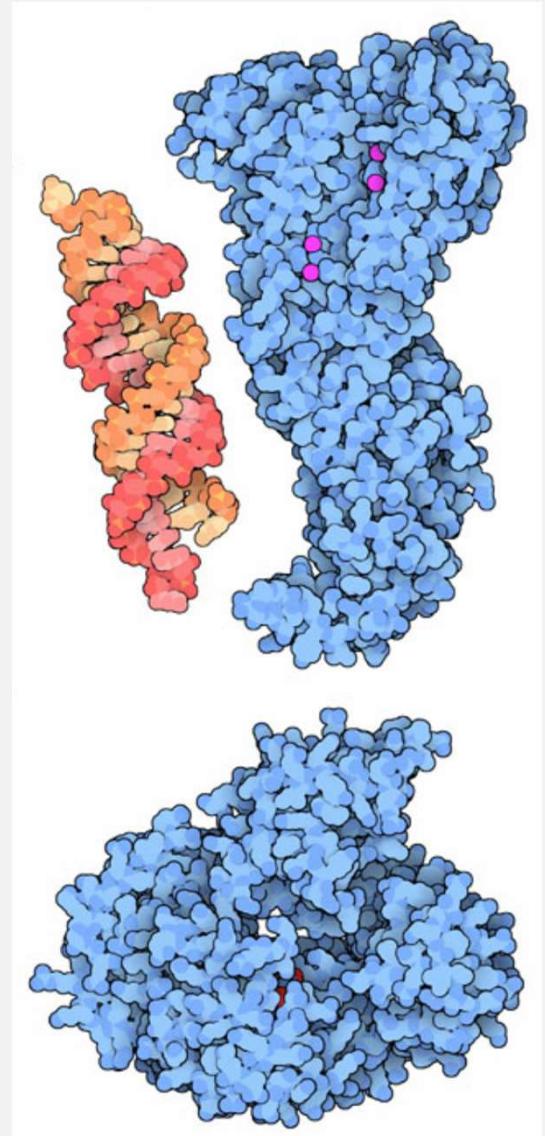


ncRNA

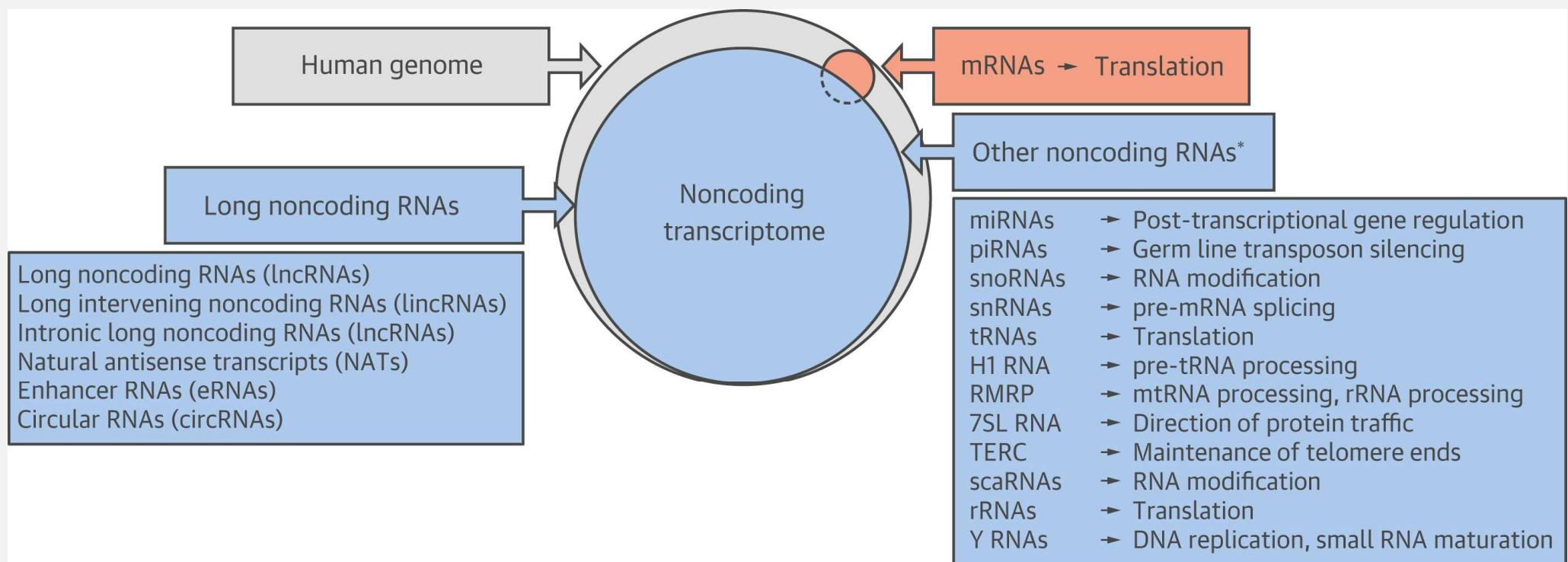
Molekularne Techniki Analizy RNA

Monika Zakrzewska-Płaczek



<https://pdb101.rcsb.org/motm/98>

NIEKODUJĄCY RNA W TRANSKRYPTOMIE CZŁOWIEKA



NIEKODUJĄCY RNA

(*non-coding RNA; ncRNA*)

Housekeeping RNA

Konstytutywna 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** – działają w procesach wyciszania ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym (TGS – *transcriptional gene silencing*) i post-transkrypcyjnym (PTGS – *post-transcriptional gene silencing*)
- **lncRNAs** – mniej poznany, przeważnie działa w transkrypcyjnym wyciszaniu genów (TGS) na poziomie chromatyny

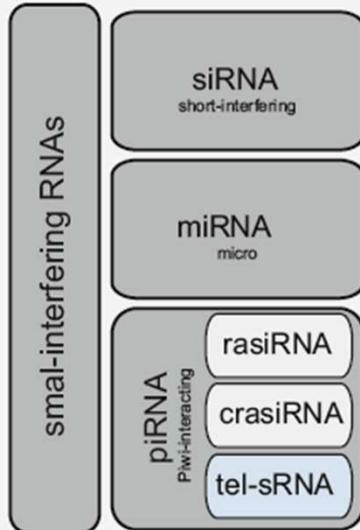
PODZIAŁ ncRNA

NA PODSTAWIE
WIELKOŚCI CZĄSTECZEK

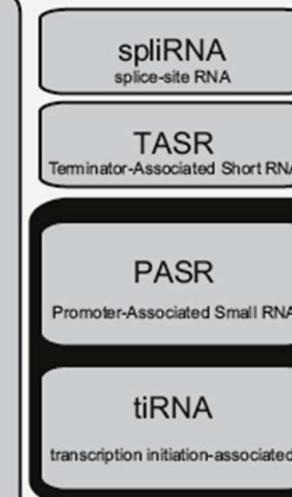
short ncRNA <200nt
long ncRNA >200nt

Tisseur et al., Biochémie, 2011

short non-coding RNAs



small non-coding RNAs - sRNAs



PAR
Promoter Associated RNA

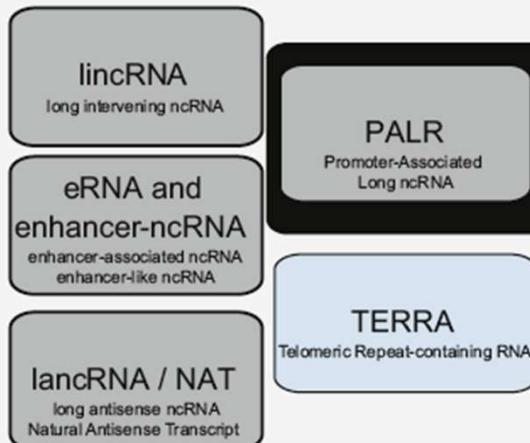
Stable Transcript

Unstable Transcript

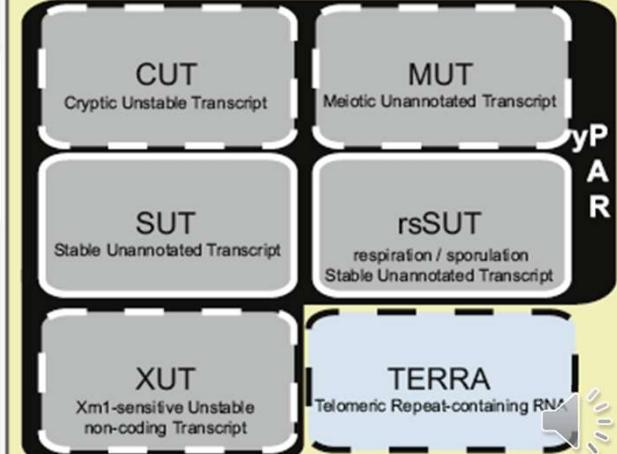
Telomeric transcript

Yeast ncRNA

large non-coding RNAs - lncRNAs



Saccharomyces cerevisiae



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

sRNA – 21-30 nt 

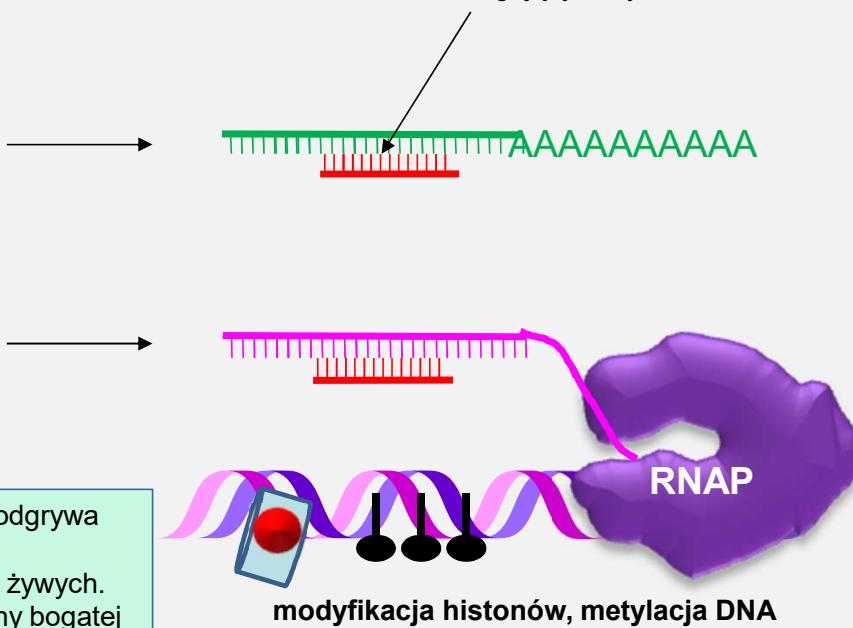
wyciszanie ekspresji genów:
(*gene silencing*, *RNA silencing*)

post-transkrypcyjne
(*post-transcriptional gene silencing*, *PTGS*)
degradacja mRNA, inhibicja translacji

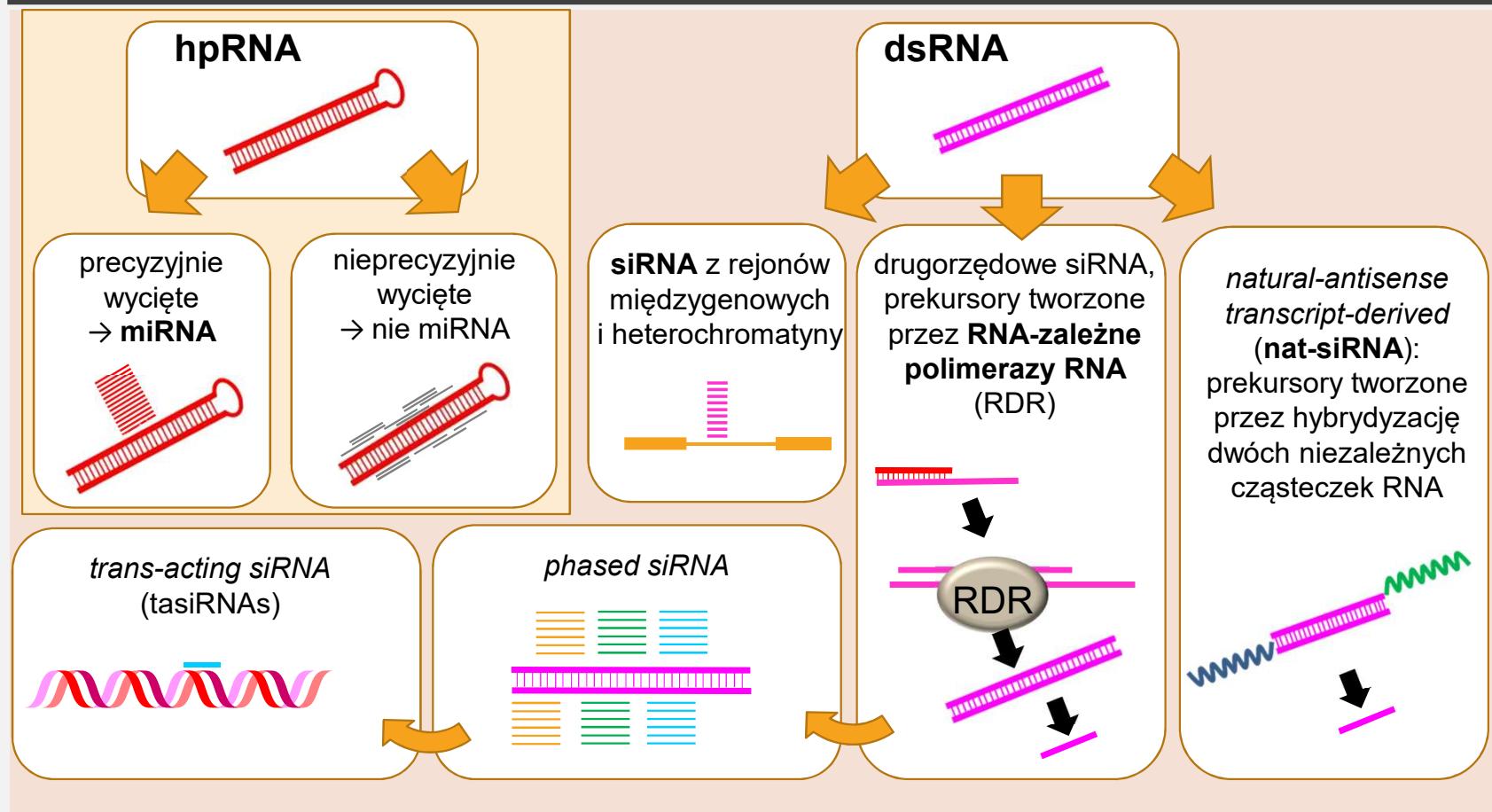
transkrypcyjne
(*transcriptional gene silencing*, *TGS*)
epigenetyczne modyfikacje chromatyny

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



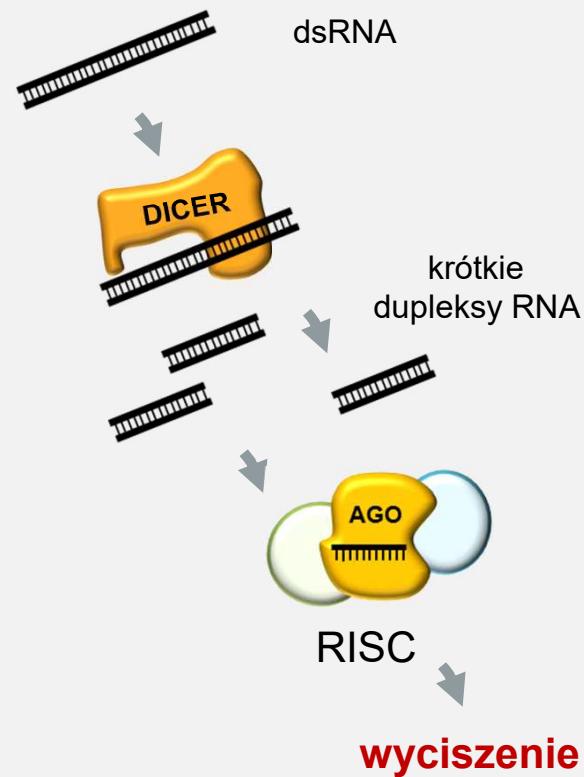
MAŁE RNA MOGĄ POCHODZIĆ ZE STRUKTUR SPINKI LUB DWUNICOWEGO RNA



Adapted from Axtell, M.J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. Annu. Rev. Plant Biol.

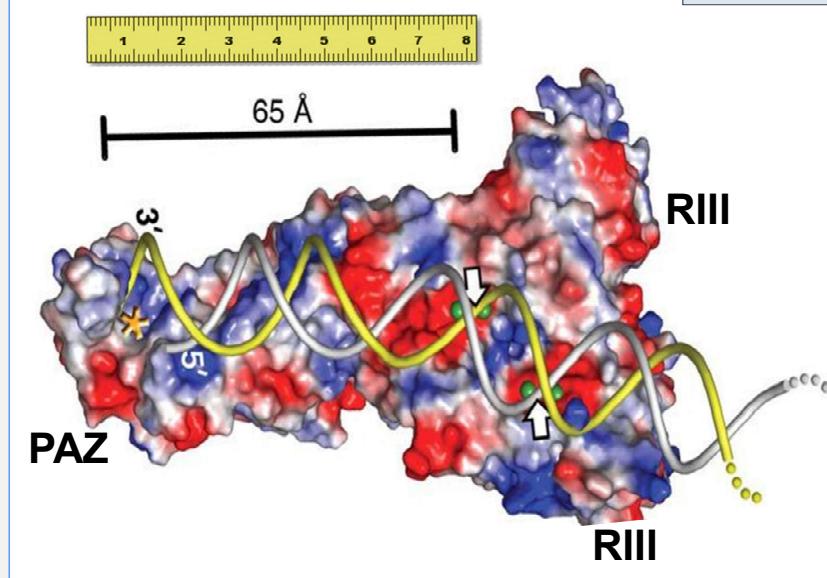
Białka *Dicer* i *Argonaute* (AGO): główne elementy szlaku wyciszania RNA

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

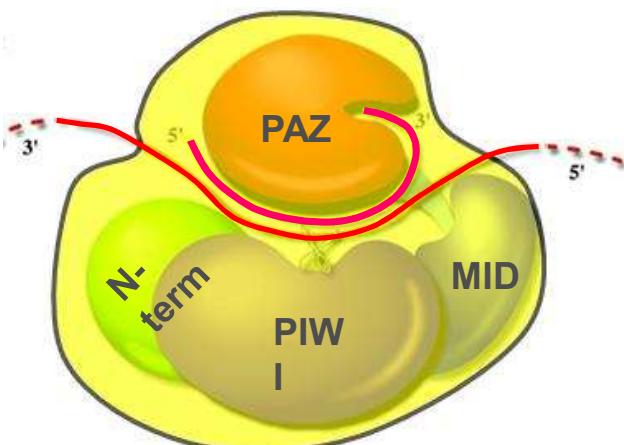
2 domeny typu **RNazy III**
aktywność endonukleolityczna
5'P / 3'OH

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 żeglarka (*Argonauta*).

PAZ

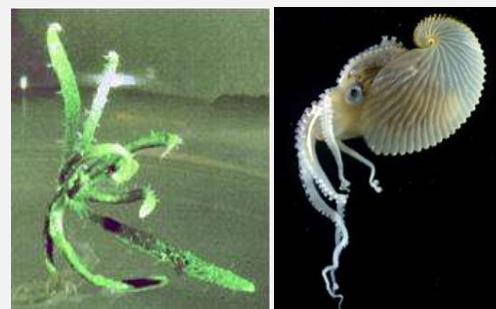
oddziałuje z końcem 3' sRNA

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

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

PTGS: post-transkrypcyjne wyciszanie genów

Klasy małych RNA:

miRNA (microRNA)	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
<i>mirtrony</i> – pochodzące z intronów prekursorów mRNA genów kodujących białka; występują u zwierząt; niezależne od Drosha					
siRNA (small interfering RNA) – większość działa <i>in cis</i> , za wyjątkiem <i>tasiRNA</i>					
exo-siRNA (pochodzenia egzogennego)	rośliny, grzyby, zwierzęta, <i>Protista</i>	21-24nt	Dicer	Transgeniczny, wirusowy lub inny egzogenny RNA	Post-transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, obrona przeciwvirusowa
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
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 stremem	Regulacja genów odpowiedzi na stres

TGS: transkrypcyjne wyciszanie genów

Klasy małych RNA:

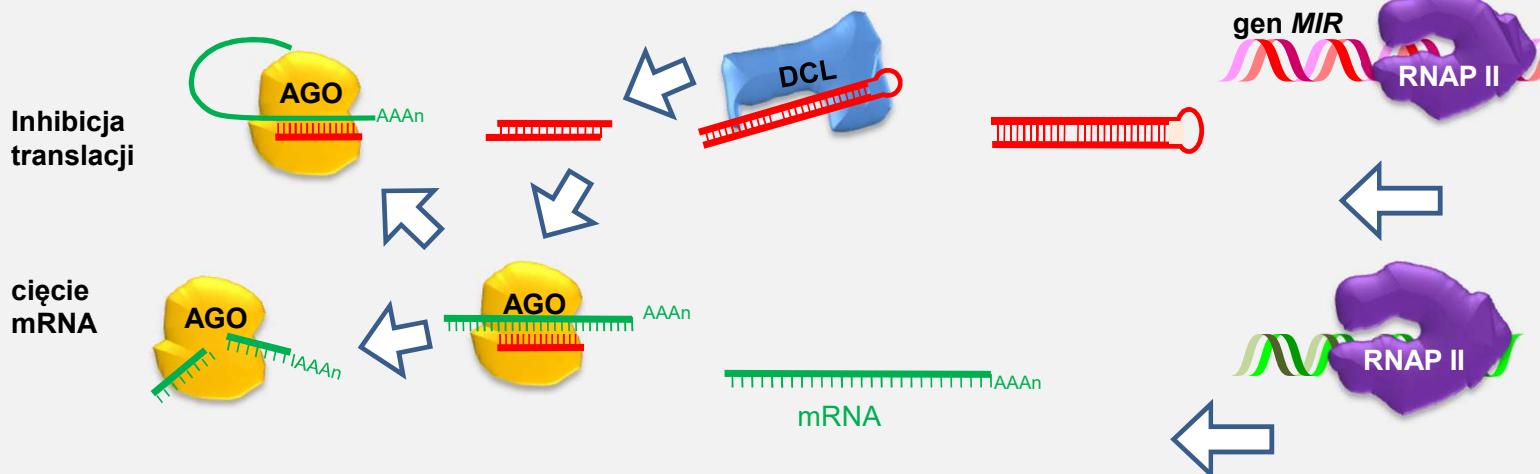
siRNA (small interfering RNA)					
endo-siRNA (pochodzenia endogennego)	rośliny, grzyby, zwierzęta, <i>Protista</i>	~21nt	Dicer	Transkrypcja dwukierunkowa lub zbieżna, wiązanie mRNA z transkryptami pseudogenów o przeciwniej orientacji	Post-transkrypcyjna i transkrypcyjna regulacja ekspresji genów, regulacja 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

	Species	Argonaute-PIWI-like			RdRP
		Argonaute	PIWI	Dicer-like	
<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>Metazoa</i>	<i>Neurospora crassa</i>	1	-	1	3
	<i>Aspergillus nidulans</i>	1	-	1	2
	<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

microRNA działają poprzez cięcie mRNA
lub inhibicję translacji



- 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

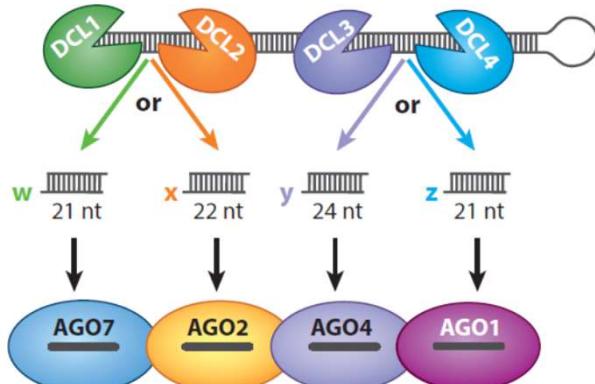


AtDCL2 - 4 siRNA



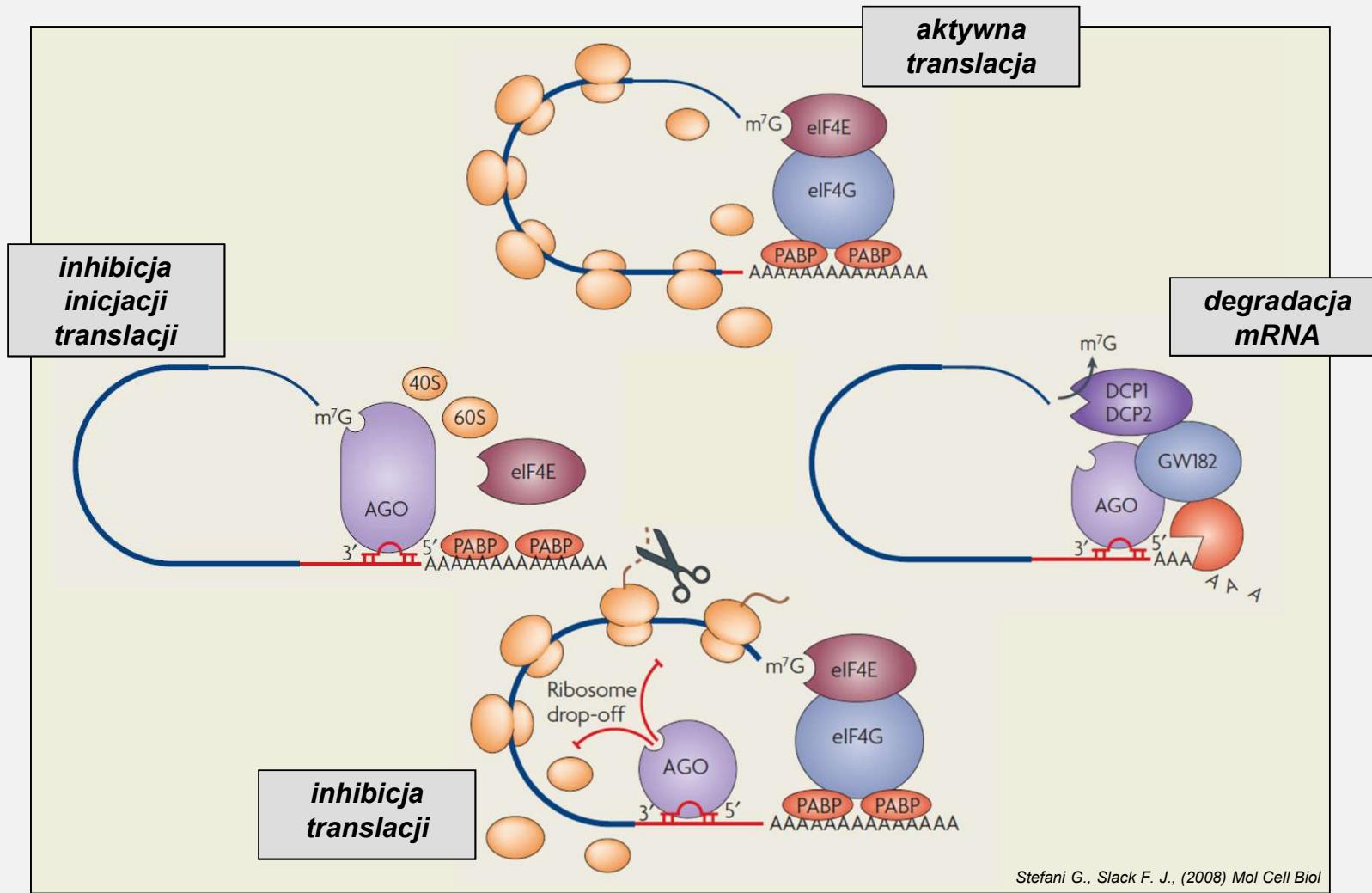
Arabidopsis thaliana:

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

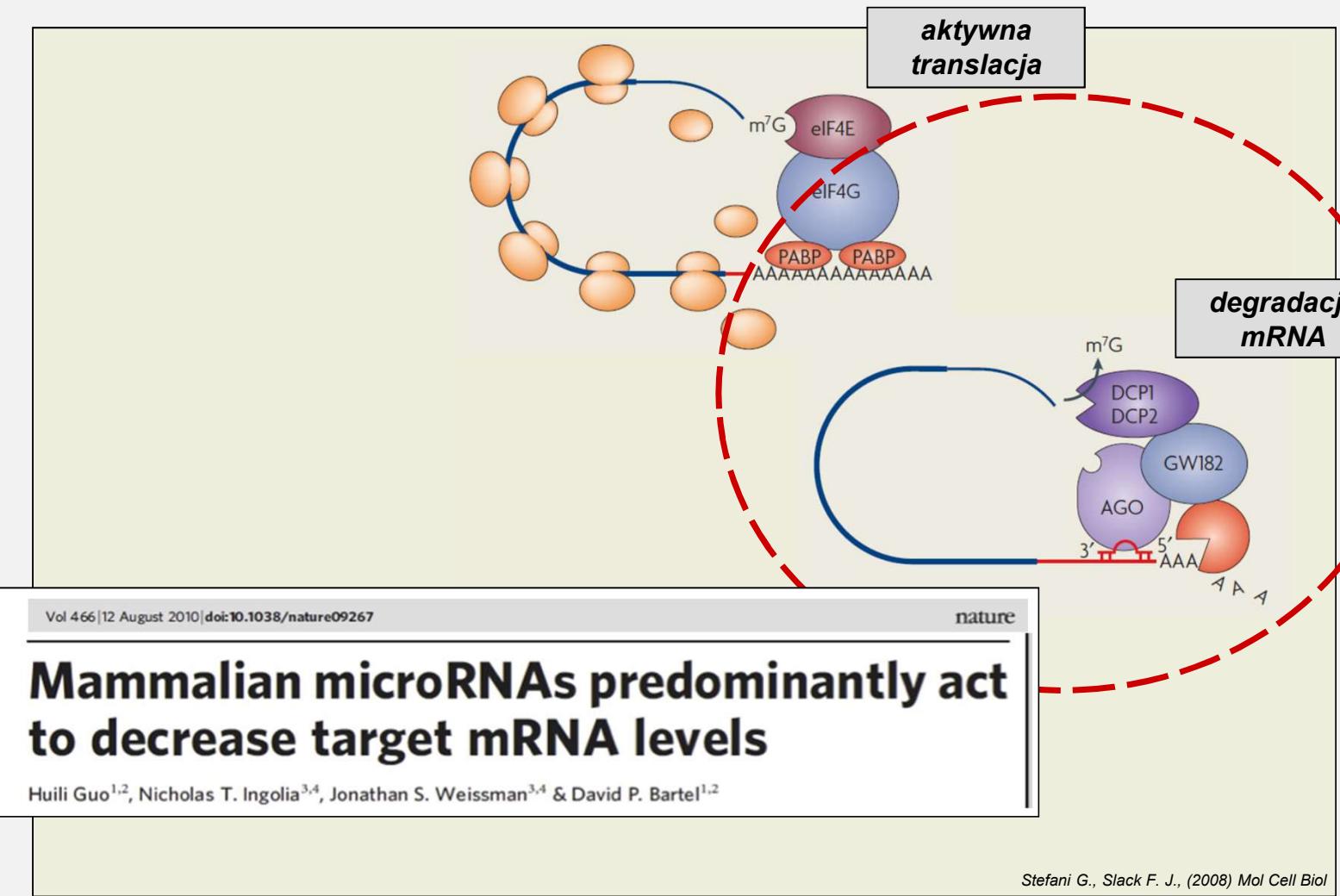


Rośliny mają 4 (i więcej) białek DCL;
większa niż u innych organizmów liczba białek DCL umożliwia roślinom bardziej precyzyjną i skuteczną obronę przed patogenami.

microRNA u zwierząt



microRNA u zwierząt

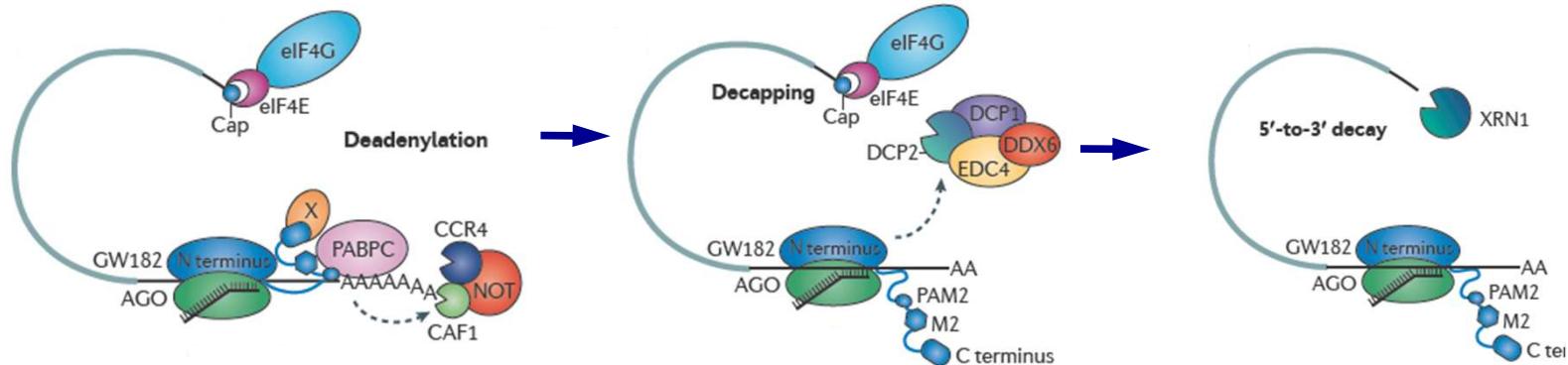


Stefani G., Slack F. J., (2008) Mol Cell Biol

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}

Destabilizacja docelowego mRNA jest główną przyczyną zmniejszenia ilości produkowanego białka.



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

Etap 1. Pierwotny efekt działania miRNA: inhibicja translacji na etapie inicjacji, bez degradacji RNA.

Etap 2. Konsekwencją inhibicji translacji jest udostępnienie ogonów poli(A) mRNA do oddziaływanego z kompleksami deadenylującymi PAN2–PAN3 i CCR4–NOT, które są rekrutowane przez miRISC.

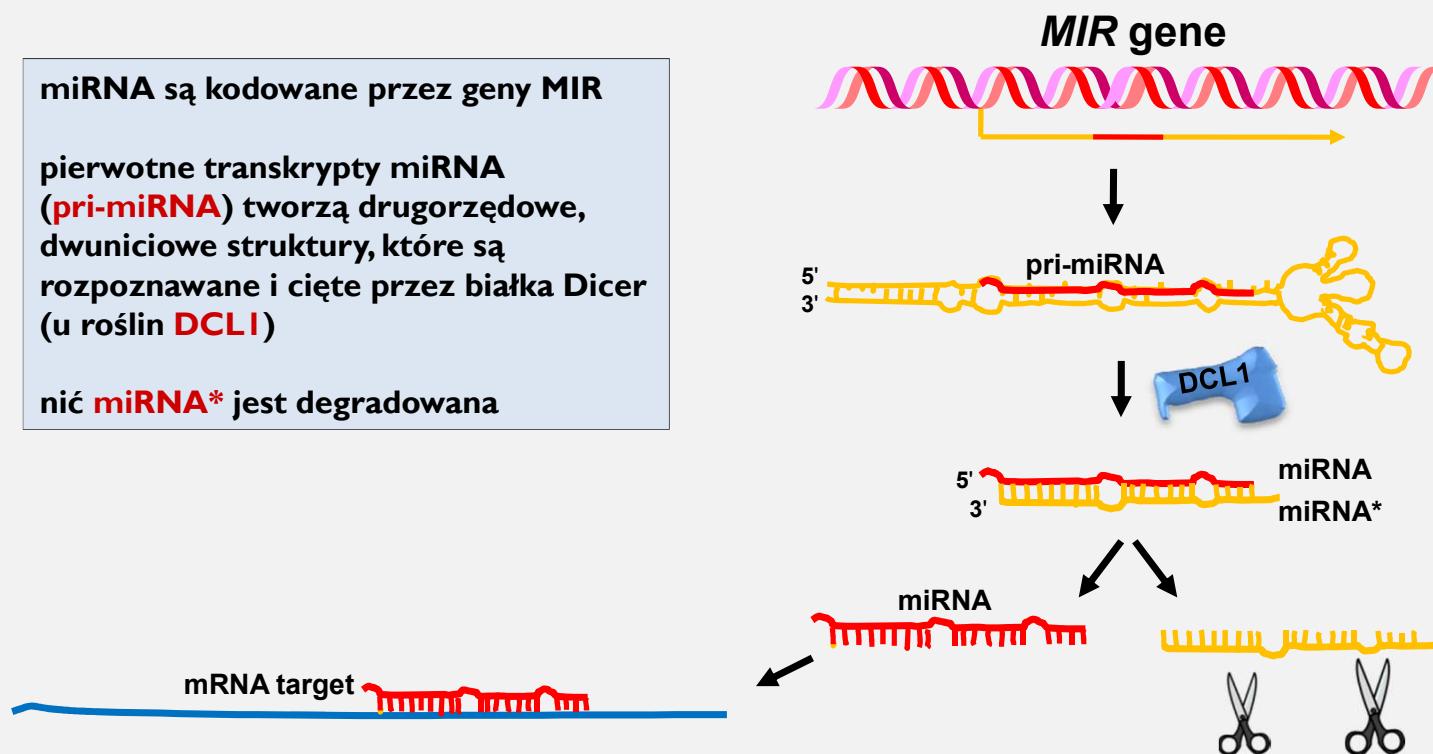
Etap 3. Deadenylenie prowadzi do rekrutacji maszynery usuwającej strukturę 5' kapu z cząsteczką mRNA (decapping) i w efekcie do degradacji docelowego mRNA.

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

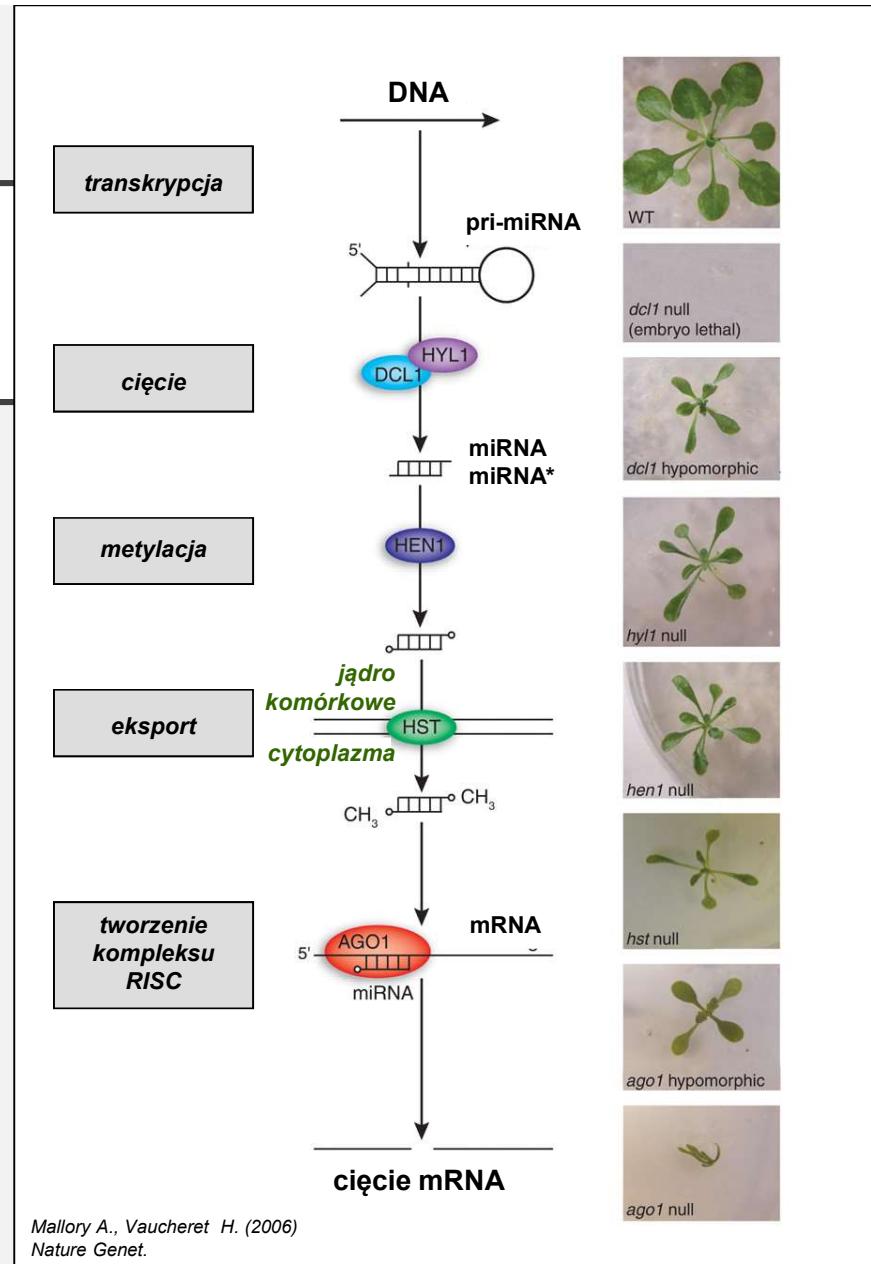


BIOGENEZA miRNA U ROŚLIN

HYL1:
oddziaływanie z DCL1

HEN1:
metyltransferaza, metylacja miRNA/miRNA*

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



BIOGENEZA miRNA U ZWIERZĄT

Drosha+DGCR8 (Pasha):

Microprocessor complex

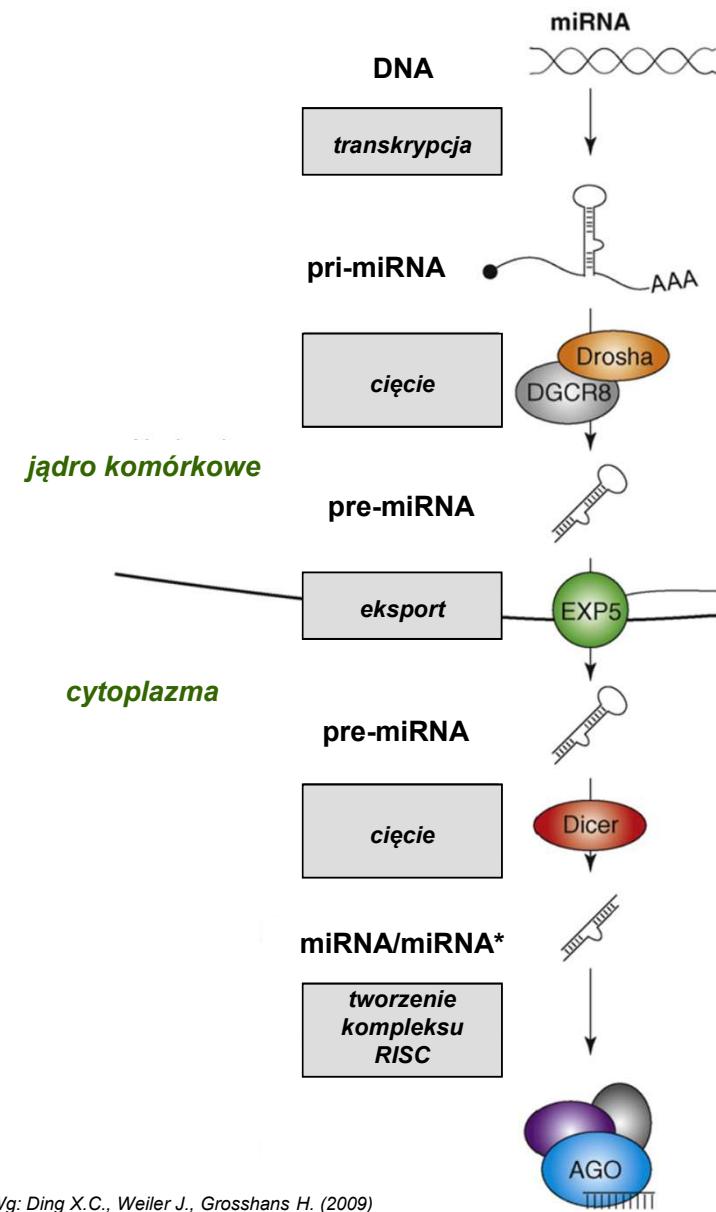
cięcie pri-miRNA → pre-miRNA

EXP5 (eksportyna 5):

eksport pre-miRNA do cytoplazmy

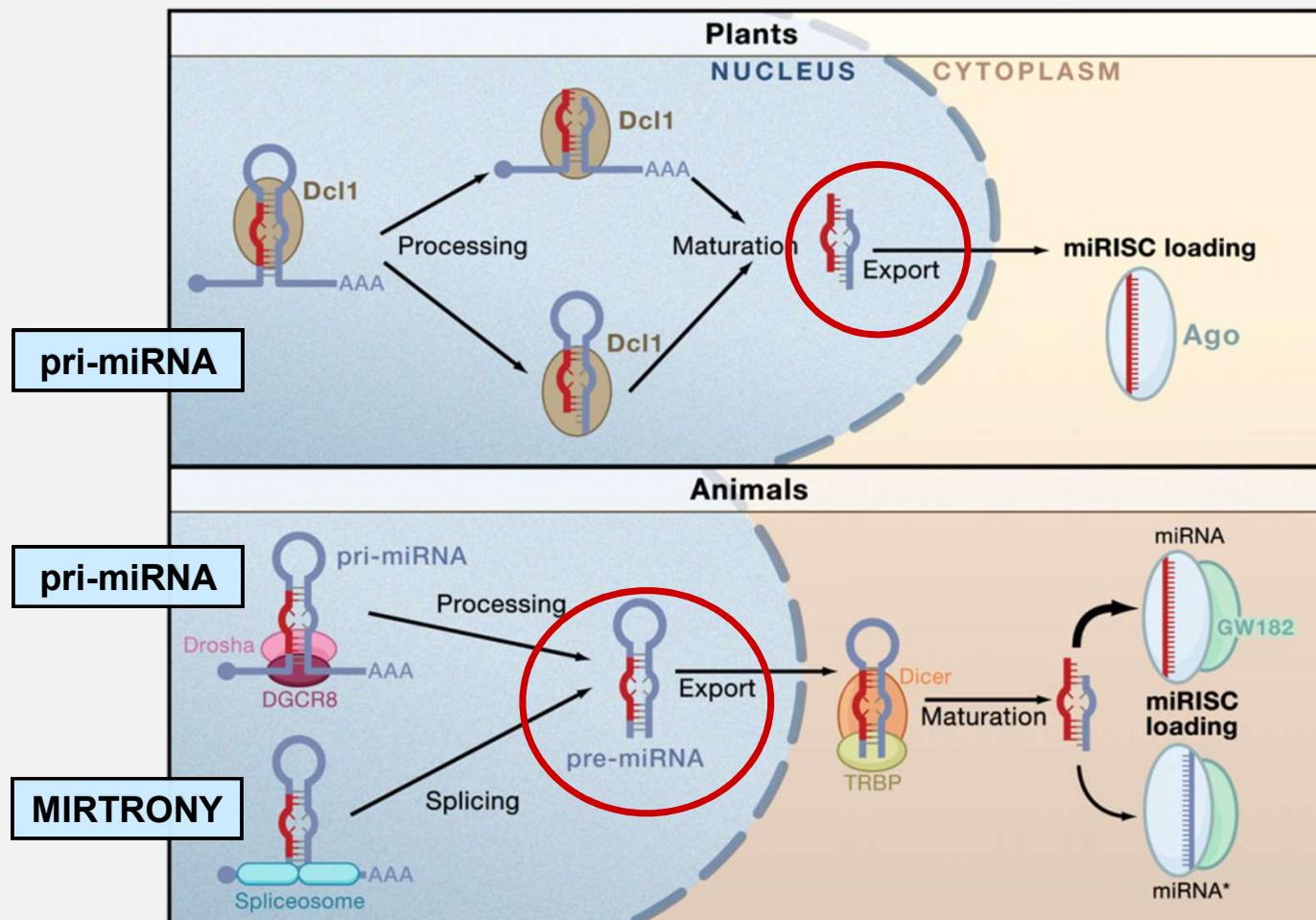
Dicer:

cięcie pre-miRNA → miRNA/miRNA*



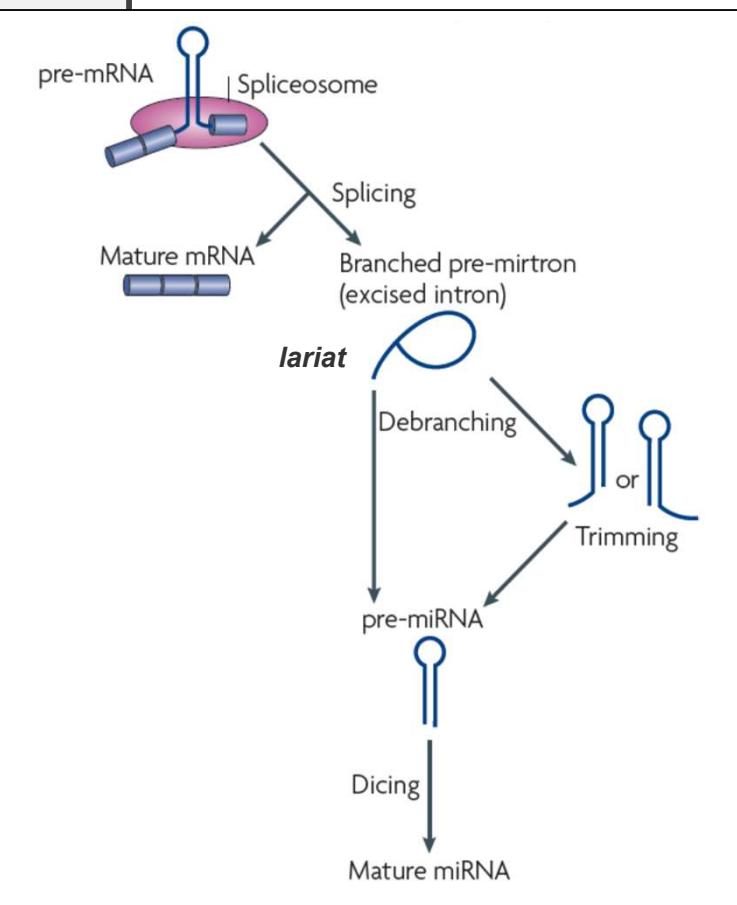
Wg: Ding X.C., Weiler J., Grosshans H. (2009)
Trends in Biotechnology

Biogeneza miRNA u roślin i zwierząt *eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy*



Carthew R. W., Sontheimer E. J., (2009) Cell

MIRTRONY



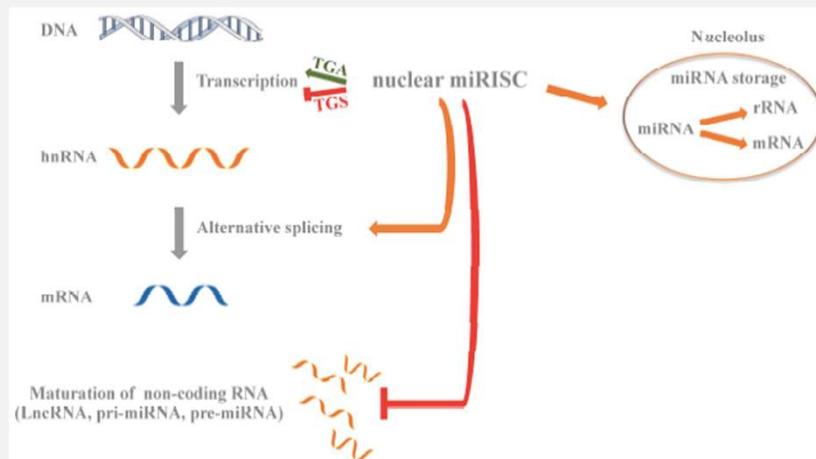
występują u *D. melanogaster*, *C. elegans*, ssaków

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

rozcięcie struktury lariatu (debranching) prowadzi do
powstania pre-miRNA

pre-miRNA → biogeneza miRNA

JĄDROWE FUNKCJE miRNA

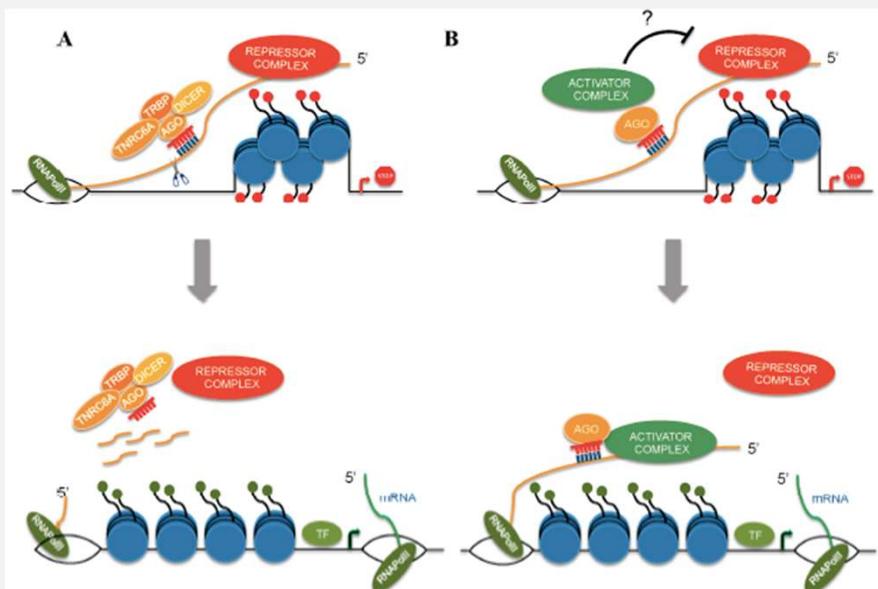


miRNA:

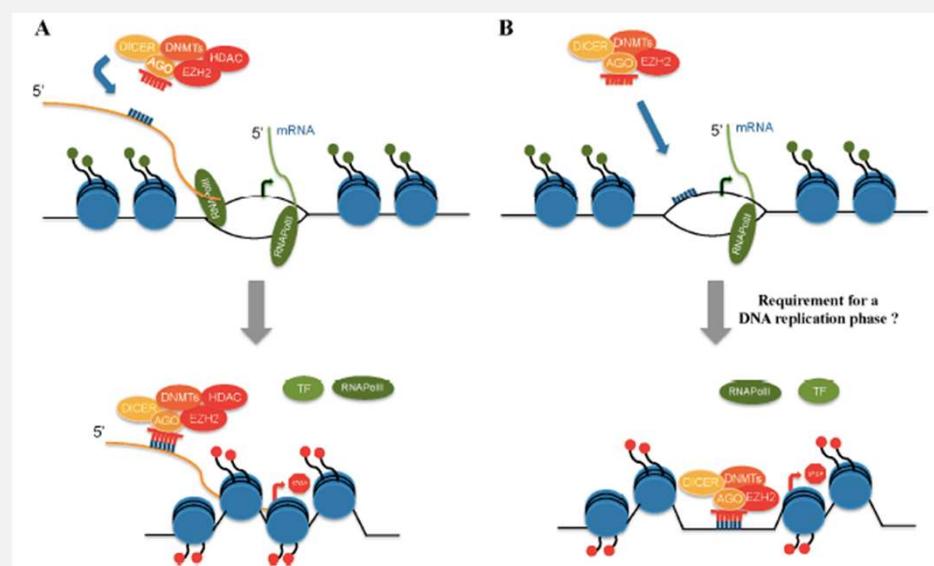
- obecne w jądrze komórkowym i jąderku
- tworzą mniejszy jądrowy kompleks miRISC complex z białkami AGO2/AGO3, DICER, TRBP i TNRC6A (TGA)

JĄDROWE FUNKCJE miRNA

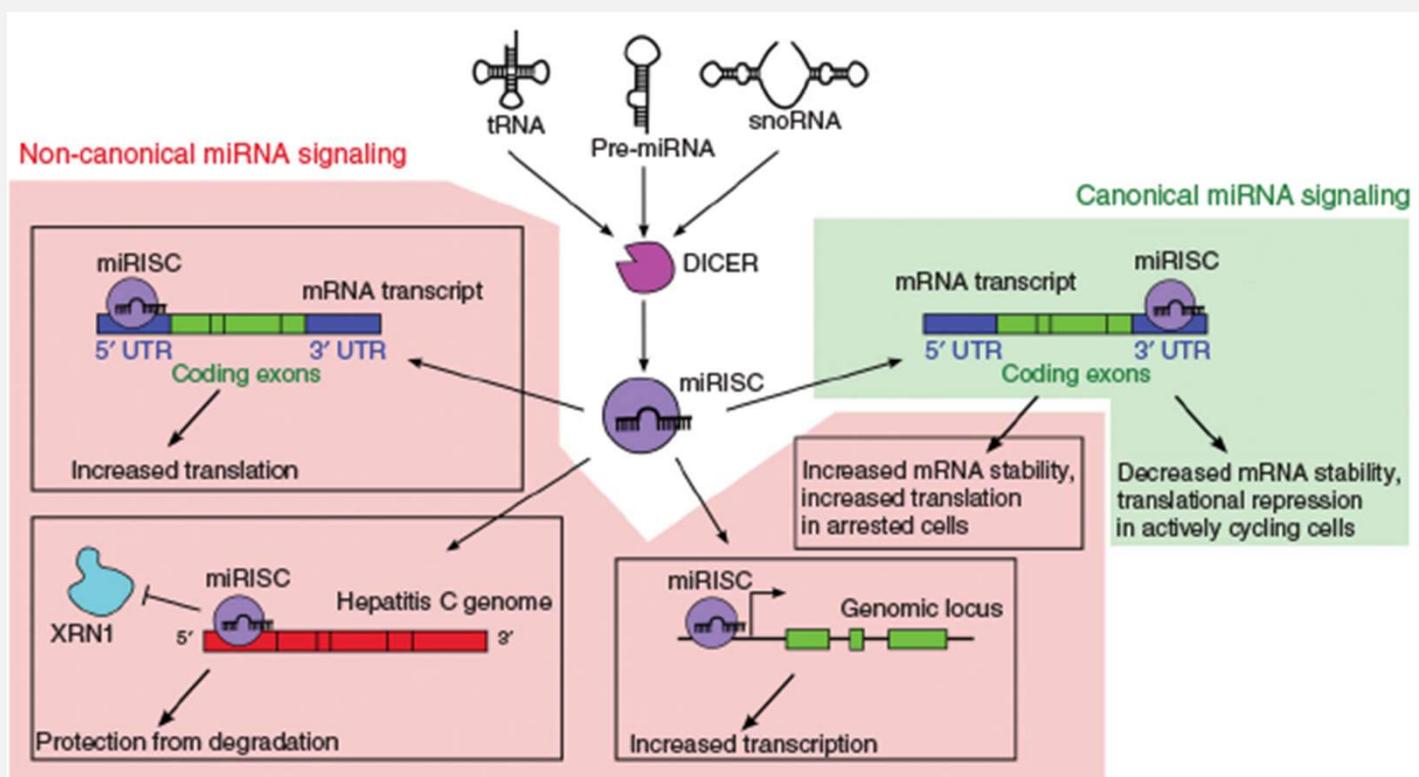
Transkrypcyjna aktywacja genów (TGA)



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*)

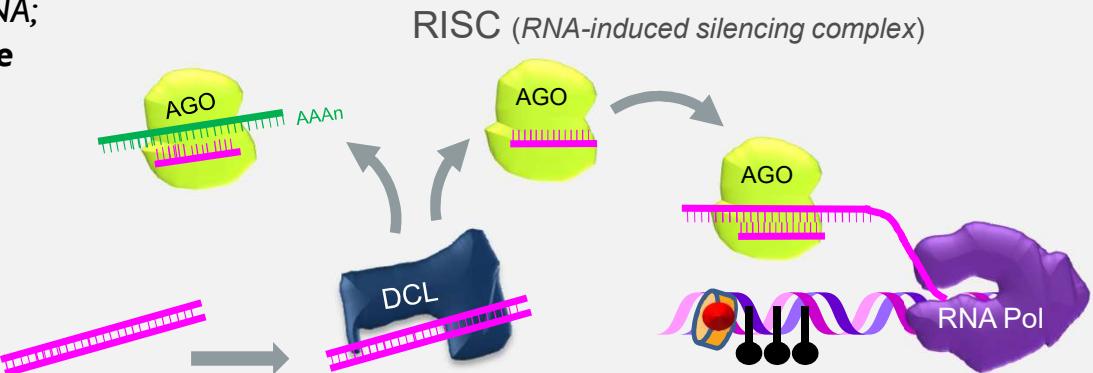
Transgeny wprowadzane sztucznie są często wyciszane przez siRNA; mogą być wyciszane **post-transkrypcyjnie** lub **transkrypcyjnie**

Wyciszenie może być wywołane:

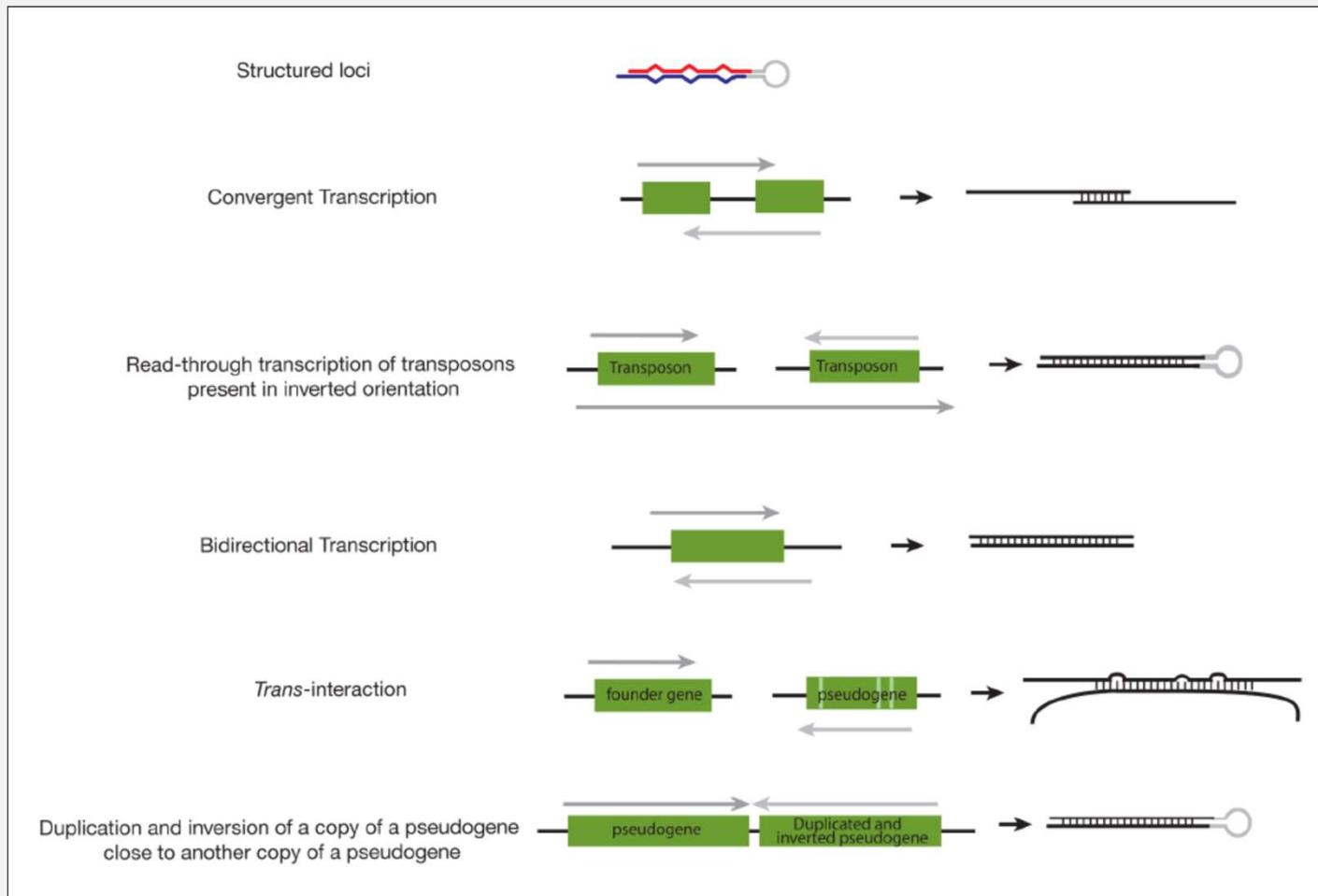
- bardzo wysokim poziomem ekspresji transgenu
- dwuniciowym RNA pochodzącym z ekspresji transgenu
- nieprawidłowymi RNA pochodzącymi z ekspresji transgenu

endo-siRNA:

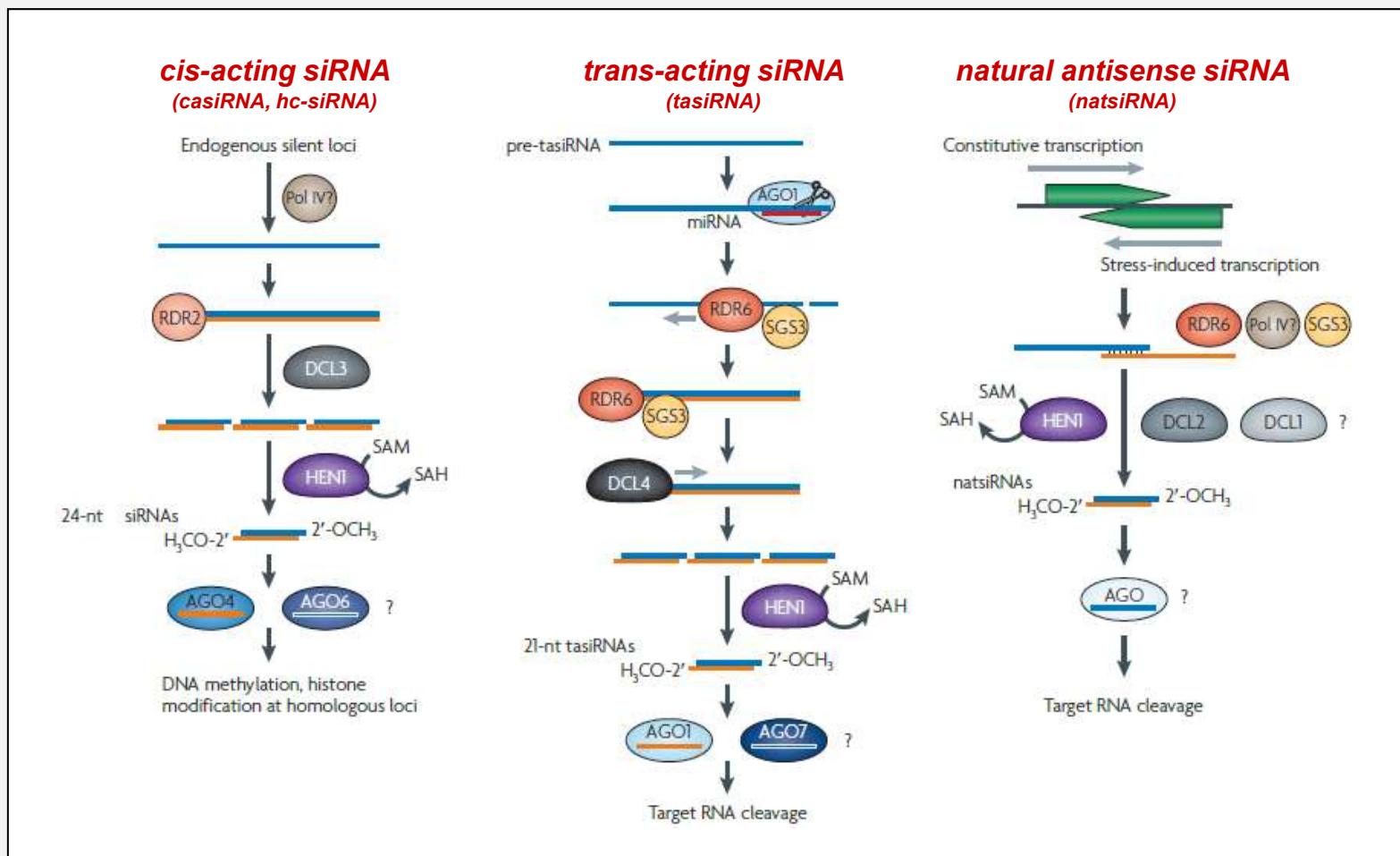
- wyciszczenie transpozonów i sekwencji powtarzonych
- utrzymywanie niektórych genów w stanie epigenetycznie nieaktywnym



Endo-siRNA: pochodzenie endogenne



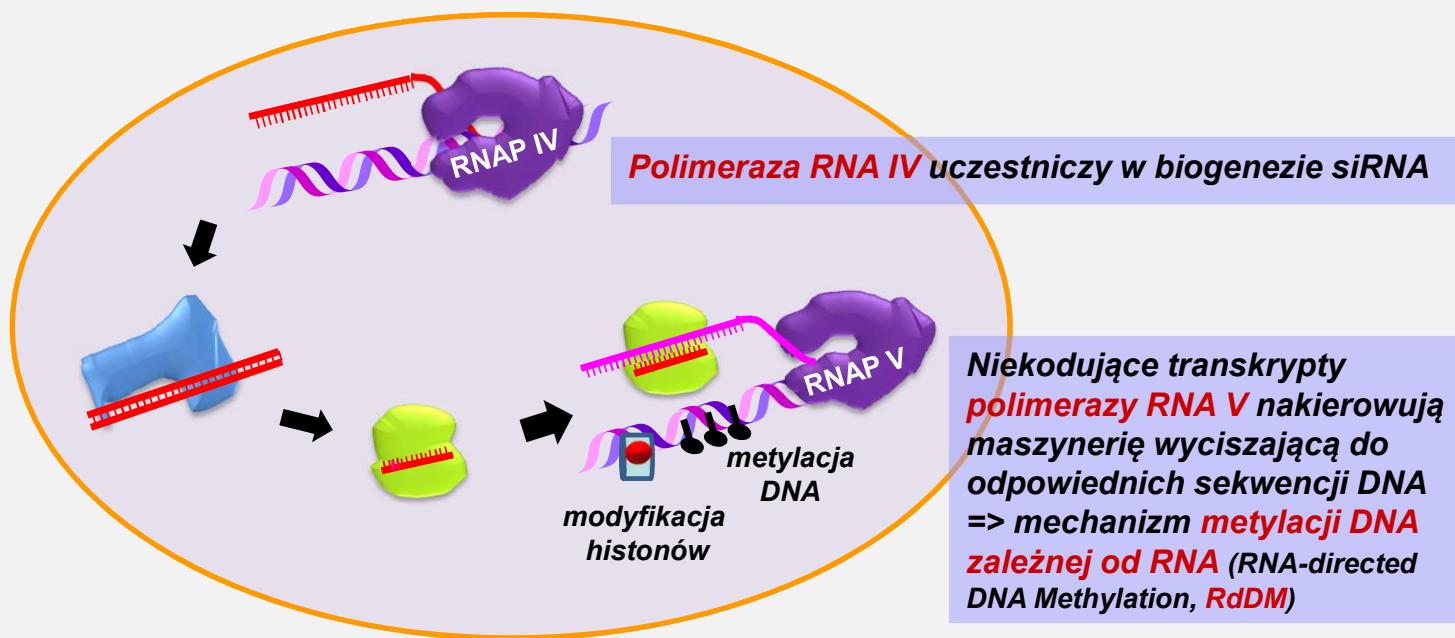
Endo-siRNA u roślin:



Ghildyal & Zamore (2009) Nat Rev Genet

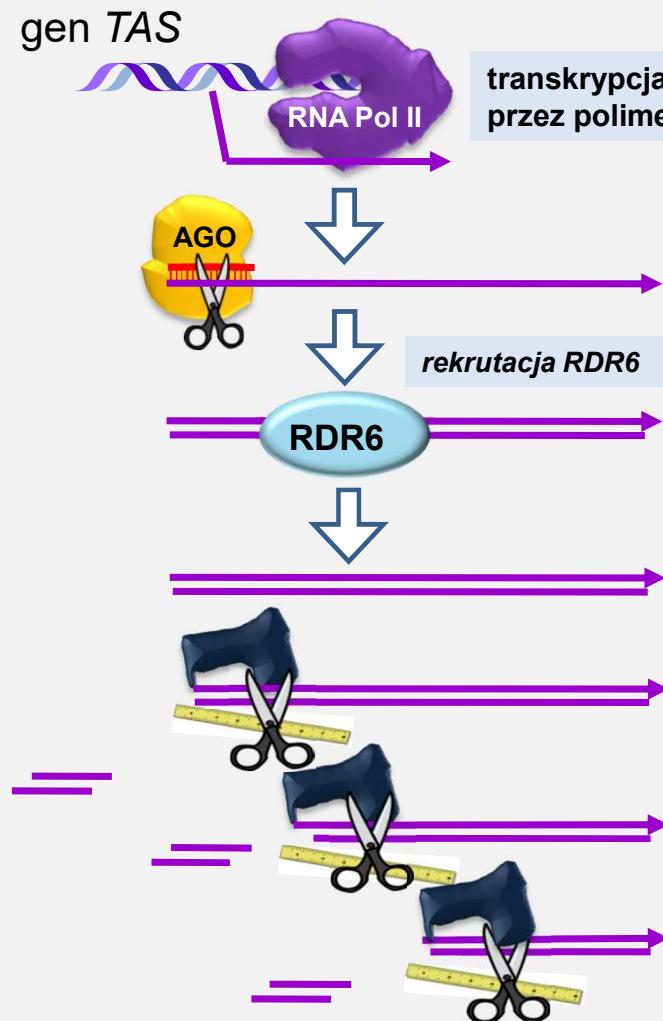
hc-siRNA: roślinne endogenne siRNA

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.

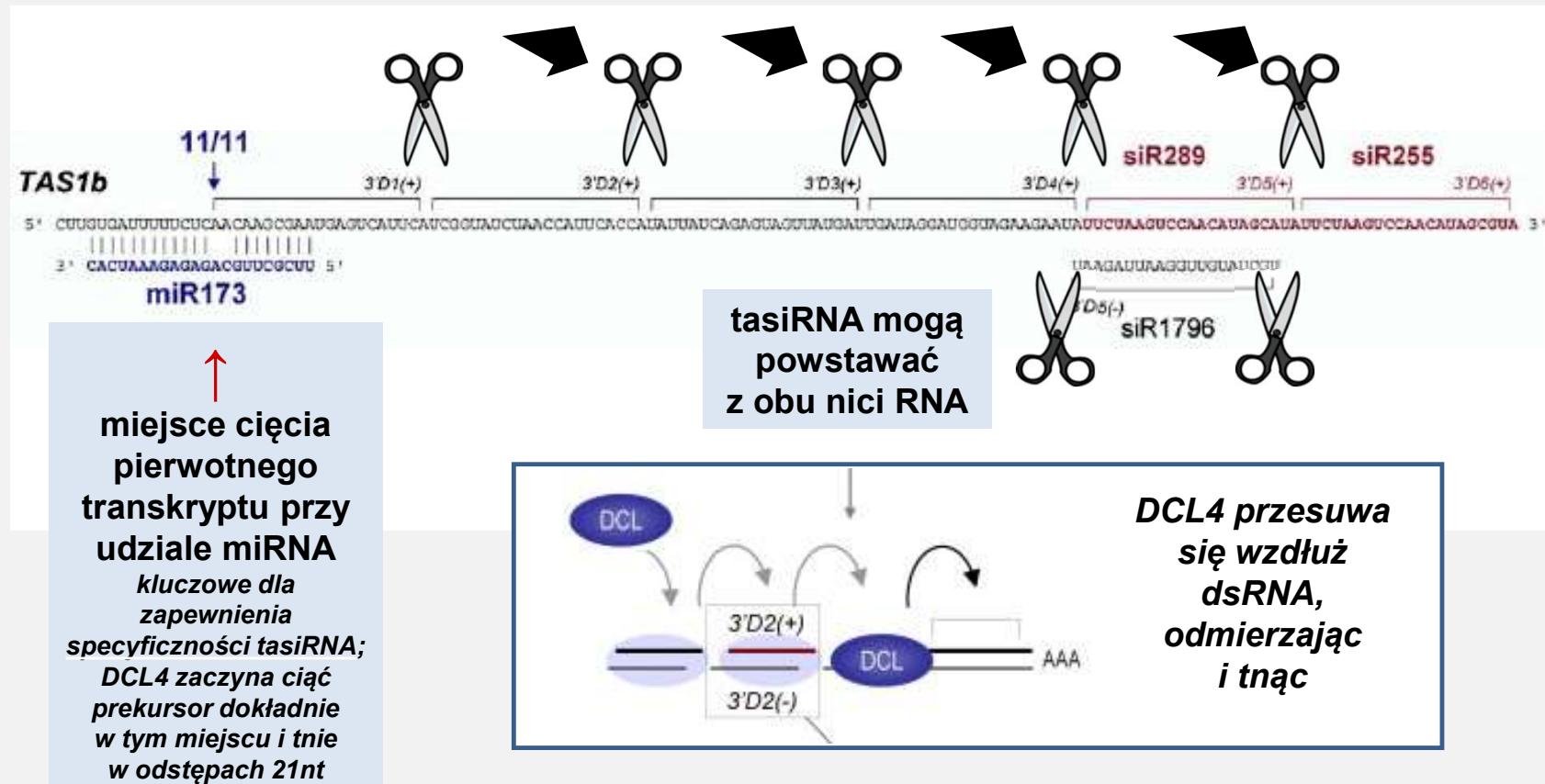
tasiRNA: roślinne endogenne siRNA



tasiRNA – *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



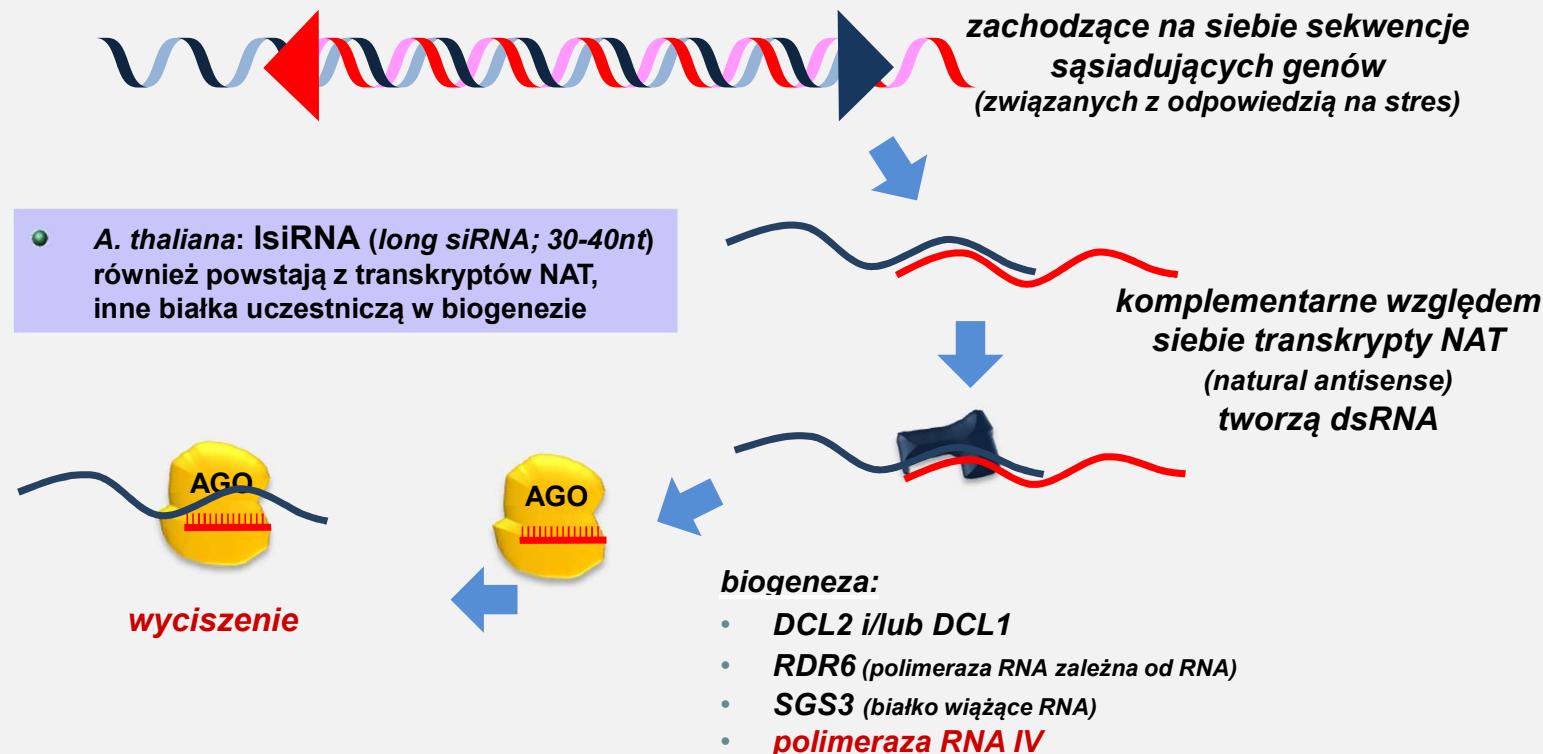
Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C. (2005) Cell

natsiRNA: roślinne endogenne siRNA

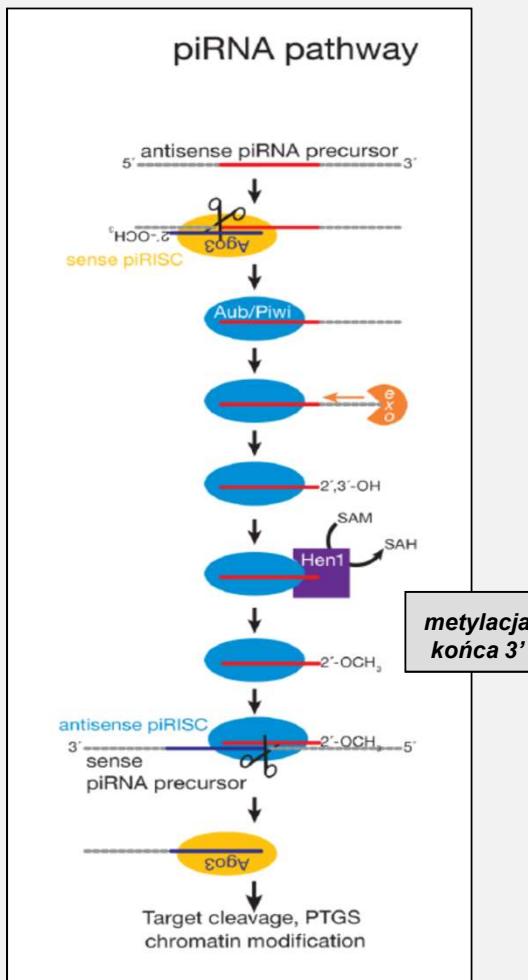
natsiRNA – *natural antisense-transcript derived siRNA*

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 – wiążące 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

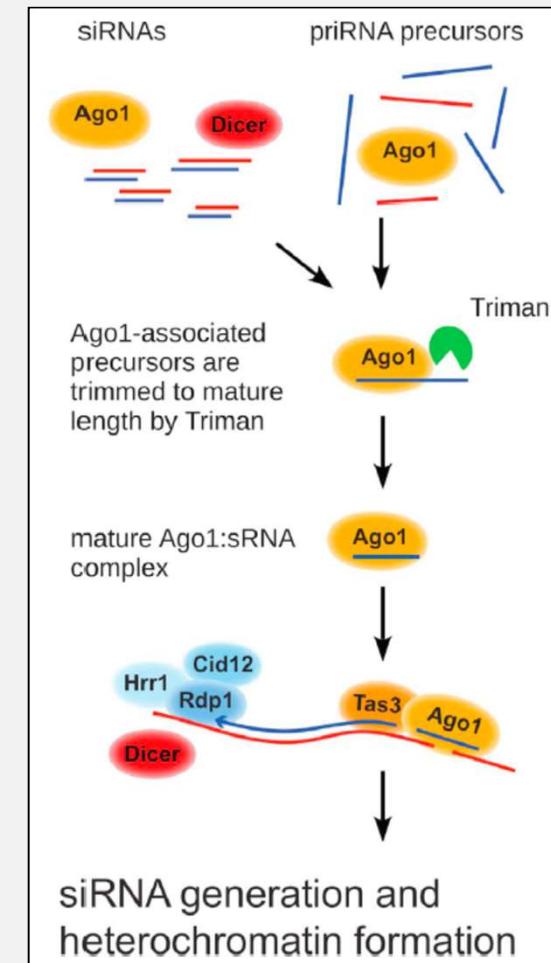
priRNA – primal small RNAs

- 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

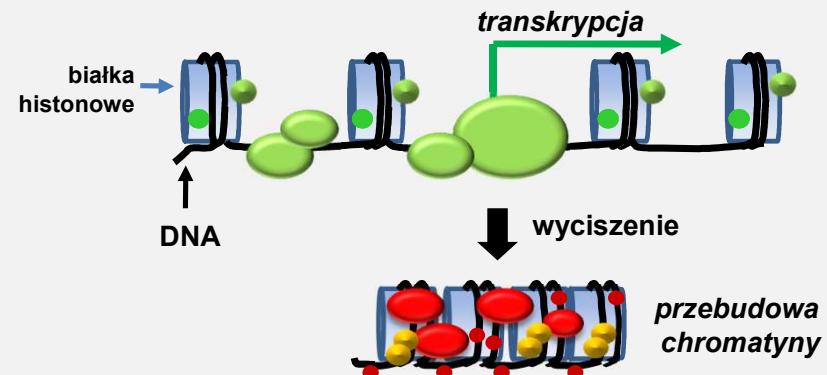
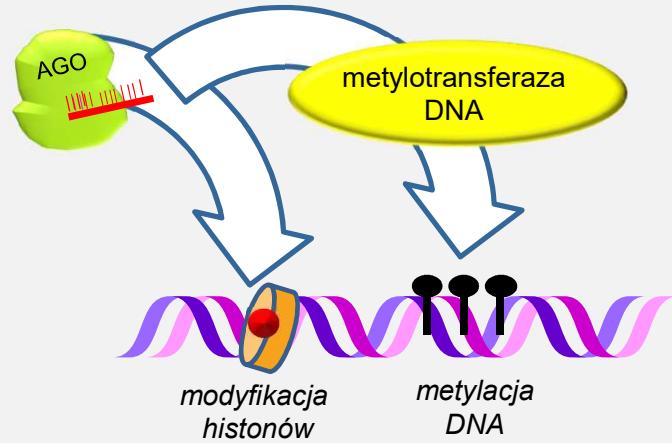
Argonaute and Triman Generate Dicer-Independent priRNAs and Mature siRNAs to Initiate Heterochromatin Formation

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



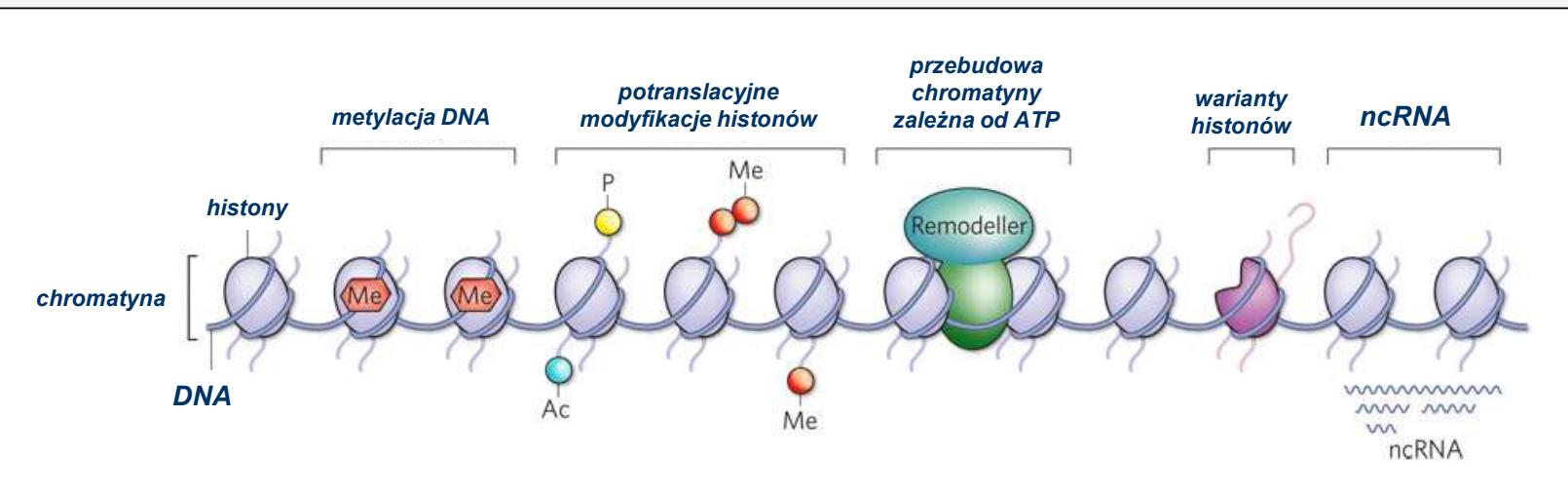
TRANSKRYPCYJNE WYCISZANIE EKSPRESJI GENÓW (TGS)

- 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 PolV

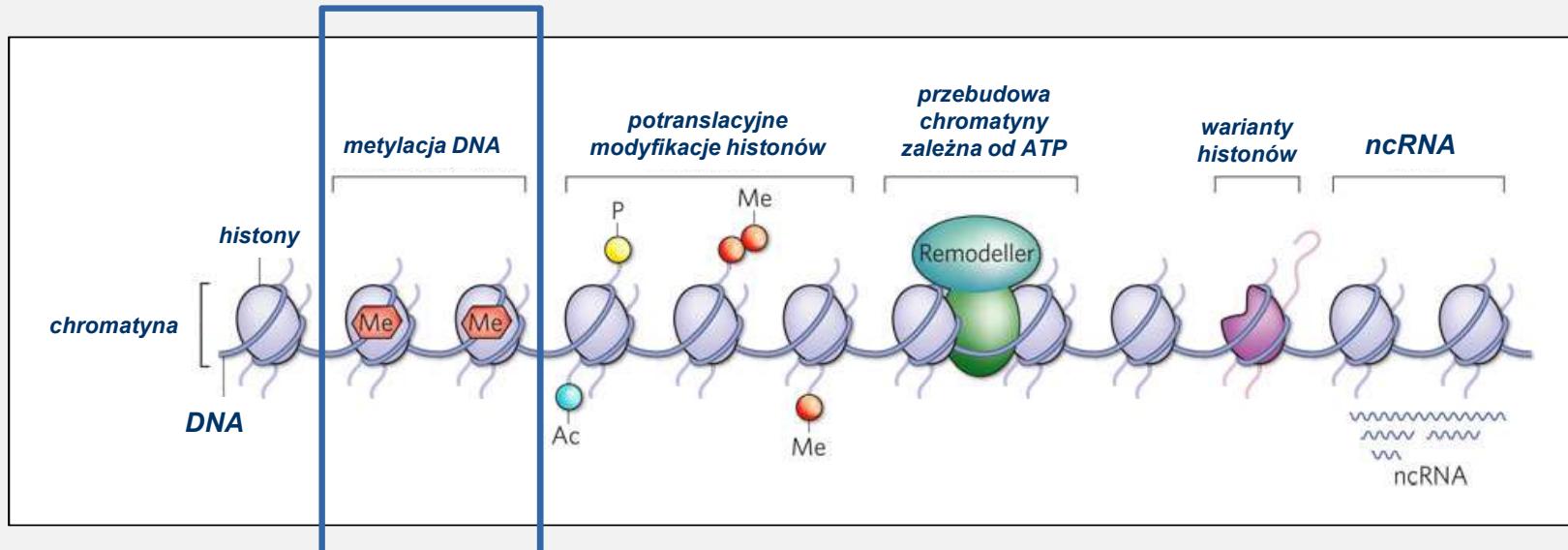


EPIGENETYCZNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

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

metyltransferaza DNA 1



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



5'-CHG-3' (H= A, C lub T) specyficzna dla roślin, może być rekruitowana przez methyltransferazę histonową SUVH4 (KYP), a więc odpowiadać na modyfikację białek histonowych
de novo:



metyltransferaza DNA 3A



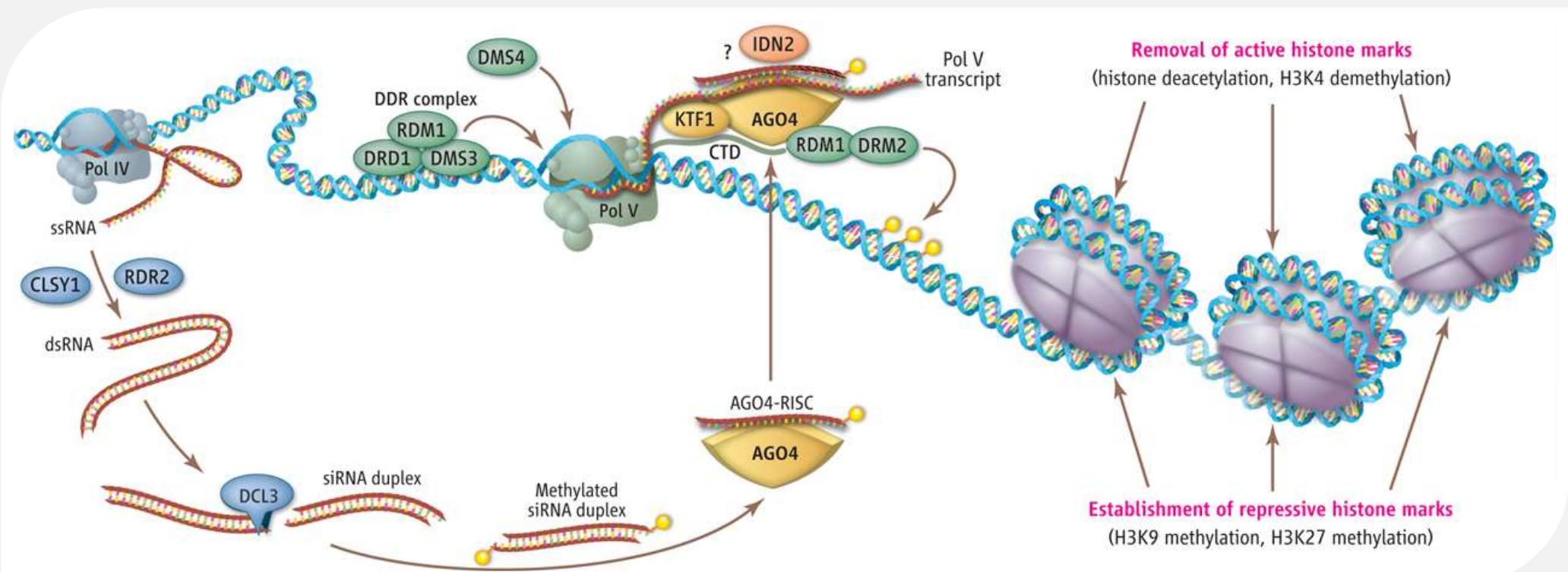
metyltransferaza DNA 3B



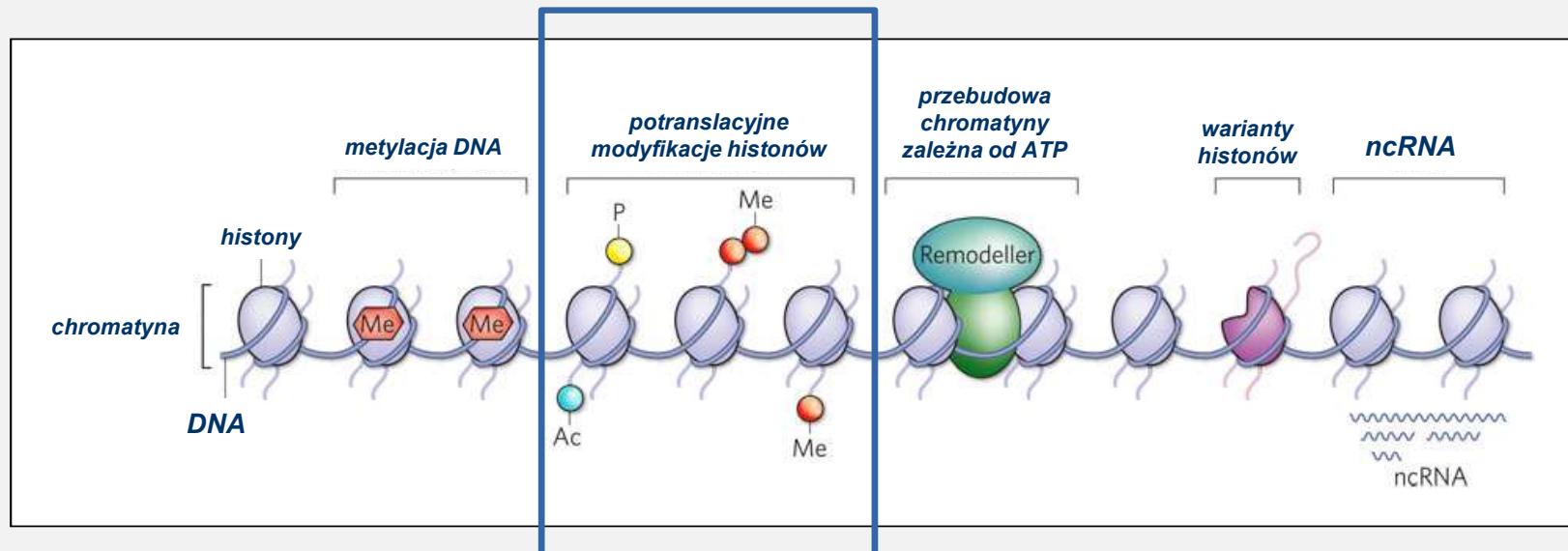
5'-CHH-3' metylacja powtórzeń DNA wyciszanych przez siRNA

MODEL MECHANIZMU METYLACJI DNA ZALEŻNEJ OD RNA

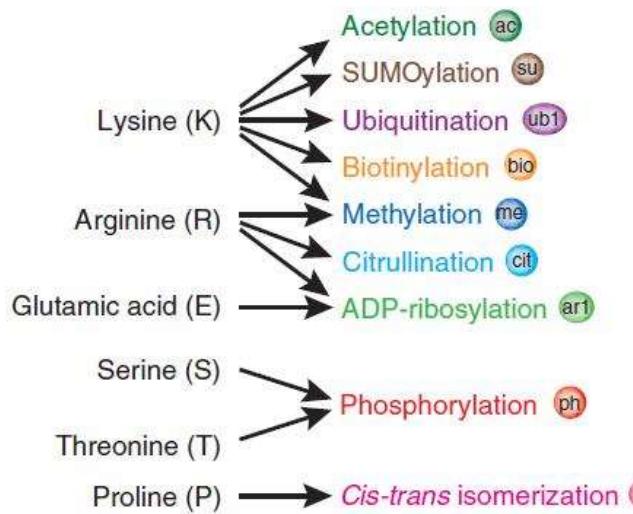
(RdDM – *RNA directed DNA methylation*)



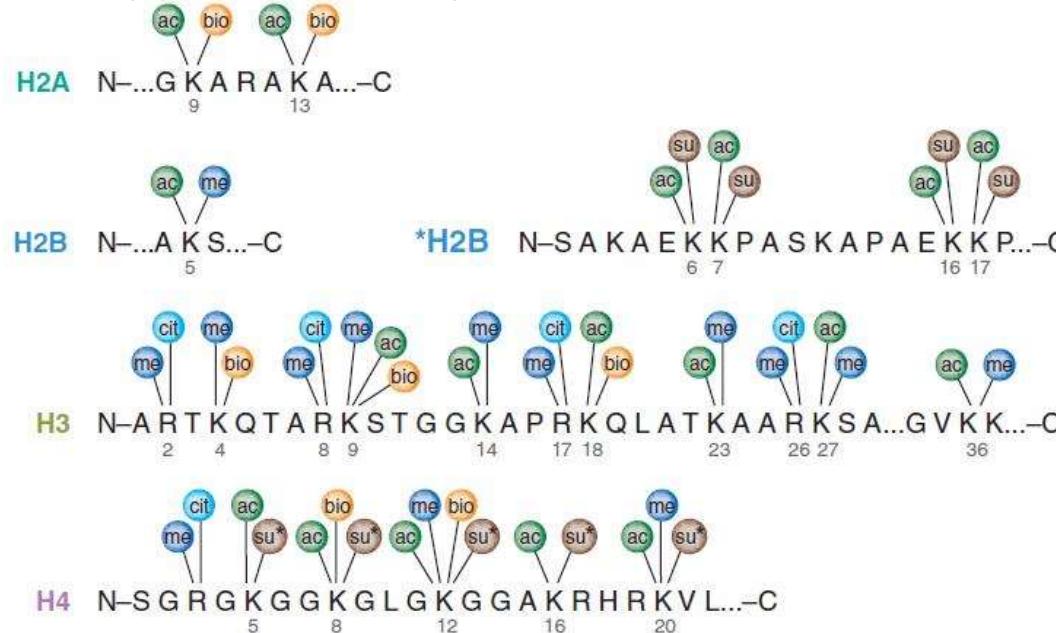
POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE HISTONÓW



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

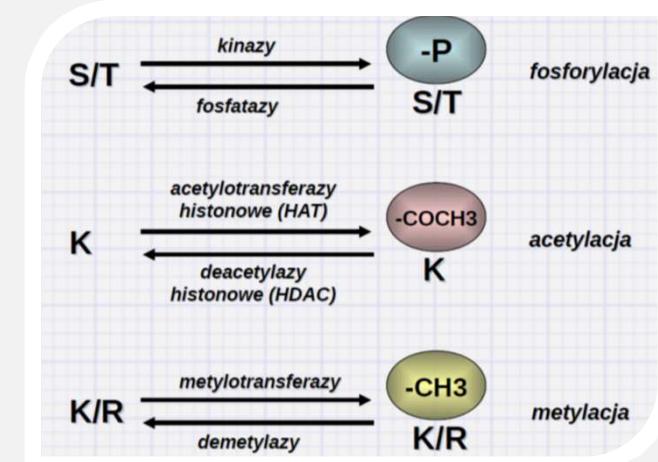


Modyfikacje białek histonowych ludzkich i drożdżowych (*)



Modyfikacje białek histonowych wpływają na zmiany struktury chromatyny

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



MECHANIZM DZIAŁANIA MODYFIKACJI POTRANSLACYJNYCH BIAŁEK HISTONOWYCH

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

Działanie pośrednie: rekrutacja białek rozpoznających określone modyfikacje histonów

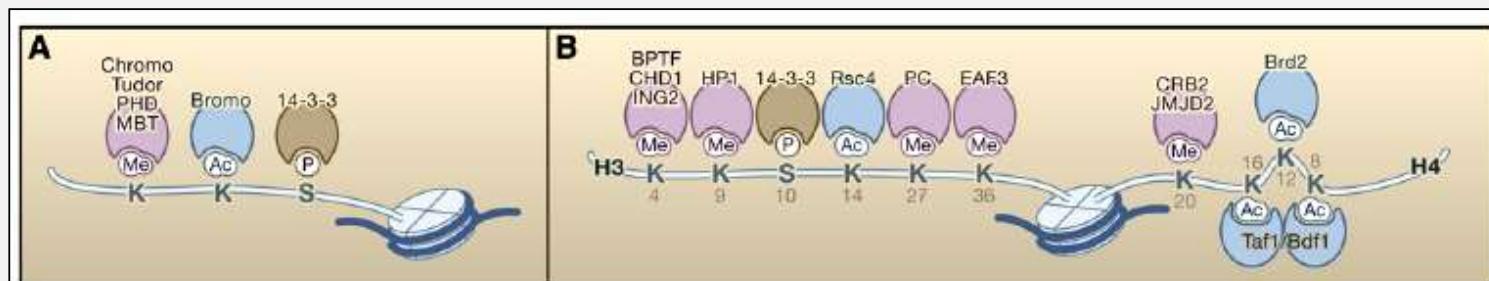
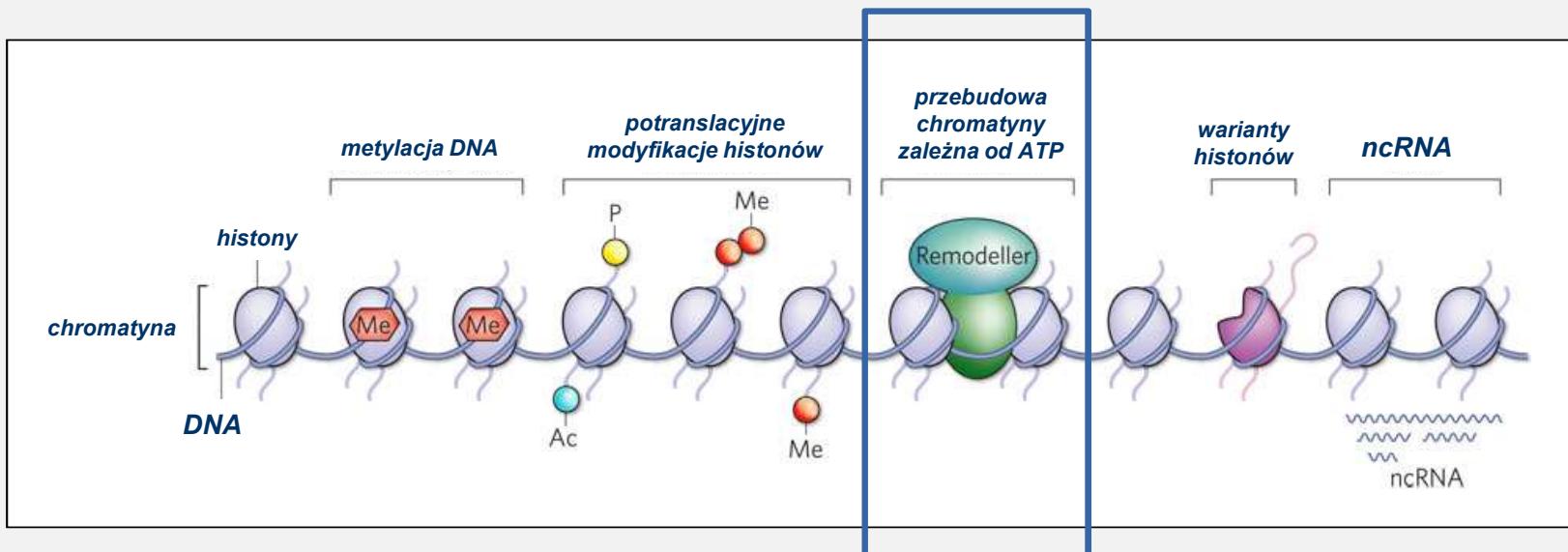


Figure 1. Recruitment of Proteins to Histones

(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 remodeling*)

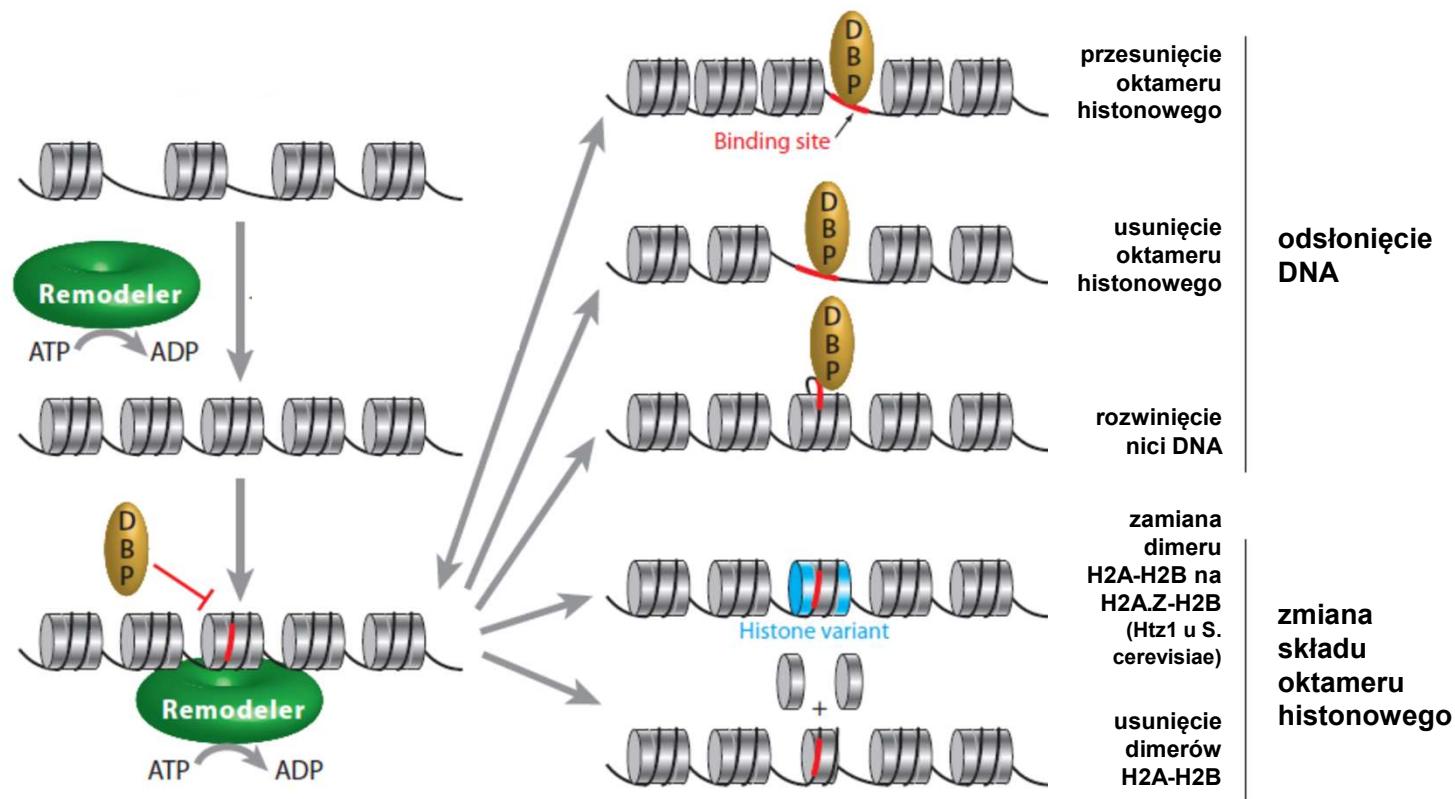


Aktywność kompleksów przebudowujących chromatynę zależy od ATP, w wyniku ich działania zmienia się sposób oddziaływanie histon-DNA.

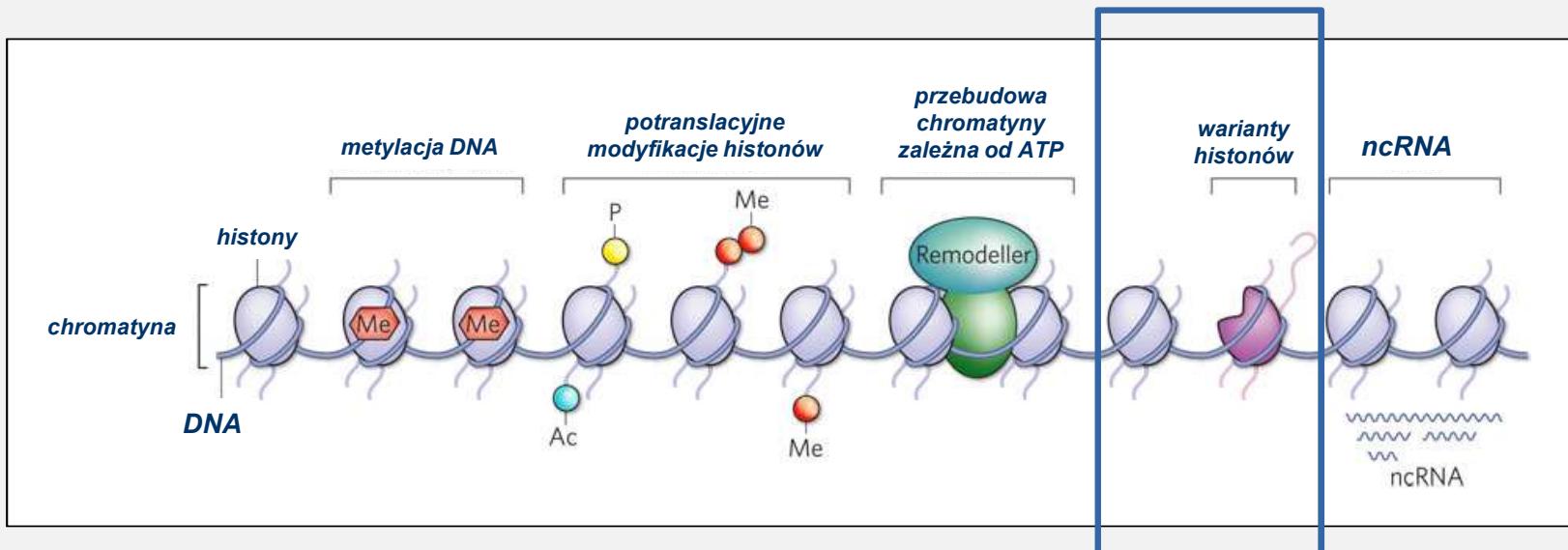
Kompleksy remodelujące zaangażowane są zarówno w aktywację, jak i represję transkrypcji.

PRZEBUDOWA CHROMATYNY

zależna od ATP (*chromatin remodeling*)



WARIANTY HISTONÓW



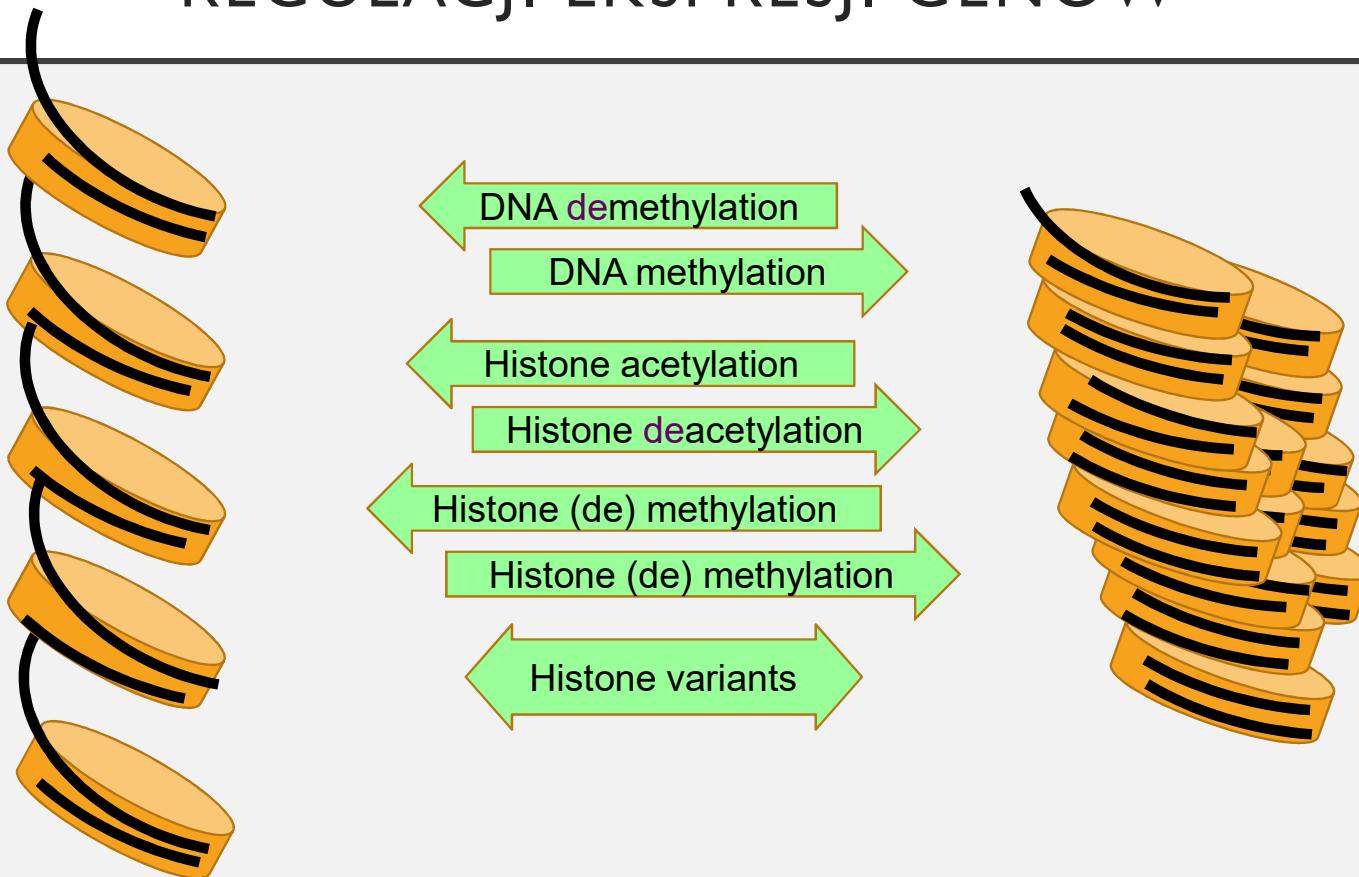
Za wymianę różnych wariantów histonów
w oktamerze histonowym odpowiadają
kompleksy przebudowujące chromatynę
z rodziny INO80/SWR

Dulac C. (2010) Nature

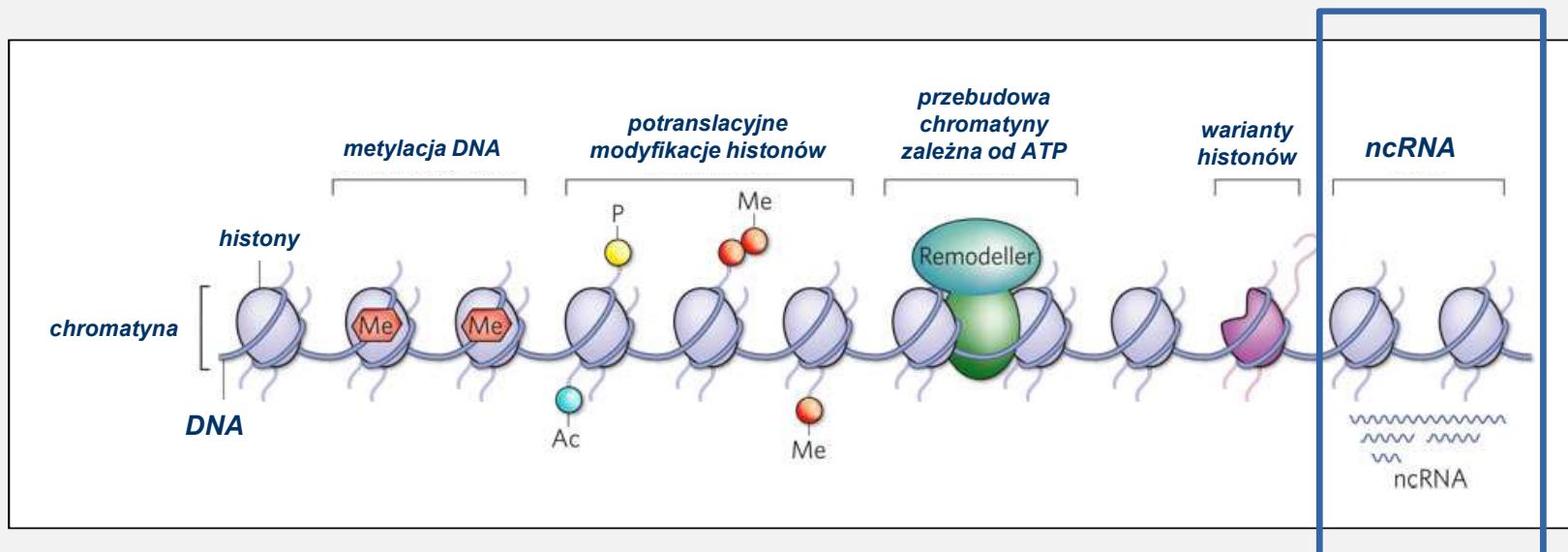
WARIANTY HISTONÓW

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	Bdelloids
H3	H3V	Transcription termination	Trypanosomes
H4	H4V	Transcription termination	Trypanosomes
H2B	H2BV	Transcription initiation	Trypanosomes

EPIGENETYCZNE MECHANIZMY REGULACJI EKSPRESJI GENÓW



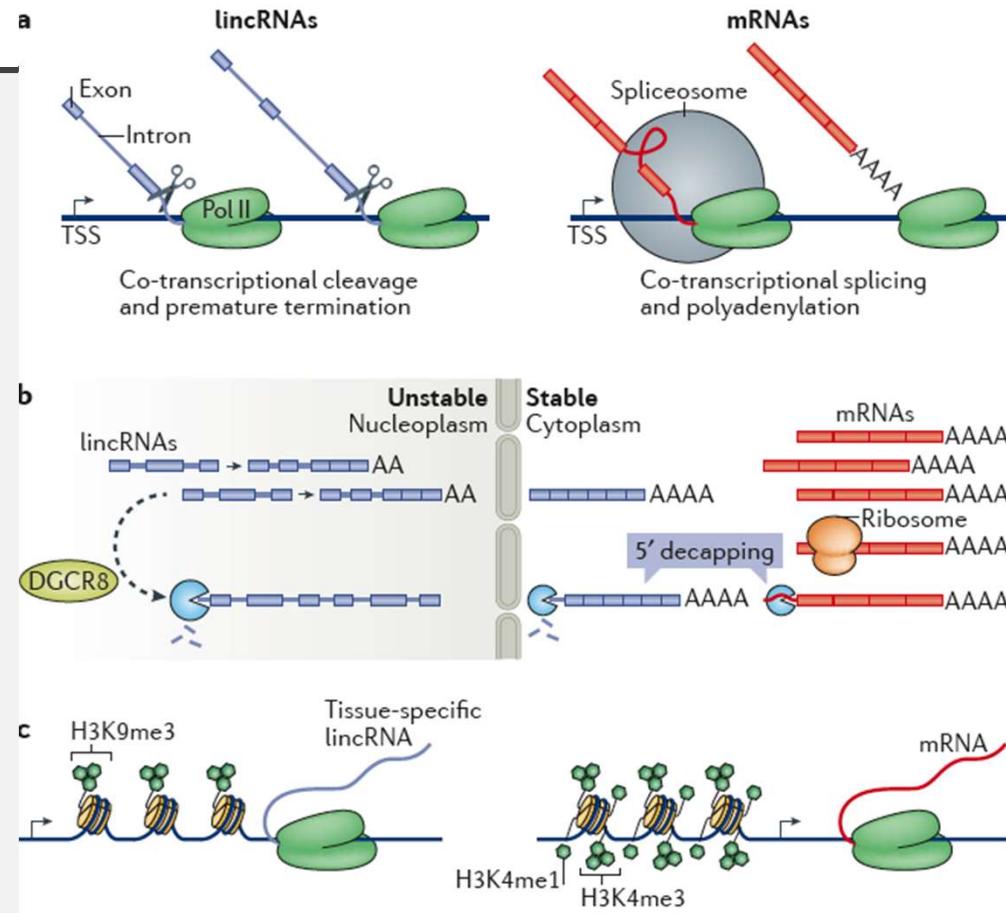
EPIGENETYCZNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PRZEZ ncRNA



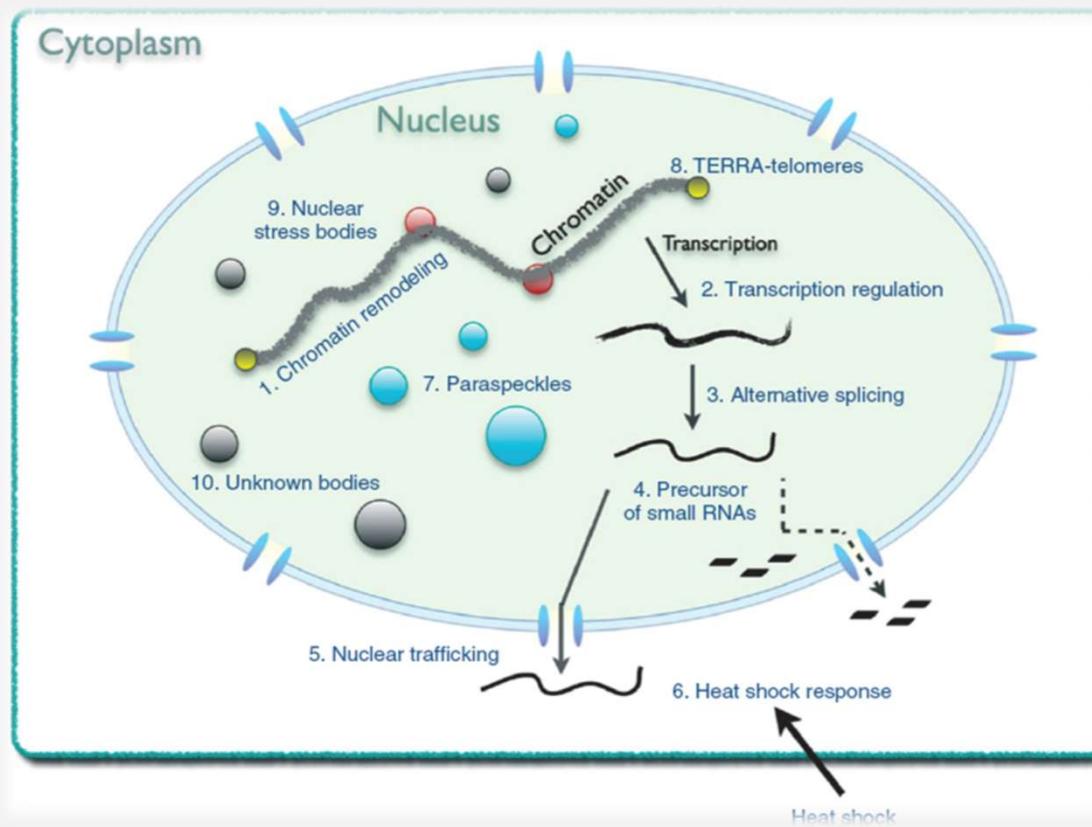
RNA jest jedynym jak dotąd poznanym czynnikiem inicjującym dziedziczenie epigenetyczne i odróżniającym sekwencje, które mają zostać wyciszone lub aktywowane

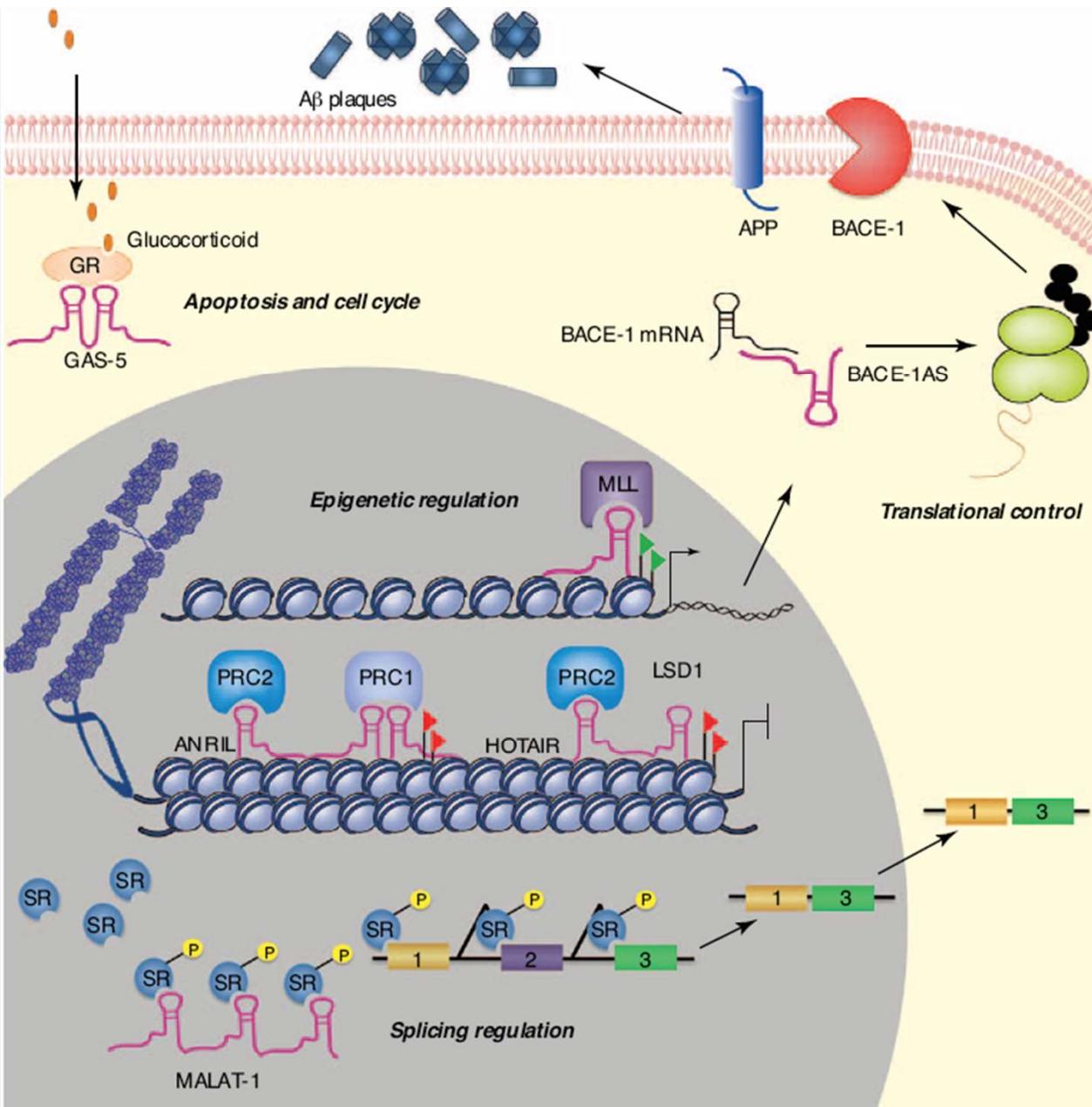
1. wyciszanie transkrypcyjne przez siRNA (TGS)
2. regulacja ekspresji przez długie niekodujące RNA (lncRNA)

lncRNA vs mRNA

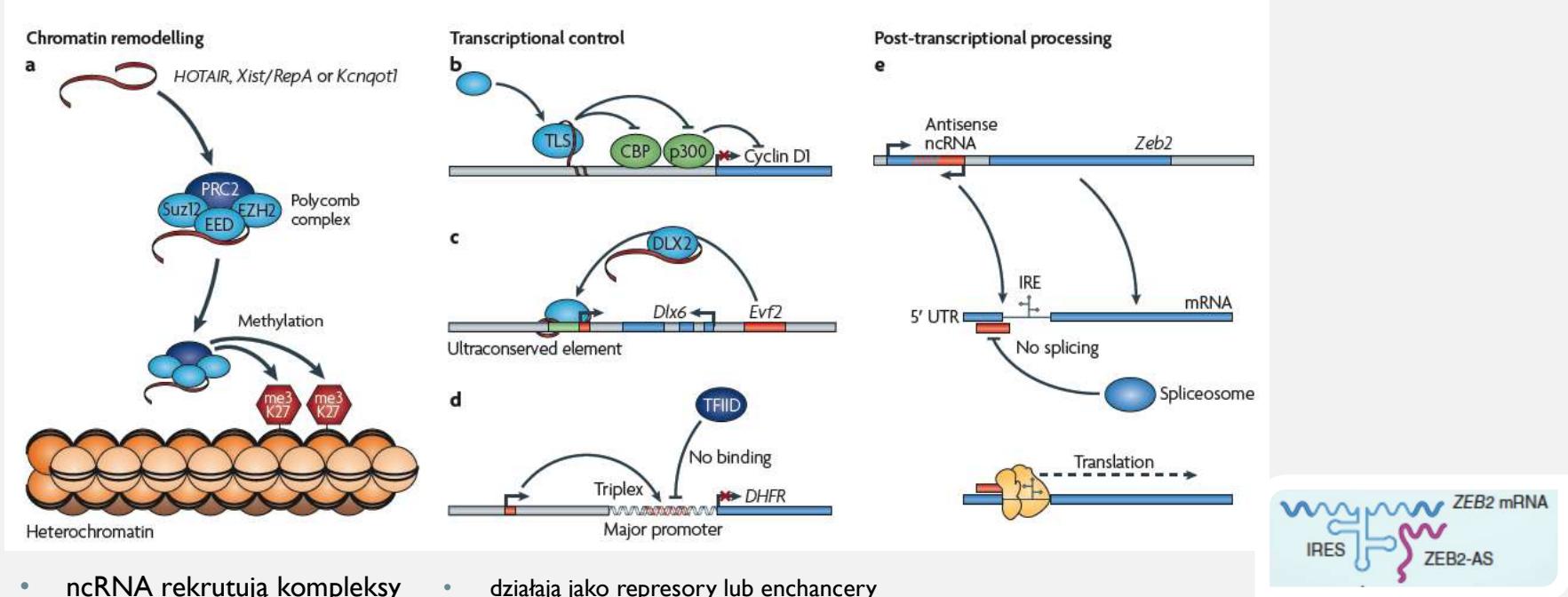


FUNKCJE IncRNA





MECHANIZMY DZIAŁANIA IncRNA



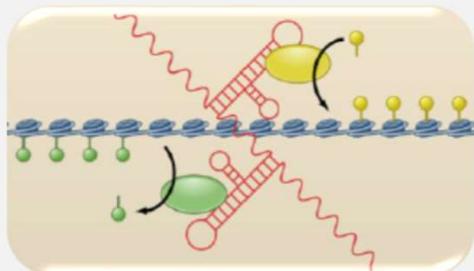
- ncRNA rekrutują kompleksy modyfikujące chromatynę → modyfikacje białek histonowych (H3meK27) i tworzenie heterochromatyny

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

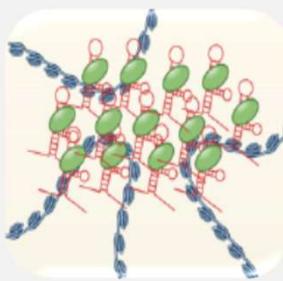
- maskują miejsce splicingu 5', co skutkuje zatrzymaniem intronu, rozpoznaniem IRE i translacją

Mercer et al., Nat. Rev. Genet., 2007

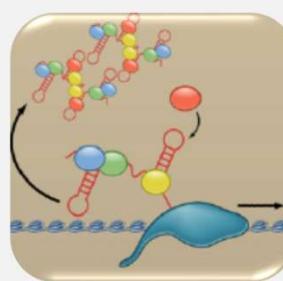
MECHANIZMY DZIAŁANIA IncRNA



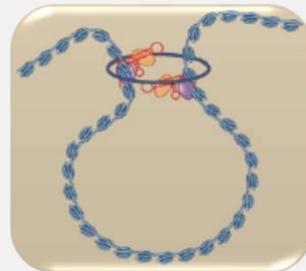
Kotranskrypcyjna rekrutacja czynników modyfikujących chromatynę



Chromatin nucleation



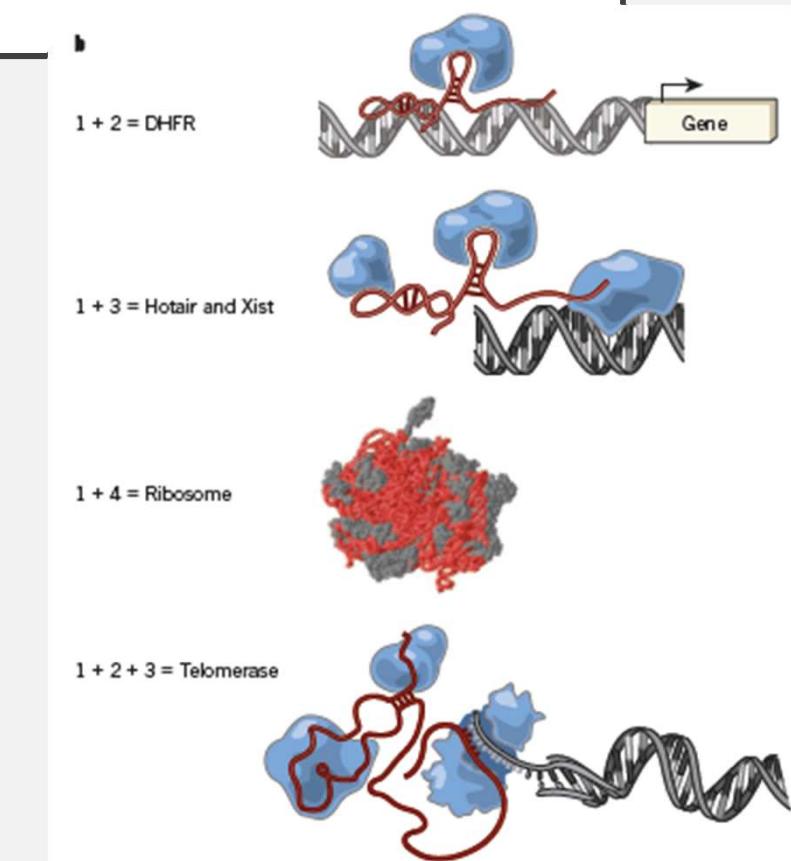
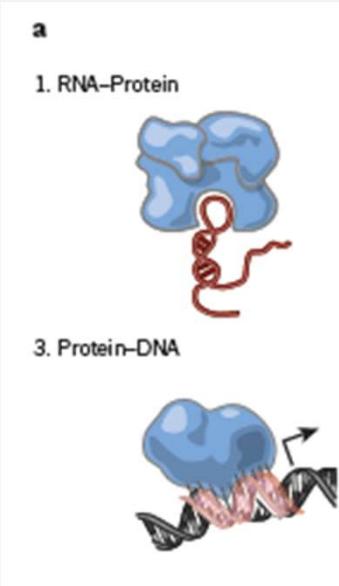
Dynamiczne formowanie struktur w jądrze komórkowym: *paraspeckles*, *nuclear bodies*



Tworzenie pętli chromatyny (*chromatin loops*)

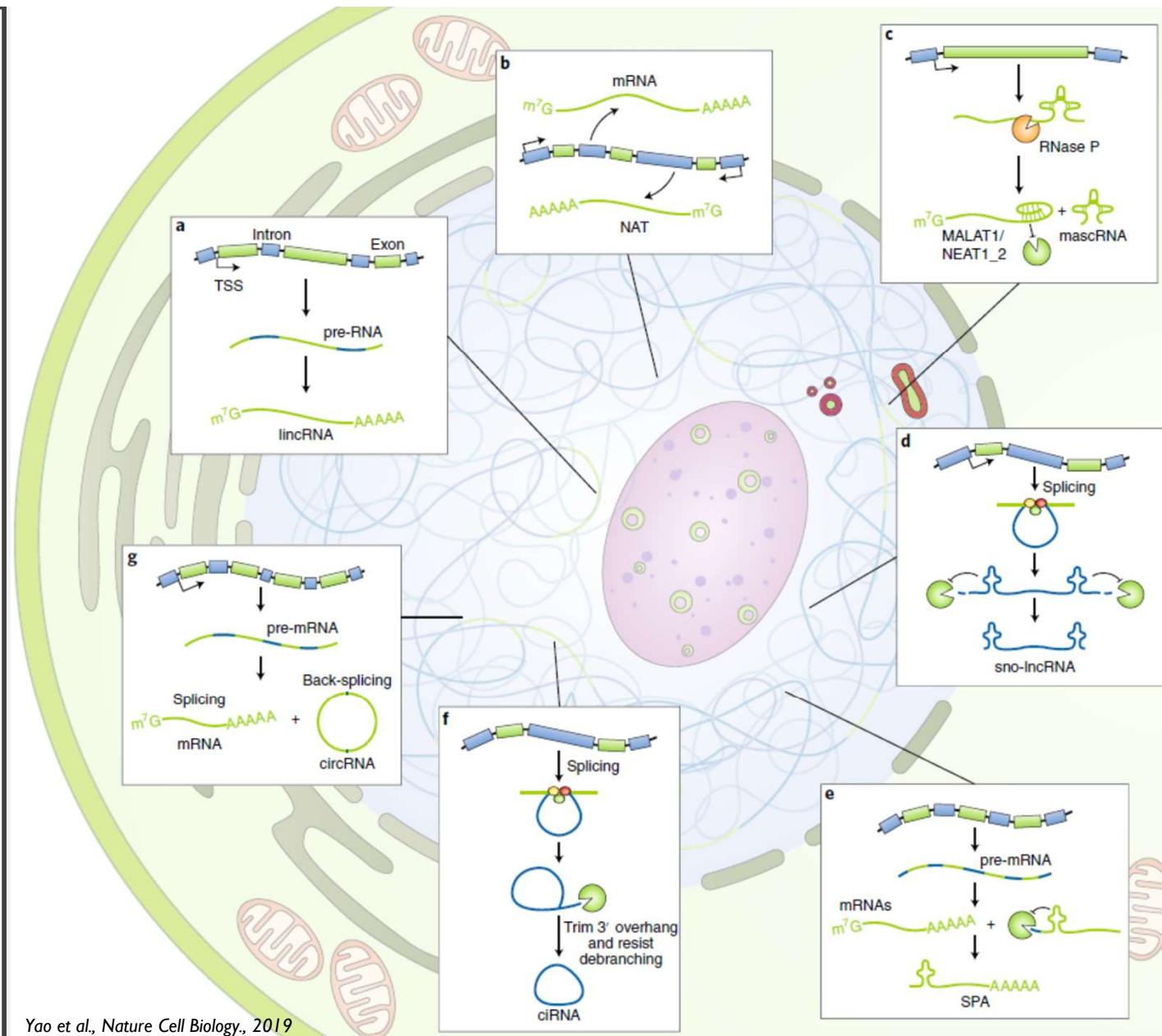
- „**Przewodniki**” (*guides*) dla czynników modyfikujących chromatynę
- **Czynniki transkrypcyjne**
- **Szkielet do tworzenia struktur RNP**

MECHANIZMY DZIAŁANIA IncRNA



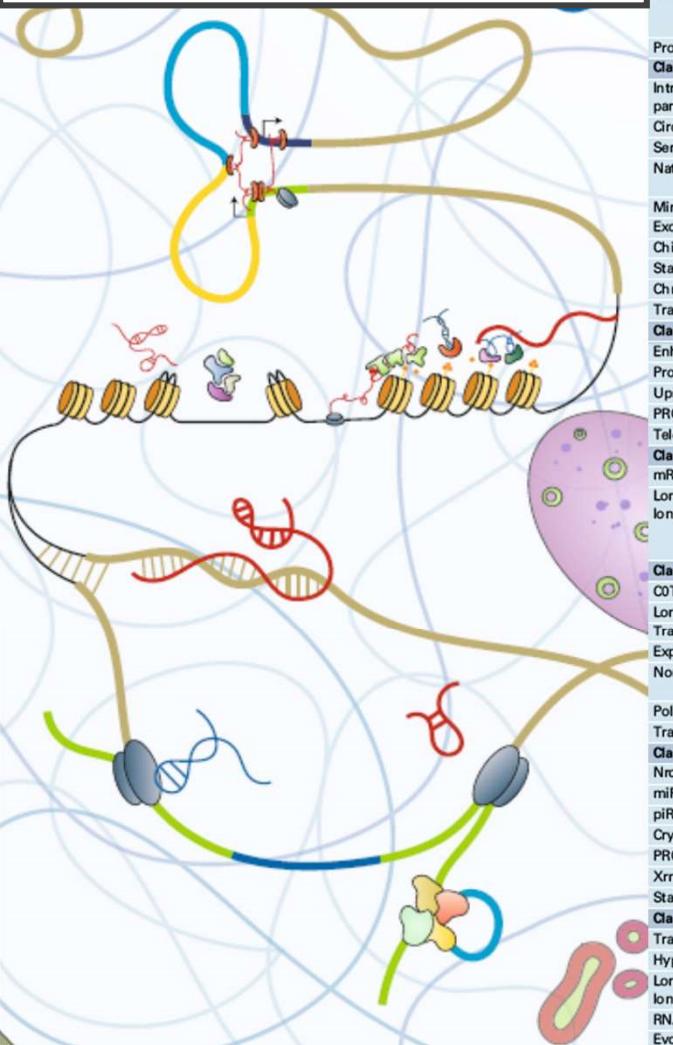
Różnorodność lncRNA w komórkach ssaczych

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



lncRNA

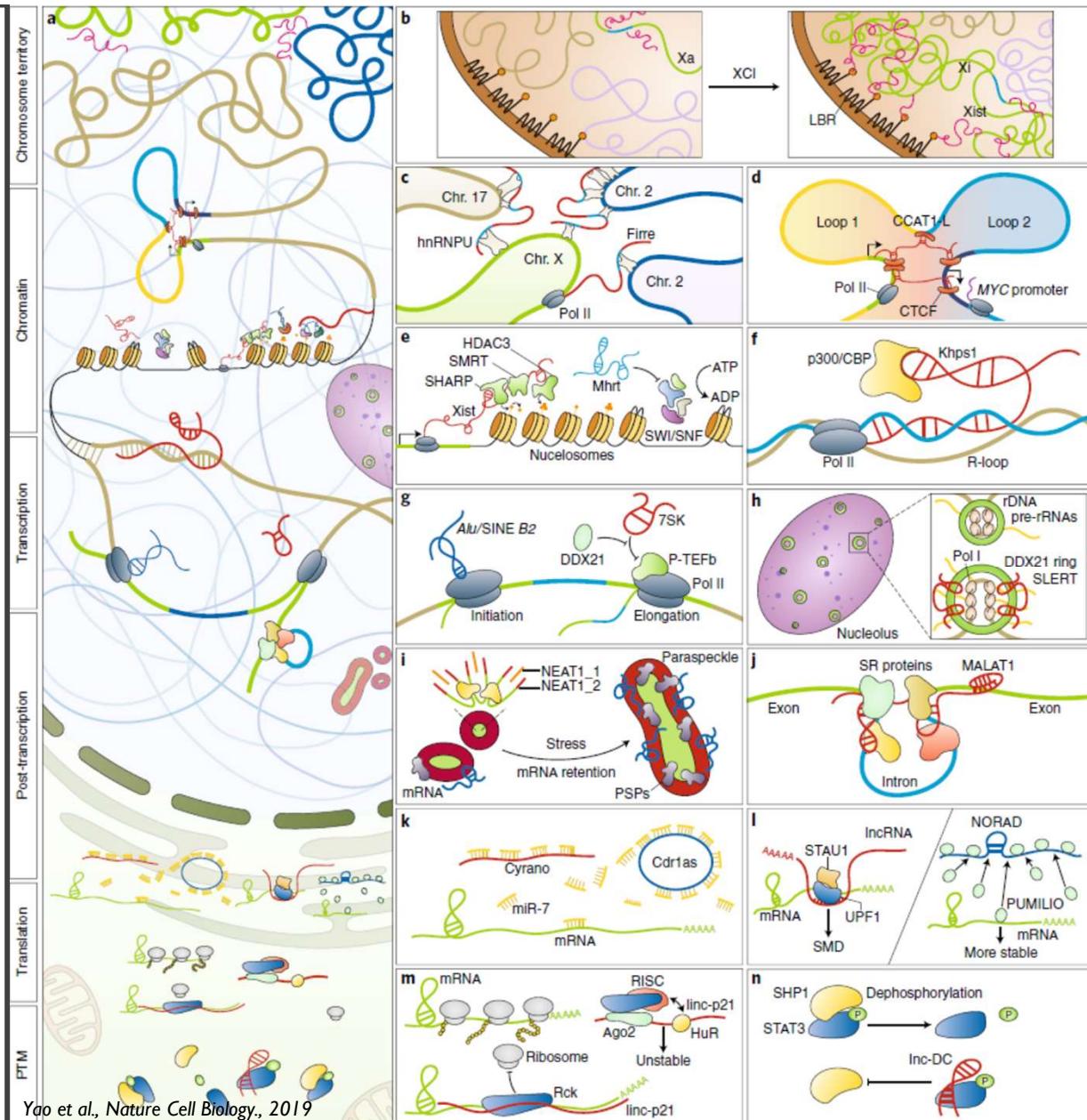
Laurent et al, TiG 2015



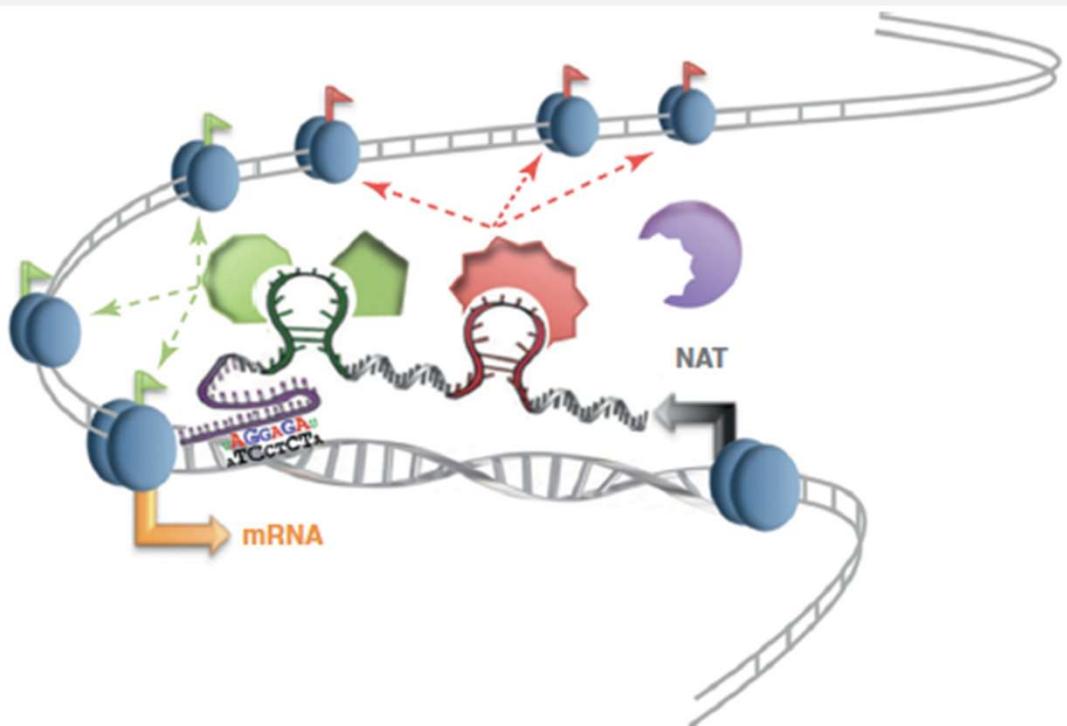
Category	Abbreviation	Specific examples	Category	Abbreviation	Specific examples
Classification based on transcript length			Classification based on expression in different biological states		
Long noncoding RNA	lncRNA	ANRIL [117], H19 [147], HOTAIR [18], HOTTIP [148], lincRNA-p21 [149], XIST [150], Paupar [151]	Long stress-induced noncoding transcript	LSINCT	
Long-intergenic noncoding RNA; large intervening noncoding RNA, long-intervening noncoding RNA			Hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcript	HINCUT	
Very long intergenic noncoding RNA	vlncRNA	HELLP transcript [42], Vlinc_21, vline_185, vline_377, vline_500 [29]	Non-Annotated Stem Transcript	NAST	
macroRNA		Airn, Gt12t, KCNQOT1, Lncat, Nespas (reviewed in [152]), STAIR1 [28]	Classification based on association with subcellular structures		
Promoter-associated long RNA	PALR		Chromatin-associated RNA	CAR	
Classification based on association with annotated protein-coding genes			Chromatin-interlinking RNA	cirNA	
Intronic ncRNA; stable intronic sequence RNA; totally intronic RNA, partially intronic RNA	sisRNA, TIN, PIN		Nuclear bodies associated RNAs		
Circular intronic RNAs	cirRNAs		PRC2 associated RNAs		
Sense ncRNA			Classification based on function		
Natural antisense ncRNA	asRNA, NAT	BACE1-AS [153], aHIF [154], Tsix [155]	Long noncoding RNAs with enhancer-like function; ncRNA-activating	ncRNA-a	ncRNA-a7 [108]
Mirror antisense		Globin antisense [67]	miRNA primary transcripts		H19 [166]
Exonic circular RNAs	ecircRNAs	cANRIL [118]	piRNA primary transcripts		
Chimeric RNAs, trans-spliced RNAs, exon juxtaposition			Competing endogenous RNA	ceRNA	PTENP1 and KRASP1
Stand-alone ncRNAs made from 3'UTRs	uaRNA				
Chromatin-interlinking RNA	cirRNA				
Transcription start site-associated RNAs	TSSa-RNAs				
Classification based on association with other DNA elements of known function					
Enhancer-associated RNA	eRNA				
Promoter-associated long RNA	PALR				
Upstream antisense RNA	uaRNA				
PROMoter uPstream Transcript	PROMPT				
Telomeric repeat-containing RNA	TERRA				
Classification based on protein-coding RNA resemblance					
mRNA-like noncoding RNAs	mIncRNAs				
Long-intergenic noncoding RNA; large intervening noncoding RNA, long-intervening noncoding RNA	lncRNA	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	LINE1/2				
Transcribed endogenous retroviruses					
Expressed Satellite Repeats					
Non-coding RNA driven by promoters within repeats	vlncRNAs, NASTs	Vlinc_21, vline_185, vline_377, vline_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-terminated 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	lncRNA	HOTAIR [18], HOTTIP [148]			
RNA-Z regions					
EvoFold regions					
InRNA	InRNA function				
ANRIL Xist	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				
HOTAIR					
COLDAIR					
Kcnq1ot1					
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				
lncRNA-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				
I/2 SBS	Pairs with mRNAs via Alu repeats and targets them into a NMD pathway				
HULC H19	miRNA decoys: HULC induces PRKACB translation, H19 interferes with let-7 activity, PTENP1 deprocesses PTEN production				
PTENP1					
LINK RNAs	Cellular signalling, activate of kinases, promote protein phosphorylation				
I/2-sbsRNA	STAUFEN1-dependent mRNA decay, induce mRNA degradation or stabilization				
TINCR					
HOTAIR	Protein turnover, stimulate degradation of Snurportin-I and Ataxin-I (HOTAIR) or HIV proteins tat (NRON_				
NRON					

Przykłady funkcji lncRNA

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

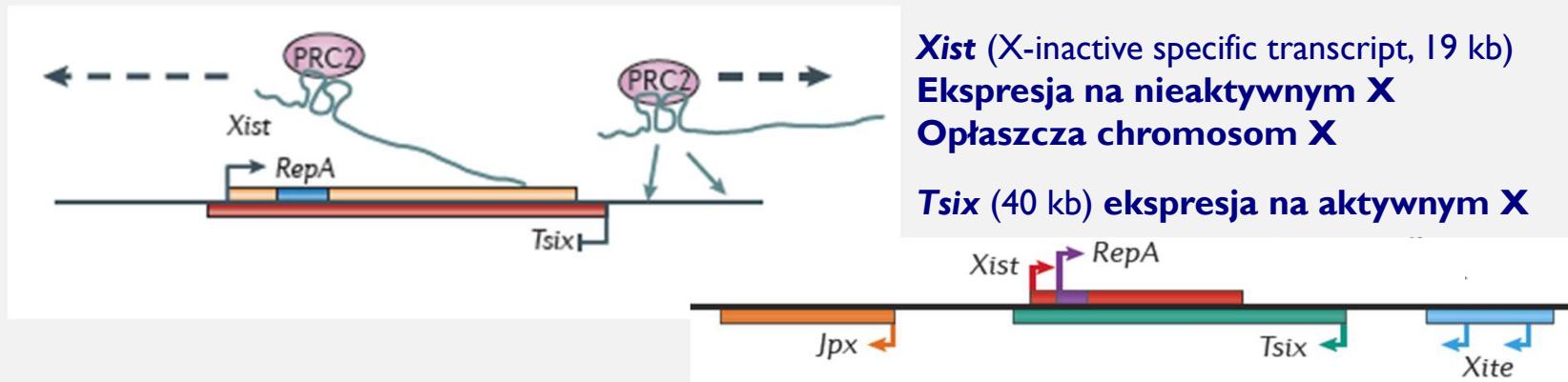


REGULACJA EPIGENETYCZNA PRZEZ NAT (*natural antisense transcripts*)



- 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



- *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: wyciszanie epigenetyczne

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

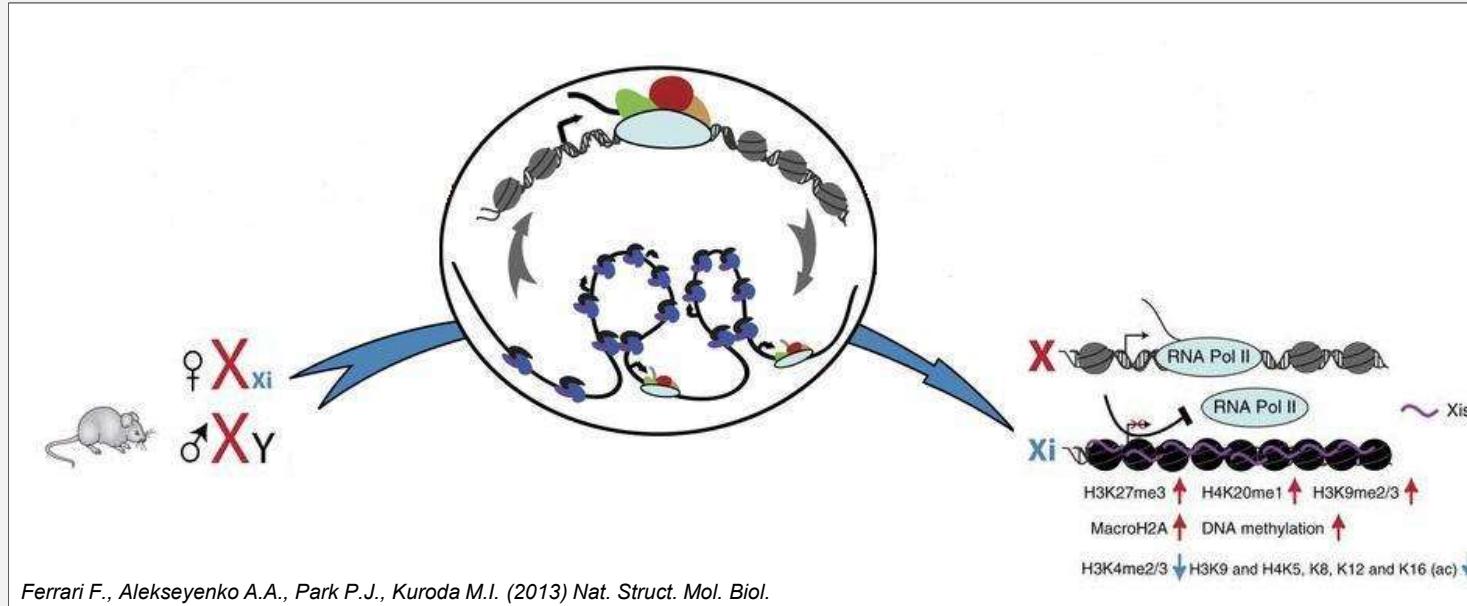
zamiana histonu H2A na makroH2A

metylacja histonu H3:

H3K9
H3K27

deacetylowanie histonu H4 (?)

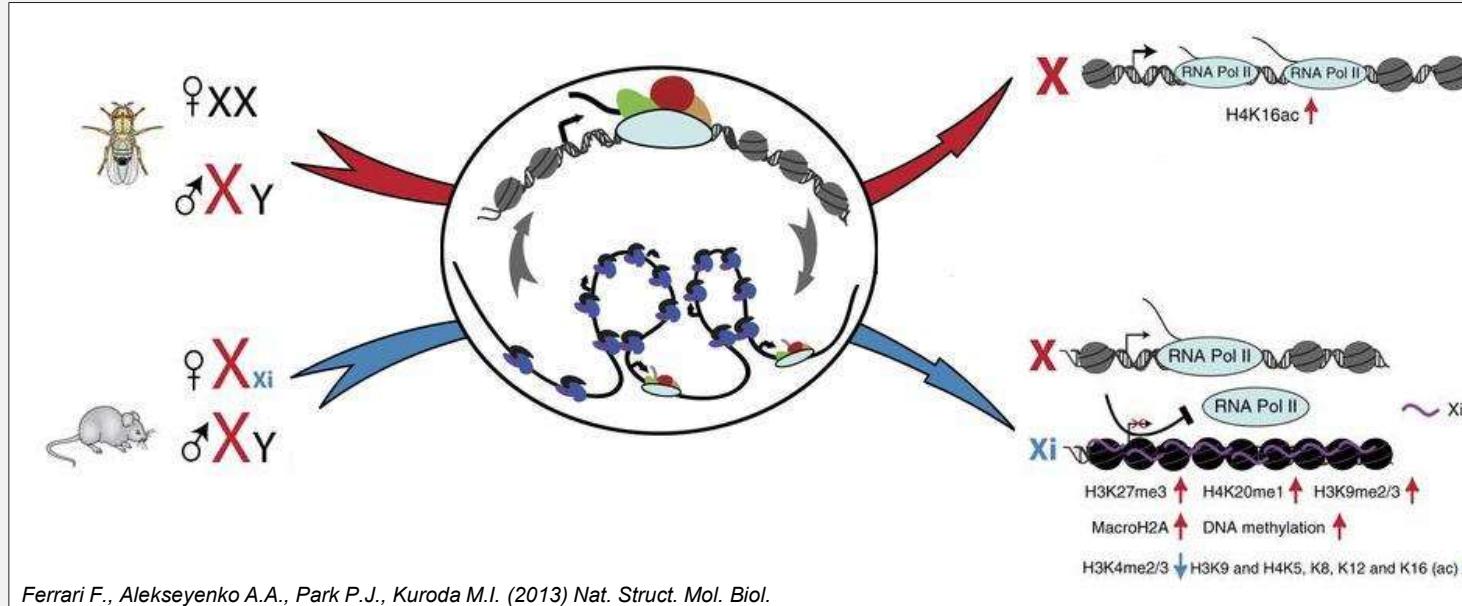
metylacja DNA /już po inaktywacji chromosomu



Epigenetyczna regulacja ekspresji genów przez ncRNA

kompensacja dawki chromosomów płciowych (*dosage compensation*)
u *Drosophila melanogaster* → roX

- *roX1/roX2* ncRNA inicują modyfikacje histonów → u samców *Drosophila* zwiększenie aktywności chromosomu X
- acetylacja histonów
- demetylacja H3K9



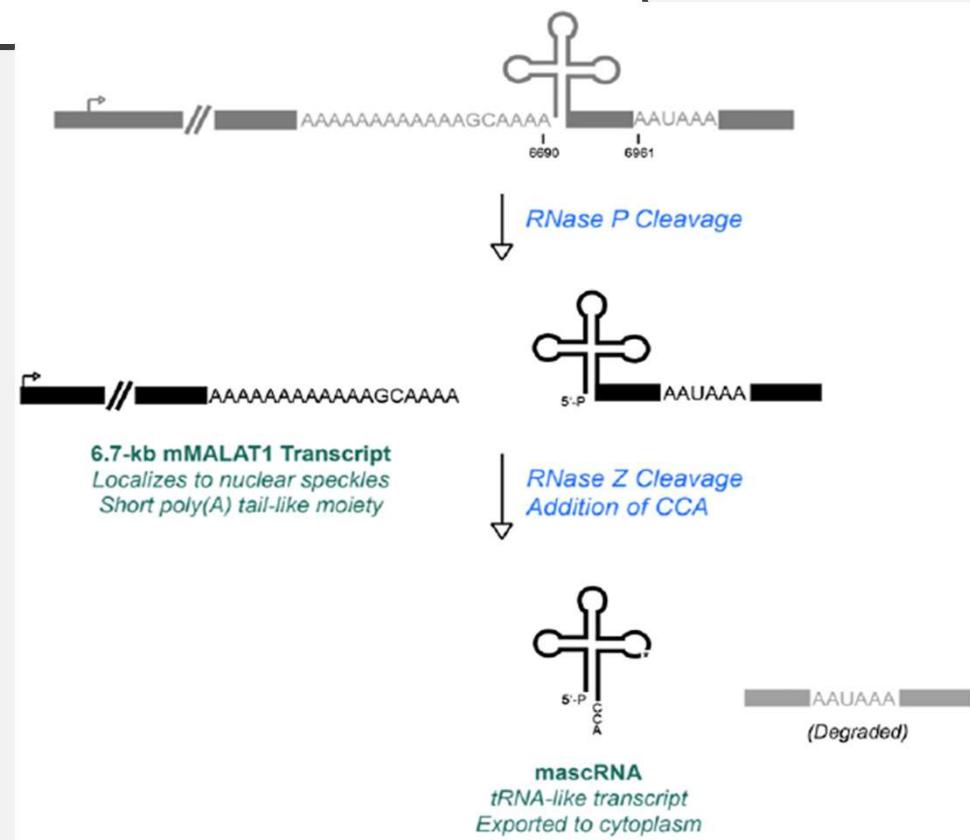
MALAT1/mascRNA

MALAT1:

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

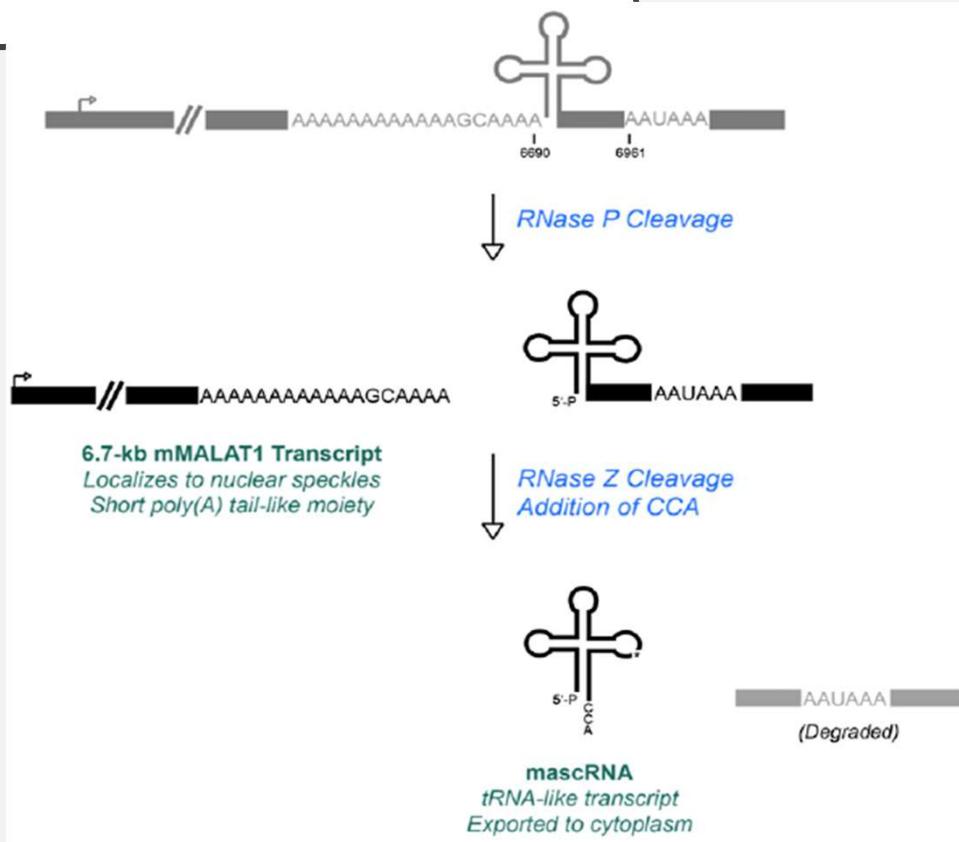
mascRNA:

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

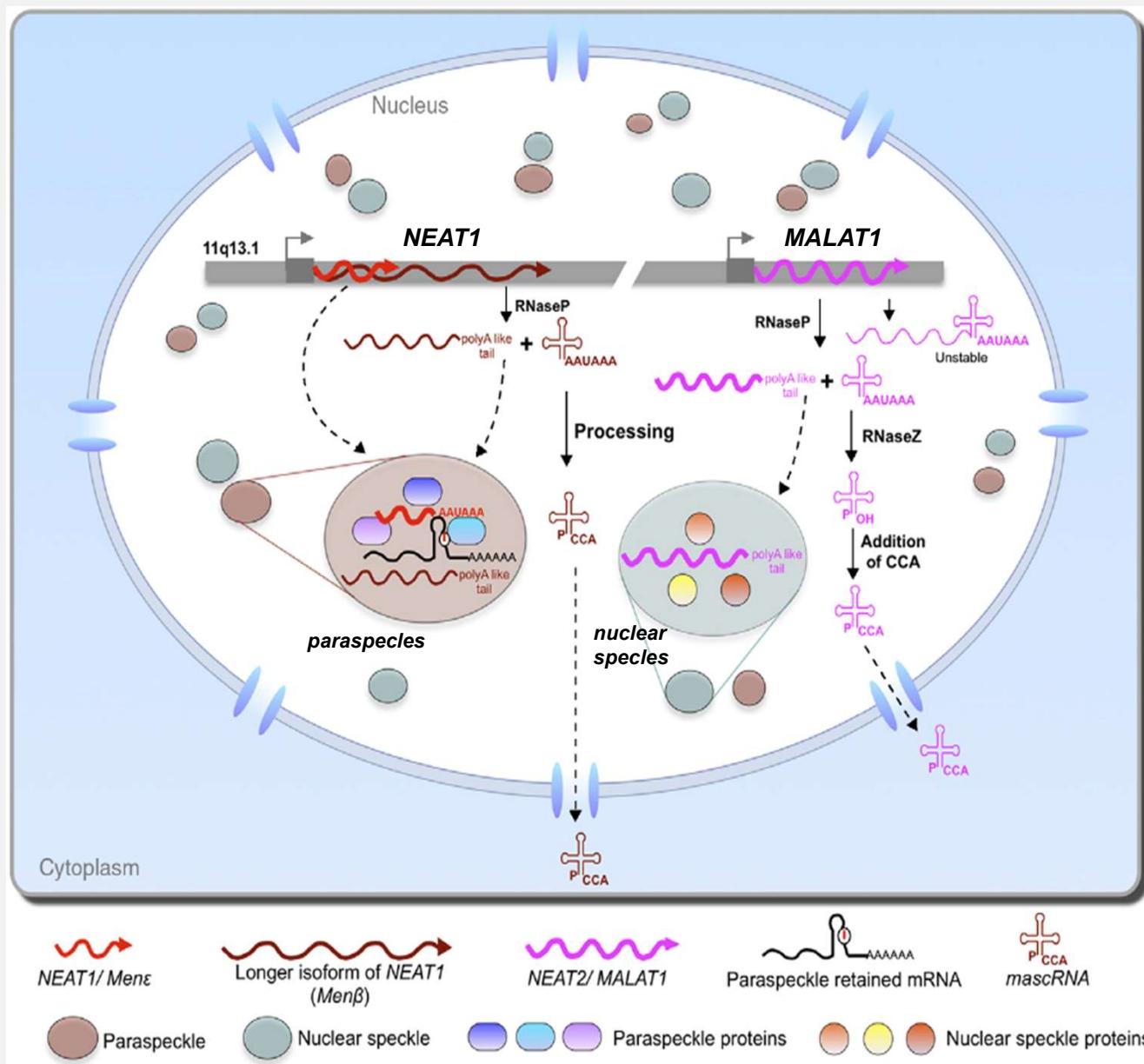


MALAT1/mascRNA

- 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



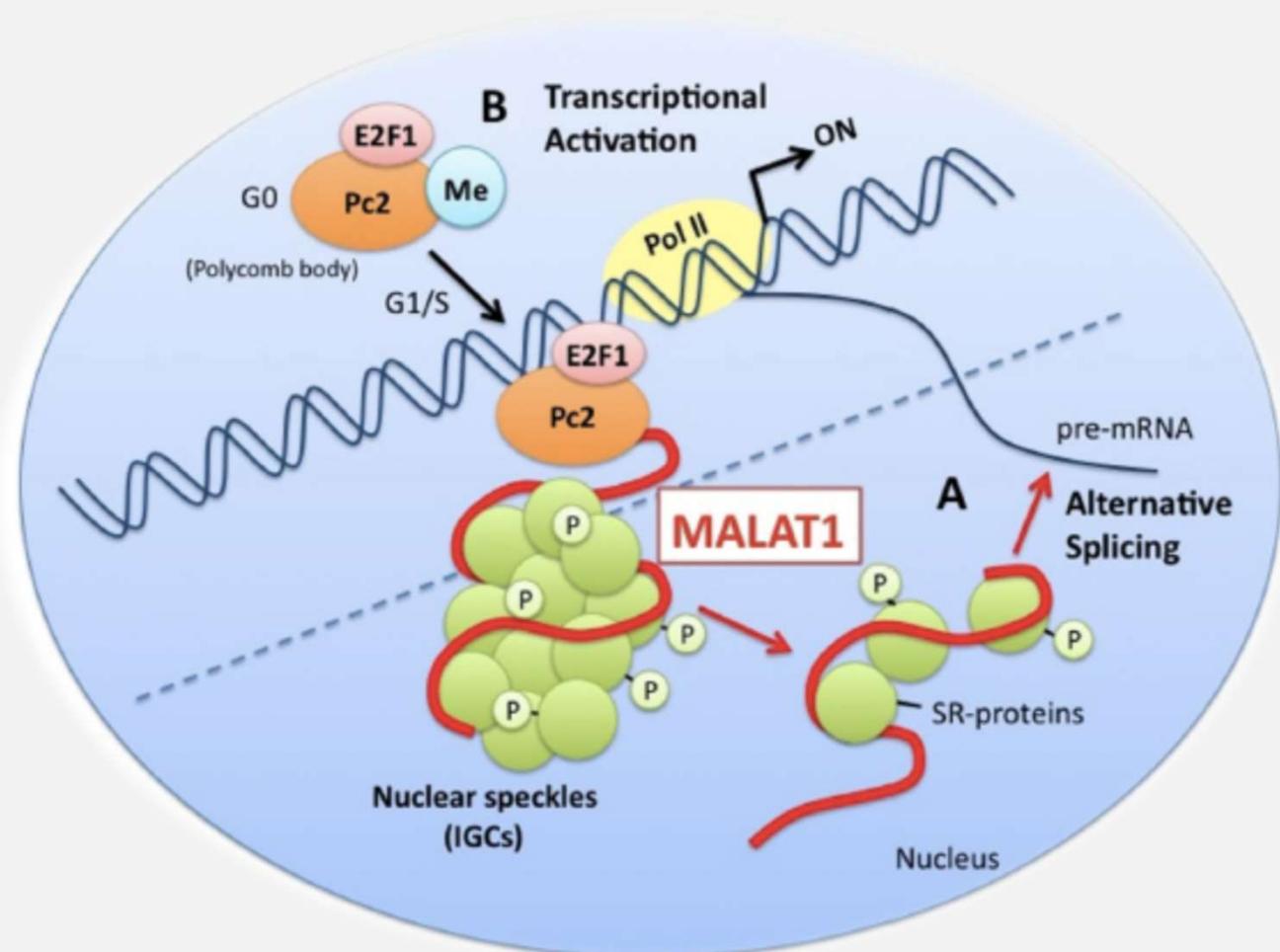
NEAT1 i MALAT1



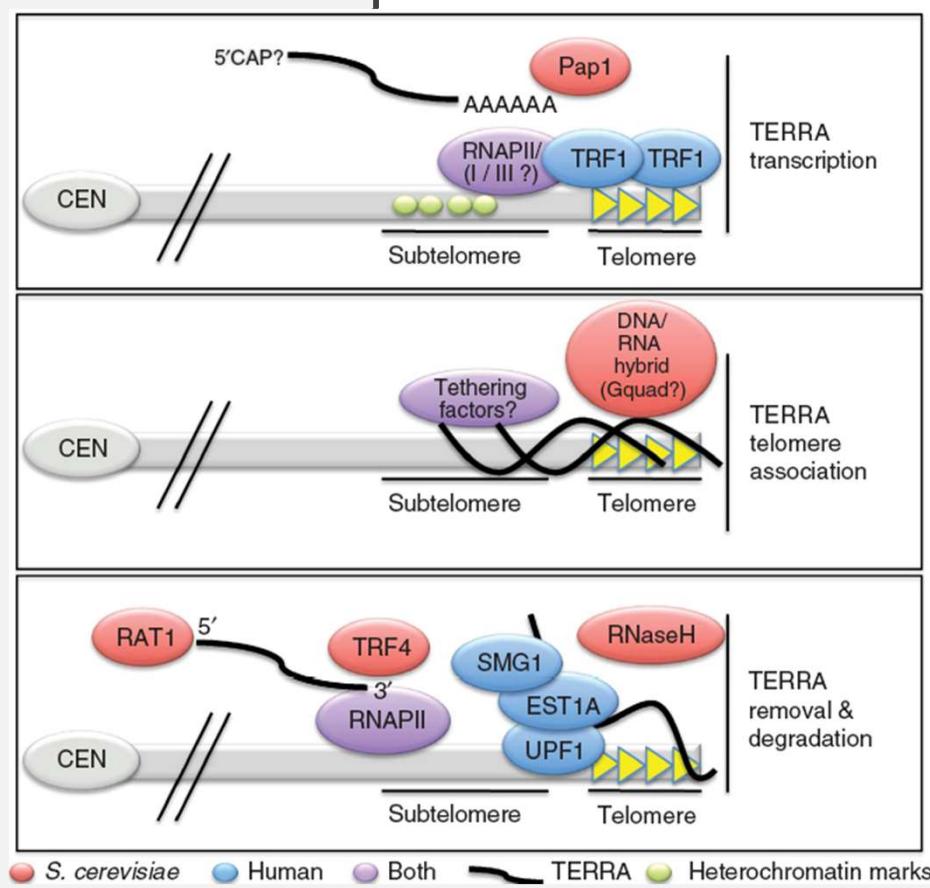
Chen & Carmichael, WIRE RNA, 2010

FUNKCJE MALAT1

- Aktywacja transkrypcji i splicing

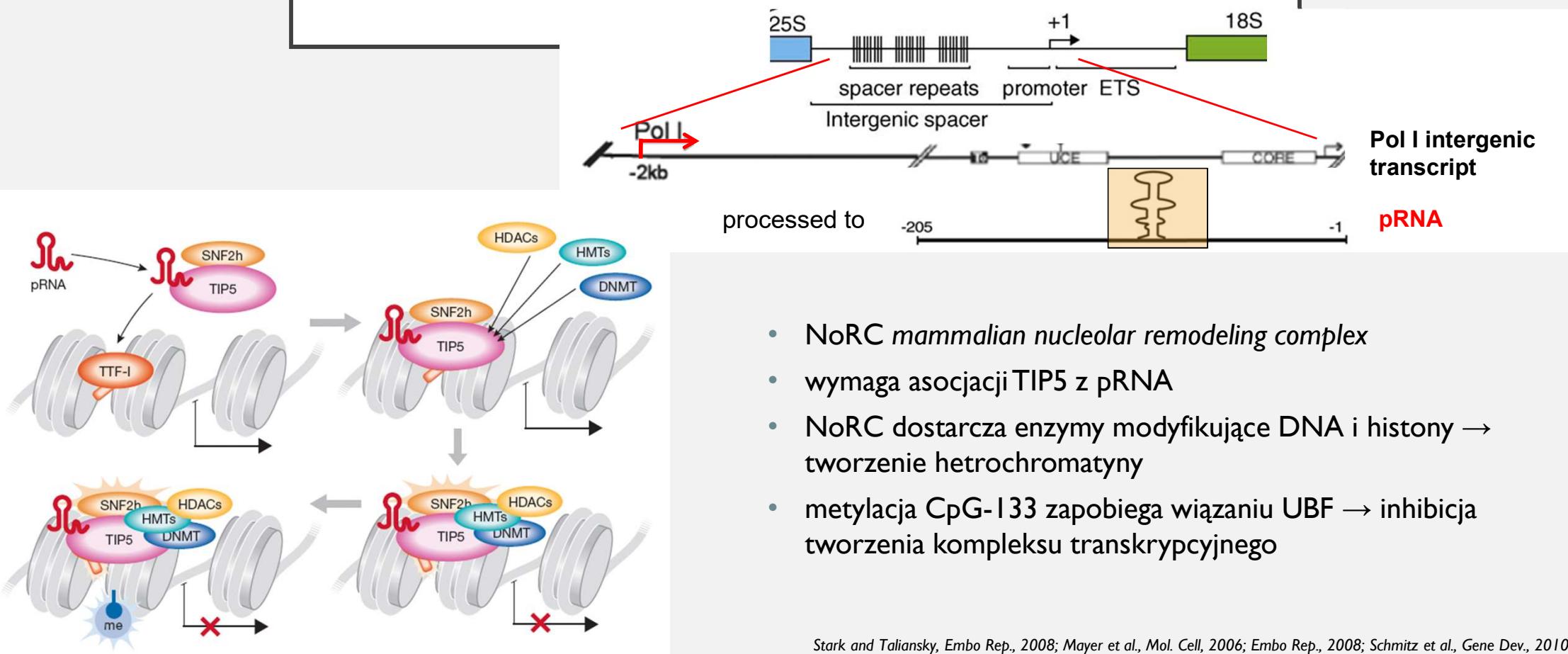


TERRA – TELOMERIC REPEAT-CONTAINING RNA

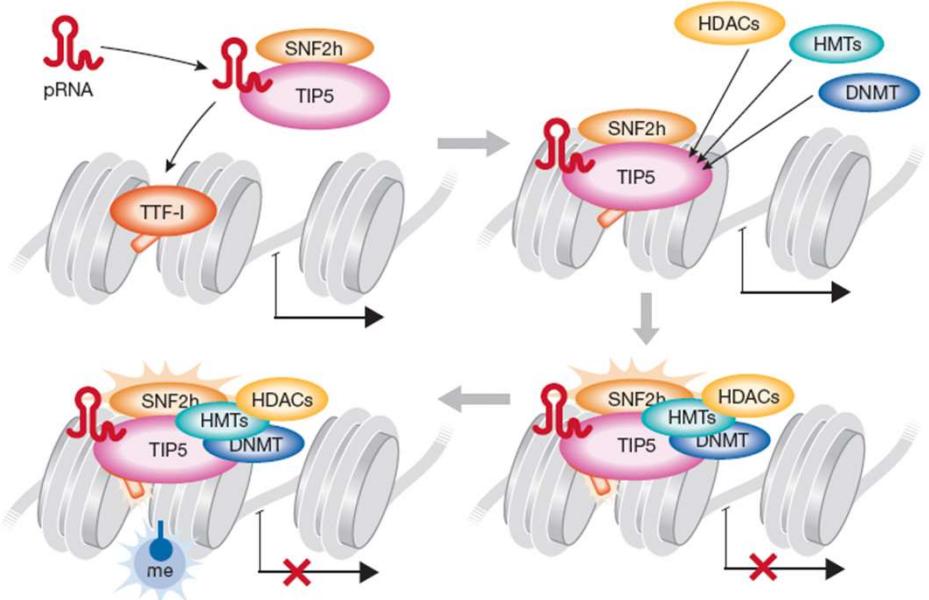
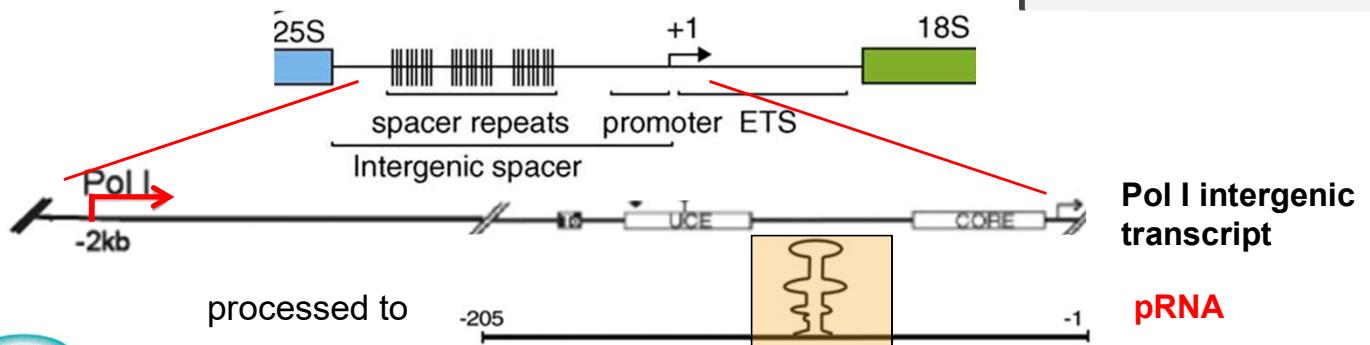


- w komórkach drożdżowych i ludzkich
- poliadenylowany transkrypt Pol II
- obejmuje regiony subtelomeryczne i telomeryczne
- komponent heterochromatyny telomerowej
- asocjacja z telomerami i białkami telomerowymi (Trf1, Trf2)
- regulowany przez czynniki RNA surveillance (Rat1, Trf4, czynniki NMD, RNaza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

WYCISZANIE rDNA PRZEZ pRNA I NoRC



WYCISZANIE rDNA PRZEZ pRNA I NoRC

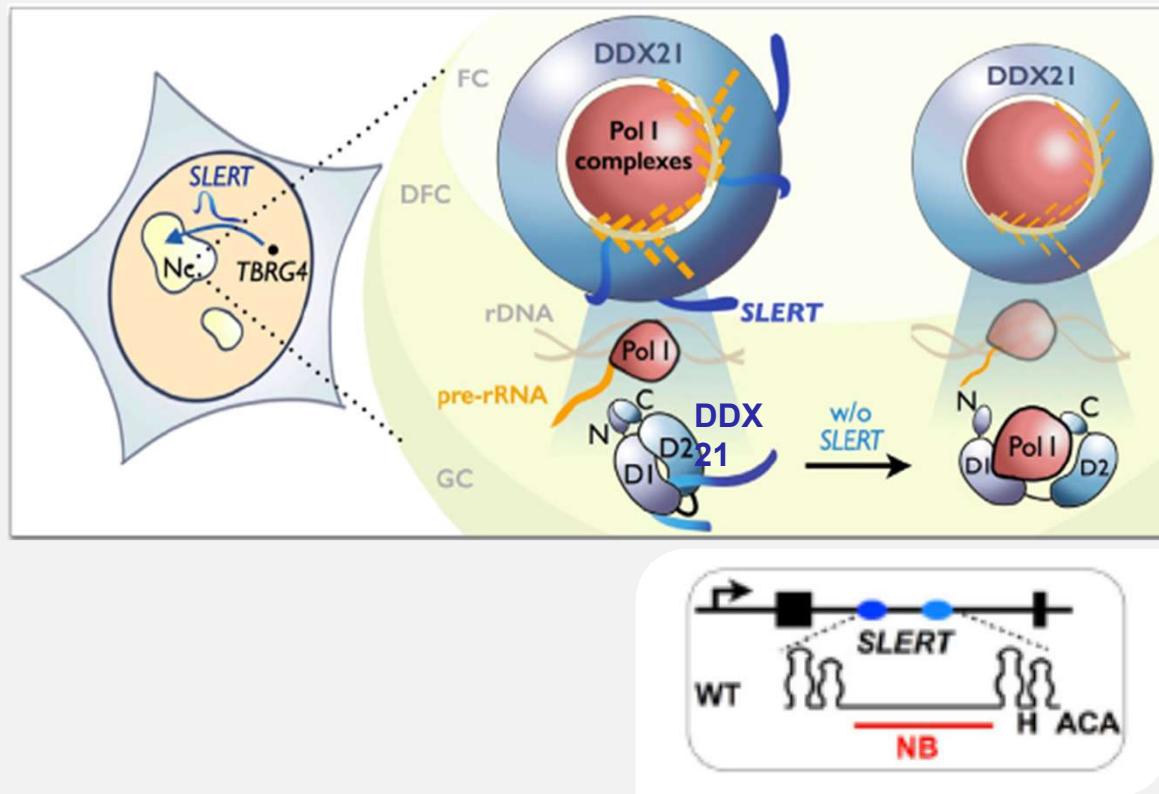


DODATKOWE WYCISZENIE

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

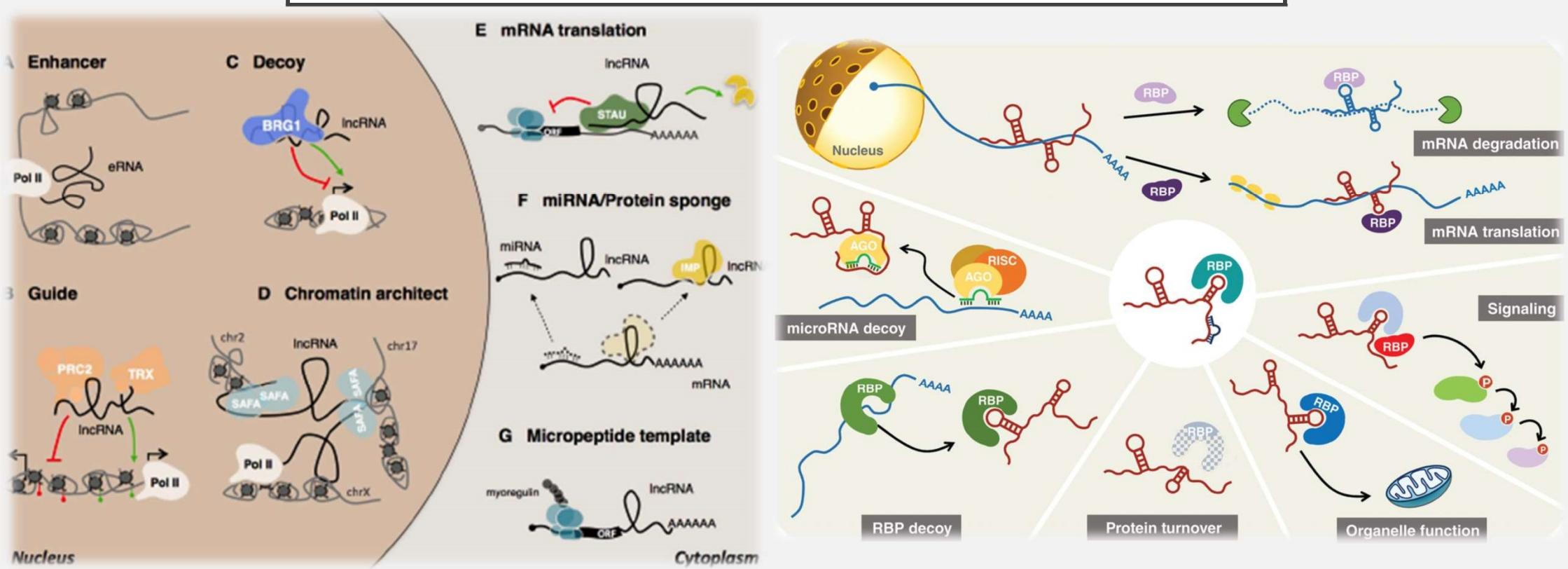
Stark and Taliensky, Embo Rep., 2008; Mayer et al., Mol. Cell, 2006; Embo Rep., 2008; Schmitz et al., Gene Dev., 2010

SLERT – TRANSKRYPCJA Pol I (human)



- SLERT- IncRNA, zakończony boxH/ACA snoRNA
- snoRNA na obydwu końcach SLERT są potrzebne do biogenezy i lokalizacji jąderkowej
- helikaza DDX21 RNA tworzy struktury pierścieniowe wokół kompleksów Pol I → supresja transkrypcji pre-rRNA
- SLERT wiąże się do DDX21 i moduluje pierścień 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

