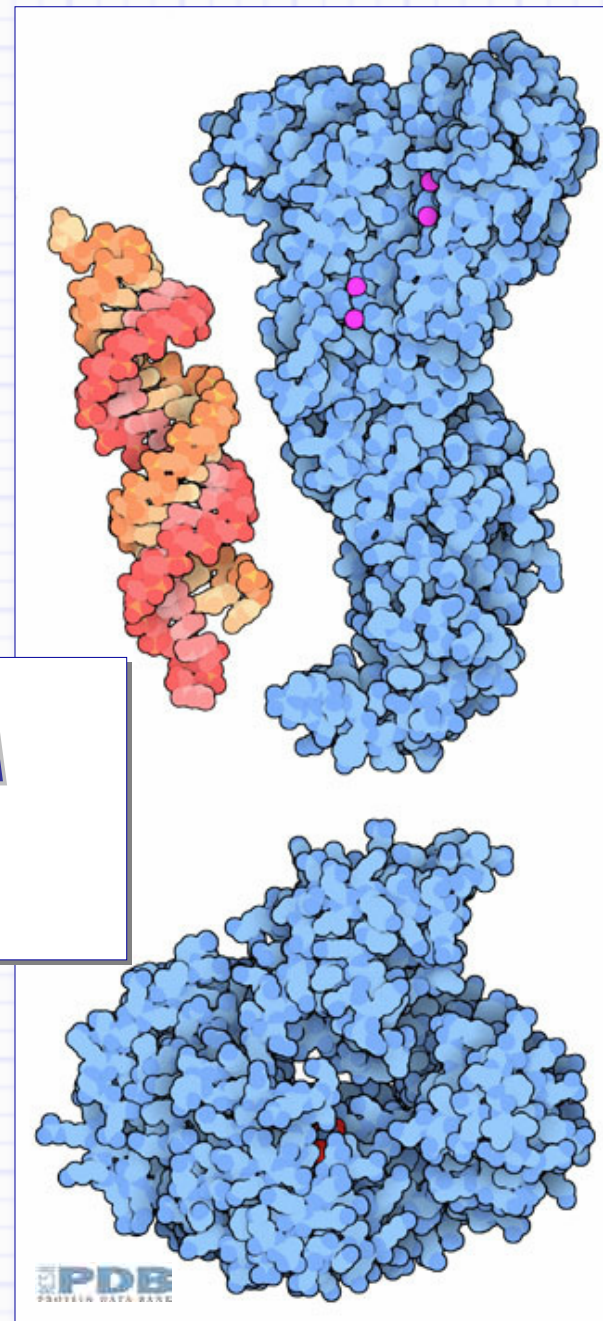


Świat małych RNA

Monika Zakrzewska-Płaczek

monika.z@ibb.waw.pl



Małe RNA (*small RNAs*, *sRNAs*)

sRNA – 21-30 nt

wyciszanie ekspresji genów:

(*gene silencing*, *RNA silencing*)

- **post-transkrypcyjne wyciszanie genów**

(*post-transcriptional gene silencing*, *PTGS*)

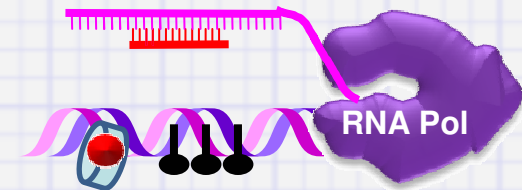
degradacja mRNA, inhibicja translacji



- **transkrypcyjne wyciszanie genów**

(*transcriptional gene silencing*, *TGS*)

epigenetyczne modyfikacje chromatyny



modyfikacja histonów, metylacja DNA

PTGS: post-transkrypcyjne wyciszanie genów

Klasy małych RNA:

miRNA (*microRNA*)

rośliny,
zwierzęta,
wirusy,
Protista

20–25nt

Drosha
(u zwierząt)
+ Dicer

Transkrypcja
przez Pol II/Pol III

Regulacja stabilności mRNA
(cięcie mRNA), inhibicja
translacji

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

siRNA

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

exo-siRNA (pochodzenia egzogenego)

rośliny,
grzyby,
zwierzęta,
Protista

21-24nt

Dicer

Transgeniczny, wirusowy
lub inny egzogeny RNA

Post-transkrypcyjna
regulacja ekspresji genów,
obrona przeciwwirusowa

endo-siRNA (pochodzenia endogenego)

rośliny,
grzyby,
zwierzęta,
Protista

~21nt

Dicer

Transkrypcja
dwukierunkowa lub
zbieżna, wiązanie mRNA z
transkryptami
pseudogenów o
przeciwnej orientacji

Post-transkrypcyjna i
transkrypcyjna regulacja
ekspresji genów, regulacja
aktywności transpozonów

tasiRNA (*trans-acting siRNA*)

rośliny

21nt

DCL4

TAS RNA cięte przez
miRNA

Regulacja post-
transkrypcyjna

natsiRNA (*natural antisense transcripts-derived siRNA*)

rośliny

24nt
21nt

DCL2
DCL1

Transkrypcja
dwukierunkowa
indukowana stresem

Regulacja genów
odpowiedzi na stres

TGS: transkrypcyjne wyciszenie genów

Klasy małych RNA:

siRNA

(small interfering RNA)

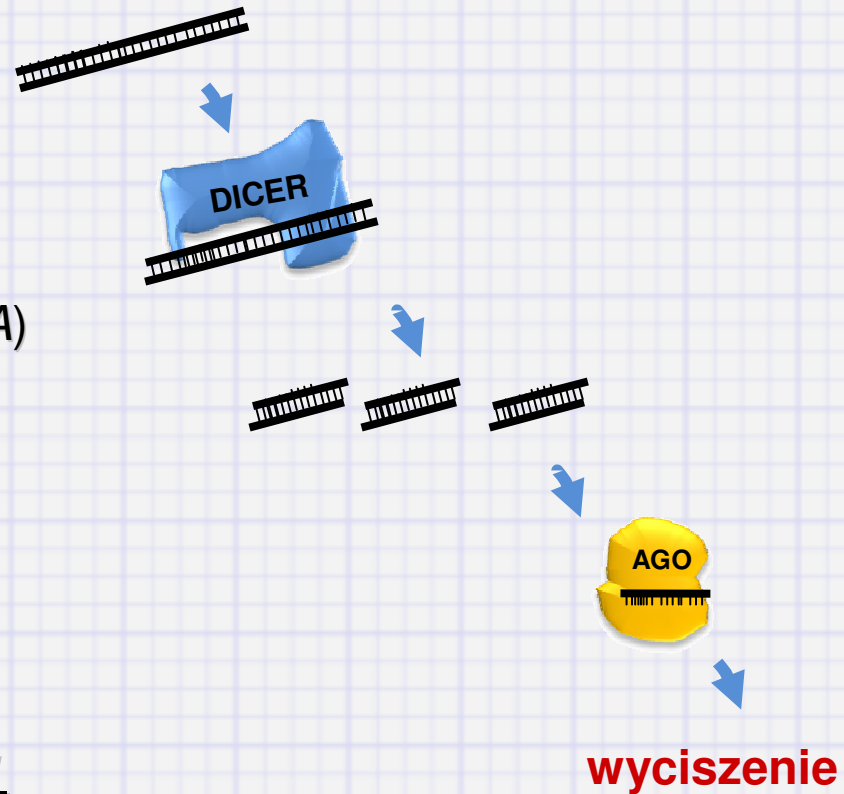
endo-siRNA (pochodzenia endogennego)	rośliny, grzyby, zwierzęta, <i>Protista</i>	~21nt	Dicer	Transkrypcja dwukierunkowa lub zbieżna, wiązanie mRNA z transkryptami pseudogenów o przeciwnej orientacji	Post-transkrypcyjna i transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, regulacja aktywności transpozonów
hc-siRNA (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</i> <i>rerio</i>	24-30nt	niezależne od Dicer	Długie pierwotne transkrypty (?)	Regulacja aktywności transpozonów, inne nieznane funkcje

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

Dwuniciowy RNA

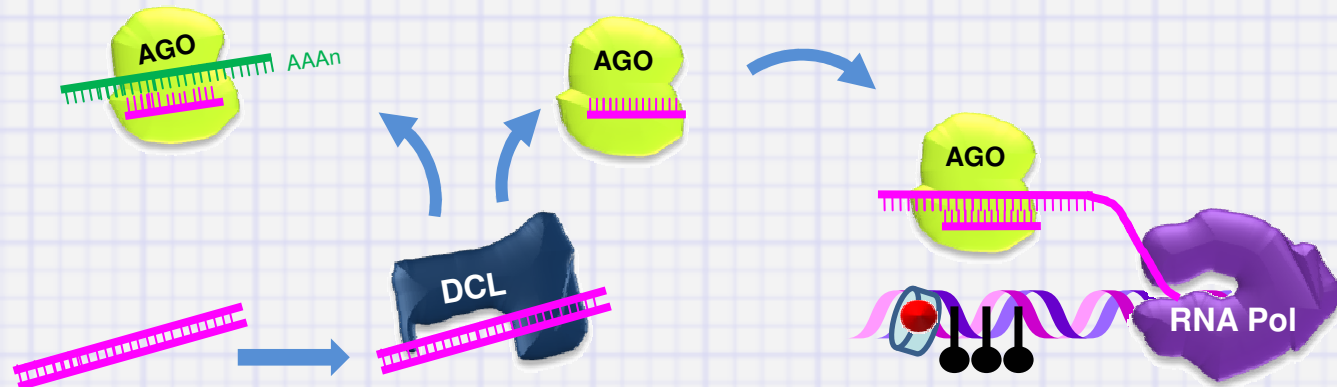
(*double-stranded RNA, dsRNA*)

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

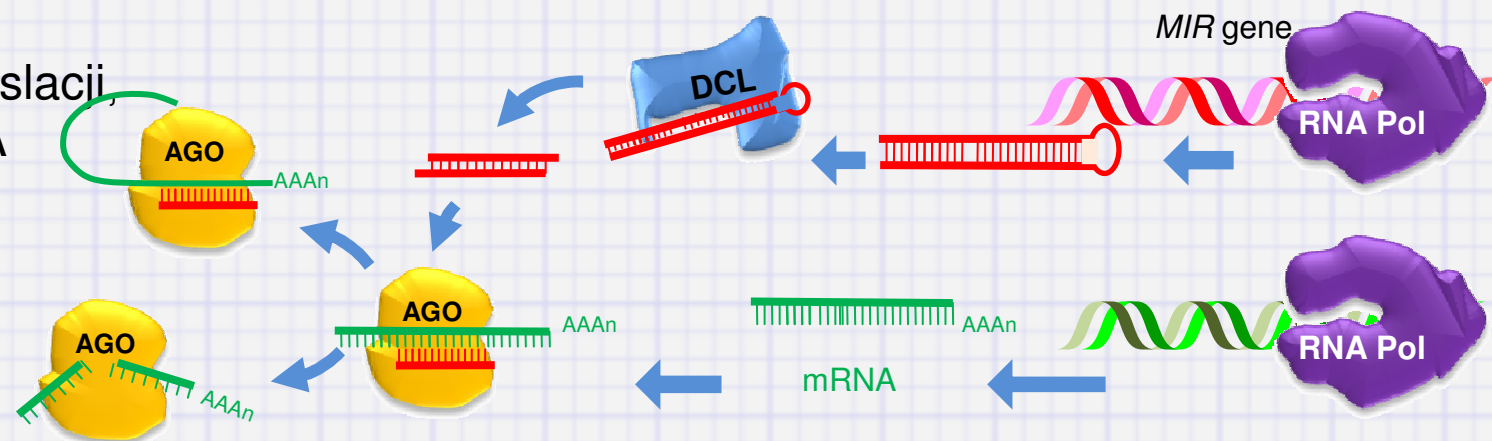


Wyciszanie ekspresji genów

siRNA-post-transkrypcyjne lub transkrypcyjne wyciszanie ekspresji genów

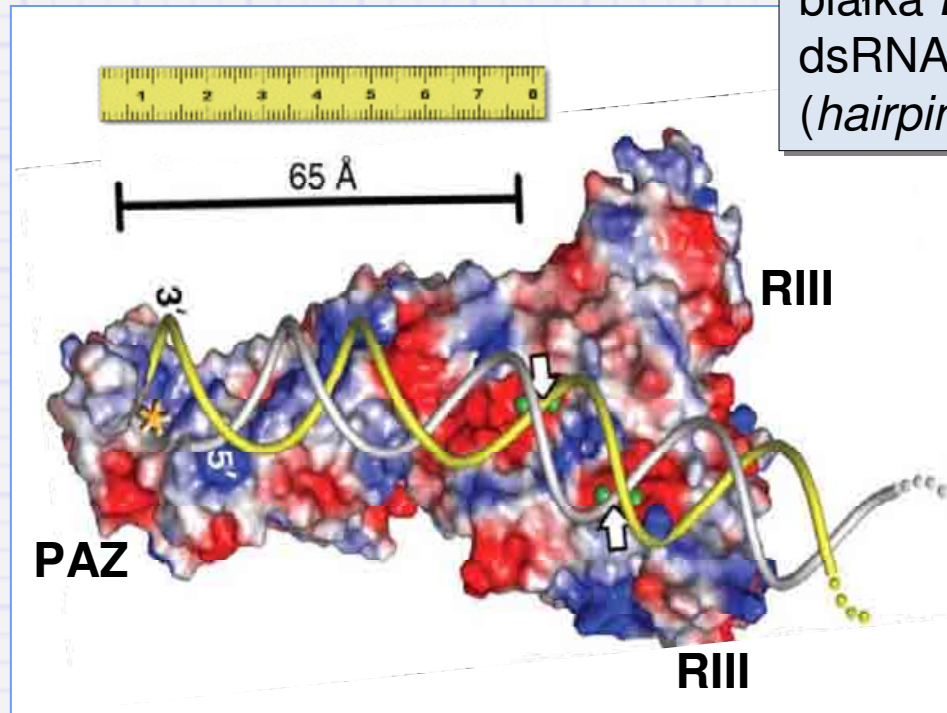


miRNA -
inhibicja translacji,
cięcie mRNA



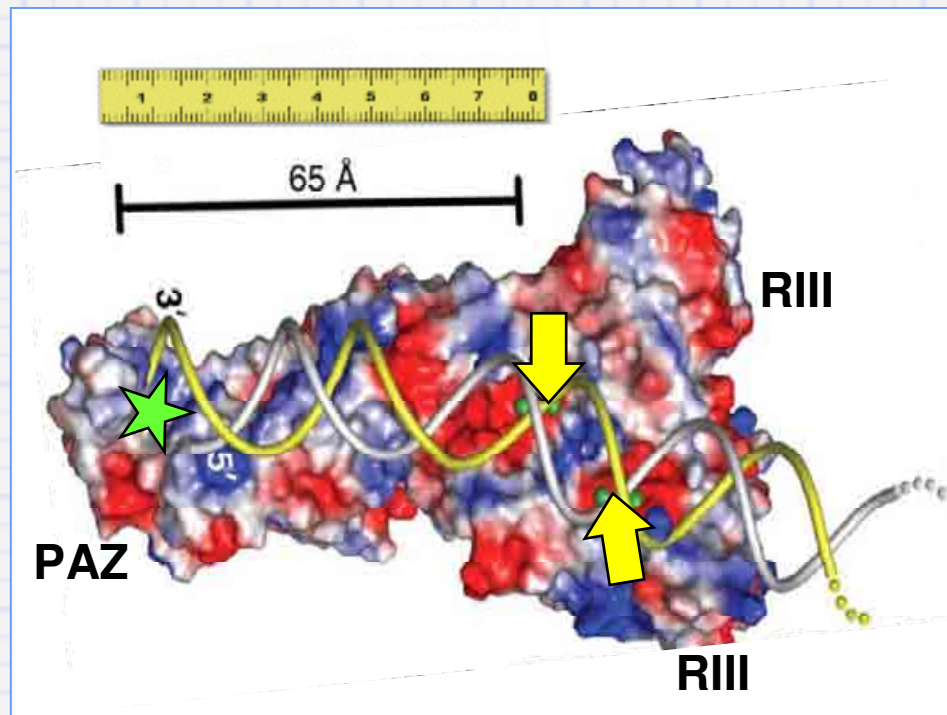
Dicer i Dicer-like

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



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

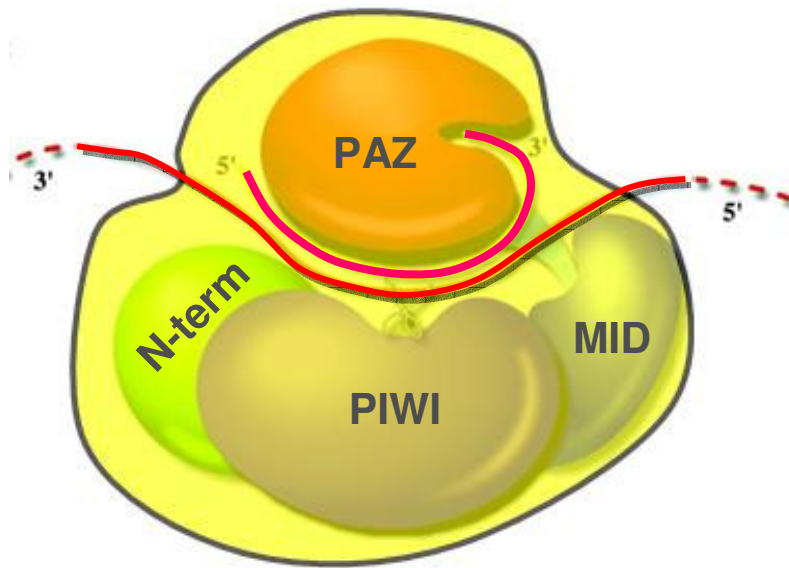
Dicer i Dicer-like



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

Argonaute

Białka ARGONAUTE wiążą
sRNA i mRNA



A. thaliana ago1

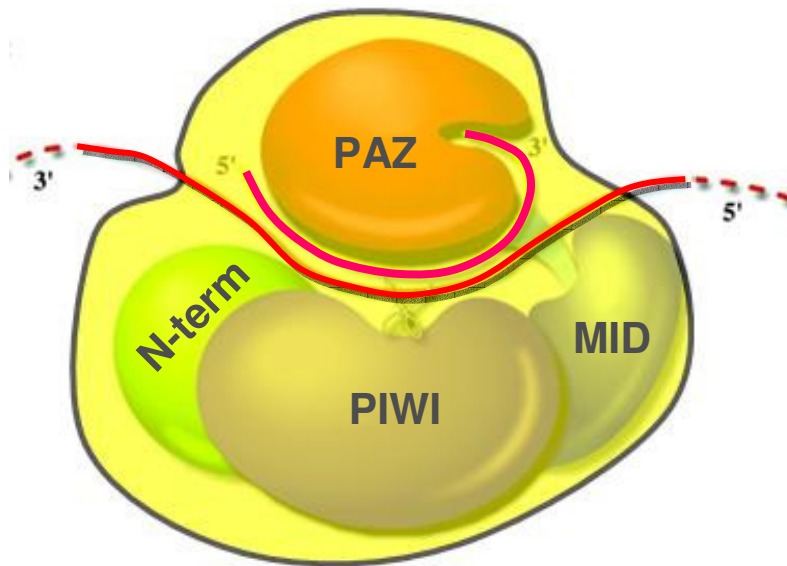


Argonauta argo

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

Argonaute

Białka ARGONAUTE wiążą
sRNA i mRNA



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

Dicer i Argonaute u różnych organizmów

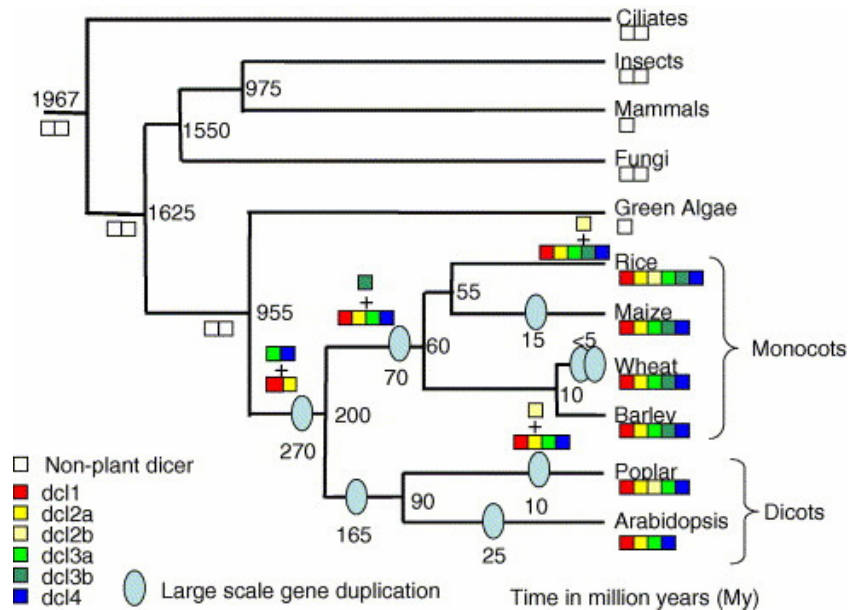
	Species	Argonaute-PIWI-like		Dicer-like	RdRP
		Argonaute	PIWI		
Plantae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10 (AGO1-10)	-	4 (DCL 1-4)	6
	<i>Oryza sativa</i>	18	-	5	5
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	-	1	1
	<i>Neurospora crassa</i>	1	-	1	3
	<i>Aspergillus nidulans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

U roślin w biogenezie miRNA i siRNA uczestniczą różne białka DCL

AtDCL1 **miRNA**



AtDCL2 - 4 **siRNA**



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

U roślin w biogenezie miRNA i siRNA uczestniczą różne białka DCL

AtDCL1 **miRNA**



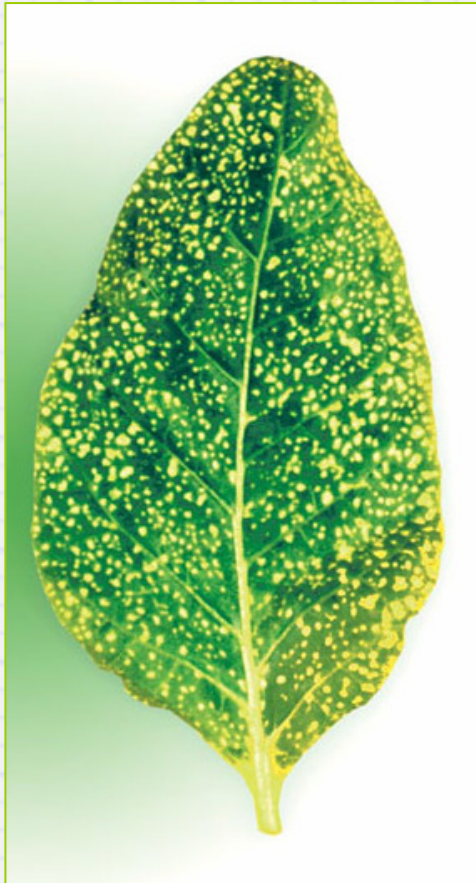
AtDCL2 - 4 **siRNA**



Arabidopsis thaliana:

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

siRNA – strażnicy genomu



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

endo-siRNA:

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

Exo-siRNA: wyciszanie transgenów

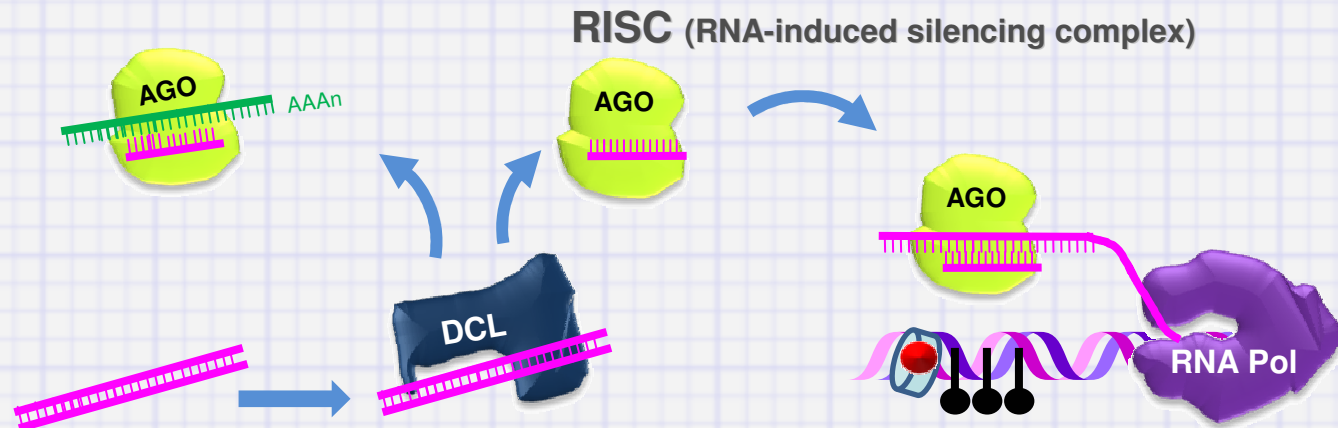
Transgeny wprowadzane sztucznie są często wyciszane przez siRNA

Wyciszenie może być wywołane:

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

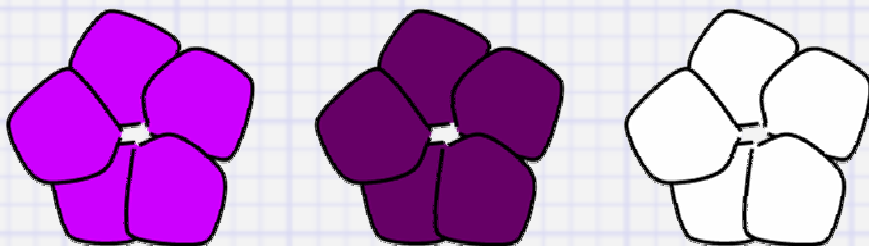
*Transgeny są wyciszane **post-transkrypcyjnie** i **transkrypcyjnie***

siRNA-post-transkrypcyjne lub transkrypcyjne wyciszanie ekspresji genów



Post-transkrypcyjne wyciszanie genów u roślin

transgene-induced post-transcriptional silencing



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

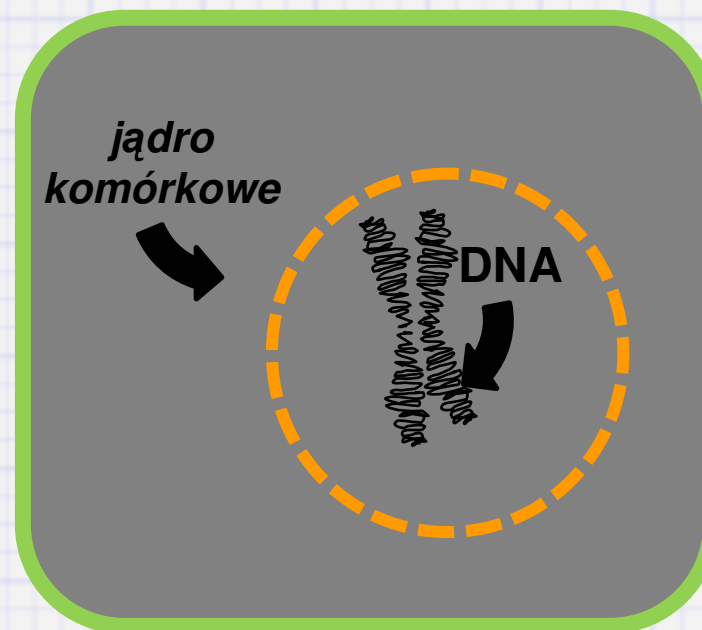
*Agrobacterium
tumefaciens*
na powierzchni
komórki roślinnej



Martha Hawes, University of Arizona



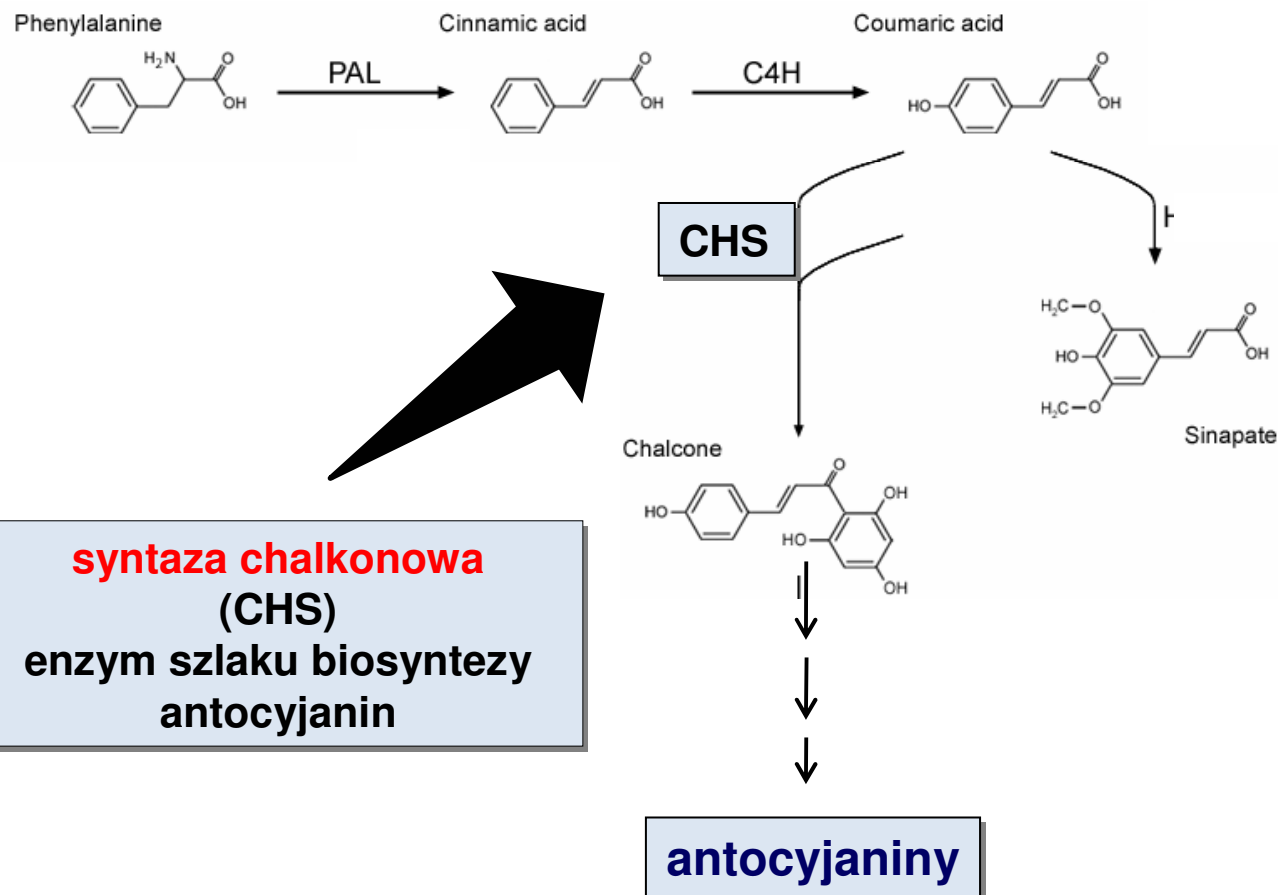
komórka roślinna



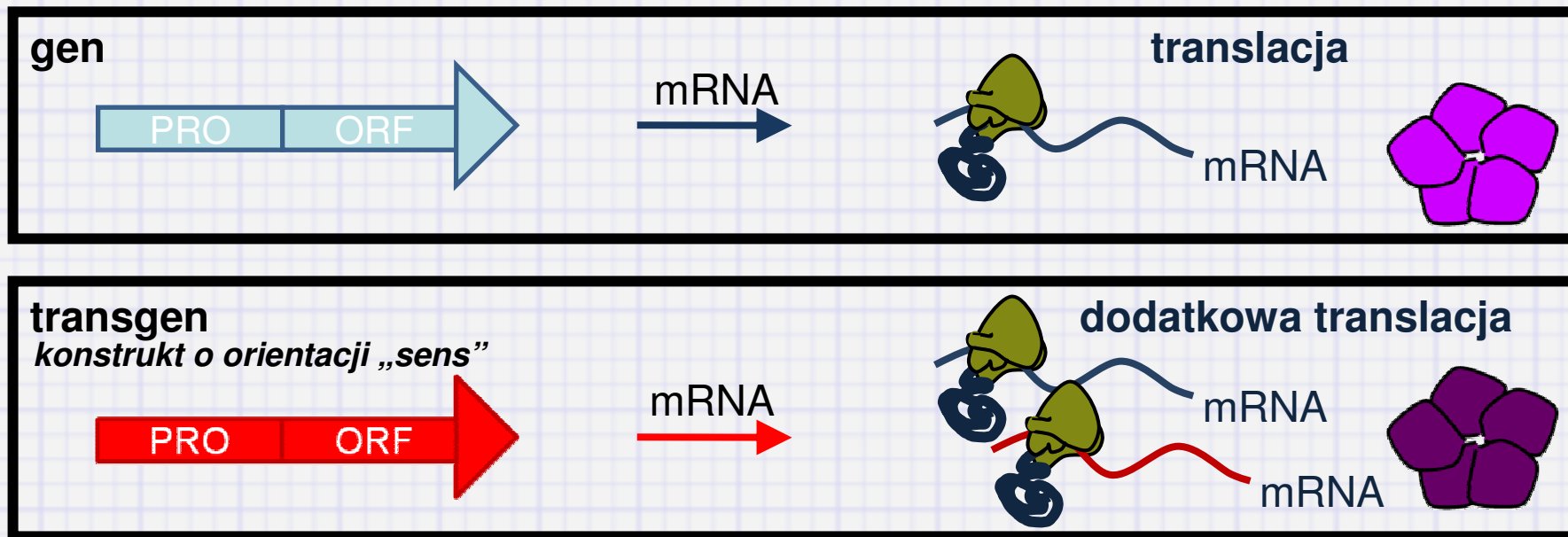
Manipulacja ekspresją genu syntazy chalkonowej: zmiana pigmentacji kwiatów petunii



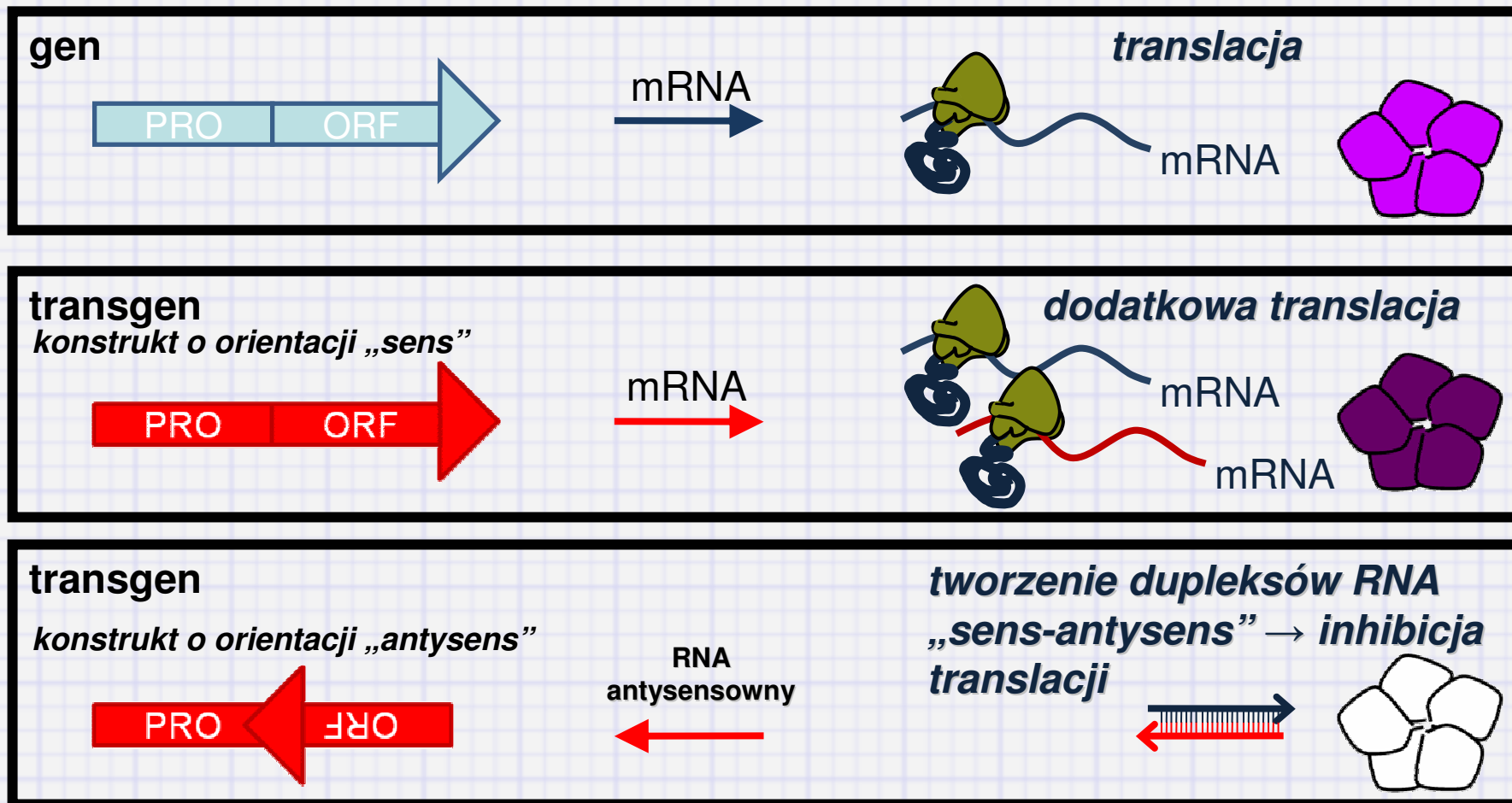
*Dziki kwiaty petunii
zawierają
antocyjaniny
nadające purpurową
barwę*



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



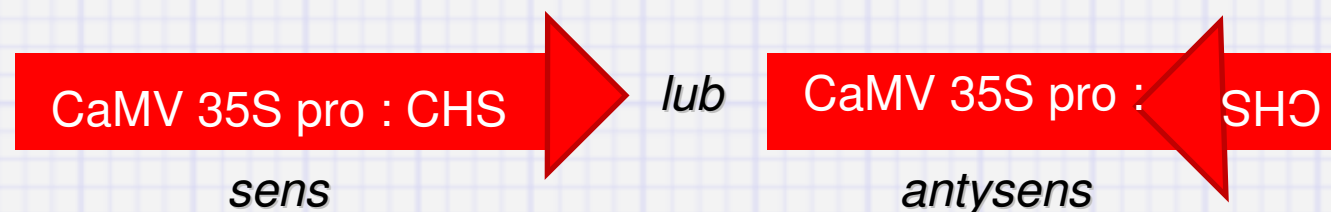
...a synteza RNA o odwróconej orientacji zablokuje syntezę barwnika



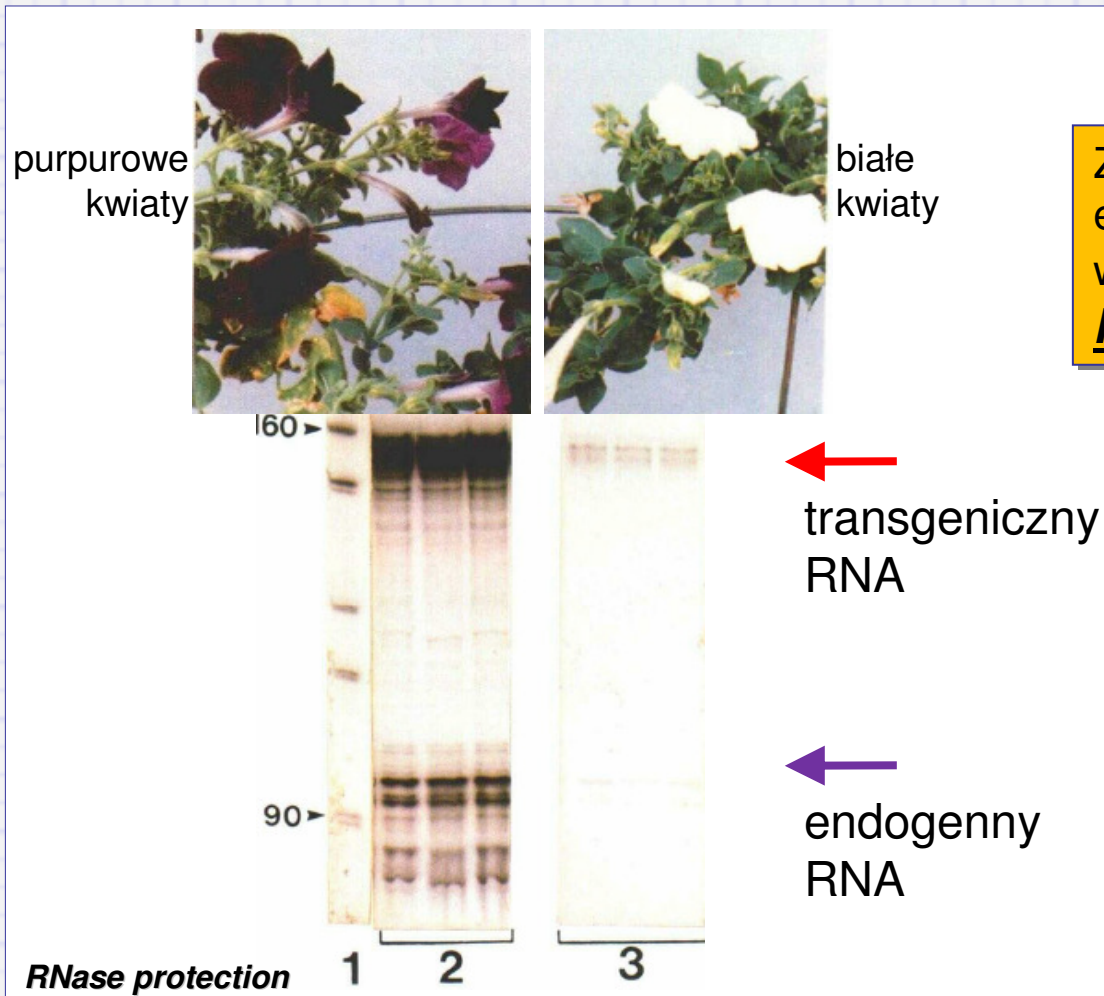
Nieoczekiwanie, wprowadzenie zarówno konstruktów *sens* jak i *antysens* prowadzi do inhibicji syntezy barwnika



rośliny zawierające transgen CHS

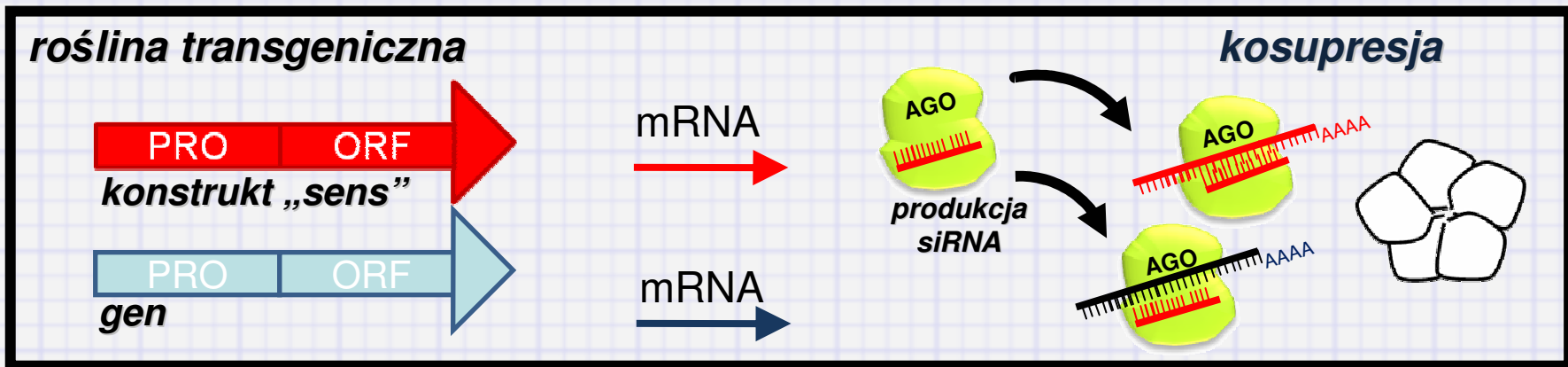
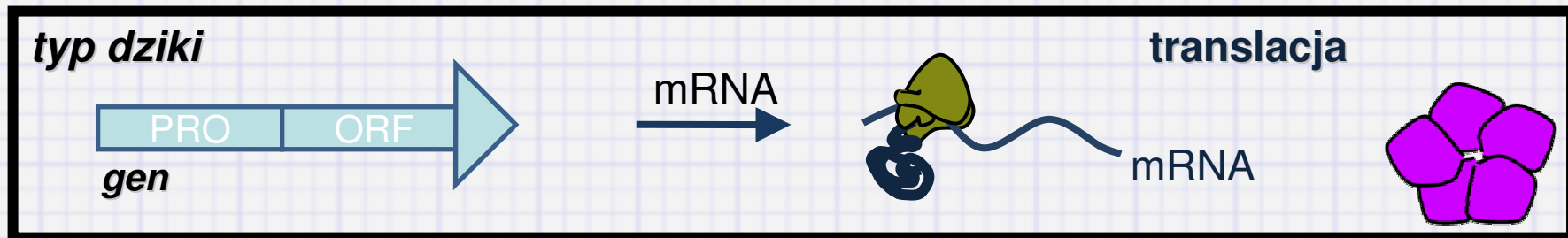


W modyfikowanych roślinach nie dochodzi do syntezy ani endogennej ani transgenicznej CHS

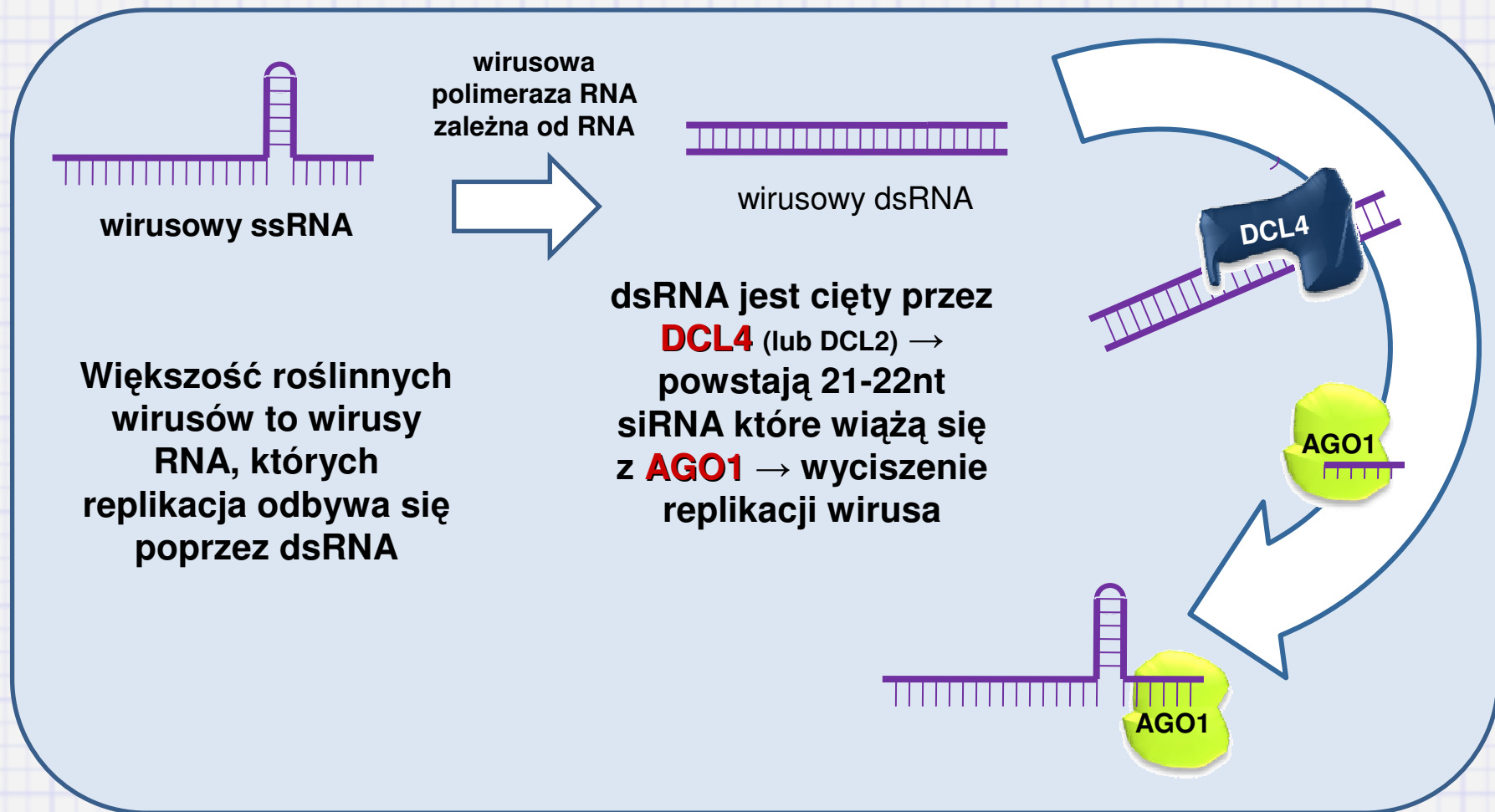


Zjawisko wyciszania zarówno endogennego jak i sztucznie wprowadzonego genu nazywamy **kosupresją**

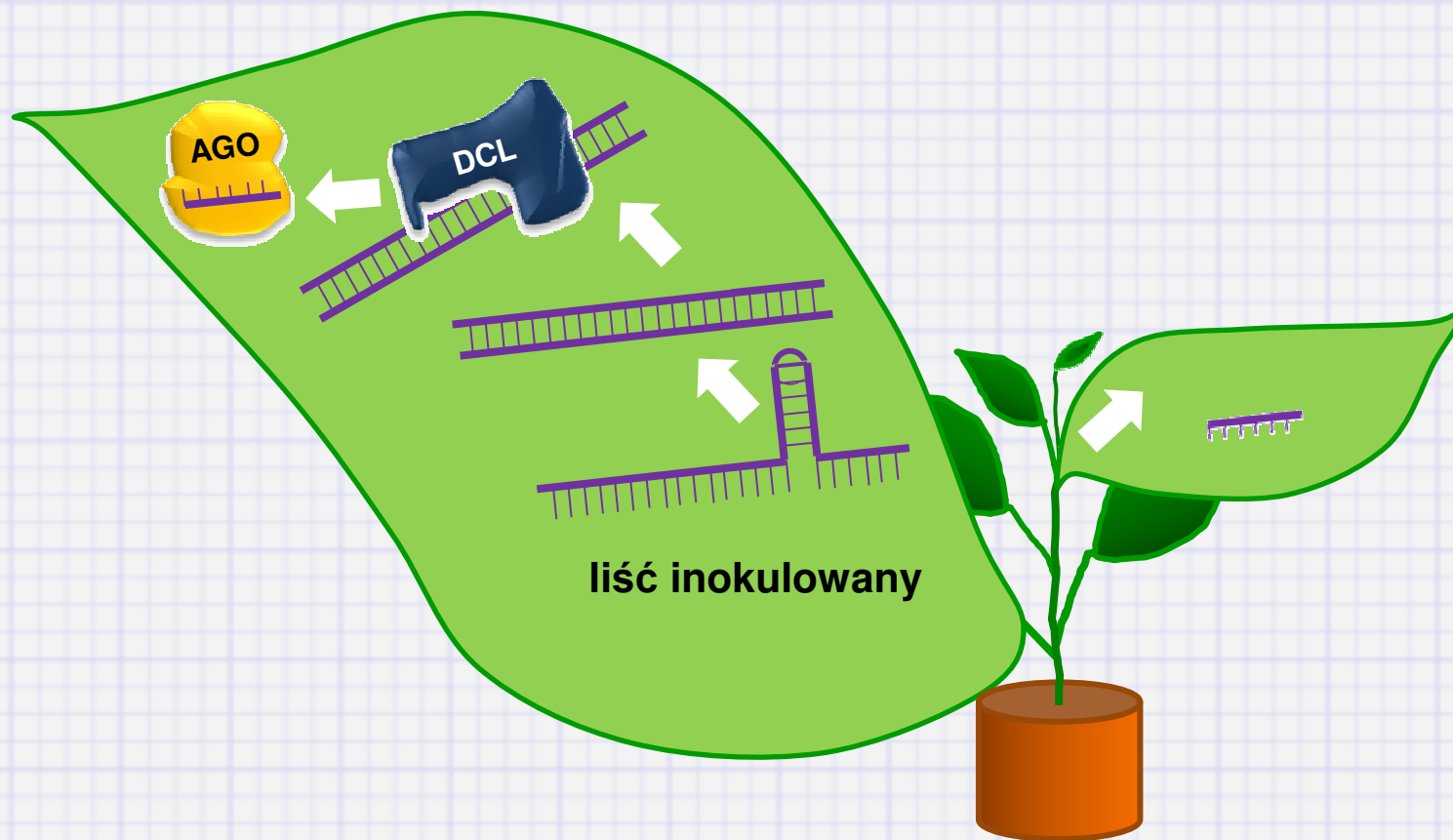
Kosupresja jest wynikiem produkcji siRNA



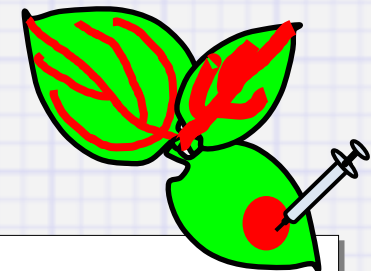
VIGS - *viral induced gene silencing*



Infekcja wirusowa powoduje akumulację siRNA

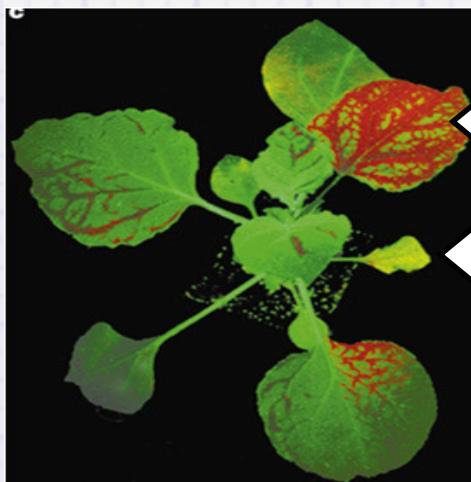


Sygnal wyciszający może rozprzestrzeniać się w całej roślinie poprzez floem



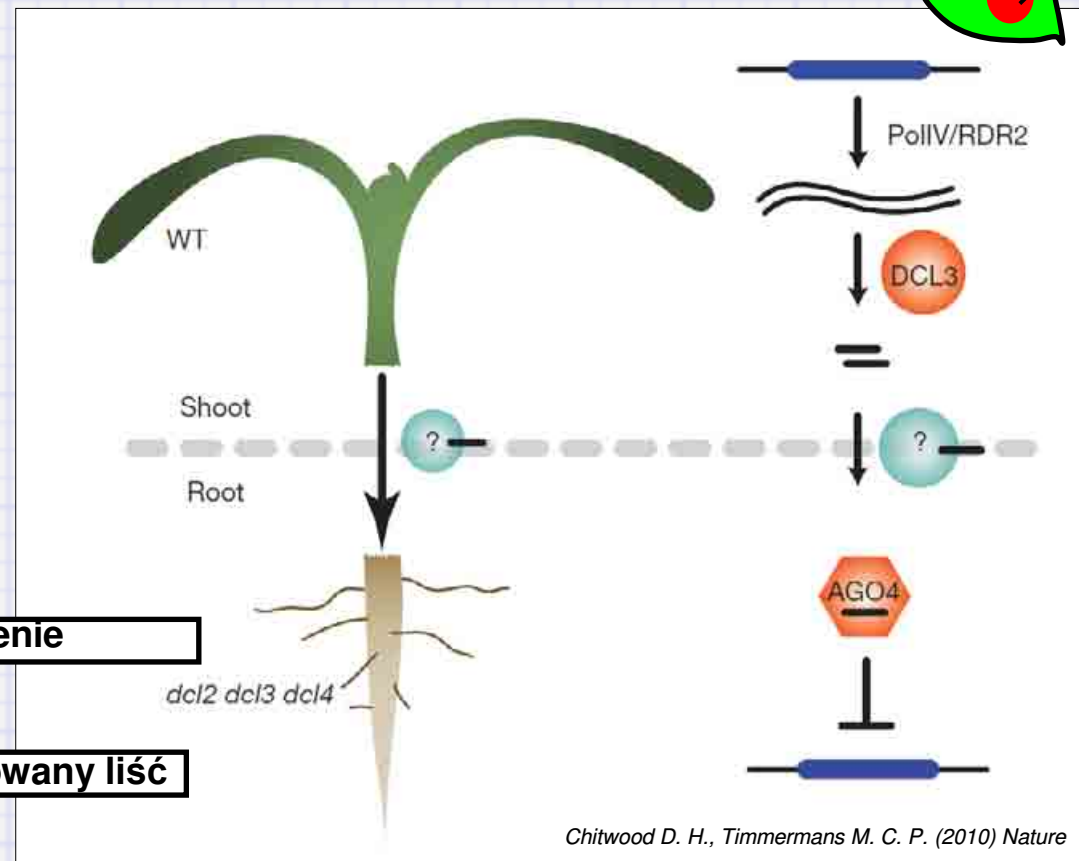
Arabidopsis thaliana:

- egzogenne siRNA 21 i 24nt – wyciszanie transgenu GFP
- endogenne siRNA – tylko 24nt są mobilne
(zaangażowane głównie w TGS poprzez remodelowanie chromatyny, pochodzą z transpozonów i innych zmetylowanych rejonów genomu)



wyciszenie

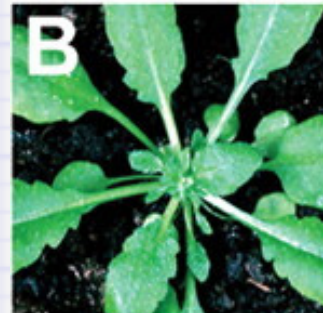
inokulowany liść



Mutanty biogenezy siRNA są mniej odporne na choroby wirusowe i patogeny bakteryjne

Wyciszenie wirusa **TRV** *Tobacco Rattle Virus* (wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu) w roślinach *A. thaliana* dzikiego typu zapobiega objawom choroby. Mutanty *dcl* są niezdolne do zahamowania infekcji.

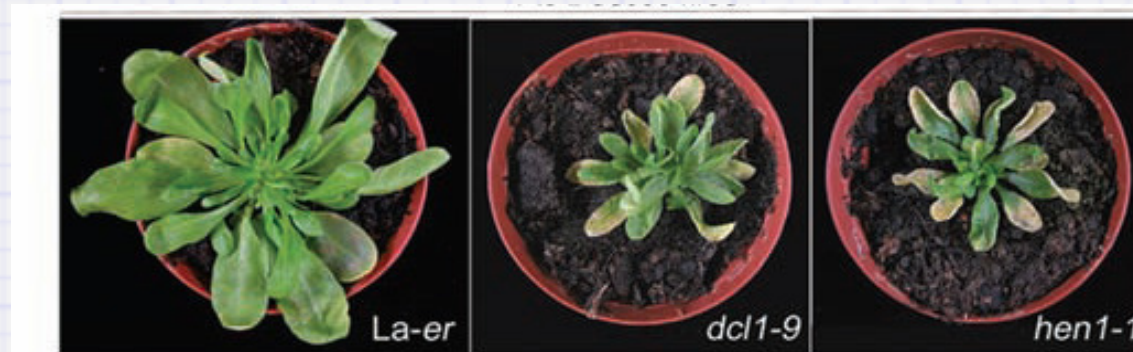
WT *Arabidopsis*
inokulowany TRV



Podwójny mutant
dcl2-dcl4 inokulowany TRV



Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K., Carrington, J.C., and Voinnet, O. (2006) *Science*



Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S.Y., and Voinnet, O. (2008) *Science*

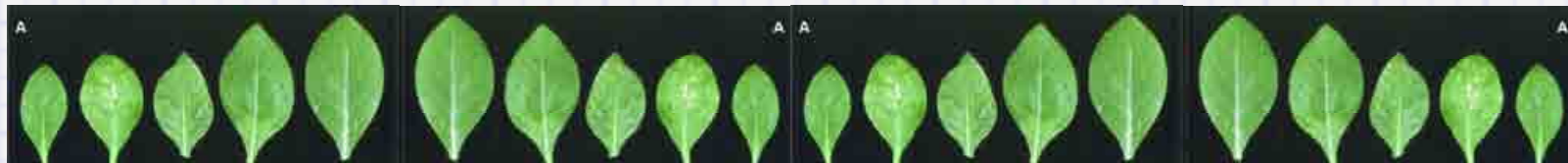
A. thaliana dzikiego typu (*La-er*) i mutanty biogenezy sRNA (*dcl1-9* i *hen1-1*) inokulowane bakteriami ***Pseudomonas***.

VIGS - podsumowanie

***Wyciszenie ekspresji genów za pośrednictwem siRNA jest ważnym mechanizmem obrony roślin przed patogenami – wirusami i bakteriami
siRNA hamują replikację wirusową u roślin (również u zwierząt - *Drosophila melanogaster*)***

siRNA działają ogólnoustrojowo – u roślin mogą się przemieszczać poprzez wiązki przewodzące

Większość wirusów wytwarza białka supresorowe, hamujące szlak wyciszania

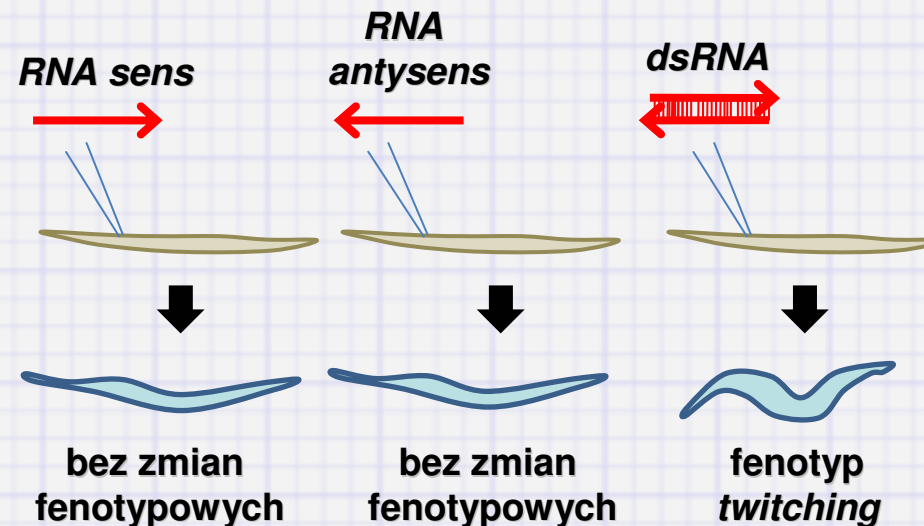


Exo-siRNA u zwierząt:

dsRNA – najsilniejszy inicjator wyciszenia

modyfikacje genetyczne nicienia *C. elegans*:

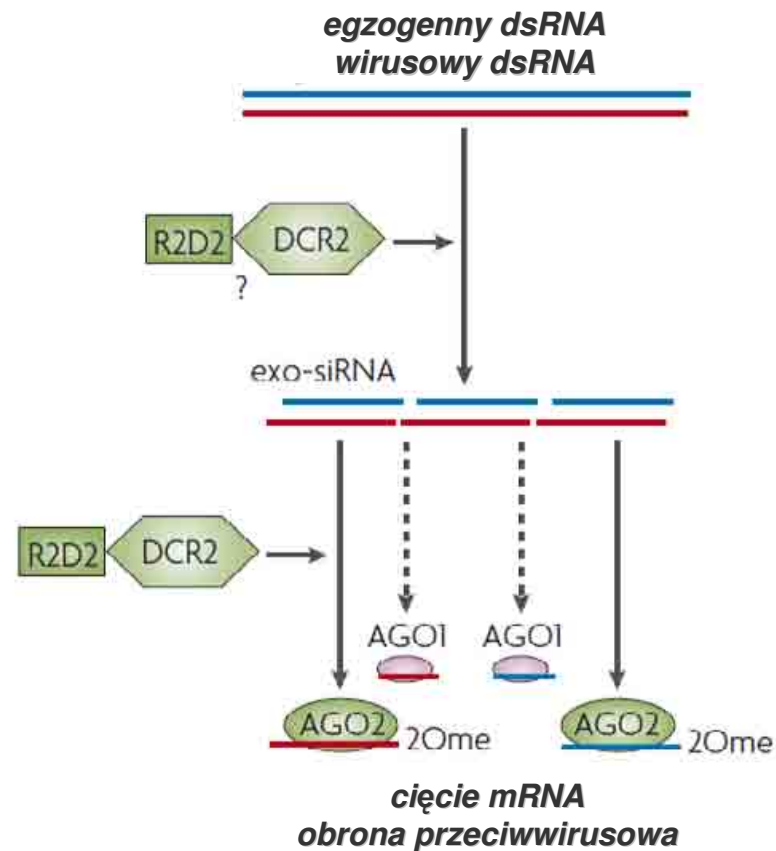
Wprowadzanie do organizmów nicieni *Caenorhabditis elegans* RNA o prawidłowej lub odwróconej orientacji, oraz dwuniciowych RNA, odpowiadających sekwencji genu *unc-22*, kodującego miofilamentowe białko komórek mięśniowych. Wyciszenie *unc-22* powoduje fenotyp kurczenia ciała (*twitching*)



Exo-siRNA u zwierząt:

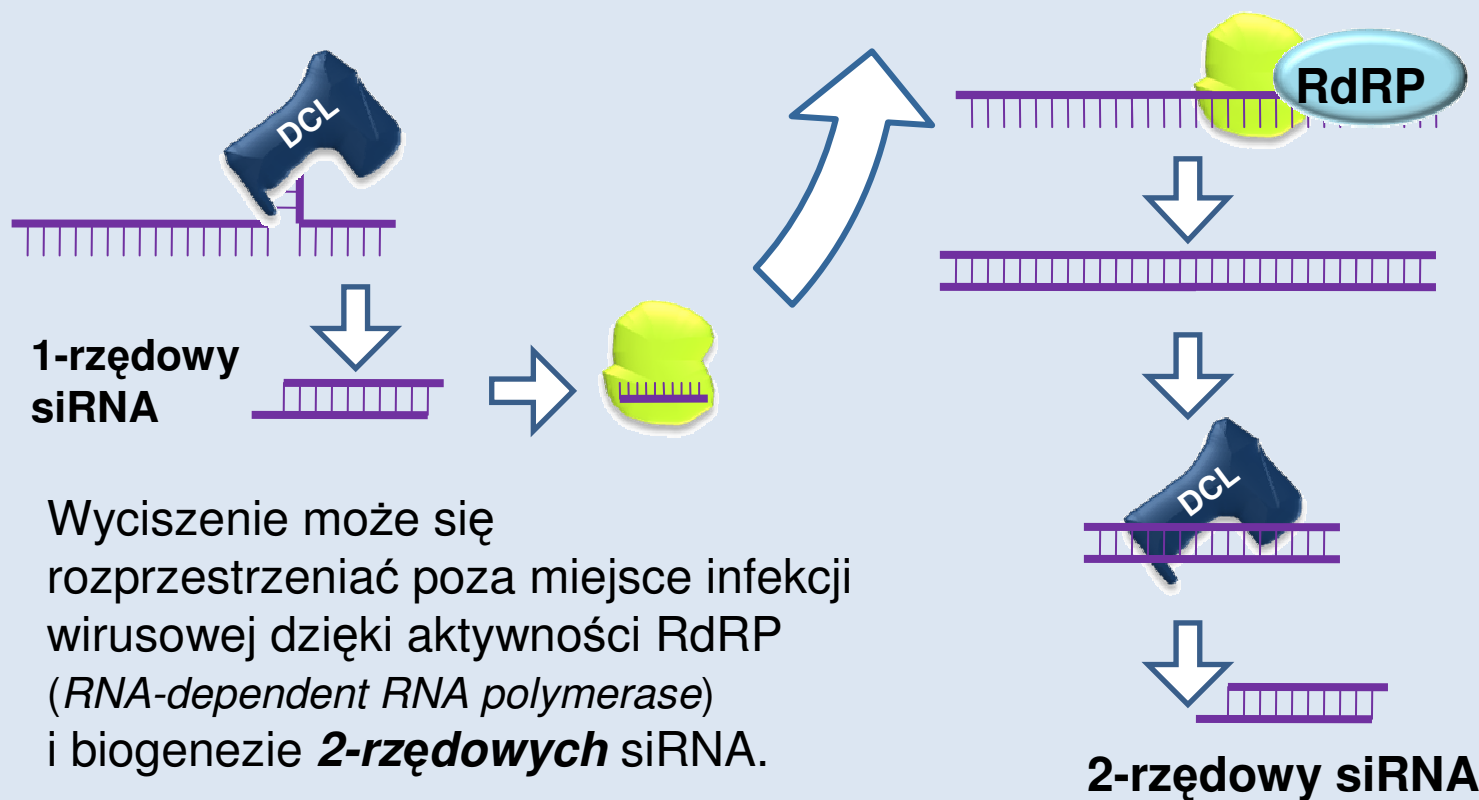
- U ssaków i *C. elegans* – tylko jedno białko *Dicer*, odpowiada za biogenezę zarówno siRNA, jak i miRNA

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



Efekt wyciszenia jest wzmacniany przez amplifikację siRNA

RdRP – polimeraza RNA zależna od RNA (RNA-dependent RNA Polymerase)



Efekt wyciszenia jest wzmacniany przez amplifikację siRNA

