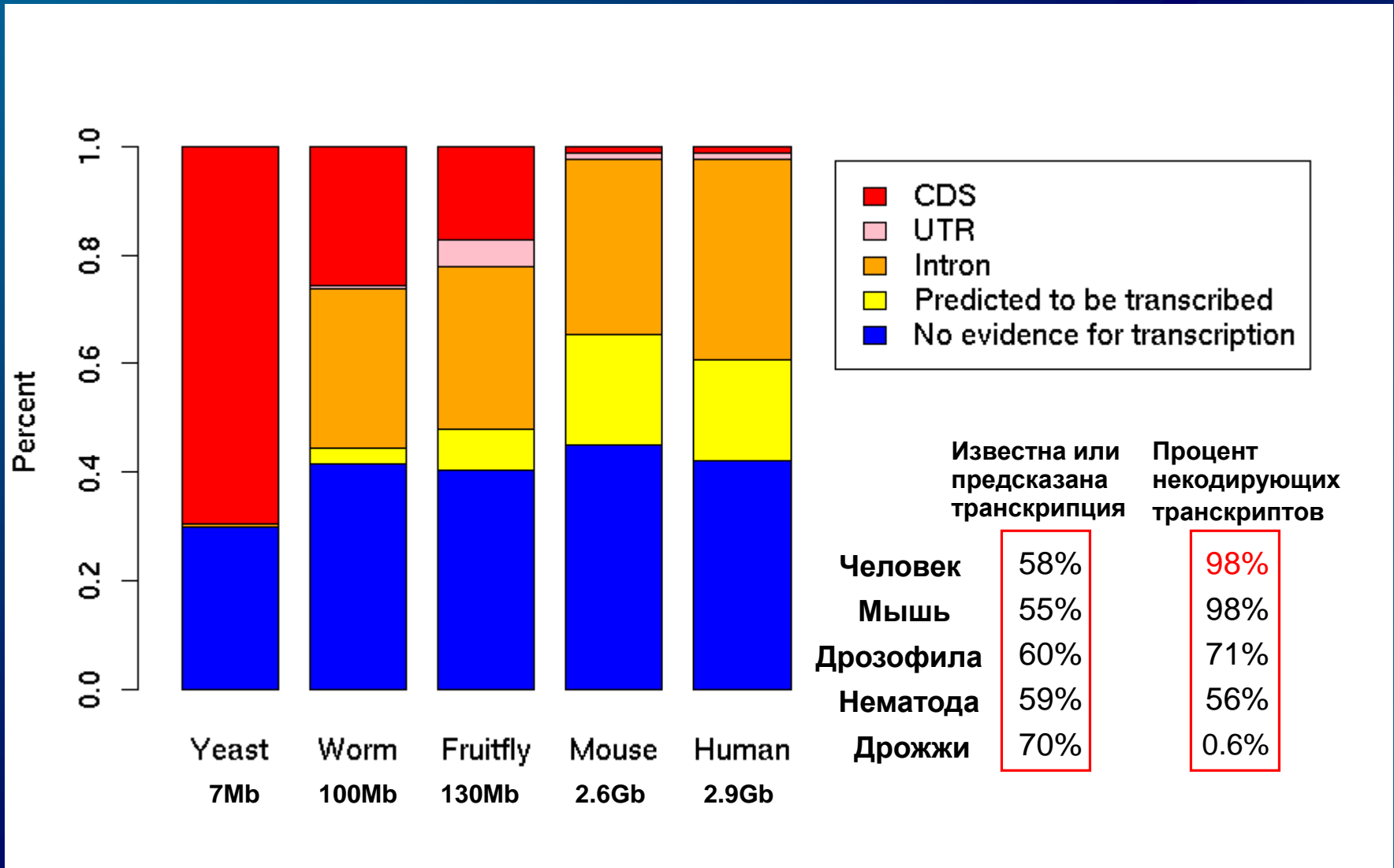


# *Короткие некодирующие РНК и регуляция экспрессии генов эукариот*

*I: РНК-интерференция – принцип, основные  
свойства и механизмы*

# Виды РНК в эукариотической клетке:

*большая часть не кодирует белки!*



# Виды РНК в эукариотической клетке:

*большая часть не кодирует белки! Среди них много регуляторных*

Рибосомные РНК ~80%

Транспортные РНК ~10%

**Матричные РНК ~5%**

Геномные РНК вирусов, РНК ретротранспозонов

Каталитические РНК (рибозимы)

Антисмысловые РНК

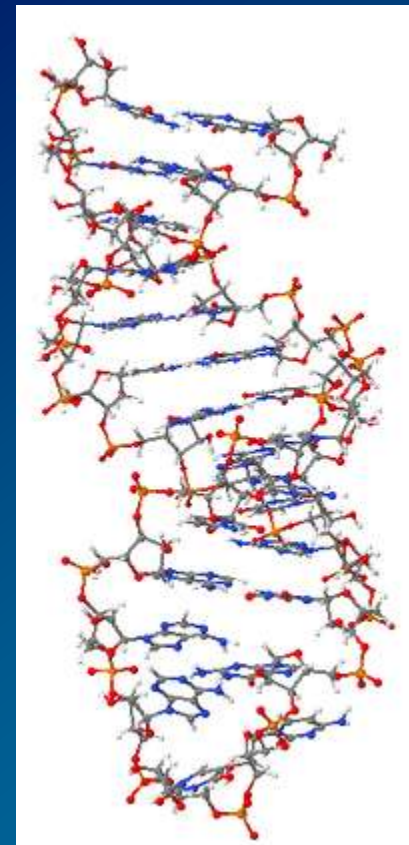
Малые ядерные РНК (snRNA)

Малые ядрышковые РНК

Длинные некодирующие РНК (XIST/TSIX, HOTAIR)

Короткие некодирующие РНК (много видов)

Продукты “фоновой транскрипции” и т.п.



Некодирующие РНК могут выступать в качестве зондов, привлекающих к участкам НК-мишеней белковые комплексы

Перепрограммирование генома

Инактивация мишеней (обратимая и необратимая)

Уничтожение мишеней

Модификация мишеней

Изменение специфичности комплексов, включающих мишени

...

Механизмы регуляции экспрессии генов, предполагающие участие некодирующих РНК:

Эпигенетические механизмы (TGS, PTGS)

Альтернативный сплайсинг

Редактирование мРНК

...

Молекулы РНК участвуют в реализации многих эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генома

Транскрипционный генетический сайленсинг (transcriptional **g**ene **s**ilencing - **TGS**) – *запрет на транскрипцию*

Примеры: импринтинг, инактивация X-хромосомы, РНК-индуцированный транскрипционный сайленсинг (RNA-induced transcriptional silencing - RITS) – происходит в ядре!

**HDGS** *Homology Dependent Genetic Silencing*  
=**CTGS** *Co-transcriptional Gene Silencing*

Посттранскрипционный генетический сайленсинг (**p**ost-transcriptional **g**ene **s**ilencing - **PTGS**) - *запрет на синтез белка*



# Что такое РНК-интерференция?

Это группа механизмов сиквенс-специфичного подавления экспрессии генов **с участием комплементарной им двуцепочечной\* РНК (дцРНК)**

Термин предложен Craig Mello (1998)

В дальнейшем было показано участие сходных механизмов не только подавление, но и активации генов, и смысл термина несколько “размылся”

## ДцРНК



Разрушение (и/или модификация мРНК)

Репрессия трансляции

Эпигенетические модификации хроматина

Изменение последовательности ДНК

\*хотя не исключено и участие одноцепочечных РНК

# Короткие двуцепочечные РНК:

*ключевой компонент изученных вариантов РНК-интерференции!*

*21-34 (чаще не более 25) (п.)н., общие особенности структуры. В основе принципа действия – комплементарное взаимодействие с гомологичными последовательностями - мишенями*

Классификация этих РНК находится в стадии формирования и основана на нескольких параметрах:

происхождение РНК (экзогенное/эндогенное и пр.)  
способ процессинга  
биологический эффект

*Постоянно открывают новые формы этих РНК, новые биологические эффекты и новые механизмы их реализации*  
Большая часть транскрибируемого генома человека может относиться именно к малым регуляторным РНК или их предшественникам!



# Малые регуляторные РНК: наиболее изучены два основных типа



малые интерферирующие РНК (siRNA)  
в основном **экзогенной** природы  
предшественники - дцРНК более  
30 пн  
могут быть **специфичны к**  
**одной мишени**

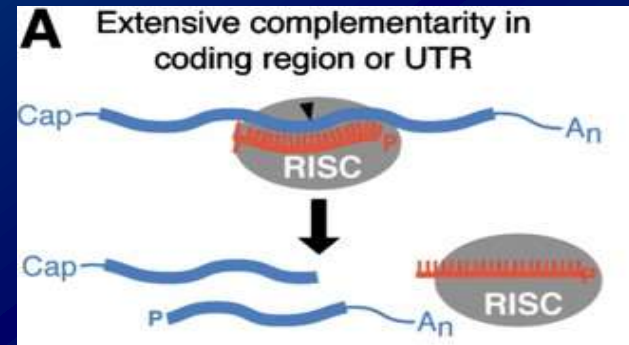


микроРНК (miRNA)  
кодируются **эндогенными**  
генами  
предшественники –  
шпилечные РНК  
как правило, одна miРНК  
**действует на множество**  
**мишеней**

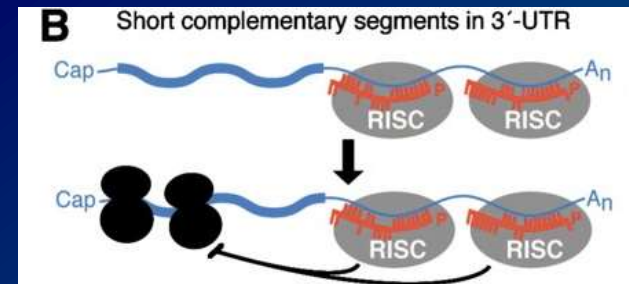
Источники в клетке, механизмы процессинга  
и способы регуляции чрезвычайно разнообразны!

# Основные (“канонические”) активности коротких двухцепочечных регуляторных РНК:

**Пост-транскрипционное расщепление** мРНК-мишени (“классическая” РНКi):  
условие – высокая гомология с мишенью

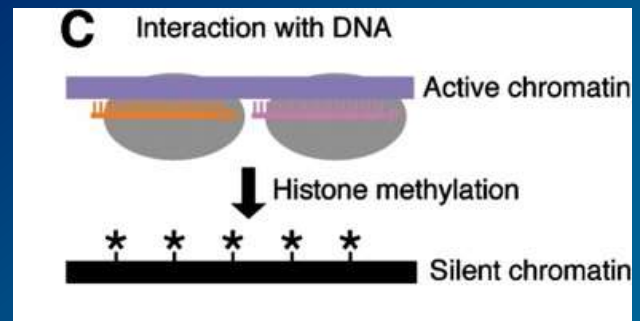


**Репрессия трансляции** мРНК;  
гомология с мишенью не должна быть полной



\* по последним данным, могут происходить и в ядре

Транскрипционный сайленсинг хроматина с **модификацией** его ДНК



В цитоплазме\*

В ядре

# Зачем нужна РНК-интерференция *in vivo*?

*Обеспечение стабильности генома*

*Борьба с инфекциями*

*Регуляция экспрессии практически всех генов*

Защита от вирусной инфекции (прежде всего РНК-вирусы)

Стабилизация структуры генома, поддержание структуры хроматина (прежде всего гетерохроматина)

Аттенуация экспрессии генов, например, эффекты дозовой компенсации

Стабилизация/дестабилизация РНК-мишени

Специфичное подавление “незаконной” экспрессии онкогенов

Тканеспецифичная регуляция экспрессии

Синхронизированная регуляция экспрессии генов в развитии

**Быстрый комплексный ответ на стресс** (прежде всего средовой, но, возможно, и “генетический”)

...?

Зачем нужна РНК-интерференция *in vitro*?

*Генетический нокдаун,  
в т.ч. ткане- и стадиоспецифичный*

*Генетическая вакцинация*

*Генетическая терапия*

*Борьба с инфекциями*

*Репрограммирование генома*

*...*

# “Классическая” РНК-интерференция - пример РТGS, предполагающий деградацию специфической РНК-мишени

Подавление экспрессии гена на уровне РНК (после транскрипции)

Всегда имеется **специфическая** мишень!



Примеры супрессируемых генов: транспозоны, гены ретровирусов, последовательности гетерохроматина

Древний и консервативный процесс – от простейших, растений и грибов до млекопитающих

*Эукариоты, у которых ее нет, скорее всего потеряли ее вторично*

# Обнаружение РТГС:

Явление впервые показано у растений



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*

Carolyn Napoli,<sup>1</sup> Christine Lemieux, and Richard Jorgensen<sup>2</sup>

DNA Plant Technology Corporation, 6701 San Pablo Avenue, Oakland, California 94608

We attempted to overexpress chalcone synthase (CHS) in pigmented petunia petals by introducing a chimeric petunia CHS gene. Unexpectedly, the introduced gene created a block in anthocyanin biosynthesis in approximately 10 percent of plants with the introduced CHS gene produced totally white flowers and/or patterned or pale nonclonal sectors on a wild-type pigmented background; none of hundreds of transgenic plants exhibited such phenotypes. Progeny testing of one plant demonstrated that the novel color phenotype was associated with the introduced CHS gene; progeny without this gene were phenotypically wild type. The stability of the novel color patterns was variable. RNase protection analysis of petal RNA from white flowers showed that, although the developmental timing of mRNA expression of the endogenous CHS gene was not altered, the level of the mRNA produced by this gene was reduced 50-fold from wild-type levels. Reversion of plants with white flowers to phenotypically parental violet flowers was associated with a rise in the steady-state levels of the mRNAs produced by both the endogenous and the introduced CHS genes. Thus, in the altered white flowers, the expression of both genes was coordinately suppressed, indicating that expression of the introduced CHS gene was not alone sufficient for suppression of endogenous CHS transcript levels. The mechanism responsible for the reversible co-suppression of homologous genes *in trans* is unclear, but the erratic and reversible nature of this phenomenon suggests the possible involvement of methylation.



# Неожиданный результат:

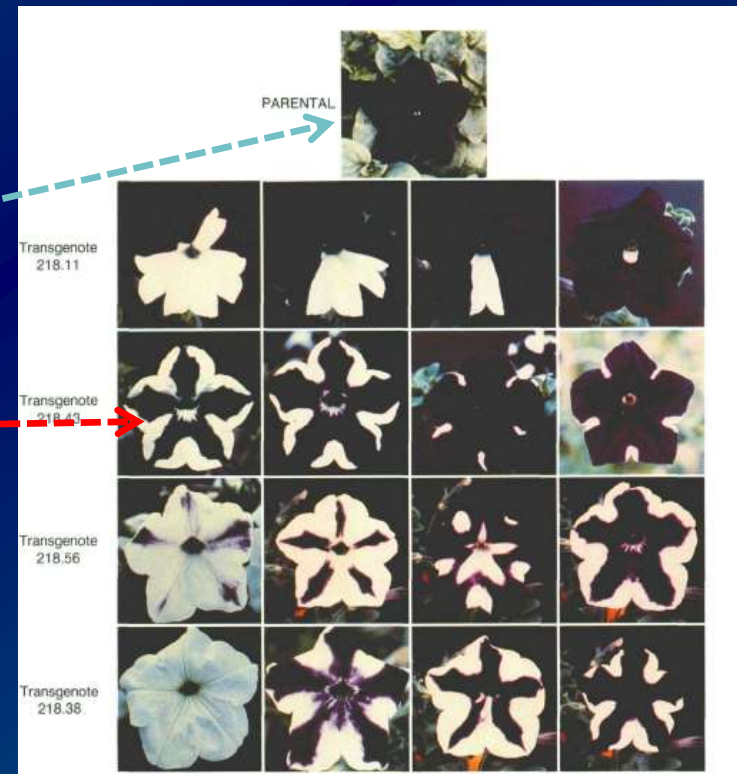
Введение трансгенных копий генов *CHS* (*chalcone synthase*, см. рисунок) и *DFR* (*dihydroflavonol reductase*) у петунии привело к подавлению экспрессии как трансгенных копий, так и эндогенных гомологов

Фенотипы трансгенных растений петунии:

Верхний ряд –  
родительский цветок  
(контроль)

Остальные ряды – 4  
трансгенных растения  
(представлены  
типичные типы цветков)

Napoli et al. *Plant Cell*. 1990



Подавление сопровождалось деградацией соответствующих мРНК!  
Был предложен термин “косупрессия трансгенов”

1995-1999:

Косупрессия трансгенов оказалась типичной и для других объектов!  
*N.crassa* (“Quelling”), планарии, трипаносомы, *Zebrafish*, *C.elegans*...

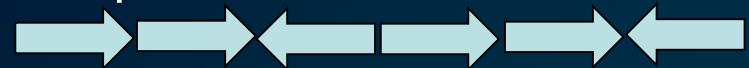
Наблюдения:

**Экспрессия** трансгена часто **приводит к сайленсингу** самого трансгена, а также его эндогенного гомолога

Введение генетических конструкций, направленных на **усиленную экспрессию**, приводило к **более сильному эффекту сайленсинга**

Сайленсинг сопровождается деградацией мРНК подавляемого гена – является **посттранскрипционным**

Наиболее эффективными оказываются трансгены, образующие тандемные инвертированные повторы или содержащие их

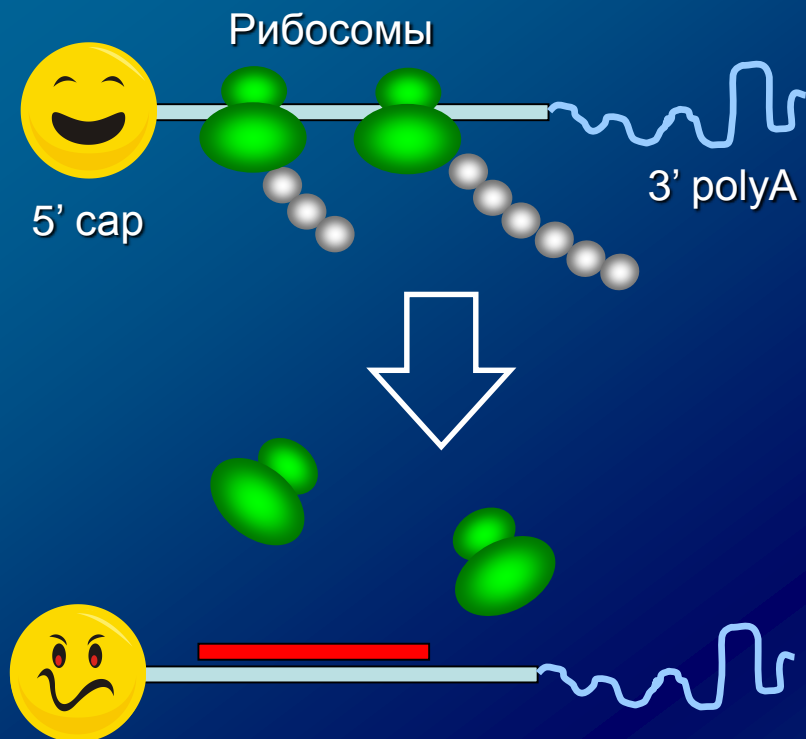


Сходные эффекты вызывают **дцРНК содержащие вирусы** растений, имеющие в геноме участки гомологии с генами хозяина



*Если сайленсинг вызван транскрипцией трансгена или введением РНК-вирусов, можно ли вызвать его простым введением соответствующей РНК?*

# Гипотеза: супрессия транскриптов вызвана антисенс-ингибированием?



Guo, Kemphues (Cell, 1995):  
*механизм подавления экспрессии не может объясняться простым спариванием с мРНК-мишенью!*


- 1) для подавления экспрессии не требуется вводить много копий РНК
- 2) инъекция антисмысловой РНК вызывала сайленсинг эндогенного гена, но инъекция смысловой РНК давала тот же эффект!

(Работа на гене *par-1 C.elegans*)

Многочисленные работы по антисенс-ингибированию имели переменный успех. Одно из серьезных ограничений – короткое время циркуляции вводимой НК

# Открытие РНК-интерференции (1998)

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

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

Andrew Fire<sup>\*</sup>, SiQun Xu<sup>\*</sup>, Mary K. Montgomery<sup>\*</sup>, Steven A. Kostas<sup>\*†</sup>, Samuel E. Driver<sup>‡</sup> & Craig C. Mello<sup>‡</sup>



**Признак:** подавление экспрессии гена гена *Unc-22* у *C. elegans*: мутантный фенотип = нескоординированные судороги (twitching)

**Воздействие на признак:** инъекции синтетических РНК, соответствующих или комплементарных РНК-копиям различных экзонов

# Из Нобелевской лекции Andrew Fire



...The cell being injected in this photo is the germline or gonad of the worm, a large cell with hundreds of individual nuclei surrounding a common core of cytoplasm. Each gonad will generate hundreds of oocytes, making this is a remarkable technique for being able to influence a large population of animals with just a single microinjection. The microinjection needle can be filled with almost any liquid including the great variety DNAs, RNAs, and proteins that we can now design and synthesize in the lab

...Don Moerman, Guy Benian, and Bob Waterston prepared fragments of *unc-22* [28] that I then injected with the hope that the injected fragments might recombine with the normal *unc-22* allele and produce a loss-of-function character that could then be studied. **The results of these experiments were a puzzle: although twitching worms appeared in populations derived from the injected animals, there was no direct alteration in the original *unc-22* gene**

# Открытие РНК-интерференции

*Введение синтетической смысловой и антисмысловой РНК, соответствующей матричной, сопровождалась деградацией соответствующей мРНК и появлением мутантного фенотипа в F1*

Гипотеза: сайленсинг после введения смысловой либо антисмысловой РНК обусловлен примесями двуцепочечной РНК

дцРНК оказалась как минимум в 10 раз более эффективна, чем оцРНК  
очистка от дцРНК привела к исчезновению сайленсинга при введении смысловых и антисмысловых РНК!

Gene	segment	Size (kilobases)	Injected RNA	F <sub>1</sub> phenotype
<i>unc-22</i>				<i>unc-22</i> -null mutants: strong twitchers <sup>7a</sup>
<i>unc22A*</i>	Exon 21-22	742	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type Wild type Strong twitchers (100%)
<i>unc22B</i>	Exon 27	1,033	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type Wild type Strong twitchers (100%)
<i>unc22C</i>	Exon 21-22†	785	Sense + antisense	Strong twitchers (100%)

(!) для эффекта достаточно нескольких молекул дцРНК на клетку – нестехиометрический эффект, требуется механизм усиления сигнала

Антисмысловая и смысловая РНК для индукции РНК-интерференции могут быть инъецированы отдельно, хотя не более, чем с часовым интервалом

# Свойства РНК-интерференции (1)

(к 1998 г.)

ДцРНК действует в крайне низких концентрациях → **механизм действия не может быть объяснен простым спариванием с мишенью**

Эффективна только дцРНК, гомологичная экзонам гена, экспрессия которого подавляется; **инъекция сегментов, соответствующих промоторам и интронам, не приводит к интерференции**

Эффект репрессии падает с уменьшением размера дцРНК

Добавление **негомологичной дцРНК** снижает активность подавления экспрессии (200х избыток – отсутствие эффекта!)

Эффект репрессии может наследоваться и пересекать границы клеток (черви, растения)

Снижается содержание цитоплазматической мРНК, но не ядерных предшественников → **РНК-интерференция действует посттранскрипционно**

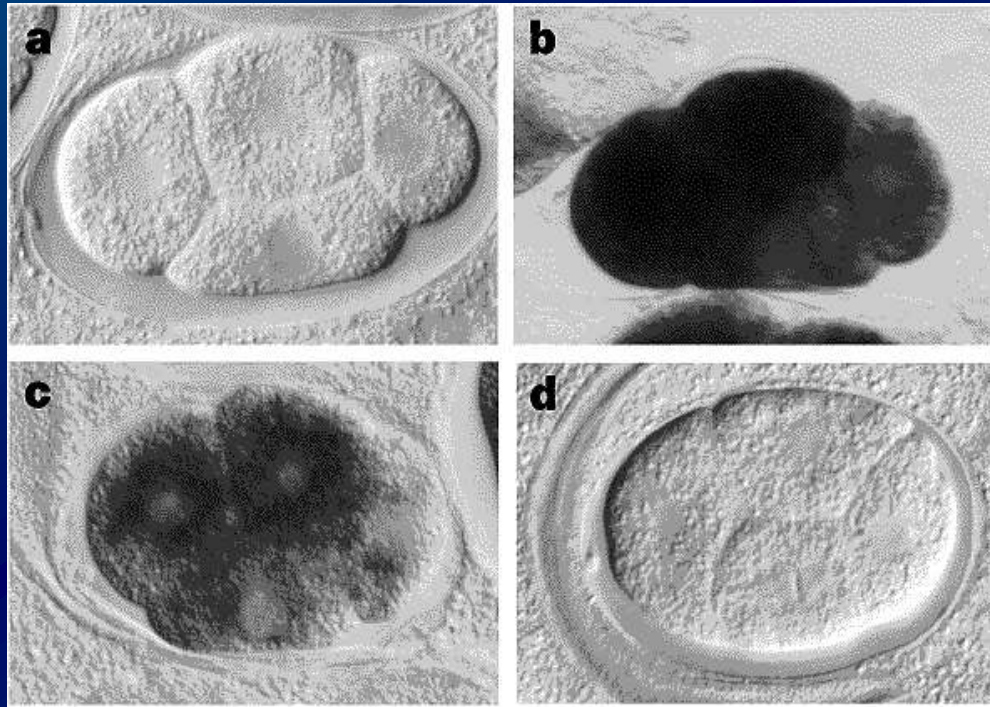
# Подтверждение посттранскрипционного эффекта РНК-интерференции у *C.elegans*

*in situ* гибридизация меченого зонда с мРНК гена *Mex-3*

(регуляторный консервативный РНК-связывающий белок, локализуется в гонадах развивающегося эмбриона)

а) отрицательный контроль (без зонда)

б) эмбрион взрослого родителя с нормальной экспрессией *mex3*



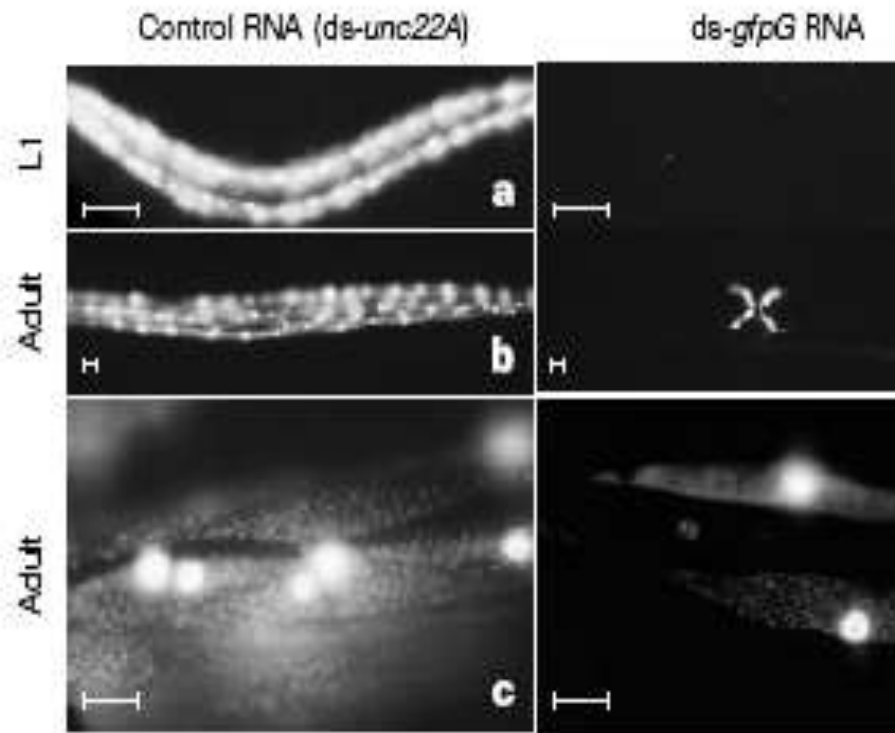
с) эмбрион после инъекции родителю антисмысловой РНК к *mex3* – уровень экспрессии *mex3* снижен

д) эмбрион после инъекции родителю дцРНК к *mex3* – нет экспрессии *mex3*

Fire et al.  
Nature (1998)

# РНК-интерференция может распространяться по клетке и организму и наследоваться в поколениях!

GFP экспрессировался в двух вариантах – ядерная и митохондриальная локализация



На фотографиях видно свечение GFP

Слева: потомство животных, которым была инъецирована контрольная дцРНК *ds-unc22A*

а) личинка

б) зрелая особь

с) тело зрелой особи при высоком увеличении

Справа: потомство животных, которым была инъецирована дцРНК *ds-gfpG*.

Немногочисленные клетки, в которых сохранилась экспрессия GFP, сохраняли ее и в ядре, и в митохондриях

масштаб 20 мкм



# Конец 1990х – начало 2000х гг.

Синтетическая мРНК подвергается **специфической АТФ-зависимой деградации** в бесклеточных системах экспрессии (например, эмбриональном экстракте *Drosophila*) при добавлении гомологичной дцРНК-индуктора любого происхождения

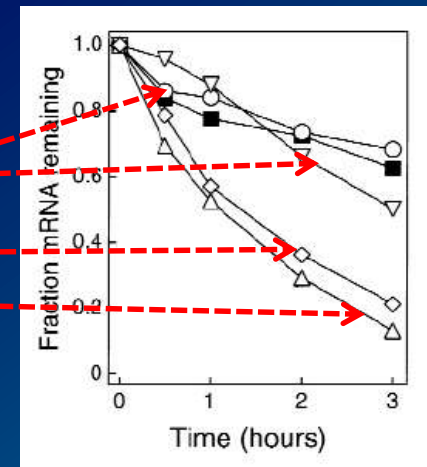
Чем продолжительнее предварительная инкубация дцРНК с экстрактом перед добавлением мРНК, тем меньше количество индуктора необходимо для проявления эффекта. **При инкубации происходит усиление сигнала**

Экстракты эмбрионов *Drosophila*, инкубированные с равномерно меченой дцРНК (слева направо - 0, 15, 30 или 60 минут инкубации)



Длина индуктора:

49 пн.  
149 пн.  
505 пн.  
997 пн.



**В экстрактах присутствует какой-то фактор, который расщепляет любую длинную двуцепочечную РНК с образованием коротких дцРНК**

Количество этого фактора ограничено, и при значительном избытке негомологичной дцРНК (~200) эффект расщепления мишени исчезает

# Свойства РНК-интерференции (2)

*При РНК-интерференции происходит деградация РНК-мишени*

*При РНК-интерференции происходит расщепление дцРНК-индуктора*

*Скорость расщепления дцРНК-индуктора коррелирует со скоростью деградации РНК-мишени (и, соответственно, скоростью подавления экспрессии гомологичного гена)*

*При расщеплении дцРНК-индуктора образуются короткие фрагменты одинаковой длины, которые также могут вызывать РНК-интерференцию*

*Эти короткие двуцепочечные фрагменты сами по себе могут запускать механизм специфической деградации РНК-мишени*

*дцРНК-индуктор может иметь любое происхождение*

# ДцРНК - индукторы РНК-интерференции

Возможные источники дцРНК в организме разнообразны, могут быть экзогенными и эндогенными:

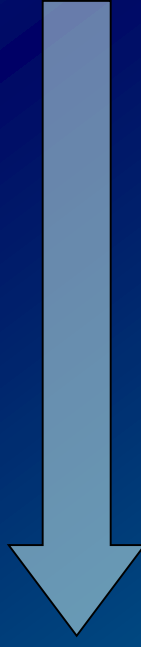
Транскрипция РНК в  
результате  
активности RdRP

Транскрипция с  
инвертированных повторов  
(в т.ч. рРНК и тРНК)

Транскрипция и  
процессинг РНК  
специфических  
генов

Вирусная  
инфекция и  
репликация

Антисмысловая  
транскрипция



**Специфичная дегградация РНК-мишени**

Индукция RNAi длиной (сотни п.н.) дцРНК в цитоплазме характерна для растений и беспозвоночных  
У позвоночных длинная дцРНК > 30 пн запускает систему интерферонового ответа

# Способы искусственной индукции РНК-интерференции зависят от объекта исследования



*C. elegans*



*Drosophila*



ЭСК, ооциты,  
ранние эмбрионы



Дифференцированные клетки в культуре,  
взрослые организмы *in vivo*



Растения

Кормление бактериями –  
продуцентами дцРНК

Вымачивание  
в растворе дцРНК

Инъекция дцРНК

Трансгенез (введение  
конструкции, транскрибирующей  
с образованием РНК-шпильки или дцРНК)

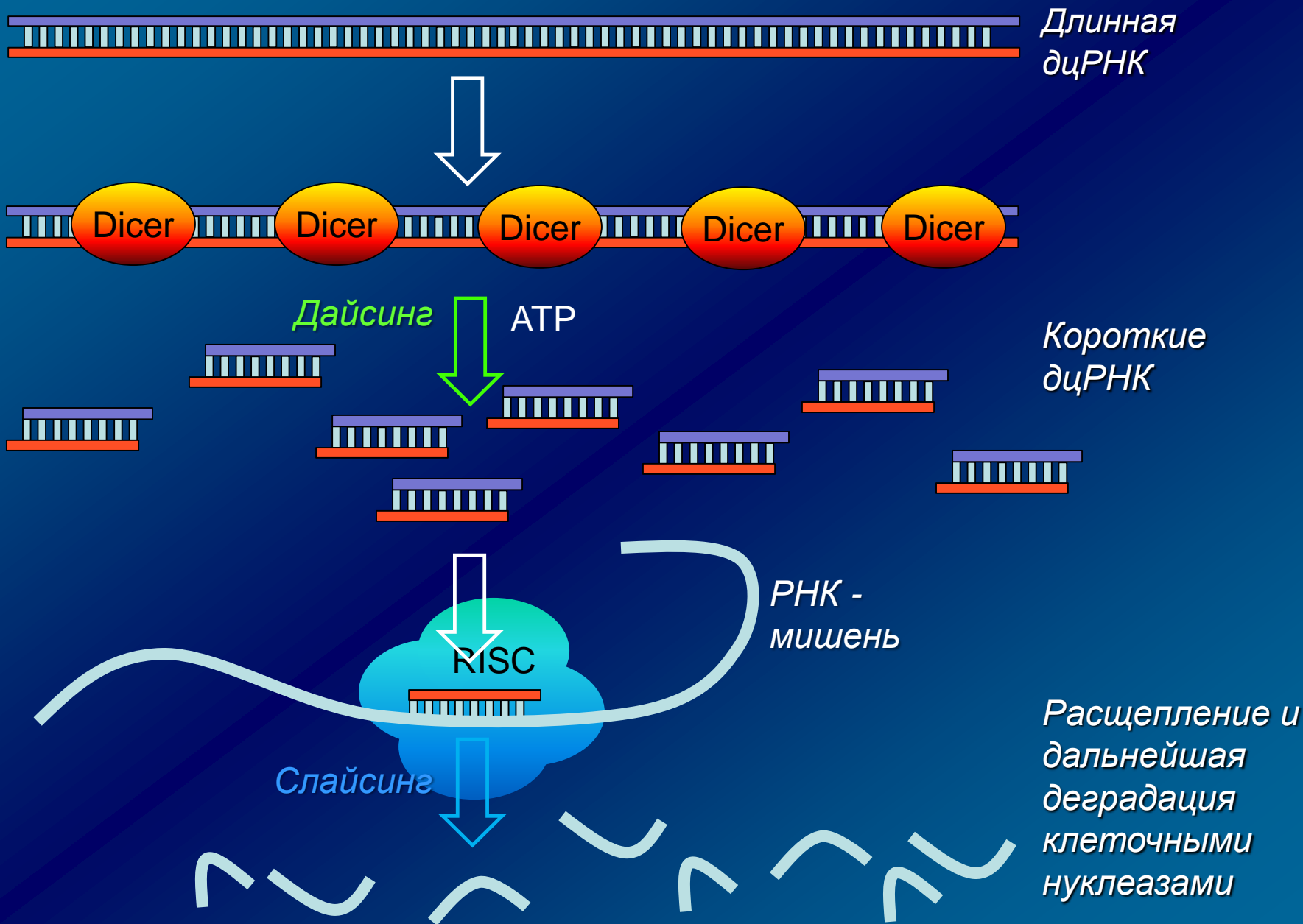
Трансфекция дцРНК

Трансфекция синтетической siРНК

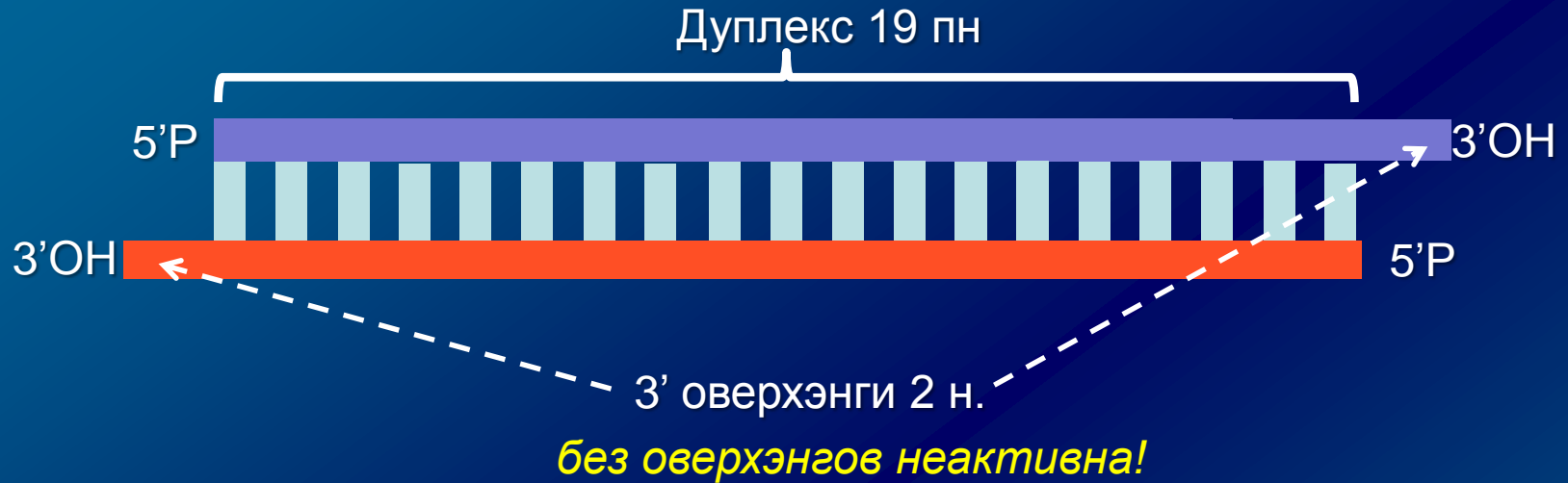
Трансфекция плазмидой,  
транскрибирующей  
с образованием РНК-шпильки

Оверэкспрессия комплементарной оцРНК  
трангена или вирусного вектора  
(через механизм ко-супрессии)

# Общая схема “классической” РНК-интерференции

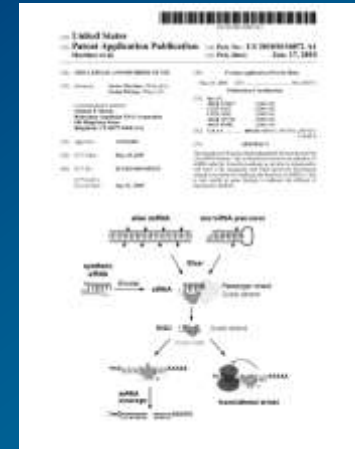


# Организация siРНК



3' концевая OH- группа – **необходима для праймирования при образовании вторичных siРНК (см. далее)**, короткие оверхэнги с 3' OH- группой и 5' фосфатной группой – типичный результат расщепления РНКазми типа III

5' концевая фосфатная группа – **необходима для эффективного слайсинга**, может быть добавлена к синтетической РНК специфической РНК-киназой, например, hC1p1 человека)





Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro

Thomas Tuschl, Phillip D. Zamore, Ruth Lehmann, et al.

Genes Dev. 1999 13: 3191-3197

Thomas Tuschl

# Механизм РНК-интерференции: I стадия – дайсинг (dicing)



Phillip Zamore



Jennifer A. Doudna

## Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer

Ian J. MacRae,<sup>1,3</sup> Kaihong Zhou,<sup>1,3</sup> Fei Li,<sup>1</sup> Adrian Repic,<sup>1</sup> Angela N. Brooks,<sup>1</sup> W. Zacheus Cande,<sup>1</sup> Paul D. Adams,<sup>4</sup> Jennifer A. Doudna<sup>1,2,3,4\*</sup>

SCIENCE VOL 311 13 JANUARY 2006

Cell, Vol. 101, 25–33, March 31, 2000, Copyright ©2000 by Cell Press

### RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals

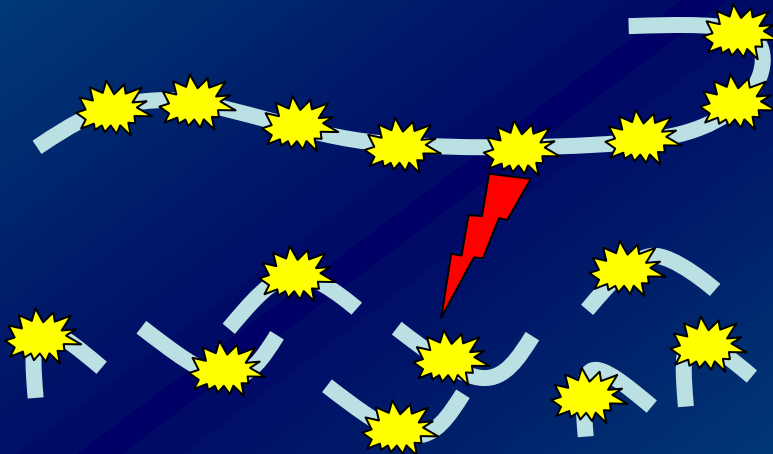
Phillip D. Zamore,\*# Thomas Tuschl,†# Phillip A. Sharp,‡§ and David P. Bartel§||

# Последовательность дцРНК определяет, в каких участках будет расщеплена мРНК-мишень

К клеточному лизату *Drosophila* (бесклеточная система, в которой возможна транскрипция и трансляция) добавляли меченую  $^{32}\text{P}$  мРНК, например, *Rr-luc* (*Renilla reniformis* (вид губки) luciferase), и инкубировали с дцРНК, комплементарными разным ее участкам. Затем РНК разделяли электрофорезом в денатурирующем ПААГ и анализировали радиоавтографией



Эксперимент 1: равномерное мечение РНК - видны все продукты деградации



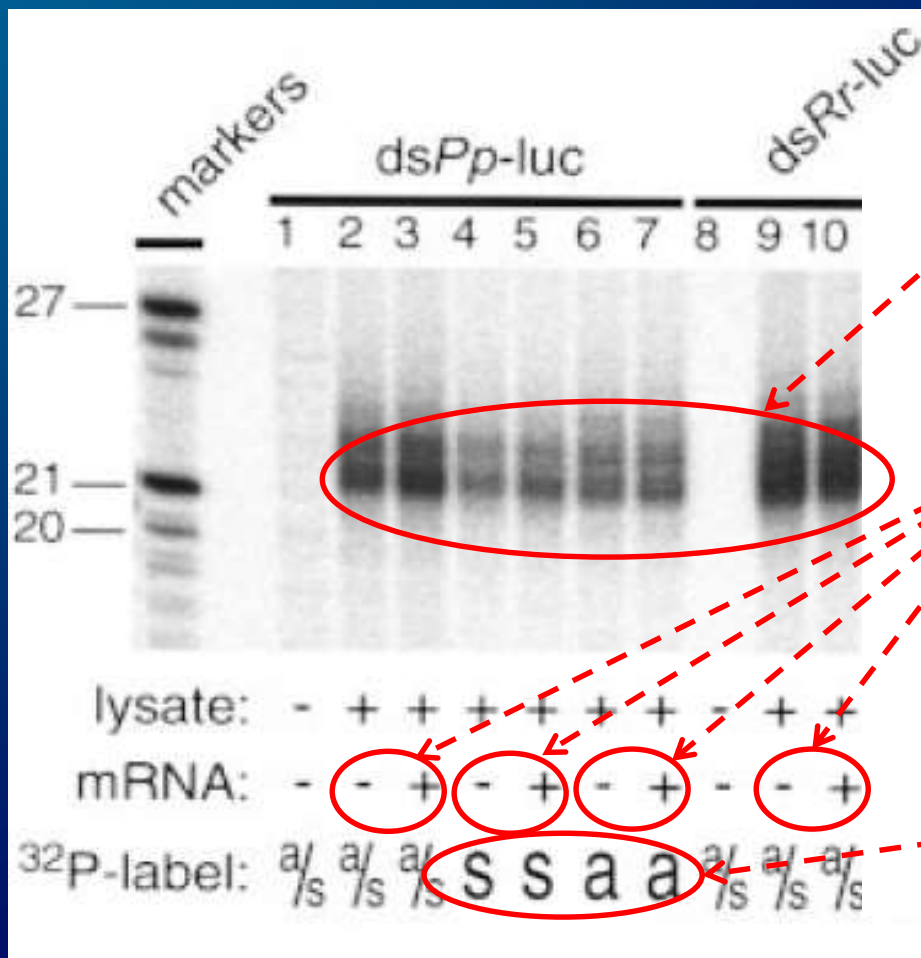
Эксперимент 2: мечение РНК по 5' концу - видны 5' продукты деградации





Эксперимент 1: клеточный лизат *Drosophila* + **равномерно меченая рекомбинантная дцРНК**, комплементарная мРНК-мишени

Мечены либо смысловая цепь (s), либо антисмысловая (a), либо обе (a/s)



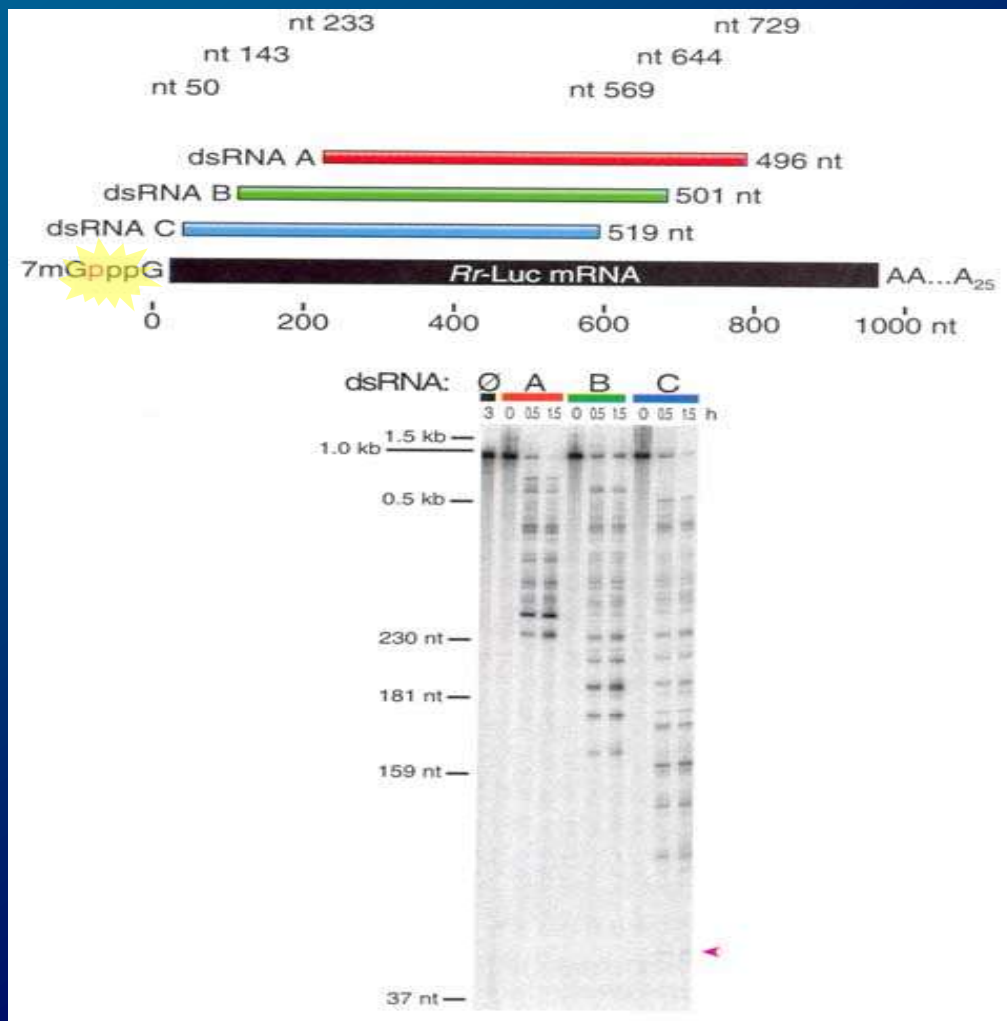
Результат:

образуются фрагменты РНК длиной 21-23 н.

их образование не требует присутствия соответствующей мРНК

обе цепи процессируются одинаково!

Эксперимент 2: клеточный лизат *Drosophila* + рекомбинантные дцРНК, комплементарные разным участкам мРНК, **одноцепочечная мРНК мечена по 5' концу**

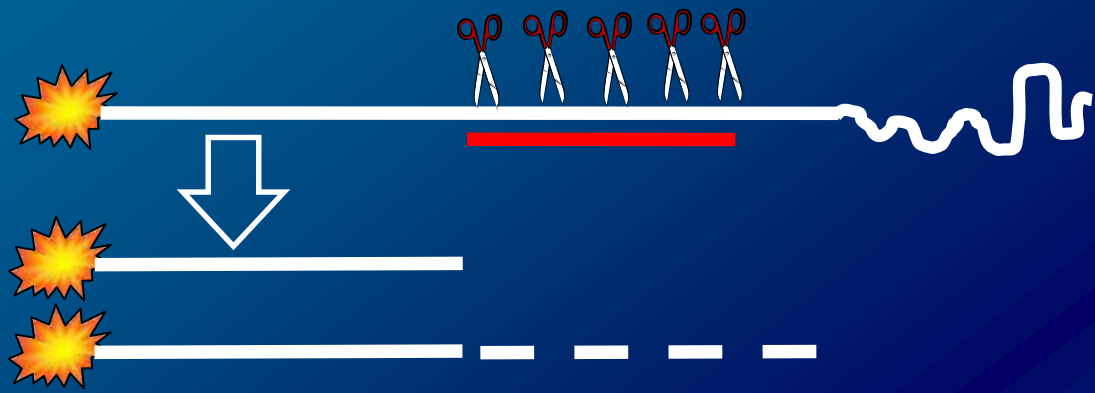


Промежуточные продукты расщепления отличаются на величину, кратную 21-23 н.



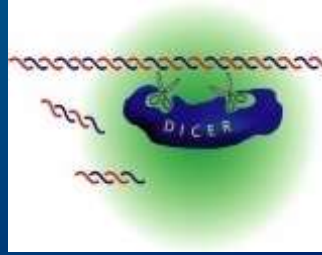
мРНК-мишень расщепляется с интервалом 21-23 н.

Меченые продукты деградации мРНК *Rr-luc*, вызванной добавлением дцРНК (B), оказались на ~100 н. длиннее, чем для (C), для (A) – еще на ~100 н. длиннее



*В клеточном экстракте присутствует фактор, вызывающий расщепление РНК-мишени в участке, комплементарном добавленной дцРНК, на фрагменты, расщепление происходит с интервалом 21-23 н.*

# DICER



*H. sapiens*, другие  
млекопитающие

*Drosophila*

*C. elegans*

*Arabidopsis*

Dicer (siPHK,  
miPHK)

Dcr-1 (siPHK,  
miPHK)  
Dcr-2 (siPHK)

Dcr-1 (siPHK,  
miPHK)

DCL1 (miPHK, siPHK)  
DCL2 (siPHK, вирусная РНК)  
DCL3 (siPHK, гетерохроматин)  
DCL4 (siPHK)

РНКаза III – подобный фермент, около 200 кДа

Разные варианты могут быть АТФ-зависимы либо независимы

Одновременно расщепляет дцРНК в двух сайтах

Сложная структура (самый сложный из РНказ III), много доменов

Высоко консервативен, имеется у многих, если не всех эукариот

Слабое сродство к оцРНК (в 3-40 раз ниже)

Ключевая роль в РТGS, мутации могут вызывать  
катастрофические нарушения развития

Bernstein E et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.  
Nature 2001

Dicer обнаруживается преимущественно в цитоплазме, но также и в ядре

Sinkkonen et al., PLoS ONE 2010: обнаружение Dicer, ассоциированного с рибосомальной ДНК млекопитающих

### Dicer Is Associated with Ribosomal DNA Chromatin in Mammalian Cells

Lasse Sinkkonen<sup>1,2,3</sup>, Tabea Hugenschmidt<sup>3</sup>, Witold Filipowicz<sup>4</sup>, Petr Svoboda<sup>1,2,4</sup>

Ando et al. PLoS ONE 2011: белки ядерного порового комплекса участвуют в доставке Dicer в нуклеоплазму в клетках человека

### *Candida albicans* Dicer (CaDcr1) is required for efficient ribosomal and spliceosomal RNA maturation

Douglas A. Bernstein<sup>a,1</sup>, Valmik K. Vyas<sup>a,1</sup>, David E. Weinberg<sup>a,b,c</sup>, Ines A. Drinnenberg<sup>a,c</sup>, David P. Bartel<sup>a,b,c</sup>, and Gerald R. Fink<sup>a,b,2</sup>

Bernstein et al., NAR2012: Dicer у грибов необходим для созревания рибосомальной РНК

Продукты расщепления рРНК с участием Dicer участвуют в регуляторных процессах, вовлекающих РНК-интерференцию

# DICER имеет несколько консервативных функциональных доменов:

**PAZ** домен (не у всех!)  
Piwi-Argonaute-Zwille

Начальный слабый контакт с дцРНК (и оцРНК!), белок-белковые взаимодействия

Bridging domain (между РНКазами)

DsRBD

Второй контакт с дцРНК, прочное связывание

2 С-концевых домена РНКазы III

Расщепление дцРНК с последующим высвобождением одной цепи

Коннекторная альфа-спираль (рулер) (положительно заряжена)

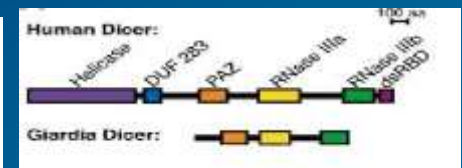
АТФазный/геликазный домен DExD/H (не у всех)

Определяет расстояние между сайтами разрезания

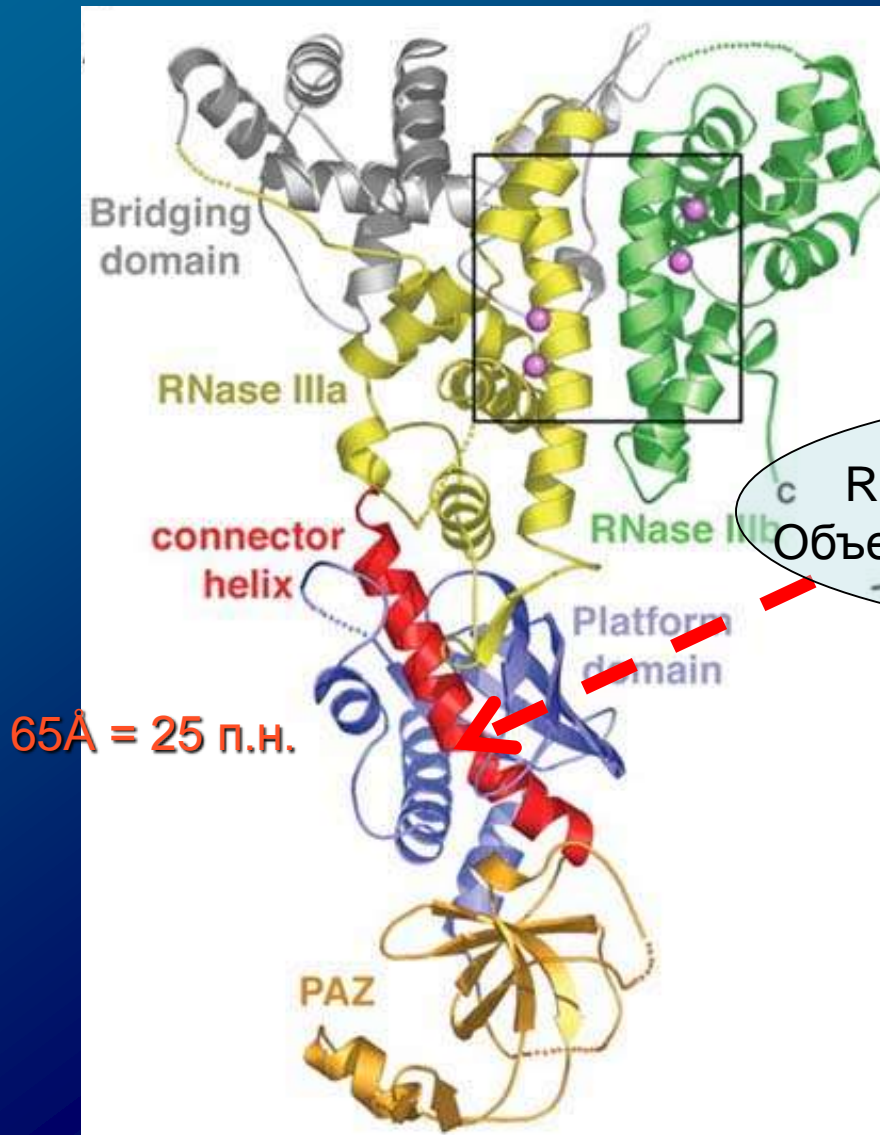
**DUF** (Domain of Unknown Function) (не у всех) ("платформа")

Более легкое высвобождение продукта, транслокация DICER? Не показана геликазная активность!

Домены, ответственные за ядерную локализацию (не у всех)



# Кристаллическая структура Dicer



Ruler – определяет длину продукта!  
Объект искусственного мутагенеза DICER

MacRae IJ et al. Structural Basis for Double-Stranded RNA processing by Dicer. Science 2006



Субстратом для Dicer может служить любая дцРНК достаточной длины, независимо от происхождения!



*Процессинг дцРНК происходит независимо от наличия мишени!*  
ДцРНК, Dicer и те или иные его кофакторы (дцРНК связывающие белки) формируют комплекс, в котором и происходит процессинг

Выбор субстрата требует участия кофакторов. Dicer без кофакторов может щепить длинную дцРНК *in vitro*, но не может стабильно связывать образовавшиеся короткие дцРНК

# DICER *in vivo* работает совместно с кофакторами

У *D. melanogaster* – два дайсера, Dcr-1 и Dcr-2

Dcr-1 – есть PAZ, Dcr-2 – нет PAZ

Dcr-1 - АТФ-независим, нет геликазной активности, Dcr-2 – АТФ-зависим, есть геликазная активность

*in vitro* могут утилизовать одинаковые субстраты, но *in vivo* активности отличаются!

Dcr-1+Loqs-PA+Loqs-PB – работают с короткими эндогенными индукторами (прежде всего предшественниками miРНК)

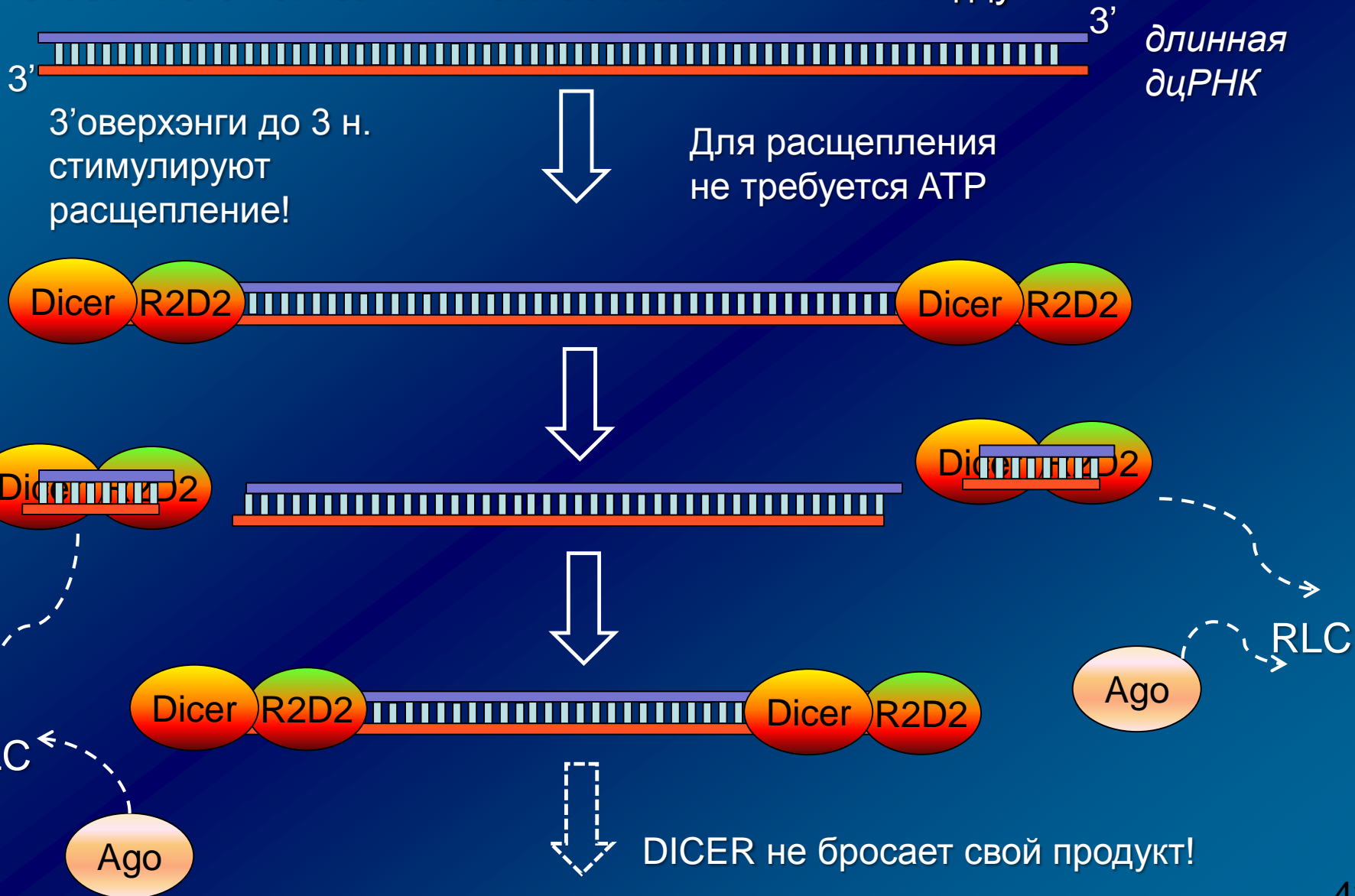
Dcr-2 +R2D2 – не может работать с предшественниками miРНК, расщепляет длинные дцРНК

У млекопитающих, в т.ч. у человека – один дайсер

TRBP (Transactivation-response RNA-binding protein); альтернативный партнер Dicer – PACT (Protein kinase R-activating protein)

Субстратная специфичность индивидуальных молекул Dicer у млекопитающих определяется с участием дополнительных кофакторов

DICER в комплексе с R2D2 (TRBP) нарезает протяженную дцРНК с каждого из краев к середине. При этом в конечном счете с кофактором оказывается связанным более стабильный конец дуплекса



*Механизм РНК-  
интерференции: II стадия –  
слайсинг (slicing)*

# RISC

*RNA interference specificity complex*

*or*

*RNA induced silencing complex*

*ключевые компоненты - белки семейства Ago*

# RISC

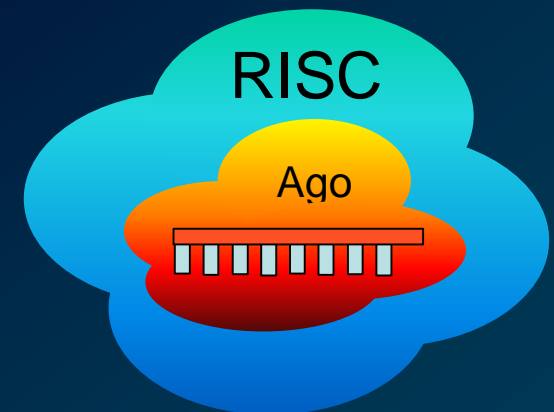
Семейство больших (~500-kDa) гетерогенных РНК-мультибелковых комплексов, **вовлеченных во все пути РНК-зависимого сайленсинга**

В “сердцевине” комплекса – белок Ago с активным нуклеазным доменом (может выступать в качестве “минимального RISC”)

“Заряженный” – с активной цепью siРНК или miРНК внутри, связанной с Ago – белком, либо “незаряженный”

Другие возможные компоненты (до сих пор не все описаны, и ни в одном случае не определен полный набор):

- РНК-связывающие белки, в т.ч. Ago
  - РНК/ДНК геликазы
  - Факторы ингибирования и инициации трансляции
  - RdRP (РНК-зависимая РНК-полимераза)
  - трансмембранные белки
- (предполагается роль у объектов, для которых показана системная RNAi – растения и *C. elegans*)
- Dicer’ы и другие компоненты RLC...



# RISC

Субстратная специфичность, локализация в клетке, участие в ткане- и стадийспецифичной регуляции обеспечивается множеством “съемных” белковых факторов

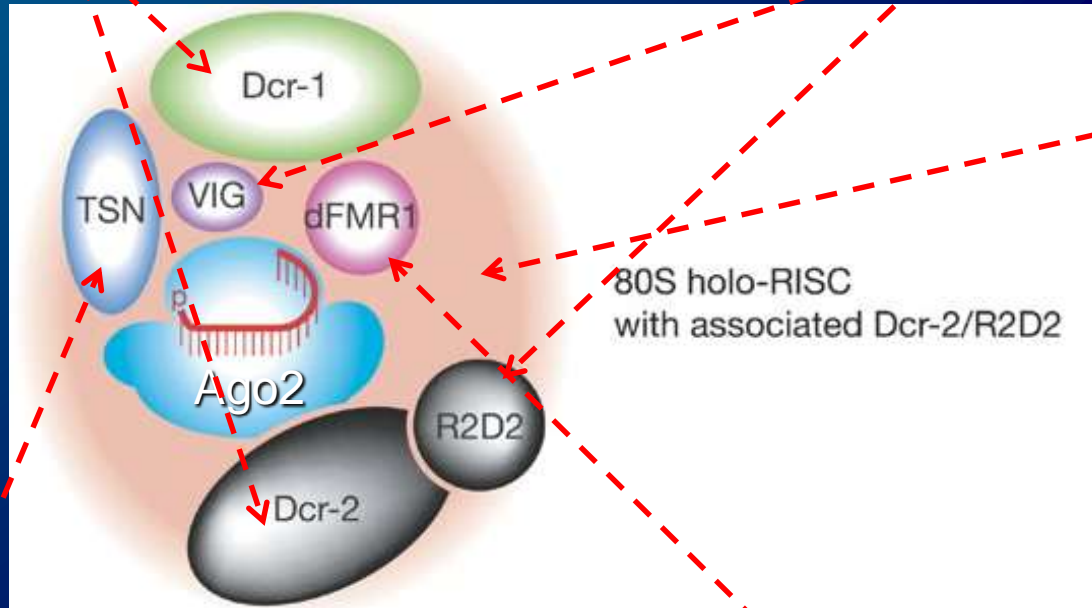
coreRISC и holoRISC, промежуточные формы у одного и того же объекта – от 150 кДа до 3 мДа



# Основные компоненты siRISC у *Drosophila melanogaster*

Дср-белки

Аго-подобные белки



Также вовлечены в сборку RISC:  
Armitage (геликаза?)  
Spindle E (геликаза?)  
Rm62 (геликаза?)  
Dmp68 (геликаза?) ...

От Tudor domain и Staphylococcal Nuclease domains – нуклеаза, ассоциирует с VIG-1 и короткими дцРНК, а также с рибосомами

The Fragile-X Mental Retardation protein (FMRP/dFMR1) консервативный репрессор трансляции в нейронах



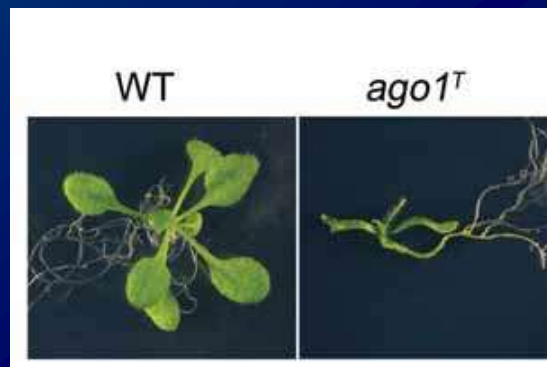
# Белки семейства Argonaute (Ago)

Древние, высоко консервативные (вероятное происхождение – из компонентов аппарата инициации трансляции) белки порядка 100 kDa

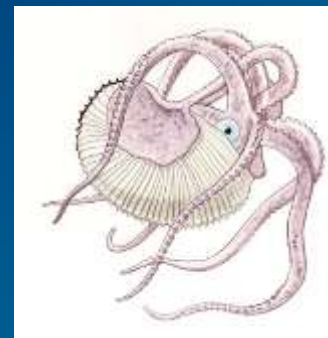
Впервые выделены у *D.melanogaster*, обнаружены у подавляющего большинства эукариот от грибов до людей, у одноклеточных водорослей, а также у прокариот (археи, эубактерии), у которых по структуре подобны эукариотическим

В клетке обнаруживаются в цитоплазме и ядре диффузно, а также в Р-тельцах и стрессовых гранулах

Абсолютно необходимы для развития всех организмов, у которых они обнаружены



Мутанты *ago1* у *Arabidopsis* дефицитны по системе сайленсинга и демонстрируют нарушения развития, в честь которых и названы эти белки



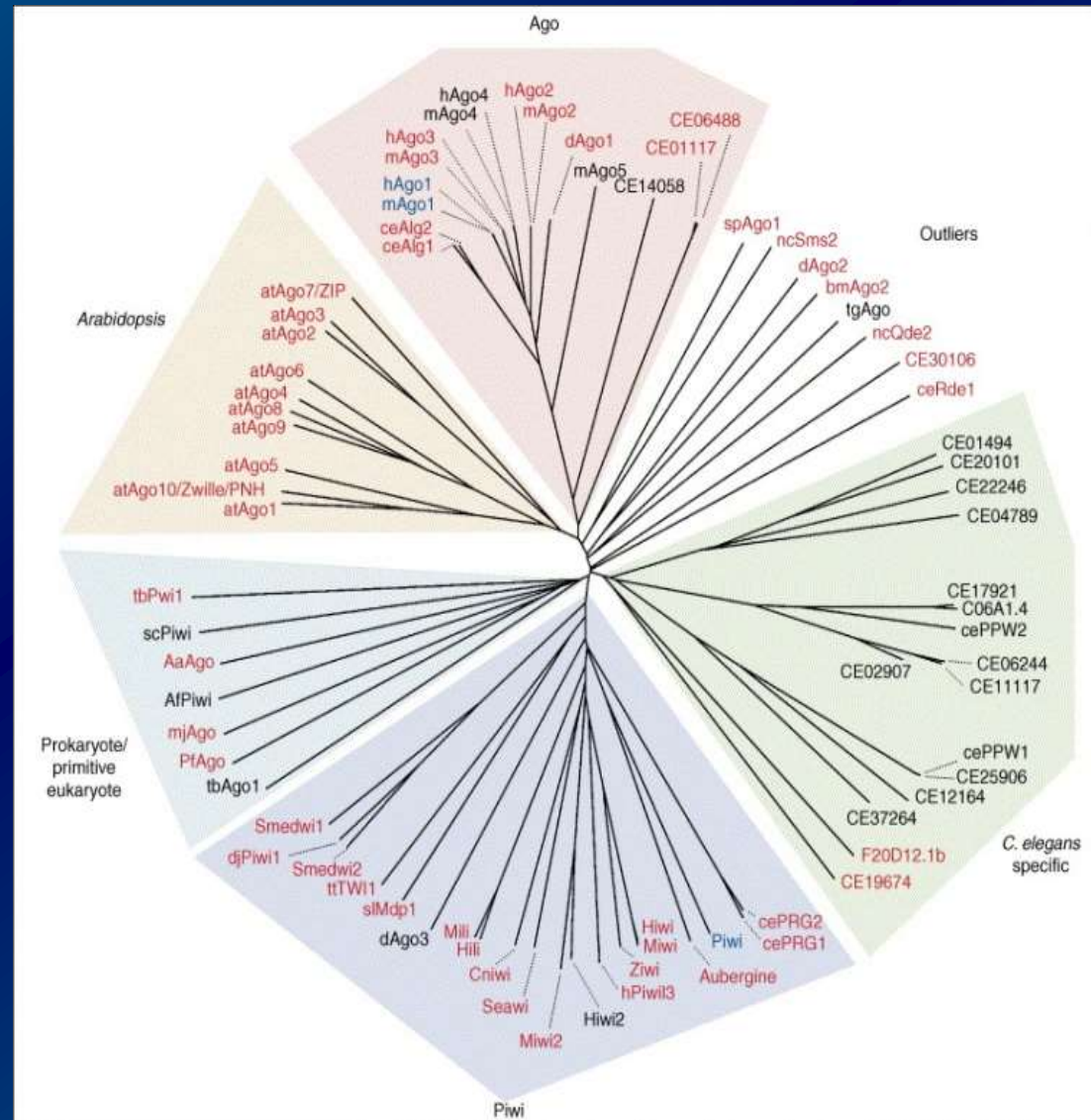
# Белки Ago широко распространены и составляют большое семейство

Часто обнаруживаются множественные белки семейства Ago:

их функции, как правило, **не перекрываются!**

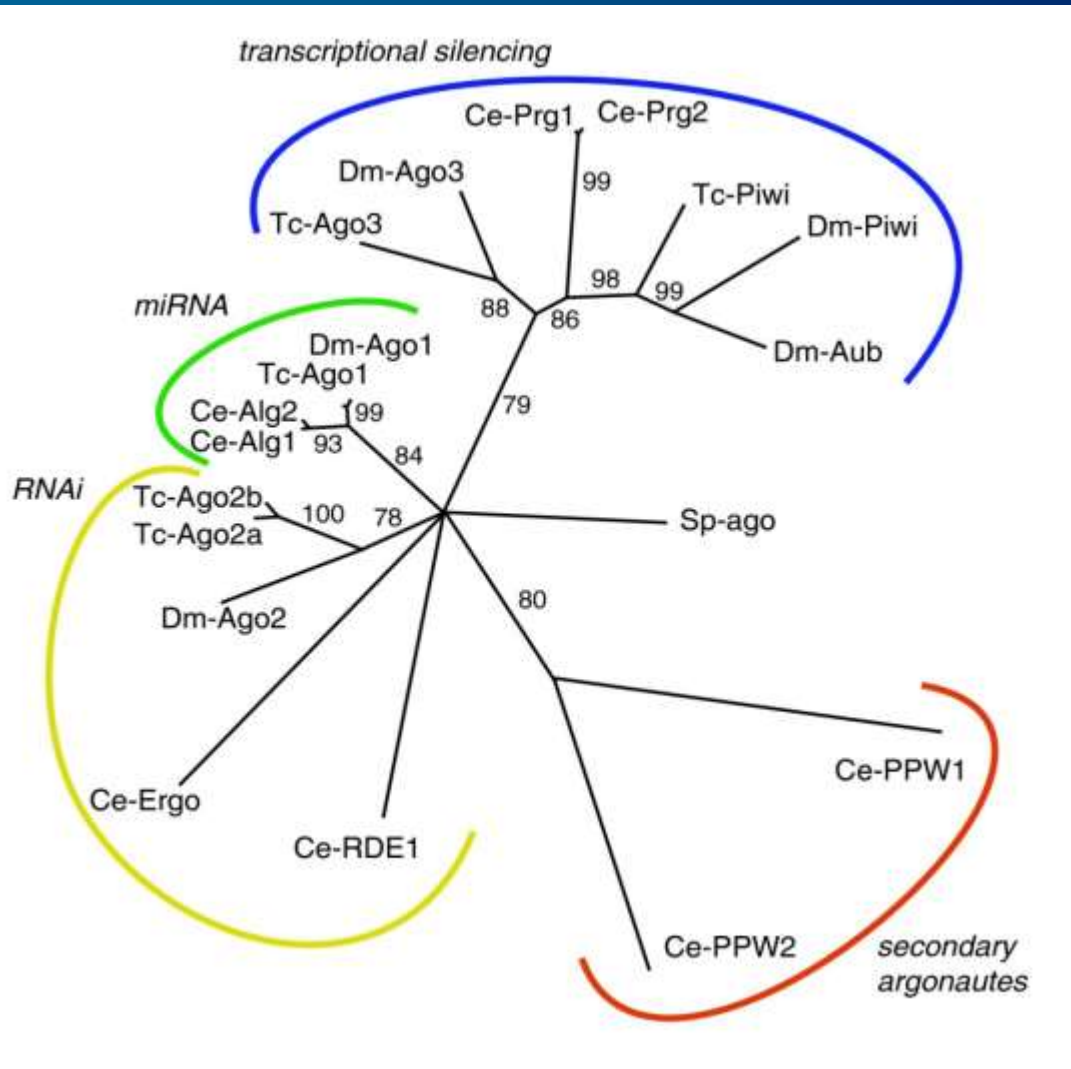
- 27 у *C. elegans*
- 8 у людей и мышей
- 1 у *S. pombe*

Часто разные Ago обнаруживаются в составе комплексов RISC, вовлеченных в разные механизмы сайленсинга и/или имеющих разную субстратную специфичность



Phylogenetic analysis of Argonaute family proteins  
J.S. Parker and D. Barford, *Trends Biochem. Sci.* (2006)

# Филогенетическое дерево Аго-белков



Аго белки делятся на 4 группы, каждая из которых важна для разных путей РНК-зависимого сайленсинга (Tomoyasu et al. Genome Biology 2008)

Классическая РНКi (желтые), сайленсинг с участием микроРНК (зеленые), TGS (синие), вторичная РНК-интерференция (красные)

*Dm* = *D. melanogaster*

*Tc* = *T. castaneum* (жук)

*Ce* = *C. elegans*

*Sp* = *S. pombe*

Ago – ключевой компонент любого пути РНК-зависимого сайленсинга

У человека и других млекопитающих Ago2 может расщеплять одну из цепей РНК в РНК/РНК дуплексе (т.е. является слайсером)

Piwi белки (обнаружены только у животных) - расщепляют РНК в составе РНК/ДНК дуплекса (активность РНКазы H)

Многие Ago не являются нуклеазами. У человека 3 из 4 Ago – не нуклеазы

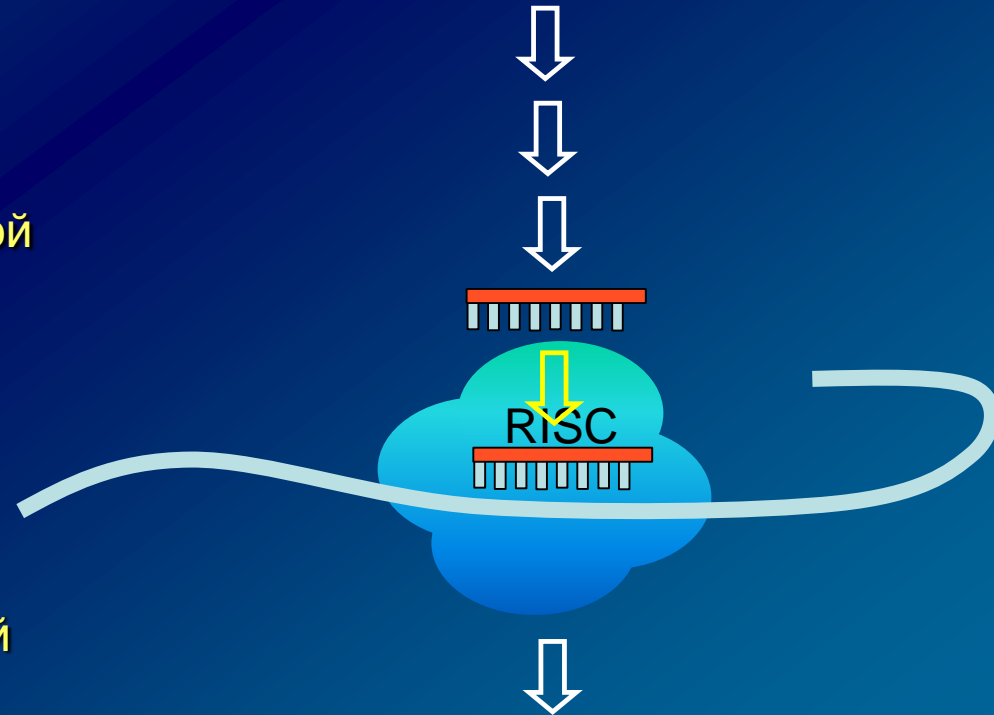


Общая для всех функция:

Связать одну (активную) цепь короткой дцРНК в РНК-белковом комплексе (например, RISC), участвующем в сайленсинге



Обеспечить взаимодействие активной цепи с комплементарной последовательностью мишени



*Разнообразные механизмы сайленсинга*

Белки Ago включают несколько функциональных доменов, образующих структуру “полумесяца”

PAZ (~100 а.к.)

- как у Dicer, 20 кДа, начальный контакт и связывание с дцРНК (может связывать оцРНК)
- связывает 3' оверхэнги, типичные для siРНК

PIWI (~300 а.к.)

- 40 кДа, нуклеаза, схожая с нуклеазным доменом РНКазы H
- PIWI отвечает на направляемое дцРНК расщепление оцРНК, но у некоторых Ago- белков известны и другие активности

Mid

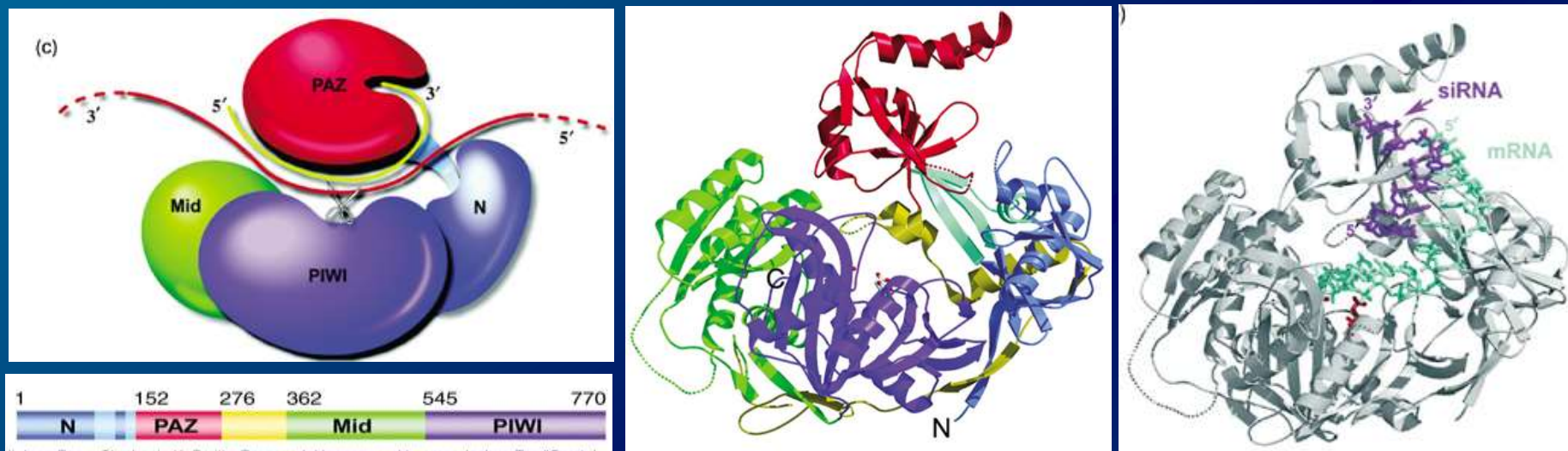
- совместно с PIWI формирует бороздку для укладки дцРНК за счет электростатических взаимодействий

N-концевой домен

Функции других доменов не до конца определены



# Белки Ago включают несколько функциональных доменов, образующих структуру “полумесяца”



За счет комплементарности активной цепи siРНК или miРНК RISC взаимодействует с РНК-мишенью, при этом нуклеация при спаривании происходит в коротком участке 6-8 н. т.н. “seed sequence”, однозначно определяемом с участием белка Ago

Прокариотические Ago-белки способны *in vitro* включать короткие оцДНК и расщеплять комплементарные им РНК-мишени! (Yuan et al. Mol Cell 2005). *In vivo* назначение этой активности пока не определено, но ... (см. далее)

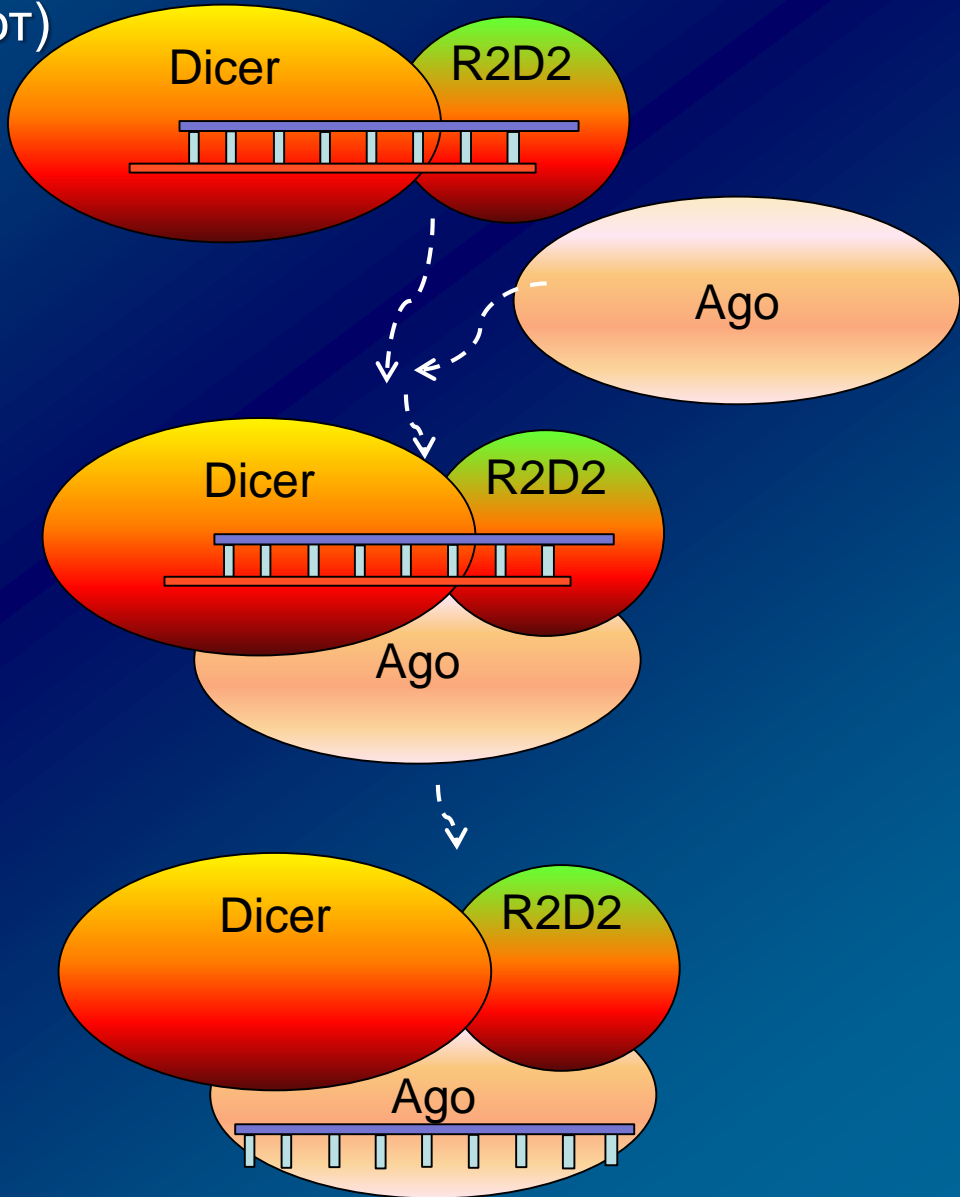
В отличие от эукариотических, не все содержат PIWI домен, но соочищаются совместно с нуклеазами

Переход от первой стадии ко второй происходит с участием Dicer (по крайней мере, у высших эукариот)

Комплекс В (siРНК + гетеродимер Dicer/кофактор) объединяется с белком Ago и формирует комплекс RLC (RISC Loading Complex)  
*RLC может формироваться с привлечением дополнительных белков*



Две цепи siРНК разделяются в составе RLC: дуплекс “перезаряжается” в Ago и цепи диссоциируют  
*Судьба второй цепи (passenger strand) может быть различной, диссоциирует и/или расщепляется белком Ago*



Переход от первой стадии ко второй происходит с участием Dicer (по крайней мере, у высших эукариот)

Две цепи siРНК разделяются в составе RLC: дуплекс “перезаряжается” в Ago и цепи диссоциируют

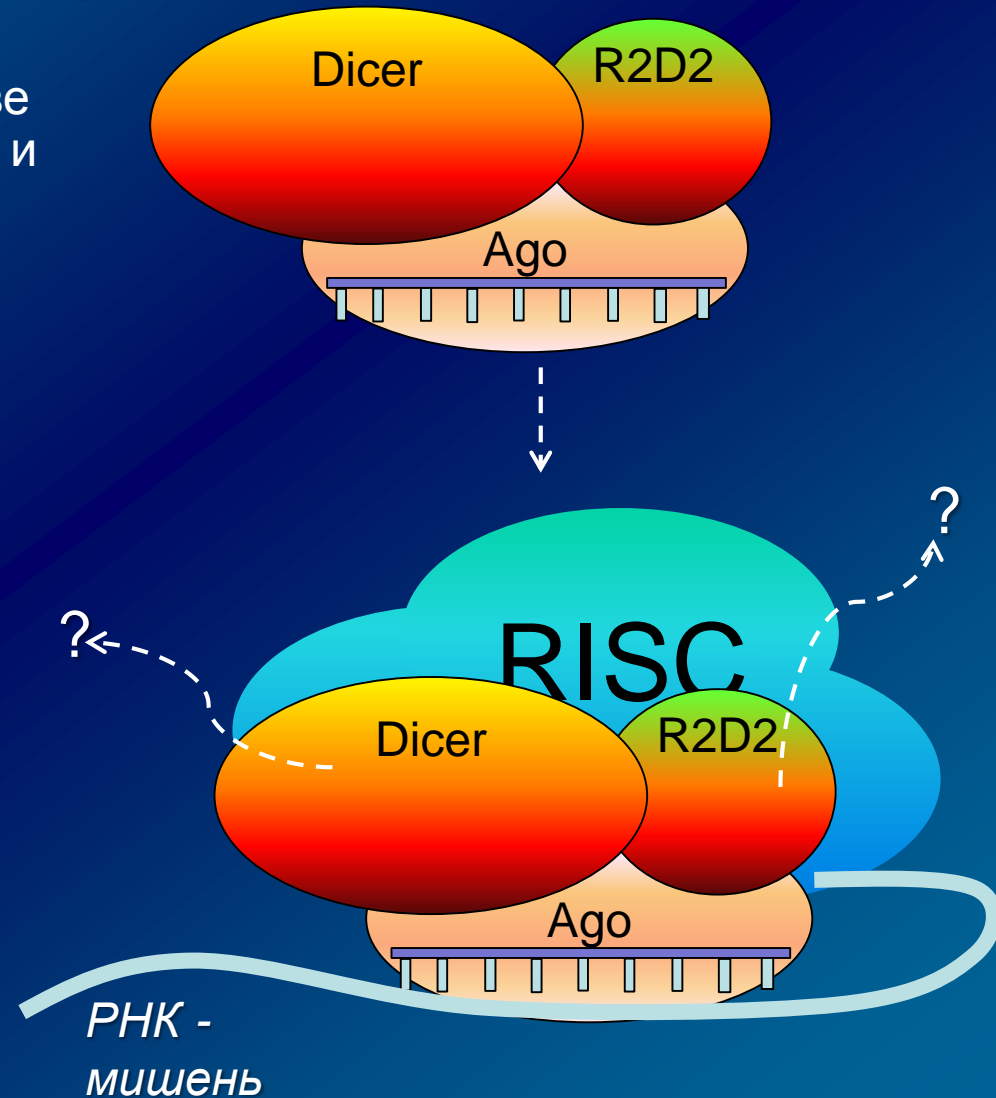


Активная цепь, связанная с Ago, попадает в активный комплекс **RISC**  
Судьба *DICER* и *R2D2* может быть различной (могут остаться ассоциированными с *RISC*)

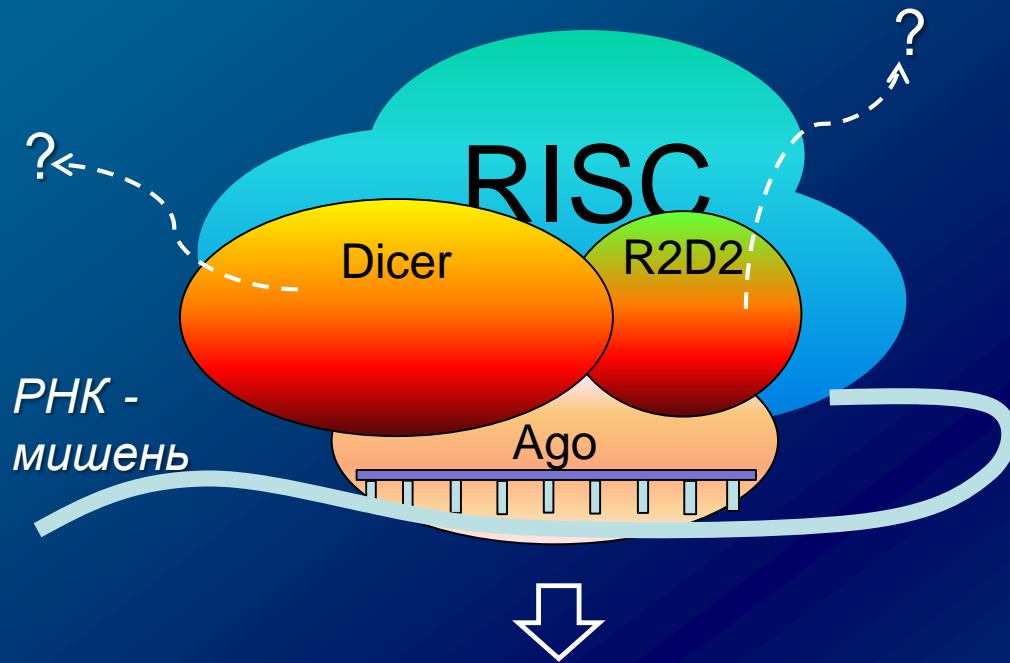


Активная цепь siРНК спаривается с мРНК- мишенью в активном центре домена PIWI

*Распознавание мишени происходит за счет 5'конца активной цепи (seed sequence, позиции 2-8 от 5'конца). Нуклеация, затем распространение дуплекса в 3'направлении вдоль активной цепи, вероятно конформационное изменение Ago, 3' конец активной цепи удаляется из кармана PAZ*





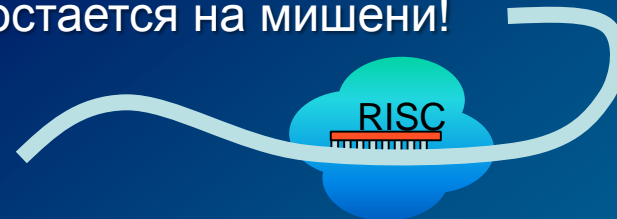


Перестройка всего комплекса помещает фосфат расщепляемого сайта мишени (обычно между 10 и 11 н. от 5'конца активной цепи) в каталитический центр домена PIWI

Если **комплементарность велика** и **РНКазный центр активен**, происходит  $Mg^{2+}$  зависимое расщепление (слайсинг), затем диссоциация мишени (усиливается при наличии АТФ) и деградация с участием клеточных нуклеаз

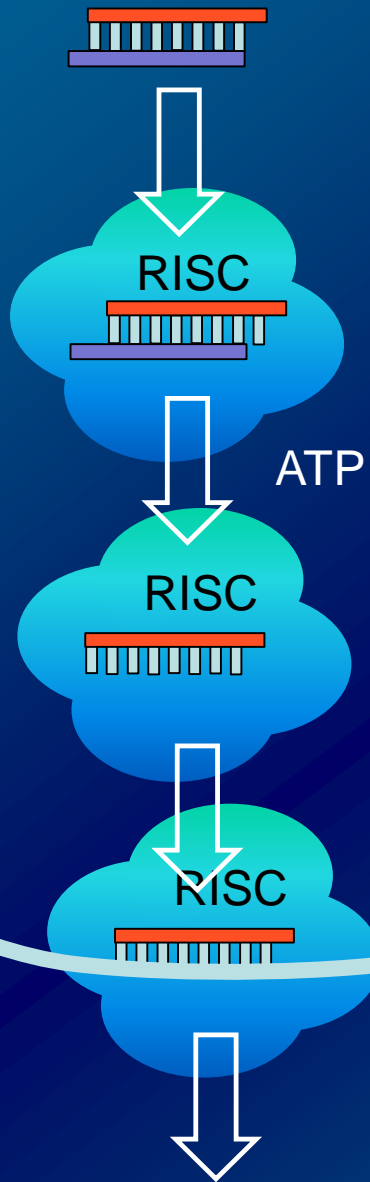


В противном случае весь комплекс остается на мишени!



“Репрессированные” Ago – содержащие mRNP агрегируют в Р – тельца, где репрессированная мРНК может либо храниться, либо деградировать с участием деаденилирующих и декэпирующих ферментов

# Участие комплекса RISC в процессинге siРНК



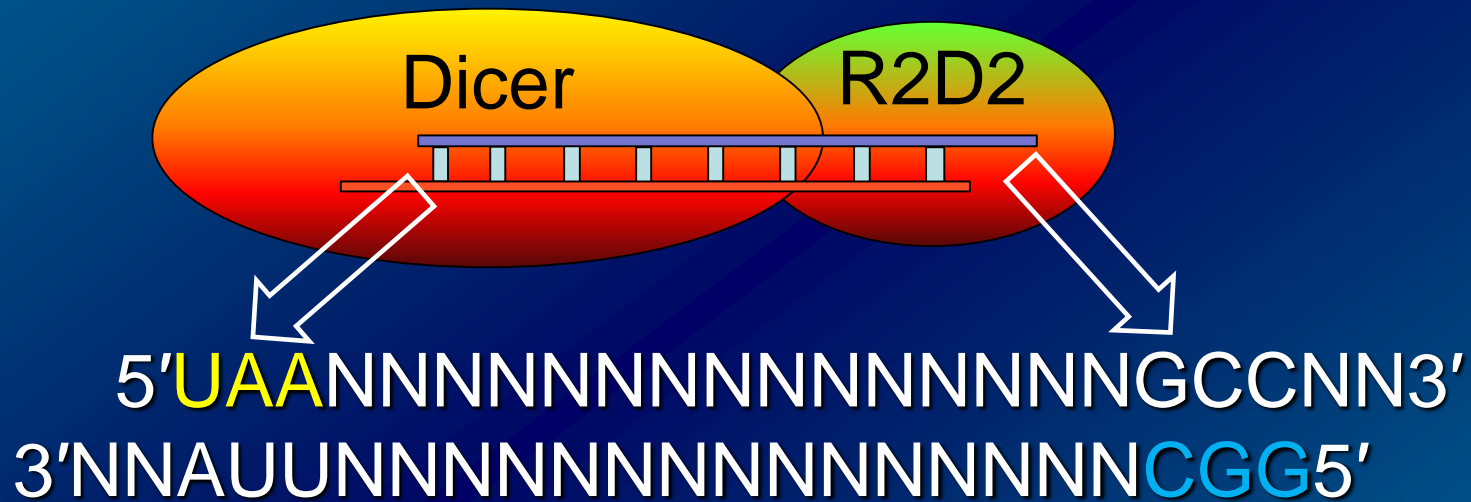
Короткая дцРНК (продукт Dicer или синтетическая) может включаться в состав RISC **без участия Dicer**

В этом случае две цепи дцРНК разделяются за счет АТФ-зависимой геликазной активности. Активная цепь остается в составе зрелого комплекса RISC, вторая удаляется. Активная цепь взаимодействует с РНК-мишенью. Если происходит расщепление, RISC может выступать как комплекс многообразного действия (Novina and Sharp, 2004)

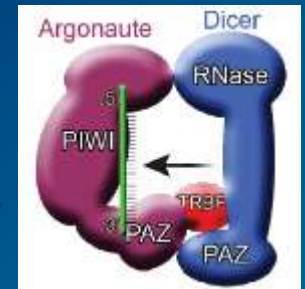
Высвобождение двух продуктов расщепления РНК-мишени из RISC требует АТФ. 3' фрагмент расщепленной мРНК деградирует в цитоплазме с участием экзонуклеазы Xrn1, а 5' фрагмент расщепляется набором 3'-5' экзонуклеаз в экзосоме

# Как выбирается активная (антисмысловая) цепь?

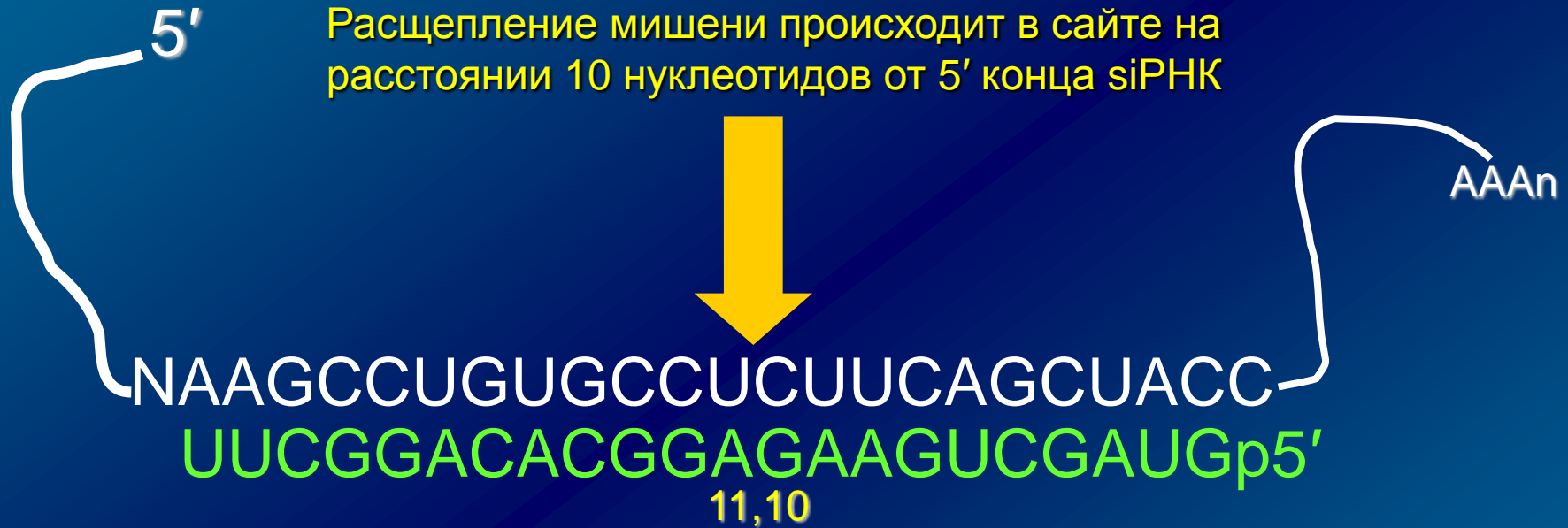
Dicer и R2D2 образуют гетеродимер, в котором R2D2 связывает более термодинамически стабильный 5'конец короткой дцРНК, а Dicer – менее стабильный. Такой характер связывания предопределяет, какая цепь в итоге будет заряжена в RISC – а именно **цепь, 5'конец которой термодинамически менее стабилен**. Присутствие 5'-фосфата на конце siРНК усиливает связывание R2D2



При “передаче” из Dicer/R2D2 в Ago ориентировка siРНК сохраняется. PIWI домен белка Ago связывает 5' фосфорилированный конец активной цепи siРНК, а PAZ домен – ее 3' конец



# Расщепление происходит в центре дуплекса siРНК - мишень



# Расщепление происходит в центре дуплекса siРНК - мишень

Расщепление мишени происходит в сайте на расстоянии 10 нуклеотидов от 5' конца siРНК



незначимая  
позиция

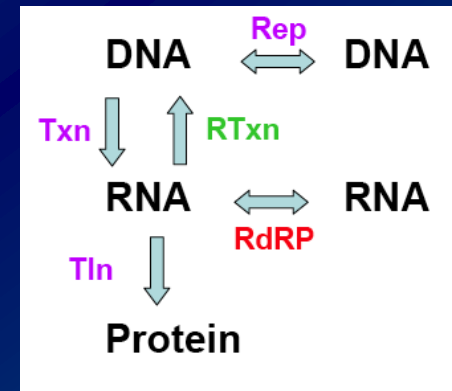
менее  
ответственный  
участок

**Мутации в сайте расщепления  
инактивируют siРНК!** Мутации в других сайтах – РНК-интерференция может сохраняться. 1-2 замены – могут переноситься, 3-4 замены – снижение РНК-интерференции

# РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP)

*RdRP – RNA-dependent RNA Polymerase*

Очередная поправка к “центральной догме”  
молекулярной биологии



Активность RdRP найдена у растений, грибов, *C.elegans*

Функциональные гомологи известны у высших эукариот

может служить фактором усиления эффекта РНК-интерференции

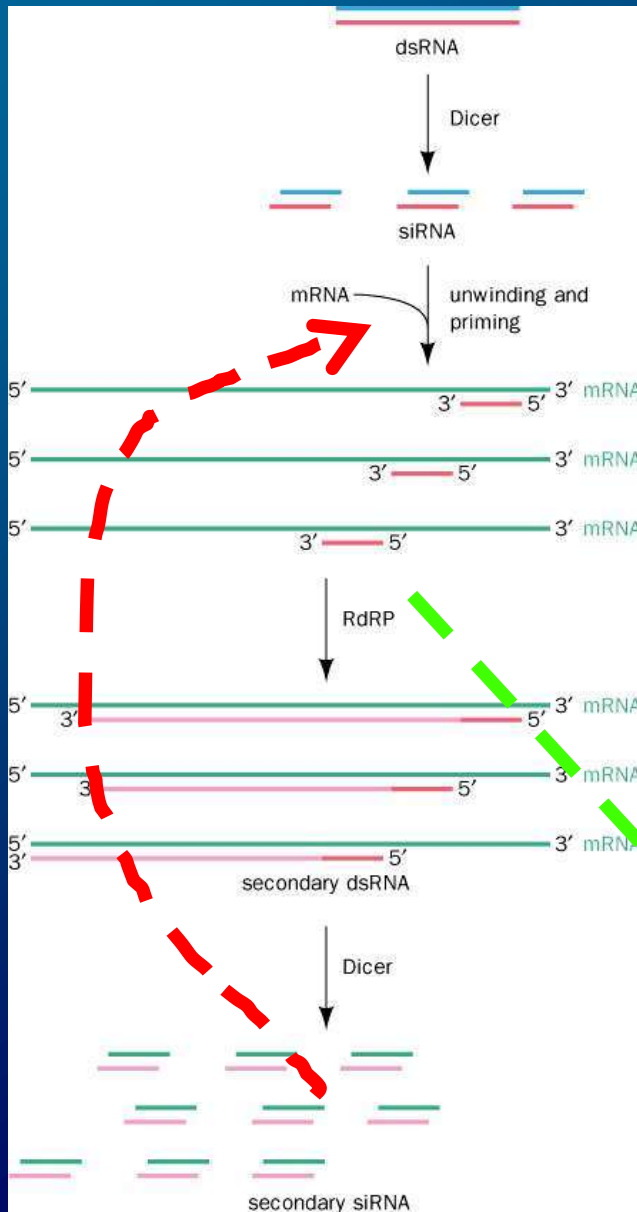
необходима ли для любой РНК-интерференции? Однозначно нет!

- Не выявлена у млекопитающих и *Drosophila*

- RdRP – дефицитные растения и черви – неоднозначные данные

может участвовать в процессе, названном Random degenerative PCR (Lipardi et al., 2001)

# Схема образования вторичных siРНК



1) siРНК, образовавшаяся в результате активности Dicer, расплетается и связывается с мРНК-мишенью

2) siРНК действует как затравка для RdRP

3) 5'-3' элонгация

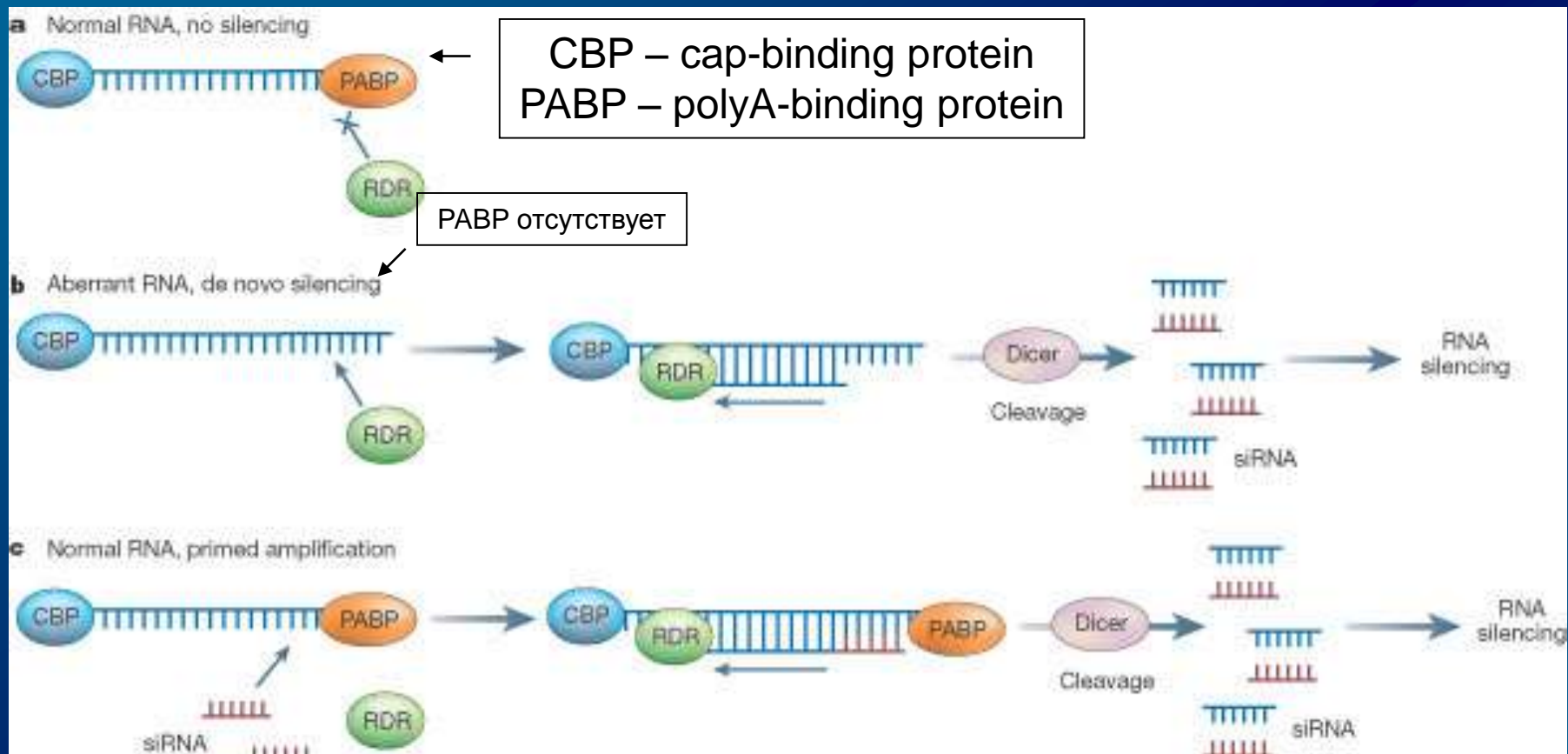
4) образовавшаяся длинная дцРНК является субстратом для Dicer, который нарезает ее на вторичные siРНК → амплификация siРНК

эффект ограничен расстоянием 300-500 н. в 5' направлении от сайта первоначального расщепления

вторичные siРНК могут отличаться по размеру от первичных

расщепление мишени с участием RISC

# “Нормальная” мРНК связана с белками CBP и PABP и защищена от вовлечения в механизмы собственного сайленсинга с участием RdRP



D. Vaulcombe, Nature (2004)

Каждая молекула PABP связана с 30 аденозиновыми остатками  
Обеспечивает защиту от общей нуклеазной активности, но повышение чувствительности к полиА рибонуклеазе, которая постепенно деградирует мРНК в цитоплазме  
Когда остается 30 аденозинов – быстрая деградация мРНК



# Общие принципы РНК-интерференции - summary:

РНК-интерференция – древний и консервативный механизм РНК-зависимого сайленсинга

Ключевые события:

- расщепление дцРНК-индуктора до коротких дцРНК
- взаимодействие активных цепей коротких дцРНК с РНК-мишенью по принципу комплементарности в составе рибонуклеопротеинового комплекса с обязательным участием Аго-белков

В качестве индуктора может выступать РНК самого разнообразного происхождения

Механизмы сайленсинга отличаются большим разнообразием, сайленсинг может быть индуцирован искусственно

Возможно эпигенетическое наследование эффектов РНК-интерференции

Благодарю за внимание!

Вопросы?