

*Короткие некодирующие РНК и
регуляция экспрессии генов
эукариот*

II: МикроРНК

При РНК-интерференции

Введение экзогенных дцРНК или индукция экспрессии трансгенов вызывает подавление экспрессии генов, гомологичных соответствующей РНК

Механизм включает образование коротких дцРНК и является универсальным для эукариот



Следовательно, *in vivo* также образуются короткие дцРНК, комплементарные каким-то мишеням!

Источники индуктора: вирусы? Продукты незаконной транскрипции? Что-то еще?

Открытие генов микроРНК у *C.elegans*: раньше, чем открытие РНК-интерференции!

Открытие первой микроРНК:

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* (1993)

Wightman B, Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* (1993)



слева - Victor Ambros
справа - Gary Ruvkun

Гены stРНК у *C.elegans*

stRNA = short temporal RNA

Ген *lin-14* (lineage-abnormal-14)

- кодирует ядерный белок, подавление экспрессии которого в конце стадии L1 инициирует переход в стадию L2

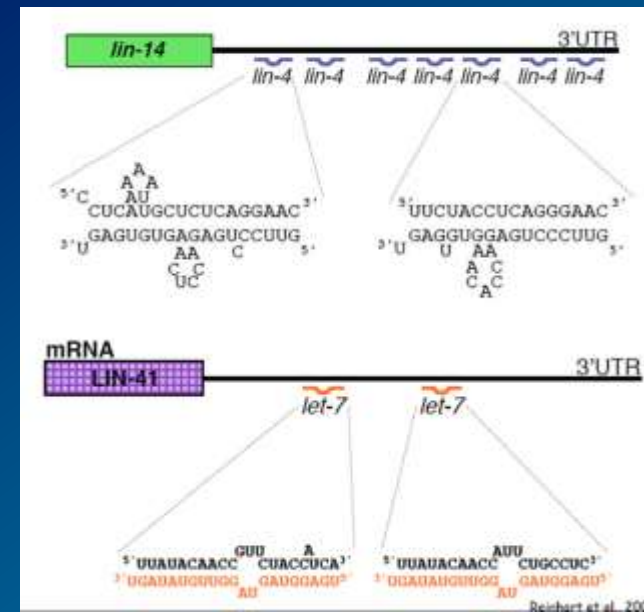
Ген *lin-4* (lineage-abnormal-4)

- выявлен при скрининге на дефекты личиночного развития: осуществляет негативную регуляцию трансляции *lin-14*
- продукт – некодирующая РНК 22 н., имеющая предшественник 70 н.
- РНК **частично** комплементарна 7 неодинаковым консервативным сайтам на 3'UTR мРНК *lin-14* и связывается с ними

Ген *let-7* (lethal-7)

- открыт только через 7 лет (Reinhart *et al.*, 2000)
- продукт – некодирующая РНК 21 н., осуществляет негативную регуляцию трансляции гена *lin-41*, связываясь с 3'UTR его мРНК

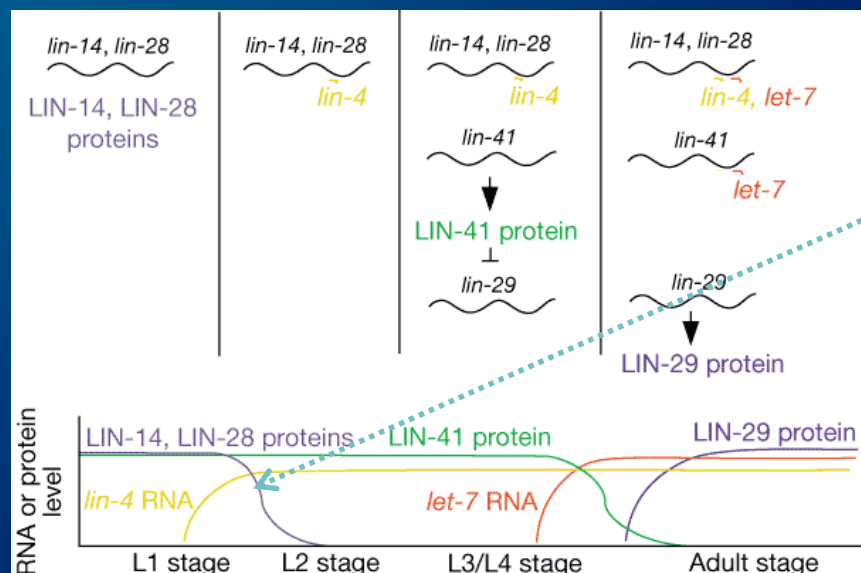
Фенотипические эффекты мутаций генов *lin-4* и *let-7* подобны эффектам от некоторых мутаций в подавляемых ими генах



Последовательная регуляция активностей генов *lin-14* и *lin-41* при помощи stРНК *lin-4* и *let-7* во время развития *C. elegans*

stРНК *lin-4* подавляет трансляцию не только *lin-14* (линьки между личиночными стадиями L1 и L2), но и *lin-28* (линька после стадии L4 во взрослую особь)

miРНК *let-7* подавляет трансляцию *lin-41* (линька после стадии L4 во взрослую особь)



- (1) уровни экспрессии LIN-14 и LIN-28 снижаются за счет экспрессии РНК *lin-4* в конце L1, делая возможным переход к более поздним личиночным стадиям
- (2) на поздних личиночных стадиях экспрессия LIN-41 и некоторых других генов подавляется РНК *let-7*, при этом возможна экспрессия белка LIN-29 и переход к взрослому состоянию

В отличие от *lin-4*, ген *let-7* чрезвычайно консервативен: гомологи *let-7* были выявлены во множестве организмов от морских ежей до людей (Pasquinelli et al., Nature 2000)

2001 г. - установление связи механизмов действия stРНК и РНК-интерференцией

- 8 лет после открытия stРНК
- 1 год после открытия наличия множественных гомологов stРНК у разных видов

Cell, Vol. 106, 23-34, July 13, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press

Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing

Alla Grishok,^{1,9} Amy E. Pasquinelli,^{3,9} Darryl Conte,¹ Na Li,¹ Susan Parrish,⁴ Ilho Ha,⁷ David L. Baillie,⁵ Andrew Fire,⁸ Gary Ruvkun,³ and Craig C. Mello^{1,2,8}

Общие свойства stРНК (позже появился термин miРНК):

- транскрибируются с **эндогенных последовательностей** в виде предшественников длиной порядка 70-100 н.
- исходные транскрипты являются субстратом для белков типа Dicer, имеют в своем составе двуцепочечные шпилечные структуры
- в ходе сложного процессинга расщепляются до зрелых форм (как правило, 21-25 п.н.)
- продукты расщепления подобны siРНК, образуются при участии белков, родственных компонентам аппарата РНК-интерференции

Характерные свойства miРНК

Высококонсервативны

- гены miРНК редко утрачиваются в ходе эволюции
- 15% известных miРНК есть у *C.elegans*, *D.melanogaster* и млекопитающих
- среди млекопитающих – высочайшая консервативность

Индивидуальные паттерны экспрессии (нет “хаускиперов”), органо-, ткане- и стадиоспецифичность

- **паттерны экспрессии различаются по специфичности**; некоторые экспрессируются во всех клетках и на всех стадиях развития, другие имеют более ограниченные паттерны экспрессии

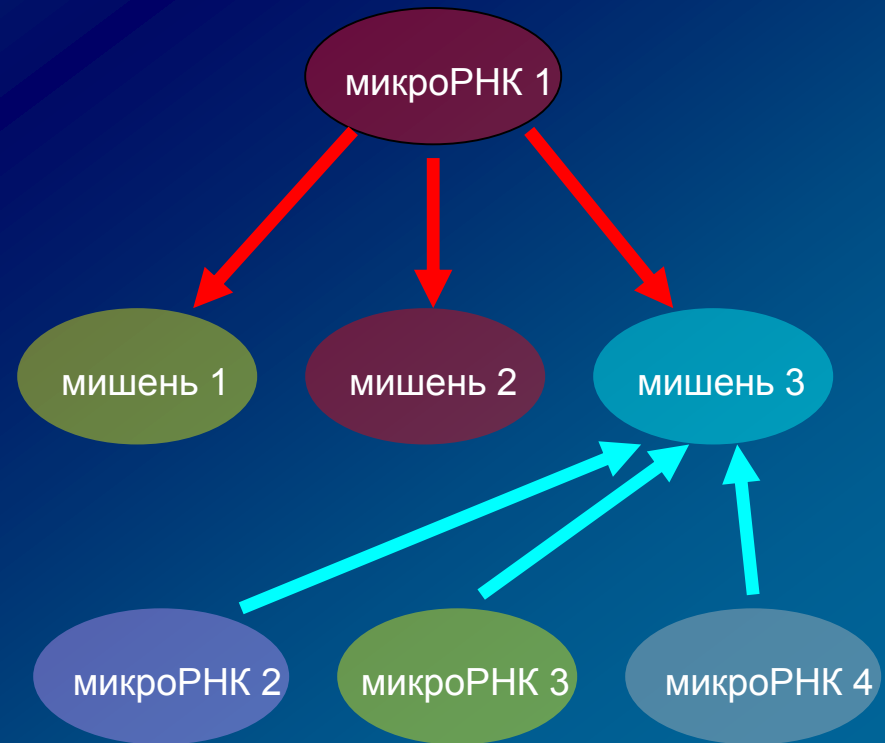
Как правило, имеют множество мишеней

Типичный механизм действия – предотвращение трансляции, начинающееся с не полностью комплементарного связывания с 3' UTR мишени (животные)

Характерные свойства *miRNA*

Участвуют во всех процессах в эукариотической клетке

- до нескольких десятков тысяч копий на клетку (в среднем порядка 50000)
- оценка Lewis *et al.* (2003): **в среднем 5 мРНК-мишеней на каждую *miRNA***
- степень подавления экспрессии может быть от сотен раз до **очень умеренной** (в 2 раза и менее!)
- стехиометрический характер действия предполагает возможность быстрой и обратимой “тонкой настройки” при регуляции



Геном человека:

~25,000 “классических” генов

даже с учетом дифференциального процессинга и альтернативного сплайсинга РНК разнообразие продуктов не объясняет сложность организмов

~1800 микроРНК, закодированных в геноме
практически у каждой – множество мишеней

Количество регуляторных РНК, не являющихся
“классическими” микроРНК - неизвестно

Сколько генов микроРНК в геноме?

Сколько зрелых продуктов этих генов?

Какая их часть функциональна?

*МикроРНК и подобные им регуляторы - дополнительный уровень регуляции экспрессии, **не менее важный, чем ядерная регуляция транскрипции**; выявлен у большинства эукариот, начиная от одноклеточных трипаносом, дрожжей и водорослей и кончая людьми*

*У млекопитающих **>60% белок-кодирующих генов** регулируются с участием микроРНК!*

Гены микроРНК

Детальный сравнительный анализ филогенетического распределения гомологов 1048 генов миРНК человека (www.mirbase.org, выпуск 16, 2010г., сейчас уже 1800) среди различных организмов:

149 гомологов выявлены уже в геномах рыб (*Danio rerio*, *Oryzias latipes*)

169 гомологов у истинных плацентарных (мышь, собака, лошадь, корова и др.)

308 генов являются общими только между человеком и шимпанзе

380 генов миРНК (40%) специфичны только для человека!



Основные подходы для выявления генов микроРНК и их мишеней:

Прямой биохимический метод – очистка комплексов RISC и последующий анализ связанных miРНК (microarrays, NGS)

Разработка компьютерных алгоритмов предсказания мишеней для известных miРНК и miРНК для известных мРНК, исходя из закономерностей, следующих из накапливающейся информации о принципах взаимодействия miРНК–мРНК (MiRscan, TargetScan и др.)

Регистрация и измерение изменений содержания мРНК-мишеней при добавлении экзогенных дцРНК-индукторов

Анализ полных транскриптомов или фракций РНК, обогащенных короткими последовательностями (NGS), выравнивание с известными последовательностями

Идентификация генов микроРНК в геномах

- идентифицированы сотни генов, но для большинства объектов это лишь меньшая часть из предсказанных
- клонирование и секвенирование, затем экспериментальное подтверждение биологической активности (валидация)
- проблема точного предсказания мишеней еще далеко не решена, в особенности у животных (неполная комплементарность с мишенью), многие предсказанные мишени не проходят валидацию
- многие высоко консервативны, особенно 5' конец, консервативные сайты связывания часто располагаются в 3' UTR

Критерии для валидации предполагаемой miРНК

(Experimental Validation of miRNA Targets, Donald E. Kuhn et al. 2008)

- 1) Подтверждение взаимодействия miРНК и мРНК-мишени
- 2) Подтверждение коэкспрессии miРНК и мРНК-мишени
- 3) miРНК должна оказывать предсказуемый эффект на экспрессию белка, соответствующего мишени, ее подавление должно восстанавливать уровень экспрессии
- 4) Эффекты регуляции с участием miРНК должны быть равноценны эффектам от изменения биологической функции по другим причинам

Гены микроРНК у животных

Локализация (*Drosophila*, *C.elegans*):

- большинство – в межгенных областях, далеко от белок-кодирующих генов
- значительная часть – в интронах
- небольшая часть – в экзонах длинных белок-некодирующих РНК
- индивидуальные гены либо локальные геномные кластеры
- возможна регуляция по оперону-подобному принципу

Локализация (млекопитающие):

- большинство (около 70%) – в пределах транскрипционных единиц
- около 50% — в интронах, из них:
 - $\frac{3}{4}$ в интронах белок-кодирующих генов
 - $\frac{1}{4}$ в интронах генов длинных белок-некодирующих РНК
- более 7% перекрываются с экзонами генов нкРНК

Структура:

Может не быть консервативных сайтов полиаденилирования и TATA-like боксов “чужие” либо собственные промоторы (недостаточно изучены)

Примеры промоторов:

SSCWCCS – Hs CTCCGCCS – Ce ATGCAT – Hs, Dm

Процессинг микроРНК у животных

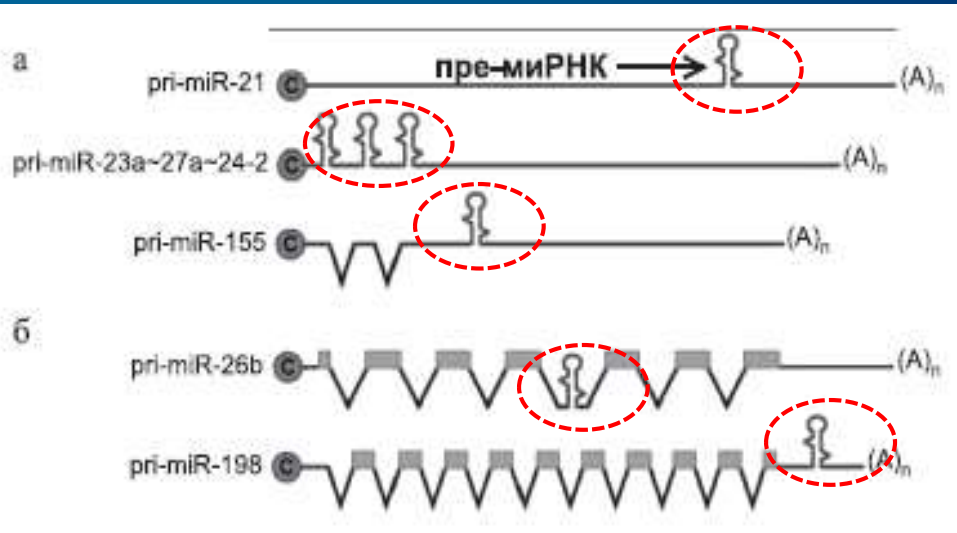
Транскрипция РНК-полимеразой II

- ткане- и стадийспецифичная регуляция известна как факт, но недостаточно изучена
- продукт транскрипции - pri-miРНК, длина 70-200 н. и более
- характерны множественные шпильки с неполной внутренней комплементарностью
- ранее предполагали возможное участие других полимераз, в особенности Pol III, но сейчас сомневаются в этом

Кэпирование, полиаденилирование и редактирование

- высокая частота редактирования (>10%), в т.ч. в позициях seed sequence, которое часто является тканеспецифичным
- возможно дезаминирование A->I

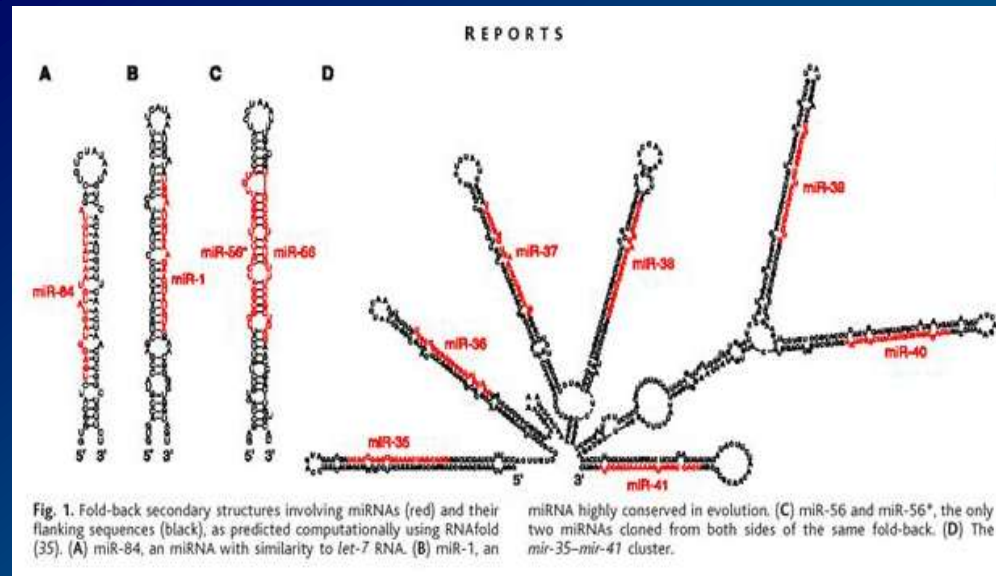
Структура некоторых pri-микроРНК человека:



А) автономная транскрипция

Б) транскрипция в интроне или экзоне белок-кодирующих мРНК

Зрелая miРНК может быть локализована как на 5'-, так и на 3'-плече шпилечной структуры. Могут быть использованы механизмы цис- и транс-сплайсинга, возможен альтернативный сплайсинг



Процессинг miРНК у животных

Расщепление pri-miРНК в ядре ферментом Drosha

- ~160 kDa, консервативный, часть большого комплекса (~500 кДа у *D. melanogaster*, ~650 кДа у *H.sapiens*)
- высокая гомология с Dicer, содержит два домена, подобных РНКазе III, и участок связывания дцРНК
- действует в составе гетеродимера с белком, связывающим дцРНК
- длинная дцРНК не является субстратом
- у растений не найдена, функцию выполняет один из DCL (Dicer-like) белков
- продукт расщепления - pre-miРНК с 3' оверхэнгами, обычно 60-70 н., содержит несовершенные шпильки (чаще одну), экспортируется в цитоплазму



Molecular Cell, Vol. 16, 861–865, December 22, 2004,

RIII, RNase III catalytic domain; D, dsRNA binding domain; PRO-RICH, proline-rich domain; RS-RICH, arginine/serine rich domain.

DROSHA, как и Dicer, работает совместно с кофакторами

PASHA – *D.melanogaster*, *C.elegans*, DGCR8 – млекопитающие

- размер~120 кДа
- подобны R2D2/TRBP, содержат два dsRBD
- связывают miРНК, участвуют в обеспечении субстратной специфичности Drosha
- ингибируют неспецифическую РНКазную активность DROSHA, способствуют правильному процессингу



Микропроцессор

Осуществляет первый этап созревания микроРНК из первичного транскрипта



“Большой комплекс”

Также проявляет *in vitro* слабую процессирующую pri-miРНК активность, но, скорее всего, вовлечен в пути процессинга других РНК, таких, как пре-рибосомальная РНК

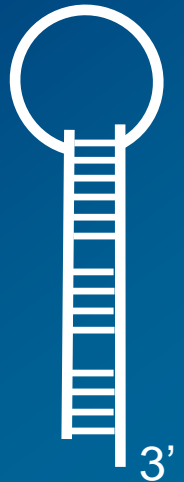
Как Drosha-содержащие комплексы узнают pri-miРНК?

- длина стебля
- размер терминальной петли (должен быть достаточным, ≥ 10 н.)
- структура стебля (должна быть высокая комплементарность)
- последовательности, фланкирующие шпильку
- предположительно, важна третичная структура



Результат действия DRISHA - шпилька с 3'-оверхэнгом

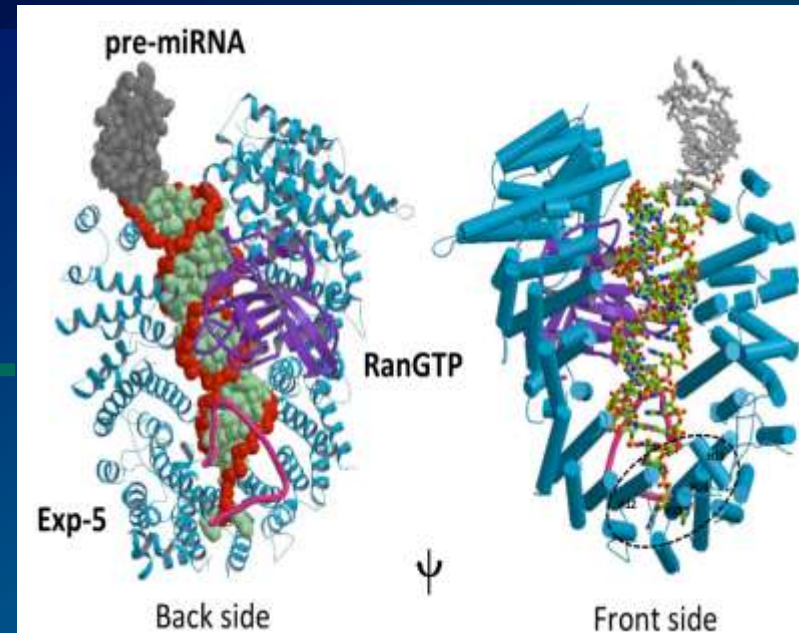
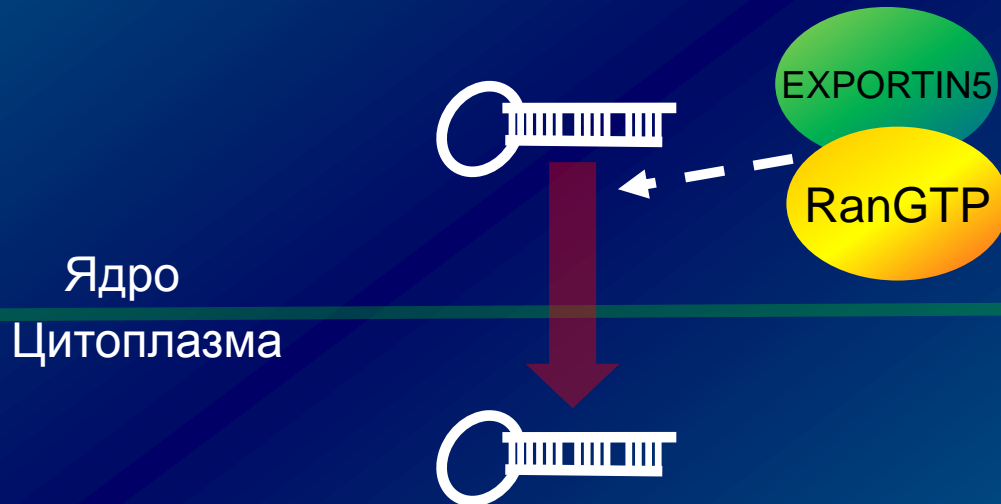
- сигнал для связывания с белками, отвечающими за транспорт pre-miРНК в цитоплазму
- сигнал для Dicer к продолжению процессинга
- сайт разрезания для DRISHA определяется в основном (но не исключительно) расстоянием от терминальной петли, консенсусов для него не выявлено
- отрезанные фланкирующие сегменты, как правило, деградируют в ядре



Процессинг miРНК у животных

Экспорт pre-miРНК из ядра в цитоплазму

- является активным
- осуществляется комплексом Exportin5-Ran-GTP, который транспортирует pre-miРНК и защищает ее от деградации в ядре
- для эффективного связывания требуется 3'-оверхэнг
- Exportin-5 ранее считали запасным транспортным белком для tРНК, замещающим Exportin-T, но имеет большее сродство к pre-mi РНК. Также может транспортировать схожие по структуре аденовирусные некодирующие РНК



Процессинг miРНК у животных

Расщепление pre-miРНК в цитоплазме с помощью Dicer

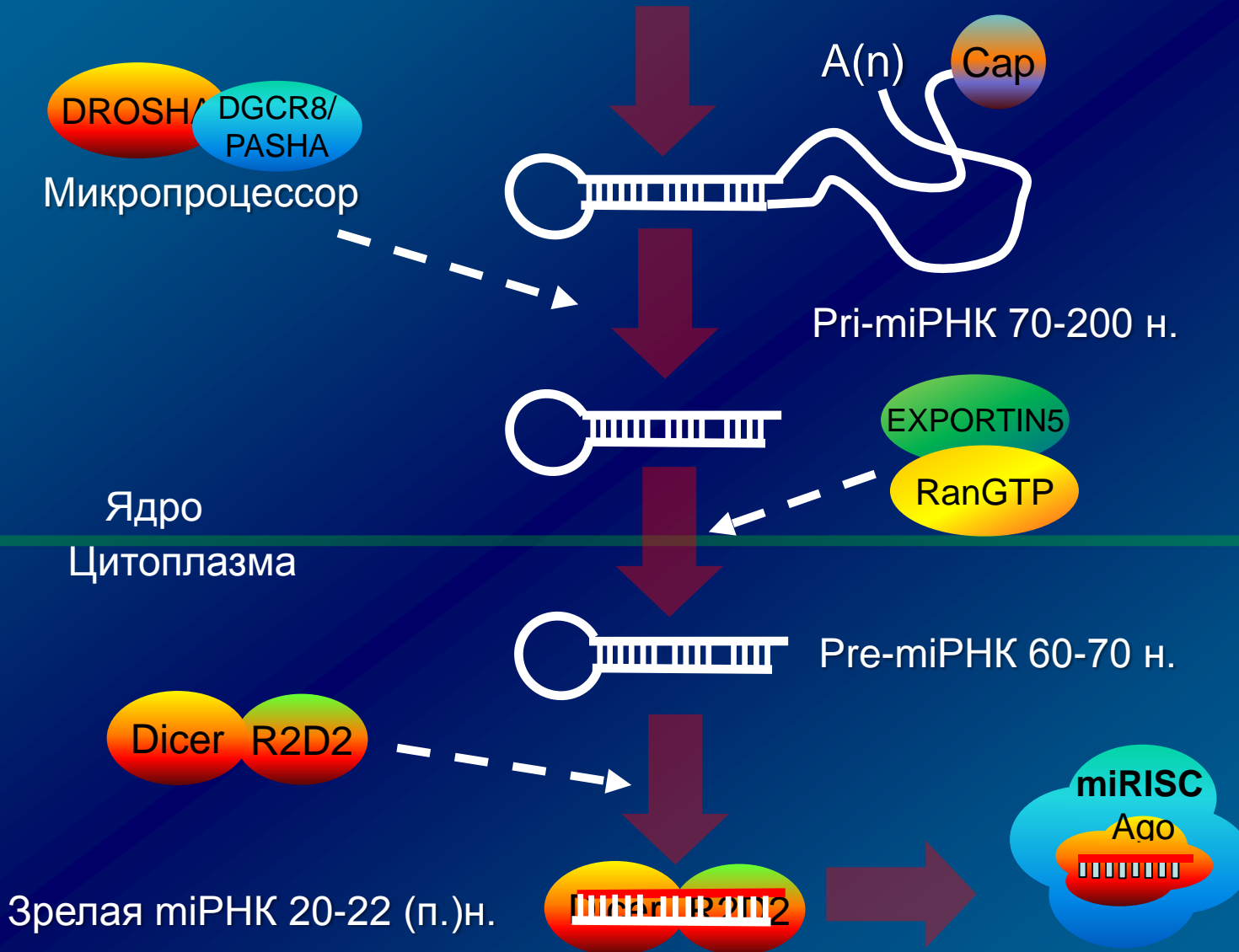
- двуцепочечный разрез за счет активности РНКазы III-подобных доменов
- эффективное расщепление требует 3'-оверхэнга и некоторой минимальной длины стебля; эта структура, являющаяся продуктом расщепления Drosha, взаимодействует с доменом PAZ и определяет позиционирование нуклеазного домена относительно miРНК-предшественника
- продукт – 21-25 п.н. несовершенная дцРНК (miРНК:miРНК*), включающий зрелую miРНК (активная цепь) и комплементарную ей цепь (miРНК*, passenger strand), симметричные 2н. 3' оверхэнги, 5' фосфатные группы

Типичные структуры pre-miРНК (красным выделены активные цепи зрелых miРНК)

mir-60	<i>C. elegans</i>	<i>C. briggsae</i>
	<pre> - C A ACA UCUUGAACUGGAAGA GUGC AUAA AUCAUG A AGAACUGAUCUUUU CACG UAUU UAGUGC A A - A AUG </pre>	<pre> AG - A A A CC UCUUG CUGGAAAG GUG CAUAA AUC UGU A AGAAC GAUCUUUU CAC GUAAU UAG GCA A CU A - A C CG </pre>
mir-80	<i>C. elegans</i>	<i>C. briggsae</i>
	<pre> A -- U G CCGCA GCUUUCGAC AUGAU CU AACAAU A CGAAGUUG UACUA GA UUGUUG G C AU - G UACCC </pre>	<pre> A -- U A C- U GCUUUCGAC AUGAU CU AACAAU GC G CGAAGUUG UACUA GA UUGUUG CG U C AU - G AA C </pre>
mir-87	<i>C. elegans</i>	<i>C. briggsae</i>
	<pre> - U C U A - - UC GGC CGCCUGA ACUUU G CUCA CCU CG CUG A CCG GUGGACU UGAAA C GAGU GGA GC GGU G U U - - - U U UA </pre>	<pre> GC U C U A - - UGUC CGCCUGA ACUUU G CUCA CCU CG C \ GUGGACU UGAAA C GAGU GGA GC G A GU U - - - U U UAAG </pre>
	<i>D. melanogaster</i> AE003626	<i>H. sapiens</i> AC016720
	<pre> -U U- C G CU----- AU CGCGCCUG AU UUGCU AACCG GCC \ GUGUGGAC UA AACGA UUGGC CGG U GU UU A G CUAGCAAC UA </pre>	<pre> U- UG A CUACUUUUG C UUGCU UU---CAGUC A GAUGAGGACU G AACGA GG GUCAG C U A GU \ / U </pre>

Этапы процессинга miRNA у животных

Pol II транскрипция, полиаденилирование, кэпирование, редактирование



Процессинг miРНК у животных: митронный путь

Митроны

- miРНК, происходящие из интронов и отличающиеся особенностями процессинга
- открыты у *Drosophila*, позже обнаружены у *C.elegans* и млекопитающих
- существование у растений – под вопросом
- для образования pre-miРНК не требуется Drosha: вначале процессинг по интронному пути, затем расщепление Dicer
- **мутации в позициях, важных для сплайсинга** – нет сплайсинга и нет продукции митронов
- участки спаривания известных pre-miРНК митронов не выходят за пределы сайтов сплайсинга
- последующие этапы соответствуют “каноническим” miРНК интронного происхождения, для выщепления предшественников которых необходим Drosha и не обязателен сплайсинг, требуются те же факторы - Exportin 5 для переноса в цитоплазму, Dicer для процессинга в зрелые miРНК и Ago для связывания с мишенями

Процессинг miРНК у животных: митохондриальный vs канонический путь



Особенности процессинга miRNA у растений:

Отсутствует ортолог DRONHA, более широкие функции гомологов DICER (основной – DCL1)

- катализируют биосинтез miRNA на всех этапах созревания

Более сложная вторичная структура пре-miRNA

- гетерогенны, обычно гораздо длиннее, но могут быть и короче (от 60 до >300 н.)

Созревание miRNA полностью происходит в ядре

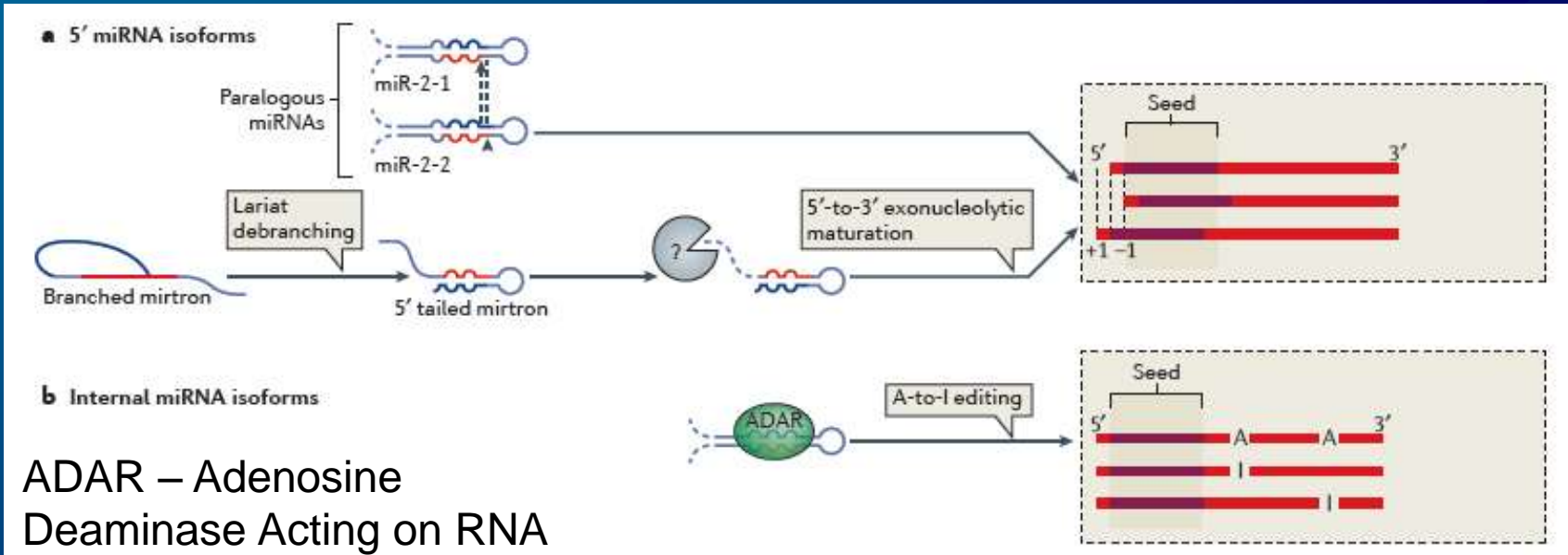
- минимум три стадии разрезания с помощью DCL1 и ряда кофакторов
- **HYL1** – кофактор DCL1, содержит два dsRBD, обеспечивает эффективность и точность расщепления pri-miRNA)

В цитоплазму доставляется уже зрелая miRNA

- активный транспорт с помощью белка HASTY (гомолог EXPORTIN5)
- в цитоплазме белок HEN1 (содержит dsRBD и домен метилтрансферазы) метилирует miRNA-дуплекс по 2'-гидроксильным группам 3'-концевых нуклеотидов (2'-O-метилирование)



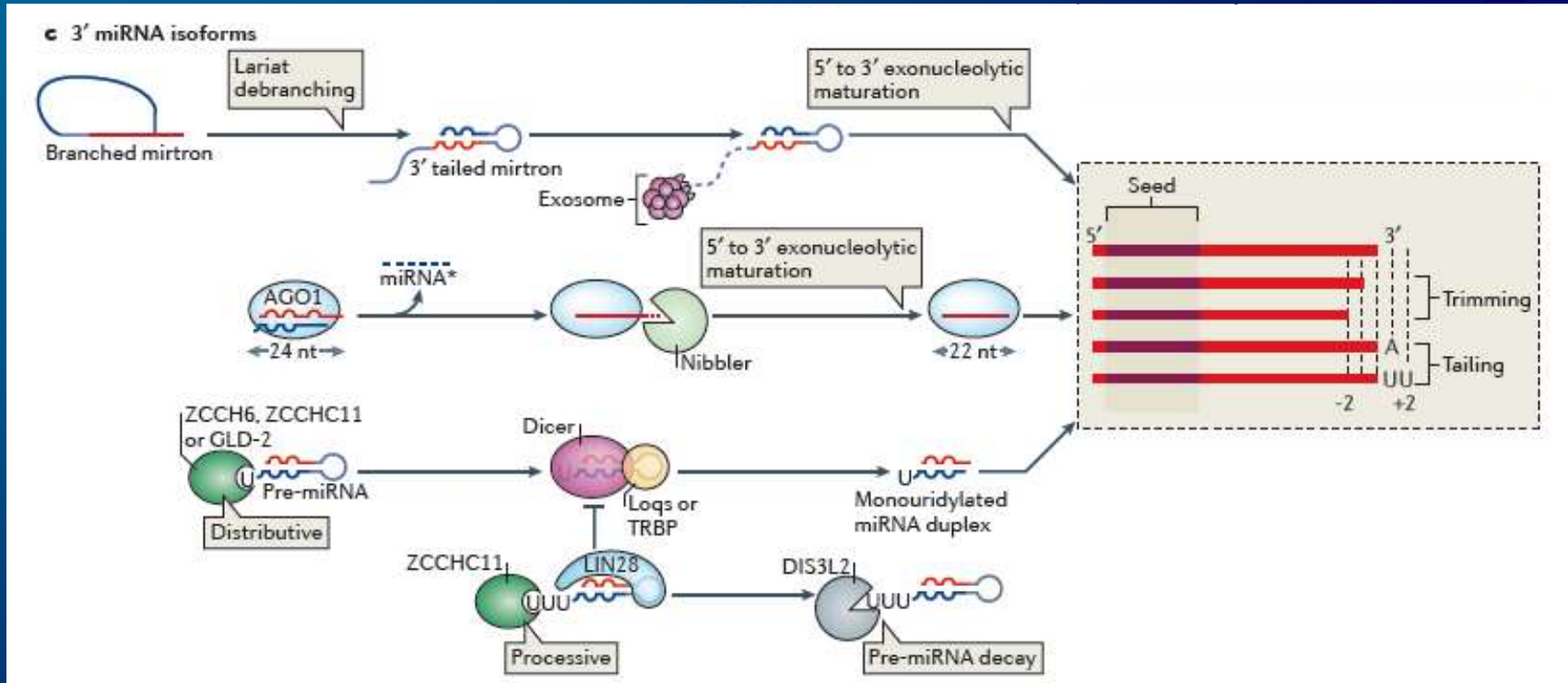
Образование изоформ микроРНК (1)



ADAR – Adenosine
Deaminase Acting on RNA

- зрелые активные формы микроРНК, отличающиеся структурой
- 5'-изоформы известных микроРНК составляют до 10% всех микроРНК у людей, дрозофилы и *C.elegans*, могут быть высокопредставлены
- отличаются по эффективности встраивания в Ago-содержащие комплексы
- образуются в результате тримминга, который может приводить к последующему сдвигу “seed sequence”
- 5' конец может представлять из себя “заготовку” для тримминга
- изоформы могут образовываться в результате редактирования без изменения “seed sequence”, преимущественно в мозге

Образование изоформ микроРНК (2)



- 3'-изоформы известных miРНК более разнообразны
- образуются в результате тримминга без сдвига “seed sequence” (25% всех miРНК у дрозофилы процессируются при помощи 3' экзонуклеазы Nibbler), а также наращивания дополнительных нуклеотидов (A, U)
- изоформы могут образовываться в результате редактирования без изменения “seed sequence”, преимущественно в мозге

Образование изоформ микроРНК (3)

- для некоторых miРНК до 80% прочтений методами NGS содержат как минимум одну замену по сравнению с консенсусом, но, как правило, количество таких вариантов за пределами чувствительности NGS
- изоформы некоторых miРНК равнопредставлены с консенсусными вариантами (miR-210 у *D.melanogaster*)
- изоформы могут иметь совершенно разные профили регуляции (miR-29a и miR-29b в клетках HeLa: первая не меняется в ходе клеточного цикла, вторая накапливается в митотических клетках)
- Различные методы выявления miРНК имеют разную специфичность и чувствительность в отношении изоформ

Включение miРНК в состав RISC

- в целом подчиняется тем же принципам, что и включение siРНК
- некоторые pre-miРНК могут непосредственно включаться в состав RISC, в этом случае белок Ago осуществляет вырезание участка, включающего терминальную петлю (пример – pre-miR-451)
- как и в случае siРНК, для включения в RISC выбирается цепь с меньшей стабильностью 5' конца, зарядка происходит с участием шаперонов HSC70 и HSP90 в виде дуплекса
- созревание дуплекса приводит к удалению цепи miРНК*
- в тканях, где экспрессируется соответствующий ген, цепь miРНК* выявляется с частотой, в ~100 раз меньшей, чем комплементарная ей зрелая miРНК
- то, по какому механизму будет осуществляться сайленсинг, зависит от того, в состав какого комплекса RISC будет включена miРНК (могут отличаться белками Ago и иными компонентами)

Взаимодействие miРНК с мишенями

Мишени для микроРНК в составе RISC

- **MRE** – **M**icroRNA **R**esponsive **E**lements
- у животных – много известных мишеней в 3'UTR мРНК, комплементарность зрелой miРНК и мишени чаще **неполная**
- у растений мишени в основном в ORF мРНК, большинство известных мишеней – факторы транскрипции, комплементарность зрелой miРНК и мишени чаще **полная**
- короткие (обычно 6-8 н.) примеры известных мишеней на 3' UTR's для многих miРНК у Dm: K box – cUGUGAUa, BrD box – AGCUUUA

miРНК – это молекулярный зонд

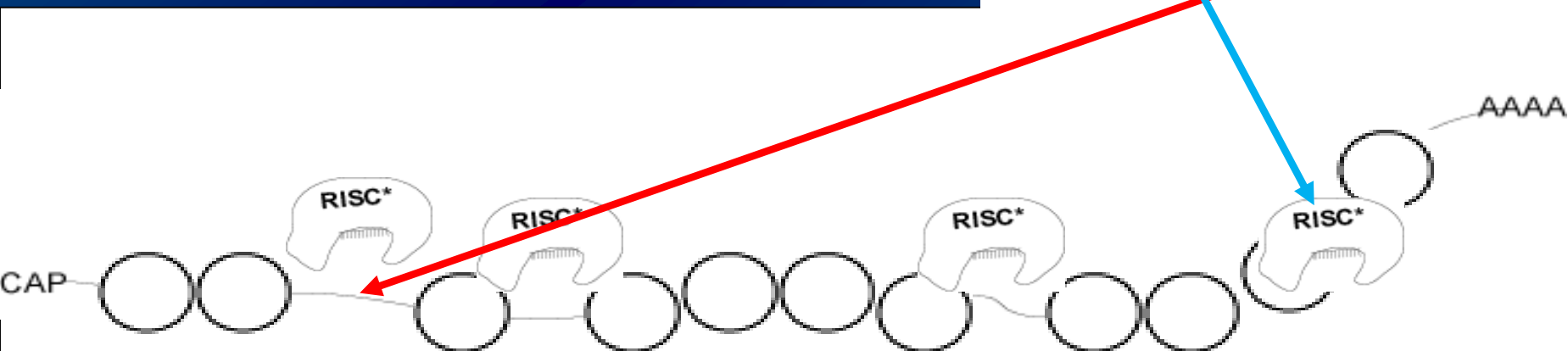
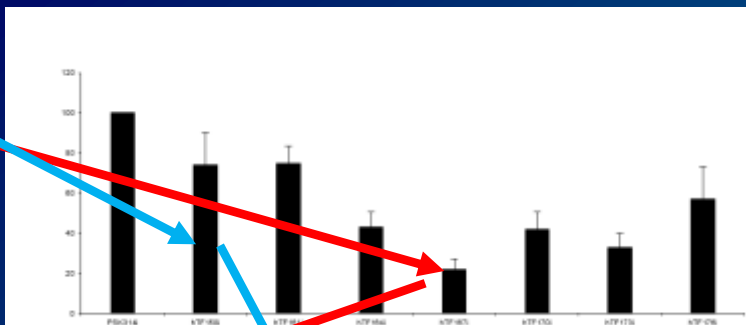
- его основная роль – доставка того или иного нуклеопротеинового комплекса на MRE
- активность этого комплекса определяется в том числе и степенью комплементарности miРНК с MRE
- добавлением MRE на 3'конец мРНК можно добиться сайленсинга, а добавлением его дополнительных копий – усилить сайленсинг
- *многие мРНК, судя по всему, прошли негативную селекцию на присутствие MRE для miРНК, экспрессирующихся в тех же клетках*

Не всякий участок РНК может быть мишенью для miРНК

Важна доступность MRE для комплекса RISC (обусловлена связыванием мРНК с белками или наличием вторичных структур, препятствующих посадке RISC)

По: Hoken et al, NAR 2002

мРНК	AGGUGGCCGGCGCUUCAGGCACUACAAAUACUGUGGC
hTF158i	AGGUGGCCGGCGCUUCAGGTT
hTF161i	UGGCCGGCGCUUCAGGCACTT
hTF164i	CCGGCGCUUCAGGCACUACTT
hTF167i	GCGCUUCAGGCACUACAAATT
hTF170i	CUUCAGGCACUACAAUACTT
hTF173i	CAGGCACUACAAAUACUGUTT
hTF176i	GCACUACAAAUACUGUGGCTT



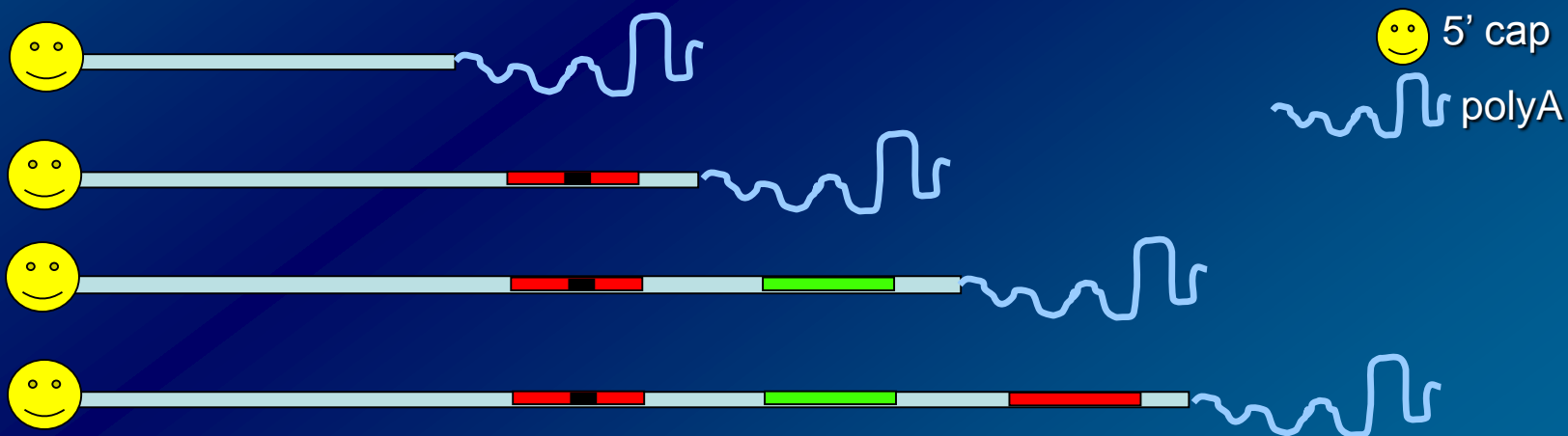
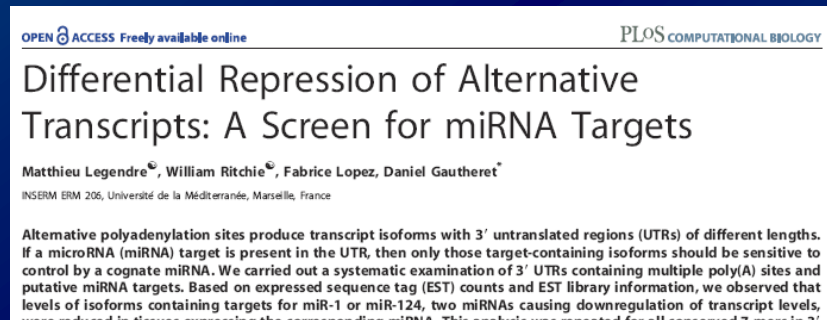
Стабильность зрелых мРНК может зависеть от набора мишеней для miРНК

дцРНК могут влиять на стабильность мишени не только напрямую, но и опосредованно

альтернативный сплайсинг

альтернативное полиаденилирование

...



Есть белки, защищающие РНК-мишень от воздействия miРНК и препятствующие репрессии

HuR (ARE(AU-rich element)-binding protein)

(*M. musculus*, *Danio rerio*)

Dnd1 (Dead-end1) (позвоночные, включая человека)

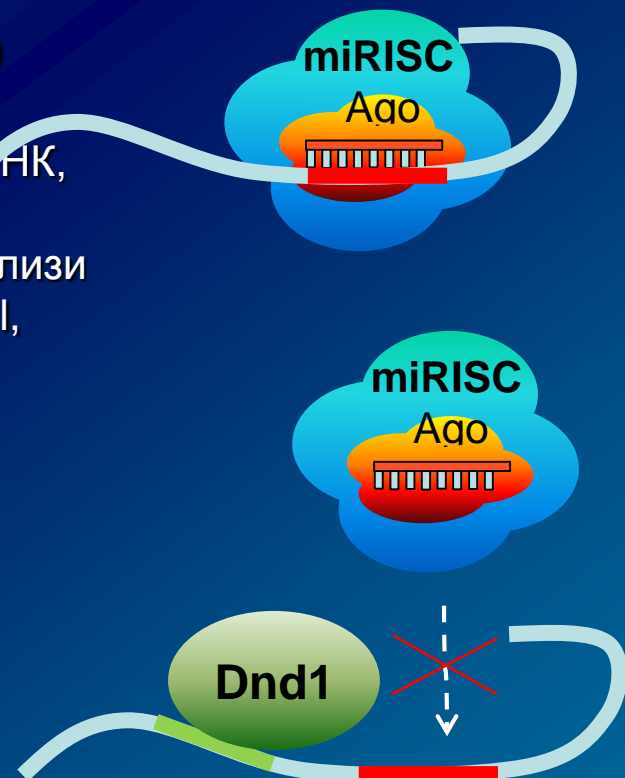
3' UTR-связывающие белки: защищают мРНК от доступа miРНК, связываясь с мишенями для их воздействия – а именно специфическими консервативными U-богатыми мотивами вблизи потенциальных мишеней для miРНК (Bhattacharyya et al., Cell, 2006; Kedde et al., Cell 2007)

Но есть и белки, усиливающие эффект репрессии трансляции

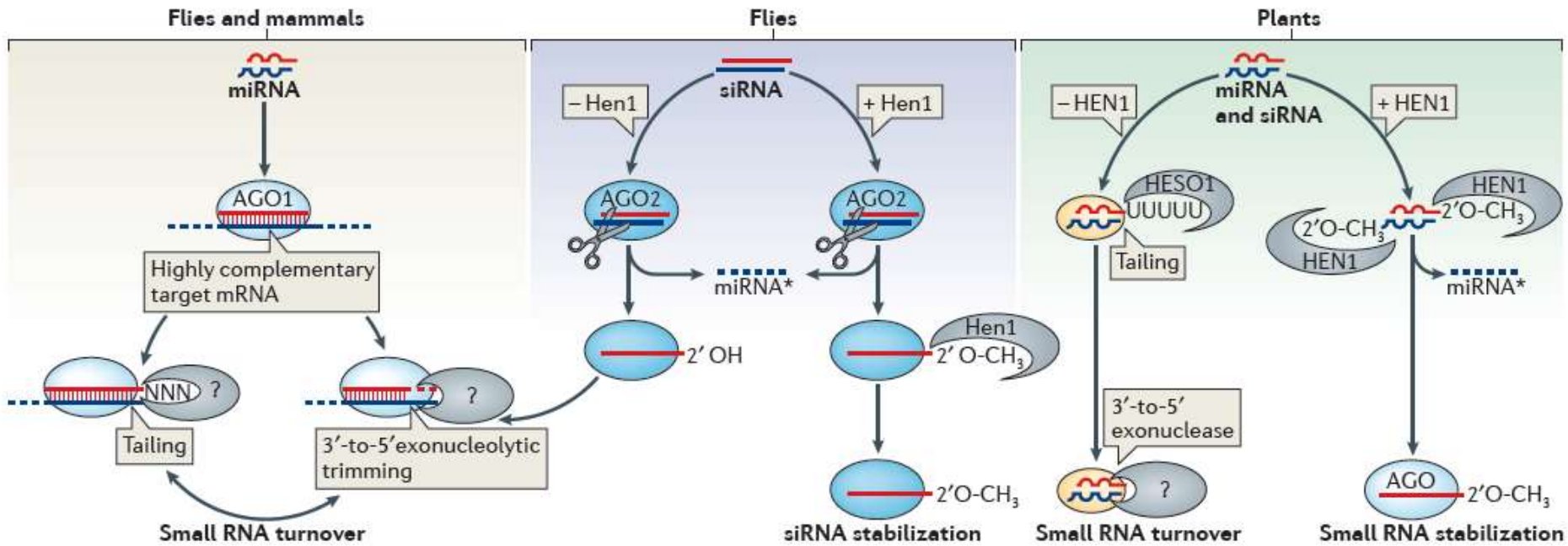
NHL-2 (*C. elegans*)

TRIM32 (*M. musculus*)

Взаимодействующие с Ago позитивные регуляторы активности некоторых, но не всех miRISC (Hammell et al., Cell 2009; Schwamborn et al., Cell 2009)



Стабильность некоторых miРНК может зависеть от присутствия комплементарных им мРНК



Активно экспрессируемые мРНК могут запускать деградацию полностью комплементарных им miРНК

Tailing – добавление аденозинов или урацилов к miРНК

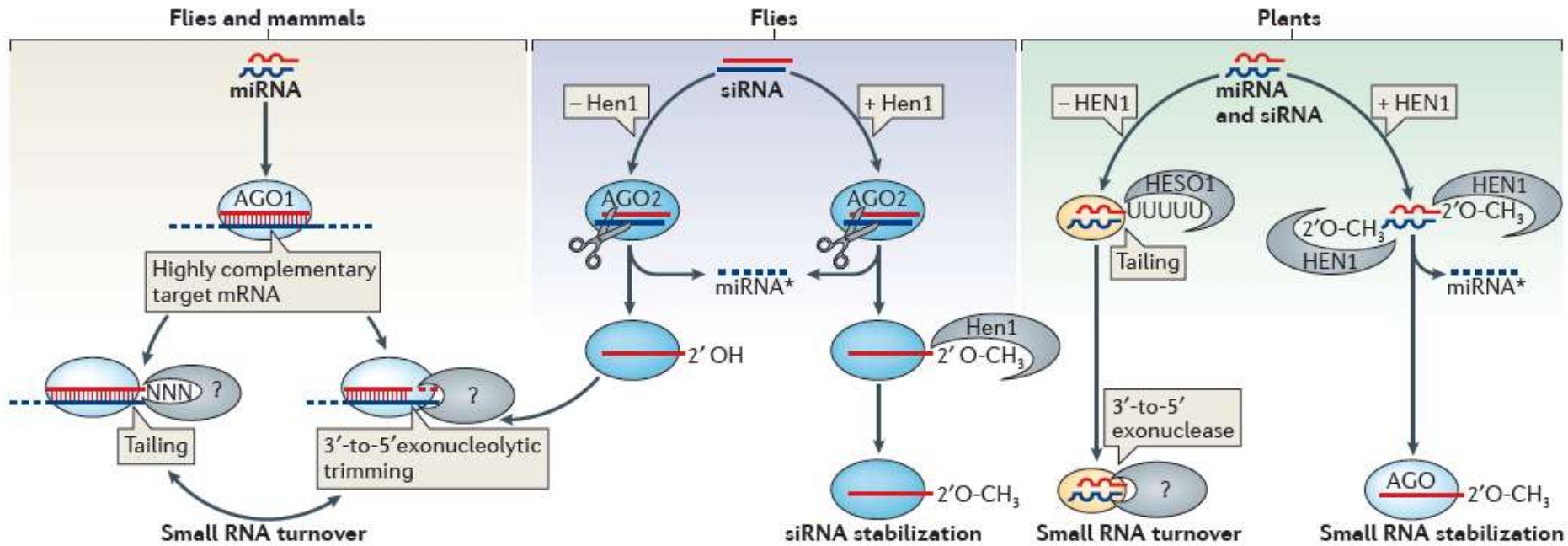
Trimming – расщепление 3'-конца miРНК

Так можно добиться подавления эффектов miРНК

Этот прием используют вирусы в борьбе с хозяином

Механизм распространен, но ключевые белки и роль *in vivo* не изучены

Стабильность некоторых miРНК может зависеть от присутствия комплементарных им мРНК



У *Drosophila* tailing и trimming участвуют в расщеплении miРНК, но не других типов коротких регуляторных РНК, которые защищены метильной группой, вводимой Hen1 при связывании с Ago2 (например, противовирусные siРНК)

У растений и miРНК, и siРНК метилируются перед зарядкой в Ago, отсутствие метилирования запускает механизм деградации с участием терминальной трансферазы, наращивающей 3'хвост (детали механизма и принцип регуляции не выяснены)

Взаимодействие miРНК с мишенями

- RISC обычно связывает 3' UTR мРНК, что делает последнюю недоступной для аппарата трансляции
- несовершенная комплементарность между siРНК или miРНК в составе RISC и мРНК-мишенью приводит к блокированию трансляции
- комплекс RISC и мРНК, как правило, доставляется в Р-тельца, независимо от степени комплементарности между si/miРНК и мишенью, но дальнейшая судьба компонентов комплекса зависит от этой комплементарности

miРНК, не связанные с мишенями, как правило, удаляются

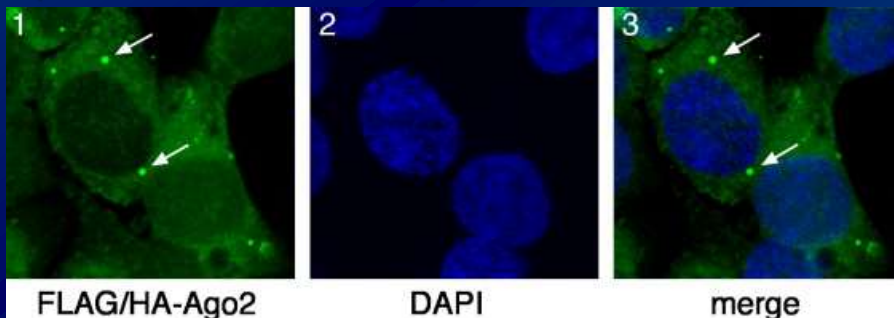
мРНК могут стабилизировать miРНК

- у *C. elegans* экзонуклеаза XRN-2 отвечает за деградацию miРНК и ограничивает их число, если они не связаны с частично комплементарной РНК в составе RISC
- в культуре клеток человека стабильность противовирусной siРНК повышается в присутствии полностью комплементарной мишени
- таким образом, в клетке не поддерживается пул “ненужных” miРНК (стратегия “Use It or Lose It”)

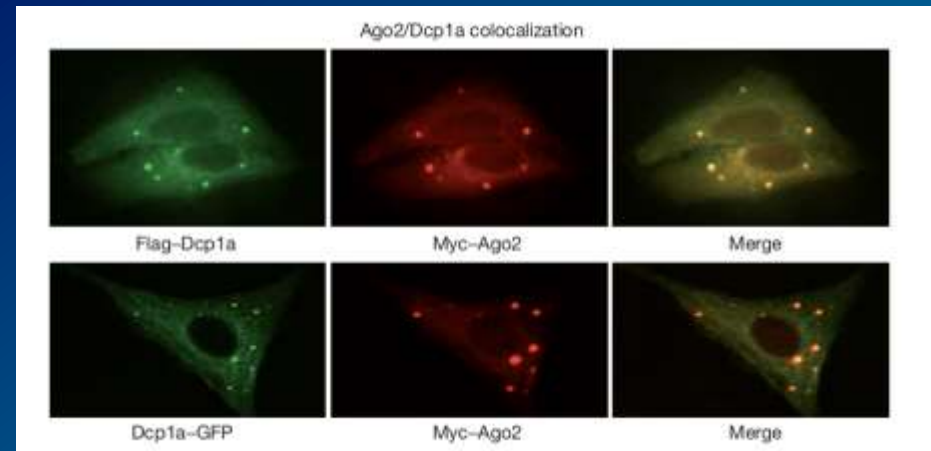
Судьба большинства комплексов Ago-мРНК – деградация в Р-тельцах

- цитоплазматические Р-тельца (Processing Bodies) отвечают за активную утилизацию мРНК у животных, растений и грибов
- у млекопитающих в Р-тельцах локализуются белки Ago, там же обнаруживаются белки GW182 (ключевой компонент miRISC), ферменты декэппинга и деаденилирования, ряд РНКаз
- за доставку комплекса в Р-тельца отвечают Ago-белки, которые должны при этом быть связаны с miРНК
- мРНК, трансляция которых запрещена с участием механизмов, не связанных с miРНК, так же могут доставляться в Р-тельца (либо в стрессовые гранулы, где нет белков декэпирования)
- Р-тельца бывают нескольких видов, не все содержат Ago белки

Ко-локализация Ago2 (Slicer) и Dcp1a (белок декэппинга) в Р-тельцах

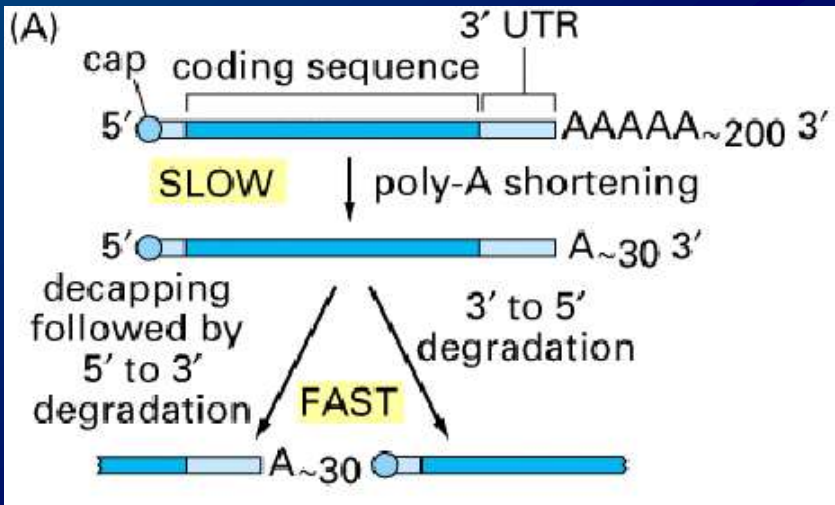


Локализация белков Ago-1 в Р-тельцах



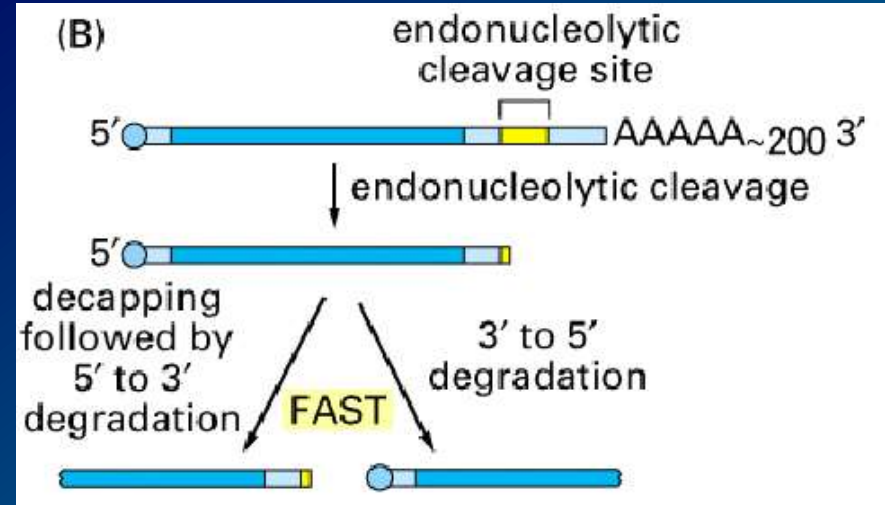
- времена полужизни эукариотических мРНК варьируют от нескольких минут до многих часов
- и 5' cap, и 3' poly-A хвост эукариотических мРНК используются двумя аппаратами – аппаратом трансляции и аппаратом деградации, зависящей от деаденилирования
- ингибирование трансляции с участием микроРНК в большинстве случаев ведет к деградации мишени

Деградация, зависящая от деаденилирования



Деградация, не зависящая от деаденилирования

специфическая последовательность на 3' UTR мРНК является сайтом распознавания для эндонуклеазы



активный процесс!

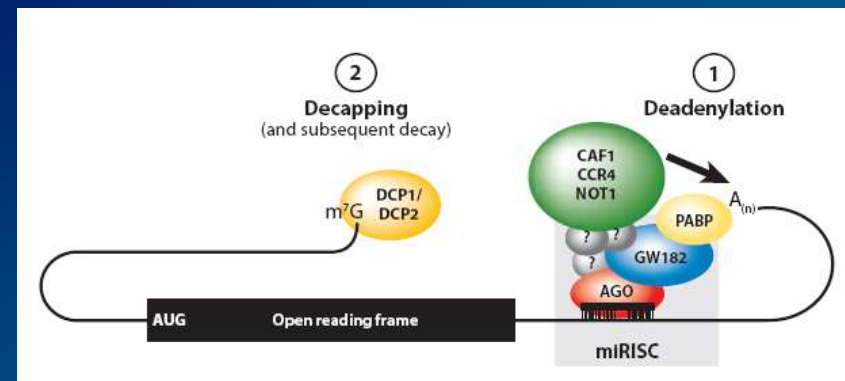
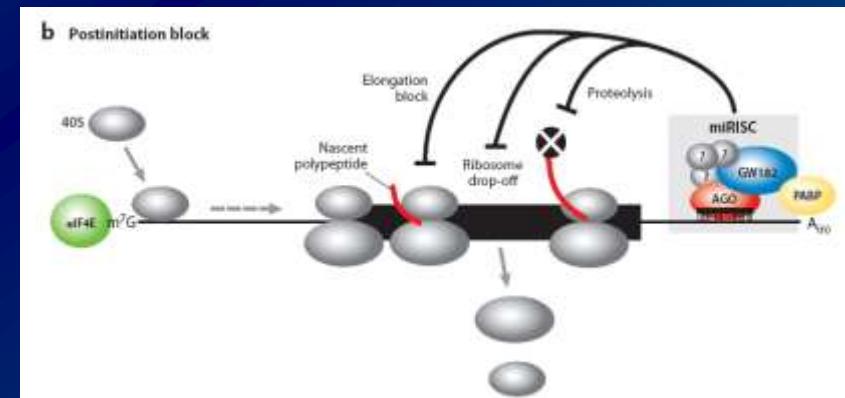
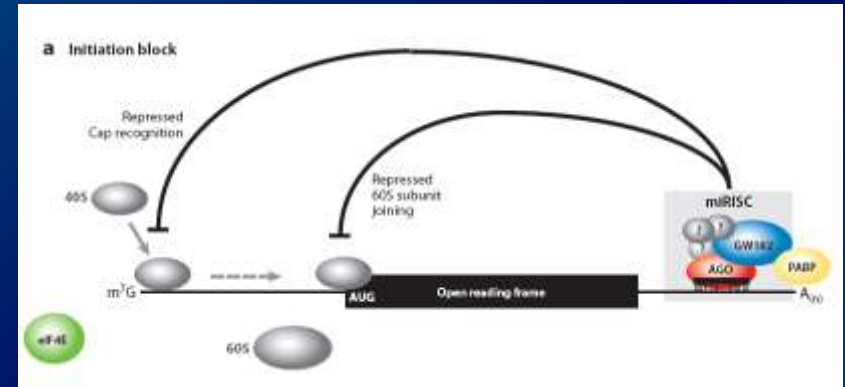
Ингибирование синтеза белка с участием miРНК

Блокирование инициации. miRISC ингибирует инициацию трансляции, мешая узнаванию кэпа фактором инициации или препятствуя сборке рибосомы (вместо этого могут образовываться “псевдополисомы”)

Репрессия трансляции после инициации. miRISC ингибирует элонгацию, индуцирует отделение рибосомы или облегчает протеолиз образующегося полипептида (мало данных, механизмы неизвестны)



Участие miRISC в деградации мРНК. miRISC взаимодействует с деаденилазой CCR4-NOT1 и стимулирует деаденилирование, для чего необходимо взаимодействие GW182 и PABP. После деаденилирования 5'кэп удаляется комплексом DCP1-DCP2 и РНК деградирует



Ингибирование трансляции с участием микроРНК в большинстве случаев (85-90%) ведет к деградации мишени

- факторы, интерферирующие с трансляцией специфической мРНК, будут оказывать противоположный эффект на ее деградацию
- так, PABP и eIF4G/E взаимодействуют, вызывая “циркуляризацию” мРНК, что повышает эффективность трансляции, а деаденилирование, в т.ч. направляемое микроRNP, препятствует этому
- белки Ago и GW182 в составе RISC привлекают белки, осуществляющие декэпирование и деаденилирование мишени
- В стрессовых гранулах, куда попадает часть таких комплексов, нет компонентов декэпирования и деаденилирования

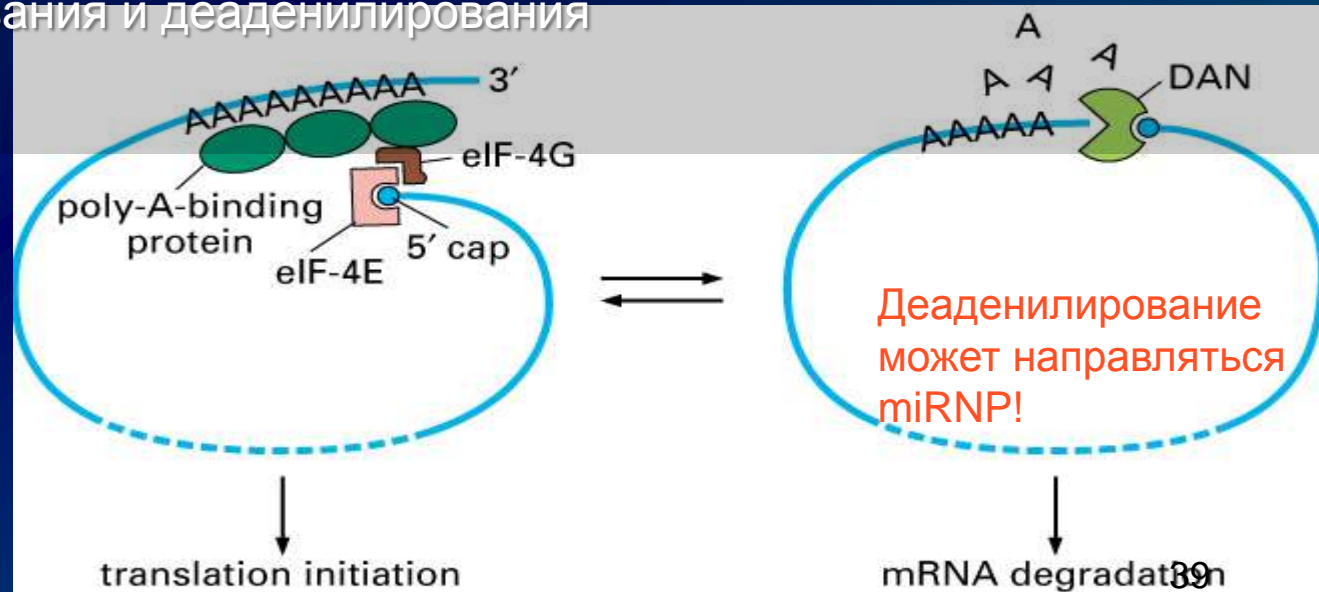
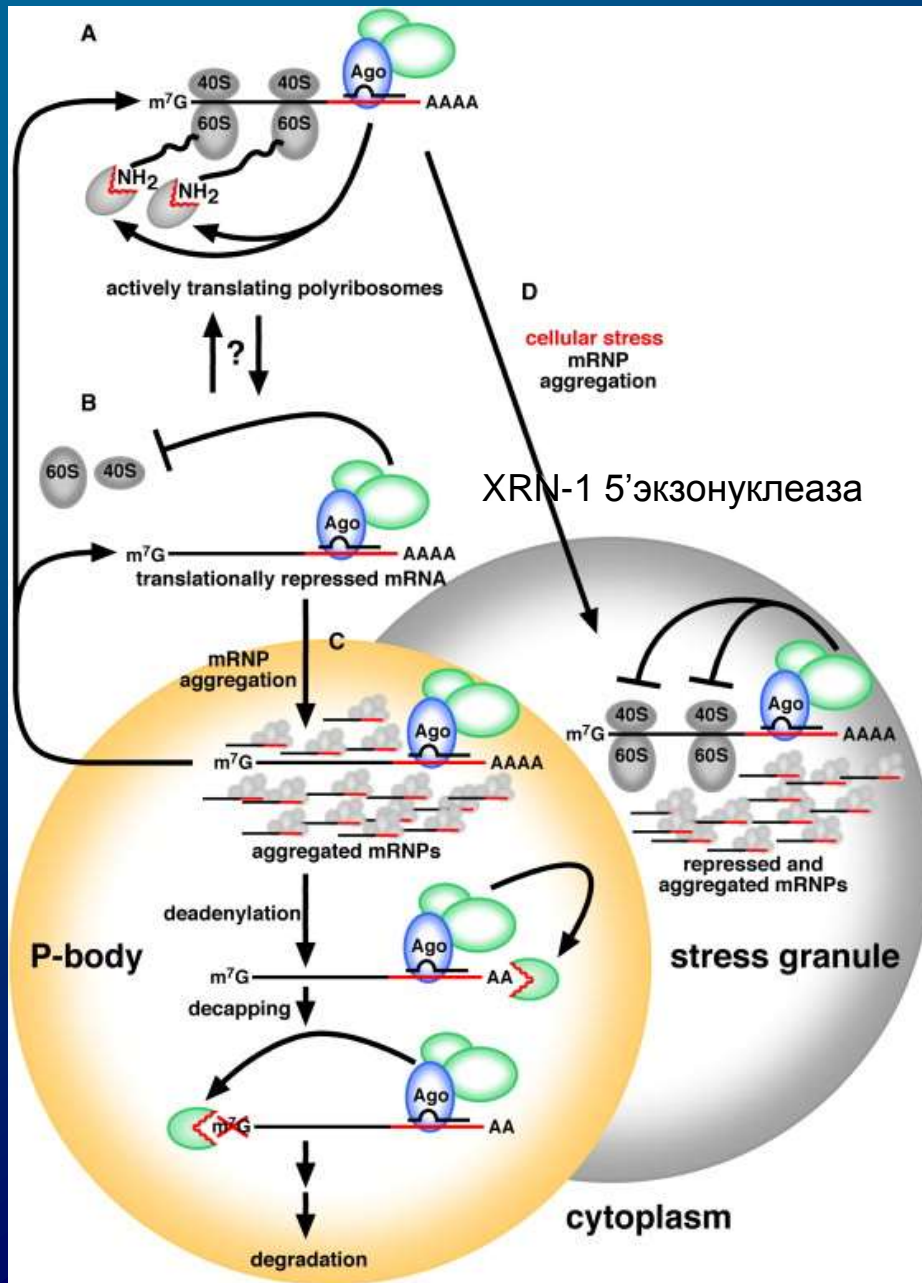


Figure 7-104. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Ингибирование трансляции Ago –содержащими комплексами



Комплексы подавляют трансляцию на уровне активных полирибосом (A) или инициации трансляции (B)

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

Под действием “клеточного стресса” трансляционно активные полирибосомы агрегируют и формируют стрессовые гранулы. Белки Ago могут подавлять трансляцию мРНК, которые не нужны для эффективного ответа на стресс (D)

В Р-тельца попадают и мишени, расщепляемые в результате классической РНК-интерференции (напр. с участием Ago2), Ago “отвечают за доставку” и затем возвращаются в цитоплазму

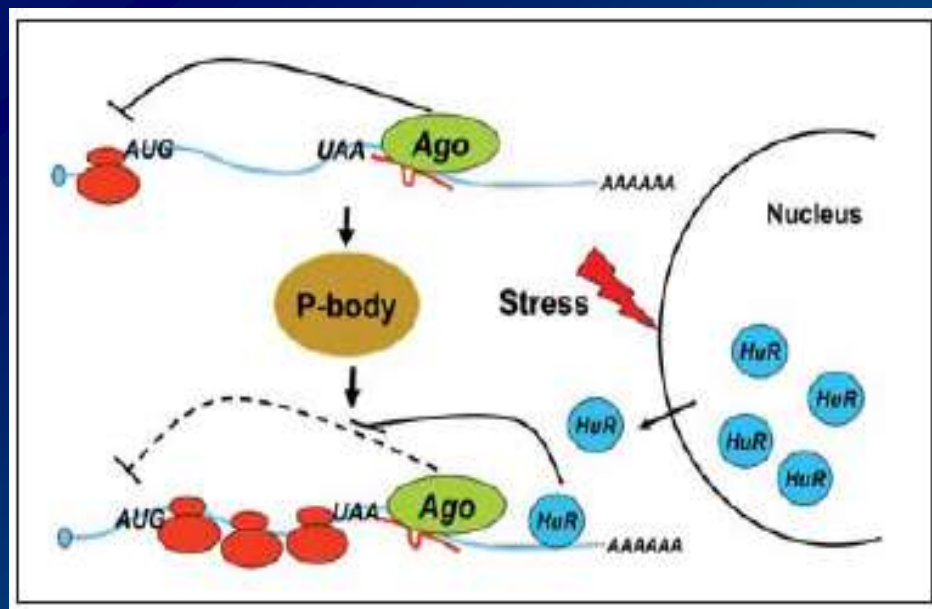
С участием miРНК мРНК-мишень может “закладываться на хранение”, а затем под воздействием какого-то сигнала возвращаться в цитоплазму и транслироваться с участием белков, препятствующих miРНК-зависимому сайленсингу

Белки Ago в клетке разделены между тремя пулами: большая часть – диффузно в цитоплазме, ~1% в Р-тельцах (концентрация стабильна), в стрессовых гранулах содержание сильно зависит от условий. Использование ингибитора инициации трансляции (hippuristanol) вызывает аккумуляцию Ago в стрессовых гранулах

Пример:
мРНК гена CAT-1 (Cationic Amino Acid Transporter) в печени млекопитающих специфично подавляется с участием печень-специфичной miR-122 и хранится в Р-тельцах

Клеточный стресс (инкубация в среде без аминокислот): снимается блок трансляции, начинается наработка белка CAT-1, необходимого для клеточного ответа на стресс.

Высвобождение мРНК CAT-1 происходит с участием РНК-связывающего белка HuR. В нормальных условиях этот белок находится в ядре, при стрессе высвобождается в цитоплазму



Bhattacharya et al., Cell, 2006

Действие miРНК на свои мишени: другие варианты

Расщепление мишеней

- miR-196 – расщепление мРНК Hoxb8 (человек, *Mus musculus*)
- расщепление мРНК-мишеней в клетках человека, пораженных вирусом Эпштейна-Барр, который экспрессирует несколько miРНК
- miR-125b, miR-16, Let-7 – деаденилирование и снижение концентрации своих мишеней (неполная комплементарность!) (человек)
- перед расщеплением – присоединение U и A к 5'продукту расщепления по его 3'концу (*M. musculus* – от 1 до 9 U, EBV – 5-24 н.)

Активация экспрессии с участием miРНК

- опосредованная (miR-128 подавляет NMD при дифференциации нейронов у позвоночных, miR-373 подавляет наработку антисенс-транскриптов)
- непосредственная (активация репликации вируса гепатита С с участием miR-122, активация фактора некроза опухолей в некоторых условиях с участием miR-369-3)

Участие в локальном метилировании участка ДНК с последующей гетерохроматинизацией

- впервые показано у растений, сходно с другими механизмами TGS

Кругооборот miРНК

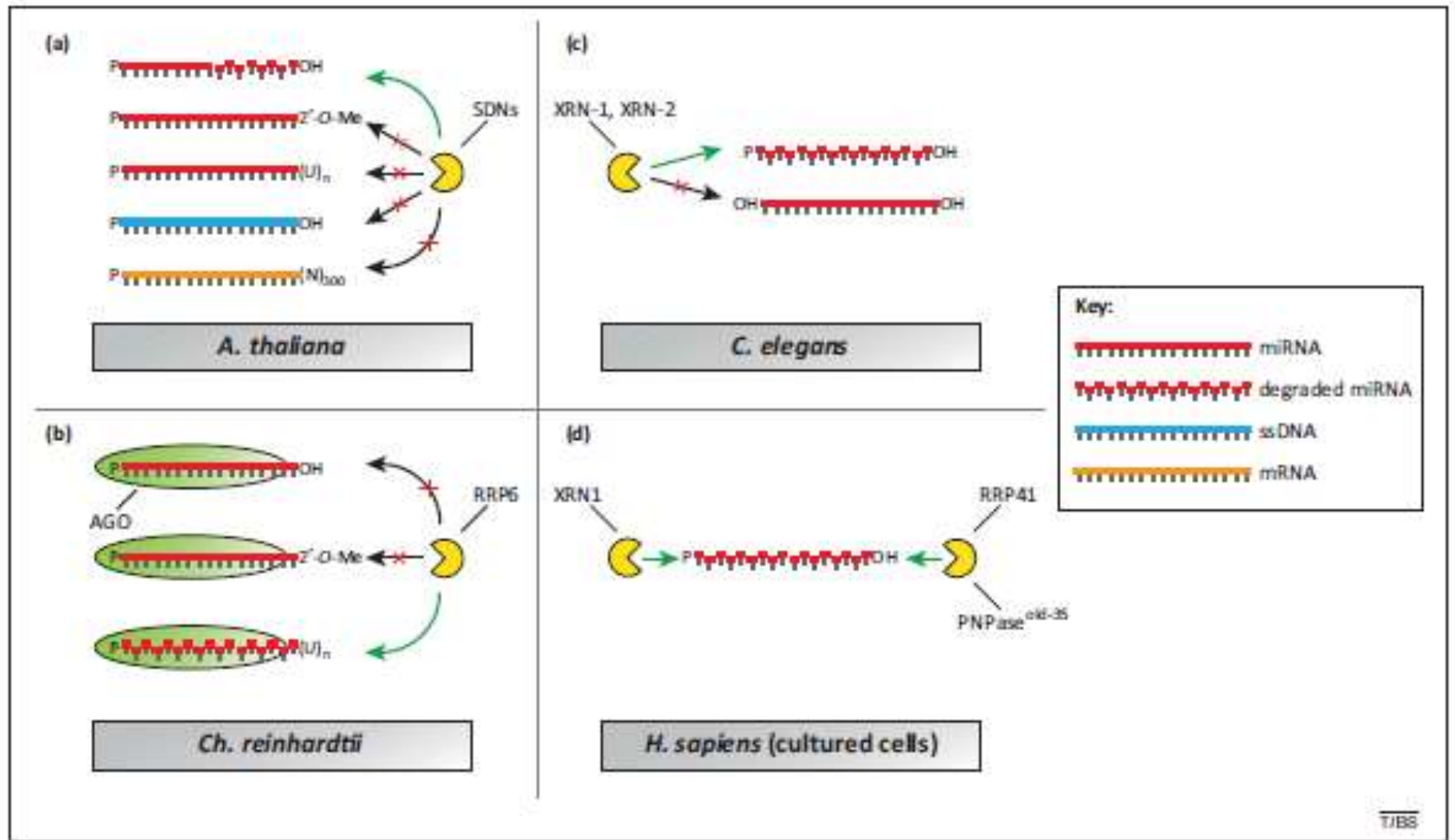
- времена полужизни miРНК сильно варьируют (от менее, чем часа, до дней)
- возможно быстрое изменение профилей содержания
- снижение содержания в известных случаях касается зрелых форм, но не предшественников
- зрелые и функциональные miРНК защищены от деградации за счет ассоциации с белками Ago и высокостабильны, но *in vivo* при отсутствии комплементарных мишеней утилизируются
- некоторые miРНК приобретают дополнительные защитные модификации - 2'ОМе, 3' А, 3' U (в других случаях, наоборот, способствует деградации)

Специфичные нуклеазы, ответственные за утилизацию mi/siРНК

- SDN (small RNA degrading nuclease) у *Arabidopsis* (3')
- XRN-2 (Rat1p) (5') и RRP41 у млекопитающих (3'), PNPase в культуре клеток человека (5')
- XRN-1, XRN-2 у *C.elegans* (5')
- RRP6 у *Chlamydomonas reinhartii* (5') (высокоактивна после окончания комплексного ответа на стресс)

Кругооборот miRNA: ферменты, участвующие в гидролизе

- всегда есть модификация, защищающая от гидролиза!



Кругооборот miRNA: секретируемые miRNA в экзосомах

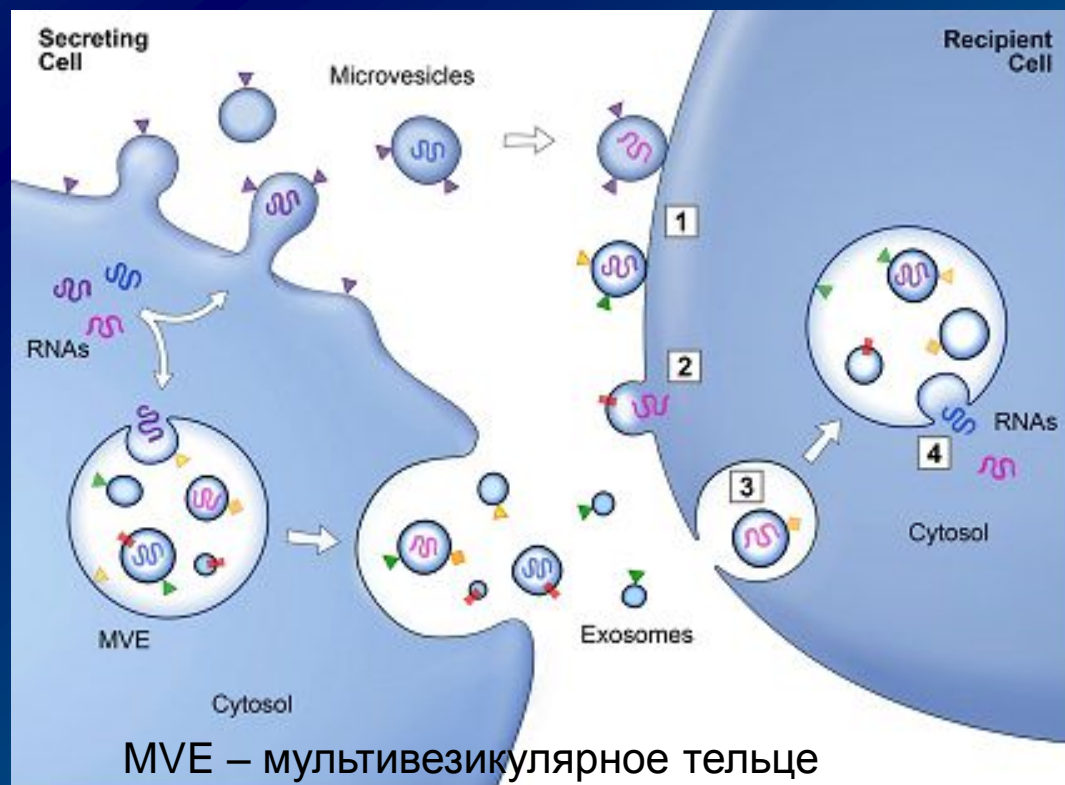
- экзосомы обеспечивают один из способов межклеточной коммуникации, презентацию антигенов, координацию клеточного старения и пр.
- 30-100 нм, содержатся в плазме крови (до 3 млн в микролитре), СМЖ, моче, грудном молоке, слюне, семенной жидкости
- содержат РНК, белки и липиды, в т.ч. зрелые miRNA, но не рРНК

miRNA в экзосомах

- профили отличаются от тех клеток, откуда экзосомы произошли
- только зрелые формы
- возможна передача вирусных miRNA
- возможно выделение специфических фракций за счет связывания с лигандами к рецепторам
- выявлены профили, характерные для заболеваний
- стабильны и перспективны в качестве молекулярных маркеров,

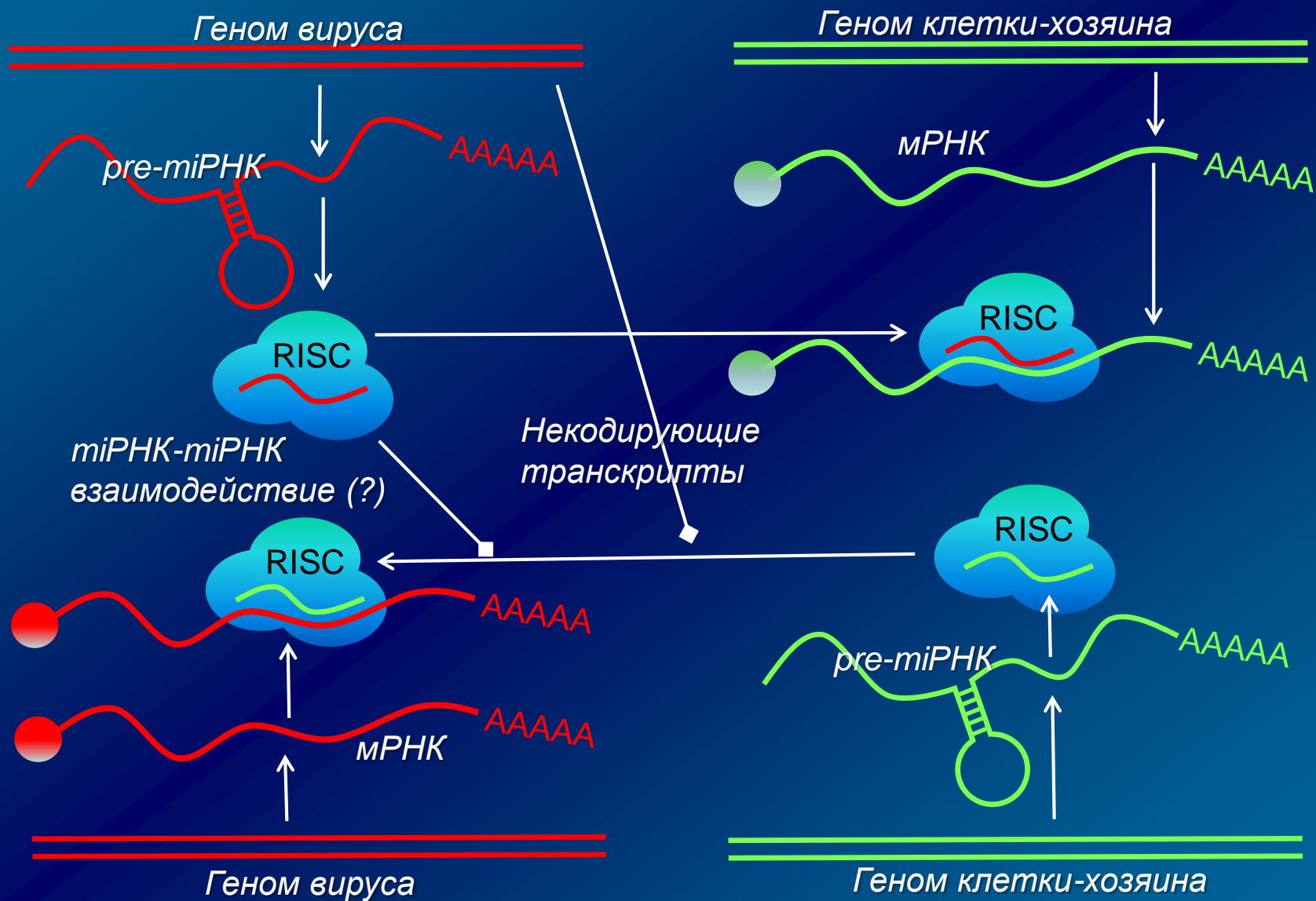
в т.ч. ранних

- 1) связывание, в т.ч. рецептор-опосредованное
- 2) слияние мембран
- 3) эндоцитоз с последующим слиянием



MVE – мультивезикулярное тельце

Борьба вируса и клетки-хозяина с использованием РНК



Изменения экспрессии miRNA ассоциированы со многими болезнями (примеры)

Повышенная экспрессия предшественника 155/BIC RNA – лимфома Беркетта

Пониженная экспрессия Let7 – низкая постоперационная выживаемость при раке легких

Делеции и подавление экспрессии miR-15 и miR-16 – хроническая В-клеточная лимфоцитарная лейкемия (ассоциация в 68% случаев)

Повышение экспрессии miR-10b (x50) – повышенная способность к метастазированию при раке молочной железы (за счет подавления трансляции транскрипционного фактора NoxD10, ответственного за блокирование экспрессии генов, участвующих в метастазировании). *Индукция экспрессии этой miRNA со встроенных трансгенных копий ведет к метастазированию!*

Экспрессия вирусных miRNA – подавление трансляции клетки-хозяина

Пример: miRNA к вирусной mRNA гена Nef, вырабатываемая клетками, пораженными HIV-1, может подавлять транскрипцию вируса (Omota et al., Retrovirology 2004), и в то же время miRNA, вырабатываемые самим HIV-1, могут подавлять трансляцию в клетках хозяина

МикроРНК – биомаркеры и потенциальные средства мишени для терапии

- развитие многих заболеваний вызвано или сопровождается изменением экспрессии тех или иных miРНК
- гены miРНК сами могут действовать, как опухолевые супрессоры или онкогены, либо взаимодействовать с такими генами (множество свидетельств)
- типы опухолей могут различаться профилями экспрессии miРНК
- мутации в участках генома, кодирующих miРНК или их мишени, могут приводить к разнообразным специфическим эффектам, в том числе и положительным
- miРНК стабильны и являются перспективными биомаркерами
- последовательности miРНК с мишенями в мРНК онкогенов в будущем могут использоваться в терапевтических целях
- перспективное направление РНКi-терапии – воздействие на вирусные РНК

Профилирование miRNA позволяет классифицировать раковые опухоли (пример)

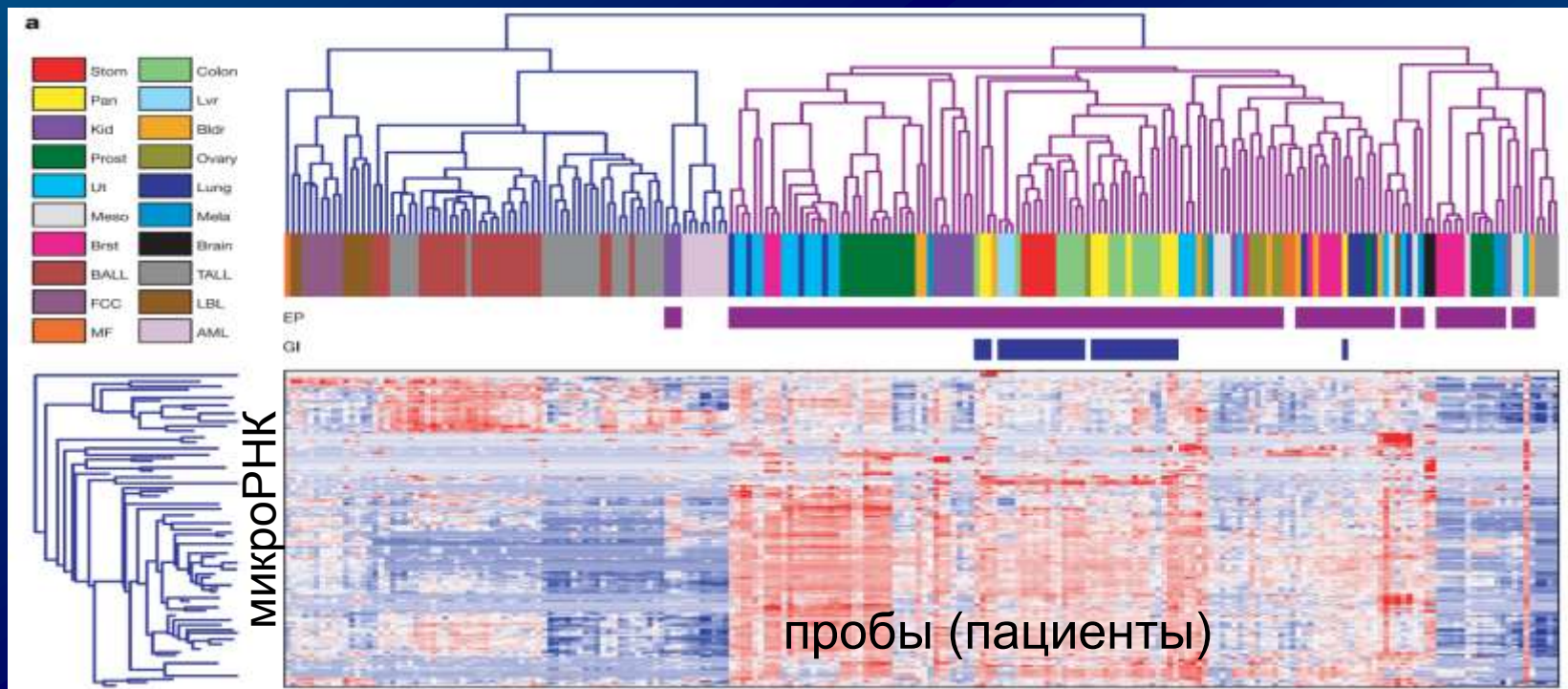
334 образца опухолей человека

проанализирован массив из 217 miRNA млекопитающих

показаны различия в уровнях miRNA, дискриминирующие тип опухоли

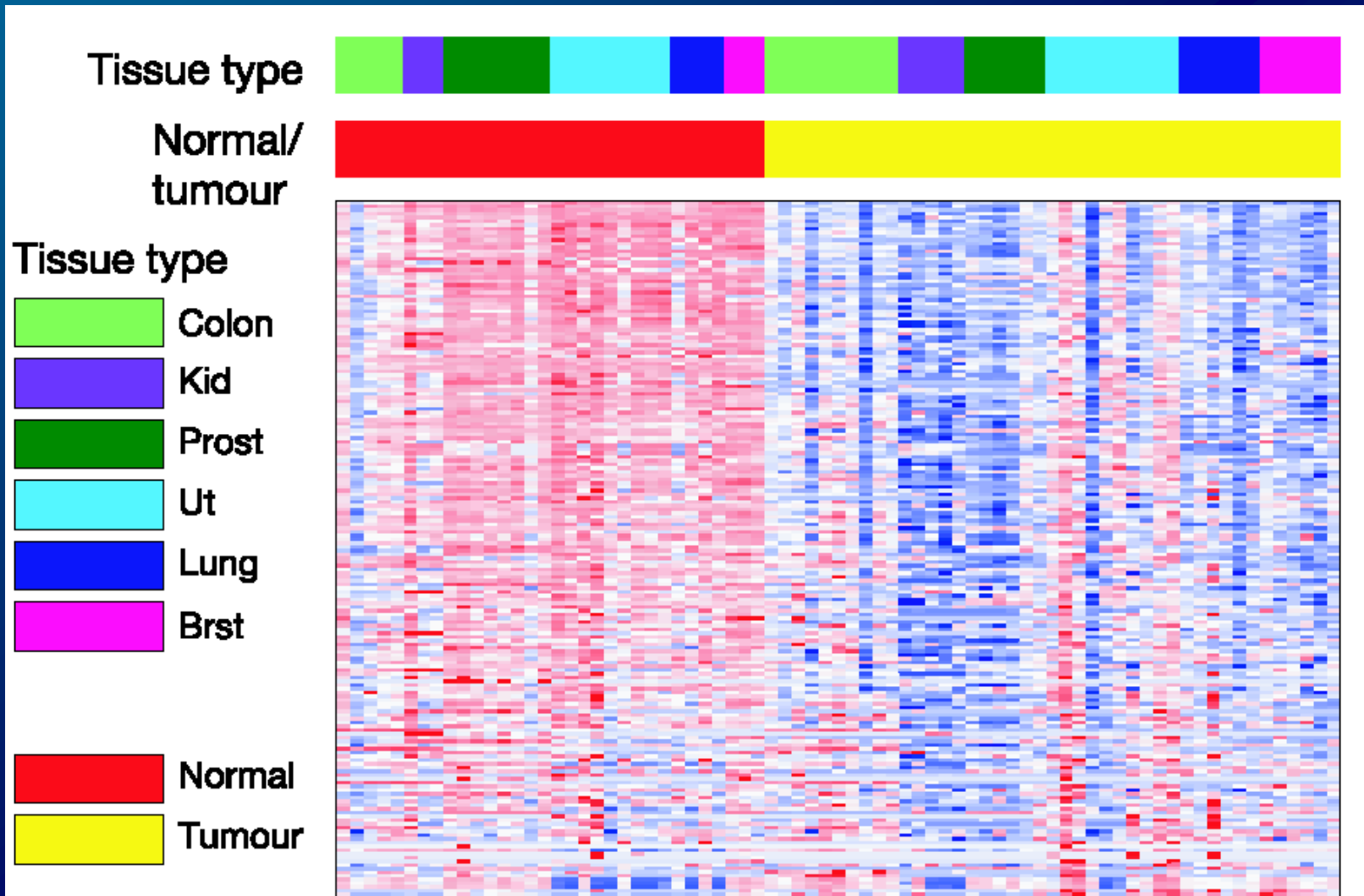
отличия в основном заключались в снижении уровня тех или иных микроRNA

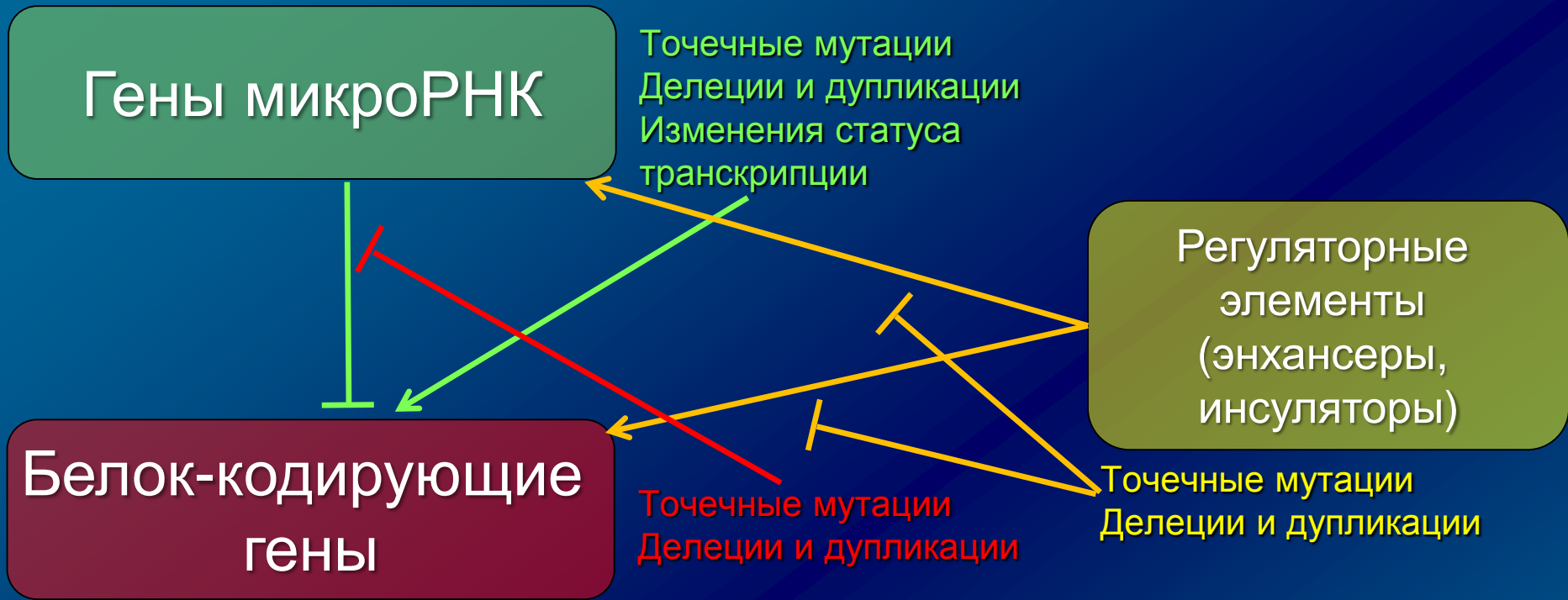
дискриминация опухолей по ткани происхождения при помощи анализа профилей miRNA оказалась более эффективной, чем аналогичная дискриминация при помощи профилей mRNA



Профилирование miRNA позволяет классифицировать раковые опухоли (пример)

профили miRNA заметно отличаются для опухолей и нормальных тканей





Изменение концентрации некоторых miРНК (онкомиры, oncomiRs) за счет мутаций и/или изменения статуса транскрипции может быть онкогенным.

“Онкомиры” могут выступать как онкогены или опухолевые супрессоры

Значимые изменения концентрации могут быть незначительны (менее, чем в 2 раза). Для того, чтобы достоверно выявлять такие изменения, нужны особые подходы

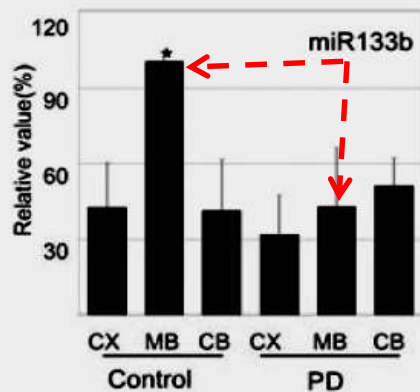
Разрешение “классических” методов анализа экспрессии малых РНК (Northern blotting, Nuclease Protection Assay, Real-Time qPCR, MicroArrays) может быть недостаточным

МикроРНК и болезни: болезнь Паркинсона

- Паркинсонизм связан с нехваткой дофамина в тканях черной субстанции (участок среднего мозга, участвующий в контроле произвольных движений)
- при болезни Паркинсона дофаминэргические нейроны черной субстанции отмирают и перестают вырабатывать дофамин -> останавливается передача сигнала нейронам полосатого тела
- отмирание может быть вызвано разными причинами (повышенный уровень оксидантов, действие токсинов). Одна из причин – недостаток специфической miR-133b (показано на животных моделях)



Крыса, страдающая болезнью Паркинсона (тремор конечностей, непроизвольные движения и все остальные симптомы)



Концентрация miR-133b в различных отделах мозга у больных паркинсонизмом (PD) и у здоровых людей (control)
CX — кора больших полушарий, MB — средний мозг, CB — мозжечок

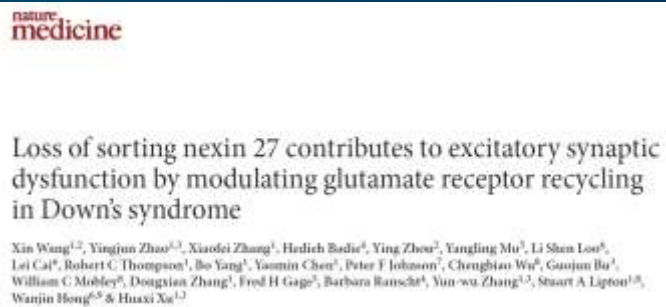
miR-133b специфически связывается с ТФ Pitx3, регулирующим созревание дофаминэргических нейронов
В норме концентрация обеих молекул — miR-133b и Pitx3 — поддерживается на строго определенном уровне

Существует обратная регуляторная петля miR-133b и Pitx3



МикроРНК и болезни: синдром Дауна

- связан с трисомией по хромосоме 21, приводящей к комплексным дефектам

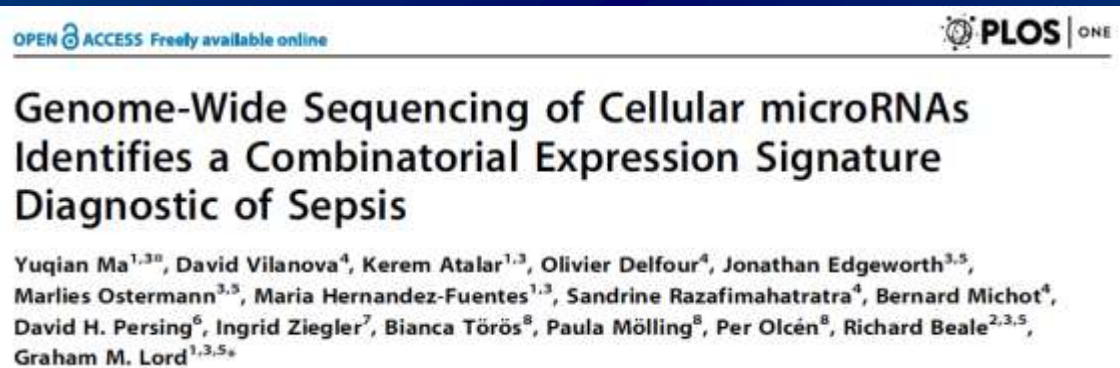


Концентрация miR-155, кодируемая 21 хромосомой, повышается при трисомии, что приводит к подавлению экспрессии гена SNX27 и нарушениям в образовании некоторых структур головного мозга (исследовано на мышинной модели)

SNX27. Down's syndrome causes overexpression of miR-155, a chromosome 21–encoded microRNA that negatively regulates C/EBP β , thereby reducing SNX27 expression and resulting in synaptic dysfunction. Upregulating SNX27 in the hippocampus of Down's syndrome mice rescues synaptic and cognitive deficits. Our identification of the role of SNX27 in synaptic function establishes a new molecular mechanism of Down's syndrome pathogenesis.

МикроРНК и болезни: сепсис

- ранние молекулярные маркеры сепсиса - miR-150 и miR-4772-5p-iso



Повышение концентрации этих miРНК запускается взаимодействием в крови бактериальных лигандов с Toll-like рецепторами макрофагов и дендритных клеток, отвечающих за запуск воспалительного ответа

Мутации в участках геномной ДНК, отвечающих за синтез miРНК, могут приводить к снижению их активности и онкогенным эффектам (пример)

В пробах CLL секвенировали 42 гена miРНК (для которых ранее было показано изменение экспрессии при проявлениях CLL)

В 11 из 75 проб (15%) были выявлены мутации в участках, кодирующих 4 из этих miРНК

miR-16-1, miR-27b, miR-29b-2, miR-187

Ни один из 160 доноров без проявлений CLL (контроль) не имел этих мутаций

Из 11 доноров с мутациями 8 (73%) – 1я стадия опухолеобразования, у семи – рак у близких родственников

miR-16-1 – одна из двух расположенных в кластере miРНК – индукторов апоптоза

Непосредственная мишень – мРНК гена Bcl-2

Мутации в этом кластере, как и его делеция, препятствуют этой активности

Белок Bcl-2 подавляет апоптоз (участвует в регуляции проницаемости внешней митохондриальной мембраны)

Содержание Bcl-2 увеличено во многих образцах CLL (с делециями кластера miРНК)

Cimmino, Amelia, Calin, George Adrian, Fabbri, Muller, Ferracin, Manuela et al. miR15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. PNAS 2005; (39)102: 13944-13949.

A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia

George Adrian Calin, M.D., Ph.D., Manuela Ferracin, Ph.D., Amelia Cimmino, M.D., Ph.D., Gianpiero Di Lisa, Ph.D., Masayoshi Shimizu, B.S., Sylvia E. Witzel, M.Sc., Mariela V. Iorio, Ph.D., Rossa Vitone, Ph.D., Francesco Zaccaro, Ph.D., Daniela Negrini, M.D., Rodolfo Salinas, Ph.D., Paolo Ghislini, Ph.D., Stefano Piccinini, Ph.D., Claudia Poldo, M.D., Ramiro Garzon, M.D., Chiara Sevignani, Ph.D., Laura Ranzani, Ph.D., Hanjueng Ailee, Ph.D., Stefano Wernia, Ph.D., Chang-gong Liu, Ph.D., Thomas J. Kipp, M.D., Ph.D., Massimo Negrini, Ph.D., and Carlo M. Croce, M.D.

NEJM 2005

Выявление профилей miRNA, ассоциированных с заболеванием

Отбор кандидатов

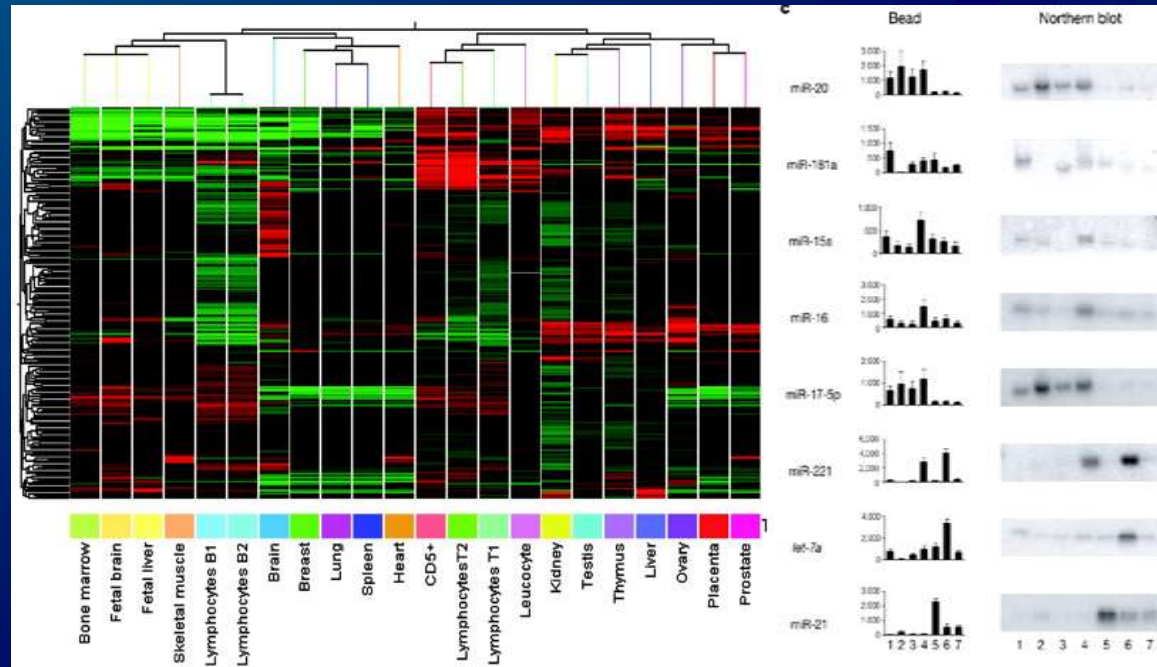
- гибридизационные методы (MicroArrays, NanoString)
- секвенирование (NGS)

Проверка кандидатов

- Northern Blotting
- RT-PCR (Stem-loop, Exiqon)
- цифровая ПЦР

Валидация кандидатов

- анализ расширенных и слепых выборок
- ретроспективный анализ (парафиновые блоки и т.п.)
- подтверждение биологической активности



Разработка
диагностического
алгоритма

Выбор потенциального
метода терапии

Методы анализа miRNA: stem-loop real-time PCR



RT

1 шаг: Stem-loop RT



RNAseH



↓

2 шаг: Real-Time PCR



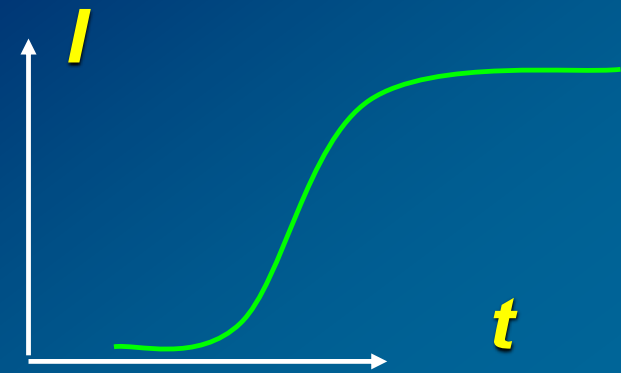
↓



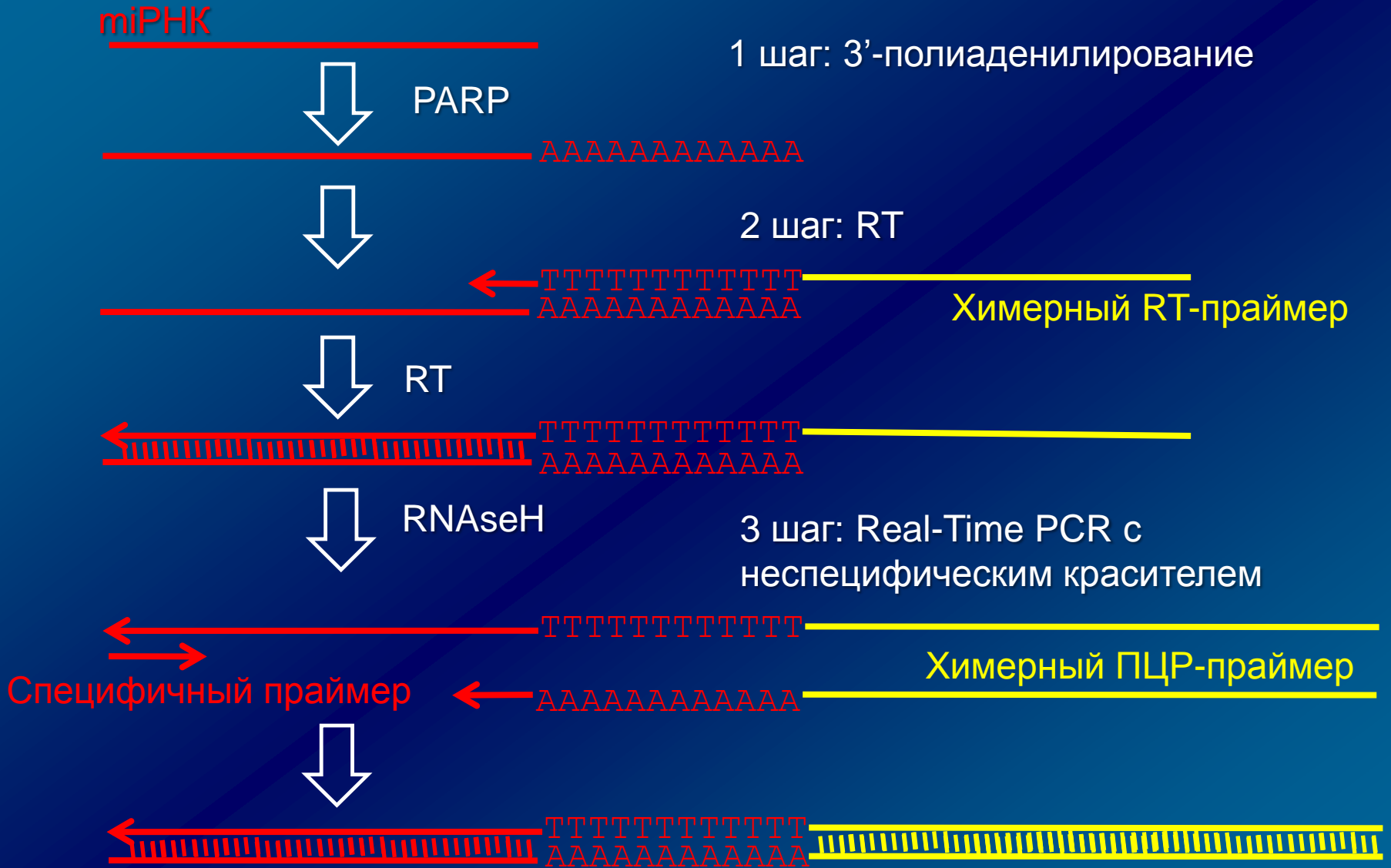
↓



↓

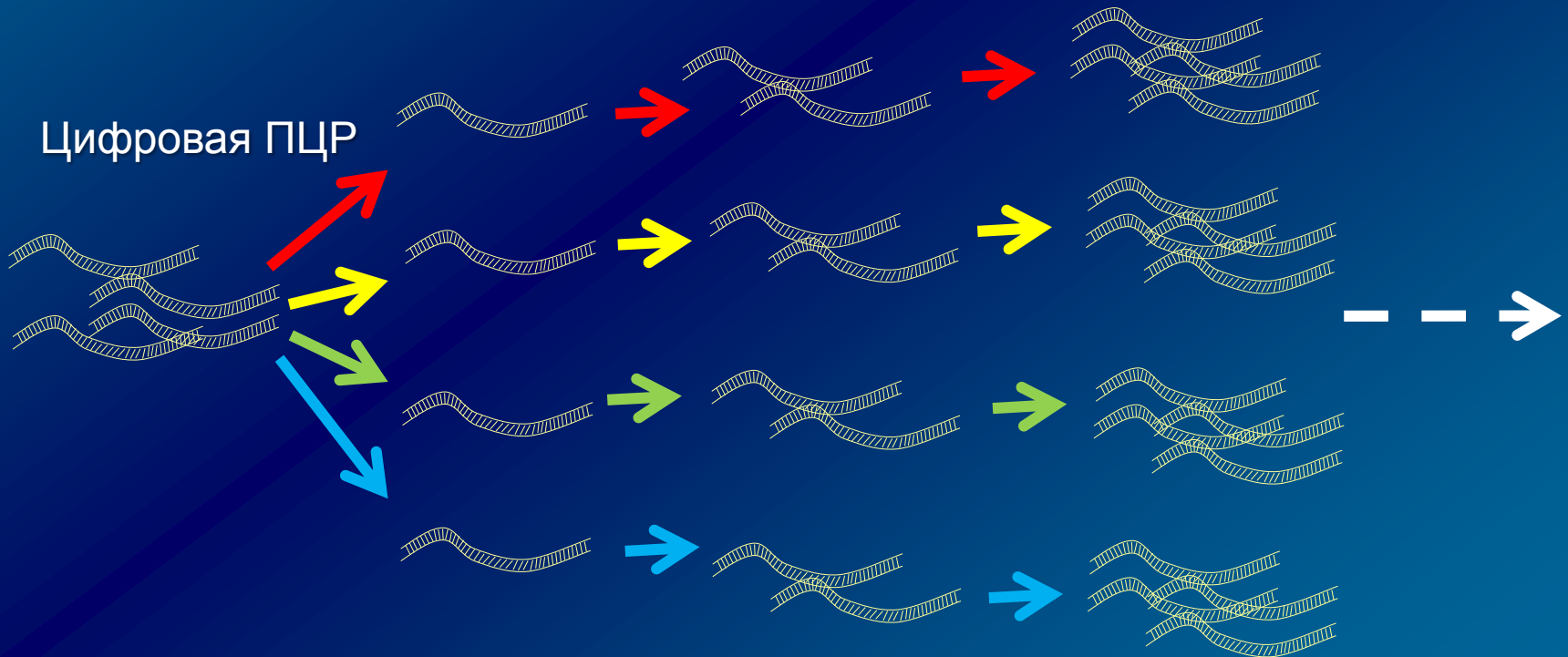
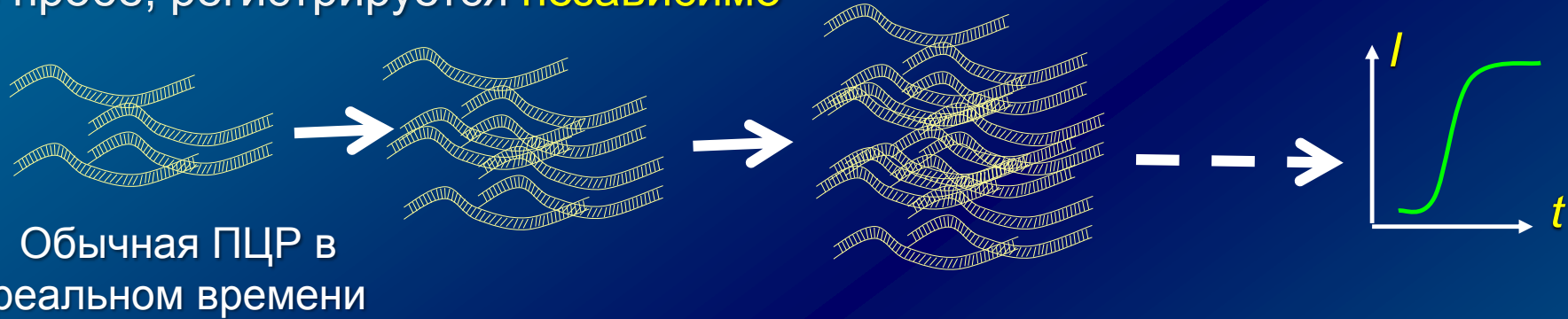


Методы анализа miRNA: Exiqon



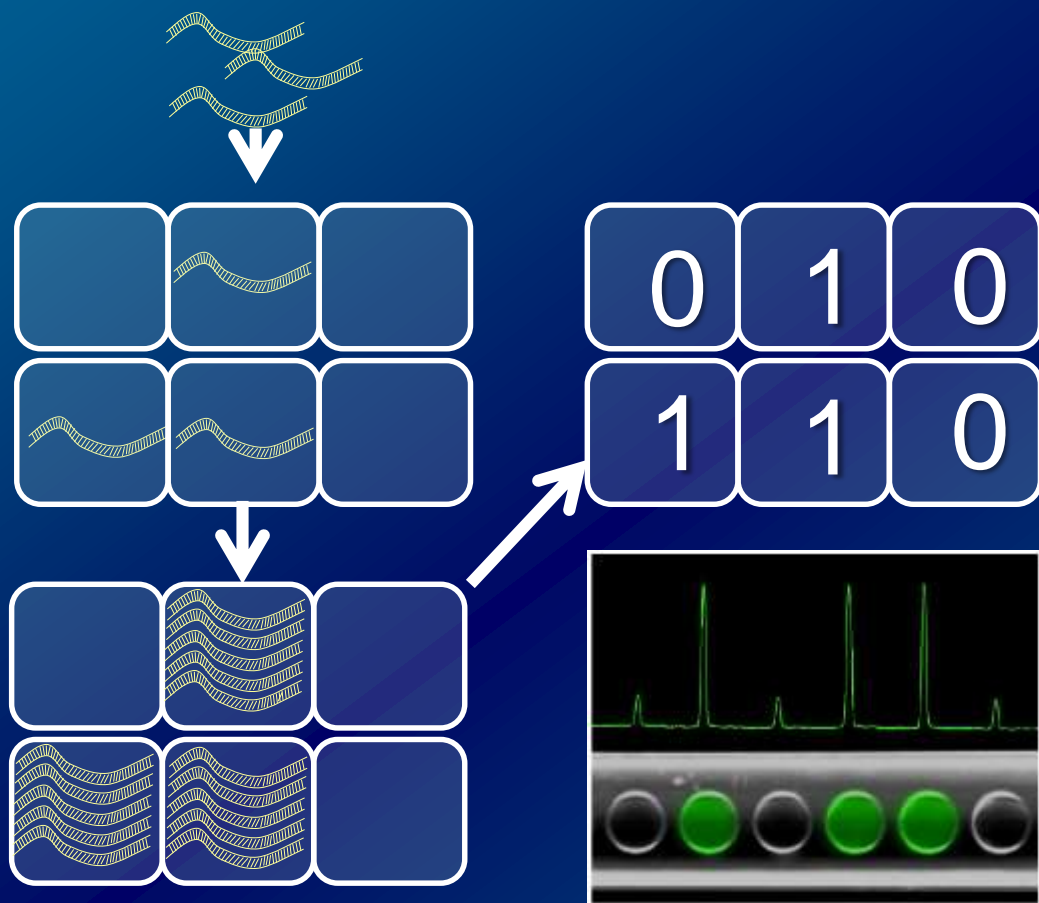
Методы анализа miRNA: цифровая ПЦР

Количественный анализ с детекцией по конечной точке!
Аmplification каждой молекулы ДНК, изначально присутствующей в пробе, регистрируется **независимо**



Методы анализа miRNA: цифровая ПЦР

Количественный анализ с детекцией по конечной точке!
Аmplification каждой молекулы ДНК, изначально присутствующей в пробе, регистрируется **НЕЗАВИСИМО**



От 10000 до 100000000 реакций в одном анализе

МикроРНК: summary (1)

- встречаются у всех высших эукариот и многих низших, регулируя экспрессию множества генов
- в клетке присутствуют в высоких концентрациях (от нескольких тысяч до 100,000 молекул/клетка)
- известны уже сотни генов
- одной регуляторной РНК может регулироваться наработка сотен мРНК
- отличаются от siРНК биогенезом, но аппарат экспрессии содержит родственные компоненты и могут совпадать по структуре и функциям
- механизмы действия разнообразны, сайленсинг осуществляется на всех стадиях экспрессии
- характерна тканеспецифичность и стадиоспецифичность экспрессии и регуляции
- при высокой комплементарности с мишенями предпочтительный механизм действия – расщепление мишени (чаще у растений), при низкой – репрессия трансляции (чаще у животных), которая чаще всего все равно ведет к деградации

МикроРНК: summary (2)

- у животных обычно множественные мишени в каждом 3' UTR, в то же время различные miРНК могут связываться с одной и той же мишенью в 3' UTR (комбинаторный контроль)
- многие miРНК кодируются интронами белок-кодирующих генов и их гены транскрибируются совместно с этими генами
- возможно быстрое изменение концентрации miРНК в клетке, как в сторону повышения (до десятков и сотен раз), так и в сторону понижения
- развитие многих заболеваний вызвано или сопровождается изменением экспрессии тех или иных miРНК
- miРНК стабильны и являются перспективными биомаркерами и потенциальными средствами и мишенями для специфической терапии
- могут быть применены для подавления транскрипции онкогенов, нежелательных продуктов альтернативного сплайсинга, транскриптов с единичными онкогенными заменами и т.п.
- гены часто расположены в участках с высоким рекомбиногенным потенциалом

Благодарю за
внимание!
Вопросы?