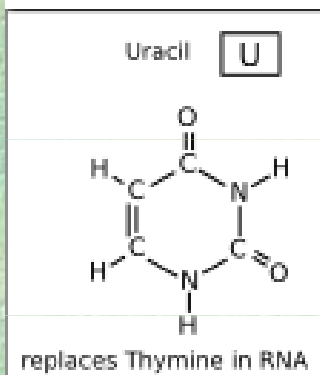
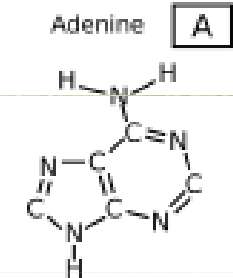
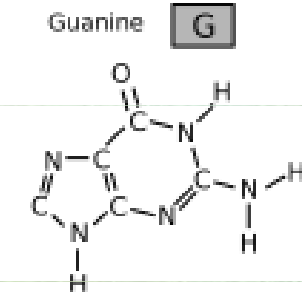
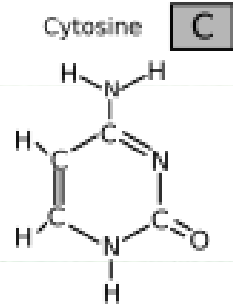
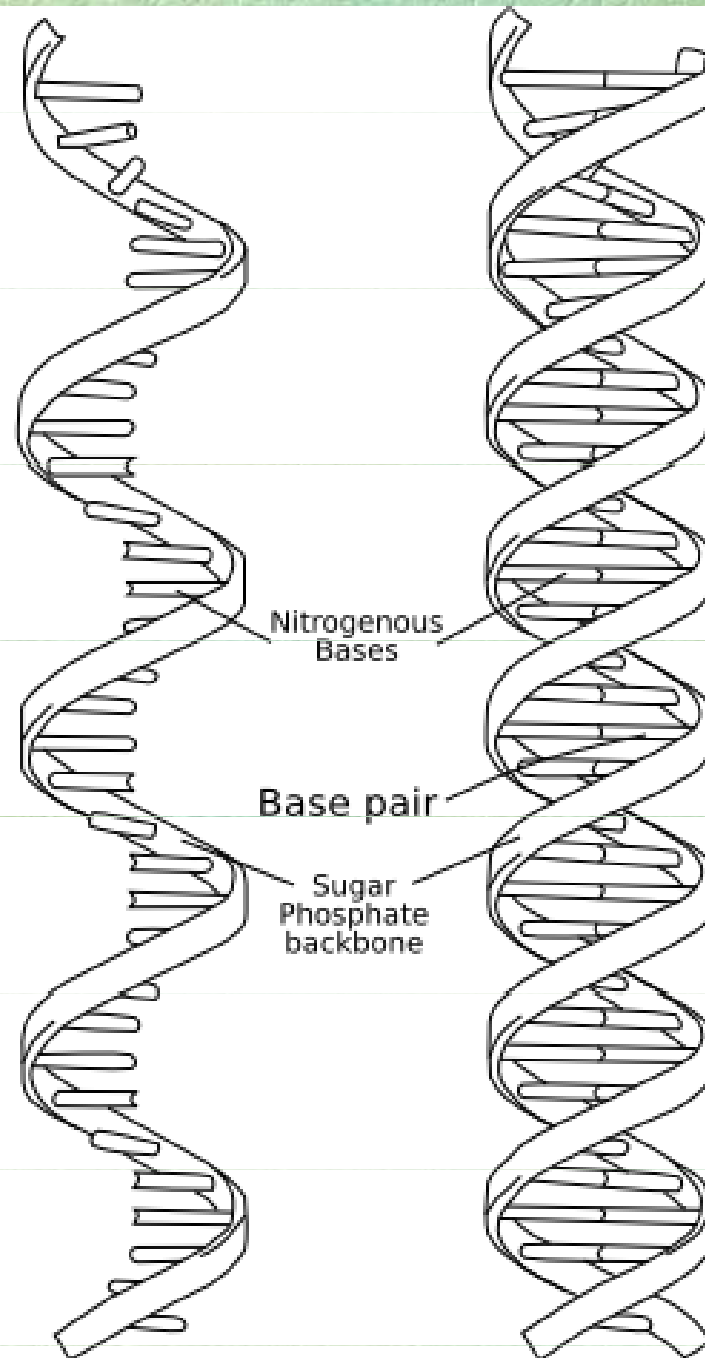


RNA

vlákno kovalentně
vázaných
nukleotidů



Nitrogenous
Bases

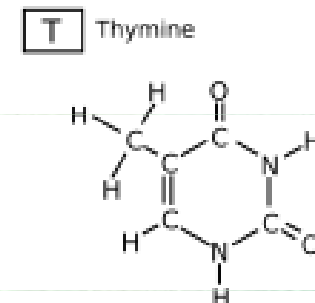
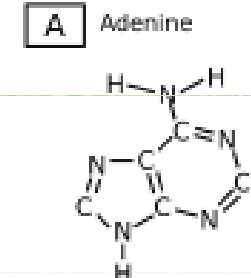
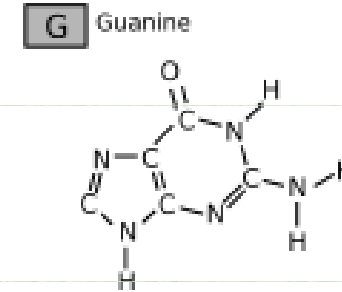
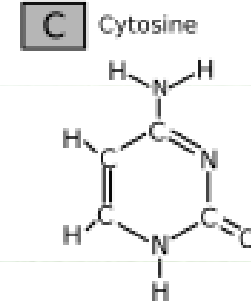


RNA

Ribonucleic acid

DNA

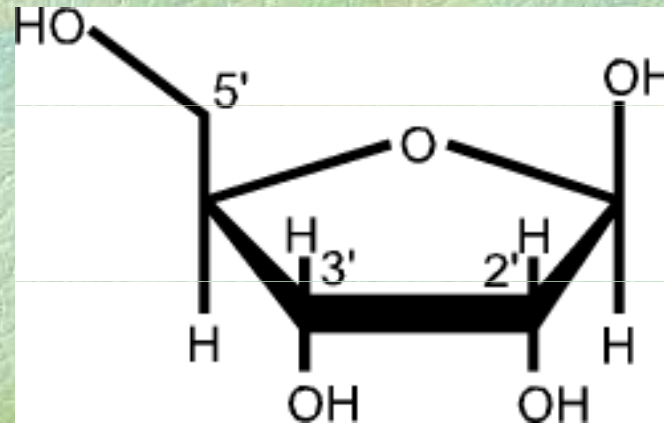
Deoxyribonucleic acid



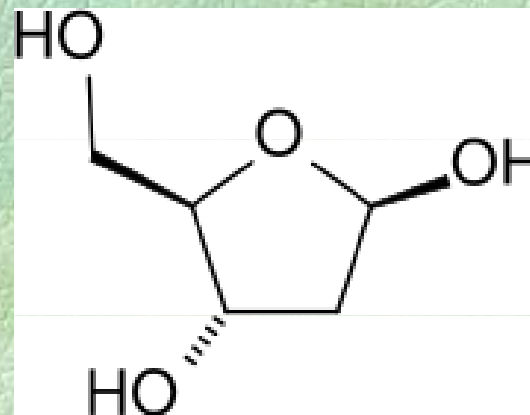
Nitrogenous
Bases

RNA je chemicky odlišitelná od DNA

obsahuje ribózu

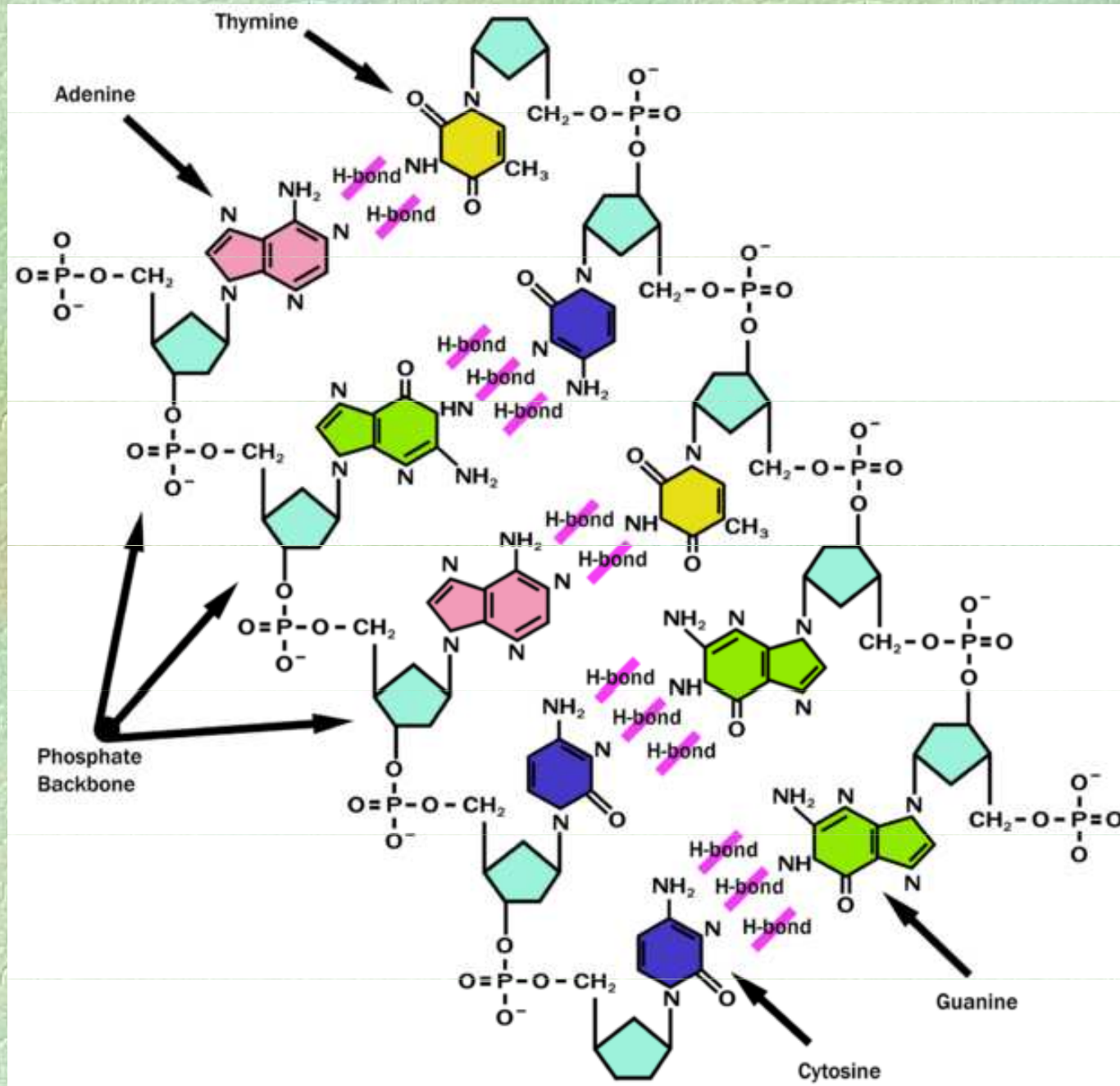


namísto deoxyribózy v DNA



což ji činí méně odolnou proti alkalické hydrolyze

Primární struktura DNA



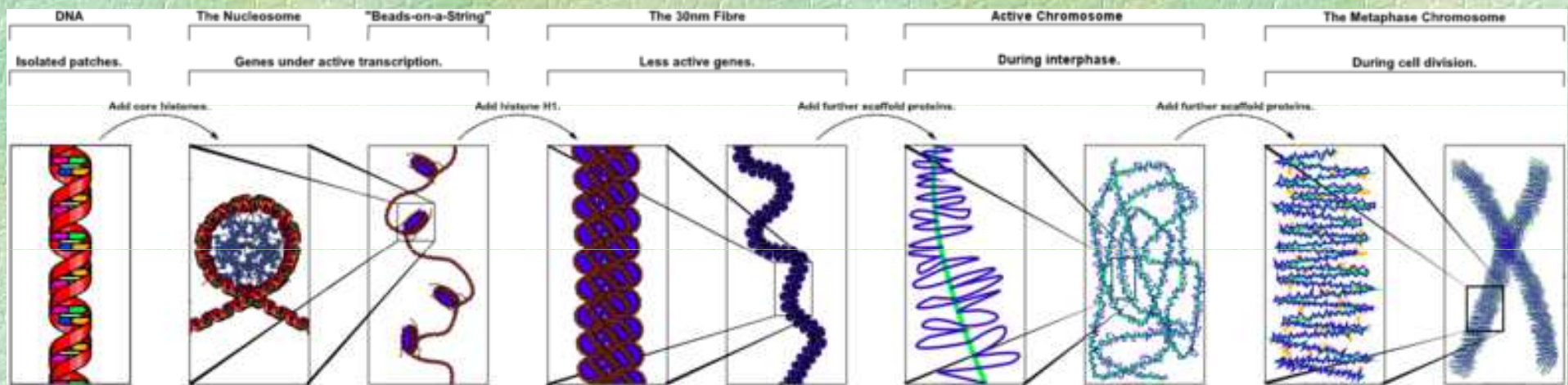
Vymezení základních pojmů

Primární struktura DNA – určena pořadím (sekvencí) nukleotidů, přímo určuje genetickou informaci.

Lze znázornit lineárním zápisem (5' AGGTCATG 3')

Sekundární struktura DNA – způsob stočení dvoušroubovice, má vliv na reaktivitu molekuly (pravotočivé – A, B; levotočivá Z)

Vyšší úrovně – až na chromatin, histony



Vymezení základních pojmů - genová exprese

Replikace DNA – enzymaticky řízený proces kopírování sekvence DNA na základě komplementarity bází (adenin se páruje s thyminem, guanin s cytosinem). Vznikají dvě dceřinné molekuly, každá s jedním vláknem původním, jedním nově syntetizovaným (semikonzervativní replikace)

Transkripce – enzymaticky řízená syntéza RNA podle matrice DNA. DNA-dependentní-RNA polymerázy rozeznávají specifické místo na vlákně DNA – počátek transkripce.

Translace – proces syntézy bílkovin – sestavení primárního proteinového řetězce podle informace přepsané molekuly mRNA. Informace uložená v mRNA je dle genetického kódu přeložena do sekvence aminokyseli.

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 – RNA s katalytickou funkcí (23S-rRNA ve velké podjednotce ribozomu katalyzující syntézu peptidové vazby)
————→ 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

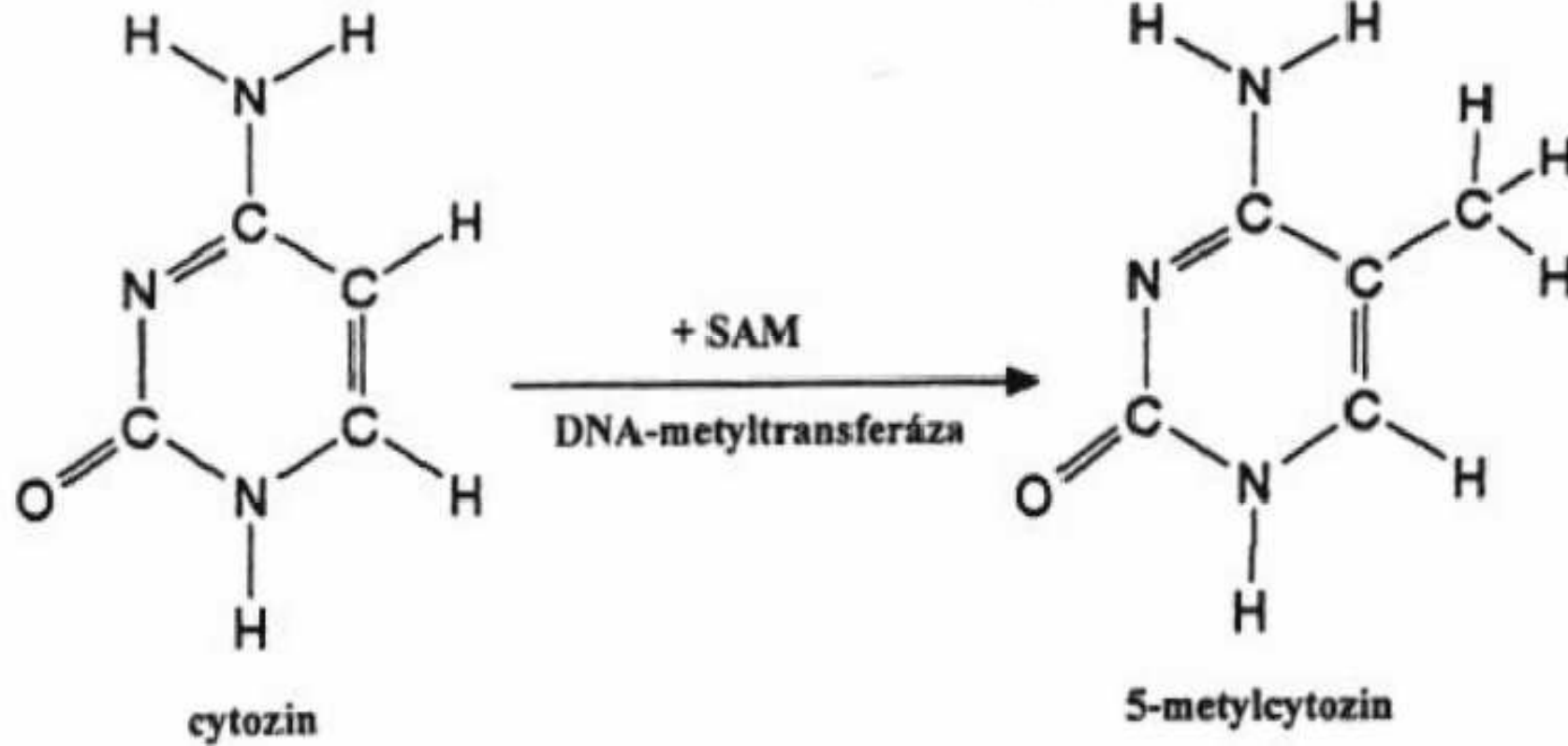
Epigenetickou kontrolu zprostředkovávají modifikace makromolekul, DNA a histonů:

METYLACE DNA

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

Metylace DNA

Modifikace cytosinu v poloze 5



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)

TGS A METYLACE DNA

Distribuce metylace v genomech:

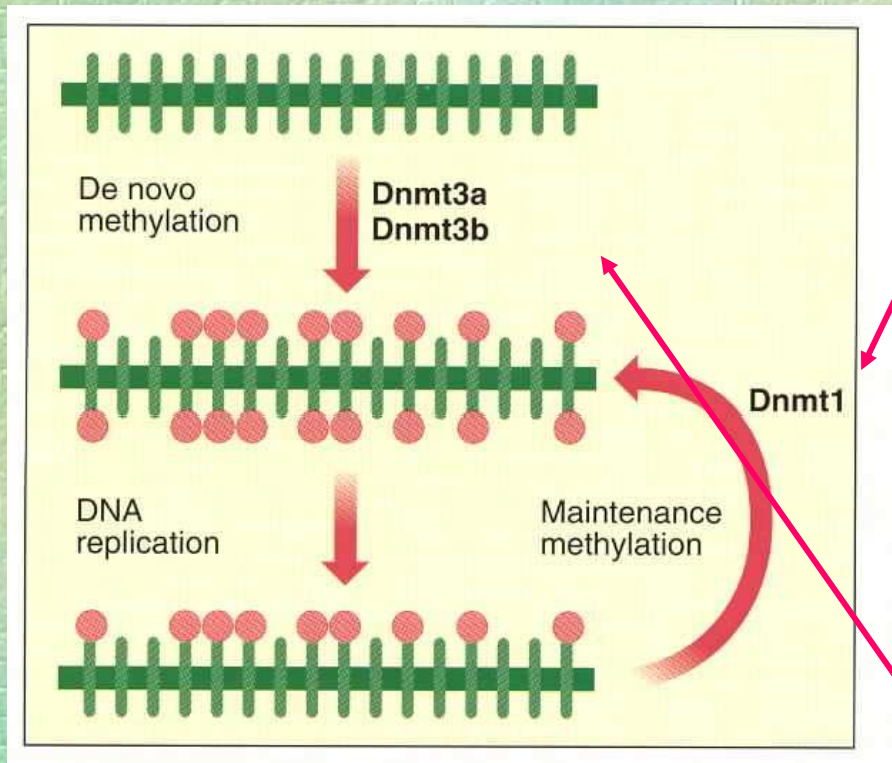
Metylace C v symetrických sekvencích

- **CpG**,
- **CpNpG** (rostliny)

Metylace C v **asymetrických** sekvencích
(rostliny)

Pro RDDM je typická metylace cytosinů ve **VŠECH** sekvenčních kontextech

Živočišné DNA metyltransferázy



Udržovací (maintenance):
metylace hemimetylovaných vláken po replikaci DNA;
cytosiny v symetrických motivech

***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)

Dnmt2-u savců, rostlin;

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

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

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 všech sekvenčních motivů, 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 komplex remodelujícího chromatin, role v udržování CG metylace)

Biologická role CpG a non-CpG metylace u rostlin

CG: zajišťuje stabilní epigenetický obraz
(non-CpG metylace a
ostatní epigenetické modifikace).

Mutanty *A. thaliana*, nefunkční enzymy, které
udržují CpG – globální pokles metylace cytosinů,
fenotypické defekty – přetrvávají i po obnovení
funkcí enzymů.

Úbytek metylace mimo CpG – většinou bez
fenotypu, po obnovení funkcí příslušných enzymů
se metylační stav vrací k normálu

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).

DEMETYLACE

1. **PASÍVNÍ – ne-funkce udržovacích metyltransferáz**

2. **AKTIVNÍ (v rostlinách)**

DEMETER (DME)

REPRESOR OF SILENCING (ROS)

DNA glykosylázová doména – odstraní 5-mC

DME – vývoj rostliny; kontroluje parentální imprinting genů v endospermu – hypometylace promotorů maternálních alel genů MEA (regulátor vývoje endospermu) a FWA (transkripční faktor).

ROS – uvolňuje TGS transgenů s hypermetylovanými promotory

METODY STUDIA METYLACE DNA

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

CG: HpaII mC^mCGG

CfoI G^mCGC

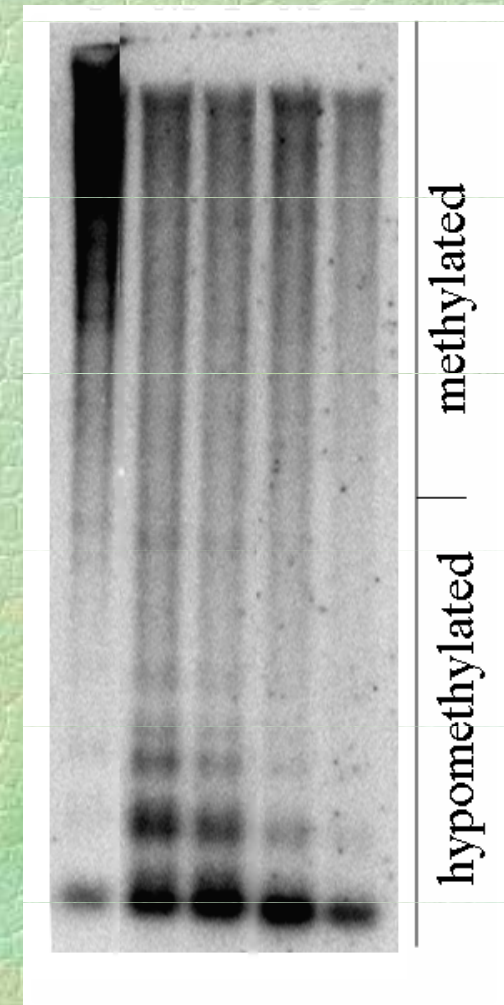
SmaI CC^mCGGG

TaiI A^mCGT

CNG: MspI $mCCGG$

CHH: Sau96I $GG(A/T)^mC^mC$

(záleží na tom, co v sekvenci následuje)



METODY STUDIA METYLACE DNA

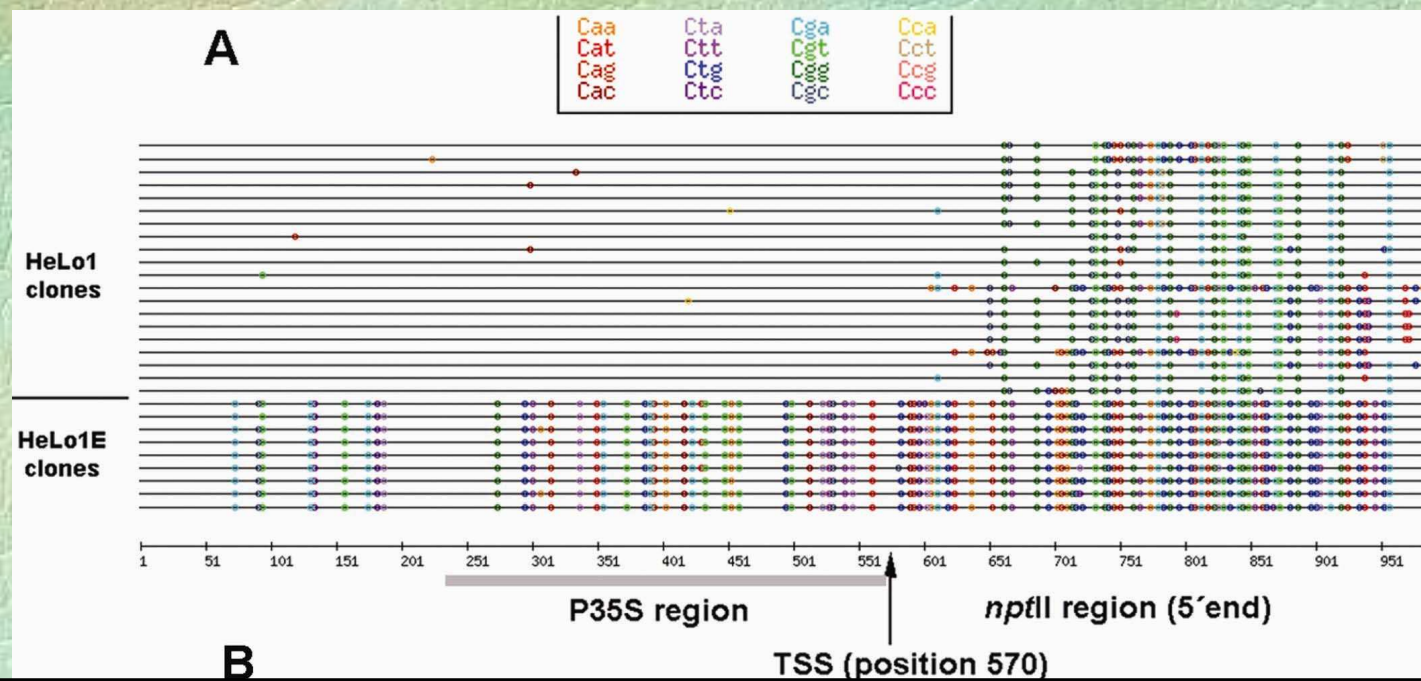
2. Modifikace DNA bisulfitem

cytosiny kovertovány na uracily, ^mC nereagují.

Modifikovaná DNA je namnožena pomocí PCR (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 ^mC.



METODY STUDIA METYLACE DNA

3. Imunoprecipitace pomocí protilátek proti ^mC nebo afinitní purifikace pomocí ^mC 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 ^mC 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)

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, Kempfues, 1995

Fire, Mello, 1998



RNAi

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998

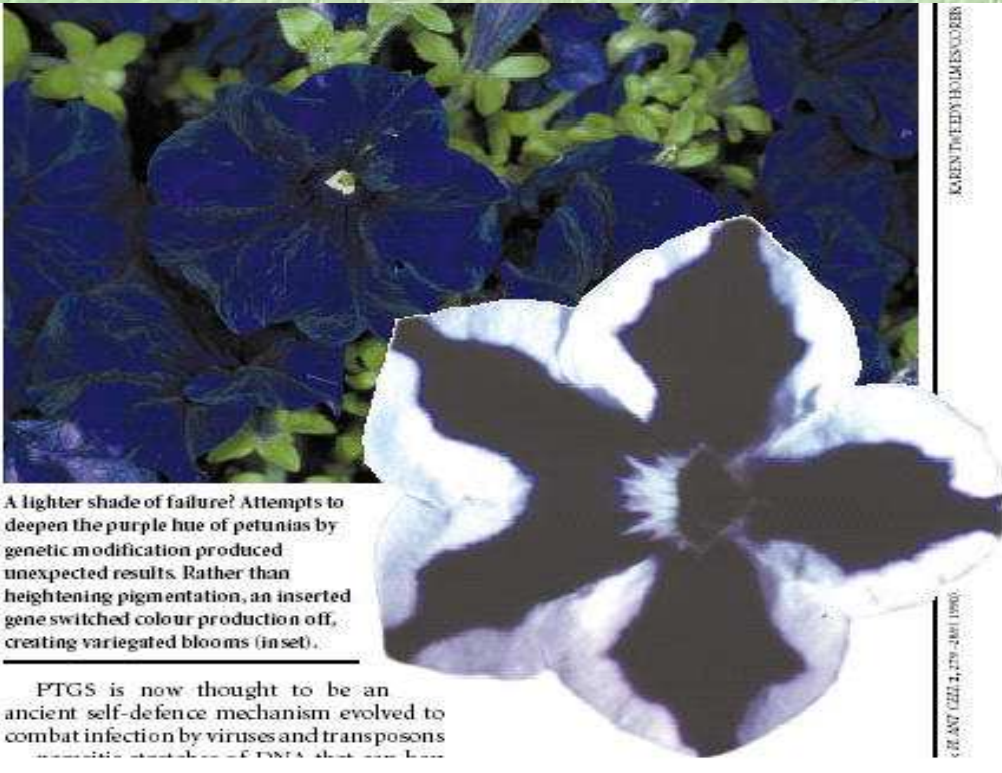


PTGS



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



**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, 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

INJEKTÁŽE C. ELEGANS

1.

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

XX

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

2.

+ **mix sense a antisense RNA**

\longrightarrow **několikanásobně vyšší
umlčovací efekt**

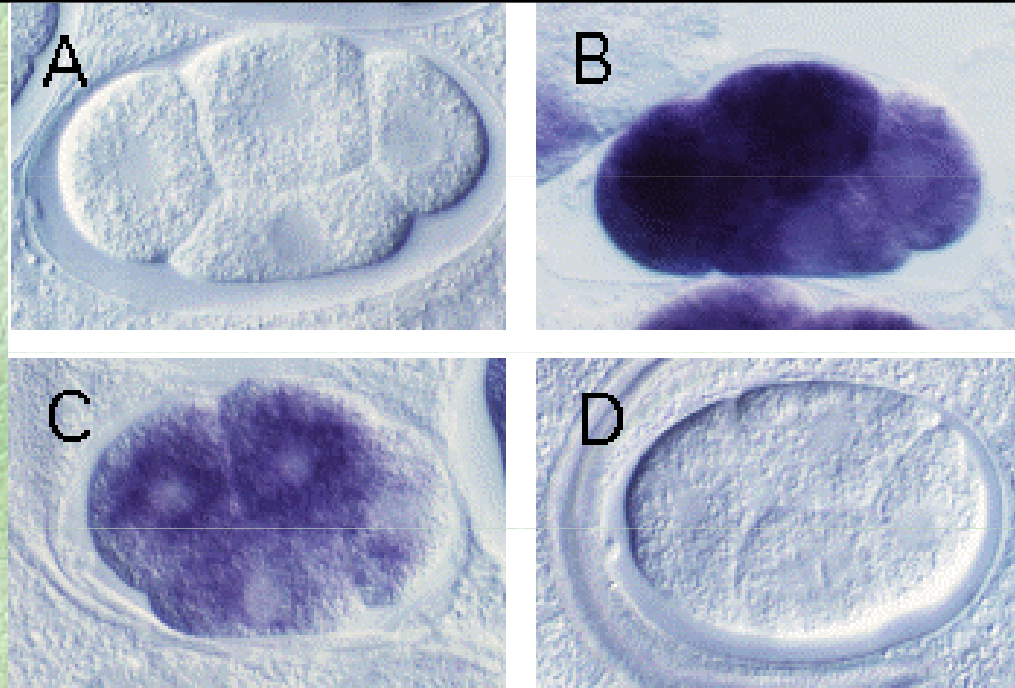


Figure 1. Effects of mex-3 RNA interference on levels of the endogenous mRNA. Nomarski DIC micrographs show in situ hybridization of 4-cell stage embryos. (A) Negative control showing lack of staining in the absence of the hybridization probe. (B) Embryo from uninjected parent showing normal pattern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

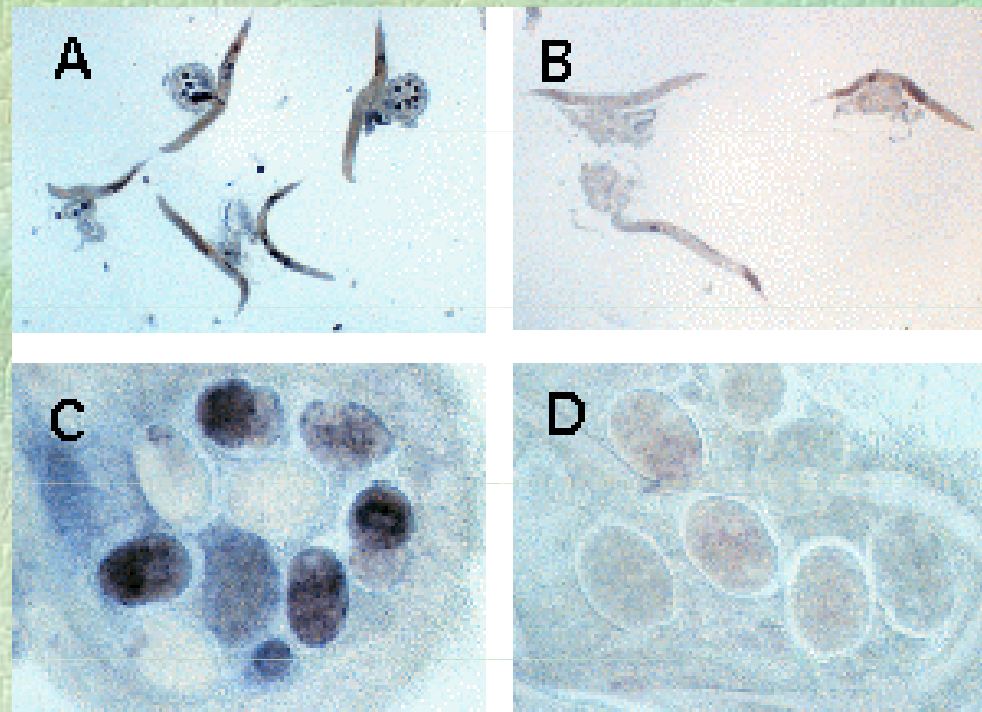


Figure 2. SOAKING WORMS WORKS ALMOST AS EFFECTIVELY AS INJECTING.

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

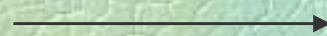
Fire, Mello, 1998



RNAi

Jorgensen et al., 1990

Que, Jorgensen, 1998



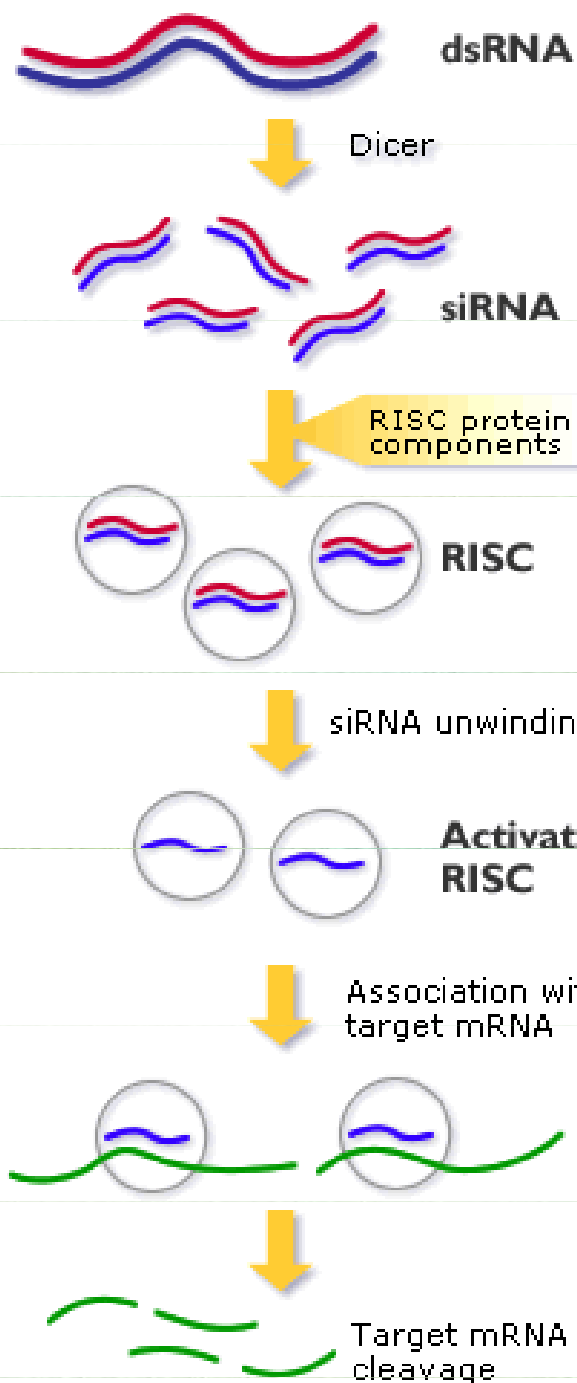
PTGS



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

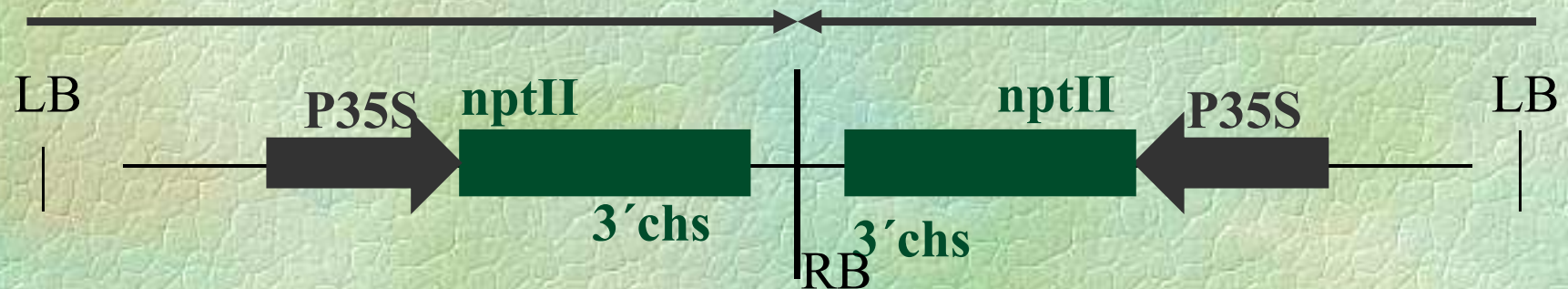


— Sense — Target mRNA
— Antisense



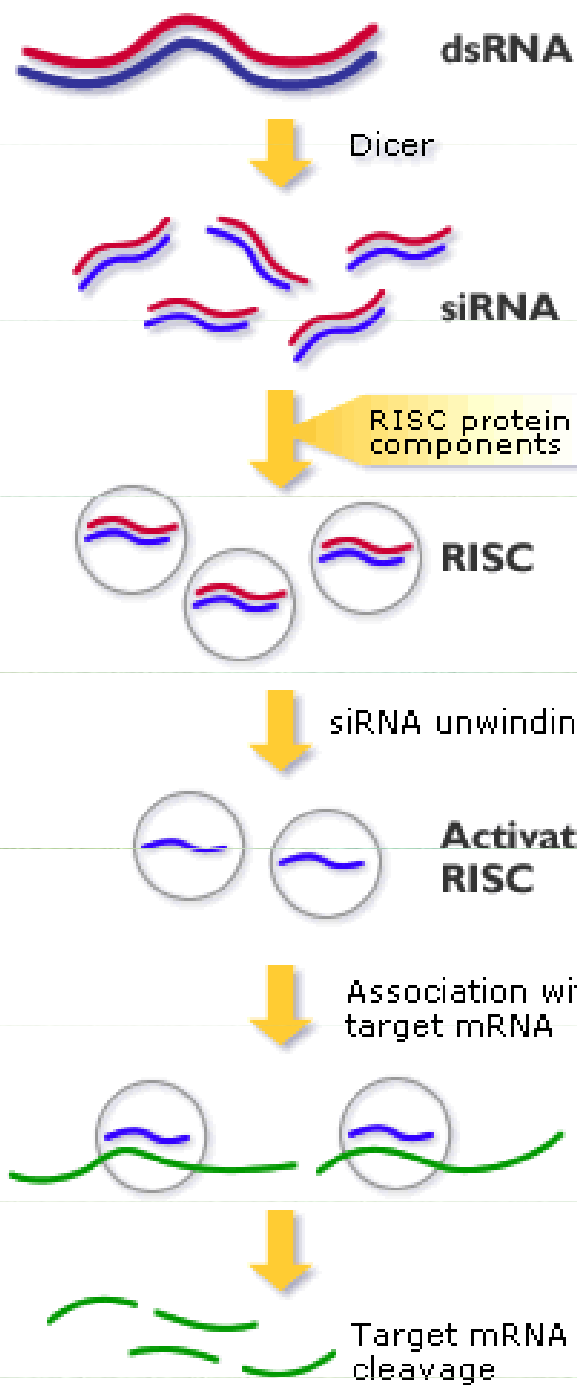
VZNIK dsRNA:

- 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

Molekulární základ RNAi



Legend:
Sense (red wavy line) Target mRNA (green wavy line)
Antisense (blue wavy line)



DICER

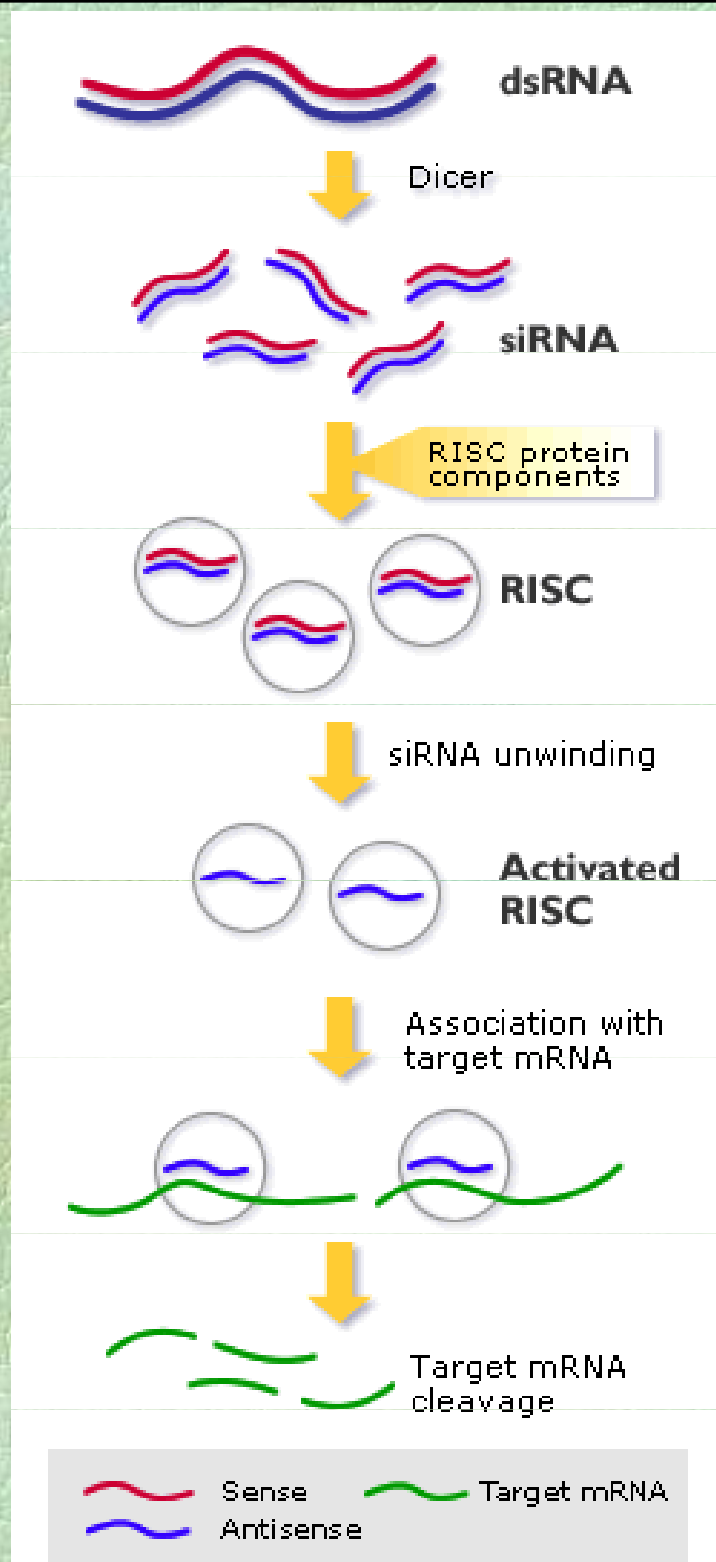
- vlastní iniciátor umlčení, poprvé identifikován v Drozofile
- RNase III-like enzym (N-konec:helikázová doména, C-konec:RNaseIII doména a dsRNA vazebný motiv)
- štěpení molekul dsRNA \longrightarrow siRNA (21 - 25 nt)
- evolučně konzervativní (houby, živočichové, rostliny)
- ATP - dependentní nukleáza,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

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
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.**

Proteiny rodiny ARGONAUT (Ago)

Bazické proteiny (schopnost vazby na RNA)

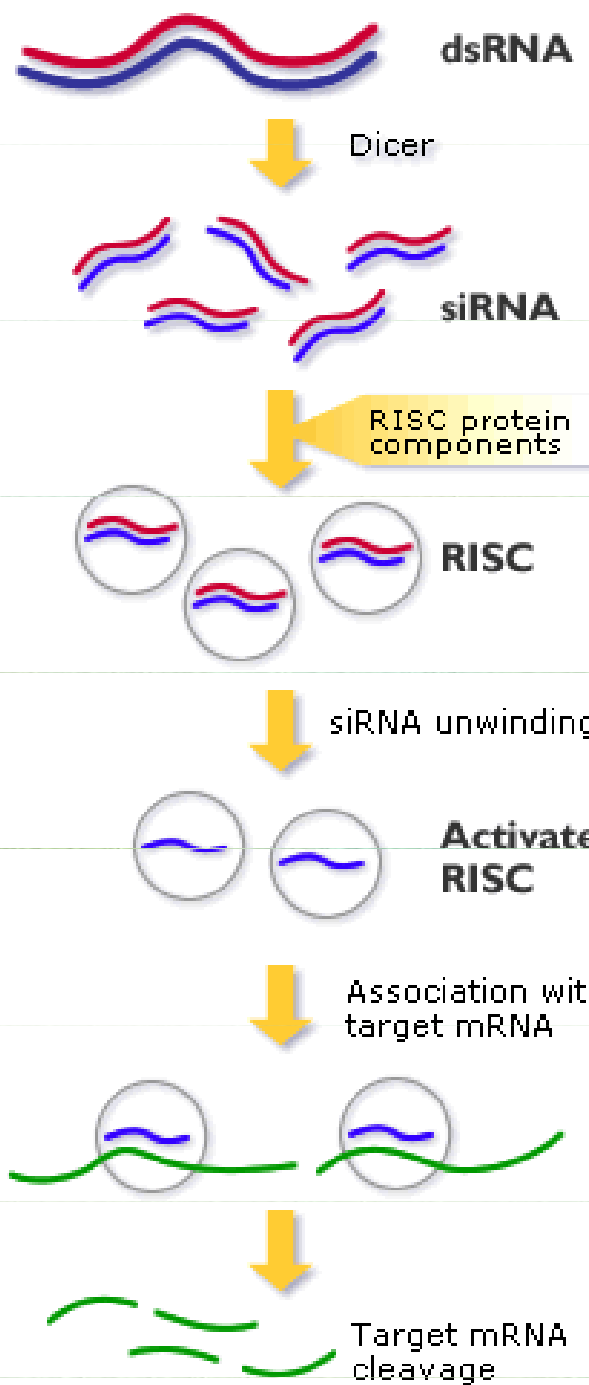
PAZ doména – protein-protein interakce

PIWI doména - ?

Účastní se produkce siRNA a jejich „nasměrování“ do příslušného efektorového komplexu.

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

Molekulární základ RNAi



Sense
Antisense

Target mRNA

←

RDDM
(RNA-directed DNA
methylation);
v rostlinách

KO-EXISTENCE RNAi A RDDM

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.

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*.

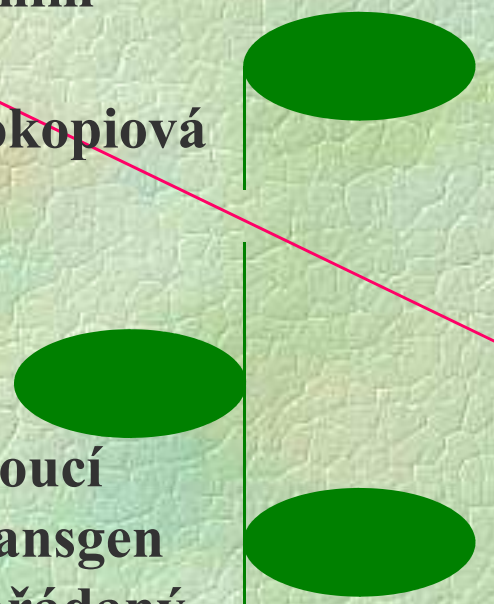
SYSTEMIC SILENCING

- 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 lokusy **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).

Živočichové – jeden prekursor společný pro několik miRNA,
rostliny – každá miRNA má svůj prekursor.

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

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, replikace a stabilizace konce chromozomu).

Modifikace histonů (velice zjednodušené)

Heterochromatin: metylace histonů (H3K9Me2),
deacetylovaný H3K9.

Metylovaný H3K9 -vazba na
Hp1 (Heterochromatin protein 1) →
represe transkripce.

Masívní metylace DNA následně fixuje umlčený
stav.

Euchromatin: acetylované histony, metylace na
H3K4.

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.

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

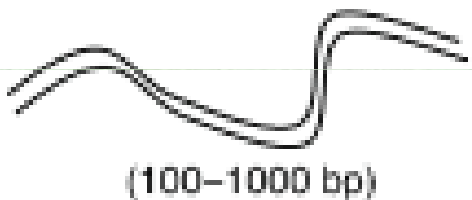

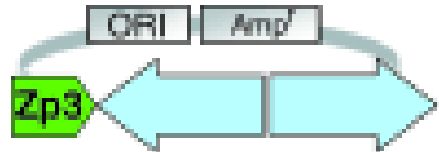
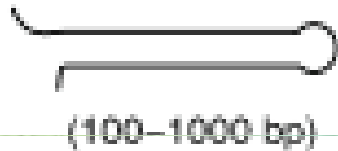



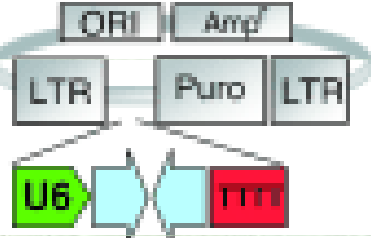


RNA polymerázy v mitochondriích a chloroplastech

V rostlinách – **RNA polymeráza IV** (velice recentní výsledek)
je nutná pro amplifikaci krátkých molekul RNA,
které slouží jako signály např. pro RDDM

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				<i>C. elegans</i> mammalian embryos
dsRNA vectors				<i>C. elegans</i> plants mammalian embryos
synthetic siRNA				mammals
shRNA vectors				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)**