

Η εξέλιξη της ζωής δε έχει ως κέντρο της πλέον τα γονίδια

- Για πάνω από 50 χρόνια ο όρος γονίδιο ήταν συνώνυμος με περιοχές που κωδικοποιούν mRNAs.
- Παρόλα αυτά, πρόσφατα (τα τελευταία 10-15 χρόνια) έχουμε ανακαλύψει ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα μεταγράφεται διαχυτικά (pervasively) παράγοντας χιλιάδες ρυθμιστικά RNAs (μη – κωδικοποιά). Από μικρά ncRNAs (20-30 nts), μεσαίου μεγέθους (~40-200nts) και μεγάλα (μακρά) μη-κωδικοποιά RNAs με κρίσιμους ρόλους στη μεταγραφή, μετα-μεταγραφή, μετάφραση και ρύθμισης της δομής της χρωματίνης

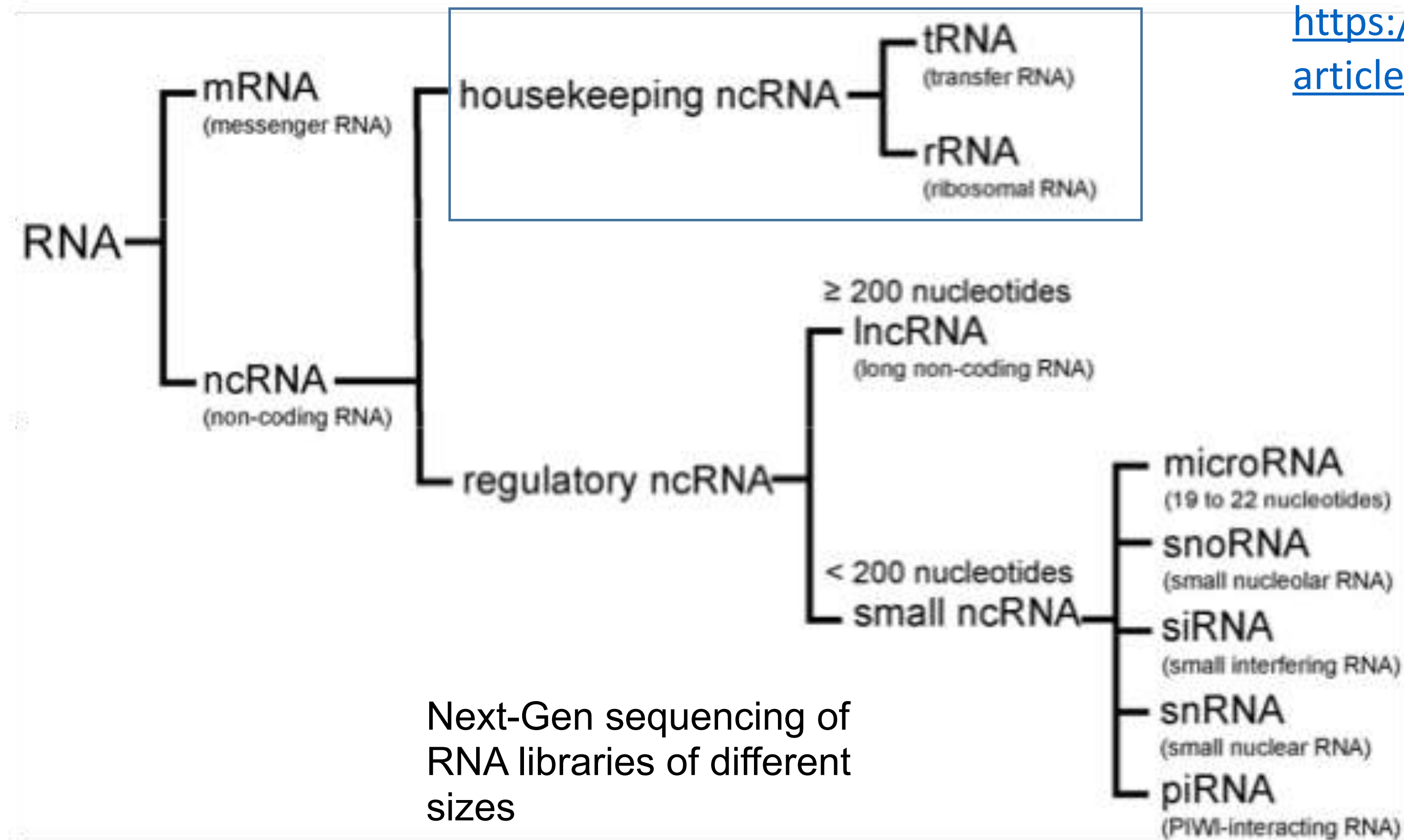
RNA-μεσολαβούμενη διακυτταρική επικοινωνία

- Τα μη-κωδικοποιά RNAs (non-coding RNAs) έχουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία με αποτέλεσμα να θεωρούνται πλέον ως ρυθμιστές, ιστών, της αλληλοεπίδρασής ιστών σε επίπεδο οργανισμού αλλά και της αλληλοεπίδρασης διαφορετικών οργανισμών μεταξύ τους.
- Υπάρχει μια **κοινή** και **αρχαία** βιολογική γλώσσα που αντιπροσωπεύεται από τα μόρια RNA.
- Μέσα στους οργανισμούς, τα κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν ncRNAs τα οποία μπορούν να «ταξιδέψουν» χρησιμοποιώντας τα βιολογικά υγρά ώστε να φτάσουν σε μακρινούς στόχους και τα επιτελέσουν τη ρυθμιστική τους λειτουργία, δρώντας ως «γενετικές ορμόνες». Το ίδιο ισχύει και ανάμεσα σε οργανισμούς
- Διάφοροι παρασιτικοί οργανισμοί, όπως ιοί, βακτήρια και μύκητες μπορούν να πραγματοποιήσουν «πειρατεία» στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, μέσω των ncRNAs. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να παρατηρηθεί και σε σχέσεις συμβίωσης, ή στους πολυκύτταρους οργανισμούς
- Στου πολυκύτταρους οργανισμούς το καλό του κυττάρου θυσιάζεται για την επιβίωση του οργανισμού

Table 1. Classes of non-coding RNA in mammals

NcRNA class	Characteristics	References
<i>Established ncRNA classes</i>		
Long (regulatory) non-coding RNAs (lncRNAs)	The broadest class, lncRNAs, encompass all non-protein-coding RNA species >~200 nt, including mRNA-like ncRNAs. Their functions include epigenetic regulation, acting as sequence-specific tethers for protein complexes and specifying subcellular compartments or localization	Reviewed in [97,98]
Small interfering RNAs (siRNAs)	Small RNAs ~21–22 nt long, produced by Dicer cleavage of complementary dsRNA duplexes. siRNAs form complexes with Argonaute proteins and are involved in gene regulation, transposon control and viral defence	Reviewed in [15–17,227]
microRNAs (miRNAs)	Small RNAs ~22 nt long, produced by Dicer cleavage of imperfect RNA hairpins encoded in long primary transcripts or short introns. They associate with Argonaute proteins and are primarily involved in post-transcriptional gene regulation	Reviewed in [16,17,70]
PIWI-interacting RNAs (piRNAs)	Dicer-independent small RNAs ~26–30 nt long, principally restricted to the germline and somatic cells bordering the germline. They associate with PIWI-clade Argonaute proteins and regulate transposon activity and chromatin state	Reviewed in [15,17]
Promoter-associated RNAs (PARs)	A general term encompassing a suite of long and short RNAs, including promoter-associated RNAs (PASRs) and transcription initiation RNAs (tiRNAs) that overlap promoters and TSSs. These transcripts may regulate gene expression	Reviewed in [38,39]
Small nucleolar RNAs (snoRNAs)	Traditionally viewed as guides of rRNA methylation and pseudouridylation. However, there is emerging evidence that they also have gene-regulatory roles	Reviewed in [228]
<i>Other recently described classes</i>		
X-inactivation RNAs (xiRNAs)	Dicer-dependent small RNAs processed from duplexes of two lncRNAs, Xist and Tsix, which are responsible for X-chromosome inactivation in placental mammals	131
Sno-derived RNAs (sdRNAs)	Small RNAs, some of which are Dicer-dependent, which are processed from small nucleolar RNAs (snoRNAs). Some sdRNAs have been shown to function as miRNA-like regulators of translation	229–231
microRNA-offset RNAs (moRNAs)	Small RNAs ~20 nt long, derived from the regions adjacent to pre-miRNAs. Their function is unknown	232,233
tRNA-derived RNAs	tRNAs can be processed into small RNA species by a conserved RNase (angiogenin). They are able to induce translational repression	Reviewed in [44]
MSY2-associated RNAs (MSY-RNAs)	MSY-RNAs are associated with the germ cell-specific DNA/RNA binding protein MSY2. Like piRNAs, they are largely restricted to the germline and are ~26–30 nt long. Their function is unknown	234
Telomere small RNAs (tel-sRNAs)	Dicer-independent ~24 nt RNAs principally derived from the G-rich strand of telomeric repeats. May have a role in telomere maintenance	43
Centrosome-associated RNAs (crasiRNAs)	A class of ~34–42 nt small RNAs, derived from centrosomes that show evidence of guiding local chromatin modifications	42

Κατηγορίες μη-κωδικοποιών RNAs



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4104869/>

Μικρά RNAs

- Αποτελούνται από: Κανονικά και μη-κανονικά μικρά RNAs

- **Κανονικά μικρά RNAs:**

- Ribosomal/Transfer RNAs
- Small nuclear RNAs (snRNAs)
- Small nucleolar RNAs (snoRNAs)
- microRNAs (miRNAs),
- endogenous small interfering RNAs (siRNAs)
host-gene expression and transposable element transcripts.
- Piwi-interacting RNAs (piRNAs)

Μετα-μεταγραφική
Γονιδιακή Αποσιώπηση

- **Μη-κανονικά RNAs:**

- Promoter-associated small RNAs (PASRs)
- transcription start site associated RNAs (TSSa-RNAs)
- transcription initiation RNAs (tiRNAs)

Μικρά πυρηνισκικά RNA (Small nucleolar RNA, snoRNA)

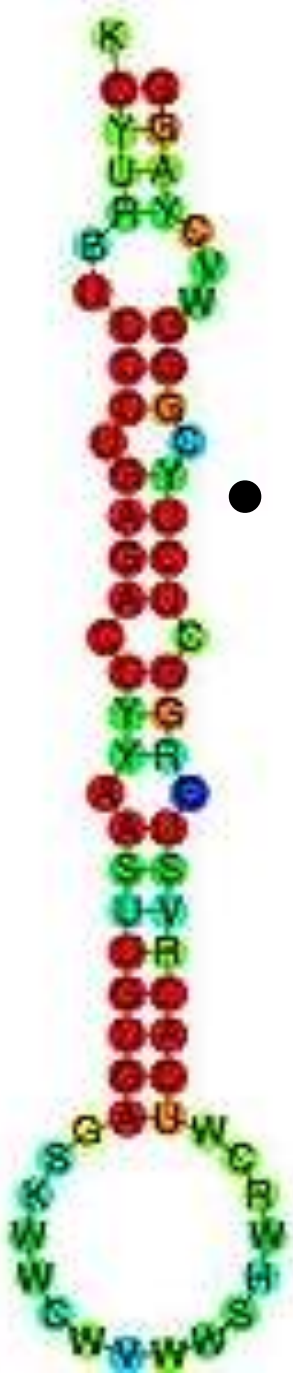
- Τα snoRNAs, συμβάλλουν στη βιογένεση του ευκαρυωτικού ριβοσώματος που λαμβάνει χώρα στον πυρηνίσκο.
- Συνιστούν μια οικογένεια μη-κωδικοποιών RNAs που μετέχουν στην επεξεργασία και τροποποίηση του rRNA και των snRNAs του σωματίου ματίσματος.
- Δύο κύριοι τύποι: RNA με πλαίσιο C/D (RNA C/D box), τα οποία μεθυλιώνουν το rRNA σε μια θέση 2'-O-ριβόζης και τα RNA με πλαίσιο H/ACA (RNA H/ACA box), τα οποία μετατρέπουν την ουριδίνη σε ψευδοουριδίνη στο rRNA.
- Σχηματίζουν αντίστοιχα τα μικρά πυρηνισκικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snoRNPs)

Μετα-μεταγραφική Γονιδιακή Αποσιώπηση

Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS)

Η ανακάλυψη των μικρών ρυθμιστικών RNAs (siRNAs, miRNAs)

- Το πρώτο μικρό ρυθμιστικό RNA, lin-4, ανακαλύφθηκε το 1993 στα νηματοιειδή σκουλήκια από τους Lee, Feinbaum & Ambros.
- Μια πρωτεΐνη στο *C.elegans*, lin-14, ρυθμίζεται από ένα μικρό προϊόν RNA του γονιδίου lin-4, το οποίο μεταγράφεται από ένα πρόδρομο μόριο 61 νουκλεοτιδίων που ωριμάζει σε ένα μόριο RNA 22 νουκλεοτιδίων που είναι εν μέρει συμπληρωματική με πολλαπλές αλληλουχίες στο 3' UTR του lin-14 mRNA.
- Μερικά χρόνια αργότερα, οι Αμερικανοί επιστήμονες Andrew Fire και Craig Mello ανακάλυψαν ότι η ταυτόχρονη έγχυση νοήματος και αντιπληροφοριακού dsRNA του γονιδίου unc-22 (το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μυοϊνώματος) στις γονάδες του *C. elegans* οδήγησε σε έντονες συσπάσεις στην επόμενη γενιά.
 - ο βραβείο Nobel στη Φυσιολογία ή Ιατρική το 2006 στους Andrew Z. Fire και Craig C. Mello για την ανακάλυψη της "RNA παρεμβολής– σίγαση γονιδίων μέσω δίκλωνων μορίων RNA".
 - Μικρά μόρια RNA «ξεγελάνε» το κύτταρο στο να καταστρέψει συγκεκριμένα mRNA πριν να παράγει πρωτεΐνη
 - Άρχισαν την εργασία τους το 1998.



Η ανακάλυψη των siRNAs

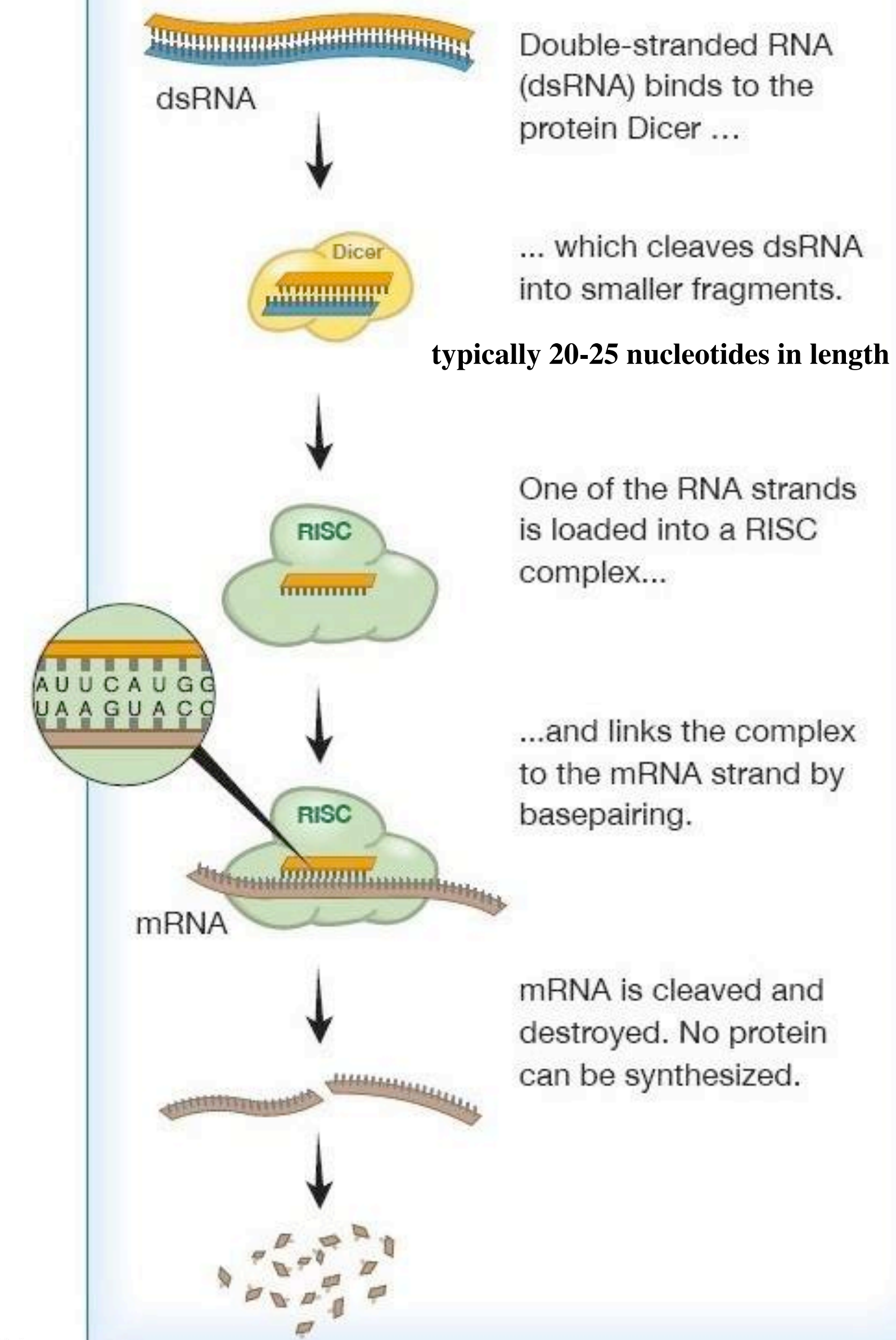
- Ο μηχανισμός PTGS και τα αντινοσηματικά RNAs ανακαλύφθηκαν πρώτα στα φυτά
- Το 1998, οι Andrew Fire και Craig Mello δημοσίευσαν ένα καθοριστικό για τη Μοριακή Βιολογία άρθρο αναγνωρίζοντας δίκλινα μόρια RNA (double-stranded RNAs, dsRNA) ως τους φορείς του μηχανισμού PTGS στο σκουλήκι (*Caenorhabditis elegans*), ένα φαινόμενο που ονόμασαν RNA interference (RNAi).
 - Μικρά μόρια RNA «ξεγελάνε» το κύτταρο στο να καταστρέψει συγκεκριμένα mRNA πριν να παράγουν πρωτεΐνη
- Βιοχημικές μελέτες που ακολούθησαν μετά την ανακάλυψη του μηχανισμού RNAi στο *C. elegans* (Fire et al., 1998) αποκάλυψαν ότι μικρά RNAs επεξεργάζονται από **δίκλινα RNAs, dsRNA** (Zamore et al., 2000).
- Επειδή αυτά τα dsRNAs μπορούσαν να πραγματοποιήσουν ανασύσταση των συμπλόκων αποσιώπησης, ονομάστηκαν siRNAs.
- Η γονιδιακή ρύθμιση μέσω siRNA αρχικά έμοιαζε να υπάρχει μόνο σε οργανισμούς που έχουν RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση RNA (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), η οποία όμως δεν υπάρχει στα θηλαστικά. Σχετικά πρόσφατες μελέτες όμως έχουν δείξει ότι τα siRNAs υπάρχουν και στα θηλαστικά αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (Watanabe et al. 2008).
- Πολύ σύντομα μετά την ανακάλυψή τους αποδείχθηκε ότι τα συνθετικά siRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιλεκτικά για την μείωση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης στα θηλαστικά και να έχουν εκτεταμένη εφαρμογή σε λειτουργικές μελέτες γενετικής μηχανικής.
- Αποδείχθηκε ότι έχουν περιορισμένη κλινική εφαρμογή. Τα φάρμακα που βασίζονται στα siRNAs παρουσιάζουν σοβαρές παρενέργειες (τοξικότητα) και μικρή προσβασιμότητα στους ιστούς που στοχεύσουν. Πολλές φαρμακευτικές εταιρίες σταμάτησαν την κλινική έρευνα από το 2010 και μετά.

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. Mel

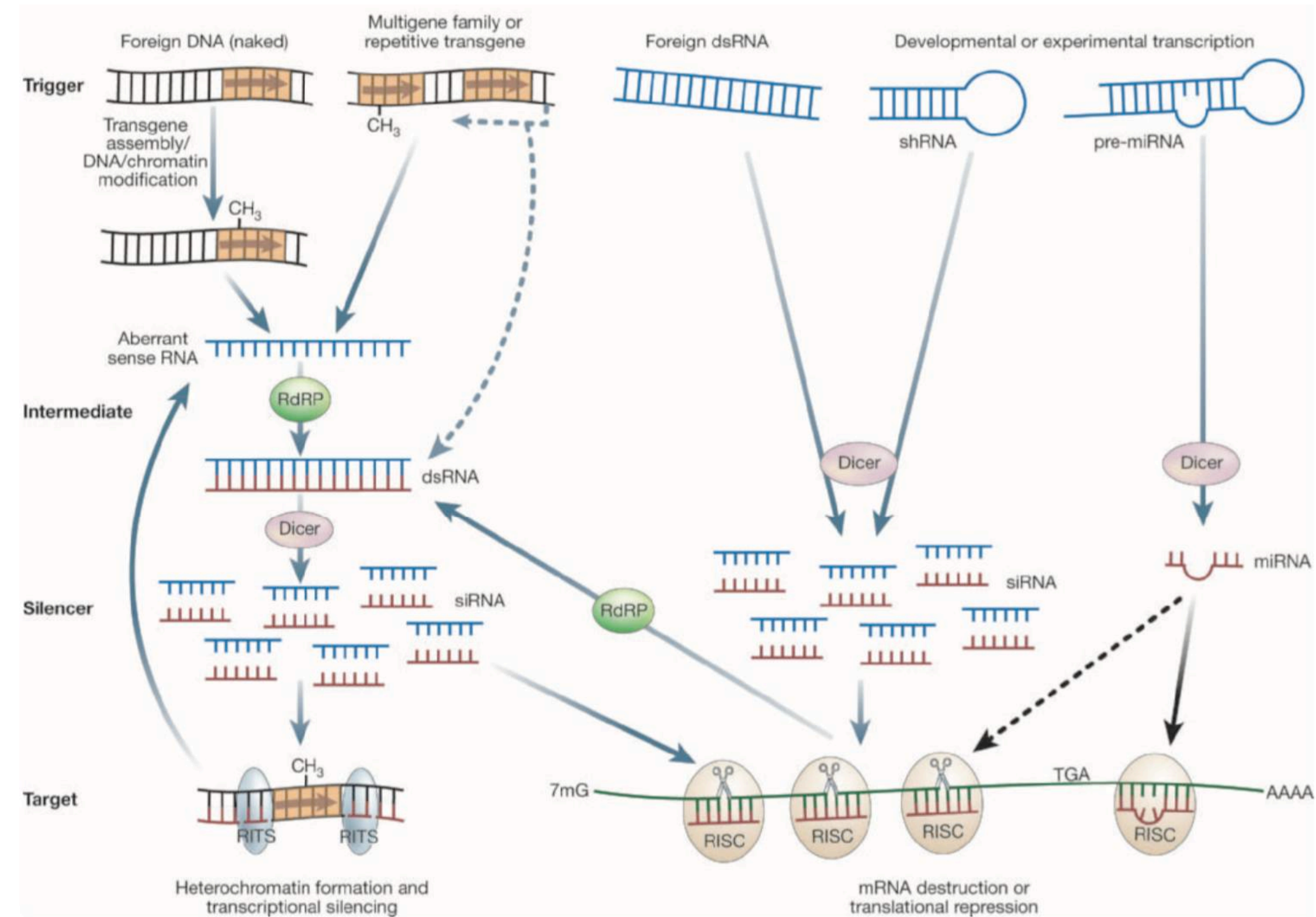
The RNAi mechanism

RNA interference (RNAi) is an important biological mechanism in the regulation of gene expression.



Κύρια χαρακτηριστικά των μικρών RNAs (miRNAs and siRNAs)

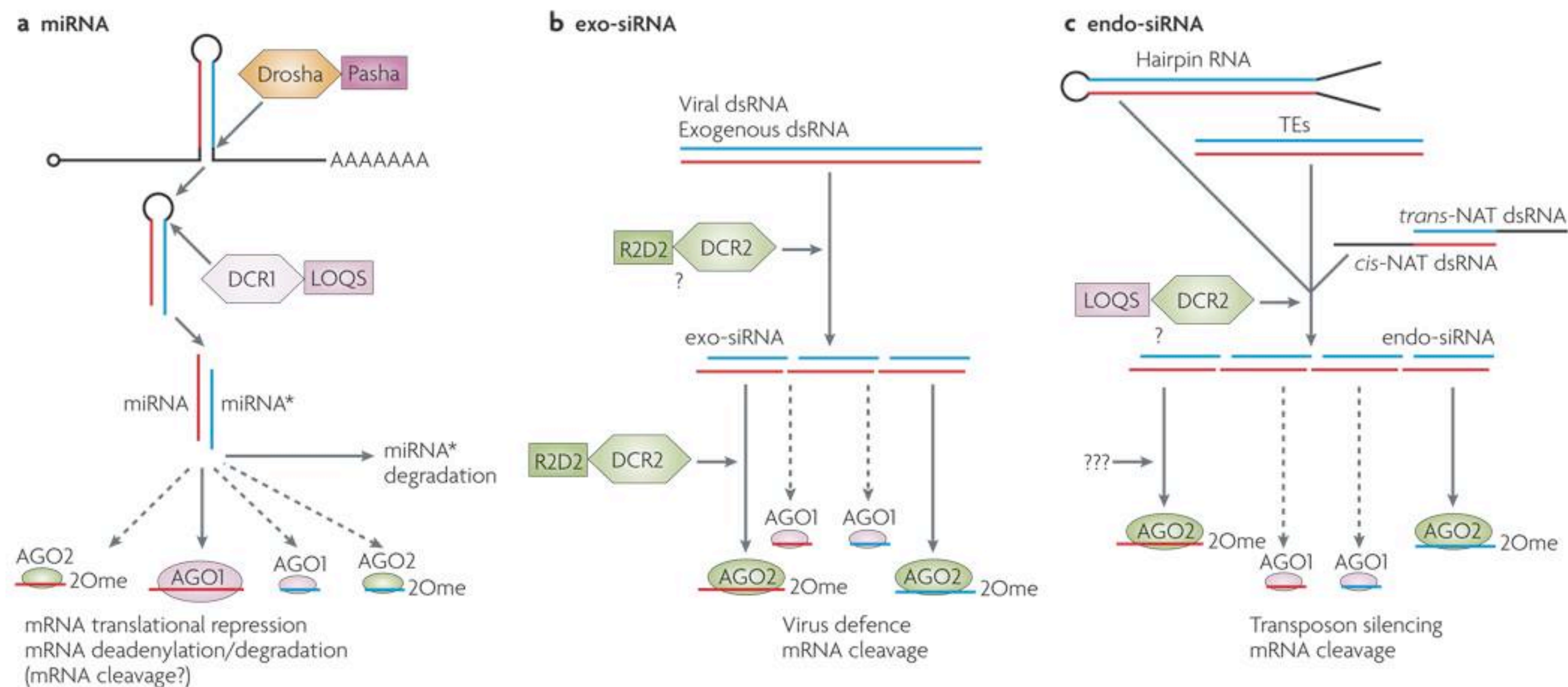
- Ένα μικρό παρεμβαλλόμενο RNA είναι ένα δίκλωνο μόριο RNA μήκους 20 με 25 nt με δύο αζευγάρωτα νουκλεοτίδια στο 3'-άκρο κάθε αλυσίδα της έλικας.
- Μέσα στο κύτταρο, «κόβεται» από την πρωτεΐνη DICER και ενσωματώνεται στο σύμπλοκο αποσιώπησης που επάγεται από RNA (RNA-induced silencing complex, RISC).
- Στη συνέχεια μία από τις αλυσίδες του siRNA που ονομάζεται επιβάτης (passenger) αποικοδομείται και αφαιρείται από το σύμπλοκο.
- Η αλυσίδα που μένει, ονομάζεται **αλυσίδα-οδηγός** και προσδένει σε μια συμπληρωματική περιοχή με αντινοσηματική ενός στόχου RNA strand.
- Εάν αυτή η περιοχή είναι 100% συμπληρωματική τότε ο στόχος RNA αποικοδομείται μέσω των πρωτεϊνών των Αργοναυτών (Argonautes) και έτσι επιτυγχάνεται η γονιδιακή αποσιώπηση.



- Μοντέλο που απεικονίζει διακριτούς ρόλους για dsRNA σε ένα δίκτυο αλληλεπιδρώντων μονοπατιών σιγής. Σε ορισμένες περιπτώσεις το dsRNA λειτουργεί ως αρχικό ερέθισμα (ή έναυσμα), για παράδειγμα όταν εισάγεται πειραματικά ξένο dsRNA. Σε άλλες περιπτώσεις το dsRNA δρα ως ενδιάμεσο, για παράδειγμα όταν τα «παρεκκλίνοντα» mRNA αντιγράφονται από το κυτταρικό RdRP. Η μεταγραφή μπορεί να παράγει dsRNA μέσω ανάγνωσης από γειτονικά μεταγραφήματα, όπως μπορεί να συμβεί για επαναλαμβανόμενες οικογένειες γονιδίων ή συστοιχίες υψηλού αντιγράφου (μπλε διακεκομμένα βέλη). Εναλλακτικά, η μεταγραφή μπορεί να ενεργοποιηθεί πειραματικά ή αναπτυξιακά, για παράδειγμα στην έκφραση γονιδίων κοντής φουρκέτας (shRNA) και γονιδίων ενδογενούς φουρκέτας (miRNA). Τα μικρά προϊόντα RNA της αντίδρασης επεξεργασίας dsRNA με τη μεσολάβηση Dicer οδηγούν διακριτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα στους στόχους τους. Αυτά τα σύμπλοκα σιγής περιλαμβάνουν το επαγόμενο από RNA σύμπλοκο σιγής (RISC), το οποίο εμπλέκεται στην καταστροφή του mRNA και τη μεταφραστική καταστολή, και το επαγόμενο από RNA σύμπλοκο μεταγραφικής σιγής (RITS), το οποίο εμπλέκεται στη σίγηση της χρωματίνης. CH₃, τροποποιημένο DNA ή χρωματίνη. 7mG, 7-μεθυλγουανίνη; AAAA, ουρά πολυαδενοσίνης; TGA, κωδικόνιο τερματισμού μετάφρασης. Προσαρμογή από Mello et al., Εικόνα 2 (2004).

RNA-διαμεσολαβούμενη γονιδιακή αποσιώπηση

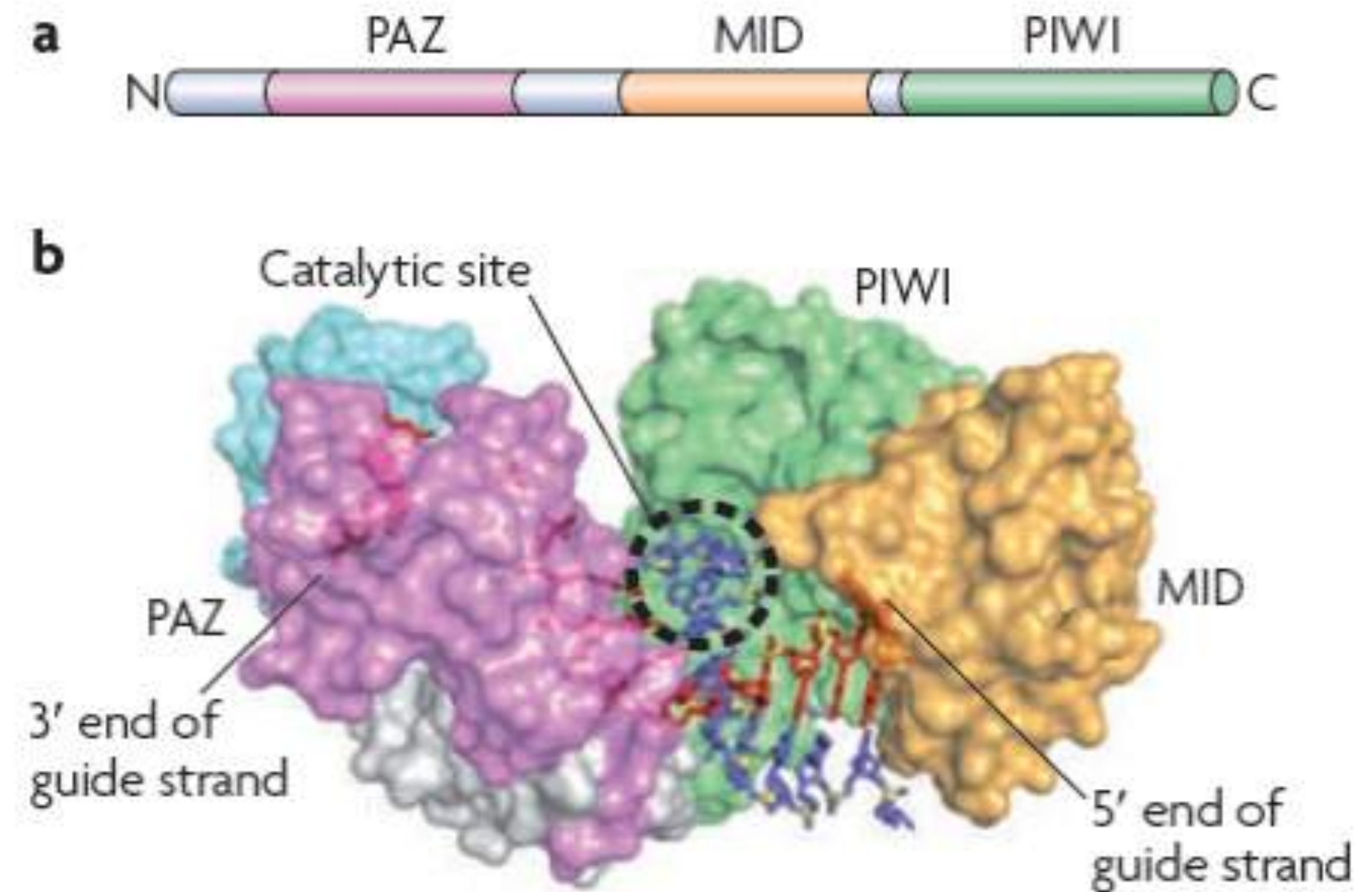
Okamura K, Lai EC. Endogenous small interfering RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Sep;9(9):673-8. doi: 10.1038/nrm2479

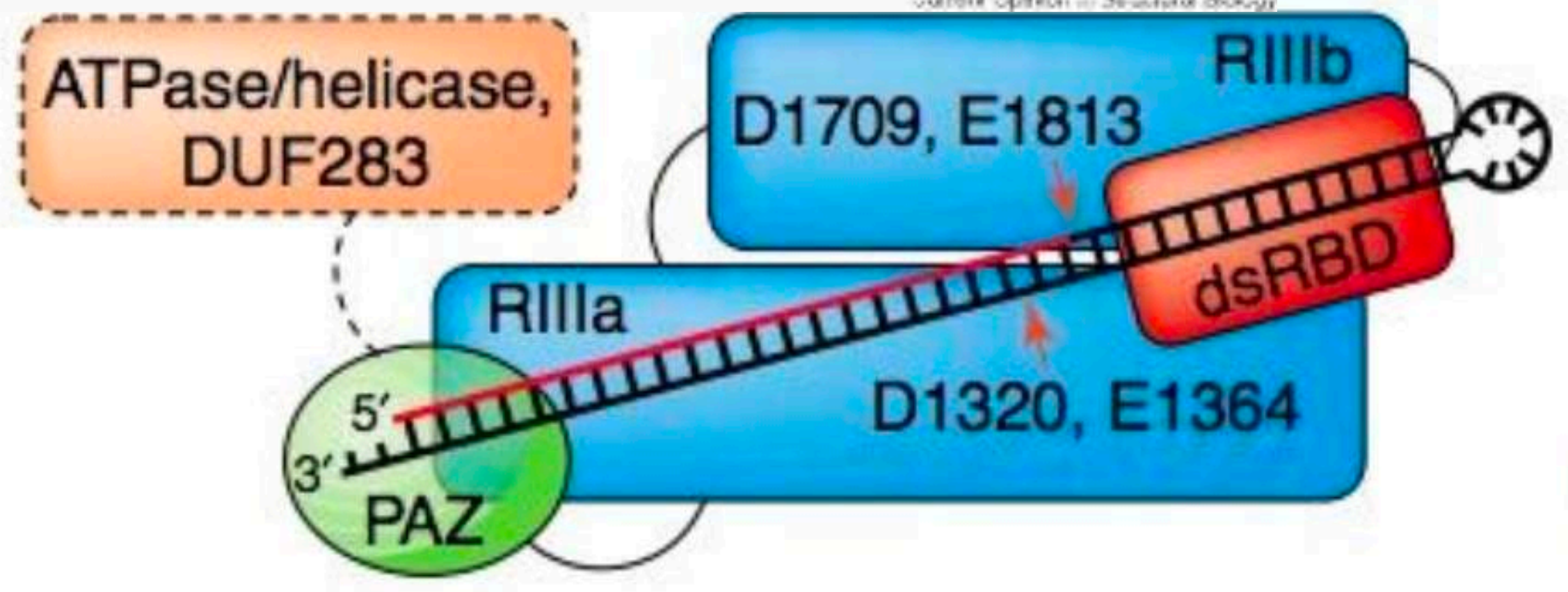
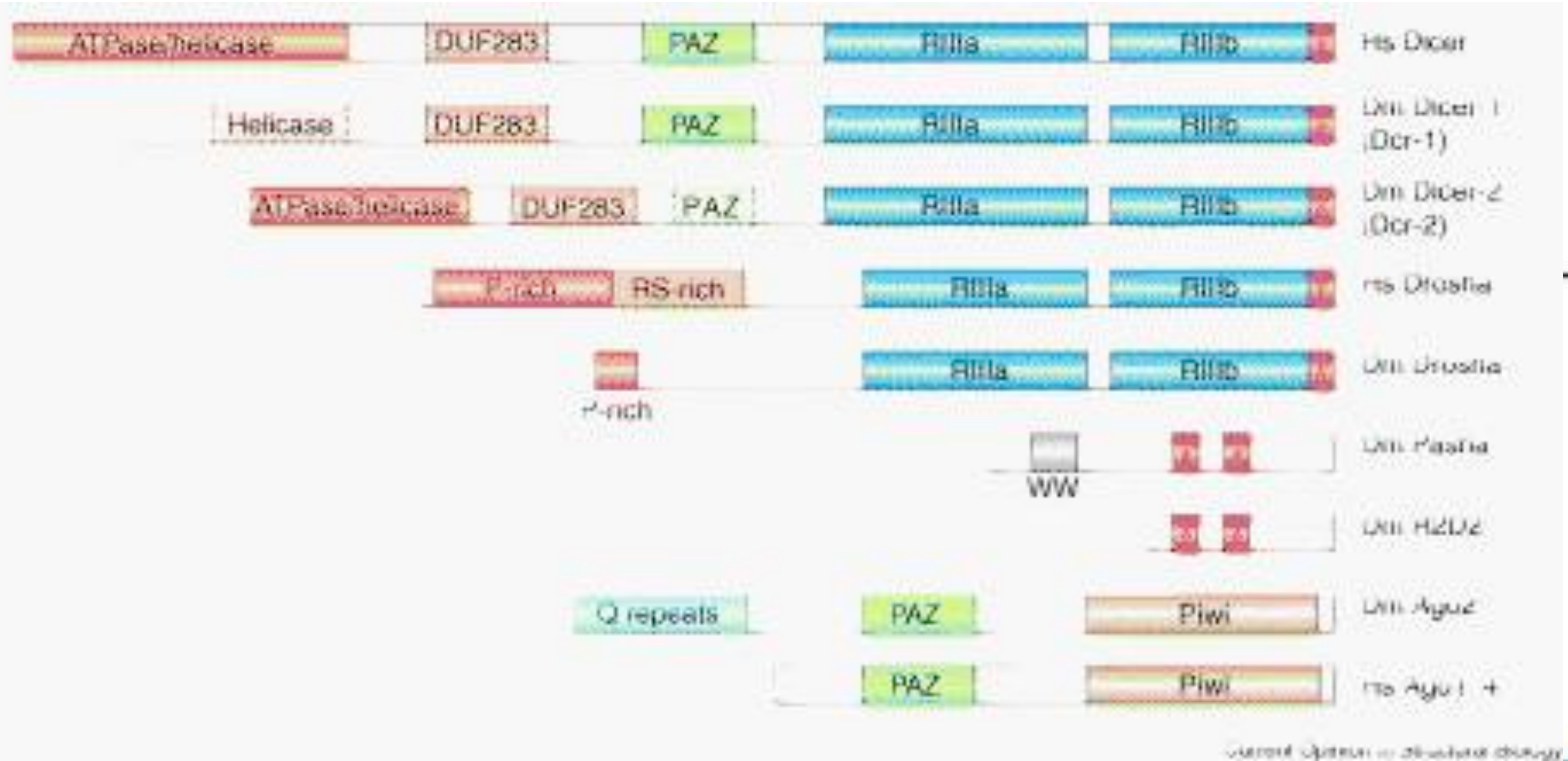


- Η γονιδιακή ρύθμιση με τη μεσολάβηση μικρών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων, συμπεριλαμβανομένου του μικρού παρεμβαλλόμενου RNA (siRNA), του microRNA (miRNA), του αλληλεπιδρώντος με τις πρωτεΐνες PIWI μικρά RNA (piRNA), και του μικρού παρεμβαλλόμενου DNA (siDNA), έχει αποδειχθεί ότι είναι η θεμελιώδης αρχή στη ρύθμιση πολλών βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της διαφοροποίησης και της ομοιόστασης. Το βασικό στοιχείο ενεργού πρωτεΐνης σε αυτές τις διεργασίες είναι η οικογένεια πρωτεϊνών Argonaute. Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ευκαρυώτες, τα βακτήρια και τα αρχαία
- Τα siRNAs διαμεσολαβούν επίσης μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (transcriptional gene silencing, TGS) σε ένα εύρος οργανισμών όπως τα φυτά και τους μύκητες, μέσω μηχανισμών όπως η μεθυλίωση του DNA (Arabidopsis) ή η μεθυλίωση των ιστονών, όπως πρώτα αποδείχθηκε στη ζύμη ότι ενέχονται στη συναρμολόγηση ετεροχρωματίνης.

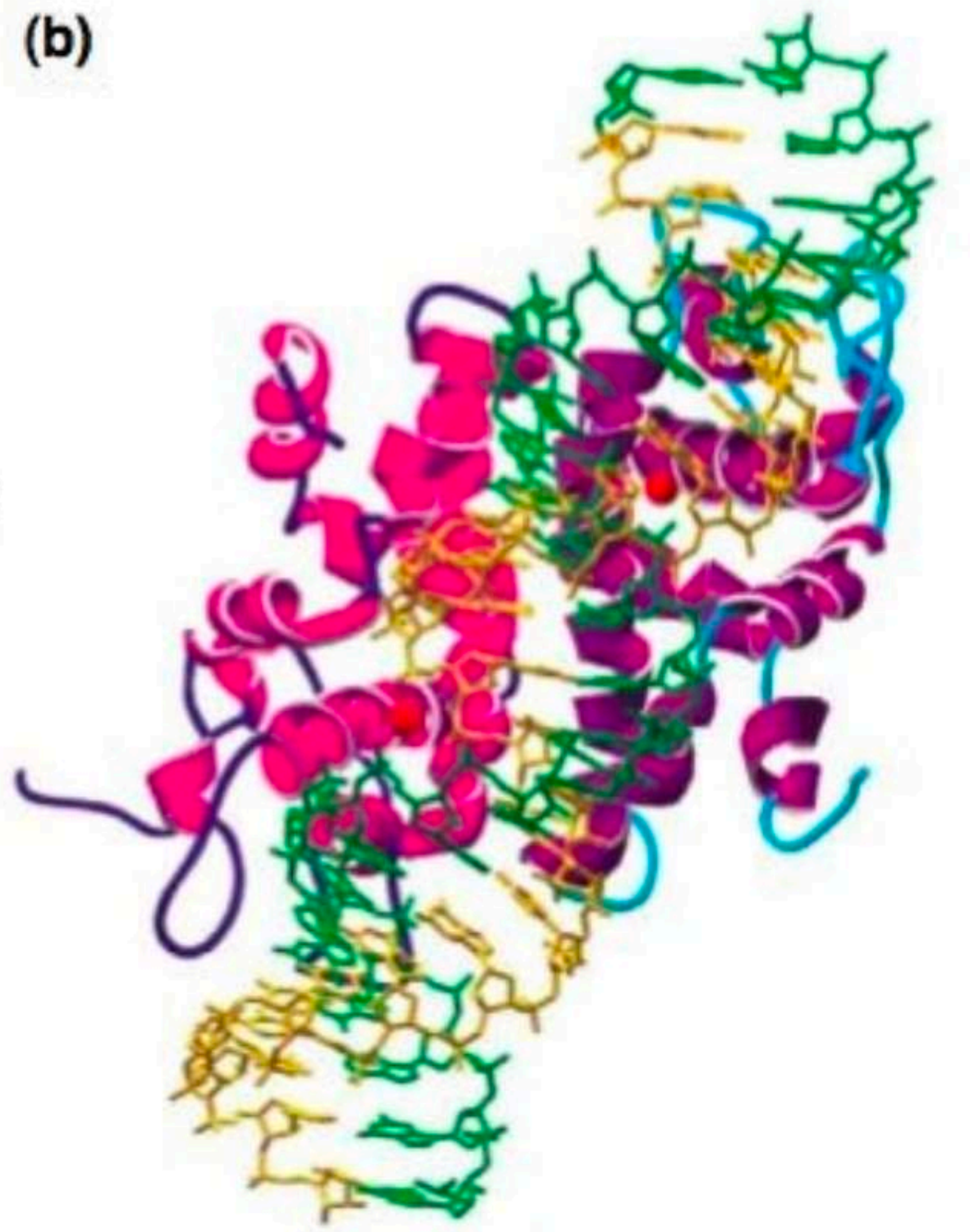
Argonaute-bound small RNAs

- Argonaute proteins lie at the heart of related small-RNA pathways that operate in organisms as diverse as Archaea, plants, and animals. They bind various small RNAs that are < 32 nucleotides (nt) in length, which guide the Argonaute complexes to their regulatory targets.
- Argonautes are structurally organized into N-terminal, PAZ, middle (MID), and PIWI domains. Numerous crystal structures of archaeal, bacterial, and eukaryotic AGO proteins in complex with nucleic acids have indicated recognition of the 5' monophosphorylated end within a conserved basic pocket formed by the MID domain, while the 3' hydroxyl end is anchored in the PAZ domain
- The PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domain was identified from structure-function studies as a RNA-binding module, with subsequent structure-function studies on RNA-bound complexes defining the principles underlying recognition of a 2-nt overhang at the 3' end of double-stranded RNA (dsRNA), as well as recognition of the 3' end of single-stranded RNA (ssRNA)
- The piwi domain is a protein domain found in piwi proteins and a large number of related nucleic acid-binding proteins, especially those that bind and cleave RNA. The function of the domain is double stranded-RNA-guided hydrolysis of single stranded-RNA, as has been determined in the argonaute family of related proteins





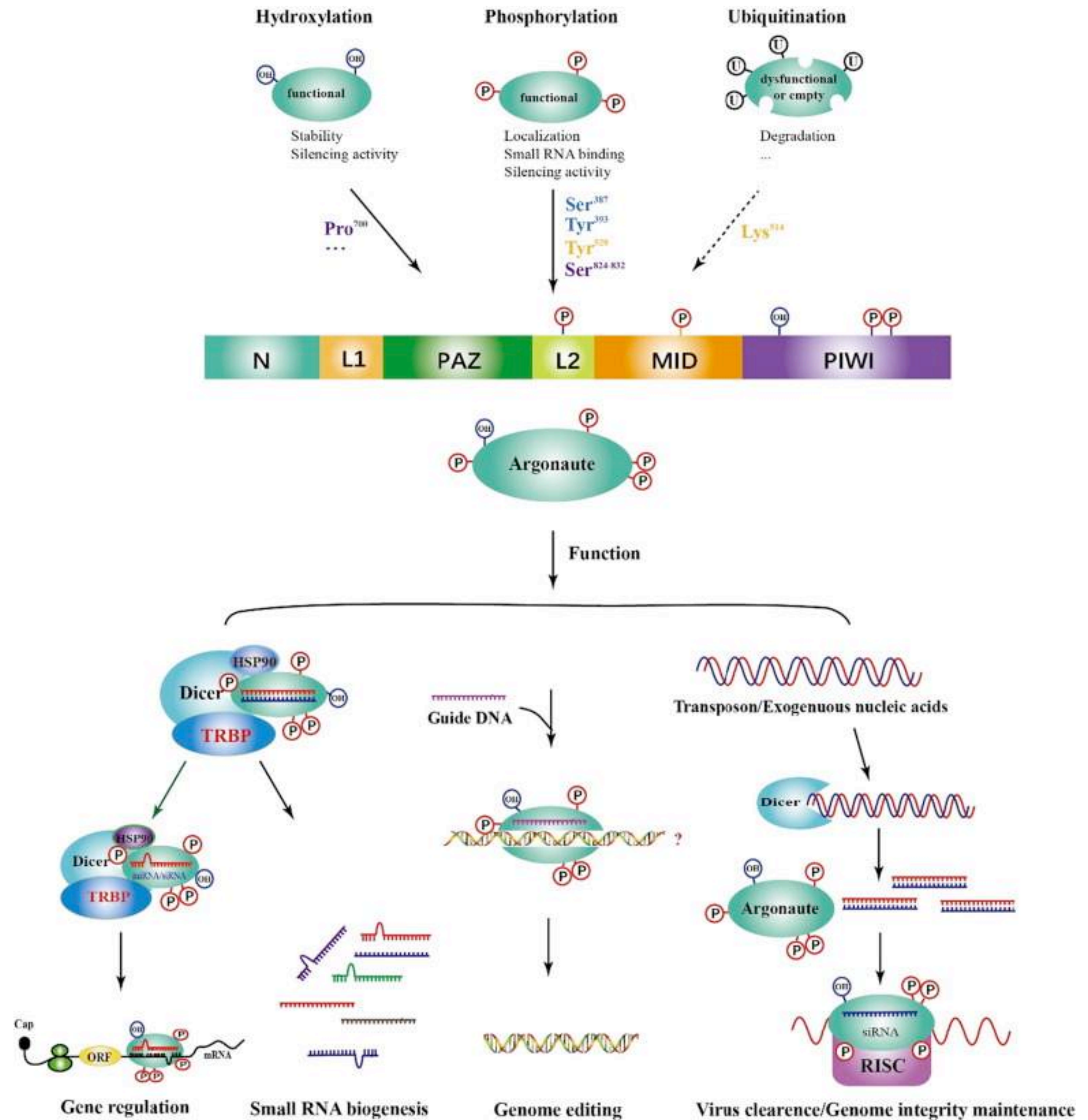
(b)



Χαρακτηριστικά κανονικών sRNAs

- Ενέχονται στην αποσιώπηση ή το μετα-μεταγραφικό έλεγχο γονιδίων mRNAs
- Ενέχονται στην επιγενετική ρύθμιση .
- Συγκεκριμένο μέγεθος (~20–32 νουκλεοτίδια)
- Προσδένουν τις πρωτεΐνες της οικογένειας Αργοναυτών (Argonaute, Ago)
- Οι πρωτεΐνες Argonaute αποτελούν ένα κύριο συστατικό των RISCs με μικρά RNA και/ή πρόσθετες πρωτεΐνες μέσω άμεσης ή έμμεσης δέσμησης, συμπεριλαμβανομένων των Dicer, GW182, πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 /90 (Hsp70/Hsp90). Αυτά τα σύμπλοκα όχι μόνο εμπλέκονται στη βιογένεση μικρού RNA από οδούς εξαρτώμενες ή ανεξάρτητες από του συμπλόκου Drosha/ DiGeorge (DGCR8), αλλά παρέχουν επίσης θέσεις αγκύρωσης για μικρά RNAs για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο κυτταρόπλασμα.
- Στη διαδικασία αναγνώρισης στόχου, οι πρωτεΐνες Ago μπορούν να παρακάμψουν τη δευτερογενή δομή και τους πρωτεϊνικούς φραγμούς για να διαχυθούν κατά μήκος του υποστρώματος και να σαρώσουν αποτελεσματικά έναν κανονικό στόχο μέσω χαλαρών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέος και διατμηματικής μεταφοράς [22].
- Εν τω μεταξύ, αναφέρθηκε επίσης ότι οι πρωτεΐνες Argonaute μπόρεσαν να εντοπιστούν στον πυρήνα, όπου εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση χρωματινών μέσω τροποποίησης ιστόνης, μεθυλίωσης DNA, εναλλακτικού ματίσματος προδρόμων mRNA και διεργασιών αποκατάστασης θραύσης DNA διπλής έλικος.
- Επιπλέον, οι πρωτεΐνες Argonaute συνδέονται επίσης στενά τον καρκίνο

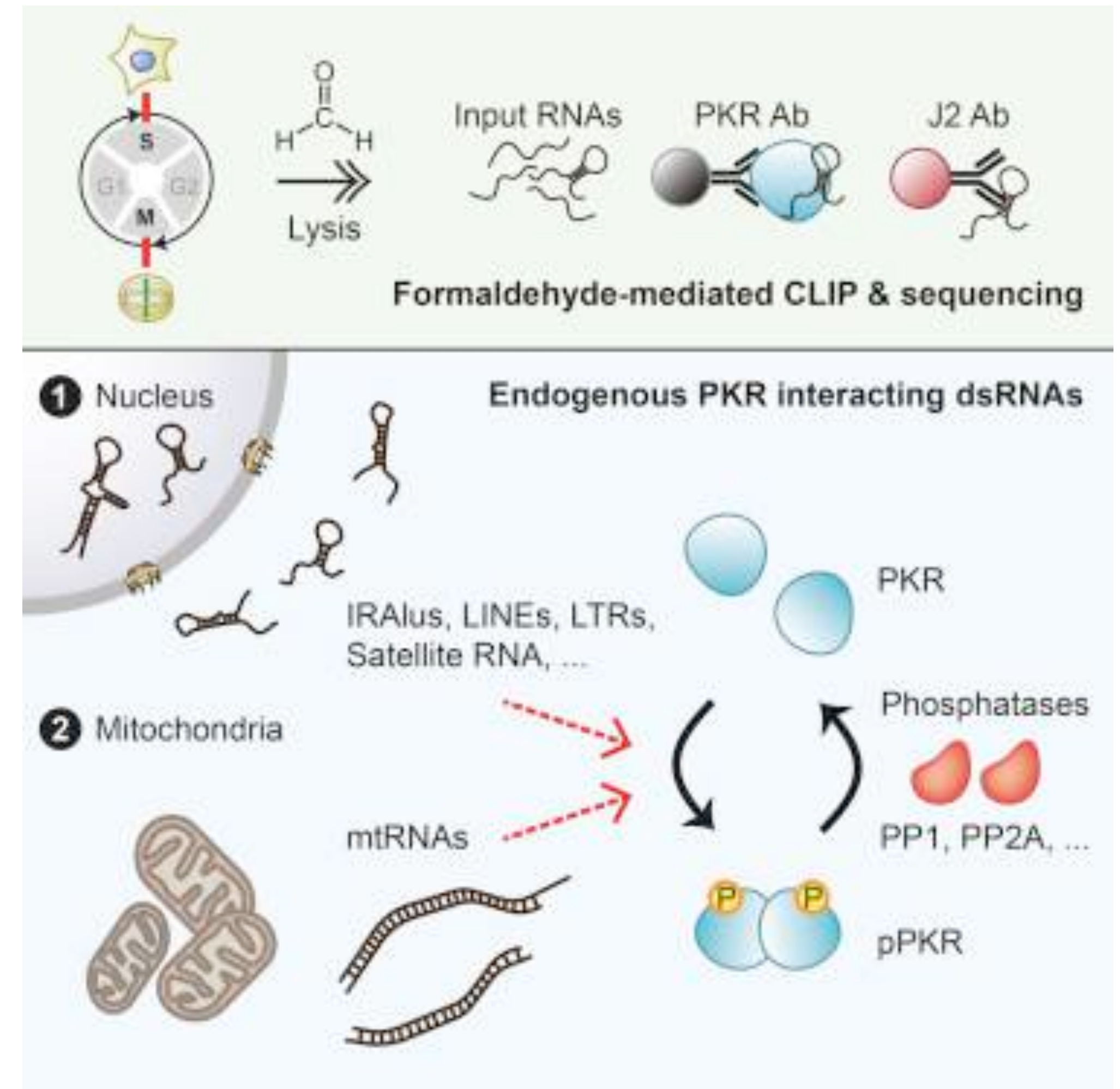
Wu J, Yang J, Cho WC, Zheng Y. Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. J Adv Res. 2020 Apr 29;24:317-324. doi: 10.1016/j.jare.2020.04.017.



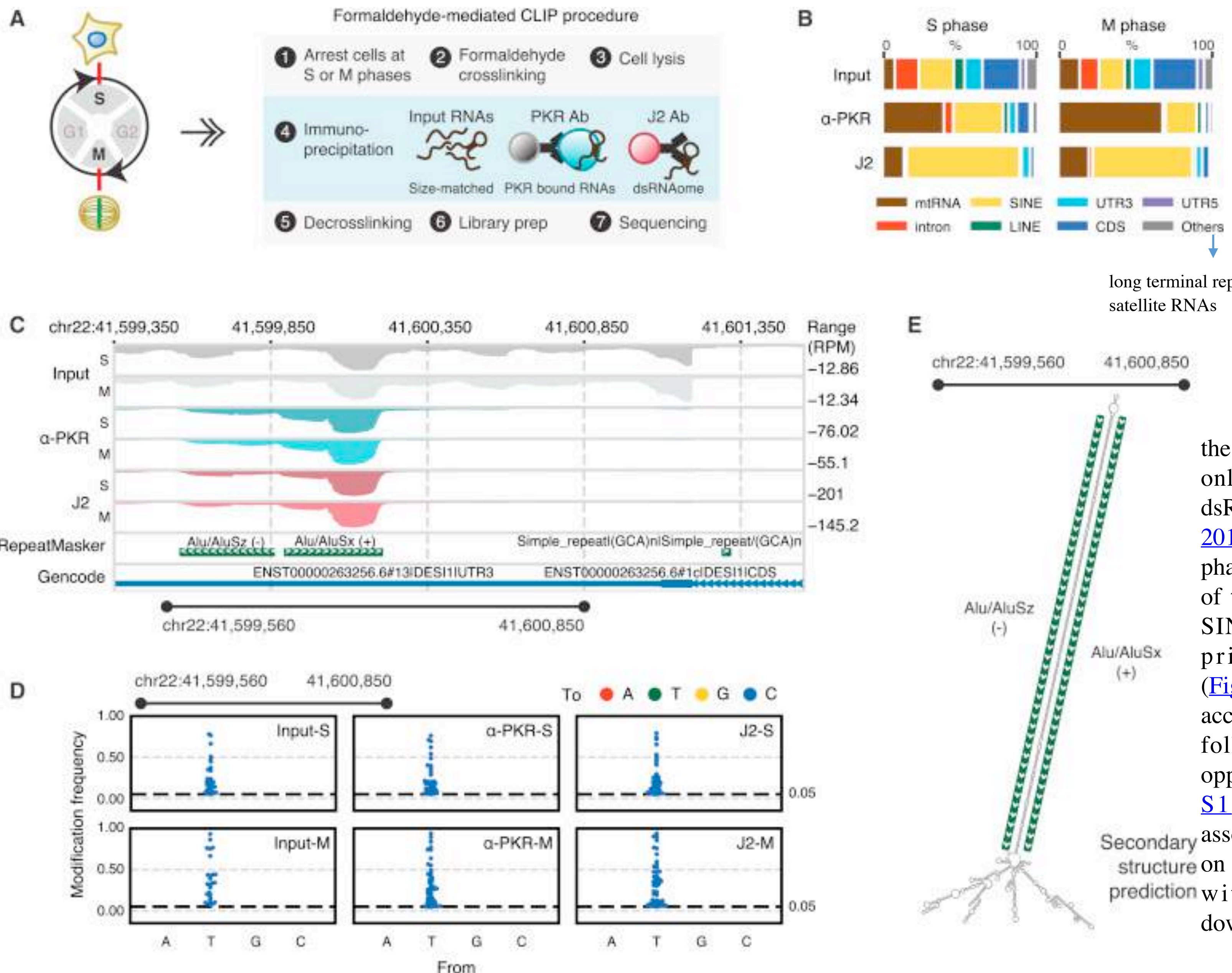
Sources of Endogenous dsRNA

- **There are three main sources of endogenous dsRNA:** 1. mitochondrial transcripts, 2. repetitive nuclear sequences, including short and long interspersed elements (SINEs, LINEs), and 3. endogenous retroviruses (ERVs) as well as natural sense-antisense transcript pairs.
- Human mitochondria have a circular genome of 16,566 bp, with a guanine-rich heavy strand and a guanine-poor light strand, depending on buoyant density. Both strands are equally transcribed, resulting in complementary transcripts that may bind to each other, though the light strand undergoes rapid degradation. Complementarity encompasses the length of the entire mitochondrial genome, as shown by electron microscopic analysis. The mitochondrial DNA encodes 13 genes, 12 of which are encoded by the heavy strand and one by the light strand. Under physiological circumstances, the light strand is rapidly degraded by two enzymes, polynucleotide phosphorylase (PNPase) and the helicase HSuv.

Activated/phosphorylated PKR (pPKR) suppresses global translation by phosphorylating eIF2 α on Ser51, which blocks translational initiation by preventing the GDP-to-GTP exchange of eIF2 by eIF2B



In infected cells, PKR recognizes long viral double-stranded RNAs (dsRNAs)



DES11 mRNA

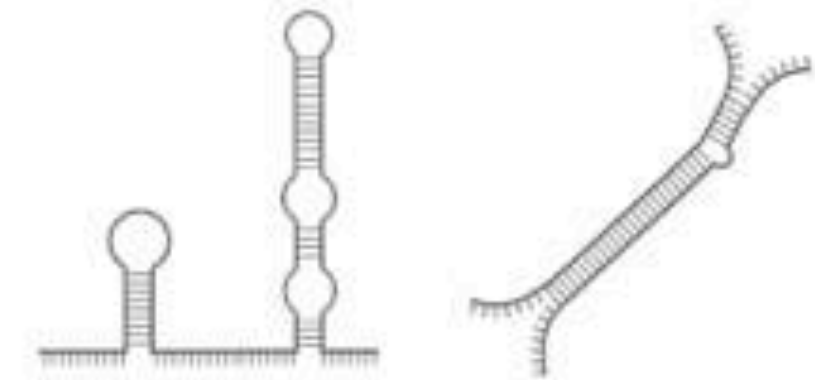
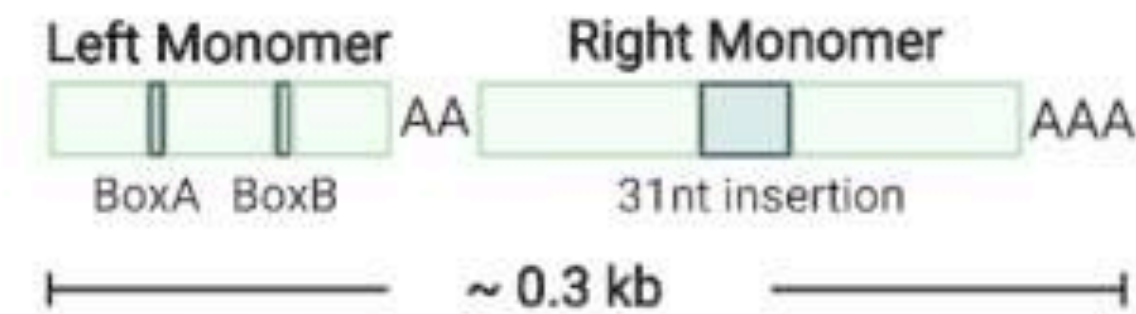
Collectively, these findings established that mitochondria are an important source of dsRNA which may be released into the cytoplasm upon stress-mediated mitochondrial permeabilization [32].

the enrichment of IRAlus, which are the only known PKR-activating cellular dsRNAs in humans (Elbarbary et al., 2013, Kim et al., 2014a). In both S and M phase libraries, we found that over 20% of the sequencing reads were mapped to SINEs, which are mostly Alus in primates (Lander et al., 2001) (Figure 1B). Moreover, the reads were accumulated at regions where an Alu is followed by another Alu with the opposite orientation, IRAlus (Figures S1A and S1B). We defined Alu associations as direct or inverted based on the orientation of neighboring Alus within the 300 bp upstream or downstream in the genome.

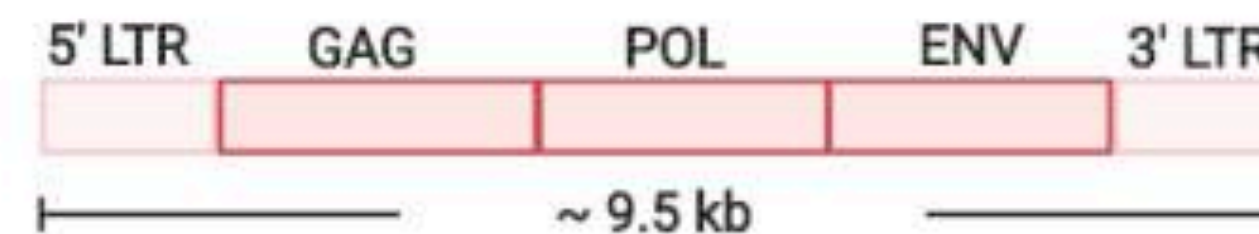
Repetitive DNA Sequences

- For dsRNA originating from nuclear DNA, A-to-I editing provides an accurate readout to assess genome-wide dsRNA formation. In humans, 62.9% of all edited sites map to repeat regions, including SINEs, LINEs, endogenous retroviruses, and DNA transposons, whereas protein-coding transcripts are hardly edited at all. Overall, editing shows distinct species' variability and depends on the nature of the repetitive elements rather than the complexity of the organism.
- Alu repeats are commonly found in intergenic regions (autonomous) as well as in introns and UTRs of genes (mRNA-embedded elements) [38]. Autonomous Alu elements constitute a small portion of the repetitive genome and are highly induced by viral infection, heat shock and cycloheximide treatment [39]. Stress enhances the activity of the RNA polymerase III (viral infection) or increases the chromatin accessibility of Alu elements (heat shock), which is reversed with recovery from stress. As compared to autonomous Alus, embedded Alu elements represent a higher proportion of repeated sequences. Because of their enrichment in UTRs, embedded Alus play an important function in gene expression via the stabilization of mRNA, as well as its localization and translation
- ERVs: Human endogenous retroviruses share a comparable structure with exogenous retroviruses, the protein coding genes gag, pro (protease), pol and env flanked by two terminal repeats (5' and 3' LTR) (Figure 1). ERVs comprise up to 8% of the human genome; however, most open reading frames (ORFs) are mutated [45]. Nevertheless, ERV-related transcripts can be detected in most human tissues [46], particularly when repressive DNA methylation is inhibited. In contrast to the mutated protein coding genes, ERV-related LTRs have retained their promoter activity and provide alternative transcriptional control elements for cellular genes or drive the production of non-coding cellular RNA. LTR promoters are bi-directional and can lead to widespread dsRNA formation [48,49]; alternatively, two adjacent ERVs in opposite orientations could fold back and form a hairpin structure.
- LINEs: Long interspersed nuclear elements (LINEs) are 6–7 kb in size and constitute up to 20% of the human genome. Full-length copies contain two open reading frames (ORF1 and ORF2) which encode proteins essential for retro-transposition [52] (Figure 1). ORF1 makes a 40-kDa RNA-binding protein (RBP 40) which plays an important role in activating the host innate immune system, while ORF2 encodes an endonuclease and the reverse transcriptase [53]. Transcription is driven by a promoter that harbors several transcription factor binding sites as well as a CpG island. Most LINEs are inactive because of truncations, mutations and rearranged copies; however, a small number of elements are functional [54].

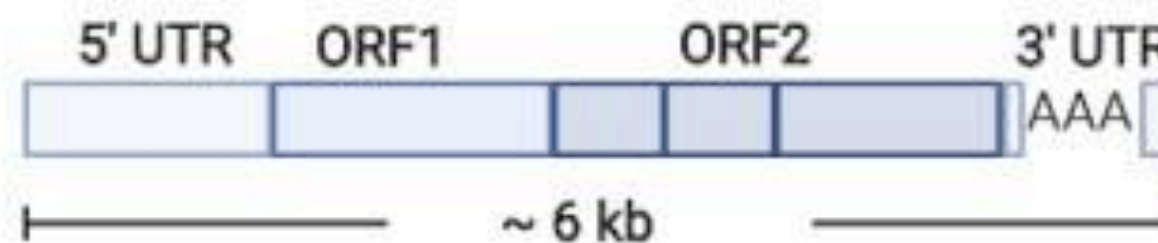
ALU



ERV



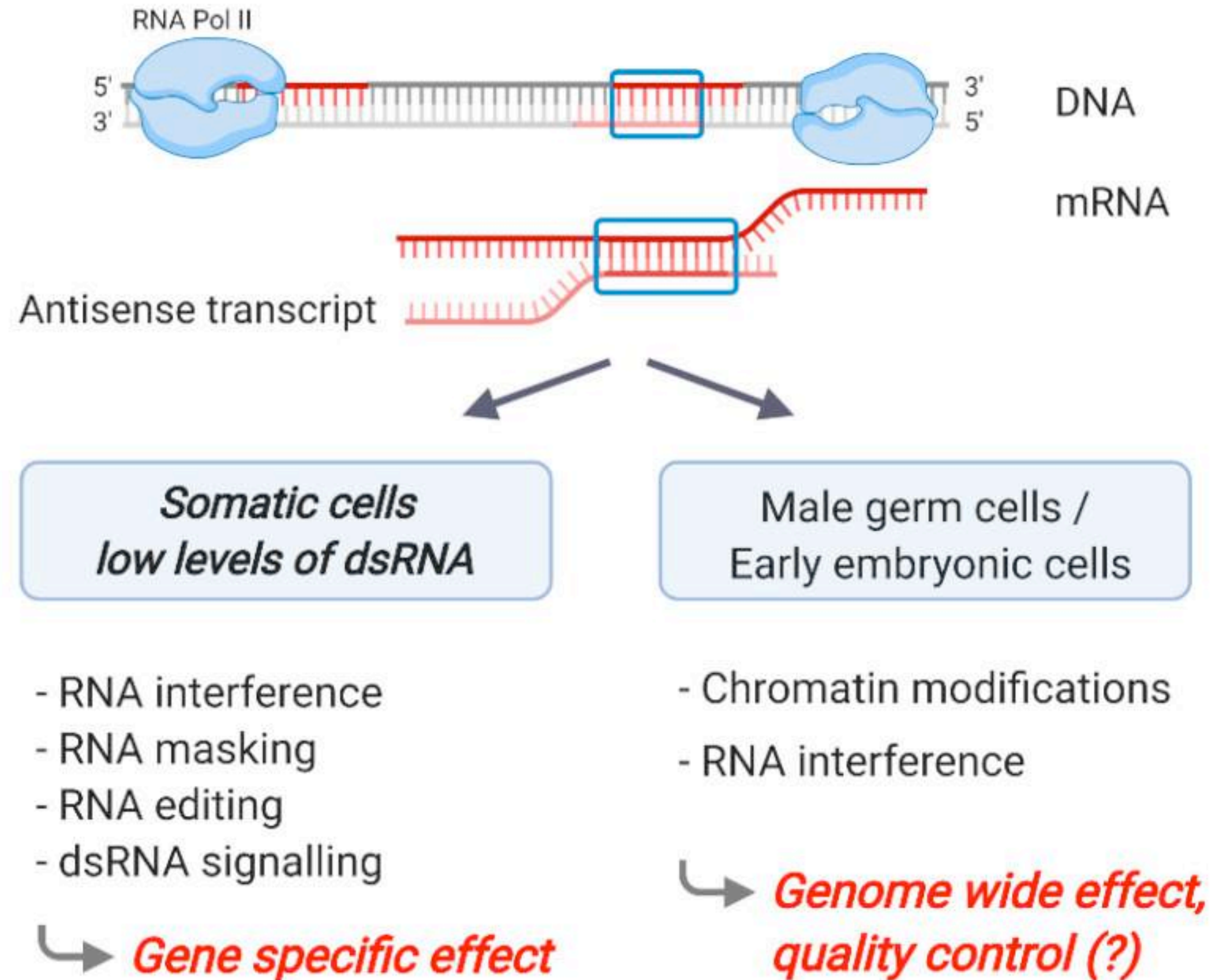
LINE 1



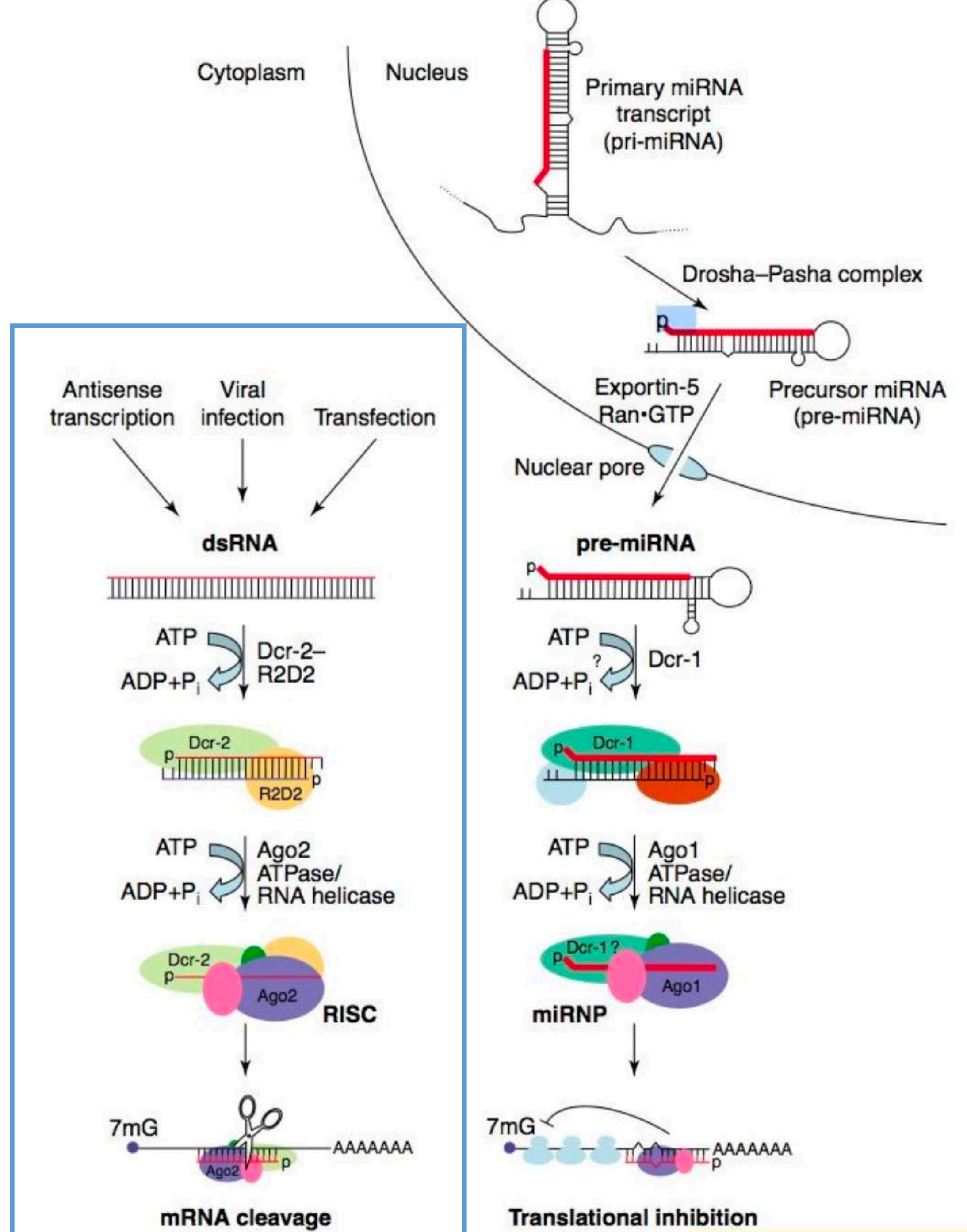
Sadeq S, Al-Hashimi S, Cusack CM, Werner A. Endogenous Double-Stranded RNA. *Noncoding RNA*. 2021 Feb 19;7(1):15. doi: 10.3390/ncrna7010015. PMID: 33669629; PMCID: PMC7930956.

Natural antisense transcripts (NATs)

- Natural antisense transcripts: According to the gencode biotype definition, antisense transcripts are “transcripts that overlap the genomic span (i.e., exon or introns) of a protein-coding locus on the opposite strand”. This definition excludes protein-coding antisense transcripts and read-through transcripts from tail-to-tail arranged gene pairs; if those are included, 40–70% of loci show bi-directional transcription [58,59]. Hence, if a sense/antisense transcript pair is co-expressed in the same cell, dsRNA structures are potentially formed (Figure 2). To what extent hybridization actually occurs is controversial and rather challenging to demonstrate experimentally.



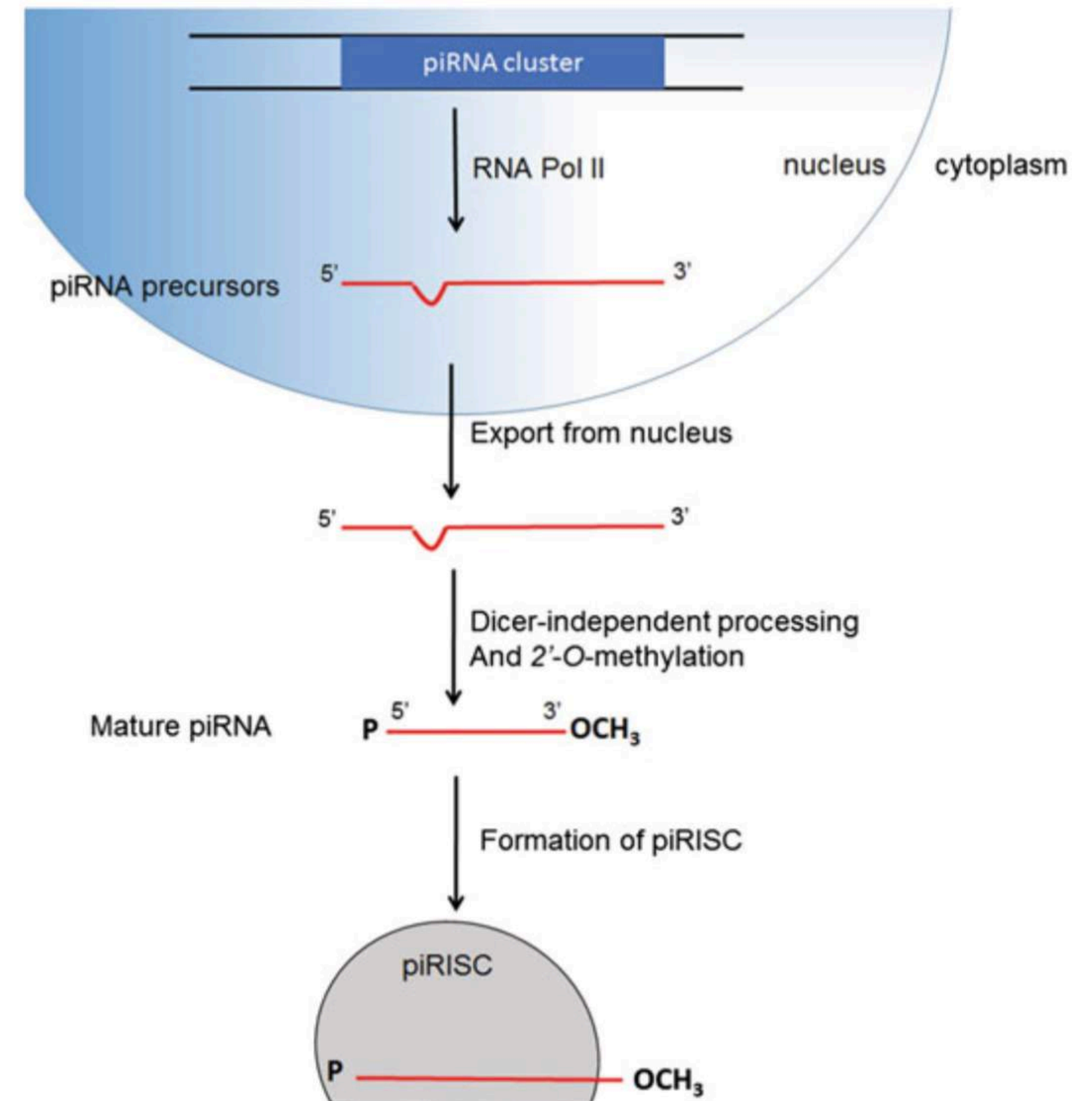
A siRNA vs a miRNA mediated degradation of mRNA



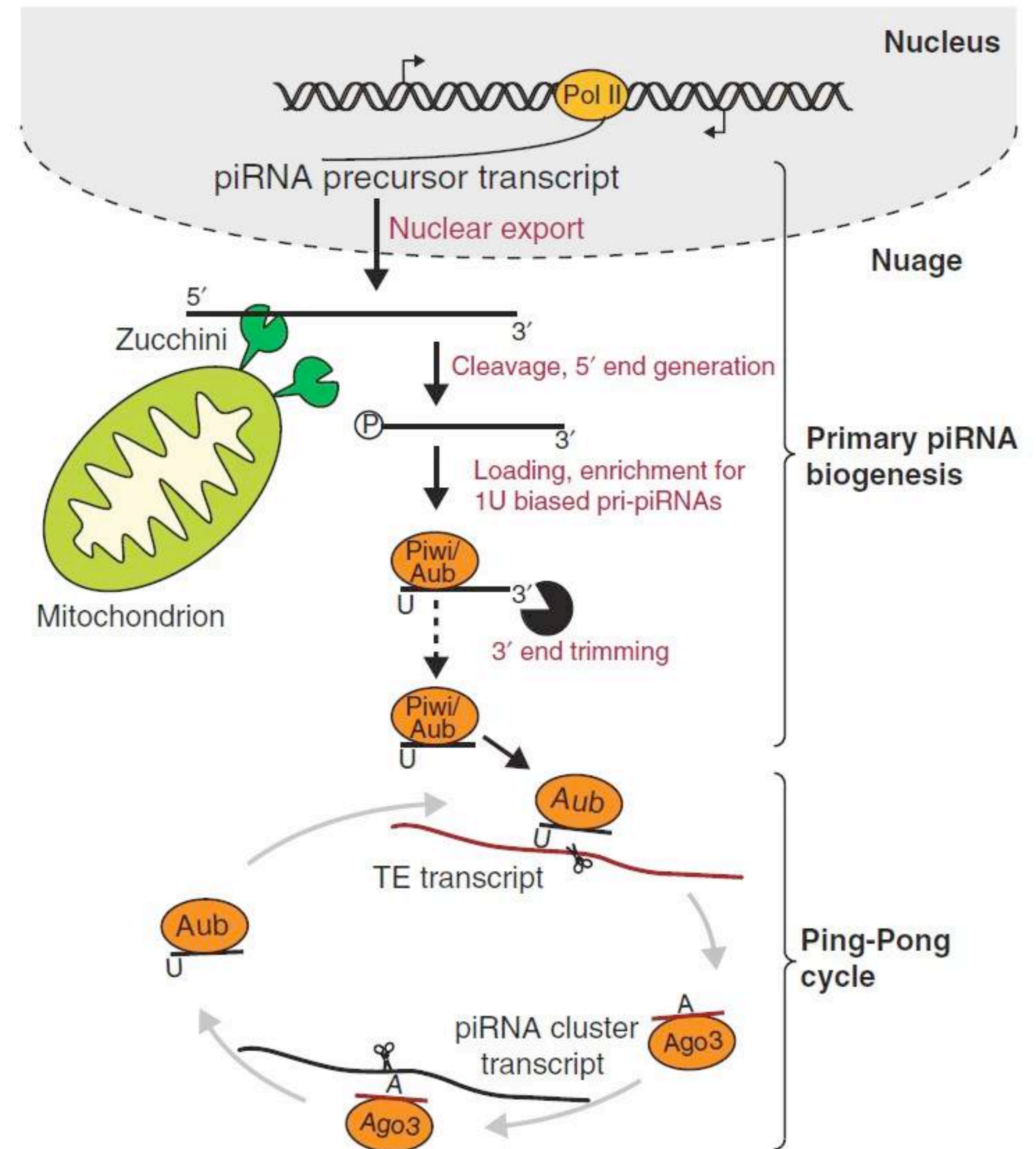
- Τα siRNAs και τα piRNAs), σε αντίθεση με τα miRNAs, τα οποία κόβονται με ένα ακριβή μηχανισμό από το πρόδρομο τους dsRNA, επεξεργάζονται με ένα πιο τυχαίο τρόπο
- Δεν είναι συντηρημένα
- Προέρχονται από ιούς, βακτήρια, περιοχές επαναλήψεων στο πυρήνα και συνθετικά («ξένα») μόρια

Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and piRNA-guided transposon control, transcriptional gene silencing (TGS), post-transcriptional gene silencing (PTGS)

- Τα piRNAs αναγνωρίστηκαν πρώτα ως μικρά RNAs που αλληλοεπιδρούν ειδικά με τις πρωτεΐνες Piwi οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Αργοναυτών, σε γεννητικά κύτταρα από ποντικούς και αρουραίους. Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι βρίσκονται κυρίως σε γαμέτες (αλλά και σωματικά κύτταρα) όλων των θηλαστικών. Σε αντίθεση με τα miRNAs και τα siRNAs, τα piRNAs είναι 24-31 νουκλεοτίδια. Επίσης σε αντίθεση με τα miRNAs, τα piRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II από διαγονιδιακούς τόπους που ονομάζονται συστοιχίες piRNAs (piRNA clusters) ως μεγάλου μήκους συνεχόμενα μονόκλινα πρόδρομα μετάγραφα τα οποία επεξεργάζονται χωρίς την Dicer σε μικρά RNAs των οποίες τα 3' άκρα τροποποιούνται με 2'-O-μεθυλομάδες.
- Τα piRNAs προέρχονται κυρίως από περιοχές επαναλήψεων όπως περιοχές μεταθετών στοιχείων και περιοχές ετεροχρωματίνης και δρουν για την αποσιώπηση τέτοιων περιοχών με εγλωιστικά στοιχεία γιατί η έκφρασή τους αποσταθεροποιεί το γονιδίωμα. Απουσία piRNAs έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε μειωμένη γονιμότητα σε πολλά είδη ζώων.
- Υστερα από τη συναρμολόγηση του συμπλόκου piRISC εισέρχεται στον πυρήνα και καθοδηγεί τη μεθυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 9 (H3K9me3) σε γενετικούς τόπους μεταθετών στοιχείων για τη δημιουργία ετεροχρωματίνης

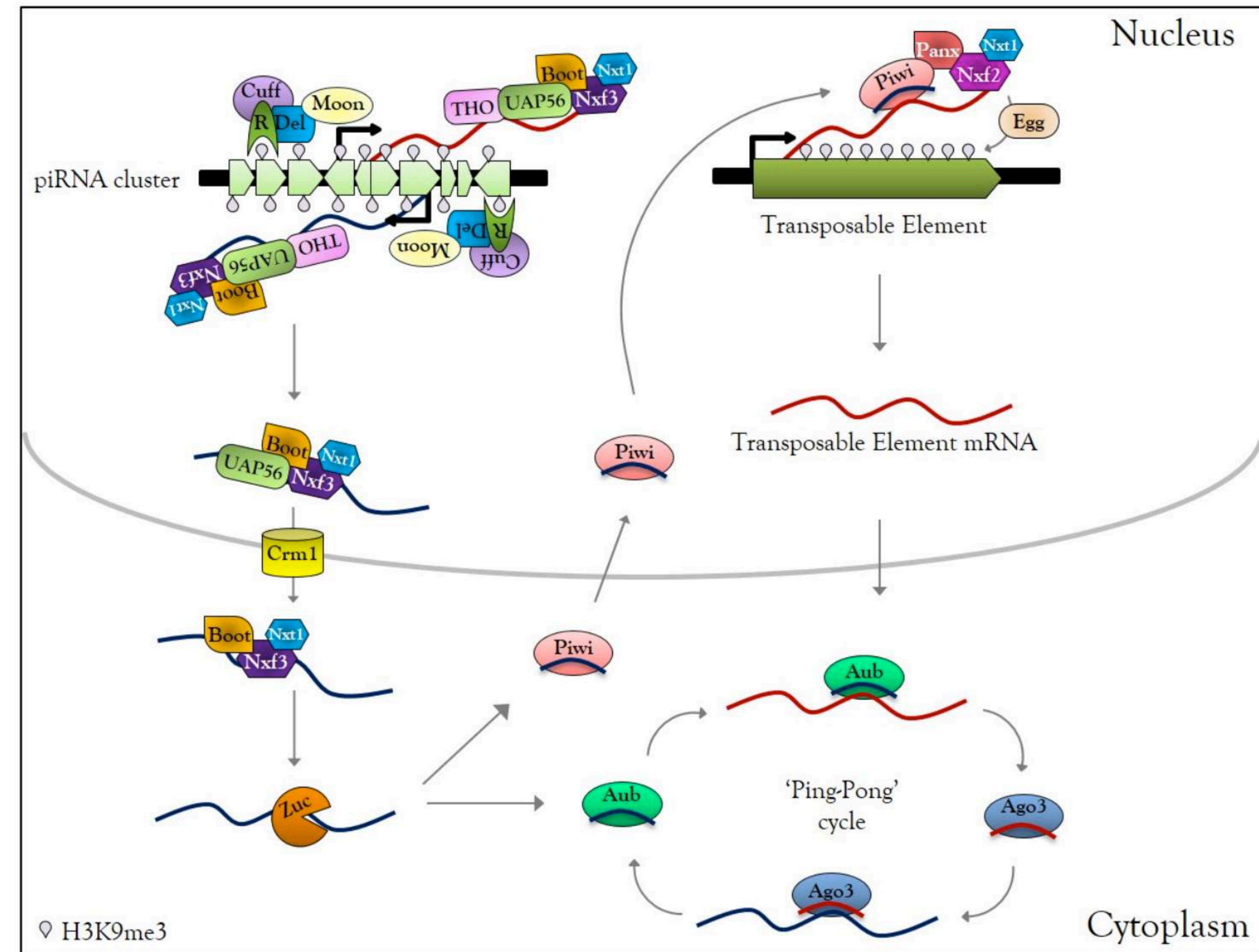


piRNA biogenesis. Two pathways, primary piRNA biogenesis and the Ping-Pong cycle, have been implicated in generation of piRNAs in *Drosophila* germ cells, whereas only primary piRNA biogenesis operates in follicular cells. Long RNAs transcribed from piRNA cluster regions are exported from the nucleus to nuage granules, where many protein components involved in the piRNA pathway localize and where piRNA biogenesis is believed to occur. During primary piRNA biogenesis long piRNA precursors are cleaved by an endonuclease, possibly Zucchini, located in the outer membrane of mitochondria, generating the 5' end of the future piRNA. The cleaved transcript is loaded into Piwi proteins (Piwi and Aub) and then trimmed from the 3' end by an unidentified trimmer nuclease to its final length. In the Ping-Pong cycle, Aub loaded with piRNAs recognizes and cleaves complementary RNAs such as transposon (TE) mRNAs or transcripts derived from the opposite strand of the same piRNA cluster. This cleavage produces the 5' end of a new piRNA that is loaded into Ago3 and in turn can induce cleavage of complementary RNA. This generates a new piRNA that is identical in sequence to the piRNA that initiated the cycle.

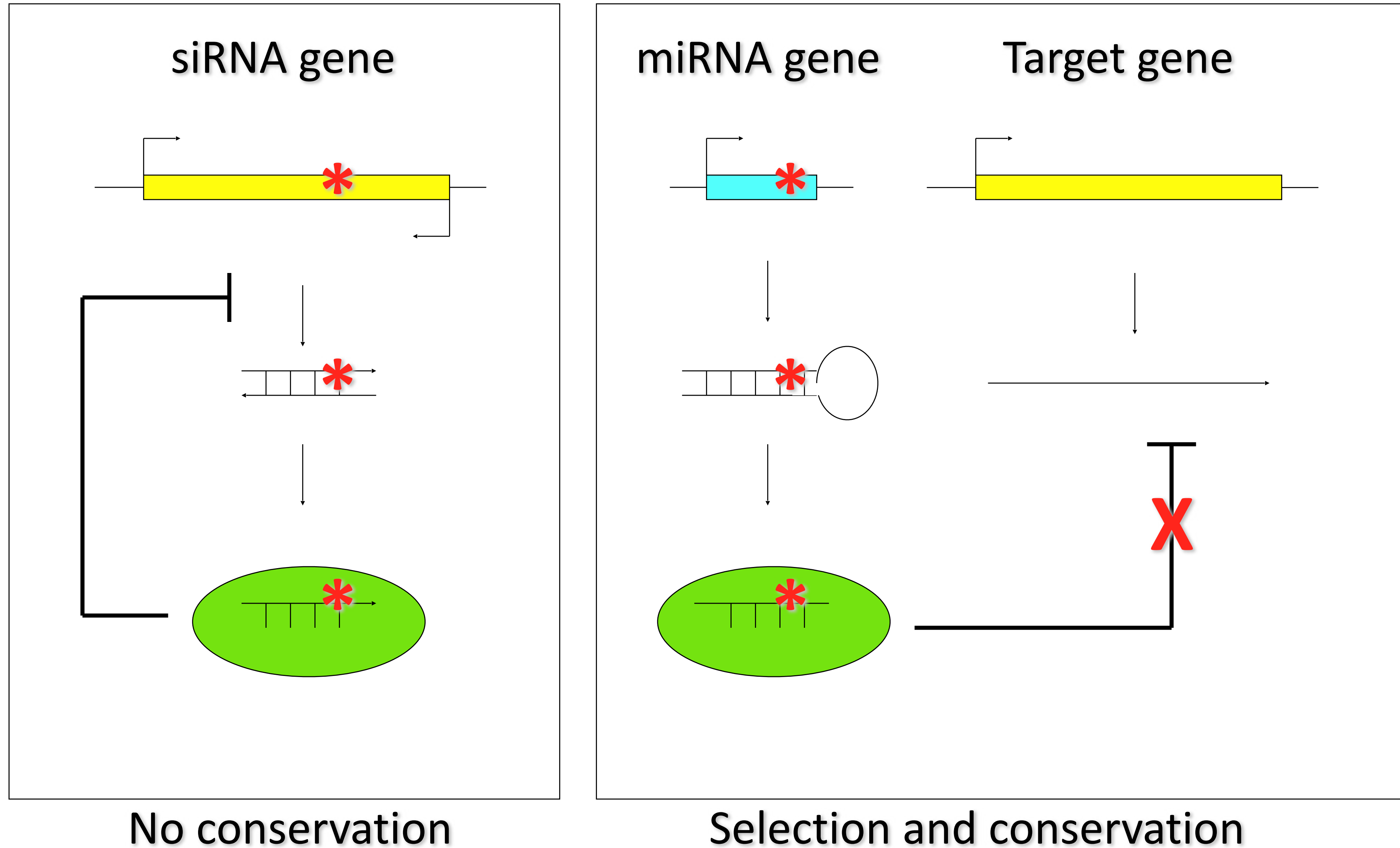


Κύκλος Ping – Pong

- Στα γαμετικά κύτταρα της *Drosophila*, τα πρωτογενή piRNAs διαμορφώνουν τα piRISCs με τις Piwi και Aub πρωτεΐνες.[7] [8] Τα σύμπλοκα Piwi-piRISCs έχουν ως λειτουργία την αποσιώπηση στον πυρήνα όπως και στα σωματικά κύτταρα, ενώ τα σύμπλοκα Aub-piRISCs εδράζονται στο κυτταρόπλασμα και καταστέλλουν τα μεταθετά στοιχεία. Ο μοριακός μηχανισμός αυτής της καταστολής ομοιάζει με αυτό του συμπλέγματος Ago2-siRISC, με τη διαφορά ότι στην καταστολή μέσω συμπλέγματος Aub-piRISC το RNA στόχος δεν αποικοδομείται αλλά χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την παραγωγή δευτερογενών piRNAs. Τα τελευταία συνδέονται με την πρωτεΐνη Ago3 και συνθέτουν το σύμπλεγμα piRISC- Ago3, το οποίο κόβει τα RNAs στόχους που περιέχουν τις αλληλουχίες των μεταθετών στοιχείων στον αντίστροφο προσανατολισμό. Αυτή η αντίδραση δίνει κατόπιν γένεση στα αντικωδικά piRNA, τα οποία φορτώνονται στις Aub, δημιουργώντας έναν μηχανισμό εμπρόσθιας τροφοδότησης (feed-forward). Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή και ως ο κύκλος του ring-pong.[6][9]



Auto- and hetero-silencers evolve at different rates



Κοινά χαρακτηριστικά των siRNAs και miRNAs

- Τα μικρά μη-κωδικοποιά RNAs (smRNA) συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανάπτυξης, κυτταρική διαφοροποίηση, προσαρμογή στο περιβάλλον και άμυνα από ιούς και βακτήρια.
- Ρυθμίζουν αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση μετα-μεταγραφικά ή με το σχηματισμό ετεροχρωματίνης
- Δημιουργούνται από πρόδρομες δίκλωνες έλικες RNA (dsRNA) οι οποίες κόβονται σε 20–24 nucleotide dsRNAs από ριβονουκλεάσες τύπου III που ονομάζονται DICERs.
- Η μία αλυσίδα της δίκλωνης έλικας φορτώνεται σε δραστικά σύμπλοκα που περιέχουν διαφορετικές πρωτεΐνες ARGONAUTE (AGO).