

Институтъ Цитологіи и Генетики

Въ среду, 3 октября

Состоится

ПУБЛИЧНАЯ ЛЕКЦІЯ О Р. Н. К.:

«Транскрипція - это только начало»

=устраиваемая=

для сотрудниковъ и аспирантовъ

<въ исполненіи к.б.н.>

Ивана Андреевича

Буркова

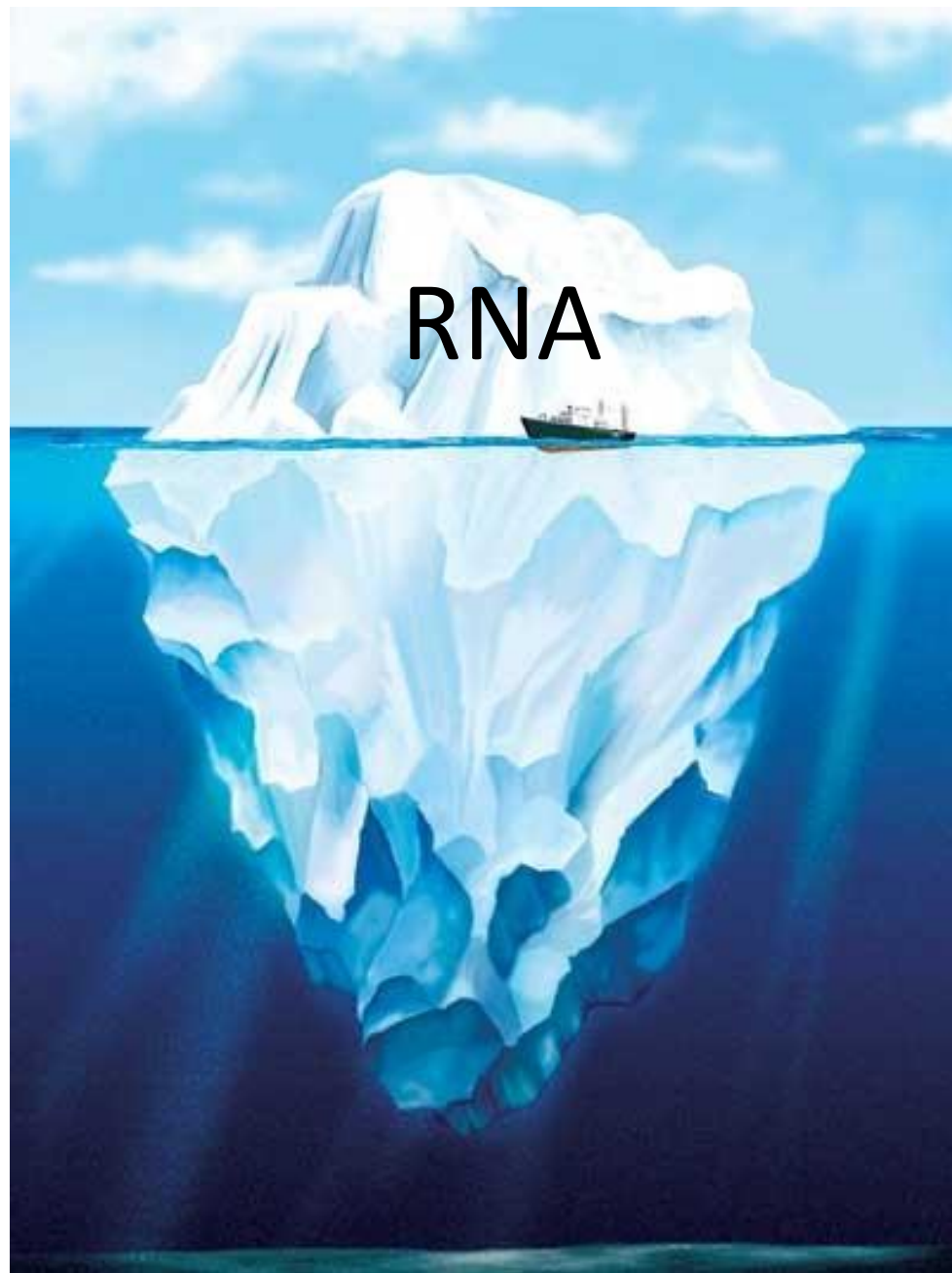
малороссійскій дивертисментъ

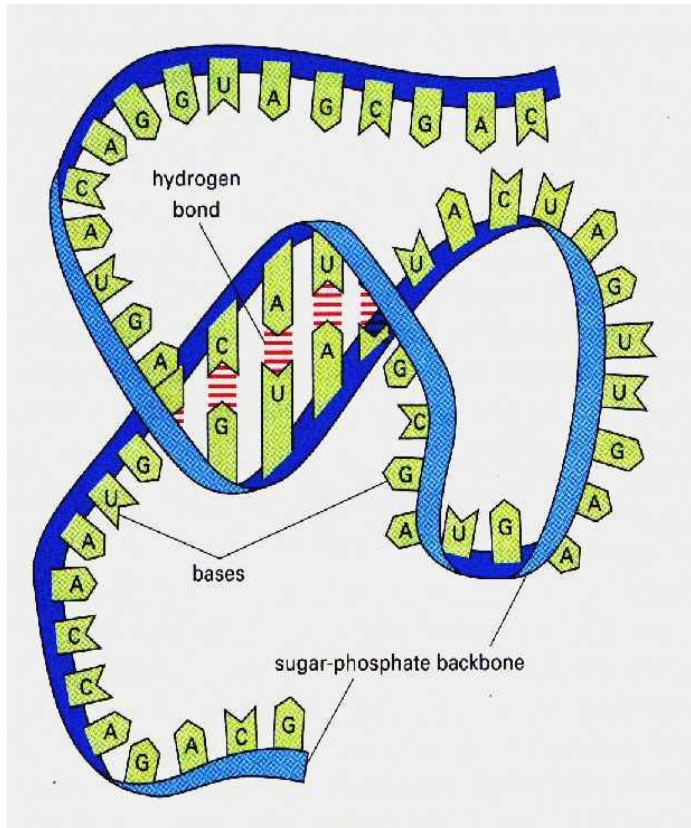
съ картинками и исторіями

Начало въ 4 часа дня

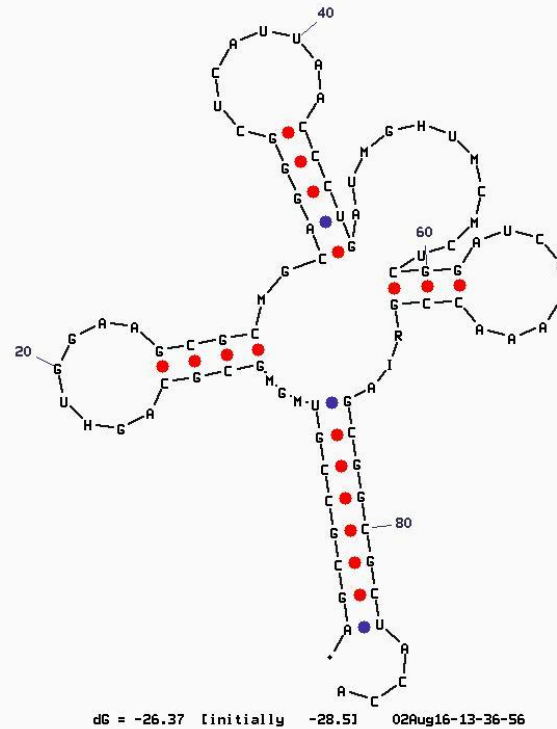
«Великолѣпный ангажементъ,
отъ транскрипціи и до
трансляціи!...»







p142.jpg by D. Stewart and M. Zuker
 © 2002 Washington University



История



- Описаны химические свойства РНК

- мРНК → белок
- Рибосомы
- Генетический код
- РНК полимеразы

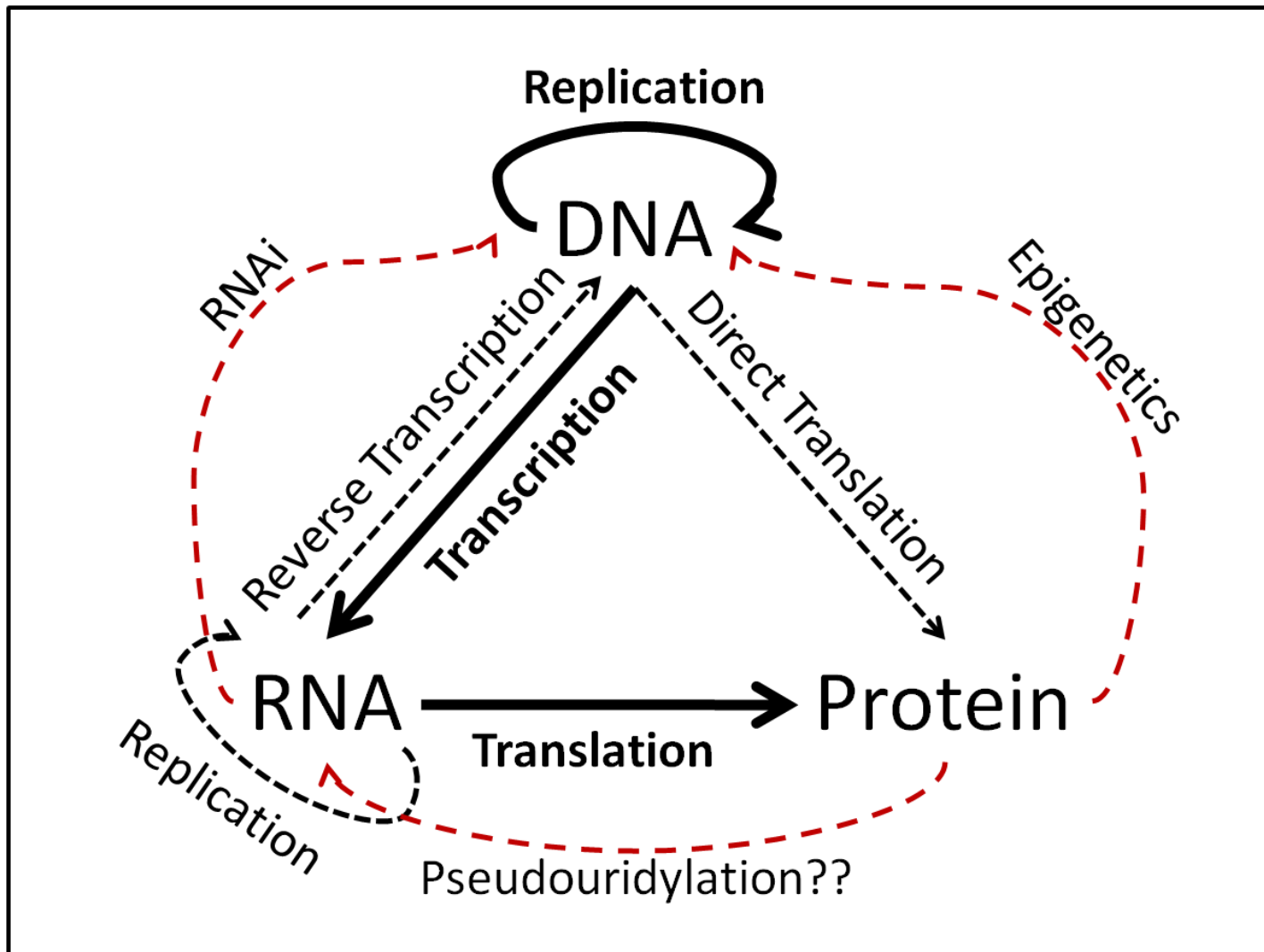
- Первый сиквенс
- Обратная транскриптаза
- Некодирующие нуклеотиды в транскрипте

- Малые РНК в ядре
- Трехмерная структура
- Интроны
- Альтернативный сплайсинг
- Рибозимы
- Мобильные элементы
- Сплайсосомы и сплайсинг

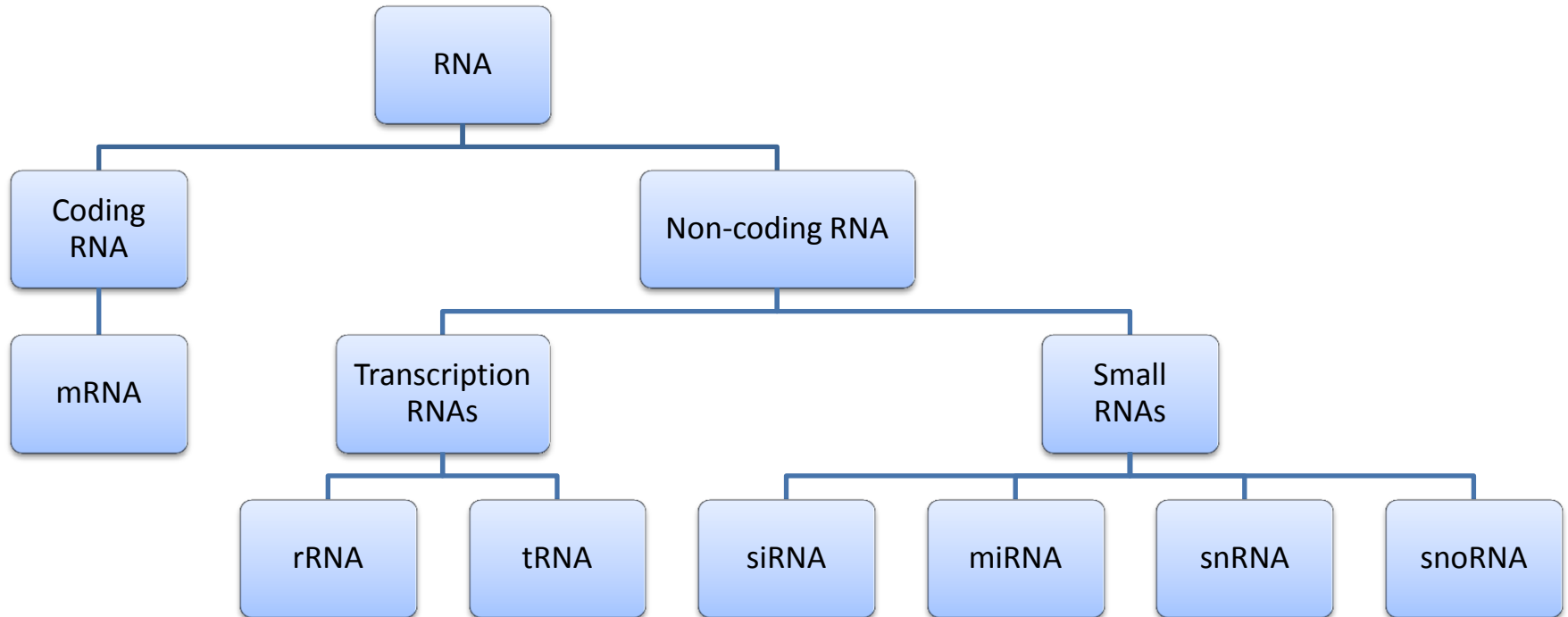
- Редактирование РНК
- РНК – шаблон в теломеразе
- In vitro эволюция
- РНК – интермедиат в мобильных элементах
- РНК контролирует экспрессию генов
- Некодирующая РНК и эпигенетика

30 Нобелевских премий...

Реализация биологической информации

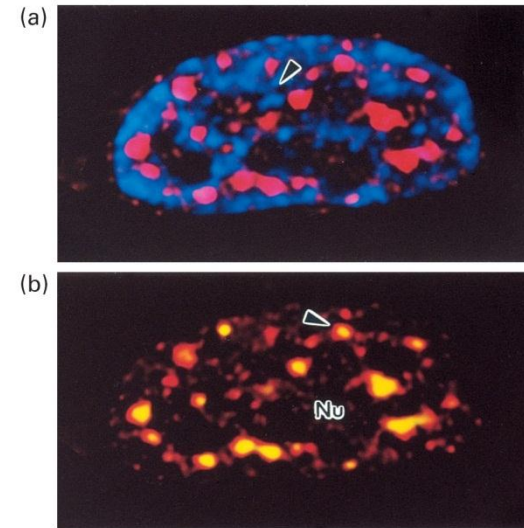
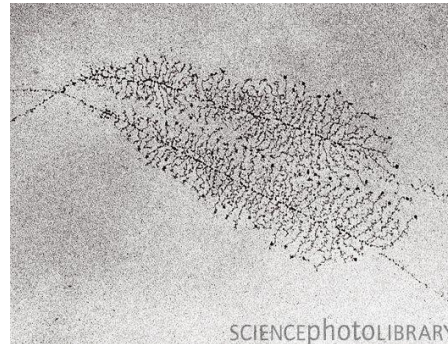


Классификация



Транскрипция у эукариот

- **RNA Pol I** – rRNA
- **RNA Pol II** – mRNA, miRNA, snoRNA, snRNA
- **RNA Pol III** – tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA
- Центры транскрипции



*процессинг 3'-конца мРНК
экспорт мРНК из ядра;
защита от экзонуклеаз;
инициация трансляции*

Процессинг:

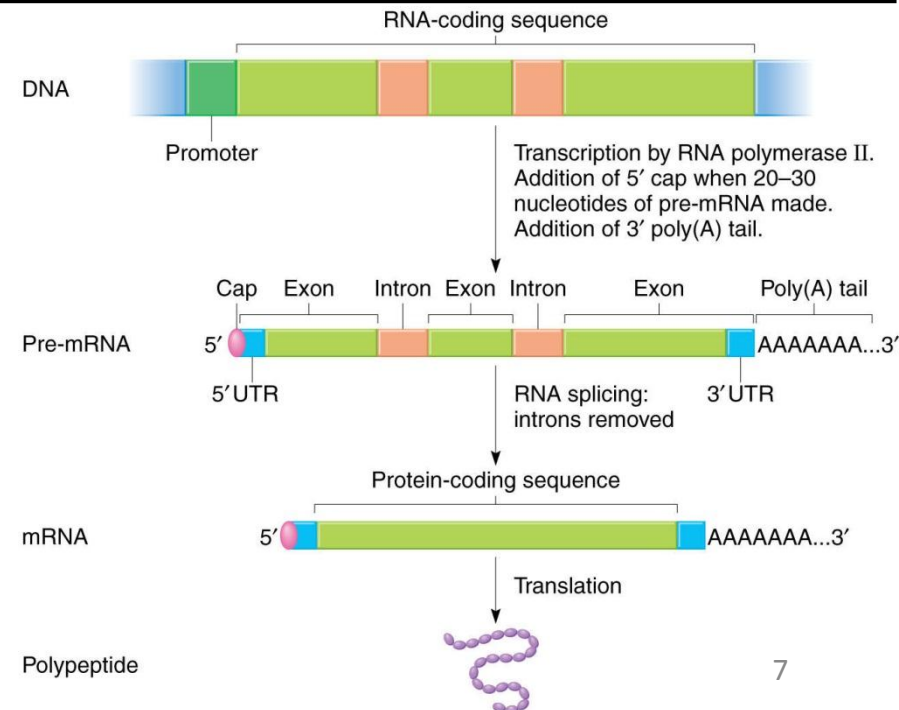
Кэпирование;

Полиаденилирование; →

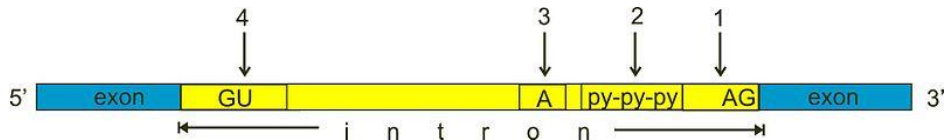
Сплайсинг;

Редактирование

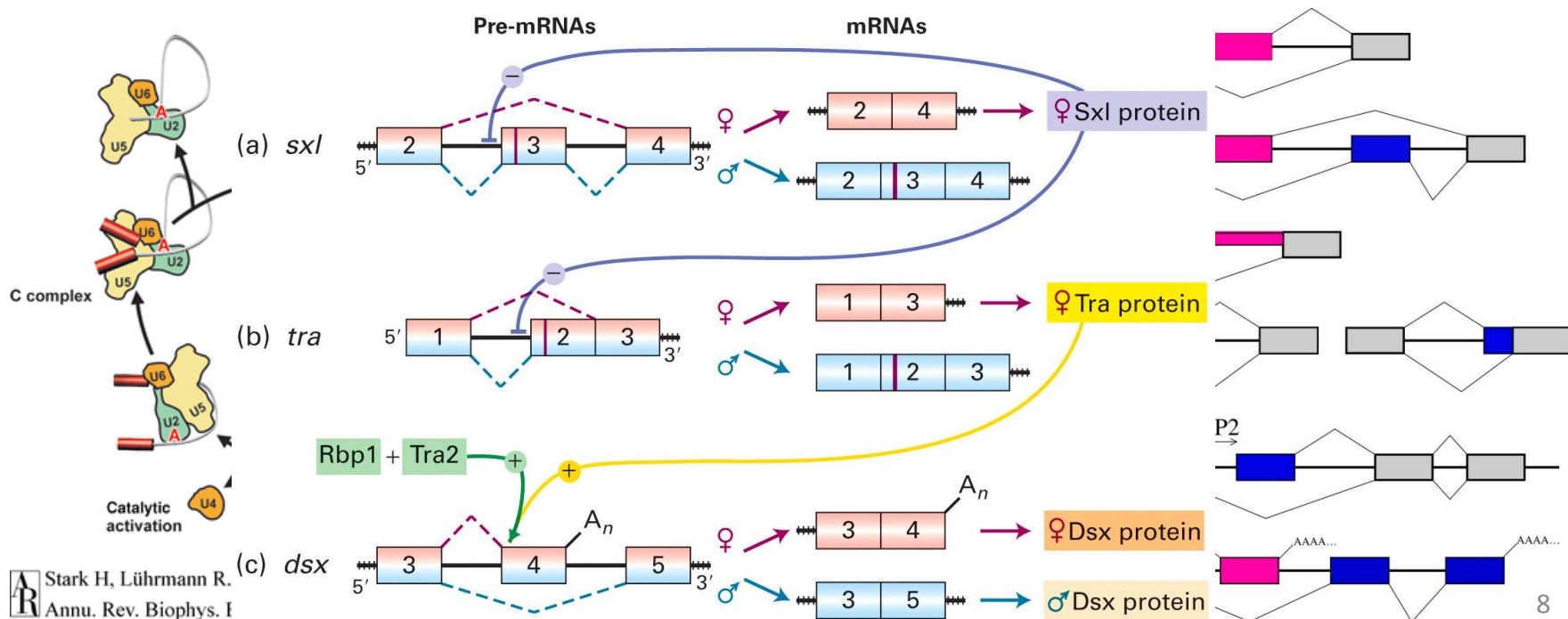
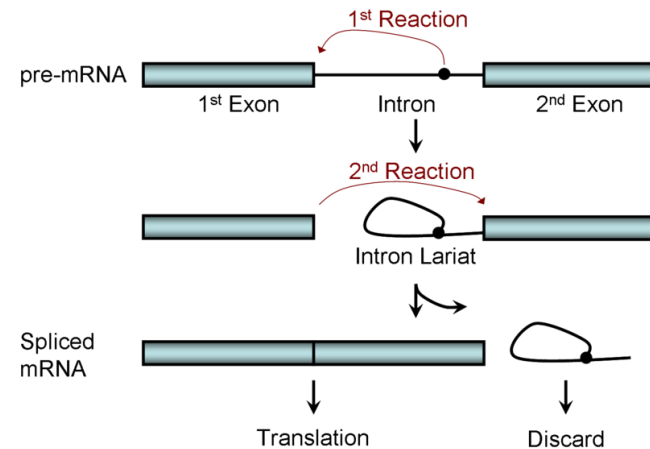
*Защита от экзонуклеаз
Терминация транскрипции
Экспорт из ядра
Трансляция*



Сплайсинг у эукариот



- 1) Обычный
(Сплайсома)
 - 2) Автосплайсинг
- ↑разнообразие белков
↑регуляцию



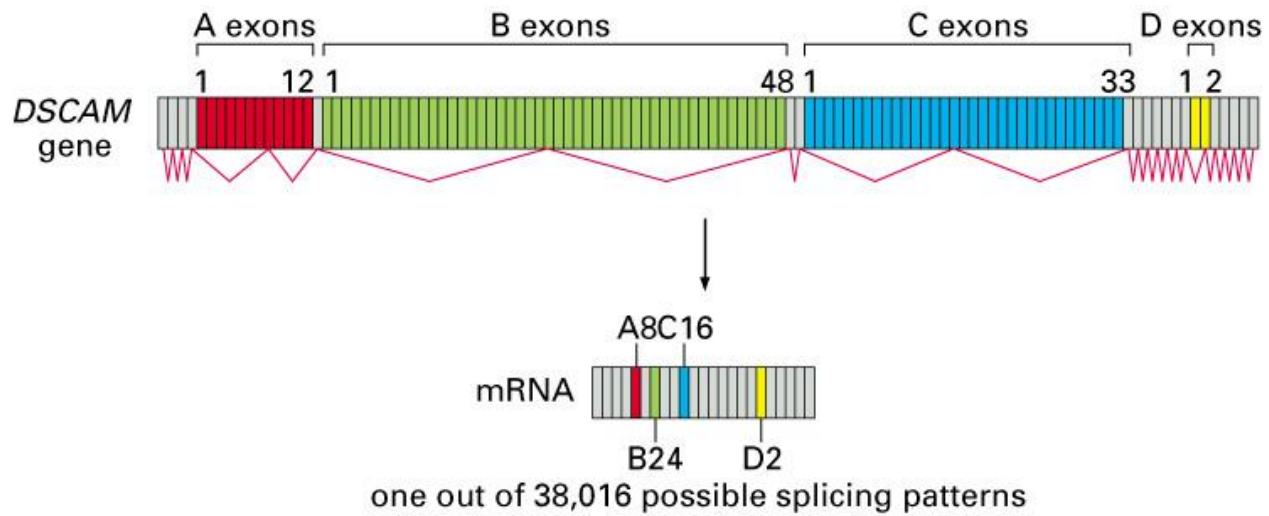
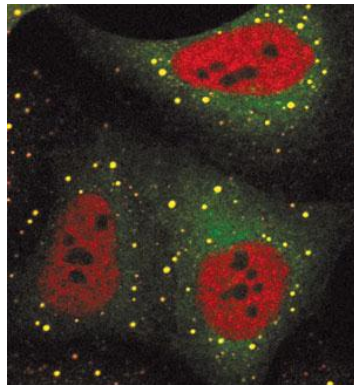
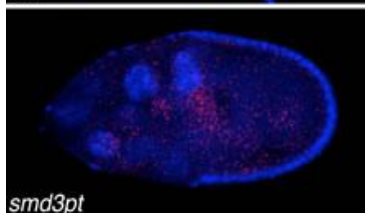
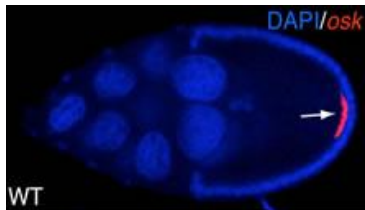
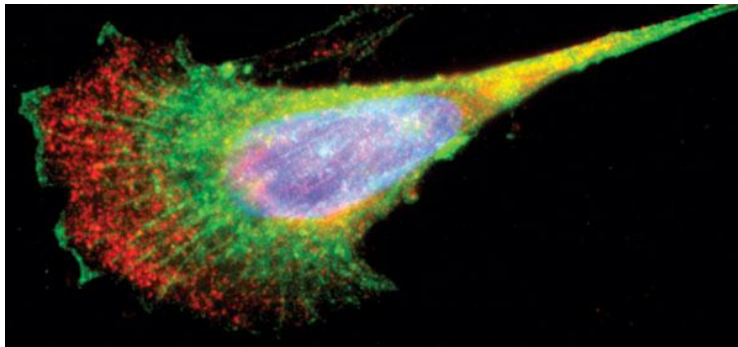


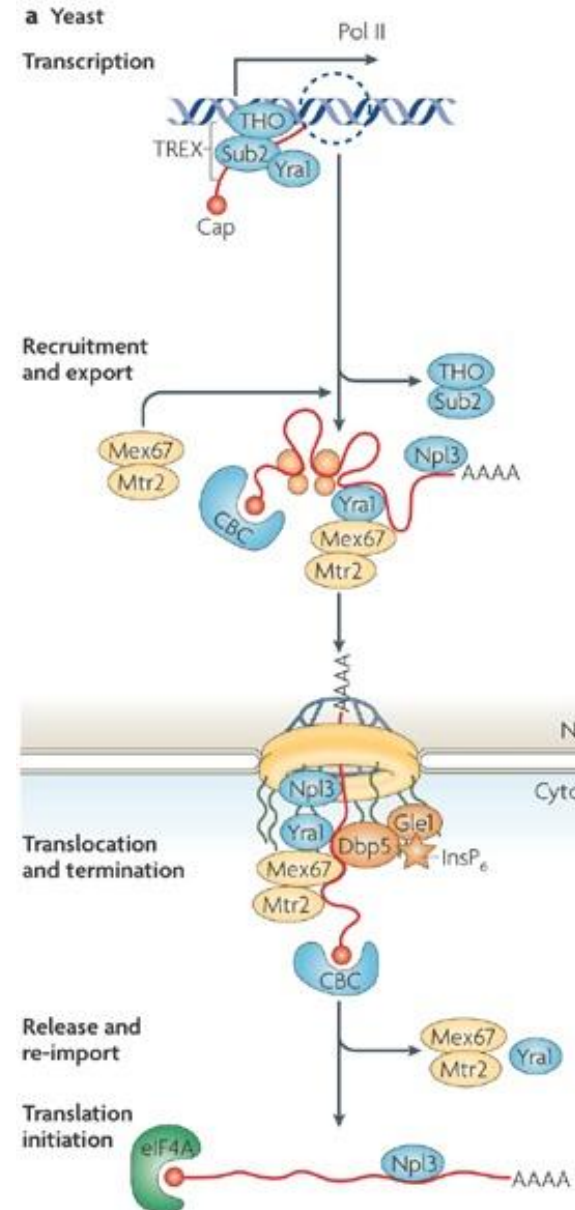
Figure 7–89. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

В нужном месте и в нужное время

- РНК синтезируются в ядре, а после транспортируются в необходимое место
- До момента доставки на место трансляция репрессирована с помощью RNP
- У человека больше 1000 RNPs
- Сайты связывания RNPs – в 3'-UTR



Nature Reviews | Molecular Cell Biology



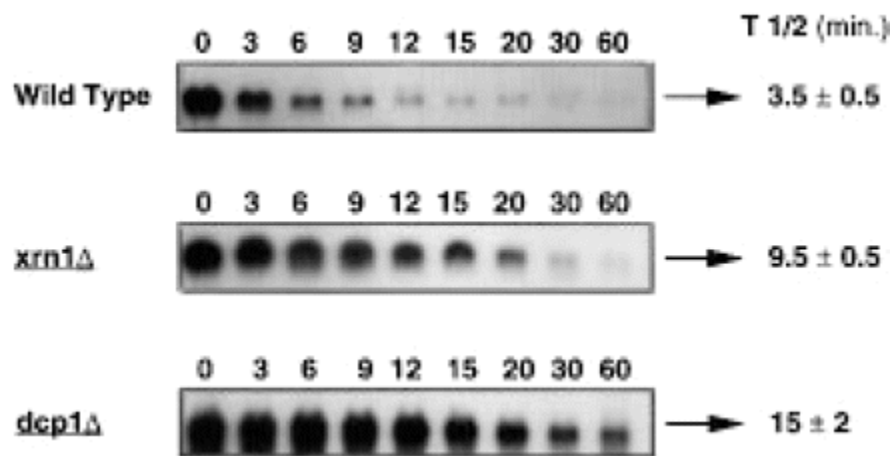
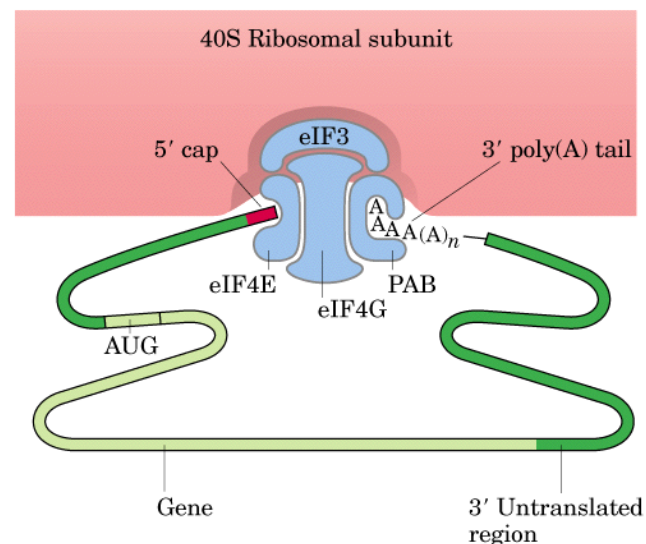
Стабильность РНК

5'UTR:

- КЭП
- шпильки
- РНК-белковые взаимодействия
- ORFs
- Internal ribosome entry sites (IRES).

3'UTR:

- РНК-белковые взаимодействия;
- poly(A);
- AU-rich element (ARE);
- miRNA
- Iron response element (IRE)
- Cytoplasmic polyadenylation element (CPE)



Среднее $t_{1/2}$ мРНК у млекопитающих ~ 8 часов.

РНК *c-fos* – 15', РНК *бета-глобина* – 17 часов.



«RNA stability: Remember your driver»

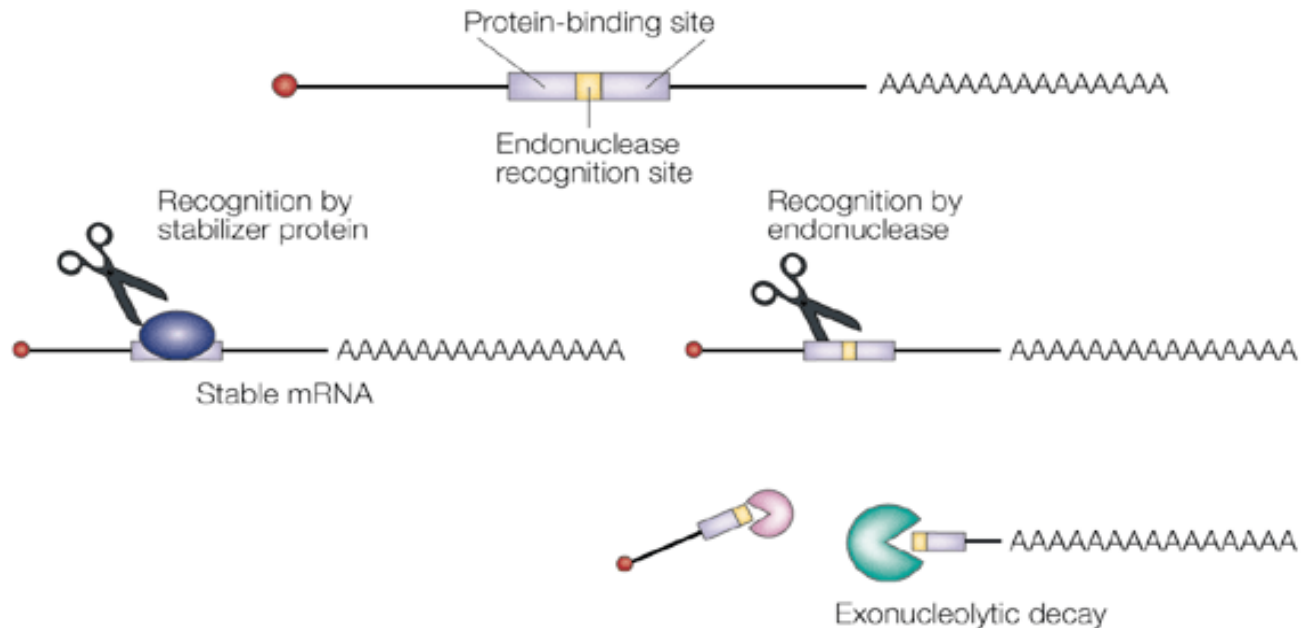
Деградация РНК

3 цели деградации РНК:

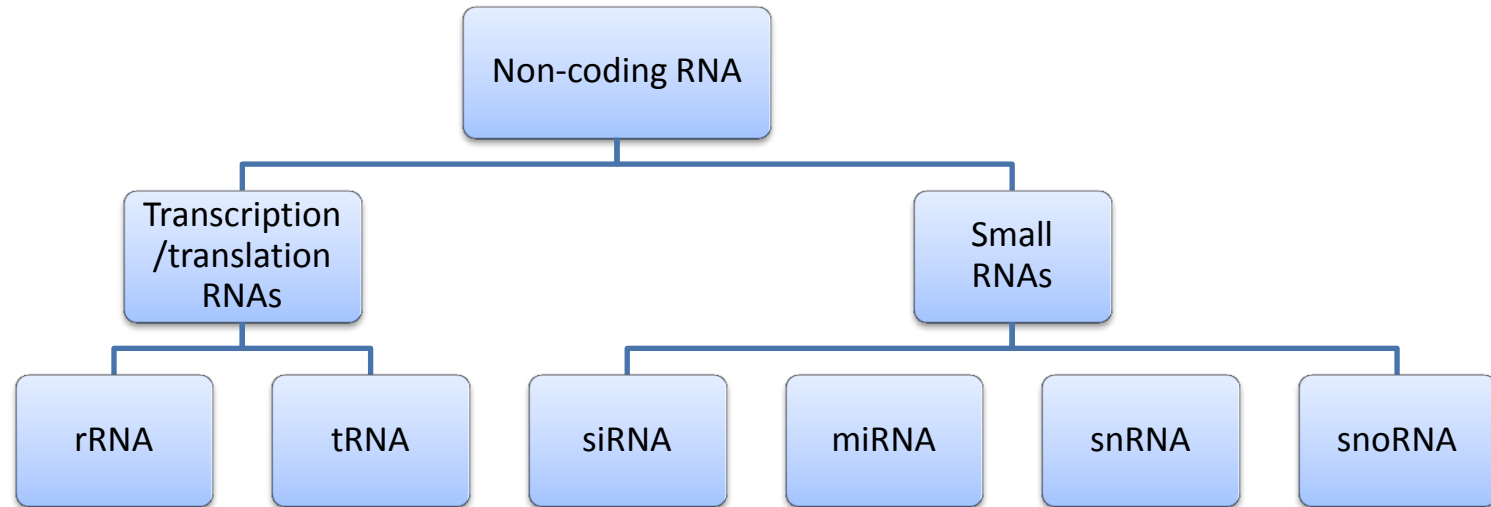
1. Тонкий контроль работы генов
2. Утилизация неправильных молекул
3. Защита от вирусов, ретротранспозонов

3 пути деградации РНК:

1. С помощью деаденилирования
2. Без деаденилирования
3. С помощью РНК интерференции



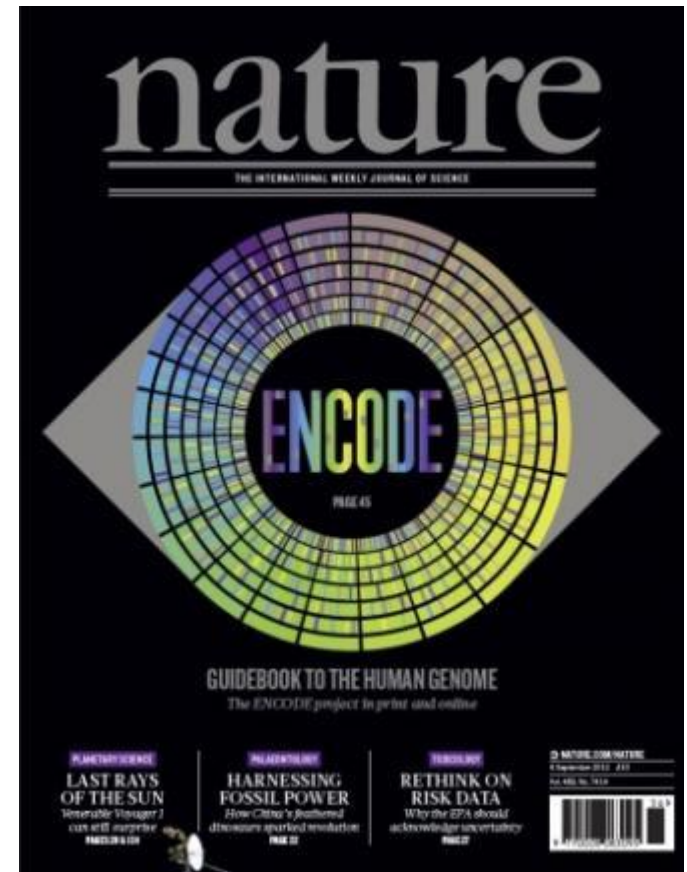
Некодирующие РНК



- Обеспечивают работу клетки [tRNA and rRNA].
- Управляют биогенезом и активностью рибосом [snoRNA]
- Отвечают за процессинг РНК и регуляцию транскрипционных факторов [snRNA]
- Репрессируют экспрессию генов [miRNA]
- Регуляция работы генов, защита клетки [siRNA]

ENCODE Project (Encyclopedia of DNA elements)

- Исследованы геномы и транскриптомы 147 типов клеток
- ~80% генома человека биохимически активны
- В РНК транскрибируется около **76%** ДНК
- Обнаружены 8800 «генов» малых РНК и 9600 длинных некодирующих последовательностей РНК.
- Обнаружены многие новые РНК, которые задействованы в механизмах регуляции активности генов.



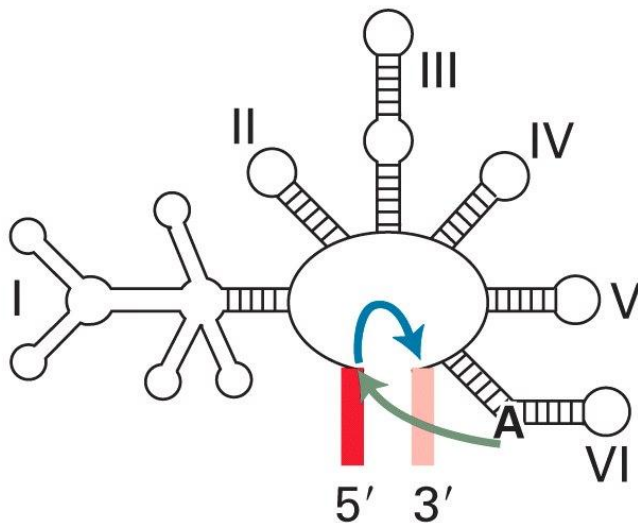
Малые ядерные РНК (snRNA)

- Локализованы в ядре, связаны с белками (snRNPs).
- Содержат большое количество “U”, Размер 90-300 нуклеотидов.
- Транскрибируются РНК pol II, РНК pol III.
- На 5'-конце триметилированный кэп.

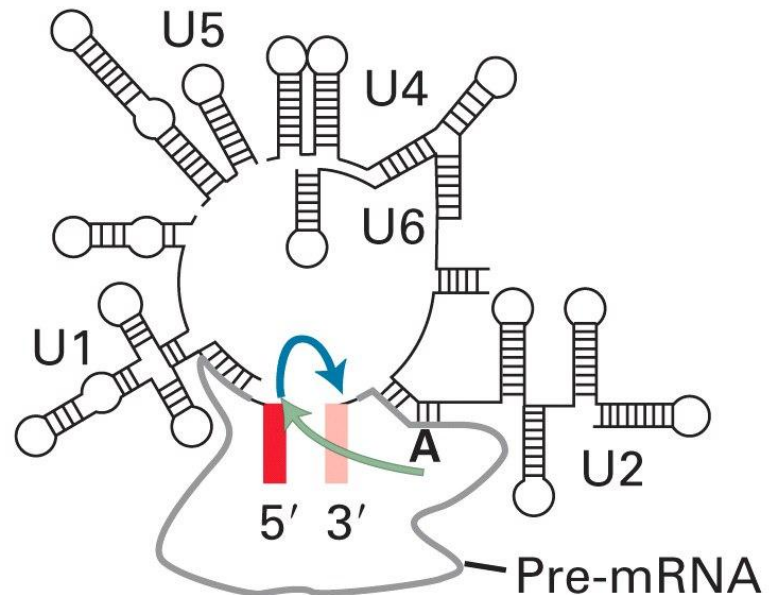
Функции:

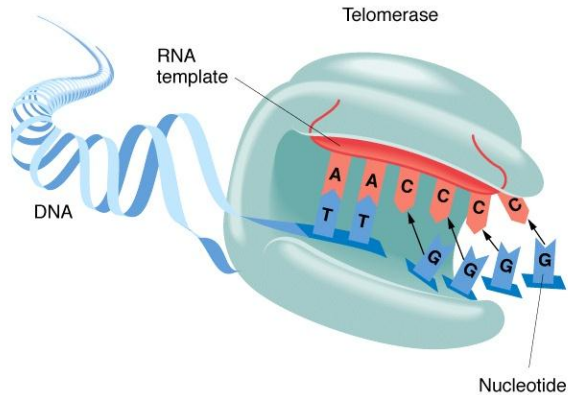
- Участвуют в процессинге пре-мРНК (формируют сплайсому).
- Расщепляют полицистронные мРНК.
- Поддерживают целостность теломер.
- Регулируют транскрипцию.

(a) Group II intron

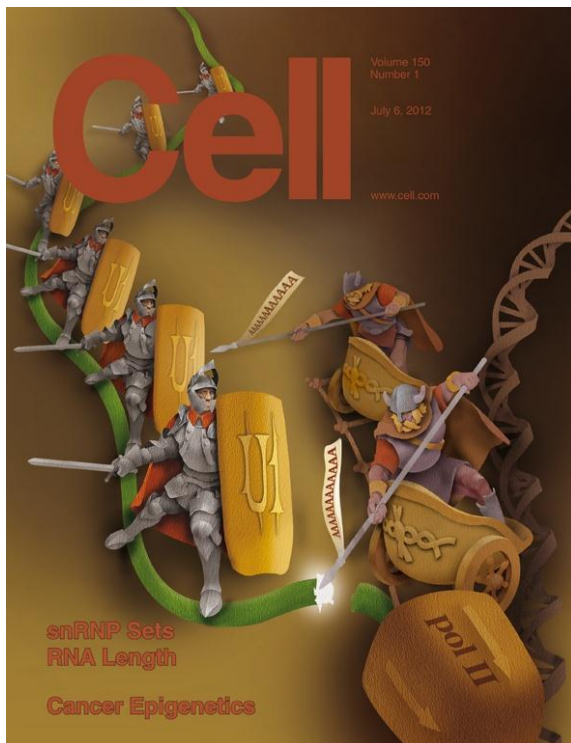


(b) U snRNAs in spliceosome





- ✓ Две популяции гистоновых генов: кластеризованная и диспергированная.
- ✓ 5 гистоновых генов в кластере (6900 н.п.)
- ✓ Кластеры повторены в геноме многократно и тандемно (~35 раз).
- ✓ Отсутствуют интроны, пре-мРНК не полиаденилируется.
- ✓ Кластер транскрибируется как единое целое (общая пре-мРНК).
- ✓ U7 snRNA участвует в расщеплении полицистронной РНК



Гипотеза РНК-мира

SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential amplification

Какие молекулы могли участвовать в возникновении жизни?

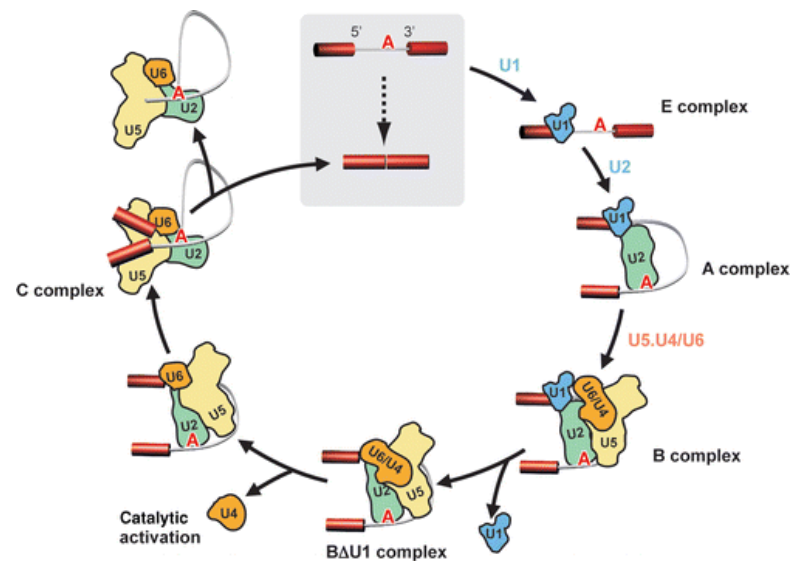
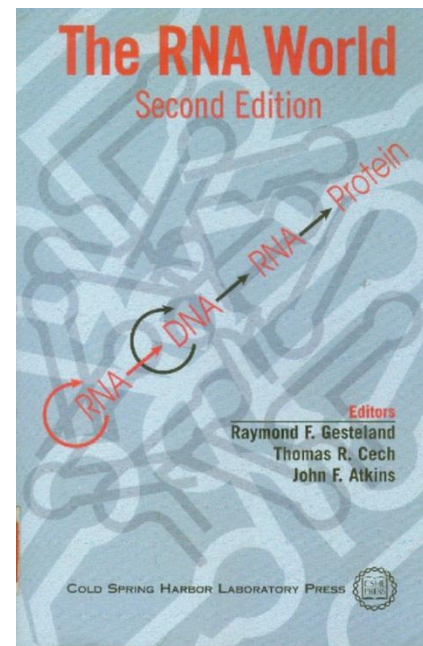
Белки: разнообразие в строении, катализ

ДНК: стабильность и хранение информации

РНК: Разнообразие в строении, хранение информации и катализ

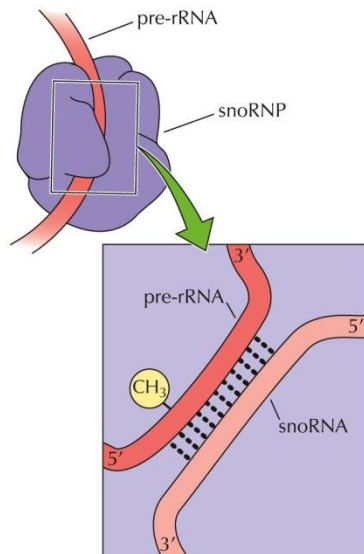


В 1982 г. у *Tetrahymena thermophila* был открыт интрон, способный катализировать свой собственный сплайсинг.

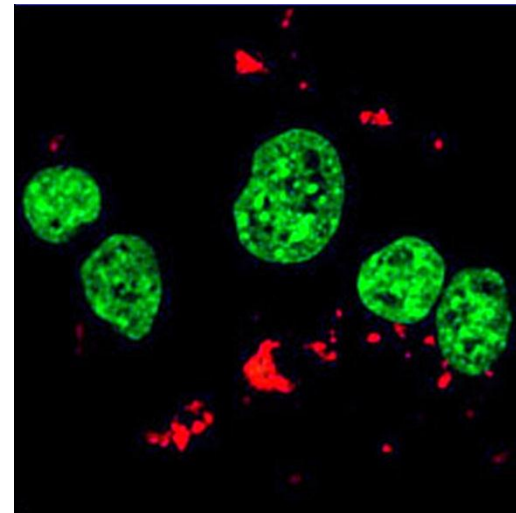
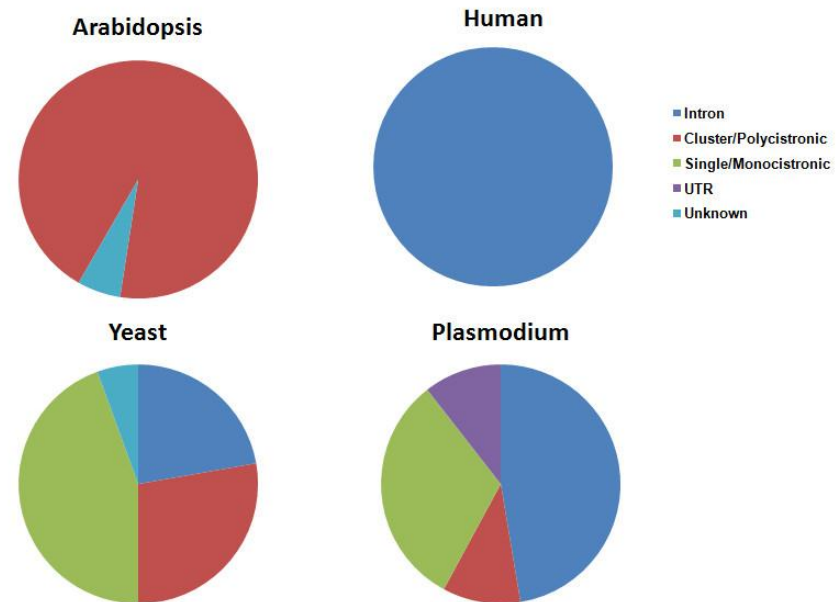


Малые ядрышковые РНК (snoRNA)

- Вместе с нуклеазами принимают участие в процессинге рРНК (↑фолдинг и ↑ассоциацию их с rRNP) .
- Локализованы в регионе ядрышка.
- Гены snoRNA содержатся в интронах других генов
- В состав snoRNA входят модифицированные компоненты нуклеотидов: псевдоуридин и 2'-О-метилрибоза.



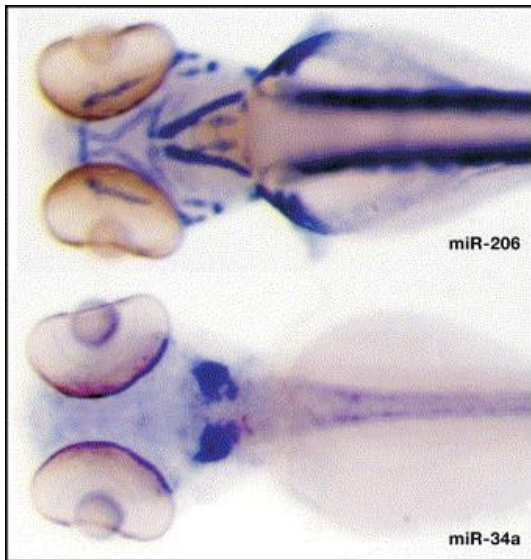
THE CELL, Fourth Edition, Figure 9.30 © 2005 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.



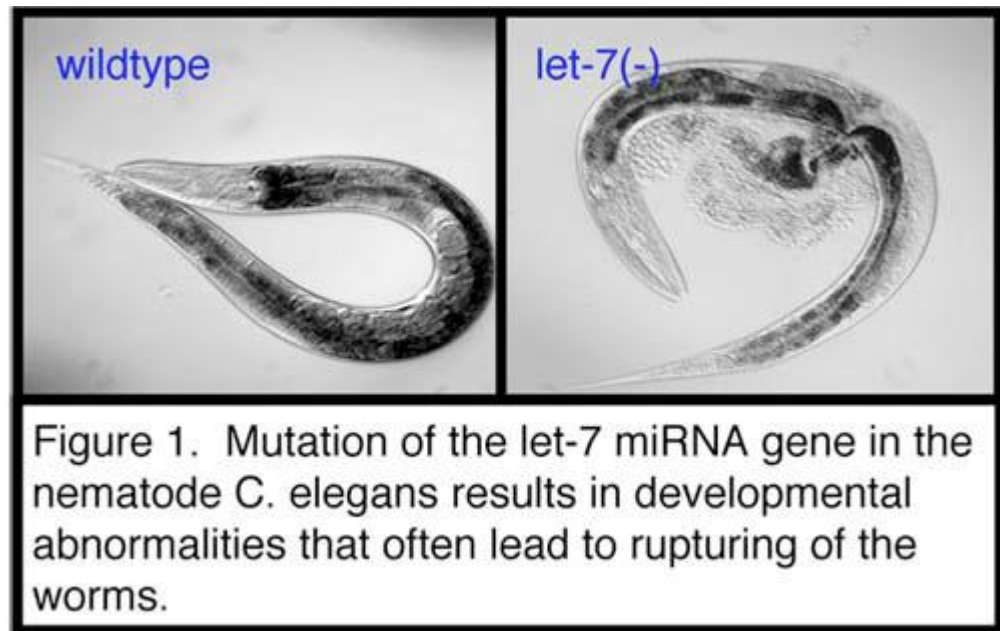
РНК интерференция

Микро-РНК (miRNA)

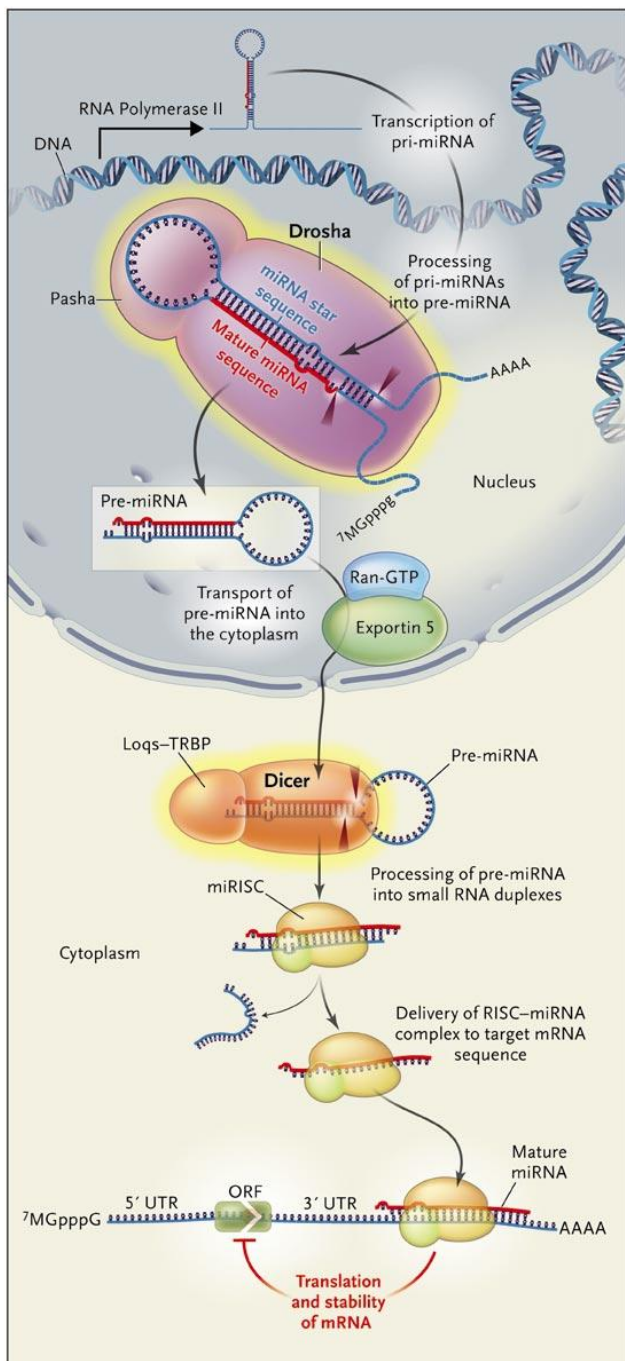
- Имеют малый размер (~22 нуклеотида).
- В геноме находятся в некодирующих последовательностях ДНК (в т.ч. в интронах).
- Обнаружены у всех многоклеточных.
- Репрессируют экспрессию генов-мишеней, связываются с 3'-UTR, как правило связывание неполное.
- 1 miRNA → мРНК, 1 мРНК ← несколько miRNA.



Plasterk *Cell* 124:877, 2006



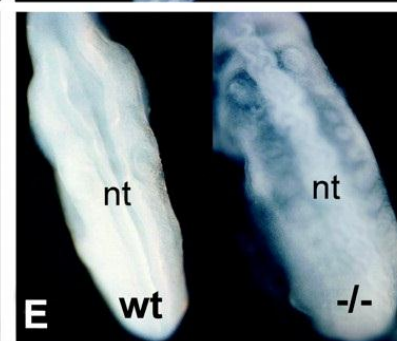
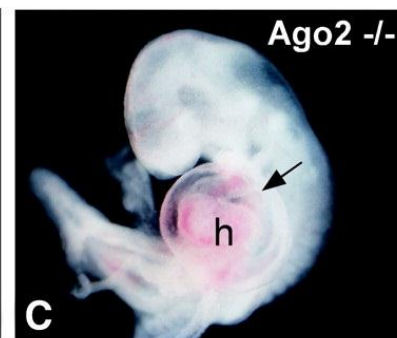
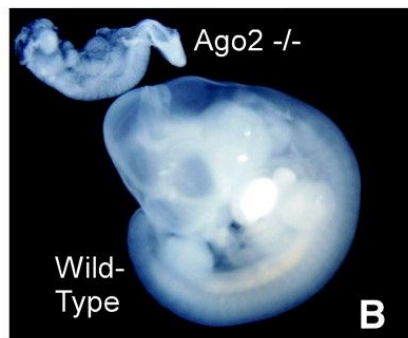
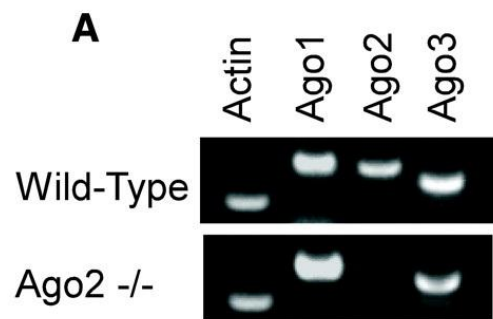
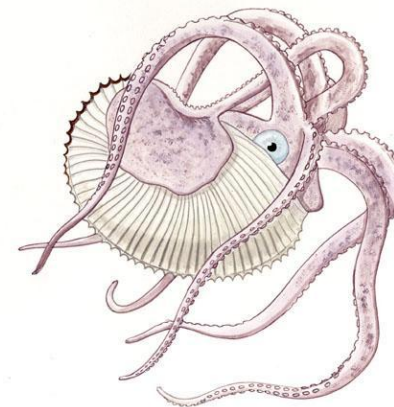
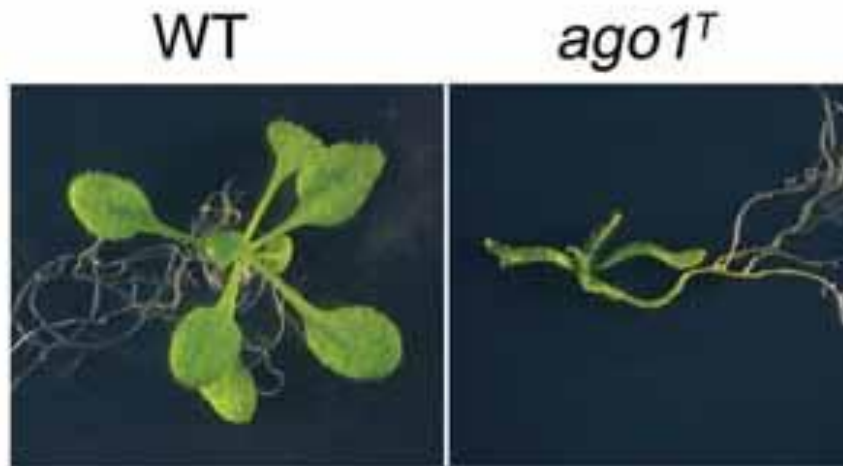
Механизм образования

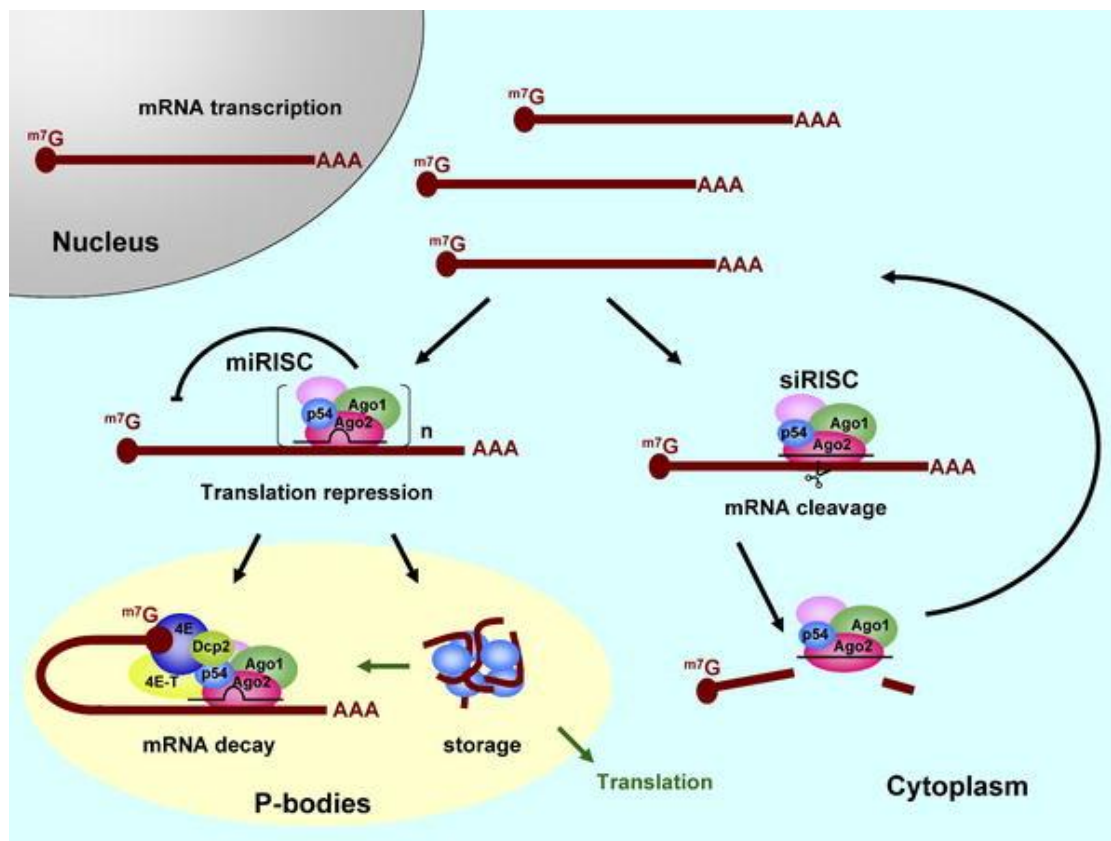


- miRNA образуются из крупных первичных транскриптов, которые имеют инвертированные повторы, как следствие - большое количество шпичечных структур.
- 1-5% всех генов человека - гены miRNA, регулируют до 30% структурных генов

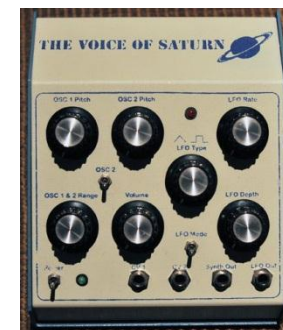
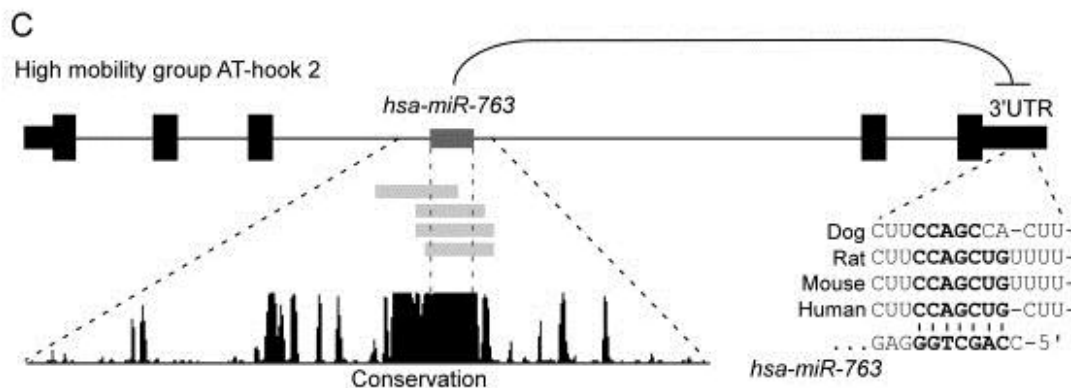
1. Транскрипция с ДНК (РНК Pol II)
2. Разрезание ферментом Drosha (РНКаза III)
3. Экпортируются из ядра (Exportin 5)
4. Дополнительно разрезается ферментом Dicer → miRNA
5. Двухцепочечная РНК связывается с RISC (RNA-induced silencing complex), одна из цепей отсоединяется
6. Комплекс связывается с мРНК

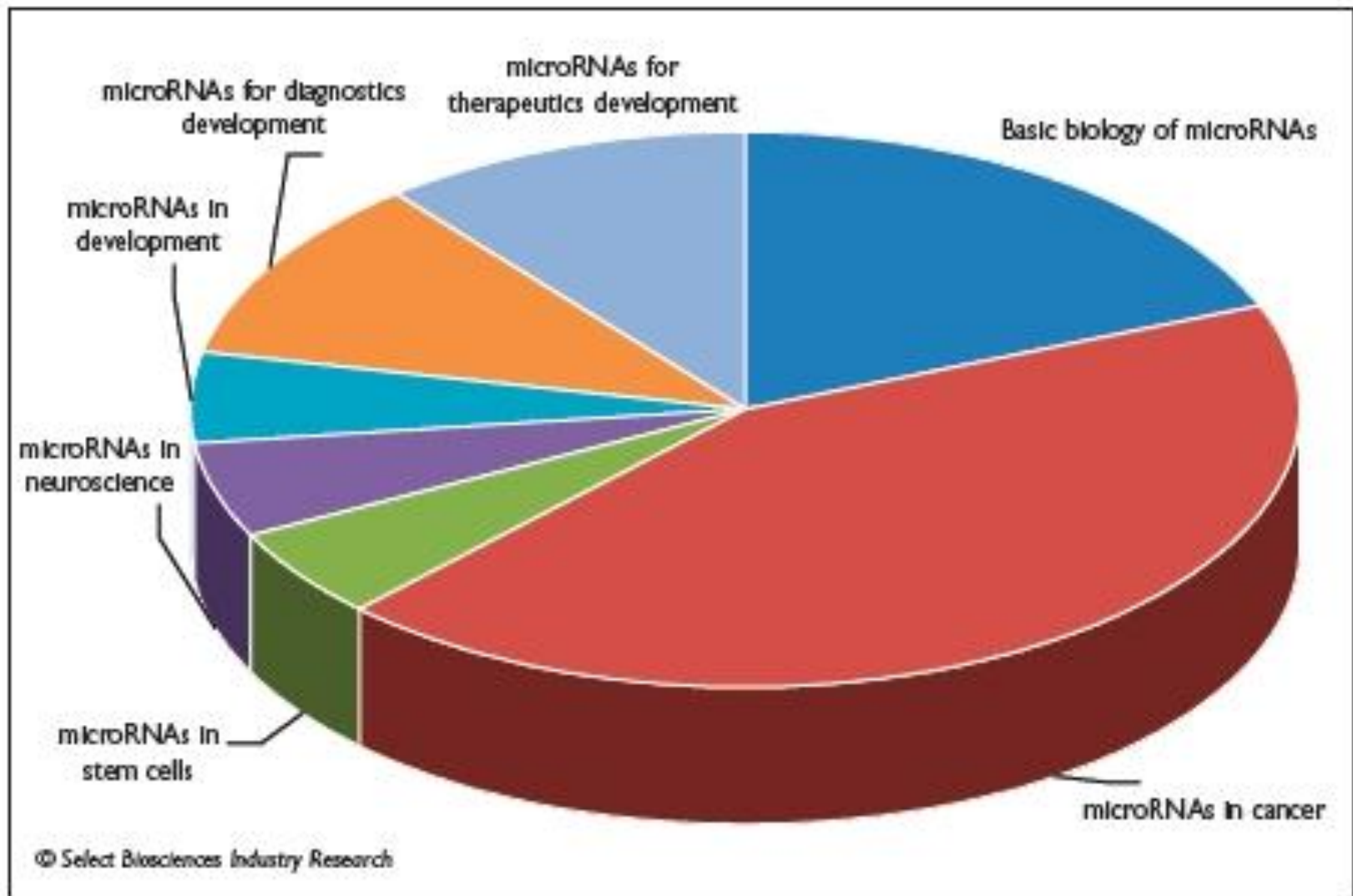
RISC и AGO





1. Ингибирование связи кэпа и 40S;
2. Ингибирование присоединения 60S;
3. Ингибирование элонгации;
4. Ранняя терминация;
5. Котрансляционная деградация белка;
6. Связывание в Р-тельцах;
7. Дестабилизация мРНК, удаление poly(A);
8. Ингибирование транскрипции с помощью ремоделирования хроматина





Малые интерферирующие РНК (siRNA)

- введены гены синтетазы розового и фиолетового пигментов
- активность фермента не росла, а снижалась. Гены синтетазы экспрессировались на более низком уровне, чем до введения трансгена.
- деградация мРНК приводит к снижению активности гена по механизму посттранскрипционного ингибирования
- VIGS

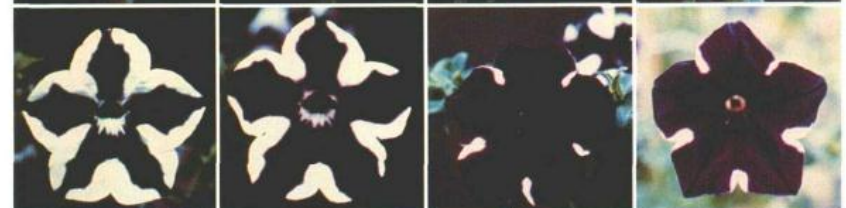
PARENTAL



Transgene
218.11



Transgene
218.43



Transgene
218.56



Transgene
218.38



The Plant Cell, Vol. 2, 279–289, April 1990 © 1990 American Society of Plant Physiologists

Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

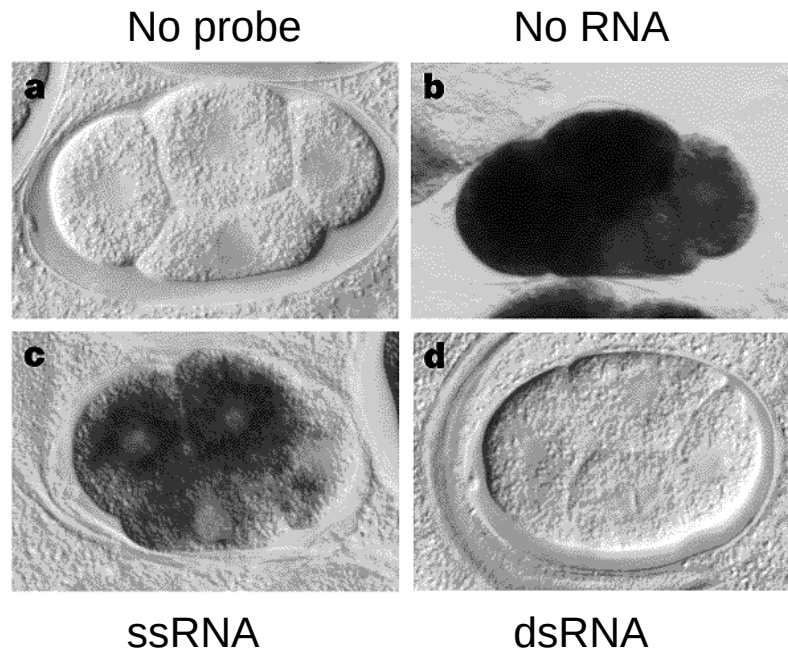
ANDREW FIRE*, SIQUN XU*, MARY K. MONTGOMERY*, STEVEN A. KOSTAS*†, SAMUEL E. DRIVER‡ & CRAIG C. MELLO‡

* Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA

† Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA

‡ Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.F. (e-mail: fire@mail1.ciwemb.edu).



Medicine



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"



Photo: L. Cicero/Stanford

Andrew Z. Fire

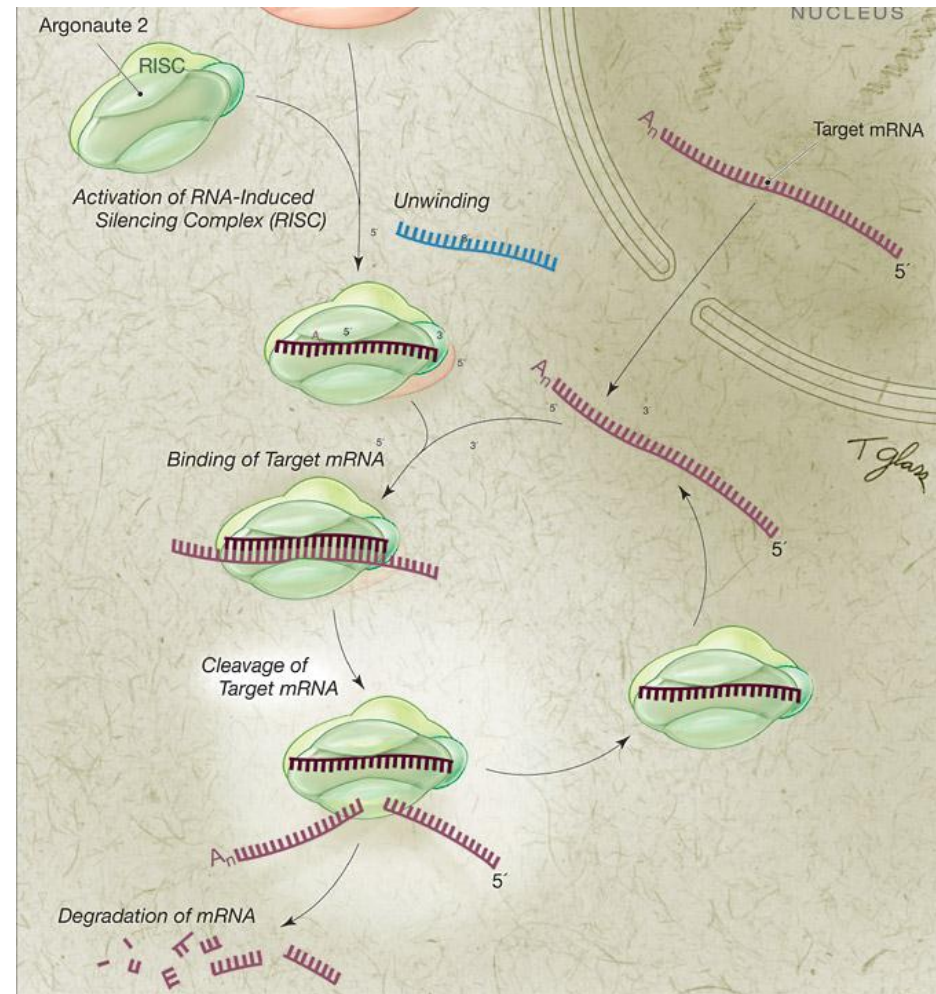
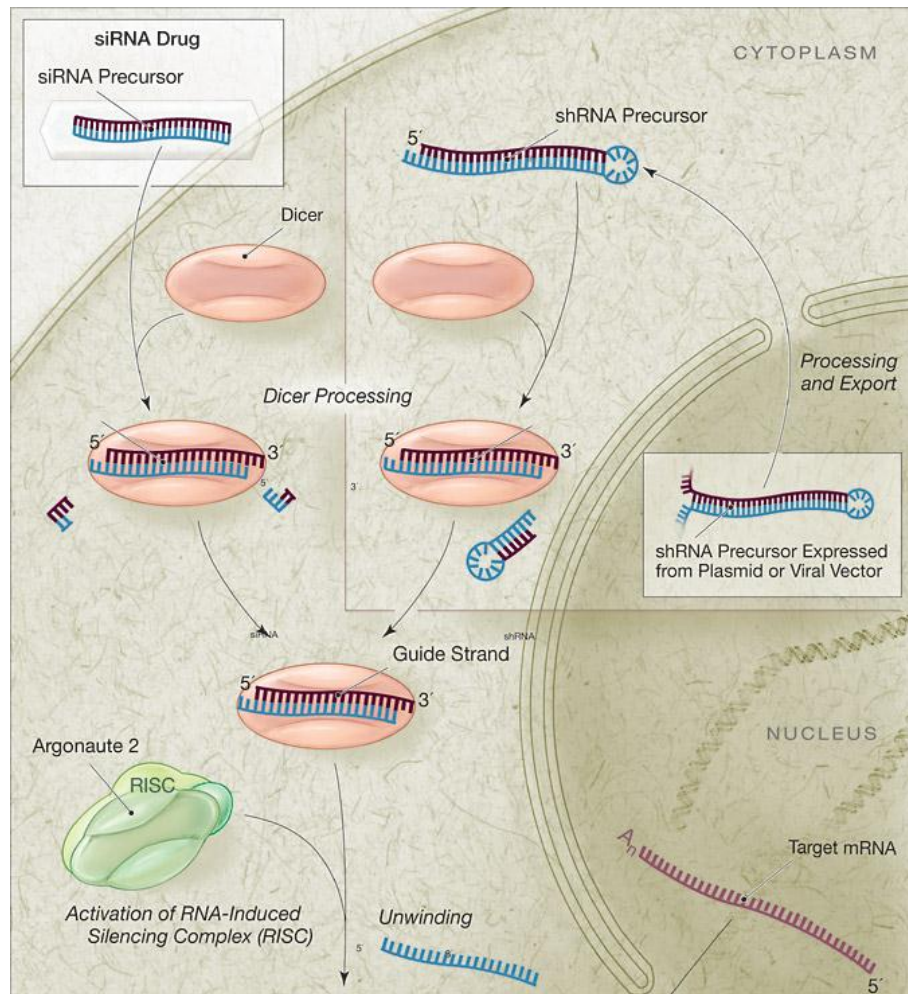
1/2 of the prize



Photo: R. Carlin/UMMAS

Craig C. Mello

1/2 of the prize



- 1) Появление двуцепочечной РНК
- 2) Разрезание Dicer'ом
- 3) Выбор guide-strand
- 4) Активация комплекса RISC

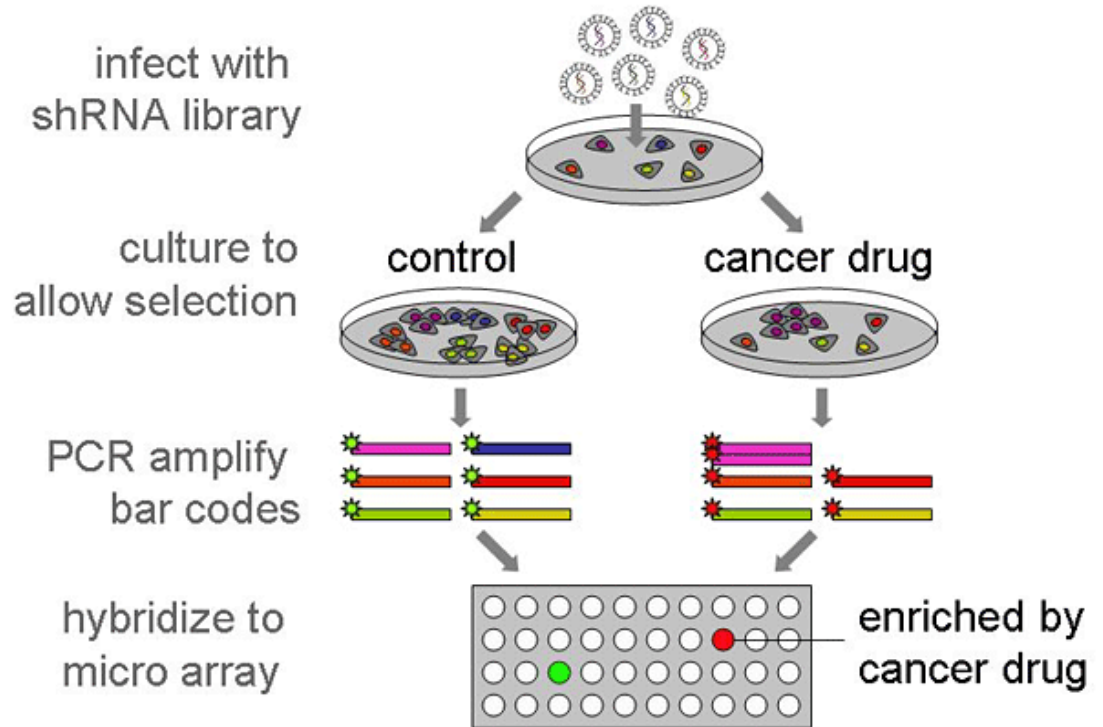
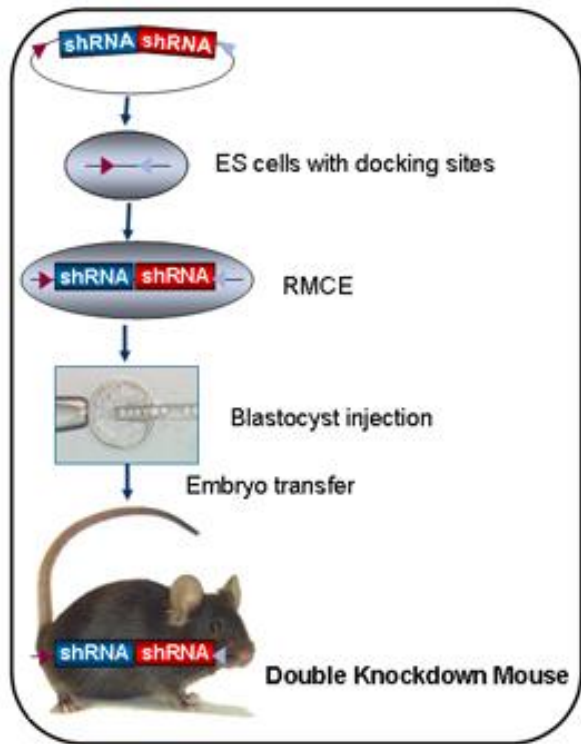
- 5) Связывание guide strand и RISC
- 6) Связывание комплекса с мРНК
- 7) Ago разрезает мРНК, которая далее деградирует

siRNA возникают из двуцепочечной РНК (dsRNA). Ее источники:

1. Продукт РНК-зависимых РНК-полимераз.
2. Двухнаправленная транскрипция генов (транскрипция с обеих антипараллельных цепей).
3. Транскрипция регионов, содержащих инвертированные повторы.
4. РНК содержащие вирусы.
5. Искусственные генетические конструкции.

- ✓ Выделяют несколько классов siRNA: первичные, вторичные, TaSiRNA, NatSiRNA, ra-siRNA.
- ✓ Длина ~ 21-27 нуклеотидов.
- ✓ Репрессирует последовательности, от которых она произошла (sequence specific manner).
- ✓ Точно спаривается с мишенью → эндонуклеазы расщепляют единственную специфическую мРНК.
- ✓ Является частью иммунного ответа к вирусам и чужеродному генетическому материалу.
- ✓ У растений предотвращает распространение транспозонов.
- ✓ (Растения имеют гомологи Dicer'а против различных вирусов.)

РНК интерференция в науке и медицине (shRNA)



Примеры:

- Вакцина “FANG” для противораковой терапии (shRNA против мРНК факторов TGF β 1 и β 2)
- SEQ508, лечение аденоматозных полипов (бактериальный вектор, экспрессирующий shRNA против бета-катенина)

Проблемы:

- Доставка.
- Опасность использования вирусных векторов.
- Опасность чрезмерной активности комплекса RISC
- Возможный иммунный ответ
- “Off-target” активность shRNA

Редактирование РНК

I. Инсерции/делеции
и нуклеотидов

II. Дезаминирование
азотистого
основания:

- C → U
- A → I

- Показано для тРНК, рРНК, мРНК и микроРНК.
- Наблюдается только у эукариот
- Происходит как в ядре, так и в цитоплазме, митохондриях и пластидах.

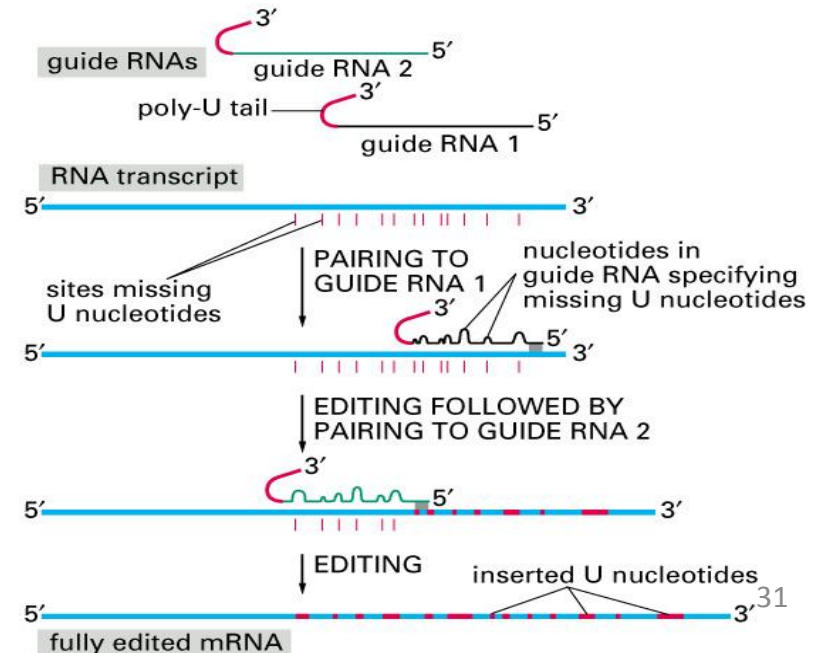
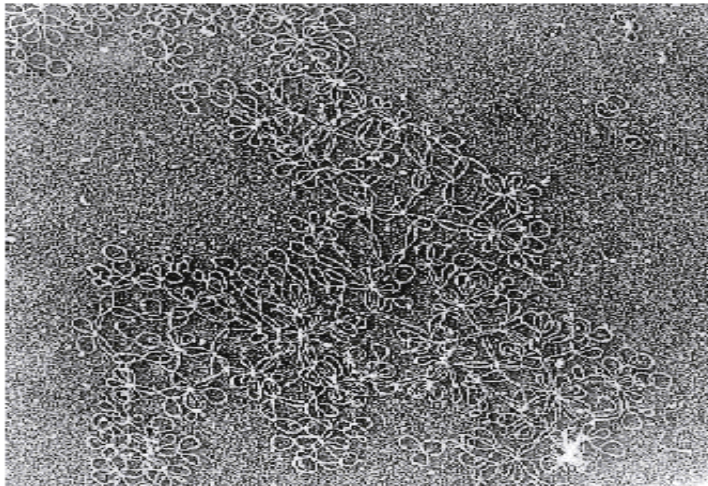
Инсерция/делеция U-нуклеотидов у *T. Brucei* (gRNA)

[illegible]

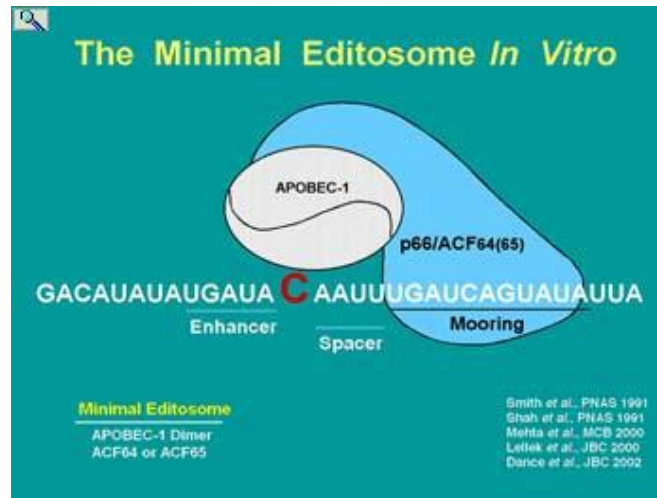
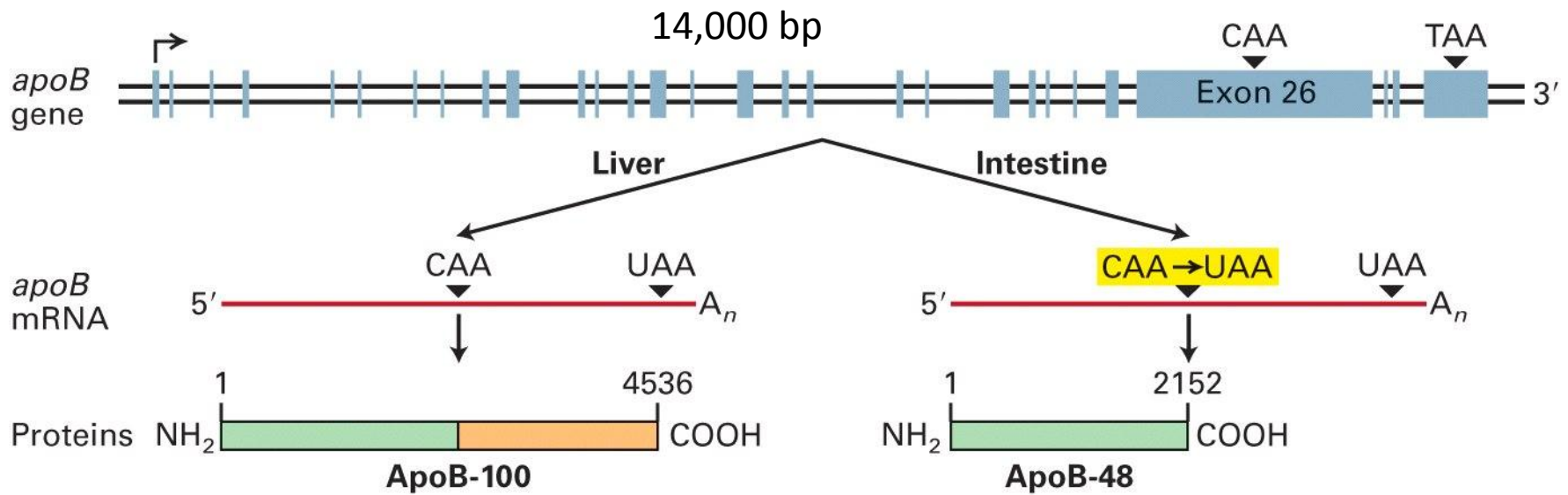
T. brucei ATPase subunit 6 RNA

5' . . . UUAGGGGGAGGAGAGAuAGuuAuuAuAuuGuuGuuGAAuuuGGuu UGuu AUUGGAGUUAUAG . . . 3'

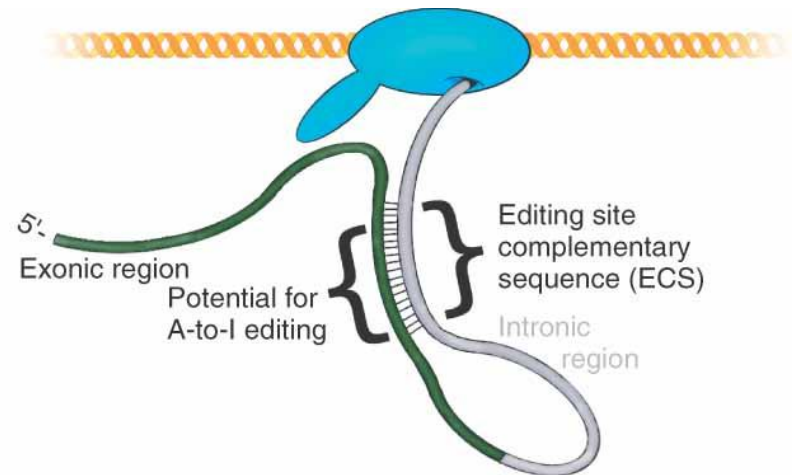
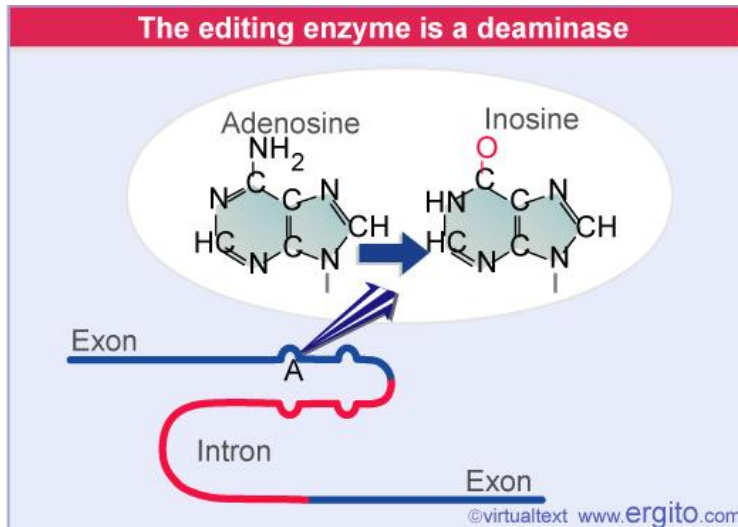
3' UUUUUUUUUUUU AUUA AUAGUAUAG GACAGUUUUAGACUAAGCAAU AGCCUCAUAUC . . . 5'



Дезаминирование: C→U



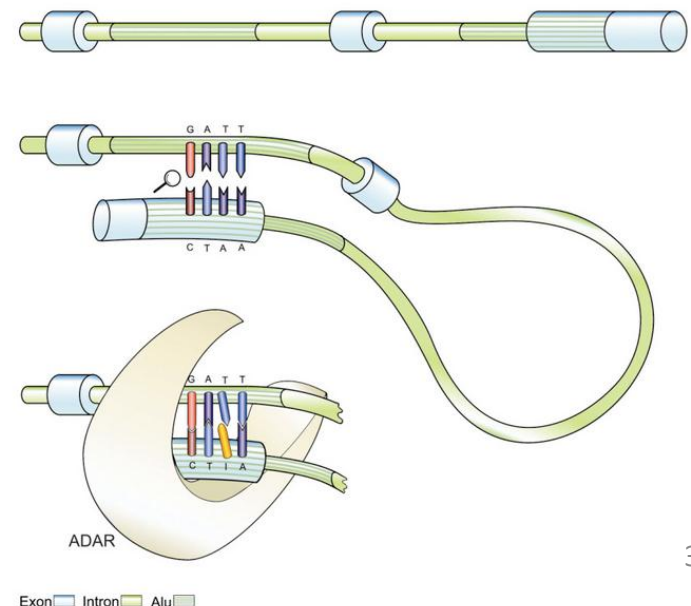
Дезаминирование: A→I



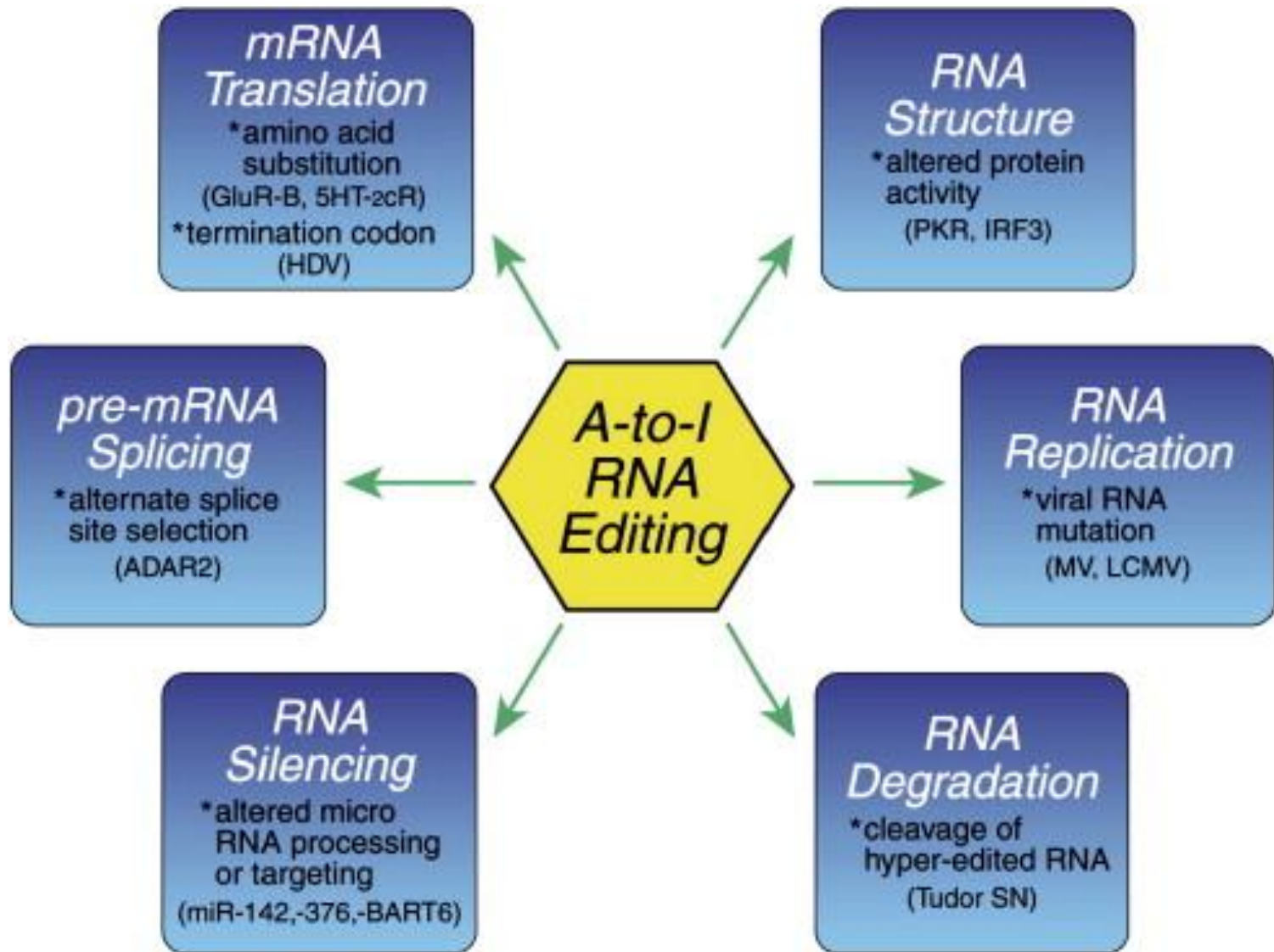
ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA)

Животные – от *C. Elegans* до человека

- 1) A → I
 - 2) В трансляции I = G
- Несинонимичная замена (новая аминокислота)
 - Новый стоп-кодон
 - Новый сплайс-сайт
 - Изменение вторичной структуры
 - Появление/исчезновение сайтов связывания белков



Дезаминирование: A→I



ADAR involved	Target gene	Molecular pathway	Disease	References
ADAR1	<i>ADAR1</i>	Melanoblast migration?	Dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH)	Miyamura <i>et al.</i> , 2003 Tojo <i>et al.</i> , 2006 Liu <i>et al.</i> , 2006
ADAR2	Unknown	Cell proliferation, migration	Astrocytomas/glioblastoma mutiforme (GBM)	Maas <i>et al.</i> , 2001 Paz <i>et al.</i> , 2007 Cenci <i>et al.</i> , 2008
ADAR2	<i>GluR-B</i>	Cell migration, tumor spreading	GBM	Ishiuchi <i>et al.</i> , 2002
ADAR1 unknown	Unknown <i>microRNAs</i>	Unknown	Lobular breast cancer neuroblastoma	Shah <i>et al.</i> , 2009 Schulte <i>et al.</i> , 2010
ADAR2	<i>GluR-B</i>	AMPA channel	Transient forebrain ischemia	Peng <i>et al.</i> , 2006
ADAR1/ADAR2	Unknown	HIV-replication, release, infectivity	HIV-1 infection	Phuphuakrat <i>et al.</i> , 2008 Clerzius <i>et al.</i> , 2009 Doria <i>et al.</i> , 2009 Doria <i>et al.</i> , 2011
ADAR1/ADAR2	Unknown	Unknown	systemic lupus erythematosus (SLE)	Laxminarayana <i>et al.</i> , 2007 Orlowski <i>et al.</i> , 2008
ADAR2	<i>GluR-B</i>	Motor neuron degeneration	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	Kawahara <i>et al.</i> , 2004 Kuner <i>et al.</i> , 2005 Hideyama <i>et al.</i> , 2010
ADAR2	Unknown	Regulated exocytosis	Diabetes	Gan <i>et al.</i> , 2006 Yang <i>et al.</i> , 2010
ADAR1/ADAR2	<i>5-HT_{2C}-R</i>	Abnormal 5-HT _{2C} -receptor	Prader-Willi syndrome (PWS)	Morabito <i>et al.</i> , 2010

Дезаминирование: A→I

