

Ανασυνδυασμένο DNA

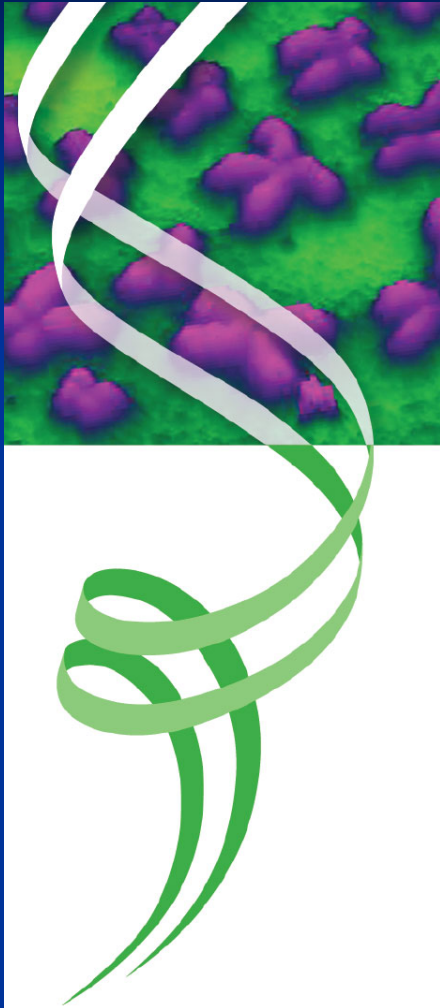
Γονίδια και Γονιδιώματα
Μία Συνοπτική Παρουσίαση

James D. Watson

Amy A. Caudy

Richard M. Myers

Jan A. Witkowski



Κεφάλαιο 9

Η παρεμβολή RNA ρυθμίζει τη λειτουργία των γονιδίων

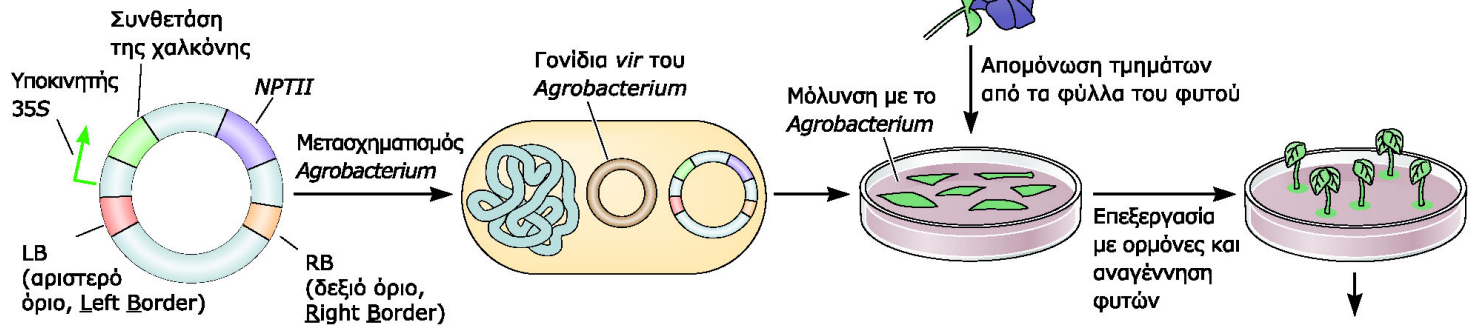
Κλασσική Γενετική: ξεκινάμε συνήθως με ένα ασυνήθη φαινότυπο και στη συνέχεια προσπαθούμε να ανακαλύψουμε το μεταλλαγμένο γονίδιο.

Ανάστροφη γενετική: αδρανοποιούμε ή αποσιωπούμε ένα γονίδιο και ερευνούμε το φαινότυπο που προκύπτει.

RNAi: Ίσως η πιο εύκολη μέθοδος αδρανοποίησης ενός γονιδίου σήμερα

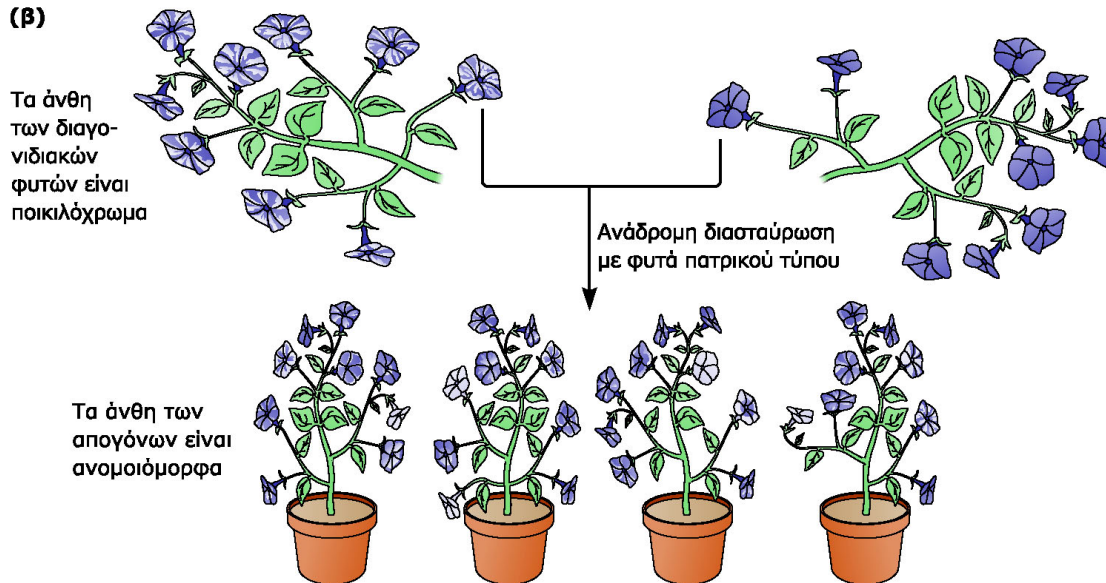
Η υπερέκφραση ενός διαγονιδίου προκαλεί αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου.

(α)



Τα διαγονιδιακά φυτά φέρουν το δείκτη επιλογής *NPTII* και επιλέγονται με καναμυκίνη

(β)



(γ)



Η υπερέκφραση ενός διαγονιδίου προκαλεί αποσιώπηση του ομόλογου ενδογενούς γονιδίου

Ορισμένες παρατηρήσεις:

- Το διαγονίδιο προκαλούσε αποσιώπηση όχι μόνο της δικής του έκφρασης αλλά και εκείνης του ενδογενούς γονιδίου.
- ...παρόλο που τα γονίδια είχαν διαφορετικούς υποκινητές και βρίσκονταν σε διαφορετικές θέσεις στο χρωμόσωμα.
- Το φαινόμενο ονομάστηκε συγκαταστολή.
- οι φαινότυποι συγκαταστατολής δεν ήταν σταθεροί.
- Το ίδιο φυτό μπορεί να είχε κλαδιά με διαφορετικά πρότυπα χρωματισμού.
- Οι απόγονοι είχαν διαφορετικά πρότυπα χρωματισμού από τη πατρική γενεά ενώ μπορεί να επανέρχονταν αργότερα στα φυσιολογικά πρότυπα χρωματισμού.
- η μείωση των επιπέδων έκφρασης δεν αφορούσε κάποια μεταλλαγή.

Τα **επίπεδα μεταγραφής** του διαγονιδίου **επηρέαζαν καθοριστικά** τη συγκαταστολή.

1. **Ισχυροί** υποκινητές → **ισχυρά** επίπεδα μεταγραφής → **πιθανότερη** πρόκληση συγκαταστολής.
 2. **Περισσότερα** αντίγραφα του διαγονιδίου → **πιθανότερη** πρόκληση συγκαταστολής.
-

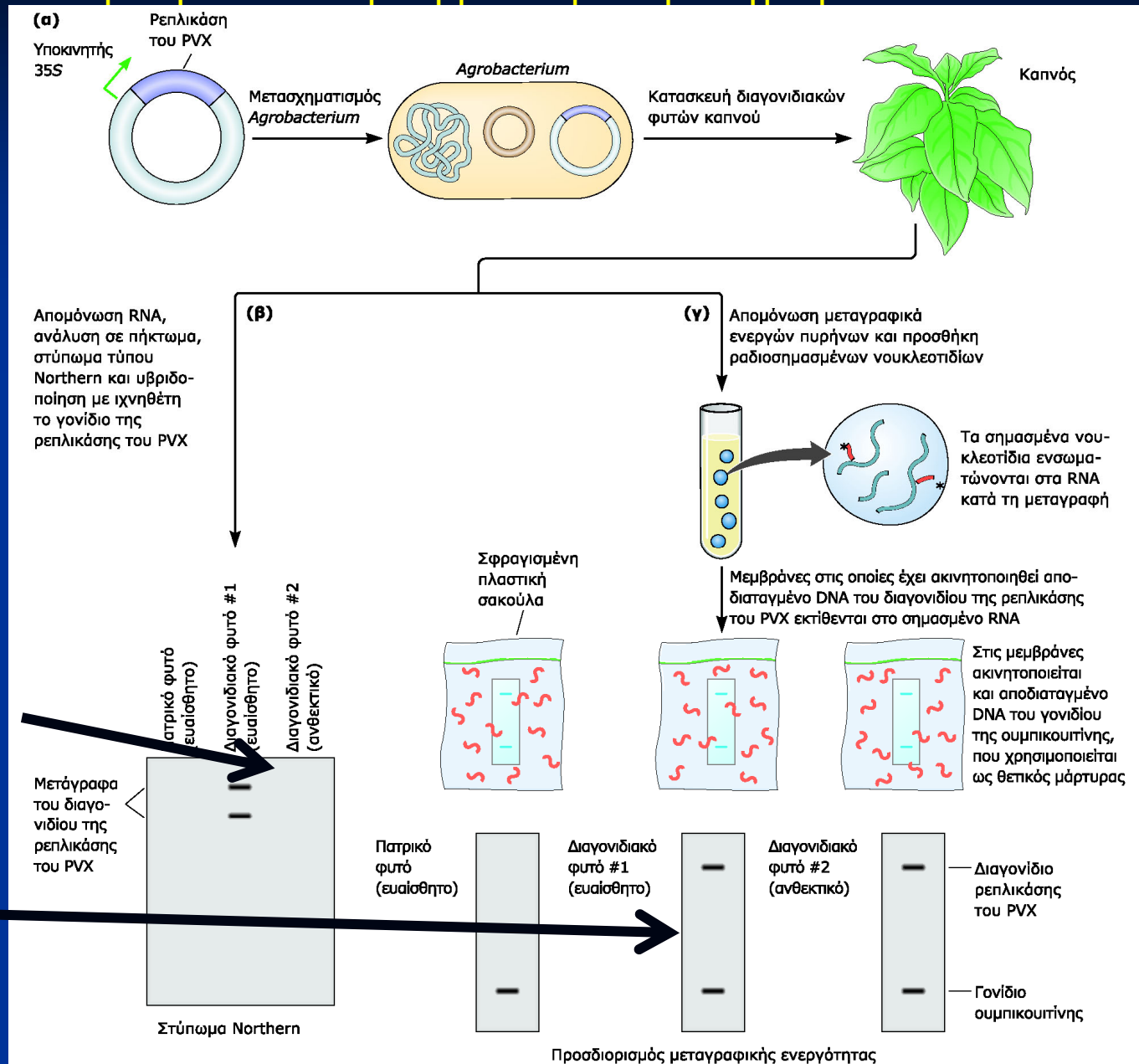
Εκτός από το χρώμα, είναι χρήσιμη και η παραγωγή ανθεκτικών φυτών σε ιούς.

1. Κατασκευάστηκαν φορείς έκφρασης (πλασμίδια E.coli) που έφεραν μια τροποποιημένη ρεπλικάση **του ιού X της πατάτας (PVX)** που ανταγωνιζόταν τη φυσιολογική εμποδίζοντας την αντιγραφή του.
2. Λόγω των συντηρημένων μηχανισμών αναμενόταν ότι η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου κλώνου θα παρεμπόδιζε ενδεχόμενη μόλυνση και από άλλους ιούς.

Αλλά:

1. τα φυτά ήταν ανθεκτικά μόνο στον ιό PVX και όχι σε άλλους ιούς.
2. Και ενώ αναμενόταν υπερέκφραση του μεταλλαγμένου ιού, τα mRNA επίπεδα του PVX ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμα.

ΕΙΚΟΝΑ 9.2: Πειράματα μελέτης της μεταγραφής σε απομονωμένους πυρήνες δείχνουν ότι η συγκαταστολή συμβαίνει μετα-μεταγραφικά.



τα mRNA επίπεδα του PVX ήταν μη ανιχνεύσιμα...

αν και μεταγράφονταν

Για πολύ καιρό θεωρούσαν ότι το φαινόμενο της συγκαταστολής αφορά μόνο τα φυτά.

Sense RNA



Parent



Offspring

Antisense RNA



c. Elegans

Par-1 μεταλλαγή είχε χαρτογραφηθεί σε μια περιοχή του γονιδιώματος αλλά δεν βρέθηκε ο κλώνος που αποκαθιστούσε το φυσιολογικό φαινότυπο.



Ηταν γνωστό πως το αντισημαίνον RNA υβριδοποιείται με το mRNA. Ως αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποίησαν το σημαίνον RNA.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.1: Ένεση διαφόρων σημαινόντων και αντισημαινόντων RNA στον *Caenorhabditis elegans* και καταγραφή της επαγόμενης εμβρυϊκής θνησιμότητας.

Μόριο που ενίεται	Αριθμός ατόμων που ενέθηκαν	Εμβρυϊκή θνησιμότητα (%)
Αντισημαίνον <i>par-1</i>	16	52
Σημαίνον <i>par-1</i>	12	54
Αντισημαίνον <i>twinstar</i> (γονίδιο της δροσόφιλας)	8	0
Αντισημαίνον ζυγωτικό γονίδιο του <i>C. elegans</i>	8	0
Νερό	4	0

Τόσο το σημαίνον όσο και το αντισημαίνον RNA είναι υπεύθυνα για τη συγκαταστολή.

(Nobel prize 2006: Andrew Fire & Craig Mello)

Κατά την *in vitro* μεταγραφή παράγεται και το RNA του άλλου κλώνου.
Δημιουργώντας ένα dsRNA...

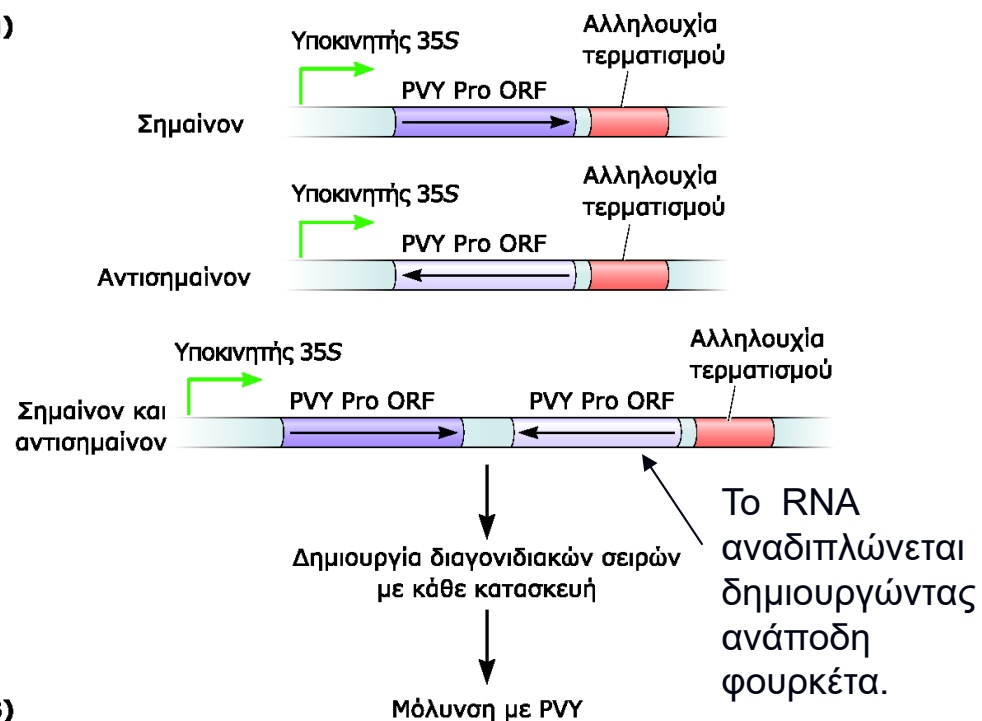
ΠΙΝΑΚΑΣ 9.2: Το **δίκλωνο RNA ενός γονιδίου έπρεπε **να είναι ώριμο** για να επάγει φαινοτύπους που μοιάζουν με αυτούς των αντίστοιχων εκμηδενιστικών μεταλλαγμάτων. Αλληλουχίες υποκινητών/ιντρονίων **δεν είχαν καμία επίδραση!****

Γονίδιο	Τμήμα	Μέγεθος (kb)	RNA που ενίεται	Φαινότυπος F ₁
<i>unc-22</i>				Εκμηδενιστικά μεταλλάγματα του <i>unc-22</i> : νευρολογικά προβλήματα (φαινότυπος strong twitchers)
<i>unc22A</i>	Εξόνια 21-22	742	Σημαίνουν Αντισημαίνουν Σημαίνουν + Αντισημαίνουν	Αγριου τύπου Αγριου τύπου Φαινότυπος strong twitchers (100%)
<i>unc22B</i>	Εξόνιο 27	1.033	Σημαίνουν Αντισημαίνουν Σημαίνουν + Αντισημαίνουν	Αγριου τύπου Αγριου τύπου Φαινότυπος strong twitchers (100%)
<i>unc-22C</i>	Εξόνια 21-22	785	Σημαίνουν + Αντισημαίνουν	Φαινότυπος strong twitchers (100%)
<i>fem-1</i>				Εκμηδενιστικά μεταλλάγματα του <i>fem-1</i> : όλα τα άτομα αναπτύσσονται σε θηλυκά
<i>fem1A</i>	Εξόνιο 10	531	Σημαίνουν Αντισημαίνουν Σημαίνουν + Αντισημαίνουν	Ερμαφρόδιτα (98%) Ερμαφρόδιτα (98%) Θηλυκά (72%)
<i>fem1B</i>	Ιντρόνιο 8	556	Σημαίνουν + Αντισημαίνουν	Ερμαφρόδιτα (> 98%)
<i>unc-54</i>				Εκμηδενιστικά μεταλλάγματα του <i>unc-54</i> : παράλυση
<i>unc54A</i>	Εξόνιο 6	576	Σημαίνουν Αντισημαίνουν Σημαίνουν + Αντισημαίνουν	Αγριου τύπου (100%) Αγριου τύπου (100%) Παράλυτα (100%)
<i>unc54B</i>	Εξόνιο 6	651	Σημαίνουν Αντισημαίνουν Σημαίνουν + Αντισημαίνουν	Αγριου τύπου (100%) Αγριου τύπου (100%) Παράλυτα (100%)

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.2: Το δίκλωνο RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου επάγει φαινοτύπους που μοιάζουν με αυτούς των αντίστοιχων εκμηδενιστικών μεταλλαγμάτων.

Γονίδιο	Τμήμα	Μέγεθος (kb)	RNA που ενίεται	Φαινότυπος F ₁
<i>unc54C</i>	Εξόνια 1-5	1.015	Σημαίνον + Αντισημαίνον	Σταματά η ανάπτυξη των εμβρύων και των προνυμφών (100%)
<i>unc54D</i>	Υποκινητής	567	Σημαίνον + Αντισημαίνον	Άγριου τύπου (100%)
<i>unc54E</i>	Ιντρόνιο 1	369	Σημαίνον + Αντισημαίνον	Άγριου τύπου (100%)
<i>unc54F</i>	Ιντρόνιο 3	386	Σημαίνον + Αντισημαίνον	Άγριου τύπου (100%)
<i>hih-1</i>				Εκμηδενιστικά μεταλλάγματα του <i>hih-1</i> : προνύμφες με μορφολογικές ανωμαλίες κατά μήκος του σώματος και προβλήματα κινητικότητας (φαινότυπος lumpy-dumpy)
<i>hih1A</i>	Εξόνια 1-6	1.033	Σημαίνον Αντισημαίνον	Άγριου τύπου (< 2% προνύμφες με φαινότυπο lumpy-dumpy) Άγριου τύπου (< 2% προνύμφες με φαινότυπο lumpy-dumpy)
<i>hih1B</i>	Εξόνια 1-2	438	Σημαίνον + Αντισημαίνον	Προνύμφες με φαινότυπο lumpy-dumpy (> 90%)
<i>hih1C</i>	Εξόνια 4-6	299	Σημαίνον + Αντισημαίνον	Προνύμφες με φαινότυπο lumpy-dumpy (> 90%)
<i>hih1D</i>	Ιντρόνιο 1	697	Σημαίνον + Αντισημαίνον	Άγριου τύπου (< 2% προνύμφες με φαινότυπο lumpy-dumpy)

(α)



(β)



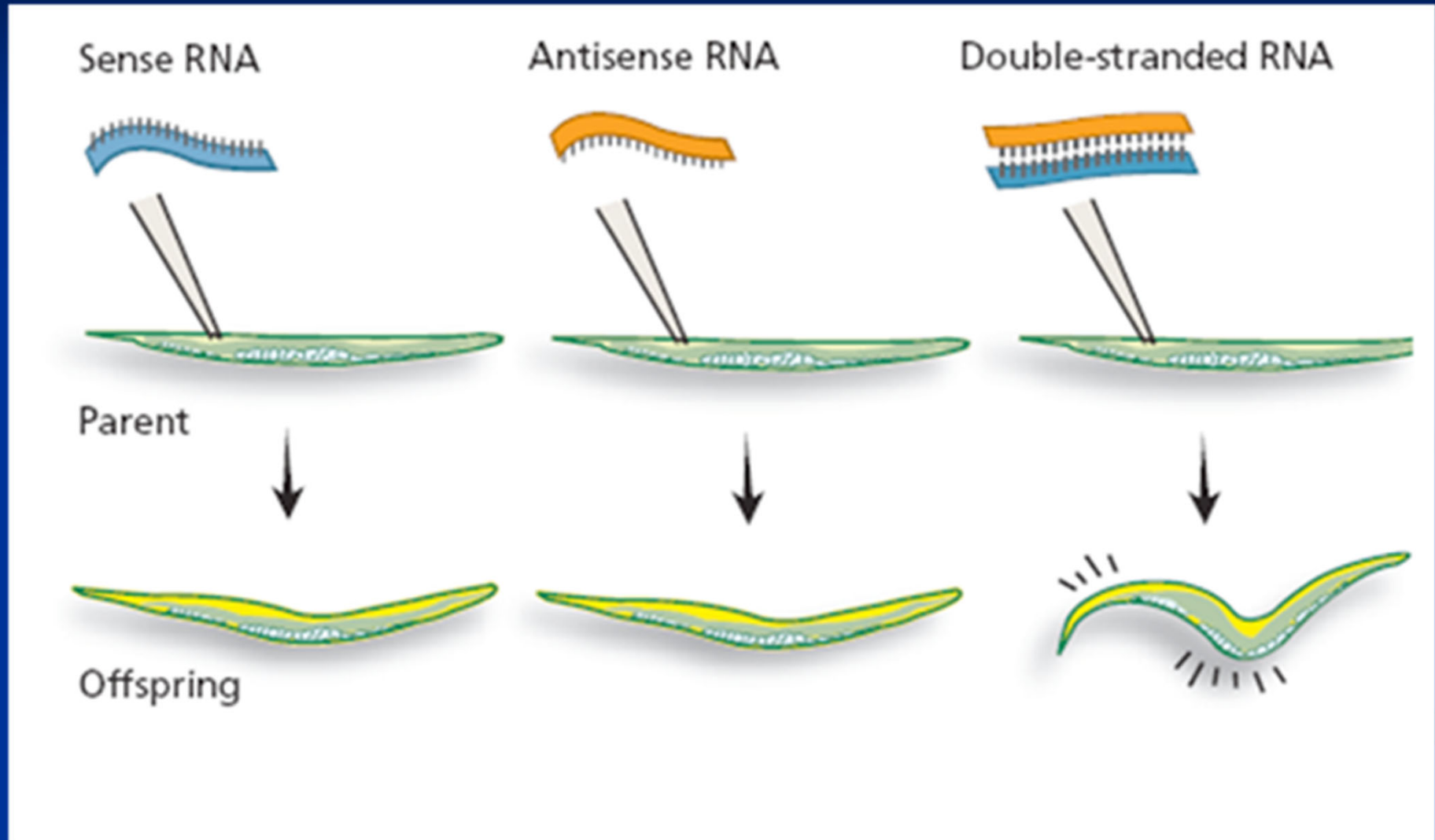
Κατασκευή	Αριθμός σειρών με ανοσία	Αριθμός ανθεκτικών σειρών	Αριθμός ευαίσθητων σειρών	Συνολικός αριθμός σειρών
Σημαίνον	2	2	23	27
Αντισημαίνον	1	0	24	25
Σημαίνον και αντισημαίνον	10	2	15	27

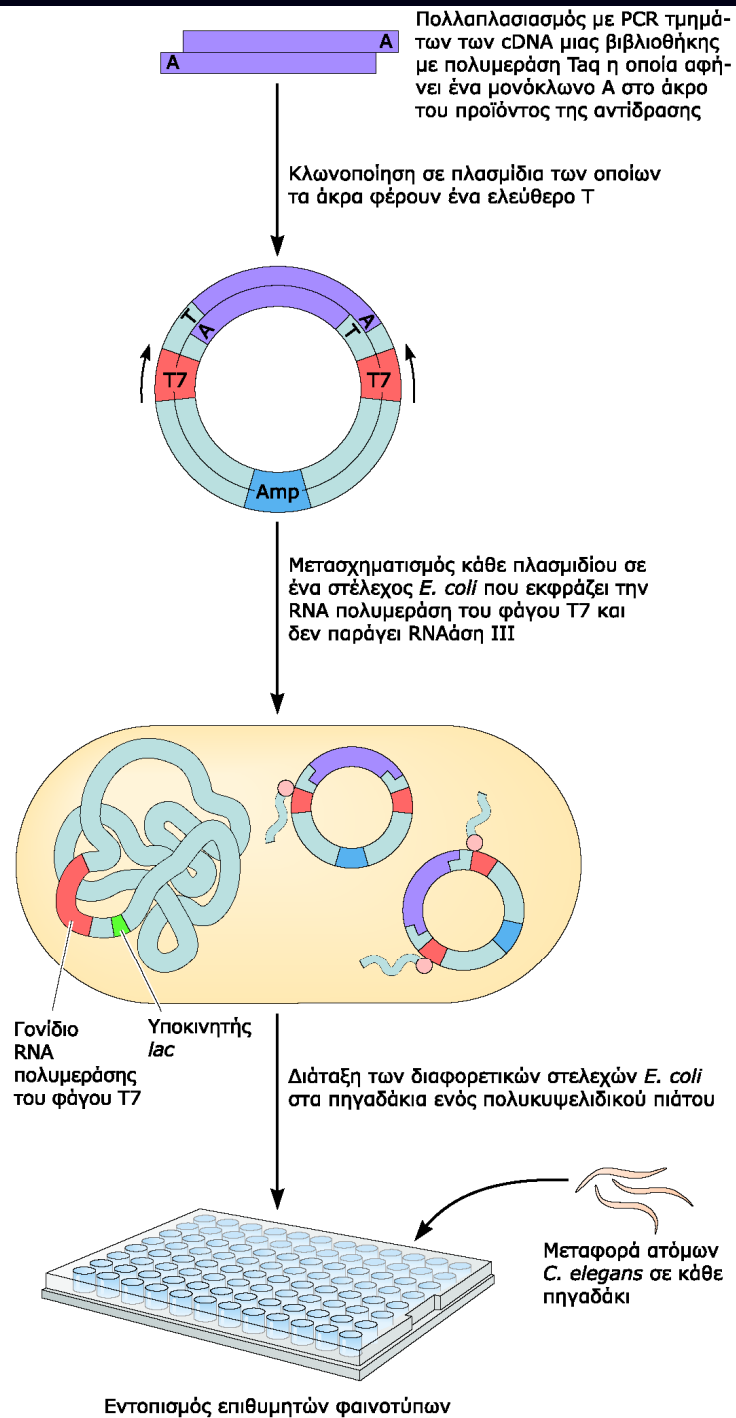
ΕΙΚΟΝΑ 9.3: Η έκφραση ενός διαγονιδίου με ανάστροφες επαναλήψεις προκαλεί συγκαταστολή.

Φυτά που έφεραν 2 διαγονίδια που μετέγραφαν διαφορετικούς κλώνους του ίδιου ιού ήταν πιο ανθεκτικά στους ιούς από φυτά που εφεραν μόνο ένα διαγονίδιο που μετέγραφε τον έναν ή τον άλλο κλώνο.

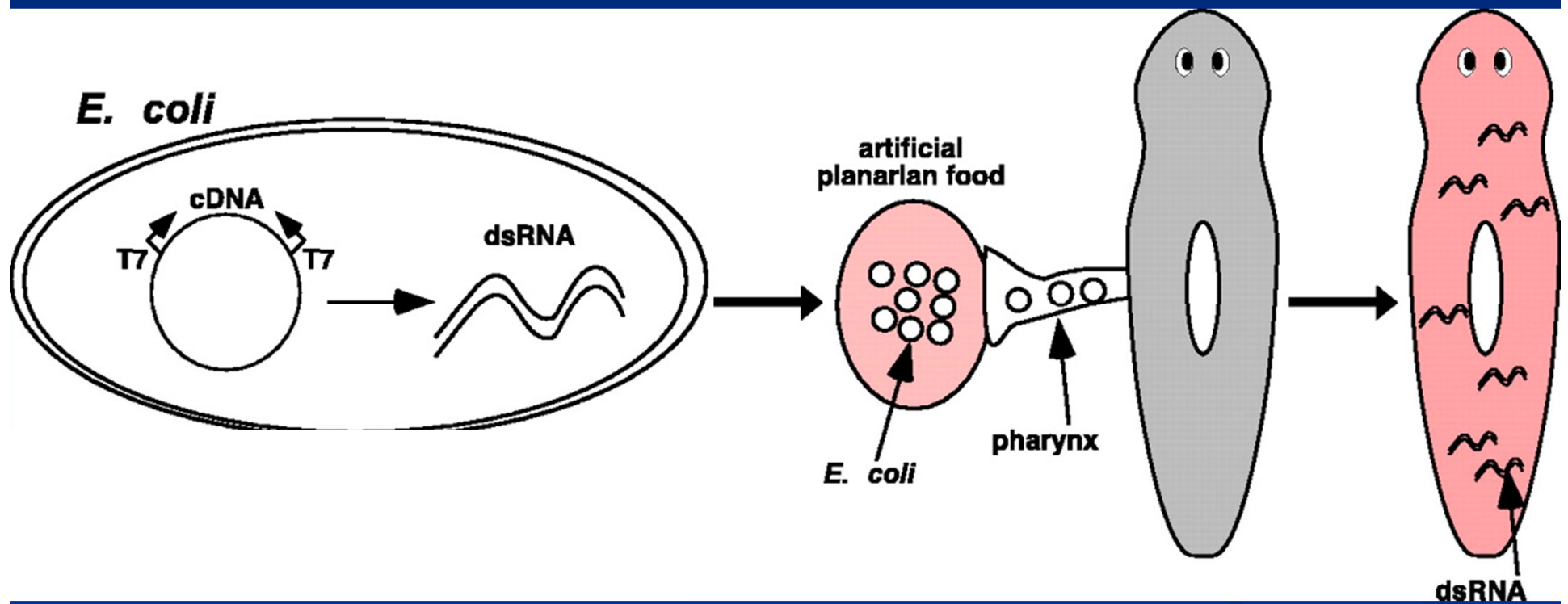
Το πείραμα αφορούσε το γονίδιο για μια πρωτεάση του ιού της πατάτας.

Η διαδικασία ένεσης στις γονάδες των σκουληκιών ήταν επίπονη





ΕΙΚΟΝΑ 9.4: Η επαγωγή της παρεμβολής RNA στον *C. elegans* μπορεί να γίνει **απλώς ταΐζοντας τα ζώα** με στελέχη *Escherichia coli* που παράγουν dsRNA.

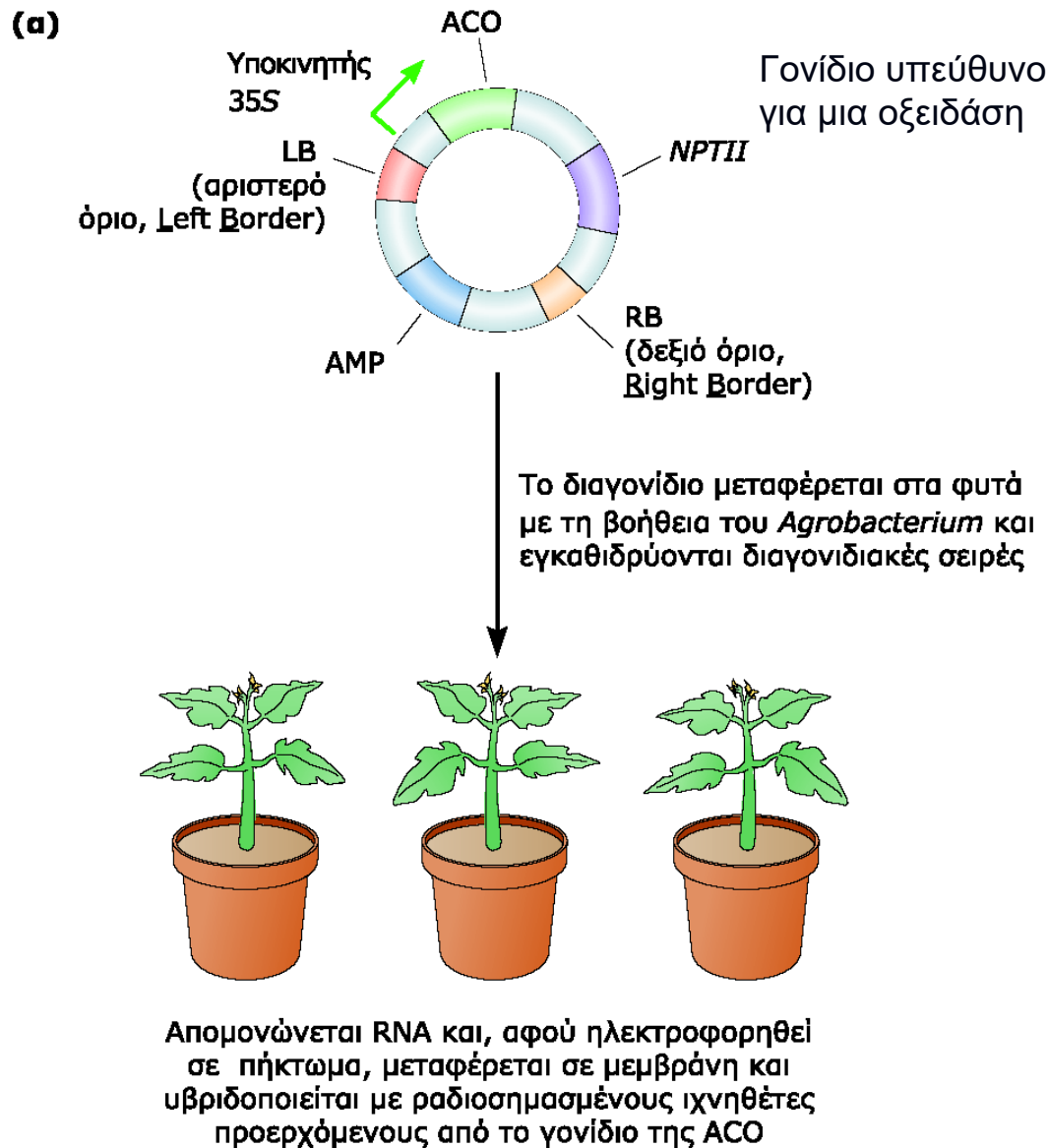


Πως γινόταν η αποικοδόμηση του μονόκλωνου RNA?

Στη μύγα:

- Χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από έμβρυα και κύτταρα δροσόφιλας
- Μετά από επώαση αυτών των εκχυλισμάτων με dsRNA και προσθήκη μονόκλωνου RNA ομόλογου προς το dsRNA παρατηρήθηκε γρήγορα η αποικοδόμηση του μονόκλωνου RNA .
- αν το μονόκλωνο RNA δεν ήταν ομόλογο τότε παρέμενε σταθερό.
- το σύμπλοκο που είναι υπεύθυνο για την ενεργότητα νουκλεάσης ονομάζεται «επαγόμενο από RNA σύμπλοκο αποσιώπησης»
= RISC (RNA-induced silencing complex)
- Το RISC στοχεύει οποιοδήποτε RNA αν το ομόλογο dsRNA βρίσκεται στο εκχύλισμα.

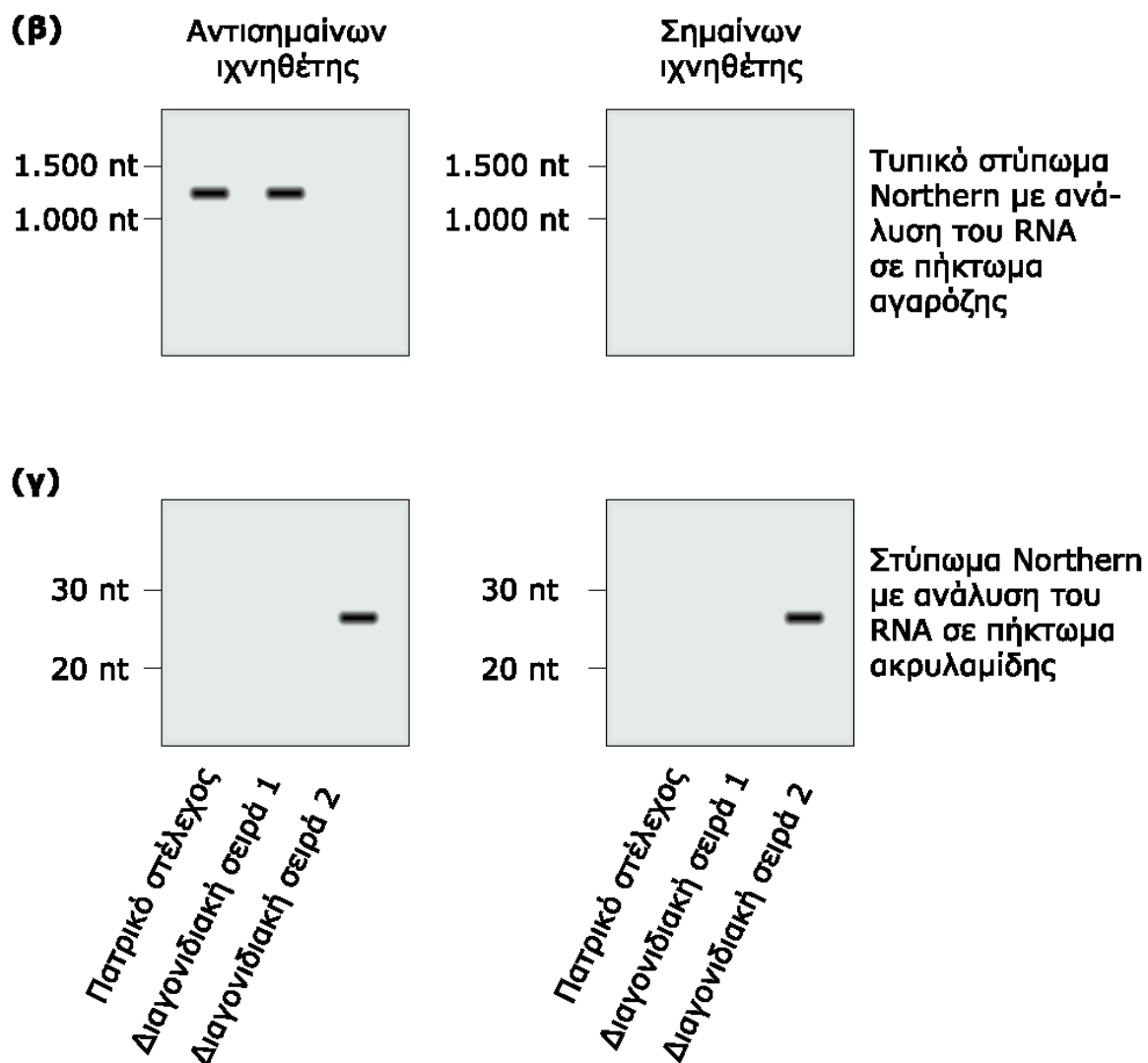
ΕΙΚΟΝΑ 9.5: Εντοπίζονται μικρά RNA ομόλογα προς το αποσιωπημένο γονίδιο σε φυτά που υφίστανται αποσιώπηση.



ΕΙΚΟΝΑ 9.5: Εντοπίζονται μικρά RNA ομόλογα προς το αποσιωπημένο γονίδιο σε φυτά που υφίστανται αποσιώπηση.

Τα μικρά μόρια RNA
δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν
σε πήκτωμα αγαρόζης αλλά σε
ακρυλαμίδης. Αλλά ήταν εκεί!

Εντοπίστηκαν αντισημαίνοντα
RNA ακόμη και σε φυτά όπου η
συγκатаστολή είχε προκληθεί
από το σημαίνοντα κλώνο του
γονιδίου.



Ποιά γονίδια κωδικοποιούν τις RNAses που κόβουν το dsRNA;

Η ανακάλυψη μικρών RNA οδήγησε αμέσως στο ερώτημα για το ποιά γονίδια κωδικοποιούν τις RNAses οι οποίες κόβουν το dsRNA.

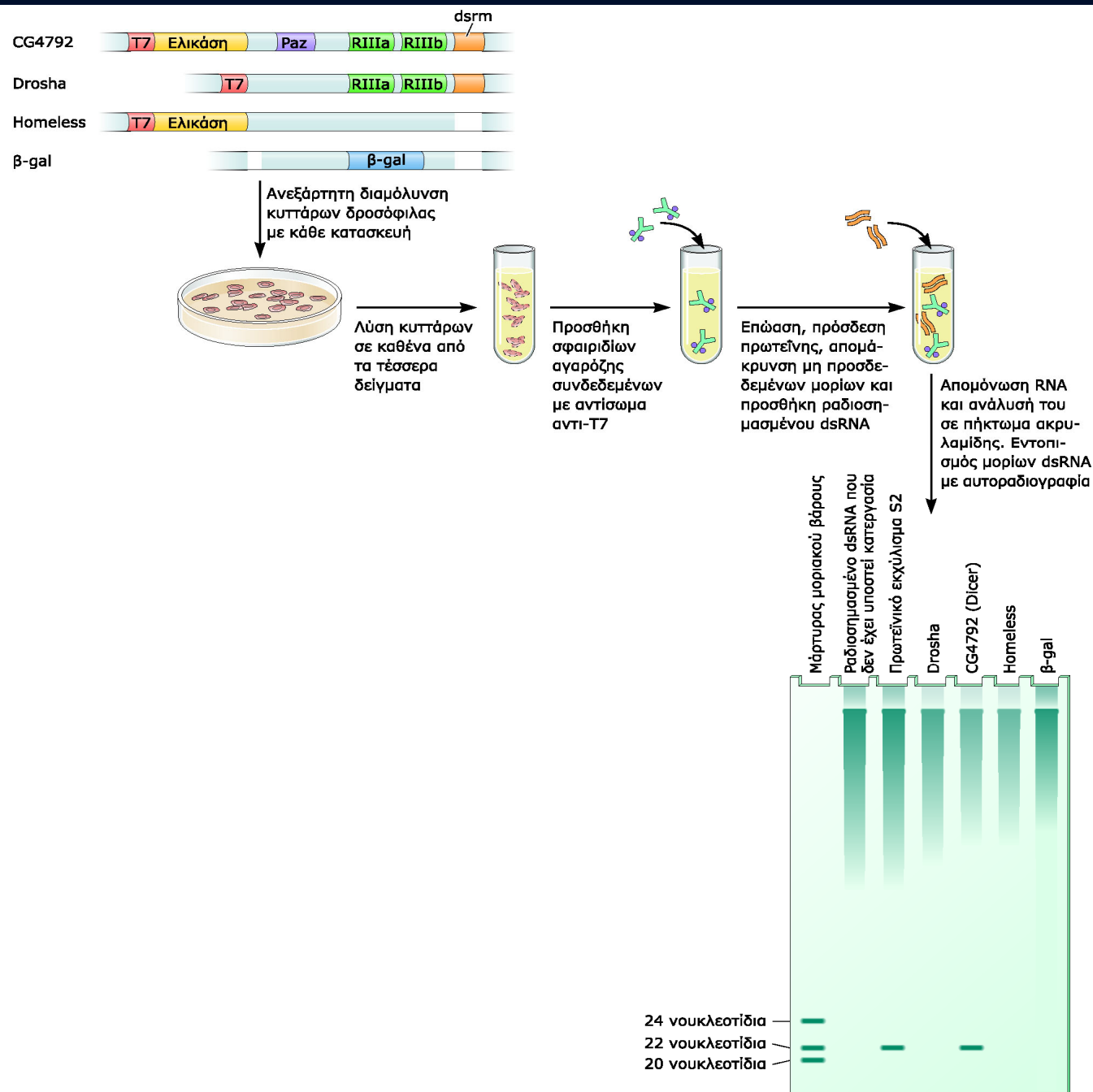
Αρχικά έψαχναν για πρωτείνες στη δροσόφιλα όμοιες με την RNase III που ήταν γνωστό ότι έκοβε dsRNA

Τις ομόλογες αυτές πρωτείνες θα μπορούσαν να τις εκφράσουν μέσω ετερόλογης έκφρασης σε βακτήρια και να δοκιμαστεί αν έχουν ενεργότητα νουκλεάσης

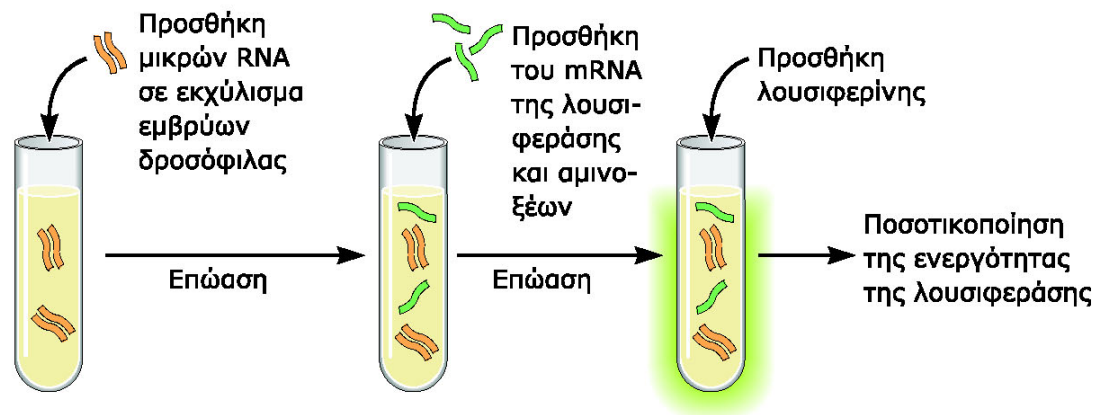
Αν όμως δεν ήταν μια πρωτεΐνη;

Αν συμμετείχαν κι άλλοι παράγοντες;

Ανακαλύπτεται η Dicer με μία στρατηγική, μελέτης υποψήφιων γονιδίων.

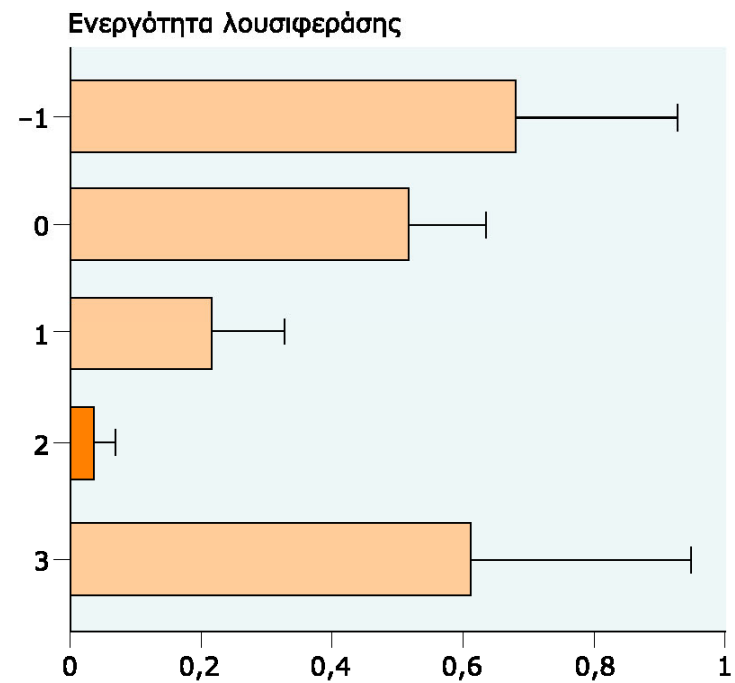


Ποιά είναι η φύση αυτών των μικρών μορίων RNA; RNA όμοια με τα προϊόντα της Dicer προκαλούν RNAi.



Έλεγχος του τύπου των προεξέχοντων άκρων (5' ή 3')

5', 1 bp	5' AUCACGUACGCGGAAUACUUC AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'	
Τυφλά άκρα	5' UCACGUACGCGGAAUACUUCG AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'	
3', 1 bp	5' CACGUACGCGGAAUACUUCGA AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'	
3', 2 bp	5' ACGUACGCGGAAUACUUCGAA AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'	Ιδανικός τύπος άκρων
3', 3 bp	5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'	



ΕΙΚΟΝΑ 9.7: Συνθετικά μικρά RNA όμοια με τα προϊόντα της Dicer προκαλούν RNAi.

Έλεγχος του μήκους

Ιδανικό
μήκος

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

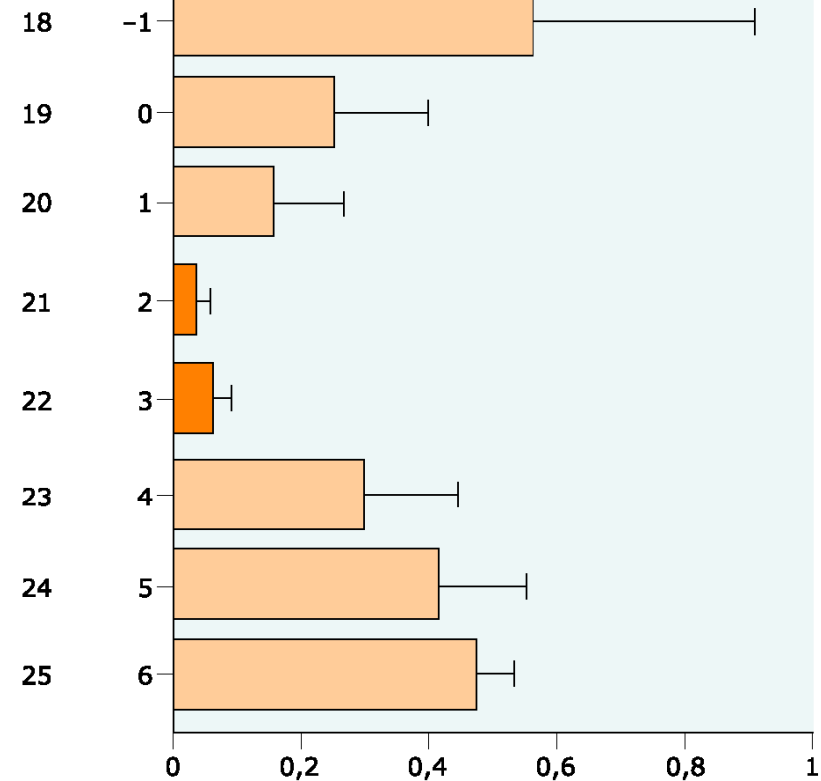
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

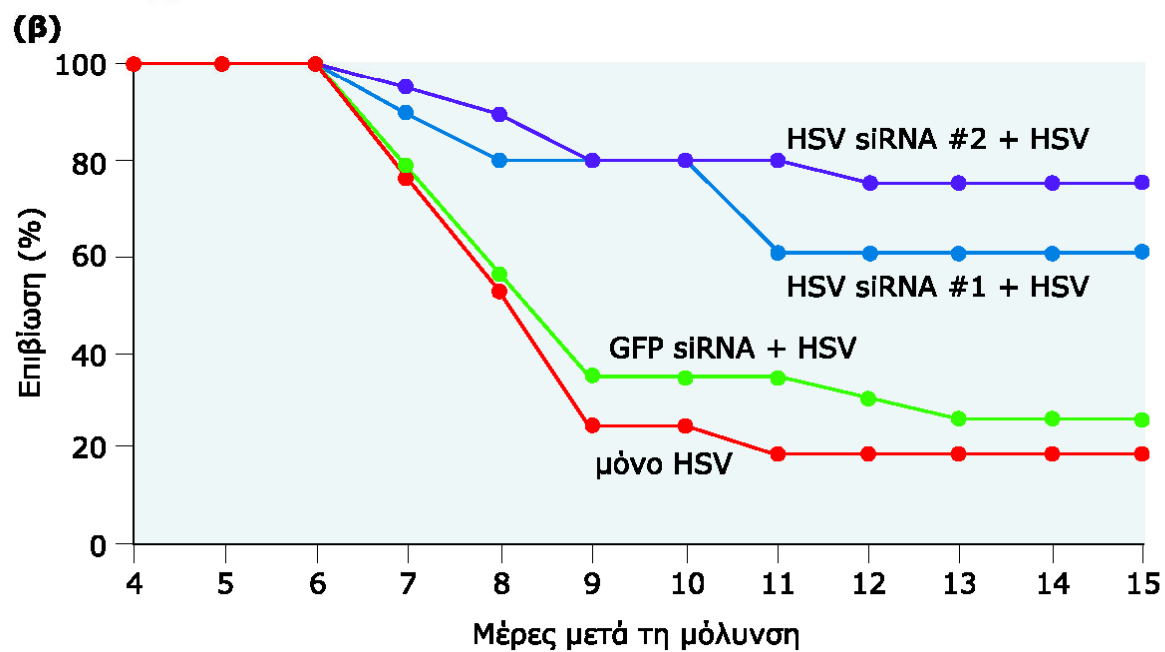
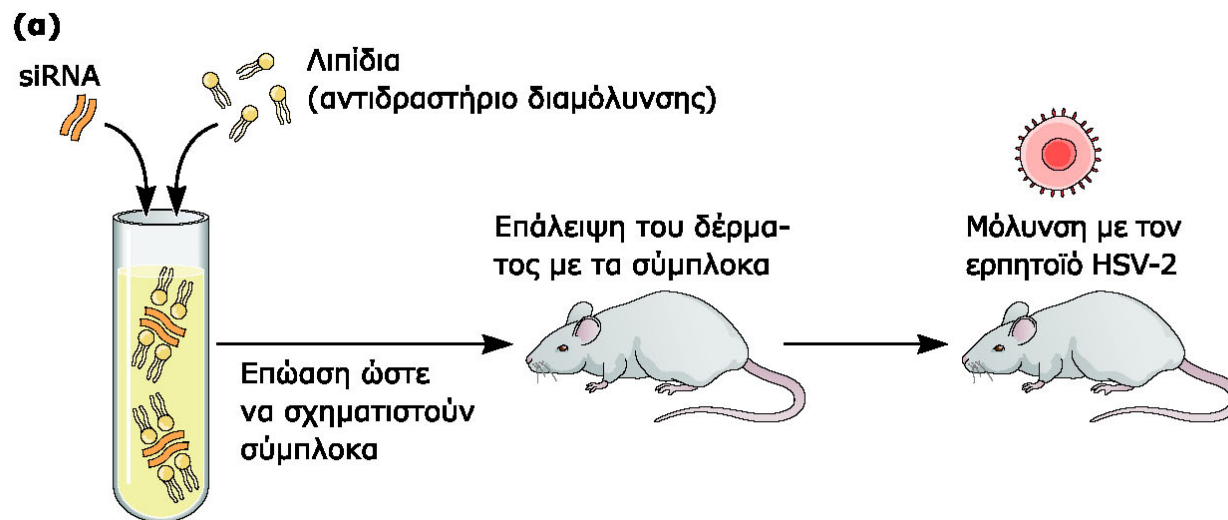
Ενεργότητα λουσιφεράσης



Στα θηλαστικά

- Στα θηλαστικά η παρουσία dsRNA **καταστέλλει πλήρως** τη μετάφραση όλων των πρωτεϊνών.
- Το dsRNA ενεργοποιεί **αμυντικούς μηχανισμούς** κατά των ιών.
- Η **πρωτεϊνική κινάση R** προσδένεται στο dsRNA και **ενεργοποιείται**. Στη συνέχεια και **καταστέλλει τη μετάφραση** φωσφορυλιώνοντας παράγοντες που είναι απαραίτητες για τη έναρξη της μετάφρασης.
- Το **μικρότερο dsRNA** που μπορεί να προσδέσει η PKR είναι **30bp**. Αρα ένα dsRNA μήκους 20-21bp δεν μπορεί να προσδεθεί στην PKR και ενώ είναι αποτελεσματικό για την μείωση των επιπέδων mRNA δεν επηρεάζει την μετάφραση.
- Τα **μικρά αυτά RNA μόρια** λέγονται **siRNA (short interfering RNA)**.

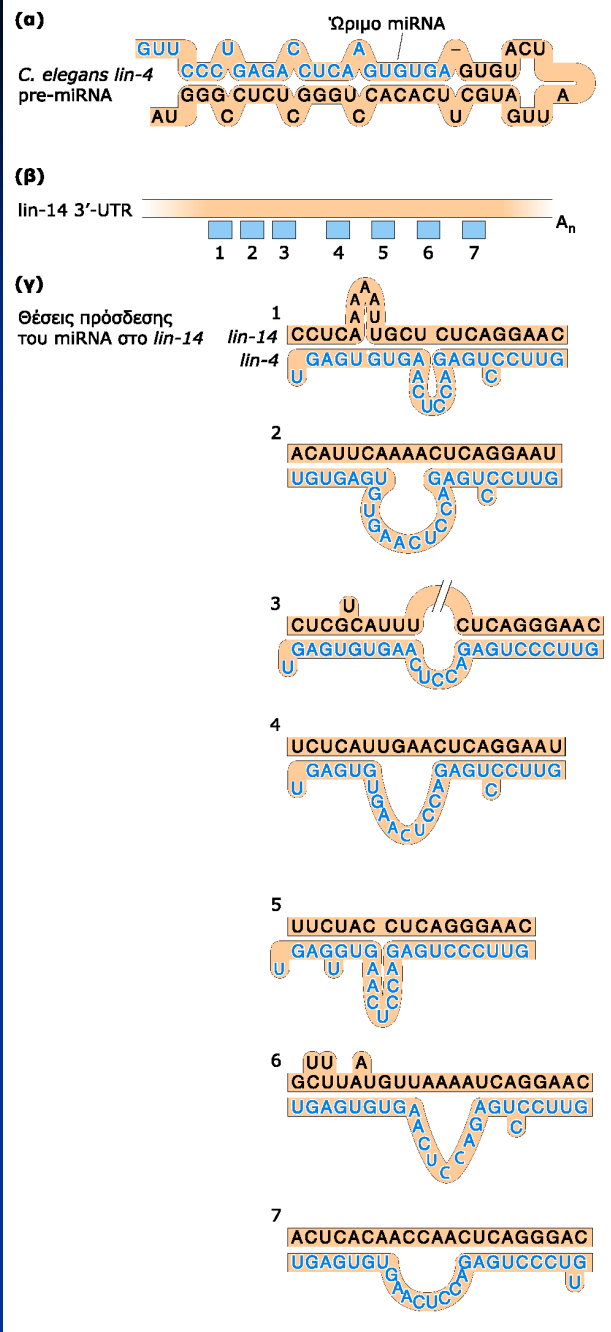
ΕΙΚΟΝΑ 9.8: Χρήση siRNA για την καταπολέμηση μόλυνσης από ερπητοϊό Herpes simplex virus 2.



Υπάρχουν πολλά μικρά RNA μόρια

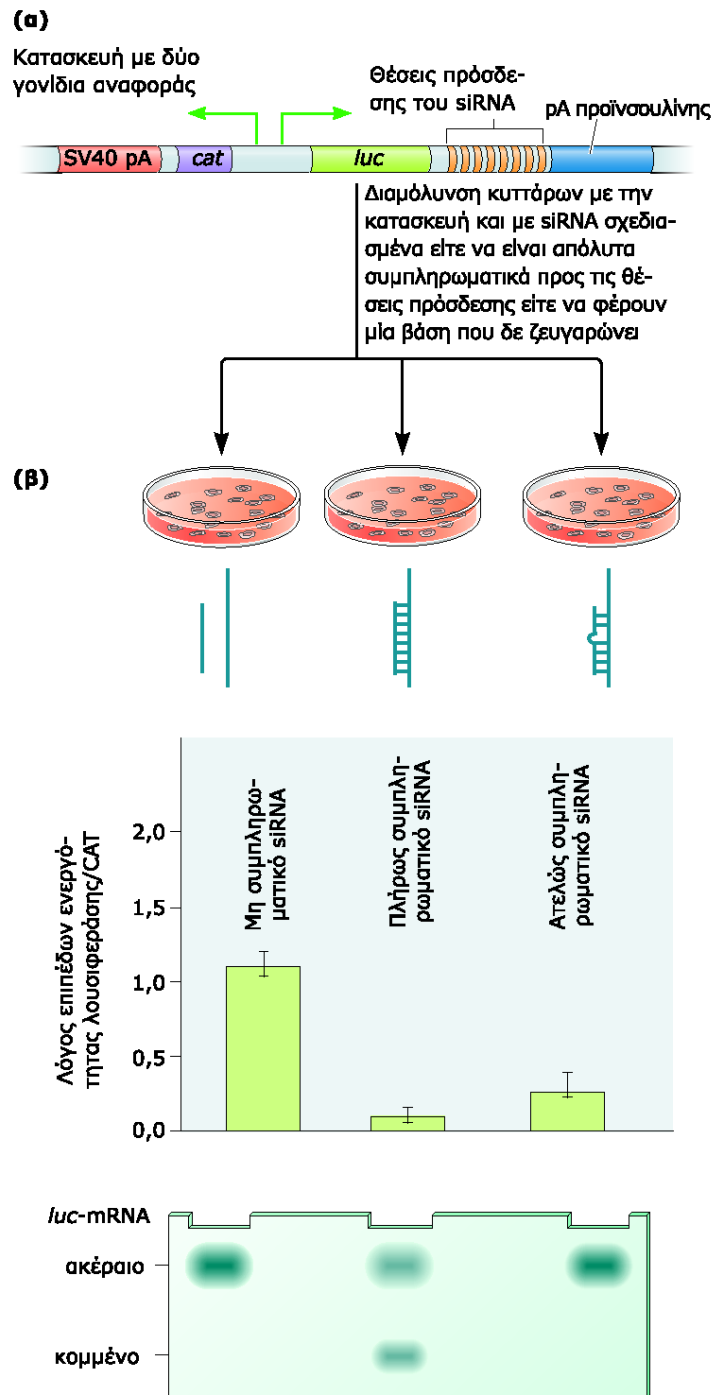
ΠΙΝΑΚΑΣ 9.3: Ονοματολογία μικρών RNA.

Συντομογραφία	Όρος	Σχόλια
siRNA	Βραχύ παρεμβαλλόμενο RNA	Δημιουργούνται μέσω κοπής dsRNA από την Dicer. Ο όρος χρησιμοποιείται επίσης για να περιγράψει μικρά συνθετικά μόρια RNA που μιμούνται τα προϊόντα της Dicer και τα οποία εισάγονται στα κύτταρα με διαμόλυνση για να προκαλέσουν την αδρανοποίηση γονιδίων.
miRNA	microRNA	Προέρχονται από τη μετατροπή ενός μεγαλύτερου pri-miRNA σε pre-miRNA με δομή φουρκέτας και την περαιτέρω επεξεργασία αυτού από την Dicer. Προκαλούν την αποσιώπηση γονιδίων.
shRNA	Μικρά RNA με δομή φουρκέτας	Συνθετικό RNA με ανάστροφες επαναλήψεις μικρού μήκους, σχεδιασμένο ώστε να δρα ως υπόστρωμα της Dicer.* ¹
ta-siRNA	siRNA που δρουν <i>in trans</i>	Τύπος siRNA τα οποία μεταγράφονται ως πρόδρομα μόρια από ένα γενετικό τόπο και προκαλούν την αποσιώπηση άλλων γενετικών τόπων. Η κοπή του πρωτογενούς μεταγράφου πολλών ta-siRNA πραγματοποιείται από την Dicer και ρυθμίζεται από κάποιο miRNA (βλ. Εικ. 9.13).
ra-siRNA	siRNA σχετιζόμενα με επαναλήψεις (repeat-associated siRNA)	Τύπος siRNA των οποίων η αλληλουχία αντιστοιχεί σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία, συνήθως αυτά που βρίσκονται στα κεντρομερή ή στα μεταθετά στοιχεία.* ²



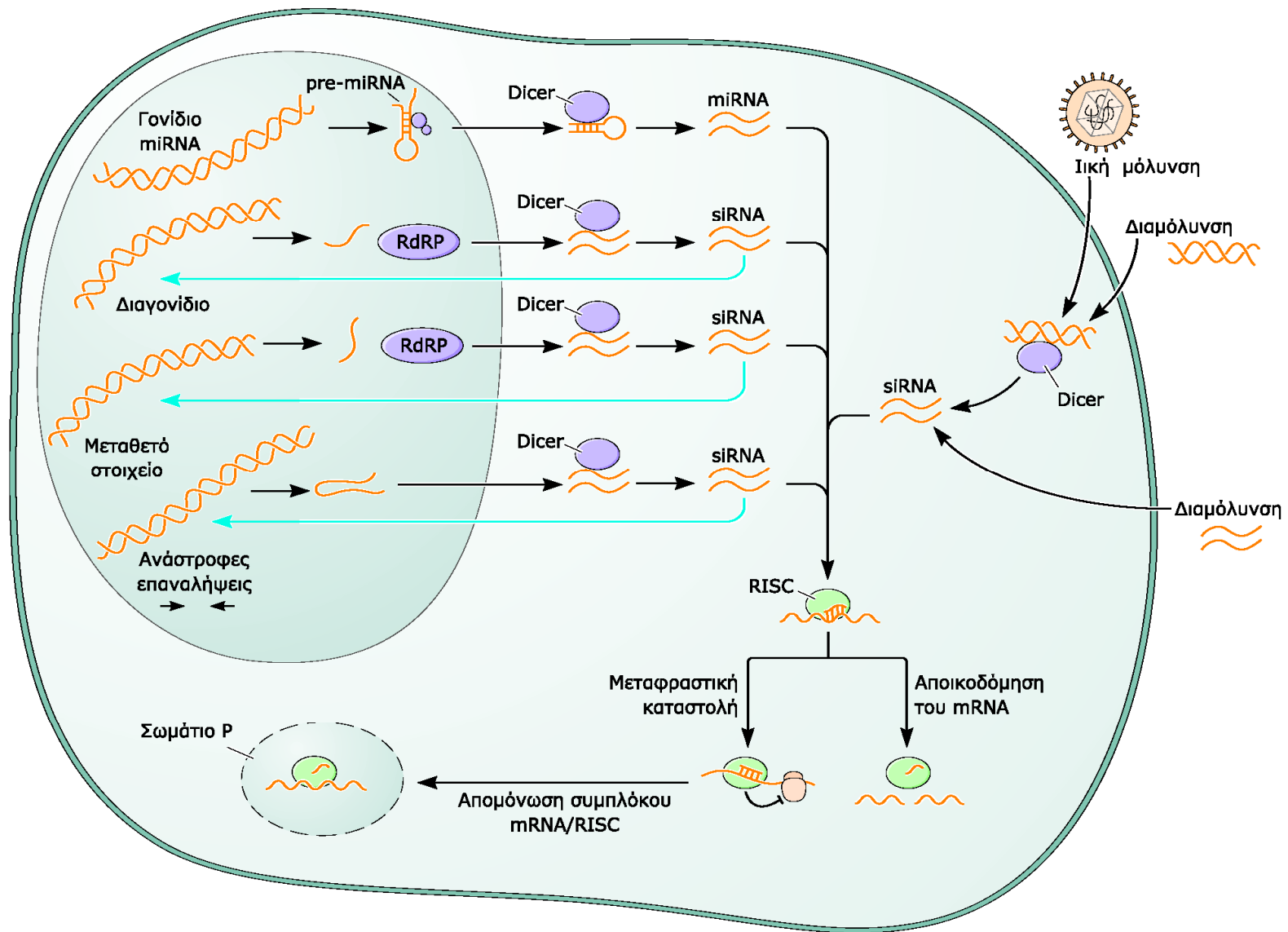
ΕΙΚΟΝΑ 9.9: Το miRNA *lin-4* διαθέτει επτά πιθανές θέσεις πρόσδεσης, στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *lin-14* που αποτελεί το στόχο του.

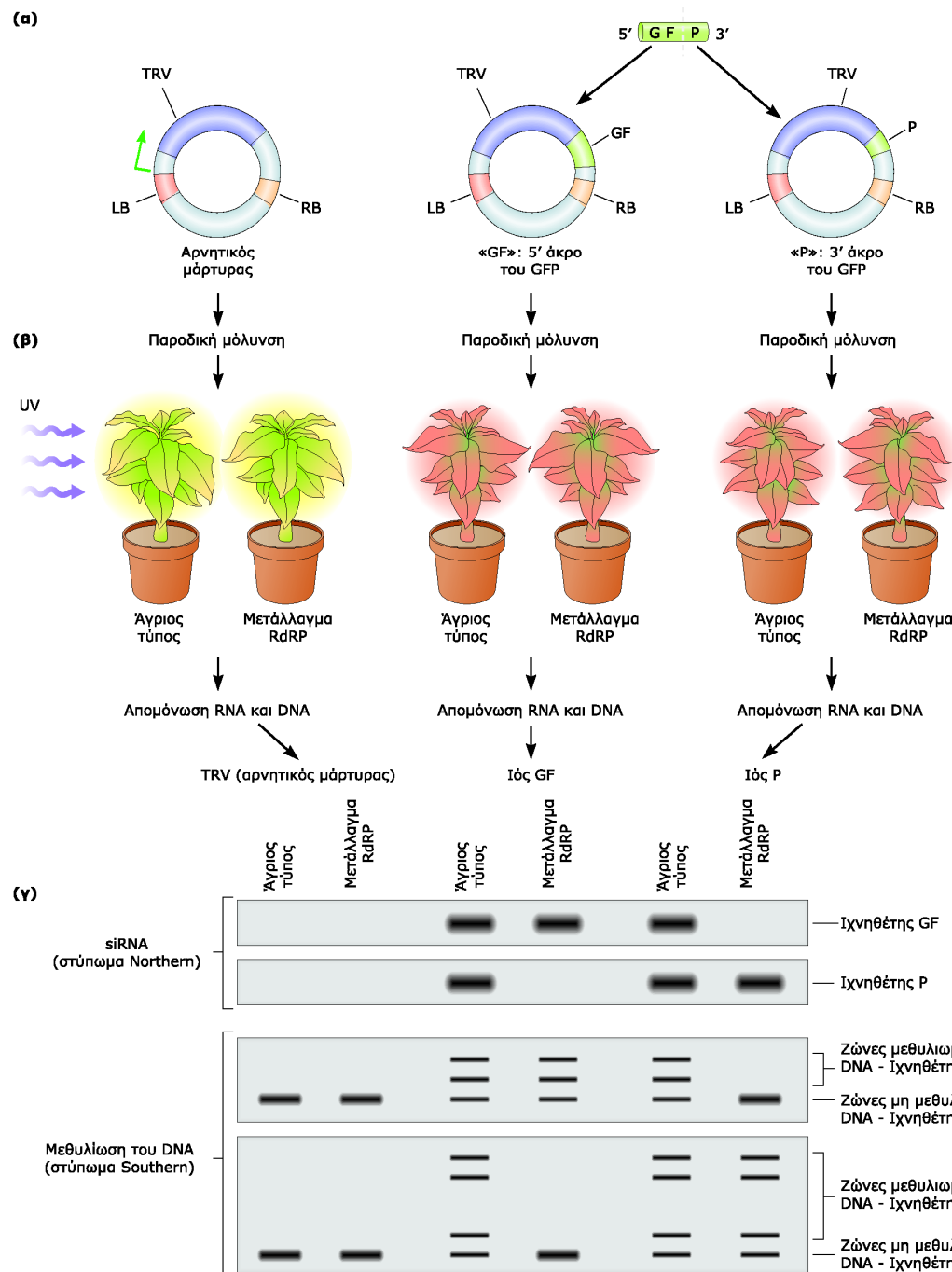
Τα μεταλλάγματα *Lin14* αναπτύσσονται πρόωρα ενώ τα μεταλλάγματα *Lin4* αναπτύσσονται αργά. Τα *Lin4* και *14* αλληλοεπιδρούν γενετικά. Ο φαινότυπος που προέρχεται από μεταλλαγές του ενός αναιρεί το φαινότυπο που προέρχεται από μεταλλαγές του άλλου.



ΕΙΚΟΝΑ 9.10: Το ατελές ζευγάρωμα siRNA-mRNA προκαλεί καταστολή της μετάφρασης, παρόλο που το mRNA **δεν** αποικοδομείται.

ΕΙΚΟΝΑ 9.11: Επισκόπηση του RNAi.



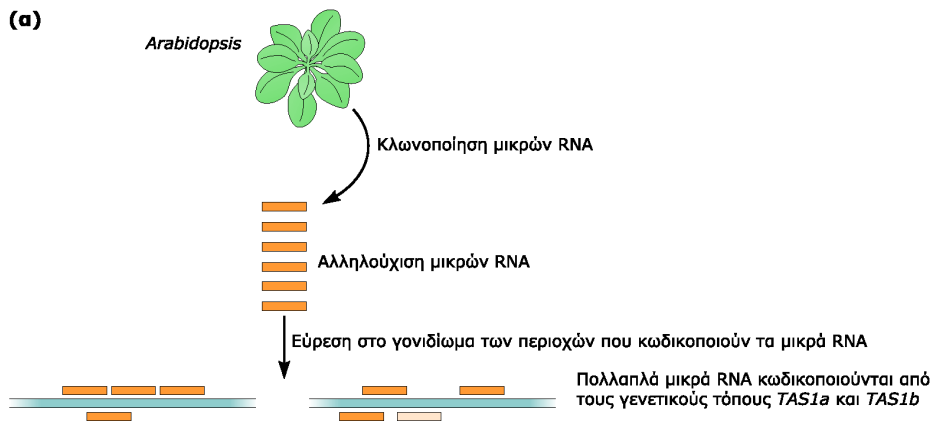


ΕΙΚΟΝΑ 9.12: Η αποσιώπηση εξαπλώνεται από μία θέση-στόχο του dsRNA σε γειτονικές αλληλουχίες μέσω της δράσης της RdRP.

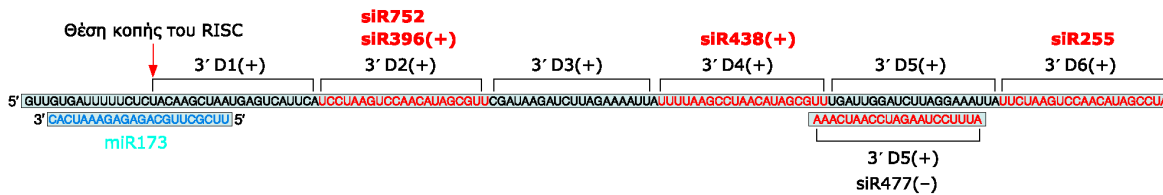
Η RdRP χρησιμοποιεί τα πρωτογενή siRNA που παράγονται από το dsRNA ως εκκινητές και με μήτρα το σημαίνουν RNA συνθέτει νέα dsRNAs τα οποία περιλαμβάνουν και γειτονικές αλληλουχίες του αρχικού στόχου.

TRV: Tobacco rattle virus

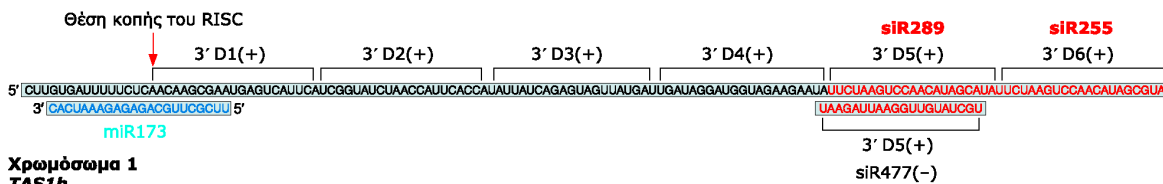
(a)



(β) Χρωμόσωμα 2
TAS1a

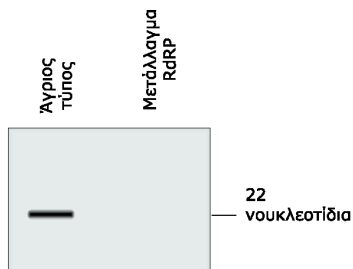


Αναμενόμενο πρότυπο
διαδοχικών κοπών από την Dicer



Χρωμόσωμα 1
TAS1b

(Υ) Στύψωμα τύπου Northern με ιχνηθέτη συμπληρωματικό ως προς το siR255

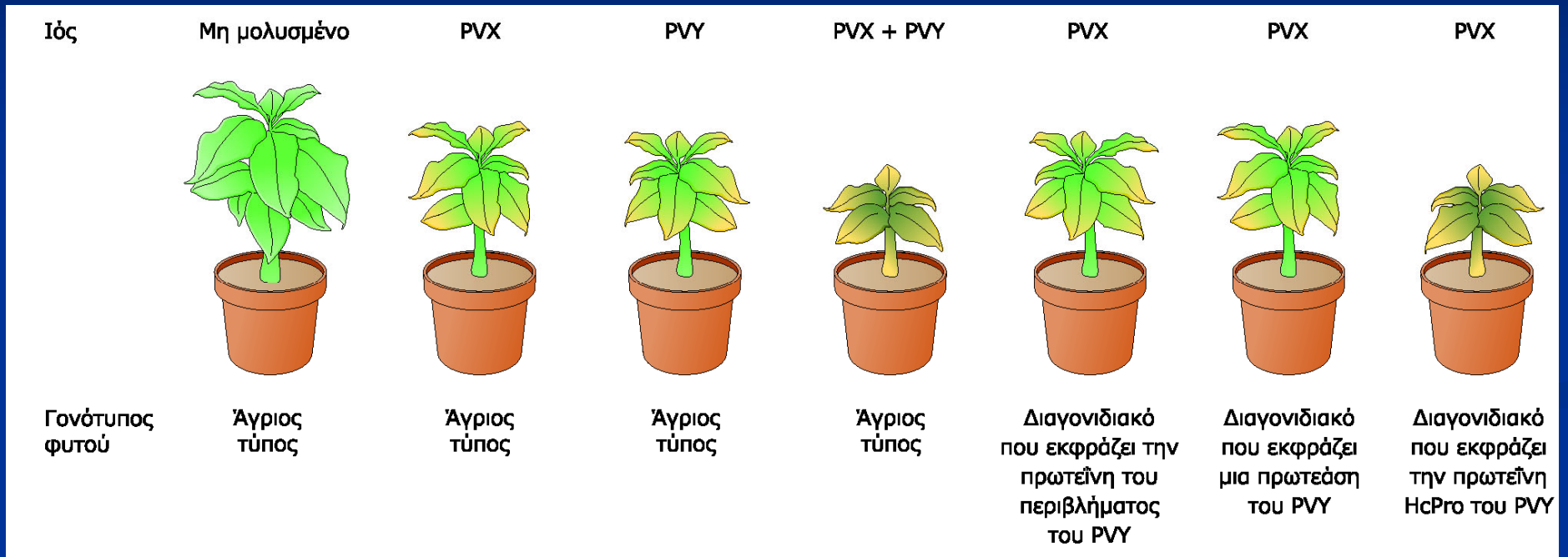


ΕΙΚΟΝΑ 9.13: Μπορούν να παραχθούν siRNA που δρουν *in trans* μέσω κοπής η οποία κατευθύνεται από ένα miRNA.

ΕΙΚΟΝΑ 9.14: Τα σήματα γονιδιακής αποσιώπησης εξαπλώνονται διασυστημικά στα φυτά. Αφορά την άμυνα του ιού απέναντι στους ιούς.



ΕΙΚΟΝΑ 9.15: Οι ιοί έχουν αναπτύξει στρατηγικές αντιμετώπισης των αντιικών μηχανισμών άμυνας των φυτών.



Ο HcPro επηρεάζει είτε την ενεργότητα της Dicer είτε την σταθερότητα των siRNAs.

Επίσης: Τα φυτά χρησιμοποιούν το RNAi για να ελέγξουν τη δράση των μεταθετών στοιχείων. Δεν γνωρίζουμε αν αυτό ισχύει στα θηλαστικά.

ΕΙΚΟΝΑ 9.16: Τα φυτά χρησιμοποιούν το RNAi για να ελέγξουν τη δράση των μεταθετών στοιχείων.

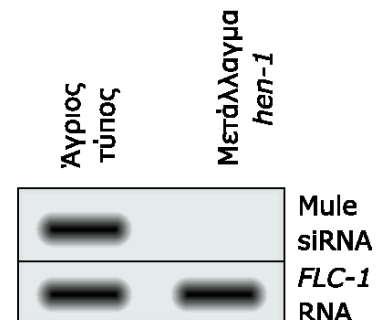
(α) Αλληλόμορφο όψιμης ανθοφορίας



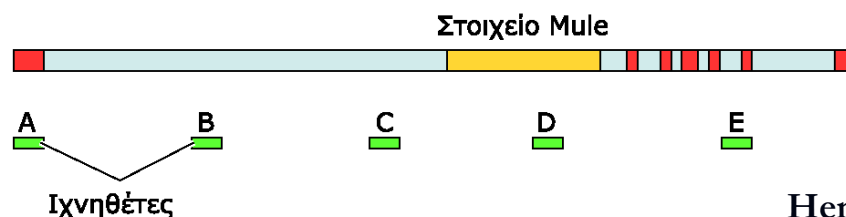
Μέρες μέχρι την ανθοφορία

Άγριος τύπος	Μετάλλαγμα <i>hen-1</i>
30	33

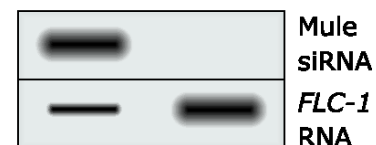
Στύπωμα Northern



(β) Αλληλόμορφο πρώιμης ανθοφορίας



20	35
----	----



Hen1: μεθυλοτρανσφεράση που μεθυλιώνει τα μικρά RNA → απαραίτητη για τη συσσώρευση των miRNA και siRNA.

(γ) Ανάλυση ChIP για τον εντοπισμό της μεθυλιωμένης μορφής της ιστόνης H3

Αλληλόμορφο πρώιμης ανθοφορίας
Φυτά άγριου τύπου

Αλληλόμορφο πρώιμης ανθοφορίας
Μετάλλαγμα *hen-1*

