

# Biologická úloha RNA

---

**mRNA** – kopíruje genetickou informaci z molekuly DNA, přenáší ji do místa, kde dojde k překladu do struktury proteinu

**tRNA** – překládá kód sekvence bází do sekvence aminokyselin. cca 80 nukleotidů, koncová sekvence –CCA, na ni se váže příslušná AK

**rRNA** – podílí se (s proteiny) na struktuře ribozomu.  
Prokaryota: 5S, 16S, 23S  
Eukaryota: 5S, 5.8S, 18S, 28S

**ribozym** – (**Ribonucleic acid enzyme**), RNA s katalytickou funkcí  
23S-rRNA ve velké podjednotce ribozomu katalyzující syntézu peptidové vazby (peptidyl transferáza)  
RNázaP – štěpí RNA  
RNA+protein, *in vitro* - katalytická aktivita RNA složky

→ představa RNA světa v jistém stádiu evoluce, kdy byly molekuly RNA hlavními biologickými katalyzátory

# Epigenetická informace

---

Mitoticky i meioticky děděné změny genové exprese, které nesouvisí se změnou primární struktury DNA

Epigenetickou kontrolu zprostředkovávají

- modifikace makromolekul; DNA a histonů:

METYLACE DNA

MODIFIKACE (metylace, acetylace, fosforylace, ubiquitinace) histonových proteinů

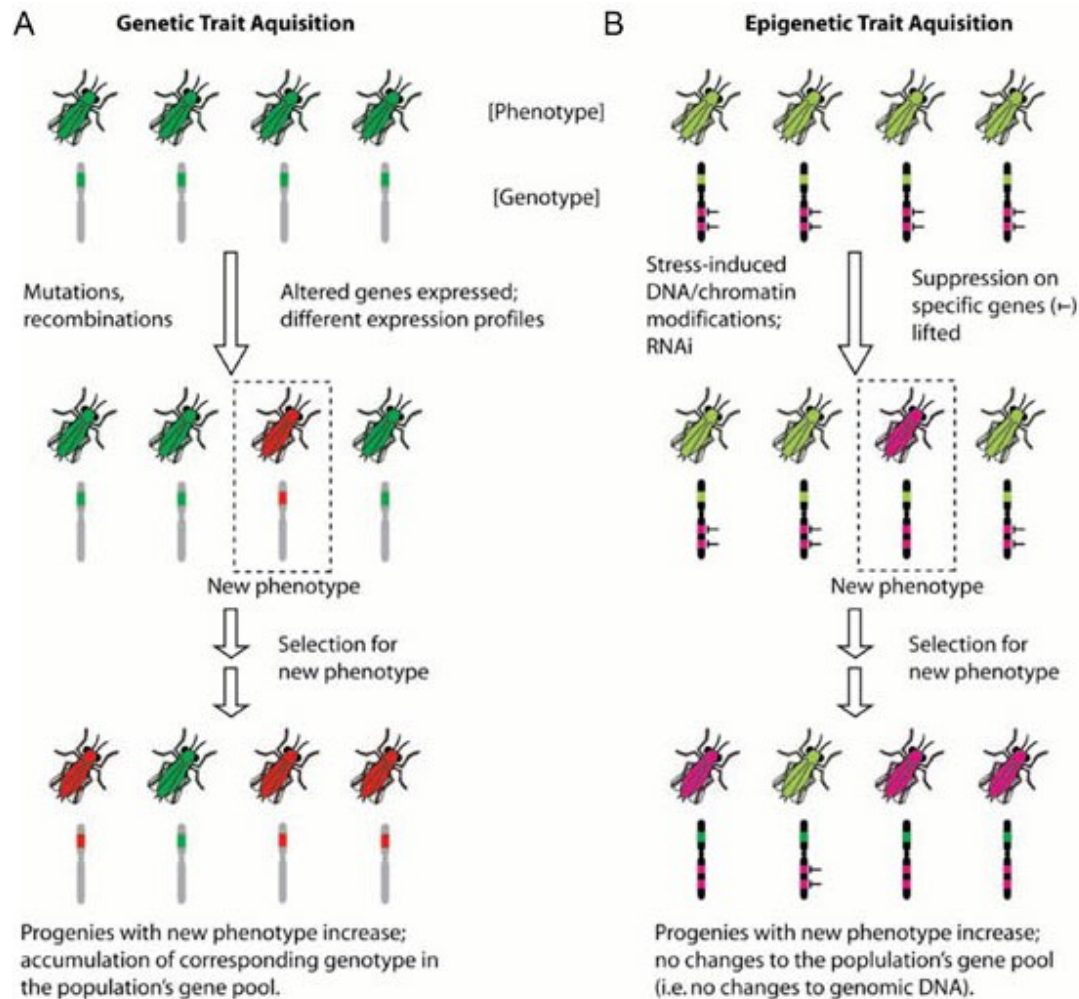
- malé a nekódující molekuly RNA
- architektura chromatinu



Regulace aktivity a exprese genů během vývoje a diferenciaci, reakce na změněné podmínky

Spojka mezi genotypem a fenotypem

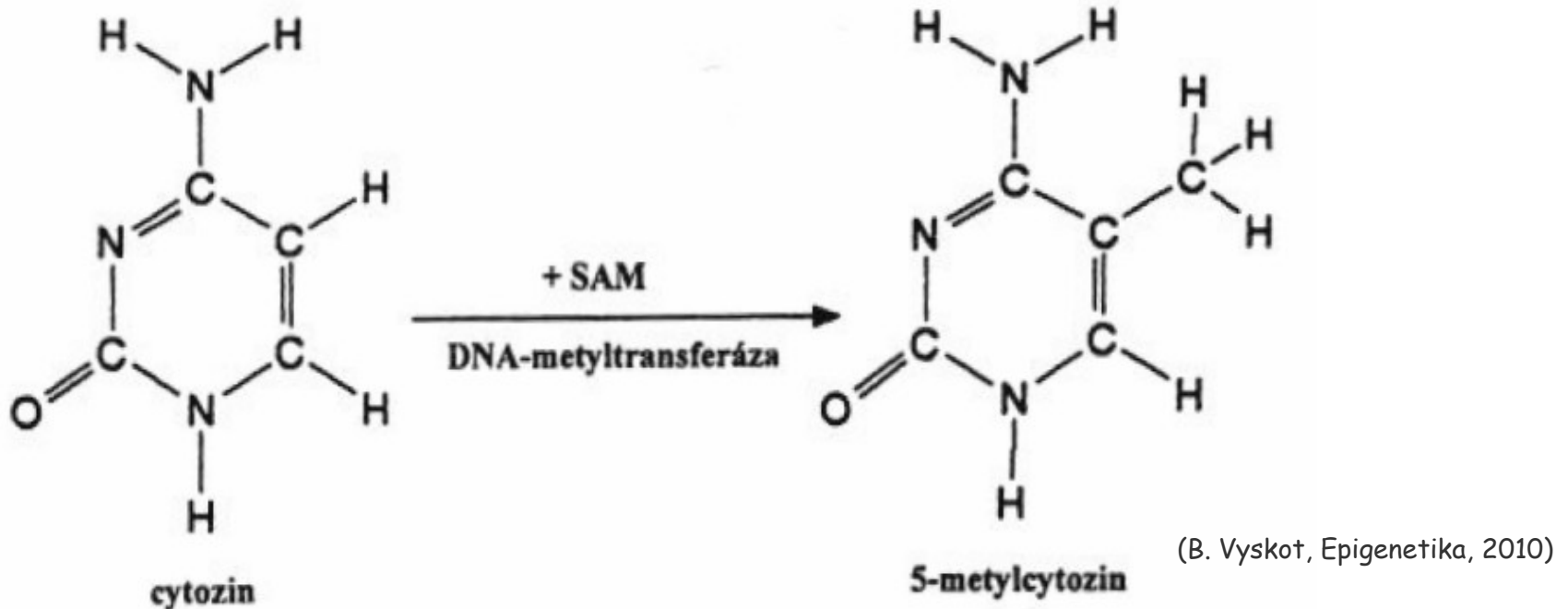
# Genetické a epigenetické změny vedoucí ke změně fenotypu



# Metylace DNA

Modifikace cytosinu v poloze 5, nejčastější modifikace DNA u eukaryot

Postreplikativní modifikace



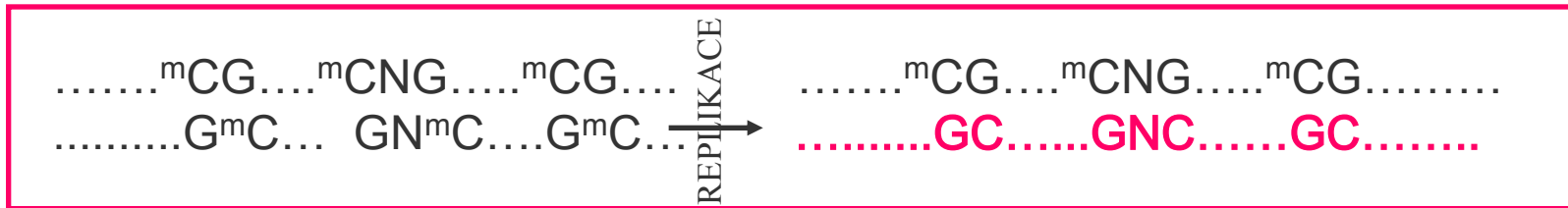
SAM – S-adenosyl-methionin; v transmetylační reakci se konvertuje na S-adenosyl-homocystein

# Metylace DNA

## Distribuce metylace v genomech:

Metylace C v **symetrických** sekvencích – klíčové pro dědičnost metylačního obrazu

- CpG (dublety)
- CpNpG (triplety; rostliny)



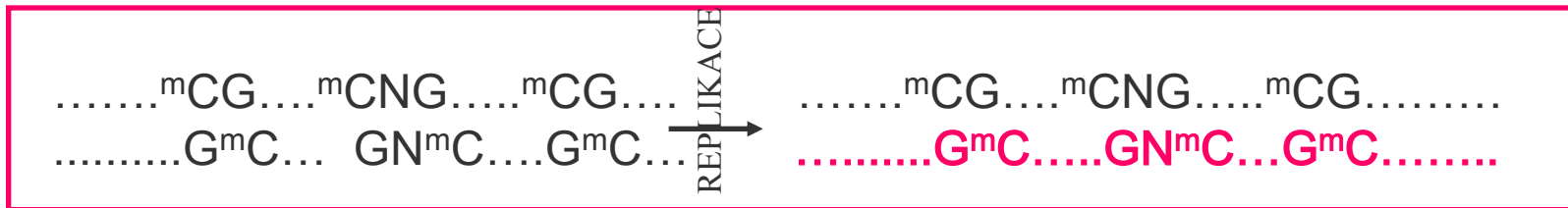
Metylace C v **asymetrických** sekvencích  
(rostliny, velice omezeně u živočichů)

# Metylace DNA

## Distribuce metylace v genomech:

Metylace C v **symetrických** sekvencích

- CpG (dublety)
- CpNpG (triplety; rostliny)



Metylace C v **asymetrických** sekvencích

(rostliny, velice omezeně u živočichů)

# UMLČENÍ GENU

TRANSKRIPČNÍ  POSTTRANSKRIPČNÍ

- inaktivní promotor (žádný transkript nebo pouze malé množství)

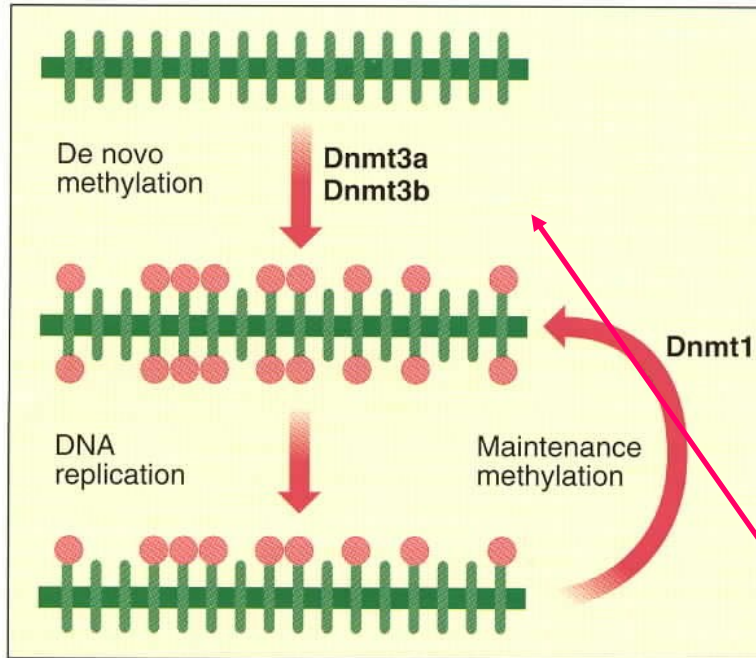
- metylace DNA v oblasti promotoru

- normální transkripční aktivita promotoru

- nestabilní transkript

- metylace DNA v transkribované oblasti (hlavně na 3'konci genu)

# Živočišné DNA metyltransferázy



(Bird A, Science, 1999)

**Dnmt2** - u savců, rostlin;

*Drosophila* – slabá non-CG metylace  
v časných fázích vývoje;

*S. pombe* – mutace, kóduje nefunkční  
protein, ale je exprimován

**Udržovací (maintenance):**  
methylace hemimetylovaných  
vláken po replikaci DNA;  
cytosiny v symetrických  
motivech (správný embryonální  
vývoj, imprinting, inaktivace chr. X)

***de novo*:** metylace dosud  
nemetylovaných úseků;  
musí existovat podnět (třeba  
přítomnost regulačních molekul  
RNA-dokázáno pouze v rostlinách;  
interakce DNA-DNA v repetících;  
neobvyklé struktury DNA)  
schopny *de novo* i udržovací metylace



# Rostlinné DNA metyltransferázy

**MET1 (Methyltransferase 1)** - udržovací metylace cytosinů v dubletech CG; homolog Dnmt1

**CMT3 (Chromomethylase 3)** - metylace cytosinů v tripletech CNG; unikátní pro rostliny

**DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 2)** - *de novo* metylace cytosinů ve všech sekvenčních motivech, musí existovat permanentní stimul – RNA?;

homolog Dnmt3 - jinak řazené podjednotky – příčina odlišné substrátové specifity?

DRM3 – VI, IX, X, I – V

Dnmt3 – I – VI, IX, X

**(DDM1 (Decrease in DNA methylation)** – kóduje protein, který je součástí komplexu remodelujícího chromatin, role v udržování CG metylace)

# FUNKČNÍ KOOPERACE MEZI METYLTRANSFERÁZAMI:

MET1 je schopná (v kooperaci s DRM2),  
*de novo* metylace CG motivů

Dnmt1 je také schopná *de novo* metylace CG,  
tuto schopnost posiluje pre-existující  
methylace v daném lokusu

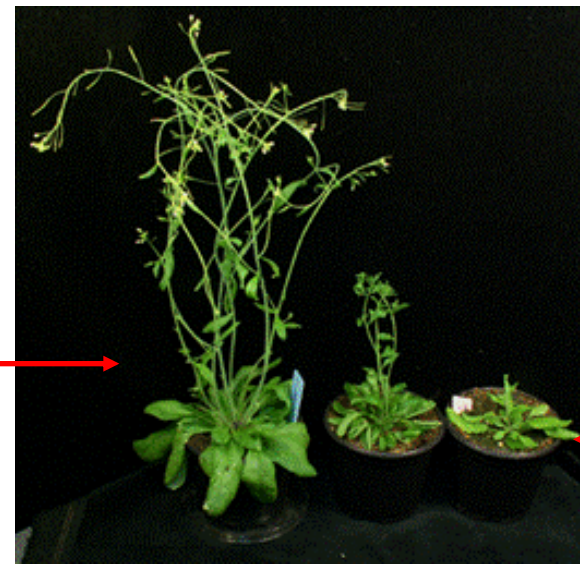
# Biologická role CpG a non-CpG metylace u rostlin

## CG: zajišťuje stabilní epigenetický obraz

(*A.thaliana* mutanty deficientní v udržování metylace CG – aktivace alternativních epigenetických mechanismů – non-CG metylace, H3K9Me2, architektura jádra) (Mathieu O. et al, Cell 2007)

Nefunkční MET1 – poruší se celý epigenetický obraz, fenotypické defekty – přetrvávají i po obnovení funkce enzymu.

rostlina  
divokého typu



met1 mutant



# Biologická role CpG a non-CpG metylace u rostlin

## CG: zajišťuje stabilní epigenetický obraz

(*A.thaliana* mutanty deficientní v udržování metylace CG – aktivace alternativních epigenetických mechanismů – non-CG metylace, H3K9Me2, architektura jádra) (Mathieu O. et al, Cell 2007)

Nefunkční MET1 – poruší se celý epigenetický obraz, fenotypické defekty – přetrvávají i po obnovení funkce enzymu.

Nefunkční CMT3 nebo DRM2 – bez fenotypu

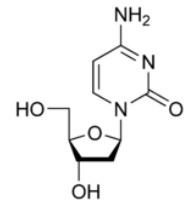
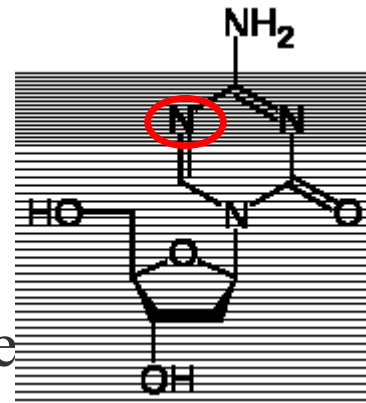
Nefunkční CMT3 a DRM2 - fenotypové změny po obnovení funkcí enzymů se metylační i fenotypový obraz vrací k normálu

# Inhibitory metyltransferáz – epigenetická terapie

Nádory - specifické změny v metylačním obrazu (pokles metylace v sekvencích pericentromerických satelitů, hypermetylace promotorů tumor supresorových genů) – vývoj nových diagnostických a terapeutických nástrojů.

## 5-aza-cytidine, 5-aza-deoxycytidine

inkorporace do DNA, irreverzibilní vazba na DNA metyltransferázu – inaktivace



„Malé“ molekuly inhibující DNA metyltransferázy: procain (lokální anestetikum), procainamide – deriváty kyseliny 4-aminobenzoové, neinkorporují se do DNA, váží se na CG bohaté oblasti, pravděpodobně narušují interakce mezi metyltransferázou a cílovou sekvencí (**X** jejich působení je komplexní, přímý vliv na DNA metyltransferázy nebyl jednoznačně prokázán).

# DEMETYLACE

1. PASÍVNÍ – ne-funkce udržovacích metyltransferáz

2. AKTIVNÍ (v rostlinách)

DEMETER (DME)

REPRESOR OF SILENCING (ROS)

(DNA glykosylázová doména – odstraní 5-mC, lyáza otevře vlákno, polymerázová a ligázová aktivita doplní mezeru)

DME – vývoj rostliny; kontroluje parentální imprinting genů v endospermu – hypometylace promotorů maternálních alel genů *mea* (regulátor vývoje endospermu) a *fwa* (transkripční faktor, podílí se na kontrole doby kvetení).

ROS – uvolňuje TGS transgenů s hypermetylovanými promotory

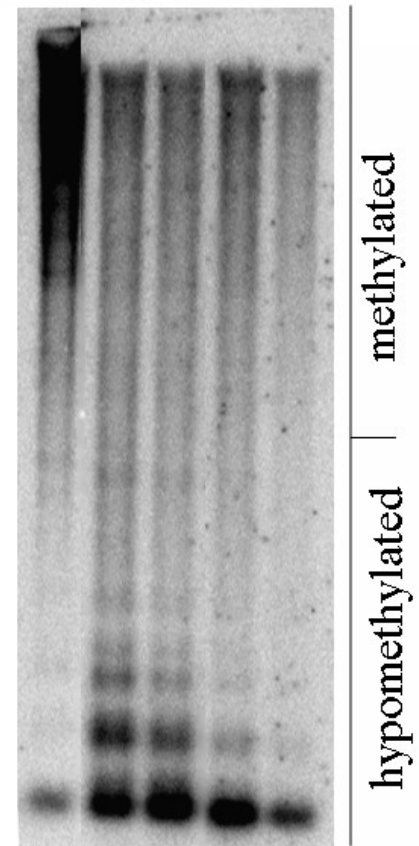
# METODY STUDIA METYLACE DNA

- Digestce metylačně citlivými restričními endonukleázami**  
- v rozpoznávací sekvenci mají cytosin, neštěpí, pokud je metylován

CG: HpaII  $mC^mCGG$   
CfoI  $G^mCGC$   
SmaI  $CC^mCGGG$   
TaqI  $A^mCGT$

CNG: MspI  $mCCGG$

CHH: Sau96I  $GG(A/T)^mC^mC$   
(záleží na tom, co v sekvenci následuje)



# Metody studia metylace DNA

## 2. Modifikace DNA bisulfitem

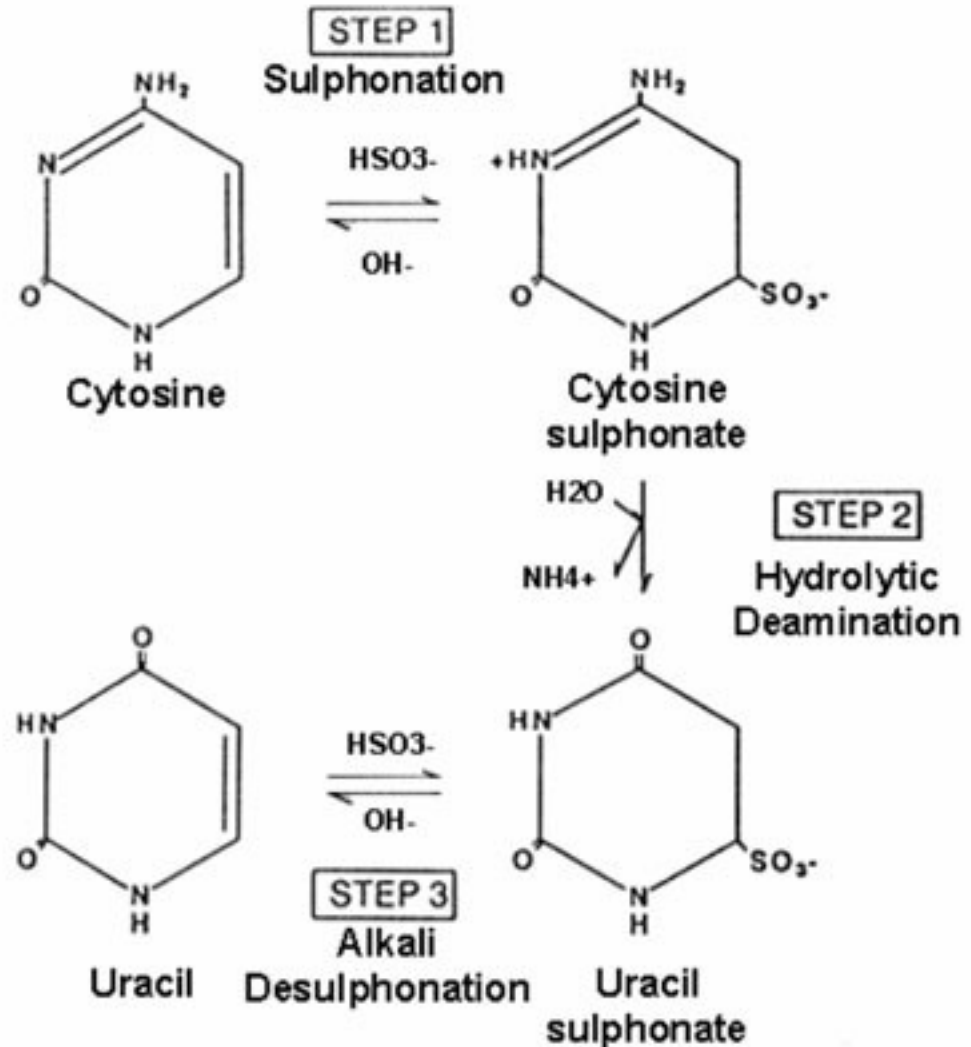
cytosiny kovertovány na uracily,  $^{14}\text{C}$  nereagují.

Modifikovaná DNA je namnožena pomocí PCR, uracily se párují s adeninem jako thyminy. Primery musí amplifikovat modifikovaný i nemodifikovaný templát; amplifikuje se každé vlákno zvlášť – nejsou komplementární.

PCR produkt se klonuje a sekvenuje – cytosiny jsou pouze tam, kde byly původně  $^{14}\text{C}$ .

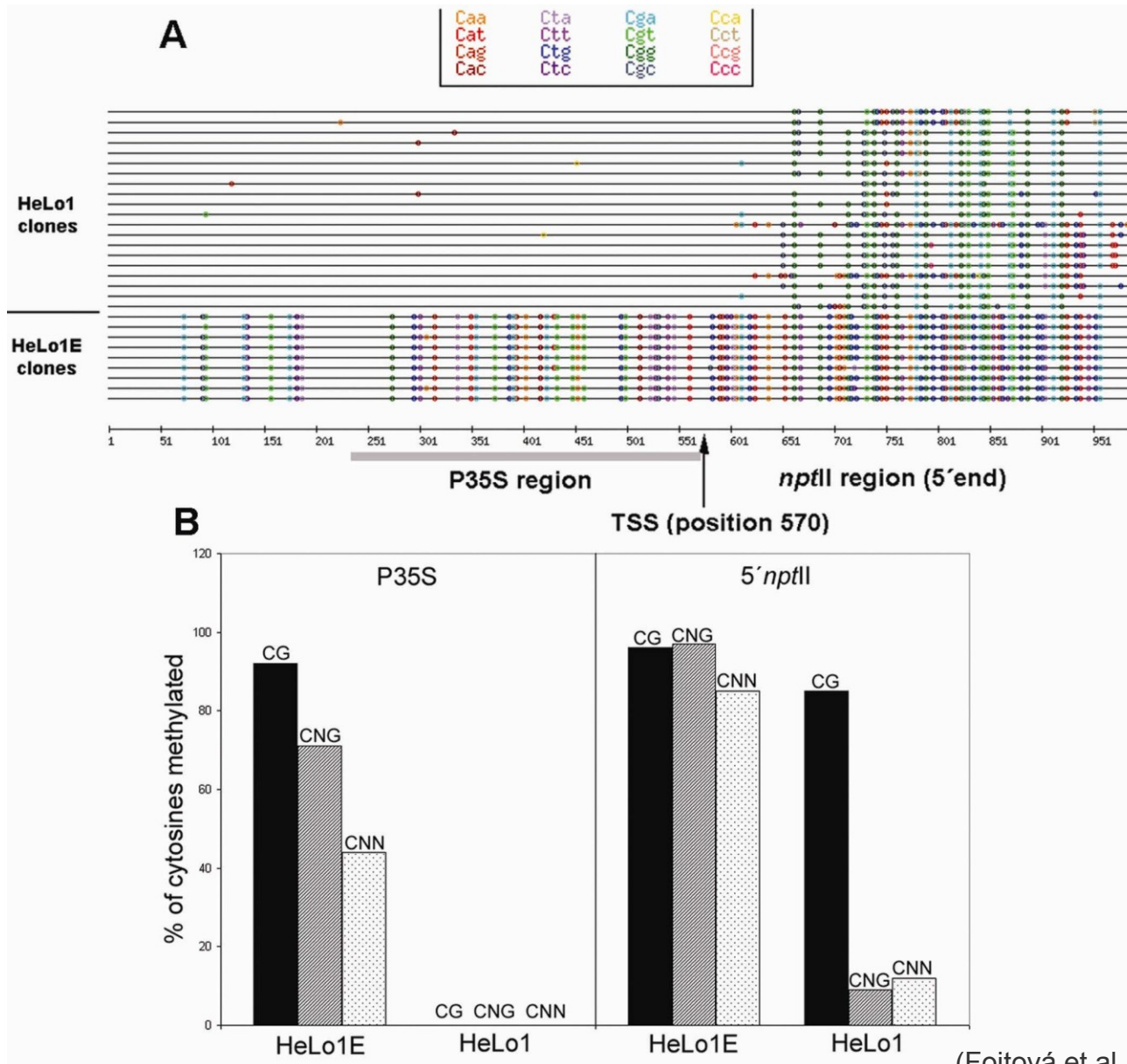
Výhoda analýzy:

- informace o lokalizaci metylovaných cytosinů v celé sekvenci, ne pouze v konkrétním restriční místě





# METODY STUDIA METYLACE DNA



# METODY STUDIA METYLACE DNA

## 3. Imunoprecipitace pomocí protilátek proti <sup>m</sup>C nebo afinitní purifikace pomocí <sup>m</sup>C vazebného proteinu

Techniky umožňující metylační analýzu celého genomu, metylovaná frakce je vizualizovaná hybridizací na microarrays.

Výsledky analýzy genomu *Arabidopsis*:

- cca 20% cytosinů v genomu je metylovaných
- nejvíce <sup>m</sup>C je v transpozonech a dalších repetících
- nejméně metylované jsou promotory endogenních genů
- asi 1/3 genů obsahuje „body methylation“ (CG místa na 3' konci kódující oblasti)

# RNA INTERFERENCE - SHRNUTÍ

Dlouhá dvouvláknová RNA (**dsRNA**; >200 nt) může umlčet expresi cílových genů v různých organismech (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, rostliny). Dlouhé dsRNA vstupují do metabolické dráhy nazývané RNA interference (**RNAi**). Dvouvláknová RNA je v reakci katalyzované enzymem **Dicer** (z rodiny RNáz III) rozštěpena na úseky dlouhé 20-25 nukleotidů, tzv. malé interferující RNA (**siRNA**). siRNAs jsou začleněny do komplexu obsahující enzymy s ribonukleázovou aktivitou zvaného „RNA-induced silencing complexes“ (**RISC**). Dvouvláknové siRNA jsou rozvolněny, čímž dochází k aktivaci komplexu. siRNA navádějí RISC k molekulám RNA s komplementární sekvencí a dochází ke štěpení těchto molekul, a to blízko středu úseku, který je navázán k vlákně siRNA.

**Začalo to červem.....,  
ale na počátku byly kytky**

**Guo, Kempfues, 1995**

**Fire, Mello, 1998**



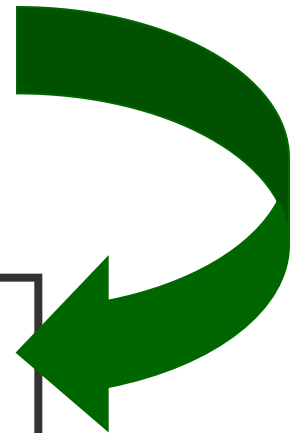
**RNAi**

**Jorgensen et al., 1990**

**Que, Jorgensen, 1998**



**PTGS**



### **Vlastnosti procesu RNA interference:**

\* vlastní interferující molekulou je dsRNA (ne antisenseRNA)

\* efekt je vysoce specifický

\* velice potentní (několik molekul dsRNA v buňce stačí pro vyvolání efektivní odpovědi)

\* mobilní (je možno indukovat interferenci v buňkách a tkáních vzdálených od místa injeckáže)



KAREN TWETIN/HOLMESCORBIS

A lighter shade of failure? Attempts to deepen the purple hue of petunias by genetic modification produced unexpected results. Rather than heightening pigmentation, an inserted gene switched colour production off, creating variegated blooms (inset).



ILLUSTRATION BY JILLI L. 279-2001/ISTOCK

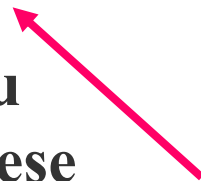
PTGS is now thought to be an ancient self-defence mechanism evolved to combat infection by viruses and transposons

**Šlechtění petunií –  
zintenzivnění barvy květů.**

**Logický přístup – více kopií  
příslušného genu – vyšší exprese**

**KOSUPRESE**

**-přítomnost transgenu  
vede k omezení exprese  
homologních  
(trans)genů**



**ALE**



**žíhané rostliny až zastavení  
syntézy barviva**

# Začalo to červem....., ale na počátku byly kytky

Guo, Kemphues, 1995

Fire, Mello, 1998



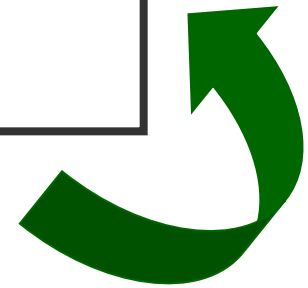
RNAi

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998



PTGS



## Vlastnosti procesu RNA interference:

- \* vlastní interferující molekulou je dsRNA (ne antisenseRNA)

  - \* efekt je vysoce specifický

- \* velice potentní (několik molekul dsRNA v buňce stačí pro vyvolání efektivní odpovědi)

- \* mobilní (je možno indukovat interferenci v buňkách a tkáních vzdálených od místa injektáže)

# INJEKTÁŽE C. ELEGANS

1.

+ **asRNA**  $\longrightarrow$  **zablokování  
exprese**

**XX**

+ **sense RNA**  $\longrightarrow$  **zablokování  
exprese**

• analogie s pokusy  
na petuniích

• saturace translačních  
faktorů ☹

2.

+ **mix sense a antisense RNA**  $\longrightarrow$  **několikanásobně vyšší  
umlčovací efekt**

- základem interference je dsRNA
- existence amplifikačního kroku

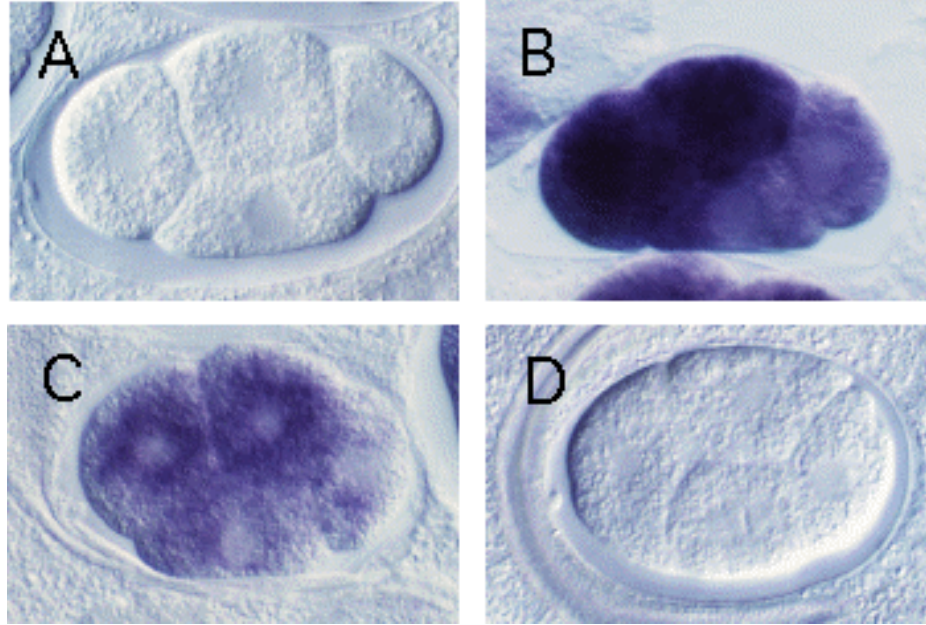
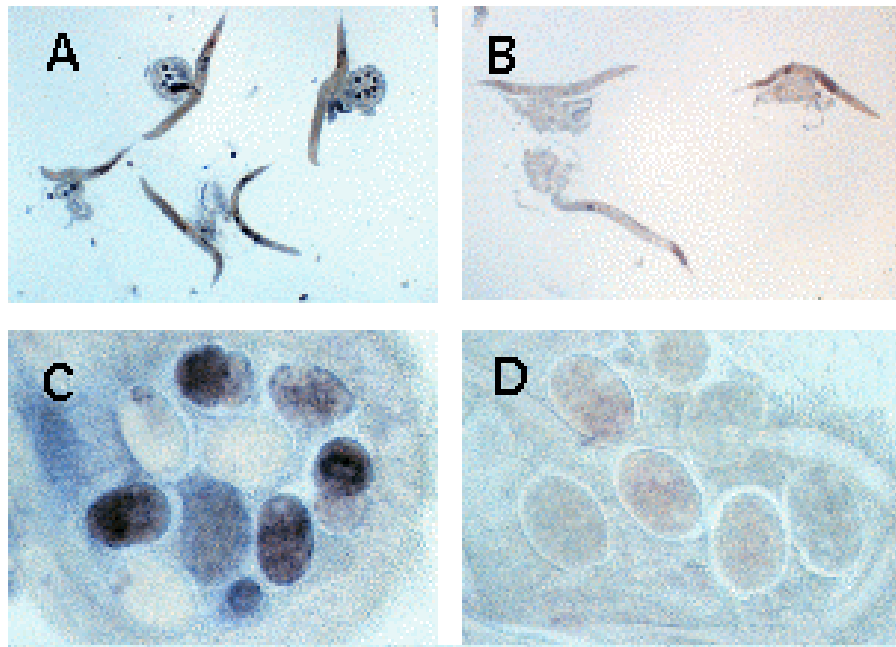


Figure 1. Effects of *mex-3* RNA interference on levels of the endogenous mRNA. Nomarski DIC micrographs show in situ hybridization of 4-cell stage embryos. (A) Negative control showing lack of staining in the absence of the hybridization probe. (B) Embryo from uninjected parent showing normal pattern of endogenous *mex-3* RNA (purple staining). (C) Embryo from parent injected with purified *mex-3* antisense RNA. These embryos (and the parent animals) retain *mex-3* mRNA, although levels may be somewhat less than wild type. (D) Late 4-cell stage embryo from a parent injected with dsRNA corresponding to *mex-3* ; no *mex-3* RNA is detected.

Each embryo is approximately 50  $\mu\text{m}$  in length.

(For details see: Fire et al. '98 "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* " *Nature* 391: 806-11)





## Figure 2. SOAKING WORMS WORKS ALMOST AS EFFECTIVELY AS INJECTING.

These images demonstrate the results of *mex-3* in situ hybridization following an RNAi soaking protocol (for original methods, see Tabara et al. '98 Science 282: 430-31). The left panels show the wildtype pattern of endogenous *mex-3* mRNA in untreated adults and embryos. The right panels show loss of *mex-3* staining following soaking of L4 hermaphrodites overnight in *mex-3* dsRNA. Endogenous *mex-3* RNA is greatly reduced, although still faintly detectable; this experiment resulted in approximately 90% dead embryos. Although not as effective as directly injecting dsRNA, this approach is VASTLY EASIER and may be good enough for analysis of most maternally acting genes.

**Začalo to červem.....,  
ale na počátku byly kytky**

**Guo, Kempthues, 1995**

**Fire, Mello, 1998**



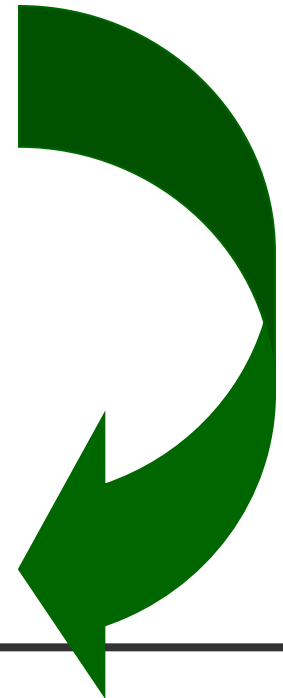
**RNAi**

**Jorgensen et al., 1990**

**Que, Jorgensen, 1998**



**PTGS**



### **Vlastnosti procesu RNA interference:**

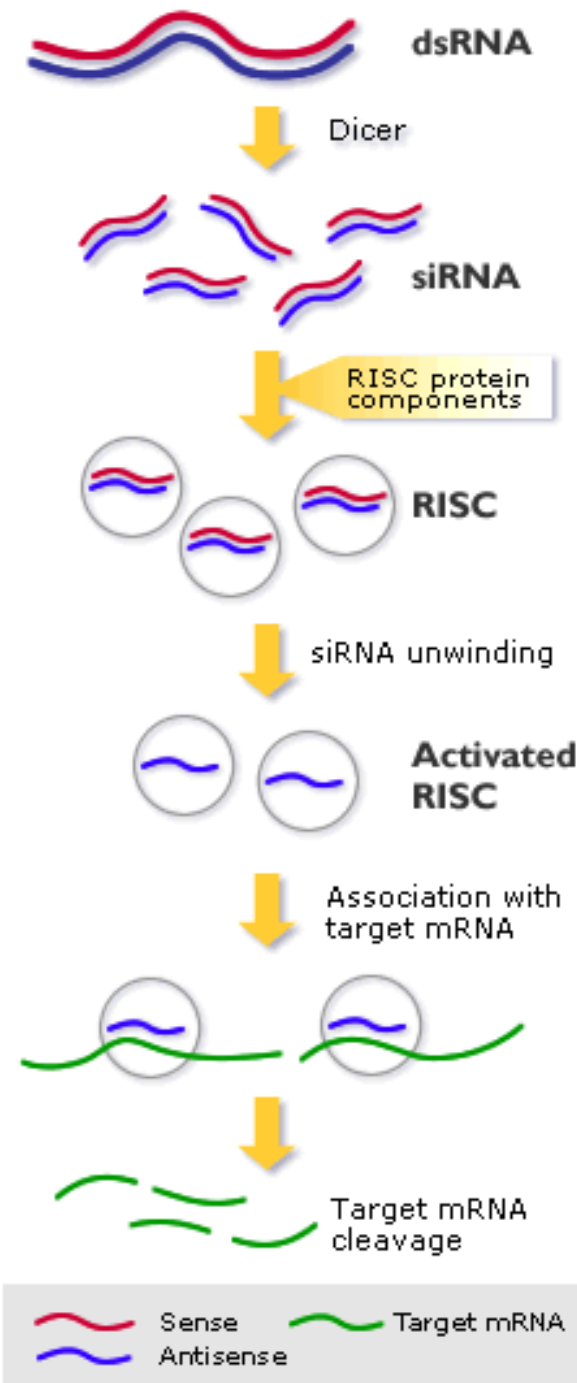
\* vlastní interferující molekulou je dsRNA (ne antisenseRNA)

\* efekt je vysoce specifický

\* velice potentní (několik molekul dsRNA v buňce stačí pro vyvolání efektivní odpovědi)

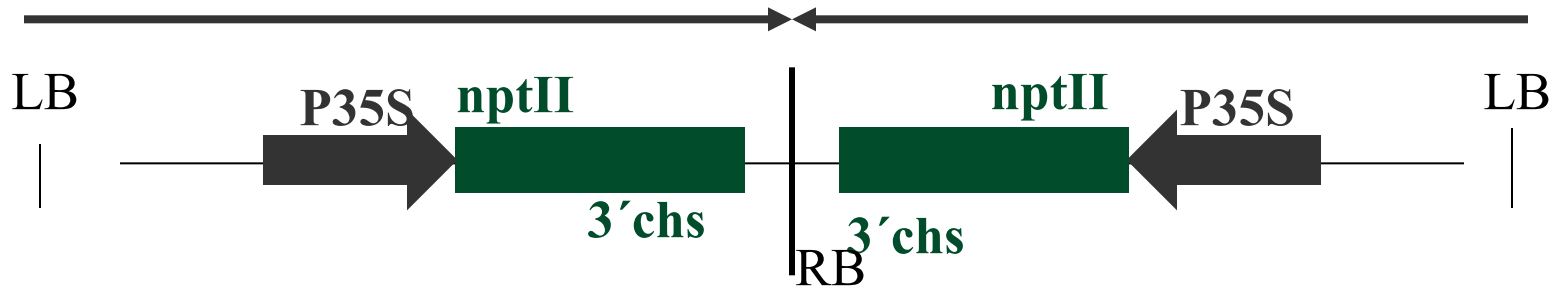
\* mobilní (je možno indukovat interferenci v buňkách a tkáních vzdálených od místa injeckáže)

# Molekulární základ RNAi



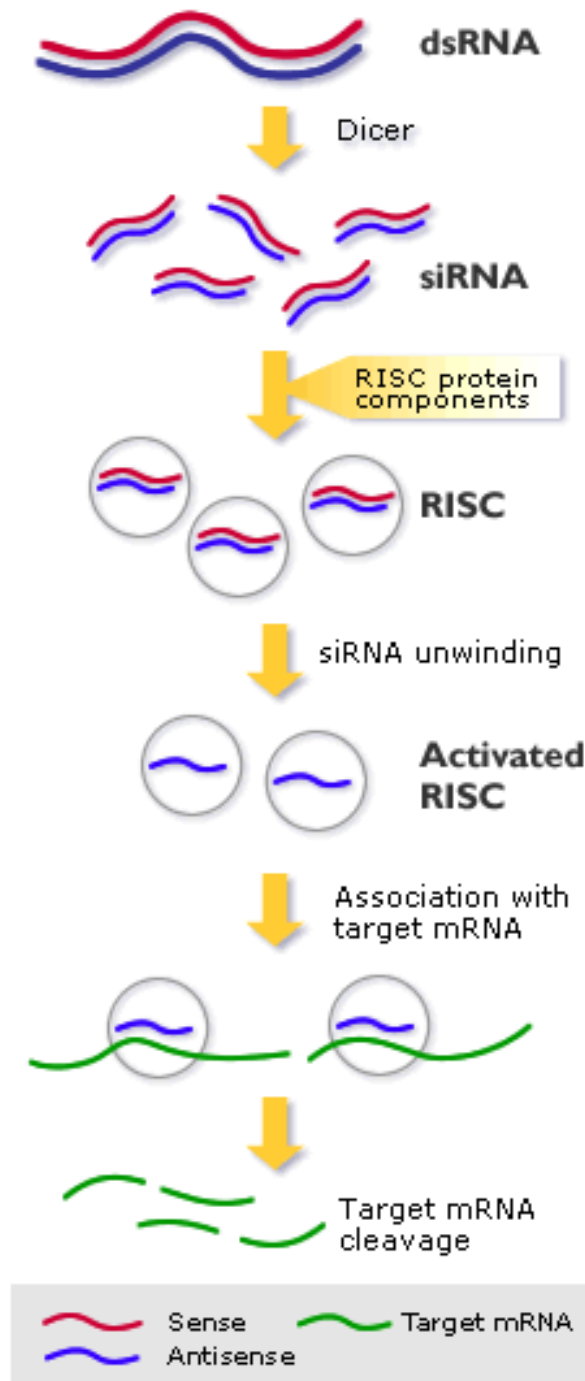
## VZNIK dsRNA:

- pokud je transgen uspořádán jako invertovaná repetice – transkripce přes střed IR



- aberantní molekuly mRNA - předčasně terminované, nesprávně procesované - substrát pro RdRP (RNA-dependent-RNA-polymerase) → katalyzuje syntézu dsRNA  
(nebyla identifikována u *Drosophila* a obratlovců)

# Molekulární základ RNAi



# DICER

- vlastní iniciátor umlčení, poprvé identifikován v *Drosophila*
- RNase III-like enzym (N-konec:helikázová doména, C-konec:RNaseIII doména a dsRNA vazebný motiv)
- štěpení molekul dsRNA → siRNA (21 - 25 nt)
- evolučně konzervativní (houby, živočichové, rostliny)
- ATP - dependentní nukleáza, funguje procesivně, ATP využívá k translokaci podél substrátu
- *C. elegans* s mutací v genu kódujícím DICER – fenotypové defekty, důkaz zapojení RNAi do regulace vývojových procesů

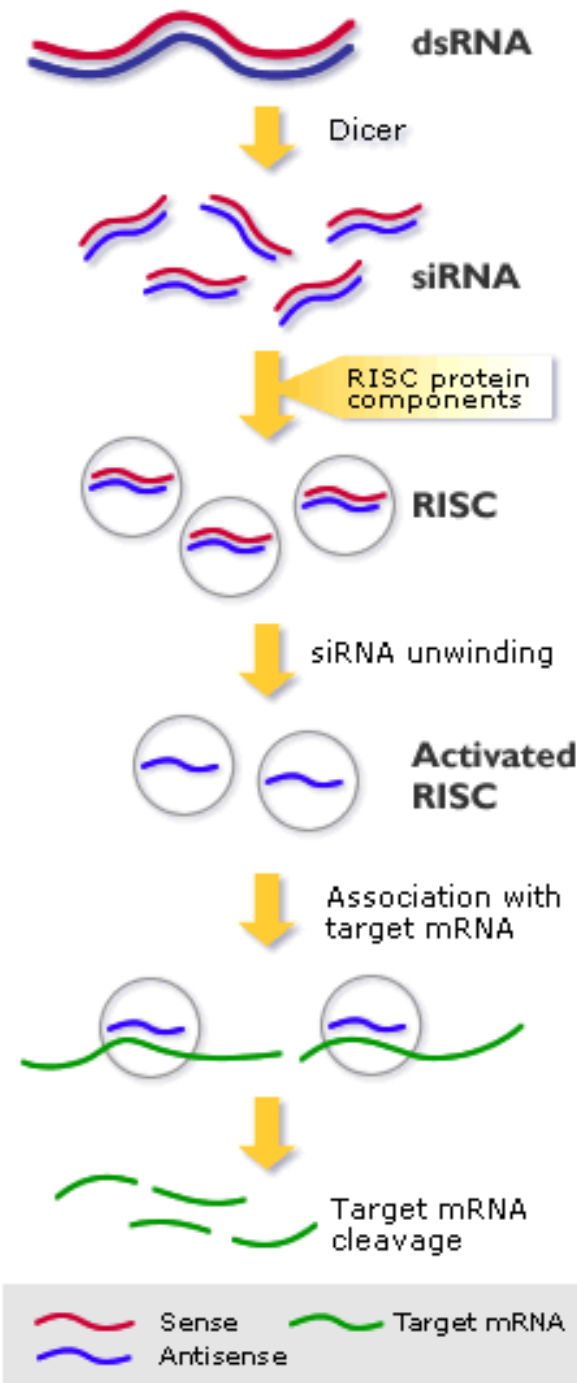
---

Živočichové, *C. elegans*, *S. pombe* – jeden DICER protein

*Drosophila* – dva DICER

Rostliny – čtyři!, mutace mají dramatický vliv na vývoj rostliny

# Molekulární základ RNAi



# RISC

- **RNA-induced silencing complex, efektorový komplex, destrukce cílové mRNA**
- **součástí procesu je odvinutí vláken dsRNA**  
**aktivovaný RISC**  
↓
- **jednovláknové siRNA - na základě komplementarity bazí navádí komplex k cílovému místu**
- **helikáza, nukleázy s endo- a exo- aktivitou, protein recA (homology searching activity)**

**ARGONAUTE – proteinová rodina, interakce s Dicer, součást komplexu RICS.**



# Proteiny rodiny ARGONAUT (Ago)

**Bazické proteiny (schopnost vazby na RNA)**

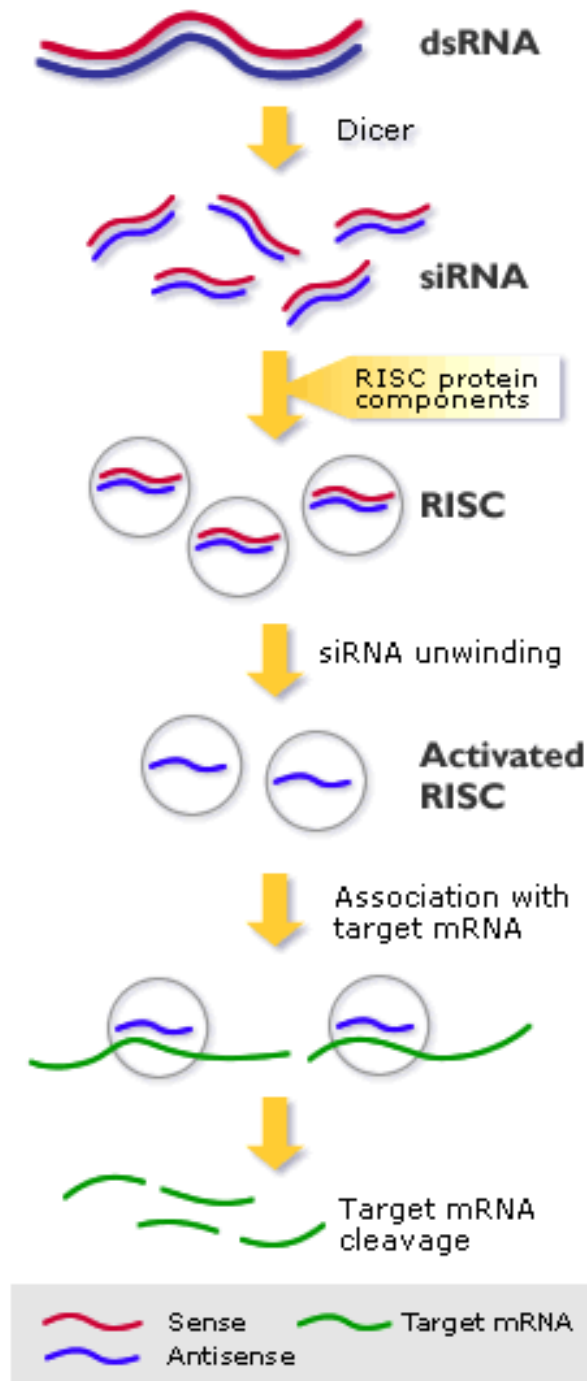
**PAZ doména – protein-proteinové interakce  
asi přispívá i k vazbě siRNA**

**PIWI doména – vazba siRNA v RISC, RNaseH doména  
(štěpení mRNA)**

**Účastní se produkce siRNA, jejich „nasměrování“ do příslušného efektorového komplexu i vlastní degradace mRNA, u rostlin procesu RDDM.**

**Multigenové rodiny (Arabidopsis – 10 členů, Drosophila – 4, C. elegans – 3, člověk – 7, myš - 8).**

# Molekulární základ RNAi

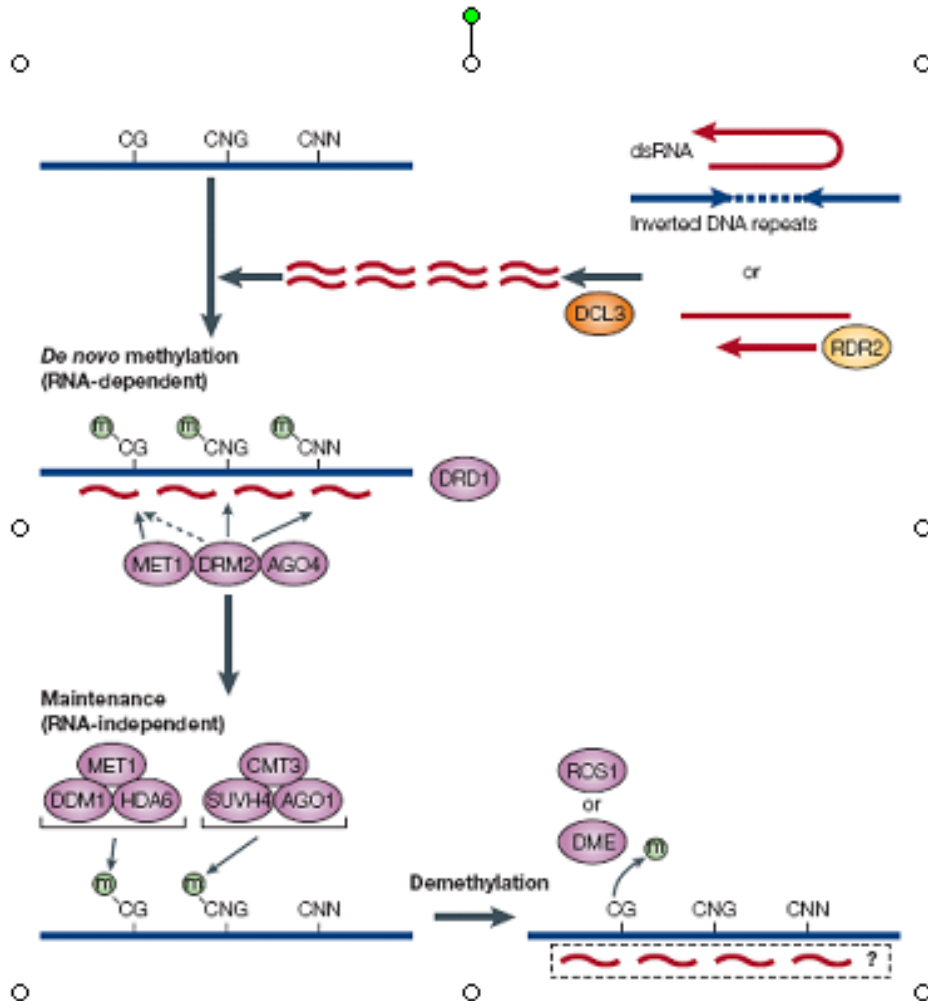


## RDDM (RNA-directed DNA methylation); v rostlinách

v rostlinách infikovaných  
rekombinantními viroidy  
nesoucími min. 300 nt  
homologie s kódující sekvencí  
→ metylace a PTGS

pokud je homologie  
s promotorem → TGS

# RDDM



- Vznik dsRNA transkripce přes IR (RNA pol II nebo RNA pol IV) vznik ze ssRNA (RdRP-RDR2)
- dsRNA je procesována DICER, vznikající molekuly řídí metylaci DNA v komplementárních sekvencích (MET1 CG *de novo* DRM2 non-CG *de novo* DRD1 chromatin remodelující protein)
- RNA nezávislý proces uchování metylačního obrazu (kromě CNN)

# KO-EXISTENCE RNAi a metylace

Rostliny, obratlovci, *Neurospora* - metylovaná DNA a RNAi

*Drosophila*, *S. pombe* – RNAi a Dnmt2 (i když jen v *Drosophila* je funkční)

*C. elegans* – RNAi, ale nemá gen pro DNA metyltransferázu

*S. cerevisiae* – nemá metylaci ani RNAi

# Homology-dependent gene silencing -TERMINOLOGIE

**PTGS** - v rostlinách, umlčení indukované transgenem nebo virovou infekcí. Transkripce genu není ovlivněna, nestabilní mRNA.

**TGS** - blok na úrovni transkripce, spojení s modifikací chromatinu a metylací DNA

**Transgene-induced silencing** - v důsledku přítomnosti transgenu, závislost na počtu kopií transgenu. Na úrovni PTGS nebo TGS.

**Virus-induced silencing** - indukované přítomností virové genomové RNA, nezbytná je replikační kompetence viru.

**Cossuppression** - umlčení endogenního genu v důsledku přítomnosti transgenu.

**RNAi** - PTGS indukované přímo dsRNA. Mechanisticky příbuzné (totožné?) s PTGS u rostlin.

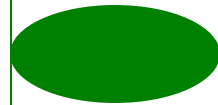
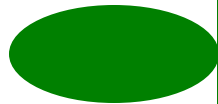
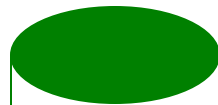
**Quelling** - PTGS v důsledku přítomnosti transgenu u *Neurospora crassa*.

# SYSTÉMOVÉ UMLČENÍ

- umlčení se přenáší z podnože na roub pokud existuje sekvenční homologie mezi umlčenou a umlčovanou genovou oblastí (tj. podnož i roub obsahují homologní transgeny) - **signál je sekvenčně specifický**

roub s aktivním transgenem (např. jednokopiová inzerce)

podnož nesoucí umlčený transgen (např. uspořádaný jako obrácená repetice)

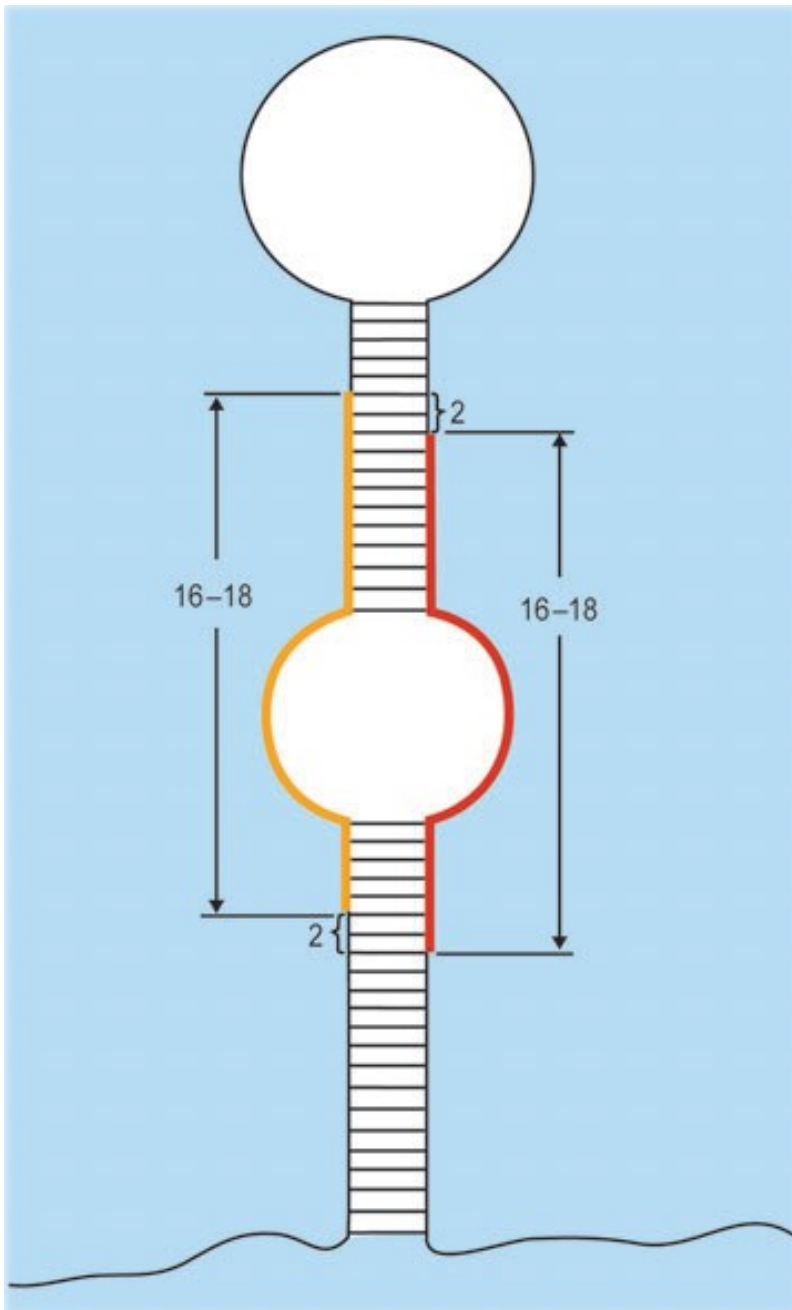


- umlčení se přenesse i když jsou transgenní roub a podnož odděleny až 30 cm dlouhým stonkem z wild-type rostliny
- **signál je mobilní**

# Dvě třídy krátkých interferujících RNA (v *Arabidopsis*)

21 - 22 nt: sekvenčně specifická degradace mRNA

24 - 26 nt: systémové umlčení  
metylace homologní DNA



## microRNA

endogenní malé molekuly RNA, kódovány lokusy **ODLIŠNÝMI** od těch, jež regulují.

21 nt, vazba na parciálně komplementární místa na 3' netranslatovaném konci cílové mRNA - represe translace.

Vznik z vlásenkového prekursoru (70 bp), přepisován z intergenových oblastí.

Živočichové - jeden prekursor společný pro několik miRNA.

Rostliny - každá miRNA má svůj prekursor, maturované miRNA jsou metylované (HEN1).



# micro RNA

## ROSTLINY

- degradace mRNA (AGO1)
- vysoká komplementarita s cílovou sekvencí
- 2/3 regulují expresi transkripčních faktorů

## ŽIVOČICHOVÉ

- represe translace cílové sekvence spojená s její destabilizací
- limitovaná komplementarita s cílovou sekvencí
- širokospektrý účinek (vývoj)

## truncated RNA (tncRNA)

**20 – 21 nt**

**Nevznikají z vlásenkového prekursoru**

**Exprese některých je závislá na fázi vývoje organismu**

**Nejsou evolučně konzervativní**

**Funkce není známa – jsou odvozeny z nekódujících sekvencí,  
pravděpodobně budou zacíleny na modifikace chromatinu  
v regulačních oblastech**

## **snoRNA (small nucleolar)**

řídí štěpení pre-rRNA na 18S, 5.8S a 18S rRNA  
a jejich modifikace

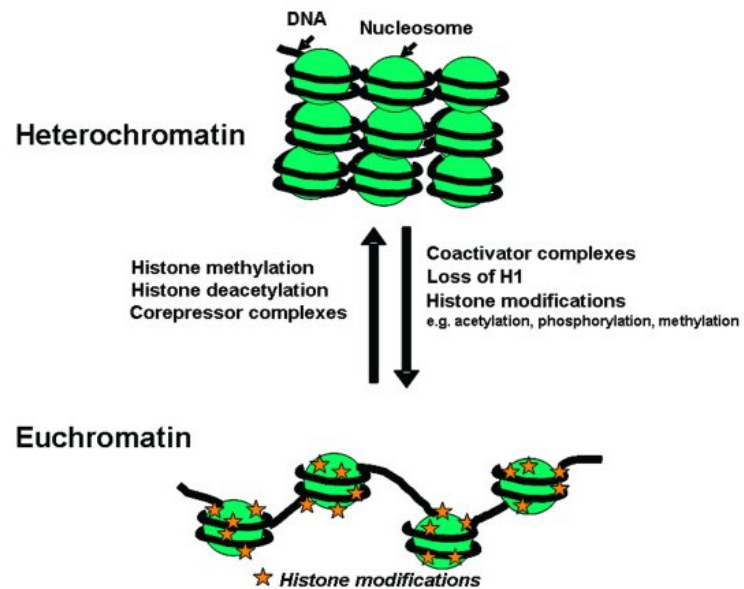
## **snRNA (small nuclear)**

AKTIVNÍ součást spliceosomu

# Chromatinové stavy

**Heterochromatin** - vysoce spiralizovaný (kompaktní) chromatin; transkripčně neaktivní geny, repetitivní sekvence, transpozony; oblast centromer, pericentromer a telomer  
Konstitutivní a fakultativní heterochromatin

**Euchromatin** - rozvolněné uspořádání, obsahuje transkribující se geny



# Modifikace histonů

## Metylace – např. lysin v poloze 9 na histonu H3 (H3K9)



Distribuce euchromatinových a heterochromatinových značek v *Arabidopsis thaliana* a myši (podle (Fransz *et al.*, 2006))

Modifikace	Stupeň	<i>A. thaliana</i>		myš	
		euchromatin	heterochromatin	euchromatin	heterochromatin
H3K9	mono	-	+	+	-
	di	-	+	+	-
	tri	+	-	-	+
H4K20	mono	-	+	+	-
	di	+	-	+	-
	tri	+	-	-	+
5m-C		-	+	-	+

# Modifikace histonů

Metylace – např. lysin v poloze 9 na histonu H3 (H3K9)

Lokus-specifické modifikace u kvasinek a člověka (podle (Hon *et al.*, 2009))

Modifikace	Lokalizace	Efekt	Lokalizace
H3K4me3	promotory	aktivace	euchromatin
H3K36me3	transkribovaná oblast	aktivace	euchromatin



Jde o druhově- a dokonce lokus-specifické, dynamické modifikace

# Modifikace histonů

---

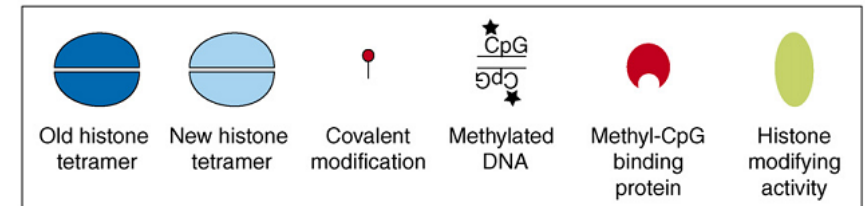
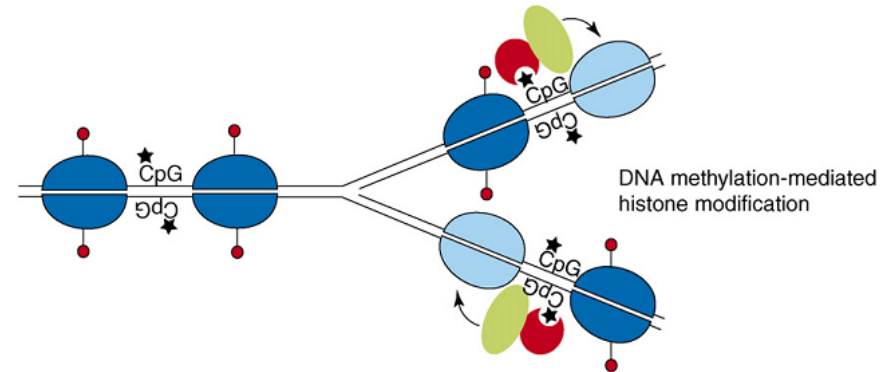
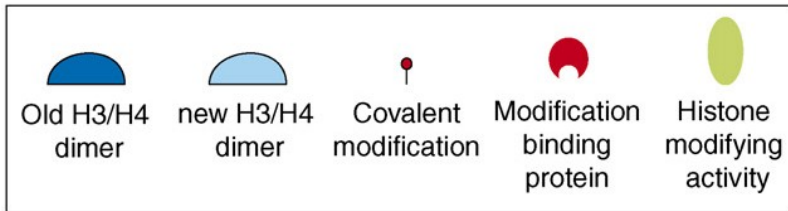
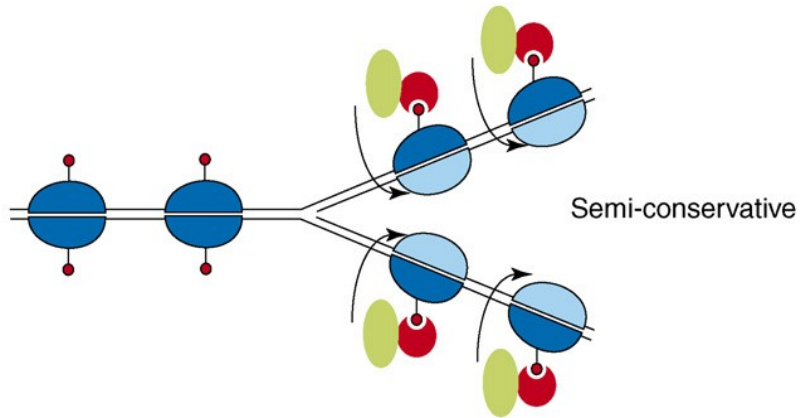
*Acetylace* – přidavek acetylové skupiny, která kompenzuje kladný náboj lysinových zbytků – oslabení interakcí mezi DNA a histony



Acetylovaný chromatin – euchromatin  
Deacetylovaný chromatin – heterochromatin

Enzymy: histon acetyltransferázy  
histondeacetylázy

# Dědičnost histonových modifikací



(Martin and Zhang, 2007)

semikonzervativní model

„piggy back“ model



# Vztah mezi metylací DNA a modifikacemi histonů

---

1. Typicky heterochromatinová modifikace H3K9me3 rekrutuje další enzymové aktivity (histodeacetylázu, HP1, DNA metyltransferázy) —————> tvorba kompaktního uspořádání a fixace heterochromatinového stavu
2. V *Arabidopsis thaliana* byly vyřazeny geny pro histometyltransferázy (SUVH4, SUVH5, SUVH6) —————> aktivace transpozonů spojená s jejich hypomethylací
3. Proteiny obsahující Jumonji doménu jsou schopny odstraňovat metylové skupiny z histonů. V *Arabidopsis* byl identifikován protein IBM1 s Jumonji doménou, který reguluje (snižuje) hladinu metylace CNG v transkribovaných oblastech
4. „piggy – back“ model

# siRNA A HETROCHROMATIN

**Heterochromatin** obsahuje repetitivní sekvence a transpozony, transkripčně umlčená oblast.

(Trans)geny inzertované do heterochromatinových oblastí – umlčení (*Drosophila* – PEV).

RNAi – významná role ve formování a umlčení  
heterochromatinu

X

„umlčený“ heterochromatin není transkribován

# Typické heterochromatinové oblasti

- **Centromery** – sekvence odpovědné za organizaci kinetochoru, řídí pohyb chromozomů při dělení buňky.
- **Pericentromery** – spojují sesterské centromery, oddělují centromery od ramen chromozomu.
- **Telomery** – nukleoproteinové struktury na koncích lineárních chromozomů (ochrana a stabilizace konce chromozomu, řešení problému replikační nedostatečnosti).

# RNAi a heterochromatin

**Mutantní forma kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*,  
blokována RNAi (mutace v genech Dicer, Rdp1, ago)  
————→ neschopnost tvorby heterochromatinových struktur  
v centromerách**

(Volpe et al., 2002, Science)

**Analogická mutantní forma v *Tetrahymena thermophila***



**molekuly siRNA jsou nezbytné pro procesy rearrangementu  
DNA v průběhu konjugace jader**

(Mochizuki et al., 2002, Cell)

# RNAi a heterochromatin - rostliny

- 90 – 95% endogenních siRNA odpovídá transpozonům a vysoce metylovaným repetitivním sekvencím (transkripce PŘES centrum obrácené repetice, v důsledku inserce repetice do transpozonu,..).
- *FWA* (kóduje protein kontrolující kvetení), exprimován v endospermu, ve vegetativních tkáních umlčen (TGS - metylace promotoru). Inserce transgenu *FWA*: umlčen ve „wild type“, exprimován v mutantních rostlinách (*dcl3*, *rdr2*, *ago4*) – pozdně kvetoucí fenotyp.

# Telomerové transkripty

Telomery jsou typický heterochromatin (epigenetické modifikace, neobsahují geny, telomere position effect (TPE))  
→ transkripčně neaktivní

V savčích buňkách – TERRA (TElomeric Repeat containing RNA)  
100 bp – 9 kb  
v jaderné frakci  
UUAGGG repetice (jenom slabý signál pro CCCUAA)  
počátek transkripce v subtelomerické oblasti  
aspoň část jich zůstává asociována s telomerami  
*in vitro* experimenty: TERRA ovlivňují aktivitu telomerázy

(Azzalin et al. Science, 2007; Ng et al. NAR, 2009)

# RNA polymerázy

**RNA pol. I** – syntéza pre-rRNA 45S (28S, 18S, 5.8S rRNA)

**RNA pol. II** – prekursorů mRNA, ncRNA, miRNA

**RNA pol. III** – tRNA, 5S rRNA a ostatní krátké RNA v jádře a cytoplasmě

RNA polymerázy v mitochondriích a chloroplastech

V rostlinách – **RNA polymeráza IV**

transkripce heterochromatinových oblastí (intergenové sekvence, repetice)

vznikají krátké transkripty (s „cap“, bez polyA)

substráty pro RDRP

**RNA polymeráza V**

transkripty zapojené do procesu RDDM

# Klinické využití RNAi

**+**

**vysoký potenciál a specifita**

**dostupnost siRNA z komerčních zdrojů**

**-**

**přechodný účinek v savčích buňkách**

**problémy s transfekcí (mění fyziologii buněk)**

**- savčí buňky nepřijímají efektivně exogenní RNA**

**- vliv siRNA není trvalý (6-8 buněčných dělení)**



## PHARMACEUTICALS

# Drug giants turn their backs on RNA interference

Nature, 2010

*A once much-touted technique faces a difficult transition to the clinic.*

BY HEIDI LEDFORD

Not long ago, a technique called RNA interference (RNAi) seemed to be on the fast track to commercial success. Its discovery in 1998 revealed a new way to halt the production of specific proteins using specially designed RNA molecules, and it quickly became a favourite tool of basic research. In 2006, the scientists who made the discovery were awarded the Nobel prize for medicine, and the New Jersey-based pharmaceutical giant Merck paid more than US\$1 billion to snatch up Sirna Therapeutics in San Francisco, California — one of the first biotechnology companies aiming to harness RNAi to create new drugs.

Yet all that seemed like ancient history last week when drugs and diagnostics corporation Roche in Basel, Switzerland — a major investor in RNAi-based drug research — announced it was killing its programme after spending three years and more than \$500 million on the technique. Although part of a larger restructuring to

## A SAMPLING OF RNAI THERAPIES IN CLINICAL TRIALS

Indication	Company	Clinical phase	Delivery method
Age-related macular degeneration	Quark Pharmaceuticals/ Pfizer/Silence Therapeutics	Phase II	Naked RNA
Diabetic macular oedema	Quark Pharmaceuticals/Pfizer	Phase II	Naked RNA
HIV	Benitec	Phase I	Lentivirus vector
Liver cancer	Alnylam/Tekmira	Phase I	Lipid nanoparticle
TTR amyloidosis	Alnylam/Tekmira	Phase I	Lipid nanoparticle
Respiratory syncytial virus	Alnylam/Cubist Pharmaceuticals/ Kyowa Hakko Kirin	Phase II	Inhaled naked RNA








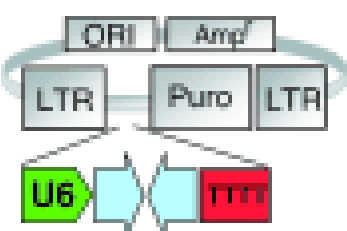


than originally thought,” says Michael French, chief executive of Marina Biotech, an RNAi company based in Bothell, Washington.

Of the dozen RNAi-based therapeutics in early clinical testing, most apply the RNA molecules directly to the target tissues, or aim to shut down the production of a protein in the liver, which takes up the RNA as it filters the blood (see table). Several candidates also package the

wary of the RNAi platform, says Josh Schimmer, an analyst at the investment bank IBC Swann & Company in New York. “Alnylam has a very interesting drug at this point,” says Schimmer. “It’s premature to say they’re a very promising platform.”

Companies such as Alnylam have built their business by enticing big pharmaceutical companies in as partners. That strategy has p

# RNAi delivery strategies

<u>Strategy</u>	<u>Trigger</u>	<u>Intermediate</u>	<u>siRNA</u>	<u>Application</u>
dsRNA	 (100–1000 bp)		 N N ——— N N (19 nt)	<i>C. elegans</i>
dsRNA vectors		 (100–1000 bp)	 N N ——— N N (19 nt)	<i>C. elegans</i> plants mammalian embryos
synthetic siRNA	 dTdT ——— dTdT (19 nt)		 dTdT ——— dTdT (19 nt)	mammals
shRNA vectors		 (19–29bp)	 N N ——— N N (19 nt)	mammals

# RNAi a HIV

**Klasický přístup - kombinace léčiv**

—————→ **prodloužení života pacientů**  
—X—→ **toxicita léčiv, odolné varianty  
viro**

**1. onemocnění, na něž byla aplikována léčba  
založená na RNAi**

**Problémy: vysoká mutační kapacita viru  
(mutanty nejsou terapií zacíleny)  
vnesení RNA do buněk (T-lymfocyty,  
monocyty, makrofágy)**

# RNAi a virová hepatitida

Existuje pouze preventivní vakcína proti HVB, nic proti HVC.

Výzkum koncentrován na HVC:

genomem je + RNA molekula  
s 1 otevřeným čtecím rámcem kódujícím  
polyprotein

siRNA terapie je zaměřená na inhibici funkce  
replikonu

# RNAi a nádory

**Neprovádějí se klinické zkoušky,  
existují nadějně výsledky z předchozího asRNA  
výzkumu** (oligonukleotid komplementární k mRNA  
antiapoptického genu *bcl2* + chemoterapie).

**Laboratorní testy - syntetické siRNA selektivně  
omezily expresi onkoproteinu p210 (CML)  
————→ inhibice proliferace buněk.**