

Analýza genové exprese pomocí cytometrických (a jiných) metod

Studium exprese a funkce microRNA

Eva Slabáková, Ph.D.

Bi9393 Analytická cytometrie 12.11.2013

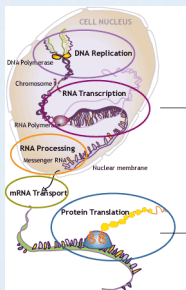
Oddělení cytogenetiky
Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i.
Královopolská 135
612 65 Brno
E-mail: slabakova@ibp.cz
tel.: 541 517 166

Analýza exprese a funkce microRNA

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



Ústřední dogma molekulární biologie



Transkripce

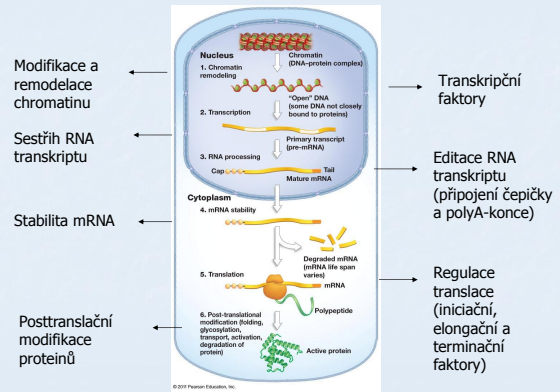
Translace

Genetická informace (DNA)
+ RNA polymeráza
+ Nukleotidy
+ Transkripční faktory
↓
mRNA transkript

mRNA transkript +
+ Ribosom
+ Aminokyseliny
↓
Protein

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

Úrovně regulace genové exprese



Modifikace a remodelace chromatinu

Sestřih RNA transkriptu

Stabilita mRNA

Posttranslační modifikace proteinů

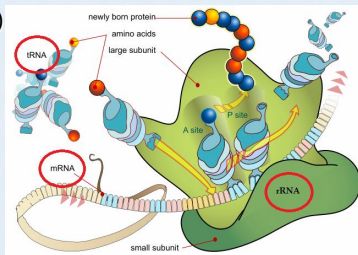
Transkripční faktory

Editace RNA transkriptu (připojení čepičky a polyA-konce)

Regulace translace (iniciační, elongační a terminační faktory)

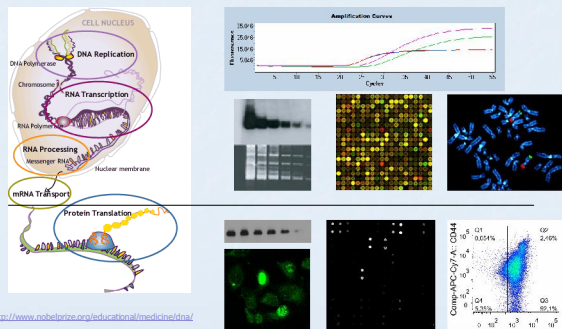
RNA molekuly

- Kódující (mRNA)
- Nekódující a regulační (tRNA, rRNA, miRNA, siRNA, ...)



http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2010/2010%20Exam%20Reviews/Exam%201%20Review/RNA_types.png

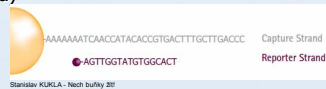
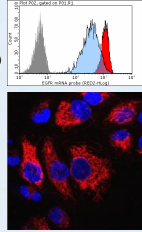
Metody zobrazování a kvantifikace exprese genů a proteinů



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

Detekce RNA v živých buňkách

- SmartFlare™ technologie (Merck Millipore):
- Využívají technologii nanočástic zlata – pro buňky netoxické
- Konjugace nanočástic s řetězci oligonukleotidů komplementárními se sekvencí studované RNA (capture strand)
- Do buňky je próbá dopravena s komplementárním řetězcem obsahujícím fluorofor (reporter strand)



SmartFlare™ Technologie – princip a výhody

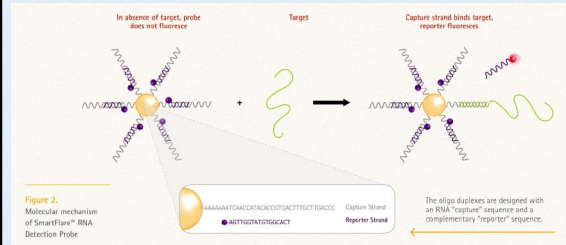


Figure 2. Molecular mechanism of SmartFlare™ RNA Detection Probe. The oligo duplexes are designed with an RNA "capture" sequence and a complementary "reporter" sequence.

Detekce *in vivo*
Data na úrovni buněk
Netoxické

Možnost downstream
zpracování
Sortování buněk
Multiplexování

Stanislav KUKLA - Nech buňky žít!

2. Úloha RNA v regulaci buněčných funkcí

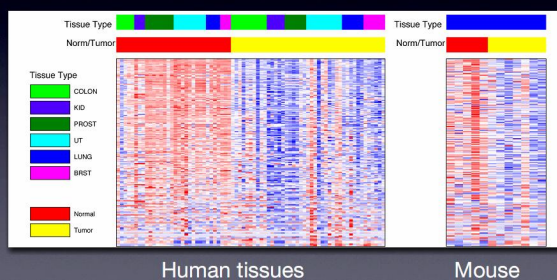
- 1998 objev **RNA interference** (Andy Fire a Craig Mello, Nobelova cena 2006)
- Význam RNA interference (RNAi):
 - Inhibice translace**, vedoucí ke snížení proteinové exprese
 - Udržení genomové stability (umlčení transposonů)
 - Obrana proti virové infekci
 - Experimentální umlčení genů
 - Genová terapie



Proč studovat miRNA

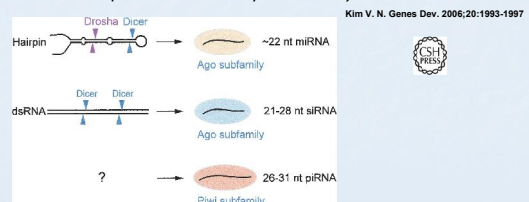
- Evolučně konzervovaný mechanismus
- Tkáňově specifická a časově ohraničená exprese během embryogeneze
- Schopnost regulovat až třetinu genů v organismu (kontrola buněčného cyklu, apoptózy, vývojových a fyziologických procesů, buněčného cyklu, apoptózy, ...)
- Změny v expresi při mnoha onemocněních**

Many microRNAs are down-regulated in primary human tumours



2. Regulační RNA molekuly

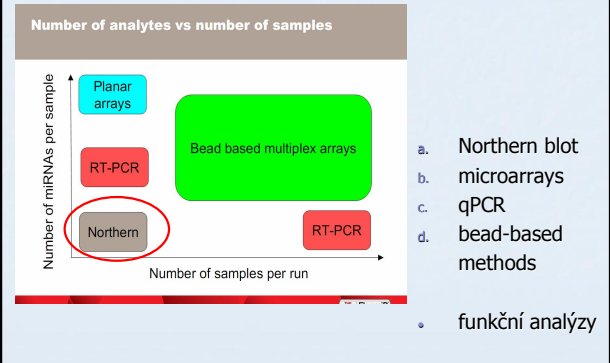
- siRNA – short interfering RNA (dsRNA prekurzory s perfektní komplementaritou)
- miRNA – microRNA (dsRNA prekurzory s nedokonalým párováním)
- piRNA – Piwi-interacting (sekvence nejsou konzervované; umlčení retrotransponů v zárodečných buňkách)



4. Metody analýzy miRNA

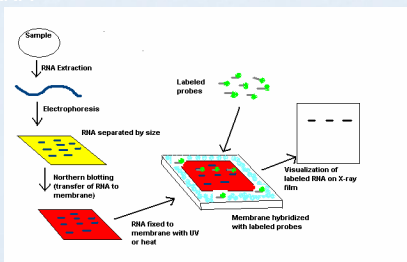
- ... aneb co brát v úvahu při výběru metody
- „Throughput“ – počet vzorků, miRNA
- Cena (reagencie, materiál, instrumentace)
- Otevřená vs. uzavřená platforma (možnost vytvářet vlastní assays)
- Možnost standardizace
- Případné artefakty

5. Metody analýzy exprese miRNA

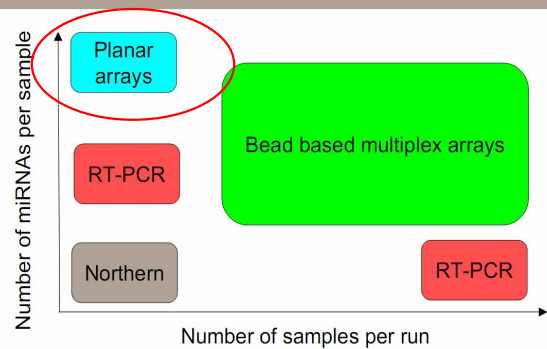


a. Northern blot

- Časově náročná metoda pro malý počet vzorků a miRNA

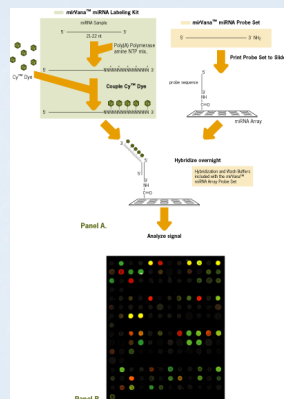


Number of analytes vs number of samples



b. Arrays

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



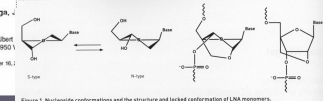
locked nucleic acids for miRNA detection

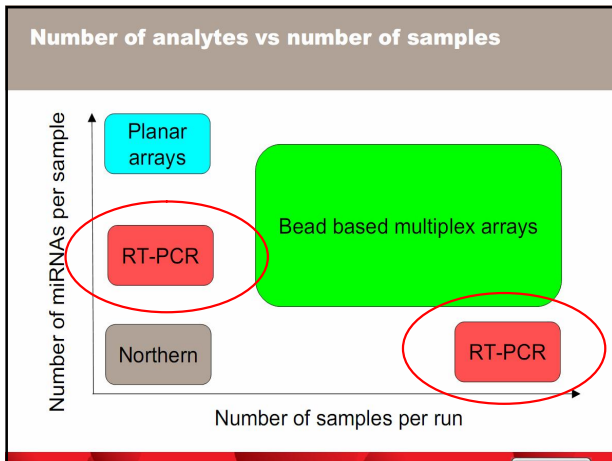
Zvýšení afinity

	LNA™	RNA
Tm increase/monomer against DNA (°C)	2.0-6.0	<0.5-0.5
Tm increase/monomer against RNA (°C)	3.0-8.0	1.0-1.5
ΔTm 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 Váňková, Csaba Hornyik, Nóra Varga, and Zoltán Havasi
Agricultural Biotechnology Center, Szent-Györgyi Albert Functional Genomics, Eötvös, Byattabán 9, DK-2950
Received September 29, 2004; Revised and Accepted November 16, 2004





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

Mature microRNA

miR-specific RT primer

iDNA template

EXIQON
Seek Find Verify

Step 2: Real-time PCR amplification

LNA™ PCR primer

iDNA template

miRNA sequence area

Universal PCR primer

PCR Product

c. qRT-PCR - TaqMan

Chen et al. 2005 (ABI)

TaqMan® Probe Chemistry

Denature

Anneal

Extend

miRNA

RT primer

Step 1: Stem-loop RT

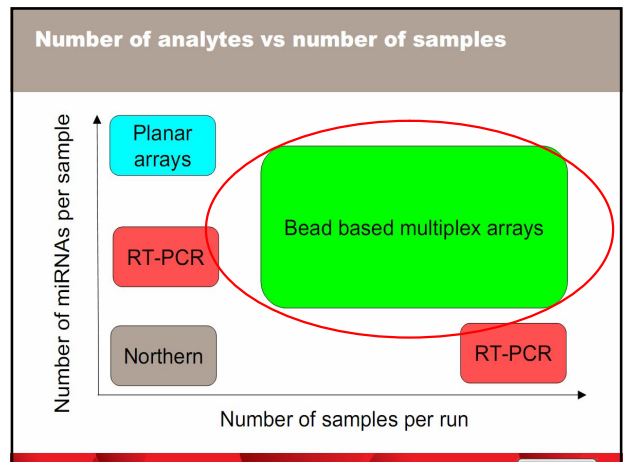
cDNA

Step 2: Real-time PCR

Forward primer

TaqMan probe

Reverse primer



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

INFRARED DYE

RED DYE

FlexmiR Workflow

- 1 Label total RNA with biotin
- 2 Hybridize miRNA targets to LNA-doped microspheres
- 3 Wash away unbound sample
- 4 Add SAPE reporter molecule
- 5 Analyze samples on Luminex analyzer

4 HOURS

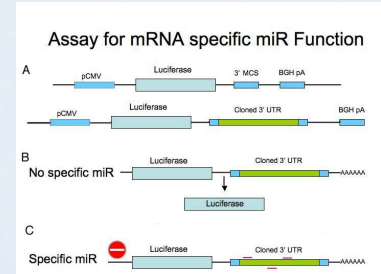
The FlexmiR Laboratory

Funkční analýzy

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

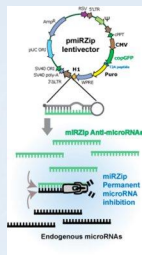
Funkční analýzy

- Luciferázové reportéry

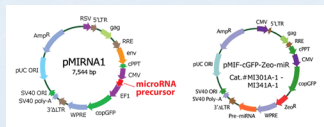


Funkční analýzy

- Knockdown pomocí modifikovaných průb - 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

Závěr

- Metody analytické cytometrie lze využít ke studiu genové exprese
- Bead-based metody detekce miRNA
- Detekce RNA v živých buňkách pomocí nanočástic (detekce průtokovou cytometrií či mikroskopicky)