

RNA

Vlákno kovalentně vázaných nukleotidů.

Biochemicky odlišitelná od DNA (hydroxyl na C2 pentózy, uracil místo thyminu)

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

tRNA – překládá kód sekvence bází di 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

RNA s katalytickou funkcí



RNA WORLD

Dříve: hypotetické stádium v evoluci
(RNA genetickým materiálem)

Nyní: regulace exprese endogenních genů,
obrana proti invazi cizího genetického
materiálu

SUMMARY

Long double-stranded RNAs (dsRNAs; typically >200 nt) can be used to silence the expression of target genes in a variety of organisms and cell types (e.g., worms, fruit flies, and plants). Upon introduction, the long dsRNAs enter a cellular pathway that is commonly referred to as the RNA interference (RNAi) pathway. First, the dsRNAs get processed into 20-25 nucleotide (nt) small interfering RNAs (siRNAs) by an RNase III-like enzyme called Dicer (initiation step). Then, the siRNAs assemble into endoribonuclease-containing complexes known as RNA-induced silencing complexes (RISCs). The siRNA strands are then unwound to form activated RISCs. The siRNA strands subsequently guide the RISCs to complementary RNA molecules, where they cleave and destroy the cognate RNA (effector step). Cleavage of cognate RNA takes place near the middle of the region bound by the siRNA strand.

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

Guo, Kemphues, 1995

Fire, Mello, 1998



RNAi

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998

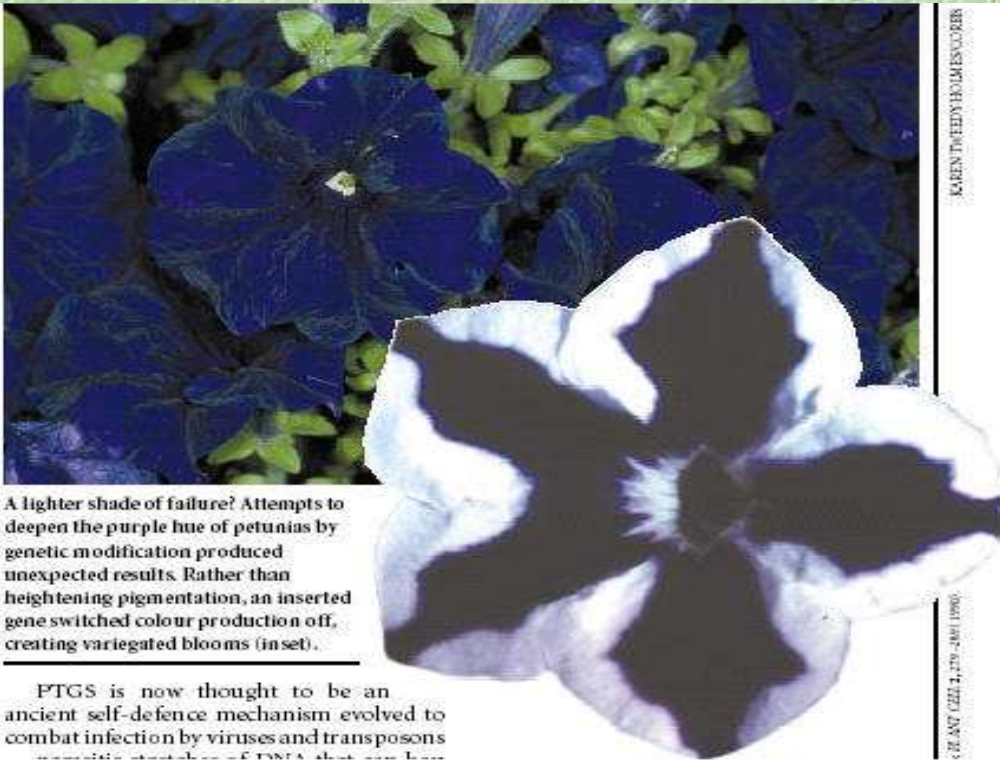


PTGS



The most interesting aspects of RNAi are the following:

- * dsRNA, rather than single-stranded antisense RNA, is the interfering agent
 - * it is highly specific
- * it is remarkably potent (only a few dsRNA molecules per cell are required for effective interference)
- * the interfering activity (and presumably the dsRNA) can cause interference in cells and tissues far removed from the site of introduction



**Šlechtění petunií –
zintenzivnění barvy květů.**

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

KOSUPRESE

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



**žíhané rostliny až zastavení
syntézy barviva**

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

Guo, Kempfues, 1995

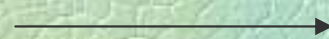
Fire, Mello, 1998



RNAi

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998



PTGS



The most interesting aspects of RNAi are the following:

- * dsRNA, rather than single-stranded antisense RNA, is the interfering agent
 - * it is highly specific
- * it is remarkably potent (only a few dsRNA molecules per cell are required for effective interference)
- * the interfering activity (and presumably the dsRNA) can cause interference in cells and tissues far removed from the site of introduction

1.

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

XX

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

2.

+ **mix sense a antisense RNA**

\longrightarrow **několikanásobně vyšší
umlčovací efekt**

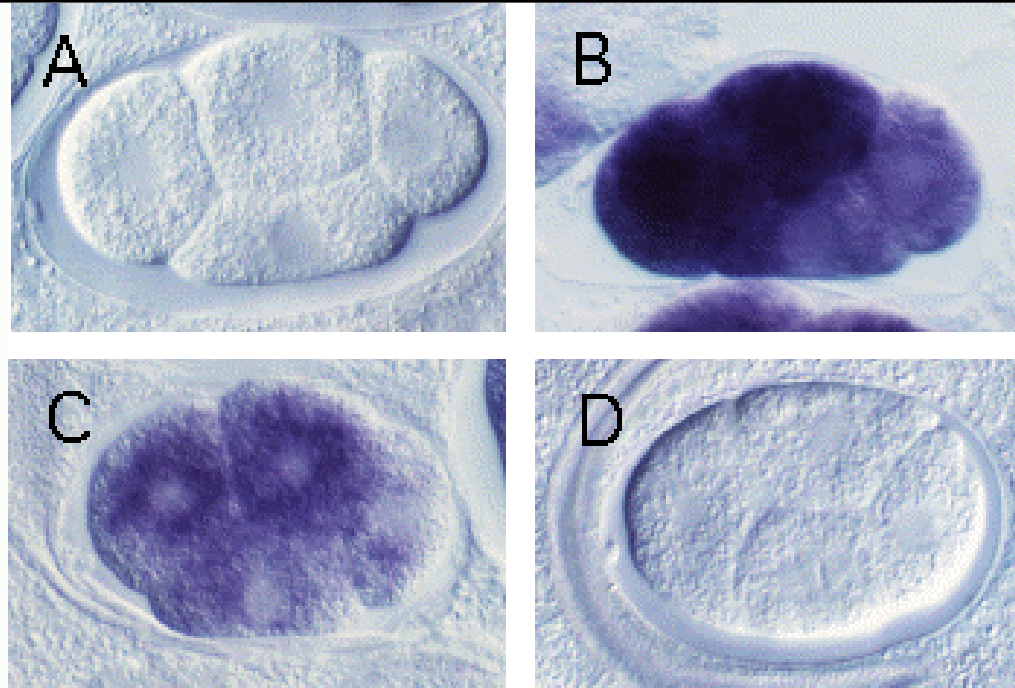


Figure 1. Effects of mex-3 RNA interference on levels of the endogenous mRNA. Nomarski DIC micrographs show in situ hybridization of 4-cell stage embryos. (A) Negative control showing lack of staining in the absence of the hybridization probe. (B) Embryo from uninjected parent showing normal pattern 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 μm 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)

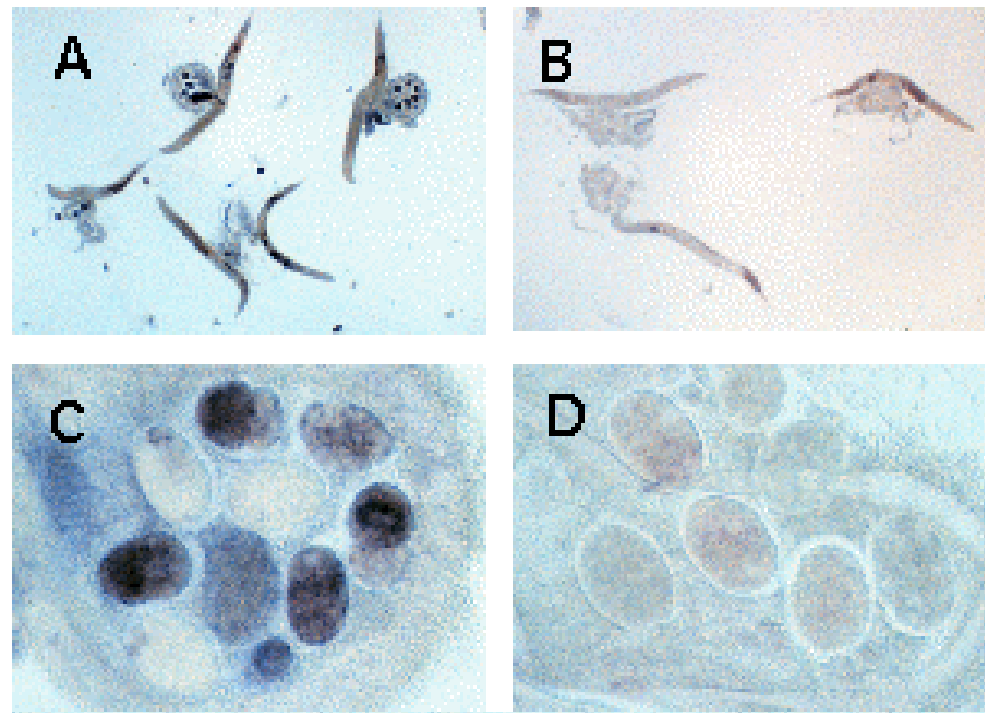


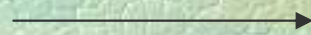
Figure 2. SOAKING WORMS WORKS ALMOST AS EFFECTIVELY AS INJECTING.

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

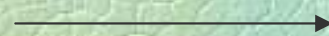
Fire, Mello, 1998



RNAi

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998



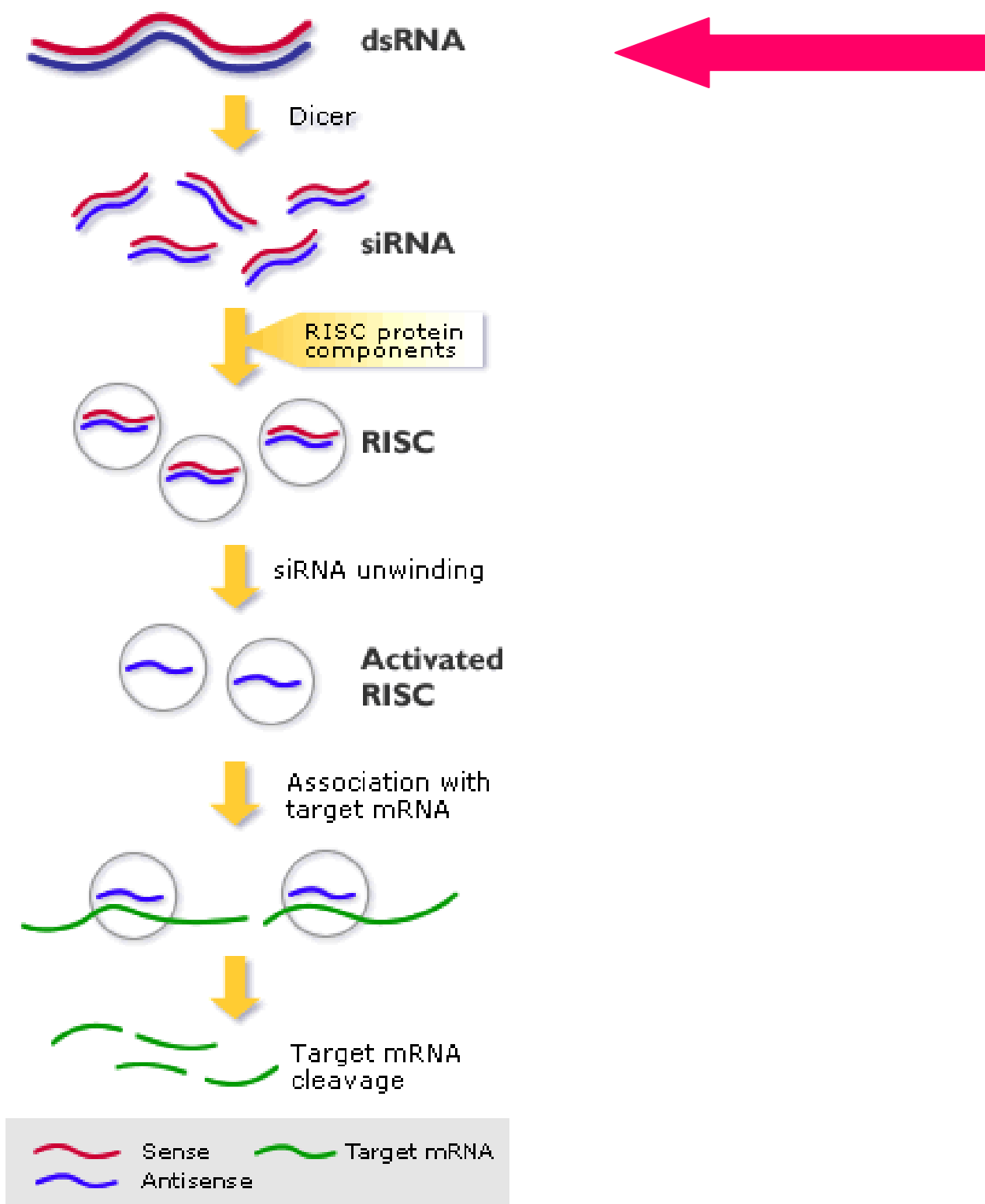
PTGS



The most interesting aspects of RNAi are the following:

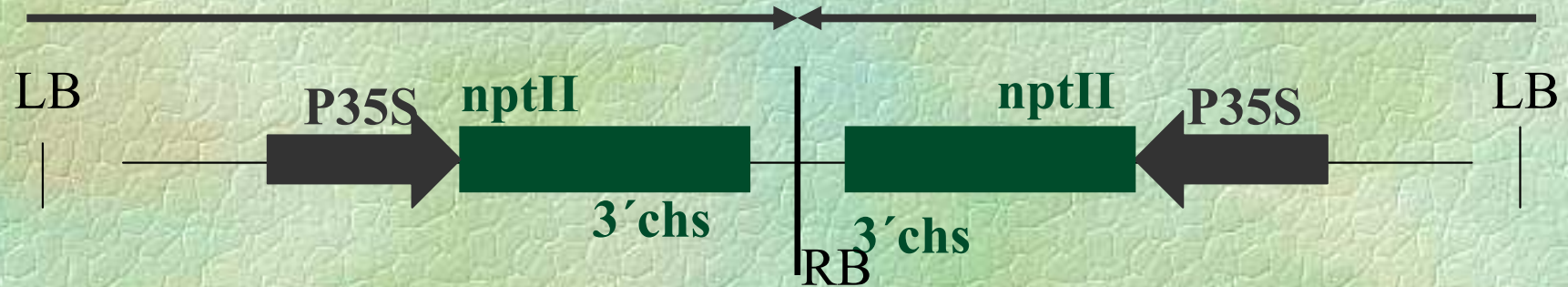
- * dsRNA, rather than single-stranded antisense RNA, is the interfering agent
 - * it is highly specific
- * it is remarkably potent (only a few dsRNA molecules per cell are required for effective interference)
- * the interfering activity (and presumably the dsRNA) can cause interference in cells and tissues far removed from the site of introduction

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

RNA – directed – DNA methylation

Poprvé popsána v rostlinách infikovaných rekombinantními viry obsahujícími úseky homologní s endogenní sekvencí – metylace homologních úseků.

Modifikace chromatinu (dimetylace lysinu 9 na histonu H3, H3K9Me2, typické pro heterochromatin)

Kvasinky a Drosophila: dsRNA indukuje H3K9Me2

umlčený chromatin, závislé na komponentách RNAi

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)

Umlčení *in cis*: ovliněna je jedna nebo více kopií v jednom lokusu (není třeba přítomnost homologní sekvence).

U rostlin – inverzní korelace mezi počtem kopií a úrovní exprese genu → PŘEDPOKLÁDÁ se interakce mezi kopiemi → změny sekundární struktury → metylační a heterochromatinové komponenty. Interakce je PRAVDĚPODOBĚ zprostředkována regulačními molekulami RNA.

Umlčení *in trans* je indukováno „interakcí“ s homologním lokusem. Původně – interakce typu DNA-DNA. Nyní – dsRNA odvozená z homologních úseků.

TGS A METYLACE DNA

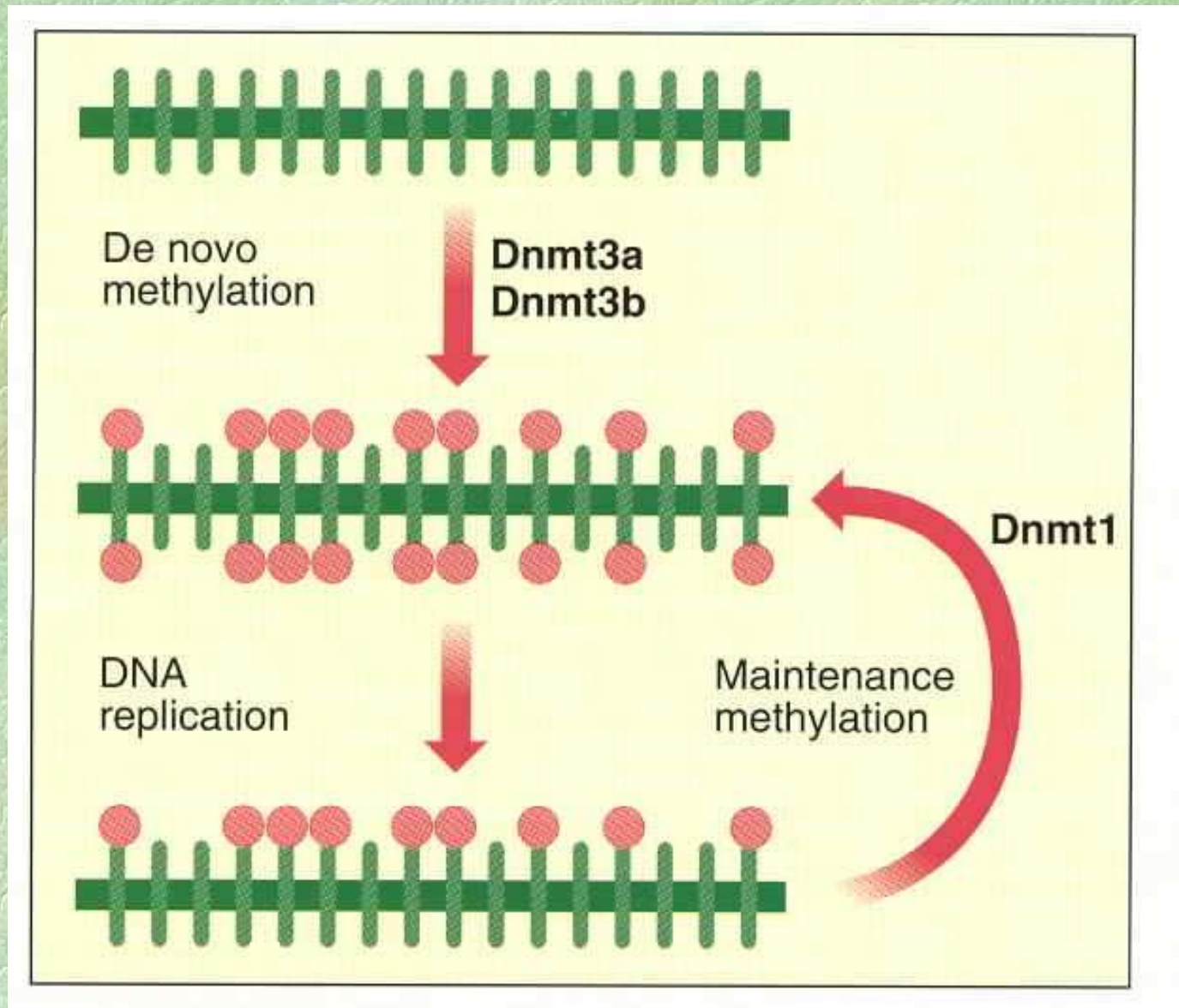
Distribuce metylace v genomech:

Metylace C v symetrických sekvencích

- CpG,
- CpNpG (rostliny)

Metylace C v asymetrických sekvencích
(rostliny)

Živočišné DNA metyltransferázy



Inhibitory metyltransferáz – epigenetická terapie

Nádory - specifické změny v metylačním obrazu (pokles metylace v sekvencích pericentromerických satelitů, hypermethylace 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).

Rostlinné DNA metyltransferázy

MET 1 (Methyltransferase 1) - udržovací metylace
cytosinů v dubletech CG

CMT 3 (Chromomethylase 3) - metylace cytosinů
v tripletech CNG

DRM (Domains Rearranged Methylase) - *de novo*
methylace

(DDM1 (decrease in DNA methylation) – kóduje protein,
který je součástí komplexu
remodelujícího chromatin)

RDDM v savčích buňkách

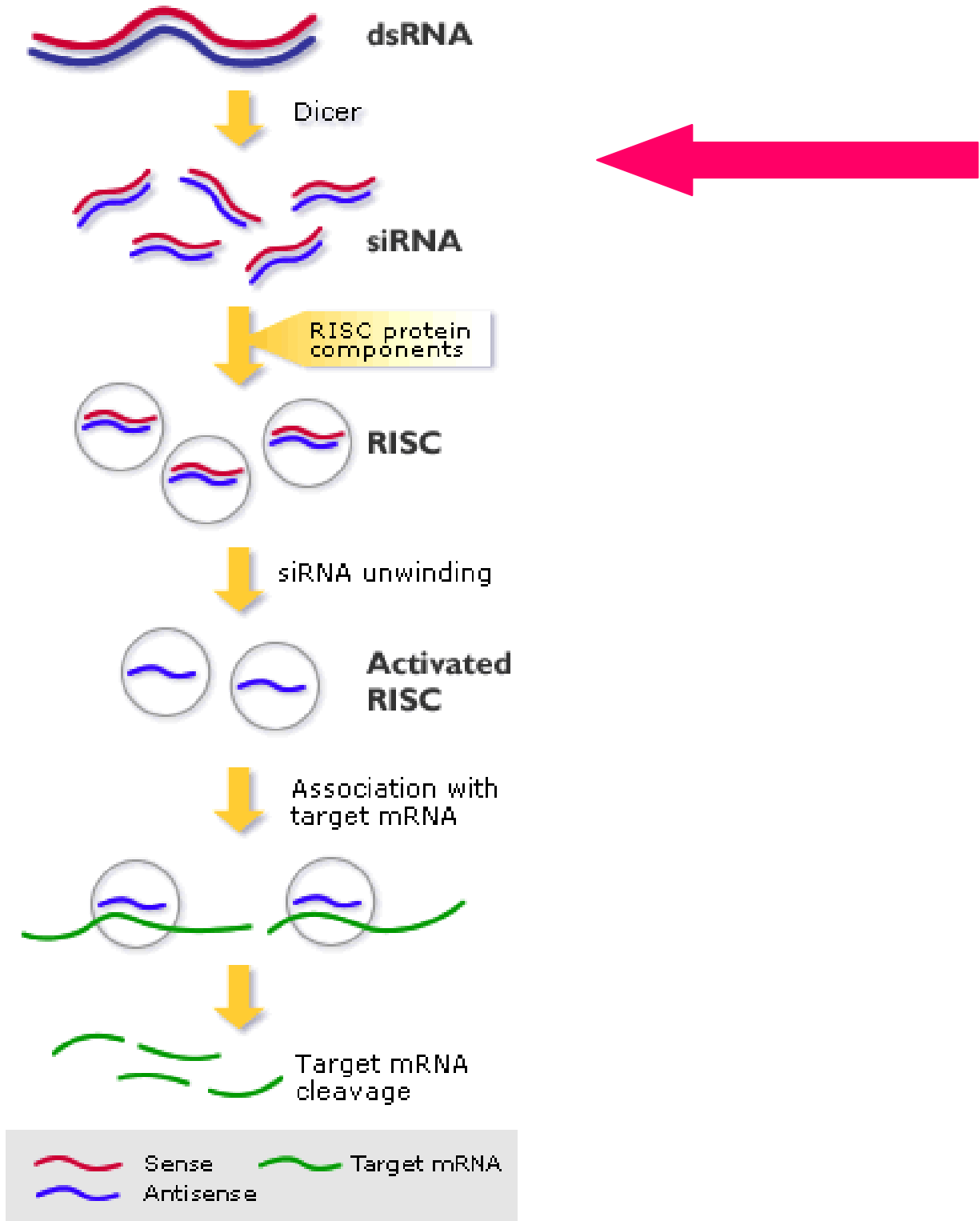
Kawasaki et al., Nature 2004: transfekce lidských buněk siRNA specificky zacílenými proti CpG ostrovům v promotoru genu pro E-cadherin → metylace DNA, metylace H3K9 → umlčení exprese genu na úrovni transkripce.

Morris et al., Science 2004: umlčení transgenu po transfekci siRNA homologních k promotoru, metylace promotoru.

X

Svoboda et al., NAR 2004: exprese dlouhých úseků dsRNA homologních ke kódující oblasti cílového genu v myších oocytech → PTGS, ale ne metylace DNA

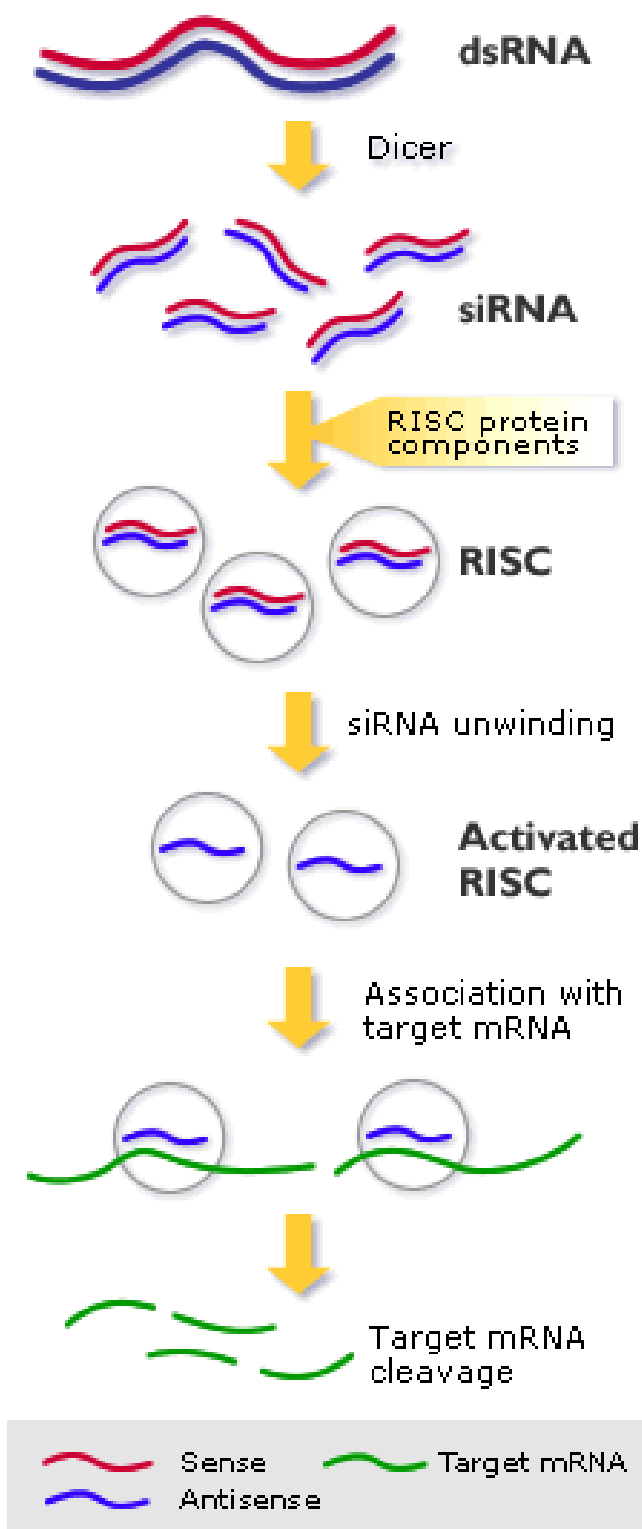
Molekulární základ RNAi



DICER

- vlastní iniciátor umlčení, poprvé identifikován v Drozofile
- RNase III-like enzym (N-konec:helikázová doména, C-konec:RNaseIII doména a dsRNA vazebný motiv)
- štěpení molekul dsRNA \longrightarrow siRNA (21 - 25 nt)
- evolučně konzervativní (houby, živočichové, rostliny)
- ATP - dependentní nukleáza, funguje procesivně, ATP využívá k translokaci podél substrátu

Molekulární základ RNAi



RISC

- **RNA-induced silencing complex, efektorový komplex, destrukce cílové mRNA**

- **součástí procesu je odvinutí vláken dsRNA
aktivovaný RISC**

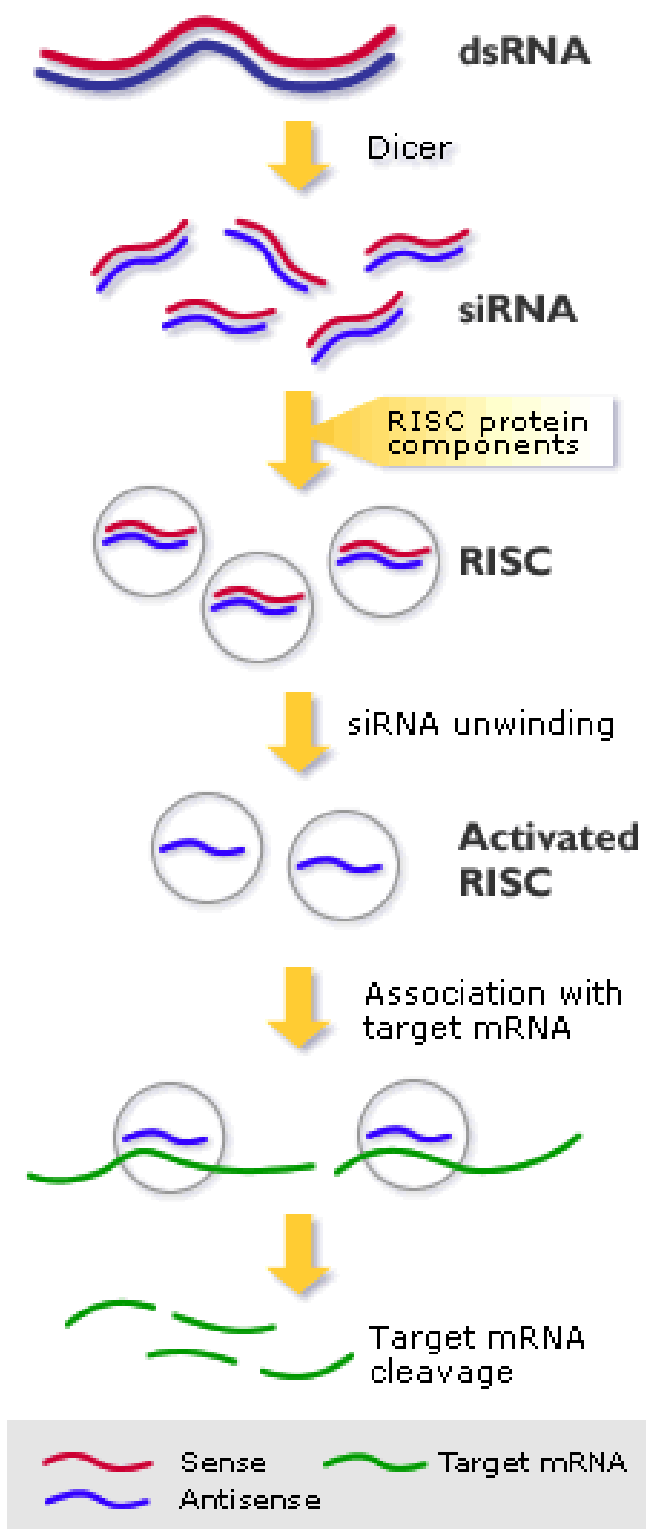


- **jednovláknové siRNA - na základě komplementarity
bází navádí komplex k cílovému místu**

- **helikáza, nukleázy s endo- a exo- aktivitou,
protein recA (homology searching activity)**

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

Molekulární základ 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.

Cosuppression - 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*.

SYSTEMIC SILENCING

- 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

21 - 22 nt: sekvenčně specifická degradace mRNA

24 - 26 nt: systemic silencing
methylace homologní DNA

microRNA

endogenní malé molekuly RNA, kódovány geny **ODLIŠNÝMI** od těch, jež regulují. 21 nt, vazba na parciálně komplementární místa na 3' netranslatovaném konci cílové mRNA → represe transkripce.

Vznik z vlásenkového prekursoru (70 bp).

U rostlin – maturované miRNA jsou metylované (HEN1),
ochrana před degradací

.

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)

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 „silent“ 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, replikace a stabilizace konce chromozomu).

Epigenetické modifikace: metylace DNA,
methylace histonů (H3K9Me2), deacetylovaný
H3K9.

Metylovaný K9 -vazba na Hp1 (Heterochromatin
protein 1) → represe transkripce.

Methylace DNA následně fixuje umlčený stav.

RNAi a heterochromatin - kvasinky

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)








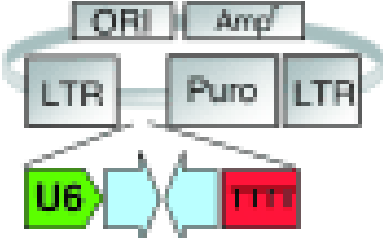


RNAi a heterochromatin - rostliny

- 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.

Klinické využití RNAi

- +** vysoký potenciál a specifita
dostupnost siRNA z komerčních zdrojů
- přechodný účinek v savčích buňkách
problémy s transfekcí

RNAi delivery strategies

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

RNAi a HIV

Klasický přístup - kombinace léčiv

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

1. onemocnění, na něžž 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.**

**Laboratorní testy - syntetické siRNA selektivně
omezily expresi onkoproteinu p210 (CML)**