

Белок-некодирующие РНК

1. Белок-некодирующие РНК

Белок-некодирующие РНК — короткие РНК, среди которых miРНК, gasiРНК, piРНК и пр.

При выделении тотальной РНК из клетки и проведении электрофореза в геле проявляются яркие полосы, соответствующие 28S и 18S рРНК (так как больше всего в клетке рибосомальной РНК), а остальная РНК образует так называемый «шмер», подсвеченную область, содержащую РНК разного размера. Далее, в зоне фореза, соответствующей самой легкой фракции, обнаруживается еще одно светлое пятно, которое ранее считали артефактными продуктами деградации РНК, например, в результате действия РНК-аз. С применением более совершенных методов выделения РНК эта фракция все равно проявлялась. Эта РНК представляет собой отдельный класс коротких некодирующих РНК.

2. РНК-интерференция

В 1996 Fire и Mello опубликовали данные по механизму работы некоторых некодирующих РНК, за что получили Нобелевскую премию в 2006 году. В их статье описан механизм РНК-интерференции в клетках червя *C.elegans*. РНК-интерференция — это подавление экспрессии генов эукариот (замалчивание генов) на посттранскрипционном уровне, индуцированное короткими интерферирующими РНК (siRNA).

Суть механизма в том, что введенная каким-либо способом в клетку двуцепочечная РНК узнается особым ферментом Dicer, которые нарезает ее на более короткие участки двуцепочечной РНК — siRNA. Комплекс белков RISC распознает эти куски РНК и вступает во взаимодействия с одной из цепей. Каким образом происходит выбор из двух цепей еще не до конца ясно. Вторая цепь РНК при этом деградирует.

RISC+siRNA образуют комплекс, который может замалчивать те или иные гены. Если в этот момент в клетке есть какая-то мРНК, участок которой комплементарен участку, входящему в комплекс с RISC, то она вступает с ними во взаимодействие. После этого комплекс белков режет мРНК по месту комплементарного связывания. Такие фрагменты мРНК уязвимы для РНК-аз, поэтому быстро деградируют. При этом комплекс RISC+РНК остается активным и способен разрезать комплементарные мРНК дальше.

Механизм интерференции обнаружили впоследствии у простейших, кишечнополостных, насекомых, грибов, растений и млекопитающих. Роль интерференции может быть в защите клетки от заражения вирусом. Существуют вирусы, геном которых состоит из двуцепочечной РНК (или на определенном этапе представляет собой двуцепочечную РНК, прим. автора). Интерференция помогает распознать ее на первых этапах инфекции и успешно остановить распространение вируса. Также интерференция может сдерживать размножение и перемещение ретротранспозонов в геноме.

РНК-триггеры интерференции обладают рядом специфических черт: siRNA двуцепочечные, длиной 21 – 25 нуклеотидных пар, имеют 5'-фосфатный конец и 3'-гидроксильный конец. Белком Dicer они нарезаются так, что на 3'-конце остаются 2 неспаренных нуклеотида.

3. MicroRNA

Кроме того оказалось, что в клетках изучаемых видов были обнаружены гены, продукты которых также могут образовывать малые РНК; они названы microRNA. Но механизм созревания у них другой. С гена транскрибируется РНК (pri-miRNA) и ее вторичная структура содержит шпильки. Далее в ядре эта РНК претерпевает укорочение с помощью белков Drosha и Pasha и транспортируется в цитозоль (pre-miRNA). Там она узнается белком Dicer и образуется miRNA, которая узнается комплексом белков RISC и взаимодействует с ним. Какие-то гены miRNA кодируются в интронах и образуют только одну шпильку. Интересно, что одна РНК может образовывать сразу много шпилек и являться предшественником многим микроРНК.

Интерферирующие РНК имеют более долгий период жизни в клетке, в среднем 24 часа (до 220 часов), чем кодирующие РНК (на порядки меньше).

Согласно базе данных miRBase для человека на сегодняшний день известно более 2,5 тысяч микроРНК.

Итак, двуцепочечные РНК вирусов или мобильных элементов с участием белков Dicer и RISC подавляют мРНК в клетке. Кроме того, гены микроРНК локализованы в ядре, транскрибируются, созревают и с участием тех же белков Dicer и RISC работают по тому же механизму.

4. Регуляция экспрессии генов с помощью малых РНК

Регуляция экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях происходит с помощью малых РНК (miRNA и siRNA) и зависит от комплементарности:

- Разрезание матричной РНК происходит при полной комплементарности малой РНК с мРНК;
- Репрессия трансляции при частичной комплементарности комплекса малой РНК и RISC с мРНК. Рибосома садится на эту мРНК, доходит до этого комплекса и прекращает синтез;
- Ремоделирование хроматина — комплексы могут менять конформацию ДНК, приводя некоторые участки к замалчиванию.

Очевидно, что вероятность реализации первой регуляции намного ниже, чем вероятность реализации второй.

Изначально регуляция путем малых РНК изучалась в частном порядке для каждого гена. Учитывая количество малых РНК и генов, перспективы старых методов не очень хороши. Поэтому разработаны новые методы по изучению малых РНК, удовлетворяющие ученых своей точностью и скоростью получения данных. Один из таких методов — **CLASH method** (Cross-linking, Ligation and Sequencing of Hybrids). Он заключается в том, что клетку обрабатывают фиксирующим агентом (формальдегидом), который связывает все взаимодействия, и смотрят, какие молекулы между собой взаимодействовали при жизни. Далее все микроРНК-мРНК комплексы извлекаются и обрабатываются РНК-азами. В результате вся мРНК порежется на мелкие кусочки кроме тех участков, на которых сидит комплекс микроРНК+RISC, который защищает мРНК от РНК-аз. Далее все обрабатывается ферментом лигазой, который сшивает микроРНК с мРНК с образованием петли. Далее эти петли просто секвенируют.

С помощью этого метода были получены следующие результаты: большая часть взаимодействий с микроРНК приходилась на CDS-регионы ДНК (кодирующие участки, около 42,6%), далее большой процент составляли взаимодействия с 3'UTR и 5'UTR (некодирующие области, расположенные после и до кодирующей, 23,4% и 3,8% соответственно). Определенные малые РНК узнают рРНК (12,6%), тРНК (4,9%), псевдогены (4,9%), другие малые РНК, образуют дуплексы (2,9%).

Общий вид путей происхождения малых РНК и их функций представлен на рис. ??.

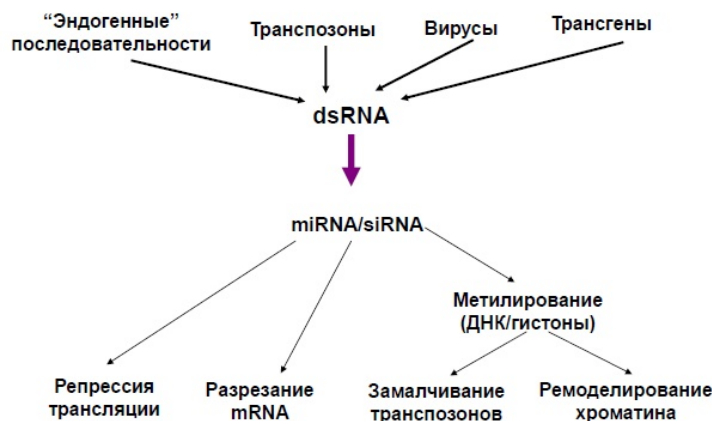


Рис. 1: Происхождения малых РНК и их функции

5. Эволюционная роль интерференции

У прокариот нет механизма интерференции с помощью малых РНК. В статье 2014 года были опубликованы данные о похожем механизме интерференции у бактерии *Thermus thermophilus*, но на основе ДНК. У них есть специальный белок TtAgo, который нарезает чужеродную ДНК на олигонуклеотиды, которые могут быть комплементарны ДНК генома. Авторы предполагают, что это вариант-предшественник РНК-интерференции, который позволял бактериям защищаться от чужеродной ДНК. То есть, изначально ДНК-интерференция существовала для защиты от чужой ДНК, затем появилась РНК-интерференция для защиты от чужой РНК,

и эволюционно позже появился продвинутый тип РНК-интерференции для регуляции экспрессии собственных генов (Swarta et al., 2014).

6. Птичий грипп

Во время эпидемии птичьего гриппа ученые изучили геном курицы и человека и обнаружили причину, по которой вирус гриппа (H5N1) не мог инфицировать человека. Оказалось, что в клетках человека есть 5 специальных интерферирующих РНК, последовательности которых комплементарны последовательности генома вируса, которые эффективно защищают человека от вируса птичьего гриппа. У кур их нет, поэтому они восприимчивы к этому вирусу.

7. Прикладное применение интерференции

Известен механизм специфического замалчивания отдельных генов в клетке. То есть, теоретически, если искусственно синтезировать определенную последовательность малой РНК и поместить ее в клетку, то можно заставить замолчать точно определенный ген или мРНК. И такой метод действительно используется для изучения функций генов или лечения генетических заболеваний.

Одной из первых в 2006 году прикладным применением интерференции занялась компания **Sirna Therapeutics**. В качестве мишеней она выбрала наиболее распространенные генетические заболевания, в том числе и раковые заболевания. На сайте компании выкладывается информация относительно стадии клинических испытаний того или иного препарата. На сегодняшний день компания может предложить лекарство только от макулярной дегенерации сетчатки глаза. Основная трудность в разработке лекарства — это проблема точной транспортировки интерферирующих РНК в определенную ткань или орган.

В китайской статье 2012 года группа ученых пыталась выяснить, какие микроРНК есть в крови у разных животных (Zhang et al., 2012). Кровь можно забирать у пациента и анализировать на предмет РНК и диагностировать какие-либо заболевания. Считается, что их главный источник в плазме — апоптотирующие клетки, которые свое содержимое выбрасывают наружу, в кровяной поток. Интересно, что среди прочих своих РНК, в плазме также было обнаружено с десяток чужеродных РНК.

Одной определенной РНК (№168a) в плазме крови человека было настолько много, что ее невозможно было проигнорировать. Выяснилось, что эта РНК происходит из риса, более того была обнаружена положительная корреляция между долей риса в рационе и концентрацией РНК в крови. Оказалось, что эта РНК комплементарна мРНК гена LDL-RAB1, который кодирует рецептор липопротеинов низкой плотности. Показано, что эта чужеродная РНК может регулировать этот ген и распределена она не только в крови, но и в некоторых органах, в первую очередь в печени.

Возникает вопрос, как РНК вообще попадает из пищеварительного тракта в кровяной поток, и как она там не деградирует и влияет на экспрессию генов. Как оказалось, эта РНК в принципе очень устойчива к РНК-азам, также очень устойчива к кислой среде желудка, где большинство нуклеиновых кислот гидролизуются.

Эта статья произвела фурор в СМИ, особенно в рядах противников ГМО.

Механизм распределения РНК в разных тканях хорошо исследован. Существуют клетки, которые могут образовывать «экзосомы» (экзоцитозные пузырьки с цитоплазмой). Экзосомы устойчивы, могут перемещаться по организму и сливаться с другими клетками, вливая в них свое содержимое. Таким образом, существует некое информационное общение между клетками разных частей организма. При онкологии раковые клетки экспрессируют свой опухолевоспецифичный набор РНК. Через экзосомы, опухолевые транскрипты могут расходиться по всему организму и подавлять нормальную деятельность клеток.

Как показано в статье Fire и Mello, одна микроРНК за счет дегградации может изменять экспрессию нескольких сотен мРНК. Кроме того, при блокировке трансляции одна микроРНК способна также подавлять большое число мишеней мРНК. То есть изменение экспрессии одной микроРНК может косвенным образом влиять на огромное число других генов.

Существуют программы, которые предсказывают взаимодействие микроРНК и мРНК. Программы на загруженной последовательности помечают сайты связывания.

8. PiRNA

Помимо микроРНК есть еще и piРНК. Эта РНК получила свое имя от обнаруженного белка Piwi, с которым связывается фракция коротких РНК. PiРНК встречаются у млекопитающих только в мужских половых

клетках, а у беспозвоночных и в мужских и в женских половых клетках. Причем эта РНК может покрывать всю хромосому равномерно и целиком. РiРНК привлекает особые белки, которые переводят хромосому в неактивное компактизованное состояние. Это важно для сохранности генетического материала в половых клетках.

Образование рiРНК идет по принципу «ping-pong», в котором также участвует белок RISC в ассоциации с неким начальным фрагментом РНК (см. рис. ??). Этот комплекс распознает мРНК и расщепляет ее, с фрагментом взаимодействует другой фермент и расщепляет другую мРНК, а фрагмент последней взаимодействует с белком RISC и цикл замыкается.

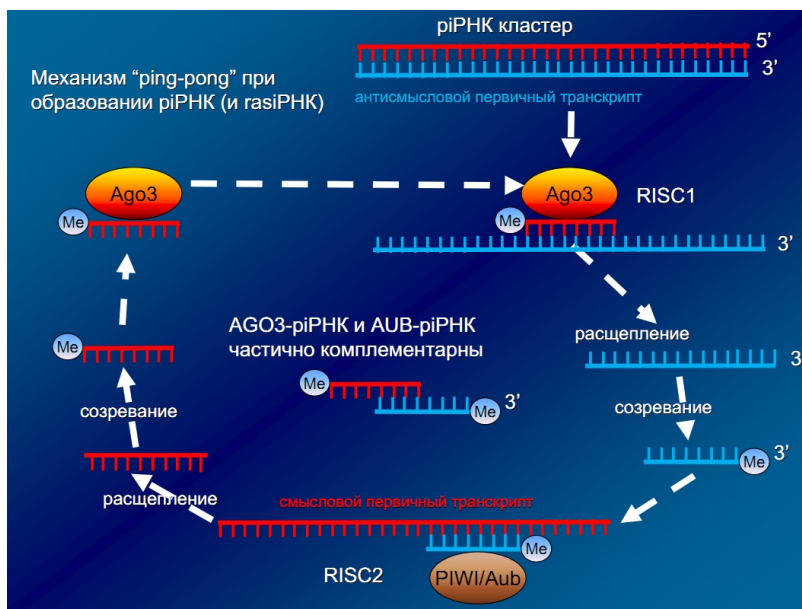


Рис. 2: Механизм образования piRNA

Таким образом piРНК нарабатывают сами себя и, достигнув какого-то количества, взаимодействуют с ДНК для ее дальнейшей компактизации.

9. RasiRNA

RasiРНК — это тоже короткие некодирующие РНК размером в 24–29 нуклеотидов, функции которых пока неизвестны. Также существуют так называемые **малые ядерные РНК**, или мяРНК (snRNA). МяРНК в комплексе с белками реализуют прохождение сплайсинга.

10. Описание свойств длинных некодирующих РНК (lncRNA, или lincRNA)

К длинным некодирующим РНК относят РНК с длиной больше 200 нуклеотидов. До недавнего времени было непонятно, сколько их в клетке. Помогли в понимании этого вопроса недавно опубликованные материалы The GENCODE Project (ENCyclopedia of genes and gene variants). Длинных некодирующих РНК было насчитано порядка 13 тысяч, при этом у каждой хромосомы было некоторое количество такой РНК. Относительно кодирующей области они могут располагаться рядом или с перекрыванием, также они имеют особые способы сплайсинга. На рисунке ?? (слева) представлен график сравнения длин транскриптов в клетке.

На рисунке ?? (справа) представлен анализ альтернативных изоформ транскриптов, возникающих за счет альтернативного сплайсинга. Наибольшее количество изоформ обнаружено у белок-кодирующих генов, некодирующие предпочитают иметь одну изоформу и лишь небольшая доля из них может иметь несколько изоформ.

Повторы некоторых областей довольно часто встречаются в геноме, в том числе в белок-кодирующих и белок-некодирующих генах. В экзонах белок-кодирующих генов их больше. Консервативность генов lncRNA

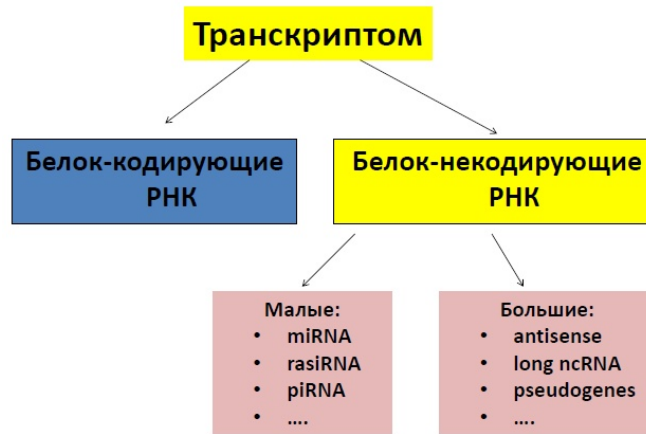


Рис. 3: Разновидности белок-некодирующих РНК

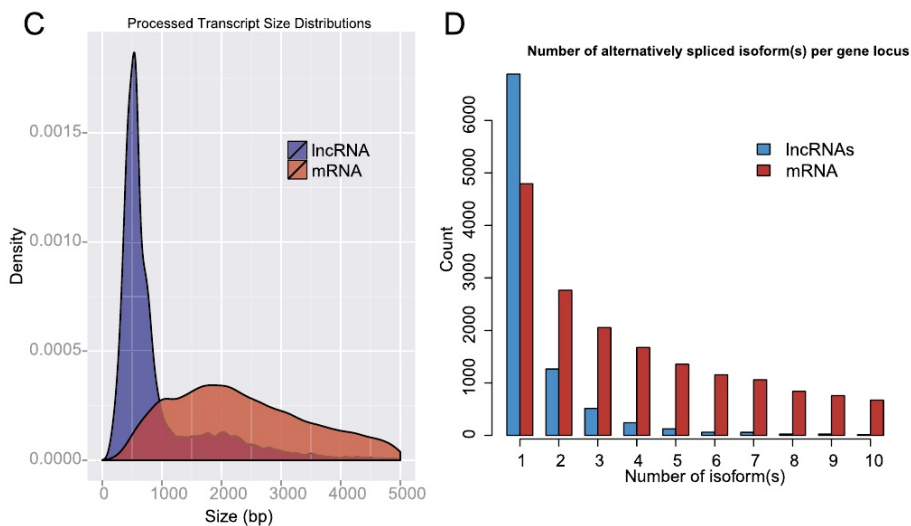


Рис. 4: Анализ размеров транскриптов и альтернативных изоформ

ниже, по сравнению с белок-кодирующими генами, которые возникли давно и находятся под более жестким отбором. Экспрессия lncRNA в разных клетках также ниже.

С локализацией мРНК в клетке все должно быть логично: после транскрипции она транспортируется в цитоплазму к месту трансляции. Но есть какое-то количество мРНК, которое остается в ядре. Зачем? Возможно, в комплексе с белками они ждут какого-то сигнала из цитоплазмы для транспортировки из ядра. А может и нет. На данный момент этот вопрос все еще не имеет ответа. LncRNA больше сосредоточена в ядре, но выходит и в цитоплазму.

LncRNA вопреки ожиданиям может транслироваться. С помощью масс-спектрометрии картировали все белки клетки на ее геном и выяснили, что какой-то процент пептидов имеет lncRNA происхождение. Из 9640 lncRNA около 8% могут транслироваться (Banfai et al., 2012).

В статье 2013 года (Guttman et al.) были описаны эксперименты по рибосомному профайлингу. Эксперимент заключается в детектировании взаимодействий РНК с другими РНК и, с помощью методов секвенирования, определения ее локализации. В итоге для каждой молекулы РНК можно определить где и когда происходило ее взаимодействие с рРНК. Эксперимент показал, что рибосома распознает любую РНК (кодирующую и некодирующую), и движется по ней. Но в случае с мРНК белок получается, а в случае с lncRNA — нет. Почему так происходит пока не известно.

Время жизни мРНК и lncRNA в клетке примерно одинаково (Clark et al., 2012).