

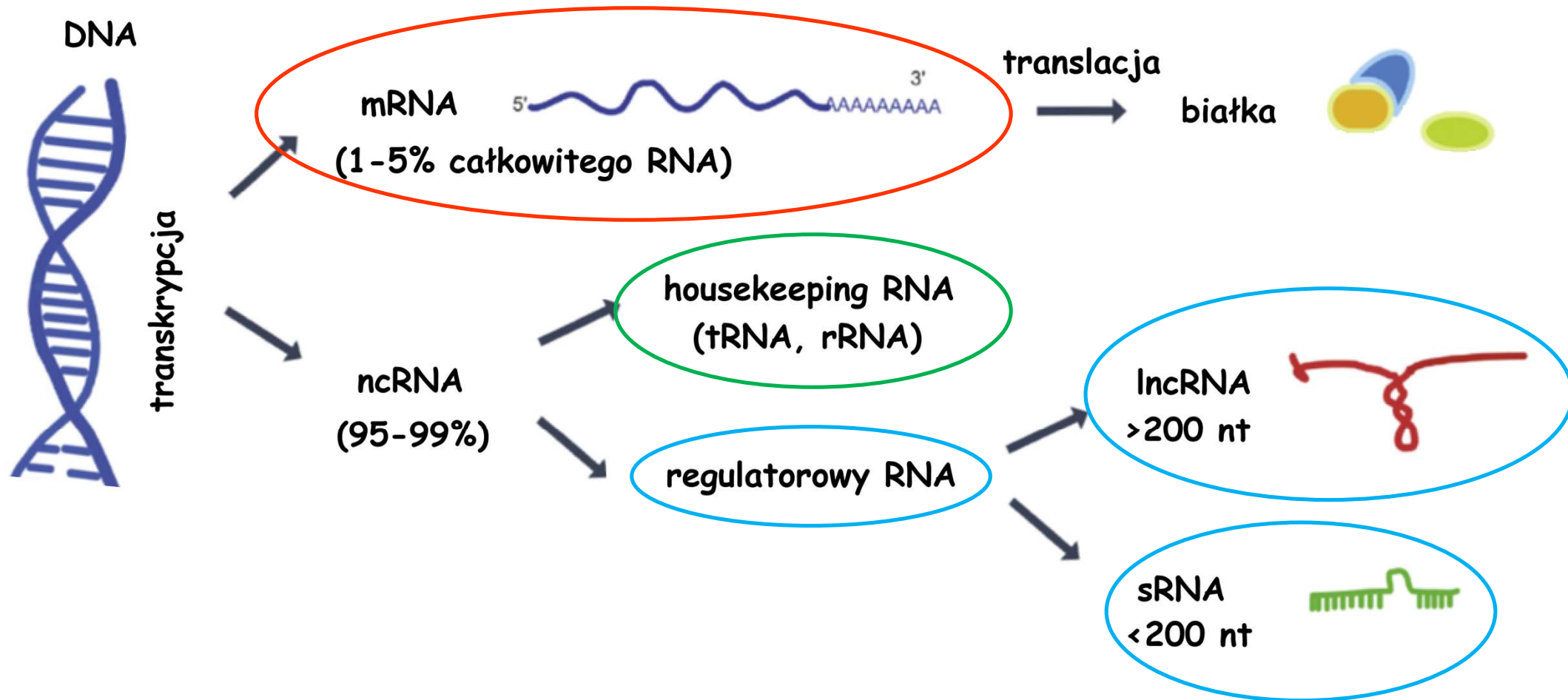
Niekodujący RNA (ncRNA)

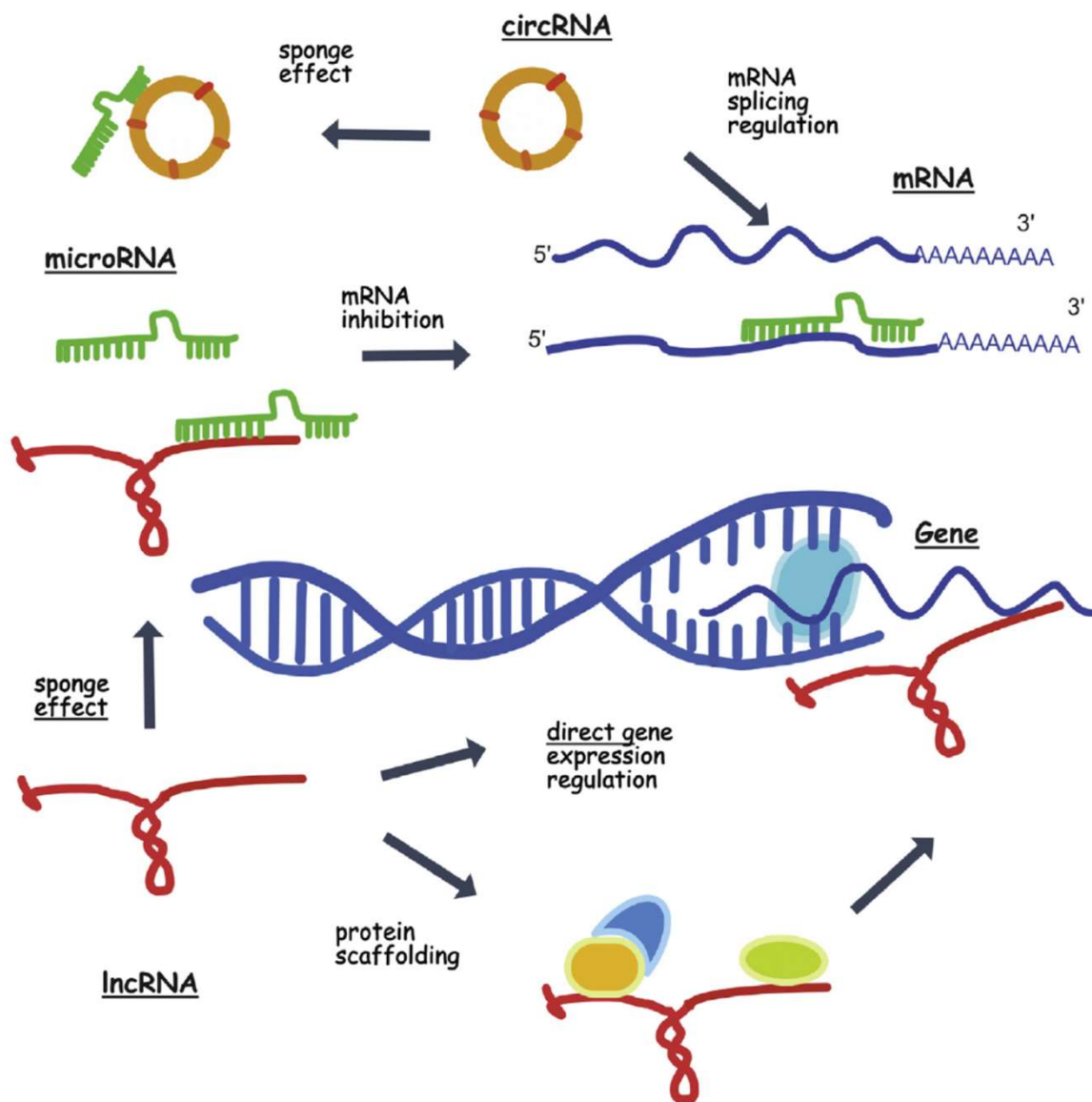


Molekularne Techniki Analizy RNA

Monika Zakrzewska-Płaczek

28.10.2022





Niekodujące RNA wpływają na regulację ekspresji genów poprzez różne mechanizmy:

miRNA i **lncRNA** mogą bezpośrednio regulować ekspresję genów przez wiązanie się:

- z mRNA (miRNA)
- z genem lub nowo-powstającym transkryptem (lncRNA)
- z białkami modyfikującymi histony, rekrutując je do genu (lncRNA)

lncRNA i mikroRNA mogą również regulować siebie nawzajem poprzez tzw. mechanizm „gąbki” (*sponge effect*)

CircRNA regulują mikroRNA poprzez mechanizm „gąbki” i ekspresję genów poprzez *splicing mRNA*.

Niekodujący RNA



Housekeeping RNA

Konstrytuwna ekspresja

Niezbędne do normalnego funkcjonowania komórki

tRNA i rRNA – translacja

snRNA – komponenty splicesosomu, pre-mRNA splicing

snoRNA – dojrzewanie i modyfikacja rRNA

scaRNA (specyficzne dla CB)

RNA wchodzące w skład **RNazy P** i **RNazy MRP** –

endonukleazy: dojrzewanie tRNA i rRNA

Signal Recognition Particle **SRP RNA** – transport białek do ER

tmRNA (hybrydy tRNA-mRNA)- kierowanie nowo-syntetyzowanych białek (nascent proteins) do degradacji

gRNA – guide RNA (RNA editing)

telomerase RNA – synteza telomerów

Regulatorowy RNA

Ekspresja okresowa

np. w odpowiedzi na bodziec, w określonej fazie rozwoju, cyklu komórkowego

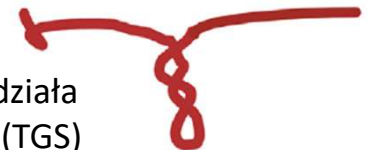
Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji
lub translacji



sRNA: siRNA (exo-siRNAs i endo-siRNAs; ta-siRNA; nat-siRNA; lsiRNAs); miRNA; piRNA

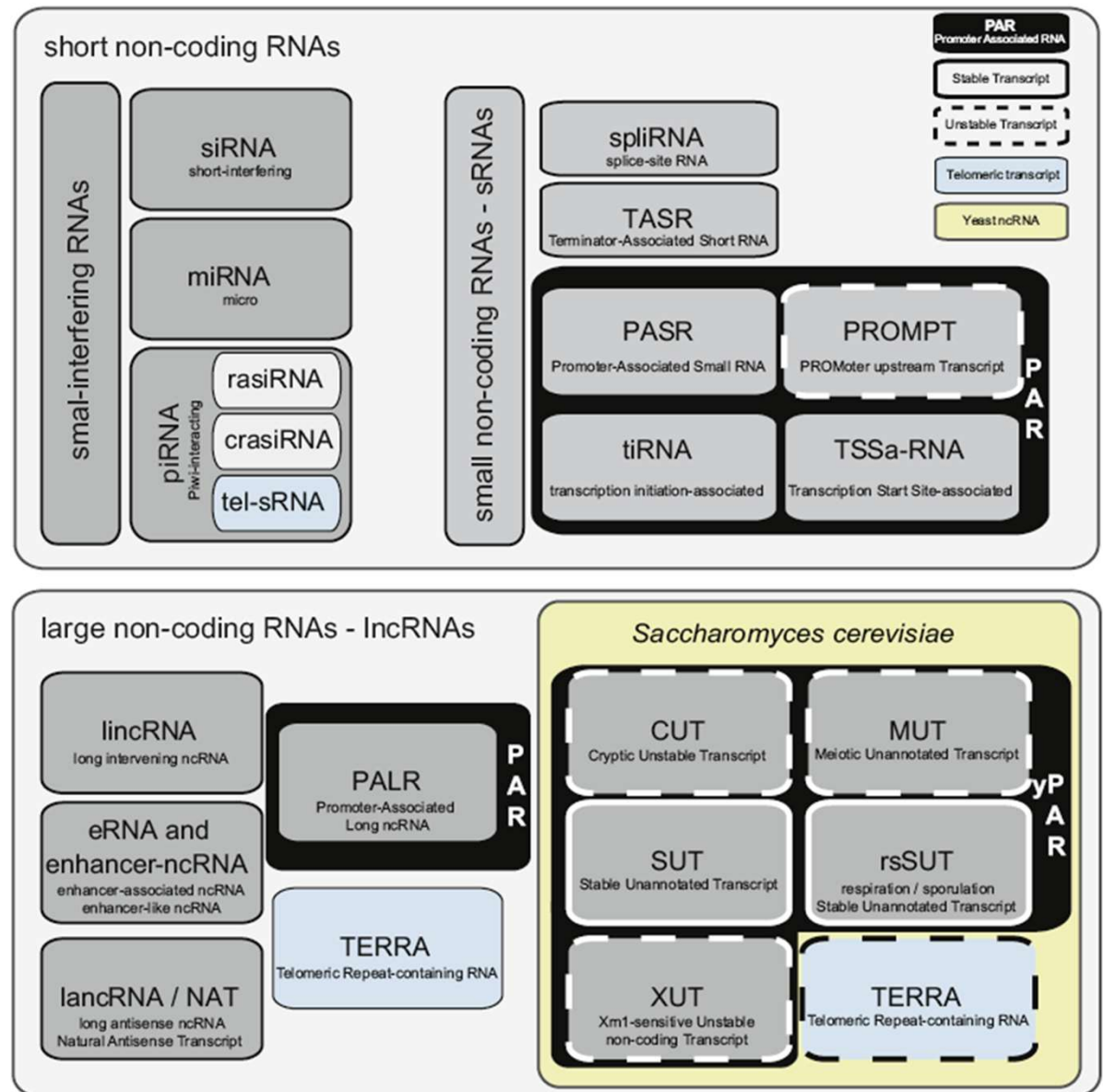
→ działają w procesach wyciszania ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym (TGS – transcriptional gene silencing) i post-transkrypcyjnym (PTGS – post-transcriptional gene silencing)

lncRNA – mniej poznany, przeważnie działa w transkrypcyjnym wyciszaniu genów (TGS) na poziomie chromatyny



Podział ncRNA na podstawie wielkości cząsteczek:

short ncRNA <200nt
long ncRNA >200nt



Małe RNA (*small RNAs, sRNAs, smRNAs*)

sRNA – 21-30 nt 

wyciszanie ekspresji genów:

(*gene silencing, RNA silencing*)

post-transkrypcyjne

(*post-transcriptional gene silencing, PTGS*)

degradacja mRNA, inhibicja translacji

transkrypcyjne

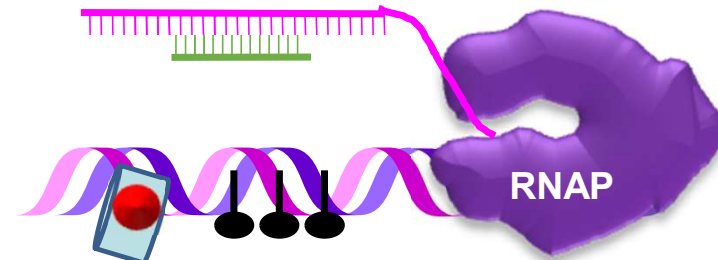
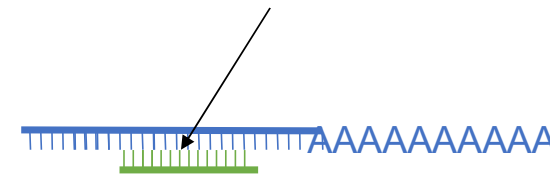
(*transcriptional gene silencing, TGS*)

epigenetyczne modyfikacje chromatyny

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

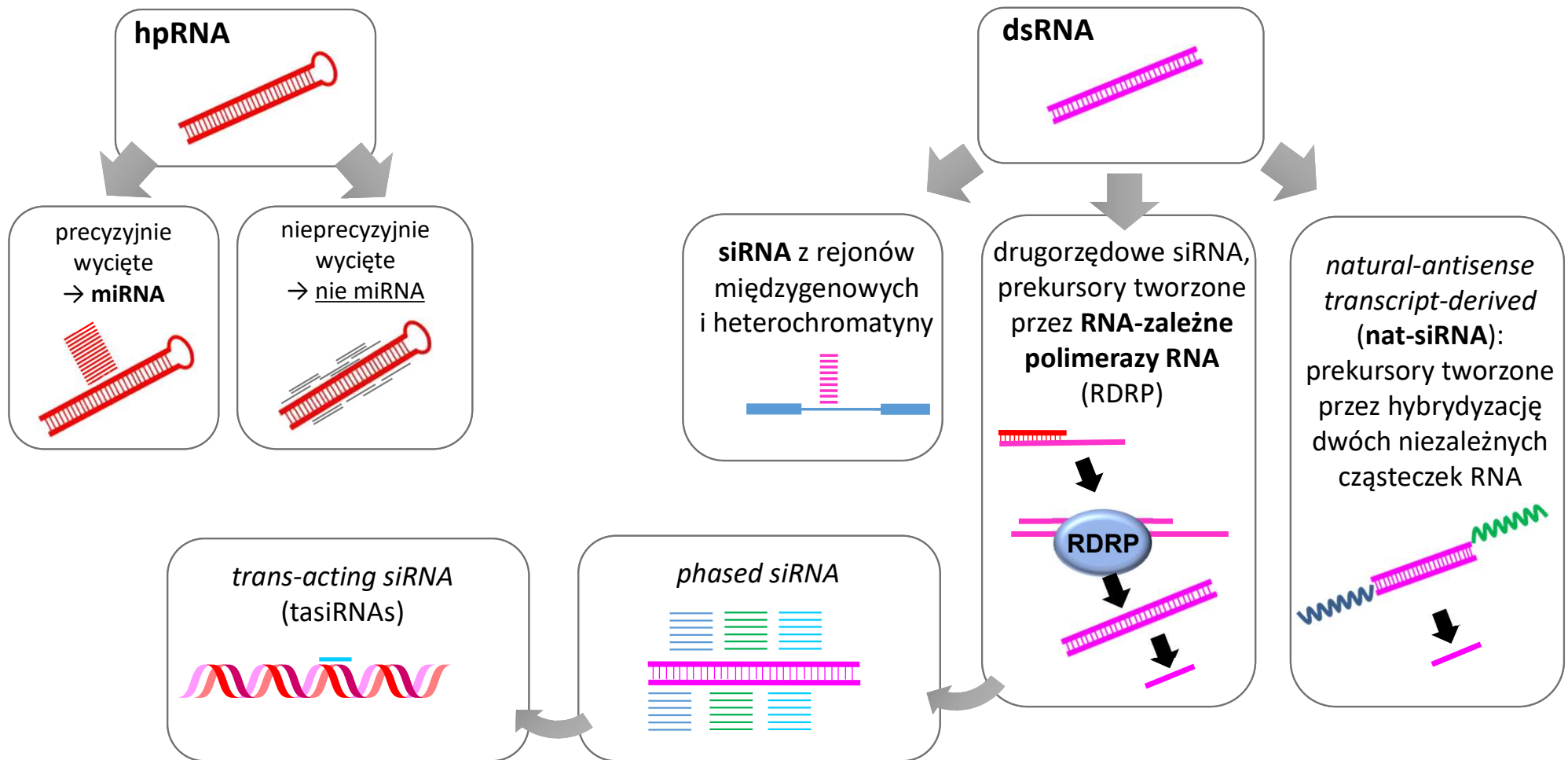
Specyficzność wyciszenia

określonych sekwencji zapewniona jest dzięki komplementarności zasad między wyciszającym sRNA, a RNA ulegającym wyciszeniu



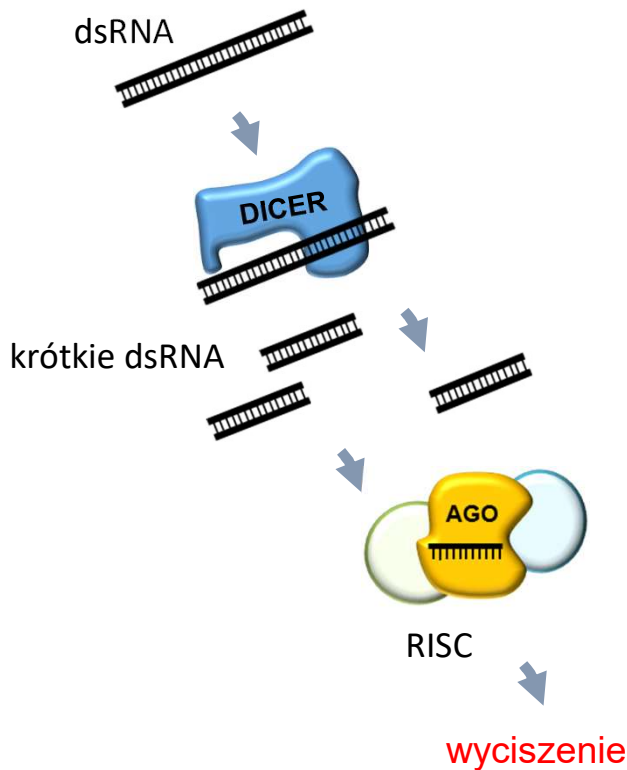
modyfikacja histonów, metylacja DNA

Małe RNA mogą pochodzić ze struktur spinki lub dsRNA



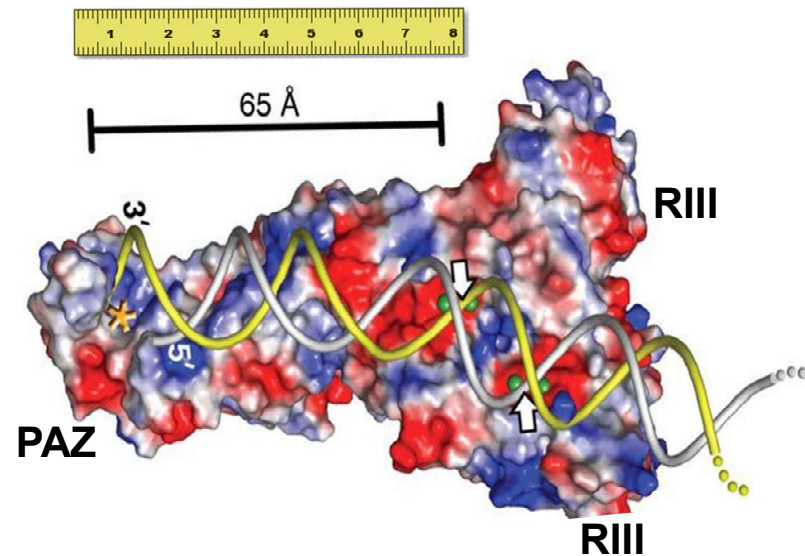
Białka *Dicer* i *Argonaute* (AGO)

dsRNA jest cięty przez **DICER**
na krótkie dwuniciowe cząsteczki RNA,
które są wiązane przez jedno z białek
rodziny **AGO**



Białka **DICER**

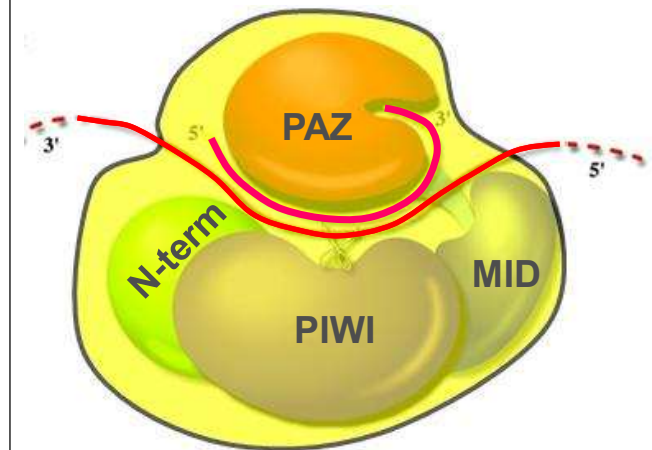
Podczas biogenezy siRNA i miRNA, tną długie dsRNA
lub RNA o strukturze spinki (*hairpin*) na fragmenty



Struktura białka Dicer umożliwia równomierne
rozcinać RNA na fragmenty o takiej samej długości
(21 – 25nt)

Białka **AGO**

wiążą sRNA i mRNA



domena PIWI:
struktura podobna do RNazy H
w niektórych białkach Ago → cięcie RNA
związanego z sRNA (*slicer activity*)

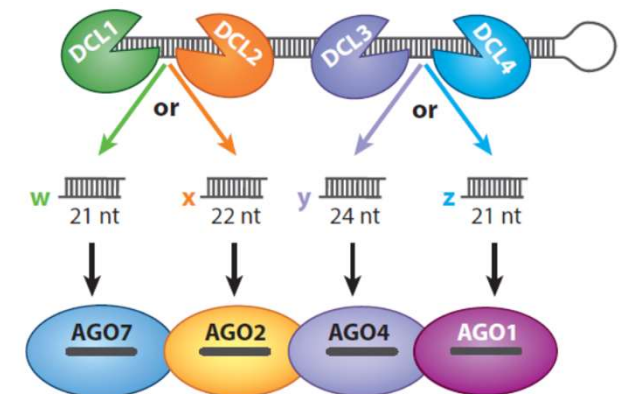
MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006) *Science*
Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998) *EMBO J.*
Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004) *Science*

Białka DICER i AGO u różnych organizmów

	Species	AGO-PIWI-like		Dicer-like	RDRP
		AGO	PIWI		
Plantae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10	-	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)	-

Arabidopsis thaliana:

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

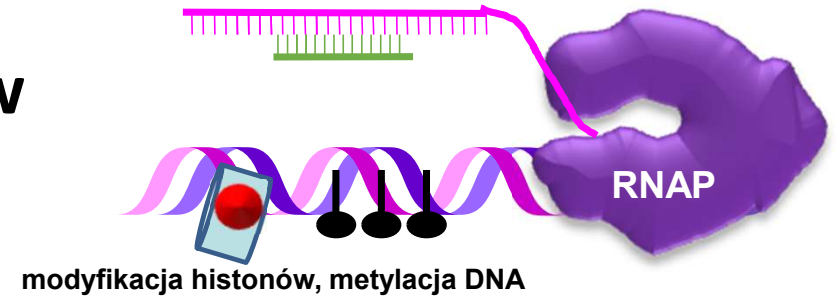


PTGS: post-transkrypcyjne wyciszanie genów



miRNA (<i>microRNA</i>)	rośliny, zwierzęta, wirusy, <i>Protista</i>	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; <i>niezależne od Drosha</i>					
siRNA (<i>small interfering RNA</i>) – większość działa <i>in cis</i> , za wyjątkiem <i>tasiRNA</i>					
exo-siRNA (<i>pochodzenia egzogennego</i>)	rośliny, grzyby, zwierzęta, <i>Protista</i>	21-24nt	Dicer	Transgeniczny, wirusowy lub inny egzogeny RNA	Post-transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, obrona przeciwwirusowa
endo-siRNA (<i>pochodzenia endogennego</i>)	rośliny, grzyby, zwierzęta, <i>Protista</i>	~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 (<i>trans-acting siRNA</i>)	rośliny	21nt	DCL4	TAS RNA cięte przez miRNA	Regulacja post- transkrypcyjna
natsiRNA (<i>natural antisense transcripts-derived siRNA</i>)	rośliny	24nt 21nt	DCL2 DCL1	Transkrypcja dwukierunkowa indukowana stresem	Regulacja genów odpowiedzi na stres

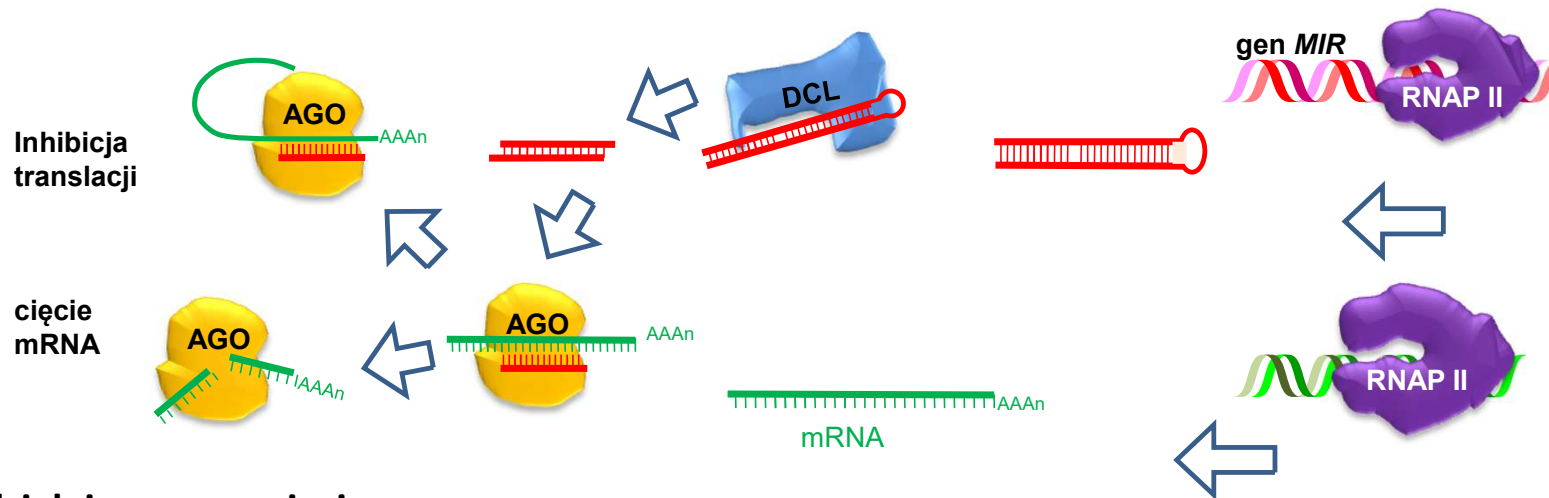
TGS: transkrypcyjne wyciszanie genów



siRNA (small interfering RNA)					
endo-siRNA (pochodzenia endogennego)	rośliny, grzyby, zwierzęta, <i>Protista</i>	~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 rerio</i>	24–30nt	niezależne od Dicer	Długie pierwotne transkrypty (?)	Wyciszanie transpozonów, inne nieznane funkcje

miRNA u roślin

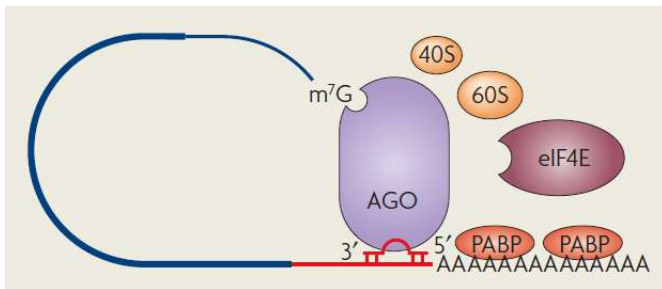
- miRNA są kodowane przez specyficzne geny MIR, ale wpływają na ekspresję innych genów – są cząsteczkami regulatorowymi działającymi *in trans*
- miRNA regulują procesy rozwojowe i fizjologiczne
- uważa się, że miRNA wyewoluowały z siRNA – powstają i dojrzewają w podobny (do pewnego stopnia) sposób



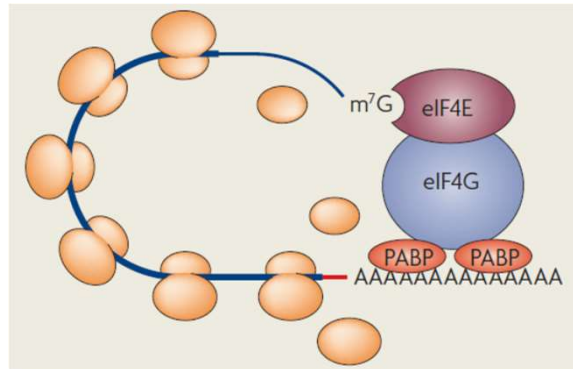
microRNA działają poprzez cięcie mRNA lub inhibicję translacji

miRNA u zwierząt

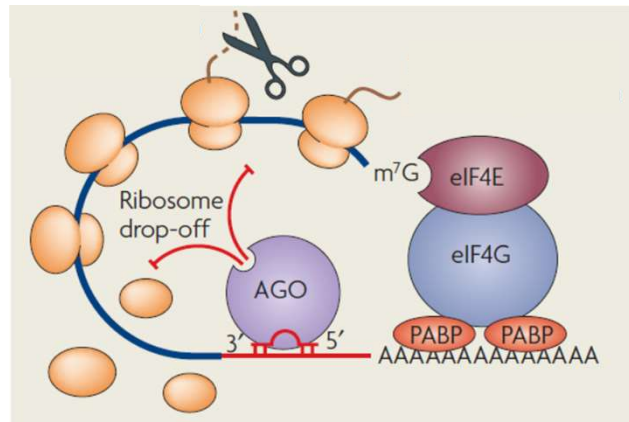
inhibicja inicjacji translacji



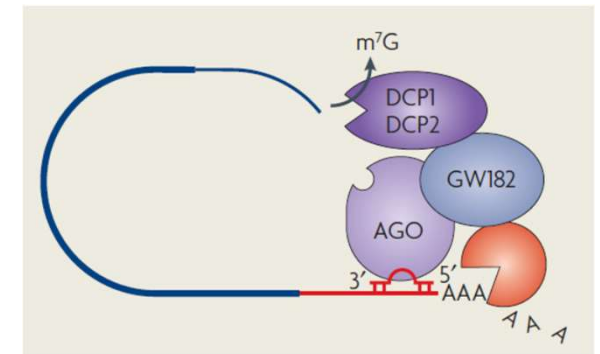
aktywna translacja



inhibicja translacji

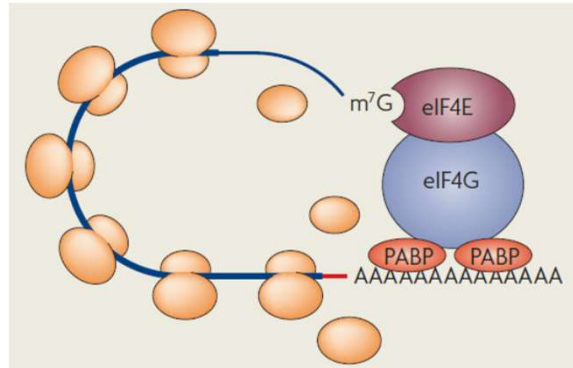


degradacja mRNA

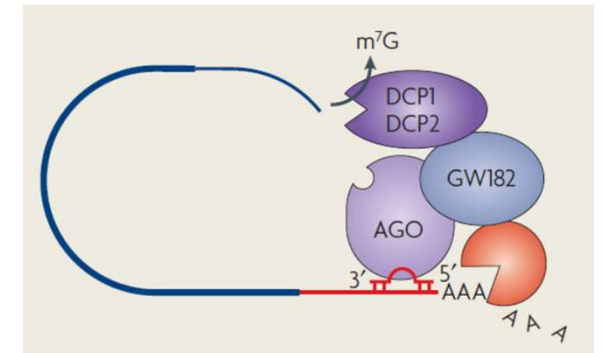


miRNA u zwierząt

aktywna translacja



degradacja mRNA



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

nature

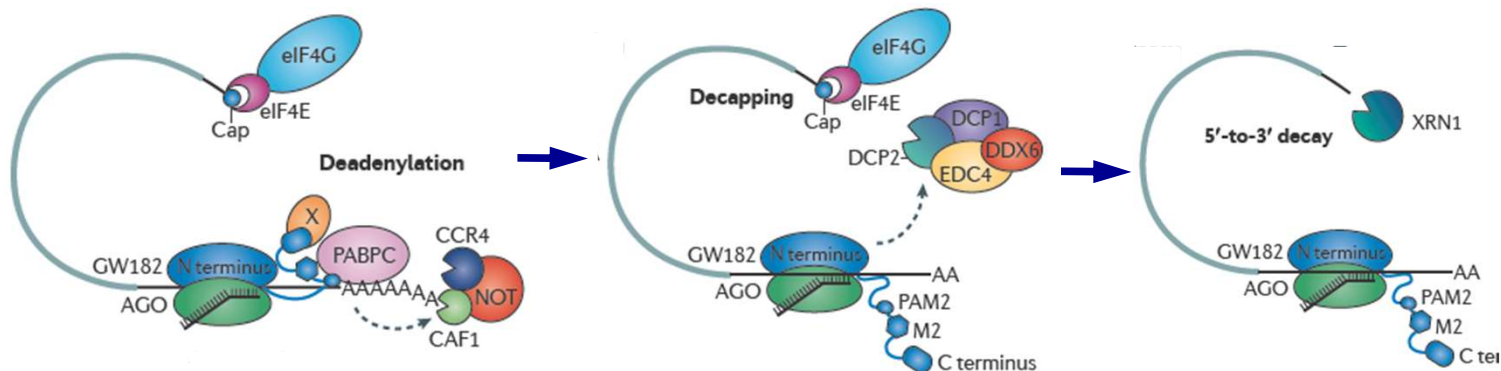
Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels

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

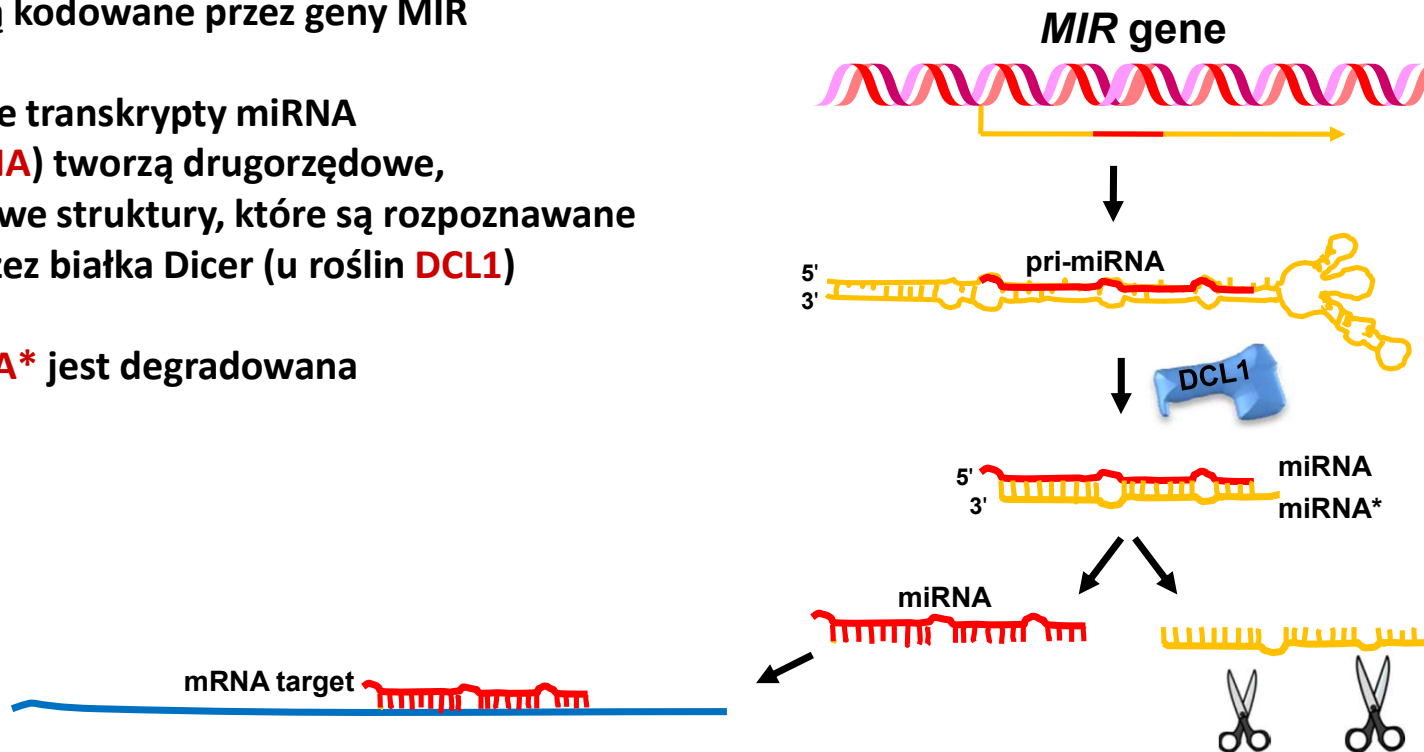
- Step 1** Initial effect of miRNAs: inhibition of translation at the initiation step without mRNA decay.
- Step 2** mRNA deadenylation by PAN2–PAN3 and CCR4–NOT complexes recruited by miRISC as a consequence of translation inhibition that makes poly(A) tail more accessible.
- Step 3** Stimulated deadenylation 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

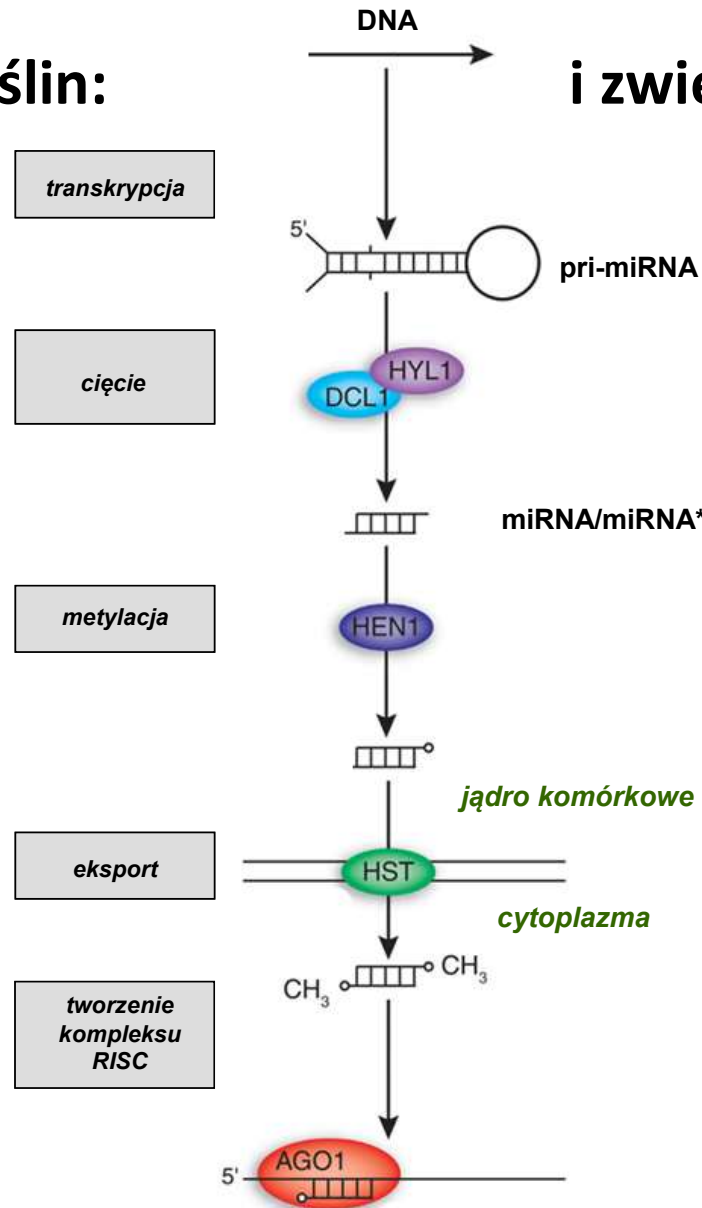


Biogeneza miRNA u roślin:

HYL1:
białko wiążące dwuniciowy RNA

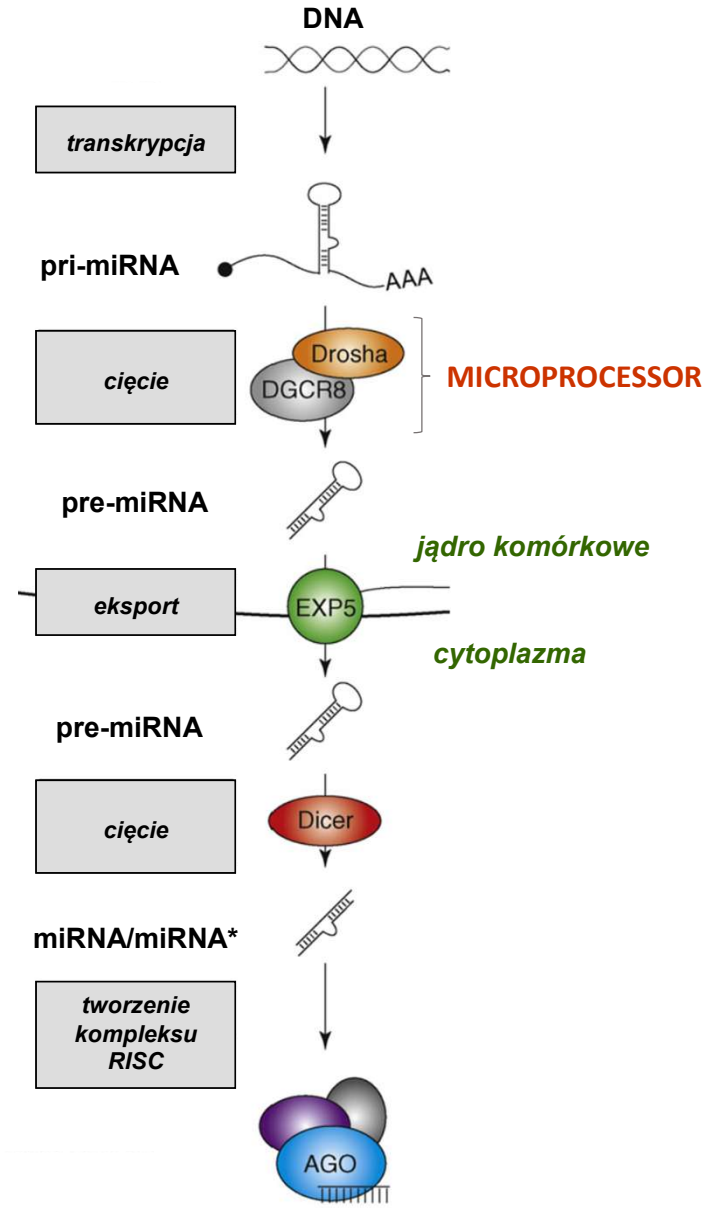
HEN1:
metylotransferaza, metylacja
miRNA/miRNA*

HST (HASTY):
eksport miRNA/miRNA* do
cytoplazmy, homolog eksportyny 5



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

i zwierząt:



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

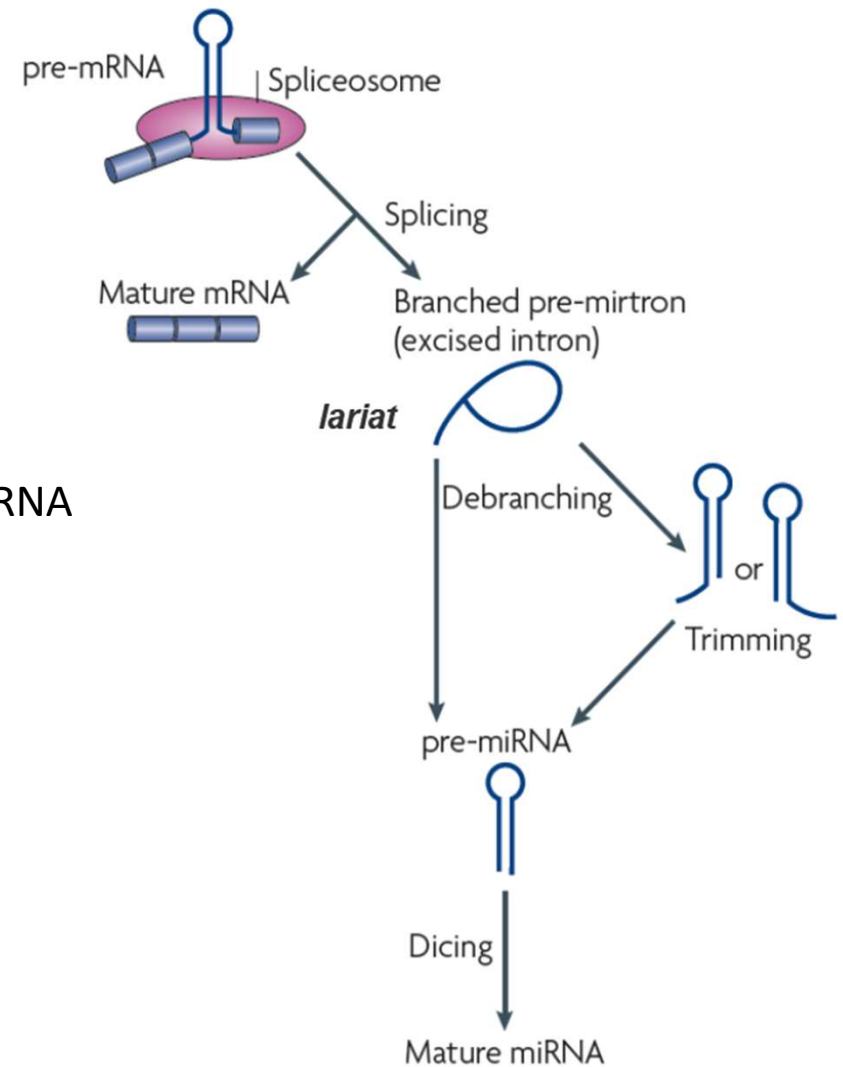
Mirtrony

występują u *D. melanogaster*, *C. elegans*, ssaków

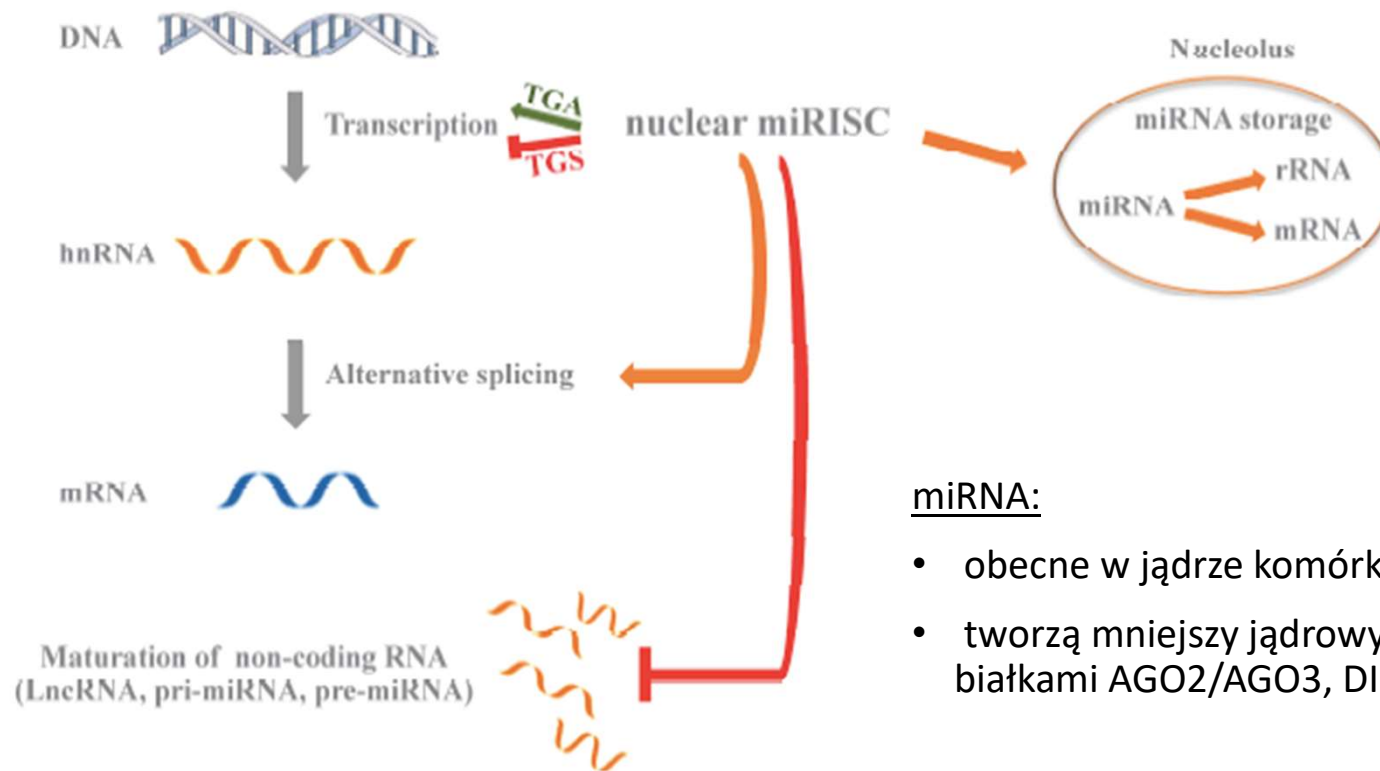
miRNA mogą powstawać z intronów wyciętych z pre-mRNA podczas składania mRNA (*splicing*)
niezależne od Drosha

rozcięcie struktury lariat (*debranching*) prowadzi do powstania pre-miRNA

pre-miRNA → biogeneza miRNA



Jądrowe funkcje miRNA

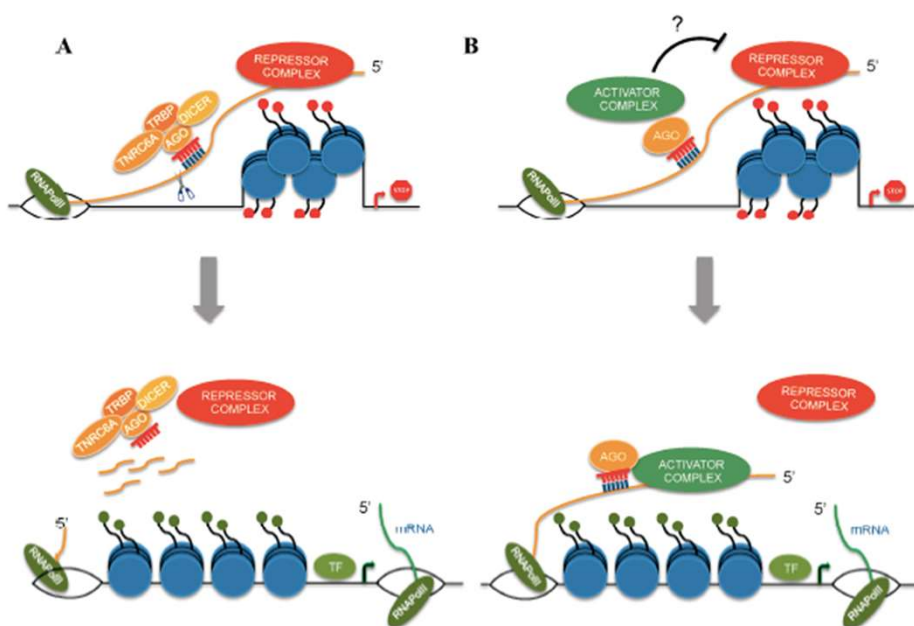


miRNA:

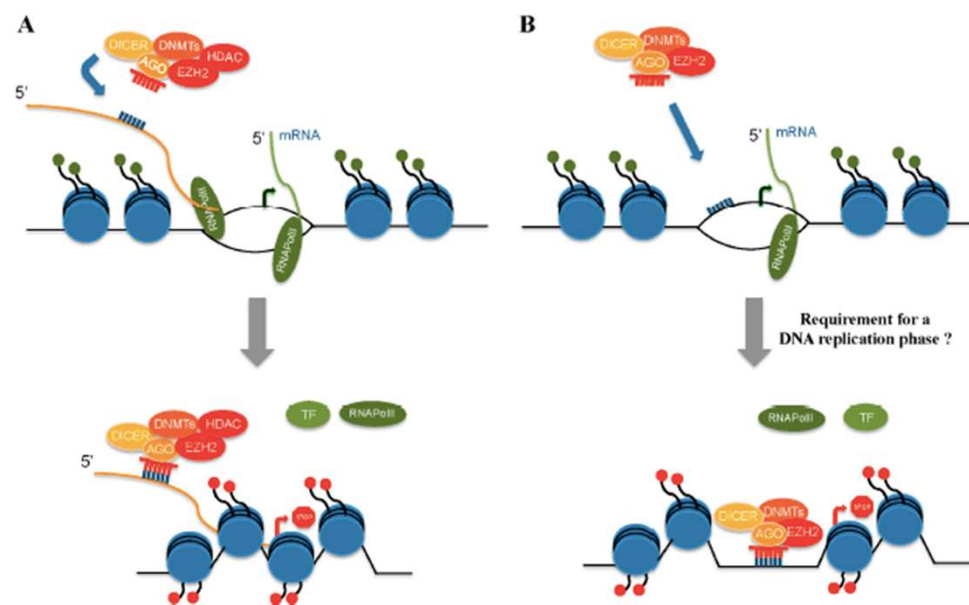
- obecne w jądrze komórkowym i jąderku
- tworzą mniejszy jądrowy kompleks miRISC complex z białkami AGO2/AGO3, DICER, TRBP i TNRC6A (TGA)

Jądrowe funkcje miRNA

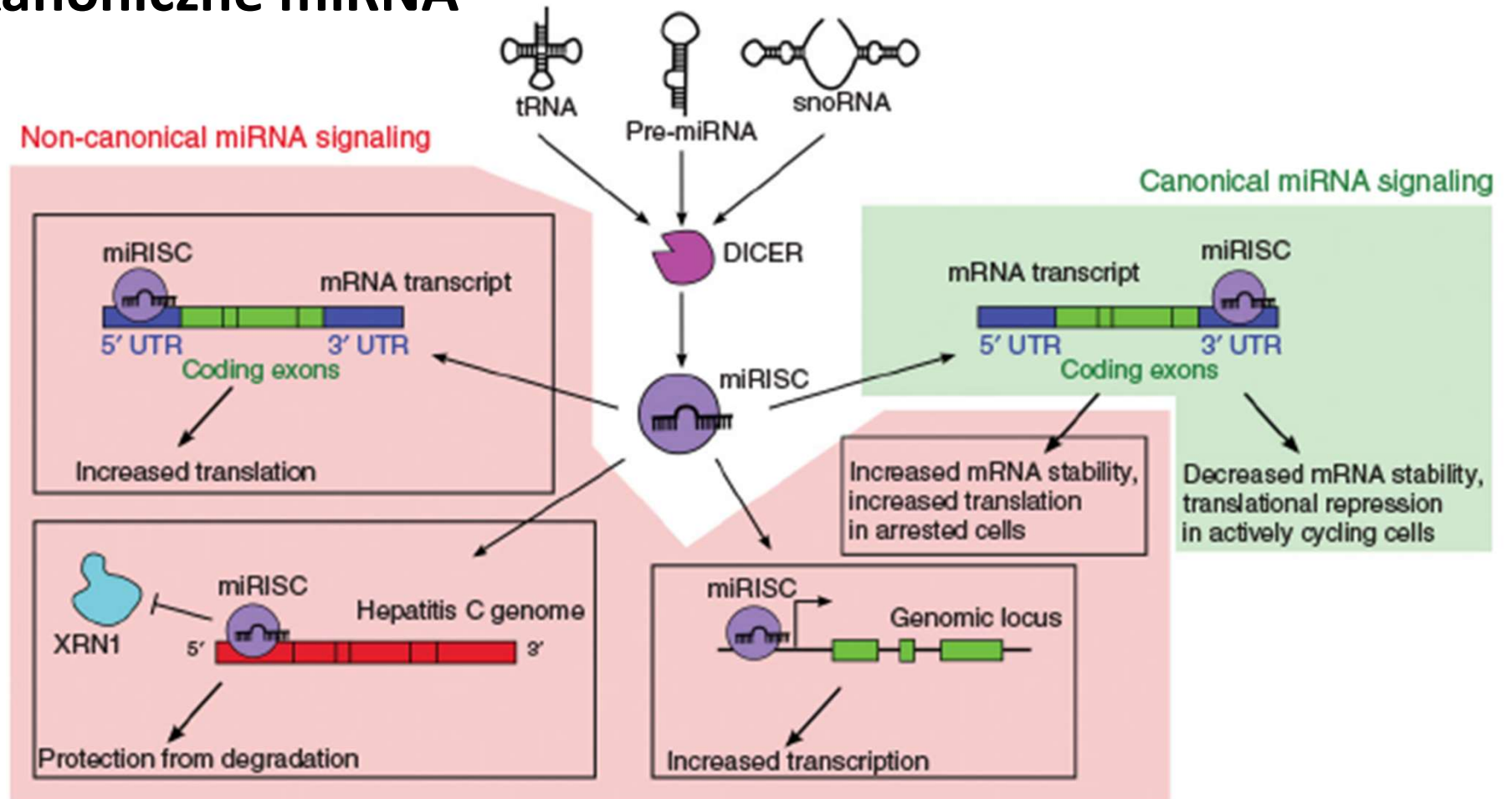
Transkrypcyjna aktywacja genów (TGA)



Transkrypcyjne wyciszanie genów (TGS)



Niekanoniczne miRNA



siRNA

ochrona i utrzymywanie stabilności genomu

endo-siRNA:

- ochrona genomu przed „obcym” materiałem genetycznym (exo-siRNA):
 - transgenicznym
 - wirusowym (*VIGS – viral induced gene silencing*)

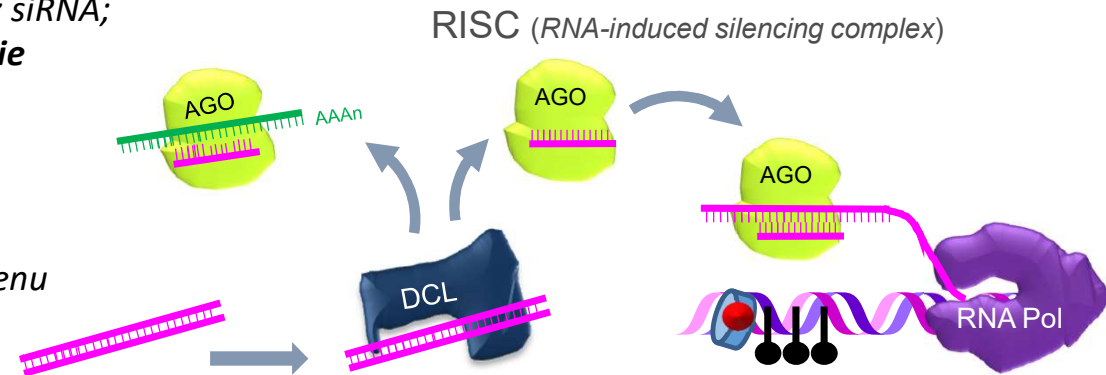
Transgeny wprowadzane sztucznie są często wyciszane przez siRNA;
mogą być wyciszane **post-transkrypcyjnie** lub **transkrypcyjnie**

Wyciszenie może być wywołane:

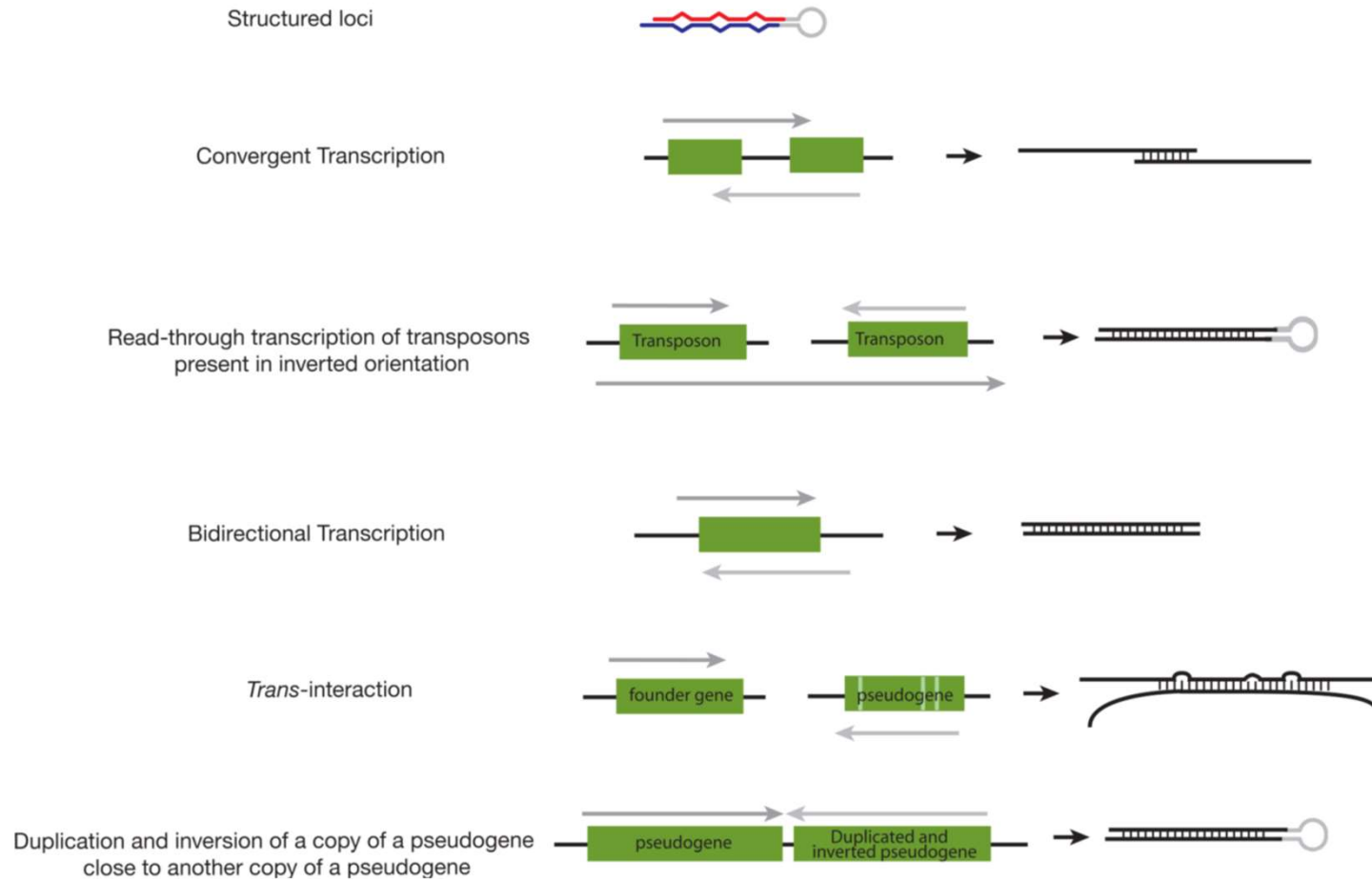
- bardzo wysokim poziomem ekspresji transgenu
- dwuniciowym RNA pochodzącym z ekspresji transgenu
- nieprawidłowymi RNA pochodzącymi z ekspresji transgenu

endo-siRNA:

- wyciszanie transpozonów i sekwencji powtórzonych
- utrzymywanie niektórych genów w stanie epigenetycznie nieaktywnym



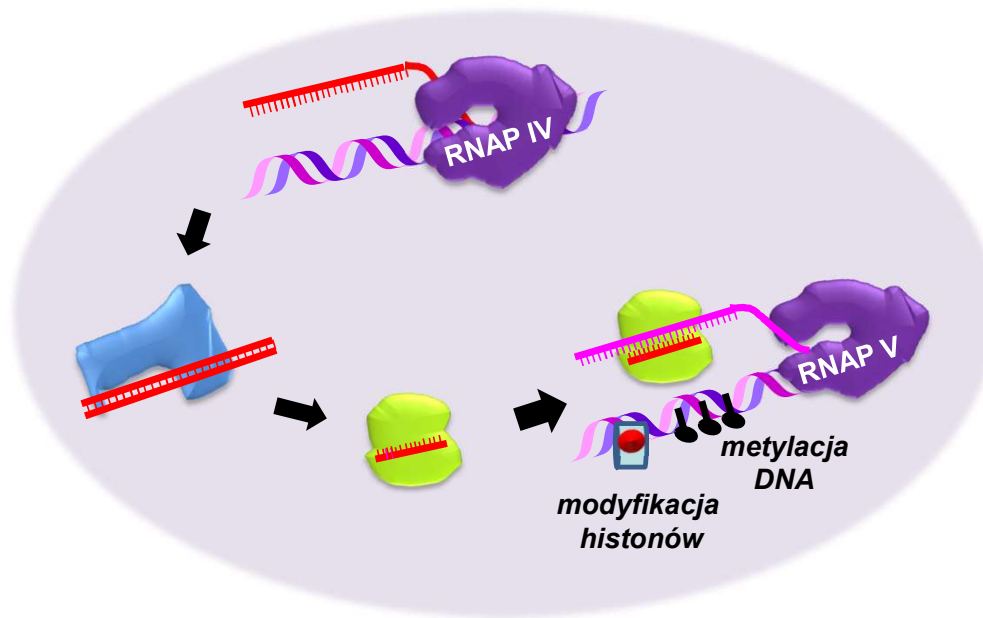
Pochodzenie endogenne siRNA



Endogenne siRNA u roślin: hc-siRNA

= heterochromatynowe siRNA

Z biogenezą i funkcją hc-siRNA związane są dwie specyficzne dla roślin polimerazy RNA



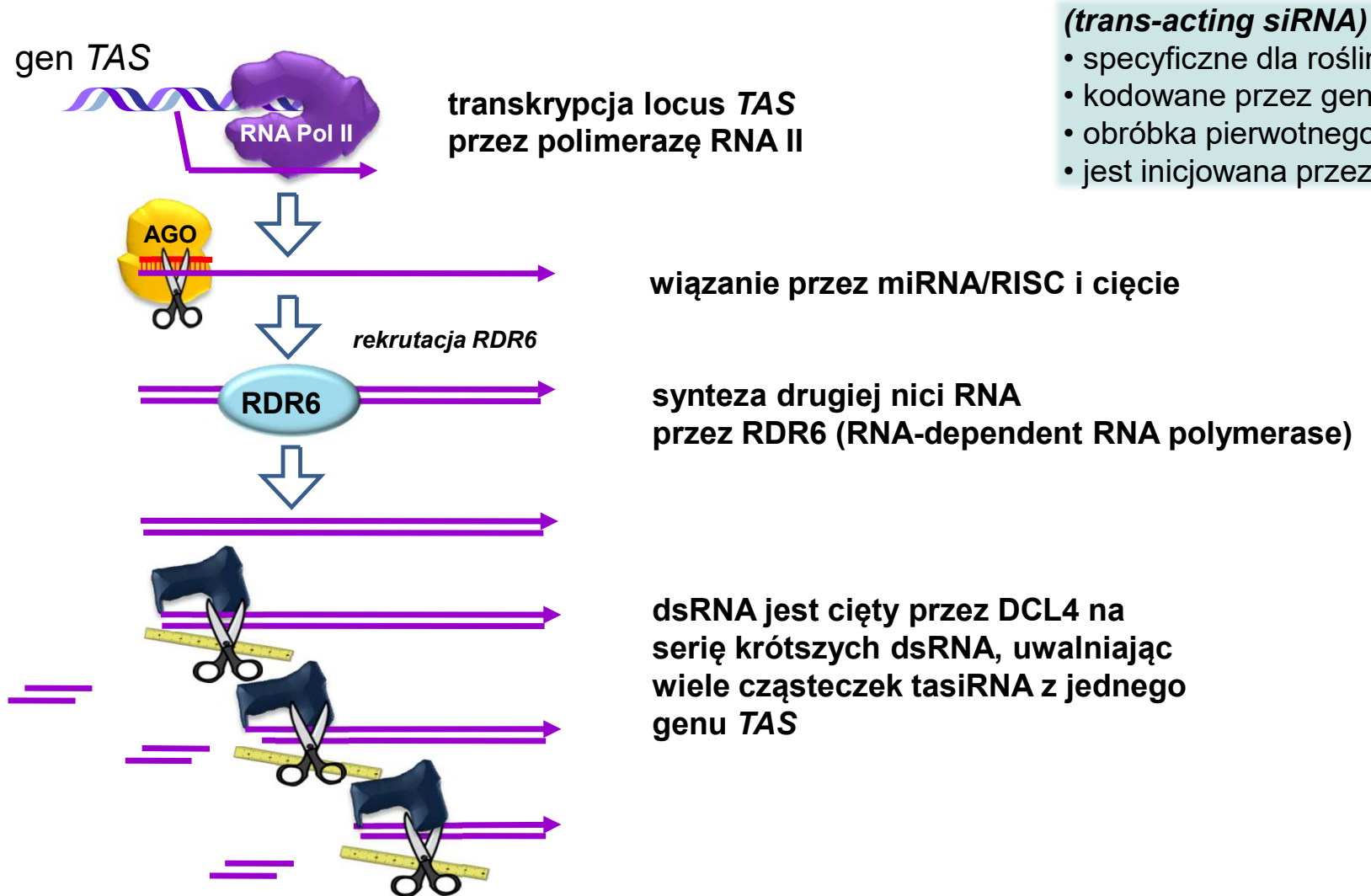
Polimeraza RNA IV uczestniczy w biogenezie siRNA

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

=> mechanizm **metylacji DNA zależnej od RNA** (RNA-directed DNA Methylation, RdDM)

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

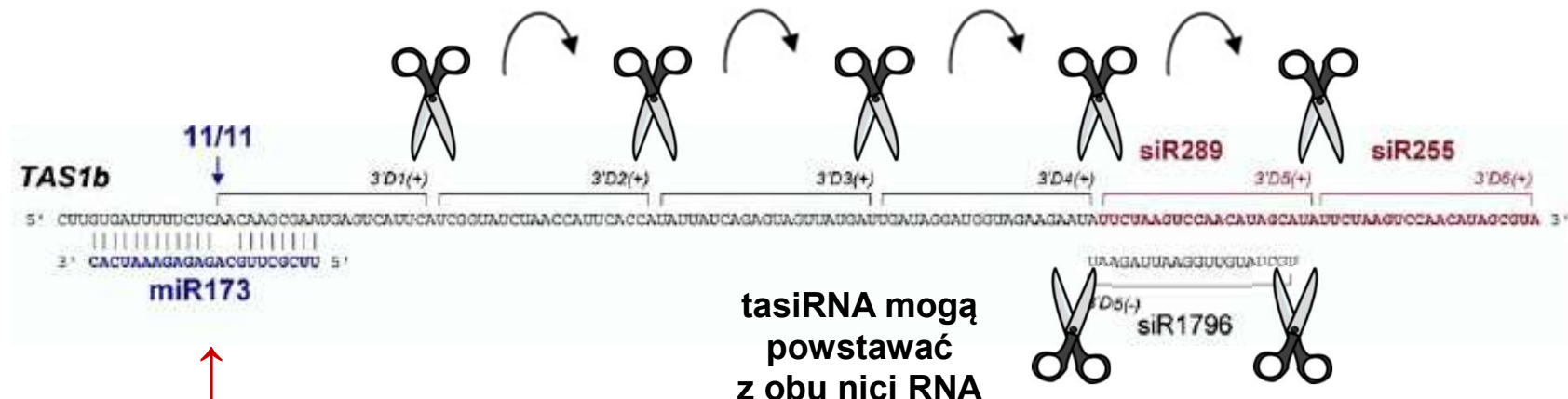
tasiRNA: roślinne endogenne siRNA



(*trans-acting siRNA*)

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

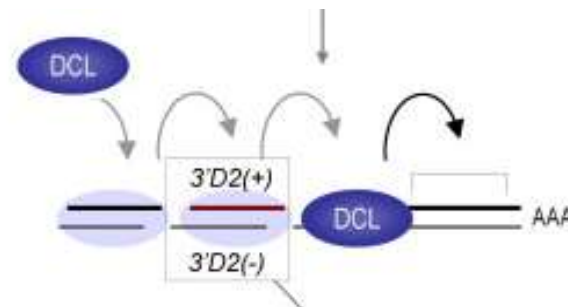
Z jednego genu *TAS* powstaje wiele cząsteczek tasiRNA



tasiRNA mogą
powstawać
z obu nici RNA

miejsce cięcia pierwotnego
transkryptu przy udziale miRNA

kluczowe dla zapewnienia
specyficzności tasiRNA; DCL4
zaczyna ciąć prekursor dokładnie
w tym miejscu i tnie
w odstępach 21nt



DCL4 przesuwa się
wzdłuż dsRNA,
odmierzając i tnąc

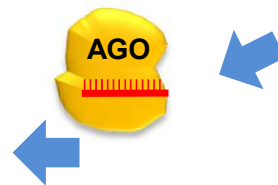
natsiRNA: roślinne endogenne siRNA

natsiRNA – *natural antisense-transcript derived siRNA*
cis-acting

- syntetyzowane w odpowiedzi na stres np. wysokie zasolenie gleby



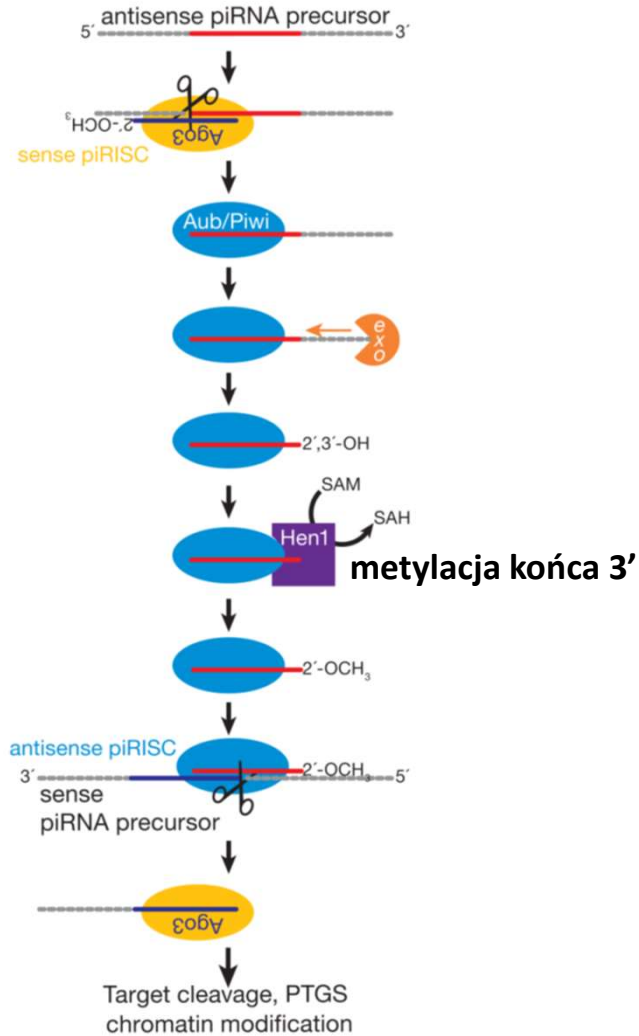
- *A. thaliana*: lsiRNA (*long siRNA*; 30-40nt) również powstają z transkryptów NAT, inne białka uczestniczą w biogenezie



biogeneza:

- DCL2 i/lub DCL1
- RDR6 (polimeraza RNA zależna od RNA)
- SGS3 (białko wiążące RNA)
- **polimeraza RNA IV**

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)

wyciszanie transpozonów i powtórzeń DNA; uważa się, że mogą działać na różnych poziomach:
 posttranskrypcyjnie – degradacja transkryptu u ssaków **metylacja DNA sekwencji transpozonowych**

Małe RNA niezależne od Dicer: priRNA

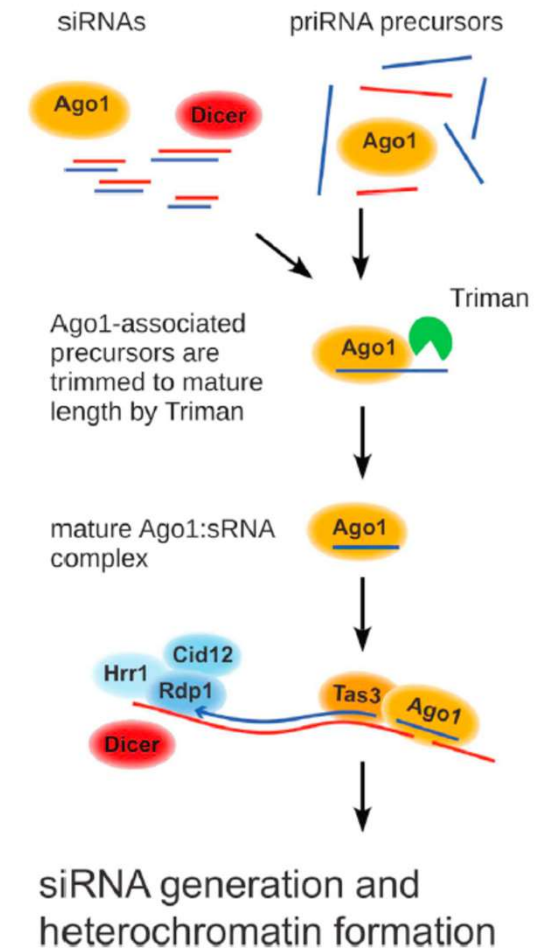
priRNA – primal small RNAs

- 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

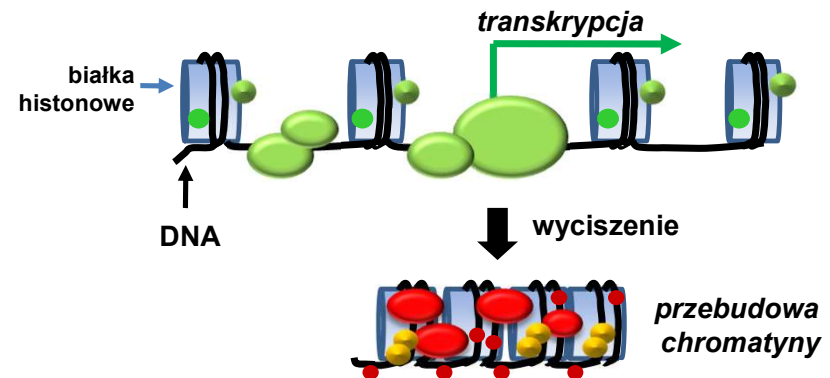
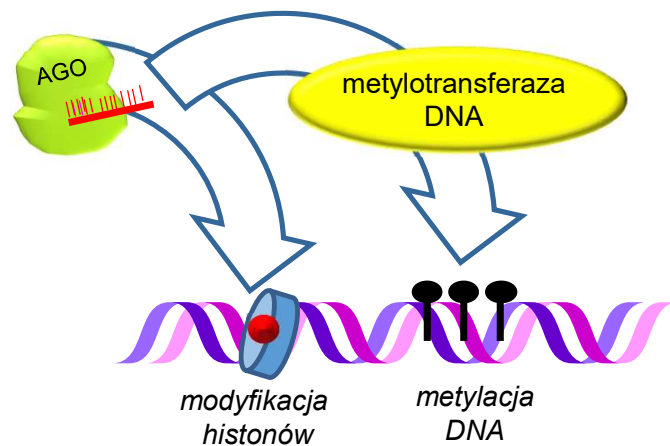
Argonaute and Triman Generate Dicer-Independent priRNAs and Mature siRNAs to Initiate Heterochromatin Formation

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



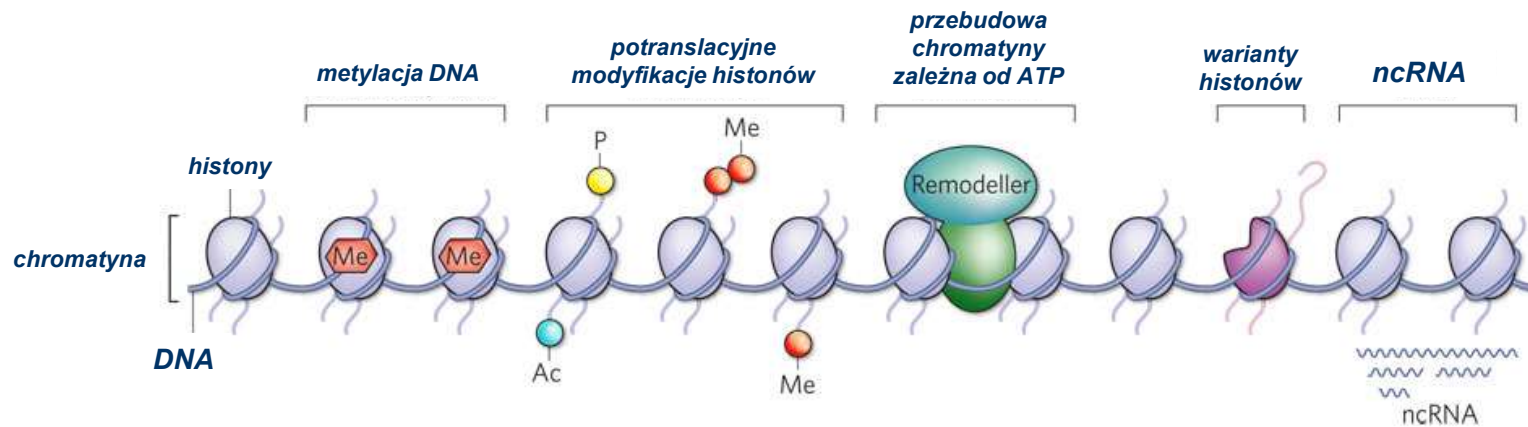
Transkrypcyjne wyciszanie ekspresji genów (TGS)

- 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

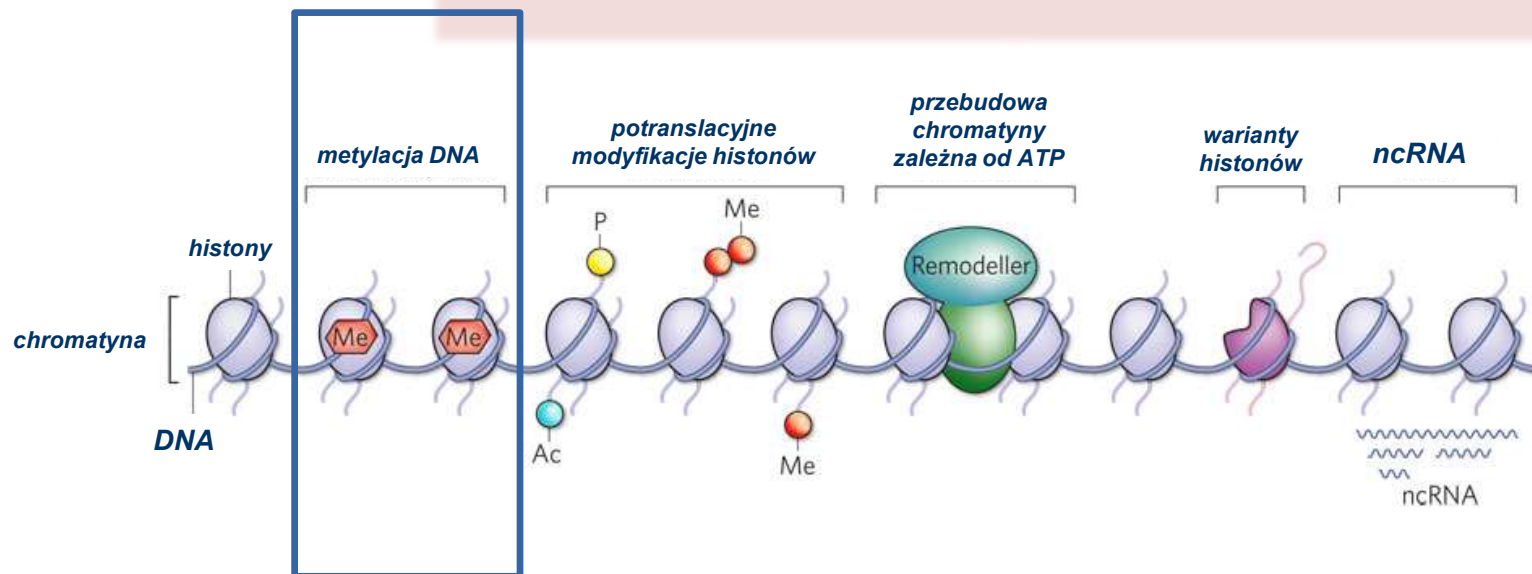
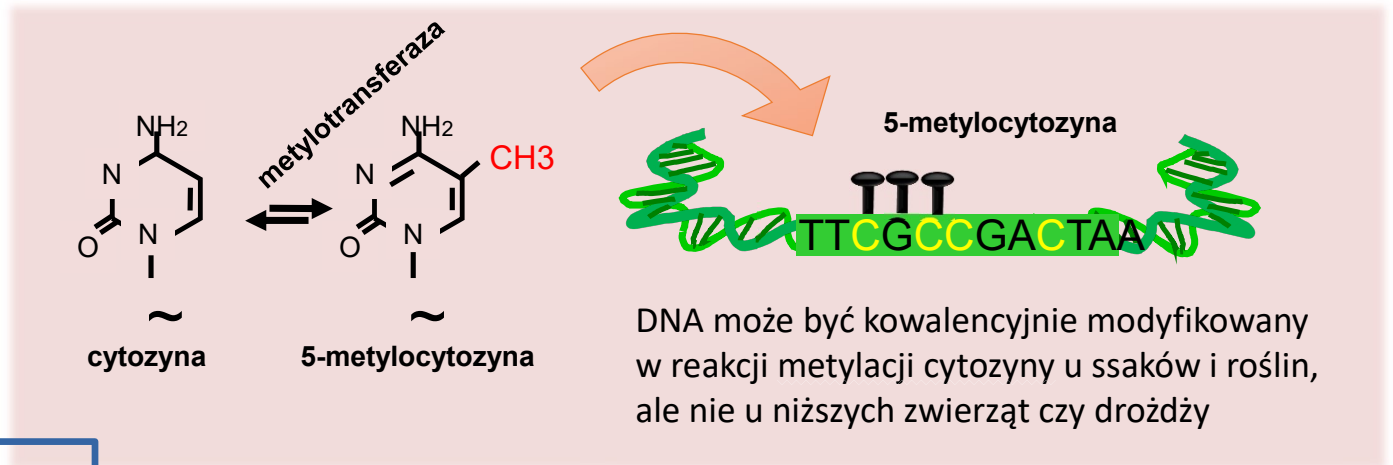


EPIGENETYCZNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

Epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów



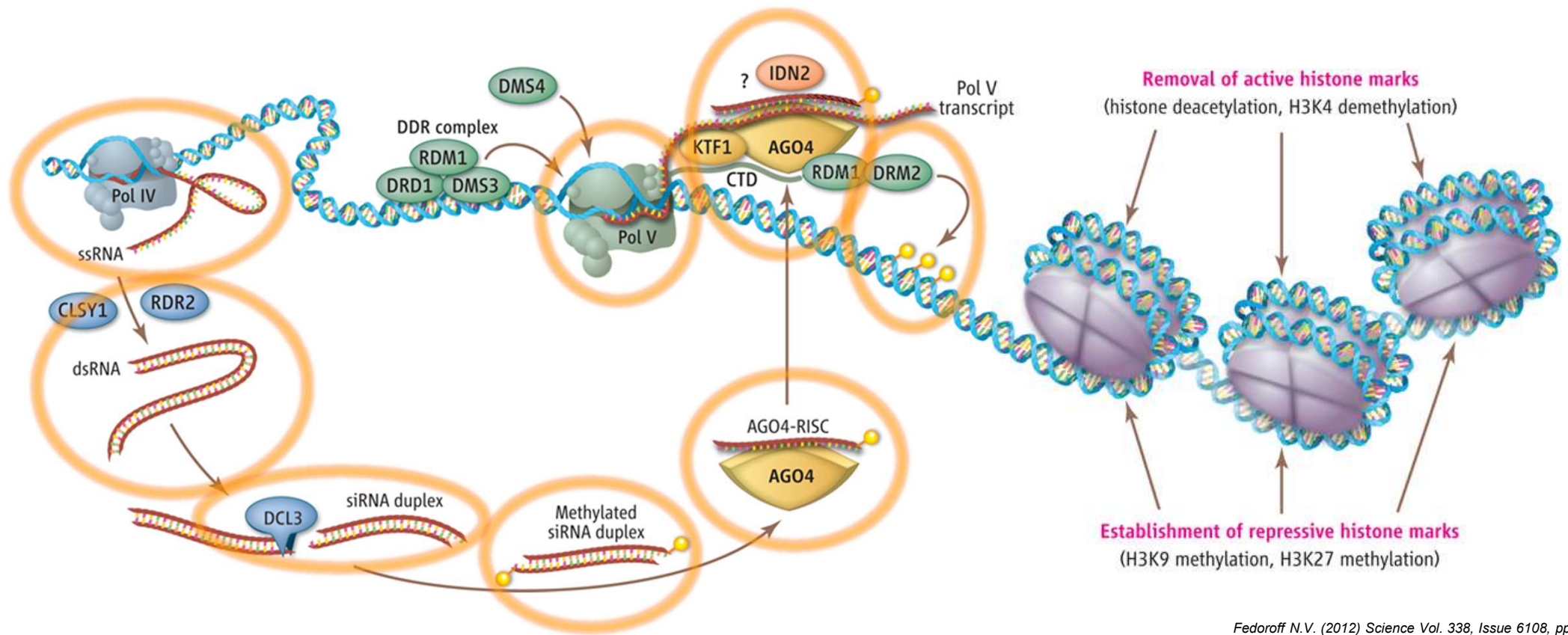
Metylacja DNA



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

Model mechanizmu metylacji DNA zależnej od RNA

(RdDM – *rna directed dna methylation*)



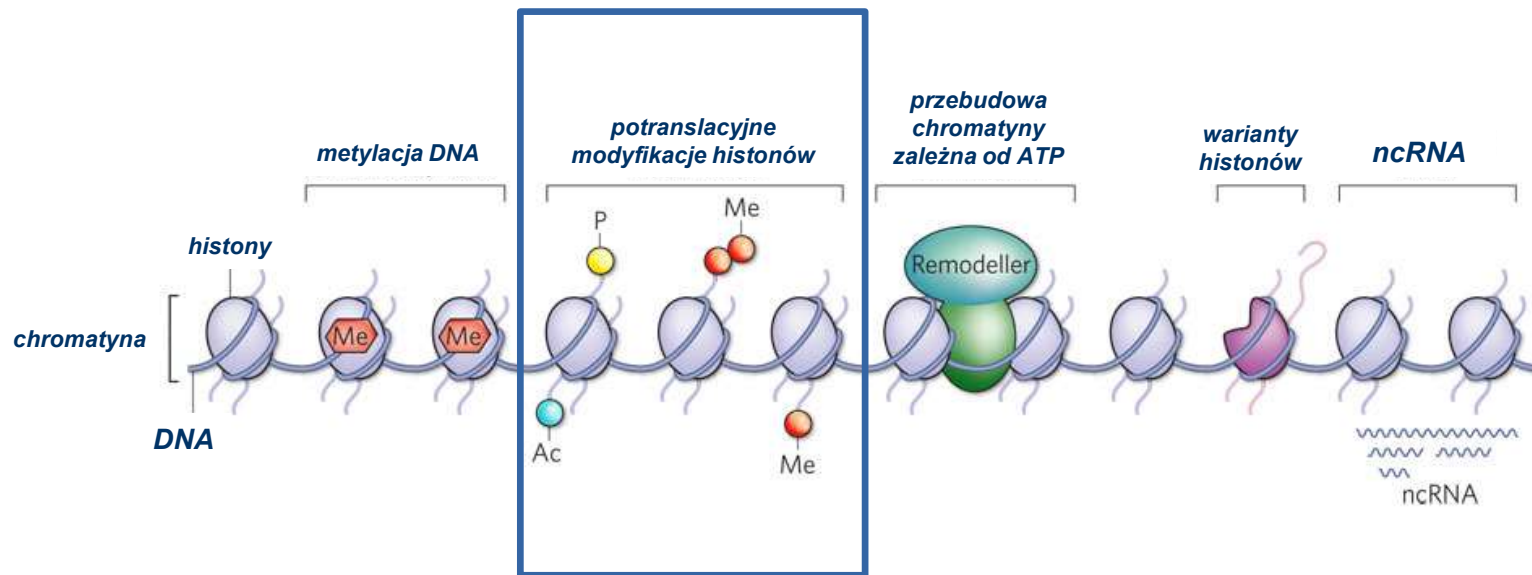
Potranslacyjne modyfikacje histonów

Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny

W zależności od miejsca modyfikacje mogą przyczyniać się do aktywacji lub inaktywacji transkrypcji

Najczęstsze modyfikacje:

- P – fosforylacja
- Me – metylacja
- Ac – acetylacja

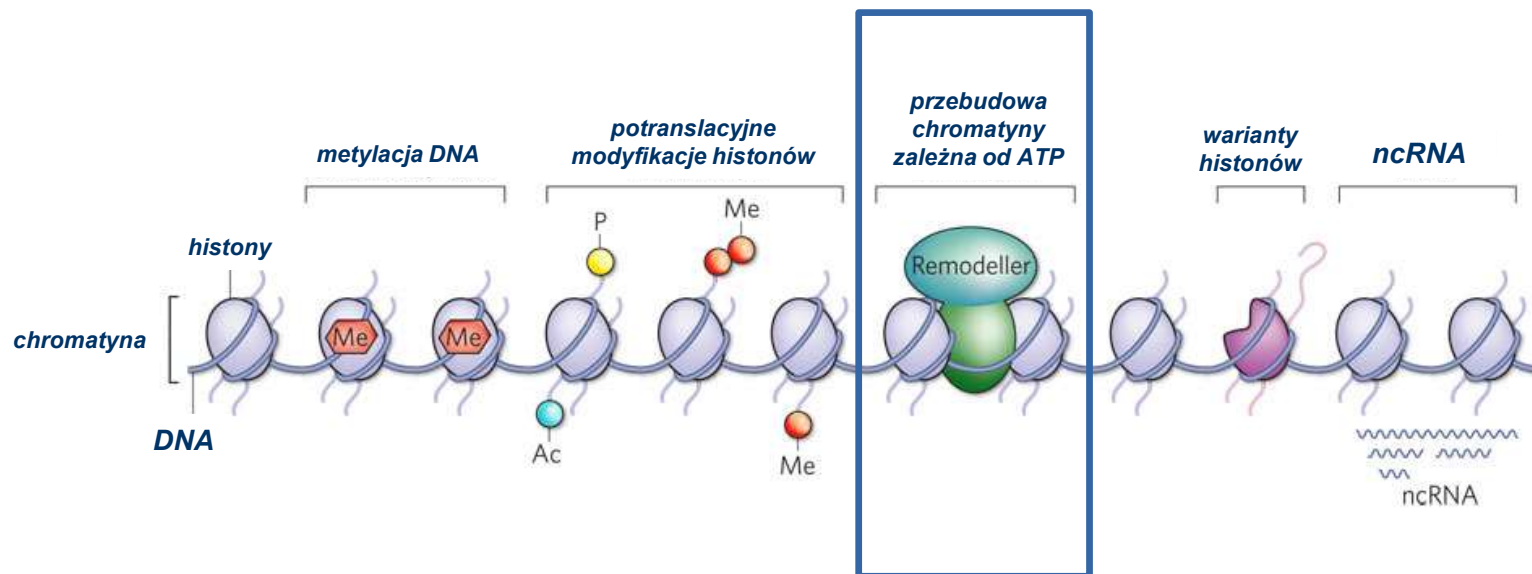


Końce N białek histonowych (tzw. ogony histonowe)
wystają poza nukleosom, są dostępne dla enzymów modyfikujących

Przebudowa chromatyny

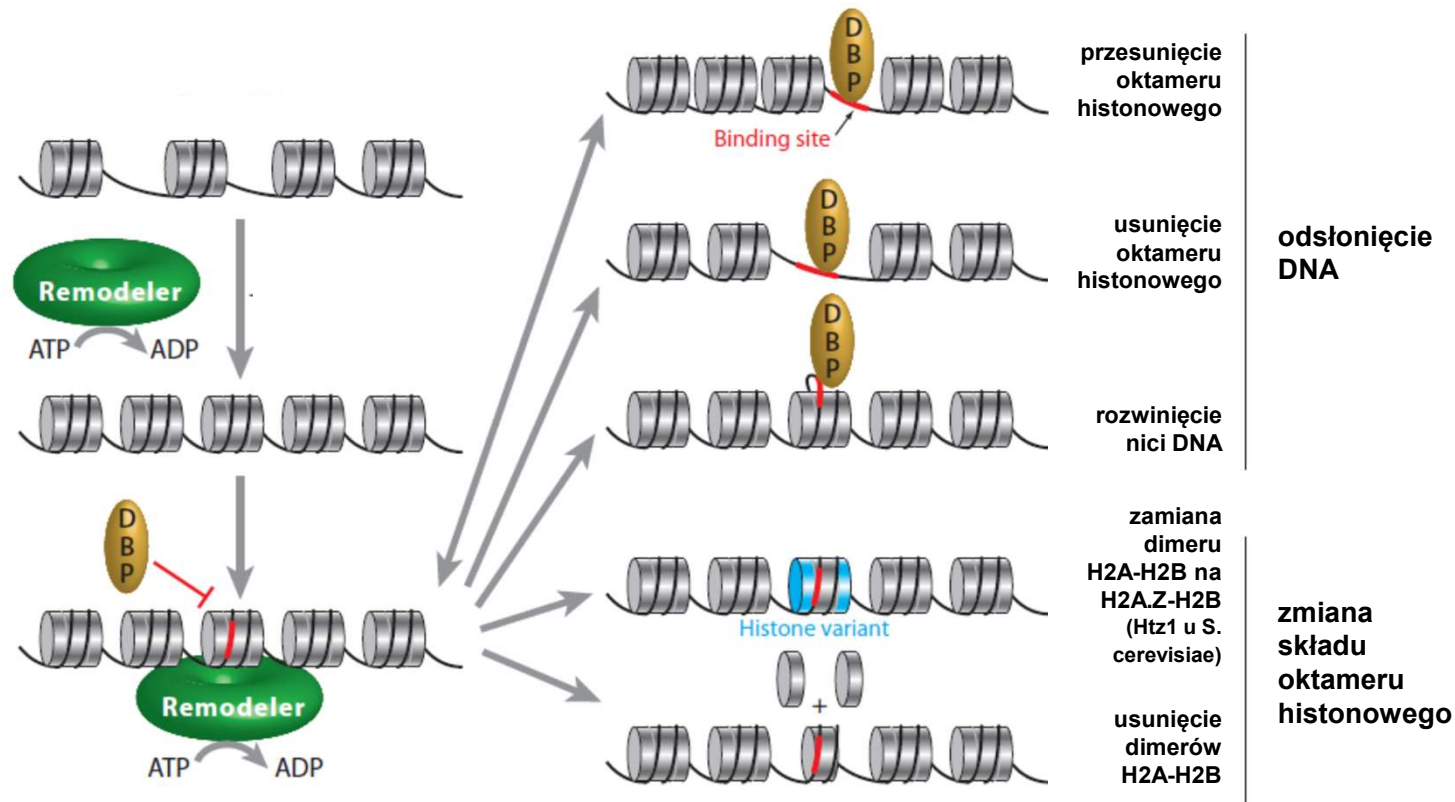
zależna od ATP (*chromatin remodelling*)

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.

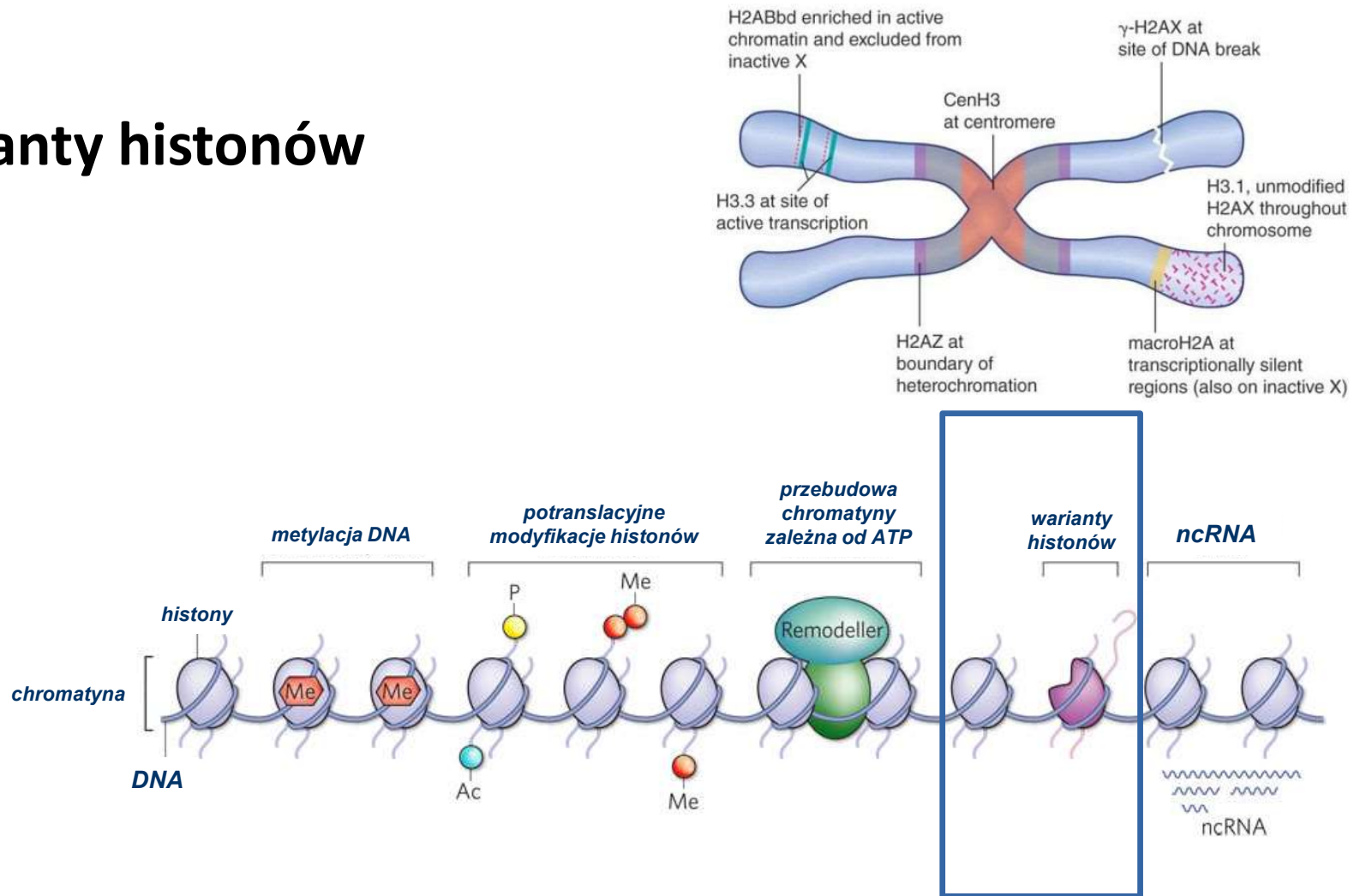


Przebudowa chromatyny

zależna od ATP (*chromatin remodelling*)

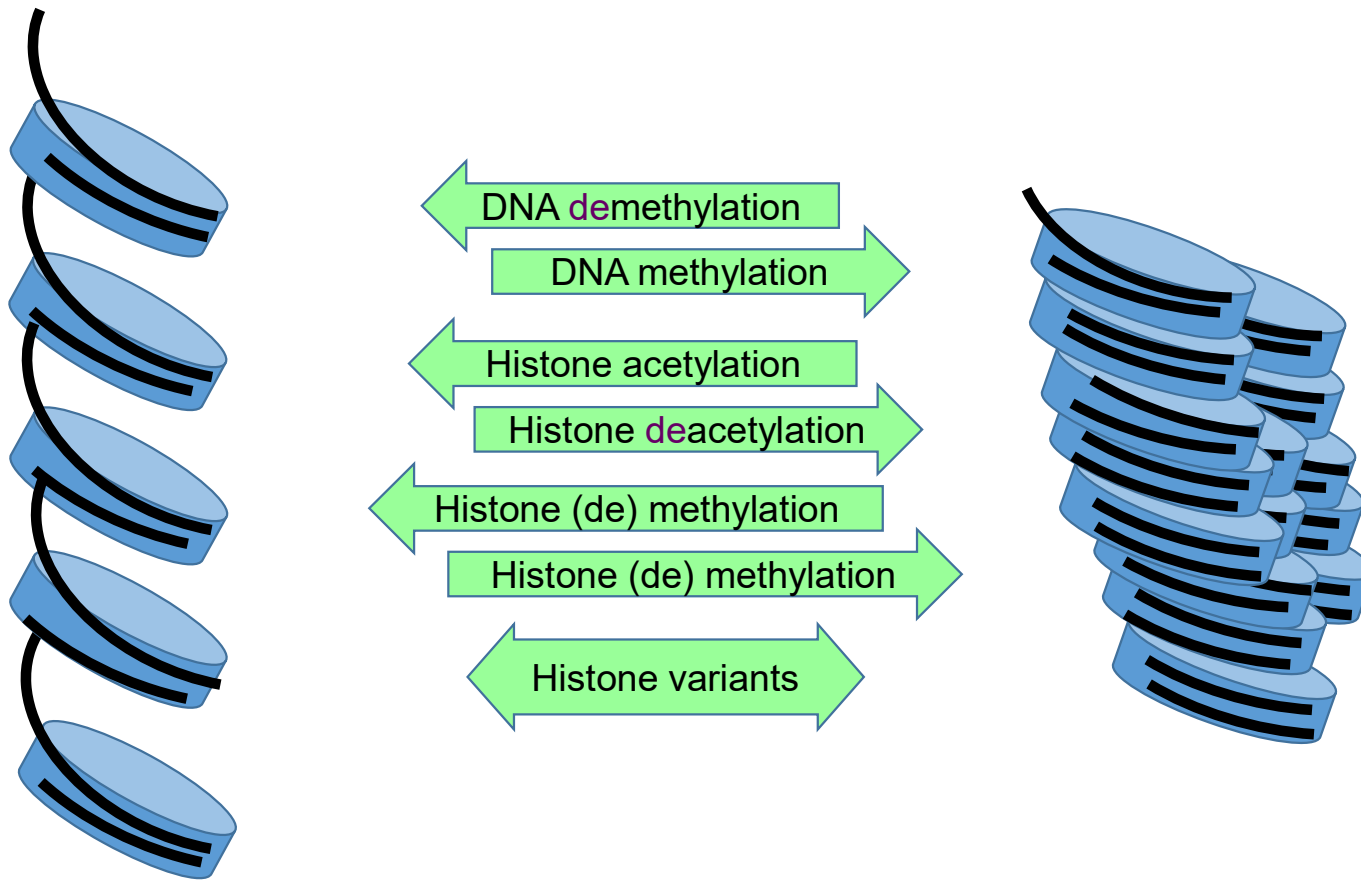


Warianty histonów



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

Epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów



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)

