

Az RNS interferencia effektor mechanizmusai

Orbán Tamás

Génreguláció Kutatócsoport



ELKH

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)

RNS interferencia – Nobel-díj, 2006

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

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

* Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA

† Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA

‡ Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA

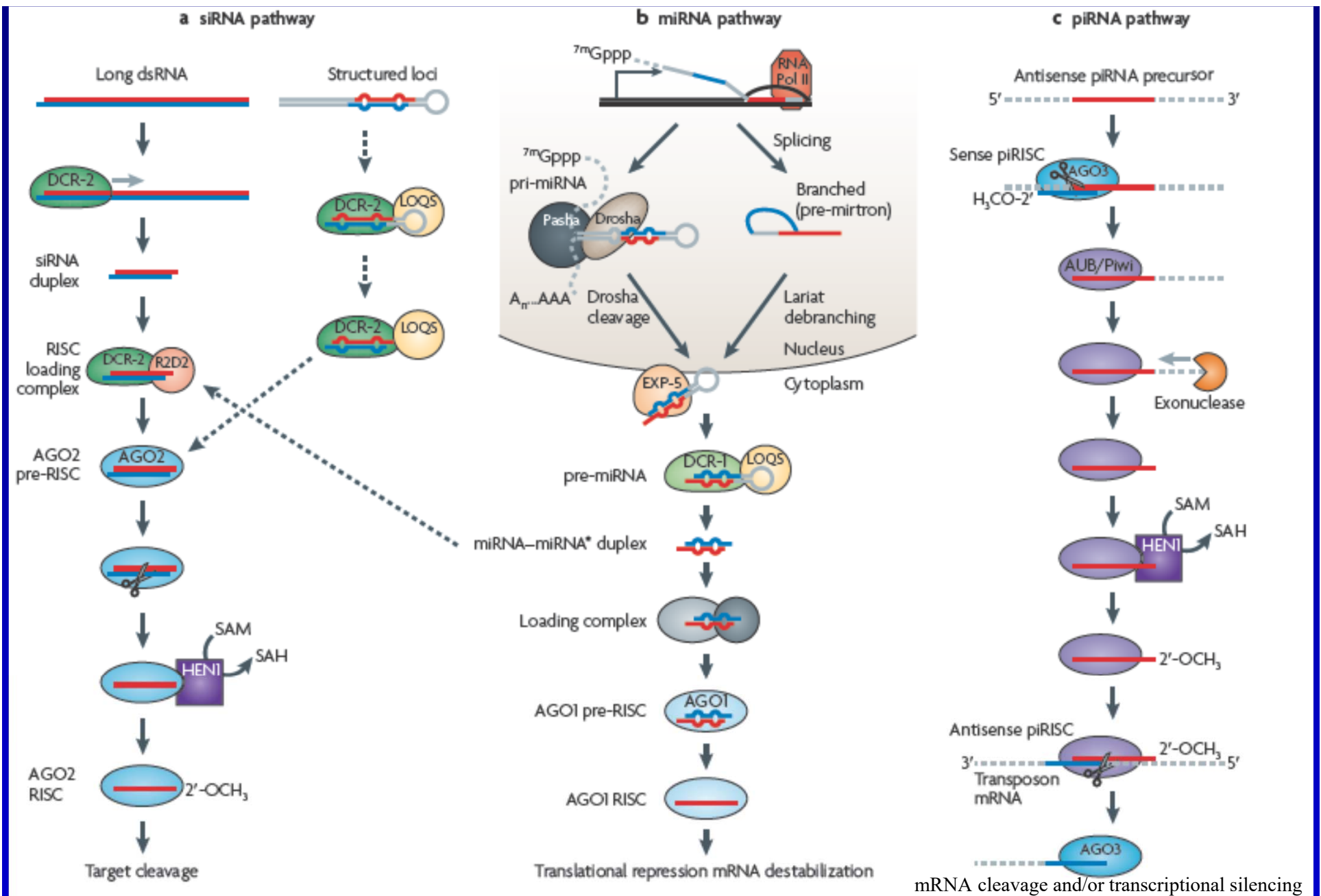
Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene^{1,2}. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression^{3,4}. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous



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 fehérjecsalád egy képviselőjével
- RISC: poszttranszkripció csendesítés
 - RITS: transzkripció csendesítés → „klasszikus” epigenetika
 - siRNS / miRNS / piRNS /... → állati szervezetek

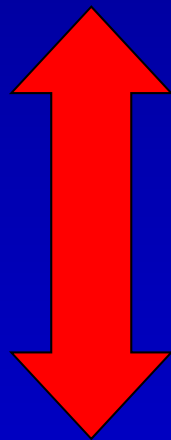


Ghildiyal and Zamore, Nat Rev Genet (2009) 10:94.

A mechanizmusok részletesen...

RNAi - Poszt-transzkripciós hatások

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

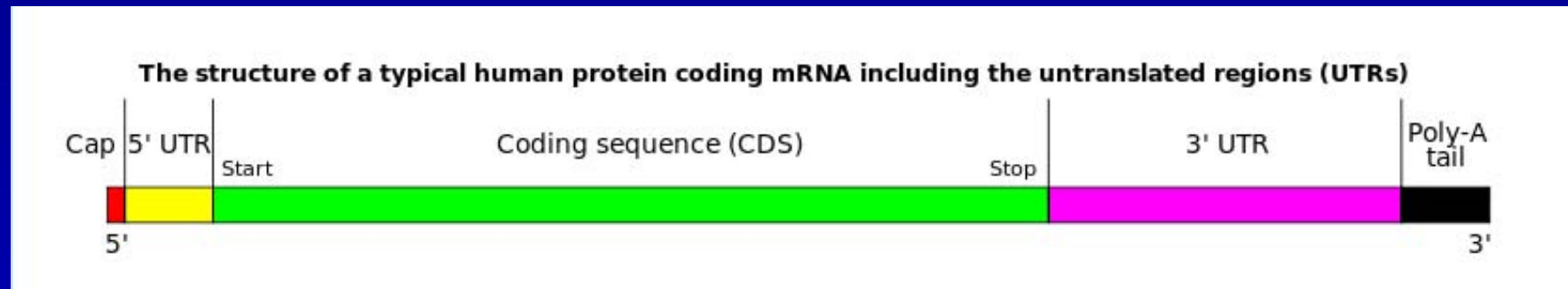


Mitől függ? :

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

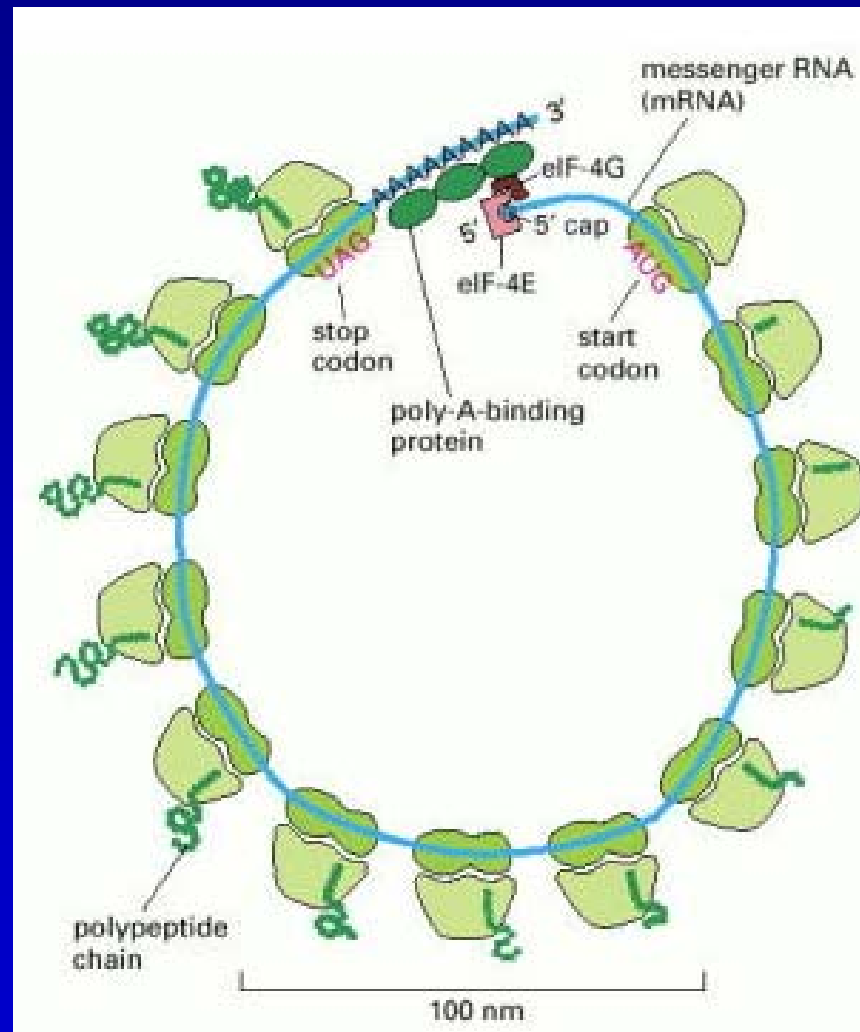
transzlációs blokk → állati miRNS
(*van példa transzláció serkentésre...*)

Egy tipikus eukarióta mRNS szerkezete



Forrás: Wikipedia

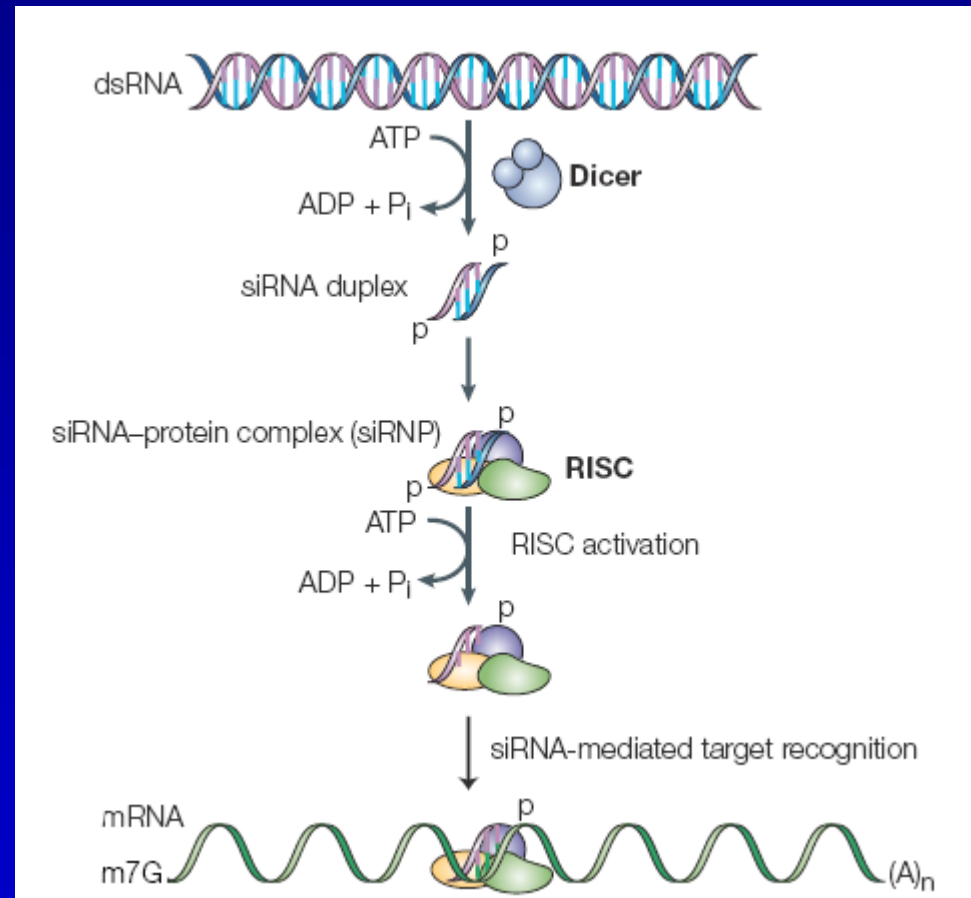
mRNS szerkezete a sejtben



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

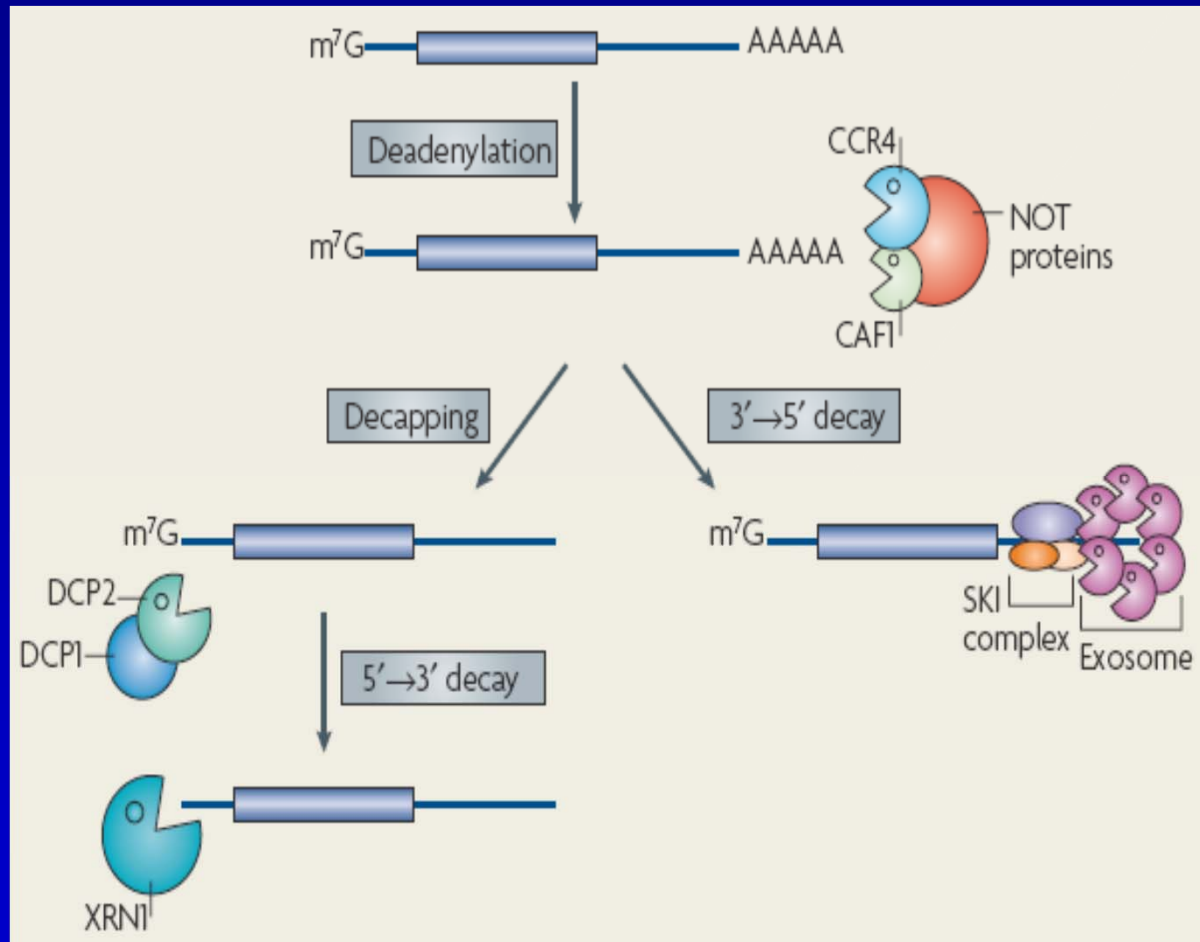
1. Az siRNS-ek világa

siRNS hatás – mRNS degradáció



Dyxhoorn 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.

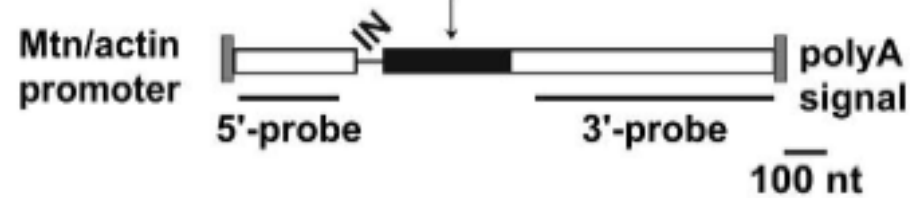
Lehetséges lebomlási útvonalak

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

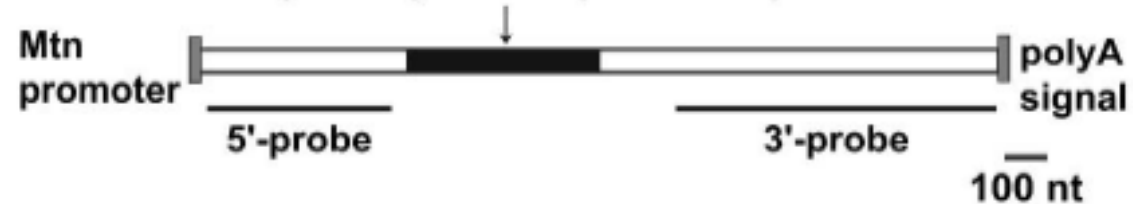
adh reporter

targeted by dsRNA (nt 284-580)

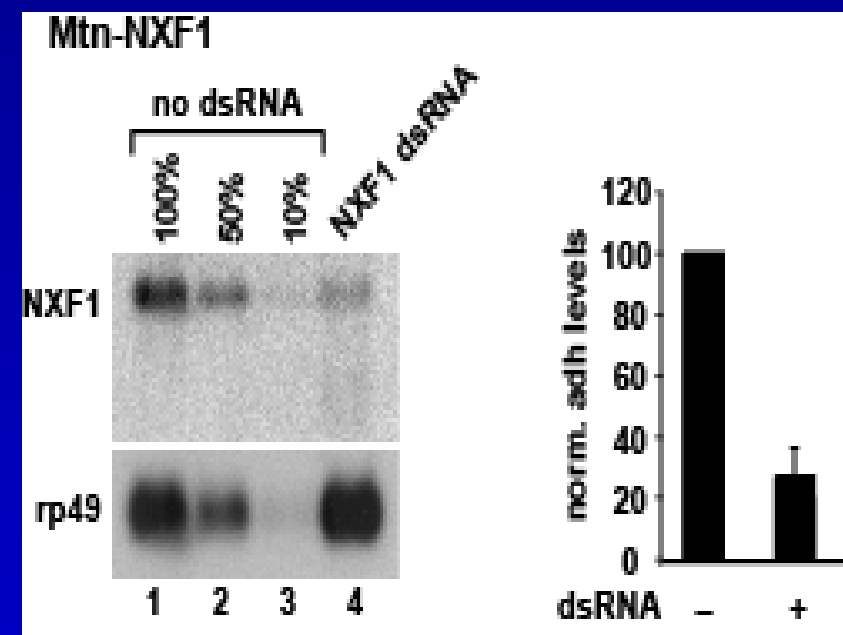
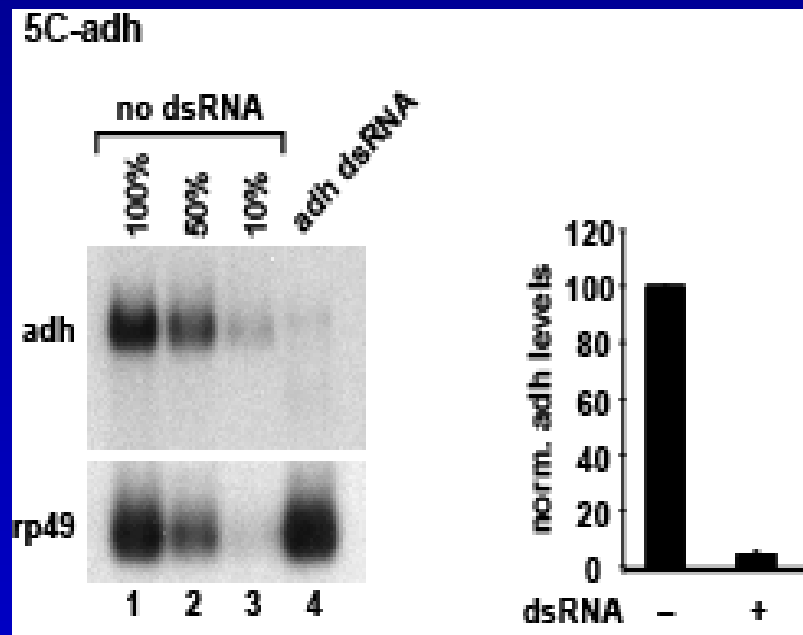


NXF1 reporter

targeted by dsRNA (nt 488-928)

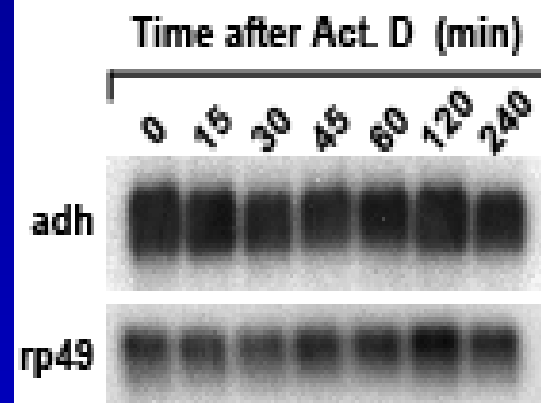


Duplaszálú RNS csökkenti a cél-mRNS szintjét

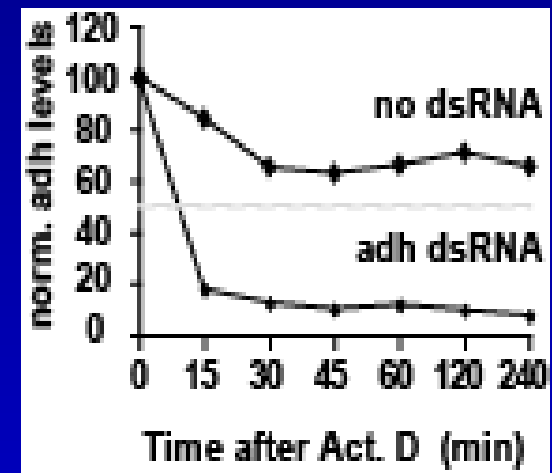
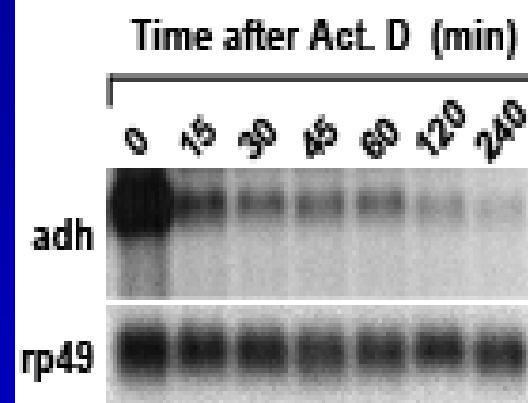


A duplaszálú RNS a mRNS fél-életidőt csökkenti

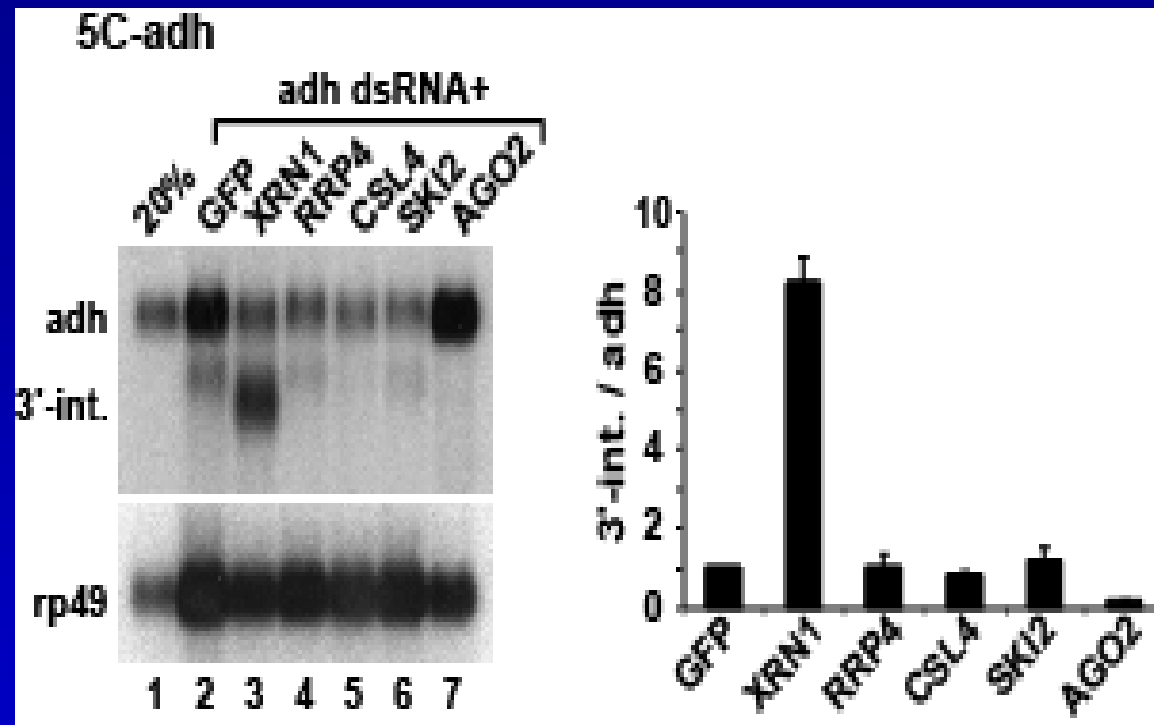
Mtn-adh, no dsRNA



Mtn-adh + adh dsRNA



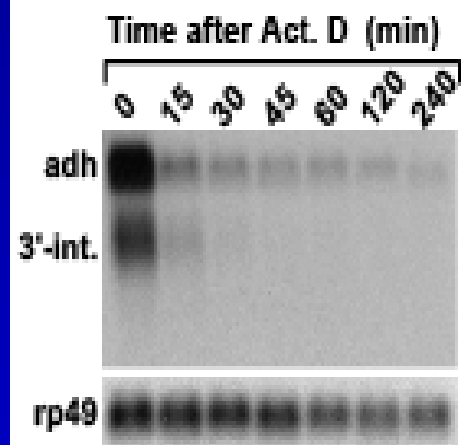
A 3'-fragmentumot az XRN1 bontja le



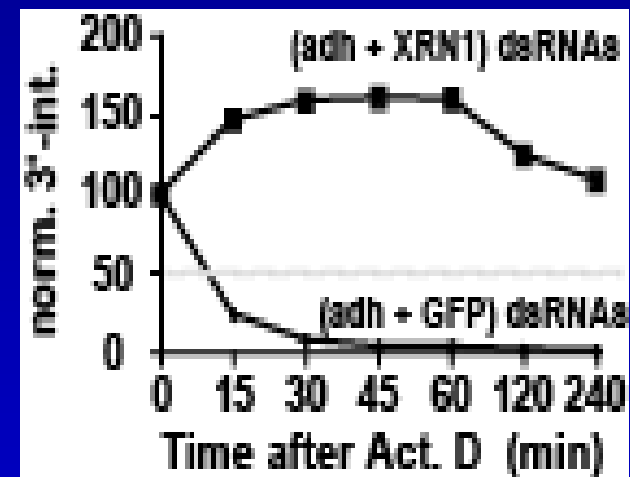
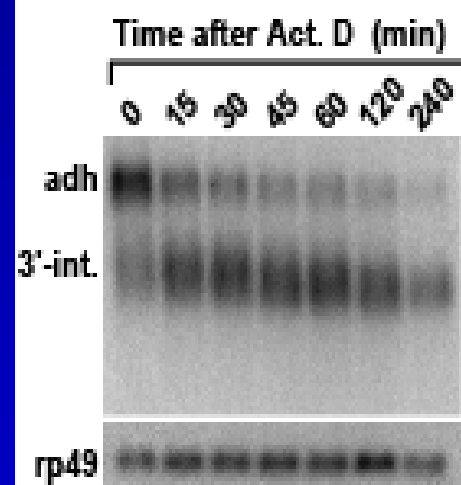
XRN1 a sejt fő 5'-3' exonukleáz enzimje

A 3'-fragmentumot az XRN1 bontja le

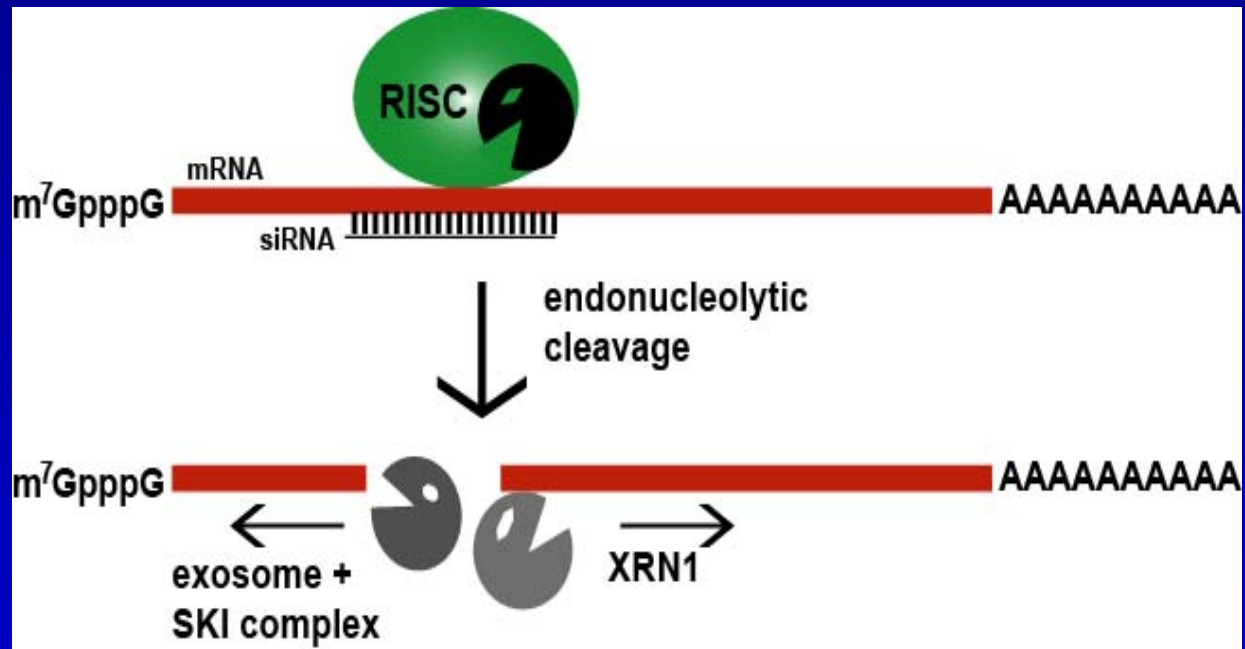
Mtn-adh + (adh + GFP) dsRNAs



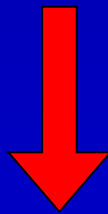
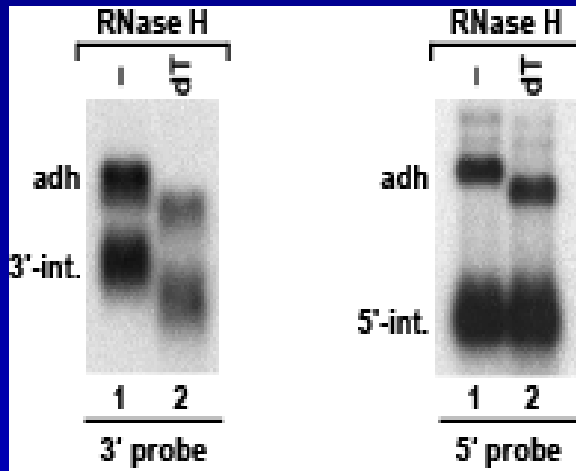
Mtn-adh + (adh + XRN1) dsRNAs



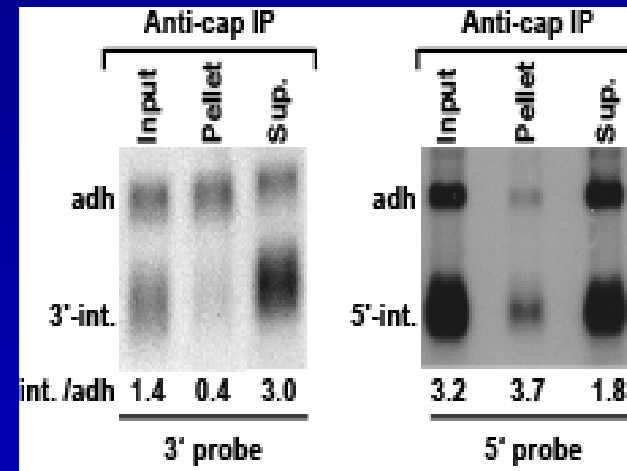
A célzott mRNS lebomlásának részletei



Más lebontási útvonalak szerepe

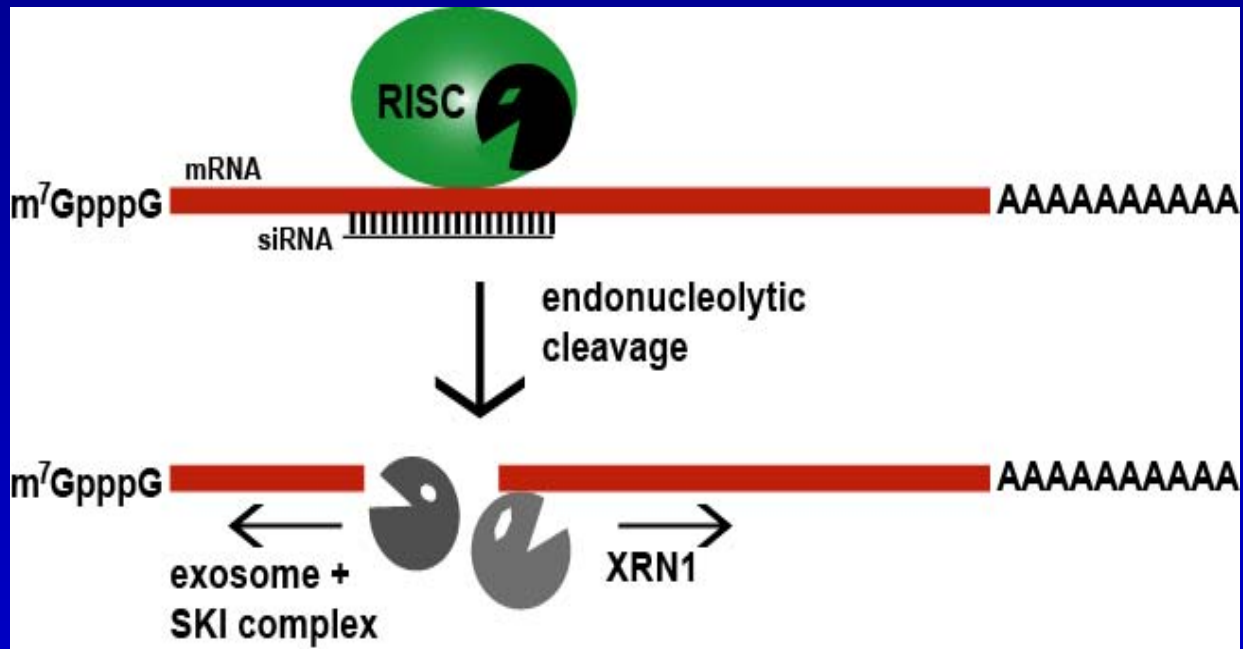


A 3'-fragmentumon megmarad
a poly(A) farok;
nincs deadeniláció.



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!**

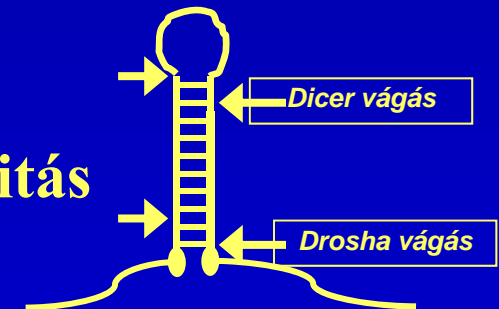
3. Hogyan/mit juttassuk be?

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

shRNS: miRNS-szerű, teljes komplementaritás

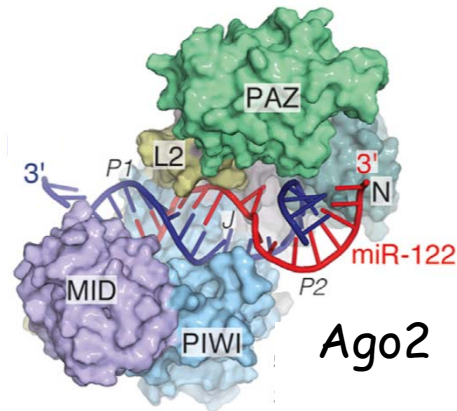
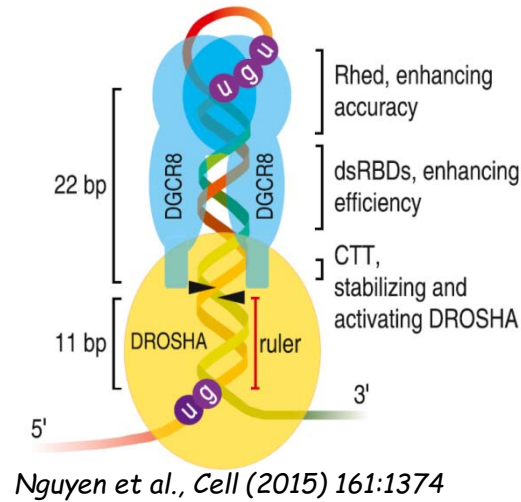
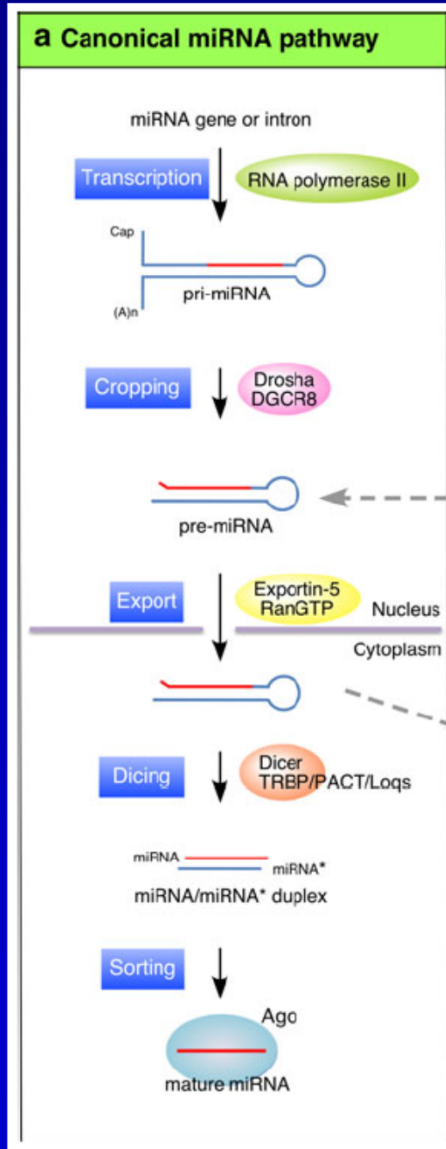
4. Hogyan mérjük **a hatást?**

RNS? Fehérje? Funkció? → Féléletidők kérdése is!

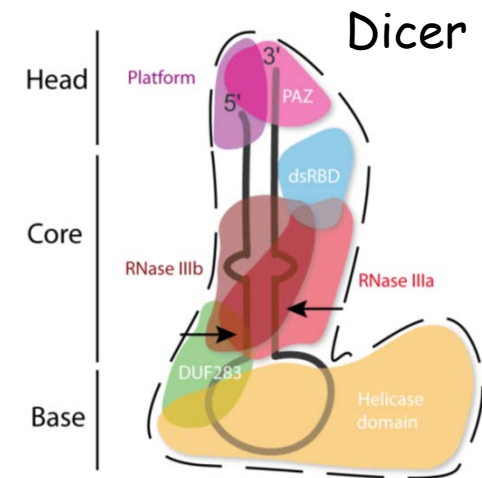


2. A miRNS-ek világa

miRNS képződés diverz világa...

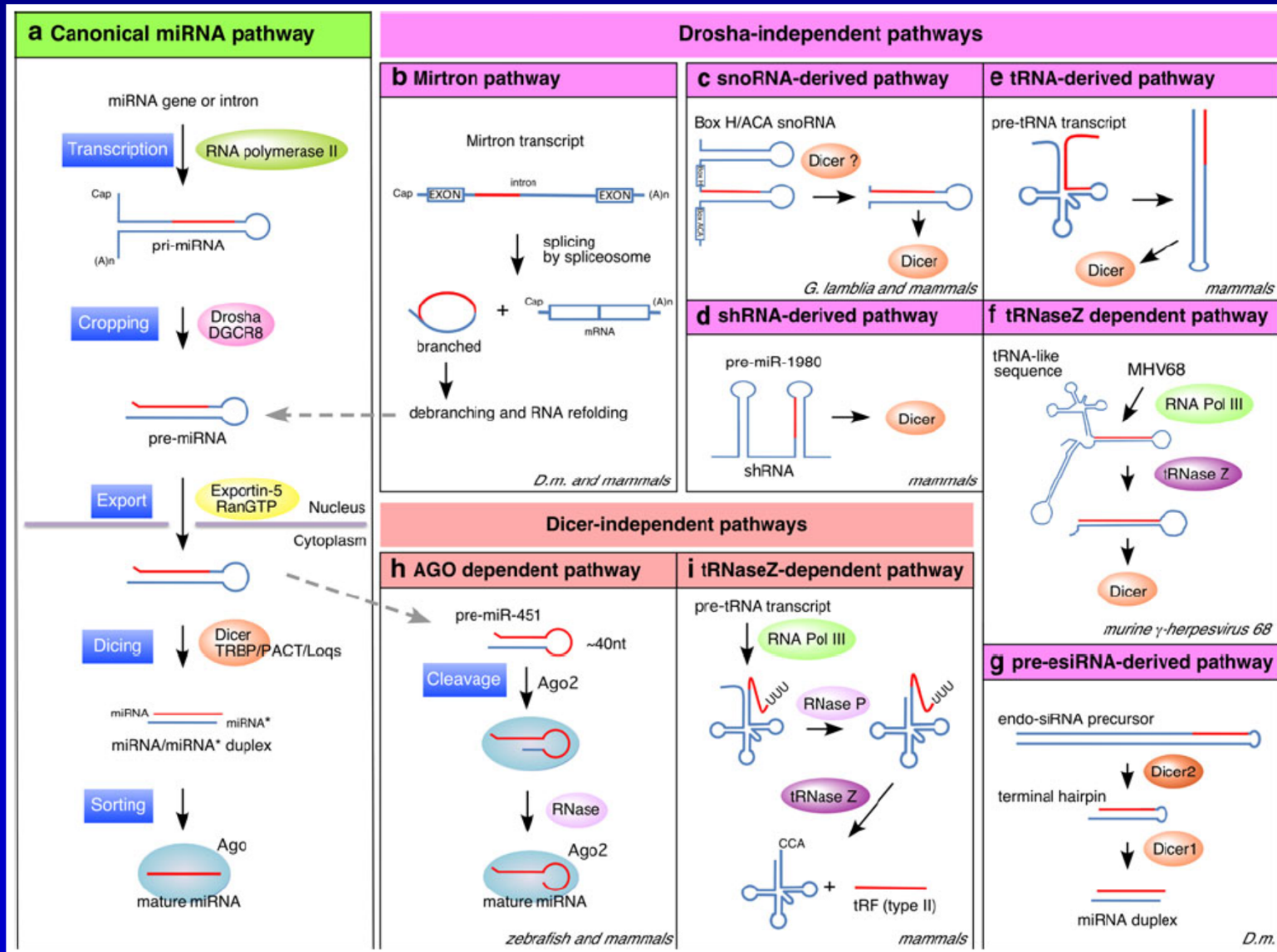


Sheu-Gruttadauria et al., Mol Cell (2019) 75:1243



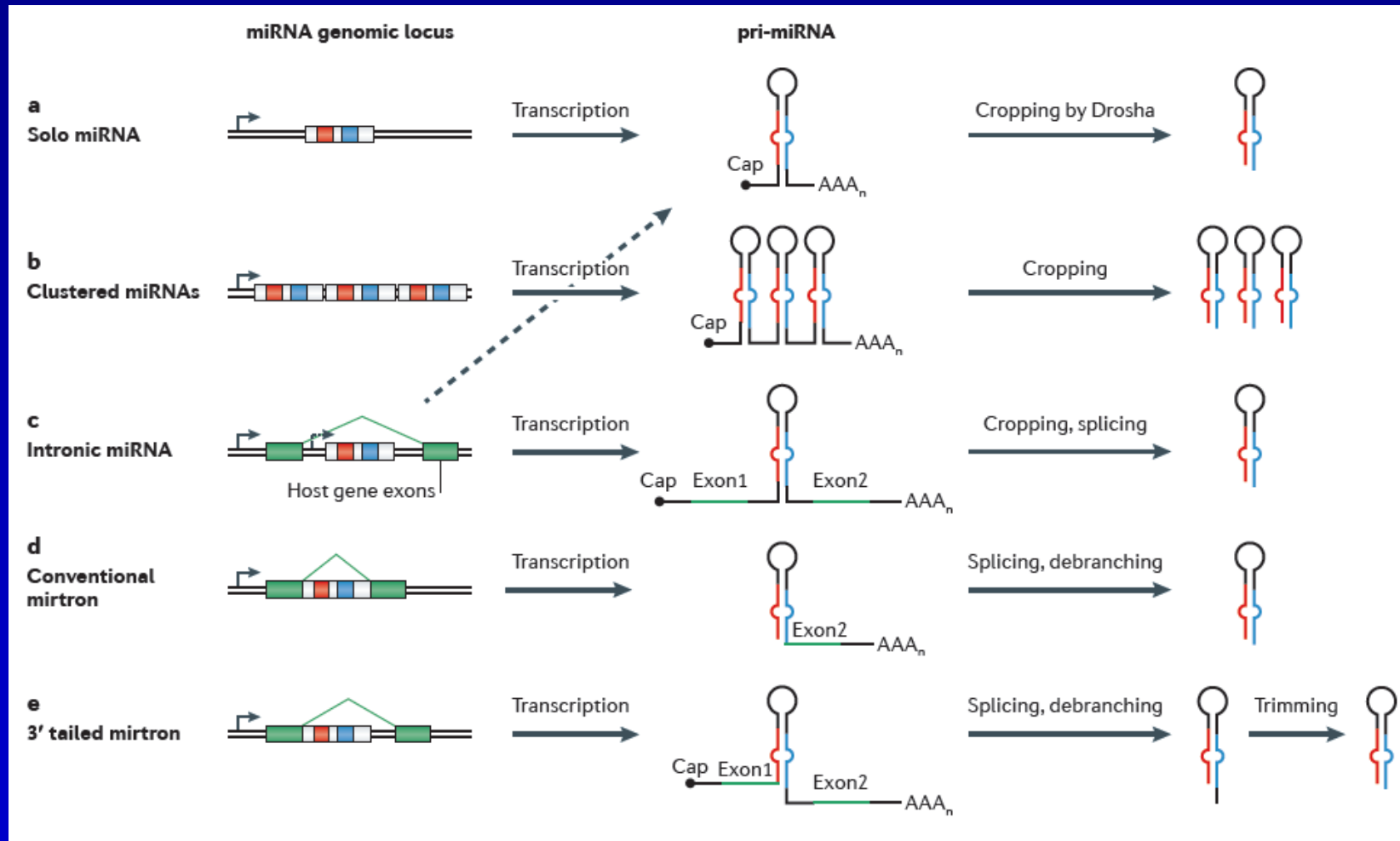
Ciechanowska et al., Int J Mol Sci (2021) 22:616

miRNS képződés diverz világa...



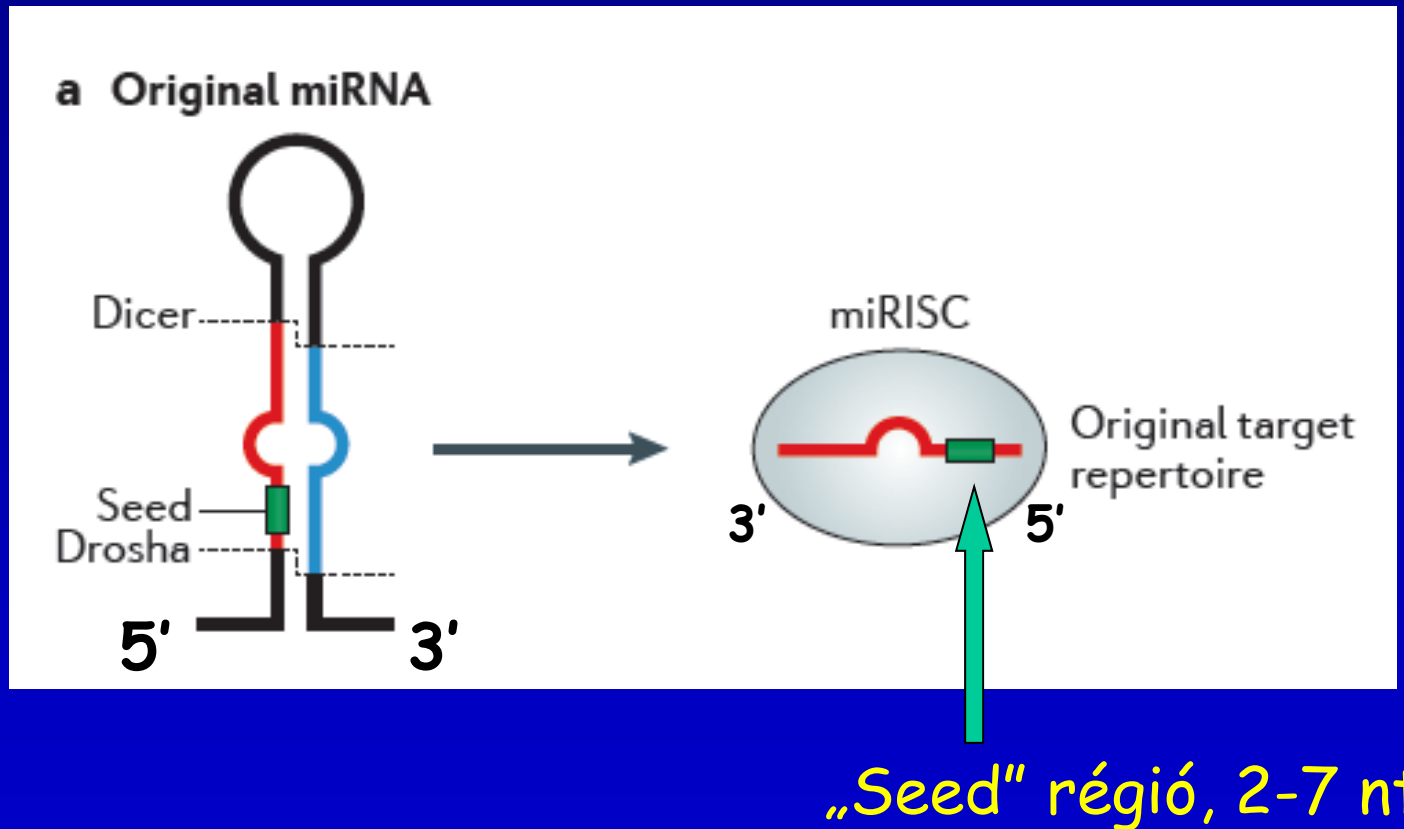
Miyoshi et al., Mol Genet Genomics (2010) 284:95.

A miRNS-ek képződése, szerkezete 1.



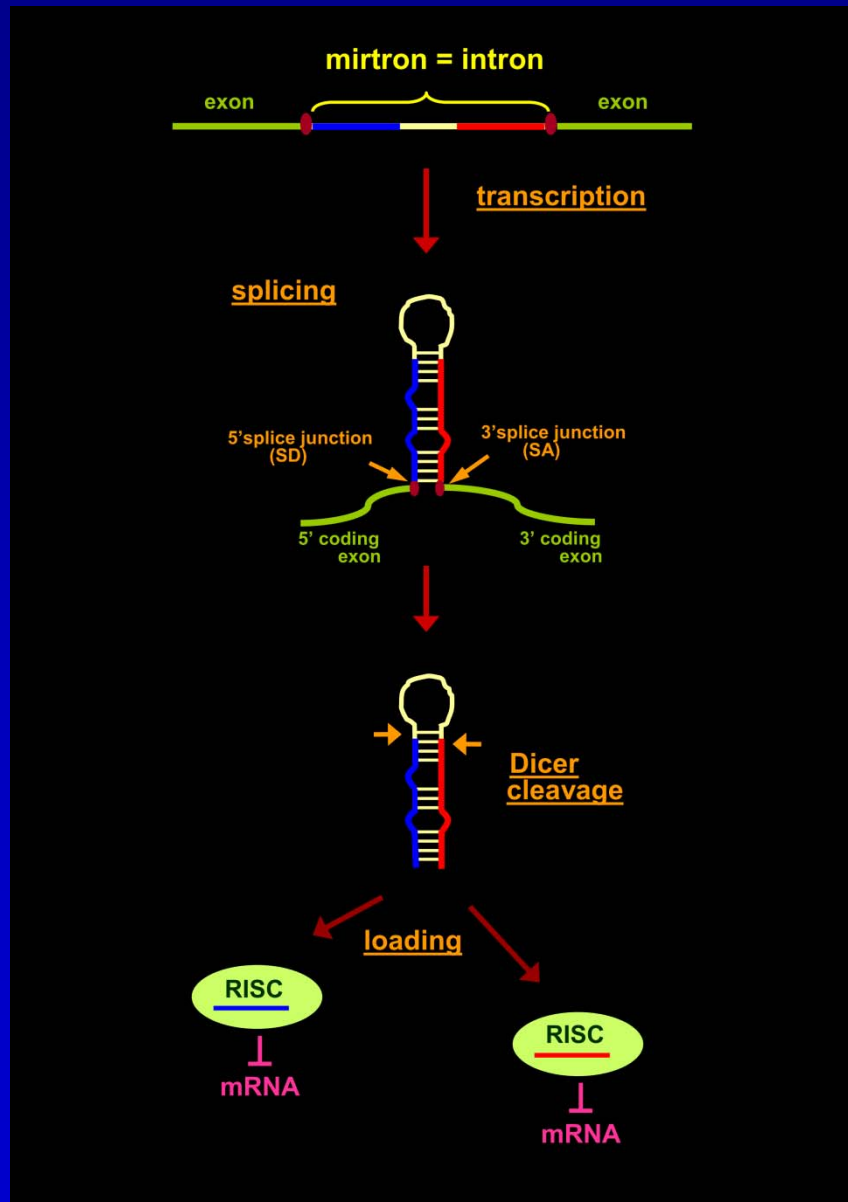
Berezikov, Nat Rev Genet (2011) 12:846.

A miRNS-ek képződése, szerkezete 2.



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

A mirtronok és a pre-miRNS mindkét szála

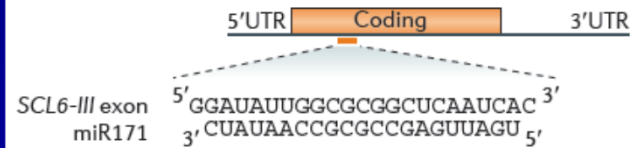


**hsa-miR-877:
emlős mirtron**

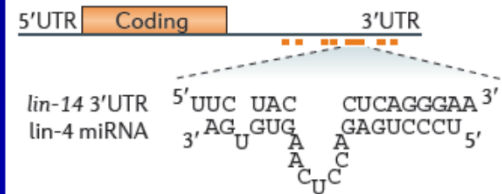
*Schamberger et al.,
RNA Biology (2012) 9:1177.*

Példák a miRNS-ek kötődésére

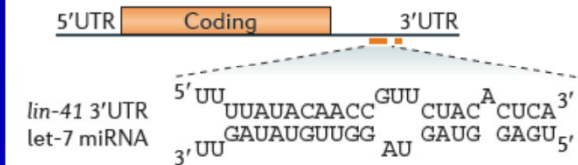
a *Arabidopsis thaliana* SCL6-III



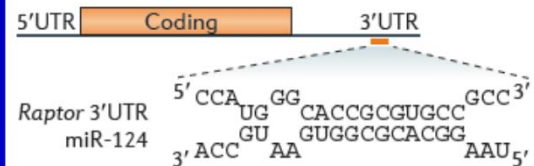
b *Caenorhabditis elegans* lin-14



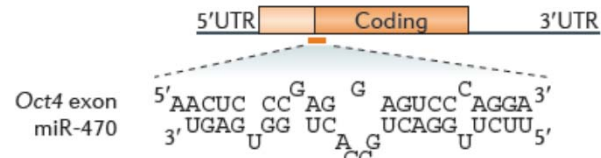
c *Caenorhabditis elegans* lin-41



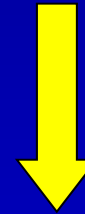
d Human Raptor



e *Mus musculus* Oct4



A komplementaritás változékonysága



predikációs nehézségek!

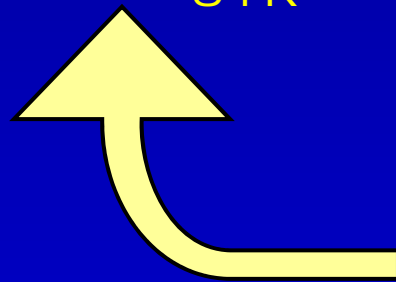
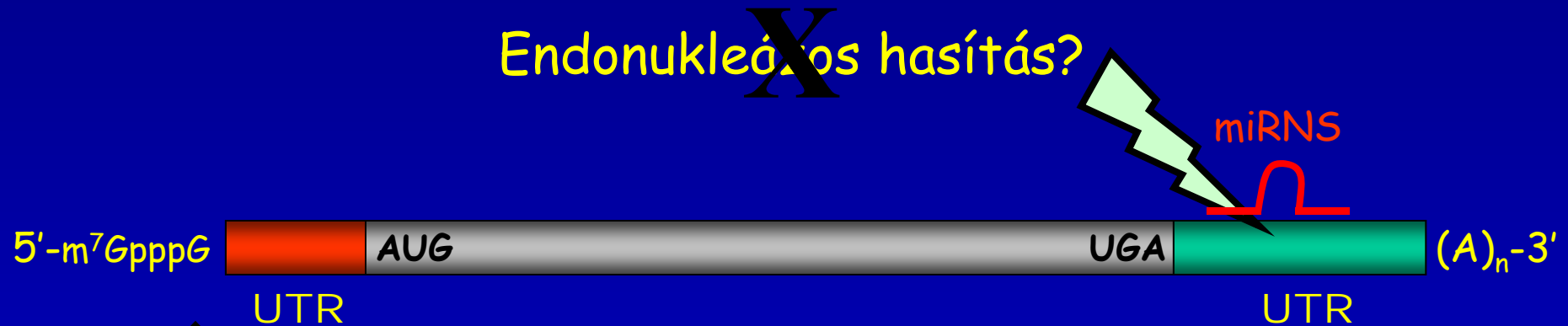
Pasquinelli, Nat Rev Genet (2012) 13:271.

A miRNS-ek effektor funkciója

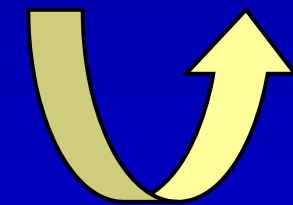
- 1. mRNS degradáció**
- 2. transzlációs gátlás a mRNS-en**

miRNS kiváltott mRNS degradáció állatokban

Endonukleázos hasítás?

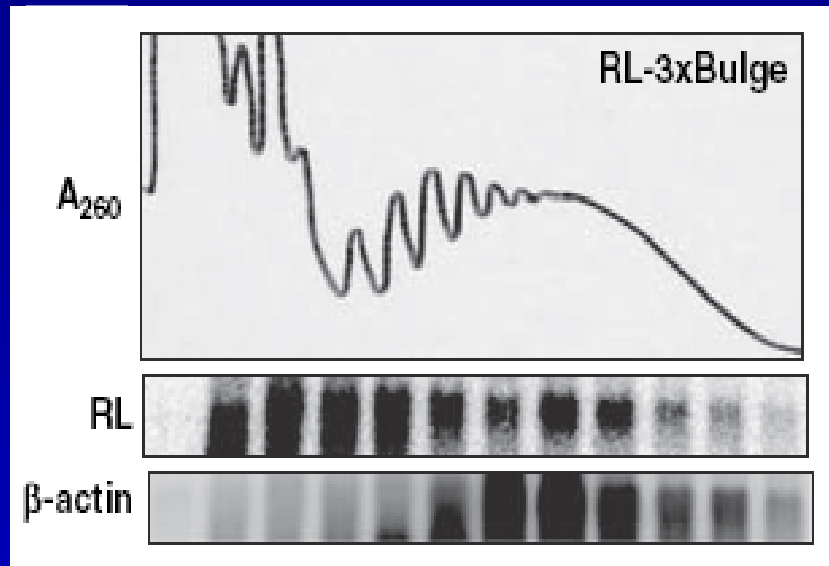


2. sapka eltávolítás
3. $5' \rightarrow 3'$ lebontás (*XRN1*?)



1. deadeniláció

miRNS-kiváltott transzláció gátlás



poliszóma grádiens

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



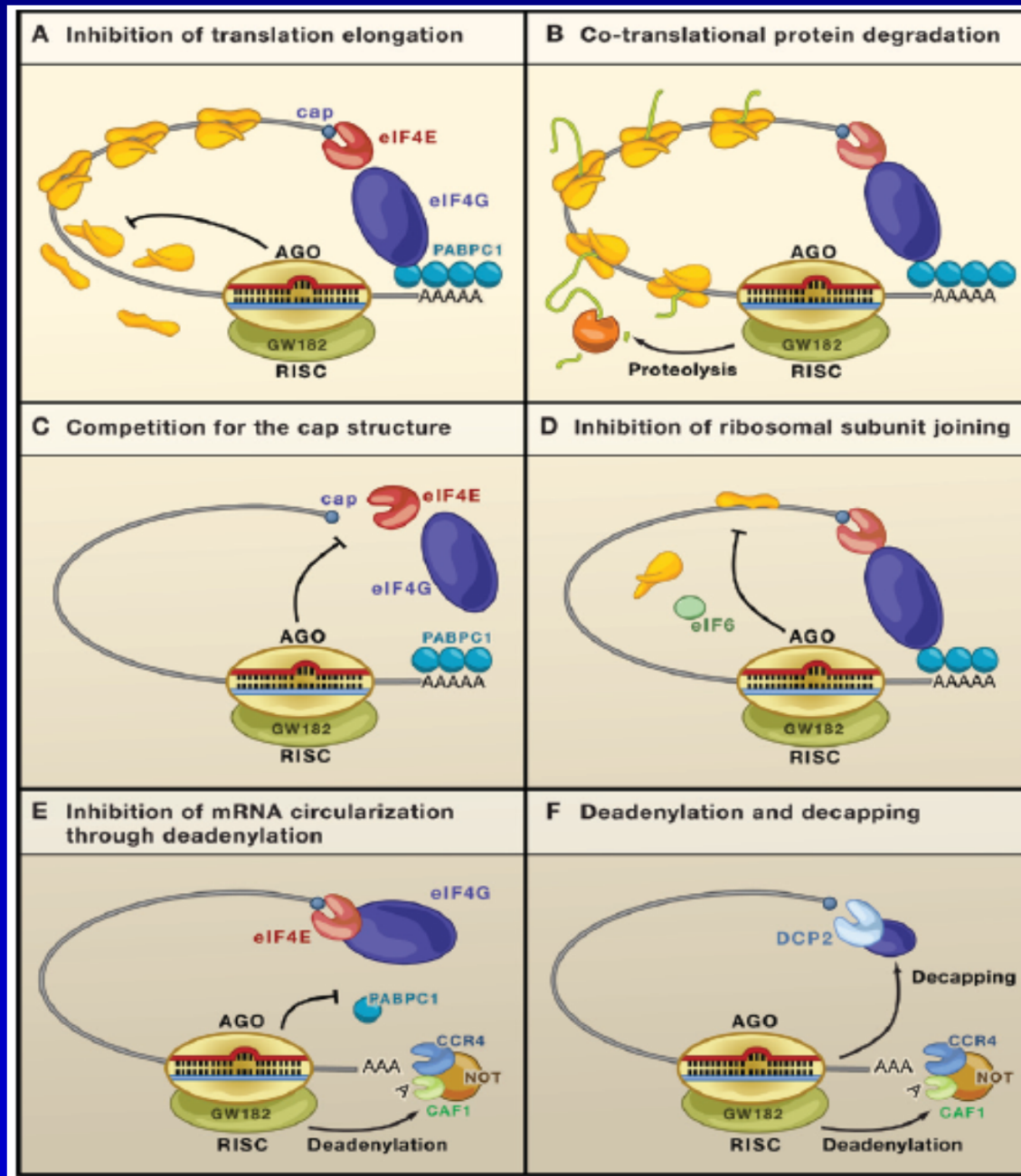
transzláció iniciáció gátlás

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

miRNS-kiváltott transzláció gátlás

...és még más mechanizmusok...





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

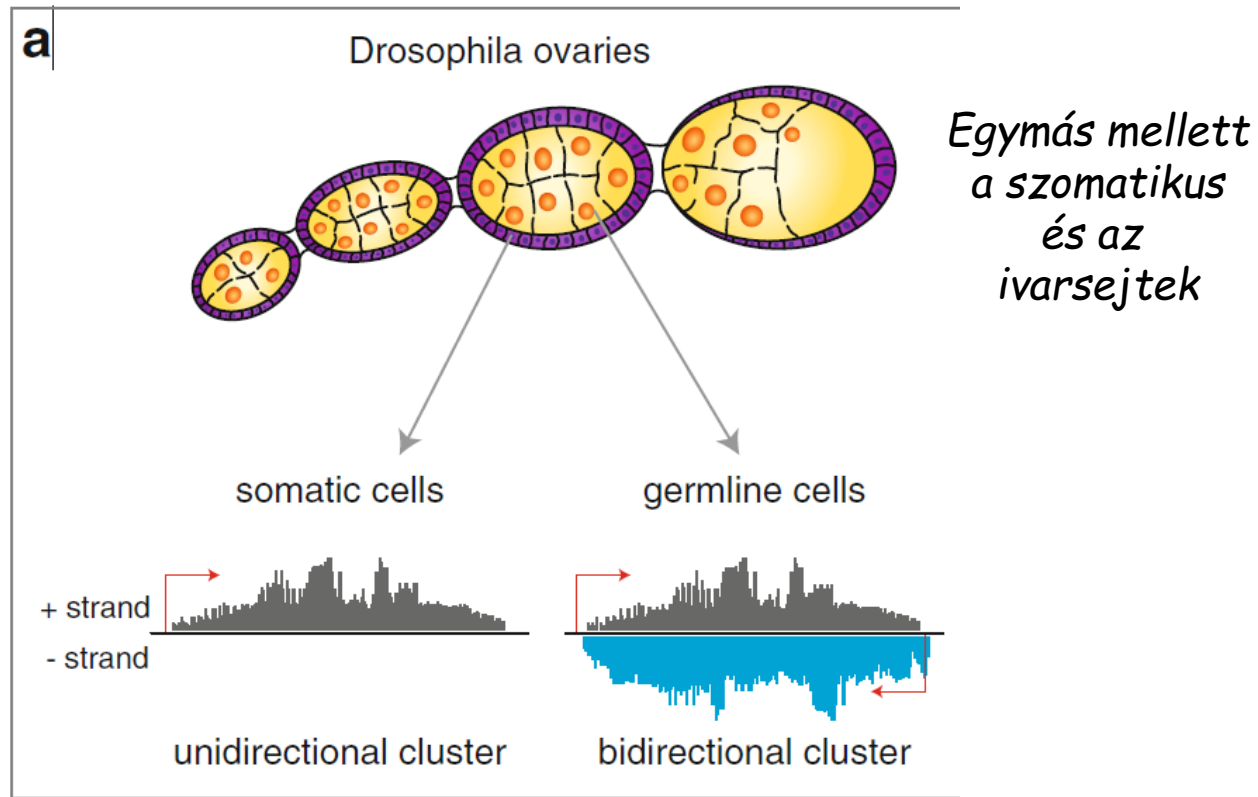
3. A piRNS-ek világa

RNS interferencia: a piRNS-ek világa

- **nagyobb méret (~27-31 nt)**
- **más „Argonauták”, a Piwi-család:
Piwi, Aub, Ago3 (*Drosophila melanogaster*)**
- **ált. egy hosszú RNS prekuzorról képződnek**
- **főleg a csíravonal sejtjeiben expresszálódnak**
- **a csírasejtek („germline”) genomialis védelme**
- **védelem transzpozonok ellen**

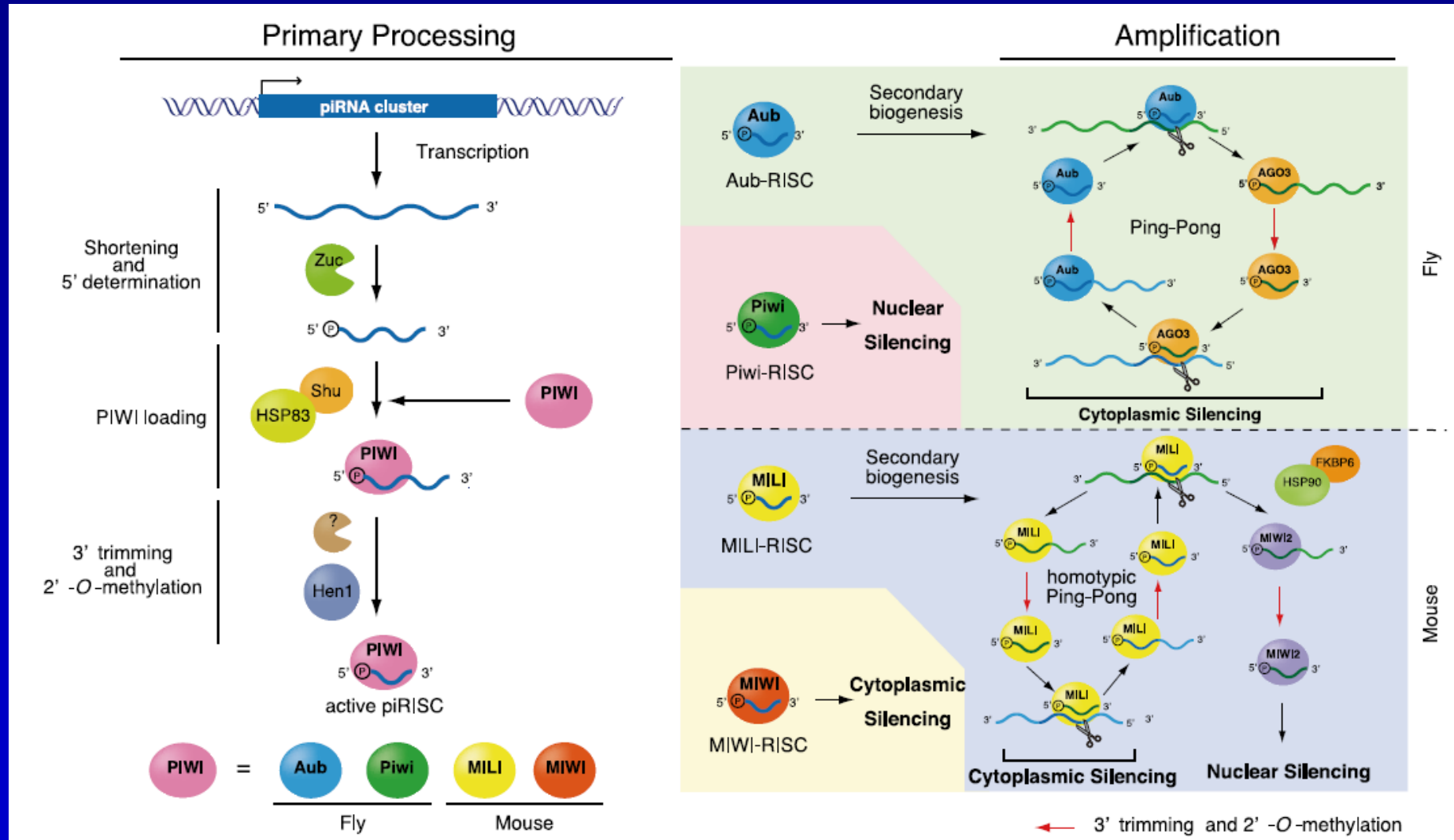
A Drosophila-modell előnyei

The piRNA Pathway Guards the Germline Genome Against Transposable Elements



*Fejes-Tóth et al., Non-coding RNA and the Reproductive System
Book (2016) 51*

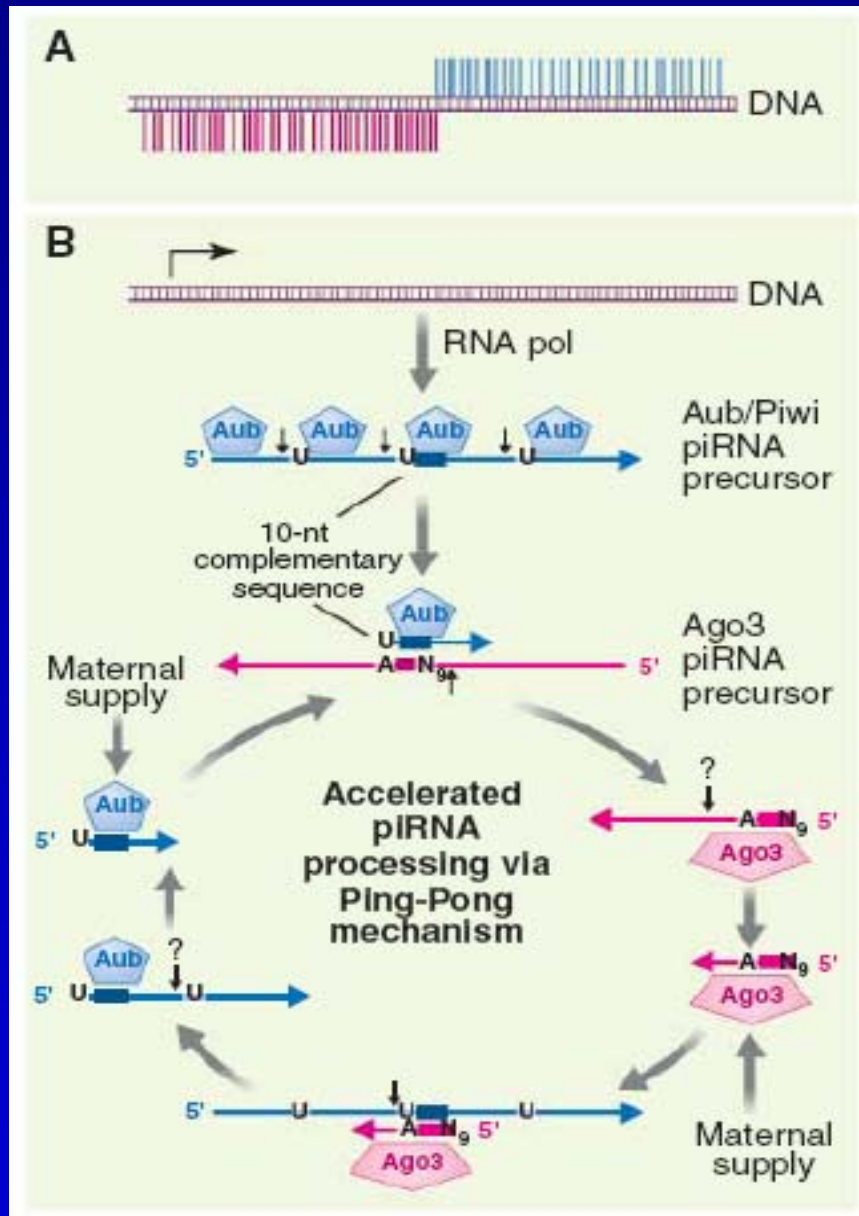
piRNS-ek képződése: kétféle út



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

„Germline ping-pong”

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??