

**Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT);
Analiza końców 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** (Immuno-precypitacja Chroamtyny), np. obecność Pol RNA na genie; oddz. TFs – DNA; „ChIP on CHIP”; **ChIP-seq**
- **RIP** (Immuno-precypitacja RNA), np. oddziaływania białek RRM z RNA
- **DIP** (Immuno-precypitacja 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

DNA
↓
↑ RT

RNA



BIAŁKO



Howard
M. Temin



David
Baltimore



Renato
Dulbecco

(wirusy onkogenne)

**RNA ZALEŻNA
POLIMERAZA DNA**

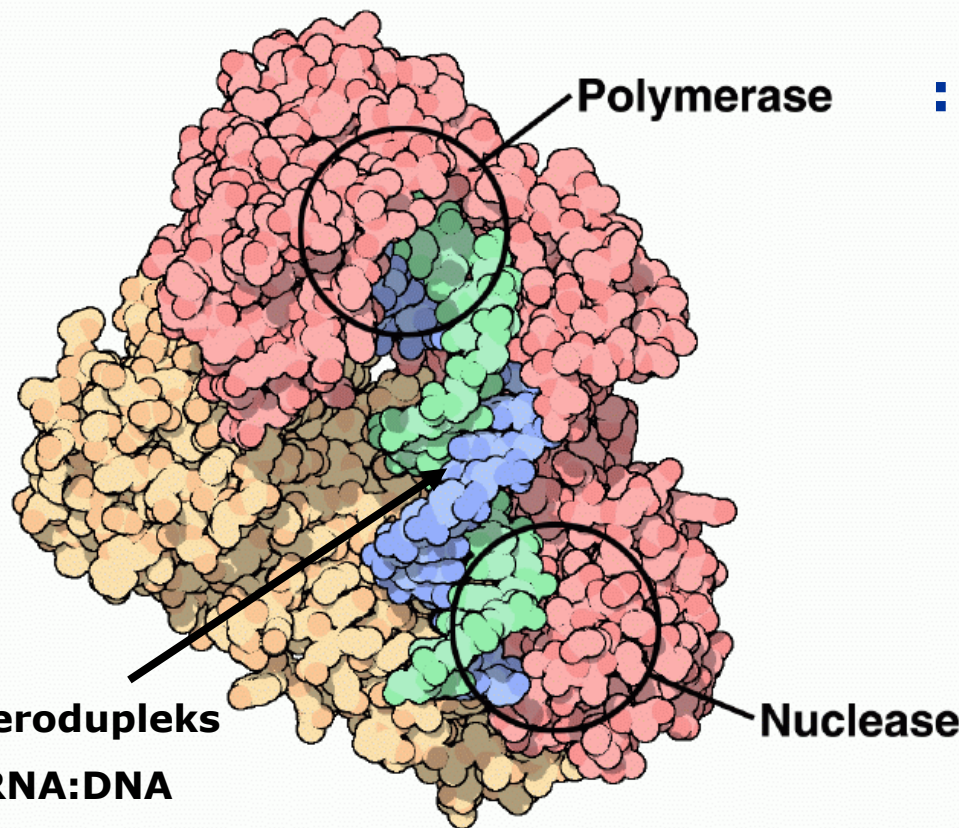
Temin, H. M., and S. Mizutani. 1970. **RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.** Nature 226: 12 1 | 1 2 13.

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

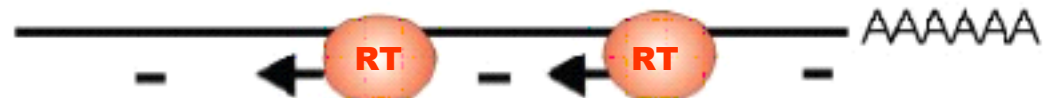
**startery
genowo-specyficzne**



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



**krótkie startery losowe
np. heksamery, oktamery**



Zastosowania odwrotnej transkrypcji

OZNACZENIA JAKOŚCIOWE:

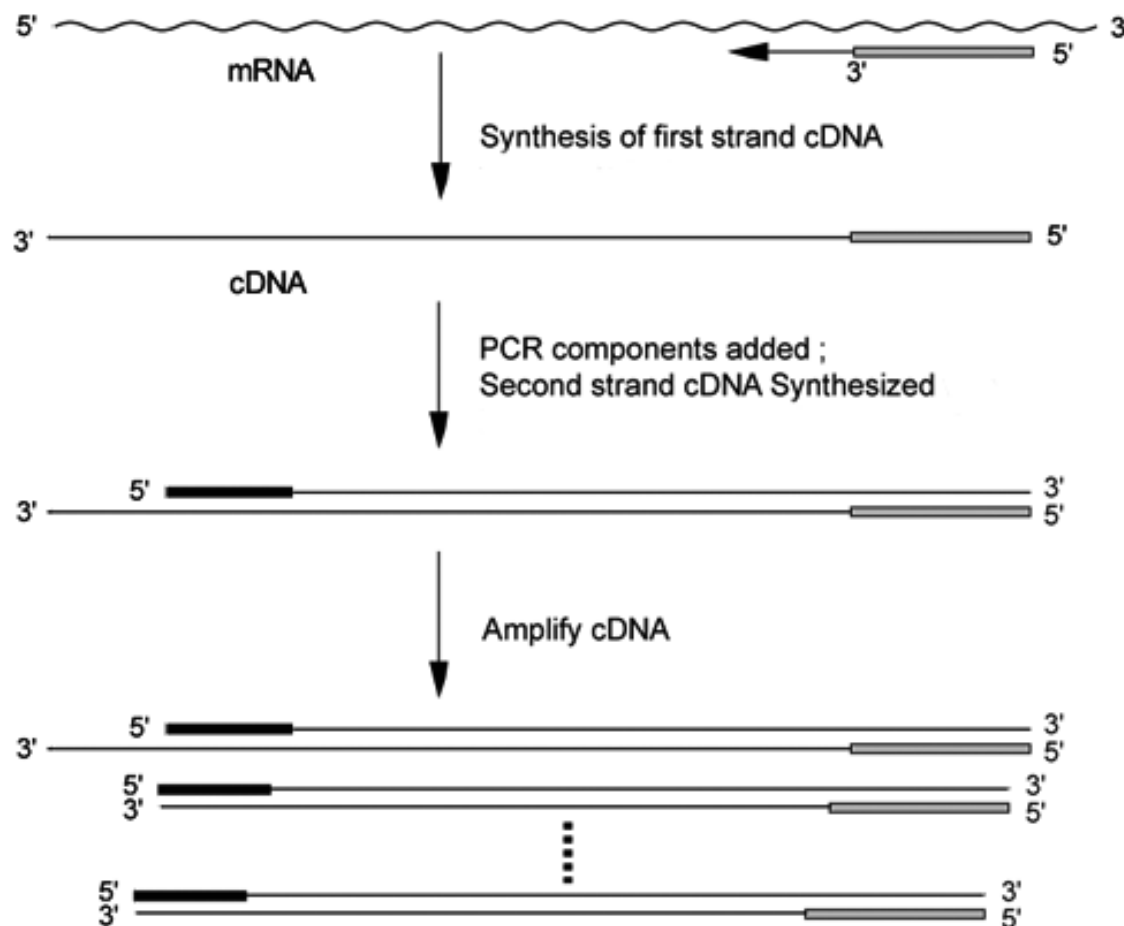
- **poznawanie struktury genów (introny)**
- **wyznaczanie końców 5' RNA**
- **analiza budowy końców 3'**
- **wykrywanie ekspresji konstruktów**

OZNACZENIA ILOŚCIOWE:

- **semi RT-PCR**
- **RT-qPCR**

Sekwencjonowanie transkryptomów

Podstawy RT-PCR



Oznaczenia ilościowe:

- semiq RT-PCR
- RT-qPCR

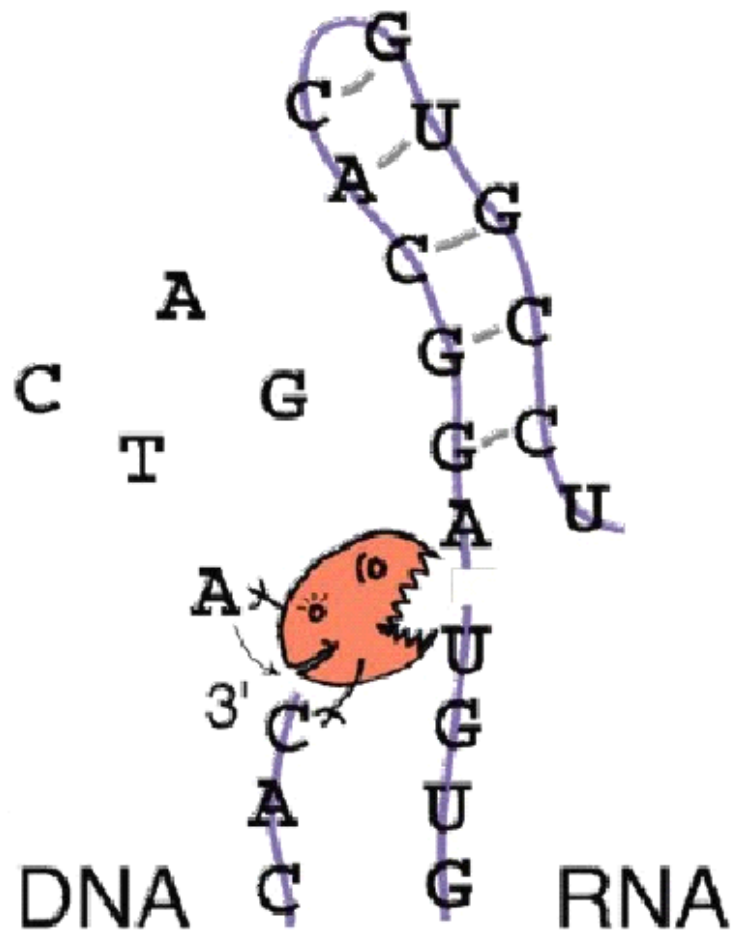
Aktywność RNazy H RT dzikiego typu

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.

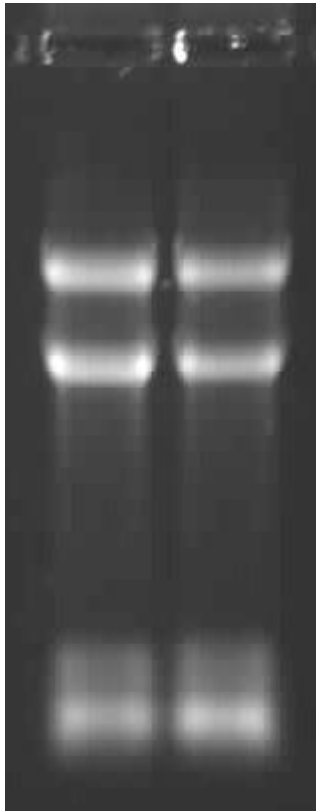
AMV: wirus ptasiej białaczki

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!**

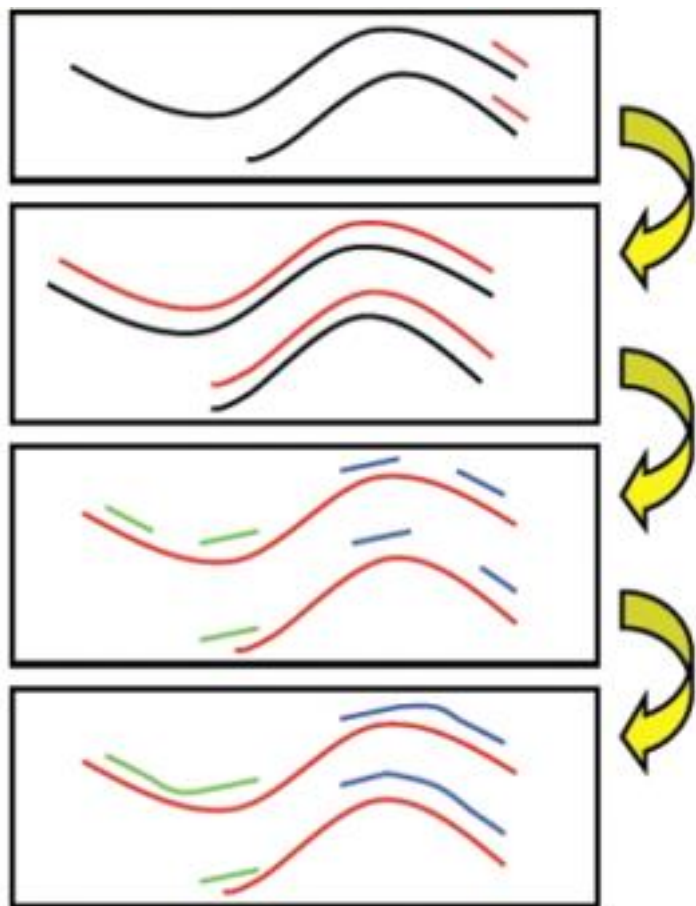
**Konieczna kontrola jakości
RNA po izolacji!**

**Zawsze konieczne
DNazowanie prób!**

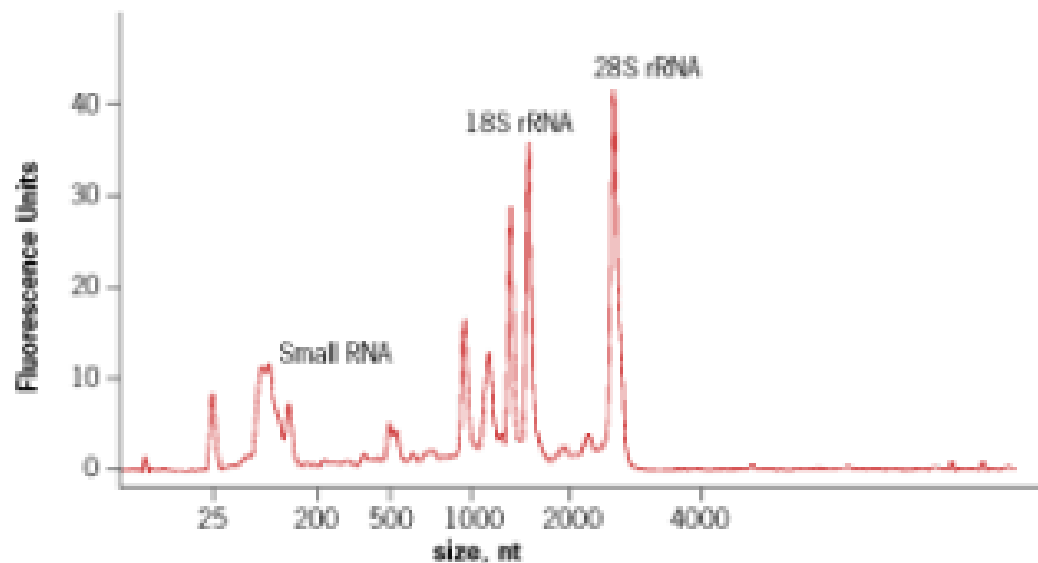
**Zalecane stosowanie
inhibitorów RNaz!**

Ocena jakości RNA

Test integralności końców 5'-3' RNA



Analizatory mikrocieczowe



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

Wydajność i specyficzność RT

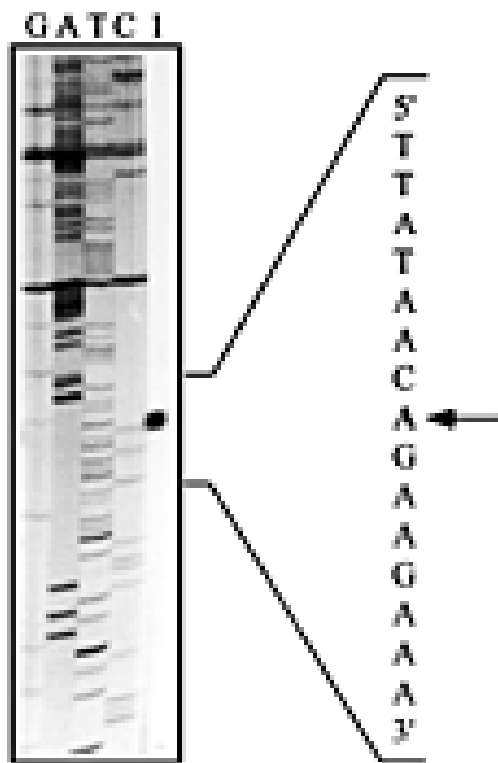
Specyficzność i wydajność reakcji odwrotnej transkrypcji
SILNIE zależy od:

- 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”)



**Przyłączanie (znakowanego radioaktywnie) GS
startera do końca 5'**



Odwrotna transkrypcja



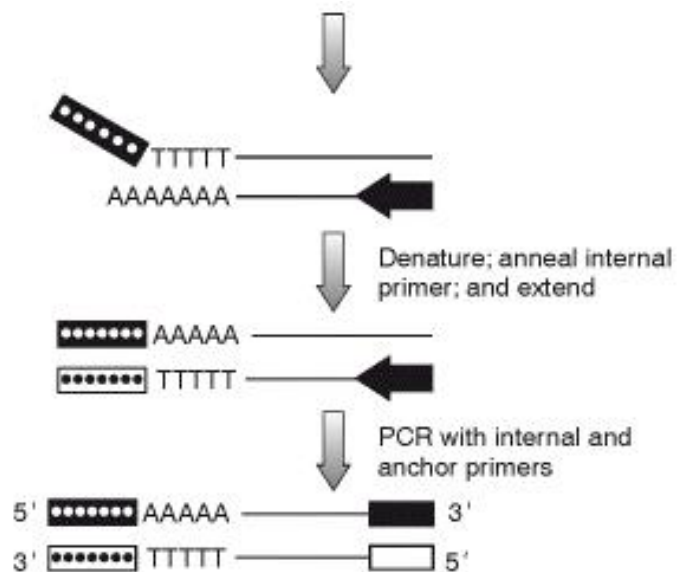
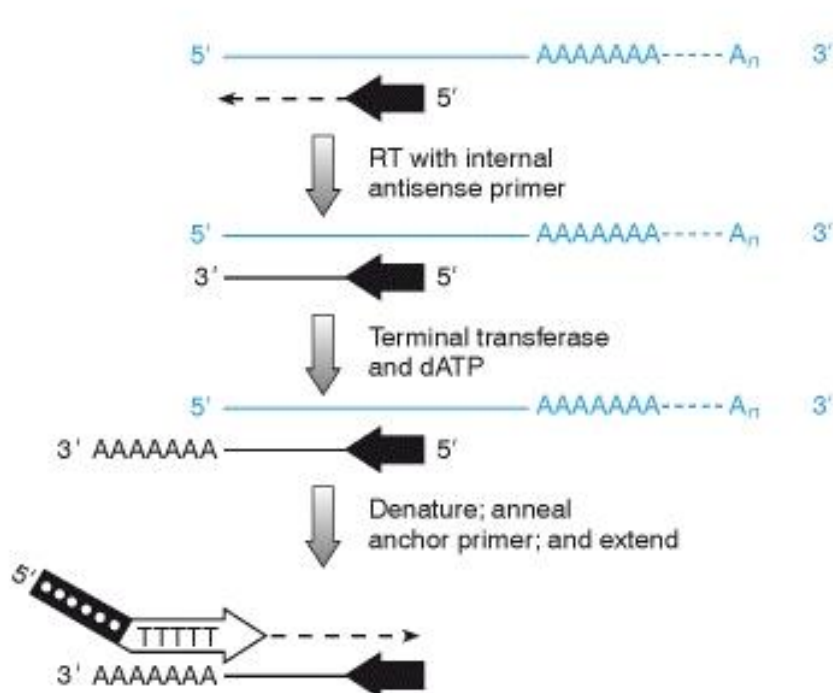
**Rozdział w żelu poliakrylamidowym razem z
reakcjami sekwencjonowania prowadzonymi z tego
samego startera**

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

Analiza końców 5' RNA – 5' RACE

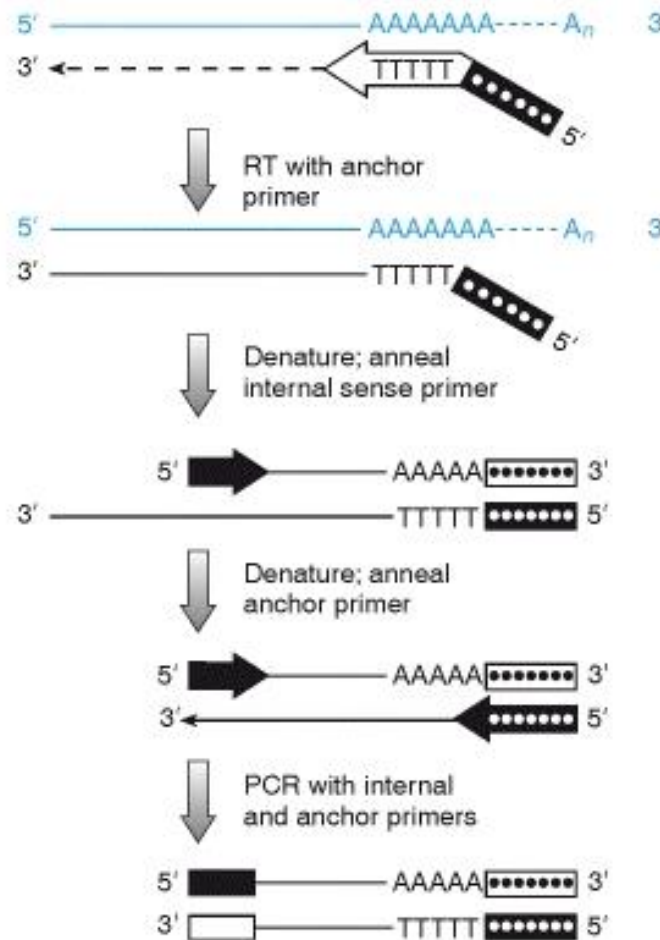
Rapid Amplification of 5'cDNA Ends

jednostronny PCR
zakotwiczony PCR

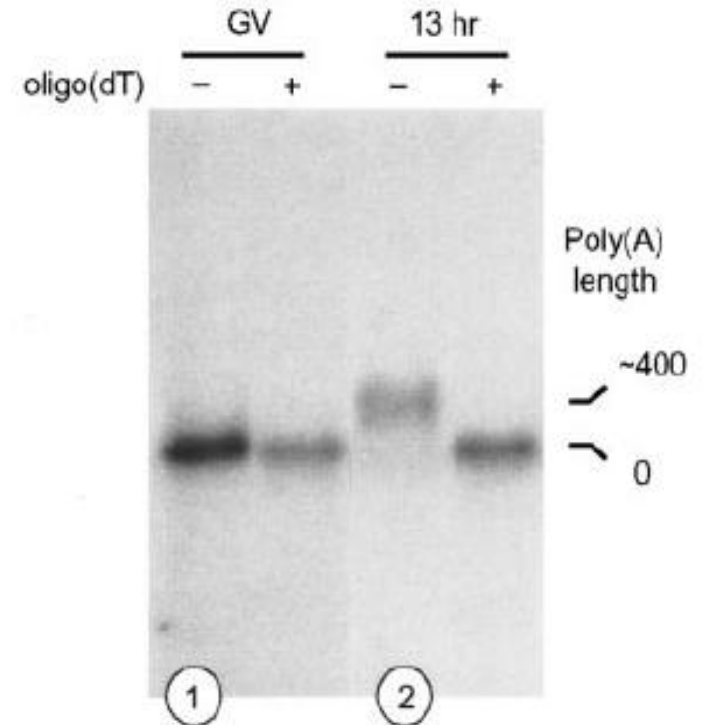


Analiza końców 3' poliadelynowanych RNA – 3' RACE

Rapid Amplification of 3'cDNA Ends



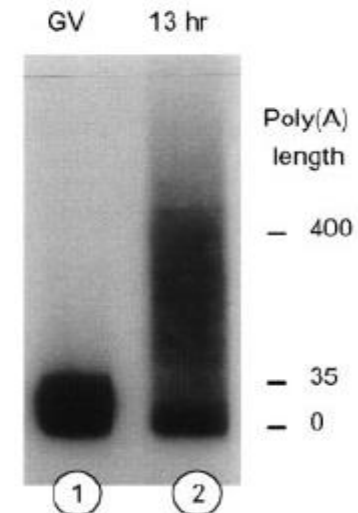
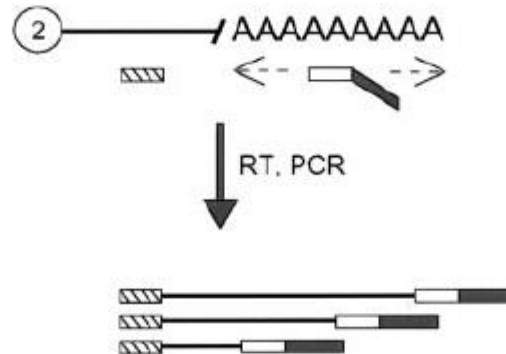
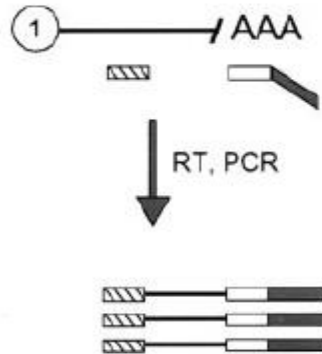
Metody analizy końców poliA - 1



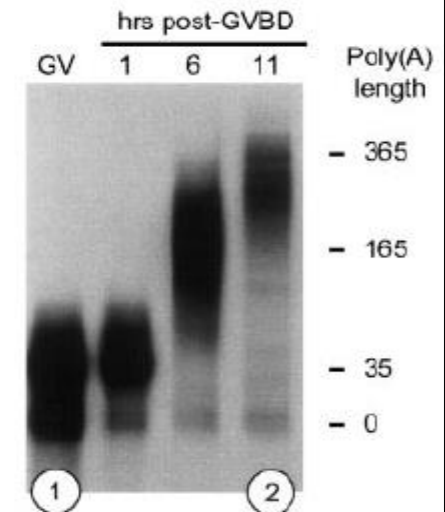
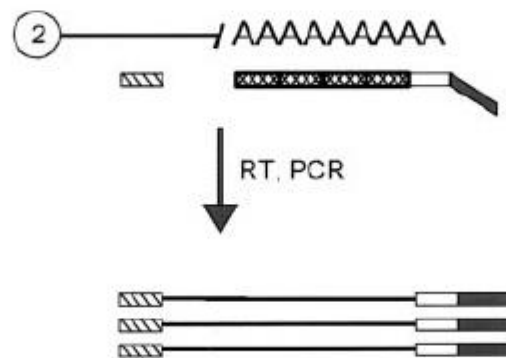
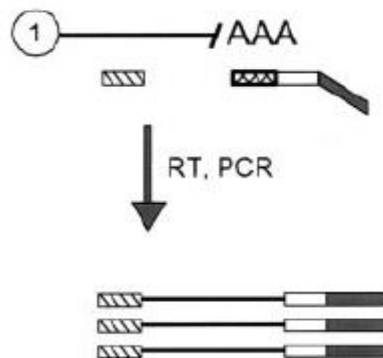
Metody analizy końców poliA - 2

RACE-PAT

PAT = Poly(A) Test



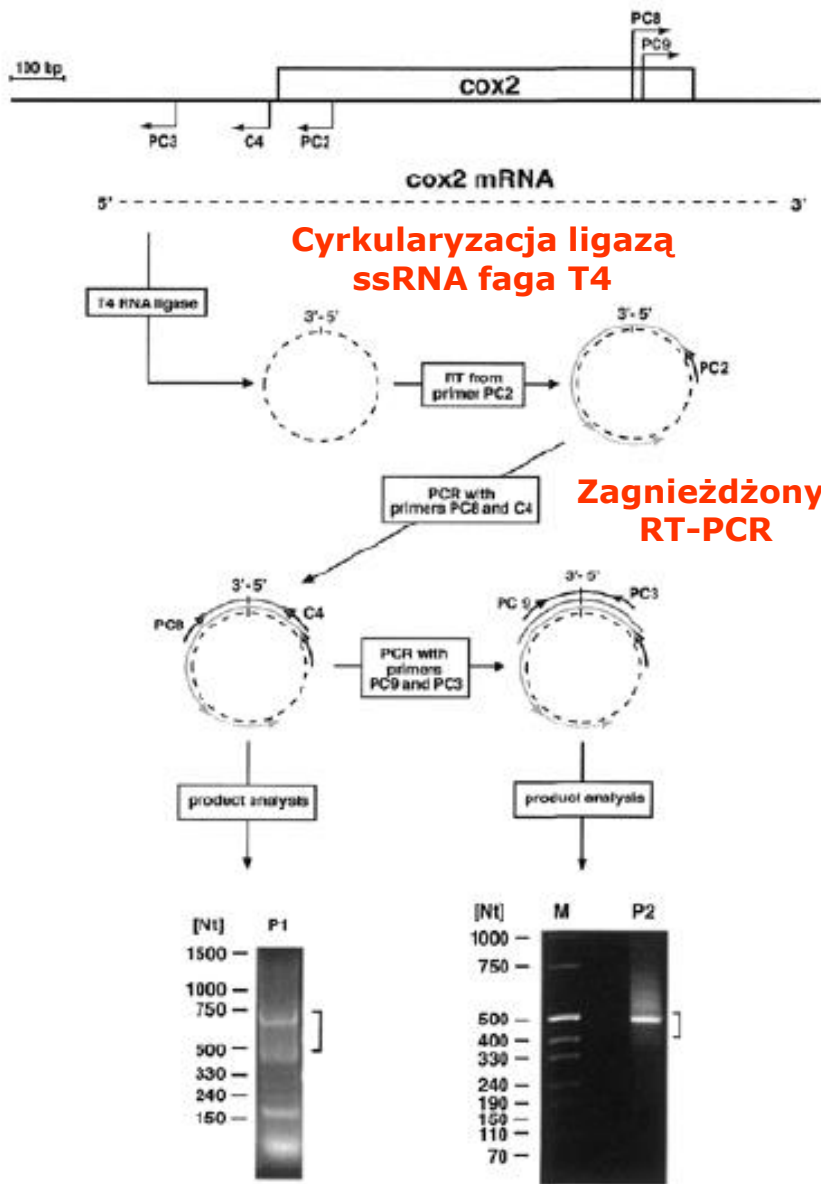
LM-PAT = Ligation Mediated PAT



Cyrkularny RT-PCR (cRT-PCR)

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

Khun i Binder, NAR, 2002.



1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+300 -277	AGAAAGAA....
3	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299 -280	GATAGAAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299 -278	TAGAAAGA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299 -277	AGAAAGAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299 -273	AGAATCGT....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299 -270	ATCGTTCA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299 -269	TCGTTTCA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+298 -291	ATCACGTA....
2	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+296 -269	TCGTTTCA....
2	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+298 -261	TAGGCTAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+297 -262	GTAGGCTA....

Σ 15

Cyrkularny RT-PCR (cRT-PCR) cd.

- Ligaza RNA łączy 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' pyrofosforylhydrolazą RNA RppH (NEB) lub roślinną kwaśną pirofosfatazą Cap-Clip (CellScript) (niegdyś **kwaśną pirofosfatazą z tytoniu TAP**, obecnie nie produkowaną) lub **trawiąc duplekisy RNA-DNA RNazą H** (ma sens gdy RNA jest wysoko ekspresjonowany, znamy dokładnie 5' koniec transkryptu i nie interesują nas alternatywne 5' końce)

Techniki badania transkrypcji

Technika *„Transcription Run ON”*

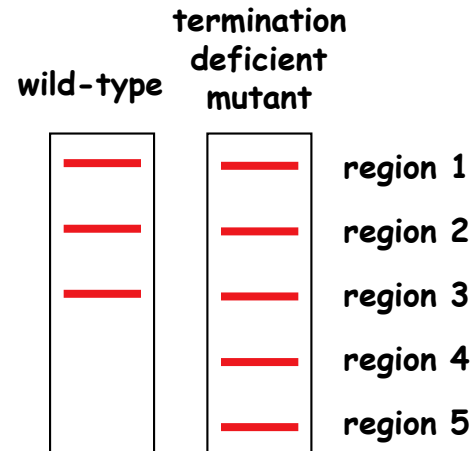
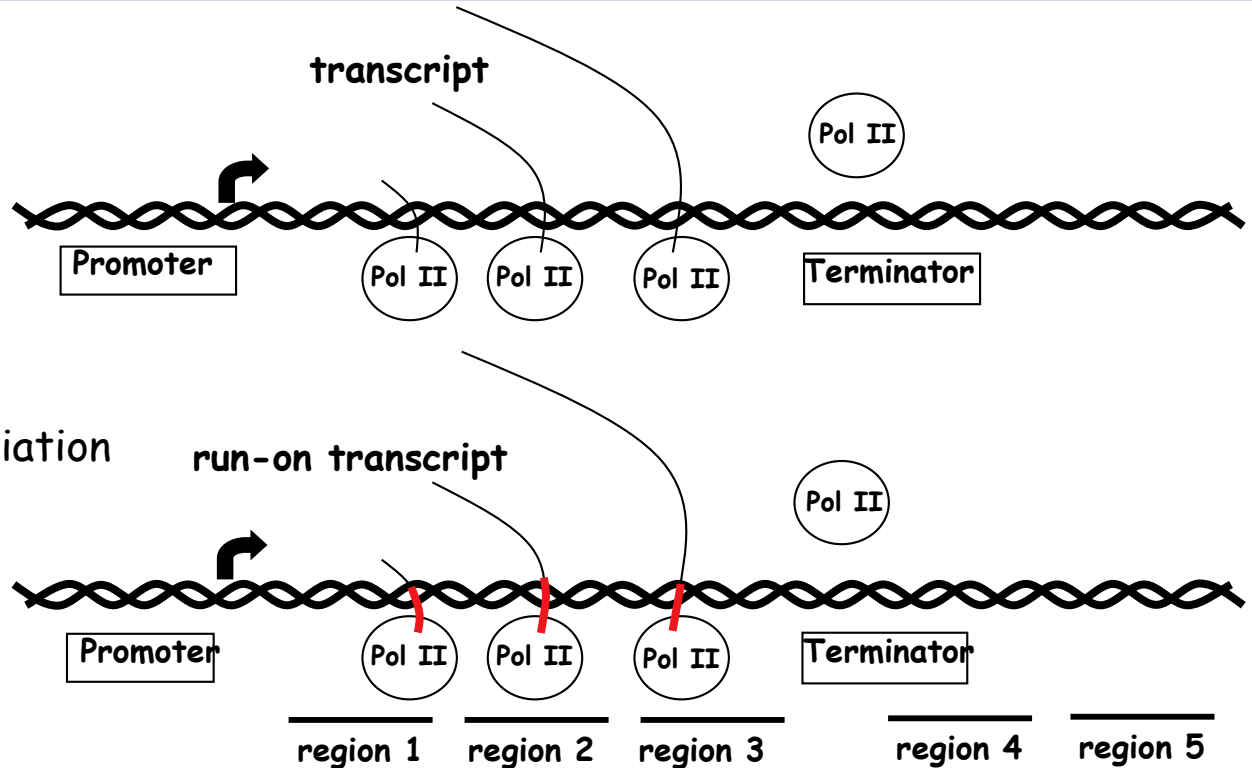
Transcription Run-On (TRO)

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 μ g**
oligonukletydów 75 nt. lub **5 μ g**
sond ssDNA M13 (ok. 250 nt.).



Wykonanie TRO – transkrypcja *in vivo*

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

Hodowla komórek do $OD_{600} \sim 0,2-0,3$ (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*)
- Rozróżnienie pomiędzy samą obecnością RNA Pol a synteza RNA

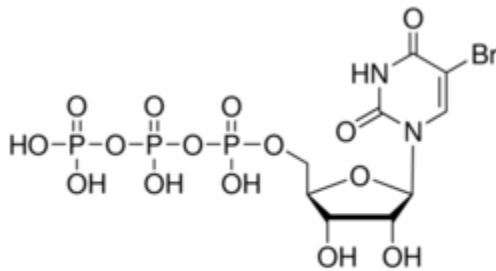
Warianty TRO:

- 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)

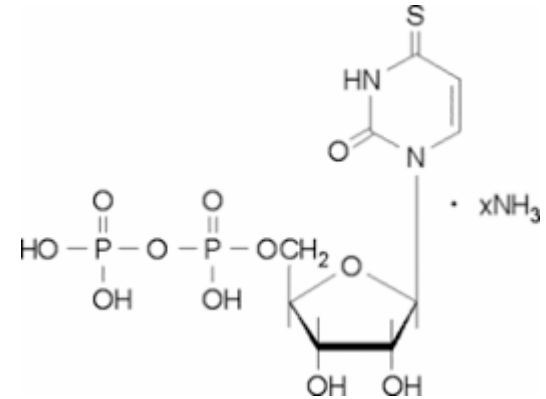


• xNa



fragmentacja RNA i
immunoprecypiacja na
złożu agaroza-antyBrU

4-tiourydyna (4tU)



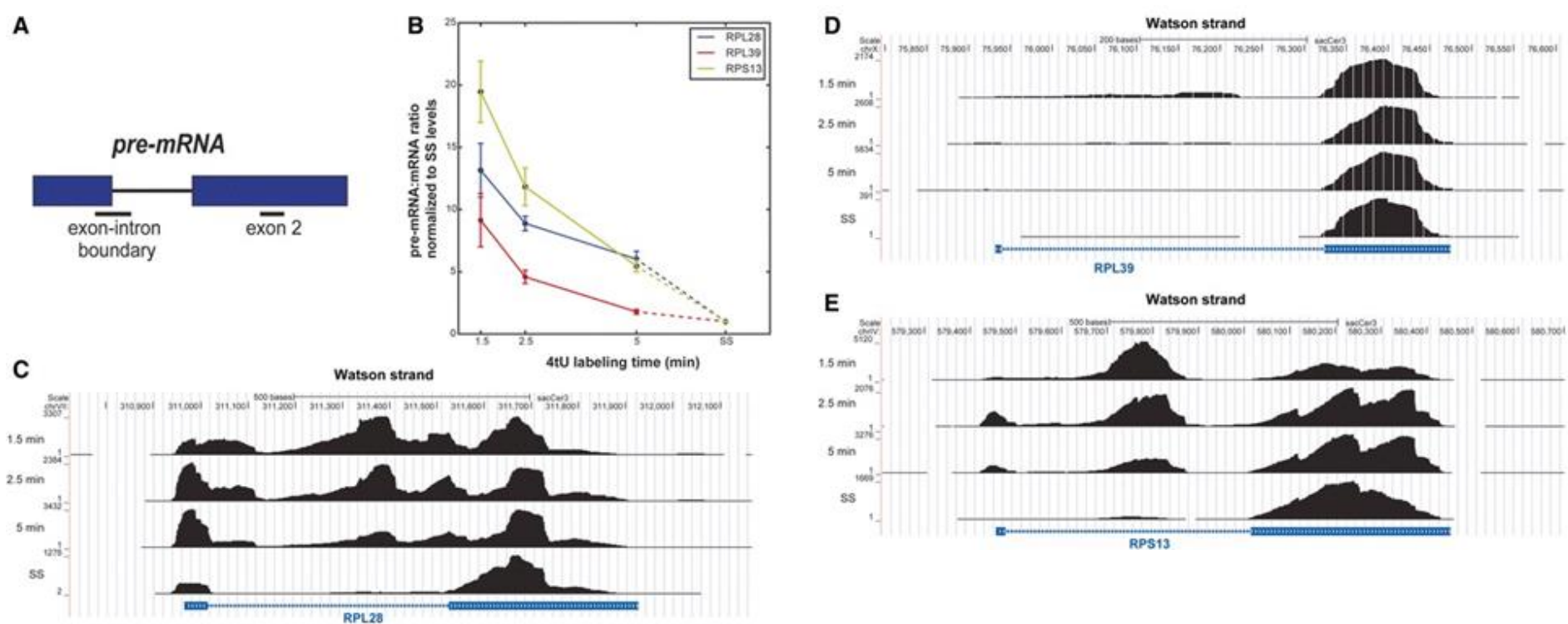
biotynylacja grupy tiolowej
i wiązanie do złoża ze
streptoawidyną



Odwrotna transkrypcja
-> RNAseq

4tU-seq

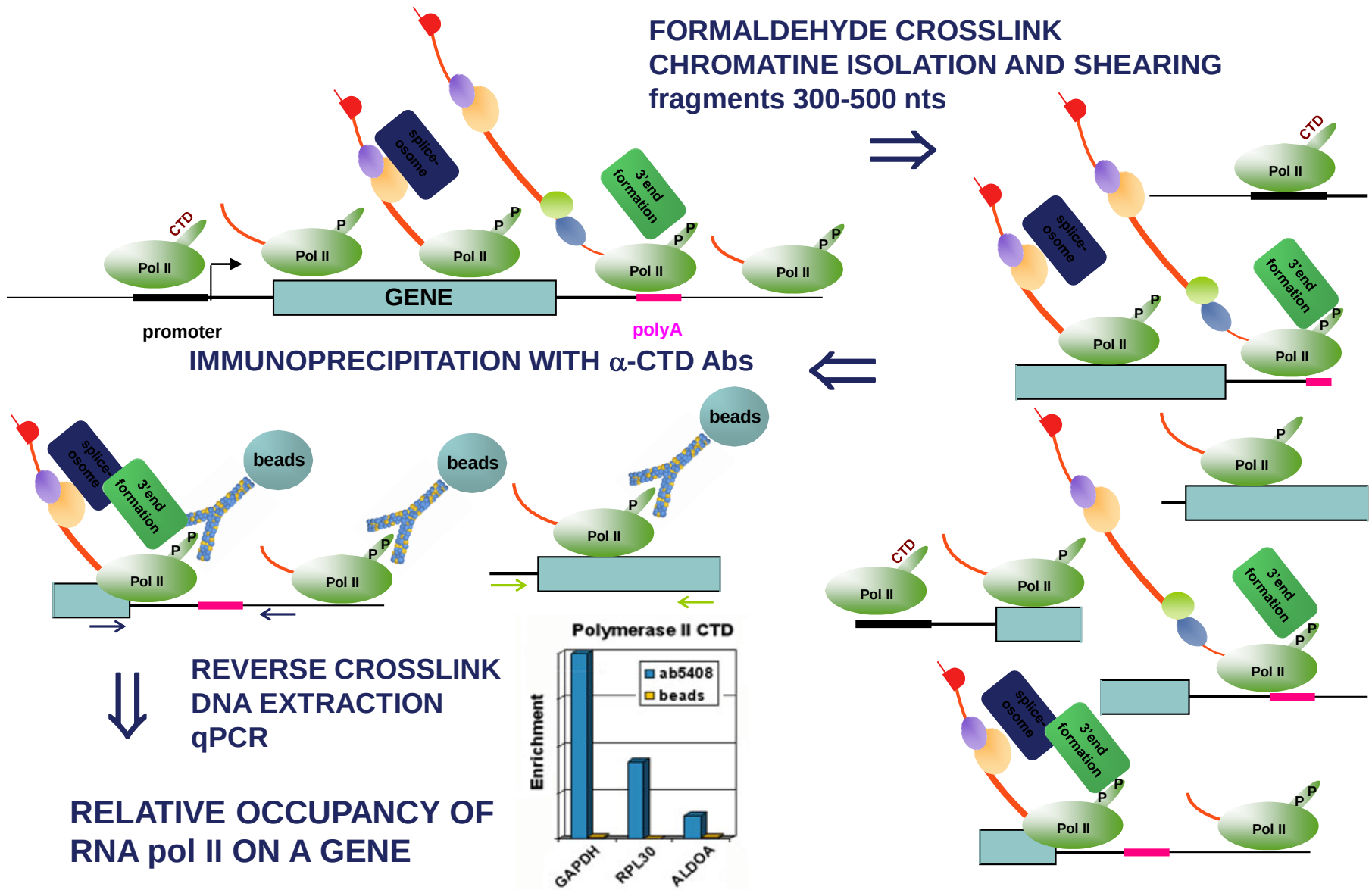
Transcriptome-wide RNA processing kinetics revealed using extremely short 4tU labeling



(Barras i wsp., Genome Biol 2015)

Immunoprecypitacja chromatyny - ChIP

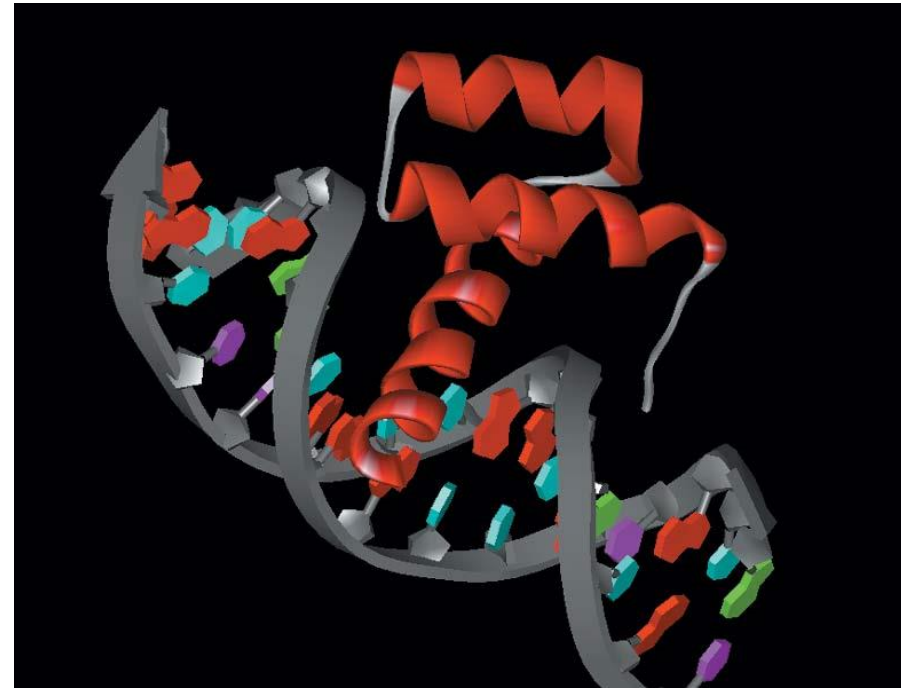
Immunoprecipitacja chromatyny - ChIP



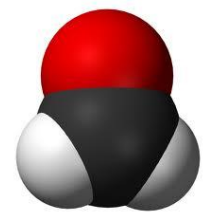
Zastosowania ChIP

Badanie oddziaływań białka-DNA *in vivo*!

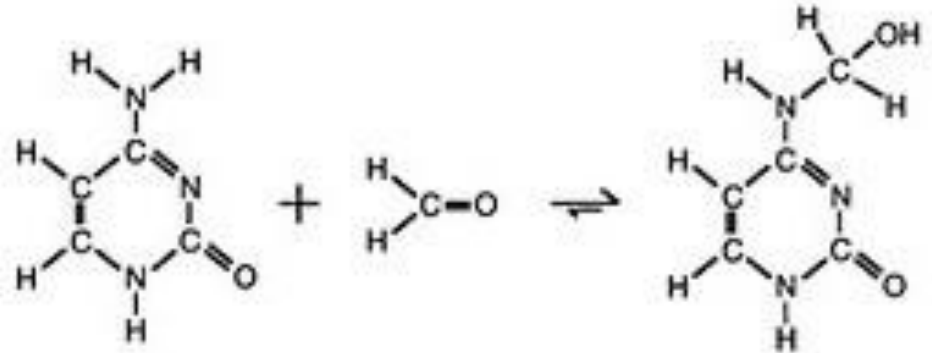
- Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych
- Obecność (dystrybucja) Pol RNA wzdłuż chromatyny (genów)
- Modyfikacje histonów
- Czynniki remodelujące chromatynę



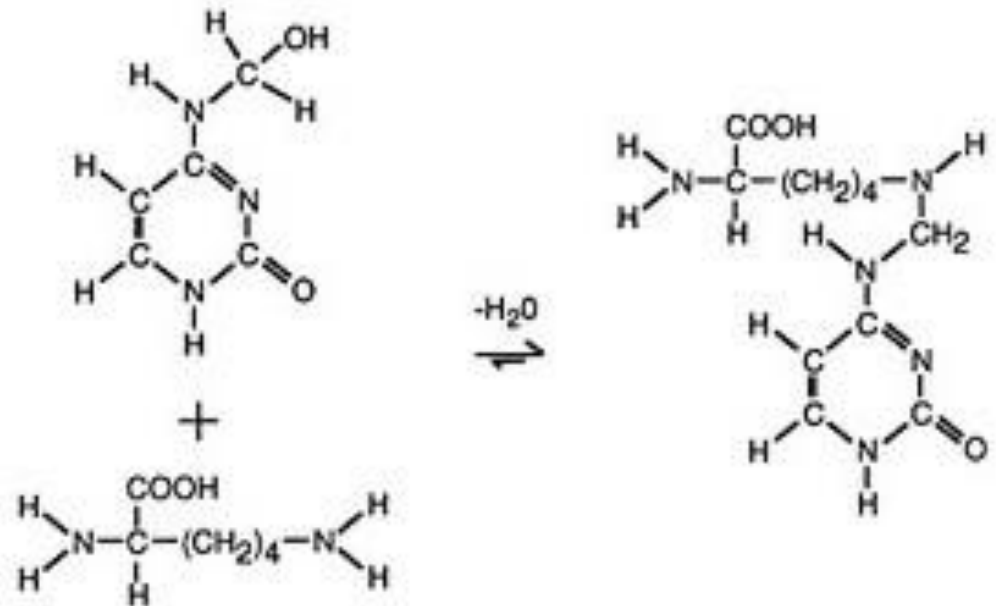
Czynnik sieciujący: formaldehyd



**Reakcja 1 (powstaje
zasada Shiffa)**



Reakcja 2

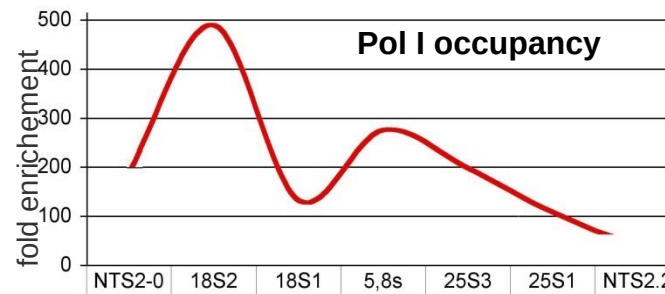
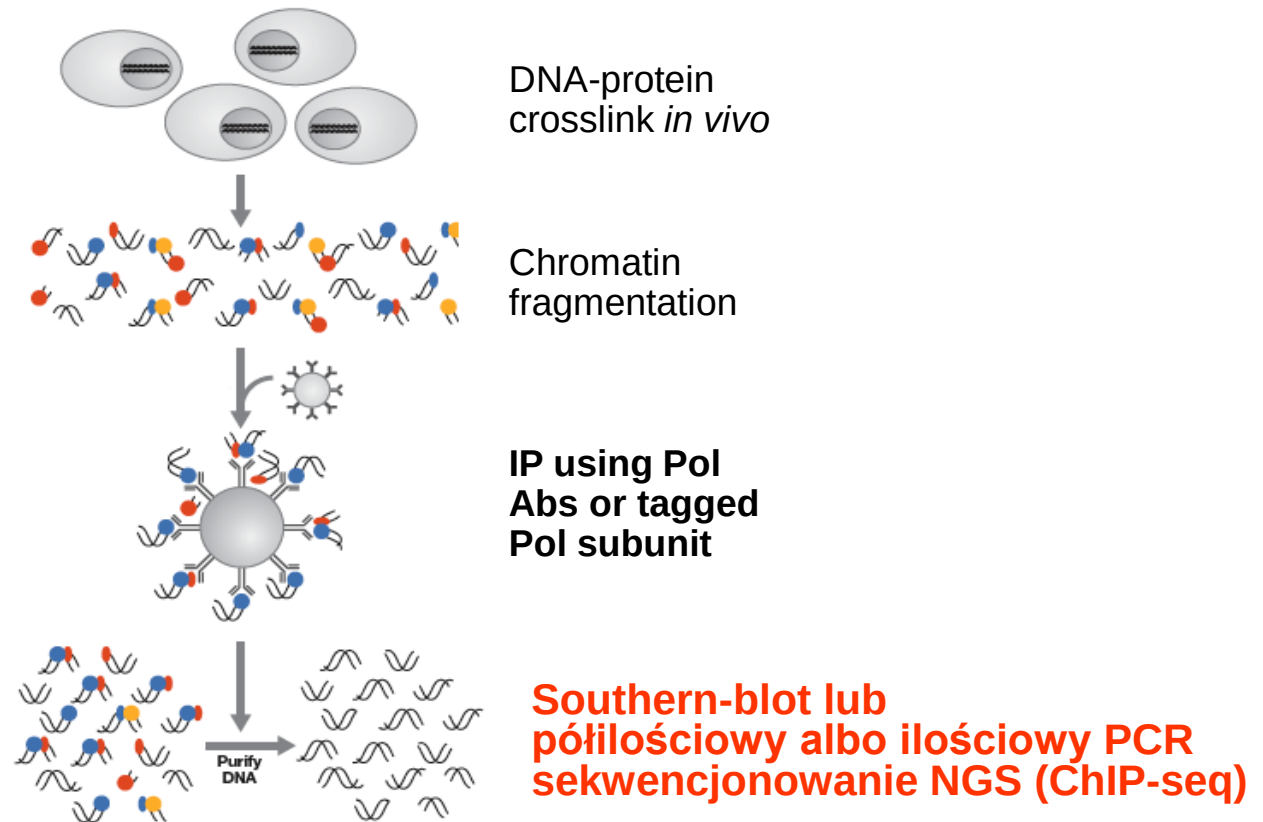


Rozdzielczość a specyficzność sieciowania

- 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)

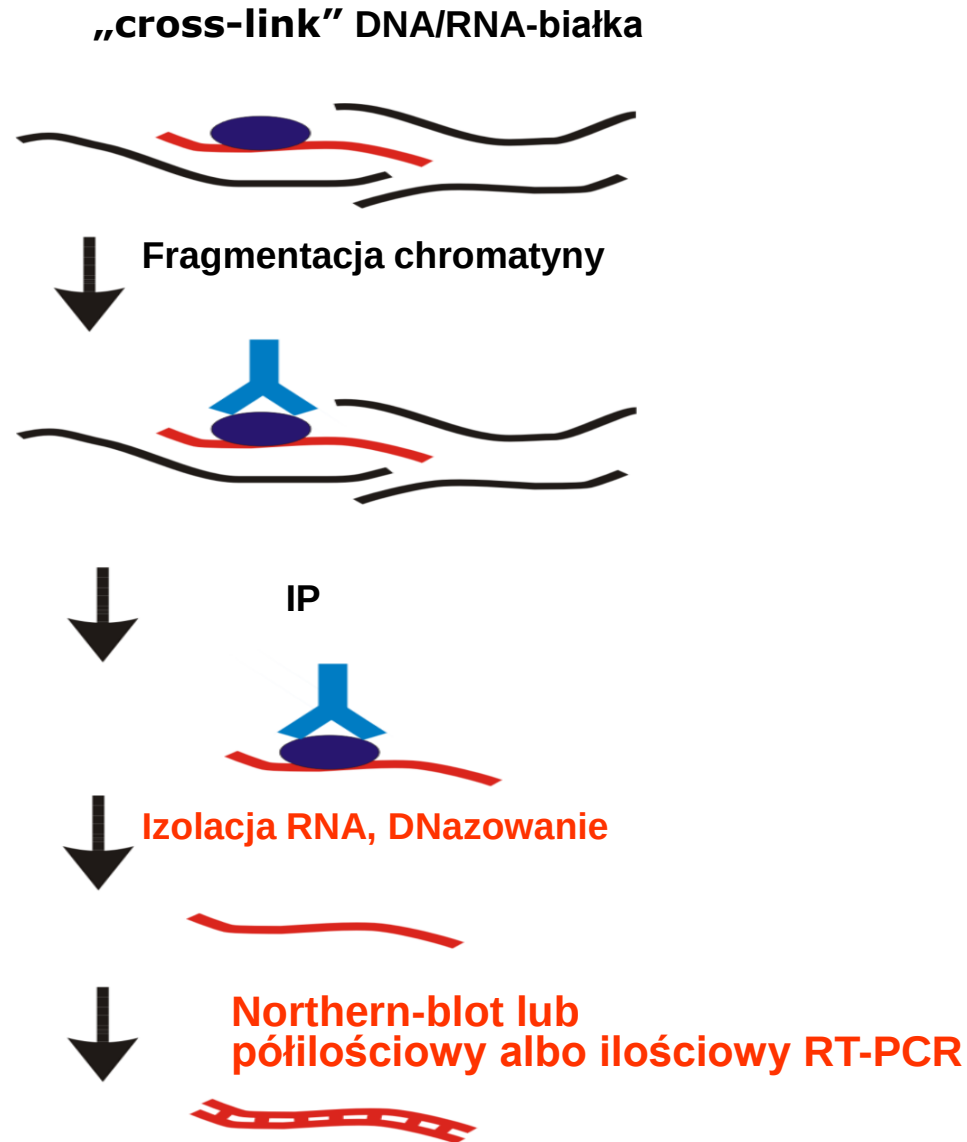
Procedura ChIP

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)



Immunoprecypitacja RNA - RIP

Immunoprecypitacja RNA jest podobna do ChIP



Terminacja transkrypcji

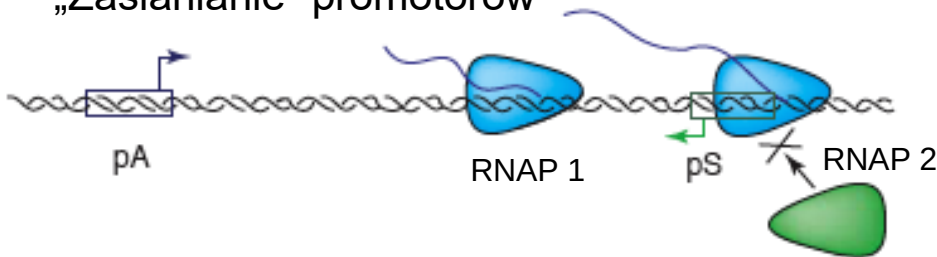
Po co terminacja transkrypcji?

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

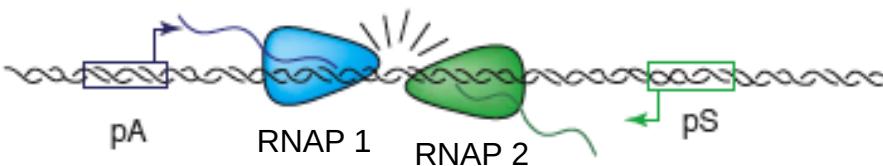
Niepoprawna terminacja transkrypcji wpływa na ekspresję genów

1. Ko-transkrypcyjnie

„Zasłanianie” promotorów

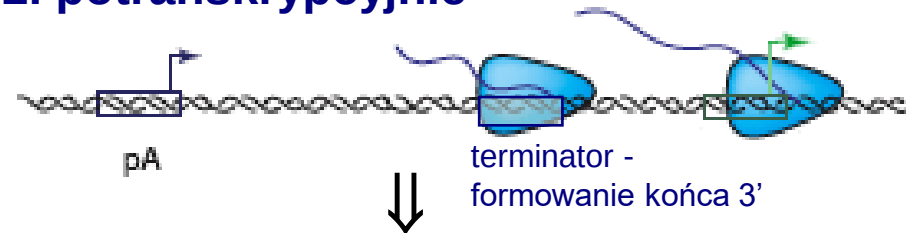


Kolizje polimeraz

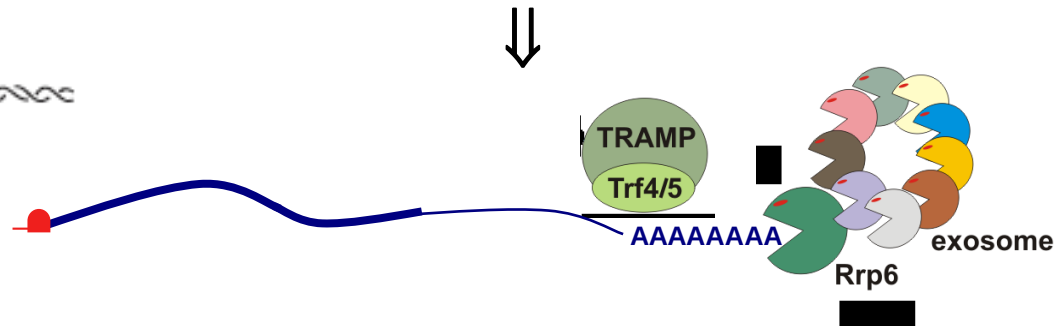


Shearwin et al, TiG., 2005

2. potranskrypcyjnie



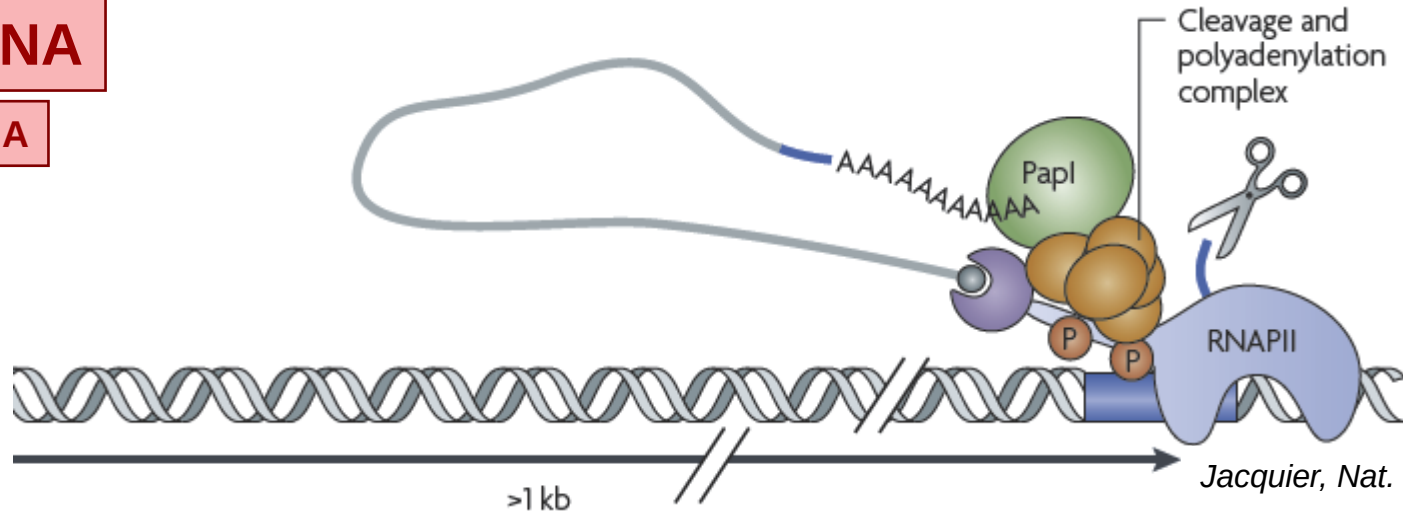
„Przeczyt” – ang. Transcription Readthrough (RT)



Usuwanie wadliwie wydłużonych transkryptów
(nuclear RNA surveillance)

Polimeraz RNA II - cięcie i poliadenylacja

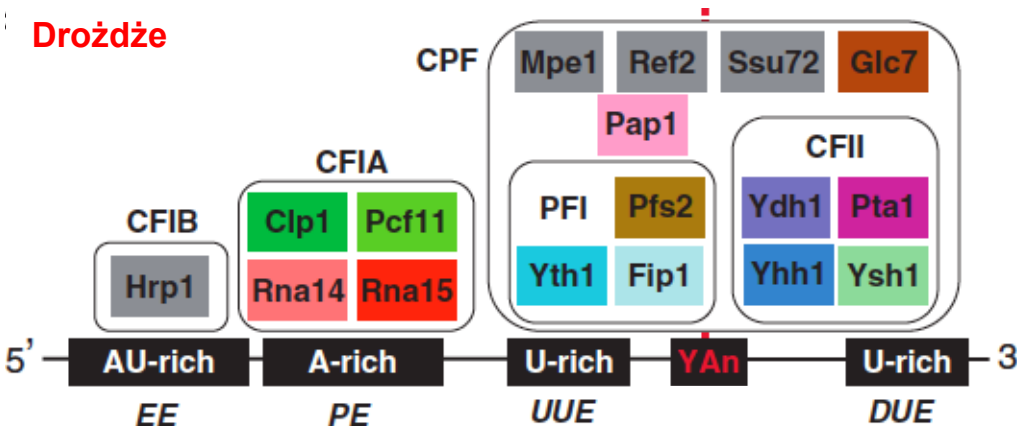
mRNA
ncRNA



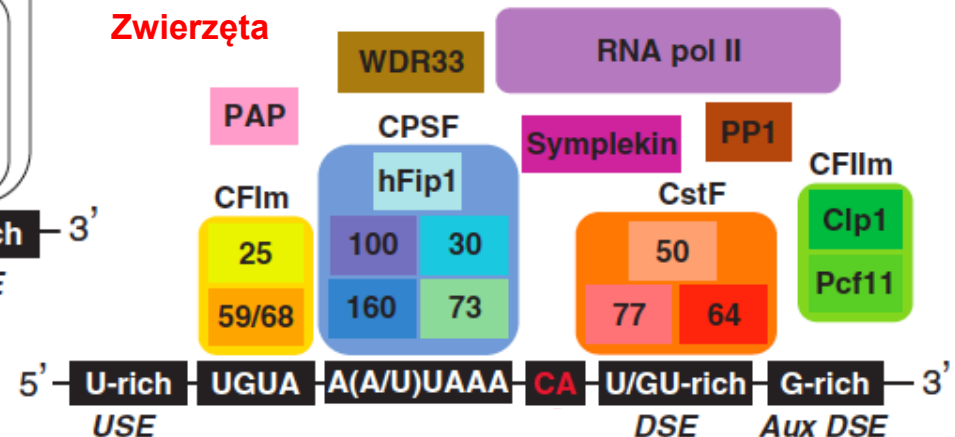
Jacquier, Nat. Rev. Genet, 2009

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

Drożdże



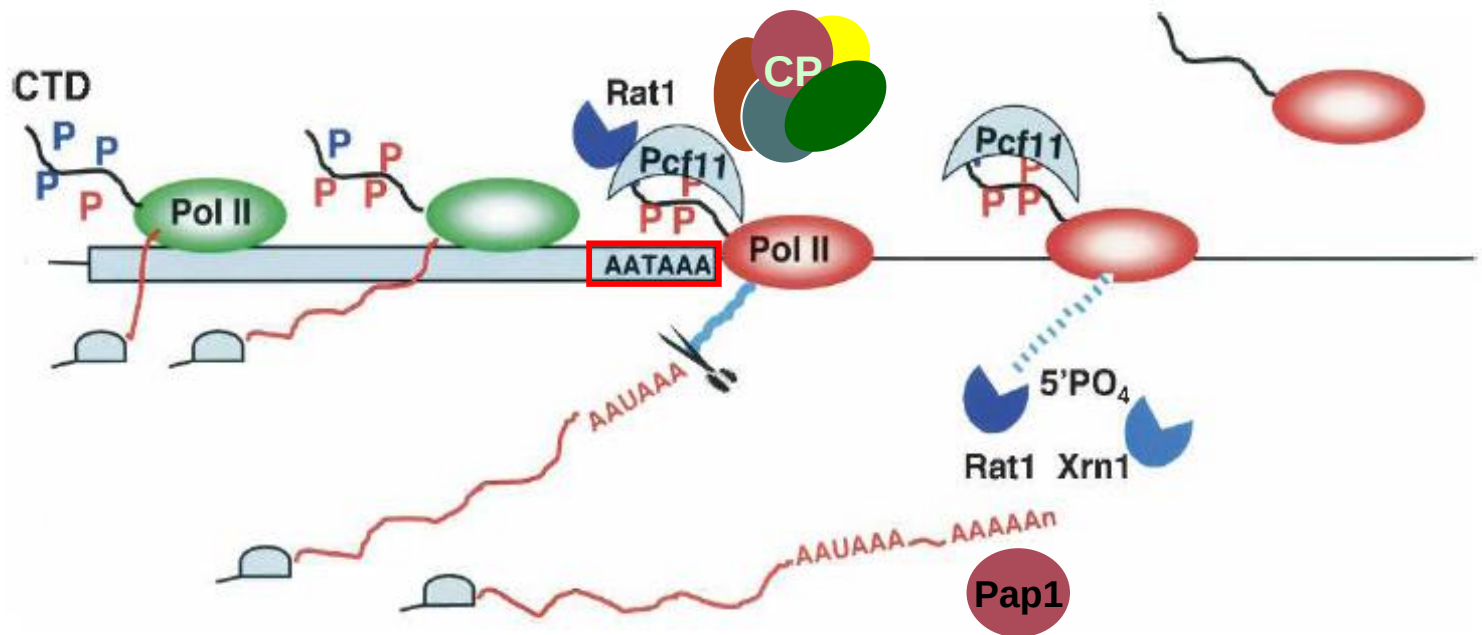
Zwierzęta



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

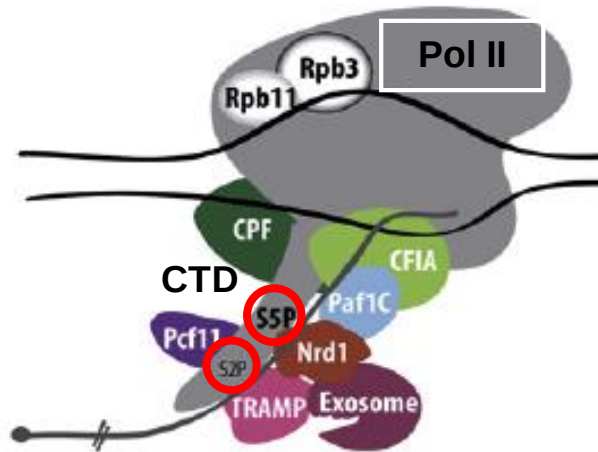
Millevoi and Vagner, NAR, 2008

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



Luo and Bentley, Gene Dev, 2006

Terminacja pol II zależna od Nrd1/Nab3/Sen1



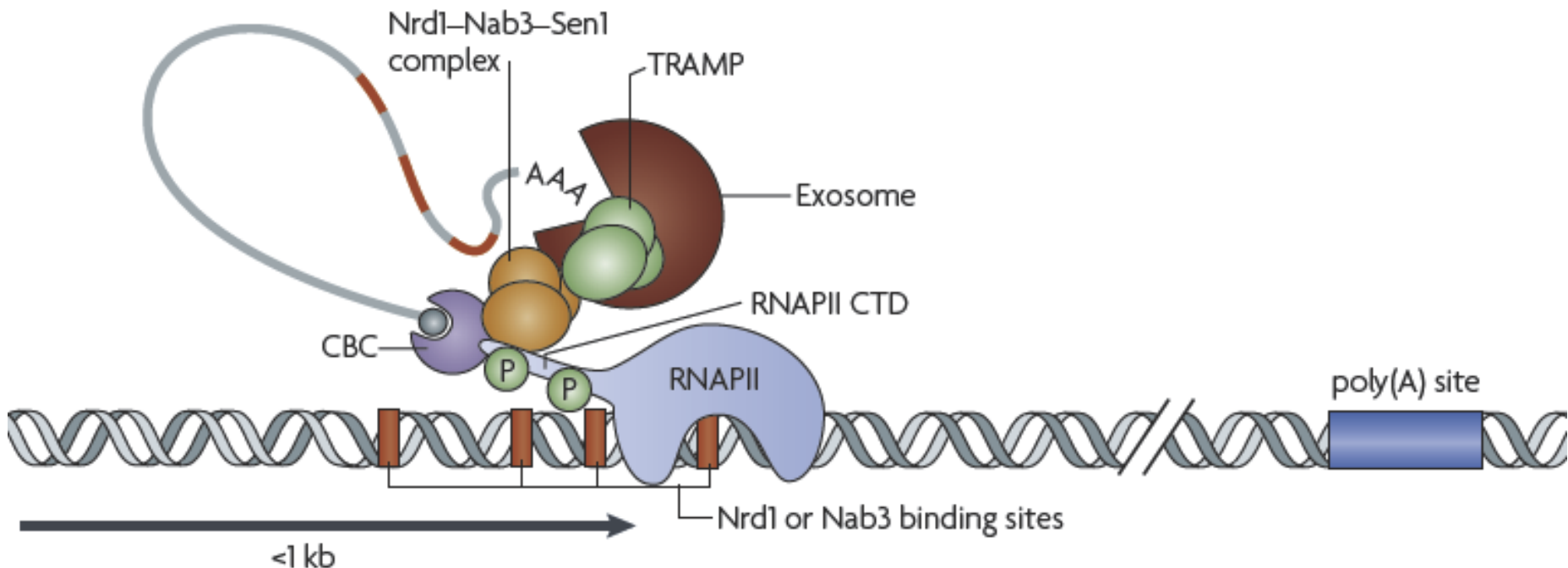
Nrd1/Nab3/Sen1 – **NNS complex**

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

ncRNA

mRNA

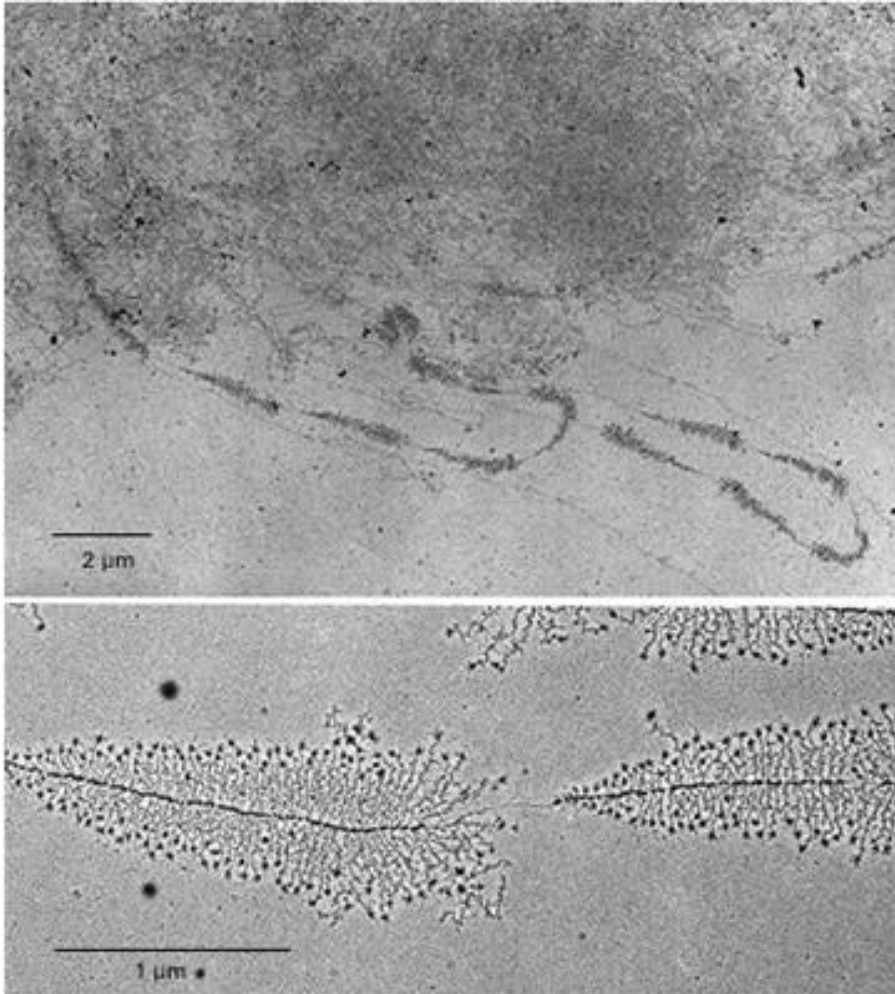
(rekrutacja poprzez Ser5-P CTD)



Terminacja transkrypcji polimerazy RNA I

Geny rDNA zebrane są w jąderku

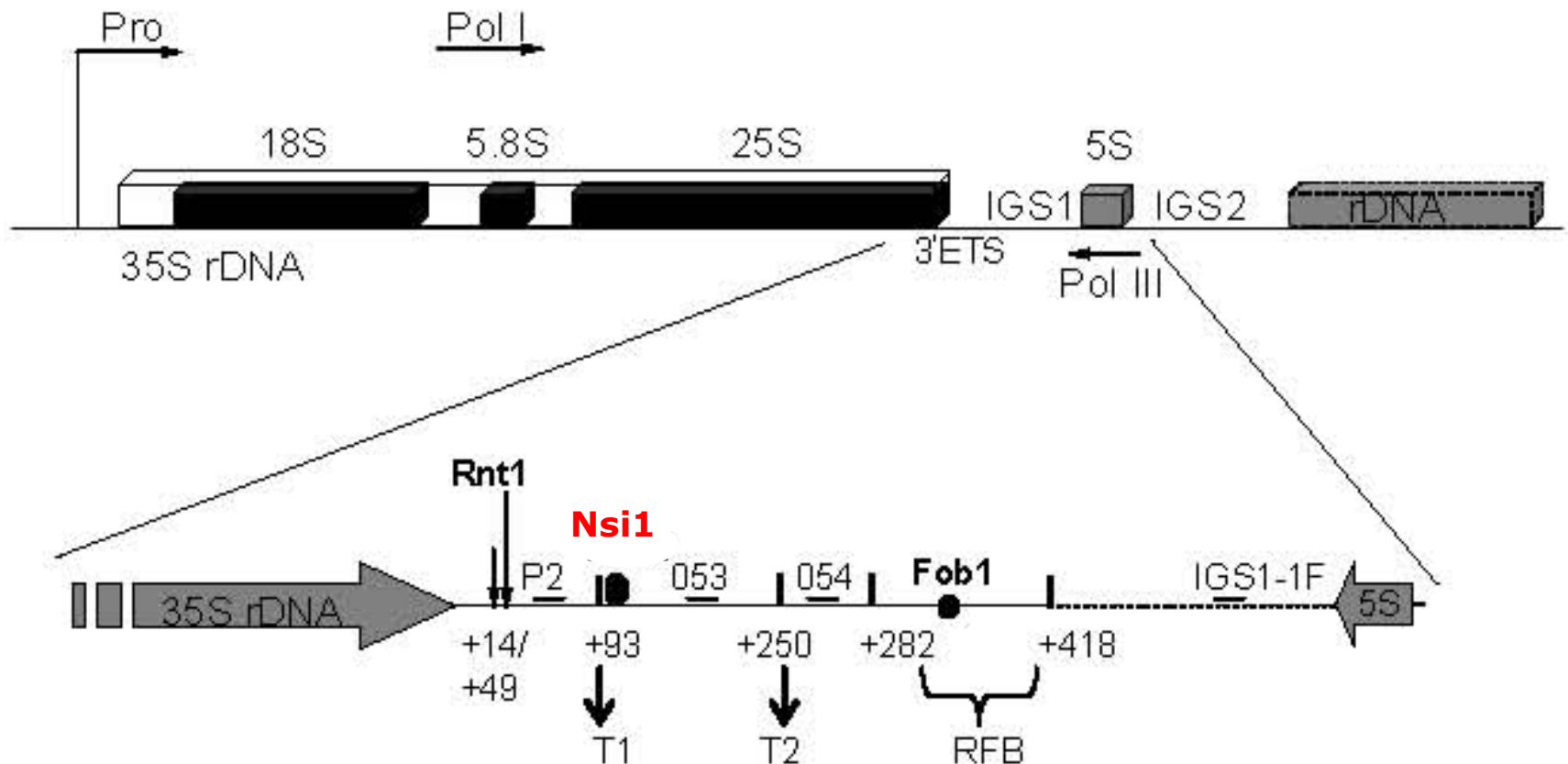
Miller's spreads – „Christmans tree”



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

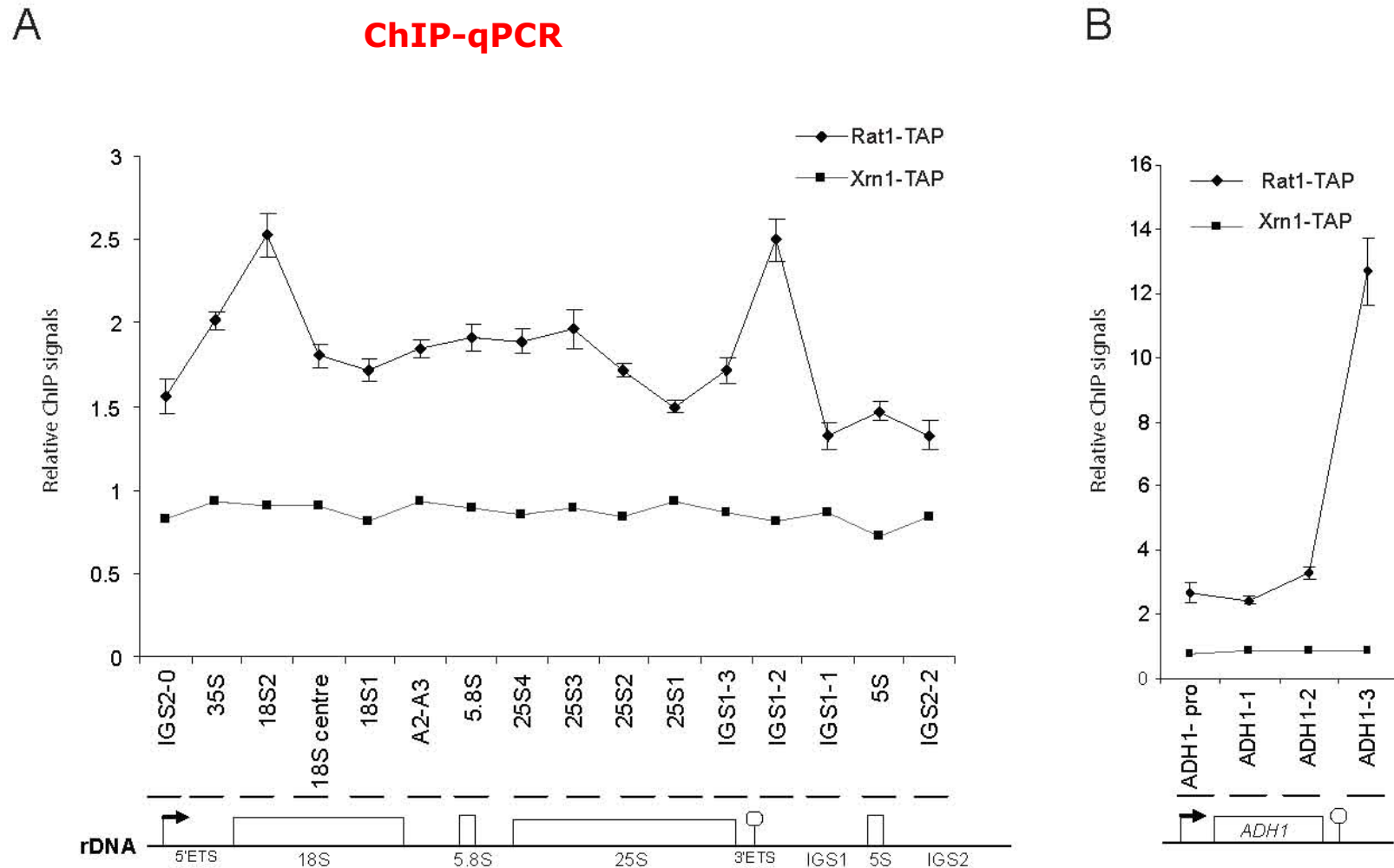
- Pol I transkrybuje rybosomalny RNA (**35S rRNA**)
- Pol I RNA – ok. **80%** całej aktywności transkrypcyjnej jądra komórkowego!!!
- U drożdży geny rDNA w **150-200** tandemowych powtórzeniach

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



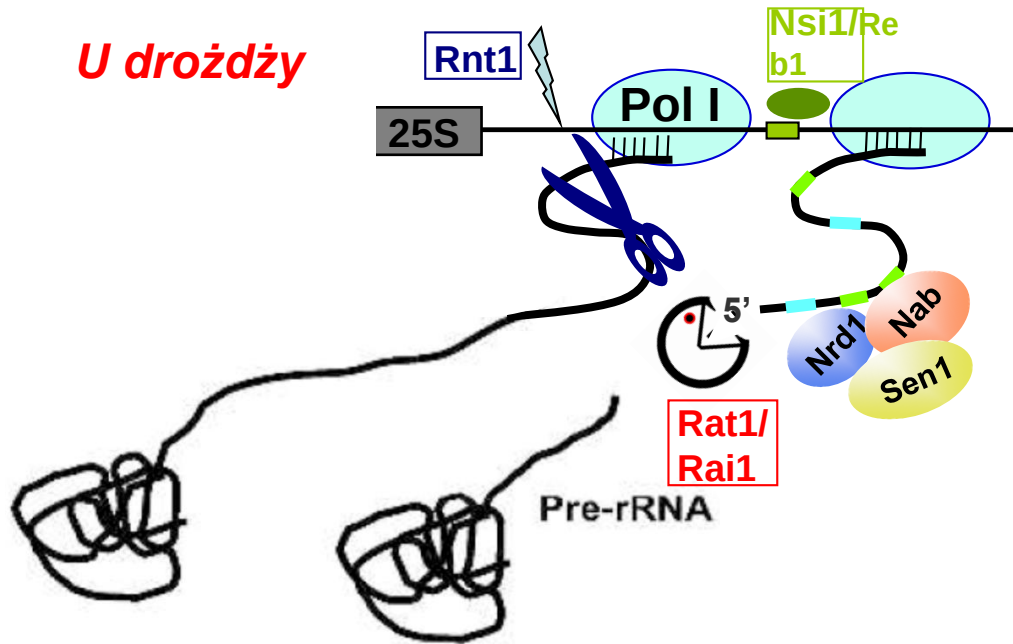
El Hage i wsp., Genes Dev., 2008,15;22(8)

A



Terminacja transkrypcji polimerazy RNA I

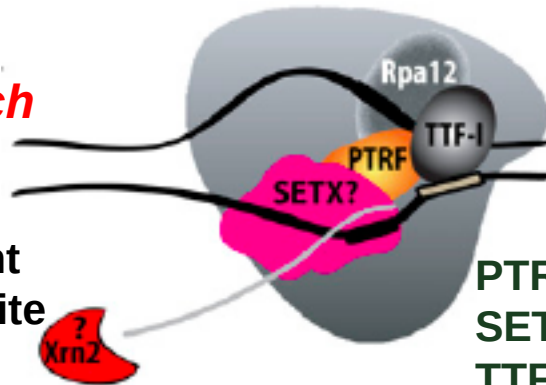
U drożdży



Pol I termination factors:

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

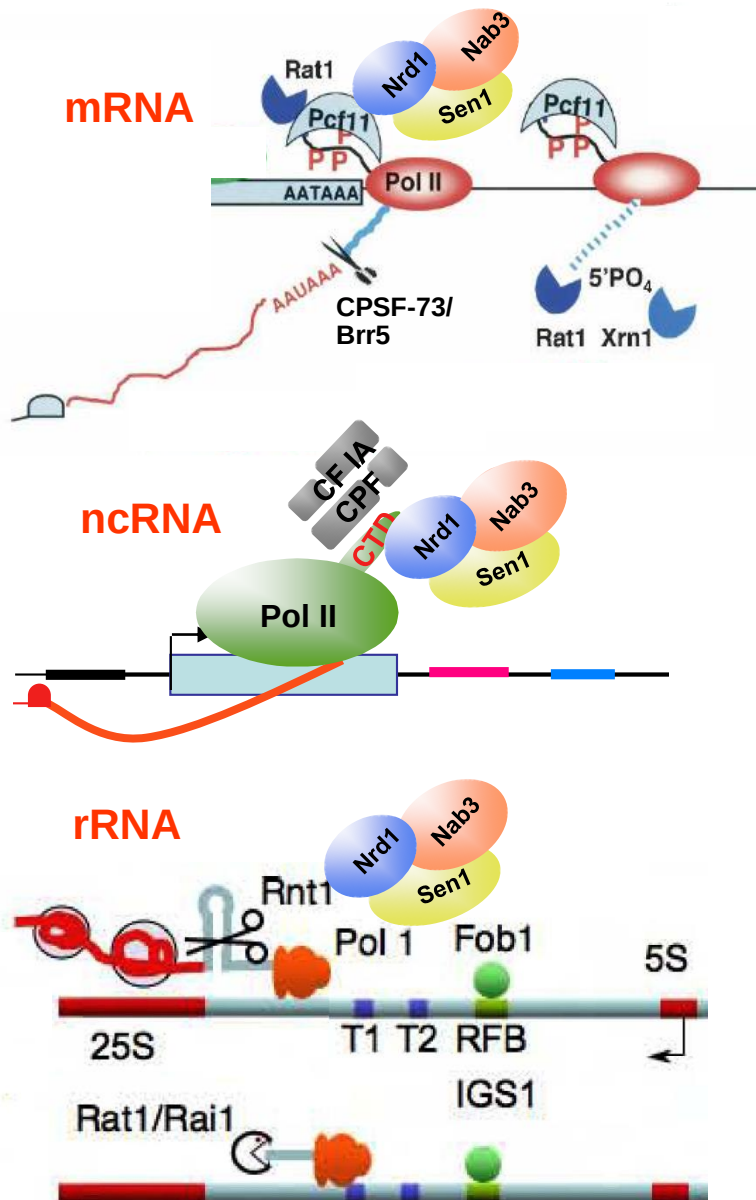
W komórkach ssaczych



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

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

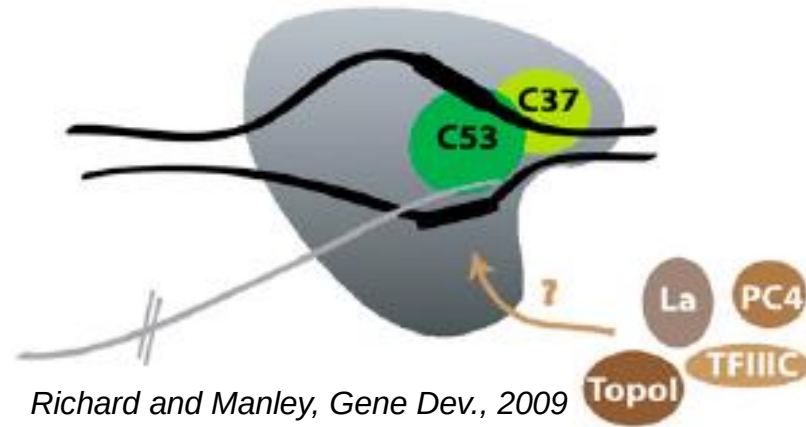
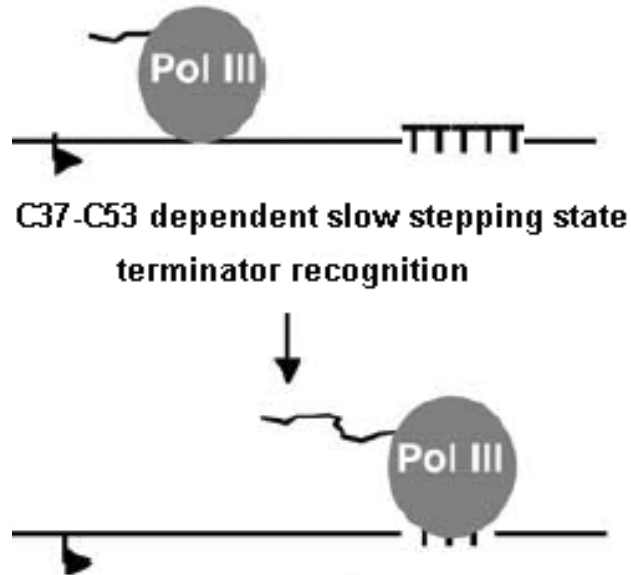
Wniosek – „współużytkowanie” ścieżek terminacji przez Pol RNA I i Pol RNA II



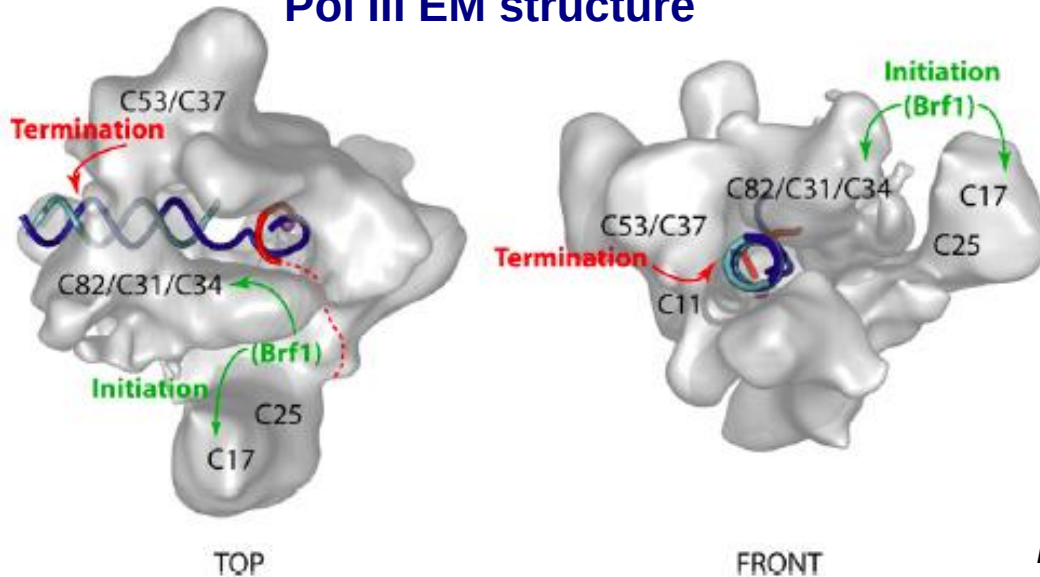
Pathways for transcription termination by different polymerases, Pol I and II, utilize overlapping factors and mechanisms

POL III TRANSCRIPTION TERMINATION

Landrieux et al., EMBO J., 2006



Pol III EM structure



C1, C2 core subunits

(Pol pausing)

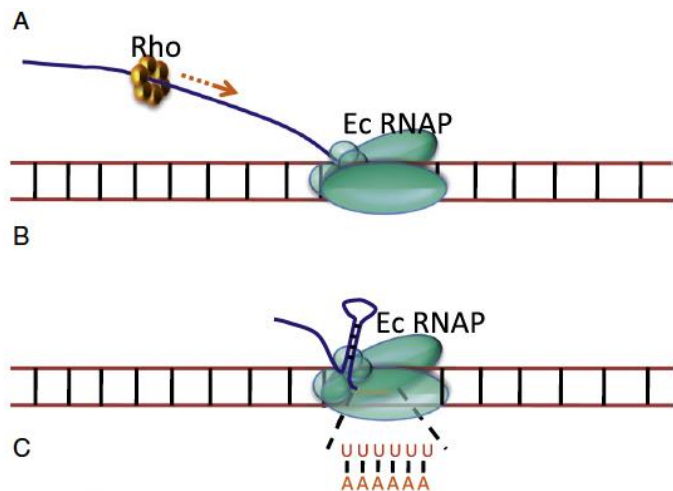
C37-C53 subcomplex is situated across the cleft near RNA exit

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

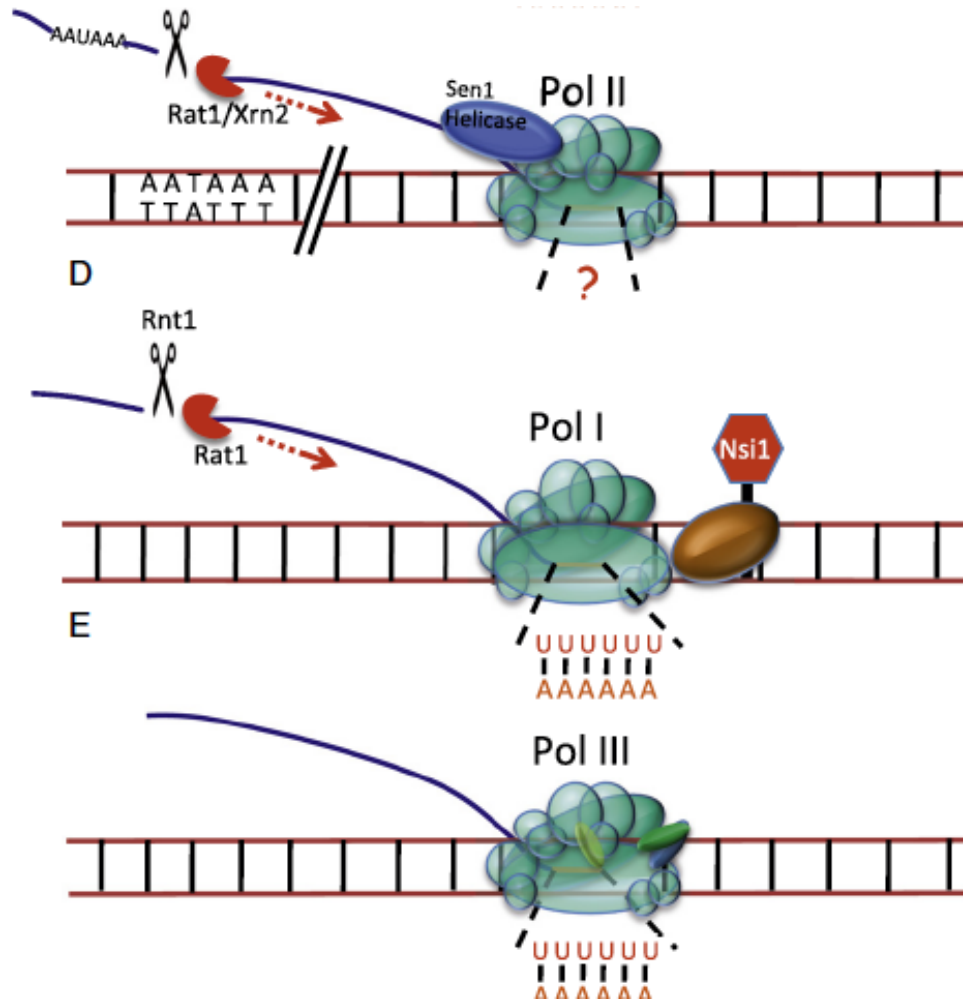
Fernandez-Tornero et al., Mol. Cell, 2007

Terminacja transkrypcji – porównanie dla polimeraz I, II i III

Bakteryjna polimeraza RNA



Euakriotyczne polimerazy RNA



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

Benchmarks

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

Michał Koper^{*,1} & Seweryn Mroczek¹

¹*Institute of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, A. Pawinskiego 5a, 02-106, Warsaw, Poland*

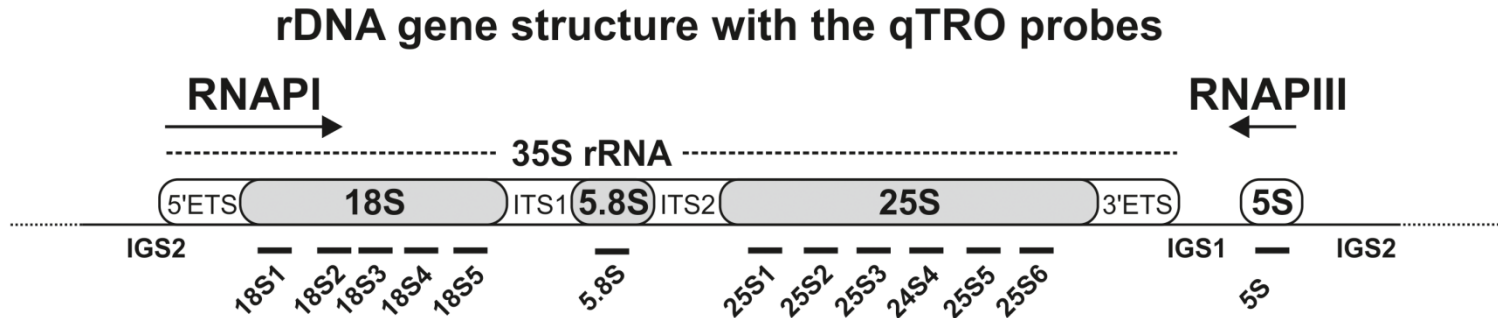
BioTechniques 65: 163–168 (September 2018) 10.2144/btn-2018-0073

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.

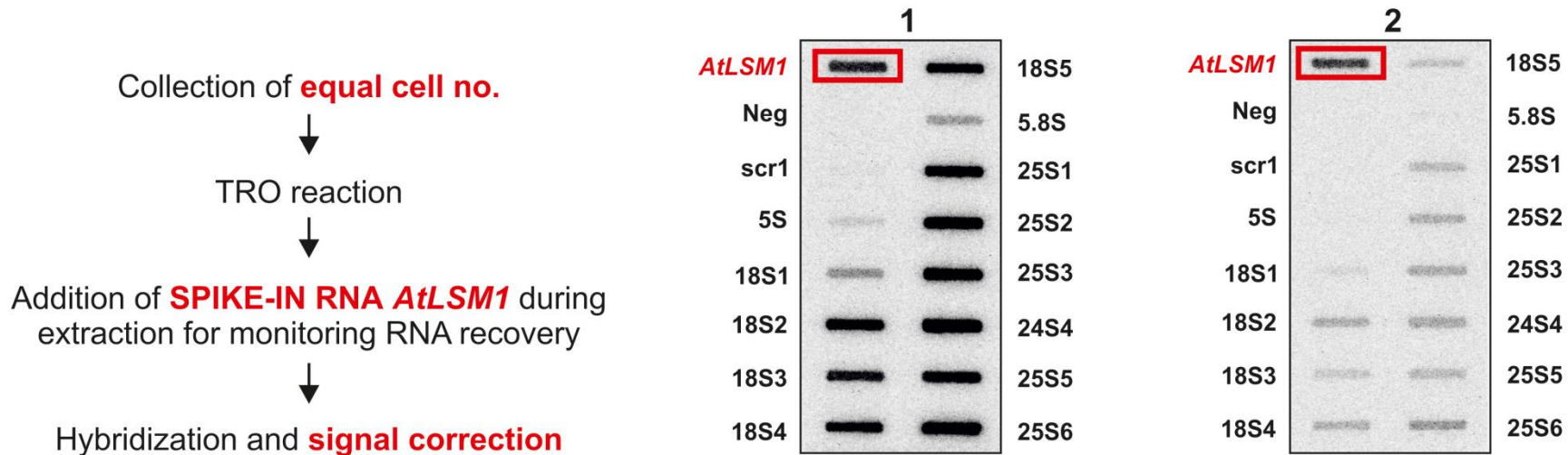
Figure 1A-B. Principles of qTRO.

A



B

qTRO PRINCIPLES

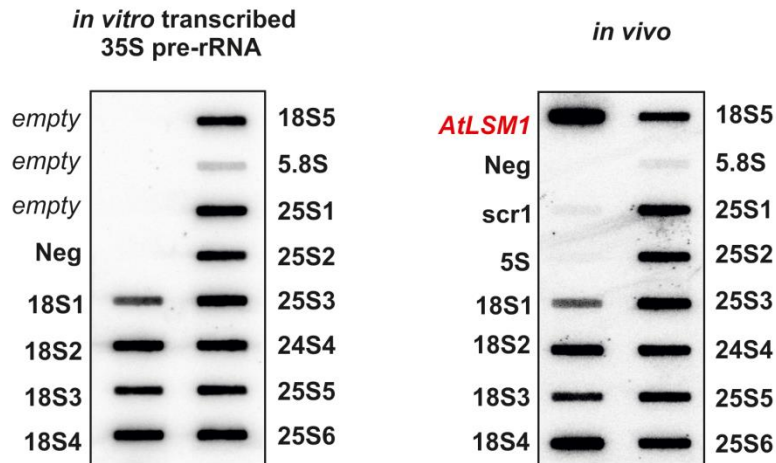


AtLSM1 – RNA wyznakowany w transkrypcji *in vitro* przy pomocy ^{32}P -UTP dodawany przed izolacją RNA do peletów drożdżowych

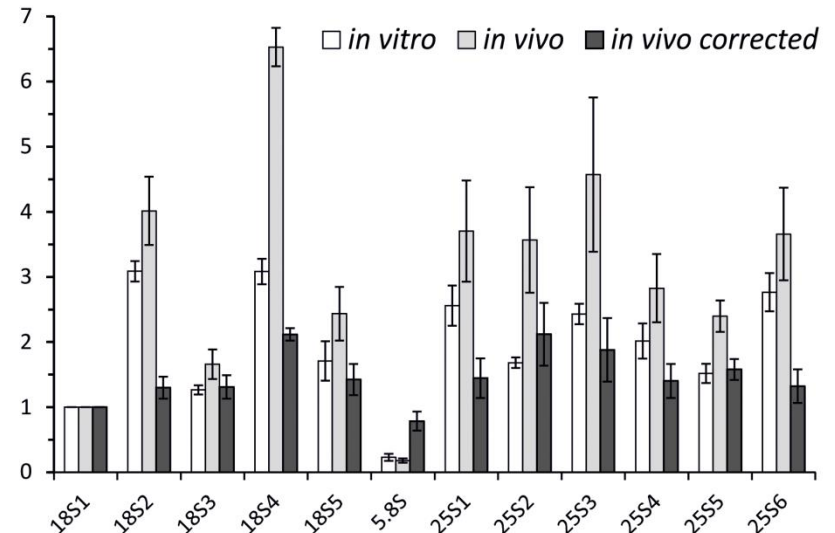
Figure 1C-D. RNAPI activity profile

Standardization of the probe signals and RNAPI transcription profile

C



D



Korekcja sygnałów sond względem 35S rRNA otrzymanego w transkrypcji *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*

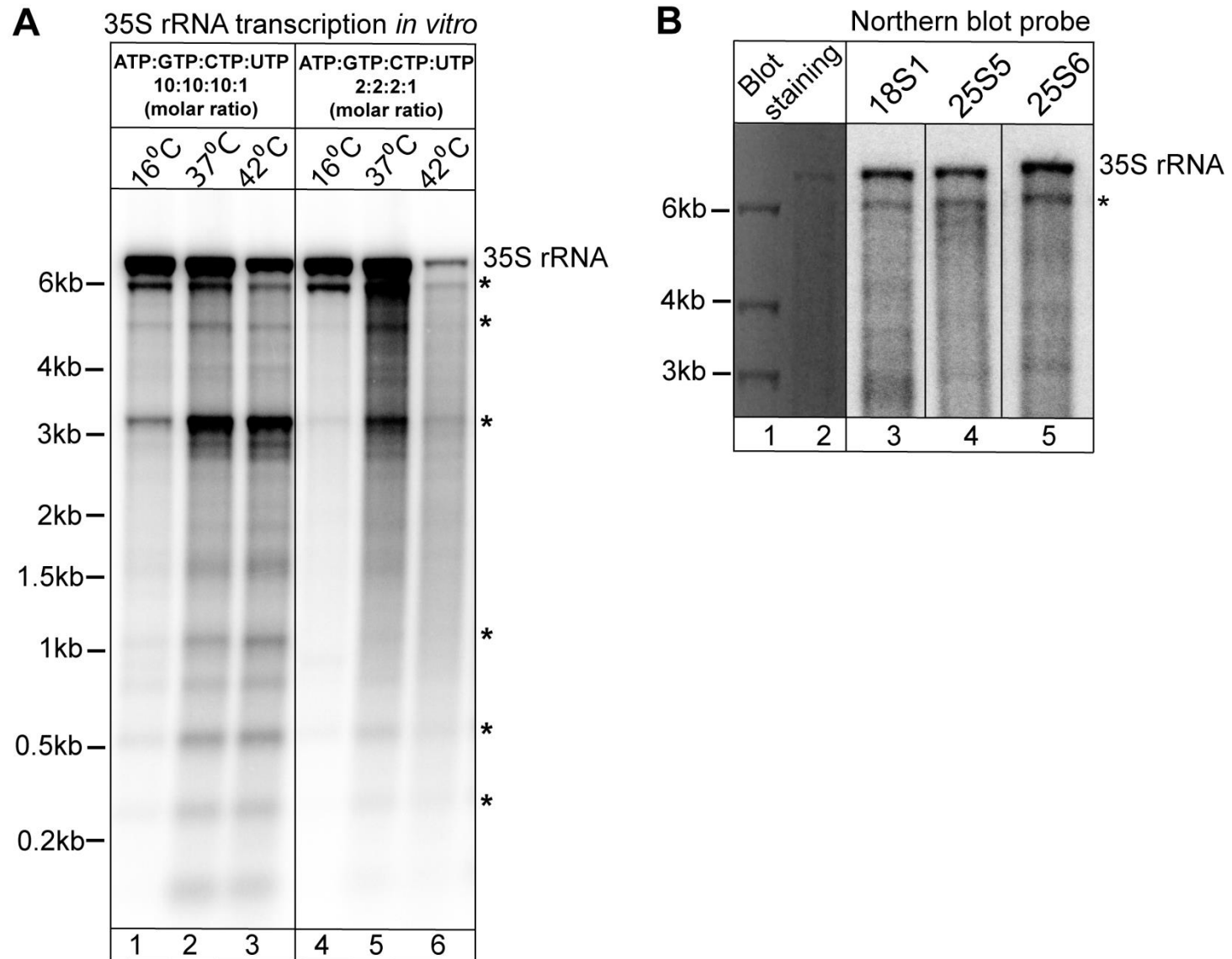


Figure S2. Comparison of qTRO signals obtained using fresh harvested cells or flash-frozen

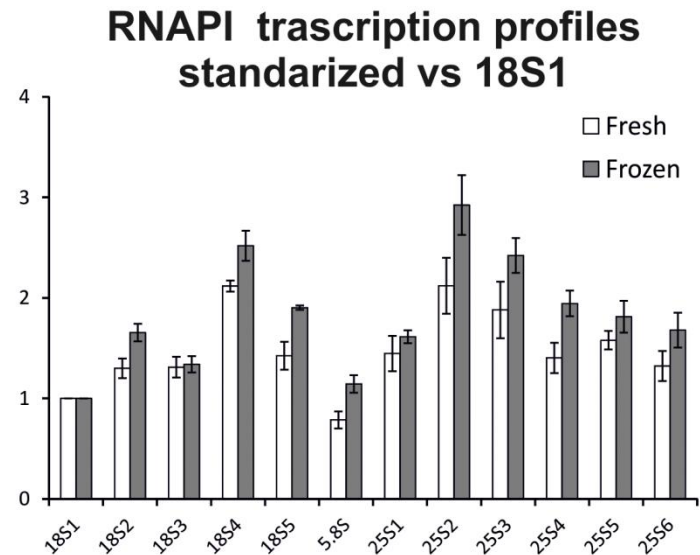
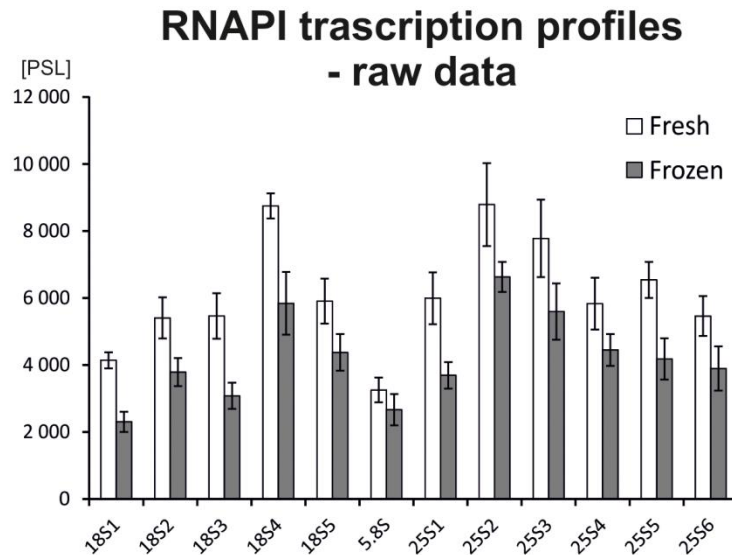
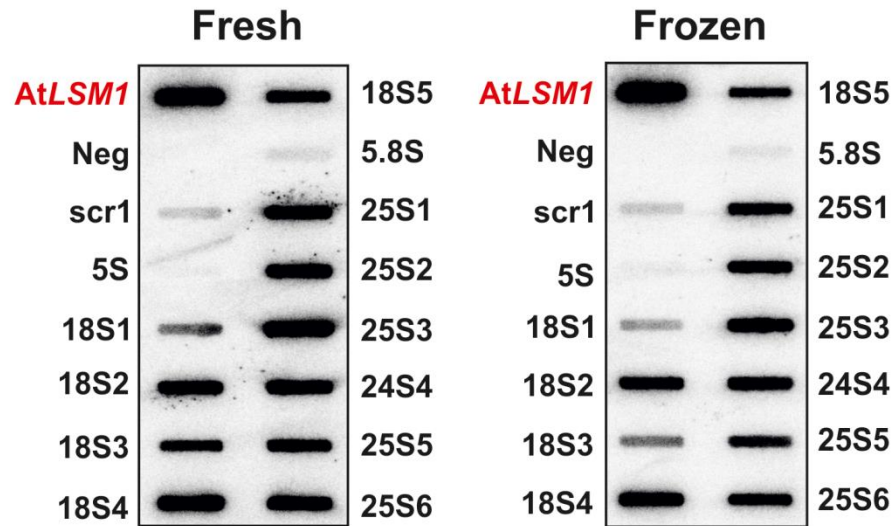


Figure 2. Decrease in rRNA transcription correlates with RNAPII dissociation from the template upon oxidative stress

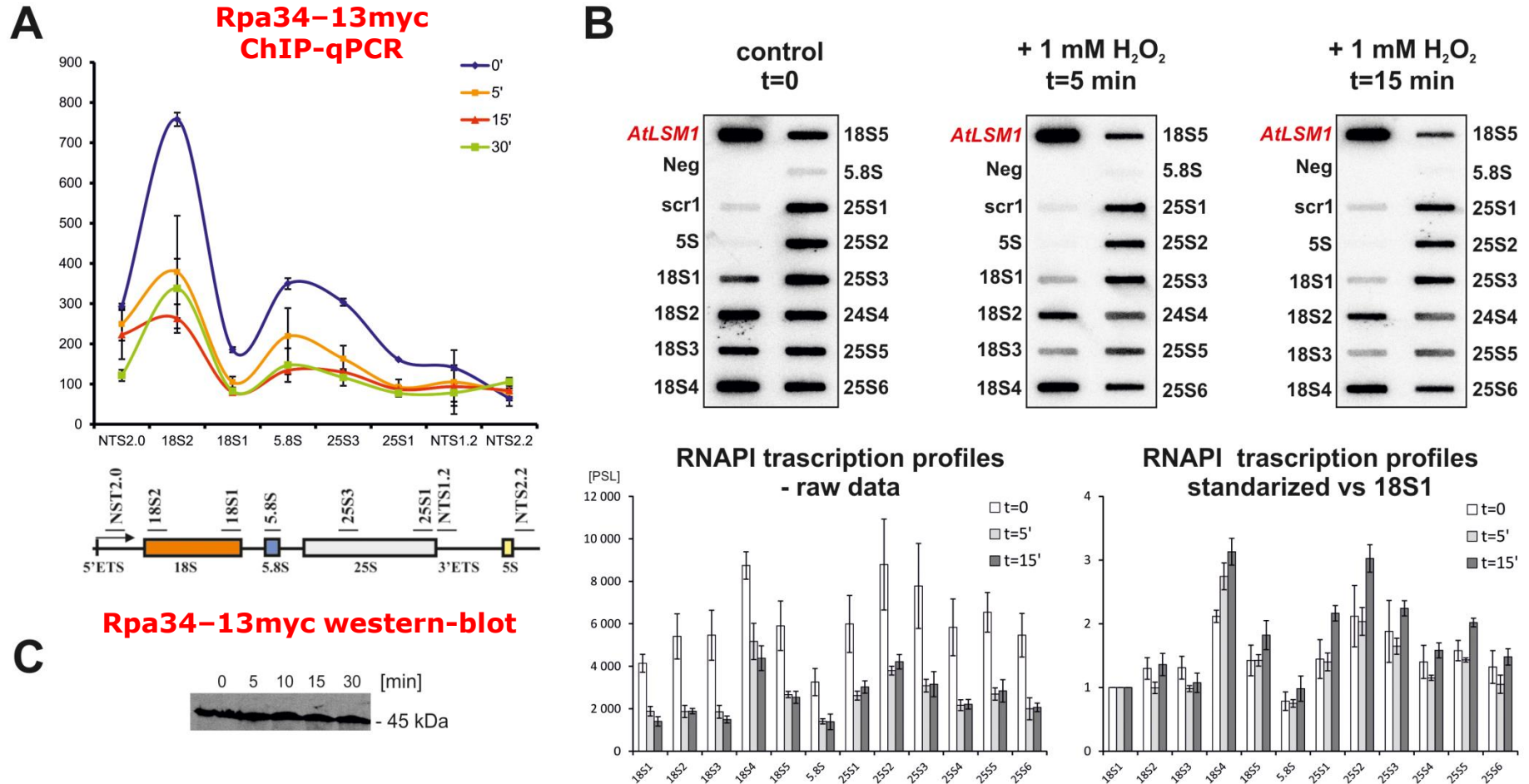
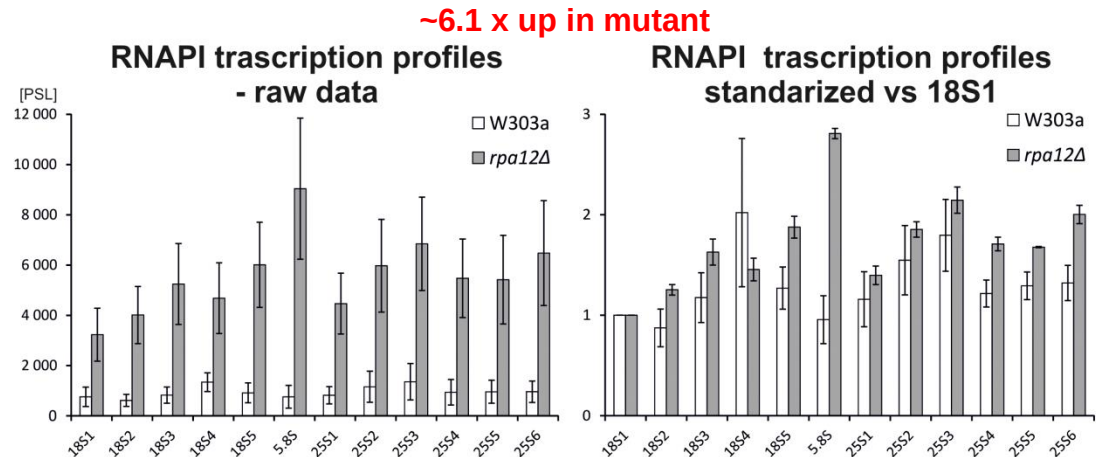
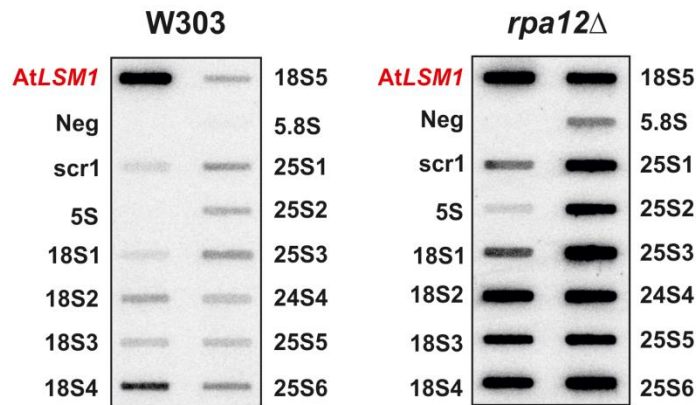


Figure S3. RNAPI transcription strength and profiles in mutants with impaired rRNA synthesis

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

A



B

