

关于环状 RNA 相关研究方法进展

吕得场 李常昆 郭士琳

(福建师范大学 福建省福州市 350108)

摘要: 环状 RNA 是一类不含 5' 帽子和 3' polyA 尾的共价闭合分子, 绝大多数的环状 RNA 是由前体 mRNA 经反向剪接形成, 在生物体中大量存在。目前, 环状 RNA 已被证明可以调控相关基因的表达, 在疾病的发生发展中发挥着重要作用。同时也可以用于疾病的诊断、治疗和预后中作为可靠的生物标志物, 甚至可以作为治疗的核酸药物。随着相应 RNA 领域的不断突破, 对于环状 RNA 的探究愈发的深入, 在此, 我们针对环状 RNA 的基础研究方法和潜在应用进行了综述。

关键词: 环状 RNA; 反向剪接; 环状 RNA 的敲减; 环状 RNA 的敲除; 环状 RNA 的过表达; RNA 的体外环化

环状 RNA 是一种共价闭合的单链 RNA, 由前体 mRNA 经反向剪接形成, 最早于 20 世纪 70 年代在植物类病毒中被发现。虽然环状 RNA 早在几十年前被发现, 但由于环状 RNA 缺少 3' poly(A) 和 5' 帽子结构, 因此无法通过针对 poly(A) 的分子技术检测到; 同时, 由于环状 RNA 是经反向剪接形成的, 不同于经典的线性剪接, 一度被认为是 RNA 加工过程中错误剪接的产物, 并不具有任何功能。随着高通量测序技术的出现, 在 2012 年, 环状 RNA 被首次指出是由前体 mRNA 经反向剪接产生, 并且发现其大量存在于人类的不同类型细胞中。此后发现环状 RNA 可以吸附 miRNA 从而调控细胞的生理过程, 自此更多的人开始了针对环状 RNA 产生机制及其功能的研究。

1 影响环状 RNA 产生的因素

目前针对环状 RNA 的产生主要有三种假说模型: 内含子配对, 套索驱动的环化, RNA 结合蛋白驱动的环化。无论是哪一种假说模型, 环状 RNA 都是由剪接体的剪接机制通过头对尾的方式反向剪接形成的, 其受到环状 RNA 外显子侧翼互补内含子序列 (ICSs) 调控, 环状 RNA 侧翼内含子序列的互补性、长度和结构都会影响环状 RNA 的形成; 组蛋白以及基因上的表观修饰会影响可变剪接, 也可能对环状 RNA 的形成有影响。除此之外, 利用剪接体抑制剂异黄酮素阻止剪接体的组装会抑制环状 RNA 的形成, 但过敲除 U2 snRNP 抑制剪接体反而会使环状 RNA/线性 RNA 比例增加; 另外, 剪接体因子参与剪接事件但不属于 snRNP 的蛋白, 通过敲除剪接体因子将增加环状 RNA 水平, 多个因子敲除并不影响环化。影响环状 RNA 产生的因素除上述之外还有很多。

对于环状 RNA 的功能而言, 环状 RNA 在正常生理以及疾病的发生发展中起着重要的调控作用, 但也有研究指出, 环状 RNA 的产生来源于错误剪接, 绝大多数不具有生理功能, 不可否认的是, 仍有少量环状 RNA 在生理以及病理学中发挥重要的作用, 或者可以作为生物标志物用于疾病的检测。同时, 由于环状 RNA 与线性 RNA 相比, 通常稳定性更高, 半衰期更长, 可以抵抗一些核酸酶的消化, 具有很好的医药应用前景。本文对环状 RNA 的一些常规研究方法进行了综述。

2 环状 RNA 的测序和鉴定

在环状 RNA 的研究中, RNase R 占有重要地位, 作为核酸外切酶, 它可以沿 RNA 分子 3' -5' 方向进行切割并降解 RNA, 能够消化几乎所有的线性 RNA, 但不易消化环状 RNA。环状 RNA 由于缺少 5' 帽子和 3' poly(A) 尾, 需采用全转录组的高通量测

序。同时, 由于环状 RNA 在生物体内含量相对很低, 其含量远低于 mRNA, 总 RNA 采用 RNase R 处理后可以去除大部分线性 RNA, 可以对环状 RNA 进行有效富集, 相对提升环状 RNA 含量, 对环状 RNA 的测序更为准确。

环状 RNA 的经典鉴定方法是发散引物进行的 RT-PCR 和 RNase R 处理后的 RT-qPCR 联用。生物体中 RNA 的常见的剪接方式有顺式剪接和反式剪接两种, 其中, 部分通过反式剪接产生的 RNA 与相应顺式剪接形成的环状 RNA 具有同样的 BSJ 序列, 但是这种反式剪接产生的 RNA 是线性的, 因此仅仅依靠发散引物判定 BSJ 序列对于环状 RNA 的鉴定是不准确的。RNase R 的引入可以降解反式剪接产生的线性 RNA, 对 RNase R 处理后的 RNA 进行 RT-qPCR, 则对环状 RNA 的鉴定起到了重要的补充^[1]。

3 环状 RNA 的敲减/敲除系统

环状 RNA 的敲减/敲除策略有以下几种, 第一种, 针对于环状 RNA 本身的敲减, RNA 干扰 (RNAi) 是常用的敲减方法, 通常使用小干扰 RNA (siRNA), 短发夹 RNA (shRNA) 和反义寡核苷酸 (ASO)。除了使用 RNAi 外, 也常采用核糖核酸酶进行环状 RNA 的敲减, 例如基于 RNA 靶向的 VI 型 CRISPR-Cas13, 其中 RfxCas13d 已被用于大规模筛选功能性的环状 RNA。第二种方法, 针对于环状 RNA 的产生方式进行 DNA 编辑进而敲除环状 RNA, 如利用 CRISPR/Cas9 系统敲除对环状 RNA 的产生起必要作用的侧翼序列, 对其 mRNA 的产生不受影响。此外, 也可利用碱基编辑器针对环状 RNA 中特异存在的外显子反向剪接位点进行突变, 从而实现环状 RNA 的敲减/敲除, 对相应线性 RNA 影响极低。

值得注意的是, 无论是哪一种方法都有其局限性。例如, 使用 RNAi 的环状 RNA 敲减/敲除有可能脱靶导致其同源线性的 RNA 表达量降低, 且 RNAi 的机制主要作用于细胞质, 为了减少脱靶, 降低对亲本 mRNA 的影响, 可使用 LNA Gapmers 敲减/敲除环状 RNA; Cas13 被报道具有反切活性, Cas13 作为非特异性 RNA 敲除工具的实用性受到质疑。最近, 一种基于嗜热链球菌的 III-A 型 CSM 复合体的靶向 RNA 的敲除系统被证明可以用于真核生物体内的线性 RNA 敲除, 也有可能实现对于环状 RNA 的敲低, 其脱靶效应低, 且不具有反切活性, 有潜力作为环状 RNA 研究的新工具^[2], 但其缺点是由多个亚基构成的复合体, 因此操作相对繁琐。在环状 RNA 产生的机制上来说, 在基因组水平上进行的环状 RNA 和单碱基编辑虽然可以很好的敲除环状 RNA, 但是成功率非常低, 有时会对亲本 mRNA 的产生造成严重影响, 其适用环状 RNA 并不多。总之,

使用敲减/敲除方法来研究环状 RNA 的功能,应根据具体情况选择相应的方法。

4 环状 RNA 的表达系统

在生物实验中,往往需要环状 RNA 过表达,与线性 RNA 的产生不同,环状 RNA 的产生需要在相关线性 RNA 的基础上,通过其 RNA 的侧翼序列在剪接体加工后产生,主要是通过侧翼 ICSs 的帮助下,利用剪接体的剪接机制进行过表达相应的环状 RNA。环状 RNA 的过表达载体包含产生环状 RNA 的外显子,同时保留其本身两侧的 ISCC 或者用其它环状 RNA 外显子两侧的 ICSs。当这些序列被转录时,将在侧翼 ICSs 的帮助下产生环状 RNA。为了提高环状 RNA 的表达量,可通过添加一些剪接蛋白的识别基序促进剪接,例如,在 ICSs 中添加 NOVA2 的识别基序 YCAY,使得相应环状 RNA 表达量是其线性 RNA 的近三倍^[9]。

除了使用 ICSs 外,也可以使用 Twister 优化的 RNA 持久过表达系统 (Tornado) 在细胞中进行过表达环状 RNA^[10],但使用该方法进行的环化会保留一部分冗余序列。

当前存在很多环状 RNA 表达载体,但没有一种表达载体可以使得所有环状 RNA 得到正确表达,这与环状 RNA 产生的机制密切相关,同时,环状 RNA 序列的长度和序列的复杂性对环状 RNA 的产生有着重要的影响。

5 环状 RNA 的体外制备及其应用

随着 mRNA 疫苗的发展,人们逐渐认识到 mRNA 对于疾病防治的重要作用。早在 1995 年人们就认识到,在环状 RNA 中添加内部核糖体进入位点 (IRES) 就可以进行翻译,之后人们将 IRES 引入到环状 RNA 过表达载体或体外环化的 RNA 中,发现蛋白质仍然可以在细胞和动物中发生有效的翻译并进行高效表达,因此,环状 RNA 同样具有开发作为疫苗的潜力。

相对于 mRNA 的体外制备,环状 RNA 在体外制备仅需对 RNA 进行环化处理。体外环化的 RNA 除了可以转入细胞内研究该环状 RNA 的生理功能外,还可以作为核酸药物用于治疗。

5.1 基于溴化氢或相似缩合剂的化学环化法。使用该方法环状 RNA 的 B5J 磷酸二酯键的形成主要是通过溴化氰或者乙基-3'-5'-二甲氨基丙基碳二亚胺催化 RNA 的 5' -单磷酸以及 3' -羟基的缩合反应成环。使用该方法进行的体外环化效率极低,且仅适用于环化较小片段的 RNA,并且化学基团在基因治疗中存在较大的安全隐患,难以获得广泛应用。

5.2 基于 DNA/RNA 连接酶的酶促环化法。使用该方法进行的环化,需要设计夹板序列辅助环化提高环化效率以及正确率,即通过一条与 RNA 成环链两端都互补的 DNA 或 RNA 模板,模板与成环链互补配对后,通过 T4 DNA/RNA 连接酶将成环链的两端连接形成环状单链 RNA。使用该方法进行的环化可能会存在单链 RNA 间的连接,形成聚合副产物,及多条 RNA 首尾相接成较大的多分子线性或环状 RNA,并且随着 RNA 单链浓度的升高,副产物比例会急剧增加,大大降低所需环状 RNA 的产率。

5.3 基于自剪接内含子的核酶环化法。使用的自剪接内含子主要有两种, I 类内含子和 II 类内含子。Alexander^[11]等人改造鱼腥藻前体 tRNA 来源的 I 类内含子,将内含子序列进行重排,并通过添

加同源臂等一些必要元件提高反向自剪接效率,可实现 5-10kb 序列的环化。II 类内含子的二级结构有六个主要的结构域 (I-VI),其中 I 结构域含有与外显子配对的 EBS 序列,与 EBS 序列互补的外显子序列为 IBS 序列,IV 结构域能忍受较大的插入,且不会影响内含子的自我剪接,即忍受插入位点两侧的两个半分子能重新组装形成一个有功能的核酶,并发生有效的反向剪接产生环状 RNA^[12]。需要注意的是,使用 I 类内含子进行的环化尽管效率很高,但产生的环状 RNA 会保留一部分内含子序列;使用 II 类内含子进行的环化虽然可以不引入外源序列,但环化效率较低。

6 讨论与展望

与过去相比,人们开发了更多针对环状 RNA 测序的方法,使得环状 RNA 的检测更加准确,同时也发现了更多的环状 RNA,但对于环状 RNA 精确的形成、运输、成熟和具体的降解机制尚不明确。尽管大多数环状 RNA 是剪接体剪接中产生的副产物,但仍有越来越多的证据表明有部分环状 RNA 在正常生理以及疾病的发生发展中发挥着重要作用,而这些环状 RNA 可以作为疾病的潜在性治疗靶点。同时,还有一些具有组织特异性以及高丰度的环状 RNA 有望成为临床诊断、治疗和预后的生物标志物。在作为疫苗的开发上,环状 RNA 疫苗对比 mRNA 疫苗,具有不易被核酸酶降解、半衰期长和高稳定性的特点,以及相对简便的制备方法,更低的成本,低免疫原性,因此具有很好的开发应用前景,但是环状 RNA 疫苗对比 mRNA 疫苗具有更高的设计难度,需要考虑设计的序列是否会影 响环化效率,自身稳定性和蛋白翻译效率。需要注意的是,环状 RNA 由于其半衰期更长,在一些应用上需要考虑的问题更多。

综上所述,环状 RNA 在疾病的诊断和治疗以及作为核酸药物的开发上具有重大潜力。对环状 RNA 的初步研究必定集中在它们的发现以及表征上,希望在不久的将来有更加成熟和方便的技术对环状 RNA 进行更好的生物学验证,一旦对其具体产生机制以及生物学功能有了更全面更深入的了解,有可能在临床上充分发挥环状 RNA 的潜力。

参考文献:

- [1]Vromman Marieke,Anckaert Jasper,Bortoluzzi Stefania et al. Large-scale benchmarking of circRNA detection tools reveals large differences in sensitivity but not in precision.[J].Nat Methods, 2023, 20: 1159-1169.
- [2]Cognori David,Trinidad Marena,Doudna Jennifer A,Precise transcript targeting by CRISPR-Csm complexes.[J].Nat Biotechnol, 2023, 41: 1256-1264.
- [3]Knupp David,Cooper Daphne A,Saito Yuhki et al. NOVA2 regulates neural circRNA biogenesis.[J].Nucleic Acids Res, 2021, 49: 6849-6862.
- [4]Litke Jacob L,Jaffrey Samie R,Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts.[J].Nat Biotechnol, 2019, 37: 667-675.
- [5]Wesselhoeft R Alexander,Kowalski Piotr S,Anderson Daniel G,Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells.[J].Nat Commun, 2018, 9: 2629.