

Az RNS interferencia effektor mechanizmusai

Orbán Tamás

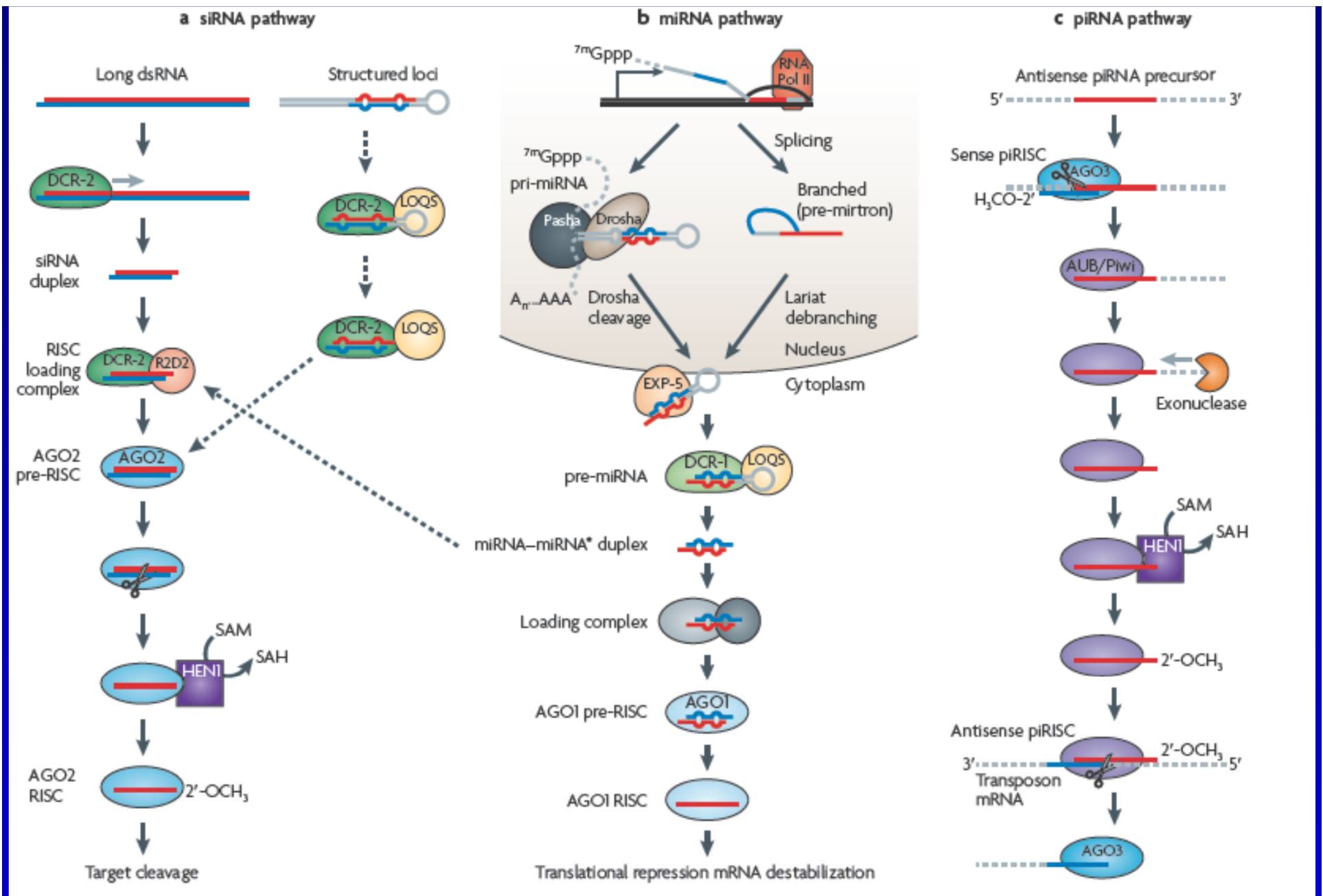
MTA TTK Enzimológiai Intézet



Mi is az az RNS interferencia (RNAi)?

= „géncsendesítés”

- első megfigyelések növényi rendszereken voltak...
 - 1993: első kis RNS „lelet” (*lin-4 miRNS*, gátolja a *lin-14-t*)
 - 1998: első bizonyíték a dsRNS hatására
(Fire és Mello; Nobel díj, 2006)
- géncsendesítési komplexek jellemzői:
rövid (~20-30 nt) RNS molekulák, egy komplexben az Argonaute fehérjecsald egy képviselőjével
- RISC: poszttranszkripció csendesítés
 - RITS: transzkripció csendesítés → EPIGENETIKA
 - siRNS / miRNS / piRNS /... → állati szervezetek

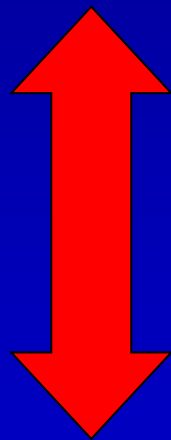


Ghildiyal and Zamore, Nat Rev Genet (2009) 10:94.

A mechanizmusok részletesen...

RNAi - Poszt-transzkripciós hatások

mRNS degradáció → állati siRNS (*néhány miRNS is...*)
növényi miRNS, siRNS

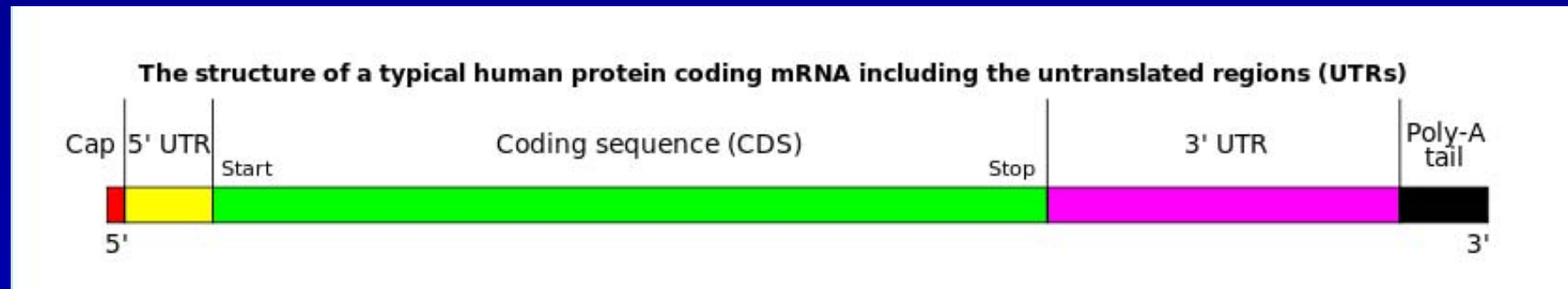


Mitől függ? :

- komplementaritás
- kódoló – nem kódoló régióhoz
- ribonukleoprotein-környezet

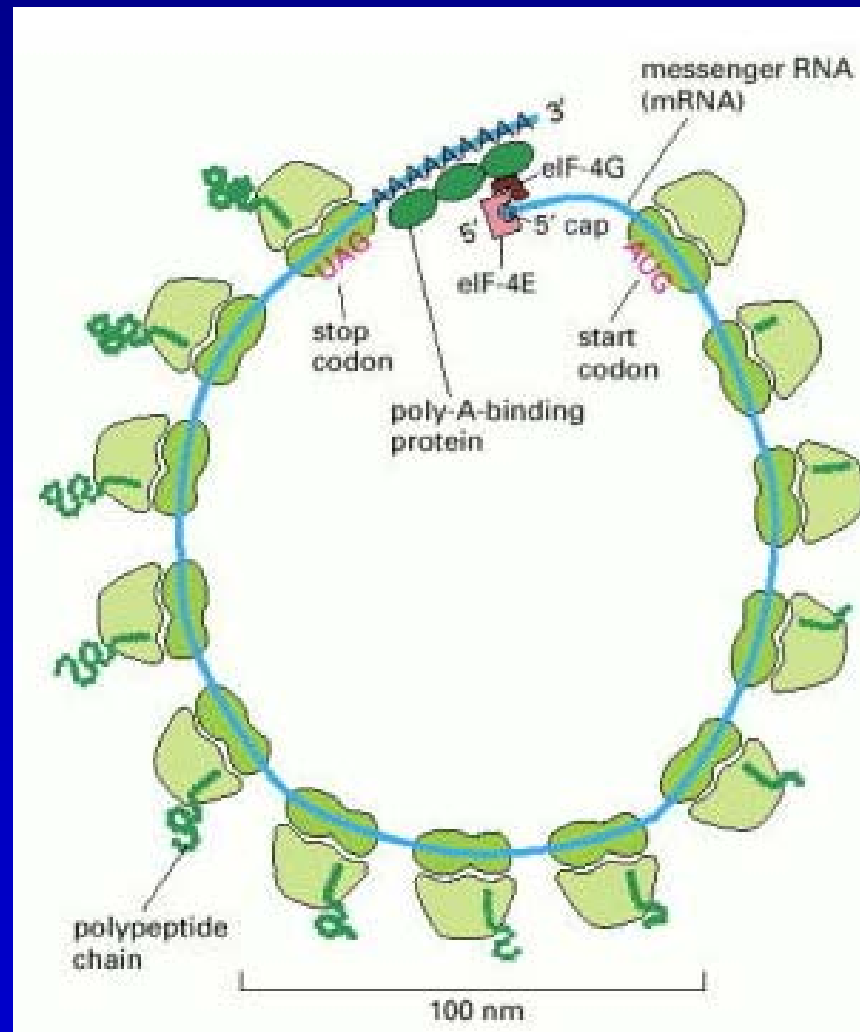
transzlációs blokk → állati miRNS
(*néha transzláció serkentés...*)

Egy tipikus eukarióta mRNS szerkezete



Forrás: Wikipedia

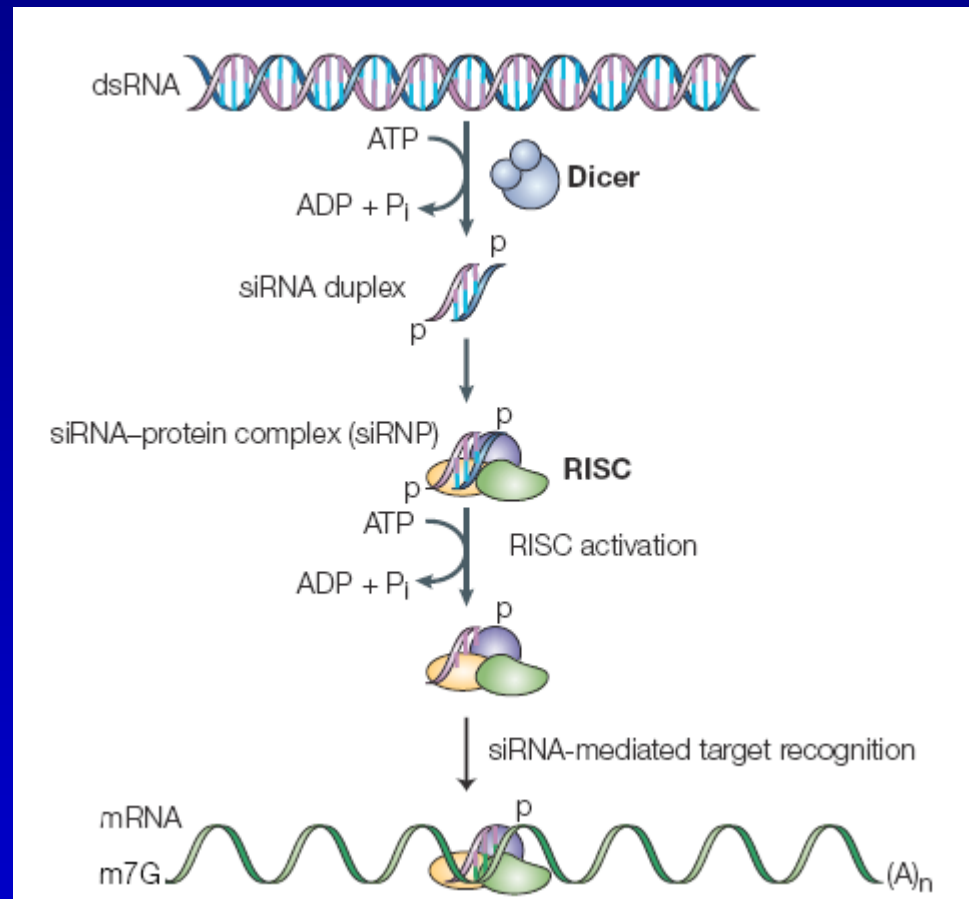
mRNS szerkezete a sejtben



Molecular Biology of the Cell, 2002, Figure 6-75.

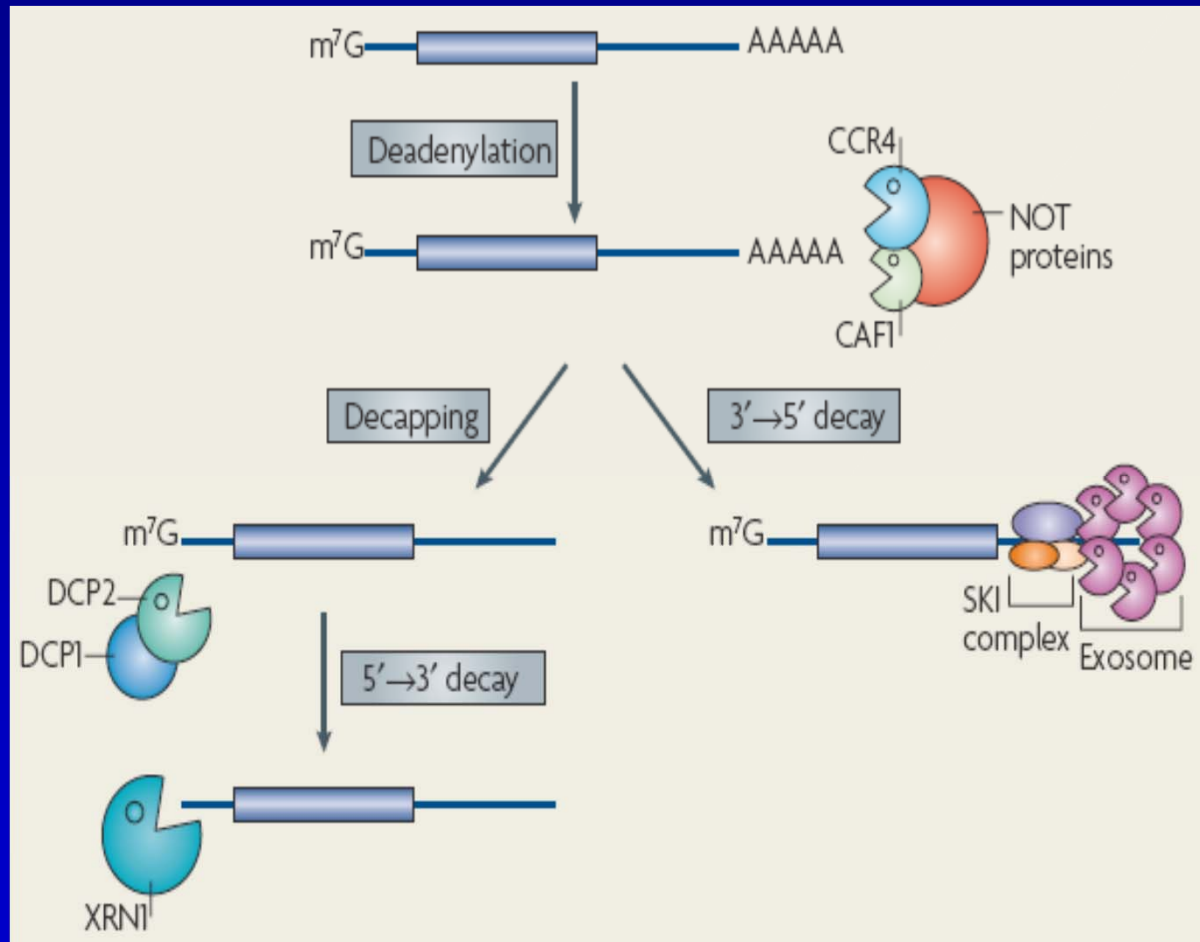
1. Az siRNS-ek világa

siRNS hatás – mRNS degradáció



Dykxhoorn et al., Nat Rev Mol Cell Biol (2003) 4:457.

mRNS lebomlási útvonalak a sejtben



Eulalio et al., Nat Rev Mol Cell Biol (2007) 8:9.

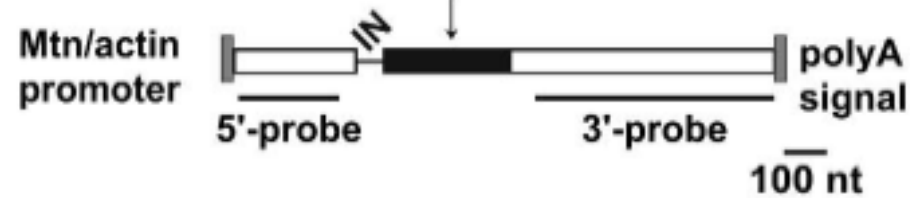
Lehetséges lebomlási útvonalak

1. Deadeniláció → 3'-5' lebomlás (exoszóma)
2. 5'-sapka eltávolítás → 5'-3' lebomlás (XRN1)
3. Lebomlás az endonukleázos hasítási ponttól
4. Speciális útvonal? (pl. RISC által)

A riporter gének szerkezete

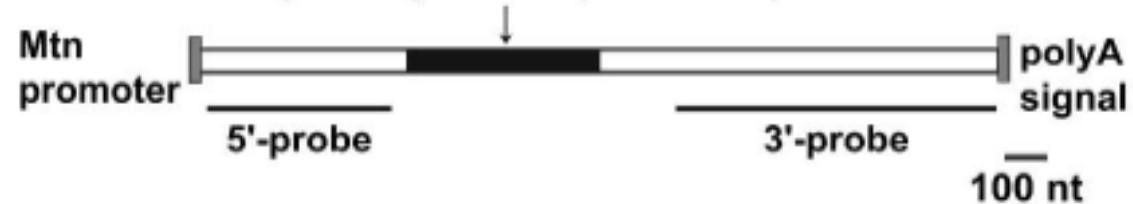
adh reporter

targeted by dsRNA (nt 284-580)

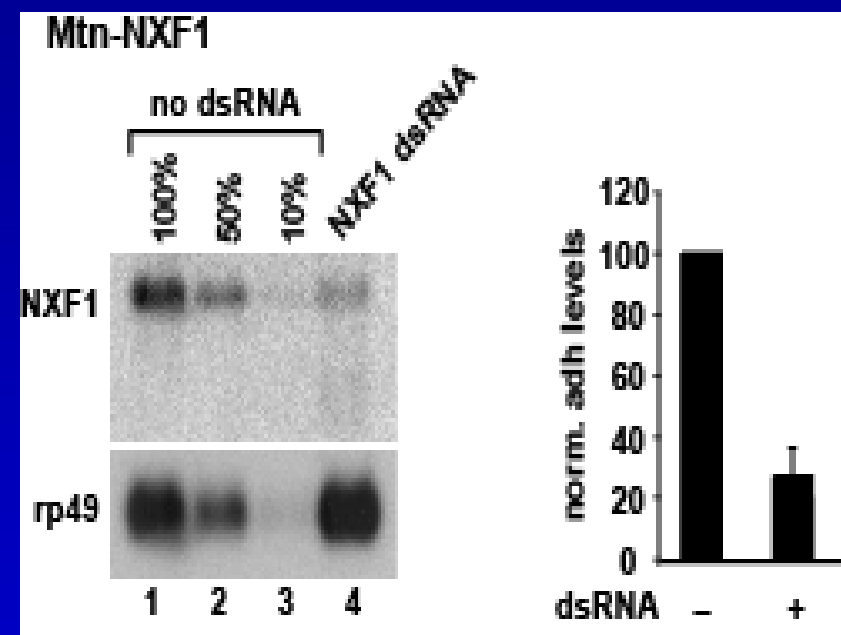
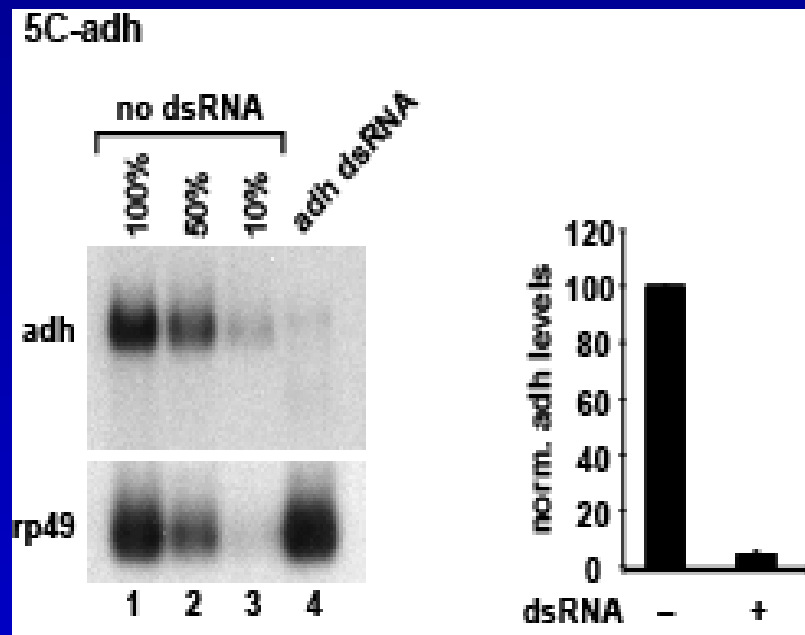


NXF1 reporter

targeted by dsRNA (nt 488-928)

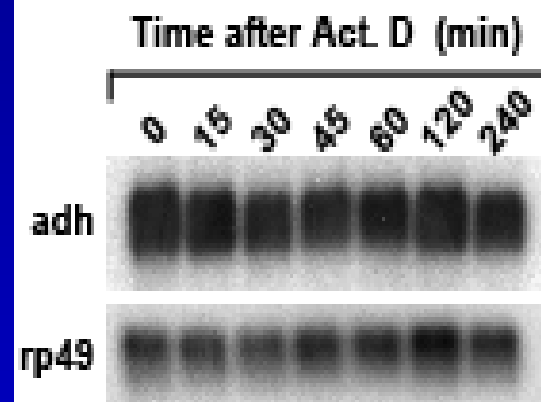


Duplaszálú RNS csökkenti a cél-mRNS szintjét

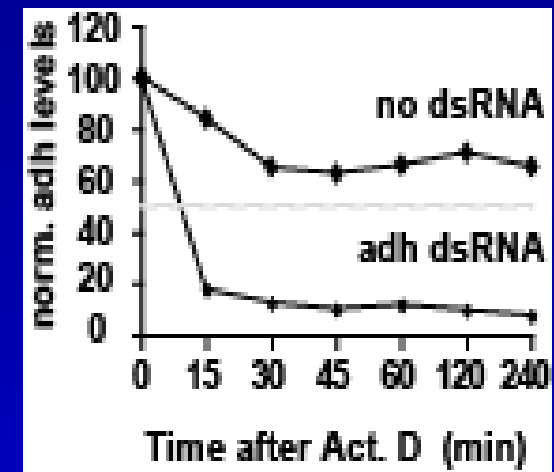
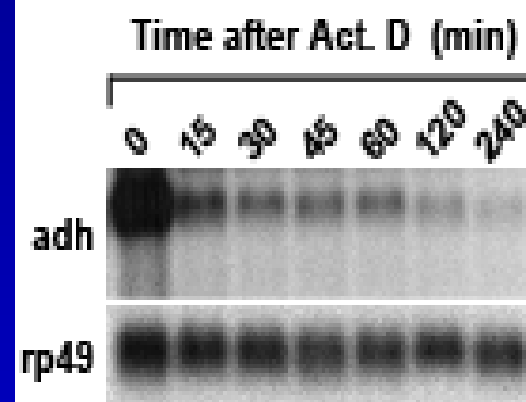


A duplaszálú RNS a mRNS fél-életidőt csökkenti

Mtn-adh, no dsRNA



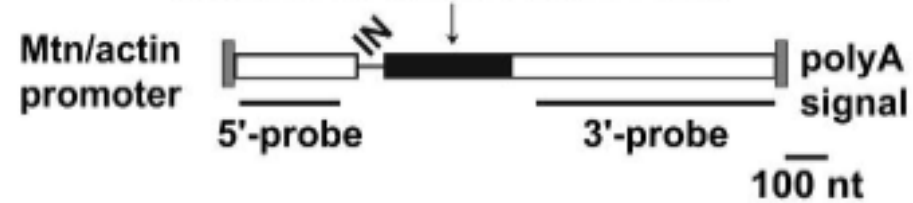
Mtn-adh + adh dsRNA



A riporter gének szerkezete

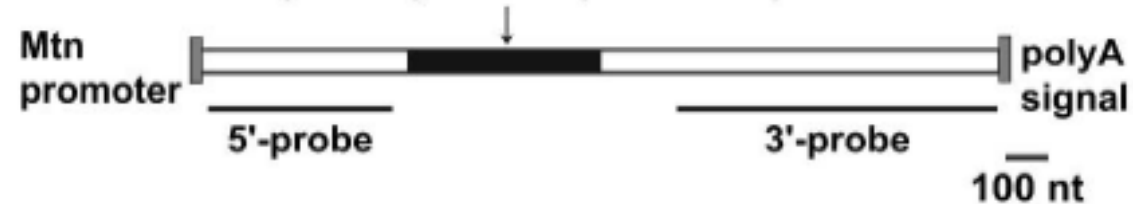
adh reporter

targeted by dsRNA (nt 284-580)

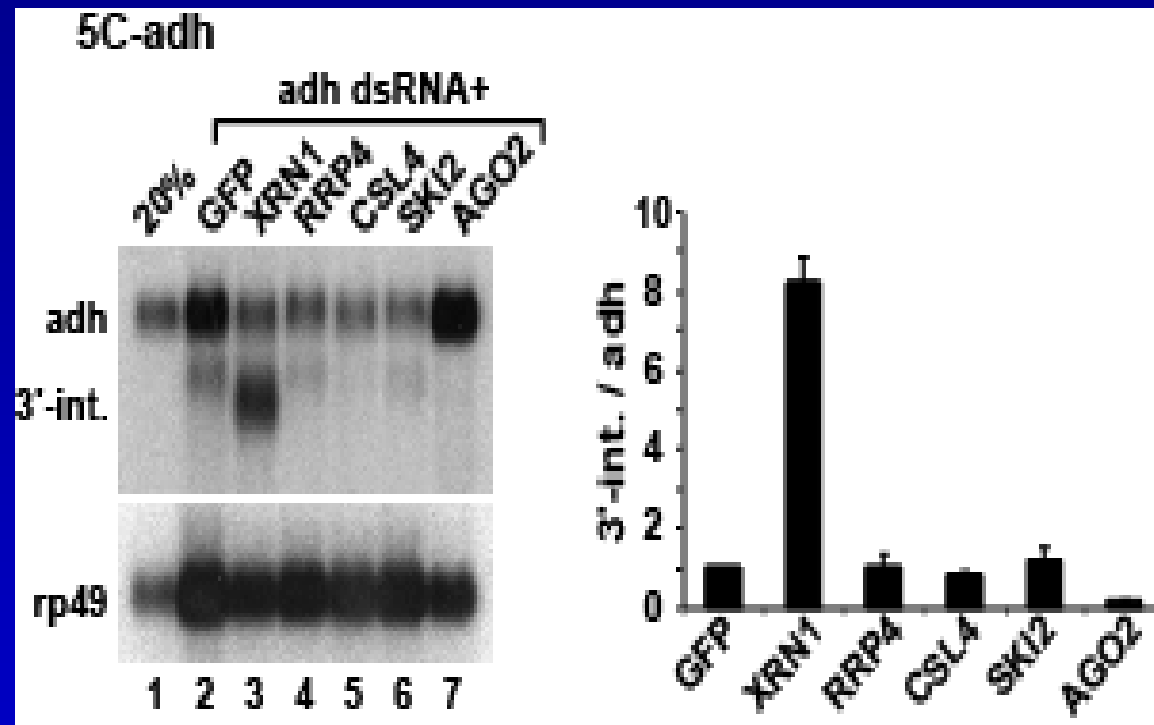


NXF1 reporter

targeted by dsRNA (nt 488-928)



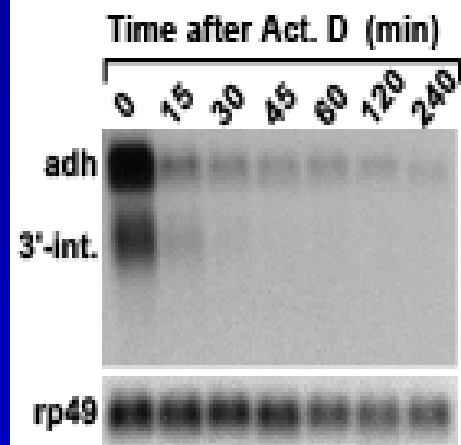
A 3'-fragmentumot az XRN1 bontja le



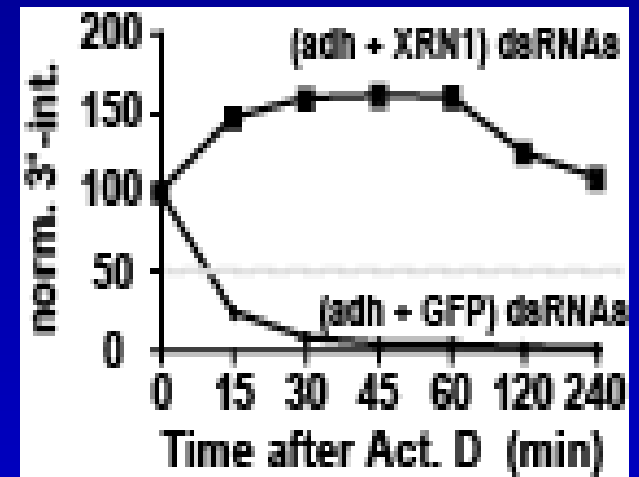
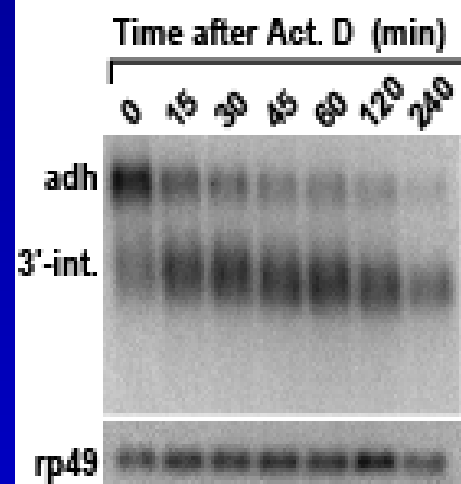
XRN1 a sejt fő 5'-3' exonukleáz enzimje

A 3'-fragmentumot az XRN1 bontja le

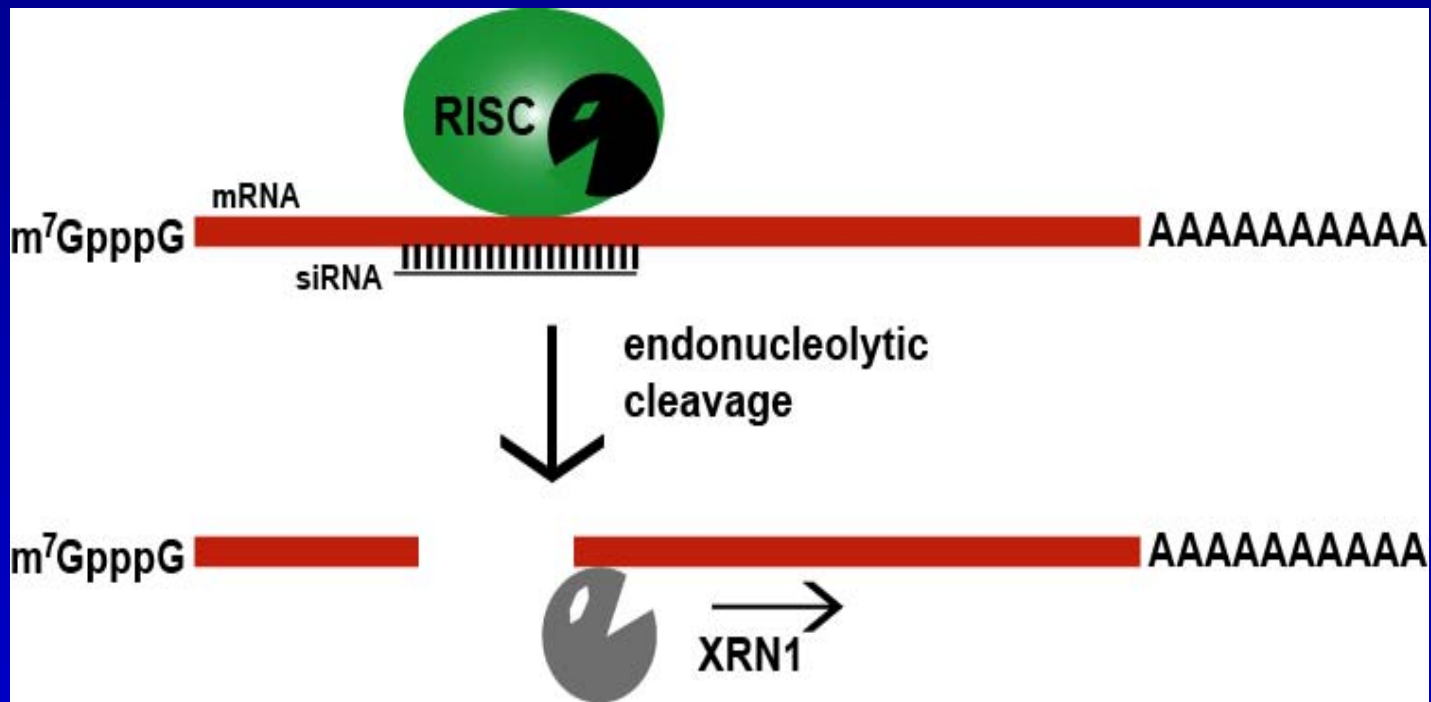
Mtn-adh + (adh + GFP) dsRNAs



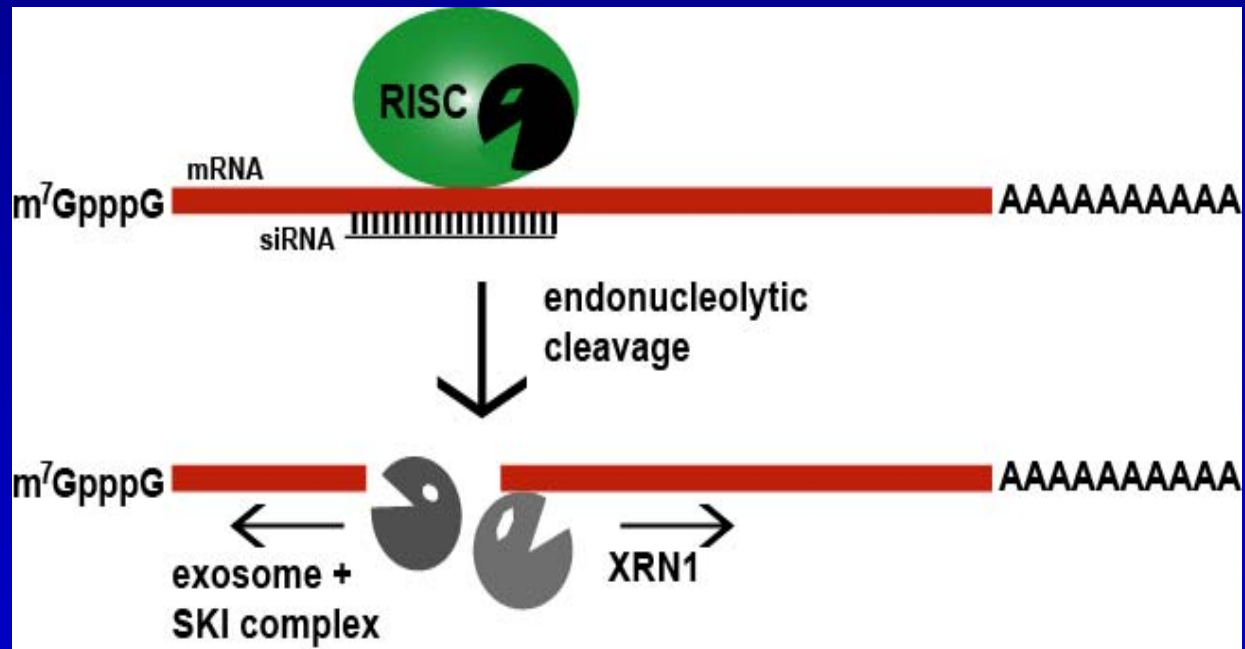
Mtn-adh + (adh + XRN1) dsRNAs



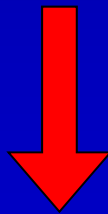
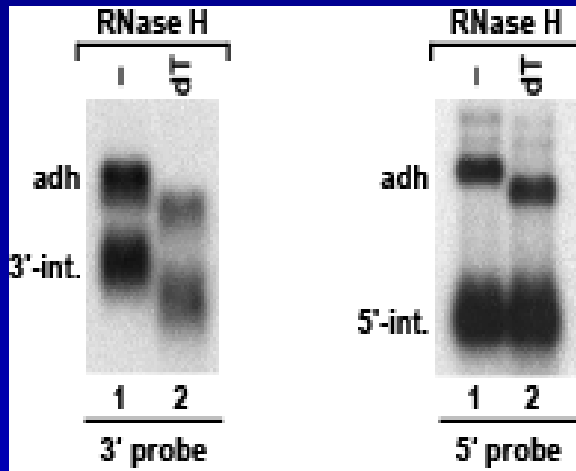
A 3'-fragmentumot az XRN1 bontja le



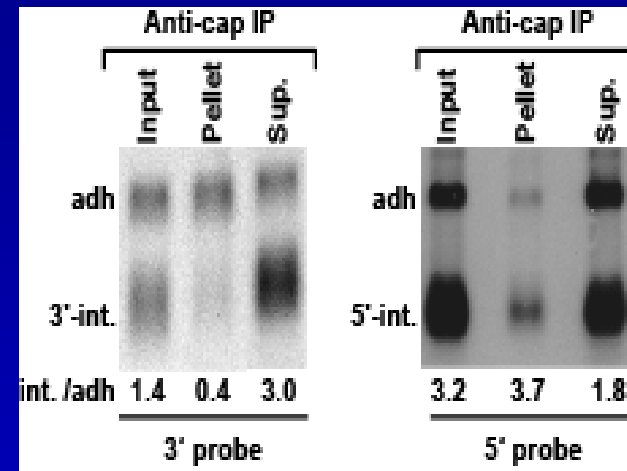
**5'-fragmentumot az exoszóma bontja le,
de a folyamathoz a Ski-komplexum is szükséges**



Más lebontási útvonalak szerepe

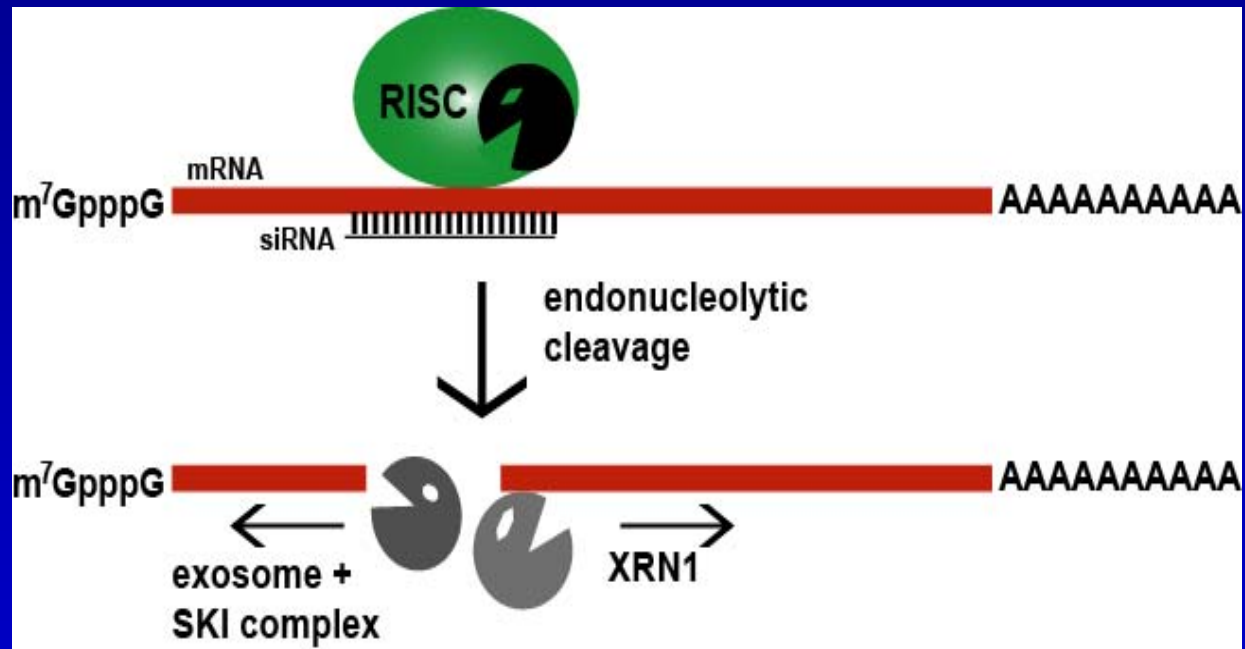


A 3'-fragmentumon megmarad
a poly(A) farok;
nincs deadeniláció.



Az 5'-fragmentumon megmarad
5'-sapka.

Az siRNS által kiváltott mRNS degradáció



Orban and Izaurralde, RNA (2005) 11:459.

Az siRNS-ek felhasználása

1. Mit jutassunk a sejtekbe? **dsRNS-t vagy siRNS-t?**

Drosophila → dsRNS

Humán → inkább siRNS-t!

(dsRNS itt: nem specifikus hatás, interferon válasz!)

2. Nem specifikus („**off target**”) hatások → **terápia!**

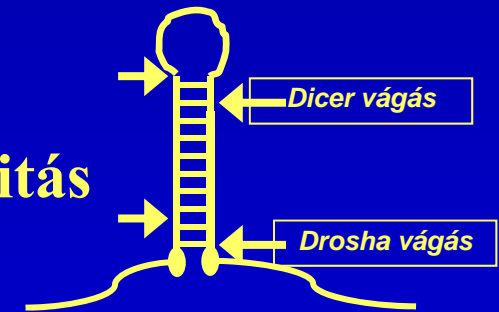
3. Hogyan/mit juttassuk be?

siRNS vagy **shRNS** (expressziós vektor)?

shRNS: miRNS-szerű, teljes komplementaritás

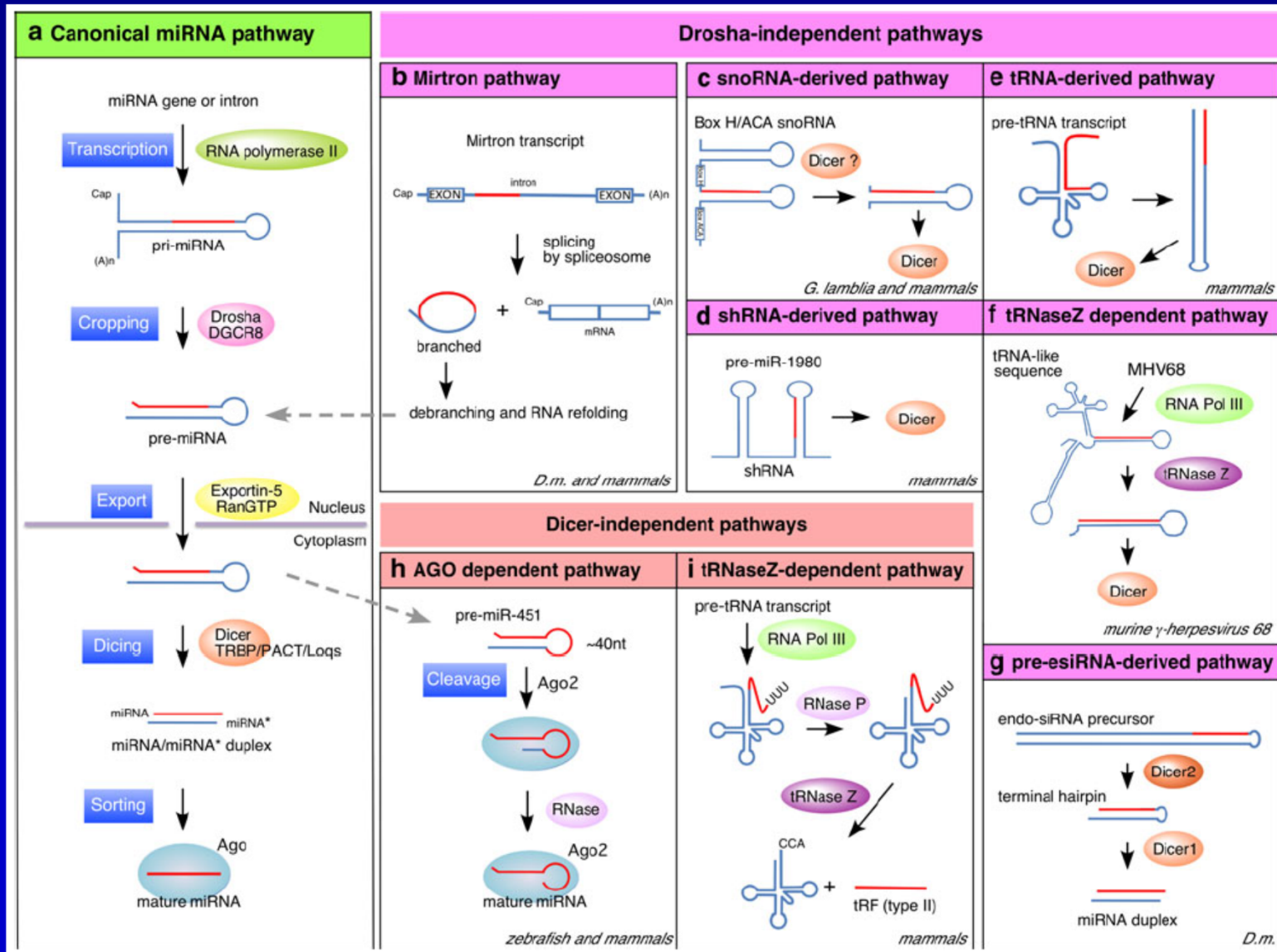
4. Hogyan mérjük **a hatást?**

RNS? Fehérje? Funkció? → Féléletidők kérdése is!



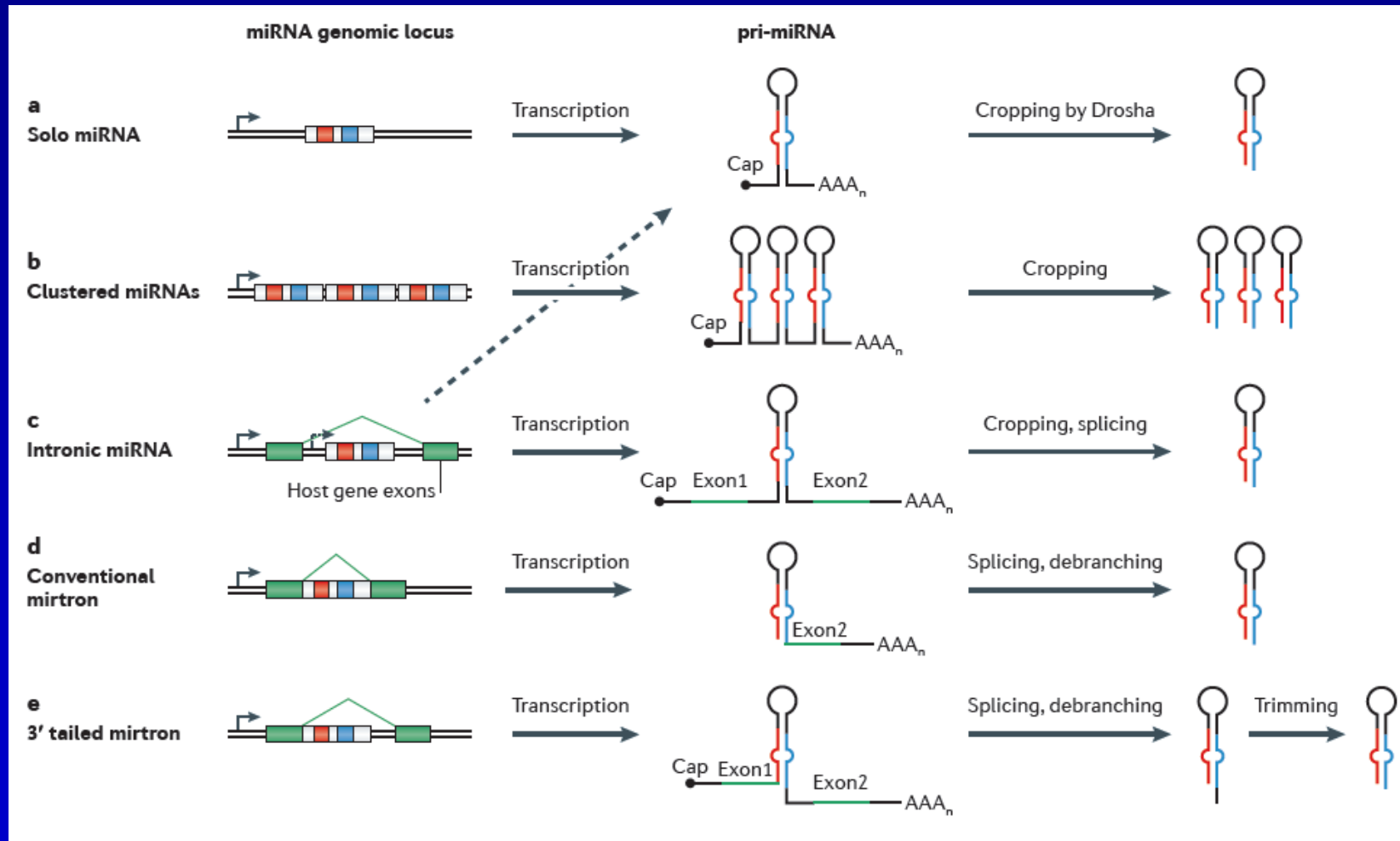
2. A miRNS-ek világa

miRNS képződés diverz világa...



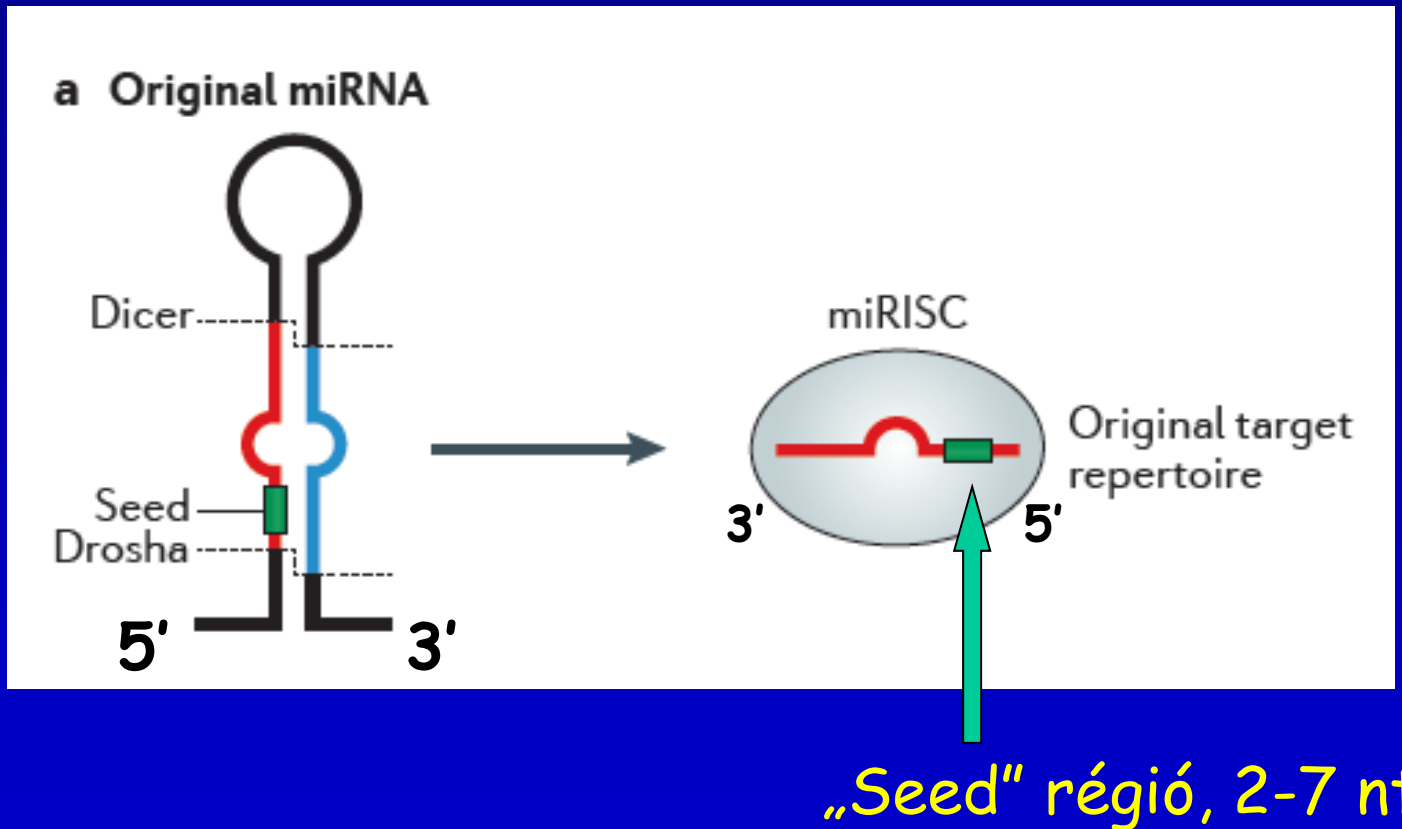
Miyoshi et al., Mol Genet Genomics (2010) 284:95.

A miRNS-ek képződése, szerkezete 1.



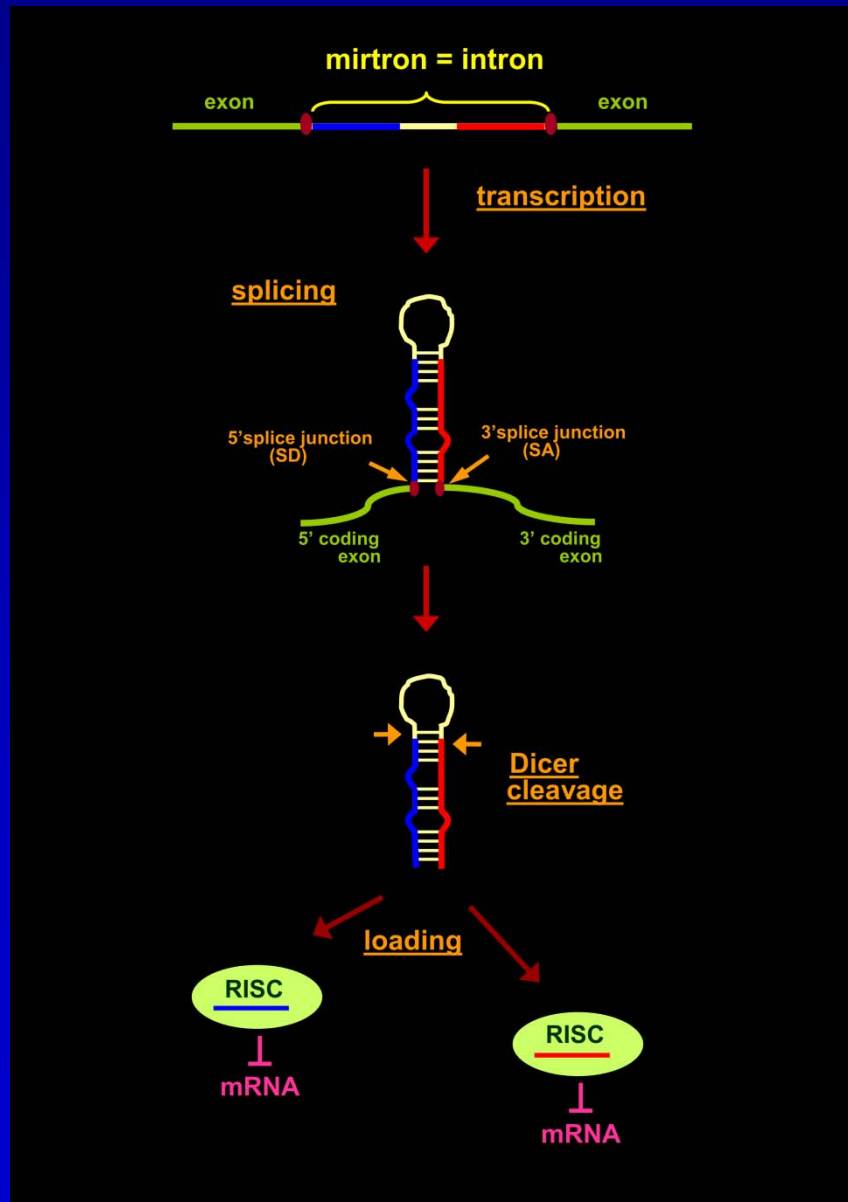
Berezikov, Nat Rev Genet (2011) 12:846.

A miRNS-ek képződése, szerkezete 2.



Berezikov, Nat Rev Genet (2011) 12:846.

A mirtronok és a pre-miRNS mindkét szála

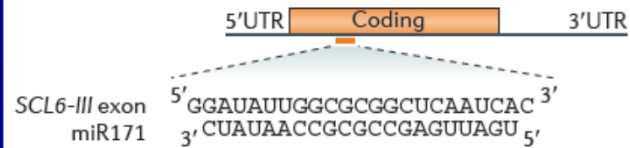


**hsa-miR-877:
emlős mirtron**

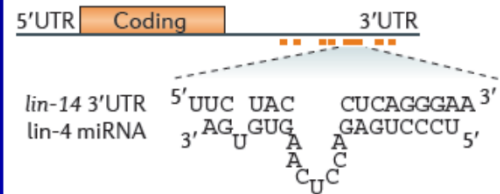
*Schamberger et al.,
RNA Biology (2012) 9:1177.*

Példák a miRNS-ek kötődésére

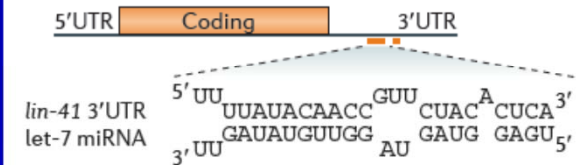
a *Arabidopsis thaliana* SCL6-III



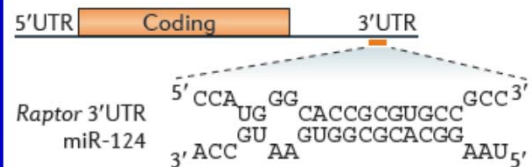
b *Caenorhabditis elegans* lin-14



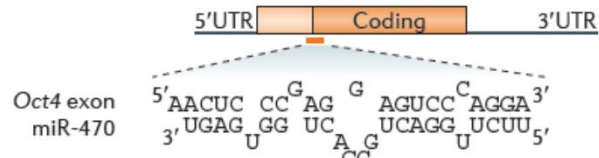
c *Caenorhabditis elegans* lin-41



d Human Raptor



e *Mus musculus* Oct4



A komplementaritás változékonysága



predikációs nehézségek!

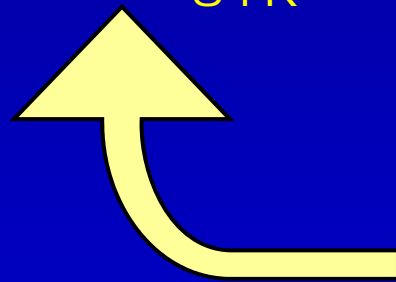
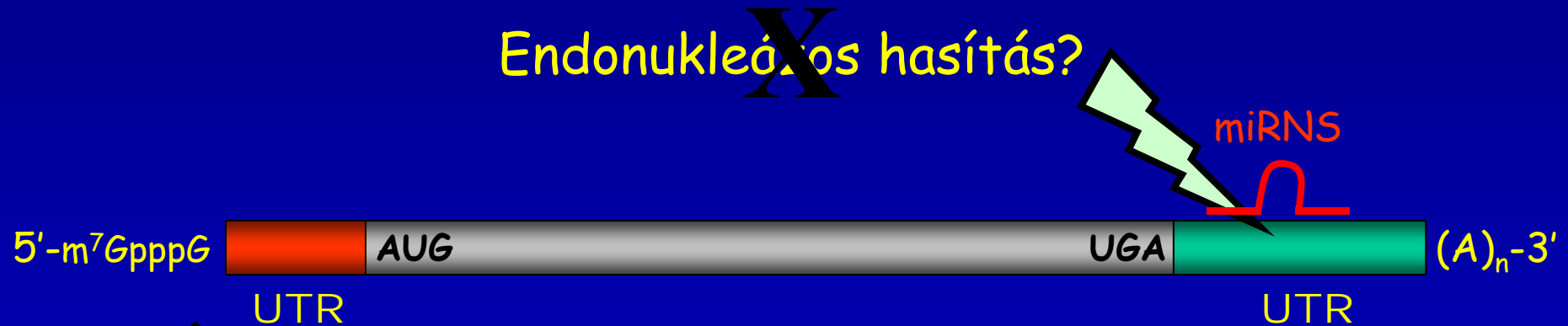
Pasquinelli, Nat Rev Genet (2012) 13:271.

A miRNS-ek effektor funkciója

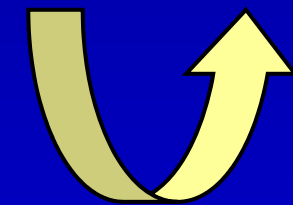
- 1. mRNS degradáció**
- 2. transzlációs gátlás a mRNS-en**

miRNS kiváltott mRNS degradáció állatokban

Endonukleázos hasítás?

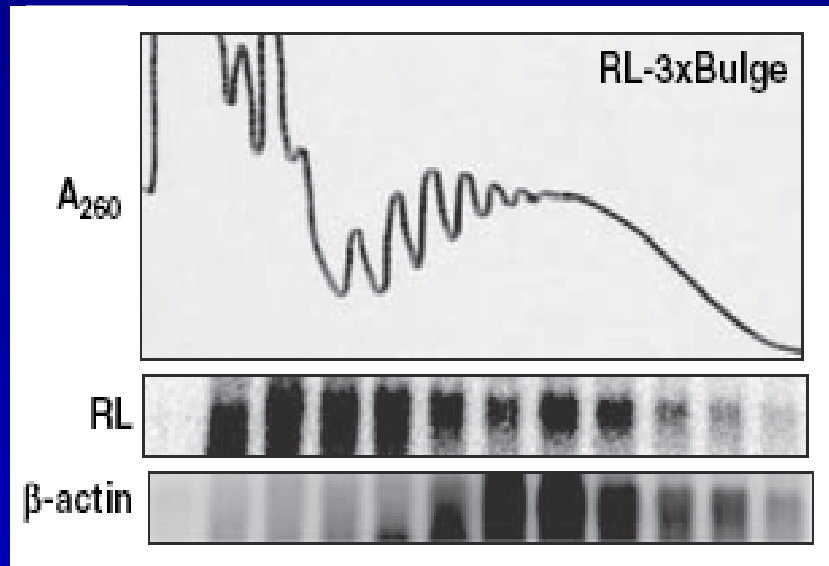


2. sapka eltávolítás
3. $5' \rightarrow 3'$ lebontás (*XRN1*?)



1. deadeniláció

miRNS-kiváltott transzláció gátlás



poliszóma grádiens

C. elegans:
let-7 miRNS jelenlétében
a riporter (RL) eltolódik a
monoszómák irányába



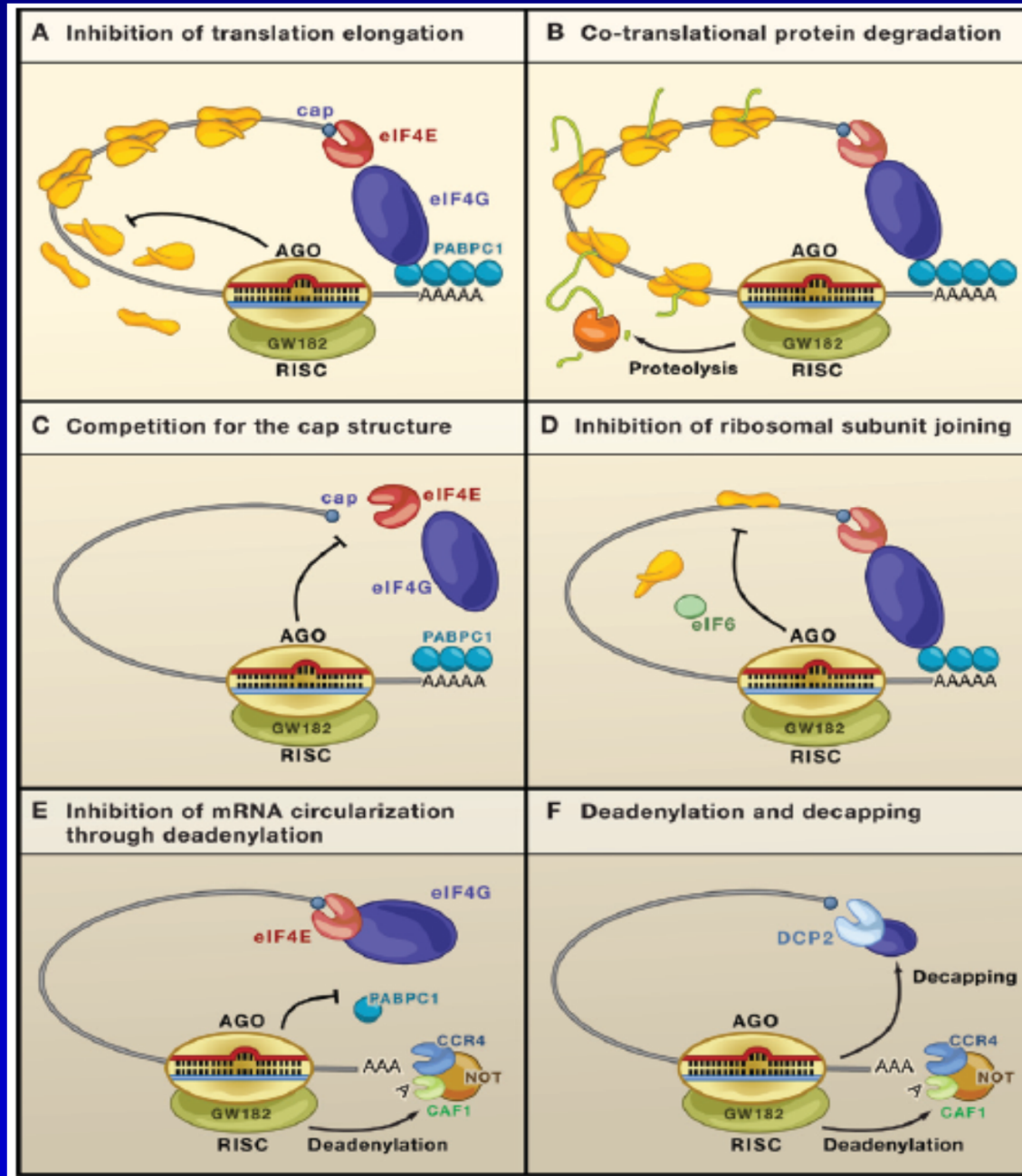
transzláció iniciáció gátlás

Pillai et al., Science (2005) 309:1573.

miRNS-kiváltott transzláció gátlás

...és még más mechanizmusok...





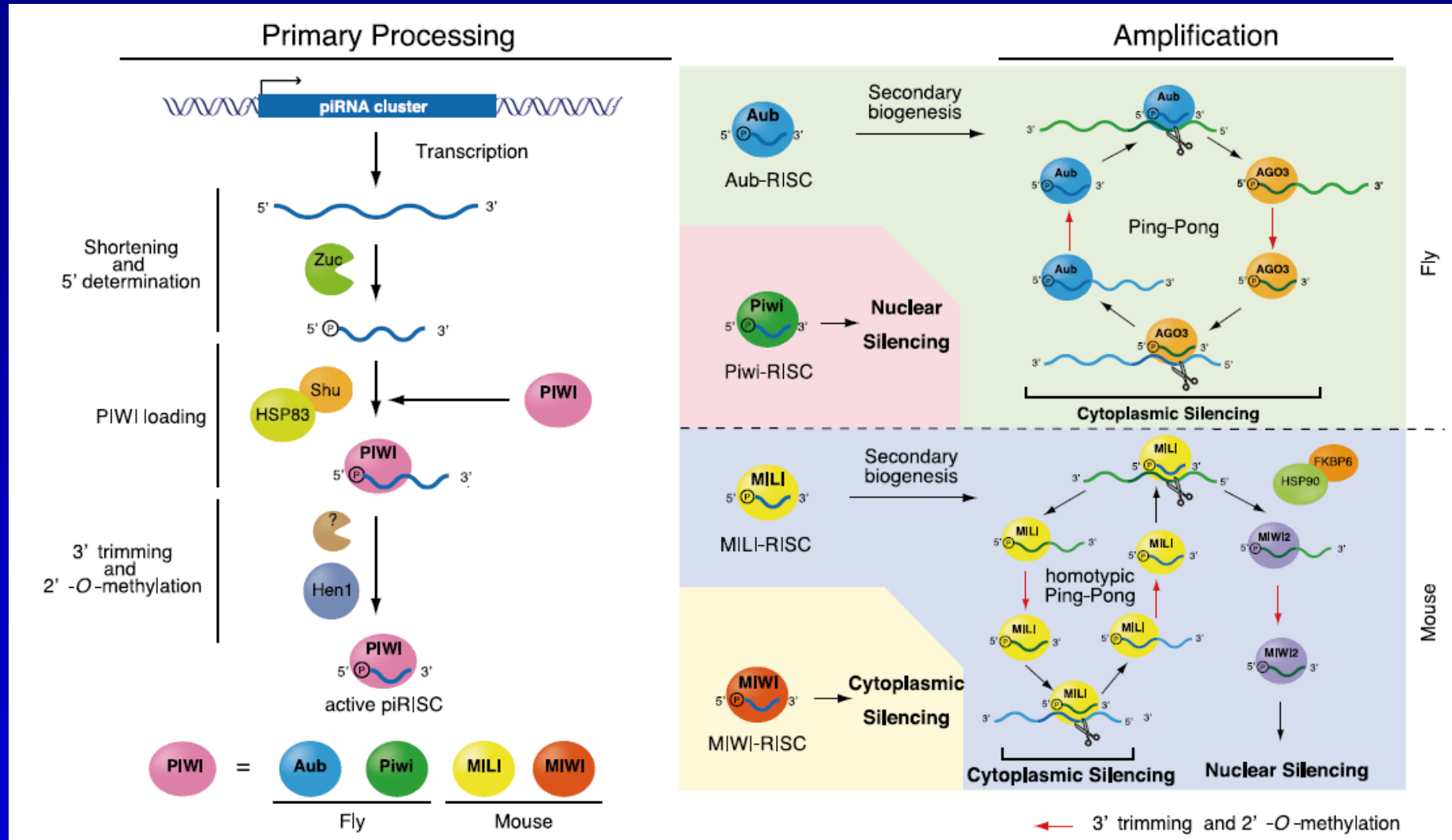
Eulalio et al., Cell (2008) 132:9.

3. A piRNS-ek világa

RNS interferencia: a piRNS-ek világa

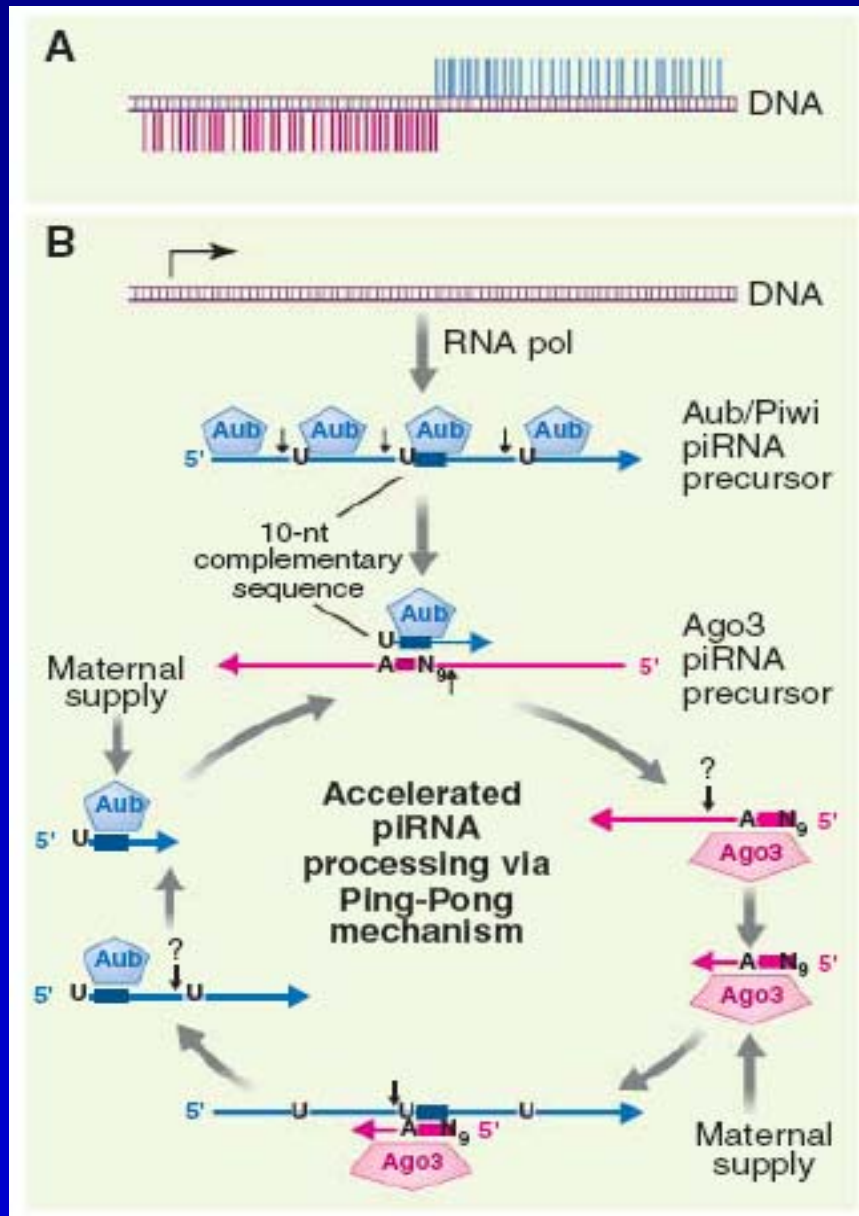
- nagyobb méret (~24-31 nt)
- más „Argonauták”, a Piwi-család:
Piwi, Aub, Ago3 (*Drosophila melanogaster*)
- ált. egy hosszú RNS prekurzorról képződnek
- főleg a csíravonal sejtjeiben expresszálódnak
- a csírasejtek („germline”) genomialis védelme
- védelem transzpozonok ellen

piRNS-ek képződése: kétféle út



Ishizu et al., Genes Dev (2012) 26: 2361

A flamenco és a ping pong...



„flamenco” lókuszt:

→ ahová >1,5 millió piRNS
térképezhető!

→ retrotranszpozonokat szabályoz
(pl. *gypsy*, *ZAM*, *Idefix*)

Lin, H., Science
(2007) 316:397.

Újdonságok a piRNS-ekről

1. Szex determináció (*Bombyx mori* lepkefaj)
2. Saját – nem saját megkülönböztetés (*C. elegans*)
3. PIWI-piRNS-ek szerepe a memória folyamatokban (*Aplysia*)
4. Fokozott PIWI expresszió daganatsejtekben??