

Metody založené na práci s RNA

Izolace RNA

Detekce RNA

Nekódující RNA

Manipulace genové exprese přes RNA

Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

jipro@sci.muni.cz

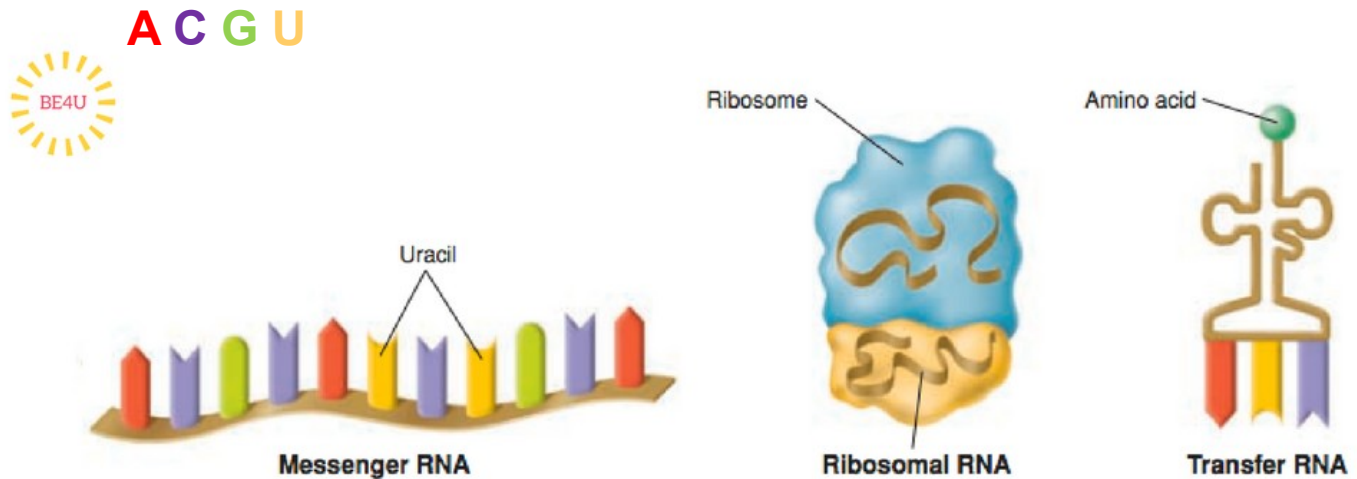
<http://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>

RNA

Hypotéza RNA světa

<https://www.youtube.com/watch?v=K1xnYFCZ9Yg> od 3,15

Tři hlavní typy RNA v buňkách



Základní fakta

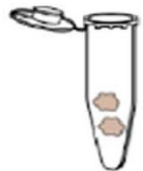
- ▶ celková buněčná RNA („total“ RNA) zahrnuje řadu typů RNA, které se mohou lišit svými fyzikálněchemickými vlastnostmi a tedy i nároky na jejich izolaci
- ▶ 80 % buněčné RNA tvoří ribozomální RNA
1 - 5 % mediátorová „messenger“ RNA (mRNA)
<1 % transferová RNA (tRNA)
- ▶ pro izolaci mRNA za účelem studia genové exprese se využívají jak metody vhodné pro izolaci celkové RNA, tak specifické postupy umožňující přípravu „čisté“ mRNA;

Izolace RNA



- Izolace celkové RNA
 - extrakce pomocí organických rozpouštědel
 - afinitní/adsorpční metody
- izolace mRNA
 - pomocí oligo(dT) substrátů – kuličky, kolony
 - zdroj – celková RNA nebo přímo z buněčných/tkáňových lyzátů
- RNA je citlivá k degradaci ribonukleázami (RNázy)
 - nedotýkat se vzorků, pracovat v rukavicích, používat RNase-free špičky, zkumavky, voda
 - používat inhibitory RNáz, např. guanidin isothiokyanát (GITC) – denaturace proteinů, včetně RNáz
- vedle proteinů je třeba také odstranit kontaminující DNA

Extrakce RNA pomocí organických rozpouštědel



Homogenizace a lyzace buněk

směs fenol:chloroform:isoamyl alkohol –
inkubace a centrifugace



vodná fáze obsahuje RNA, zatímco
genomová DNA a zbytky buněčného
materiálu vytvářejí úzkou vrstvu na rozhraní
vodné a organické fáze;

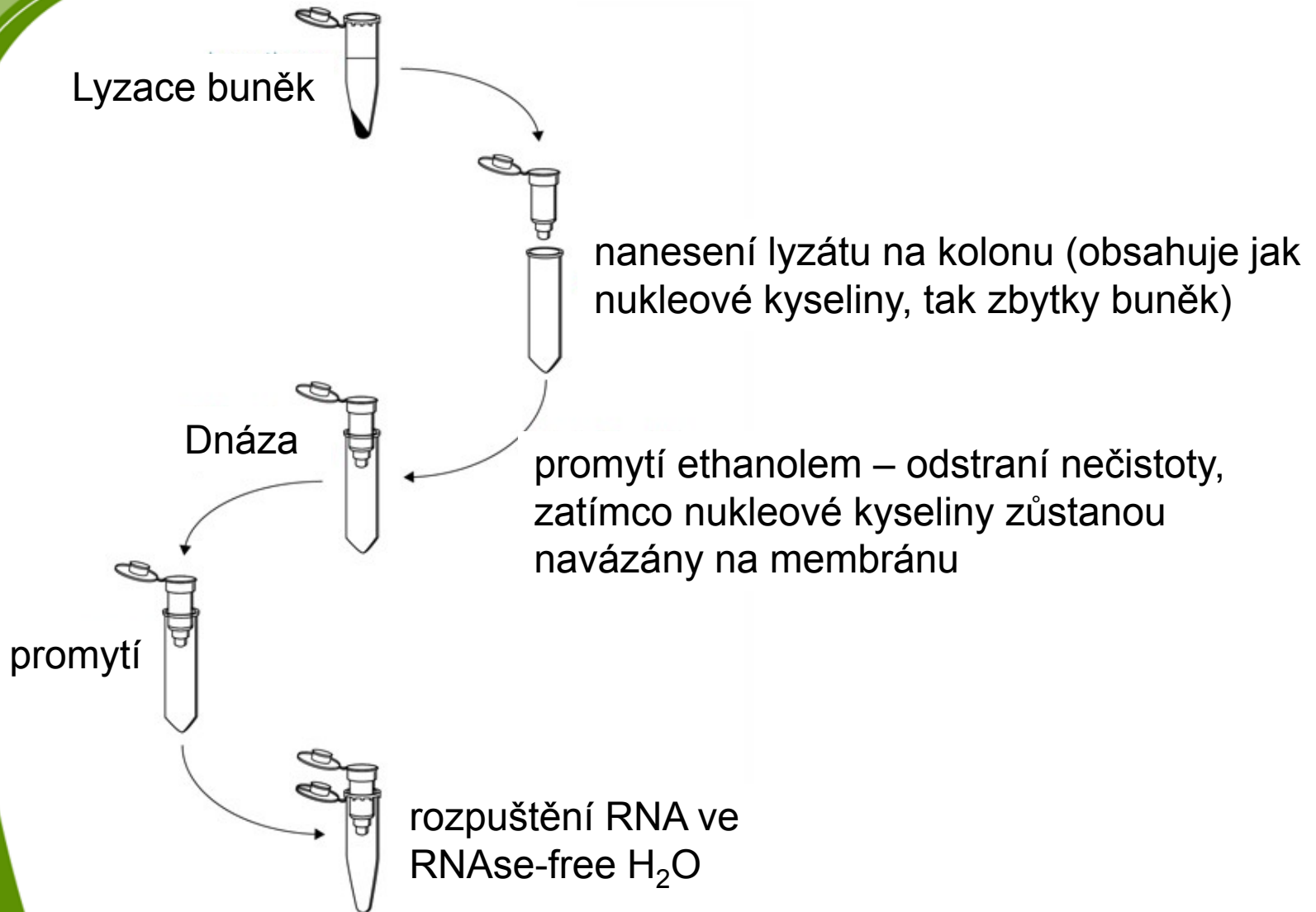
Aqueous
phase

Organic
solvents



přenos RNA do čisté zkumavky –
precipitace a přečištění ethanolem a
vysrážená RNA je rozpuštěna ve vodě
zbavené RNáz

Afinitní purifikace RNA



Srovnání metod izolace RNA

- ▶ Extrakce organickými rozpouštědly
 - ▶ Použitelná i ve velkých objemech
 - ▶ Nízké náklady
 - ▶ Toxická organická rozpouštědla
 - ▶ Časová náročnost
 - ▶ RNA může být kontaminována DNA

- ▶ Afinitní purifikace
 - ▶ Vysoce kvalitní RNA,
 - ▶ Nehrozí kontaminace DNA (DNáza)
 - ▶ Časová úspora
 - ▶ Vysoká cena

Kontrola kvality a čistoty RNA

➤ Nanodrop spektrofotometr

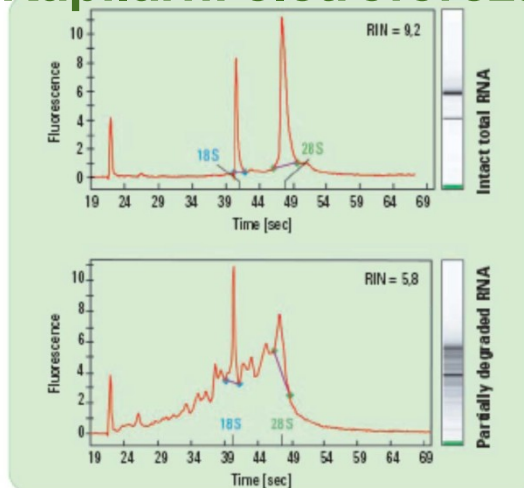
- A260 – 1.0 ~ 40 ug/ml
- A260/A280 ~ 2.0

Malý objem (2ul), rychlé měření
bez speciálních kyvet

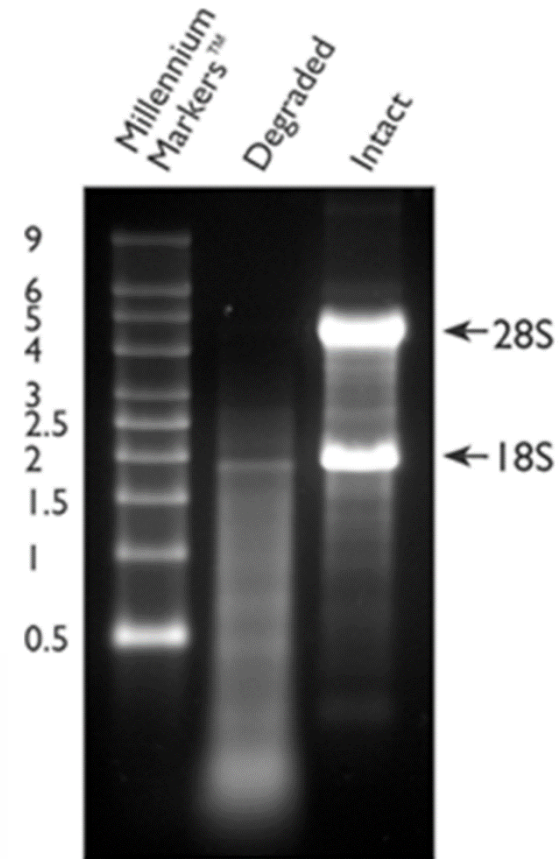


➤ Agilent 2100 bioanalyzér

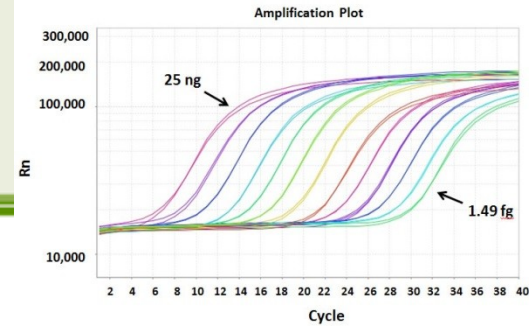
Kapilární elektroforéza



Separace v agaróze

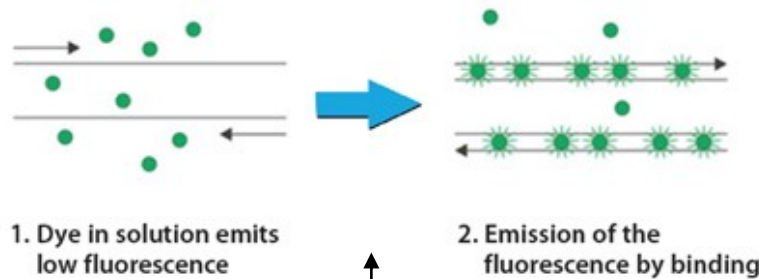


qRT-PCR



- ▶ dynamická regulace hladiny mRNA – detekce změn je zásadní pro studium změn exprese specifických genů;
- ▶ Kvantifikace exprese proteinů podle množství molekul mRNA využívající reverzní transkripci a PCR
- ▶ Reverzní transkripce převede mRNA na cDNA
 - Primery oligoT, náhodné hexa-nona oligonukleotidy, specifické primery pro konkrétní RNA
- ▶ Kvantifikace je umožněna použitím fluorescenčně značených molekul – nárůst fluorescence po každém cyklu
- ▶ Po každém cyklu je provedena detekce přírůstku = odpadá nutnost kvantifikace pomocí elektroforézy

Značení nových řetězců DNA

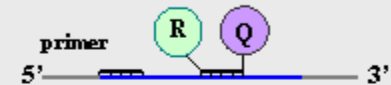


- **Interkalace fluorochromů** vázajících se jen do dvouřetězcové DNA (**SybrGreen**)
alternativa Syto9, EvaGreen...
HRM dyes <http://dyes.gene-quantification.info>
- **Značení nukleotidů pomocí 32P**
- **Použití fluorescenčně značených prób** (**TaqMan**) Reporter: 6-carboxy-fluorescein
Quencher: 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
Reporter fluoreskuje až po degradaci quencheru exonukleázovou aktivitou Taq polymerázy
Alternativa – Molecula Beacon probes, Scorpion probes

TaqMan® Applied Biosystems

Annealing

R is reporter fluorophore, which emits at a wavelength absorbed by the quencher fluorophore (Q).



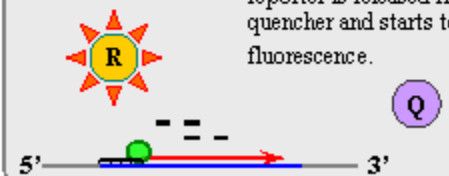
Probe displacement

DNA polymerase starts extending primers moving toward the probe.



Probe cleavage

The probe is degraded. The reporter is released from the quencher and starts to emit fluorescence.



Typy qRT-PCR

► One step qRT-PCR

- kombinace syntézy prvního cDNA řetězce (reverzní transkripce) a PCR reakce ve stejné zkumavce
- + zjednodušení reakčního postupu a snížení rizika kontaminace
- + rychlejší zpracování velkého množství vzorků
- + díky tomu, že se amplifikují všechny mRNA (cDNA) dosáhneme vyšší senzitivity (stačí i 0.01 pg celkové RNA)
- možné použít jen „sequence-specific“ primery
- celá reakce je použita pro jedno PCR, nemožnost opakování

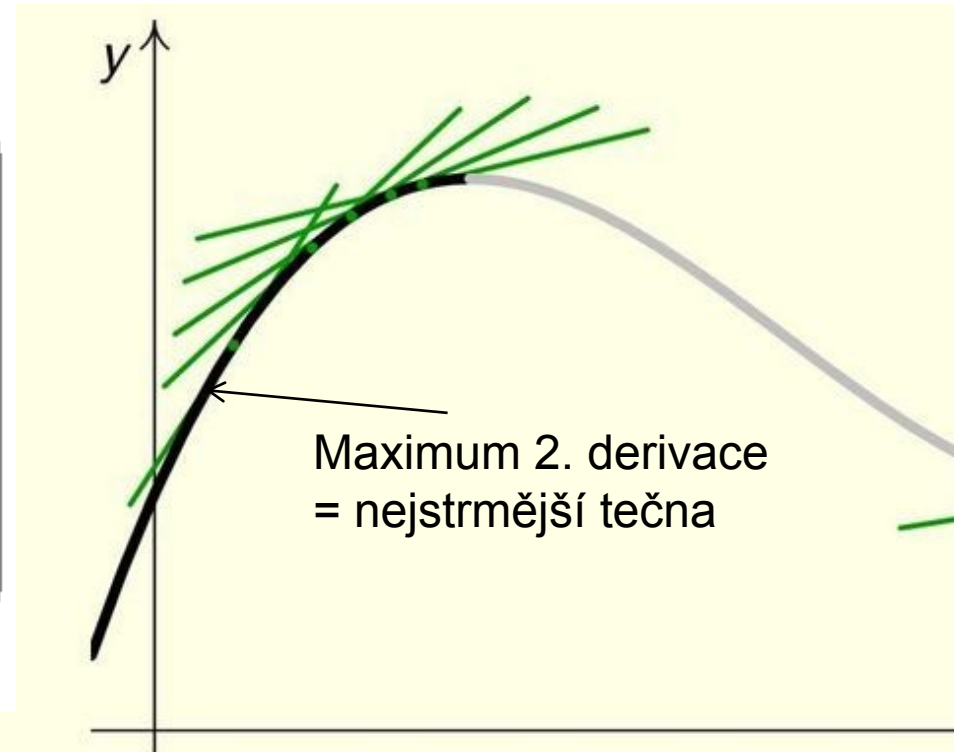
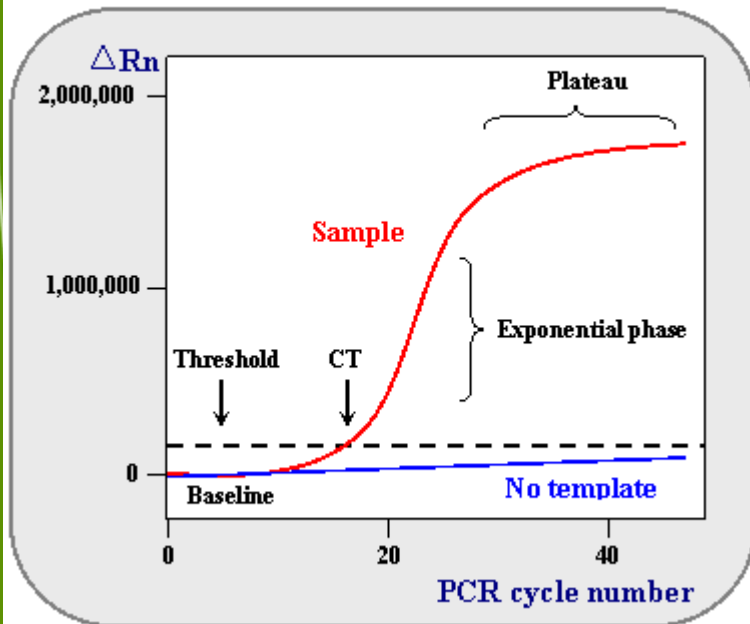
► Two step qRT-PCR

- nejprve se provádí reverzní transkripce z celkové RNA pomocí oligo dT primeru za vzniku cDNA (do reakce vstupuje 1 ug celkové RNA)
- PCR probíhá v nových zkumavkách (do reakce vstupuje 1,5 ul cDNA z přepisu)
- + z jednoho přepisu je možné provést cca 25 PCR reakcí (různé primery)
- + možnost optimalizovat PCR s použitím různých polymeráz, primerů atp.
- + srovnání exprese různých genů na stejném vzorku
- vyšší riziko kontaminace
- více pipetovacích kroků

Hodnocení kvantitativní real time PCR

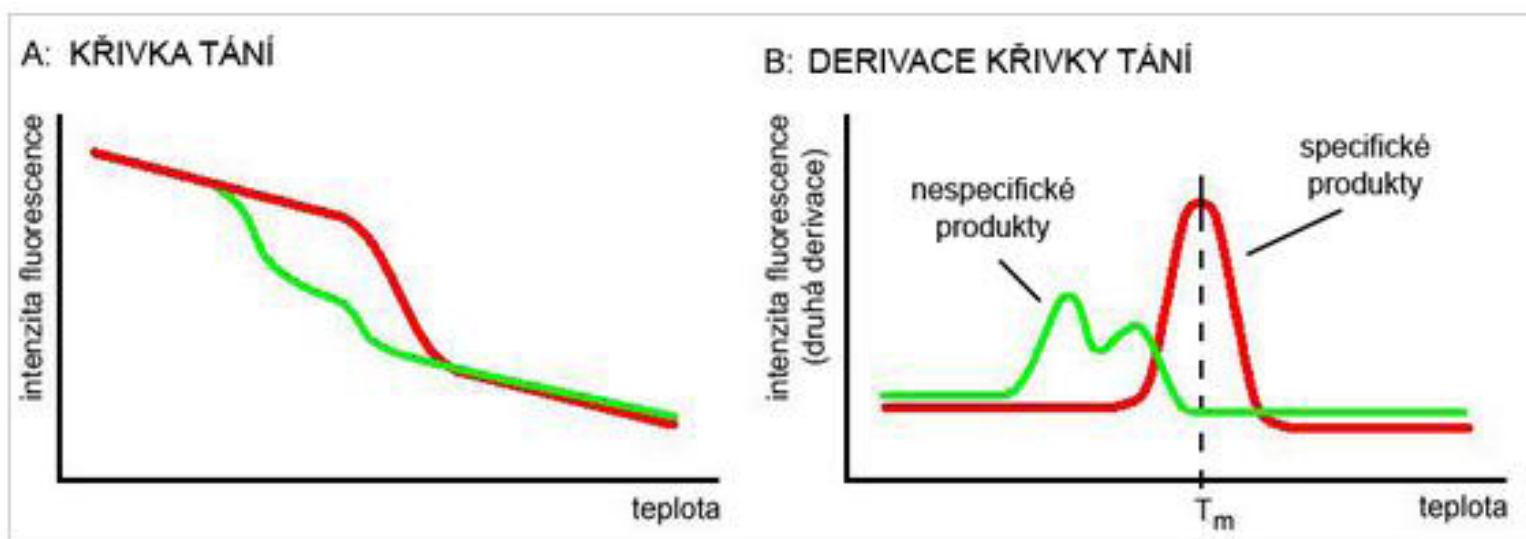
- Určení Ct (Cp) – manuálně nebo pomocí maxima 2. derivace - bod, kde dochází k nejstrmějšímu stoupání amplifikační křivky vzorku
- Čím vyšší Ct, tím méně molekul mRNA bylo ve vzorku

Model of real time quantitative PCR plot



Křivka tání (melting curve)

- Na konci reakce proběhne postupné zahřívání celé reakce, po dosažení bodu tání T_m dojde k degradaci DNA (pokles fluorescence)
- Specifitu reakce ilustruje křivka tání (melting curve) – musí mít jen jeden vrchol = jeden produkt



Více info: https://theses.cz/id/go0fw3/Bakalarska_praceEliska_Ruzickova.pdf
<http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

Vyhodnocení qRT-PCR

Absolutní kvantifikace – kalibrační křivka ze vzorků o známém množství molekul RNA

Relativní kvantifikace – srovnání s expresí house-keeping genu (HPRT)

| Name | Ct | | průměr | HPRT | Průměr - HPRT ↑ ΔCt | $2^{-\Delta Ct}$ |
|---------|-------|-------|--------|--------|---------------------------|------------------|
| F16 K3 | 31,84 | 31,43 | 31,635 | 36,39 | -4,755 | 27,0021 |
| F16 LY3 | 32,17 | 33,18 | 32,675 | 36,985 | -4,31 | 19,8353 |
| F16 K6 | 32,25 | 32,13 | 32,19 | 35,225 | -3,035 | 8,1965 |
| F16 LY6 | 31,83 | 31,84 | 31,835 | 34,97 | -3,135 | 8,7847 |
| F16 K9 | 31,16 | 31,01 | 31,085 | 36,34 | -5,255 | 38,1867 |

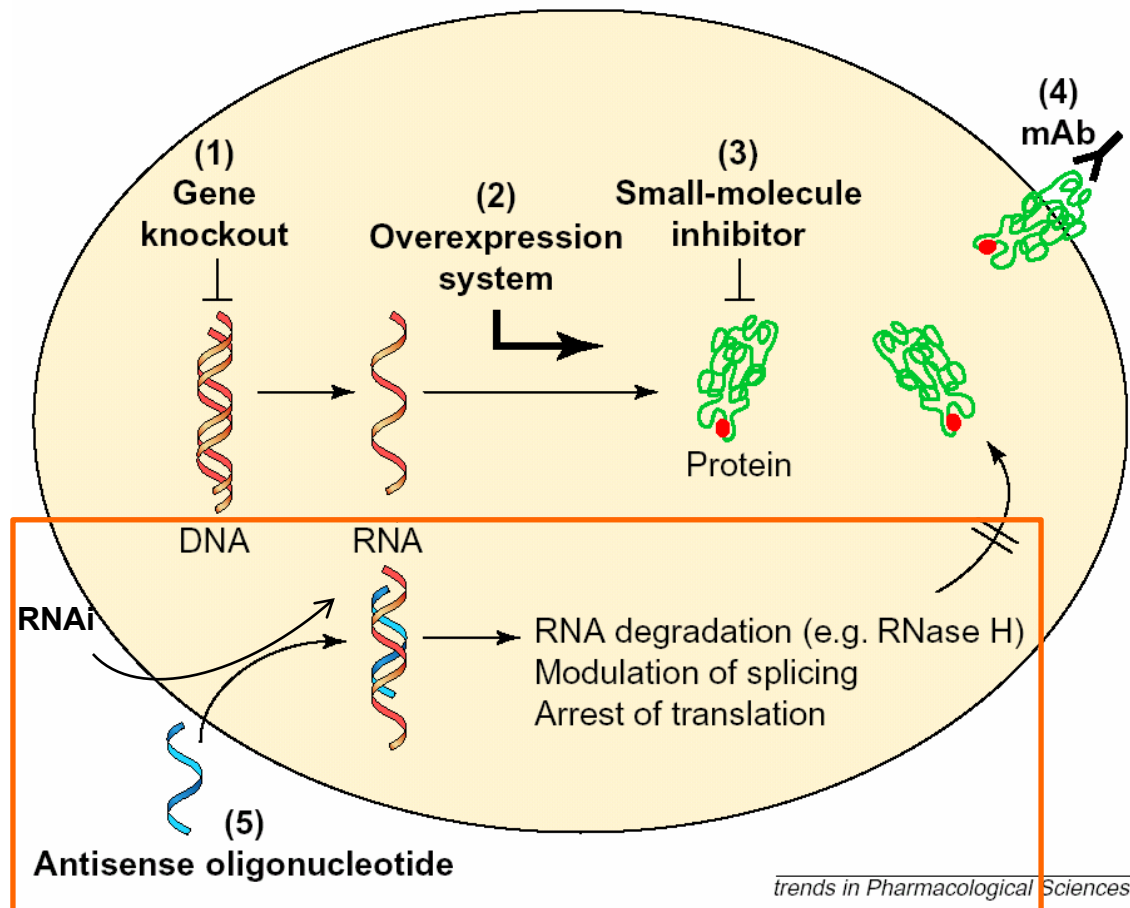
RNA sequencing

- ▶ Zjistit, co to je RNA sequencing!!!!

Manipulace genové exprese pomocí RNA

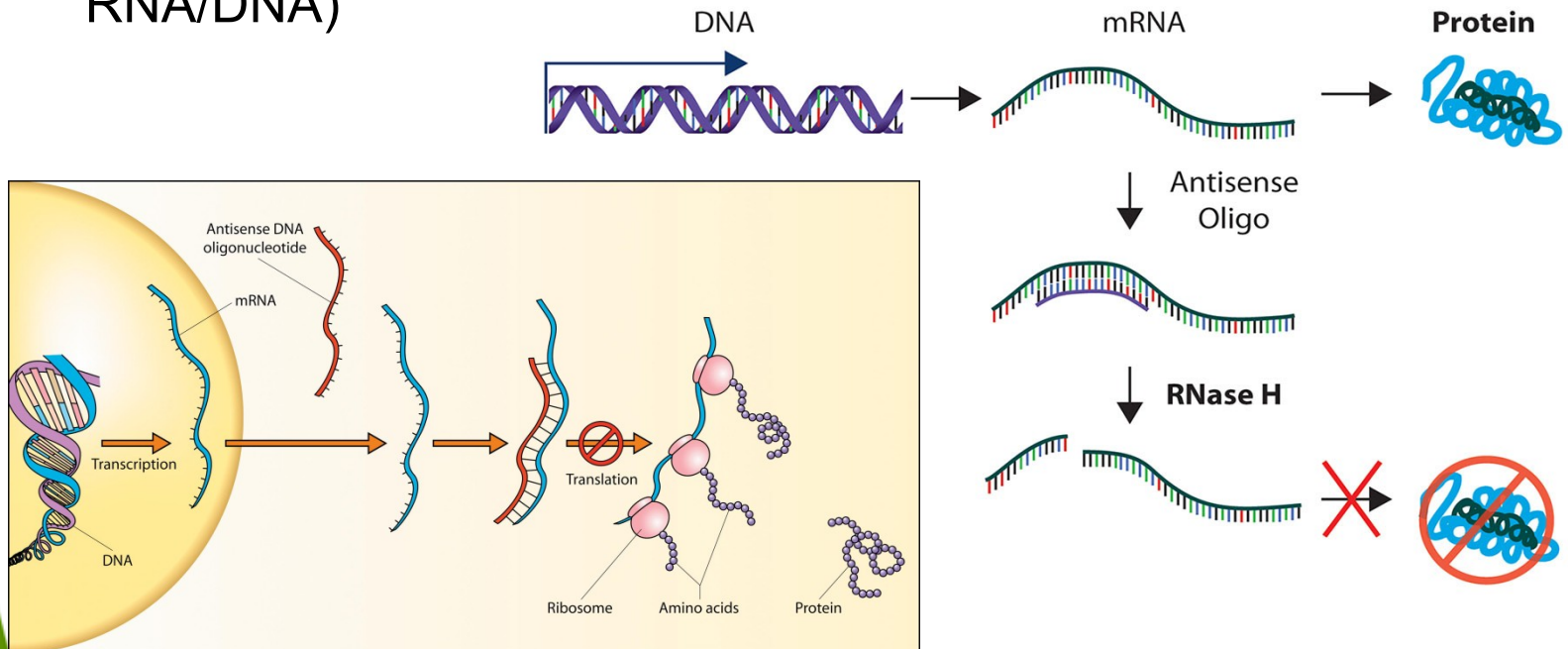
- ▶ Antisense oligonukleotidy
- ▶ RNA interference (post transkripčně)
 - siRNA
 - ShRNA
 - miRNA

RNAi



Antisense DNA oligonukleotidy

- Syntetické oligonukleotidy 10-20 bp
- Fosfodiesterová vazba nahrazena fosfotioátovou (přidaná síra, odolná nukleázám)
- Vazba antisense oligo zabrání ribozomové mašinérii produkovat protein, nebo rozštěpí RNA pomocí RNázy H (štěpí duplexy RNA/DNA)



Terapie antisense oligonukleotidy

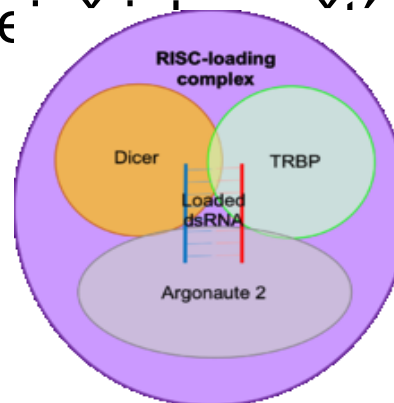
- Fomivirsen (Vitravene) (IE2) – cytomegalovirová retinitida – injekce přímo do sklivce
- Mipomersen (Kynamro) (ApoB100) – homozygotní familiární vysoký cholesterol – podkožní injekce
- Affinitak (PKC- α), Genasense (Bcl-2) – nádory – injekce intratumorálně
- AV1-6002 (Ebola virus), AV1-6003 (Marburg virus) – hemoragická horečka – intravenózní podání
- AP1-2009 (Trabedersen) (TGF β 2) – pokročilé gliomy - injekce intratumorálně

Nekódující RNA

- **Ribozymální RNA** katalyzují biochemické reakce podobně jako proteiny
- **snRNA** (small nuclear), která odstraňuje introny při výrobě mRNA
- **snoRNA** (small nucleolar), která pracuje na maturaci ribosomální RNA (metylace, pseudouridynylace)
- **scaRNA** (small cajal) modifikuje snRNA a snoRNA
- **siRNA** (small interfering), dsRNA vede k degradaci mRNA o stejné sekvenci (antivirová funkce)
- **hnRNA** (heterogenous nuclear) vysokomolekulární RNA obsahující nezprocesovanou mRNA
- **Telomerázová RNA** slouží jako primer pro dosyntetizování nukleotidů na 3 konci
- **gRNA** (guide) RNA editace, může manipulovat s bázemi
- **tmRNA** (transfer-messenger) bakteriální RNA má funkci mRNA i tRNA zároveň
- **miRNA** (mikro) blokuje translaci některých mRNA
- **piRNA** (piwi interacting) interakce s proteiny piwi – postranlační umlčování
- **Xist** – RNA umlčující X chromozom u žen
- **shRNA** (short hairpin) uměle vytvořená molekula tvořící RNA induced silencing complex

Efektor - RISC

- RISC - RNA-induced silencing complex
- Pomocí proteinu s endonukleázovou aktivitou Argonaut(Ago) /Piwi a proteinů TRBP dojde k připojení vedoucího řetězce (guide strand, gs) do RISC
- Navigace celého komplexu k místu komplementárním s gs, dicer (endoribonukleáza) vytvoří krátké úseky ds RNA a Ago (Rnáza) rozštípne vzniklý hybrid přibližně uprostřed jeho délky
- Vedlejší řetězec (passenger strand, ps) je degradován nukleázami, stejně jako i gs



TRBP =
human immunodeficiency virus (HIV)-1
transactivating response (TAR)
RNA-binding protein

miRNA

- mikro RNA – 21-27 b, která se přirozeně vyskytuje v genomu, je přepsána podobně jako mRNA (poly A konec, 5 čepička) do pri-miRNA (Drosha) – pre-miRNA (Dicer) – miRNA – aktivace RISC
- Částečně komplementární s mRNA
- Často se nachází v intronech
- asi 2578 (600) miRNA v lidském genomu, ovlivňují asi 60 % genů
- Často studována v souvislosti s nádory a onemocněním myokardu, deregulace exprese
- Jeden gen je regulován více miRNA, jedna miRNA reguluje více genů

miRNA-based therapeutics regulate targets across multiple signal transduction pathways

small molecules



one target

antibodies



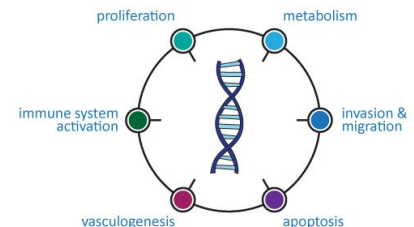
one target

siRNA



one target

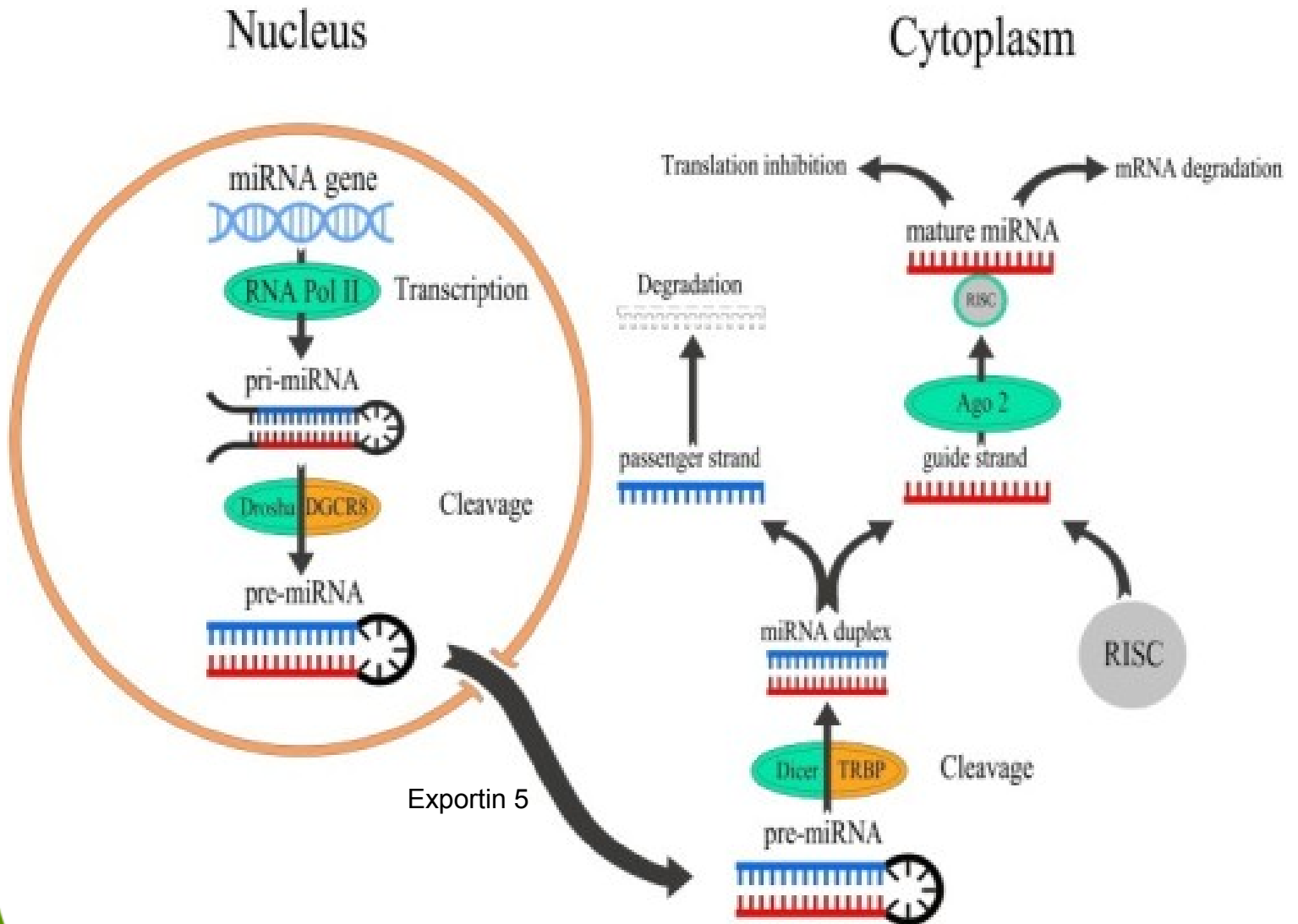
miRNAs



multiple targets

Processing miRNA

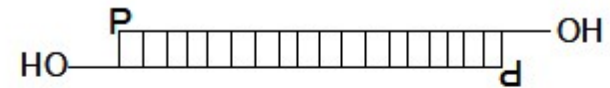
RNAI



Využití nekódující RNA – RNA interference

➤ siRNA

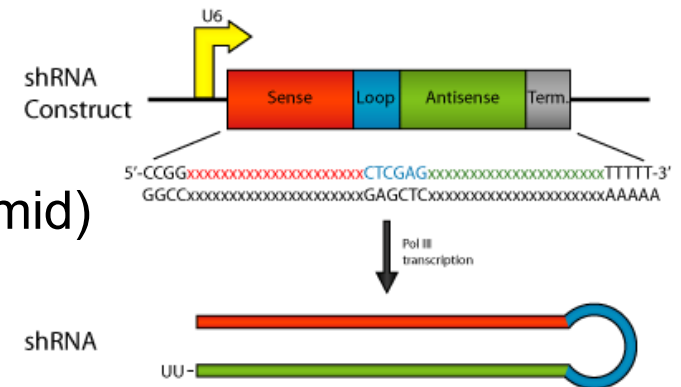
- Krátká dsRNA (20-25 bp)
- Exogenní původ (viry) i endogenní původ (centromery, repetice)



Schematic representation of a siRNA molecule: a ~19-21basepair RNA core duplex that is followed by a 2 nucleotide 3' overhang on each strand. OH: 3' hydroxyl; P: 5' phosphate.

➤ shRNA

- Vlásokovitá struktura dsRNA
- Čistě arteficiální struktura (plazmid)
- Drosha a Dicer rozštěpí shRNA za vzniku siRNA

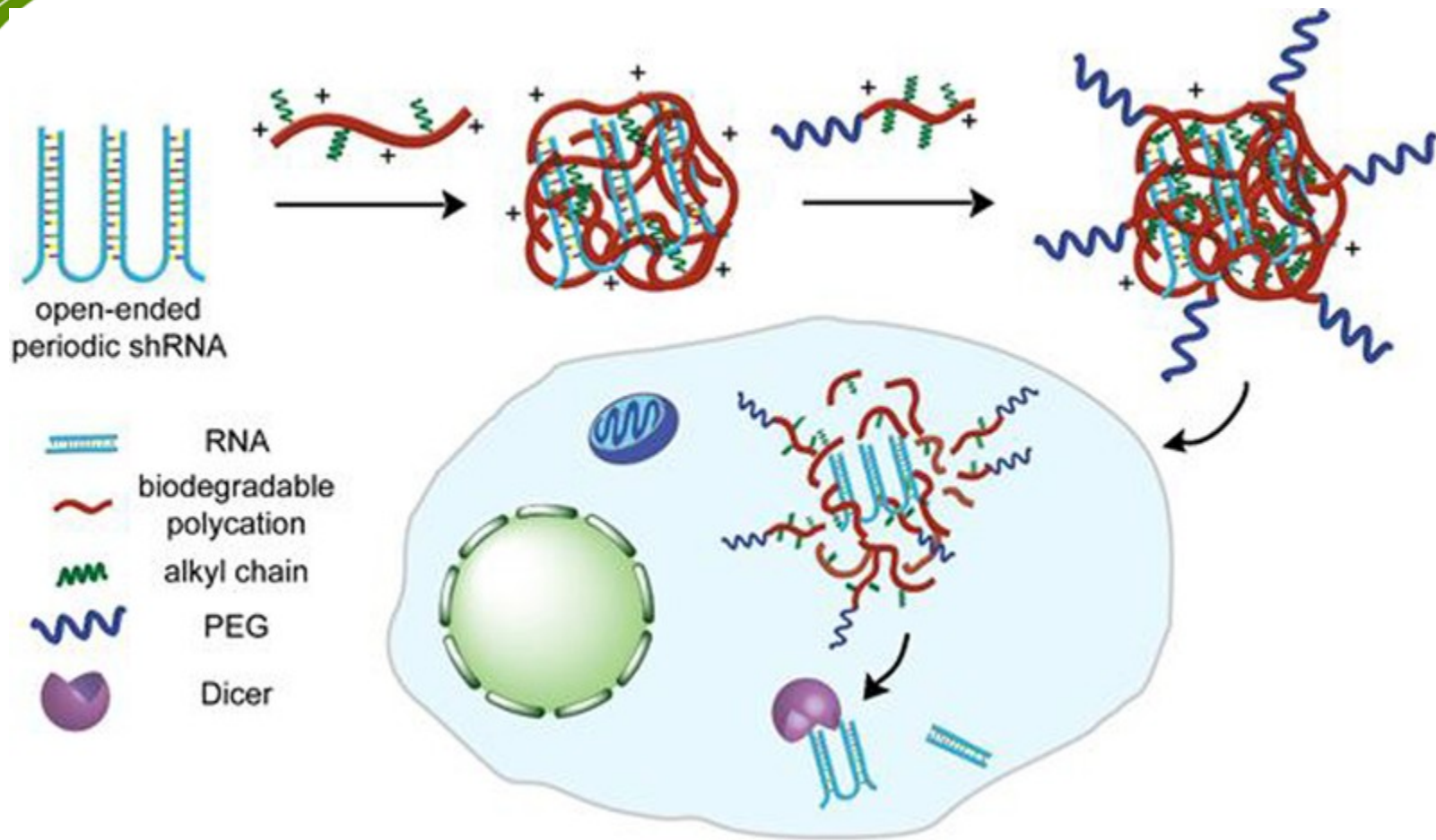


Hlavní problém – jak doručit molekuly dsRNA do cytosolu

siRNA vs shRNA

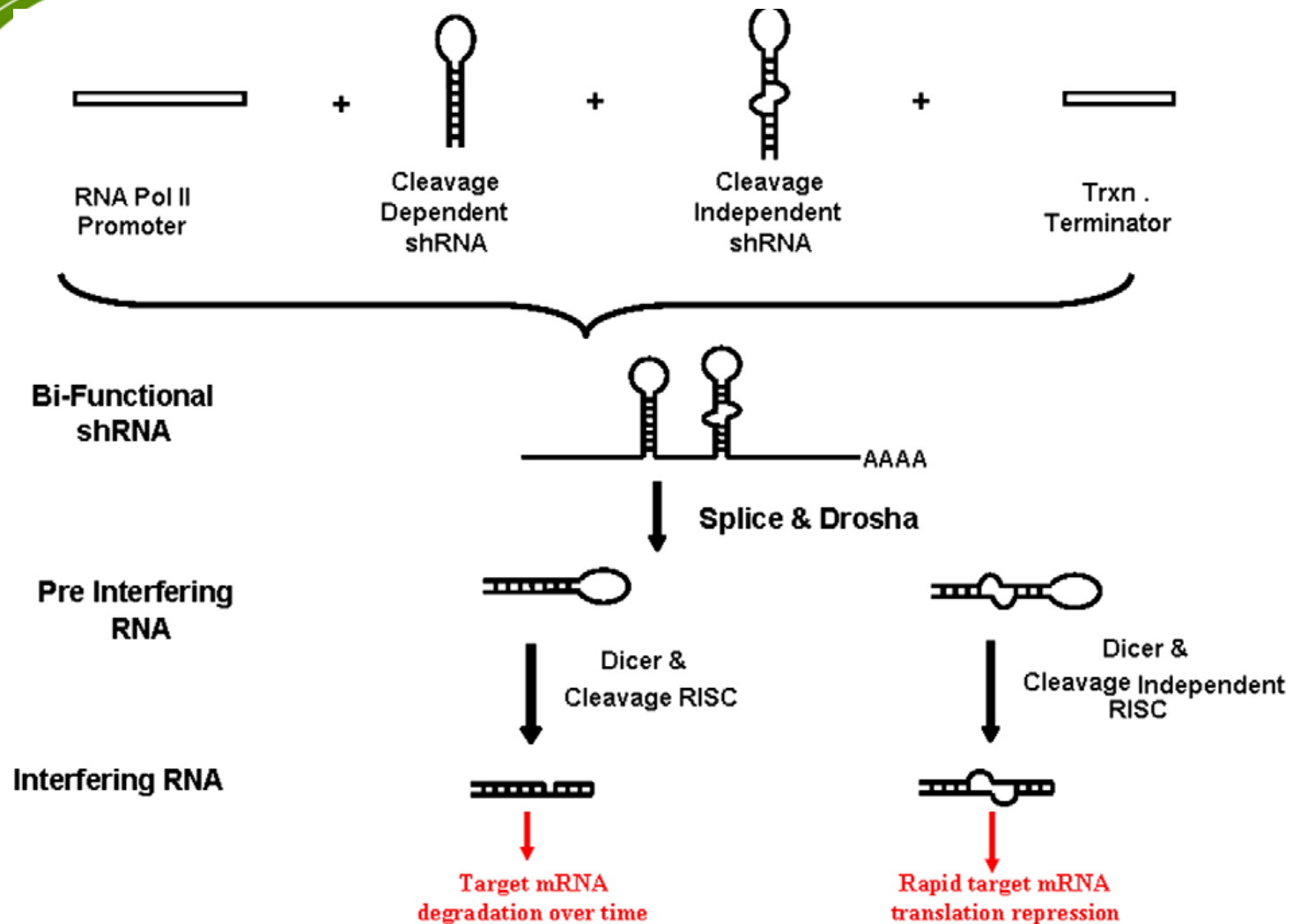
- ▶ Stabilní nebo transientní interference
 - ▶ SiRNA – transientní interference (transfekce)
 - ▶ ShRNA - stabilní interference (pomocí infekce)
- ▶ Riziko – velké množství dsRNA molekul v cytoplazmě vede k off-target štěpení
- ▶ Pravidla a návod pro konstrukci oligonukleotidů
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3679364/>
- ▶ In vivo RNAi
 - ▶ „nahá“ siRNA – játra, ledviny - Invivofectamin (Invitrogen), shRNA - Adenoviry (toxické)
 - ▶ Adeno-asociované virové vektory – potencionálně slibné
 - ▶ Terapeutické pokusy (op-shRNA)

op-shRNA – vytvoření větší molekuly, která se lépe tranfekuje



Biodegradabilní polykation – např. poly(beta-amino ester)
Periodická shRNA je přepisována jako konkatemer,
mnoho molekul v cytoplazmě <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4923333/>

Bifunkční shRNA



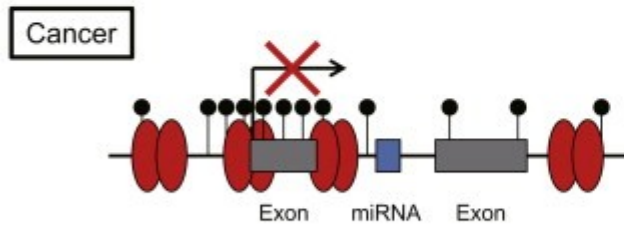
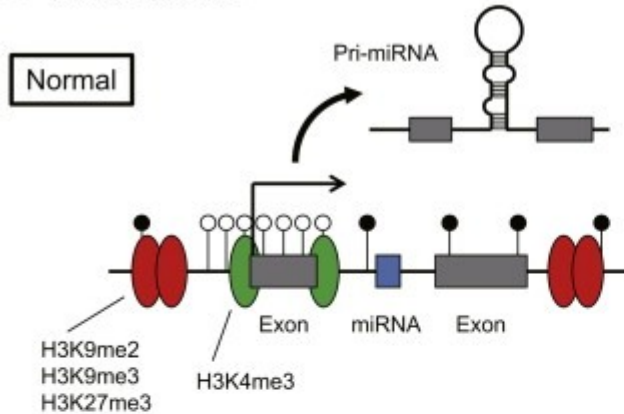
RNAI

Příklady regulace miRNA v nádorech

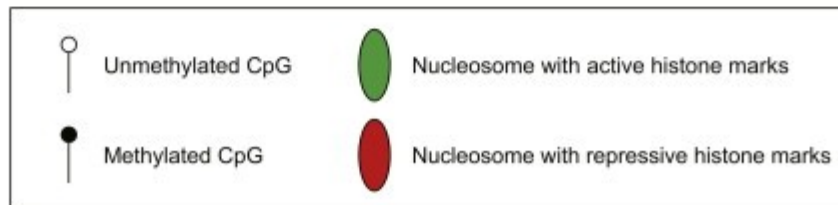
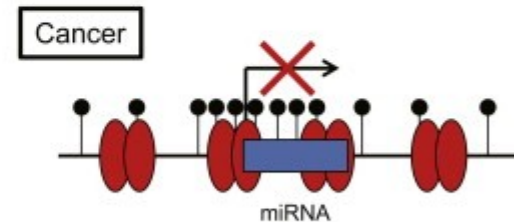
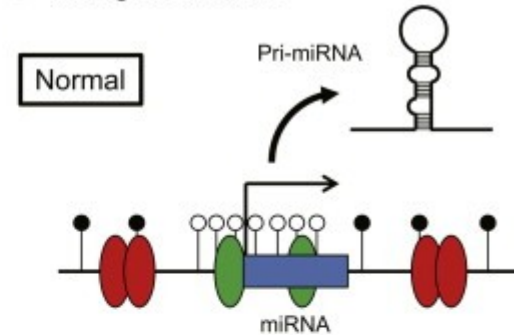
- Protinádorová funkce
 - Role tumor supresoru
 - *miR-15a a16-1*
 - delece těchto genů je častá u B lymf CLL
 - Delece miRNA vede ke zvýšené expresi Bcl2 a p53, tj. potlačení apoptózy a zrychlený průchod b. cyklem
 - <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217316530?via%3Dihub>
 - *Let7*
 - Mutace Let7 miRNA vede k nadměrné aktivaci genu pro Ras
- Pro nádorová funkce
 - Aktivace drah vedoucích k podpoře metastázování
 - miR-21/miR-29a se váže na TLR7, TLR8 (jako ligand)
 - https://www.researchgate.net/publication/228105286_MicroRNAs_bind_to_Toll-like_receptors_to_induce_prometastatic_inflammatory_response
- Hypermetylace CpG ostrůvků
 - Umlčení miRNA vede k rozvoji nádorů
 - <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574789112000798>

Hypermethylate miRNA

A Intronic miRNA



B Intergenic miRNA



Shrnutí

- ▶ Hypotéza světa RNA
- ▶ mRNA se nejvíce studuje v souvislosti s expresí genů (qRT PCR)
- ▶ Antisense oligonukleotidy jsou využívány i k terapii
- ▶ Nekódující RNA jsou používány jako nástroj k posttranskripčnímu umlčení genů
- ▶ Deregulace miRNA vede k progresi nádorů