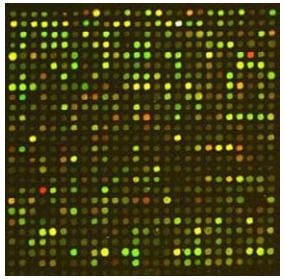
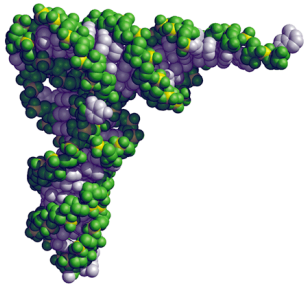


Wysokoprzepustowe metody badania transkrypcji

Struktura a funkcja RNA

Michał Koper, IGiB UW

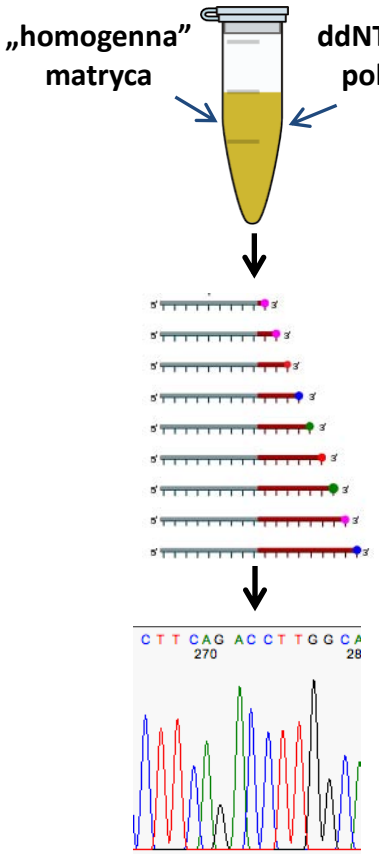


Sekwencjonowanie DNA nowej generacji - NGS

(„wysokoprzepustowe”)

Sanger *versus* NGS

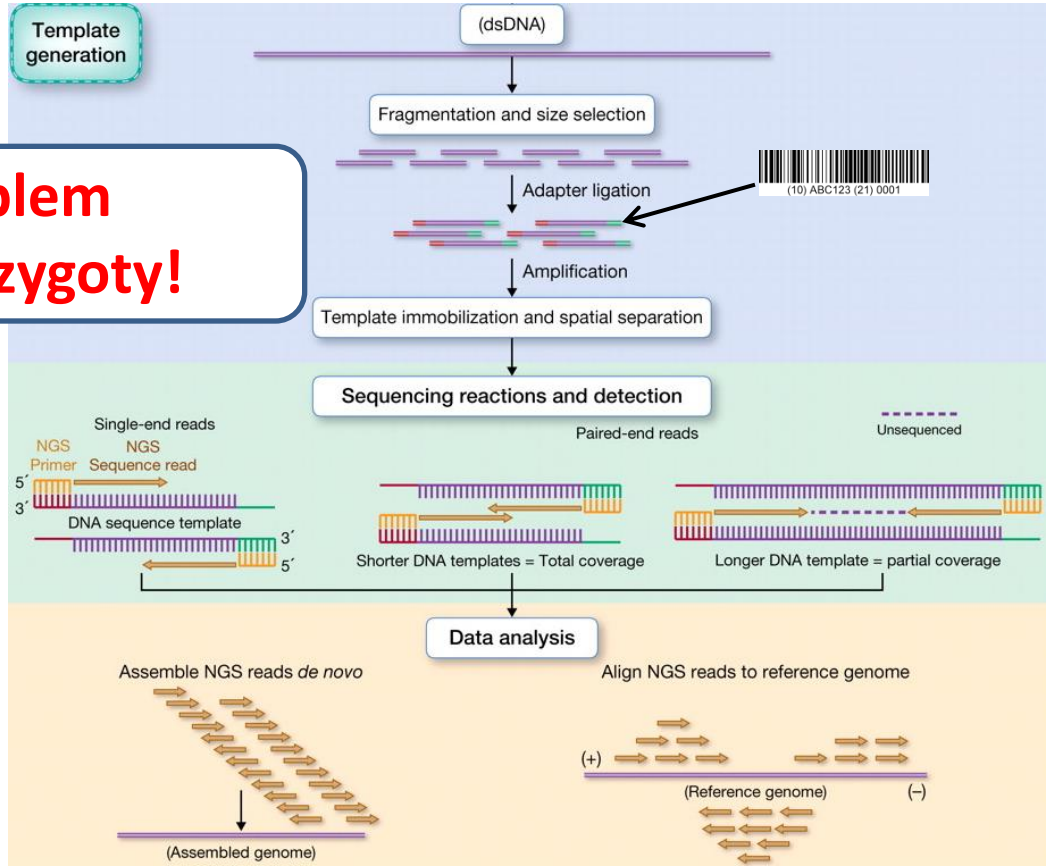
Sekwencjonowanie Sangera



Problem heterozygoty!

N G S

(wysokoprzepustowe; masowe sekwencjonowanie równoległe)



Rizzo and Buck; Cancer Prev Resss 2012

- **do 96 odczytów** (odczyt=próba)
- **600**-1200 **bp na odczyt**
- **do ok. 100 kbp na „run”**

- **od setek tyś. do 20 miliardów odczytów** (multipleks)
- **zwykle od 2x50 bp do 2x300 bp na odczyt** (do 20 kbp)
- **do ok. 6 Tbp na „run”**

Sekwencjonowanie nowej generacji – różne technologie

Sekwencjonowanie 2-giej generacji
(obecnie platformy „zombie”)

Pirosekwencjonowanie: przez syntezę z kaskadą 4 reakcji enzymatycznych (454; Roche) – historycznie pierwsza komercyjnie dostępna platforma NGS (2005-2016); Marquiles et. al., Nature 2005.

SOLID: przez ligację fluorescencyjnie znakowanych krótkich oligonukleotydów (Life Technologies)

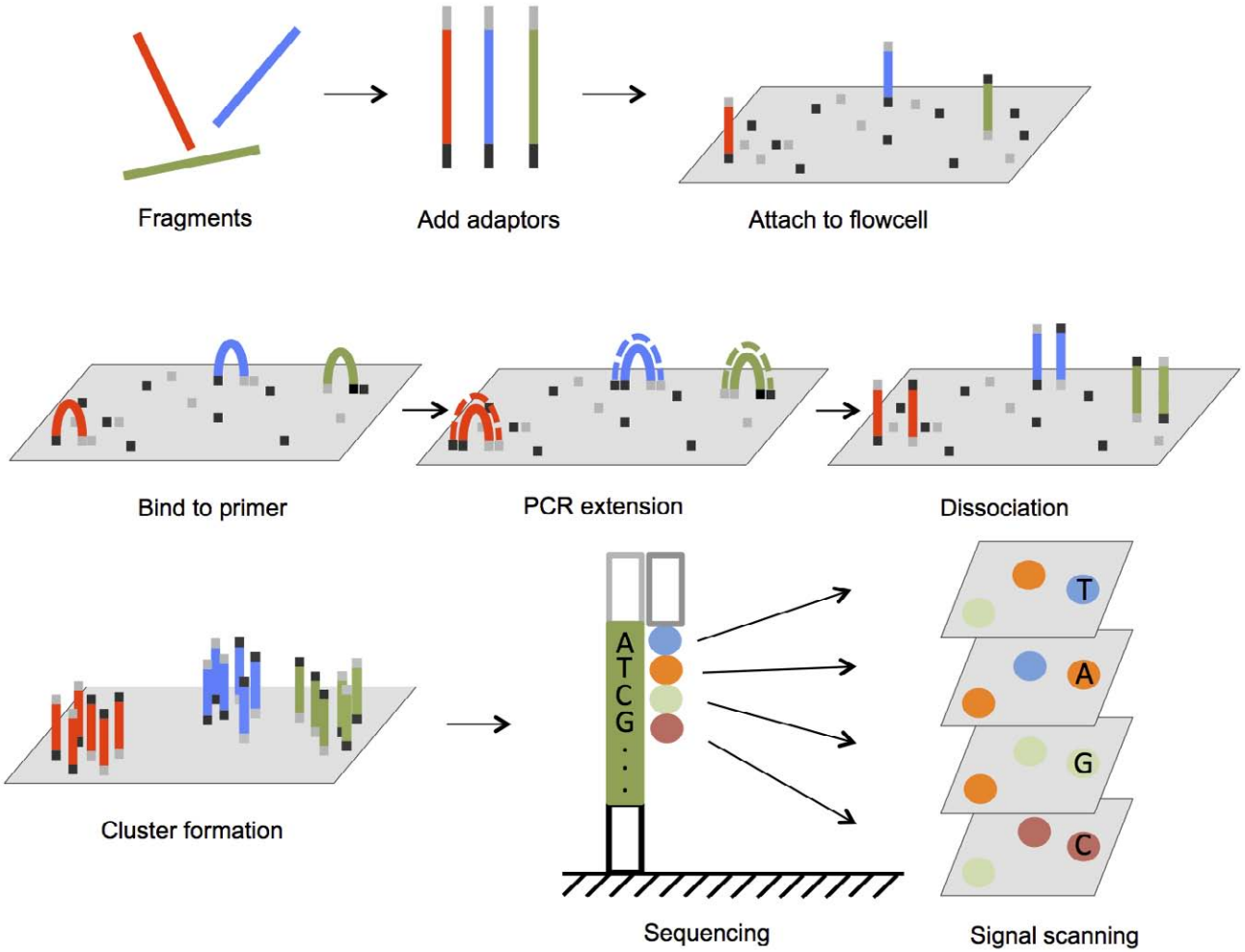
Sekwencjonowanie 3-ciej generacji

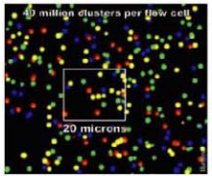
Illumina: mostkowe, przez syntezę z odwracalną terminacją (SBS – sequencing by synthesis) – **obecnie najczęściej stosowana i najbardziej wydajna technologia** (do 6 Terra par zasad / 2 dni pracy urządzenia)

Ion Torrent: przez syntezę z detekcją protonów na układzie scalonym (Life Technologies/ThermoFisher Scientific)

PacBio: technologia SMRT (Single Molecule Real-Time sequencing) – najdłuższe odczyty (10-20 kb) (Pacyfic Biosystems)

Technologia Illumina





Lu et. al., „Next Generation Sequencing in Aquatic Models" in „Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges", 2016.

Flow cell

Sequencer

http://www.illumina.com/

Sekewncjonowanie w technologii Illumina: mostkowe, przez syntezę z odwracalną terminacją

https://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM

http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf

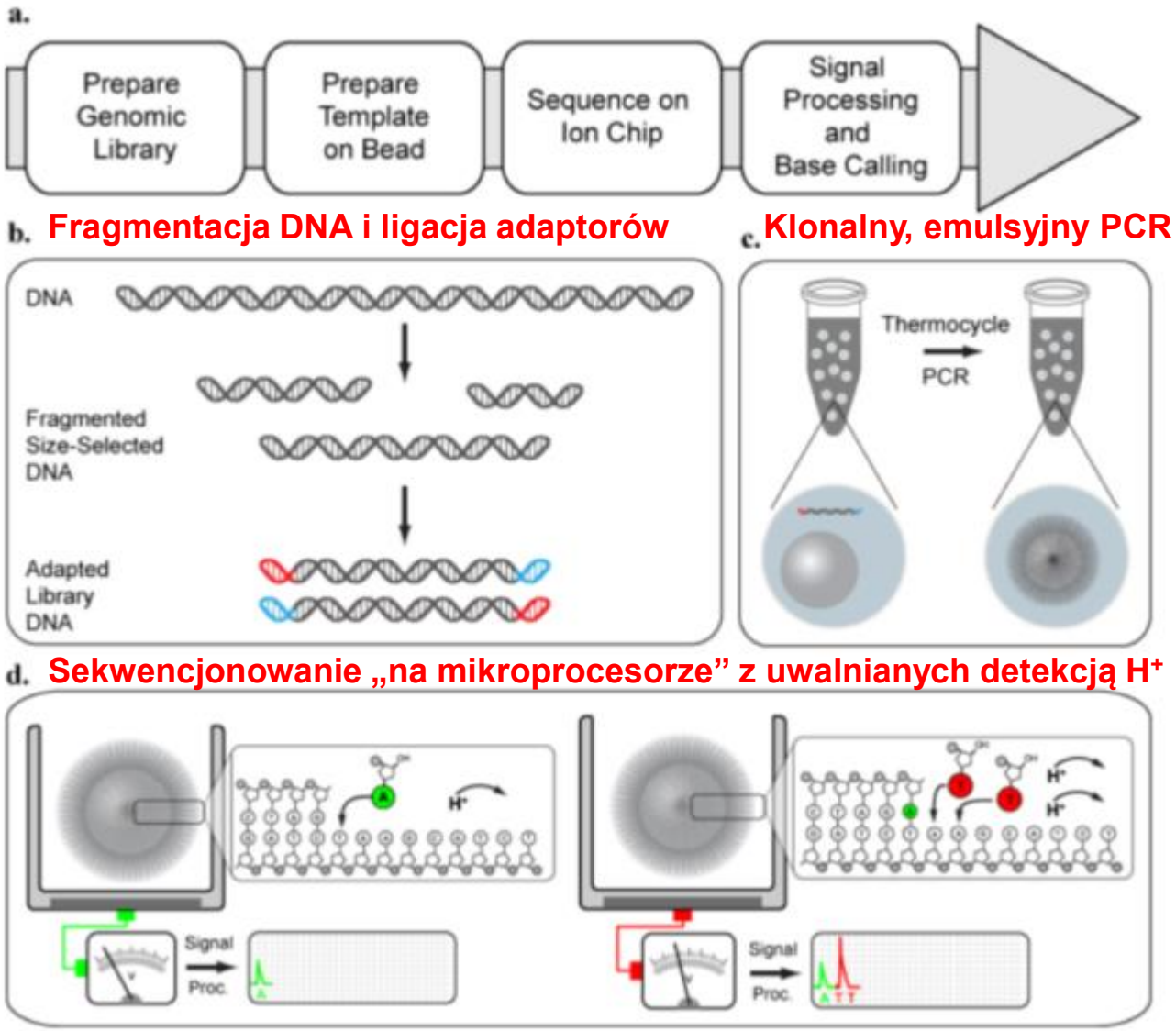
Illumina sequencers

MiSeq

NextSeq

NovaSeq 6000

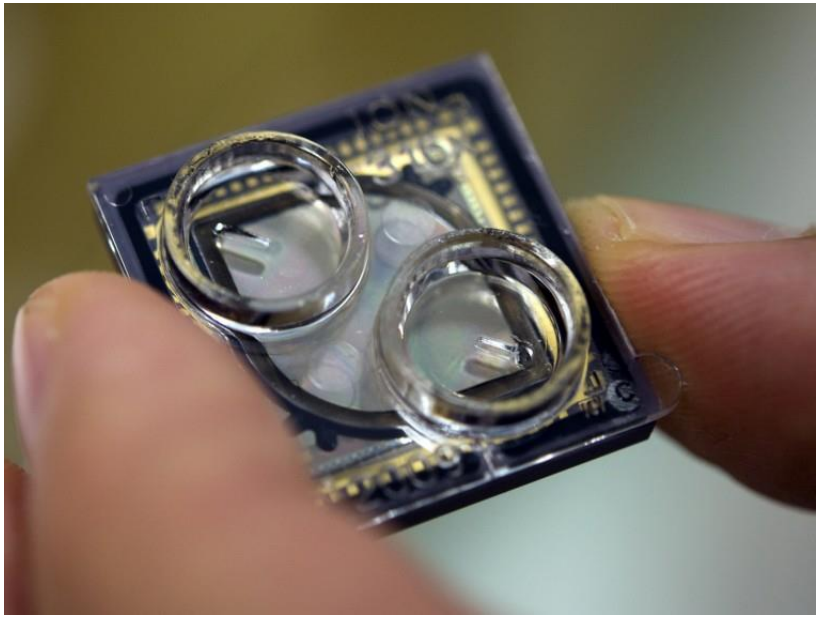
Sekwencjonowanie w technologii Ion Torrent: przez syntezę z detekcją protonów na układzie scalonym

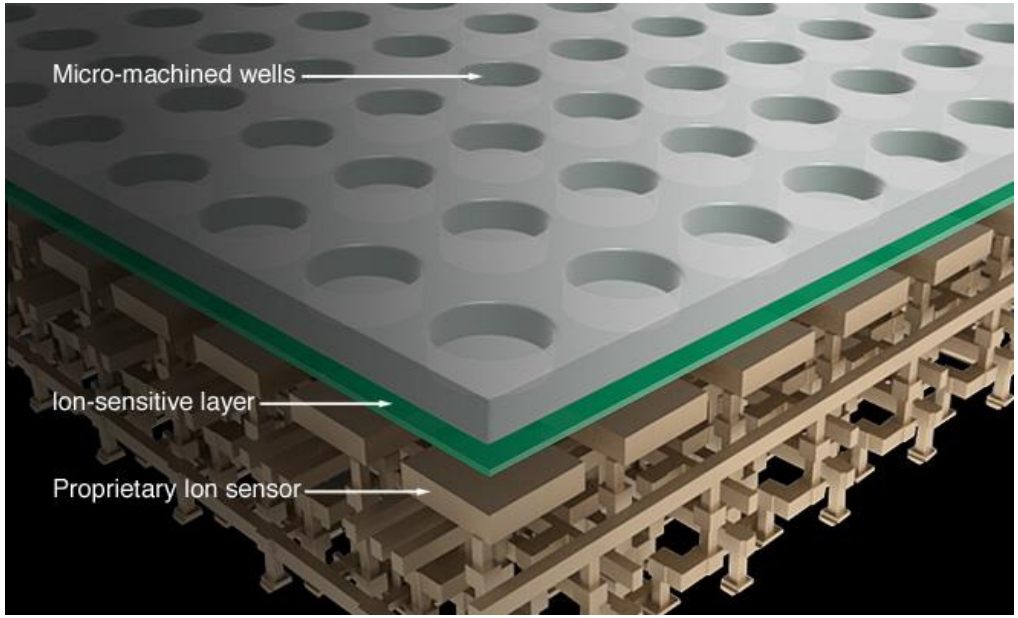


http://www.lifetechnologies.com/pl/en/home/brands/ion-torrent.html

Sekwencjonowanie w technologii Ion Torrent: przez syntezę z detekcją protonów na układzie scalonym

Ion-Torrent sequencing microprocessor





Ion Torrent sequencers

PGM

Proton

Ion S5

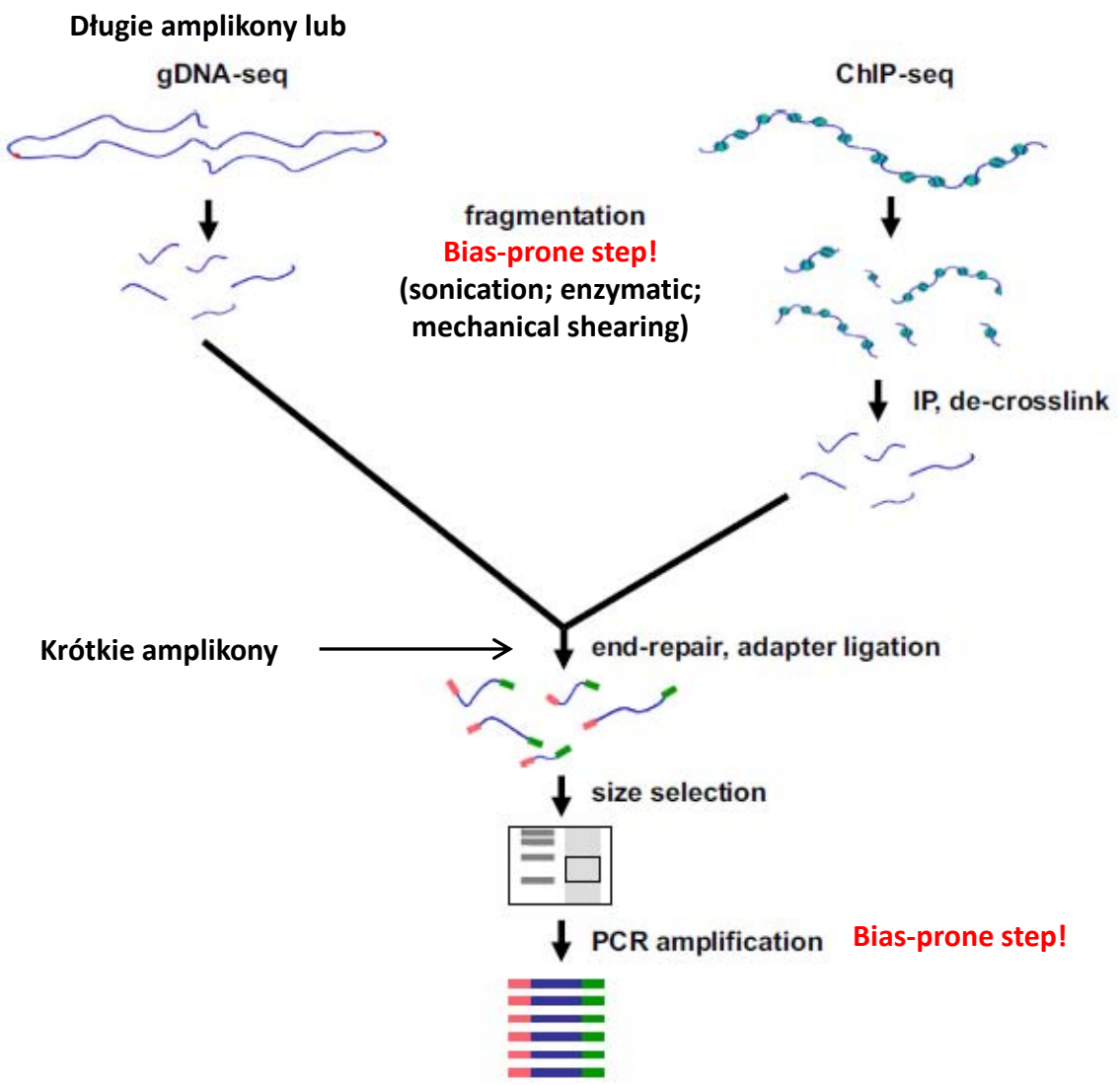
http://www.lifetechnologies.com/pl/en/home/brands/ion-torrent.html
https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxIfuKs

Metody wykorzystujące NGS

Sample collection
E.g., Normal tissue
Source material
E.g., Tumor sample
WGS
Targeted genomic/Epigenomic sequencing
Hypersensitive sites
TFBSs
Histone modifications (e.g., acetylation, methylation)
DNA modifications (e.g., methylation)
RNA-binding protein
E.g., splicing variants and copy number variation
RNA polymerase
Nucleosome (histone proteins)
CH_3
CH_3CO
CH_3
RIP-seq
Transcripts
RNA-seq
Bisulfite-seq
RNA
MNase-seq
5c-seq
DNase-seq
FAIRE-seq
ChIP-seq
Gene
Reverse transcription
Intron (noncoding)
Exon (coding region)
Long-range regulatory elements (enhancers, repressors/ silencers, insulators)
Cis-regulatory elements (promoters, TFBSs)
"Exome" sequencing
cDNA

Rizzo and Buck; Cancer Prev Res 2012

Przygotowywanie bibliotek NGS dla DNA



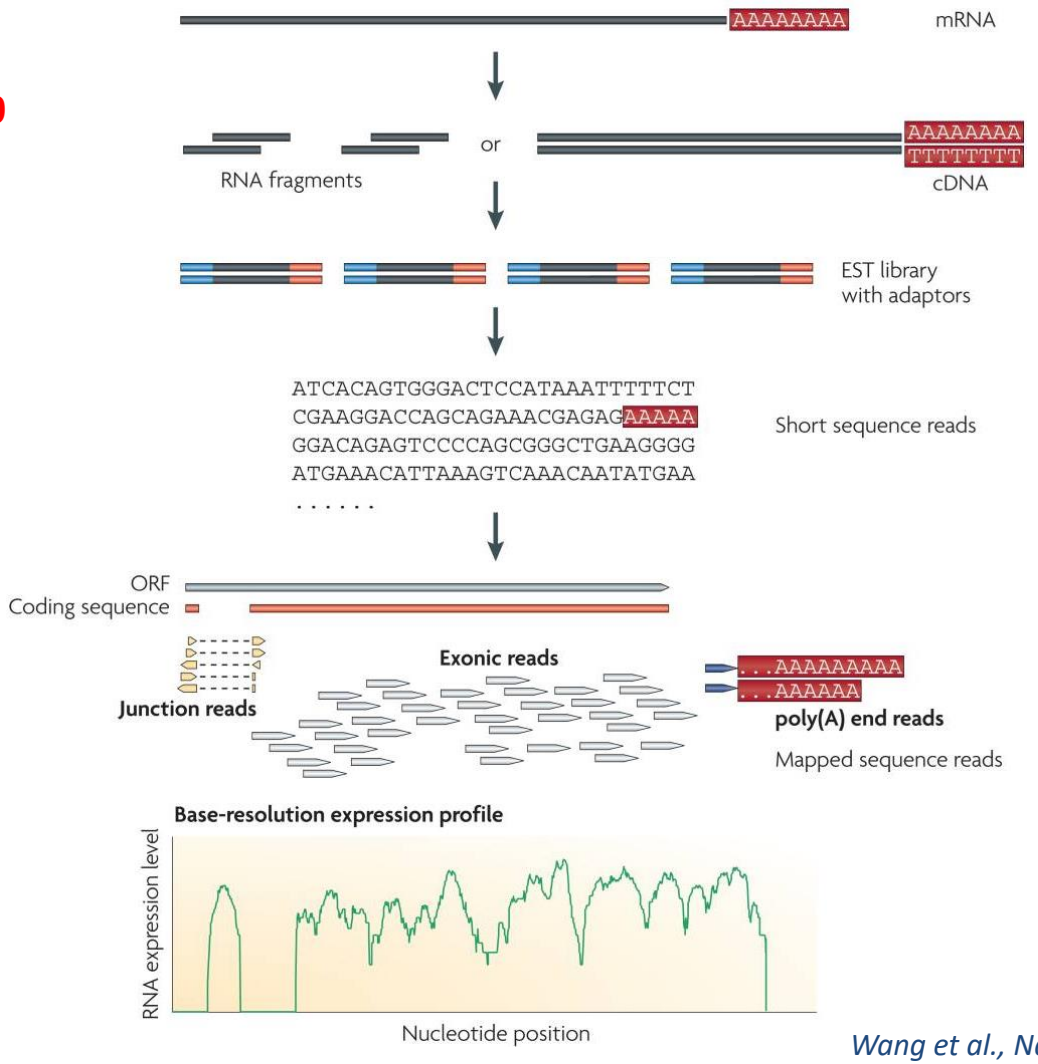
van Dijk et. al., Exp Cell Res. 2014

Typowe doświadczenie mRNAseq

Pierwszy raport *Mortazavi et. al., Nature 2008*

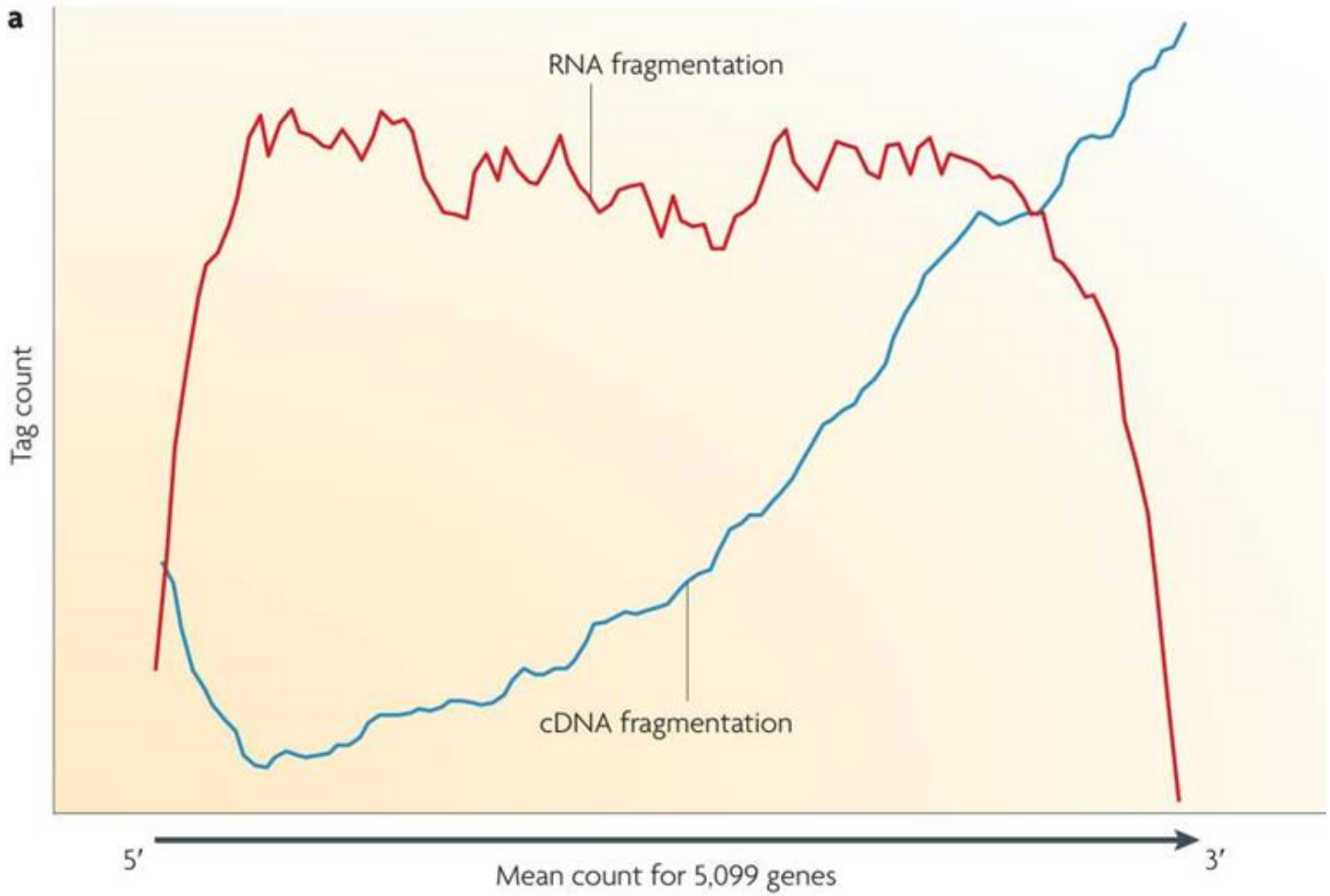
RNA o wysokiej jakości, RIN>7.5-8.0

Selekcja frakcji PolyA+ na złożu oligo-dT



Wang et al., Nat Rev Genet. 2009

Po co fragmentować RNA?



Wang et al.,
Nat Rev Genet. 2009

Rodzaje bibliotek do RNA-seq

Total RNA library

- Usually depleted of rRNA.
- Represents whole transcriptome.

PolyA selected library

- oligo(dT) selected RNA's – poly A+ fraction.
- Usually understood as mRNAs but also refers to some ncRNAs with polyA tails.

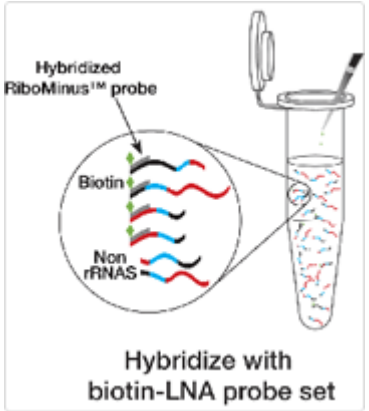
small RNA library

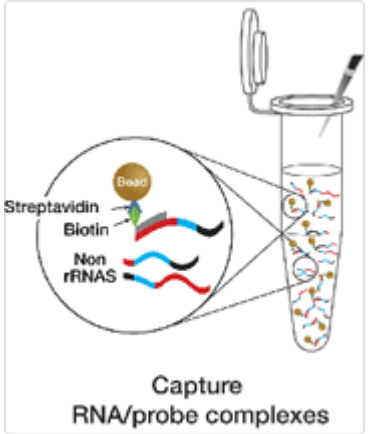
- Usually refers to micro RNA and other smaller then ~ 200 nt nc RNAs.
- Size selected library.
- Size selection based on magnetics beads.
- Specific RNA isolation protocol that – promotion of small RNA precipitation.

- **Specyficzne względem nici**
- **Niespecyficzne względem nici**

RNAseq dla całego transkryptomu

Usuwanie rRNA z całkowitego RNA (*rRNA depletion*)

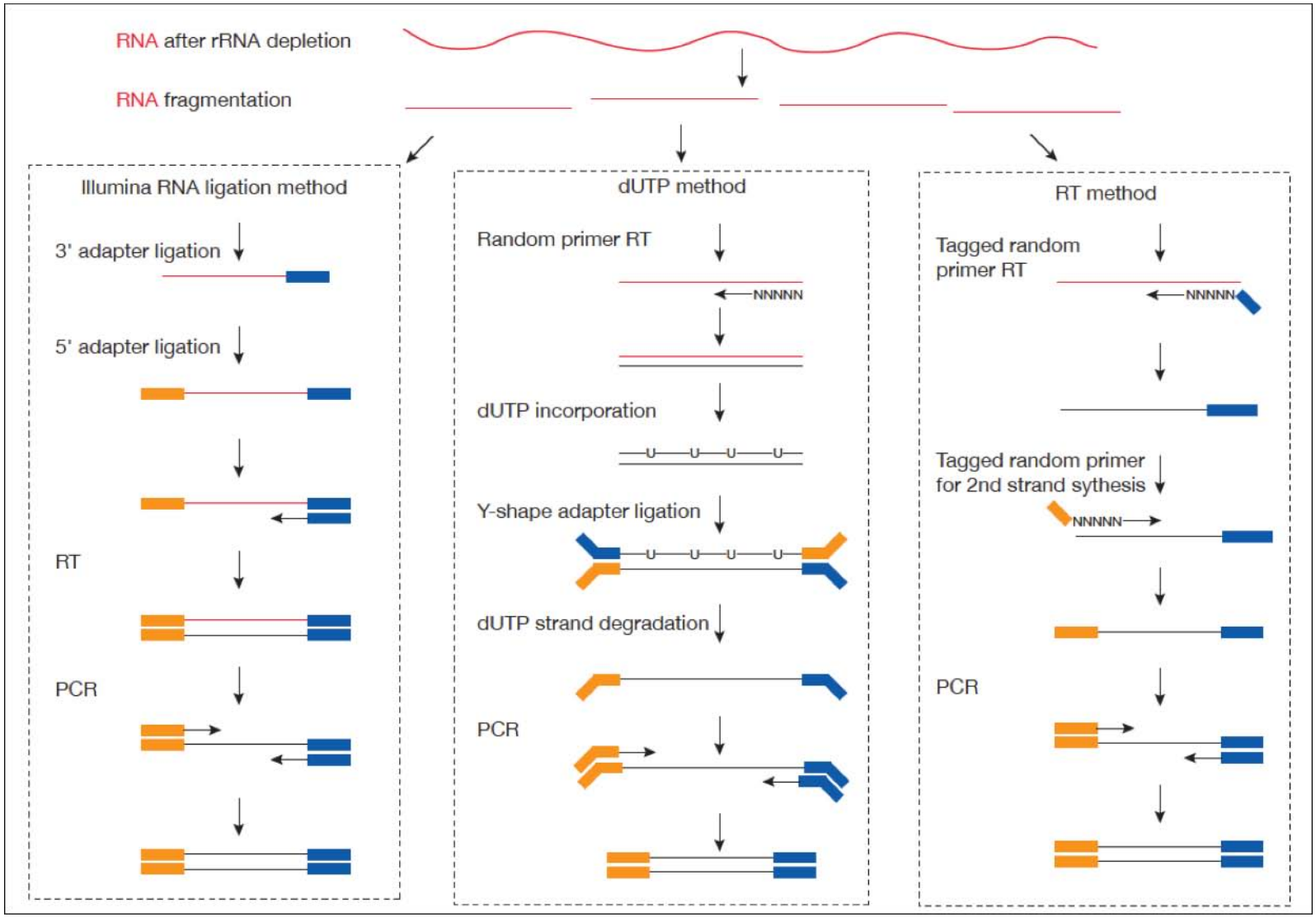




RiboMinus™ Technology by Life Technologies (ThermoFisher)

Podobnie działa Ribo-Zero by Epicenter (Illumina)

Konstruowanie bibliotek do RNAseq



dUTP-marked strand is selectively degraded by Uracil-DNA-Glycosylase (UDG)

http://onetipperday.blogspot.com/2012/07/how-to-tell-which-library-type-to-use.html

Paired-end vs single-end sequencing

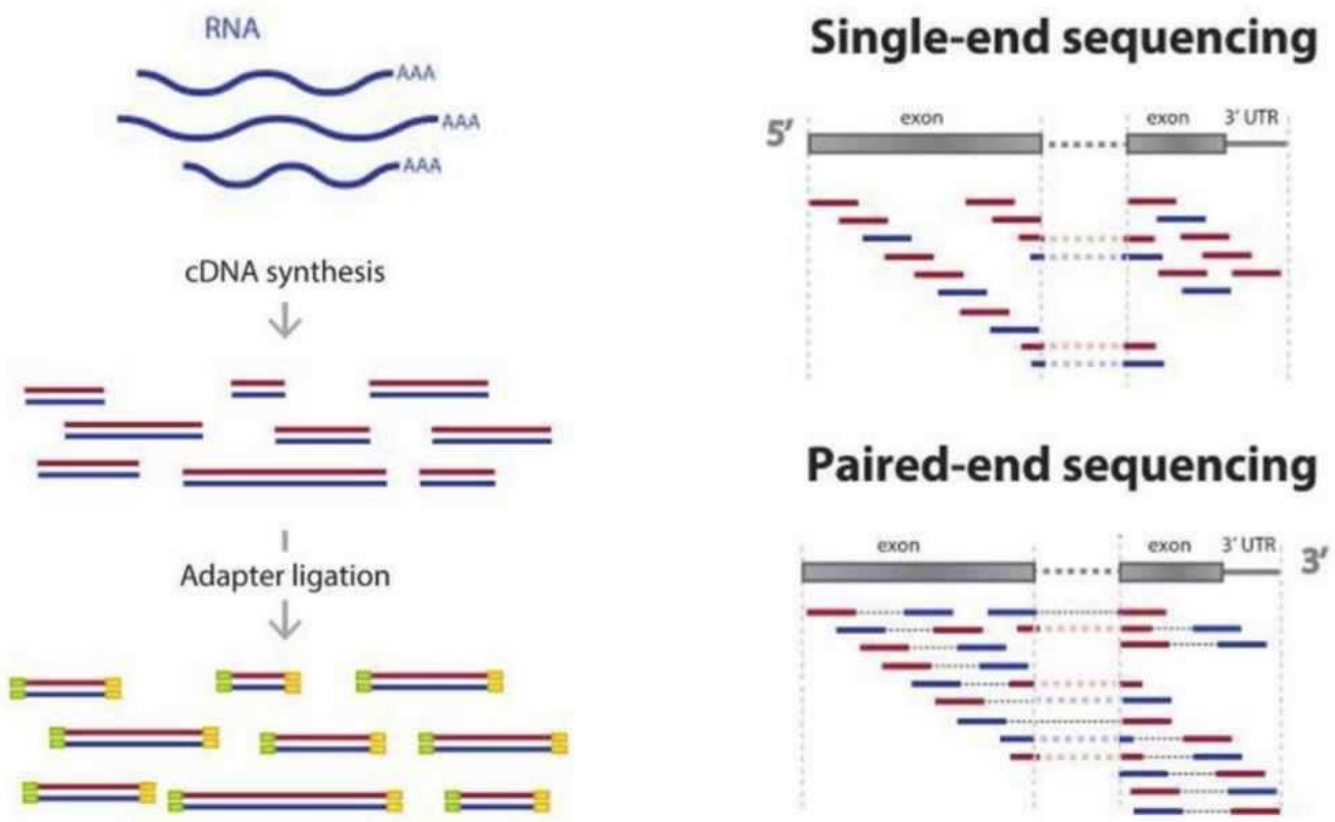


Image adapted from Zhernakova, et al., PLoS Genet. 2013 June; 9(6): e1003594.

ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChiP-seq

- **Immunoprecypitacja chromatyny**
- **Detekcja immunoprecypitowanego DNA na mikromacierzach lub via sekwencjonowanie nowej generacji**
- **Pozwala na badanie oddziaływań białka-DNA na skalę genomową : dystrybucja wiązania czynników transkrypcyjnych czy dystrybucję polimerazy RNA II**

Methods 48 (2009) 398–408

Contents lists available at ScienceDirect

Methods

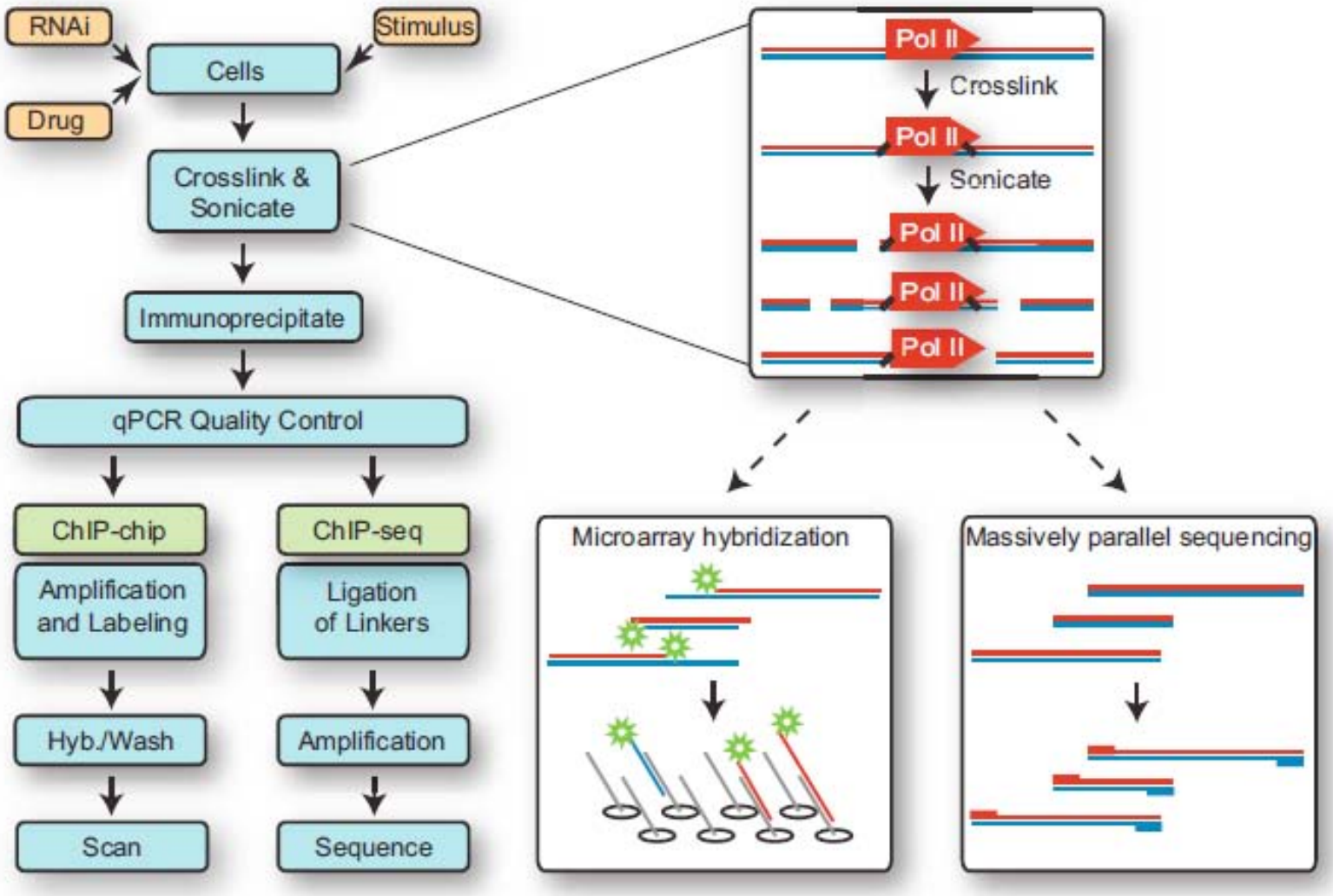
journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth

Review Article

Using ChIP-chip and ChIP-seq to study the regulation of gene expression: Genome-wide localization studies reveal widespread regulation of transcription elongation

Daniel A. Gilchrist [a], David C. Fargo [b], Karen Adelman [a,*]

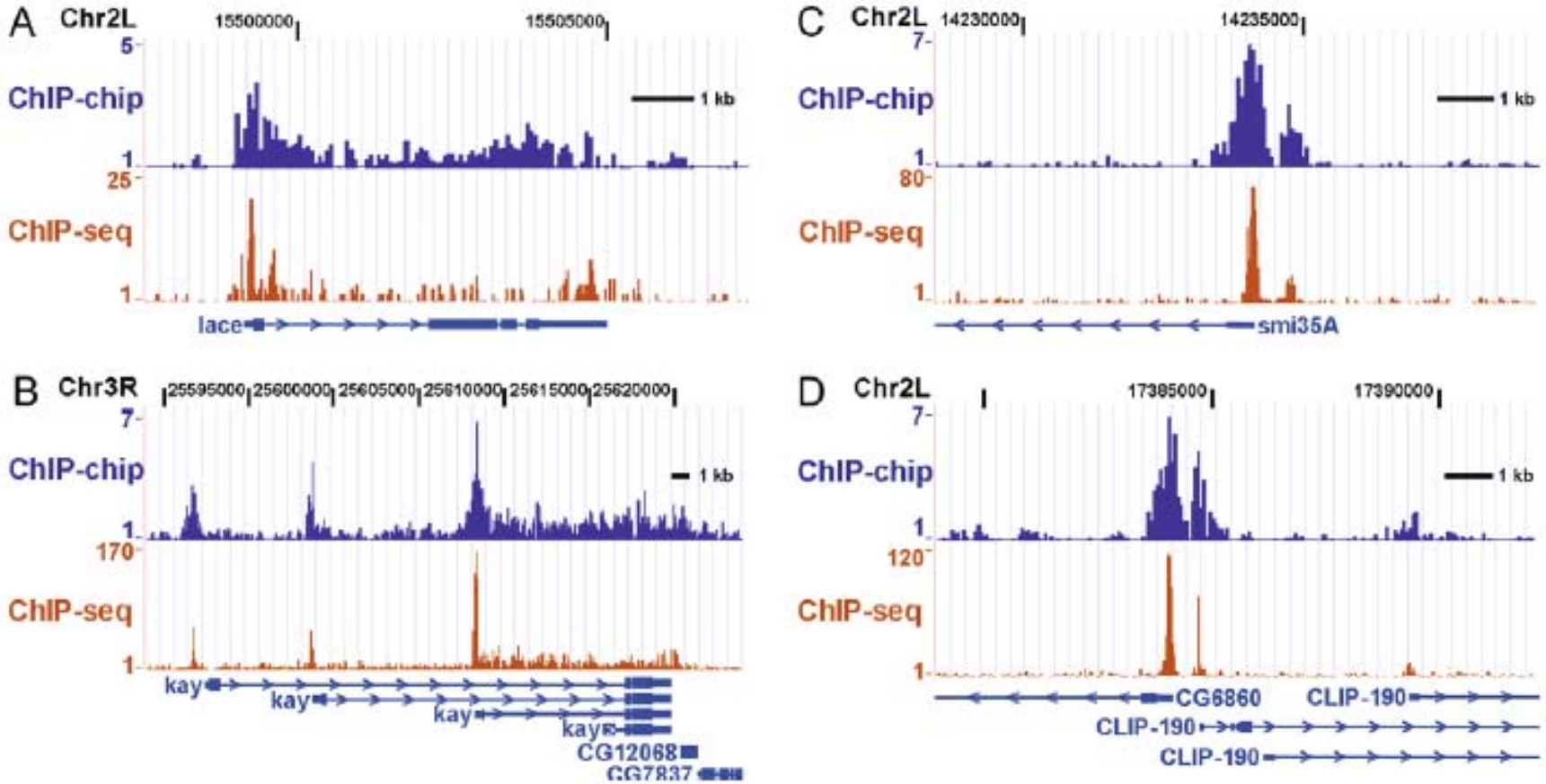
ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChiP-seq



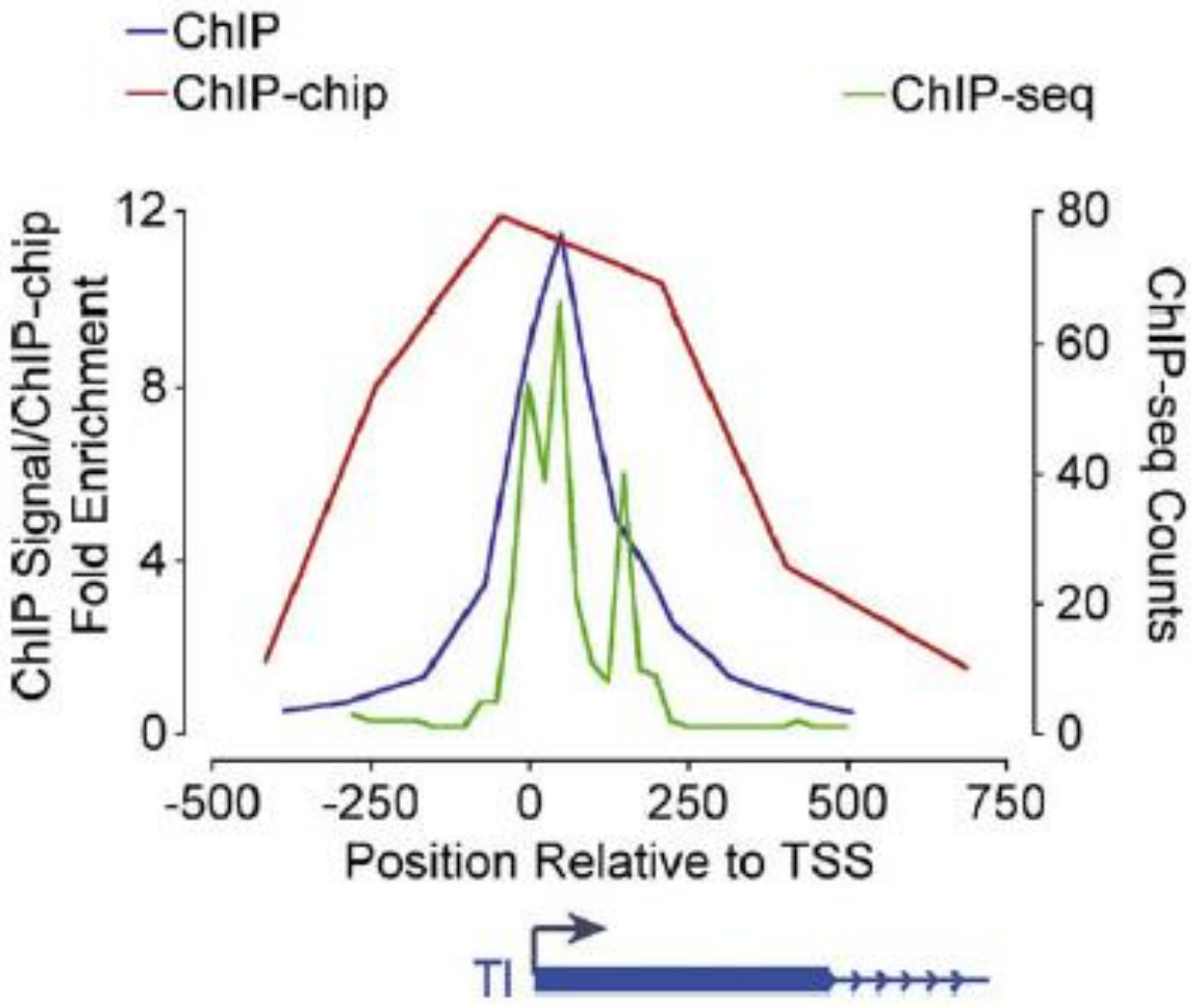
Gilchrist i wsp, 2009

ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChiP-seq

D.A. Gilchrist et al / Methods 48 (2009) 398–408

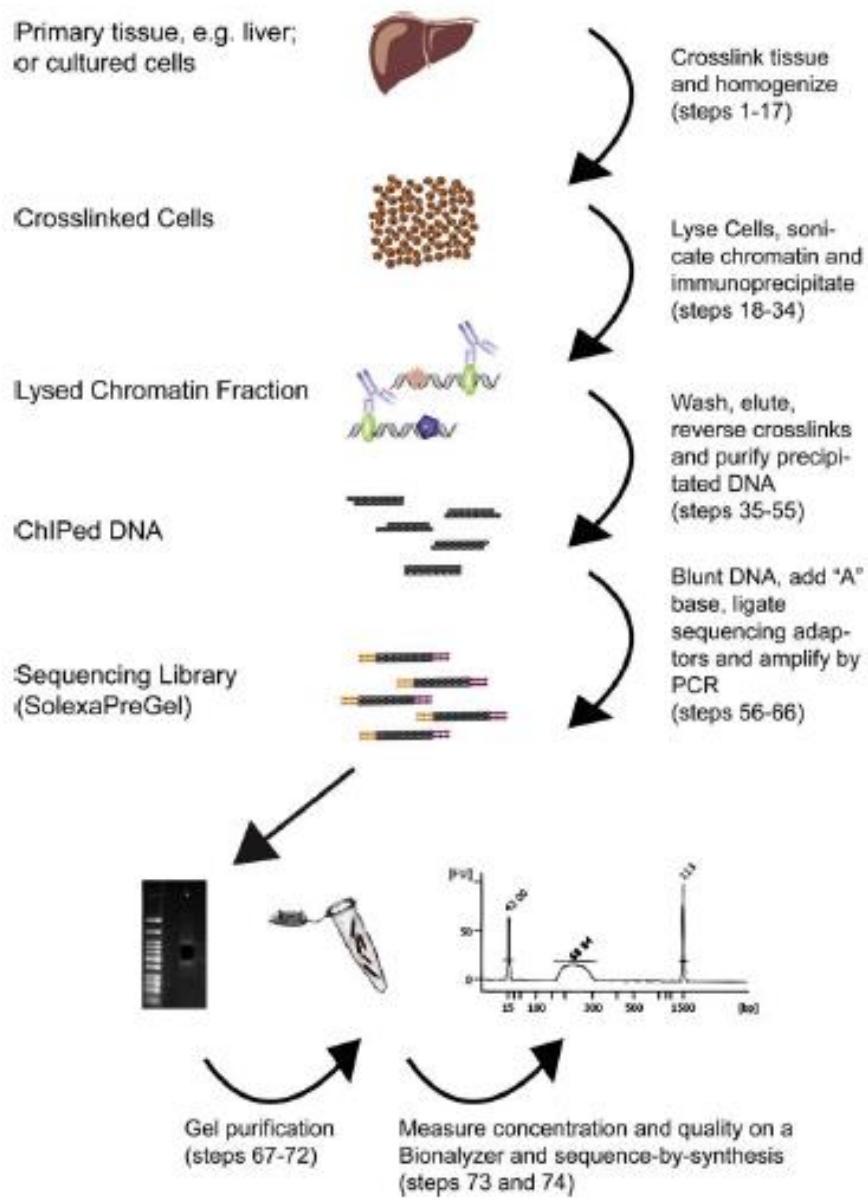


ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChiP-seq



Gilchrist i wsp, 2009

ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChiP-seq



Methods 48 (2009) 240–248

Contents lists available at ScienceDirect

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth

ChIP-seq: Using high-throughput sequencing to discover protein–DNA interactions

Dominic Schmidt [a,b], Michael D. Wilson [b], Christiana Spyrou [b,c], Gordon D. Brown [b], James Hadfield [b], Duncan T. Odom [a,b,*]

Sekwenatory NGS – możliwości a koszty

Instrument	Amplification	Run time	Millions of Reads/run	Bases / read	Reagent Cost/run	Reagent Cost/Gb	bp/run	Gbp/run	cost/Gb
Applied Biosystems 3730 (capillary)	PCR, cloning	2 hrs.	0.000096	650	$144	$2,307,692.31	62,400	0	$2,307,692.31
Illumina MiSeq v3	bridgePCR	56 hrs.	25	600	$1,530	$102.00	15,000,000,000	15	$102.00
Illumina NextSeq 500 - High v2	BridgePCR	29 hrs.	400	300	$4,240	$35.33	120,000,000,000	120	$35.33
Illumina HiSeq 2500 - high output v3	BridgePCR	11 days	1500	200	$15,860	$52.87	300,000,000,000	300	$52.87
Illumina HiSeq 2500 - high output v4	BridgePCR	40 hrs.	2000	50	$6,240	$62.40	100,000,000,000	100	$62.40
Illumina HiSeq 4000	BridgePCR	3.5 days	2500	300	$15,400	$20.53	750,000,000,000	750	$20.53
Illumina HiSeq X - Ten	BridgePCR	< 3 days	3000	300	$6,375	$7.08	900,000,000,000	900	$7.08
Ion Torrent – PGM 314 chip v2	emPCR	4 hrs.	0.55	400	$474	$2,154.55	220,000,000	0.22	$2,154.55
Ion Torrent - S5 540 chip	emPCR	2.5 hrs.	80	200	$1,275	$79.69	16,000,000,000	16	$79.69
Pacific Biosciences Sequel	None - SMS	≤6 hrs.	0.385	10000	$700	$181.82	3,850,000,000	3.85	$181.82

+ Illumina NovaSeq 6000 (2016/17) – do 20 mld. odczytów, 6 Tb

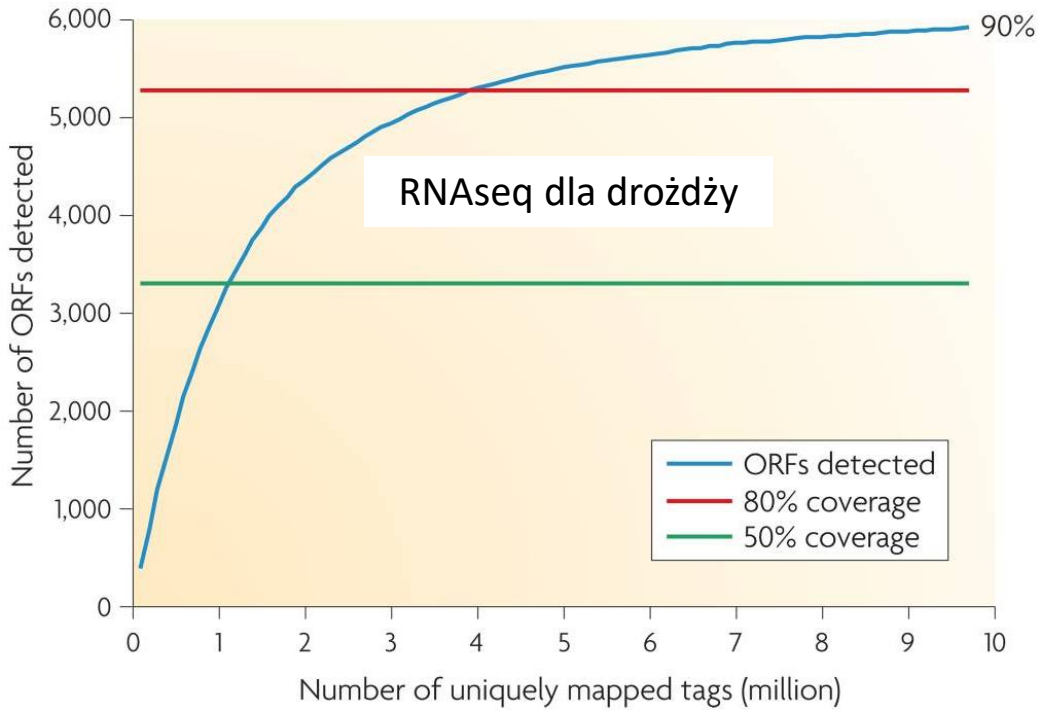
Glenn, TC (2011) Field Guide to Next Generation DNA Sequencers. Molecular Ecology Resources. 2016 Update.

http://www.molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2016/

Dobór platformy NGS i przepustowości

Resekwencjonowanie genomów – wymagane pokrycie ~ **30X**
Sekwencjonowanie genomów *de novo* – wymagane pokrycie ~ **100X**

Wymagane Pokrycie w RNAseq zależy od stopnia skomplikowania genomu i zamierzonej „**czułości**" doświadczenia



Wang et al., Nat Rev Genet. 2009

Transkryptom drożdży ~ 5-10 mln. odczytów
Transkryptom człowieka ~ 20-30 mln. dla mRNA, 50-200 mln. dla całkowitego RNA

NGS „in house” *versus* „outsourcing”

„Must have a box”... nie tylko same sekwenatory!

Pracownia NGS w IGiB UW

Illumina MiSeq

http://www.illumina.com/

Ion Torrent

PGM

Proton

http://www.lifetechnologies.com/pl/en/home/brands/ion-torrent.html

Covaris S220

http://covaris.com

Agilent Bioanalyzer 2100

https://www.genomics.agilent.com

Serwer obliczeniowy + stacje robocze + CLC

http://dell.com

Koszty doświadczeń RNAseq

Najtańszy wariant:

mRNAseq 2x150 bp, 20 mln. odczytów od 200$/próbę z analizą bioinformatyczną

Typowe sekwencjonowanie całkowitego RNA:

przykładowa usługa w Polsce przy skali 20 prób (brutto):

~ 1 000 PLN/próbę – przygotowanie biblioteki (z „rybodeplecją”) **~ 500** (selekcja mRNA)

+

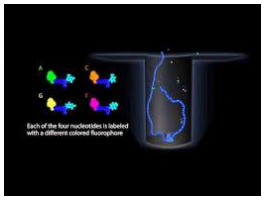
~ 900 PLN/próbę – sekwencjonowanie Illumina 2x100 bp, 40 mln odczytów/próbę

= ~ 1 500 - 2 000/próbę (dane tylko do formatu FASTQ)

Perspektywy rozwoju NGS

1. **Uproszczenie konstrukcji bibliotek**

PacBio Systems *Sequel*



http://www.pacb.com

2. **Wydłużenie odczytów bez spadku ich jakości**

Oxford Nanopore Technologies
***MiniION* (Plug and Play sequencer)**

3. **Sekwenatory na prawdę „personalne”**

http://www.sciencemag.org

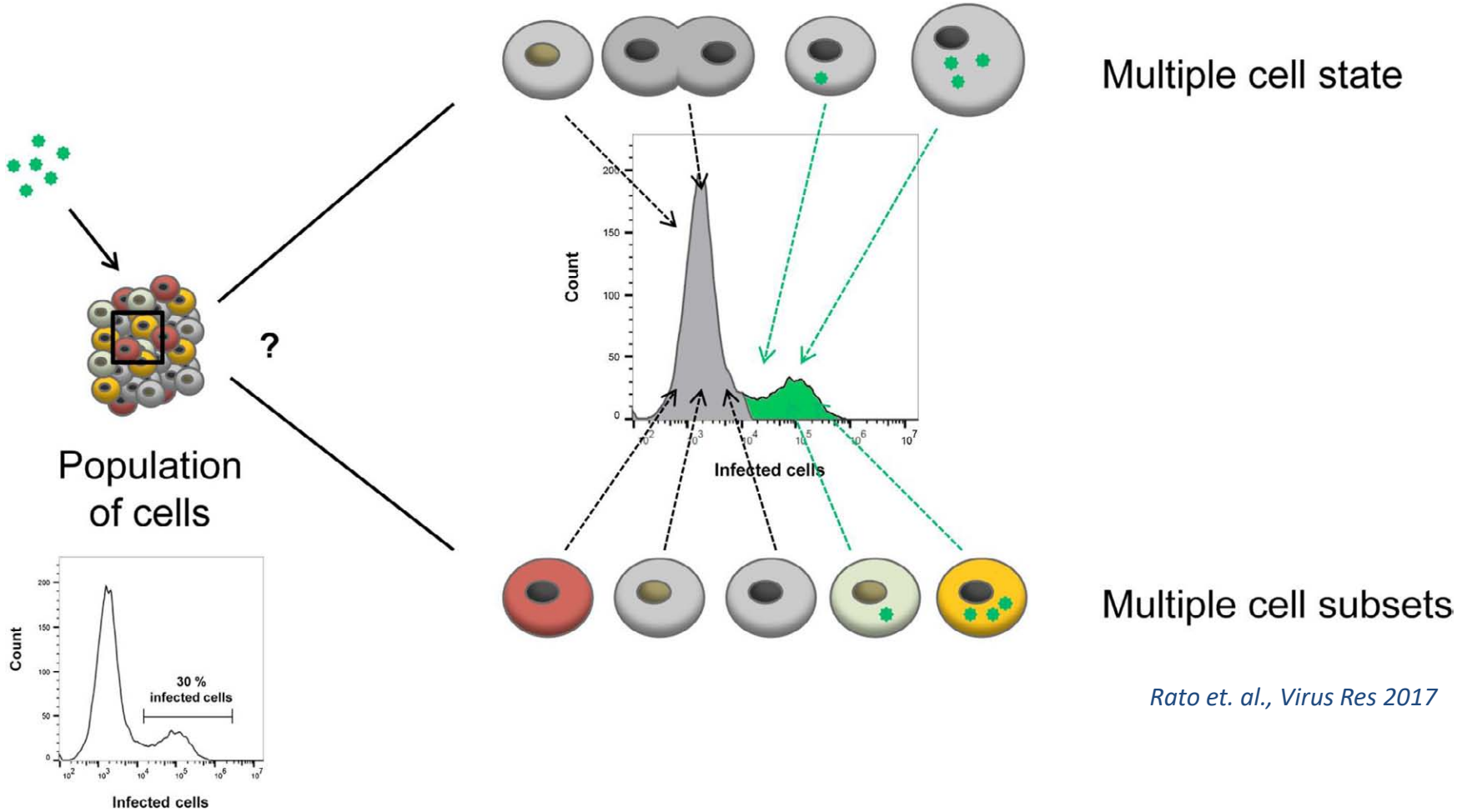
4. **Uproszczenie, zautomatyzowanie analizy bioinformatycznej + kształcenie bioinformatyków**

5. **Nowe zastosowania -> np. sekwencjonowanie z pojedynczej komórki**

6. **Nowe technologie, może powrót bezpośredniego sekwencjonowania RNA (DRS; Direct RNA Sequencing)?**

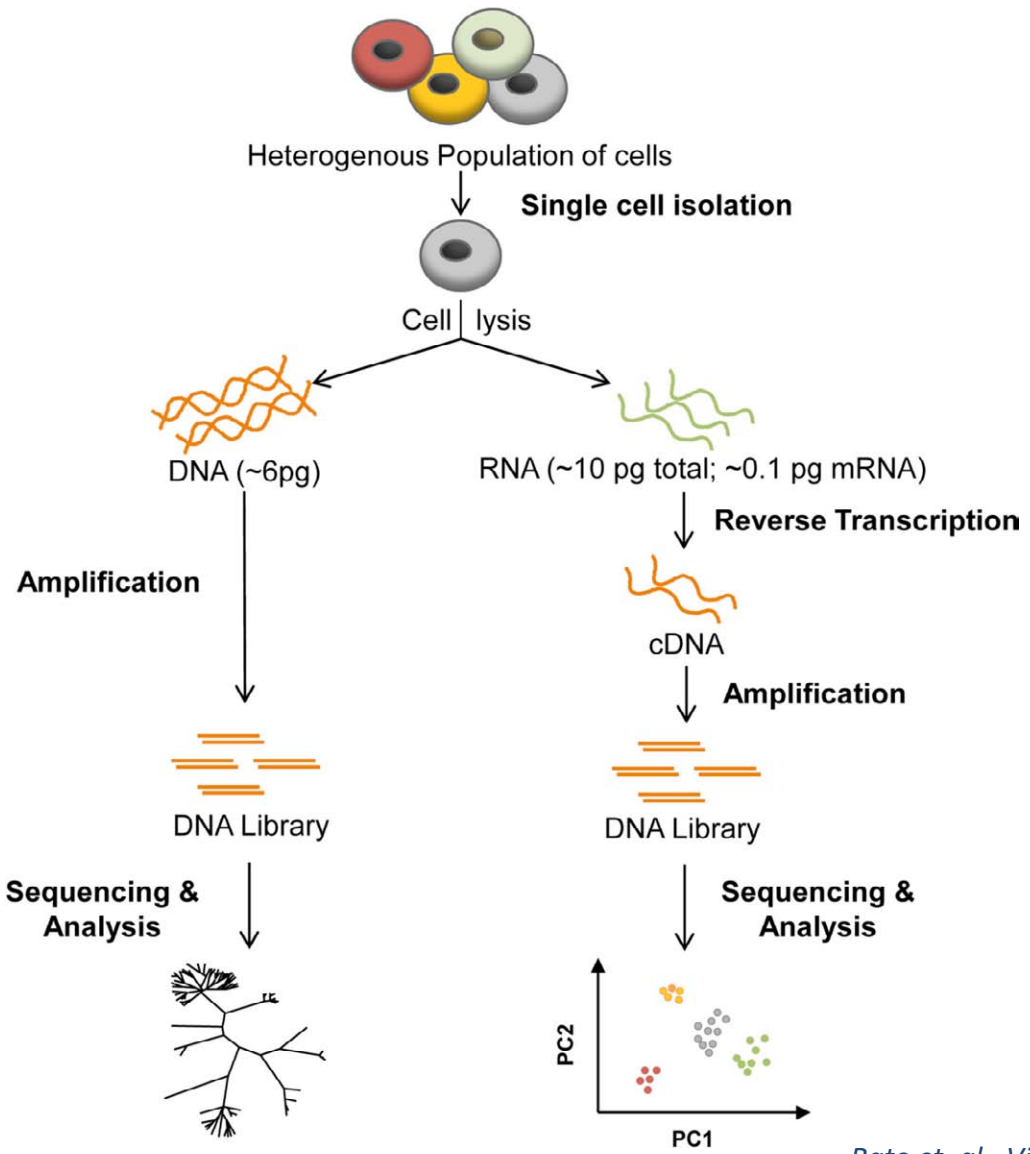
Sekwencjonowanie z pojedynczej komórki

Single-cell sequencing (SCS)



Rato et. al., Virus Res 2017

Sekwencjonowanie z pojedynczej komórki



Profile transkryptomiczne dla poszczególnych komórek różniących się stanem fizjologicznym

Możliwość badania rozwoju infekcji zależnej od heterogenności komórek gospodarza

Dynamika infekcji na poziomie pojedynczych komórek

Rato et. al., Virus Res 2017

Struktura a funkcja RNA

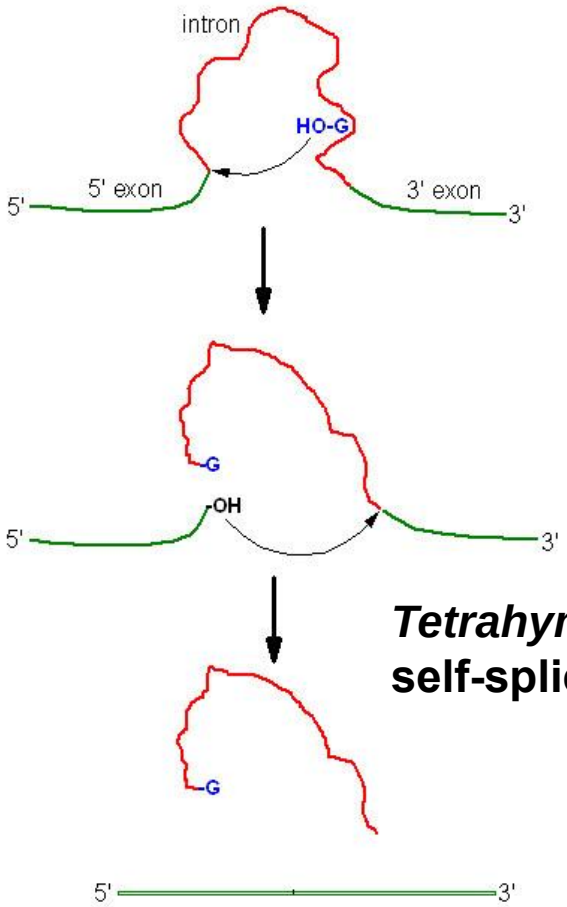
RNA capacity - CATALYTIC RNAs

Nobel 1989

RNA enzymes **– RIBOZYMES**

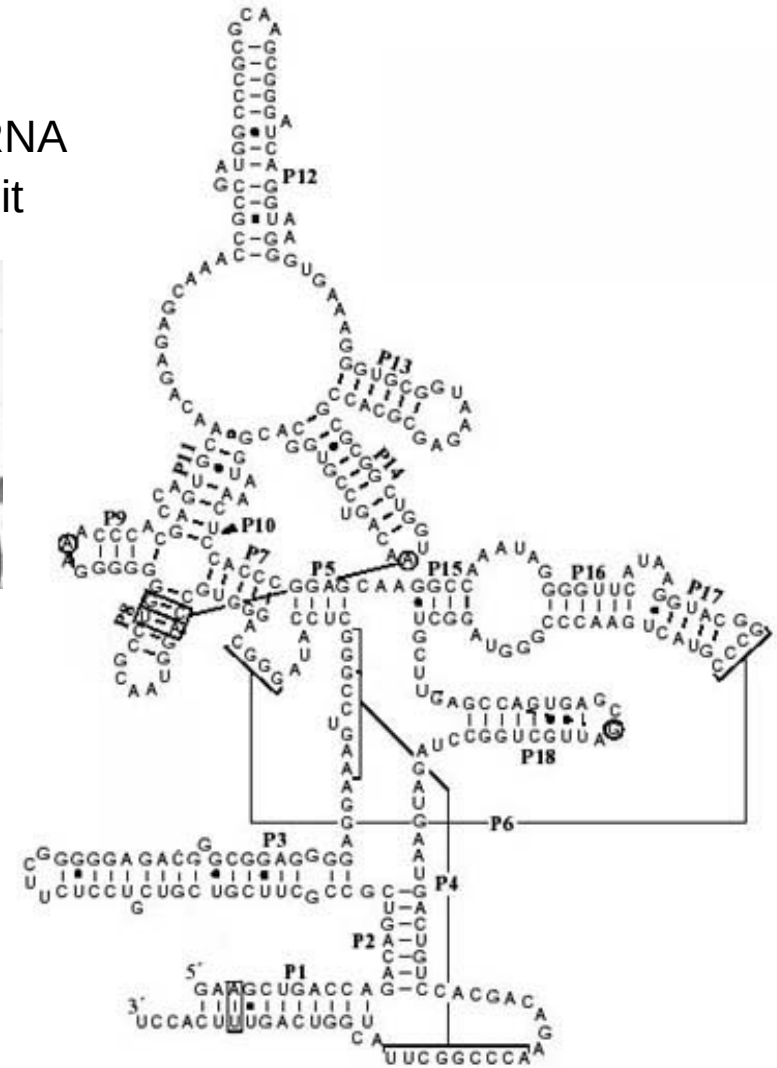
-1981/82 Tom Cech - self-splicing in *Tetrahymena* rRNA

-1982 Sidney Altman - bacterial RNaseP RNA subunit



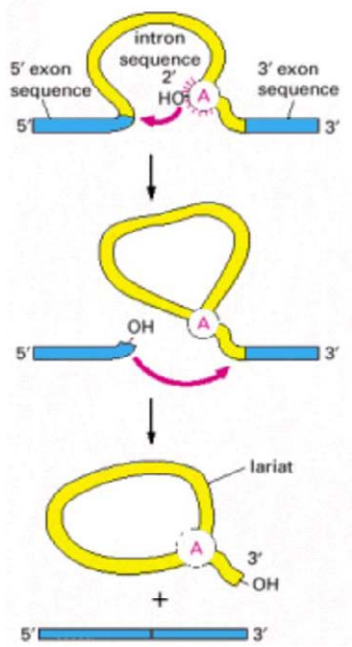
Thomas Cech
Sidney Altman

***Tetrahymena* group I self-splicing intron**

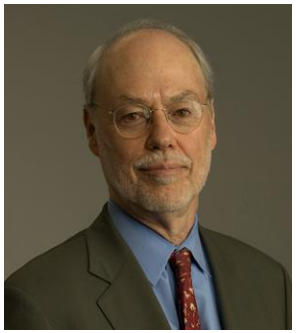


***Escherichia coli* RNaseP RNA**

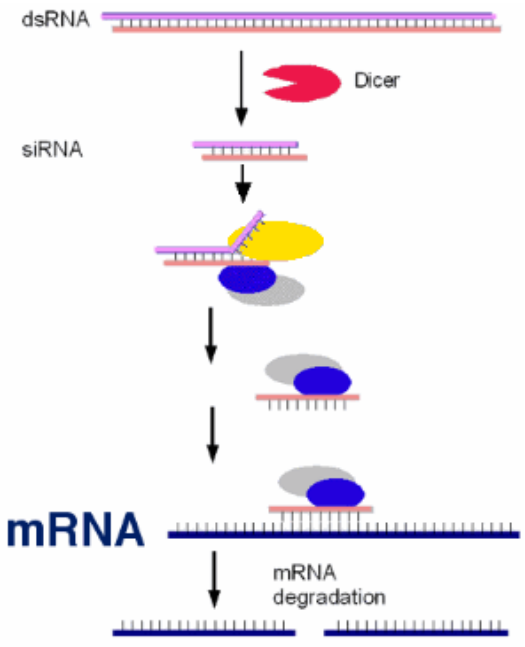
Za J. Kufel (Wykład 1)



mRNA SPLICING Nobels 1993



Phil Sharp
Richard Roberts



RNAi Nobels 2006

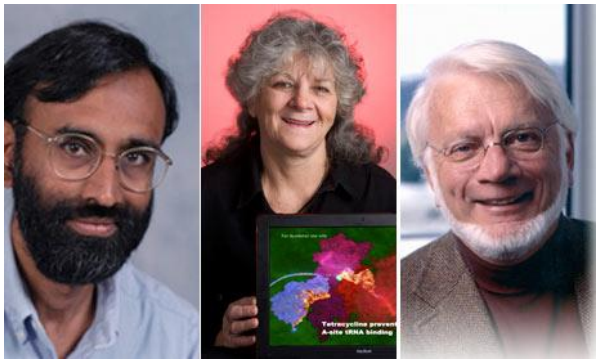
Andrew Fire
Craig Mello

Za J. Kufel (Wykład 1)

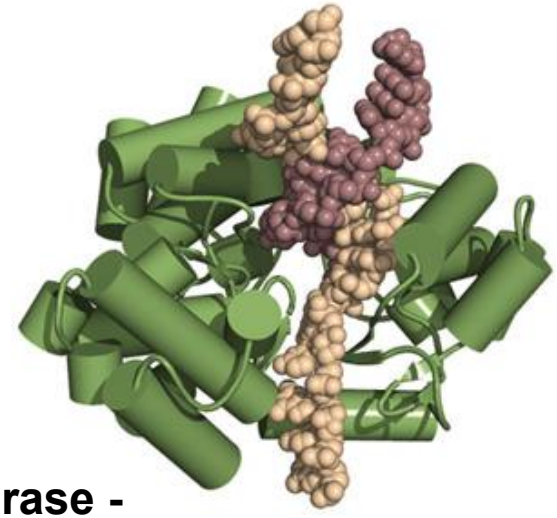
RNAs – STRUCTURE AND FUNCTION

Nobels 2009

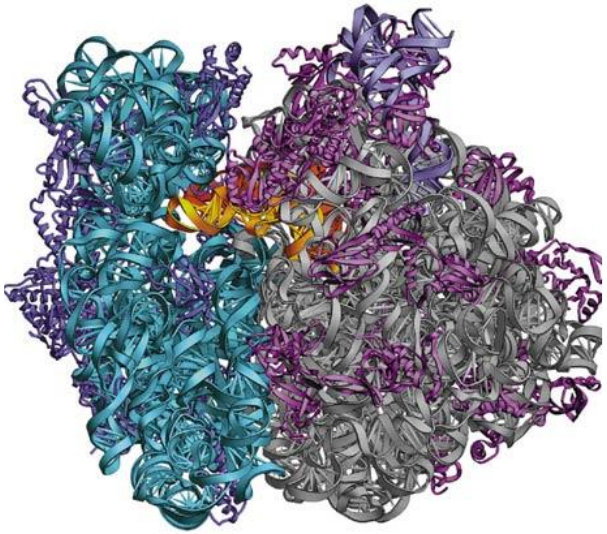
Elizabeth Blackburn
Jack Szostak
Carol Greider



Venkatraman Ramakrishnan
Ada Yonath
Thomas Steitz



Telomerase -
maintaing chromosome ends



Crystal structure of the ribosome

Za J. Kufel (Wykład 1)

SELEX = Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

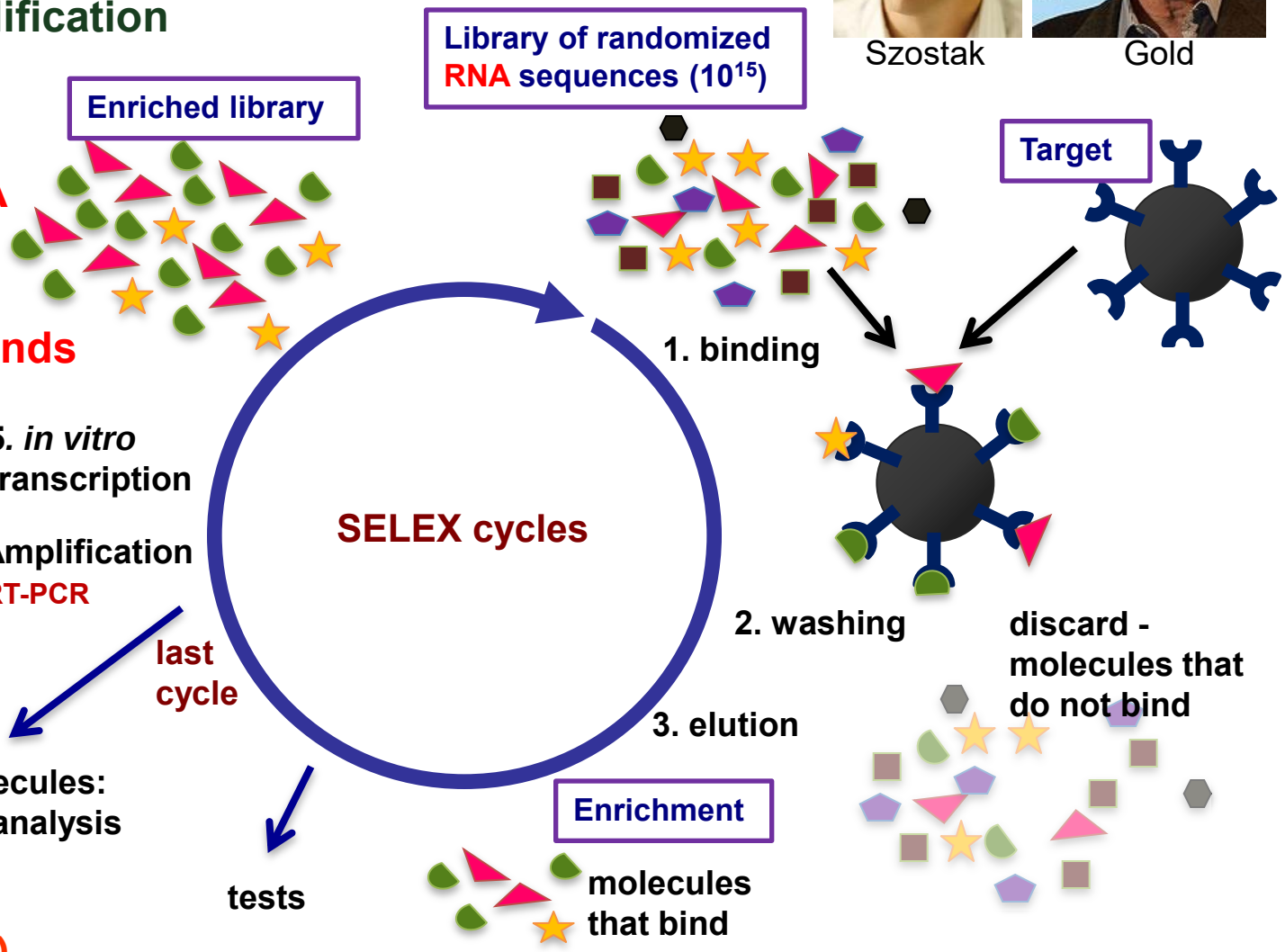
1990

Szostak

Gold

Method of selecting RNA/DNA molecules with desired properties (aptamers, ribozymes) based on cycles of amplification

Selected RNAs:
- **cleave DNA i RNA**
- **ligate RNAs**
- **self-replicate**
- **create peptide bonds**



Za J. Kufel (Wykład 1)

Zwijanie się RNA

Organizacja struktury RNA: 3 poziomy

- **Struktura I-rzędowa: sekwencja nukleotydowa**

- **Strukura II-rzędowa: parowania nukleotydów wg zasad Watsona-Cricka**

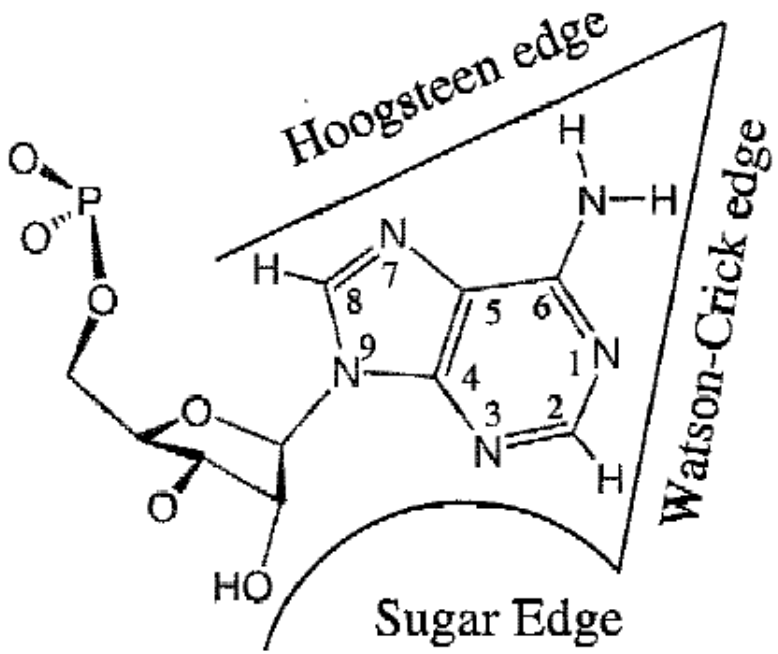
- **Struktura III-rzędowa: oddziaływania pomiędzy odległymi strukturami II-rzędowymi w cząsteczce**

Struktura I-rzędowa: sekwencja nukleotydowa

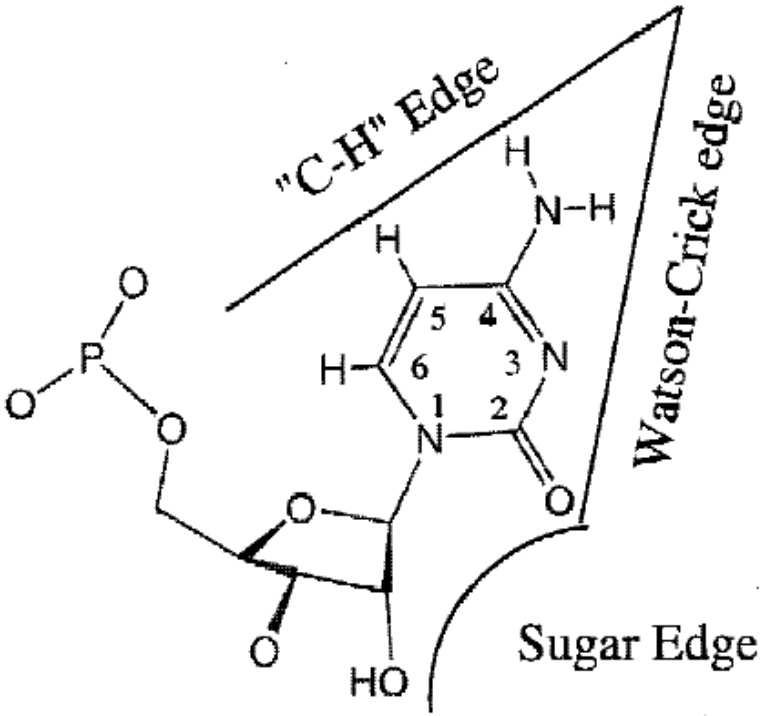
- **Sekwencja zależna od DNA ale…**
- **wycianane intronów, insercje, delecje oraz…**
- **modyfikacje potranskrypcyjne (Ψ - pseudouracyl, D - dihydrourydyna)…**
- **więc dokładne jej określenie jest możliwe dzięki sekwencjonowaniu cDNA, czasem koniecznie w połączeniu ze spektrometrią mas**

Krawędzie zasad uczestniczące w parowaniu nukleotydów

Puryny (G lub A)



Pirymidyny (T, C lub U)



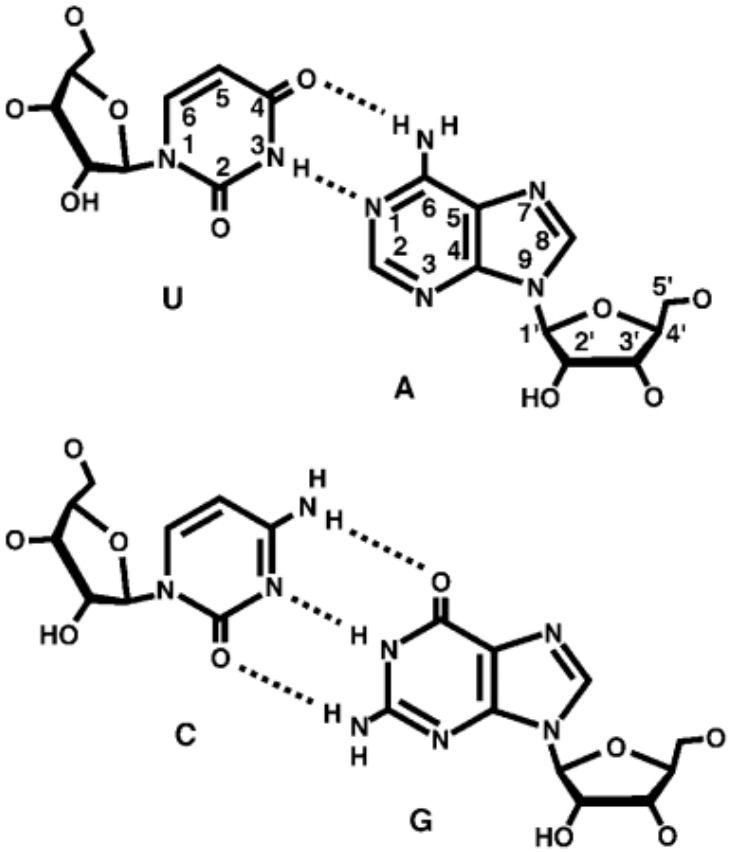
Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. NB Leontis and E Westhof. RNA 2001. 7: 499-512

Struktura II-rzędowa: parowania nukleotydów kanoniczne i niekanoniczne

- **Parowanie kanoniczne:** parowania nukleotydów wg reguł **Watsona-Cricka** (G:C, A:T, A:U)

- **Parowania niekanoniczne**: typu *wobble* (G:U) oraz wynikające z odziaływań pomiędzy atomami pozostałych krawędzi cząsteczek zasad – wiele możliwości.

- **Parowania** tworzą **odcinki dwuniciowe:** oraz odcinki **jednoniciowe** je rozdzielające



RNA canonical and non-canonical base pairing types: a recognition method and complete repertoire

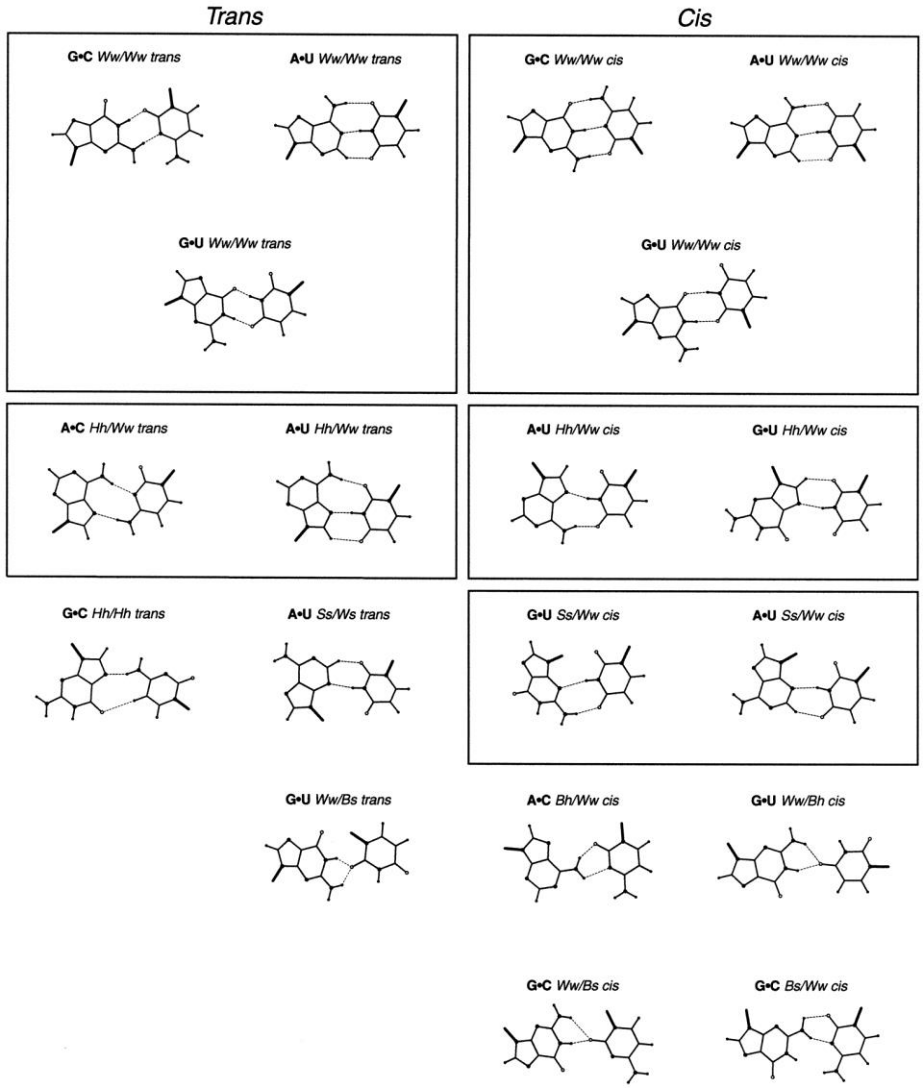


Figure 8. (Previous page and above) Two H-bond base pairing types found in HR-RNA-SET.

©2002 by Oxford University Press

Lemieux S , Major F Nucl. Acids Res. 2002;30:4250-4263

Nucleic Acids Research

RNA canonical and non-canonical base pairing types: a recognition method and complete repertoire

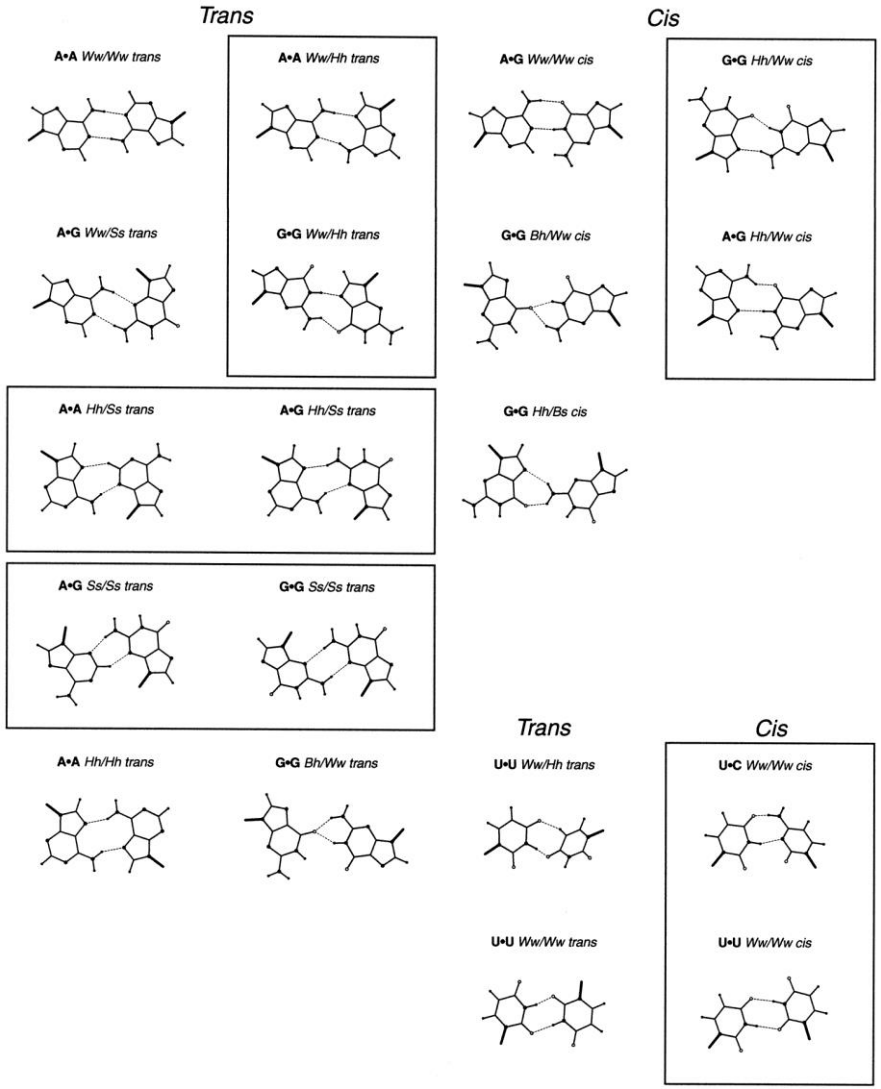


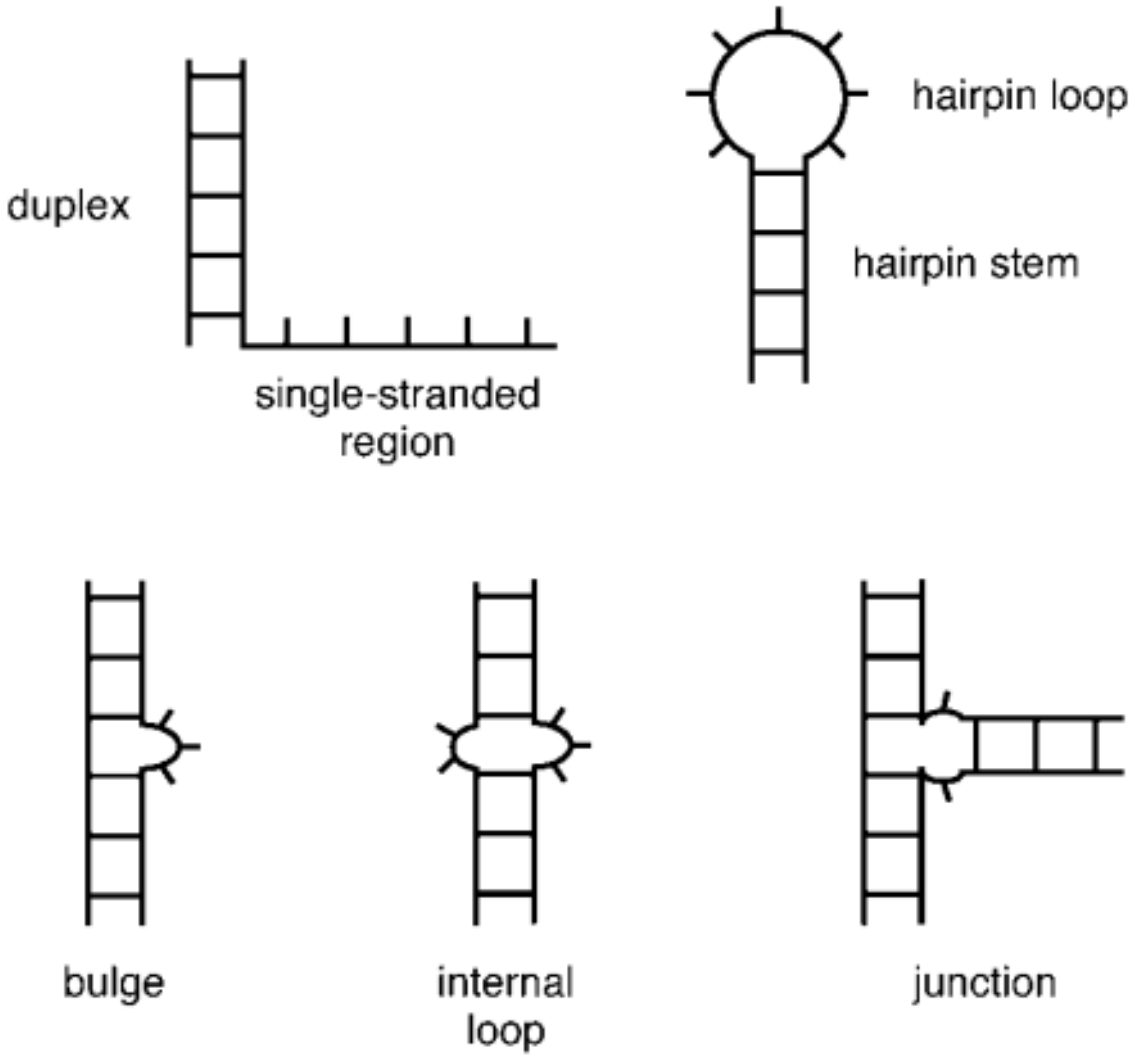
Figure 8. (Previous page and above) Two H-bond base pairing types found in HR-RNA-SET.

©2002 by Oxford University Press

Lemieux S , Major F Nucl. Acids Res. 2002;30:4250-4263

Nucleic Acids Research

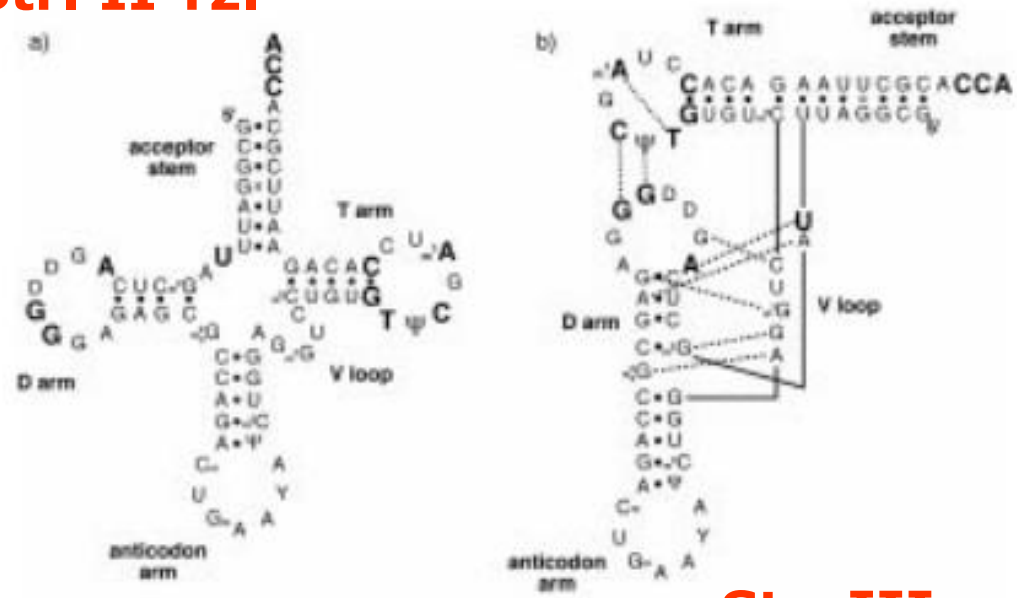
Najczęściej występujące elementy struktury II-rzędowej z parowaniami Watsona-Cricka



Robert T. Batey, Robert P. Rambo, and Jennifer A. Doudna Angew. Chem. Int. Ed. 1999

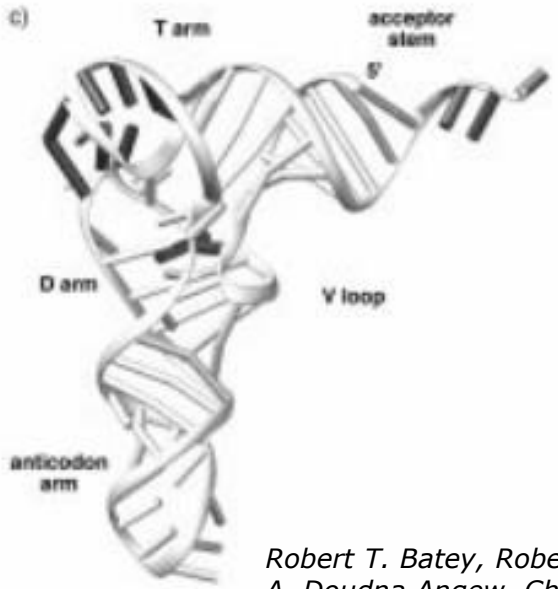
Przykładowa struktura: tRNA^{Phe}

Str. II-rz.

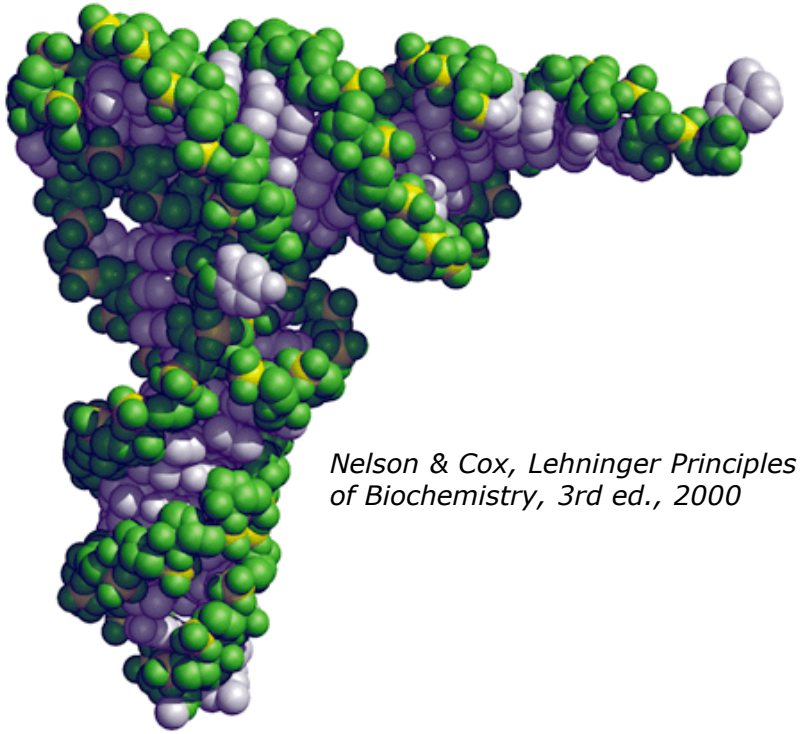


Stałe (niezmienne) pozycje nukleotydowe dla klasy I tRNA wytłuszczono. Biorą one udział w funkcjach biologicznych lub są odpowiedzialne za organizowanie architektury cząsteczki

Str. III-rz.



Robert T. Batey, Robert P. Rambo, and Jennifer A. Doudna Angew. Chem. Int. Ed. 1999



Nelson & Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed., 2000

Struktura III-rzędowa: oddziaływania 3D pomiędzy odległymi elementami struktury

Oddziaływania pomiędzy motywami helikalnymi

- Upakowanie współosiowe
- Platforma adenozynowa
- Oddziaływania helikalne poprzez grupę 2'-hydroksylową

Odziaływania pomiędzy helikalnymi i nie sparowanymi motywami

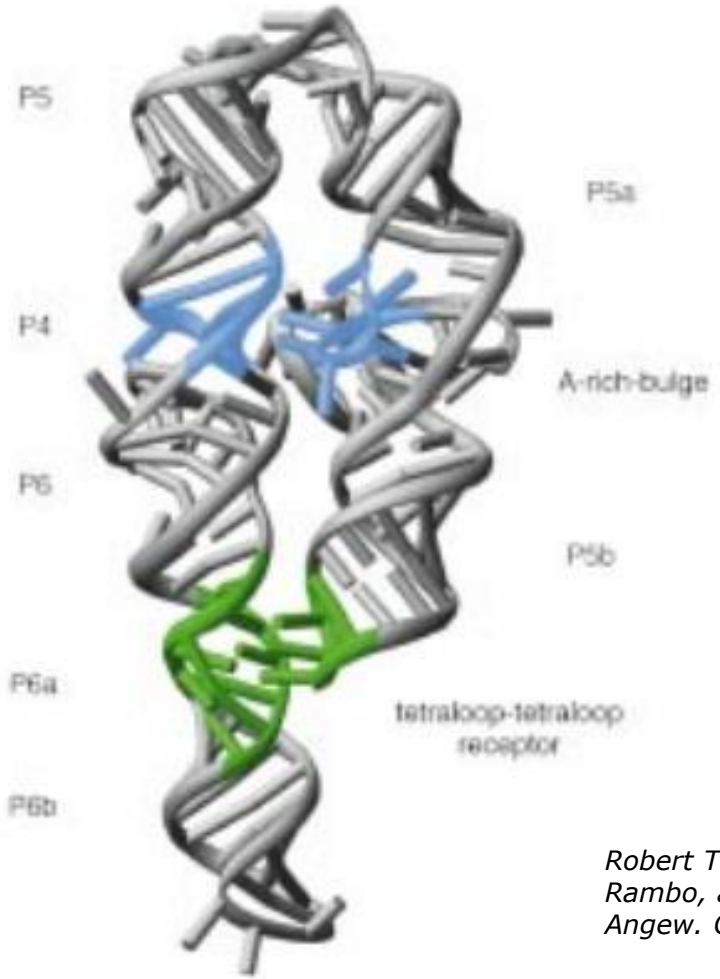
- Triplety i Tripleksy zasad
- Motyw „tetraloop"
- Motyw z rdzeniowym metalem
- Suwak rybozowy

Trzeciorzędowe oddziaływania pomiędzy odcinkami niesparowanymi

- Oddziaływania pętla-pętla
- pseudowęzły

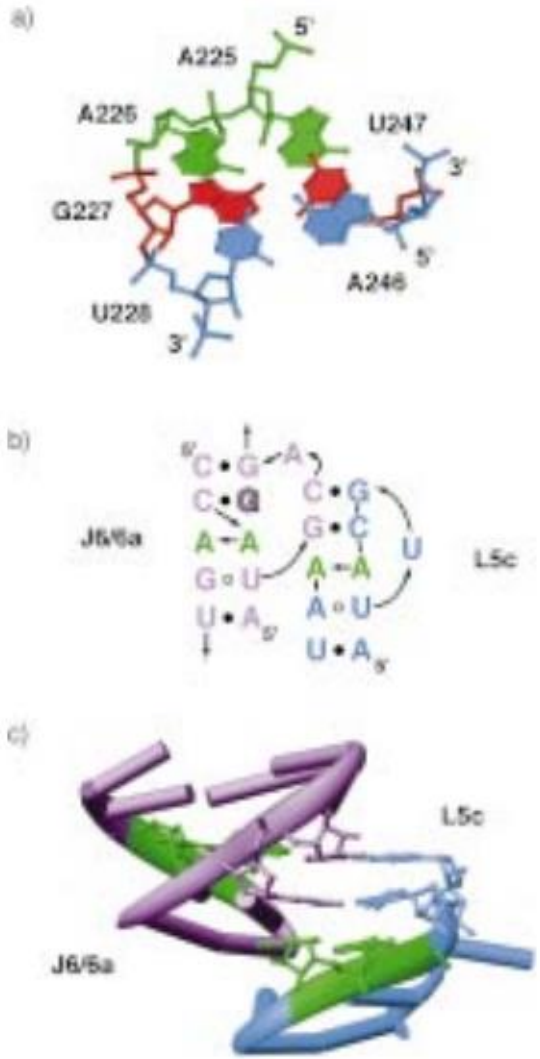
Oddziaływania pomiędzy motywami helikalnymi

Model domen P4-P6 intronu *Tetrachymena*
(PDB accession number 1gid)

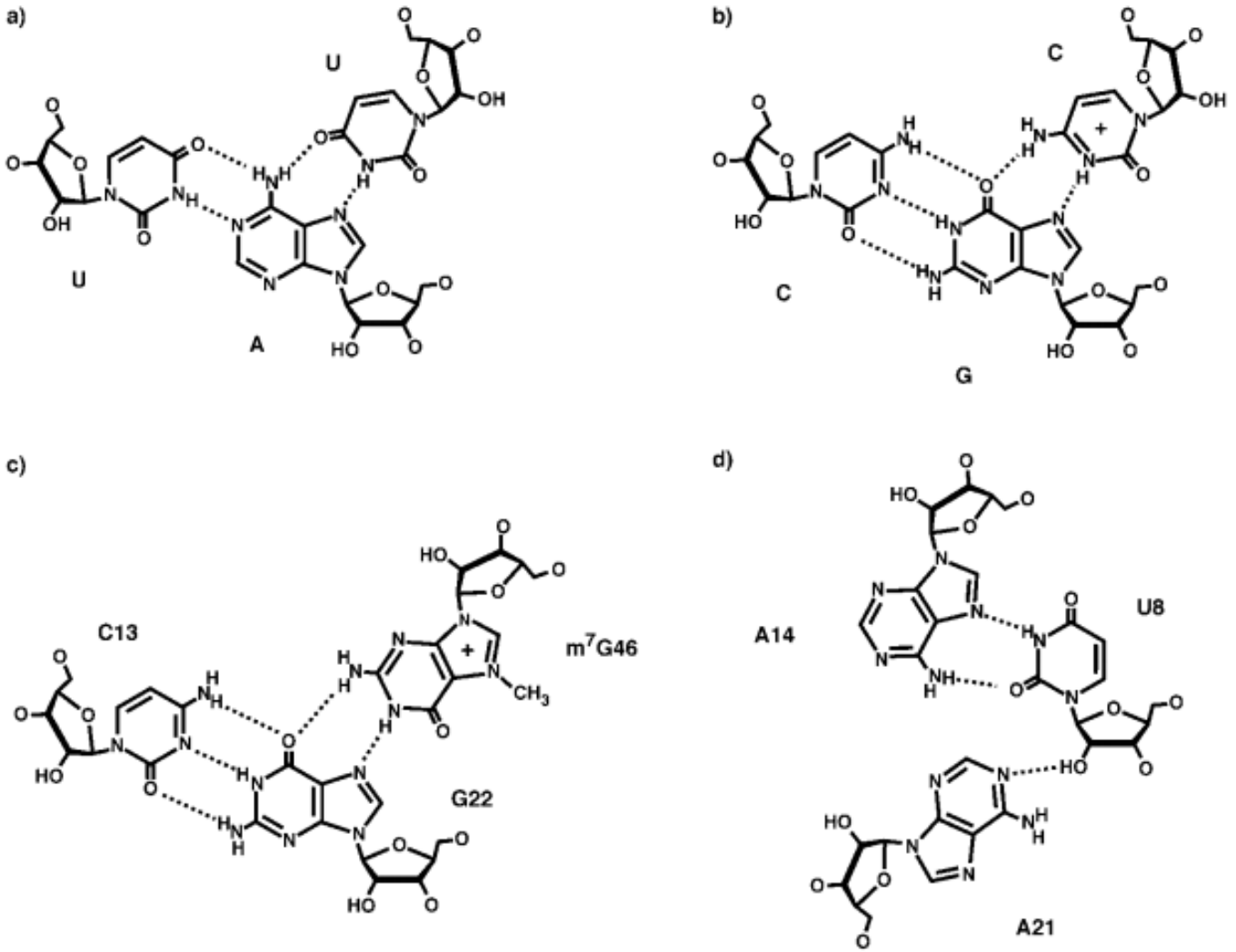


Robert T. Batey, Robert P. Rambo, and Jennifer A. Doudna Angew. Chem. Int. Ed. 1999

Platforma adenozynowa intronu *Tetrachymena*

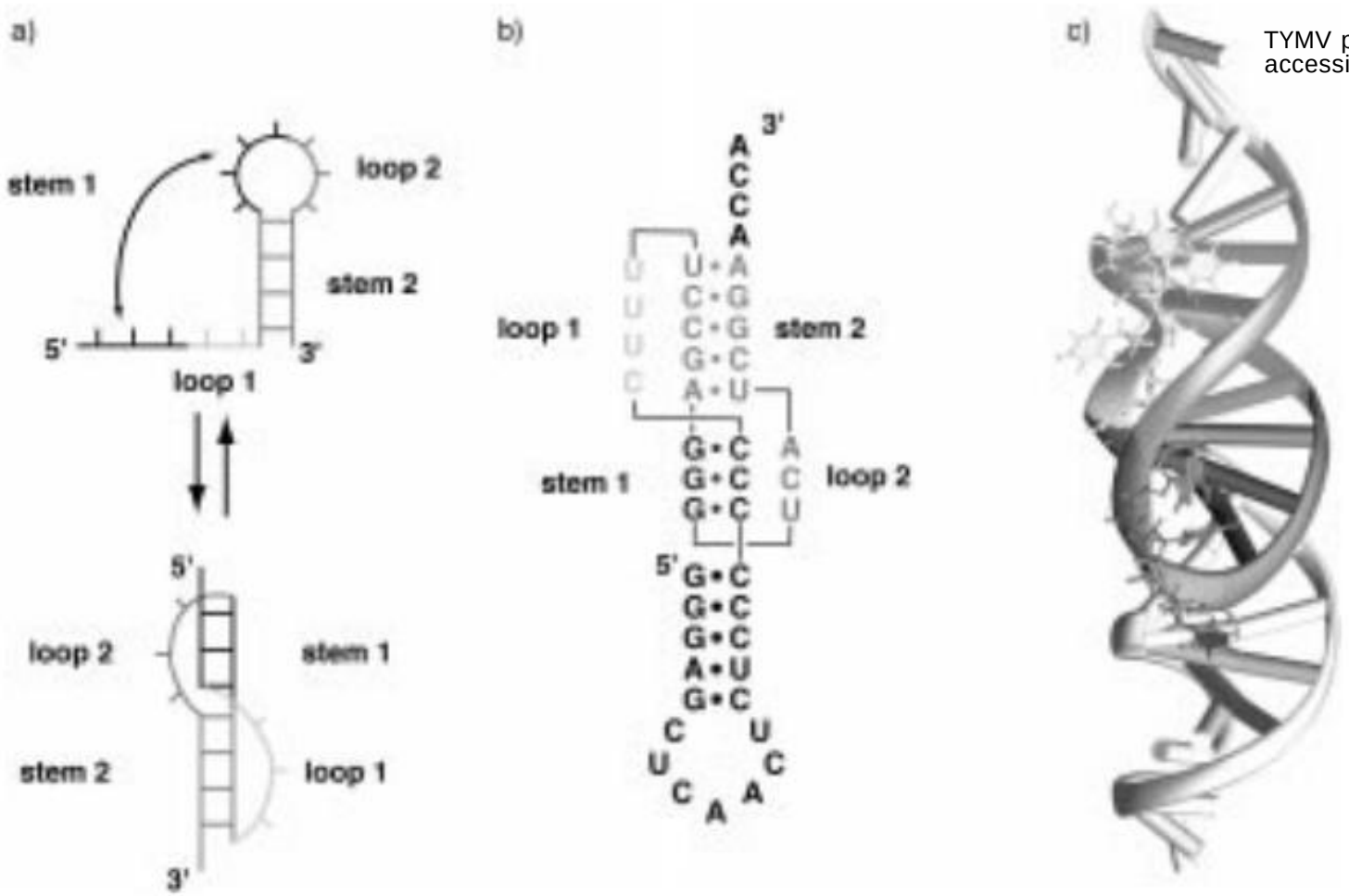


Potrójne parowania zasad w RNA



Robert T. Batey, Robert P. Rambo, and Jennifer A. Doudna Angew. Chem. Int. Ed. 1999

Pseudowęzły



TYMV pseudoknot (PDB accession number 1a60)

Robert T. Batey, Robert P. Rambo, and Jennifer A. Doudna Angew. Chem. Int. Ed. 1999

Modelowanie struktury RNA

Przewidywanie struktury RNA:

- **Przewidywanie struktury II-rzędowej: algorytmy obliczające mapę parowań dla struktur o najniższej energii swobodnej, np. algorytm Zuckera (mfold) – *podejście fizyczne*.**

- **Przyrównanie z homologiczną sekwencją o znanej strukturze – *podejście ewolucyjne*.**

Badanie faktycznej struktury RNA:

- **Analiza biochemiczna mapy parowań: cięcie nukleazami odcinków jednoniciowych**

- **Badania krystalograficzne, np. NMR, X-ray**

Integracja danych daje najlepsze rezultaty

Rybopzełączniki i aptamery RNA

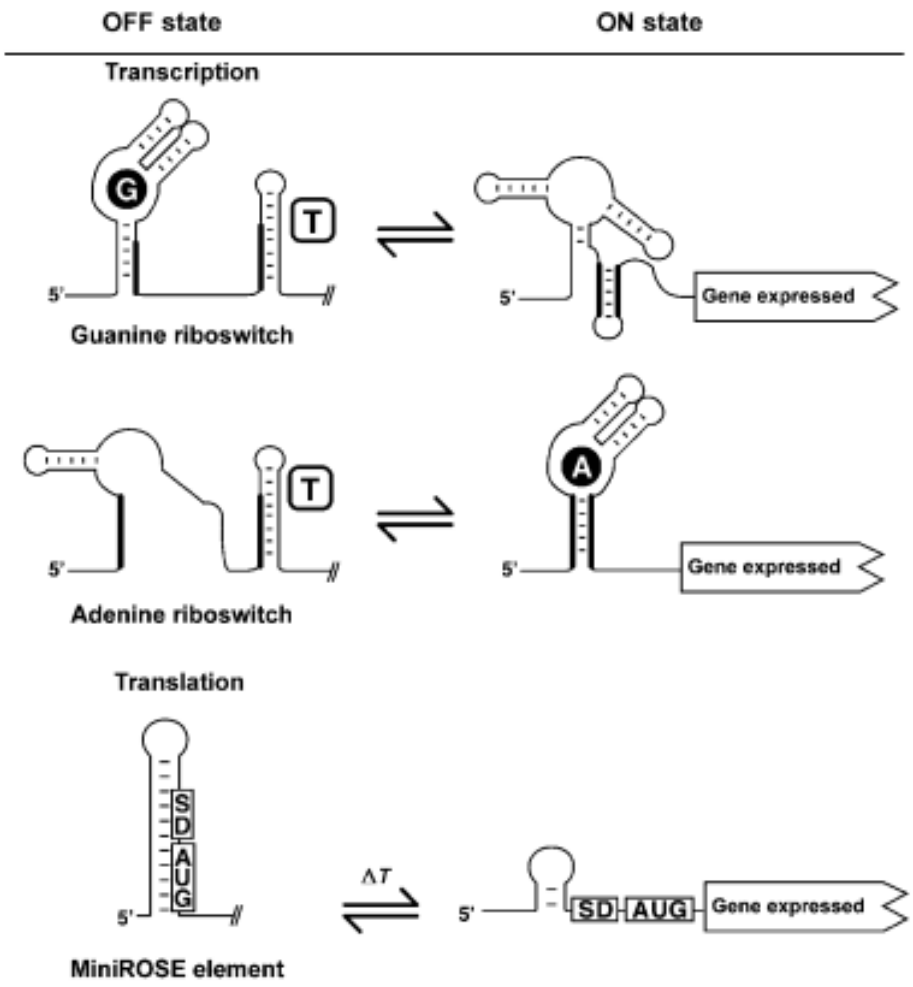
Aptamery RNA:
elemnty strukturalne wiążące niskocząsteczkowe ligandy lub białka

Ryboprzełączniki (ang. „riboswitch”)

RNA sensorowe, zdolne do wiązania niskocząsteczkowych ligandów

- **Wiązanie niskocząsteczkowego ligandu zmienia strukturę RNA**
- **Elemnty wiążące (aptamery) znajdują się najczęściej w UTRach**
- **Regulacja transkrypcji**
- **Regulacja translacji**
- **Odpowiedź na bodźce środowiskowe**
- **Pierwotnie wykryte u *Procaryota* i traktowane jako pozostałość „Świata RNA”**
- **Obecnie znane przykłady u *Eucaryota***

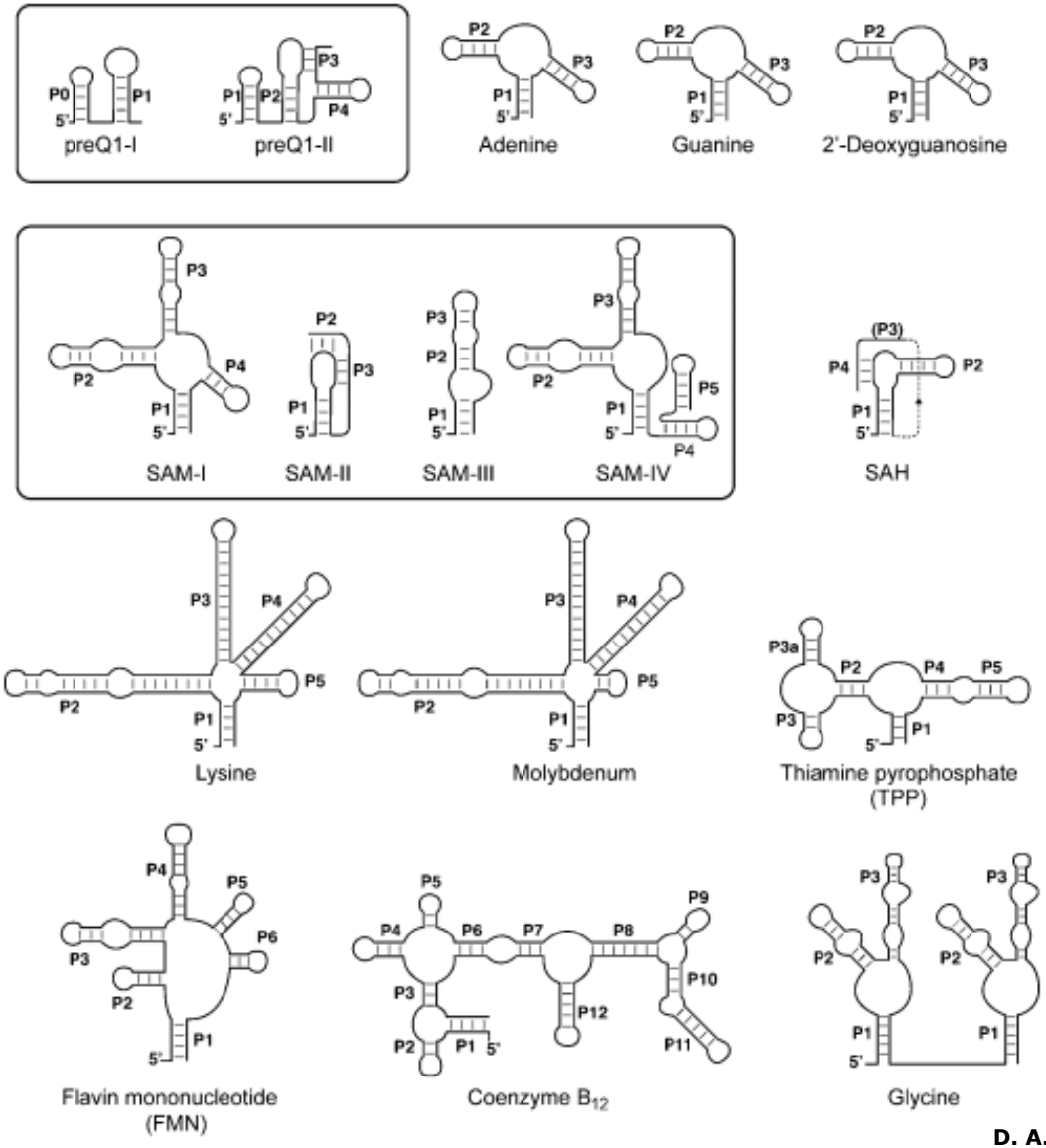
Przykłady ryboprzełączników



„termometr RNA”

D. A. Lafontaine et al, Riboswitches as Promising Regulator, ChemBioChem 2009, 10, 400 – 41

Przykłady aptamerów wiążących niskocząsteczkowe ligandy



D. A. Lafontaine et al, Riboswitches as Promising Regulator, ChemBioChem 2009, 10, 400 – 41

Zastosowanie w praktyce

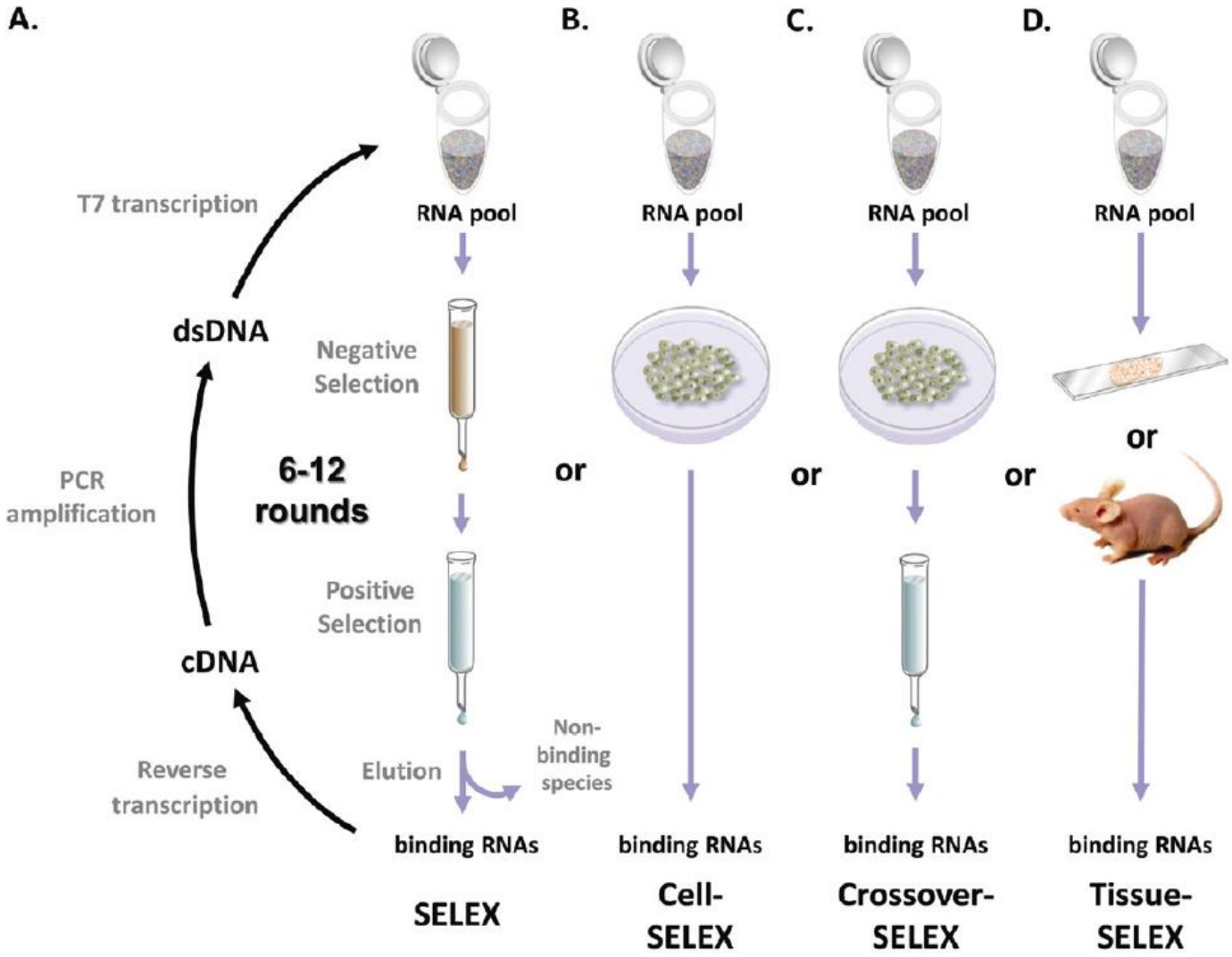
Medycyna – zamiast przeciwciał

- **Kd nawet rząd wielkości niższe!**
- **Problem ze stabilnością (czasem zaleta)**
- **Najczęściej przeciw receptorom komórkowym (np. anty-VEGF w AMD) lub czynnikom transkrypcyjnym (np. anty-AML1 w ostrej białaczce szpikowej)**
- **Modyfikacje: pegylowanie, podstawianie modyfikowanych zasad**
- **Pierwsze leki już dostępne!**
- **Testy płytkowe podobne do ELISA ale z aptamerami RNA zamiast przeciwciał, np. diagnostyka wirusów.**

Biosensory

- **Układy *in vivo* z genami reporterowymi**
- **Translacja *in vitro***

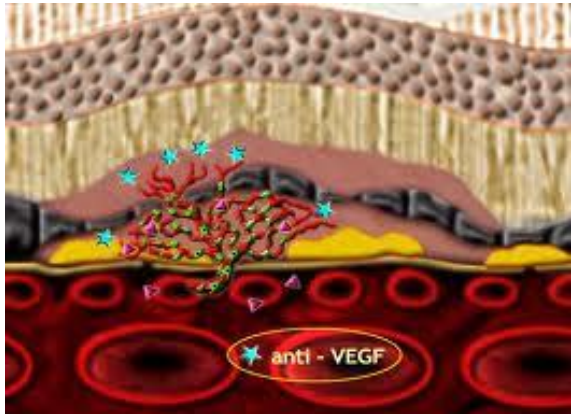
Nowe odmiany techniki SELEX



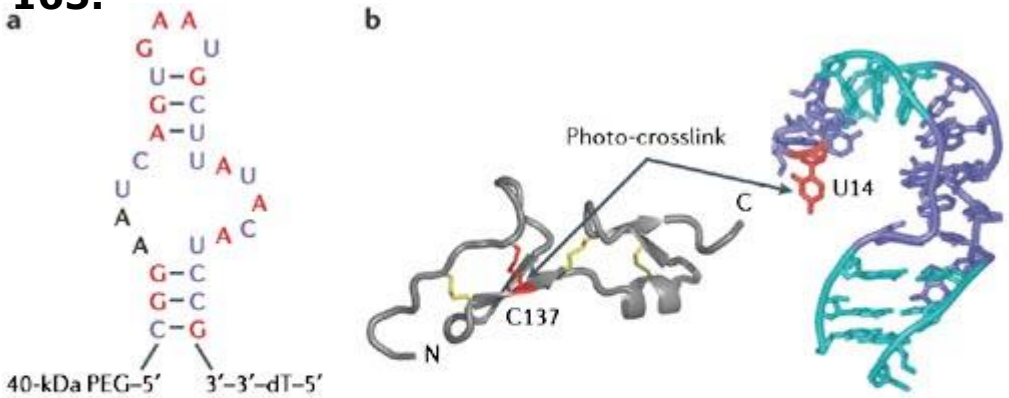
Germer i wsp., Int J Biochem Mol Biol (2013)

Pegaptanib – pierwszy lek oparty o aptamer RNA

Degenaracja plamki żółtej związanej z wiekiem (AMD) – rozrost i przeciekanie naczyń krwionośnych stymulowany VEGF (vascular endothelial growth factor).



Pierwszy zatwierdzony w USA aptamer jako lek (2004): Pegaptanib (Macugen). PEGylowany aptamer anty-VEGF, hamuje angiogenezę wiążąc pozakomórkową formę czynnika VEGF165.



Eugene i wsp., Nature Reviews Drug Discovery (2006)

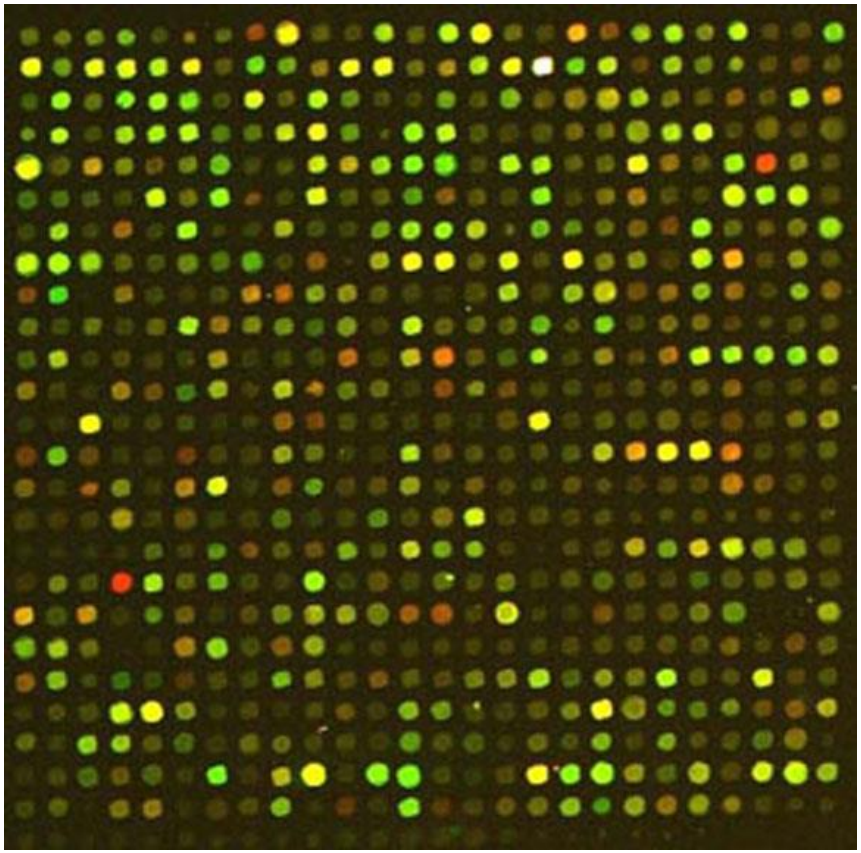
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Dziękuję za uwagę

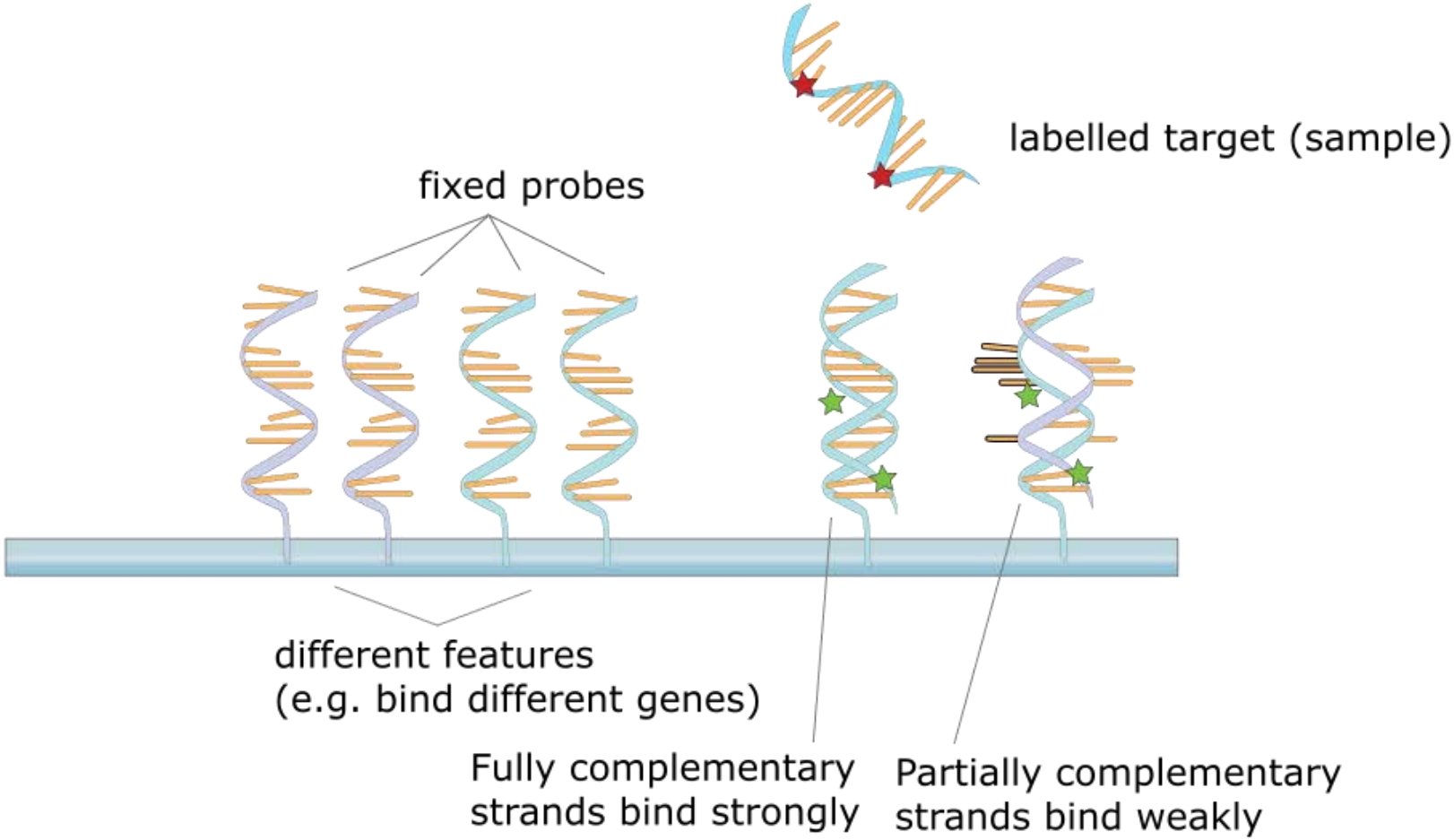
Suplement

Mikromaczierze

(„chip” not „ChIP”)



Podstawa techniki - hybrydyzacja



Za: Wikipedia

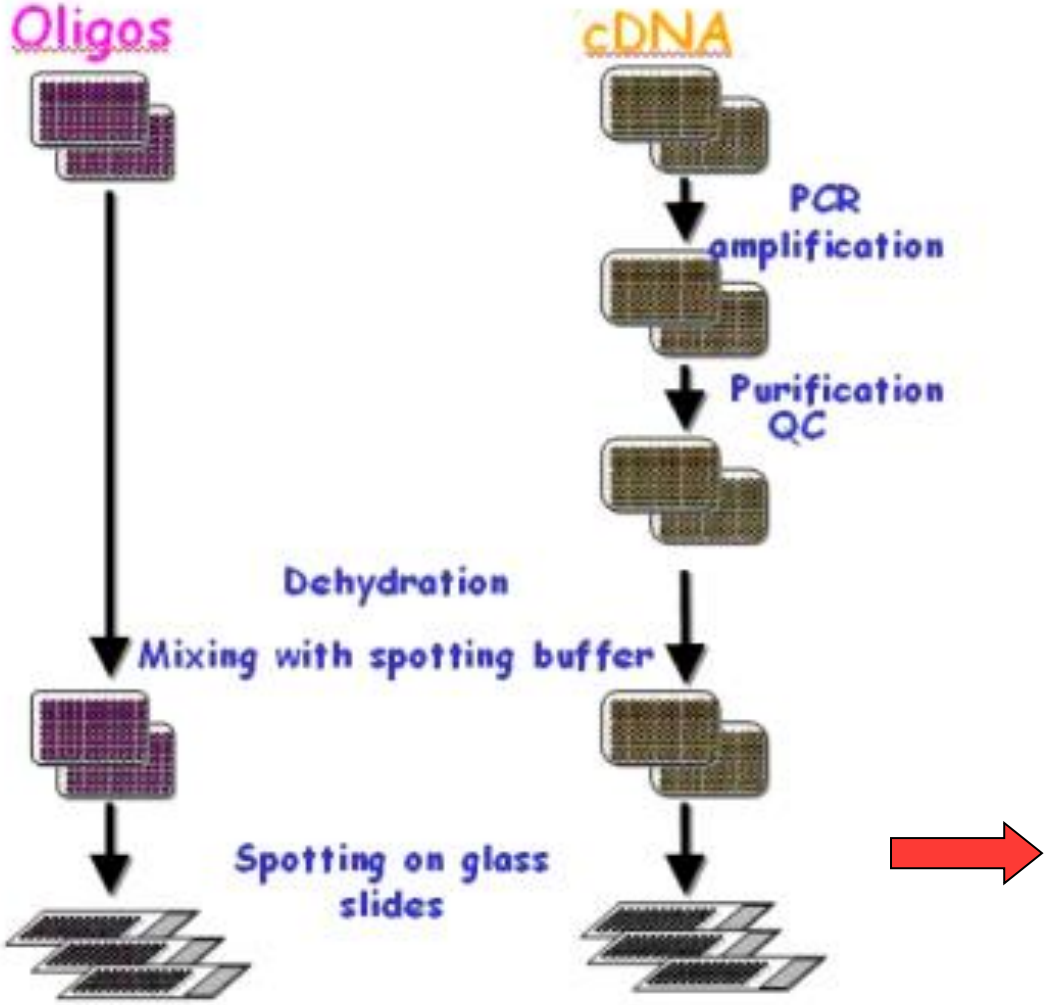
Historia

- **Lata 80-te XX w. – wczesne próby z nanoszeniem DNA na filtry (rozwijanie techniki Southerna)**
- **1995: pierwszy nowoczesny, skomputeryzowany, wysokorozdzielczy „chip" z zastosowaniem skanowania laserowego**
  (Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray". Science 270)
- **1997: pierwszy cały genom na jednym układzie, *S. cerevisiae***
  (Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW, "Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis". Proc Natl Acad Sci USA 94)

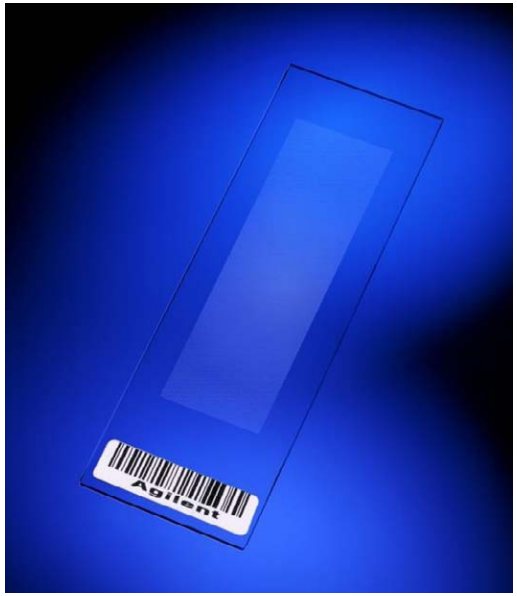
Mikromacierze DNA
(ang. „DNA Microarrays”, „DNA-chip”)

- **Układy pozwalające na wysokoprzepustowe badania ekspresji... ale nie tylko.**
- **Układy z naniesionymi sondami molekularnymi, od kilkuset tys. do ponad 2 mln. (obecnie, ale gęstość rośnie)**
- **Najczęściej na podłożu szklanym, plastikowym lub krzemowym, ewentualnie „na kulkach”**
- **Sondy DNA: oligonukleotydy (krótkie lub długie) lub cDNA**
- **Sondy reprezentujące fragment *locus***
- **Sondy dla odcinków międzygenowych**
- **Mikromacierze „tillingowe” („na zakładkę”)**

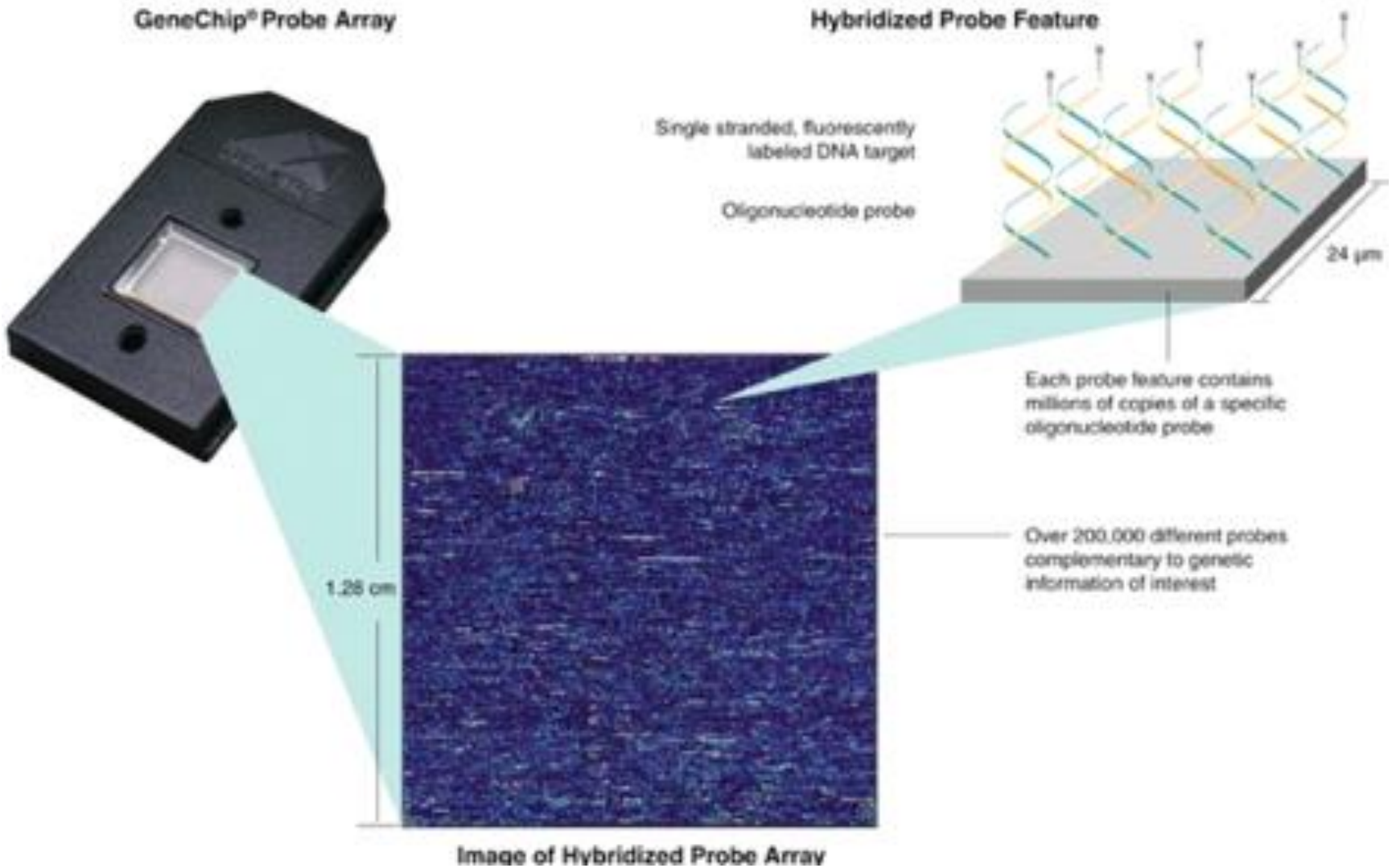
Przygotowanie mikromacierzy



www-microarrays.u-strasbg.fr/images/spotted



Przygotowanie mikromacierzy Affymetrix



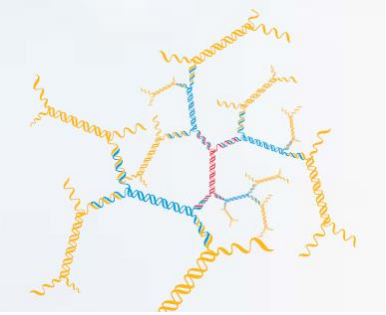
Znakowanie prób

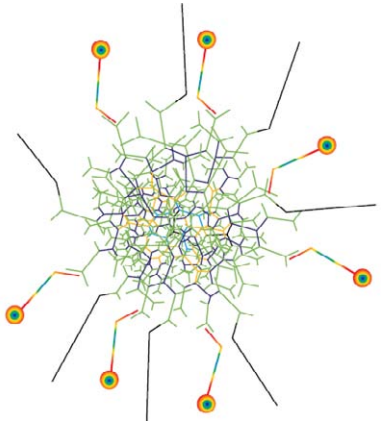
1. **Bezpośrednio**
   - inkorporacja modyfikowanych dNTP (**Cy3**, **Cy5**) podczas syntezy cDNA

2. **Pośrednio**
   - inkorporacja modyfikowanych dNTP (amino-allyl dGTP) podczas syntezy cDNA;
   - przyłączenie barwnika fluorescencyjnego (Cy3, Cy5)

3. **Dendrymery**
   - dołączanie dodatkowych sekwencji na 3' podczas syntezy cDNA;
   - drugi etap hybrydyzacji w obecności wyznakowanych (Cy3, Cy5) dendrymerów (3DNA)

4. **Biotyna i streptavidyna**
   - cRNA wyznakowane biotyną (uracyl – biotyna);
   - dodanie wyznakowanej fluorescencyjnie streptavidyny



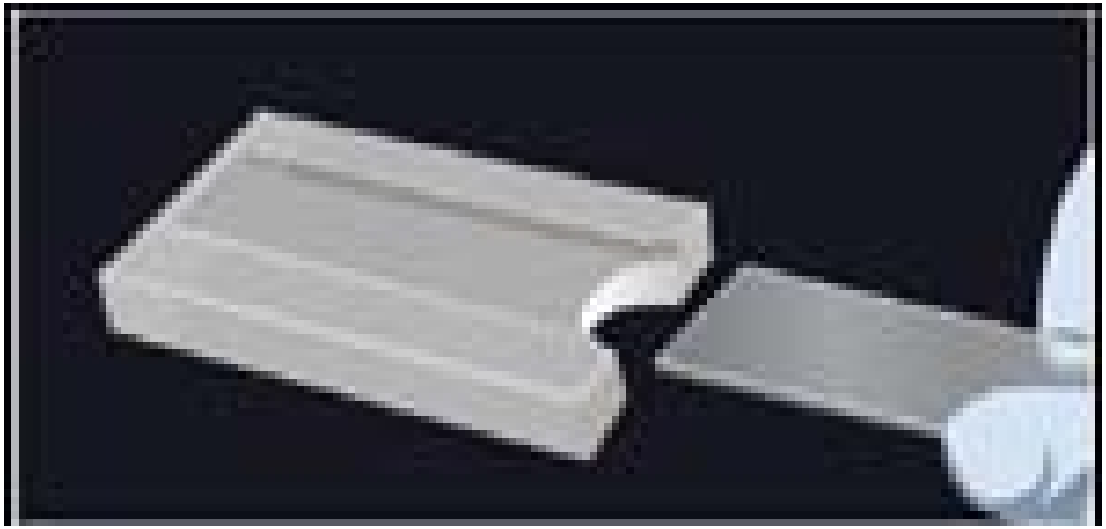


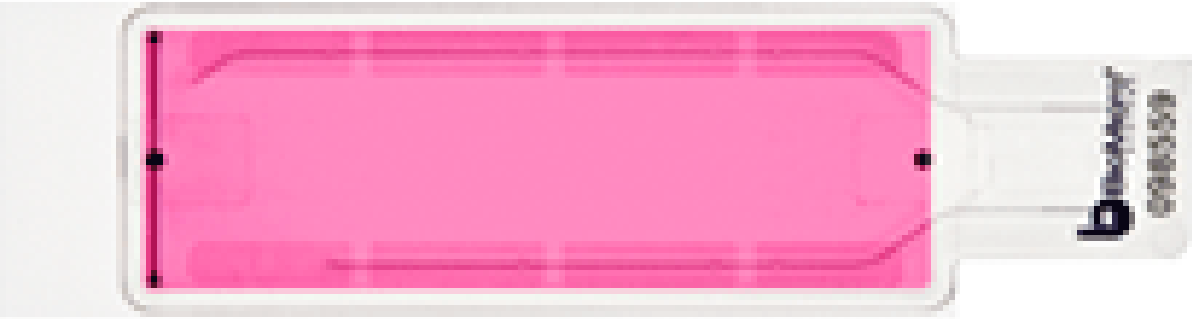
Doświadczenia wymagające technicznie

Bardzo istotne:

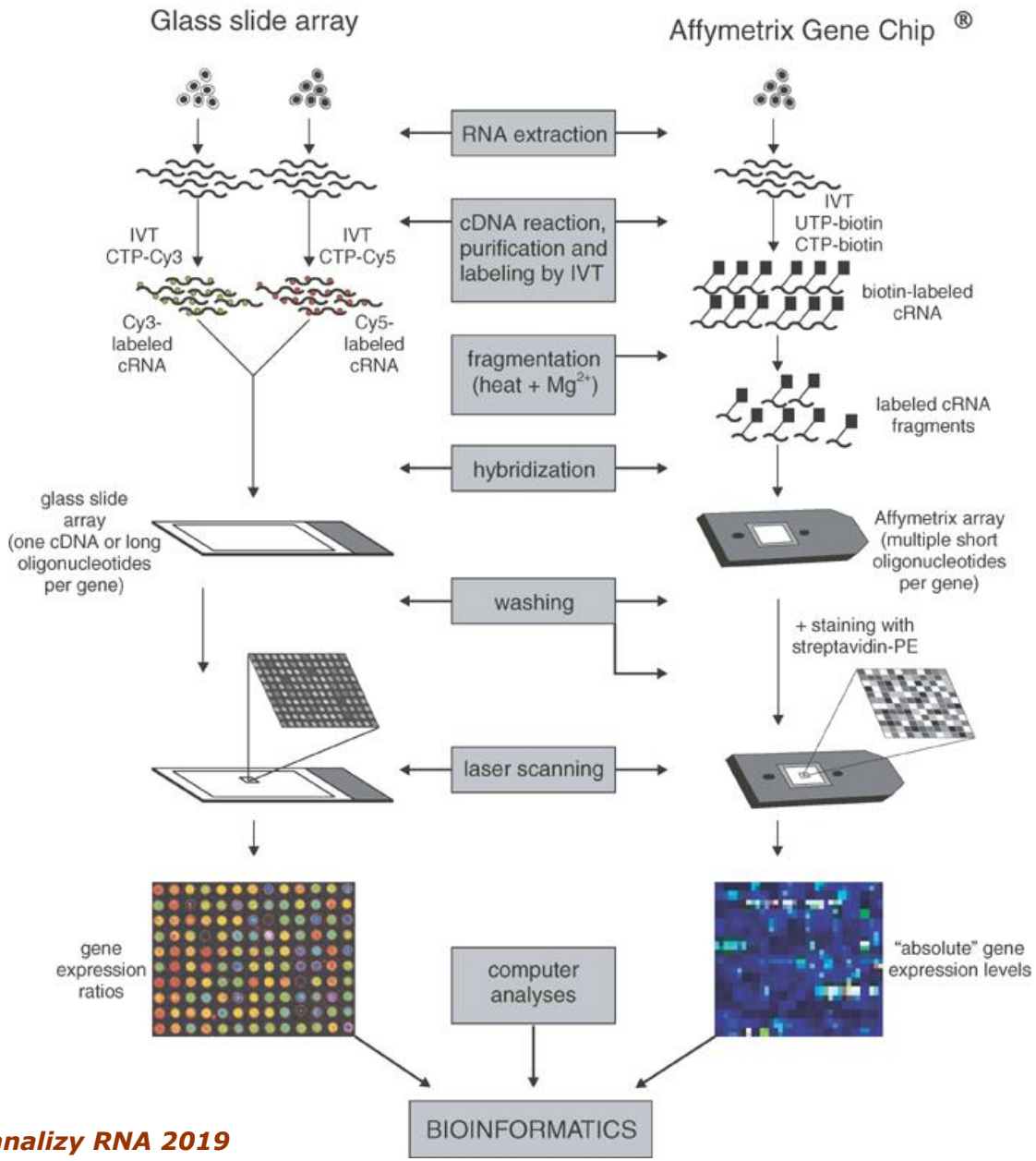
- **Jakość slajdu**
- **Jakość i ilość oligonukleotydów nadrukowanych na slajdzie**
- **Jakość próbek RNA**
- **Metoda znakowania próbki**
- **Metoda hybrydyzacji**
- **Procedura skanowania**

MAUI MIXER (Agilent)

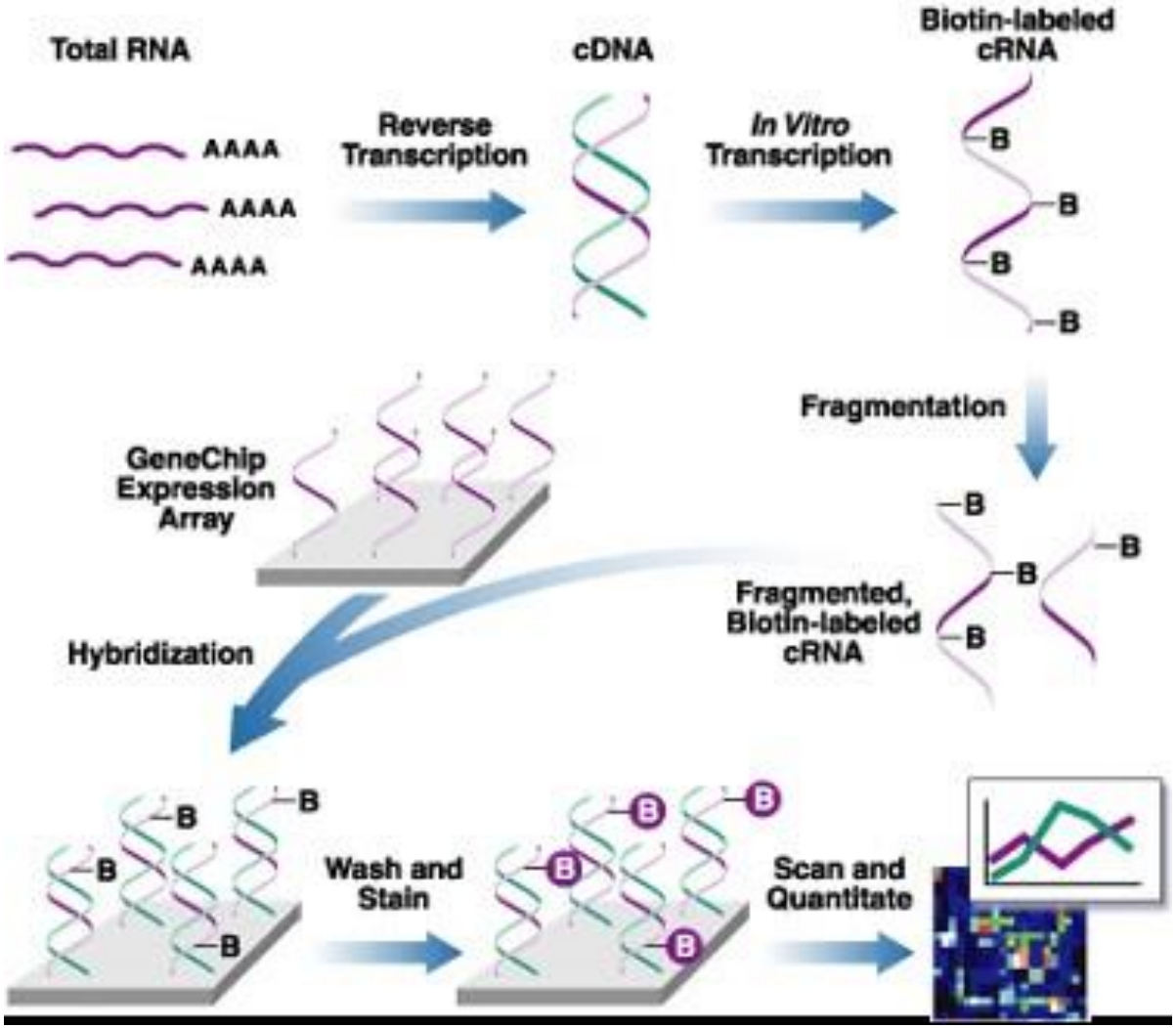




Znakowanie i hybrydyzacja



Wykorzystanie znakowanego cRNA



Otrzymywanie i analiza danych

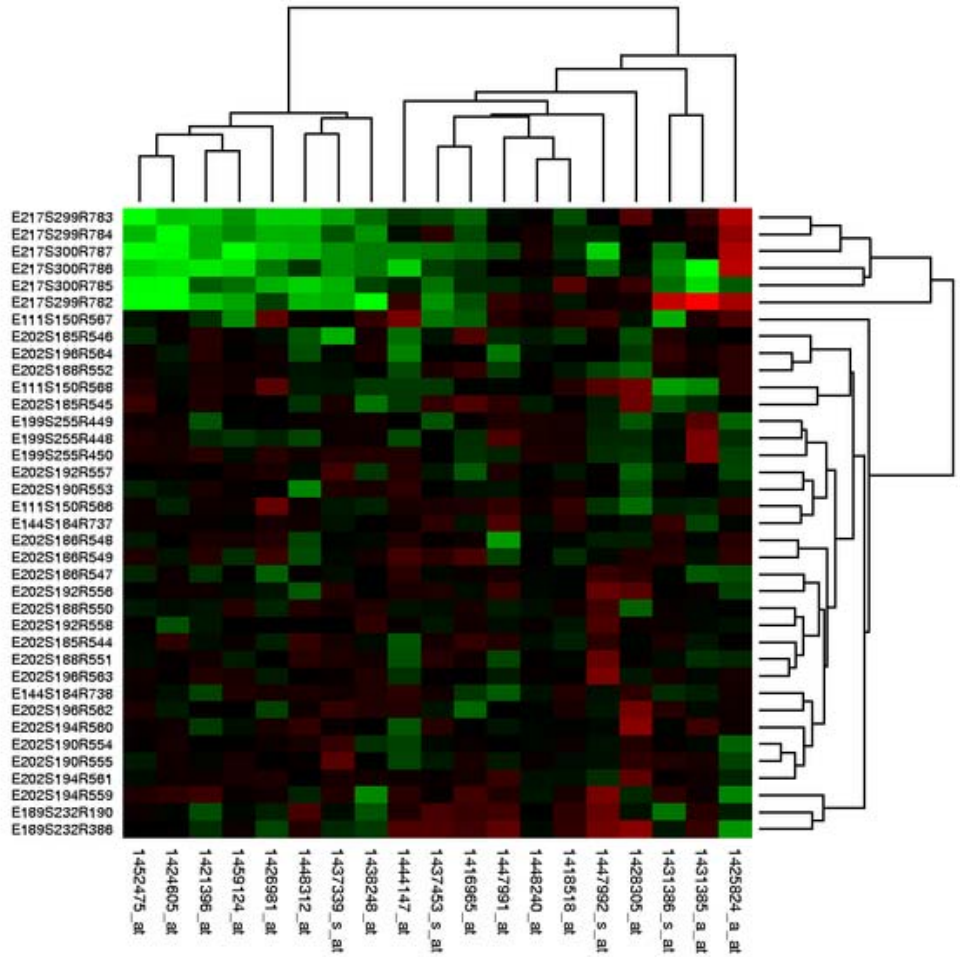
1. Skanowanie
2. Obróbka obrazu:
   - identyfikacja właściwych sygnałów
   - określenie tła
   - określenie intensywności sygnału
3. Standaryzacja danych
4. Ostateczna analiza

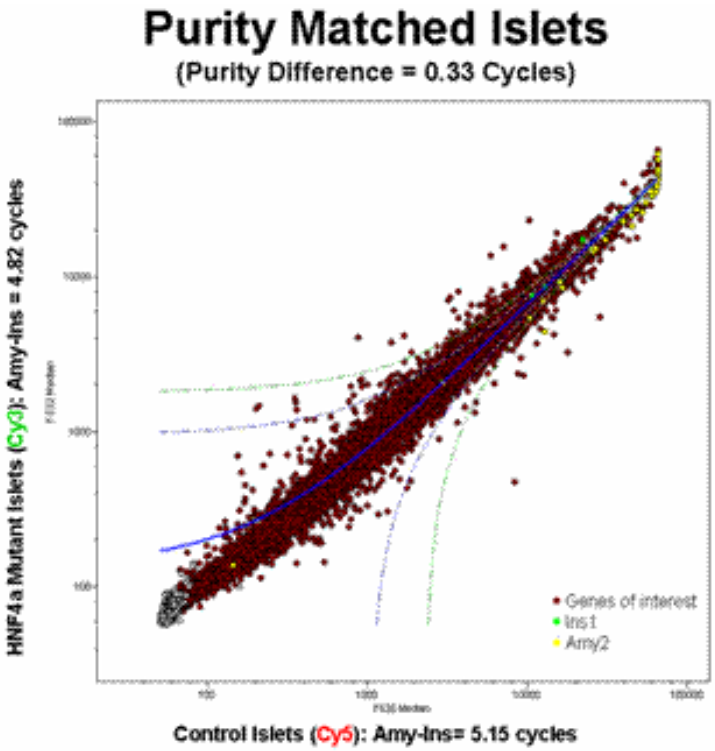
"Minimum Information About a Microarray Experiment" (MIAME)

TECAN PowerScanner

Skaner Axon GenePix

Analiza statystyczna danych





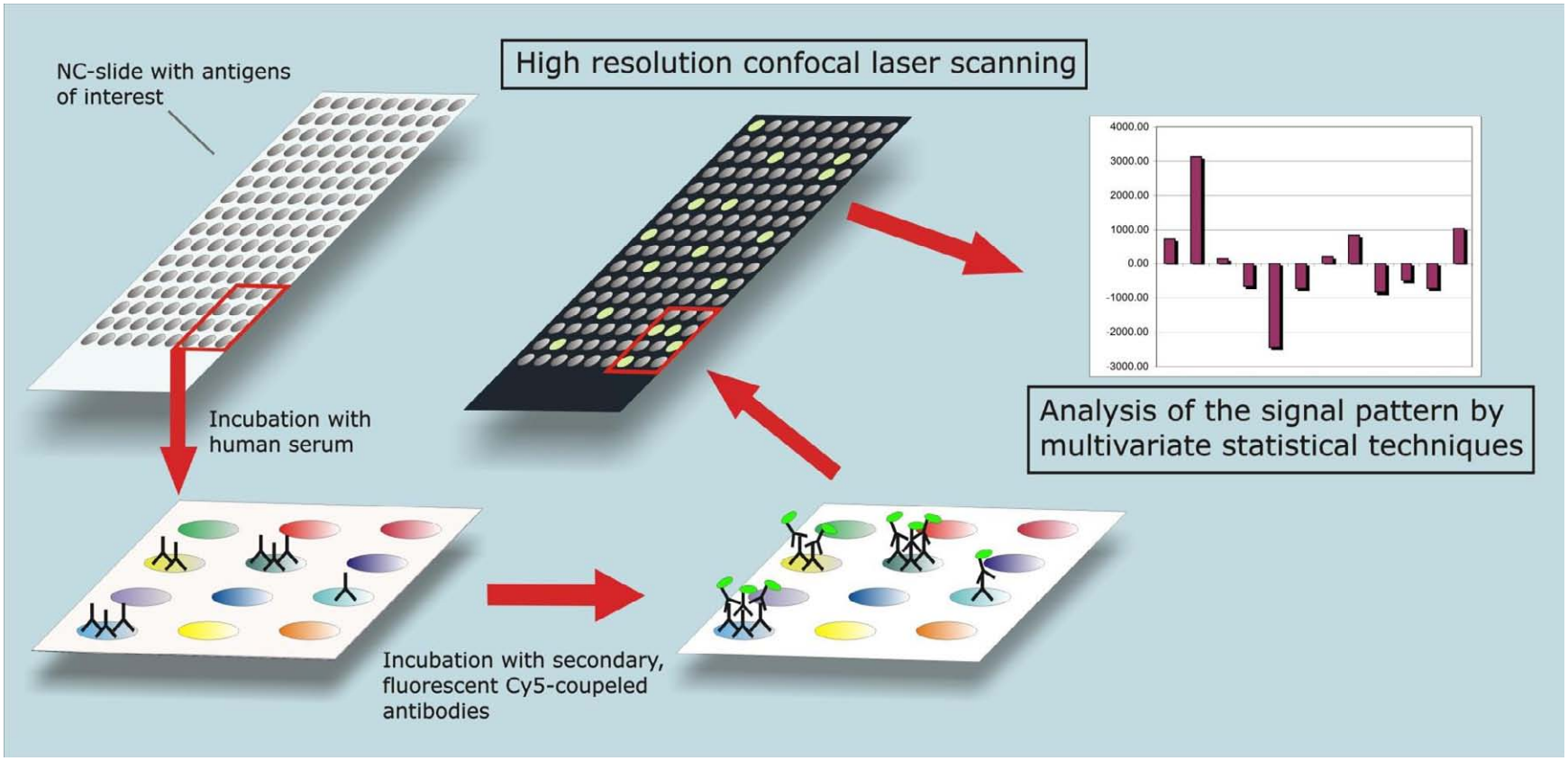
Zastosowania i warianty mikromacierzy DNA

- **Macierze ekspresyjne**
- **Macierze cytogenetyczne**
- **Macierze tkankowo specyficzne (TMAS):**
  Progression Tissue Microarrays*; *Prognosis Tissue Microarrays
- **Macierze CGH: *Comparative Genomic Hybridization* - różnice ilości kopii DNA pomiędzy genomami**
- **Macierze CGS: *Comparative Genome Sequencing*, dla małych genomów**
- **Macierze wykrywające metylację CpG, sprzęgnięte z technikami wzbogcania próby w DNA metylowany,**
  np. MeDIP (Methylated DNA immunoprecipitation)
- **Mikromacierze stosowane do wzbogacania frakcji przed sekwencjonowaniem**
  (np. technologia NimbleGen SeqCap EZ Exome)

Mikromacierze białkowe

Białka immobilizowane na podłożu stałym:

- **Przeciwciała – „przepłukiwanie ekstraktem”**
- **Białka – „przepłukiwanie przciwciałami”**
- **Badanie oddziaływań białka - białka**



Za: http://www.eye-research.org/joomla/index.php?option=com_content&task=view&id=24&Itemid=37

Mapowanie struktury RNA z zastosowaniem nukleaz

Mapowanie struktury RNA przy pomocy RNaz

- **Czynniki przecinające RNA w obrębie odcinków jednoniciowych, dwuniciowe protegowane**

- **Enzymatyczne lub chemiczne RNazy:**

- nukleazy U2, T1, V1, RnI, ChSI
- jony metali ciężkich: Pb^{2+}
- degradacja alkaiczna

- **Specyficzność względem sekwencji (wiązań pomiędzy konkretnymi zasadami)**

Mapowanie struktury RNA przy pomocy RNaz

- **Doświadczenia *in vitro***

-wada: niefizjologiczne stężenia RNA, nie zawsze fizjologiczne stężęnia soli w buforach

-zaleta: proste w wykonaniu, możliwe mapowanie dużych cząsteczek, łatwe dodawanie niskocząsteczkowych ligandów

- **Schemat doświadczenia:**

1. Transkrypcja *in vitro* w obecności np. ^{32}P-UTP, lub znakowanie zimnych transkryptów poprzez kinazowanie (5'koniec) lub ligację (ligaza RNA T4)

2. Czyszczenie piętnowanego RNA

3. Inkubacja w buforze z RNazami

4. Rozdział w żelu poliakrylamidowym i autoradiogrfia

5. Analiza wyników, sprzęgnięta z algorytmami modelowania struktur RNA (mfold)

Mapowanie struktury 5'UTR mRNA arginazy *A. nidulans*

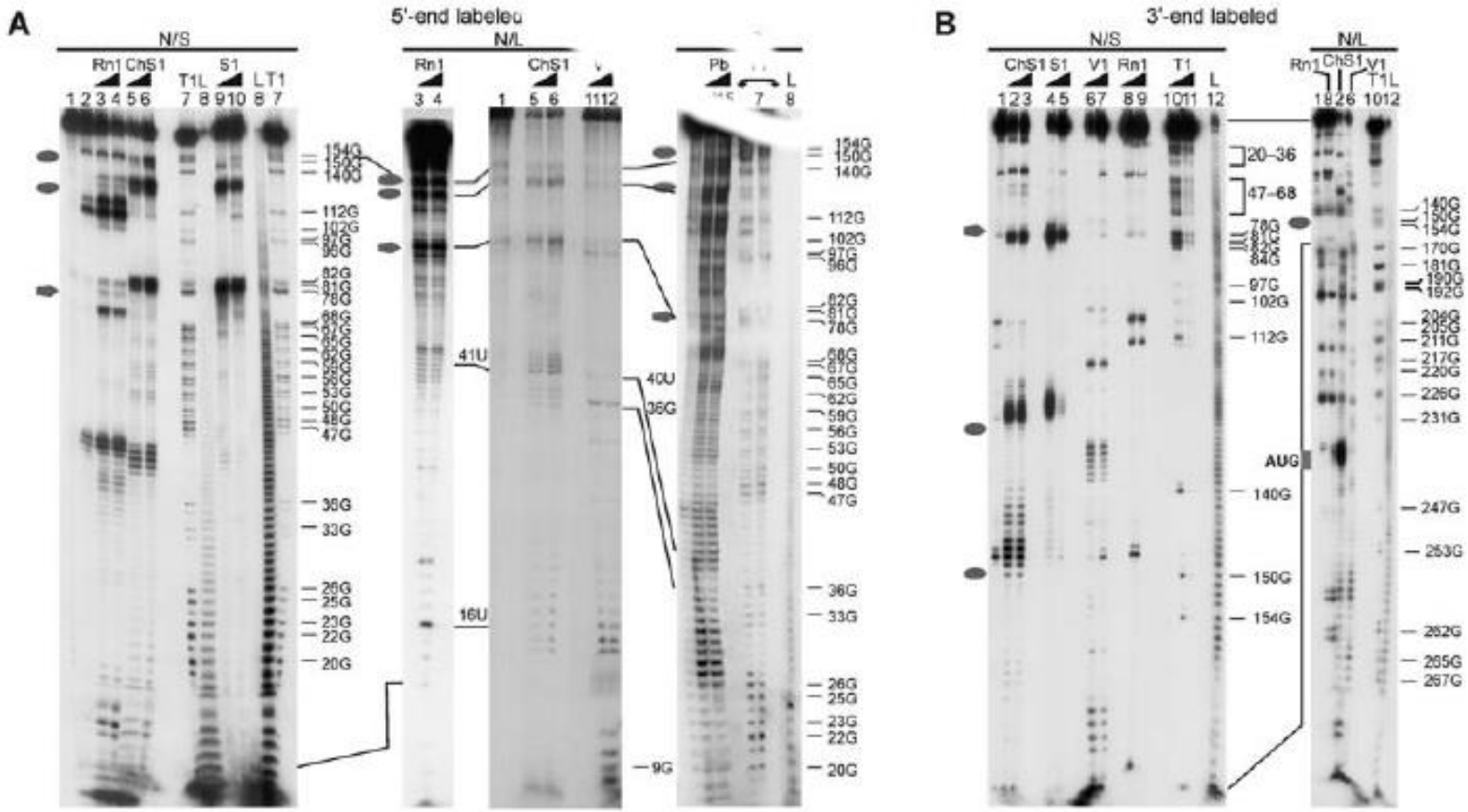
Biol. Chem., Vol. 388, pp. 135–144, February 2007 • Copyright © by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/BC.2007.015

L-Arginine influences the structure and function of arginase mRNA in *Aspergillus nidulans*

Piotr Borsuk[1,2], Anna Przykorska[2], Karina Blachnio[2], Michal Koper[1,2], Jerzy M. Pawlowicz[2], Malgorzata Pekala[1] and Piotr Weglenski[1,2,*]

- **5'UTR mRNA *agaA* posiada złożoną potencjalnią strukturę 2-rzędową.**
- **L-arginina wiąże się z 5'UTR mRNA arginazy.**
- **L-arginina specyficznie zmienia strukturę 5'UTR mRNA arginazy *in vitro*, D-arginina nie**
- **W 5'UTR znajduje się intron, którego położenie sugeruje możliwość jego alternatywnego wycinania: 19 nt za poznanym doświadczalnie 3' miejscem składania znajduje się druga konserwowana sekwencja sygnałowa dla 3' miejsca składania intronów.**

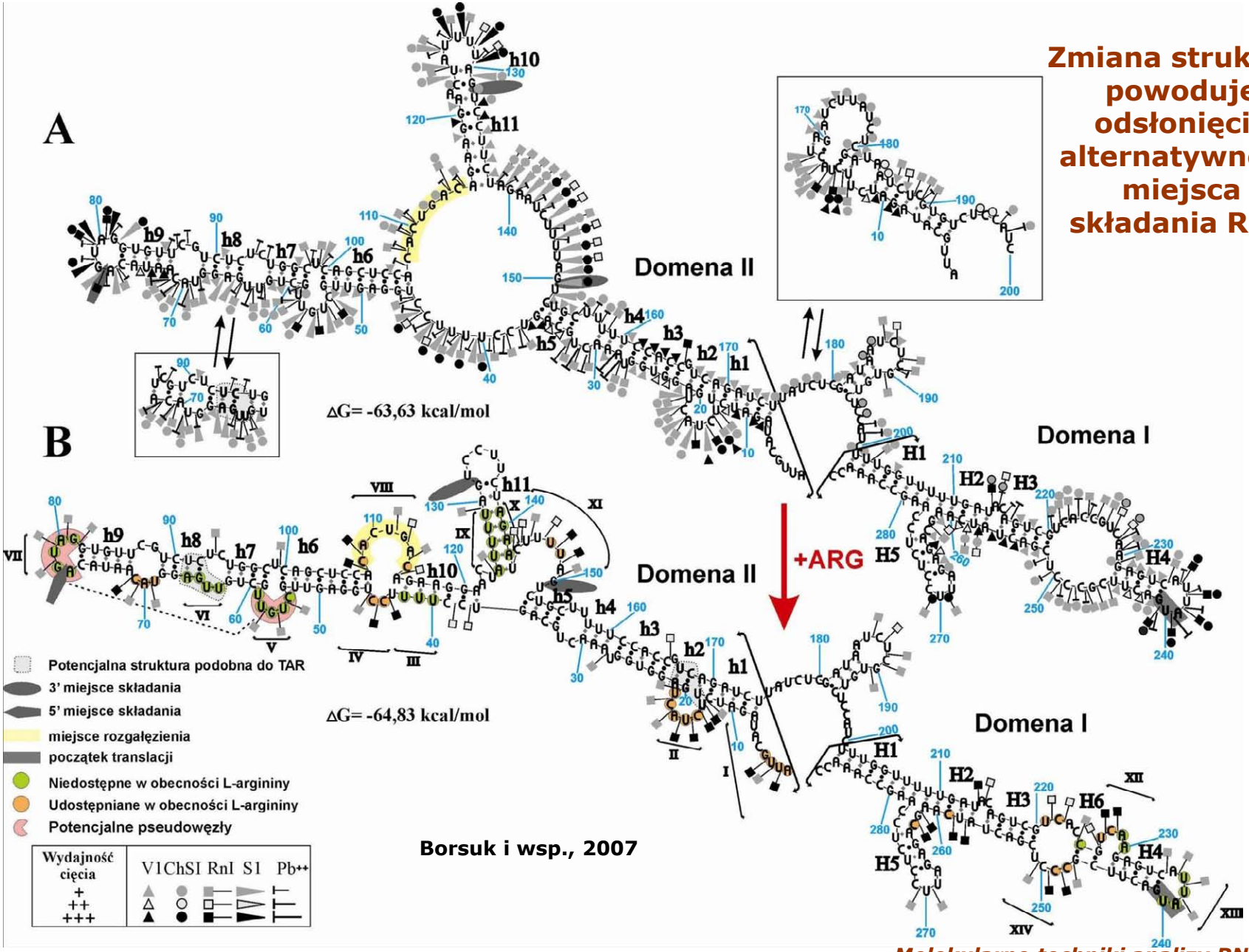
Mapowanie struktury 5'UTR mRNA arginazy *A. nidulans*



Borsuk i wsp., 2007

Figure 3 Probing the structure of *agaA* mRNA 5′-UTR fragments.
In vitro transcribed N/L or N/S 5′-UTR fragments were labelled at the 5′- (A) or 3′- (B) ends and subjected to enzymatic and chemical probing. (A) Lane 1, incubation control in TMK buffer containing 1.5 mM $ZnCl_2$. Lane 2, incubation control in TMK buffer. Lanes 3 and 4, 0.2 and 0.3 U of nuclease RnI, respectively. Lanes 5 and 6, 0.2 and 0.3 U of nuclease ChSI, respectively. Lane 7, RNase T1 ladder. Lane 8, alkaline ladder. Lanes 9 and 10, 12.5 and 25 U of nuclease S1, respectively. Lanes 11 and 12, 0.1 and 0.2 U of RNase V1, respectively. Lane 13, incubation control in HEPES buffer. Lanes 14 and 15, 8 and 16 mM lead acetate, respectively. (B) Lane 1, incubation control in TMK buffer. Lanes 2 and 3, 0.2 and 0.3 U of nuclease ChSI, respectively. Lanes 4 and 5, 12.5 and 25 U of nuclease S1, respectively. Lanes 6 and 7, 0.1 and 0.2 U of RNase V1, respectively. Lanes 8 and 9, 0.2 and 0.3 U of nuclease RnI, respectively. Lanes 10 and 11, RNase T1 ladder. Lane 12, alkaline ladder.

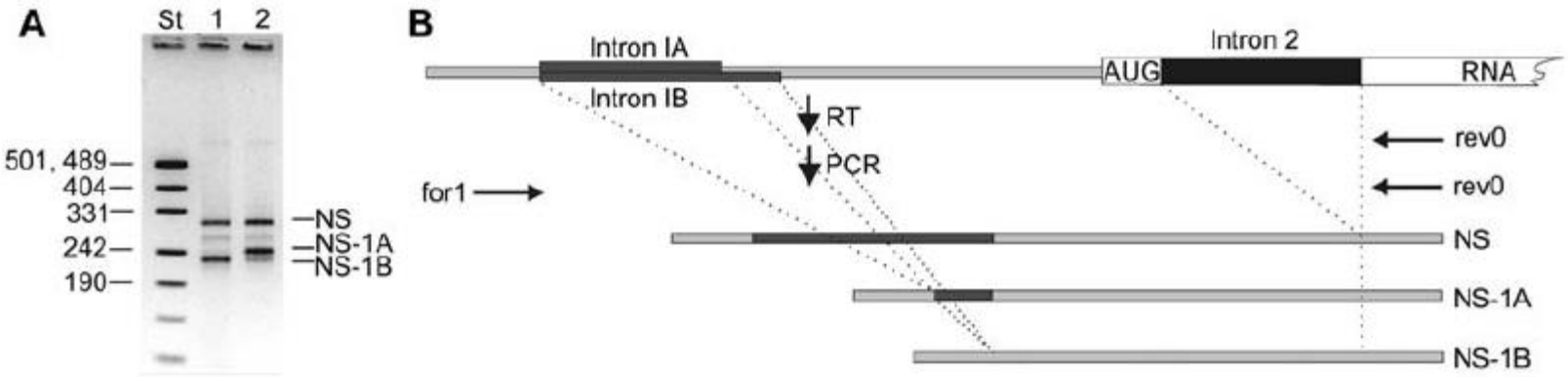
5'UTR arginazy zmienia strukturę pod wpływem L-argininy



Zmiana struktury powoduje odsłonięcie alternatywnego miejsca składania RNA

Borsuk i wsp., 2007

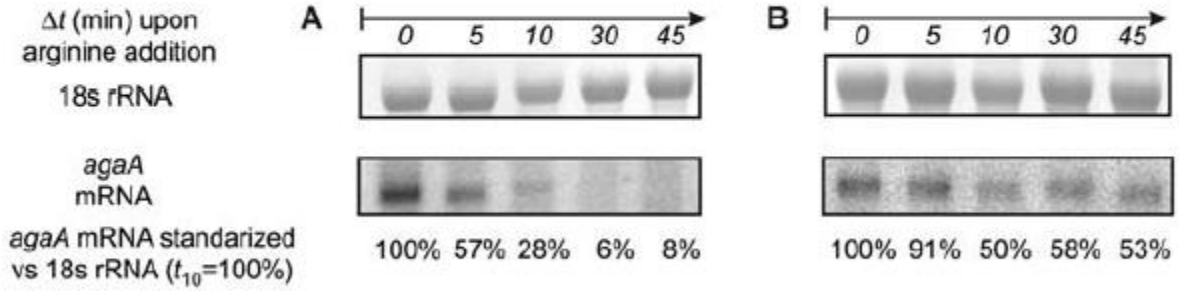
Mapowanie struktury RNA przy pomocy RNaz



RT-PCR of the *agaA* 5′-UTR.

P. Borsuk et al.

Alternatywne składanie 5'UTR mRNA *agaA* wpływa na stabilność transkryptu

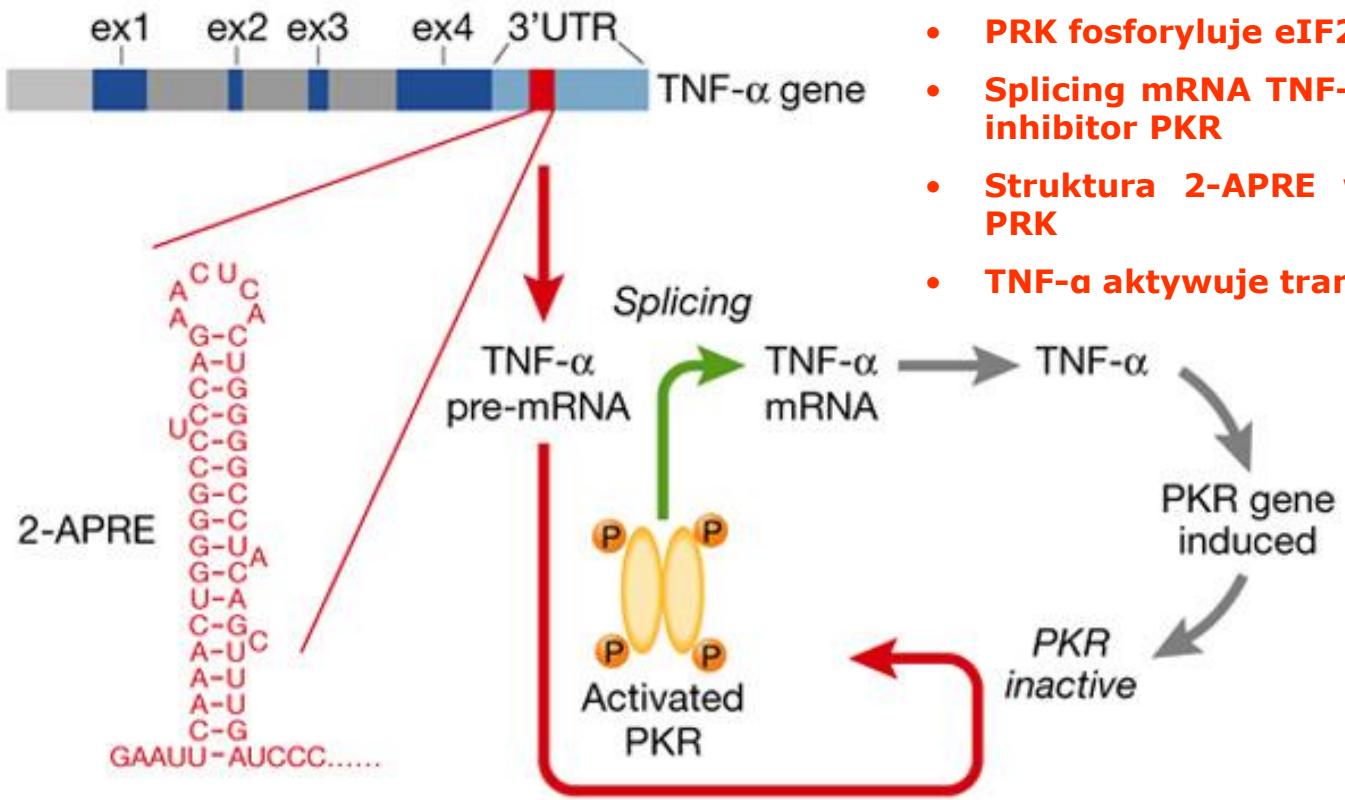


Decay of arginase mRNA in the absence (A) and presence (B) of L-arginine (2 mM) upon transcription inhibition.

Przykłady ryboprzełączników u eukariontów

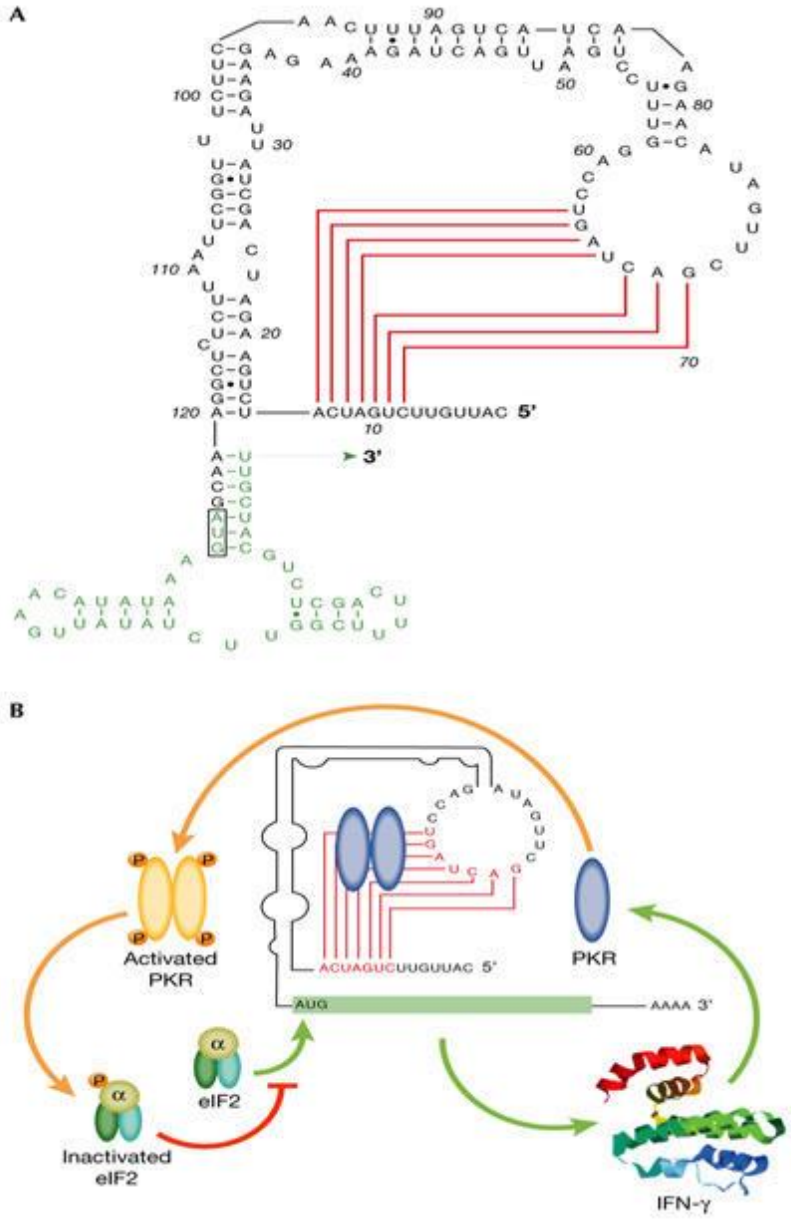
Pozytywna pętla zwrotna w składaniu mRNA TNF-α

- PKR – RNA zależna kinaza białkowa, mediator odpowiedzi immunologicznej
- Samoaktywacja PRK po związaniu dsRNA np. wirusowego
- PRK fosforyluje eIF2 – blokada translacji
- Splicing mRNA TNF-α czuły na 2-aminopurynę, inhibitor PKR
- Struktura 2-APRE w mRNA TNF-α aktywuje PRK
- TNF-α aktywuje transkrypcję genu PRK



Raymond Kaempfer, RNA sensors: novel regulators of gene expression
EMBO reports VOL 4 | NO 11 | 2003

Negatywna pętla zwrotna w translacji mRNA IFN-γ



- **Pseudowęzeł typu H w 5'UTR mRNA IFN-γ aktywuje PRK**
- **PRK poprzez fosforylację eIF2 hamuje translację mRNA IFN-γ**
- **IFN-γ wzmaga ekspresję PRK**

Raymond Kaempfer, RNA sensors: novel regulators of gene expression, EMBO reports VOL 4 | NO 11 | 2003