

IMAGING SINGLE-mRNA LOCALIZATION AND TRANSLATION IN LIVE NEURONS

Presentado por: Molera Zamorano, Ana¹, Troncone-Clemente, Claudia¹

¹Carrera de Biotecnología, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid

Autores: Byung Hun Lee¹, Seong-Woo Bae¹, Jaeyoun Jay Shim¹, Sung Young Park², and Hye Yoon Park^{1,3,*}

¹Department of Physics and Astronomy, Seoul National University, Seoul 08826, Korea, ²Center for RNA Research, Institute for Basic Science, Seoul 08826, Korea, ³The Institute of Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

Objetivo: Revelar mecanismo de transporte de mRNA, localización y traducción en neuronas vivas.

INTRODUCCIÓN

La localización y la posterior traducción del ARNm son medios importantes para regular la expresión génica, con un alto control espacial y temporal. En neuronas dirigir el ARNm a sitios específicos y poder sintetizar proteínas donde y cuando se necesita es muy beneficioso, dada la longitud que alcanzan en ocasiones axones y dendritas que pueden llegar a medir hasta un metro. Sin embargo, quedan muchas preguntas sobre cómo los ARNm navegan a través de los complejos arborescentes neuronales a regiones específicas y como se regula la traducción local de esos ARNm. La observación de la dinámica de localización y de la traslación proporcionará información importante para comprender como de precisa es la regulación de la expresión génica.

Para obtener información espacial y temporal debemos utilizar células vivas, para que sea posible observar los eventos moleculares que ocurren en tiempo real.

Al obtener imágenes de moléculas de ARNm en células vivas podemos comenzar a comprender la cinética de la relación causa-efecto de la regulación del ARN de forma más predecible.

SEGUIMIENTO DEL TRÁFICO DE ARNm INDIVIDUALES EN DENDRITAS

La síntesis de nuevas proteínas en las dendritas es necesaria para la plasticidad sináptica a largo plazo. Una gran fracción de estos ARNm codifican proteínas sinápticas. Para comprender como se codifican y transportan los ARNm a dendritas es necesario realizar un seguimiento del movimiento de las moléculas de ARNm individuales.



Fig. 1. Schematic diagrams of local translation in dendritic spines and an axonal growth cone. (A)

El transporte y la localización del ARNm dependen de la interacción de los elementos que actúan en cis, las proteínas de unión al ARN (RBP) y las proteínas motoras. Varios tipos de RBPs se unen a sus ARNm diana para formar complejos de ribonucleoproteínas mensajeras (mRNPs). Estos complejos reclutan proteínas motoras, kinesina o dineína, y son transportados a lo largo del citoesqueleto.

En la región 3'UTR del ARN encontramos una secuencia que actúa en cis y confiere localización dendrítica, a esta secuencia se la llama elemento de diana dendrítica (DTE). En determinados experimentos que se han realizado se ha sugerido que algunos ARNs que comparten DTE común pueden clasificarse en distintos complejos y transportarse a dendritas distales. Sin embargo, no sabemos cuál es el DTE funcional mínimo para la localización selectiva del ARNm.

La mayoría de los estudios del ARN anteriores se han realizado mediante inyección de ARNs reporteros exógenos, sin embargo, los ARN informadores pueden no representar las características verdaderas de los ARN endógenos. Para etiquetar, monitorizar ARNm endógenos se generan ratones modificados genéticamente que expresan la MS2-GFP.

Usando esta técnica todos los ARNm de β -actina estaban marcados con el sistema MS2-GFP en ratones vivos. El seguimiento de estos ARNs marcados reveló que la difusión del ARNm era mucho más lenta en las neuronas que en los fibroblastos.

En conjunto, el seguimiento de los movimientos de un solo ARNm nos permite revelar como ocurre el transporte y la localización del ARN en las neuronas vivas.

Otros estudios utilizan nuevos desarrollos de ingeniería genética en los que enfoques de biología de sistemas explican mecanismos reguladores precisos de a localización del ARNm en las dendritas.

SEGUIMIENTO DE TRADUCCIÓN MEDIANTE ARNm INDIVIDUALES EN NEURONAS VIVAS

Ribosome profiling: mide regiones en ARNm protegidas del ribosoma, mediante *Next Generation Sequencing*. Analiza el transcriptoma y proporciona medidas de ratios de las etapas de la traducción.

Purificación por afinidad de ribosomas translacionales: basado en la retención de proteínas ribosomales asociadas a HA o GFP y la identificación de ARNm asociados.

Isótopos de pulso estable: emplean aminoácidos etiquetados con isótopos radioactivos en cultivos celulares (SILAC), para identificar las proteínas sintetizadas que los incorporen. Pero todas estas técnicas que afectan al genoma, proporcionan medidas de conjuntos celulares, haciendo necesario el desarrollo de técnicas basadas en imagen, que estudien la dinámica de la traducción en células individuales.

Se emplean proteínas fluorescentes en el seguimiento de síntesis local de proteínas, creando un biosensor ARN, que permite distinguir entre ARNm no traducidos, de aquellos que han sufrido, al menos, una ronda de transcripción; además de permitir identificar las proteínas nacientes:

TRICK: reconocimiento de ARNm que ha sufrido traducción (knock-off PCP-GFP)

Suntag: reconocimiento de proteínas nacientes, por señalización mediante MCP-RFP de fragmentos de Ac que se unen a múltiples copias de epitopos cortos en cada polipéptido.

Además, el empleo de ambos sistemas, permite la colocalización de ambas señales, proporcionando información de ARNm que se encuentran activos en traducción.

El seguimiento de los polipéptidos recientemente sintetizados han permitido desvelar que la traducción no se encuentra reprimida durante el transporte de ARNm hasta su destino de localización.

Además, si lograse desarrollarse un reportero endógeno (que sirva como medida de actividad de traducción en respuesta a diferentes señales en tejidos vivos), obtendríamos gran detalle de la dinámica de expresión génica.

CONCLUSIÓN

La propia morfología alargada en neuronas hace necesario el transporte dirigido de ARNm, además de la síntesis local de proteínas, correspondiendo a una expresión génica eficaz, tanto en dendritas, como en axones.

La síntesis local proteica es importante para el desarrollo neuronal y plasticidad sináptica, siendo indispensable su comprensión.

Gracias al desarrollo de técnicas moleculares dirigidas, podremos ir comprendiendo los mecanismos moleculares de localización, traducción y degradación de RNA en neuronas, permitiendo así dilucidar las relaciones fisiológicas entre expresión génica y funciones cerebrales.

VISUALIZACIÓN DE LOCALIZACIÓN DE ARNm EN AXONES

Tradicionalmente se ha cuestionado la síntesis local de proteínas en axones, permitiendo así el estudio de ARNm en funciones indispensables como guía, supervivencia y regeneración axonal. Además, las RBPs son esenciales en el transporte de ARNm y en el bloqueo de la traducción.

Métodos para la visualización de ARNm en cultivos neuronales:

1. MS2-GFP: localizan las regiones 3' y 5'UTR del receptor K-opioide, requeridos para su transporte axonal en raíces de neuronas ganglionares.

2. Método molecular TDP43, (proteínas de unión al DNA) para ARNm de Nefl (Neurofilamento - L) en axones de neuronas corticales primarias de ratón y neuronas motoras humanas, derivadas de iPSC, donde su proteína de unión al DNA (TDP-43) es vital en la entrega del ARNm en los axones distales.

Estas técnicas ofrecen un estudio fiable del transporte de ARNm en axones, ya que permiten etiquetar RNA, proporcionando alta resolución en la visualización de células vivas. Proporcionan una visualización a detalle de ARNm endógenos de cadena sencilla sin transfección. Además, estas técnicas han dado lugar a plataformas integradas, mediante dispositivos de microfluidos, que han permitido la regeneración de axones dañados.

Así pues, la traducción local es indispensable para el desarrollo y regeneración axonal, haciendo necesaria la comprensión del mecanismo molecular que gobierna el tráfico local y localización de ARNm en axones.

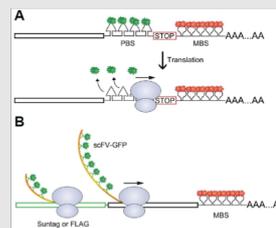


Fig. 2. Schematic diagrams of the TRICK and Suntag (or FLAG)-MBS systems. (A) Schematic of the TRICK system. Both PCP-GFP and MCP-RFP are bound to the untranslated mRNA. During translation, ribosomes read through the PBS sequence and knock off PCP-GFP from the mRNA. After the first round of translation, the mRNA is only labeled with RFP. (B) Suntag (or FLAG)-MBS system. Translation of RFP-labeled mRNA can be monitored by the fluorescence signal from scFV-GFP clustered on the nascent polypeptides of Suntag (or FLAG).

