

Ingeniería Genética II

Unidad VIII (parte 1)

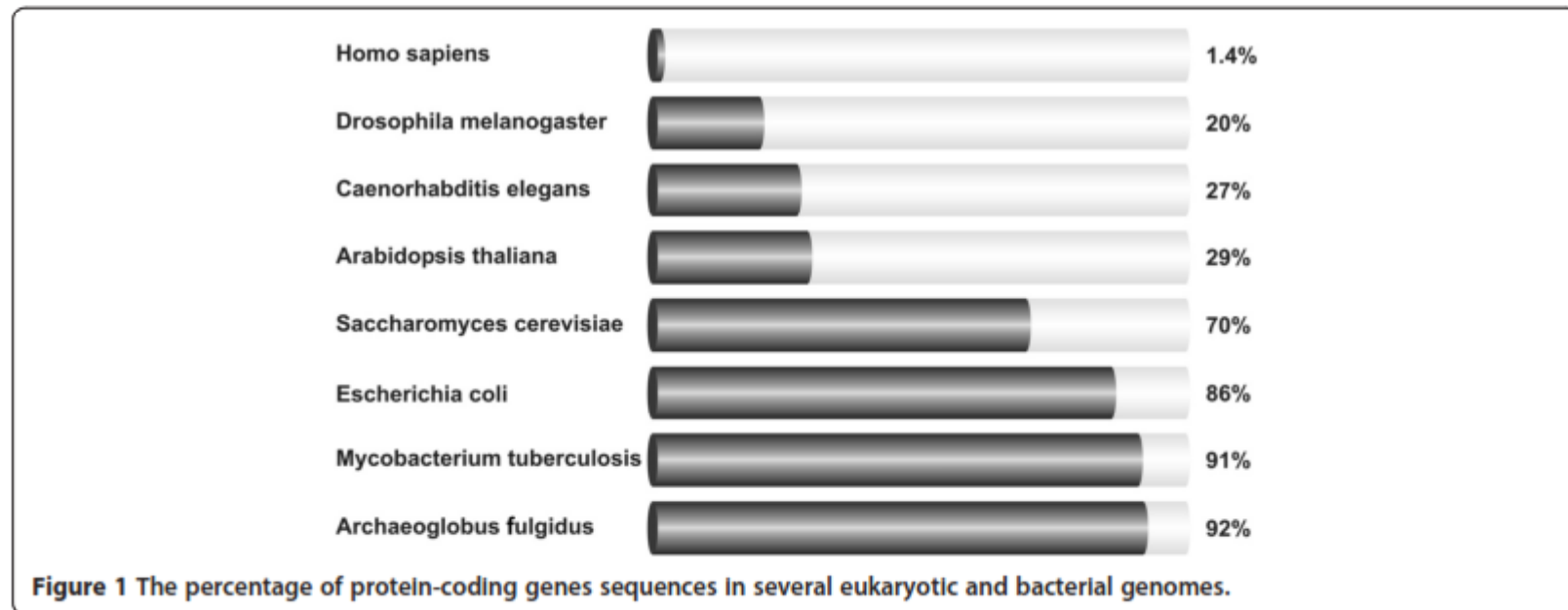
RNAs no codificantes

RNAs no codificantes

- En una **célula** existen **numerosos tipos** de **RNAs** que se sintetizan por RNA polimerasas a partir del gDNA.
- Estos RNAs los conocemos con el nombre de **transcriptos**, dado que surgen mediante el mecanismo conocido como transcripción.
- Los transcriptos pueden ser **clasificados** en dos grandes grupos: los **codificantes** para polipéptidos (mRNAs) y los **no codificantes** (ncRNAs).
- Los **ncRNAs** presentan **diversas funciones** en la célula, y los mayormente descritos desde hace años son los rRNA (ribosomales), tRNA (transferencia), snRNA (*small nuclear*, implicados en *splicing*) y snoRNA (*small nucleolar*, implicados en modificación de rRNAs).
- Sin embargo, la observación de RNAs celulares ha revelado en los últimos años que existen muchas más variantes de ncRNAs.

RNAs no codificantes

Fracción de gDNA codificante para polipéptidos.



- A pesar que menos del **2%** del **gDNA humano** es **codificante para proteínas**, se ha visto que alrededor del **90%** es **activamente transcrito**, lo cual muestra la importancia del transcriptoma no codificante.

RNAs no codificantes

- La enorme **diversidad** de **ncRNAs** derivó en su **clasificación** en **dos grandes grupos**:

sncRNAs (*small non-coding RNAs*)

Hasta 200 b

lncRNAs (*long non-coding RNAs*)

200 b a ~100 kb

- En los últimos años, se han **asociado** muchas **patologías humanas** a **alteraciones** en el patrón de transcripción de estos **ncRNAs**.

RNAs no codificantes

Table 1 Types of recently discovered human non-coding RNAs

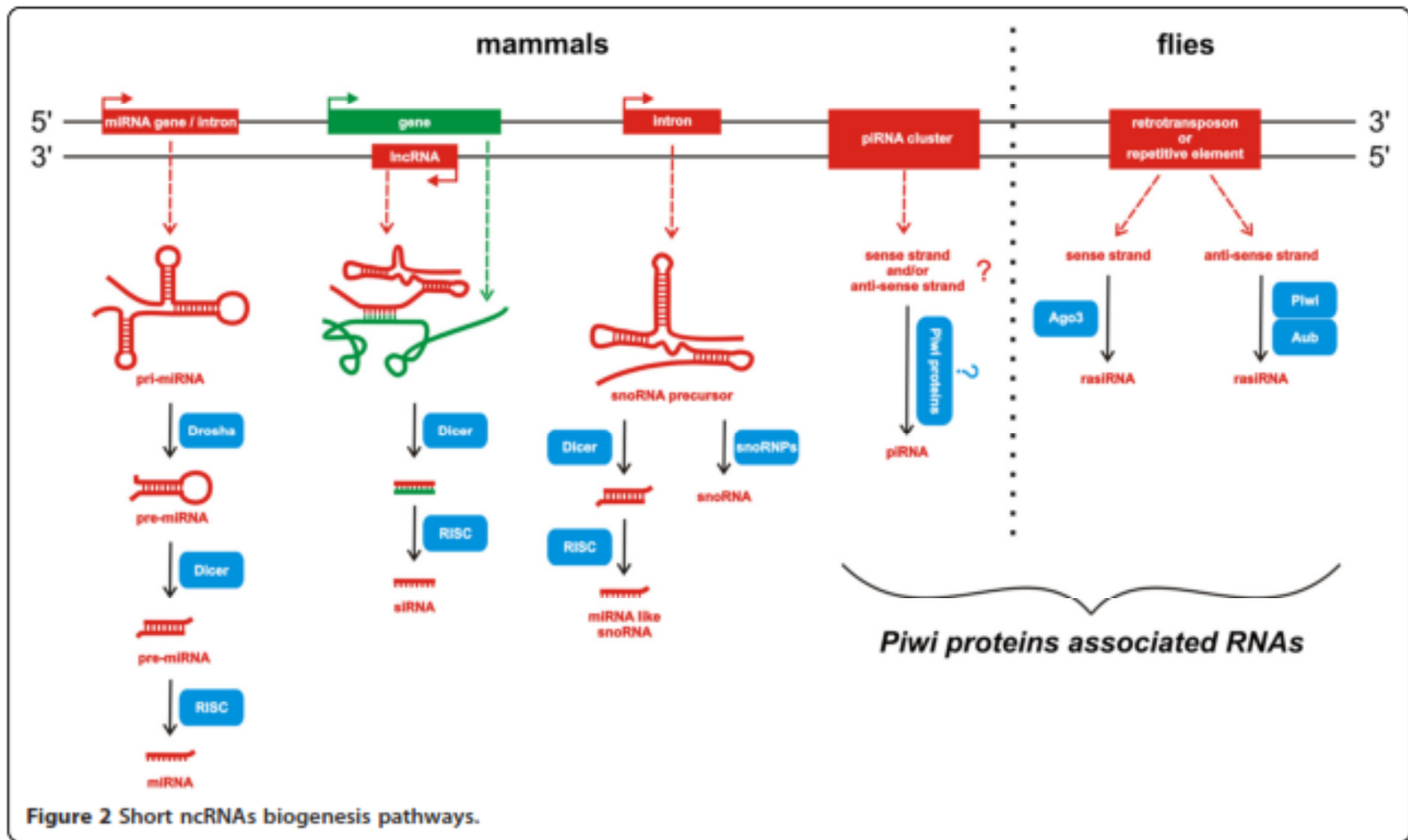
	Class	Symbol	Characteristic	Disease / biological function associations
Small non-coding RNAs	MicroRNAs	miRNAs	18–25 nt; account 1–2% of the human genome; control the 50% of protein-coding genes; guide suppression of translation; Drosha and Dicer dependent small ncRNAs	initiation of various disorders including many, if not all, cancers / regulation of proliferation, differentiation, and apoptosis involved in human development
	Small interfering RNAs	siRNAs	19–23 nt; made by Dicer processing; guide sequence specific degradation of target mRNA	great potential in diseases treatment / posttranscriptional gene silencing mainly through RISC degradation mechanism; defence against pathogenic nucleic acids
	Piwi-interacting RNAs	piRNAs	26–30 nt; bind Piwi proteins; Dicer independent; exist in genome clusters; principally restricted to the germline and somatic cells bordering the germline	relationship between piRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in germ cell development, stem self-renewal, and retrotransposon silencing
	Small nucleolar RNAs	snoRNAs	60–300 nt; enriched in the nucleolus; in vertebrate are excised from pre-mRNA introns; bind snoRNP proteins	association with development of some cancers / important function in the maturation of other non-coding RNAs, above all, rRNAs and snRNAs; miRNA-like snoRNAs regulate mRNAs
	Promoter-associated small RNAs	PASRs	20–200 nt; modified 5' (capped) ends; coincide with the transcriptional start sites of protein- and non-coding genes; made from transcription of short capped transcripts	relationship with diseases has not yet been discovered / involved in the regulation of the transcription of protein-coding genes by targeting epigenetic silencing complexes
	Transcription initiation RNAs	tiRNAs	~ 18 nt ; have the highest density just downstream of transcriptional start sites; show patterns of positional conservation; preferentially located in GC-rich promoters	
	Centromere repeat associated small interacting RNAs	crasiRNAs	34–42 nt; processed from long dsRNAs	relationship between crasiRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in the recruitment of heterochromatin and/or centromeric proteins
	Telomere-specific small RNAs	tel-sRNAs	~ 24 nt; Dicer independent; 2'-O-methylated at the 3' terminus; evolutionarily conserved from protozoa to mammals; have not been described in human up to now	relationship between tel-sRNAs and diseases has not yet been discovered / epigenetic regulation
	Pyknons		subset of patterns of variable length; form mosaics in untranslated and protein-coding regions; more frequently in 3' UTR	expected association with cancer biology / possible link with posttranscriptional silencing of genes, mainly involved in cell communication, regulation of transcription, signaling, transport, etc.

RNAs no codificantes

Table 1 Types of recently discovered human non-coding RNAs

	Class	Symbol	Characteristic	Disease / biological function associations
Long non-coding RNAs	Long intergenic non-coding RNAs	lincRNAs	ranging from several hundreds to tens of thousands nts; lie within the genomic intervals between two genes; transcriptional cis-regulation of neighbouring genes	involved in tumorigenesis and cancer metastasis / involved in diverse biological processes such as dosage compensation and/or imprinting
	Long intronic non-coding RNAs		lie within the introns; evolutionary conserved; tissue and subcellular expression specified	aberrantly expressed in human cancers / possible link with posttranscriptional gene silencing
	Telomere-associated ncRNAs	TERRAs	100 bp - >9 kb; conserved among eukaryotes; synthesized from C-rich strand; polyadenylated; form inter-molecular G-quadruplex structure with single-stranded telomeric DNA	possible impact on telomere-associated diseases including many cancers / negative regulation of telomere length and activity through inhibition of telomerase
	Long non-coding RNAs with dual functions		both protein-coding and functionally regulatory RNA capacity	deregulation has been described in breast and ovarian tumors / modulate gene expression through diverse mechanisms
	Pseudogene RNAs		gene copies that have lost the ability to code for a protein; potential to regulate their protein-coding cousin; made through retrotrans-position; tissue specific	often deregulated during tumorigenesis and cancer progression / regulation of tumor suppressors and oncogenes by acting as microRNA decoys
	Transcribed-ultraconserved regions	T-UCRs	longer than 200 bp; absolutely conserved between orthologous regions of human, rat, and mouse; located in both intra- and intergenic regions	expression is often altered in some cancers; possible involvement in tumorigenesis / antisense inhibitors for protein-coding genes or other ncRNAs

RNAs no codificantes



RNAs no codificantes

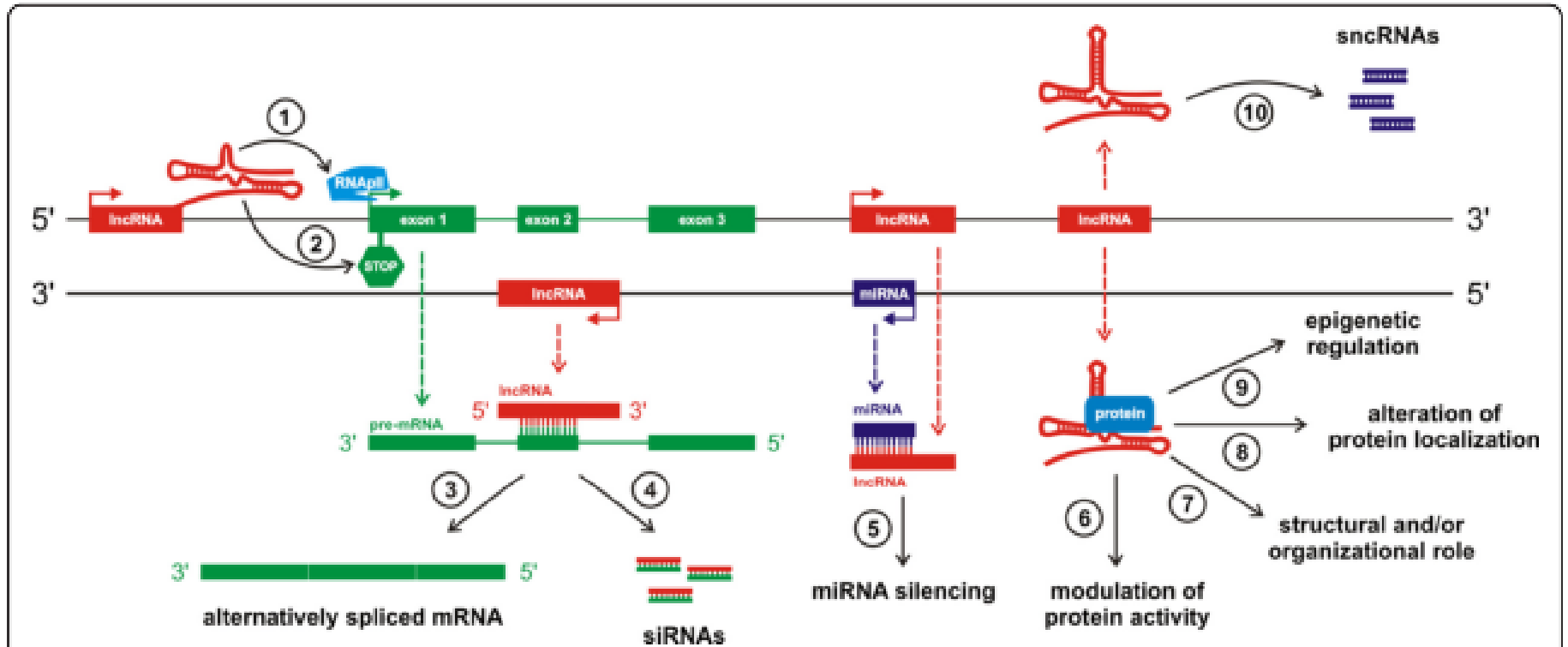
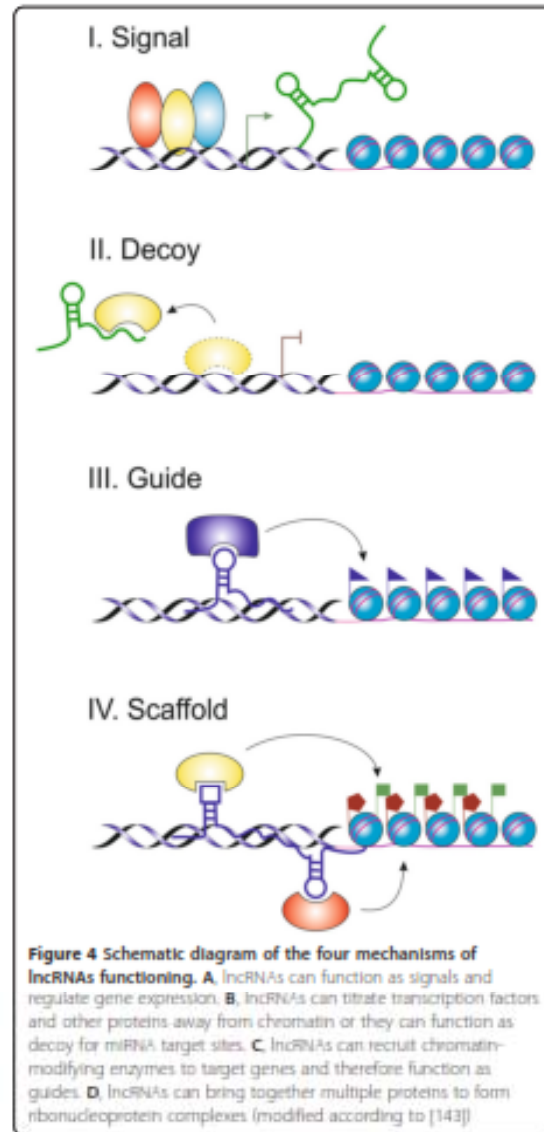


Figure 3 Schematic illustration of lncRNAs functioning. LncRNA transcribed from an upstream non-coding promoter can negatively (1) or positively (2) affect expression of the downstream gene by inhibiting RNA polymerase II recruitment and/or inducing chromatin remodeling, respectively. LncRNA is able to hybridize to the pre-mRNA and block recognition of the splice sites by the spliceosome, thus resulting in an alternatively spliced transcript (3). Alternatively, hybridization of the sense and antisense transcripts can allow Dicer to generate endogenous siRNAs (4). The binding of lncRNA to the miRNA results in the miRNA function silencing (5). The complex of lncRNA and specific protein partners can modulate the activity of the protein (6), is involved in structural and organization roles of the cell (7), alters the protein localizes in the cell (8), and affects epigenetic processes (9). Finally, long ncRNAs can be processed to the small RNAs (10)

RNAs no codificantes

Función de los lncRNA



**¿Cuál es uno de los sncRNA
más estudiados y aplicados
en Biología?**

RNAs no codificantes

Dentro de los **sncRNA**, uno de las **variantes más estudiadas y aplicadas** en Ingeniería Genética es la conformada por el grupo de transcritos conocido bajo el nombre de **RNA de interferencia** (siRNA, de *small o short interfering RNA*).

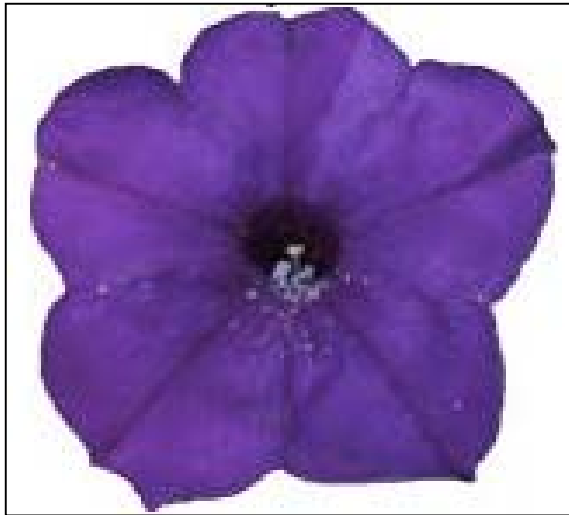


Su **rol biológico** es participar en un **mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional** activado por la presencia de **dsRNA** (RNA doble cadena).

- Los **otros sncRNA** que cumplen **roles similares** son los **miRNAs** (microRNAs) y los **piRNAs** (PIWI-interacting RNAs).
- Los **siRNAs, miRNAs y piRNAs** poseen entre **20-30 nt**.

RNAs no codificantes

- ✓ Las **primeras evidencias** de la existencia de los **siRNA** datan de los **años 80** del siglo pasado, cuando un grupo de científicos liderados por el biólogo molecular Rich Jorgensen trabajaban en la obtención de petunias más coloridas.



—————→
Sobreexpresión
del gen que
codifica para
chalcona sintasa
(fenómeno de co-
supresión).

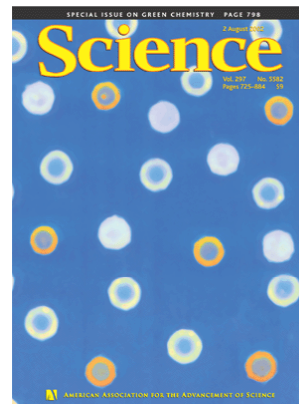


RNAs no codificantes

- ✓ **Resultados similares** al fenómeno de **co-supresión en plantas**, se observaron en **1992** al insertarse en **el hongo *Neurospora crassa*** copias adicionales del gen *al-1* (esencial en la biosíntesis de carotenoides) con la intención de producir colonias con un color naranja más intenso. Un tercio de las colonias quedaron blancas.



El fenómeno observado fue denominado “Quelling” (represión – Romano y Macino, 1992).



RNAs no codificantes

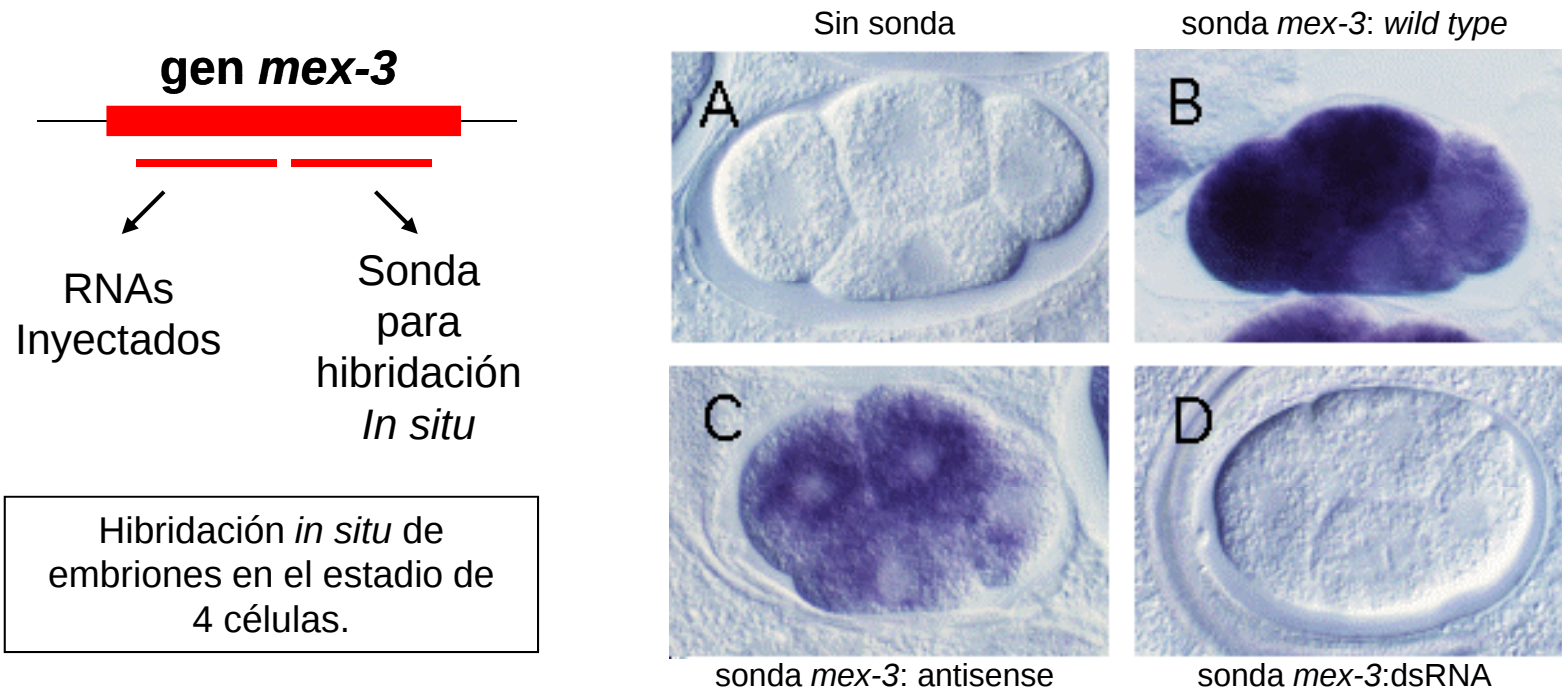
- ✓ En **1995** Sue Guo y colaboradores presentaron un trabajo en el cual utilizaban la técnica de **RNA antisentido** para silenciar el gen *par-1* de ***Caenorhabditis elegans***. En sus experimentos observaron que tanto el RNA antisentido como el RNA sentido (control) llevaban al silenciamiento del gen en estudio (Guo y Kemphues, 1995).



Fire y colaboradores creyeron en la hipótesis del dsRNA: imaginaron que los experimentos de Guo eran paradójales exactamente debido a una contaminación de las moléculas de RNA sentido con RNA antisentido, generando dsRNA que llevaban al silenciamiento génico.

RNAs no codificantes

- ✓ En **1998** Andy Fire y Craig Mello mostraron que las inyecciones de **dsRNA** eran **más efectivas** que la **ssRNA** en la generación de los fenotipos mutantes.



Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.

ANDREW FIRE, SIQUN XU, MARY K. MONTGOMERY, STEVEN A. KOSTAS, SAMUEL E. DRIVER & CRAIG C. MELLO. Nature 1998; 391: 806-11

RNAs no codificantes

*Premio **Nobel** en **Fisiología** (12 de octubre de 2006)*



Andrew Z. Fire

*Stanford University School
of Medicine
Stanford, CA, USA*



Craig C. Mello

*University of Massachusetts
Medical School Worcester,
MA, USA*

RNAs no codificantes

- ✓ El **iRNA** es **activado** por la presencia de **dsRNA**.
- ✓ Como otros sncRNA (miRNA y piRNA) se **asocian** a **complejos proteicos** que contienen **actividad nucleasa**.
- ✓ Estos sncRNAs son **complementarios** a **mRNA targets**, lo que impide la traducción de los mismos.

Alguna de sus funciones naturales son:

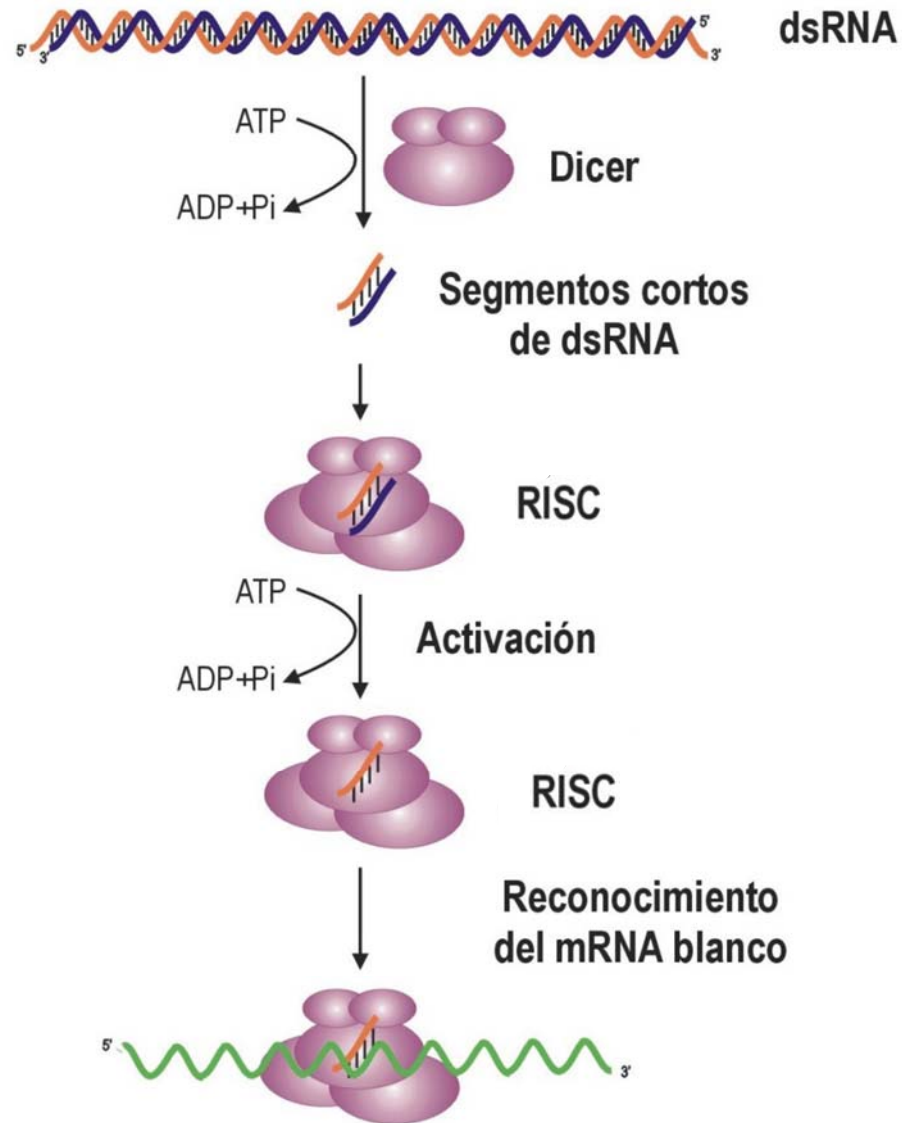
- - *Timing* del desarrollo.
- - Diferenciación celular.
- - Proliferación celular.
- - Muerte celular.
- - Control del metabolismo.
- - Disminución de la actividad de transposones.
- - Defensa antiviral.

RNAs no codificantes

Mecanismo de los siRNA

- En la **célula**, la presencia de **dsRNA** (genomas virales o sus intermediarios, transposones, transcritos muy estructurados) **activa** una **maquinaria ribonucleasa**.
- Así, la endonucleasa **Dicer** hidroliza el **dsRNA** a intervalos de **21-25 nucleótidos**.
- Luego, estos pequeños **fragmentos** de **dsRNA** son **capturados** por la proteína **Argonauta** (AGO), la cual **retiene** una de las dos cadenas (**hebra guía**) en el centro de un **complejo denominado RISC** (*RNA-induced silencing complex*) conformado por **Dicer**, **Argonauta** y una **dsRNA binding protein** (TRBP en humanos). La otra cadena (hebra no guía) es eyectada del complejo.
- Posteriormente, **RISC** usa la hebra guía para **encontrar** un **ssRNA** perfectamente **complementario** y **cataliza** el **corte** del blanco.
- El **RNA blanco** es **liberado** y el complejo **RISC** es **reciclado** en otro corte.

RNAs no codificantes



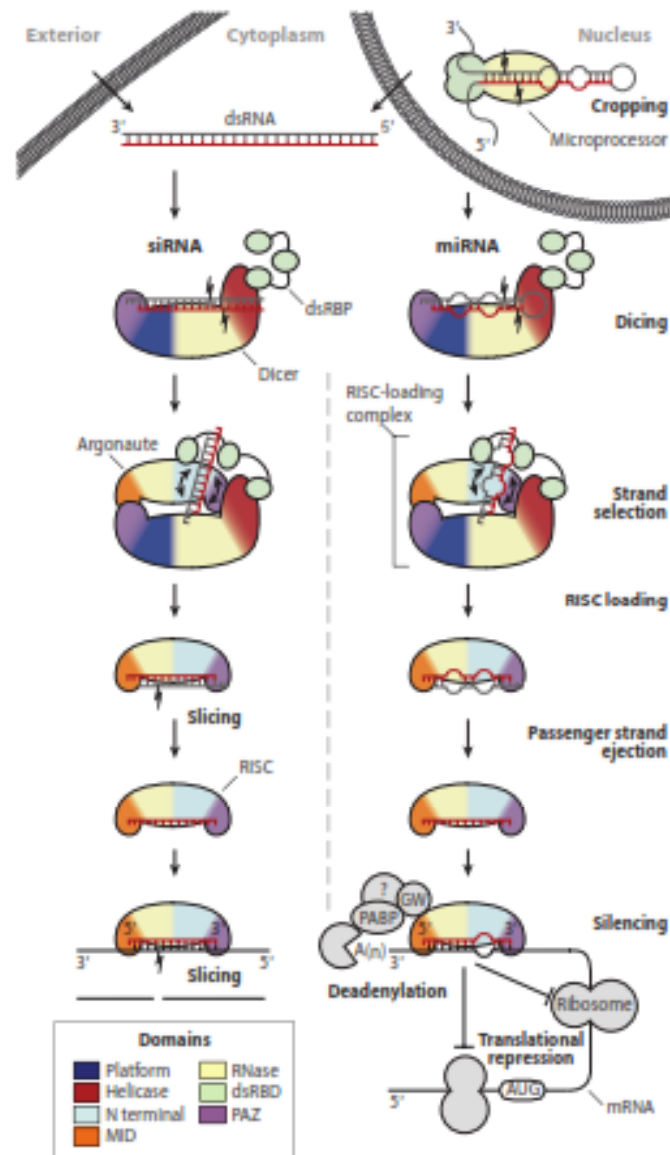
RNAs no codificantes

Mecanismo de los miRNA

- Los **miRNA**, a diferencia de los siRNA, son **codificados** por el **gDNA**.
- Son **transcriptos** a partir de genes como **pri-miRNAs** de **65-70 nt** conteniendo una **estructura** de **loop**.
- El **pri-miRNA** es **llevado** al **citoplasma** y **procesado** por el **complejo *Drosha-DGCR8*** para **generar** un **pre-miRNA**.
- Luego, ***Dicer* cliva** el pre-miRNA produciendo un **miRNA dúplex**.
- Así, ***Argonauta* toma** la **hebra guía** y **busca** complementariedad con el **mRNA** (usualmente en el **extremo 3'**)
- Dado que la **complementariedad** suele ser **imperfecta**, no se produce una actividad de corte. Aún no está bien descrito el mecanismo, pero se cree que el mRNA se despoliadenila y eso lo marca para su degradación.

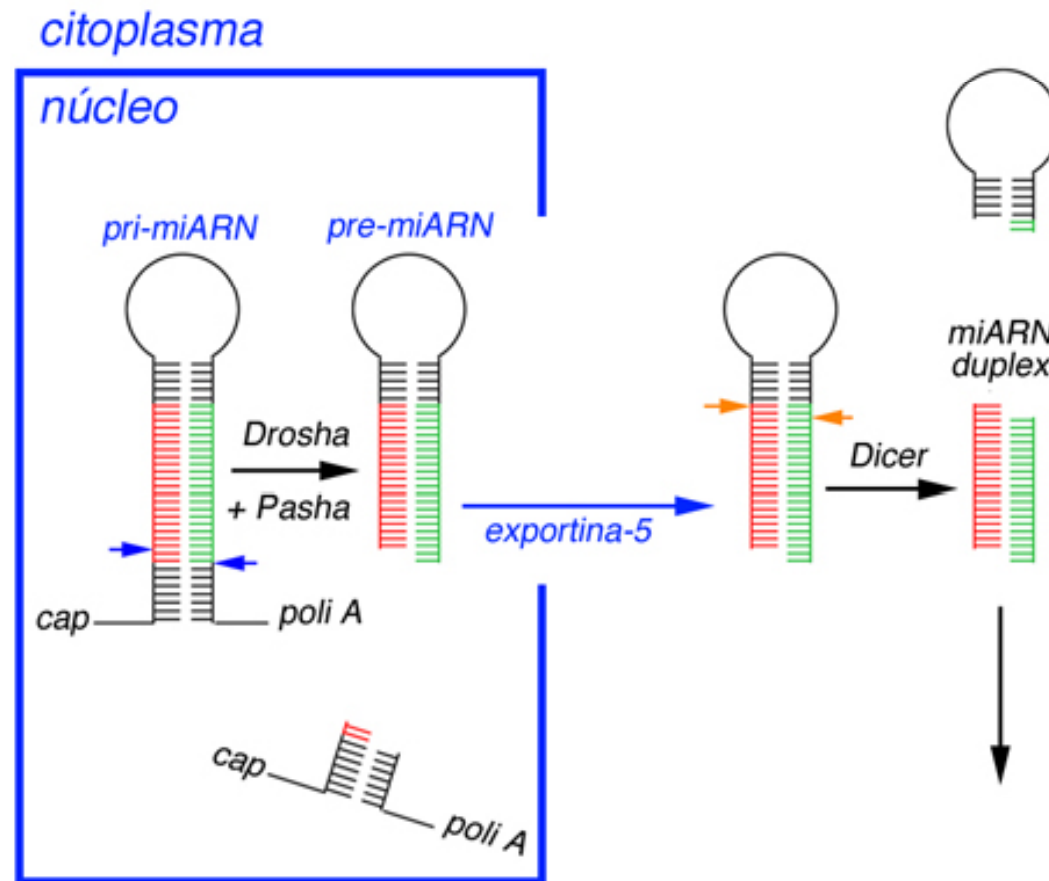
RNAs no codificantes

Mecanismo de los siRNA y miRNA



RNAs no codificantes

Mecanismo de los miRNA



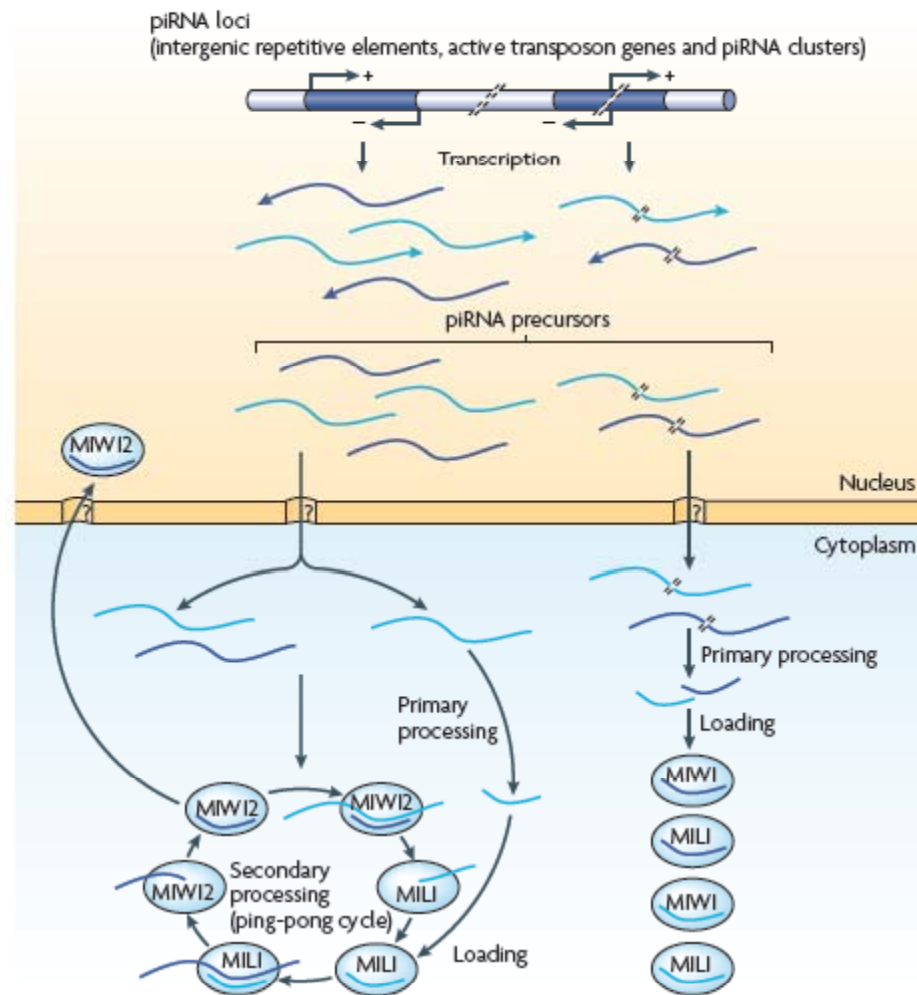
RNAs no codificantes

Mecanismo de los piRNA

- La **biogénesis** de los **piRNA** (24-31 nt) aún **no** ha sido completamente **dilucidada**.
- Se sabe que están **involucrados** en el **silenciamiento** de los **transposones** en las líneas germinales de los animales.
- Los **precursores** de los piRNA son **ssRNAs** y **no** participa **Dicer**.
- En el silenciamiento de los elementos móviles controlados por piRNAs **actúan** las proteínas **PIWI**, **Aubergina** (AUB) y **Argonauta 3** (todas perteneciente a la familia de Argonautas),

RNAs no codificantes

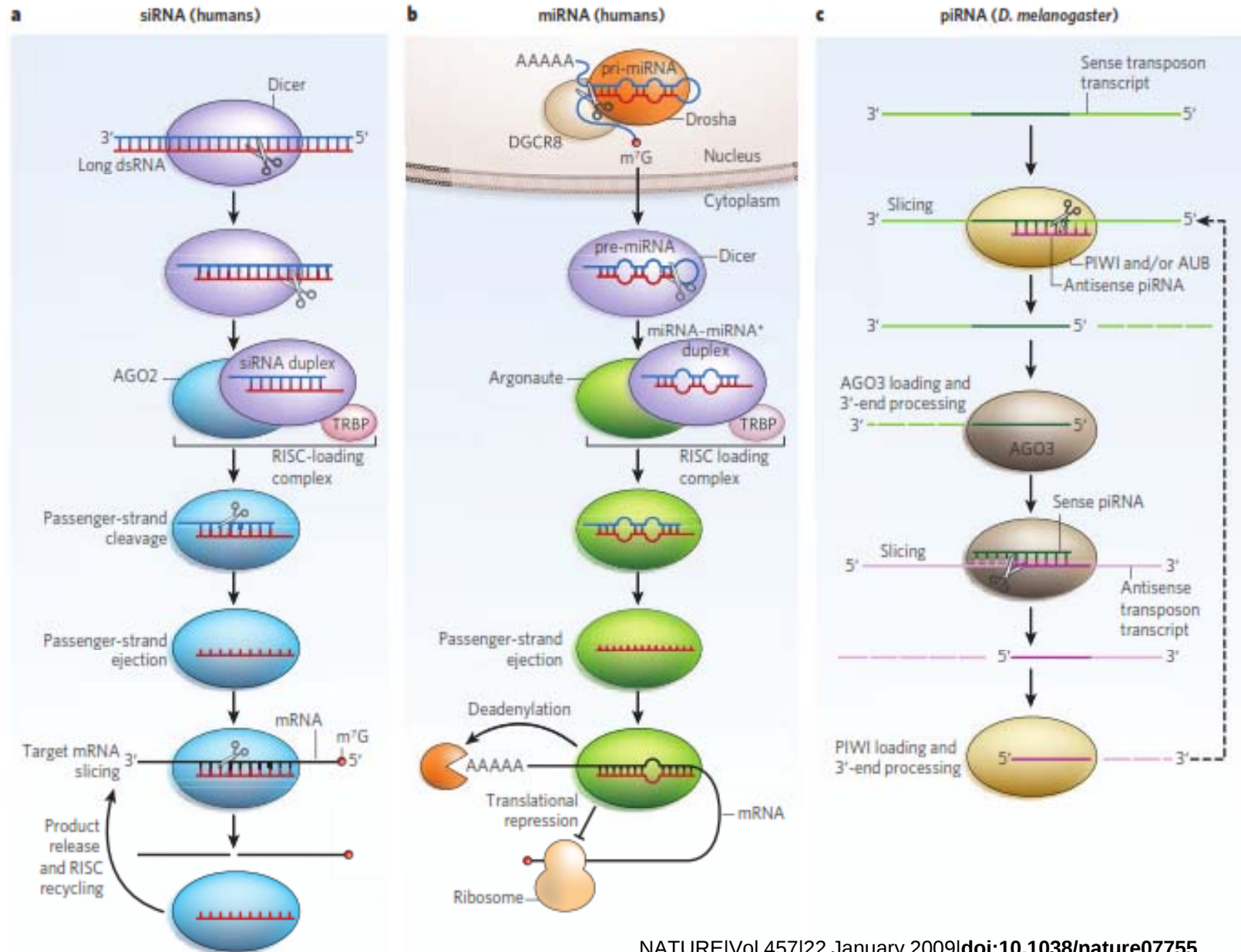
Mecanismo de los piRNA



Biogenesis of small RNAs in animals.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Nat Rev. Mol Cell Biol. 2009 Feb;10(2):126-39.

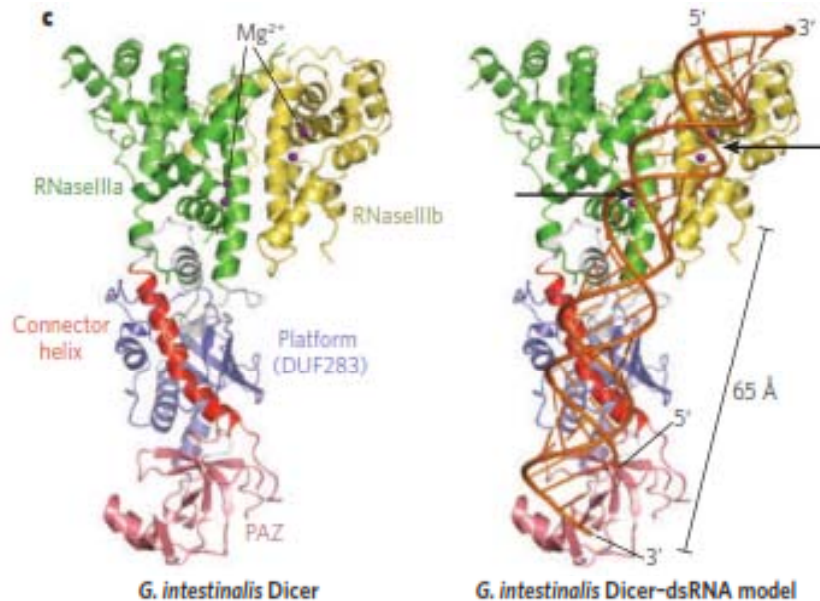
RNAs no codificantes



RNAs no codificantes

Proteínas involucradas

DICER

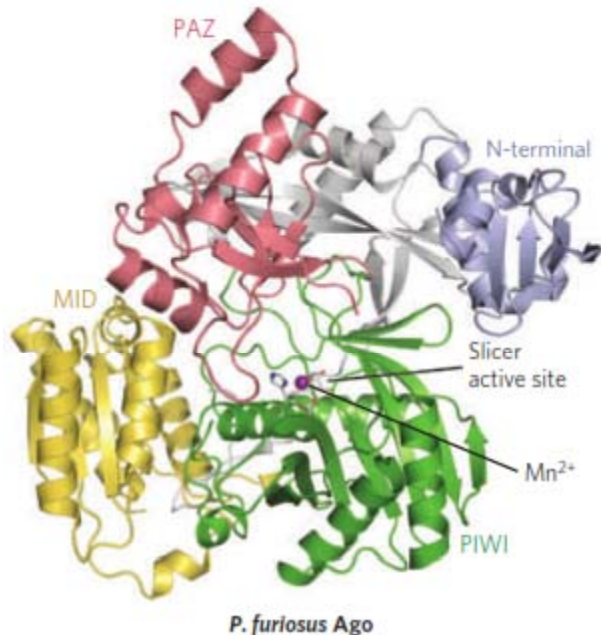


- Endonucleasa de dsRNA
- Familia: RNasa III
- Localización: citoplasma
- Sustrato: longdsRNAs y pre-miRNAs
- Productos: dsRNAs de 21-25 pb con extremos protruyentes 3' (2 nt).
- También posee dominio helicasa

RNAs no codificantes

Proteínas involucradas

AGO



- Proteína multidominio
- Dominio RNAsa H (actividad slicer)
- Localización: citoplasma
- Sustrato: híbridos siRNA/mRNA o miRNA/mRNA
- Productos: mRNA hidrolizado (si era siRNA/mRNA) a 10-11 nt del 5' del siRNA.

RNAs no codificantes

Proteínas involucradas

DROSHA

Estructura desconocida



- **Endonucleasa de dsRNA**
- **Familia:** RNAsa III
- **Localización:** Núcleo
- **Sustrato:** pri-miRNAs
- **Requerimiento:** DGCR8 (PASHA en invertebrados)
- **Productos:** dsRNAs de 21-25 pb con extremos protruyentes 3' (2 nt).

RNAs no codificantes

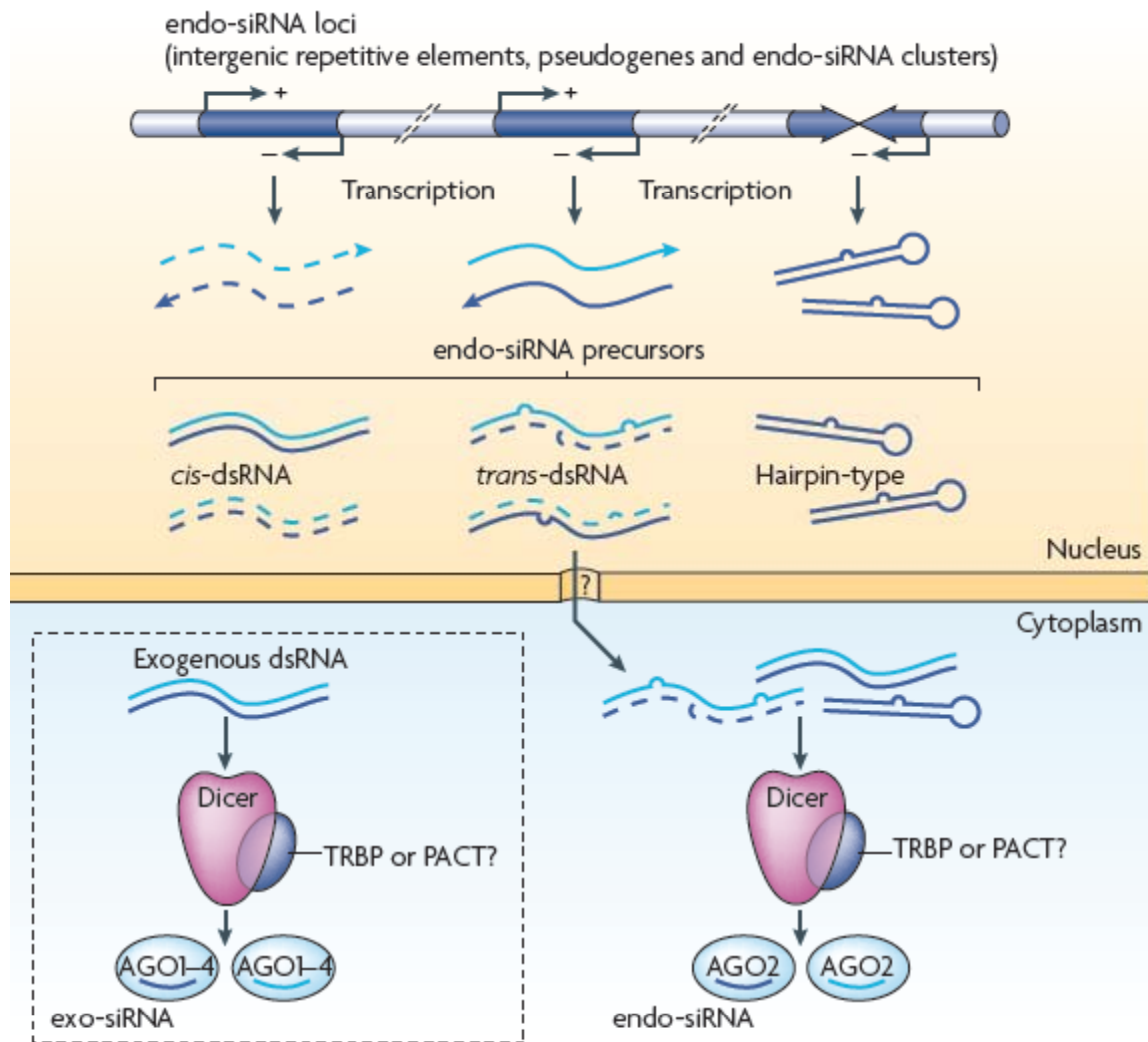
Proteínas involucradas

- Existen **otras proteínas** involucradas, variando en identidad y tipo según la especie de organismo.
- Entre ellas, actúan un grupo de **polipéptidos** denominados **dsRBD** (*dsRNA binding domain protein*).
- Estas proteínas **colaboran con *Dicer* y *Drosha*** en la **captura del dsRNA** que desencadena el mecanismo de la interferencia. .
- **Algunas** de estas proteínas son **Loqs** o **R2D2**.



RNAs no codificantes

Biogénesis de los endo-siRNA y exo-siRNA

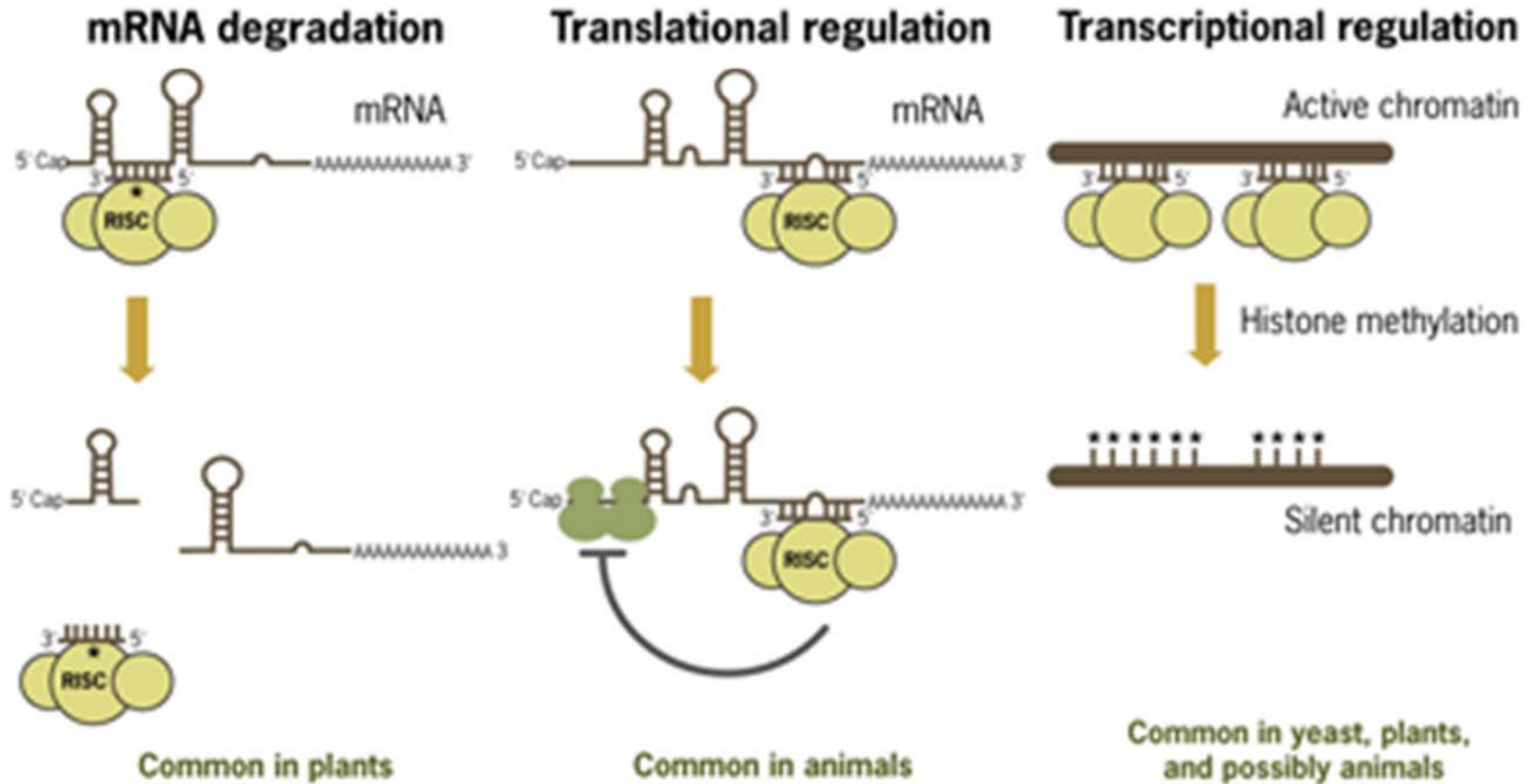


Biogenesis of small RNAs in animals.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Nat Rev. Mol Cell Biol. 2009 Feb;10(2):126-39.

RNAs no codificantes

Mecanismos de silenciamiento



**¿Cómo se puede aplicar el
conocimiento del mecanismo
de interferencia de RNA?**

RNAs no codificantes

Aplicaciones de los siRNA

- El **mecanismo natural** de **interferencia** mediado por dsRNA ha sido **explotado** desde los inicios del siglo XXI para **silenciar genes**.
- El **silenciamiento génico** o ***knockdown*** consiste en el ingreso de dsRNA en una célula para **disparar el mecanismo de interefencia**.
- Este procedimiento puede ser **transitorio** (a través del ingreso directo de dsRNA o de un transgén que lo exprese) o **estable** (en este caso es necesario modificar el gDNA).