

EFOP-3.4.3-16-2016-00014

RNS ALAPÚ GÉNSZABÁLYOZÁS

2020.

AP4_TTIK KÁRPÁT-MEDENCEI OKTATÁSI TÉR KIALAKÍTÁSA
ÉRDEKÉBEN TETT TEVÉKENYSÉGEK A TTIK-N
BBTE OKTATÁSI EGYÜTTMŰKÖDÉS

HENN LÁSZLÓ

TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS, MTA SZBK BIOKÉMIAI
INTÉZET

SZÉCHENYI 2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



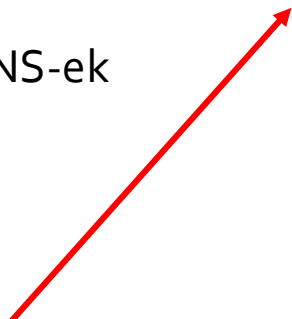
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

RNS-alapú génszabályozás

- lncRNS
- kis nemkódoló RNS-ek
 - siRNS
 - miRNS
 - piRNS
- RNS interferencia

Adaptív genomvédelem

- Eukariótákban: piRNS
- Prokariótákban: CRISPR
- CRISPR/Cas9 rendszer gyakorlati alkalmazása



Nem-kódoló RNS-ek Eukariótákban I.

rRNS: riboszómák alkotórészei: 18S RNS (kis alegység), 5S, 5.8S, 28S RNS nagy alegység, 161 rRNS gén

tRNS: aminosavak szállítása a fehérje szintézisben, 21 tRNS, 314 gén

SRP: Signal recognition particle. Citoplazmában lokalizált RNS-fehérje szignálfelismerő része. A szekrécióra szánt fehérjék mRNS-ét köti

Ribozyme: Kémiai reakciót katalizáló RNS-ek. Splicing, tRNS hasítás (RNázP), viroid és szatelit RNS-ek replikációja (Hammerhead RNA)

Telomeráz RNS: Telomer RNS szintézisében résztvevő telomeráz (reverz transzkriptáz) komplex része

RNáz MRP RNS: RNáz MRP enzim része, mely a mitokondriális replikációban és a rRNS-ek (5.8S és 18S) processzáálásában vesz részt.

Antiszensz RNS: A mRNS-sel komplementer átíródozó szál, expressziós szabályozás (ompF)

Vezető RNS (gRNA): mRNS érésben van szerepe. mRNS 3' végével komplementer. (Trypanosoma)

rasiRNS: repetitív elemekből származó kis (17-28nt) interferáló RNS-ek

scRNS: kis citoplazmikus RNS-ek összefoglaló elnevezése.

Kis reguláló ncRNS: Általában speciális másodlagos struktúrával rendelkező ncRNS-ek, melyek a génexpresszió szabályozására képesek. Pl.: OxyS RNA: Oxidatív stresszválaszért felelős *E.coli*ban

Nem-kódoló RNS-ek Eukariótákban II.

tmRNS: mRNS felszabadítása az elakadt riboszómából

snRNS: Kis sejtmagi RNS, a pre-mRNS splicingban és érésben vesz részt. 47 snRNS gén

snoRNS: Kis sejtmagvacska RNS. A sejtmagvacskában rRNS-ek processzáálásában vesz részt.

stRNA: kis temporális RNS. Poszttranszkripció szabályozás a *C.elegans* fejlődésben. A target gén 3' UTR-hez kötődik.

vRNS: A Vault ribonukleoprotein komplex része, mely a drog rezisztenciában vesz részt (sejtmagpórus transzport).

Y RNS: Ro ribonukleoprotein része. Rosszul kialakult RNS struktúrákhoz 3' végéhez kötődik. Replikációban, rRNS-ek érésében, vesz részt.

RRE RNS: HIV *env* gén által kódolt Rev Response Elementhez kapcsolódik, amely a HIV strukturális fehérjék mRNS-einek expressziójához és exportjához szükséges.

RNS 6S: Kis (184 nt) hairpin struktúrát felfevő RNS, mely az RNS-polimerázhoz kötődve gátolja a szigma-promóterről történő átírást (E.coli)

lncRNS: >200nt RNS-ek. Génkifejeződés szabályozás

miRNS: Kis (21~23nt) génkifejeződést szabályozó RNS-ek. A target mRNS hasításával vagy translációs gátlással szabályoznak.

siRNA: hosszabb dsRNS-ek hasításából származó kis RNS-ek, melyek a target-RNS hasítását indukálják.

piRNA: piwi kölcsönható RNS-ek, ivarsejt specifikus transzpozon-mobilizációt gátolnak

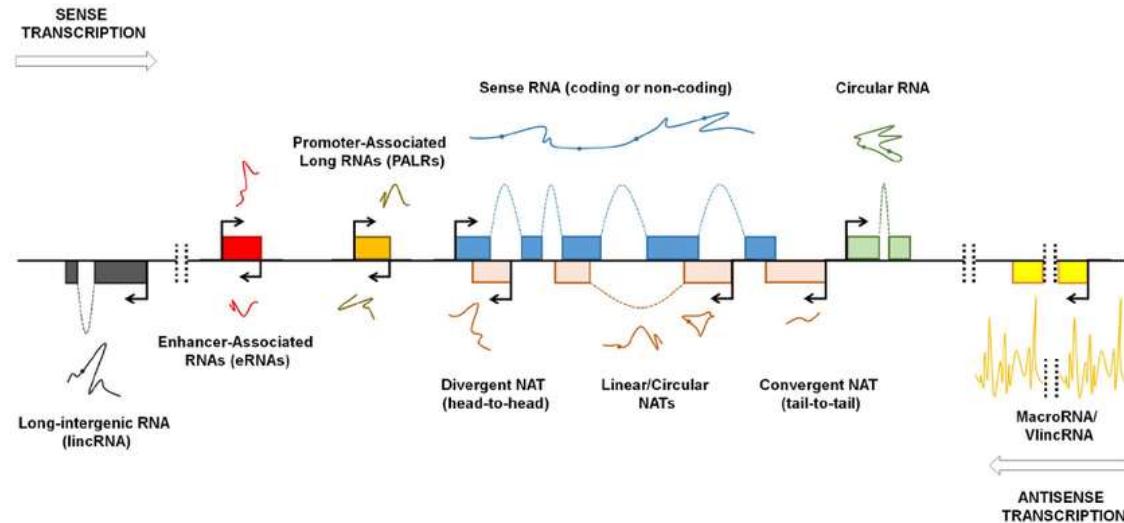
lncRNS-ek

lncRNS: long non-coding RNA

- >200nt, változatos méretűek
- legtöbbször van 5'cap, poliA, gyakran intronok
- sokféle biológiai funkció
- sokféle hatásmechanizmus

lncRNS gének:

- FANTOM (functional annotation of mammalian cDNA): 35.000 nem kódoló RNS 10.000 lókuszról
- azonos lókuszon átfedő, ellentétes irányú lncRNS gének
- fehérje kódoló génekkel átfedő szakaszokon
- legtöbbször szövetspecifikus kifejeződés
- Kevésbé konzerváltak



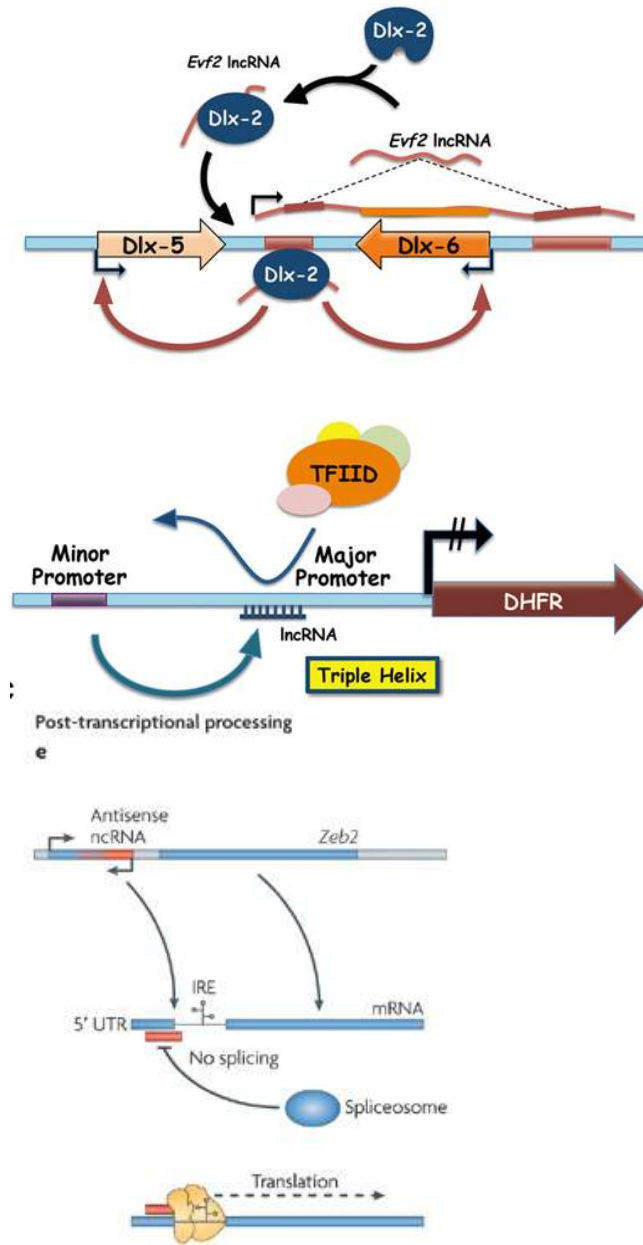
lncRNS-ek biológiai funkciói

1. Transzkripció szabályozás

- Transzkripció fehérjekomplexhez kötődve befolyásolja a:
 - TF aktivitását: co-aktivátor (*Evf2*), co-represszor
 - transzkripciót szabályozó fehérjék kötődését
- Promóterhez kötődve gátolja a TF kötődését (DHFR)
- Szomszédos vagy átfedő gének (ellentétes orientációjú) transzkripciójának szabályozása

2. Poszt-transzkripcionális szabályozás

- pre-mRNS splicing (*Zeb2*)
- citoplazmatikus transzport
- mRNS degradáció



lncRNS-ek biológiai funkciói

3. Transzláció szabályozás

- mRNS-hez kötődve megakadályozza a transzlációt (BACE-1AS)

4. Epigenetikai szabályozás

- Heterokromatint kialakító komplexet irányítja a megfelelő DNS régióhoz
 - *HOTAIR*: homeotikus gének szabályozása
 - *Xist/RepA*: X-kromoszóma inaktiváció

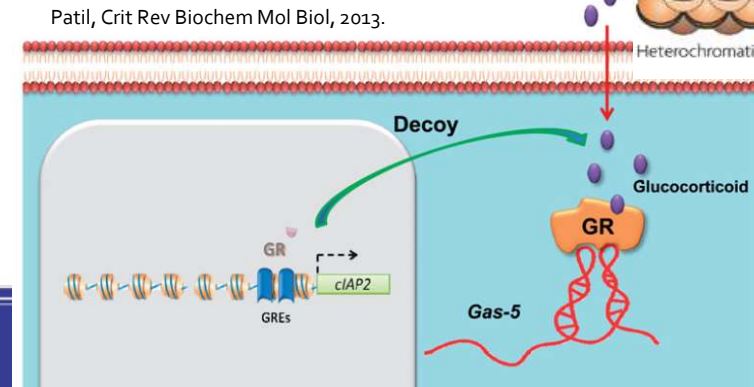
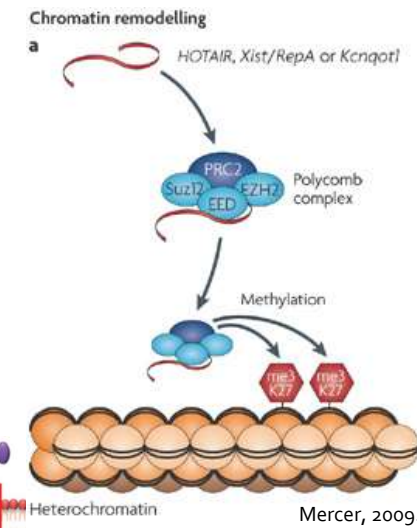
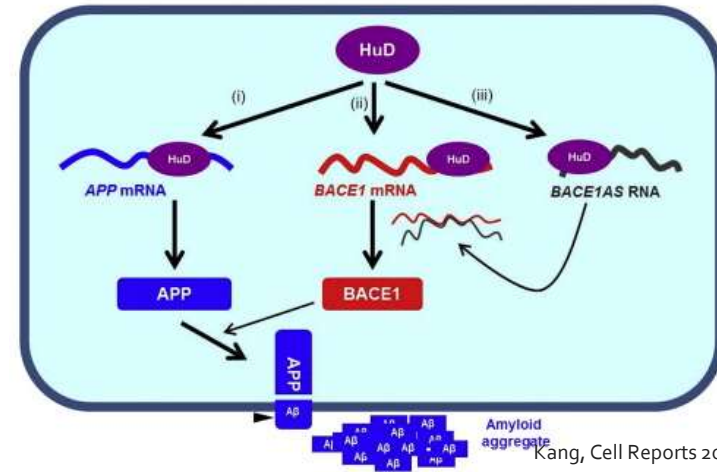
5. Imprinting: Apai vagy anyai allél aktív

- *Kcnqot1*

6. Apoptózis szabályozás

- *Gas5*: Glukokortikoid receptor csali

7. Sejtciklus szabályozás



siRNS útvonal

small interfering RNAs

20-25bp hosszú kettős szálú RNS-ek

Hosszú kettős szálú RNS prekurzorok

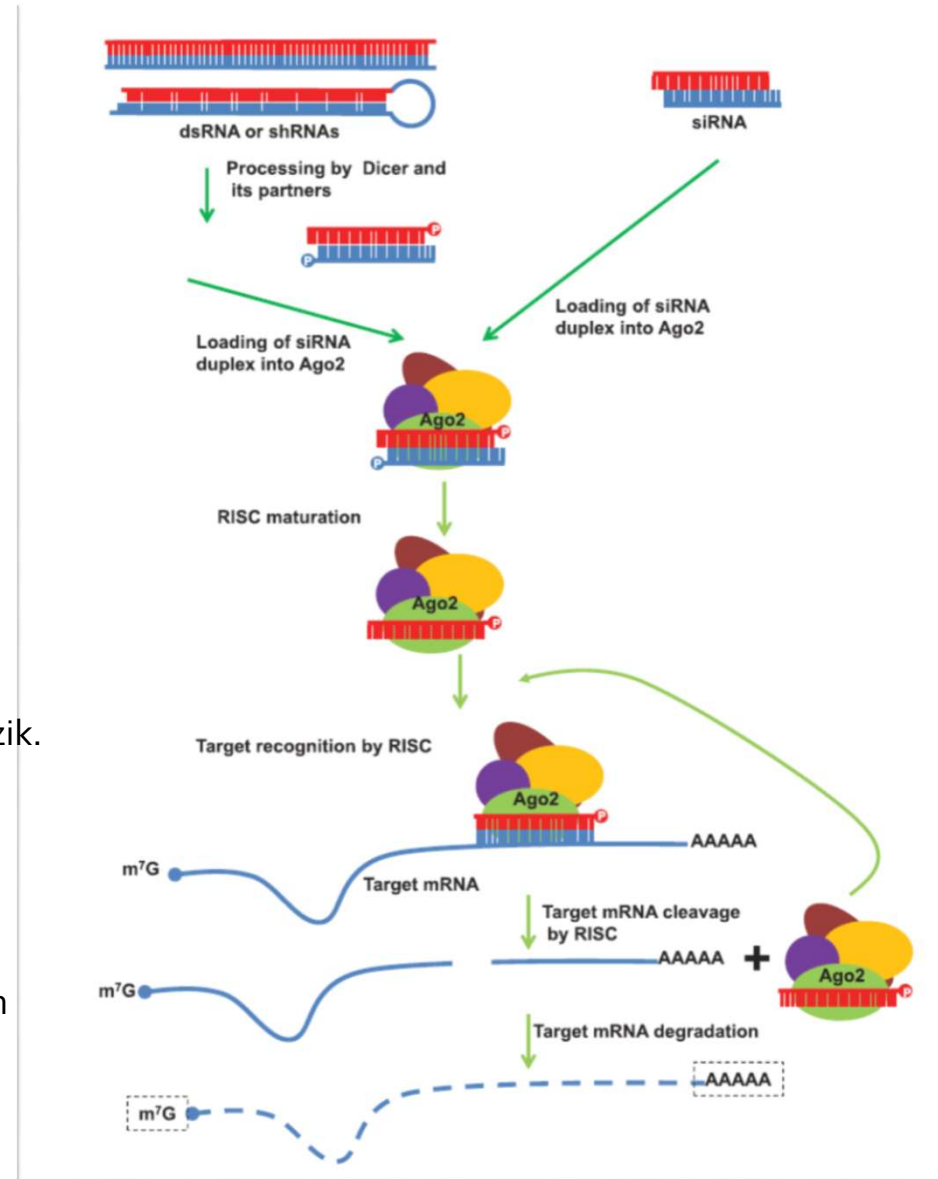
Exogén siRNS-ek: RNS vírusok elleni védelem.

A prekurzor replikálódó vírus RNS.

Endogén siRNS-ek: prekurzor a genomból származik.

- Transzpozon csendesítés
- Génkifejeződés szabályozás

Konzervált mechanizmus: állatokban, növényekben

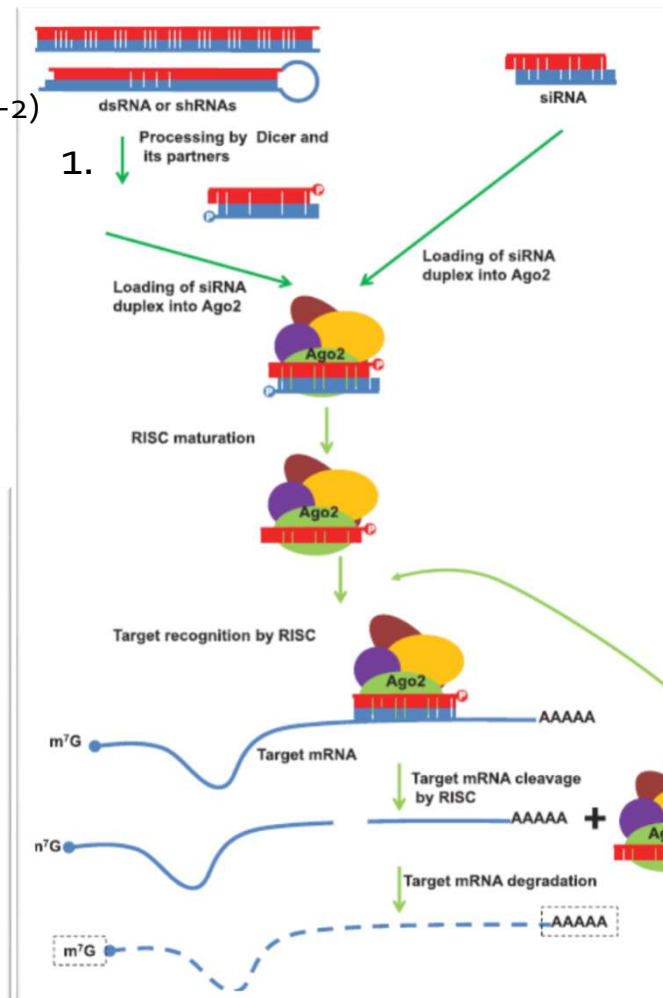
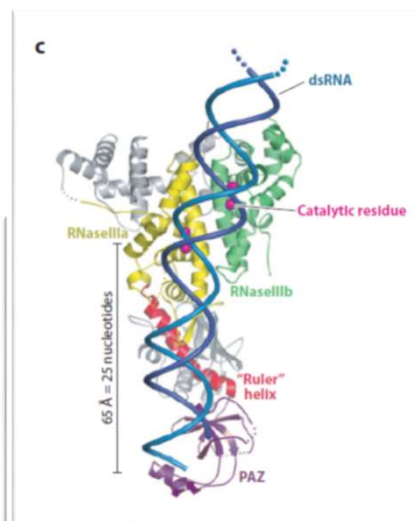
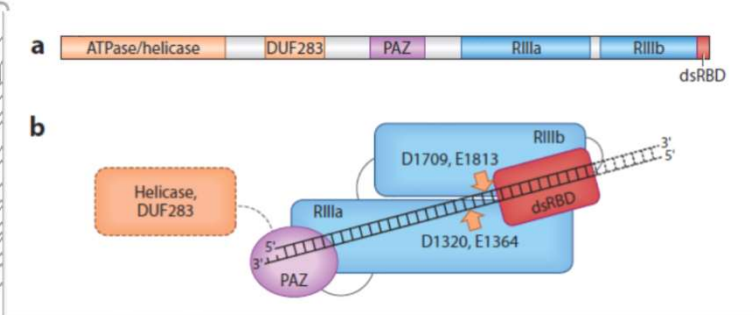


siRNS útvonal: biogenezis

1 Hosszú kettős szálú RNS prekursor feldarabolása:

Dicer-2 fehérje: dsRNS specifikus RNáz aktivitás

- Egérben, *C.elegans*ban 1 Dicer, *Drosophilában* 2 (Dcr-1, Dcr-2)
- PAZ domén: dsRNS-vég felismerése
- dsRBD (dsRNA binding domain) domén: dsRNS megkötése
- RNázIII domén: RNS hasítás
- 20-25 nt siRNS duplexek:
 - 5' foszfát
 - 3' hidroxil
 - 2nt túlnyúló vég a 3'végen



siRNS útvonal: biogenezis

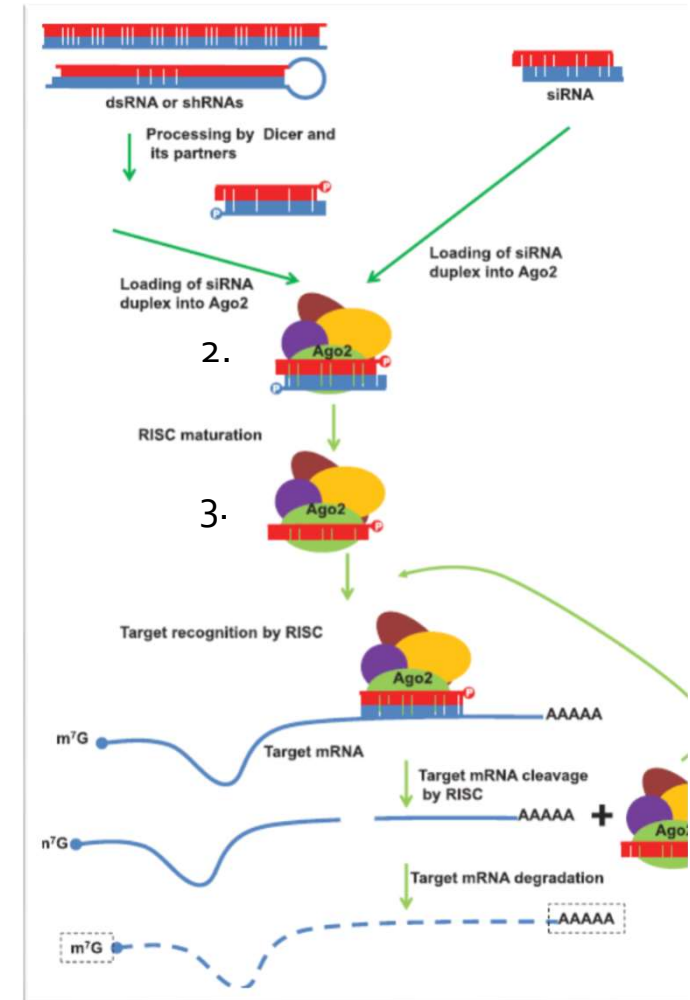
2. siRNS betöltődése RISC-komplexbbe: Dcr-2/R2D2

RISC komplex: (RNA induced silencing complex): Argonauta-2 (AGO2) + segédfehérjék

- AGO2: dsRNS specifikus RNáz
 - PAZ domén: az siRNS 2nt 3' túlnyúló végét ismeri fel
 - PIWI domén: slicer (RNáz H) aktivitás
- Segédfehérjék: módosítják az AGO funkcióját

3. RISC érése: Slicer független mechanizmus

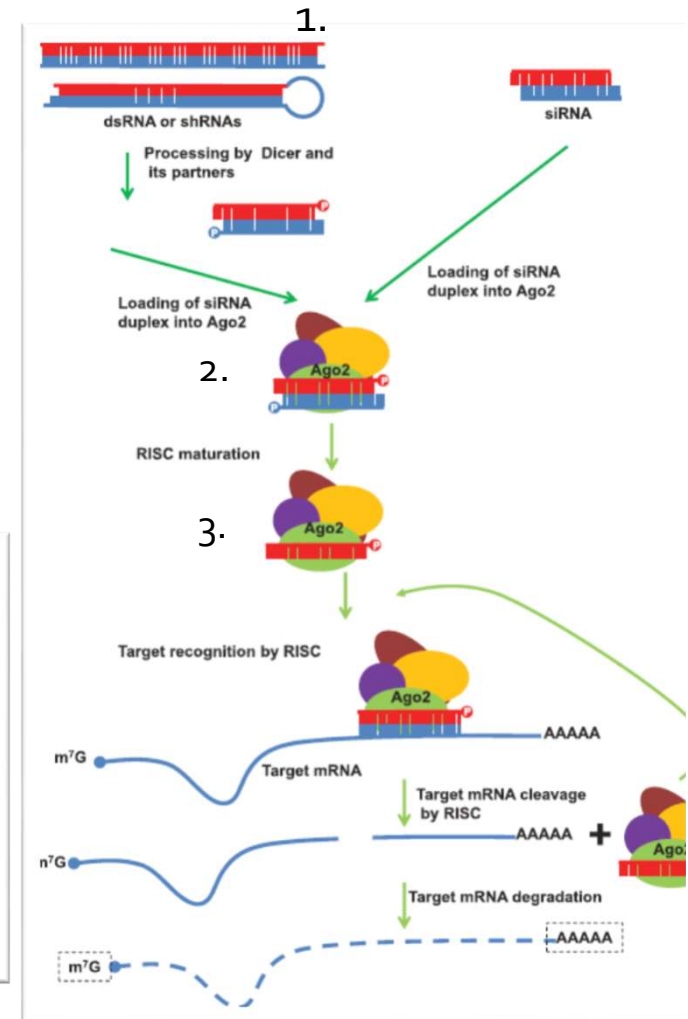
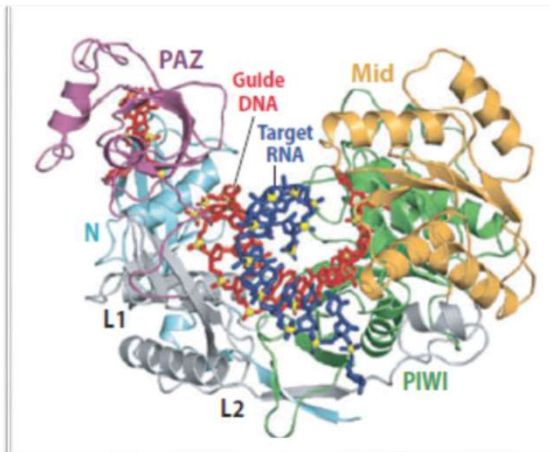
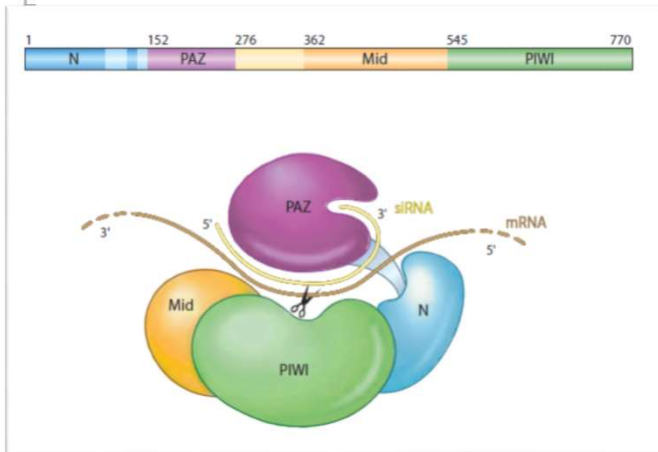
- passanger szál eltávolítása, és lebontása: C3PO
- Guide szál 3' végének 2'O-metilációja (HEN1 fehérje)



siRNS útvonal: molekuláris mechanizmus

4. Target RNS felismerése:
A gRNS-sel komplementer szekvenciú RNS megkötése
5. Target RNS hasítása: PIWI domén
 - A komplementer szekvencia 10 és 11 nt-ja között hasít

D I M A C T F C C F I N C I C



exo-siRNS-ek

Exogén siRNS útvonal: dsRNS prekursor külső „forrásból”: RNS vírusok

Fontos antivirális mechanizmus.

A vírus replikációkor keletkező dsRNS intermediereket ismeri fel.

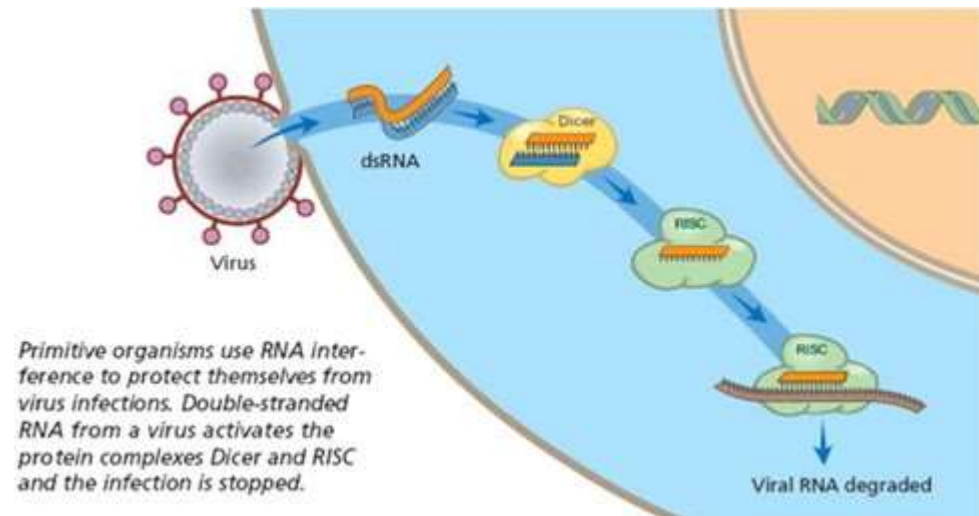
vsRNA: virus-derived siRNA

Vírus RNS elimináció 2 lépésben:

1. Dicer-2: elhasítja a hosszú dsRNS-t
2. RISC: AGO2 elhasítja a templát RNS-t

Virális védelem az siRNSD útvonal ellen:

szupresszor fehérjék



endo-siRNS-ek

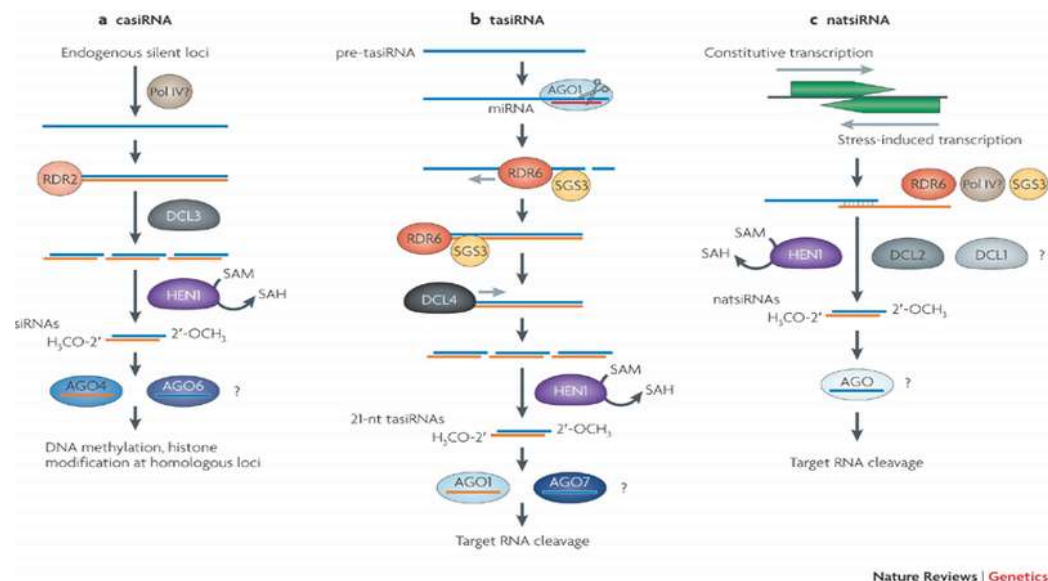
Endogén siRNS útvonal: dsRNS prekursor „belső forrásból”:
Növényekben fedezték fel, de állatokban is működik.

Növényi endo-siRNS-ek:

- **casirNS-ek:** cis-acting siRNAs: transzpozonok repetitív elemek, tandem repeatek csendesítése
- **tasiRNS-ek:** trans acting siRNAs: miRNS kötődik a pre-tasiRNS-hez, RDR6 polimeráz átírja → dsRNS

target mRNS hasítása: transz géncsendesítés

- **natsiRNS-ek:** natural antisense derived siRNAs
1 pár, egymással átfedő szekvenciájú siRNS, az egyik csak stressz hatására íródik át.
Stresszválaszban van szerepe.



Állatokban: retro-transzpozonok elleni védelem

21-22 bp hosszúak

testi sejtekben működik, piRNS útvonal mellett.

siRNS és RITS

RITS: RNA induced transcriptional silencing

Ago1

Chp1: chromodomain protein

RNS-függő RNS polimeráz

Genomi régiók, vagy gének transzkripcionális csendesítése

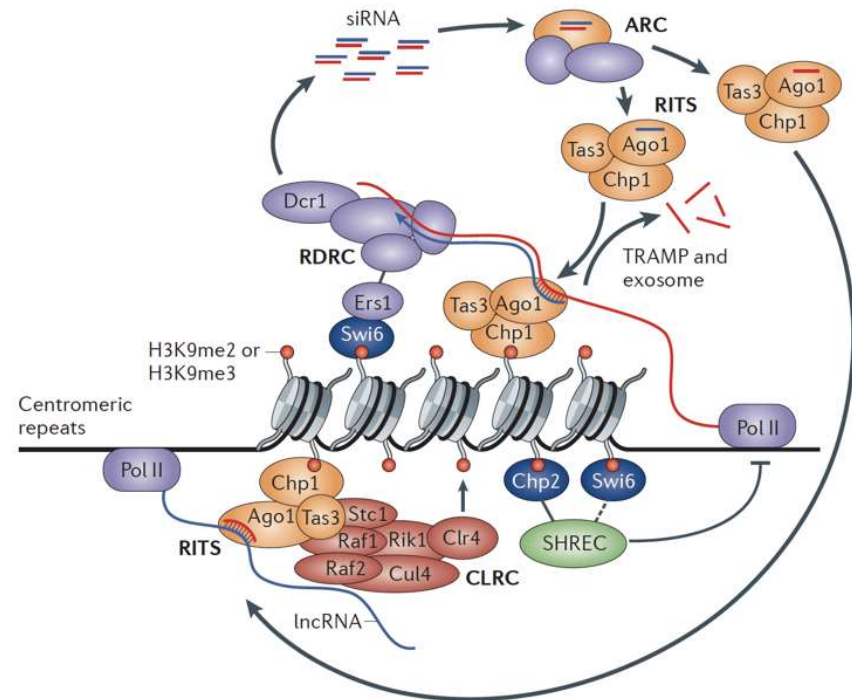
Hiszton fehérjék N-terminális poszttranszlációs

módosításaival valósul meg

Pl: H3K9m → heterokromatin kialakulás

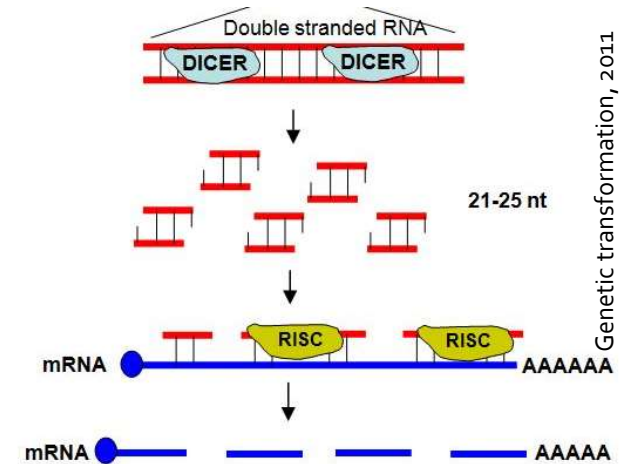
Mechanizmus:

1. RNS függő RNS polimeráz: antiszensz mRNS-t ír át
→ dsRNS → siRNS útvonal
2. Az siRNS-t tartalmazó RITS komplex az átíró mRNS-hez kötődve metilálja a közvetlen környezetében lévő hisztonokat, ami heterokromatin kialakulást indukál (zárt kromatinstruktúra → célgén transzkripcionális gátlása)



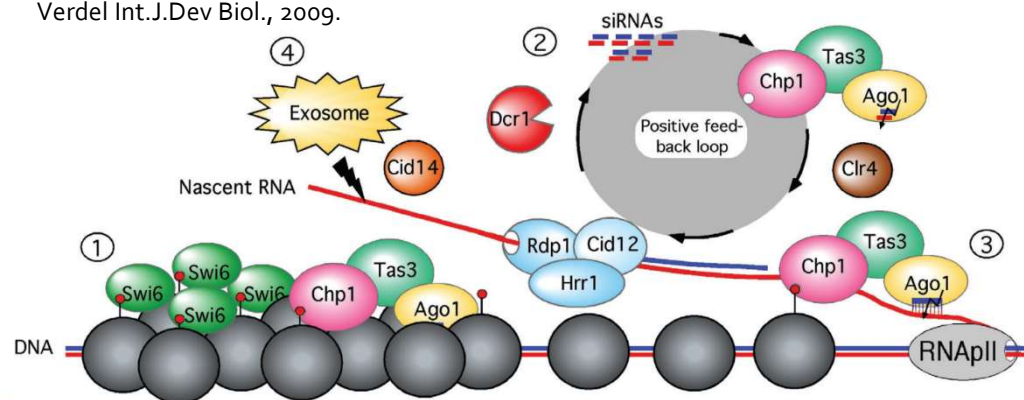
siRNA útvonala sajátosságai

- Dicer: nincs szekvenciaspecifitás
1 dsRNA prekursor: sokféle siRNA
- A dsRNA prekursor 3-lagos, 4-leges szerkezete befolyásolja a Dicer aktivitást.
- A miRNA útvonallal kompatibilis elemei vannak
- A végkimenetel nem csak target RNS hasítás lehet:
 - transláció gátlás
 - kromatin szintű génexpresszió-szabályozás



Genetic transformation, 2011

Verdel Int.J.Dev Biol., 2009.



miRNS útvonal

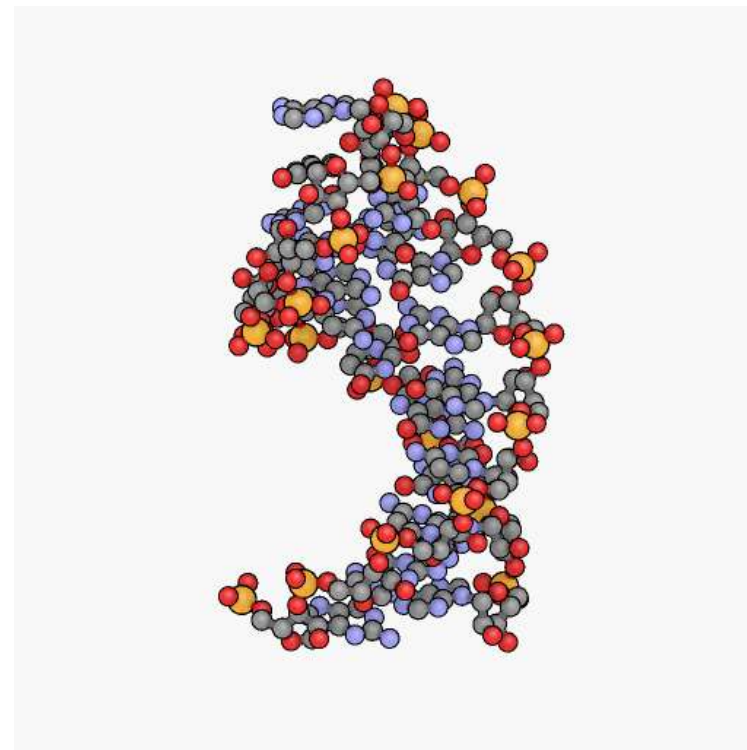
micro-RNS-ek

21-24bp hosszú kettős szálú RNS-ek

Részlegesen kettős szálú RNS prekursorok a genomban kódolt
miRNS génekből származnak

Funkciója a targetgének kifejeződésének szabályozás

Konzervált mechanizmus: állatokban, növényekben



miRNS útvonal

micro-RNS gének

Az Eukarióta genomok legnépesebb géncsaládja

Humán genom >2500 miRNS gén

Többnyire klaszterekben vannak jelen (miRNS klaszterek):

policisztronos elsődleges transzkript

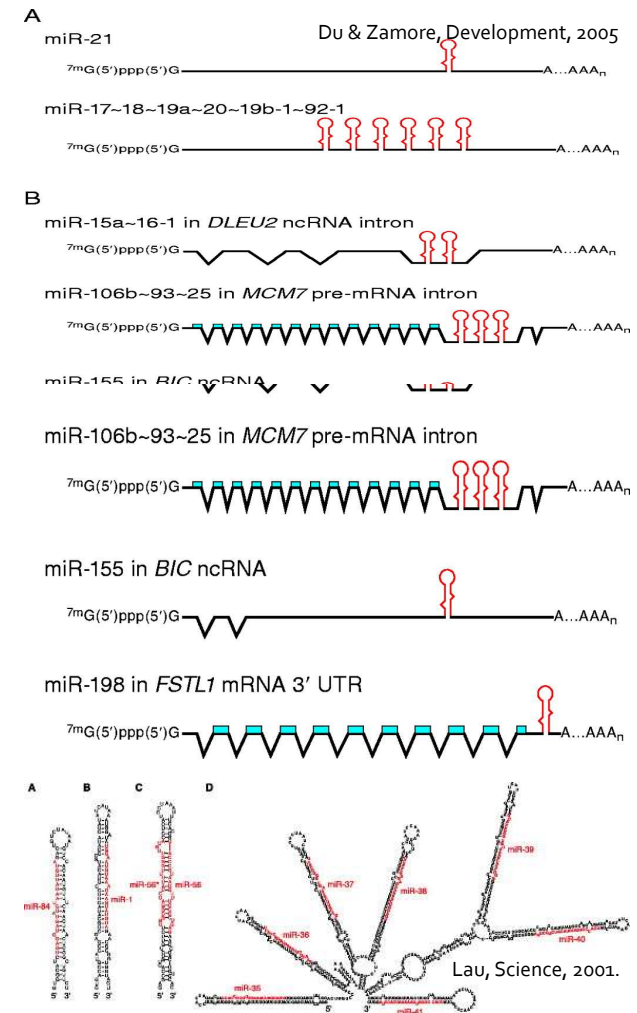
Vannak egyedi miRNS gének is.

Más génekkel átíródva:

- ncRNS
- fehérje kódoló gének intronjában: mirtronok
- fehérje kódoló gének UTR-jében

miRNS gének azonosítása:

- Felfedezése: 1993 (*C.elegans*), *Drosophilában* 2003.
- Kevés a molekuláris klónozással azonosított gén
- A klasszikus génpredikciós módszerek sokszor nem működnek: nincs CDS, exonokban, sőt intronokban is
- pri-miRNS-ek kihalászása, újgenerációs szekvenálása



miRNS	<i>C.elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>
prekurzor	250	256	1881
érett	434	466	2588

miRNS-ek érése

1. miRNS gének átíródása (sejtmag)

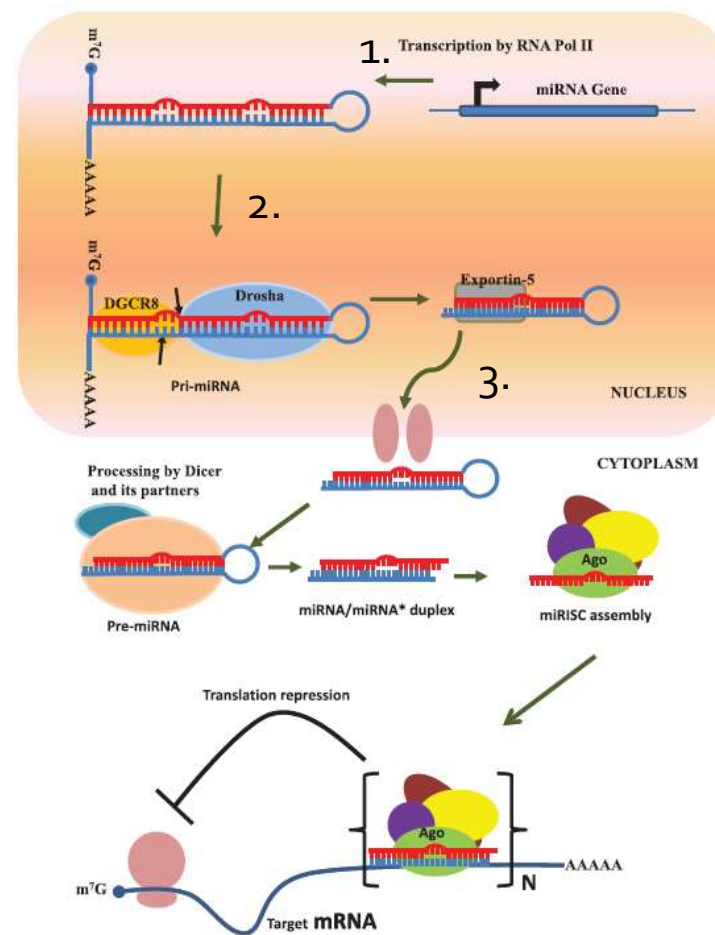
- Egyedi, vagy policisztronos pri-miRNS-ek (primary miRNA)
- poliA farok, RNA pol II
- stem-loop szerkezet
- 5' végen 7-metilguanozin (m^7G)

2. pri-miRNS hasítása (sejtmag)

- Drosha (RNázIII) + segédfehérjék (pl.: Pasha: RNS-kötő)
- ~60-70bp-os stem-loop kihalászása: 5'foszfát, 3'-OH, 2nt 3'túlnyúló → pre-miRNS (precursor miRNA)

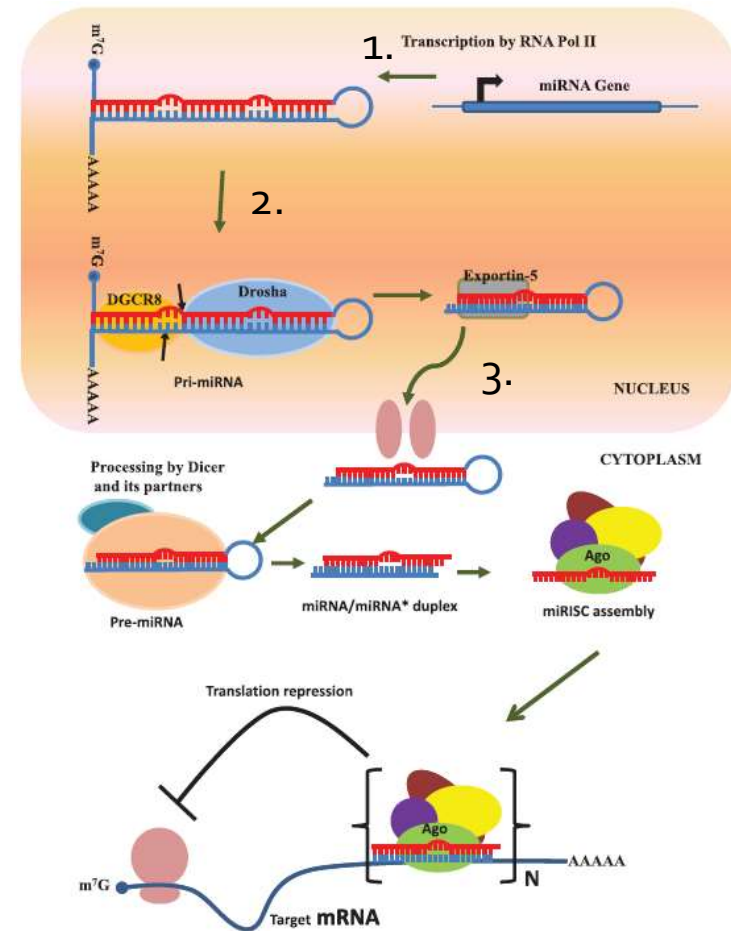
3. pre-miRNS exportja a citoplazmába

- Exportin-5 + Ran fehérje



miRNS-ek érése

4. pre-miRNS-ek hasítása
- Dicer-1 (RNáz) + segédfehérjék (loquacious, Loqs)
 - loop lehasítása → 22-24 nt-os érett miRNS: 2nt túlnyúló a 3' végén
 - Az érett miRNS-egyik szála a miRISC effektor komplexbe töltődik be.
 - A másik szál többnyire lebomlik.



miRNS-ek hatásmechanizmusa

Drosophilában

Effektor komplex: miRISC: AGO-1

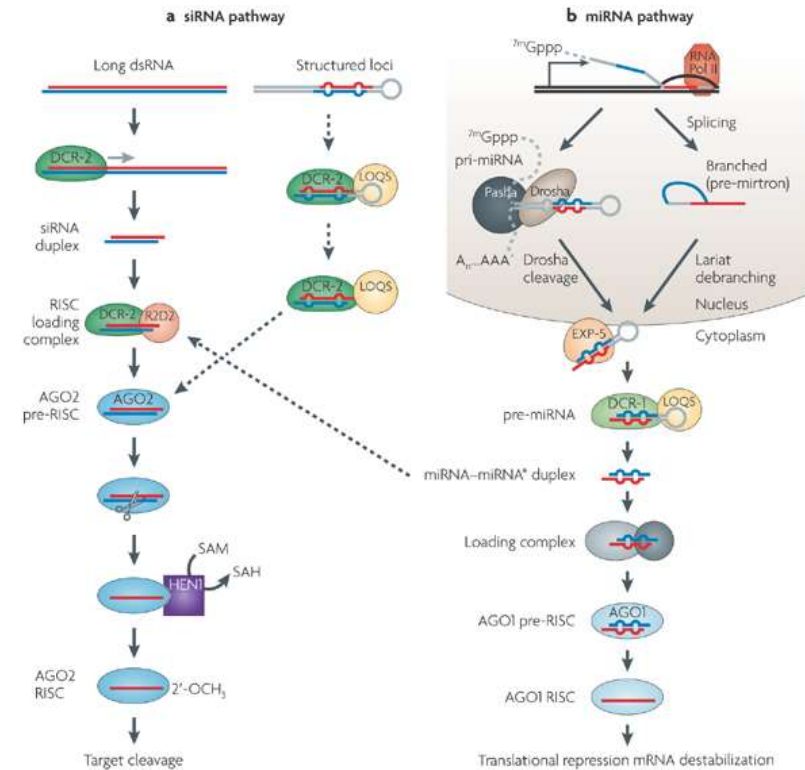
- Abban az esetben, ha a miRNS duplex 9 és 10 pozícióban nem párosodik tökéletesen
- target mRNS megkötése: transláció gátlás

Effektor komplex: siRISC: AGO-2

- Abban az esetben, ha a miRNS duplex 9 és 10 pozícióban tökéletesen párosodik
- target mRNS megkötése és feldarabolása

Emlősökben: 4 féle AGO fehérjekomplex

- miRNS-ek betöltődése a komplexekbe kevésbé meghatározott
- Mind a 4 AGO részt vesz az RNS csendesítésben



miRNS célszekvenciák

Magasabb rendű eukarióták mRNS-einek <50%-a

- Általában 3'UTR
- 5'UTR
- CDS
- Egy mRNS-en több miRNS célszekvencia

miRNS targetek azonosítása:

- Elsősorban *in silico* módszerekkel
- A miRNS géncsendesítésnek nem feltétele a tökéletes bázispárosodás a célszekvenciával
- Kevés kísérleti adat
 - kevés mutáns (kis mutációs felület)

miRNS adatbázisok

[mirBase](#)

[mirDB](#)

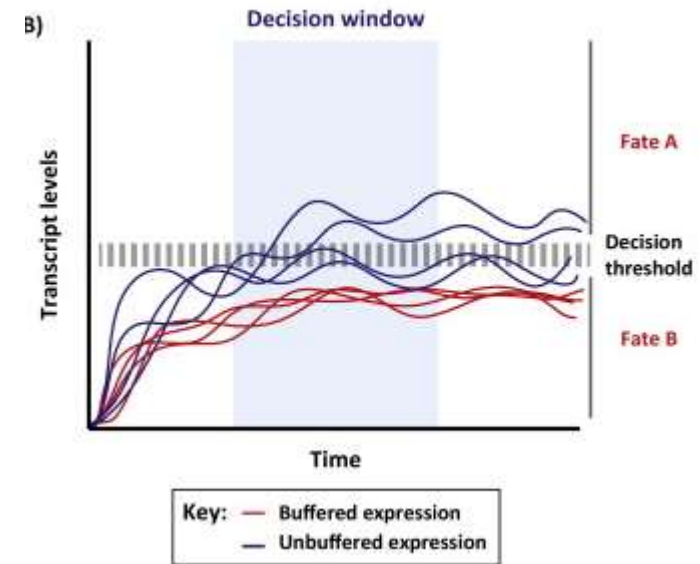
[microRNA.org](#)

miRNS-ek biológiai funkciója

- Egy-egy miRNS hiánya ritkán okoz drámai fenotípust
- A miRNS útvonal fehérjéi esszenciálisak és konzerváltak
- Egy miRNS – sok target mRNS
- Egy mRNS – több miRNS
- Egy miRNS kifejeződését sok fehérje befolyásolhatja
- Többféle hatásmechanizmus:
 - mRNS elimináció
 - transzláció gátlás
 - mRNS destabilizálás deadeniláció által
 - transzkripció aktiválás!

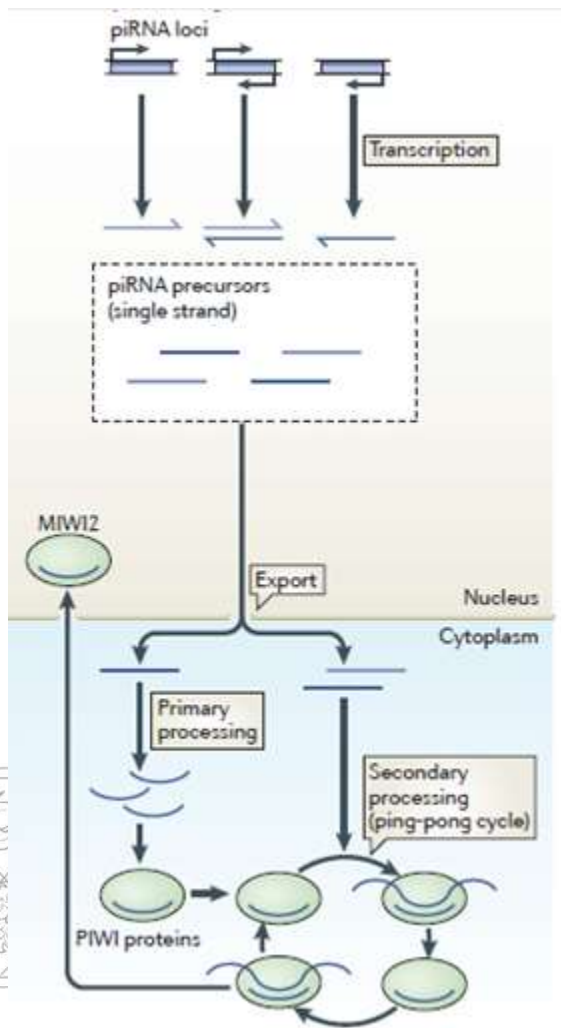
Durva vagy finom poszttranszkripciószabályozás?

- Fejlődés „kanalizációja”
- Véletlenszerű genetikai zaj pufferelése
- **Robosztus** genetikai szabályozás



Vidigal, 2015

piRNS-ek



- Prekursorok a piRNS klaszterekről származó hosszú ssRNS-ek
- Elsősorban az állati ivarvonalban működő kis nem-kódoló RNS útvonal
- Elsődleges feladata az ugráló genetikai elemek (transzpozonok) mutagén hatásának kivédése
 - transzpozonokról származó RNS-ek eliminálása
 - heterokromatin kialakítás
- Csírvonal fejlődés biztosítása

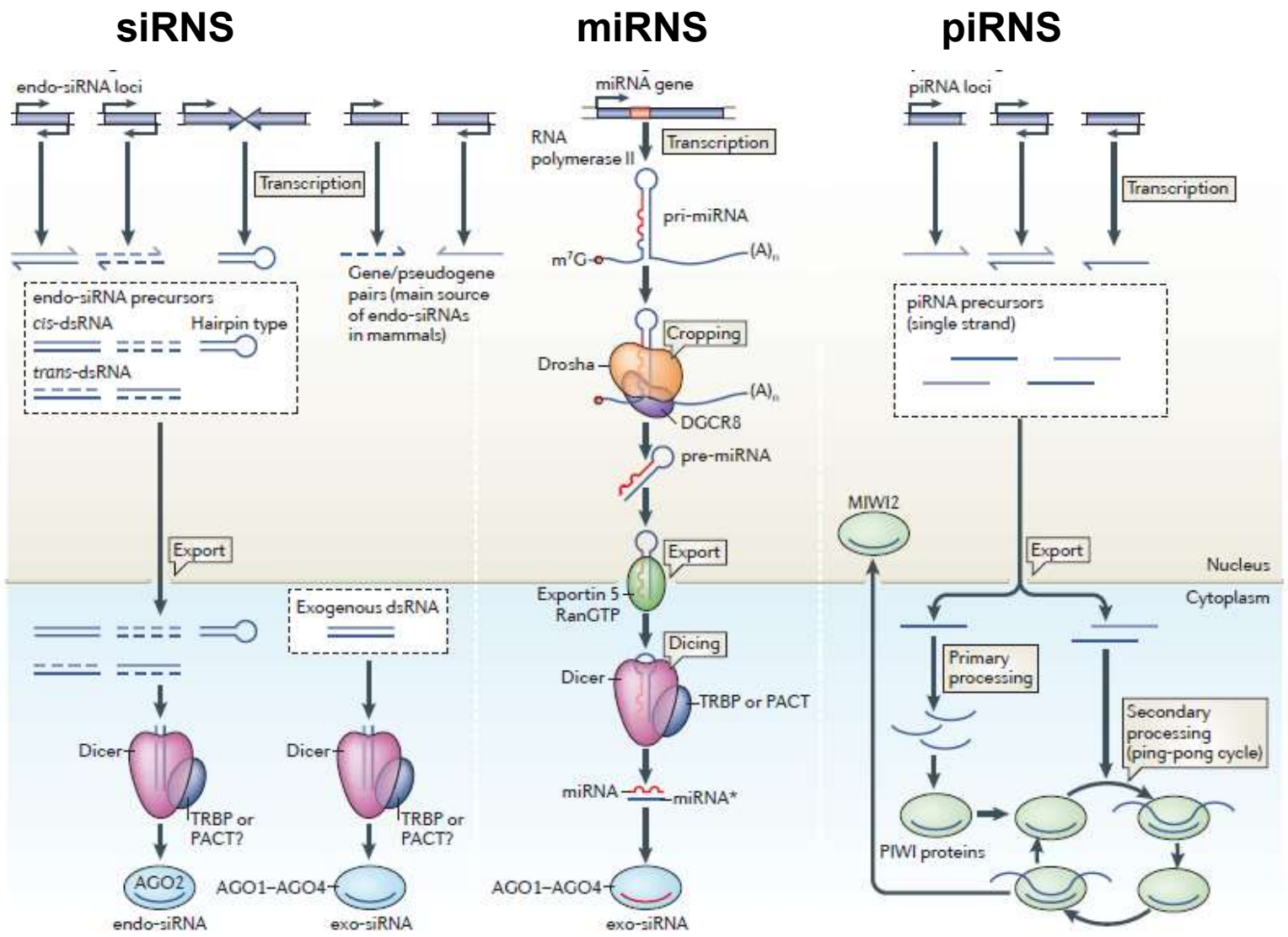
PIWI asszociált RNS (piRNS) útvonal



piwi (*Drosophila*): P-element induced wimpy testis, Lin, H., Spradling, A.C. (1997)



piRNS



PIWI

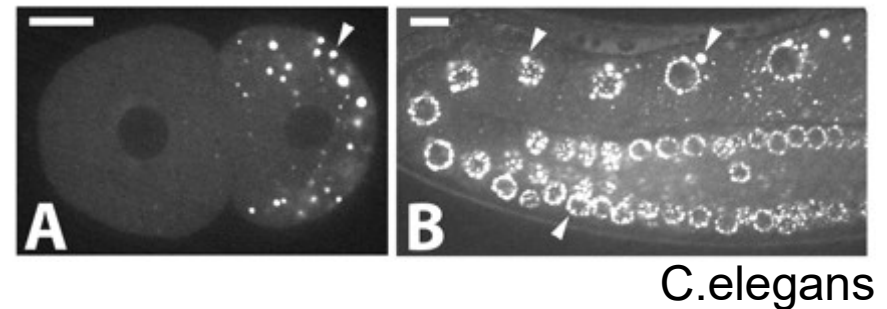
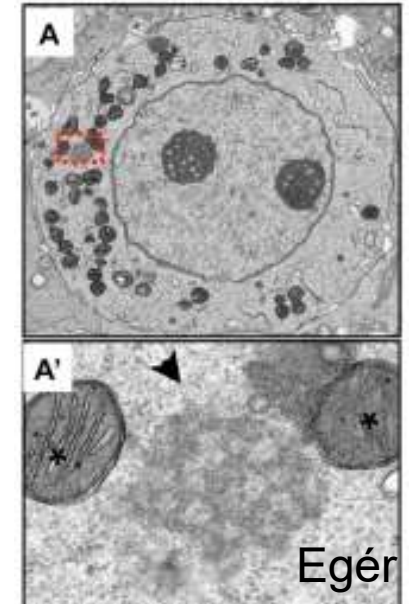
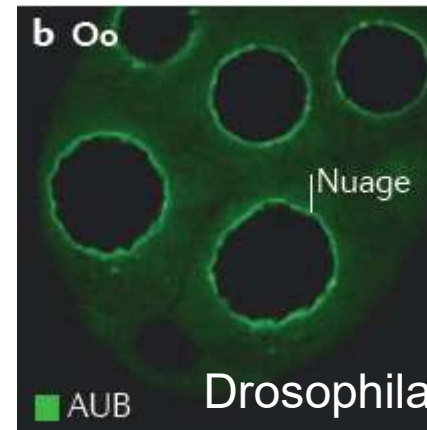
- Elsősorban az állati ivarvonalban működő kis nem-kódoló RNS útvonal
- Elsődleges feladata az ugráló genetikai elemek (transzpozonok) mutagén hatásának kivédése
- Csíravonal fejlődés biztosítása



PIWI

A piRNS alapú transzpozoncsendesítés a csírvonalban

- Jellegzetes citoplazma részletek: ivari szemcsék
- elektrondenz membránmentes citoplazma részletek
- Jelenlétük általános az állati csírvonalban:
 - piP-body, chromatoid body: egér
 - P-body: *C.elegans*
 - nuage: *Drosophila*



PIWI

A piRNS-ek

- Nincs konzervált szekvenciájuk, sem másodlagos szerkezetük.
- Transzpozon szekvenciákkal homológok.
- 24-32 nt hosszúak
- 5' végükön általában Uridin
- 5' vég: monofoszfát, 3'vég: 2'-O-metiláció (stabilitás)



PIWI

A piRNS klaszter

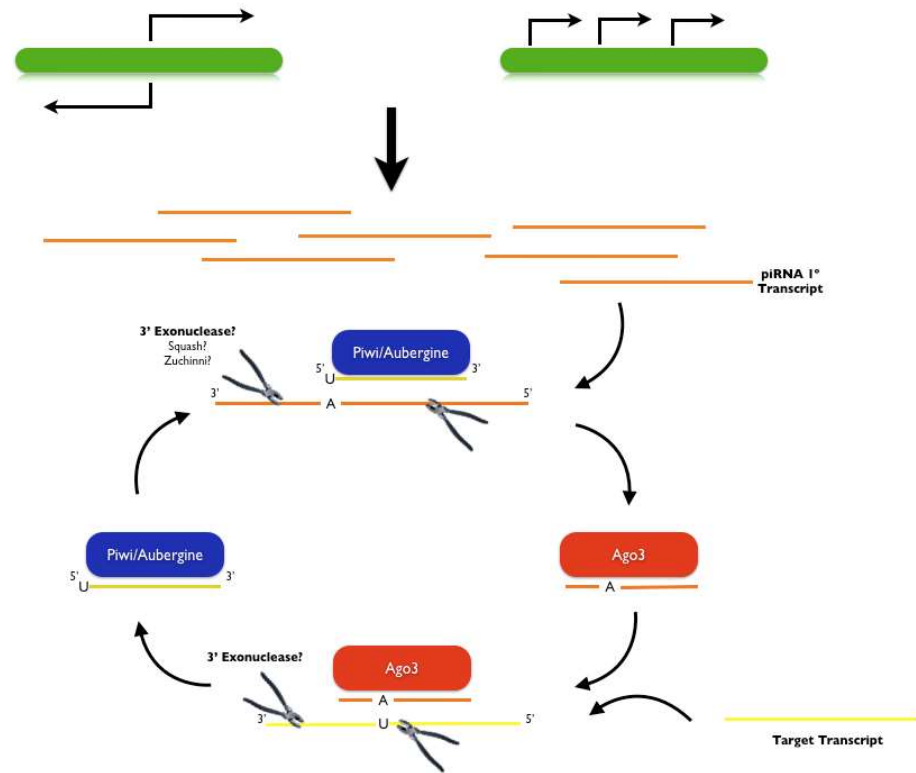
- A piRNS-ek az állati genomokban klaszterekbe tömörülnek.
- Néhány tíz-több ezer piRNS/klaszter, sok klaszter/genom.
- Méretük: 1-200kbp.
- A klaszteren belül a piRNS-ek nem periódikus elhelyezkedésűek
- Általában génmentes szakaszon (kiv.: *C.elegans*).
- Meglétük konzervált, de szekvenciájuk nem.
- Főként a csírvonalban íródnak át klaszterenként.
- A legismertebb piRNS klaszter a *Drosophila flamenco* lókuszt



PIWI

A piRNS-ek biogenezise

- Elsődleges processzálás
- Ping-pong ciklus



PIWI

Elsődleges processzálas

Csírvonalban és testi sejtekben is működik.

Hosszú ssRNS átíródása a piRNS lókusztól

Hosszú RNS feldarabolódása 24-32nt-os kis RNS-ekre: ismeretlen mechanizmus.

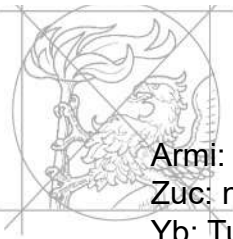
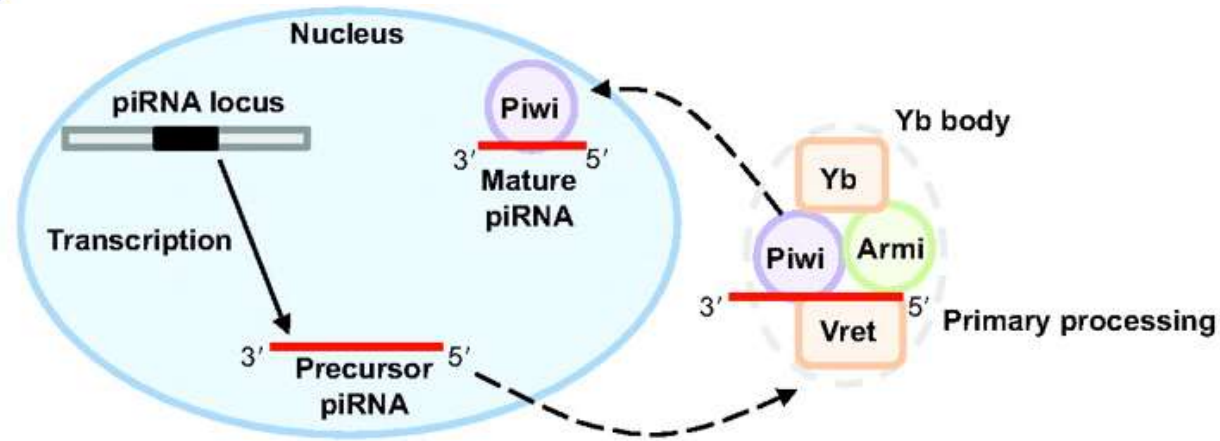
piRNS-ek transzpozon csendesítése: konzervált fehérjék: PIWI (MIWI, ZIWI, XIWI, 5

Argonaute 3 (AGO3), egyéb asszociált fehérjék:

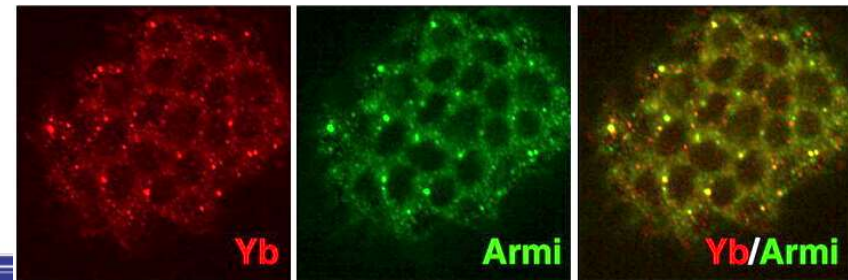


PIWI

Elsődleges processzálas: *Drosophila* ovárium folliculáris (testi) sejtekben



Armi: RNS-helikáz
 Zuc: nukleáz
 Yb: Tudor domén, helikáz
 Vret: Fehérje kötő, Tudor domén



follicle cells

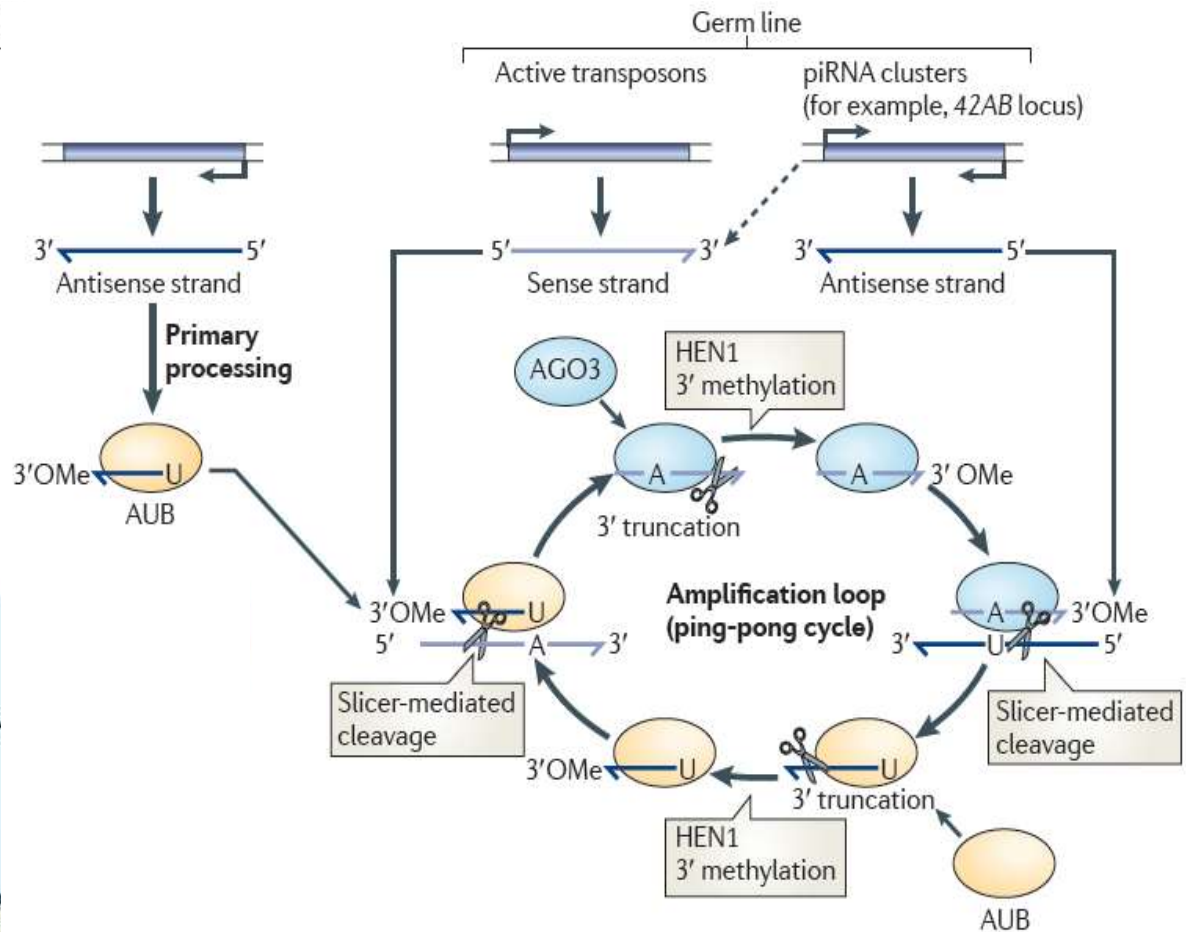
PIWI

Ping-pong ciklus

Csíravonalban működik

piRNS amplifikációs lépés

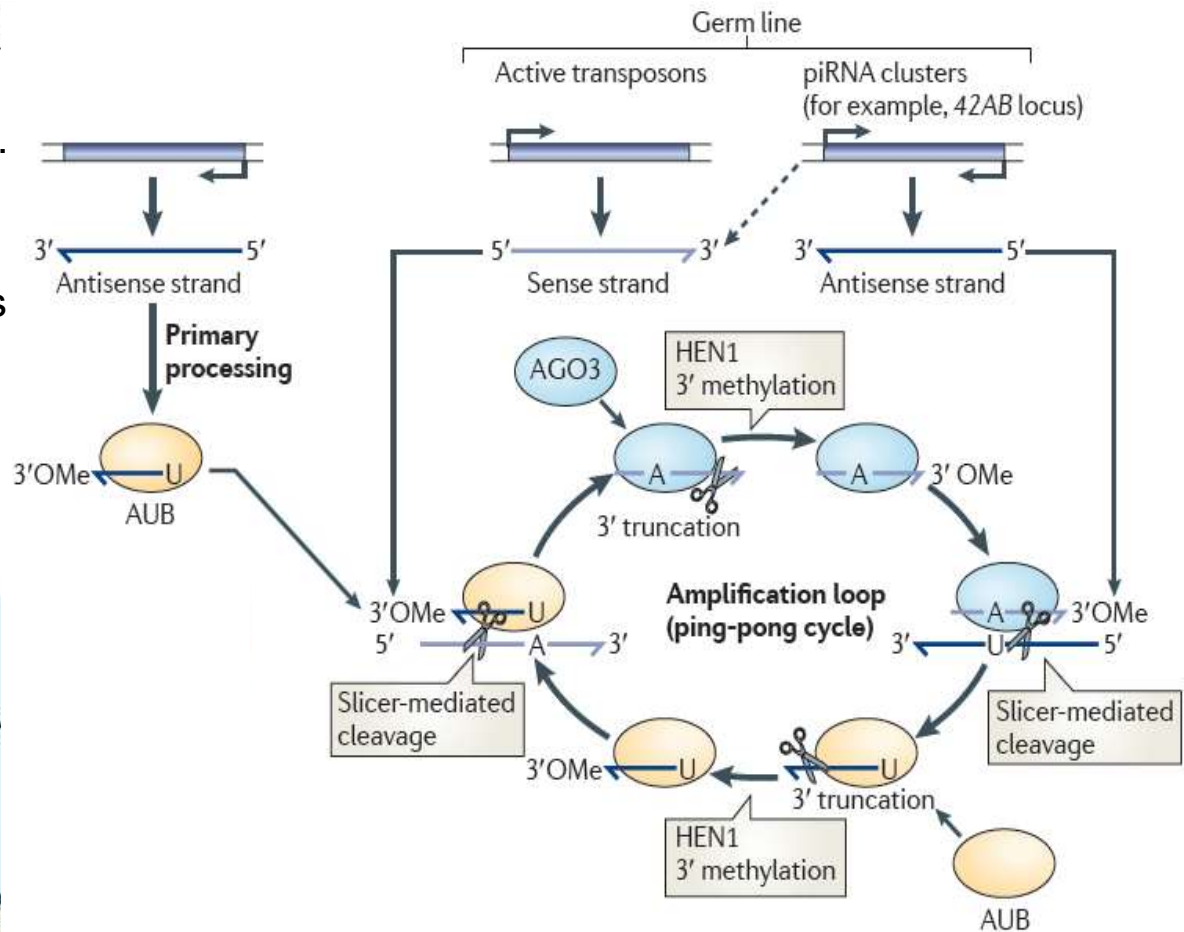
AUB (Aubergine) és AGO3 (Argonaute3) fehérjék:
Slicer aktivitás



PIWI

Ping-pong ciklus

1. Elsődleges piRNS (5'U) betöltődése **AUB** fehérjébe.
2. **AUB** fehérje megköti a piRNS-ek komplementer transzpozon elemet (TE) és elhasítja a TE-t. → másodlagos piRNS (10A)
3. másodlagos piRNS (10A) betöltődik **AGO3** fehérjébe.
4. AGO3 megköti az antiszensz piRNS-t és elhasítja → 5'U

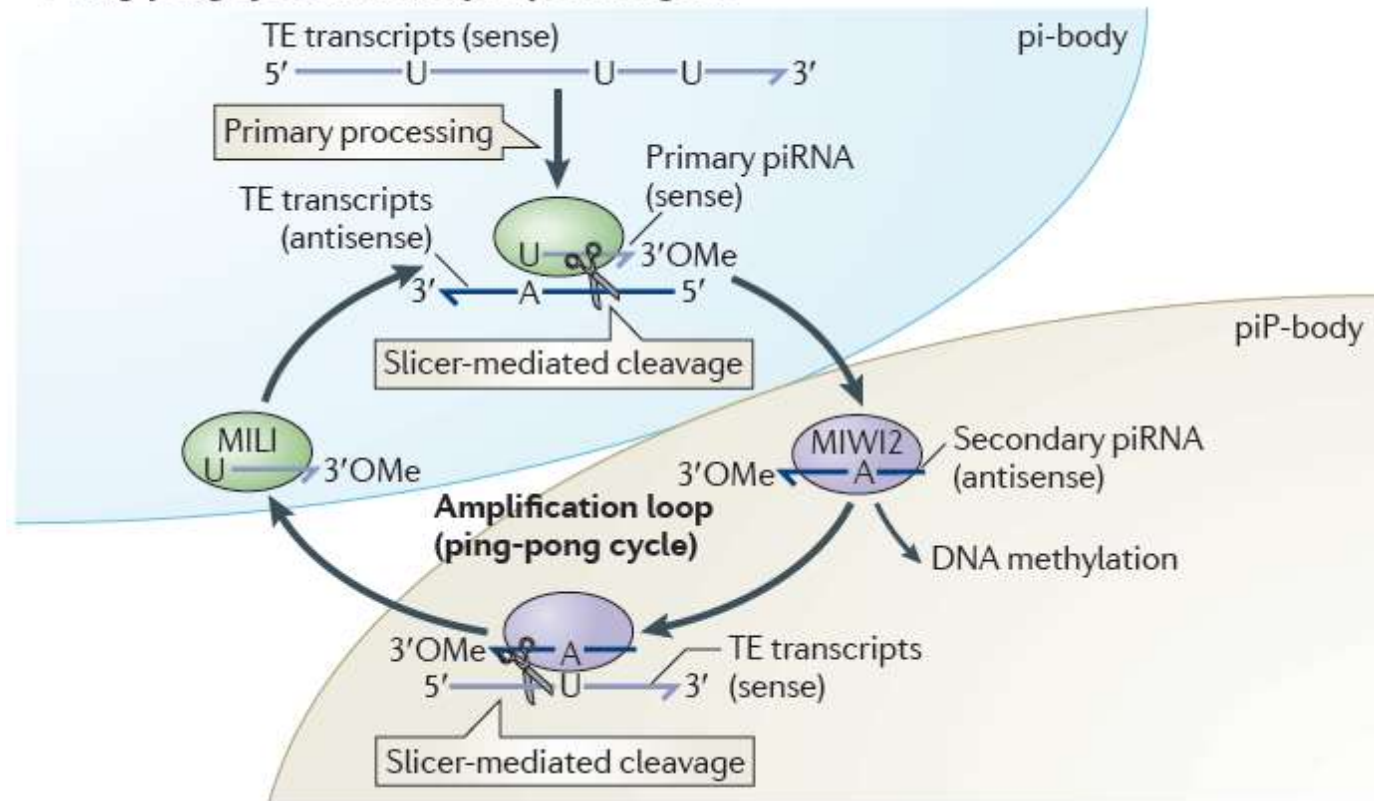


MILI ~ AUB
 MIWI ~ AGO3



PIWI

c Ping-pong cycle in mouse prospermatogonia



PIWI

A piwi útvonal szabályozása

Fehérjekomplexek

- Tudor domént tartalmazó fehérjék.
- Nem-Tudor fehérjék:
 - ARMI ~ MOV10L1
 - Vasa ~ MVH
 - Zucchini



b Egér

	MILI	MIWI2	MIWI
TDRD1	++	+	+
TDRD2	+	++	++
TDRD4	-	-	++
TDRD6	+	-	++
TDRD7	-	-	++
TDRD9	-	++	++

c Drosophila

	PIWI	AUB	AGO3
TUD	ND	+	+
SPN-E	ND	+	ND
FS(1)YB	+	ND	ND
KRIMP	ND	ND	ND
Tejas	ND	+	ND



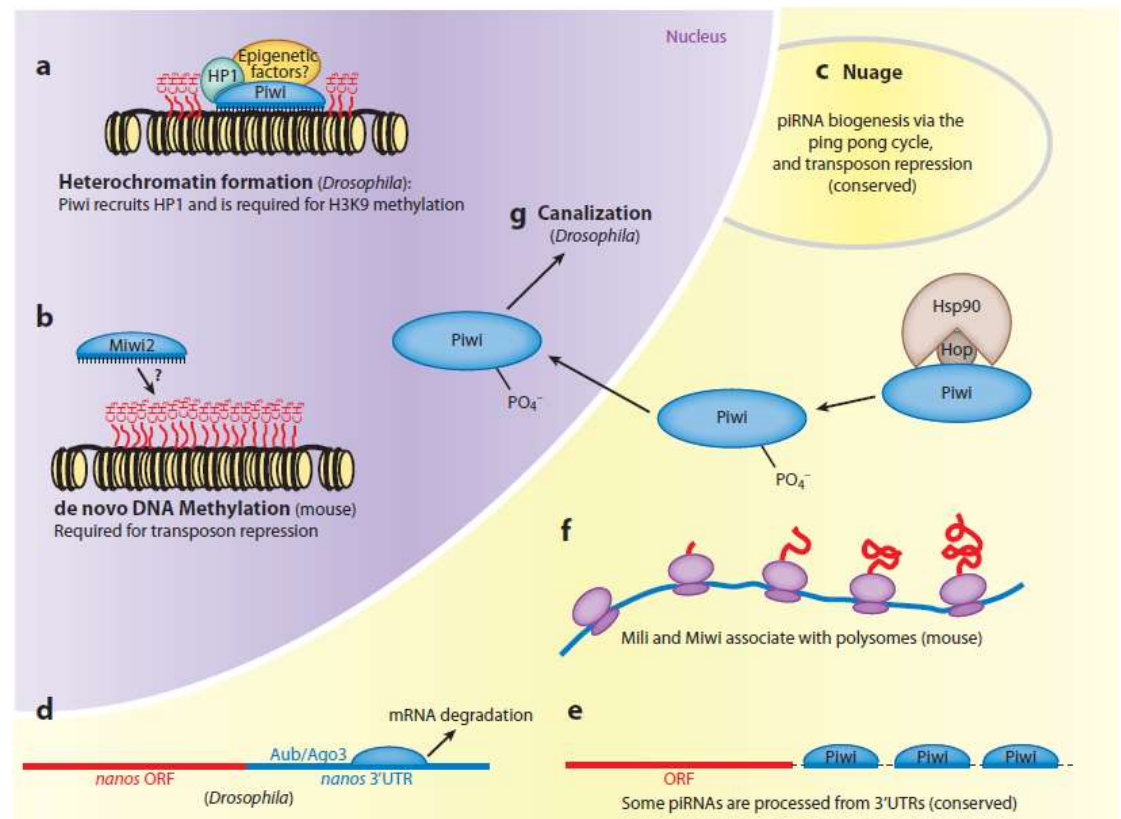
PIWI

PIWI/piRNS többrétű szerepe a transzpozonok elleni harcban...

1. TE csendesítés
2. Heterokromatinkialakulás és fenntartás (hisztin módosítás)
3. DNS metiláció

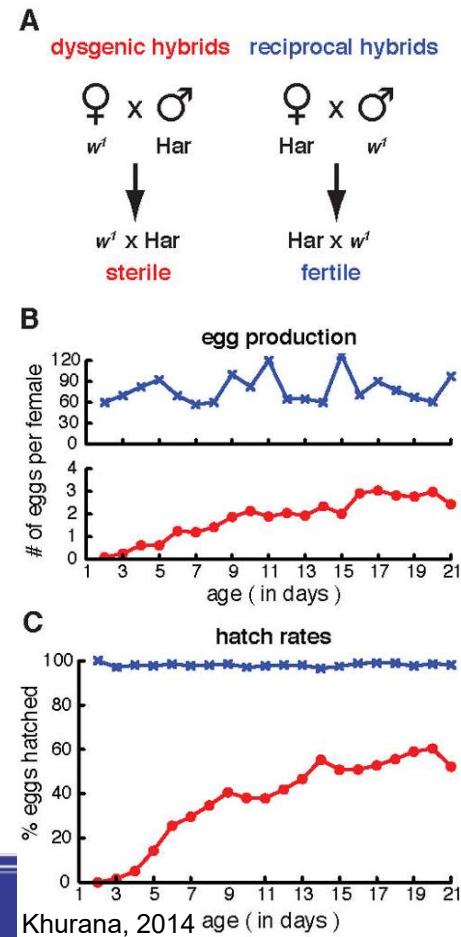
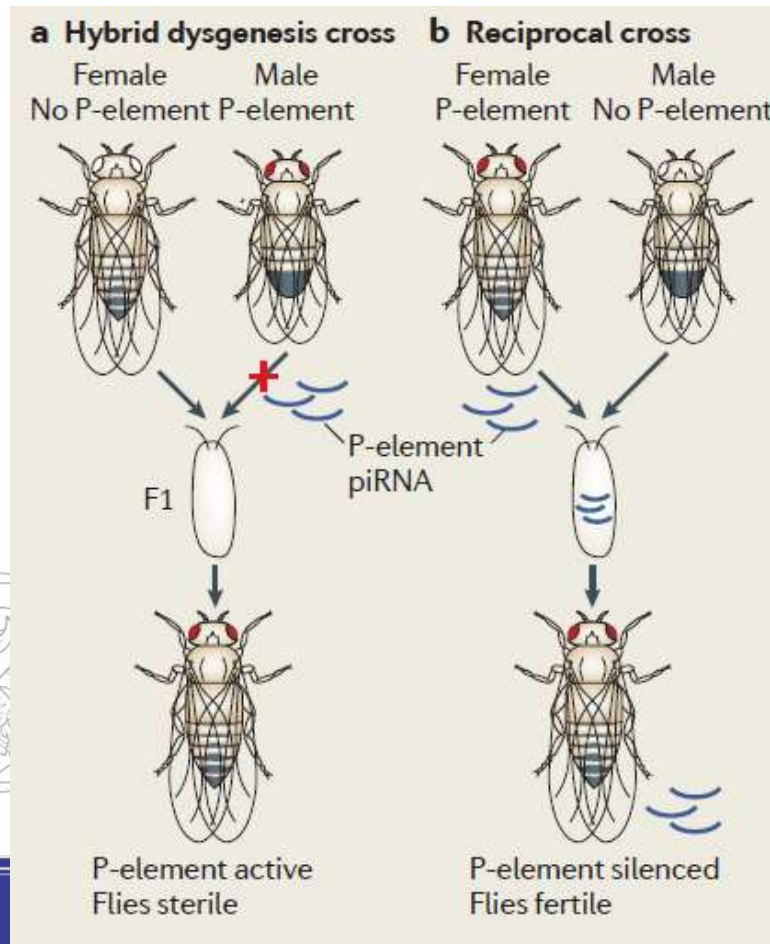
...és a csírvonal fejlődésben:

1. Anyai mRNS-ek lebomlásának szabályozása a MZT (maternal-to-zygotic transition) alatt: *nanos*
2. mRNS-ek kifejeződésének szabályozása: *cis*
3. Poliszómák pozitív regulációja: transz génszabályozás
4. Magi/citoplazmás lokalizáció aránya



PIWI

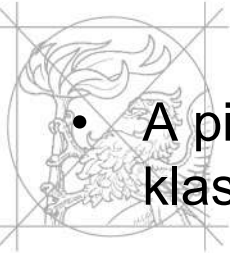
piRNS klaszterek kialakulása: Drosophila hibrid diszgenézis



PIWI

Evolúciós vonatkozások:

- A funkció (TE csendesítés), a ping-pong mehanizmus konzervált az állatvilágban.
- Az effektorfehérjék szintén konzerváltak.
- PIWI-szerű (de nem PIWI) fehérjék megtalálhatók növényekben, gombákban sőt baktériumokban is.
- A piRNS-ek nem konzerváltak, de a piRNS klaszterek helyzete igen.



PIWI

Transzpozon elemek és piRNS útvonal koevolúciója:

magas TE aktivitás

→erősebb piRNS kifejeződés

→piRNS klaszterek duplikálódása

→PIWI és PIWI asszociált fehérjék evolúciója

– gyorsabb evolúció, mint az immungének esetén

– alternatív kodonhasználat, de as. szinten nincs változás → expresszió fokozása

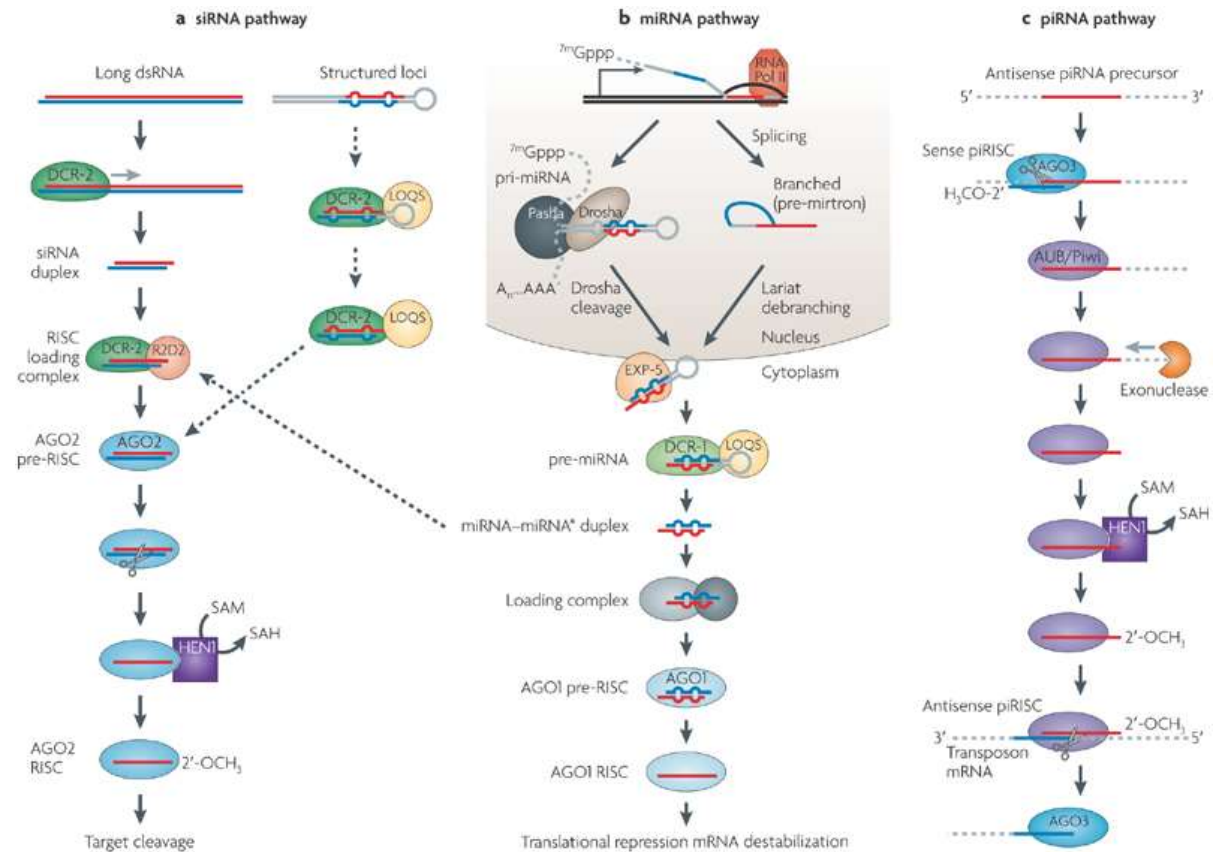
PIWI

piRNS klaszterek kialakulása:

- Mechanizmus nem ismert.
- Véletlenszerű, ott tömörülnek ahol, nem zavarnak annyira?
- Van TE-beépülésnek preferenciája?



Kis nem-kódoló RNS-ek



Nature Reviews | Genetics

	siRNS	miRNS	piRNS
Kis RNS-ek forrása	Endogén: pszeudo-gének, transzpozonok Exogén: RNS vírusok	miRNS gének	piRNS klaszterek
Prekurzor RNS	kettősszálú, hairpin	hairpin	egyesszálú
Érés	Dicer2	Dicer1	Dicer független
Érett ki sRNS hossz (emlős)	21nt	22nt	24-32nt
Target	RNS vírusok, pszeudogének, transzpozonok	mRNS-ek	transzpozonok

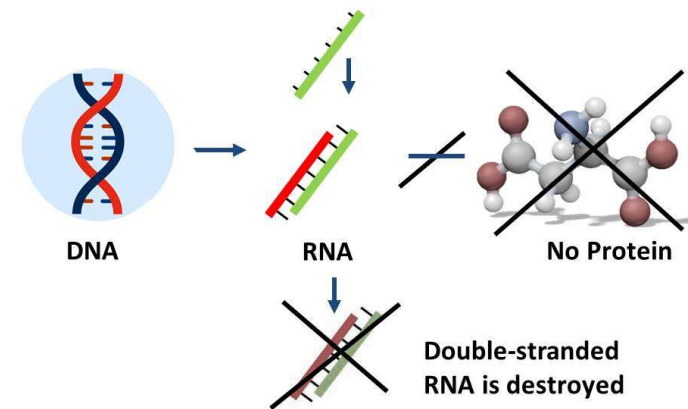
nem-kódoló RNS-ek gyakorlati alkalmazása: RNSi

RNSi: RNS interferencia

- poszttranszkripciós géncsendesítés
- mRNS-ek lebontása
- transzláció gátlása
- siRNS vagy miRNS útvonalon hat
- Fenokópia (fenotípus helyett)
- Elterjedt funkcionális genomikai eszköz: génkiütés
- poliploid szervezeteknél kiemelt jelentőségű
- Gyógyászati jelentőség
- Ipari felhasználás



WHAT IS RNAi?



Az RNSi felfedezése

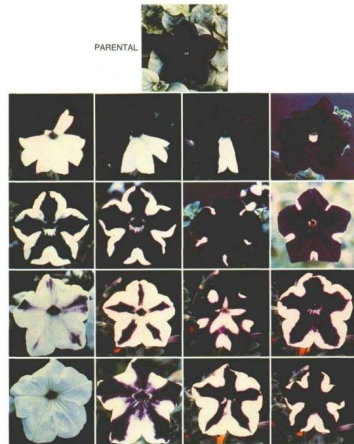
Előzmények:

1980-as évektől: mRNS „kititrálása” antiszensz RNS-sel:
 hibridizációs modell

[Cell](#). 1984 Apr;36(4):1007-15.

Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis.

[Izant JG](#), [Weintraub H](#).



[Plant Cell](#). 1990 Apr;2(4):279-289.

Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.

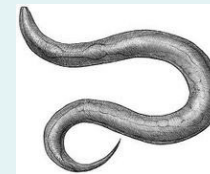
[Napoli C](#), [Lemieux C](#), [Jorgensen R](#)

[Nature](#). 1985 Feb 21-27;313(6022):459-462.

Production of phenocopies by injection into Drosophila embryos.

[Rosenberg UB](#), [Preiss A](#), [Seif](#)

Gene segment	Size (kilobases)	Injected RNA	F ₁ phenotype
unc-22 <i>unc-22</i> null mutants: strong twitchers ¹⁴			
<i>unc22A*</i> Exon 21-22	742	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type Wild type Strong twitchers (100%)
<i>unc22B</i> Exon 27	1,033	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type Wild type Strong twitchers (100%)
<i>unc22C</i> Exon 21-22†	785	Sense + antisense	Strong twitchers (100%)
fem-1 <i>fem-1</i> null mutants: femal (no sperm) ¹⁵			
<i>fem1A</i> Exon 10†	531	Sense Antisense Sense + antisense	Hermaphrodite (98%) Hermaphrodite (>98%) Female (72%)
<i>fem1B</i> Intron 8	556	Sense + antisense	Hermaphrodite (>98%)
unc-54 <i>unc-54</i> null mutants: paralysed ¹¹			
<i>unc54A</i> Exon 6	576	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type (100%) Wild type (100%) Paralysed (100%)
<i>unc54B</i> Exon 6	661	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type (100%) Wild type (100%) Paralysed (100%)
<i>unc54C</i> Exon 1-5	1,015	Sense + antisense	Arrested embryos and larvae (100%)
<i>unc54D</i> Promoter	567	Sense + antisense	Wild type (100%)
<i>unc54E</i> Intron 1	369	Sense + antisense	Wild type (100%)
<i>unc54F</i> Intron 3	286	Sense + antisense	Wild type (100%)
hhb-1 <i>hhb-1</i> null mutants: lumpy-dumpy larvae ⁸			
<i>hh1A</i> Exons 1-6	1,033	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type (<2% lpy-dpy) Wild type (<2% lpy-dpy) Lpy-dpy larvae (>90%)
<i>hh1B</i> Exons 1-2	438	Sense + antisense	Lpy-dpy larvae (>80%)
<i>hh1C</i> Exons 4-6	299	Sense + antisense	Lpy-dpy larvae (>80%)
<i>hh1D</i> Intron 1	697	Sense + antisense	Wild type (<2% lpy-dpy)
myo-3-driven GFP transgenes††			
<i>myo-3::NLS::gfp::lacZ</i>			Makes nuclear GFP in body muscle
<i>gfpG</i> Exons 2-5	730	Sense Antisense Sense + antisense	Nuclear GFP-LacZ pattern of parent strain Nuclear GFP-LacZ pattern of parent strain Nuclear GFP-LacZ absent in 98% of cells
<i>gfpG</i> Exons 2-5	730	Sense Antisense Sense + antisense	Makes mitochondrial GFP in body muscle Mitochondrial-GFP pattern of parent strain Mitochondrial-GFP pattern of parent strain Mitochondrial-GFP absent in 98% of cells
<i>lacZL</i> Exon 12-14	830	Sense + antisense	Mitochondrial-GFP pattern of parent strain



Nature 1998, 806-811
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*
 Andrew Fire & Craig C. Mello
 Nobel-dij: 2006



Az RNSi hatásmechanizmusa

siRNS útvonalon keresztül

Néhány száz bp hosszú dsRNS

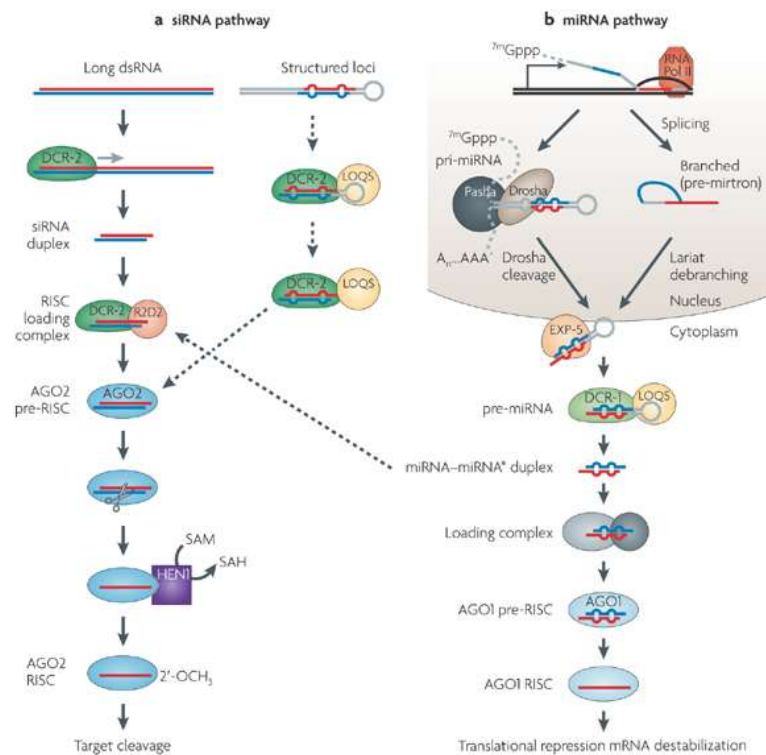
Dicer-2 feldarabolja ~21nt-os darabokra

Sokféle siRNS képződik egy dsRNS-ről

Off-target hatás jelentősebb

Szinte mindig van géncsendesítő hatás

Fenotípus sorozatok



miRNS útvonalon keresztül

mestreséges miRNS gén

21 nt targetspecifikus szakasz

teljesen komplementer a

célszekvenciával

Bekapcsolódik az siRNS útvonalba

Egyféle géncsendesítő si/miRNS

képződik

Off-target hatás kisebb, jobban

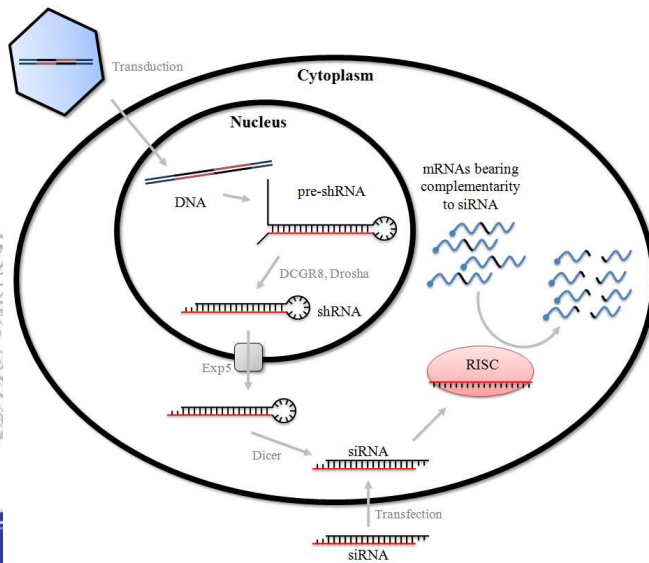
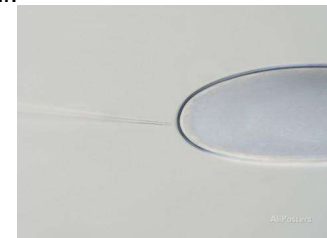
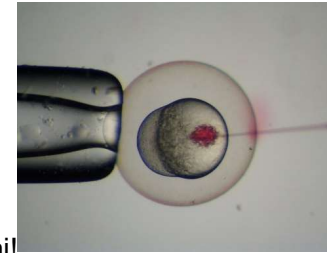
prediktálható

~lgen/nem fenotípus



dsRNS bejuttatása a sejtekbe vagy kifejeztetése transzgénről

- A. dsRNS vagy dsRNS gént kódoló plazmid bejuttatása (exogén dsRNS): tranzienst dsRNS kifejeződés
- transzekció: dsRNS (gént kódoló plazmid) bejuttatása (sejtvonalak). Sejteket kompetensé kell tenni!
 - injektálás (Drosophila, vagy gerinces embriók)
 - génpuska (növényi sejtek)
 - etetés (C.elegans)
 - transzdukció: dsRNS gén bejuttatása vírusfertőzéssel: klinikai jelentőség



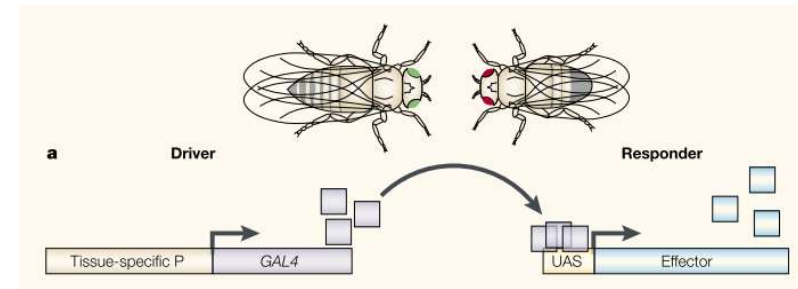
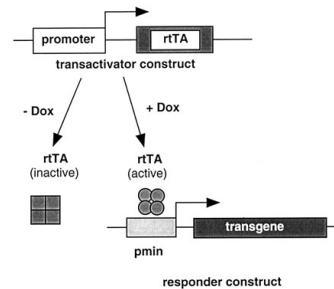
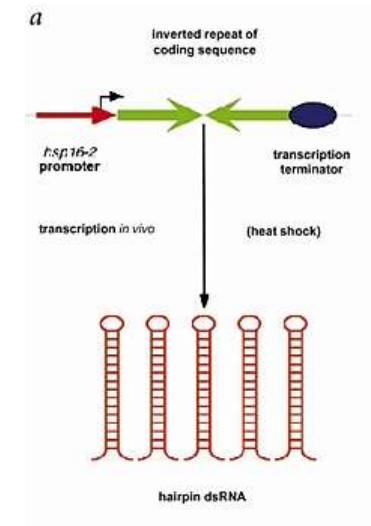
dsRNS bejuttatása a sejtekbe vagy kifejeztetése transzgénről

B. dsRNS-t (vagy miRNS-t) kódoló transzgén kifejeztetése

A transzgén a genomba építve:

- Folyamatos kifejeződés: állandóan működő promóter (Act5c, U6)
- Egy meghatározott kifejeződési mintázat szerint: jól ismert expressziós mintázatú gén promóterével / szabályozó elemeivel meghajtva
- Indukálható:
 - stresszhatásra bekapcsoló génkifejeződés (pl hősök promóter)
 - kémiai/fény indukció indukció (Tet rendszer)
 - UAS-GAL4 rendszer: UAS-szabályozó elemmel ellátott transzgén

Szövetspecifikus promóterrel ellátott GAL4



RNSi sajátosságai

Akkor működik hatékonyan, ha az effektor fehérjék jelen vannak

A géncsendesítő hatás korlátozott, ha a célgén fehérjeterméke stabil

Milyen gyorsan hat?

Függ a targetgén fehérjetermékének turnoverétől

UAS-GAL4 rendszeren keresztül: Drosophilában korai embrióban nem működik

Meddig aktív?

Drosophila embrióba injektálva w dsRNS → adult fenotípus

RNSi fenotípus menekítése:

- inszenzitív transzgénnel: pl közeli rokon fajból
- RNSi az UTR ellen

Modification of *D. melanogaster* H1



Protein sequence	... A K V T A A K P V V A K A S K . . .
Original Dmel H1	...GCG AAA GTG ACT GCA GCG AAG CCA...GTA GTA GCG AAA GCG TCA AAG...
Modified Dmel H1	...GCA AAG GTA ACG GCG GCA AAA CCA...GTT GTC GCA AAG GCT AGC AAA...

RNSi screenek állati modellekben

C. elegans, Schmidtea mediterranea

- mikroinjektálása
- dsRNS-ek etetése
- dsRNS expresszáló E.coli etetése



D. melanogaster

- dsRNS injektálása
- dsRNS transzgének (UAS-GAL4)
- mesterséges miRNS transzgének (UAS-GAL4)



Danio rerio, Xenopus

- nem igazán elterjedt, helyette morpholinók

Emlős modellek

- Elsősorban sejtvonalakon
- Különböző indukálható rendszerek
- Bevitel: liposzómák, nanopartikulumok, elektroporálás, vírusok



RNSi orvosi alkalmazásai

Génterápia: Rendellenesen kifejeződő transzkriptek csendesítése

RNSi (siRNS) bevitele virális vagy vírus mentes módon

Állati modelleken:

- Alzheimer's disease
- Amyotrophic lateral sclerosis
- Huntington's disease
- spinocerebellar ataxia
- anxiety
- depression
- neuropathic pain
- encephalitis
- glioblastoma.

Gyakorlatban használt:
Makuladegeneráció



Antivirális alkalmazás:

HIV
Kanyaró
Hepatitis-A, -B
influenza

Condition	Study type	Study design	Studied RNA	ClinicalTrials.gov Identifier	Sponsor country	Ref.
Alzheimer's disease	Observational	Cross-sectional case control	miRNA 107	NCT01819545	China	2013a
Amyotrophic lateral sclerosis	Observational	Prospective cohort	miRNA expression	NCT01992029	France	2013c
Mild cognitive impairment	Intervention	Behavioral: 3 months exercise intervention program	Role for myokines and miRNAs	NCT02253732	Slovakia	2014
Alzheimer disease, Parkinson disease						
Glioma, neurofibromatosis type 1	Observational	Prospective case-only	miRNA expression patterns	NCT01595139	USA	2012

Wen, Front. Mol. Neurosci, 2016

RNSi biotechnológiai alkalmazásai

Haszonnövényben anyagcsere útvonal gátlása

- Nikotin mentes dohány
- Koffeinmentes kávé
- Allergén mentes gabona
- PPO (polifenol oxidáz) mentes alma
- Mérgező anyagcseretermék szintézisének gátlása

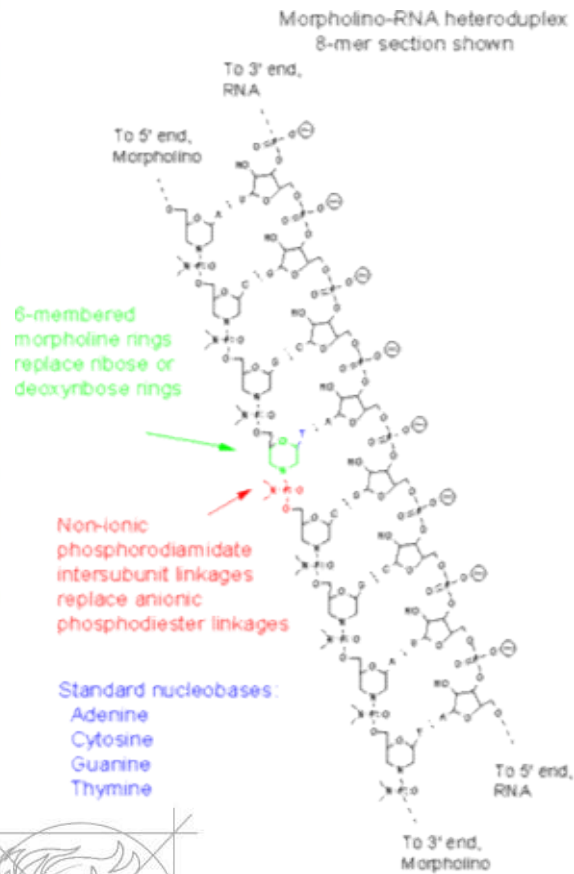
Inszekticidek

- Transzgenikus siRNS-t termelő növény
- Öntözés siRNS tartalmú vízzel

DE: eddig nincs engedélyezett RNSi-n alapuló
GMO növény



Morpholino

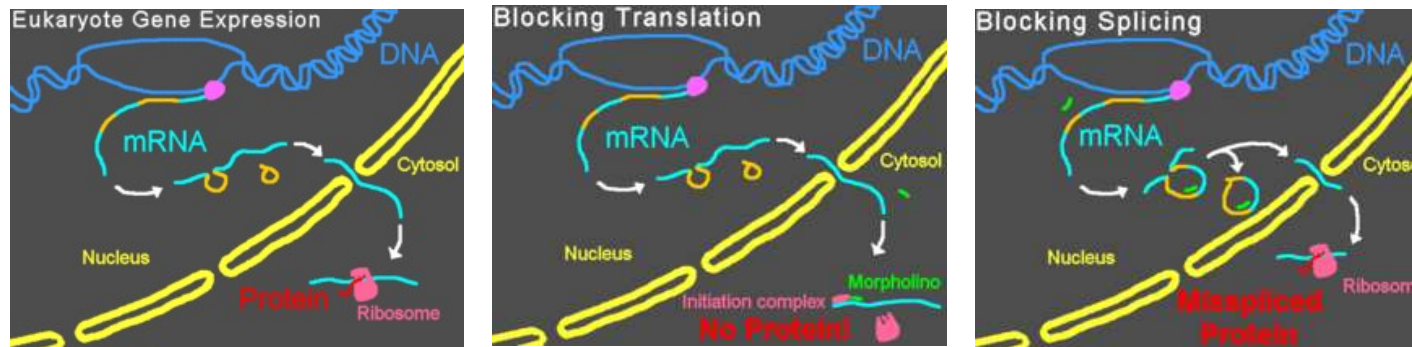


Nem RNSi, de valami olyasmi

- Phosphorodiamidate Morpholino oligomer (PMO)
- ~25nt hosszú módosított DNS mesterséges oligomerek
- A bázisok foszfát csoport helyett foszforodiamidát csoporton keresztül kapcsolódnak egymáshoz
- targetgén mRNS-ével komplementer
- siRNS és miRNS útvonalaktól független hatás
- Elsősorban zebradánió, egér, tengerisün modellekben
- Transzgenikusan nem termeltethető

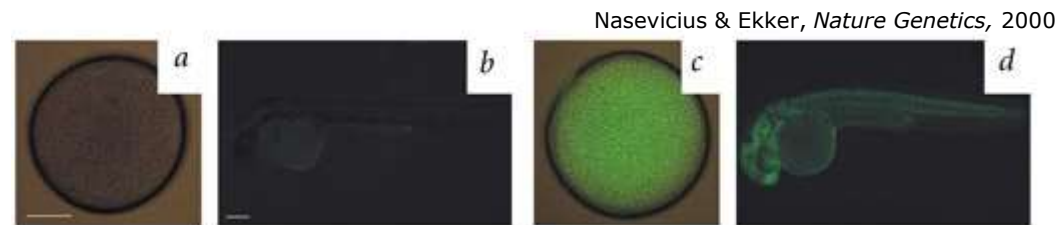
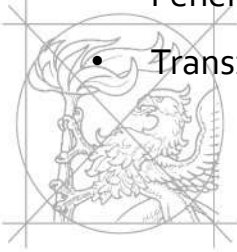
Morpholino hatásmechanizmus

- Exon-intron határra tervezve: gátolja a splicingot
- 5' UTR-re tervezve : transzlációt gátolja



Egyéb felhasználás:

- RNS-ek blokkolása: pl. miRNS-ek
- Fluoreszcens jelölés: fluoreszcensen jelölt Morpholino: target mRNS nyomonkövetése
- Fehérje-RNS kölcsönhatások gátlása
- Transzlációs frameshift



Összefoglalás

Kis nem kódoló RNSeK

- siRNS: vírusok elleni védelem , génszabályozás, RITS
 - érés: Dcr-2, effektor: Ago-2
- miRNS: génszabályozás
 - Érés: Dcr-1, effektor: Ago-1 vagy Ago-2
- piRNS: transzpozon csendesítés főként ivarvonalban
 - Dcr független érés, effektor: AGO-3/Aub

} RNSi

(+ Morpholino)



KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

SZÉCHENYI  2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE