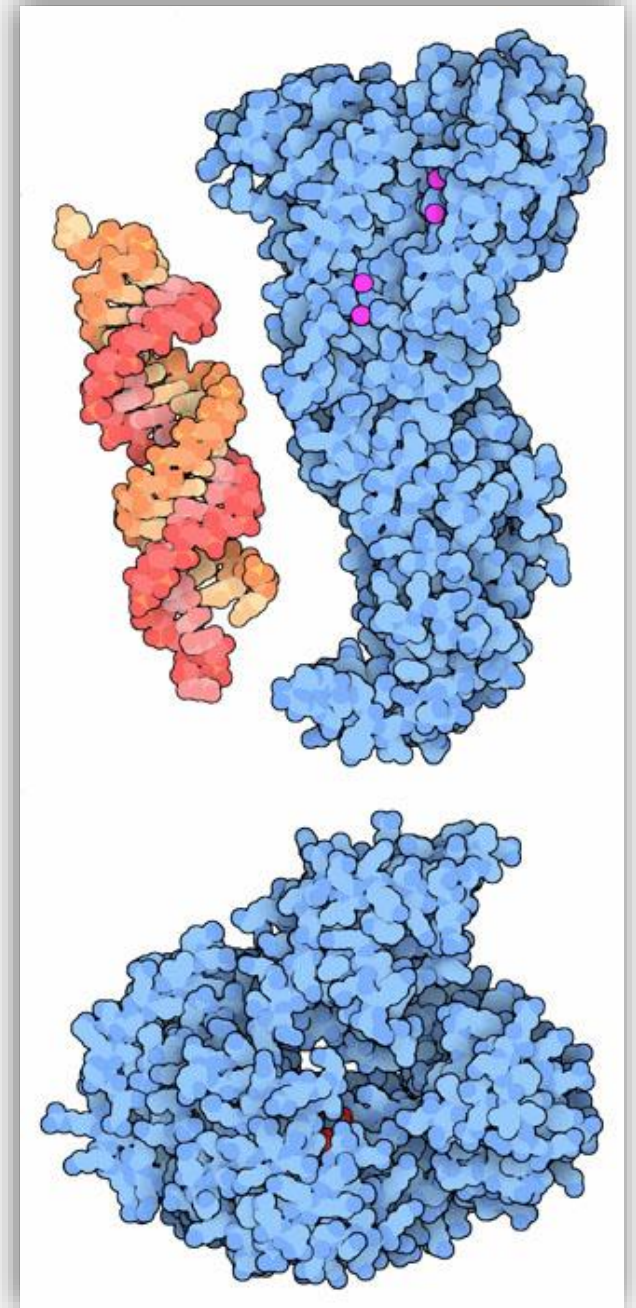


ncRNA

Molekularne Techniki Analizy RNA

Monika Zakrzewska-Płaczek



NIEKODUJĄCY RNA

(*non-coding RNA; ncRNA*)

Housekeeping RNA

Konstitutywna 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

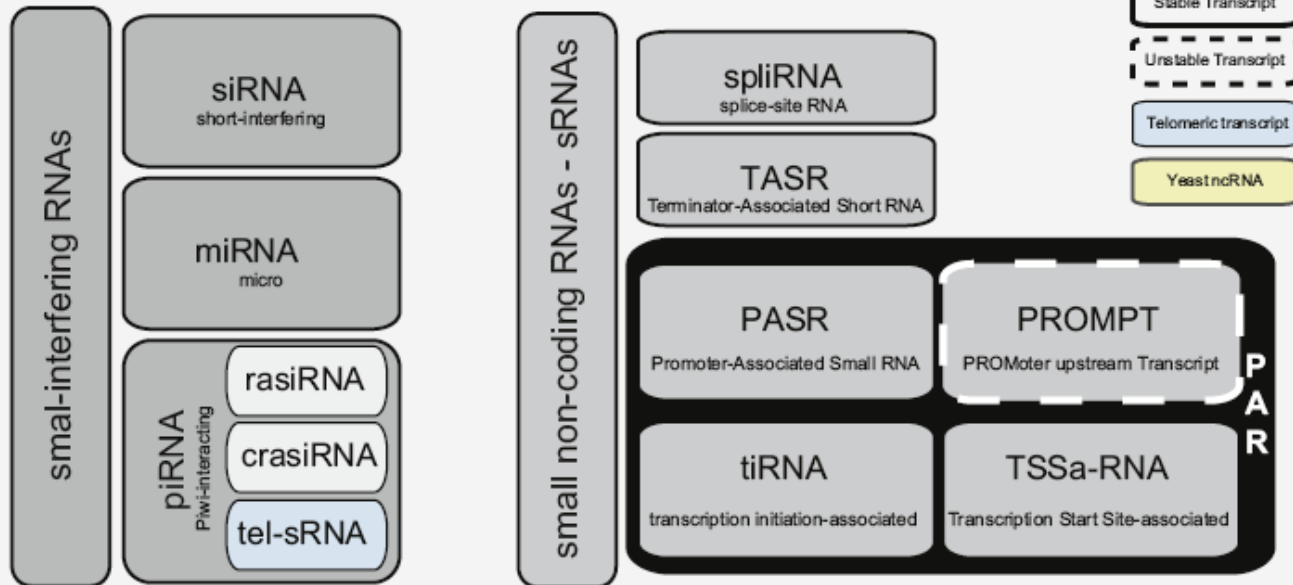
Ekspresja okresowa

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

Wpływ na ekspresję genów na poziomie transkrypcji lub translacji

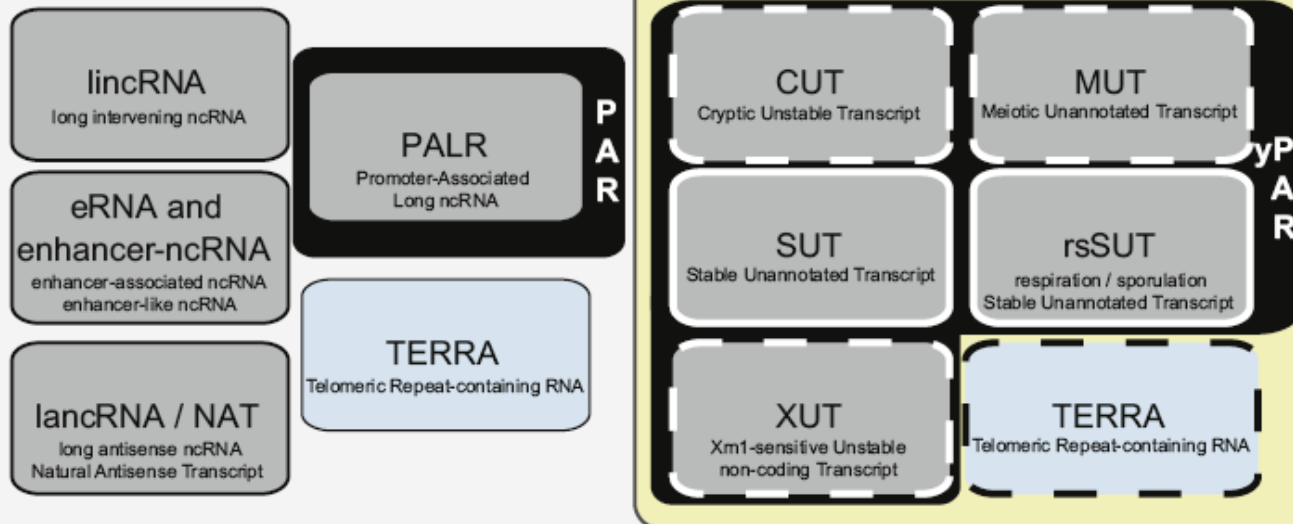
- **sRNA: siRNA** (exo-siRNAs i endo-siRNAs; ta-siRNA; nat-siRNA; lsiRNAs); **miRNA**; **piRNA** – act in TGS or PTGS
- **lncRNAs** – much less known, usually act in TGS (chromatin level)

short non-coding RNAs



CZY TO JUŻ
WSZYSTKIE
ncRNA?

large non-coding RNAs - lncRNAs



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

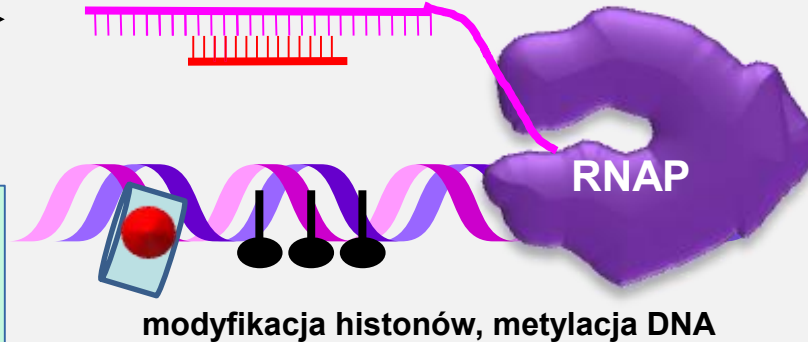
sRNA – 21-30 nt 

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

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



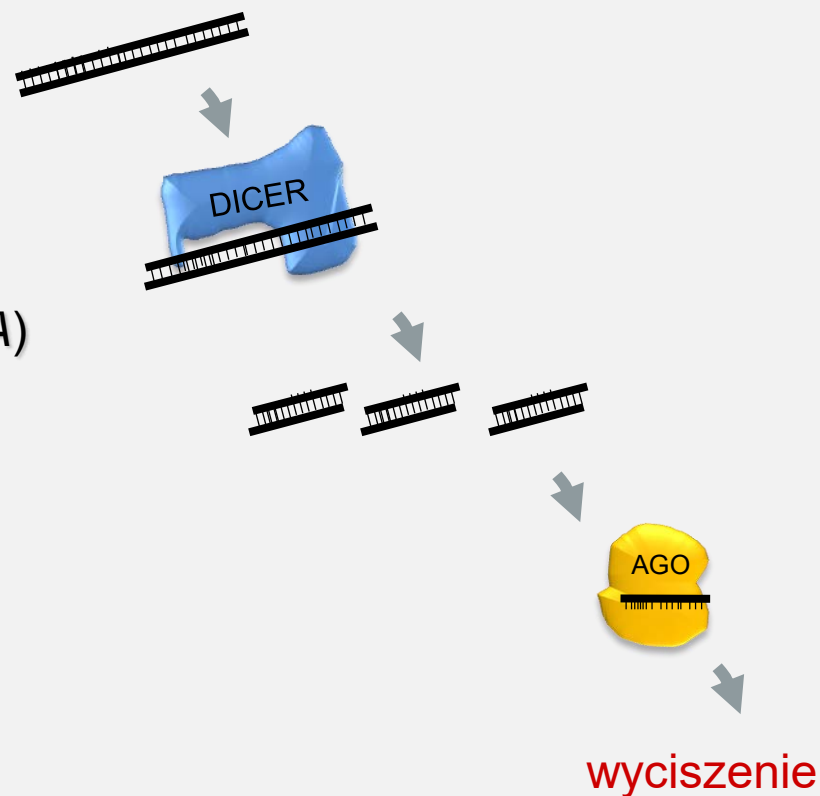
Wyciszanie genów za pośrednictwem małych RNA odgrywa istotną rolę zarówno w **regulacji ekspresji**, jak i w **zachowaniu integralności genomów** organizmów żywych. Za pośrednictwem **siRNA** wyciszane są m.in. regiony bogate w powtórzenia DNA heterochromatyny, sekwencje transpozonowe, wirusy i inne patogeny. **miRNA** i **tsiRNA** regulują m.in. ekspresję genów związanych z zegarem biologicznym, rozwojem, reakcją na stres.

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

Dwuniciowy RNA

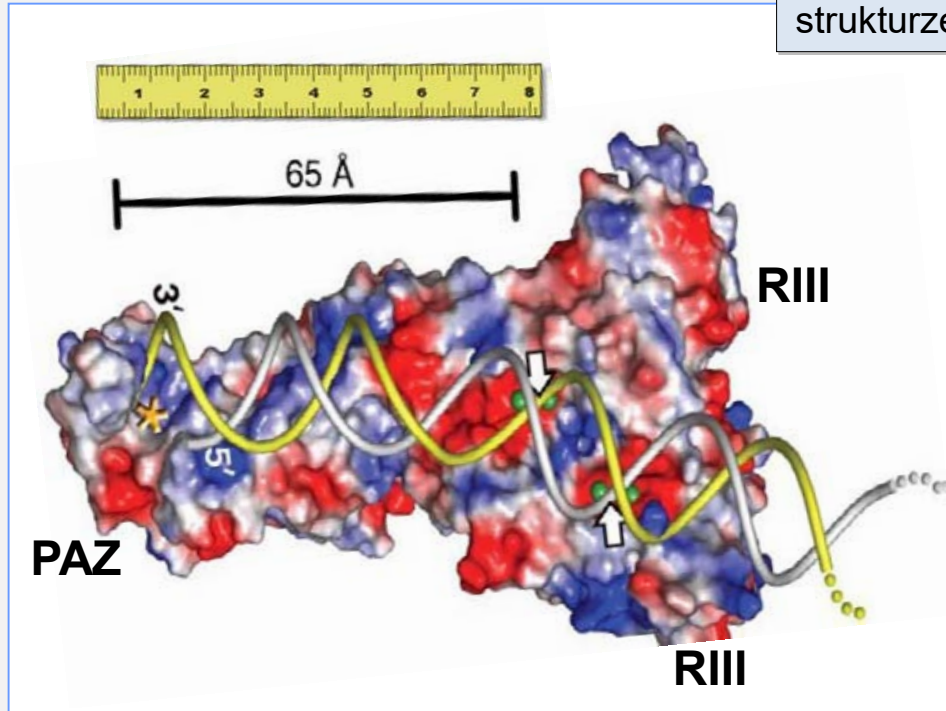
(*double-stranded RNA, dsRNA*)

jest cięty przez *Dicer*
na krótkie dwuniciowe
cząsteczki RNA,
które są wiązane
przez jedno z białek
rodziny *ARGONAUTE*.



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.



PAZ

konserwowana domena wiążąca
dsRNA
(dsRBD- dsRNA-binding domain)
oddziałuje z końcem 3' dsRNA

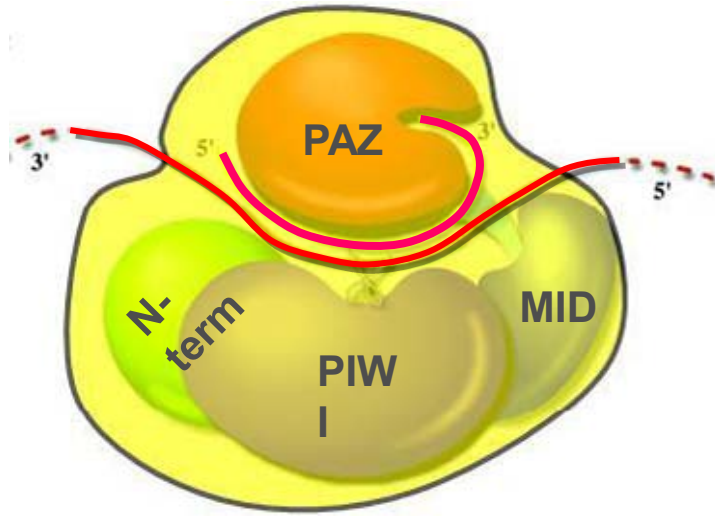
2 domeny typu **RNazy III**
aktywność endonukleolityczna
5'P / 3'OH

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



Argonaute

Białka ARGONAUTE wiążą
sRNA i mRNA



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

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*)



A. thaliana ago1 ***Argonauta argo***

PTGS: post-transkrypcyjne wyciszanie genów

Klasy małych RNA:

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

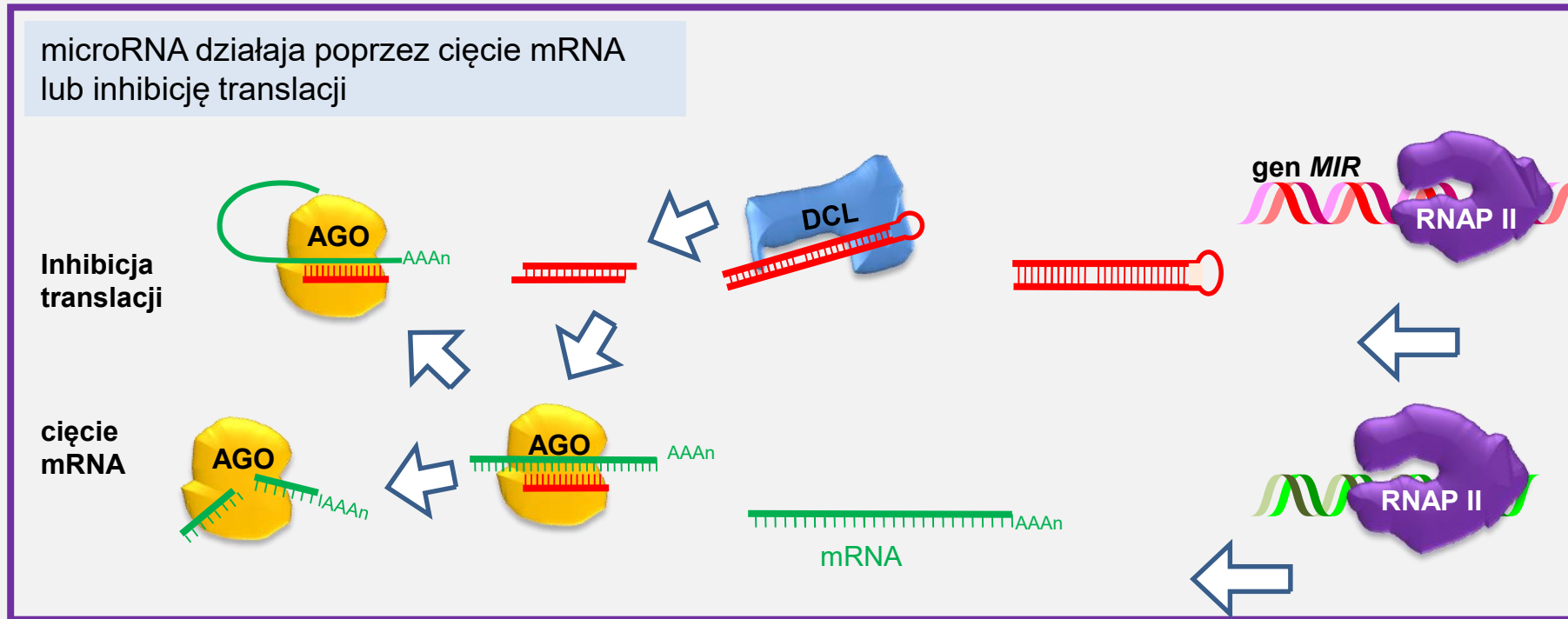
Klasy małych RNA:

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

BIAŁKA DICER I ARGONAUTE U RÓŻNYCH ORGANIZMÓW

	<i>Species</i>	<i>Argonaute-PIWI-like</i>		<i>Dicer-like</i>	<i>RdRP</i>
		<i>Argonaute</i>	<i>PIWI</i>		
<i>Plantae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10 (AGO1-10)	-	4 (DCL 1-4)	6
	<i>Oryza sativa</i>	18	-	5	5
<i>Fungi</i>	<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
<i>Metazoa</i>	<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)	-

miRNA U ROŚLIN



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

U ROŚLIN W BIOGENEZIE miRNA I siRNA UCZESTNICZĄ RÓŻNE BIAŁKA DCL

AtDCL1 **miRNA**

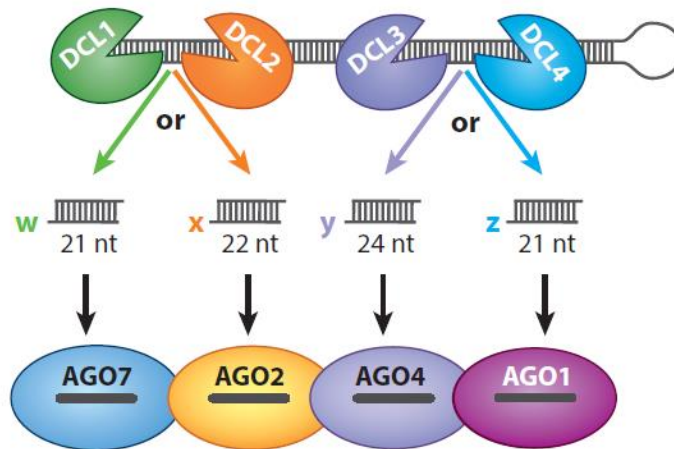


AtDCL2 - 4 **siRNA**



Arabidopsis thaliana:

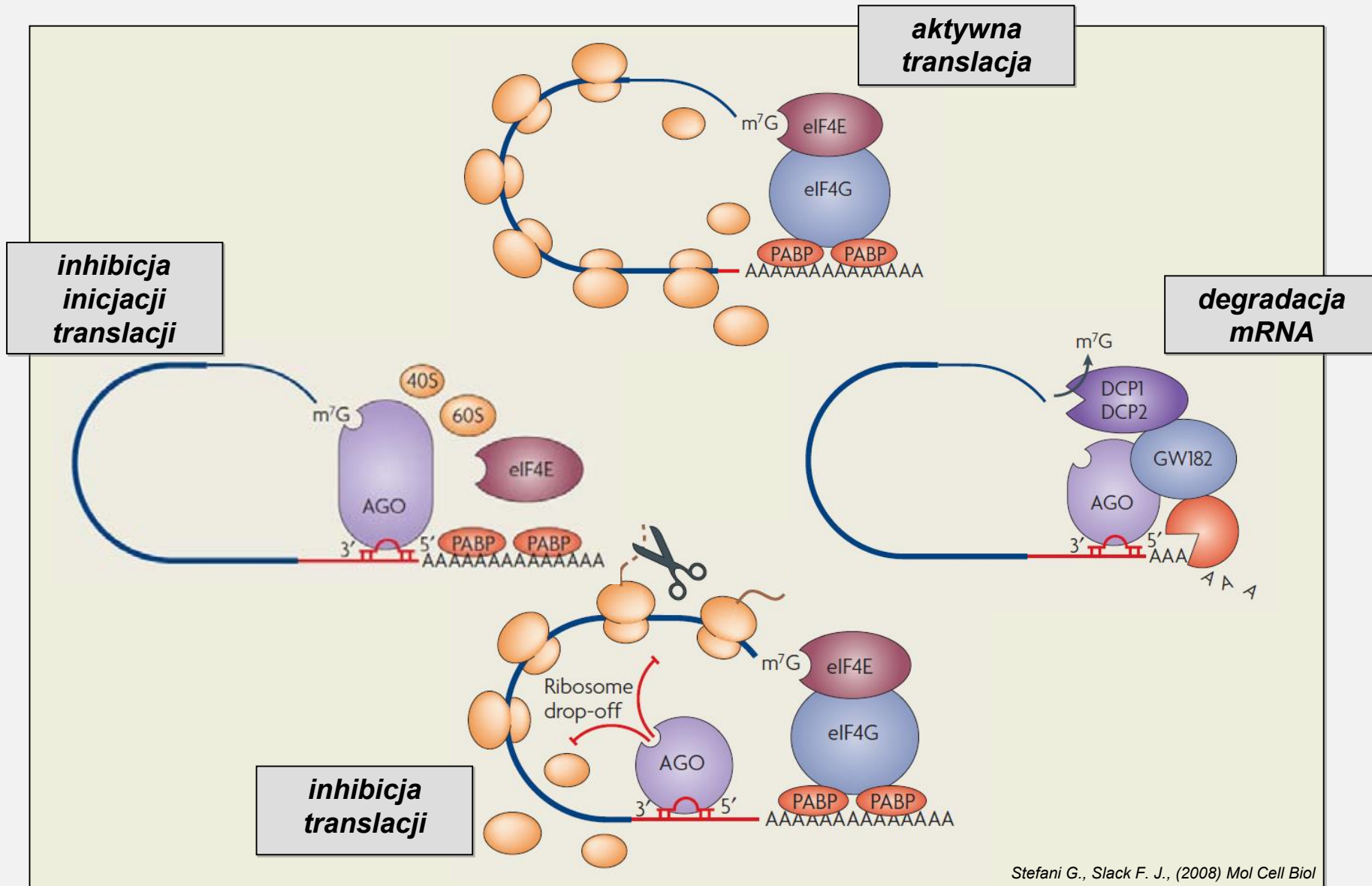
- DCL1 → 21nt miRNA → AGO1/7/10
- DCL2 → 22nt siRNA
- DCL3 → 24nt siRNA → AGO4/6
- DCL4 → 21nt siRNA (tasiRNA) → AGO1
-



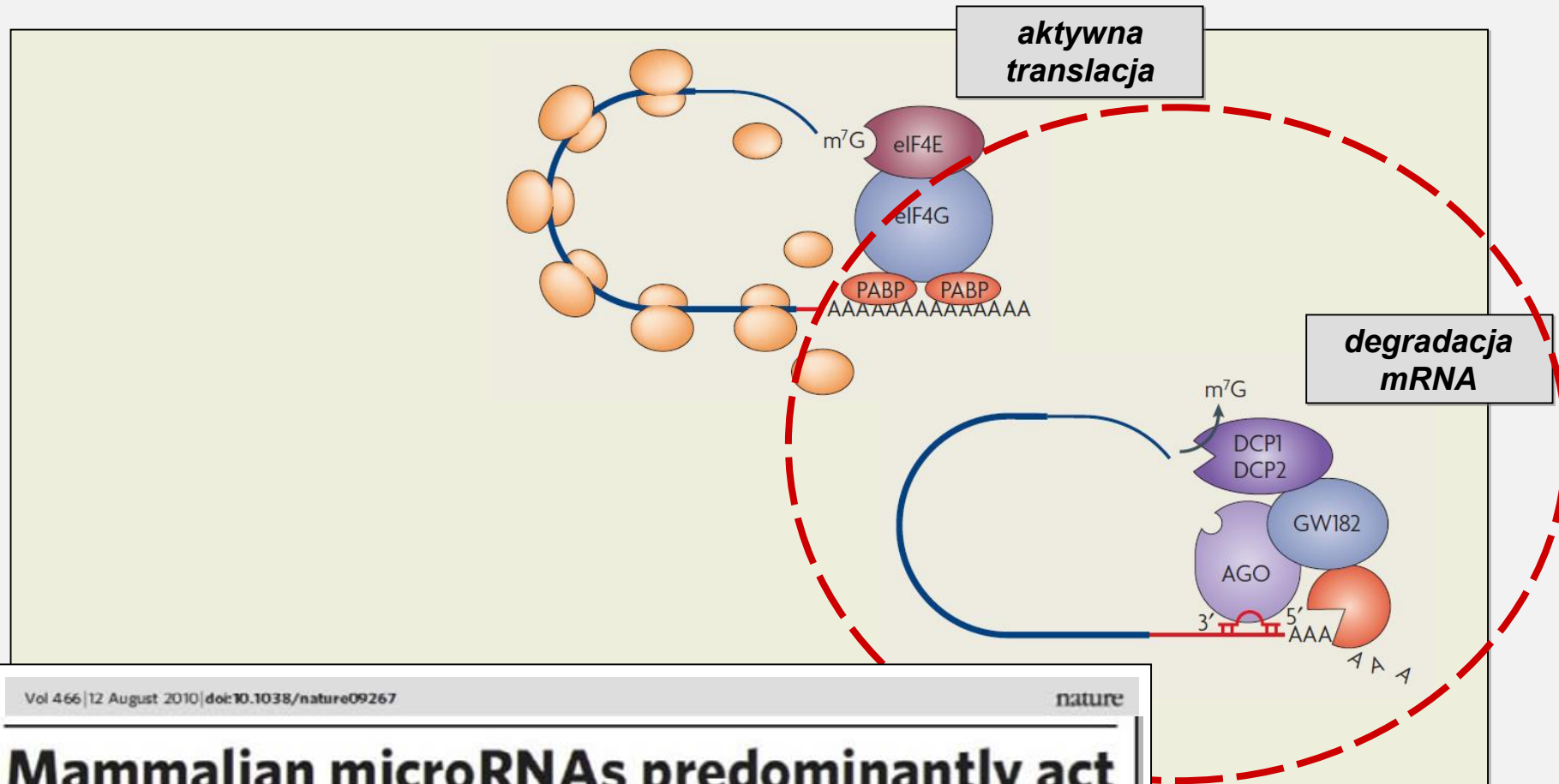
Rośliny mają 4 (i więcej) białek DCL;

większa niż u innych organizmów liczba białek DCL umożliwia roślinom bardziej precyzyjną i skuteczną obronę przed patogenami.

microRNA u zwierząt



microRNA u zwierząt



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

nature

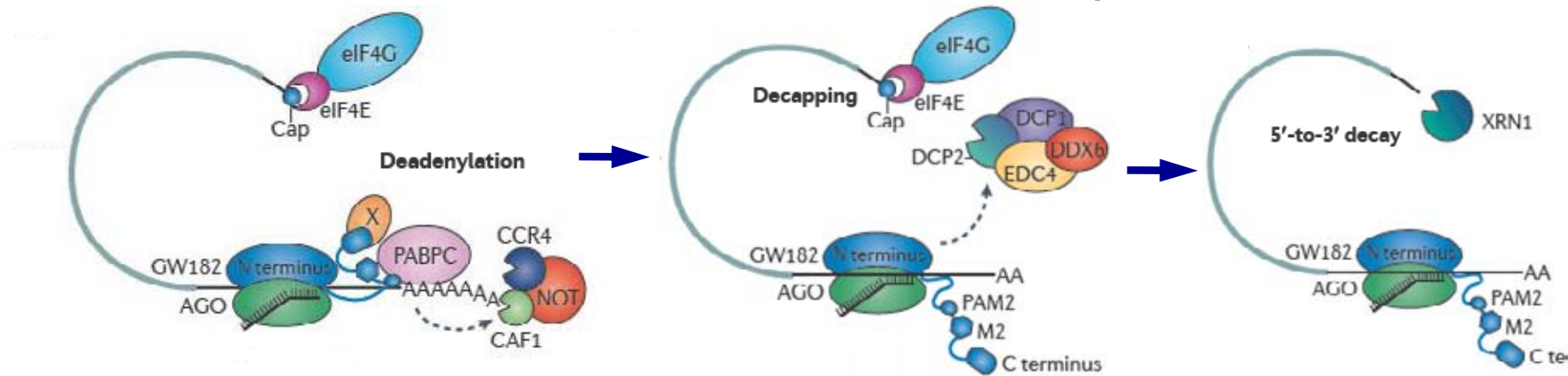
Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels

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

Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels

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

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



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

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

EMBO reports VOL 13 | NO 8 | 2012

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

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

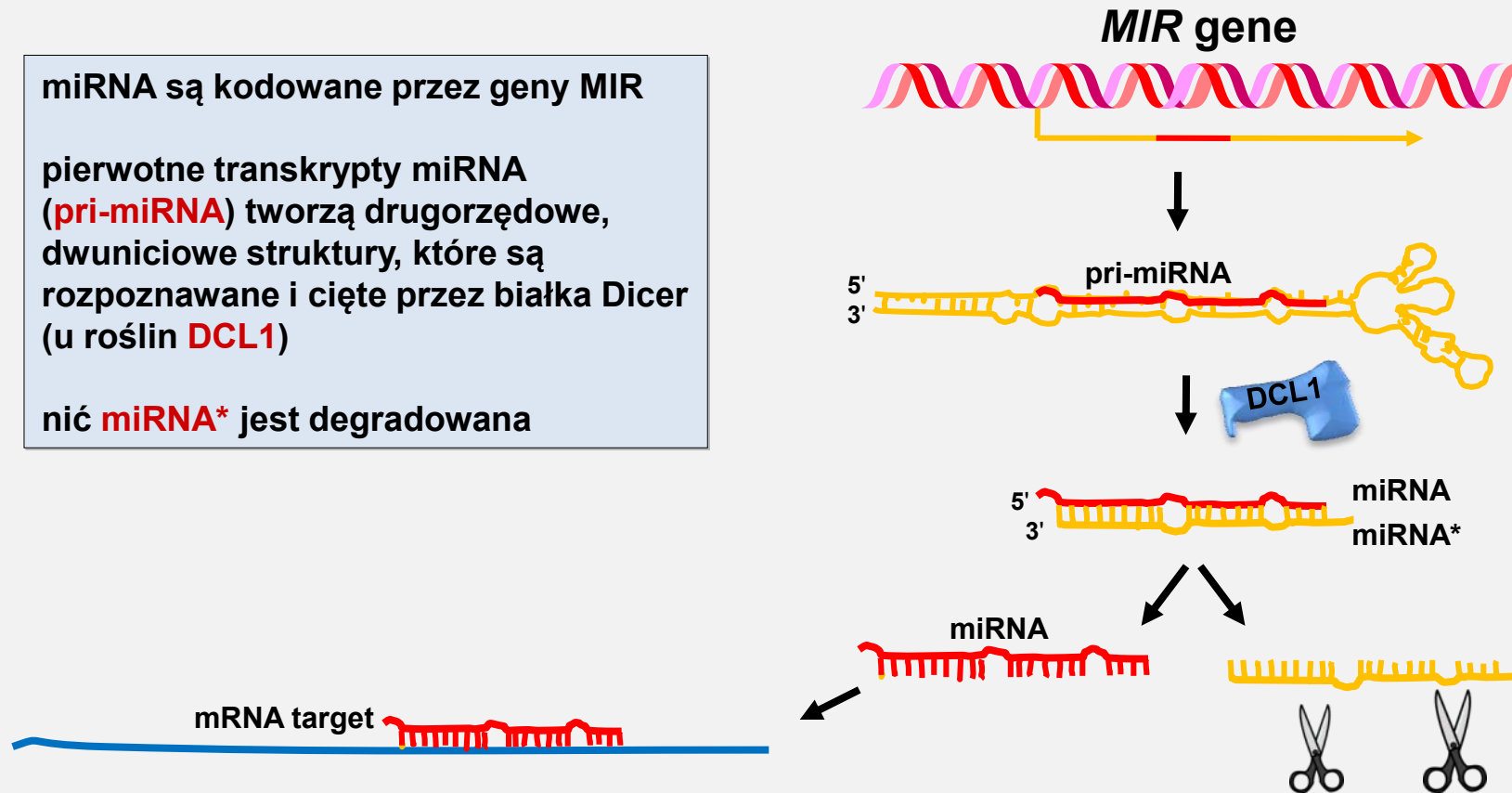
Step 3. Stimulated deadenylation potentiates the effect on translational inhibition and leads to decay of target mRNAs through the recruitment of the decapping machinery.

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

miRNA są kodowane przez geny MIR

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

nić **miRNA*** jest degradowana

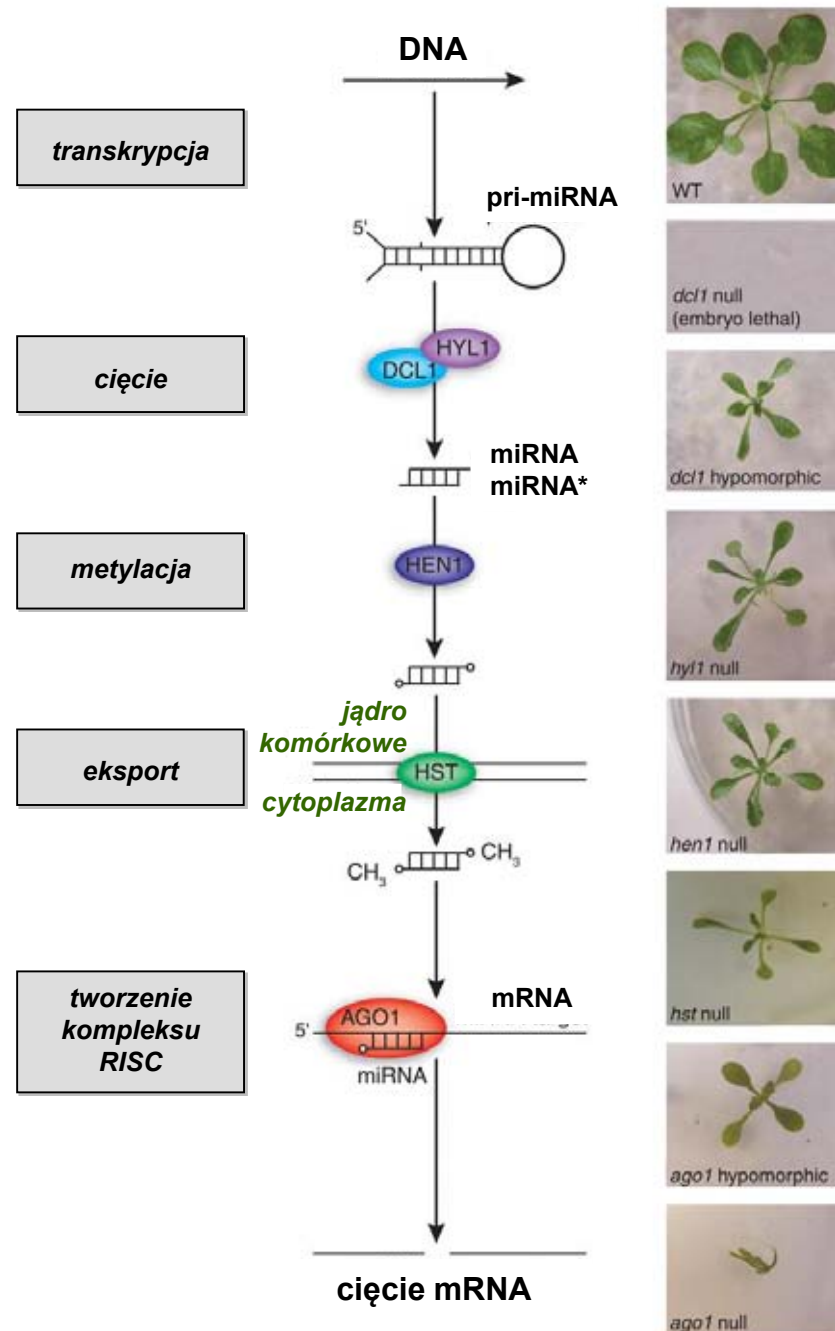


Biogeneza miRNA u roślin

HYL1:
oddziaływanie z DCL1

HEN1:
metylotransferaza, metylacja
miRNA/miRNA*

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

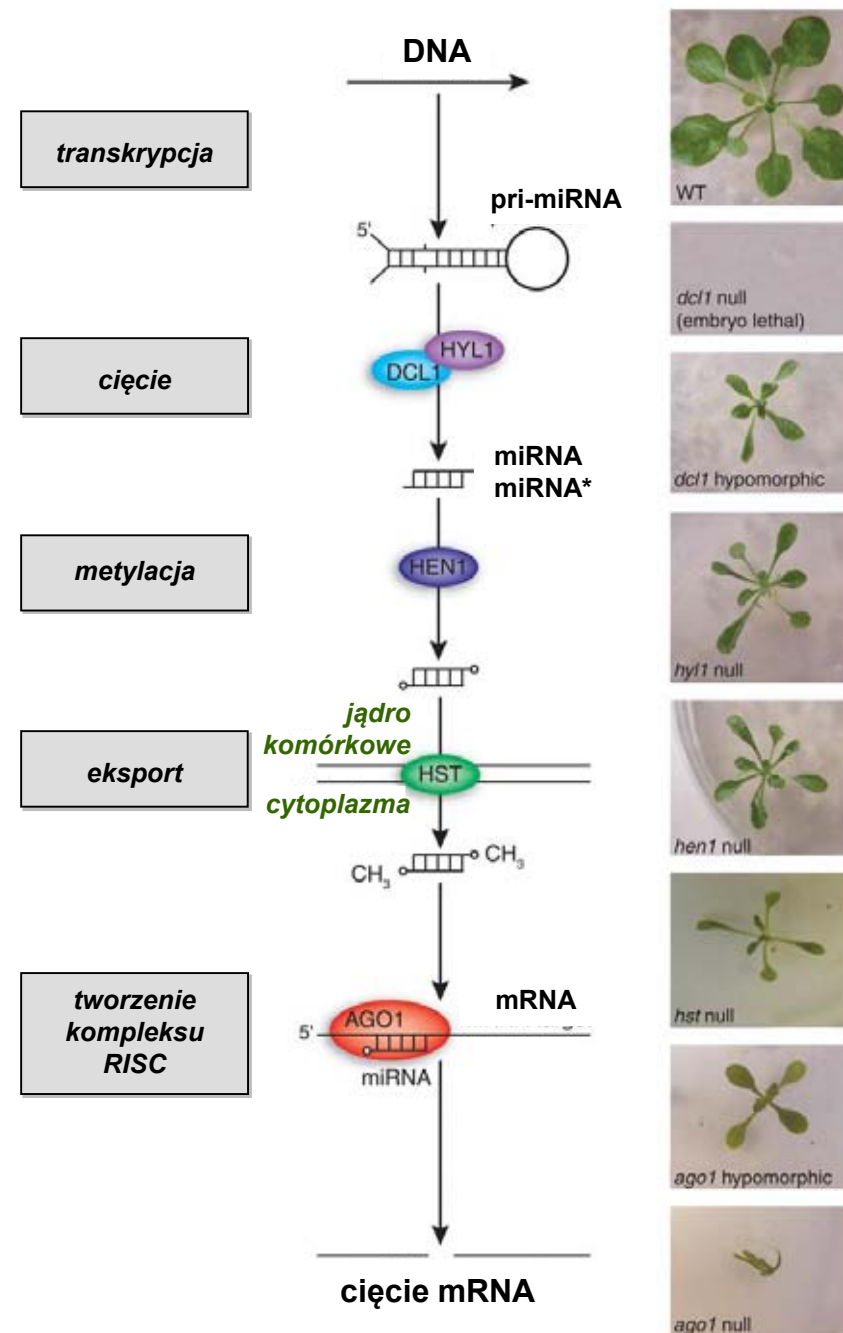


BIOGENEZA miRNA U ROŚLIN

HYL1:
oddziaływanie z DCL1

HEN1:
metylotransferaza, metylacja miRNA/miRNA*

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



BIOGENEZA miRNA U ZWIERZĄT

Drosha+DGCR8 (Pasha):

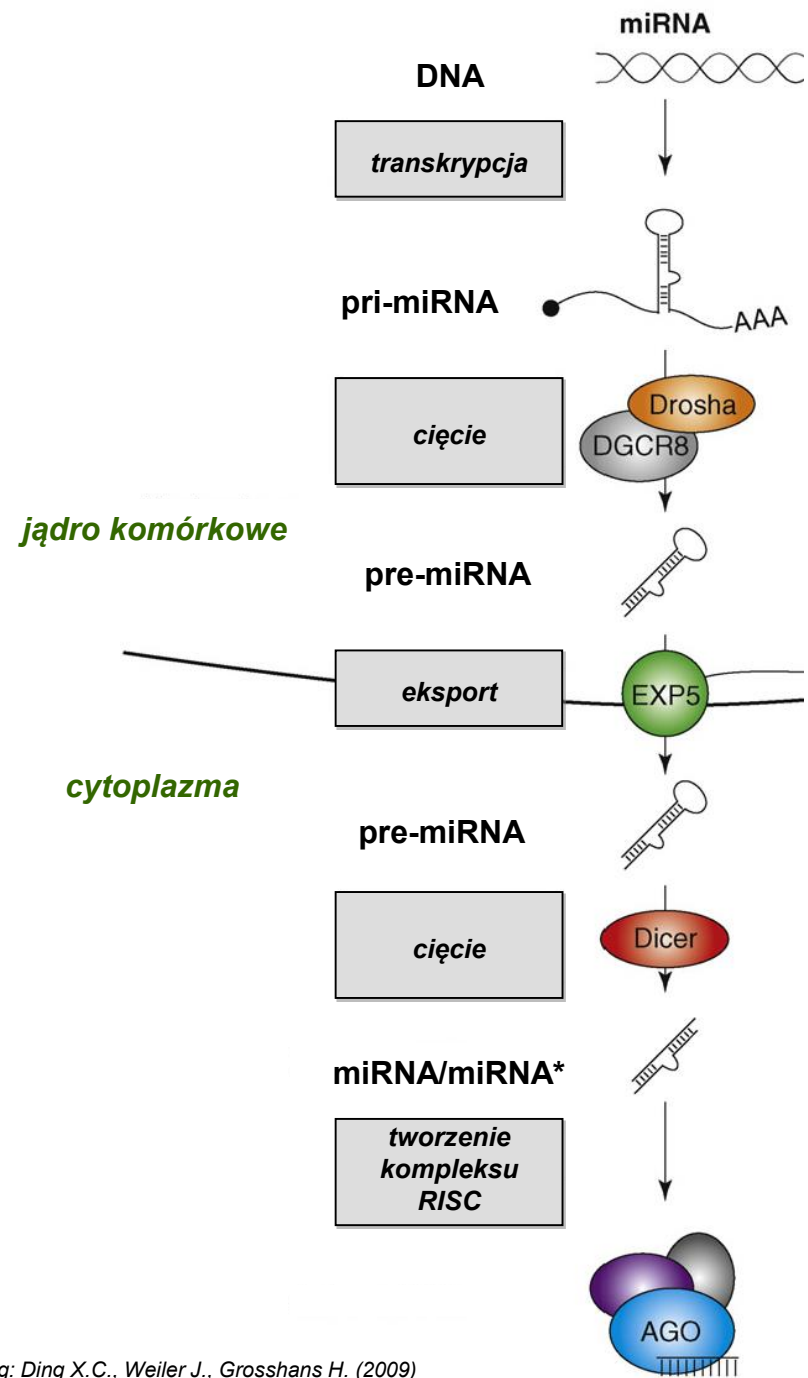
cięcie pri-miRNA → pre-miRNA

EXP5 (eksportyna 5):

eksport pre-miRNA do cytoplazmy

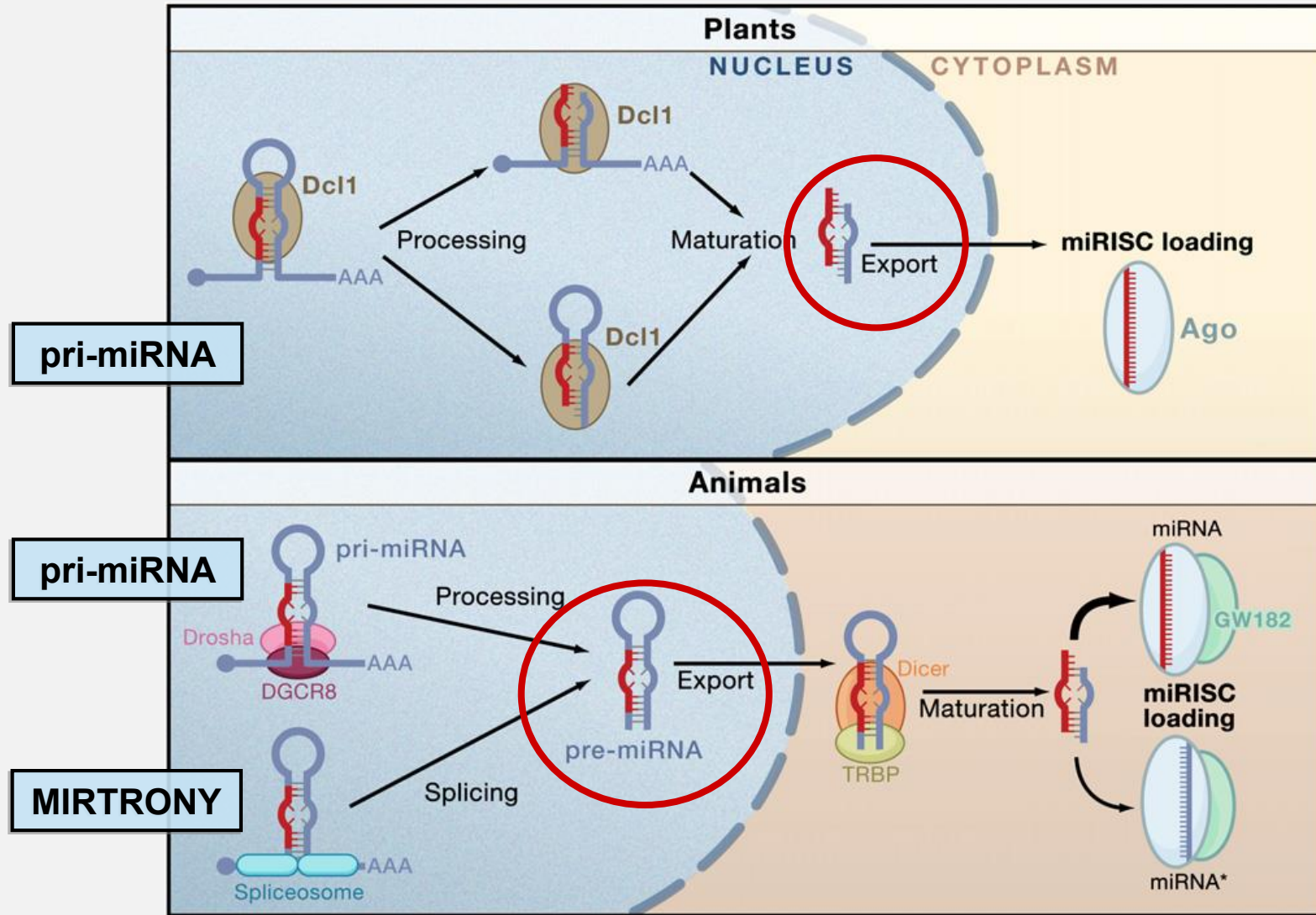
Dicer:

cięcie pre-miRNA → miRNA/miRNA*

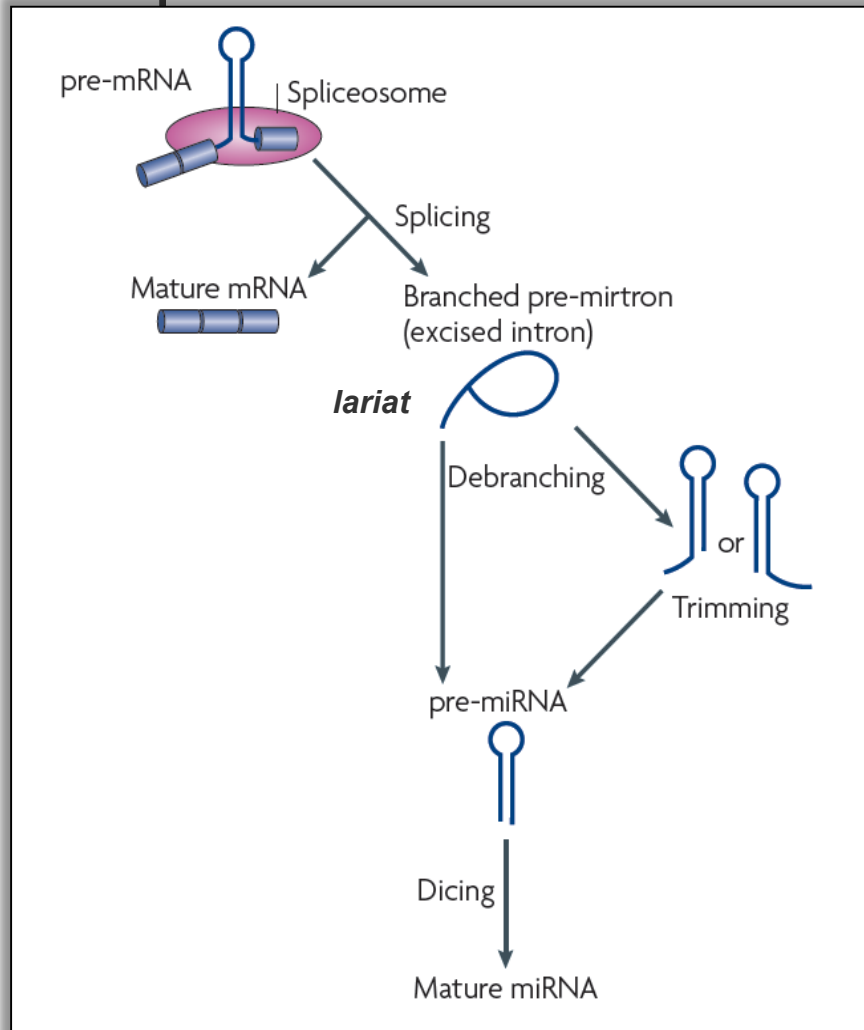


Biogeneza miRNA u roślin i zwierząt

eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy



MIRTRONY



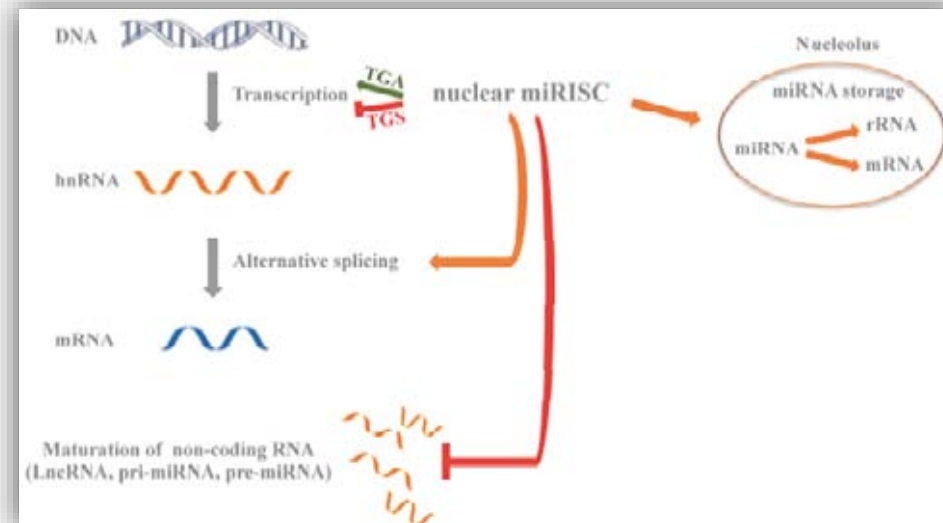
występują u *D. melanogaster*, *C. elegans*, ssaków

powstają z intronów wyciętych z pre-mRNA
podczas składania mRNA (*splicing*)
niezależne od Drosha

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

pre-miRNA → biogeneza miRNA

JĄDROWE FUNKCJE miRNA

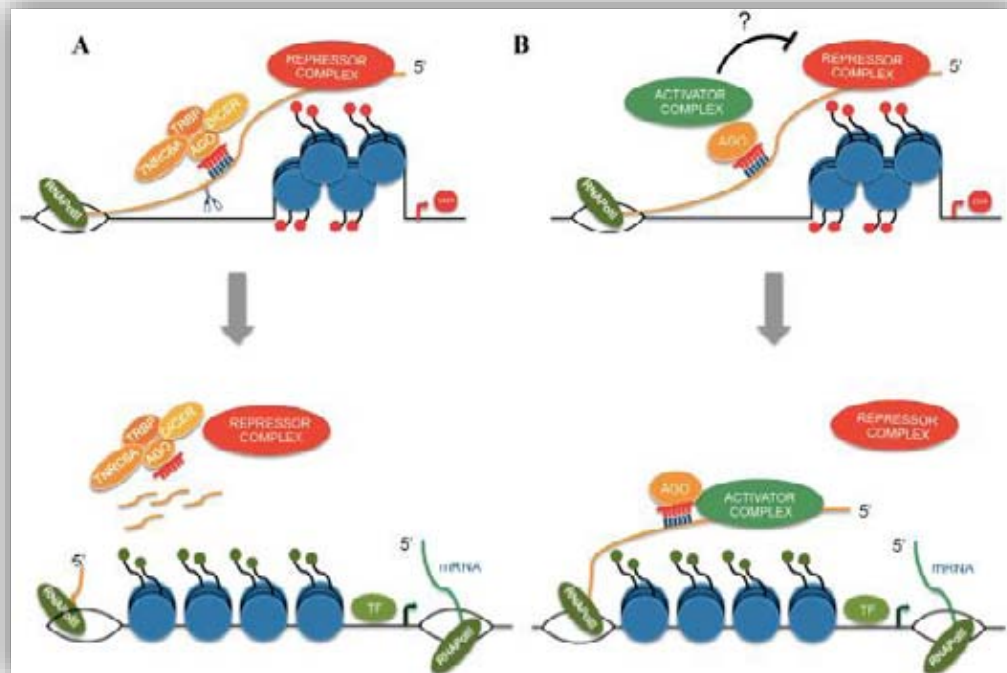


miRNA:

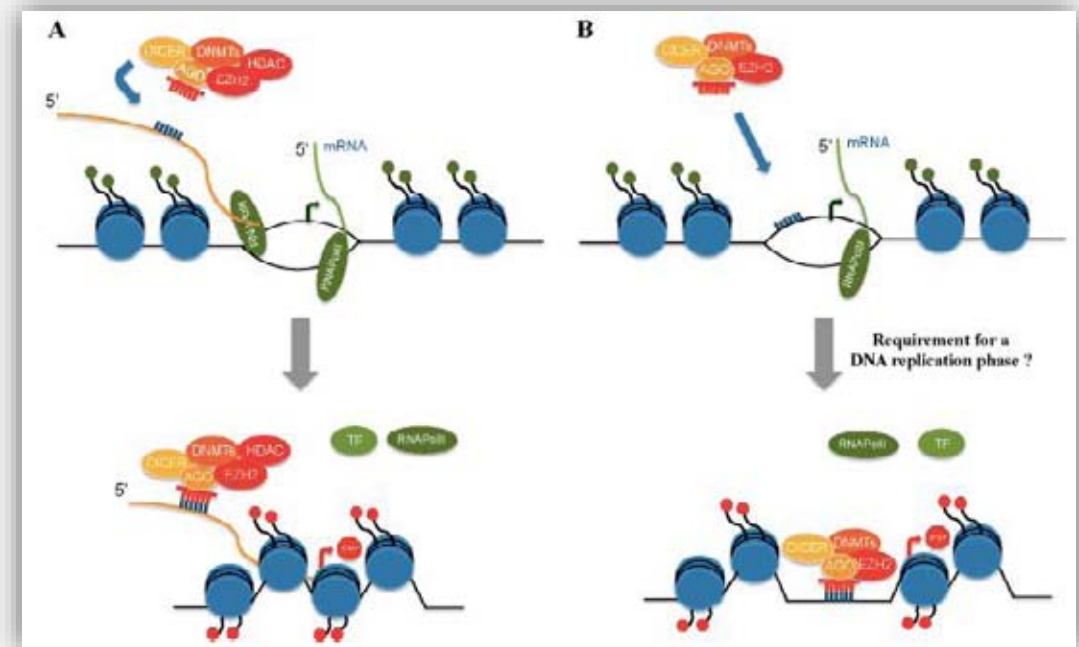
- obecne w jądrze komórkowym i jąderku
- tworzą mniejszy jądrowy kompleks miRISC complex z białkami AGO2/AGO3, DICER, TRBP i TNRC6A (TGA)

JĄDROWE FUNKCJE miRNA

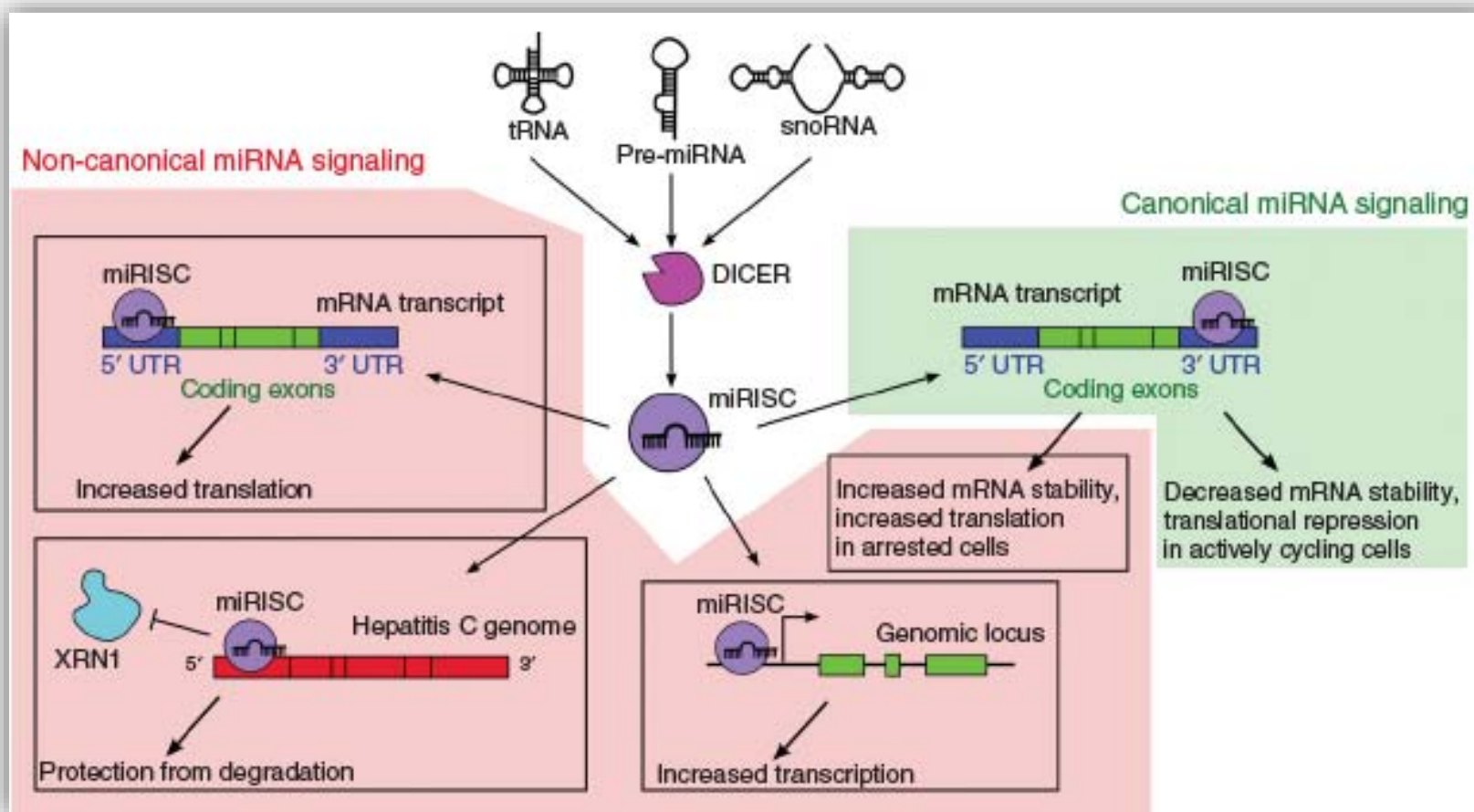
Transkrypcyjna aktywacja genów (TGA)



Transkrypcyjne wyciszenie 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*)

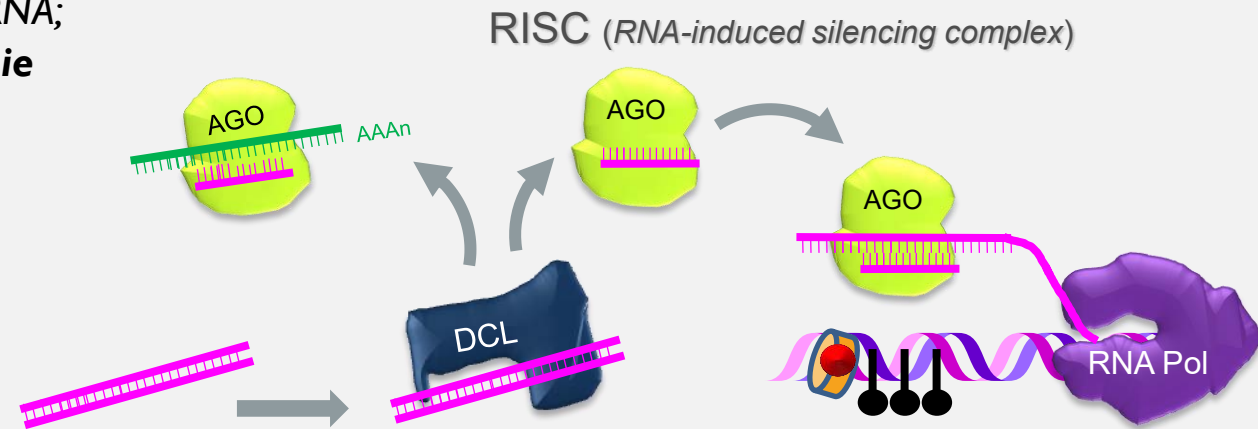
Transgeny wprowadzane sztucznie są często wyciszane przez siRNA;
mogą być wyciszane **post-transkrypcyjnie** lub **transkrypcyjnie**

Wyciszenie może być wywołane:

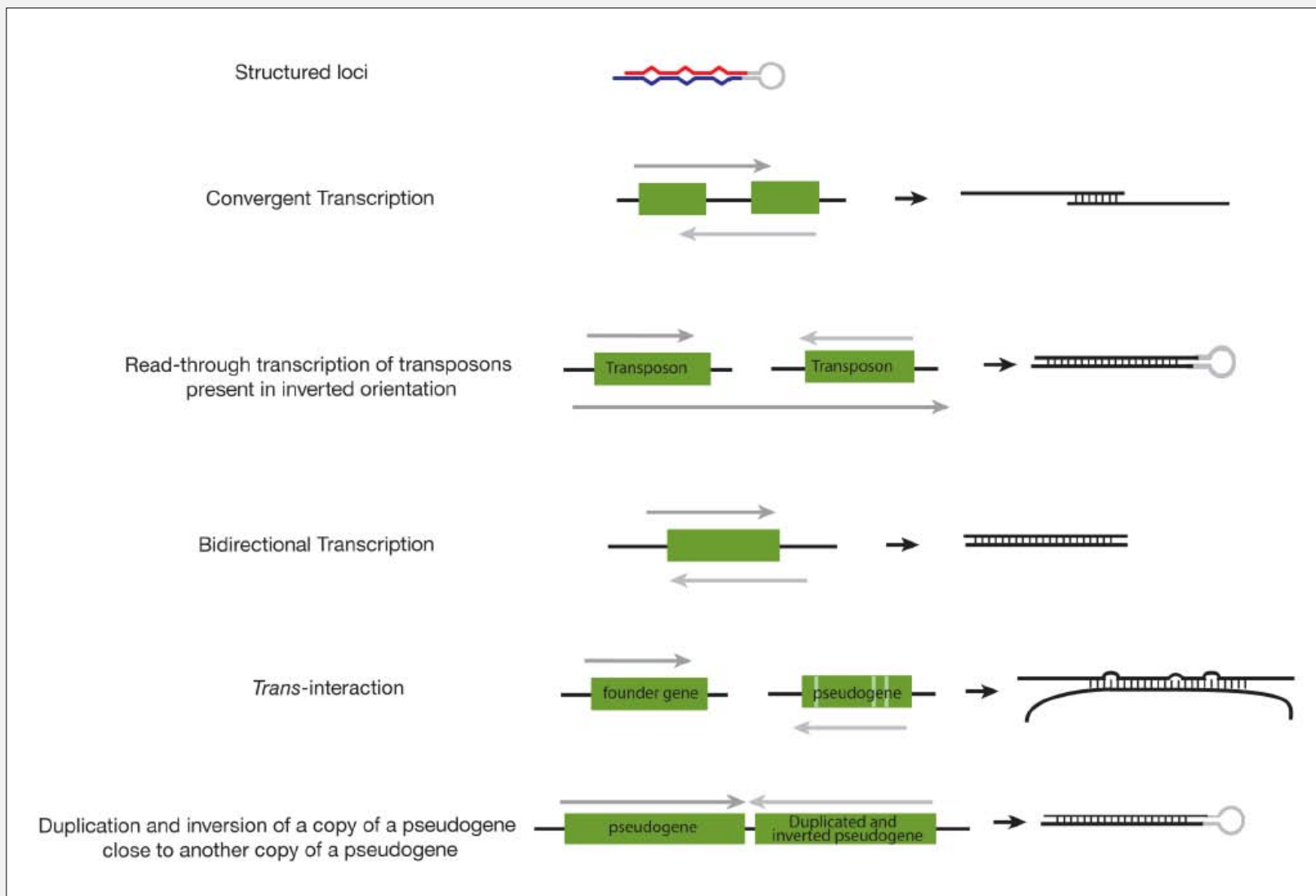
- bardzo wysokim poziomem ekspresji transgenu
- dwuniciowym RNA pochodzącym z ekspresji transgenu
- nieprawidłowymi RNA pochodzącymi z ekspresji transgenu

endo-siRNA:

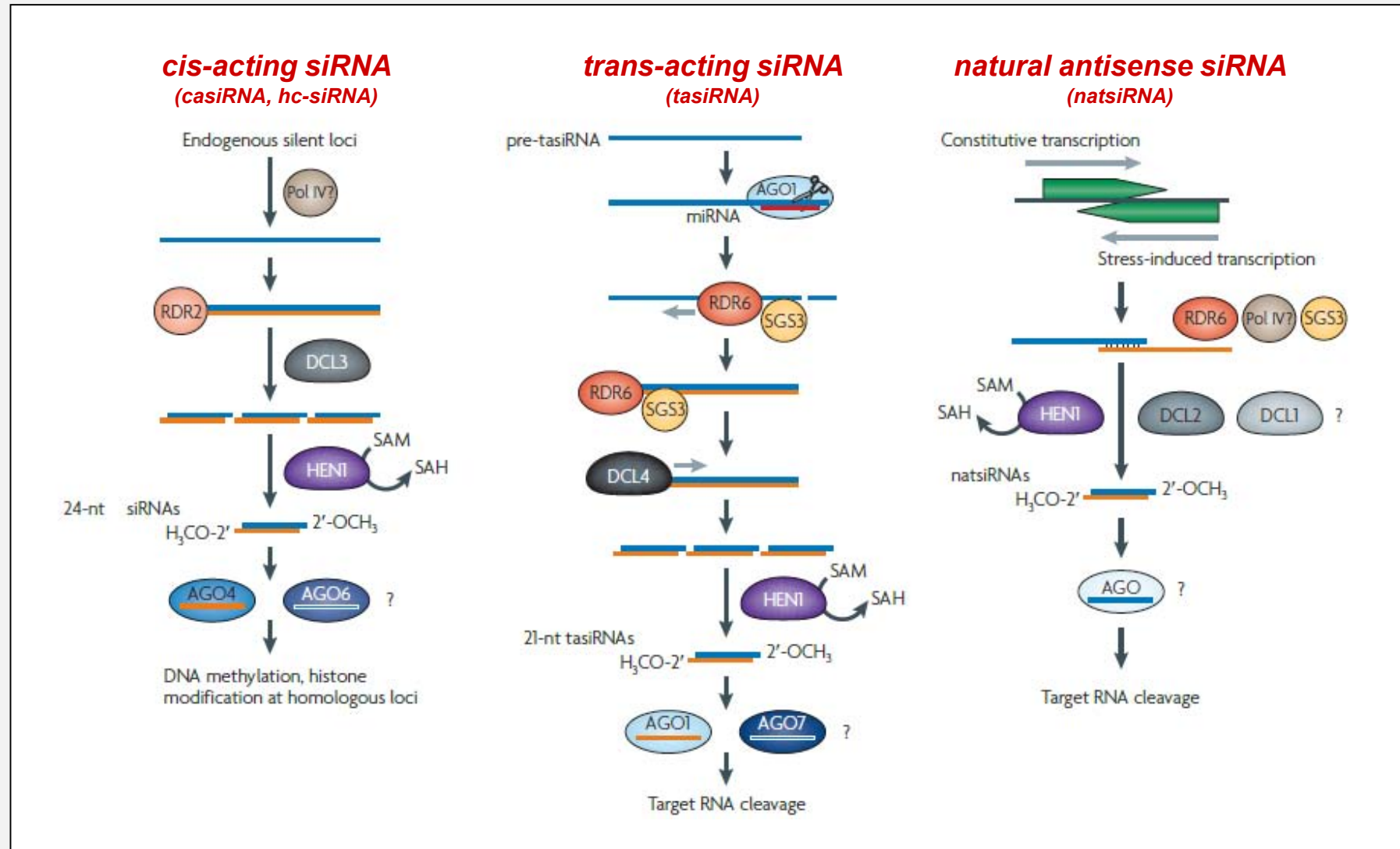
- wyciszenie transpozonów i sekwencji powtórzonych
- utrzymywanie niektórych genów w stanie epigenetycznie nieaktywnym



Endo-siRNA: pochodzenie endogenne

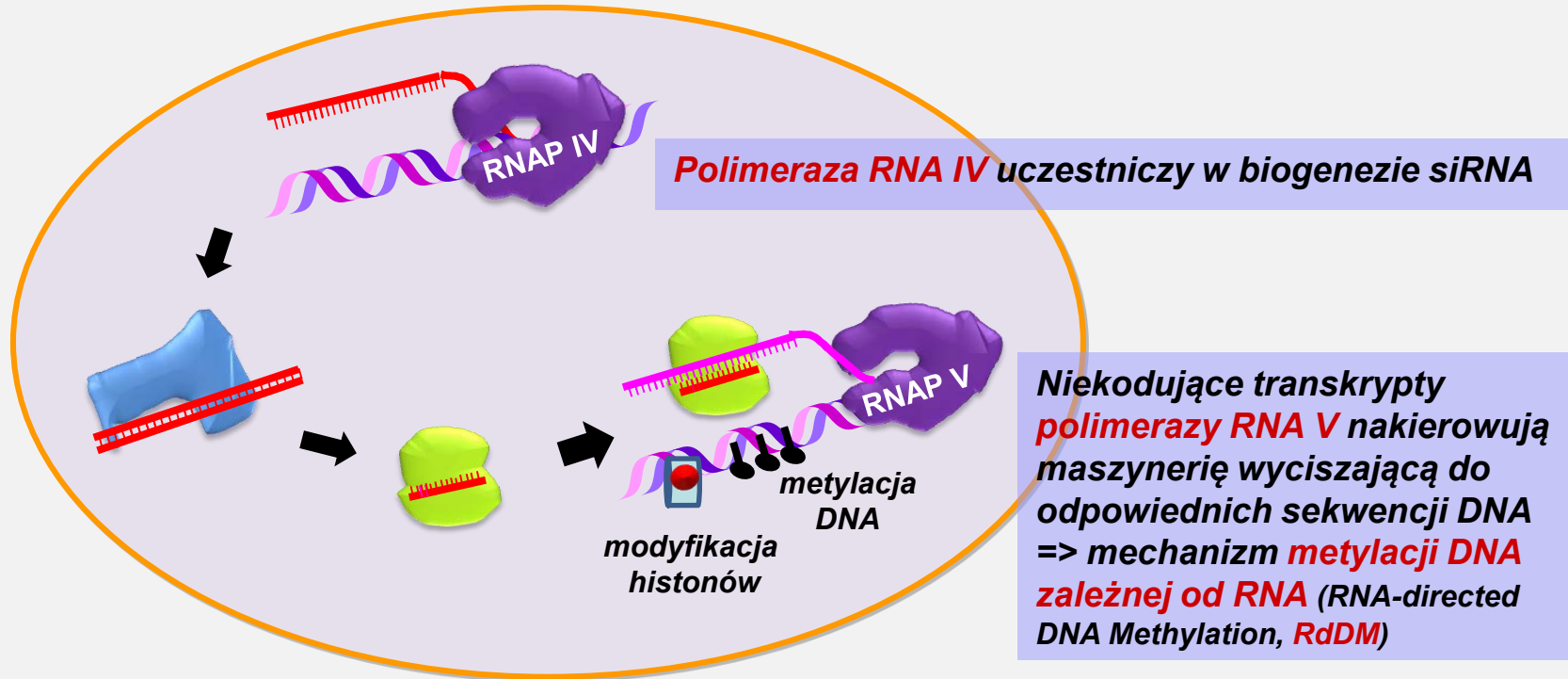


Endo-siRNA u rošlin:



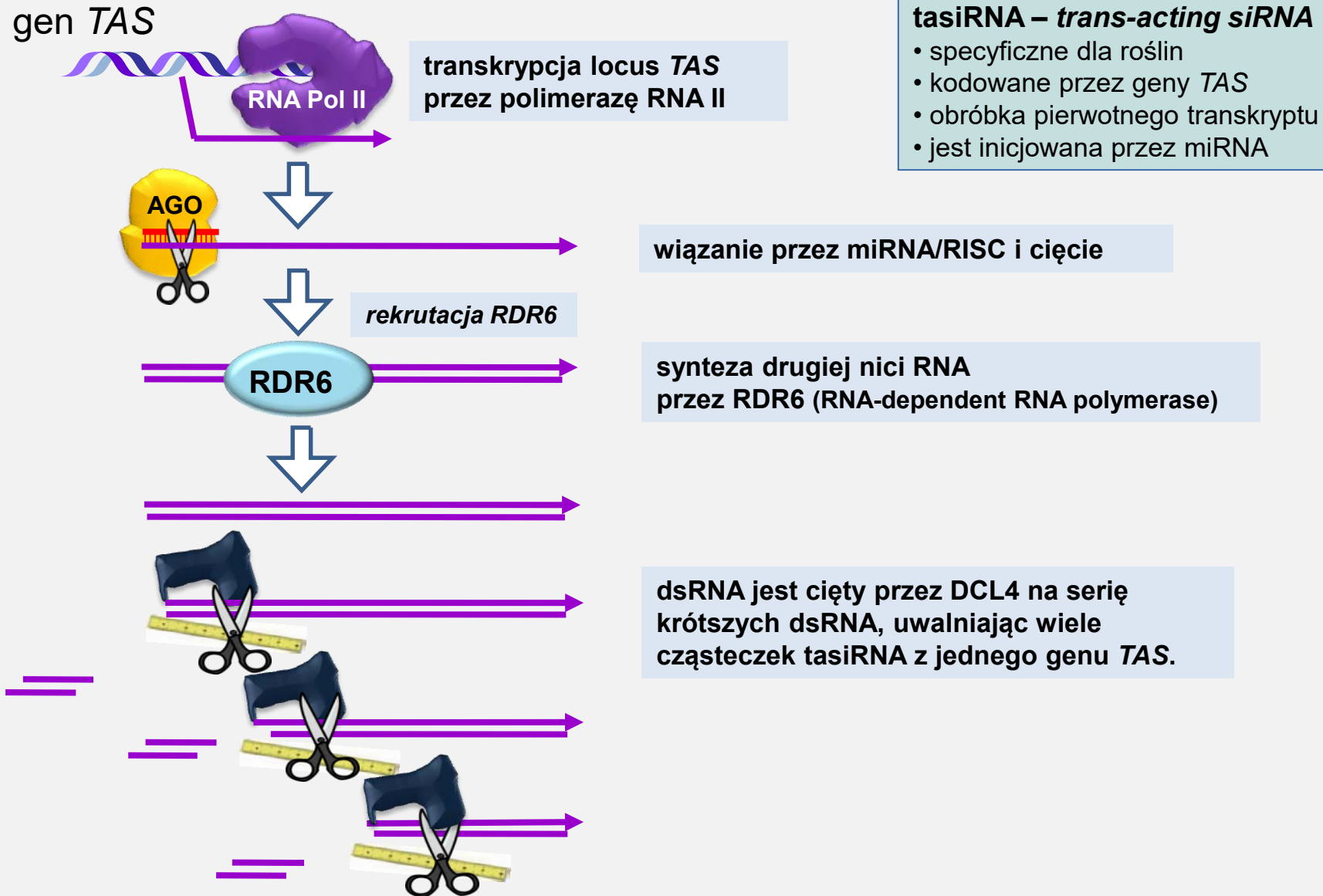
hc-siRNA: roślinne endogenne siRNA

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

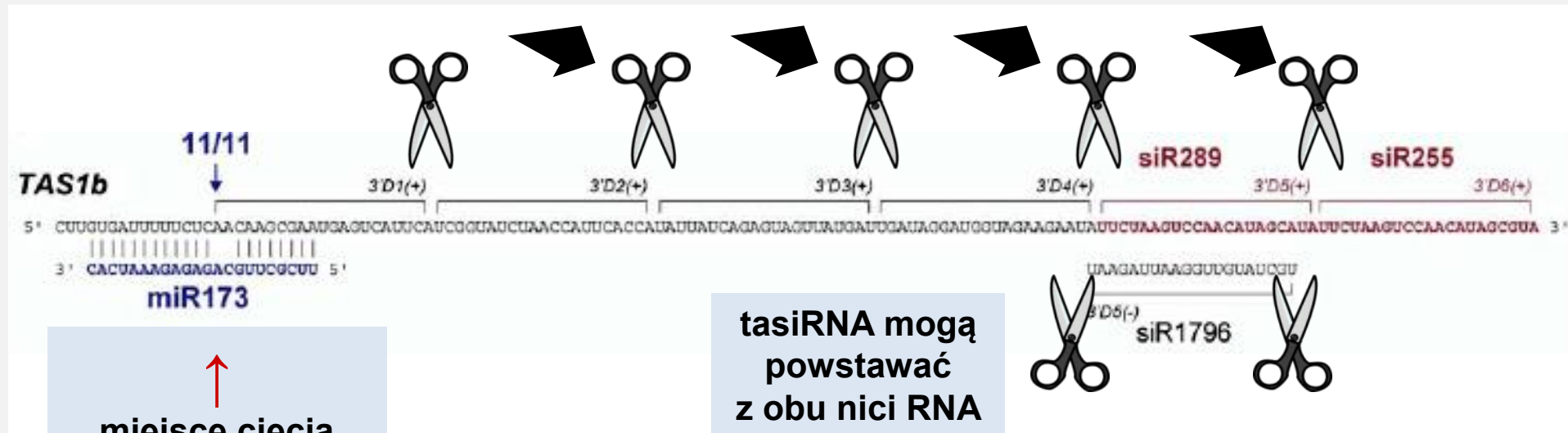


Ten rodzaj wyciszenia jest często związany ze stale nieaktywnym transkrypcyjnie DNA, włączając rejony centromerowe i transpozony, ale również zachodzi w genach.

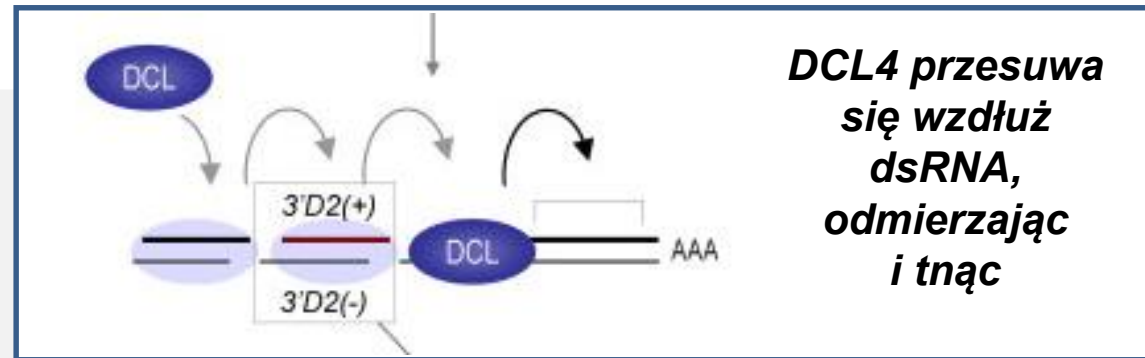
tasiRNA: roślinne endogenne siRNA



Z jednego genu *TAS* powstaje wiele cząsteczek tasiRNA



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

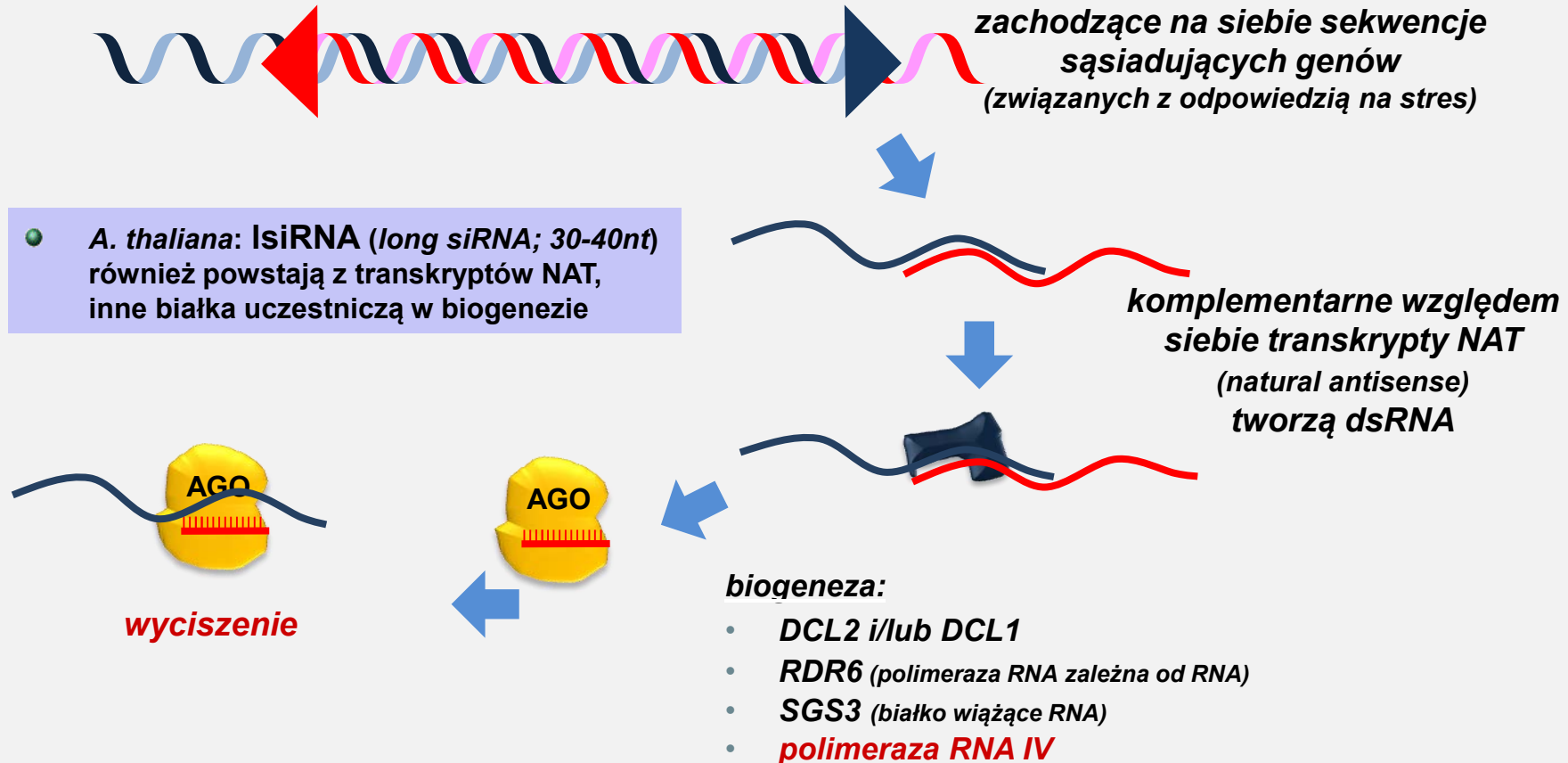


natsiRNA: roślinne endogenne siRNA

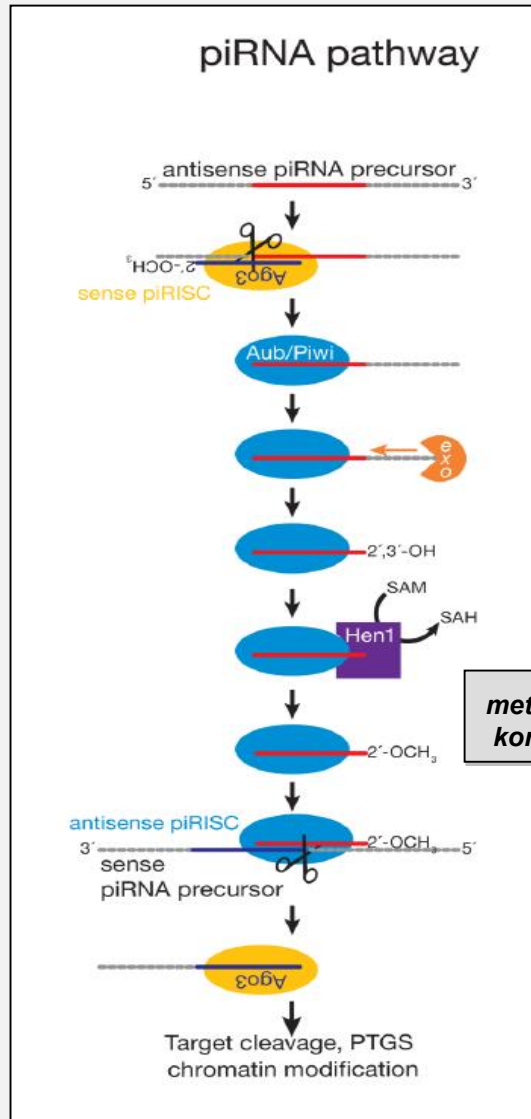
natsiRNA – *natural antisense-transcript derived siRNA*

cis-acting

- syntetyzowane w odpowiedzi na stres np. wysokie zasolenie gleby



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

Małe RNA niezależne od Dicer: priRNA

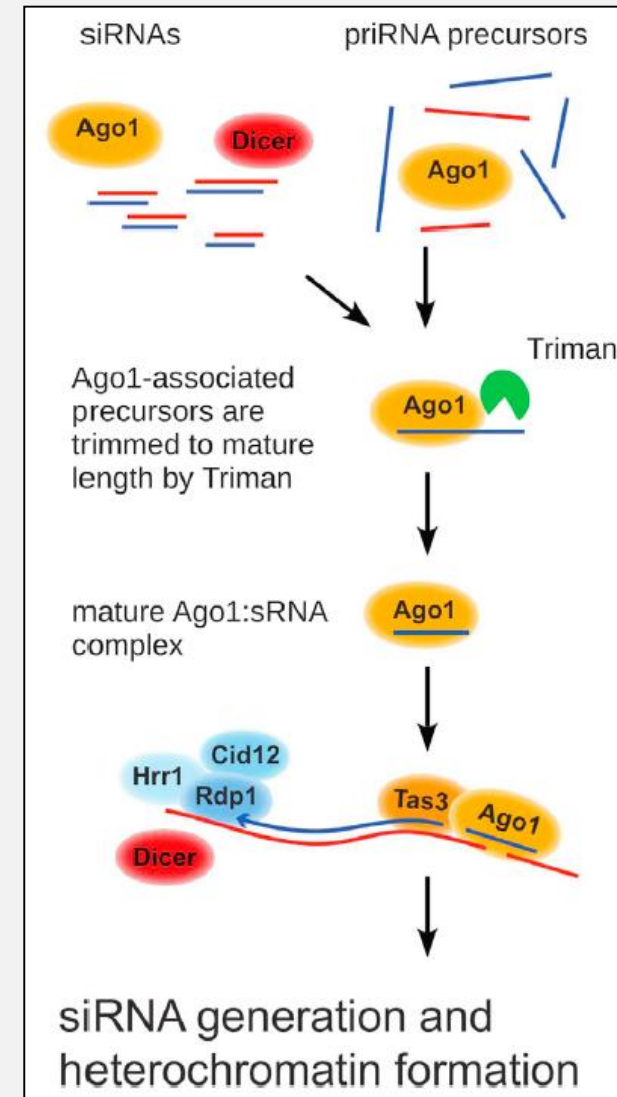
priRNA – *primal small RNAs*

- 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

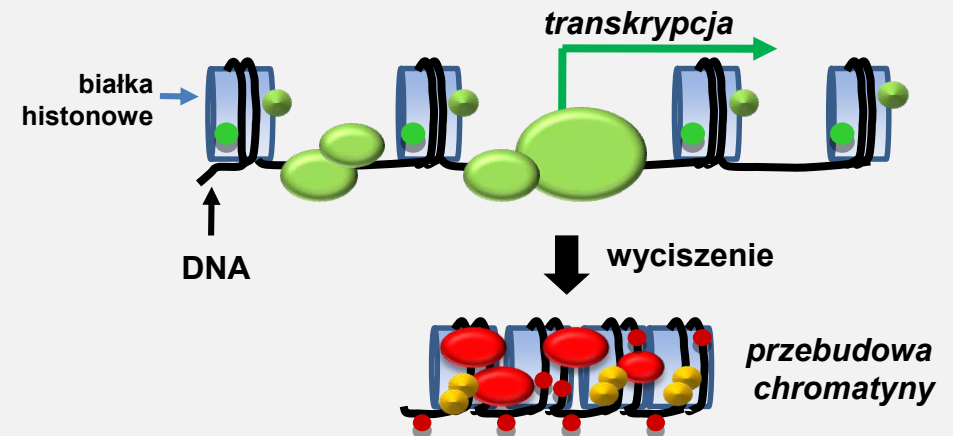
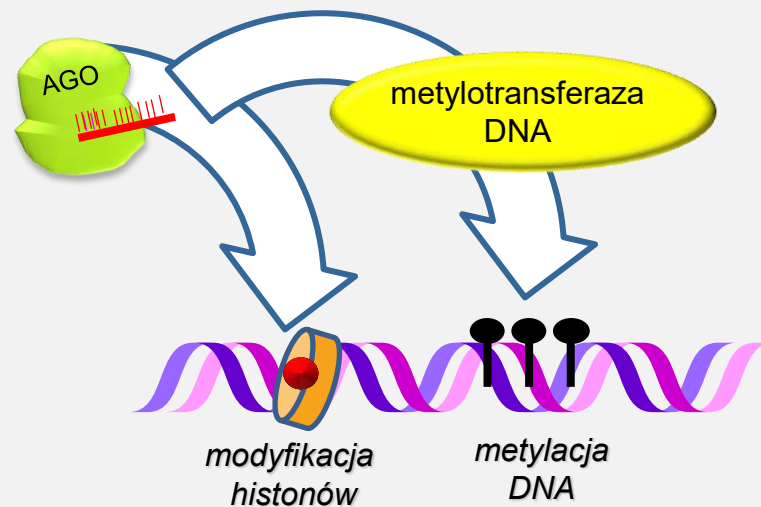
Argonaute and Triman Generate Dicer-Independent priRNAs and Mature siRNAs to Initiate Heterochromatin Formation

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



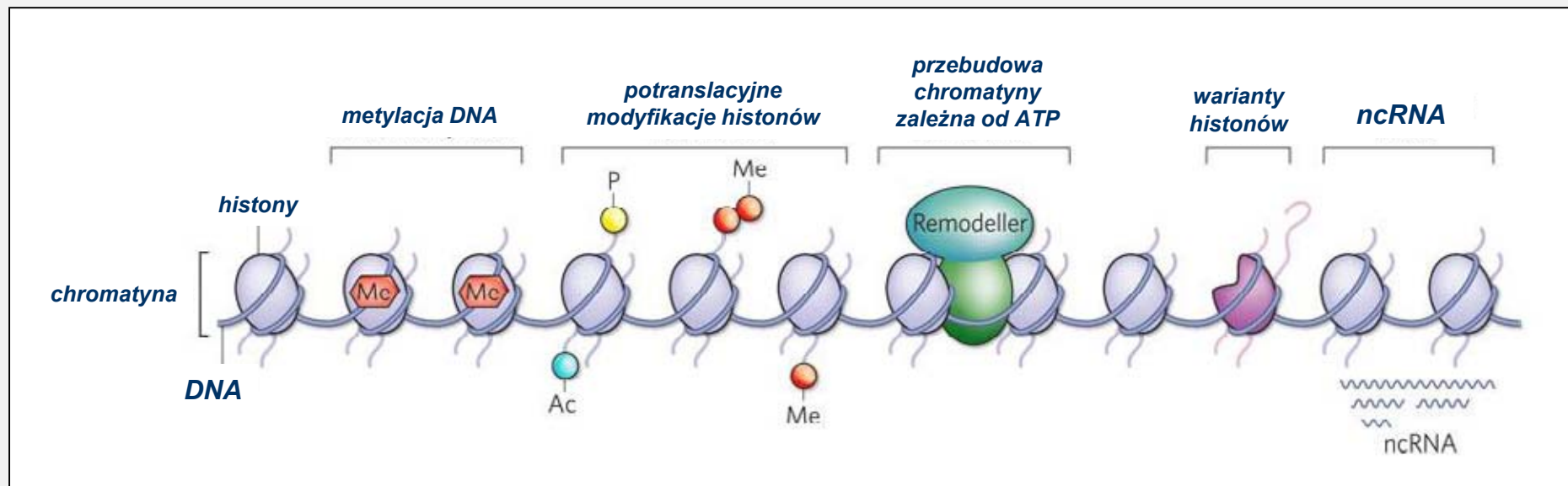
TRANSKRYPCYJNE WYCISZANIE EKSPRESJI GENÓW (TGS)

- 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

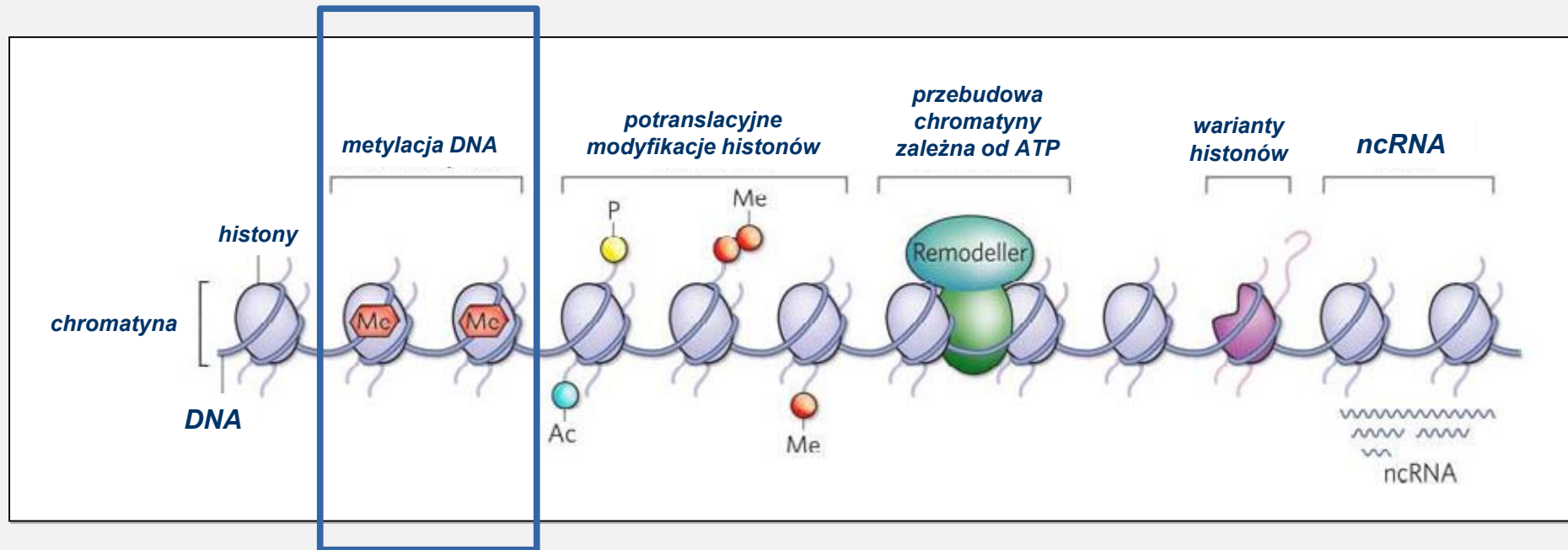


EPIGENETYCZNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

EPIGENETYCZNE MECHANIZMY REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

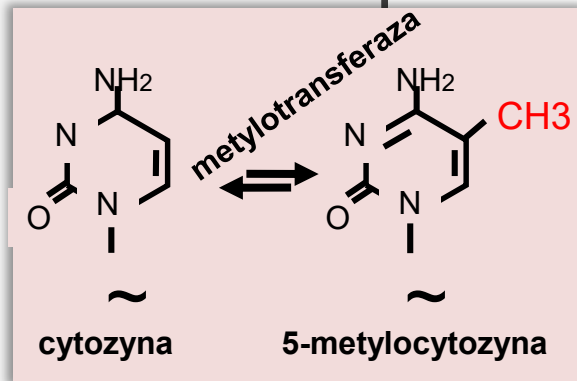


METYLACJA DNA



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

METYLACJA DNA



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

metylotransferaza DNA 1



- 5'-CG-3' i 5'-CNG-3' wyciszenie transpozonów, powtórzeń DNA, piętnowanie niektórych genów



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

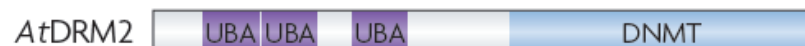
de novo:



metylotransferaza DNA 3A

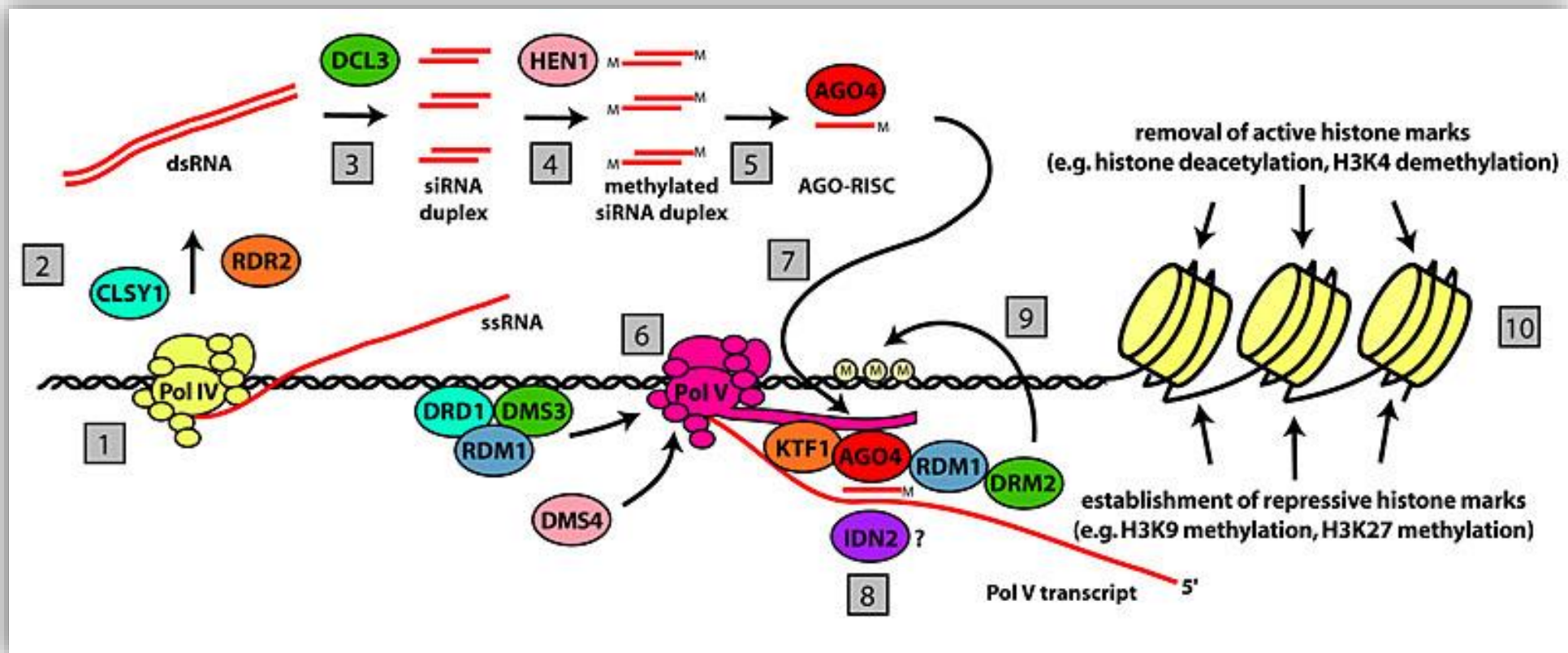


metylotransferaza DNA 3B

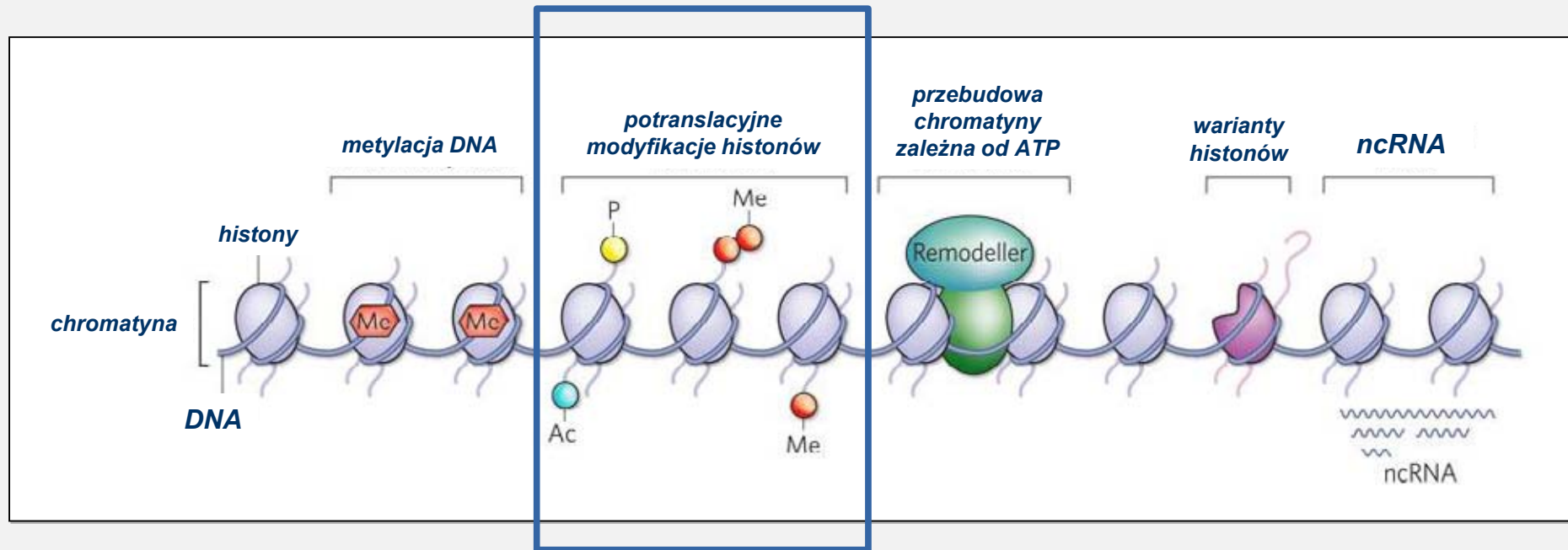


5'-CHH-3' metylacja powtórzeń DNA wyciszanych przez siRNA

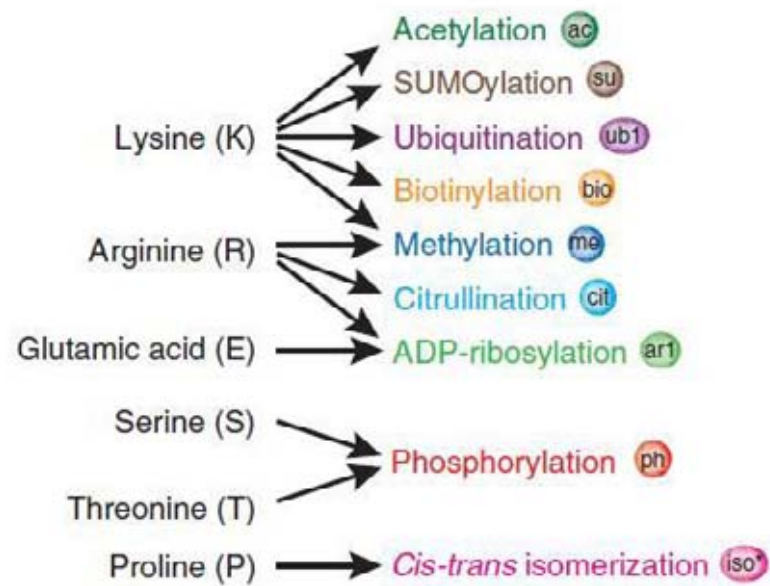
MODEL MECHANIZMU METYLACJI DNA ZALEŻNEJ OD RNA (RdDM – RNA directed DNA methylation)



POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE HISTONÓW



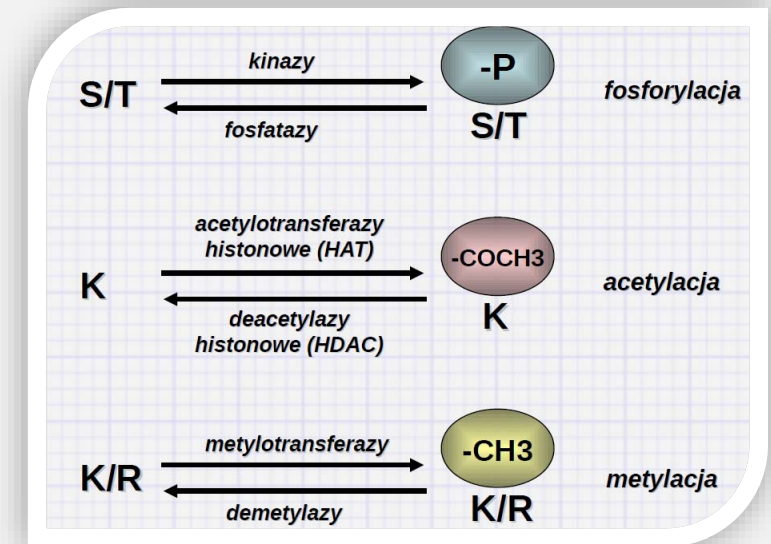
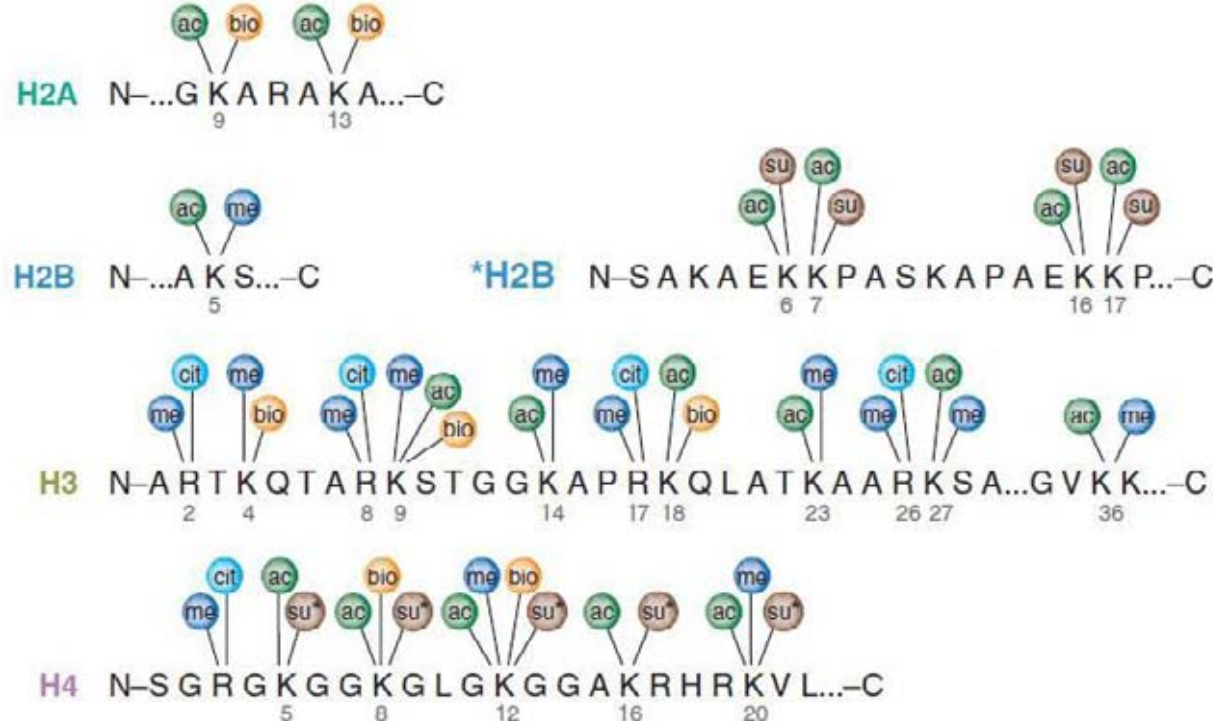
Końce N białek histonowych
(tzw. ogony histonowe)
wystają poza nukleosom, są dostępne
dla enzymów modyfikujących



Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny

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

Modyfikacje białek histonowych ludzkich i drożdżowych (*)



MECHANIZM DZIAŁANIA MODYFIKACJI POTRANSLACYJNYCH BIAŁEK HISTONOWYCH

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

Działanie pośrednie: rekrutacja białek rozpoznających określone modyfikacje histonów

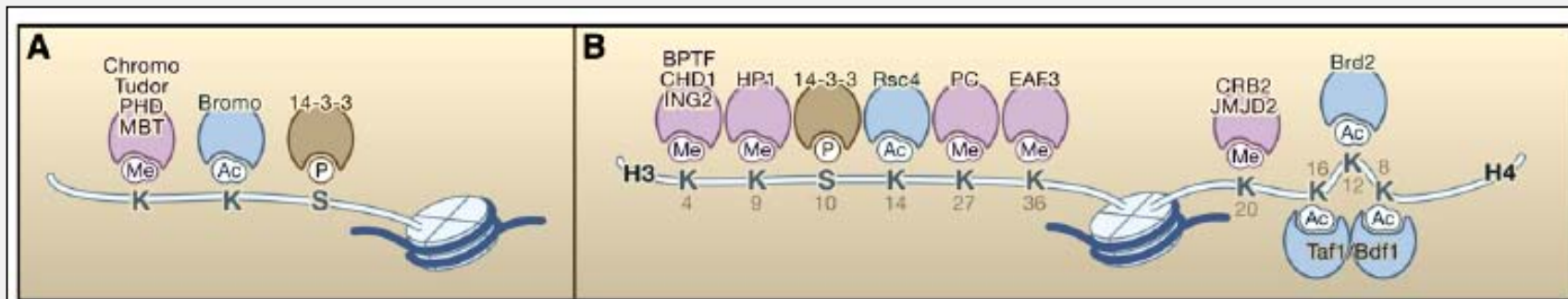
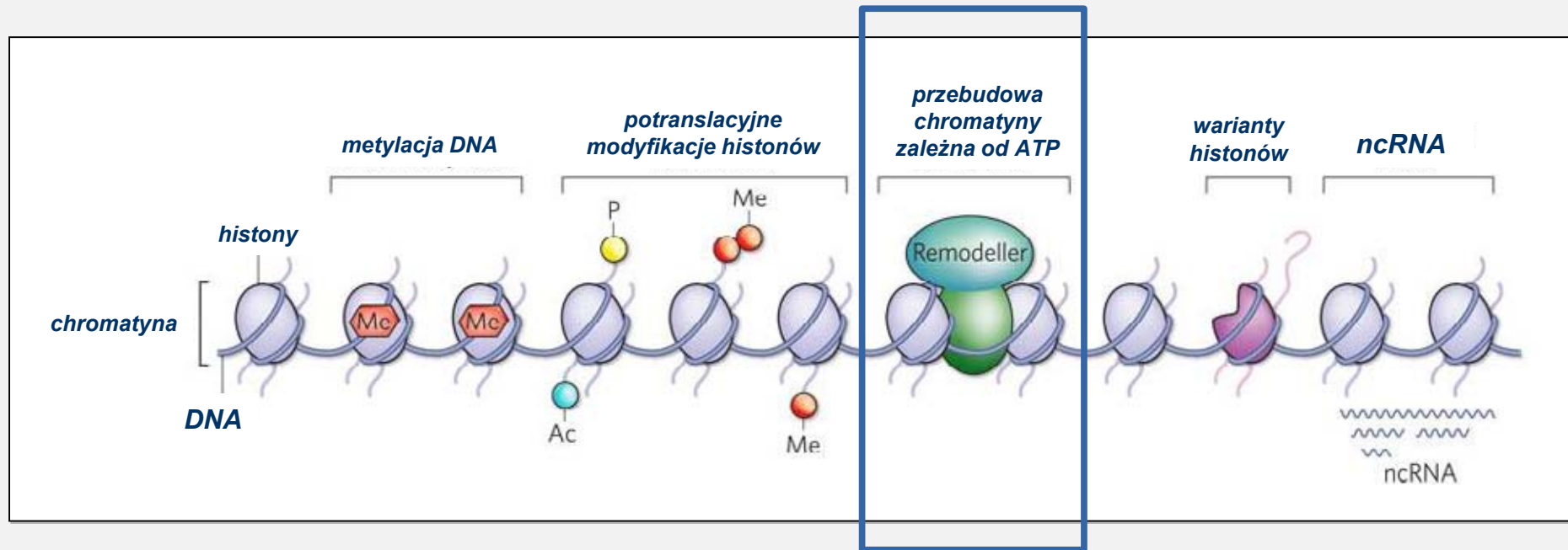


Figure 1. Recruitment of Proteins to Histones

(A) Domains used for the recognition of methylated lysines, acetylated lysines, or phosphorylated serines. (B) Proteins found that associate preferentially with modified versions of histone H3 and histone H4.

PRZEBUDOWA CHROMATYNY

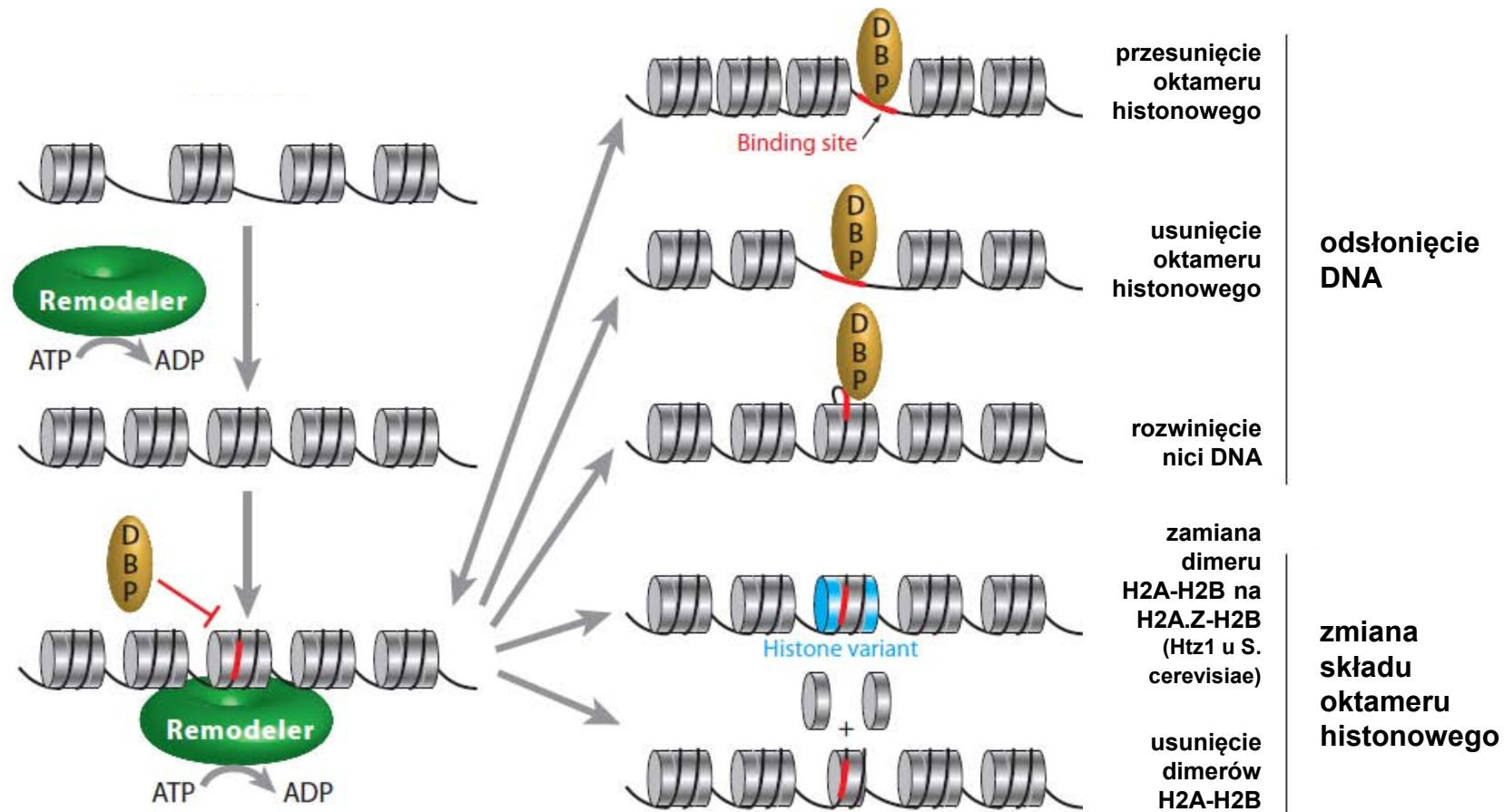
zależna od ATP (*chromatin remodelling*)



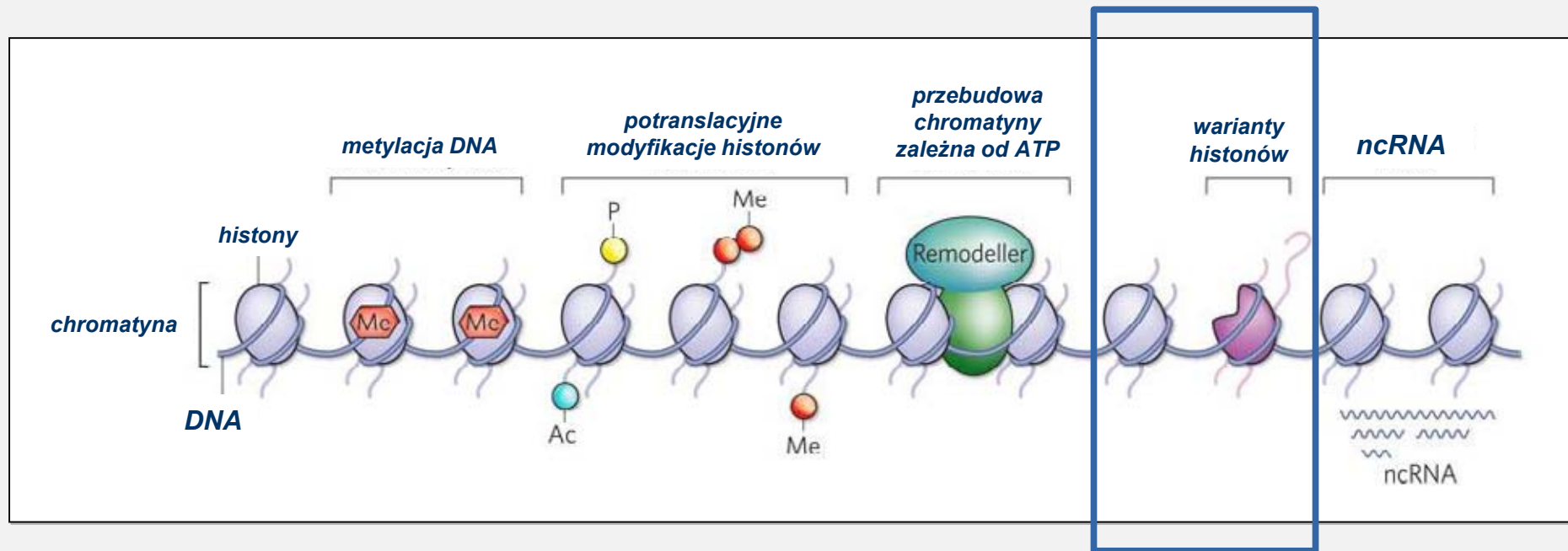
Aktywność kompleksów przebudowujących chromatinę zależy od ATP, w wyniku ich działania zmienia się sposób oddziaływania histon-DNA.
Kompleksy remodelujące zaangażowane są zarówno w aktywację, jak i represję transkrypcji.

PRZEBUDOWA CHROMATYNY

zależna od ATP (*chromatin remodelling*)



WARIANTY HISTONÓW

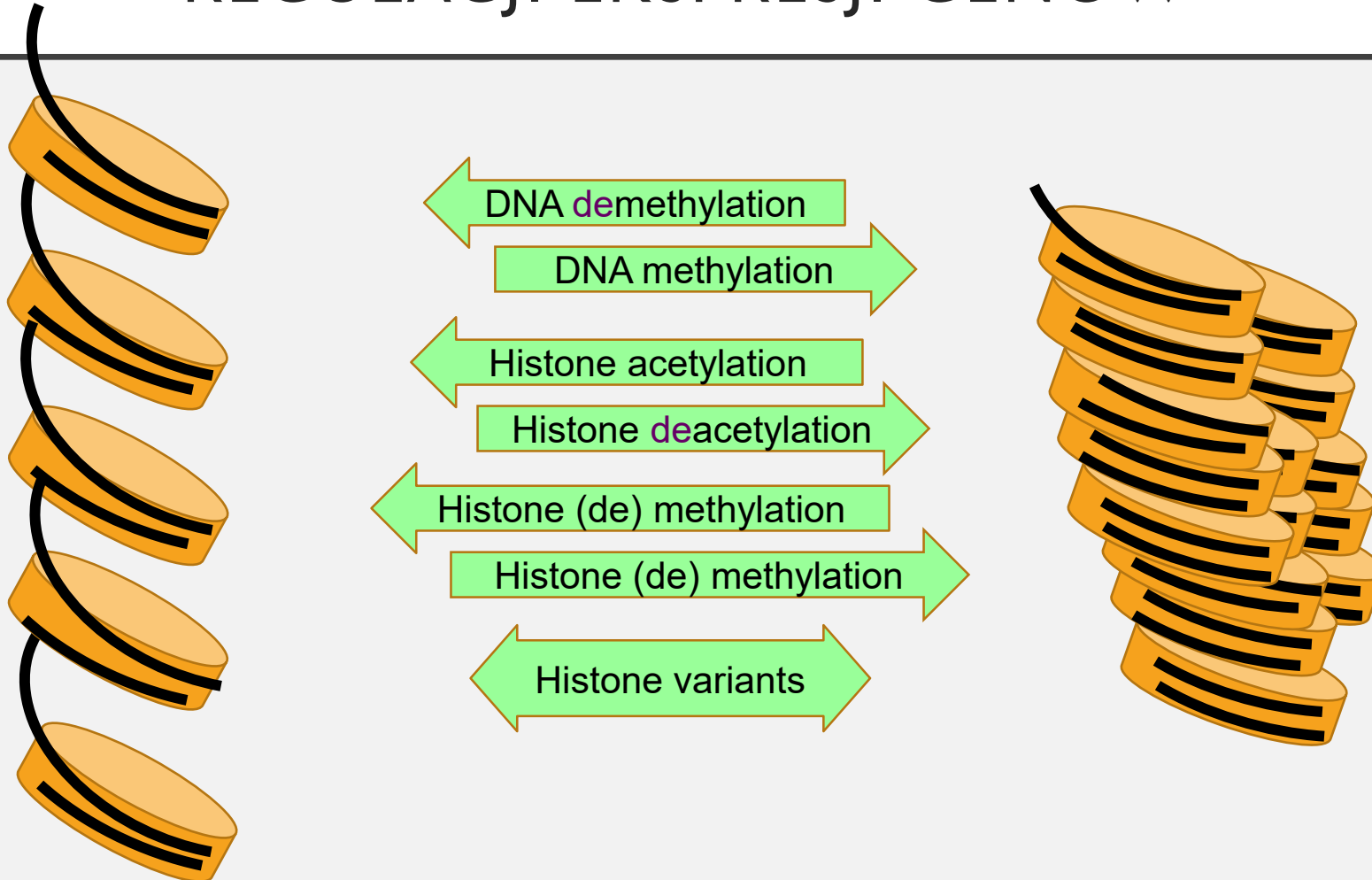


Za wymianę różnych wariantów histonów w oktamerze histonowym odpowiadają kompleksy przebudowujące chromatynę z rodziny **INO80/SWR**

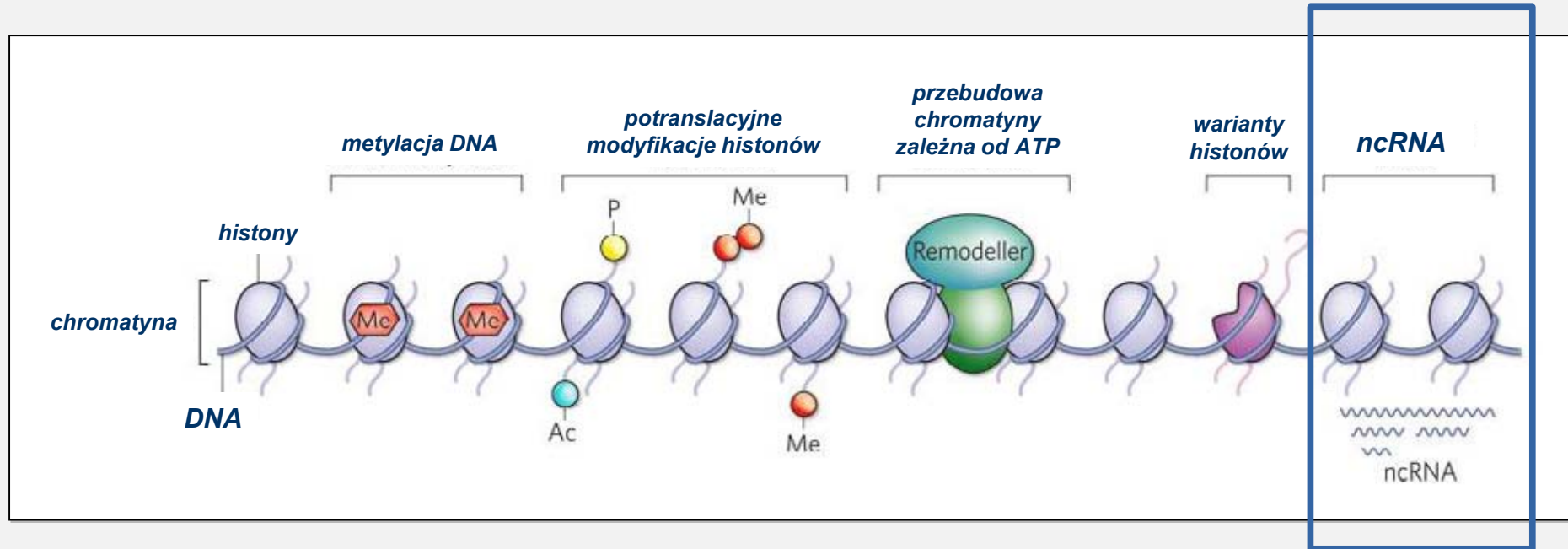
WARIANTY HISTONÓW

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	Unknown	Animals
H3	H3t	Testes-specific	Mammals
H2B	TH2B	Testes-specific	Mammals
H2A	H2A.Bbd	Unknown	Mammals
H2B	H2BFWT	Testes-specific	Mammals
H2A	H2AL1,L2	Testes-specific	Mammals
H2A	H2Abd	DNA ds break repair	Bdeloids
H3	H3V	Transcription termination	Trypanosomes
H4	H4V	Transcription termination	Trypanosomes
H2B	H2BV	Transcription initiation	Trypanosomes

EPIGENETYCZNE MECHANIZMY REGULACJI EKSPRESJI GENÓW



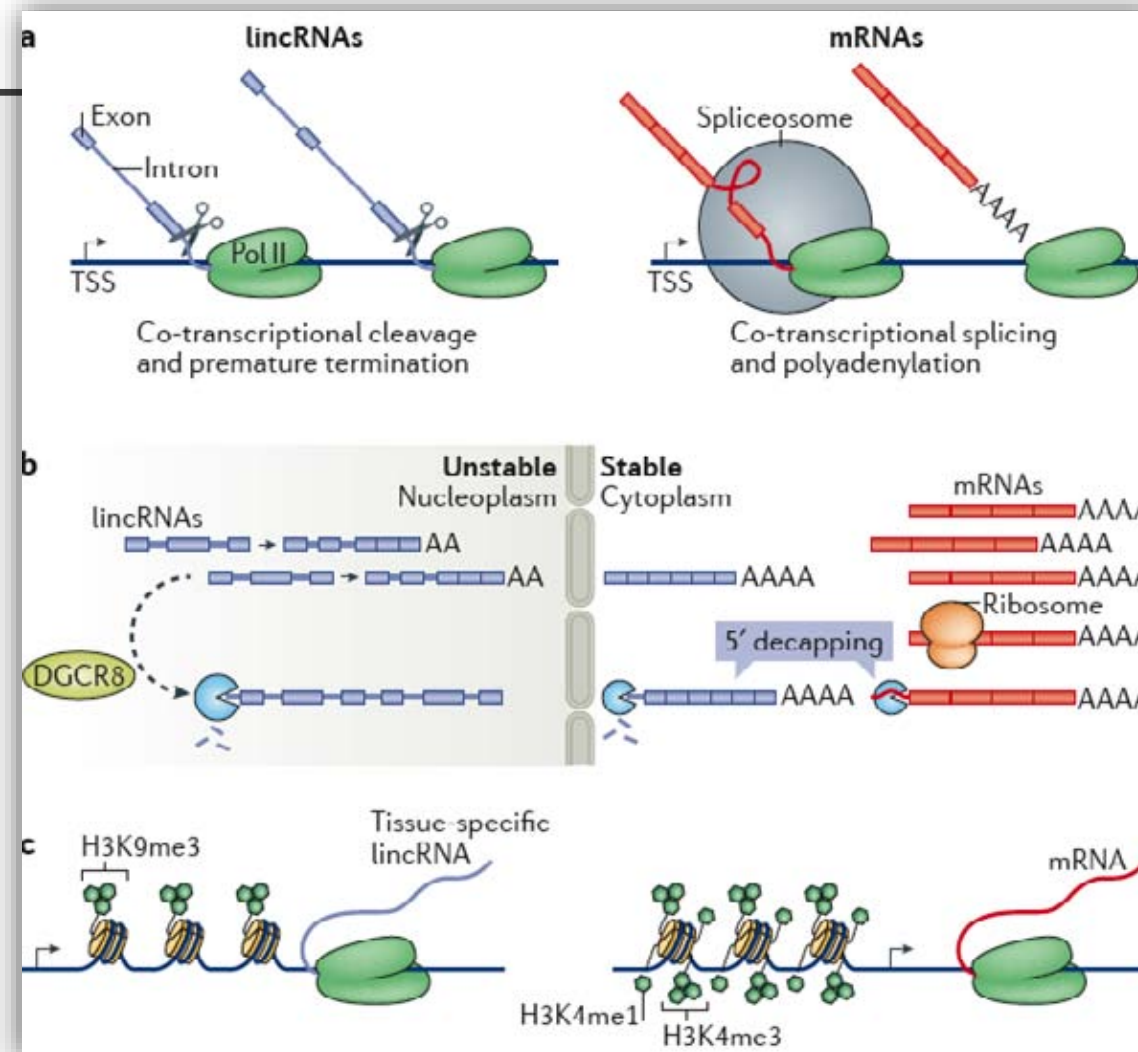
EPIGENETYCZNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PRZEZ ncRNA



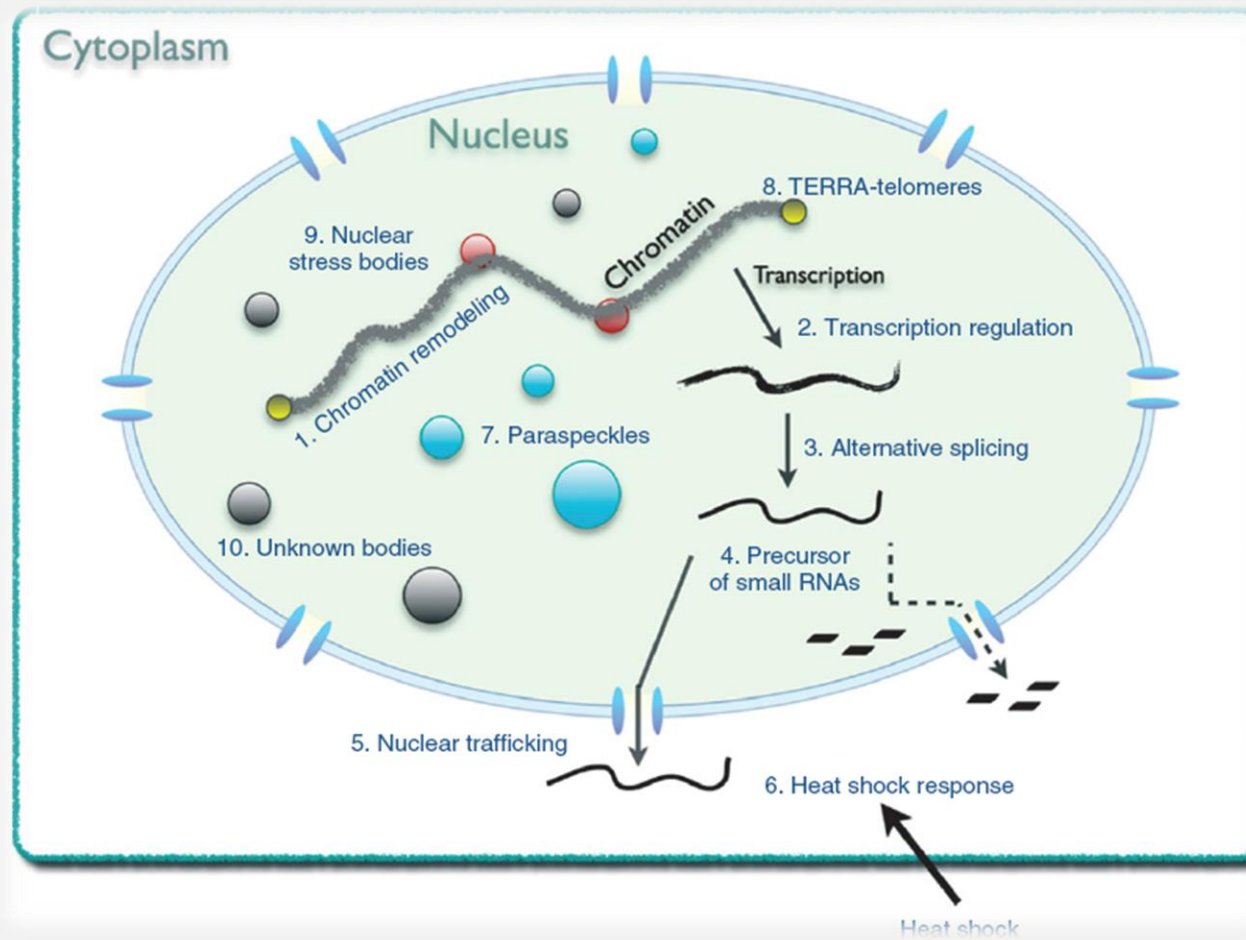
RNA jest jedynym jak dotąd poznany czynnikiem inicjującym dziedziczenie epigenetyczne i odróżniającym sekwencje, które mają zostać wyciszone lub aktywowane

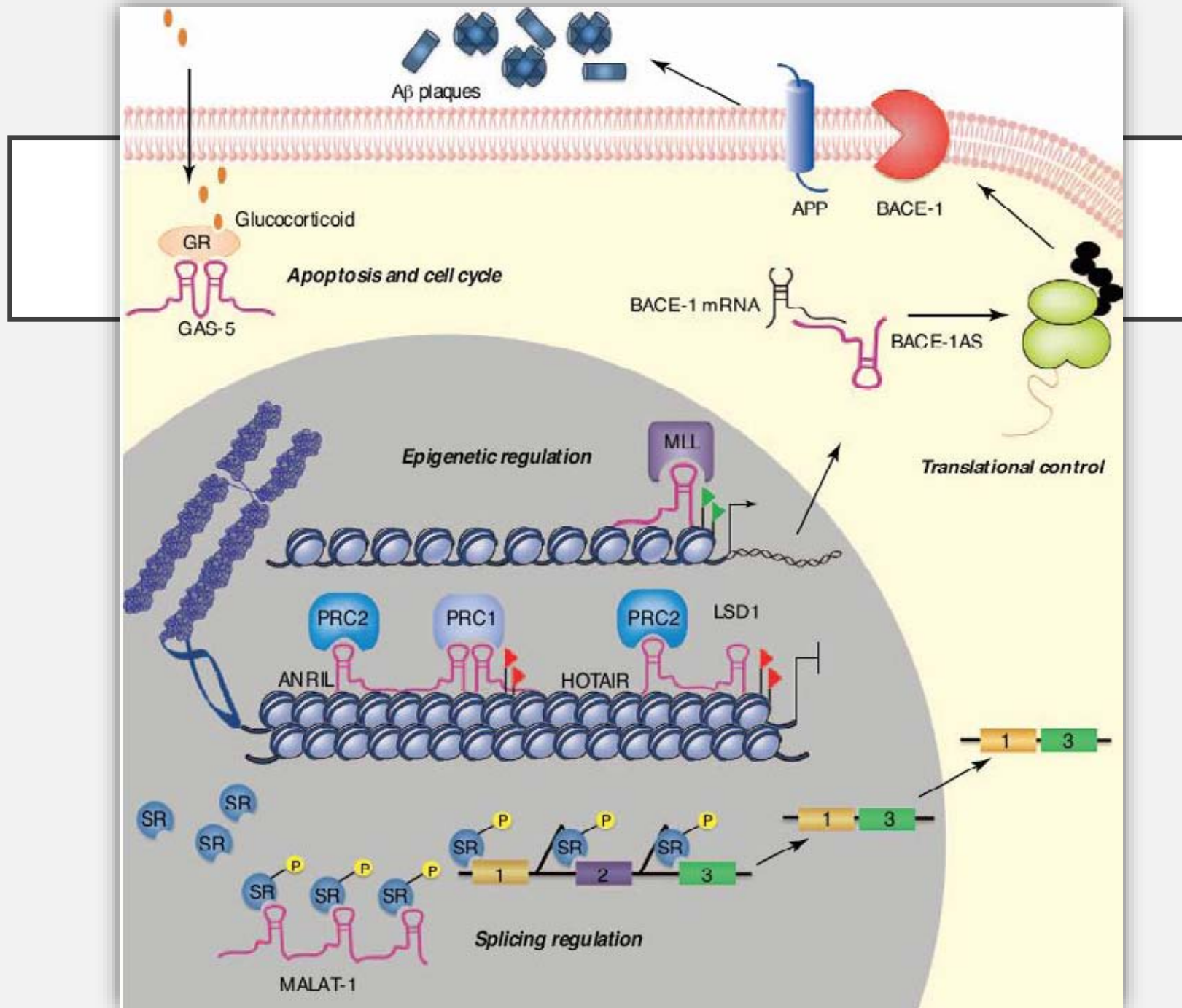
1. wyciszanie transkrypcyjne przez siRNA (TGS)
2. regulacja ekspresji przez długie niekodujące RNA (lncRNA)

lncRNA vs mRNA



FUNKCJE lncRNA





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], Vlinc_21, vlinc_185, vlinc_377, vlinc_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	mlncRNAs	
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	Vlinc_21, vlinc_185, vlinc_377, vlinc_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-untersminated 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		

IncRNA

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
COLDAIR
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

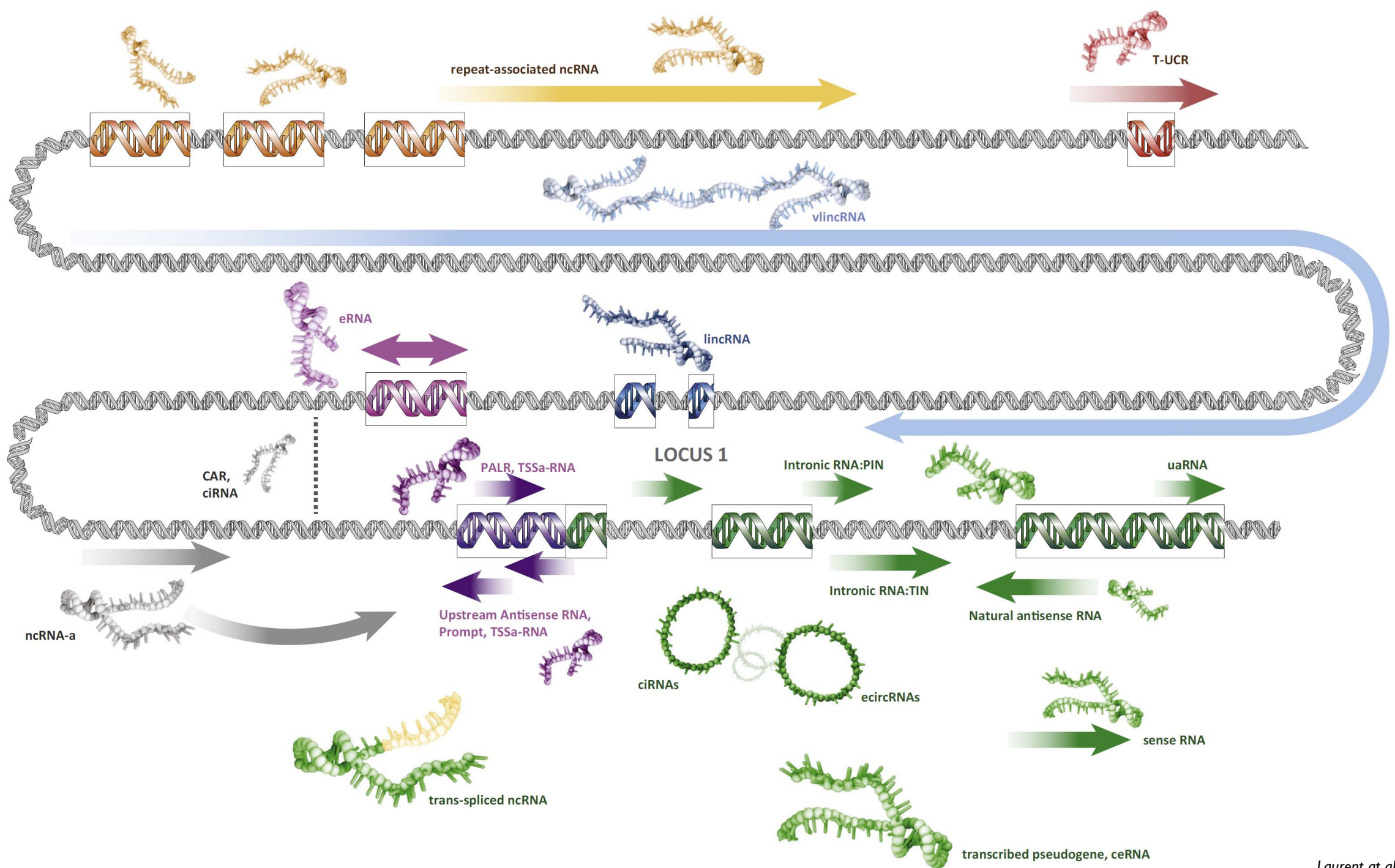
Cellular signalling, activate of kinases, promote protein phoshorylation

1/2-sbsRNA TINCR

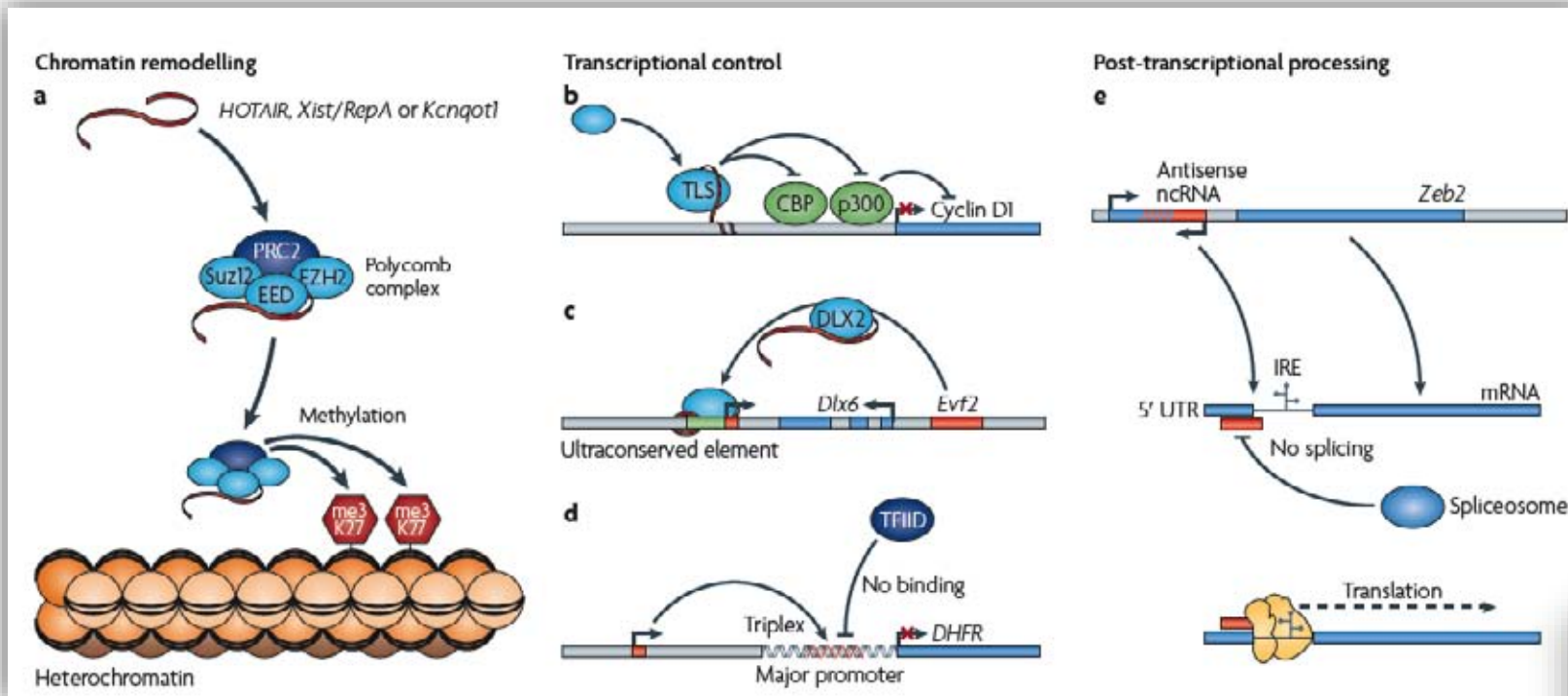
STAUFEN1-dependent mRNA decay, induce mRNA degradation or stabilication

HOTAIR NRON

Protein turnover, stimulate degradation of Snurportin-1 and Ataxin-1 (HOTAIR) or HIV proteins tat (NRON_



MECHANIZMY DZIAŁANIA lncRNA



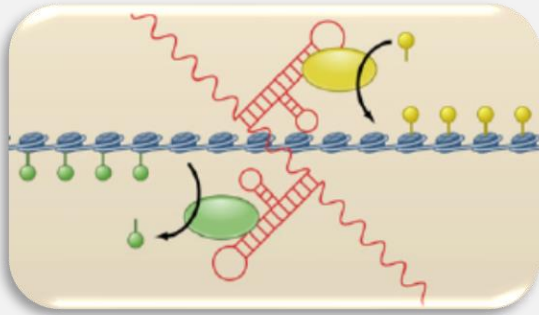
- ncRNA rekrutują kompleksy modyfikujące chromatynę → modyfikacje białek histonowych (H3meK27) i tworzenie heterochromatyny

- działają jako represory lub enhancery transkrypcji poprzez wiązanie do czynników białkowych lub DNA;
- mogą działać jako „przynęty” miareczkując czynniki transkrypcyjne

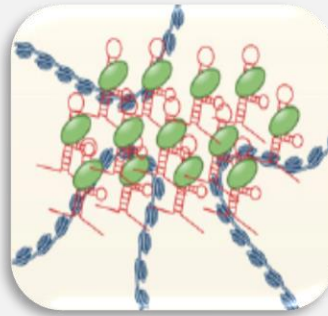
- maskują miejsce splicingu 5', co skutkuje zatrzymaniem intronu, rozpoznaniem IRE i translacją



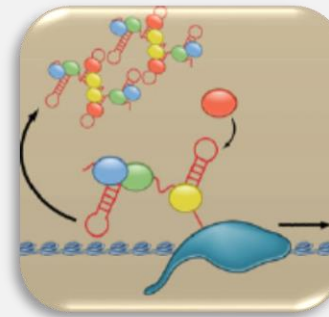
MECHANIZMY DZIAŁANIA lncRNA



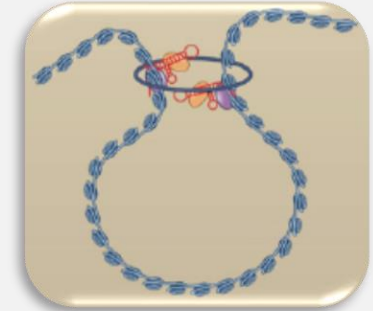
Kotranskrypcyjna rekrutacja czynników modyfikujących chromatynę



Chromatin nucleation



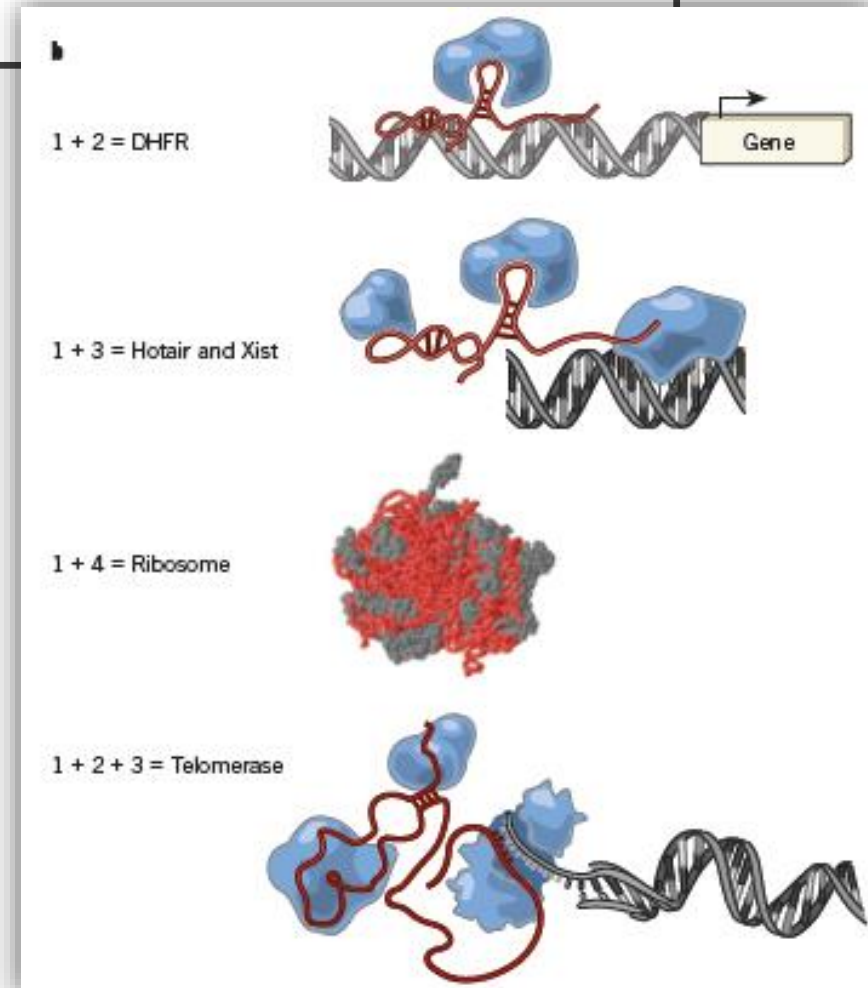
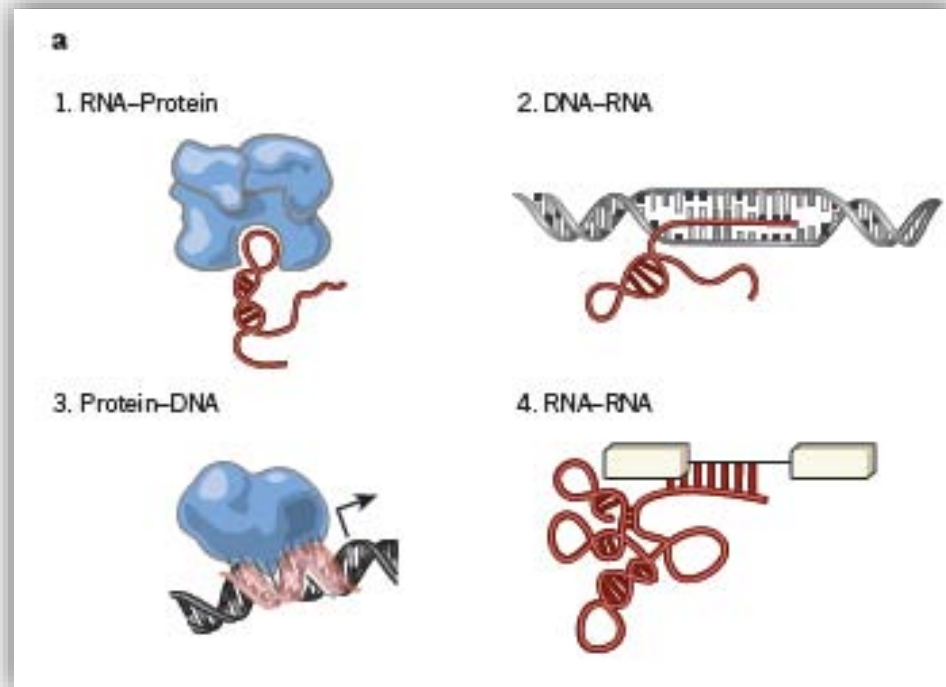
Dynamiczne formowanie struktur w jądrze komórkowym: *paraspeckles*, *nuclear bodies*



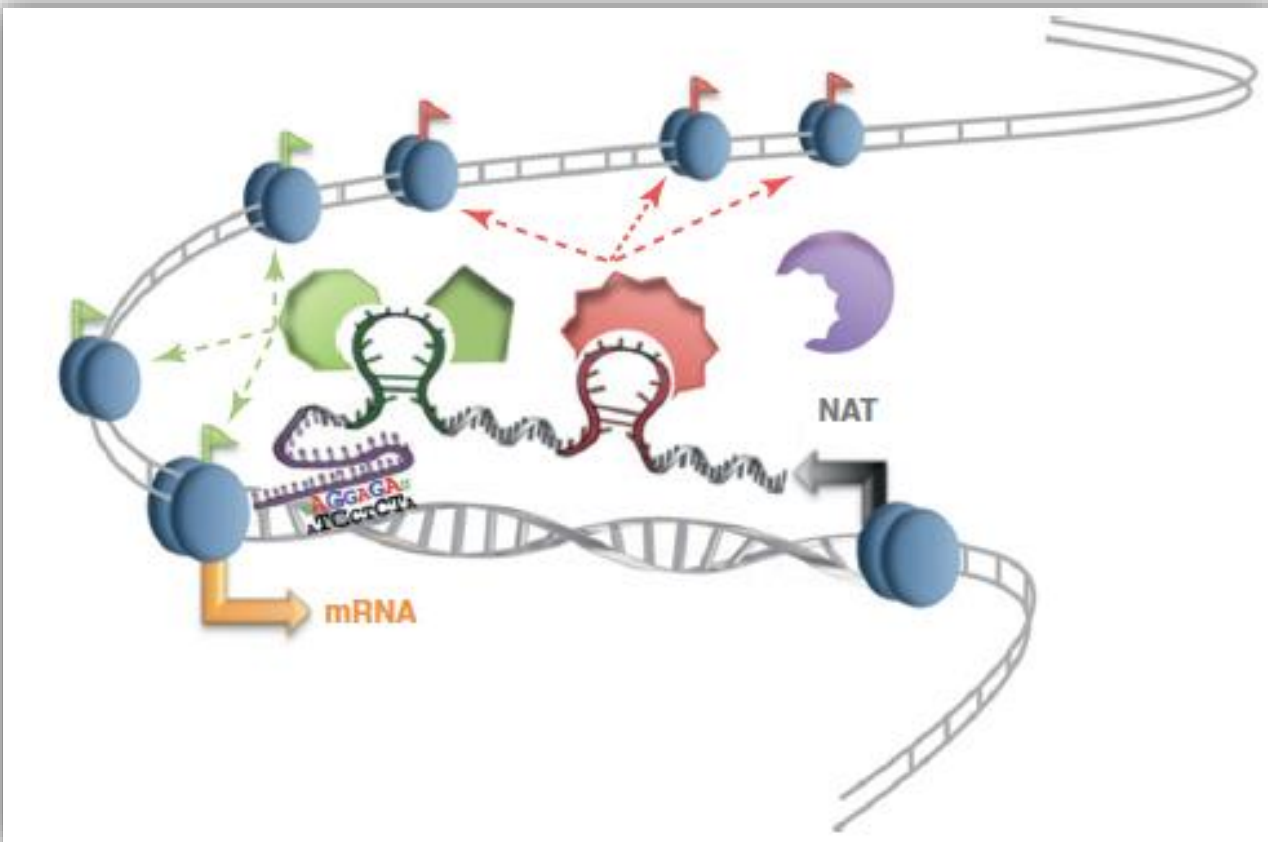
Tworzenie pętli chromatyny (*chromatin loops*)

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

MECHANIZMY DZIAŁANIA lncRNA

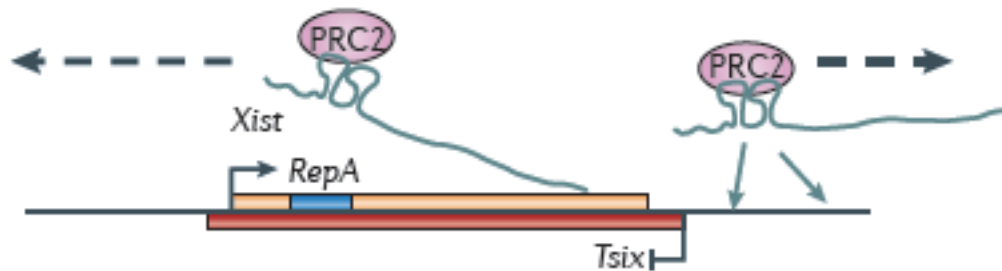


REGULACJA EPIGENETYCZNA PRZEZ
NAT (*natural antisense transcripts*)



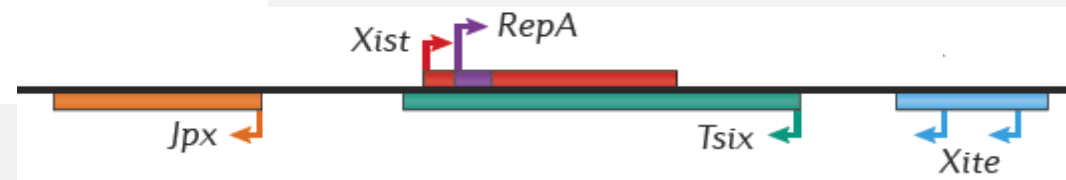
- NAT regulują stan epigenetyczny *loci* genomowych, z których są transkrybowane (regulacja *in cis*).
- Specyficzna struktura drugorzędowa NAT umożliwia oddziaływanie z różnymi enzymami modyfikującymi chromatynę, koordynując w ten sposób ich działanie i kierując określonymi modyfikacjami epigenetycznymi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

***XIST* ncRNA – INAKTYWACJA CHROMOSOMU X**



Xist (X-inactive specific transcript, 19 kb)
Ekspresja na nieaktywnym X
Opłascza chromosom X

Tsix (40 kb) ekspresja na aktywnym 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**

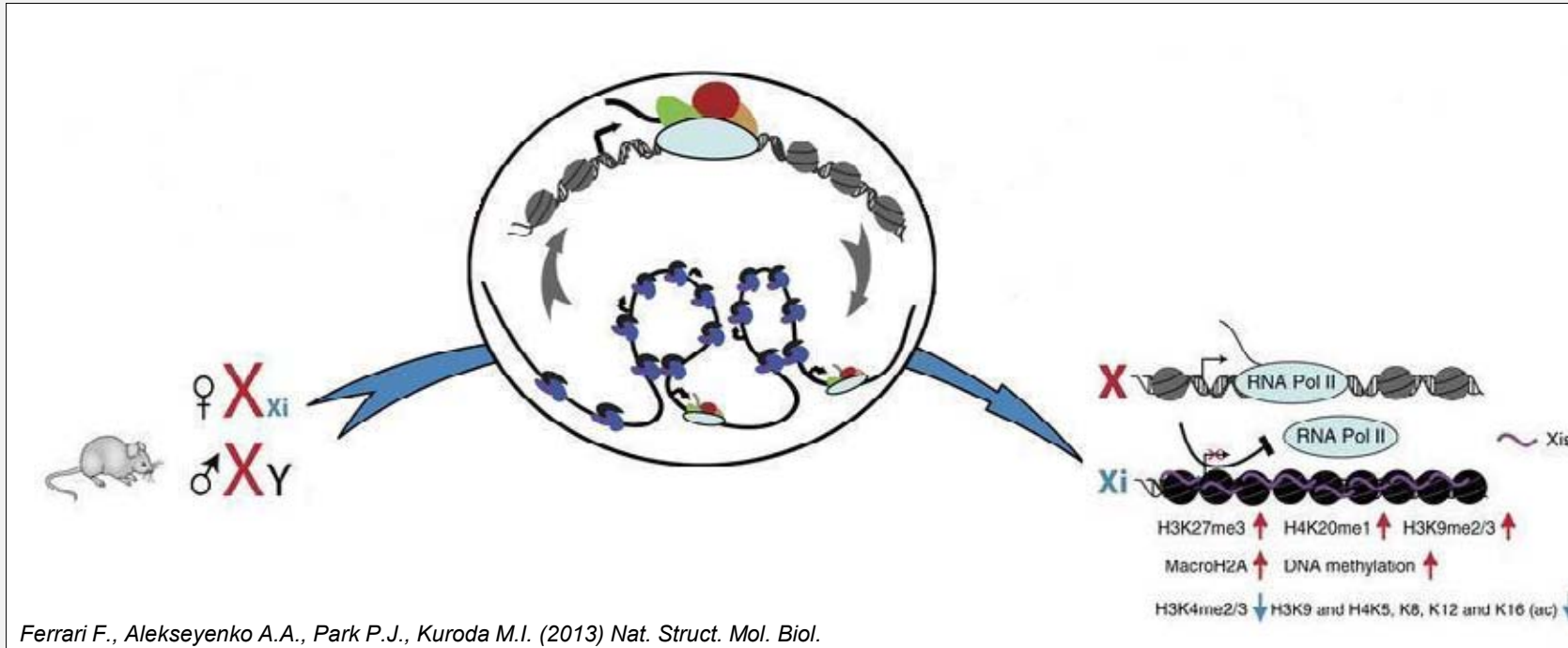
metylacja histonu H3:

H3K9

H3K27

deacetylacja histonu H4 (?)

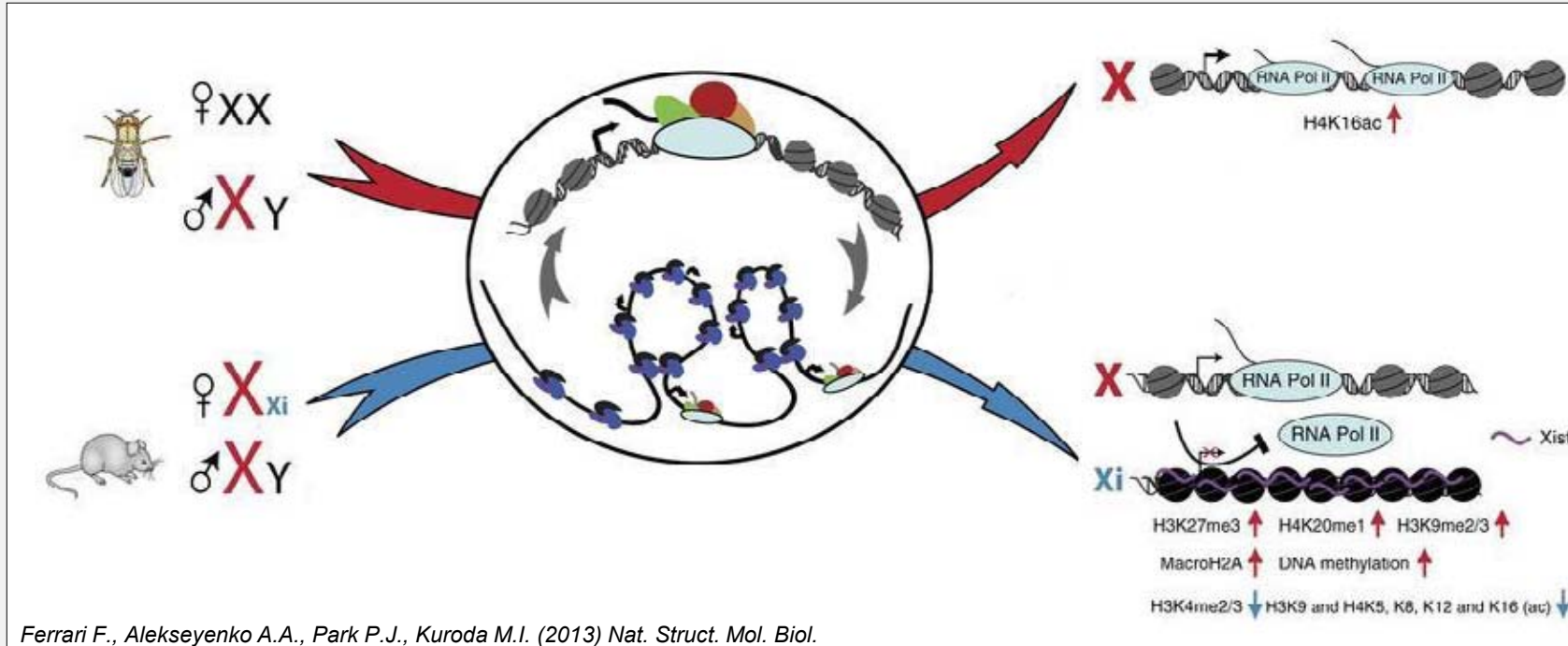
metylacja DNA /już po inaktywacji chromosomu



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



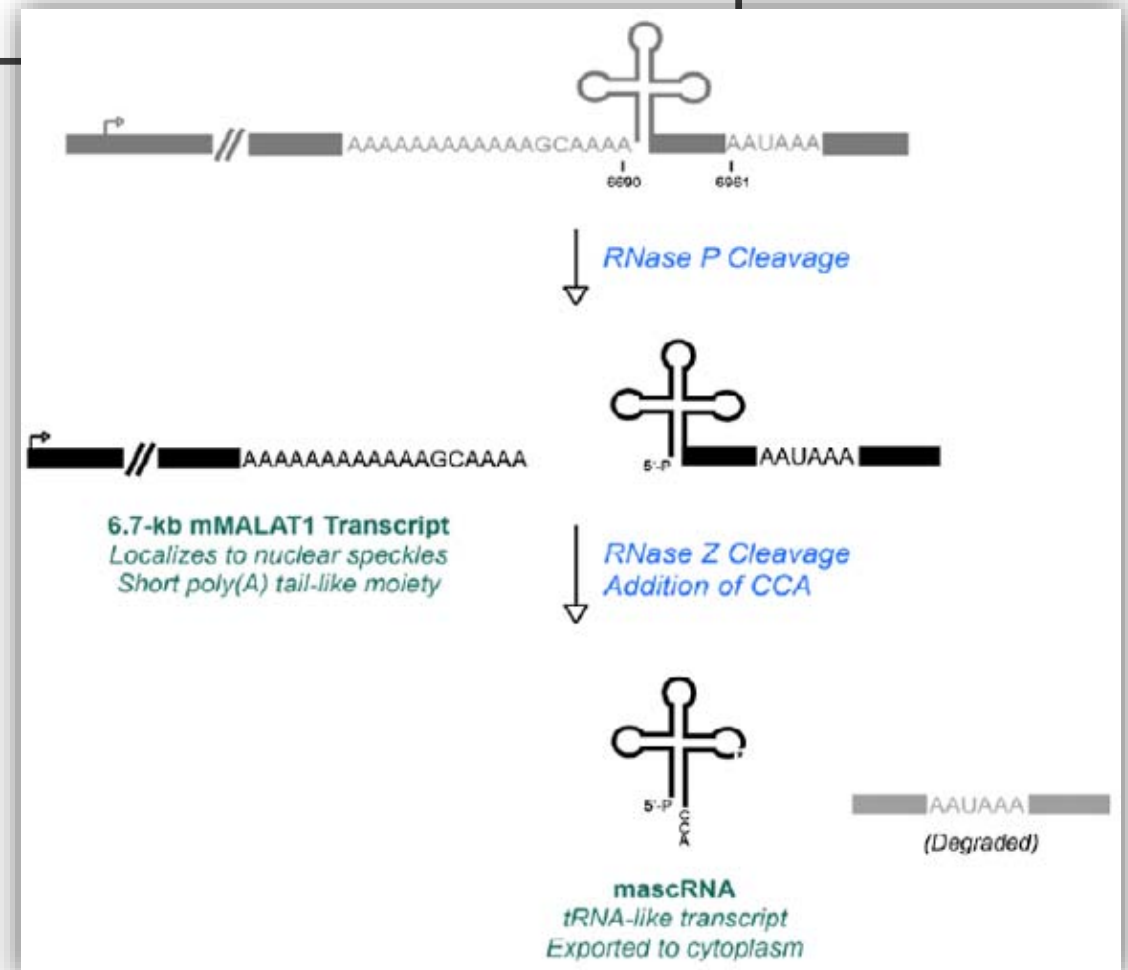
MALAT1/mascRNA

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)

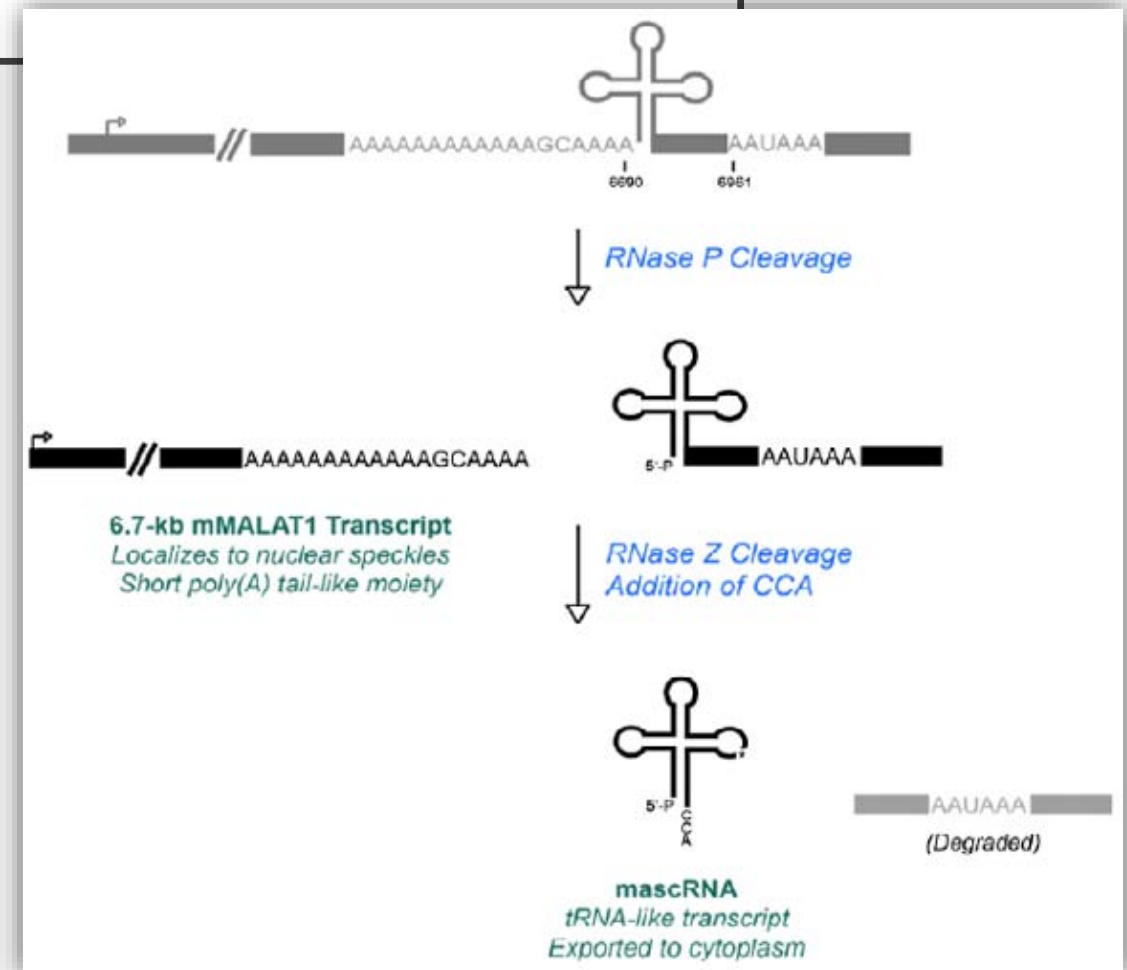
mascRNA:

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

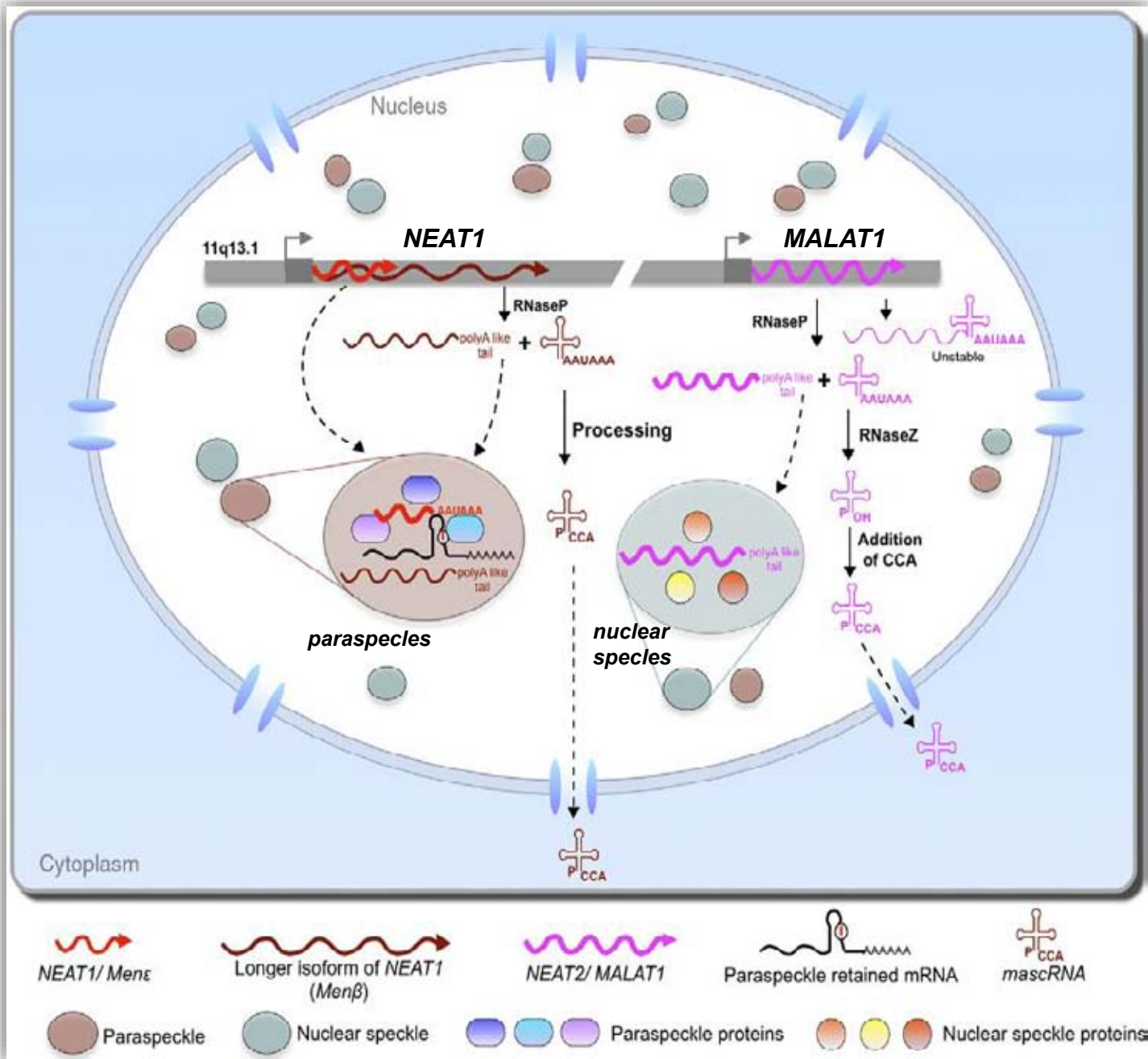


MALAT1/mascRNA

- 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

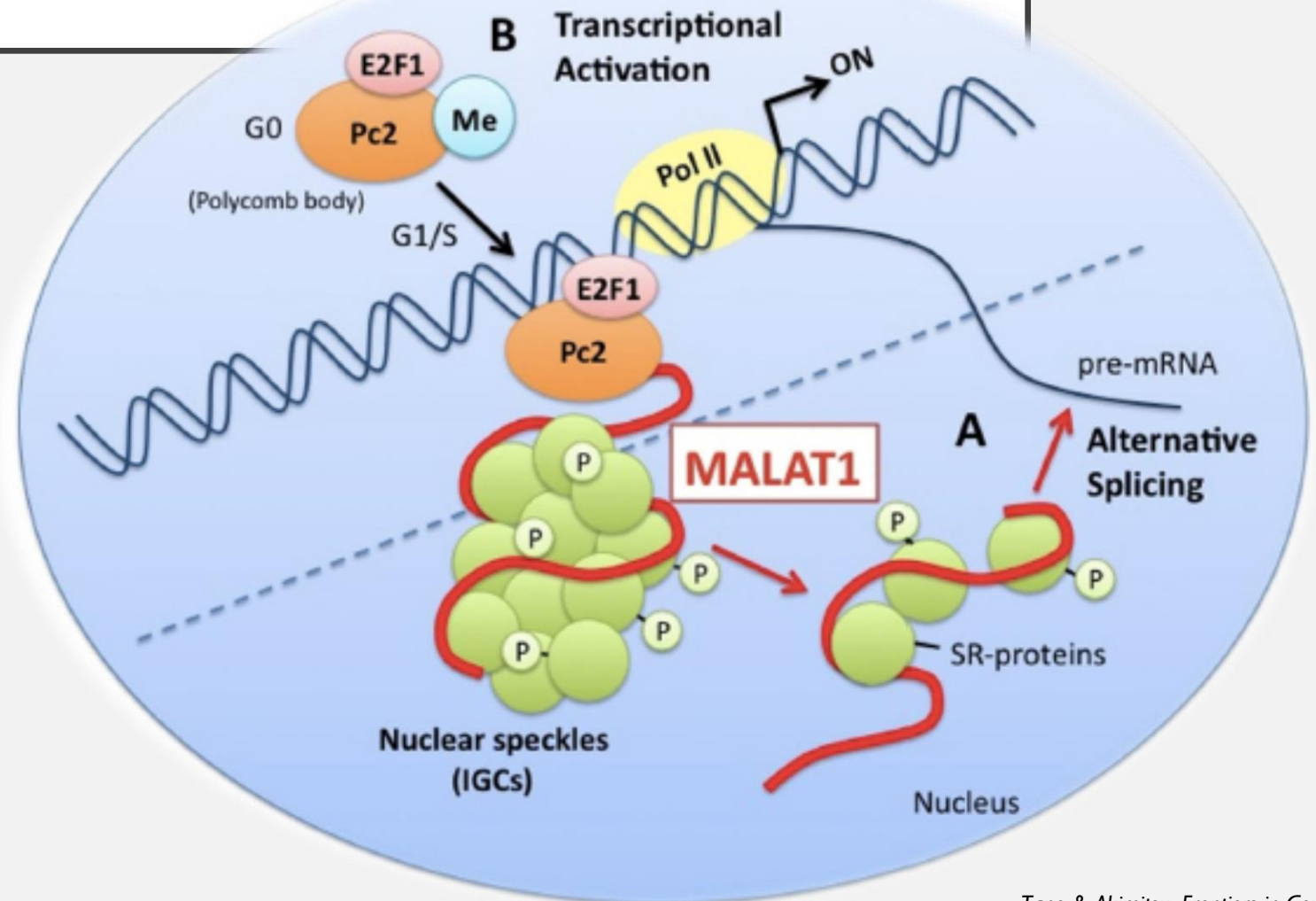


NEAT1 i MALAT1

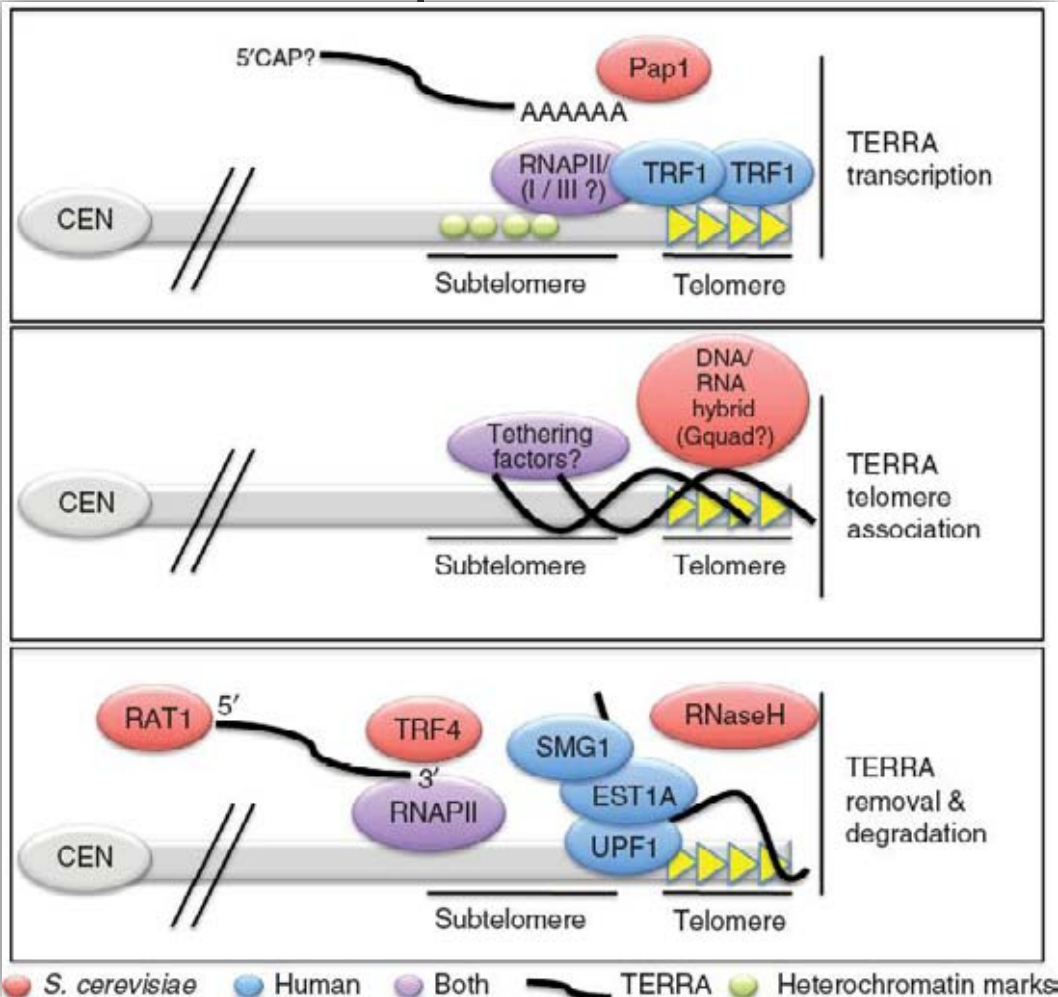


FUNKCJE MALAT1

- Aktywacja transkrypcji i splicing

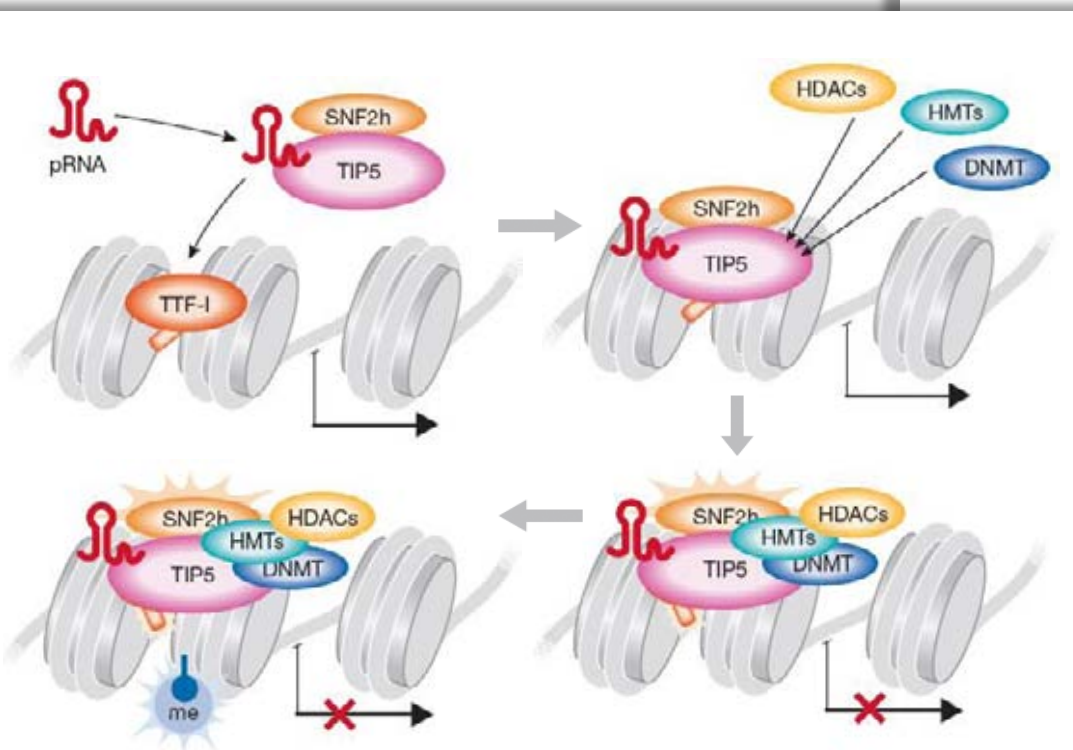
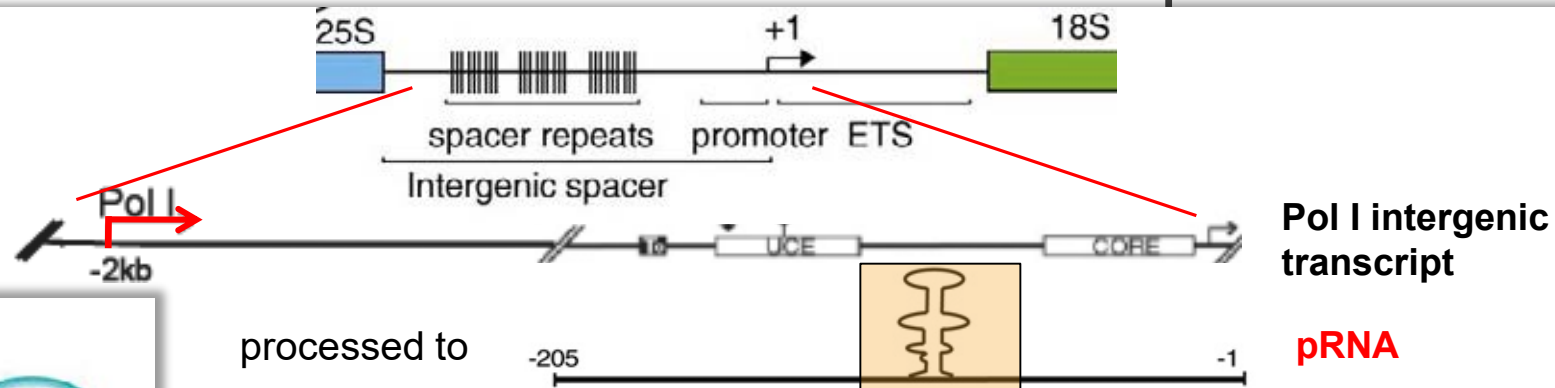


TERRA – TELOMERIC REPEAT-CONTAINING RNA



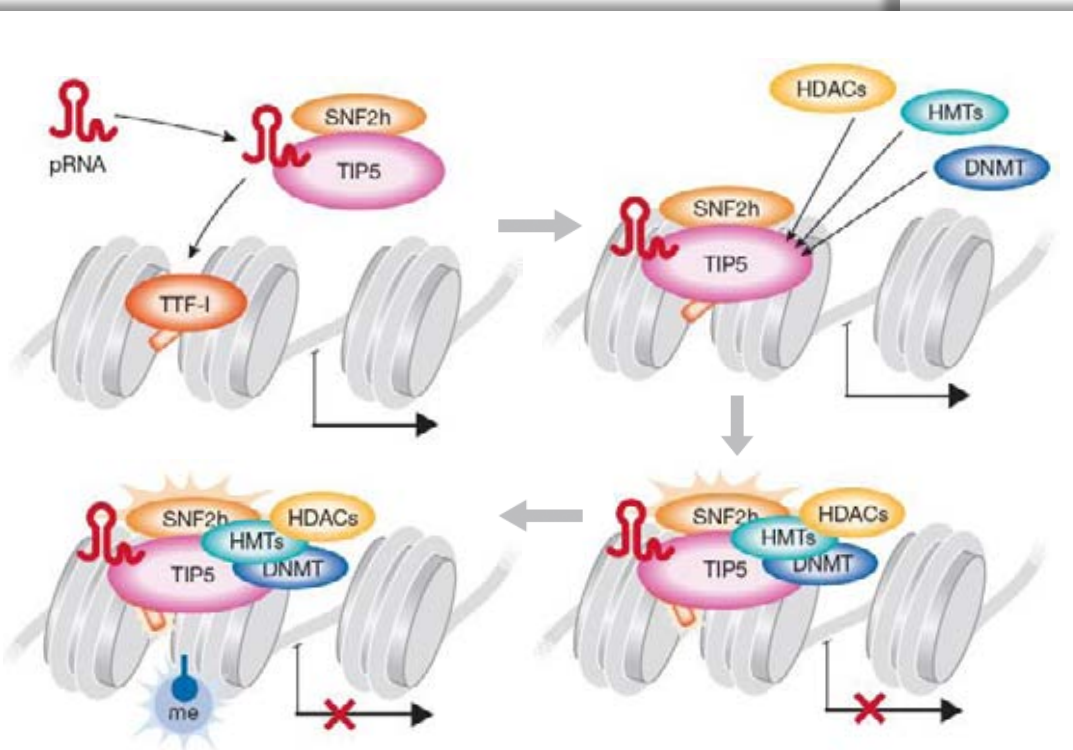
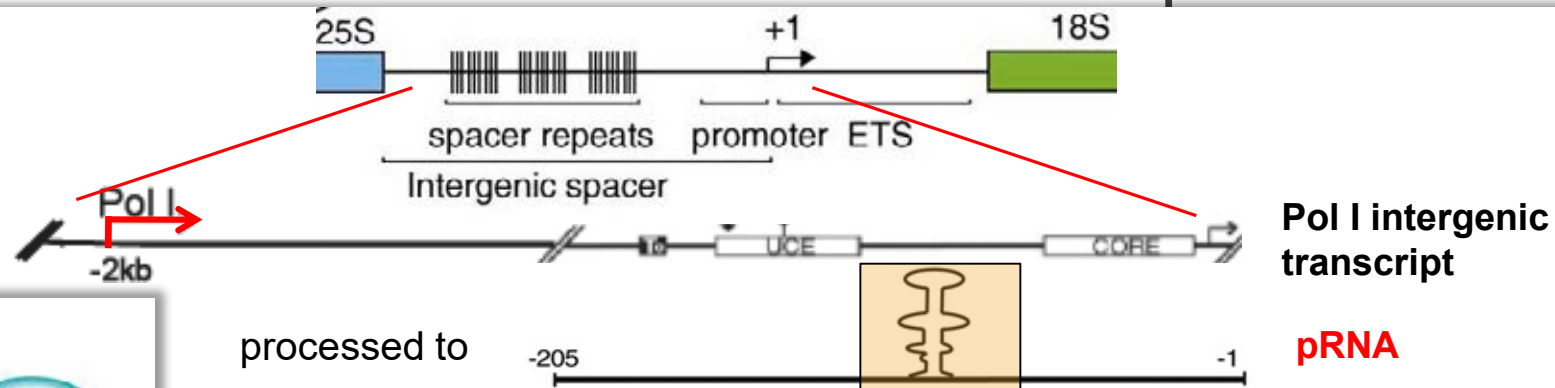
- w komórkach drożdżowych i ludzkich
- poliadenylowany transkrypt Pol II
- obejmuje regiony subtelomeryczne i telomeryczne
- komponent heterochromatyny telomerowej
- asocjacja z telomerami i białkami telomerowymi (Trf1, Trf2)
- regulowany przez czynniki *RNA surveillance* (Rat1, Trf4, czynniki NMD, RNaza 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



- NoRC *mammalian nucleolar remodeling complex*
- wymaga asocjacji TIP5 z pRNA
- NoRC dostarcza enzymy modyfikujące DNA i histony → tworzenie heterochromatyny
- metylacja CpG-133 zapobiega wiązaniu UBF → inhibicja tworzenia kompleksu transkrypcyjnego

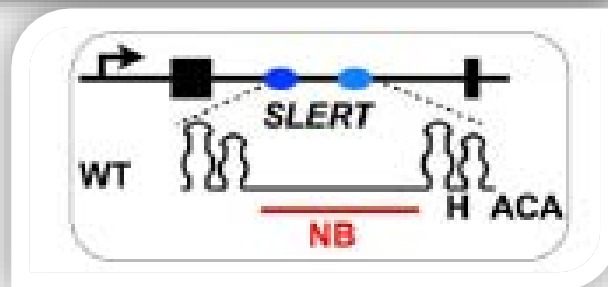
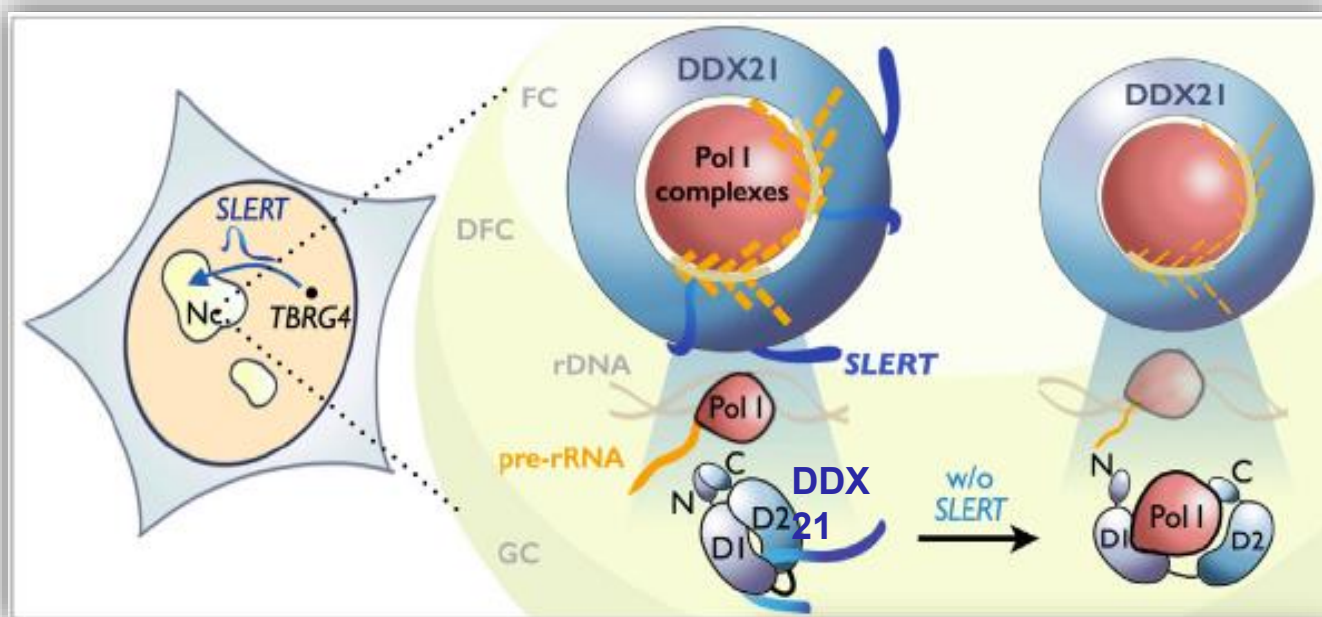
WYCISZANIE rDNA PRZEZ pRNA I NoRC



DODATKOWE WYCISZENIE

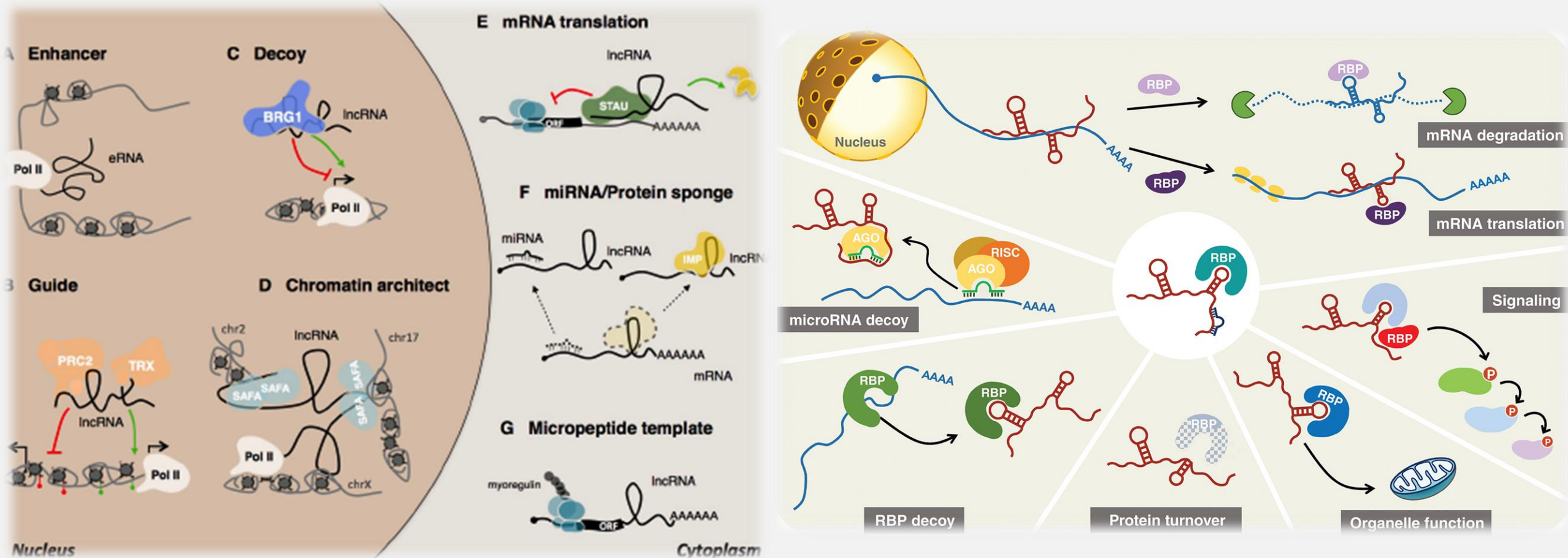
- pRNA wiąże się do promotora rDNA w T0, niezależnie od TTF-I i innych białek, tworząc triplex RNA-DNA
- pRNA konkuruje z TTF-I
- rDNA/pRNA triplex rekrutuje metylotransferazę DNMT3b → hipermetylacja chromatyny i wyciszenie rDNA

SLERT –TRANSKRYPCJA Pol I (*human*)



- 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



TAKE-HOME MESSAGE

- Większość genomów eukariotycznych ulega transkrypcji, co powoduje powstawanie różnych RNA
- Co najmniej niektóre z „niewidocznych” transkryptów w niektórych warunkach tworzą funkcjonalne ncRNA
- Zwykle działają one w transkrypcyjnym wyciszeniu *in-cis* lub *in-trans* poprzez rekrutację enzymów modyfikujących (DNA, histonów) do promotorów lub interakcji z DNA (pRNA)
- Nieprawidłowy poziom lub aktywność ncRNA jest związany z występowaniem niektórych chorób

