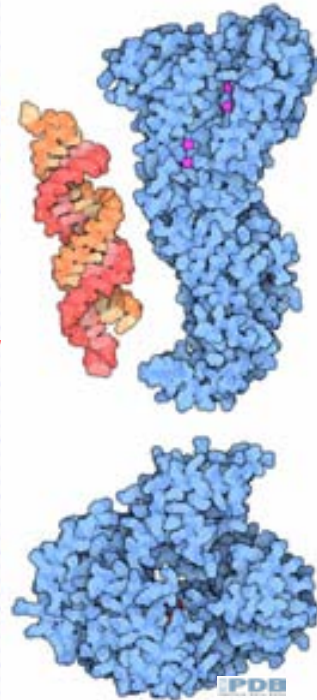


Małe RNA i epigenetyczna regulacja ekspresji genów

Monika Zakrzewska-Płaczek
monika.z@ibb.waw.pl



Małe RNA (*small RNAs, sRNAs*)

sRNA – 21-30 nt

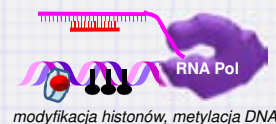


wyciszenie ekspresji genów:
(*gene silencing, RNA silencing*)

- **post-transkrypcyjne**
(*post-transcriptional gene silencing, PTGS*)
degradacja mRNA, inhibicja translacji



- **transkrypcyjne**
(*transcriptional gene silencing, TGS*)
epigenetyczne modyfikacje chromatyny



PTGS: post-transkrypcyjne wyciszanie genów

Klasy małych RNA:

miRNA (microRNA)	rośliny, zwierzęta, wirusy, Protista	20–25nt	Drosha (u zwierząt) + Dicer	Transkrypcja przez Pol II/Pol III	Regulacja stabilności mRNA (cięcie mRNA), inhibicja translacji
----------------------------	---	---------	-----------------------------------	--------------------------------------	--

mirtrony – pochodzące z intronów prekursorów mRNA genów kodujących białka; występują u zwierząt; **niezależne od Drosha**

siRNA

(small interfering RNA) – większość działa in cis, za wyjątkiem tasiRNA

exo-siRNA (pochodzenia egzogennego)	rośliny, grzyby, zwierzęta, Protista	21–24nt	Dicer	Transgeniczny, wirusowy lub inny egzogeny RNA	Post-transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, obrona przeciwwirusowa
endo-siRNA (pochodzenia endogenego)	rośliny, grzyby, zwierzęta, Protista	~21nt	Dicer	Transkrypcja dwukierunkowa lub zbieżna, wiązanie mRNA z transkryptami pseudogenów o przeciwnej orientacji	Post-transkrypcyjna i transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, regulacja aktywności transpozonów
tasiRNA (trans-acting siRNA)	rośliny	21nt	DCL4	TAS RNA cięte przez miRNA	Regulacja post- transkrypcyjna
natsiRNA (natural antisense transcripts-derived siRNA)	rośliny	24nt 21nt	DCL2 DCL1	Transkrypcja dwukierunkowa indukowana stresem	Regulacja genów odpowiedzi na stres

3

TGS: transkrypcyjne wyciszanie genów

Klasy małych RNA:

siRNA

(small interfering RNA)

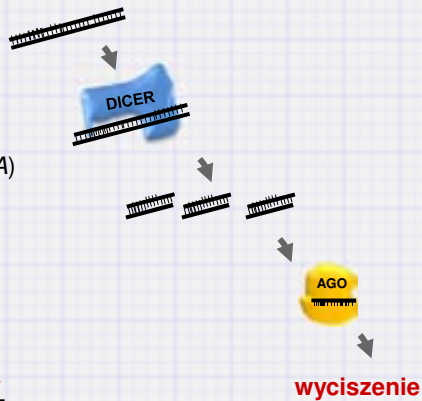
endo-siRNA (pochodzenia endogenego)	rośliny, grzyby, zwierzęta, Protista	~21nt	Dicer	Transkrypcja dwukierunkowa lub zbieżna, wiązanie mRNA z transkryptami pseudogenów o przeciwnej orientacji	Post-transkrypcyjna i transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, regulacja aktywności transpozonów
hc-siRNA (heterochromatic siRNA)	rośliny, <i>S. pombe</i>	24–26nt	DCL3	Transpozony, powtórzenia	Modyfikacja chromatyny
piRNA (Piwi-interacting RNA)	<i>Drosophila</i> , <i>C. elegans</i> , ssaki, <i>Danio</i> <i>rerio</i>	24–30nt	niezależne od Dicer	Długie pierwotne transkrypty (?)	Regulacja aktywności transpozonów, inne nieznane funkcje

4

Białka *Dicer* i *Argonaute* (AGO): główne elementy szlaku wyciszania RNA

Dwuniciowy RNA

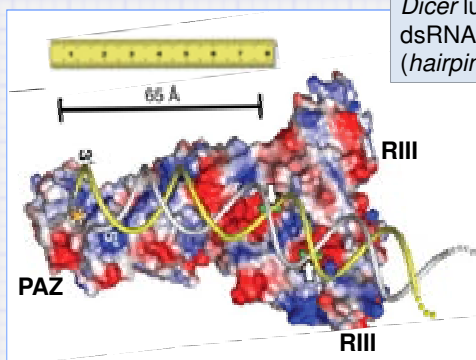
(double-stranded RNA, dsRNA)
jest cięty przez **Dicer**
na krótkie dwuniciowe
cząsteczki RNA,
które są wiązane
przez jedno z białek
rodziny **ARGONAUTE**.



5

Dicer i *Dicer-like*

Podczas biogenezy siRNA i miRNA, białka *Dicer* lub *Dicer-like* (DCL) tną długie dsRNA lub RNA o strukturze spinki (*hairpin*) na fragmenty ~ 21 – 25nt.

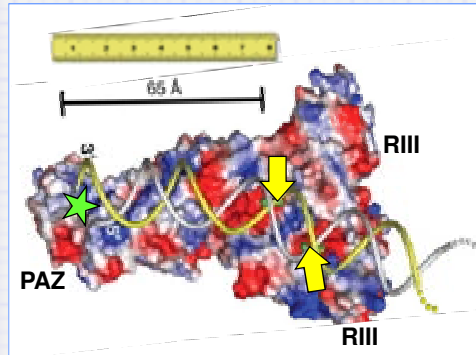


**Struktura białka *Dicer* umożliwia równomierne rozcinanie RNA
na fragmenty o takiej samej długości.**

6

MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006) *Science*

Dicer i Dicer-like



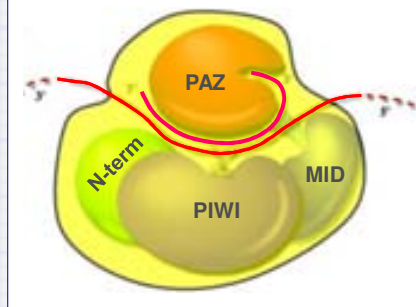
- **PAZ**
konserwowana domena
wiążąca dsRNA
(dsRBD- dsRNA-binding domain)
oddziałuje z końcem 3' dsRNA
- 2 domeny typu
RNazy III
aktywność endonukleolityczna
5'P / 3'OH

7

MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006) Science

Argonaute

Białka ARGONAUTE wiążą
sRNA i mRNA



- **PAZ**
oddziałuje z końcem 3' sRNA
- **MID** (middle)
oddziałuje z nukleotydem na
końcu 5' sRNA
- **PIWI**
struktura podobna do RNazyH
w niektórych białkach Ago:
cięcie RNA związanego z sRNA
(slicer activity)

Nazwa ARGONAUTE pochodzi od
mutanta *argonaute1* *A. thaliana*; który
swoim kształtem przypomina
ośmiornicę żeglarkę (*Argonauta*).



A. thaliana ago1

Argonauta argo

8

Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998) EMBO
J. Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004) Science

Dicer i Argonaute u różnych organizmów

	Species	Argonaute-PIWI-like		Dicer-like	RdRP
		Argonaute	PIWI		
Plantae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10 (AGO1-10)	-	4 (DCL 1-4)	6
	<i>Oryza sativa</i>	18	-	5	5
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	-	1	1
	<i>Neurospora crassa</i>	1	-	1	3
	<i>Aspergillus nidulans</i>	1	-	1	2
Metazoa	<i>Caenorhabditis elegans</i>	5	3	2 (Dicer + Drosha)	4
	<i>Drosophila melanogaster</i>	2	3	3 (2 Dicers + Drosha)	-
	<i>Danio rerio</i>	4	4	2 (Dicer + Drosha)	-
	<i>Homo sapiens</i>	4	4	2 (Dicer + Drosha)	-

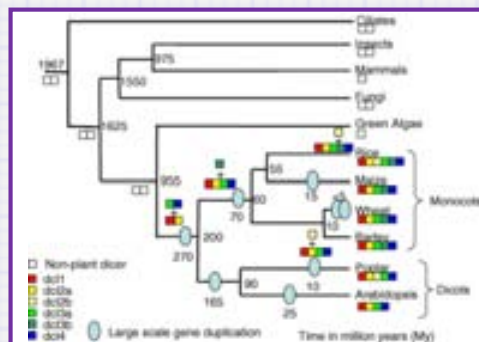
9

U roślin w biogenezie miRNA i siRNA uczestniczą różne białka DCL

AtDCL1 **miRNA**



AtDCL2 - 4 **siRNA**



Rośliny mają 4 (i więcej) białek DCL: większa niż u innych organizmów liczba białek DCL umożliwia roślinom bardziej precyzyjną i skuteczną obronę przed patogenami.

10

Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J., and Waterhouse, P.M. (2006) FEBS Lett.

U roślin w biogenezie miRNA i siRNA uczestniczą różne białka DCL

AtDCL1 **miRNA**

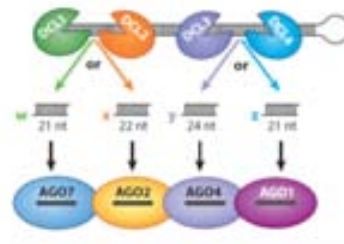


AtDCL2 - 4 **siRNA**



Arabidopsis thaliana:

- DCL1 → 21nt miRNA → AGO1/7/10
- DCL2 → 22nt siRNA
- DCL3 → 24nt siRNA → AGO4/6
- DCL4 → 21nt siRNA (tasiRNA) → AGO1



11

Bologna N.G., Voinnet O. (2014) Annu. Rev. Plant Biol.

Exo-siRNA: wyciszanie transgenów

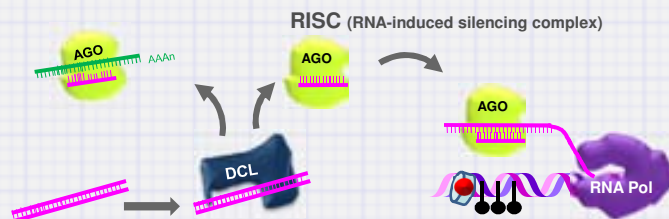
Transgeny wprowadzane sztucznie są często wyciszane przez siRNA

Wyciszenie może być wywołane:

- bardzo wysokim poziomem ekspresji transgenu
- dwuniciowym RNA pochodzącym z ekspresji transgenu
- nieprawidłowymi RNA pochodzącymi z ekspresji transgenu

Transgeny są wyciszane **post-transkrypcyjnie** i **transkrypcyjnie**

siRNA-post-transkrypcyjne lub transkrypcyjne wyciszanie ekspresji genów



12

Post-transkrypcyjne wyciszanie genów u roślin

transgene-induced post-transcriptional silencing

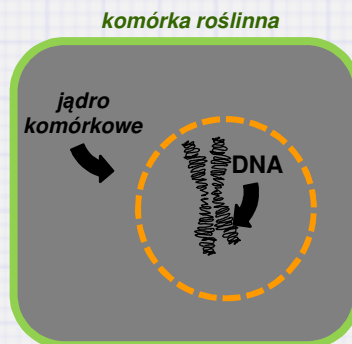


**Eksperymenty modyfikacji koloru
kwiatów petunii (*Petunia hybrida*)**
- odkrycie mechanizmu wyciszania genów

Agrobacterium tumefaciens
na powierzchni
komórki roślinnej



Martha Hawes, University of Arizona

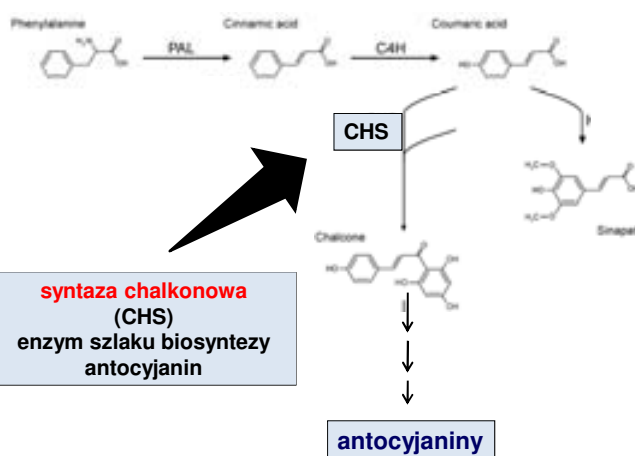


13

Manipulacja ekspresją genu syntazy chalkonowej: zmiana pigmentacji kwiatów petunii



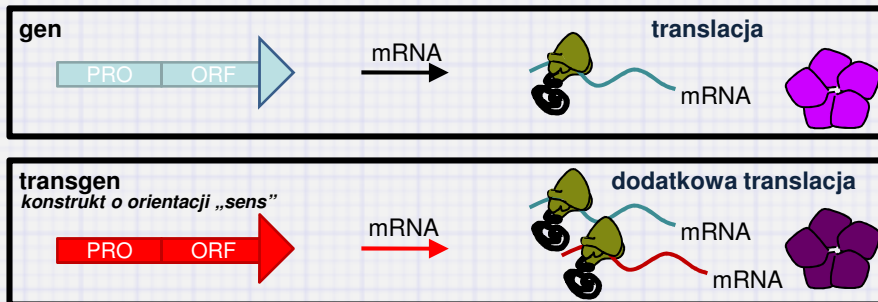
**Dzięki kwiaty petunii
zawierają
antocyjaniny
nadające purpurową
barwę**



14

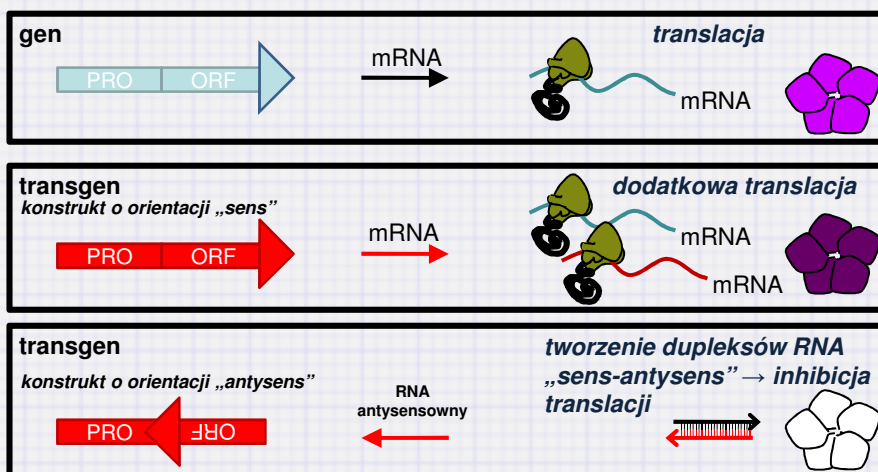
Aksamit-Stachurska et al. BMC Biotechnology 2008
Foto: Richard Jorgensen

Oczekiwanie – synteza RNA o prawidłowej orientacji pogłębi barwę kwiatów...



15

...a synteza RNA o odwróconej orientacji zablokuje syntezę barwnika

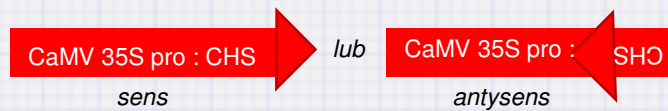


16

Nieoczekiwanie, wprowadzenie zarówno konstruktów *sens* jak i *antysens* prowadzi do inhibicji syntezy barwnika



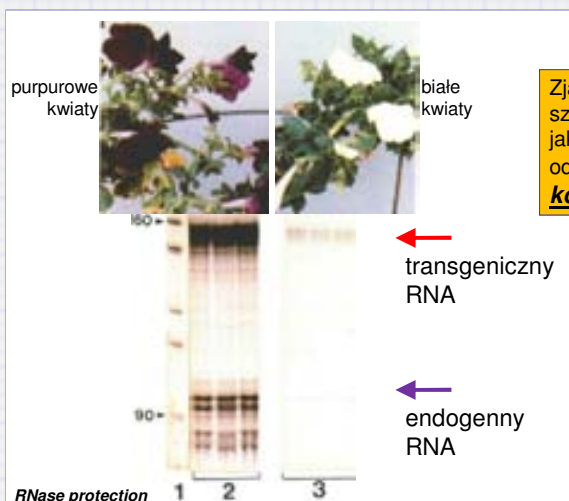
rośliny zawierające transgen *CHS*



17

Foto: Richard Jorgensen

W modyfikowanych roślinach nie dochodzi do syntezy ani endogennej ani transgenicznej *CHS*

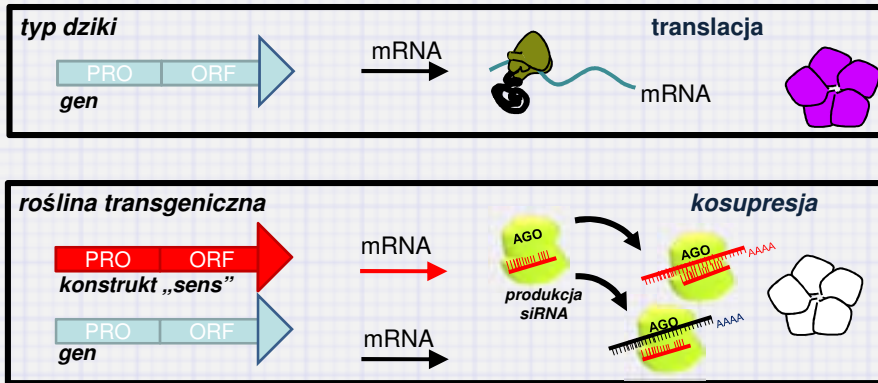


Zjawisko wyciszania zarówno sztucznie wprowadzonego genu, jak i jego endogennego odpowiednika nazywamy **kosupresją**

18

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990) *Plant Cell*

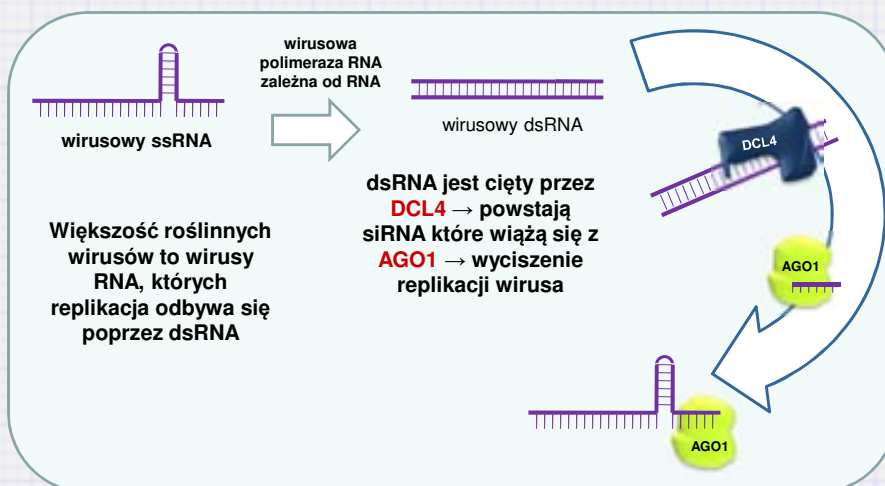
Kosupresja jest wynikiem produkcji siRNA



19

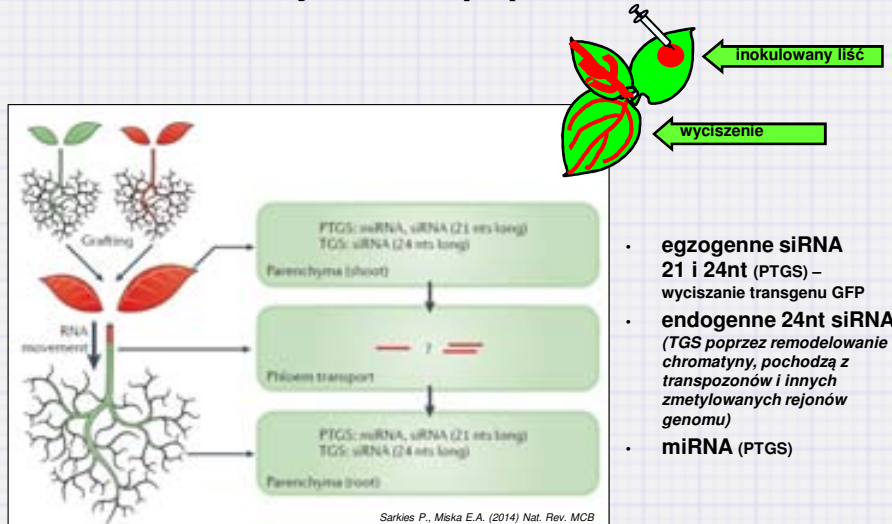
De Paoli, E., Dorantes-Acosta, A., Zhai, J., Accerbi, M., Jeong, D.-H., Park, S., Meyers, B.C., Jorgensen, R.A., and Green, P.J. (2009). RNA

VIGS - viral induced gene silencing



20

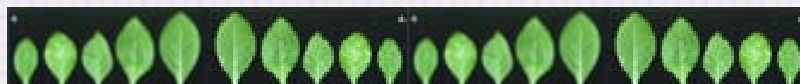
Sygnal wyciszający może rozprzestrzeniać się w całej roślinie poprzez floem



23

VIGS - podsumowanie

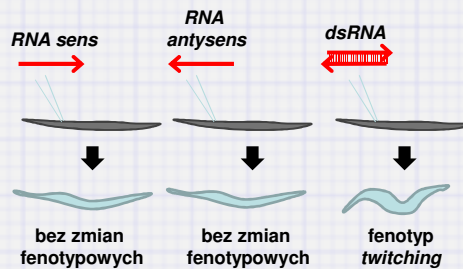
Wyciszenie ekspresji genów za pośrednictwem siRNA jest ważnym mechanizmem obrony roślin przed patogenami – wirusami i bakteriami
siRNA hamują replikację wirusową u roślin (również u zwierząt - *Drosophila melanogaster*)
siRNA działają ogólnoustrojowo – u roślin mogą się przemieszczać poprzez wiązki przewodzące
Większość wirusów wytwarza białka supresorowe, hamujące szlak wyciszania



24

Exo-siRNA u zwierząt: dsRNA – najsilniejszy inicjator wyciszenia modyfikacje genetyczne nicienia *C. elegans*:

Wprowadzanie do organizmów nicieni *Caenorhabditis elegans* RNA o prawidłowej lub odwróconej orientacji, oraz dwuniciowych RNA, odpowiadających sekwencji genu *unc-22*, kodującego miofilamentowe białko komórek mięśniowych. Wyciszenie *unc-22* powoduje fenotyp kurczenia ciała (*twitching*)



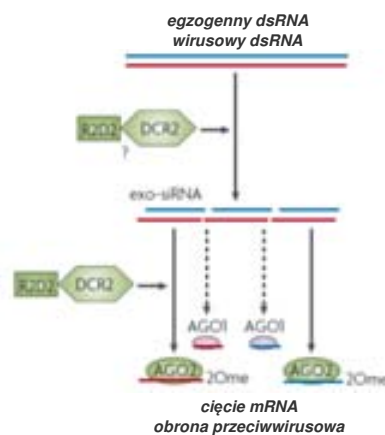
25

Fire, A. et al., (1998) Nature

Exo-siRNA u zwierząt:

- U ssaków i *C. elegans* – tylko jedno białko *Dicer*, odpowiada za biogenezę zarówno siRNA, jak i miRNA

- Drosophila melanogaster*.
Dcr1 – miRNA
Dcr2 – siRNA,
wiązane przez **AGO2**
obrona przeciwwirusowa

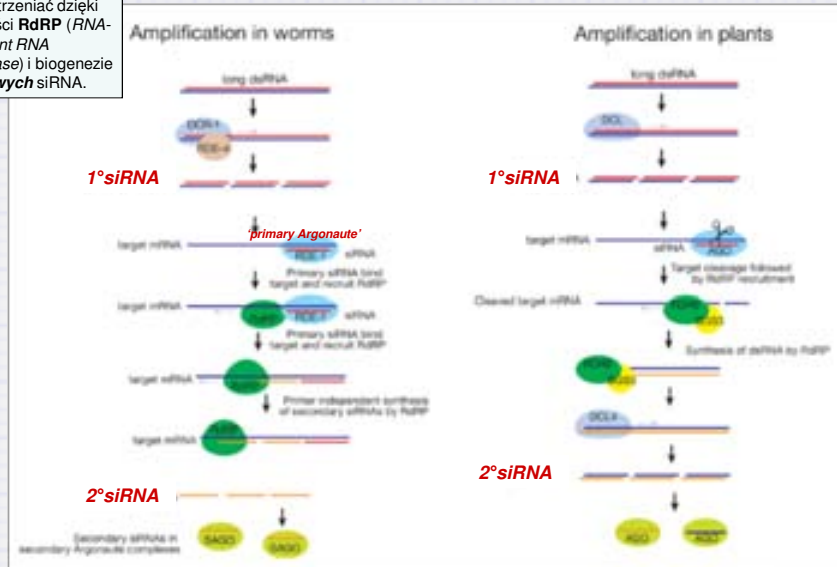


26

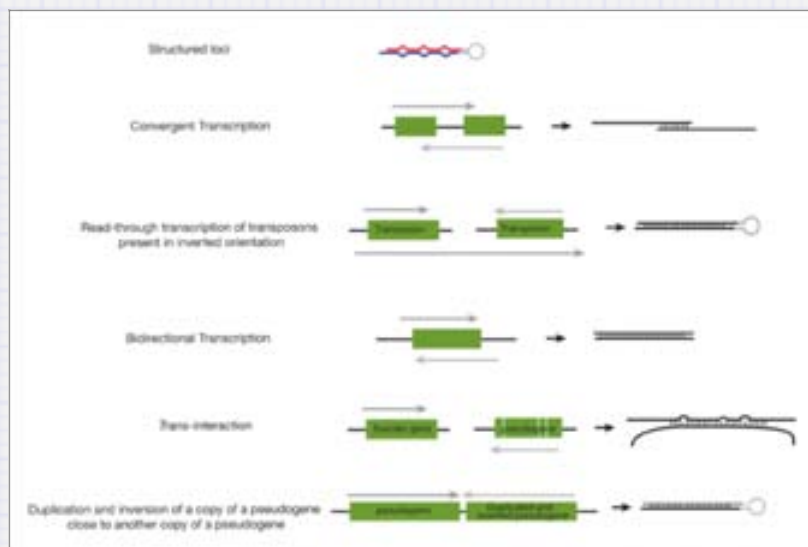
Okamura K. & Lai E.C. (2008) Mol Cell Biol

Efekt wyciszenia jest wzmacniany przez amplifikację siRNA

Wyciszenie może się rozprzestrzeniać dzięki aktywności **RdRP** (RNA-dependent RNA polymerase) i biogenezie **2-rzędowych** siRNA.



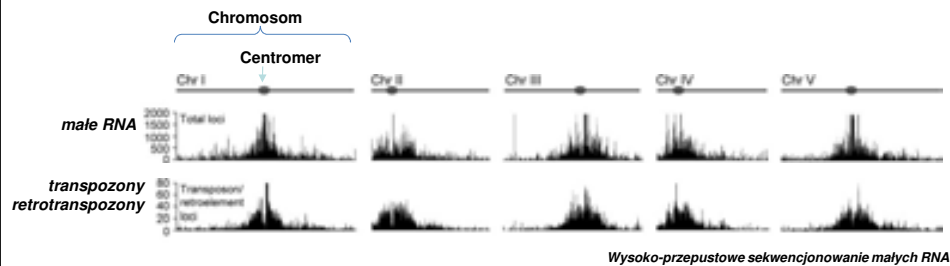
Endo-siRNA:



28

Ghildiyal & Zamore (2009) Nat Rev Genet

Większość endogennych siRNA powstaje z transpozonów i powtórzeń sekwencji DNA

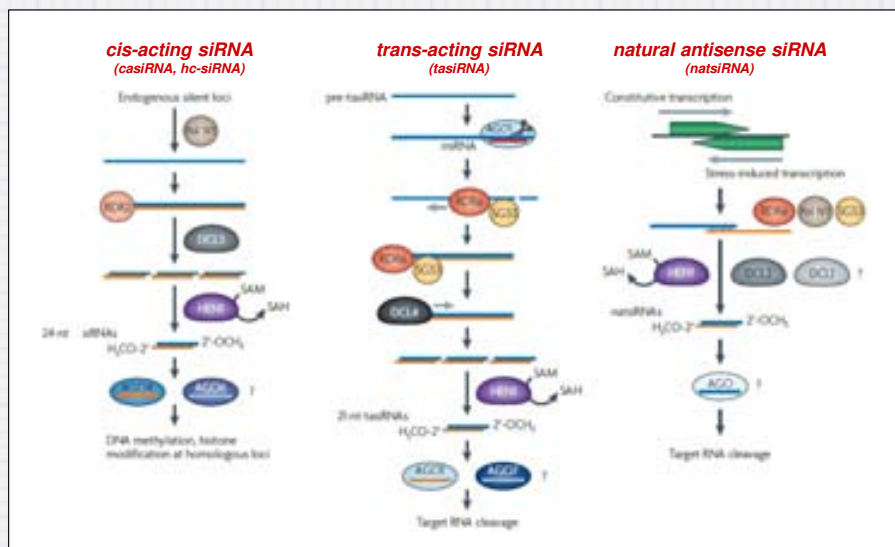


Większość siRNA w komórce pochodzi z sekwencji transpozonowych i powtórzonych. U *Arabidopsis thaliana* duże zagęszczenie tego typu sekwencji występuje w rejonach centromerowych chromosomów.

29

Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumble, J.S., Glvan, S.A., and Carrington, J.C. (2007) PLoS Biol

Endo-siRNA u roślin:



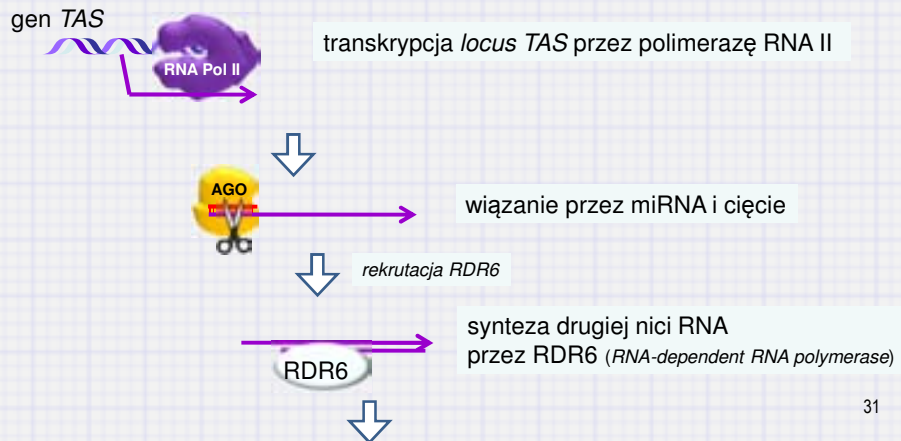
30

Ghildiyal & Zamore (2009) Nat Rev Genet

tasiRNA: roślinne endogenne siRNA

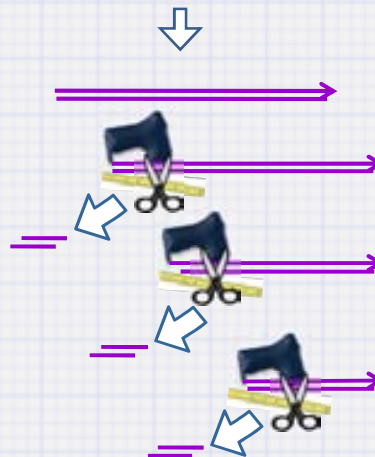
tasiRNA – *trans-acting siRNA*

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



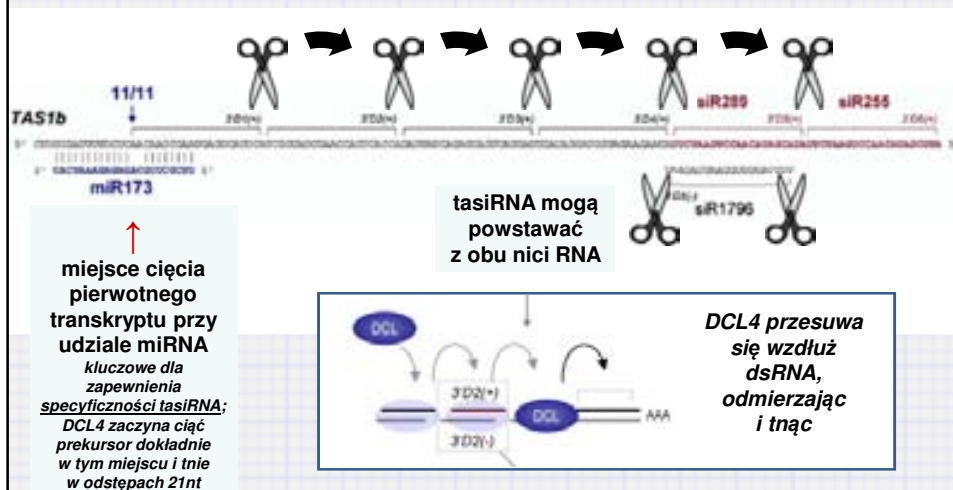
biogeneza tasiRNA – c.d.

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



32

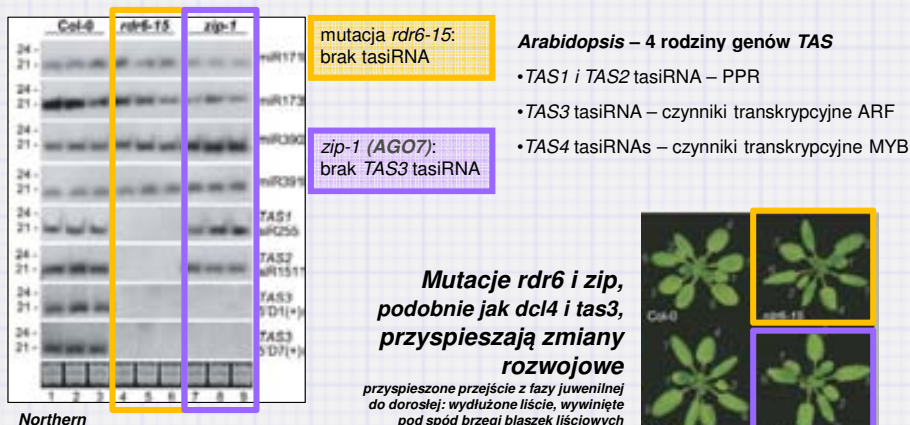
Z jednego genu *TAS* powstaje wiele cząsteczek tasiRNA



33

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C. (2005) *Cell*

Zaburzenia biogenezy tasiRNA → zaburzenia rozwoju



34

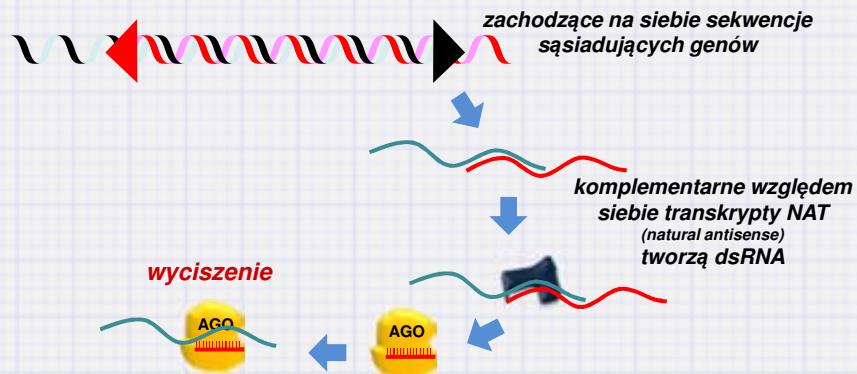
Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., Dvorak, S.K., Alexander, A.L., and Carrington, J.C. (2006) *Curr. Biol.*

natsiRNA: roślinne endogenne siRNA

natsiRNA – *natural antisense-transcript derived siRNA*

cis-acting

pochodzą z zachodzących na siebie transkryptów genów związanych ze stresem

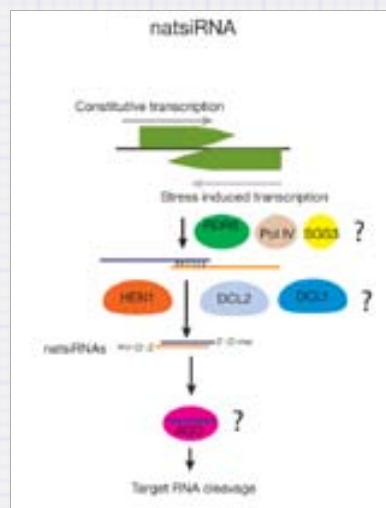


35

Wg Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas Jr, A., Zhu, J.-K., Staskiewicz, B.J., and Jin, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

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 części mRNA, druga służy jako matryca do syntezy 2-rzędowych 21nt natsiRNA przez RDR6 i DCL1
- *A. thaliana*: lsiRNA (*long siRNA*)
30-40nt
również powstają z transkryptów NAT
inne białka uczestniczą w biogenezie



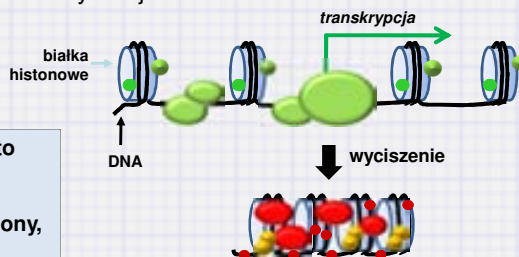
36

Ghildyal & Zamore (2009) *Nat Rev Genet*

Transkrypcyjne wyciszenie genów (TGS): hc-siRNA

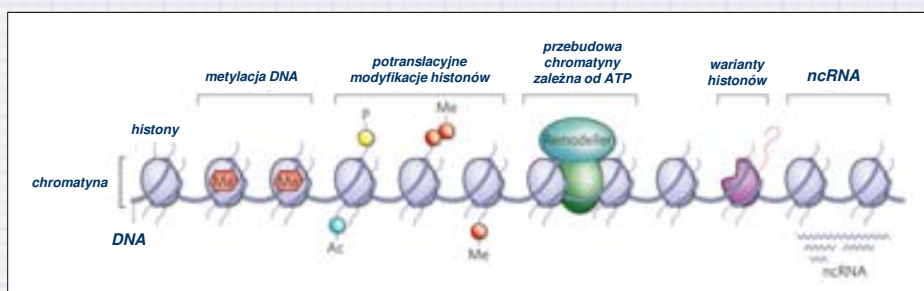
małe RNA mogą hamować transkrypcję określonych genów poprzez kowalencyjne modyfikacje DNA lub białek histonowych

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



37

Mechanizmy epigenetyczne kontroli ekspresji genów



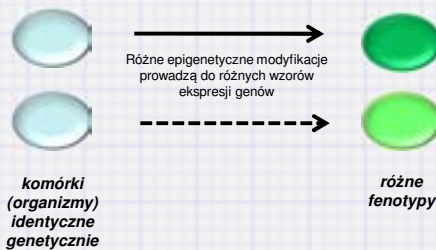
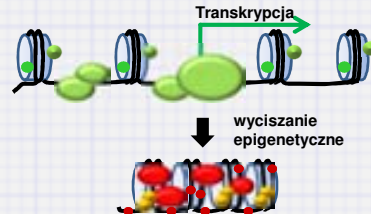
Dulac C. (2010) Nature

38

Co oznacza “epigenetyka”?

Epigenetyczna regulacja ekspresji genów = zmiana ekspresji genu, która zachodzi bez zmiany sekwencji DNA

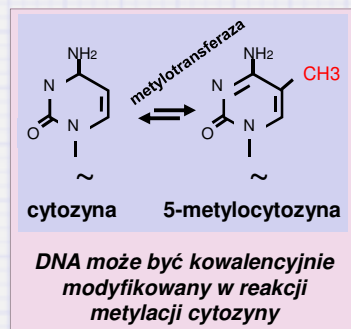
- Dosłownie, słowo „epigenetyka” oznacza „powyżej genetyki”
- Jest to informacja pozagenowa, nie dotycząca samej sekwencji, ale kowalencyjnych modyfikacji DNA i zmian struktury chromatyny



W praktyce, epigenetyka opisuje zjawiska, dzięki którym w identycznych genetycznie komórkach lub organizmach dochodzi do różnego sposobu ekspresji genów czego efektem są różnice fenotypowe.

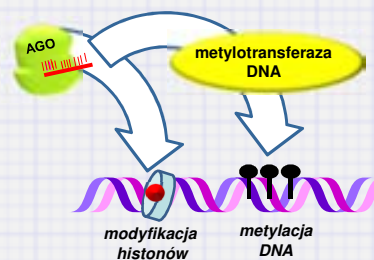
39

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



40

Roślinne polimerazy RNA

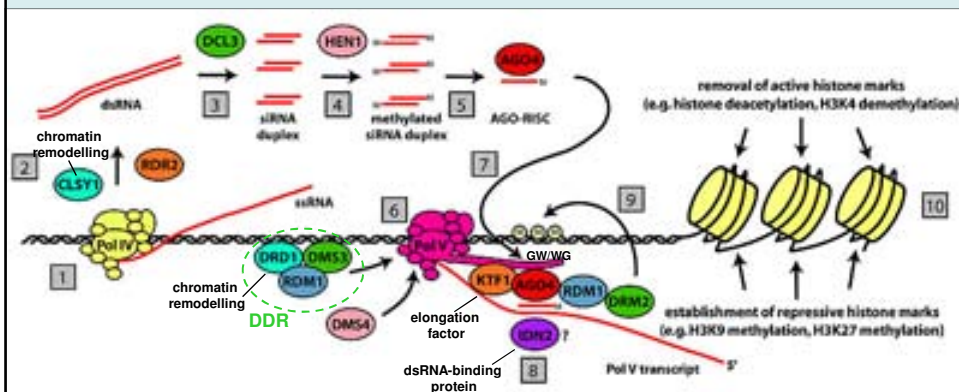


enzym	występowanie	funkcja
Polimeraza RNA I	wszystkie <i>Eucaryota</i>	synteza rRNA
Polimeraza RNA II	wszystkie <i>Eucaryota</i>	synteza mRNA, microRNA
Polimeraza RNA III	wszystkie <i>Eucaryota</i>	synteza tRNA, 5S rRNA
Polimeraza RNA IV	rośliny	biogeneza siRNA
Polimeraza RNA V	rośliny	rekrutacja białek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

41

Polimerazy RNA IV i V uczestniczą w transkrypcyjnym wyciszaniu genów

Model mechanizmu metylacji DNA zależnej od RNA (*RdDM- RNA-directed DNA methylation*)

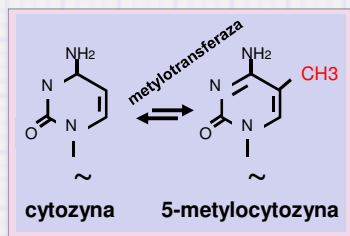


Polimeraza RNA IV uczestniczy w biogenezie siRNA.

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

42

Metylacja DNA



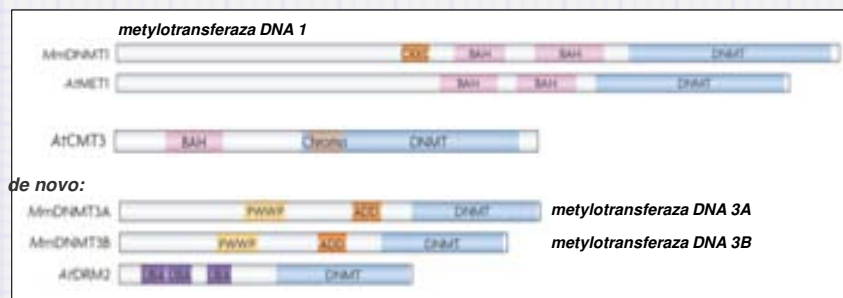
DNA może być kowalencyjnie modyfikowany w reakcji metylacji cytozyny:
wyst. u ssaków i roślin, ale nie u niższych zwierząt czy drożdży



Rola metylacji DNA:
imprinting, inaktywacja chromosomu X,
rozwój embrionalny, represja sekwencji
powtórzonych i transpozonów

43

Metylotransferazy DNA (DNMT)



MET1 (METHYLTRANSFERASE1) – 5'-CG-3' i 5'-CNG-3'

- wyciszanie transpozonów, powtórzeń DNA, piętnowanie niektórych genów

CMT3 (CHROMOMETHYLASE3) – 5'-CHG-3'

- (H= A, C lub T)
- specyficzna dla roślin, może być rekrutowana przez metylotransferazę histonową SUVH4 (KYP), a więc odpowiadać na modyfikację białek histonowych

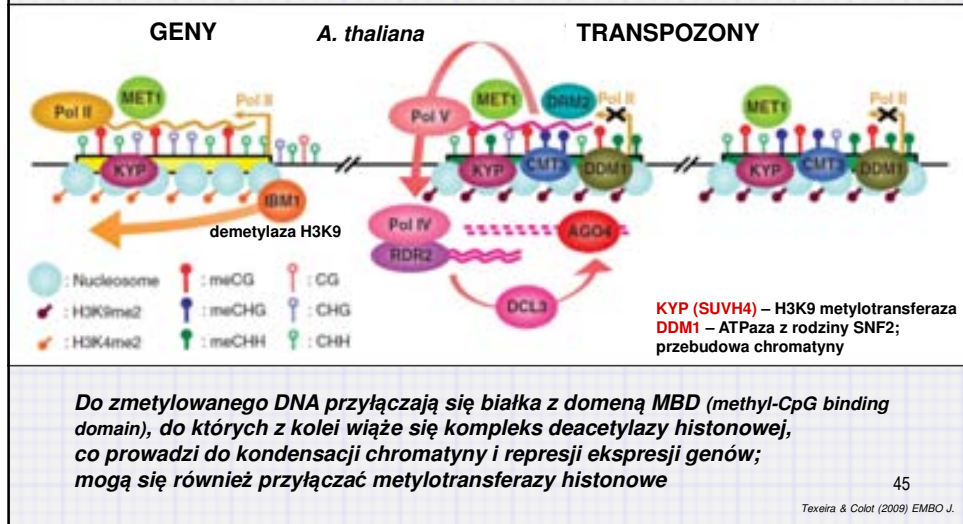
DRM1/ DRM2 (DOMAINS REARRANGED 1/2) – 5'-CHH-3'

- metylacja *de novo* – DRM2
- metylacja powtórzeń DNA wyciszanych przez siRNA

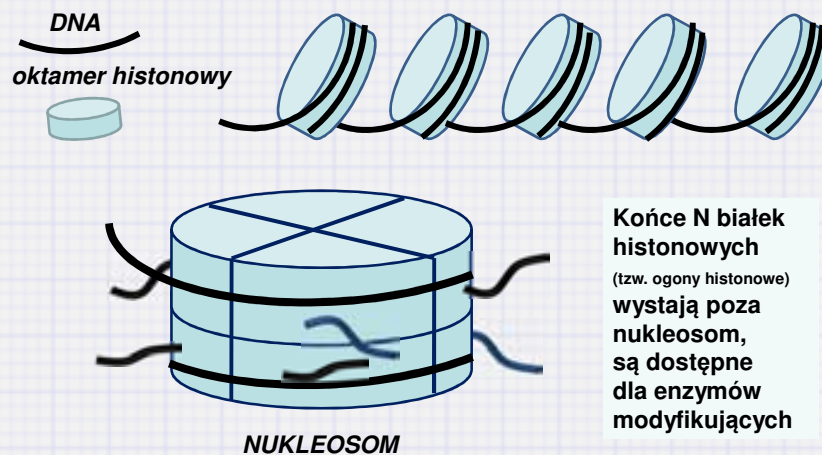
44

Głównym celem metylacji cytozyn jest wyciszenie transpozonów i powtórzeń DNA

Nie wszystkie transpozony są wyciszane na drodze mechanizmu RNAi

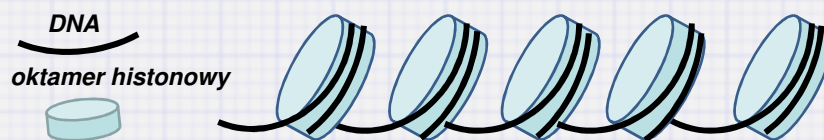


Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny



46

Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny



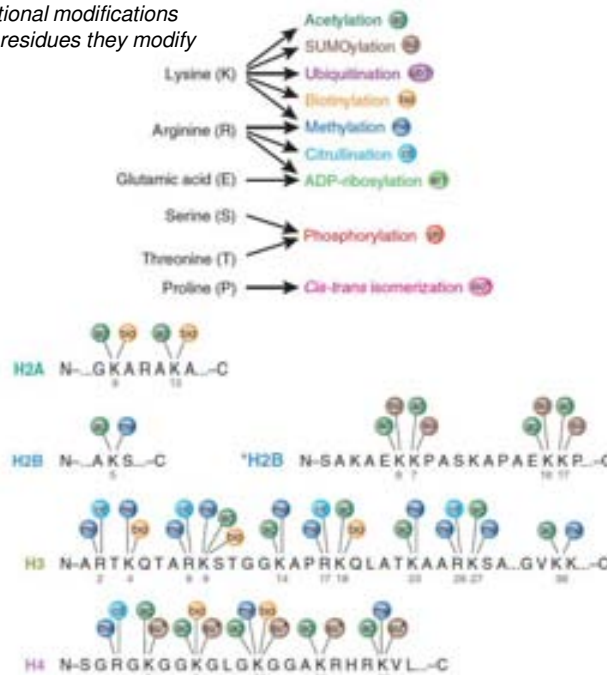
Modyfikacje histonów: (kod histonowy)

- **acetylacja** (Ac)
- **metylacja** (Me)
- **fosforylacja** (P)
- **ubikwitynacja** (Ub)
- **sumoilacja** (Su)

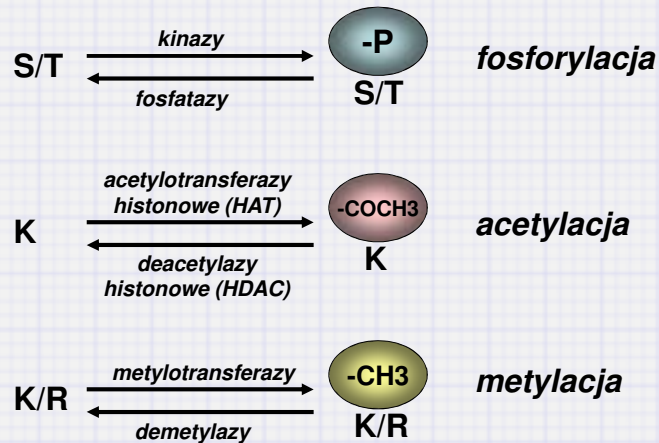
W zależności od miejsca w/w modyfikacji mogą one przyczyniać się do aktywacji lub inaktywacji transkrypcji

47

Known post-translational modifications and the amino acid residues they modify



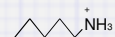
Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny



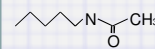
49

Acetylacja lizyny białek histonowych

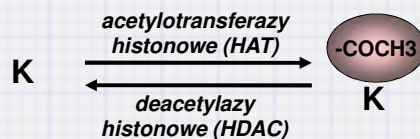
- seria acetylo-lizyn (bardziej obojętne niż dodatnio naładowane lizyny) na ogonach histonów osłabia interakcje elektrostatyczne między histonami a DNA, co pozwala na rozluźnienie struktury chromatyny
- inne funkcje: regulacja naprawy DNA poprzez przebudowę chromatyny; acetylowane lizyny są wtedy miejscami przyłączenia dla białek przebudowujących chromatynę (poprzez bromodomenę)
- za acetylację odpowiedzialne są acetylotransferazy (HAT), a donorem grupy acetylowej jest acetylo-CoA
- acetylacja jest odwracalna; deacetylację przeprowadzają deacetylazy (HDAC)



lizyna (K)



acetylowana lizyna (KAc)

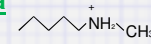


50

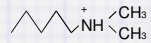
Metylacja białek histonowych

- metylacja lizyny powoduje zwiększenie hydrofobowego i kationowego charakteru tej reszty aminokwasowej; w zależności od enzymu lizyna może być mono, di lub trimetylowana.
- za metylację odpowiedzialne są metylotransferazy (HMT) zawierające domenę SET, a donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina (SAM) lub S-adenozylhomocysteina (AdoHcy); metylacja H3K79 katalizowana jest przez Dot1 spoza rodziny Set
- usunięcie grup metylowych: wymiana nukleosomów, modyfikacje chemiczne zmetylowanych reszt lub enzymatyczna demetylacja

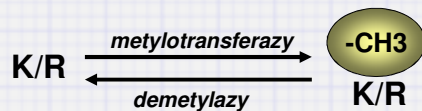
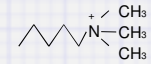
metylowana lizyna
Mono (Kme1)



Di (Kme2)



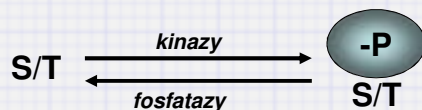
Tri (Kme3)



51

Fosforylacja białek histonowych

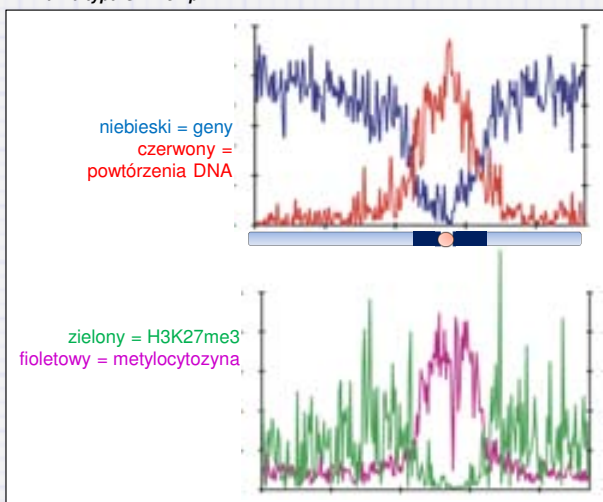
- Fosforylacje seryn H3S10 i H3S28 niezbędne są do kondensacji chromosomów i prawidłowej mitozy; także pozytywna rola w aktywacji transkrypcji: hamuje metylację H3K9 i promuje acetylację lizyn położonych w jej sąsiedztwie
- Zidentyfikowano ufosforylowane seryny na wszystkich histonach (fosforylacja wariantu H2A niezbędna jest w aktywacji naprawy DNA i regulacji cyklu komórkowego po uszkodzeniu DNA)



52

H3K27me3: w genach kodujących białka

Analiza typu ChIP-chip



H3K27me3 u *A. thaliana* występuje w rejonach bogatych w sekwencje kodujące

55

Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J., Jacobsen, S.E. (2007) PLoS Biol.

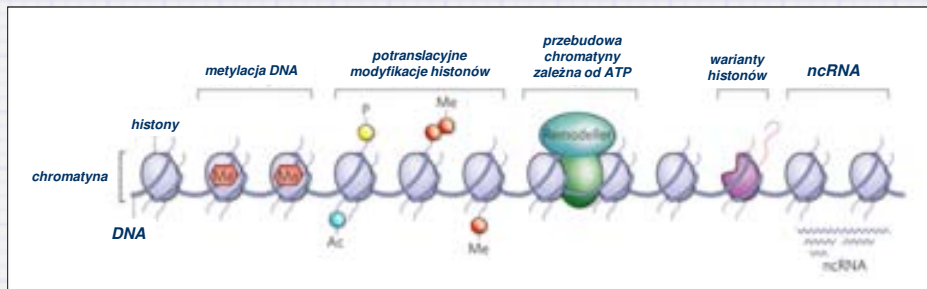
Mechanizm działania modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych

Działanie bezpośrednie: zmiany w oddziaływaniach histon-DNA i histon-histon

Działanie pośrednie: rekrutacja białek rozpoznających określone modyfikacje histonów



Przebudowa chromatyny zależna od ATP (*chromatin remodelling*)

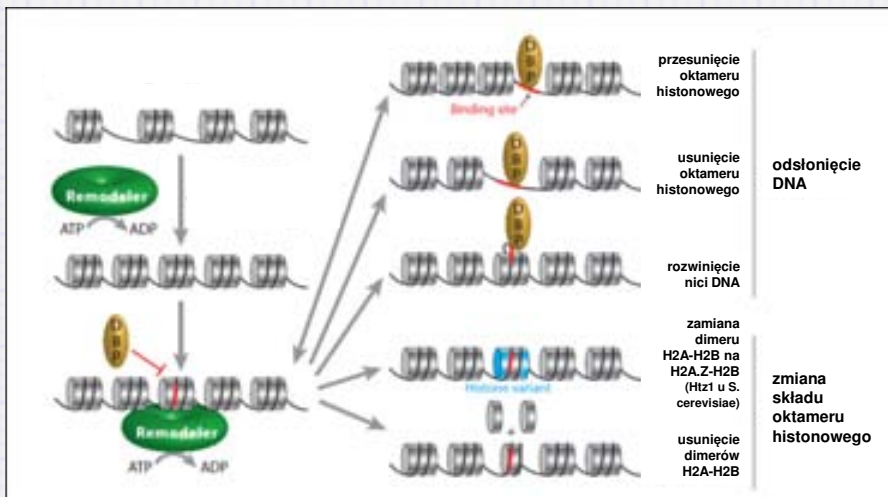


Aktywność kompleksów przebudowujących chromatynę zależy od ATP, w wyniku ich działania zmienia się sposób oddziaływania histon-DNA. Kompleksy remodelujące zaangażowane są zarówno w aktywację, jak i represję transkrypcji.

Dulac C. (2010) Nature

57

Przebudowa chromatyny:

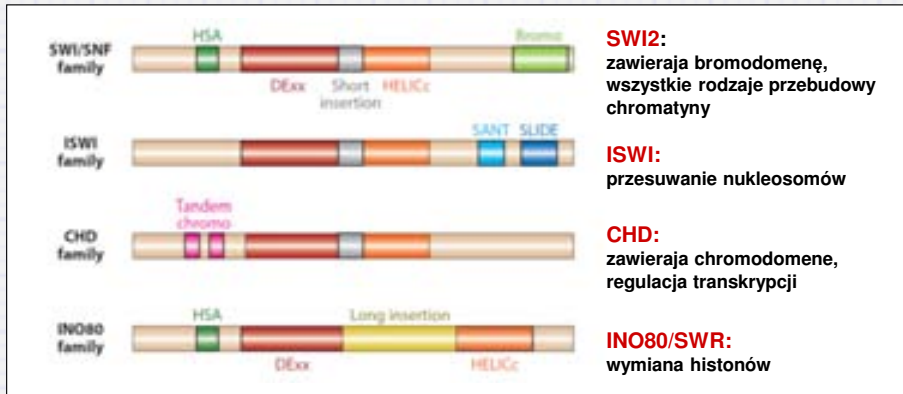


Aktywność kompleksów przebudowujących chromatynę zależy od ATP, w wyniku ich działania zmienia się sposób oddziaływania histon-DNA. Kompleksy remodelujące zaangażowane są zarówno w aktywację, jak i represję transkrypcji.

58

Clapier C. R., Cairns B. R. 2009 Annu Rev Biochem

Wyróżniamy cztery rodziny kompleksów odpowiedzialnych za przebudowę chromatyny:



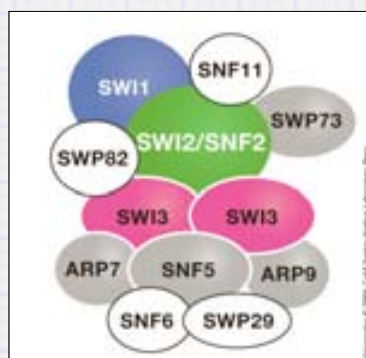
59

Clapier C. R., Cairns B. R. 2009 Annu Rev Biochem

Kompleksy przebudowujące chromatynę składają się z wielu białkowych podjednostek

Drożdżowy SWI/SNF:

11 białek

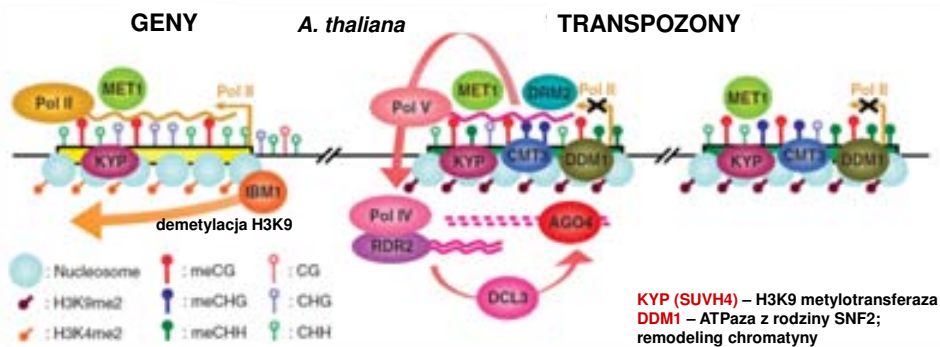


potrzebny do ekspresji genów decydujących o typie koniugacyjnym drożdży (*switching*), oraz ekspresji genów regulujących metabolizm sacharozy (*sucrose non-fermenting*)

60

DDM1 (*decrease in DNA methylation*) : ATPaza z rodziny SWI/SNF u *A. thaliana*

DDM1 jest specyficznie zaangażowana w metylację transpozonów

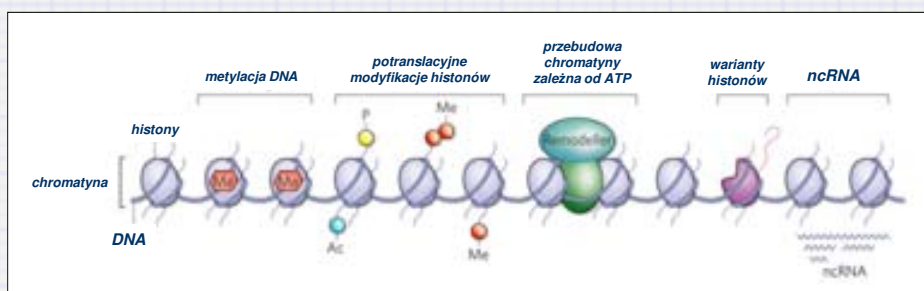


DDM1 jest kluczowym czynnikiem łączącym przebudowę chromatyny
i wprowadzanie/utrzymywanie metylacji DNA

61

Teixeira & Colot (2009) EMBO J.

Warianty histonów



Dulac C. (2010) Nature

Za wymianę różnych wariantów histonów w oktamerze histonowym
odpowiadają kompleksy przebudowujące chromatynę z rodziny
INO80/SWR

62

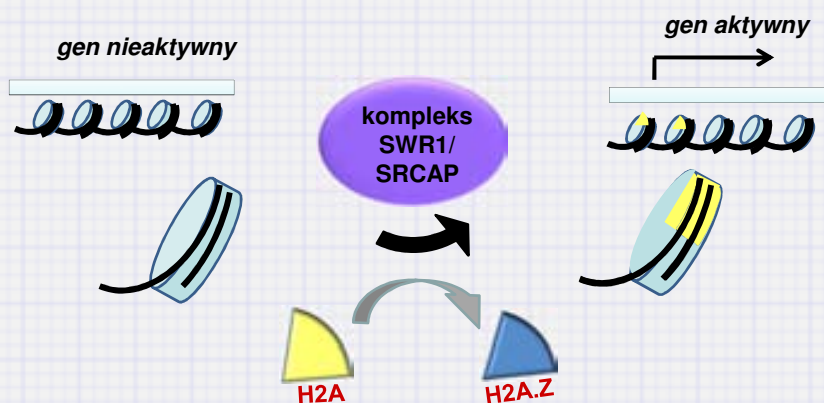
Warianty histonów:

Family	Variant	Function	Distribution
H4	Canonical	Genome packaging	Universal
H3	Canonical (H3.2**)	Genome packaging	Widespread
H3	H3.3	Replacement	Universal
H2A	Canonical	Genome packaging	Widespread
H2B	Canonical	Genome packaging	Universal
H2A	H2A.X	DNA ds break repair	Universal
H2A	H2A.Z	Promoter insulation	Universal
H3	CenH3 (CENP-A, others)	Centromere identity	Universal
H2A	macroH2A	X-inactivation	Animals
H3	H3t	Testes-specific	Mammals
H2B	TH2B	Testes-specific	Mammals
H2A	H2A.Bbd	Unknown	Mammals
H2B	H2BFWT	Testes-specific	Mammals
H2A	H2A.L1, L2	Testes-specific	Mammals
H2A	H2A.Bd	DNA ds break repair	Bdelloids
H3	H3V	Transcription termination	Trypanosomes
H4	H4V	Transcription termination	Trypanosomes
H2B	H2BV	Transcription initiation	Trypanosomes

Tabert & Henikoff (2010) Nat Rev Mol Cell Biol

63

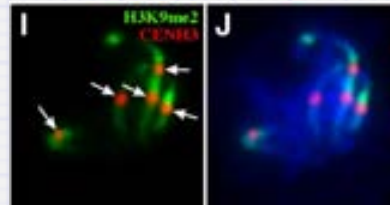
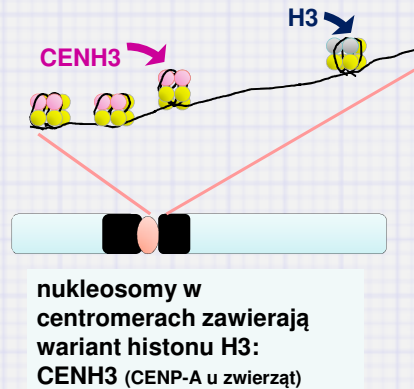
Histon **H2A.Z**: aktywacja transkrypcji



Obecność odmiany histonu H2 - H2A.Z sprzyja transkrypcji.
Kompleks SWR1/SRCAP zamienia histon **H2A** na **H2A.Z**

64

Histon **CENH3**: centromery

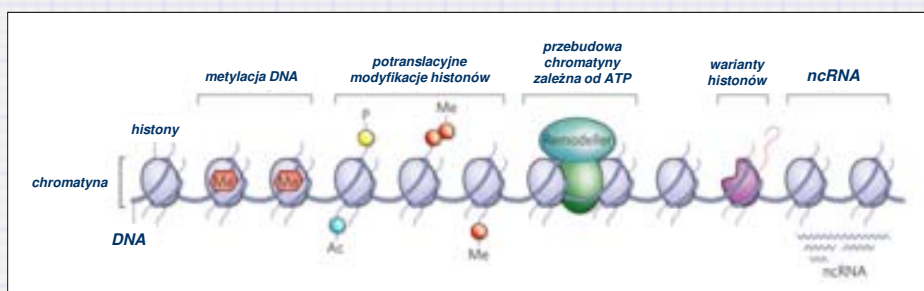


centromery zawierające **CENH3** są otoczone obszarem bogatym w metylację **H3K9me2** (heterochromatyna przycentromerowa)

65

Jiang, J., Birchler, J.A., Parrott, W.A., and Dawe, R.K. (2003) Trends Plant Sci. Elsevier.
Zhang, W., Lee, H.-R., Koo, D.-H., and Jiang, J. (2008) Plant Cell

Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA

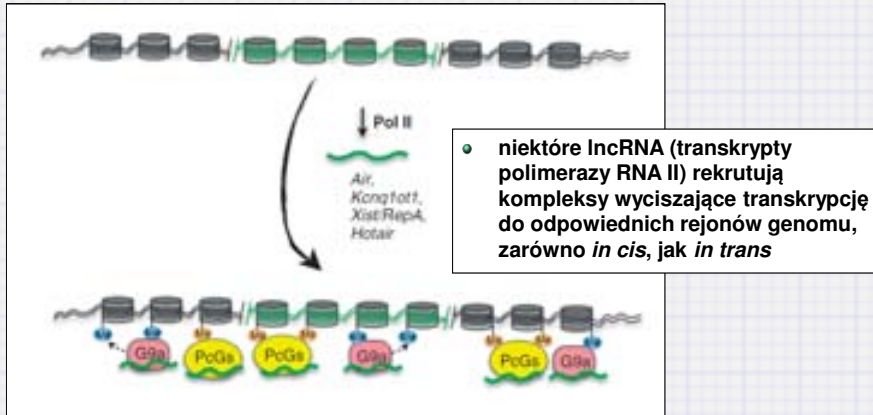


RNA jest jedynym jak dotąd poznanym czynnikiem inicjującym dziedziczenie epigenetyczne i odróżniającym sekwencje, które mają zostać wyciszone lub aktywowane

Dulac C. (2010) Nature

66

Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez lncRNA u ssaków

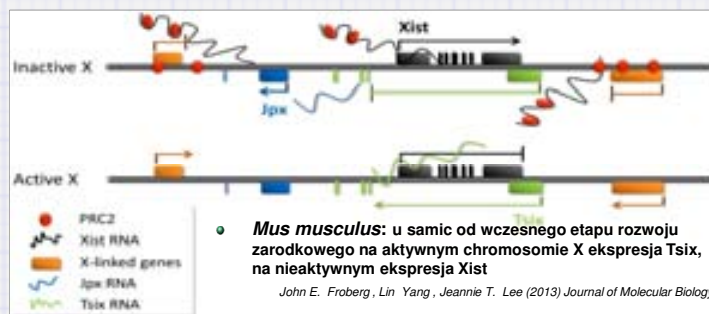


- PcG- Polycomb group proteins
- G9a- metylotransferazy histonowe /H3K9/H3K27
- **XIST** → inaktywacja chromosomu X u ssaków
(*dosage compensation*: wyrównanie poziomu ekspresji genów chromosomów X)

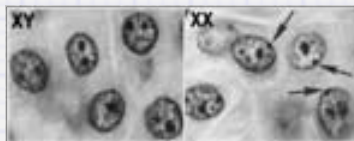
67

Chen & Carmichael (2010) Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA

Inaktywacja chromosomu X: wyciszanie epigenetyczne

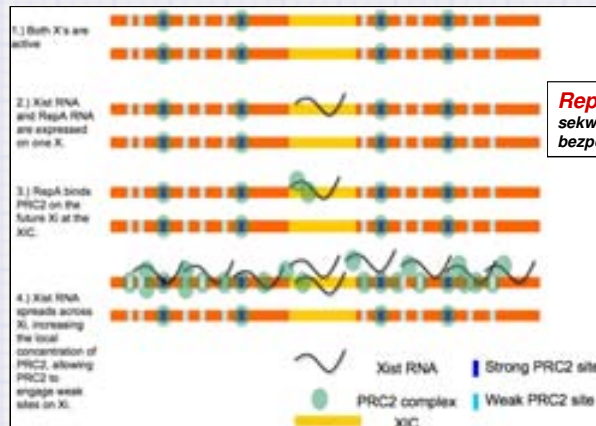


- 17kb (u myszy; ludzki 19kb) ncRNA XIST opłascza chromosom X
- tzw. ciało Barra: skondensowana forma chromosomu X, głównie w postaci heterochromatyny



68

Inaktywacja chromosomu X: wyciszenie epigenetyczne



RepA: 1,6kb ncRNA zawierający sekwencje regionu 5' transkryptu XIST bezpośrednio wiąże kompleks PRC2

69

John E. Froberg, Lin Yang, Jeannie T. Lee (2013) Journal of Molecular Biology

Inaktywacja chromosomu X: wyciszenie epigenetyczne

XIST ncRNA uruchamia zmiany epigenetyczne, które zapewniają „pamięć komórkową” stanu nieaktywnego:

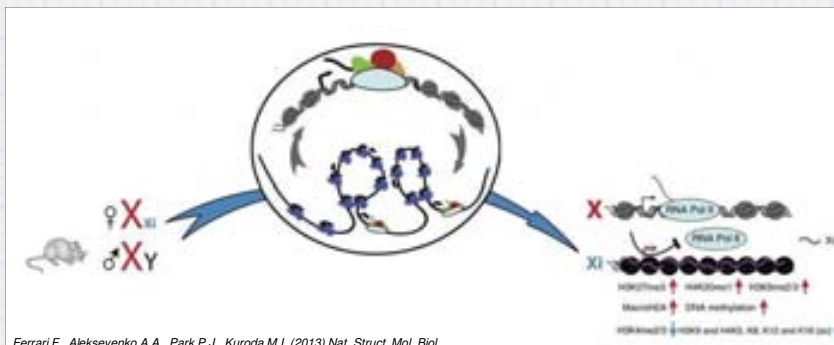
zamiana histonu **H2A** na **makroH2A**

metylacja histonu H3:

H3K9
H3K27

deacetylacja histonu H4 (?)

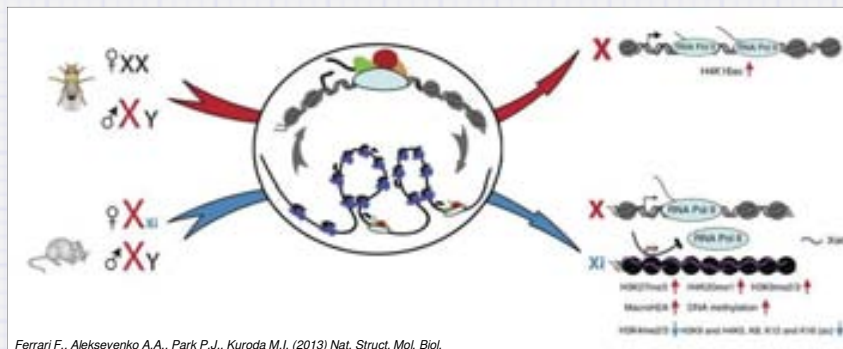
metylacja DNA /już po inaktywacji chromosomu



Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA

kompensacja dawki chromosomów płciowych (*dosage compensation*) u *Drosophila melanogaster* → **roX**

- **roX1/roX2** ncRNA inicjują modyfikacje histonów → u samców *Drosophila* zwiększenie aktywności chromosomu X
- acetylacja histonów
- demetylacja H3K9



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

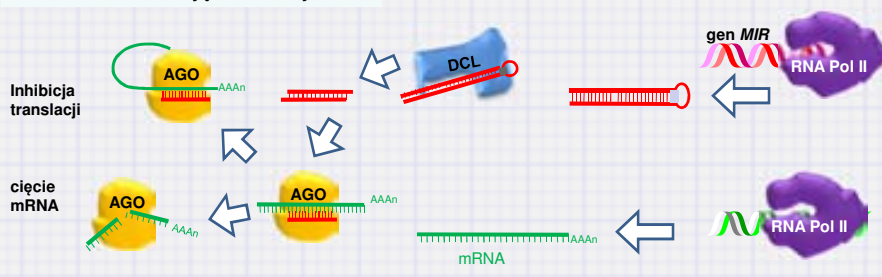
- uważa się, że miRNA wyewoluowały z siRNA – powstają i dojrzewają w podobny (do pewnego stopnia) sposób
- miRNA są kodowane przez specyficzne geny *MIR*, ale wpływają na ekspresję innych genów – są cząsteczkami regulatorowymi działającymi *in trans*
- miRNA regulują procesy rozwojowe i fizjologiczne



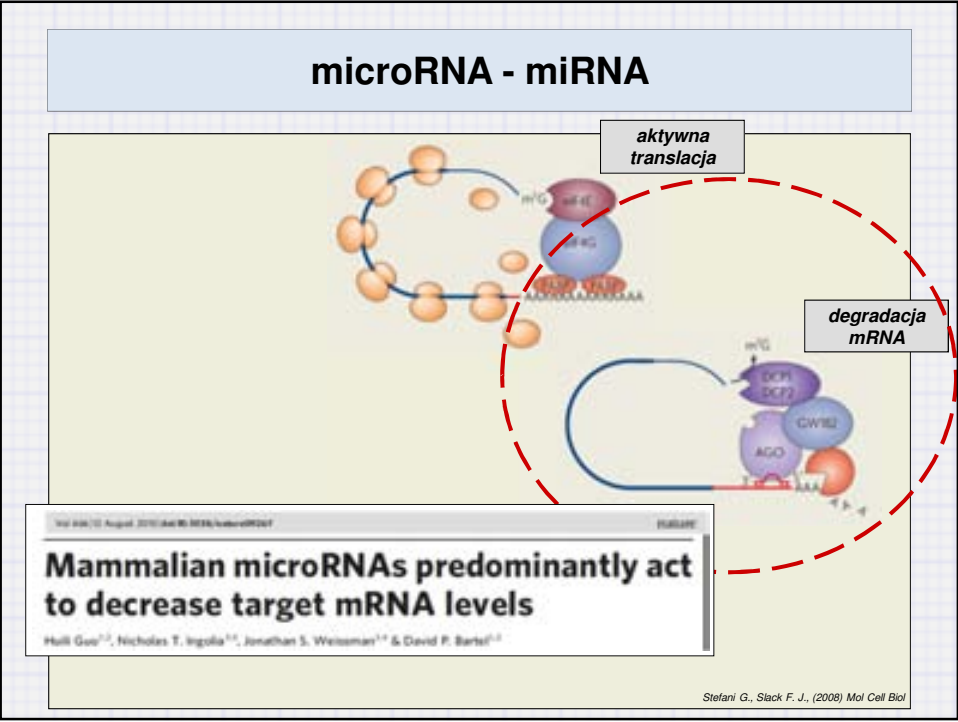
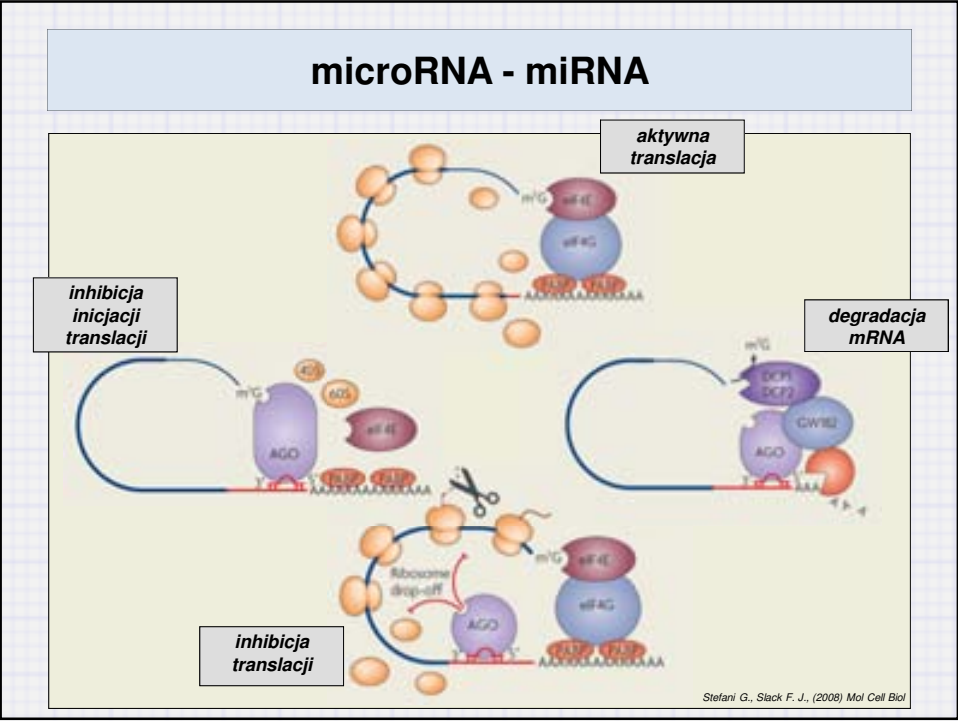
73

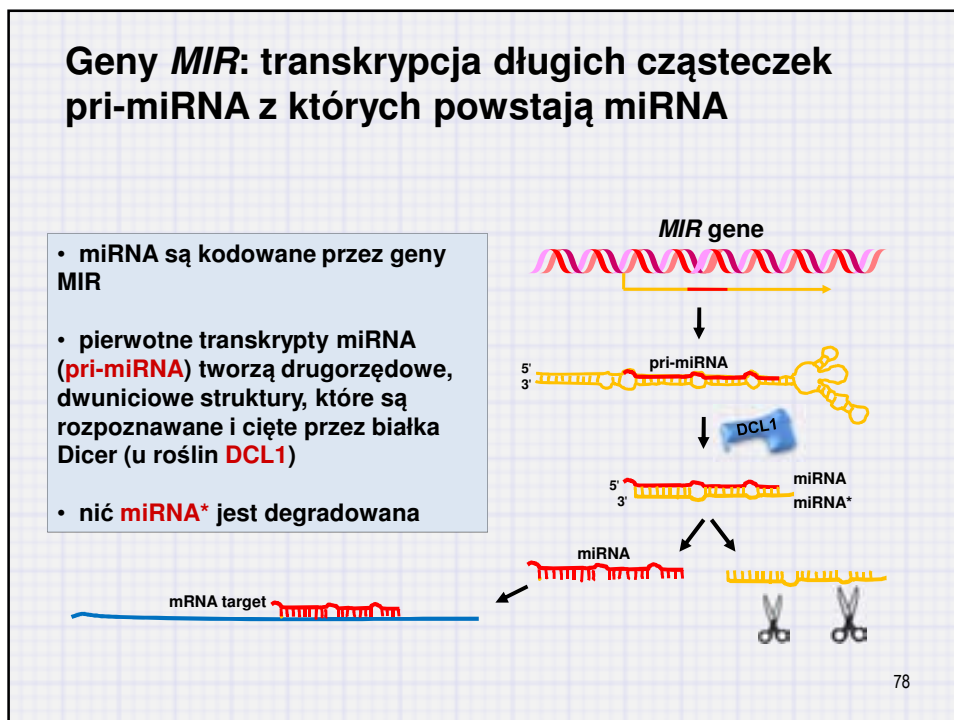
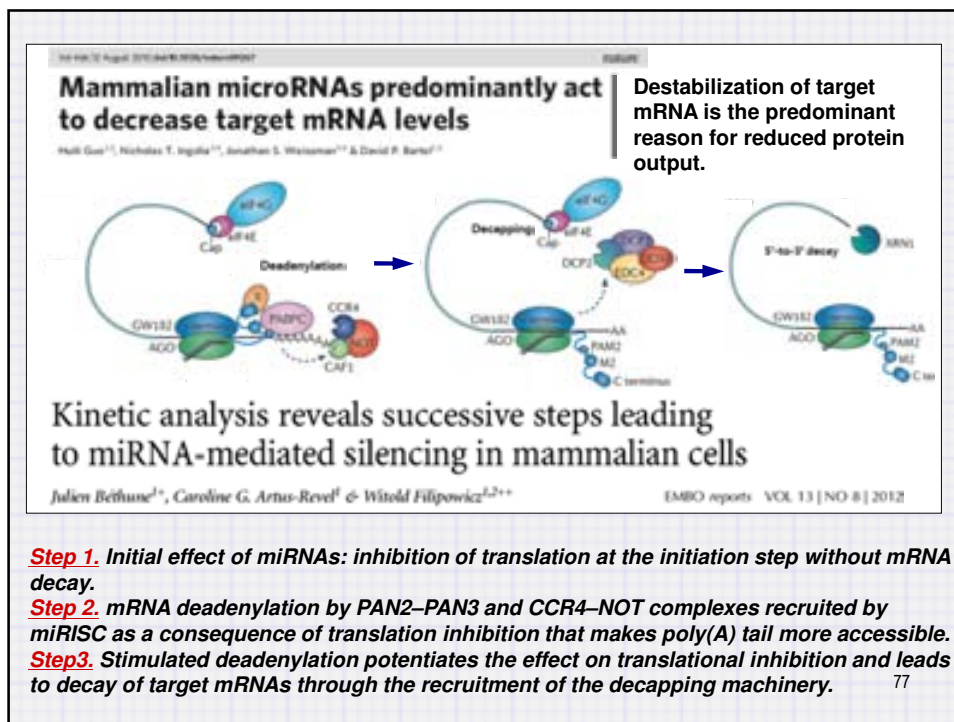
microRNA - miRNA

microRNA działają poprzez cięcie mRNA lub inhibicję translacji



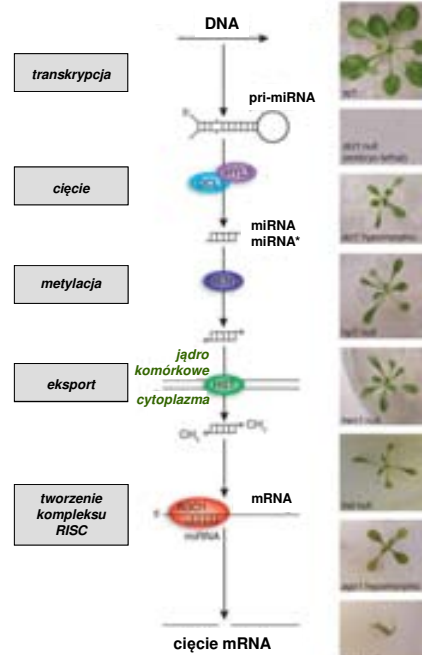
74





Biogeneza miRNA u roślin

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

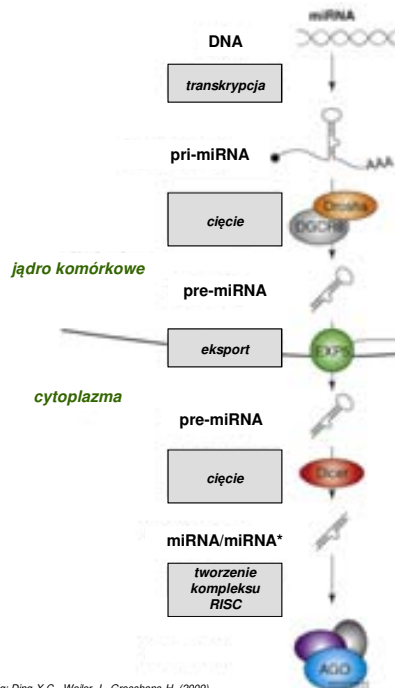


Mailory A., Vaucheret H. (2006)
Nature Genet.

79

Biogeneza miRNA u zwierząt

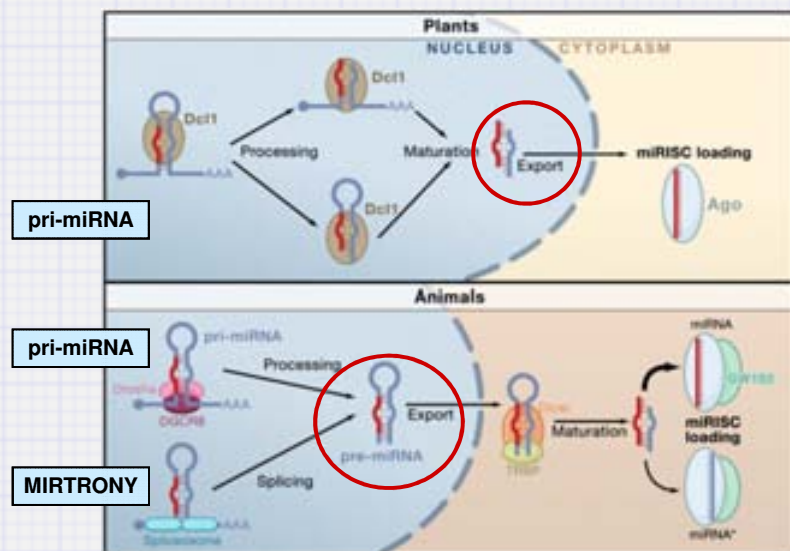
- **Drosha+DGCR8 (Pasha):**
cięcie pri-miRNA
→ pre-miRNA
- **EXP5 (eksportyna 5):**
eksport pre-miRNA
do cytoplazmy
- **Dicer:**
cięcie pre-miRNA
→ miRNA/miRNA*



Wg: Ding X.C., Weller J., Grosshans H. (2009)
Trends in Biotechnology

80

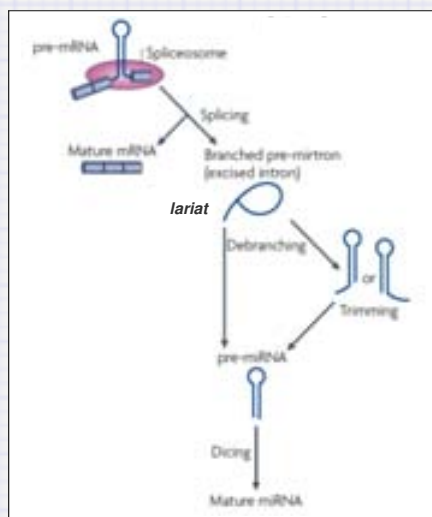
Biogeneza miRNA u roślin i zwierząt eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy



81

Carthew R. W., Sontheimer E. J., (2009) Cell

Mirtrony

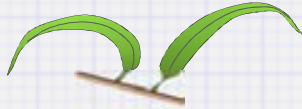


- występują u *D. melanogaster*, *C. elegans*, ssaków
- powstają z intronów wyciętych z pre-mRNA podczas składania mRNA
(*splicing*)
niezależne od Drosha
- rozcięcie struktury lariat (*debranching*) prowadzi do powstania pre-miRNA
- pre-miRNA → biogeneza miRNA

82

Kim V. N., Han J., Siomi M.C. (2009) Mol Cell Biol

miRNA - podsumowanie

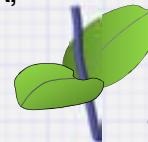


Uważa się, że miRNA regulują większość procesów biologicznych zarówno u roślin jak i zwierząt, kontrolując ekspresję specyficznych genów działając *in trans*

miRNA regulują procesy rozwojowe:

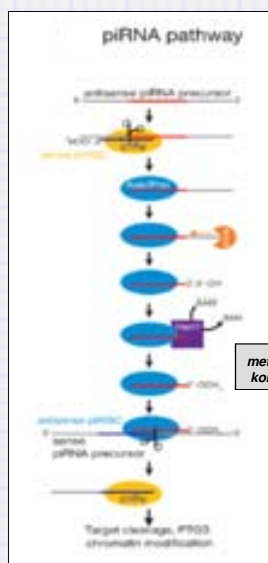
np. u *A. thaliana* miR156 i miR172 regulują procesy kwitnienia;
u *C. elegans* wyciszenie *lin-14* przez *lin-4* jest potrzebne do prawidłowego rozwoju

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



83

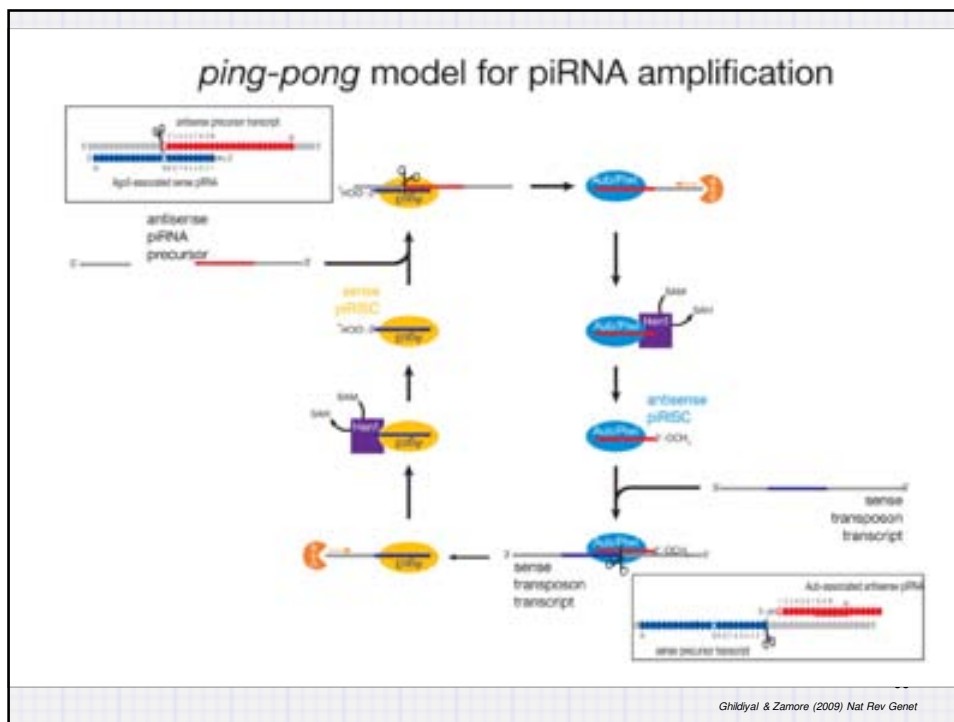
Małe RNA niezależne od Dicer: piRNA



- ~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)
- wyciszenie transpozonów i powtórzeń DNA, u ssaków **metylacja DNA sekwencji transpozonowych**

84

Ghildiyal & Zamore (2009) Nat Rev Genet

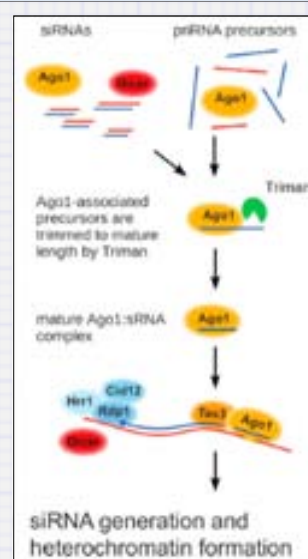


Małe RNA niezależne od Dicer

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
 Maria Monemais, Manuel Zuccato, and Mario Haber



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.

