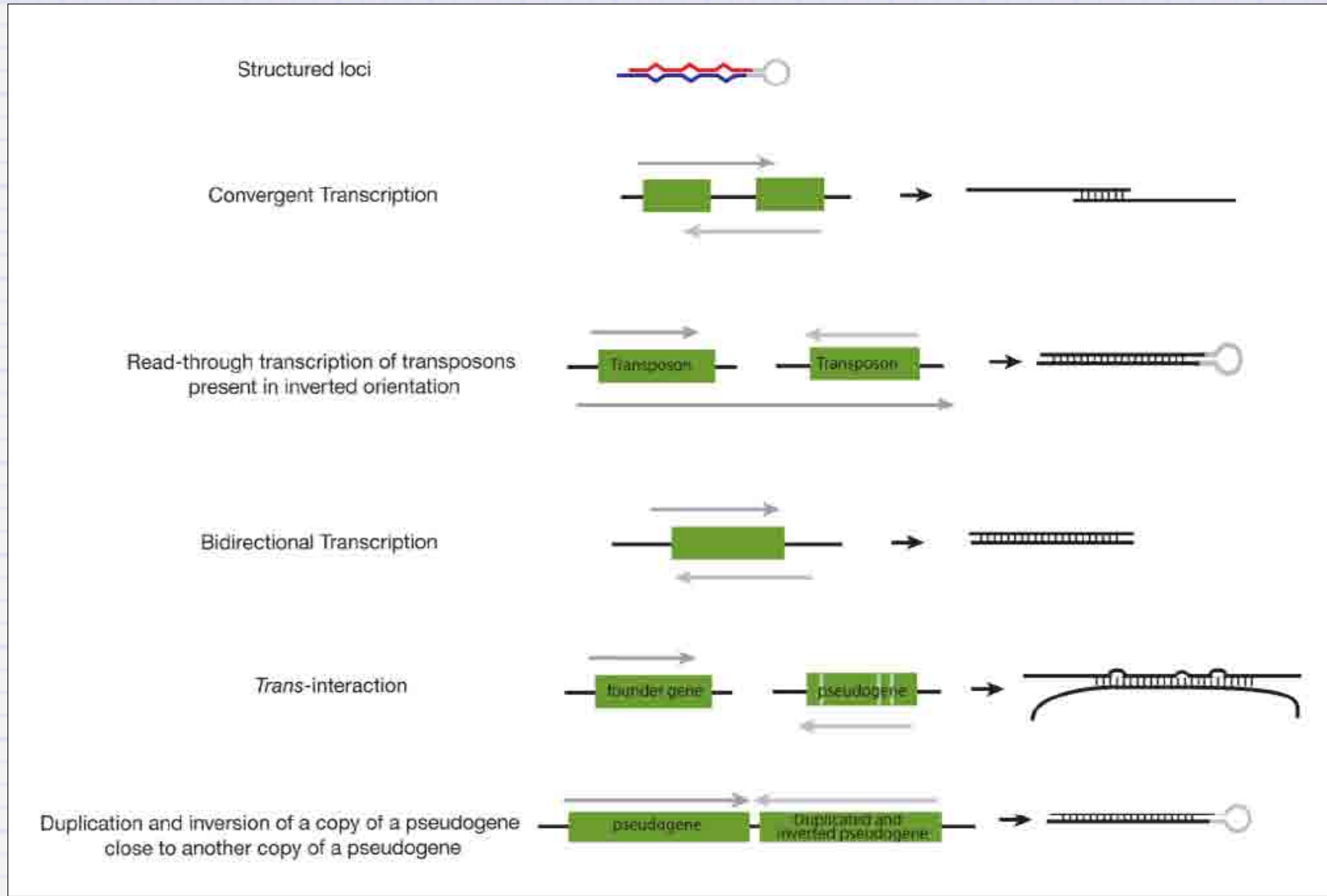
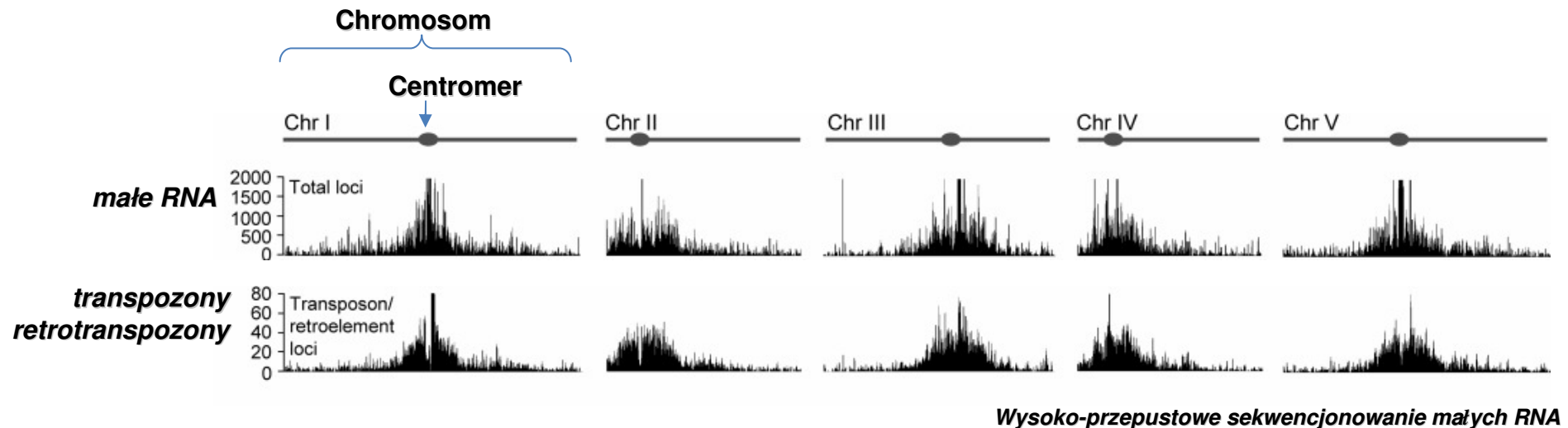


Endo-siRNA:



Większość endogennych siRNA powstaje z transpozonów i powtórzeń sekwencji DNA

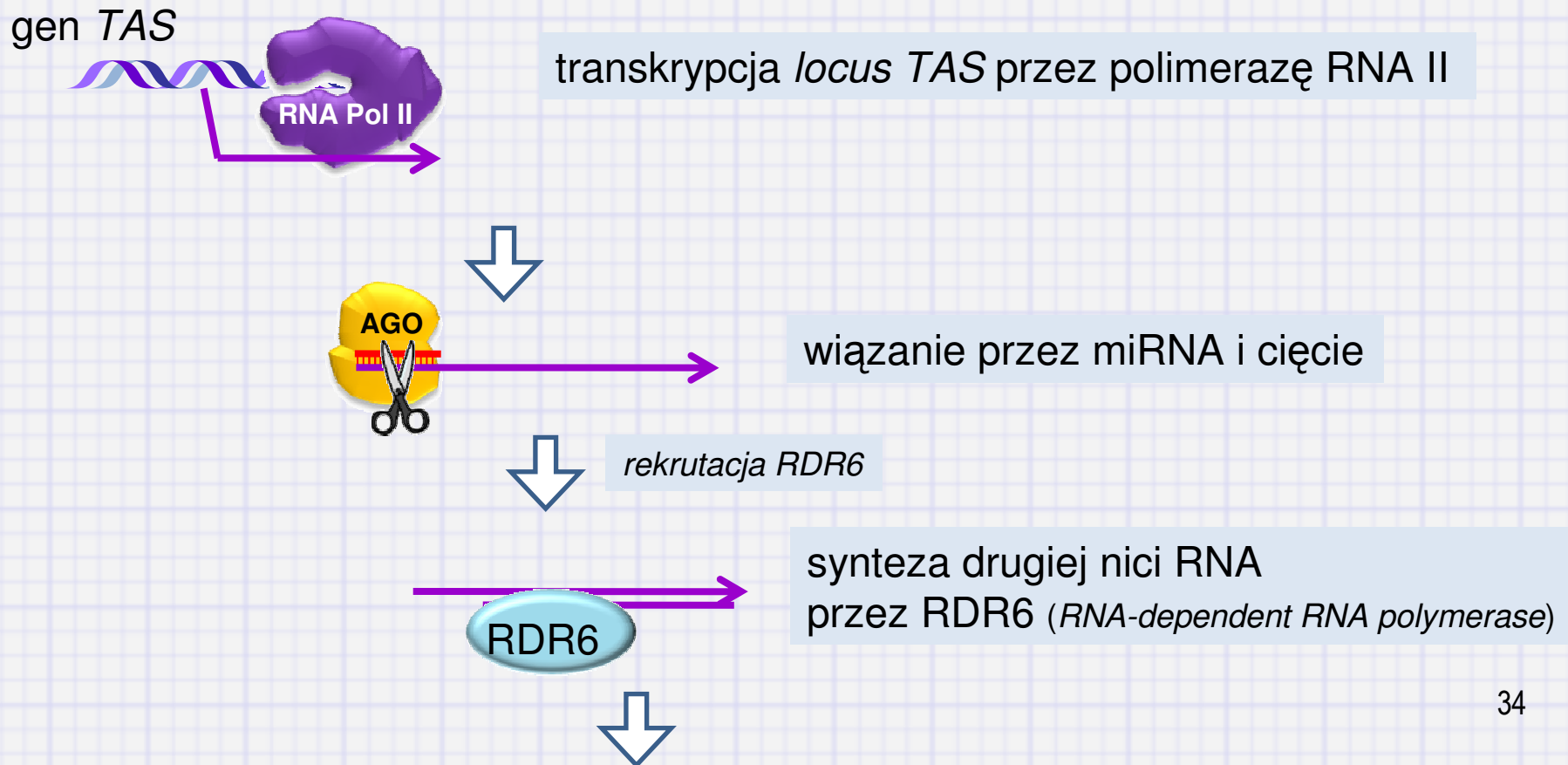


Większość siRNA w komórce pochodzi z sekwencji transpozonowych i powtórzonych. U *Arabidopsis thaliana* duże zagęszczenie tego typu sekwencji występuje w rejonach centromerowych chromosomów.

tasiRNA: roślinne endogenne siRNA

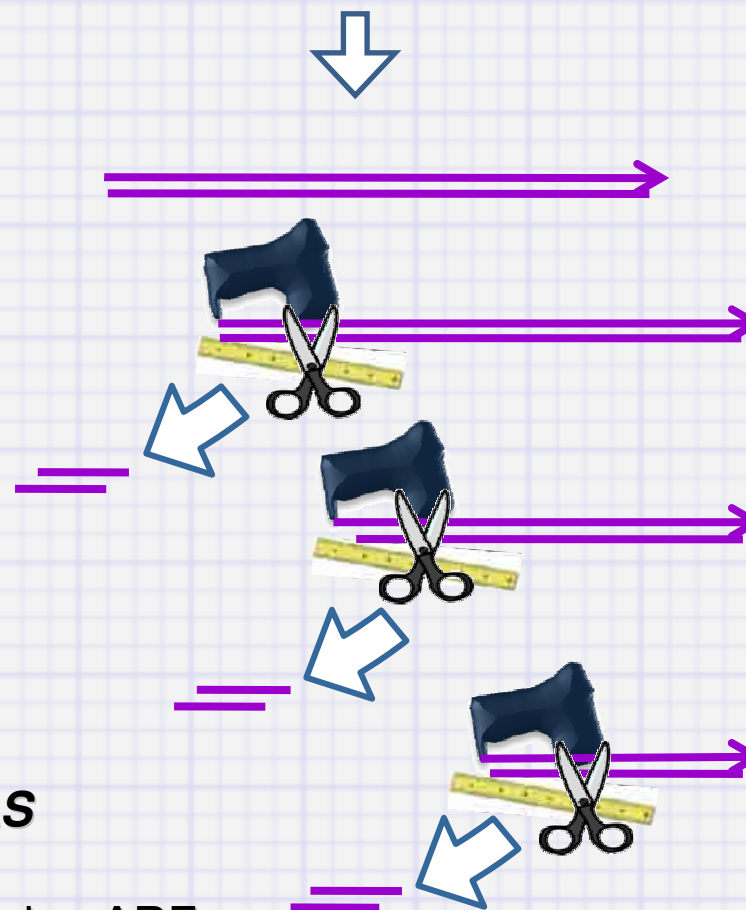
tasiRNA – *trans-acting siRNA*

- specyficzne dla roślin
- kodowane przez geny *TAS*
- obróbka pierwotnego transkryptu jest inicjowana przez miRNA



biogeneza tasiRNA – c.d.

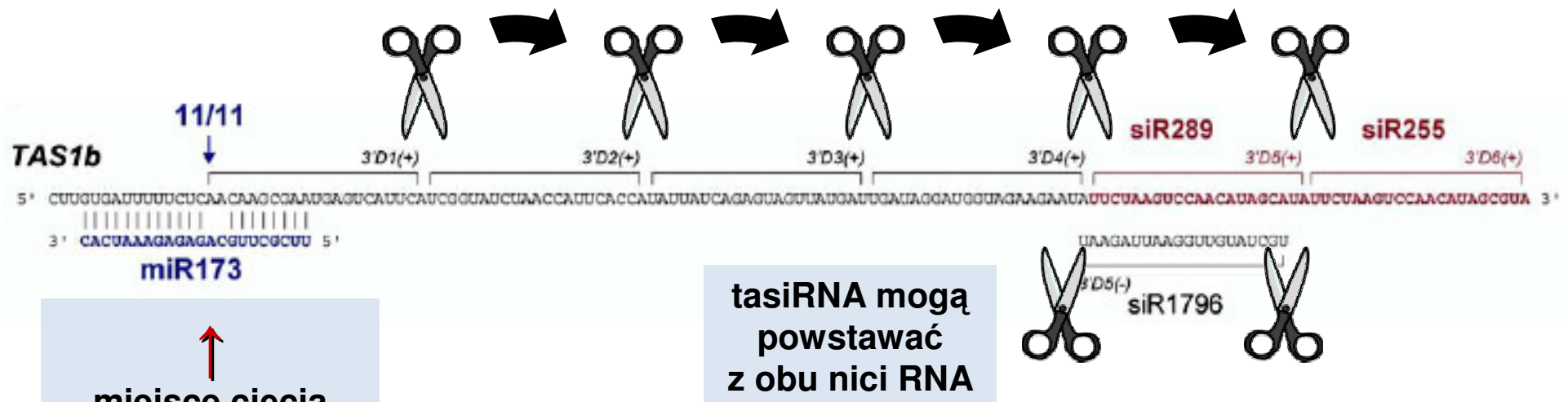
dsRNA jest cięty przez DCL4 na serię krótszych dsRNA, uwalniając wiele cząsteczek tasiRNA z jednego genu *TAS*.



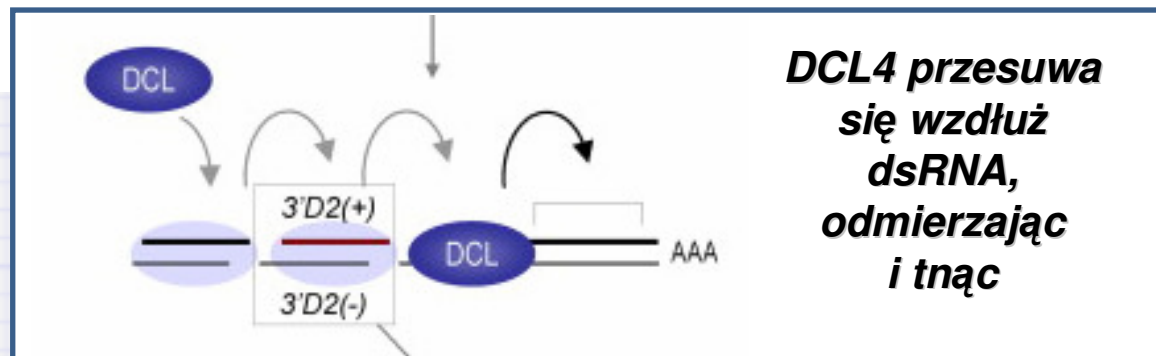
Arabidopsis* – 4 rodziny genów *TAS

- *TAS1* i *TAS2* tasiRNA – PPR
- *TAS3* tasiRNA – czynniki transkrypcyjne ARF
- *TAS4* tasiRNAs – czynniki transkrypcyjne MYB

Z jednego genu *TAS* powstaje wiele cząsteczek tasiRNA

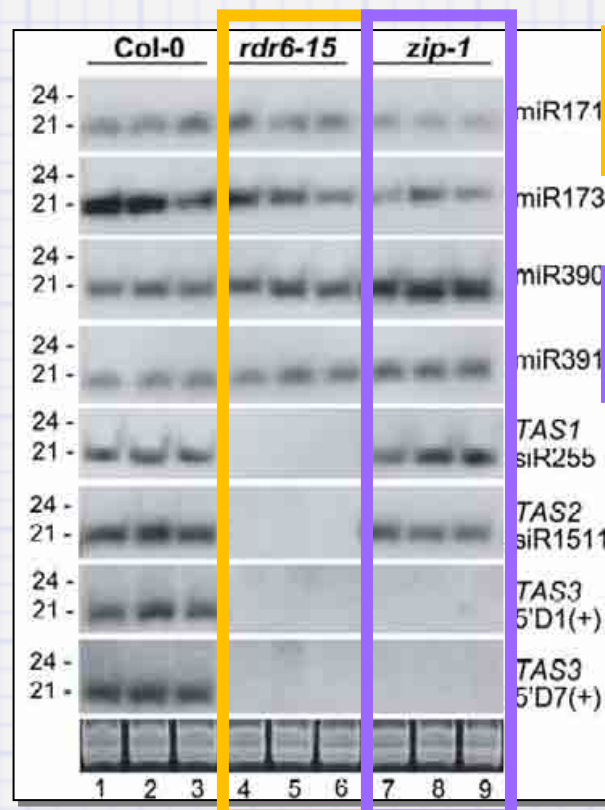


↑
miejsce cięcia
pierwotnego
transkryptu przy
udziale miRNA
kluczowe dla
zapewnienia
specyficzności tasiRNA;
DCL4 zaczyna ciąć
prekursor dokładnie
w tym miejscu i tnąc
w odstępach 21nt



Zaburzenia biogenezy tasiRNA

→ zaburzenia rozwoju



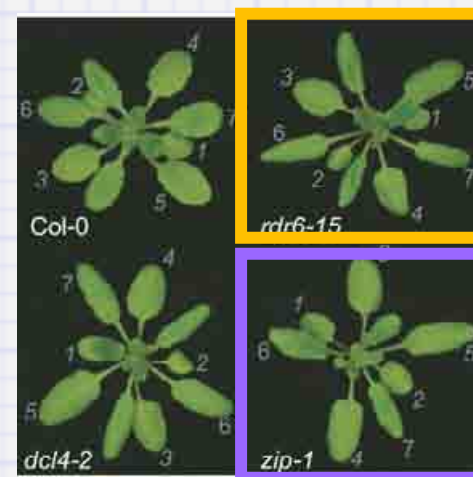
Northern

mutacja *rdr6-15*:
brak tasiRNA

zip-1 (*AGO7*):
brak *TAS3* tasiRNA

**Mutacje *rdr6* i *zip*,
podobnie jak *dcl4* i *tas3*,
przyspieszają zmiany
rozwojowe**

przyspieszone przejście z fazy juwenilnej
do dorosłej: wydłużone liście, wywinęte
pod spód brzegi blaszek liściowych

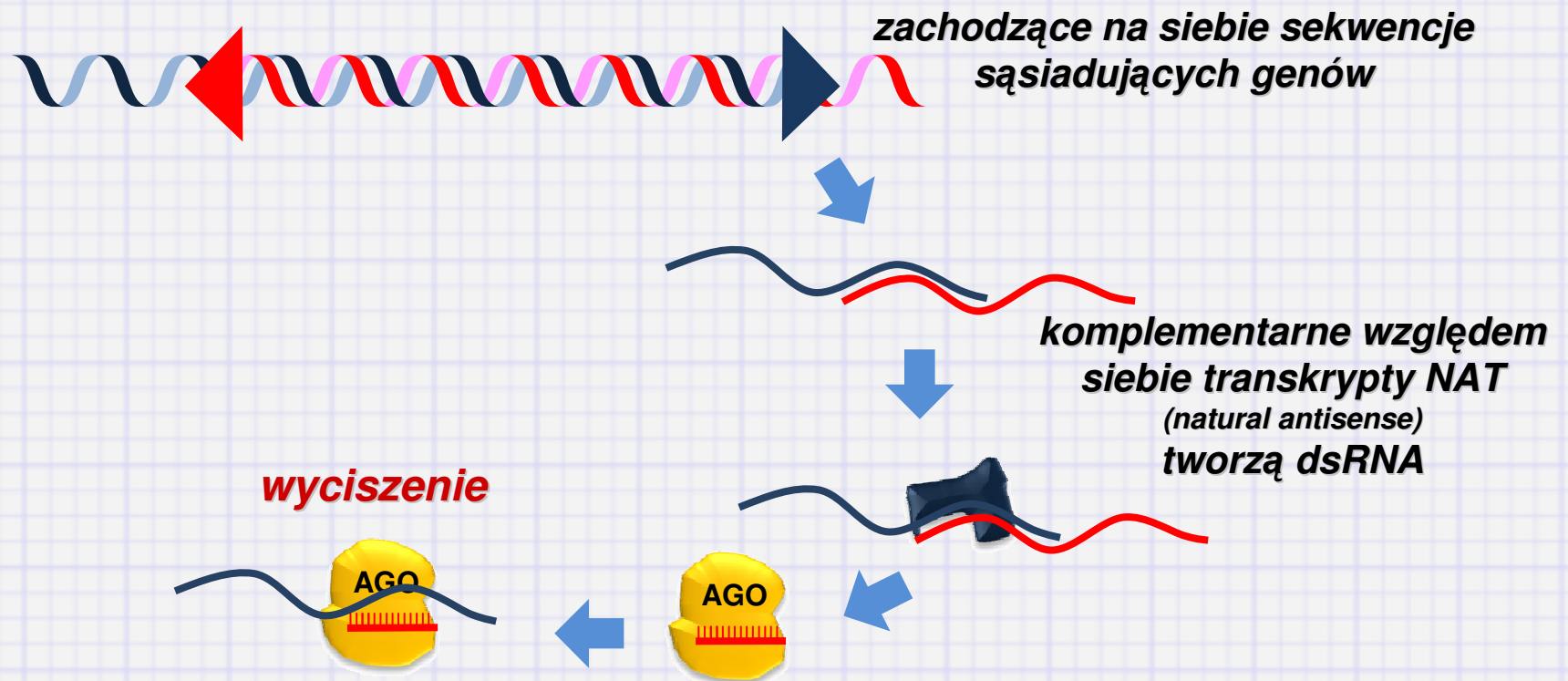


natsiRNA: roślinne endogenne siRNA

natsiRNA – *natural antisense-transcript derived siRNA*

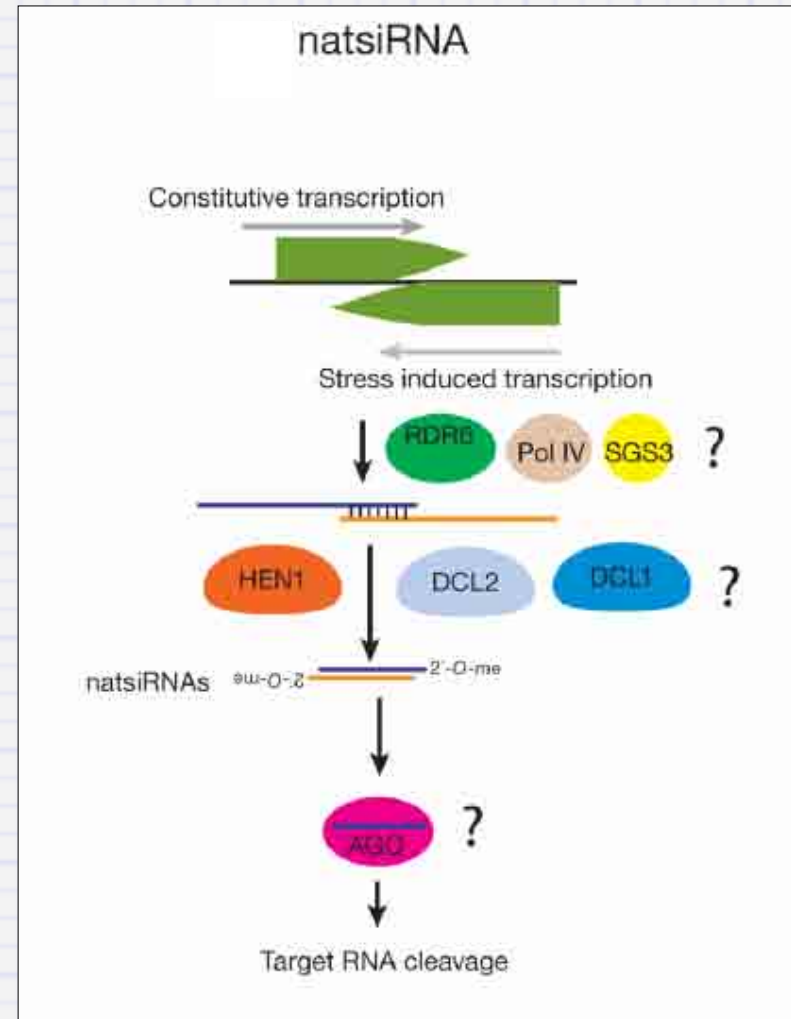
cis-acting

pochodzą z zachodzących na siebie transkryptów genów związanych ze stresem



natsiRNA: roślinne endogenne siRNA

- syntetyzowane w odpowiedzi na stres
np. wysokie zasolenie gleby
- biogeneza:
DCL2 i/lub DCL1,
RDR6 (polimeraza RNA zależna od RNA),
SGS3 (białko wiążące RNA)
i **polimeraza RNA IV**
- 24 nt natsiRNA – cięcie jednej z nici mRNA, druga służy jako matryca do syntezy 2-rzędowych 21nt natsiRNA przez RDR6
- *A. thaliana*: lsiRNA (*long siRNA*)
30-40nt
również powstają z transkryptów NAT
inne białka uczestniczą w biogenezie



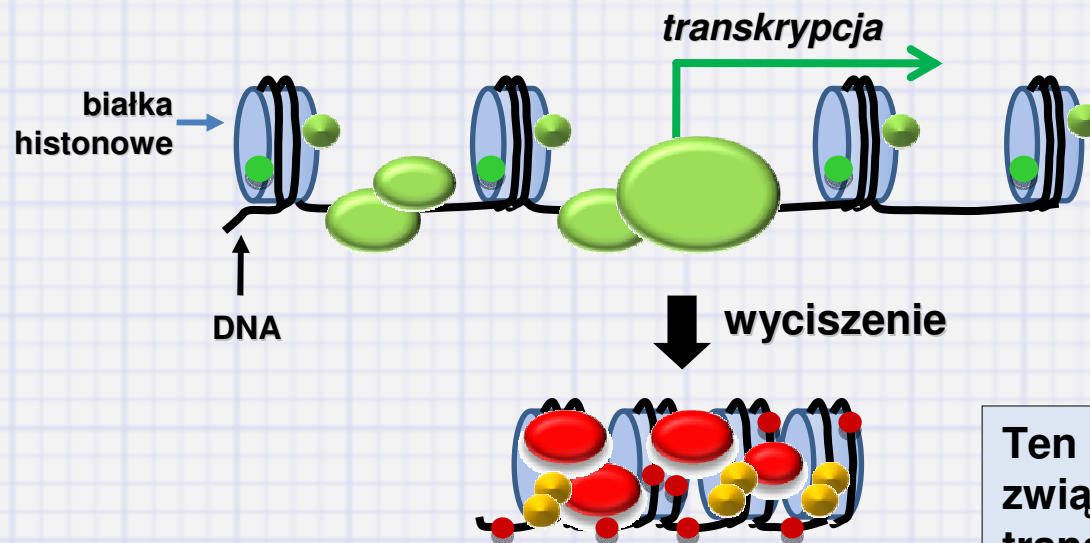
Roślinne polimerazy RNA



<i>enzym</i>	<i>występowanie</i>	<i>funkcja</i>
Polimeraza RNA I	wszystkie <i>Eucaryota</i>	synteza rRNA
Polimeraza RNA II	wszystkie <i>Eucaryota</i>	synteza mRNA, microRNA
Polimeraza RNA III	wszystkie <i>Eucaryota</i>	synteza tRNA, 5S rRNA
Polimeraza RNA IV	rośliny	biogeneza siRNA
Polimeraza RNA V	rośliny	rekrutacja białek AGO do DNA

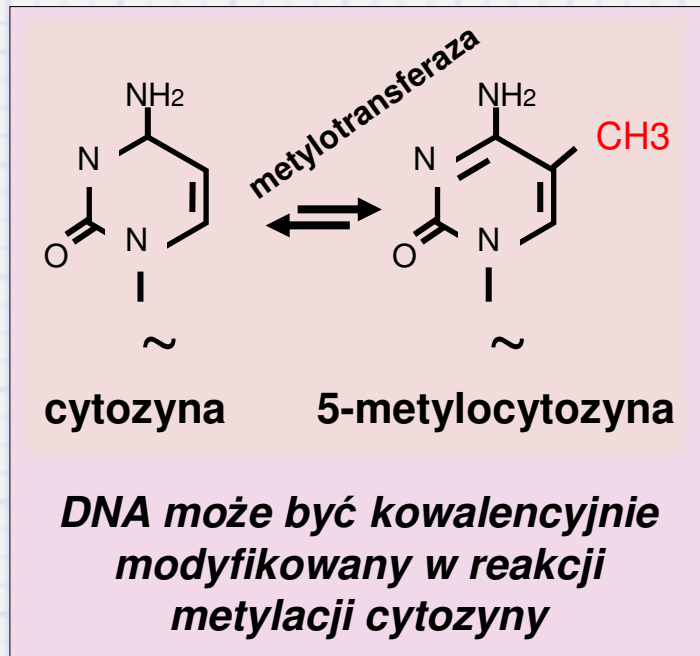
Transkrypcyjne wyciszanie genów (TGS): hc-siRNA

małe RNA mogą hamować transkrypcję określonych genów poprzez kowalencyjne modyfikacje DNA lub białek histonowych



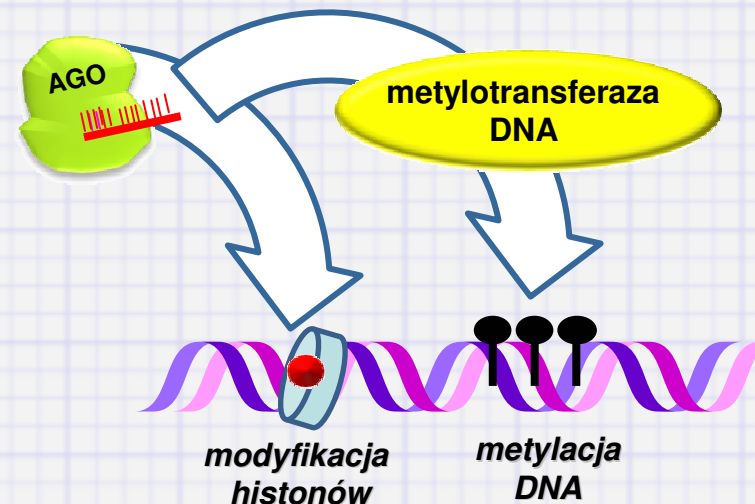
Ten rodzaj wyciszenia jest często związany ze stale nieaktywnym transkrypcyjnie DNA, włączając rejony centromerowe i transpozony, ale również zachodzi w genach.

siRNA mogą wyciszać DNA za pośrednictwem enzymów metylujących cytozyny lub modyfikujących białka histonowe

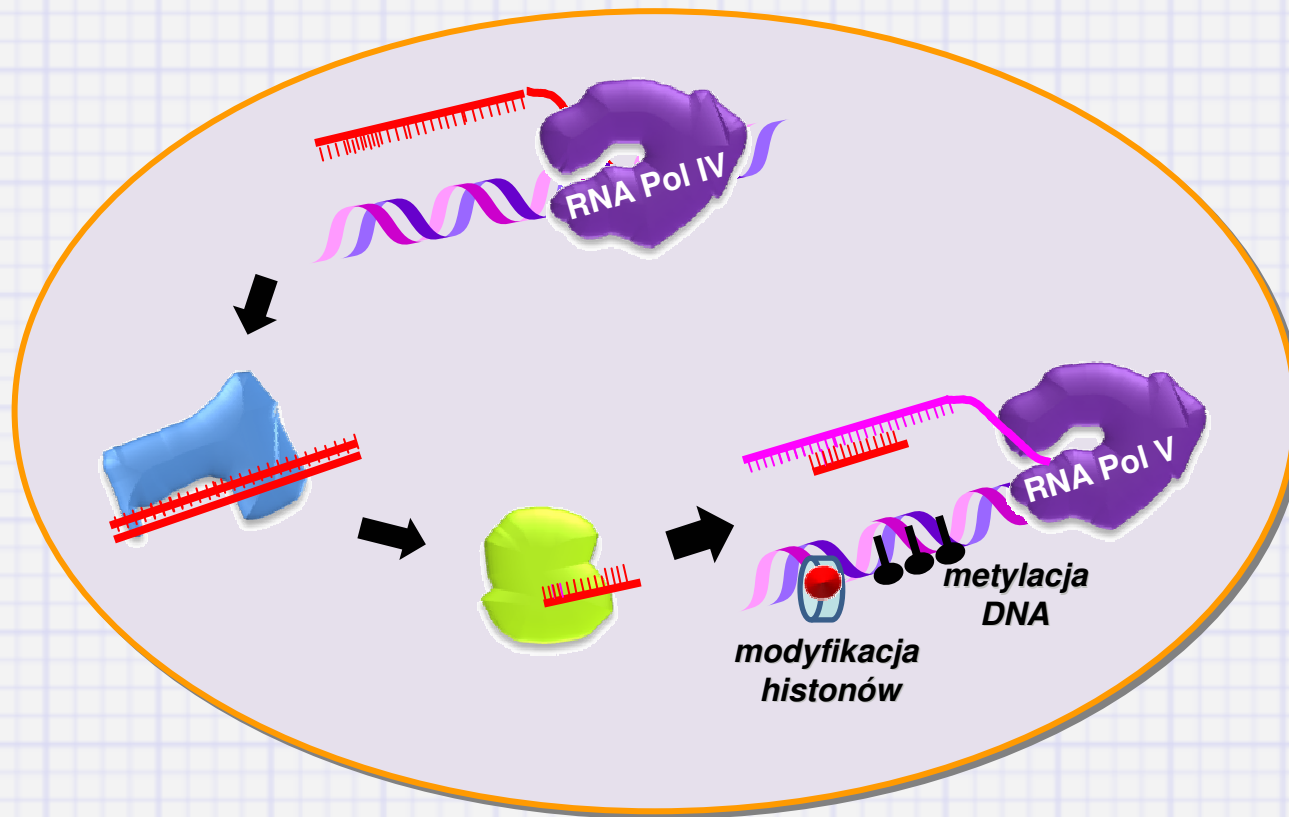


W mechanizm transkrypcyjnego wyciszania DNA przez siRNA zaangażowane są dwie specyficzne dla roślin polimerazy RNA:

Pol IV i Pol V



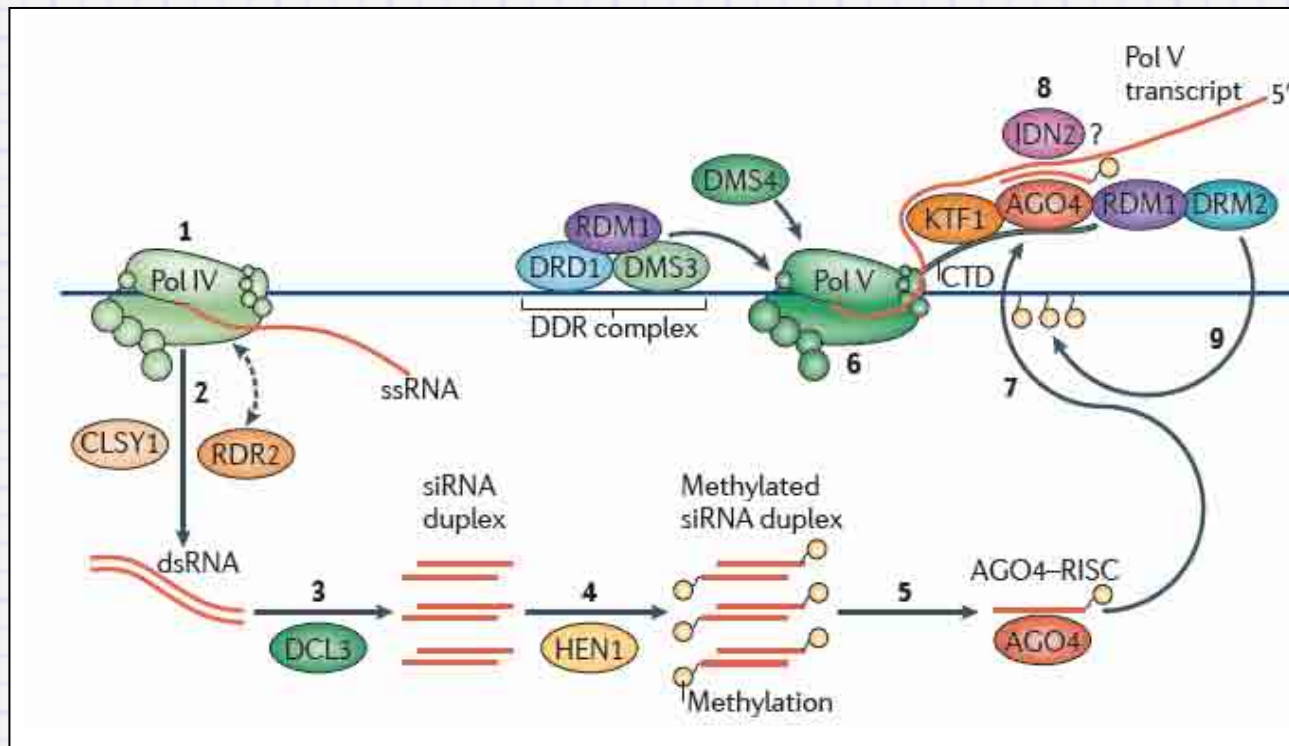
Polimerazy RNA IV i V uczestniczą w transkrypcyjnym wyciszaniu genów



Polimeraza RNA IV
uczestniczy w
biogenezie siRNA.

Niekodujące
transkrypty
polimerazy RNA V
nakierowują
maszynę
wyciszającą do
odpowiednich
sekwencji DNA.

Polimerazy RNA IV i V uczestniczą w transkrypcyjnym wyciszaniu genów



Haag J.R., Pikaard C.S., (2011) Nat Rev Mol Cell Biol

Polimeraza RNA IV uczestniczy w biogenezie siRNA.

Niekodujące transkrypty **polimerazy RNA V** nakierowują maszynę wyciszającą do odpowiednich sekwencji DNA.

siRNA - podsumowanie

Szlak siRNA wycisza egzogeny, „obcy” DNA, transpozony oraz sekwencje powtórzone

siRNA powstają dzięki aktywności białek typu Dicer, które tną dsRNA

siRNA są wiązane przez białka z rodziny AGO i tworzą kompleksy wyciszające (RISC)

Kompleksy wyciszające mogą działać potranskrypcyjnie, poprzez cięcie mRNA lub inhibicję translacji

Kompleksy wyciszające mogą zmieniać strukturę chromatyny poprzez metylację DNA lub modyfikację białek histonowych

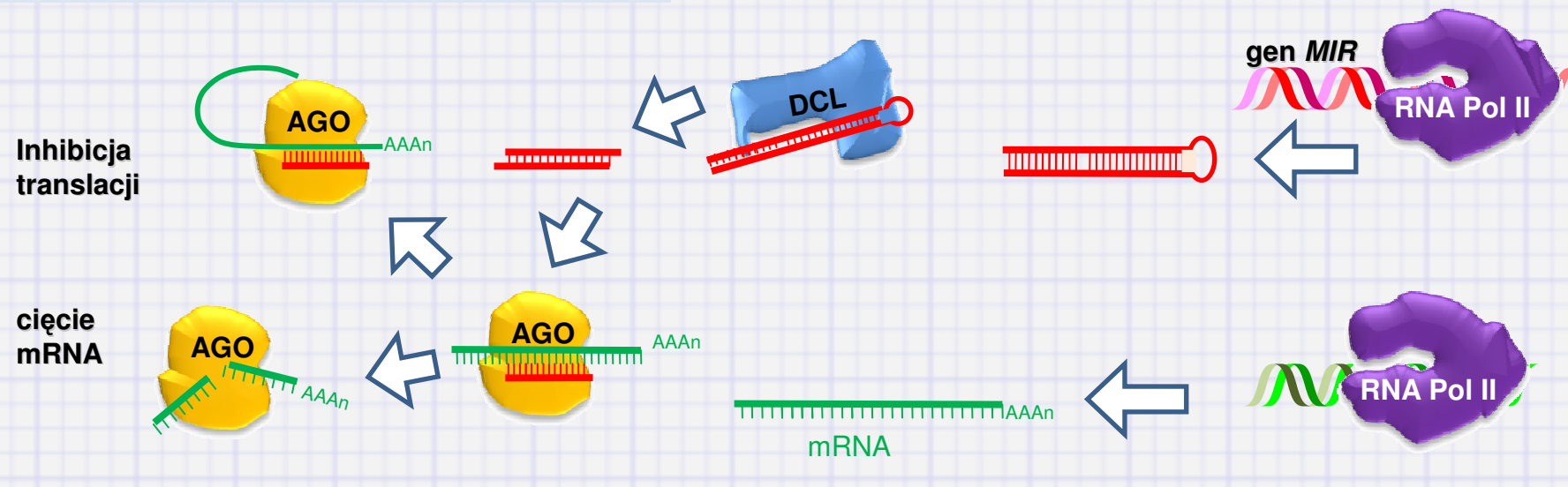
microRNA - miRNA

- uważa się, że miRNA wyewoluowały z siRNA – powstają i dojrzewają w podobny (do pewnego stopnia) sposób
- miRNA są kodowane przez specyficzne geny *MIR*, ale wpływają na ekspresję innych genów – są cząsteczkami regulatorowymi działającymi *in trans*
- miRNA u roślin (również u zwierząt) regulują procesy rozwojowe i fizjologiczne



microRNA - miRNA

microRNA działają poprzez cięcie mRNA lub inhibicję translacji



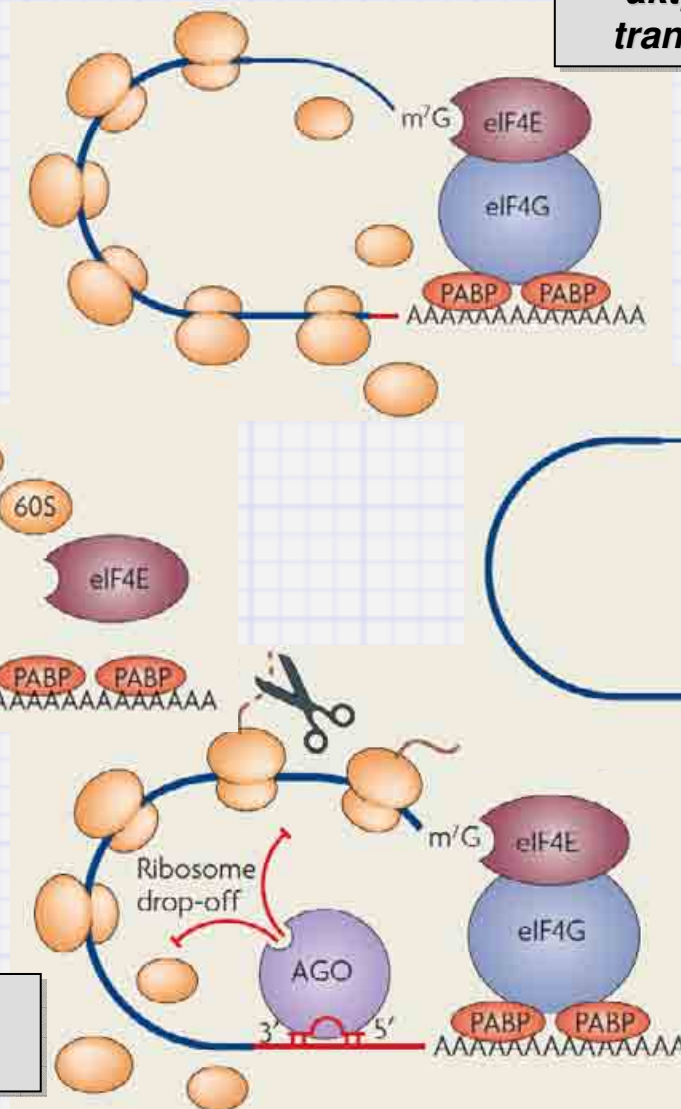
microRNA - miRNA

aktywna translacja

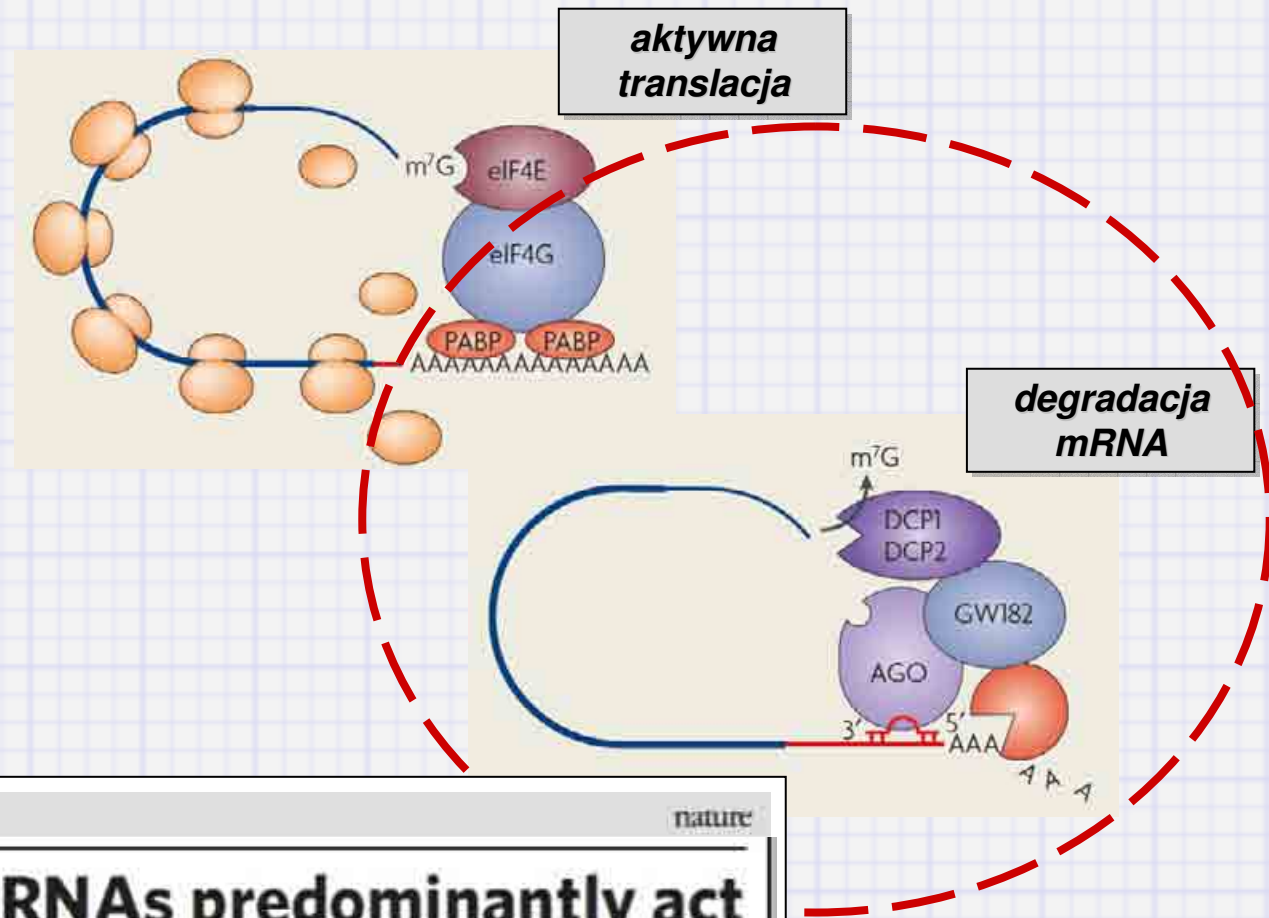
inhibicja inicjacji translacji

degradacja mRNA

inhibicja translacji



microRNA - miRNA



Vol 466 | 12 August 2010 | doi:10.1038/nature09267

nature

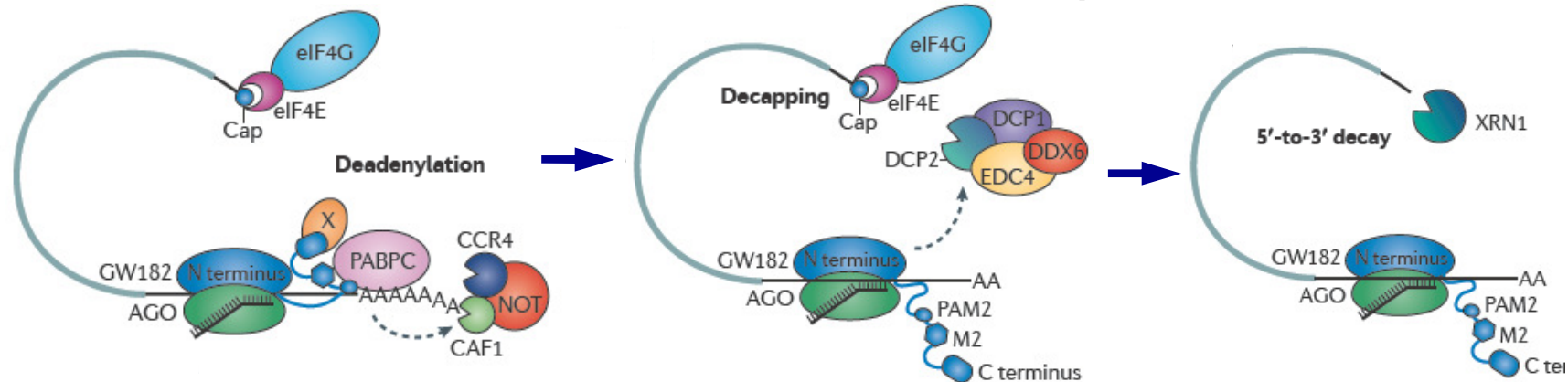
Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels

Huili Guo^{1,2}, Nicholas T. Ingolia^{3,4}, Jonathan S. Weissman^{3,4} & David P. Bartel^{1,2}

Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels

Huili Guo^{1,2}, Nicholas T. Ingolia^{3,4}, Jonathan S. Weissman^{3,4} & David P. Bartel^{1,2}

Destabilization of target mRNA is the predominant reason for reduced protein output.



Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells

Julien Béthune¹⁺, Caroline G. Artus-Revel¹ & Witold Filipowicz^{1,2++}

EMBO reports VOL 13 | NO 8 | 2012

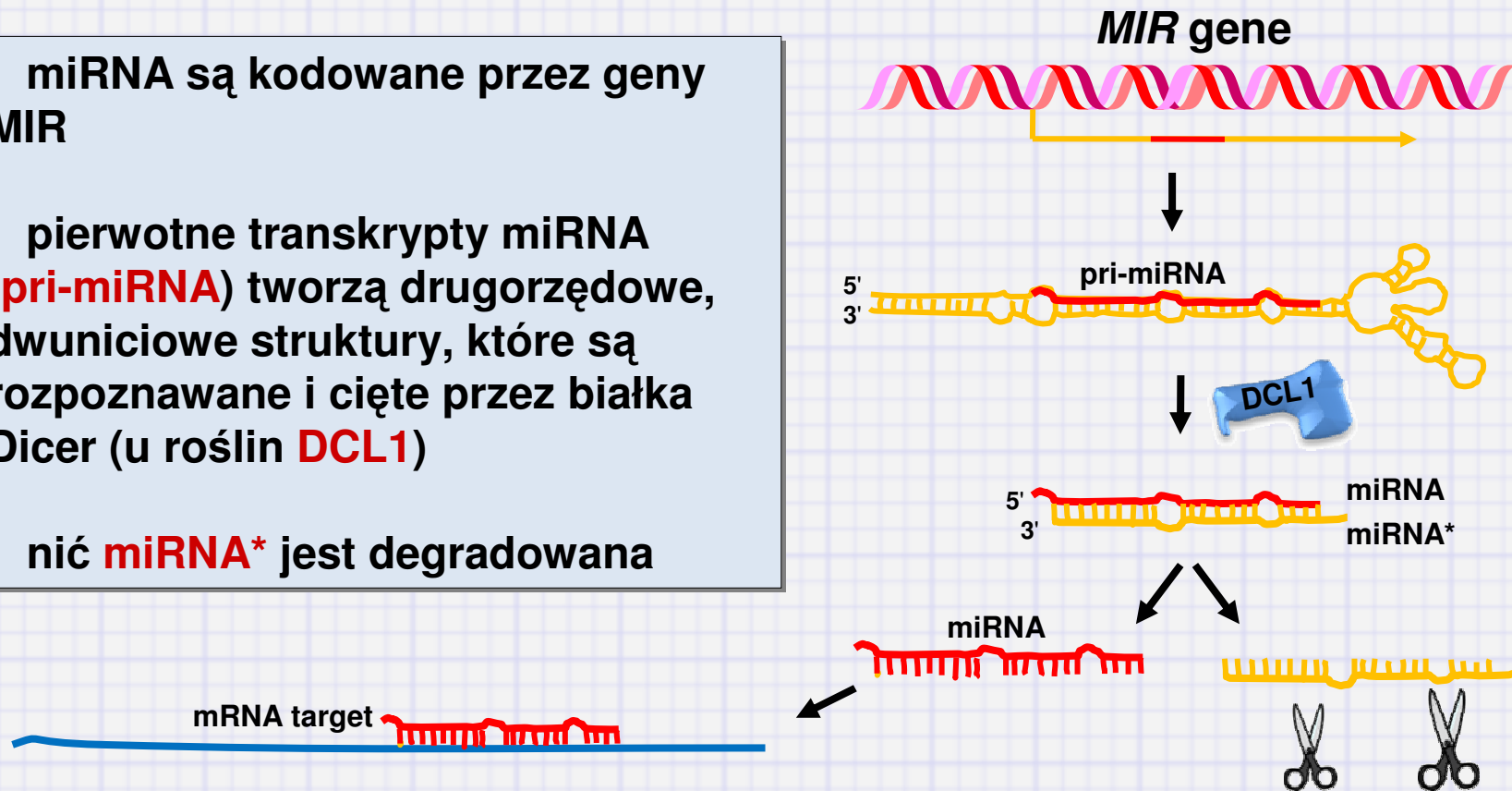
Step 1. Initial effect of miRNAs: inhibition of translation at the initiation step without mRNA decay.

Step 2. mRNA deadenylation by PAN2–PAN3 and CCR4–NOT complexes recruited by miRISC as a consequence of translation inhibition that makes poly(A) tail more accessible.

Step 3. Stimulated deadenylation potentiates the effect on translational inhibition and leads to decay of target mRNAs through the recruitment of the decapping machinery.

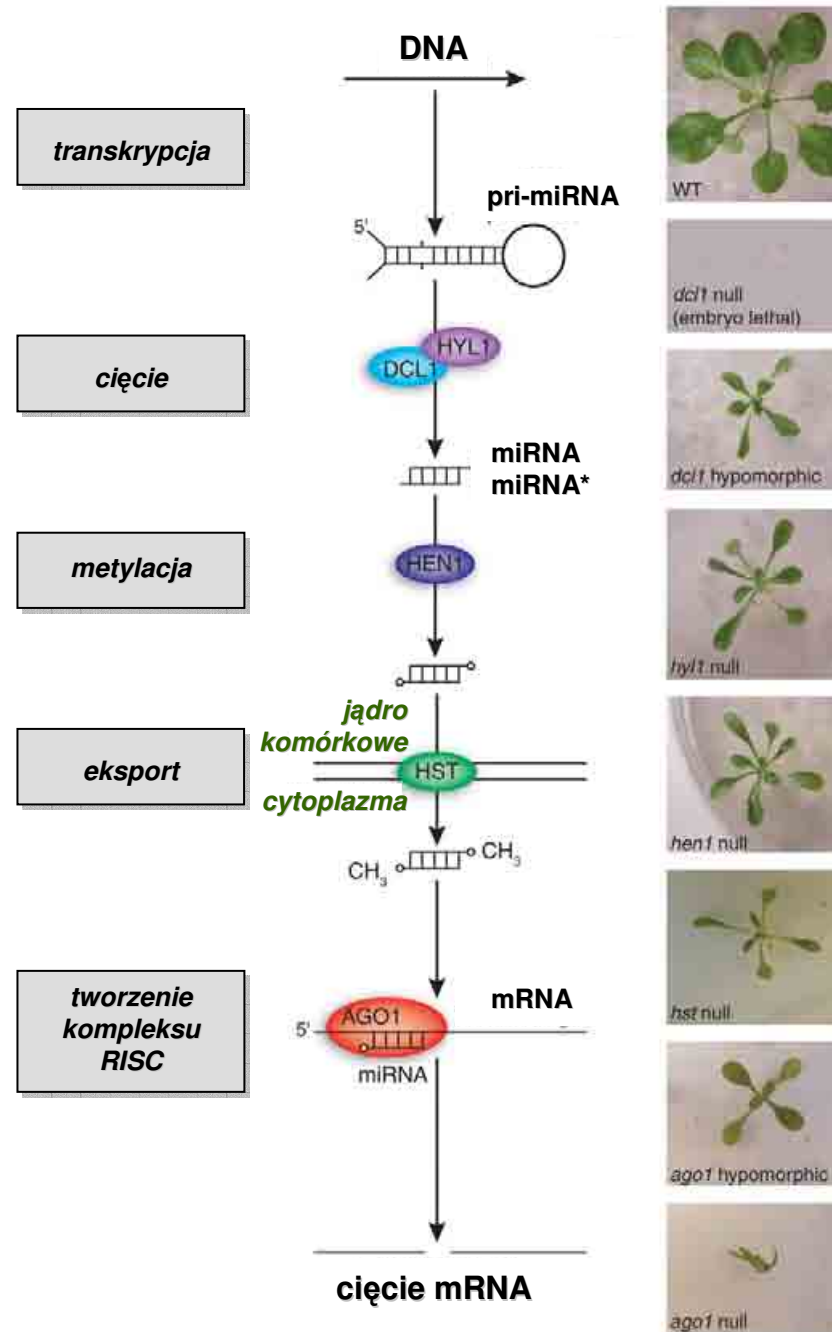
Geny *MIR*: transkrypcja długich cząsteczek pri-miRNA z których powstają miRNA

- miRNA są kodowane przez geny *MIR*
- pierwotne transkrypty miRNA (**pri-miRNA**) tworzą drugorzędowe, dwuniciowe struktury, które są rozpoznawane i cięte przez białka Dicer (u roślin **DCL1**)
- nić **miRNA*** jest degradowana



Biogeneza miRNA u roślin

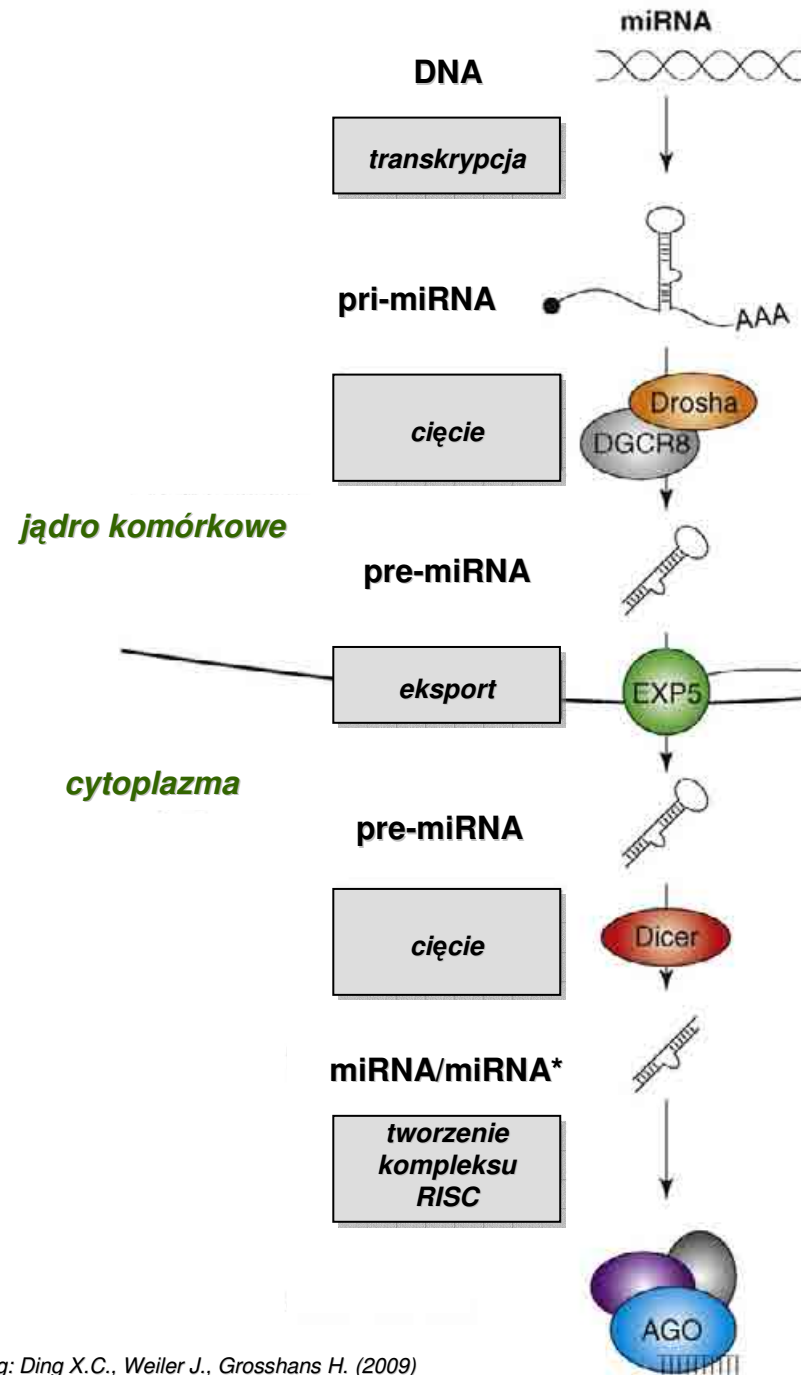
- **HYL1:**
oddziaływanie z DCL1
- **HEN1:**
metylotransferaza,
metylacja miRNA/miRNA*
- **HST (HASTY):**
eksport miRNA/miRNA*
do cytoplazmy,
homolog eksportyny 5



Mallory A., Vaucheret H. (2006)
Nature Genet.

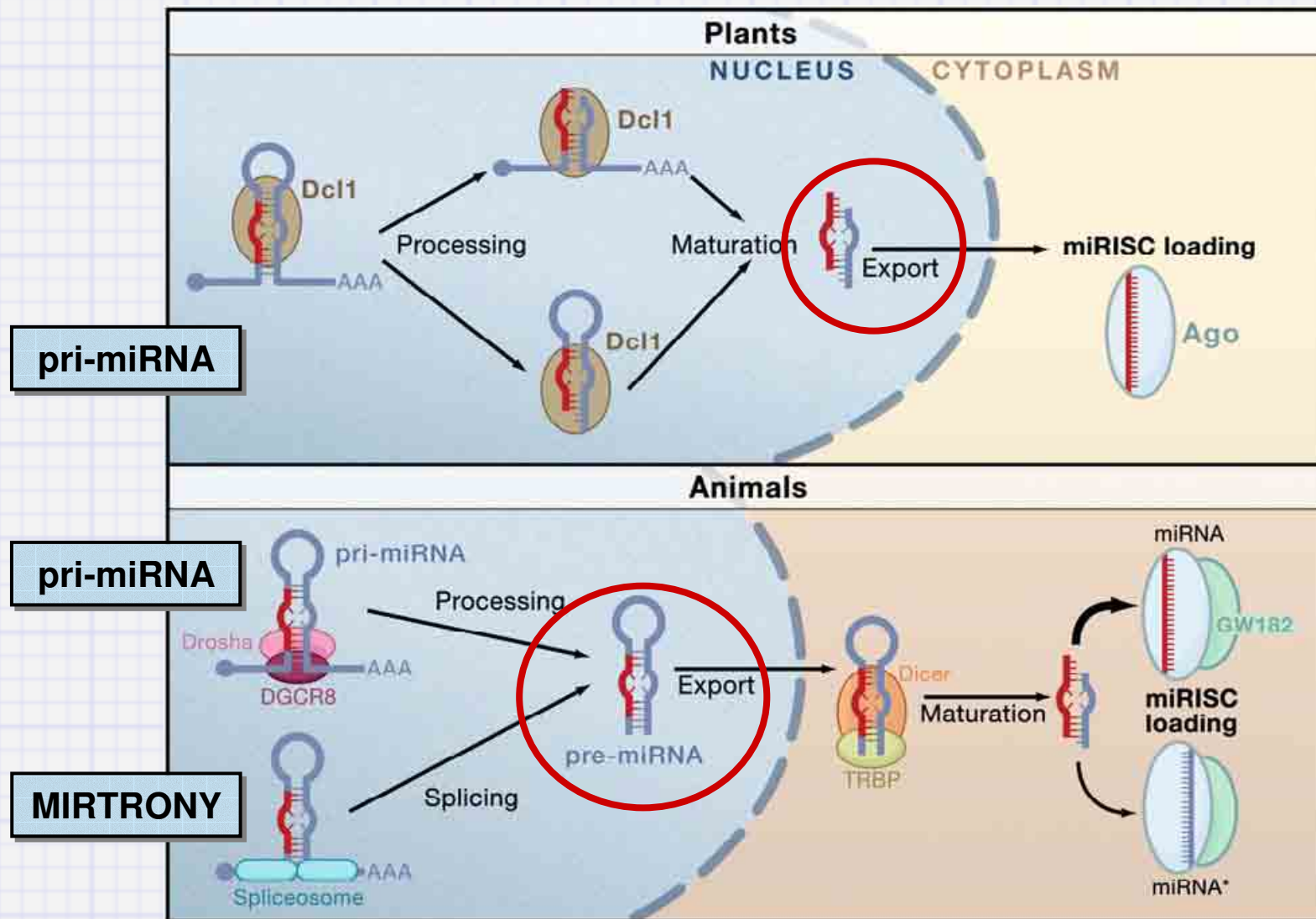
Biogeneza miRNA u zwierząt

- **Drosha+DGCR8 (Pasha):**
cięcie pri-miRNA
→ pre-miRNA
- **EXP5 (eksportyna 5):**
eksport pre-miRNA
do cytoplazmy
- **Dicer:**
cięcie pre-miRNA
→ miRNA/miRNA*

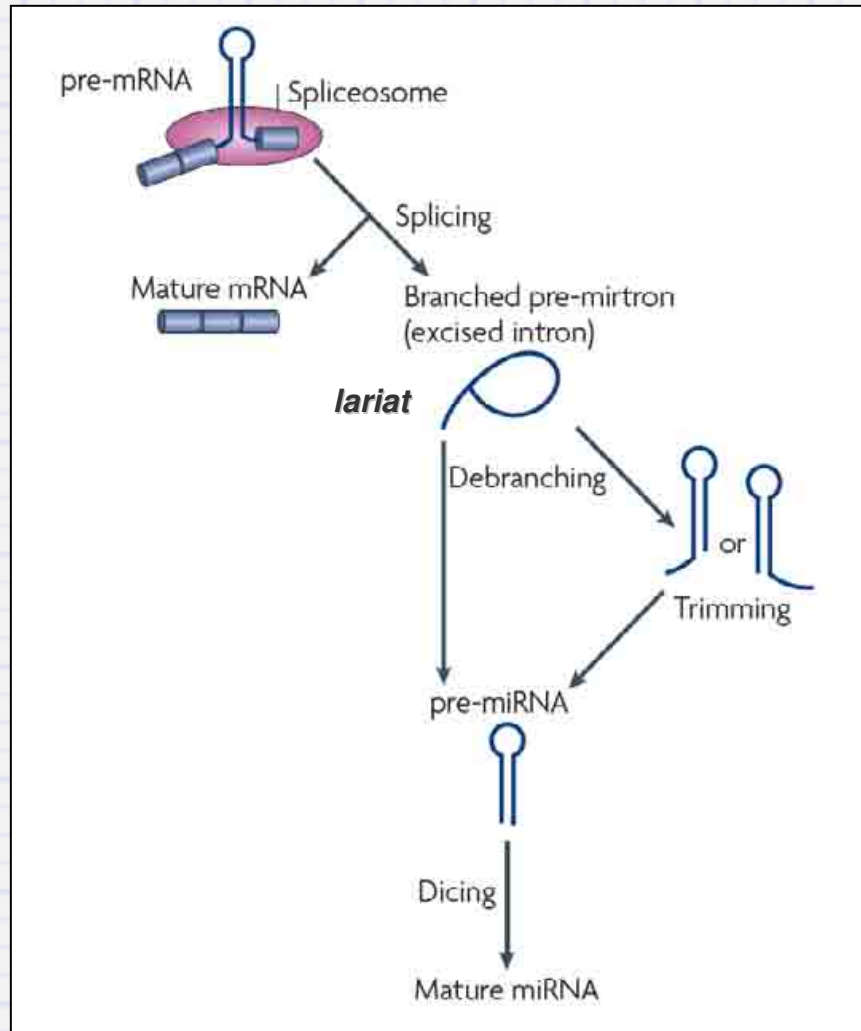


Biogeneza miRNA u roślin i zwierząt

eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy

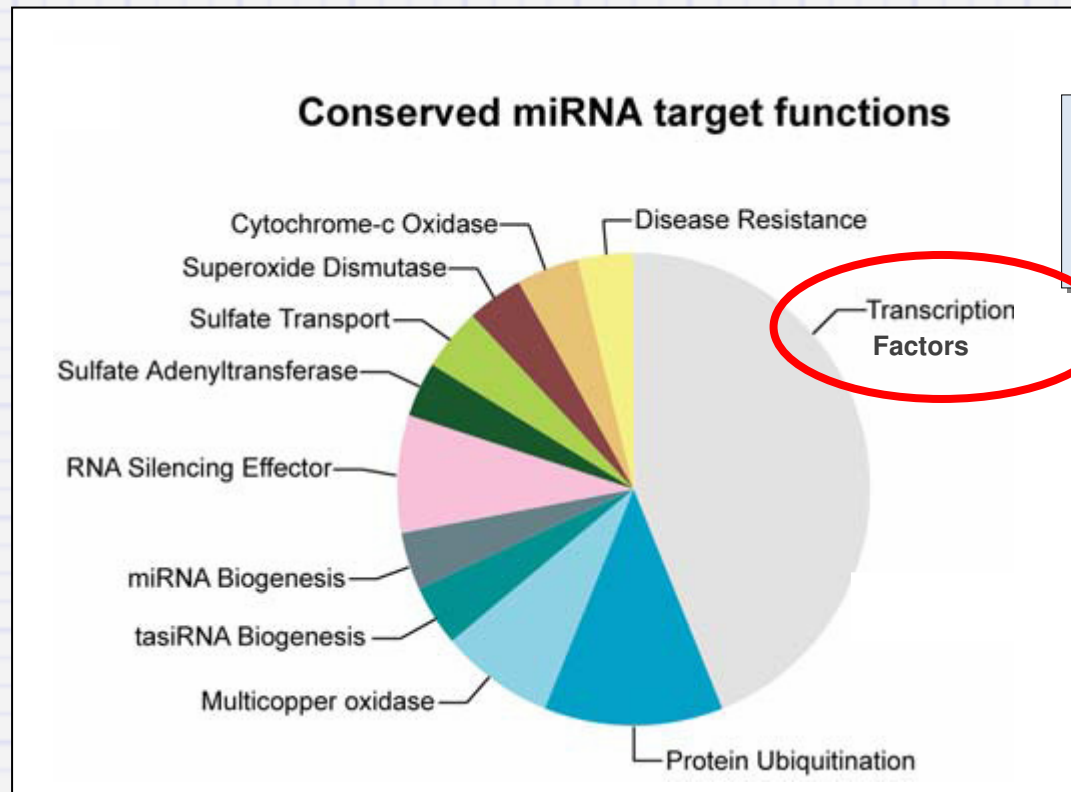


Mirtrony



- występują u *D. melanogaster*, *C. elegans*, ssaków
- powstają z intronów wyciętych z pre-mRNA podczas składania mRNA
(*splicing*)
niezależne od Drosha
- rozcięcie struktury lariatatu
(*debranching*)
prowadzi do powstania pre-miRNA
- pre-miRNA → biogeneza miRNA

Niektóre miRNA są konserwowanymi ewolucyjnie regulatorami ekspresji genów

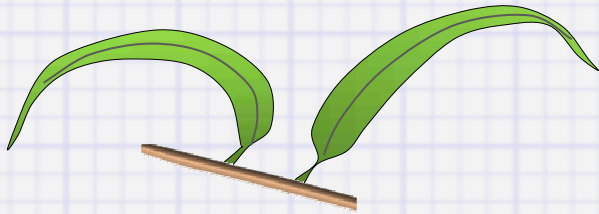


Blisko połowa spośród genów regulowanych przez miRNA to czynniki transkrypcyjne

Przykłady genów regulowanych przez miRNA u roślin

<i>rodzina miRNA</i>	<i>rodzina genów regulowanych przez miRNA</i>	<i>funkcja</i>
156	czynniki transkrypcyjne SPL	Synchronizacja procesów rozwojowych
160	czynniki transkrypcyjne ARF	Odpowiedź na auksyny, procesy rozwojowe
165	czynniki transkrypcyjne HD-ZIPIII	Rozwój, polaryzacja
172	czynniki transkrypcyjne AP2	Synchronizacja procesów rozwojowych, floral organ identity
390	TAS3 (tasiRNA – regulują ekspresję czynników transkrypcyjnych ARF)	Odpowiedź na auksyny, procesy rozwojowe
395	Transport siarczanów	Asymilacja siarki
399	Ubikwitynacja białek	Asymilacja fosforu

miRNA - podsumowanie

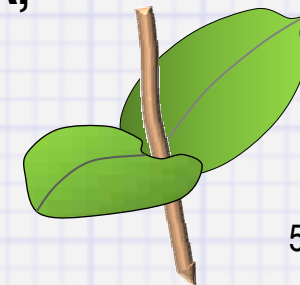


Uważa się, że miRNA regulują większość procesów biologicznych zarówno u roślin jak i zwierząt, kontrolując ekspresję specyficznych genów działając *in trans*

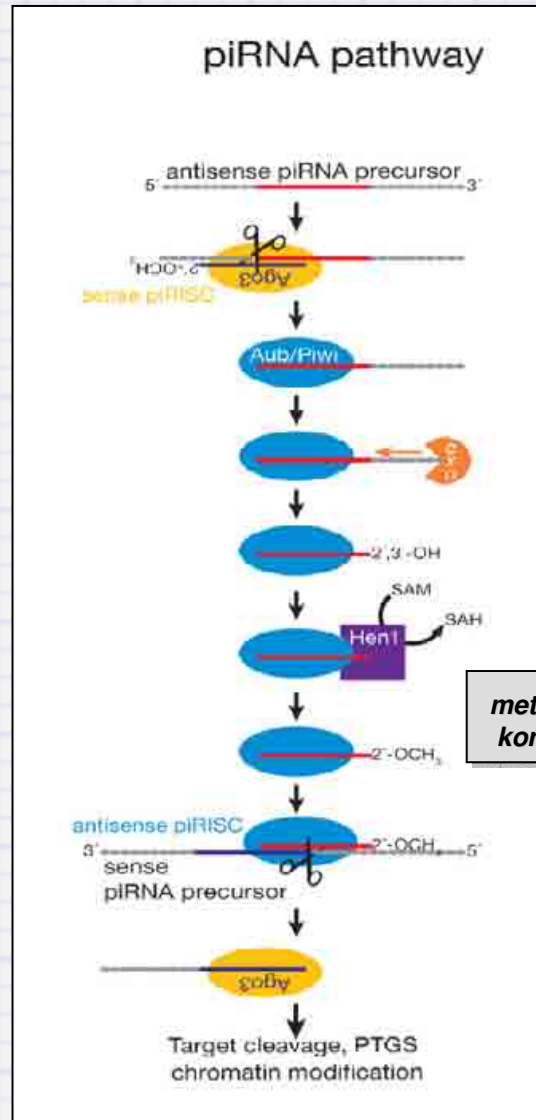
miRNA regulują procesy rozwojowe:

np. u *A. thaliana* miR156 i miR172 regulują procesy kwitnienia;
u *C. elegans* wyciszenie *lin-14* przez *lin-4* jest potrzebne do prawidłowego rozwoju

miRNA działają głównie poprzez obniżenie poziomu mRNA, ale również poprzez inhibicję translacji



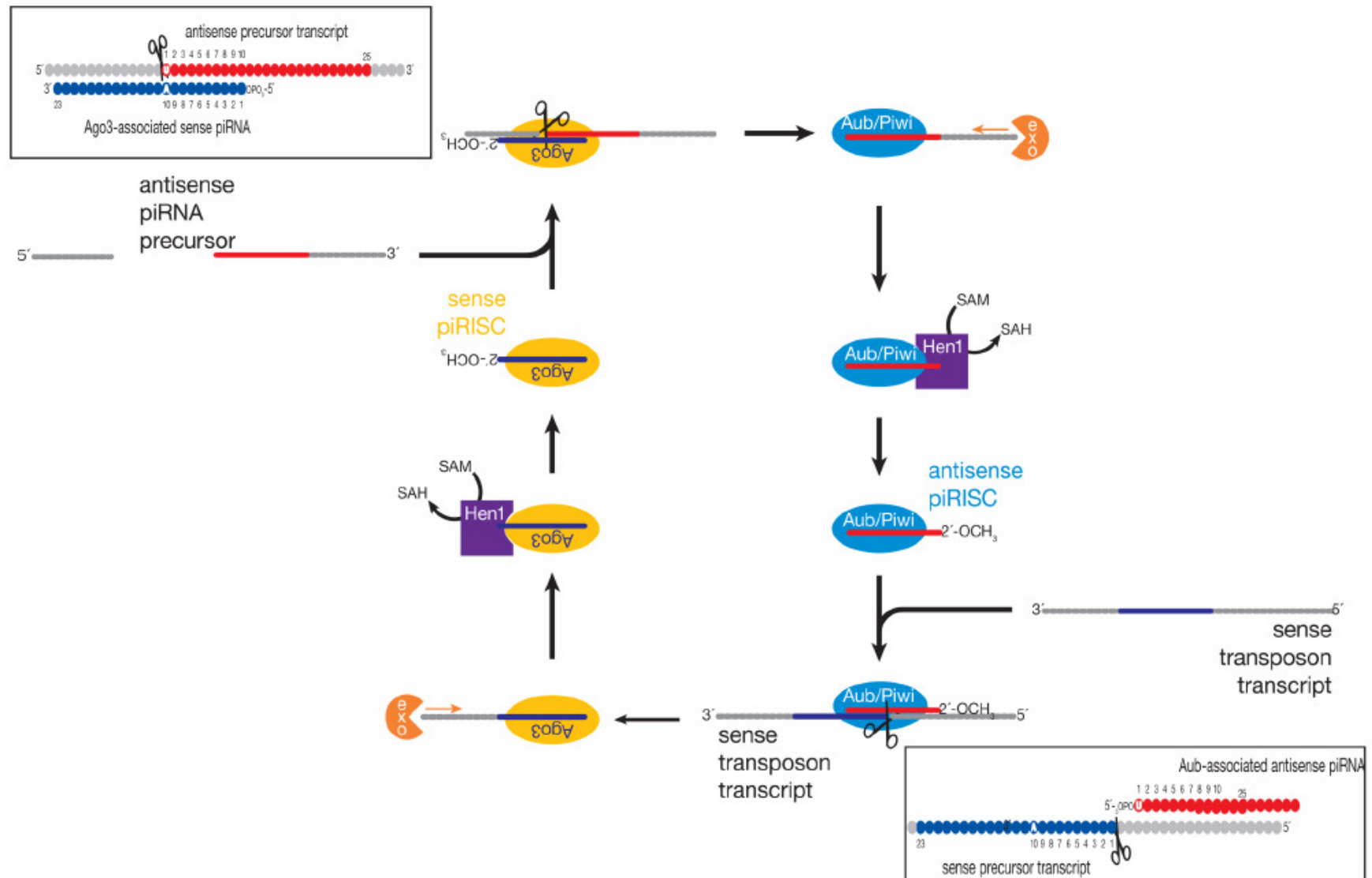
Małe RNA niezależne od Dicer: piRNA



metylacja
końca 3'

- ~25-30 nt, 2'-O-metylowane końce 3'
- występują u zwierząt, zidentyfikowane w liniach komórek rozrodczych *D. melanogaster*
- wiążą się z białkami PIWI:
Piwi, Aubergine, Ago3 – *D. melanogaster*
MILI, MIWI, MIWI2 – mysie
HILI, HIWI1, HIWI2 – ludzkie
C. elegans – „21U”RNA – 21 nt – wiąże PRG-1 (Piwi-related gene 1)
- wyciszanie transpozonów i powtórzeń DNA, u ssaków **metylacja DNA sekwencji transpozonowych**

ping-pong model for piRNA amplification



Małe RNA niezależne od Dicer

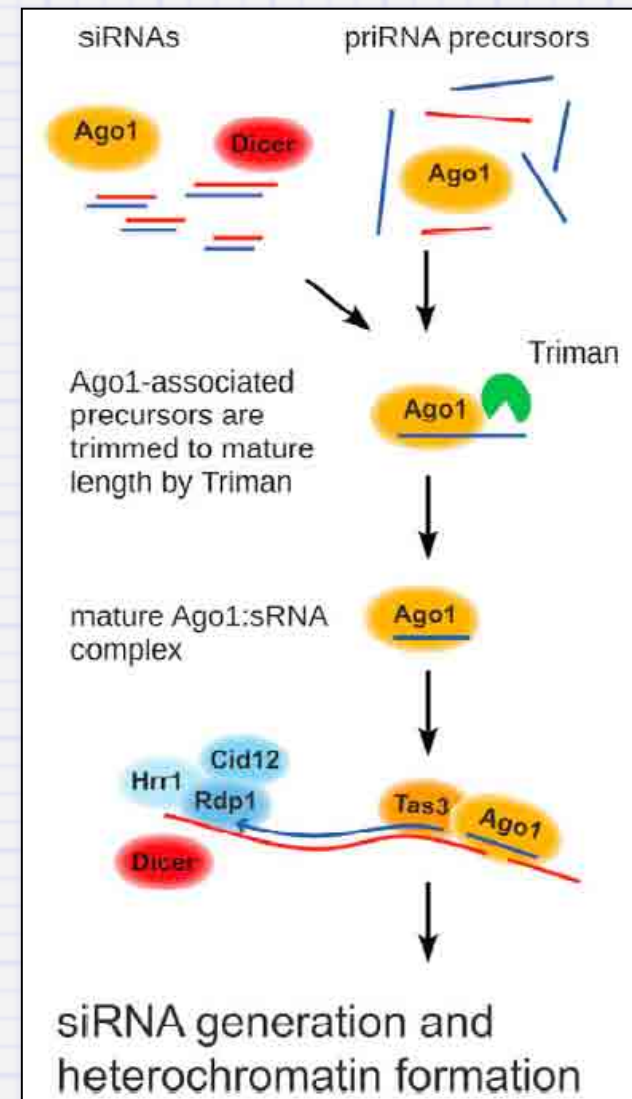
priRNA – primal small RNAs

- zidentyfikowane u *S.pombe*
- tworzenie/utrzymywanie heterochromatyny w rejonach centromerowych
- Triman: 3'-5' egzorybonukleaza – obróbka prekursorów priRNA i siRNA

Molecular Cell 52, 1–11, October 24, 2013

Argonaute and Triman Generate Dicer-Independent priRNAs and Mature siRNAs to Initiate Heterochromatin Formation

Mirela Marasovic,¹ Manuel Zocco,¹ and Mario Halic^{1,2}



Podsumowanie

Wyciszanie genów za pośrednictwem małych RNA odgrywa istotną rolę zarówno w regulacji ekspresji, jak i w zachowaniu integralności genomów organizmów żywych.

Specyficzność wyciszenia określonych genów zapewniona jest dzięki komplementarności zasad między małym wyciszającym RNA, a RNA ulegającym wyciszeniu.

Za pośrednictwem siRNA wyciszane są m.in. regiony bogatej w powtórzenia DNA heterochromatyny, sekwencje transpozonowe, wirusy i inne patogeny.

miRNA i tasiRNA regulują m.in. ekspresję genów związanych z zegarem biologicznym, rozwojem, reakcją na stres.

