

RNAi

JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH

VOL. 37 WASHINGTON, D. C., AUGUST 1, 1928 No. 3

HOSTS AND SYMPTOMS OF RING SPOT, A VIRUS DISEASE
OF PLANTS¹

By S. A. WINGARD²

Associate Plant Pathologist, Virginia Agricultural Experiment Station

INTRODUCTION

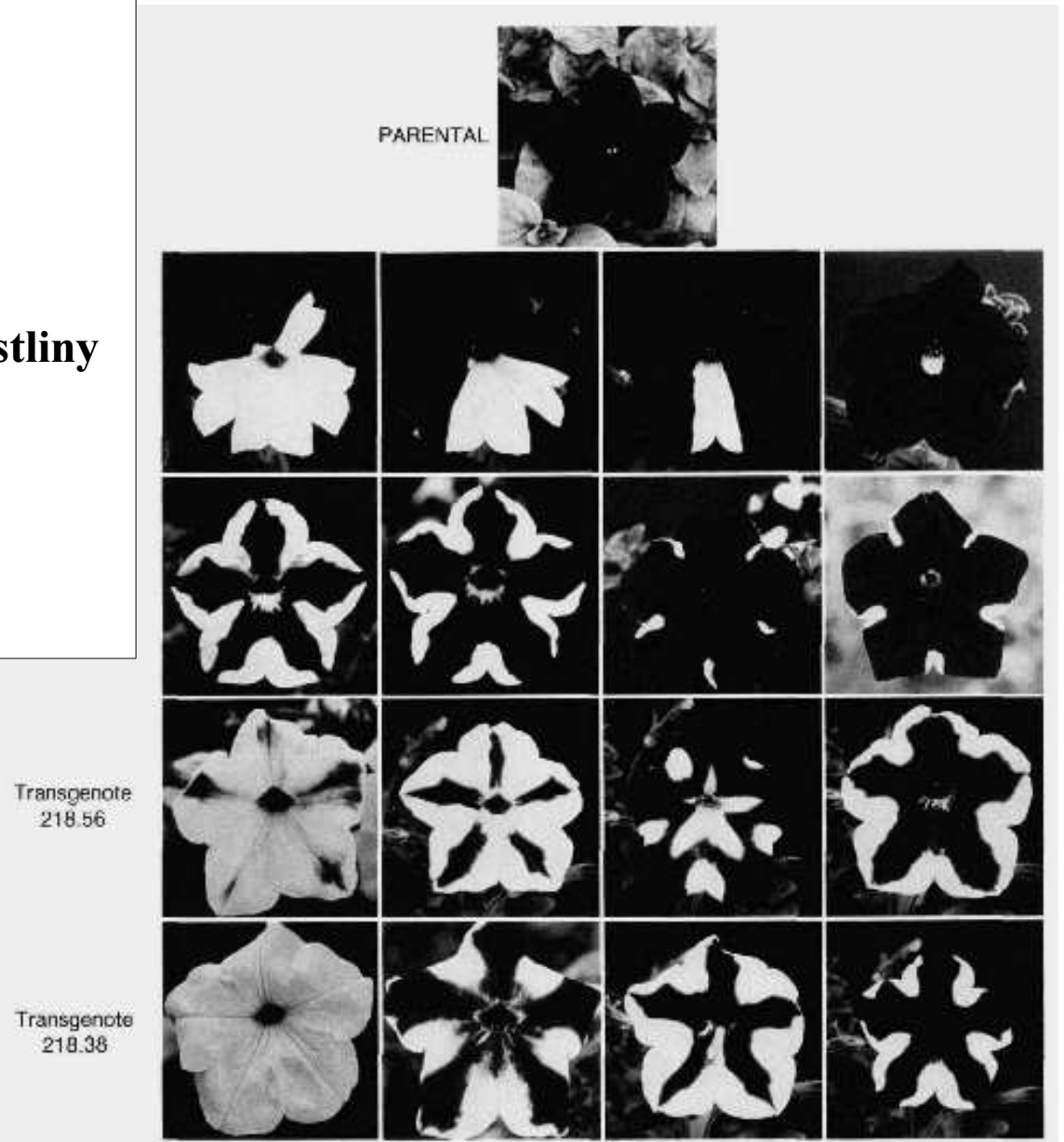


Rich Jorgensen a kolegové vložili gen produkující pigment do petunií (použili silný promotor)

Místo silné pigmentace se objevily rostliny variegované a dokonce bílé

Jorgensen pojmenoval tento fenomén "cosuppression"

Napoli et al., *Plant Cell*, 1990



Různé typy a projevy krátkých RNA v buňce

Cytoplazmatické siRNA: dsRNA představující např. intermediární stavy replikace virů

miRNA: negativní regulace specifických mRNA (genů)

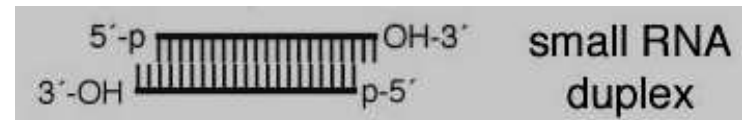
siRNA mediated supression of transcription - potlačení transkripce prostřednictvím siRNA

Jaký je rozdíl mezi miRNA a siRNA?

- **Funkce obou je regulace exprese**
- **siRNA je původem dsRNA**
- **siRNA souvisí s cizorodou RNA (obvykle virovou) a je 100% komplementární**
- **miRNA je původně ssRNA, která formuje vlásenkové dsRNA struktury**
- **miRNA reguluje post-transkripční genovou expresi**

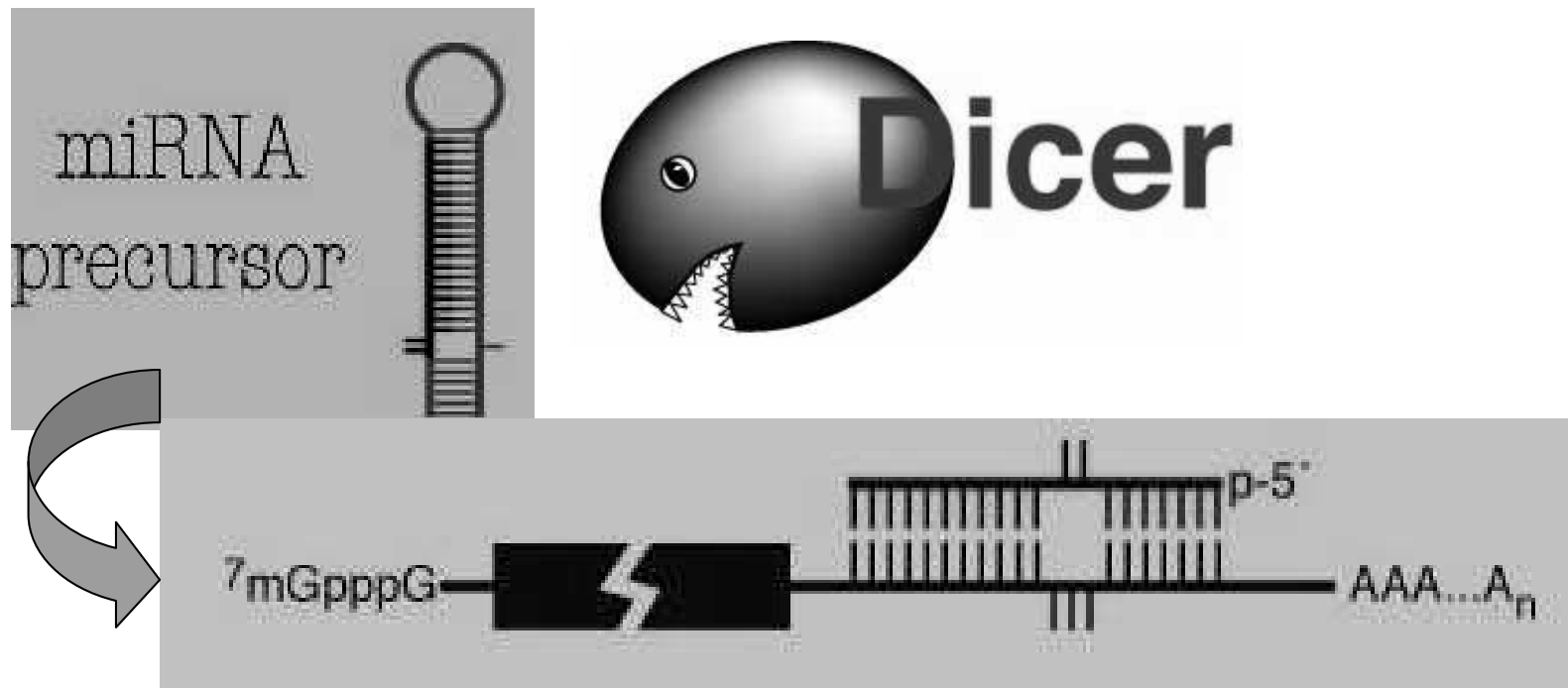
RNA interference (RNAi)

- post-transkripční utišování genů (gene silencing)
- dsRNA je rozštipána na 21-23 nt segmenty (“small interfering RNAs”, „microRNAs“) enzymem Dicer



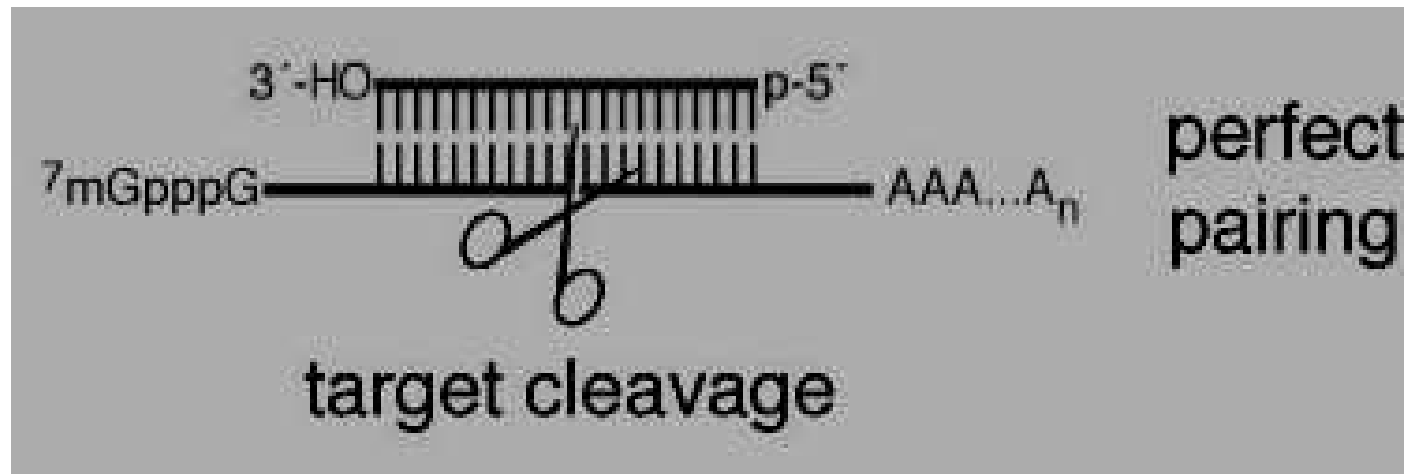
microRNA (miRNA)

- Regulace genové exprese
- Mechanismus podobný jako u siRNA
- Obecně zabraňuje vazbě k ribozomům



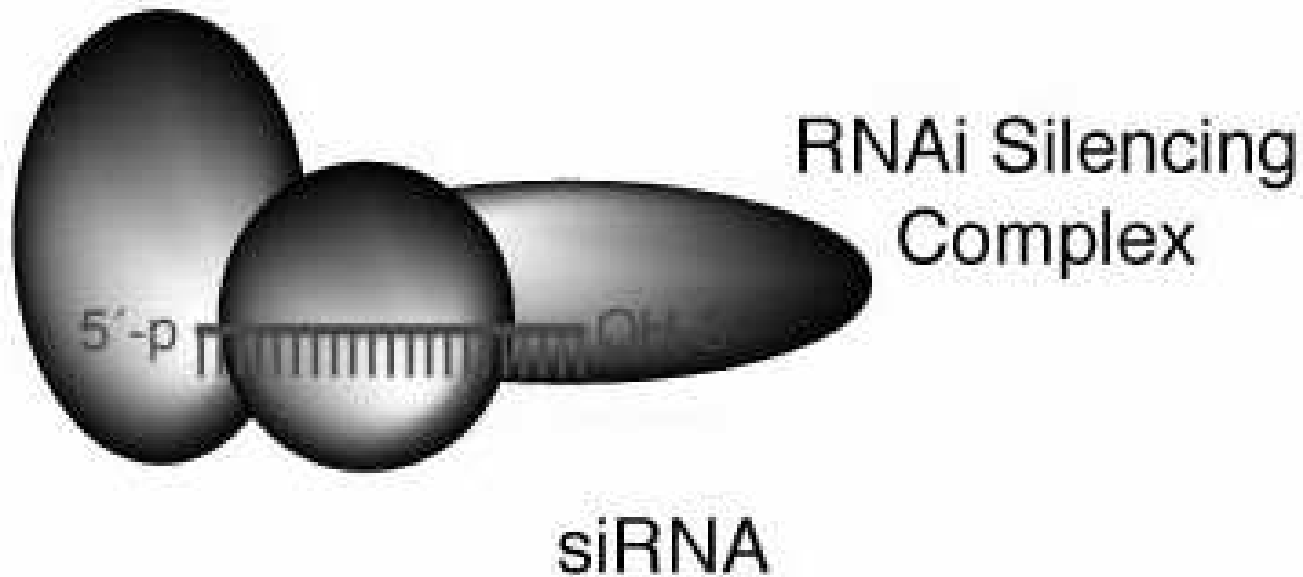
RNA interference

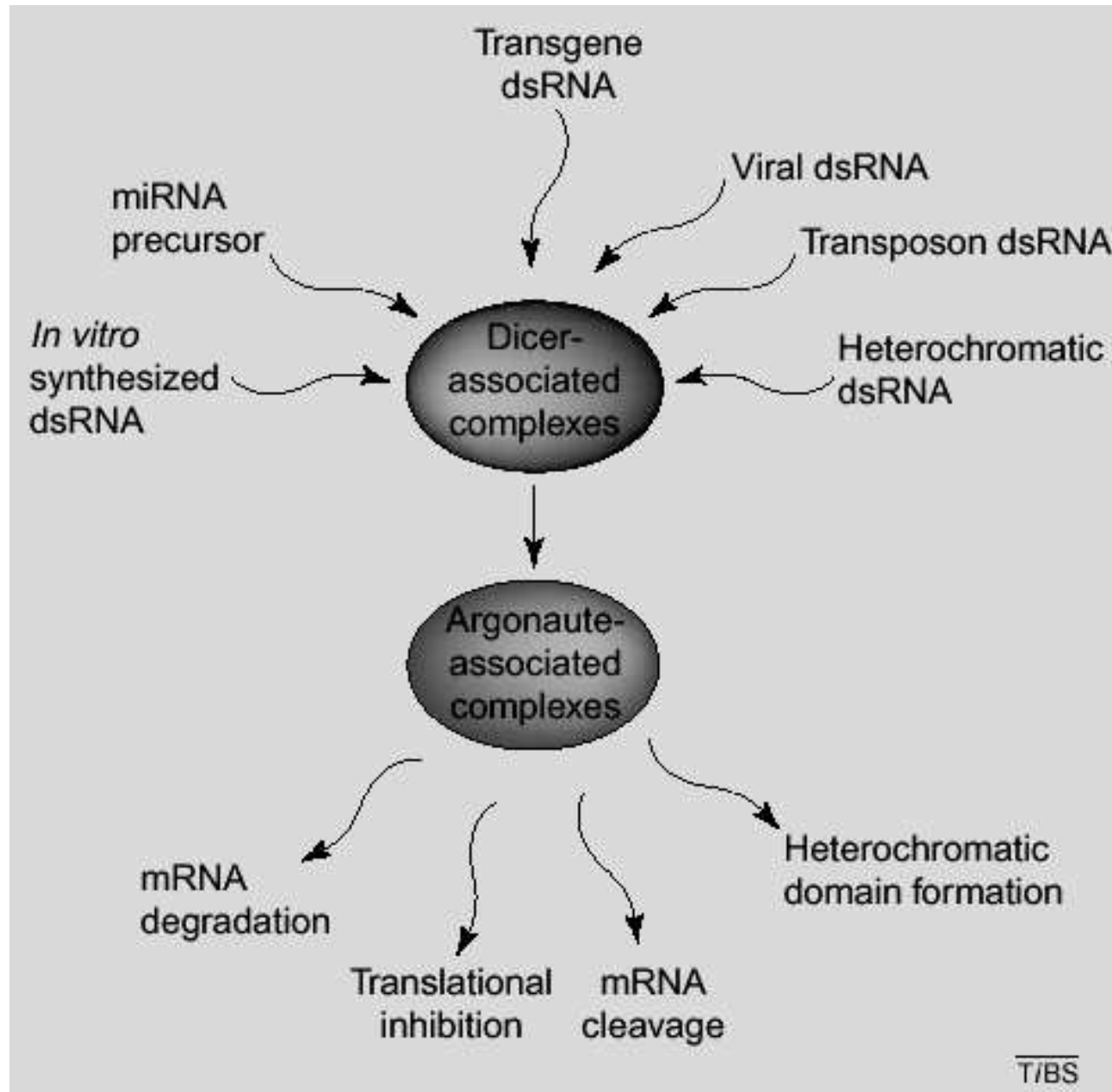
- Na základě homologie siRNA nebo miRNA k mRNA způsobí RISC komplex degradaci



RNA interference

- siRNAs nebo miRNA je inkorporována do „RNA-induced silencing complex“ (RISC)





Denli and Hannon, *Trends in Biochemical Sciences*, 2003

Použití RNA interference

- **Studium funkce genů**
 - **Knock-out nebo knock-down genů**
- **Terapeutická suprese**

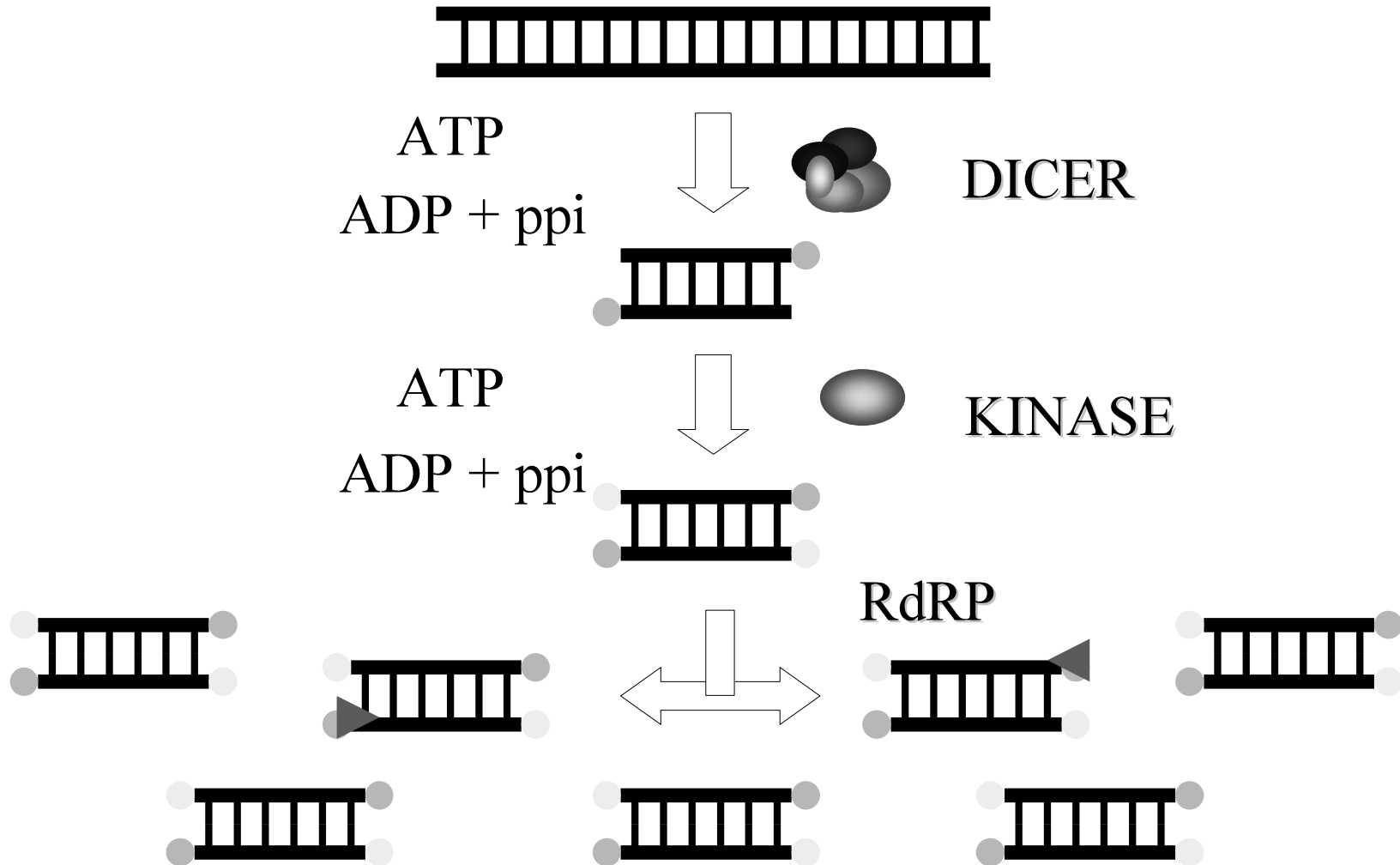
Mechanismus siRNA RNAi

DVA kroky:

- Iniciační krok**
 - Generování siRNA molekul**

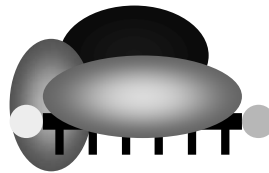
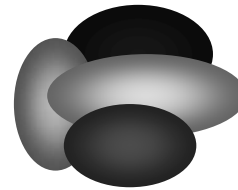
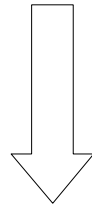
- Efektorový krok**
 - Degradace cílové RNA**

Iniciační krok



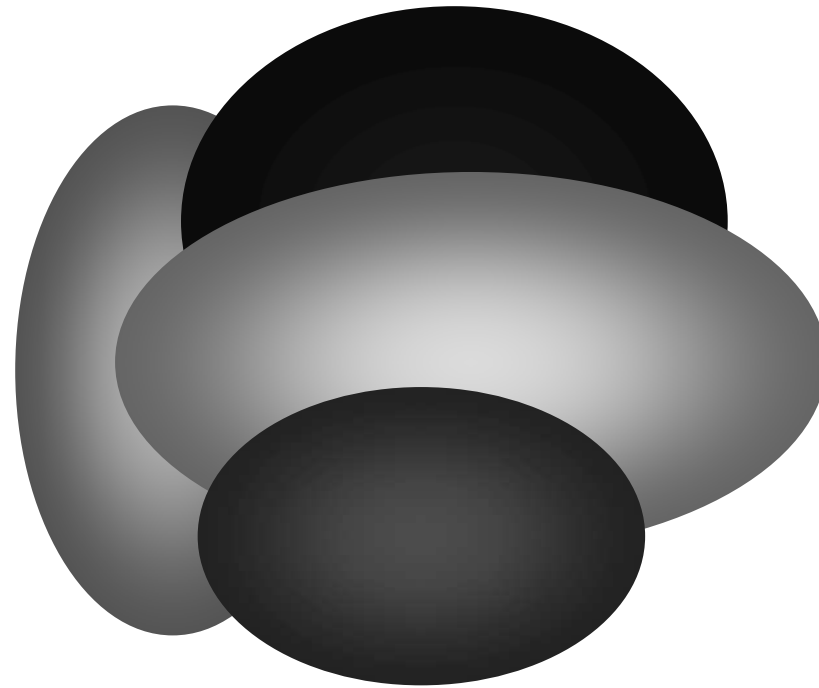
Efektorový krok

- Vazba na siRNA
- siRNA rozvolnění
- RISC aktivace

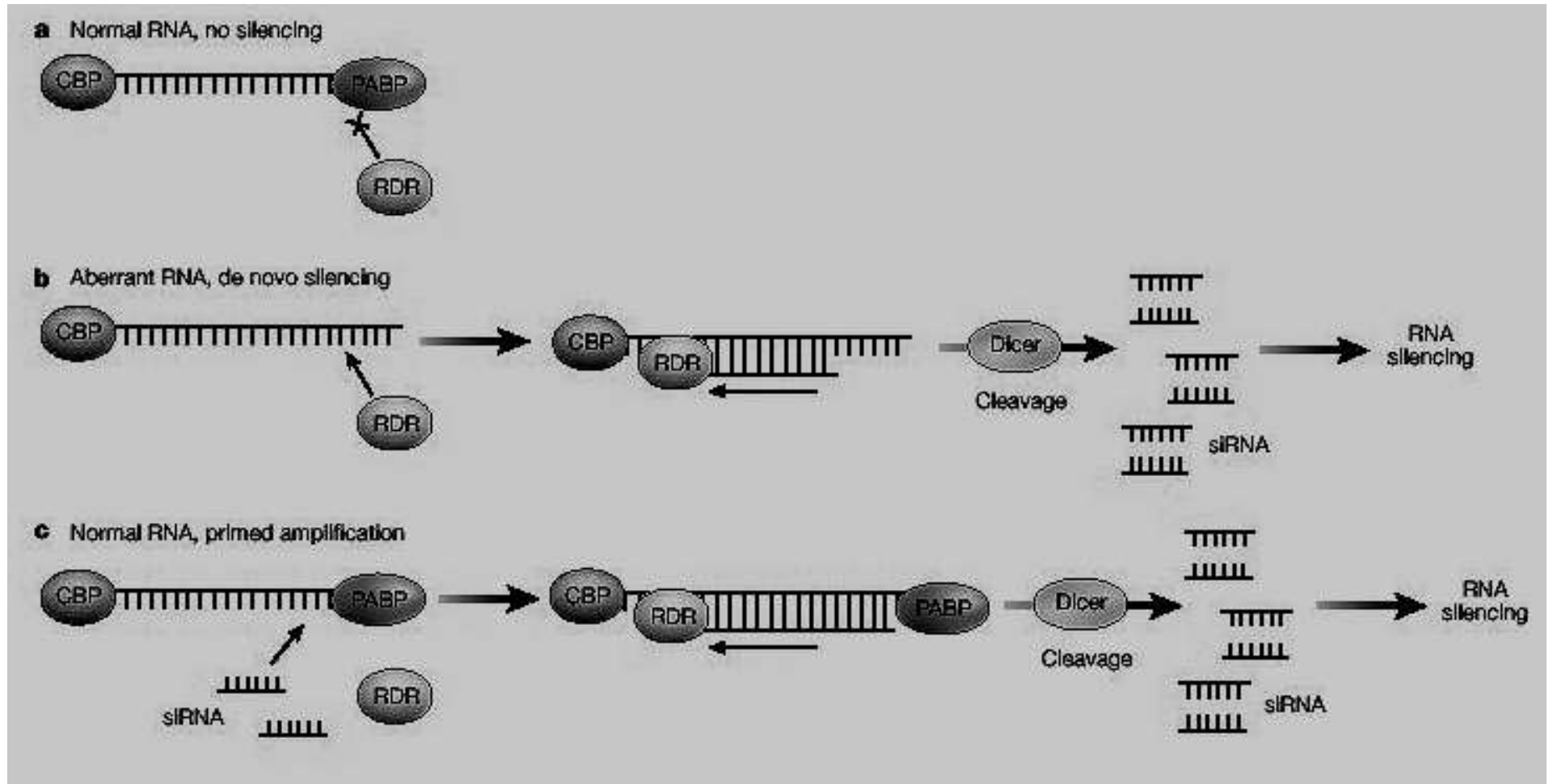


RISC

- 2 RNA binding proteins
- RNA/DNA Helicase
- RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRP)

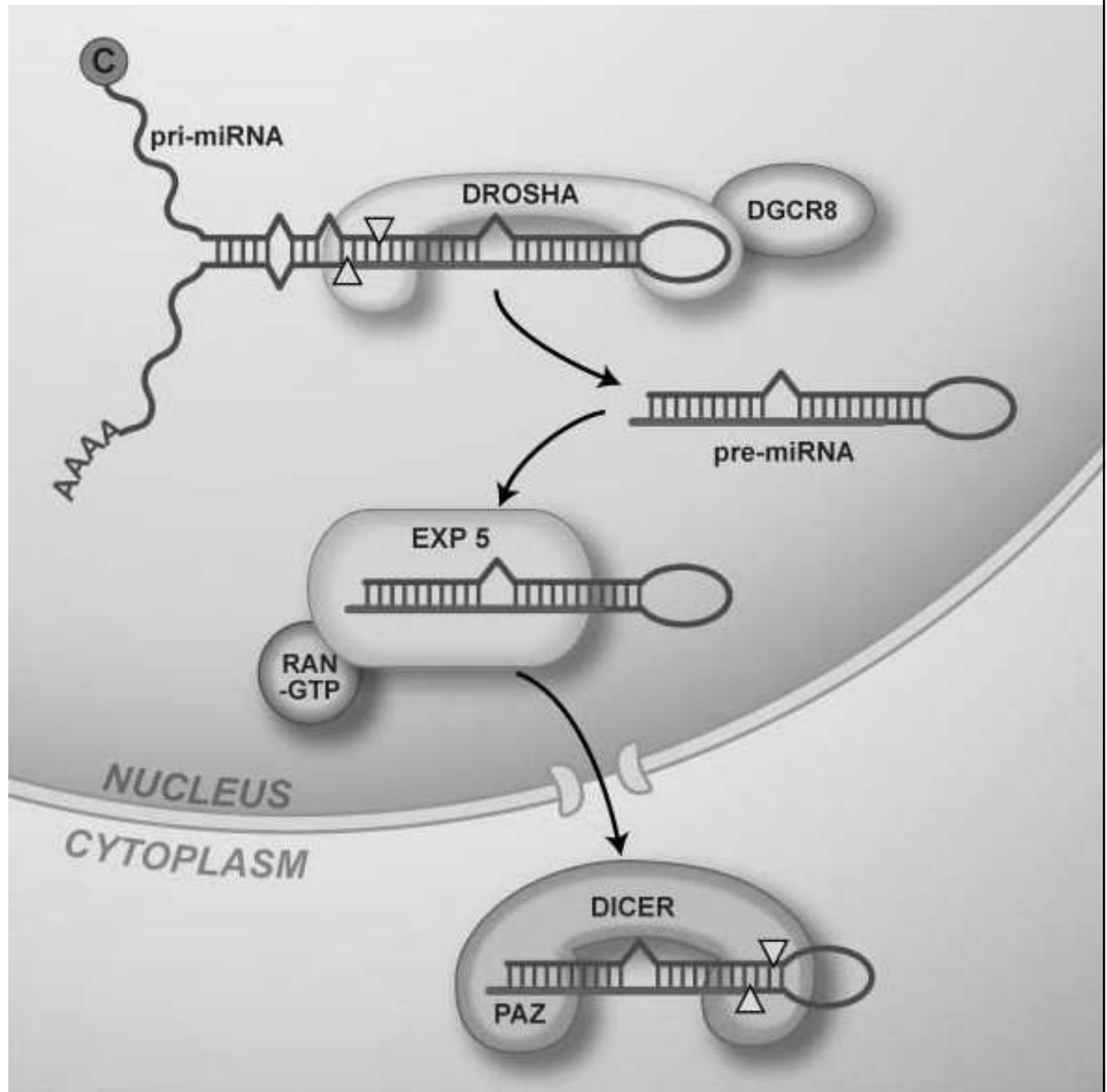


siRNA

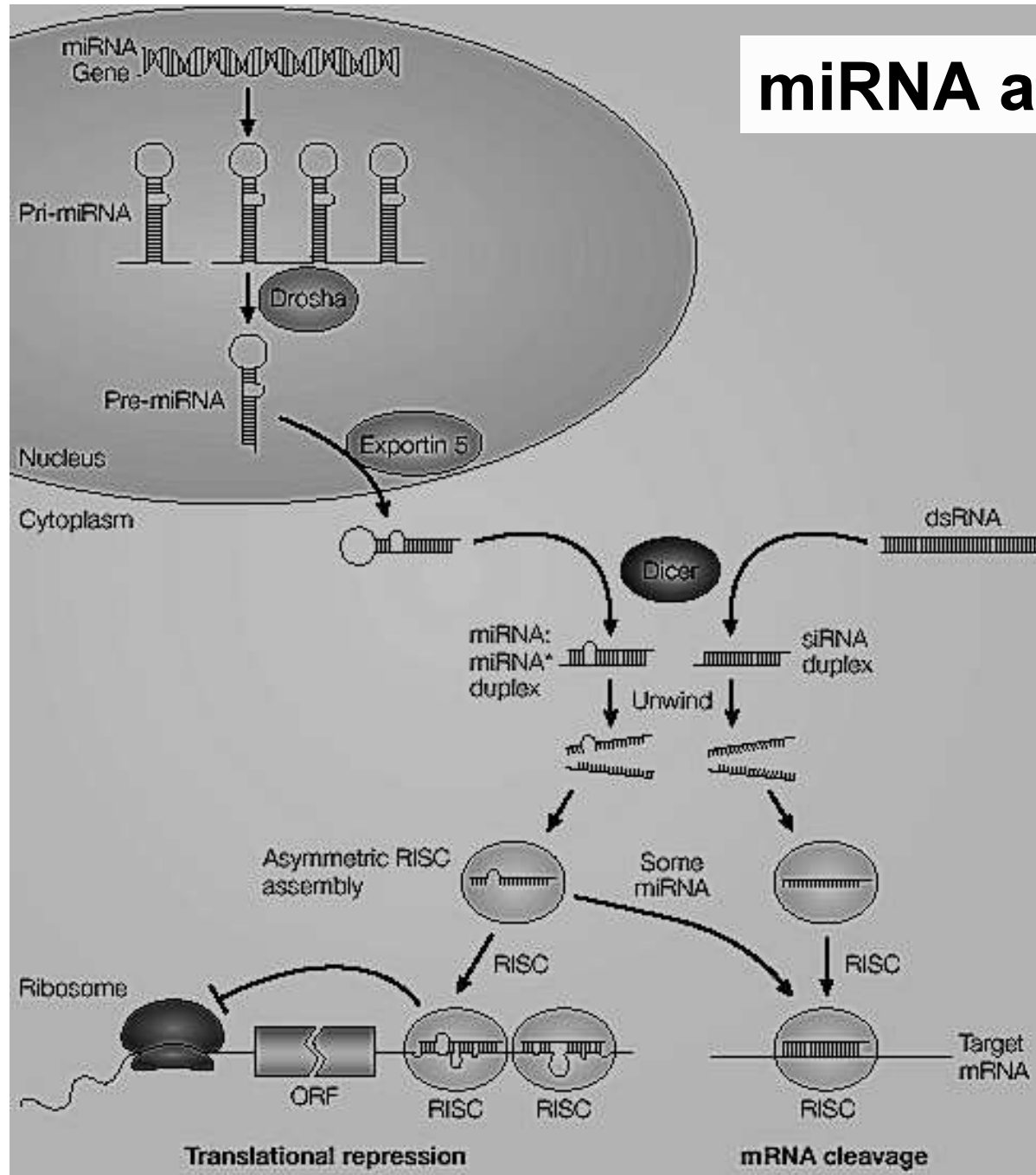


Baulcombe D, *Nature*, 2004

miRNA processing

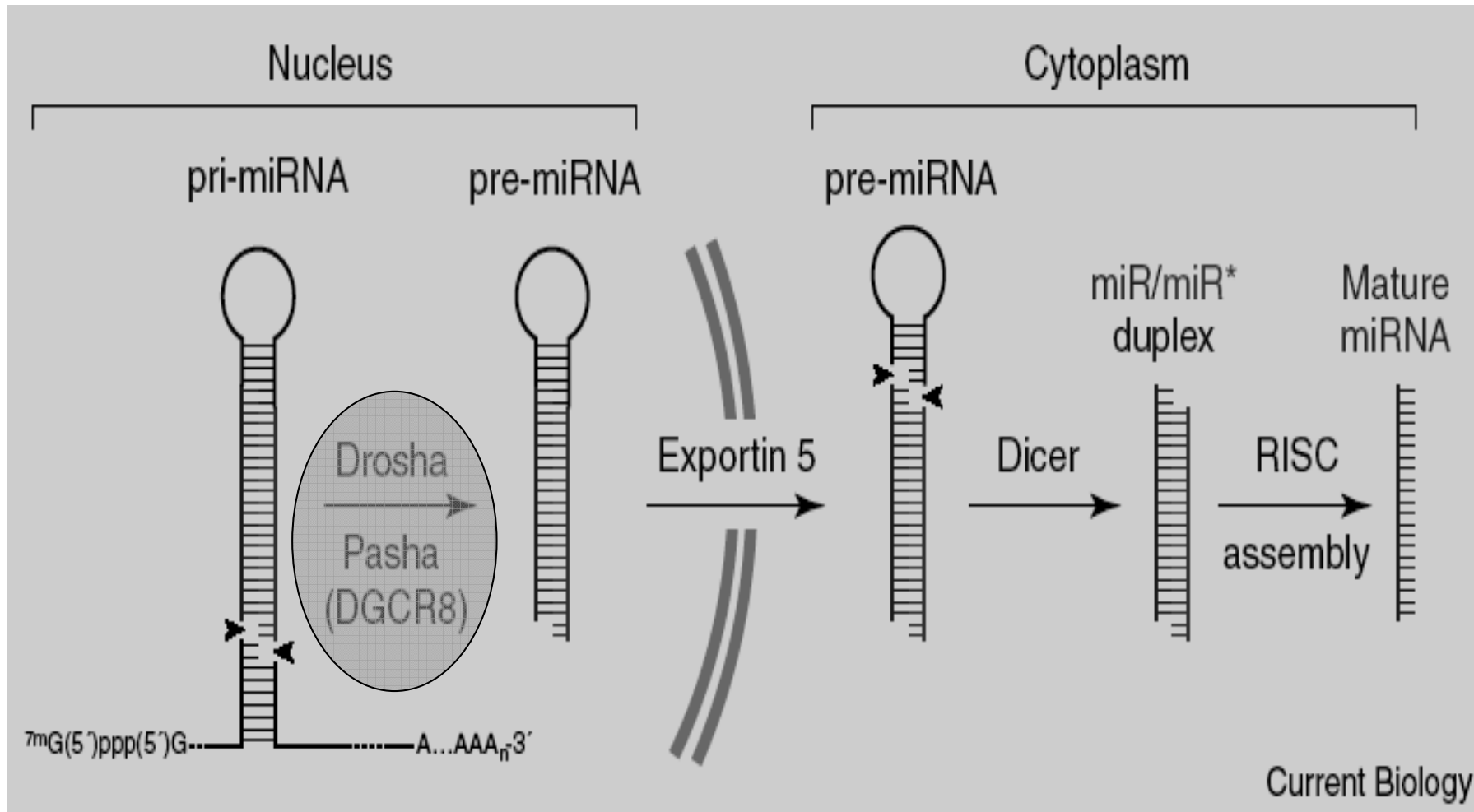


miRNA and RNAi



He and Hannon, *Nature Reviews Genetics*, 2004

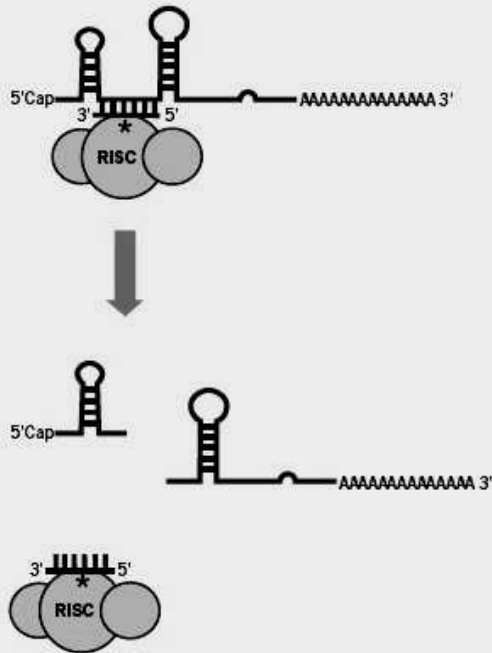
miRNA



RNAi

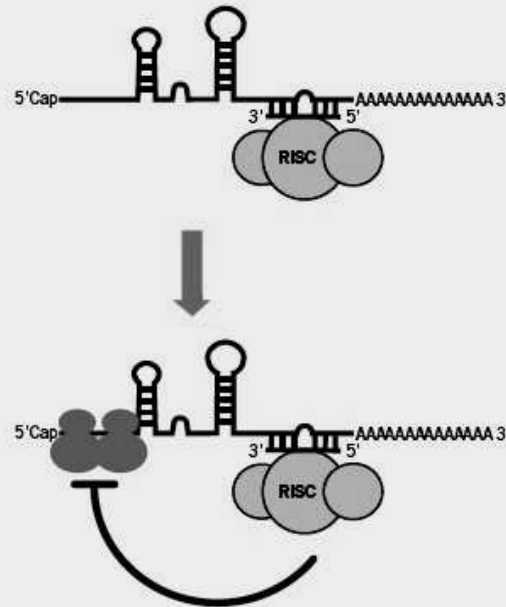
Common in plants

mRNA degradation



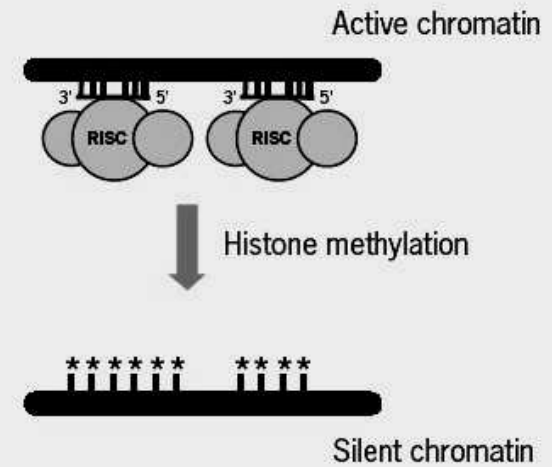
Common in animals

Translational regulation



Common in yeast and plants, and possibly animals.

Transcriptional regulation



Jak vytvořit siRNA pro účely genetického inženýrství

- **Chemická syntéza**
- **Vektor exprimující siRNA**
 - **Virové a plazmidové vektory**

Tvorba siRNA

- **Počáteční užívané dlouhé dsRNA vedly k nespecifickým interakcím (velké změny v expresi proteinů → apoptóza)**
- **Později zjištěno, že RNAi je zprostředkována 21 a 22 bp dlouhými RNA molekulami**

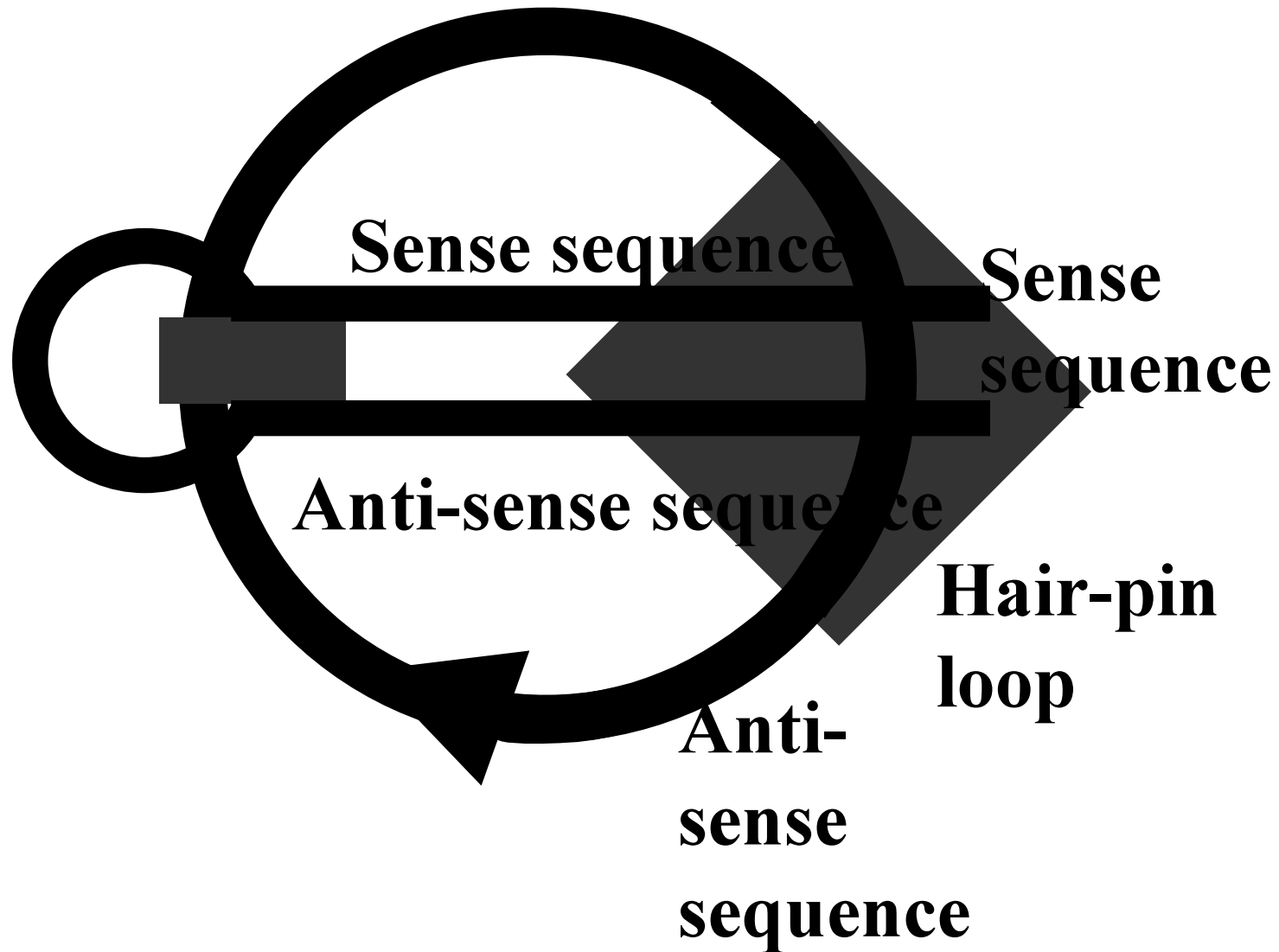
Expese siRNA

- **Pro přechodnou expresi: do buňky musí být dopravena duplexová RNA**
- **Pro stabilní expresi: do buňky dopraven vektor zodpovědný za vznik vlásenkové (hairpin) RNA**
- **Vektorem může být plasmid, retrovirus, adenovirus**

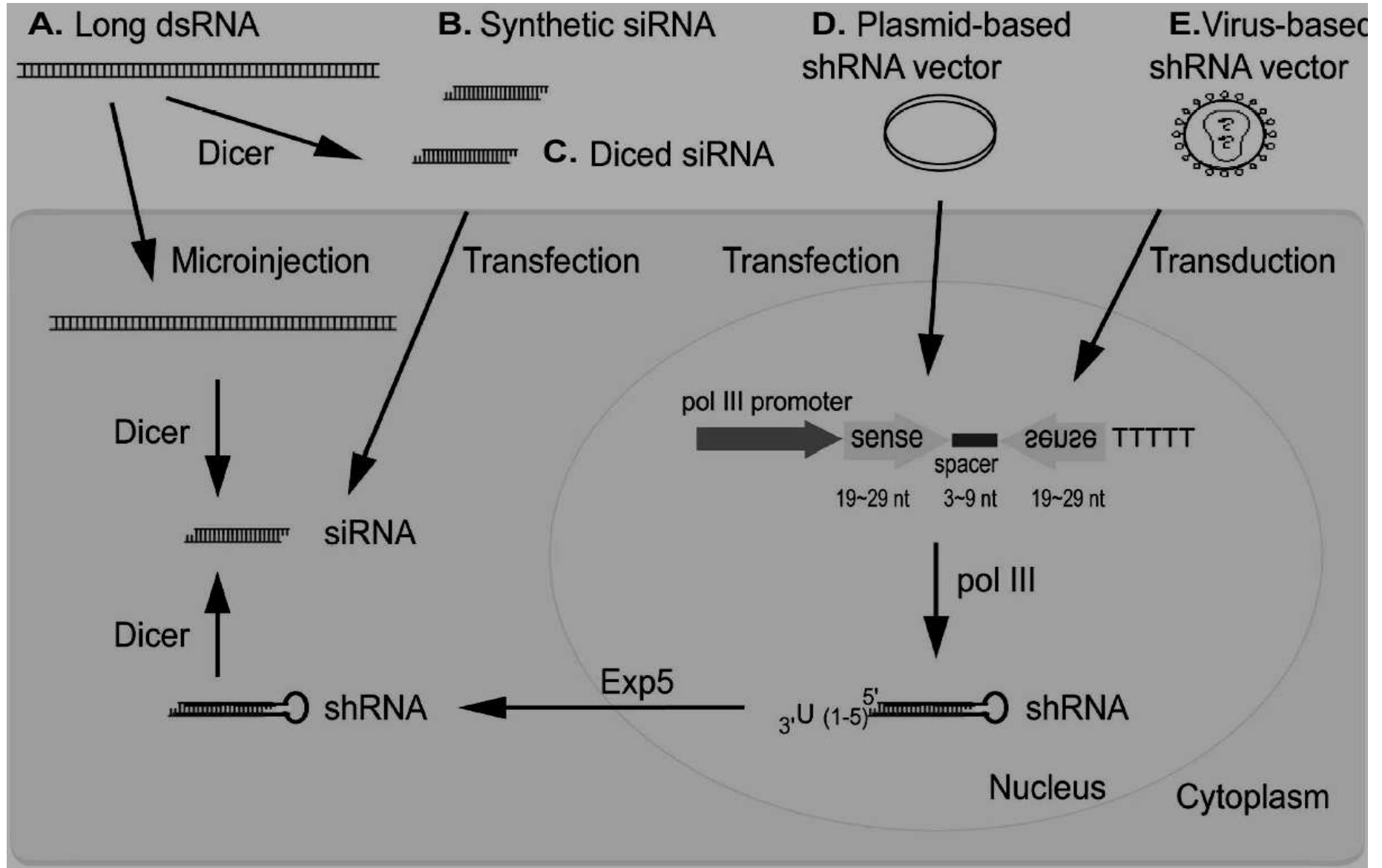
Chemická syntéza siRNA

- **Sekvence**
 - **50-100 bp od start kodonu směrem do genu (downstream)**
 - **Kolem 21 nucleotidů: AA(N₁₉)TT**
- **GC content: 30-70%**

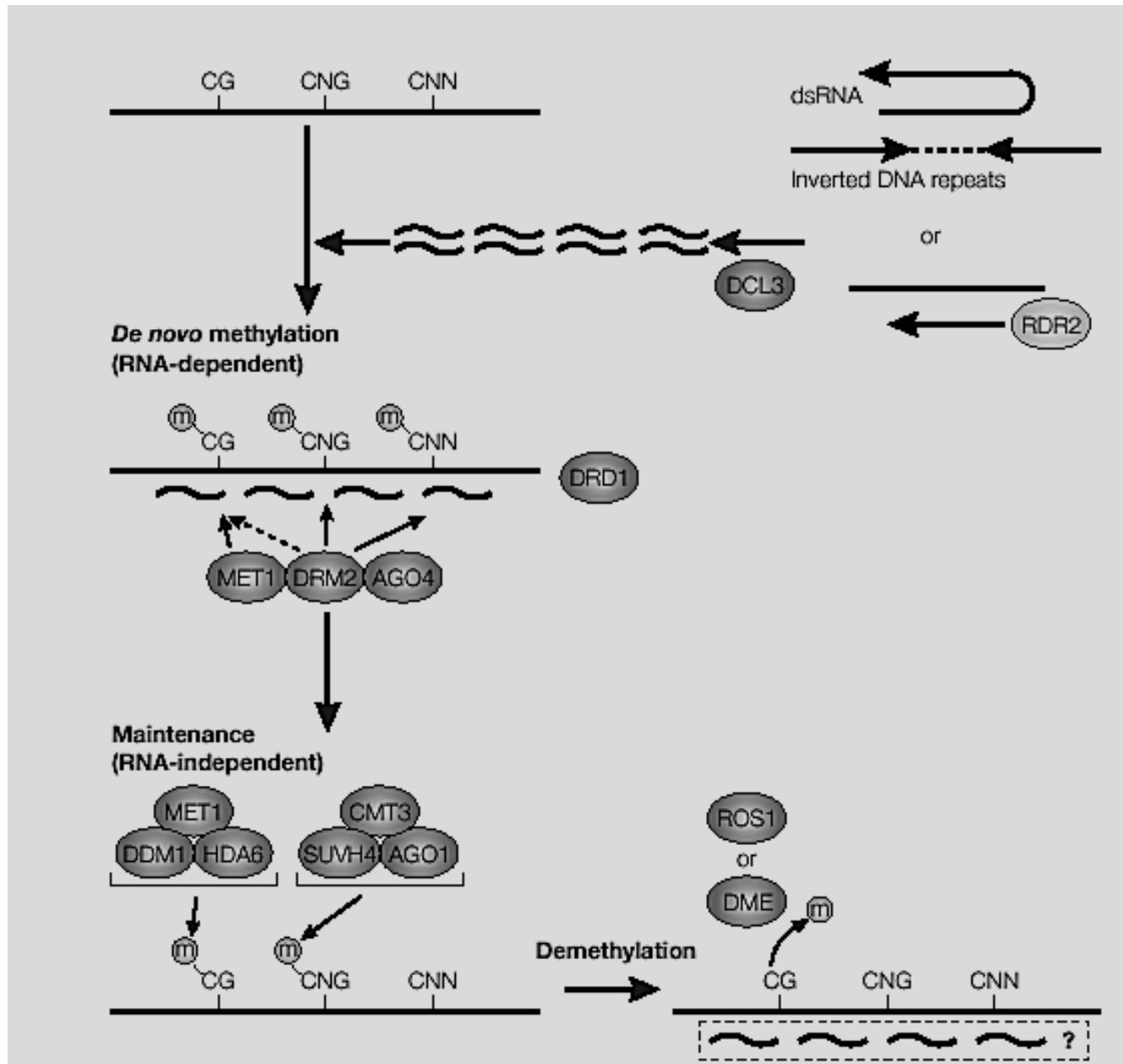
Vectors expressing siRNAs



siRNA

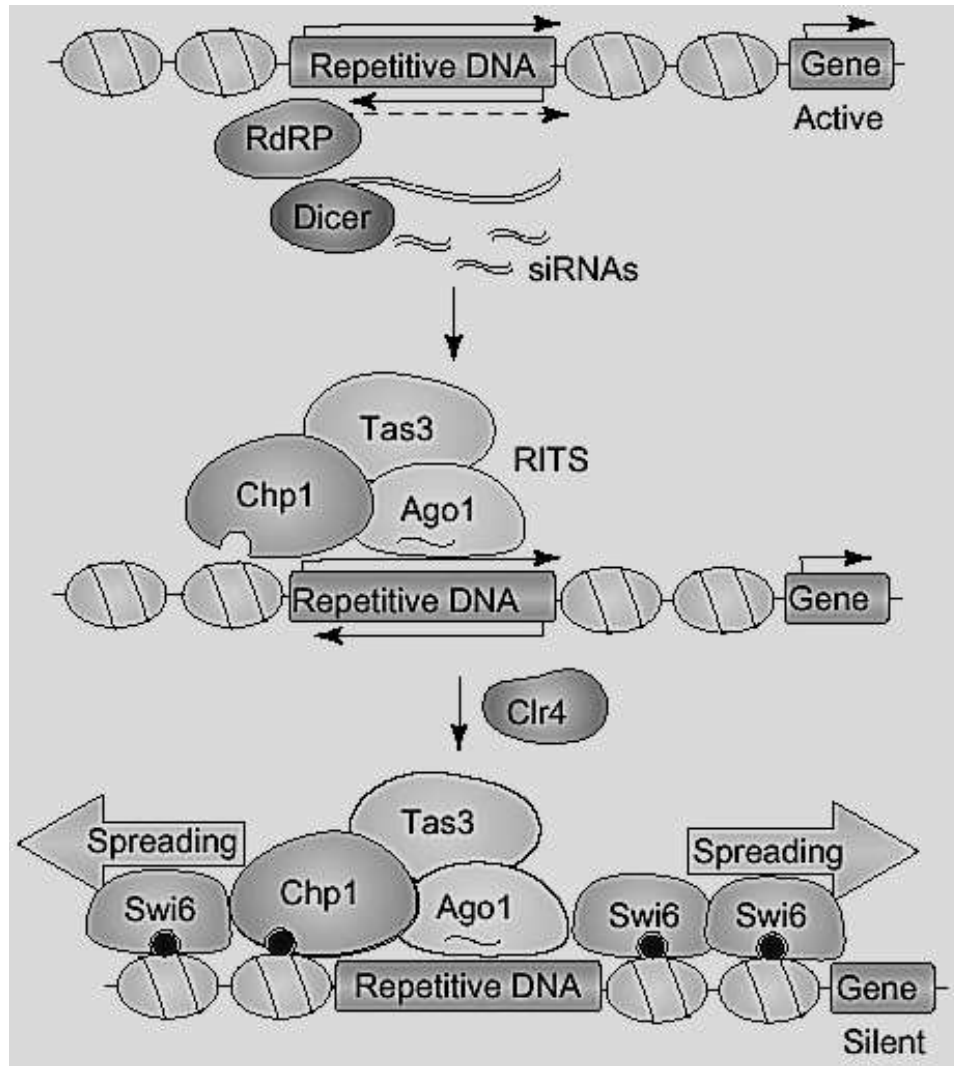


RNA- directed DNA methylation



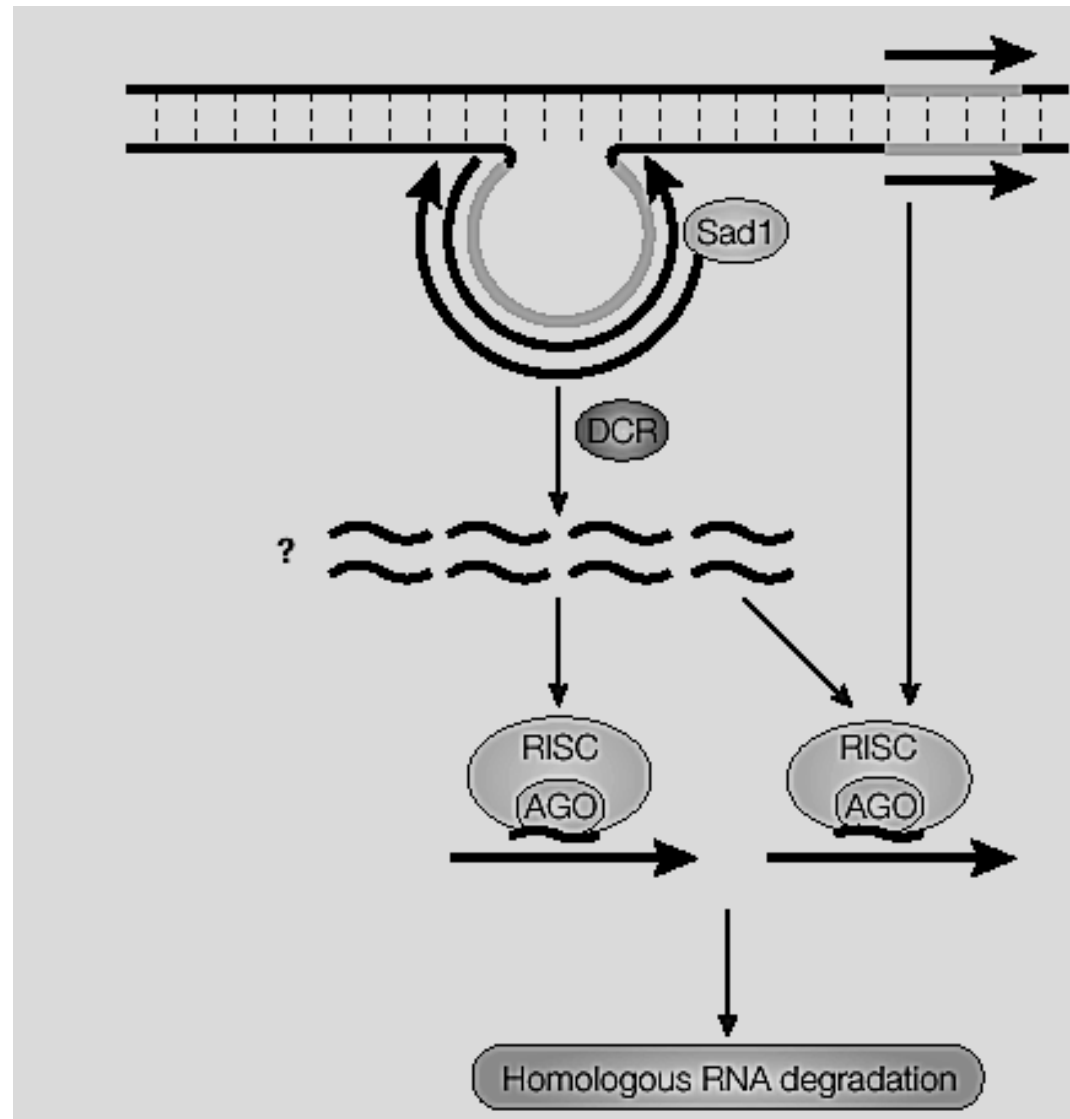
Matzke and Birchler, *Nature Reviews Genetics*, 2005

RNA interference-mediated heterochromatin assembly



Greval and Rice, *Current Opinion in Cell Biology*, 2004

Silencing of unpaired DNA during meiosis



RNA jako molekulární přepínač

**Small modulatory RNA – smRNA
(Kuwabara et al., Cell, 2004)**

Původně objeveny u myší:

Vyskytují se u všech obratlovců

Interagují s regulačními proteiny

Přemění transkripční represor v aktivátor

Rozdíly mezi rostlinnými a živočišnými miRNA

Rostliny

Živočichové

Nachází se:	intergenové oblasti	intergenové oblasti, introny
Shluky miRNA:	vzácné	běžné
Mechanismus působení:	mRNA-štěpení	represe translace
Místo vazby na mRNA:	otevřený čtecí rámeček	3'-konec
Vazebná místa:	jedno	několik

Historie

A vertical timeline on the left side of the slide, with horizontal lines connecting the years to the corresponding text on the right. The years listed are 1969, 1972, 1990, 1993, and 1995. There is a break in the timeline between 1972 and 1990, indicated by two parallel diagonal lines.

1969	Britten a Davidson navrhli, že RNA může sloužit jako regulátor genové exprese
1972	Dvouřetězcové RNA izolovány z lidských buněk
1990	Kosuprese u rostlin
1993	První microRNA (lin-4) izolována u hád'átka
1995	Sense i antisense RNA konstrukty inhibují expresi u hád'átka

Historie

1998	dsRNA efekt u háďátka
1999	Objev krátkých RNA rostlin
2000	Purifikace RISC komplexu
2001	Identifikace Dicer
2002	RNAi použito proti HIV
2004	miRNA fungují jako onkogeny
Dnes	Plošný „screening“ odhaluje, že až polovina genů je regulována miRNA