pox

Prozessierung viraler oder zellulärer mRNA



Splicing-Signale und Mechanismus der Splicing-Reaktion

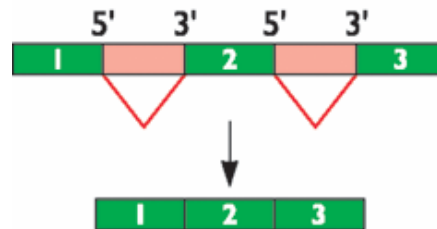


1. Umesterung

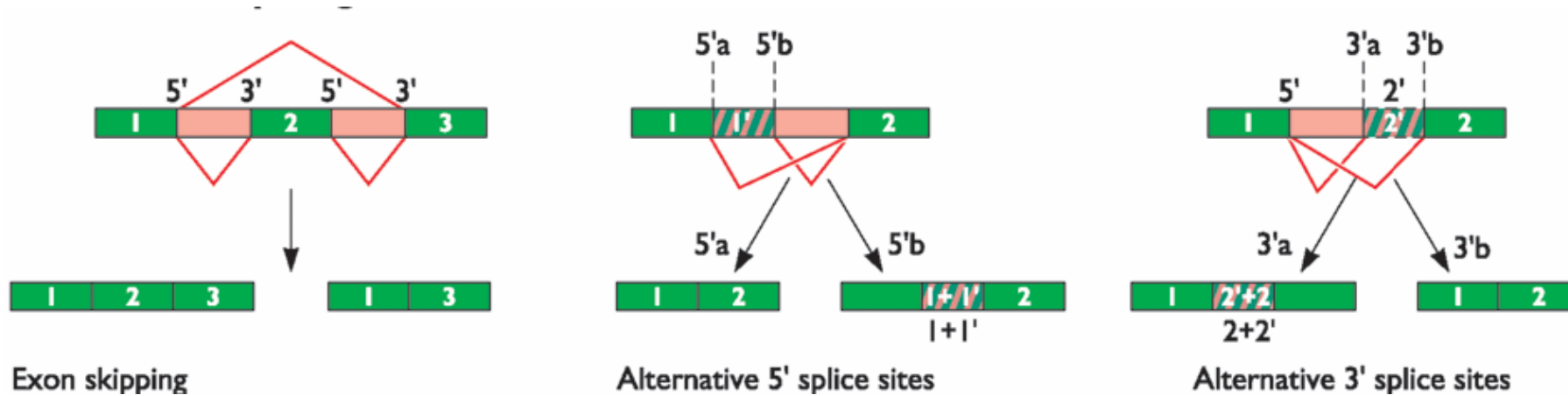
2. Umesterung

,Lariat'-Struktur

Konstitutives Splicing



Alternatives Splicing



Retroviren produzieren alle unterschiedlichen mRNAs durch differentiell Spleissen

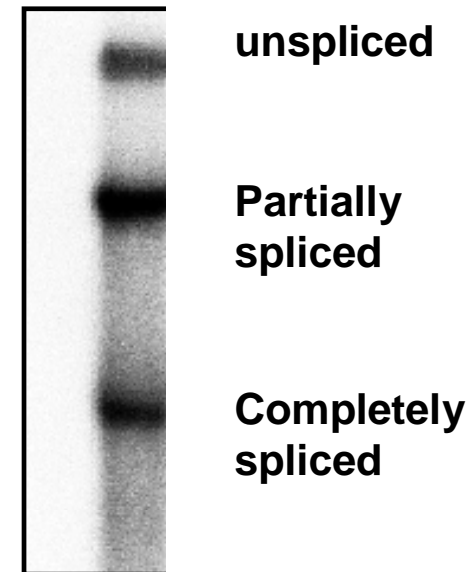
Retroviren kodieren in der Regel nur ein Primärtranskript = genomische RNA

Alle mRNAs werden durch differentiell Spleissen produziert

Intron-tragende RNAs werden exportiert (spez. Transportmechanismus)

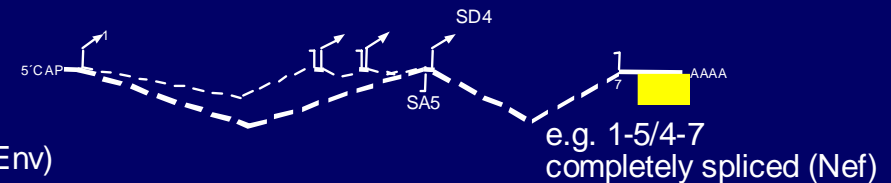
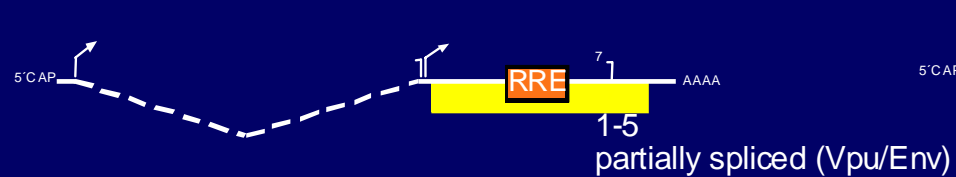
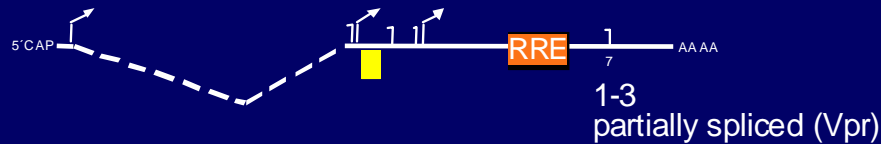
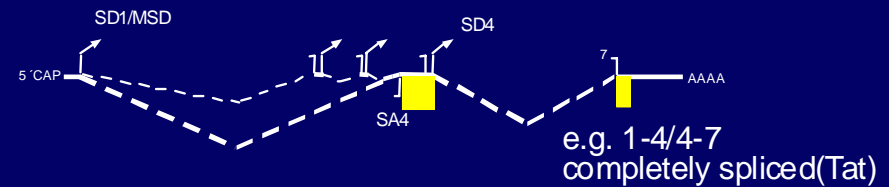
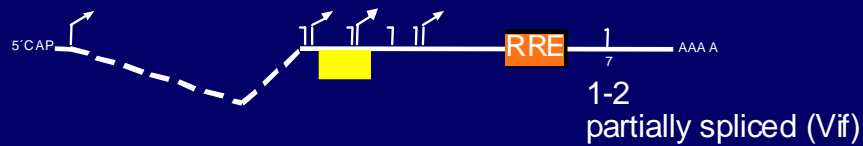
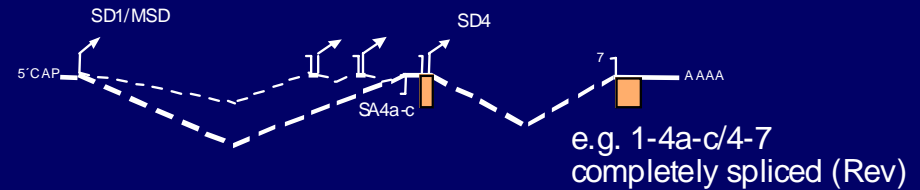
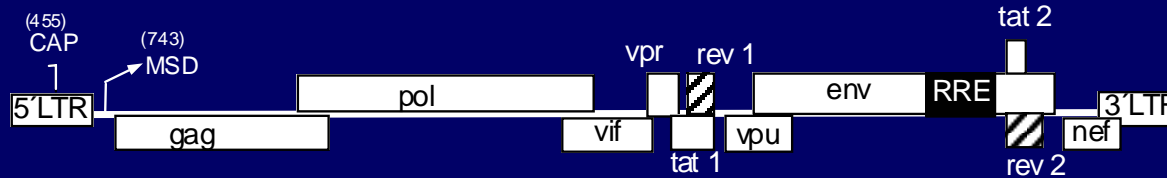
Im Falle von HIV gibt es mehr als 20 verschiedene mRNA-Spezies

Frühe und späte Genexpression erfolgt durch differentiell gespleisste mRNAs (früh: komplett; spät: inkomplett gespleisst)

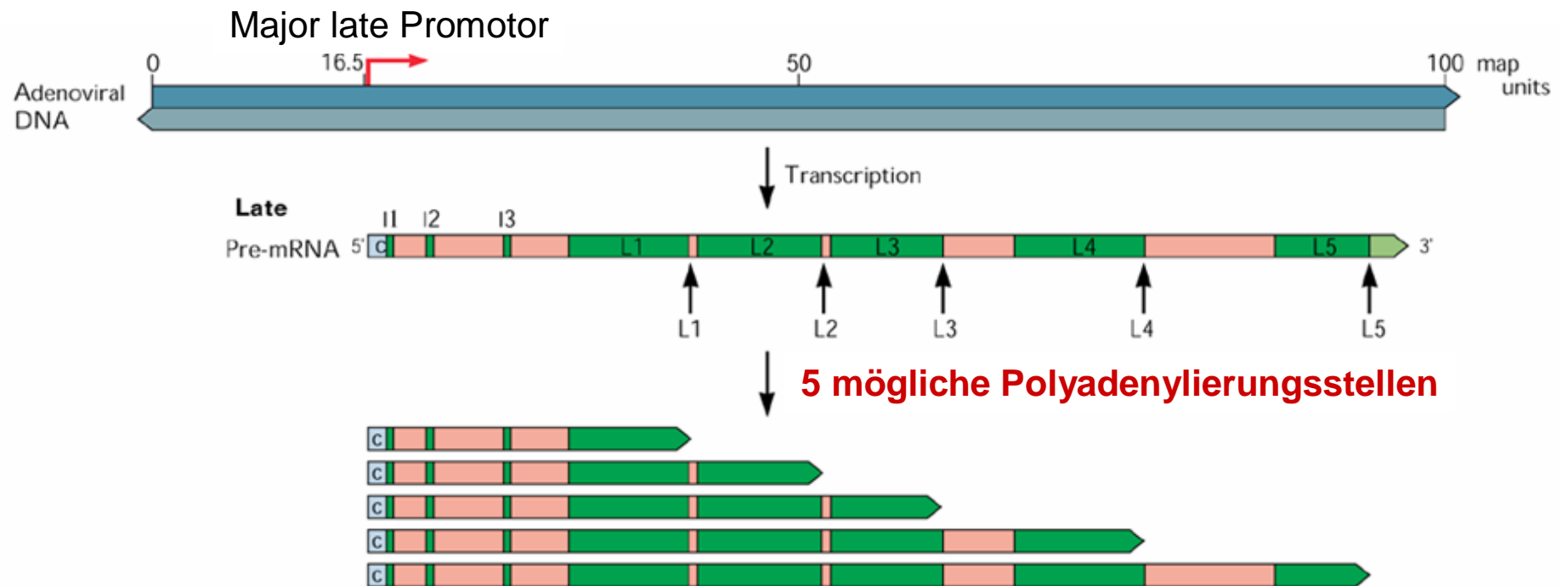


Spleissmuster von HIV-1
Northern Blot infizierter Zellen

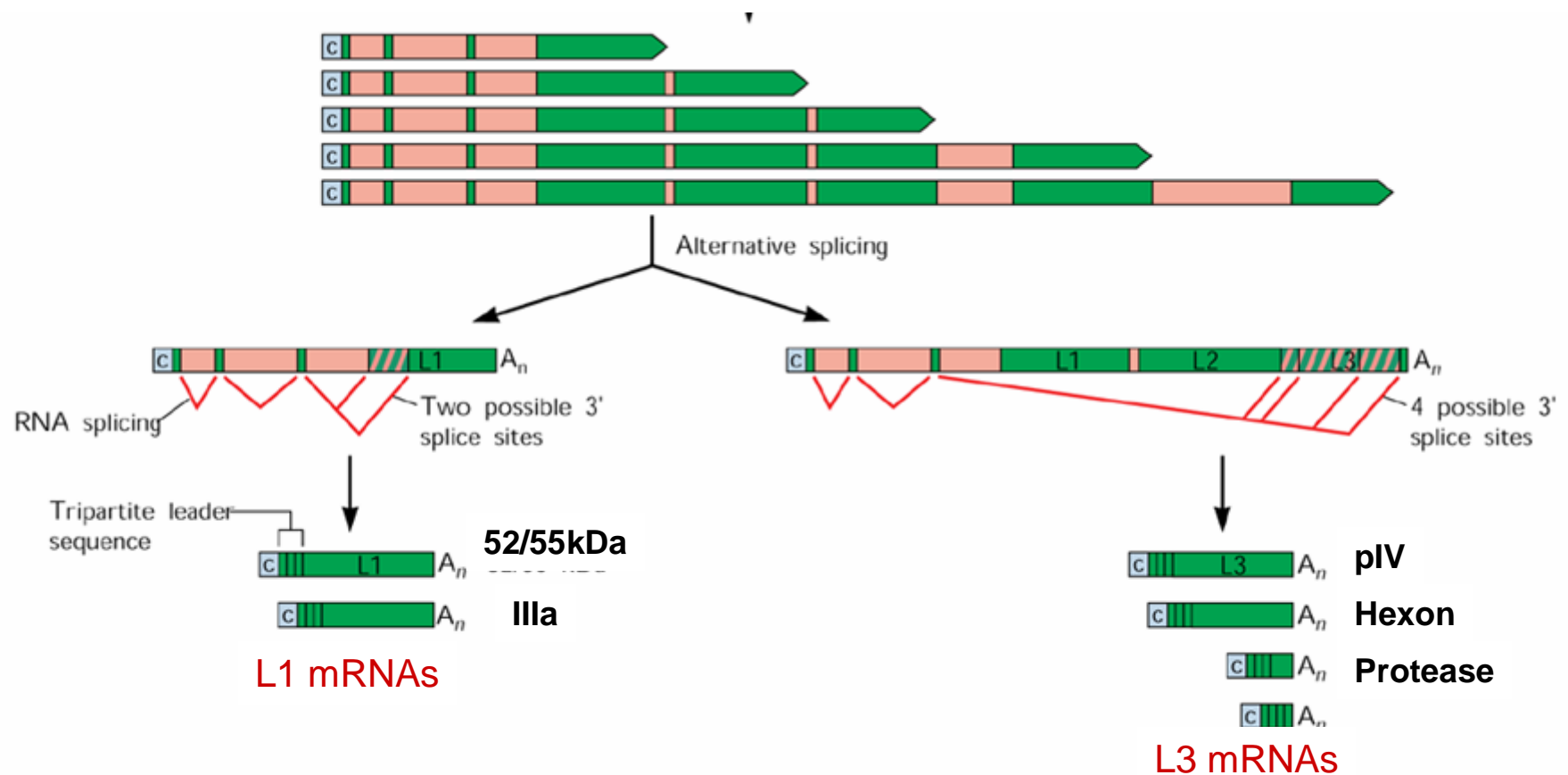
Spleiss-Muster von HIV



„Major late“ Transkripte von Adenovirus: I. Alternative Polyadenylierung



„Major late“ Transkripte von Adenovirus: II. Alternatives Splicing

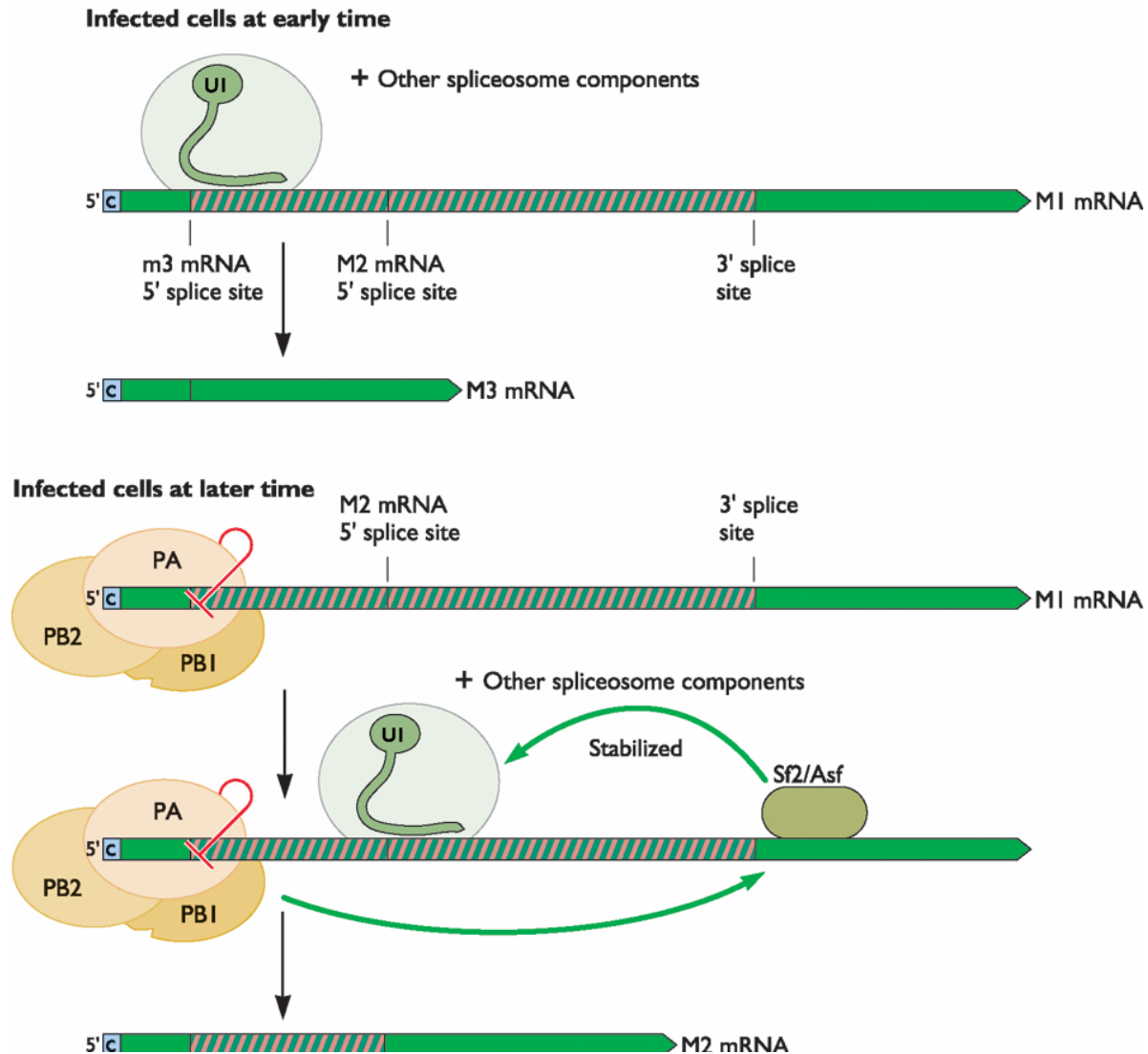


Regulation von alternativem Spleissen bei Influenzaviren

Die M1 mRNA von Influenzavirus wird differentiell gespleisst:
ungespleisst: M1 Protein (Matrix)
gespleisst: M2 Protein (Ionenkanal)
alternativ gespleisst: M3 mRNA (kein funktionelles Protein)

Alternatives Spleissen führt zu M3-Produktion in der frühen und M2-Produktion in der späten Phase der Virusreplikation

Splicing-Regulation der M1 mRNA von Influenza A



Splicing

Genetische Ökonomie:

ein Primärtranskript, mehrere Proteine

Regulation:

Umschalten der Proteinexpression in verschiedenen Phasen der Virusreplikation durch differentielles Spleissen

Problem:

Exportmechanismus für ungespleisste RNA wird benötigt

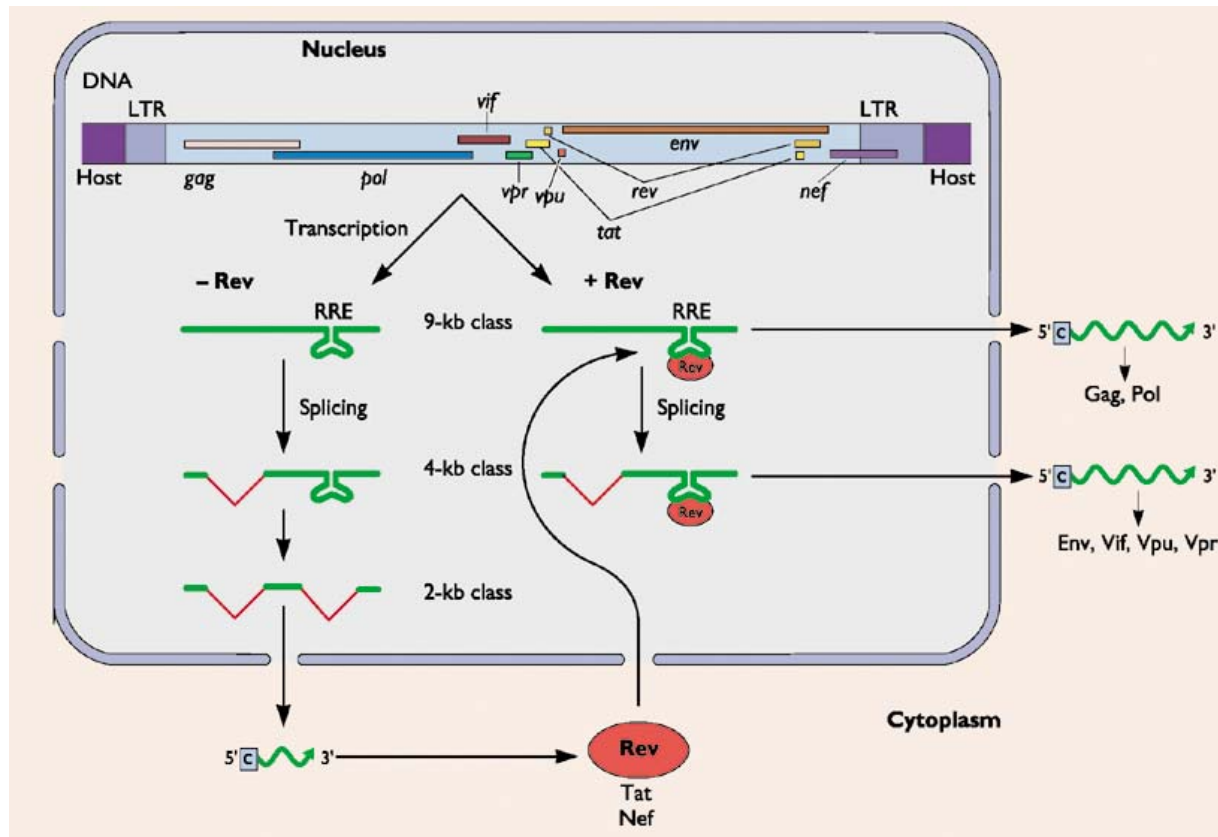
Export aus dem Zellkern

Inkomplett prozessierte RNA (mit ungespleissten Introns) wird normalerweise nicht aus dem Kern exportiert

Bei manchen Viren (z.B. Retro- Herpesviren) werden sowohl ungespleisste als auch gespleisste RNA zur Translation genutzt

Viren haben Exportmechanismen für inkomplett prozessierte RNA evolviert bzw. adaptiert

Regulation des Kernexports von HIV-1 mRNAs durch das Rev-Protein



Komplett gespleißte RNA

Rev, Tat

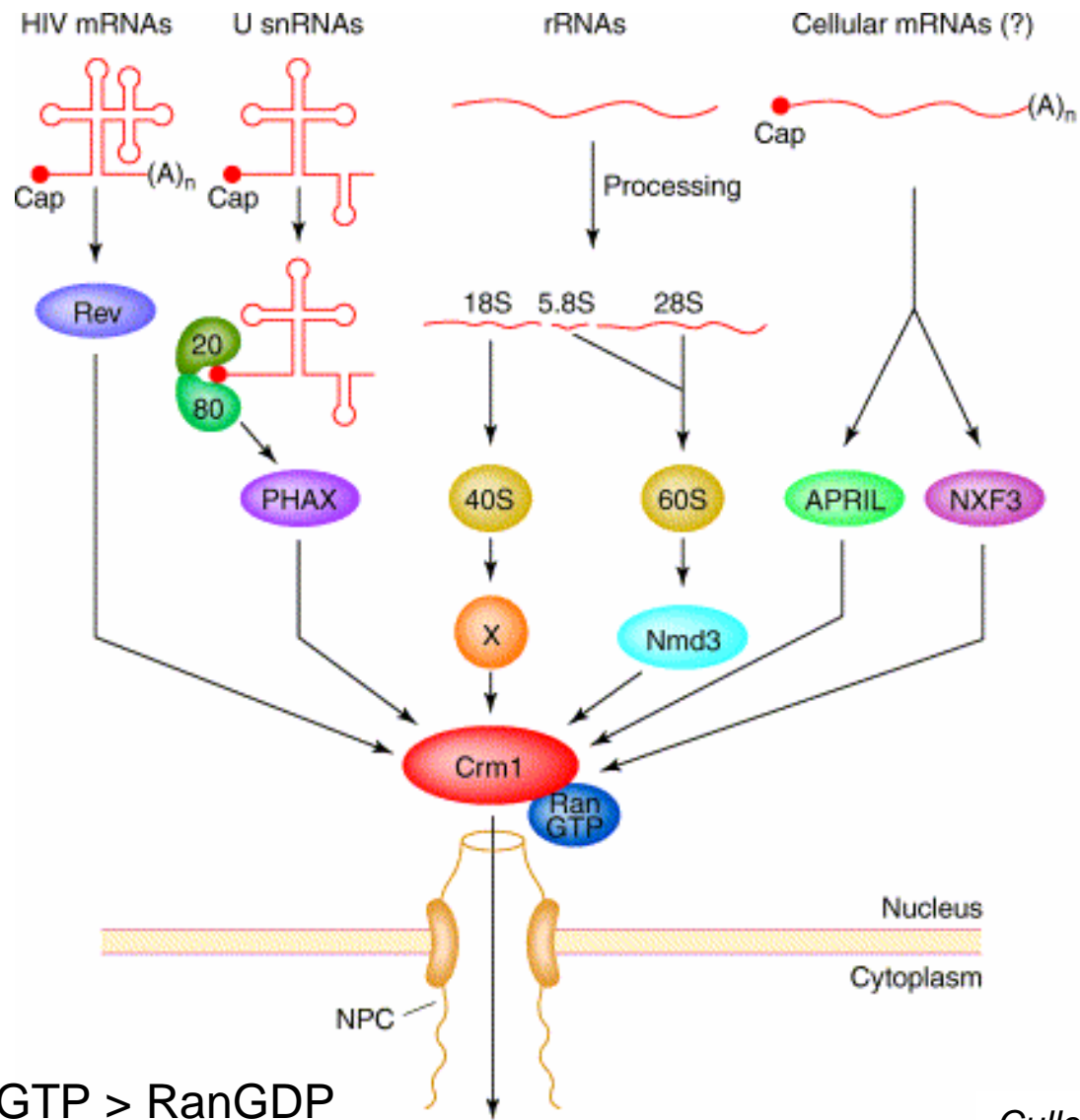
RNA-Export

REV-unabhängig

Ungespleißte RNA
Gag, Gag-Pol, Env

RNA-Export
REV-abhängig

Crm1 ist ein zentraler Faktor für den Kernexport von RNA



Adapterproteine mit Leucinreicher NES binden an RNA-Cargo und an CRM1

RanGTP > RanGDP
Cargo-Freisetzung

Cullen, TIBS 2003

Virale RNA Elemente vermitteln Kernexport ungespleisster RNA

Virale Elemente + virale Faktoren

HIV: Rev Responsive Element + Rev
Crm1 abhängiger Kernexport

Virale RNA Elemente + zelluläre Faktoren

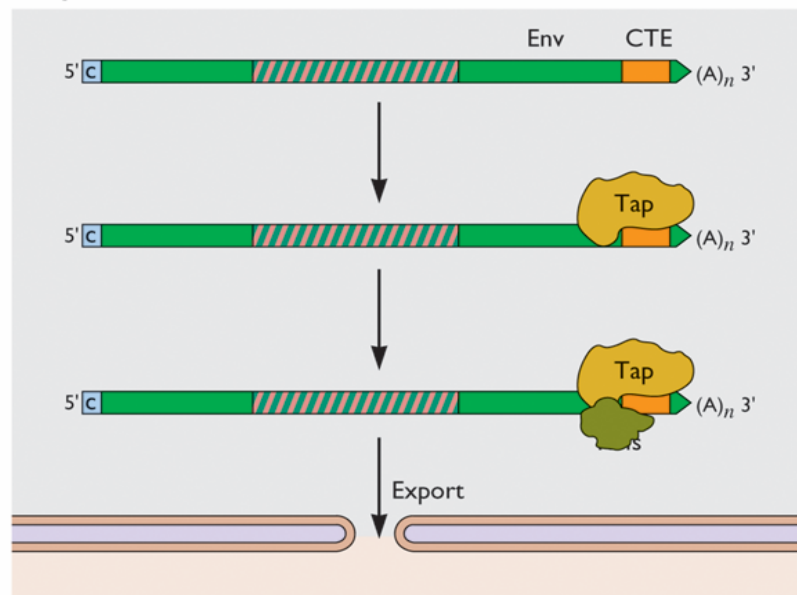
MPMV: Constitutive Transport Element
Tap-abhängiger Kernexport

HBV: Posttranscriptional Regulatory Element

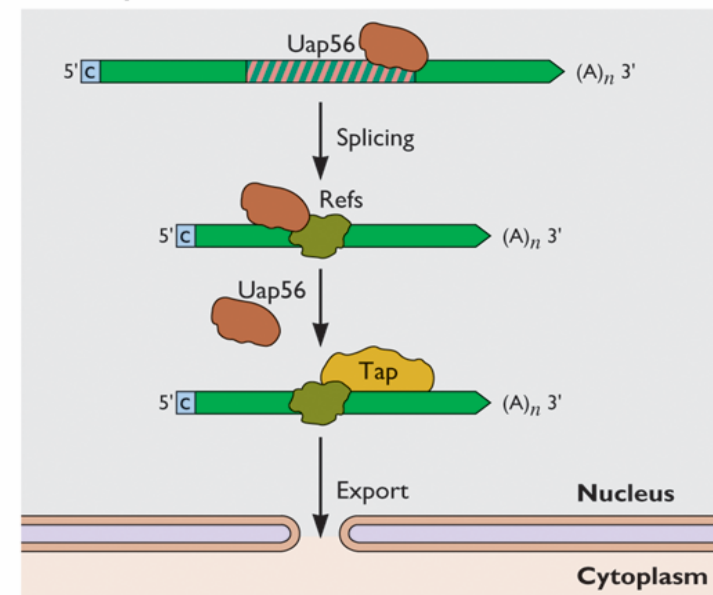
RSV: Direct Repeat

Ungespleisste mRNA einfacher Retroviren benutzen den zellulären TAP/NXF1 Export Rezeptor

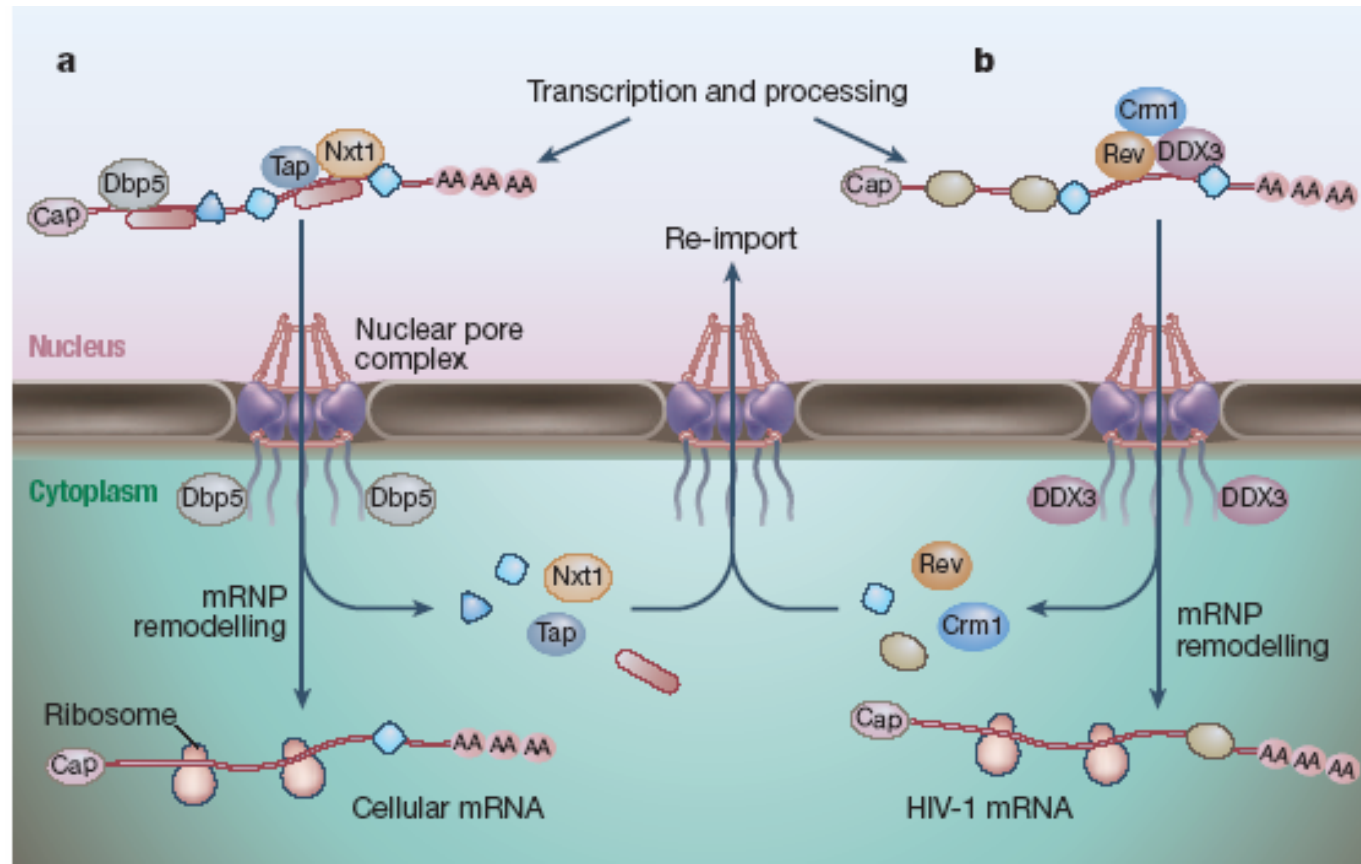
Unspliced retroviral RNA



Cellular pre-mRNA



RNA-Kernexport erfordert Exportfaktoren und Helikasen

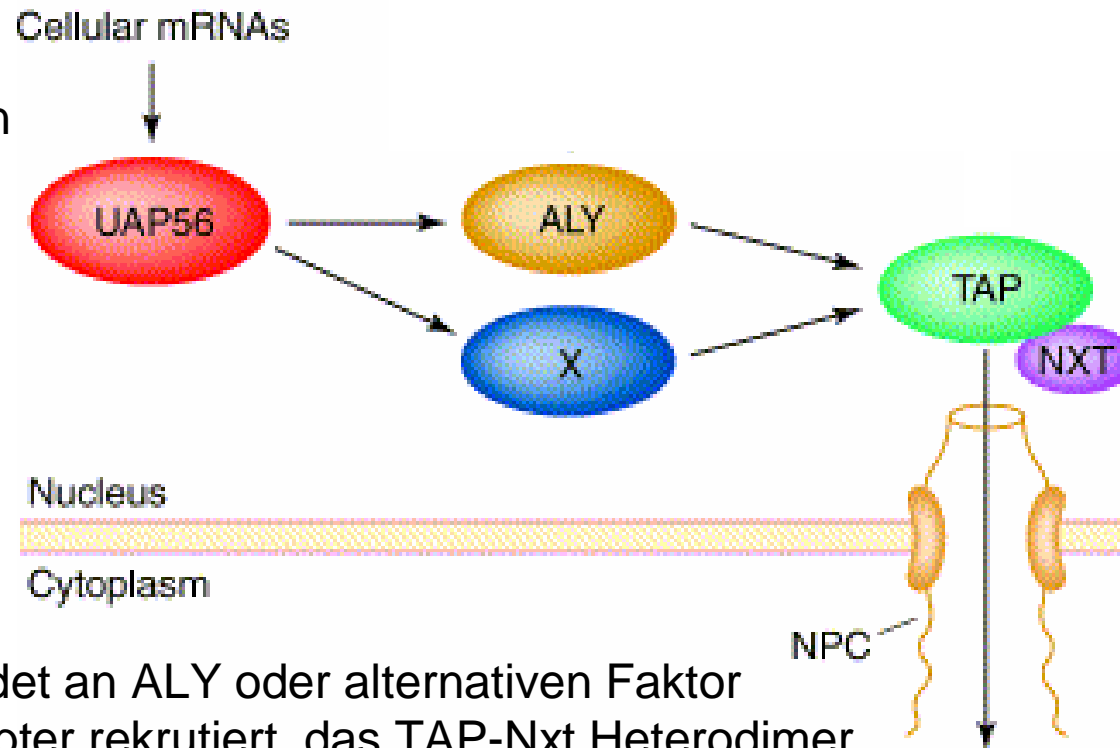


Kernexport von mRNA erfordert neben den Exportfaktoren eine zelluläre Helikase zum „remodelling“: Dbp5 (dead box Helikase)

Kernexport von HIV RNA ist unabhängig von Dbp5, aber benötigt eine andere Helikase der gleichen Familie (dead box): DDX3

Export viraler mRNA über den zellulären mRNA-Exportweg

1. Rekrutierung von UAP56 zu mRNA
Beteiligt am Splicing
Bindet bevorzugt an Intron-haltige mRNA



2. UAP56 bindet an ALY oder alternativen Faktor
3. Dieser Adapter rekrutiert das TAP-Nxt Heterodimer
4. TAP vermittelt Kernexport (Ran-unabhängig)

Kernexport von Herpesvirus-mRNA

Frühe Proteine von Herpes simplex virus (HSV) werden gespleißt und wie zelluläre mRNA exportiert und translatiert.

Das frühe Protein ICP27 ist multifunktionell und essentiell für Virusreplikation und virale Genexpression

ICP27 inhibiert Wirtszell-Genexpression durch Blockieren des Splicing

ICP27 bindet selektiv an etwa 80 HSV mRNAs und aktiviert deren Kernexport

ICP27 bindet direkt an das zelluläre Protein ALY

→ Rekrutierung der zellulären mRNA-Export-Maschinerie

Rekrutierung der mRNA Export-Maschinerie durch virale Faktoren

