



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



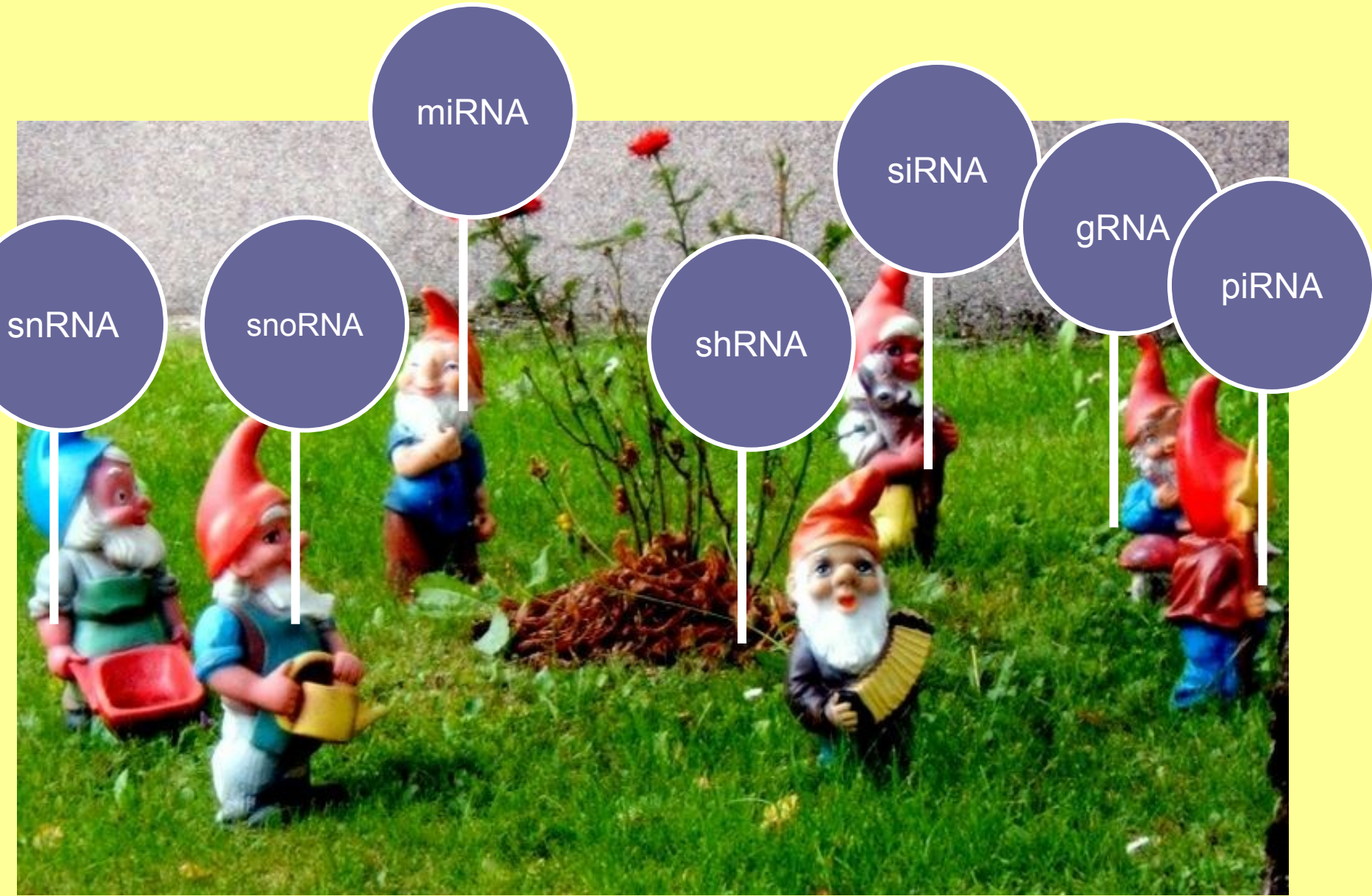
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Regulační mechanismy zprostředkované malými RNA

Milan Bartoš

Přednáška Molekulární biologie 2012



snRNA

snoRNA

miRNA

shRNA

siRNA

gRNA

piRNA

Obsah přednášky

- **Historie objevu**
- **Nekódující malé RNA v buňce**
- **Co to je RNA interference**
- **Mechanismus RNA interference**
- **siRNA a miRNA, biogeneze, shody, rozdíly**
- **Úloha miRNA v ontogenetickém vývoji**
- **piRNA, aRNA a další ...**
- **Využití RNAi ve farmacii**
- **RNA interference u prokaryot**
- **Novinky**

Interferující RNAi

- **Objeveny v roce 1998 u *Caenorhabditis elegans***
- **Nobelova cena v roce 2006 (Andrew Fire a Craig Mello, University of Kansas, USA)**



První historické zmínky

JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH

VOL. 37 WASHINGTON, D. C., AUGUST 1, 1928 No. 3

HOSTS AND SYMPTOMS OF RING SPOT, A VIRUS DISEASE
OF PLANTS¹

By S. A. WINGARD²

Associate Plant Pathologist, Virginia Agricultural Experiment Station

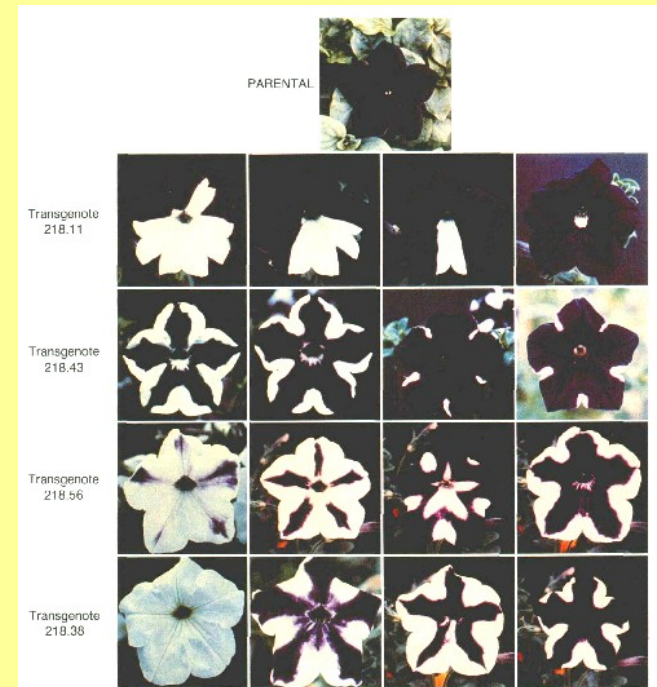
INTRODUCTION



V té době o DNA, natož o RNA nikdo nic nevěděl

Fenomén „kosuprese“

- Rich Jorgensen a kolegové vložili gen produkující pigment do petunií
- Místo silné pigmentace se objevily rostliny variegované a dokonce bílé
- Jorgensen pojmenoval tento fenomén "cosuppression"



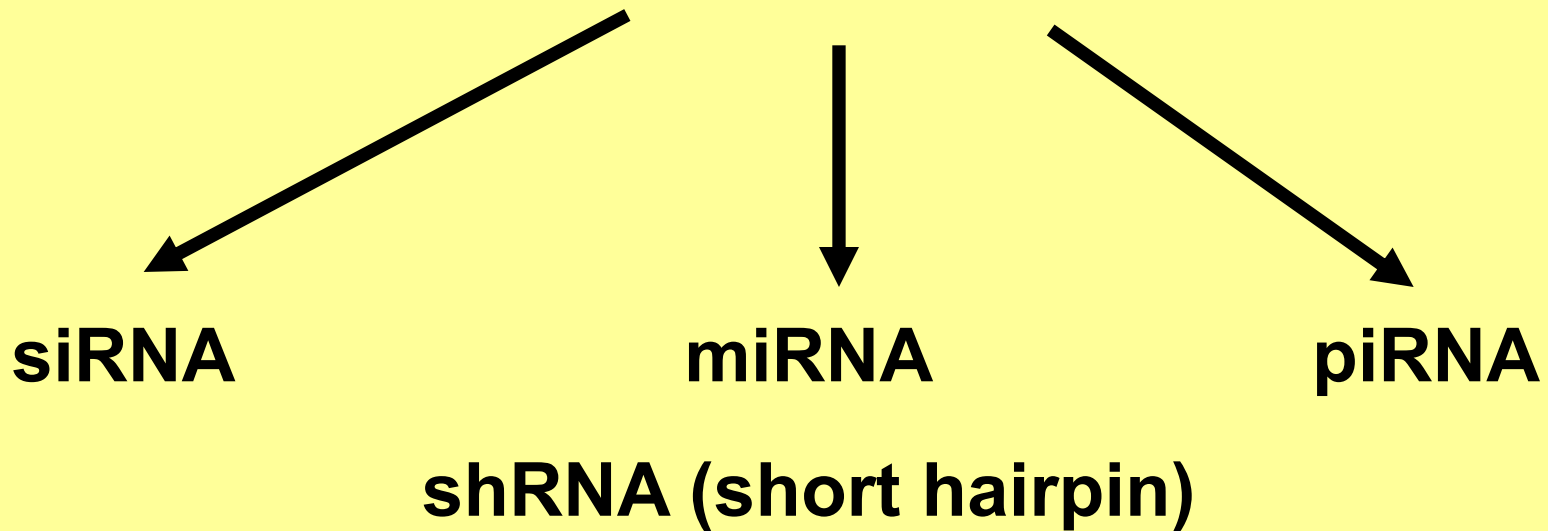
Napoli et al., *Plant Cell*, 1990

Nekódující „malé“ RNA v buňce

- **7SK snRNA (ovlivňuje transkripci u člověka vazbou na elongační faktory)**
- **SRP RNA (ovlivnění translace, jsou součástí SRP “signal recognition particle”)**
- **součást telomerázy (úloha při replikaci)**

- **XIST RNA (inaktivace X chromozómu)**
- **gRNA (úloha při editaci RNA)**
- **microRNA (miRNA)**
- **siRNA**

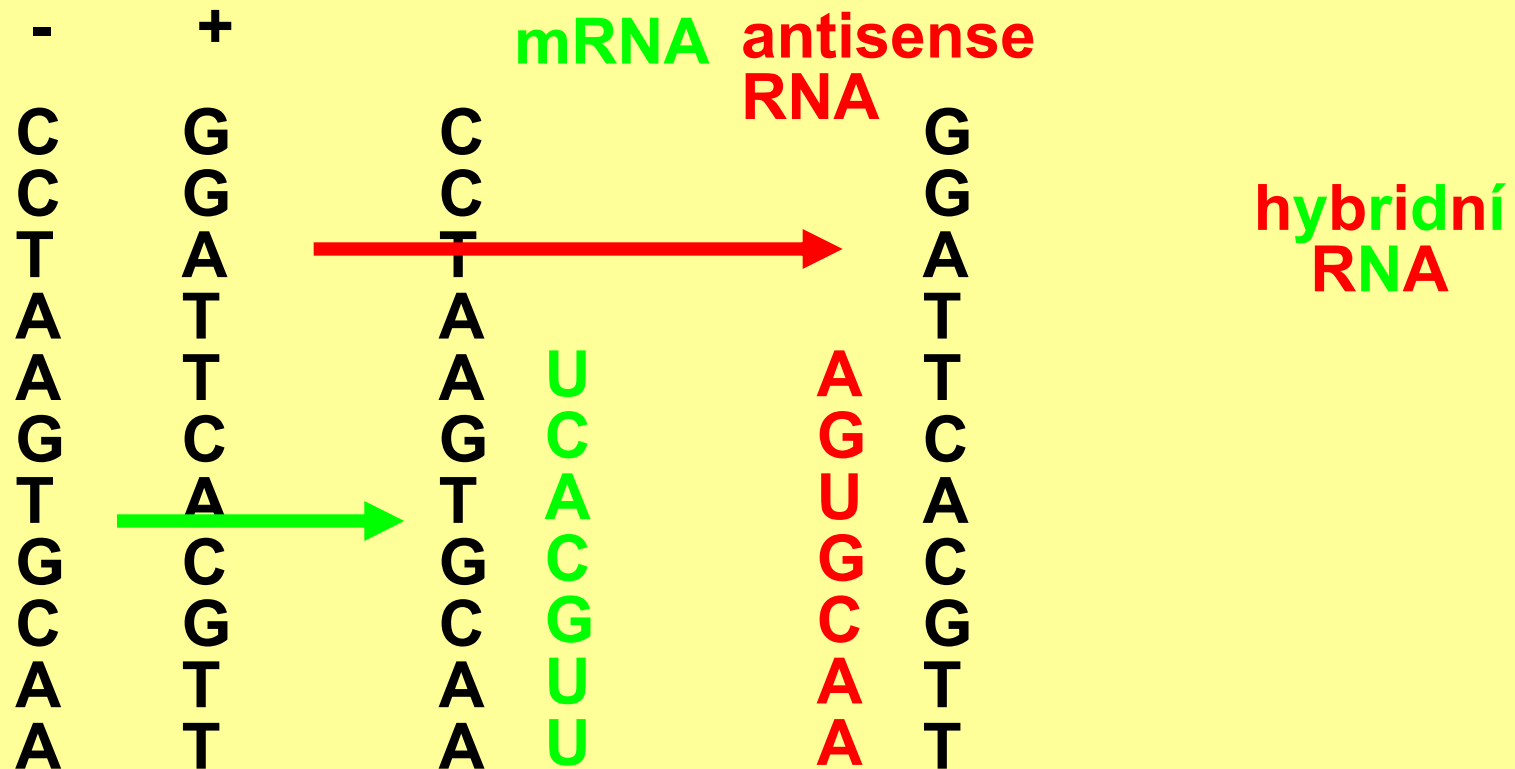
Interferující RNAi



**RNA interference = posttranskripční
umlčování genů, tzv. „gene silencing“**

Protismyslná RNA – antisense RNA

- je komplementární k primárnímu transkriptu a vazbou na něj jej inhibuje
- přepisuje se z pozitivního DNA-řetězce

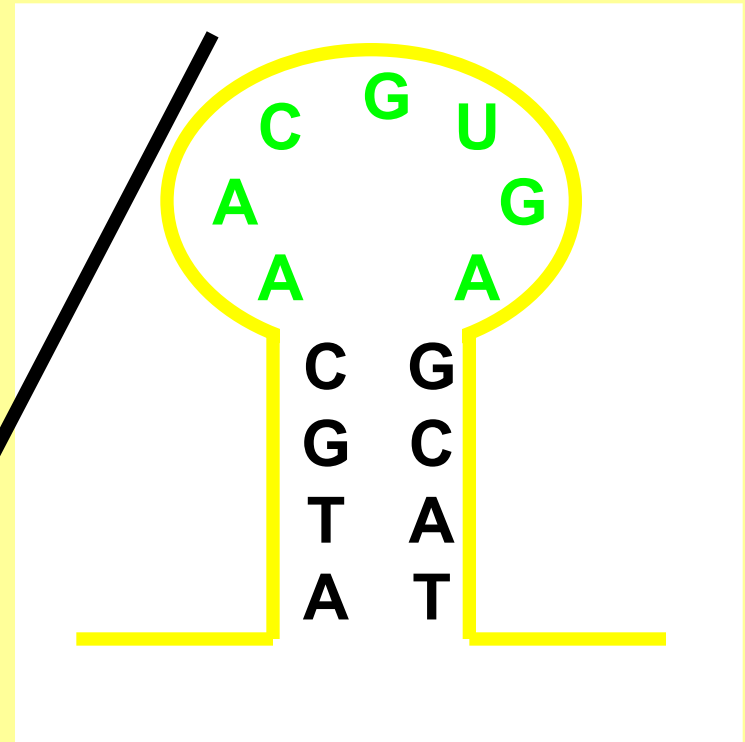


Struktura a funkce siRNA a miRNA

siRNA

A
G
U
G
C
A
A

miRNA



- přímý vliv
- transport virovými částicemi

Paradigma interferující RNAi

Jev RNA interference koliduje s koncepcí transkripčních faktorů

Transkripční faktory sice spustí vlastní transkripci, ale interferující RNAi rozhodnou o tom, které transkripty budou použity

Jak vznikl mechanismus RNAi?

Primitivní imunitní systém

Obrana buňky proti virové infekci

Virus = dsRNA

Buňka detekuje dsRNA

= POZOR, může to být VIRUS !

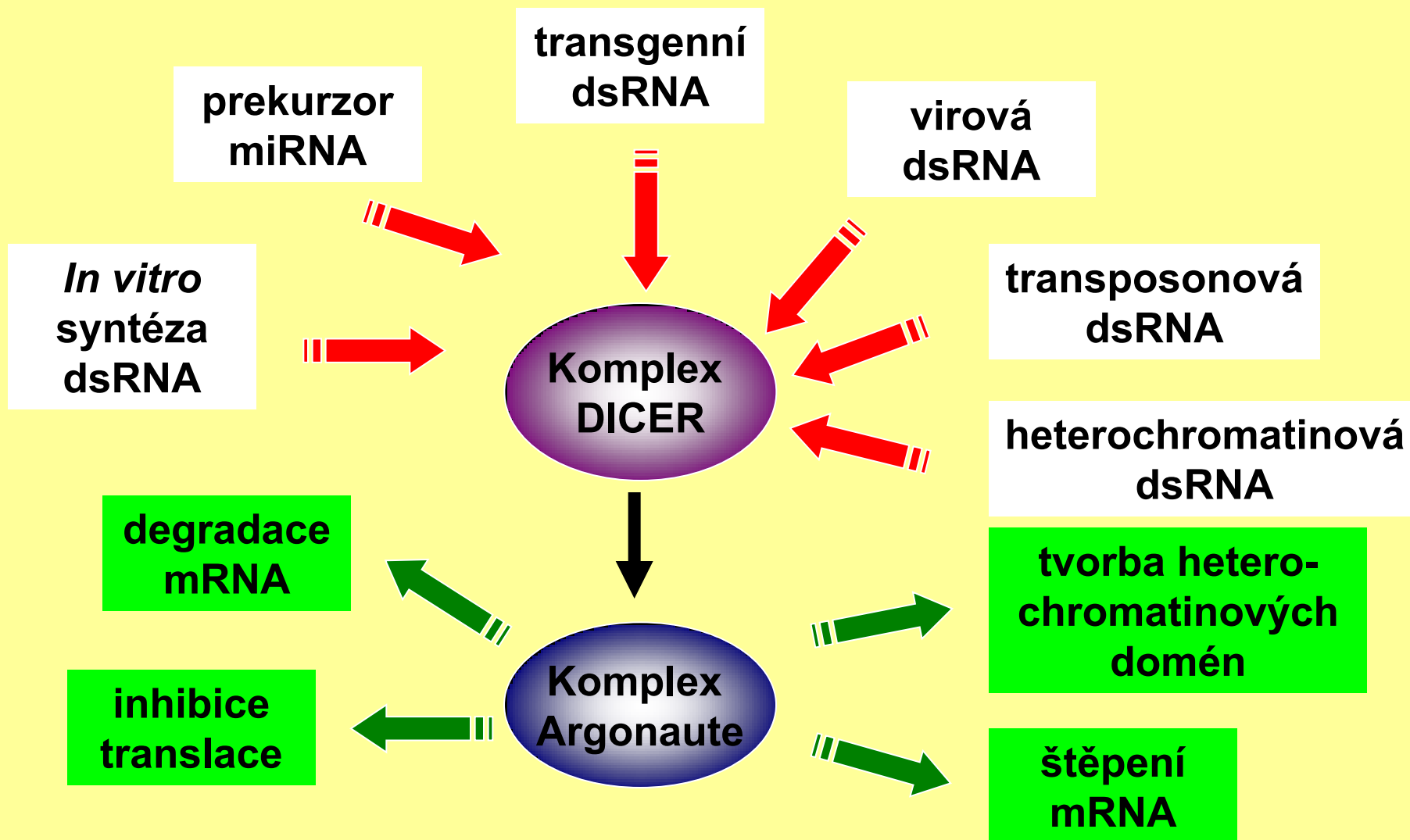
Adaptace RNA interference

Vzniklý mechanismus obrany proti virům byl následně adaptován u eukaryotických buněk, u kterých slouží jako regulační mechanismus rychlého zablokování translace u aktuálně „nepotřebných“ transkriptů

To umožňuje ontogenetický vývoj

Byla RNAi evoluční fenomén vedoucí k mnohobuněčným?

Cesta RNAi od signálu k akci



Místa účinku RNAi

Transkripce

- **siRNA**
- **metylace sekvencí v promotoru**

Posttranskripční procesy

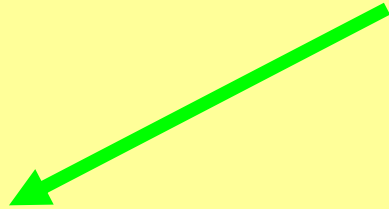
- **siRNA, miRNA, piRNA**
- **degradace mRNA**
- **inhibice úprav mRNA**
- **zablokování translace**
- **aktivace interferonu ?**

Jak vznikají a fungují siRNA ?

transkript delší sekvence dsRNA (stovky bp)



štěpení na krátké úseky (24 až 26 bp)



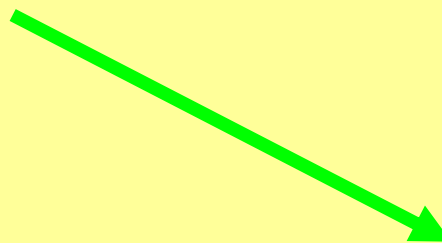
vazba na promotor



metylace



inhibice
transkripce



vazba k
3' - konci mRNA



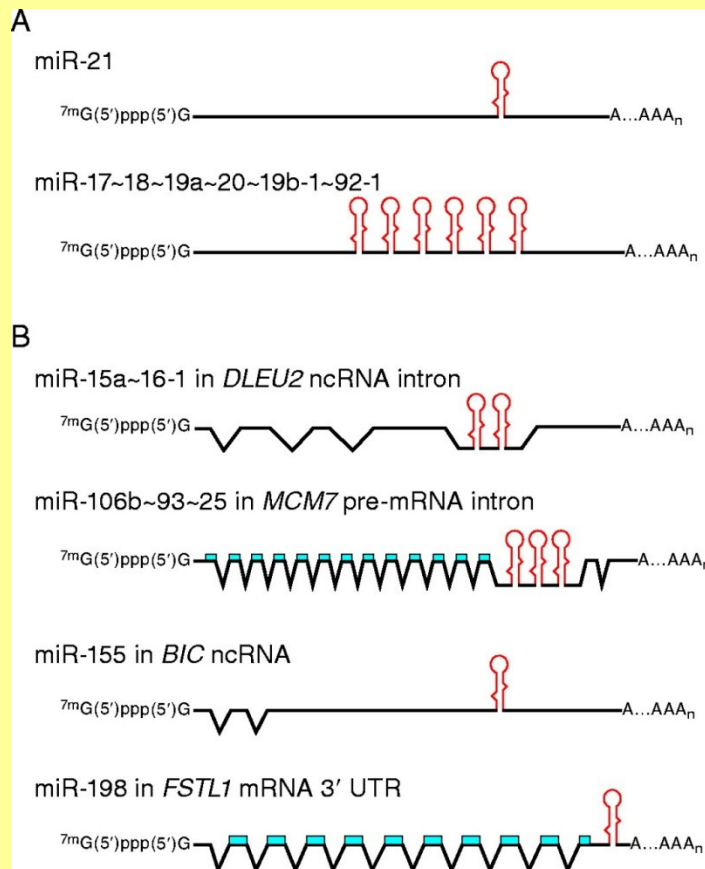
degradace dsRNA

stabilizace dsRNA



Jak vznikají miRNA?

Objeveny jen u rostlin, živočichů a hub



pri-miRNA
(stovky až tisíce bp)

- většinou transkripce z oblastí, kde nejsou geny strukturní
- ale i uvnitř intronů nebo exonů
- koordinovaná transkripce s hnRNA

Jak vznikají miRNA – II?

RNA polymeráza II

pri-miRNA (100s-1000s bp)

RNáza III - DROSHA

odštěpení okrajů a vznik
pre-miRNA (70 bp, vlásenka)

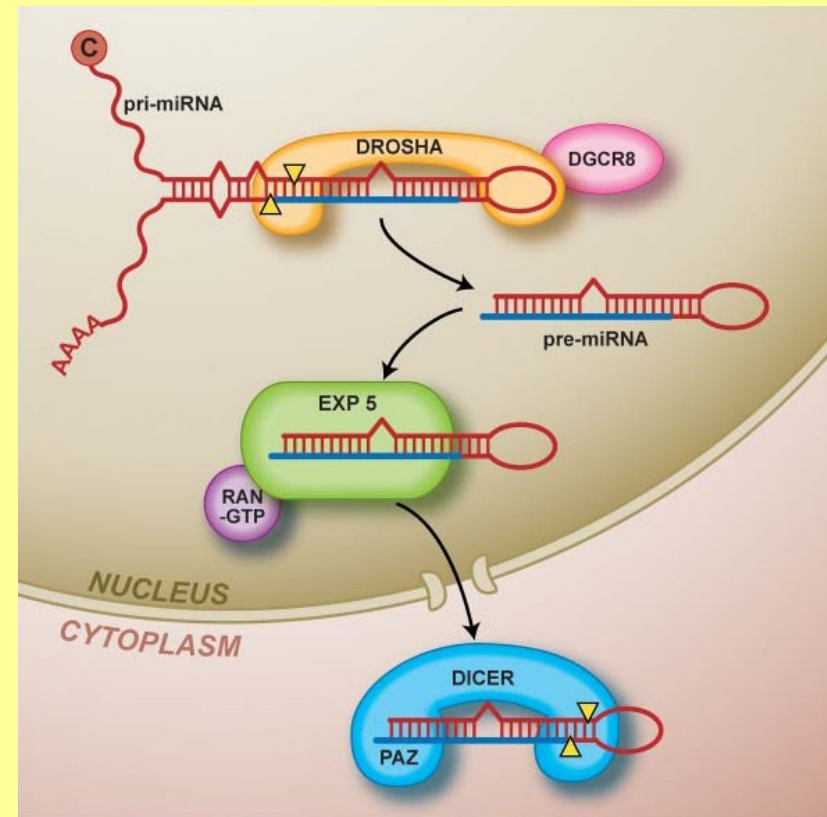
export do cytoplasmy

RNáza III - DICER

úprava na dsRNA = miRNA/miRNA* (21 bp)

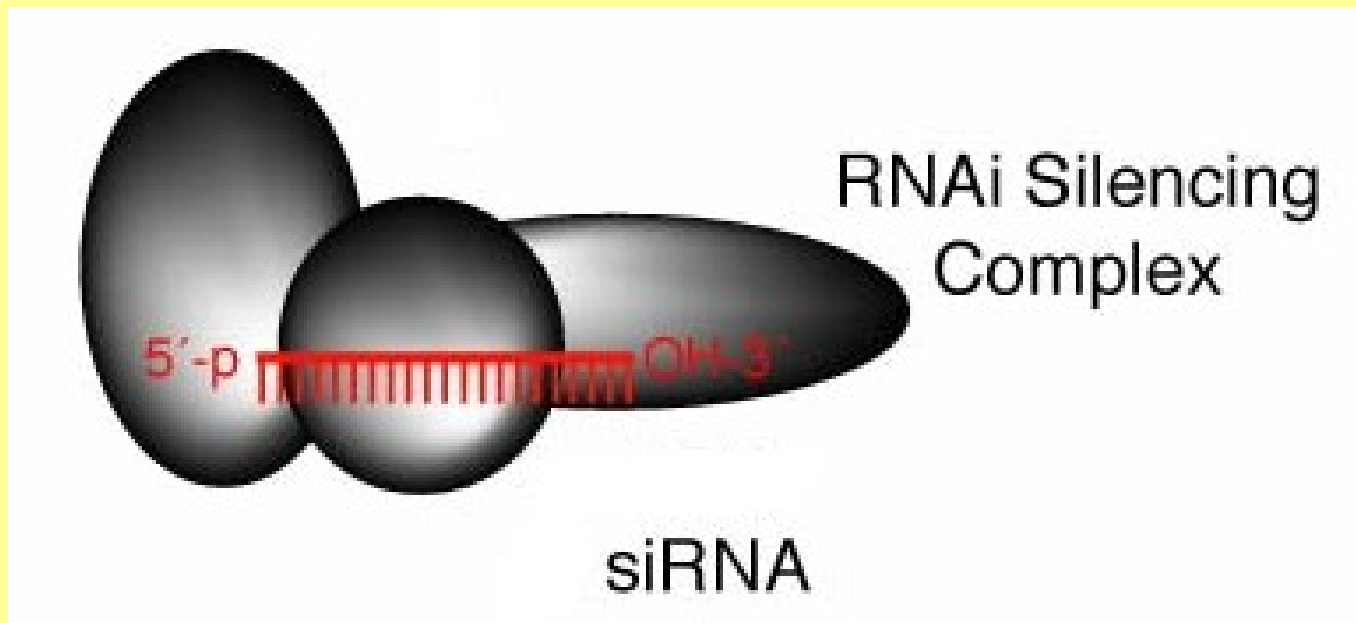
degradace miRNA*

akce miRNA



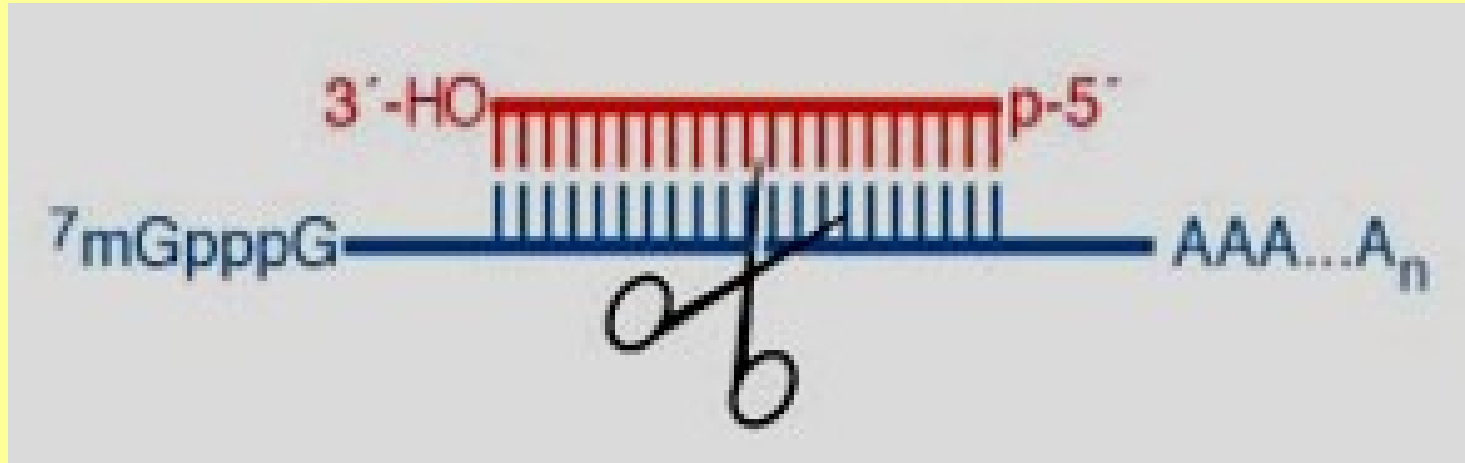
RNA interference I

siRNAs nebo miRNA je inkorporována do „RNA-induced silencing complex“ (RISC)



RNA interference II

Na základě homologie siRNA nebo miRNA k mRNA způsobí RISC komplex degradaci této mRNA



Jaký je rozdíl mezi miRNA a siRNA?

- **obojí regulují expresi**
- **siRNA má původ v dsRNA**
- **siRNA často souvisí s cizorodou RNA (obvykle virovou) a je 100% komplementární**
- **miRNA pochází z molekul ssRNA, která formuje vlásenkové dsRNA struktury**
- **miRNA reguluje post-transkripční genovou expresi**

Další rozdíly mezi siRNA a miRNA

siRNA

- **dsRNA**
- **ochrana před viry a transpozony**
- **ochrana před nadprodukcí**
- **způsobují degradaci cílových molekul**
- **absolutní komplementarita s cílovou sekvencí**

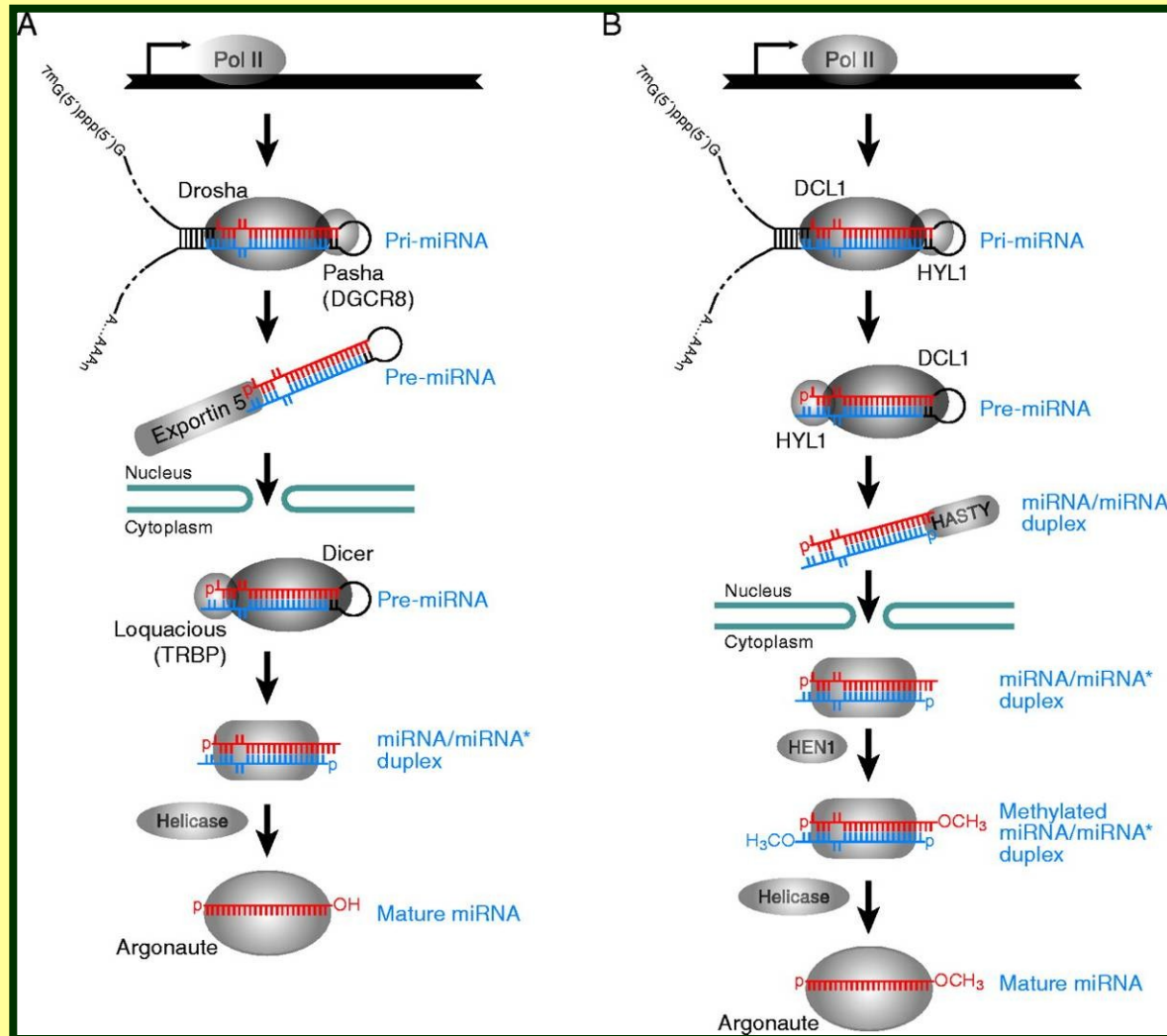
miRNA

- **ssRNA (vlásenky)**
- **regulace ontogeneze a vývojových procesů**
- **nezpůsobují degradaci, jen blokádu translace**
- **komplementarita s cílovou sekvencí není absolutní**
- **vznikají činností RNA polymerázy II**

Rozdíly v biogenezi miRNA

živočichové

rostliny



Rozdíly mezi živočišnými a rostlinnými miRNA

Rostliny

Živočichové

Nachází se:

intergenové oblasti

intergenové oblasti, introny

Shluky miRNA:

vzácné

běžné

Mechanismus působení:

mRNA-štěpení

represe translace

Místo vazby na mRNA:

otevřený čtecí rámeček

3'- konec

Shrnutí RNA interference

ROSTLINY

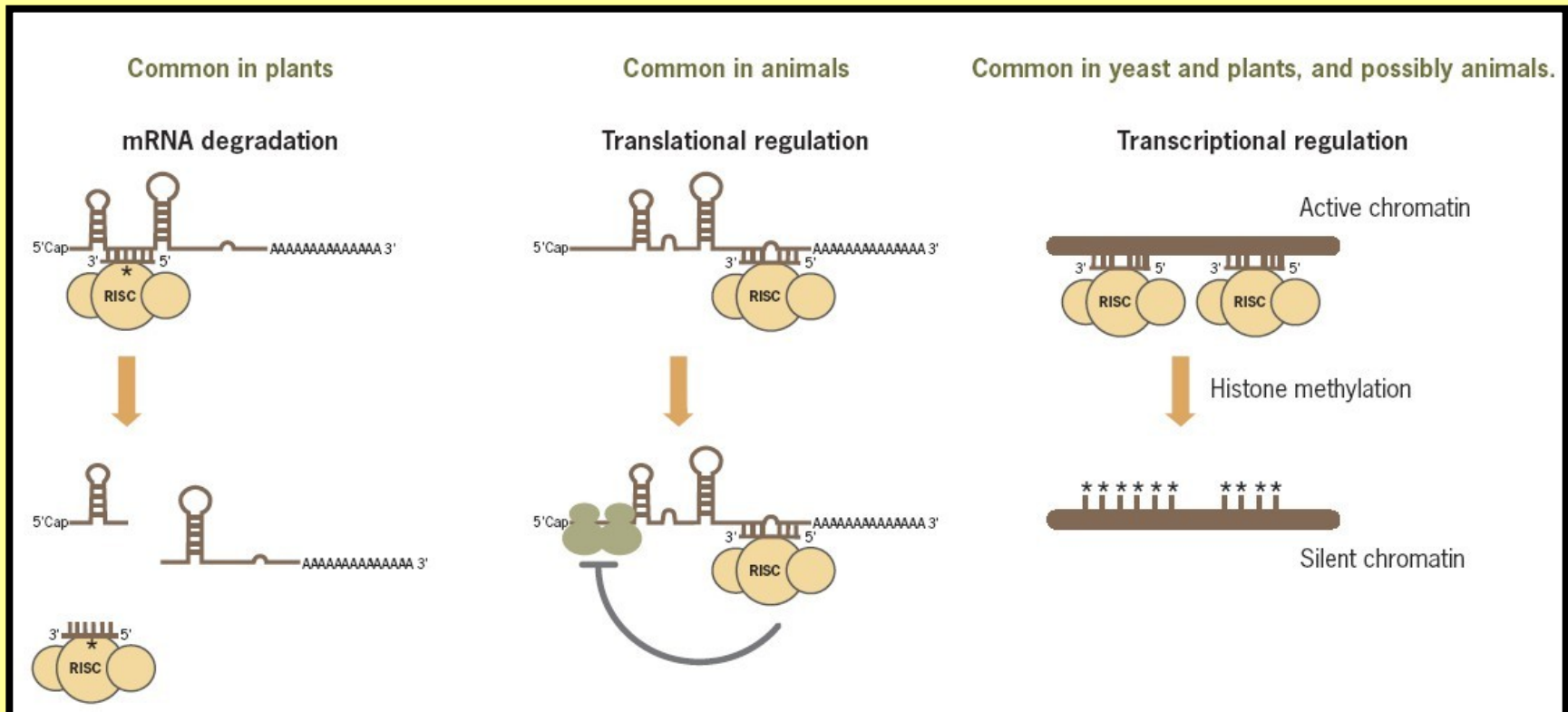
ŽIVOČICHOVÉ

KVASINKY,
ROSTLINY,
živočichové

degradace
mRNA

regulace
translace

regulace
transkripce



miRNA působí v ontogenezi živočichů

- **Regulace přesmyku exprese genů z mateřské mRNA do mRNA zygoty (viz. skriptá)**

miRNA a imunitní systém u rostlin

➤ **Indukce imunitní odpovědi u rostlin**

- 1) Po ataku pseudomonádami transkripce specifických miRNA (miR393)**
- 2) Ty inhibují expresi receptorů pro auxiny a tím auxinové signální dráhy**
- 3) To vede ke snížení citlivosti k bakteriální infekci**

Existuje ale i alternativní systém mimo miRNA

miRNA působí v ontogenezi rostlin

- **Působí jako signál během časných vývojových fází. Tento signál se zapamatuje i pro pozdější vývoj prostřednictvím na RNAi závislých epigenetických mechanismech jako je například tvorba heterochromatinu.**
- **U rostlin se miRNA podílejí na funkci meristému, vzniku orgánové polarity, vývoji vaskulárních struktur, vývoji květu a odpovědi na hormonech.**
- **Téměř polovina transkripčních faktorů je cílovou molekulou miRNA.**

piRNA = Piwi-interacting RNA



piRNA = Piwi-interacting RNA

- objeveny v myším spermatu
- vyskytují se u obratlovců i bezobratlých
- tvoří komplexy s Piwi proteiny
- působí na ontogenezi (nejsou-li transkribovány nevznikají spermatické buňky)
- **transportují miRNA k cílovým sekvencím !!!**

- délka 26 až 31 bp
- *in silico* analýzou bylo popsáno 52 934 kandidátních molekul piRNA u myší, 52 099 u člověka a 47 024 u krys
- vznikají z několika málo clusterů mimo genové oblasti jako ssRNA

Předpokládané funkce piRNA



- **modulují transkripci ?**
- **podílejí se na skladování RNA v procesních tělíkách ?**
- **spekuluje se též o jejich možném podílu na přenosu dědičné informace jinými mechanismy než je replikace DNA ?**
- **mohou působit na úrovni histonů, DNA nebo RNA ?**
- **možná štěpí cílové sekvence nebo mění strukturu chromatinu ?**

Využití siRNA a miRNA

- **Analýza funkce genů**
- **Nové genové terapie**
- **Nové antivirové vakcíny**
- **Transgenní organismy s dočasně vyblokovanou funkcí určitého genu**

- **Použití iRNA nespadá pod nakládání s GMO**
- **Použití kazet produkujících iRNA ale ano !**

Terapeutické aplikace RNAi - I

- 1) Primárně - RNAi jako antivirové látky, blokují replikaci virového genomu a expresi virových genů. Nejčastěji uvažovaným cílem RNAi terapie je virus HIV.**
- 2) Kontrola genové exprese ovlivňováním epigenetických změn v lokální struktuře chromatinu.**
- 3) Předpokládá se, že 35% až 70% lidských genů je přepisováno do transkriptů hnRNA, které podléhají alternativnímu sestřihu. Defekty v procesu alternativního sestřihu vedou k řadě onemocnění. RNAi by mohla být použita k zablokování defektně sestřižených struktur a v důsledku toho k inhibici exprese defektního genu.**

Terapeutické aplikace RNAi - II

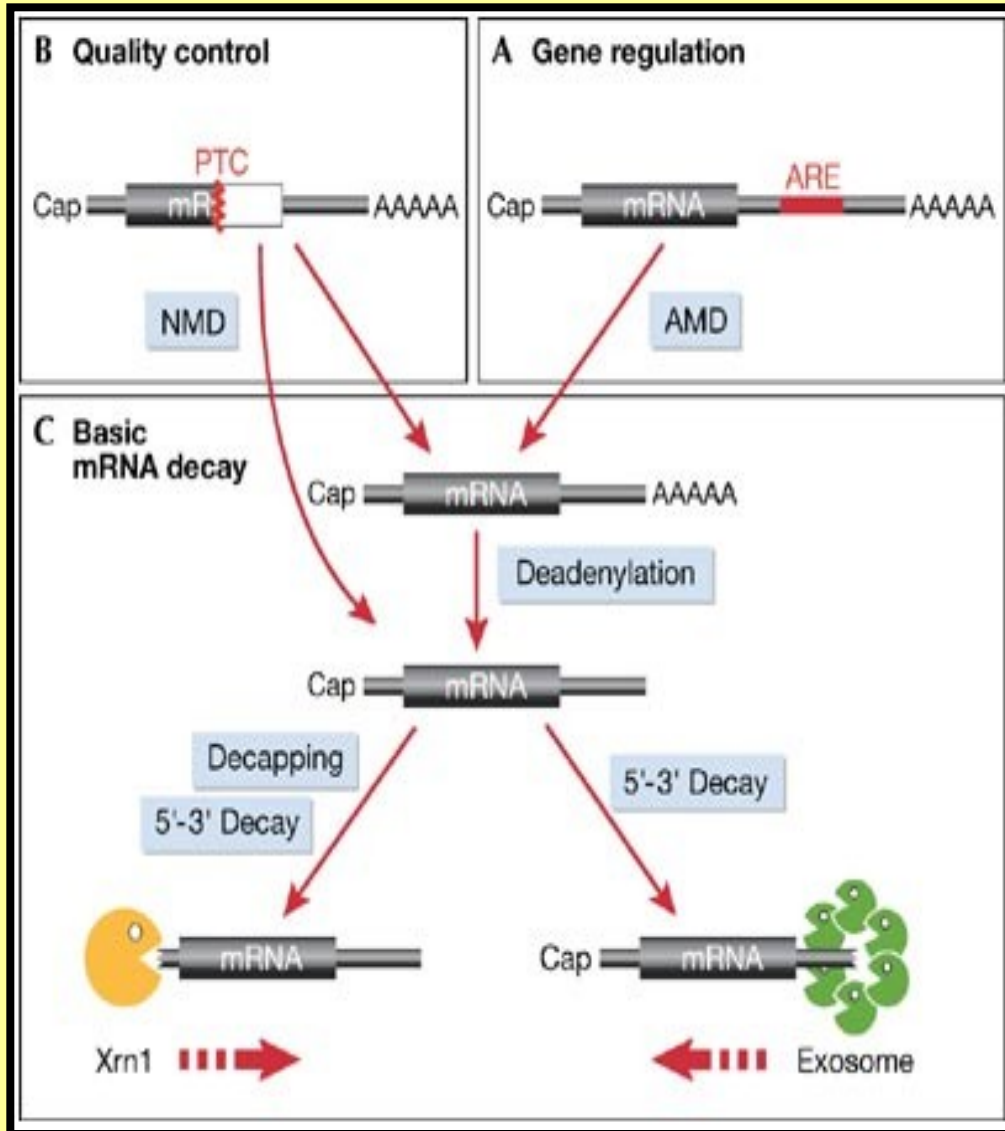
- 4) RNAi mohou být zacíleny proti genům, které jsou spojeny s metabolickými poruchami. Například v léčbě diabetes mellitus typu II, kde centrální roli v rezistenci k inzulínu hrají poruchy signalizace v důsledku změn v expresi genů.**
- 5) Genové „knock-outy“ v genomu původce malárie, *Plasmodium falciparum*, mohou sloužit ke studiu jeho životního cyklu a k vyhledávání nových terapeutických cílů, kromě toho, že terapeutikem by mohly být samotné RNAi.**

Molekuly RNAa aktivují geny !

- **Popsány v listopadu 2006 skupinou z „University of California, San Francisco, USA“**
- **Tento jev byl pro vědeckou komunitu překvapivý, protože ho po objevu siRNA, miRNA, piRNA aj., už nikdo nepředpokládal**
- **Nejedná se přitom o nepřímý účinek spočívající ve vypnutí genu, což ve svých důsledcích vyvolá aktivaci genu jiného, ale o vliv přímý**
- **Mechanismus účinku RNAa ale doposud nebyl objasněn – novinky v listopadu 2007!**
- **RNAi vypínají geny zpravidla na dobu 5 až 7 dnů, RNAa aktivuje geny na dobu 13 dnů**

Rok 2007

Obecné schéma degradace mRNA



**Stabilizace
sekvence ARE
vede k indukci
genové exprese !**

**miR369 chrání
sekvence ARE a
tím degradaci
mRNA !**

Propojení funkce miRNA a siRNA

Autoři článku vyslovili předpoklad, že regulace translace prostřednictvím částic microRNP osciluje mezi represí a aktivací v závislosti na fázi buněčného cyklu

- **v proliferujících buňkách reprimují translaci**
- **ve fázi G1/G0 (která často předchází diferenciaci) translaci aktivují**

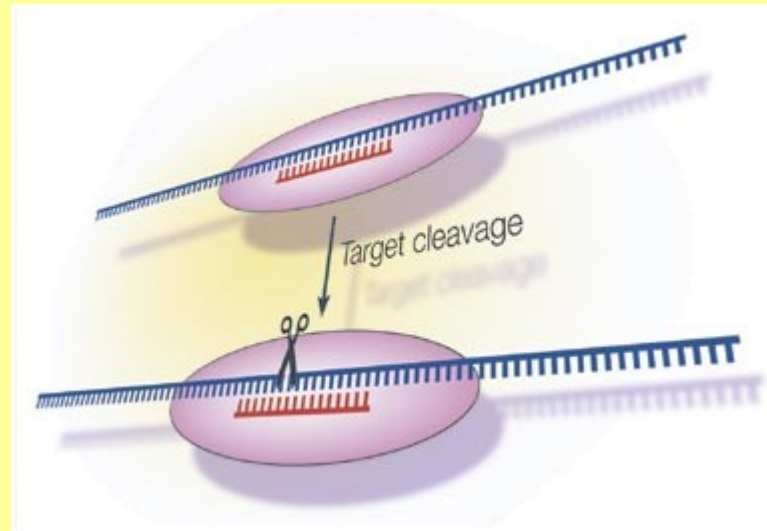
Vasudevan et al. (2007): ScienceXpress, November 29, 1-4

Molekuly RNAa v terapii

- 1) Jako léčivo mohou být využity samotné RNAa
- 2) To, že malá interferující RNAi může působit nejen jako **negativní** ale i **pozitivní regulátor** znamená, že při jejich použití se musí zvažovat hledisko nejen očekávaného **vlivu na terapeutický cíl** (ve smyslu **negativní regulace**), ale také možné **vedlejší účinky na geny jiné** (ve smyslu jejich možné **aktivace**)

RNA interference u bakterií a Archaeae?

První zmínka v roce 2007?



**Sheilagh Molloy (2007): First evidence of prokaryotic RNAi?
Nature Reviews Microbiology 5, 329.**

CRISPR systém

V roce 2008 byl popsán RNAi analogický systém určený k degradaci virových NA

- **Využívá interní „antivirové“ sekvence začleněné v obrácených repetících (CRISPR)**
- **CRISPR = clusters of regularly interspaced short palindromic repeats**
- **Po transkripci této sekvence dochází k jejich postupnému štěpení Cas proteiny**
- **Výsledné produkty interferují s nukleovou kyselinou vstupujícího viru**

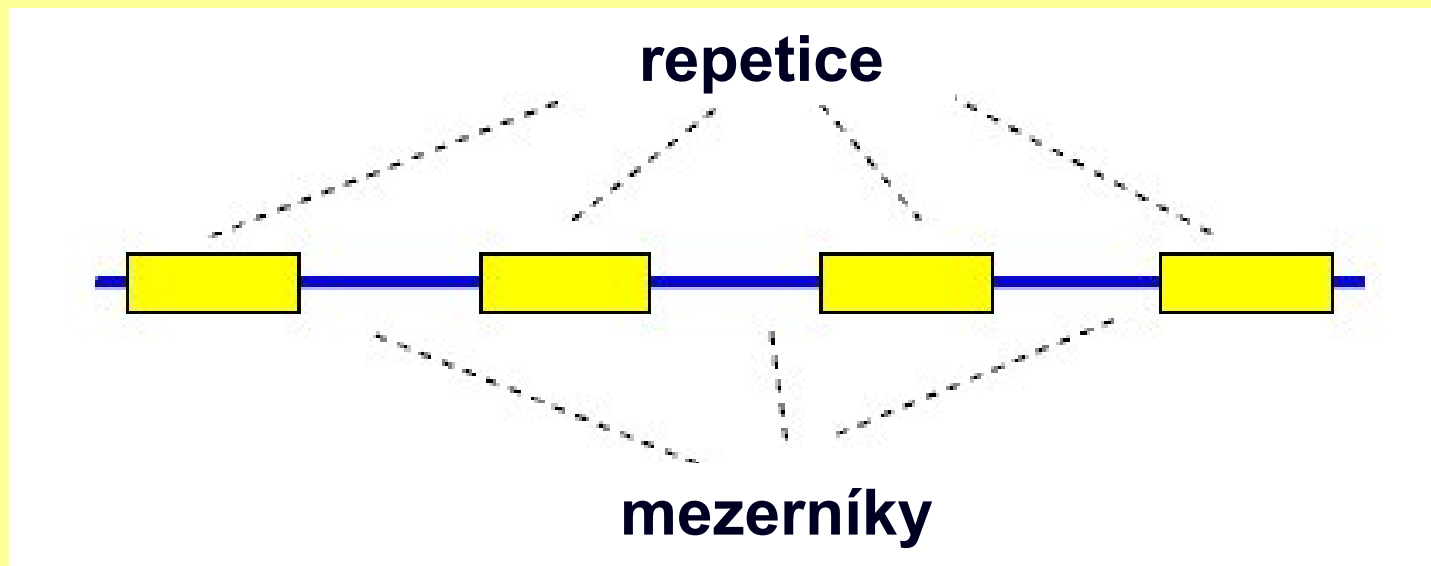
Brouns et al. (2008): Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes, Science 321, 960-964

Struktura CRISPR

Ke konci roku 2008 byly CRISPR popsány u asi 40% sekvenovaných eubakterií a téměř všech archeí

Všechny obsahují krátké repetice o délce 24 až 48 nukleotidů a mezerníky o přibližně stejné délce

Marraffini a Sontheimer (2008): Science 322, 1843 - 1845



Edgar (2007): BMC Bioinformatics 8:18

CRISPR omezují horizontální přenos DNA u Staphylococcus

Mezerník v oblasti CRISPR kóduje crRNA

Sekvence crRNA je homologická ke genu *nickase*, který se vyskytuje téměř ve všech konjugativních plasmidech rodu *Staphylococcus*

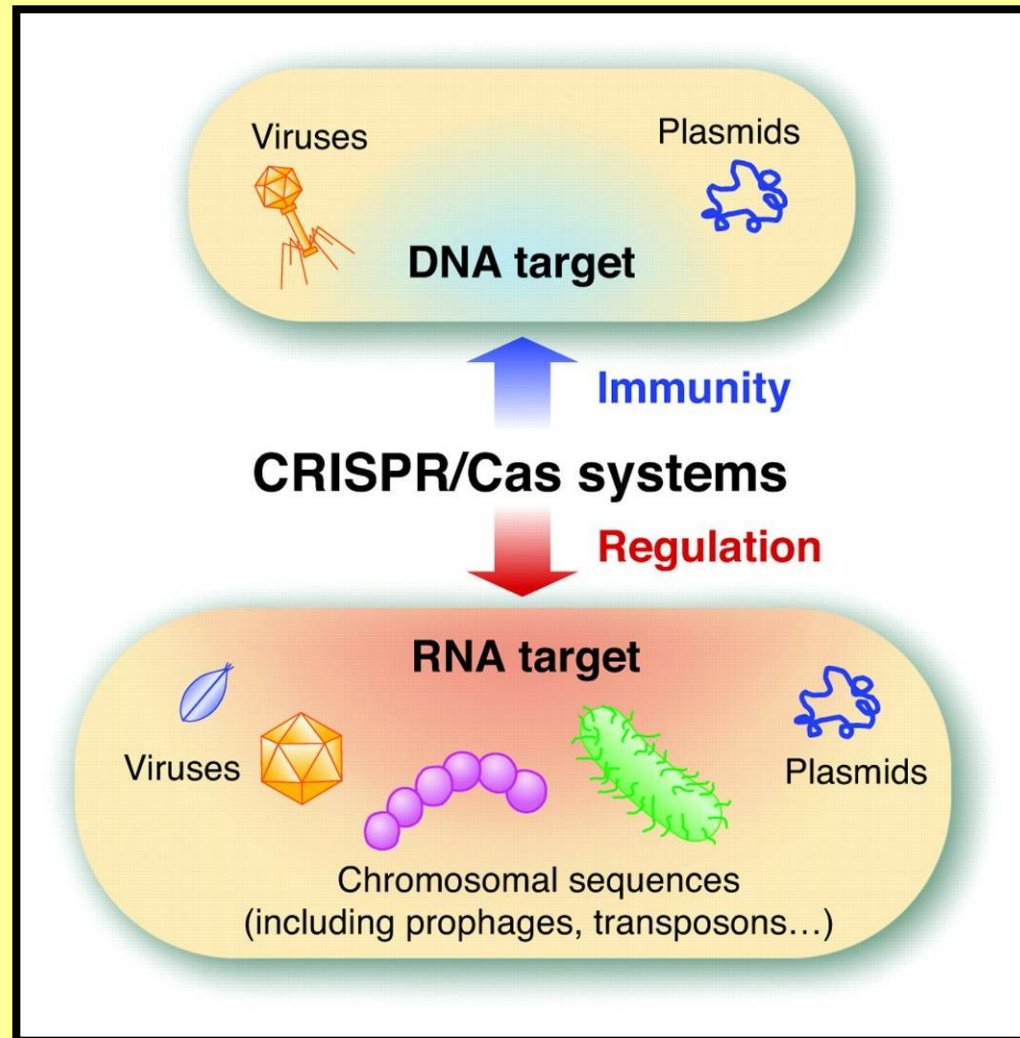
Vazba crRNA k *nickase* brání konjugaci a transformaci plasmidů

K interferenci dochází na úrovni crRNA-DNA, nikoli crRNA-mRNA

CRISPR ve svém důsledku brání šíření rezistence k antibiotikům

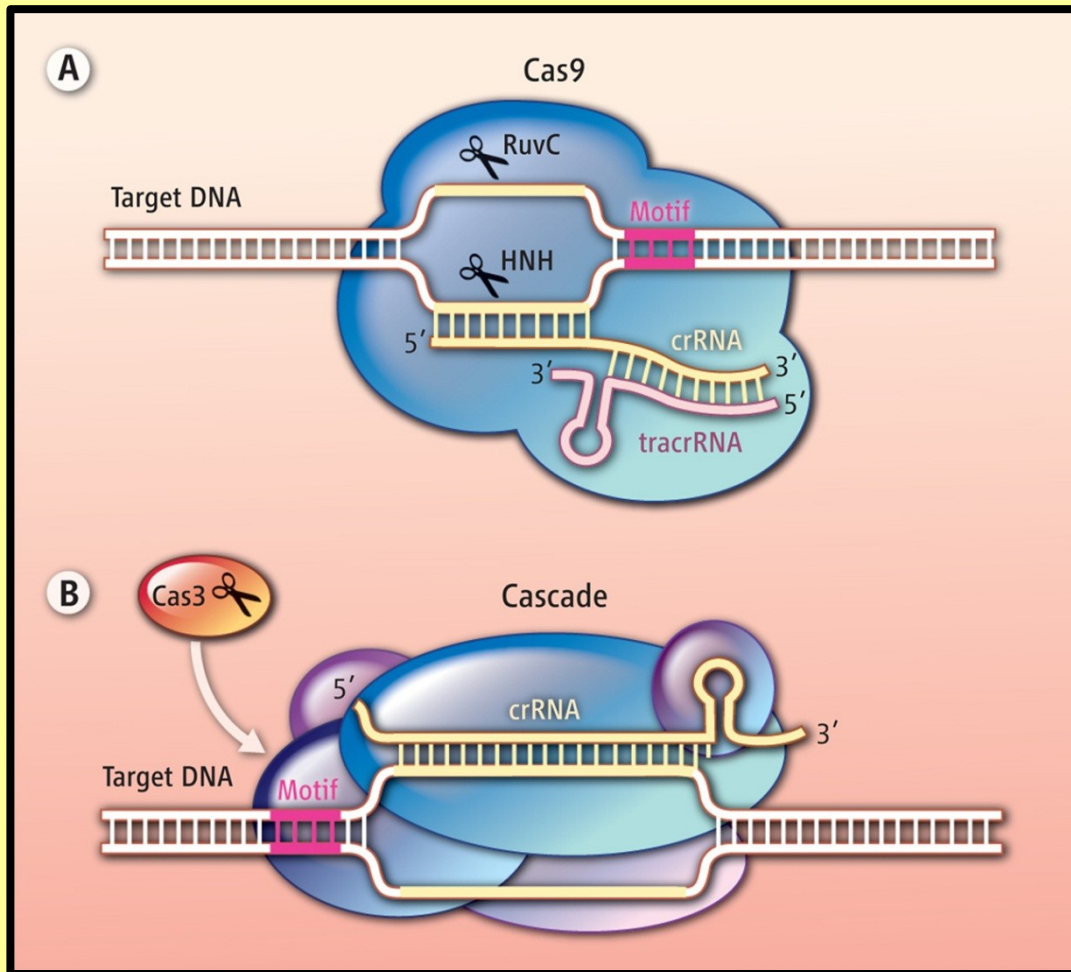
Marraffini a Sontheimer (2008): Science 322, 1843 - 1845

CRISPR interference



P. Horvath et al., *Science* 327, 167-170 (2010)

Mechanismus účinku



- A) Nukleáza Cas9 rozpoznává cílovou sekvenci prostřednictvím crRNA a tracrRNA**
- B) Procesu štěpení se účastní celkem 5 Cas proteinů; Cas3 je nukleáza a helikáza**

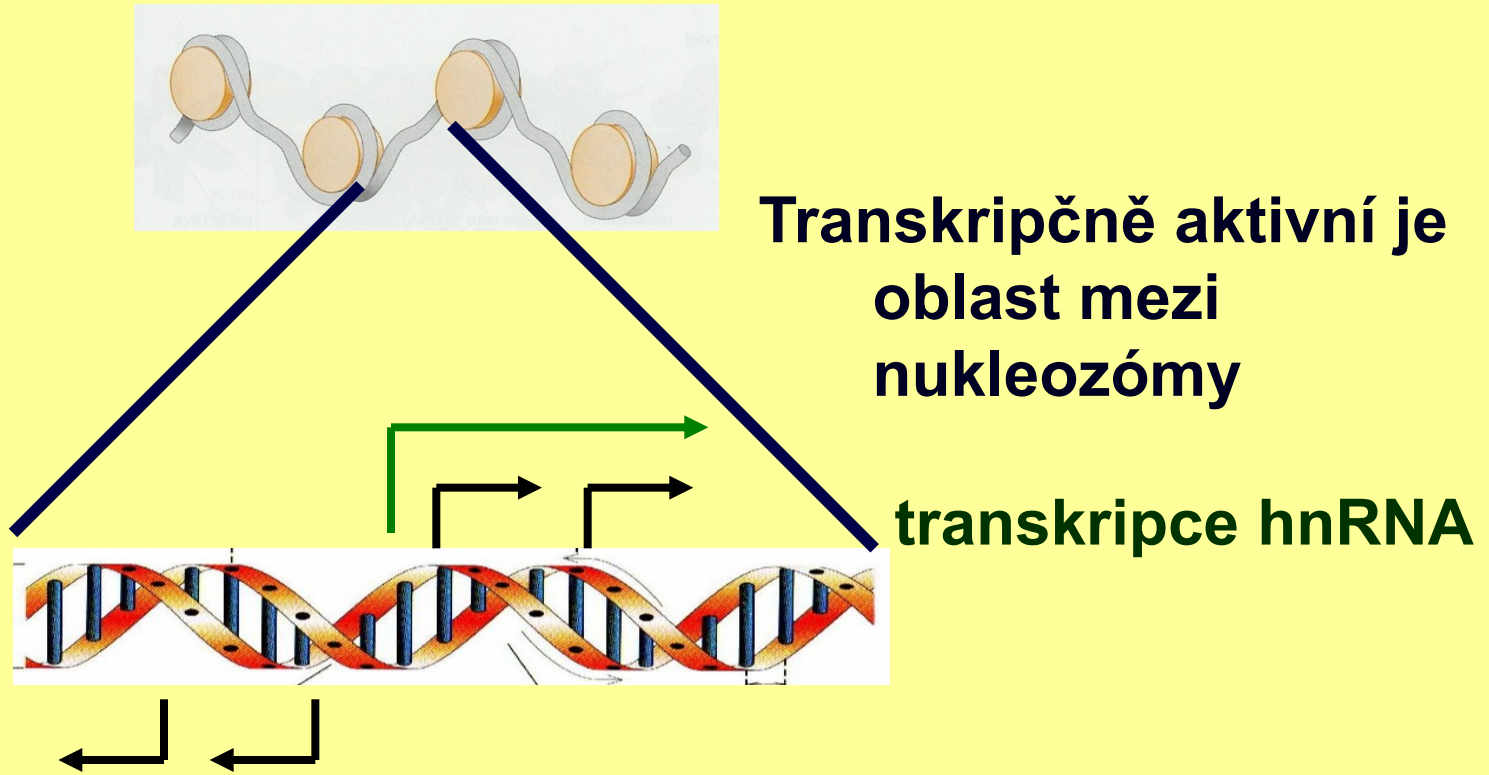
Brouns, SJJ (2012): Science 337: 808-809

Další novinky

Rok 2008

Prosinec 2008 – objev pasRNA

pasRNA = promotor associated RNA



Buratowski (2008): Science 322, 1804-1805

Prosinec 2008 – objev pasRNA

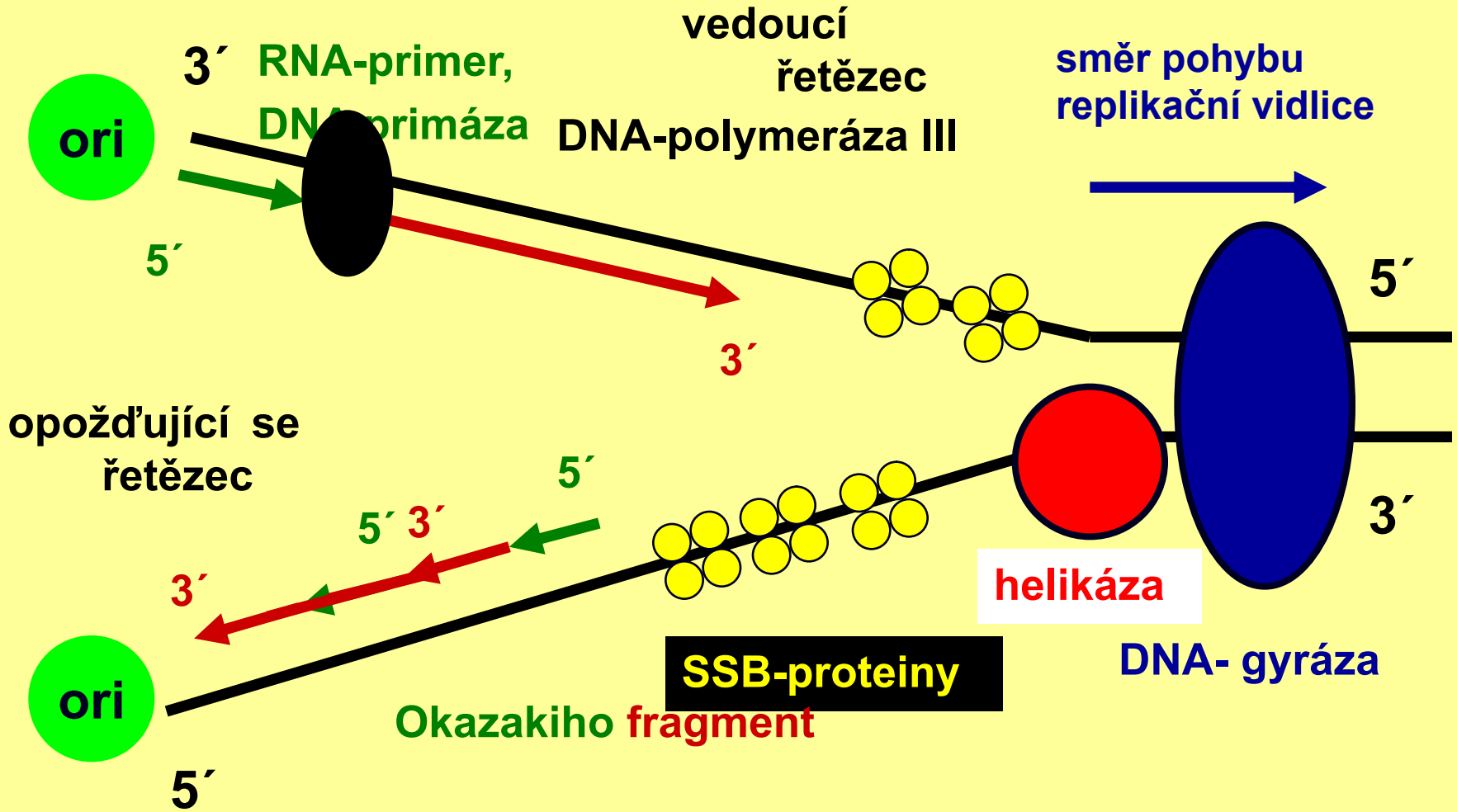
- **pasRNA je vlastně jednoduchou antimediatorovou RNA**
- **vzniká současně s transkripcí hnRNA**
- **syntetizuje je RNA polymeráza II**

- **pasRNA porušuje koncept promotoru ?**
- **Proč existují promotory, když dochází k expresi více než 90% ?**
- **Jsou dosud nepoznané promotory na 3´- konci transkripční jednotky ?**
- **Jedná se o abortivní transkripci z nespecifických promotorů ?**

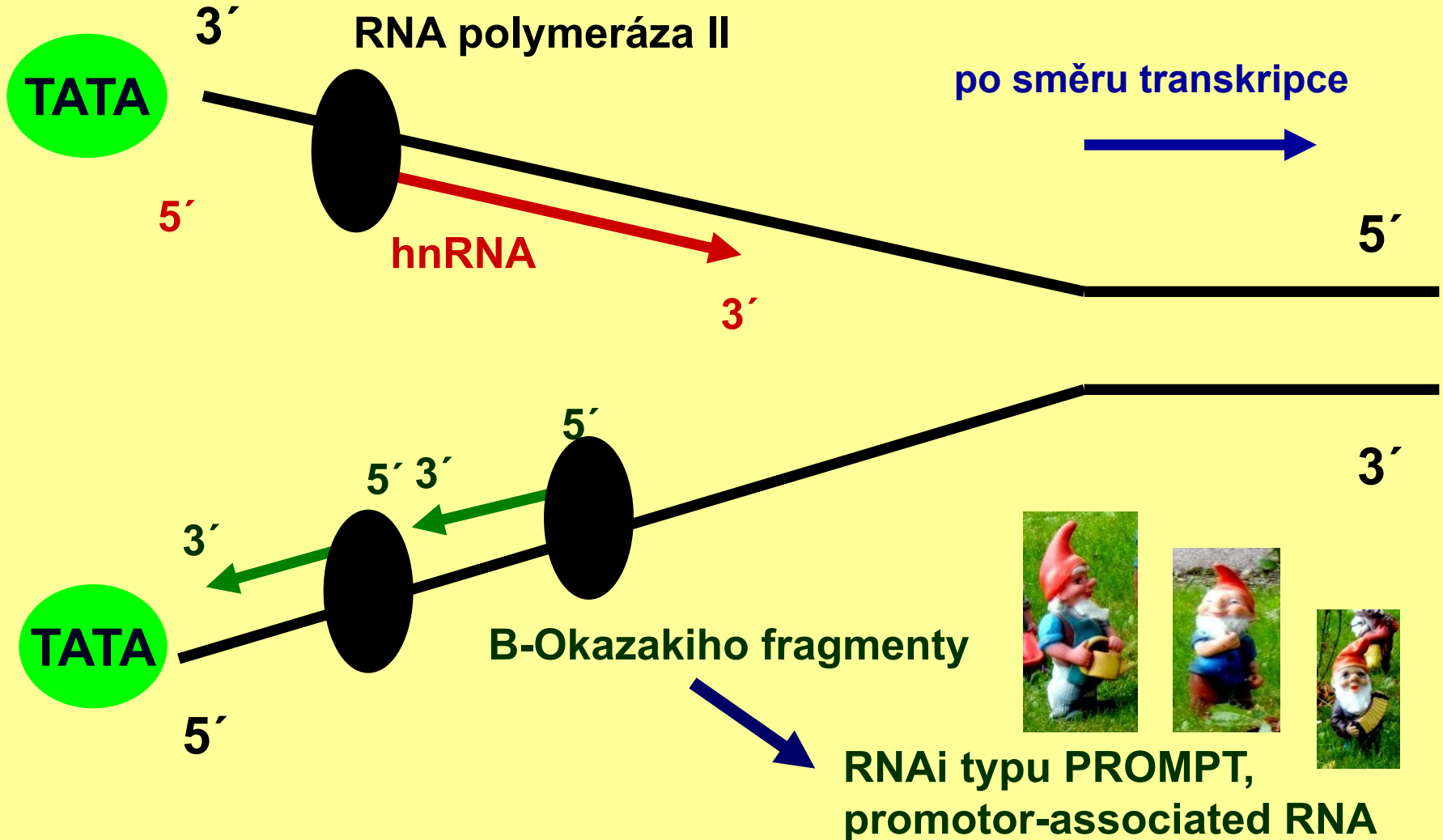
Model semidiskontinuální transkripce

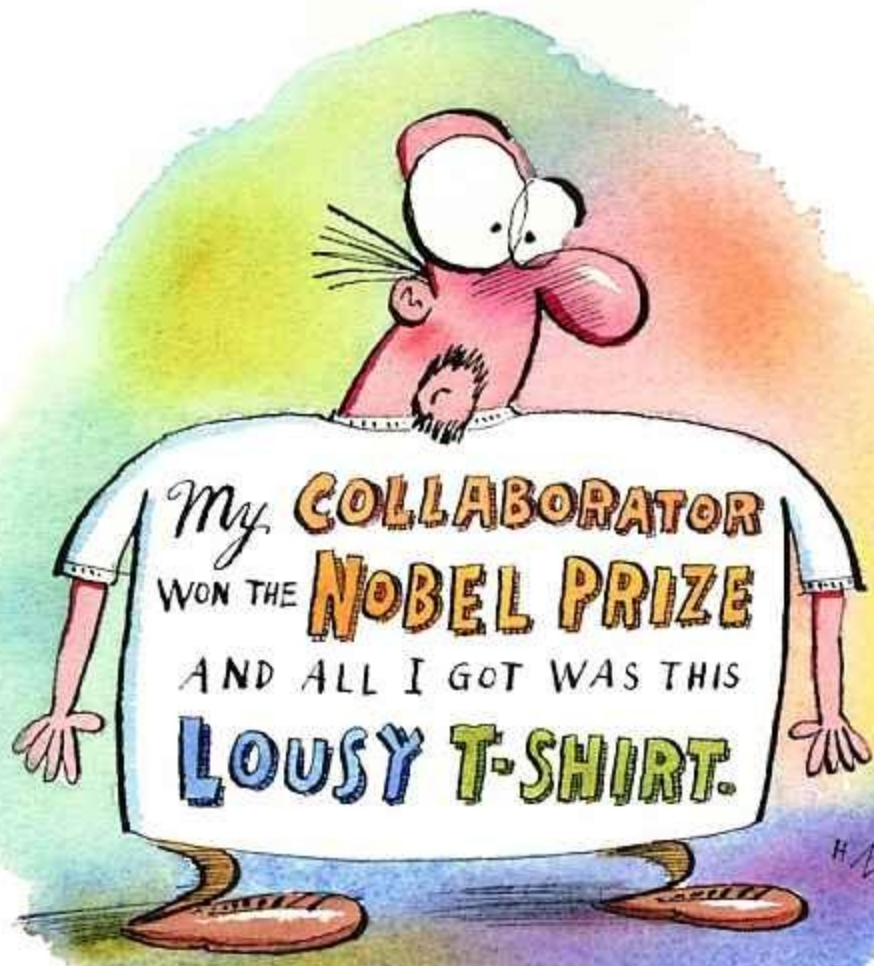
- **Vytvořil jsem na základě modelu replikace DNA**
- **Transkripce a replikace RNA jsou evolučně starší než replikace DNA**
- **Replikace DNA obsahuje prvky replikace RNA jako evoluční relikv**

Replikace DNA



Transkripce – model prosinec 2008





My **COLLABORATOR**
WON THE **NOBEL PRIZE**
AND ALL I GOT WAS THIS
LOUSY T-SHIRT.

Další čtení

www.evolucnigenomika.cz

Rok 2009 a 2010 ?



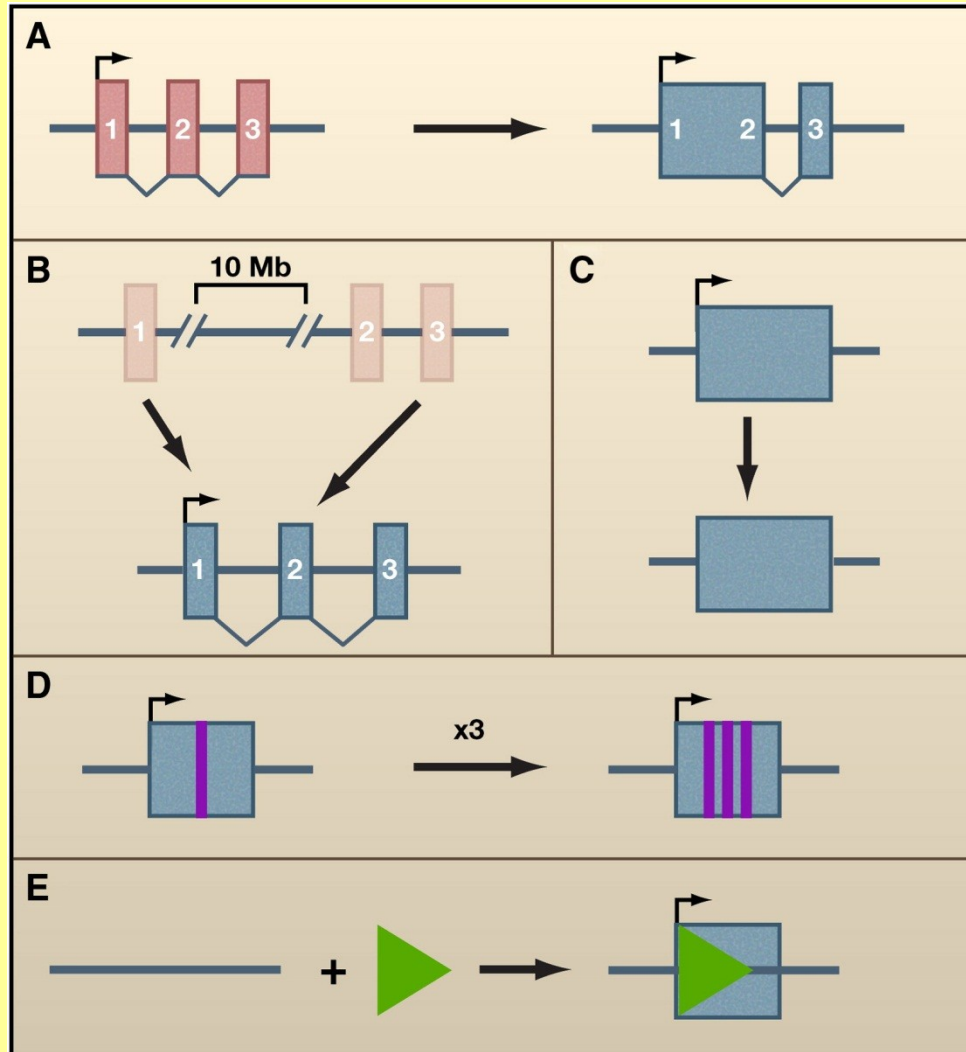
Hlavní objevy

- Dlouhé interferující molekuly RNA (lncRNA)
- Interference při vývoji mozkové tkáně
- Souhra transkripčních faktorů a RNAi
- Nové enzymatické funkce RNA

**lncRNA jsou předpovězené B-
Okazakiho fragmenty**

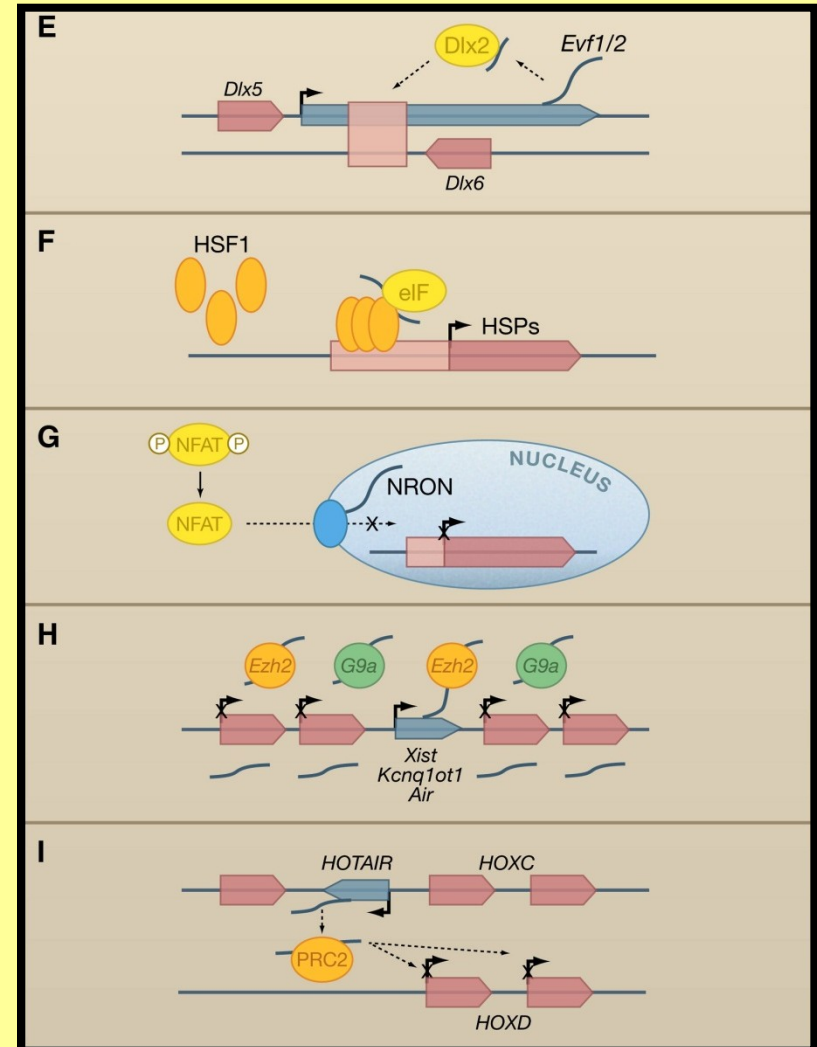
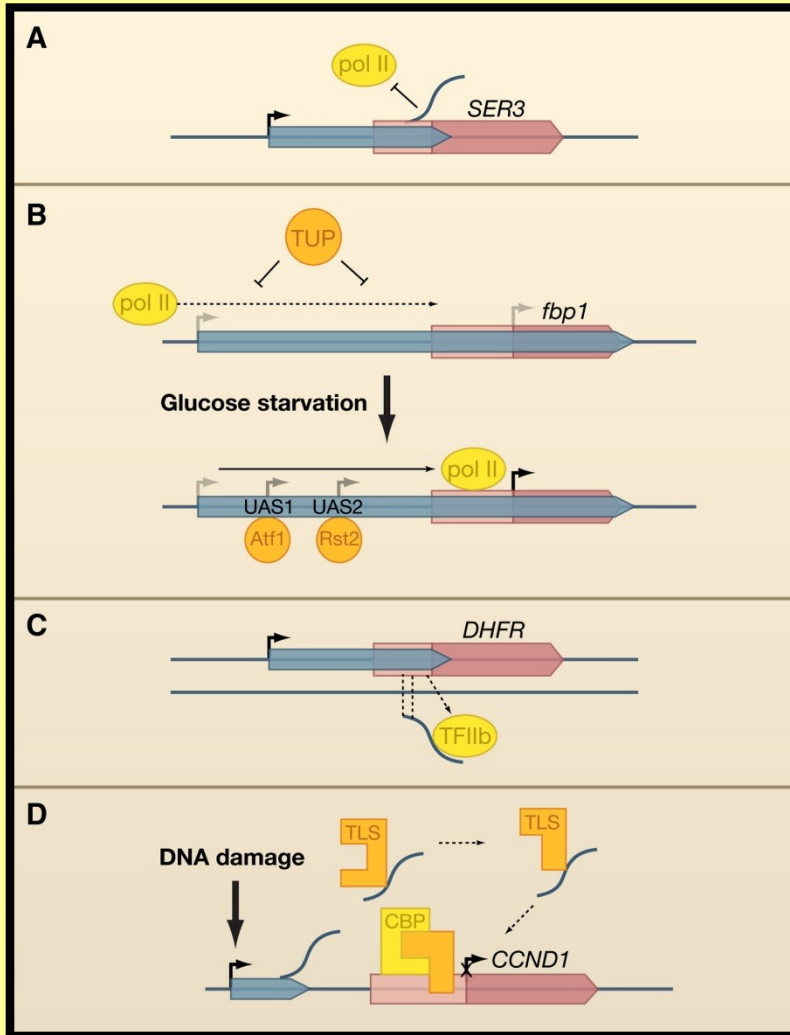


Jak vznikají lncRNA?



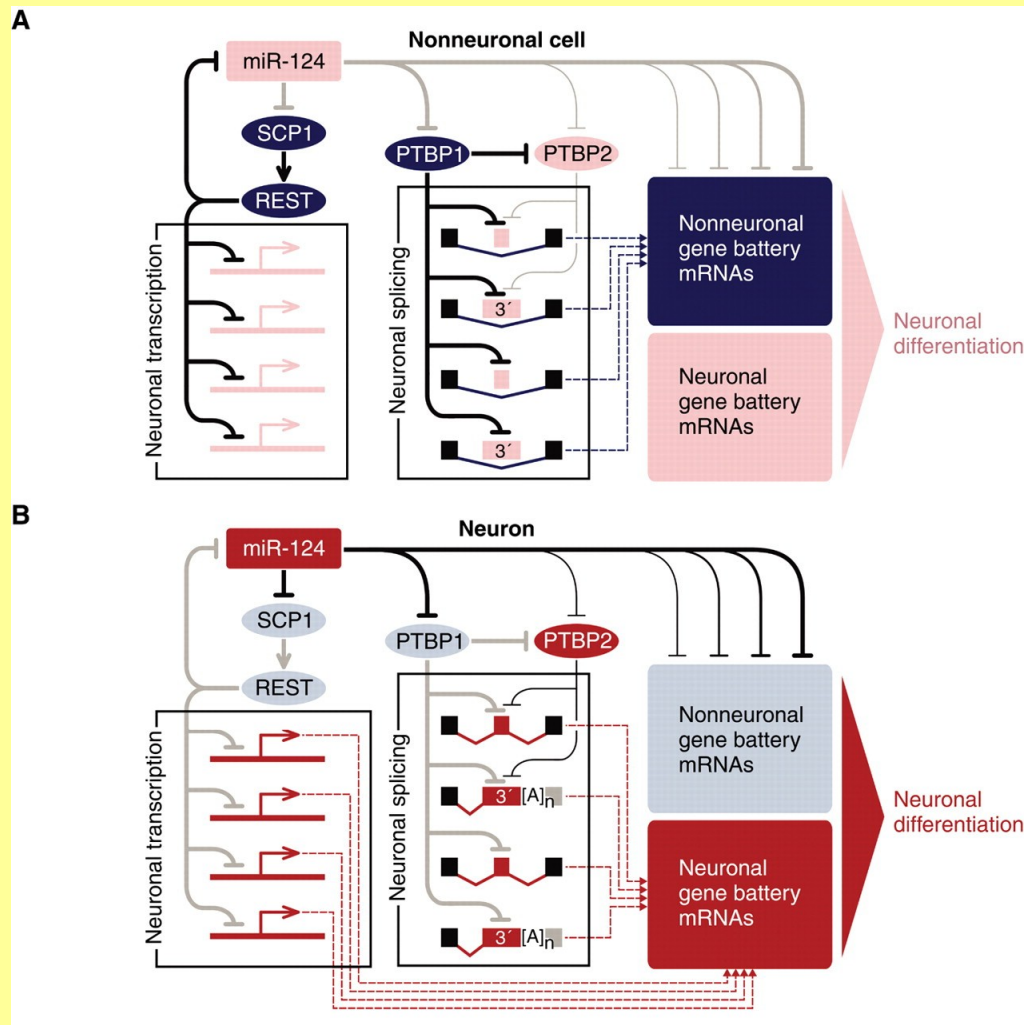
Ch.P. Ponting et al., Cell 136, 629-641 (2009)

Funkce lncRNA v regulaci transkripce



Ch.P. Ponting et al., Cell 136, 629-641 (2009)

Regulační síť MiR-124



E. V. Makeyev et al., *Science* 319, 1789 -1790 (2008)

Principy regulace TF a miRNA

	Transcription factors	miRNAs
Pleiotropy		
Combinatorial and cooperative activity		
Accessibility		
Regulation		
Network motifs		

O. Hobert Science 319, 1785 -1786 (2008)

Rok 2011?

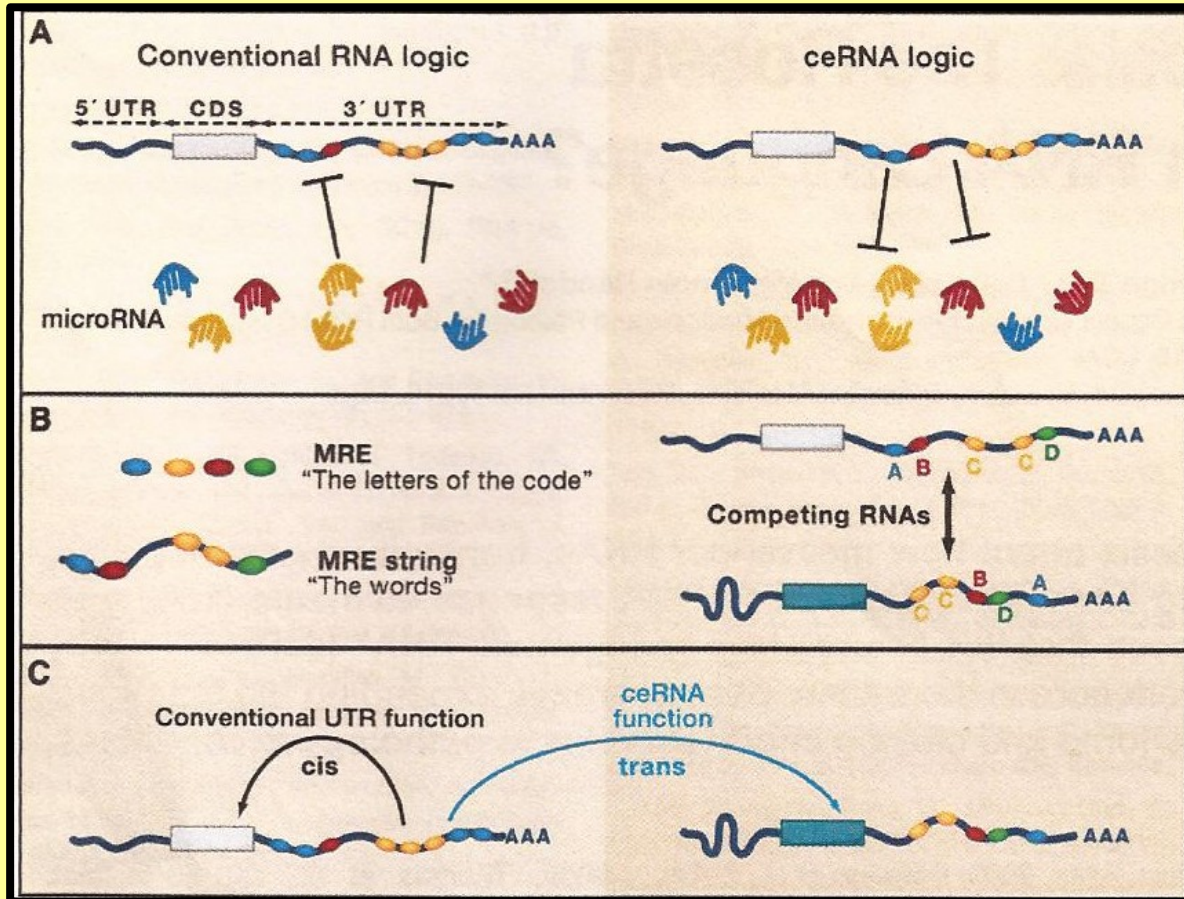


JAK SE U NÁS ŘÍKÁ, HLoupý, KDO DÁVÁ, HLoupěš, KDO NEBERE ...

Koncept ceRNA

- 1) Hypotéza, která se snaží osvětlit jak mRNA, transkripty pseudogenů a lncRNA interagují prostřednictvím tzv. „microRNA response elements“ (MRE)**
- 2) Vytváří úplně nový komunikační jazyk**
- 3) Vnáší termín „competing endogenous RNA“ (ceRNA)**
- 4) Snaží se vysvětlit patologické procesy, např. vývoj nádorů**

Koncept ceRNA

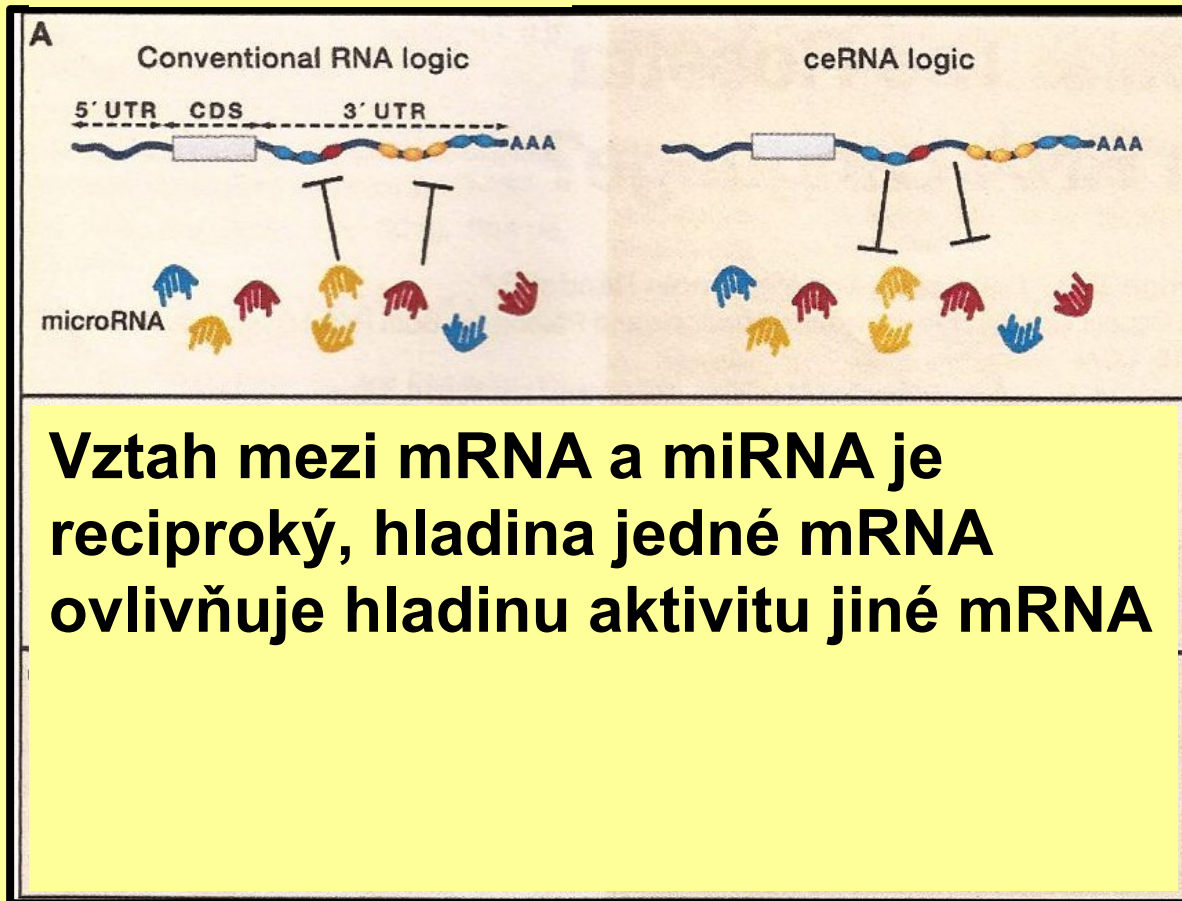


Salmena L. et al. (2011): Cell 146, 353-358, August 2011

Koncept ceRNA

Konvenční
logika

ceRNA
logika

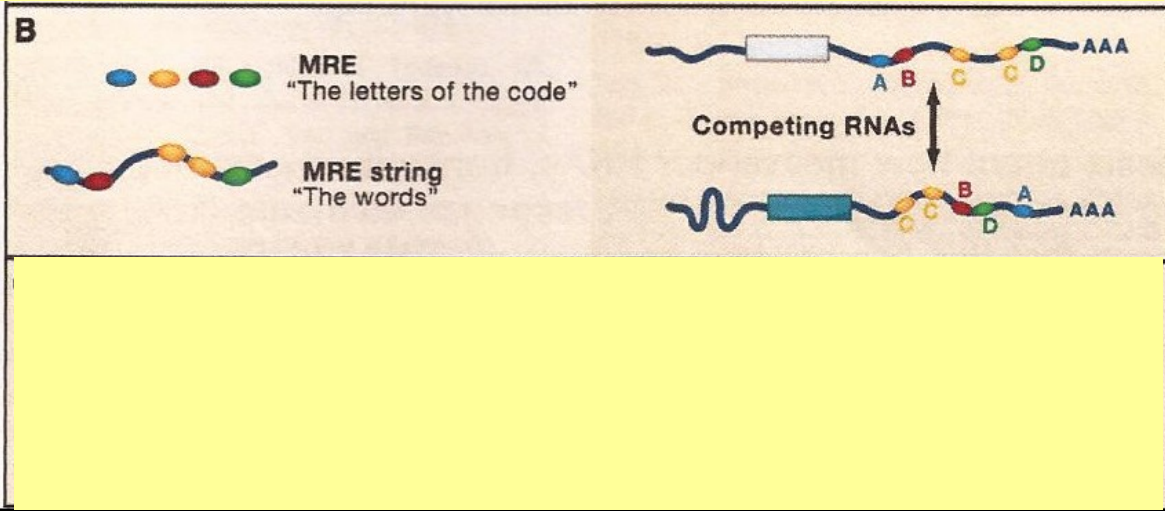


Koncept ceRNA

Konvenční
logika

ceRNA
logika

Molekuly RNA vzájemně interagují prostřednictvím MRE elementů, větší počet sdílených MRE znamená širší komunikaci a koregulaci

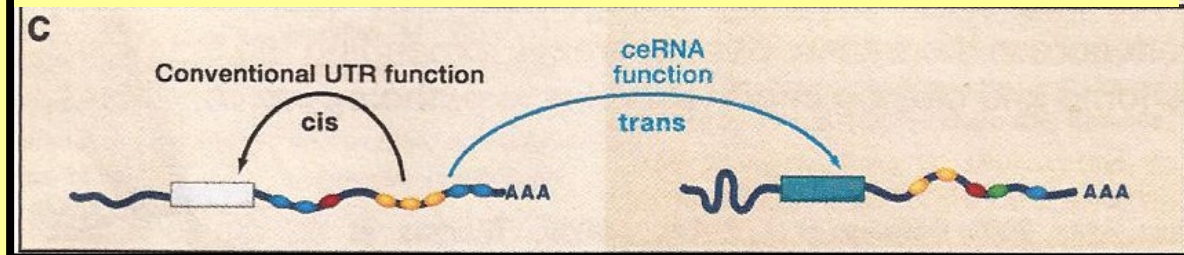


Koncept ceRNA

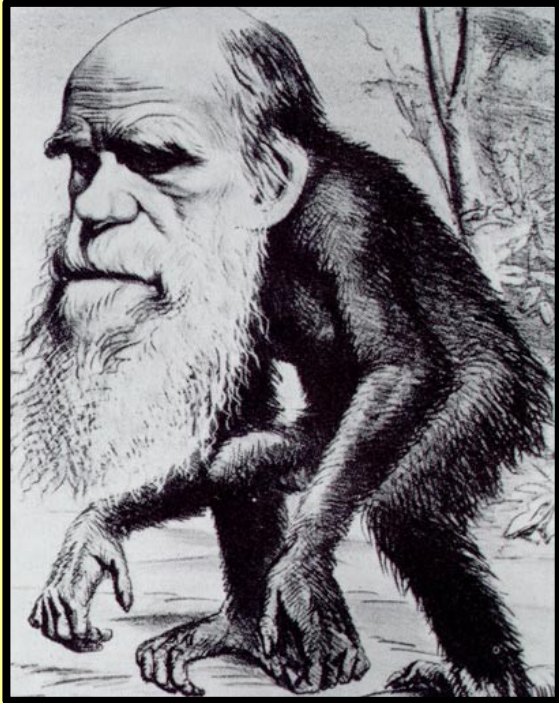
Konvenční
logika

ceRNA
logika

3'-UTR oblasti molekul RNA obsahují MRE, které mohou být regulovány mechanismem cis, tedy ovlivňovat sebe sama, nebo mechanismem trans, tedy prostřednictvím miRNA ovlivňují jiné RNA



Vliv miRNA na polidžtění opice



- 1) Vývojové profily miRNA a jejich cílových genů vykazují 3-5x vyšší rychlost změn u lidí než u šimpanzů
- 2) miR-92a, miR-454, a miR-320b jsou pravděpodobně ty regulátory, které jsou zodpovědné za specifický vývoj nervové soustavy u lidí

Somel et al. (2011): MicroRNA-Driven Developmental Remodeling in the Brain Distinguishes Humans from Other Primates, Plos Biology 9 (12), e1001214, December 2011