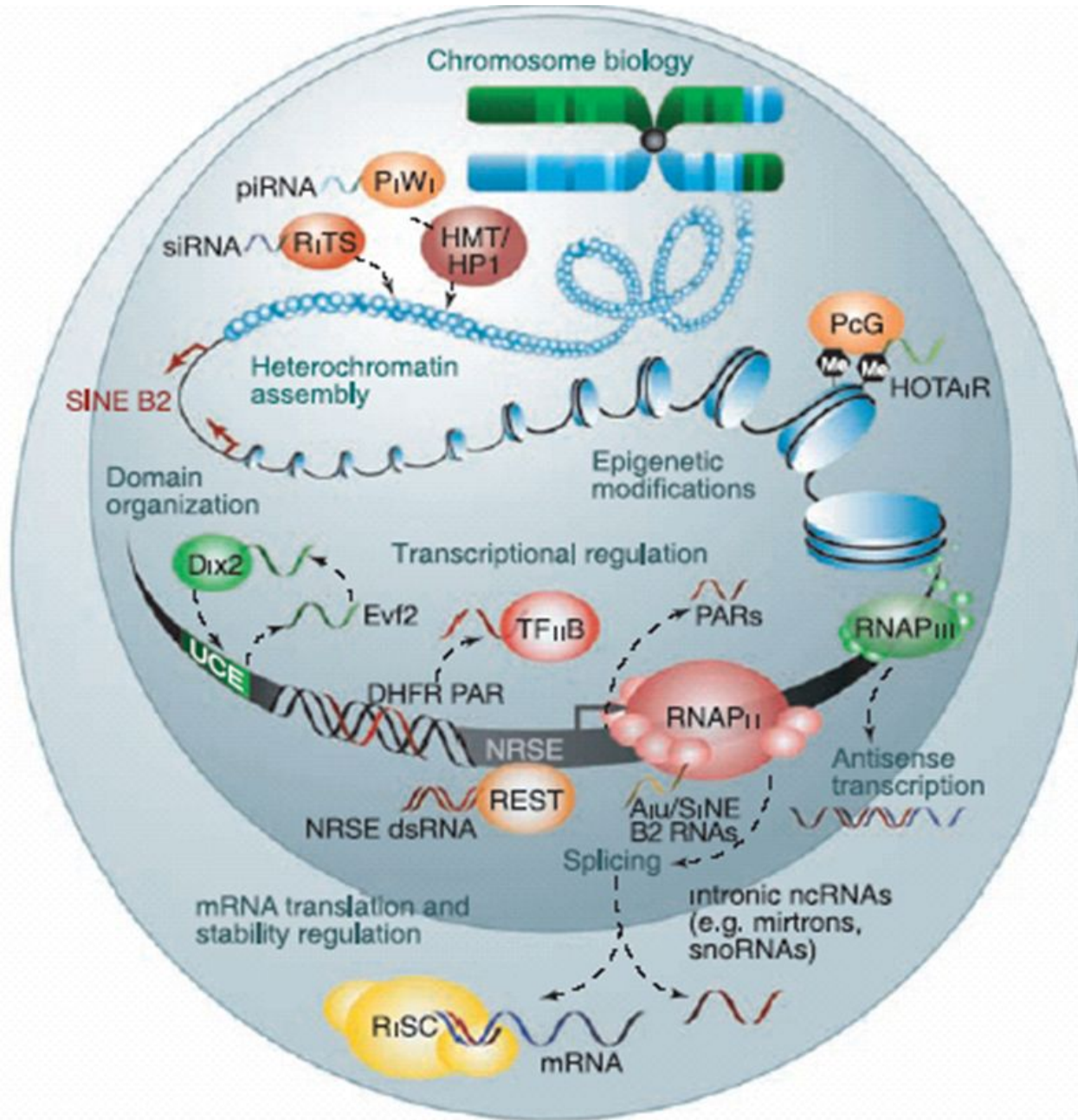


НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК. ВВЕДЕНИЕ.

С основами РНК-интерференции.



THE EUKARYOTIC GENOME AS AN RNA MACHINE

ВИДЫ РНК, О КОТОРЫХ СКАЖЕМ МИНИМУМ ДВА СЛОВА (НАЗВАНИЕ ТОЖЕ СЧИТАЕТСЯ):

- Длинные некодирующие РНК (>200 пн) Long ncRNA:
- 1) ***Xist u Tsix***- участвуют в процессах компенсации дозы у млекопитающих, обеспечивая прекращение экспрессии генов одной из X-хромосом самок. Аналоги *roX1* и *roX2* вовлечены в дозовую компенсацию у дрозофилы и участвуют в увеличении уровня экспрессии генов единственной X-хромосомы самцов.
- 2) ***Air***-экспрессируется с отцовского аллеля и необходима для репрессии транскрипции локуса *Igf2r* (Insulin-like growth factor type 2)
- 3) ***NRON***(non-coding repressor of NFAT(nuclear factor of activated T cells)-регулирует ядерный транспорт для дефосфолированного NFAT, модулируя ее активность.
- 4) ***7SK RNA***- транскрибируется РНК-полимеразой III, консервативна у позвоночных. В комплексе со связанным с ее 5'-концевой шпилькой белком HEXIM1 ингибирует активность фактора элонгации транскрипции Р-TEFb, состоящего из циклинзависимой киназы 9 (CDK9) и циклина T1 (CycT1) и фосфорилирующего С-терминальный конец полимеразы. Без него РНК-полимераза II синтезирует только короткие 5'-концевые последовательности пре-мРНК.
- 5) ***U1 RNA***- наоборот способна активировать транскрипцию, связываясь с TFIIN, фосфорилирующим С-терминальный конец полимеразы. (***U1 RNA***- ОТНОСИТСЯ К МАЛЫМ ЯДЕРНЫМ РНК(snRNA), ЗДЕСЬ ОНА ДЛЯ ПРИМЕРА).

- 6) **SRA**(*steroid receptor RNA activator*)-один из немногих известных коактиваторов транскрипции гормонов, являющийся РНК.
- 7) **HSR-1**(*Heat-shock RNA-1*)- в комплексе с eEF 1A (eucaryotic translation- elongation factor-1A) стимулирует тримеризацию *HSF-1*, последний связывается с промоторами генов теплового шока и активирует транскрипцию.
- 8) *ncRNA from an upstream minor promotor of dihydrofolate reductase(DHFR)*- формирует стабильную структуру с двуцепочечной ДНК в области основного промотора гена, предотвращая связывание с ним транскрипционного фактора TFIID.
- 9) **Evf-2**- является коактиватором транскрипционного фактора Dlx2, играющего важную роль в ходе нейроонтогенеза, в частности при развитии переднего мозга. Sonic hedgehog-индуцирует транскрипцию Evf-2 из консервативного элемента локализованного между Dlx5 и Dlx6 в процессе развития переднего мозга. Evf-2 в свою очередь рекрутирует Dlx2 к тому же консервативному элементу и индуцирует экспрессию Dlx5 (пример генерализованной регуляции).
- 10) **HAR1F**-специфично экспрессируется в клетках Кахаля-Ретциуса в неокортексе, подверглась быстрым эволюционным изменениям, если сравнивать ...ммм...с шимпанзе.
- 11) **lincRNA**(intergenic)- транскрибируется с «некодирующих» ДНК последовательностей, расположенных между белок-кодирующими последовательностями. Регуляция процессов дифференцировки клеток в ходе эмбриогенеза, влияет на судьбу стволовой клетки.

КОРОТКИЕ(МАЛЫЕ) РНК:

1) <200 пн

2) Виды:

- **NRSE**(neuron-restrictive silencer element double-stranded RNA)
- **snoRNA** (small nucleolar)
- **snRNA** (nuclear)
- **scaRNA** (Cajal associated)

Интерферирующие РНК:

- **siRNA** (small interference)
- **miRNA**
- **piRNA** (PIWI-interacting)
- **tasiRNA** (trans-acting)
- **راسiRNA** (Repeat-Associated)
- **митроны** и так далее и так далее и так да.....

Малые РНК, производные SINE и LINE элементов (ретротранспозонов): BC220-семенники, нервная ткань(один Alu-элемент(SINE)).

NRSE RNA

- двуцепочечная РНК длиной ~20 н. локализована в ядре.
- последовательность идентична последовательности, которая расположена в промоторных областях многих специфических для нейронов генов и названа RE1/NRSE (repressor element 1)
- С RE1, длина которой 19–24 н., связывается фактор транскрипции REST/NRSF (RE1 silencing transcription factor/neuronrestrictive silencer factor), последний рекрутирует ряд репрессоров, в частности гистондеацетилазы. Экспрессия подавлена.
- Экспрессия NRSE РНК в нейрональных стволовых клетках вызывает их дифференцировку по нейрональному пути и сопровождается активацией транскрипции генов, содержащих RE1.
- Возможно, REST связывает NRSE РНК потому, что ее последовательность идентична последовательности RE1. Предполагают, что ассоциация с NRSE РНК препятствует связыванию с REST корепрессоров транскрипции и приводит к тому, что REST, возможно в результате индуцированных NRSE РНК конформационных изменений, начинает активировать транскрипцию

snoRNA

МАЛЫЕ ЯДРЫШКОВЫЕ РНК

snoРНК участвуют в разрезании пре-рРНК и обуславливают две самые распространенные модификации РНК:

- 2'-О-метилирование-С/D-семейство
- Псевдоуридилирование-Н/АСА-семейство.

У позвоночных только в рРНК содержится ~100 модификаций каждого вида.

Аналогичные РНК обнаружены у архебактерий и названы sРНК (sno-like)

Малые ядрышковые РНК

1. Транскрибируются в основном РНК полимеразой II, но кодируются часто в интронах генов рибосомных белков. Иногда - в нетранслирующихся генах (со СТОП-кодонами)
2. Имеют участки, комплементарные рРНК
3. Два класса, Н/АСА и С/D

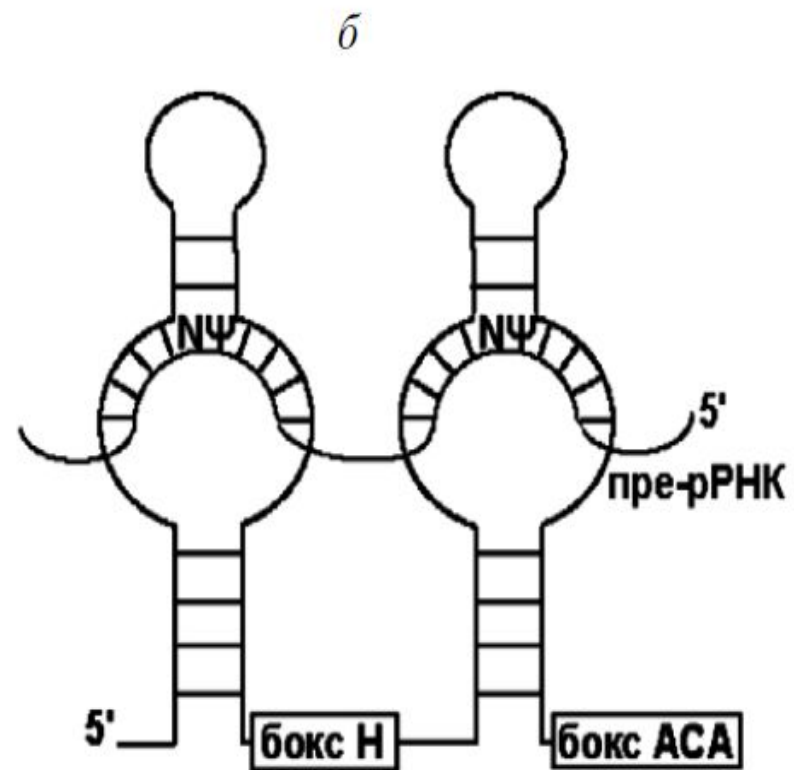
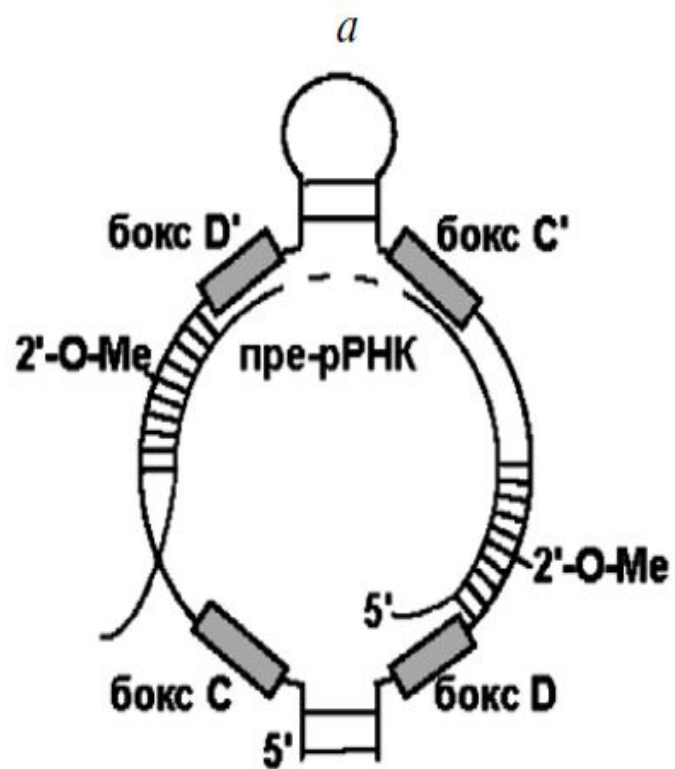


Схема 1. Ядрышковые РНК семейств C/D (*a*) и H/ACA (*б*). 2'-O-Me – 2'-O-Метилированный нуклеотид, Ψ – псевдоуридилированный нуклеотид

snRNA

МАЛЫЕ ЯДЕРНЫЕ РНК

- Обнаруживаются в ядре, всегда связаны с белками, формируя малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы (snurp).
- Содержат большое количество уридина (U1,U2, ...U12).
- Размер от 90-300 нуклеотидов.
- Транскрибируются РНК pol II или РНК pol III. 5'-конец имеет триметилированный кэп (по N7 и дважды по N2 гуанозина).

Функции:

- 1. Участвуют в процессинге пре-мРНК.
- 2. Расщепление полицистронных мРНК.
- 3. Поддержание целостности теломер.
- 4. Регуляция транскрипции.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПОЛИЦИСТРОННЫХ мРНК

- Малый ядерный рибонуклеопротеидный U7 участвует в формировании гистоновых мРНК: осуществляет специальный процессинг гистоновых транскриптов + имеется дополнительная стабилизация мРНК SLBP белком, что способствует тесной координации синтеза гистонов и репликацией.
- Две популяции гистоновых генов: кластеризованная и диспергированная.
- Первая активна только в S-фазу клеточного цикла, вторая обеспечивает текущие потребности в гистонах.
- U7 участвует в формировании гистоновых мРНК в S-фазу.
- Все 5 гистоновых генов сгруппированы в кластер (6900 н.п.).
- Кластеры повторены в геноме многократно (примерно 35 раз).
- Кластеры в хромосоме лежат тандемно.
- В генах кластеров отсутствуют интроны, а пре-мРНК не полиаденилируется.
- Кластер у эукариот транскрибируется как единое целое (общая пре-мРНК).

scaRNA

АССОЦИИРОВАННЫЕ С ТЕЛЬЦАМИ КАХАЛЯ

- Некоторые РНК, относящиеся к семействам C/D и H/ACA, локализованы не в ядрышке, а в тельцах Кахаля.
- Тельца Кахаля (ТК), или спиральные тельца (coiled bodies), локализованы в ядре и представляют собой овальные или круглые образования диаметром 0,3–0,5 мкм.
- Предположительная функция ТК – созревание и сборка snРНП и snoРНП.
- Мишенями scaРНК служат малые ядерные РНК (snRNAs), участвующие в сплайсинге.
- Помимо C/D и H/ACA scaРНК в составе ТК обнаружены scaРНК длиной 250–300 н., содержащие консервативные последовательности как C/D, так и H/ACA РНК. Такие химерные scaРНК ассоциированы с коровыми белками C/D и H/ACA РНП и участвуют как в 2'-О-метилировании, так и в псевдоуридилровании.

Классы малых регуляторных РНК:

(имеющих “короткую двуцепочечную” стадию)

Класс	Источник	Особенности строения и биогенеза, функции
siРНК экзогенные	Вирусная РНК, трансгены, другие чужеродные НК	Защита от инфекции, стабилизация генома
siРНК эндогенные	Транспозоны, повторы в геноме	Стабилизация генома
miРНК	Собственные гены и фрагменты генов, псевдогены	Разнообразны, неполная комплементарность с мишенями (происходят не из мишеней!)
tasiРНК (Trans-Acting)	Межгенные районы, некодирующие транскрипты, расщепляемые с участием miРНК	Обнаружены у растений, длина 21-24 н., индуцируют расщепление мРНК
tncРНК (Tiny Non-Coding)	Предшественник неизвестен, но для биогенеза необходим Dicer	У <i>C.elegans</i> , 20-22 н., близки к tasiРНК, функции неясны
scnРНК (Small-Scan)	Предшественники - продукты транскрипции с обеих цепей ДНК генома микронуклеуса	Длина 28 н. у <i>Tetrahymena thermophila</i> сканирование участков ДНК для геномных перестроек в них. Белок из семейства Argonaute TW1 опосредует метилирование гистонов, а оно, в свою очередь, необходимо элиминации участка ДНК

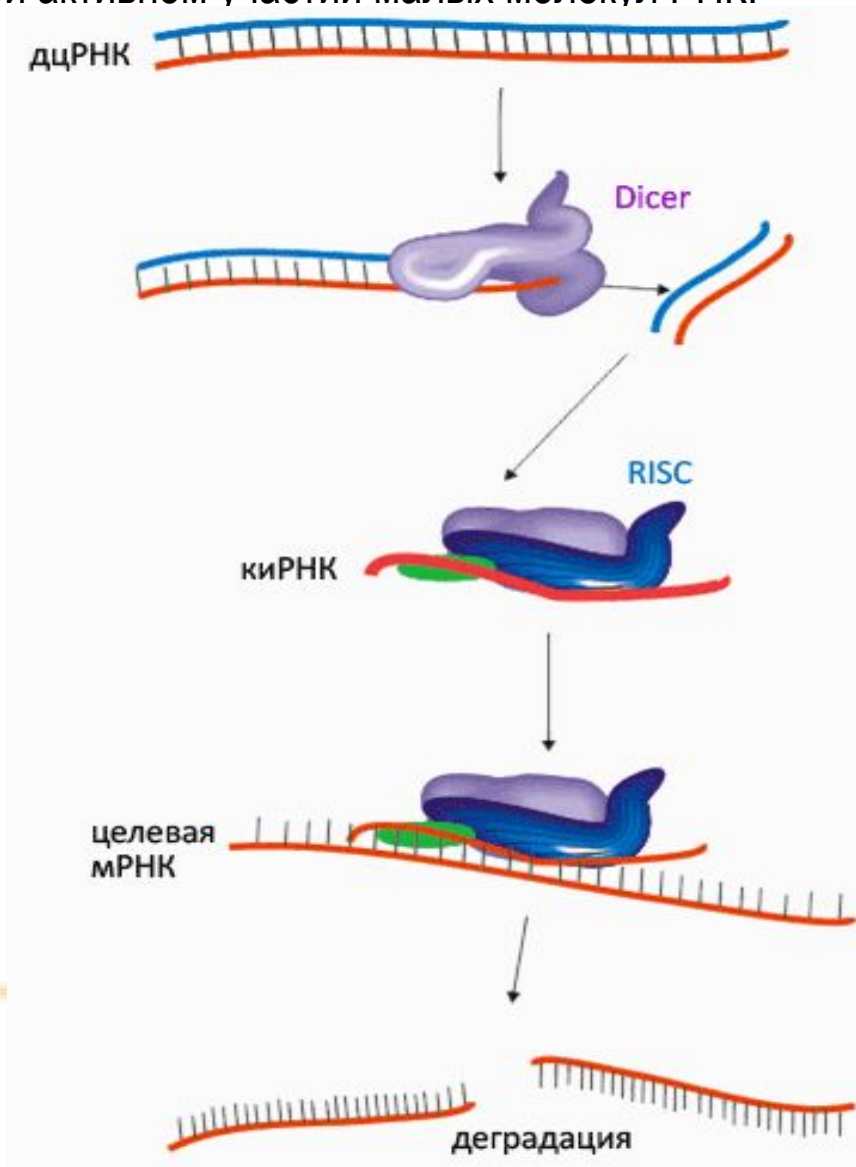
Классы малых регуляторных РНК:

(имеющих “короткую двуцепочечную” стадию)

Класс	Источник	Особенности строения и биогенеза, функции
smРНК (Small Modulatory), в т.ч. saРНК (Small Activating)	Разнообразные	Размер около 20 н. У позвоночных переключение активности (switching) активаторов в репрессоры и наоборот в нейронах
piРНК (PIWI)	Транспозоны, повторы в геноме и т.п.	Стабилизация генома (сайленсинг транспозонов и др.) через TGS в клетках зародышевой линии
راسiРНК (Repeat-Associated) – подкласс piРНК	Транспозоны, повторы в геноме Участки центромер и теломер Предшественники – длинные дцРНК	У <i>S. pombe</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>D. melanogaster</i> . 24-29 н. “отмечают” повторяющиеся элементы в прямой или обратной ориентации. TGS, стабилизация генома, контроль активности транспозонов. Взаимодействуют с разнообразными типами Ago белков (не только Piwi). У млекопитающих не обнаружены.
Миртроны	Интроны	Разнообразны
L1-специфичные siРНК	LINE-1 ретротранспозоны	Мишени – 5'UTR транскриптов L1 Вызывают их деградацию в клетках зародышевой линии
hcРНК		TGS у растений

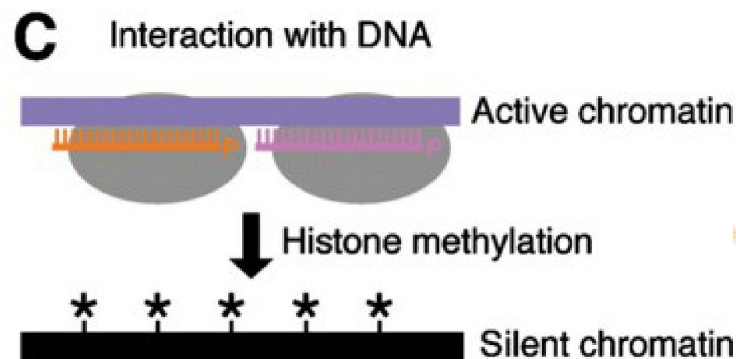
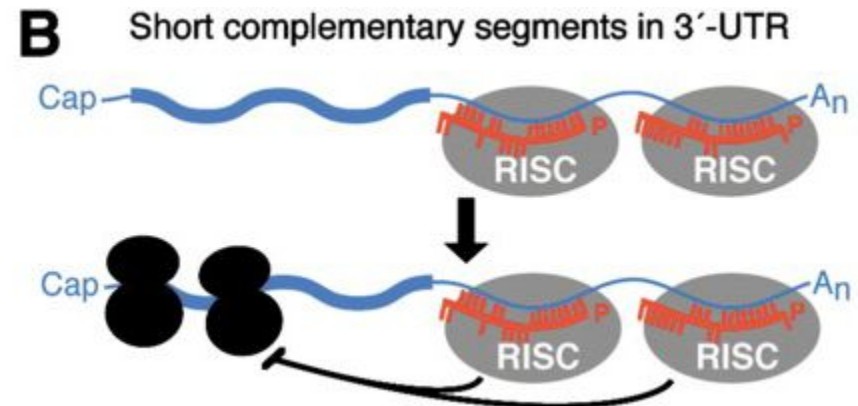
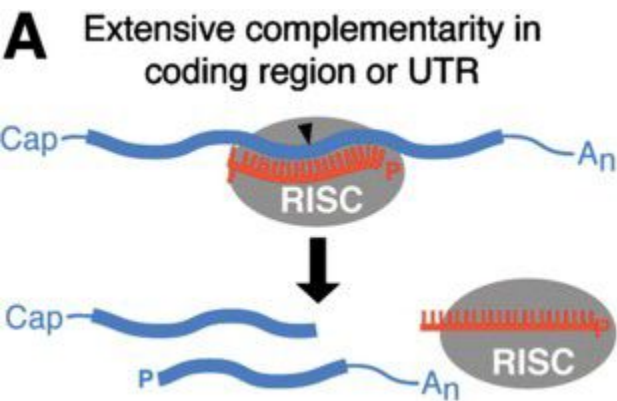
ОСНОВЫ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

- Суть феномена заключается в подавлении экспрессии гена на стадии транскрипции или трансляции при активном участии малых молекул РНК.



ОСНОВНЫЕ ЭФФЕКТЫ МАЛЫХ РНК

- Посттранскрипционное расщепление мРНК --мишени (“классическая” РНКi) условие—высокая гомология с мишенью.
- Репрессия трансляции мРНК- гомология с мишенью не должна быть полной.
- Транскрипционный сайленсинг хроматина с модификацией его ДНК.



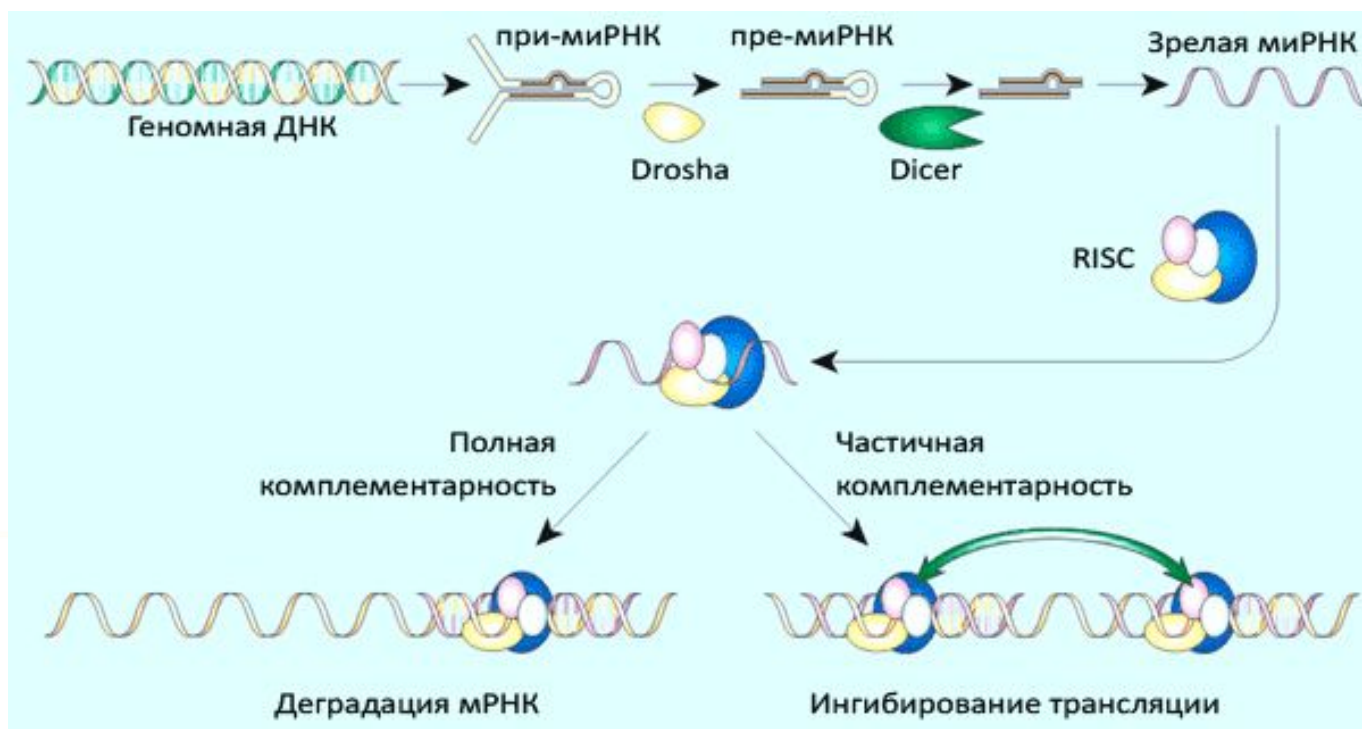
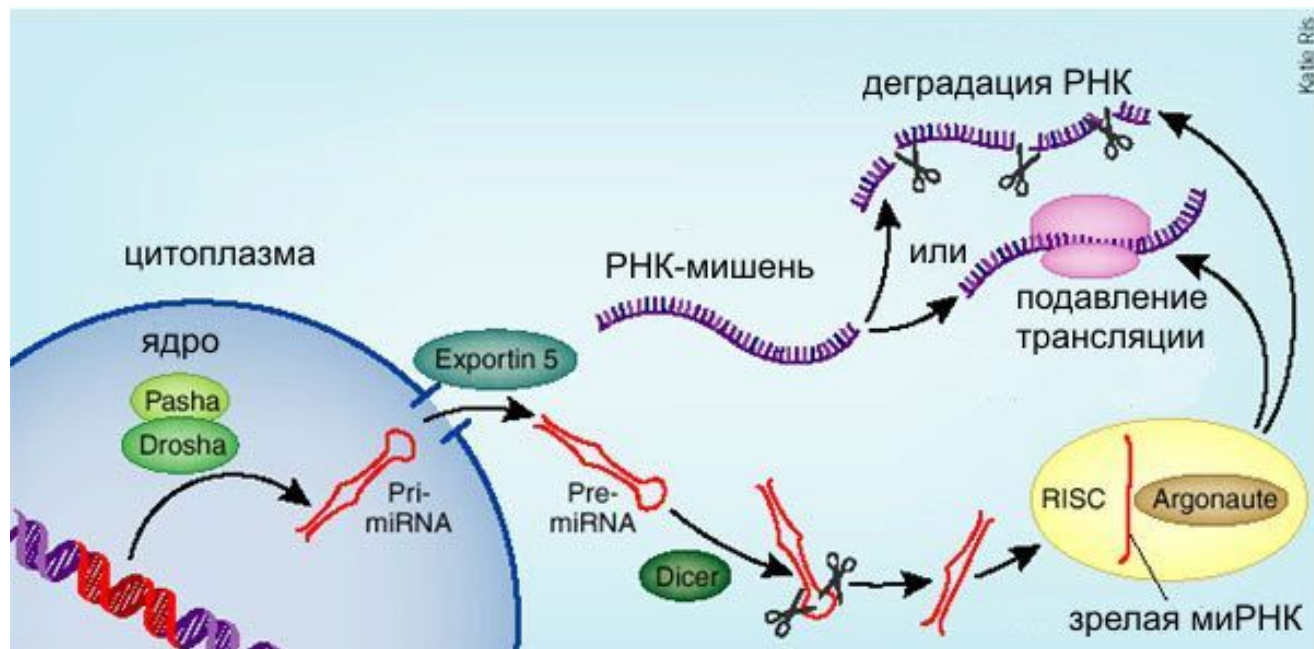
Сводная таблица. Свойства всех трёх классов коротких РНК

	кшРНК	микроРНК	пиРНК
Распространение	Растения, <i>Drosophila</i> , <i>C. elegans</i> . Не найдено у позвоночных	Эукариоты	Эмбриональные клетки животных (начиная с кишечнорастных). Нет у простейших и растений
Длина	21–22 нуклеотидов	19–25 нуклеотидов	24–30 нуклеотидов
Структура	Двухцепочечная, по 19 комплементарных нуклеотидов и два неспаренных нуклеотида на 3'-конце	Одноцепочечная сложная структура	Одноцепочечная сложная структура. U на 5'-конце, 2'-O-метилованный 3'-конец
Процессинг	Dicer-зависимый	Dicer-зависимый	Dicer-независимый
Эндонуклеазы	Ago2	Ago1, Ago2	Ago3, Piwi, Aub
Активность	Дегградация комплементарных мРНК, ацетилирование геномной ДНК	Дегградация или ингибирование трансляции целевой мРНК	Дегградация мРНК, кодирующих МГЭ, регуляция транскрипции МГЭ
Биологическая роль	Антивирусная иммунная защита, подавление активности собственных генов	Регуляция активности генов	Подавление активности МГЭ во время эмбриогенеза

Общие свойства микроРНК

- ✓ Транскрибируются с **эндогенных генов** в виде предшественников длиной порядка 70-100 н.
- ✓ Транскрипты являются субстратом для Dicer, имеют в своем составе двуцепочечные шпилечные структуры, в ходе сложного процессинга расщепляются до зрелых микроРНК (как правило, 21-25 п.н.)
- ✓ Характеризуются индивидуальными паттернами экспрессии
- ✓ Как правило, имеют множество мишеней

Продукты расщепления подобны siРНК
и участвуют в схожих механизмах



Drosha

Ядерный фермент РНКаза III (Lee et al., 2003)

➤ ~160 kDa, у животных консервативный белок, часть большого комплекса (~500 кДа у *D.melanogaster*, ~650 кДа у *H.sapiens*)

Осуществляет процессинг pri-miРНК до pre-miРНК

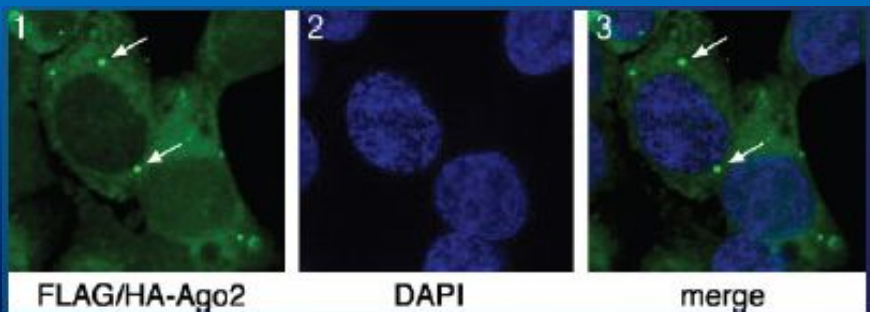
✓ оставляет 3' оверхэнги на pre-miРНК

Не найдена у растений

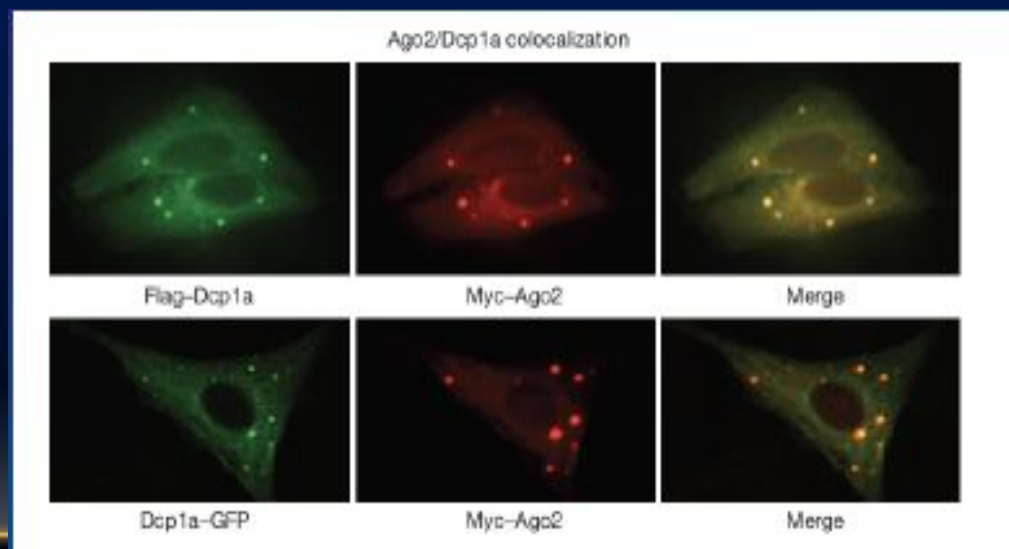
➤ Функцию выполняет один из DCL (Dicer-like) белков

У животных действует в составе гетеродимера с белком, связывающим дцРНК

➤ длинная дцРНК не является субстратом!



У млекопитающих белки Ago локализуются в цитоплазматических Р-тельцах (Processing Bodies) (Peters L, Meister G. Mol Cell. 2007)





piРНК

Piwi-interacting RNA (piRNA) – самый большой класс малых РНК, экспрессируемых в клетках животных. И у позвоночных, и у беспозвоночных. Отличаются от miРНК по размеру (типичный размер 24-31 н.), структуре (не имеют выраженной вторичной структуры!), биогенезу (для образования не нужен Dicer). Образуют комплексы с белками Piwi.

Детали биогенеза не изучены. Происходят из одной цепи ДНК, предположительно имеют длинный одноцепочечный предшественник. Для биогенеза не требуются белки Argonaute, RdRP, PIWI белки (но последние связывают их и необходимы для стабилизации).

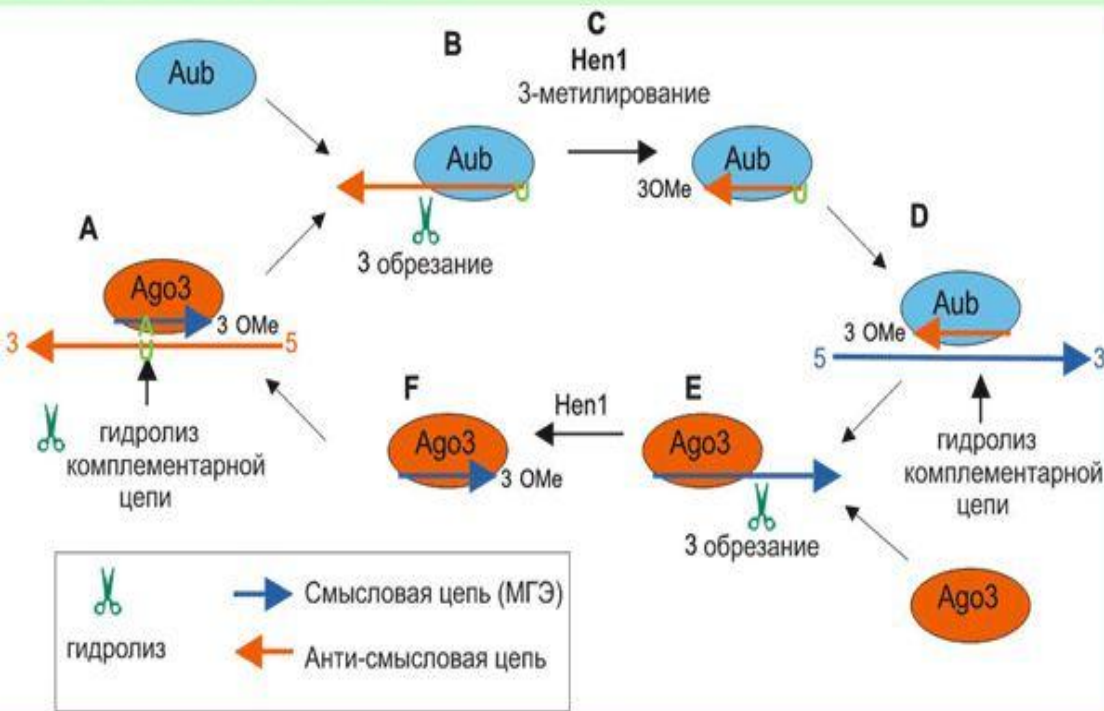


Одноцепочечные и в основном комплементарны транспозонам. Обычно U на 5' конце, 5' монофосфат и 3' O-метильная группа. Значительное число идентифицированных piРНК имеет A в 10й позиции.

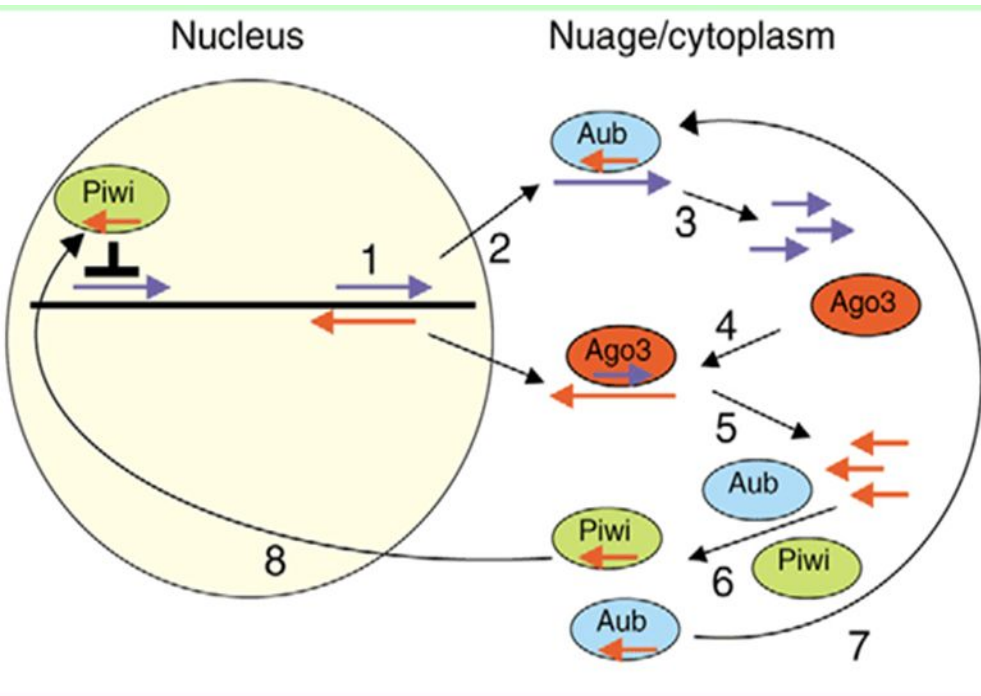
По предварительным оценкам, у млекопитающих сотни тысяч видов. У мыши уже известно более 50000 уникальных последовательностей piРНК, у *Drosophila* более 13000

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ БИОГЕНЕЗА:

Пинг-понг механизм биогенеза пиРНК



A: Цитоплазматическая часть процессинга пиРНК. Биогенез и активность пиРНК опосредуется семейством эндонуклеаз Piwi (Ago3, Aub, Piwi). Активность пиРНК обеспечивается обеими одноцепочечными молекулами пиРНК — смысловой и анти-смысловой, — каждая из которых ассоциирует со специфической эндонуклеазой Piwi. пиРНК узнает комплементарный участок мРНК транспозона (синяя цепь) и вырезает его. Это не только инактивирует транспозон, но и создает новую пиРНК (связанную с Ago3 с помощью метилирования метилазой Hen1 3'-конца). Такая пиРНК, в свою очередь, узнаёт мРНК с транскриптами кластера предшественников пиРНК (красная цепь) — таким способом цикл замыкается и снова вырабатывается нужная пиРНК [14].



Б: piРНК в ядре. Кроме эндонуклеазы Aub, антисмысловую пиРНК может связывать и эндонуклеаза Piwi. После связывания комплекс мигрирует в ядро, где вызывает деградацию комплементарных транскриптов и перестройку хроматина, вызывающую подавление активности транспозонов.

gasiРНК – возможно, являются разновидностью piРНК

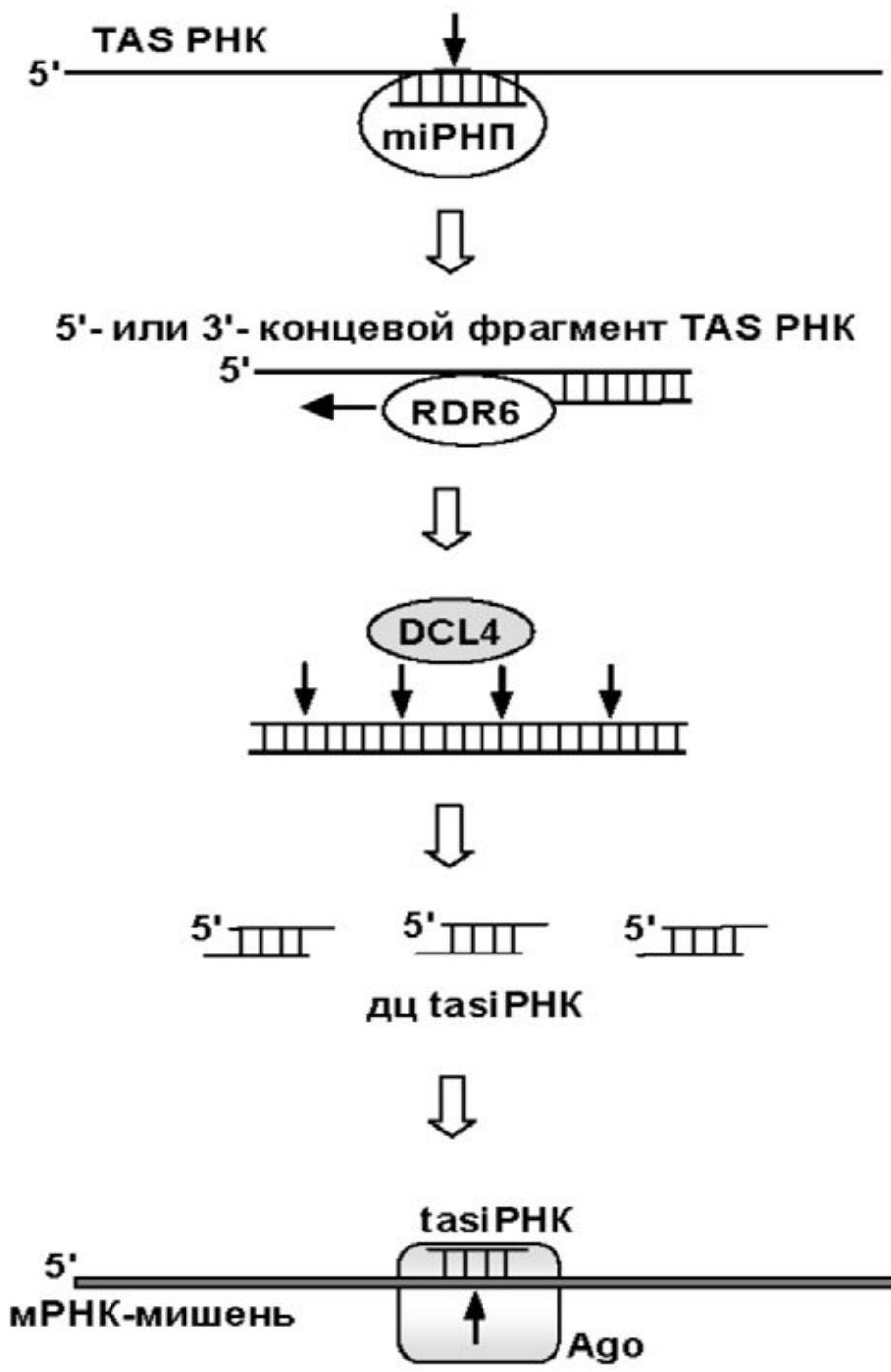
Выявлены у *Drosophila* и некоторых одноклеточных эукариот. У млекопитающих до сих пор не обнаружены. 24-29 н. Предполагается участие в формировании клеток зародышевого пути. Характерен материнский путь наследования.

Предполагаемый предшественник – дцРНК, образующаяся в результате транскрипции с обеих цепей повторенных элементов генома. Биогенез не требует участия Dicer, но требуется белок Ago3 (Argonaute), Piwi и Piwi-подобный белок Aub (от Aubergine – мутация у *Drosophila*), у растений нет Piwi белков, но есть gasiРНК, образующиеся с участием Dcl-белков.

Мутации белков Piwi, ассоциированных с gasiРНК у *Drosophila*, приводят к стерильности и отсутствию формирования клеток зародышевого пути у особей обоего пола

tasiRNA

- У цветковых растений и мхов обнаружены siРНК, которые кодируются собственными генами и направляют разрезание мРНК других, негомологичных генов. По этой причине они названы трансдействующими siРНК (*tasiRNAs*).
- Все TAS РНК служат мишенями miРНК, которые направляют их разрезание: TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2 РНК взаимодействуют с miРНК miR173, а TAS3 РНК – с miR390.
- 5'-Концевая часть TAS3, а у остальных TAS РНК 3'-концевая часть переводятся в двуцепочечную форму РНК-зависимой РНК-полимеразой RDR6.
- дцРНК нарезаются на фрагменты длиной 21 н. с выступающими 3'-концами РНКазой III DCL4
- TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2 РНК не консервативны (найлены только у *A. thaliana*). TAS3 РНК, напротив, обнаружена у многих представителей однодольных и двудольных, хотя сходство предполагаемых гомологов сохраняется только в пределах фрагмента, кодирующего *tasiРНК*



Миртроны (mirtrons)

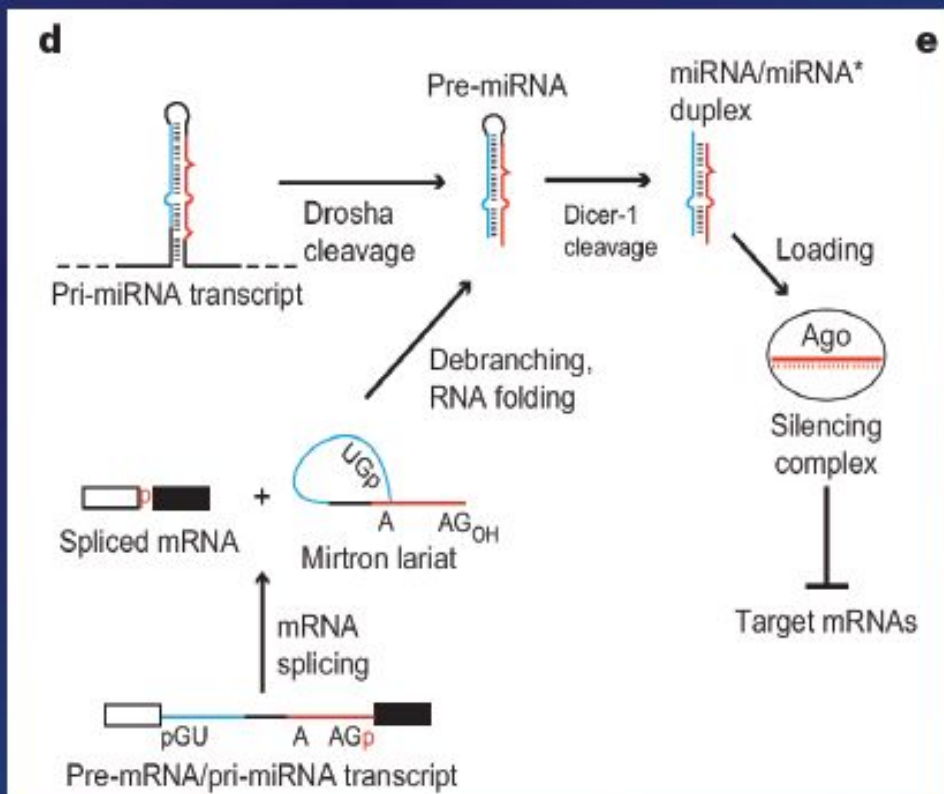
Ruby, J. G., Calvin, H. J. & Bartel, D. P. *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing* (Nature 2007)

Okamura, K. et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila* (Cell 2007)

Обнаружены у *Drosophila*, затем у *C.elegans*, позже у млекопитающих

Выделяются происхождением (из **интронов**) и особенностями биогенеза (не функциями!). Для образования **не требуется Drosha**: вначале процессинг по интронному пути, затем расщепление Dicer и формирование функциональных miRNA

Этим они отличаются от “канонических” miRNA интронного происхождения, для выщепления предшественников которых необходим Drosha



Пересечение “канонического” и “миртронного” путей биогенеза miRNA