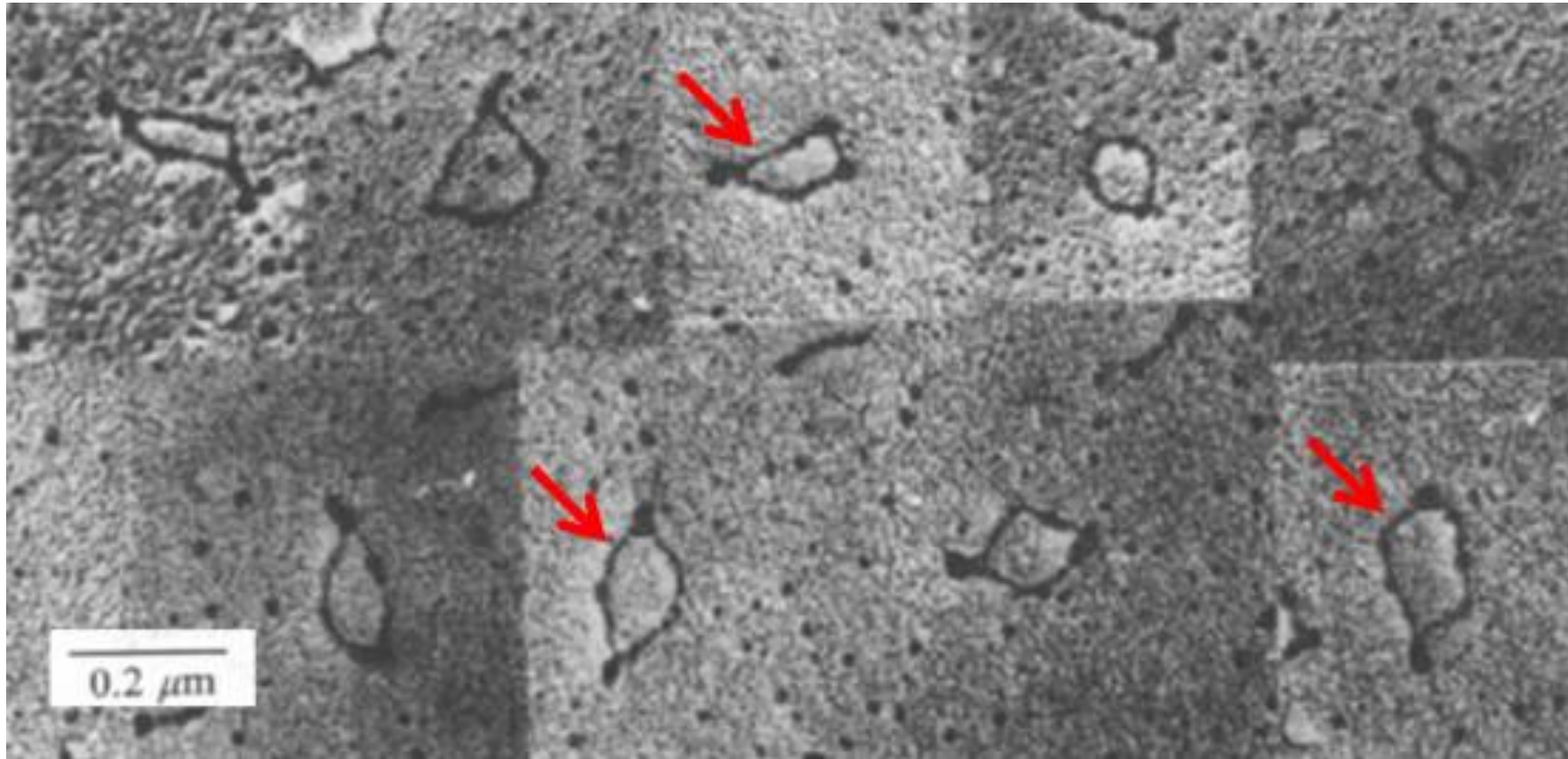


CircRNA的检测与表征

翻译：王朔、尚鸿运

PPT制作：王朔、尚鸿运

展示：王朔



1979年洛克菲勒大学的Hsu和Coca-Prados在电子显微镜下观察到的真核细胞细胞质中观测到环状RNA的存在。

定义：

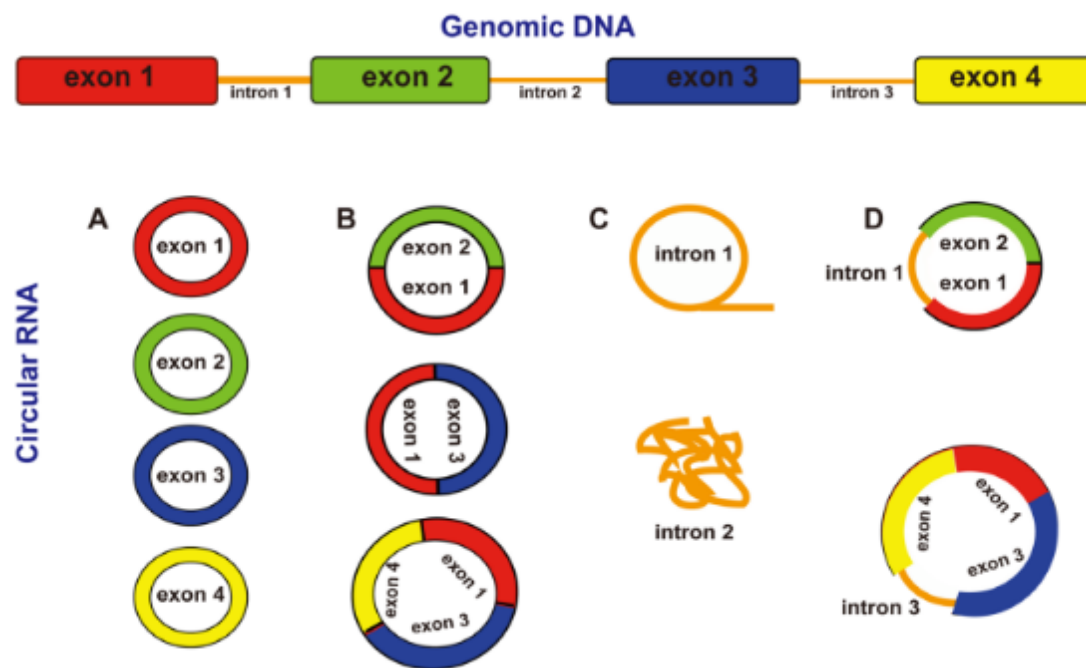
circRNAs（Circular RNAs，环形RNA分子）是一类不具有5'末端帽子和3'末端poly(A)尾巴、并以共价键形成环形结构的非编码RNA分子

生物信息学方法与生物化学富集策略和深度测序相结合，可以对环状RNA物种进行综合研究。

分类:

外显子（**exonic circRNA**），广泛存在于胞质中。

内含子（**intronic circRNA**），存在于细胞核中。

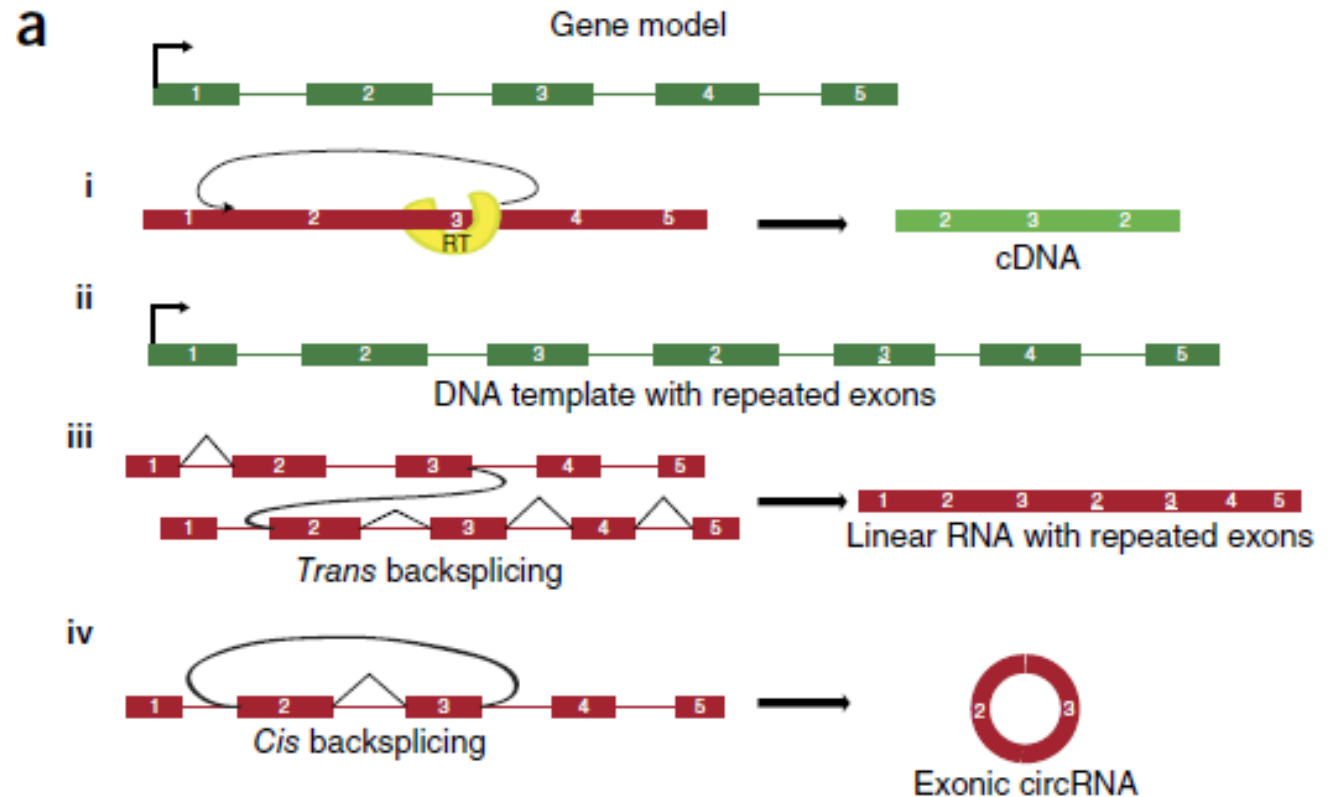


要点：

- 鉴定内源性CircRNAs的方法：分子方法、全基因组方法
- CircRNAs的性质
- Exonic CircRNAs产生机制
- Exonic CircRNAs的功能

分子检测方法:

- circRNAs的一个关键特征: 有 backsplice 序列
- apparent backsplice sequence: 序列中外显子顺序相对于注释的模板颠倒 (reversed)
- 逆转录酶模板切换, 串联重复和RNA反式剪接也可产生 apparent backsplice



DNA



转录



前体mRNA



经典剪接途径



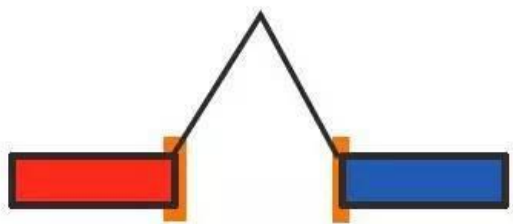
mRNA

circRNA剪接途径



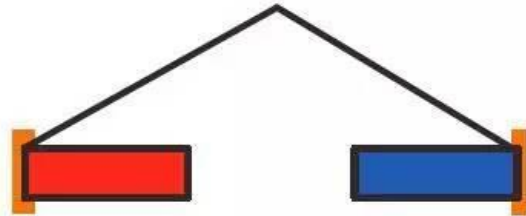
mRNA

circRNA



linear splicing

spliced read



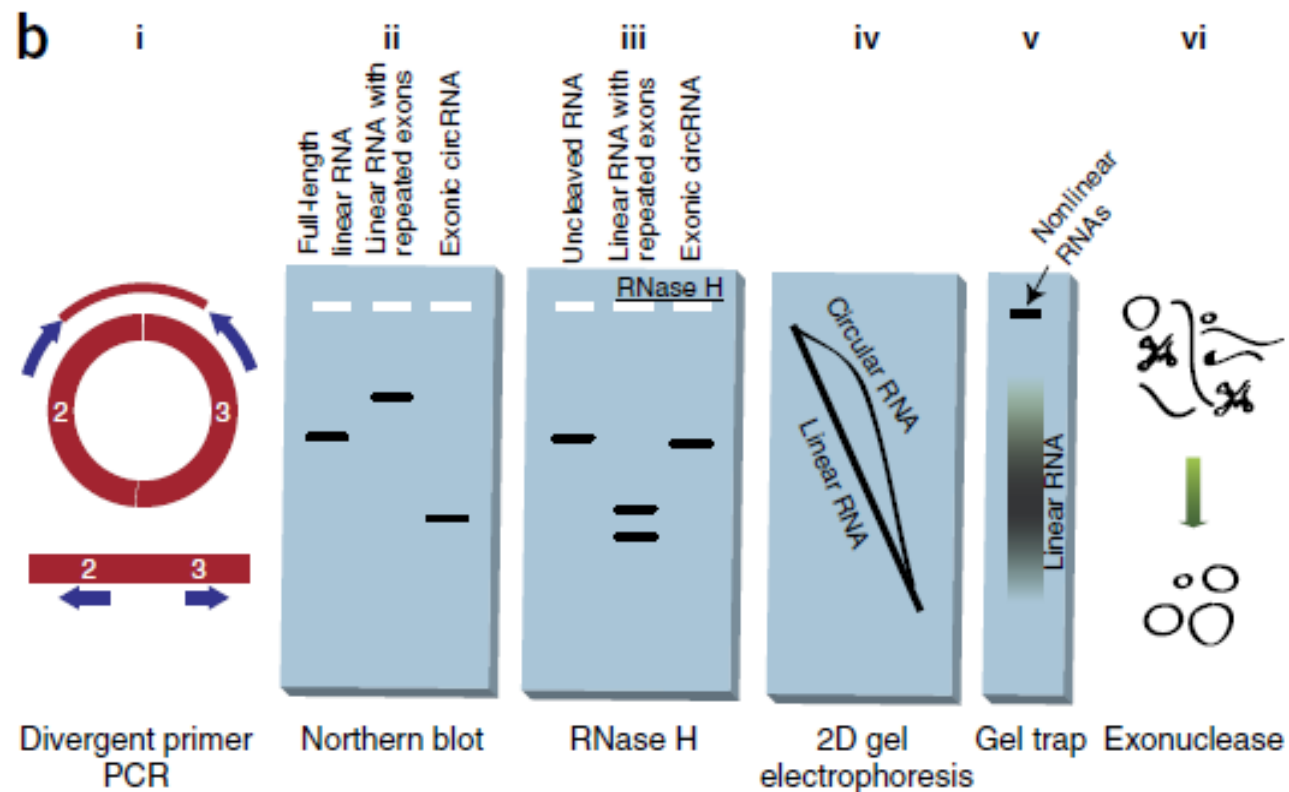
circularization



circRNA

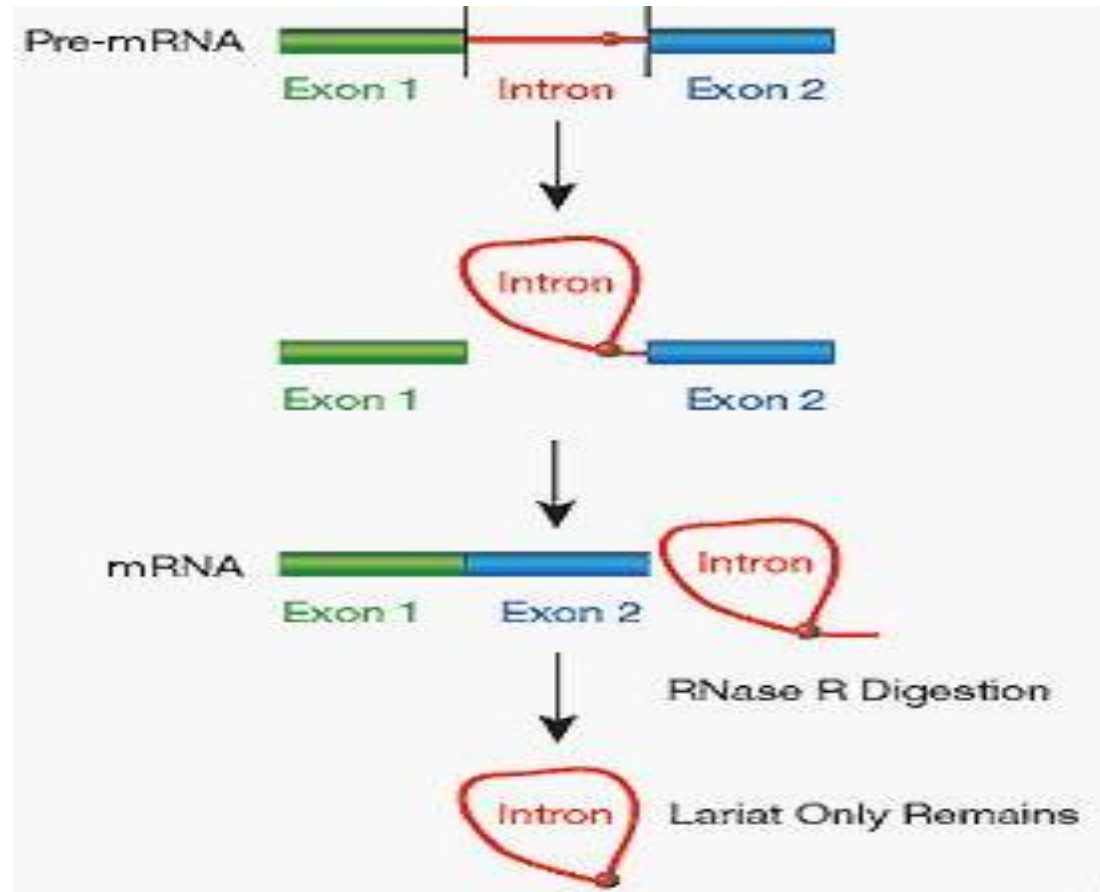
区分方法

- 线性外显子RNA通常具有3'多聚腺苷酸化，而圆没有3'末端。
- 环状RNA在凝胶中比相同长度的线性RNA更缓慢地迁移，并且通过增加凝胶交联增加了这种效应（图1b）。
- 然而，exonic circRNAs也含有比同一基因全长，反式或剪接或串联重复的转录物更少的总核糖核苷酸序列，因此在具有低交联性的凝胶中迁移速度更快（图1b，ii）。



内含子（intronic circRNA）：

- 剪接分支点处存在2'-5'连接
- 逆转录酶穿过2'-5'结时，产生一个或多个未测定的碱基，其在测序中可以容易地鉴定。
- 脱支酶酶选择性水解2'-5'连接，通过用脱支酶处理可以优先从其它环状物质中消套索RNA。

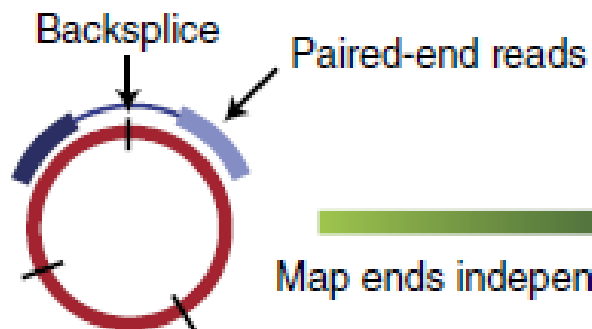


全基因组检测方法：

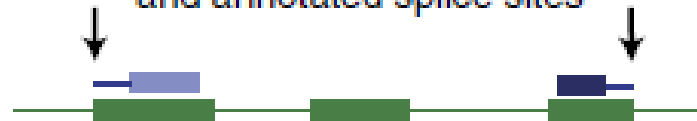
- 通过测序技术的发展（更长的读取长度的更深的测序）
- 将RNA比对到其基因组源的更好的算法
- 能够测序非多聚腺苷酸化RNA的核糖体RNA的消耗战略
- ①从现有转录模型中候选
- ②剪切比对算法完成后，通过匹配reads到基因组序列上以鉴定连接

候选， 比对转录组

a Paired-end approach



Impute backsplice from divergent read pairs and annotated splice sites

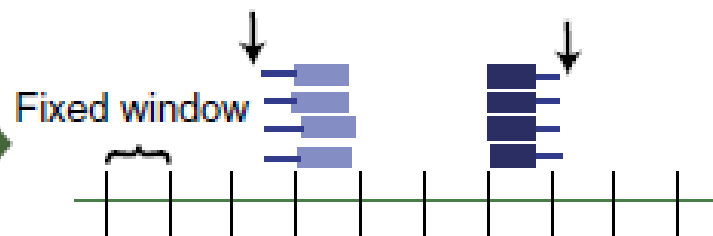


Gene model

b Windowing paired-end approach



Impute backsplice from divergent read pairs with low resolution

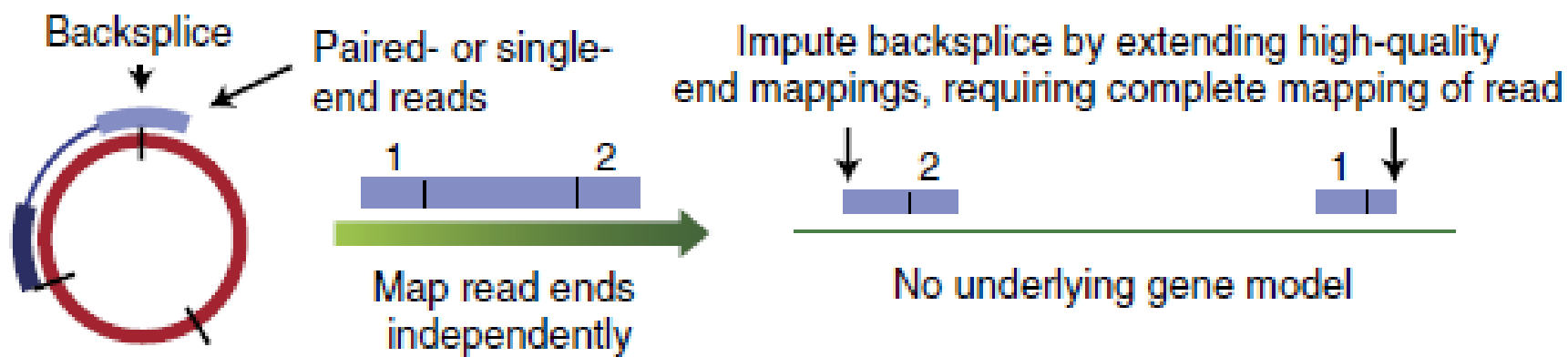


No underlying gene model

直接比对基因组，相当于把基因组分成200bp窗口，窗口看做exon

比对基因组：

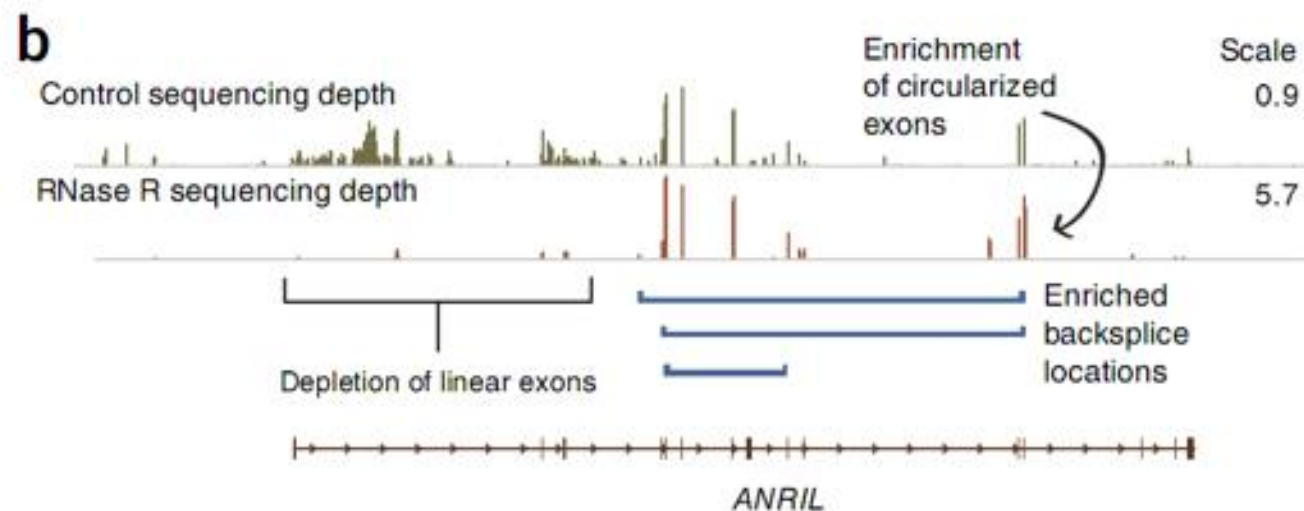
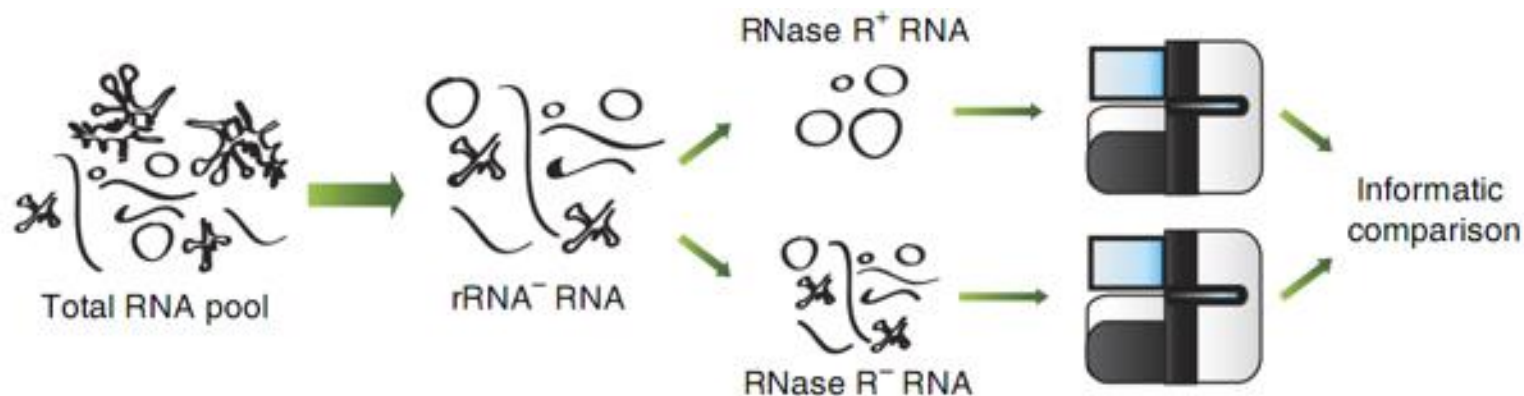
C Segmented read approach-end mapping



将read分割成片段，然后末端比对

CircleSeq:

在哺乳动物中，
不需要exon顺序信息的算法

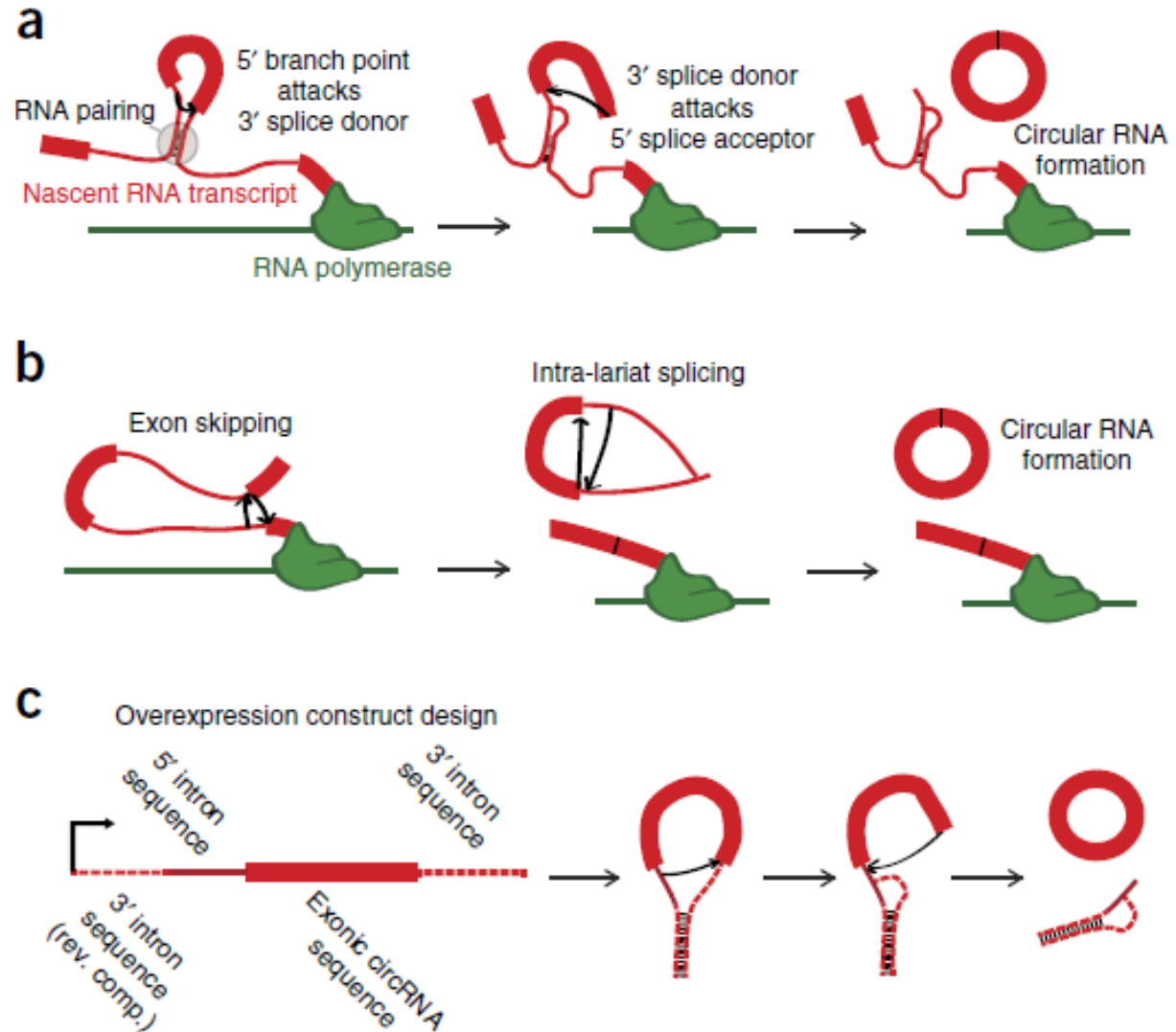


CircRNAs的性质：

- 稳定，半衰期 $>48\text{h}$ ，mRNA $\approx 10\text{h}$ ，原因具有核酸外切酶的抗性
- 外显子circRNA在血清中不稳定，半衰期 $<15\text{s}$ ，推测是由于circulating RNA核酸内切酶。
- 外显子circRNA涉及GT-AG典型剪接位点
- 包含互补上游和下游序列的circRNA过表达构建体相对于没有互补序列的构建体显示增强的circRNA形成
- 与所有表达的外显子相比，形成单外显子circRNA的外显子长了三倍。总体而言，似乎促进环化的基因组特征是长于平均的外显子
- 丰富，进化上保守的，组织特异性

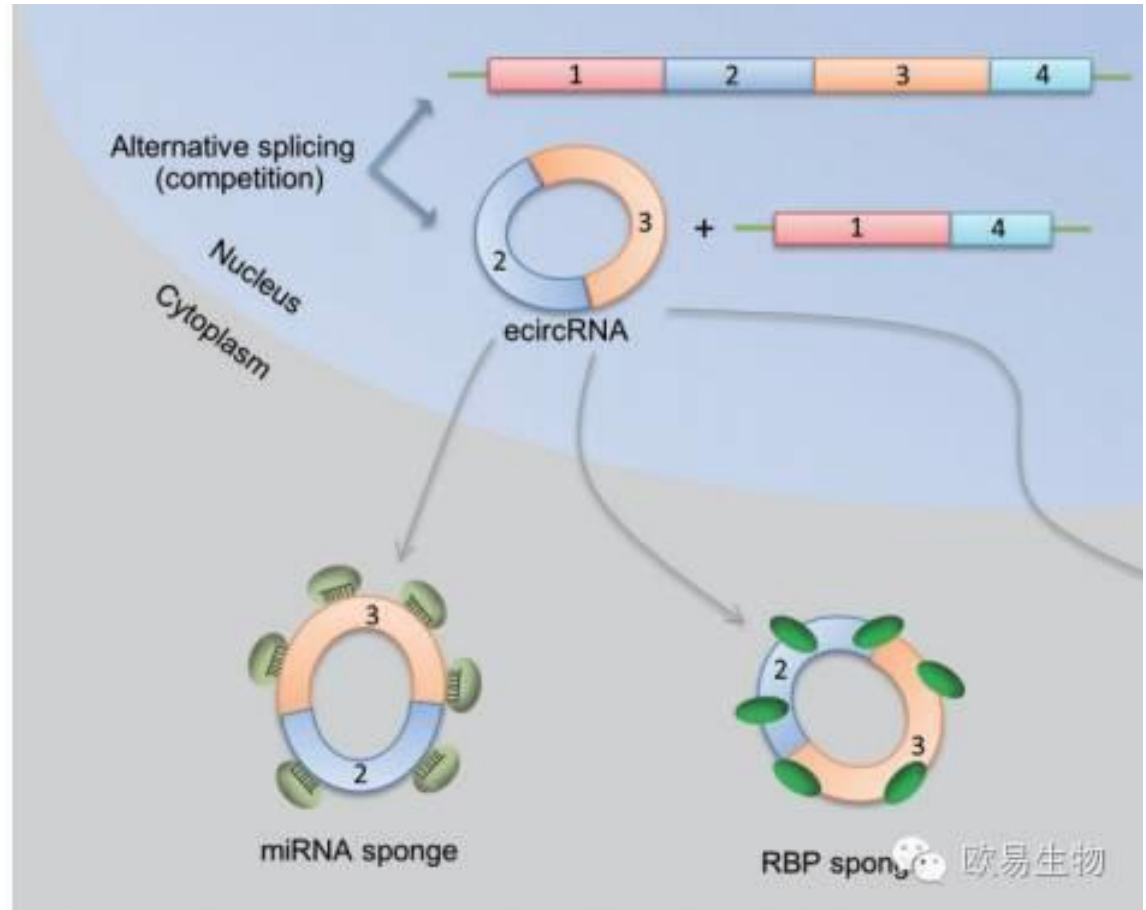
外显子circRNA产生机制：

- 直接反向切片机制
- 外显子跳过机制
- 产生CircRNA设计方案



推断外显子CircRNAs的功能：

- 吸附miRNA
- 调控转录
- 与RNA结合蛋白相互作用
- 少数circRNAs可以被翻译

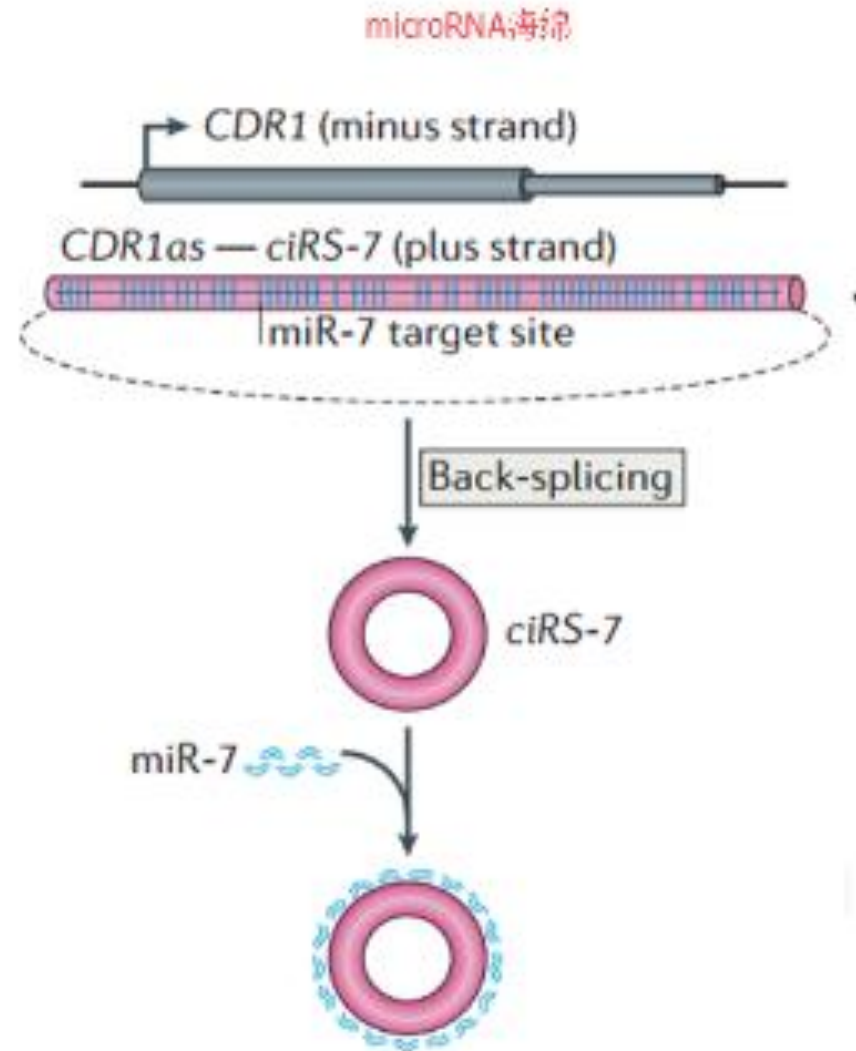


吸附miRNA:

·CDR1as和SRY的exonic circRNA结合miRNA而不降解，使其成为竞争内源性RNA活性的极好候选物

·CDR1基因起源的环状RNA（ciRS-7）可以结合吸附miR-7，从而降低miR-7的活性，间接上调miR-7相关靶基因的表达。由于环状RNA的稳定性，在机体内潜在对microRNA的吸附能力要强于线性的mRNA和lncRNA

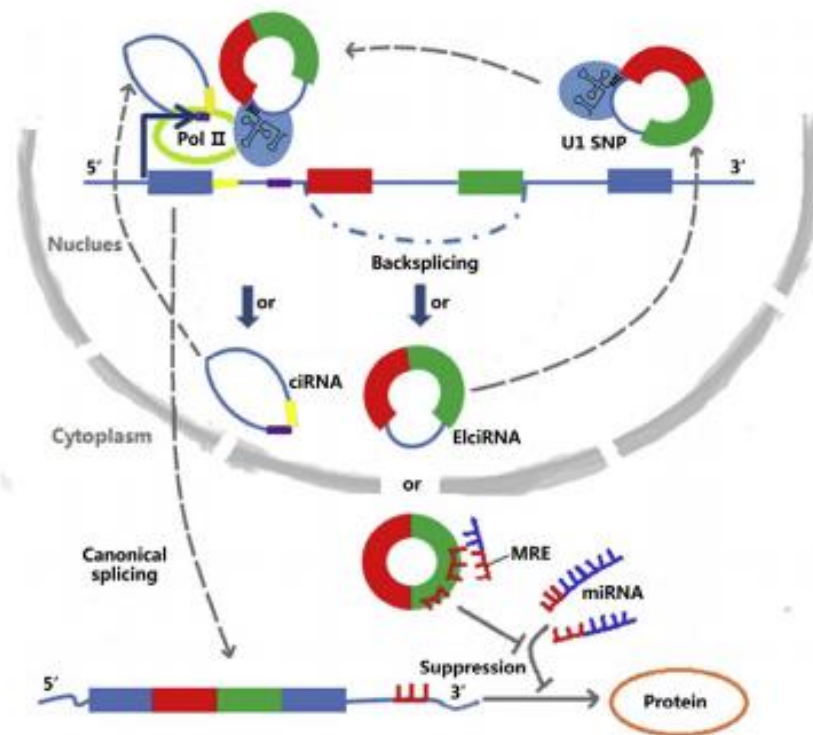
前景：吸附miRNA来降低致癌miRNA



调控转录

- formin (Fmn) 基因对肢体发育必需
- 通过backsplicing从Fmn转录本产Exonic circRNAs, 涉及到Fmn编码序列上游的一个剪切受体
- 缺乏这个剪切受体的敲除小鼠未显示可检测到的circRNAs, 具有正常肢体发育, 但是有肾缺如表型
- 因此, circRNAs的缺乏, 导致formin异常表达

环状RNA调控亲本 (parental) 基因的3类模式



三种类型circRNA调控基因表达

- 1、ciRNA (仅有内含子) 与pol II结合促进基因转录;
- 2、EliciRNA (仅含内含子有含外显子) 与小核糖体U1 snRNP结合形成复合体进一步与pol II结合促进亲本基因转录;
- 3、circRNA (仅含外显子序列) 含有miRNA结合位点元件 (MRE)可吸附miRNA间接调控mRNA表达;

S. Qu et al./Cancer Letters

与RNA结合蛋白相互作用

- 作为“支架”：通过结合多个RBP，增加其稳定性
- 作为序列靶向元件：同时结合RBP和与circRNA序列互补的RNA或DNA的区域
- circularRNA序列产生新的蛋白质结合位点;这些特征可能导致circRNA能够结合与相关线性RNA相比的不同蛋白质组。

circRNAs的翻译：

- 少数cRNA具有internal ribosome entry site (IRES，内部核糖体进入位点)
 - 带有IRES和ATG的可以翻译
 - 若 $bp\%3 = 0$ ，则可产生重复多肽序列
 - 若 $bp\%3 \neq 0$ ，则可以以不同的阅读框翻译产生多肽序列
- 前景：产新生物材料

结论：

- 标准命名法
- 治疗作用（miRNA sponges以降低癌miRNAs）
- 翻译成新生物材料

补充：作为疾病的生物标注物

- 环状RNA有较强的组织表达特异性，研究发现cANRIL 是一个从 INK4A/ARF反义转录本，cANRIL的表达可能与INK4/ARF的转录和心血管硬化疾病风险相关。
- 另外，研究人员发现has_circ_002059在胃癌中表达下调，是一个潜在的胃癌诊断的biomarker。
- 黄胜林团队对肝癌细胞外泌体circRNA测序发现，circRNA在外泌体中大量富集且于正常细胞相比差异很大，同时血清中肿瘤circRNAs的富集程度甚至与肿瘤的大小有关。表明环状RNA是未来疾病诊断和治疗的潜在靶点。

Thanks

THANKS