

Plan Wykładów do fakultetu

„MOLEKULARNE TECHNIKI ANALIZY RNA”

semestr zimowy 2016-17r. (piątek, 16:00, sala nr 7, gmach IBB PAN)

1. (07.10) „Świat RNA” cz. 1 – Joanna Kufel, IGiB UW.

Koncepcja „RNA world”, Noble w dziedzinie RNA. Katalityczne cząsteczki RNA – klasy, mechanizm, występowanie. SELEX. Pozostałości świata RNA - rybosom, splajosom, wirusy RNA. Różnorodność klas RNA u Eukaryota i ich metabolizm. Podstawowe mechanizmy regulacji ekspresji genów.

2. (14.10) „Świat RNA” cz. 2 – Joanna Kufel, IGiB UW.

3. (21.10) „Przegląd technik opartych o odwrotną transkrypcję. Techniki badania transkrypcji: TRO, ChIP, RIP i DIP. Analiza końców poliA RNA” – Michał Koper, IGiB UW.

Teoria odwrotnej transkrypcji (RT). Przegląd technik opartych o RT: RT-PCR w tym półilościowy, pulsacyjny RT-PCR, RACE, cRT-PCR, technika wydłużania startera ("primer extension"). Techniki badania nowopowstających transkryptów: jądrowy „Transcription Run-On”, immunoprecypitacja chromatinu (ChIP), immunoprecypitacja RNA (RiP). Do zilustrowania powyższych technik posłużą badania terminacji transkrypcji Polimerazy I RNA. Specyficzność wiązania DNA przez czynniki transkrypcyjne: „ChIP on chip”, immunoprecypitacja DNA (DIP). Badanie końców poliA RNA (technika PASE, izolacja frakcji RNA poliA⁺).

4. (28.10) „Biogeneza małych RNA (sRNA)” oraz „Rola chromatyny w regulacji ekspresji genów” – Monika Zakrzewska-Płaczek, IGiB UW. Podział sRNA ze względu na ich biogenezę i funkcje. Ścieżki syntezy sRNA. Udział sRNA w różnorodnych mechanizmach interferencji RNA u nicieni, ssaków i roślin. Struktury subjądrowe, budowa nukleosomu, histony i ich modyfikacje. Czynniki remodelujące chromatynę, czynniki transkrypcyjne. Rola stanów chromatyny – euchromatyny i heterochromatyny – w transkrypcji. Mechanizmy wyciszania transkrypcji: RNAi, antysensowny RNA. Kompleksy RNP biorące udział w wyciszaniu transkrypcji.

5. (04.11) „Inne niekodujące RNA (ncRNA)” cz. 2 – Joanna Kufel, IGiB UW.

6. (18.11) „PCR w czasie rzeczywistym (ilościowy; qPCR)” – Michał Koper, IGiB UW.

Teoria qPCR: sposoby detekcji DNA, podstawy projektowania starterów, sondy hybrydyzacyjne, wprowadzenie do obliczeń. Zastosowania: określanie poziomu badanych transkryptów w komórce, wykrywanie kwasów nukleinowych patogenów, detekcja pojedynczych mutacji (SNP). Dobra praktyka laboratoryjna przy doświadczeniach qPCR i najczęstsze „pułapki czekające” na eksperymentatorów.

7. (25.11) „RNA w neuronach” – Magdalena Dziembowska, CeNT UW.

Transport mRNA do wypustek komórek nerwowych i lokalna translacja w odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne. Metody wizualizacji mRNA z żywym neuronie w czasie rzeczywistym, hybrydyzacja *in situ*, metody biochemiczne pozwalające na bezpośrednią detekcję transkryptów ulegających lokalnej translacji w neuronach.

8. (02.12) „Udział metabolizmu RNA w procesach fizjologicznych” – Anna Golisz, IGiB UW.

Czynniki metabolizmu RNA i miRNA u roślin – rola w przekazywaniu sygnałów hormonalnych, rozwoju embrionalnym i generatywnym, zegarze dobowym, odporności na stres i patogeny.

9. (09.12) „Badanie enzymów metabolizmu RNA na przykładzie egzozomu” – Rafał Tomecki, IBB PAN/IGiB UW.

Ścieżki rozkładu RNA w organizmach eukariotycznych. Egzo- i endo- nukleazy. Egzozom: wielofunkcyjny i wieloskładnikowy kompleks. Badania strukturalne i funkcjonalne egzozomu u drożdży i w komórkach ludzkich. Mechanizm działania, współpraca aktywności egzo- i endo-nukleolitycznej.

10. (16.12) „Struktura RNA a funkcja. Mapowanie struktury RNA *in vitro*. Metody badania transkryptomów” – Michał Koper, IGiB UW. Mapowanie struktury RNA *in vitro*: sondy molekularne trawiące specyficznie względem struktury i sekwencji RNA. Przełączniki RNA i aptamery – naturalne oraz wyselekcjonowane na potrzeby leków lub biosensorów. Wysokoprzepustowe metody badania transkryptomów oparte o techniki sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq, ChIP-seq).

11. (13.01) „Metody badań strukturalnych RNA” – Marcin Nowotny, IICMB.

Metody badania struktur kompleksów RNA-białko, metody krystalizacji kompleksów RNP (na przykładzie rybosomu, snRNP, RNazy H). Porównanie krystalografii i badań NMR dla RNA. Technika SAXS. Chemiczne (SHAPE) i bioinformatyczne przewidywanie struktur RNA.

12. (20.01) „Globalne analizy kompleksów rybonukleoproteinowych” – Joanna Kufel, IGiB UW.

Metody biochemiczne czyszczenia kompleksów rybonukleoproteinowych (RNP). Drożdżowy system trzyhybrydowy. Chromatografia RNA w połączeniu ze spektroskopią mas. CRAC („crosslinking and analysis of cRNA”) i CLIP („crosslinking and immunoprecipitation”).

13. (27.01) „RNowe nowości” – Joanna Kufel, IGiB UW.

Nowe klasy ncRNA. RNAi u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*? Fragmenty RNA powstałe z rozkładu stabilnych RNA. Nietypowe funkcje RNP.

Plan zajęć do fakultetu

„MOLEKULARNE TECHNIKI ANALIZY RNA”

semestr zimowy 2016-17r.

(gr. 1 poniedziałki, 10:15-13.30; gr. 2 czwartki, 10:15-13.30; sala nr 129, gmach IBB PAN)

1. **03 i 06.10.** Podstawy pracy z RNA. Izolacja RNA z drożdży i z roślin.
2. **10 i 13.10.** Ocena jakości RNA. Rozdział w żelach. Radioizotopowe i fluorescencyjne metody detekcji RNA. Detekcja rybosomalnego RNA (rRNA) u drożdży i roślin: technika Northern-blot (1) z rozdziałem RNA w żelu agarozowym.
3. **17 i 20.10.** Technika Northern-blot (1): hybrydyzacja z sondą oligonukleotydową znakowaną radioizotopowo kinazą lub oligonukleotydami znakowanymi fluorescencyjnie. Wirtualny Northern-blot. Detekcja miRNA u roślin - wprowadzenie.
4. **24 i 27.10.** Analiza wyników Northern-blot (1) (skan i omówienie). Wykrywanie transkryptów CUT u drożdży: technika Northern-blot (2) z rozdziałem RNA w żelu poliakrylamidowym. Detekcja miRNA u roślin: reakcja RT.
5. **03 i 07.11.** Detekcja miRNA u roślin: reakcja PCR na matrycy cDNA, analiza produktów w żelu agarozowym. Detekcja CUT u drożdży: znakowanie sondy metodą "random-priming" i hybrydyzacja.
6. **10 i 14.11.** Detekcja CUT u drożdży: omówienie wyników hybrydyzacji Northern-blot (2). Analiza 3' końców małych jąderkowych RNA (snoRNA) przy pomocy cRT-PCR. Cięcie Rnazą H dupleksów RNA-oligonukleotyd i ligacja (cyrkularyzacja) RNA.
7. **17 i 21.11.** Analiza 3' końców snoRNA: RT + PCR.
8. **24 i 28.11.** cRT-PCR: rozdział produktów w żelu i omówienie ich sekwencjonowania. Wykrywanie prekursorów i dojrzałych mRNA metodą RT-qPCR. Przeprowadzenie RT. Projektowanie starterów do qPCR - teoria i praktyka. Konkurs na najwydajniejszą parę starterów, tzn. każdy student zaprojektuje przynajmniej 1 parę starterów, która zostanie zamówiona i przetestowana na następnych zajęciach.
9. **01 i 05.12.** Przeprowadzenie reakcji qPCR: testowanie zaprojektowanych starterów dla genów referencyjnych. Projektowanie amiRNA.
10. **08 i 12.12.** Analiza wyników reakcji qPCR.
11. **15 i 19.12.** System CRISPR/Cas.
12. **09 i 12.01.** Oznaczenia biochemiczne aktywności enzymów degradujących RNA. Analiza aktywności rybonukleolitycznych różnych wersji białka Dis3 - głównej podjednostki katalitycznej kompleksu egzozomu; badanie wrażliwości aktywności egzorybonukleolitycznej 5'-3' białka Xrn1 na status fosforylacji końca 5' substratu; reakcje degradacji syntetycznych oligonukleotydów RNA znakowanych fluorescencyjnie, rozdział produktów reakcji w denaturującym żelu poliakryloamidowym.
13. **16 i 19.01.** Oznaczenia biochemiczne aktywności enzymów degradujących RNA - analiza wyników. Oddziaływania białka - kwasy nukleinowe. Wiązania drożdżowego białka Reb1 z rDNA. Fluorescencyjny "gel-shift" (inkubacja prób, rozdział w natywnym żelu poliakrylamidowym).
14. **23 i 26.01.** Prezentacje studentów na zaliczenie ćwiczeń.

Zasady zaliczenia przedmiotu

Ćwiczenia: na podstawie prac domowych oraz prezentacji dotyczących wybranych technik badania RNA.

Cały przedmiot: egzamin pisemny (pytania testowe).

Koordynator przedmiotu:

Michał Koper
mkoper@ibb.waw.pl