

# RNS alapú génszabályozás

Dr. Henn László, tudományos munkatárs

BBTE, Haladó Genetika

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen  
készült az Európai Unió támogatásával.

Projektazonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

Olvasási idő: 45m perc.

## RNS alapú génszabályozás

Henn László, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Eukarióta szervezetekben számtalan olyan RNS féleséget ismerünk, melyek fehérjét nem kódolnak, azonban fontos biológiai funkcióval rendelkeznek. A nem-kódoló RNS-ek egyik ilyen fontos funkciója a gén kifejeződés szabályozása, melyben hosszú nem-kódoló RNS-ek (long non-coding RNA, lncRNS) és kis nem-kódoló RNS-ek is részt vesznek.

A változatos **hosszú nem-kódoló RNS-ek** (lncRNS) közös tulajdonsága, hogy 200 nukleotidnál hosszabbak, változatos méretűek. Legtöbbször a mRNS-ekhez hasonlóan 5' végi sapkát hordoznak, poliadeniláltak lehetnek, illetve intronokat is tartalmazhatnak. Sokféle biológiai funkcióval bírhatnak, és sokféle módon fejthetik ki hatásukat (különböző hatásmechanizmusok). A lncRNS-eket hatalmas géncsalád kódolja, a humán genom például kb. 35.000 lncRNS-t tartalmaz. E gének elhelyezkedésüket tekintve is sokfélék lehetnek: előfordul például, hogy fehérje kódoló gének intronjában helyezkednek el, vagy ilyen génekkel átfedésben, de ellentétes orientációban vannak jelen a genomban. Általában jellemző rájuk a szövetspecifikus kifejeződés. A lncRNS-ek szekvencia szinten kevésbé konzerváltak.

A lncRNS-ek különféle szinteken szabályozhatják célgének kifejeződését:

1. Transzkripció szabályozása: lncRNS-ek transzkripciós fehérjekomplexhez kötődve befolyásolhatja az enhanser elemhez vagy éppen más transzkripciót szabályozó fehérjékhez történő kötődését. Az így történő szabályozás segítheti, vagy gátolhatja célgének kifejeződését.
2. Poszt-transzkripcionális szabályozás: lncRNS-ek mRNS-ekhez kötődve gátolhatja splicingot, befolyásolhatja a mRNS citoplazmába történő szállítását, valamint a mRNS lebomlását.
3. Transzláció szabályozása: mRNS-hez kötődve megakadályozhatja a transzlációt.
4. Szabályozás kromatin szinten (epigenetika): A lncRNS heterokromatin kialakításáért felelős fehérjekompleket irányíthat a megfelelő genomi régióhoz. Emlősökben pl. a HOTAIR lncRNS homeotikus gének repressziójában, a Xist/RepA lncRNS az X-kromoszóma inaktivációjában vesz részt.
5. lncRNS-ek fehérjékhez kötődve szabályozhatják azok működését.

A **kis nem-kódoló RNS-eknek** 3 fő csoportját a kis interferáló RNS-ek (small interfering RNAs, siRNS) a mikroRNS-ek (miRNS) valamint a Piwi kölcsönható kis RNS-ek (Piwi-interacting RNA, piRNS) alkotják, ezek közül az siRNS-ek és a miRNS-ek vesznek részt a génkifejeződés szabályozásában, míg a piRNS-ek fő funkciója a genom védelme a transzpozonok (ugráló genetikai elemek) okozta genetikai instabilitástól.

Az **siRNS-eket** 20-25 bp hosszúságú kettős szálú RNS-ek (dsRNS) alkotják, melyek hosszú (több száz bp-os) dsRNS prekursorokból származnak. A hosszú prekursor dsRNS származhat sejten kívülről (pl. virális RNS). Ebben az esetben exogén siRNS-ekről beszélünk. A prekursor viszont származhat endogén forrásból is, azaz lehet a saját genom által kódolt (exogén siRNS-ek). Ez előbbieket szerepe a vírusfertőzés megakadályozásában van, míg utóbbiak funkciója génkifejeződés szabályozása illetve a transzpozonok elleni védelem.

A hosszú prekurzor dsRNS-eket a Dicer-2 enzim hasítja 20-25 bp-os darabokra. A fehérje rendelkezik dsRNS végeket felismerő ún. PAZ doménnel, dsRNS-t megkötő dsRDB doménnel, valamint az RNS hasítást végző RNázIII doménnel. A hasítás végén siRNS duplexek jönnek létre, melyek 5' végükön foszfát, 3' végükön hidroxil csoportot tartalmaznak, illetve 2 nukleotidnyi 3' túlnyúló végük van.

Az siRNS duplex ezután az RNS indukált csendesítő fehérje komplexbe (RNA induced silencing complex, RISC) kötődik be, melynek központi fehérjéje az Argonata 2 (AGO2) fehérje. A RISC érése során a siRNS duplex egyik szála eltávolítódik (passanger szál), míg a megmaradó RNS szál (guide szál) 3' vége 2'OH metilálódik. Az érett egyes szálú siRNS-t tartalmazó RISC képes lesz az siRNS-sel komplementer RNS szál megkötésére és hasítására. A hasításért az AGO2 fehérje RNázH aktivitású PIWI doménje felelős.

Az endogén siRNS útvonalat növényekben fedezték fel, de állatokban is működik. Növényekben 3 fő típusuk ismert, a *cis*-siRNS-ek (*cis*-acting siRNAs) szerepe a transzpozonok csendesítésben van. A *trans*-siRNS-ek (*trans* acting siRNAs) cél mRNS-ek szabályozásában vesznek részt. A *natsi*-siRNS-eknek (*natural antisense derived siRNAs*) a stresszválaszban van fontos szerepük.

Az siRNS-ek közvetítette génekpressziós csendesítés a RITS (RNA induced transcriptional silencing) komplex által valósul meg. A mechanizmus működésének lényege, hogy a genomi redetű prekurzor siRNS-eket a Dicer-1 feldarabolja, amelyek a RITS komplexbe kötődnek. Az érett siRNS-eket hordozó RITS komplex a transzkripció során képződő RNS szálhoz kötődik és a transzkripció helyére (genomi lokusz) toborozza a heterokromatin kialakulásához szükséges faktorokat ezzel meggátolva a lokuszról történő további transzkripciót.

A **miRNS**-ek a kis nem kódoló RNS-ekhez tartoznak. Jellemzően 21-24 bp hosszúságú kettős szálú RNS-ek, melyek legfőbb funkciója a célgénjeik kifejeződésnek szabályozása elsősorban poszt-transzkripcionális szinten. A miRNS szintű genszabályozás konzervált mechanizmus, állatokban és növényekben egyaránt megtalálható.

A miRNS-ek a genomban kódolt miRNS génekről átíródó, részlegesen prekurzor dsRNS-ekből származnak. A miRNS gének az eukarióta genomok egyik legnépesebb géncsaládját alkotják, például a humán genomban közel kétezer miRNS gén található. E gének igen sokfélék lehetnek, vannak policisztronos (egy gén több miRNS-t kódol) illetve egyedi miRNS gének. A miRNS-ek más génekkel is átíródhatnak, lehetnek például fehérje kódoló gének intronjában, vagy nem-transzlálódó régiójában (UTR).

A miRNS génekről elsőként egy hosszú, jellemzően több száz bp hosszúságú, részleges kettős szálú elsődleges miRNS (*primary, pri-miRNS*) az RNS polimerázII írja át és általában poliA farokkal rendelkezik, szerkezetében a hajtú szerű struktúrák találhatók. A *pri-miRNS*-ből az RNázIII aktivitású Droscha fehérje hasítja ki a kb. 60-70 bp-os hajtú szerű stem-loop formációkat, melyek 5' foszfát, 3' -OH csoportot hordoznak és 2 nukleotidos túlnyúló végük van a 3' végén. Ezeket a hajtú szerű RNS-eket prekurzor miRNS-eknek (*pre-miRNS*) hívjuk. A *pre-miRNS*-ek aktív transzporttal jutnak a sejtmagból a citoplazmába. A citoplazmában a *pre-miRNS*-ek a Dicer-1 fehérjéhez kötődik, amely hajtú szerű struktúrát a hurok részt lehasítja, ily módon 22-24 bp-os érett kettős szálú miRNS-t hozva létre, melynek 3' végén 2 túlnyúló nukleotid van. Az érett miRNS kétféle effektor fehérje komplexbe kötődhet be, attól

függően, hogy az érett miRNS két szála mennyire egymással. Ha a két szál a 9-10. nukleotid pozícióban nem bázispárosodik tökéletesen, a miRNS az Argonauta-1 (AGO-1) fehérjét tartalmazó miRISC (miRNA induced silencing complex) komplexbe kötődik. Amennyiben a két szál között a bázispárosodás tökéletes, a miRNS az siRNS RISC (siRISC) komplexébe kötődik. A két komplex működése eltérő: a miRISC a célgén mRNS-éhez kötődve első sorban annak translációját gátolja, vagy stabilitását befolyásolja, míg a siRISC a célgén mRNS-ének lebomlását eredményezi (lásd siRNS hatásmechanizmusa).

A miRNS-ek elsősorban a célgének kifejeződését gátolják, de arra is van példa, hogy azok stabilitását növelik vagy translációját serkentik. A miRNS-ek közvetített génexpressziós szabályozás a következő sajátságok miatt meglehetősen összetett rendszert alkot:

- Az eukarióta gének kb feléről tudjuk, hogy kifejeződésüket miRNS-ek is szabályozzák. A miRNS-ek általában a cél mRNS UTR-jével komplementerek, de nem szükséges teljes komplementaritás.
- Egy miRNS-nek általában több célszekvenciája is van (akár több száz).
- Egy mRNS-en több miRNSnek lehet célszekvenciája.
- miRNS-ek egymás expresszióját is képesek szabályozni.

Ezen pontok alapján látható, hogy a miRNS általi génszabályozás rendkívül bonyolult, ugyanakkor nem elhanyagolható tény, hogy a miRNS-ek mutációi ritkán okoznak drámai fenotípust. A miRNS általi génszabályozás elsődleges feladata a véletlenszerű genetikai zaj pufferelése lehet így biztosítva az egyedfejlődés robosztus génszabályozását (fejlődés „kanalizációja”).

A kis nem kódoló RNS-ek harmadik csoportját a PIWI kölcsönható RNS-ek (**piRNS**) képezik. Jellemzően 24-32 nukleotid hosszúságú RNS féleségek, amelyek elsősorban az állati ivarvonal (csírvonal) transzpozonok elleni védelmében játszanak szerepet ez által biztosítva az örökítőanyag generációról generációra történő sérülésmentes tovább jutását. A piRNS-eknek nincs konzervált szekvenciájuk sem jellegzetes másodlagos szerkezetük, azonban jellemző rájuk, hogy transzpozon szekvenciákkal homológiát mutatnak 5' végükön uridin található (5'U). A piRNS-eket kódoló DNS szekvenciák az állati genomokban általában piRNS klaszterekben tömörülnek (néhány 10-több ezer piRNS), melyek változatos méretűek. A piRNS klaszterek meglehetősen evolúciósan konzerváltak, de szekvenciájuk nem, általában a genom mentes szakaszán találhatók.

A piRNS-ek biogenezeise és hatásmechanizmusa két lépésből áll. Az elsődleges processzálas testi sejtekben és ivarvonal sejtekben is végbe mehet. Ennek során a piRNS klaszterekről, hosszú egyes szálú prekursor piRNS-ek képződnek, melyek a sejtmagból kilépve a citoplazmában elhelyezkedő fehérjekomplexekhez kötődnek, amelynek tagja többek között az Argonauta fehérjecsaldához tartozó PIWI (egérben MIWI, Zebrahalban ZIWI, Xenopusban XIWI), amely egy RNáz H endonukleáz aktivitással rendelkező fehérje, tehát egyesszálú RNS hasítására képes. Ebben a citoplazmikus fehérjekomplexben történik meg a prekursor piRNS-ek hasítása, érett kisméretű, 5'U piRNS-eket eredményezve.

A biogenezis második lépése a citoplazmában működő ping-pong ciklus, amely kizárólag ivarvonal sejtekben játszódik le. Ennek során:

1. Az elsődleges (5'U) piRNS Aubergine (Aub) fehérjéhez kötődik.

2. Az Aub megköti az elsődleges piRNS-sel komplementer transzpozon RNS-t és elhasítja azt 10 nukleotidnyi távolságra az 5'U- nel komplementer adenintől: Így a transzpozon RNS-ből egy olyan másodlagos piRNs keletkezik amelynek 10. nukleotidja adenin (10A)
3. A 10A másodlagos piRNS disszociál Aub-ról és az Argonauta3 (AGO3) fehérjéhez kötődik.
4. Az AGO3 olyan piRNS klaszterről származó hosszú RNS képes megkötni, amely komplementer a benne lévő másodlagos piRNS-sel. Ezt a hosszú prekursor RNS-t a 10. adeninnel komplementer uracilnál hasítja, tehát egy új 5'U elsődleges piRNS-t hoz létre, amely újból képes az Aub-hez kötődni.

Ez a mechanizmus rendkívül hatásos módja a transzpozonról származó RNS-ek eliminálásának az ivarvonal sejtekben. Ez azért kiemelt fontosságú az öröklődés rendjének fenntartása szempontjából, mert a transzpozonok egyik formája a retrotranszpozonok úgy „ugrálnak” a genomban, hogy reverz transzkripció segítségével RNS terméküket a genom random pozíciójába beépíteni képes DNS-sé másolják át, amely érthető módon végzetes mutációk kialakulásához vezetne.

A piRNS útvonal a felvázolt mechanizmuson túl is részt vesz a transzpozonok elleni harcban a transzpozon RNS-ek átíródásának megakadályozásával. Az érett piRNS-ek a PIWI fehérjével kapcsolódva belép a sejtmagba, ahol a piRNS-sel komplementer, éppen átíródó transzpozon RNS-hez képes kapcsolódni. Ekkor a PIWI fehérje közreműködésével az átíródó kromatin régióban olyan fehérjekomplex alakul ki, amely a kromatin gyors tömörödéséhez (DNS metiláció, hisztonmódosítások, heterokromatin kialakulás) vezet, ami megakadályozza a további transzpozon expressziót. Ez a heterokromatin kialakulással járó transzpozon csendesítés, a testi sejtekre is jellemző. Ezen kívül ismeretes, hogy a piRNS-ek például szerepet játszanak az anyai hatású (a korai embrióban jelenlevő anyai eredetű) RNS-ek lebontásának szabályozásában.

A nem kódoló RNS-ek gyakorlati alkalmazása: **RNSi**

Az RNS interferencia (RNS inhibíció, RNSi) poszt-transzkripciós géncsökkentésen alapuló eljárás. Lényege, hogy a sejt valamelyik saját kis RNS útvonalat rábírnak, hogy semlegesítse egy tetszőleges gén aktivitását. Hatásmechanizmusát tekintve beszélhetünk mRNS lebontásról, vagy transláció gátlásról. Az RNSi elterjedt genomikai eszköze a géntünetnek. Az RNSi jellemzően két kis RNS útvonalon keresztül használható. Az siRNS útvonalon keresztül ható géncsökkentésnek a beindítója a hosszú (jellemzően néhány száz bp) kettős szálú RNS (dsRNS). Ennek megfelelően a kezelni kívánt sejtekbe /szövetekbe/ szervezetekbe a csökkenteni kívánt génszekvenciának megfelelő dsRNS-t kell juttatni, vagy ott megtermeltetni. A miRNS útvonalat ezzel szemben rövid hajtú szerkezetű egyes szálú (ssRNS)-ek indítják be, tehát a géntünethez génspecifikus, mesterséges miRNS-eket kell a sejtekbe juttatnunk, vagy ott megtermeltetnünk.

Az RNSi felhasználható orvoslásban, pl. ígértes állati modellek léteznek Alzheimer-kór, Huntington-kór, encefalitisz stb. gyógyítására, valamint hasznosak lehetnek antivirális



alkalmazásai (HIV, kanyaró, májgyulladás). Mindezek ellenére a RNSi alapú engedélyezett terápiais lehetőségek igen korlátozottak.