

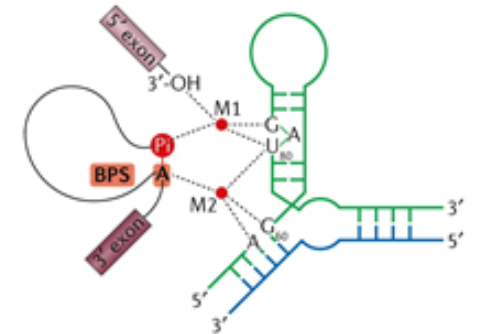
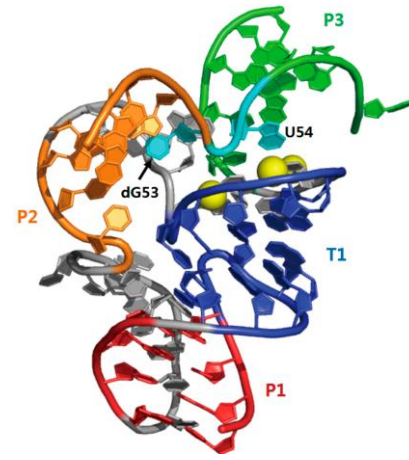
# GENOVÉ TECHNOLOGIE

## Technologie založené na RNA

rozdělení RNA, význam ne-kódujících RNA, antisense RNA a umlčování genů, ribozymy

# Role nekódujících RNA

- RNA hrají celou řadu rolí, které jsou široce využívány v biotechnologiích
- Nejvíce pochopenou rolí je jejich účast na syntéze proteinů (mRNA, tRNA, rRNA)
- Celá řada malých RNA hraje roli v sestřihu mRNA (snRNA, snoRNA, gRNA)
- Ribozymy mají enzymatickou aktivitu – štěpení a ligace celé řady substrátů
- V posledních letech popsána celá řada nových rolí (ncRNAs)
- Některé třídy RNA regulují úroveň translace (antisense RNA) – vazba na komplementární mRNA
- RNA hrají rovněž důležitou roli v obraně před RNA viry (RNAi)
- Bakterie postrádají RNAi – mají CRISPR systém využívající crRNA



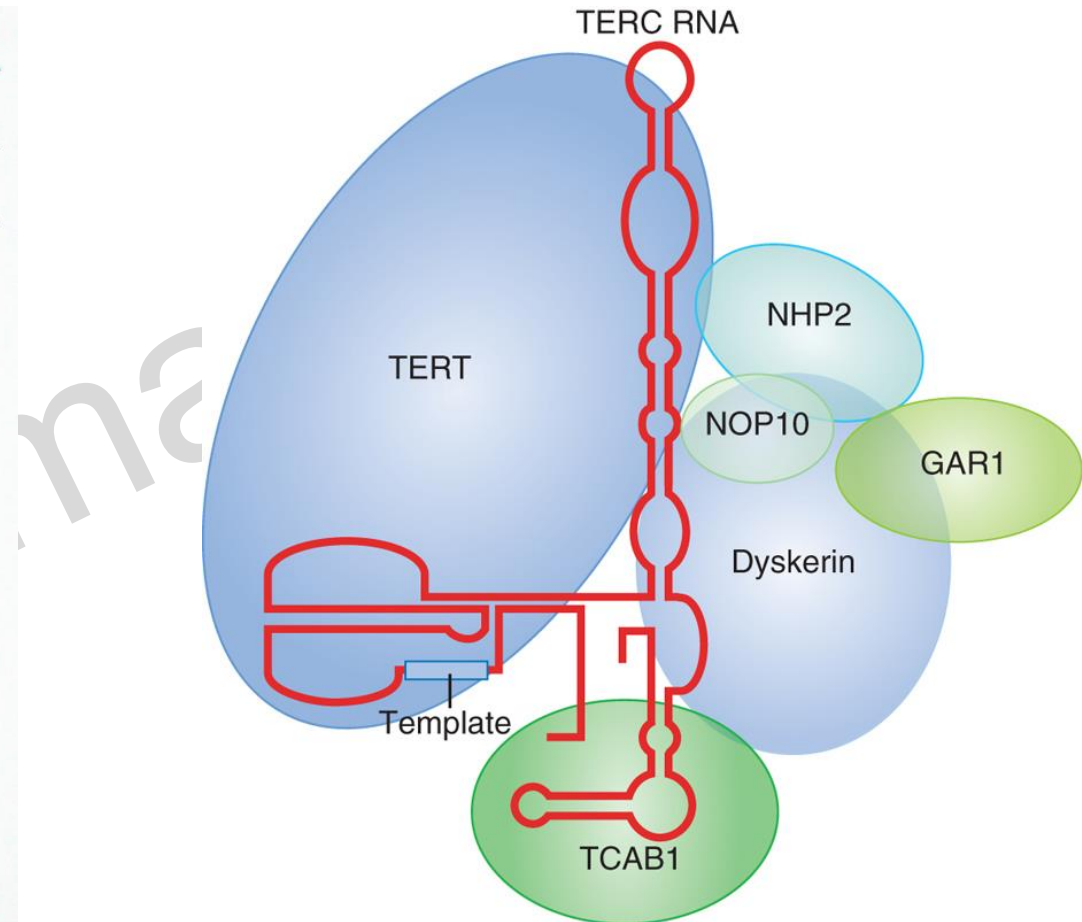
# Role nekódujících RNA

	Class	Abbreviation	Size in Nucleotides	Role	Distribution
Genomic Integrity and Protection	Piwi interacting RNA	piRNA	25–32	Transposon silencing in germline cells	Eukaryotes
	Small-interfering RNA	siRNA	22	Defense against foreign RNA	Eukaryotes
	Telomerase RNA	TERC	451	Synthesis of telomeres	Eukaryotes
	CRISPR RNA	crRNA	24–48	Defense against foreign RNA and DNA	Bacteria plus Archaea
	Xist RNA	—	17,000	X chromosome inactivation	Eukaryotes
Transcription	Antisense RNA	aRNA	19–25	Genetic regulation	All organisms
	Enhancer RNAs	eRNAs	200–500	Genetic regulation	Eukaryotes
	6S RNA	6S RNA	184 ( <i>E. coli</i> )	Regulating transcription	Bacteria
	Micro RNA	miRNA	22	Regulating mRNA degradation and translation	Eukaryotes
	Circular RNA	circRNA	1000 or more	Regulation of miRNA abundance	Eukaryotes
	Long noncoding RNA	lncRNA	Wide range	Various regulatory roles	Eukaryotes

Transcription	Antisense RNA	aRNA	19–25	Genetic regulation	All organisms
	Enhancer RNAs	eRNAs	200–500	Genetic regulation	Eukaryotes
	6S RNA	6S RNA	184 ( <i>E. coli</i> )	Regulating transcription	Bacteria
	Micro RNA	miRNA	22	Regulating mRNA degradation and translation	Eukaryotes
	Circular RNA	circRNA	1000 or more	Regulation of miRNA abundance	Eukaryotes
	Long noncoding RNA	lncRNA	Wide range	Various regulatory roles	Eukaryotes
RNA Processing	Small RNA regulators	sRNA	<300	Gene regulators (various mechanisms)	Bacteria
	Guide RNA	gRNA		Editing of mRNA	Protozoa
	Small nuclear RNA	snRNA	100–300	Splicing of RNA	Eukaryotes plus Archaea
	Small nucleolar RNA	snoRNA	60–300	RNA nucleotide modification	Eukaryotes plus Archaea

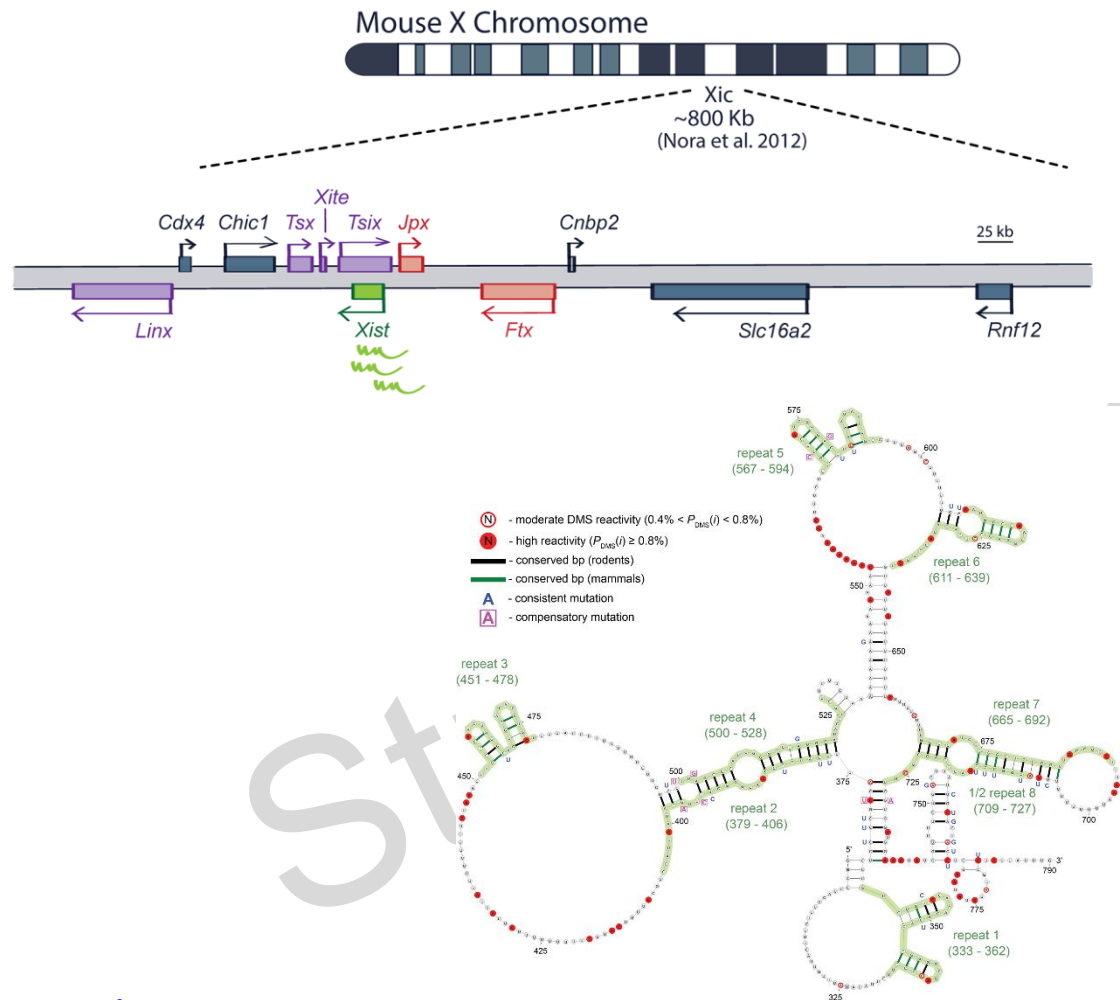
# Role nekódujících RNA

	Class	Abbreviation	Size in Nucleotides	Role	Distribution
Protein Translation	Messenger RNA	mRNA	Wide range	Protein synthesis	All organisms
	Transfer RNA	tRNA	70–90	Protein synthesis	All organisms
	Ribosomal RNA	rRNA	120, 160, 1868, 5025	Protein synthesis	All organisms (sizes shown are for higher animals)
	Transfer-messenger RNA	tmRNA		Rescues stalled ribosomes	Bacteria
	Riboswitch	—	40–140	Controls translation, transcription, or splicing of attached mRNA	All organisms (very rare in eukaryotes)
Enzymatic Function	Dual-function RNA	—		Protein coding plus various regulatory roles	All organisms
	Ribozymes	—	>250	Function as enzymes	All organisms
	Signal recognition particle RNA	7SL RNA or SRP RNA	300	Membrane insertion of proteins	All organisms

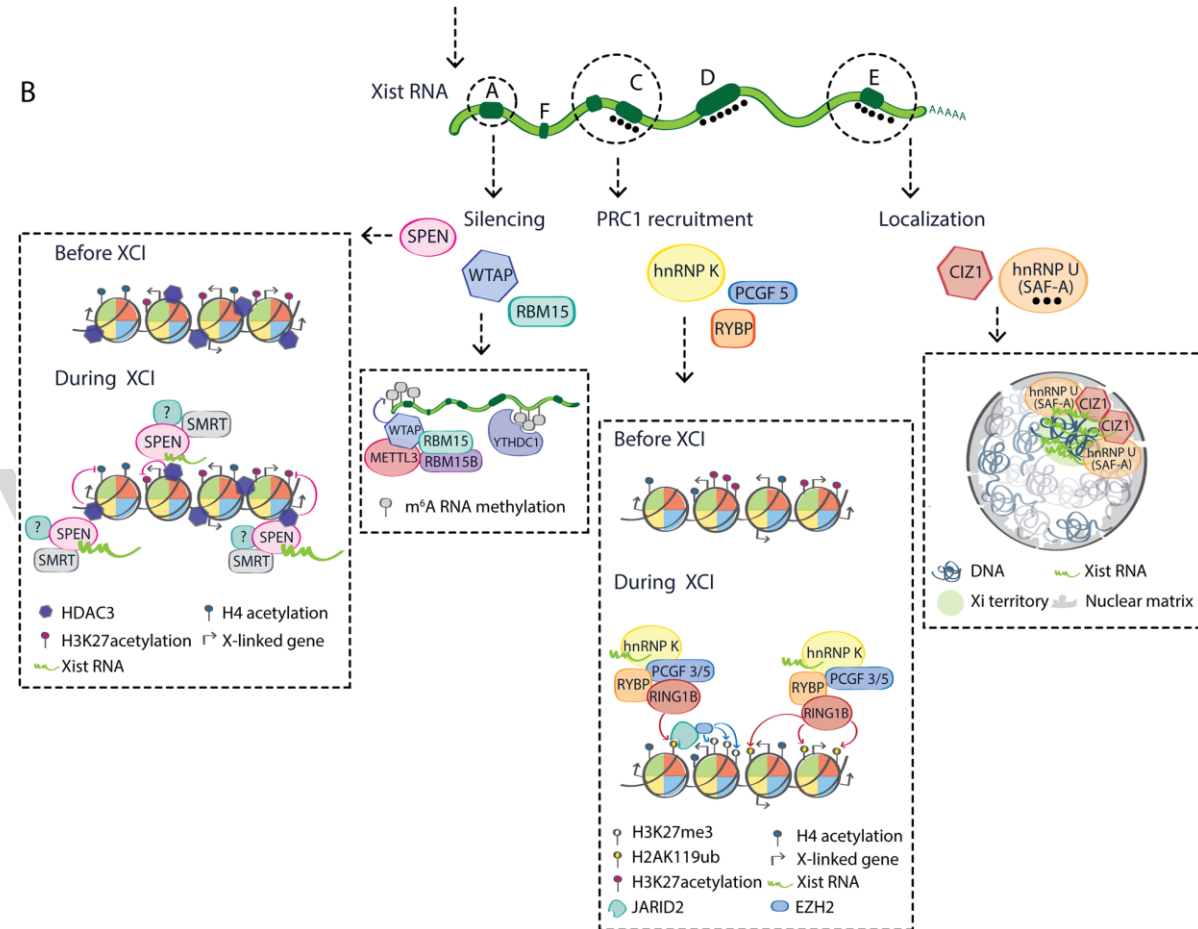


# Xist umlčení X-chromozómu

A

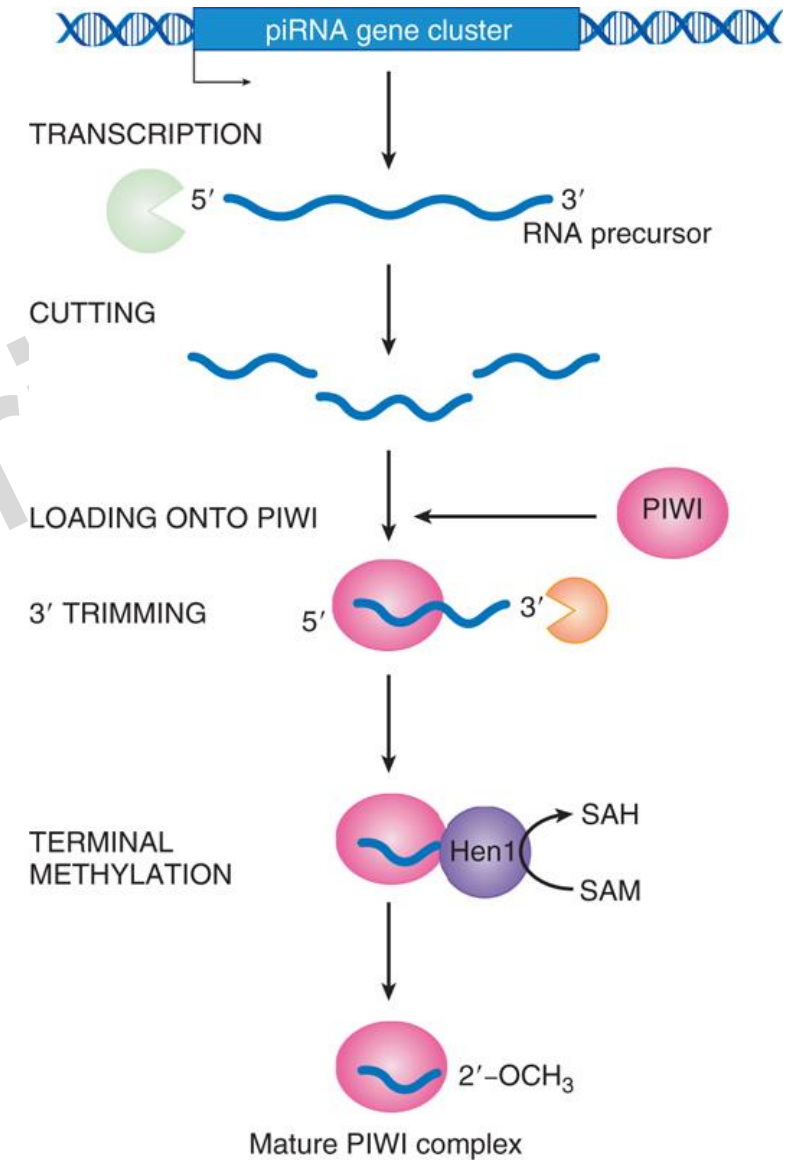


B

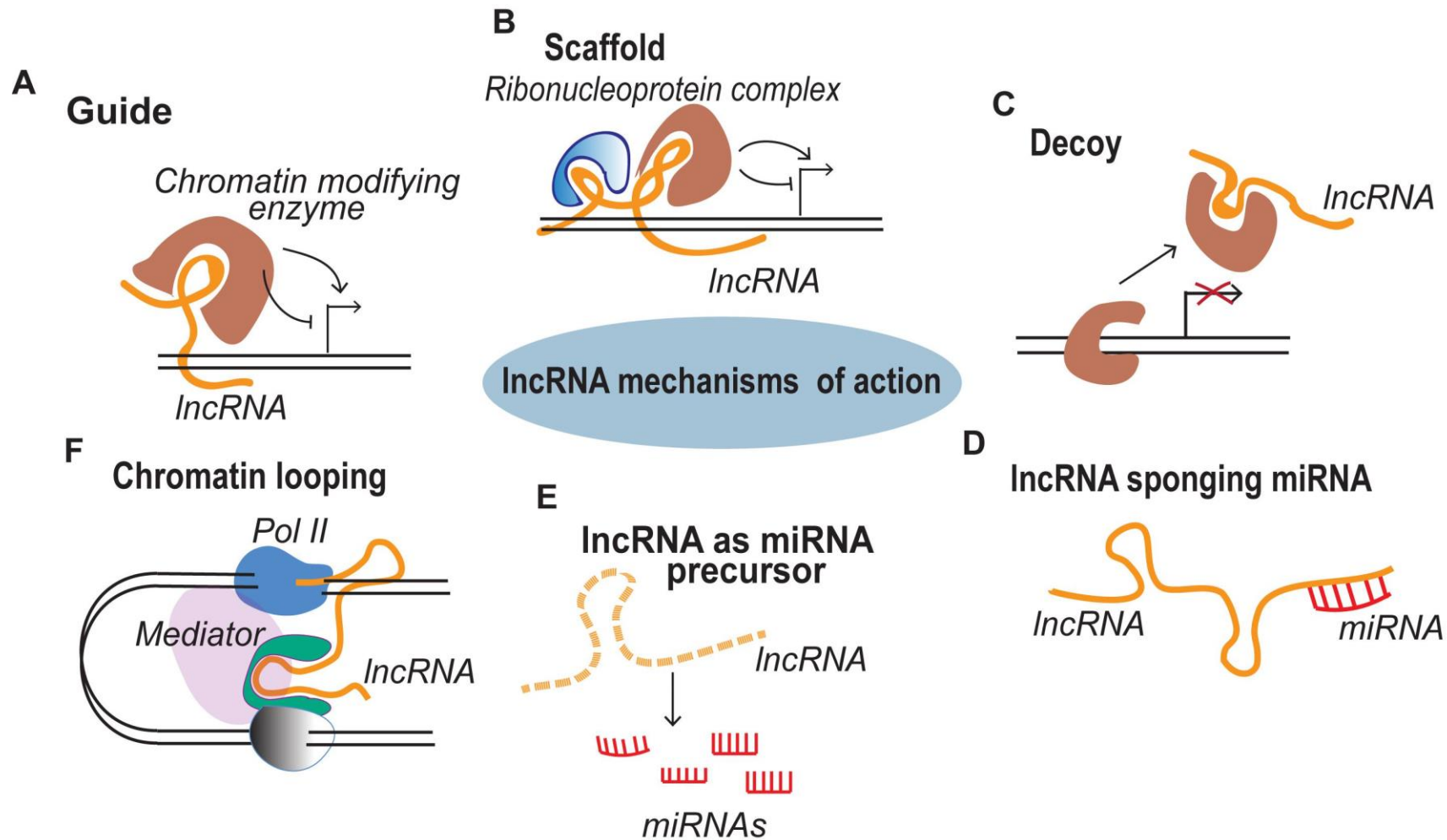


# Piwi- interagující RNA (piRNA)

- 24-30 nukleotidů dlouhé
- monofosfátová skupina na 5'konci (U) a 2'O-methylová skupina na 3'konci
- Kódovány v genomu v rámci klastrů nebo intronů jiných genů
- Sekvence komplementární k endogním transpozónům
- Jsou rozpoznávány rodinou Argonaut proteinů, štěpený na malé kousky vázající se na komplementární RNA transpozónů = štěpení zabraňující jejich posunu

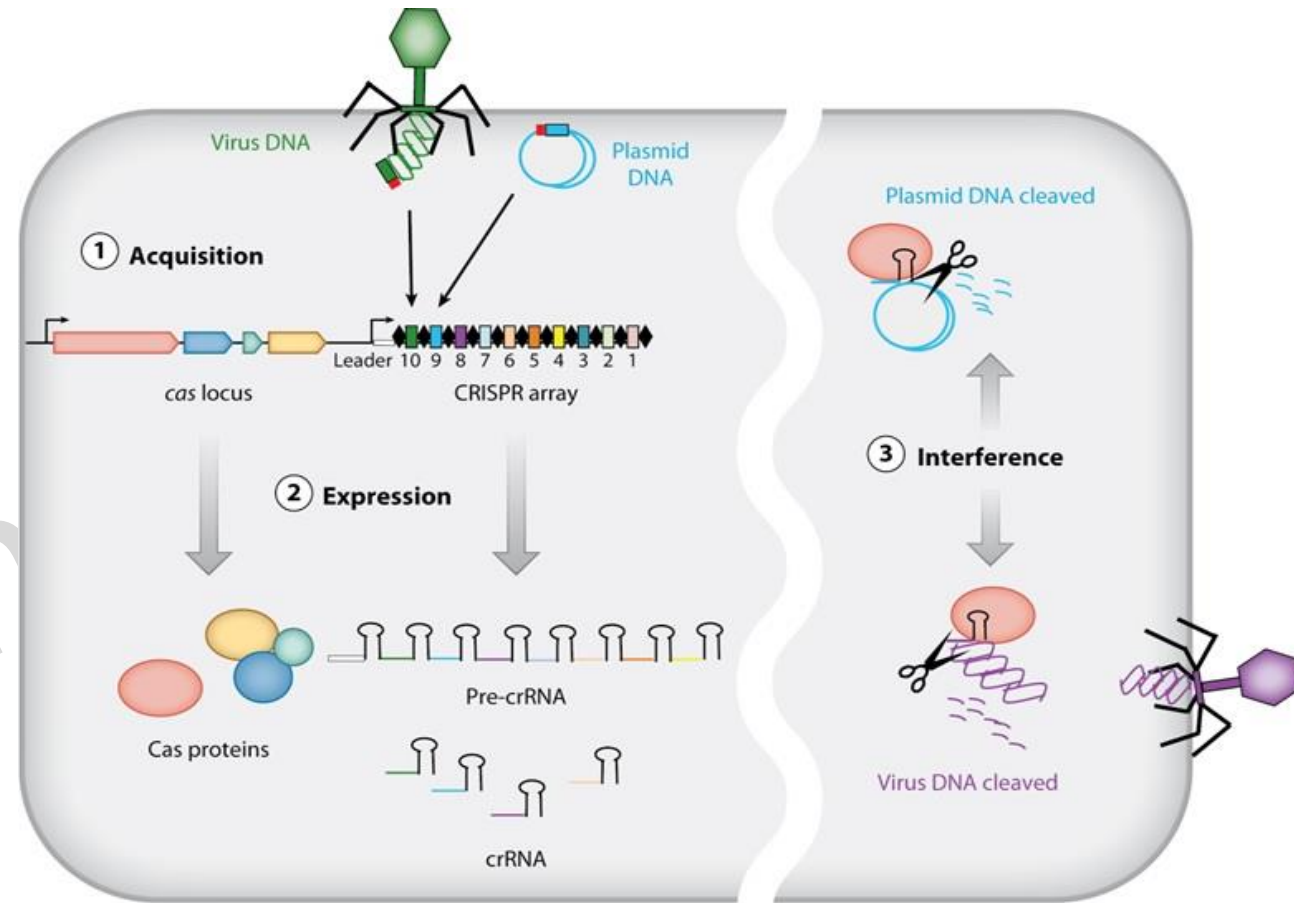


# lncRNA (long non-coding)



# CRISPR

- Hlavní ochranný systém před RNA virem u prokaryot
- Nenachází se u eukaryot, pouze u prokaryot a archaea
- Chrání před RNA i DNA virem, cizími plazmidy nebo transpozony
- Je založen na paměťové stopě ve formě krátkých DNA sekvencí uložených mezi palindromickými repeticemi
- CAS proteiny tvoří RNasy i DNasy – velmi variabilní mezi bakteriemi

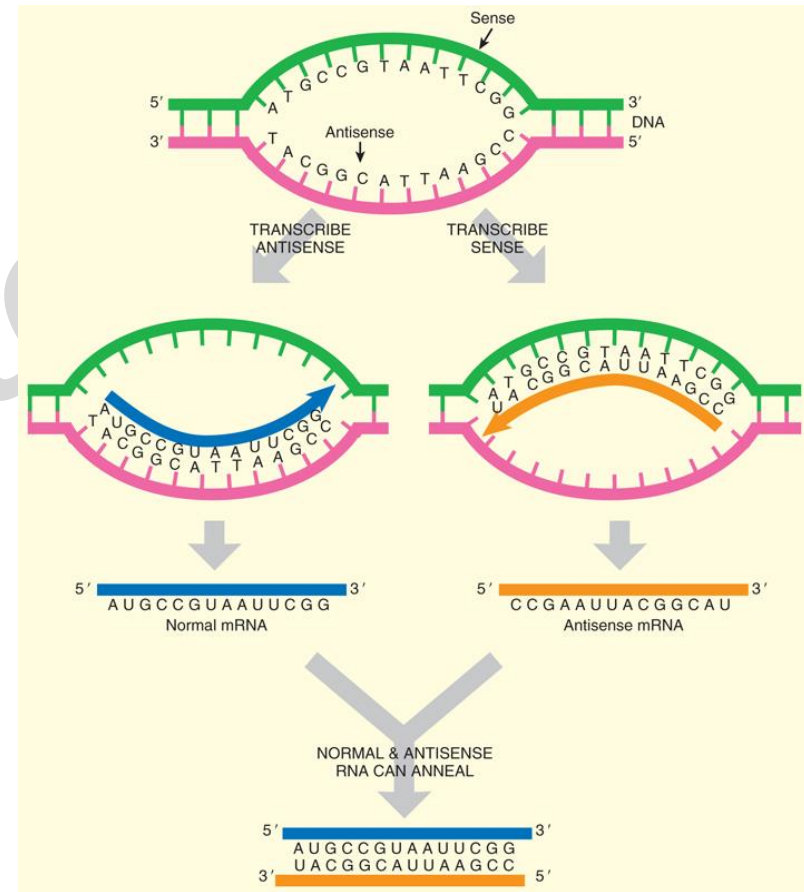


Bhaya et al. 2016

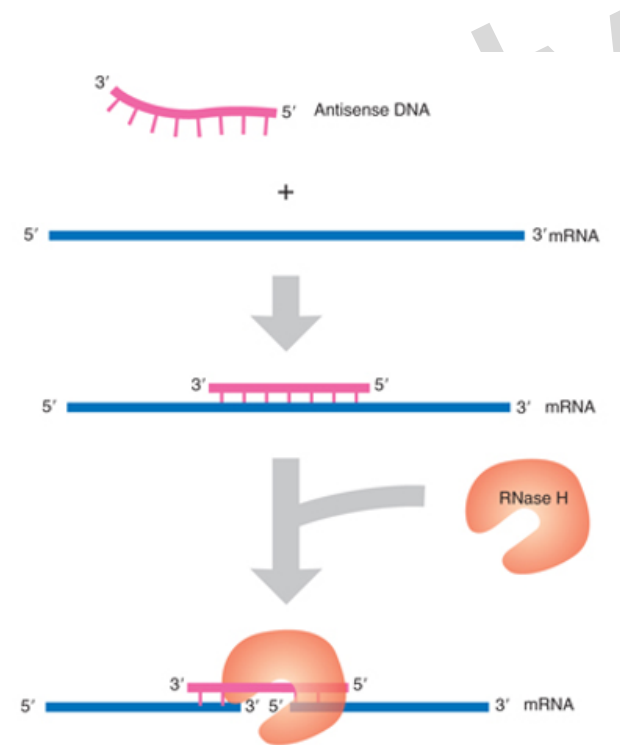
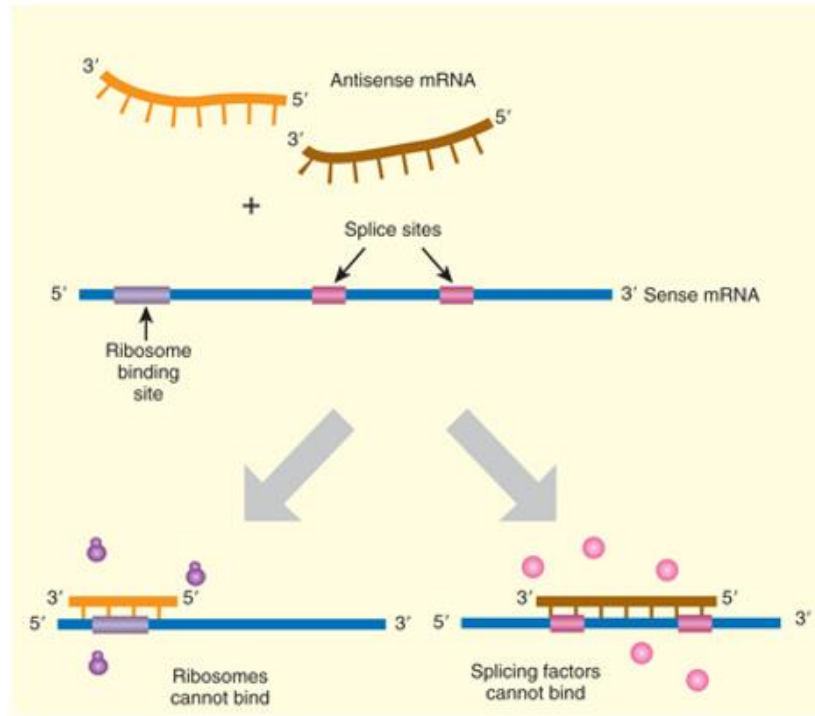


# RNA ovlivňuje transkripci

- Genová exprese je modulována rovněž RNA
- U bakterií se sRNA váží na mRNA a brání transkripci, některé ji naopak aktivují, některé se váží na proteiny (TFs)
- U euakryot zabraňují translaci nebo spouští degradaci mRNA microRNA (antisense mechanismus)
- V lidském genomu přibližně 20-40% protein kódujících genů má antisense partnery (promotor, introny, exony, 3'UTR)
- Antisense geny:
  - cis = vedle nebo uvnitř vlastního genu
  - trans = jiná lokace v rámci genomu

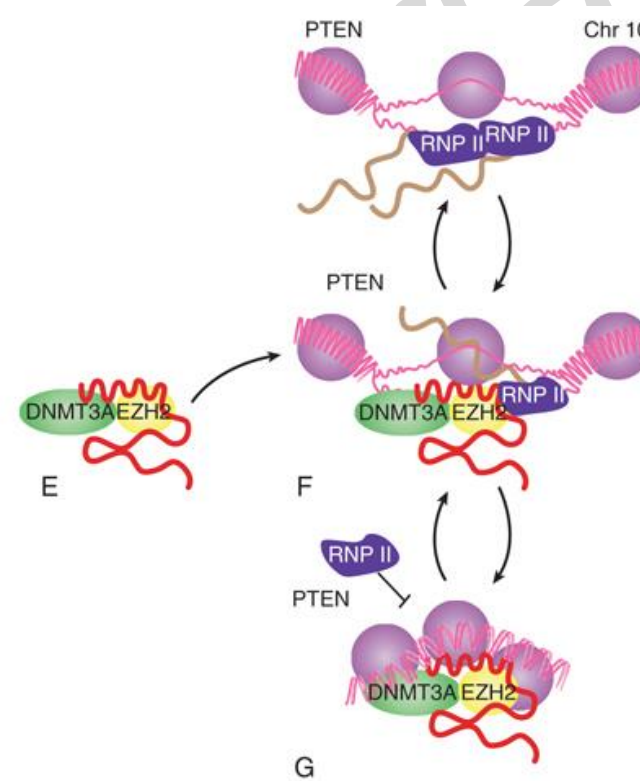
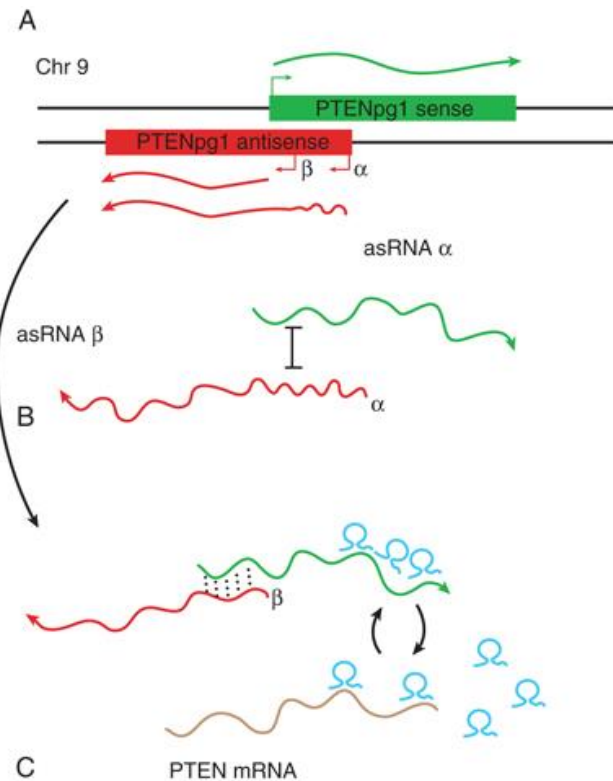


# Antisense mechanismy



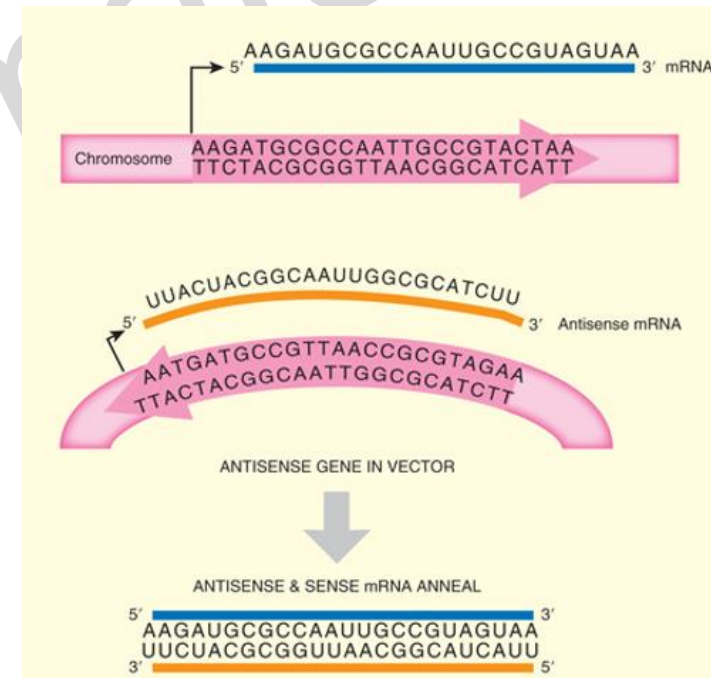
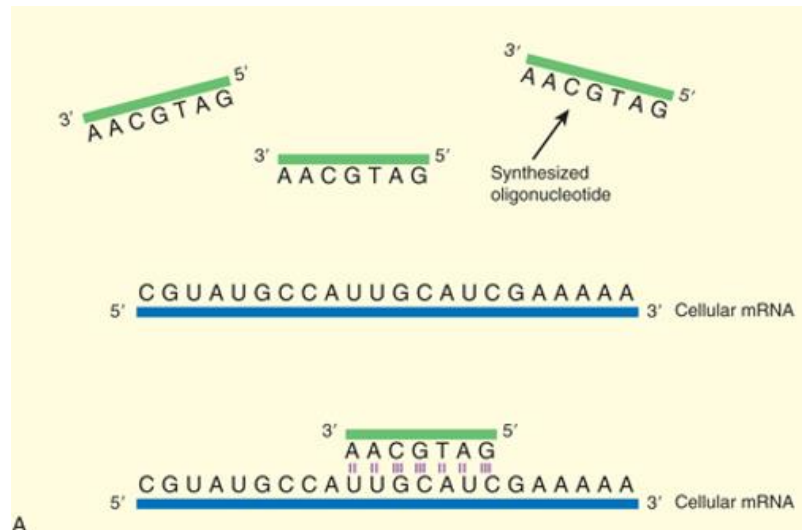
# PTEN pseudogen

- PTEN (phosphatase and tensin homolog)
- Tumor-supresorový gen, jehož transkripce koreluje se závažností rakoviny
- V rámci genomu přítomnost PTEN pseudogenu = tvorba tří ne-kódujících RNA



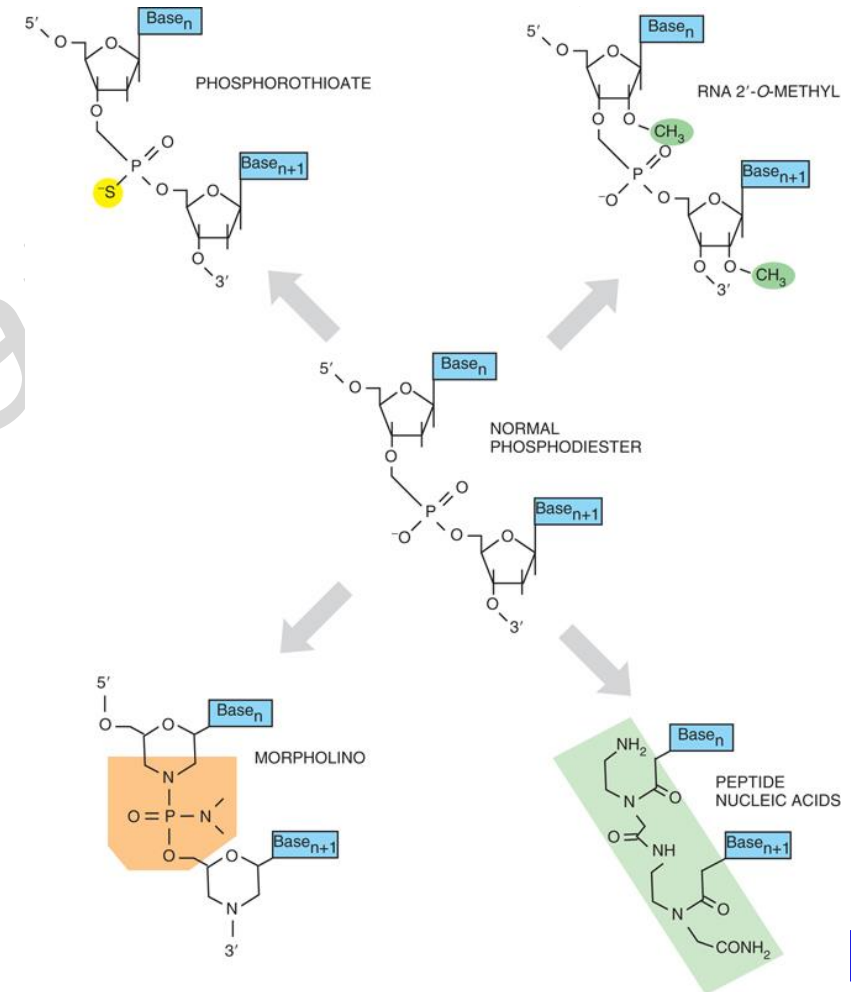
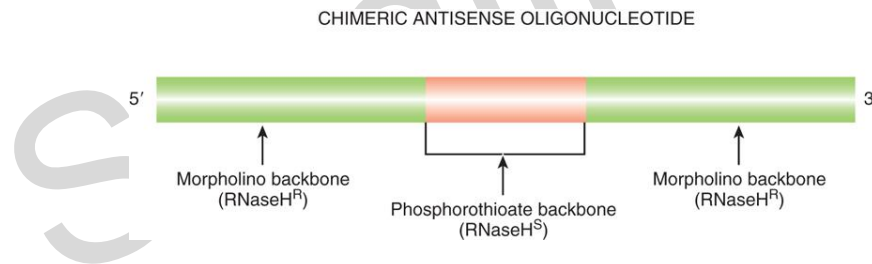
# Použití antisense RNA

- Dvě možné metody produkce:
  - chemická syntéza
  - klonování antisense RNA v opačném směru do vektoru = možná kontrola exprese
- Tvorba sekundárních struktur může vést ke ztrátě funkčnosti



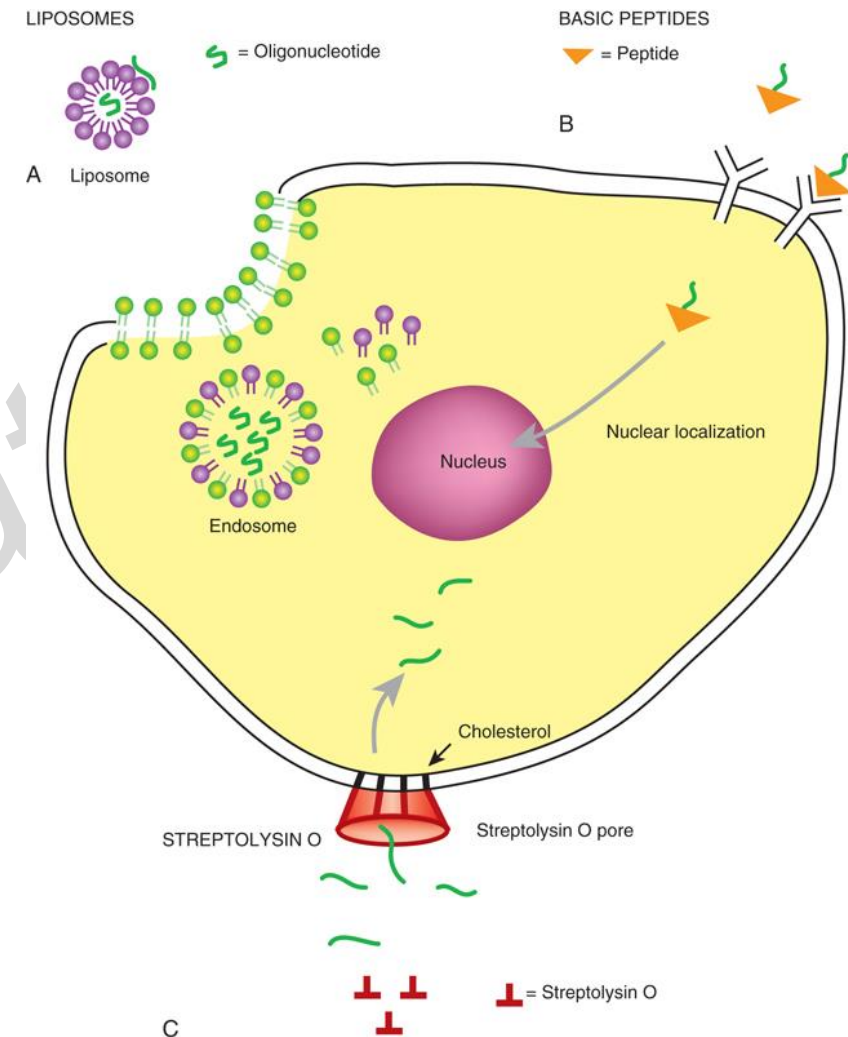
# Modifikace syntetických oligonukleotidů

- Zavádění chemických modifikací bazí pro zvýšení stability
- Použití různých strategií:
  - fosfor-thio oligonukleotid (rezistentní k degradaci DNasou)
  - morpholin-antisense nukleotid (rezistentní k DNase a RNase H)
  - přidání O-alkylu na 2'OH skupinu ribózy (rezistentní k DNase a RNase H)
  - použití PNAs (rezistentní k DNase a RNase H)
  - použití chimérických oligonukleotidů (rezistentní k DNase)



# Antisense terapie

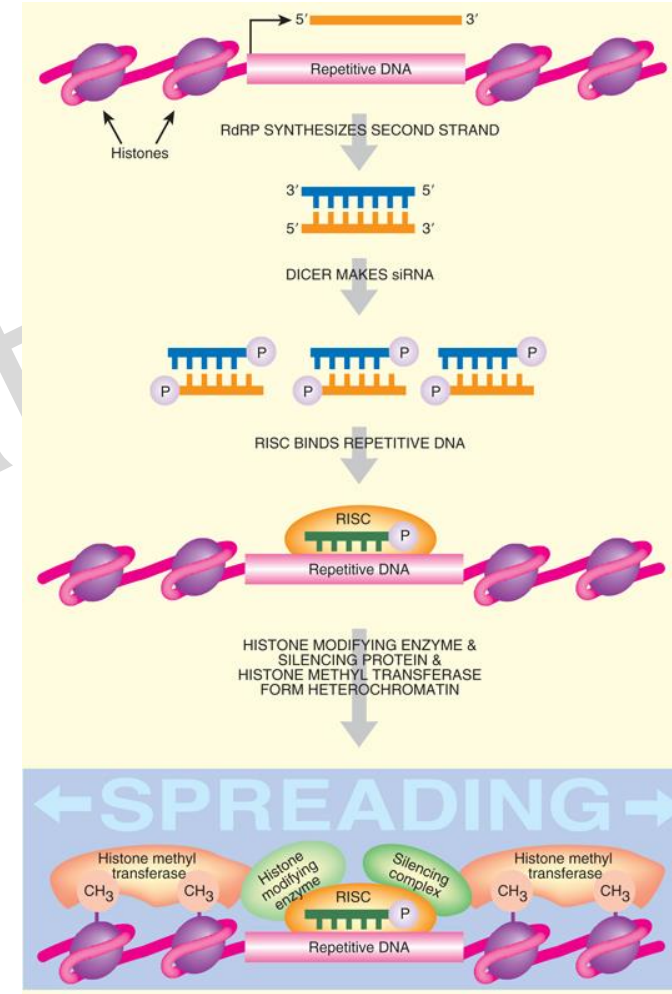
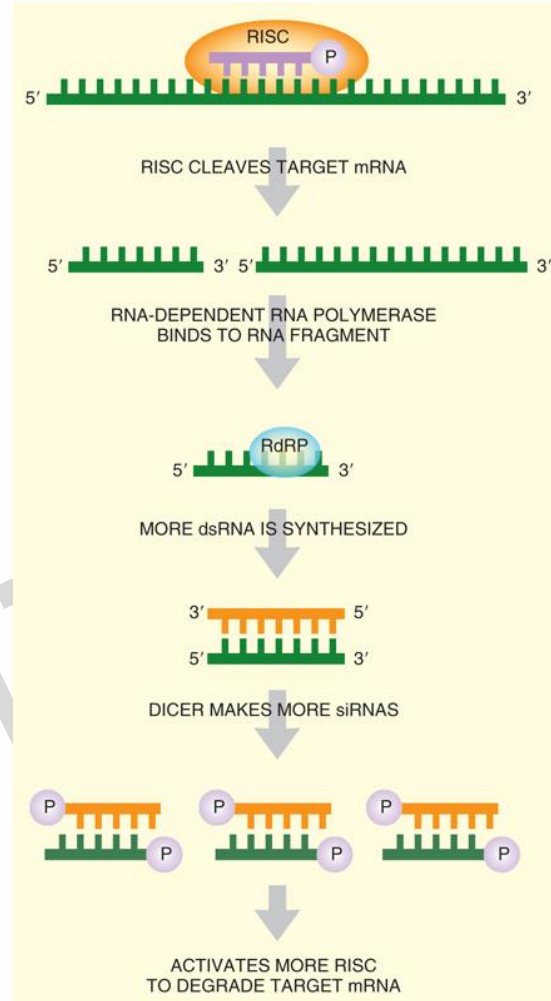
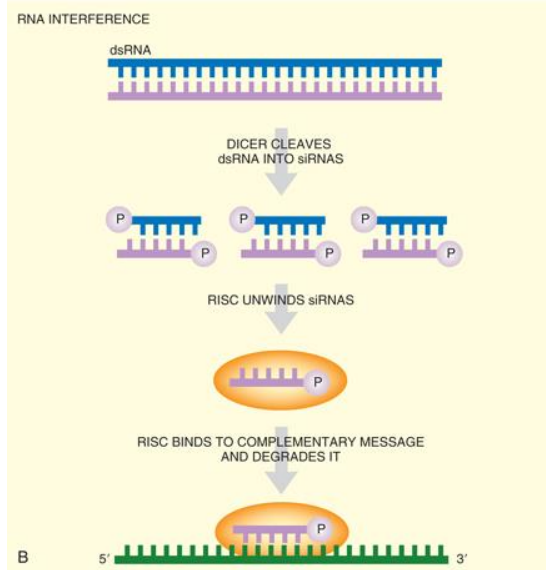
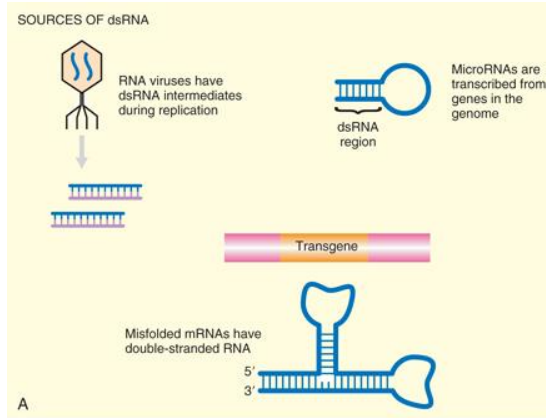
- Dostání oligonukleotidů do buňky vyžaduje speciální přístupy
- Existuje přirozený neznámý mechanismus vstupu oligonukleotidů do buňky = malá efektivita
- Možné použití několika technik:
  - použití liposomů (neutrální, kladně nabitě)
  - kationické polymery (poly-L-lysinem polyethylenimin)
  - přichycení na bazické peptidy (Tat protein, HA2 podjednotka viry chřipky)
  - použití streptolysinu O = tvorba pórů
  - mikroinjekce přímo do buňku
  - seškrábnutí buněk (poškození membrány)



# RNA interference

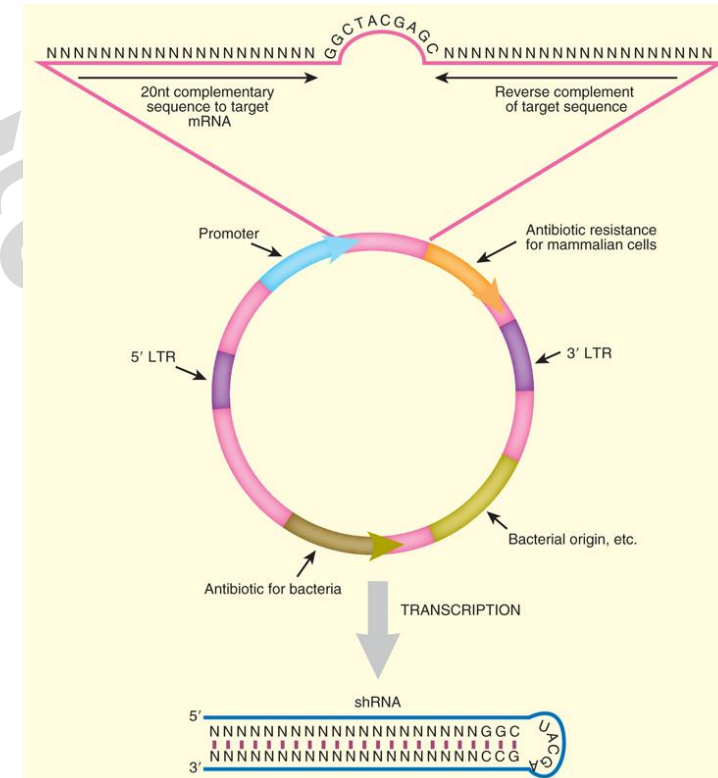
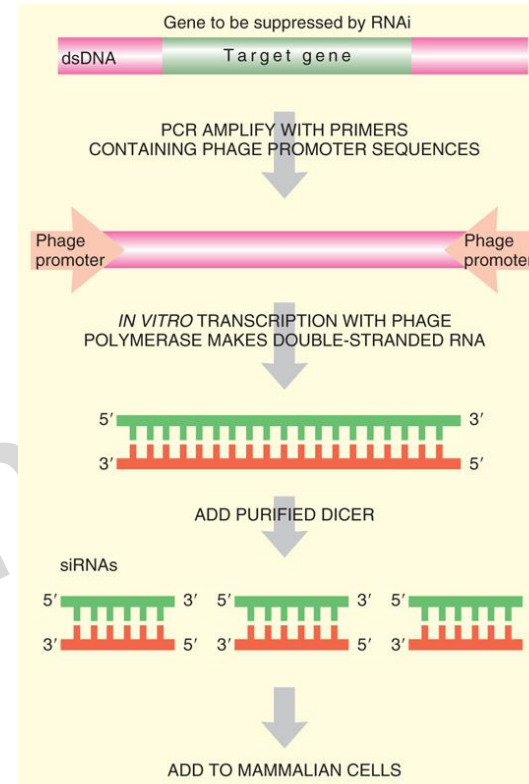
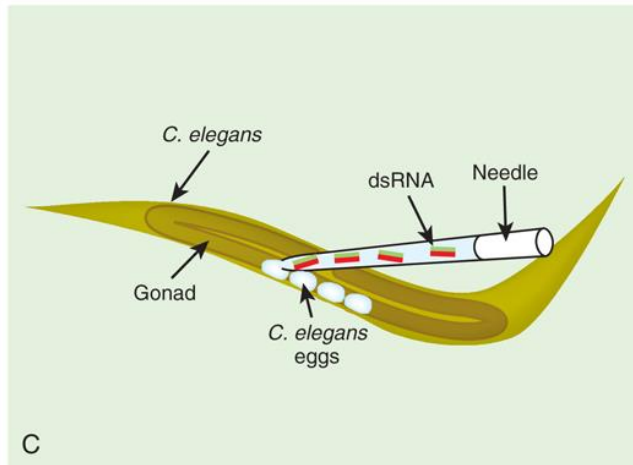
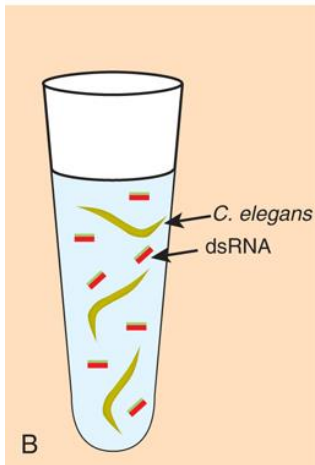
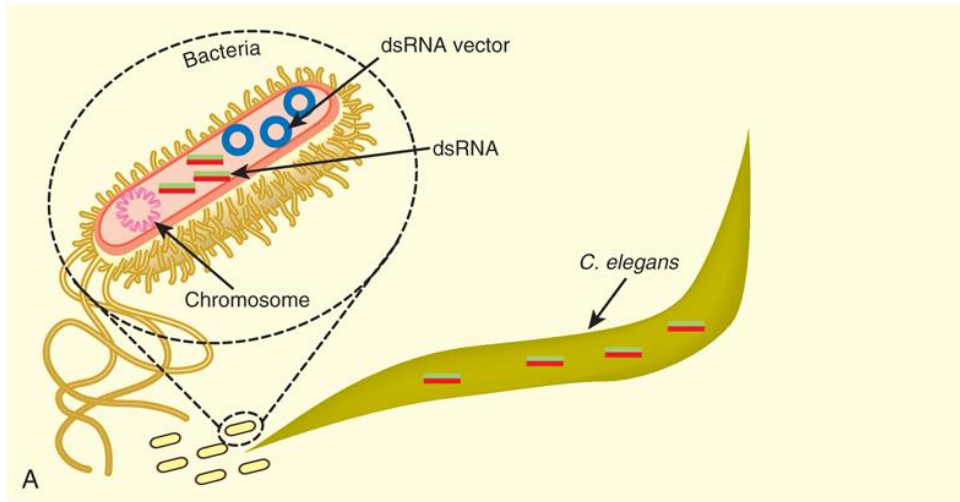
- RNA interference (RNAi) – dráha pro genovou regulaci, kde je krátký dvouřetězcový úsek RNA stimuluje enzymatickým komplex degradující mRNA
- RNAi je popsán u savců, rostlin, hub, červů, hmyzu
- RNAi rovněž zabraňuje přesunu transpozonů a je to ochrana před viry u rostlin
- RNAi má dvě stádia:
  - iniciační fáze = tvorba zkrácené dsRNA z virové dsRNA, gDNA, aberantního transkriptu = štěpení endonukleasou Dicer (RNasa z rodiny III, 21-23 nukleotidů) na siRNAs
  - efektorová fáze = přenos siRNA na RISC (RNA-induce silencing complex) a tvorba ssRNA = po rozpoznání cílové sekvence vazba proteinu z Argonaut (AGO) rodiny = štěpení mRNA
- Zesílení celého procesu pomocí RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRP) – méně než 50 kopií siRNA vede k úplné degradaci cílové mRNA

# RNA interference



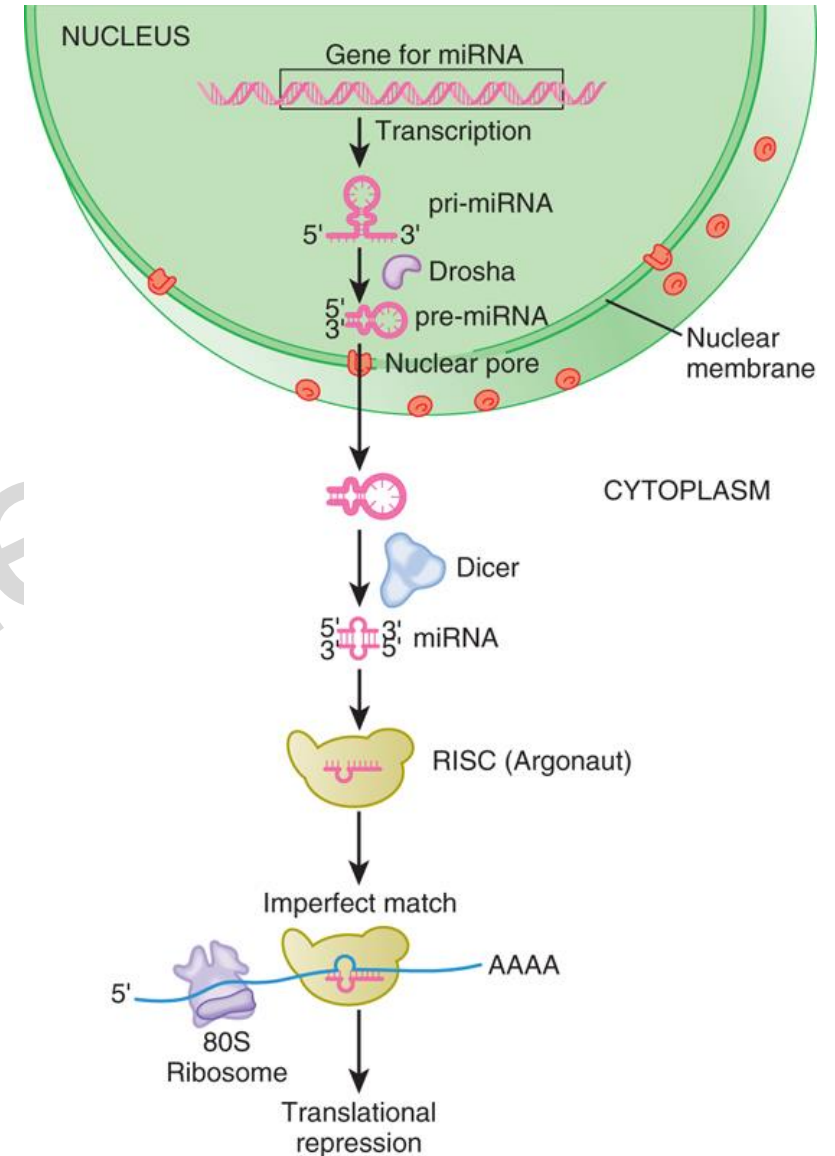


# Technologie RNAi u háďátka

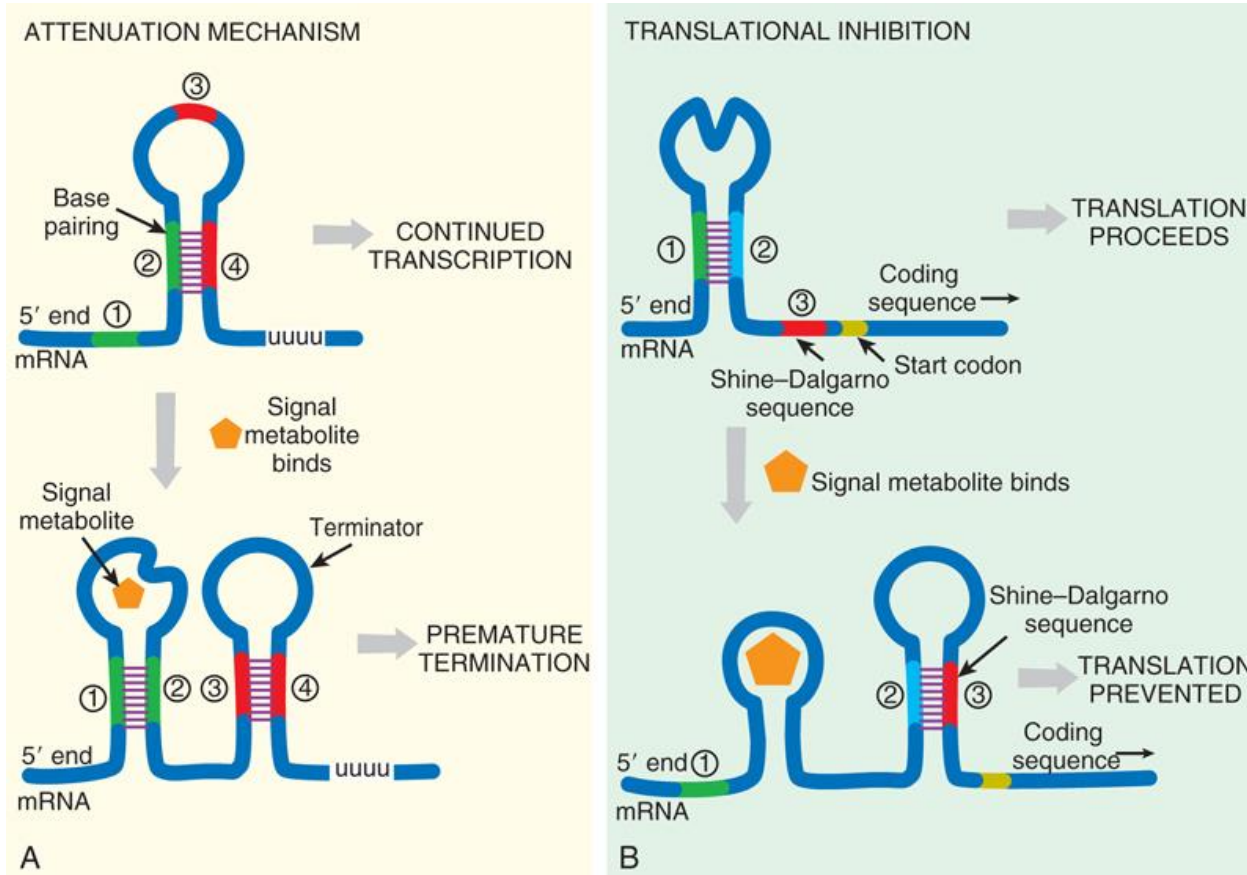


# Modulace genové exprese

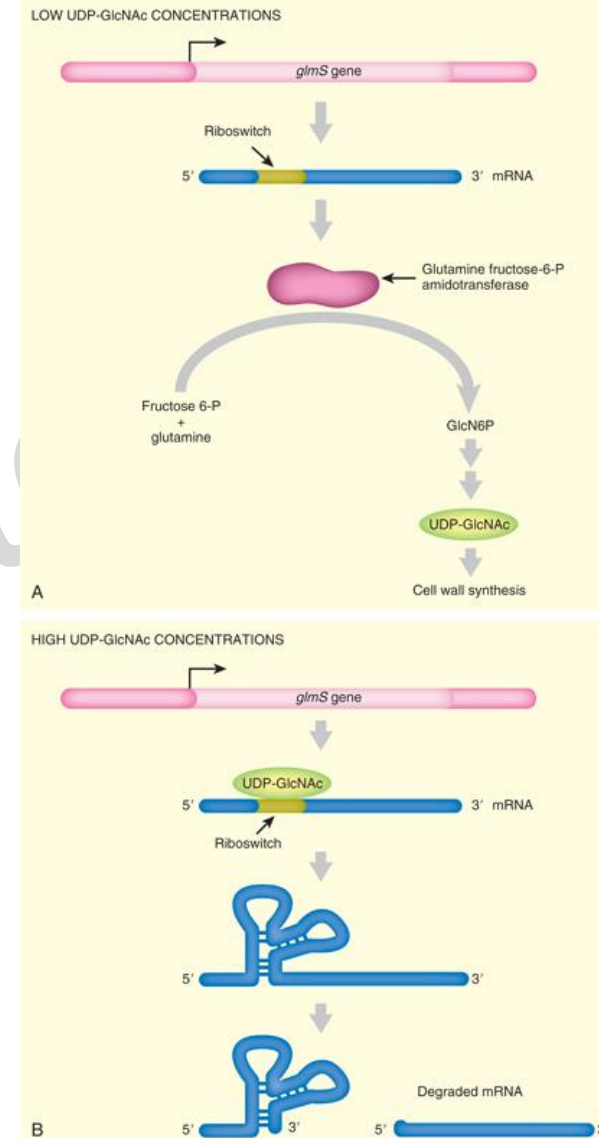
- MicroRNAs (miRNAs) mohou modulovat genovou expresi
- Popsáno prvně v rámci vývoje hádčátka
- miRNAs regulují genovou expresi blokadí translace
- miRNAs jsou dnes popsány u rostlin i člověka
- miRNAs blokují začátek translace nebo se váží na 3' UTR oblasti
- Prvně dochází k tvorbě prekurzorové pri-miRNAs (cca. 70 nukleotidů)
- Endonukleáza Drosha štěpí pri-microRNA na pre-miRNAs
- Enzym Dicer rozpoznává stem-loop strukturu a odštěpuje smyčku
- RISC komplex separuje řetězce od sebe



# Riboswitches



## Ribozyme Riboswitch with *B. subtilis*

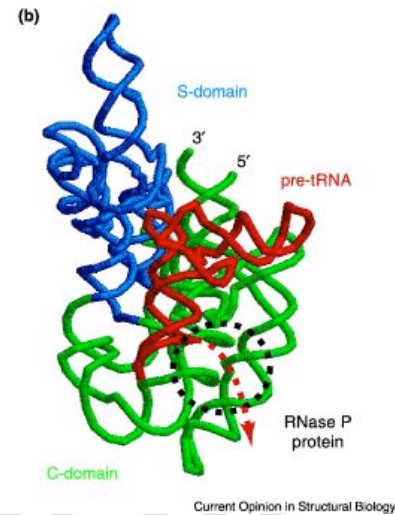
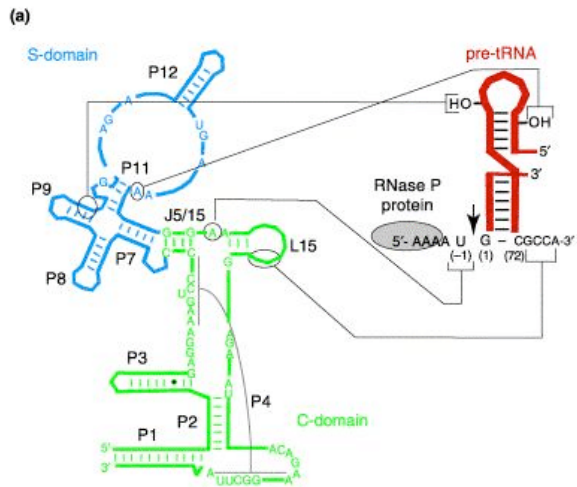


# Ribozymy

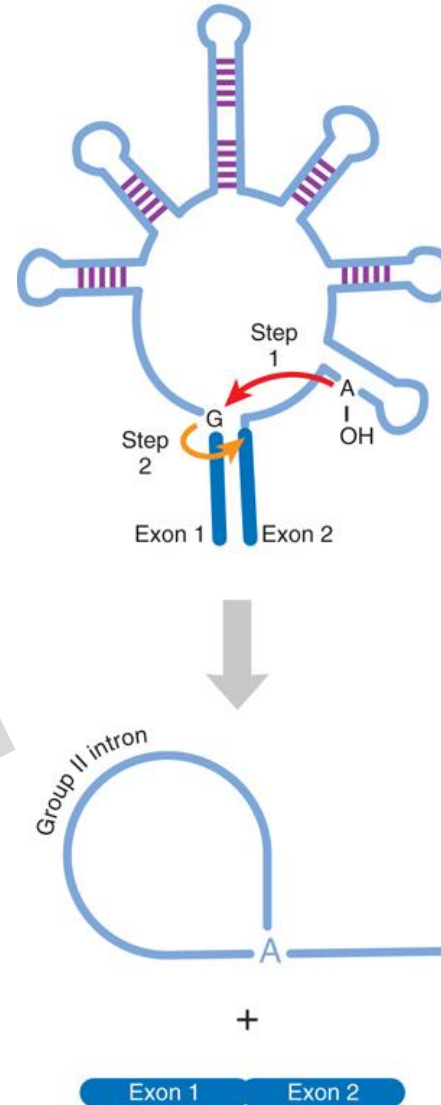


- RNA molekuly vázající se na specifické místo a katalyzující enzymatickou reakci
- Některé jsou asociované s proteiny
- V současné době popsáno osm základních tříd
- Velké ribozymy (stovky-3000 bp):
  - samosestřižné introny skupiny I *Tetrahymeny* (nálevník) - mitochondrie, chloroplasty, viry, jaderné rRNA geny)
  - samosestřižné introny skupiny II (mitochondrie, chloroplasty, řasy) – neseštrihují se in-vitro
  - Rnasa P u bakterií – asociace s proteinem, štěpení 5' konce pre-tRNA molekul
- Malé ribozymy (30-80 nukleotidů):
  - hammerhead a hairpin ribozymy (viroidy, virusoidy a satelitní viry)

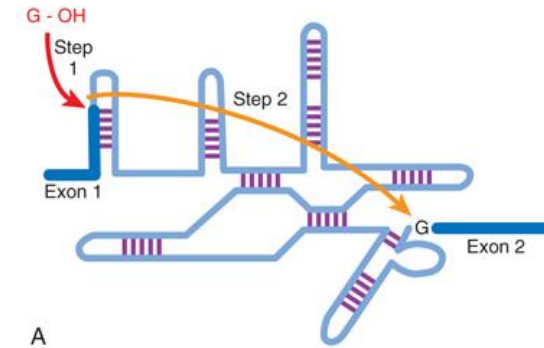
# Ribozymy



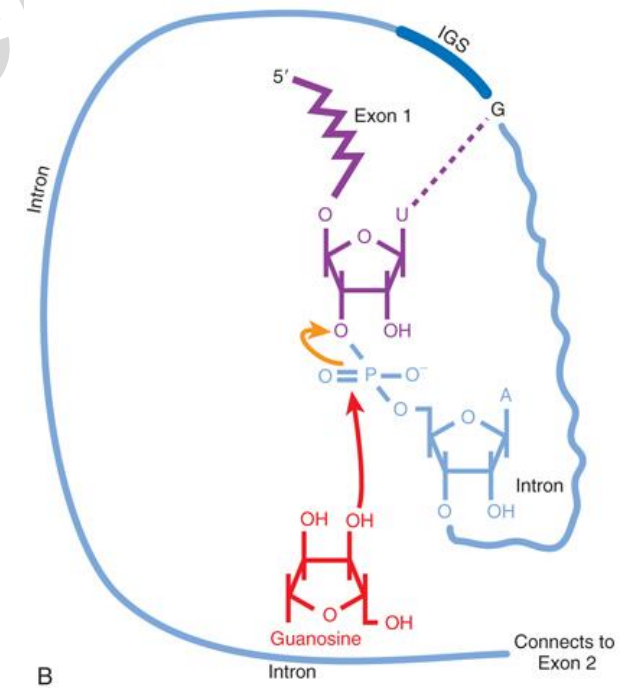
GROUP II SELF-SPLICING



GROUP I SELF-SPLICING

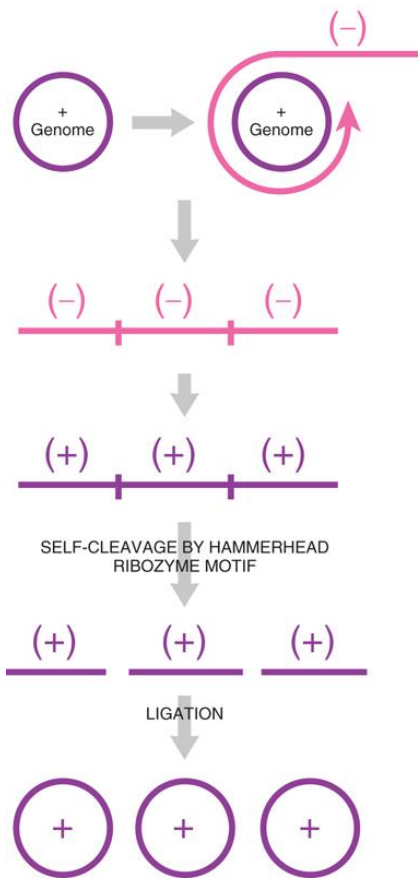


MECHANISM OF GROUP I RIBOZYME CLEAVAGE



# Ribozymy

## Hammerhead (Viroidy)



## Hairpin ribozym

