Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT); Analiza konców RNA; Techniki badania transkrypcji

Michał Koper, IGiB UW

RNA steady-state level = equilibrium between transcription, processing, and degradation

Sposoby badania transkryptów

Obecność w komórce
(*Steady state transcript*):

- Technika northern-blot
- RT-PCR
- RT-qPCR
- SAGE (serial analysis of gene expression)
- Mikromacierze
- Hybrydyzacja *in situ* (tech. mikroskopowa)
- RNAseq: Wysokoprzepustowe sekw. transkryptomów

Badania *in statu nascendi*
(*Nascent transcript*):

- TRO (Transcription Run-On)
- FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching; tech. mikroskopowa)
- GRO-Seq (Global Run-On Sequencing)

Badania oddziaływań białek–DNA/RNA *in vivo* :

- ChIP (ImmunoPrecypitacja Chroamtyny), np. obecność Pol RNA na genie; oddz. TFs – DNA; „ChIP on CHIP”
- RIP (ImmunoPrecypitacja RNA), np. oddziaływania białek RRM z RNA
- DIP (ImmunoPrecypitacja DNA)
- CLIP (*in vivo Cross-Linking and ImmunoPrecipitation; kompleksy RNA-białka*)

Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Odkrycie odwrotnej transkryptazy

Nagroda Nobla z Medycyny i Fizjologii 1975

Howard M. Temin

David Baltimore

Renato Dulbecco

DNA

↓ ↑ **RT**

RNA

↓

BIAŁKO

(wirusy onkogenne)

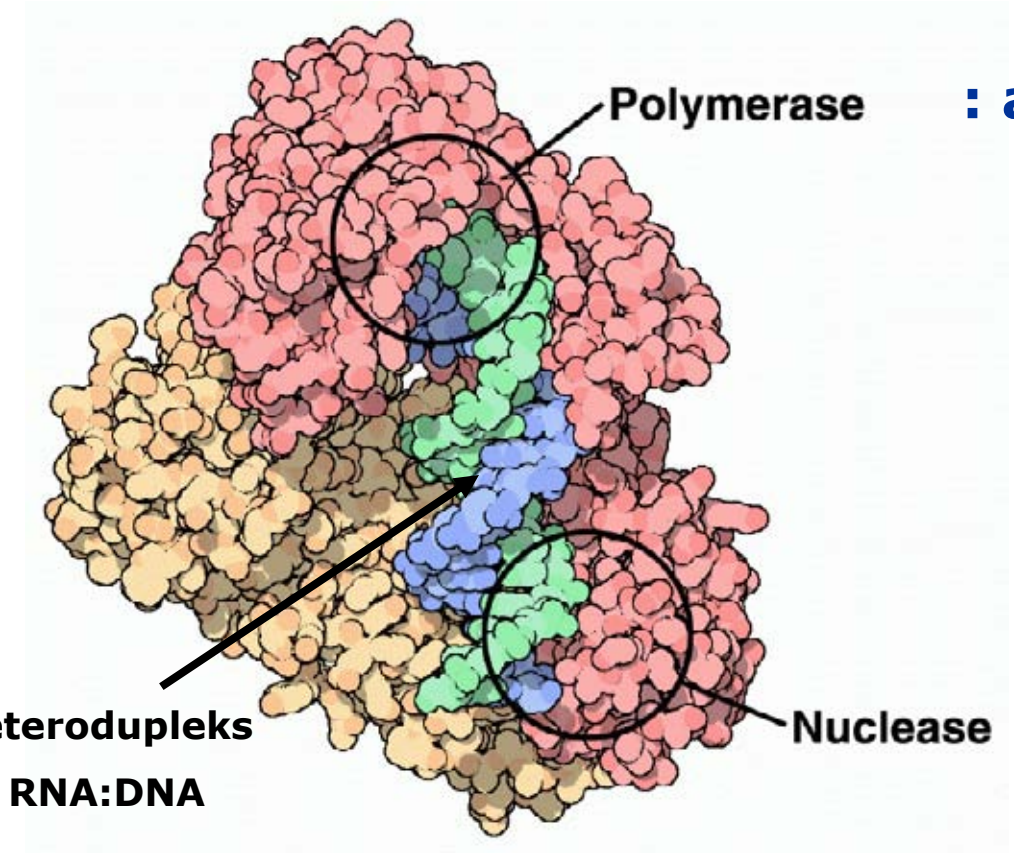
RNA ZALEŻNA POLIMERAZA DNA

Temin, H. M., and S. Mizutani. 1970. **RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus**. Nature 226: 12 1 l-l 2 13.

Odwrotna transkryptaza: 2 enzymy w 1

HIV-1 RT

(heterodimer)



: aktywność RNA zależnej polimerazy DNA

(i DNA zależnej Pol DNA)

: aktywność RNazyH

***Ding J**. i wsp., 1998, J. Mol. Biol. 284; 1095-1111*

RT wymaga startera do rozpoczęcia syntezy DNA

startery
genowo-specyficzne

startery oligodT,
mogą być „kotwiczone”
tzn. TTTTTTTTTT(A/C/G)

krótkie startery losowe
np. heksamery, oktamery

Zastosowania odwrotnej transkrypcji

OZNACZENIA JAKOŚCIOWE:

- **poznawanie struktury genów (introny)**
- **wyznaczanie 5’ końców RNA**
- **analiza budowy 3’ końców**
- **wykrywanie ekspresji konstruktów**

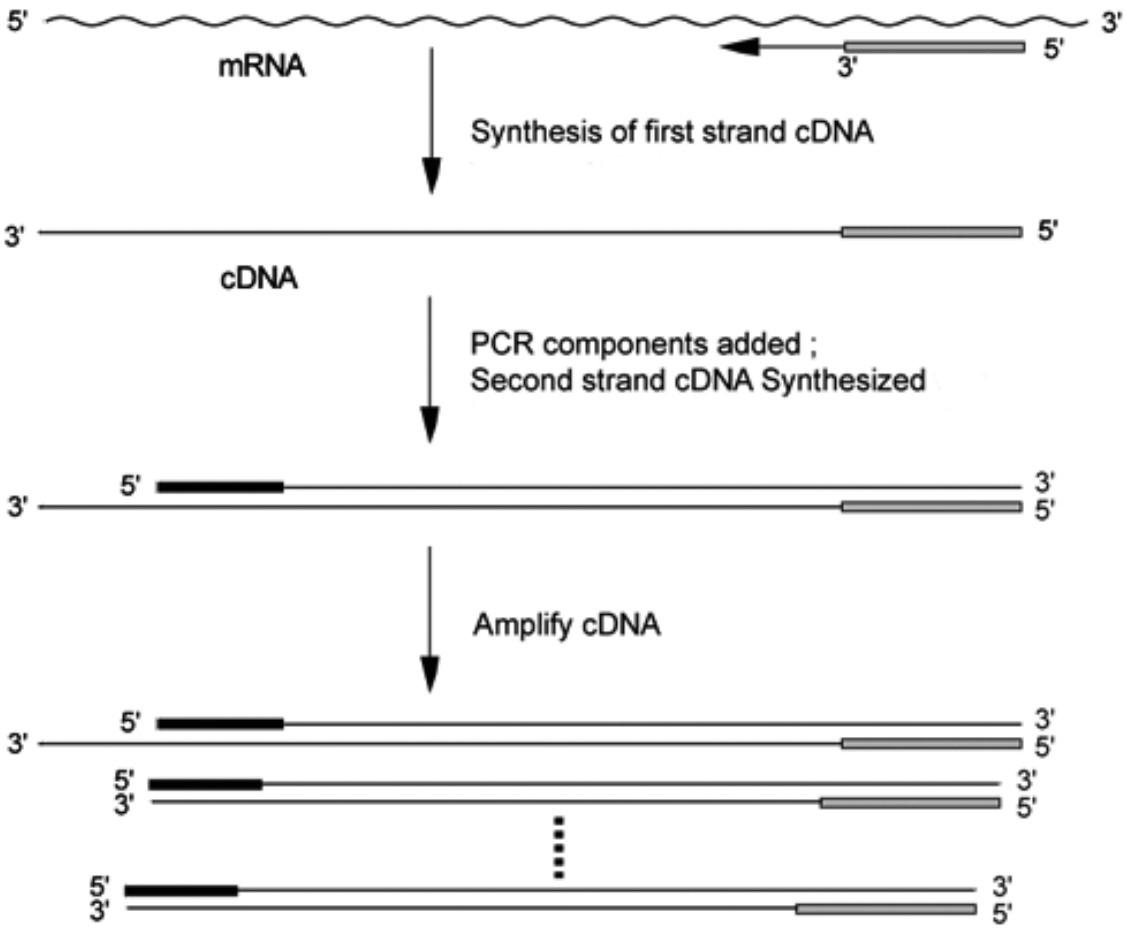
OZNACZENIA ILOŚĆIOWE:

- **semiq RT-PCR**
- **RT-qPCR**

Sekwencjonowanie transkryptomów

Zastosowania odwrotnej transkrypcji

RT-PCR



Oznaczenia ilościowe:

- semiq RT-PCR
- RT-qPCR

Aktywność RNazy H RT dzikiego typu

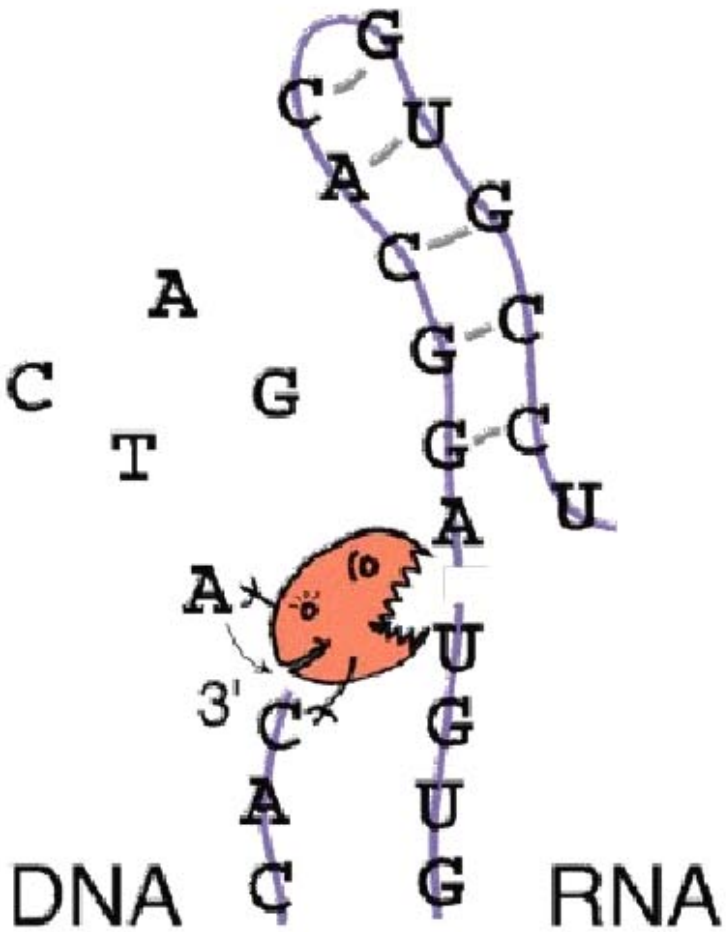
Odpowiedzialna za:

- ***usuwanie hybryd DNA:RNA***
- ***generowanie starterów PPT***
- ***usuwanie starterów tRNA i PPT***

Szczególnie aktywna w miejscach gdzie RNA przyjmuje strukturę 2-rzędową a RT zwalnia.

W części dostępnych komercyjnie RT aktywność

obniżono lub usunięto.



Za TATA Biocenter

Właściwości różnych RT

	Temp
MMLV RNase H- Minus (Promega, Germany)	37
M-MLV (Promega)	45
Avian Myeloblastosis Virus (AMV) (Promega)	37
Improm-II (Promega)	45
Omniscript (Qiagen, Germany)	37
cloned AMV (cAMV) (Invitrogen, Germany)	45
ThermoScript RNase H- (Invitrogen)	50
SuperScript III RNase H- (Invitrogen)	50

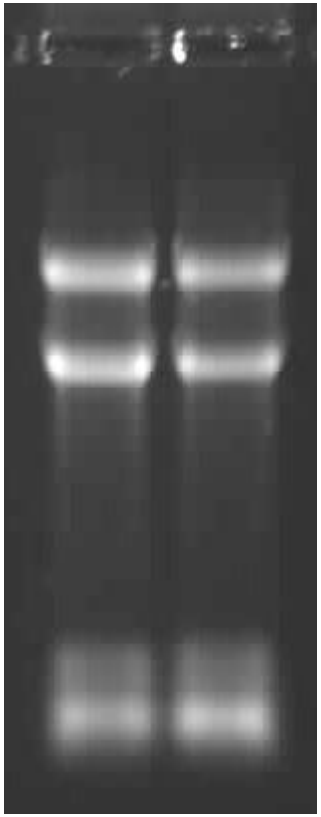
Sthalberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

AMV: wirus ptasiej białaczki
MMLV: wirus mysiej białaczki Moloneya

DOBRA PRAKTYKA LABORATORYJNA NA KAŻDYM ETAPIE PRACY Z RNA!

Inkubacja z DNazą, 1h 37° C

- +



Dla RT jest kluczowa jakość RNA!

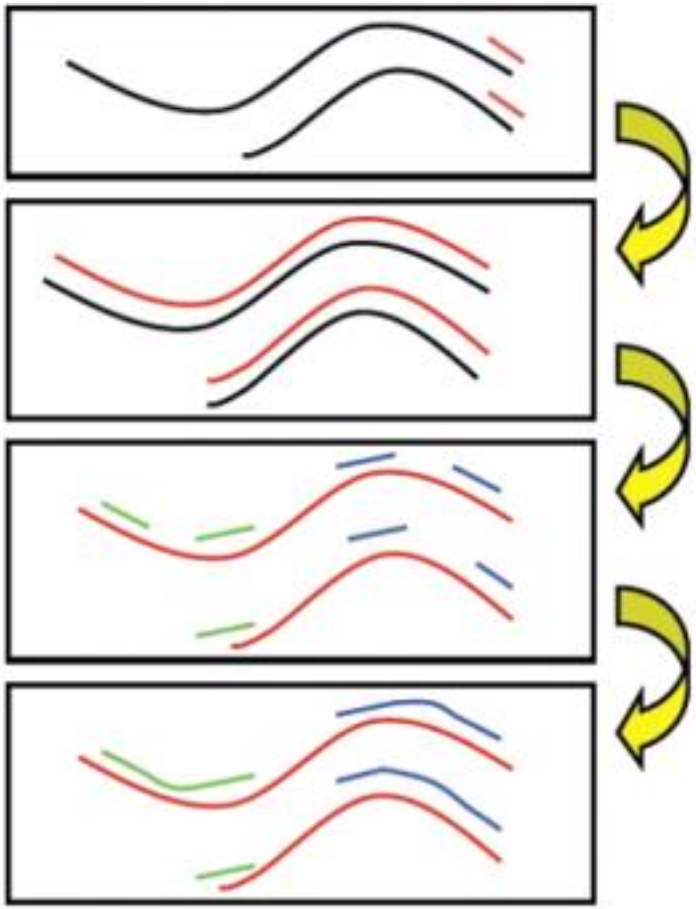
Konieczna kontrola jakości RNA po izolacji!

Zawsze konieczne DNazowanie prób!

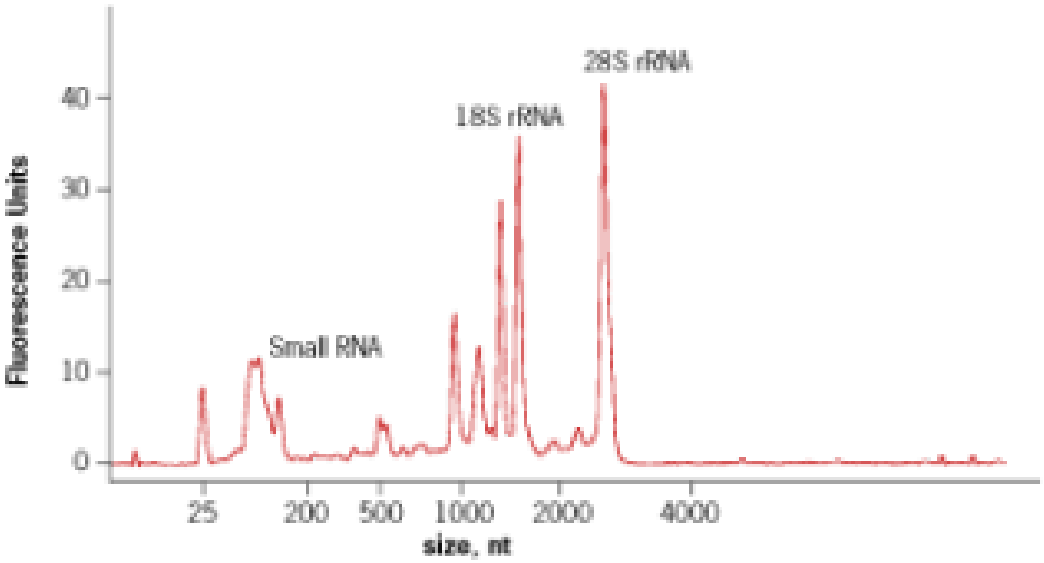
Zalecane stosowanie inhibitorów RNaz!

Ocena jakość RNA

Test integralności końców 5’-3’ RNA



Analizatory mikrocieczowe



- **Biorad: Experion**
- **Agilent: Bioanalyzer, Tapestation**
- **Elektroforeza kapilarna**

Wydajność i specyficzność RT

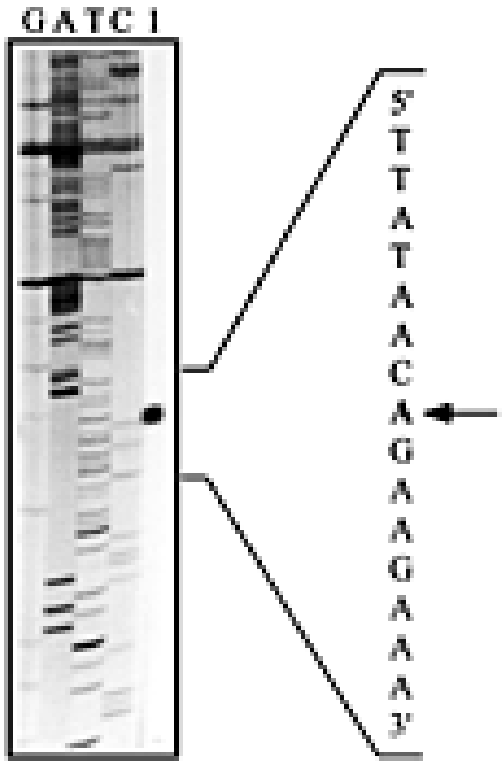
Specyficzność i wydajność reakcji odwrotnej transkrypcji SILNIE zależy od:

- **Metody startowania (primowania) reakcji.**
- **Rodzaju odwrotnej transkryptazy (cech enzymu).**
- **Sekwencji DANEJ cząsteczki RNA, w szczególności od struktur 2-rzędowych w jej obrębie.**
- **Różnice wydajności mogą sięgać nawet 100X!!!**
- **Optymalne warunki RT zawsze należy wyznaczyć eksperymentalnie.**

Analiza końców 5’ i 3’ RNA

Technika „wydłużania startera”

Wyznaczanie miejsca startu transkrypcji (ang. „primer extension”)



T.-R. Lee, H.-P. Hsu, and G.-C. Shaw, 2001, J. Biochem. Vol. 130, pp. 569-574

Przyłączanie (znakowanego radioaktywnie) GS startera do końca 5’

↓

Odwrotna transkrypcja

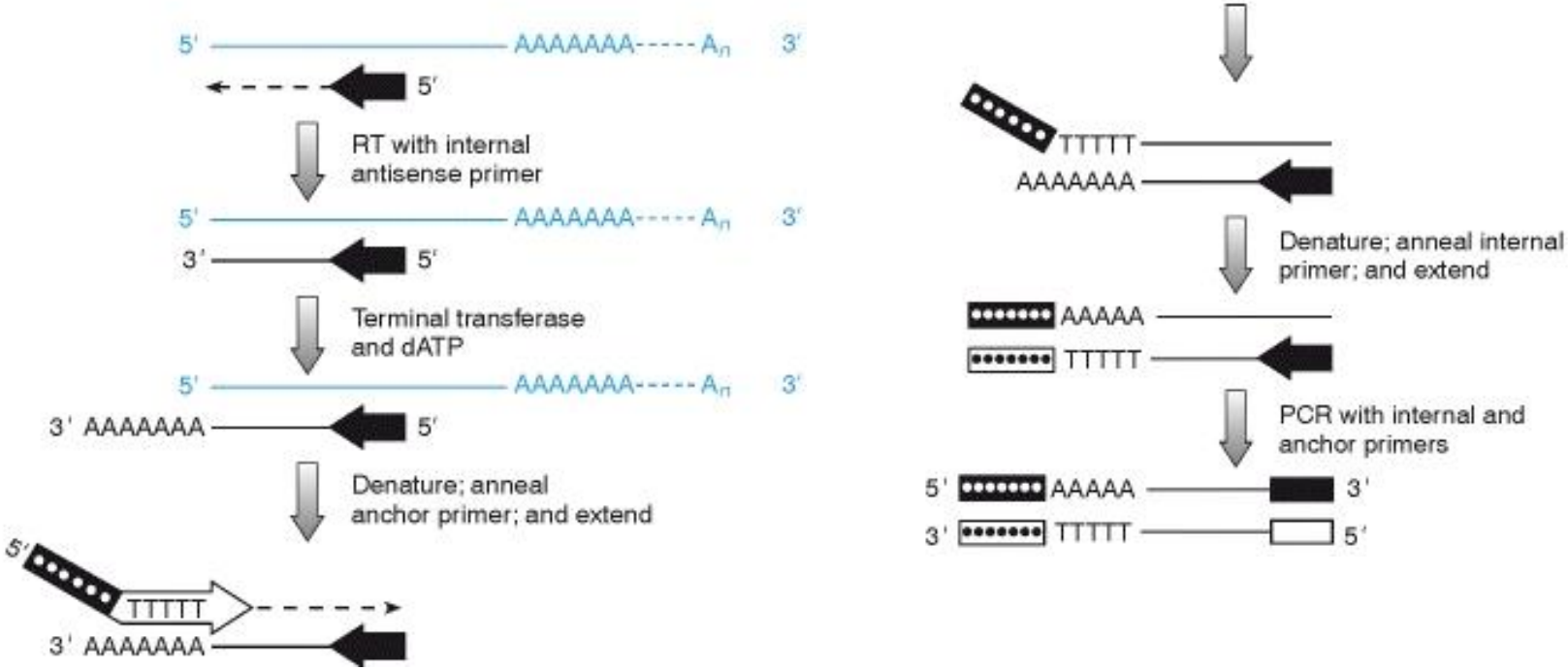
↓

Rozdział w żelu poliakrylamidowym razem z reakcjami sekwencjonowania prowadzonymi z tego samego startera

Analiza końców 5’ RNA – 5’ RACE

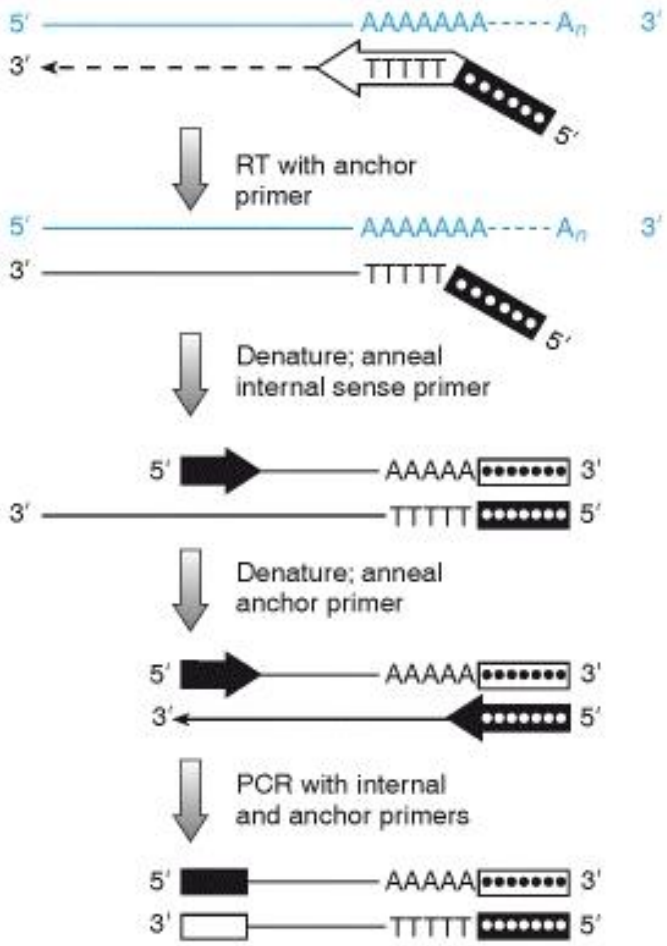
Rapid Amplification of 5’cDNA Ends

jednostronny PCR
zakotwiczony PCR

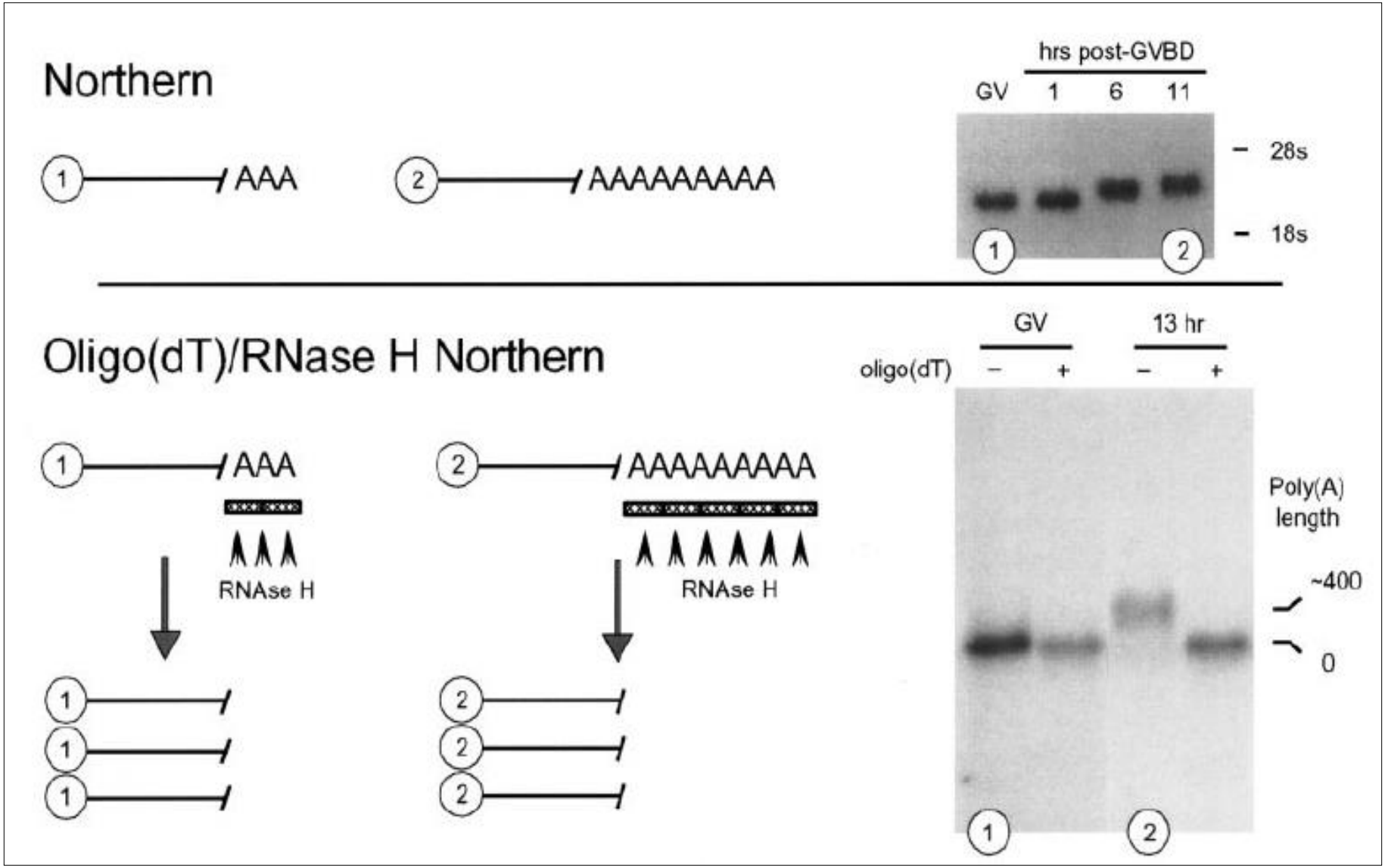


Analiza końców 3’ poliadelynowanych RNA – 3’ RACE

Rapid Amplification of 3’cDNA Ends

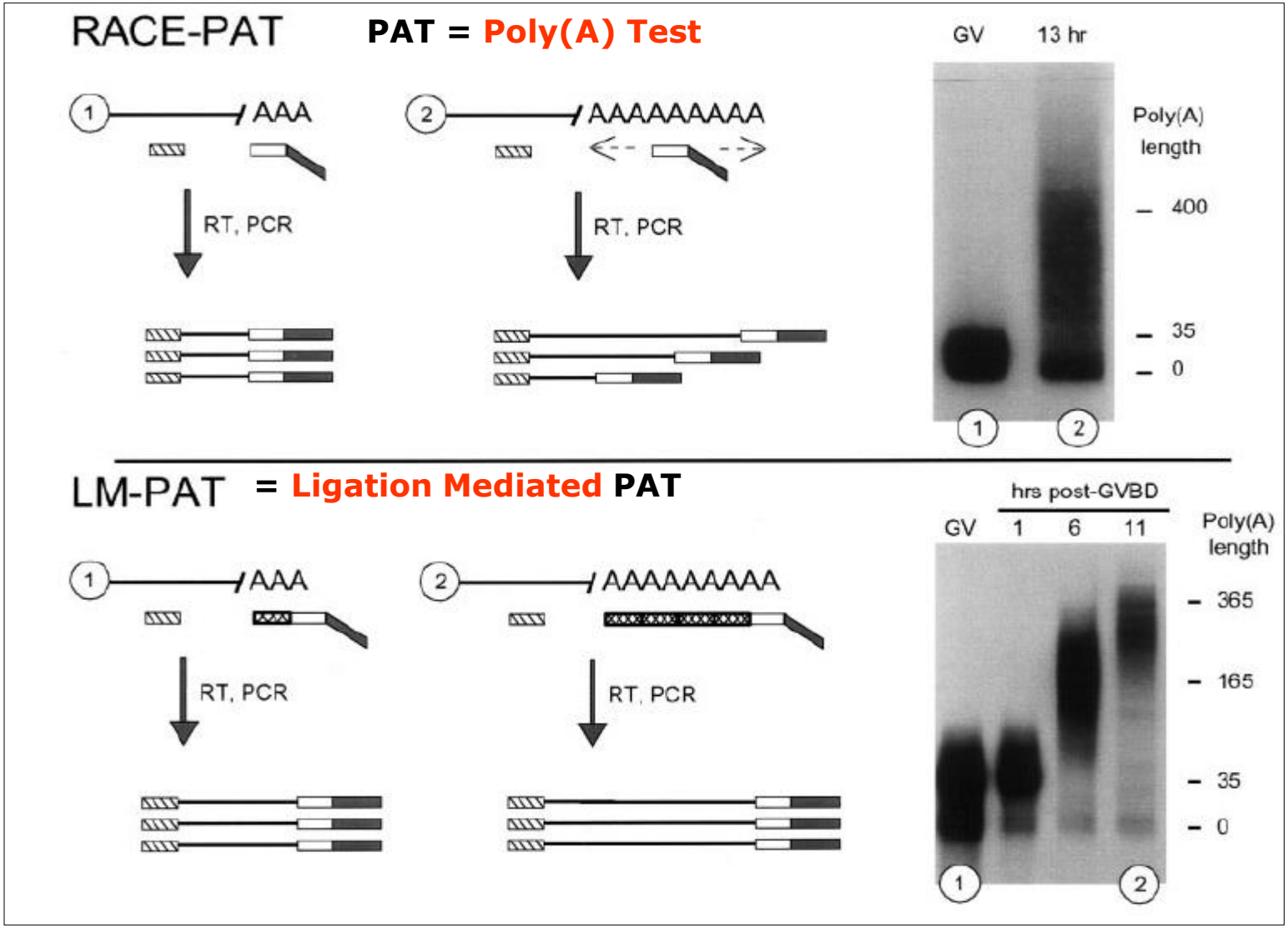


Metody analizy końców poliA - 1

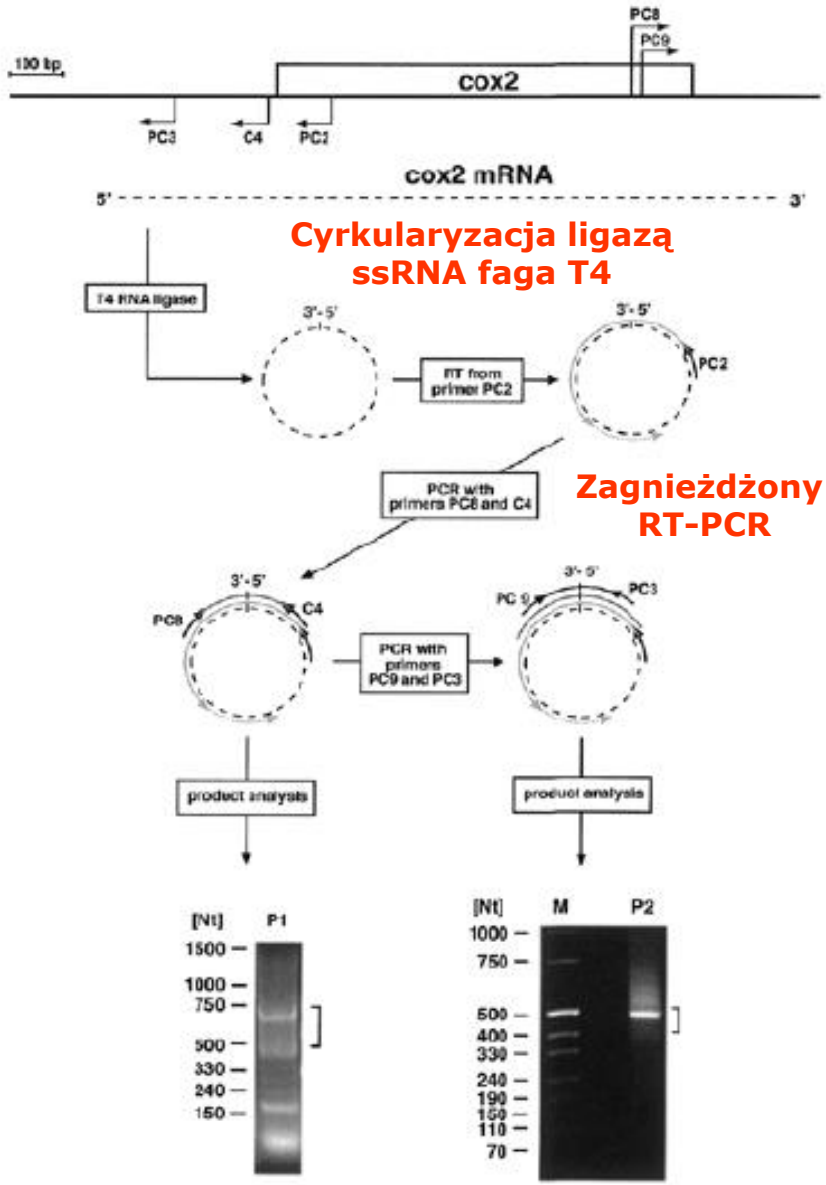


Sallés et al., Methods, 1999

Metody analizy końców poliA - 2



Cyrkularny RT-PCR (cRT-PCR)



Analiza 5' i 3' końców mitochondrialnego transkryptu COX2 u roślin

Khun i Binder, NAR, 2002.

1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	AGAAAGAA....
3	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	GATAGAAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	TAGAAAGA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	AGAAAGAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	AGAATCGT....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	ATCGTTCA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	TCGTTCAG....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	ATCACGTA....
2	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	TCGTTCAG....
2	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	TAGGCTAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	GTAGGCTA....
Σ 15		

Cyrkularny RT-PCR (cRT-PCR) cd.

- **Ligaza RNA liguje cząsteczki RNA pozbawione czapeczki na końcu 5′**
- **Gdy badamy cząsteczki z czapeczką, aby wykryć RNA należy czapeczkę usunąć**
- **Czapeczkę można usunąć enzymami hydrolizującymi wiązania P-P np. bakteryjną 5´pyrofosfohydrolazą RNA RppH (NEB) lub roślinną kwaśną pirofosfatazą Cap-Clip (CellScript) (niegdyś kwaśną pirofosfatazą z tytoniu TAP, obecnie nie produkowaną) lub trawiąc dupleksy RNA-DNA RNazą H (ma sens gdy RNA jest wysoko eksprymowany, znamy dokładnie 5′ koniec transkryptu i nie interesują nas alternatywne 5′ końce)**

Techniki badania transkrypcji

Technika
„Transcription Run ON”

Transcription Run-On (TRO)

early log-phase yeast culture

↓

sarkosyl treatment
- permeabilize cells
- inhibit transcription initiation

↓

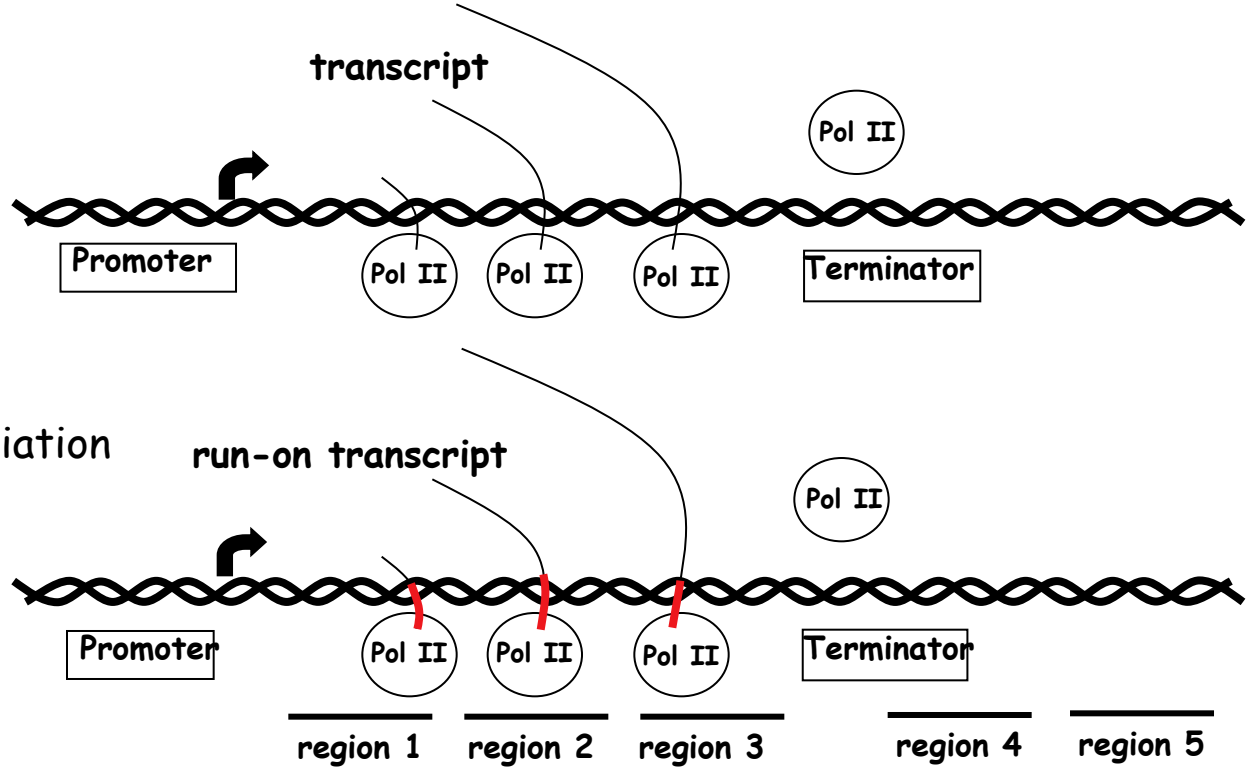
transcription reaction with ^{32}P-UTP

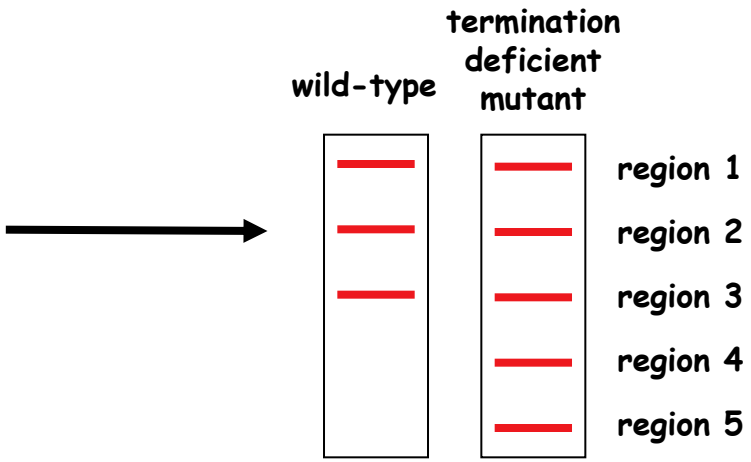
↓

RNA extraction

↓

hybridize RNA to single strand DNA probes relative to different regions on the gene of interest





Dzięki uprzejmości B. Dichtla

Sondy stosowane w TRO

Sondy o długości od ok. 70 do 400 nt., antysensowne dla badanych transkryptów:

- **ssDNA otrzymany z fagmidów pochodnych M13 ze sklonowanymi fragmentami badanych genów**
- **Oligonukleotydy (zwykle 70-85 nt)**
- **RNA transkrybowany *in vitro* (np. z promotora T7)**
- **Produkty PCR**
- **Całe plazmidy dsDNA**

Przygotowanie filtrów do TRO

Standardowe membrany nylonowe dla kwasów nukleinowych np. *Amersham Hybond N.*

Nanoszenie próżniowe np. *Bio-Rad slot/dot blotter.*

Ilości nakładanych sond zależą od poziomów ekspresji badanych transkryptów, np. dla ACT1, 25s czy 18s rRNA – 5 µg oligonukletydów 75 nt. lub 5 µg sond ssDNA M13 (ok. 250 nt.).

Wykonanie TRO – transkrypcja *in vivo*

Dla drożdży, zmodyfikowano za Birse et al., Science 280 (1998):

Hodowla komórek do OD_{600} ~ 0,2-0,3 (0,1-0,4).

Permabilizacja sarkozylem – sarkozyl rozbija kompleksy – „zdziera" białka oddziałujące z polimerazą – jakakolwiek indukcja przed zbieraniem komórek!

Transkrypcja z mieszaniną AGC i ^{32}P-UTP przez 5 min. – dłużej nie ma sensu bo i tak polimeraza „odpada" po kilkudziesięciu-kilkuset sek.

Wykonanie TRO – izolacja piętnowanego RNA i hybrydyzacja

Izolacja RNA dowolną metodą, np. „fenol na gorąco”, GTC/fenol/kulki cyrkoniowe.

Hydroliza RNA w roztworze NaOH przed nałożeniem na filtry. W zależności od czasu trwania hydrolizy różne wielkości otrzymywanych fragmentów.

Hybrydyzacja, płukania i ekspozycja podobnie jak np. w technice northern-blot.

Zastosowanie i warianty TRO

Oznaczenia ilościowe:

- Badanie aktywności transkrypcyjnej (mocy) promotorów
- Wyznaczanie „transcription rates” dla poszczególnych genów
- Różnice w aktywności transkrypcyjnej pomiędzy mutantami czy pod wpływem czynników zew.

Oznaczenia jakościowe:

- Badanie defektów terminacji transkrypcji (*read-through*)
- Rozrżóżnienie pomiędzy samą obecnośćią RNA Pol a syntezą RNA

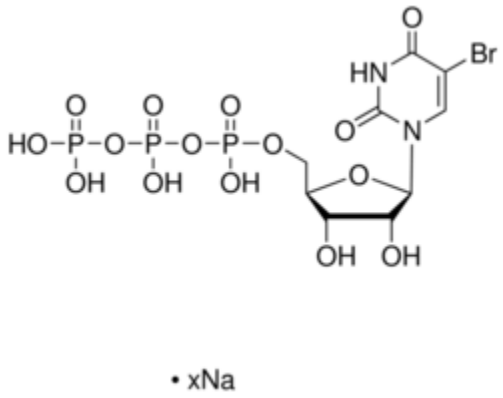
Warianty TRO:

- Jądrowy Run-On, na izolowanych jądrach komórkowych: Gariglio (1981) i Brown (1984)
- Mitochondrialny Run-On, na izolowanych mitochondriach

GRO-seq: Global (Genomic) Run-On

Znakowanie RNA: Run-On w obecności BrU lub 4tU

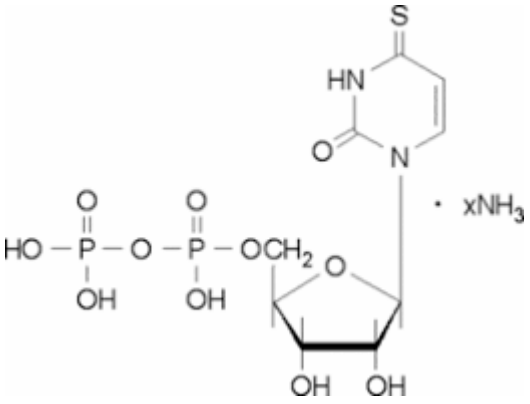
5-bromourydyna (BrU)



↓

fragmentacja RNA i immunoprecypiacja na złożu agaroza-antyBrU

4-tiourydyna (4tU)



↓

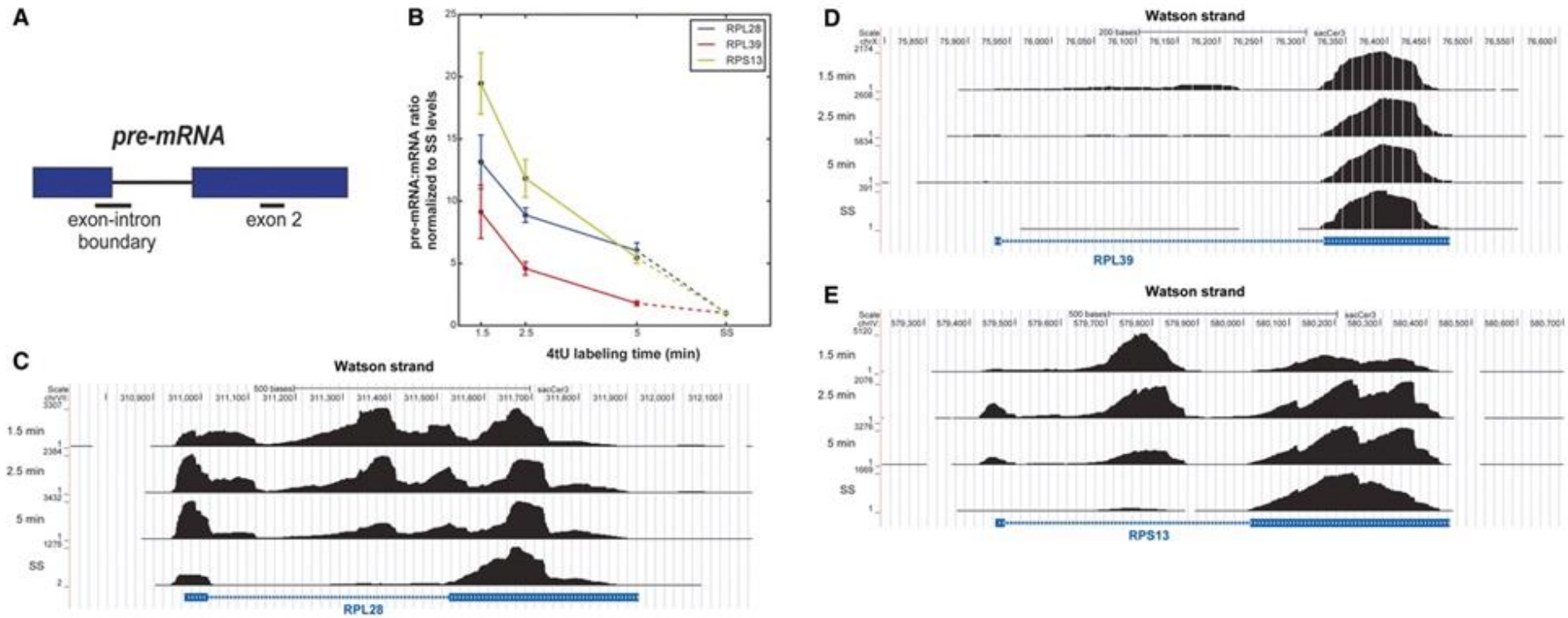
biotynylacja grupy tiolowej i wiązanie do złoża ze streptoawidyną

↓

Odwrotna transkrypcja -> RNAseq

4tU-seq

Transcriptome-wide RNA processing kinetics revealed using extremely short 4tU labeling

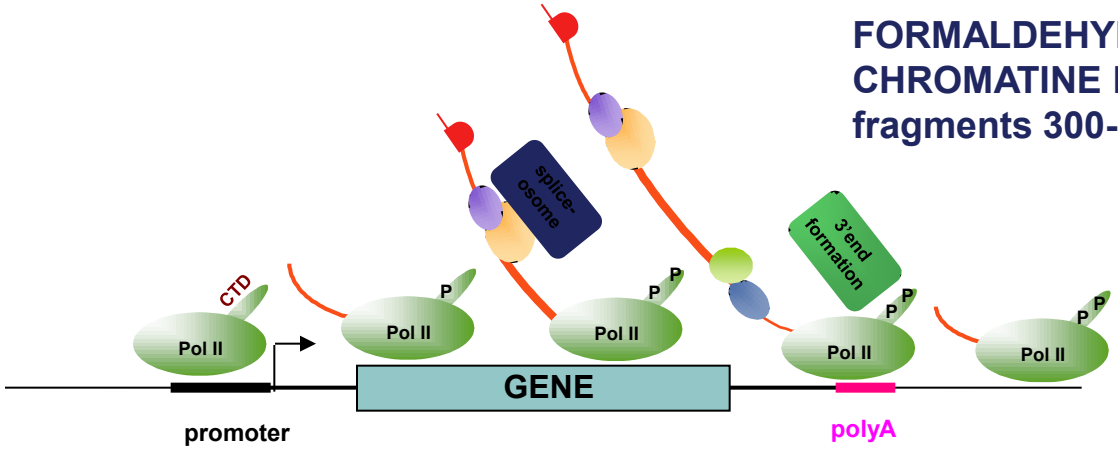


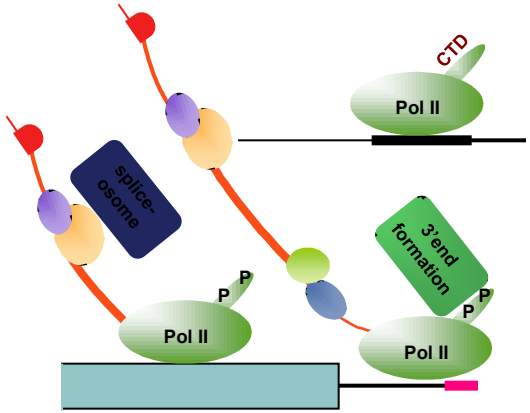
(Barras i wsp., Genome Biol 2015)

Immunoprecypitacja chromatyny - ChIP

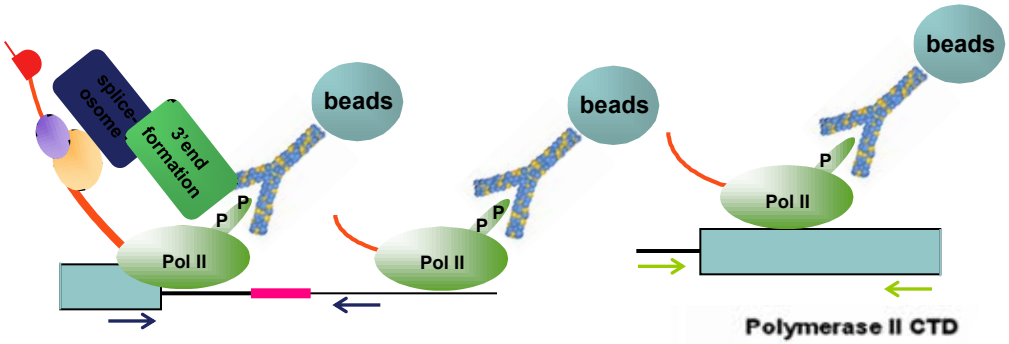
Immunoprecypitacja chromatyny - ChIP

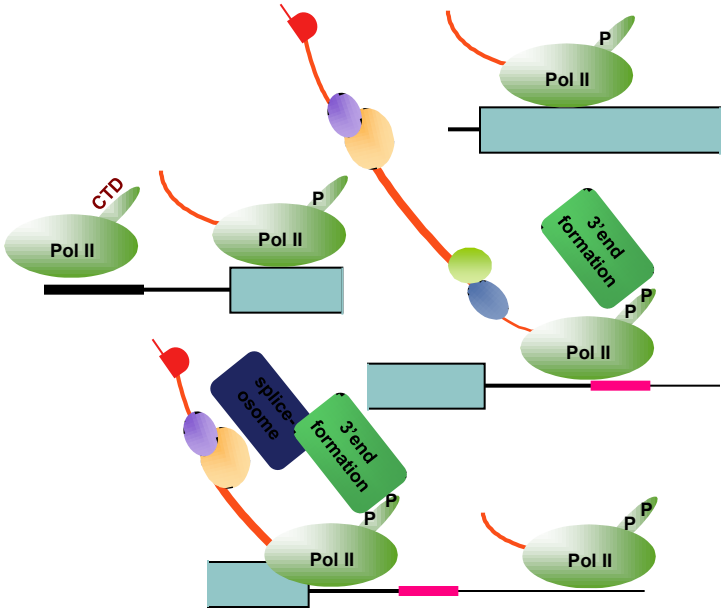
FORMALDEHYDE CROSSLINK
CHROMATINE ISOLATION AND SHEARING
fragments 300-500 nts



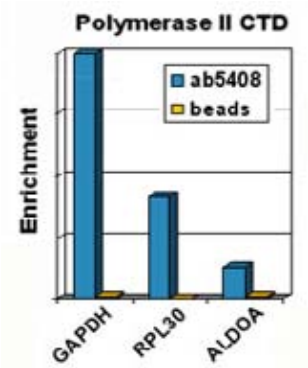


IMMUNOPRECIPITATION WITH α-CTD Abs





REVERSE CROSSLINK
DNA EXTRACTION
qPCR

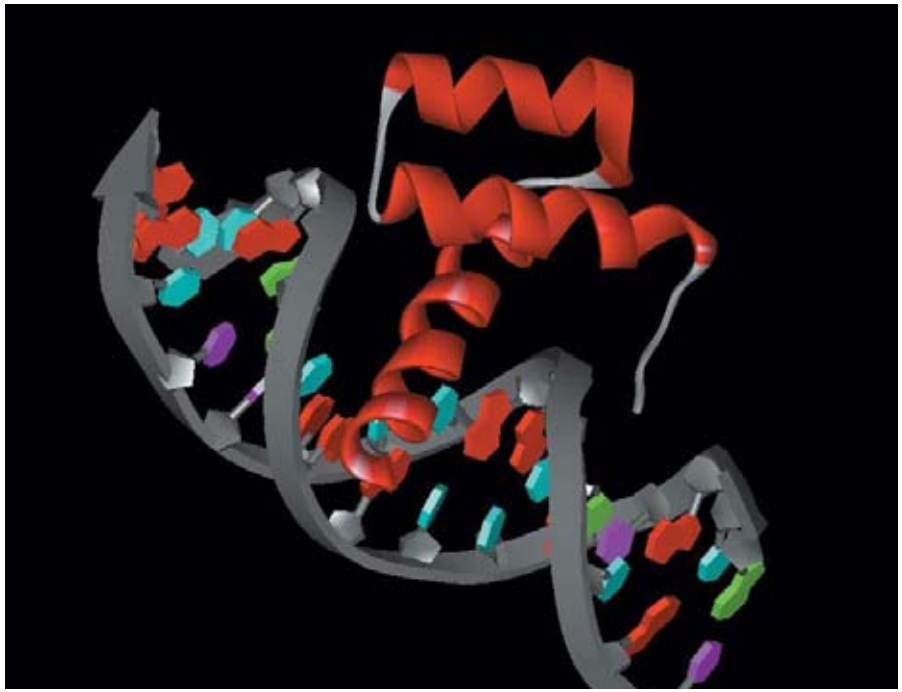


RELATIVE OCCUPANCY OF
RNA pol II ON A GENE

Zastosowania ChIP

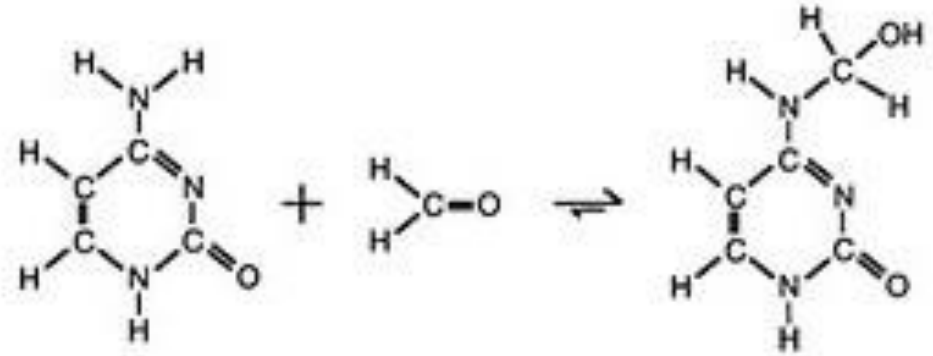
Badanie oddziaływań białka-DNA *in vivo*!

- **Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych**
- **Obecność (dystrybucja) Pol RNA wzdłuż chromatyny (genów)**
- **Modyfikacje histonów**
- **Czynniki remodelujące chromatynę**

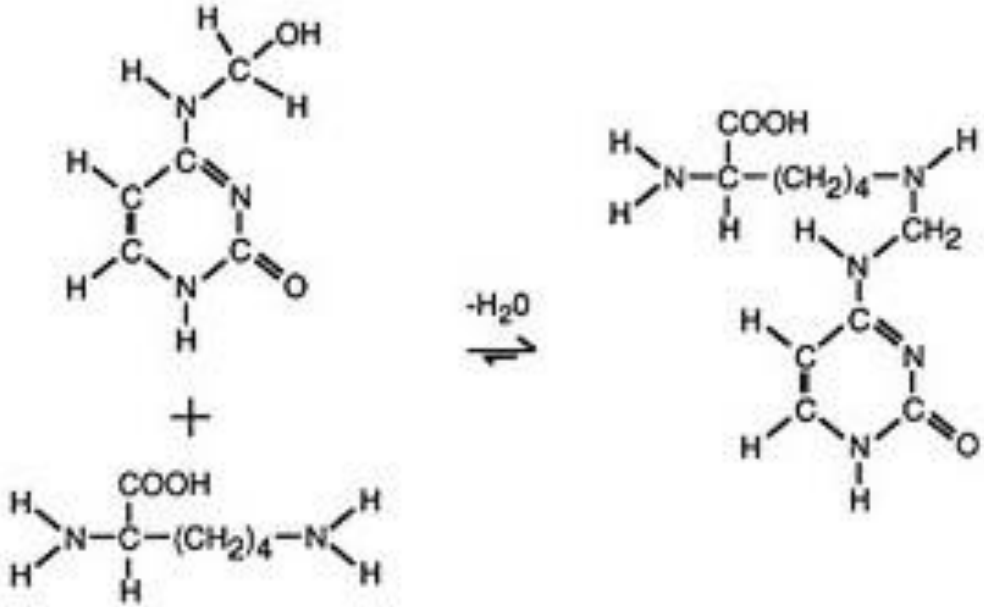


Czynnik sieciujący: formaldehyd

Reakcja 1 (powstaje zasada Shiffa)



Reakcja 2

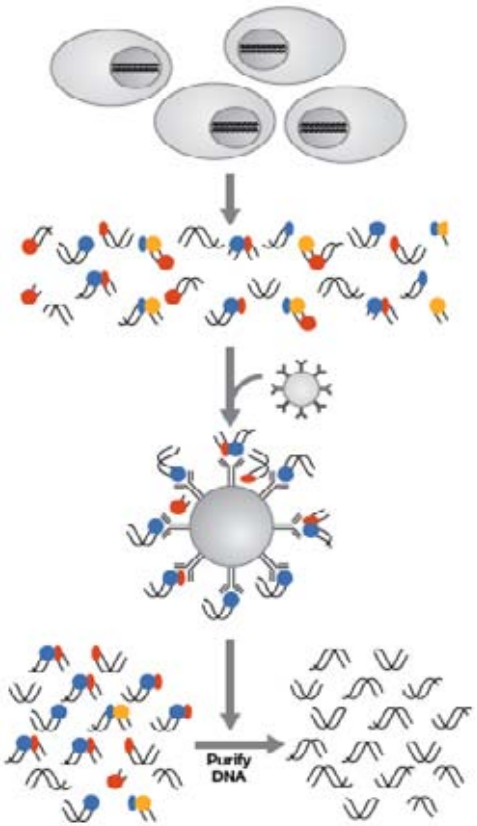


Rozdzielczość a specyficzność sieciowania

- **Sieciowanie *in vivo,* duża reaktywność formaldehydu**
- **Za to duża rozdzielczość: 2Å**
- **Problem z sieciowaniem słabiej oddziałujących białek z DNA (większe odległość)**
- **Inne czynniki sieciujące (np. DTBP)**

Procedura ChIP

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

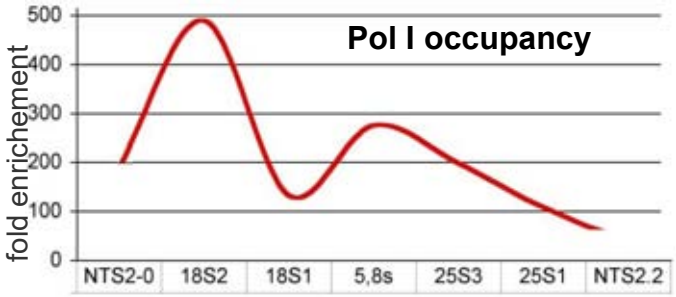


DNA-protein crosslink *in vivo*

Chromatin fragmentation

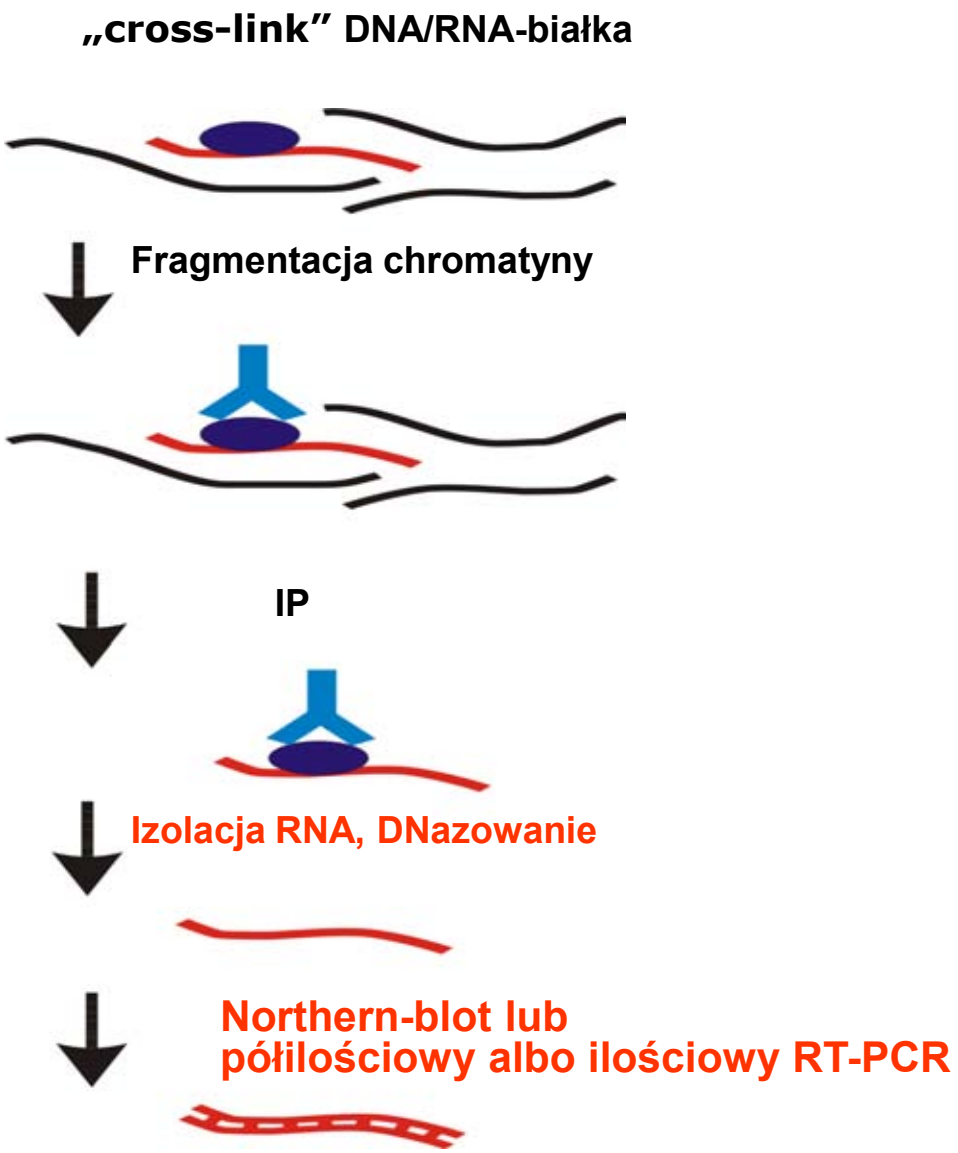
IP using Pol Abs or tagged Pol subunit

Southern-blot lub półilościowy albo ilościowy PCR sekwencjonowanie NGS (ChIP-seq)



Immunoprecypitacja RNA - RIP

Immunoprecypitacja RNA jest podobNA do ChIP



Terminacja transkrypcji

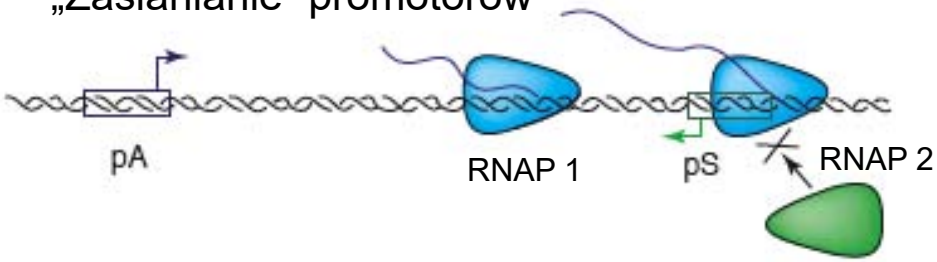
Po co terminacja transkrypcji?

U eukariontów niewiele genów zorganizowanych jest w policistronach (wyjątki: ncRNA, mtRNA)

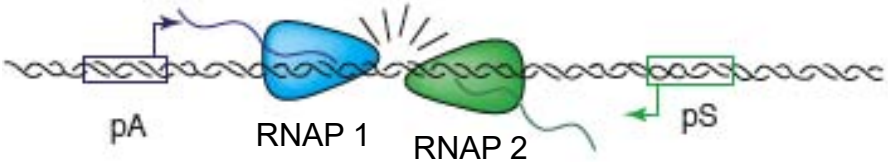
Niepoprawna terminacja transkrypcji wpływa na ekspresję genów

1. Ko-transkrypcyjnie

„Zasłanianie” promotorów



Kolizje polimeraz



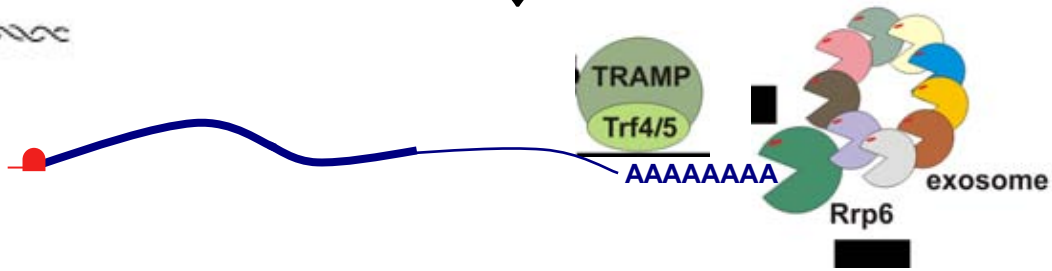
Shearwin et al, TiG., 2005

2. potranskrypcyjnie

⇓

„Przeczyt” – ang. Transcription Readthrough (**RT**)

⇓

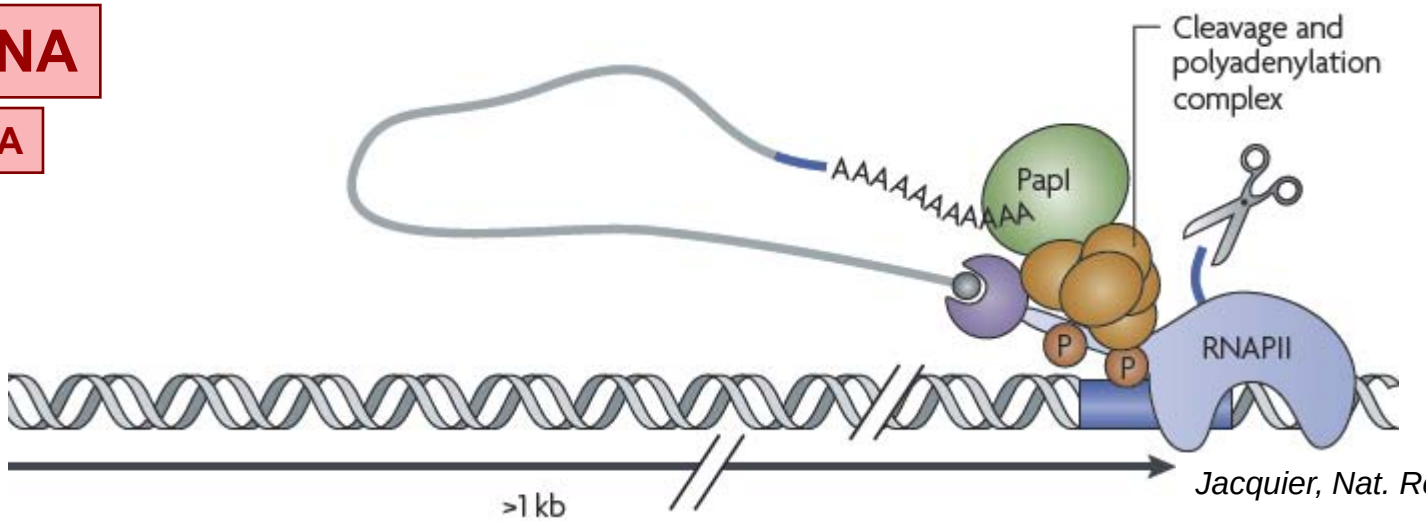


Usuwanie wadliwie wydłużonych transkryptów (nuclear RNA surveillance)

Polimeraz RNA II - cięcie i poliadenylacja

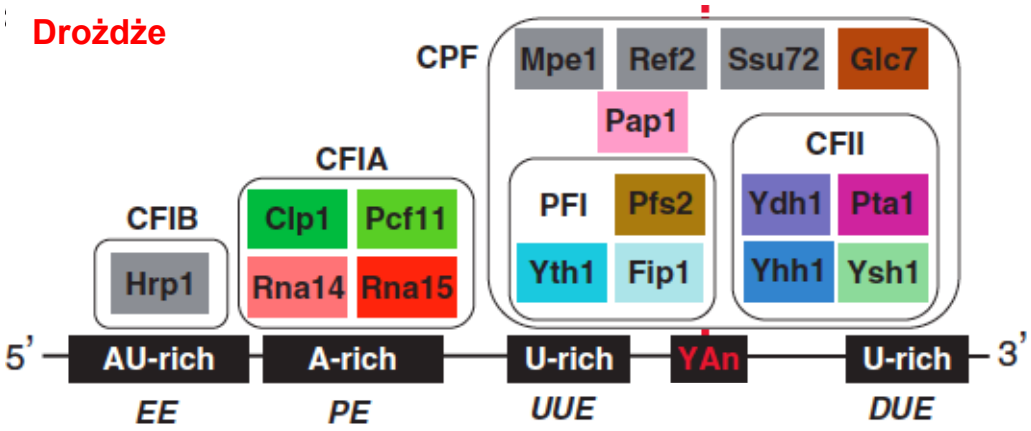
mRNA

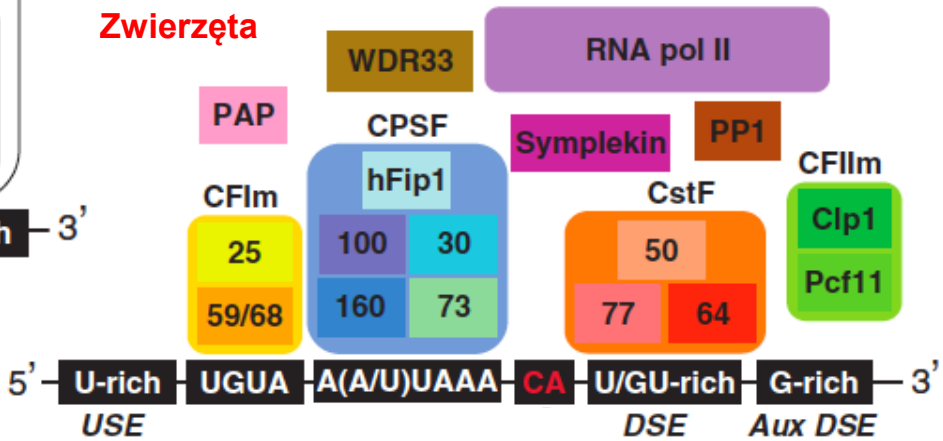
ncRNA



Jacquier, Nat. Rev. Genet, 2009

Cleavage and polyadenylation complex (CP) **(rekrutacja poprzez Ser2-P CTD)**

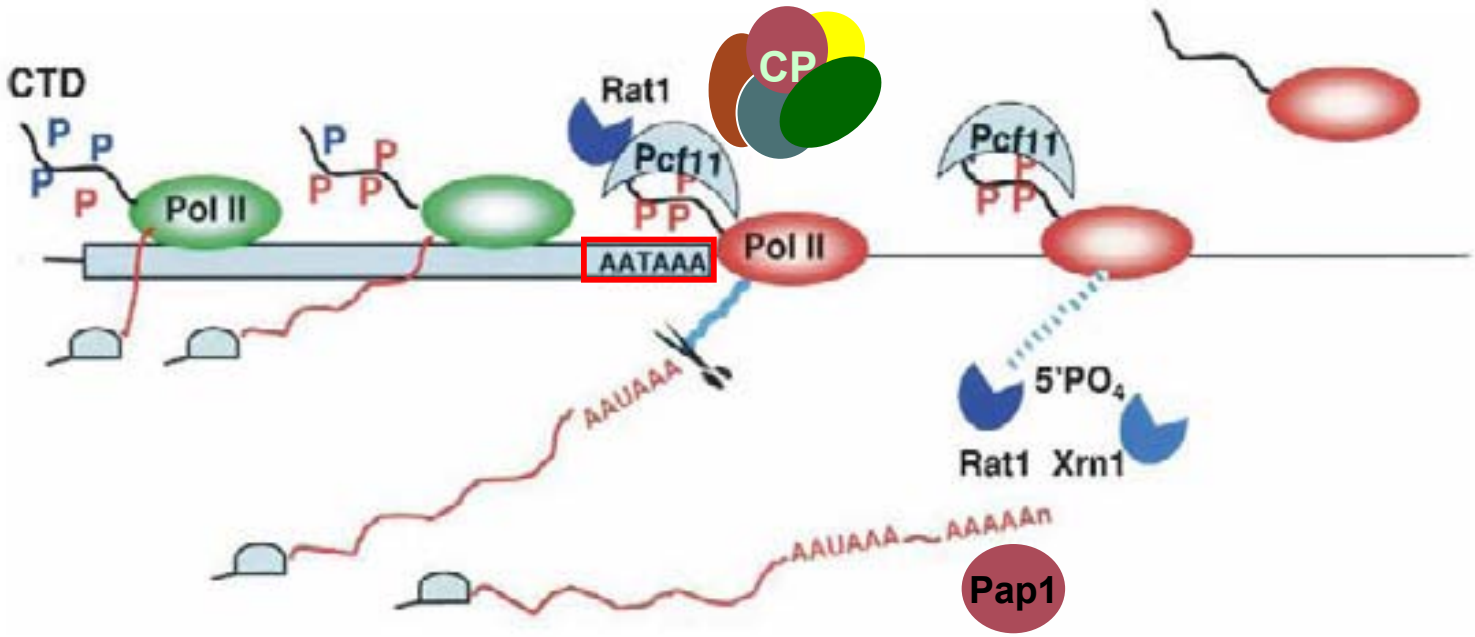




U drożdży cięcie przez Brr5/Ysh1 a u człowieka przezCPSF-73

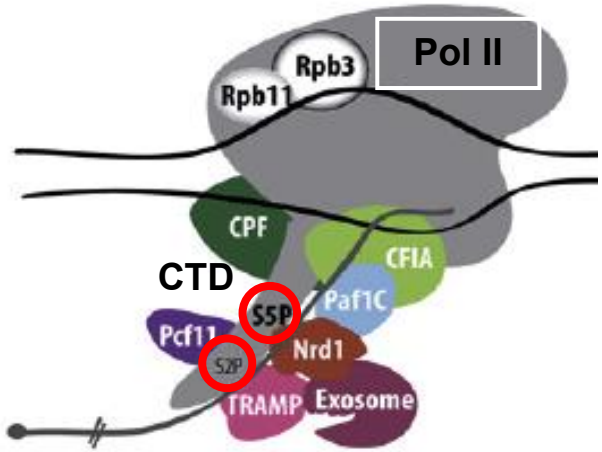
Millevoi and Vagner, NAR, 2008

Hybrydowy - allosteryczno-torpedowy - model terminacji transkrypcji polimerazy RNA II



Luo and Bentley, Gene Dev, 2006

Terminacja pol II zależna od Nrd1/Nab3/Sen1



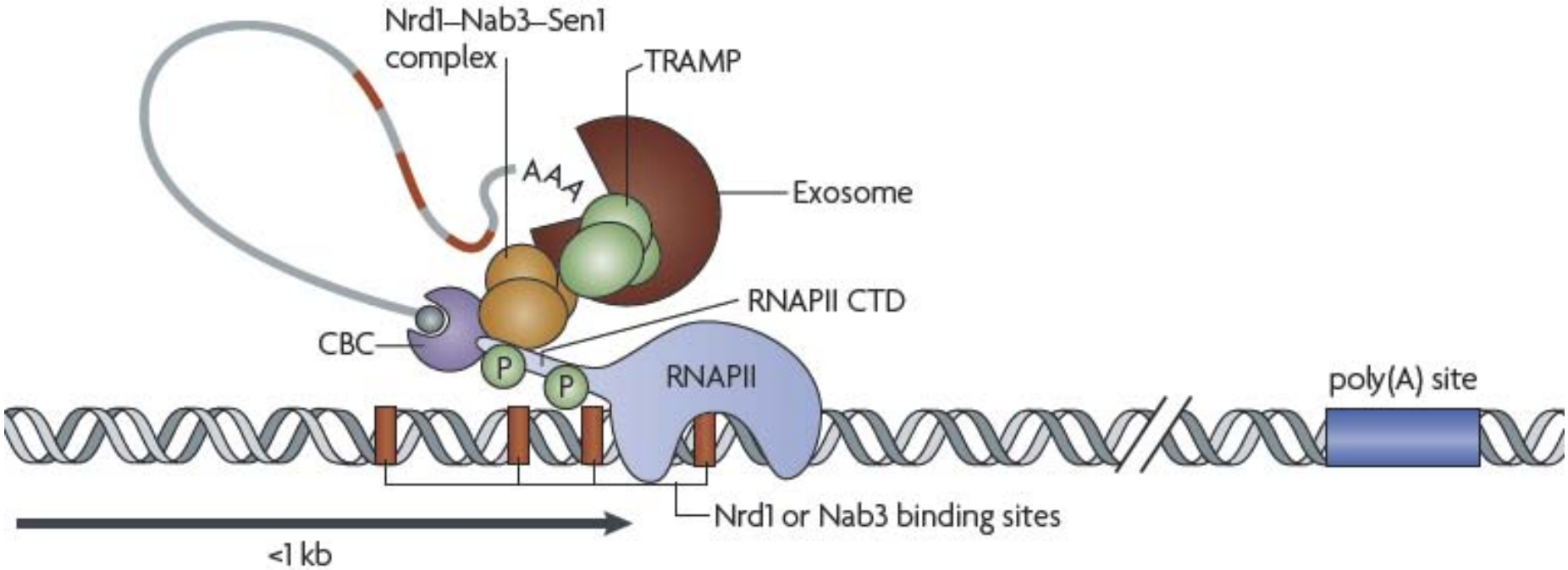
Nrd1/Nab3/Sen1 – **NNS complex**

- sn/snoRNAs
- CUTs
- short mRNAs (< 600 nt)

ncRNA

mRNA

(rekrutacja poprzez Ser5-P CTD)

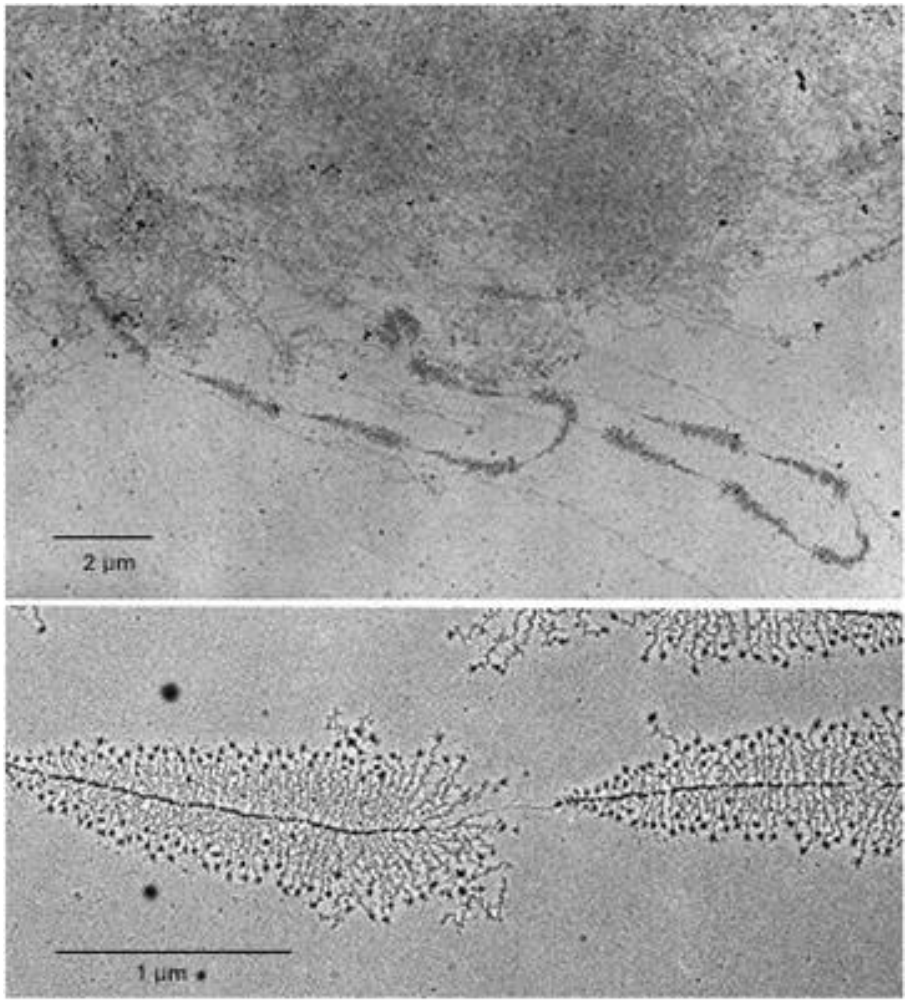


Jacquier, Nat. Rev. Genet 2009

Terminacja transkrypcji Polimerazy I RNA

Geny rDNA zebrane są w jąderku

Miller's spreads – „Christmans tree"

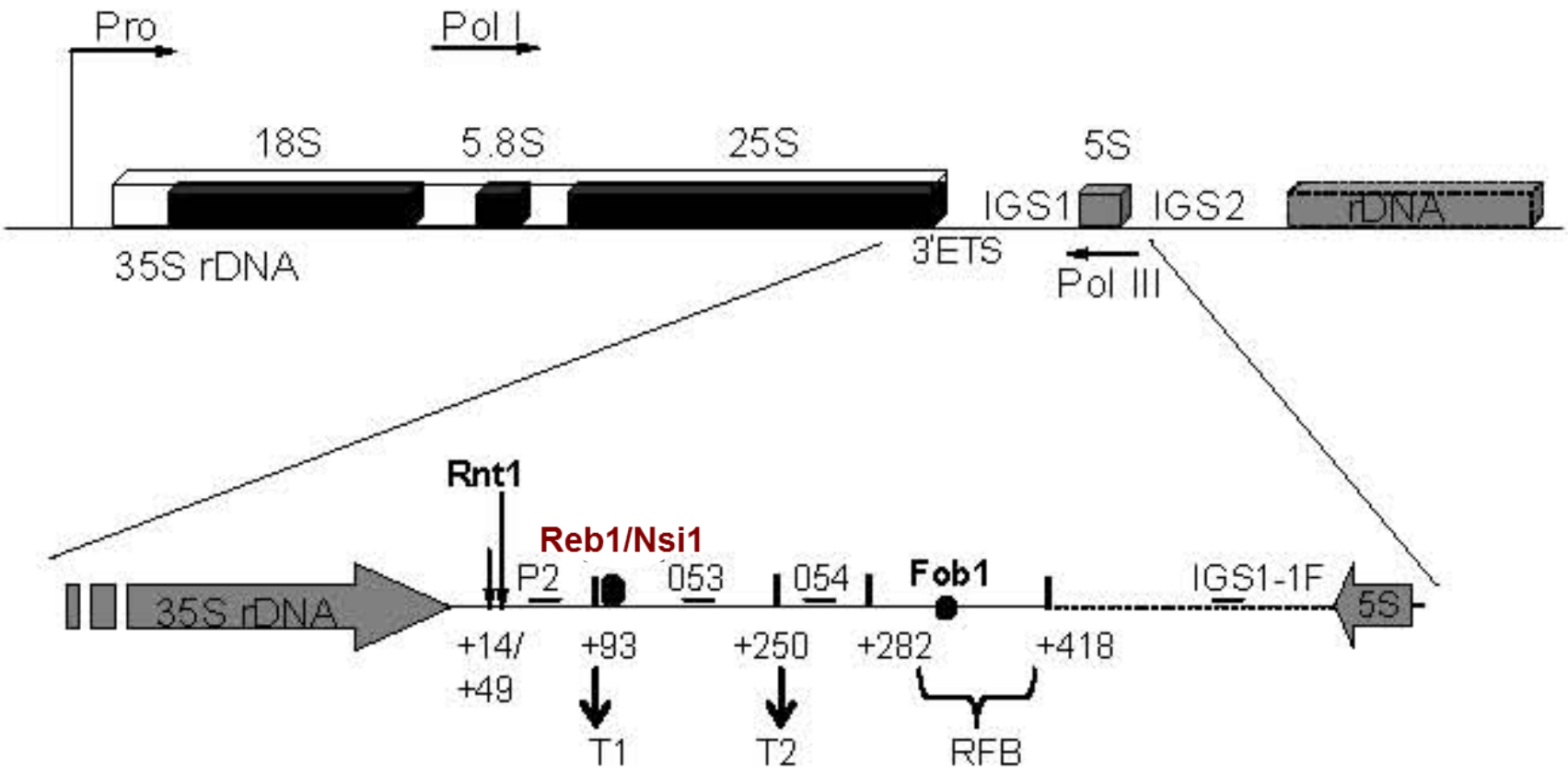


Góra: V.E. Foe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42:723-740, 1978; dół: Ulrich Scheer, MBC on NCBI.

- **Pol I transkrybuje rybosomalny RNA (35S rRNA)**
- **Pol I RNA – ok. 80% całej aktywności transkrypcyjnej jądra komórkowego!!!**
- **U drożdży geny rDNA w 150-200 tandemowych powtórzeniach**

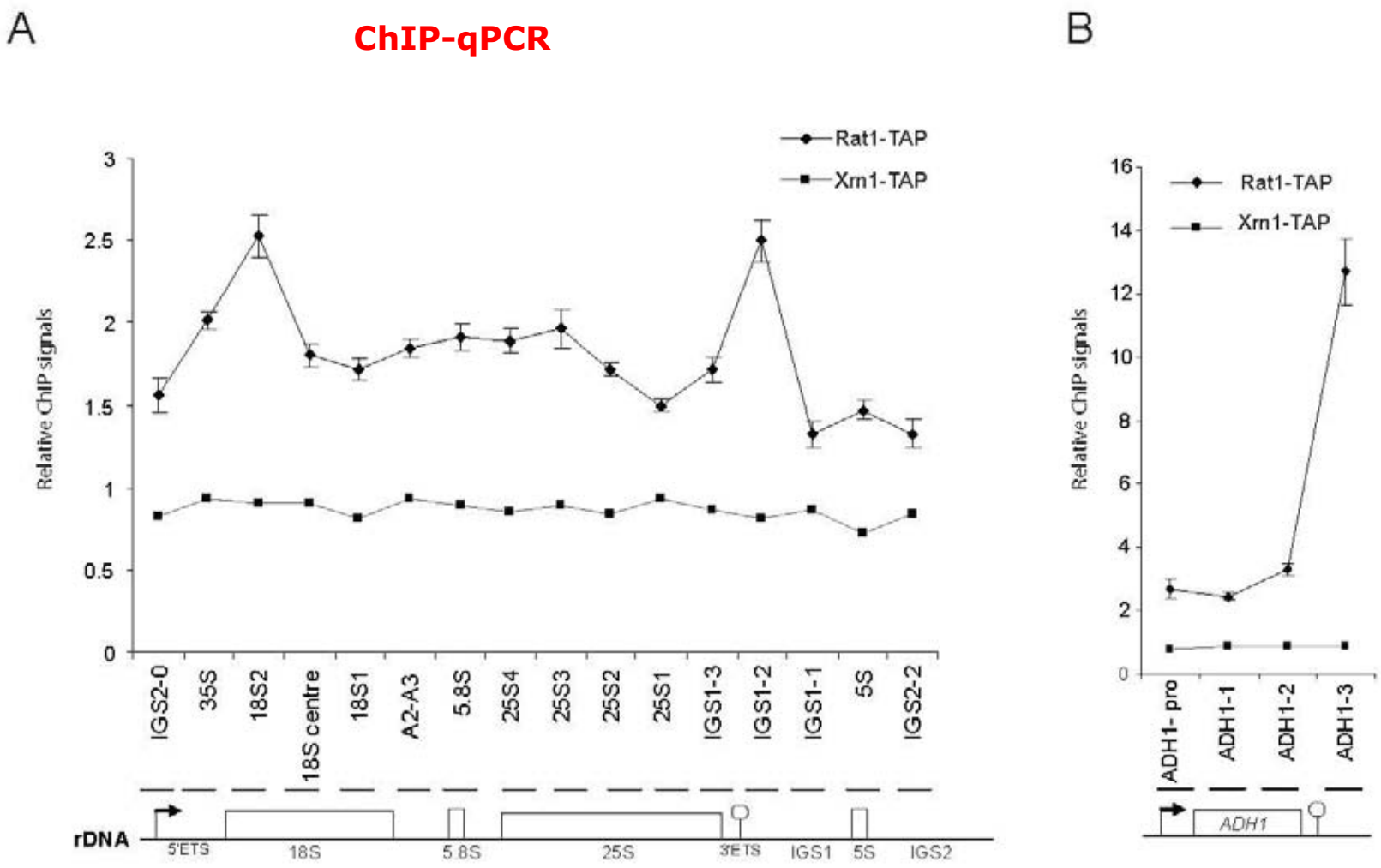
Schematic of an rDNA repeat in *S. cerevisiae*

with detailed transcription termination region



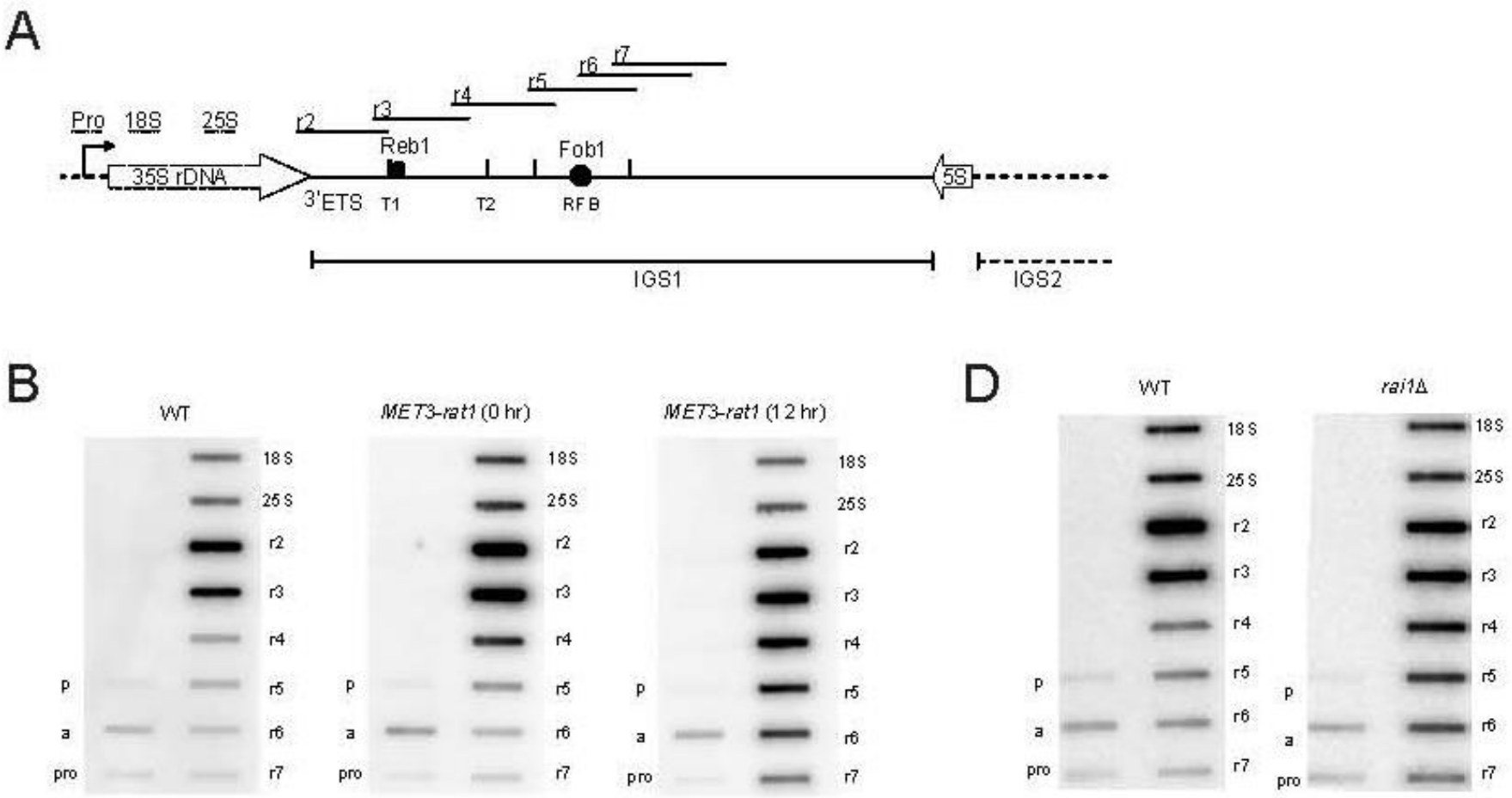
El Hage i wsp., Genes Dev., 2008,15;22(8)

Rat1 associates with the 3'-ETS region of the rDNA



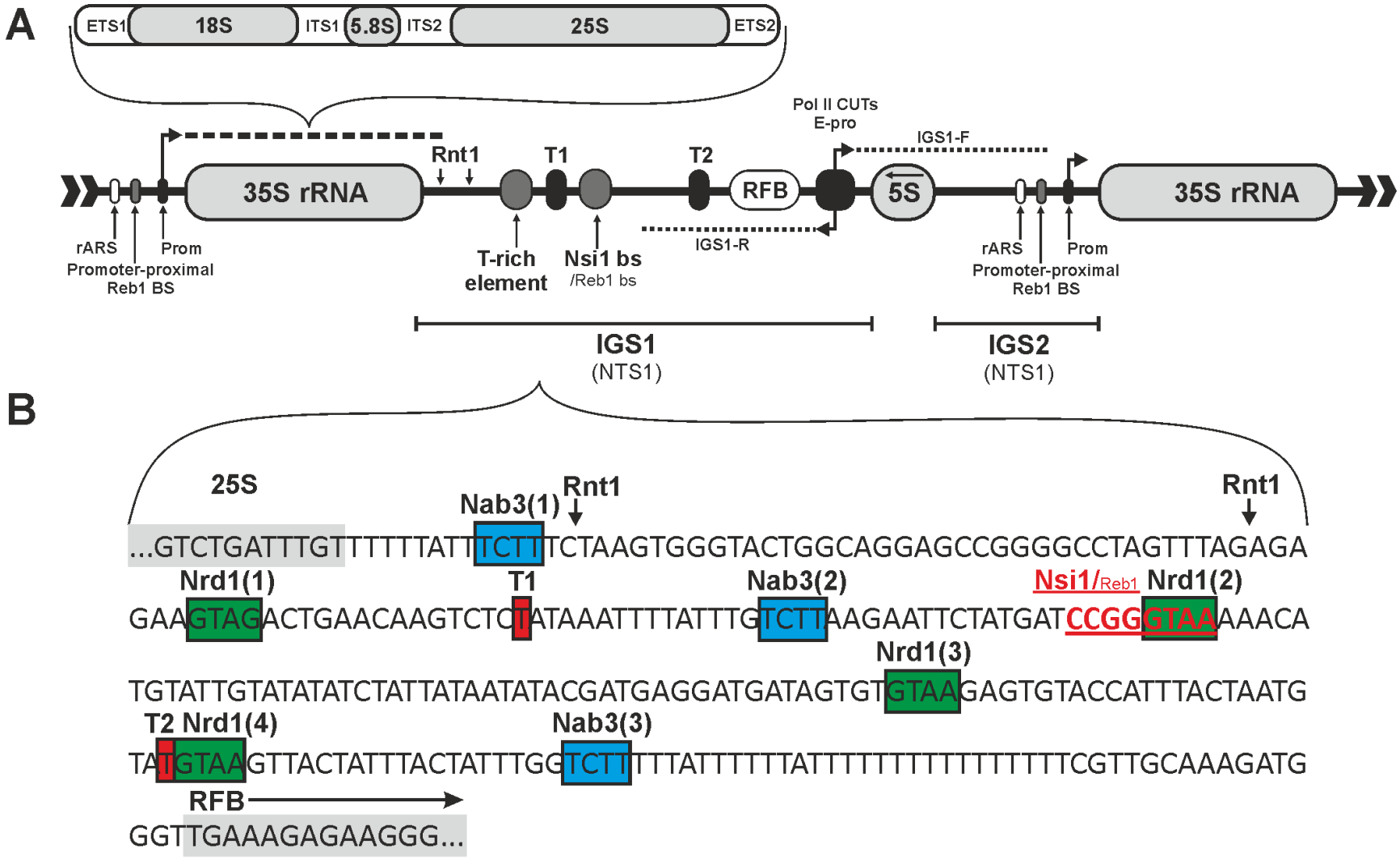
El Hage i wsp., Genes Dev., 2008,15;22(8)

Transcription run-on shows read-through of the major Pol I terminator in strains lacking Rat1 or Rai1



El Hage i wsp., Genes Dev., 2008,15;22(8)

Terminacja pol RNA I zależna od Nrd1 i Nab3?



- **Depletion of Reb1 has little effect on transcription termination**
- **Sen1 contributes to Pol I termination**
- **Nrd1 associates with rDNA IGS1:**

- Pol II transcripts are generated within IGS1 and IGS2

- IGS1-R anti-sense to 35S pre-rRNA terminates in the Nrd1/Nab3 pathway

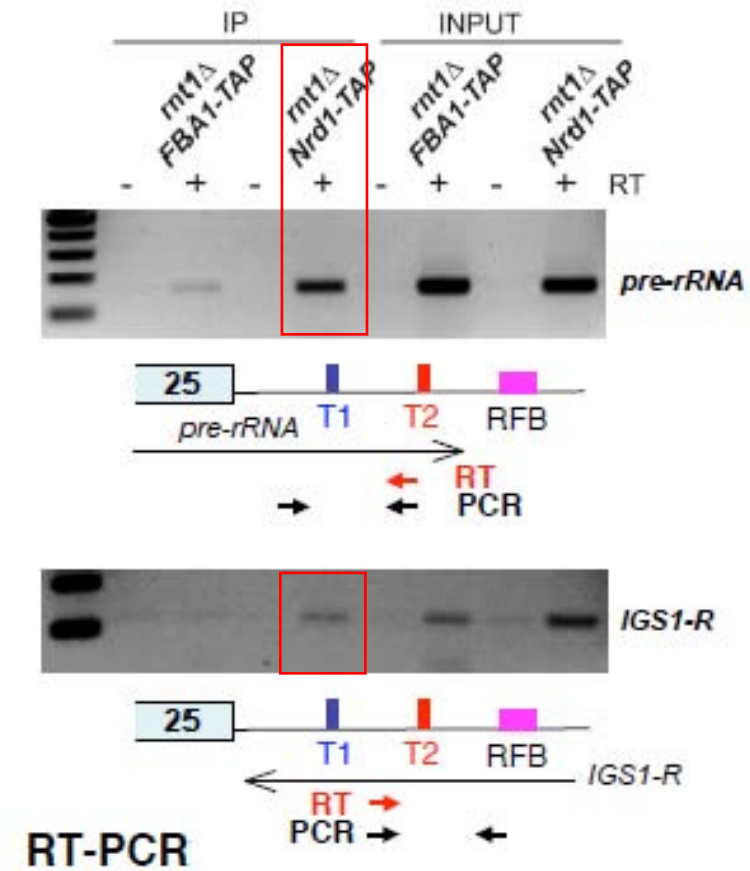
(Kawauchi et al., Gene&Dev, 2008;
Houseley et al., EMBO J, 2007;
Vasiljeva et al., Mol. Cell 2008);

Nrd1 wiążę się z IGS1 w pre-rRNA

RIP-RT-PCR with formaldehyde crosslink

Nrd1-TAP in the absence of Rnt1

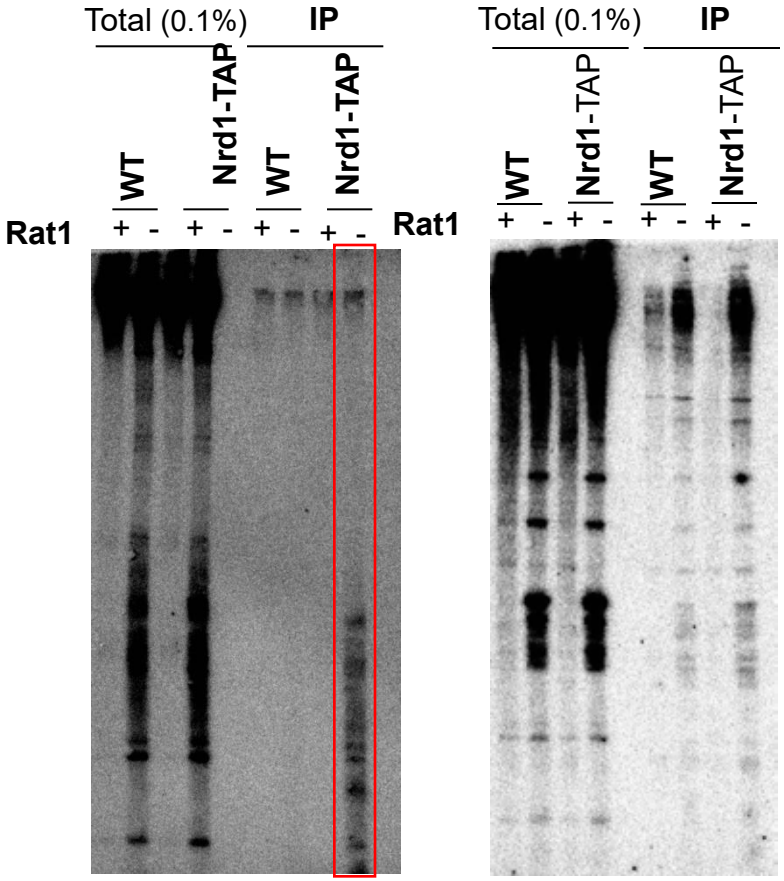
(Nrd1-TAP *rnt1Δ* strain)



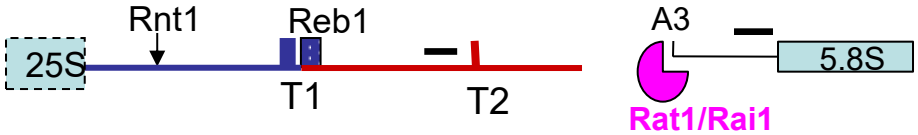
RNA IP

Nrd1-TAP in the absence of Rat1

(Nrd1-TAP *MET3::Rat1/xrn1Δ* strain)

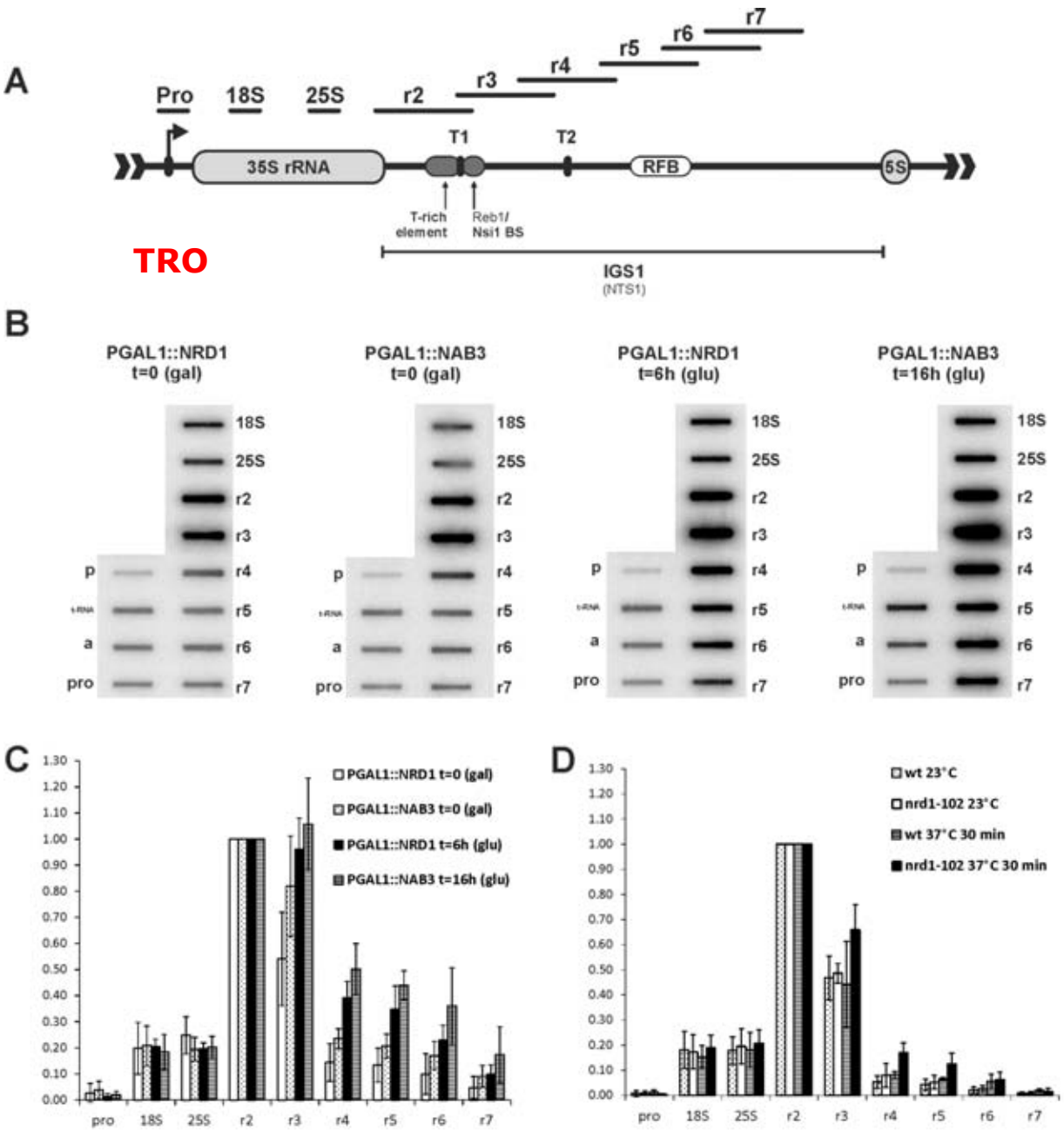


Northern blot



El Hage & Tollervey

Depletion of Nrd1 or Nab3 causes read-trough of the Pol I termination in IGS1



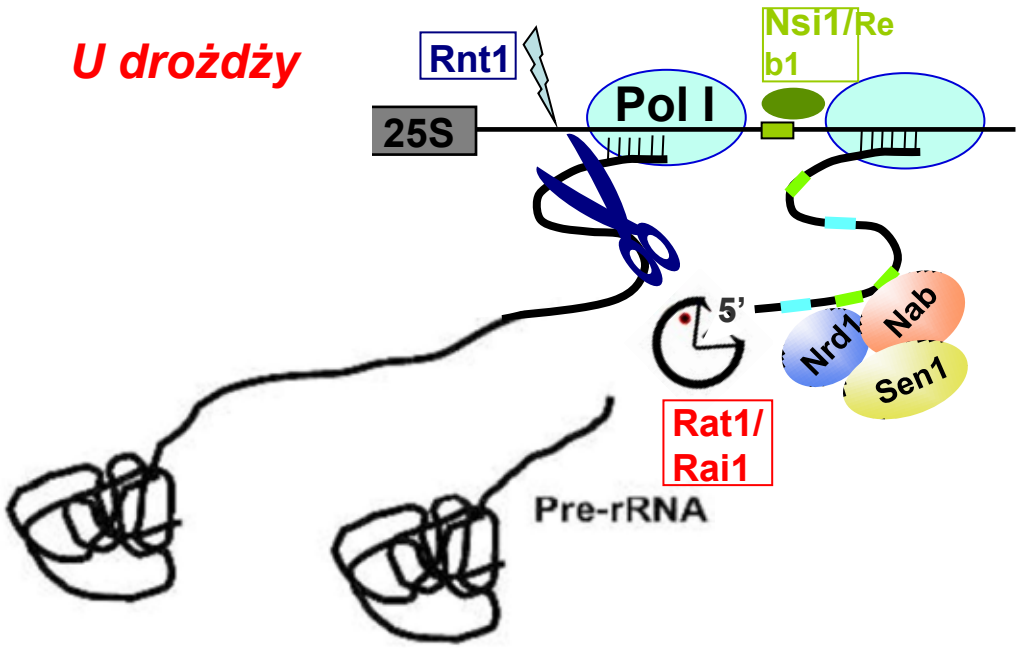
(A) Schematic representation of the positions of TRO probes.

(B) Exemplary TRO hybridizations are shown for the PGAL1::NRD1 and PGAL1::NAB3 strains grown in the galactose-containing (2%) synthetic medium (t=0) or shifted to the glucose-containing (2%) synthetic medium to induce Nrd1 or Nab3 depletion (t=6h or t=16h respectively).

(C) Quantified mean TRO profiles of three independent repetitions of (B) with standard deviation.

Terminacja transkrypcji polimerazy RNA

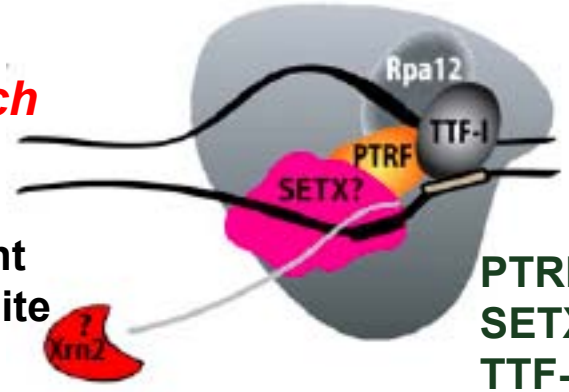
U drożdży



Pol I termination factors:

- DNA-binding protein Nsi1/Reb1
- Pol I subunit Rpa12
- endonuclease Rnt1
- RFB binding protein Fob1
- 5'-3' exonuclease Rat1/Rai1 *(torpedo mechanism)*
- RNA helicase Sen1
- Nrd1/Nab3 complex (??)

W komórkach ssaczych

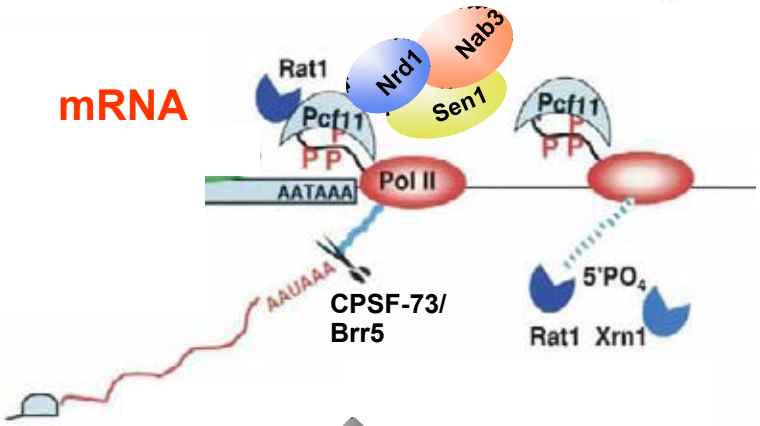


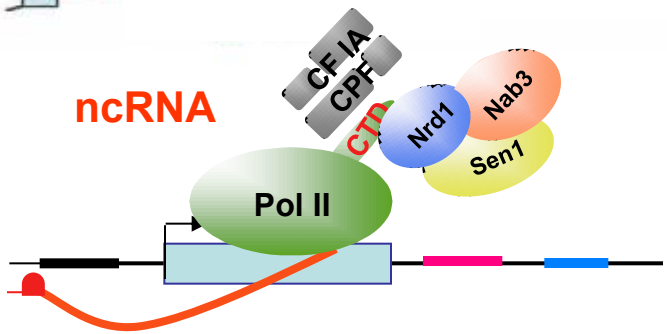
transcript release element
T-stretch + TTF-I pause site

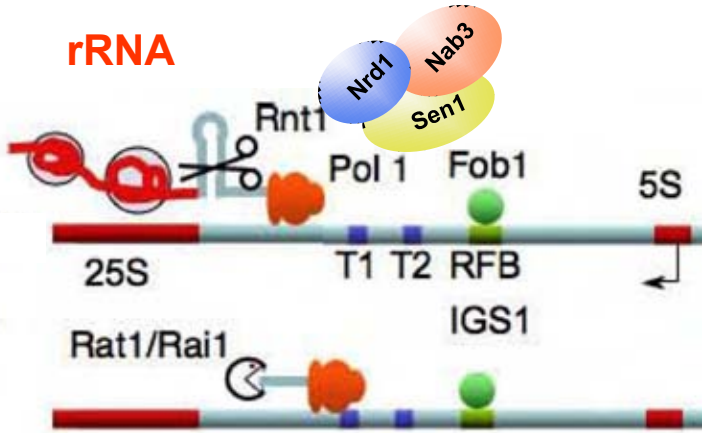
PTRF – release factor
SETX – helicase, Sen1 homolog
TTF-I – transcription termination factor I

Richard and Manley, GeneDev., 2009

Wniosek – „współużytkowanie” ścieżek terminacji przez Pol RNA I i Pol RNA II



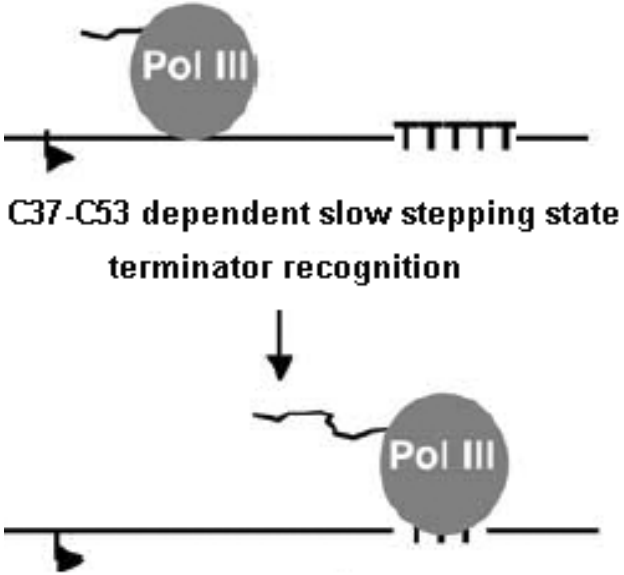


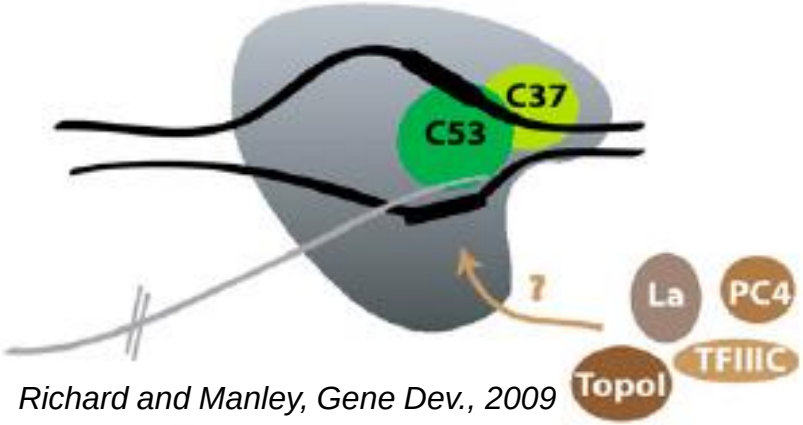


Pathways for transcription termination by different polymerases, Pol I and II, utilize overlapping factors and mechanisms

POL III TRANSCRIPTION TERMINATION

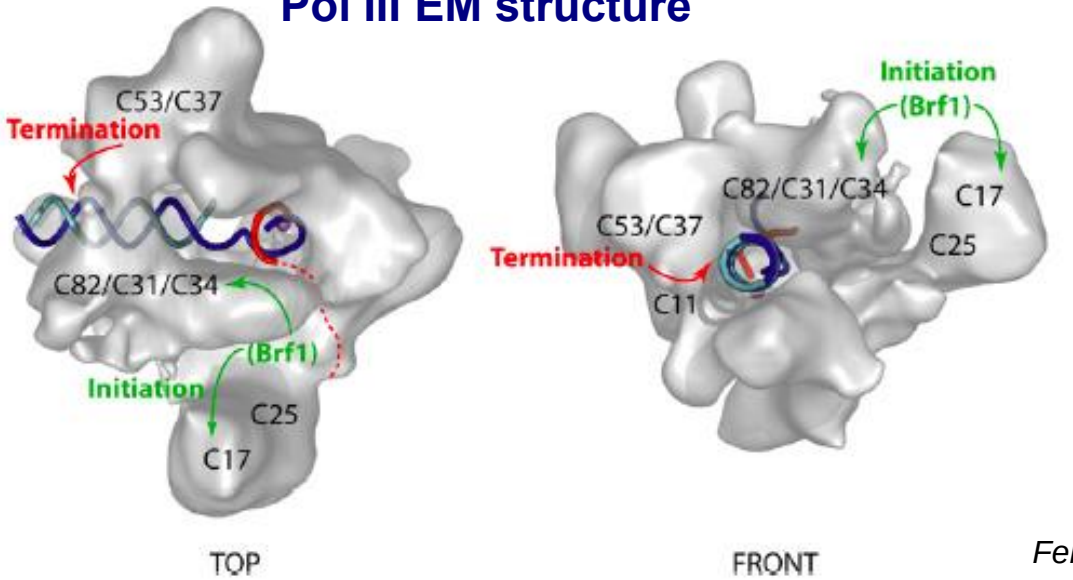
Landrieux et al., EMBO J., 2006





Richard and Manley, Gene Dev., 2009

Pol III EM structure



C1, C2 core subunits

(Pol pausing)

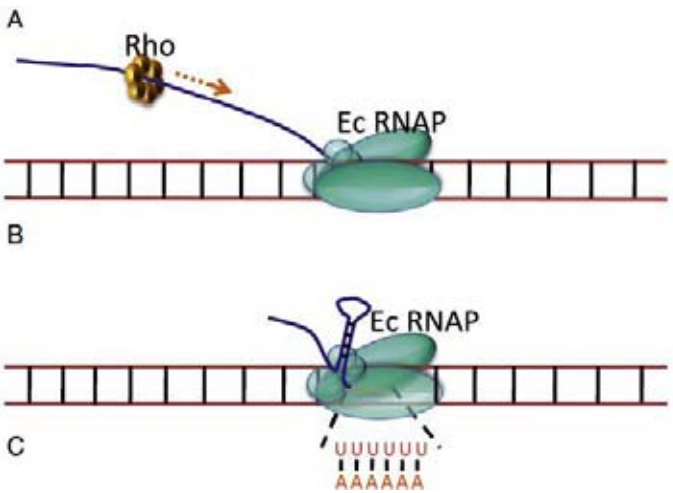
C37-C53 subcomplex is situated across the cleft near RNA exit

C11 (TFIIS) subunit of Pol III has intrinsic RNA cleavage activity important for Pol III termination

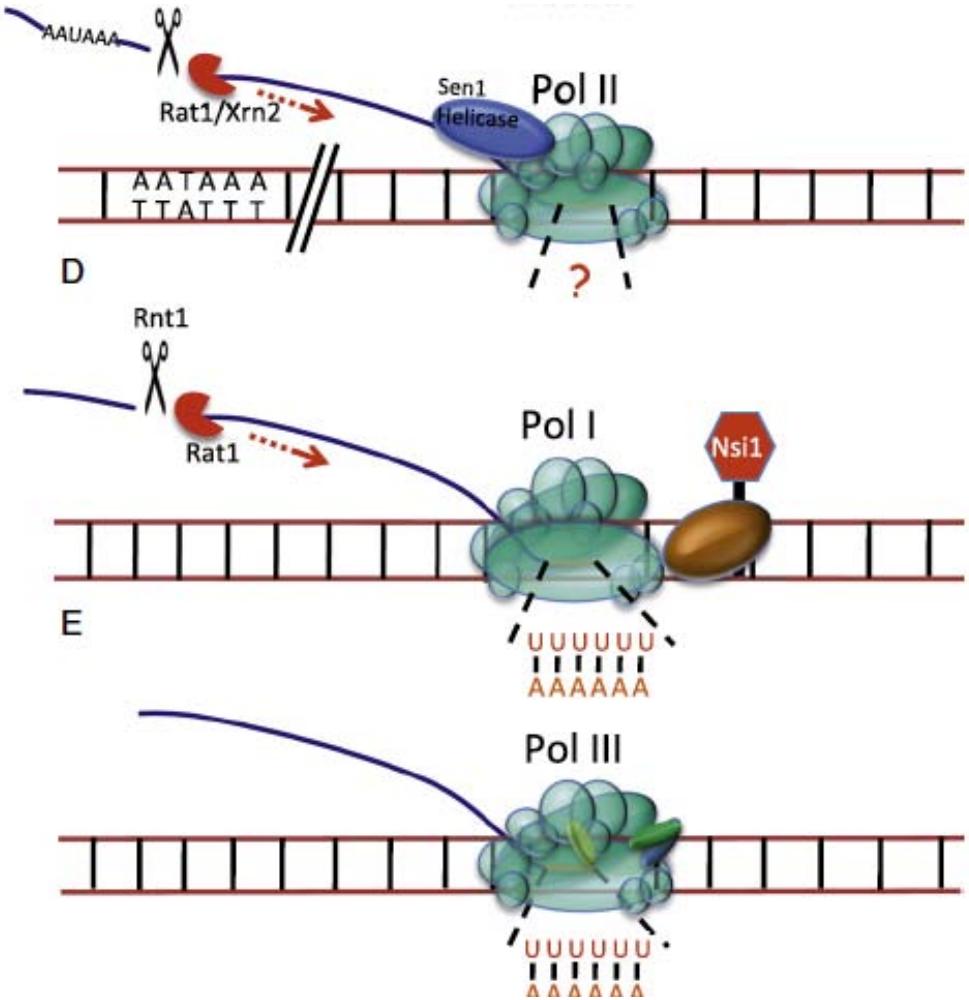
Fernadez-Tornero et al., Mol. Cell, 2007

Terminacja transkrypcji – porównanie dla polimeraz I, II i III

Bakteryjna polimeraza RNA



Euakriotyczne polimerazy RNA



Arimbaasseri et al., BBA, 2013

PODSUMOWANIE TECHNIK

Poziom RNA w komórce jest wypadkową jego syntezy i degradacji.

Sam fakt, że polimeraza RNA jest związana z DNA nie oznacza, że transkrybuje RNA.

Aby badać transkrypt w chwili jego powstawania należy zastosować różne techniki molekularne:

TRO pozwala badać jakościowo i ilościowo „bieżącą" transkrypcję.

ChIP pozwala badać *in vivo* oddziaływanie białek z DNA.

RIP pozwala badać *in vivo* oddziaływanie białek z RNA.

DZIĘKUJĘ
ZA
UWAGĘ

Suplement
– ilościowy TRO

Benchmarks

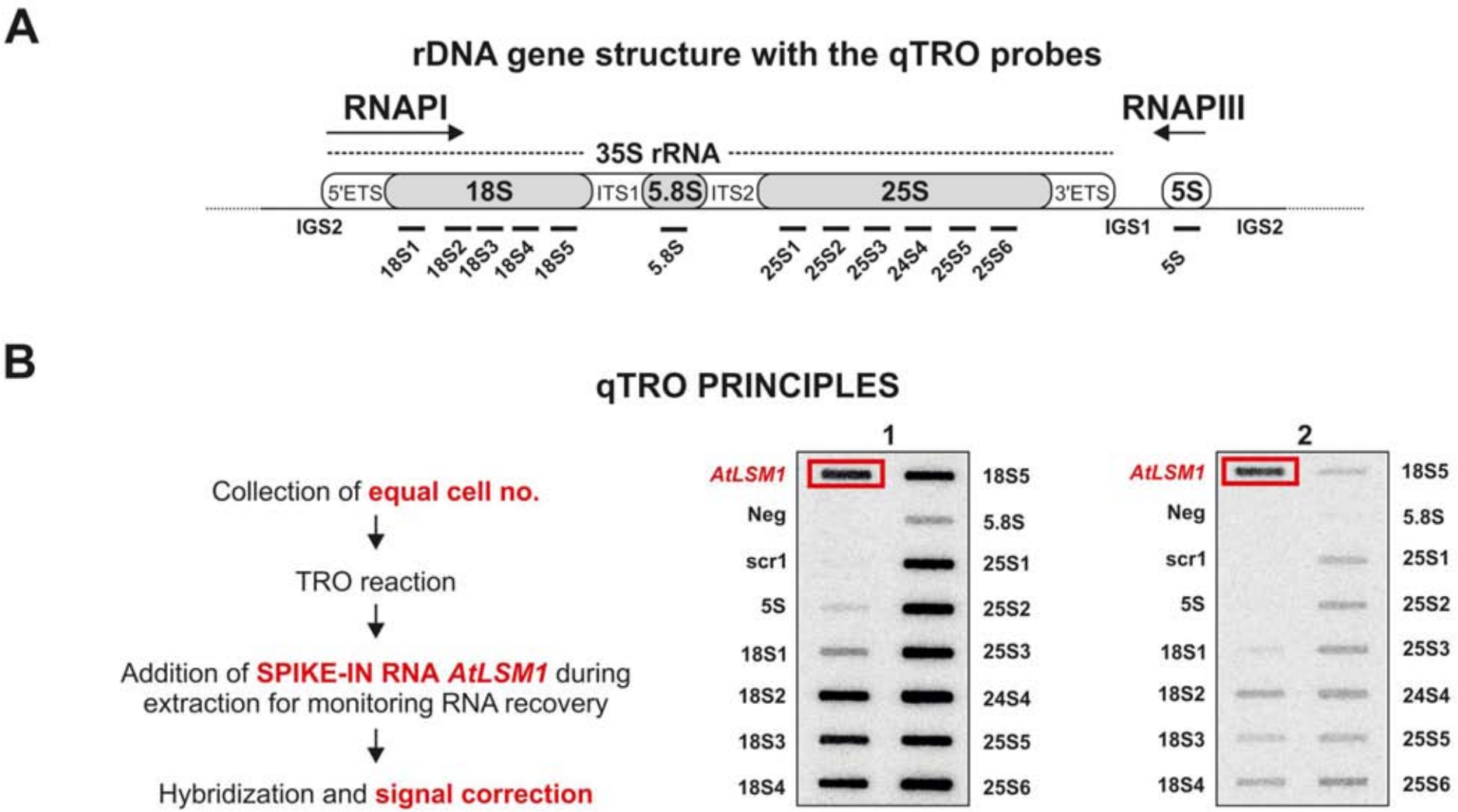
Analysis of rRNA synthesis using quantitative transcription run-on (qTRO) in yeast

Michal Koper*,[1] & Seweryn Mroczek[1]
[1]*Institute of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, A. Pawinskiego 5a, 02-106, Warsaw, Poland*

BioTechniques 65: 163–168 (September 2018) 10.2144/btn-2018-0073
Keywords: quantitative transcription run-on (qTRO) • ribosomal RNA • RNA polymerase I

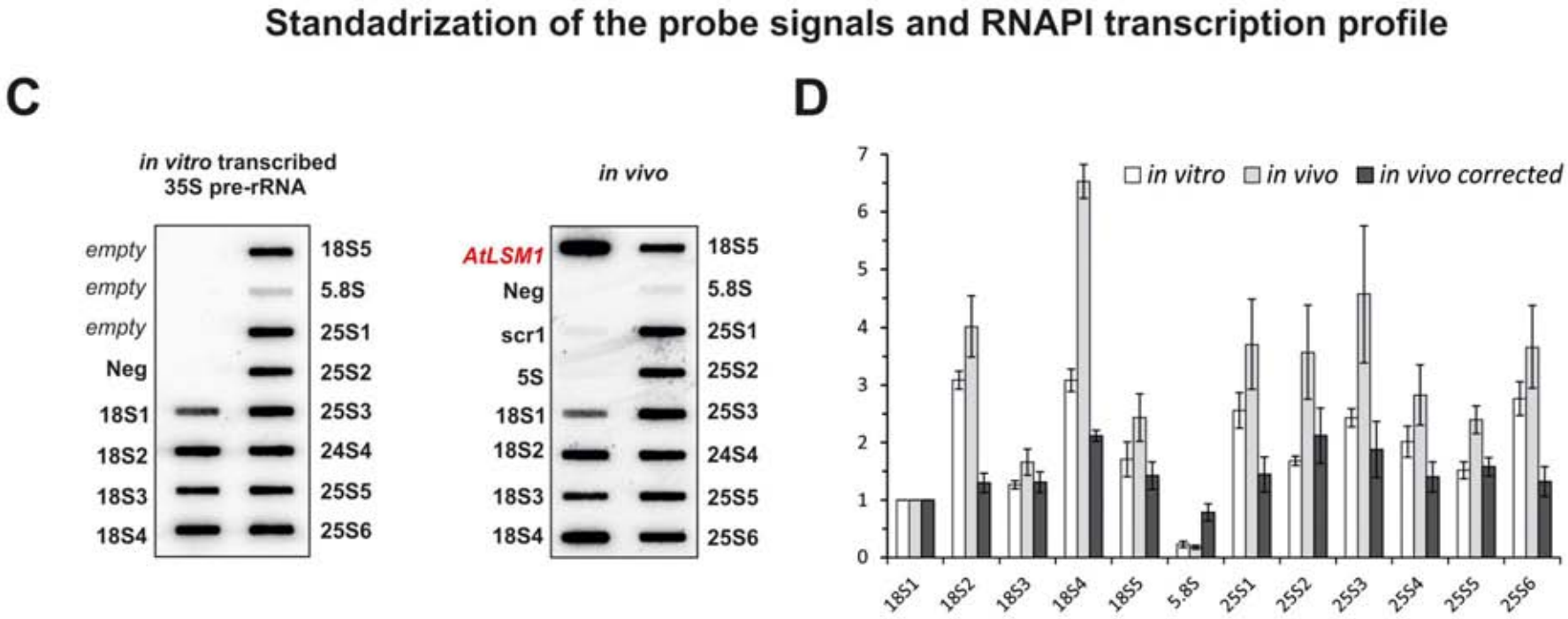
Comparative transcriptional analyses require appropriate and precise normalization. Here we describe a modified transcription run-on (TRO) method, named quantitative TRO (qTRO), that allows quantification of nascent transcription activity. The most critical improvement it introduces is a new standardization method for RNA isolation and hybridization steps, enabling transcription activity quantification and comparative biological analysis. We used this technique with chromatin immunoprecipitation to investigate RNA polymerase I (RNAPI) transcription activity and its rDNA gene profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. We designed a set of new oligonucleotide probes complementary to nascent ribosomal RNA (rRNA) transcripts and standardized their hybridization strength. The qTRO method could be successfully implemented to study RNAPI transcription in response to oxidative stress and in two mutant strains with impaired rRNA synthesis.

Figure 1A-B. Principles of qTRO.



AtLSM1 – RNA wyznakowany w transkrypcji *in vitro* przy pomocy ^{32}P-UTP dodawany przed izolacją RNA do peletów drożdżowych

Figure 1C-D. RNAPI activity profile



Korekcja sygnałów sond względem 35S rRNA otrzymanego w transkrypcj *in vitro* w obecności ^{32}P-UTP – otrzymane współczynniki „mocy” hybrydyzacji posłużyły do korekcji sygnałów otrzymanych *in vivo* w qTRO

Figure S1. Optimization of 35S rRNA transcription *in vitro*

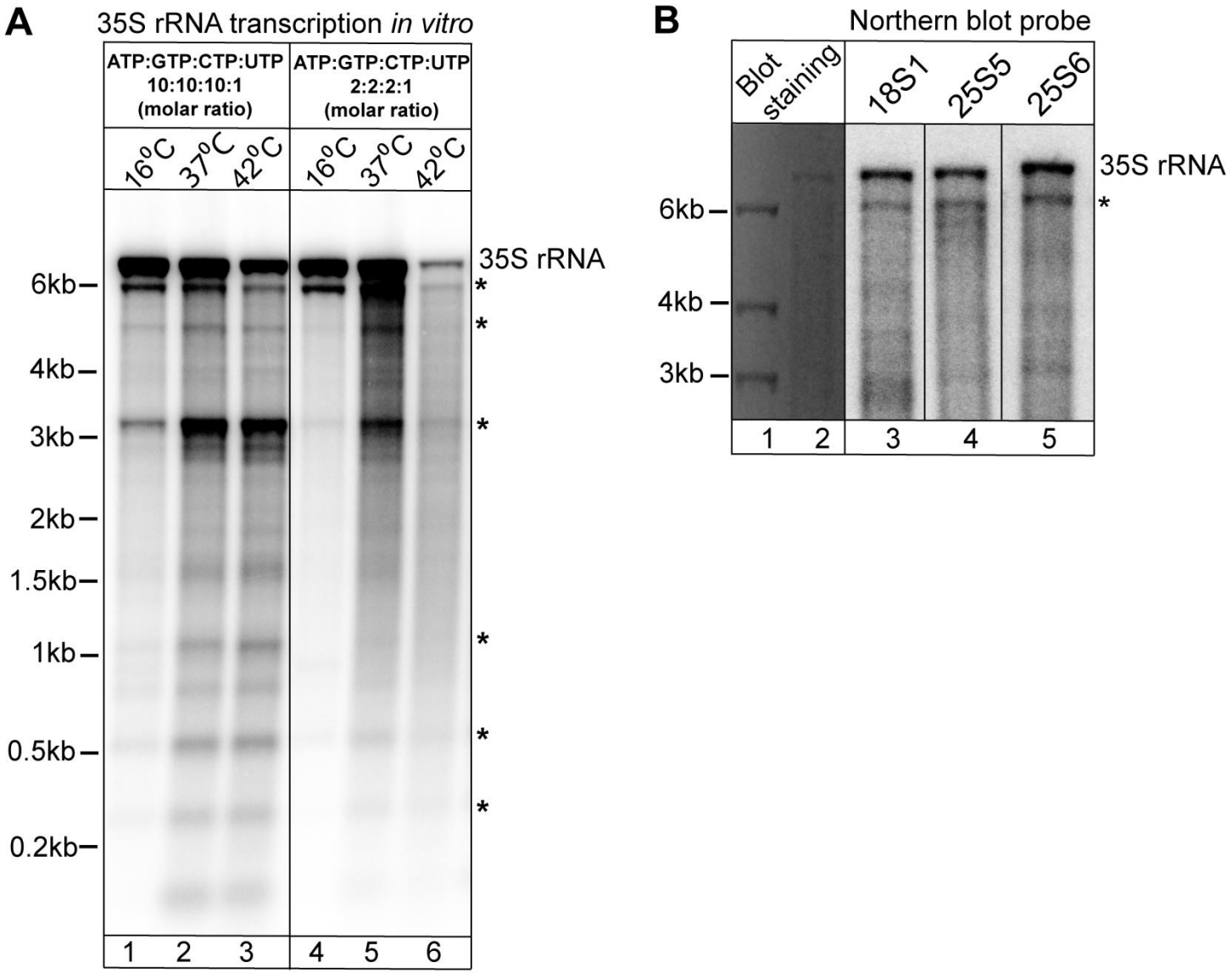


Figure S2. Comparison of qTRO signals obtained using fresh harvested cells or flash-frozen

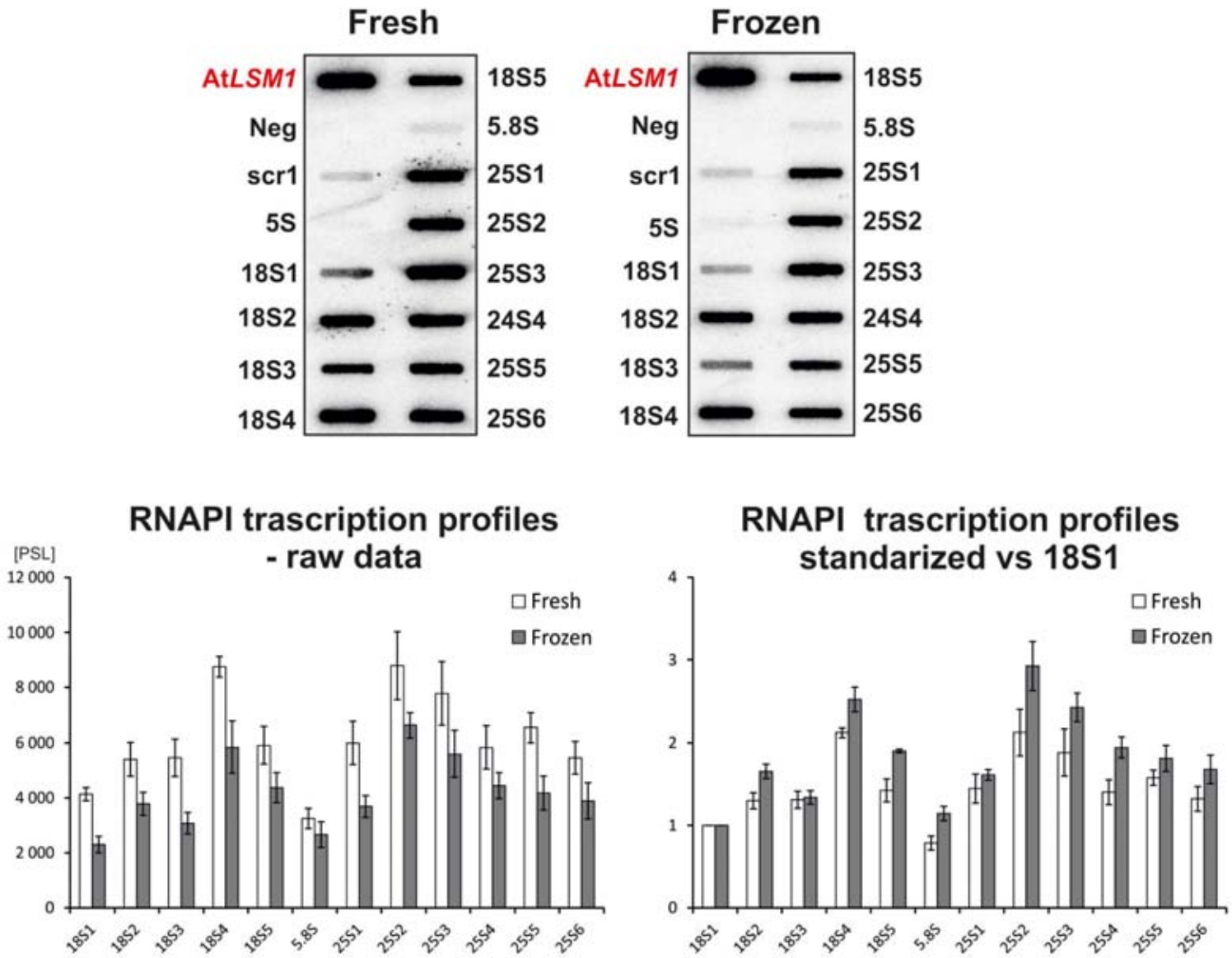


Figure 2. Decrease in rRNA transcription correlates with RNAPI dissociation from the template upon oxidative stress

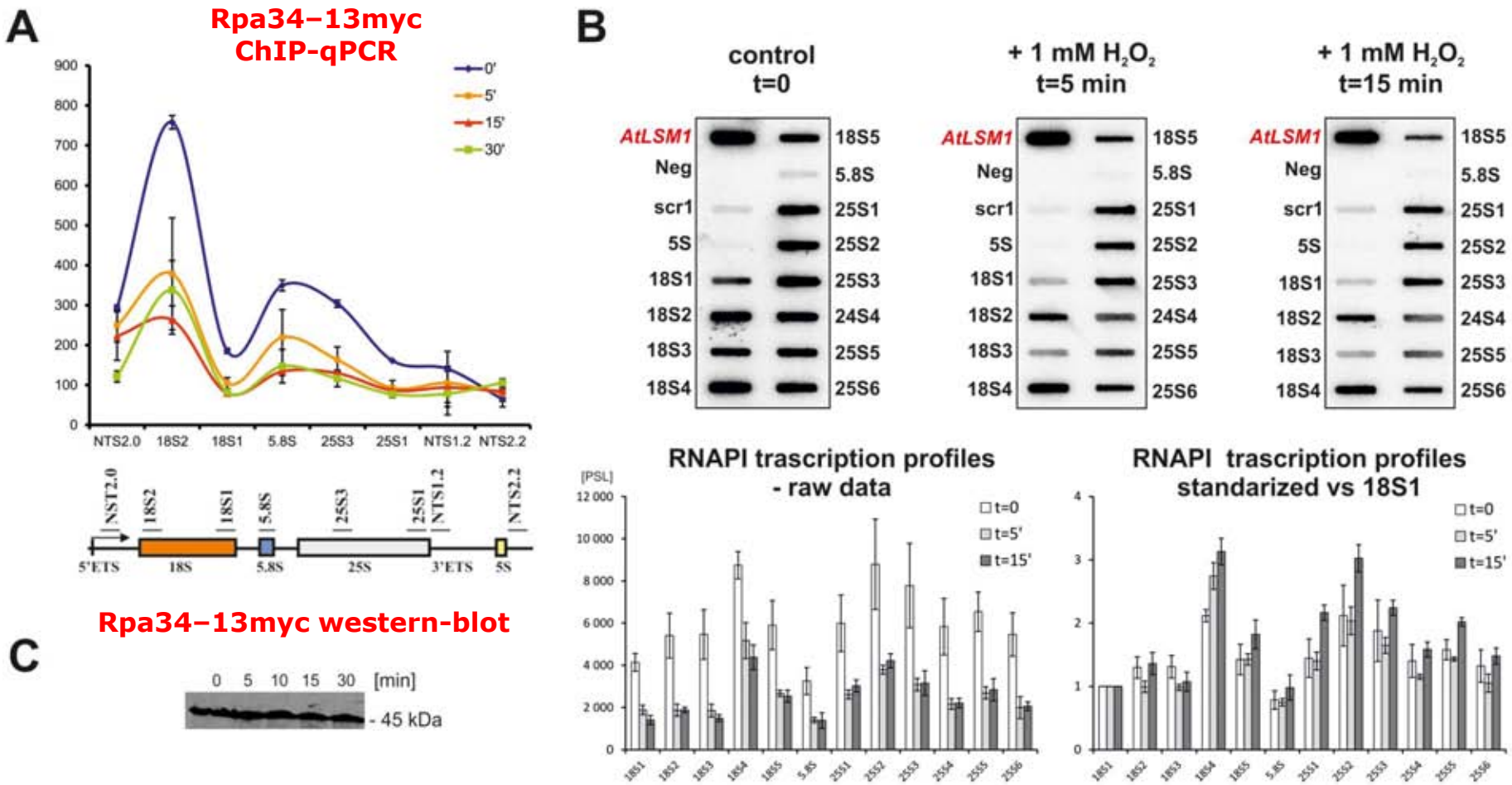
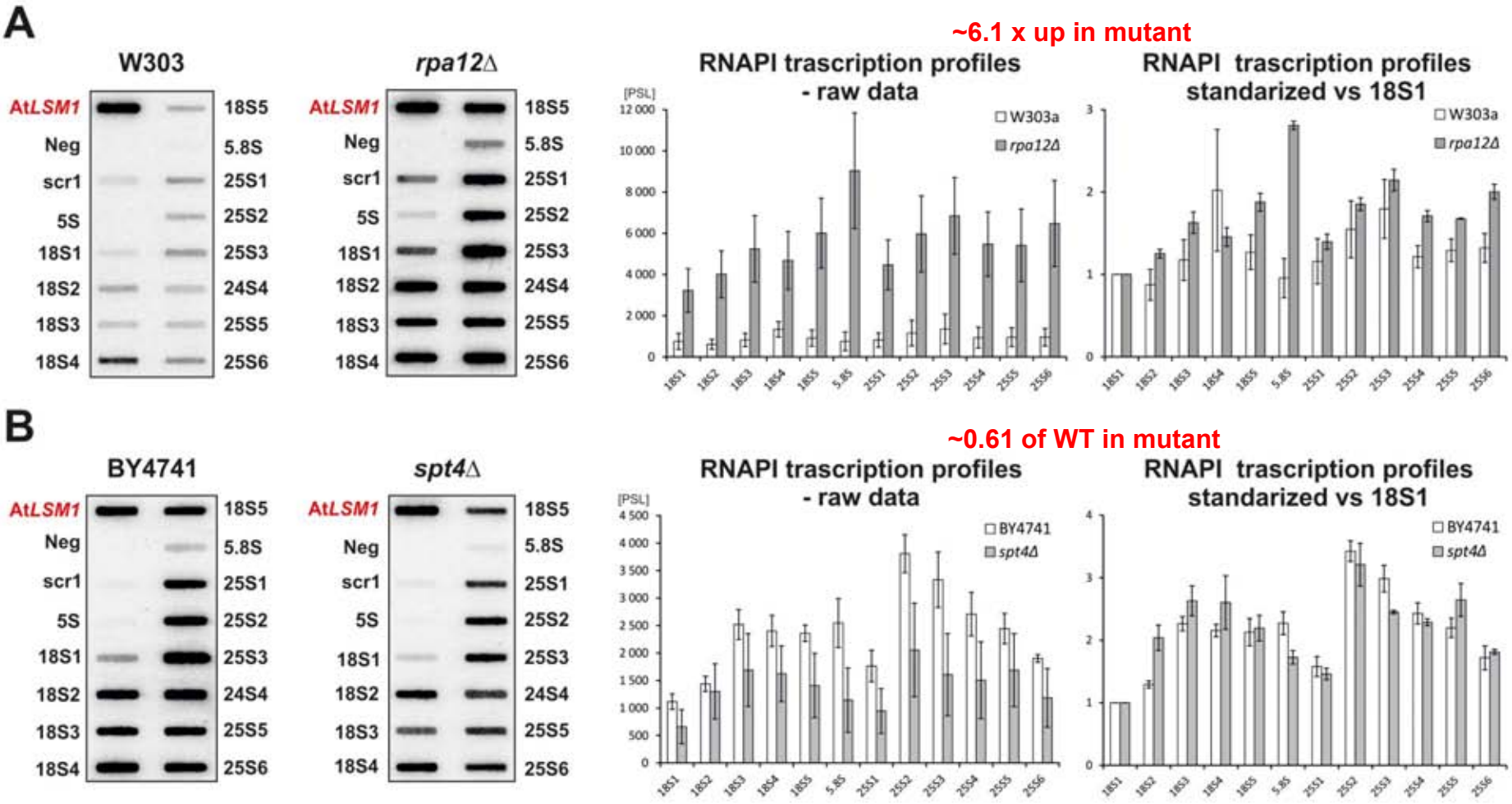


Figure S3. RNAPI transcription strength and profiles in mutants with impaired rRNA synthesis

Rpa12 – podjednostka Pol RNA I; Spt4 (razem z Spt5) elongacyjny czynnik Pol RNA I i II