

Интерференция РНК

Клеточные РНК

- і мРНК
- і рРНК
- і тРНК
- і короткие РНК

Косупрессия экспрессии гена у растений

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990).

«Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans». **Plant Cell** 2 (4): 279–289.



Цветки *Petunia hybrida*, в клетках которых экспрессия генов окраски снижена РНК-интерференцией.

Quelling (подавление)

Romano N, Macino G (1992).

«Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences». ***Mol Microbiol* 6 (22): 3343–53.**



***Neurospora crassa* — вид мицелиальных грибов отдела аскомицетов.**

РНК-интерференция

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C (1998).

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

Nature 391 (6669): 806–11.



- і Образец текста
- | Второй уровень
- | Третий уровень
- і Четвертый уровень
- | Пятый уровень

***Caenorhabditis elegans* — свободноживущая нематода (круглый червь) длиной около 1 мм.**

РНК-интерференция

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C (1998).

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

Nature 391 (6669): 806–11.

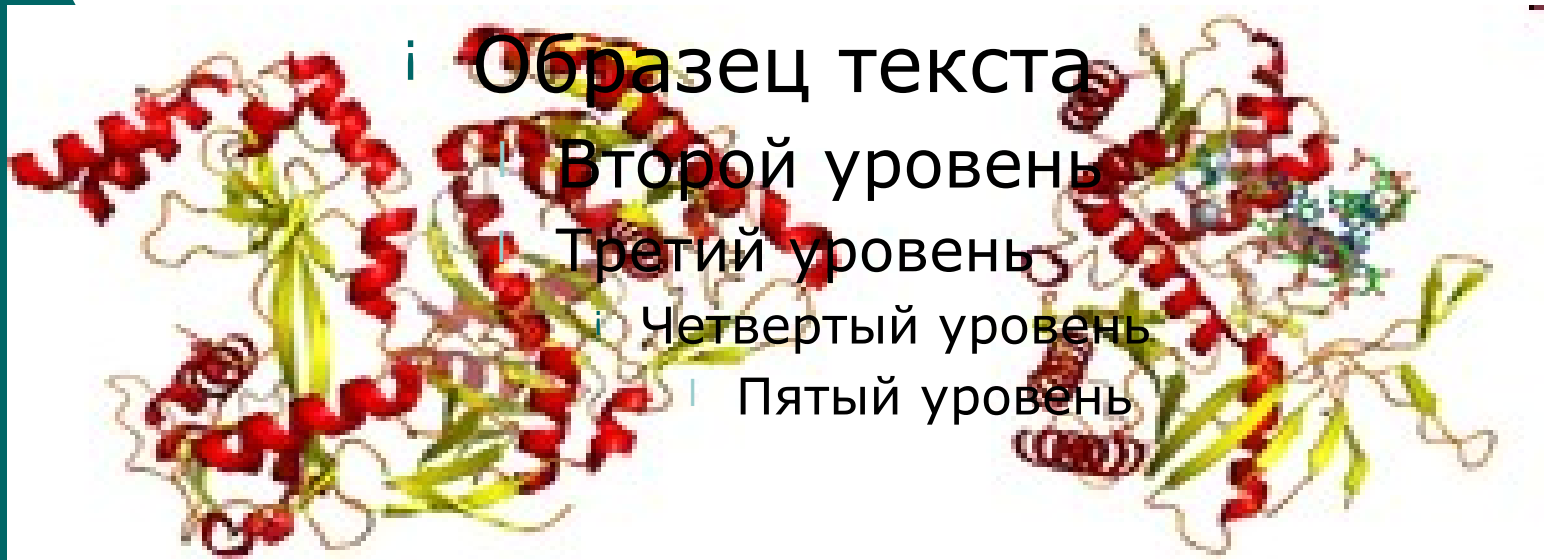


при РНК-интерференции расщепляется именно мРНК (и никакая другая);
двухцепочечная РНК действует (вызывает расщепление) значительно эффективнее одноцепочечной;
дцРНК, комплементарная участку зрелой мРНК, вызывает расщепление последней;
небольшого количества дцРНК (нескольких молекул на клетку) достаточно для полного «выключения» целевого гена.

Механизм



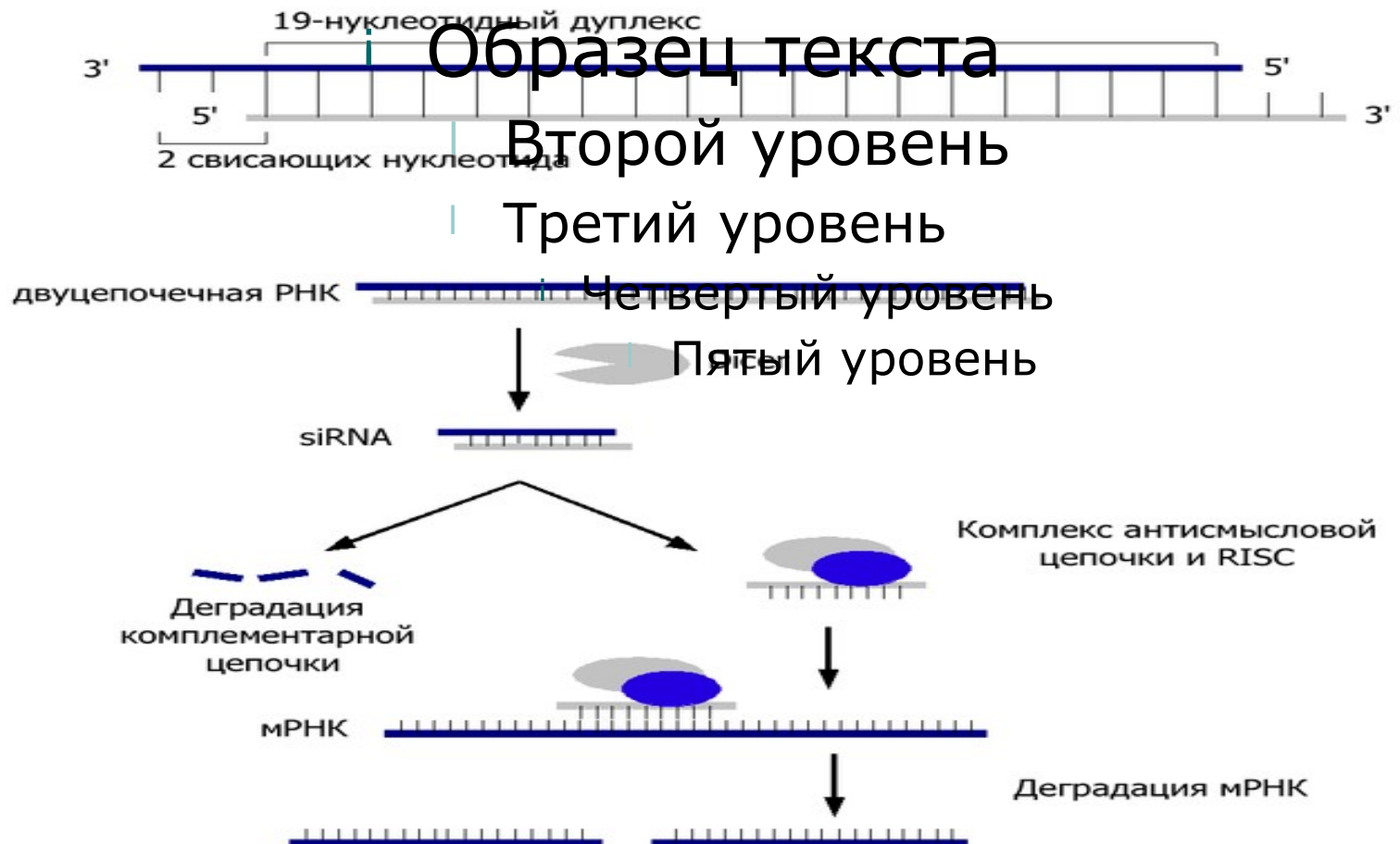
RISC (RNA-induced silencing complex)



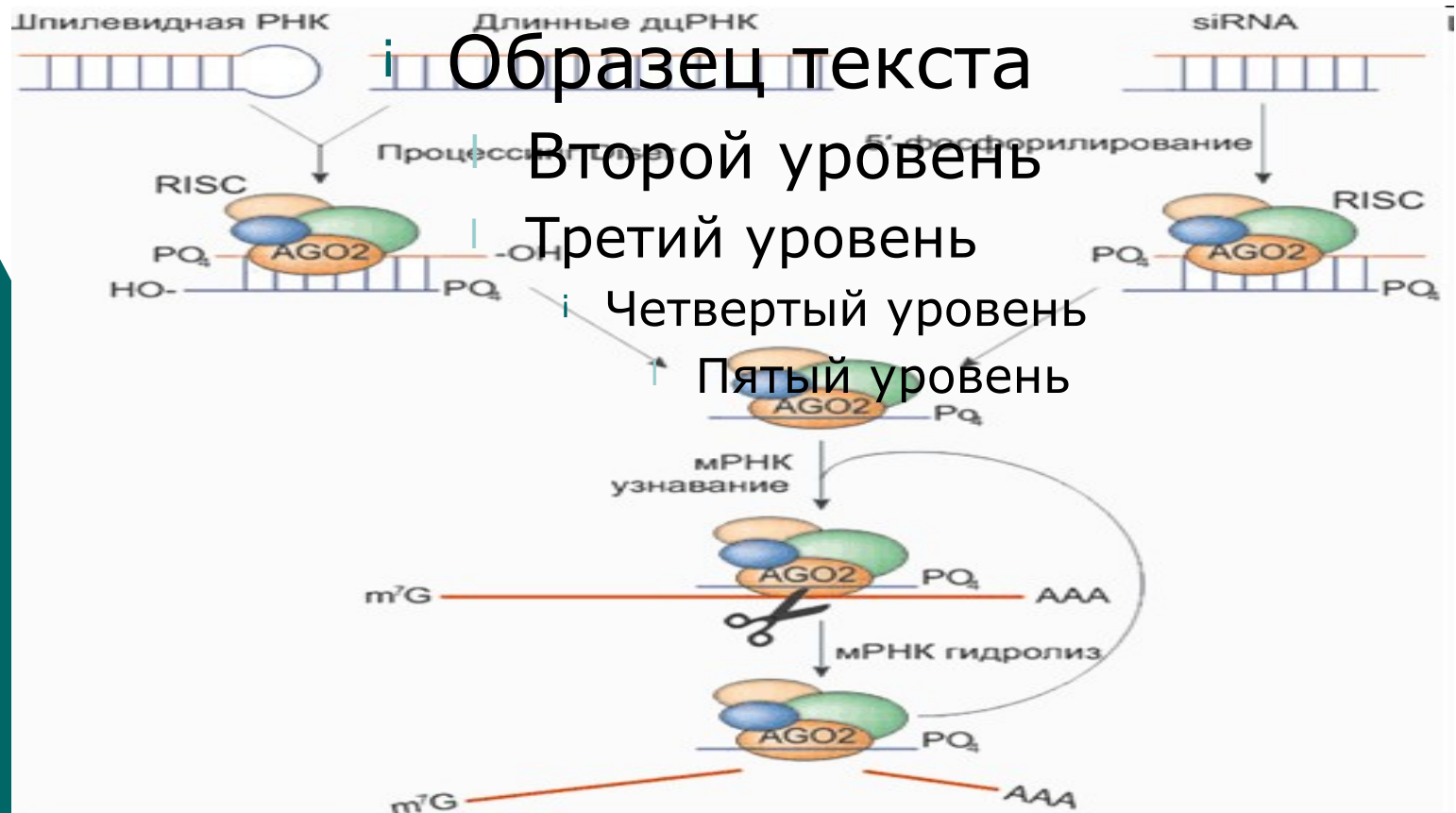
Участники процесса РНК-интерференции

- i малые интерферирующие РНК (small interfering RNA, **siRNA**);
- i микроРНК (microRNA, **miRNA**);
- пиРНК (Piwi-interaction RNA, **piRNA**).

Малые интерферирующие РНК (small interfering RNA, siRNA)



Малые интерферирующие РНК (small interfering RNA, siRNA)



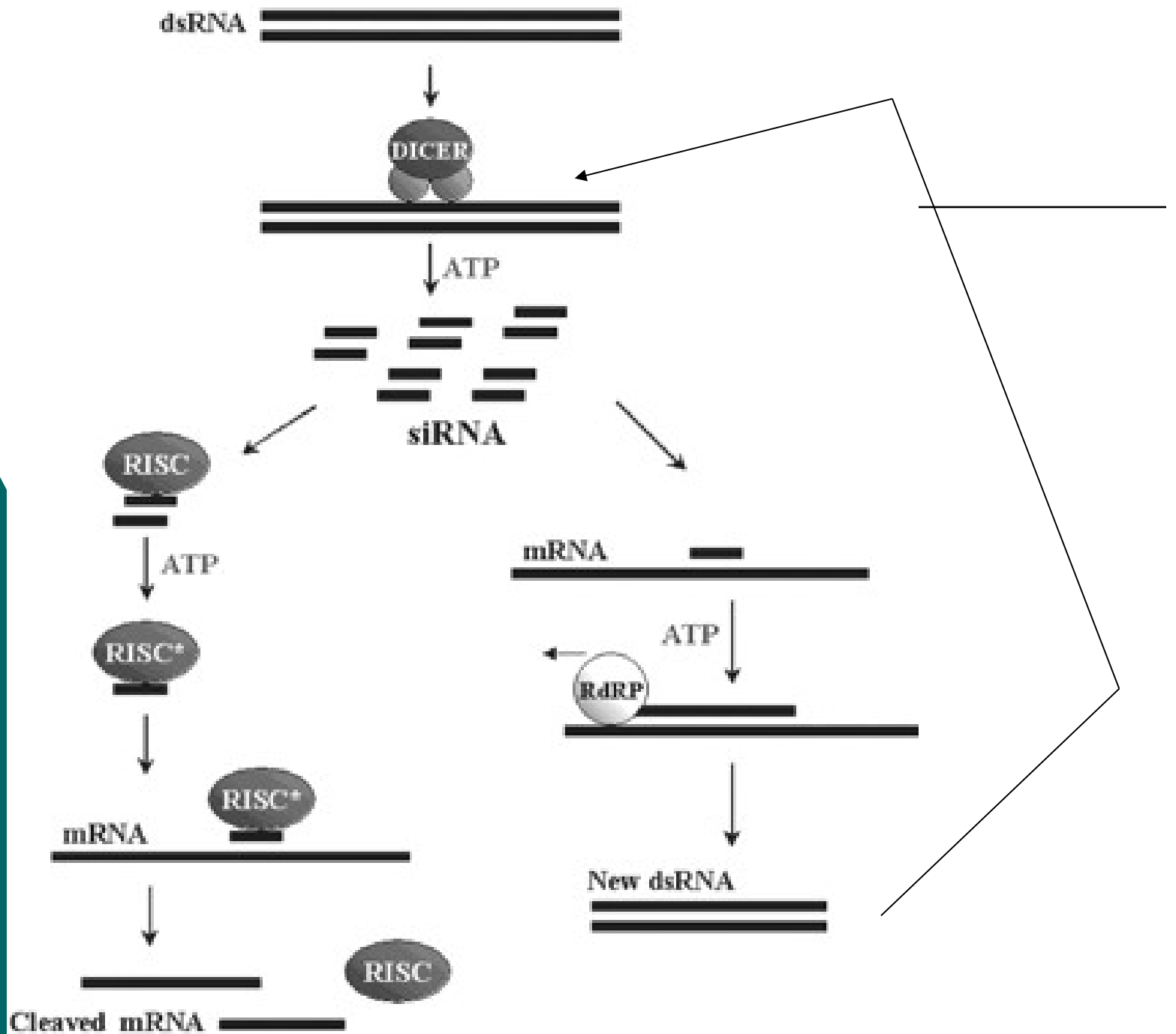
Образец текста

Второй уровень

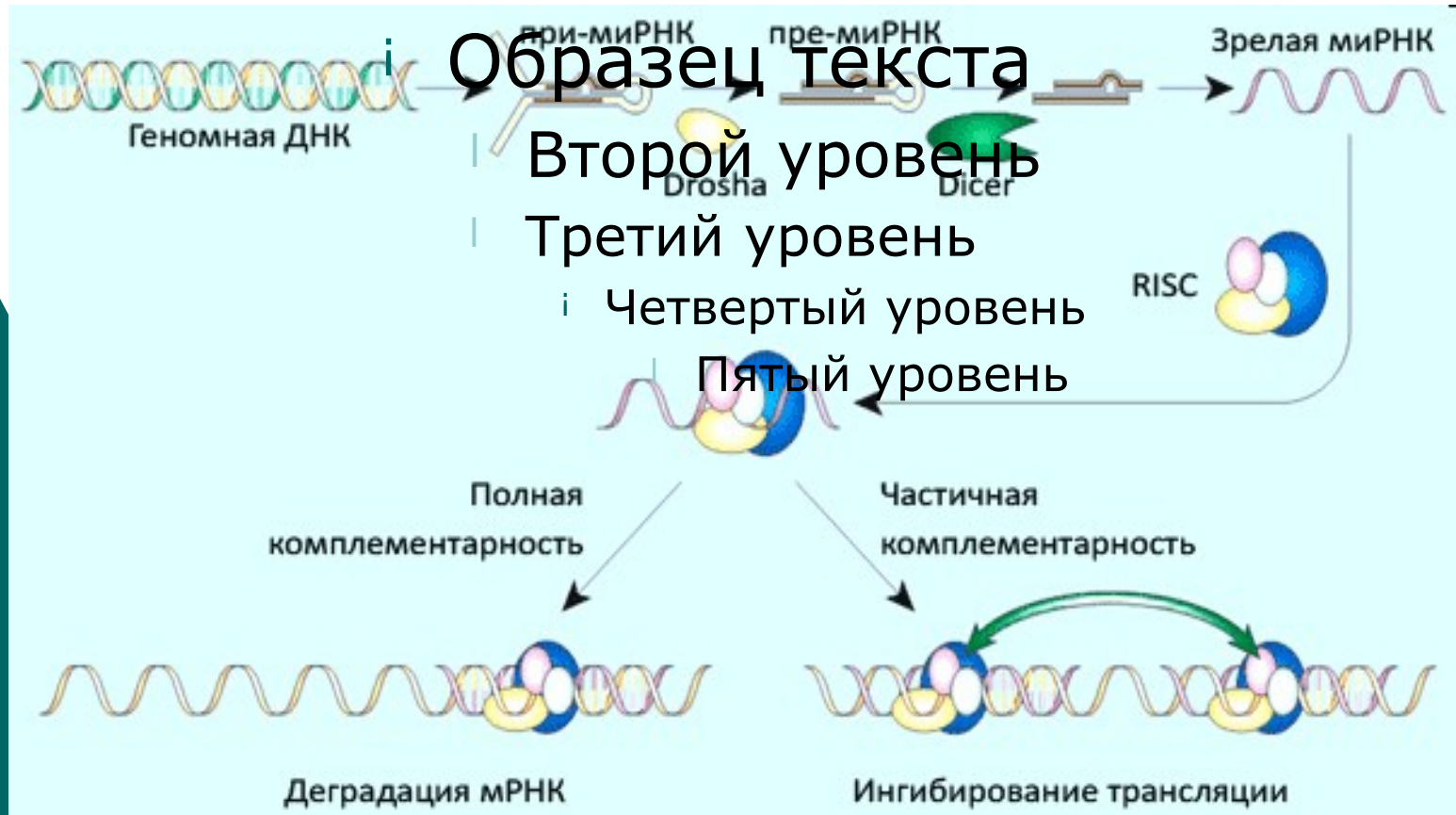
Третий уровень

Четвертый уровень

Пятый уровень



микроРНК

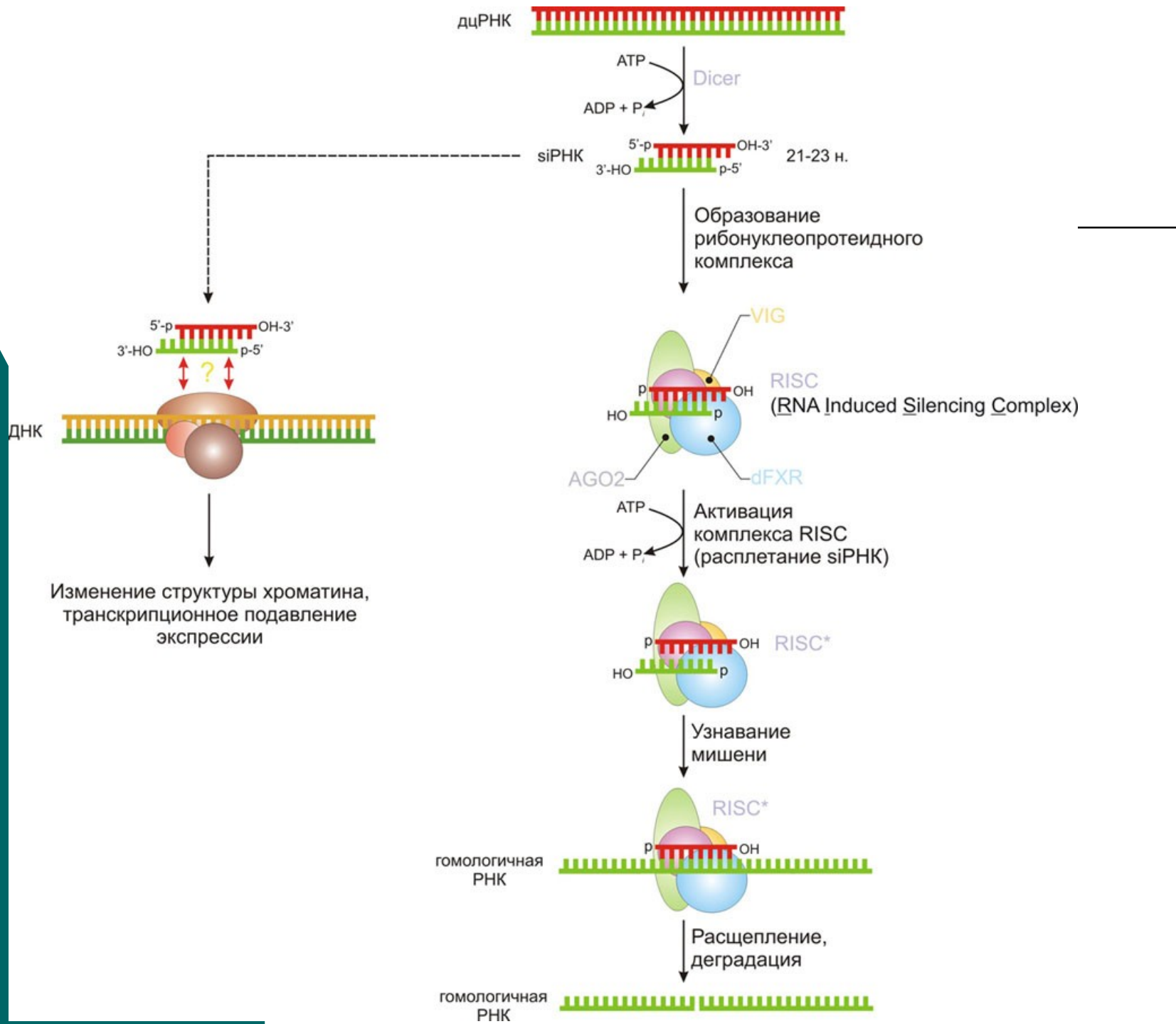


piRNA

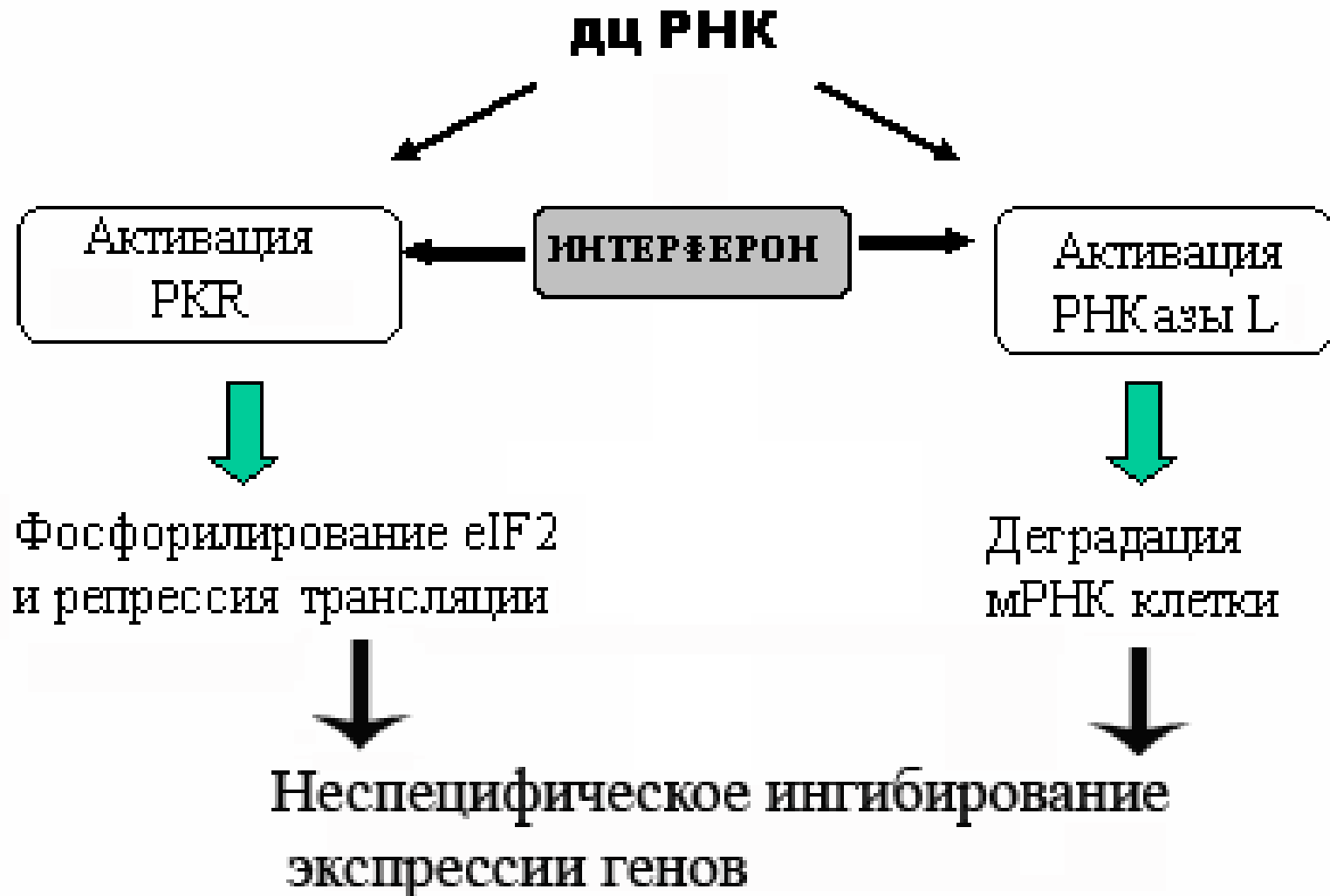
- i подавление активности МГЭ на уровне транскрипции и трансляции.

Свойства всех трёх классов коротких РНК

	кнРНК	микроРНК	мтРНК
<i>Распространение</i>	Растения, <i>Drosophila</i> , <i>C. elegans</i> . Не найдено у позвоночных	Эукариоты	Эмбриональные клетки животных (начиная с кишечнорастворимых). Нет у простейших и растений
<i>Длина</i>	21–22 нуклеотидов	19–25 нуклеотидов	24–30 нуклеотидов
<i>Структура</i>	Двухцепочечная, по 19 комплементарных нуклеотидов и два неспаренных нуклеотида на 3'-конце	Одноцепочечная сложная структура	Одноцепочечная сложная структура. U на 5'-конце, 2'-O-метилированный 3'-конец
<i>Процессинг</i>	Dicer-зависимый	Dicer-зависимый	Dicer-независимый
<i>Эндонуклеазы</i>	Ago2	Ago1, Ago2	Ago3, Piwi, Aub
<i>Активность</i>	Дегградация комплементарных мРНК, ацетилирование геномной ДНК	Дегградация или ингибирование трансляции целевой мРНК	Дегградация мРНК, кодирующих МГЭ, регуляция транскрипции МГЭ
<i>Биологическая роль</i>	Антивирусная иммунная защита, подавление активности собственных генов	Регуляция активности генов	Подавление активности МГЭ во время эмбриогенеза



Особенности протекания процесса интерференции РНК в клетках млекопитающих – неспецифический ответ на дцРНК



Клетки млекопитающих

дцРНК < 30 bp не эффективны в интерферон-зависимой активации PKR и других неспецифических систем;

Выход: использовать **siRNA** (short interfering RNA)

Преимущества генетического нокдауна (knock-down) по сравнению с нокаутом (knockout)

Скорость

Простота

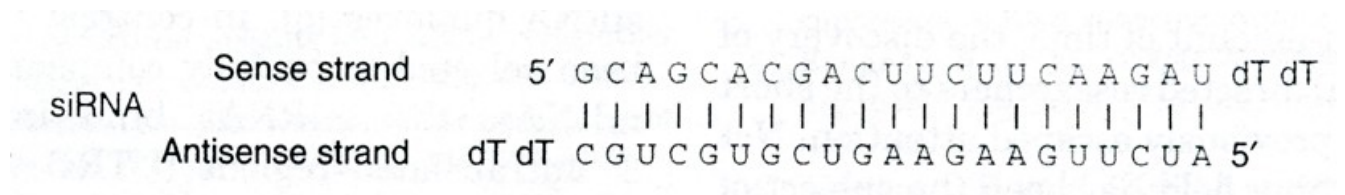
Низкая стоимость

Возможность регулировать степень
подавления экспрессии

Способы получения siRNA

- і **Химический синтез;**
- і **Транскрипция *in vitro*;**
- і **Получение интерферирующих РНК с помощью рибонуклеазы III или Dicer;**
- і **Использование экспрессионных векторов.**

Химический синтез

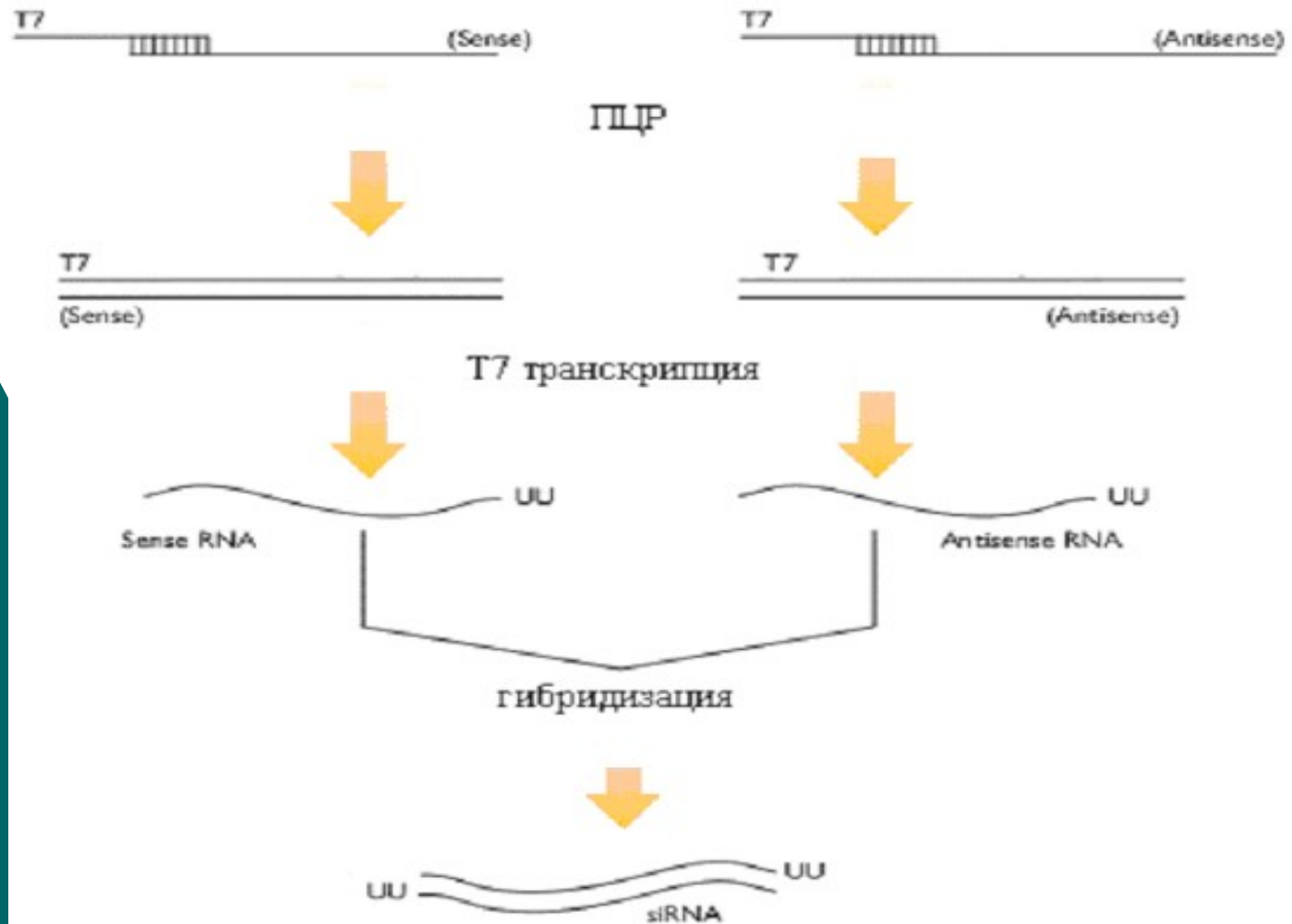


Недостатки: дороговизна синтеза РНК (по сравнению с ДНК);
низкая стабильность в клетке;
короткий срок действия.

Преимущество - возможность химических модификаций.

Модификации увеличивают стабильность РНК и часто приводят к существенному усилению эффекта siRNA.

Транскрипция *in vitro*



Непосредственное введение дцРНК в клетку – преимущества и недостатки

Преимущества:

- i отсутствие промежуточных стадий, высокая эффективность интерференции (лимитируется только эффективностью трансфекции);
- немедленное начало процесса интерференции РНК после доставки siRNA в клетку;
- возможность химических модификаций.

Недостатки:

- временный характер подавления экспрессии генов (72 часа или менее, не применимо для белков с большим временем жизни в клетке);
- низкая эффективность трансфекции для некоторых клеточных линий;

Экспрессионные векторы

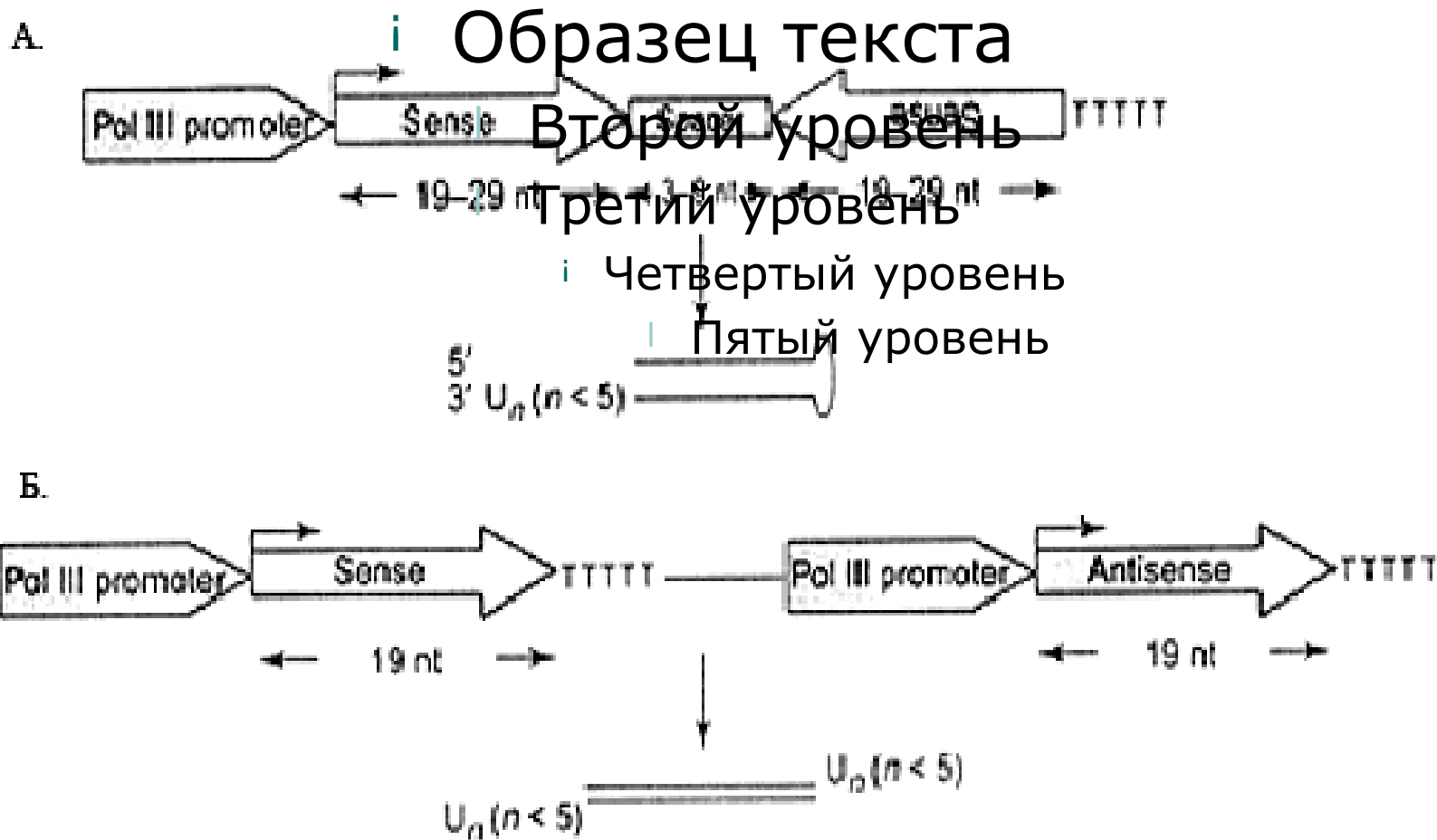
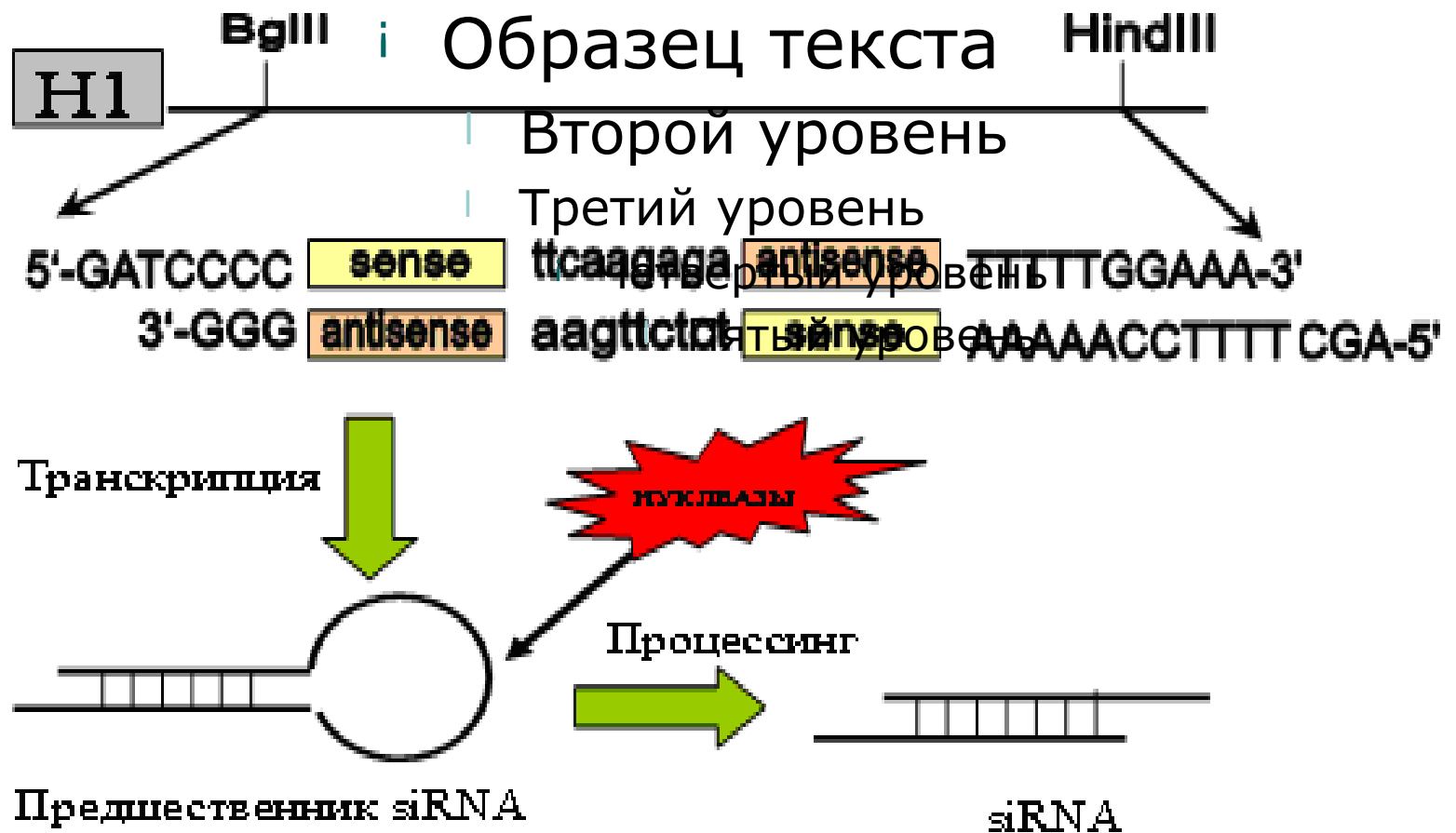


Схема получения siRNA с помощью интерференционных векторов

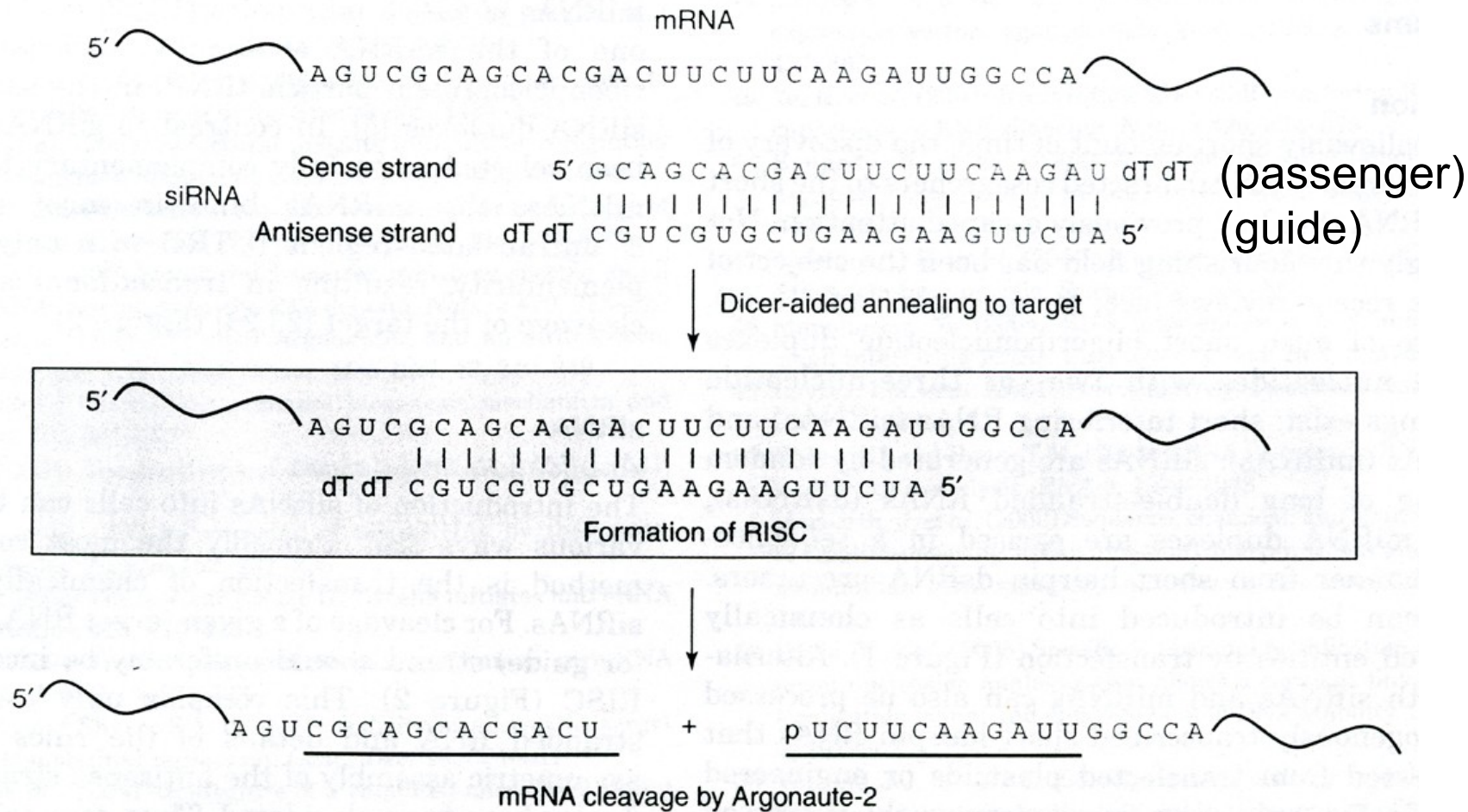


Схема получения siRNA;

Промоторы РНК-полимеразы III: H1 промотор (H1 РНК рибонуклеазы Р), U6 промотор (малой ядерной РНК), промоторы тРНК.



Взаимодействие siRNA с мишенью



Критерии выбора последовательности-мишени

Блок AA перед последовательностью-мишенью;
G/C содержание от 30 % до 50%;
Не должно быть внутри блоков из 4 или 5 T или A;
Отсутствие внутренних повторов и палиндромов;
Удаление от инициаторного и терминаторного кодонов;
Отсутствие сильной вторичной структуры мРНК;
Термодинамическая лабильность 3'-концевого участка siRNA.

Термодинамическая лабильность 3'-концевого участка siRNA

Показано, что при увеличении числа А-У пар в позициях 15-19 увеличивается эффективность подавления экспрессии гена, т.к. RISC расплетает siRNA и сохраняет в своем составе ту из цепей, 5'-конец которой менее прочно связан со своим комплементом по сравнению с 3'-концом (т.е. антисмысловую цепь).

Специальные требования

- i Определяются особенностями взаимодействия siRNA с белками комплекса RISC.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
(sense)																		
N	N	A	N	N	N	N	N	N	U	N	N	(A,T,C)	N	N	N	N	N	A/T
		17							10			7						1
(antisense)																		

А в позиции 3 и 19,
U в позиции 10 ,
отсутствие G в позиции 13 и 19,
отсутствие C в позиции 19.

Предпочтение U в позиции 10 связано с тем, что RISC, как и большинство эндонуклеаз, наиболее эффективно расщепляют фосфодиэфирную связь с U в 3'- положении.

Как изучают эффективность siRNA?

Использование репортерных генов (EGFP, luc)

Подавление экспрессии эндогенных белков

Методы:

блот-гибридизация РНК;

RT-PCR (полуколичественный или real-time PCR);

иммуноблоттинг;

иммуноферментный анализ;

флуоресцентная микроскопия.

Основные механизмы подавления экспрессии генов с помощью дцРНК

- і Деградация мРНК (siRNA);
- Ингибирование трансляции (miRNA);
- Хроматиновый сайленсинг, вызванный метилированием нуклеосом.

Источники артефактов:

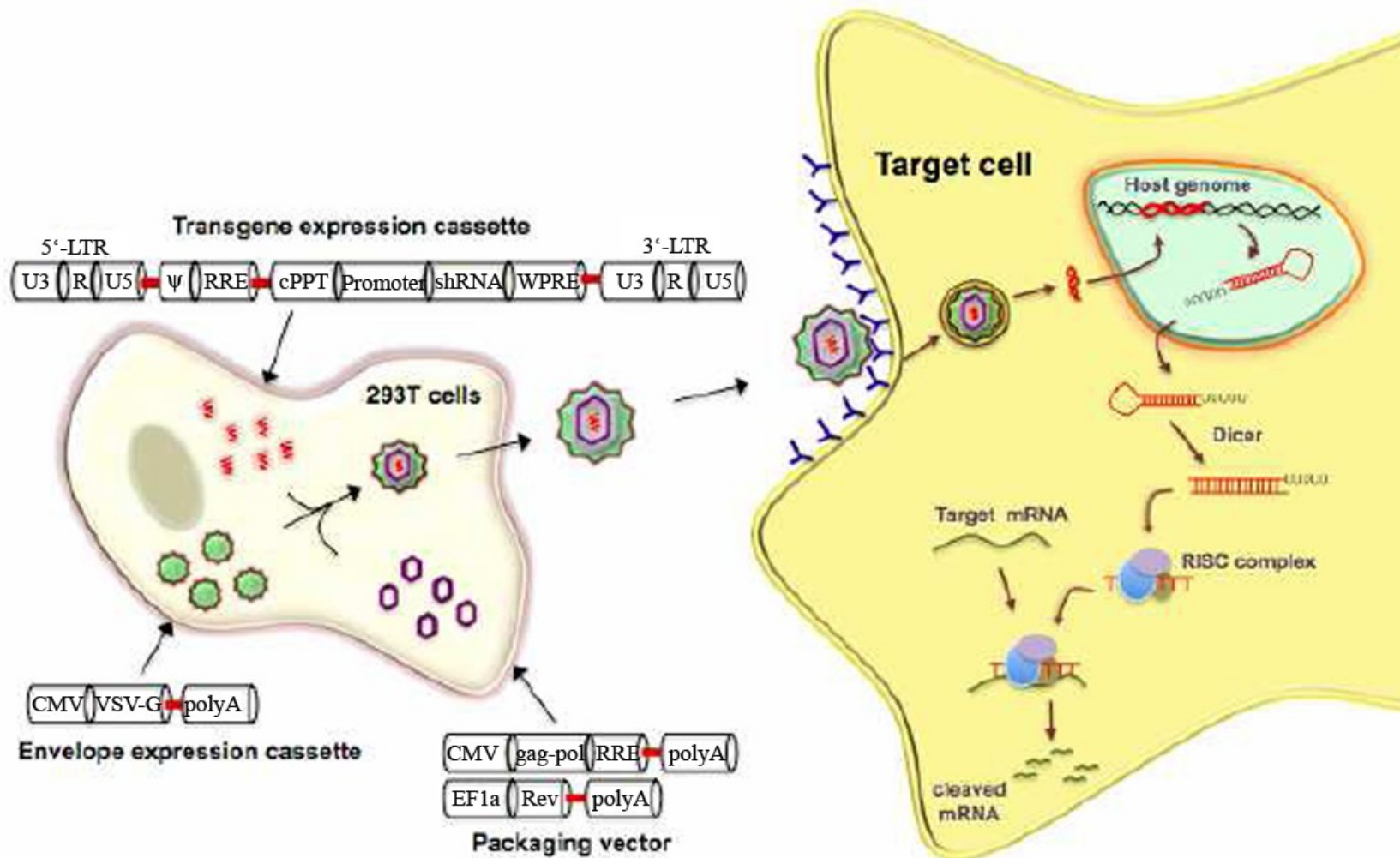
- i Связывание мРНК с частичной комплементарностью (off-target) -деградация, арест трансляции;

Неспецифический (интерфероновый) ответ клетки на дцРНК;

Контроли

- і Unrelated siRNA;
 - і siRNA к нескольким разным местам мРНК;
 - і Мутации в siRNA;
- Экспрессия гена-мишени, устойчивого к данной siRNA, должна восстанавливать уровень белка-мишени.

Стабильная экспрессия shRNA с помощью лентивирусного вектора



Риски при стабильной экспрессии shRNA и их преодоление

- i Конкуренция с клеточными miRNA;
- i Насыщение экспортина-5 и Dicer (сверхэкспрессия экспортина-5 снимала токсичность);
- i H1 промотор слабее, чем U6 промотор, и как следствие, при его использовании токсичность снижается;

Мультиплексные shRNA позволяют избежать “escape mutants”.

Использование индуцибельных систем экспрессии (Tet-on, Tet-off, экдизоновой) или Cre-lox рекомбинации (вставка loxP-stuffer-loxP кассеты перед стартом транскрипции).