

# *Короткие некодирующие РНК и регуляция экспрессии генов эукариот*

*III: РНК-интерференция – связь с модификациями  
хроматина, пересечения и расхождения путей*

*III-1. РНК-интерференция и  
транскрипционный  
генетический сайленсинг*

# Транскрипционный генетический сайленсинг (TGS)

- не все механизмы реализуются с участием малых РНК!
- синонимы: Homology Dependent Genetic Silencing (HDGS), Co-transcriptional Gene Silencing (CTGS)

## Виды воздействия РНК-сайленсинга на хроматин:

- метилирование ДНК с последующей гетерохроматинизацией
- формирование гетерохроматина, независимое от метилирования
- программируемая элиминация фрагментов ДНК

## Примеры:

- РНК-зависимый сайленсинг повторов (дрожжи)
- сайленсинг ДНК транспозонов и трансгенов (*Drosophila*, растения)
- дцРНК-индуцированное метилирование ДНК (dRDM) (растения)
- “Диминуция” хроматина в макронуклеусах (инфузории)
- Локальный сайленсинг хроматина, индуцируемый короткими РНК (животные и человек)

## Упаковка повторов в гетерохроматин:

- предотвращает незаконную рекомбинацию, которая может привести к хромосомным перестройкам
- защищает хромосомы от активности транспозонов
- создает структуры, необходимые для правильного деления
- обеспечивает реализацию пространственной информации

## Регуляторные РНК, кодируемые гетерохроматином и участвующие в сайленсинге

- могут быть короткими и длинными
- могут активно транскрибироваться либо являться результатом незаконной транскрипции
- направляют модификации белков и ДНК в гетерохроматиновых повторах и мобильных элементах, гомологичных самим этим РНК
- для реализации эффектов необходимы компоненты аппарата РНК-интерференции

Пересечение разных регуляторных путей, задействующих общие компоненты системы РНК-сайленсинга, впервые показано у *C.elegans*



Cell, Vol. 99, 123-132, October 15, 1999, Copyright ©1999 by Cell Press

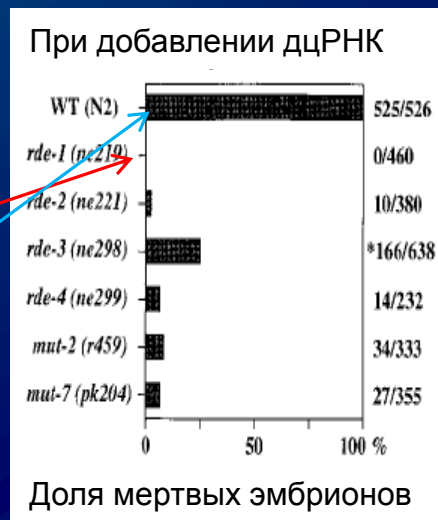
Tabara et al. Cell (1999)

**The *rde-1* Gene, RNA Interference,  
and Transposon Silencing in *C. elegans***

# Генетический скрининг для поиска генетических факторов РНК-интерференции у *C.elegans*



Штаммы с разными мутациями



Летальность эмбрионов штамма дикого типа (WT) и мутантных штаммов, в которых нарушена система РНК-интерференции

Продукт гена *pos-1* необходим для развития эмбрионов, экспрессируется в герминальных клетках

Нарушения экспрессии не летальны, но червь стерилен (производит нежизнеспособные эмбрионы)

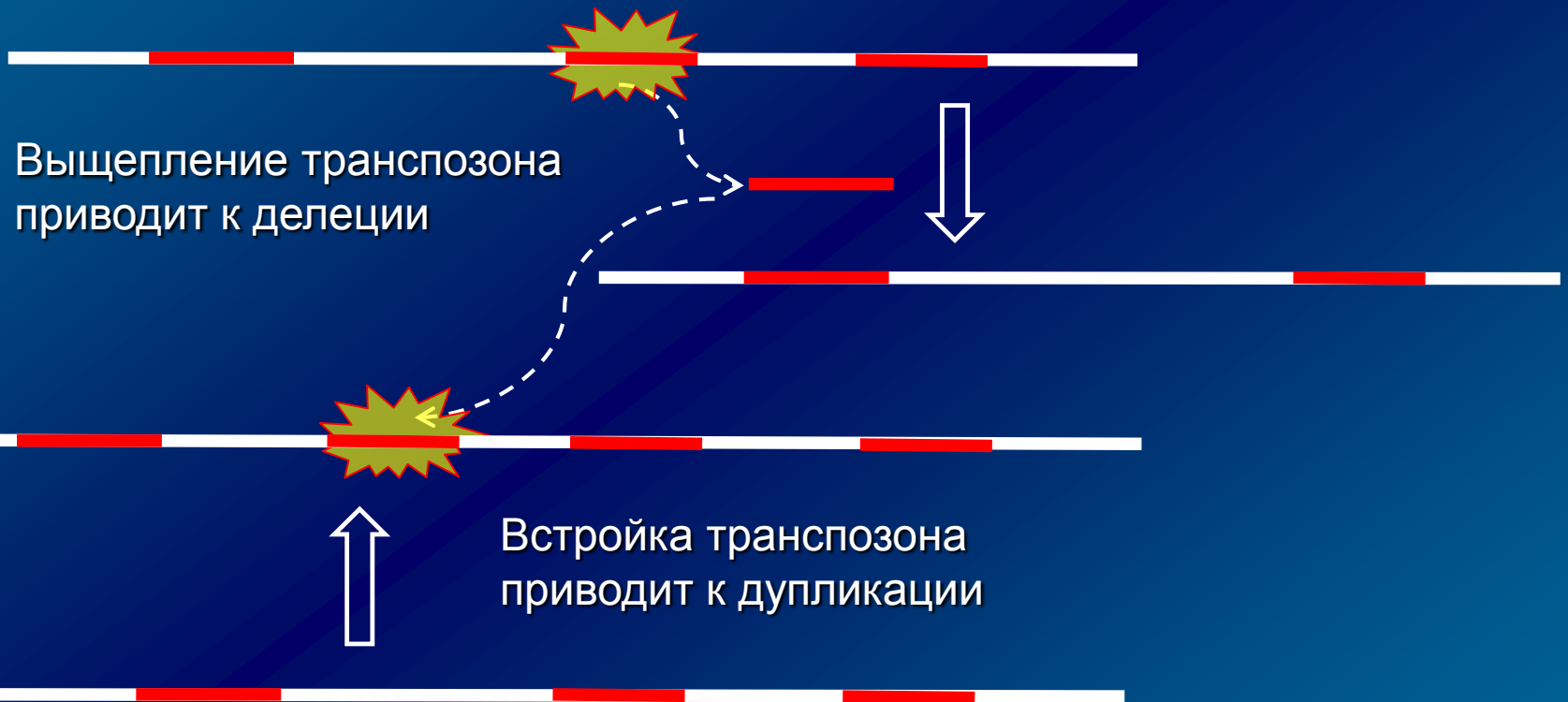
У мутантов по некоторым генам введение дцРНК к *pos-1* не приводило к стерильности – так были выявлены гены, необходимые для РНК-интерференции

Все эти мутации оказались рецессивными, некоторые из них (но не все) приводили к повышению частоты транспозиций мобильных элементов

Выявленные гены были разделены на две группы:

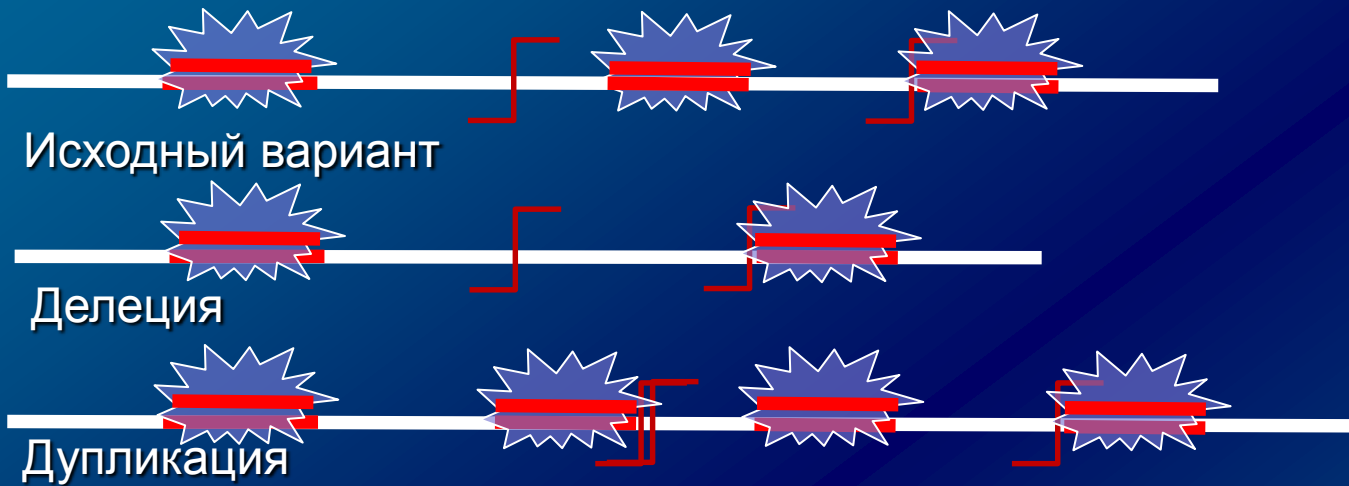
- *rde* гены (RNAi-deficient)
- *mut* гены (mutator)

В результате активности мобильных элементов в геномах возникают индивидуальные наборы делеций и дупликаций повторенных последовательностей



Эти процессы подавляются с участием РНК-зависимого сайленсинга

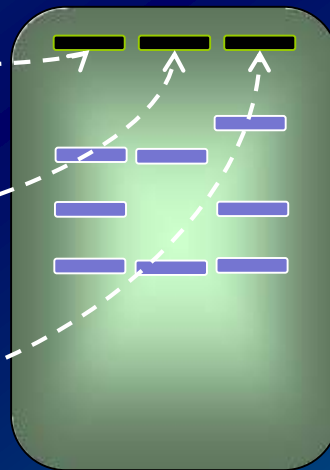
Образовавшиеся варианты генома можно различить по набору рестрикционных фрагментов, содержащих в своем составе последовательности транспозонов



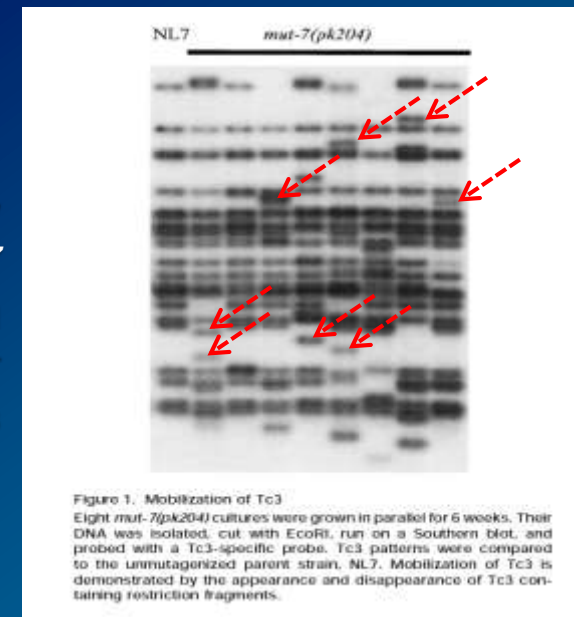
Исходный вариант

Делеция

Дупликация



Пример: у мутантов *mut-7* нарушен сайленсинг транспозонов





# У некоторых мутантов не только возростала активность транспозонов, но и учащалась потеря X хромосомы

Повышение активности транспозонов (частота встроек в исследуемый локус)

*rde-2*, *rde-3*, *mut-7* – близкие, *rde-1* и *rde-4*: нет активности

<i>unc-22 (r765::Tc4)</i>	0 (0/2000)
<i>rde-1 (ne219) ; unc-22 (r765::Tc4)</i>	0 (0/4000)
<i>rde-2 (ne221) ; unc-22 (r765::Tc4)</i>	0.96 (8/830)
<i>rde-3 (ne298) ; unc-22 (r765::Tc4)</i>	1.6 (35/2141)
<i>rde-4 (ne299) ; unc-22 (r765::Tc4)</i>	0 (0/2885)
<i>mut-7 (pk204) ; unc-22 (r765::Tc4)</i>	1.0 (40/3895)

Male Incidence (потеря X-хромосомы или ее сегментов)

*rde-2* и *rde-3* – повышенный уровень, *rde-1* и *rde-4* - уровень, соответствующий дикому типу

	Percentage of Male Animals
Wild type (N2)	0.21 (2/934)
<i>rde-1 (ne219)</i>	0.07 (1/1530)
<i>rde-2 (ne221)</i>	3.2 (25/788)
<i>rde-3 (ne298)</i>	7.8 (71/912)
<i>rde-4 (ne299)</i>	0.24 (5/2055)

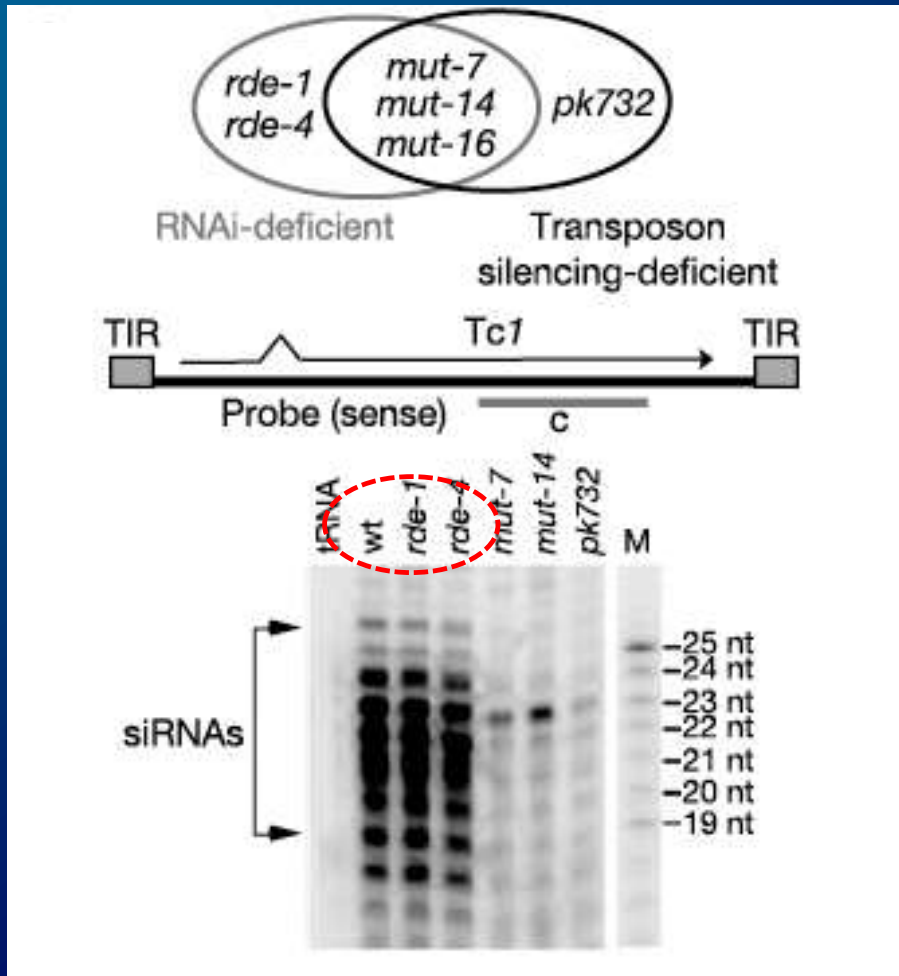


XX - гермафродиты



XO - самцы

У некоторых мутантов *C.elegans* (*mut7*, *rde2*), устойчивых к РНК-интерференции, также был ослаблен и сайленсинг транспозонов : следовательно, есть общие компоненты между этими механизмами



Короткие РНК, комплементарные транспозонам, выявлялись у особей дикого типа и мутантов *rde-1*, *rde-4*, но не у мутантов *mut* (ген *pk732* также относится к группе *mut*)

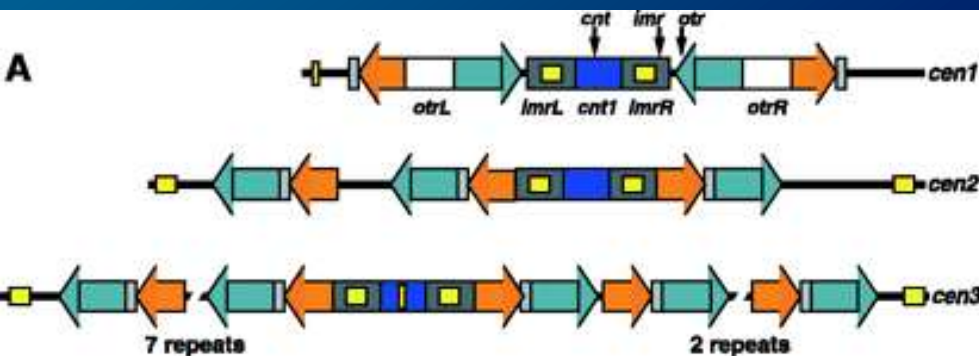
Некоторые мутанты, дефицитные по системе сайленсинга транспозонов, демонстрировали РНК-интерференцию (*pk732*)

Некоторые мутанты с нарушенной РНК-интерференцией демонстрировали нормальный сайленсинг транспозонов (*rde1*, *rde4*)

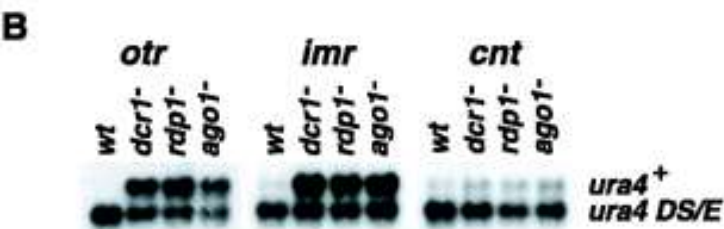
*Следовательно, механизмы РНК-интерференции не полностью совпадают с механизмами сайленсинга транспозонов и трансенов!*

# РНК-сайленсинг повторов у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*

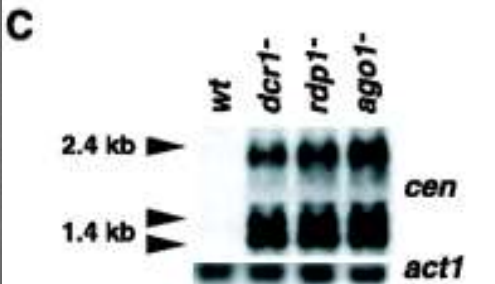
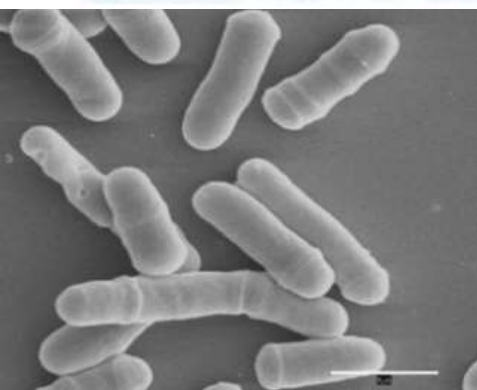
У *S. pombe* нет HP1 и стандартной цепочки “HDAC-гистонметилазы-HP1-ремоделинг”  
 Мутации генов, кодирующих факторы РНК-интерференции (Ago, Dicer, RDrP), приводят к интенсивной транскрипции повторенных последовательностей, прежде всего в центромерных районах, утрате метилирования гистонов и нарушениям формирования гетерохроматина в центромерах (но не локусах типов спаривания)



(A) Схема трех центромер *S. pombe*: обозначены удаленные от центра (*otr*), расположенные внутри (*imr*), и центральные (*cnt*) участки. Консервативные повторы обозначены стрелками. *Центральные участки уникальны*



(B) Northern-blot транскриптов, образовавшихся с центромерных трансенов *ura4+* и (*DS/E*) мини-гена *ura4+*, локализованного на плече хромосомы (контроль)



(C) Northern-blot транскриптов, происходящих из центромерных повторов, с использованием зондов к этим повторам

# РНК-зависимый сайленсинг повторов у *S.pombe*

- РНК-зависимая сборка гетерохроматина в результате эпигенетических модификаций (деацетилирование и метилирование гистонов и т.п.)
- стартовое событие – образование дцРНК-индуктора, гомологичного гетерохроматиновым повторам, которое может являться результатом:
  - (1) транскрипции РНК с обеих цепей с участием РНК-полимеразы II
    - участки, структура которых определяется РНК-сайленсингом, доступны для комплекса, включающего РНК-полимеразу II
    - известны мутации РНК-полимеразы II, нарушающие только функции, связанные с РНК-сайленсингом
  - (2) синтеза комплементарной РНК по РНК-матрице за счет активности РНК-зависимой РНК-полимеразы Rdp1, ассоциированной с центромерным гетерохроматином (не требует затравки)
- из дцРНК-индуктора нарабатываются короткие РНК, по своей структуре соответствующие siРНК
- эти РНК включаются в состав комплекса **RITS** (**R**NA-**i**nduced **t**ranscriptional **s**ilencing complex), подобного комплексу RISC, в результате чего он становится активным (“заряженным”)
- RITS ассоциирует только с продуктами транскрипции РНК-полимеразы II, гомологичными повторам, но не с мРНК или их предшественниками

# RITS

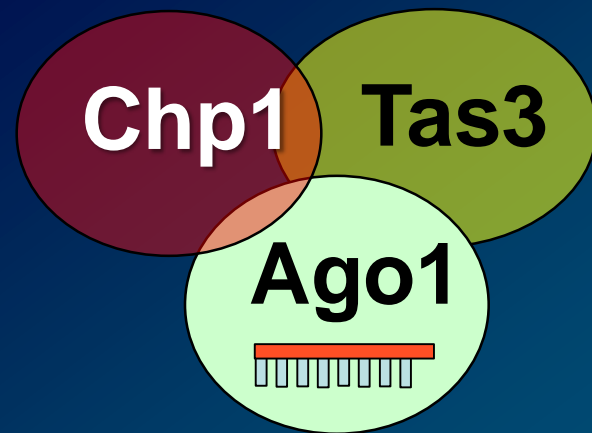
- мультибелковый комплекс, активируется связыванием с miРНК и взаимодействует с ДНК и гистонами
- связывает РНК-интерференцию и аппарат формирования ГХ
- подобен комплексу RISC и может содержать общие с ним компоненты

## Основные компоненты RITS:

- белок (белки) Ago (содержащие домен PIWI)
- белок хромодомена Chp1 (может связывать метилированные гистоны)
- Tas3 (распознает метилирование H3-K9)
- siРНК

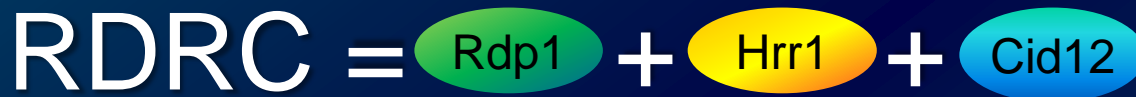
## Малые РНК, входящие в RITS:

- для образования необходим Dicer
- требуются для локализации RITS на хроматине (распознавание мишени)
- комплементарны повторам ДНК (например, центромерным), на которых инициируется сборка гетерохроматина



# РНК-зависимый сайленсинг повторов у *S.pombe*

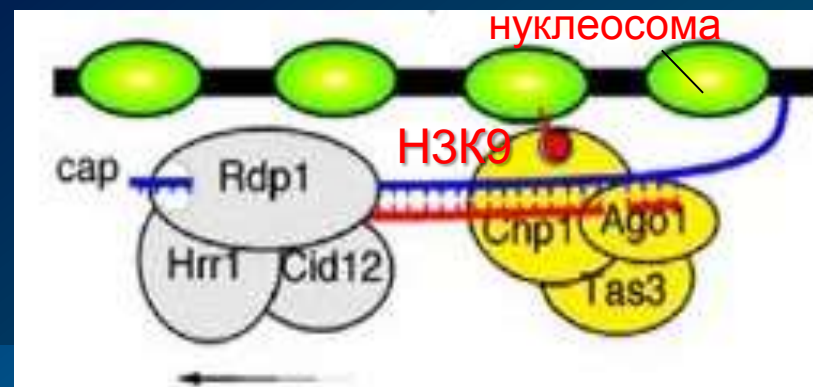
- “заряженный” RITS направляется к специфическим участкам хромосомы для их инактивации
- RITS не спаривается с ДНК хроматина непосредственно: это “непрямое спаривание” за счет взаимодействий “белок/белок” и “РНК/РНК”
- RITS стабилизируется на хроматине, вступая в два взаимодействия
- 1) физическое взаимодействие с РНК-полимеразным комплексом **RDRC** (**R**NA-**d**irected **R**NA polymerase **c**omplex) (двойное)



Hrr1 – предполагаемая РНК-геликаза

Cid12 –предполагаемая полиА полимераза

- 2) непосредственное взаимодействие с участком хроматина за счет связывания хромодомена в составе Chp1 сайтом метилирования H3-K9, которое осуществляется метилазой Clr4

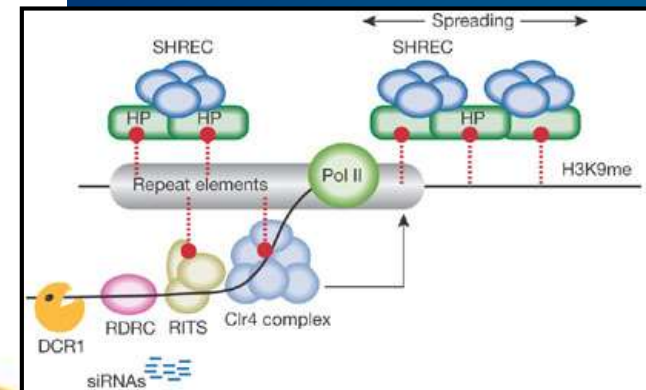
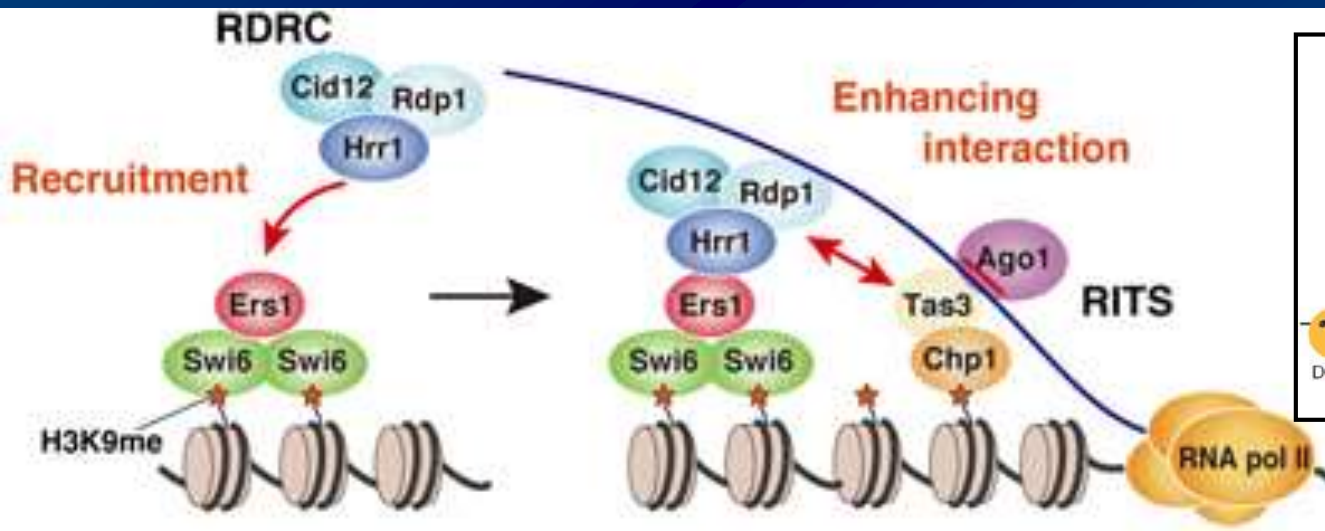


Cir4 - компонент мультибелкового комплекса, включающего белок Rik1 (белок гетерохроматина, содержит домен, притягивающий HDAC и HAT, и несколько других белков, в частности Dos1 и Dos2 (взаимодействуют с Rik1, необходимы для позиционирования Swi6)

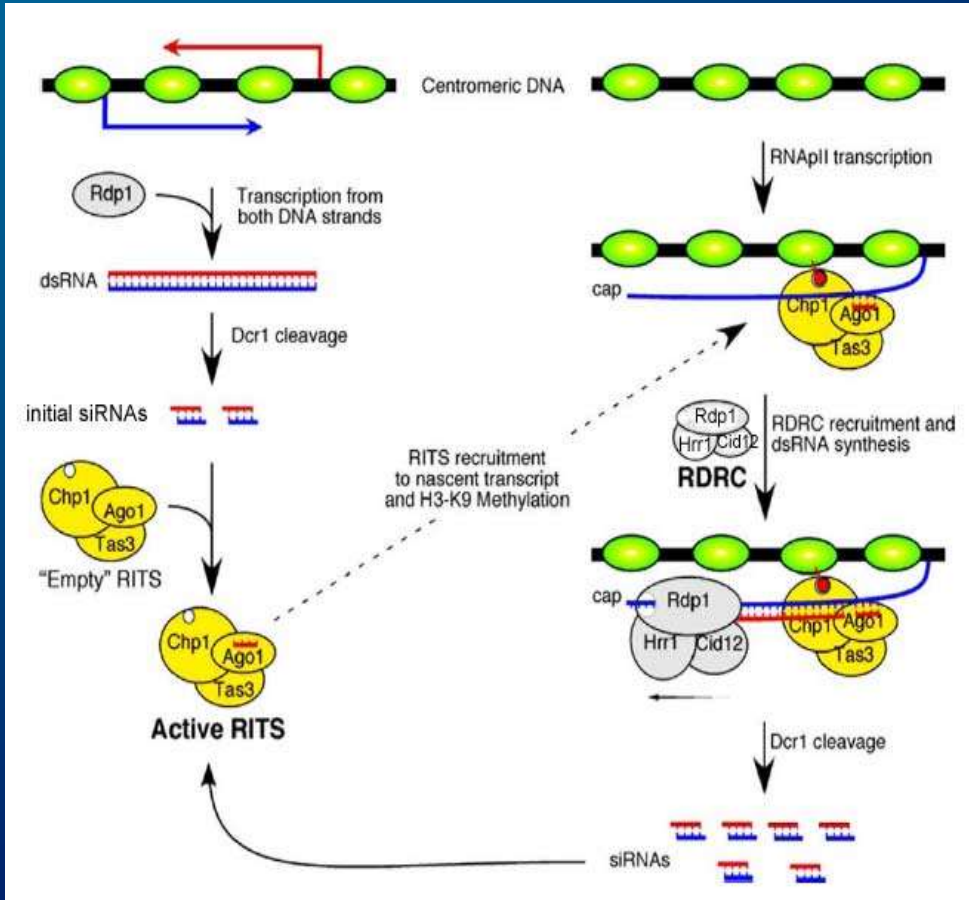
Ers1 (essential for RNAi-dependent silencing) – мостик между Hrr1 и Swi6 (HP1)

Участок хроматина, покрытый Swi6 (HP1), может привлекать RDRC с помощью Ers1 (Hayashi et al. PNAS 2012)

Дальнейший спрединг происходит с участием эффекторного комплекса SHREC (Snf2/Hdac-containing Repressor Complex), включающего гистондеацетилазы и белки ремоделинга и взаимодействующего с Swi6 (HP1) при реализации разных путей образования гетерохроматина, делая его недоступным для PolII



# РНК-сайленсинг повторов у *S.pombe*: общая схема



Участки -мишени транскрибируются с образованием обращенных транскриптов  
Образующаяся дцРНК расщепляется Dicer на siРНК

siРНК ассоциирует с Ago и "заряжает" комплекс RITS

RITS взаимодействует с мишенями, при этом привлекаются метилтрансферазы, происходит H3K9 метилирование

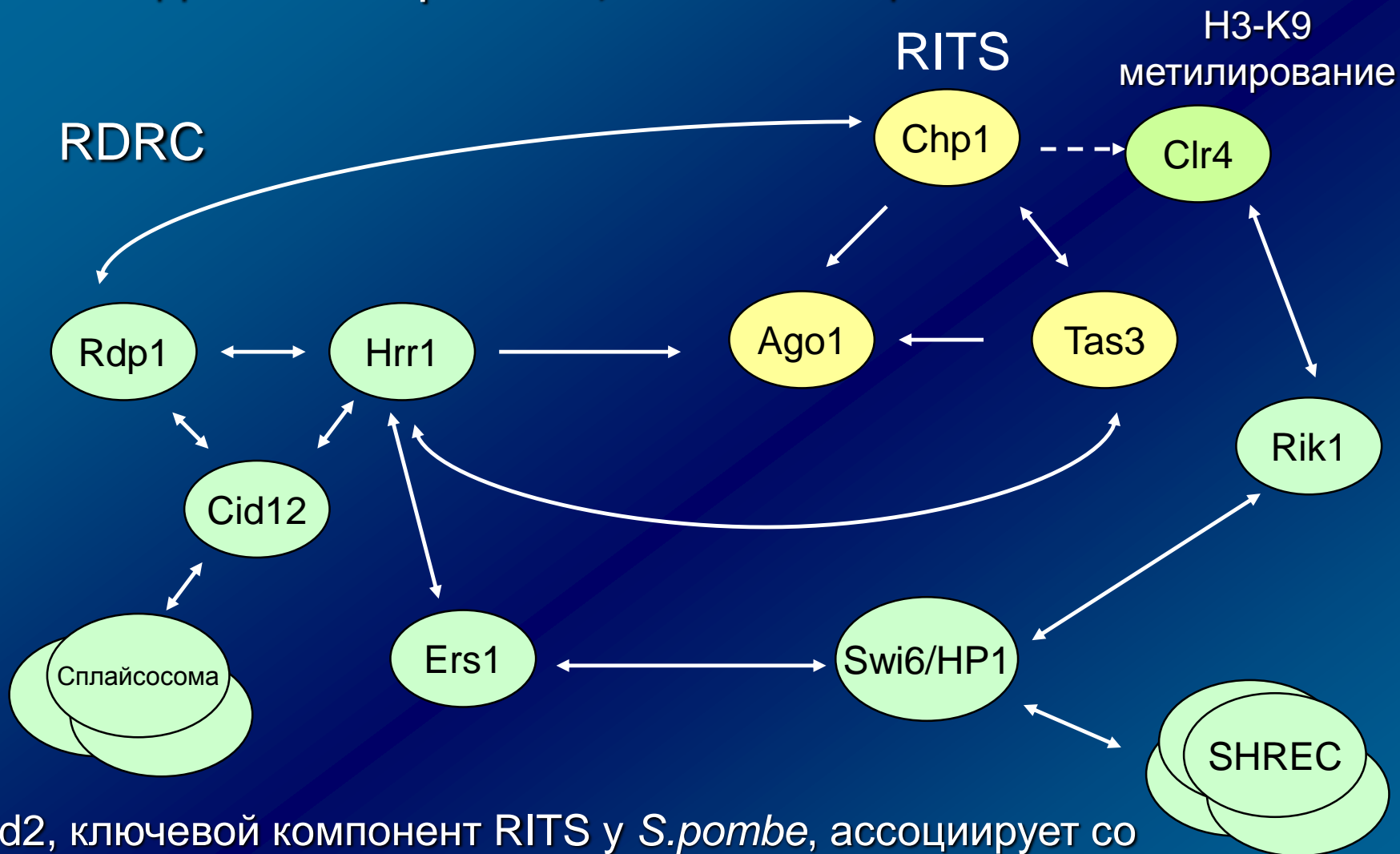
Метилированный лизин гистона H3 связывается RDC, RDC взаимодействует с RITS и RITS жестко фиксируется на подавляемом локусе.

Привлекаются дополнительные белки и запускается гетерохроматинизация по цепочке "Деацетилирование гистонов -> H3K9 ->Связывание Swi6 (HP1)-> Самоассоциация Swi6 (HP1)-> Ремоделинг с участием SHREC-> Спрединг

Детали и некоторые компоненты для центромер, теломер и локусов типа спаривания могут отличаться, реальные комплексы сложные и многокомпонентные



# Взаимодействия при TGS, вовлекающие RITS и RDRC



Cid2, ключевой компонент RITS у *S.pombe*, ассоциирует со сплайсосомой, компоненты которой способствуют TGS

“We have found that defects in specific splicing factors, but not splicing itself, affect the generation of centromeric siRNAs and consequently centromeric heterochromatin integrity. Moreover, splicing factors physically associate with Cid12, a component of the RNAi machinery, and with centromeric chromatin, consistent with a direct role in RNAi.

Science, 2008 October 24; 322(5901): 692-698. doi:10.1126/science.1164029.

**Splicing Factors Facilitate RNAi-Directed Silencing in Fission Yeast**

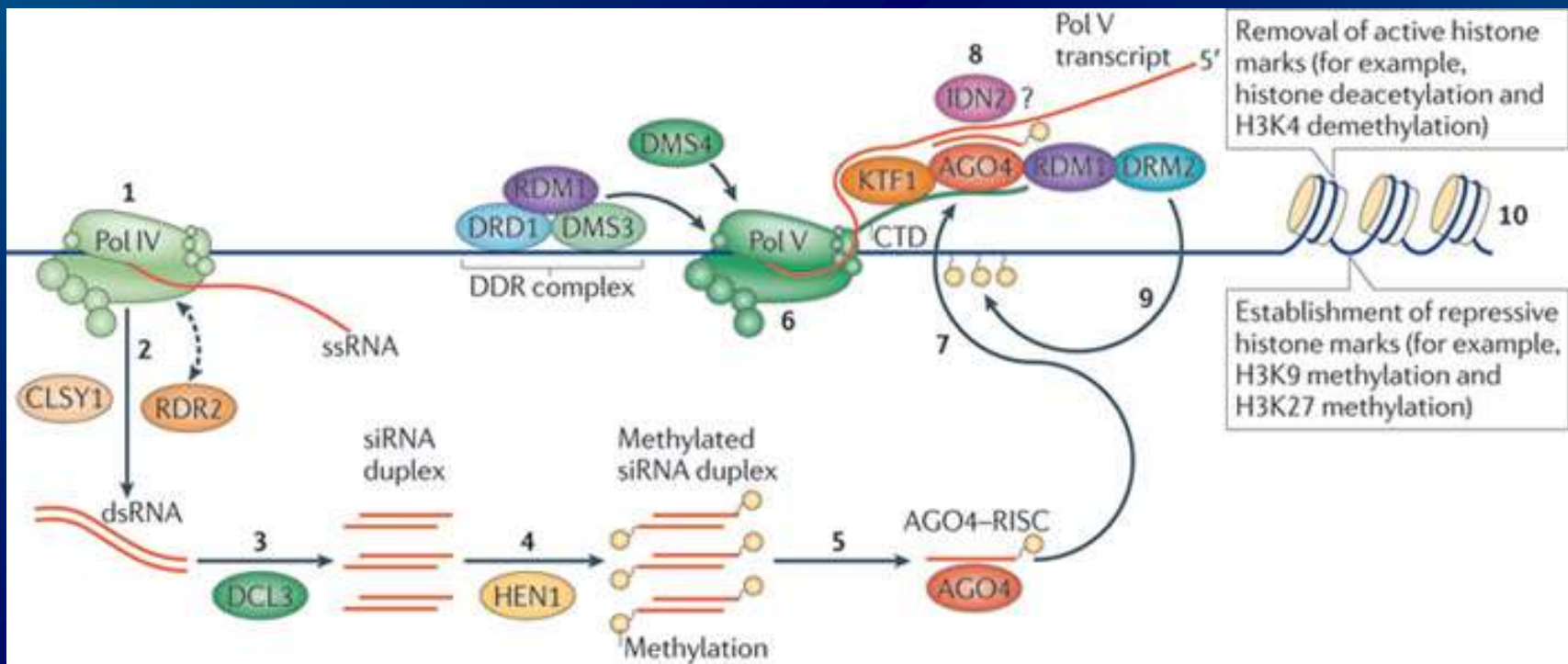
Elizabeth H. Bayne<sup>1</sup>, Manuela Portoso<sup>1,2</sup>, Alexander Kagansky<sup>1</sup>, Isabelle C. Kos-Braun<sup>1</sup>, Takeshi Urano<sup>2</sup>, Karl Ekwall<sup>3</sup>, Flavia Alves<sup>1</sup>, Juri Rappsilber<sup>1</sup>, and Robin C. Allshire<sup>1</sup>

# RdDM (RNA-Directed DNA Methylation) у растений

- направляемое РНК метилирование транспозонов, трансгенов, рДНК
- подавление транскрипции, связанное с наработкой дцРНК, вызывающей метилирование гомологичных им районов
- имеются специфическая РНК-полимеразы Pol IV и Pol V, необходимые для RdDM
- Pol IV необходима для транскрипции генов-мишеней и участвует в образовании большинства исходных матриц для РНК-зависимой РНК-полимеразы RDR2
- RDR2 использует исходный транскрипт в качестве матрицы для синтеза дцРНК, что приводит к вторичной РНК-интерференции с участием DCL3 с образованием siРНК 24 п.н. с транспозонов и повторов
- эта siРНК включается в комплекс RISC с Ago4, который распознает мишени и привлекает к ним дополнительные белки, в т.ч. ДНК-метиلاзы
- метилирование происходит *de novo* и распространяется путем спрединга с участием Pol V, в результате формируется участок гетерохроматина
- метилирование является обратимым

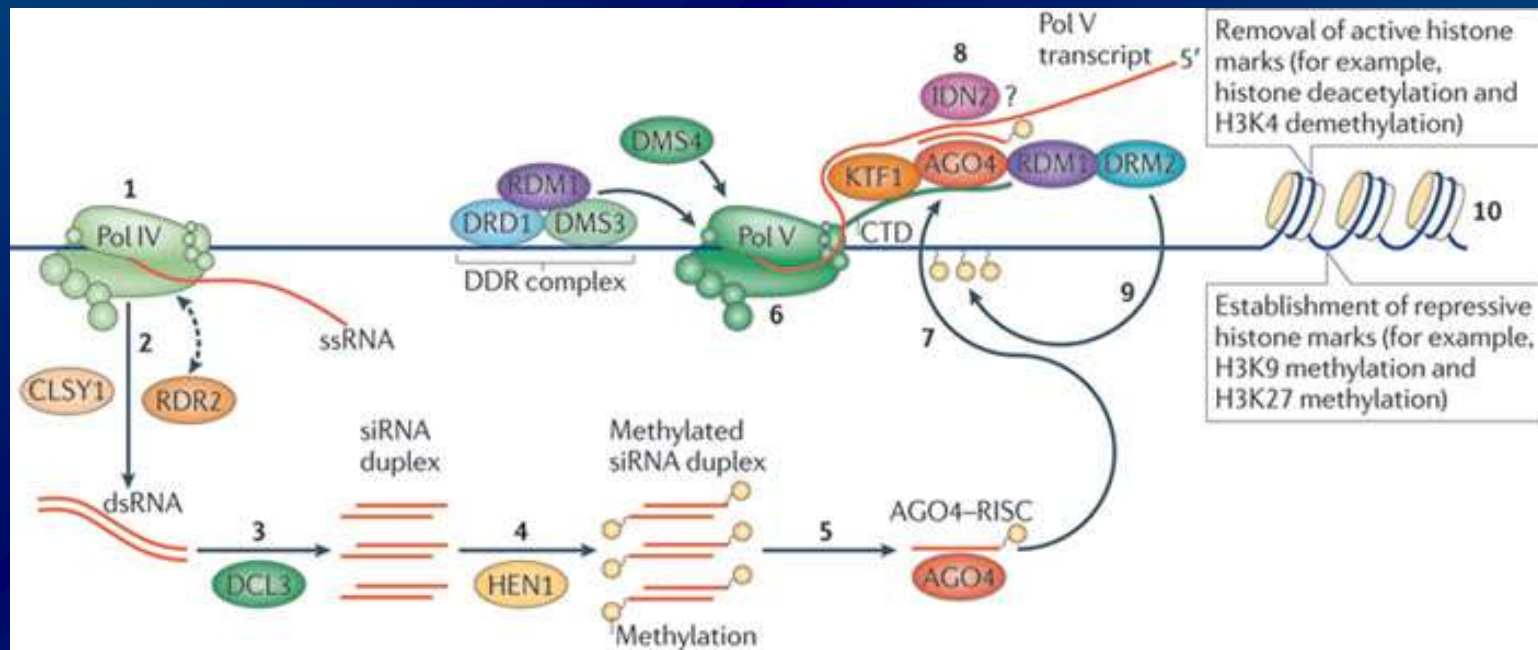
# RdDM (RNA-Directed DNA Methylation) у растений

- (1-2) Транскрипты, синтезируемые Pol IV с эндогенных локусов (5S рДНК, промоторы, трансгены, копии вирусов и транспозонов) конвертируются в дцРНК с помощью RDR2. Шпилечная РНК, синтезируемая Pol II с инвертированных повторов, может процессироваться без участия Pol IV и RDR2
- (3) DCL3 процессирует все эти дцРНК до siРНК 24-26 н.
- (4) Получившаяся siРНК метилируется РНК-метилазой HEN1 для защиты от аппарата деградации. Теперь она стабильна и может распространяться по клетке и между клетками через плазмодесмы (системный сайленсинг)



# RdDM (RNA-Directed DNA Methylation) у растений

- (5) siРНК заряжается в комплекс RISC, включающий Ago4
- (6-8) Комплекс узнает транскрипты, синтезируемые Pol V независимо от вышеперечисленных компонентов с участием комплекса DDR, и за счет спаривания siРНК с ними стабилизируется на мишени
- (9) RDM1 из комплекса DDR связывает Ago4 и *de novo* метилазу DRM2 в районах, транскрибируемых Pol V
- (10) ДНК метилируется в этих районах **практически по всем доступным остаткам цитозина**, что приводит к сайленсингу (который потом поддерживается без участия РНК и является обратимым). Метилирование распространяется с участием комплекса, включающего DDR и Pol V, и сопровождается метилированием и деацетилированием гистонов

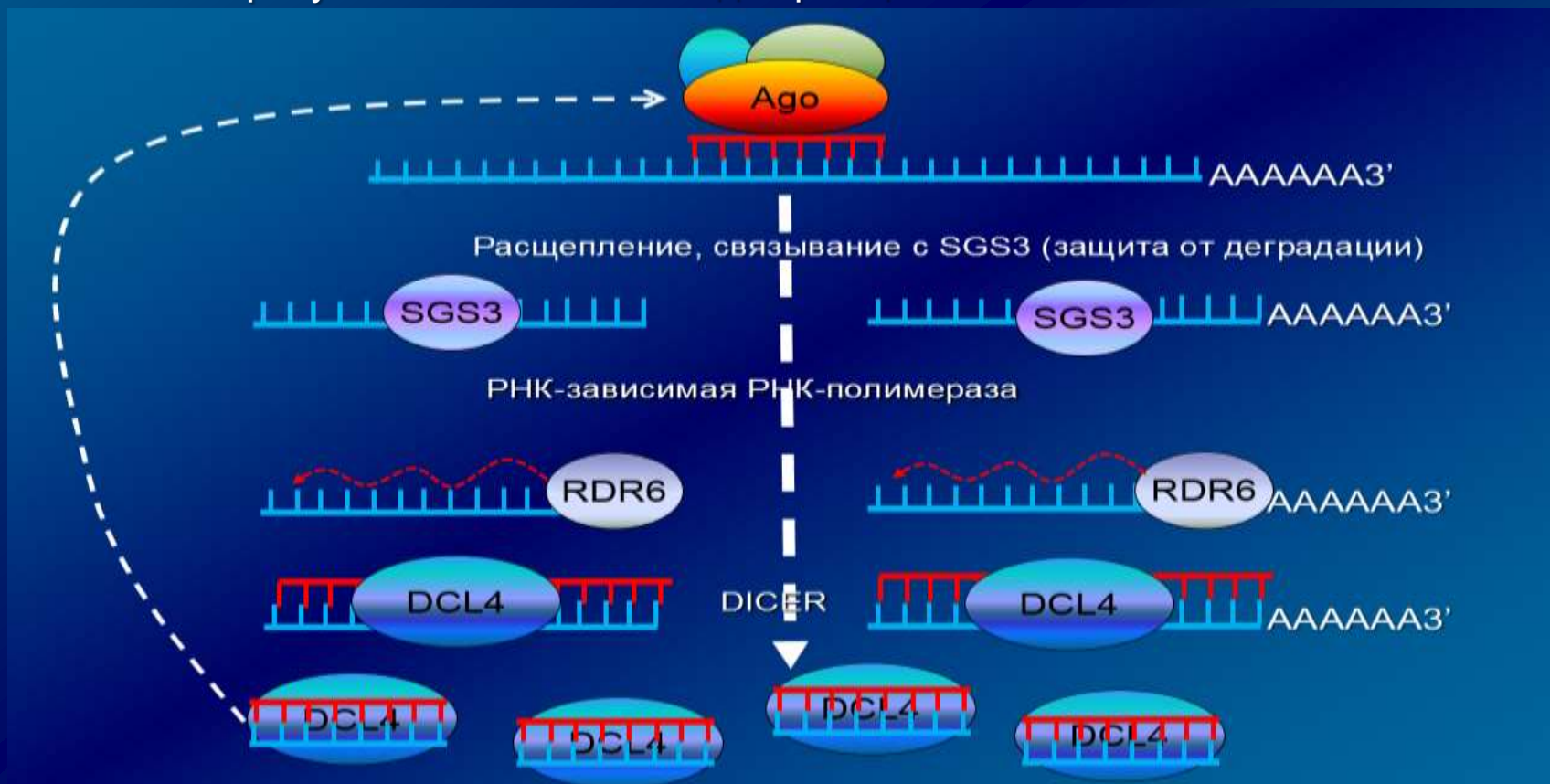


# Некоторые альтернативные виды малых регуляторных РНК

Класс	Источник	Особенности строения и биогенеза	Функции
piРНК (PIWI) rasiРНК (Repeat-Associated) – подкласс	Транспозоны, повторы в геноме, участки центромер и теломер и т.п. у <i>S. pombe</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>D. melanogaster</i> , млекопитающих (иногда белок-кодирующие гены)	Размер 25-33 н. Предшественники – длинные дцРНК. Взаимодействуют с разными типами Ago белков (не только Piwi)	Стабилизация генома (сайленсинг транспозонов и др.) через TGS в клетках зародышевой линии rasiРНК- разнообразный TGS
L1-специфичные siРНК	LINE-1 ретротранспозоны	Мишени – 5'UTR транскриптов L1	Подавление активности ретротранспозонов в клетках зародышевой линии
tasiРНК (Trans-Acting)	Межгенные районы, некодирующие транскрипты растений, расщепляемые с участием аппарата РНК-сайленсинга	Длина 21-24 н.	Индукцируют расщепление специфических мРНК-мишеней
scnРНК (Small-Scan)	Предшественники - продукты транскрипции с обеих цепей ДНК генома микронуклеуса у реснитчатых инфузорий	Длина 28 н. Ago-белок TWI1 опосредует метилирование гистонов, необходимое для элиминации участка ДНК	Сканирование участков ДНК для геномных перестроек в них, удаление ненужного генетического материала макронуклеуса

# Образование tasiРНК у цветковых растений и мхов

- Действуют на свои мишени (транскрипционные факторы) *in trans*, кодируются собственными генами TAS (известно несколько таких генов), транскрипты являются мишенями для специфических miРНК
- В результате РНК-интерференции полиаденилированный транскрипт TAS-гена разрезается на 2 части с участием DCL1, только одна из которых подвергается дальнейшему созреванию с участием DCL4
- Взаимодействие с мишенями задействует несколько специализированных Ago-белков и не требует полной гомологии для расщепления



# Piwi-interacting RNA (piРНК)

- самый большой класс малых РНК, экспрессируемых в клетках животных (и у позвоночных, и у беспозвоночных)
- отличаются размером (типичный размер 25-33 н.), структурой (одноцепочечные, не имеют выраженной вторичной структуры!), биогенезом (для образования не нужен Dicer, Ago, RdRP)
- в основном комплементарны транспозонам
- происходят из одной цепи ДНК, имеют длинный одноцепочечный предшественник
- PIWI белки не требуются для биогенеза, но последние связывают piРНК в комплексы и необходимы для стабилизации
- обычно U на 5' конце, 5' монофосфат и 3' O-метильная группа (стабилизация)
- по предварительным оценкам, у млекопитающих сотни тысяч видов, на 2008 г. у мыши уже известно более 50000 уникальных последовательностей piРНК, у *Drosophila* более 13000



# Piwi-interacting RNA (piРНК)

Кодируются в кластерах на протяжении всего генома (от 10 до многих тысяч piРНК в кластерах от одного до ста тпн)



Визуализация piРНК –содержащих комплексов на хромосомах *Drosophila*

У млекопитающих встречаются только в мужских половых клетках, около 1 млн. копий на клетку. Могут наследоваться по материнскому пути. У беспозвоночных и в женских, и в мужских половых клетках. Обнаруживаются и в ядрах, и в цитоплазме

В ядрах комплексы piРНК с белками Piwi связываются с хроматином, могут локализоваться с RNA Pol II и вовлечены в TGS повторов при формировании клеток зародышевого пути, в особенности при сперматогенезе. Взаимодействуют с HP1, привлекают ДНК- и гистонметилазы

В цитоплазме связывают транскрипты транспозонов и катализируют их уничтожение в структурах, подобных Р-тельцам

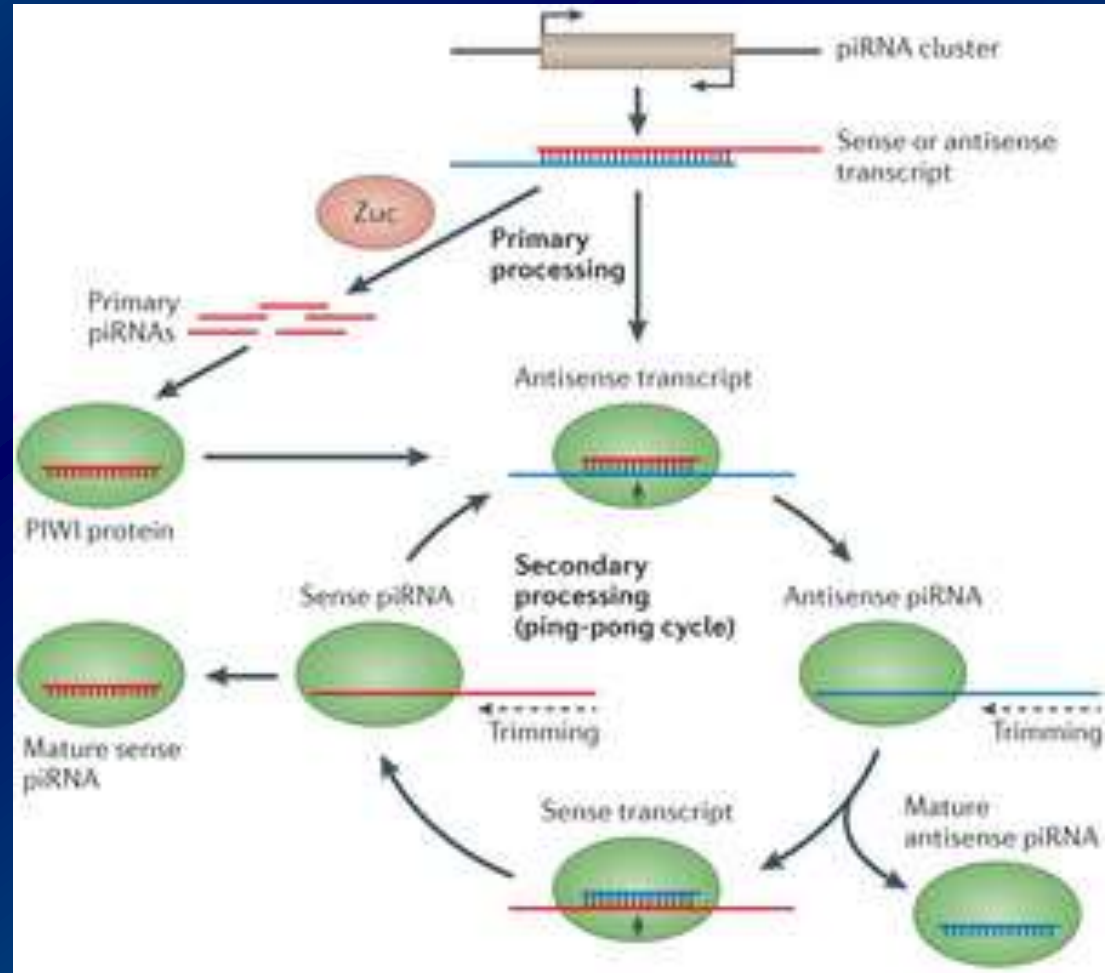
У *Drosophila* в частных случаях могут активировать экспрессию, предотвращая образование гетерохроматина (Yin, Lin, Nature 2007)



# Биогенез piRNA

Первый этап созревания – процессинг первичного транскрипта с помощью нуклеазы Zucchini с формированием 5' концов первичных piRNA (механизм плохо изучен)

Второй этап – “Пинг-Понг амплификация” (не у всех объектов). Первичные piRNA узнают комплементарные им мишени (транскрипты с транспозонов и других повторов) и их комплекс привлекает белки Piwi. Piwi расщепляет мишень в позиции 10 н. от 5' конца первичной piRNA, образуется вторичная piRNA, которая включается в Piwi. У *C.elegans* обнаружен альтернативный вариант процессинга – короткие кэпированные транскрипты Pol II декэпируются, процессируются и заряжаются в Piwi белки



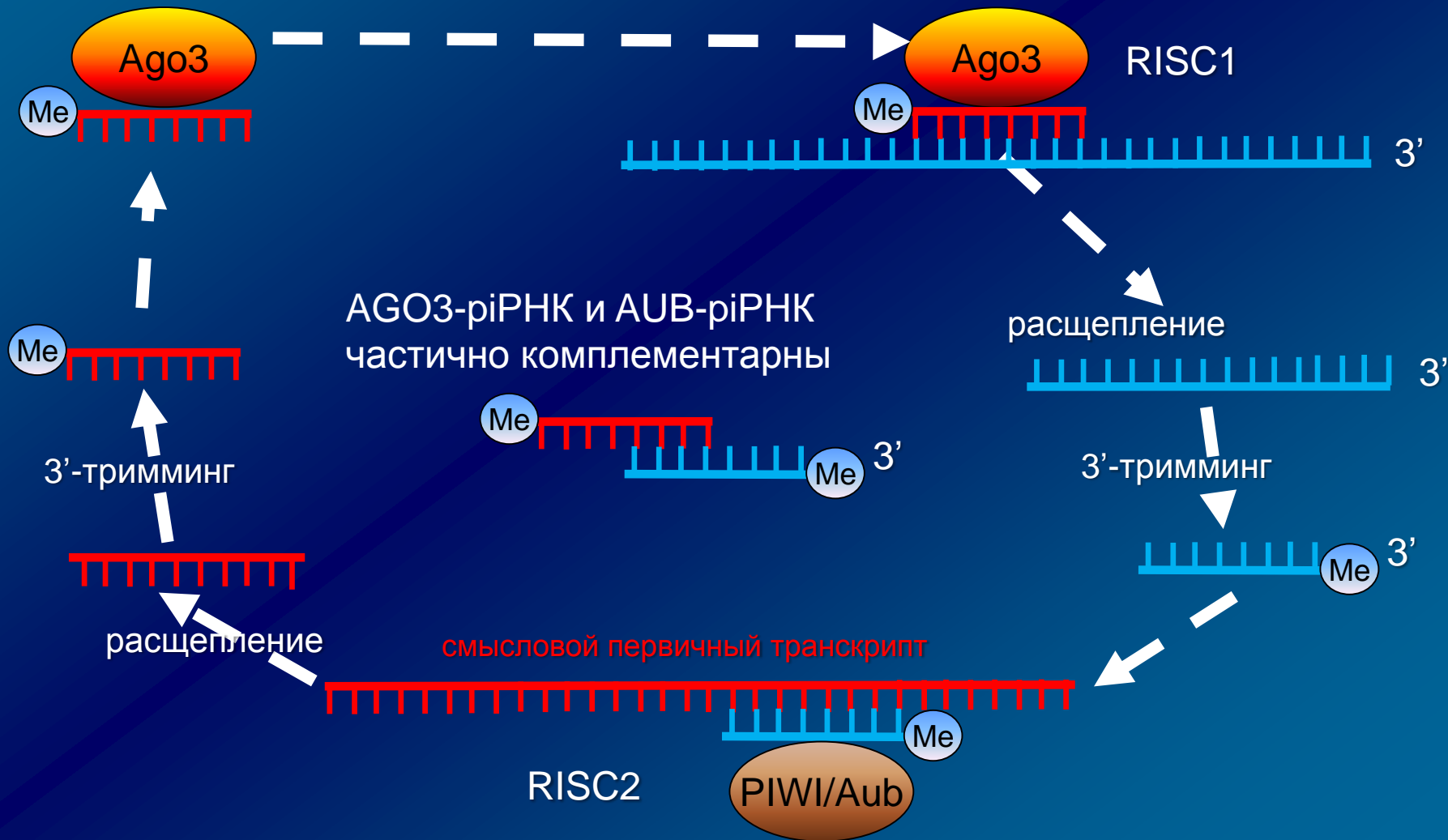
# Механизм “пинг-понг” при образовании рiРНК (и rasiРНК)

рiРНК кластер



антисмысловой первичный транскрипт

↓ Zuc, другие белки

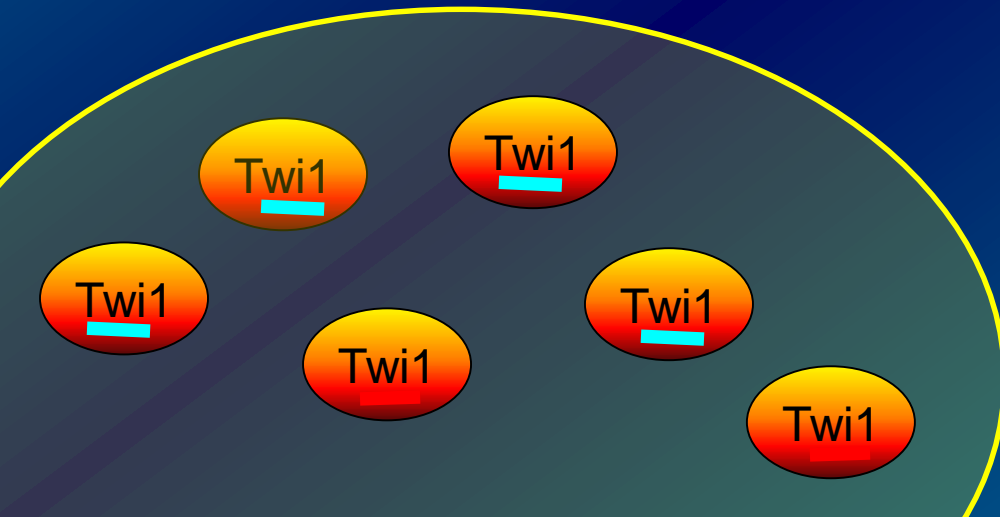
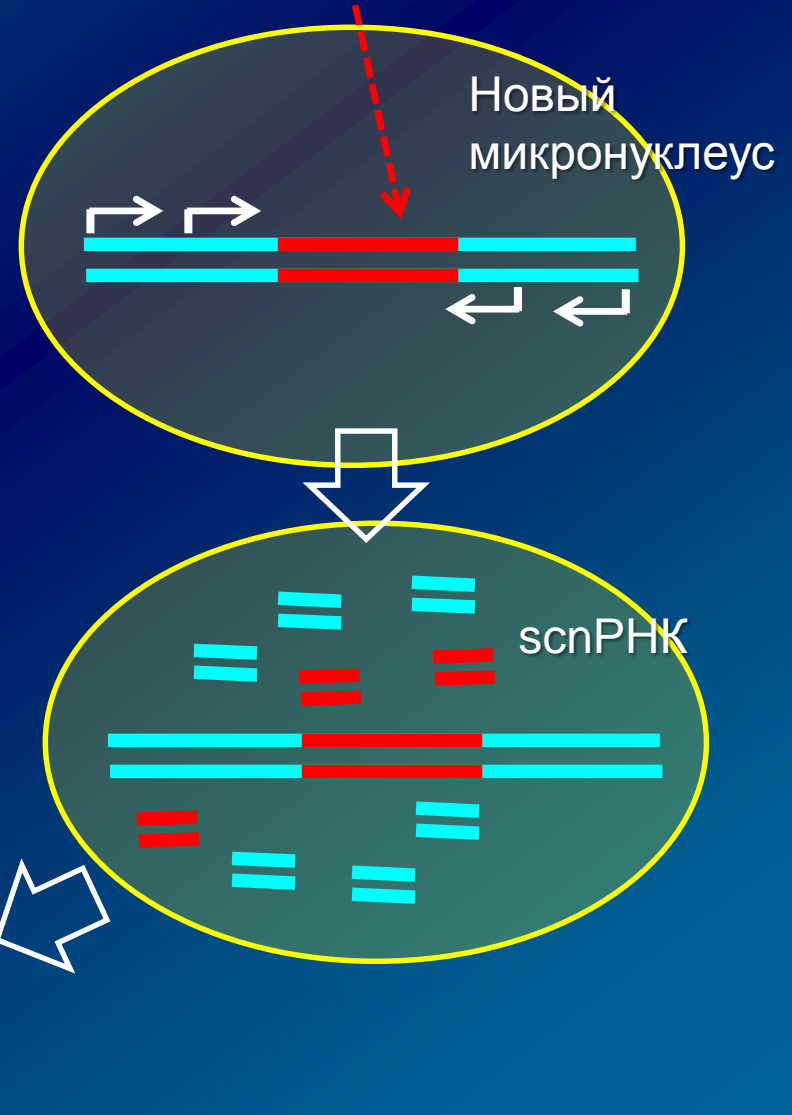


# scnРНК и “диминуция” хроматина у *Tetrahymena*

Геном вновь образованного микронуклеуса транскрибируется в обеих ориентациях с образованием длинных молекул дцРНК

ДцРНК расщепляется Dicer с образованием двуцепочечных scnРНК, которые “заряжаются” в Рiwi-белок Twi1 – получают RISCи

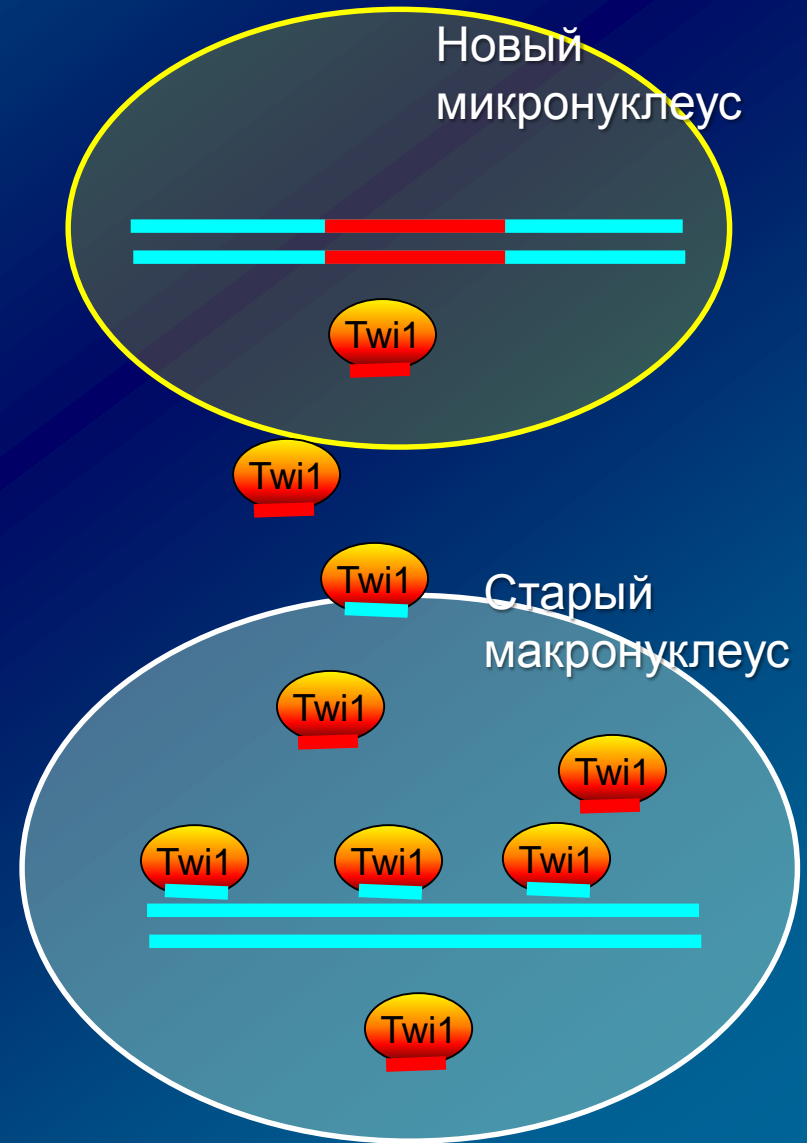
**IES** – internal eliminated sequence (~6000, от 0.5 до 20 т.п.н.)



# scnРНК и “диминуция” хроматина у *Tetrahymena*

Набор RISCов диффундирует в старый макронуклеус и сканирует его геном в поисках участков, которые должны быть элиминированы

ScnРНК, комплементарные геному старого макронуклеуса, отбраковываются

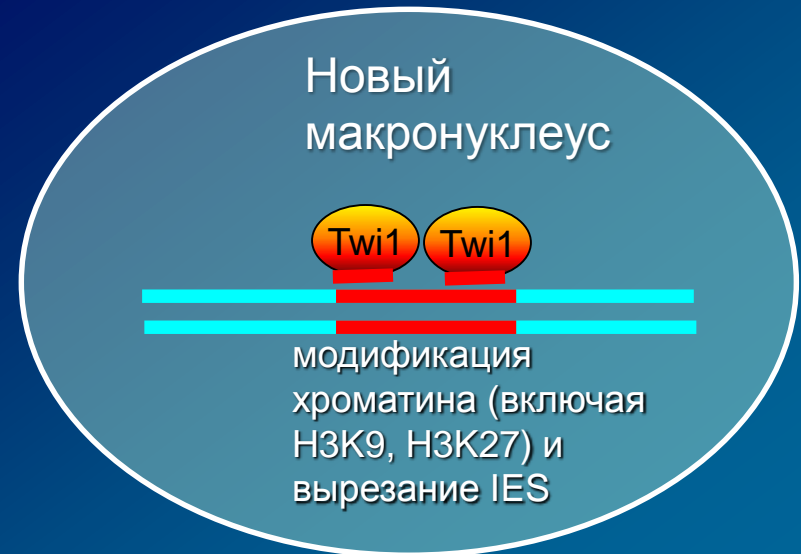
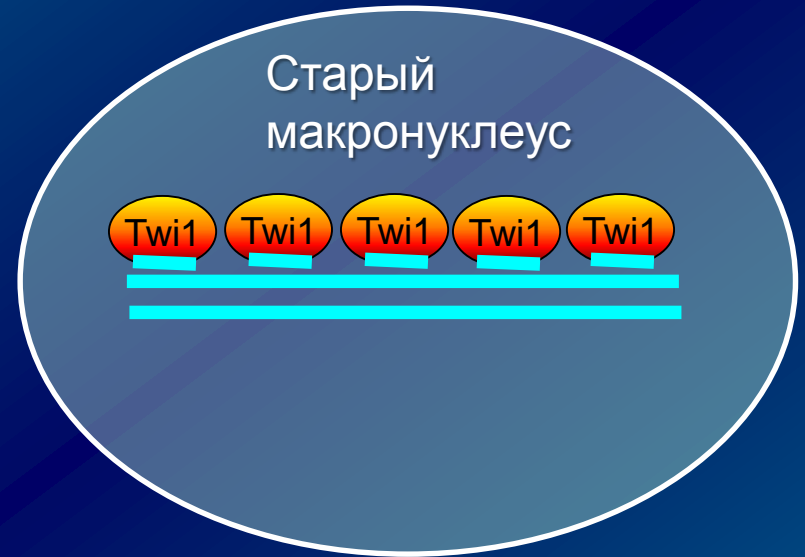


# scnRNK и “диминуция” хроматина у *Tetrahymena*

Оставшийся “отфильтрованный” набор тысяч RISCов попадает в новый образующийся макронуклеус

Соответствующие scnRNK включаются в комплекс, родственный RITS

Этот комплекс ассоциирует с хроматином и вызывает метилирование гистонов – сигнал для элиминации данного участка ДНК с участием белка Pdd1



*III-II. Пересечения и схождения  
путей РНК-сайленсинга*

# РНК-сайленсинг – древнейшая “иммунная система”!

существует не менее 1.5 миллиардов лет, многие элементы есть уже у бактерий  
судя по всему, возникала неоднократно

после расхождения таксонов – независимая эволюция в разных кладах

Наиболее распространенное мнение – возникновение РНК-сайленсинга было вызвано необходимостью **защиты генома от РНК-вирусов и мобильных элементов**

Поддержание стабильности генома – эта функция сохранилась почти повсеместно (постепенно замещается “чисто белковыми” механизмами?)

Защита от РНК-вирусов – в чистом виде сохранилась у растений, элементы обнаружены у *C.elegans*, *D.melanogaster* и позвоночных

Более “молодые” функции:

- время-разрешенная и тканеспецифичная регуляция экспрессии генов у организмов с билатеральной симметрией
- участие в формировании и функционировании гетерохроматина
- быстрый и комплексный ответ на стресс

# Эволюция аппарата РНК-интерференции

Борьба с интеграцией и незаконной транскрипцией чужеродных последовательностей (ДНК-копий вирусов и транспозонов) – **древняя функция, актуальная и для бактерий!** И уже у бактерий она реализована с участием коротких РНК, комплементарных мишеням

Выводы, основанные на филогенетическом анализе:  
общий предок эукариот, скорее всего, имел ключевые компоненты системы РНК-интерференции, которые могли играть и другие роли, в частности, в функционировании аппарата неспецифической деградациии РНК:

как минимум один Dicer-подобный белок  
(подобные белки участвуют в аппарате CRISPR-интерференции)  
выявлены гомологи доменов РНКазы III и PAZ, 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 защите от бактериофагов с расщеплением их ДНК)

РНК-зависимая РНК-полимераза  
(имеется у многих вирусов эукариот и бактериофагов)

**В то же время ДНК-зависимые РНК-полимеразы эукариот в принципе способны работать с дцРНК, воспринимая ее как дцДНК (пример – репликация РНК-генома HDV РНК-полимеразой II)**

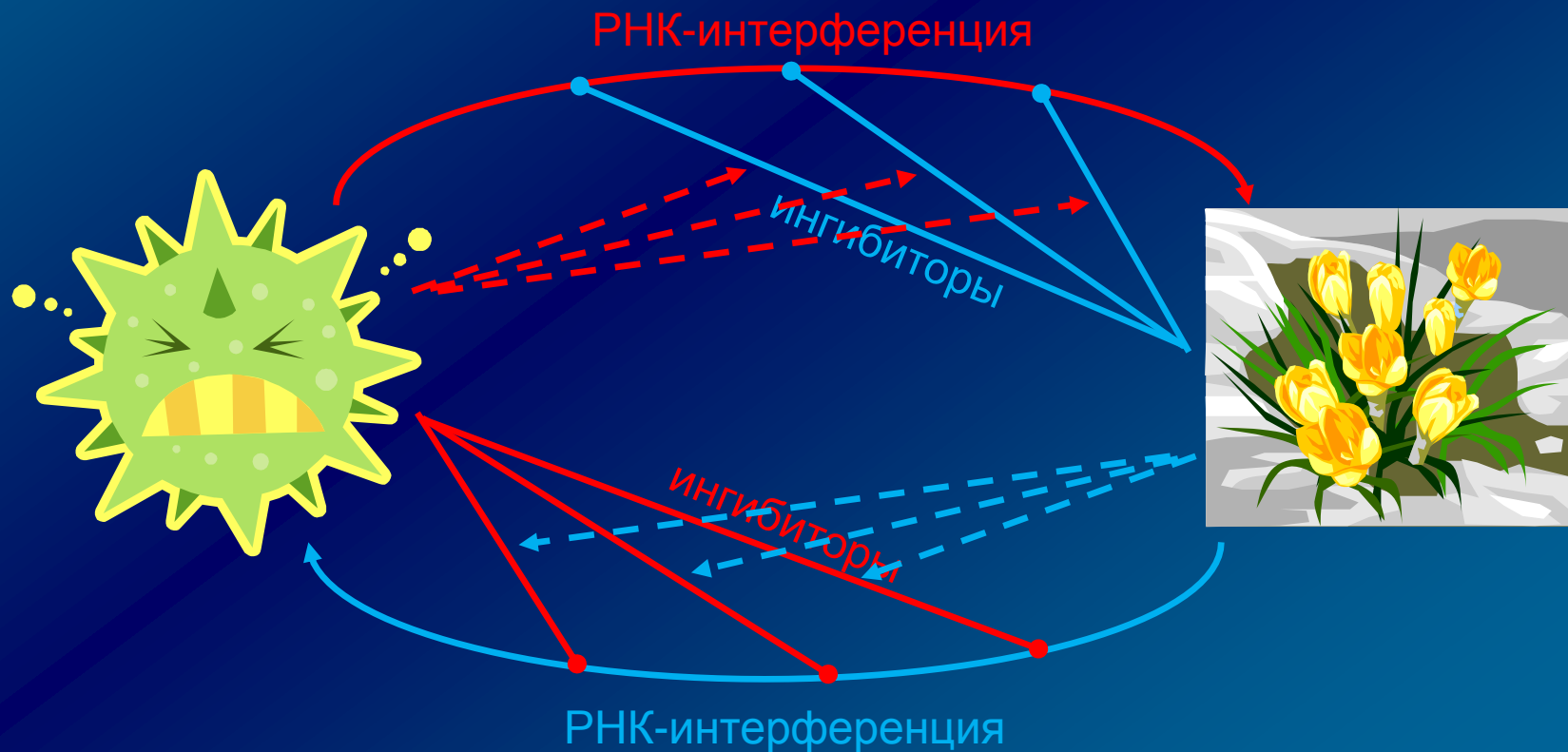


# “Гонка вооружений” между вирусами и эукариотами

Некоторые вирусы более патогенны для хозяев, у которых нарушена экспрессия *Dicer* (впервые показано для насекомых)

Клетка-хозяин может использовать РНКi для уничтожения вирусной РНК или ингибирования трансляции вирусных белков

*MiRNA* выявлены у ряда вирусов эукариот – борьба с защитными механизмами клетки - хозяйина



# ДцРНК вирусов и виридов может вызывать сайленсинг у растений

## PTSVd (Potato Spindle Tuber Viroid)

- могут вызывать метилирование мишени около 30 пн в ДНК (Pelissier & Wassenegger, RNA, 2000)
- в цитоплазме, но не в ядре выявлены вириод-специфические siРНК 25 пн (Itaya et al., Plant J. 2001; Denti et al., Plant J. 2004)

J Gen Plant Pathol (2004) 70:50–53  
DOI 10.1007/s10327-003-0083-6


© The Phytopathological Society of Japan  
and Springer-Verlag Tokyo 2004

VIRAL AND VIROID DISEASES

*Short communication*

Teruo Sano · Yoko Matsuura

**Accumulation of short interfering RNAs characteristic of RNA silencing precedes recovery of tomato plants from severe symptoms of *Potato spindle tuber viroid* infection**



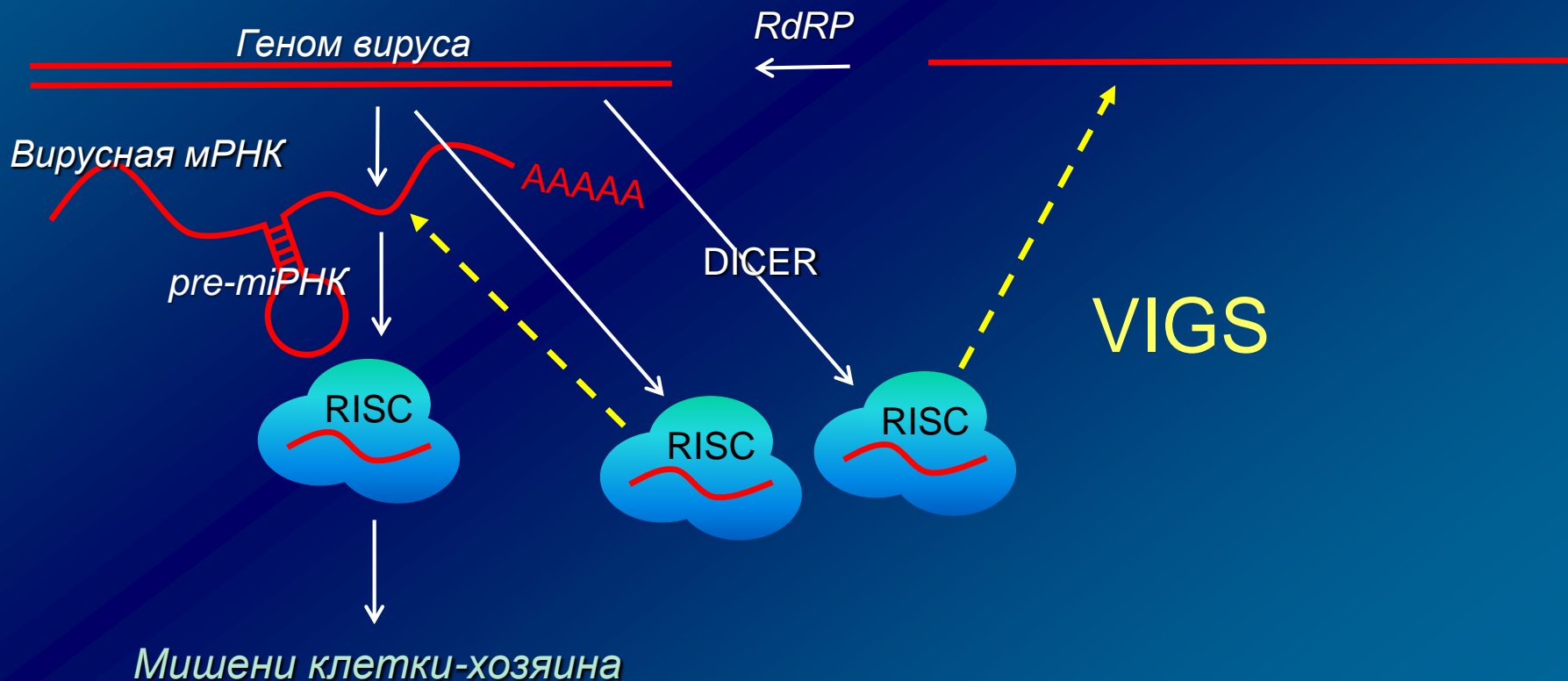
Вирусы могут вырабатывать белки -супрессоры РНК-интерференции

- **HCPro** у потивирусов растений – подавляет образование siРНК
- **P19** у Tomato Bushy Stunt Virus - связывается с siРНК и предотвращает их включение в состав RISC
- **B2** у Flock House Virus – ингибитор Dicer
- Greasy Grouper Nervous Necrosis Virus – вырабатывает белок-ингибитор Dicer, необходимый для вирусной репликации
- **2b** - ингибитор системного сайленсинга у Cucumber Mosaic Virus

# VIGS – Virus-Induced Gene Silencing

“Иммунная система” у растений

Большинство известных вирусов растений имеют оцРНК-геномы  
После попадания в клетку активность кодируемой вирусным геномом RdRP приводит к образованию дцРНК, которая может запускать механизм РНК-интерференции, направленный против собственных (вирусных) последовательностей  
дцРНК-геномы могут индуцировать VIGS без клеточной RdRP

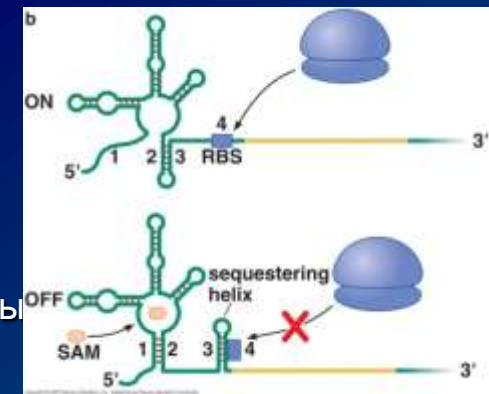
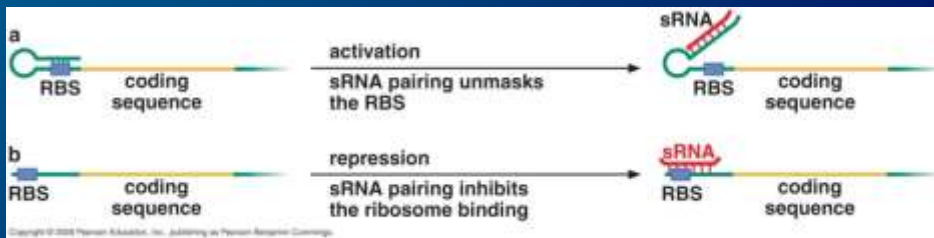


Регуляция экспрессии генов с участием некодирующих РНК-структур распространена у бактерий:

## 1. Малые РНК (sRNA): регуляция через комплементарное связывание

Регуляция инициации трансляции и терминации транскрипции за счет изменения доступности RBS и образования терминатора, соответственно. Связывание с мишенями в мРНК, на которые направлено действие. Возможна как активация, так и репрессия.

Активность РНКазы III не требуется



## 2. Рибосвитчи (Riboswitches):

регуляция через изменения структуры 5'-UTR мРНК, опосредованные метаболитами

## 3. Аттенуация: образование терминаторов в результате “торможения” рибосомы

4. **Trans-acting RNAs**: не только блок трансляции за счет комплементарного спаривания, но и привлечение нуклеаз

## 5. CRISPR – интерференция

**CRISPRs** - **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats

# CRISPRs - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Открыты в 1987 г. у *E.coli*, сходные структуры выявлены в геномах многих других прокариот (все археи, половина эубактерий)

Образуют массивы уникальной структуры (используются для “сполиготипирования” (spoligotyping))

Повторы 21-47 пн, **несовершенные палиндромы, разделенные уникальными “спейсерами”** сходной длины, аналогичными последовательностям в геномах бактериофагов и некоторых плазмид

Эти последовательности защищают бактерию от последующего заражения фагом

ATAGCCT...N8...ATAGCCT...N8...ATAGCCT

CRISPR Inter-Repetitive Sequence

```
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCSAGCGCTTTGGCTAGTTGCCCCATAGCTAATCCCAT
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCAAAACCGCATGTGCTTTCGGCGCAACTTGCAGAAATTTGGCATAAC
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCAAAACCGCAGGAGTGAAACGCAAAAAGTACCGGT
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTCGCTGGACAGAAGGAGGGAGGGTCAAAAGTAAA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCAAAAATAATAGATGCCTAACATAGCAAAATCAGC
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTCTCCTGTAAAGACTGTTGCGCTTCCCTGAAAAA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTTTGGGAAGGGCAGCCTAGAAAAACATTATCCTC
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCGCTAGAAATCGCGCTCAGACGAGAGAGAAAAC
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCCAGACACTTCCCGCAGCGCAGGAAGCGAARTATAA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCGAAGAAAGATGTTGCCCTCTGCAATTTGAAAAAGCCA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCGGCATCCGAGCGATCGCTCCTCAATTCGCCAC
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTTCATCCGAACATCAGTTGGAGTCCGCTCAAAC
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTCAGCCATTCGGTGGTGTATCCGATCATCTA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCSAGTGGGTAGGCTTTTGAATGATAGTATACCCAT
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTTGTCACTGGAGCTATTGATTTTGTAGATAGAGA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTATCATCGCGAATCCATCTTTTGTATTAGCATCCCAAAA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTTGTCACTGGAGCTATTGATTTTGTAGATAGAGA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTATCATCGCGAATCCATCTTTTGTATTAGCATCCCAAAA
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCSACTGCTAGGGCATAATCTCTTTTCTGTGTAGTGGGTG
ATTGCAATTCATCAAAATCCCTATTAGGGATTGAARCTAGCTGTT
```

CRISPR found in *Nostoc punctiforme*

Могут образовывать вторичные структуры

# Cas-гены

Рядом с CRISPRs всегда расположены (часто в оперонах) CAS (CRISPR-associated) гены (выявлены десятки таких генов, подразделяемых на 4-5 семейств)

Cas 1 –гомологичен нуклеазам и интегразам

Cas 2 –гомологичен транспозазам

Cas 3 –гомологичен геликазам

Cas 4 –гомологичен экзонуклеазе RecB (компонент белка recBCD)

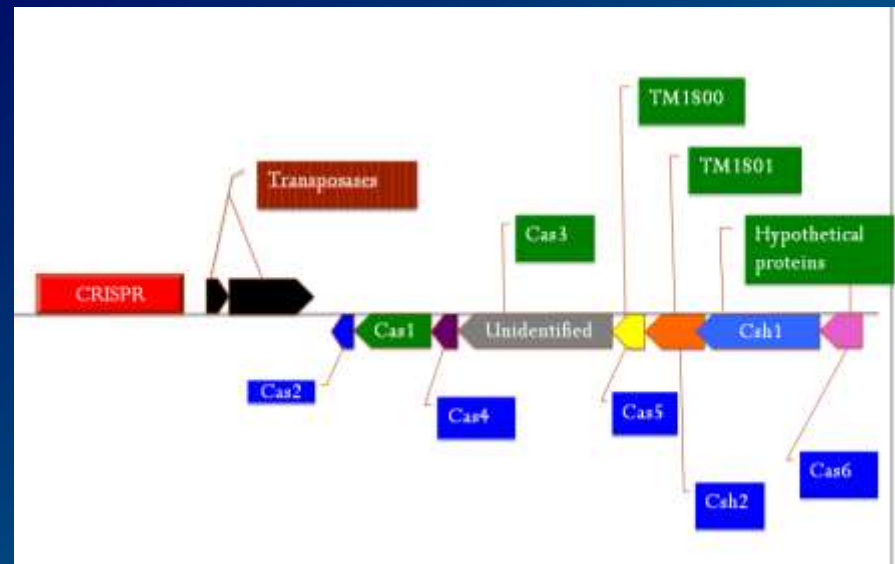
Csy4 –эндорибонуклеаза, инициирующая образование особых РНК (crRNAs, CRISPR-derived RNAs, или psiRNAs, procaryotic silencing RNAs)

Cmr 2 – полимераза с нуклеазным доменом

Cmr – 3,4,6 – RAMPs (Repeat-associated mysterious proteins)

...

Пример организации относительно простого локуса CRISPR/CAS *Sulfolobus solfataricus* (у *Pyrococcus furiosus* до 30 генов в соответствующем локусе)

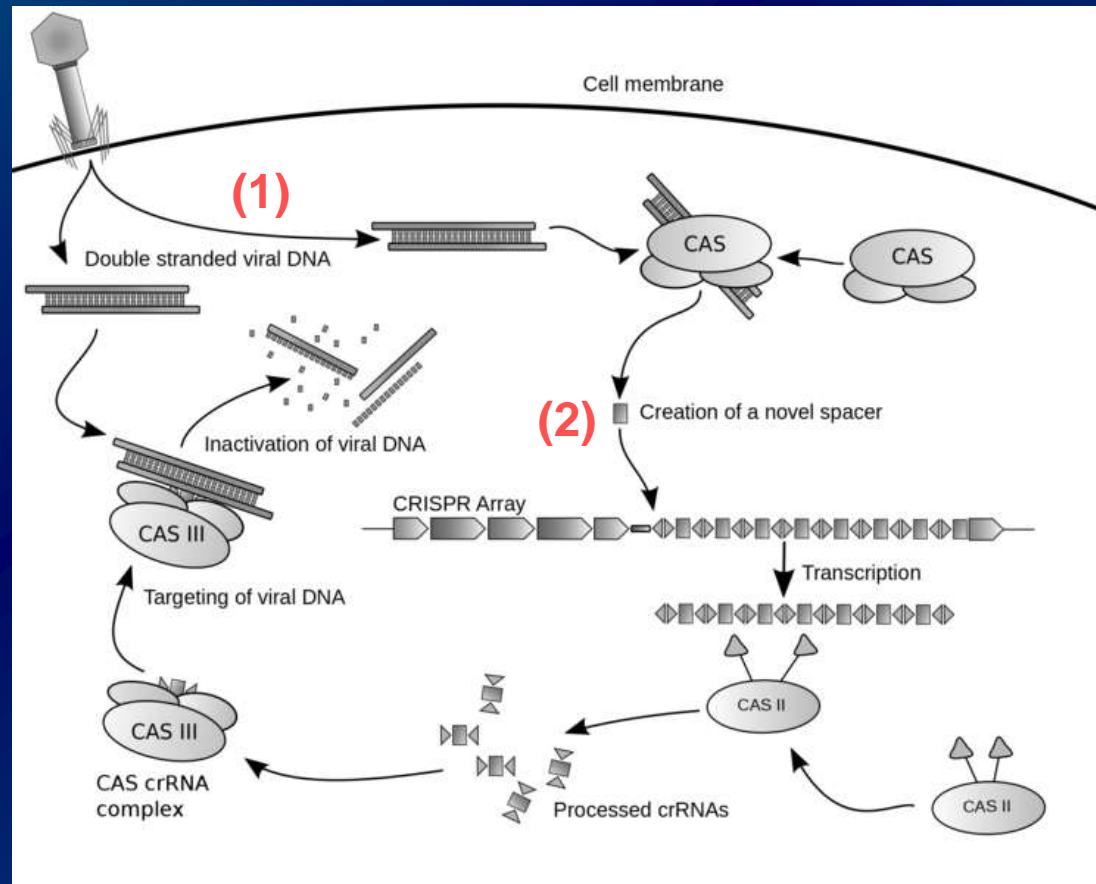


# CRISPR – интерференция у бактерий

(1) Экзогенная (например, фаговая) ДНК **расщепляется с участием CAS-белков на небольшие** (~30 пн) фрагменты

*Механизмы распознавания “своих” и “чужих” последовательностей пока неизвестны*

(2) Эти фрагменты с участием CAS-белков по неизвестному механизму **встраиваются в локус CRISPR** вблизи лидерной последовательности. В результате появляется новый спейсер



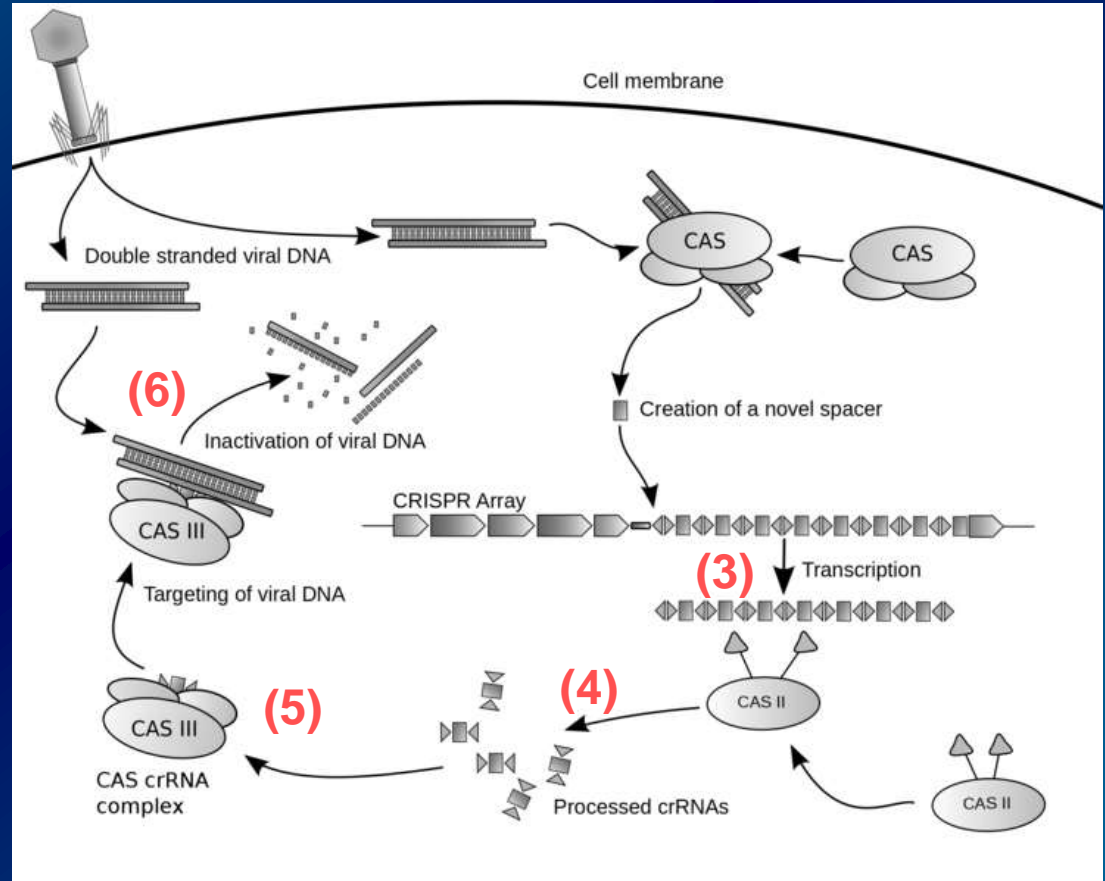
# CRISPR – интерференция у бактерий

(3) С локусов CRISPR постоянно образуются длинные нкРНК, соответствующие всему локусу (до тысяч н.)

(4) Эти РНК процессируются CAS-белками до более коротких РНК (60-70 н.), частично гомологичных ранее попадавшим в клетку экзогенным ДНК

(5) Далее происходит еще одна стадия процессинга с образованием psiRNA 25-45 н. с общим 5' концом

(6) psiРНК направляют другие CAS-белки в комплекс, осуществляющий сайленсинг экзогенных генетических элементов на уровне ДНК или РНК





Благодарю за  
внимание!  
Вопросы?