

MikroRNS-ek: a génszabályázás új mechanizmusa

Pivarcsi Andor

KI, Department of Medicine, CMM

A szeminárium vázlata

I. Háttér

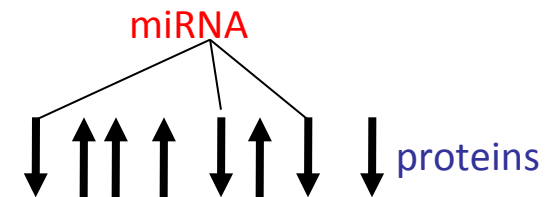
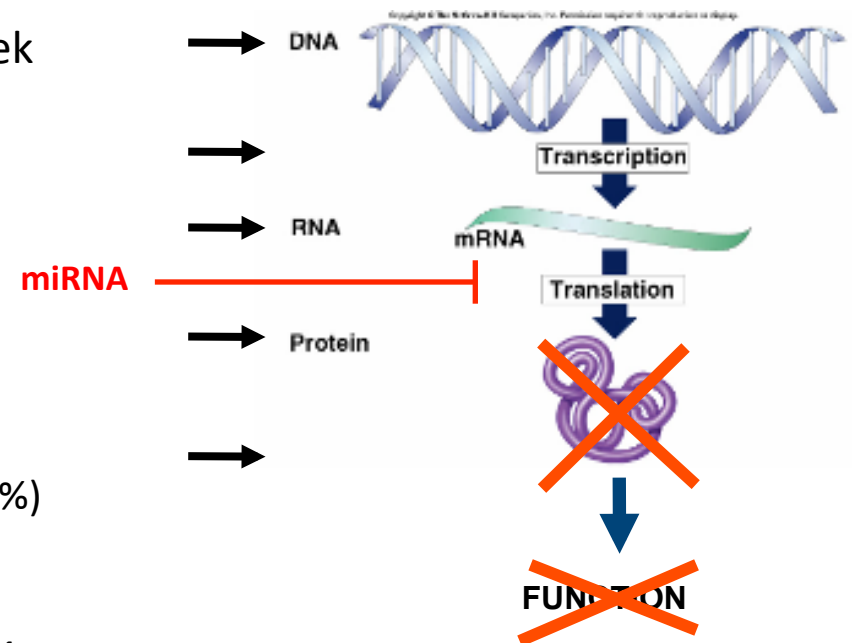
II. A mikroRNS-ek biogenezise és hatásmechanizmusa

III. A mikroRNS-ek élettani szerepe

IV. A mikroRNSeK működésének szabályozása

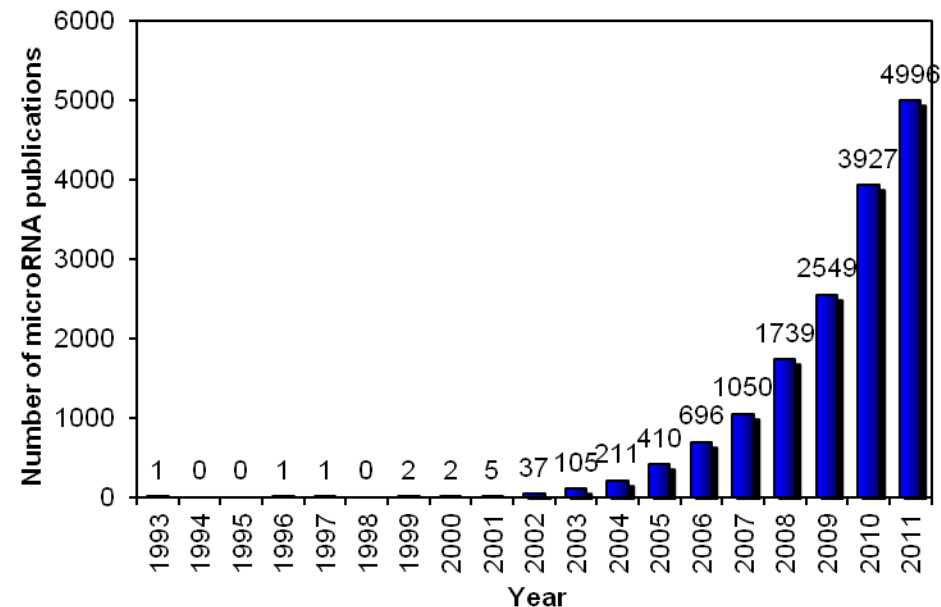
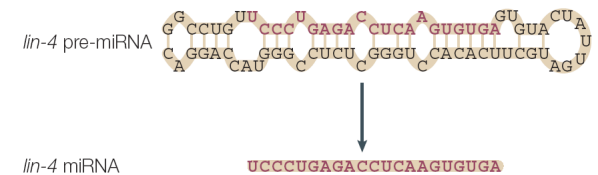
MikroRNS-ek: a genom „sötét anyaga”

- Rövid, kb. 22 nt hosszúságú nem kódoló RNS-ek
- Gátolják a mRNS-ek transzlációját
- A génszabályozás egy új formája
- Emberben >2000 miRNS
- 1 miRNS - több tucat-száz célgén
 - általában enyhe csendesítés egy célgénen (33%)
 - Több célgén egy jelátviteli úton
- A fehérjekódoló gének többségét szabályozzák
- Jelentős befolyásuk van a sejt transzkriptómjára és proteómjára
 - Fontos szerep fiziológiás folyamatokban és betegségekben



A mikroRNS-ek felfedezése

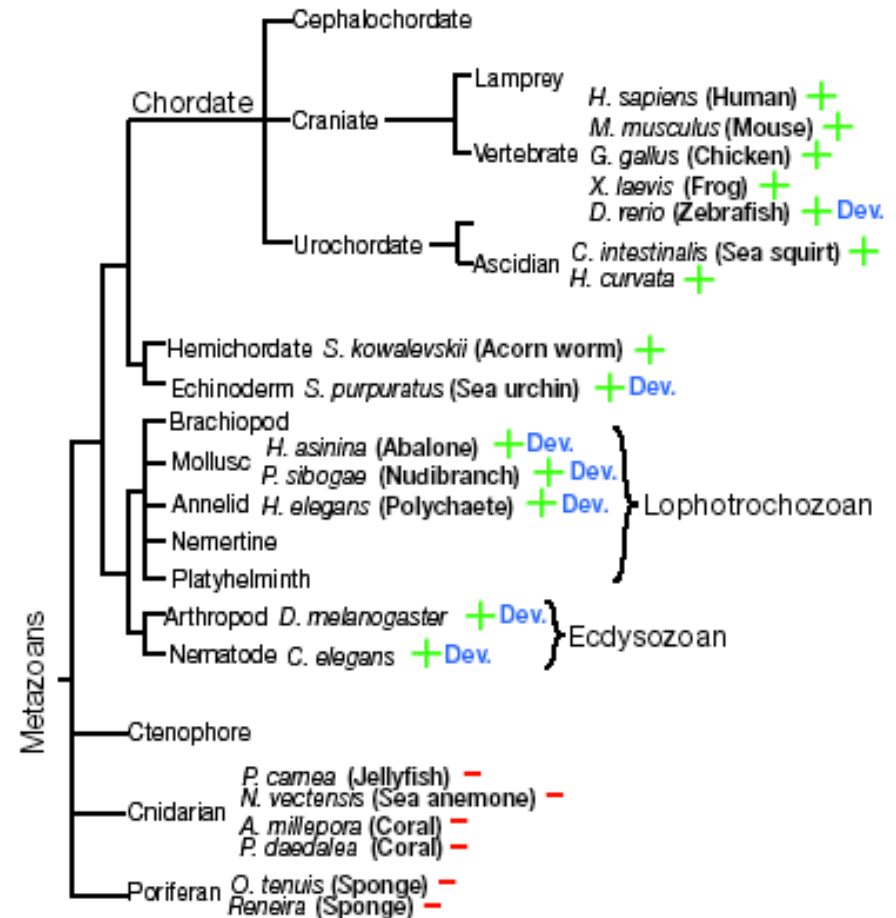
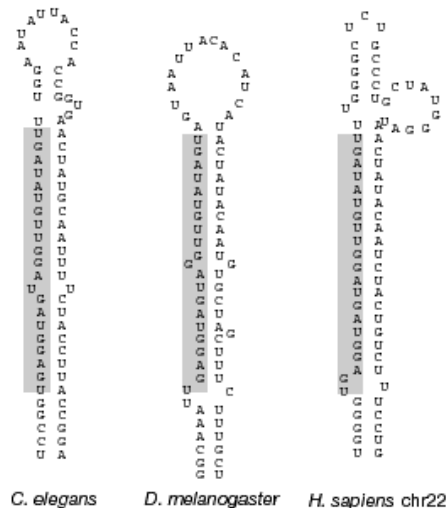
- 1993: a *lin-4* gén *Caenorhabditis elegans*-ban a lárvafejlődés időzítéséért felelős
- - de ez a gén nem fehérjét, hanem egy rövid RNS-t kódol, amely egy fehérjekódoló gént szabályoz a 3'UTR-en keresztül
- 2000: *let-7* („Lethal-7”): a második rövid funkcionális RNS
 - Konzervált: *C.elegans*-ember
- 2001: Rövid, funkcionális RNS-ek százait fedezik fel növényekben, férgekben, rovarokban, gerincesekben
 - a valaha talált legkonzerváltabb gének
 - nagy kópiaszámban vannak a sejtekben
 - fejlődési stádium- és szövet-specifikus kifejeződést mutatnak
- 2001: A hivatalos név, „mikroRNS” bevezetése
 - Robbanásszerű fejlődés



Lee et al., *Cell*, 1993

Sonkoly et al., *J Cell Mol Med*, 2009

A miRNS-ek minden többesejtű élőlényben megtalálhatóak

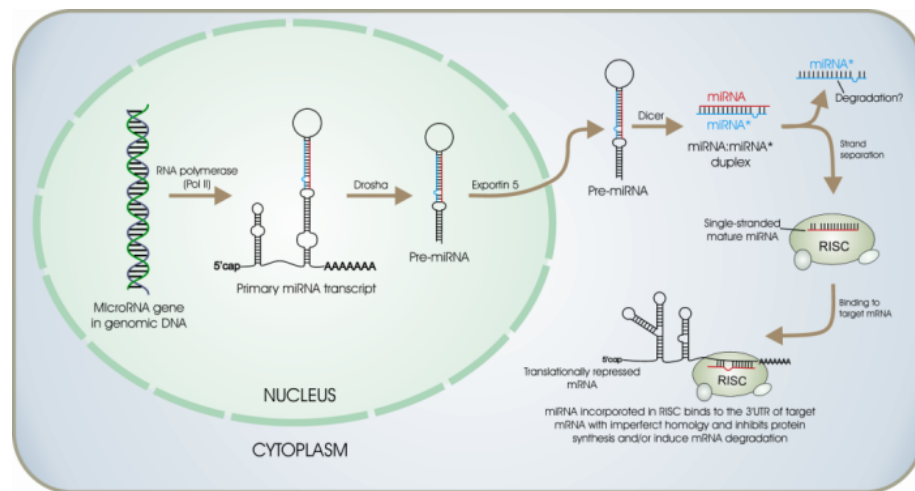


- 2012: több mint 25,000 miRNS
- Let-7 azonos a hengeresférgectől az ízeltlábúakon át az emberig
- miR-1 egyetlen nukleotidban különbözik a *C. elegans*, *Drosophila*, *Homo sapiens* között
- miR-203 egyetlen nukleotidban különbözik zebrahal és ember között

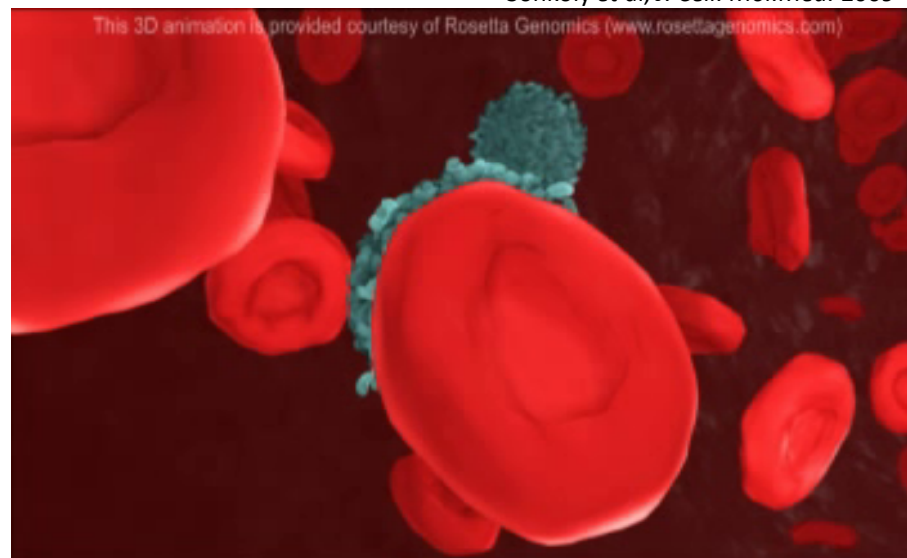
A MIKRORNS-EK BIOGENEZISE ÉS MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSA

A miRNS-ek biogenezise és hatásmechanizmusa

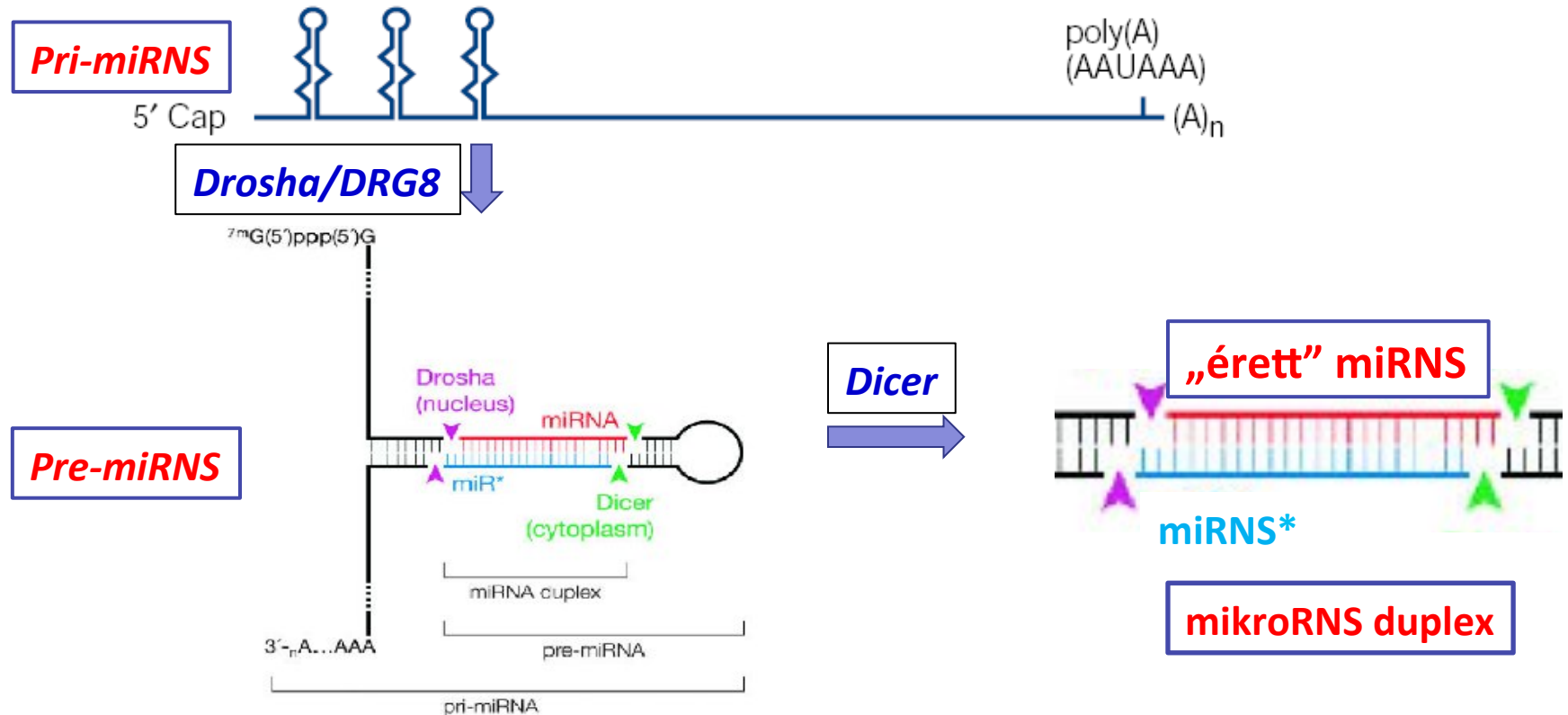
- A DNS-ről íródik át a primer miRNS (pri-miRNS) (*RNS-polimeráz II*)
- Ebből vágódik ki a miRNS prekursor (pre-mikroRNS) a sejtmagban (*Drosha*)
- A citoplazmában, a kétszálú RNS-eket egy Dicer-nek nevezett enzim 21-25 nt hosszú dsRNS darabokra vágja
- A dsRNS egyik szála válik „érett” miRNS-sé és beépül egy ribonukloprotein komplexbe:
 - RISC = „*RNA-Induced Silencing Complex*”
- A miRNS határozza meg, hogy mely mRNS-ek 3'UTR-éhez fog a RISC kötődni
- mRNS destabilizáció/transzláció gátlása



Sonkoly et al, *J. Cell. Mol. Med.* 2009



A pri- és a pre-miRNS-eket a Drosha és a Dicer RN-áz III-enzimek processzálják



- *Drosha*: felismeri és kivágja a a pri-miRNS-eken lévő hajtú-struktúrákat: *pre-miRNS*
 - 11 nt-ra azok elejétől; sejtmag
- *Dicer*: a ≈70 nukleotidból álló pre-miRNS-ről kihalásítja a *miRNS-duplexet*; citoplazma
- mikroRNA duplex: általában csak az egyik szál (*„érett miRNS”*) épül be egy ribonukleoprotein komplexbe (*„RNA including silencing complex”*): **RISC**

Mi határozza meg, hogy a miRNS duplex melyik szála épül be a RISC-be?

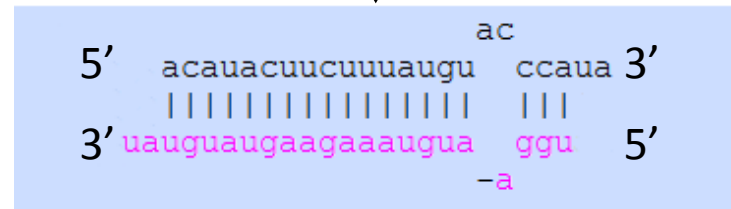
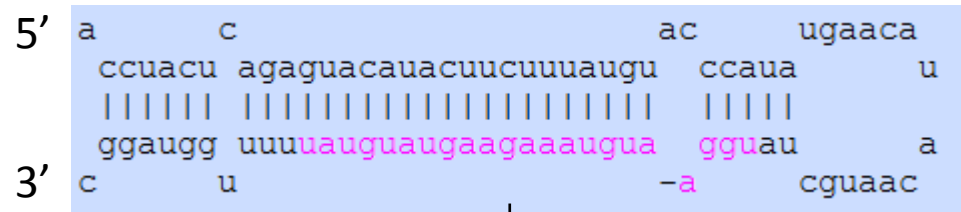
Pre-microRNA (hairpin)

Dicer

microRNA duplex

Dicer/Ago2

Mature microRNA

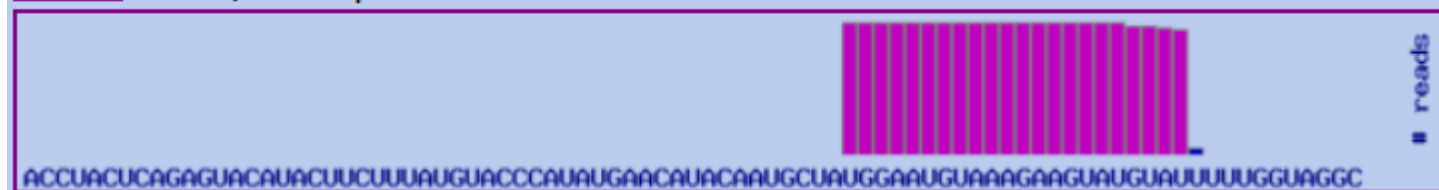


uggaauguaaagaaguauguau

hsa-miR-1

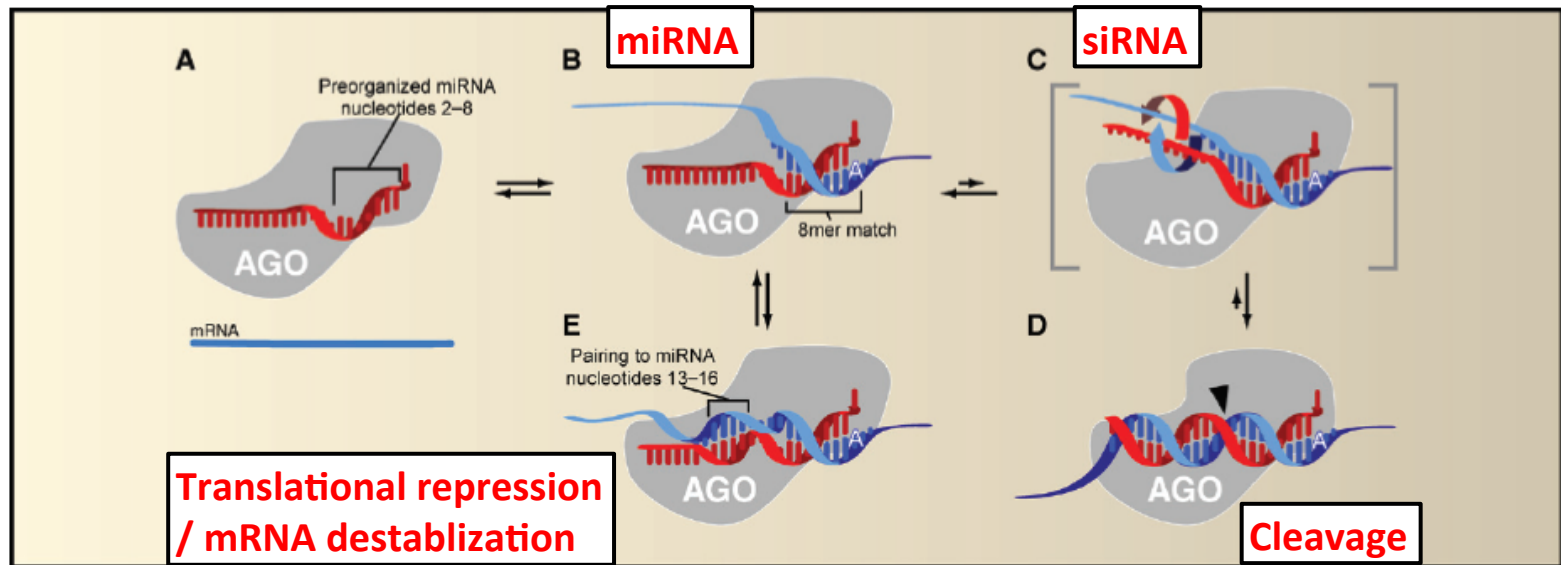
of reads
(deep
sequencing)

29359 reads, 30 experiments



- A legtöbb miRNS duplexben a két RNS szál nem 100%-ban komplementer egymáshoz
 - → termodinamikai aszimmetria
- A duplexnek az a szála kerül be a komplexbe, amelyiknek az 5' végénél lazább a bázispárosodás

A RISC-komplex

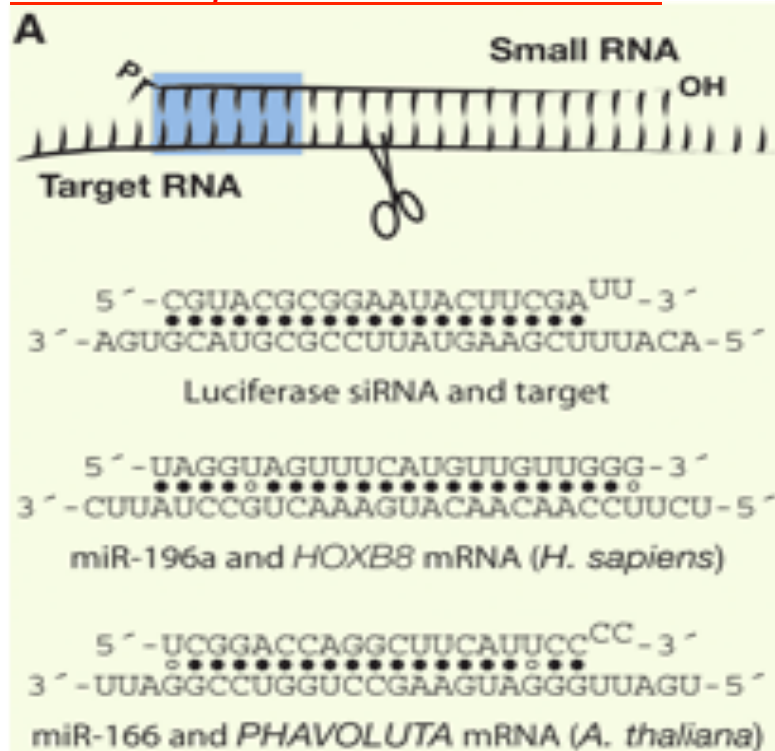


- Az RNS interferencia központi működési egysége a RISC ribonukleoprotein komplex
- Az Argonauta fehérje megköti és prezentálja az érett miRNS-t
- Az elcsendesítendő mRNS-t felismerését a megkötött miRNS-sel való szekvencia komplementaritás teszi lehetővé a RISC számára
- **miRNS „seed”**: miRNS 5' végétől számított 2-7 nukelotid
 - Elsődleges fontosságú a miRNS-ek specificitásának meghatározásában
 - A miRNS-ek hatásának alapja

A miRNS-ek által közvetített génszabályozás mechanizmusai

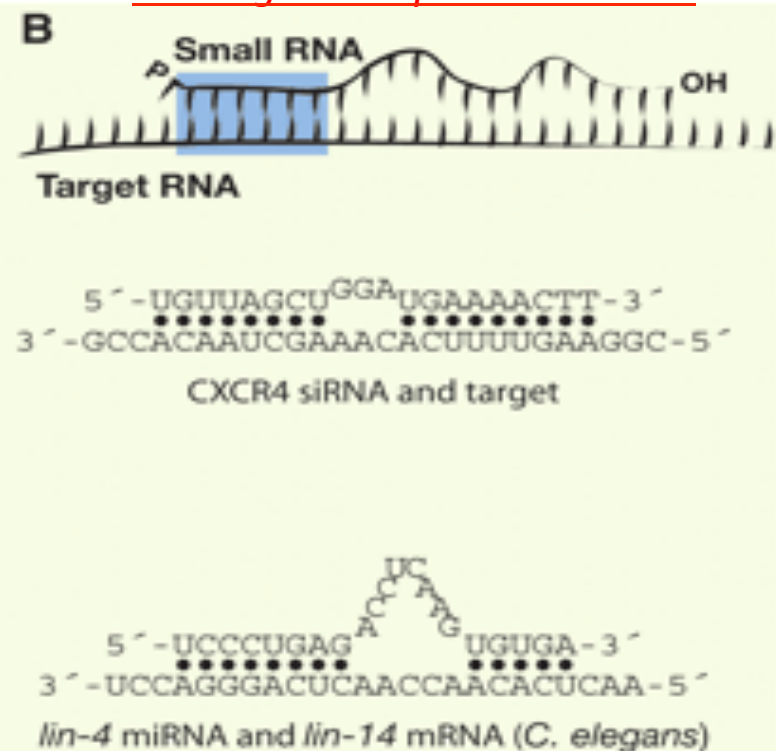
Növényi miRNS-ek, siRNS-ek

100% komplementaritás a célhoz



Állati miRNS-ek

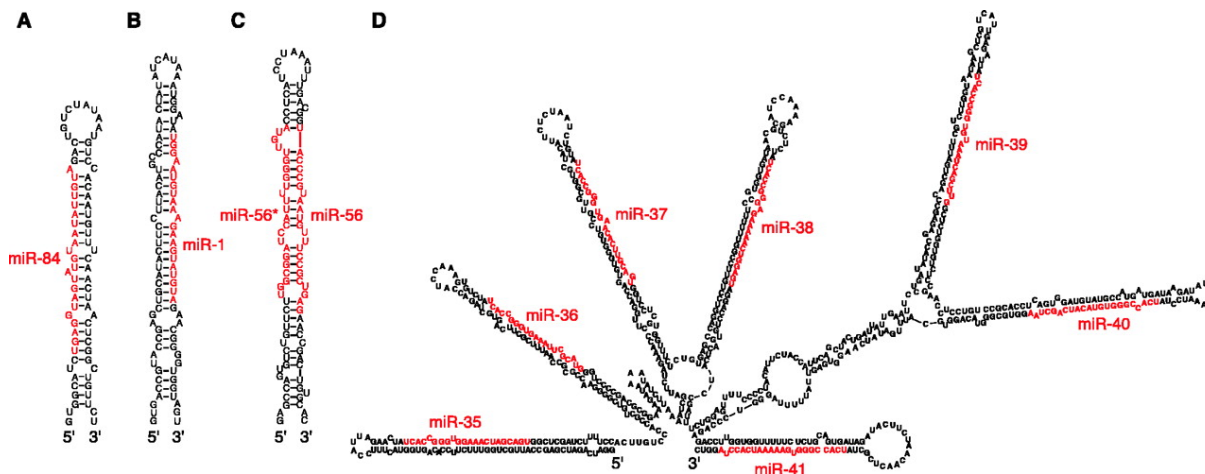
Részleges komplementaritás



Az mRNS hasítása

- mRNS-deadeniláció/ destabilizáció
- transzláció-iniciáció, vagy
- elongáció gátlása

A miRNS-ek csoportosítása: miRNS-családok



- **Definíció:** a miRNS-ek amelyek „seed” szekvenciája megegyezik, egy családot alkotnak
 - A „seed”-en kívüli szekvencia különbözhet
- Néha együtt íródnak át („cluster”), de akár egy vagy több másik kromoszómán is lehetnek
- Kifejeződésük koordinált
- Feltételezhető, hogy hasonló géneket szabályoznak és egymással együttműködnek
- Habár egy miRNS-nek általában enyhe hatása van a célgénre, (kb. 33% csökkenés) több miRNS teljesen elcsendesíthet egy mRNS-t (8 kötőhely – 25X-géncsendesítés)

miRNS-család: Szekvenciájuk és (feltételezhetően) funkciójuk alapján hasonló miRNS-ek csoportja

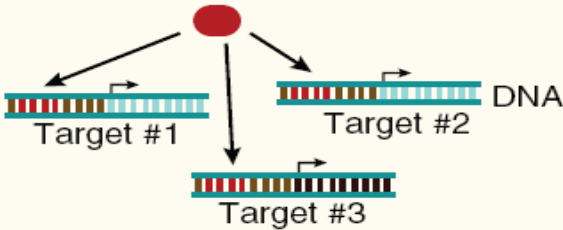
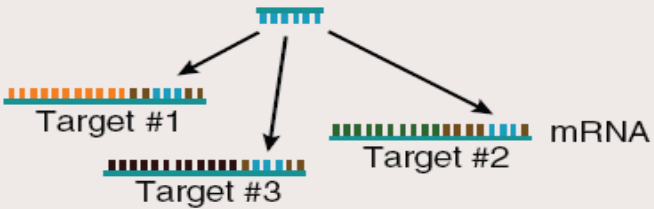
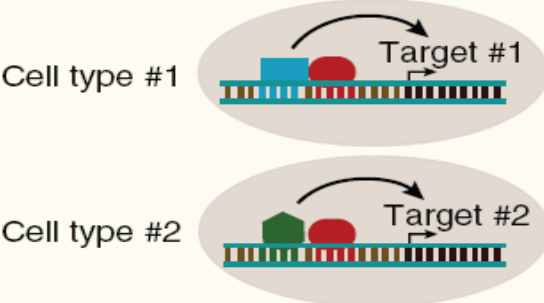
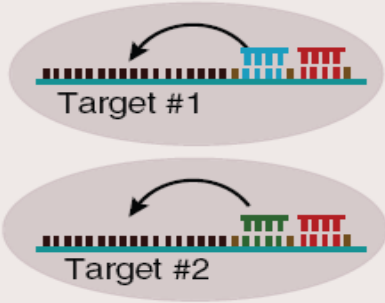
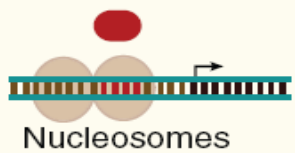
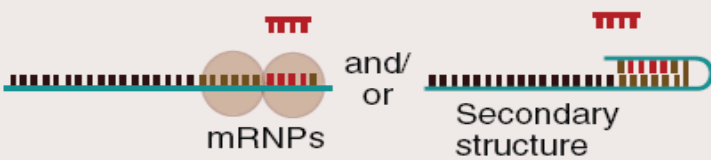
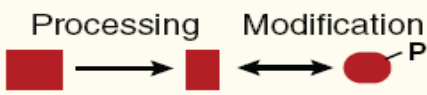
siRNS-ek és miRNS-ek:

- hasonló működési mechanizmus, de eltérő biogenezis és funkció

	siRNA	miRNA
Role	Neutralization of foreign nucleic acids (i.e. viral infection)	Regulation of gene networks
Source or target RNAs	Exogenous	Endogenous
No. of intended target genes	1	Multiple (hundreds)
Complementarity to mRNA target	Perfect	Imperfect (6-8 nts/22)
Degree of gene silencing per small RNA	High	Low
Effect on target mRNA	Endonucleolytic cleavage	Destabilization of transcript /repressed translation

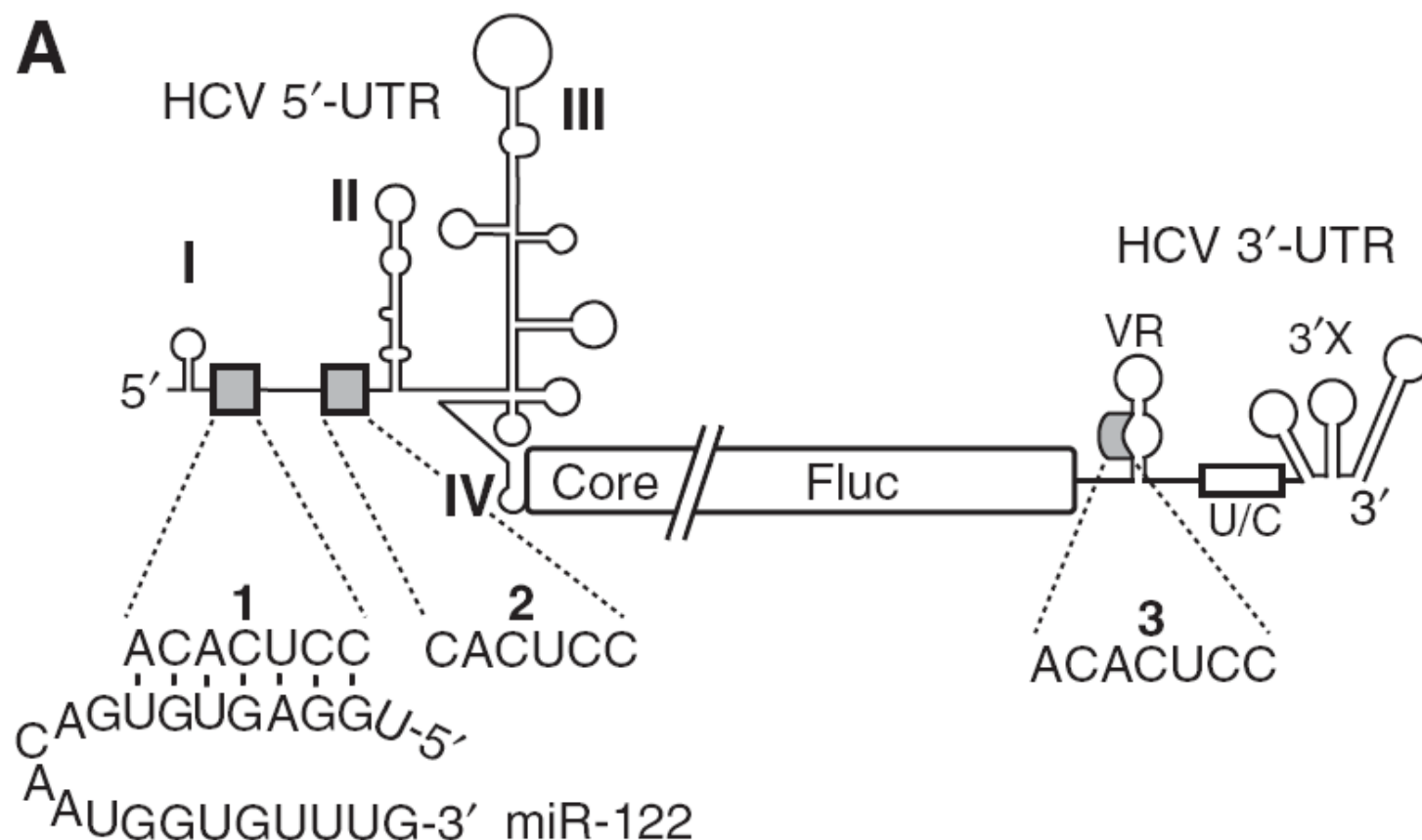
Gén-hálózatok szabályozása:

- transzkripció faktorok vs. miRNS-ek

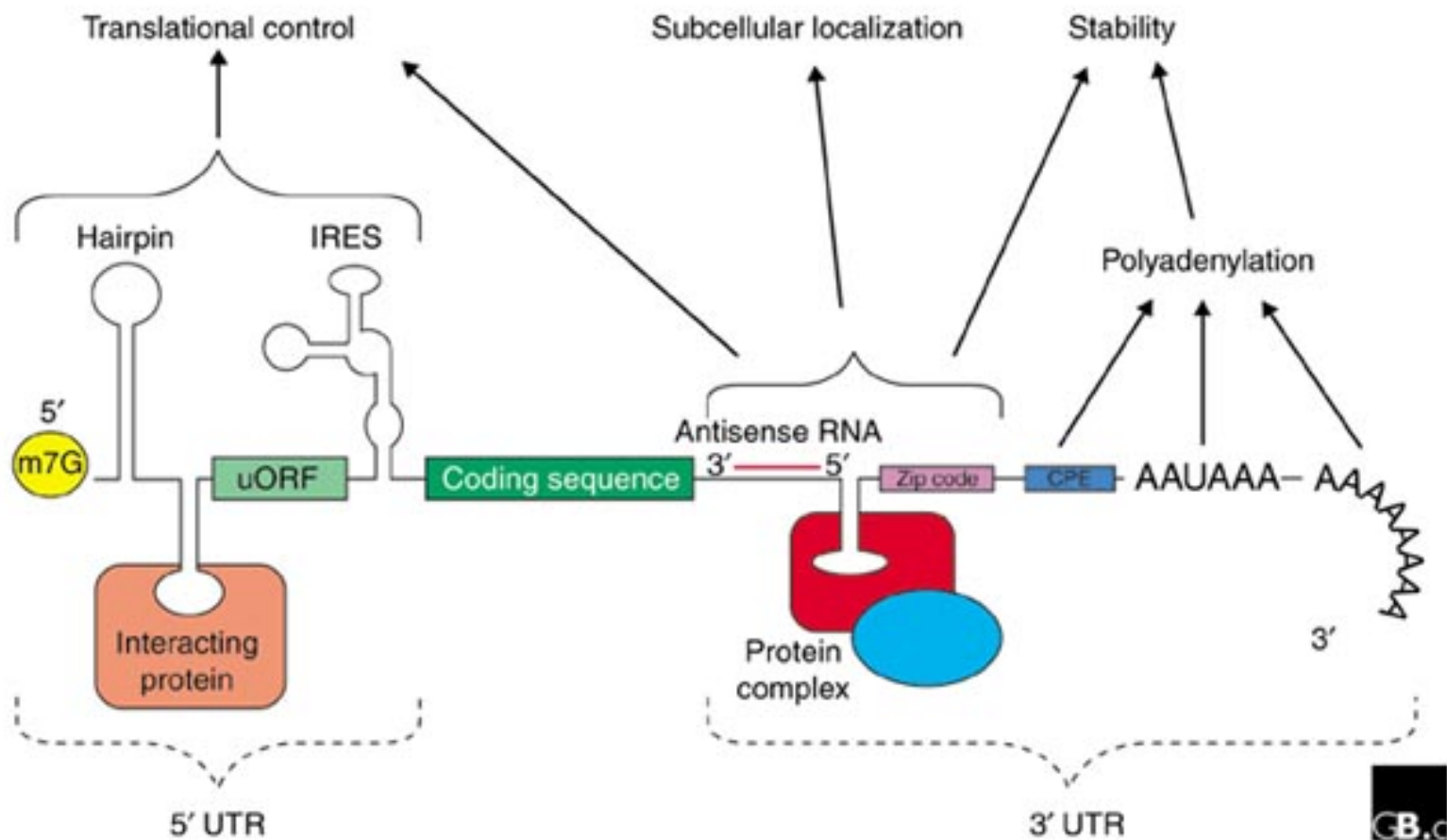
	Transcription factors	miRNAs
Pleiotropy		
Combinatorial and cooperative activity		
Accessibility		
Regulation		
Network motifs	 Example: feedforward loop	

Az miRNS-ek *mindig* csak gátolnak?

microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA



A miRNS-ek túlnyomó többsége az mRNS-ek 3'UTR-éhez kötődik



3'UTR: meghatározza az mRNS-ek stabilitását és a transzláció hatékonyságát

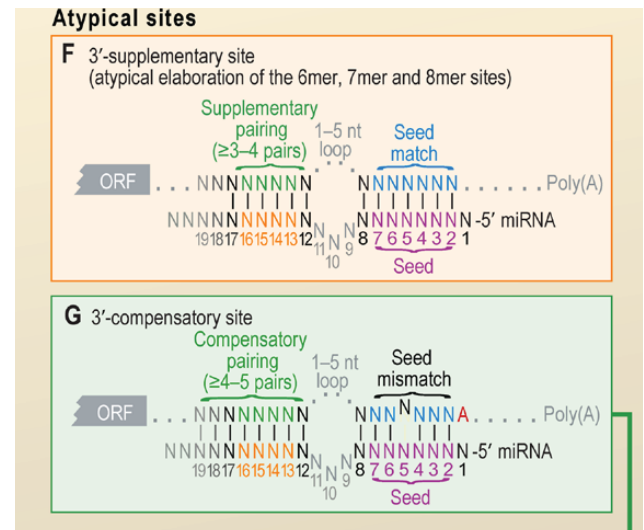
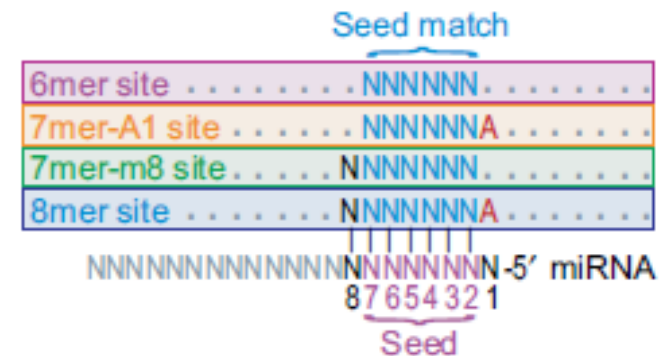
Minden miRNS-nek több száz target génje van

Hogyan lehet azonosítani a miRNS-ek
célgénjeit?

A miRNS:mRNS interakció legfontosabb szabályai

A miRNS-mediált génreguláció hatékonyságát meghatározza:

- A „seed” típusa:
 - A komplementaritás mértéke; 6nt, 7nt, 8nt, stb.
 - A „seed” régió kívüli bázispárosodás a miRNS és az UTR között
- A miRNS-kötőhelyek száma a 3'UTR-en belül
- A miRNS-kötőhelek egymástól való távolsága (Egymáshoz közeli miRNS-kötőhelyek szinergizálnak)
- AU%
 - A leghatékonyabb miRNS kötőhelyek feldúsulnak az AU-gazdag régiókban
- A miRNS-kötőhely elhelyezkedése az UTR-en belül
 - Legalább 15 nt-ra a STOP-kodontól
 - Távol a hosszú UTR-ek középső részeitől



mRNS-miRNS párokat kereső algoritmusok

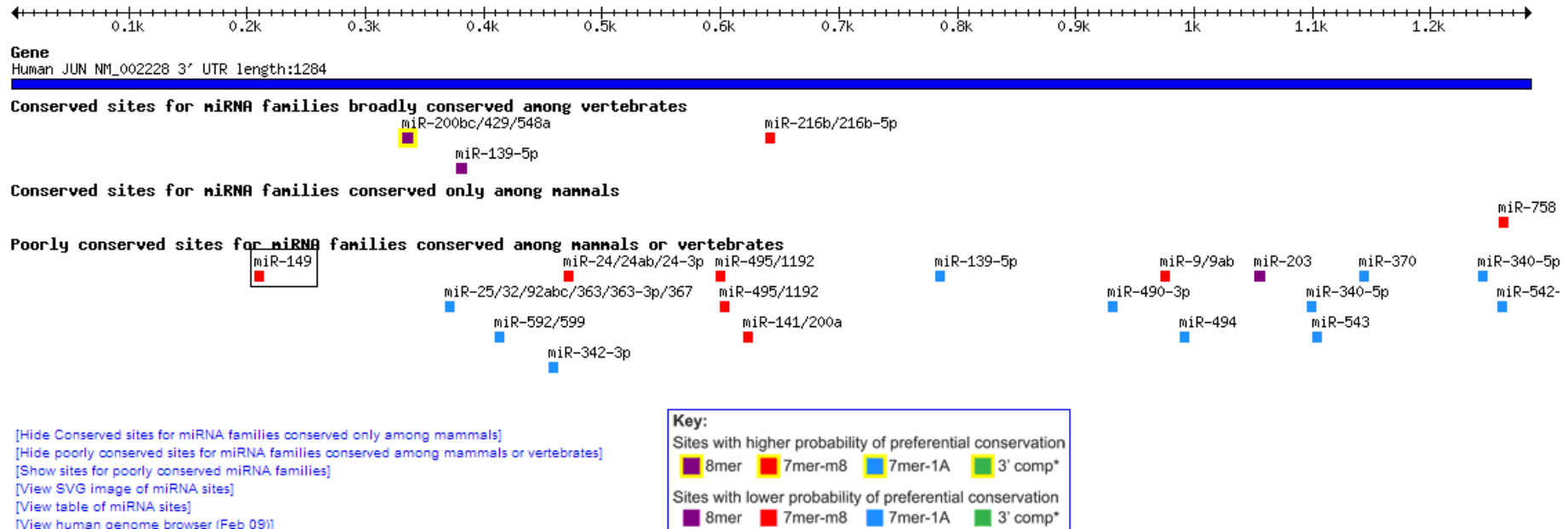
Name	Target species ^a	Algorithms	Performance	Distinguishing feature
DIANA-microT	Any	Thermodynamics	Precision: 66% ^b	Target structure comes before seed complementarity
EIMMo	Humans, mice, fishes, flies, worms	Bayesian method	Sensitivity: 0.8; specificity: 0.95 ^c	Infers the phylogenetic distribution of functional target sites for each miRNA
miRanda	Flies, vertebrates	Complementarity	FPR: 24-39%(Fly)	Also provides the expression profile of miRNA in various tissues.
MirTarget2	Humans, mice, rats, dogs, chickens	SVM classifier	FPR: 22-31%; precision rate is 80% when the recall rate is below 20%	Microarray transcriptional profiling dataset is used for algorithm training
miTarget	Any	SVM classifier	An area under the ROC curve of 88.7% with the complete feature set	Training data is derived from validated miRNA targets from literature survey
PicTar	Vertebrates, flies, worms	Thermodynamics	FPR: 30%	Uses cross-species comparisons to filter out false positives
rna22	Any	Pattern recognition	FPR: 19-25.7% Sensitivity: 83%	Eliminates the use of cross-species conservation filtering, and leads to putative targets sites in 5' UTRs and ORF
RNAhybrid	Any	Thermodynamics, statistical model	SNR: 2.9:1 (vs 3.2:1 ^d); run-time: 13-181 times faster than RNAfold ^e	An extension of the classical RNA secondary structure prediction algorithm ^f
TargetScan	Vertebrates	Seed complementarity	FPR: 31% (human, mouse, rat), 22% (pufferfish, mammal)	Mainly searches for the presence of conserved 8- and 7-nt seed matches
TargetScanS	Vertebrates	Seed complementarity	FPR: 22% (mammal);	Requires 6-nt seed match and conserved Adenosine

^aOrganism(s) for which the program is best suited; ^bSelbach *et al.*, 2008; ^cRepresentative values (For the full ROC curve, refer to the reference); ^dLewis *et al.*, 2003; ^eHofacker, 2003; ^fZuker and Stiegler, 1981.

Target Prediction by TargetScan



Human JUN 3' UTR



- Minden miRNS-nek több tucat, (több száz) célgénje lehet
- Minden mRNS-t több miRNS szabályozhat
- A predikciók nem helyettesítik a kísérletes megerősítést, csak segítenek az érdekes célgének azonosításában

miRNS célgének azonosítása kísérletes úton

- Microarray
 - a célgén mRNS-ek szinte csökken miRNS-ovexpresszáló sejtekben
 - a célgének mRNS-szintje emelkedik miRNS-inhibitorral kezelt sejtekben
- miRNS:mRNS-Ago2-komplexek izolálása immunoprecipitációval
 - Deep sequencing
- 3'UTR luciferáz riporter gén-kísérletek
 - Célgén-3'UTR-luciferáz fúziós konstrukciók tesztelése
 - A prediktált miRNS-kötőhely mutációja

A MIRNS-EK FIZIOLÓGÁS SZEREPE

A miRNS-ek élettani szerepei (1)

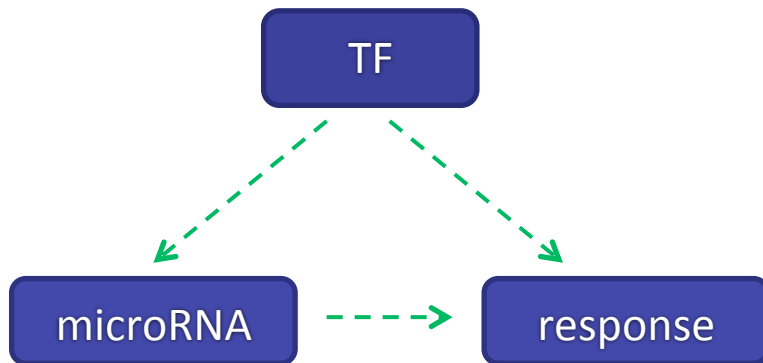
- Génjeink többségét szabályozzák
- Minden eddig tanulmányozott biológiai folyamatban szerepük van:
 - Egyedfejlődés szabályozása
 - Szerv -, szövetfejlődés, differenciáció
 - Óssejtek érése
 - Sejtosztódás és sejthalál
 - Immunválasz
 - Anyagcsere-homeosztázis
- MiRNS-ek hiányában összetett szervezetek nem képesek túlélni

A legtöbb miRNS élettani szerepe ismeretlen

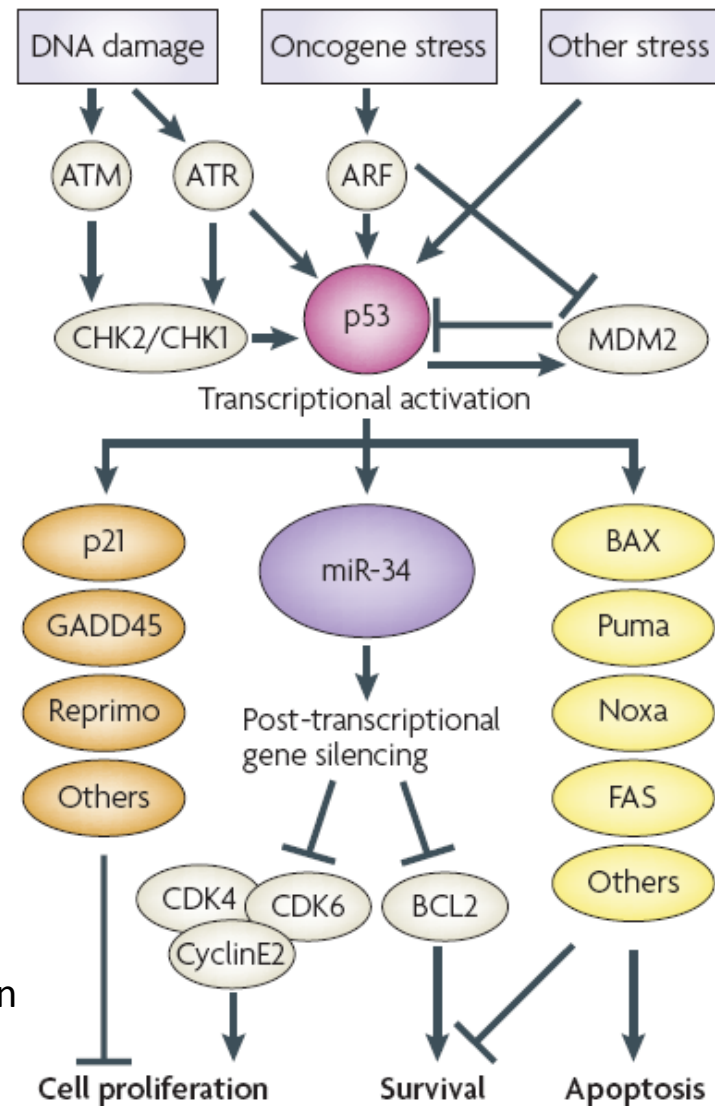
A miRNS-ek élettani szerepei (2)

- Jelátviteli utak szabályozása
 - Forward-loop
 - Negatív visszacsatolás
- Fejlődési „kapcsolók” („developmental switch”)
 - Szervek, szövetek fejlődésének szabályozása (szövetspecifikus miRNSek)
 - Fenotípus kialakítása és fenntartása
 - A differenciáció egy-irányúságának, a transzdzifferenciáció megakadályozásának biztosítása
- A genetikai program robusztusságnak és pontosságának biztosítása; védelem a véletlenszerű transzkripció következményeitől
 - Puffer-szerep,
 - Zajcsökkentés-funkció

Jelátviteli utak szabályozása miRNS-ekkel (1)



- **MiRNS**-ek és a transzkripció faktorokkal együttműködve szabályozzák ugyanazt a biológiai funkciót
- Különösen alkalmasak a válasz robusztusságának növelésére:
 - Számos cél-gén, ugyanazon a jelátviteli úton belül



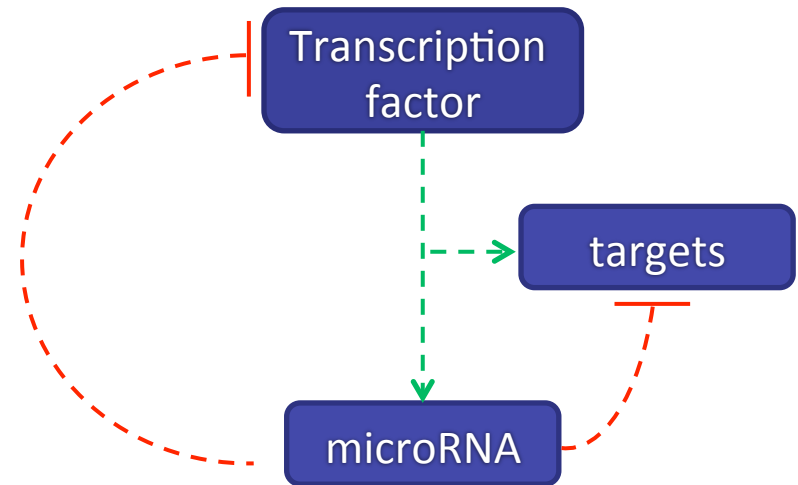
Jelátviteli utak szabályozása miRNS-ekkel (2)

- egyszerű negatív visszacsatolás

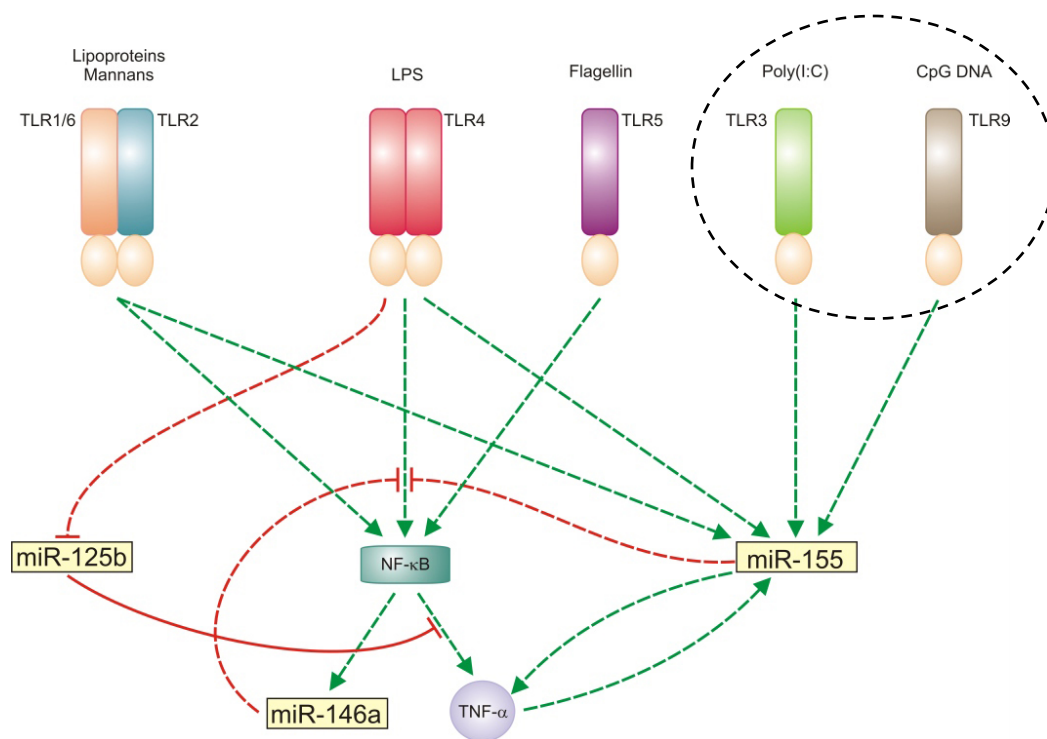
- **single-negative feedback**

- A jelátviteli út aktiválódása indukálja a miRNS-t, amely gátolja a jelátviteli utat
- Pl.: transzkripciós faktor aktiválja a miRNS-t, amely gátolja a transzkripciós faktort
- Jelentőség:
 - A nyugalmi állapot visszaállítása
 - Zajszűrés: random aktiváció következményeinek csökkentése
 - Növeli a rendszer stabilitását

- A miRNS-ek különösen alkalmasak visszacsatolás adására kis késéssel az eredeti aktiváció után:
 - Gyorsabb biogenezis, mint egy fehérjéé
 - Számos cél-gén, ugyanazon a jelátviteli úton belül



miRNS-ek az immunválasz szabályozásban: - példák a negatív visszacsatolásra

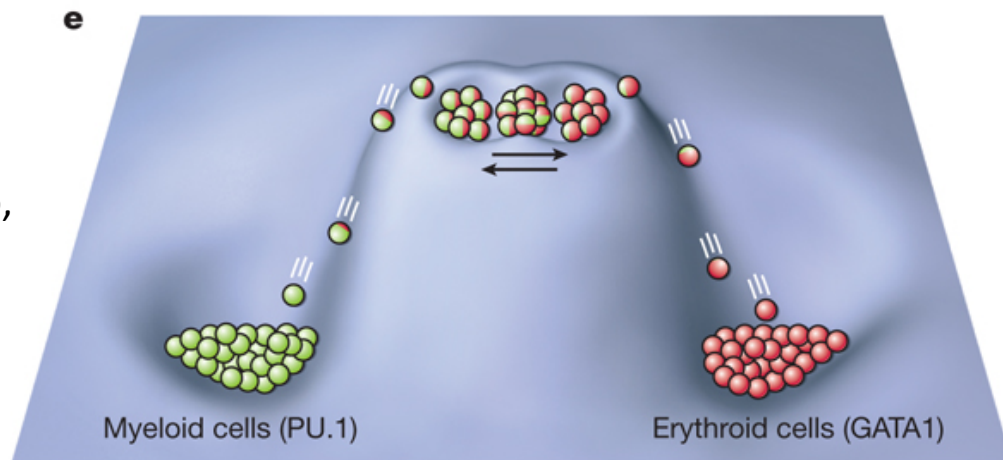
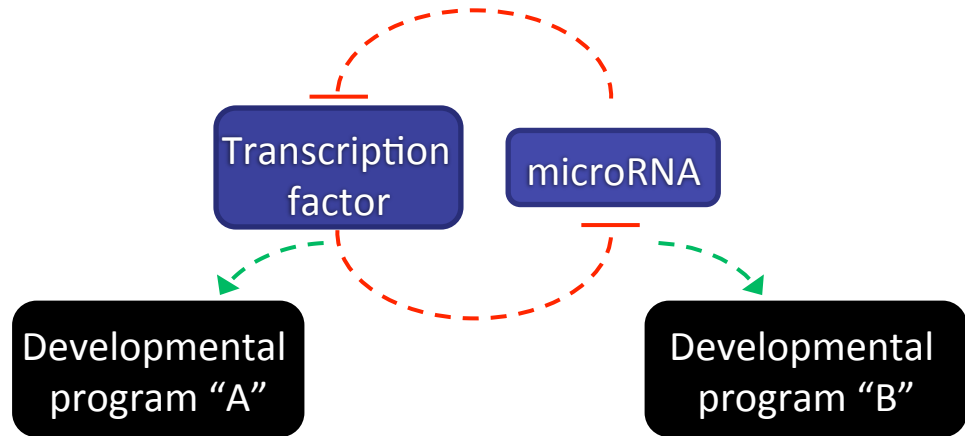


- TLRs (Toll-like receptors) receptorok: a veleszületett immunitás őrszemei
 - baktériumok, vírusok jellegzetes molekuláris mintázatait ismerik fel
- Perceken belül aktiválják az NF-κB jelátviteli utat
 - gyulladásos citokinek termelődését
 - ezáltal a veleszületett, majd azt követően az adaptív immunitást
- Bakteriális TLR-ligandok aktiválják a **miR-146a**-t, amely célgénjein keresztül szuprászálja az NF-κB-jelátviteli utat

miR-146a knock-out egerek: autoimmunitás

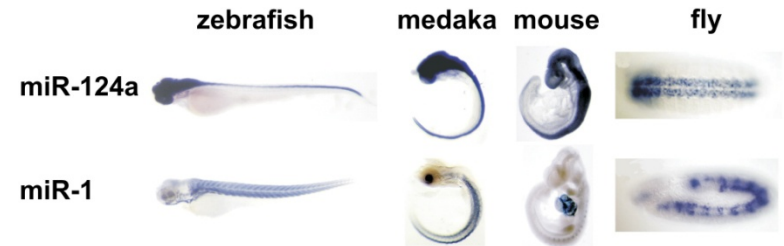
A miRNS mint fejlődéstani kapcsoló - dupla-negatív visszacsatolás

- “bistable switch”
- A kölcsönhatás eredménye két, stabil, egymást kölcsönösen kizáró kifejeződés, illetve fejlődési program
- Hatékony genetikai „kapcsoló” a sejt differenciáció során
- Meghatároz, illetve stabilizál bizonyos genetikai programokat
 - pl. epiteliális-meyenchymális tranzíció, epidermális differenciáció, stb.



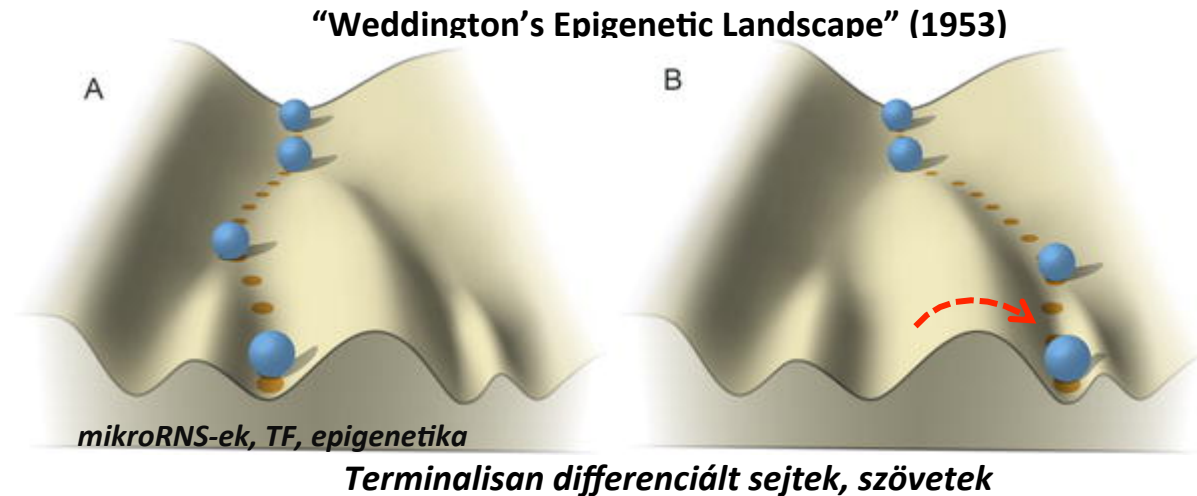
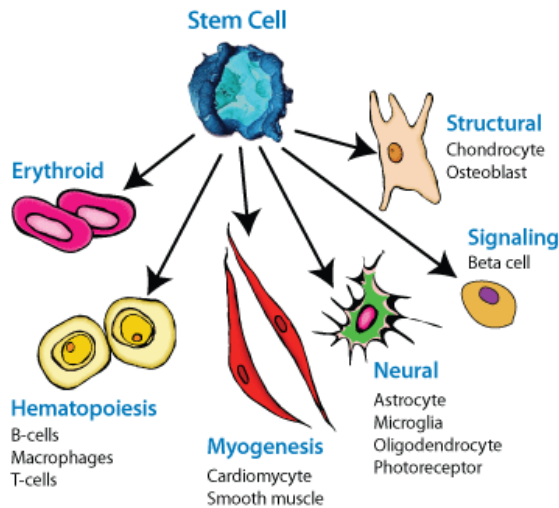
A miRNS, mint a sejt önazonosságának alappilére: szövetsspecifikus miRNS-ek

- Many miRNAs are expressed in a *tissue-, developmental stage, or differentiation-specific* manner
 - miR-1/muscle
 - miR-122/liver
 - miR-203/skin
 - miR-367/embryonic stem cells
- Each tissue- and cell-type has a characteristic miRNA signature
- Overexpression of a muscle-specific miRNA in HeLa cells shifts the transcriptome towards „muscle-direction“
 - Can induce transdifferentiation
- MiRNAs regulate maintenance of tissue identity



miR-206
(expressed in all skeletal muscle cells)

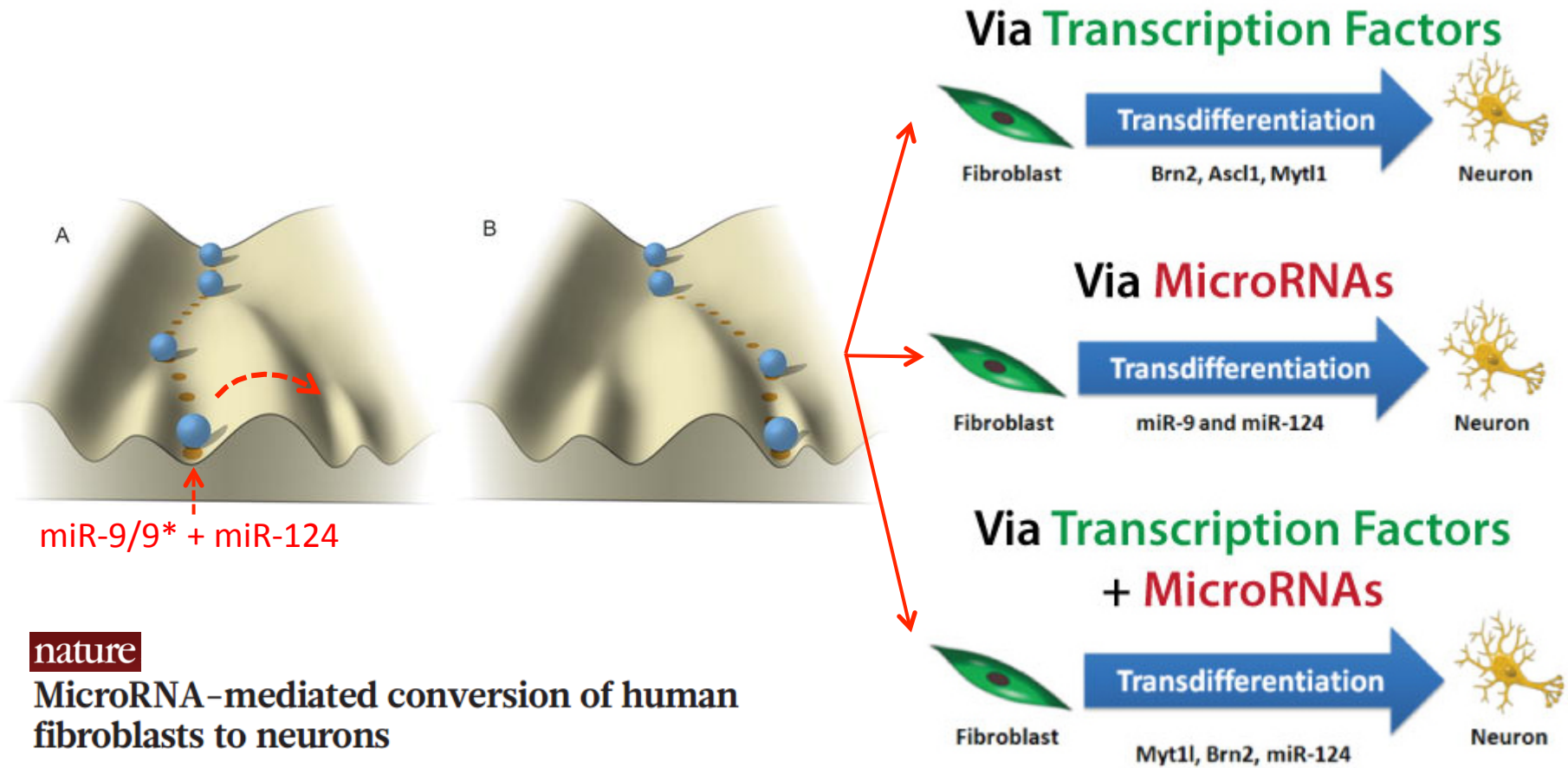
A miRNS-ek kulcsfontosságúak a sejtdifferenciáció kimenetelének meghatározásában - „kanalizáció”



1. A miRNS-ek fontos szerepet játszanak az őssejt-differenciáció „kanalizáció”-jában („canalisation”)
2. A miRNS-ek fontos szerepet játszanak a sejt epigenetikus tájképének kialakításában

A sejt miRNS-profiljának megváltozása a sejt identitásának megváltozását eredményezi!

Transz-differenciáció: Bőrsejtből neuron

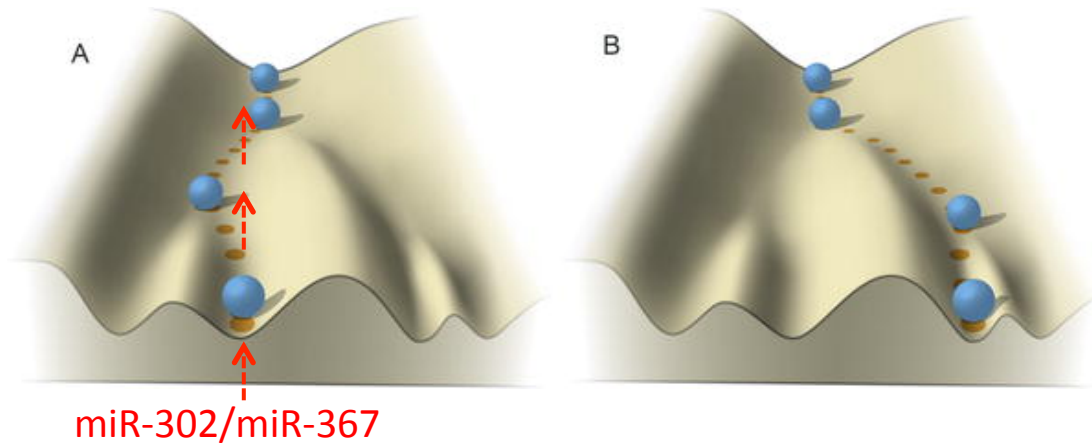


nature

MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons

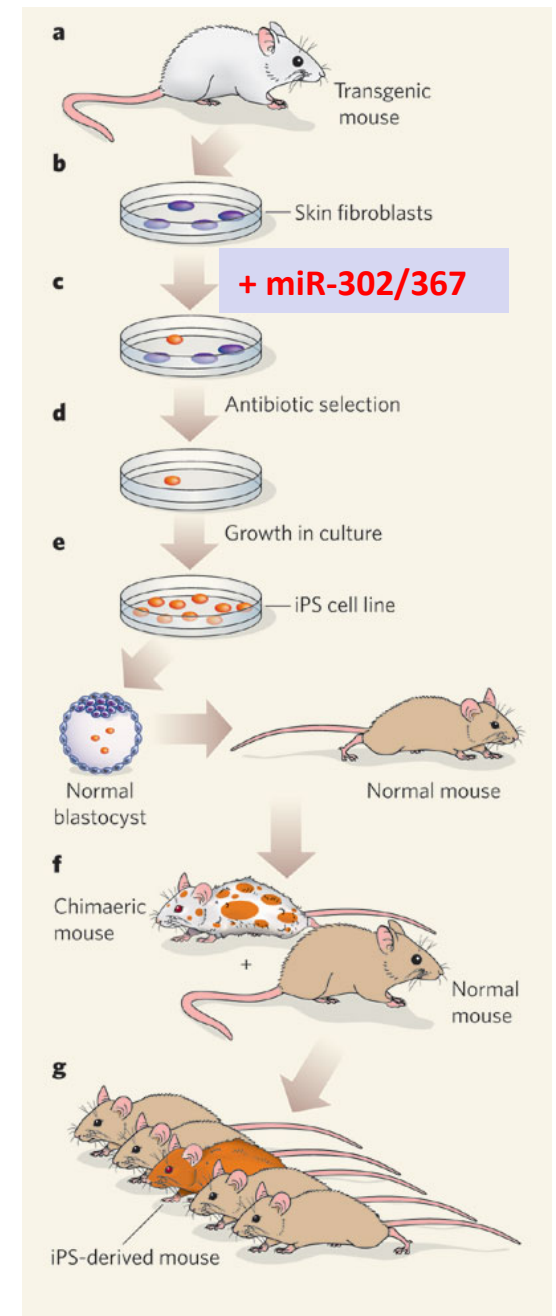
Andrew S. Yoo^{1†*}, Alfred X. Sun^{2*}, Li Li^{3,4,5*}, Aleksandr Shcheglovitov^{6*}, Thomas Portmann⁶, Yulong Li³, Chris Lee-Messer⁷, Ricardo E. Dolmetsch⁶, Richard W. Tsien³ & Gerald R. Crabtree¹

De-differenciáció: terminálisan differenciált sejtől őssejt



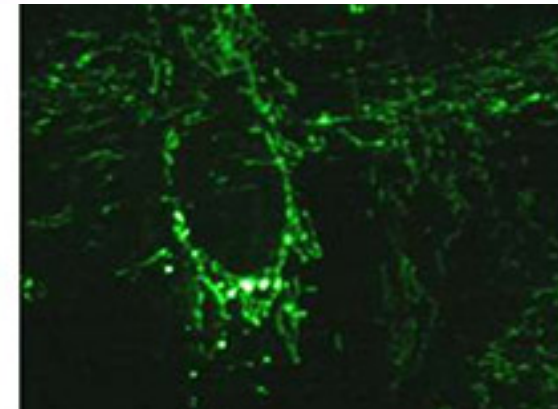
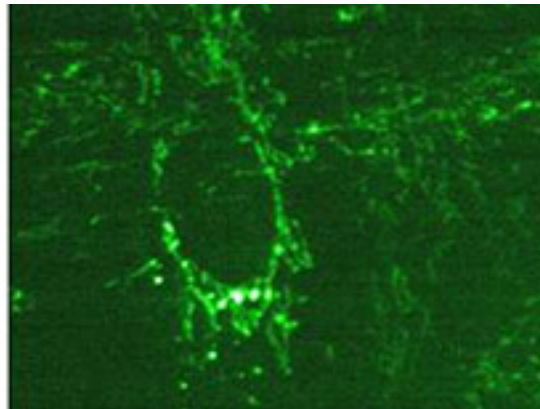
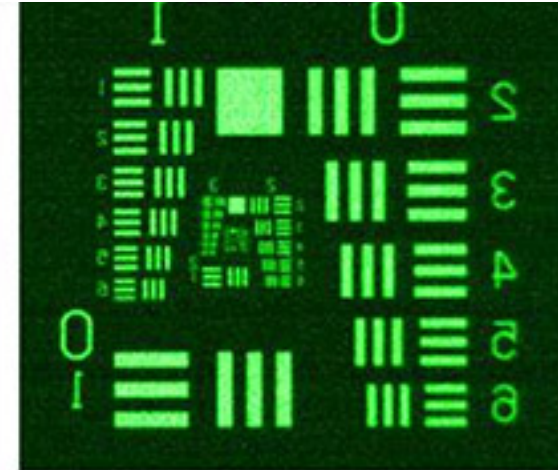
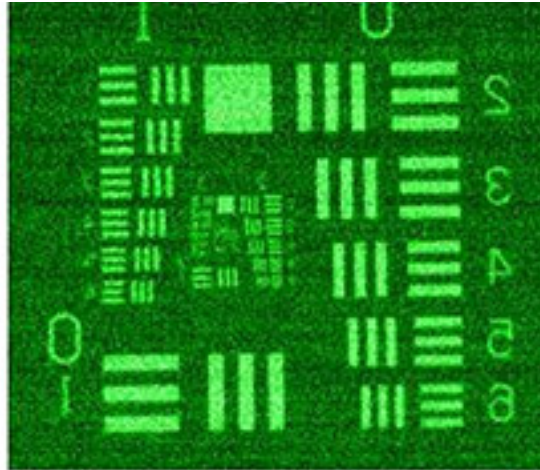
Sequence

mmu-miR-302a	UAAGUGCU UCCAUGUUUUGGUGA
mmu-miR-302b	UAAGUGCU UCCAUGUUUUAGUAG
mmu-miR-302c	UAAGUGCU UCCAUGUUUCAGUGG
mmu-miR-302d	UAAGUGCU UCCAUGUUUGAGUGU
mmu-miR-367	GAAUUGCAC UUUAGCAAUGGUGA

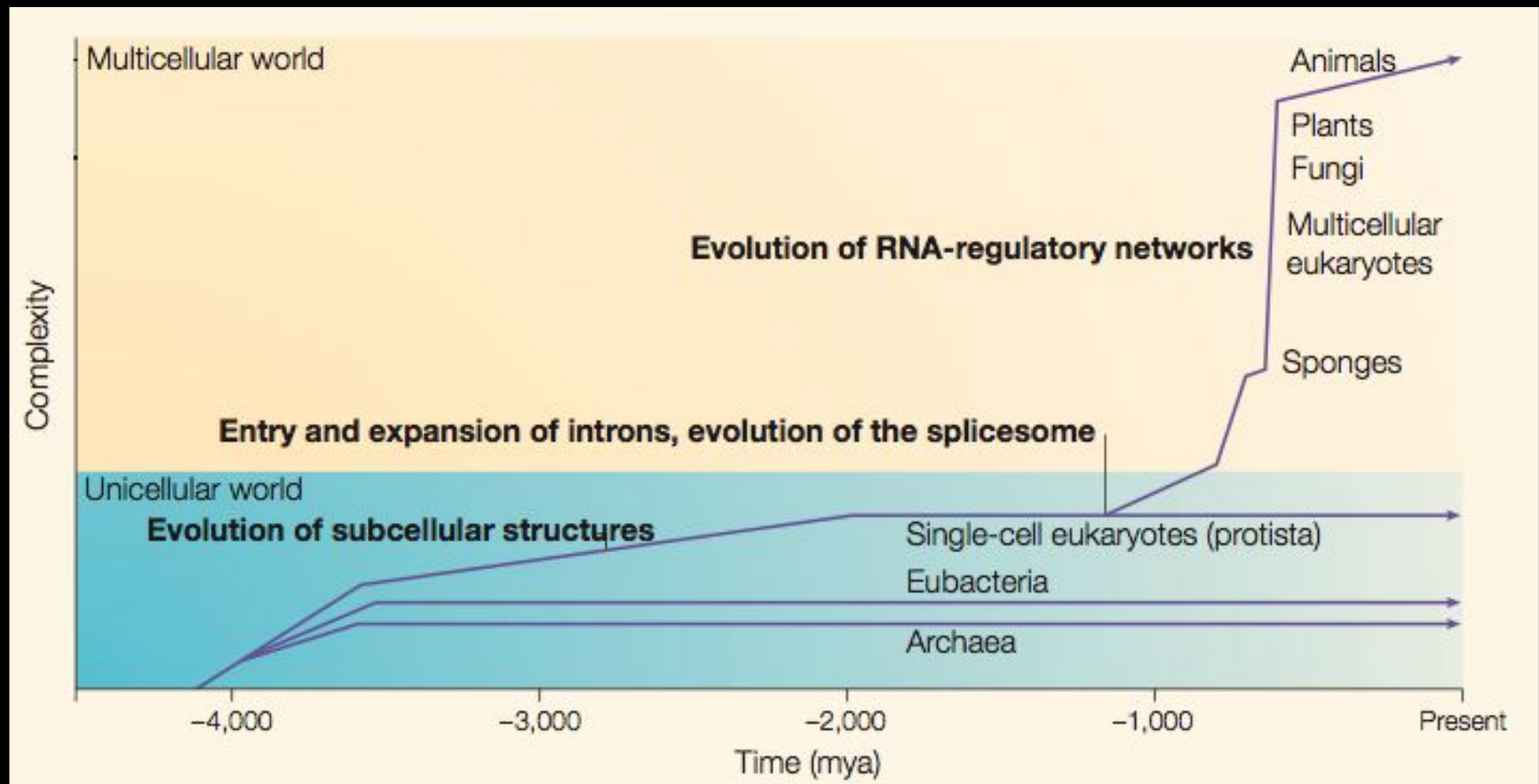


A miRNS-ek mint genetikai „zaj-csökkentők”

- A genom jelentős része detektálhatóan átíródik RNS-sé
- Sejtjeinkben tömegével vannak jelen random átíródó, „nemkívánatos” mRNS-ek
- A szövetspecifikus miRNS-ek meghatározhatják, hogy mely mRNS-ek NEM fognak fehérjét kódolni
- Zajcsökkentés – ezáltal robosztussá téve a sejt genetikai programának megjelenését
- A miRNS-ek fontos szerepe van a sejtek fenotípusának kialakításában, fenntartásában és stabilizálásában.



Az RNS-ek által közvetített génszabályozás megjelenése és a komplex élőlények megjelenése a fejlődéstörténet során



MI REGULÁJA A REGULÁTOROKAT?

A miRNS-ek szabályozása

Több szintű szabályozás:

• Transzkripció

- Transzkripciós faktorok: p53, NF-kB, Myc, stb.

• Epigenetika

- Promóter-metiláció
- Hisztin-módosulások

• Poszt-transzkripció

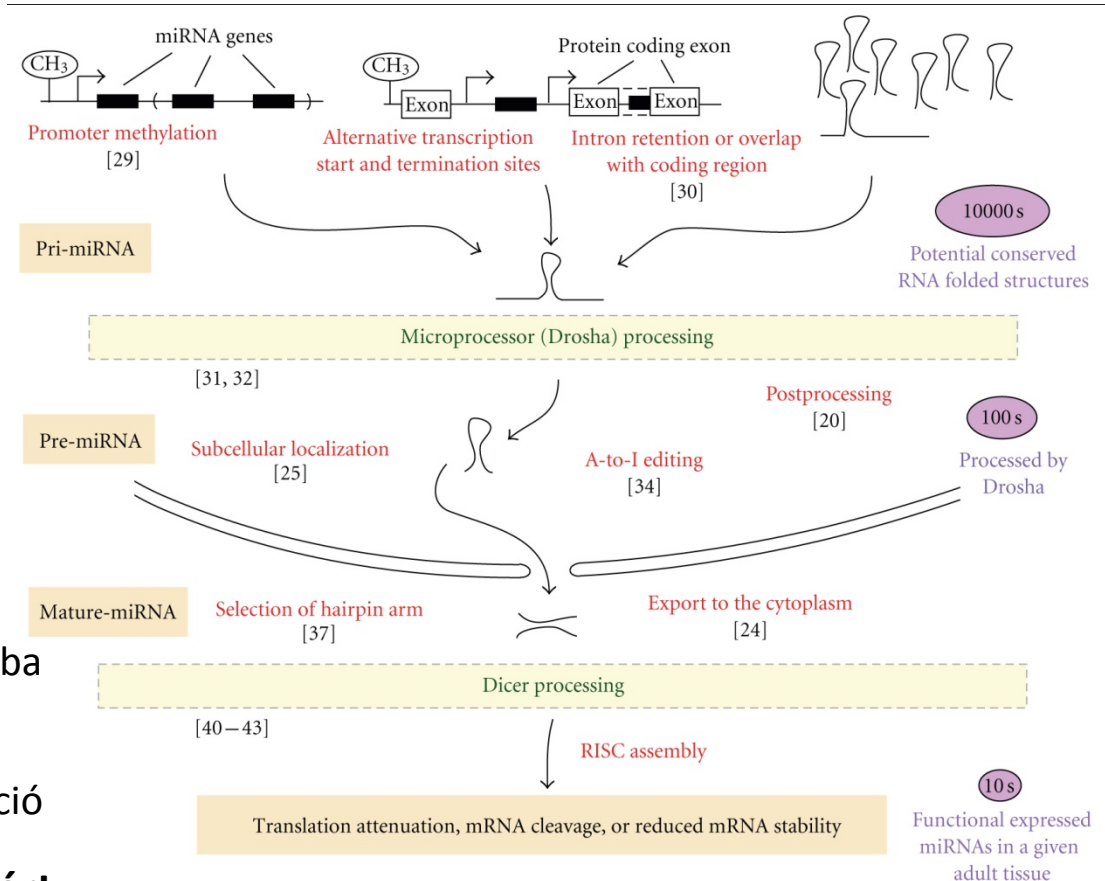
- Biogenezis: Drosha, Dicer
- Export a sejtmagból a sejtplazmába

• Mutáció

- Deléción, amplifikáción, transzlokáción

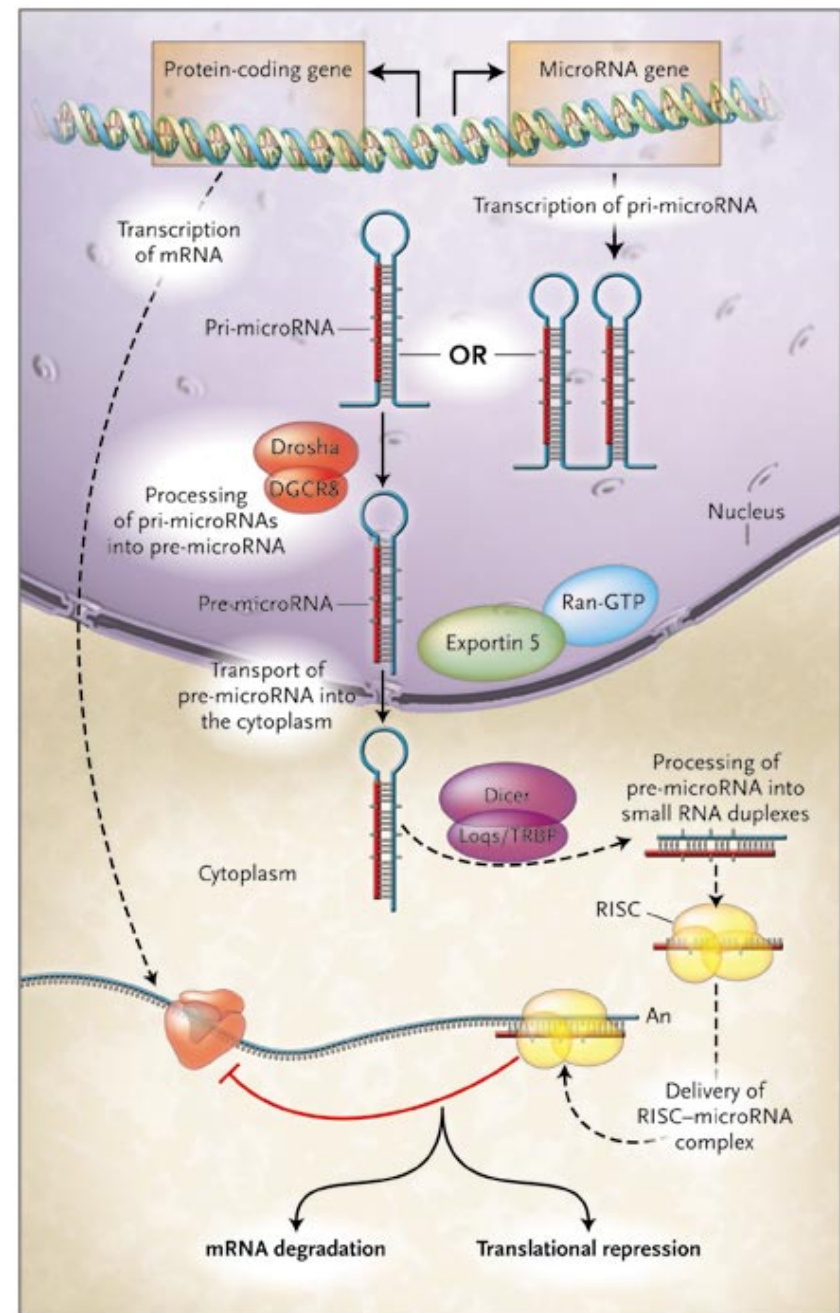
• Kompetíción a miRNS-kötőhelyekért

• Alternatív 3'UTR-ek

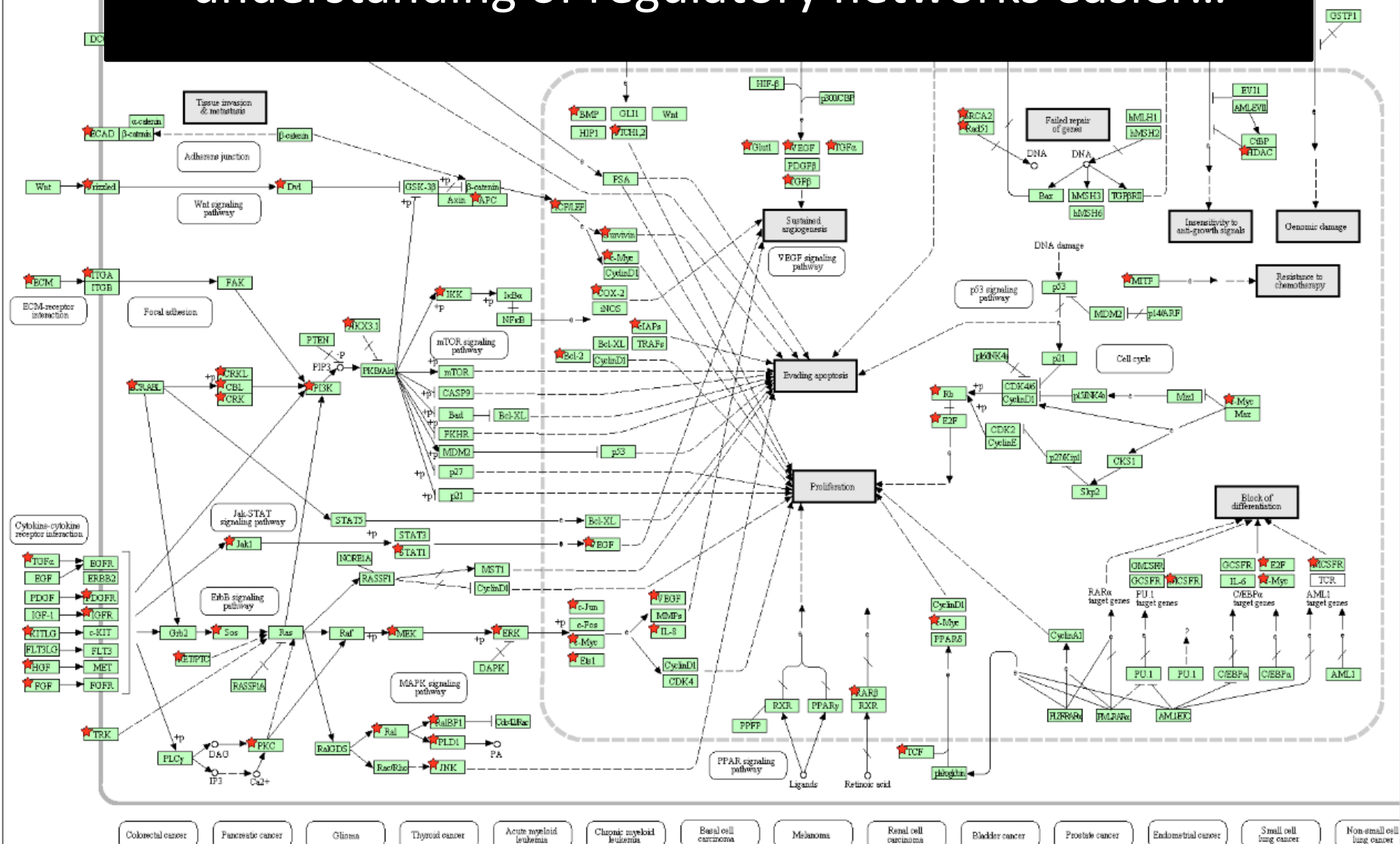


Összefoglalás

- A génműködés szabályozásának egyik alapvető módja
- Az ember géneinek 3-5%-a
- Gátolják a génkifejeződést
 - a poszttranszkripcionális szinten
- Minden miRNS-nek számos célgénje van
 - Feldúsultak a szabályozó génhálózatokban
 - Gyakran transzkripciós faktorok
- Számos miRNS szövetspecifikusan fejeződik ki és szükséges a differenciációhoz
- A miRNS-mRNS kapcsolatot elsősorban a “seed” határozza meg
- Szinte minden biológiai folyamat szabályozásában részt vesznek
- miRNS kifejeződés több szinten szabályozott
- Megváltozott kifejeződésük betegségekhez vezethet



The emergence of miRNAs will not make the understanding of regulatory networks easier...



Colorectal cancer Pancreatic cancer Glioma Thyroid cancer Acute myeloid leukemia Chronic myeloid leukemia Breast cancer Melanoma Renal cell carcinoma Bladder cancer Prostate cancer Endometrial cancer Small cell lung cancer Non-small cell lung cancer