

# *Короткие некодирующие РНК и регуляция экспрессии генов эукариот*

*III: РНК-интерференция – пересечения и  
расхождения путей (2), перспективы  
практического применения*

*III-II. Пересечения и схождения  
путей РНК-сайленсинга (2)*

# Эволюция аппарата РНК-интерференции

Борьба с интеграцией и незаконной транскрипцией чужеродных последовательностей (ДНК-копий вирусов и транспозонов) – **древняя функция, актуальная и для бактерий!**

Уже у бактерий она реализована с участием коротких РНК, комплементарных мишеням, компоненты этой системы аналогичны, но не гомологичны эукариотическим

У растений, животных и грибов аппарат РНКi эволюционировал независимо

Общий предок эукариот, происходящий от архей (LECA), скорее всего, имел ключевые компоненты системы РНКi, работавшей с siРНК:

как минимум один Dicer-подобный белок  
*(подобные белки участвуют в аппарате CRISPR-интерференции)  
выявлены гомологи основных доменов, но не в одном белке*

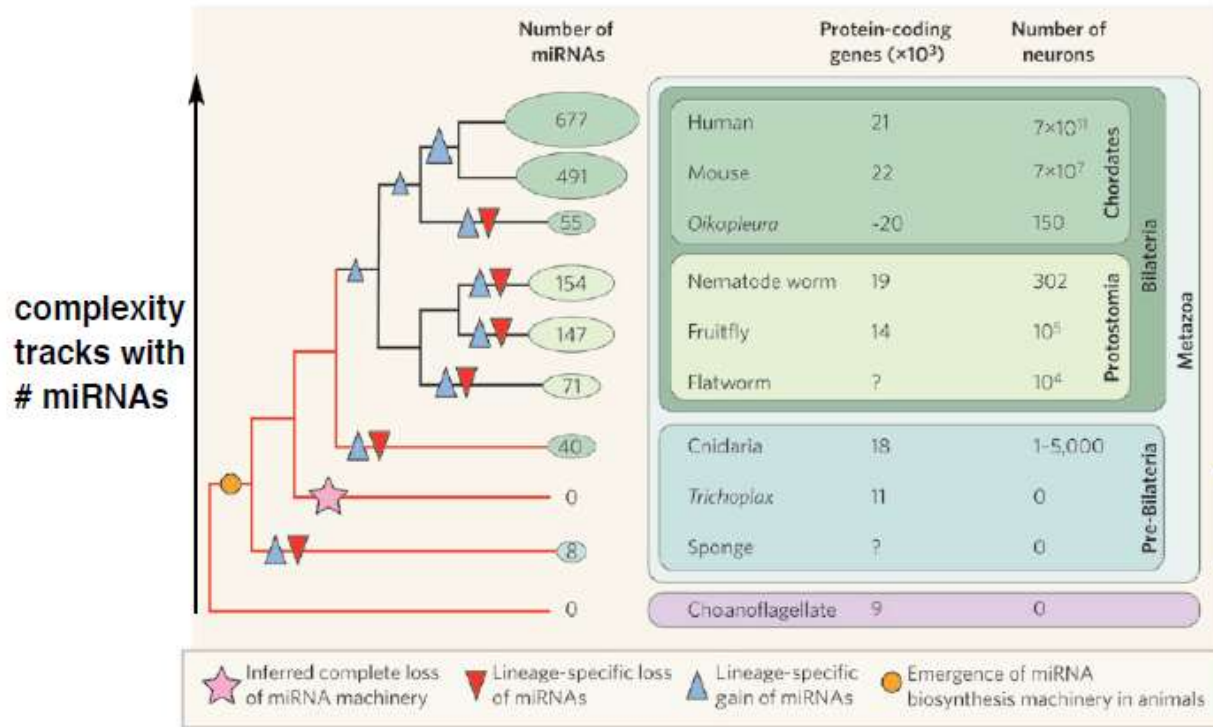
как минимум один белок Ago (с доменом PIWI)  
*(Ago-белки имеются у многих бактерий и архей. Функции не определены – предполагается участие в репликации и реорганизации хроматина)*

РНК-зависимая РНК-полимераза  
*(фаговое происхождение, от ДНК-зависимых РНК-полимераз, имеется у многих вирусов эукариот и бактериофагов)*

# Эволюция аппарата РНК-интерференции

Размер генома не коррелирует со сложностью организма  
 Общее количество генов плохо коррелирует со сложностью организма

Количество miРНК хорошо коррелирует со сложностью организма



Bartel proposes miRNA regulation could explain why complex organisms have the same number of genes as simple ones

*Nature*, 2008, 455, 1193

gene regulation  $\Rightarrow$  evolution

# Распространение компонентов аппарата РНКі в 5 супергруппах эукариот

Species	Argonaute-PIWI-like		Dicer-like	RdRP	miRNAs (Rfam v10)
	Argonaute	PIWI			
<b>Excavata</b>					
<i>Giardia intestinalis</i>	0	1	(1) no helicase domain; might not be dicer ortholog	1	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	1	1	(1)dicer-like helicase only	-	-
<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	-	-	-	-
<i>Leishmania major</i>	-	-	-	-	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	-	1	-	-	-
<b>Chromalveolata</b>					
<i>Paramecium tetraurelia</i>	-	4	2 (Dcr1 p without helicase domain)	2	-
<i>Tetrahymena thermophila</i>	-	4	2 (Dcr1 p without helicase domain)	1	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	-	-	-	-	-
<i>Phytophthora infestans</i>	1	-	?	?	-
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	-	-	-	-
<b>Archaeplastida</b>					
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	-	-	-	-	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	-	3	-	+
<i>Arabidopsis thaliana</i>	10	-	4	6	+
<i>Oryza sativa (japonica)</i>	18	-	5	5	+
<b>Unikonta</b>					
<i>Dictyostelium discoideum</i>	-	4	2 (no helicase domain)	3 (2 fused to Dicer-like helicase)	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	3	-	1	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	-	1	1	-
<i>Neurospora crassa</i>	1	-	1	3	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	-	1	2	-
<i>Caenorhabditis elegans</i> <sup>b</sup>	5	3	2 (Dicer + Drosha)	4	+

Species	Argonaute-PIWI-like		Dicer-like	RdRP	miRNAs (Rfam v10)
	Argonaute	PIWI			
<i>Drosophila melanogaster</i>	2	3	3 (2 Dicers + Drosha)	-	+
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	1	1	2 (Dicer + Drosha)	-	-
<i>Danio rerio</i>	4	4	2 (Dicer + Drosha)	-	+
<i>Homo sapiens</i>	4	4	2 (Dicer + Drosha)	-	+

<sup>a</sup>The number of detectable paralogs in each genome is indicated; the data are from references [8] and [14](Argonaute-PIWI) and additional BLASTP searches (for species that encode a single version of the respective protein or no more than 4 paralogs, all sequences were used as queries to search the NCBI non-redundant protein sequence database; for species with more than four paralogs, 2-3 representative sequences were used)

<sup>b</sup>In addition, the nematode genome encodes a large family of highly derived argonaute proteins, the Argonaute group 3 [58].

# Распространение компонентов, родственных аппарату эукариотической РНКi, у прокариот

Table 2

The prokaryotic connections of the key components of the eukaryotic RNAi machinery

Protein	Taxonomic range of homologs in prokaryotes	Closest archaeal homolog (E-value, % identity)	Closest bacterial homolog (E-value, % identity)	Functions of prokaryotic homologs (reference)
Dicer-helicase <sup>a</sup>	All archaea; no bacteria (only distantly related helicases with statistically insignificant similarity)	ERCC4-like helicase (Hef), uncultured crenarchaeote31-F-01 (5e-19; 24%)	No significant similarity	Resolution of stalled replication forks[23]
Dicer-RNaseIII <sup>a</sup>	Several mesophilic archaea; all bacteria	<i>RNaseIII</i> , <i>Methanococcus maripaludis</i> S2 (9e-14; 25%)	RNase III, <i>Mannheimia haemolytica</i> PHL213 (1e-14; 27%)	rRNA and mRNA processing [25]
Argonaute <sup>b</sup>	Scattered distribution among archaea and bacteria (mostly, in Cyanobacteria)	No significant similarity	No significant similarity	No direct evidence; prokaryotic PIWI-domain proteins are DNA-guided RNA endonucleases, so thought to participate in chromatin remodeling [27,59]
PIWI <sup>c</sup>		Homolog of the eukaryotic argonaute protein, implicated in translation or RNA processing, <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19, (0.14, 24%); limited sequence conservation only in PIWI domain	No significant similarity	
RdRP <sup>d</sup>	Bacteriophages and prophages from diverse bacteria; uncharacterized cyanobacterial proteins (possibly, prophage-derived)	No significant similarity	hypothetical DNA-directed RNA polymerase, <i>Bacillus</i> phage 0305phi8-36 (1e-14, 14% detected in 2 <sup>nd</sup> PSI-BLAST iteration)	Putative DNA-dependent RNA polymerases

<sup>a</sup>Human Dicer protein sequence (Q9UPY3.2) was employed as the query for searching the NCBI non-redundant protein sequence database using BLASTP

<sup>b</sup>Human Argonaute protein sequence (NP\_036331) was used as the query

<sup>c</sup>Human PIWI-like protein sequence (Q96J94) was used as the query

<sup>d</sup>The *C. elegans* RdRP sequence (CAA01312) was used as the query

Пути РНК-интерференции повсеместно встречаются у эукариот и их вирусов (*компоненты системы есть уже у прокариот*)

## Гены miРНК

70-300 н.  
шпилечные  
предшественники

Процессинг  
(Drosha/DCL +  
кофакторы),  
экспорт из  
ядра

## дцРНК

Вирусы, транспозоны,  
транскрипты центромерных  
повторов и т.п., гибриды  
смысловой и антисмысловой  
РНК...

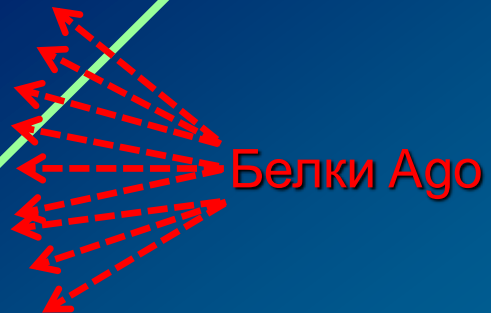
## ncРНК

Атипичные  
предшественники  
Трансгены

# DICER в цитоплазме

В комплексе с TRBP/R2D2

У экскават (примеры – лямблии, трипаносомы) отсутствует гомолог Dicer, либо не все домены, непонятно, есть ли РНК-интерференция



Пути РНК-интерференции повсеместно встречаются у эукариот и их вирусов (*компоненты системы есть уже у прокариот*)

## DICER в цитоплазме





## Некоторые пути могут отличаться у разных объектов:

### Системный сайленсинг

Растения, *C. elegans*, но **НЕ** *Drosophila* и млекопитающие?

*Связывают с трансмембранными белками группы SID*

### РНК-зависимый транскрипционный сайленсинг (TGS)

Не обнаружен у *S.cerevisiae*, слабо проявляется у *Drosophila* и млекопитающих, кроме клеток полового пути (*судя по всему, РНК-зависимые модификации хроматина вытесняются РНК-независимыми*)

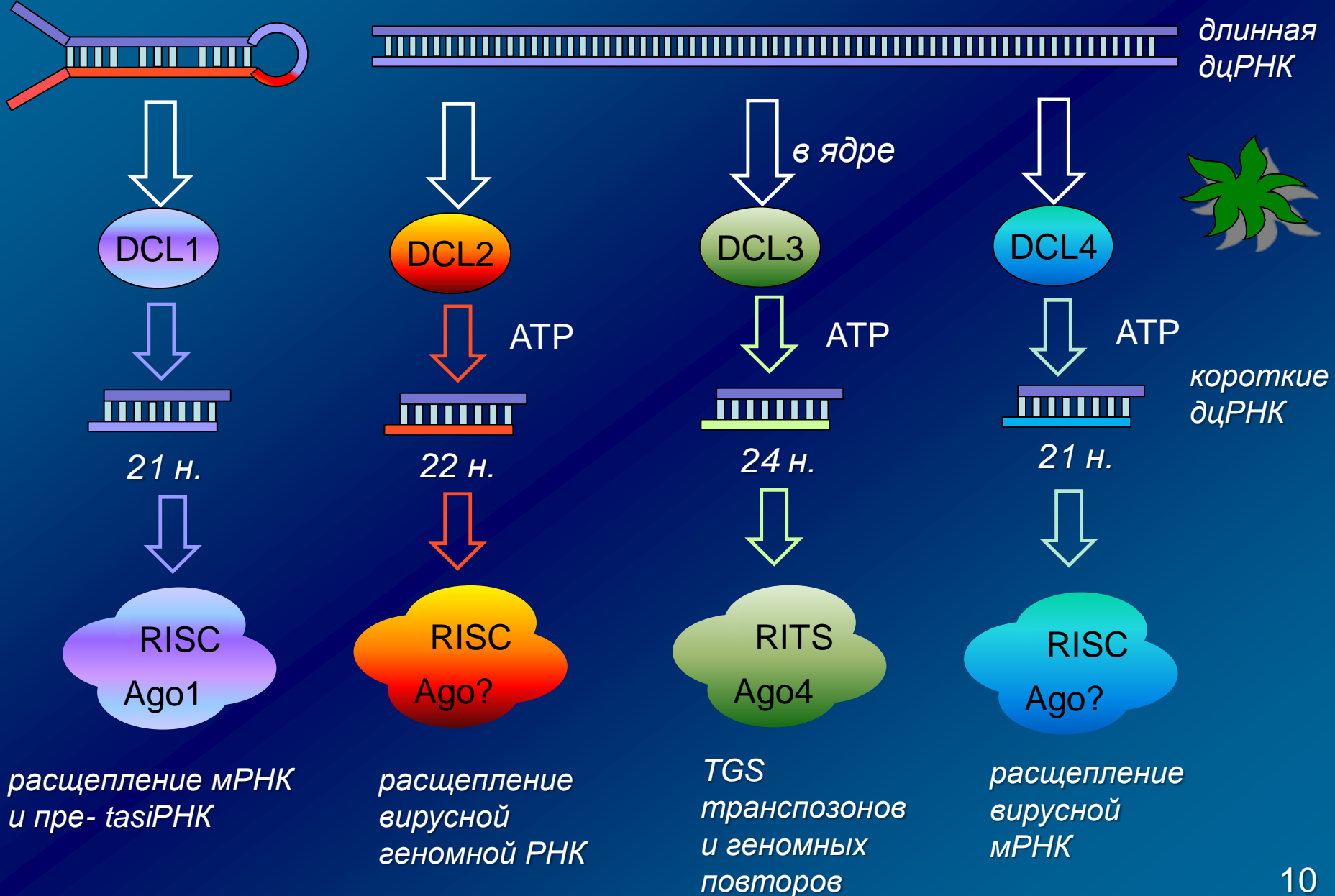
### Репрессия трансляции с участием miРНК

Не обнаружена у некоторых грибов, слабо проявляется у растений

### Классическая РНК-интерференция в цитоплазме, запускаемая длинным дцРНК-индуктором

Слабо проявляется у млекопитающих – дцРНК запускает интерфероновый ответ в цитоплазме, но, если siРНК образуется в ядре – запускается механизм РНК-интерференции – активные компоненты системы есть в наличии!

# Растения: 6 одновременно функционирующих путей РНК-зависимого сайленсинга (TGS и PTGS)



# Растения: 6 одновременно функционирующих путей РНК-зависимого сайленсинга (TGS и PTGS)



21 н.



расщепление мРНК  
и пре- tasiPHK



Регуляция  
роста и  
развития



22 н.



расщепление  
вирусной гРНК



Защита от  
вирусов



24 н.



TGS  
транспозонов  
и геномных  
повторов



Регуляция  
роста и  
развития,  
супрессия  
провирусных  
копий



21 н.



расщепление  
мРНК, в т.ч.  
вирусной



Регуляция  
роста и  
развития,  
защита от  
вирусов

+ ингибирование трансляции и RdDM

## Основные различия между системой miРНК-опосредованного сайленсинга между растениями и животными – не качественные!

	Растения	Животные
Локализация в геноме	<b>В основном</b> межгенные районы, реже интроны	Интроны (большинство), экзоны, межгенные районы
Кластеры генов	Нетипичны	Типичны
Процессинг miРНК	Несколько стадий процессинга DCL в ядре, митохондриальный путь нехарактерен*	Drosha в ядре и Dicer в цитоплазме, либо митохондриальный путь
Метилирование miРНК	Метилирование 3'-конца	Не метилируются
<b>Основной</b> механизм сайленсинга	Расщепление мишеней	Репрессия трансляции
<b>Основные</b> мишени	ORF	3'UTR
Количество мишеней на одну miРНК	<b>Как правило</b> , одна	<b>Как правило</b> , несколько
<b>Основные</b> известные мишени	Гены, участвующие в регуляции, ферменты	Гены, участвующие в регуляции, ферменты, гены структурных белков

Не выявлено гомологов между miРНК животных и растений

Возможны существенные расхождения в функционировании системы РНК- сайленсинга у эволюционно близких объектов

у *Schizosaccharomyces pombe* есть DCR и AGO

у *Saccharomyces cerevisiae* – нет (зато есть HP1)



VS



У *S.cerevisiae* вообще практически нет системы РНК-интерференции, кроме отдельных компонентов!

Но: у близких родственников *S.cerevisiae* (*Saccharomyces castellii* и *Candida albicans*) есть РНК-сайленсинг. **Введение двух белков системы РНК-интерференции (Dicer и Argonaute) от *S. castellii* запускает РНК-интерференцию у *S. cerevisiae*!** (Drinnenberg et al. RNAi in Budding Yeast. *Science* 2009)

Потеря ключевых компонентов системы РНК-интерференции частью эукариот– скорее всего, благоприобретенная характеристика!

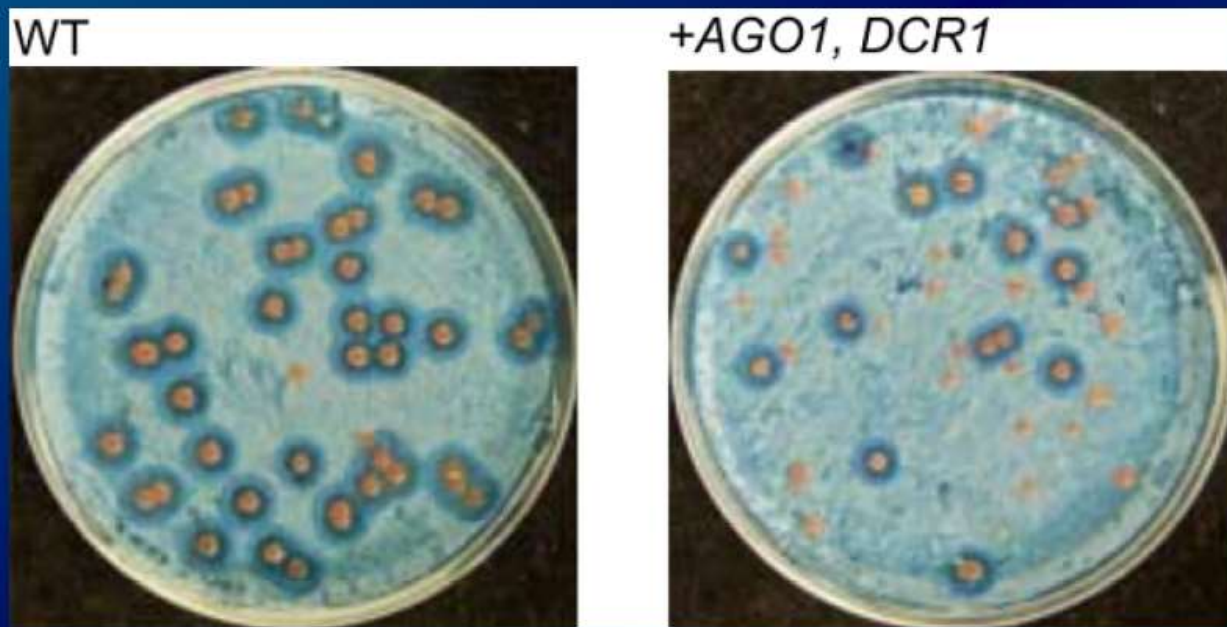
Многие простейшие лишены всех компонентов системы РНК-интерференции (примеры - *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*).

Почему происходит потеря? Возникновение дублирующих по функции механизмов либо потеря селективного преимущества в некоторых нишах

# Потеря РНК-интерференции может давать преимущества

Эксперимент: *S. cerevisiae* с восстановленной способностью к РНК-интерференции быстро теряют симбиотический дцРНК-вирус *killer*, который живет в их цитоплазме. Этот вирус, содержит в своем геноме ген токсичного белка и одновременно защищает клетку, в которой находится, от действия токсина. Яд выделяется дрожжами в окружающую среду и убивает те дрожжевые клетки, у которых нет такого вируса

Активация РНК-интерференции разрушает дцРНК вируса. В результате дрожжи теряют селективное преимущество и неспособны развиваться на средах, уже заселенных конкурентами, не имеющими вируса-убийцы, а также становятся беззащитными перед конкурентами, у которых такой вирус есть



Клетки *S. cerevisiae* высевались на среду, уже покрытую слоем клеток-конкурентов (не имеющих вируса-убийцы). Дикие дрожжи, имеющие вирус и лишённые системы РНКи (слева) справляются с конкурентами успешнее, чем те, в геном которых добавили два гена, необходимые для РНКи (справа). Зона истребления конкурентов выглядит как гало

# Потеря РНК-интерференции может давать преимущества

Целенаправленный поиск генов, необходимых для РНК-интерференции, в геномах грибов, у которых есть симбиотические вирусы-убийцы, а также поиск таких вирусов у грибов, о которых уже было известно, что РНК-интерференция у них есть:

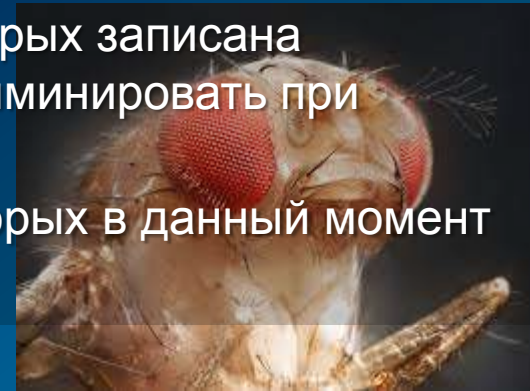
между наличием вирусов-убийц и системы РНК-интерференции существует **четкая отрицательная корреляция**. У всех видов, имеющих вирусов-убийц, нет РНК-интерференции. При этом близкородственные виды могут обладать РНК-интерференцией, но в этом случае у них наверняка нет вирусов-убийц

Все девять случаев утраты РНК-интерференции произошли сравнительно недавно по эволюционным меркам. Если какие-то грибы и утрачивали РНК-интерференцию в более далеком прошлом, потомки этих грибов не дожили до наших дней

# Как могла возникнуть регуляция с использованием miРНК?

## РНК-регуляторы могут участвовать в отборе “свой-чужой”

- многие рiРНК картируются на геноме как уникалы и не имеют явных мишеней
- у большинства животных PIWI белки направлены на транспозоны в клетках зародышевой линии
- у *D. melanogaster* встройка транспозона в локус, кодирующий рiРНК, инициирует сайленсинг его копий в клетках зародышевой линии даже в случае последующих мутаций во встроенной копии
- у потомков, если они не потеряют встройку, сайленсинг таких транспозонов всегда будет происходить, поскольку будут нарабатываться рiРНК к такому типу транспозонов
- это генетическая память
- такой сайленсинг необратим (не происходит только при системных нарушениях аппарата рiРНК-индуцируемого сайленсинга)
- рiРНК-локусы представляют собой “библиотеки”, в которых записана информация о последовательностях, которые надо элиминировать при образовании половых клеток
- в этих библиотеках закодированы регуляторы, для которых в данный момент может не быть РНК-мишеней





# РНК-регуляторы могут участвовать в отборе “свой-чужой”

- у *C.elegans* известно 15000 piРНК, но с участием Piwi-белков подавляется только одно известное семейство транспозонов (Тс3)
- штаммы с идентичными однокопийными трансгенами, встроенными в один и тот же сайт, могут поддерживать различный эпигенетический статус трансгена в клетках зародышевой линии
- трансгены, состоящие из относительно длинной чужеродной последовательности (например, *gfp*), к которой был пришит ген, экспрессирующийся в клетках зародышевой линии, подвергались наследуемому в поколениях сайленсингу, который сопровождался метилированием H3K9 и гетерохроматинизацией
- такие же трансгены, к которым была пришта короткая чужеродная последовательность, экспрессировались
- сайленсинг сопровождался накоплением piРНК, гомологичных **ТОЛЬКО чужеродной части трансгена**
- эти РНК взаимодействовали с Piwi-белком PRG-1, ответственным за сайленсинг транспозонов семейства Тс3

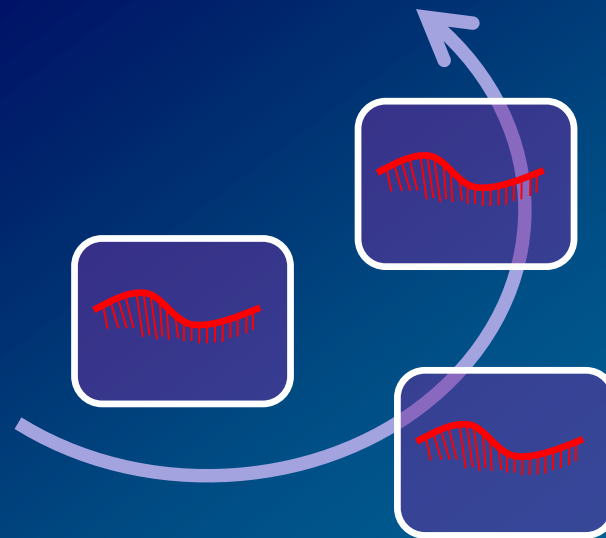
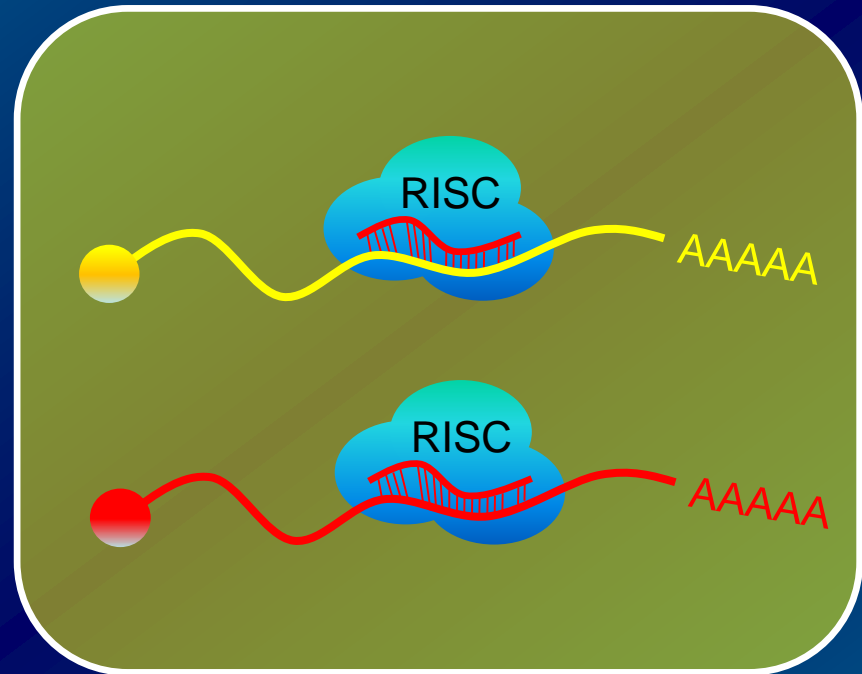
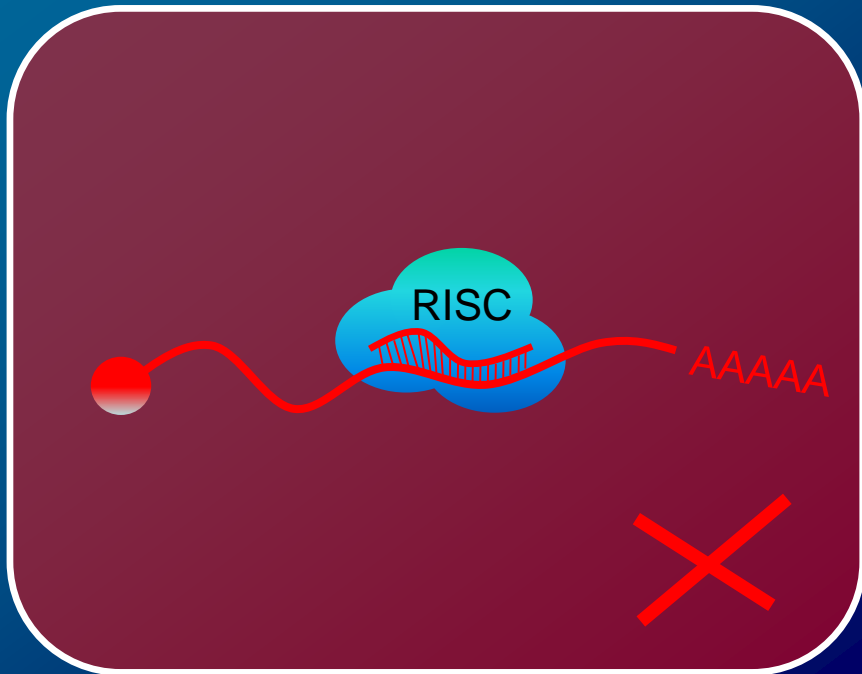


## piRNAs Initiate an Epigenetic Memory of Nonself RNA in the *C. elegans* Germline

Masaki Shirayama,<sup>1,2</sup> Meetu Solh,<sup>1</sup> Heng-Chi Lee,<sup>1</sup> Weifeng Gu,<sup>1</sup> Takao Ishidate,<sup>1,2</sup> Darryl Cortis, Jr.,<sup>1</sup> and Craig C. Mello<sup>1,2,\*</sup>

- PRG-1 требуется для инициации, но не дальнейшего поддержания сайленсинга в поколениях(для которого оказались необходимы классические компоненты системы РНКi)
- это эпигенетическая память!
- в этом случае в геноме не записана информация о том, каким участкам можно транскрибироваться, а каким нельзя
- эта информация содержится в наборе мРНК, поступающем при оплодотворении вместе с материнской цитоплазмой. Наличие этих РНК является “лицензией” на экспрессию соответствующих генов в клетках зародышевой линии
- набор материнских мРНК может осуществлять эпигенетическое программирование? (гипотеза, до конца не подтвержденная)
- такой сайленсинг обратим, возможен сайт-специфичный антисайленсинг

- 1) PRG-1 в комплексе с закодированными в геноме рiРНК ищет чужеродные РНК, экспрессируемые в клетках зародышевой линии (и в цитоплазме, и в ядре)
- 2) Связывание с мишенью по принципу неполной комплементарности привлекает RdRP и инициируется наработка “вторичных” рiРНК
- 3) Эти РНК заряжаются в белки WAGO и запускают механизм сайленсинга
- 4) Отдельный независимый (и неизвестный) механизм за счет “памяти” о том, какие последовательности являются “своими”, препятствует сайленсингу “правильных” генов, конкурируя с аппаратом сайленсинга



# Откуда происходят новые микроРНК?

1. Новые гены из уже имеющихся генов miРНК (через дупликации и мутации)
2. Интроны белок-кодирующих и белок-некодирующих генов
3. Копии транспозонов и других мобильных элементов
4. Длинные некодирующие РНК
5. Из собственных генов-мишеней (в особенности у растений)

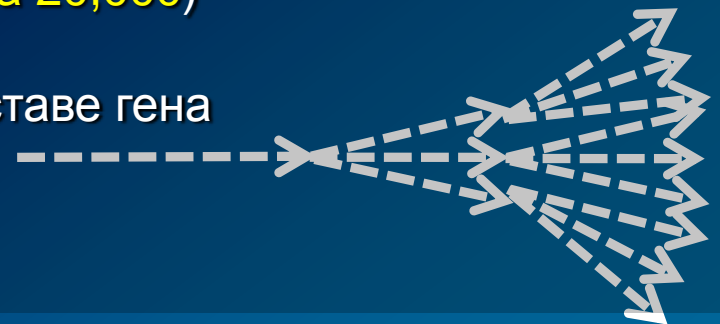
*Для многих miРНК не обнаружено мишеней*

*Псевдогены могут кодировать РНК-регуляторы своих белок-кодирующих гомологов*

*Многие гены miРНК располагаются в рекомбинационно активных участках хромосом, статус экспрессии может существенно меняться*

## Геномы эволюционируют в сторону увеличения

- доли ДНК, не кодирующей белки
- доли транскрибируемой ДНК с неизвестными функциями
- количества псевдогенов (у человека **порядка 20,000**)
- характерной длины интронов
- доли интронных последовательностей в составе гена
- сложности регуляции экспрессии
- числа дублированных функций
- ...

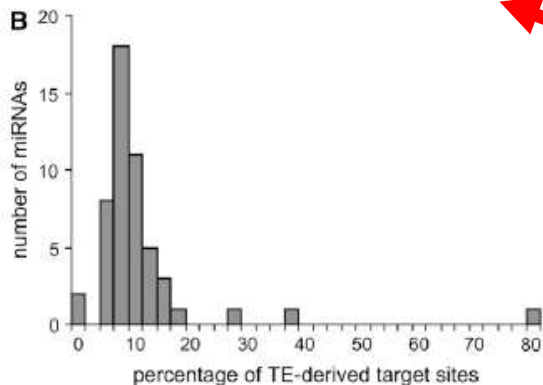
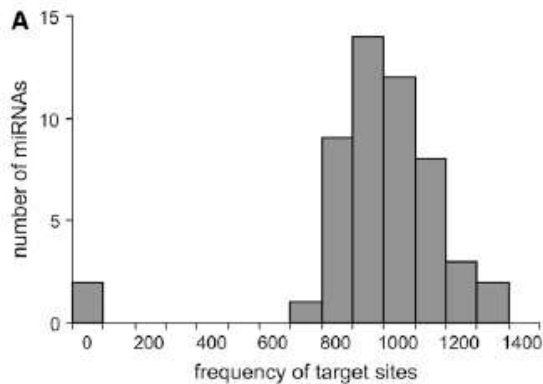


# Гены miRNA из мобильных элементов

45% генома млекопитающих – это копии транспозонов  
Зрелые miRNA, как правило, либо высоко гомологичны мобильным элементам (чаще LINE2), либо не имеют гомологии с ними

MiRNA, происходящие из повторов ретротранспозонов, распознают их транскрипты и участвуют в их нейтрализации. Для таких miRNA характерен низкий уровень консервативности.

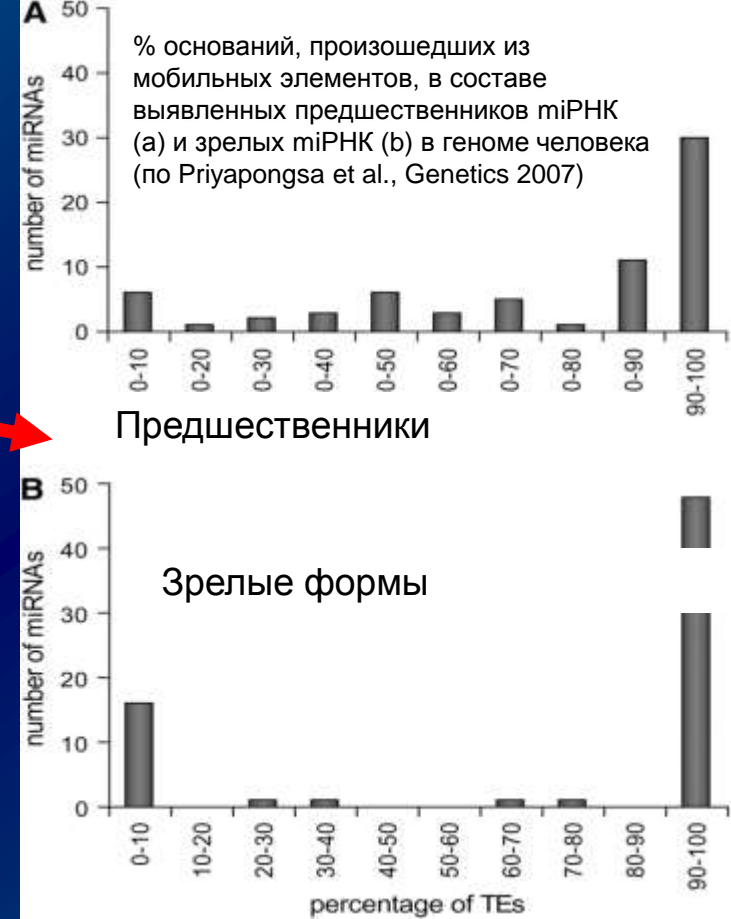
Часто игнорируются при анализе NGS данных, т.к. попадают под фильтры



*Много копий ретротранспозонов и Alu-повторов в 3'UTR miRNA*

(A) Оценочное количество мишеней для miRNA, происходящих от мобильных элементов – **чаще много!**

(B) Оценочное количество происходящих от мобильных элементов мишеней для miRNA, происходящих от мобильных элементов – **чаще мало!**



# Гены miРНК из интронов

- Для возникновения и закрепления miРНК, кодируемых межэкзонными участками, требуется наличие интронов подходящей длины
- Многие интроны родственны мобильным элементам и предположительно происходят от них
- Интроны составляют большую часть некодирующих последовательностей от белок-кодирующей ДНК в геноме (до 30 т.п.н. и более в длину)
- 10-30% сплайсированного материала интронов экспортируется в цитоплазму и относительно долго циркулирует там
- Более 50% известных miРНК человека находятся в интронах. Многие из них участвуют в сайленсинге хроматина, подавляют активность транспозонов и сами регулируются эпигенетически

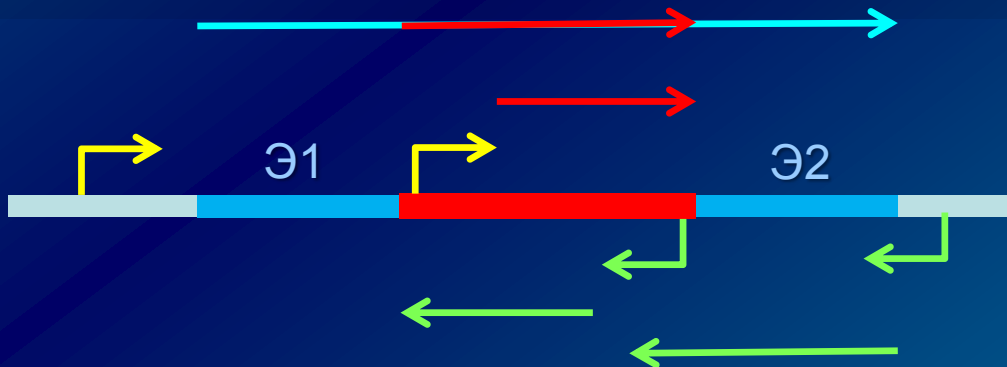
Генетические изменения в интронах могут приводить к нарушениям регуляции интронных miРНК, что приводит к наследственным заболеваниям

Species	Genome size (Mbp)	Number of introns per gene		Size of individual introns		Total intron size per kb cds	
		All genes	Homologous genes	All genes	Homologous genes	All genes	Homologous genes
Human	3400	4.0	5.54	3413.4	1152.4	6824.6	5001.7
Mouse	3454	3.1	6.68	1321.4	666.1	3331.2	3260.3
Rat	2900	3.0	3.77	1091.7	566.8	3207.7	2998.8
Chicken	1200	3.2	3.69	706.3	329.1	1830.1	1920.6
Drosophila	180	2.5	2.44	563.9	445.3	662.1	779.2
C. elegans	100	4.2	4.26	466.6	280.7	1004.2	1033.4
Cress	100	4.8	4.10	239.7	156.9	835.7	733.9
Corn	5000	4.2	4.09	327.5	270.2	1153.7	872.4
S. pombe	14	2.2	2.39	92.7	104.0	285.0	256.5
Aspergillus	13	3.1	5.27	72.2	73.1	162.9	379.2

При увеличении наблюдаемой сложности организма возрастает размер индивидуальных интронов и доля интронных последовательностей, нормированных на кодирующие, а также доля длинных интронов

# Гены miРНК из интронов

- Одни интронные miРНК транскрибируются совместно с “хозяйской” мРНК, из предшественника которой они происходят, регулируются их промоторами и могут служить интересам гена-хозяина, подавляя экспрессию генов, являющихся его функциональными антагонистами
- Другие интронные miРНК транскрибируются со своих собственных промоторов и регулируются независимо
- Третьи интронные miРНК могут котранскрибироваться с хозяйской мРНК, но подвергаться независимой регуляции процессинга
- Некоторые miРНК кодируются внутри гена участками, соответствующими копиям интронов, но транскрибируются не по той же цепи, что транскрипт этого гена. Для такой транскрипции требуется отдельный независимый промотор, и регуляция транскрипции такой miРНК может быть независимой от регуляции транскрипции того гена, внутри которого она закодирована (пример – *let7c* у животных). Эти miРНК, которые не относят к истинным интронным miРНК, могут участвовать в специфичной регуляции соответствующего гена, т.к. гомологичны копиям интронов



5232-5241 Nucleic Acids Reseach, 2005, Vol. 33, No. 10  
doi:10.1093/nar/gki273 Published online 6 August 2005

## An intronic microRNA silences genes that are functionally antagonistic to its host gene

Saiten Barik\*

Journal of Cellular Biochemistry, 2005, 98, 1-10

Genome Biology

### METHOD

Open Access

**PROMiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs**

Arundha Arundhathi\*, Matthew R. Miska\*, Jia Lu\*, Haiyang Fu\*, Daisuke Yamanaka\*, Anne Mehlert\*,  
\*J. Cell. Biochem. 98:1-10 (2005)

# Богатым материалом для коротких РНК, участвующих в сайленсинге, являются длинные некодирующие РНК

- подавляющая часть генома человека транскрибируется, но не транслируется
- >20% последовательностей в геноме человека транскрибируются по обеим цепям
- в геномах млекопитающих выявлено ~35,000 протяженных нкРНК из ~10,000 разных локусов, для которых характерны многие черты мРНК (кэпирование, сплайсинг, полиаденилирование), но они не имеют протяженных ORF (Carninci et al., Science 2005). *Помимо этого, 40% транскриптов не полиаденилированы – что в них?*

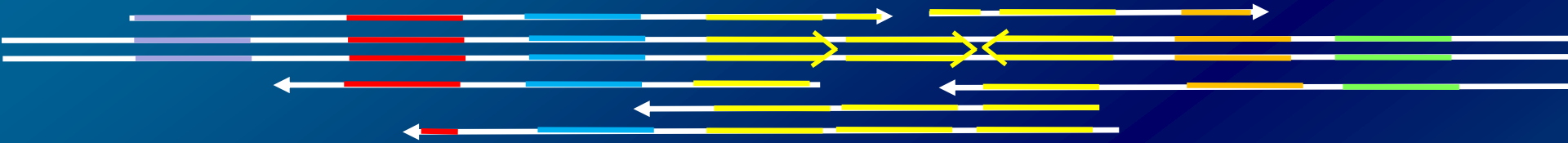
## Длинные нкРНК (long ncRNAs) – длиннее 200 н.

- от 1/2 до 3/4 всего разнообразия транскриптов в клетках человека!
- функции разнообразны:
- контроль альтернативного сплайсинга, репрессия трансляции, эпигенетическая регуляция транскрипции, геномный импринтинг, блокирование теломеразы, регуляция поддержания структуры теломер, модуляция активности факторов транскрипции
- образование триплексных структур ДНК/ДНК/РНК в промоторных участках, либо специфическое взаимодействие с белками
- большое число примеров не ген-специфических эффектов на регуляцию!

Транскрипция часто активируется в ответ на стресс! При стрессе (тепловой шок, вирусная инфекция) Pol III синтезирует длинные нкРНК по SINE ретроэлементам (например, Alu повторам), затем они связываются с Pol II и блокируют образование преинициаторных комплексов транскрипции (показано как для *Arabidopsis*, так и для клеток *M.musculus* и *H.sapiens*)

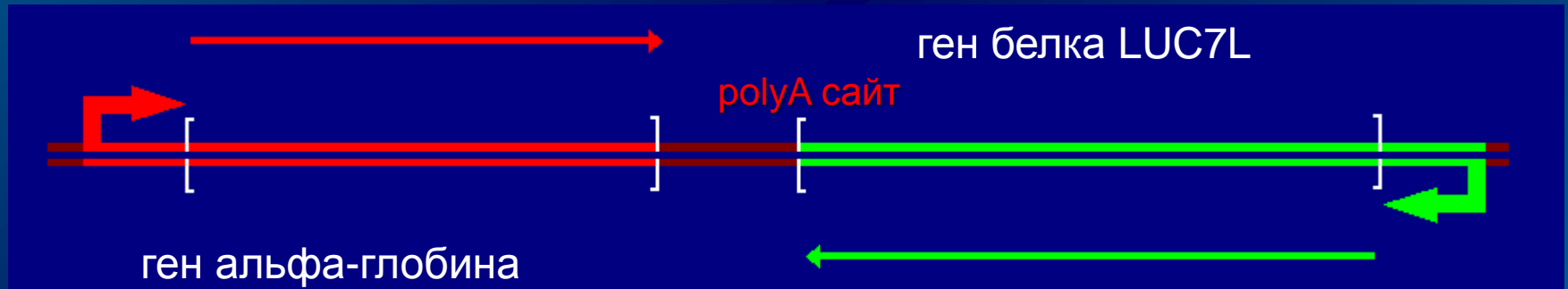


Большинство закодировано в межгенных участках, транскрибируются в виде смысловых и антисмысловых перекрывающихся транскриптов, включающих сегменты белок-кодирующих РНК, что может быть значимо для регуляции

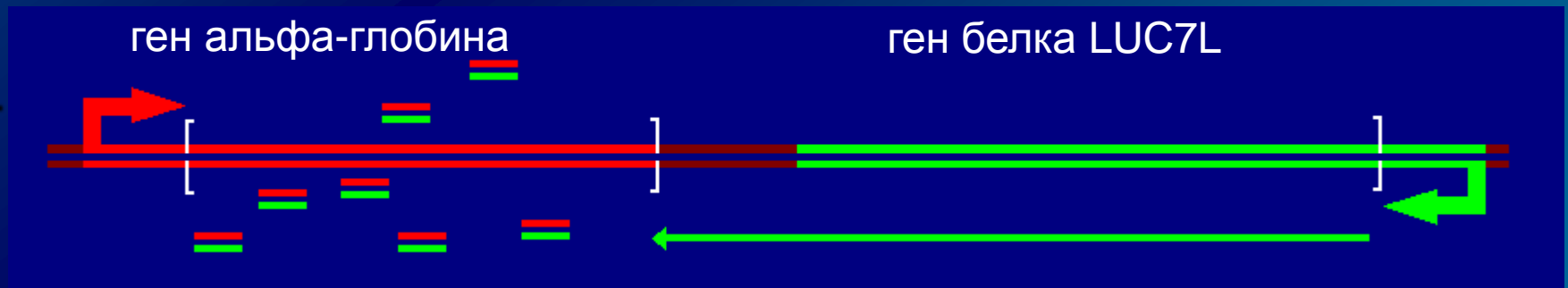


Родственный пример: наследственная форма  $\alpha$ -талассемии (болезни, обычно ассоциированной с мутациями локуса  $\alpha$ -глобина), может быть вызвана делецией в соседнем гене *LUC7L*, устраняющей его polyA сайт

НОРМА



МУТАЦИЯ



Повторы, служащие источником для новых регуляторных РНК, могут подвергаться направленному мутагенезу, приводящему к накоплению уникальных вариантов

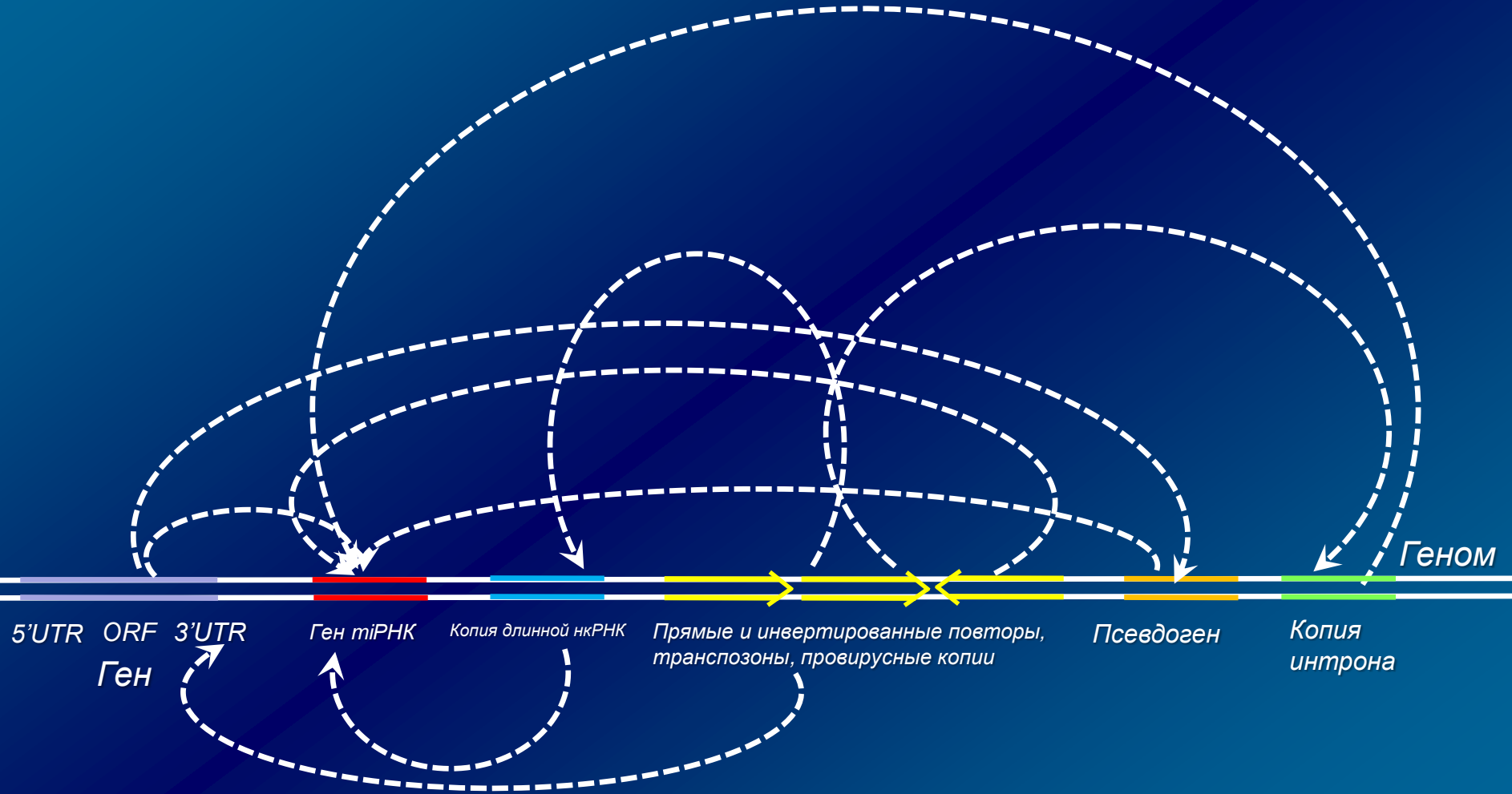
## RIP (repeat-induced point mutation) у аскомицетов

- открыт у *Neurospora*, позже выявлен у многих других видов микроскопических грибов
- средство борьбы с экспрессией транспозонов и другой "эгоистичной ДНК"
- возникновение множественных направленных мутаций (С/Г пары заменяются на Т/А) в участках повторов, гомологичных копиям транспозонов
- мишени - все повторы >400-500 п.н. с более 80% гомологии между собой, кластеры рДНК не подлежат RIP из-за недостаточного размера
- сопряжено с метилированием *de novo* оставшихся цитозинов в мутировавших участках
- происходит после оплодотворения в гаплоидных ядрах премейотических двухядерных клеток аскогенных тканей перед репликацией их ДНК
- конечный результат – эпигенетический сайленсинг, отсутствие активных транспозонов у большинства штаммов *Neurospora*, снижение частоты рекомбинации между повторами
- количество транскриптов RIP последовательностей возрастает у мутантов, дефицитных по РНК-сайленсингу

*RIP не предотвращает распространение нового (например, "горизонтально" приобретенного) транспозона в вегетативных клетках*

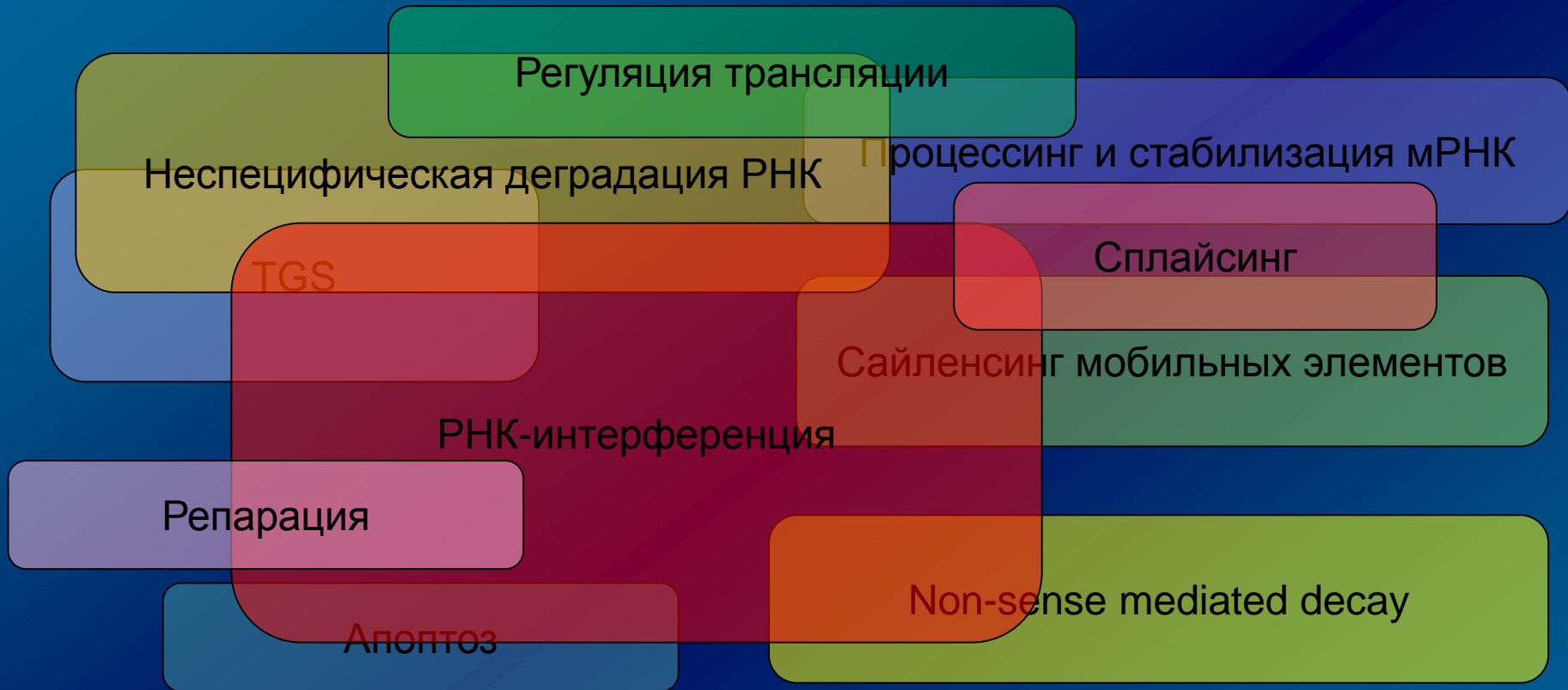


Короткие регуляторные РНК происходят из разных источников, и их происхождение может определять функцию

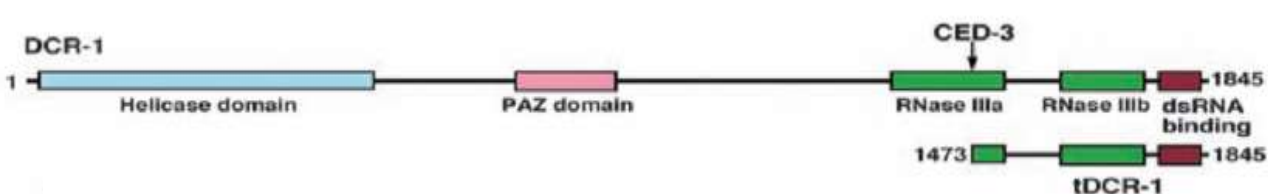


3'UTR генов домашнего хозяйства эволюционировали в сторону элиминации сайтов связывания miРНК

# Отдельные компоненты аппарата РНК-сайленсинга участвуют в реализации иных процессов в клетке



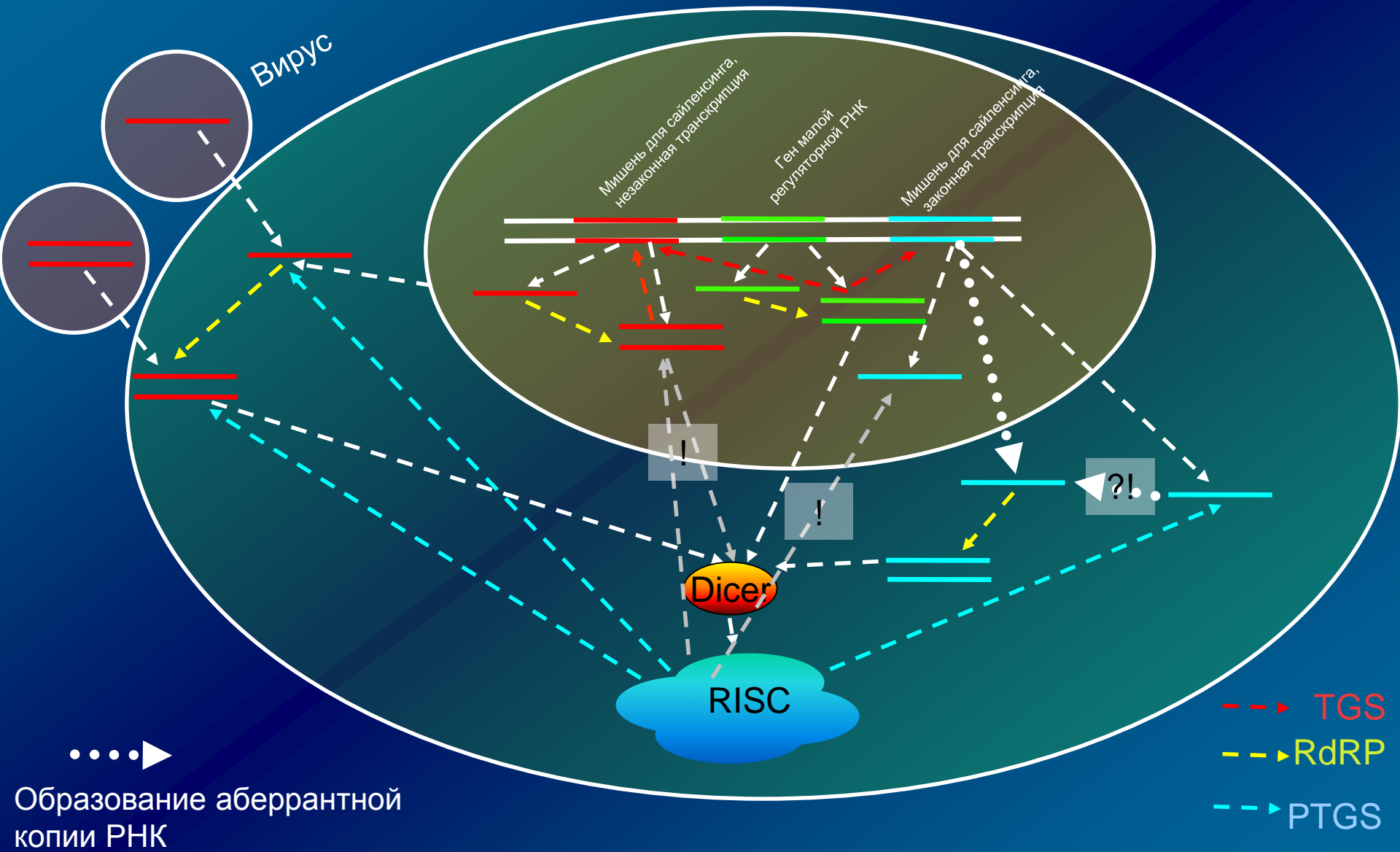
Dicer (DCR-1) у *C.elegans* расщепляется каспазой CED-3, С-концевой фрагмент проявляет ДНКазную активность, необходимую для апоптоза (Nakagawa et al., Science 2010)



**Caspase-Dependent Conversion of Dicer Ribonuclease into a Death-Promoting Deoxyribonuclease**

Akihisa Nakagawa,<sup>2\*</sup> Yong Shi,<sup>3\*</sup> Eriko Kage-Nakadai,<sup>2</sup> Shohei Mitani,<sup>2</sup> Ding Xue<sup>1†</sup>

# Механизмы РНК-сайленсинга в клетке составляют сложную сеть взаимодействий



И Dicer, и RdRP, и Ago распределены между ядром и цитоплазмой, возможен активный транспорт в ядро (напр., *imr8* для Ago2)

Вирус

В ядрах ряда модельных объектов обнаружены белки Ago, характерные для RISC (*C.elegans*, *D.melanogaster*, *A.thaliana* и т.д.)

Млекопитающие: возможна индукция РНК-интерференции против ядерных РНК (snRNA 7SK и U6). При этом **активный RISC собирается в ядре!** Те же компоненты RISC объединяются в цитоплазме, если мишень РНКi – цитоплазматическая РНК (например, РНК ВГС) (Berezyna et al., PNAS 2006)

### siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites

Svltiana Y. Berezyna<sup>1\*</sup>, Lubica Supekova<sup>1\*</sup>, Frantisek Supek<sup>1</sup>, Peter G. Schultz<sup>2\*</sup>, and Ashok A. Deniz<sup>1\*</sup>

Departments of <sup>1</sup>Molecular Biology (IMB-13) and <sup>2</sup>Chemistry, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037; And <sup>3</sup>Genetics Institute of the Novartis Research Foundation, 10675 John Jay Hooking Drive, San Diego, CA 92121

Contributed by Peter G. Schultz, March 28, 2006

Recent observations of RNA interference (RNAi) in the nuclei of human cells raise key questions about the extent to which nuclear and cytoplasmic RNAi pathways are shared. By directly visualizing the localization of small interfering RNA (siRNA) in live human cells, we show here that siRNA either selectively localizes in the cytoplasm or translocates into the nucleus, depending on where the silencing target RNA resides. Two siRNAs that target the small nuclear RSK and U6 RNAs localize into the nucleus as duplexes. In contrast, an siRNA targeting the cytoplasmic hepatitis C virus replicon RNA dissociates, and only antisense strand distributes in the cytoplasm of the cells harboring the target RNA, whereas sense strand gets degraded. At the same time, both strands of the latter siRNA are distributed throughout the cytoplasm and nucleus in cells lacking the silencing target RNA. These results suggest the existence of a mechanism by which the RNAi machinery orchestrates a target-determined localization of the siRNA and the corresponding RNAi activity, and also provide evidence for formation of nuclear-programmed active RNA induced silencing complexes directly in the nucleus.

the cytoplasm and nuclei of HeLa cells. Given these results, different mechanisms can be envisioned by which nuclear-programmed RISCs are formed and localized to the nucleus. One possibility is that the guide (antisense) siRNA strand forms RISC in the cytoplasm, and this assembled and active RISC is then transported to the nucleus. This mechanism could represent a common RISC formation pathway for both cytoplasmic and nuclear targets, with subsequent cytoplasmic and nuclear partitioning of variously programmed RISC complexes. Alternatively, siRNA could first enter the nucleus as duplexes, followed by active RISC assembly in the nucleus. A third possibility is that RISC complexes can be formed both in the cytoplasm and in the nucleus, with or without later redistribution in the cell. In a more general context, it is not known whether, after transfection, siRNA is randomly distributed and can form RISC complexes throughout the cell, or a more selective cytoplasmic versus nuclear distribution and localized activity is achieved through passive or active transport.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/051111>; this version posted March 28, 2006. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.



Образование aberrантной копии РНК



---> TGS  
---> RdRP  
---> PTGS

# РНК-сайленсинг – связь с модификациями хроматина и пересечение путей: summary

- РНК-зависимый сайленсинг действует **на всех уровнях экспрессии** генов, включая транскрипционный, а его компоненты у ряда организмов задействованы в механизмах **изменения последовательности ДНК** в геноме
- Разные компоненты аппарата РНК-сайленсинга у эукариот ведут происхождение от вирусов, эубактерий и архей
- Эволюция аппарата РНК-зависимого сайленсинга у разных организмов привела к заметным **различиям в наборе активных механизмов** у растений, животных и грибов
- Количество генетического материала для возникновения новых РНК, участвующих в сайленсинге, возрастает за счет накопления повторенных последовательностей, роста количества и увеличения длины интронов и псевдогенов
- Роль компонентов системы РНК-зависимого сайленсинга **не ограничивается РНК-зависимым сайленсингом**

*Короткие некодирующие РНК и  
регуляция экспрессии генов  
эукариот*

*IV: Использование РНК-интерференции в  
прикладных целях*



# РНК-интерференция как инструмент исследования и средство терапии— общие соображения:

РНК-сайленсинг— древний и консервативный механизм  
Может быть индуцирован практически у всех эукариот  
Может быть направлен на любой ген, последовательность которого известна  
Может воздействовать одновременно на множество генов  
Может быть реализован в краткосрочном и долгосрочном вариантах

Ряд патологий вызван нарушением природных механизмов РНК-интерференции и подлежит возможной коррекции  
Любая патология, связанная с нежелательной экспрессией специфической последовательности, в перспективе может быть скорректирована с использованием РНК-интерференции



# Применение РНК-интерференции *in vivo*

## Достоинства:

Высокая специфичность

*возможно специфическое подавление экспрессии аллеля, отличающегося от других вариантов **одной нуклеотидной заменой!***

Универсальность подхода

Небольшие затраты времени по сравнению с генным нокаутом

Возможность гибкой регуляции

Нет необходимости создания трансгенных линий

Можно обойти развитие резистентности

*новый дизайн siРНК в случае появления мутации резистентности*

## Ограничения:

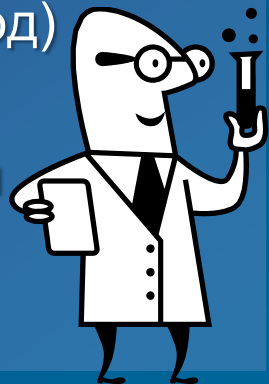
Затухание сигнала (если не используется трансгенный подход)

Стабильность сигнала

Проблемы эффективной доставки в клетки и органы-мишени

Неспецифические (off-target) эффекты

Проблемы дизайна



# Ограничения применения РНК-интерференции

1. **Позиционные эффекты** – одни мишени лучше других
2. **Угасание активности siРНК** – обычно за несколько дней после трансфекции
3. Кросс-реактивность за счет гомологии с другими мишенями, **off-target эффекты** (*возрастают с повышением концентрации*)
4. Активность блокируется за счет **конкуренции с другими siРНК**
5. Некоторые siРНК высоко устойчивы к химическим модификациям, другие - нет
6. Различная **толерантность к мутациям в мишени**
7. Различная изменчивость мишеней
8. (Основная проблема в настоящее время) – доставка в клетки *in vitro* и *in vivo*
9. Некоторые siРНК и их предшественники запускают **интерфероновый ответ** у млекопитающих

# Перспективы практического использования РНКi

Генный нокадаун для “обратной генетики”:

Исследования последствий “генного нокадауна” при помощи microarray и NGS

Выявление функций новых идентифицированных генов

Анализ возможных нецелевых эффектов медикаментов, основанных на подавлении экспрессии генов

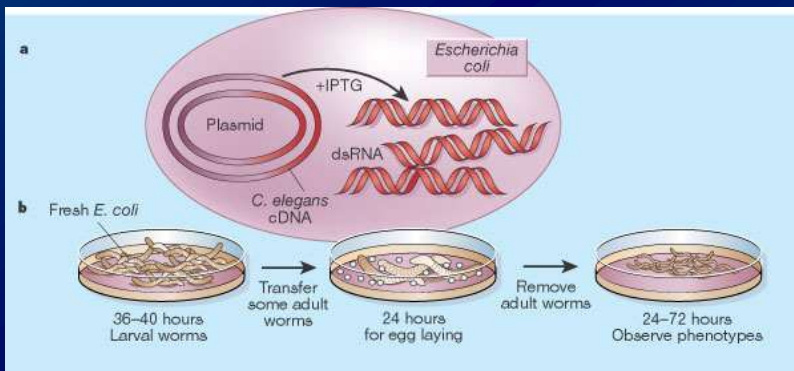
Нокадаун последовательностей с известной функцией

Нокадаун последовательностей с неизвестной функцией

Исследование “генных сетей”

## BFL (Bacterial Feeding Library) для *C.elegans*

Достаточно накормить *C.elegans* бактериями, производящими дцРНК, для индукции РНК-интерференции



Создан набор праймеров для всех белок-кодирующих генов *C.elegans*:

Клонирование 19 213 ампликонов в вектор для двунаправленной транскрипции

Результат: 16 757 рекомбинантных штаммов, из них дцРНК удалось наработать для 86.3% генов (остальные не получились)

# BFL, результаты:

- Только после индукции РНКі 10% генов-мишеней получены различные фенотипы
- **К аберрантным фенотипам** (стерильность, нарушения формирования нервной системы, дефекты эмбрионального развития и пр.) наиболее часто **приводила индукция интерференции высококонсервативных генов**: гены белков, участвующих в синтезе ДНК, контроле клеточного цикла
- **Эволюционно “молодые” гены не давали детектируемых фенотипов**: много дупликаций, специализированные или избыточные функции

Геномная **кластеризация** генов, нокаун которых приводил к фенотипическим проявлениям  
Охарактеризованные белковые домены, синтез которых был подавлен:

**жизнеспособные** фенотипы при подавлении более “**недавних**” доменов

- домены, специфичные для животных (пример: Ig-подобные повторы)

**нежизнеспособные** фенотипы при подавлении более “**старых**” доменов

- общие домены с растениями и низшими эукариотами
- эволюционно консервативны, необходимы для выживания

Ashrafi et al. (2003) использовали BFL для скрининга по признаку избыточного накопления жиров - найдено 417 генов у *C. elegans*. Многие из найденных генов консервативны – возможные мишени для терапии ожирения у человека (Tuschl, 2003)



# Перспективы практического использования РНКi

## Генетическая “вакцинация”

Теоретически при помощи инсерции гена, производящего комплементарную РНК, возможна генетическая “вакцинация” любого организма против любой РНК, в том числе мРНК и геномов ретровирусов

Гавайская папайя была поражена PRV (Papaya Ringspot Virus). Не помогала ни селекция, ни какие-либо препараты, помогла генная модификация

**генетически модифицированная папайя**

**папайя, пораженная вирусом**



*Первые подходы к контролю количественных признаков!*



*а также кофе с уменьшенным содержанием кофеина, зеленые розы и т.п.*

IN BRIEF

No More Free Lunch: Using RNA Interference in the Host to Reduce Growth of a Parasitic Plant

It is generally correct to think of plants as resistance to parasitic plants has been formation. The authors next express an

the benefits of genetic research in agriculture... effects on food and fuel production... 2011, University of Kentucky, College of Arts and Sciences



RNAi in tobacco reduces growth of parasitic dodder. Growth of the parasitic plant dodder on wild-type tobacco (left) and on tobacco transgenic for an RNAi construct targeting a dodder KNOX developmental transcription factor. (Reprinted from Alakonya et al. [2012], Figure 5A.)

# РНК-терапия

## Основные направления разработок:

- Вирусные заболевания
- Генетические расстройства (дефектные продукты в результате мутаций)
- Аутоиммунные заболевания
- Рак, в т.ч. смягчение действия традиционных противораковых препаратов

## Основные принципы:

- Антисенс-ингибирование (Morpholino)
- Антисенс-расщепление, опосредованное РНКазой H
- Рибозимы и др. направленная модификация
- Индукция деградации miРНК (tailing/trimming)
- **Введение индукторов РНК-интерференции**
- **Экспрессия индукторов РНК-интерференции**

Могут быть направлены на miРНК

## Основные ограничения:

- Нецелевые эффекты. в т.ч. цитотоксичность
  - рабочие концентрации от нм до десятков нм
  - конкуренция с другими siРНК
- Резистентность и позиционные эффекты
- Адресная доставка
- Интерфероновый ответ



# РНК-терапия

Задачи, которые приходится решать:

- Определение (или выбор) доступной мишени
- Валидация мишени
- Выбор способа индукции
- Дизайн
- Обеспечение стабильности
- Получение индуктора
- Адресная доставка
- Контроль целевых и нецелевых эффектов
- **Коррекция на всех стадиях**

## Индукция РНК-интерференции в клетках млекопитающих

Доставка в ядро с помощью векторов или экспрессия в ядре:

Длинные дцРНК, эффективнее коротких: нет кэпа и нет polyA – не выводятся в цитоплазму, а процессируются в ядре до siРНК

Доставка в цитоплазму: должны быть короткими (длинные запускают PKR и интерфероновый ответ), требуется избегать некоторых мотивов



# Защитная реакция клеток млекопитающих на дцРНК



Но:

Некоторые дцРНК уходят из-под интерферонового ответа

Некоторые вирусы борются с интерфероновым ответом

Некоторые специфические мотивы в РНК  $\leq 30$  (п.)н. ("danger motifs") стимулируют интерфероновый ответ

Степень выраженности ответа и порог по длине индуктора зависят от типа клетки

# РНК-терапия: DRACO

Double-stranded RNA Activated Caspase Oligomerizer

Рекомбинантный белок, состоящий из трех частей:

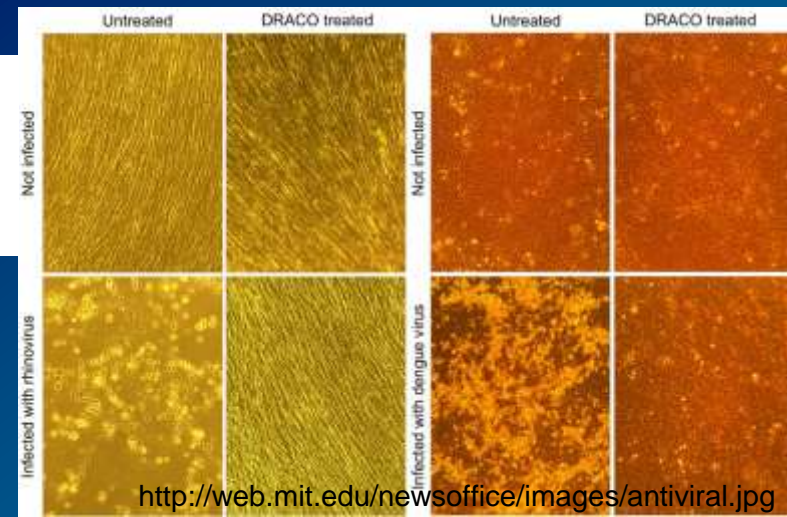
- Delivery Tag (нецитотоксичный белок, например, HIV-TAT, для доставки в клетку сквозь клеточную мембрану без ее разрушения)
- дцРНК-связывающий белок
- индуктор апоптоза (фрагмент белка Araf-1)

Триггер (образование длинной дцРНК в клетке в жизненном цикле вируса) запускает самоуничтожение клетки, не давая вирусу распространиться

- проблематично формирование устойчивости

В клеточных культурах DRACO оказался эффективен против ряда вирусов, включая грипп, вирус Денге и риновирусы. Предварительные испытания на мышах показали эффективность в борьбе с вирусом гриппа

Слева: риновирус (левый блок) и вирус Денге (правый блок) поражают необработанные клетки в культуре, обработка DRACO не токсична для неинфицированных клеток и излечивает инфицированные клетки



OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

## Broad-Spectrum Antiviral Therapeutics

Todd H. Rider\*, Christina E. Zook, Tara L. Boettcher, Scott T. Wick, Jennifer S. Pancoast, Benjamin D. Zusman

Lincoln Laboratory, Massachusetts Institute of Technology, Lexington, Massachusetts, United States of America

<http://web.mit.edu/newsoffice/images/antiviral.jpg>

# РНКи-терапия

2001: Tuschl и соавторы показали, что малые синтетические РНК, введенные в человеческие клетки, могут подавлять экспрессию человеческих генов

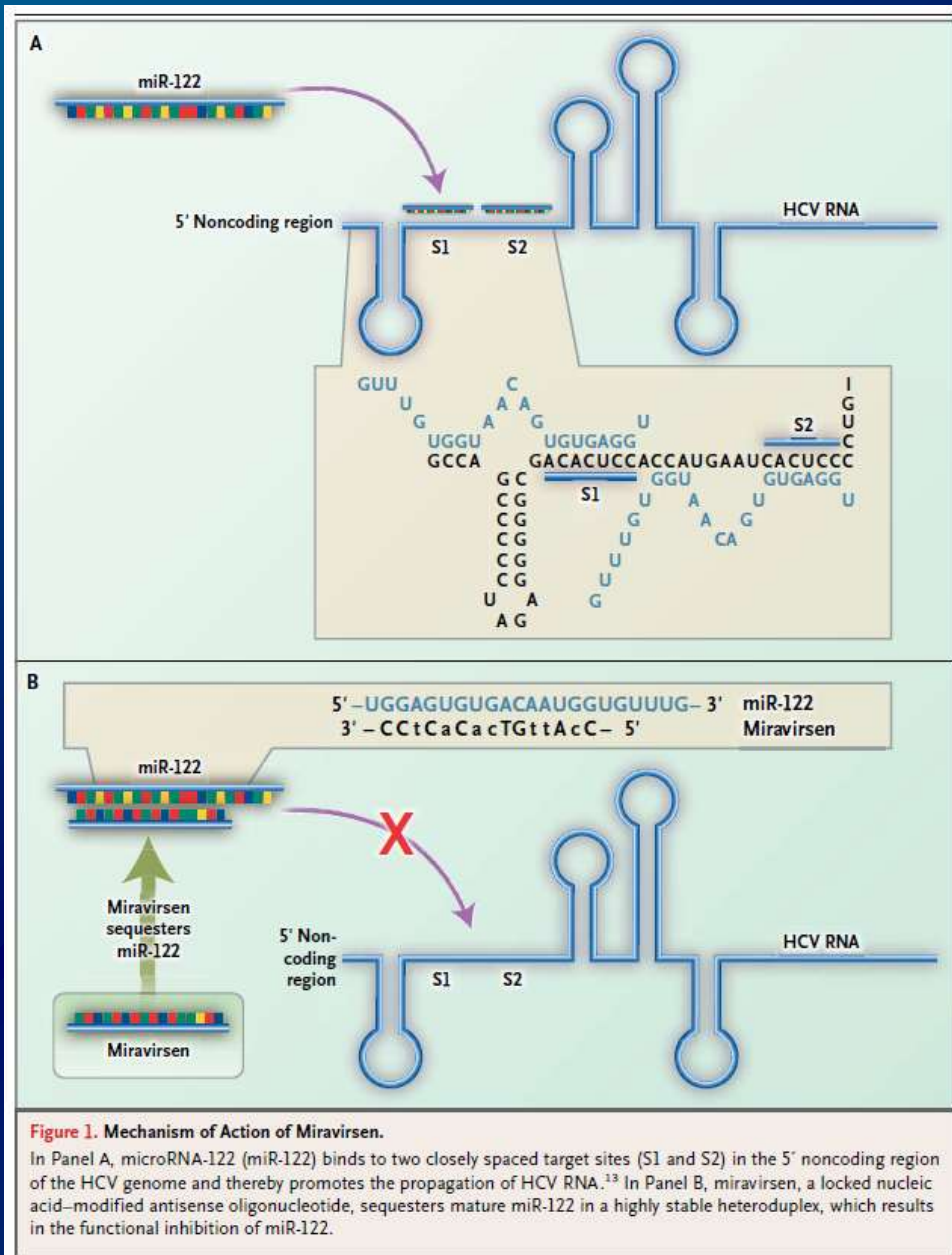
2002: McCaffrey и соавторы успешно индуцировали РНКi у взрослых мышей

Характер патологии	Принципы терапии
Вирусная инфекция	Уничтожение вируса Уничтожение инфицированных клеток Предотвращение возможности инфекции Down-регуляция вирусных miРНК
Повышение содержания регуляторной РНК	Down-регуляция регуляторной РНК Уничтожение регуляторной РНК <b>Anti-miRs</b> <b>MiРНК-приманки</b> (могут кодировать GFP)
Понижение содержания регуляторной РНК или ее отсутствие	Стимуляция экспрессии регуляторной РНК Введение регуляторной РНК или ее аналога Введение вектора, кодирующего предшественник <b>Mir-mimics</b>
Мутация в мишени для регуляторной РНК или гене самой регуляторных РНК	Уничтожение мишени Down-регуляция мишени
Нежелательная экспрессия мишени	Уничтожение мишени Down-регуляция мишени

# РНК-терапия: miR-122 и вирус гепатита С

- только у позвоночных, экспрессируется только в клетках печени
- 72% от общего содержания miРНК в печени, регулятор метаболизма жирных кислот, одна из самых высокопредставленных miРНК
- ингибирование не токсично (подтверждено на приматах, включая людей)
- связывается с 5'-UTR РНК ВГС и активирует его жизненный цикл, стимулируя трансляцию и защищая 5'UTR от клеточных нуклеаз, в т.ч. Xrn-1, в цитозоле (Li et al., PNAS 2013). Мутации, препятствующие связыванию, отбраковываются
- активация осуществляется с участием Ago2. Другие известные miРНК-активаторы тоже связываются с 5'UTR с участием Ago-белков
- внутривенное ведение 15-звенного LNA-модифицированного ингибитора Miravirsen (Santaris Pharma) обезьянам не привело к накоплению escape-мутантов в течение 16 недель
- 2 недели после лечения – снижение нагрузки в 200 и 400 раз
- контрольная группа, подвергавшаяся терапии ненуклеозидным ингибитором полимеразы: escape-мутанты выявлены уже через 2 дня
- на второй стадии доклинических испытаний на людях (проведена в 2012 г.) эффект снижения вирусной нагрузки (в среднем в 500 раз) сохранялся в течение 10 недель после последнего введения

# РНК-терапия: miR-122 и вирус гепатита С



# РНК-терапия: miR-122 и вирус гепатита С

- отношения miR-122 с клетками печени и возбудителями вирусных гепатитов не столь просты!
- разные пациенты по-разному реагировали на Miravirsen, судя по всему, из-за различий в экспрессии miR-122
- core-белок ВГС снижает содержание miR-122 в культурах клеток печени (Li et al., J. Virol. 2013)
- miR-122 может подавлять экспрессию вируса гепатита В и выступать в качестве опухолевого супрессора (обзор Sendi, Hepat. Mond. 2012)
- пониженная экспрессия miR-122 ассоциирована с повышением риска развития гепатоцеллюлярной карциномы (Lieberman et al., NEJM 2013), за исключением тех ее случаев, которые ассоциированы с ВГС
- мыши, нокаутные по гену miR-122, развивались нормально, но демонстрировали повышенные частоты гепатоцеллюлярной карциномы
- как минимум, продолжительная терапия с помощью Miravirsen может представлять существенный риск
- miR-122 – перспективный биомаркер: повышение содержания в крови указывает на повреждение печени и может быть зарегистрировано раньше, чем печеночные ферменты
- пониженные уровни miR-122 в крови наблюдаются при инфицировании штаммами ВГС, более устойчивыми к интерферонотерапии

# Экзогенный индуктор РНК-сайленсинга

- дцРНК-дуплекс с полной (siРНК) или неполной гомологией (miРНК-мимик)
- короткую шпилечную РНК
- аналог предшественника miРНК (pre-miРНК или pri-miРНК)
- антисмысловой РНК-олигонуклеотид
- вирус или вектор для внутриклеточной экспрессии

## Способы синтеза РНК-индуктора

### Химический синтез оцРНК и дцРНК

- широкие возможности модификации и мечения

### Транскрипция *in vitro* фаговыми РНК-полимеразами

- ниже выход, но проще наработка in house
- необходимость выбора участка мишени

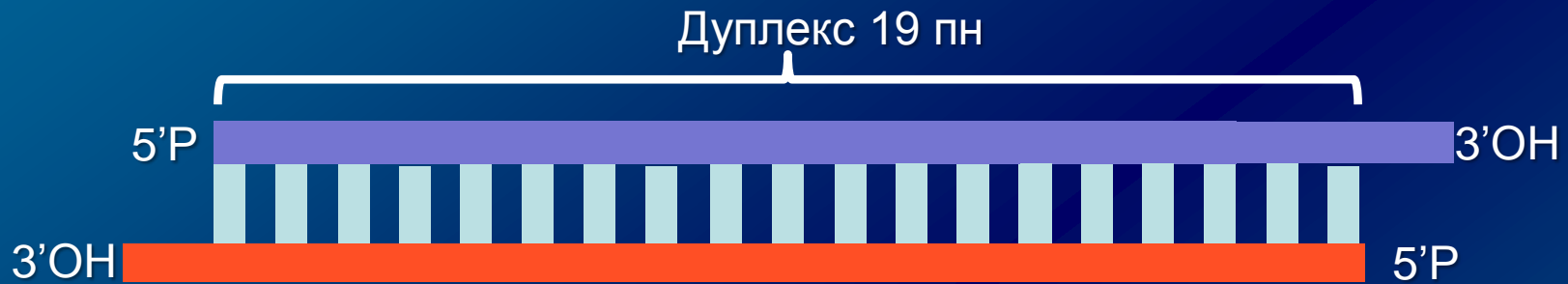
### “Коктейли siРНК”

- ферментативный гидролиз длинных дцРНК (РНКазaIII/DICER) *in vitro*
- нет необходимости выбора участка мишени
- высокий риск неспецифичных эффектов
- низкая эффективная концентрация целевой siРНК

### Клеточные системы синтеза

Эффективный субстрат для Dicer – РНК-дуплекс 27 п.н. (25-30 н. – в качестве индукторов РНКi в клетках млекопитающих в 10 раз эффективнее, чем дуплексы с оверхэнгами 19+2

“Классическая” siРНК



siРНК от IDT



*Однозначная передача выбранной специфической активной цепи с участием Dicer*



# Стабилизация РНК-индуктора

2'-О-метилирование – стабилизация в 5-10 раз за счет чувствительности к ДНКазам (используется и в антисенс-методиках, и в РНКi)

Введение остатков 2'-О-метил-РНК может предотвращать активацию интерферонового ответа

2'-метоксиэтилирование и пр. - улучшенная фармакокинетика, возможность введения с водно-солевым раствором (без липидных наночастиц)

Введение ДНК- и LNA-оснований

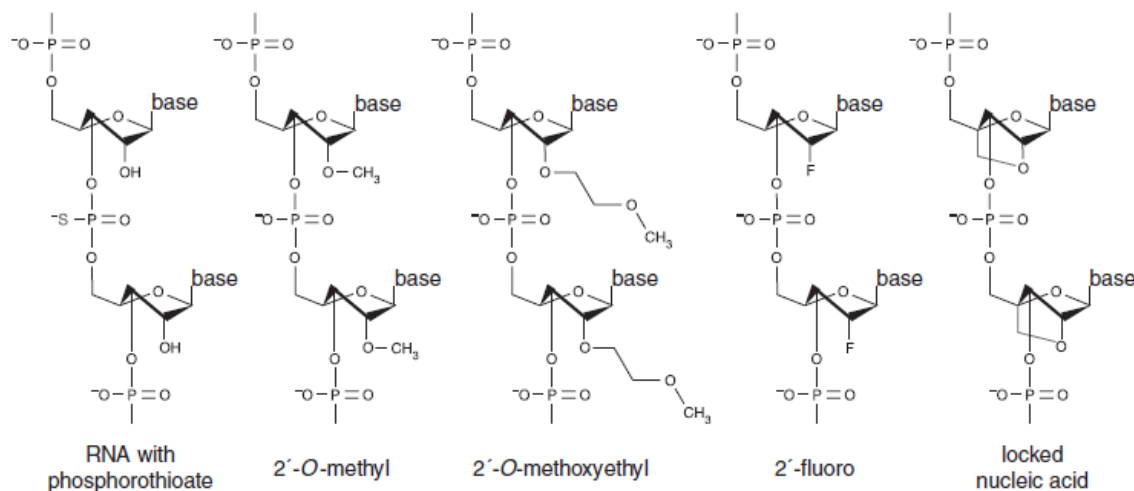


Figure 5 Chemical modifications that improve the stability, biodistribution and delivery of ASOs. S indicates sulfur substitution of a non-bridging oxygen to make a phosphorothioate linkage between nucleotides); 2'-O-methyl RNA contains a methyl group bound to the 2' oxygen of the ribose; 2'-O-methoxyethyl RNA contains a methoxy group bound to the 2' oxygen of the ribose; 2'-fluoro RNA contains fluorine molecule bound to the 2' oxygen of the ribose; and locked nucleic acid introduces a 2',4' methylene bridge in the ribose to form a bicyclic nucleotide.

# Доставка РНК-индуктора в клетки/ткани

*РНК высокомолекулярна, заряжена отрицательно и отталкивается от головок липидов клеточной мембраны, быстро фильтруется почками и экскретируется in vivo*

Кормление бактериями, электропорация, вымачивание и пр.

- применение ограничено, для немногих объектов

## Инъекции

- внутримышечная инъекция
- внутривенная инъекция
- внутриопухолевая инъекция

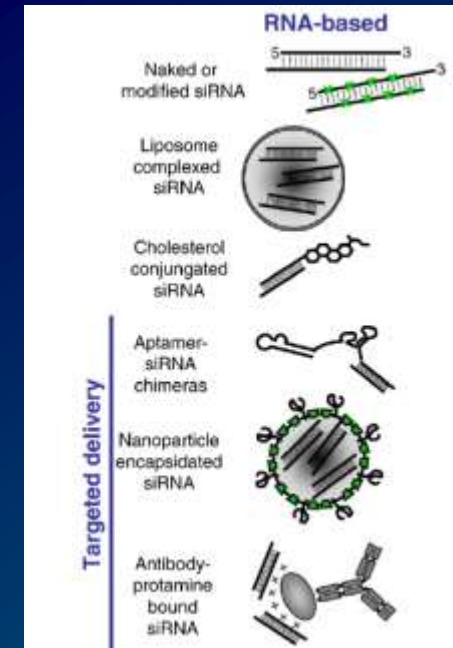
## Трансфекция

- химическая (с помощью фосфата кальция)
- гидродинамическая (в клетки млекопитающих)
- липосомы
- поликатионные комплексы (через эндоцитоз)
- плазмидные векторы

## Трансдукция

- вирусные векторы (аденовирусы, ретровирусы, в особенности лентивирусы)

## Трансгенез



# Непосредственное использование дцРНК для индукции РНКi

**Плюсы** (по сравнению с использованием векторов) :

- быстрый метод
- универсальность
- низкие трудозатраты на дизайн
- возможна стабилизация за счет различных модификаций

*Полная замена одной цепи на ДНК инактивирует siРНК, но до 8 ДНК-остатков на цепь допустимо*

*Мутации, альтернативные основания, химические модификации*

*Стабильность может изменяться в 10 раз и более (время полужизни меняется от минут до часов)*

- снижение риска мутагенных и иммуногенных эффектов

**Минусы:**

- нестабильность эффекта (зависит от частоты деления клеток)
- невозможность индукции
- трудность тканеспецифичного генного нокдауна

*Чтобы достичь более чем 90% ингибирования экспрессии мишени, вводимая siРНК должна оставаться эффективной в течение периода, равного тройному времени полужизни соответствующего белкового продукта гена-мишени*

# Доставка РНК-индуктора в клетки/ткани

## Трансфекция липосомами

- двуслойные липосомы на основе катионных фосфолипидов (Lipofectamine, Oligofectamine и пр.), внутри – водный раствор целевого агента
- размер порядка 20-50 нм
- по химическому составу сходны с природными мембранами клеток и могут сливаться с ними, на чем и основан принцип использования
- универсальны, что позволяет переносить широкий спектр медицинских химических препаратов, не вызывают аллергических реакций
- пик эффекта в культуре клеток через 2-5 дней, продолжительность до недели, неделящиеся клетки - до нескольких недель и более
- проблемы – низкая эффективность, особенно *in vivo*, возможная цитотоксичность, высокий печеночный клиренс
- поглощаются в основном клетками селезенки, костного мозга, лимфоузлов, а также большая доля остается в кровотоке, пока не отфильтруется почками
- не обеспечивает тканеспецифичности доставки (для этого необходимы дополнительные приемы)
- возможна локальная доставка (некоторые опухоли, глаза, кожа, слизистые оболочки)



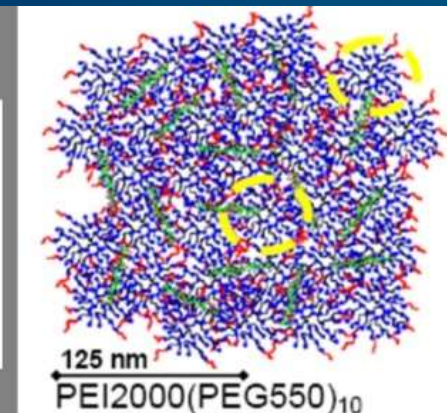
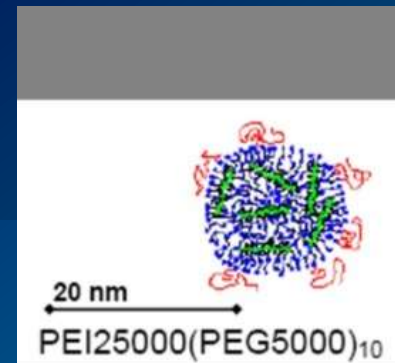
# Доставка РНК-индуктора в клетки/ткани

## Трансфекция конъюгатами

- пришивка гидрофобных соединений непосредственно к дцРНК (холестерол, PEG, декстран) с последующей липид-опосредованной трансфекцией
- пришивка РНК- или ДНК-аптамеров
- пришивка CPPs (cationic cell-penetrating peptides) (transportan, penetratin)

## Трансфекция поликатионными комплексами

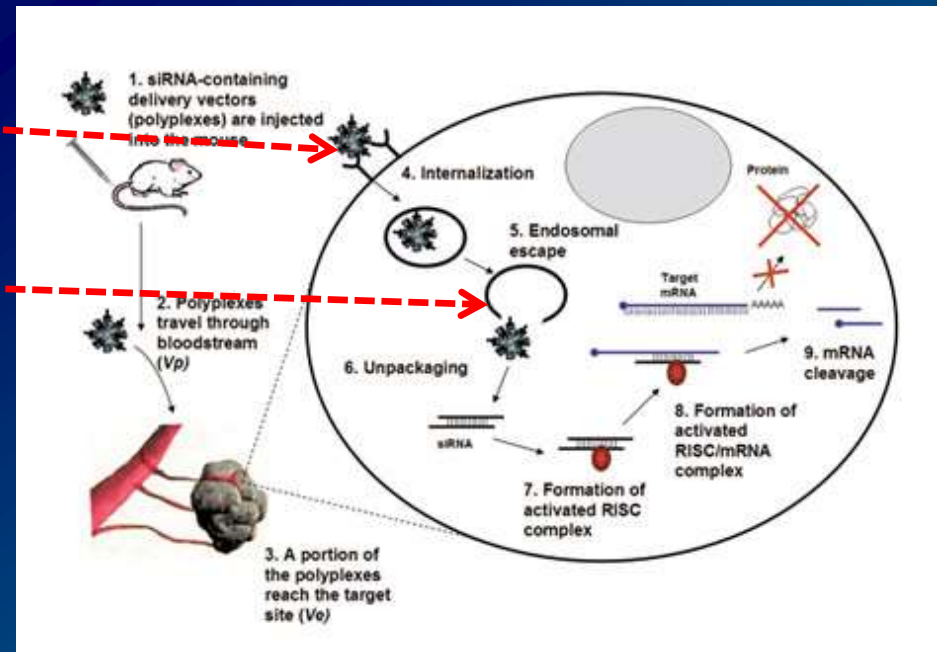
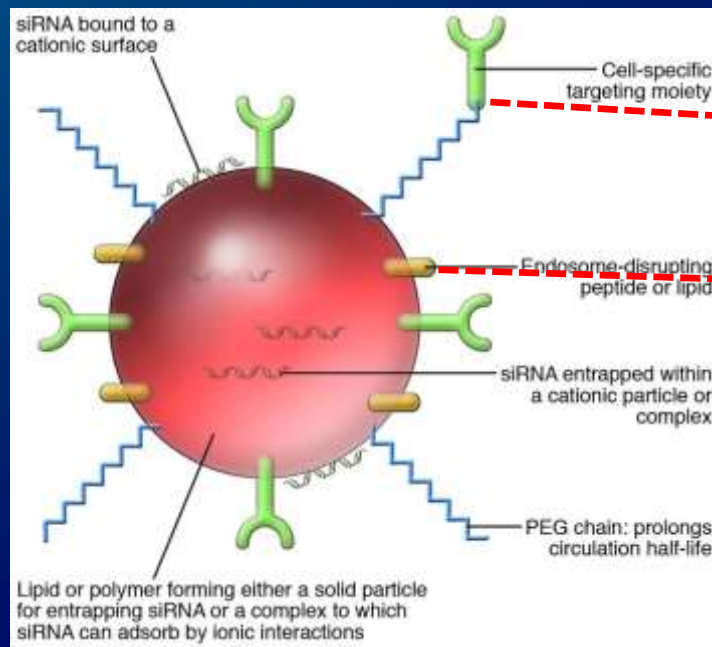
- отрицательно заряженная ДНК связывает поликатионы, и образовавшийся комплекс поглощается клетками путем эндоцитоза
- использование siРНК, связанных с комплексом антитело-протамин для адресной доставки
- использование положительно заряженных водорастворимых полимеров, таких как ДЭАЭ-декстран или полиэтиленимин
- рецептор-зависимая доставка siРНК в ткани при помощи “полиплексов” с поликатионным каркасом



# Доставка РНК-индуктора в клетки/ткани

## Объединение подходов: использование наночастиц с дополнительными функциями

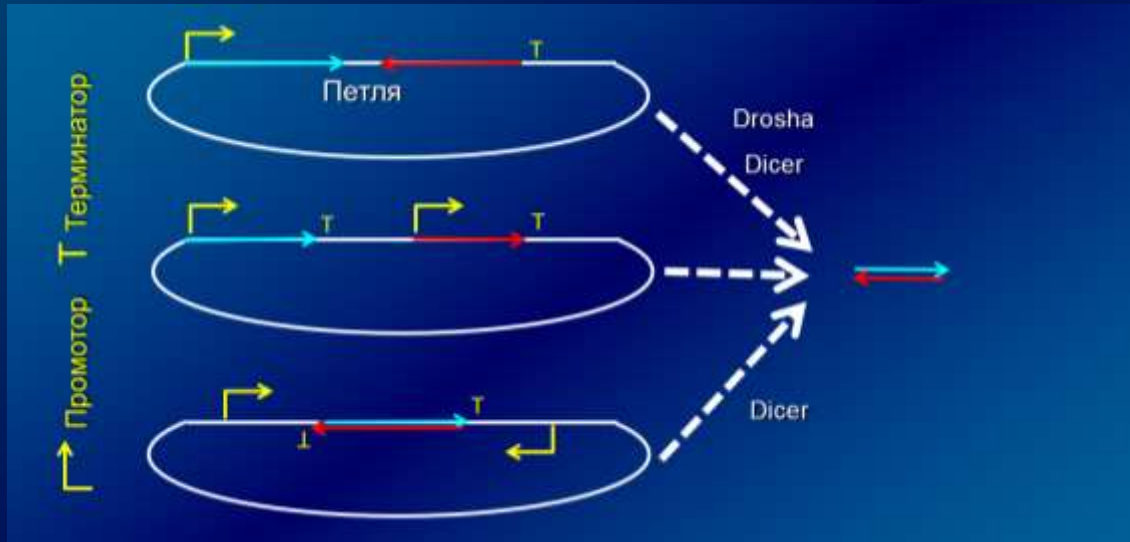
- специализированные липиды в составе липосом
- модифицированный РНК-индуктор внутри липосом
- белки, обеспечивающие адресную доставку наночастиц



# Векторы для экспрессии РНК-индуктора

## Векторы на основе плазмид

- транзientный (преходящий) характер трансфекции
- низкая и непостоянная эффективность трансфекции
- возможно использование тканеспецифичных промоторов
- возможно использование индуцируемых промоторов



Полимераза III – активна во всех клетках

Полимераза II – активна не во всех клетках и возможна тканеспецифичная экспрессия

# Векторы для экспрессии РНК-индуктора

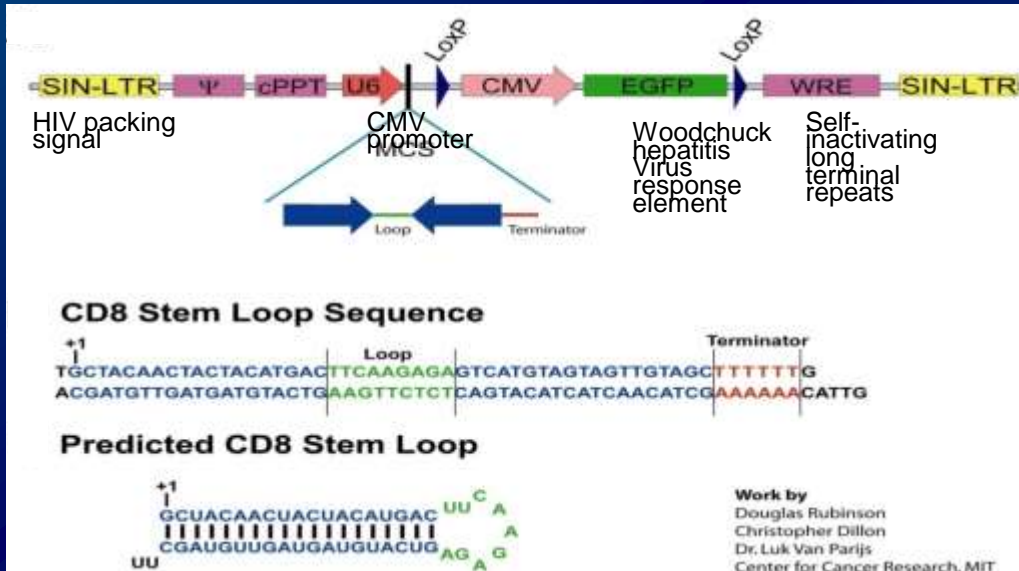
## Векторы на основе вирусов

- ретровирусы (оцРНК), аденовирусы (дцРНК), герпесвирусы (ДНК) и пр.
- можно добиться как транзientного, так и стабильного сайленсинга
- ретровирусы – копия встраивается в геном
- аденовирусы – нестабильная экспрессия
- высоко эффективны для большинства типов клеток
- небезопасны (случай смерти пациента, инъецированного аденовирусом)
- могут кодировать мимики, РНК-приманки, anti-miRs

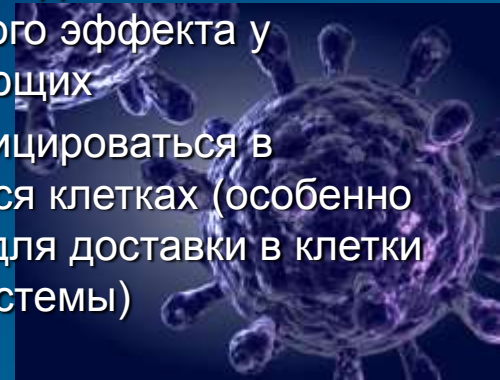


## Лентивирусные конструкции для доставки siРНК

По: Rubinson et al Nature Genetics, 2003



- можно внести много “постороннего” генетического материала
- экспрессируют РНК-шпильку
- возможность добиться наследуемого эффекта у млекопитающих
- могут реплицироваться в неделящихся клетках (особенно актуально для доставки в клетки нервной системы)





# Векторы для экспрессии РНК-индуктора

## Векторы на основе вирусов

- возможно использование тканеспецифичных и индуцируемых промоторов (пример – запуск размножения онколитического рекомбинантного аденовируса, несущего промотор, активный в некоторых типах опухолей)
- многократная инъекция вирусных векторов затруднена из-за иммуногенности вирусов, следовательно, актуально использование интеграции
- долговременный сайленсинг – актуален для противовирусной терапии и генетической вакцинации
- но: соревнование с естественными РНК-регуляторами и “насыщение” компонентов этой системы – проблемы для клетки (природные вирусы тоже могут это делать, вплоть до гибели клетки-хозяина)
- нужна не слишком большая и не слишком маленькая контролируемая экспрессия индуктора

## Возможные стратегии применения трансгенов

- введение MRE в 3'UTR терапевтических трансгенных конструкций для исключения нежелательной экспрессии трансгенов в тех или иных типах клеток (“detargeting”)
- “самоубийство” некоторых типов клеток (пример – удаление популяции плюрипотентных стволовых клеток из дифференцированных клеток, планируемых к трансплантации за счет его “невывключения” с помощью miРНК

# Прикладной РНК-сайленсинг: summary

- РНК-интерференция может быть использована как техника обратимой инактивации практически любого гена у любого объекта, как технология получила серьезное развитие
- Возможна краткосрочная и долгосрочная индукция
- Возможно использование в диагностических целях (анализ профилей, характерных для заболеваний, выявление мутаций и других дефектов в мишенях)
- Возможно использование в терапевтических целях (мишени – вирусы, онкогены, онкотіРНК и пр.)
- Возможно использование для исследования роли генов с неизвестными функциями
- Ограничения –побочные эффекты, адресная доставка, стабильность
- Крайне перспективно для выявления потенциальных мишеней для разработки противораковых средств, нацеленных на белки, и предварительной оценки их нежелательных эффектов

Благодарю за  
внимание!  
Вопросы?