



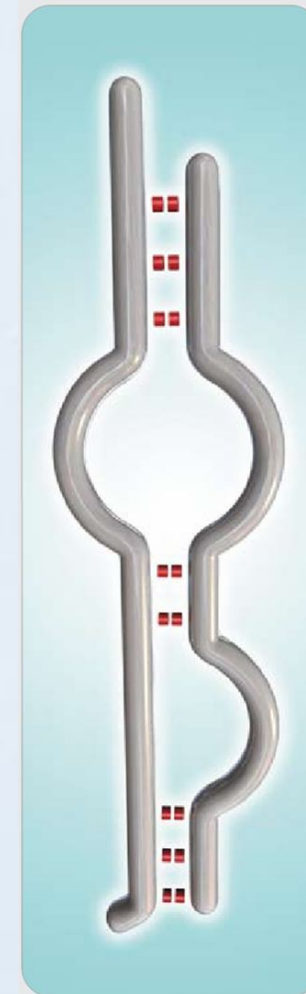
The background image is a detailed diagram of microRNA biogenesis and function. It shows the flow from primary miRNA transcription in the nucleus, through processing by Drosha and Dicer, to mature miRNA in the cytoplasm. The mature miRNA then forms a miRISC complex with target mRNAs, leading to mRNA degradation or translational repression. Labels include 'Nucleus', 'Cytoplasm', 'Primary miRNA', 'miRNA biogenesis', 'miRNA processing', 'miRNA', 'miRISC', and 'mRNA target'. The text 'Analytická cytometrie' is also visible in the lower part of the diagram.

# Analýza exprese a funkce microRNA

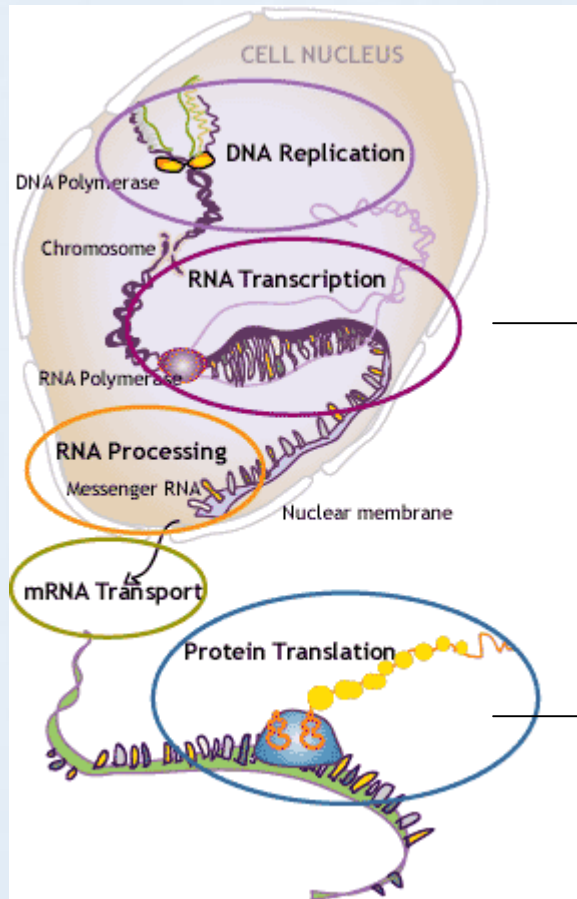
Analytická cytometrie 20.11.2012

# Analýza exprese a funkce microRNA

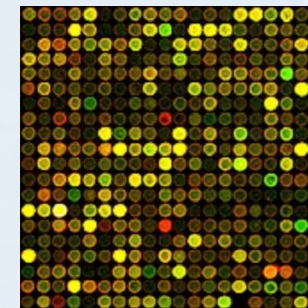
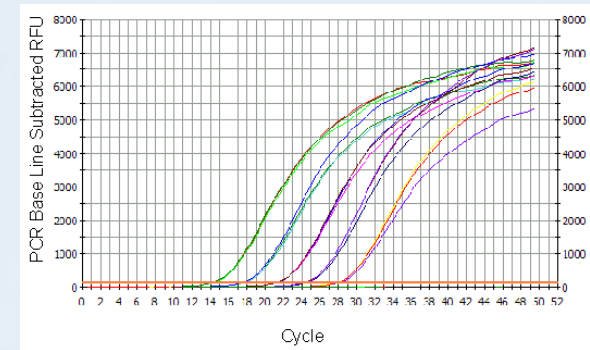
1. Regulační RNA molekuly
2. Struktura, vznik a funkce miRNA
3. Databáze a predikce miRNA
4. Metody analýzy miRNA
  - microarrays
  - qPCR
  - „bead-based methods“
  - funkční analýzy



# Opakování: transkripce, translace



RT-PCR,  
microarray



Western blotting



<http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/>

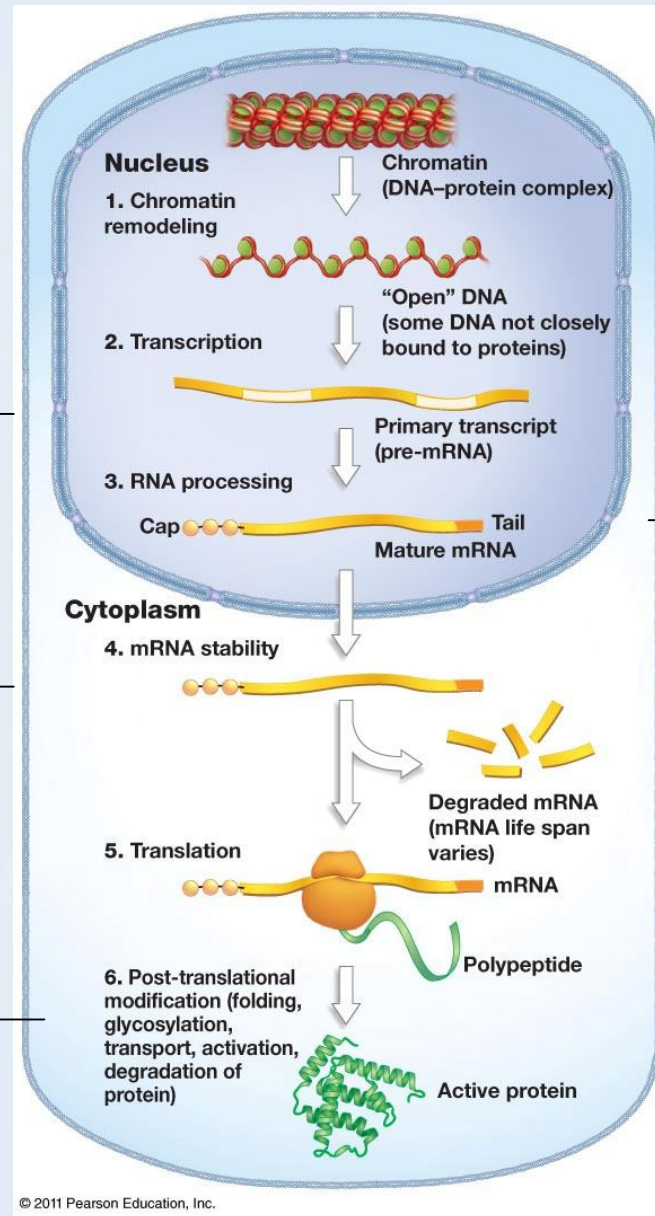
# Úrovně regulace genové exprese

Modifikace a remodelace chromatinu

Sestřih RNA transkriptu

Stabilita mRNA

Posttranslační modifikace proteinů



Transkripční faktory

Editace RNA transkriptu (připojení čepičky a polyA-konce)

Regulace translace (iniciační, elongační a terminační faktory)

# 1. Regulační RNA molekuly

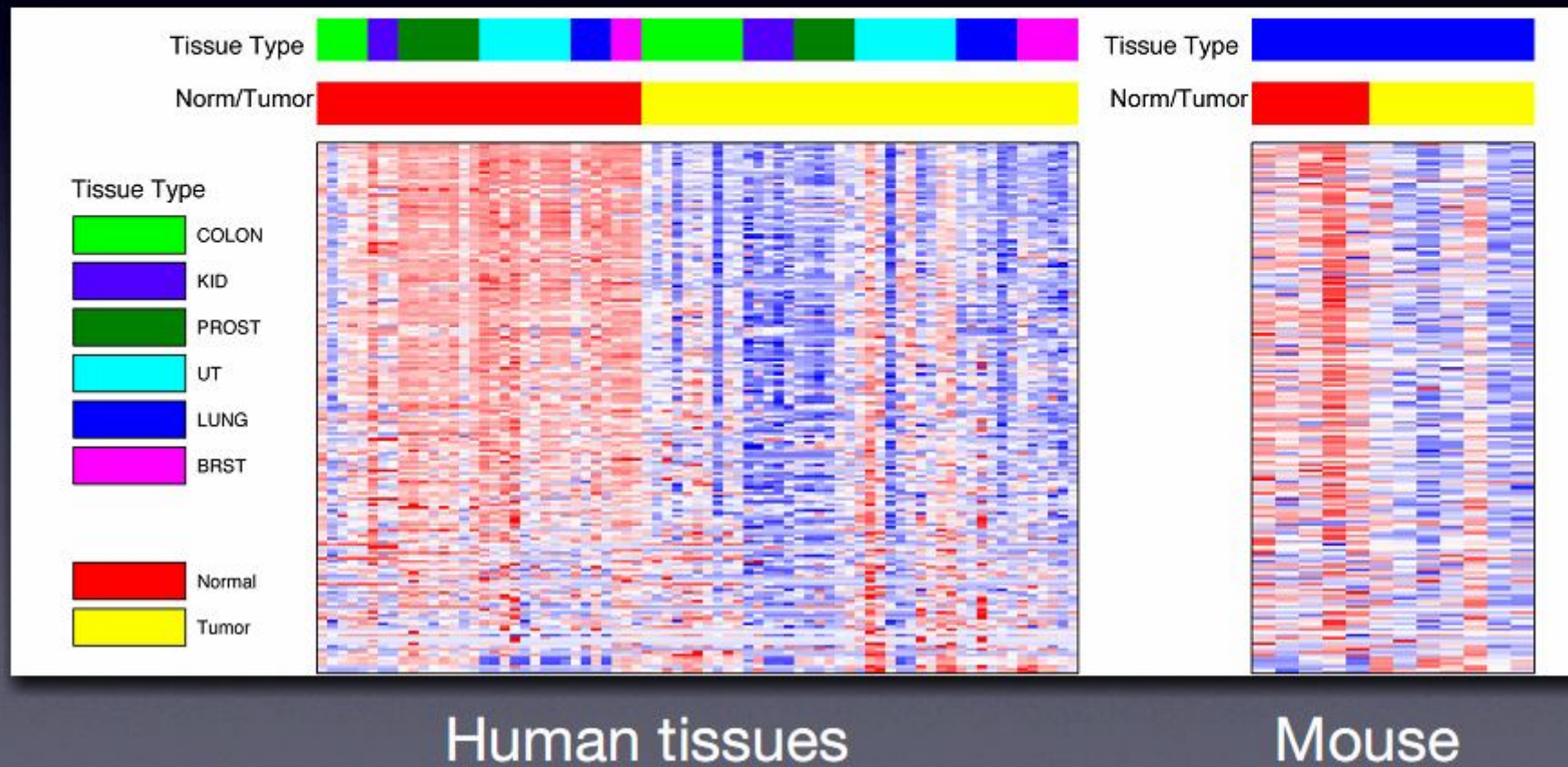
- Negativní regulátory translace a stability mRNA
- 1998 objev RNA interference (Andy Fire a Craig Mello, Nobelova cena 2006)
- Význam RNAi:
  - **Inhibice translace**
  - Udržení genomové stability (umlčení transposonů)
  - Obrana proti virové infekci
  - Udržení chromatinu v kondenzovaném stavu - zabránění transkripce
  - Experimentální umlčení genů
  - Genová terapie



# Proč studovat miRNA

- Evolučně konzervovaný mechanismus
- Tkáňově specifická a časově ohraničená exprese během embryogeneze
- Schopnost regulovat až třetinu genů v organismu (kontrola buněčného cyklu, apoptózy, vývojových a fyziologických procesů, buněčného cyklu, apoptózy, ...)
- **Změny v expresi při mnoha onemocněních**

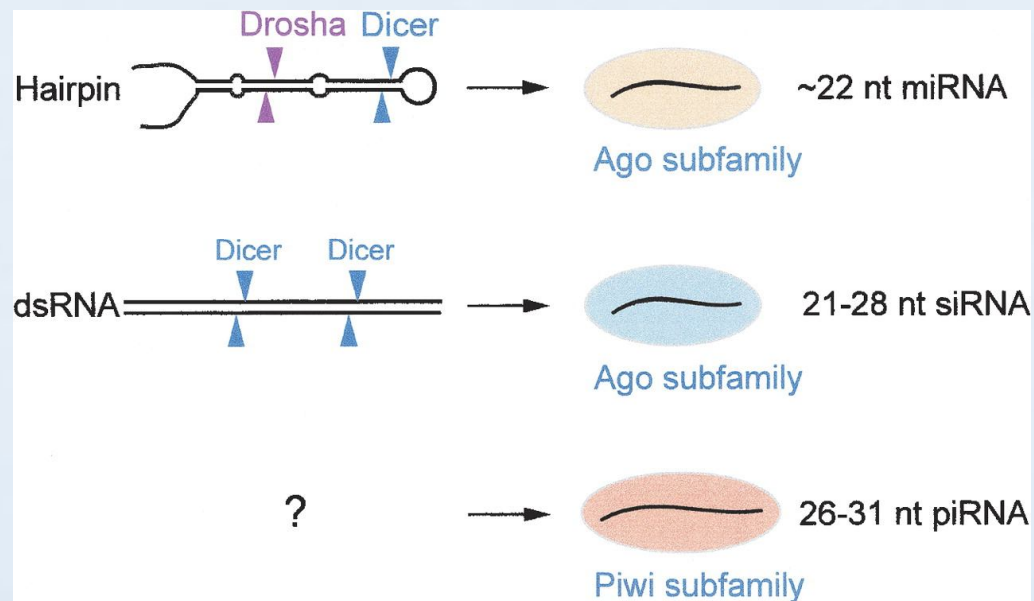
# Many microRNAs are down-regulated in primary human tumours



# 1. Regulační RNA molekuly

- siRNA – short interfering RNA (dsRNA prekurzory s perfektní komplementaritou)
- miRNA – microRNA (dsRNA prekurzory s nedokonalým párováním)
- piRNA – Piwi-interacting (sekvence nejsou konzervované; umlčení retrotransposonů v zárodečných buňkách)

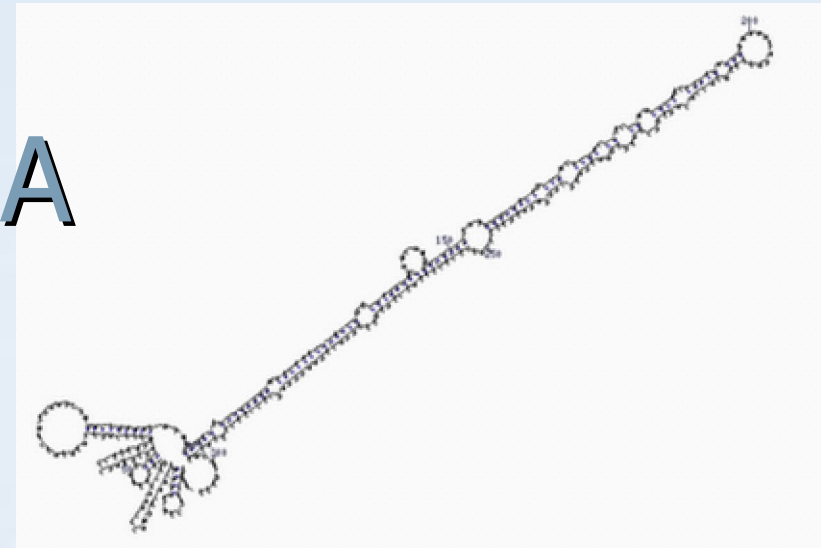
Kim V. N. Genes Dev. 2006;20:1993-1997





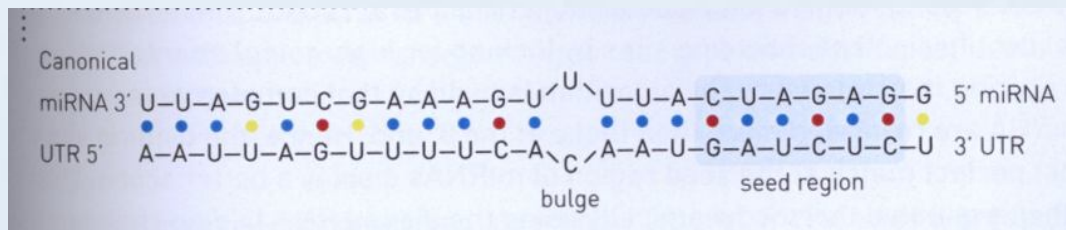
# 2. Struktura miRNA

- miRNA často kódována introny genů
- Struktura vlásenky
- „**Seed region**“ – 8 nukleotidů s perfektním párováním



Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-85

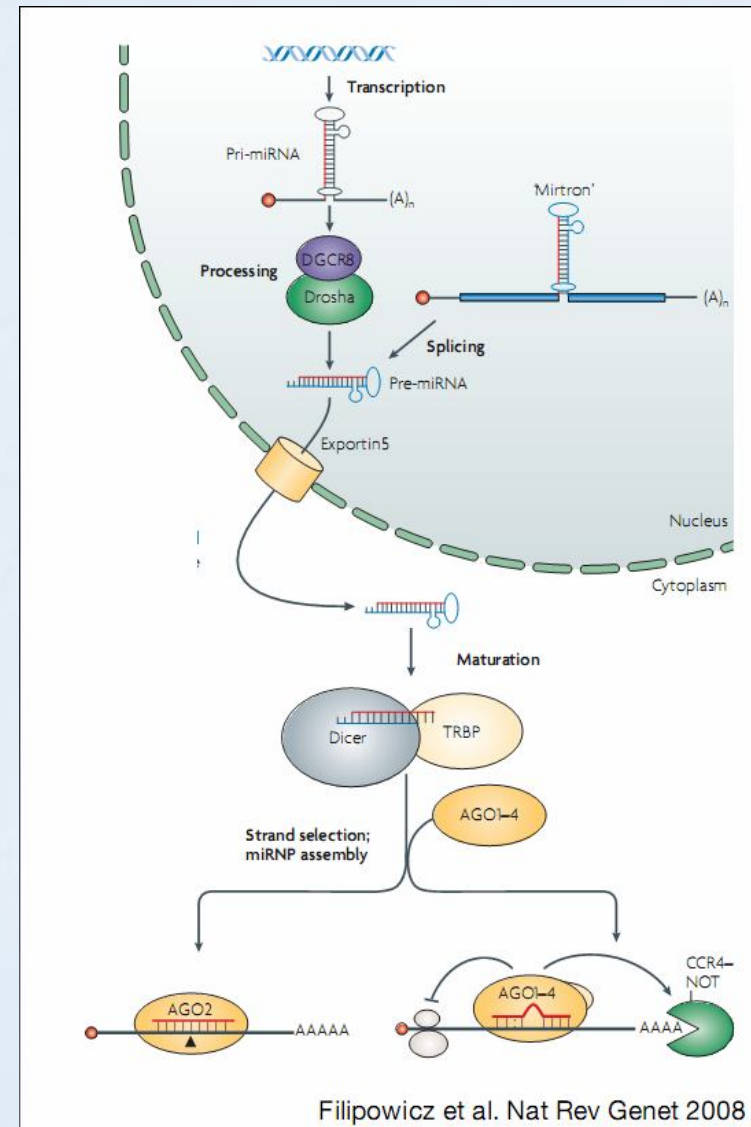
<b>Description</b>	Homo sapiens miR-200a stem-loop
<b>Stem-loop</b>	<pre> c   - c   g   -   -----   a cggg c ccu ugagcauc uuaccggacagu   gcugg u                                    u gccc g gga acuguag aauggucuguca   cgacc u c   a u   a   c   caaucucaguu   c                 </pre>
	<a href="#">Get sequence</a>



<b>Mature sequence MIMAT0000682</b>	
<b>Accession</b>	MIMAT0000682
<b>ID</b>	hsa-miR-200a
<b>Sequence</b>	54 - uaacacugucugguaacgaugu - 75
	<a href="#">Get sequence</a>

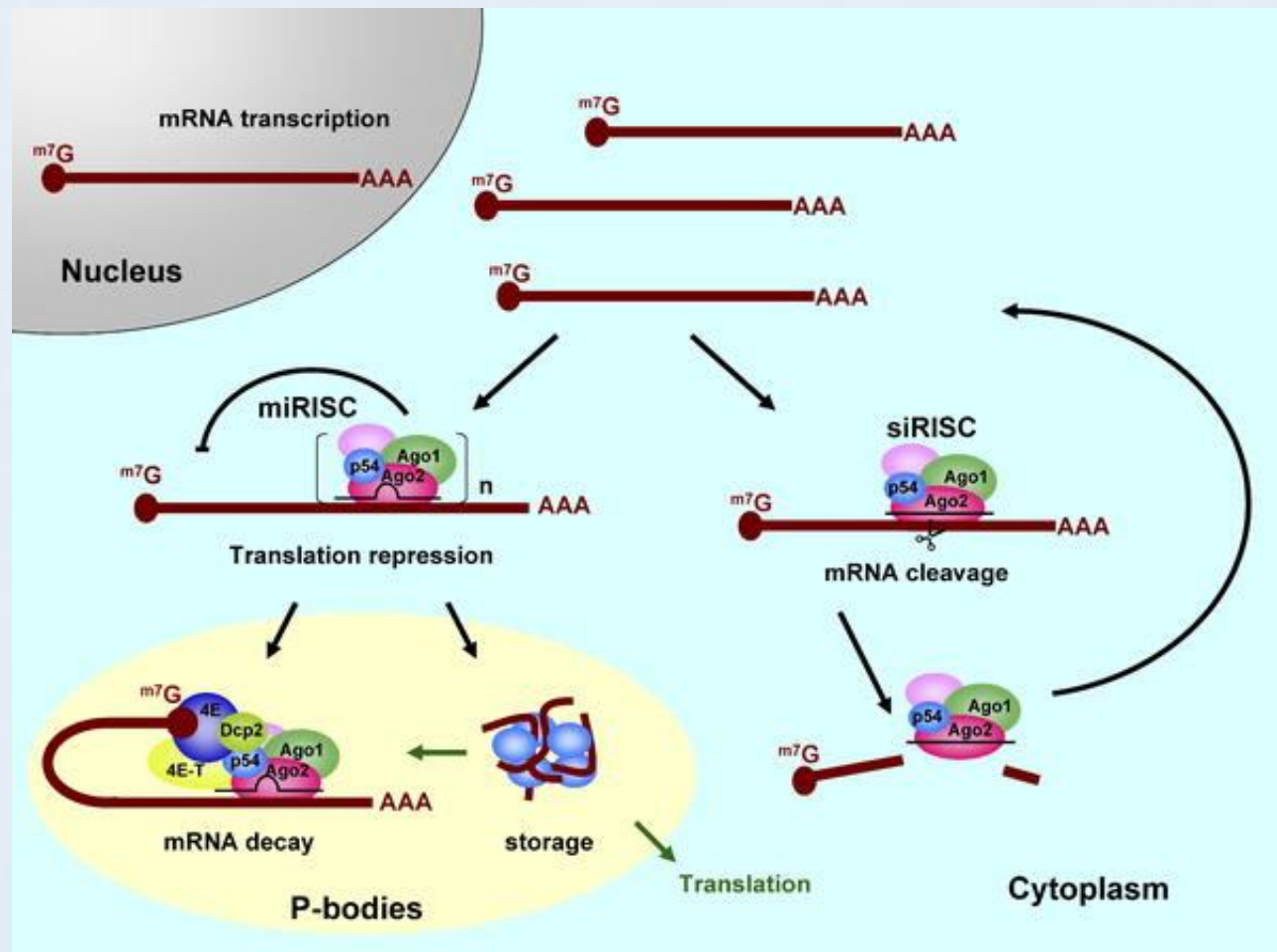
# 2. Biogeneze miRNA

1. Dlouhý primární transkript -> **pri-miRNA** (stovky nt- desítky kbp)
2. Sestřih - RNasa III Drosha + Pasha/DGCR8 -> **pre-miRNA** (70 nt)
3. Export (Exportin 5)
4. Maturace – RNasa III Dicer – začlenění jednořetězcové 19-23 nt dlouhé miRNA do **komplexu RISC** (tvořen proteiny Argonaut)
5. Negativní regulace mRNA – inhibice translace nebo degradace (P-bodies)



## 2. Funkce miRNA

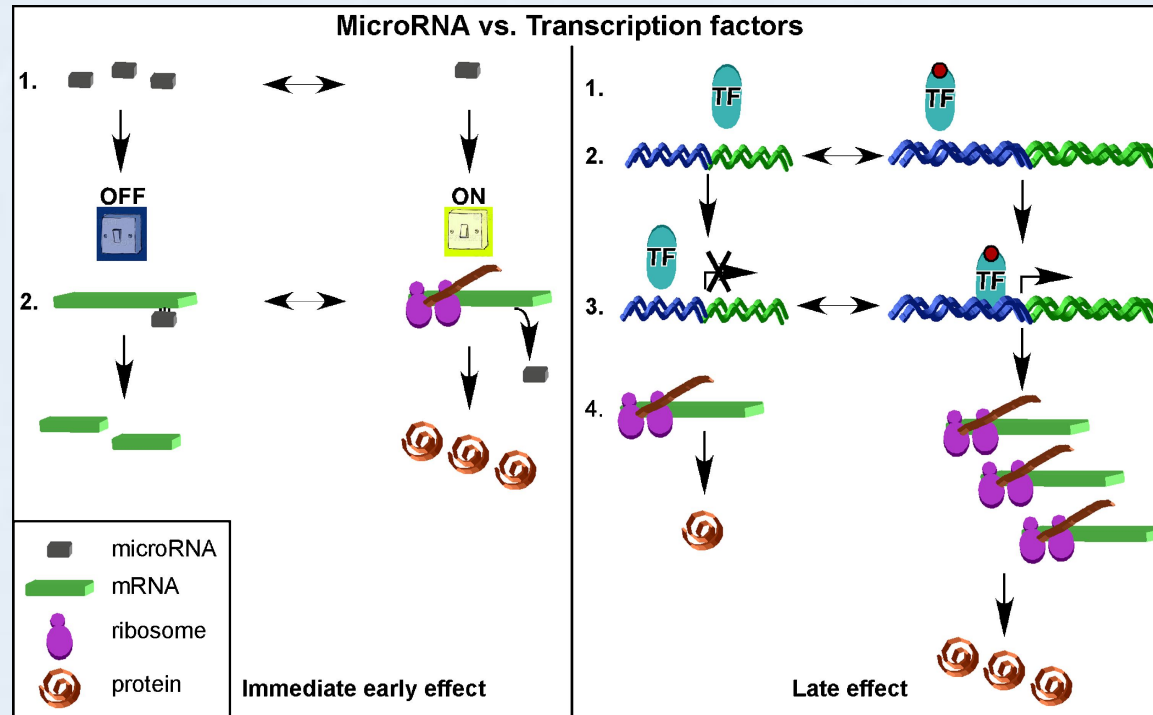
- Vazba komplexu na 3' UTR
- Degradace mRNA
- Inhibice translace – iniciační nebo elongační fáze



<http://www.nature.com/nrg/multimedia/rnai/animation/index.html>

# Srovnání regulace pomocí miRNA a transkripčních faktorů

1 Levels of miRNA are posttranscriptionally regulated. 2 This results in a miRNA attachment to the 3'UTR of a gene and inhibition of translation or mRNA degradation, or its detachment and activation of translation, thus, acting as a molecular switch that could result in an immediate early effect in response to an incoming signal.

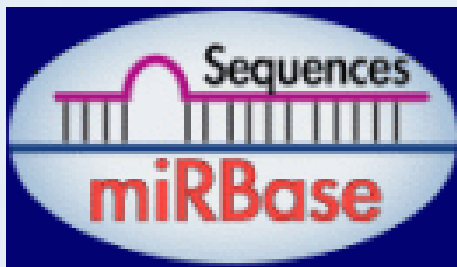


On the other hand, transcriptional regulation requires: 1 DNA remodeling; 2 attachment or detachment of the transcription factor; and 3 inhibition or activation of RNA synthesis, before an effect on 4 protein levels is observed, thus, resulting in a relatively late response to an incoming signal

Sayed, D., S. Rane, and M. Abdellatif, *MicroRNAs Challenge the Status Quo of Therapeutic Targeting*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2009. **2**(1): p. 100-107.

# 3. Databáze a predikce miRNA

- miRBase (11/2011 ver. 16.0)
- [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)



Počet miRNA



18/11/2008: 8 619 záznamů (700 lidských)  
4/11/2010: 15 172 záznamů (1114 lidských)  
22/11/2011: 18226 záznamů (1587 lidských)  
19/11/2012: (2237 lidských)

# 3. Predikce cílových molekul

- Každá miRNA může regulovat až stovky různých molekul
  - miRNA jsou krátké
  - 3' UTR jsou dlouhé a nepříliš kvalitně osekvenované a anotované
  - Dosud málo ověřených cílových molekul
  - Vazebná místa nejsou dokonale komplementární
  - Klíčová oblast specifiity je krátká (6-8 nt)
- 
- TargetScan
  - PicTar
  - miRBase Target



PicTar

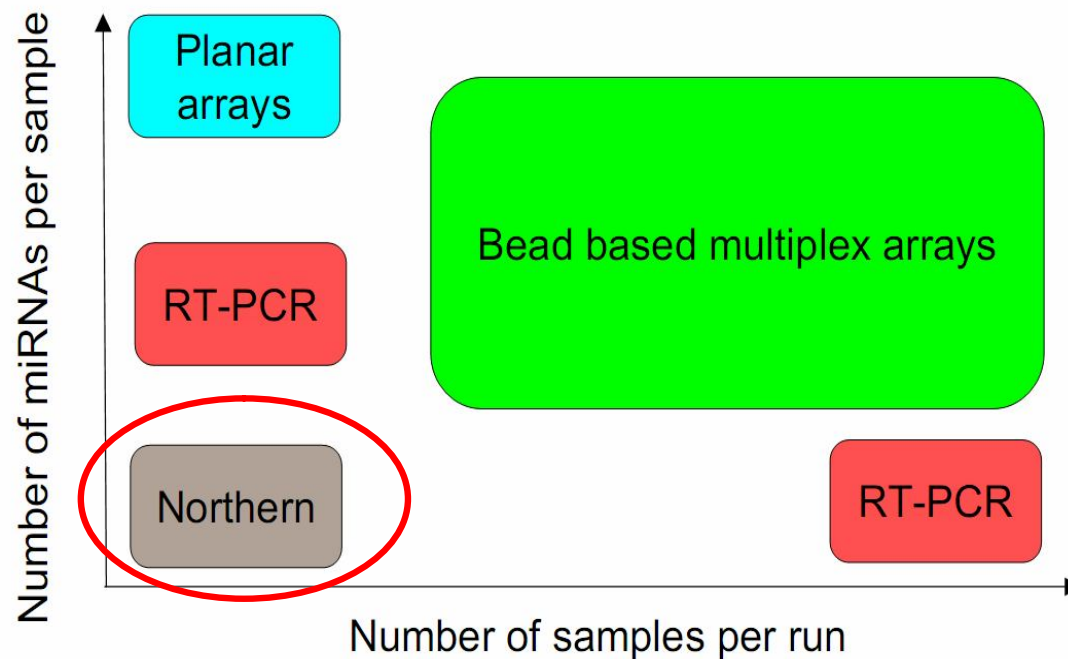


## 4. Metody analýzy miRNA

- ... aneb co brát v úvahu při výběru metody
- „Throughput“ – počet vzorků, miRNA
- Cena (reagencie, materiál, instrumentace)
- Otevřená vs. uzavřená platforma (možnost vytvářet vlastní assays)
- Možnost standardizace
- Případné artefakty

# 4. Metody analýzy exprese miRNA

## Number of analytes vs number of samples

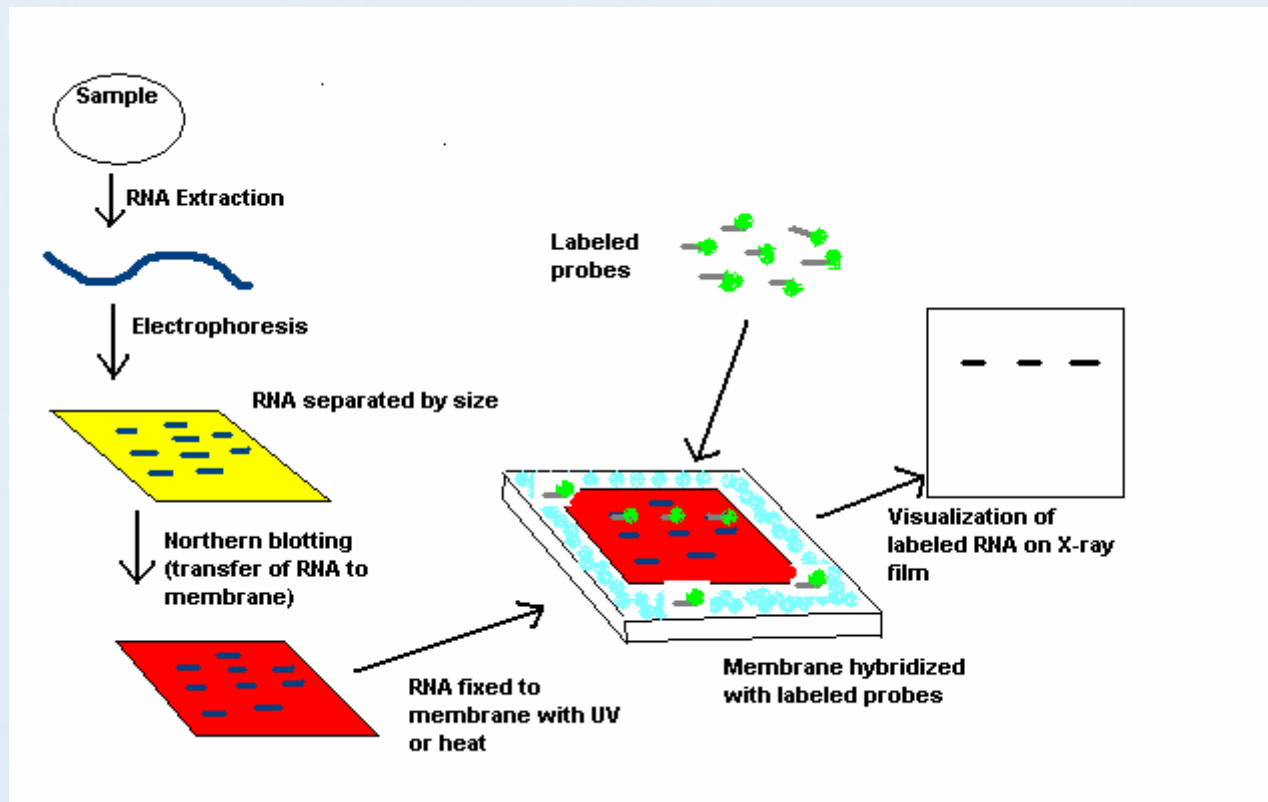


- a. Northern blot
  - b. microarrays
  - c. qPCR
  - d. bead-based methods
- 
- funkční analýzy

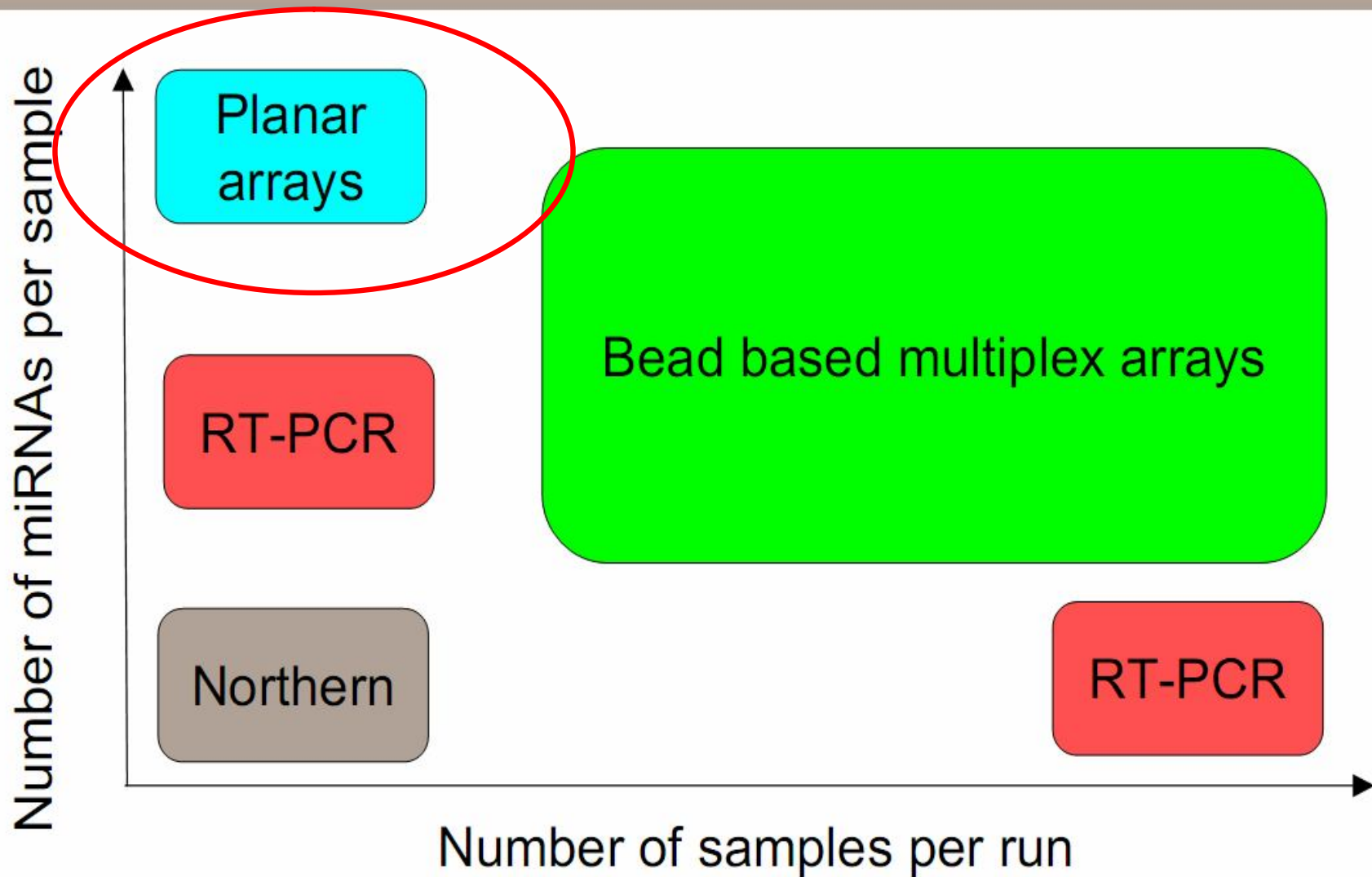


# a. Northern blot

- Časově náročná metoda pro malý počet vzorků a miRNA

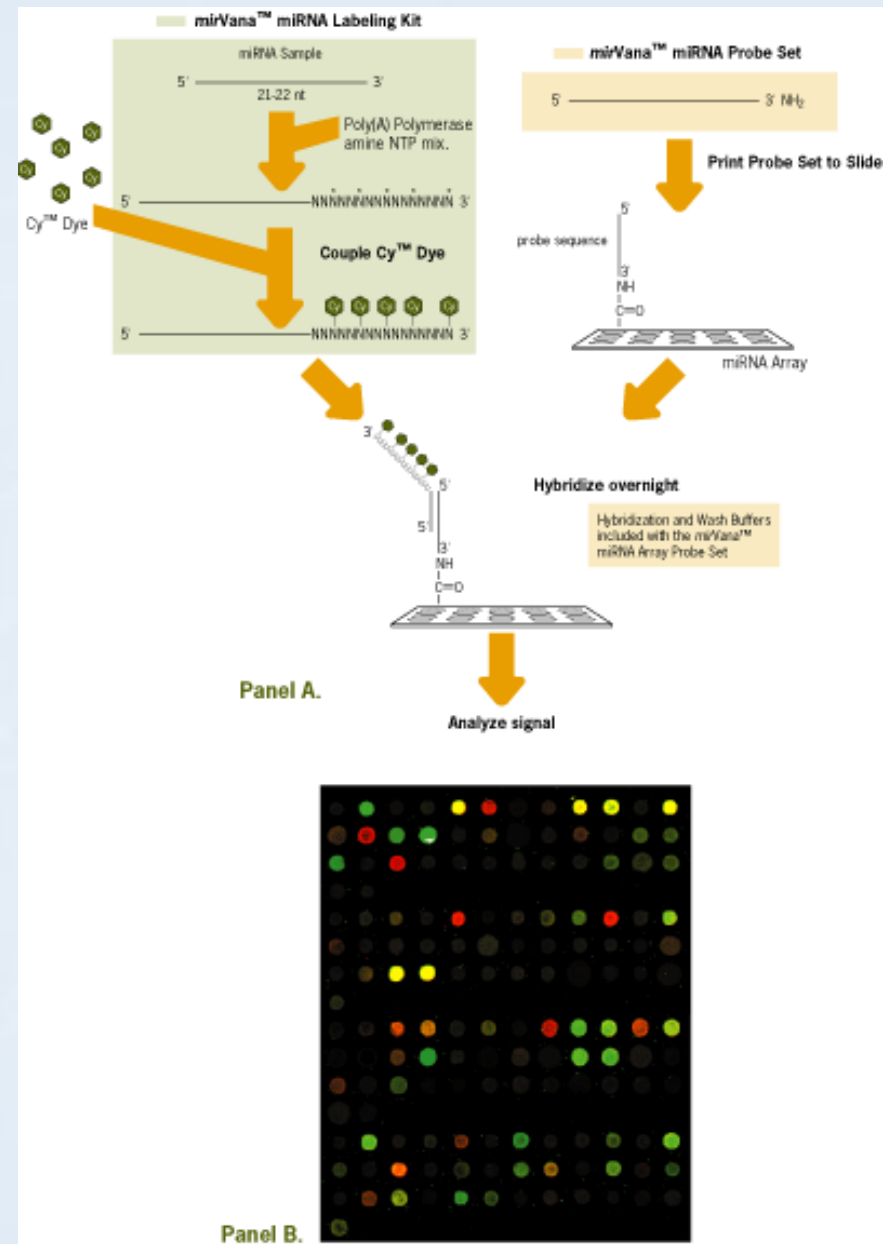


# Number of analytes vs number of samples



## b. Arrays

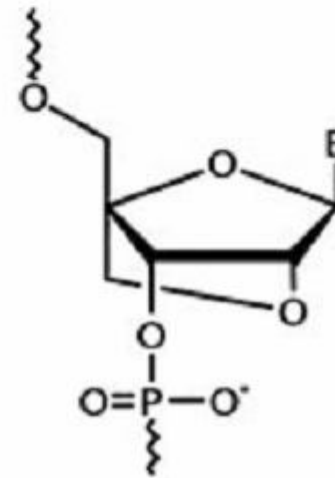
- Umožňují detekci velkého množství miRNA u malého počtu vzorků
- Rozlišení zralých miRNA a prekurzorů
- Výsledky nutno validovat další metodou



# locked nucleic acids for miRNA detection

Zvýšení  
afinity

	LNA™	RNA
T <sub>m</sub> increase/monomer against DNA (°C)	2.0-6.0	-0.5-0.5
T <sub>m</sub> increase/monomer against RNA (°C)	3.0-8.0	1.0-1.5
ΔT <sub>m</sub> at single mismatch against DNA	LNA>>DNA	RNA>DNA
Compatible with standard molecular biology	Yes	Yes
Water solubility	High	High



## Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes

Anna Válóczy, Csaba Hornyik, Nóra Varga, J and Zoltán Havelda\*

Agricultural Biotechnology Center, Szent-Györgyi Albert Functional Genomics, Exiqon, Bygstubben 9, DK-2950 V

Received September 29, 2004; Revised and Accepted November 16, 2

Figure 1

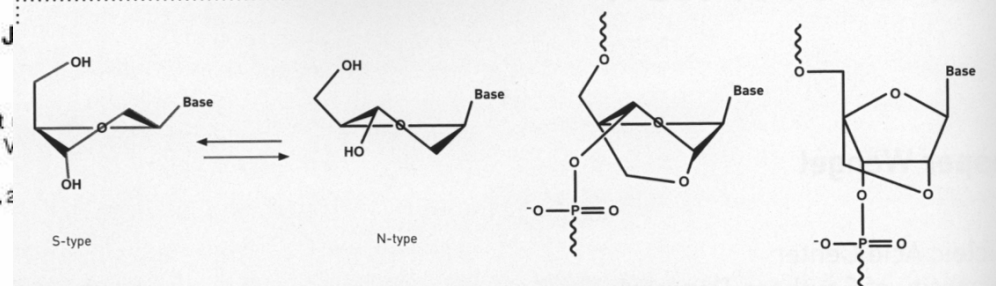
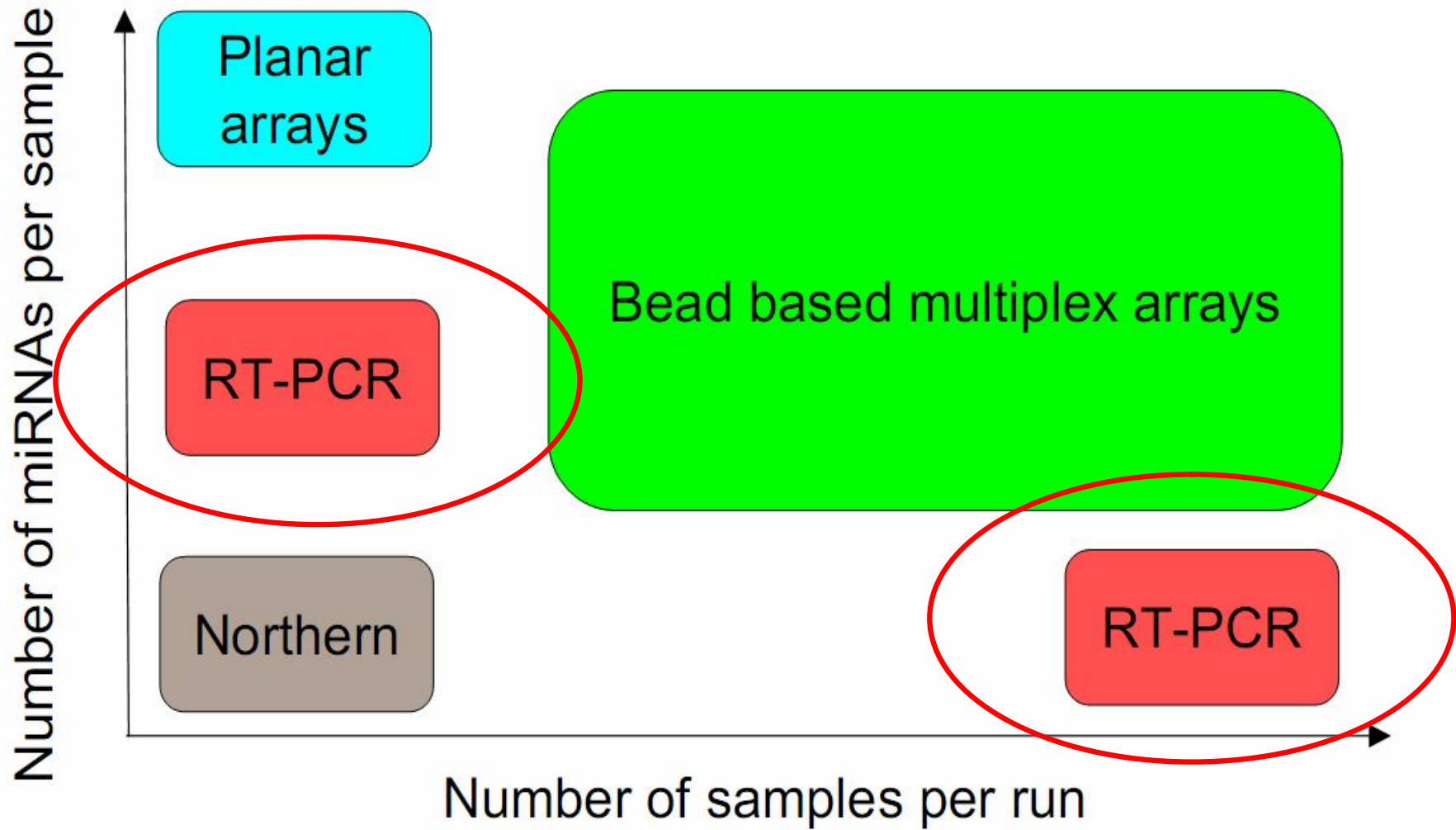


Figure 1. Nucleoside conformations and the structure and locked conformation of LNA monomers.

# Number of analytes vs number of samples



# c. qRT-PCR – SYBR Green

- Poměrně specifická metoda
- Slouží k ověření výsledků získaných pomocí microarray
- Specifický design primerů

## miRCURY™ LNA microRNA PCR system

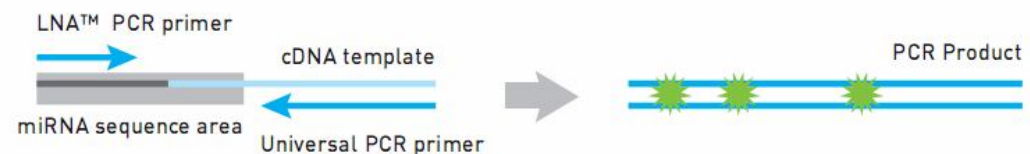
Step 1:  
First-strand cDNA synthesis

Total RNA



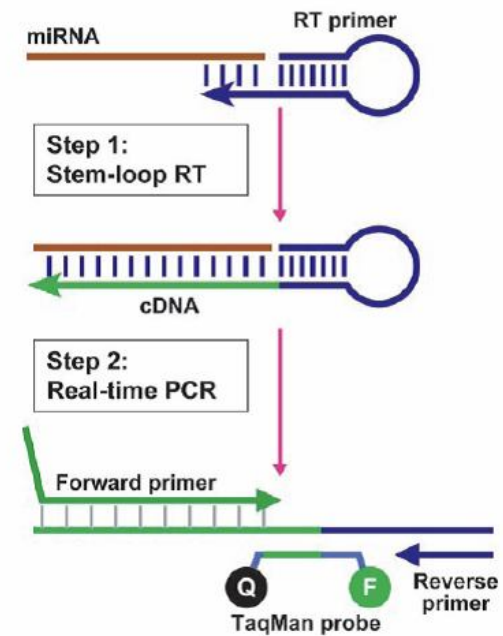
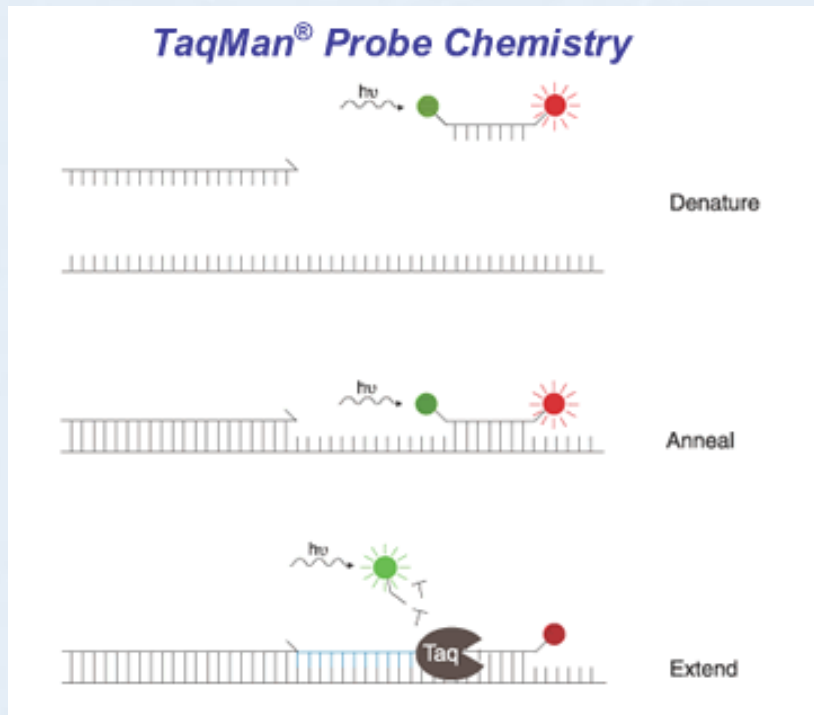
**EXIQON**  
Seek Find Verify

Step 2:  
Real-time PCR amplification

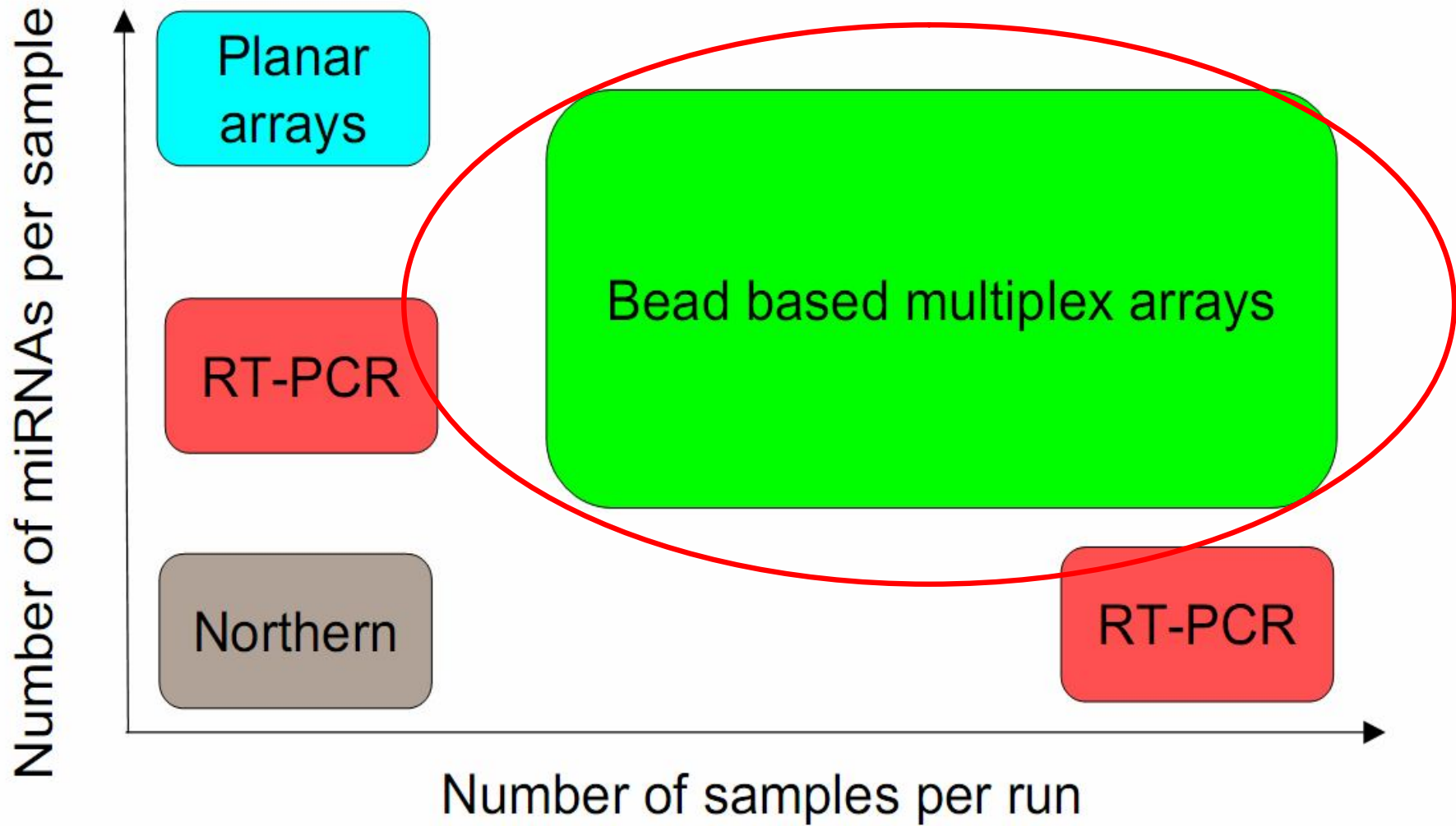


# c. qRT-PCR - TaqMan

Chen *et al.* 2005 (ABI)

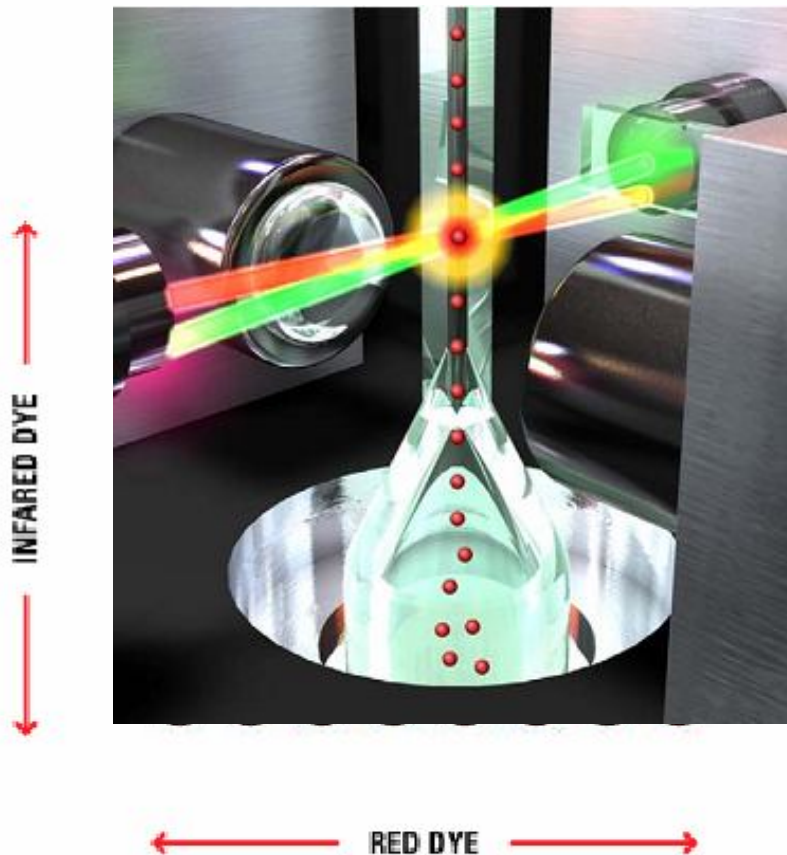


# Number of analytes vs number of samples





## d. Bead-based methods (klinické aplikace)



100 distinct bead sets

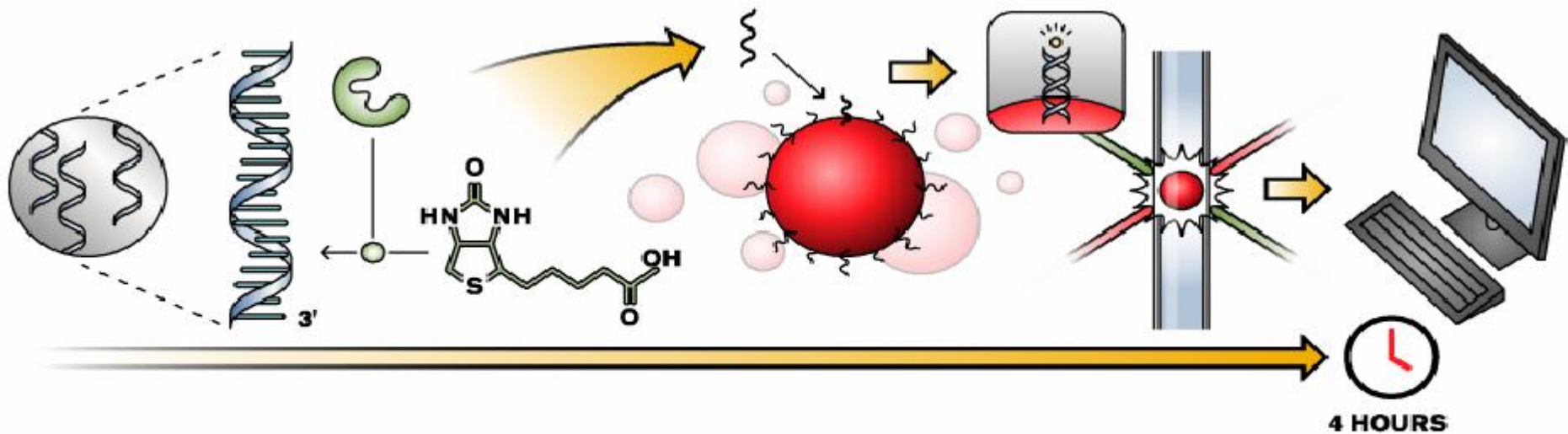
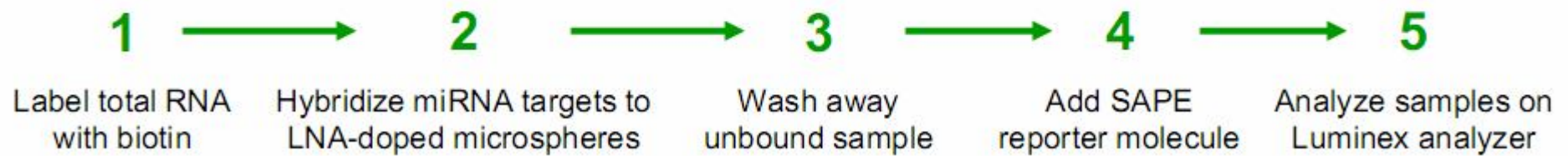
Uniform polystyrene beads

5.6 microns diam

Internal labeling with

- 2 dyes
- Each at 10 distinct levels

# FlexmiR Workflow

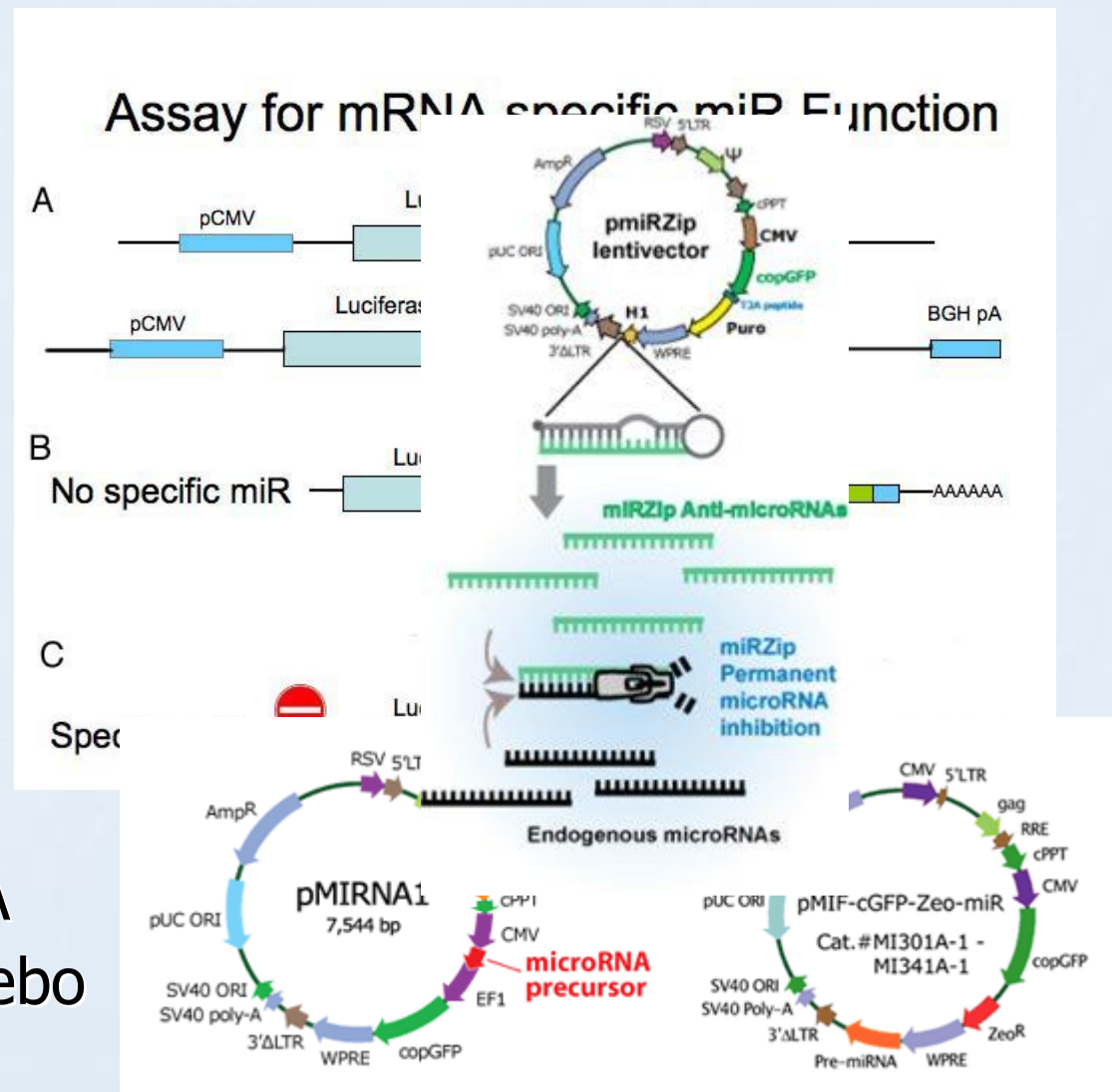


# Funkční analýzy

- Slouží k ověření biologické funkce konkrétní miRNA
- Analýza cílové sekvence pomocí luciferázové aktivity
- Zvýšení nebo snížení exprese konkrétní miRNA

# Funkční analýzy

- Luciferázové reportéry
- Knockdown pomocí modifikovaných prób - inhibitorů
- Over-exprese miRNA ve formě prekurzoru nebo zralé miRNA



# Shrnutí

- miRNA mohou negativně regulovat až 30% genů interakcí s 3' UTR na mRNA
- Profil exprese miRNA se mění při celé řadě onemocnění – diagnostický či terapeutický potenciál
- Metoda analýzy exprese závisí na počtu detekovaných miRNA a počtu vzorků
- Vybrané výsledky z „high-throughput“ metod je vhodné ověřit jiným přístupem

