

Niekodujący RNA (ncRNA)



Molekularne Techniki Analizy RNA

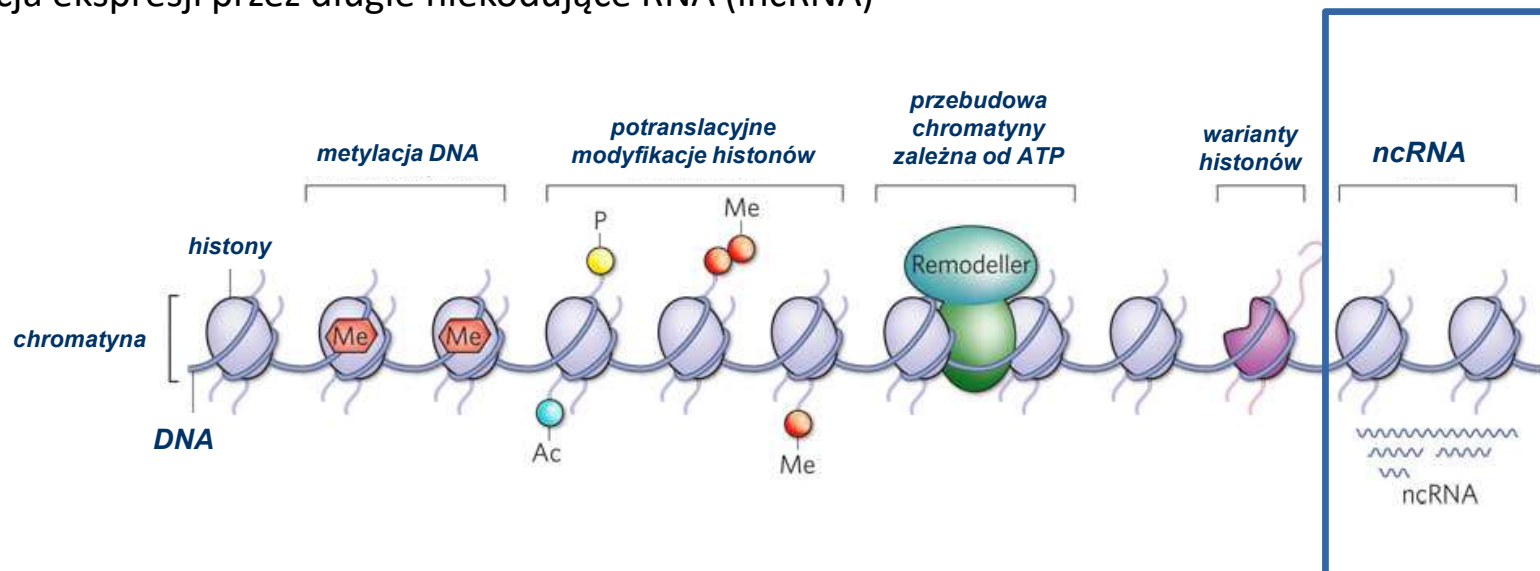
Monika Zakrzewska-Płaczek

28.10.2022

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

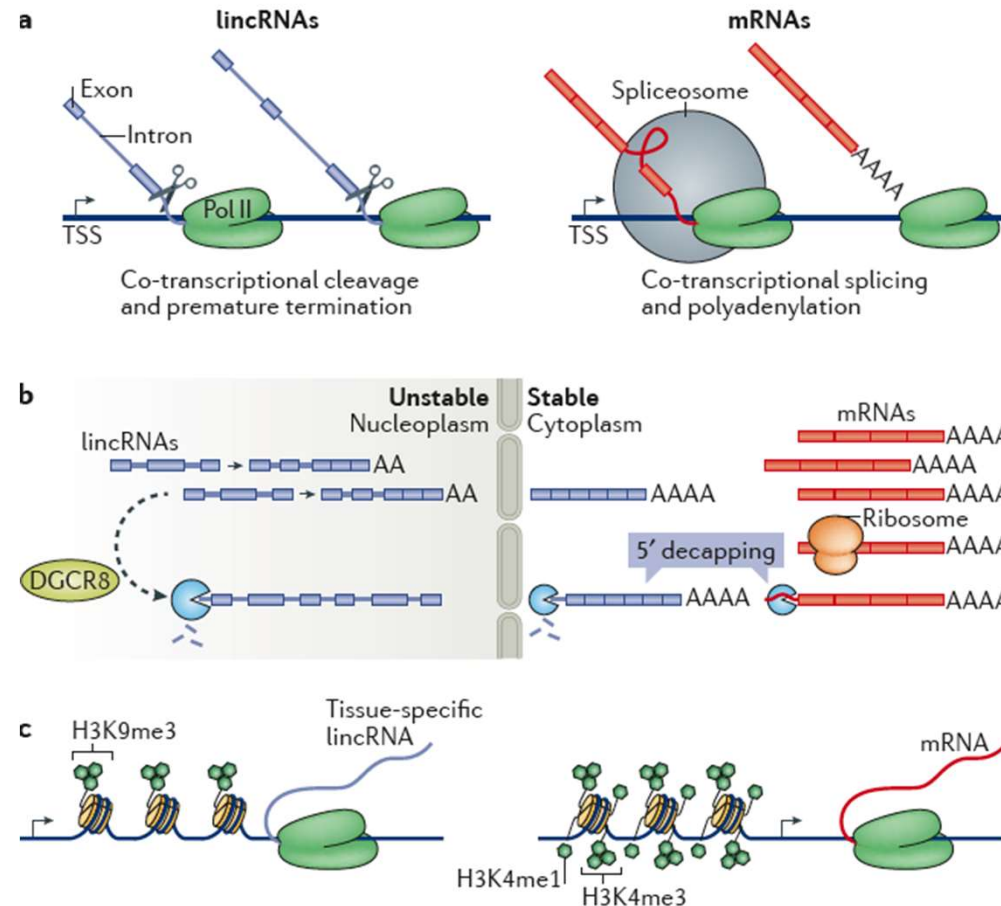
1. wyciszanie transkrypcyjne przez siRNA (TGS)
2. regulacja ekspresji przez długie niekodujące RNA (lncRNA)



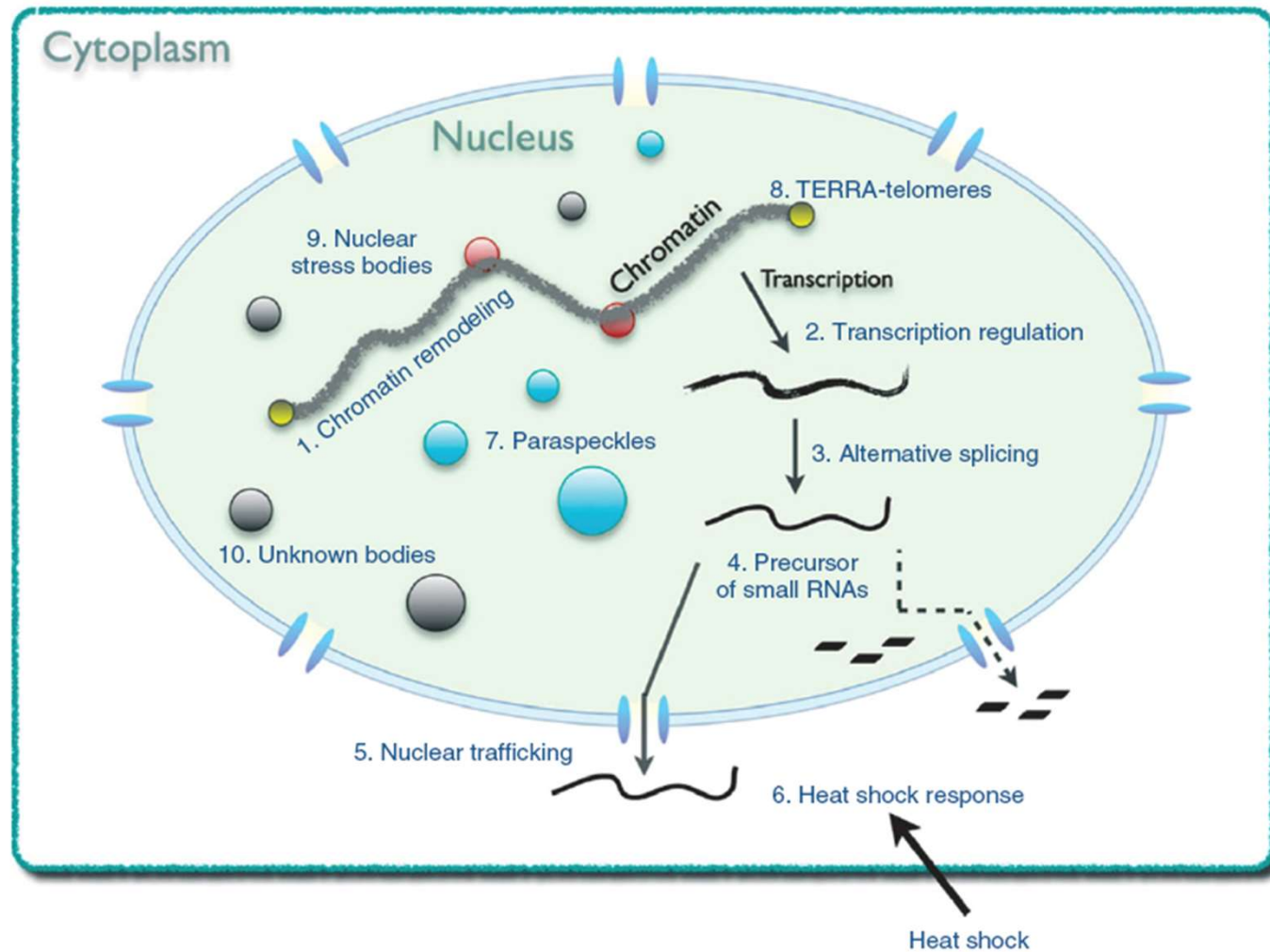
lncRNA vs mRNA

lincRNA (*long intergenic non-coding RNA*)

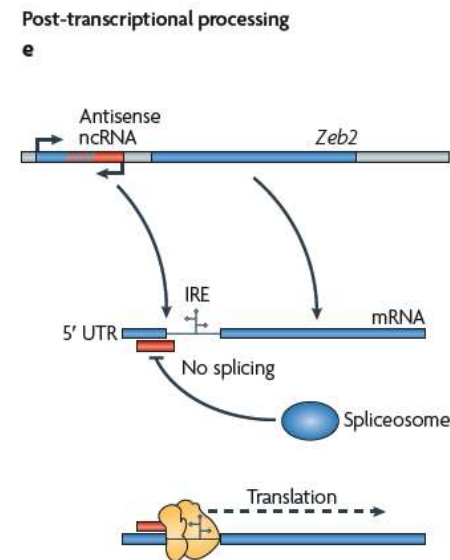
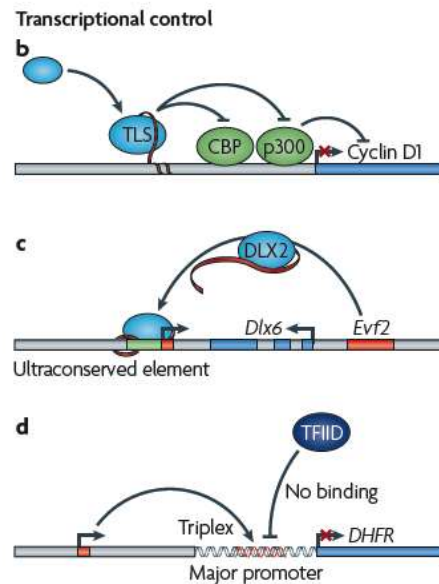
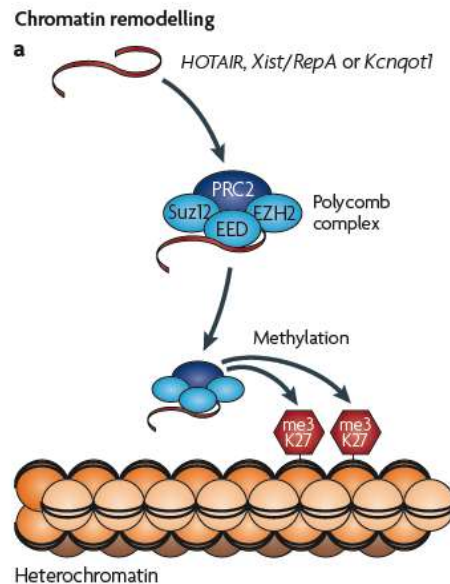
- autonomiczne transkrybowane ncRNA, dłuższe niż 200 nt, których sekwencje nie pokrywają się z genami kodującymi białka
- u ludzi stanowią ponad połowę transkryptów lncRNA



Funkcje lncRNA

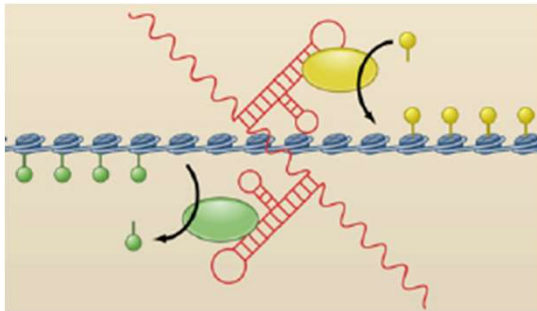


Mechanizmy działania lncRNA

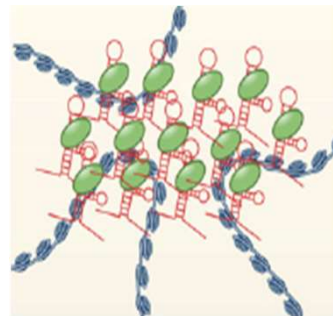


- ncRNA rekrutują kompleksy modyfikujące chromatinę → modyfikacje białek histonowych (H3meK27) i tworzenie heterochromatyny
- działają jako represory lub enhancery transkrypcji poprzez wiązanie do czynników białkowych lub DNA;
- mogą działać jako „przynęty” wiążące czynniki transkrypcyjne
- maskują miejsce splicingu 5', co skutkuje zatrzymaniem intronu, rozpoznaniem IRE i translacją

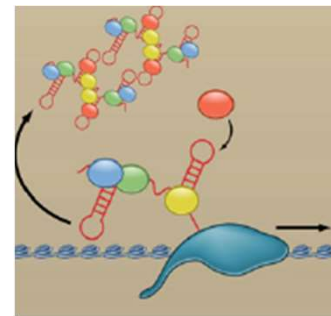
Mechanizmy działania lncRNA



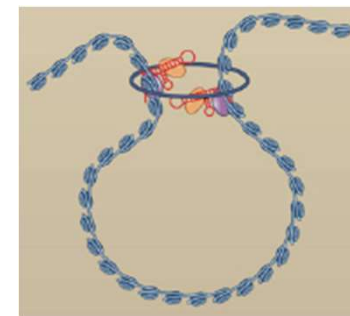
Kotranskrypcyjna rekrutacja czynników modyfikujących chromatynę



Chromatin nucleation

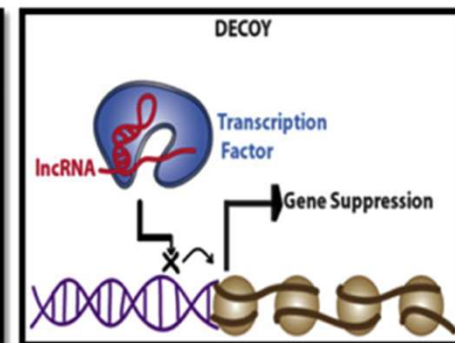
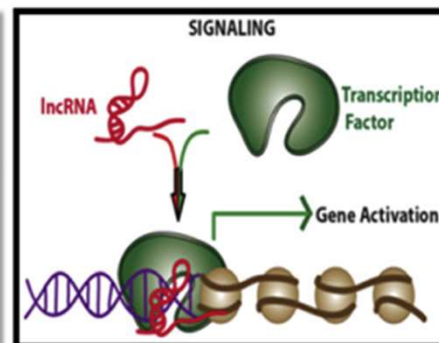
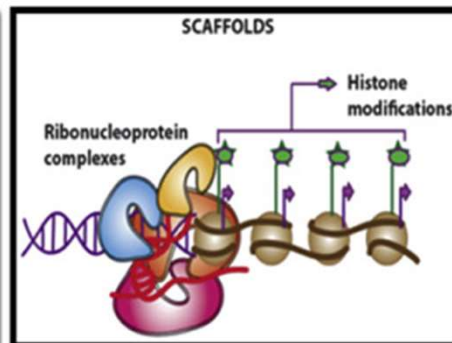
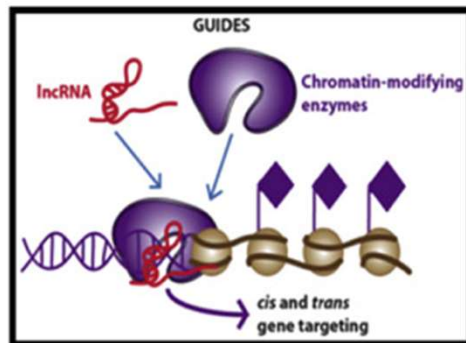


Dynamiczne formowanie struktur w jądrze komórkowym: *paraspeckles, nuclear bodies*



Tworzenie pętli chromatyny (*chromatin loops*)

Nagano & Fraser, Cell, 2011



- Przewodniki (*guides*) dla czynników modyfikujących chromatynę
- Czynniki transkrypcyjne
- Szkielet do tworzenia struktur RNP

Mechanizmy działania lncRNA

a

1. RNA-Protein



2. DNA-RNA



3. Protein-DNA

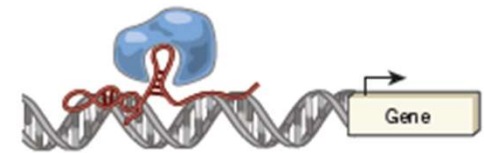


4. RNA-RNA

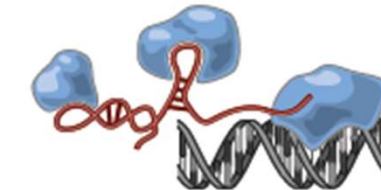


b

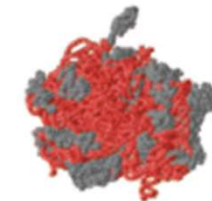
1 + 2 = DHFR



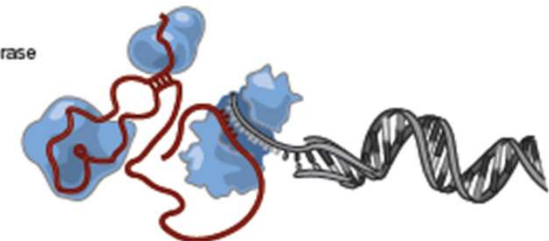
1 + 3 = Hotaïr and Xist



1 + 4 = Ribosome

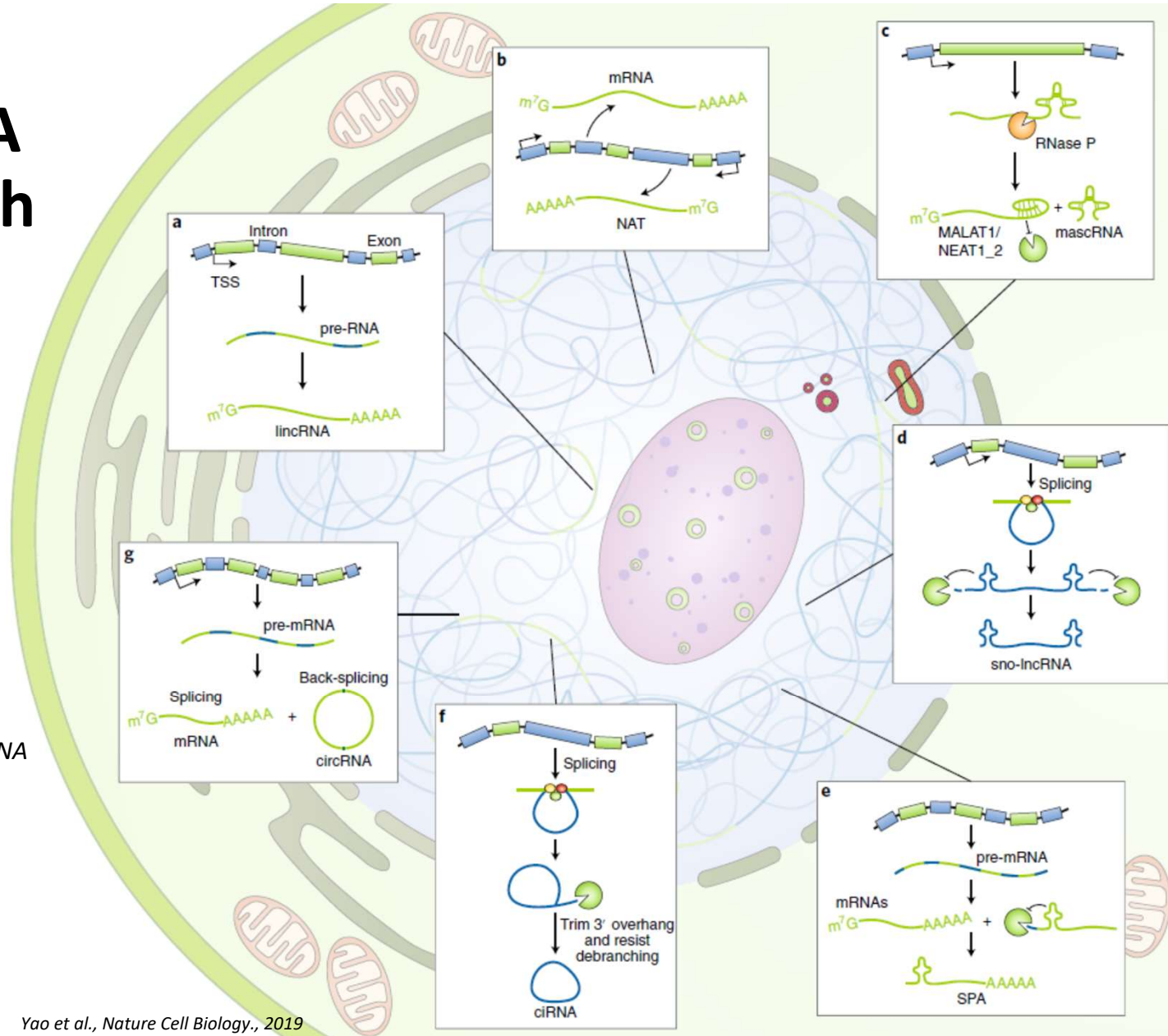


1 + 2 + 3 = Telomerase



Różnorodność lncRNA w komórkach ssaczych

- a. **lincRNA** – *large intervening/intergenic ncRNA*
- b. **NAT** – *natural antisense transcripts*
- c. **MALAT1 i NEAT1_2**
- d. **sno-lncRNA** – *snoRNA-ended lncRNA*
- e. **SPA** – *5' snoRNA-ended and 3'-polyadenylated lncRNA*
- f. **ciRNA** – *circular intronic RNA*
- g. **circRNA** – *circular RNA*



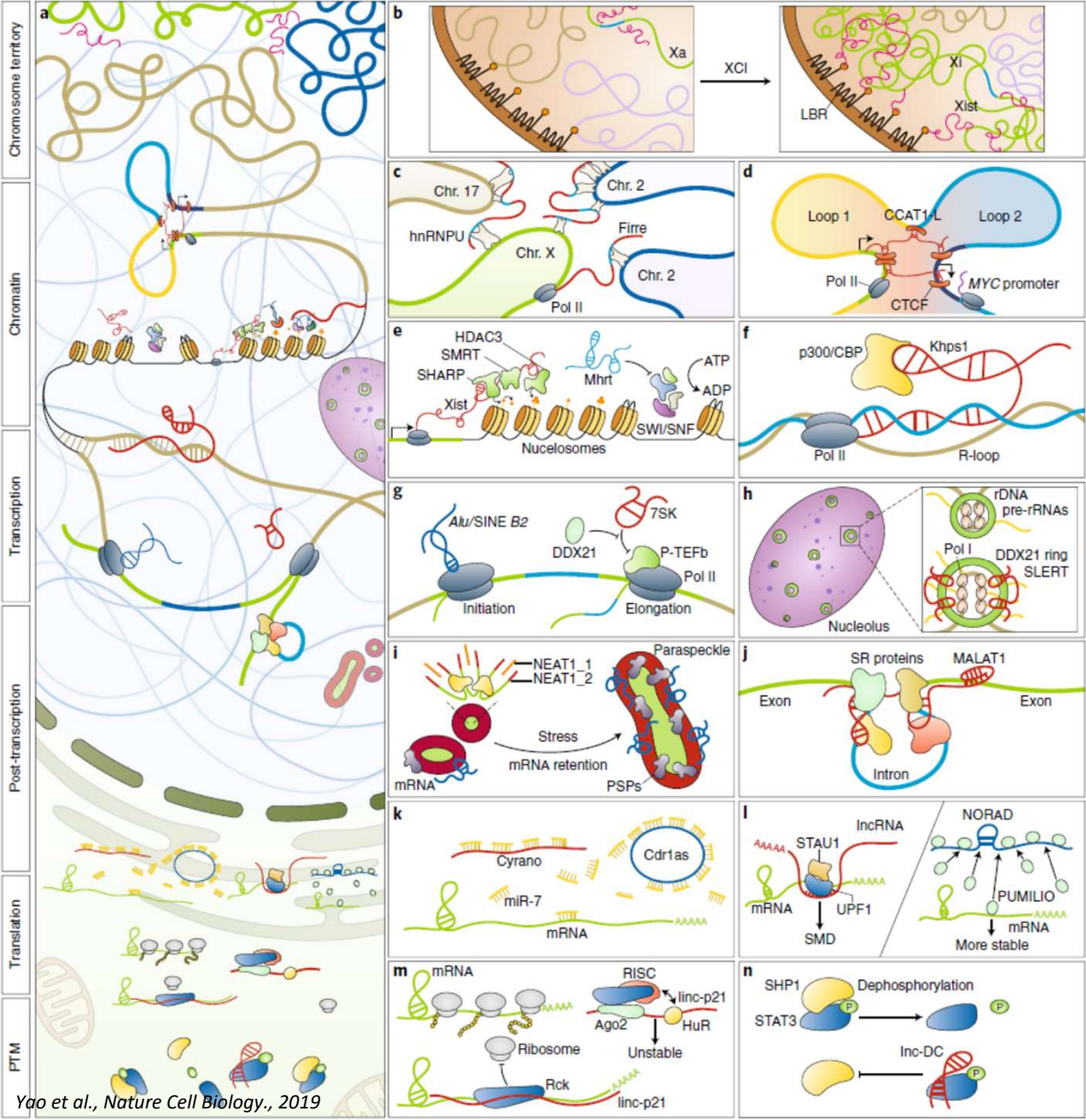
IncRNA

Category	Abbreviation	Specific examples
Classification based on transcript length		
Long noncoding RNA	lncRNA	
Long-intergenic noncoding RNA; large intervening noncoding RNA, long-intervening noncoding RNA		ANRIL [117], H19 [147], HOTAIR [18], HOTTIP [148], lincRNA-p21 [149], XIST [150], Paupar [151]
Very long intergenic noncoding RNA	vlncRNA	HELLP transcript [42], Vlnc_21, vlnc_185, vlnc_377, vlnc_500 [29]
macroRNA		Airn, Gtl2lt, KCNQOT1, Lncat, Nespas (reviewed in [152]), STAIR1 [28]
Promoter-associated long RNA	PALR	
Classification based on association with annotated protein-coding genes		
Intronic ncRNA; stable intronic sequence RNA; totally intronic RNA, partially intronic RNA	sisRNA, TIN, PIN	
Circular intronic RNAs	ciRNAs	
Sense ncRNA		
Natural antisense ncRNA	asRNA, NAT	BACE1-AS [153], aHIF [154], Tsix [155]
Mirror antisense		Globin antisense [67]
Exonic circular RNAs	ecircRNAs	cANRIL [118]
Chimeric RNAs, trans-spliced RNAs, exon juxtaposition		
Stand-alone ncRNAs made from 3' UTRs	uaRNA	
Chromatin-interlinking RNA	ciRNA	
Transcription start site-associated RNAs	TSSa-RNAs	
Classification based on association with other DNA elements of known function		
Enhancer-associated RNA	eRNA	
Promoter-associated long RNA	PALR	
Upstream antisense RNA	uaRNA	
PROMoter uPstream Transcript	PROMPT	
Telomeric repeat-containing RNA	TERRA	
Classification based on protein-coding RNA resemblance		
mRNA-like noncoding RNAs	mIncRNAs	
Long-intergenic noncoding RNA; large intervening noncoding RNA, long-intervening noncoding RNA	lincRNA	ANRIL [117], H19 [147], HOTAIR [18], HOTTIP [148], lincRNA-p21 [149], XIST [150]
Classification based on association with repeats		
COT-1 repeat RNA		
Long interspersed nuclear element	LINE 1/2	
Transcribed endogenous retroviruses		
Expressed Satellite Repeats		
Non-coding RNA driven by promoters within repeats	vlncRNAs, NASTs	Vlnc_21, vlnc_185, vlnc_377, vlnc_500 [29]
Polypurine-repeat-containing RNA	GRC-RNA	
Transcribed pseudogenes		PTENP1 and KRASP1 [86]
Classification based on association with a biochemical pathway or stability		
Nrd1-unterminated transcript	NUT	
miRNA primary transcripts		H19 [166]
piRNA primary transcripts		
Cryptic unstable transcript	CUT	
PROMoter uPstream Transcript	PROMPT	
Xrn1-sensitive unstable transcript	XUT	
Stable Uncharacterized Transcript, Stable Unannotated Transcript	SUT	
Classification based on sequence and structure conservation		
Transcribed-ultraconserved regions	T-UCR	UCR106 [95]
Hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcript	HINCUT	
Long-intergenic noncoding RNA; large intervening noncoding RNA, long-intervening noncoding RNA	lincRNA	HOTAIR [18], HOTTIP [148]
RNA-Z regions		
EvoFold regions		

Category	Abbreviation	Specific examples
Classification based on expression in different biological states		
Long stress-induced noncoding transcript	LSINCT	
Hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcript	HINCUT	
Non-Annotated Stem Transcript	NAST	
Classification based on association with subcellular structures		
Chromatin-associated RNA	CAR	
Chromatin-interlinking RNA	ciRNA	
Nuclear bodies associated RNAs		
PRC2 associated RNAs		
Classification based on function		
Long noncoding RNAs with enhancer-like function; ncRNA-activating	ncRNA-a	ncRNA-a7 [108]
miRNA primary transcripts		H19 [166]
piRNA primary transcripts		
Competing endogenous RNA	ceRNA	PTENP1 and KRASP1
InRNA	InaRNA function	
ANRIL Xist HOTAIR COLDIAIR Kcnq1ot1	Target PRC1 or PRC1 in cis to mediate histone methylation in transcriptional gene silencing for dosage compensation, imprinting and developmental gene expression; ANRIL affects cell senescence	
MALAT1	Sequesters SR splicing factors to regulate alternative splicing	
PANDA	p53-inducible, titrates away NF-YA to favor survival th during DNA damage	
TERRA	Controls telomerase access to telomeres in a cell-cycle manner	
pRNA	Targets DNMT3b in cis to the rDNA locus via an RNA:DNA:DNA triplex for DNA methylation and gene silencing	
SRA	Enhances insulator function of CTCF	
Gas5	Binds to glucocorticoid receptor as a decoy and titrates GR away from target genes	
lincRNA-p21	Targets hnRNP-K in trans to mediate p53-dependent gene repression	
HOTTIP	Bind to and localizes the MLL complex and H3K4me3 via chromosomal looping for gene activation	
1/2 SBS	Pairs with mRNAs via Alu repeats and targets them into a NMD pathway	
HULC H19 PTENP1	miRNA decoys: HULC induces PRKACB translation, H19 interferes with let-7 activity, PTENP1 depresses PTEN production	
LINK RNAs	Cellular signalling, activate of kinases, promote protein phoshorylation	
1/2-sbsRNA TINCR	STAUFEN1-dependent mRNA decay, induce mRNA degradation or stabilisation	
HOTAIR NRON	Protein turnover , stimulate degradation of Snurportin-1 and Ataxin-1 (HOTAIR) or HIV proteins tat (NRON_	

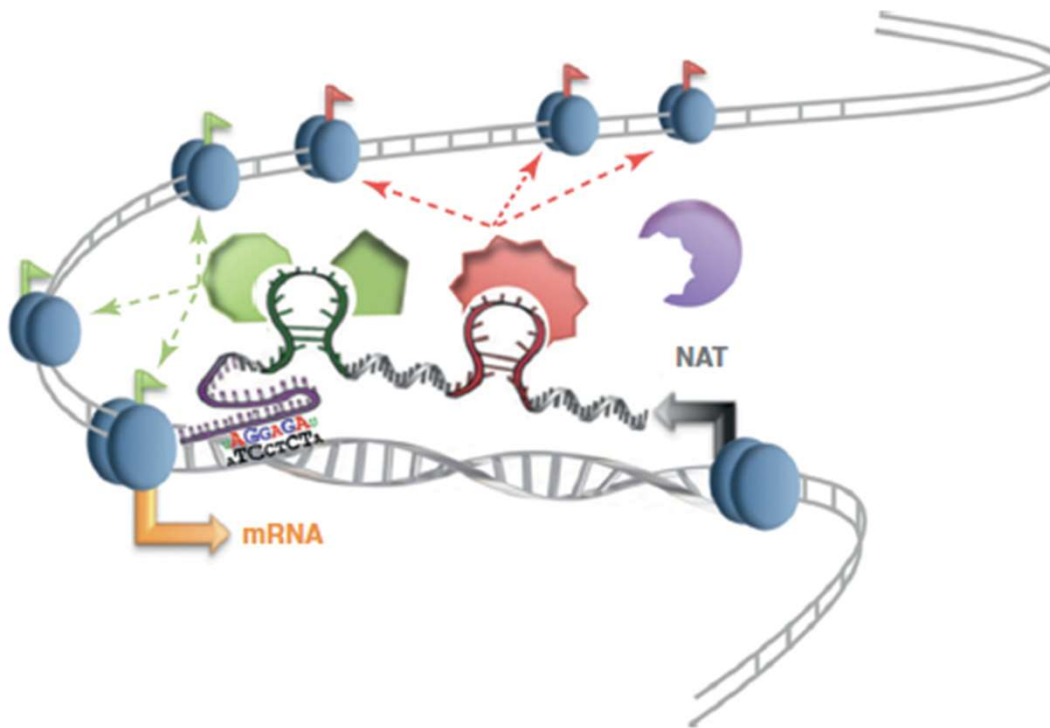
Funkcje lncRNA

- b. Xist → inaktywacja chromosomu X (XCI)
- c. transkrypty Firre regulują oddziaływania między odległymi regionami w genomie *in trans*
- d. CCAT1-L kontroluje tworzenie pętli chromatyny między enhancerami i promotorem MYC *in cis*
- e. lncRNAs regulują dostępność chromatyny
- f. Khps1 wzmacnia transkrypcję Pol II poprzez tworzenie pętli R (*R-loops*)
- g. lncRNA zakłócają transkrypcję Pol II
- h. SLERT promuje transkrypcję Pol I poprzez wiązanie DDX21
- i. strukturalny lncRNA NEAT1 indukuje tworzenie paraspeckles
- j. MALAT1 zmienia fosforylację białek SR wpływając na splicing pre-mRNA
- k. sieć regulacyjna składająca się z różnych typów ncRNA → Cyrano wiąże miR-7 i zapobiega represji przez miR-7 jego docelowych RNA (Cdr1as circRNA)
- l. lncRNA regulują stabilność mRNA poprzez łączenie się z białkami biorącymi udział w degradacji mRNA
- m. lncRNA regulują translację
- n. lncRNA regulują modyfikacje post-translacyjne



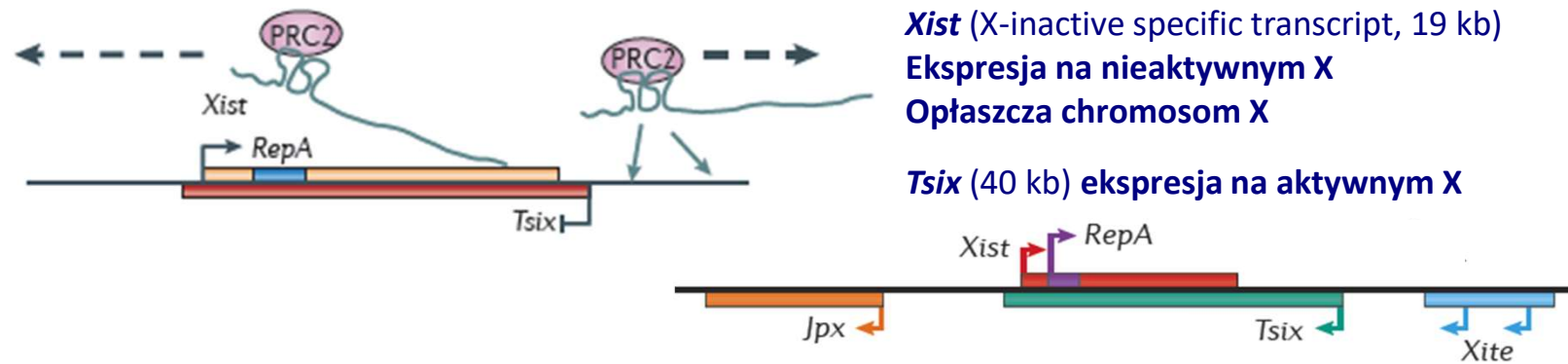
Yao et al., Nature Cell Biology., 2019

Regulacja epigenetyczna przez NAT (*natural antisense transcripts*)



- NAT regulują stan epigenetyczny *loci* genomowych, z których są transkrybowane (regulacja *in cis*).
- Specyficzna struktura drugorzędowa NAT umożliwia oddziaływanie z różnymi enzymami modyfikującymi chromatinę, koordynując w ten sposób ich działanie i kierując określonymi modyfikacjami epigenetycznymi pobliskiej chromatinę.
- Specyficzność regulowanego *locus* jest zapewniona dzięki interakcjom (komplementarność) między NAT i DNA.

Xist ncRNA – inaktywacja chromosomu x



- *Dosage compensation* – jedna kopia chromosomu u samic jest epigenetycznie wyciszana
- RepA (*repeat element*) 1.6kb ncRNA (5' Xist) wiąże kompleksy PRC2 (Polycomb)
- Tsix – chroni aktywny chromosom X przed wyciszeniem; łączy reaktywację X i przeprogramowanie komórek macierzystych
- Tsix i Xite kontrolują wybór alleli i wyznaczają aktywny chromosom X
- Jpx i RepA są pozytywnymi regulatorami Xist

Inaktywacja chromosomu X: wyciszenie epigenetyczne

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

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

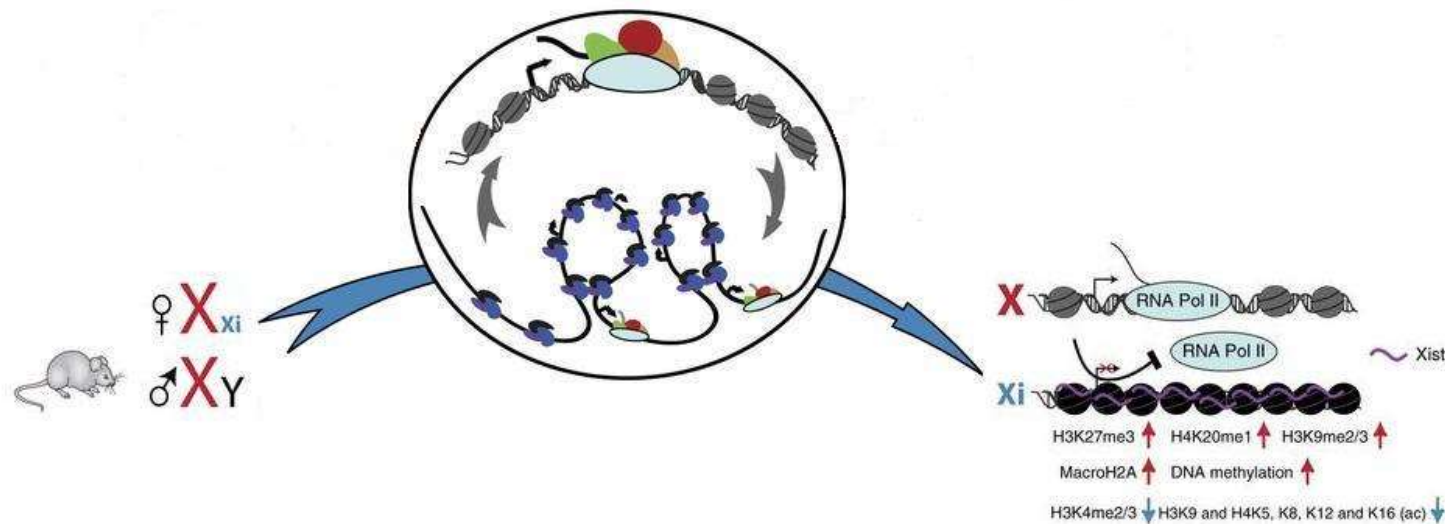
metylacja histonu H3:

H3K9

H3K27

deacetylacja histonu H4 (?)

metylacja DNA /już po inaktywacji chromosomu

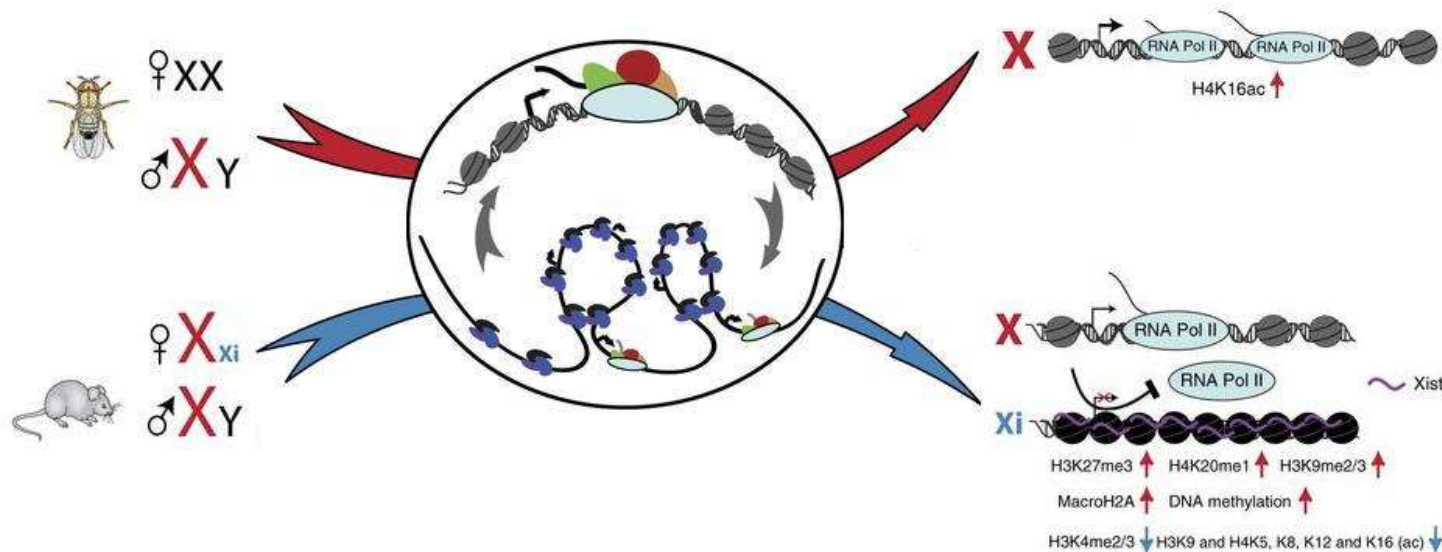


Ferrari F., Alekseyenko A.A., Park P.J., Kuroda M.I. (2013) Nat. Struct. Mol. Biol.

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



Ferrari F., Alekseyenko A.A., Park P.J., Kuroda M.I. (2013) Nat. Struct. Mol. Biol.

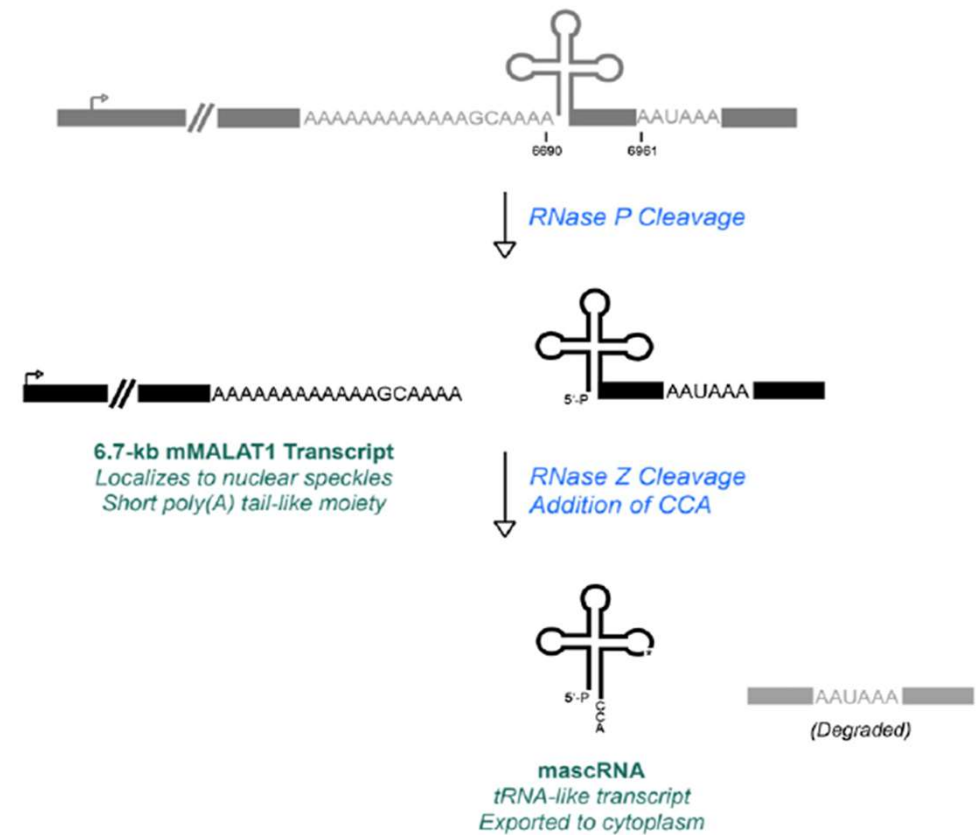
MALAT1/mascRNA

MALAT1:

- *metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1* (NEAT2 w ludzkich komórkach) – transkrypt związany z gruczolakiem płuc
- wzbogacony w strukturach subjądrowych zwanych *nuclear speckles*
- przypuszczalnie reguluje alternatywny splicing (asocjacja z białkami SR)

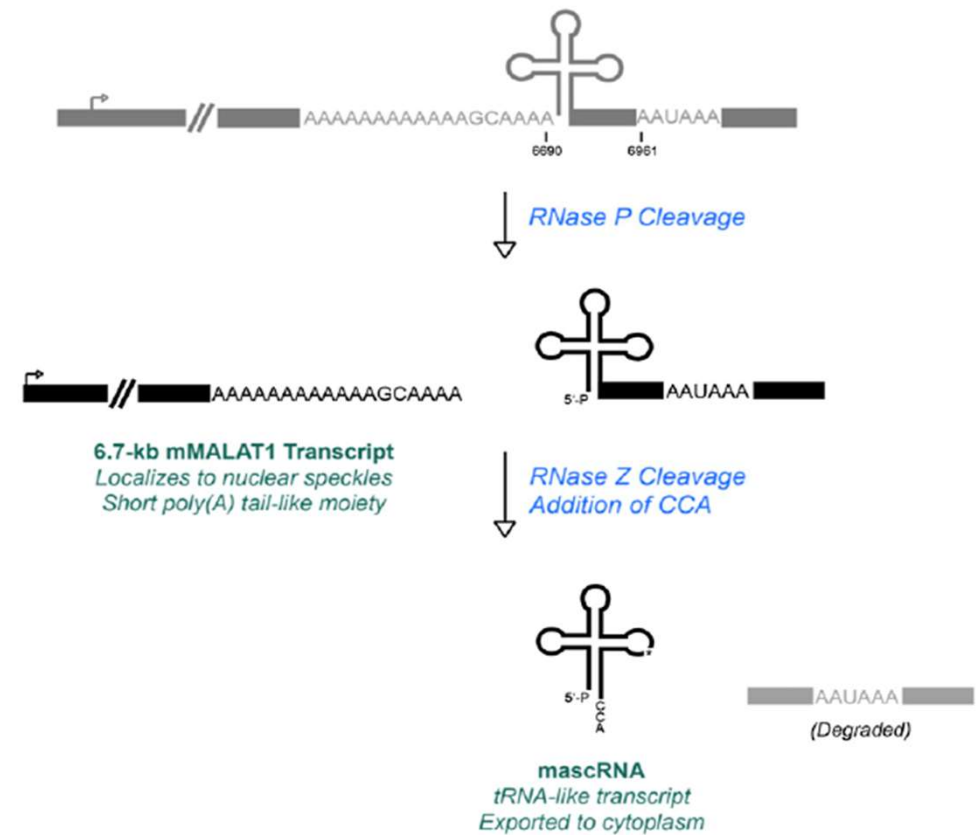
mascRNA:

- w cytoplazmie, powstaje z prekursora pre-MALAT1, funkcja nieznana

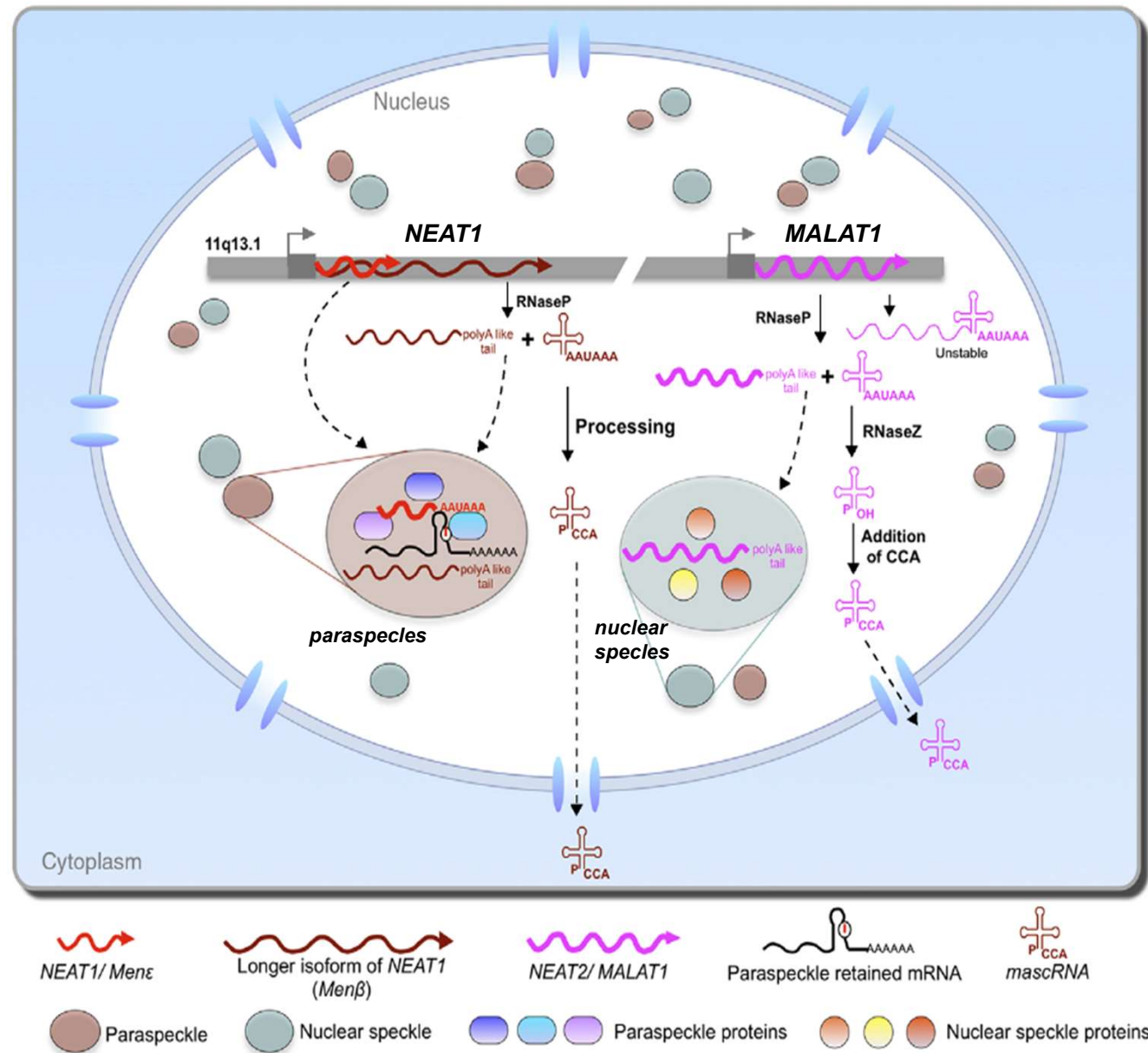


MALAT1/mascRNA

- Poliadenylowany transkrypt Pol II, prekursor dojrzałego MALAT1 i mascRNA
- Obróbka prekursora przez RNazę P (5') i RNazę Z (3') uwalnia 6.7 kb MALAT1 i mascRNA (podobny do tRNA), eksportowany do cytoplazmy po dodaniu CCA

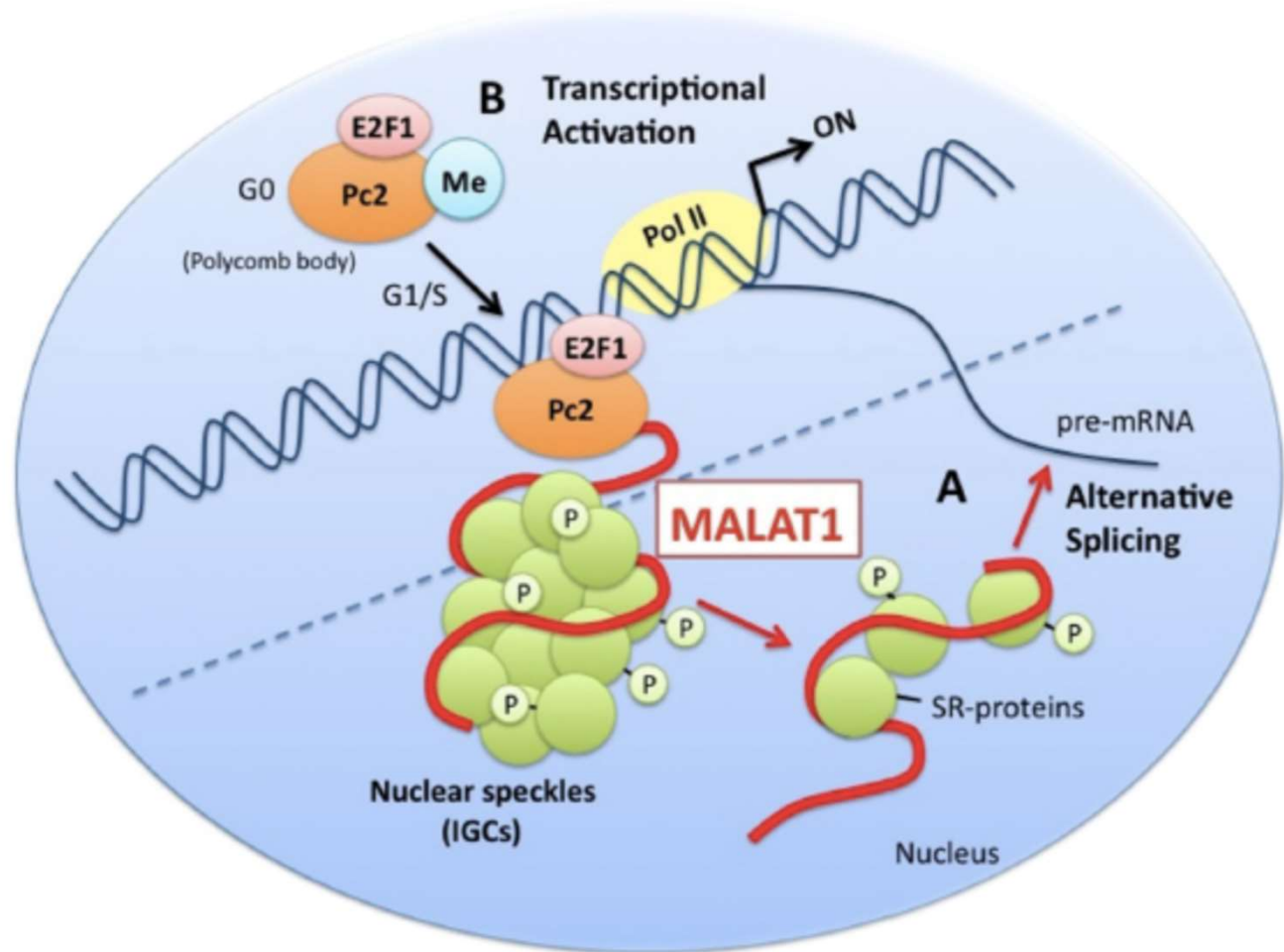


NEAT1 i MALAT1

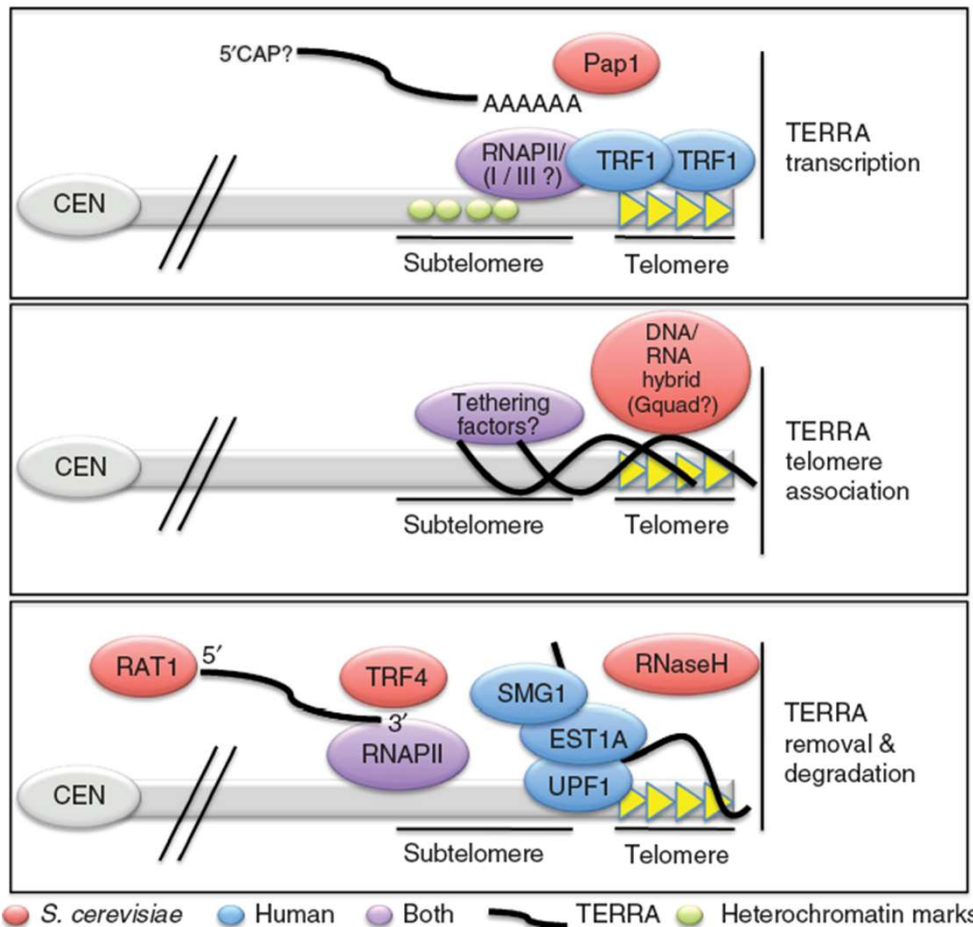


Funkcje MALAT1

- Aktywacja transkrypcji: MALAT1 oddziałuje z niemetylowaną formą białka Polycomb 2 (Pc2), promując sumoilację E2F1, jako sygnał do aktywacji programu wzrostu komórek.
- MALAT1 kontroluje również splicing poprzez modulowanie poziomów fosforylacji czynników splicingu (SR-proteins)

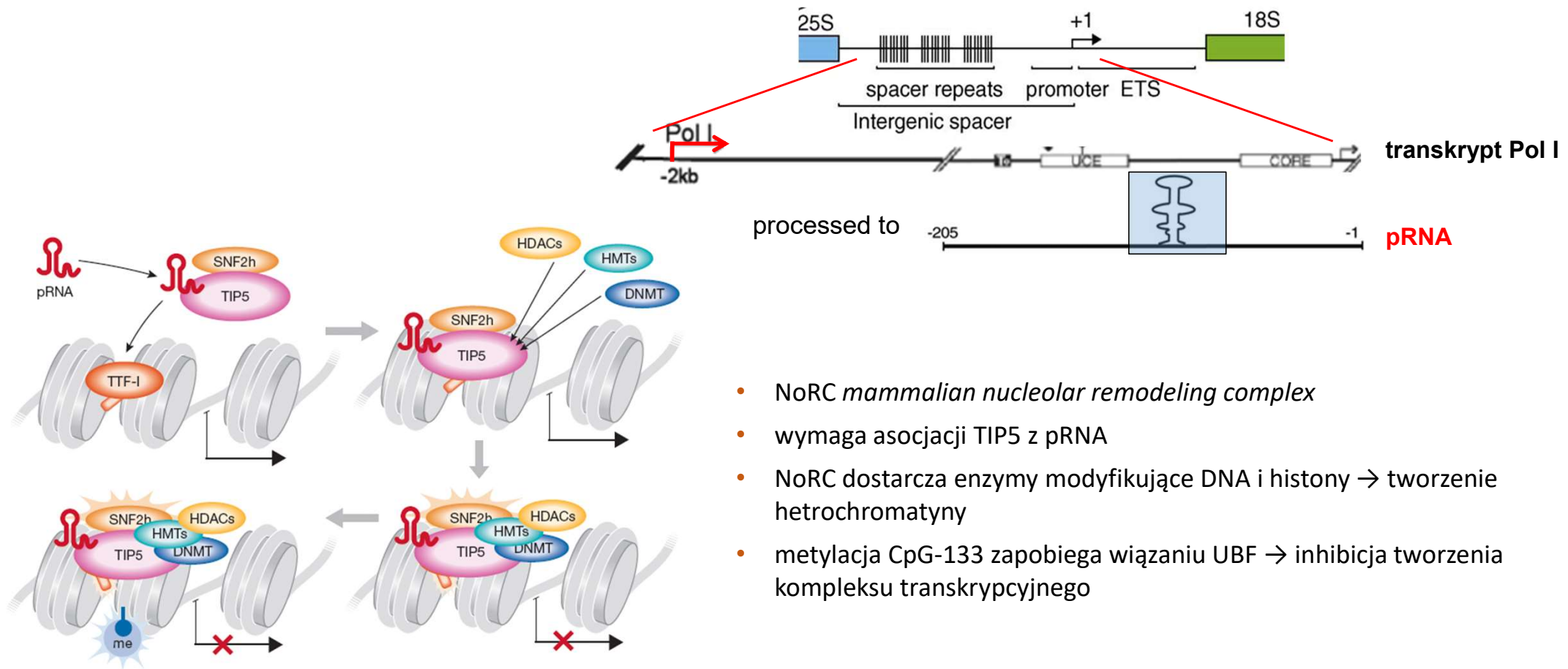


TERRA – *telomeric repeat-containing RNA*

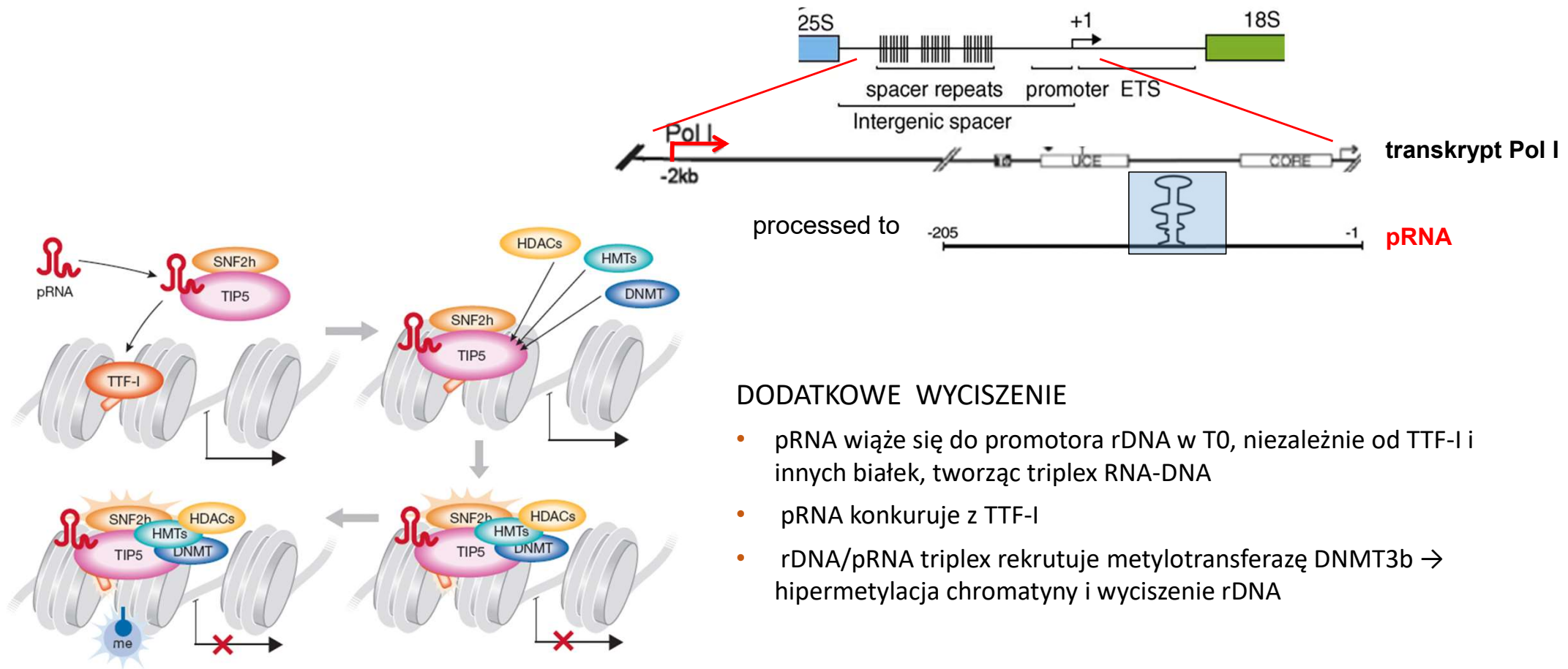


- w komórkach drożdżowych i ludzkich
- poliadenylowany transkrypt Pol II
- obejmuje regiony subtelomeryczne i telomeryczne
- komponent heterochromatyny telomerowej
- asocjacja z telomerami i białkami telomerowymi (Trf1, Trf2)
- regulowany przez czynniki *RNA surveillance* (Rat1, Trf4, czynniki NMD, RNaza H)
- reguluje telomerazę (skręcanie telomerów) poprzez tworzenie hybryd RNA-DNA
- działa w procesach przebudowy chromatyny (rozwój i różnicowanie)
- wpływ na replikację telomerów
- podwyższony u pacjentów ICF (*Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies*)

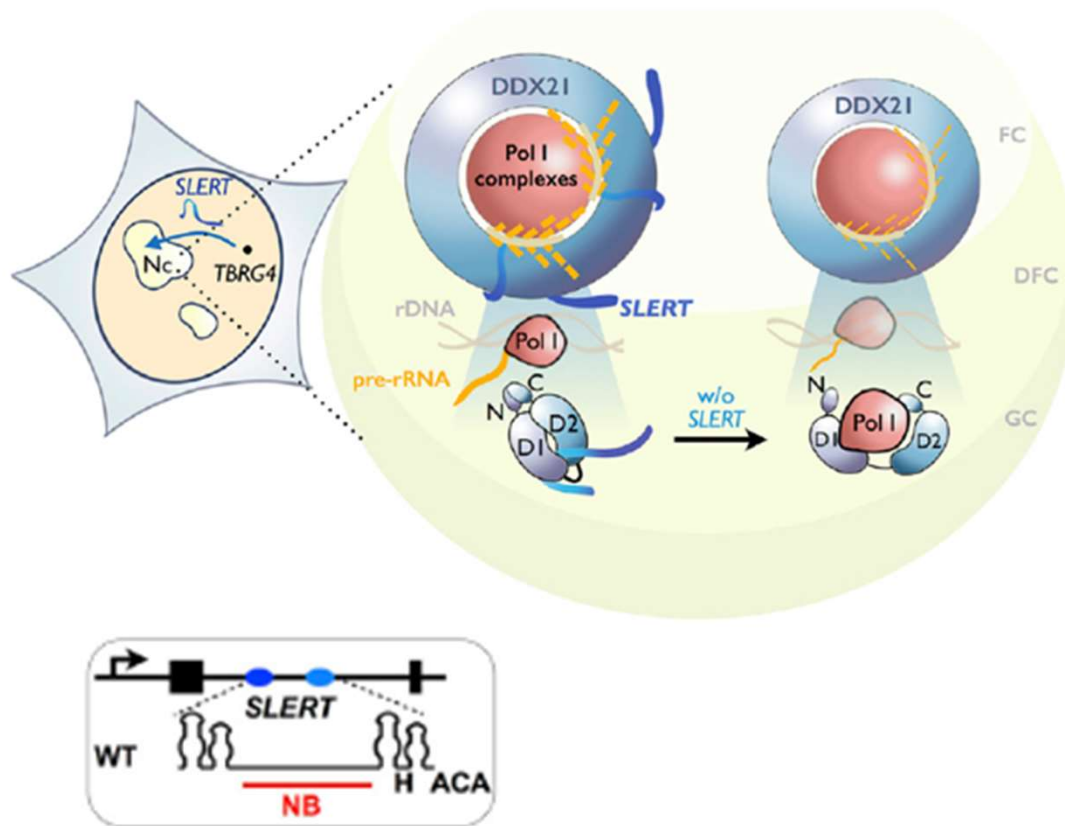
Wyciszanie rDNA przez pRNA i NoRC



Wyciszanie rDNA przez pRNA i NoRC



SLERT – transkrypcja Pol I (człowiek)



- **SLERT**- lncRNA, zakończony **boxH/ACA** snoRNA
- snoRNA na obydwu końcach SLERT są potrzebne do biogenezy i lokalizacji jądrowej
- **helikaza DDX21** RNA tworzy struktury pierścieniowe wokół kompleksów Pol I → supresja transkrypcji pre-rRNA
- SLERT wiąże się do DDX21 i moduluje pierścienie DDX21 w celu obniżenia supresji Pol I (więc SLERT pozytywnie wpływa na transkrypcję rDNA)
- interakcje SLERT-DDX21 regulują różnicową ekspresję rDNA

Różnorodność funkcji ncRNA

