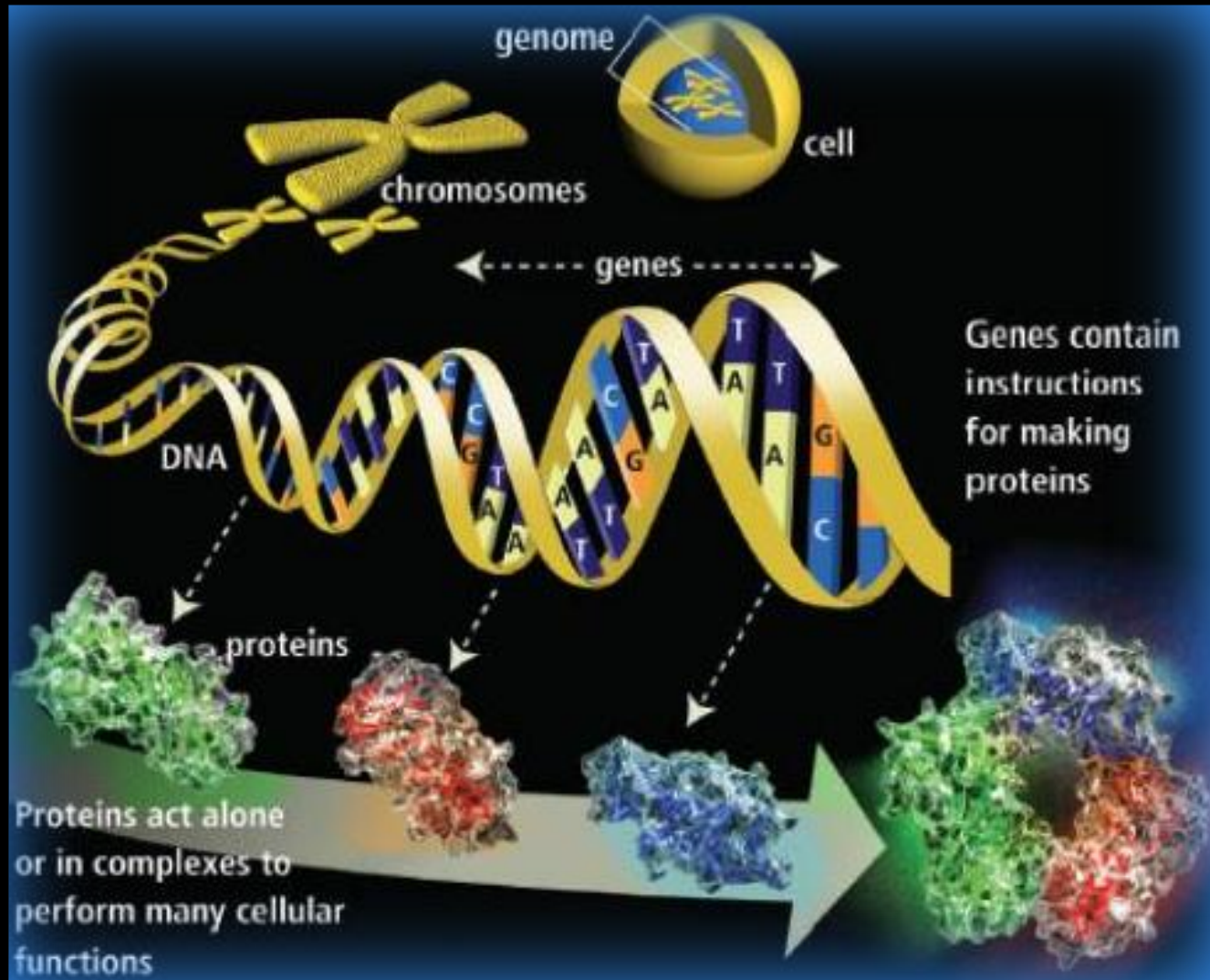
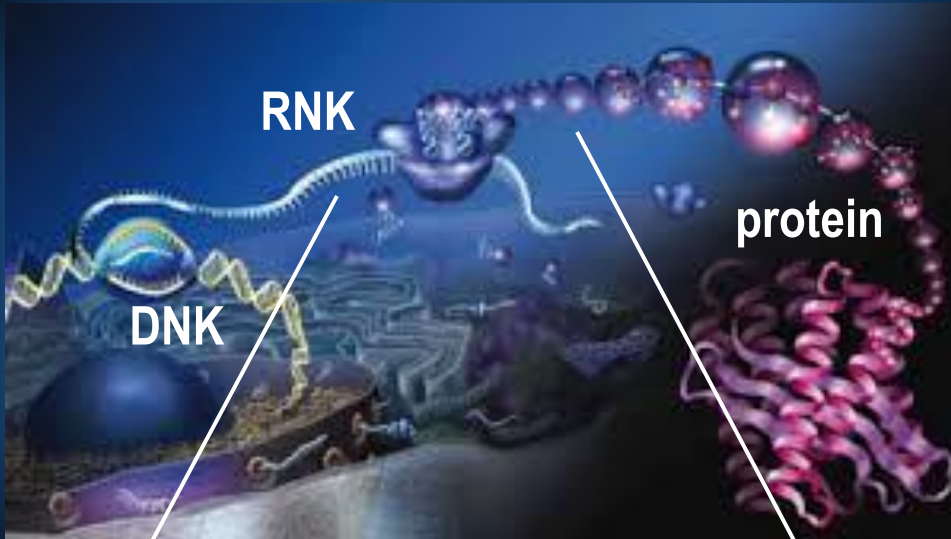


DNK – nosilac informacije, proteini – radnici



Genom čoveka – ~20 000 gena za proteine

Realizacija genetičke informacije u ćeliji



RNK – posrednici u realizaciji genetičke informacije u ćeliji (ekspresiji gena)



- ✓ **iRNK** – verni otisak gena
- ✓ **tRNK** – adaptorni i dekodirajući molekul
- ✓ **rRNK** – strukturni molekluli
- ✓ **snRNK, snoRNK**

Da li smo potcenili ulogu molekula RNK?

“Krhki” jednolančani polinukleotid

C, G, A, U



RNK obavlja najraznovrsnije funkcije u današnjim eukariotskim ćelijama

Svako otkriće nove funkcije RNK u svom periodu bilo je neočekivano otkriće

Otkriće raznovrsnosti funkcija RNK omogućava potpunije razumevanje funkcionisanja, razvića i evolucije živih bića

Molekularna biologija – lakšim putem do funkcionalnog znanja
Zavod za unapređivanje obrazovanja i vaspitanja, Beograd 2016.



RNK svet eukariotske ćelije



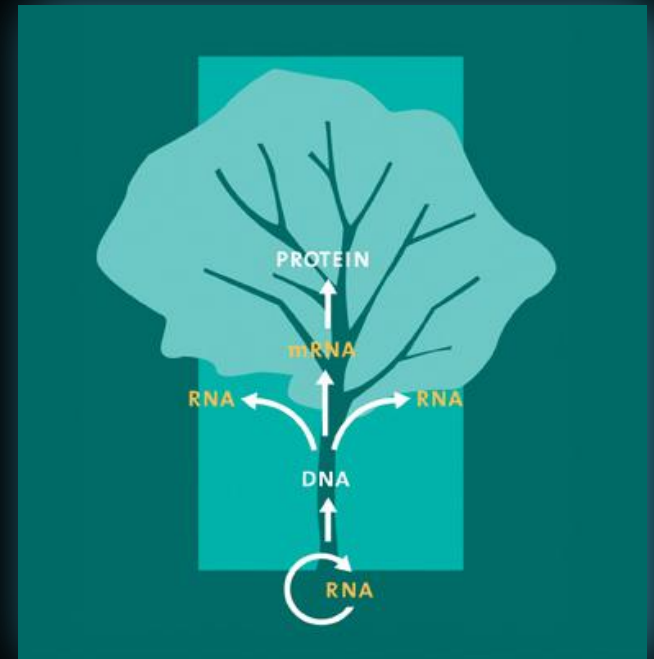
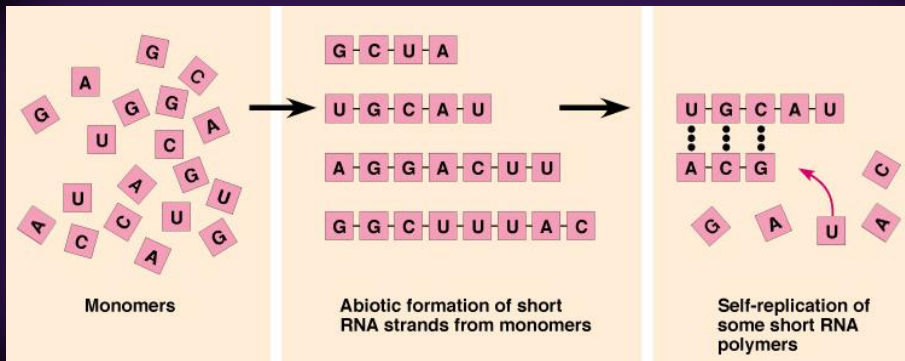
Duška Savić Pavićević

Bioški fakultet, Univerzitet u Beogradu
Centar za humanu molekularnu genetiku
duska@bio.bg.ac.rs

RNK svet – prvi život na planeti Zemlji

Hipoteza RNK sveta

Prvi “molekuli života” na planeti Zemlji – RNK – sposobnost replikacije i katalitičke funkcije

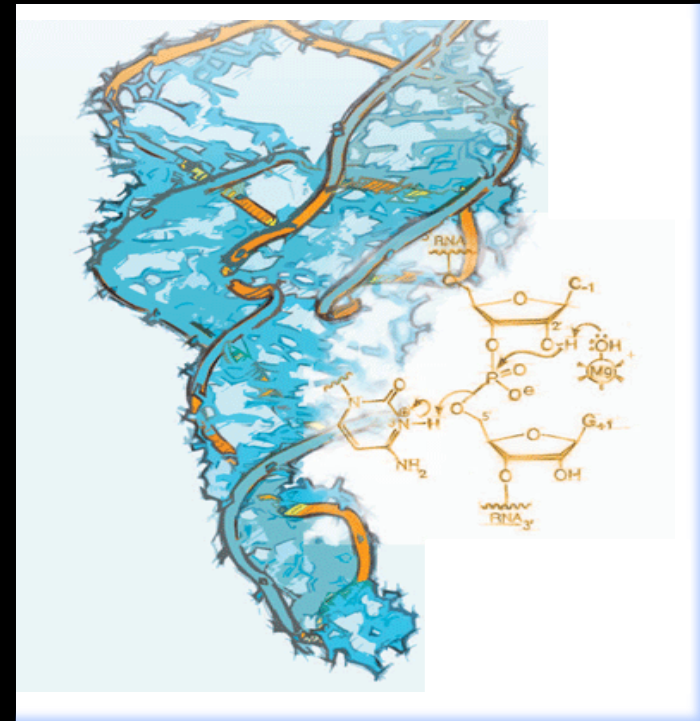


Tokom evolucije RNK “prepuštala”

- čuvanje i prenošenje genetičke informacije → molekulu DNK – stabilniji
- katalitičke funkcije → proteinima – raznovrsniji katalizatori

Danas prisutni krunski dokazi RNK sveta

Genomi nekih virusa su molekuli
RNK – RNK virusi

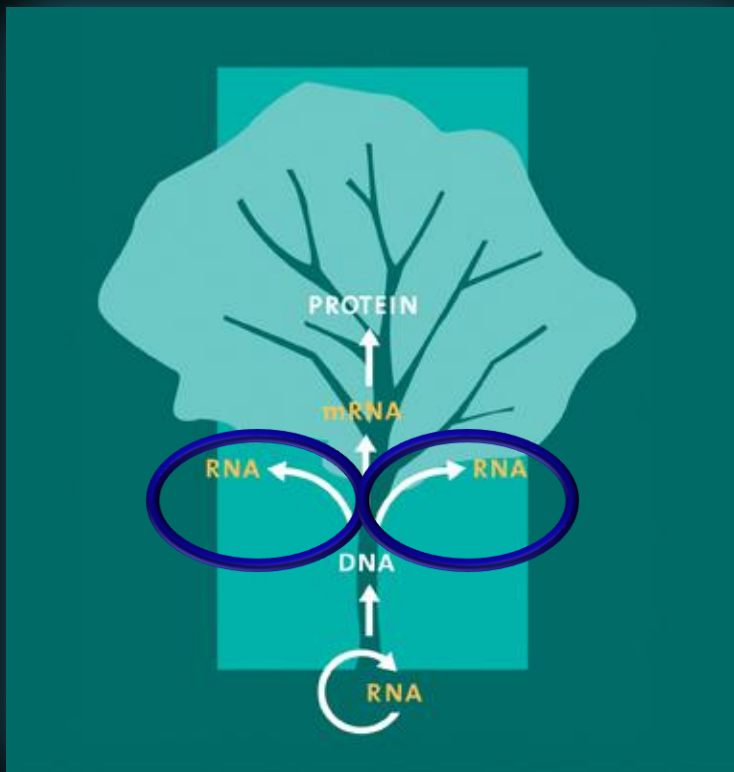


Katalitička funkcija RNK – ribozimi

- ✓ rRNK – formiranje peptidne veze tokom sinteze proteina
- ✓ snRNK – reakcije transesterifikacije tokom iskrajanja introna i spajanja egzona

Novi RNK svet

Molekuli RNK su nastavili da evoluiraju uporedo sa DNK i proteinima



Danas znamo da najdelikatnije funkcije regulacije replikacije, ekspresije i stabilnosti genoma obavlja čitav niz regulatornih molekula RNK

Dakle, RNK može sve

Prvi “molekul života”

Verni otisak gena

Dekodirajući molekul

Strukturni molekul

Katalitički molekul

Nosilac genetičke informacije

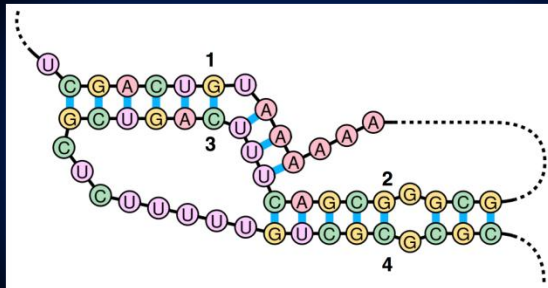
Regulatorni molekuli



Kako izgleda molekul RNK u ćeliji?

RNK je jednolančani molekul

5' ACGUGGCUAAGCCAUUUGCA 3'
primarna struktura



“Savijanje” u prostoru –
trodimenzionalna struktura



Intramolekulsko sparivanje –
sekundarna struktura



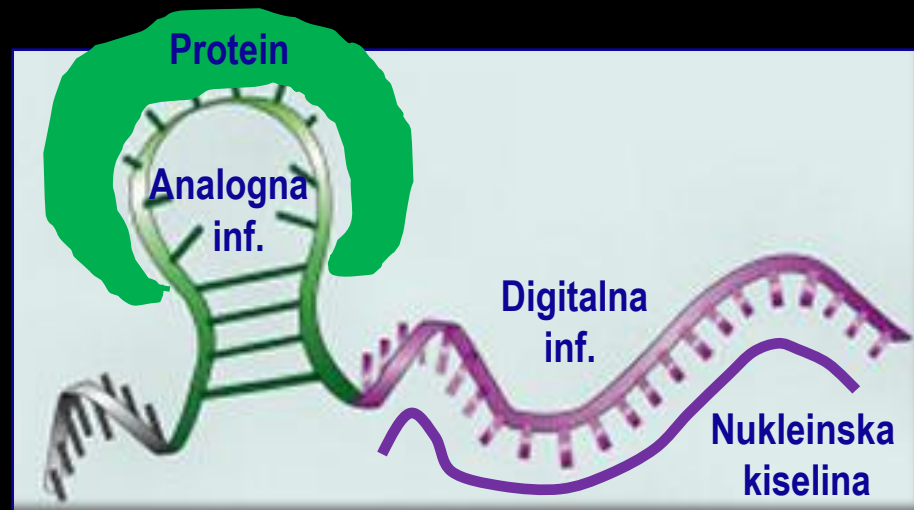
Odlikuju se najrazličitijim
prostornim strukturama, što
im omogućava da obavljaju
toliko različitih funkcija

“Moć” RNK u živom sistemu

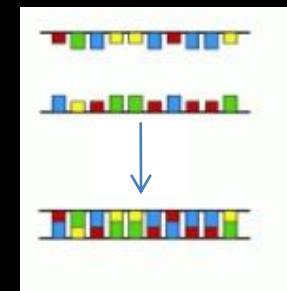
Život se zasniva na specifičnim interakcijama među molekulima



Princip ključ-brava



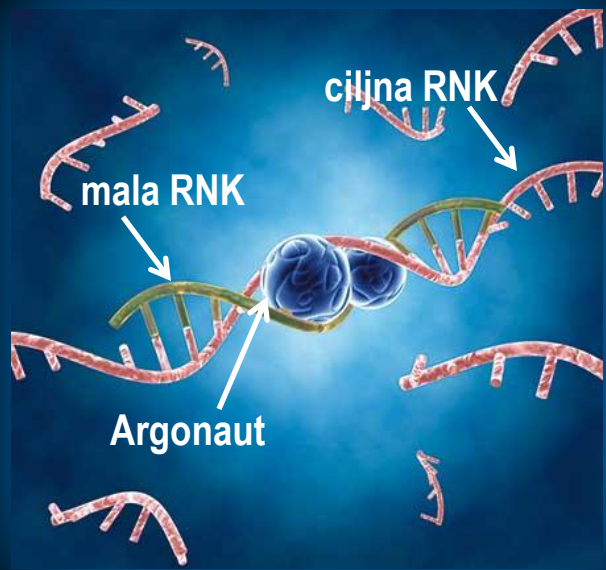
Princip komplementarnosti



RNK uspostavlja raznovrsnije interakcija u odnosu na proteine i DNK

- ✓ Analogna informacija – sekundarne i tercijalne strukture RNK – interkacija sa specifičnim proteinima
- ✓ Digitalna informacija – primarna struktura RNK – interakcija sa specifičnim i/ili jedinstvenim sekvencama nukleinskih kiselina

Male regulatorne RNK – od petunije do Nobelove nagrade



- ### Male regulatorne RNK
- ✓ dužine 20 do 30 nukleotida
 - ✓ prepoznaju komplementarnu sekvencu u ciljnim RNK
 - ✓ sa proteinima familije Argonaut dovode do represije ciljne RNK

RNK interferencija

1989.

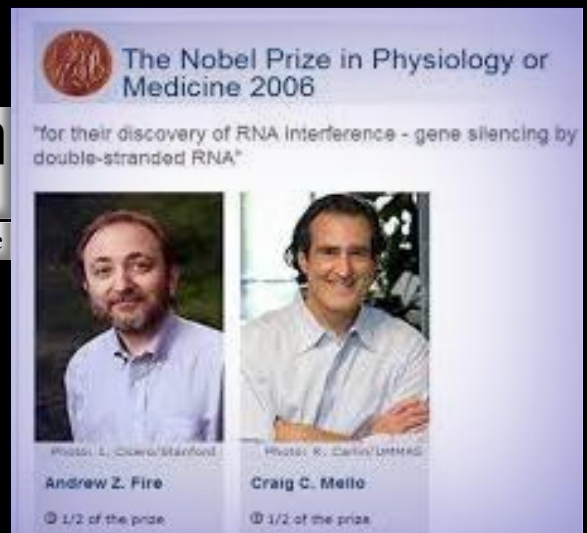


The RNAi revolution

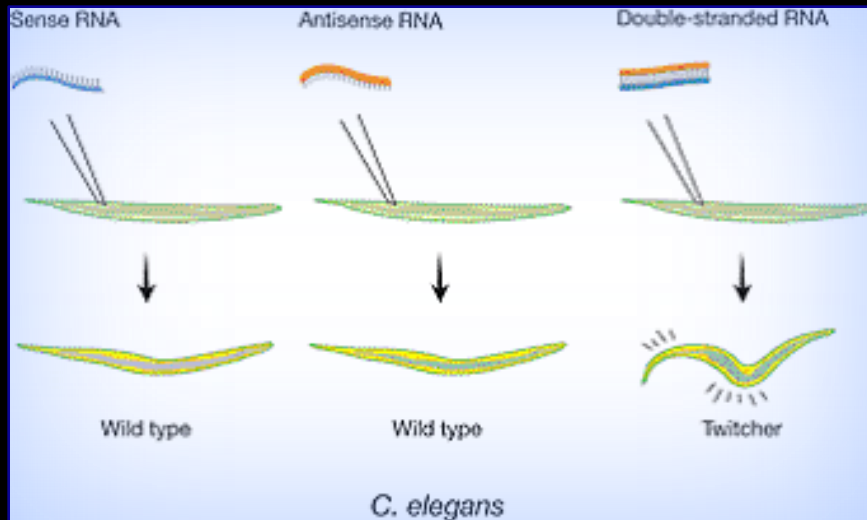
Carl D. Novina and Phillip A. Sharp

NATURE | VOL 430 | 8 JULY 2004 | www.nature.com/nature

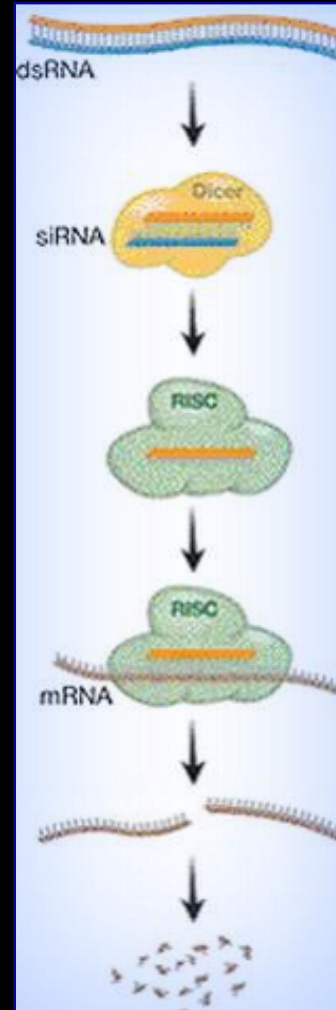
2006.



RNK interferencija



Ubrizgavanje dsRNK za protein miofilament u gonade *C. elegans* reprimira njegovu ekspresiju – trzanje kod potomaka



Prekursor – dvolančana RNK (dsRNK)

Dicer – seče dsRNK na parčiće (siRNK)

Antisense lanac siRNK se udružuje sa RISC

RISC prepoznaje ciljnu RNK komplementarnim sparivanjem siRNK i ciljne RNK

Argonaut iz RISC “seče” ciljnu RNK, koja se dalje degraduje

Priča se usložnjava ...

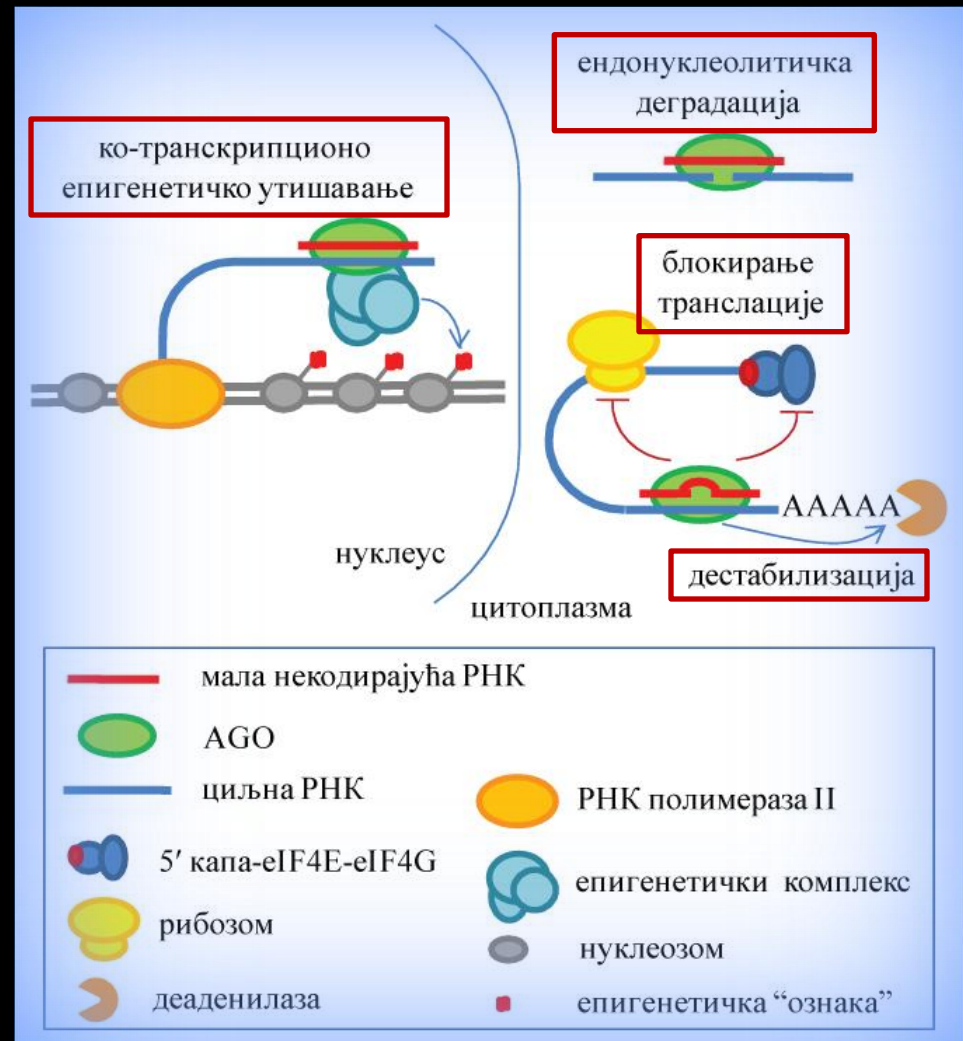
Mehanizmi delovanja

Vrste malih regulatornih RNK

- ✓ **siRNK** (male interferirajuće RNK)
- ✓ **miRNK** (mikro RNK)
- ✓ **piRNK** (RNK koje stupaju u interakciju sa PIWI proteinima)

Prekursori malih regulatornih RNK

- ✓ endogeno sintetisani (miRNK, endo siRNK, piRNK)
- ✓ virusne RNK
- ✓ egzogeno unete dsRNK



RNKi reguliše razne ćelijske procese

RNK interferencija je drevni proces razvijen za odbranu od invazivnih nukelinskih kiselina, a kasnije prilagođen za regulaciju ekspresije gena

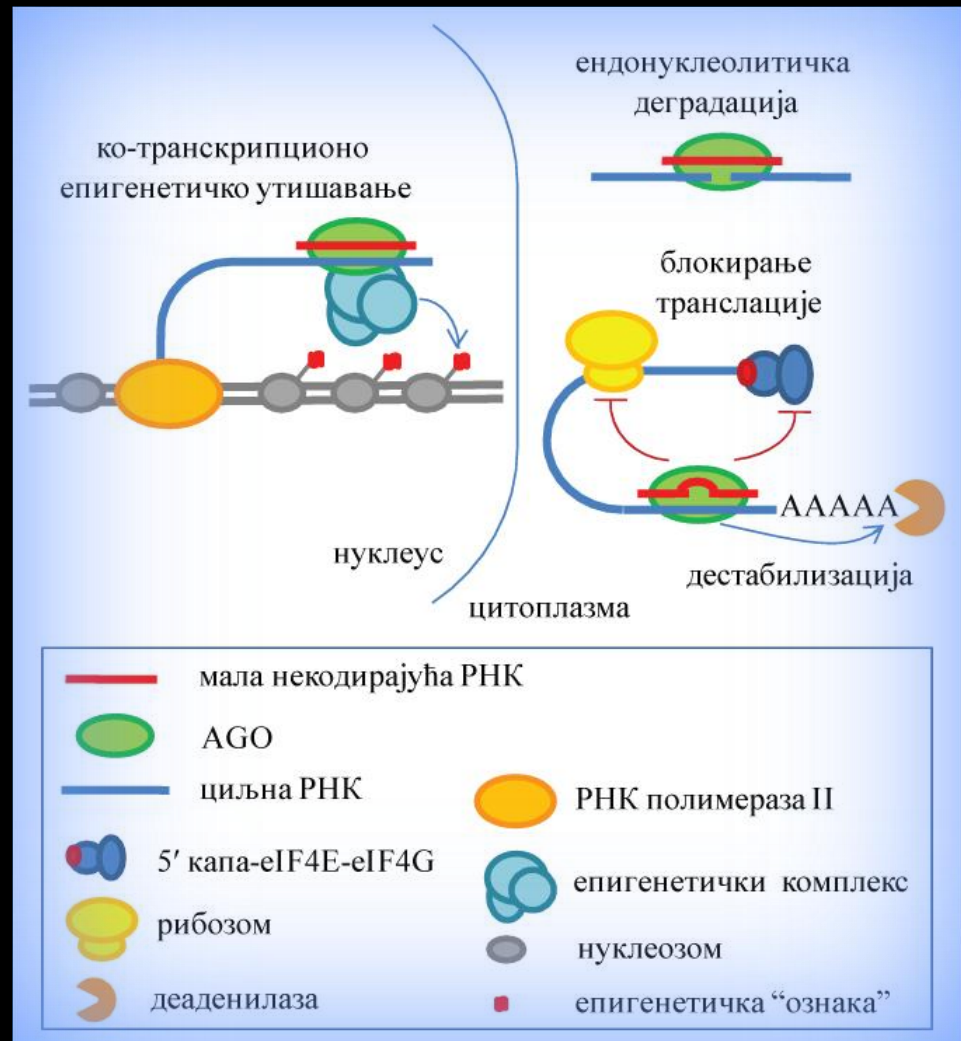
Stabilnost genoma – utišavanje “unutrašnjih neprijatelja” genoma – transpozona (piRNK – sisari, endo siRNK)

Odbrambeni sistem od virusa (siRNK) – sistemska RNKi

Regulacija ćelijskih procesa tokom normalnog funkcionisanja, razvića i patoloških procesa (miRNK i piRNK)

Eksperimentalna alatka za utišavanje gena

Novi pristup za genetičke terapije

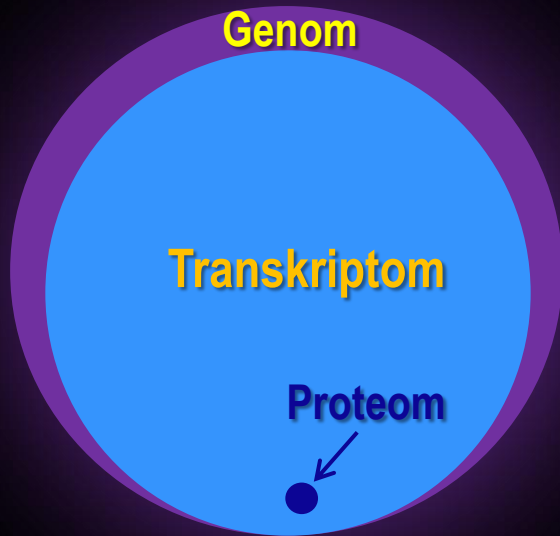




ENCYCLOPEDIA
OF DNA
ELEMENTS 2012.

Pervazivna transkripcija

2/3 genoma se transkribuje u 15 ćelijskih linija
Jedan tip ćelija transkribuje maksimalno 56,5% genoma
značajan deo genoma se transkribuje sa oba lanca



Transkriptom čoveka

- ✓ 195 000 transkripata
- ✓ 100 000 nema konzervisani okvir čitanja i dužine je 50-100 000 nt

“Višak DNK” → “Višak RNK” vs. **funkcionalni molekuli RNK**

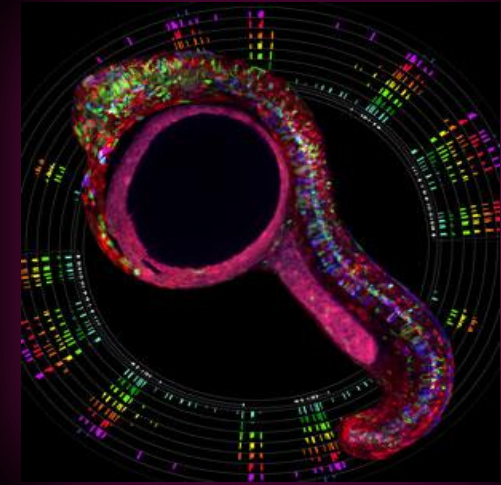


ENCYCLOPEDIA
OF DNA
ELEMENTS

Duge nekodirajuće RNK

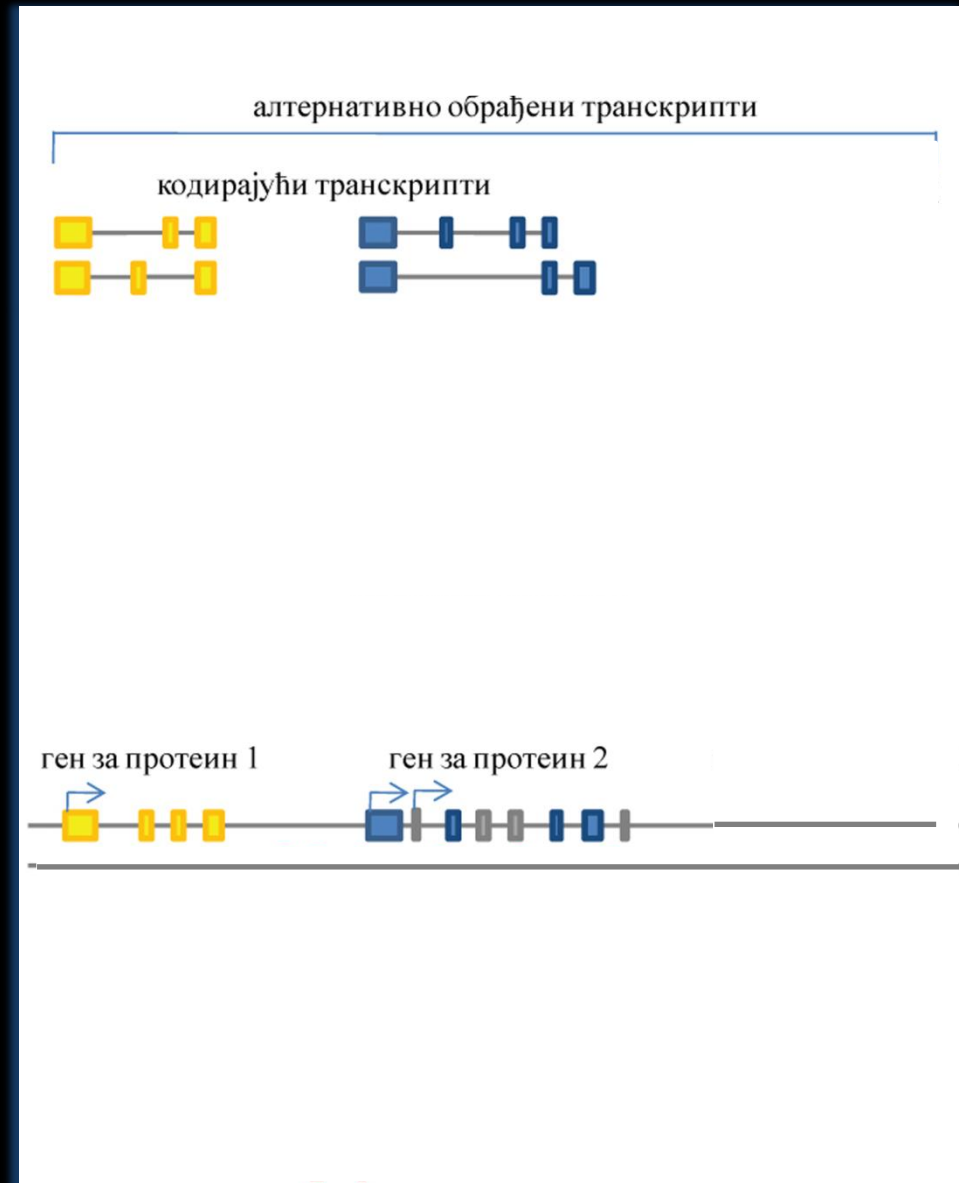
Transkripti duži od 200 nukleotida koji nemaju potencijal za kodiranje proteina
→ duge nekodirajuće RNK – **lncRNA**

Genom čoveka – ~16000 gena za lncRNK koji daju ~ 28000 transkripata (GENCODE 2015)



Geni za duge nekodirajuće RNK – dekoracija genoma

- ✓ Pre-iRNK je samo jedan od mogućih transkripata prepisanih sa određenog regiona genoma
- ✓ Geni nisu linerano već modularno organizovani u genomu



Duge nekodirajuće RNK – epigenetičke efemere



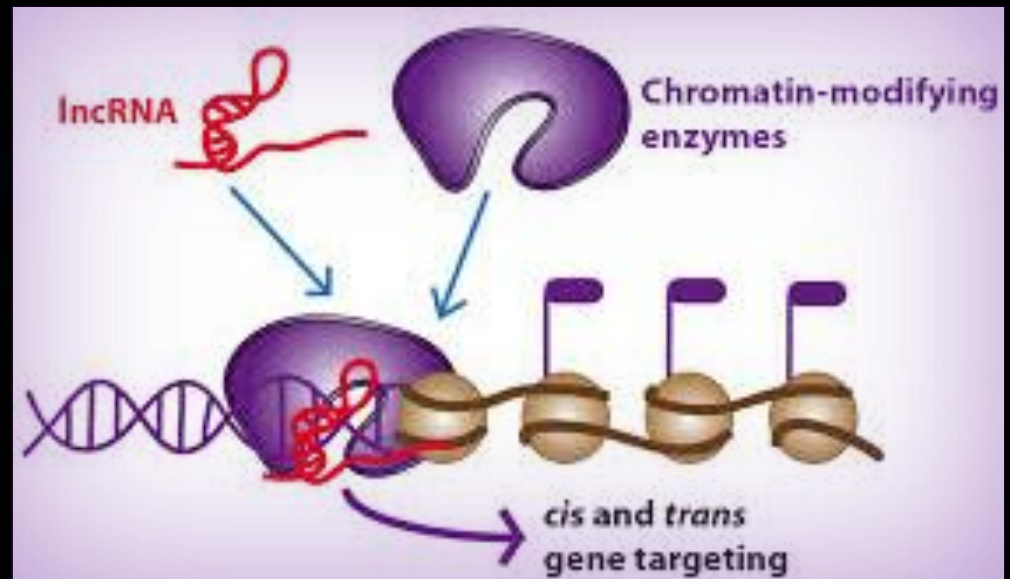
Mara

Karika koja je nedostajala ...

Regrutovanje kompleksa za epigenetičku regulaciju na **jedinstveno mesto** u genomu – lncRNK



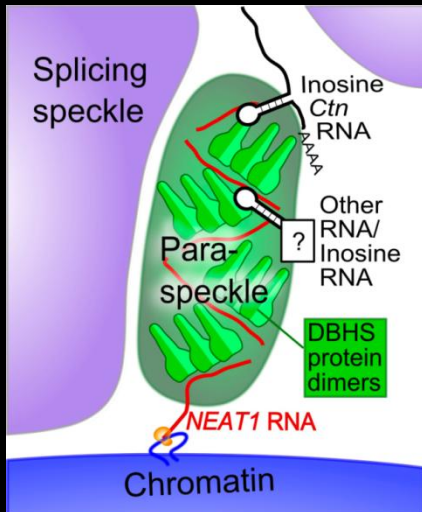
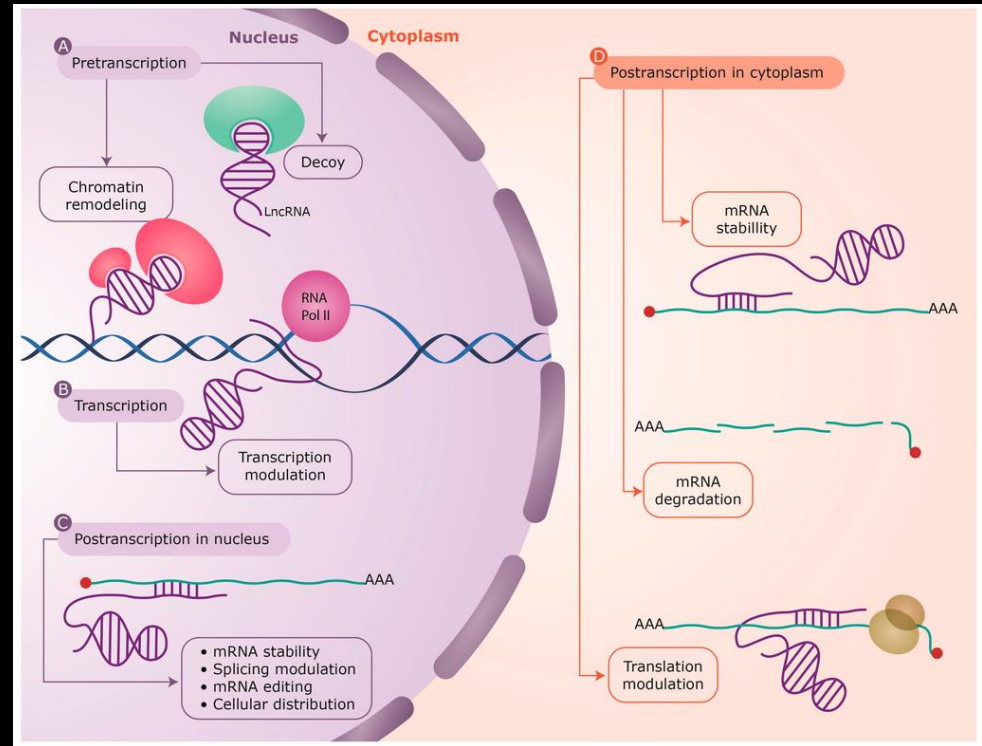
Inaktivirani X hromozom



Duge nekodirajuće RNK – demonstracija moći

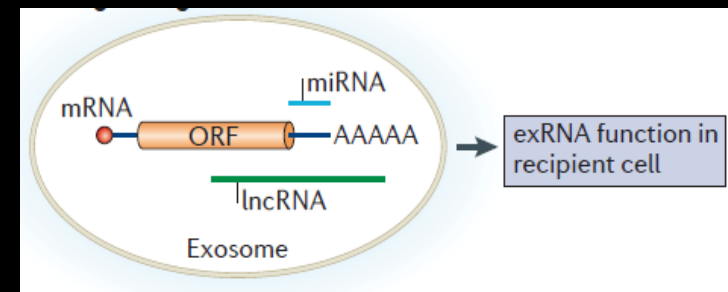
Regulišu ekspresiju genoma na svim nivoima

- ✓ epigenetički
- ✓ transkripciono
- ✓ post-transkripciono
- ✓ post-translaciono

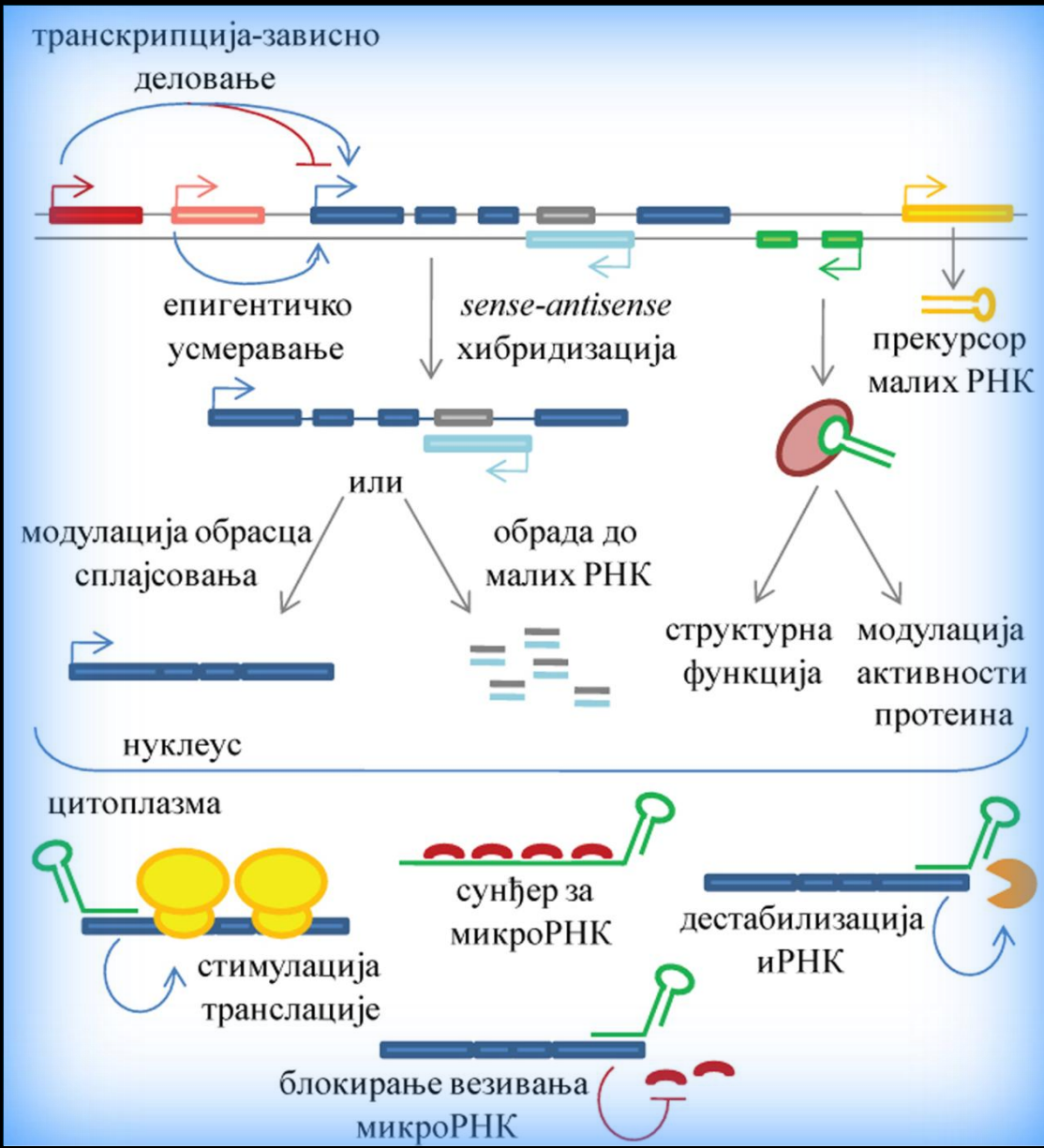


Strukturni molekuli –
potke za ribonukleoproteinske
strukture i oblikovanje
trodimenzionalne strukture
genoma

Regulatorni molekuli?



“... pravi "Divlji Zapad" u pogledu funkcija i mehanizama delovanja ... ovih veoma intrigantnih molekula." J. Lee, Science, 2012



Kružne RNK

Jedina zajednička osobina svih do sada pomenutih RNK je linearnost

Kovalentno cirkularizovane RNK petlje

Detektovano na hiljade kružnih RNK kod eukariota i arhea (2012)

> 25 000 kružnih RNK koje potiču od ~15% gena koji se aktivno transkribuju u fibroblastima čoveka

Nova klasa regulatornih RNK



Kružne RNK

circRNA

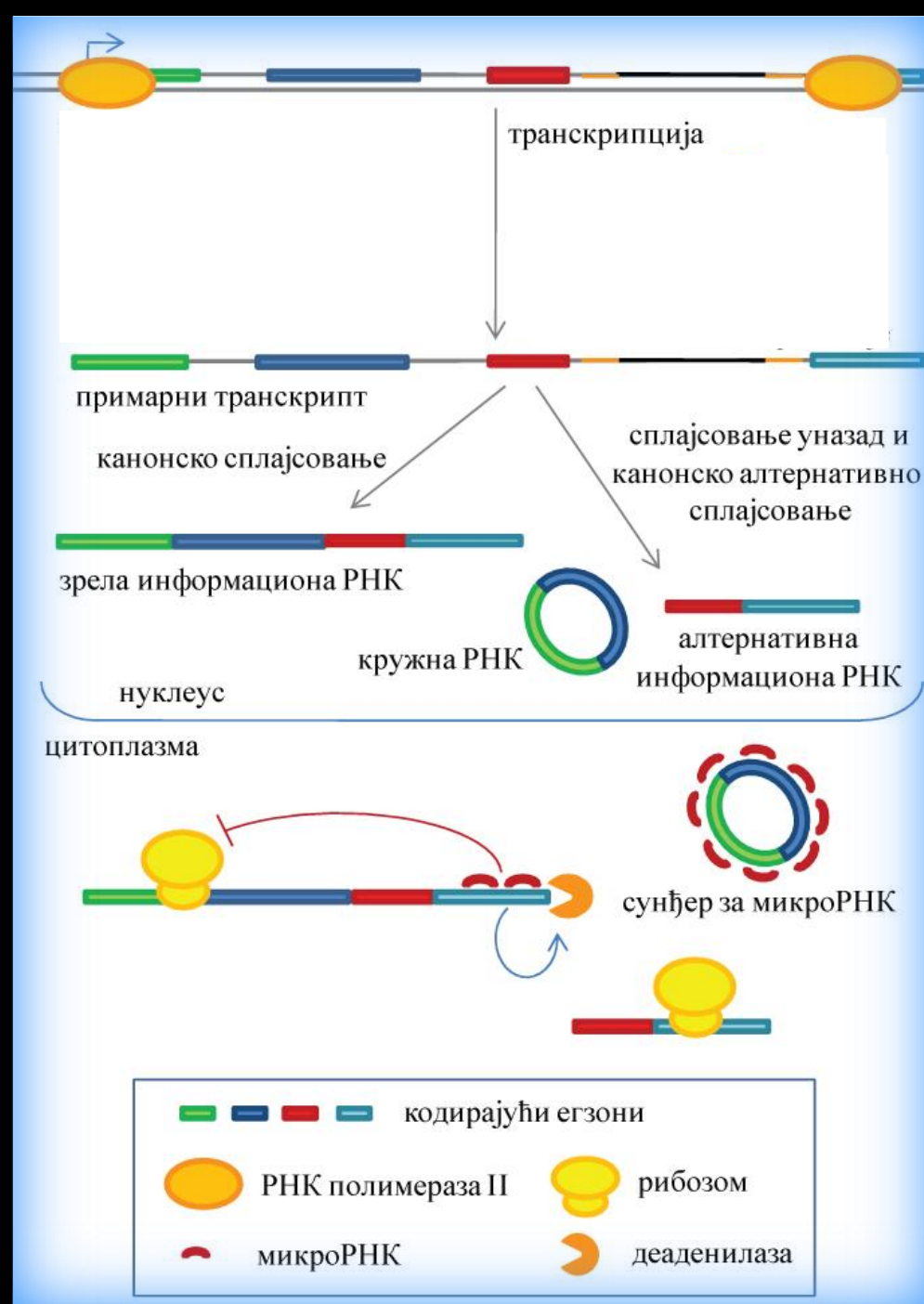
Sastoje se od sekvenci egzona

Nastaju obradom pre-iRNK kada splajsozom splajsuje unazad

Akumuliraju u citoplazmi

Sadrže brojna mesta za vezivanje miRNK i regulišu njihov nivo – najpotentniji endogeni sunderi za miRNK

Svojom biogenezom utiču na obrazac splajsovanja roditeljske pre-iRNK



Kružne RNK

exon-intron circRNA

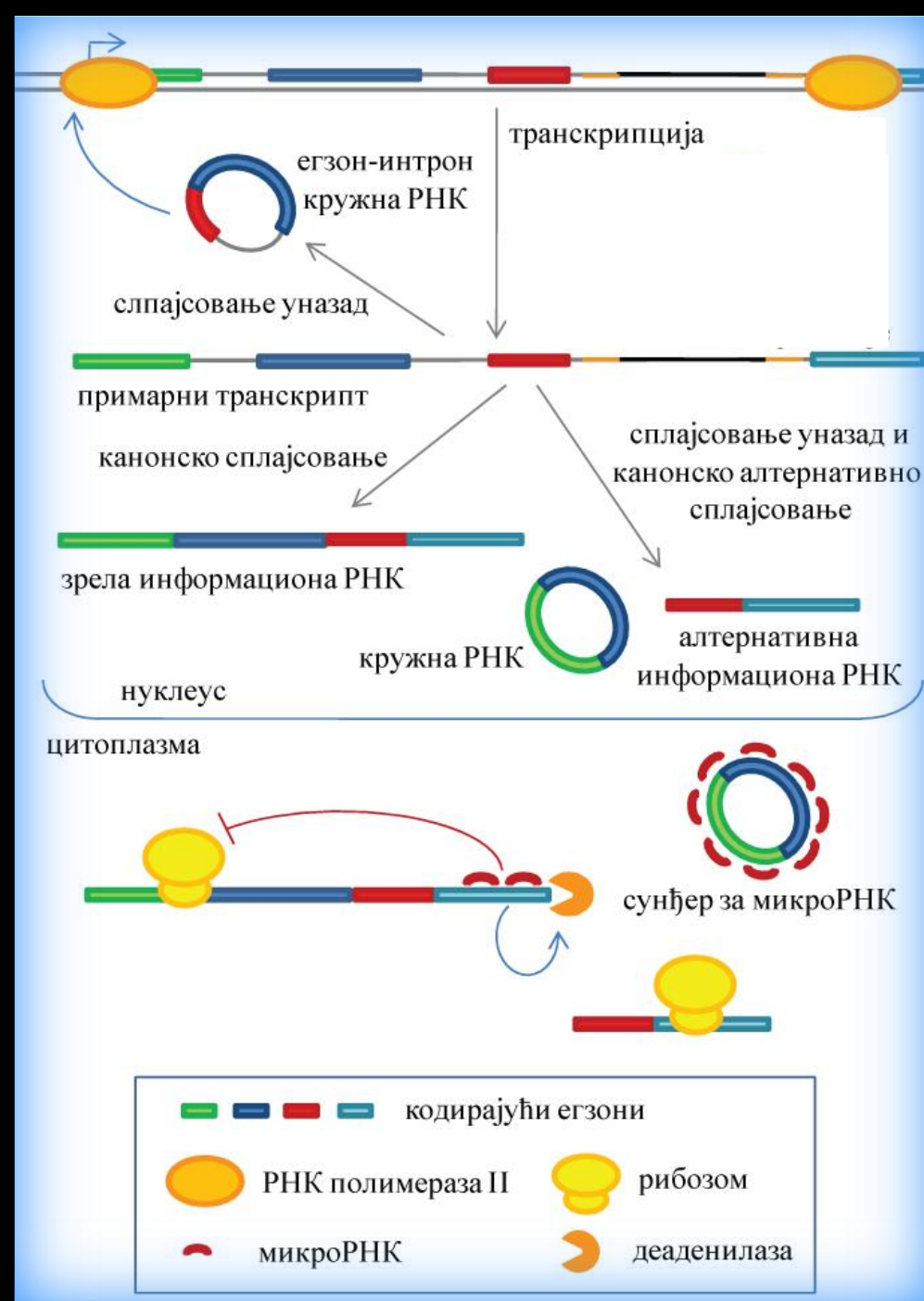
Sastoje se od sekvenci egzona i introna

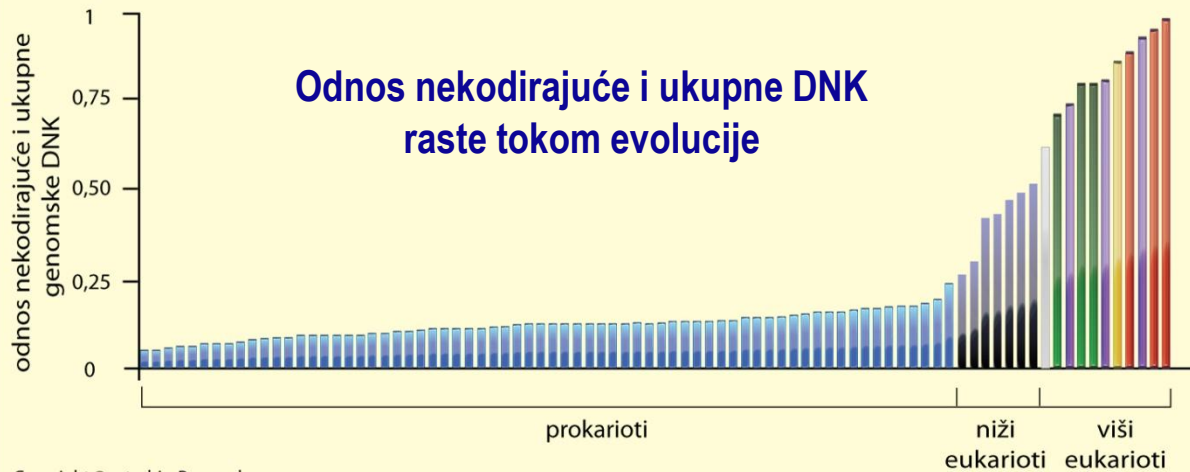
Stimulišu incijaciju transkripcije roditeljskog gena

circular intronic RNA

Sastoje se od introna koji nakon iskrajanja ne podležu linearizaciji

Stimulišu elongaciju transkripcije roditeljskog gena



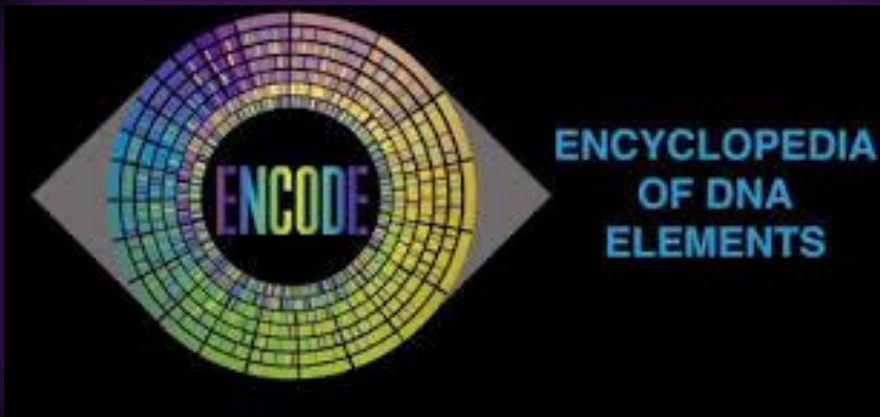
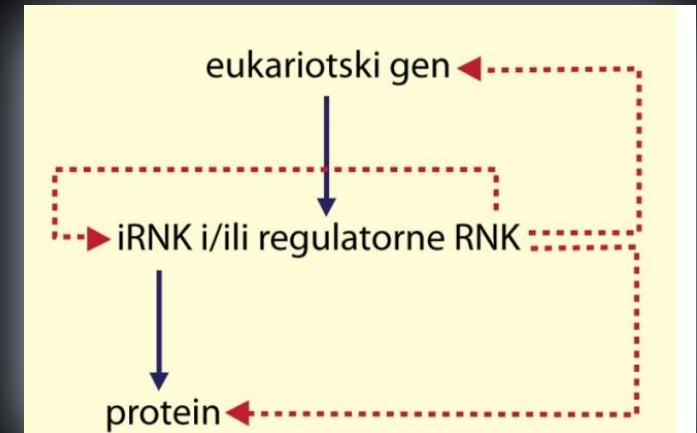


Copyright © artgrbic, Beograd

Najveći deo genoma bi mogao biti sastavljen od funkcionalne DNK

80% genoma čoveka služi nekoj biohemijskoj funkciji (ENCODE 2012)

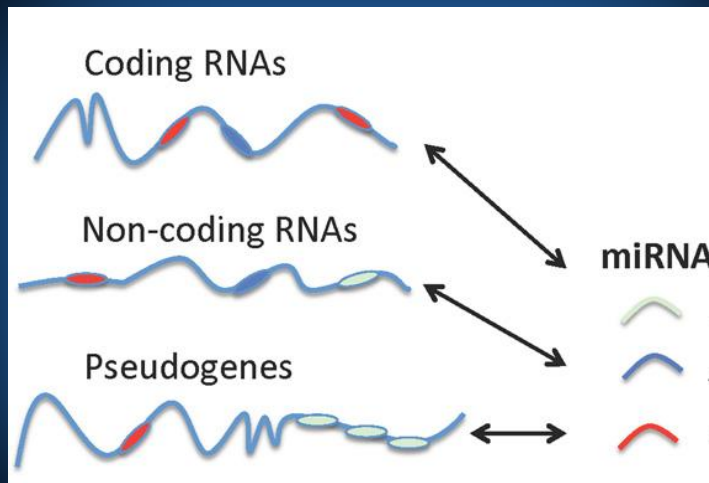
Ključni igrači – regulatorne RNK



Regulatorna mreža RNK – skriveni jezik RNK

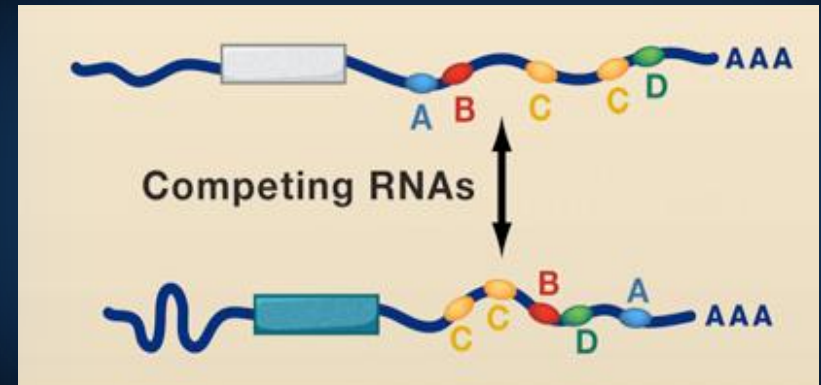
miRNK regulišu različite vrste RNK

- ✓ iRNK
- ✓ transkripte pseudogena (vezuju iste miRNK kao roditeljski transkripti)
- ✓ duge nekodirajuće RNK



miRNK funkcionišu na kombinatoran način

- ✓ jedna ciljna RNK ima više vezivnih mesta za miRNK
- ✓ svaka miRNK reguliše veliki broj transkripata



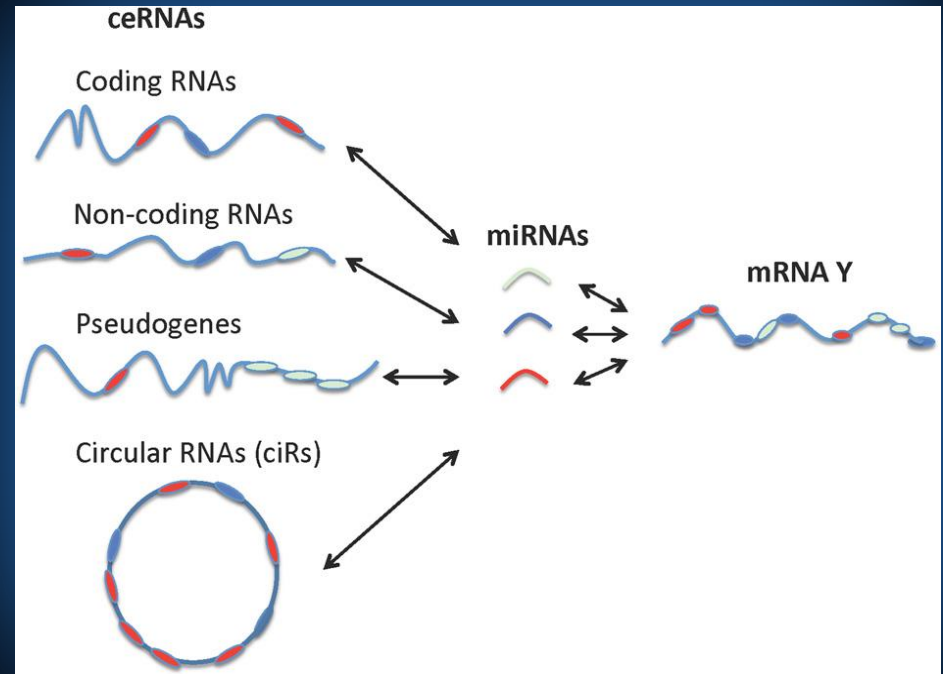
Molekuli RNK međusobno komuniciraju kroz kompeticiju za vezivanje istih miRNK →

Kompetirajuće endogene RNK

Reverzna funkcija → ceRNK
regulišu nivo miRNK

Endogeni “sunderi” za miRNK

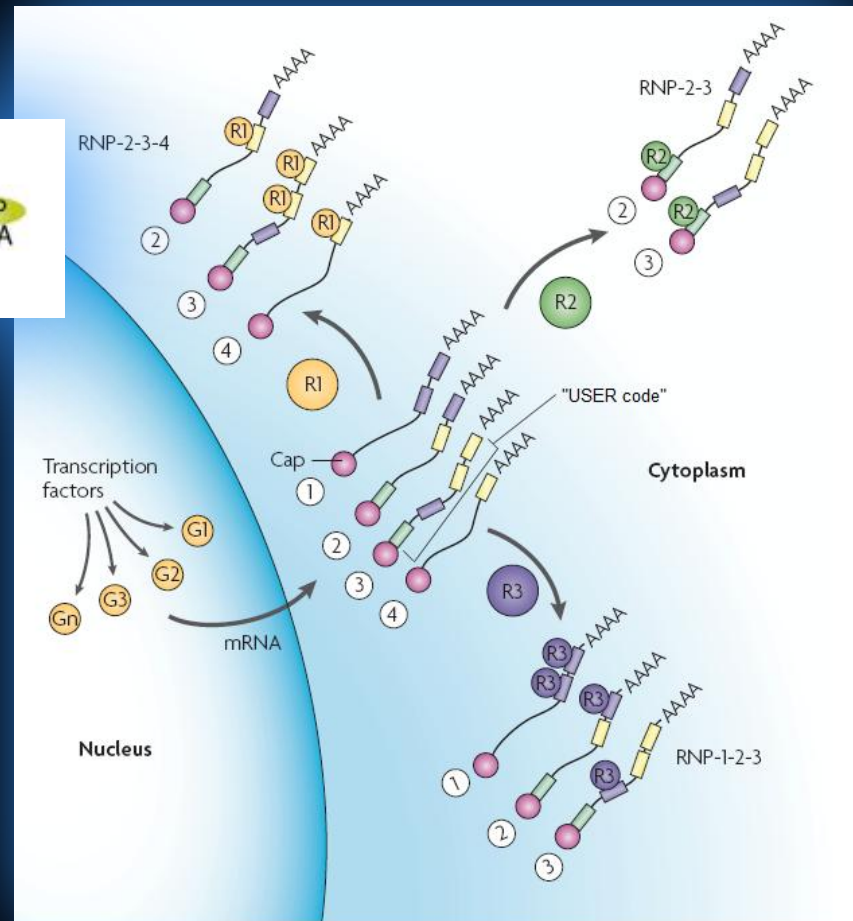
- ✓ Nova funkcija regulatornih RNK
- ✓ Transkripti pseudogena postaju regulatorni molekuli
- ✓ iRNK postaju regulatorni molekul



Svi molekuli RNK međusobno komuniciraju kroz kompeticiju za vezivanje istih miRNK
→ koregulacija nivoa ekspresije kompetirajućih RNK

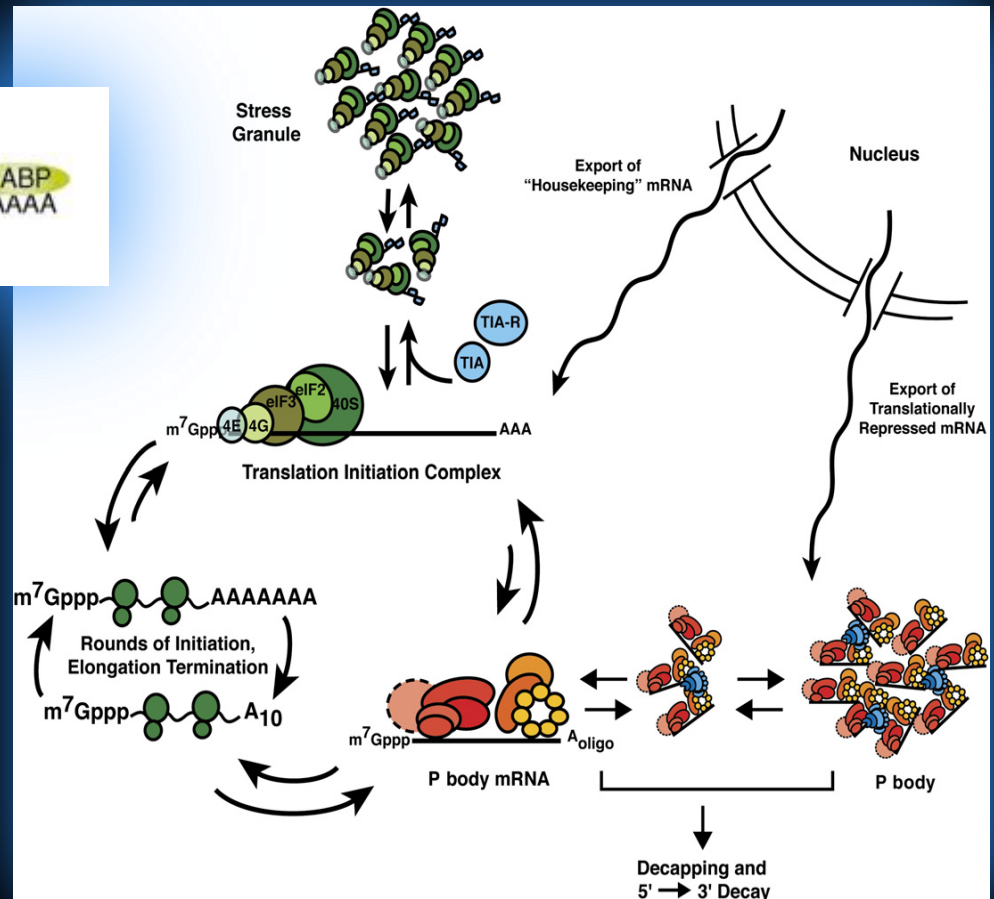
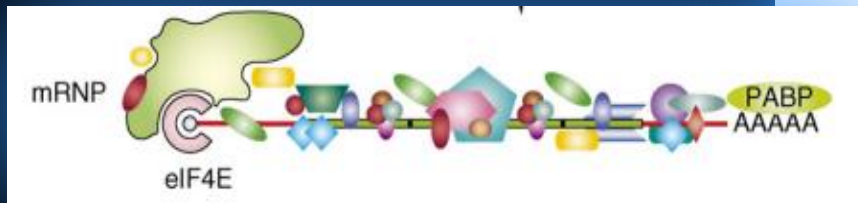
Dress code i suživot funkcionalno povezanih iRNK

iRNK poseduje regulatorne sekvence koje vezuju RNK-vezivne proteine i miRNK – “garderoba” koja koordiniše ekspresiju funkcionalno povezanih iRNK, organizujući ih u “radne grupe” – operone RNK



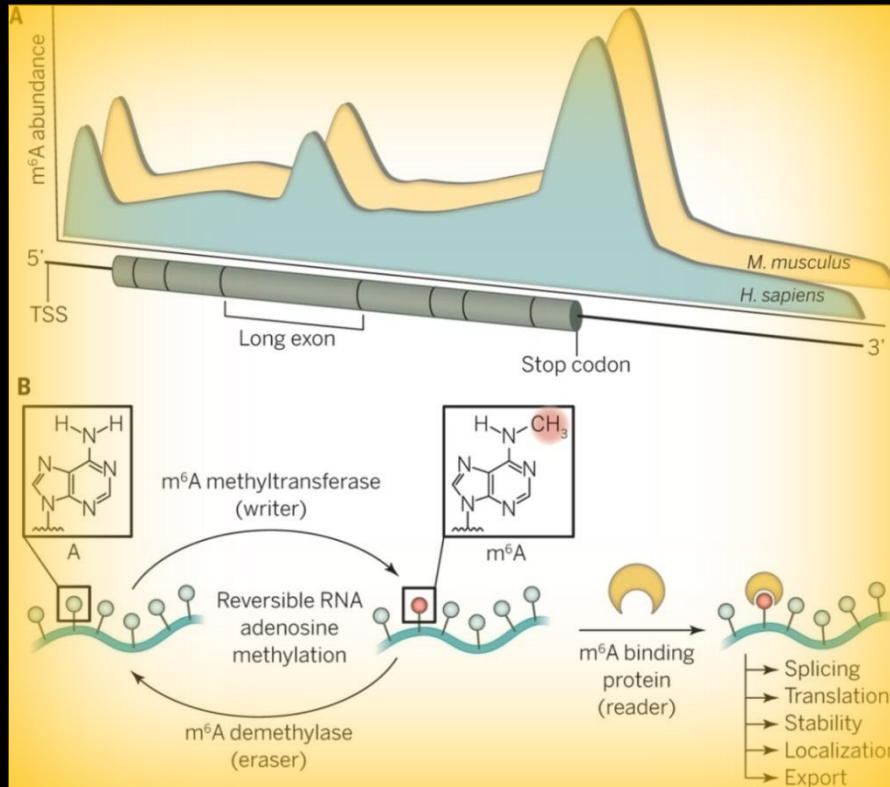
Dress code i uzbudljiv život iRNK

iRNK poseduje regulatorne sekvence koje vezuju RNK-vezivne proteine i miRNK – “garderoba” koja registrujući ćelijske signale određuje sudbinu iRNK – iRNK će biti translatirana, uskladištena, degradovana ili privremeno “penzionisana”



Epitranskriptomi

Ali... kao odgovor na signale koje ćelija prima iRNK mogu biti regulisane kroz modifikaciju baza – dodatni nivo post-transkripcione regulacije



U toku projekti mapiranja epitranskriptoma →
razumevanje funkcije ovog fenomena

- ✓ Dezaminacija adenzina u inozin – razlikovanje sopstvenih od virusnih RNK
- ✓ N6 metilacija adenzina – stabilnost iRNK
- ✓ N1 metilacija adenzina – promovisanje translacije
- ✓ Pseudouridilacija – stabilizacija iRNK u uslovima stresa

**Obrasci hemijskih modifikacija
iRNK – epitranskriptomi**

Identifikovani proteini koji “pišu”,
“čitaju” (i “brišu”) oznake

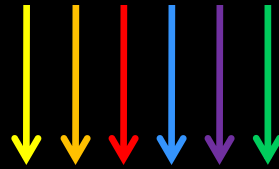
Signali

Genom



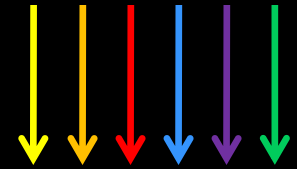
Epigenomi

Transkriptom

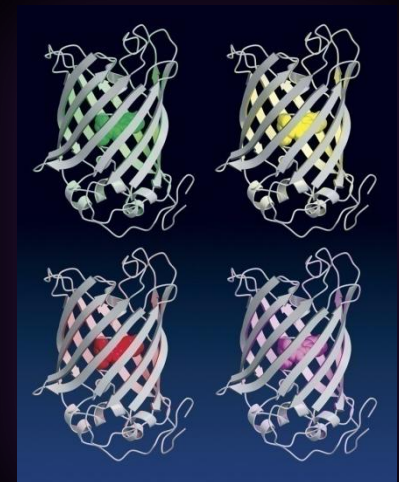
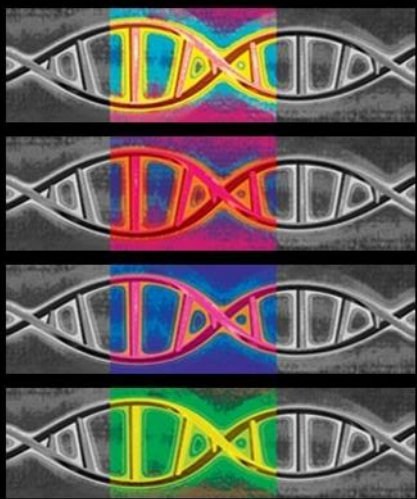


Epitranskriptomi

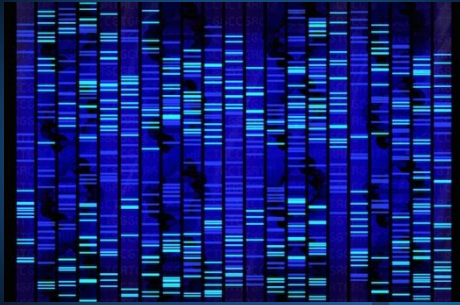
Proteom



Epiproteomi



FUNKCIONALNA PLASTIČNOST



1972.

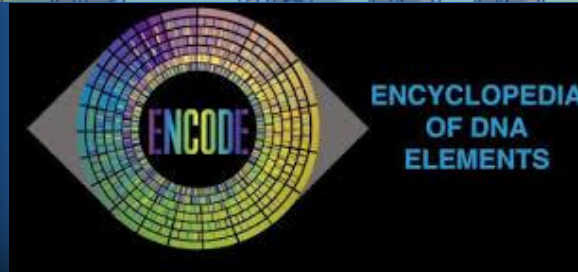
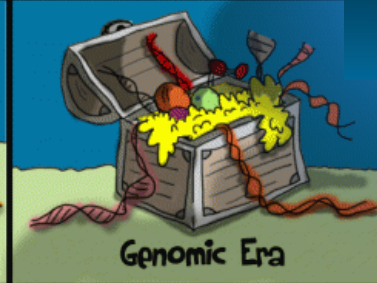
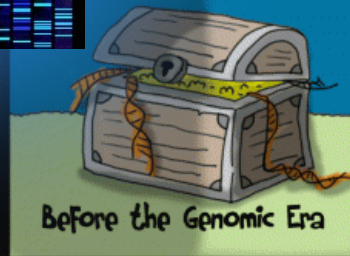
1-2% genoma kodira proteine
>2/3 genoma “višak DNK”

Human
Genome
Project



2001.

Organizmi su više od prostog
zbira njihovih gena



2012.

80% genoma čoveka služi nekoj biohemijskoj funkciji
(regulatorni elementi, regulatorne RNK)

Ključ evolucije, razvića i funkcionisanja živih sistema je regulacija



Pokaži šta znaš

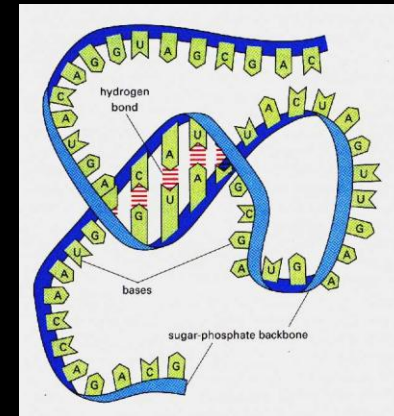
Kviz pitanje 1

Molekuli RNK su jednolančani polinukleotidi.



Jednolančanost omogućava intramolekulsko sparivanje baza, čime RNK stiče određenu trodimenzionalnu strukturu.

Trodimenzionalna struktura određena je redosledom nukleotida u RNK, tako da različiti molekuli RNK stiču najrazličitije strukture u ćeliji.

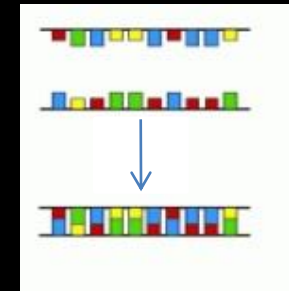
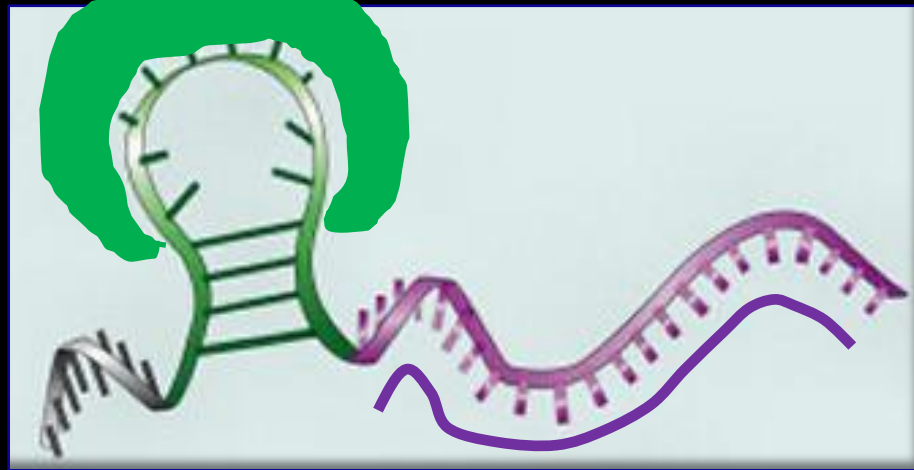


Da li je tačno da raznovrstnost strukture molekulima RNK daje porencijal da obavljaju različite funkcije u ćeliji?



Kviz pitanje 2

Molekuli RNK uspostavljaju interakcije sa proteinima (po principu ključ-brava), ali i sa molekulom DNK i drugim molekulima RNK (po principu komplementarnosti).

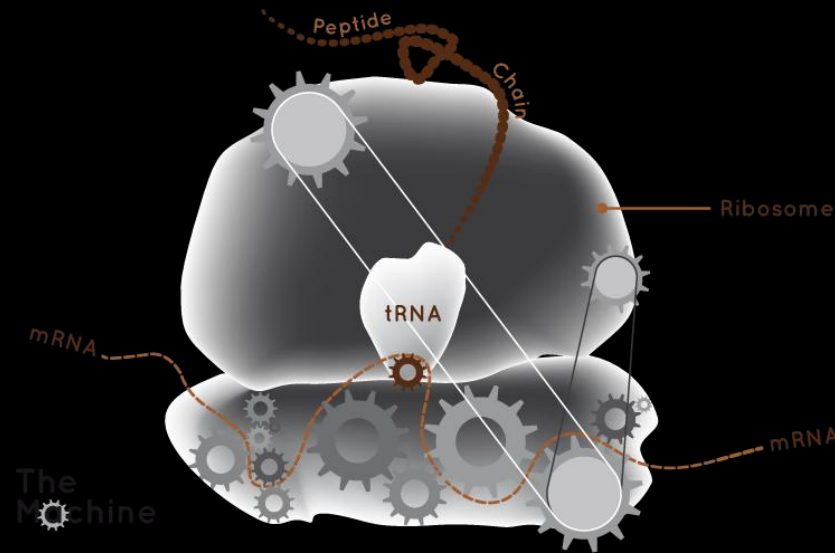


Da li je tačno da sekundarne i tercijarne strukture u molekulima RNK formiraju površine za interakcije sa nukleinskim kiselinama, dok je primarna struktura odgovorna za interakcije sa proteinima?



Kviz pitanje 3

Molekuli RNK su posrednici u realizaciji genetičke informacije u ćeliji.



Povežite određene vrste molekula RNK sa funkcijama koje obavljaju tokom translacije:

- | | | |
|------|---|--|
| iRNK | → | Strukturni molekul ribozoma |
| tRNK | → | Molekul koji vezuje aminokiseline |
| rRNK | → | Kodirajući molekul |
| | → | Molekul koji dekodira kodone |
| | → | Molekul koji katalizuje formiranje peptiden veze |

Kviz pitanje 4

U cilju dobijanja petunija tamno ljubičaste boje, ubrizgavana je dvolančana RNK čiji je jedan lanac nosio informaciju za halkon-sintazu, enzim koji katalizuje formiranje tamnog pigmenta.

Da li su dobijene tamno ljubičaste petunije?



dsRNA sa informacijom
za halkon-sintazu



RNK interferencija je proces utišavanja ekspresije specifičnog gena posredovan sa malim nekodirajućim RNK. Većina malih nekodirajućih RNK nastaje specifičnom obradom dvolančane RNK.

Kviz pitanje 5

Svega 1-2% genoma čoveka sadrži informaciju za proteine koji izgrađuju naše telo i omogućavaju odvijanje biohemijskih funkcija u našim ćelijama.

2% Coding



Dugo se smatralo da više od 80% našeg genoma nema funkciju – “višak” DNK.

80% Junk



Da li je tačno da velika proporcija “viška” DNK ima regulatornu funkcije jer nosi informaciju za nekodirajuće RNK molekule?

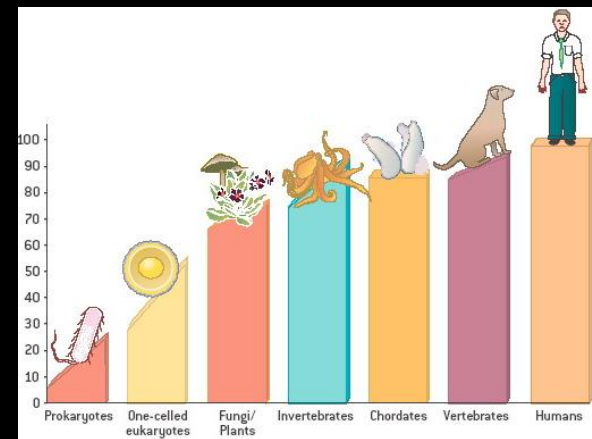
80% Processing instructions



Kviz pitanje 6

Genom čoveka je manji od genoma nekih algi, a broj gena za proteine u genomu čoveka je manji nego broj gena u genomima nekih crva.

Međutim, tokom evolucije povećavala se proporcija DNK uključena u regulaciji ekspresije genoma.



Koji parametar opisuje povećanje biološke složenosti organizama tokom evolucije?

- a) broja gena za proteine
- b) proporcija nekodirajuće DNK**
- c) veličina genoma



