

# RNAi

## JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH

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

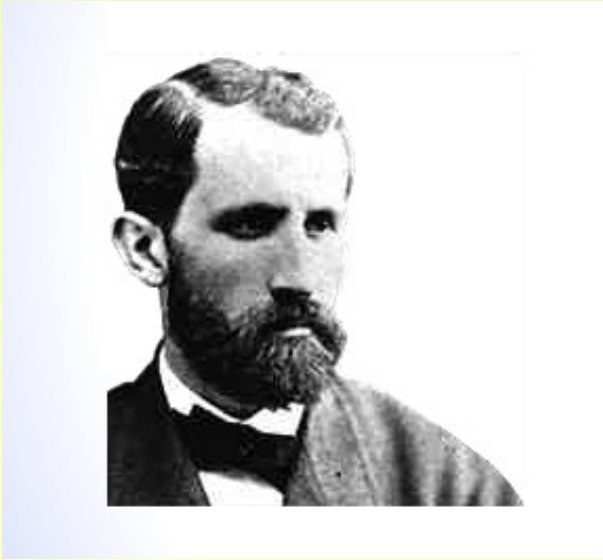
HOSTS AND SYMPTOMS OF RING SPOT, A VIRUS DISEASE  
OF PLANTS<sup>1</sup>

By S. A. WINGARD<sup>2</sup>

*Associate Plant Pathologist, Virginia Agricultural Experiment Station*

INTRODUCTION





**1868 - Friedrich Miescher  
nuclein**

**1939 - Brachet a Caspersson:  
buňky produkující proteiny jsou bohaté na RNA**

# Nekódující “malé“ RNA v buňce

- 7SK snRNA (ovlivňuje transkripci u člověka vazbou na elongační faktory)
- SRP RNA (ovlivnění translace, jsou součástí “signal recognition particle”)
- součást telomerázy (úloha při replikaci)

# Nekódující “malé“ RNA v buňce

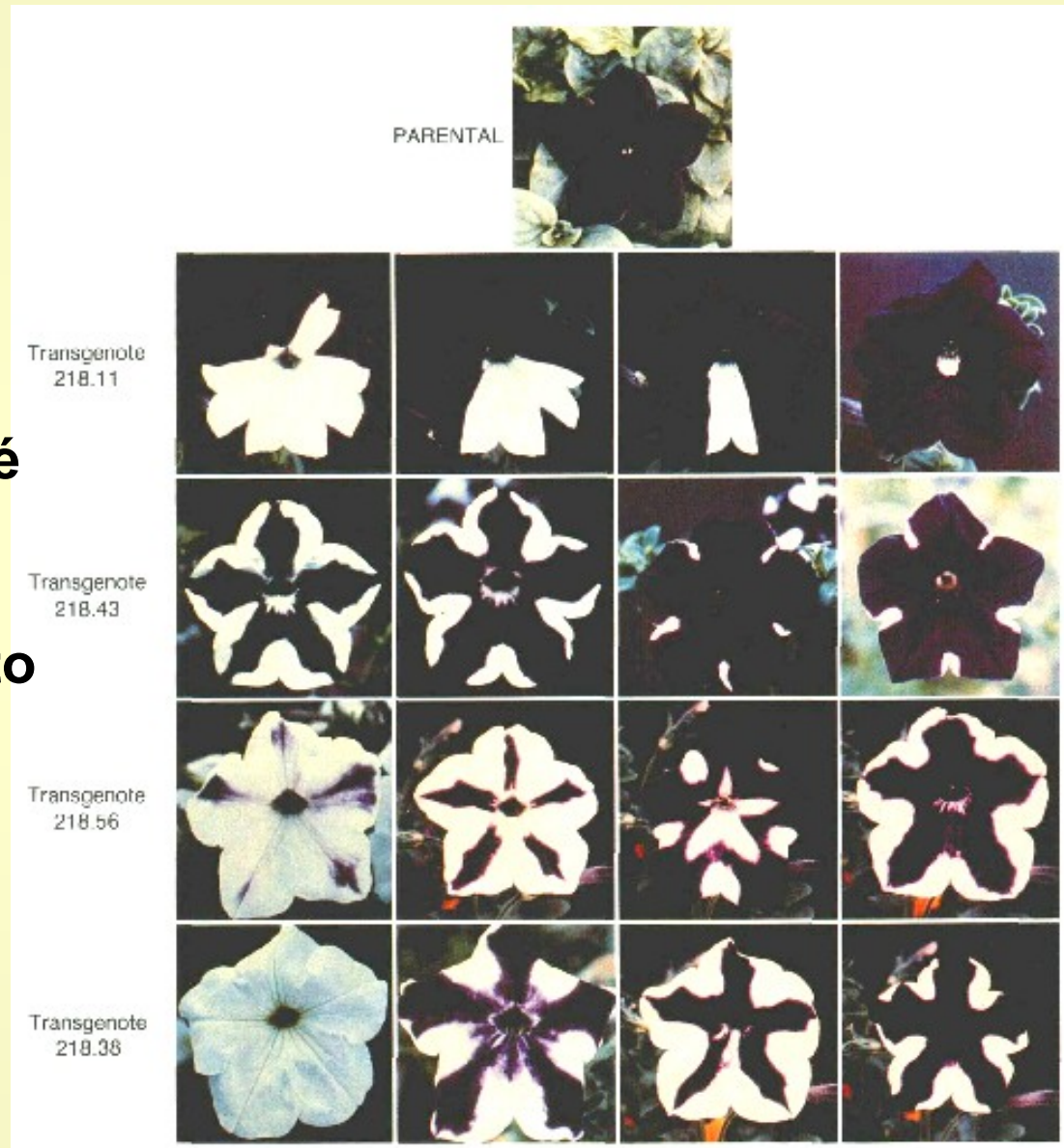
- XIST RNA (inaktivace X chromozómu)
- gRNA (úloha při editaci RNA)
- microRNA (miRNA)
- siRNA

**Rich Jorgensen a kolegové  
vložili gen produkující  
pigment do petunií**

**Místo silné pigmentace se  
objevily rostliny  
variegované a dokonce bílé**

**Jorgensen pojmenoval tento  
fenomén "cosuppression"**

Napoli et al., *Plant Cell*, 1990



**K potlačení exprese docházelo až po proběhnutí transkripce, fenomén byl nazván **PTGS** (PostTranscriptional Gene Silencing)**

**Již dříve (Matzke et al. 1989) znám fenomén **TGS** (Transcriptional Gene Silencing)**

- dva různé geny se stejným promotorem použity na transformaci tabáku**
- došlo k metylaci promotorové sekvence**
- metylace zmizela po segregaci jednotlivých genů použitých k transformaci**

**VIGS (Virus Induced Gene Silencing)**

**Nekodující část virového genomu, kterou byly transformovány rostliny způsobila rezistenci k danému viru**

# Od hád'átka k Nobelově ceně

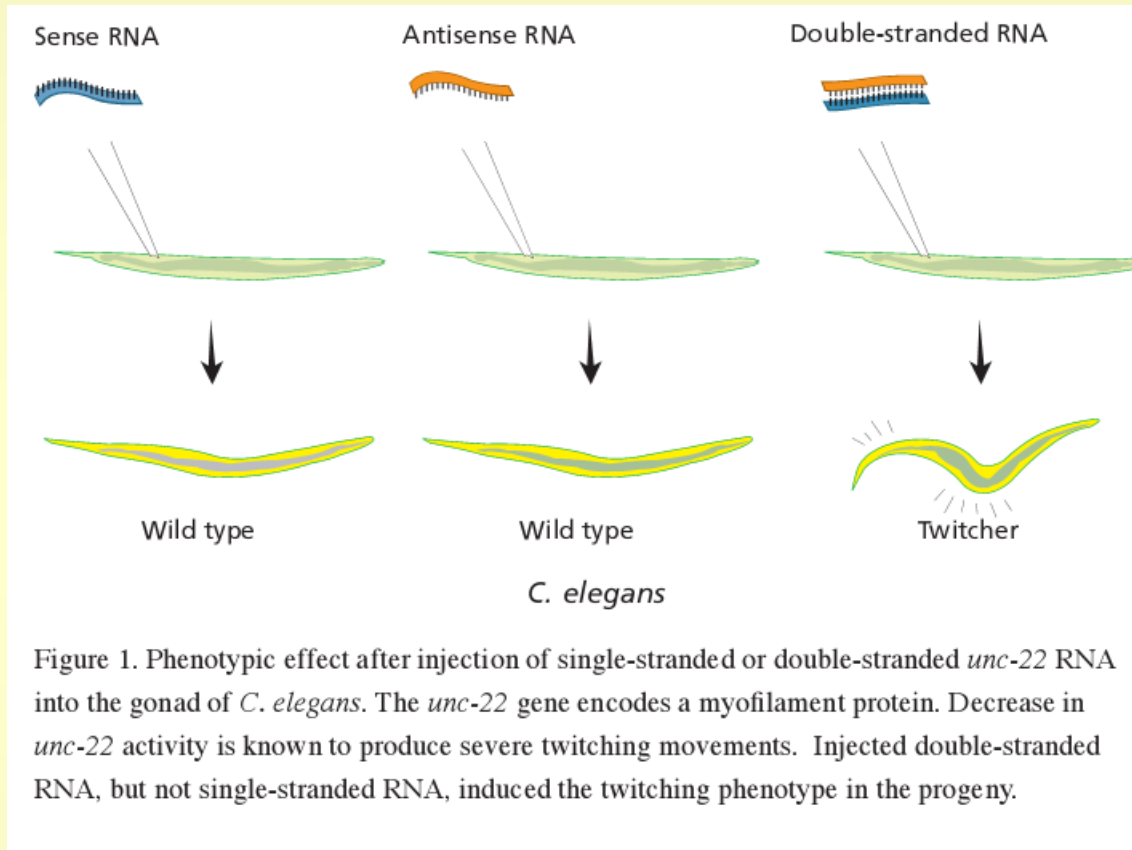


Figure 1. Phenotypic effect after injection of single-stranded or double-stranded *unc-22* RNA into the gonad of *C. elegans*. The *unc-22* gene encodes a myofilament protein. Decrease in *unc-22* activity is known to produce severe twitching movements. Injected double-stranded RNA, but not single-stranded RNA, induced the twitching phenotype in the progeny.

## Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Author(s): Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC

Source: NATURE Volume: 391 Issue: 6669 Pages: 806-811 Published: FEB 19 1998

Times Cited: 3,527 References: 27

# **Fire a Mello studovali fenotypový efekt injektované sense a antisense RNA a dsRNA (v podstatě kontrola)**

## **výsledek:**

1. dsRNA suprimuje expresi násobně více než ssRNA
2. Suprese specifická pro daný gen
3. K supresi musí dsRNA být homologní k mRNA (ne intron)
4. Cílová mRNA byla degradována
5. Jenom několik molekul dsRNA bylo schopno efektivně utlumit expresi
6. dsRNA suprimující efekt se šířil mezi orgány i do další generace



# **Různé typy a projevy krátkých RNA v buňce**

**Cytoplazmatické siRNA (small interfering): dsRNA představující  
např. intermediární stavy replikace virů**

**siRNA mediated supression of transcription - potlačení transkripce  
prostřednictvím siRNA**

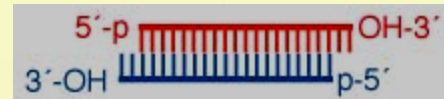
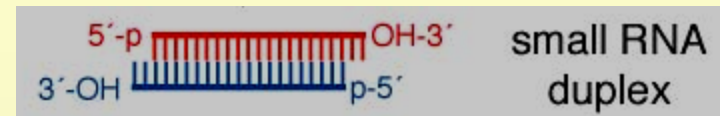
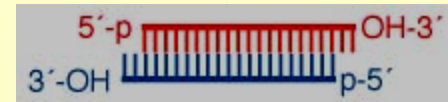
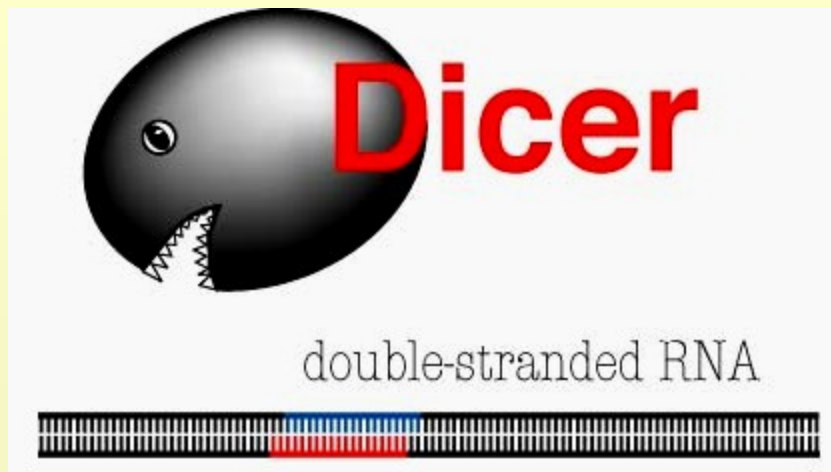
**miRNA: negativní regulace specifických mRNA (genů)**

# **Jaký je rozdíl mezi miRNA a siRNA?**

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

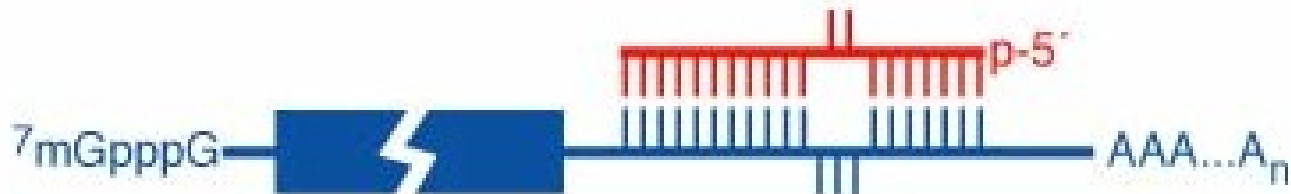
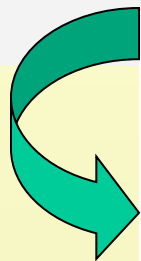
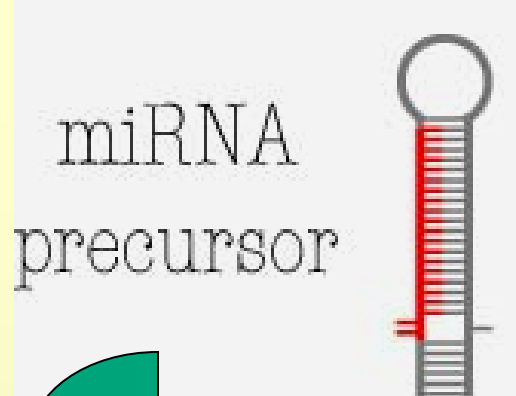
# RNA interference (RNAi)

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



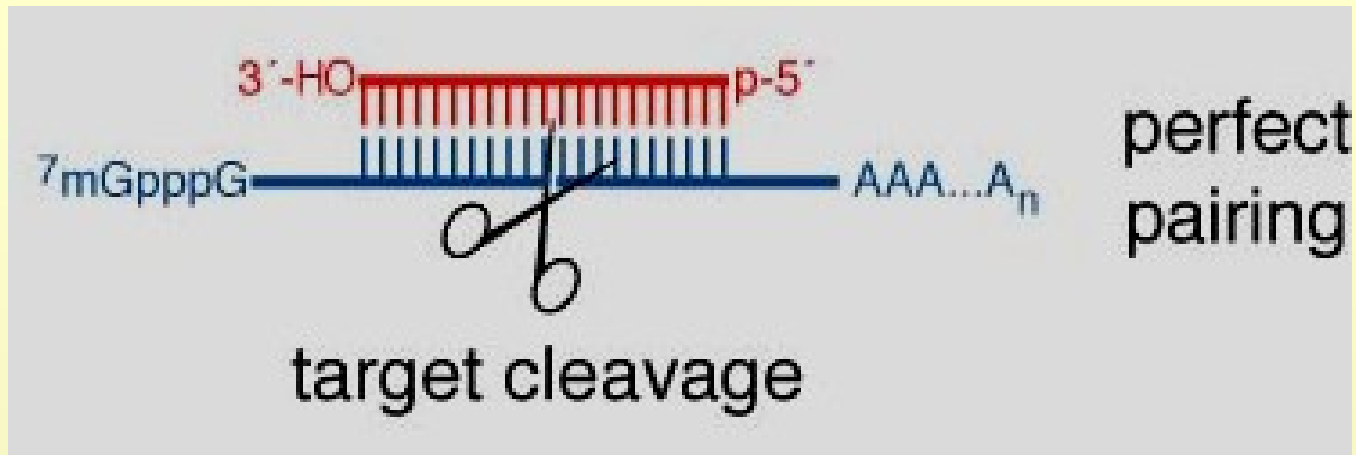
# microRNA (miRNA)

- Regulace genové exprese
- Mechanismus podobný jako u siRNA
- Zabraňuje vazbě k ribozomům (u živočichů)



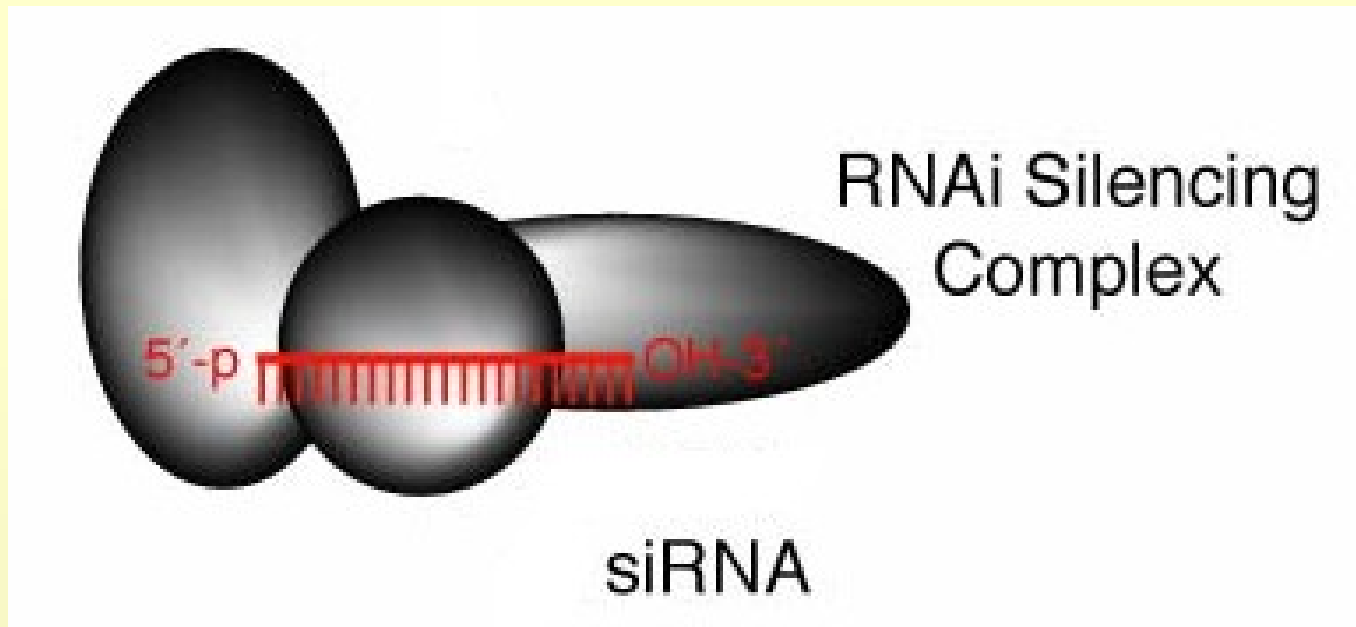
# RNA interference

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



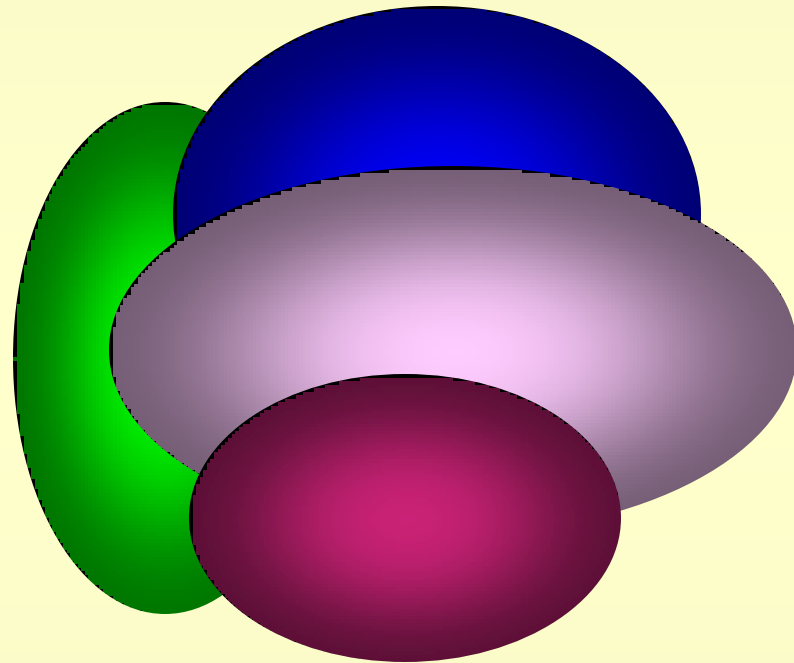
# RNA interference

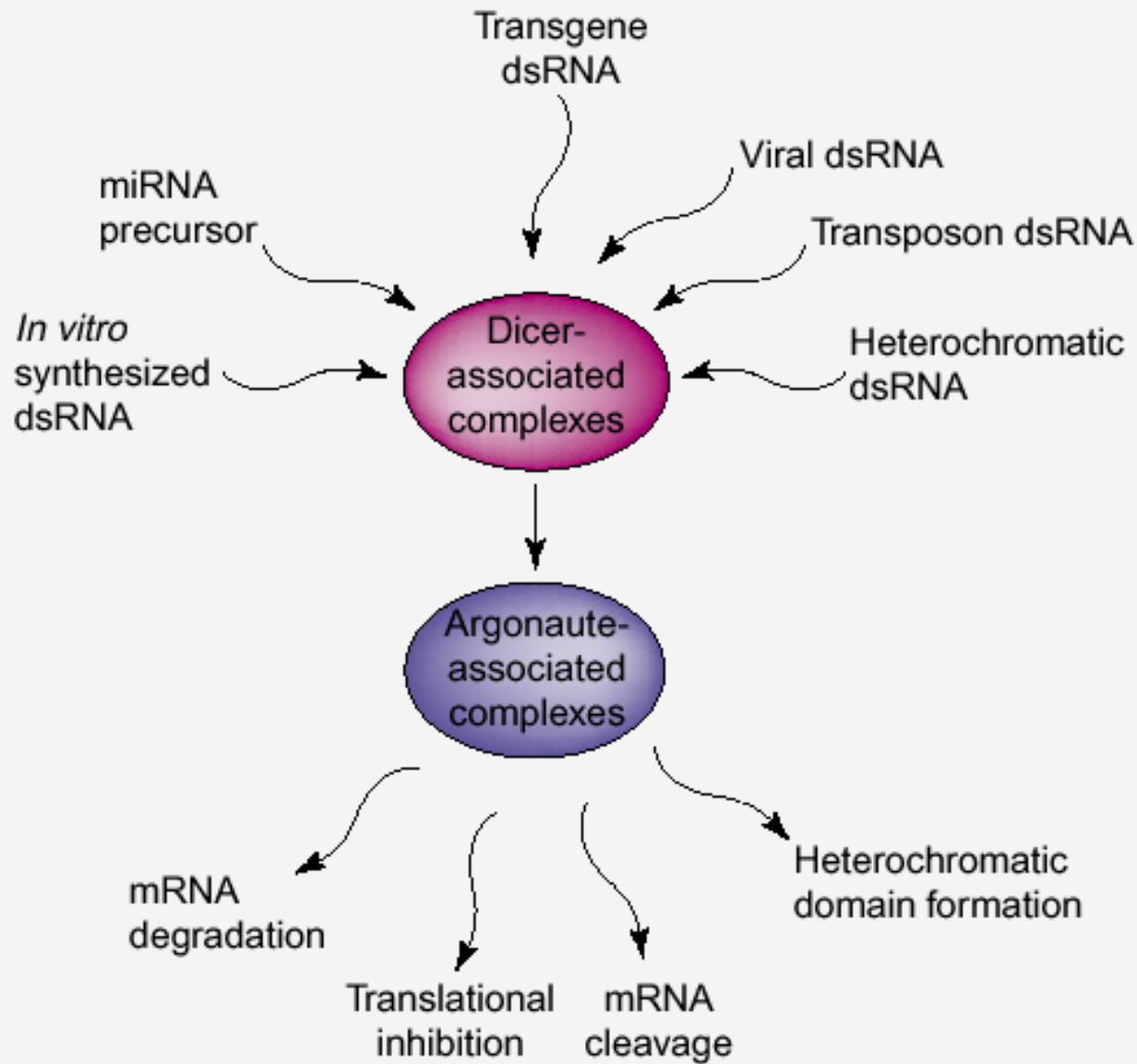
- siRNAs nebo miRNA je inkorporována do „RNA-induced silencing complex“ (RISC)



# RISC

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





T/BS



# Použití RNA interference

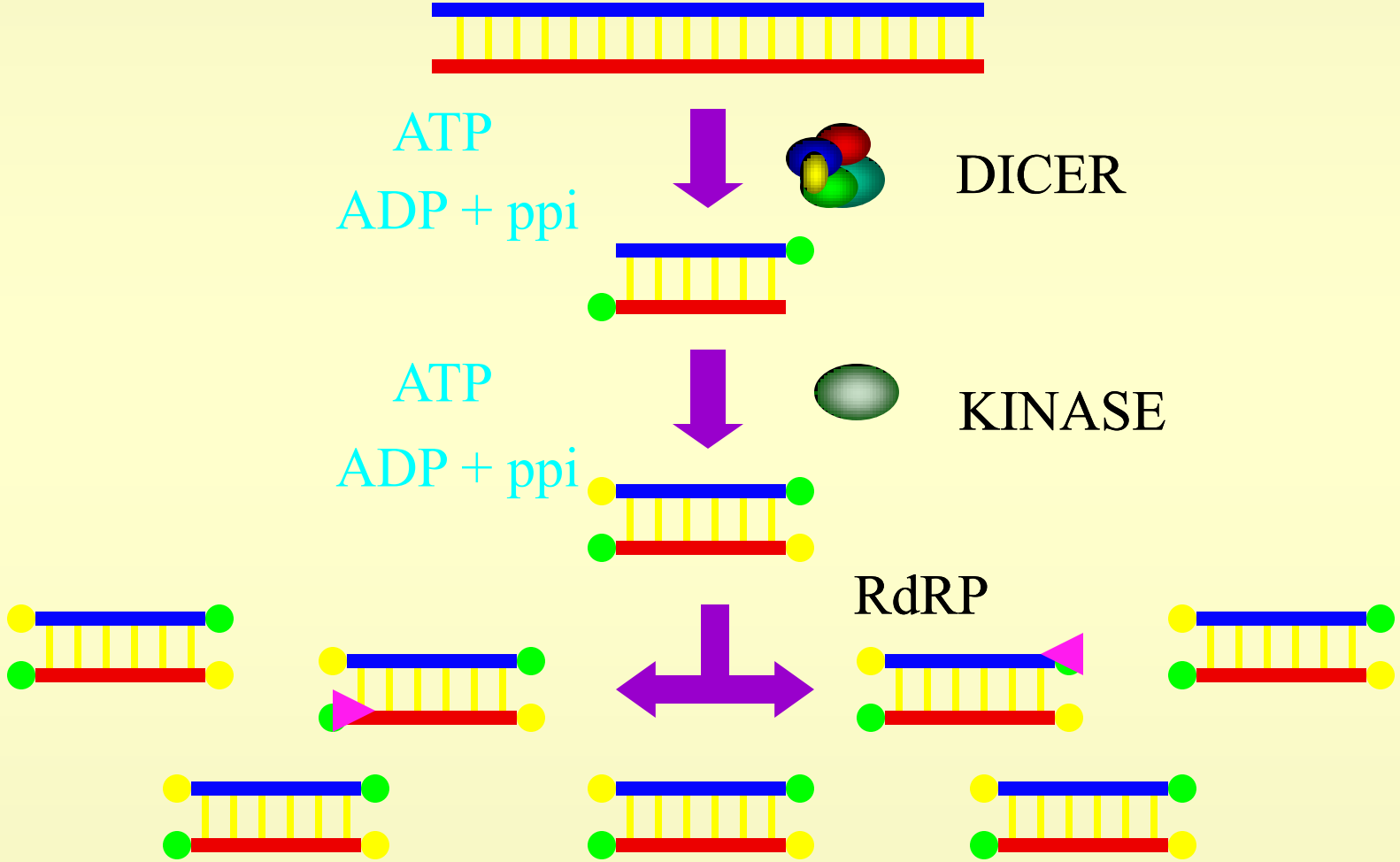
- **Studium funkce genů**
  - **Knock-out nebo knock-down genů**
- **Terapeutická suprese**
- **Indukce rezistence u rostlin**

# Mechanismus siRNA RNAi

## **DVA kroky:**

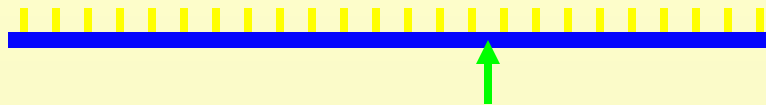
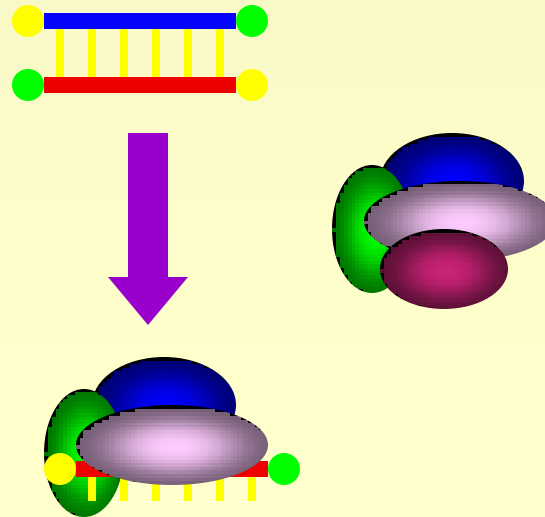
- **Iniciační krok**
  - **Generování siRNA molekul**
  
- **Efektorový krok**
  - **Degradace cílové RNA**

# Iniciační krok



# Efektorový krok

- Vazba na siRNA
- siRNA rozvolnění
- RISC aktivace



# siRNA

**a** Normal RNA, no silencing



**b** Aberrant RNA, de novo silencing

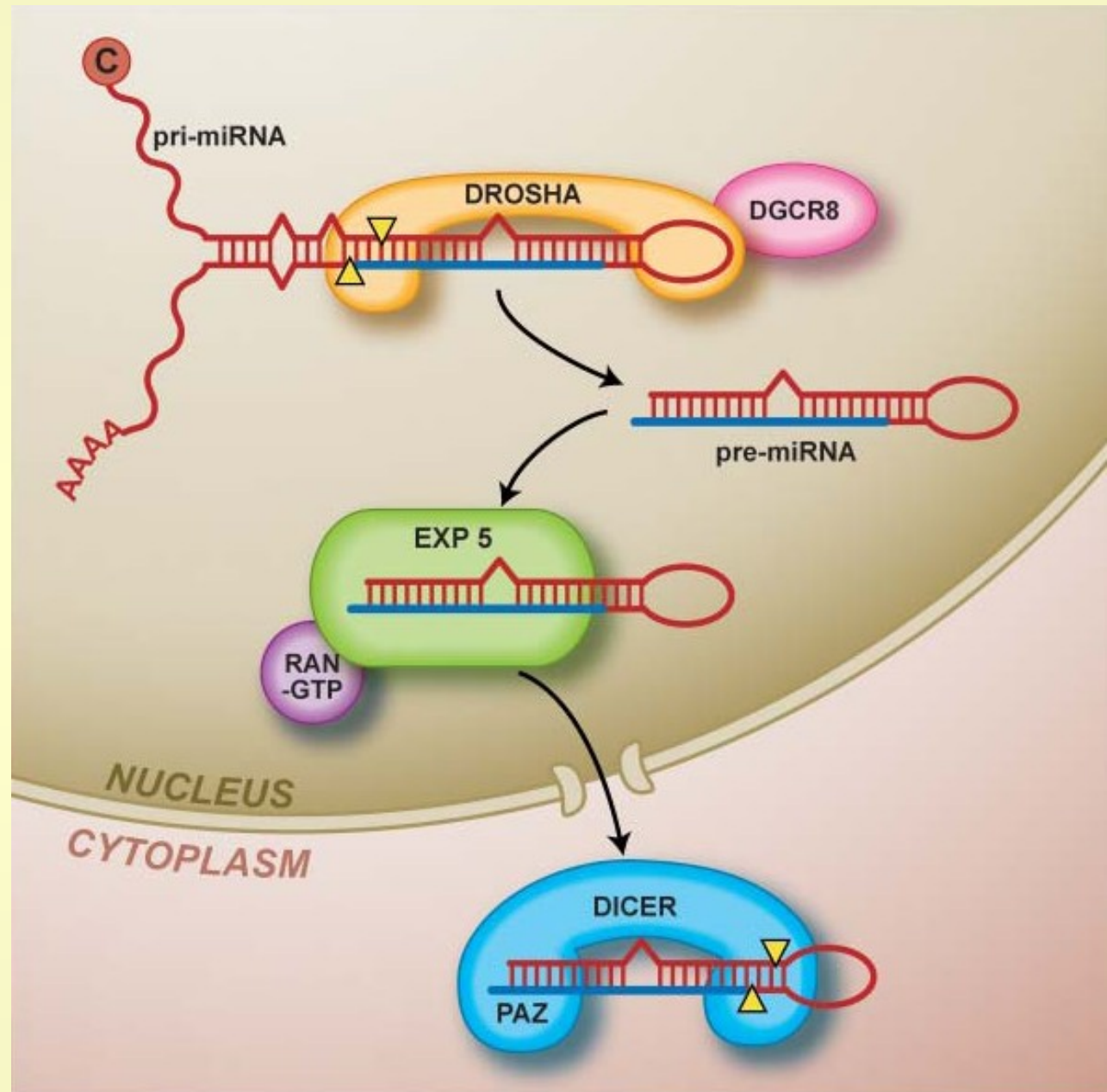


**c** Normal RNA, primed amplification

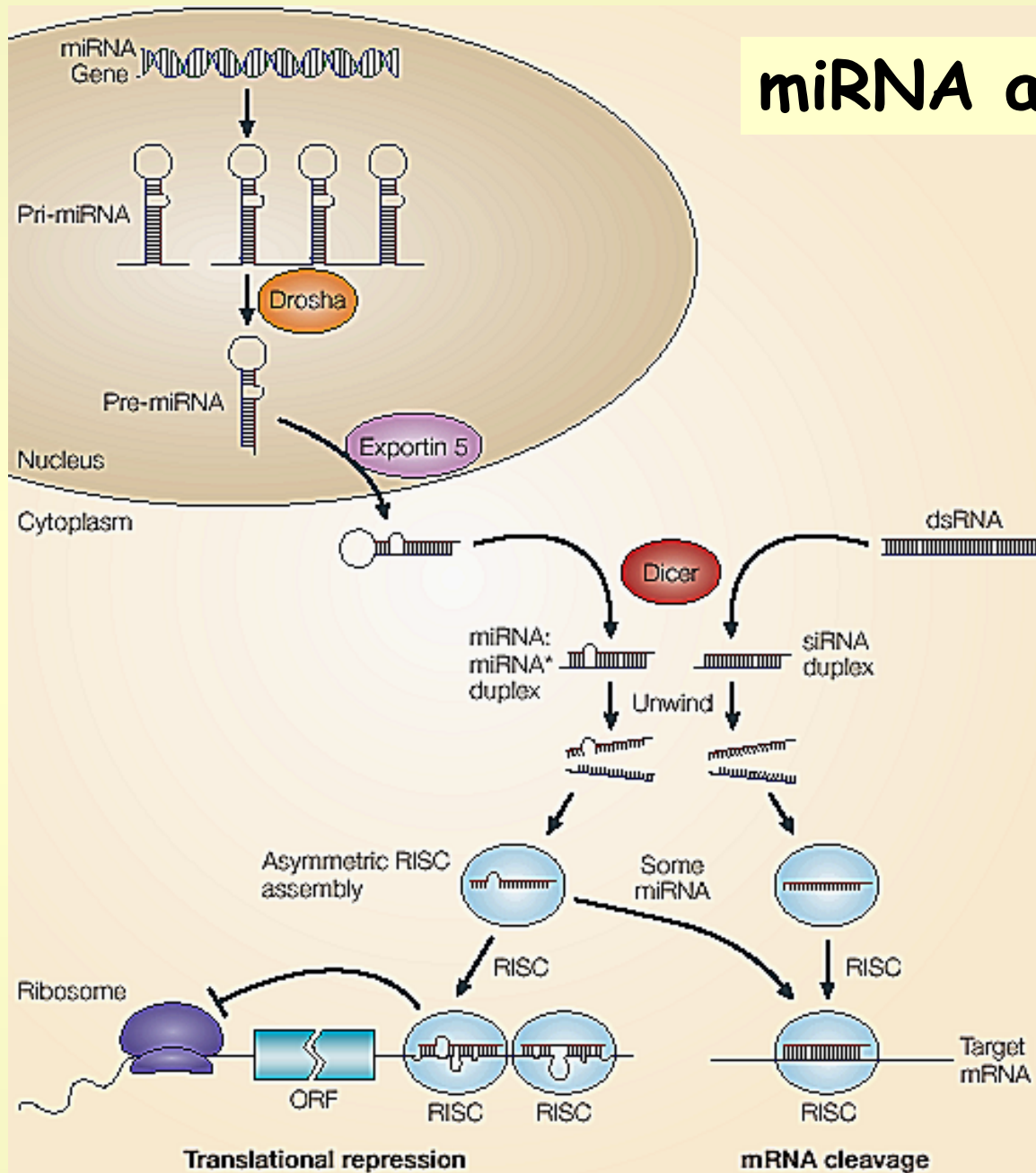


Baulcombe D, *Nature*, 2004

# miRNA processing



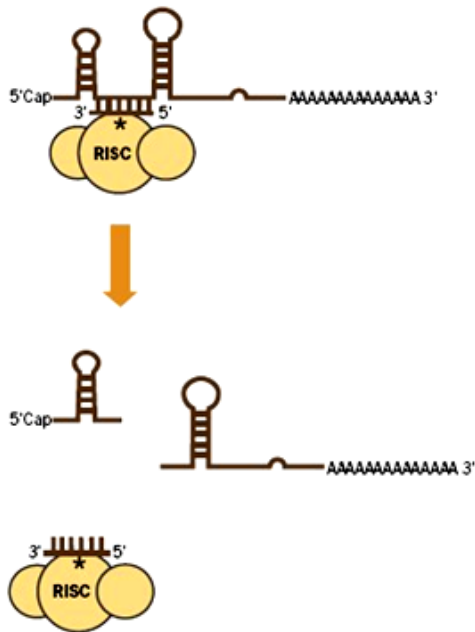
# miRNA and RNAi



# RNAi

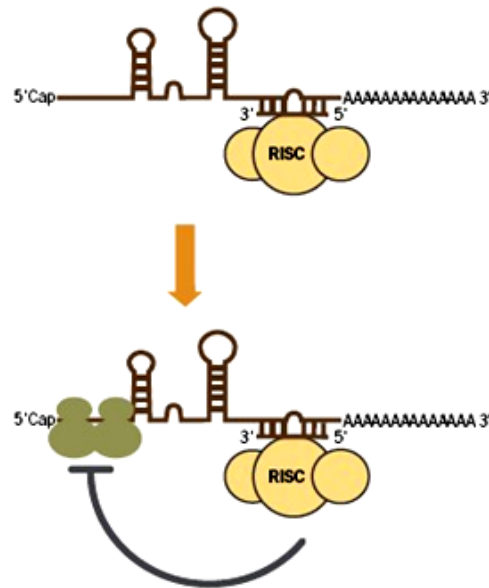
Common in plants

mRNA degradation



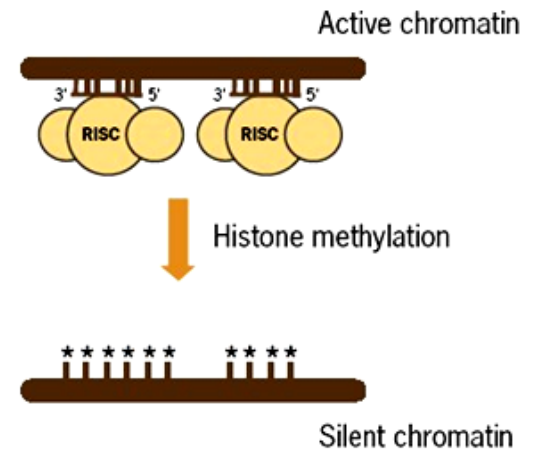
Common in animals

Translational regulation



Common in yeast and plants, and possibly animals.

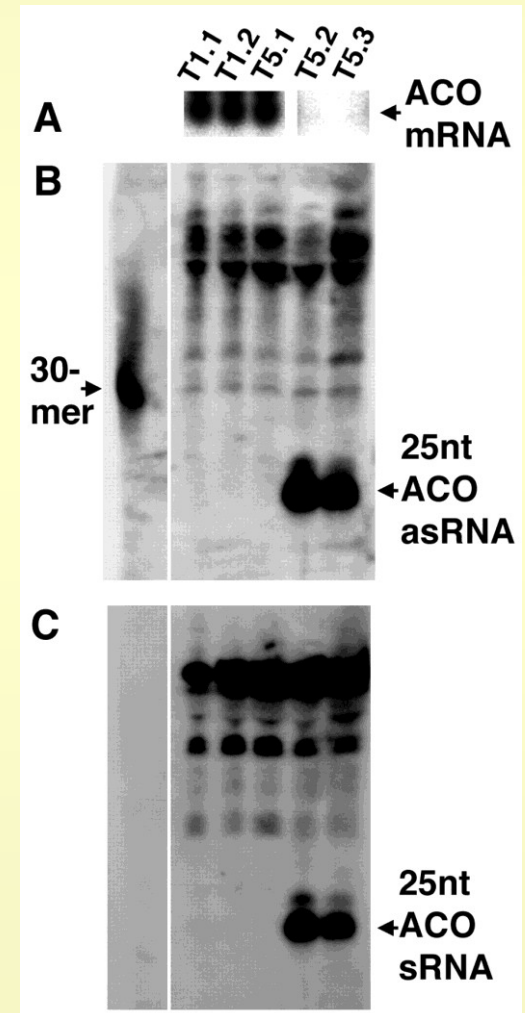
Transcriptional regulation





# Identifikace miRNA a siRNA

- Bioinformatické přístupy
- Klonování krátkých RNA



# **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**

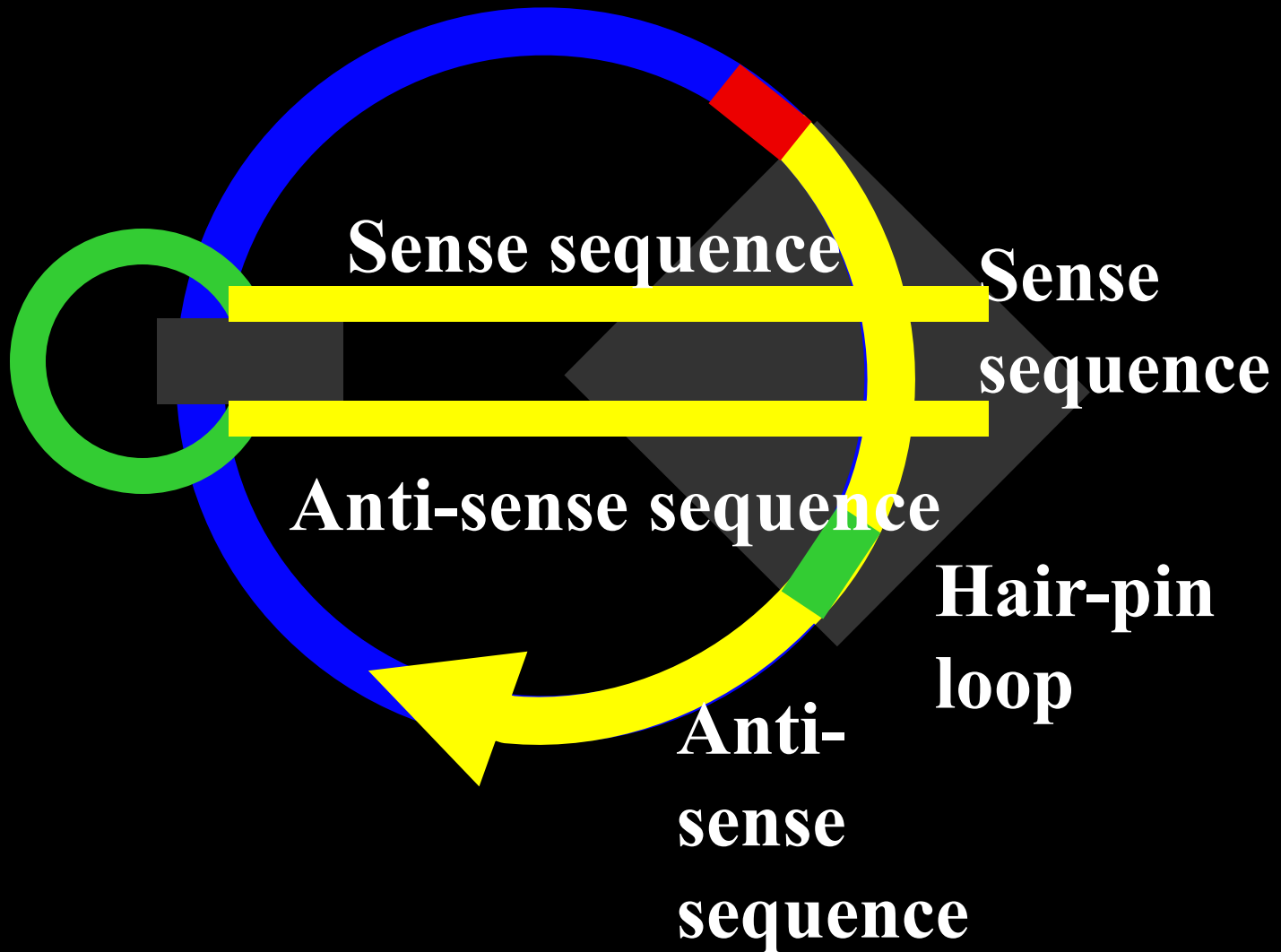
# Expese siRNA

- **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**

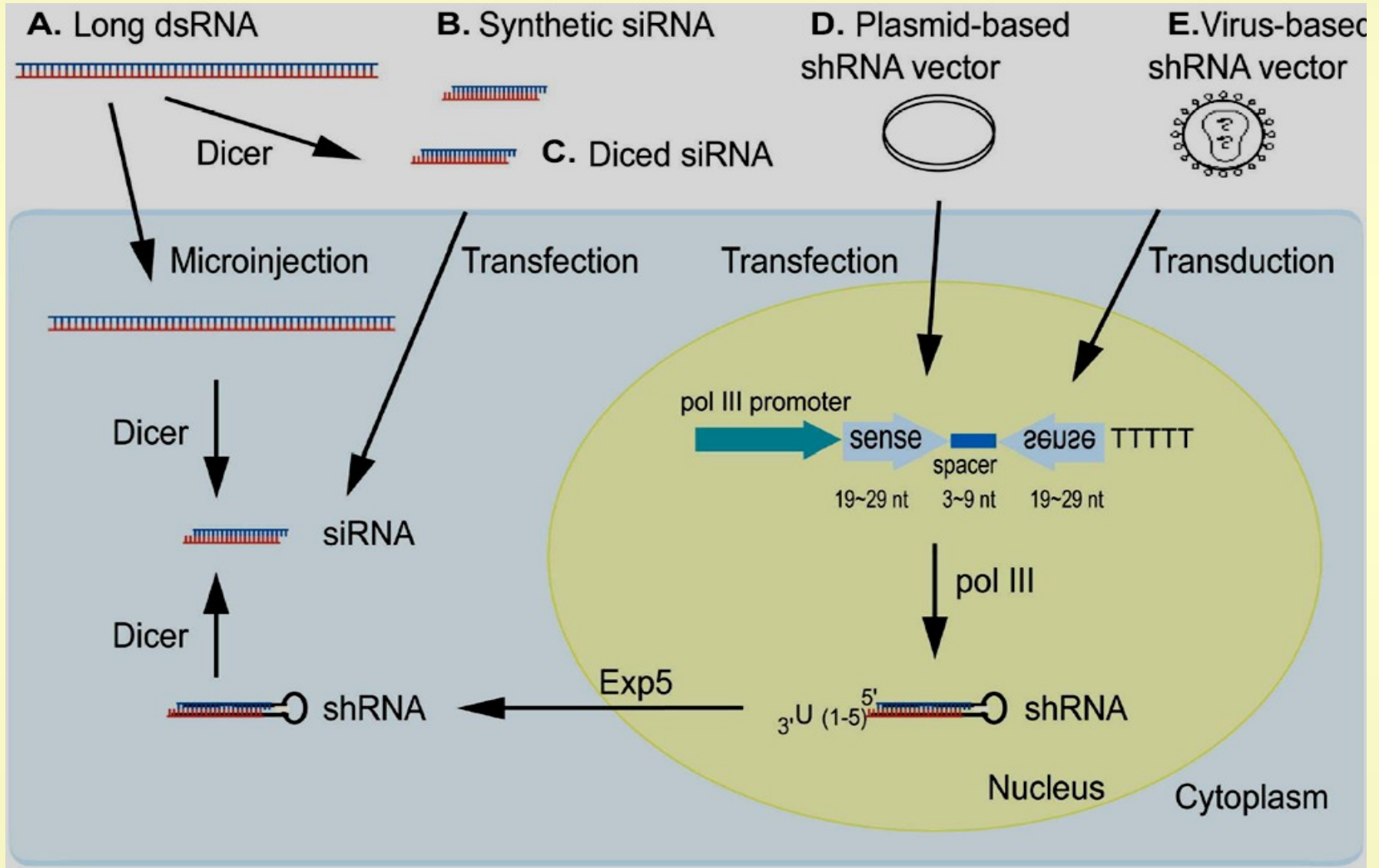
# Chemická syntéza siRNA



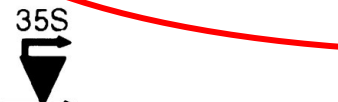

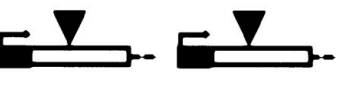

- **Sekvence**
  - **50-100 bp od start kodonu směrem do genu (downstream)**
  - **Kolem 21 nucleotidů: AA(N<sub>19</sub>)TT**
- **GC content: 30-70%**

# Vectors expressing siRNAs



# siRNA



<i>Name</i>	<i>Location</i>	<i>Result</i>
 <i>Knock-out</i>	coding region or promoter	null
 <i>Knock-down</i>	promoter or 3' UTR	reduced expression
 <i>Knock-on</i>	promoter	increased expression
 <i>Knock-about</i>	coding region	not null
 <i>Knock-knock</i>	coding region or promoter	multiple KOs in one plant
 <i>Knock-worst</i>	coding region or promoter	chromosomal rearrangement

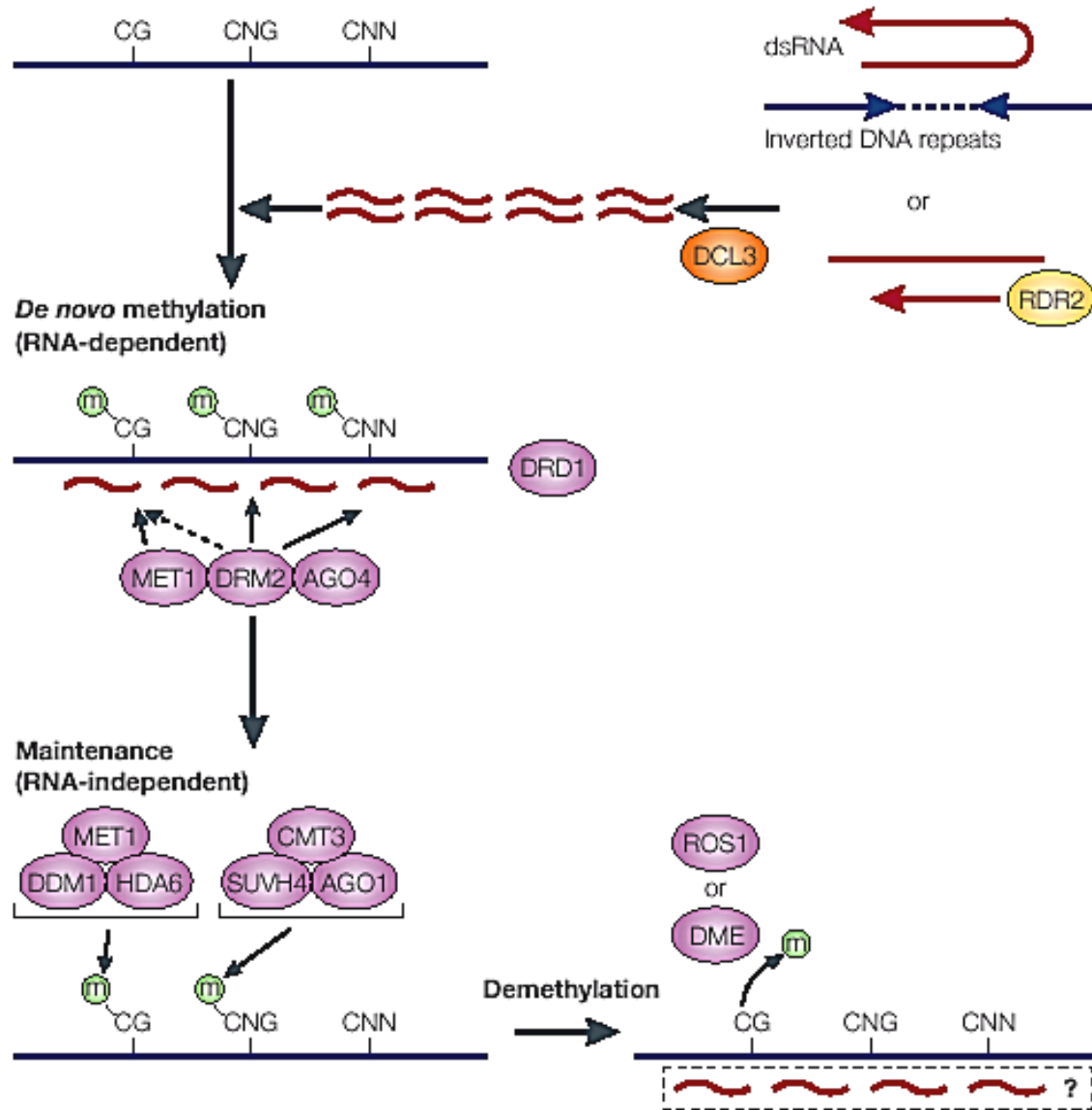
**RNAi**



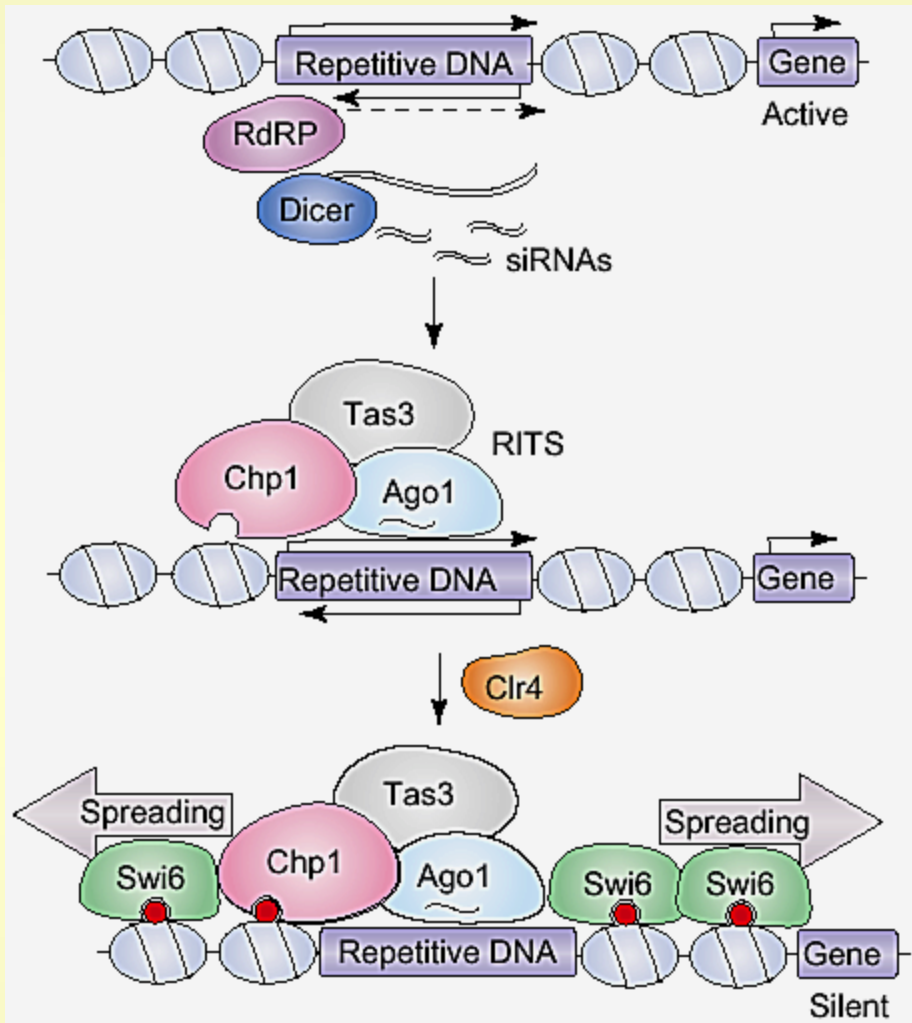
# Metodické **výhody** a **nevýhody** RNAi

- Umlčení všech kopií daného genu u polyploidů
- Jednoduchá aplikovatelnost (*C.elegans*)
- Embrya myší nereagují na exogenní dsRNA
- Některé organismy pravděpodobně sekundárně ztratili RNAi mašinerii (*Trypanosoma cruzi*, *Saccharomyces cerevisiae*)

# RNA- directed DNA methylation

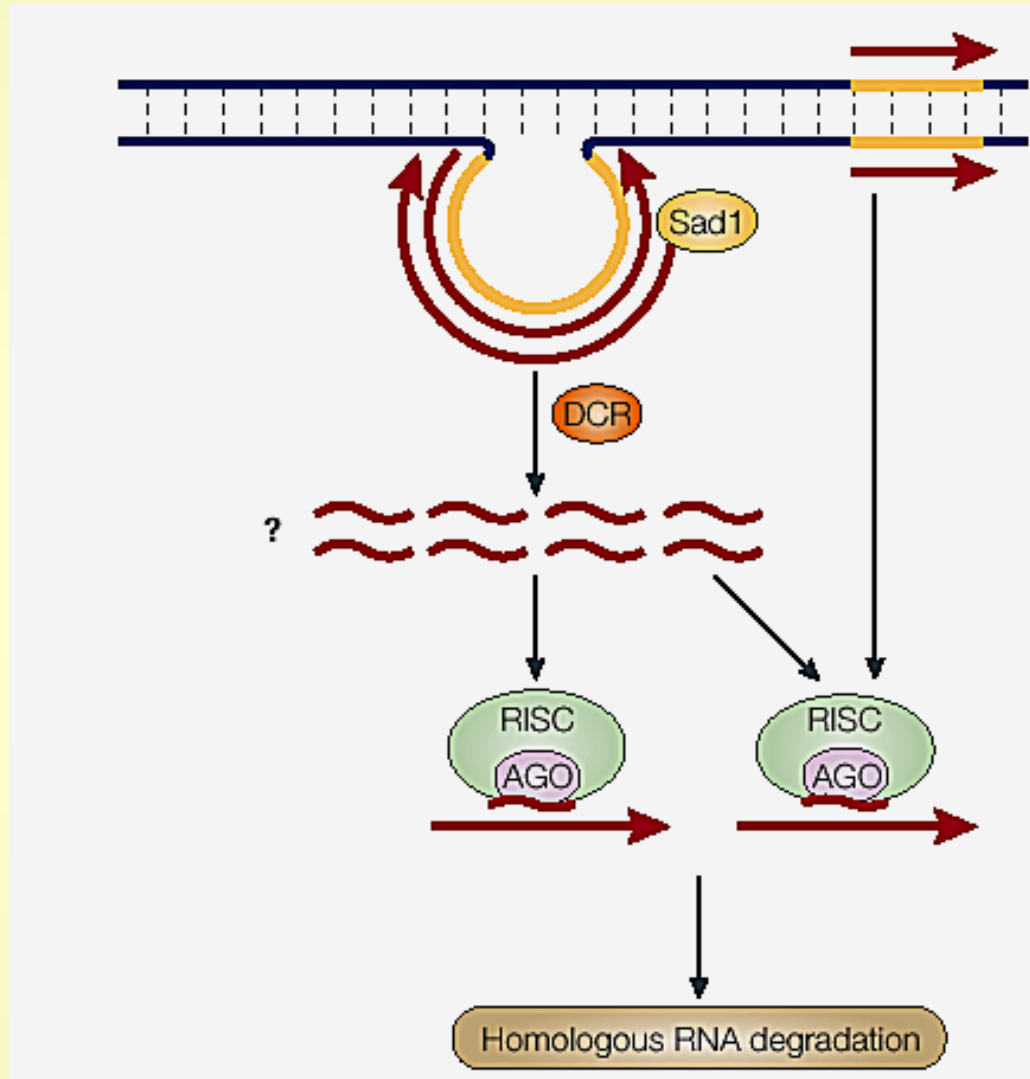


# RNA interference-mediated heterochromatin assembly

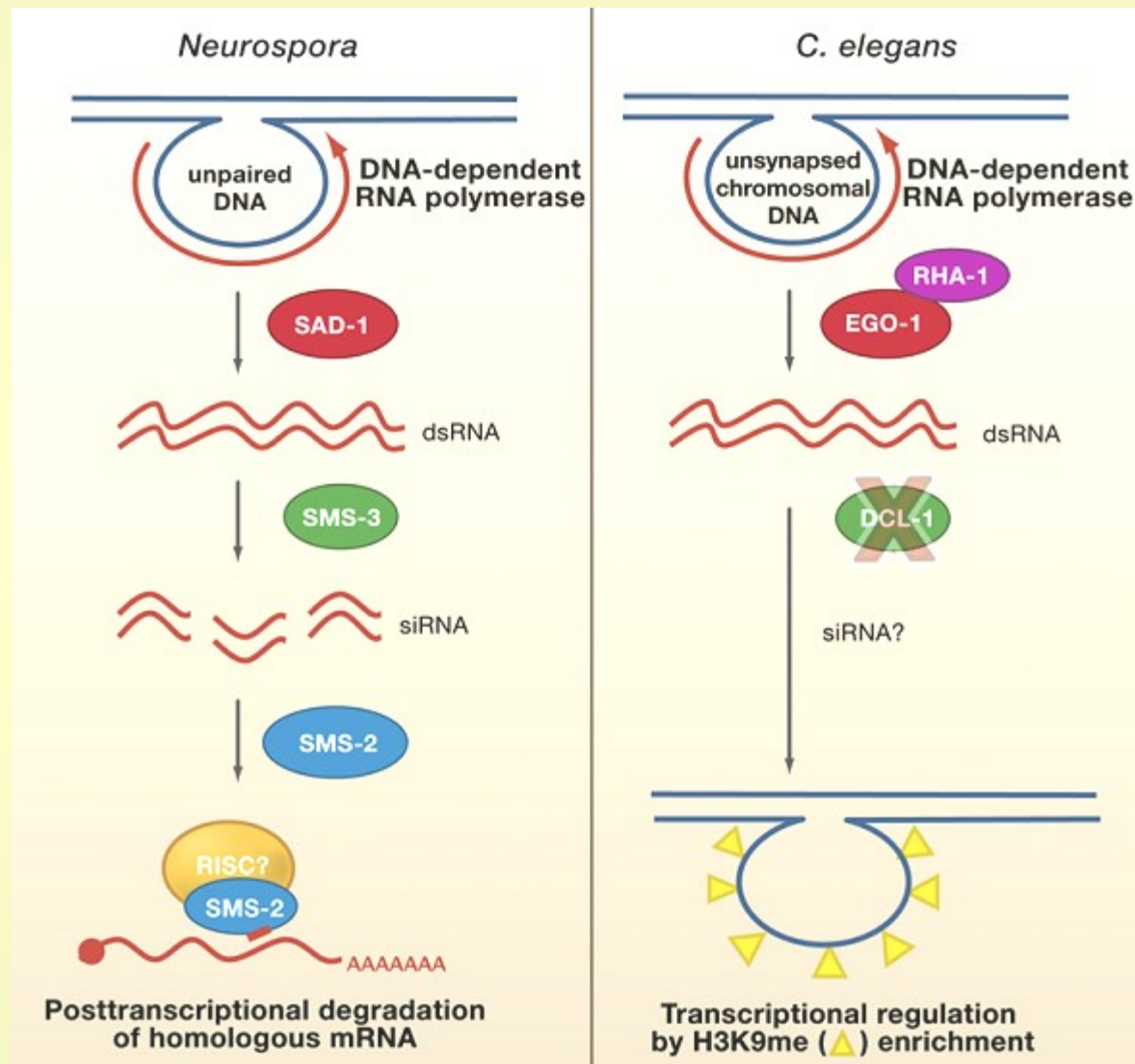


Greval SIS and Rice JC, *Current Opinion in Cell Biology*, 2004

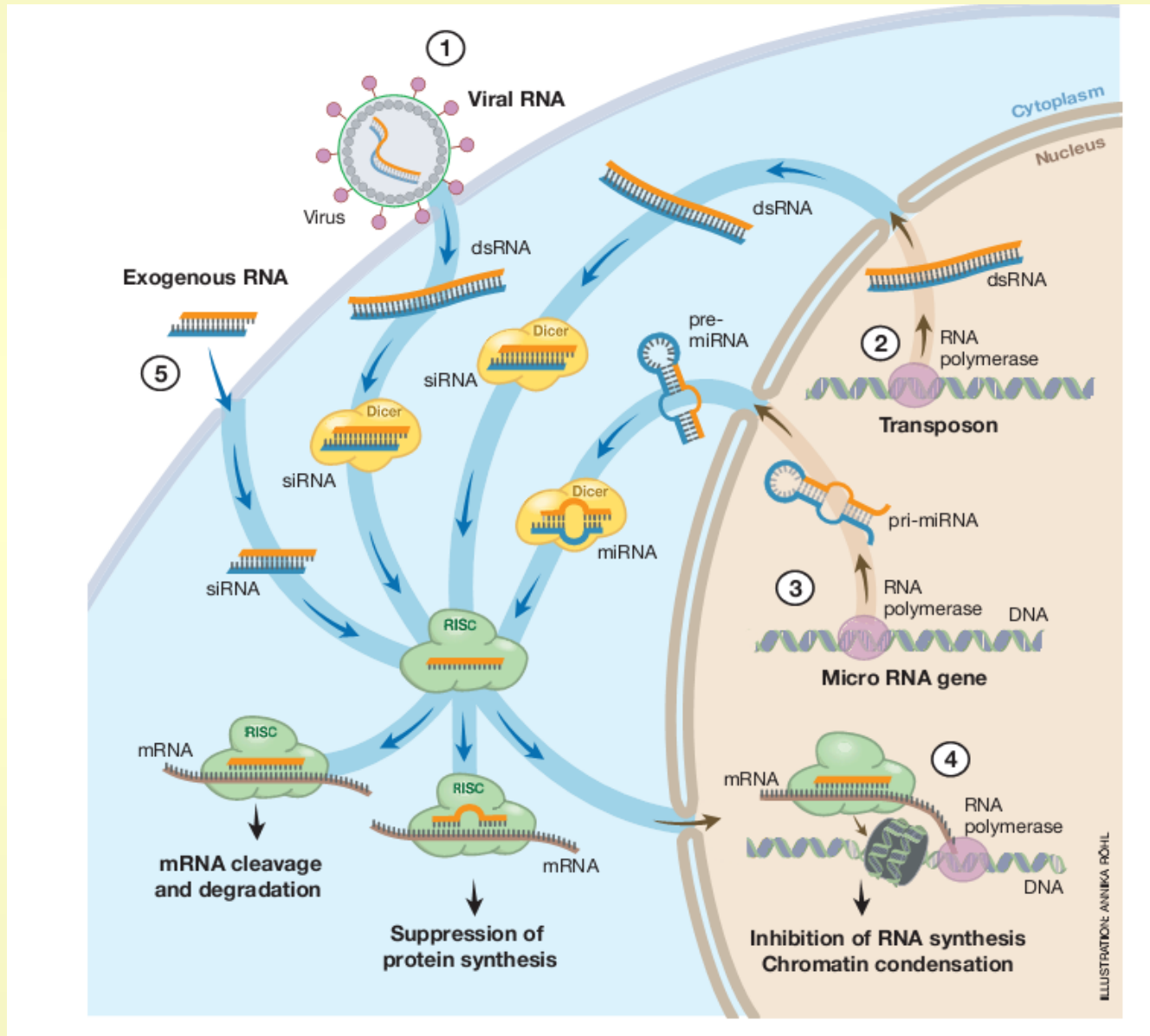
# “Silencing” nezpárované DNA u rostlin



# "Silencing" nezpárované DNA u hub a živočichů



# Pole působnosti RNAi



# **RNA jako molekulární přepínač**

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

**Původně objeveny u myši**

**Vyskytují se u všech obratlovců**

**Interagují s regulačními proteiny**

**Přemění transkripční represor v aktivátor**

# **Piwi-interacting RNA - piRNA**

**Silencing retrotranspozonů během spermatogeneze**

**Krátké RNA 29-30 bp**

**Vyskytují se v klastrech mimo genové oblasti**



# 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

# Analogie RNAi u bakterií

**CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)**

Přímé repetice (24bp-48bp) s unikátními spacery fágového původu

**Genomy s CRISPR repeticemi obsahují Cas geny (CRISPR-associated genes), které se podílejí na antivirové obraně**

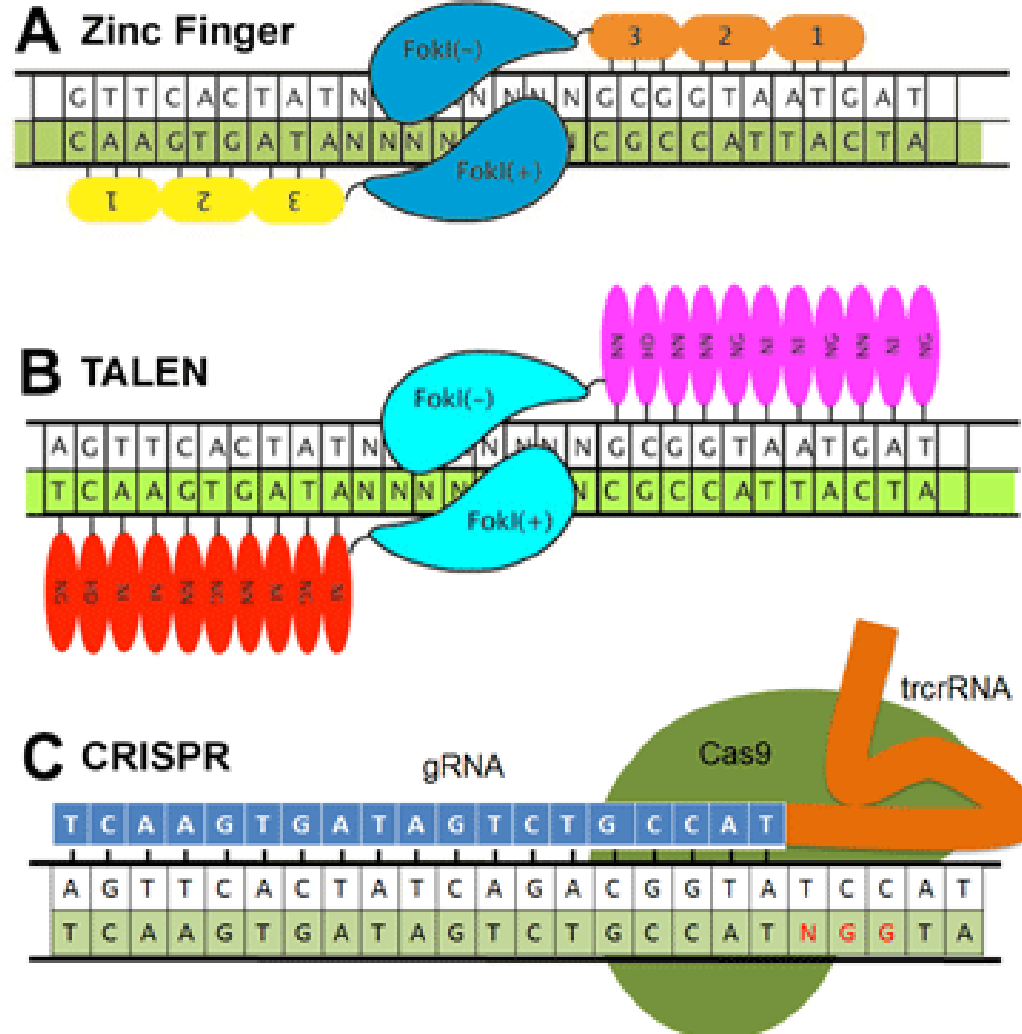
*Science* 15 August 2008:  
Vol. 321. no. 5891, pp. 960 - 964  
DOI: 10.1126/science.1159689

## REPORTS

### **Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes**

Stan J. J. Brouns,<sup>1\*</sup> Matthijs M. Jore,<sup>1\*</sup> Magnus Lundgren,<sup>1</sup> Edze R. Westra,<sup>1</sup>  
Rik J. H. Slijkhuis,<sup>1</sup> Ambrosius P. L. Snijders,<sup>2</sup> Mark J. Dickman,<sup>2</sup> Kira S. Makarova,<sup>3</sup>  
Eugene V. Koonin,<sup>3</sup> John van der Oost<sup>1†</sup>

# Tools for genome editing



# Historie

**1969** Britten a Davidson: “RNA může sloužit jako regulátor genové exprese“

**1972** Dvouřetězcové RNA izolovány z lidských buněk

**1984** Regulace translace „antisense“ mechanismem u *E.coli*

**1990** Kosuprese u rostlin

**1993** První microRNA (lin-4) izolována u hád'átka

**1995** Sense i antisense RNA konstrukty inhibují expresi u hád'átka

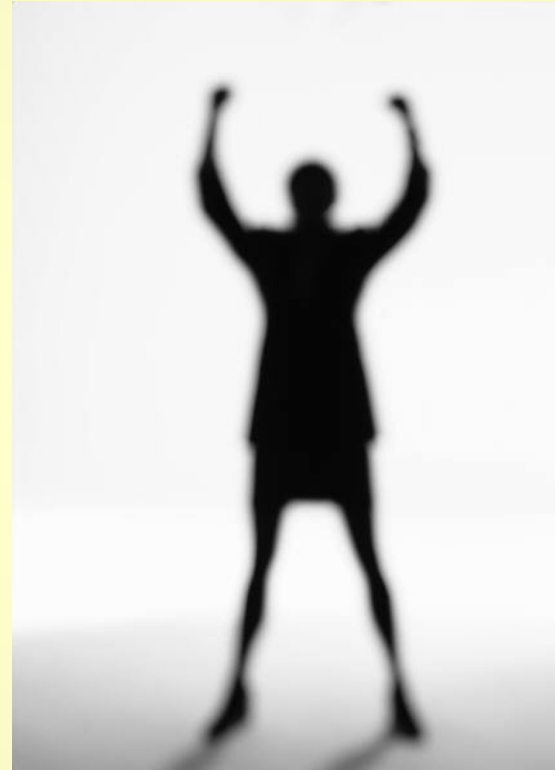
# Historie

- 1998** — dsRNA efekt u hád'átka
- 1999** — **Objev krátkých RNA rostlin**
- 2000** — Purifikace RISC komplexu
- 2001** — **Identifikace Dicer**
- 2002** — RNAi použito proti HIV
- 2004** — **miRNA fungují jako onkogeny**
- 2006** — **Fire a Mello získali Nobelovu cenu**



**Dnes** — Plošný „screening“ odhaluje, že až polovina genů je regulována miRNA

# Nobelova cena 2018



**Co reguluje microRNA?**