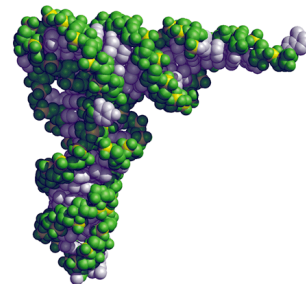


Wysokoprzepustowe metody badania transkrypcji

Struktura a funkcja RNA

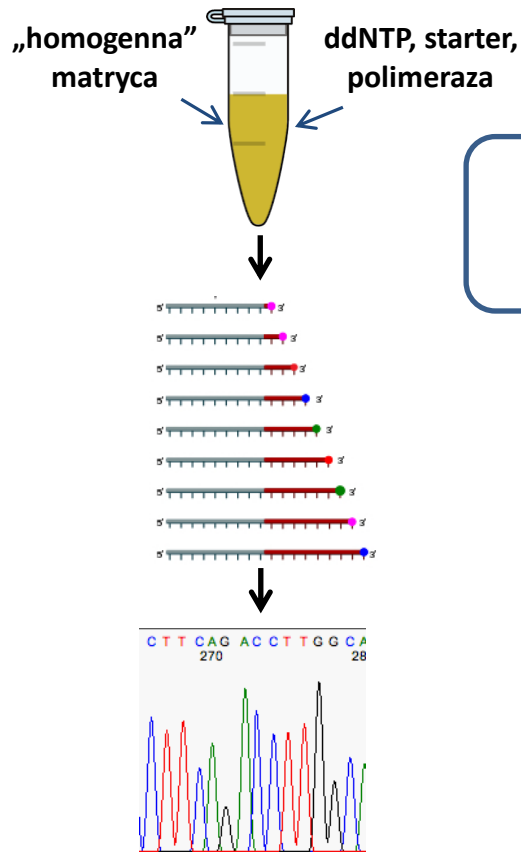
Michał Koper, IGiB UW



Sekwencjonowanie DNA nowej generacji – NGS („wysokoprzepustowe”)

Sanger versus NGS

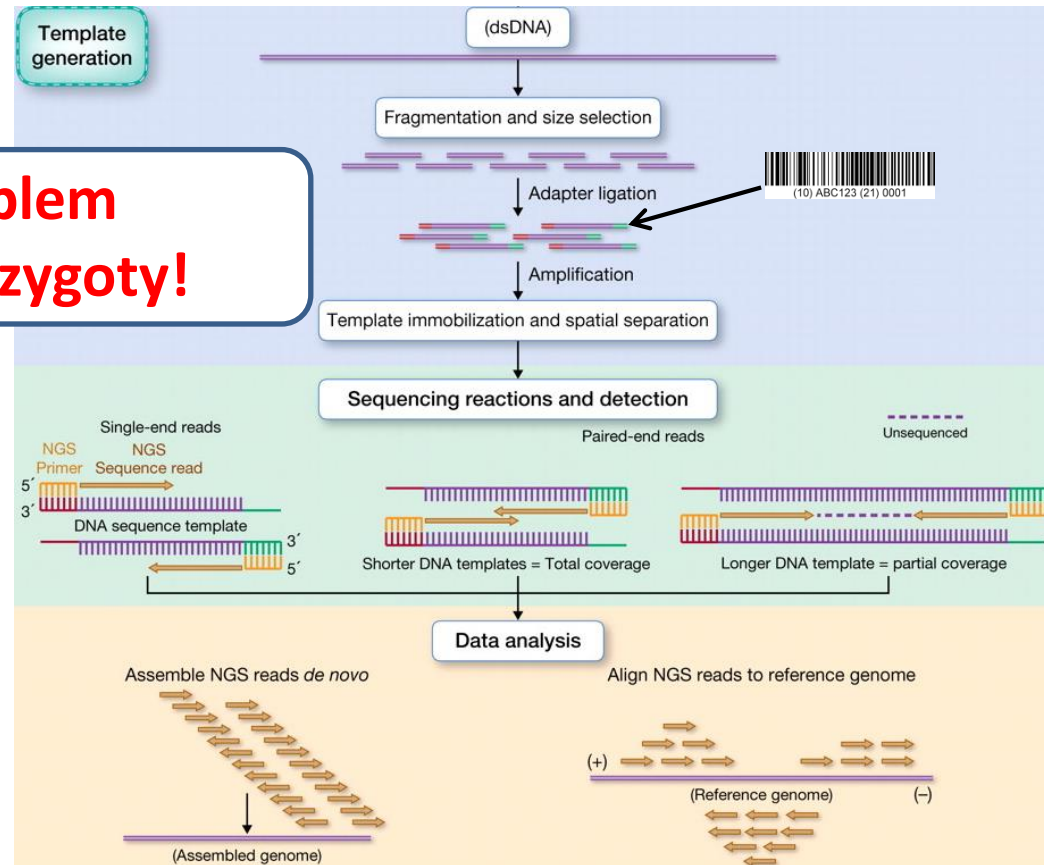
Sekwencjonowanie Sangera



Problem heterozygoty!

NGS

(wysokoprzepustowe; masowe sekwencjonowanie równoległe)



Rizzo and Buck; Cancer Prev Res 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)

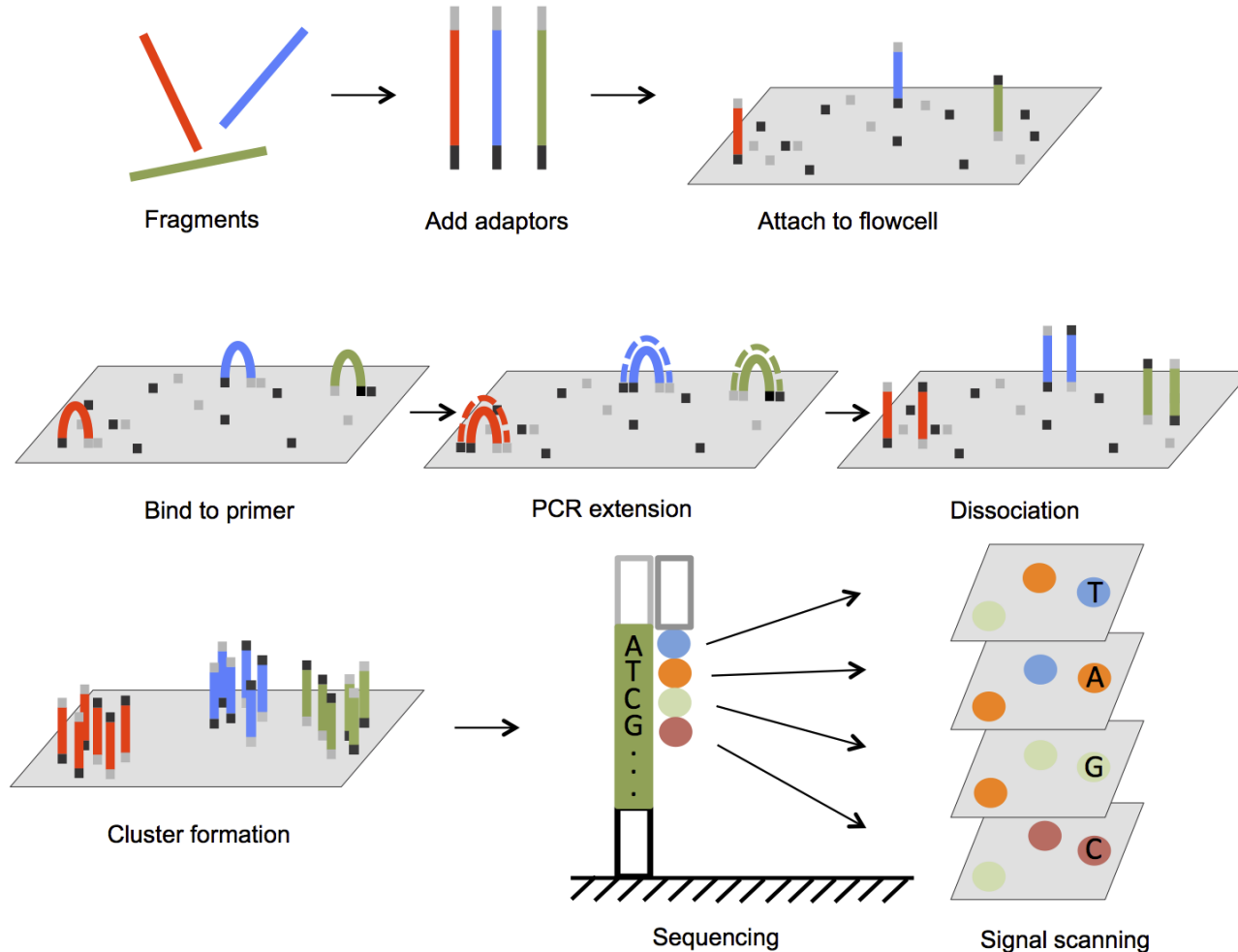
Sekwencjonowanie 3-ciej generacji

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) (PacBio Biosystems)

Technologia Illumina



Flow cell

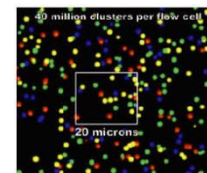


Sequencer



<http://www.illumina.com/>

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



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

[https://www.youtube.com/watch?
v=womKfikWlxM](https://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM)

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

Illumina sequencers



MiSeq



NextSeq



NovaSeq 6000

Sekwencjonowanie NGS – nie tylko krótkie odczyty

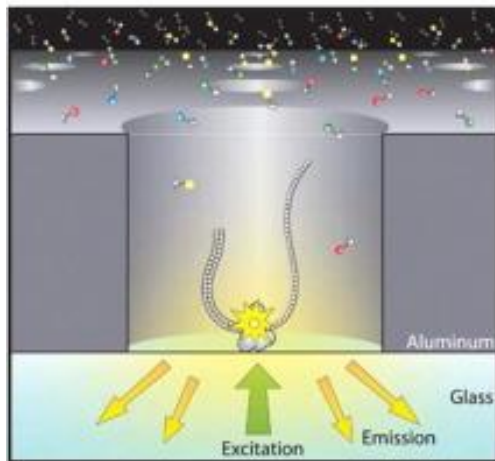


Pacific Biosciences (PacBio)

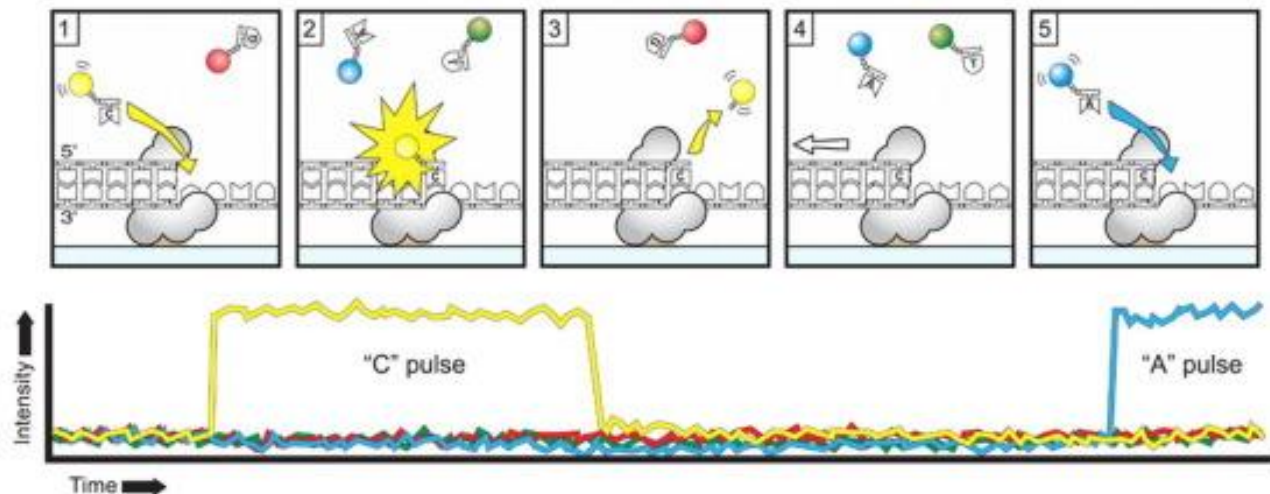
Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequencing

Odczyty do 25 kb

A



B

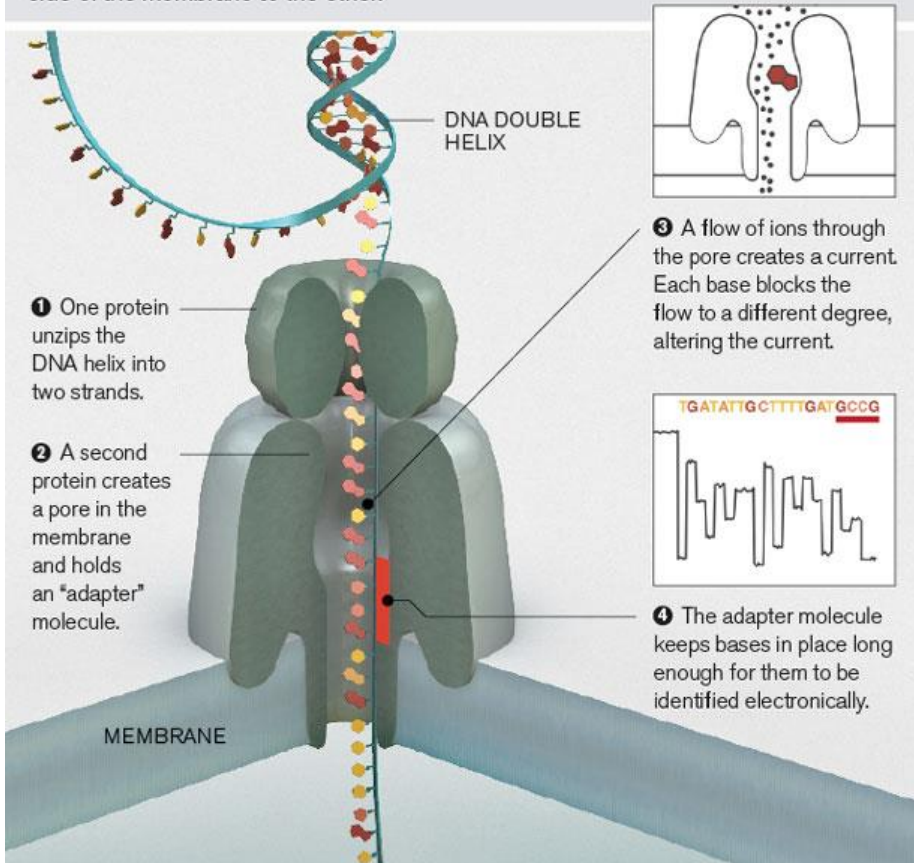


Sekwencjonowanie NGS – nie tylko krótkie odczyty

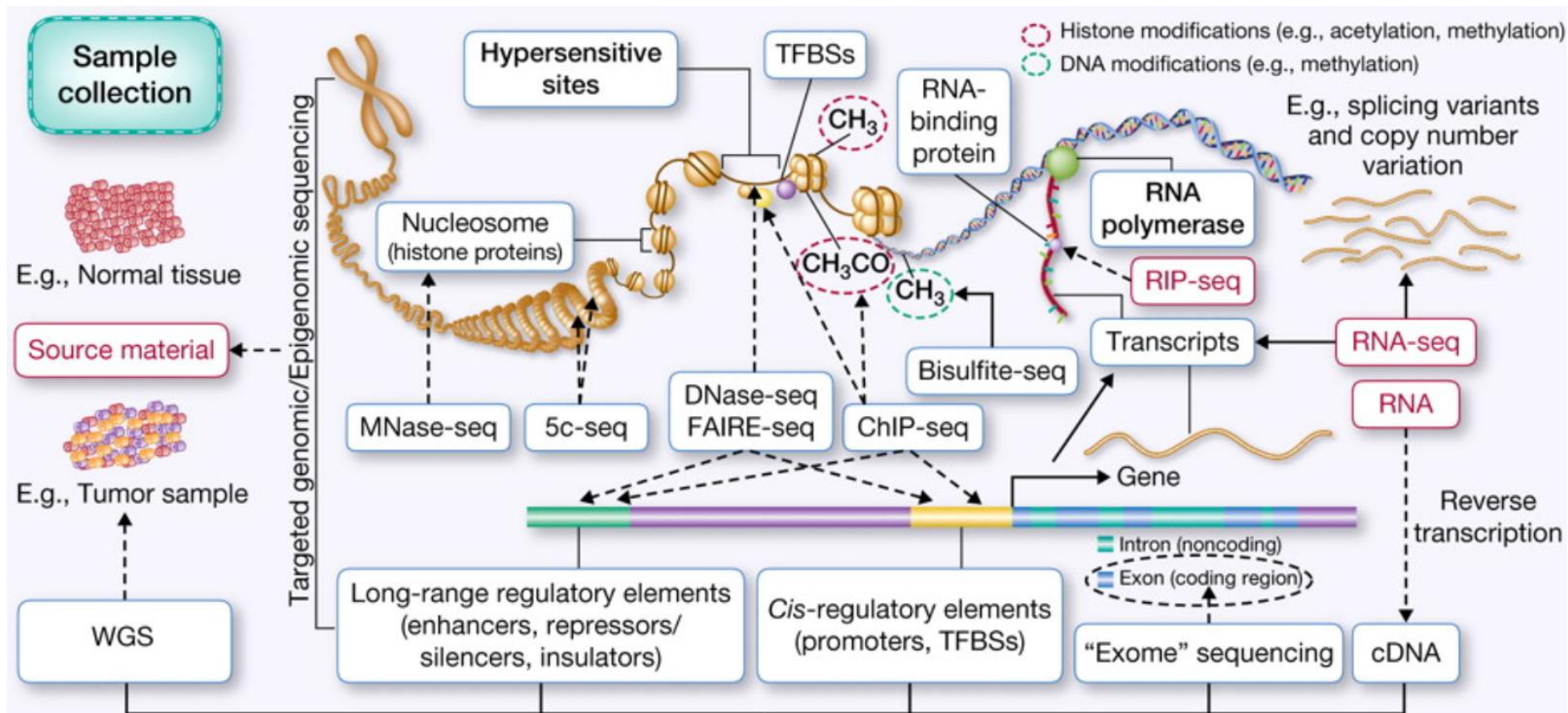
Oxford Nanopore – pojedyncze odczyty nawet do ok. 4 mln. bp

- Bezpośrednie sekwencjonowanie DNA, RNA
- Nawet możliwość rozpoznawania chemicznych modyfikacji zasad

DNA can be sequenced by threading it through a microscopic pore in a membrane. Bases are identified by the way they affect ions flowing through the pore from one side of the membrane to the other.



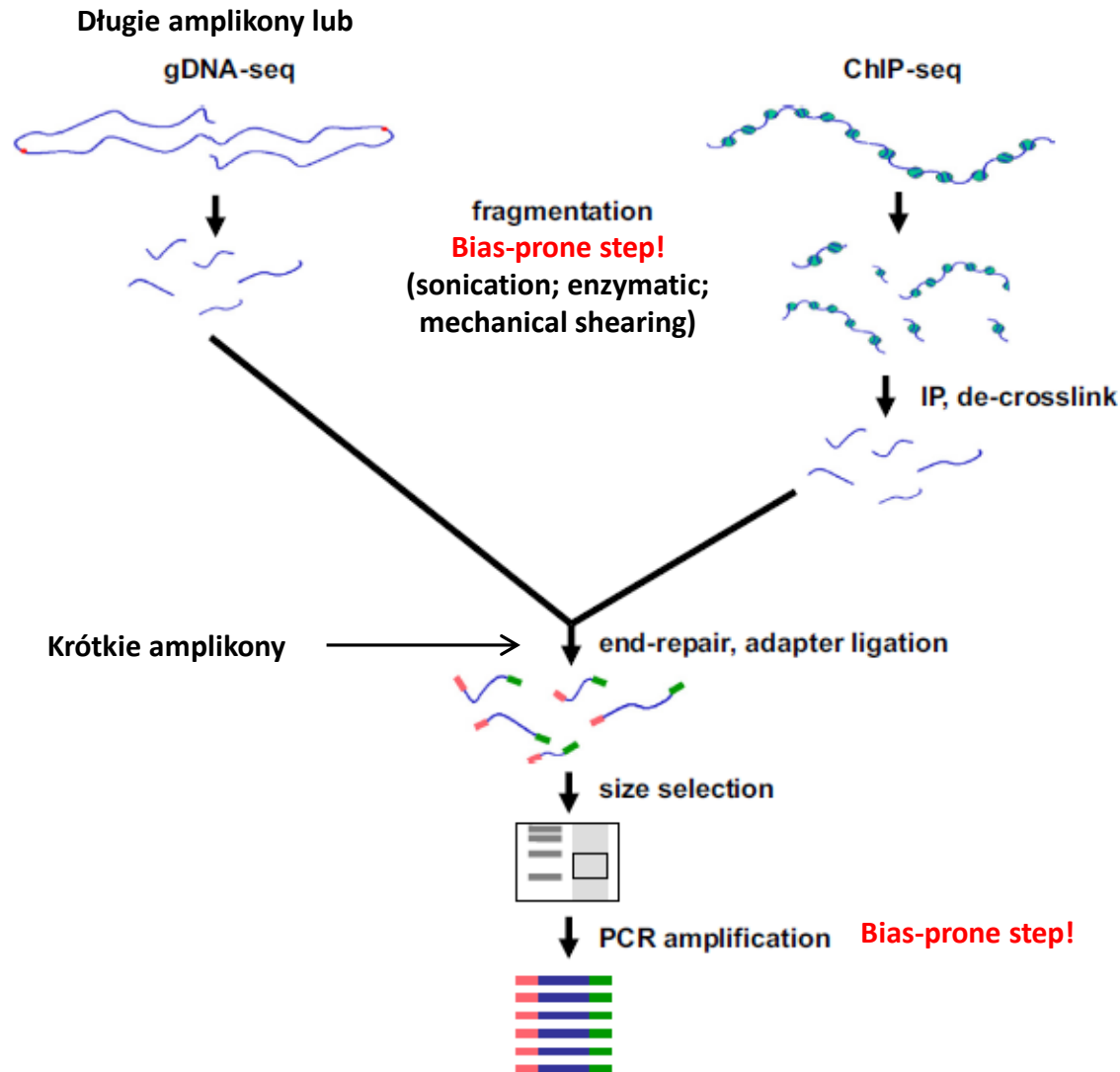
Metody wykorzystujące NGS



Rizzo and Buck; Cancer Prev Res 2012



Przygotowywanie bibliotek NGS dla DNA



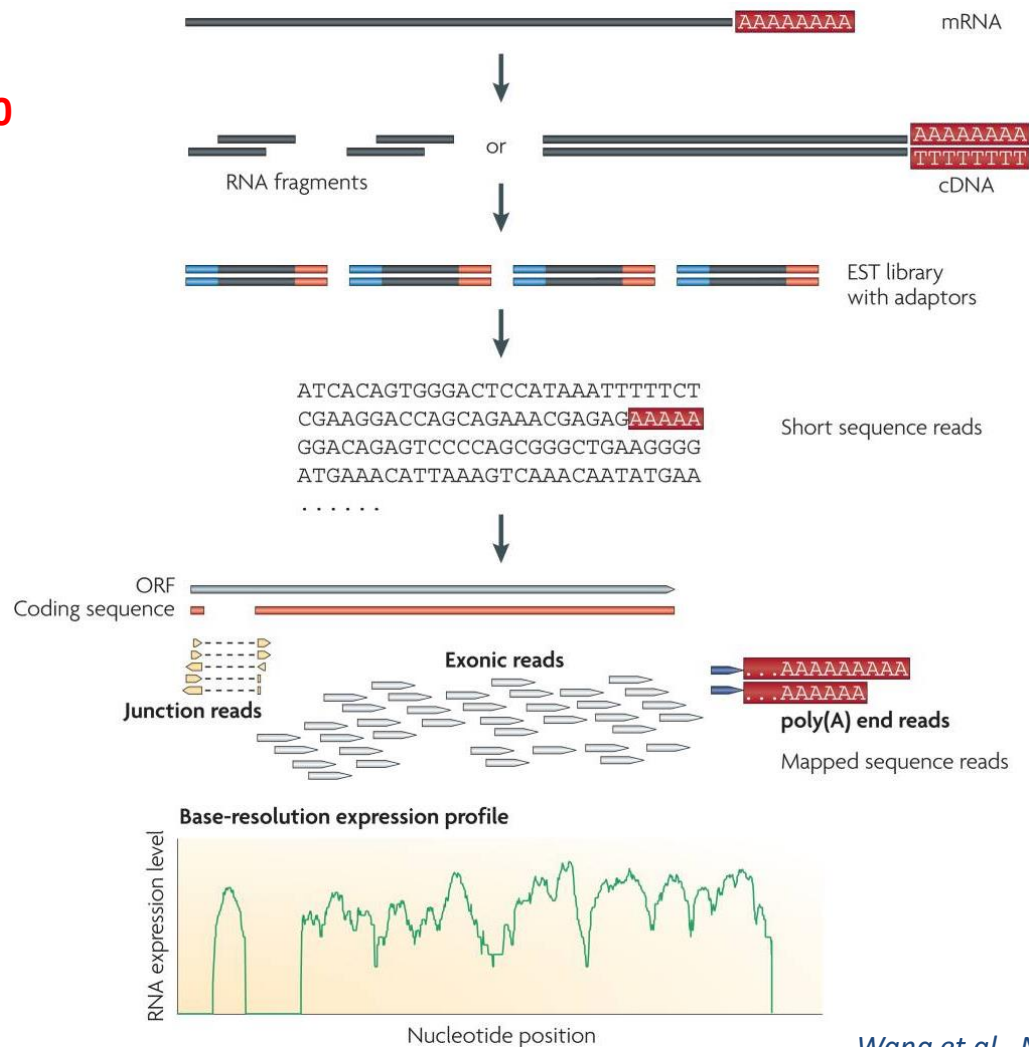
van Dijk et. al., Exp Cell Res. 2014

Typowe doświadczenie mRNAseq

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

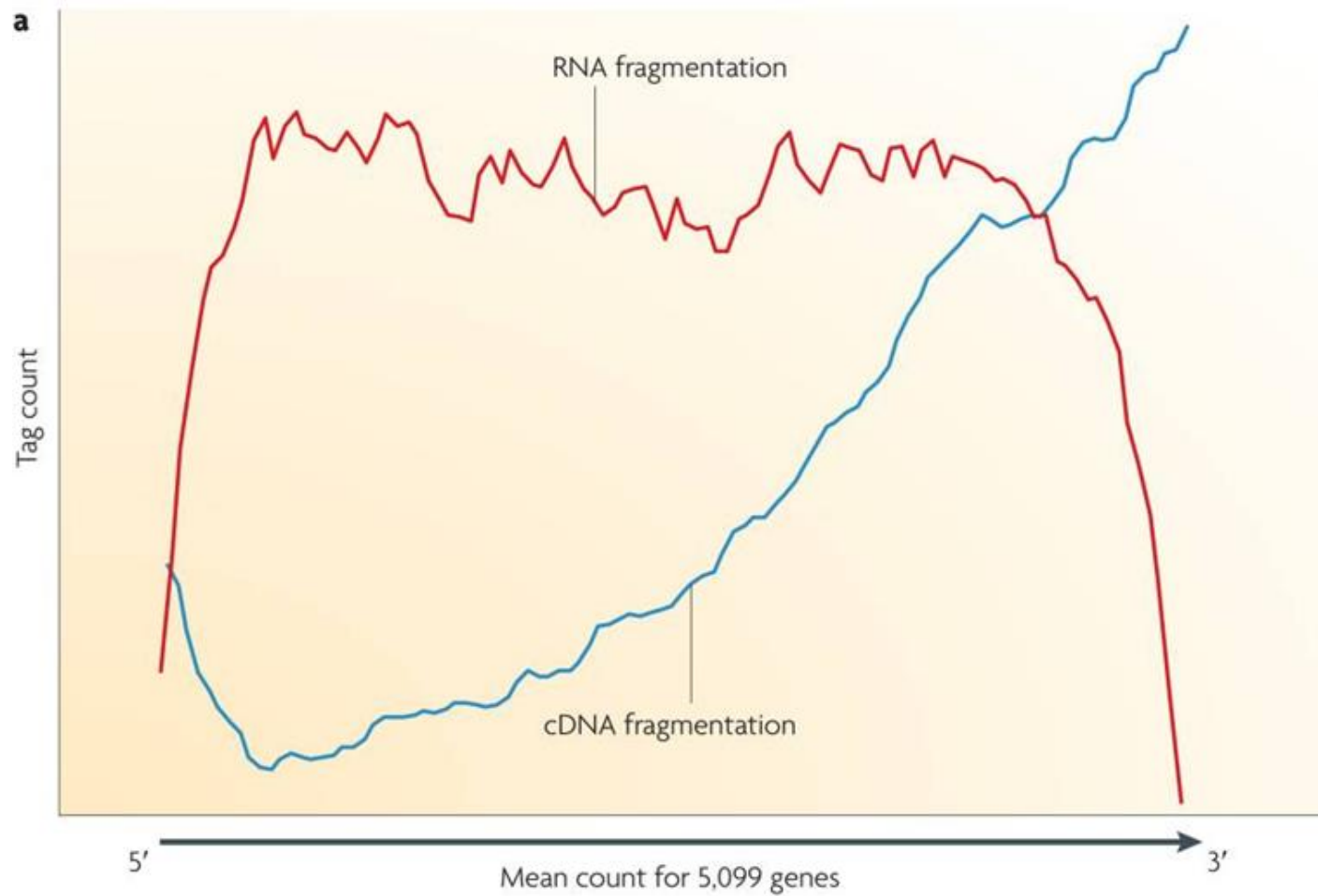
RNA o wysokiej
jakości, **RIN>7.5-8.0**

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.

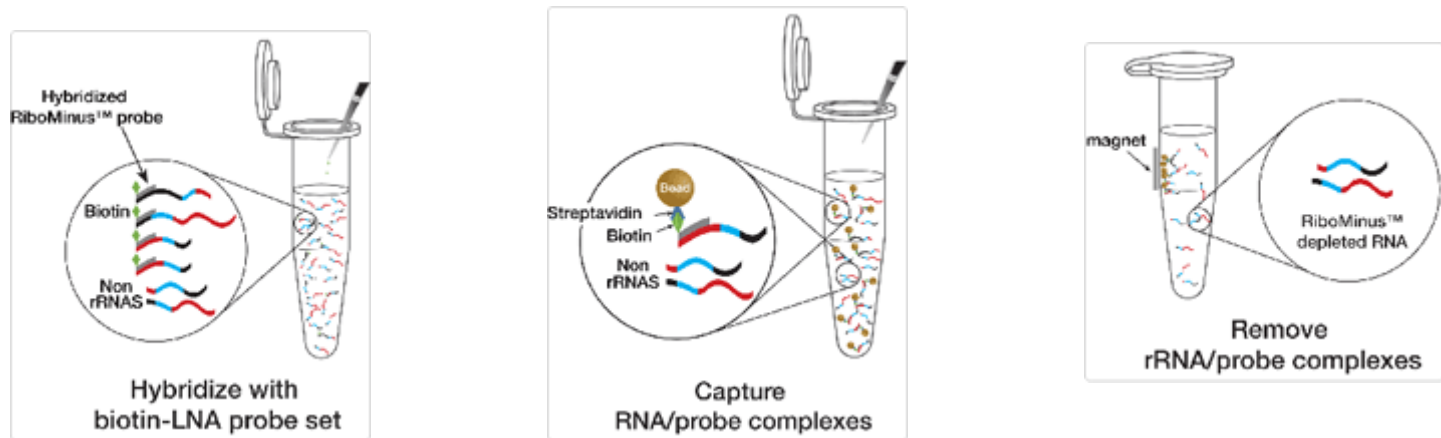
small RNA library

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

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

RNAseq dla całego transkryptomu

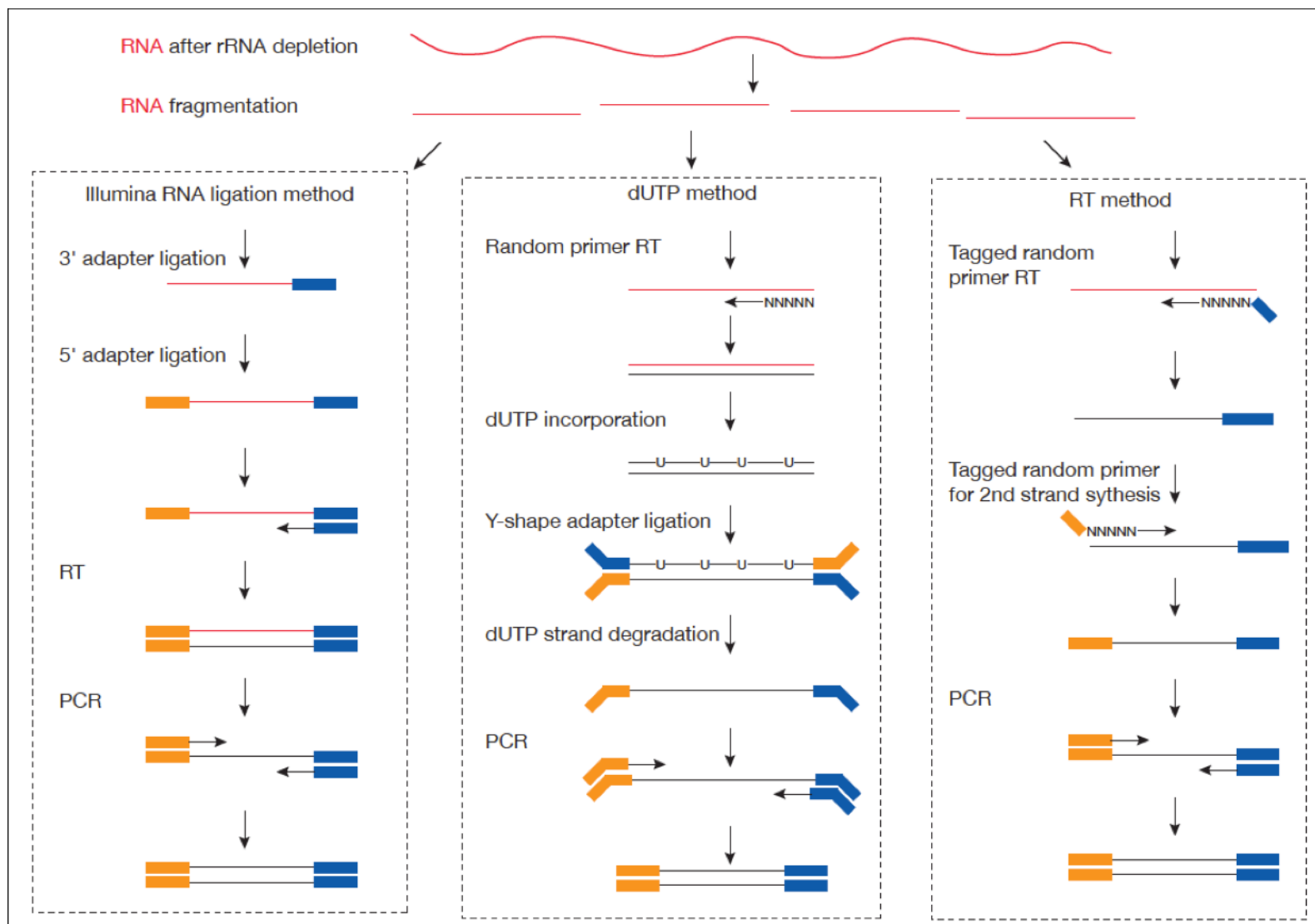
Usuwanie rRNA z całkowitego RNA (*rRNA depletion*)



RiboMinus™ Technology by Life Technologies (ThermoFisher)

Podobnie działa Ribo-Zero by Epicenter (Illumina)

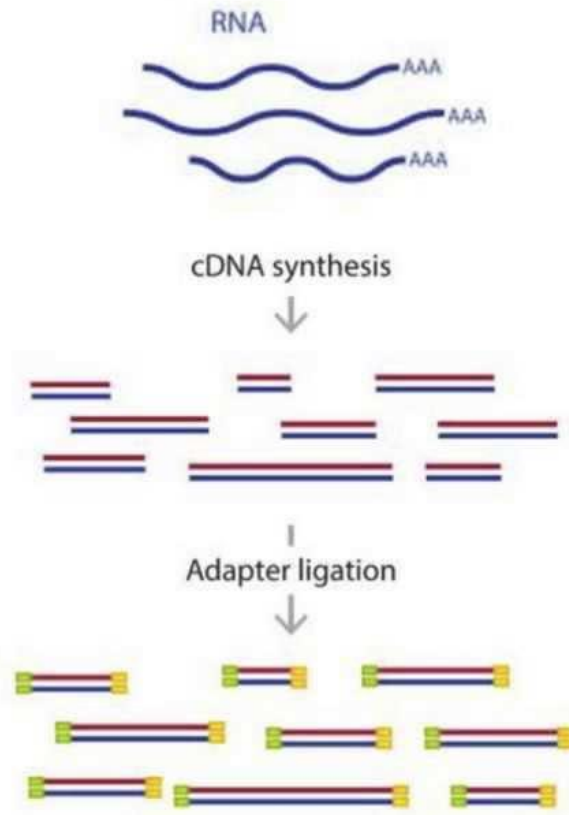
Konstruowanie bibliotek do RNAseq



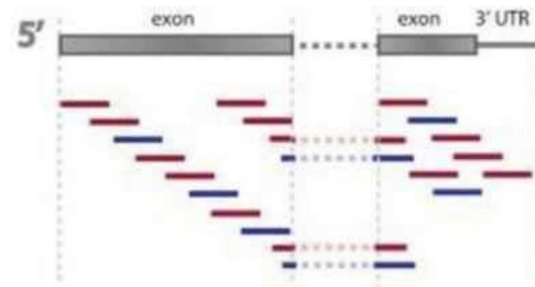
dUTP-marked strand is selectively degraded by Uracil-DNA-Glycosylase (UDG)

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

Paired-end vs single-end sequencing



Single-end sequencing



Paired-end sequencing

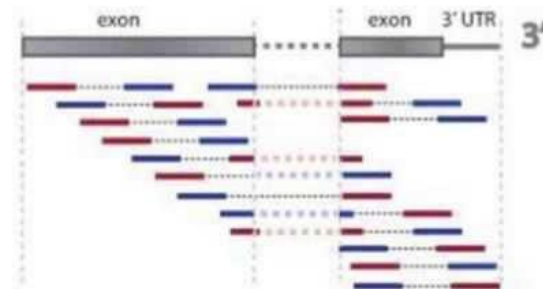


Image adapted from Zhernakova, et al., PLoS Genet. 2013 June; 9(6): e1003594.

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

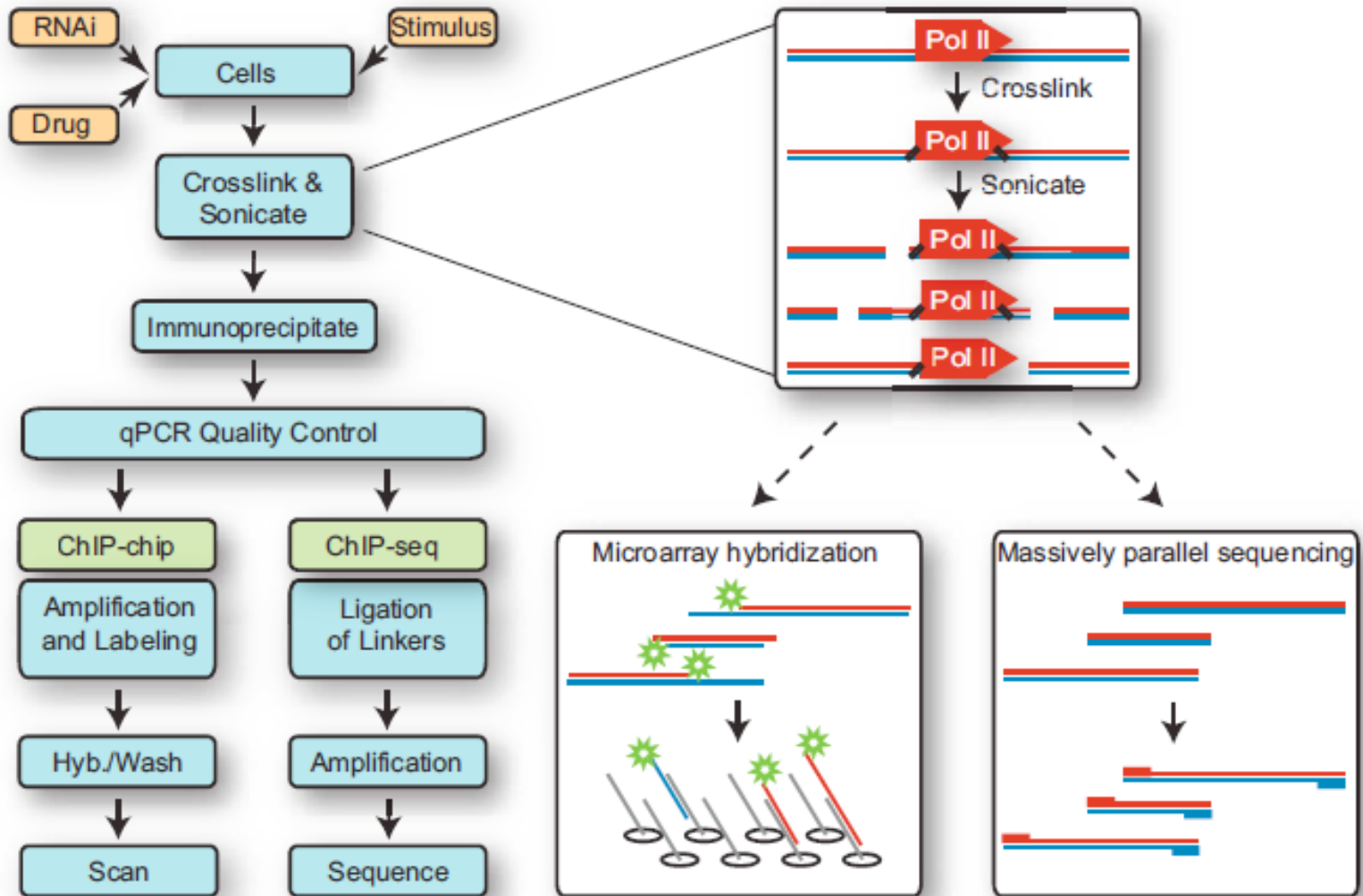


Review Article

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,*}

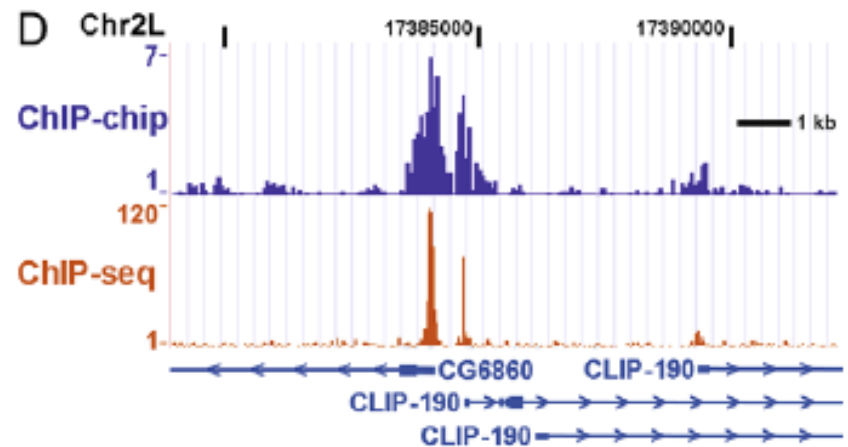
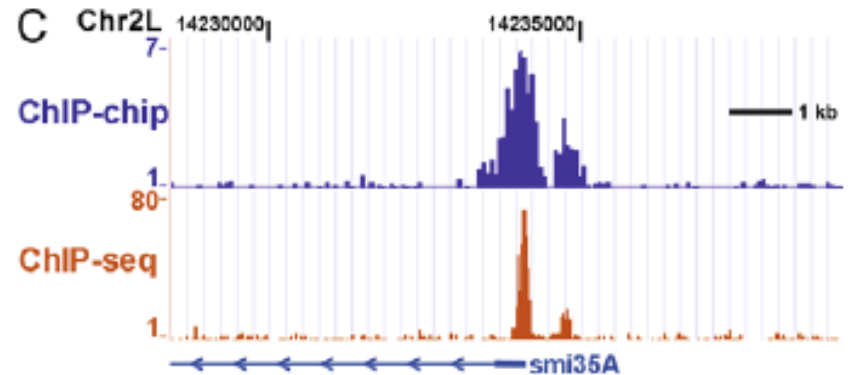
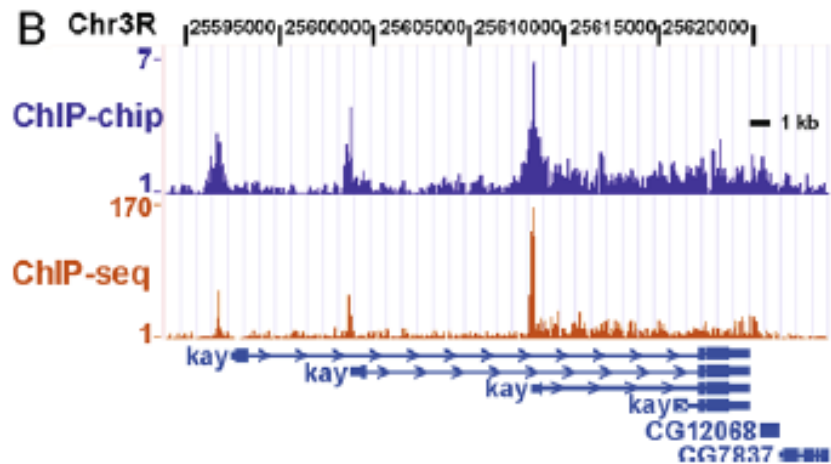
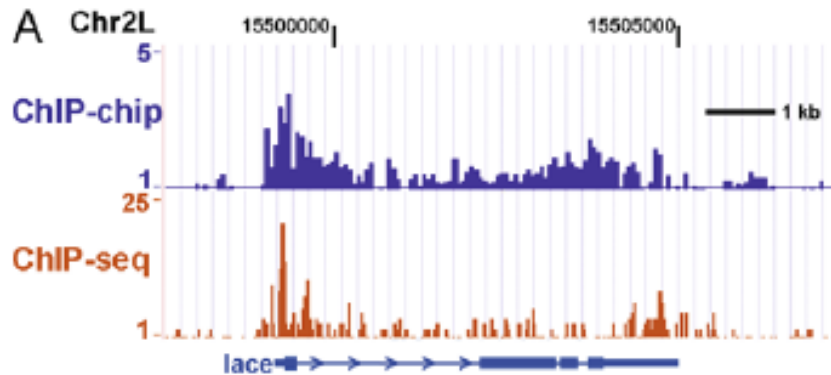
ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChIP-seq



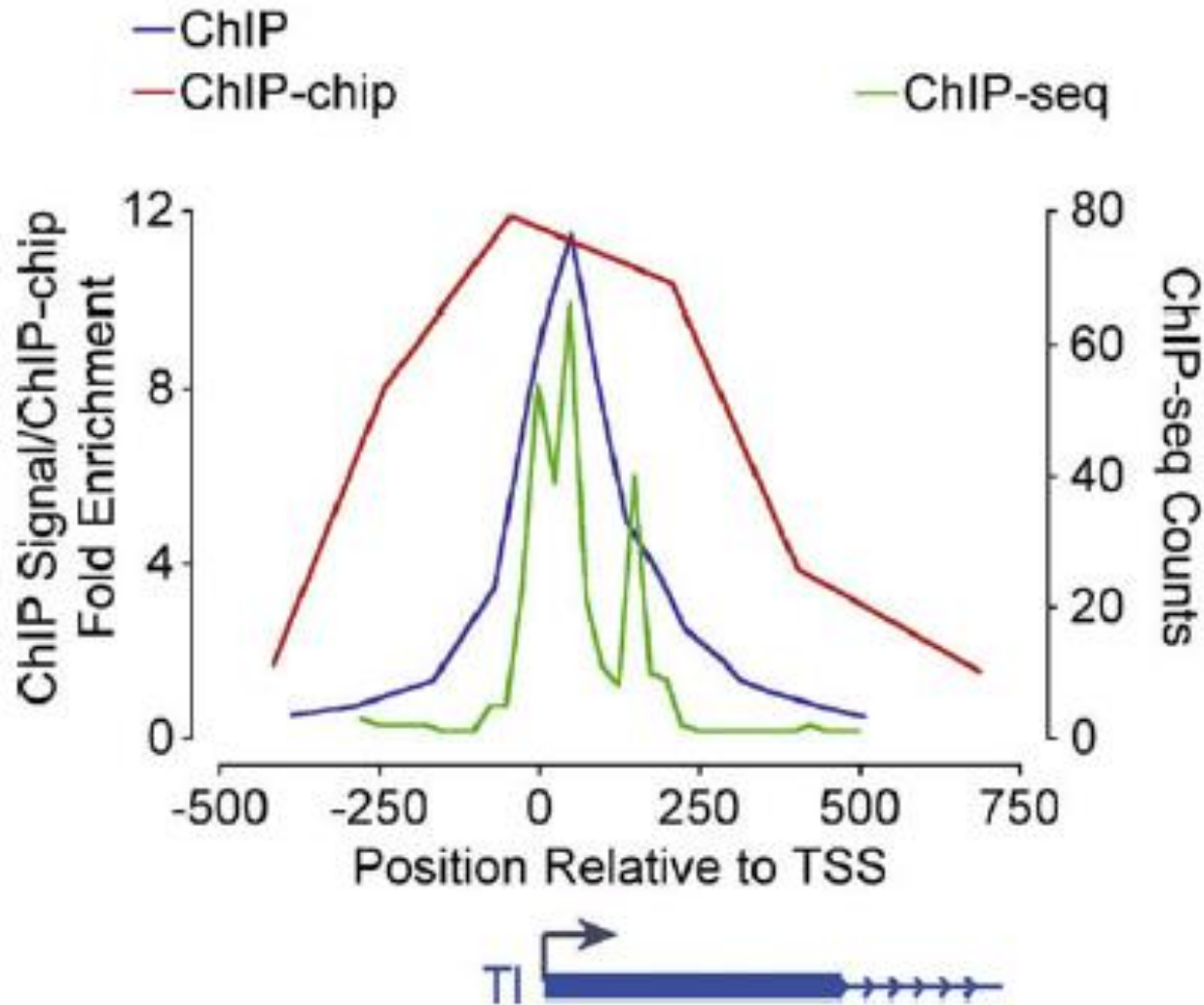
Gilchrist i wsp, 2009

ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChIP-seq

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

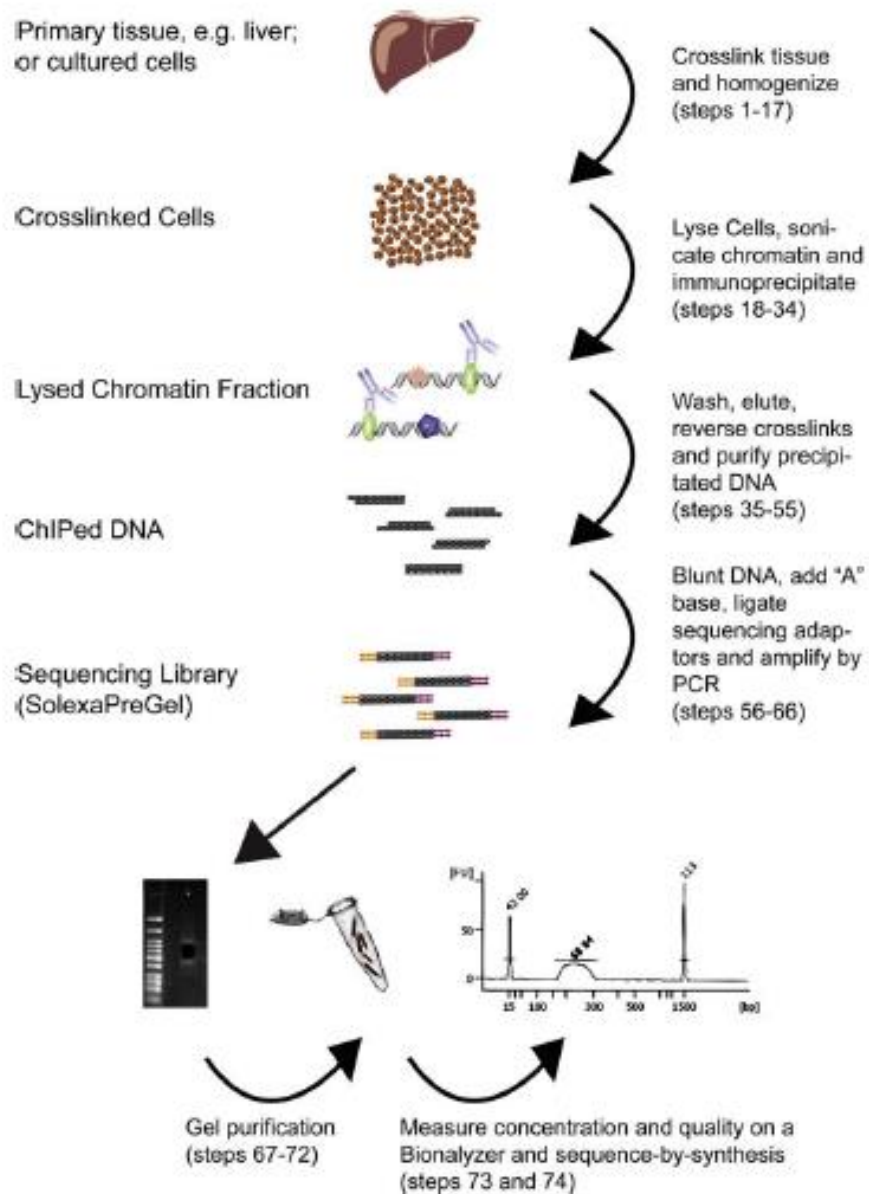


ChIP-chip („ChIP on chip”) i ChIP-seq



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.*

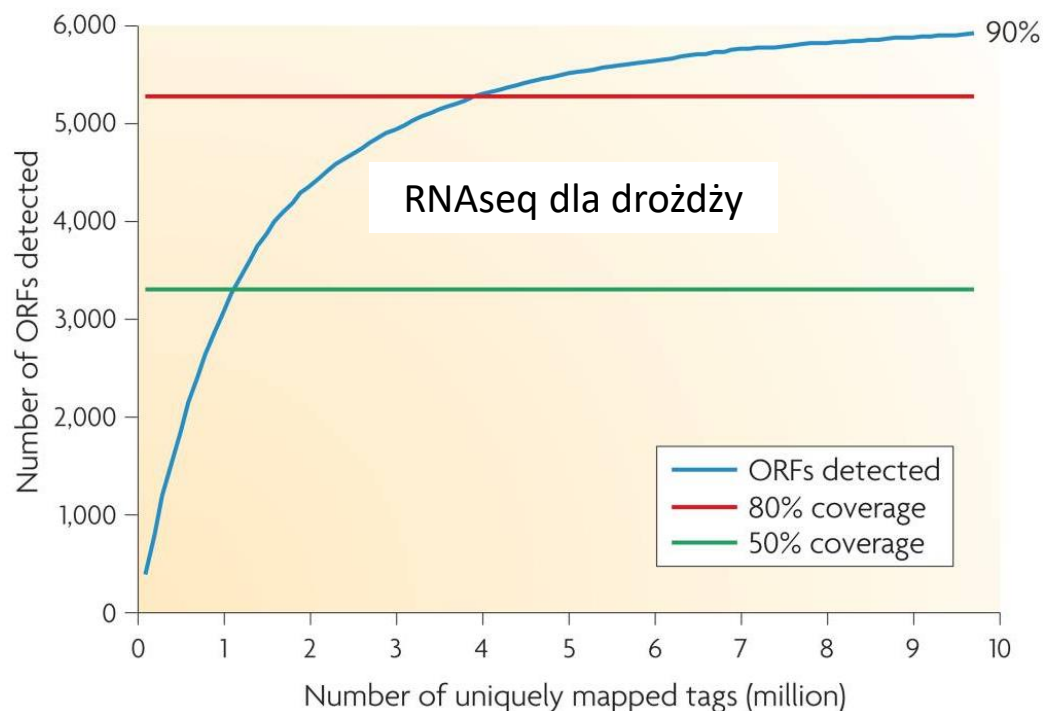
<http://www.molecular ecology.com/next-gen-fieldguide-2016/>

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

2. Wydłużenie odczytów bez spadku ich jakości

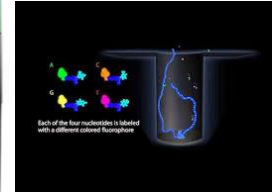
3. Sekwenatory na prawdę „personalne”

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)?

PacBio Systems *Sequel*



<http://www.pacb.com>

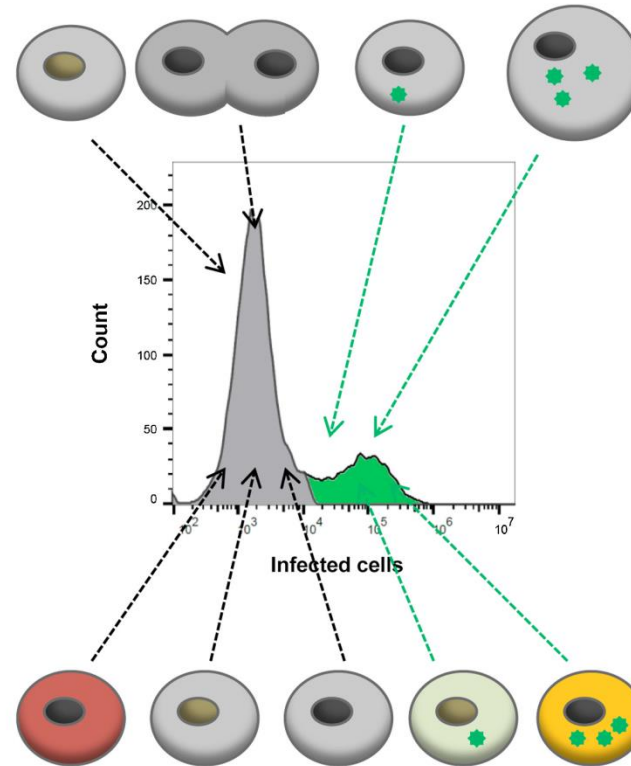
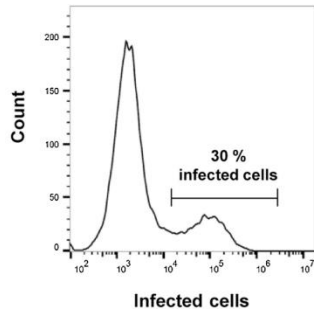
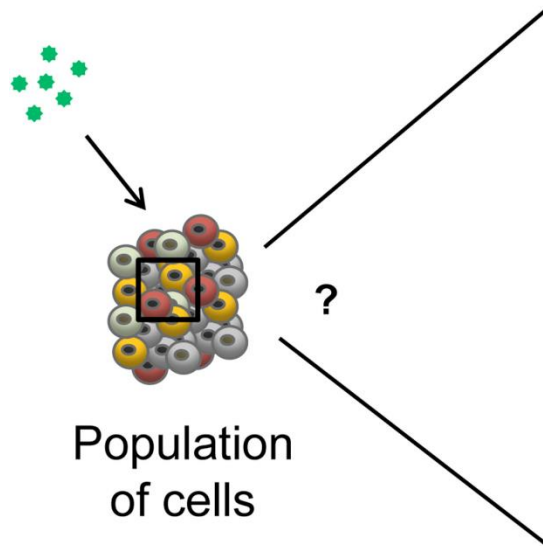
Oxford Nanopore Technologies
MinION (Plug and Play sequencer)



<http://www.sciencemag.org>

Sekwencjonowanie z pojedynczej komórki

Single-cell sequencing (SCS)

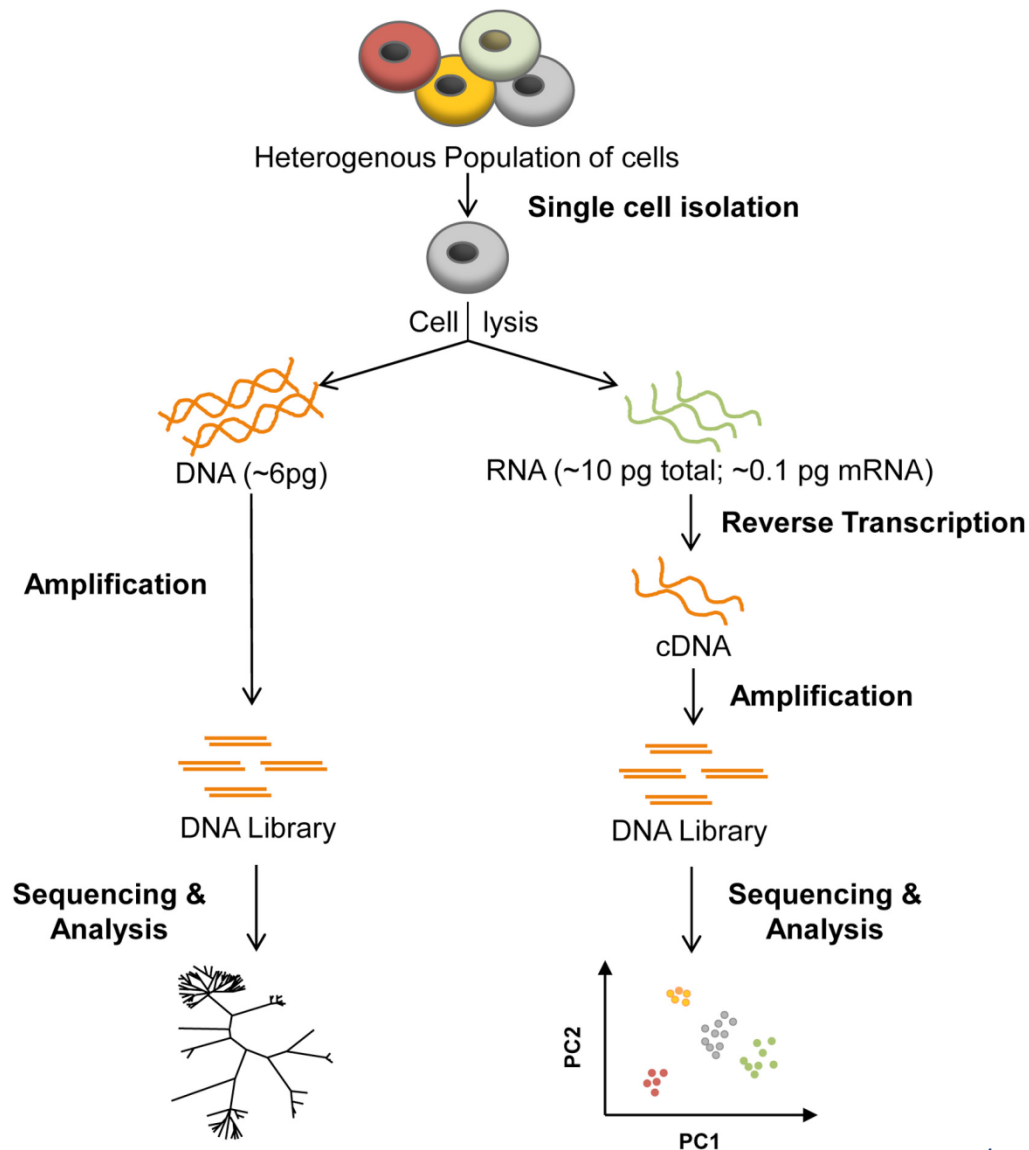


Multiple cell state

Multiple cell subsets

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

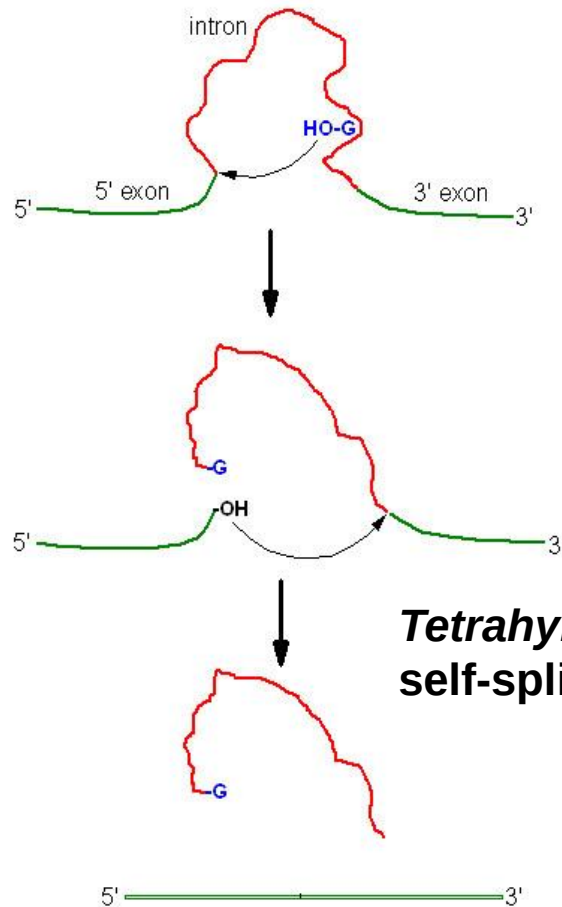
Struktura a funkcja RNA

RNA capacity - CATALYTIC RNAs

Nobel 1989

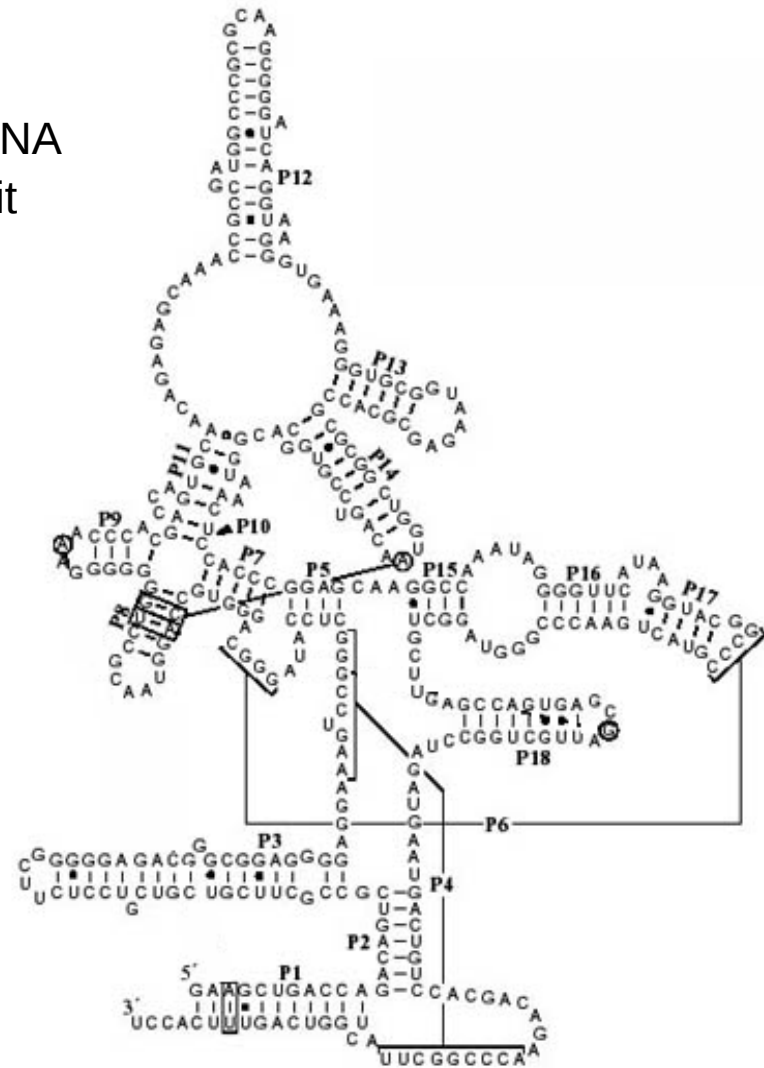
RNA enzymes – RIBOZYMES

- 1981/82 Tom Cech - self-splicing in *Tetrahymena* rRNA
- 1982 Sidney Altman - bacterial RNaseP RNA subunit

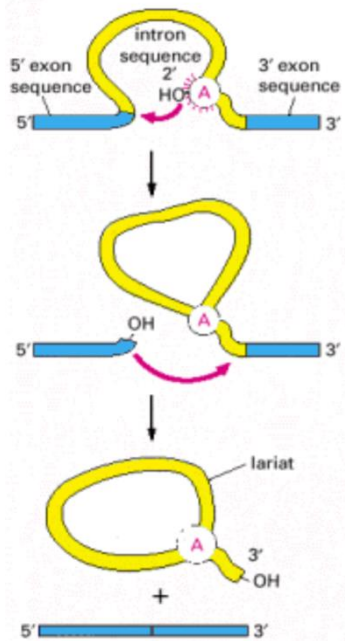


Thomas Cech
Sidney Altman

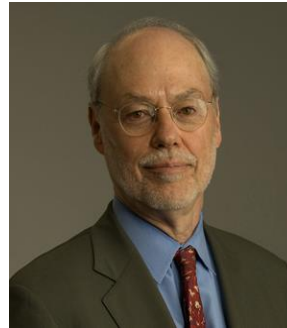
***Tetrahymena* group I
self-splicing intron**



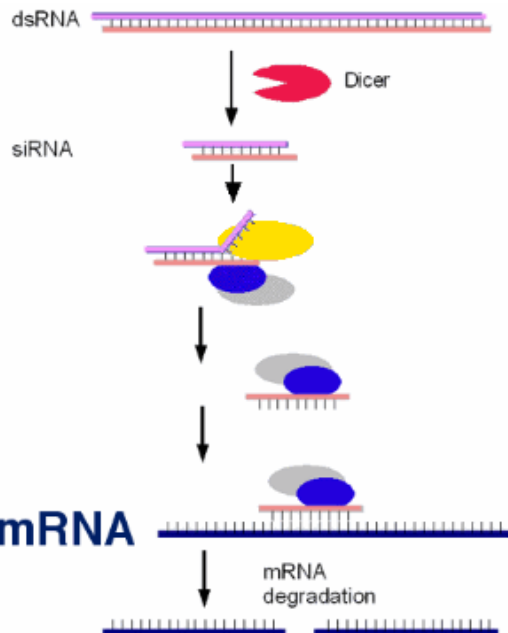
***Escherichia coli* RNaseP RNA**



mRNA SPLICING Nobels 1993



Phil Sharp
Richard Roberts



RNAi Nobels 2006



Andrew Fire
Craig Mello

RNAs – STRUCTURE AND FUNCTION

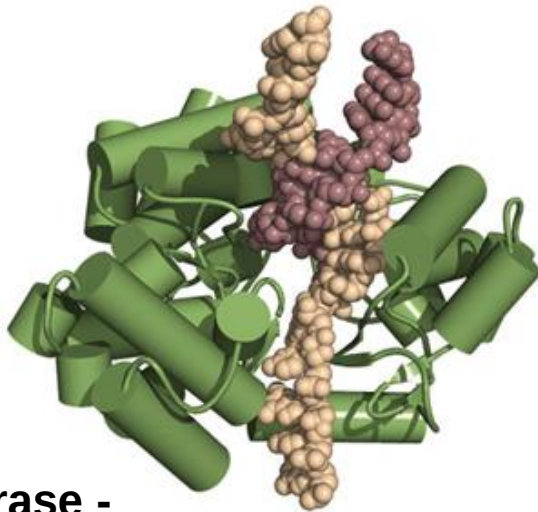
Nobels 2009



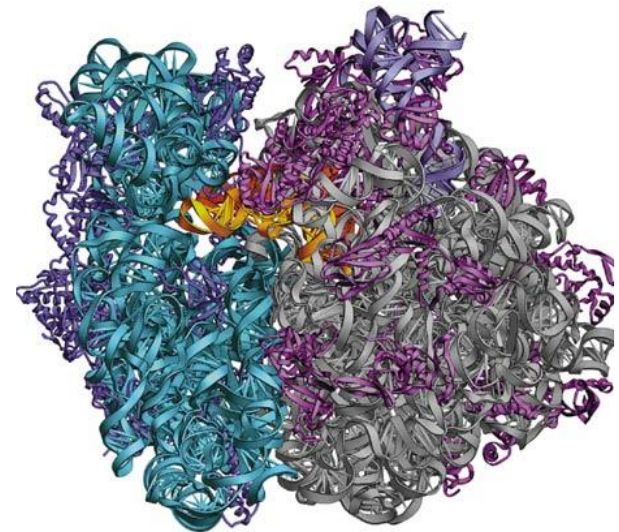
Elizabeth Blackburn
Jack Szostak
Carol Greider



Venkatraman Ramakrishnan
Ada Yonath
Thomas Steitz



Telomerase -
maintaining chromosome ends



Crystal structure of the ribosome

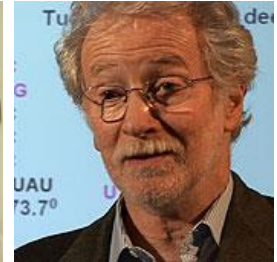
SELEX = Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

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

1990



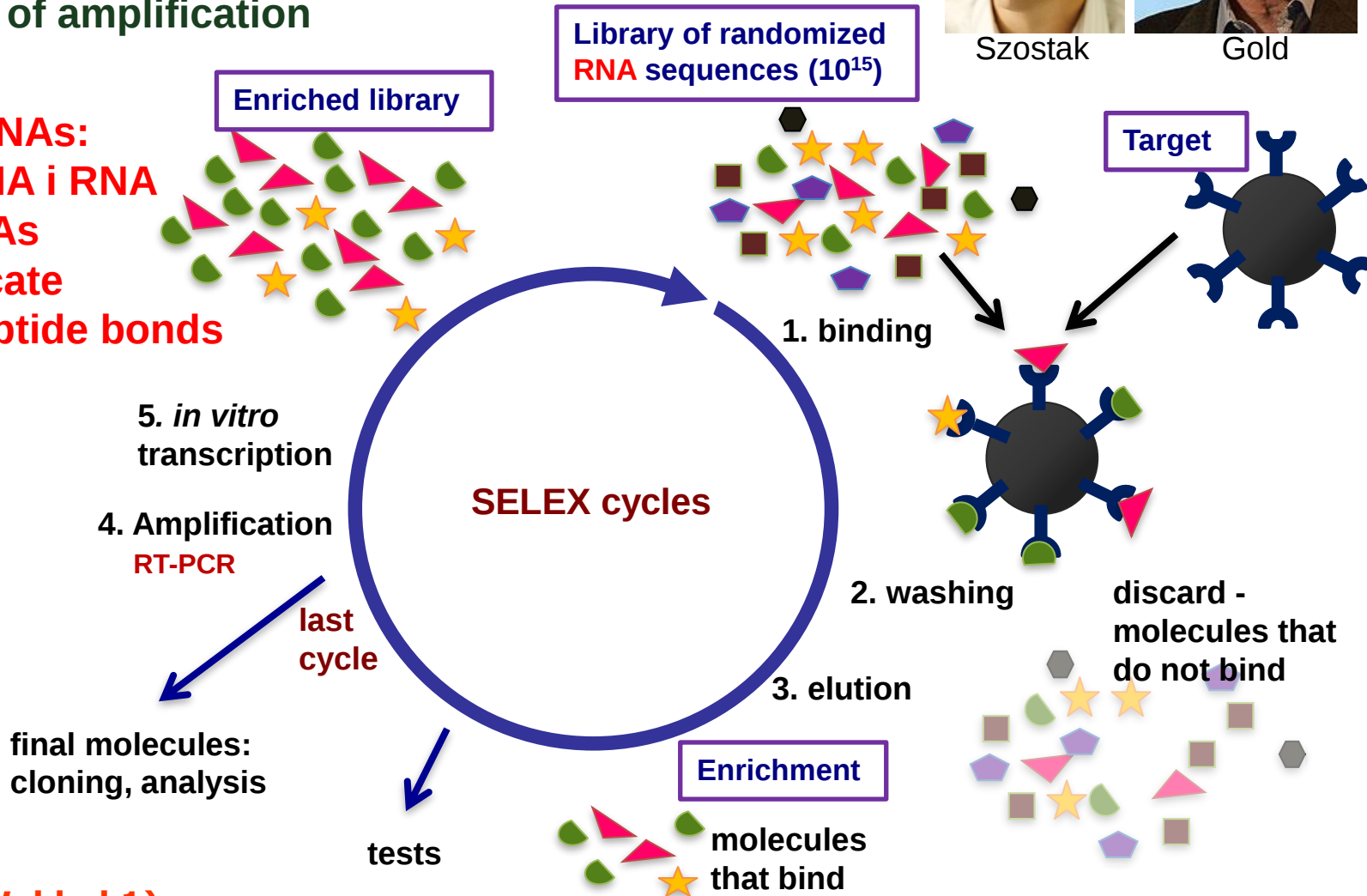
Szostak



Gold

Selected RNAs:

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



Zwijanie się RNA

Organizacja struktury RNA: 3 poziomy

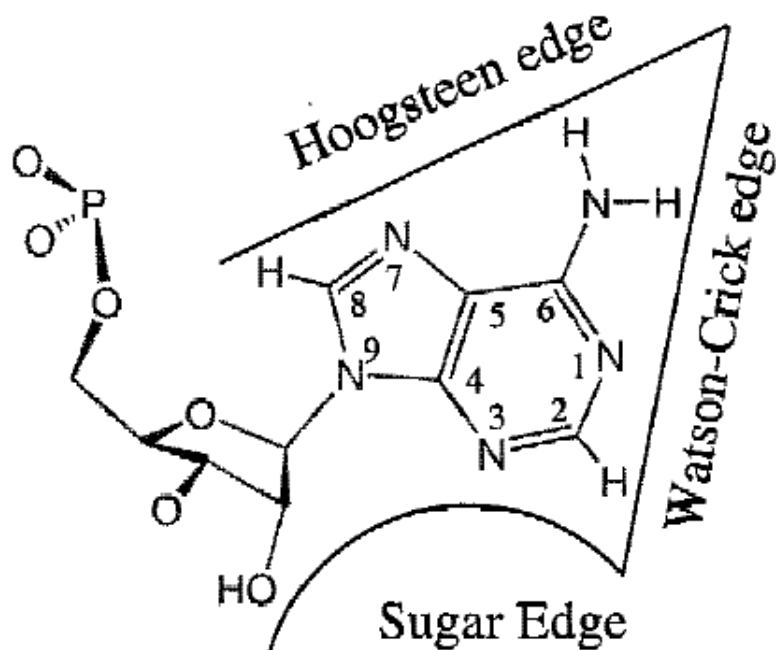
- **Struktura I-rzędowa:** sekwencja nukleotydowa
- **Struktura II-rzędowa:** parowania nukleotydów wg zasad Watsona-Cricka
- **Struktura III-rzędowa:** oddziaływania pomiędzy odległymi strukturami II-rzędowymi w cząsteczce

Struktura I-rzędowa: sekwencja nukleotydowa

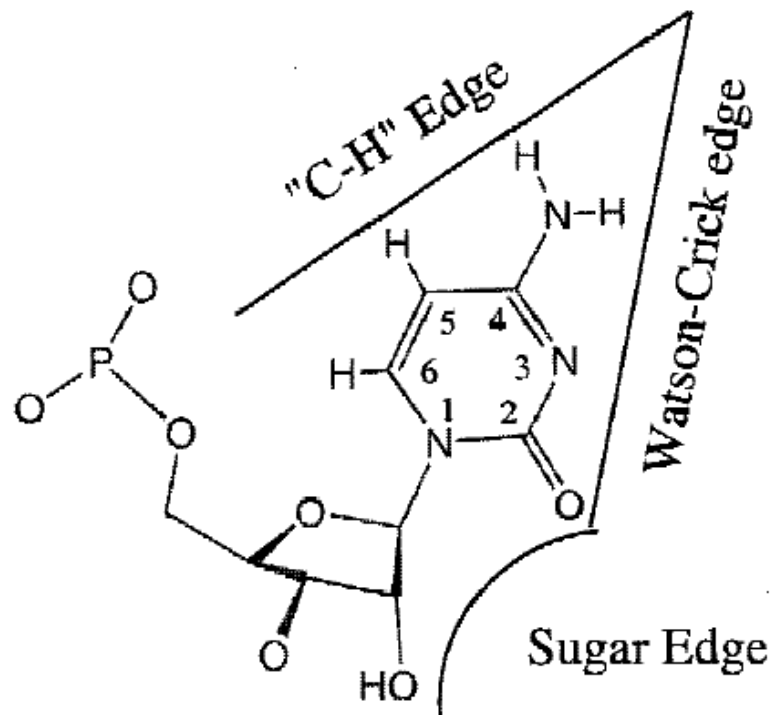
- **Sekwencja zależna od DNA** ale...
- wyciwanie **intronów**, insercje, delecje oraz...
- **modyfikacje** potranskrypcyjne (Ψ - pseudouracyl, D - dihydrourydyna)...
- więc dokładne jej określenie jest możliwe dzięki **sekwencjonowaniu cDNA**, czasem konieczne w połączeniu ze **spektrometrią mas**

Krawędzie zasad uczestniczące w parowaniu nukleotydów

Puryny (G lub A)



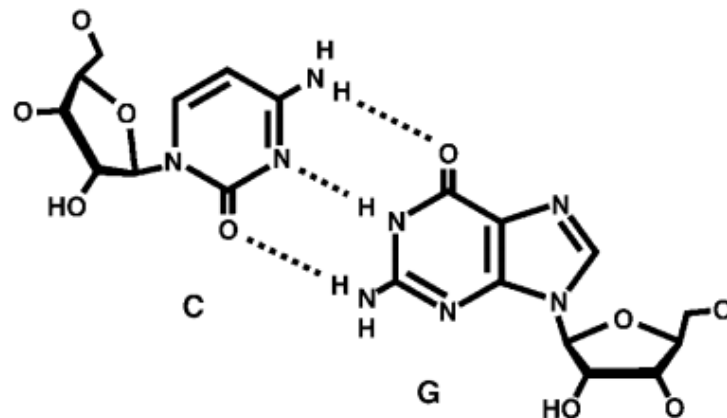
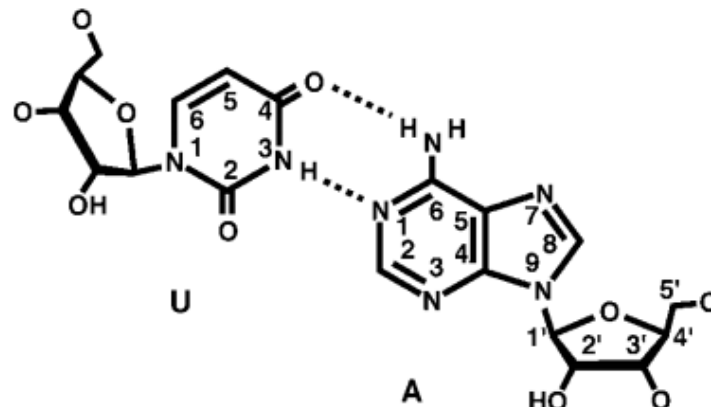
Pirymidyny (T, C lub U)



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 oddziaływań 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

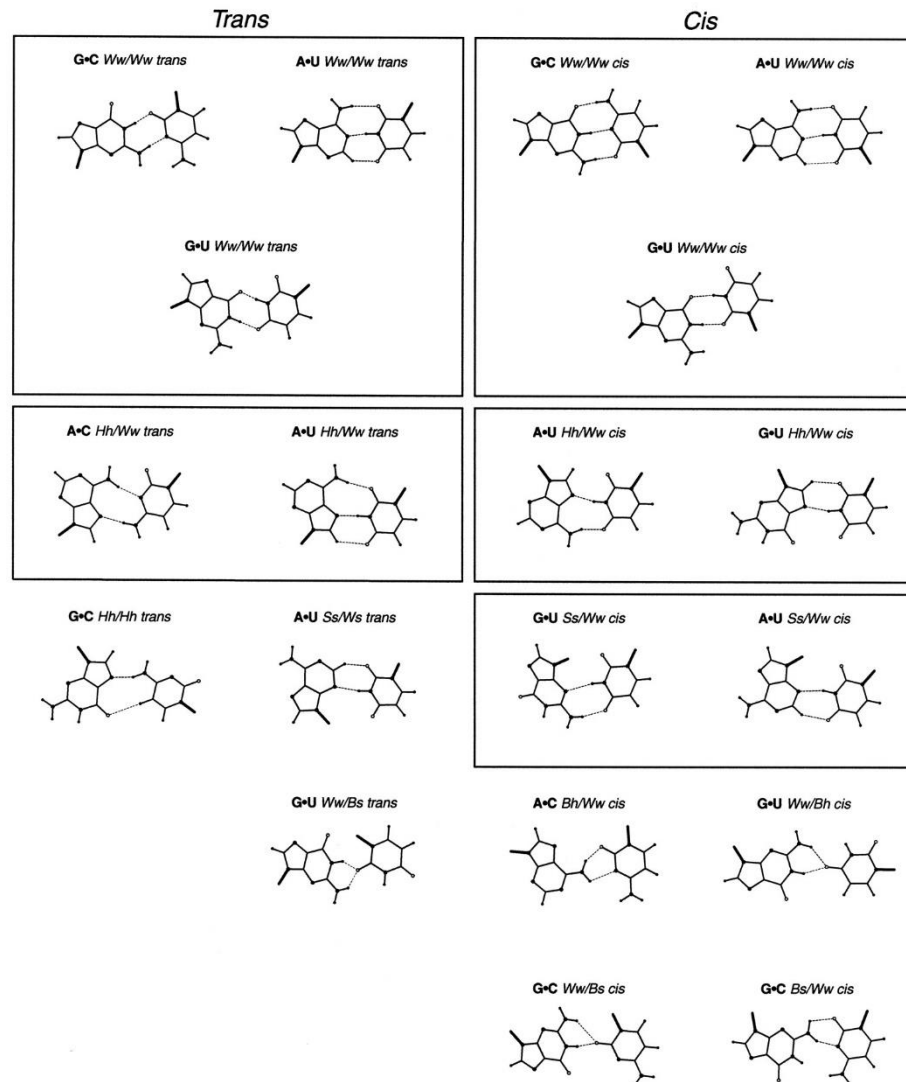


Figure 8. (Previous page and above) Two H-bond base pairing types found in HR-RNA-SET.

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

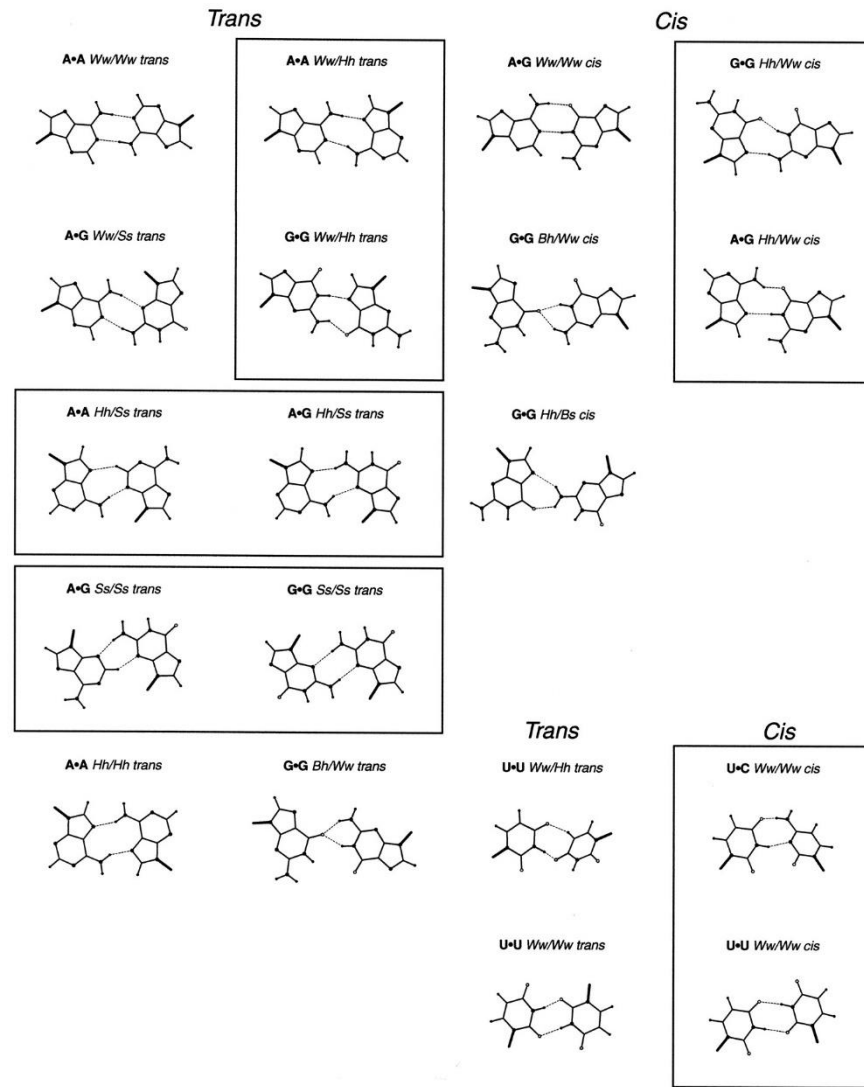
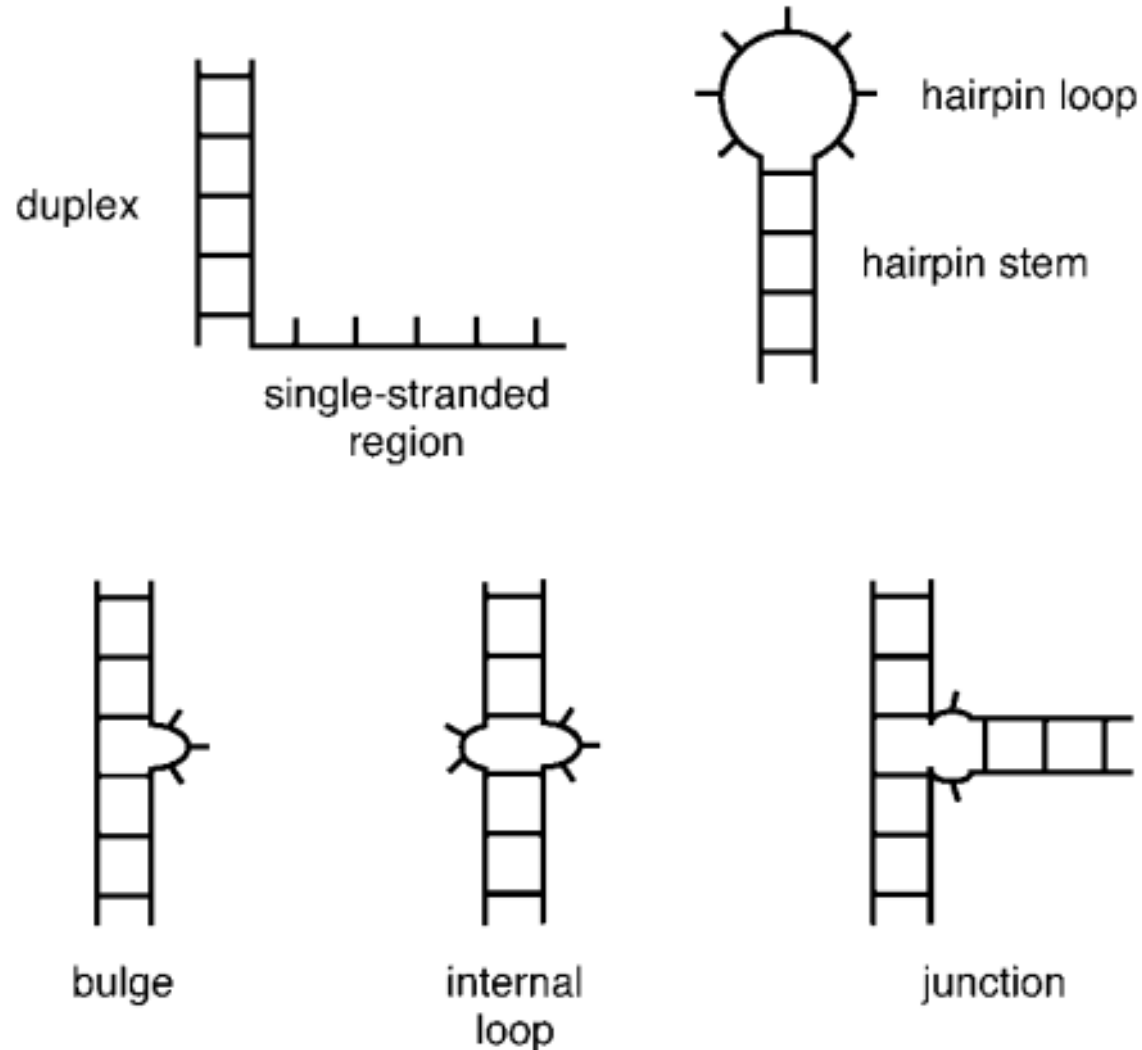


Figure 8. (Previous page and above) Two H-bond base pairing types found in HR-RNA-SET.

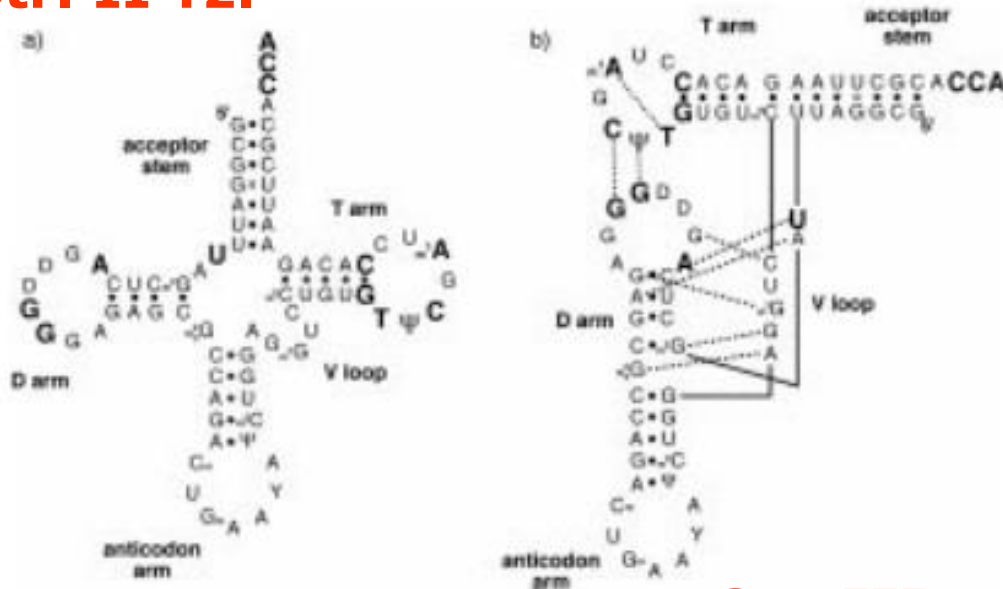
Najczęściej występujące elementy struktury II-rzędowej z parowaniami Watsona-Cricka



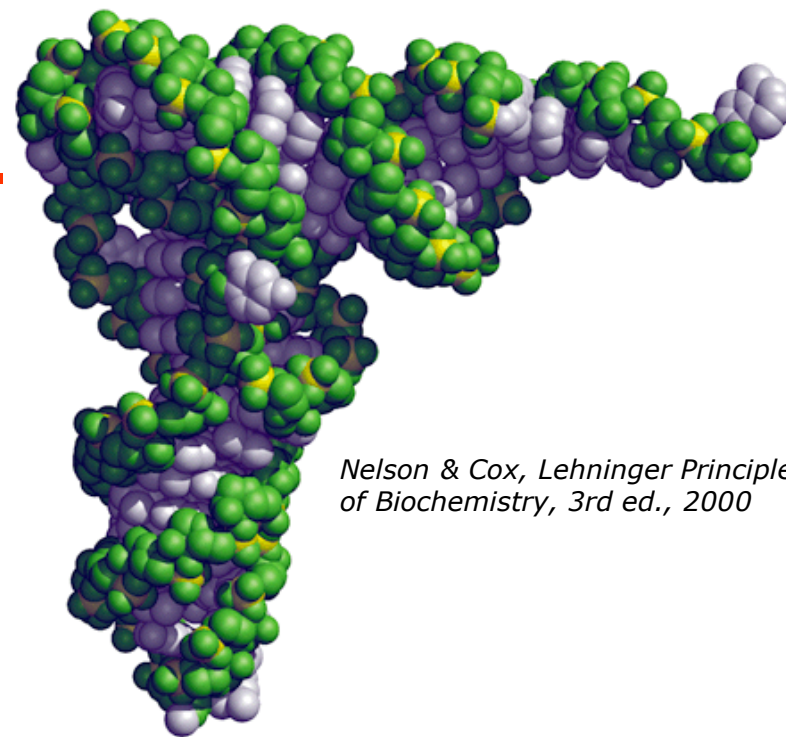
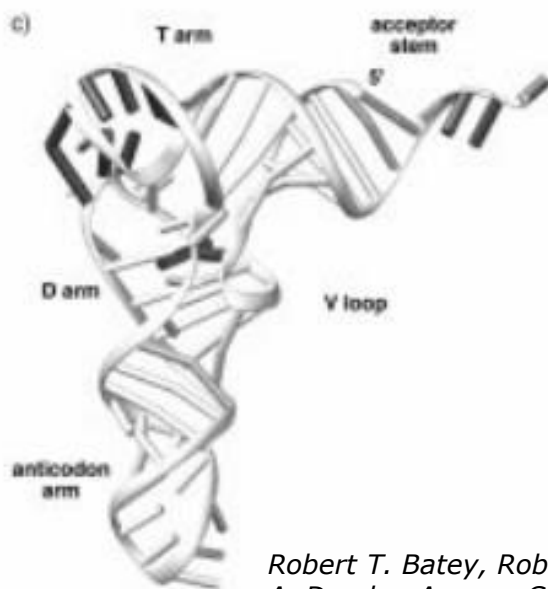
Robert T. Batey, Robert P. Rambo, and Jennifer A. Doudna *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999

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



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

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

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

Oddziaływania pomiędzy motywami helikalnymi

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

Oddziaływania pomiędzy helikalnymi i nie sparowanymi motywami

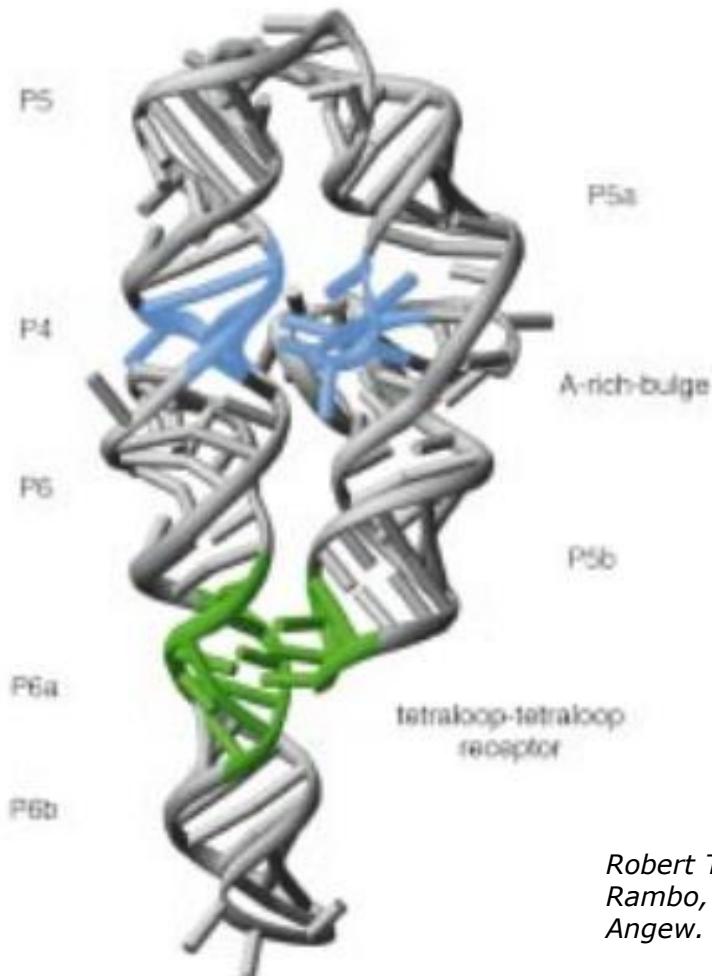
- Tripletty i Tripleksy zasad
- Motyw „tetraloop”
- Motyw z rdzeniowym metalem
- Suwak rybozowy

Trzeciorzędowe oddziaływania pomiędzy odcinkami niesparowanymi

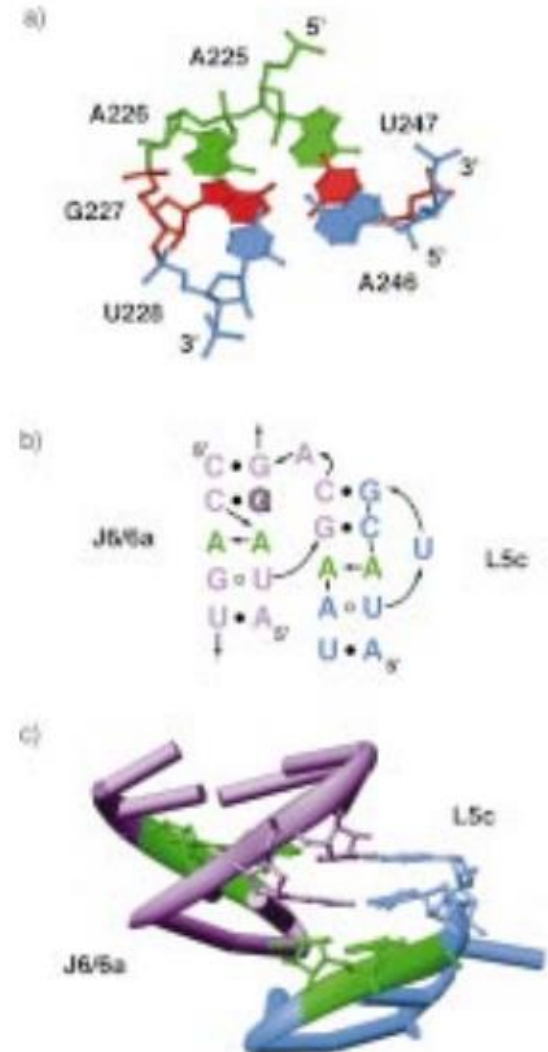
- Oddziaływania pętla-pętla
- pseudowęzły

Oddziaływania pomiędzy motywami helikalnymi

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

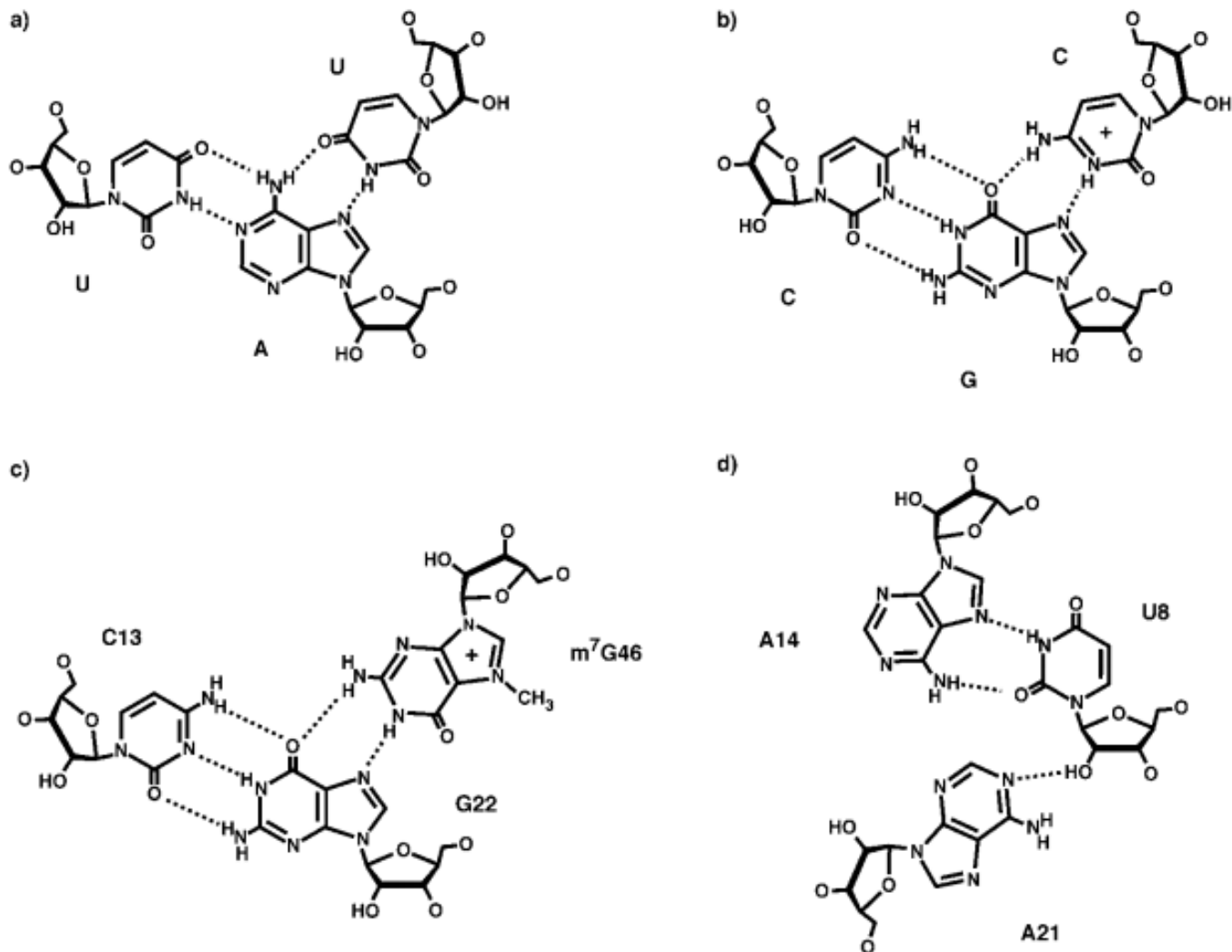


Platforma adenozynowa intronu *Tetrachymena*



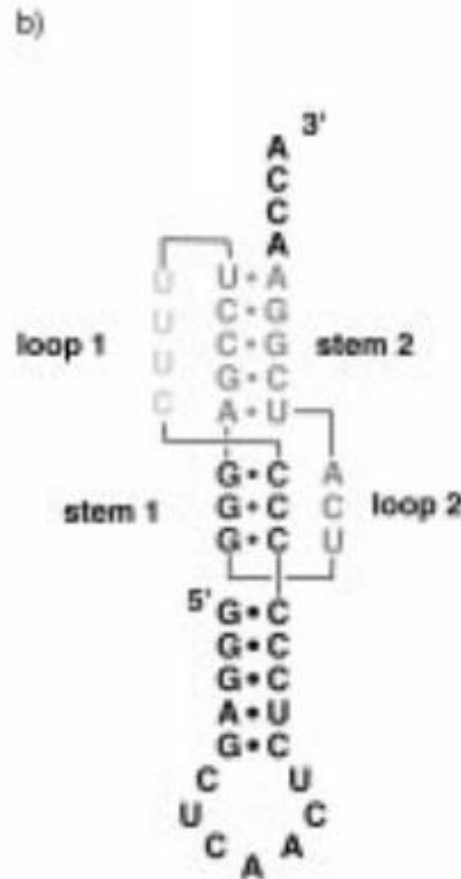
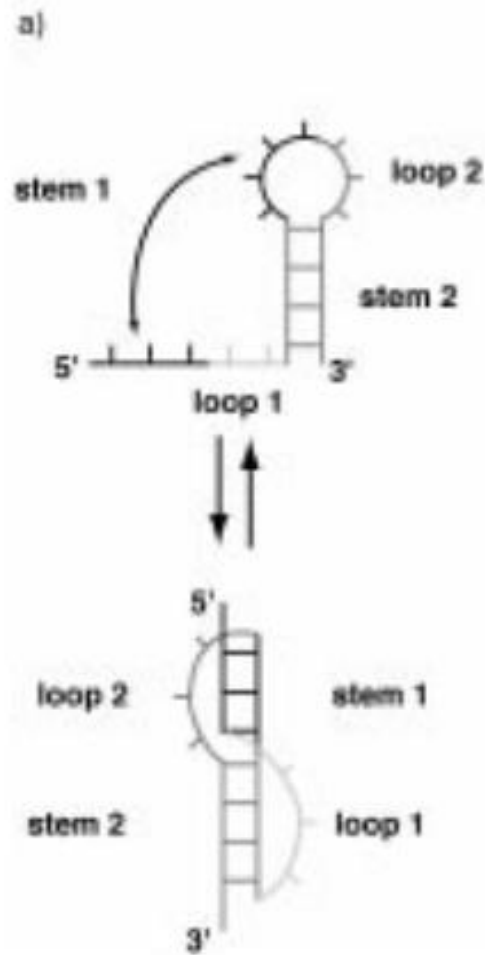
Robert T. Batey, Robert P. Rambo, and Jennifer A. Doudna
Angew. Chem. Int. Ed. 1999

Potrójne parowania zasad w RNA



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

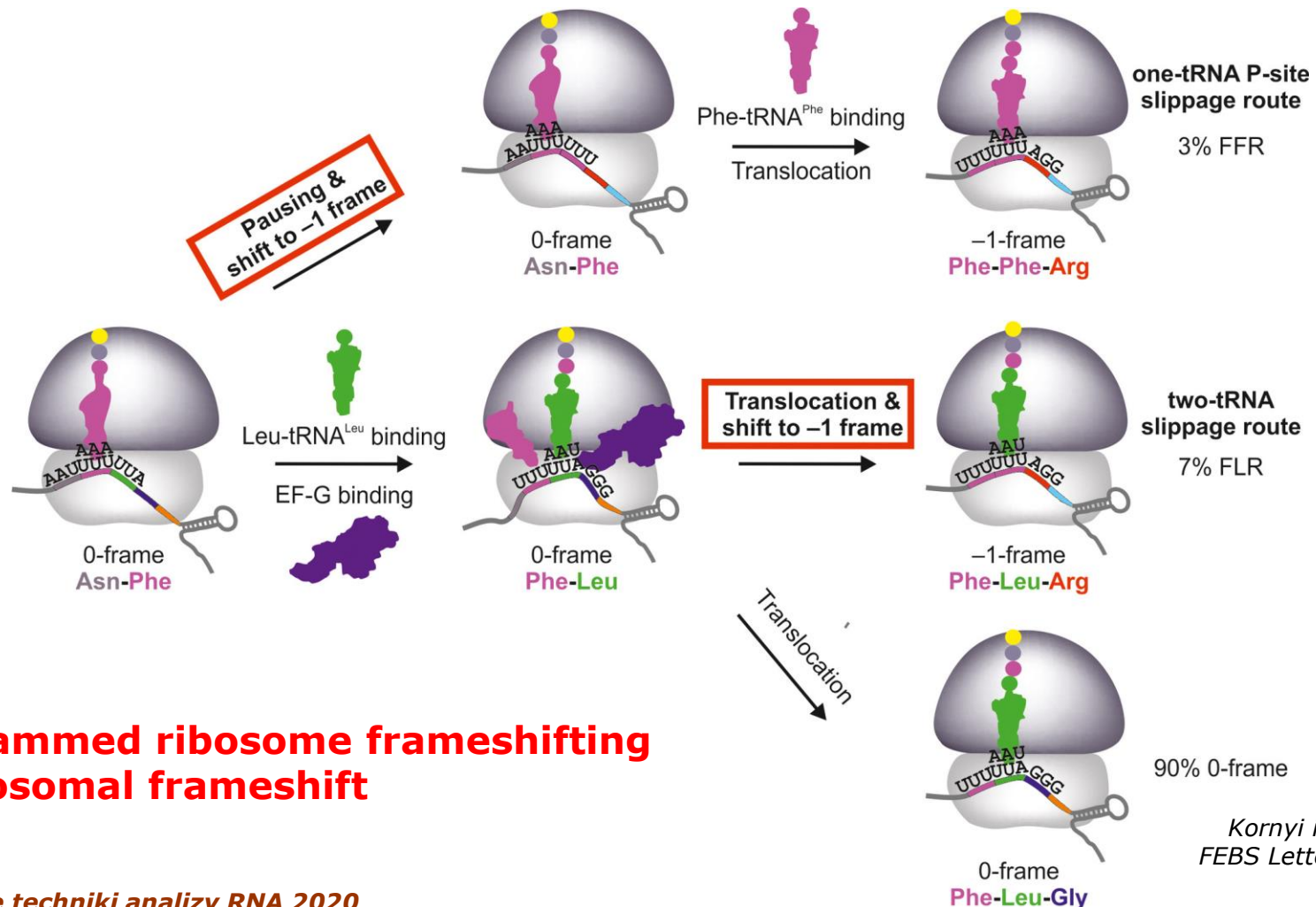
Pseudowęzły



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

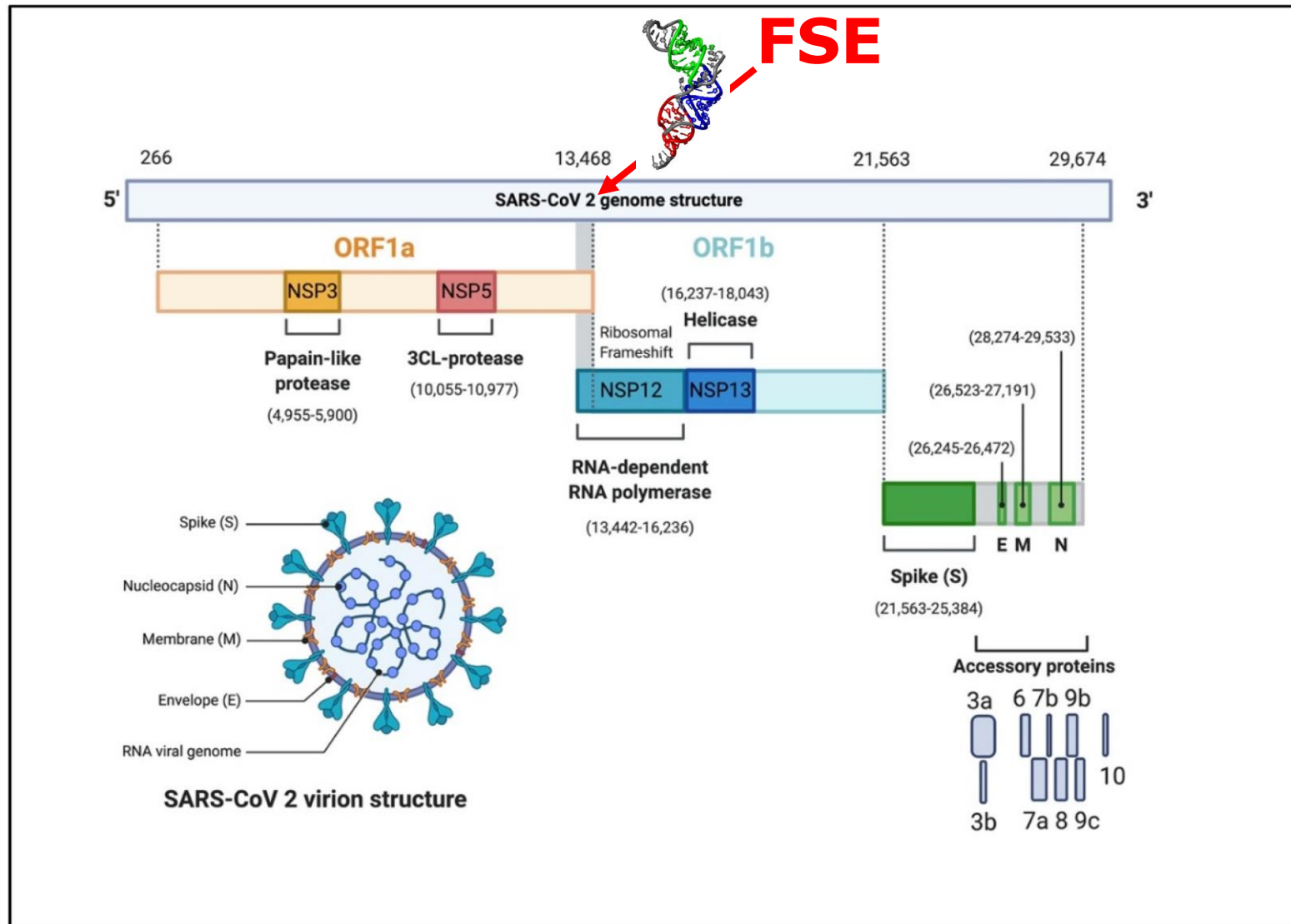
Programowana zmiana ramki odczytu translacji białek wirusowych

Kinetic mechanisms of FFR (upper) and FLR (lower) –1PRF pathways on the gag-pol mRNA of HIV-1



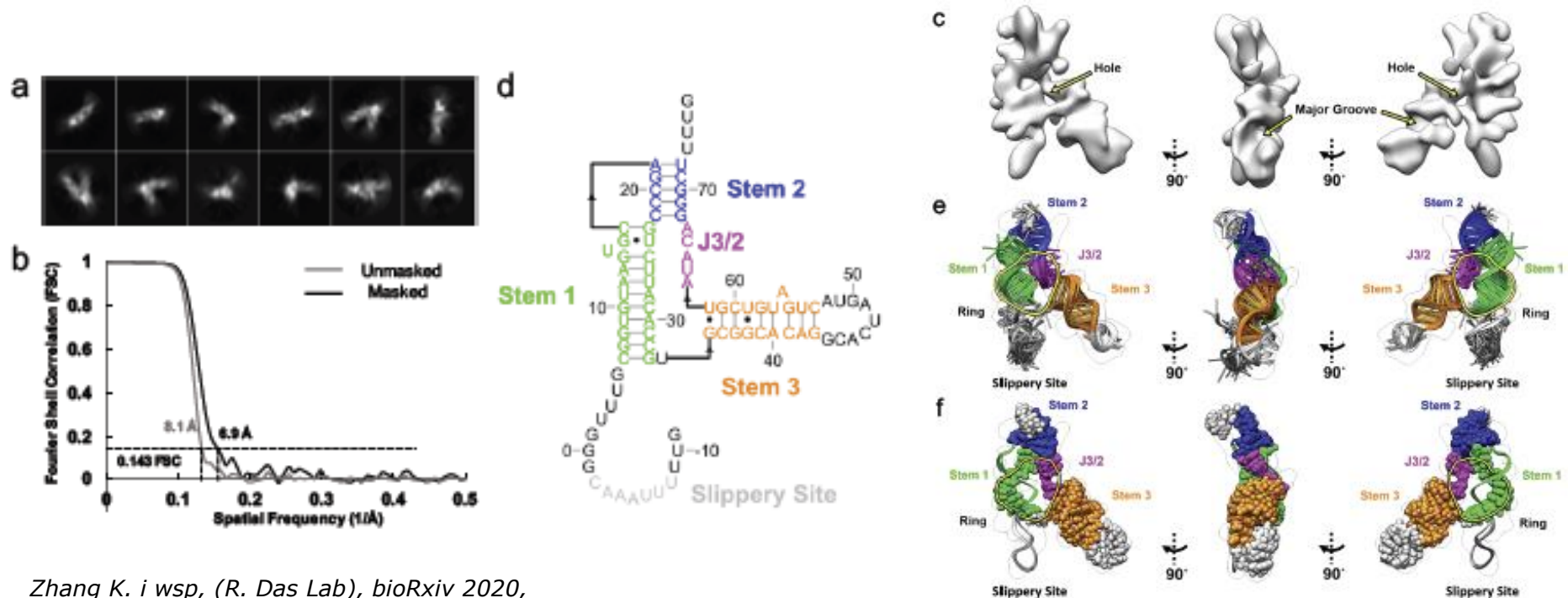
Korny i wsp.,
FEBS Letters 2019

Element zmiany ramki odczytu translacji (FSE) – pseudowęzeł w RNA SARS_CoV2



Element zmiany ramki odczytu translacji (FSE) – pseudowęzeł w RNA SARS_CoV2

Cryo-electron Microscopy and Exploratory Antisense Targeting of the 28-kDa Frameshift Stimulation Element from the SARS-CoV-2 RNA Genome



Zhang K. i wsp, (R. Das Lab), bioRxiv 2020,
<https://doi.org/10.1101/2020.07.18.209270>

**Potencjalny cel dla leków – inhibitorów
FS: związków niskocząsteczkowych lub
oligonukleotydów!**

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

Ryboprzełączniki i aptamery RNA

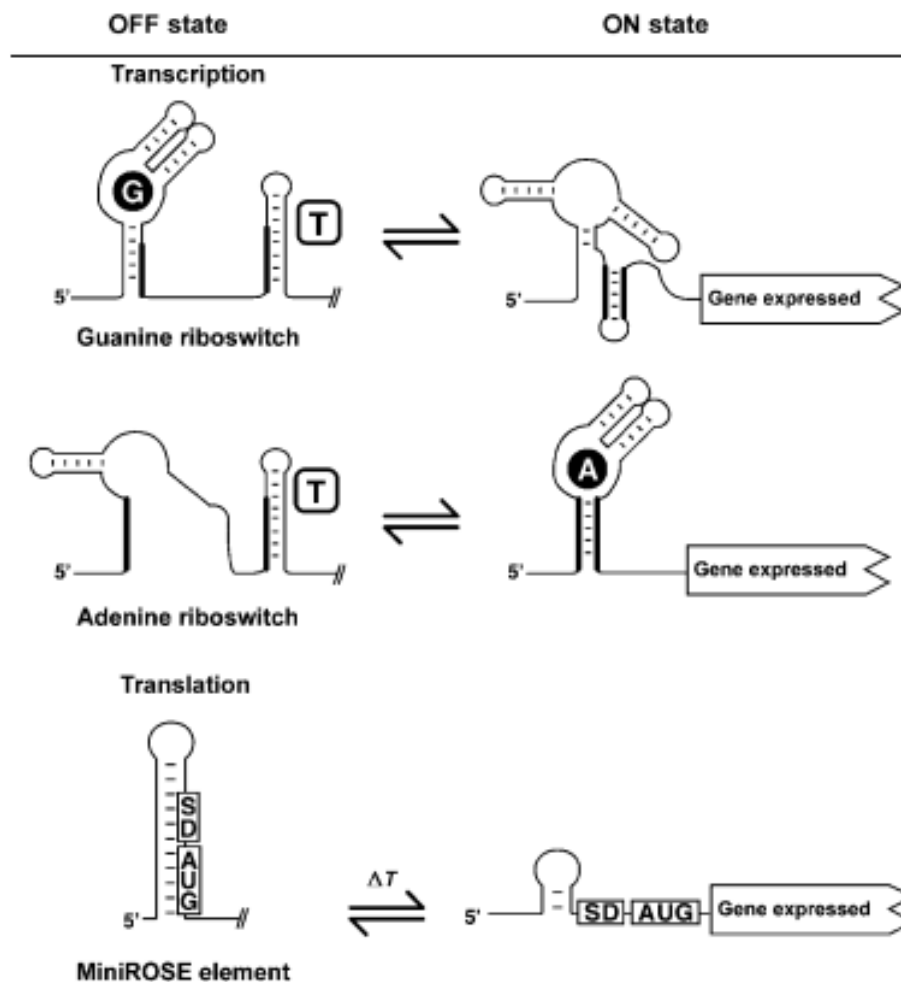
**Aptamery RNA:
elementy strukturalne wiążące
niskocząsteczkowe ligandy lub białka**

Ryboprzełączniki (ang. „riboswitch”)

RNA sensorowe, zdolne do wiązania niskocząsteczkowych ligandów

- Wiązanie niskocząsteczkowego ligandu zmienia strukturę RNA
- Elementy 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*

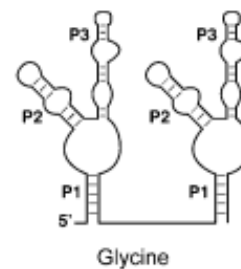
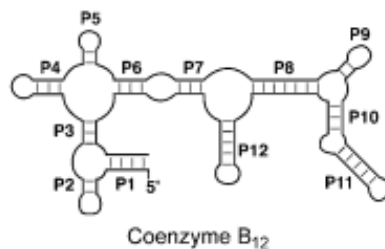
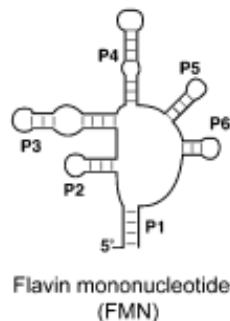
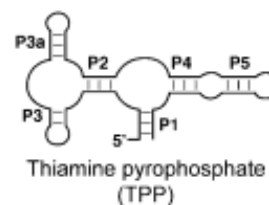
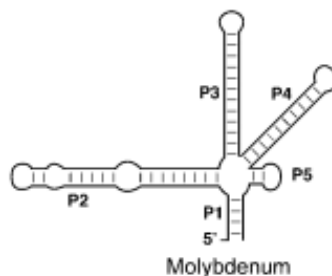
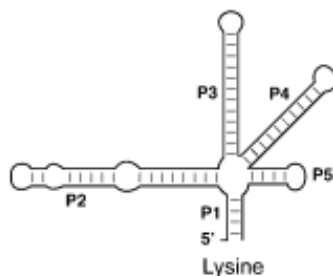
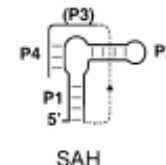
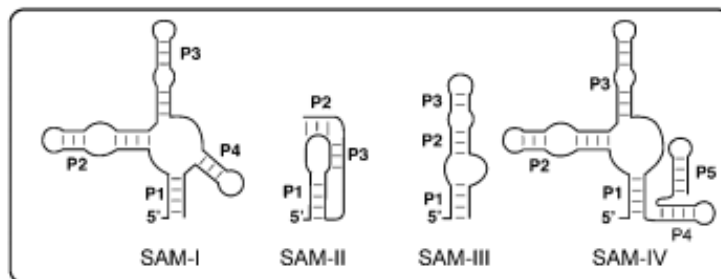
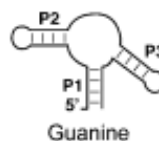
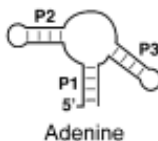
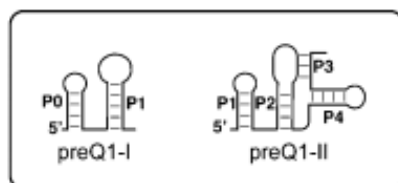
Przykłady ryboprzełączników



„termometr RNA”

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

Przykłady aptamerów wiążących niskocząsteczkowe ligandy



Zastosowanie w praktyce

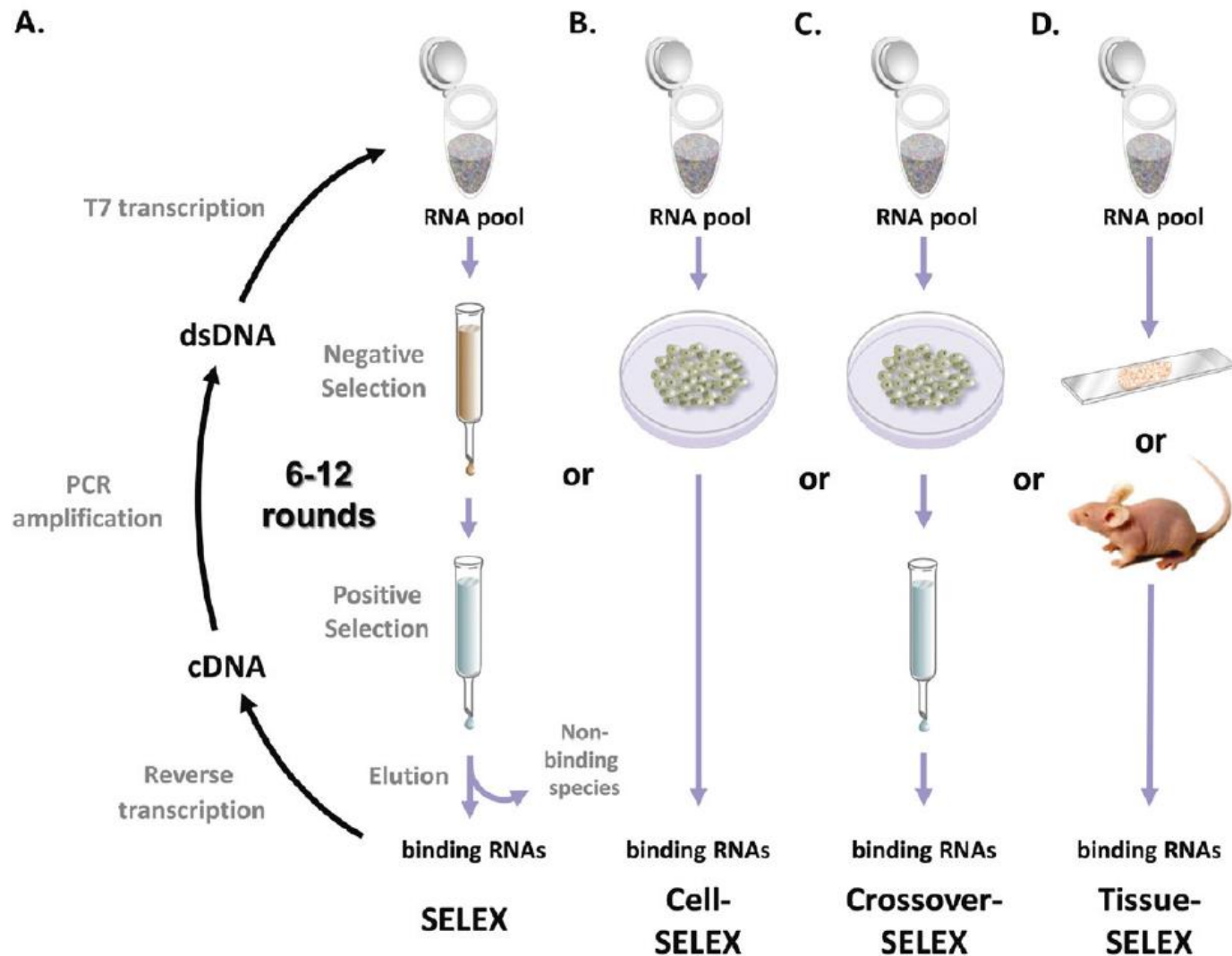
Medycyna – zamiast przeciwciał

- **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

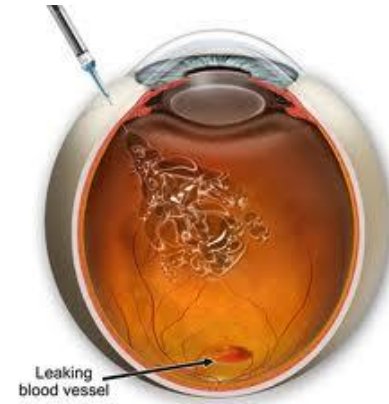
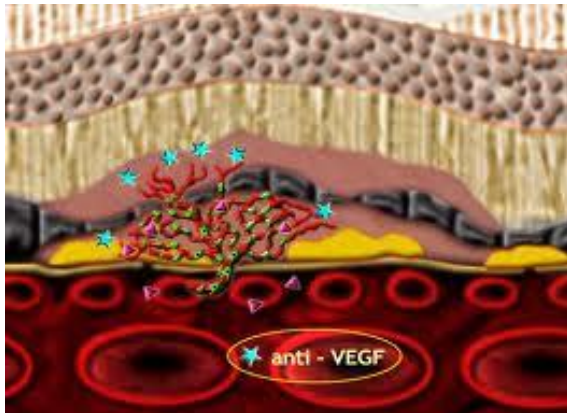
- **Układy *in vivo* z genami reporterowymi**
- **Translacja *in vitro***

Nowe odmiany techniki SELEX

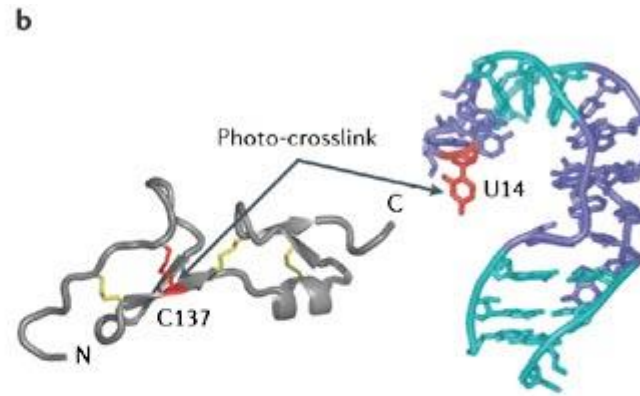
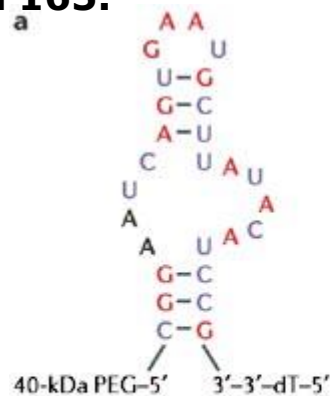


Pegaptanib – pierwszy lek oparty o aptamer RNA

Degeneracja 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)

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 stężenia soli w buforach*

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

- **Schemat doświadczenia:**

1. Transkrypcja *in vitro* w obecności np. **³²P-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 autoradiografia
5. Analiza wyników, sprzęgnięta z algorytmami modelowania struktur RNA (mfold)

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

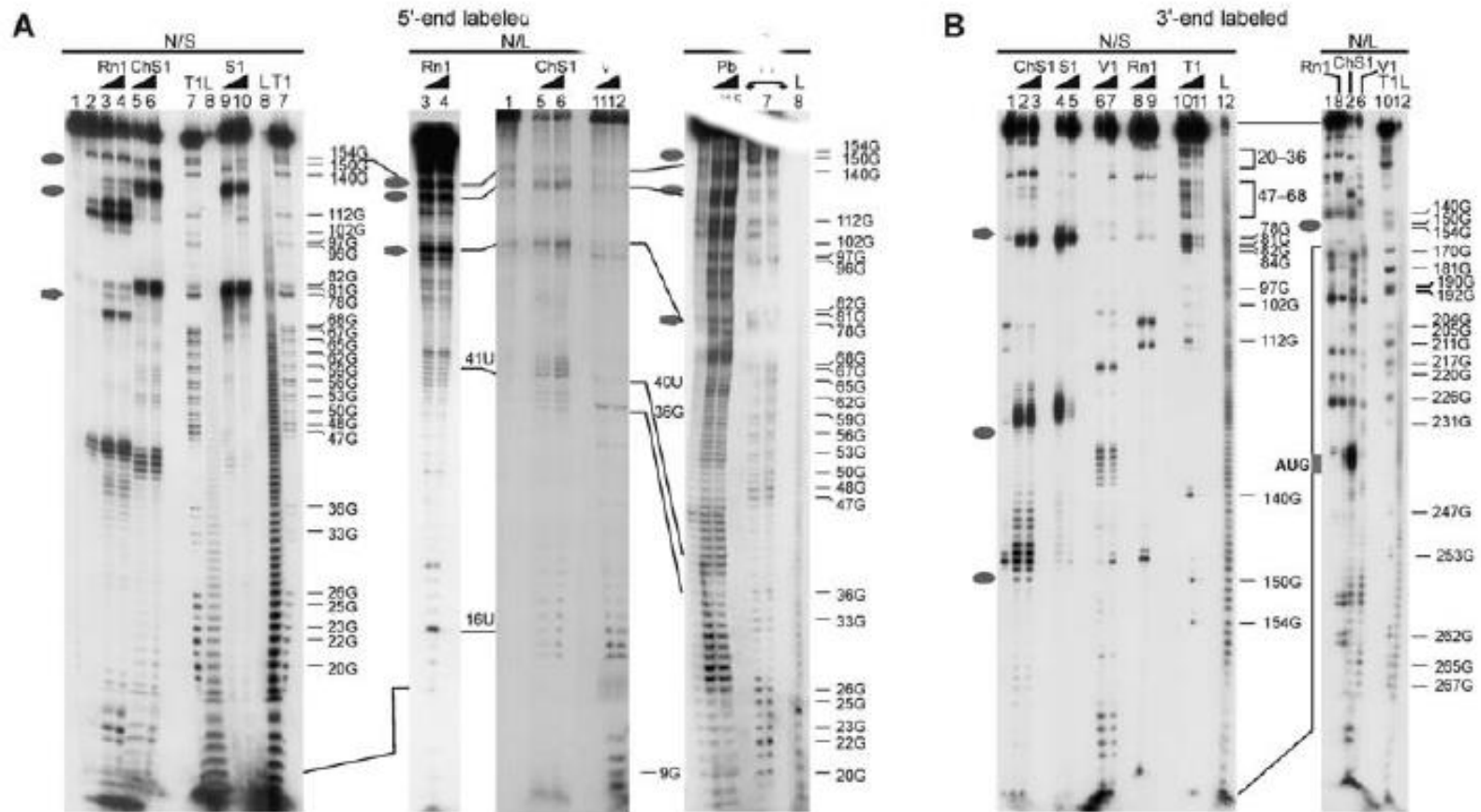
Biol. Chem., Vol. 388, pp. 135–144, February 2007 • Copyright © by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/BC.2007.015

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

Piotr Borsuk^{1,2}, Anna Przykorska², Karina Blachnio², Michal Koper^{1,2}, Jerzy M. Pawlowicz², Malgorzata Pekala¹ and Piotr Weglenski^{1,2,*}

- 5'UTR mRNA *agaA* posiada złożoną potencjalną 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*

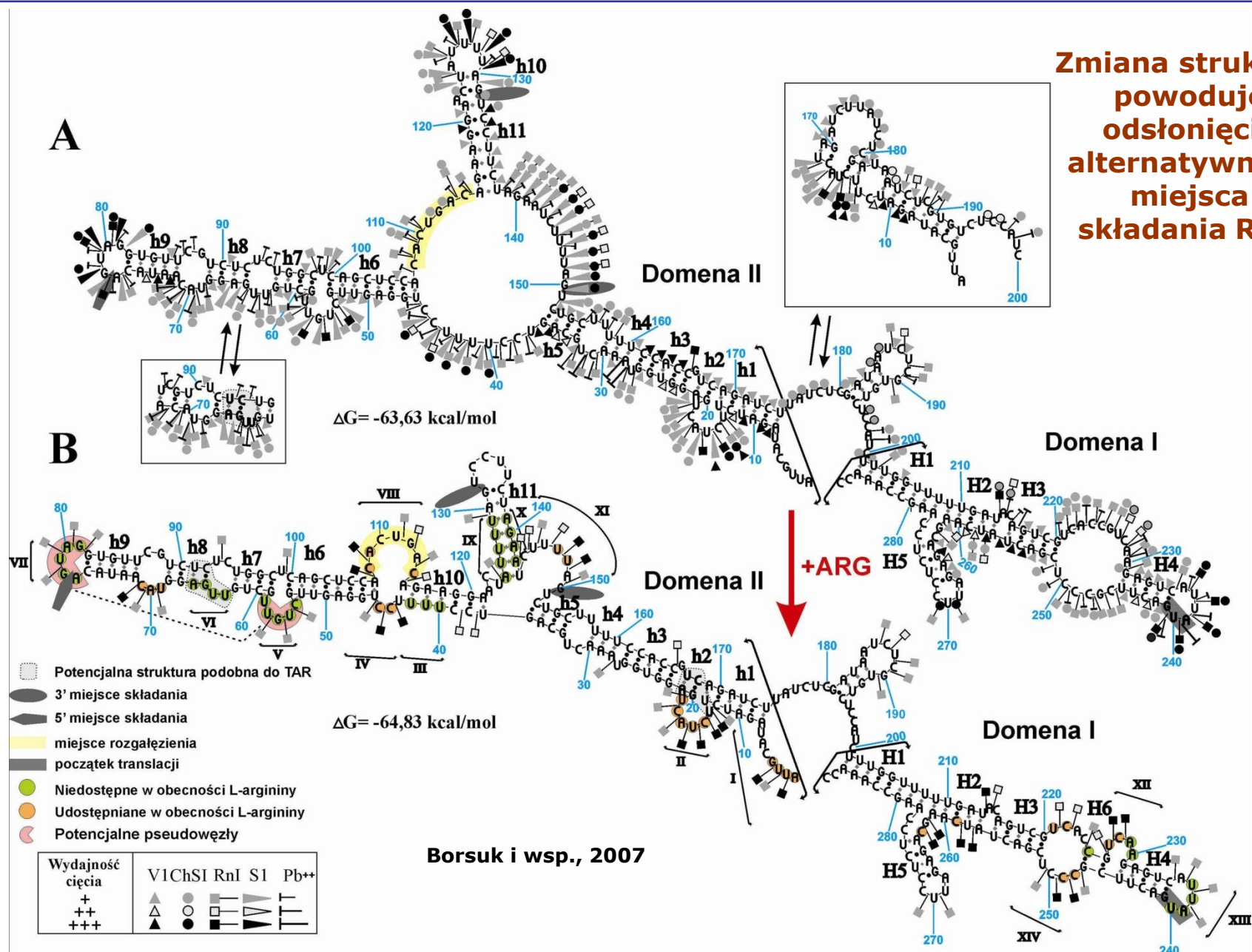


Borsuk i wsp., 2007

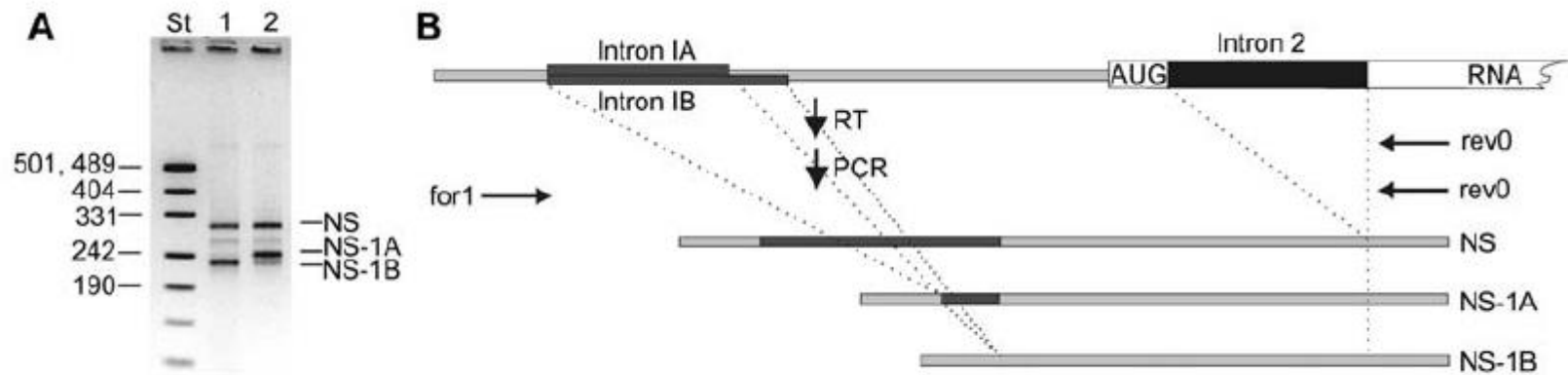
Figure 3 Probing the structure of *agaA* mRNA 5'-UTR fragments.

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 ZnCl₂. 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



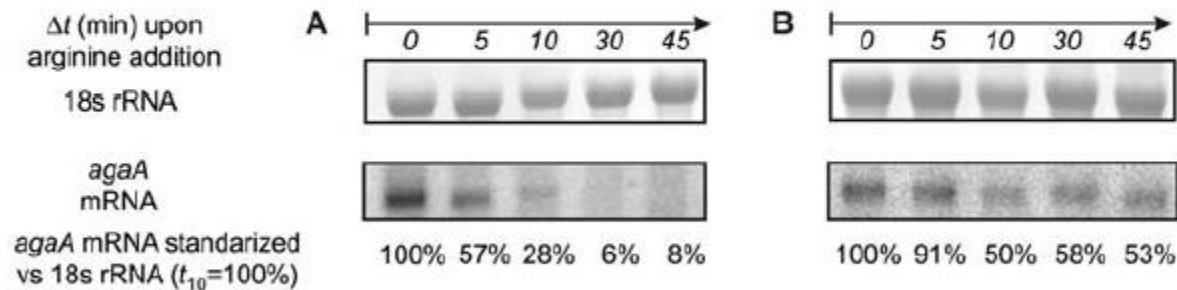
Mapowanie struktury RNA przy pomocy RNaz



RT-PCR of the *agaA* 5'-UTR.

P. Borsuk et al.

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



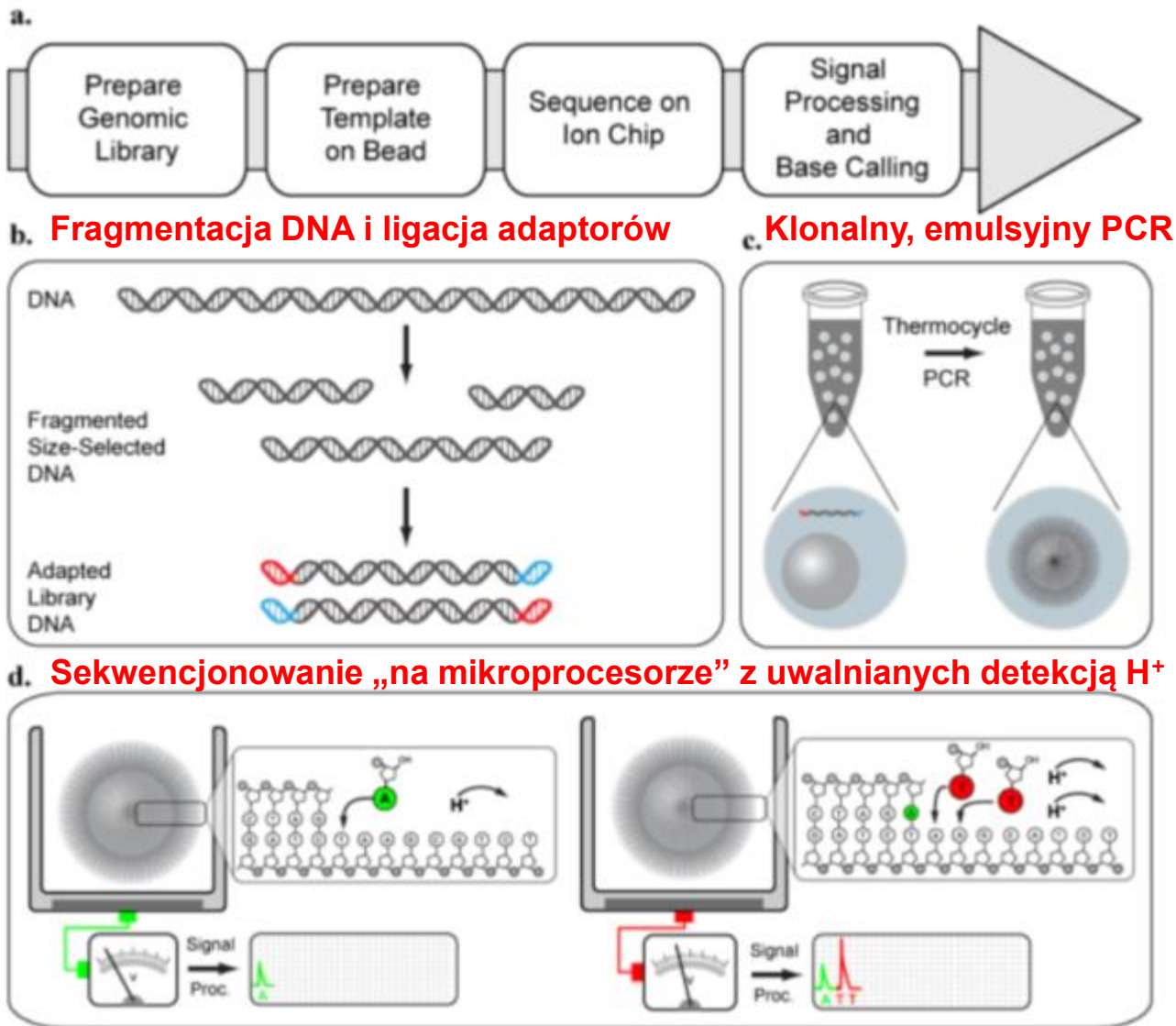
Decay of arginase mRNA in the absence (A) and presence (B) of L-arginine (2 mM) upon transcription inhibition.

Dziękuję za uwagę

Supplement

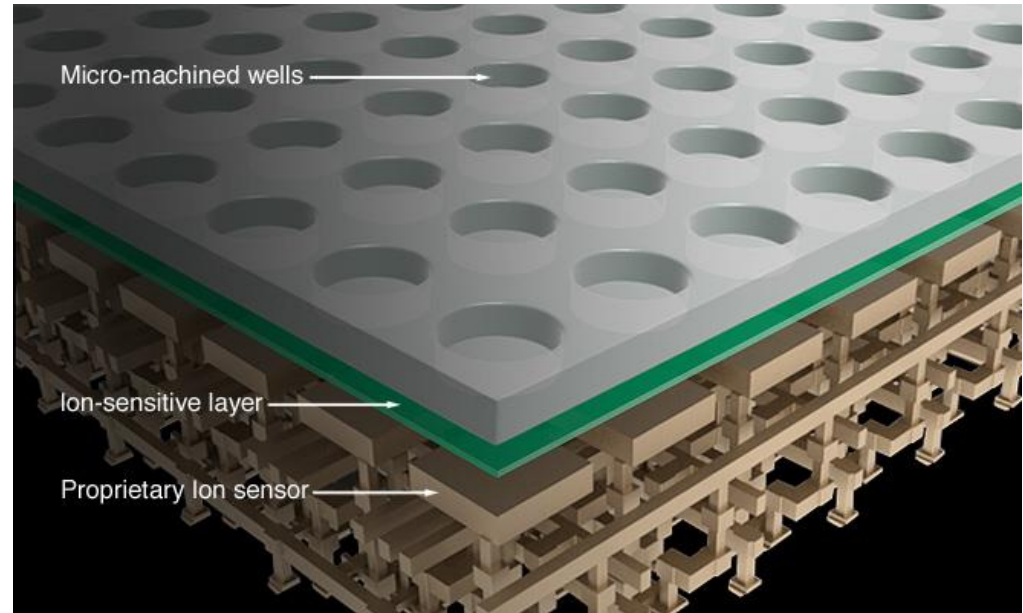
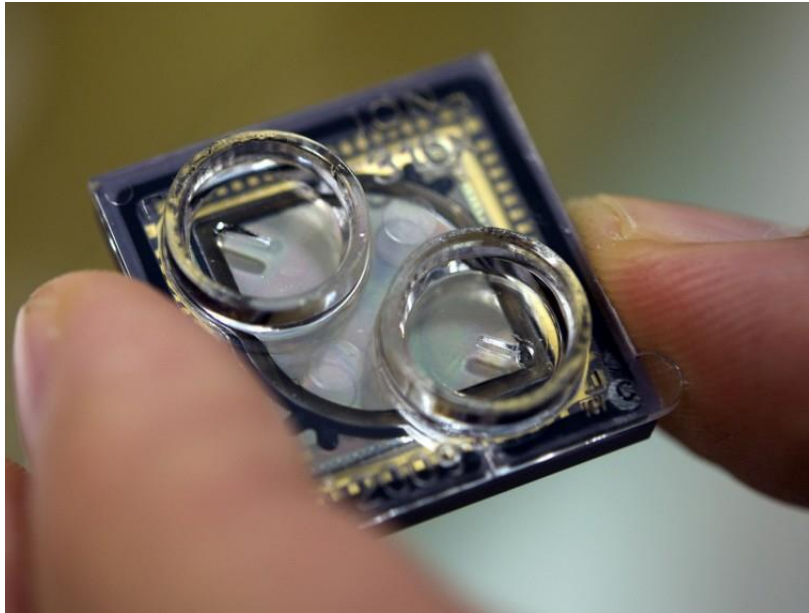
Sekwencjonowanie w technologii Ion Torrent (ThermoScientific/LifeTechnologies)

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



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

Ion-Torrent sequencing microprocessor



Ion Torrent sequencers



PGM



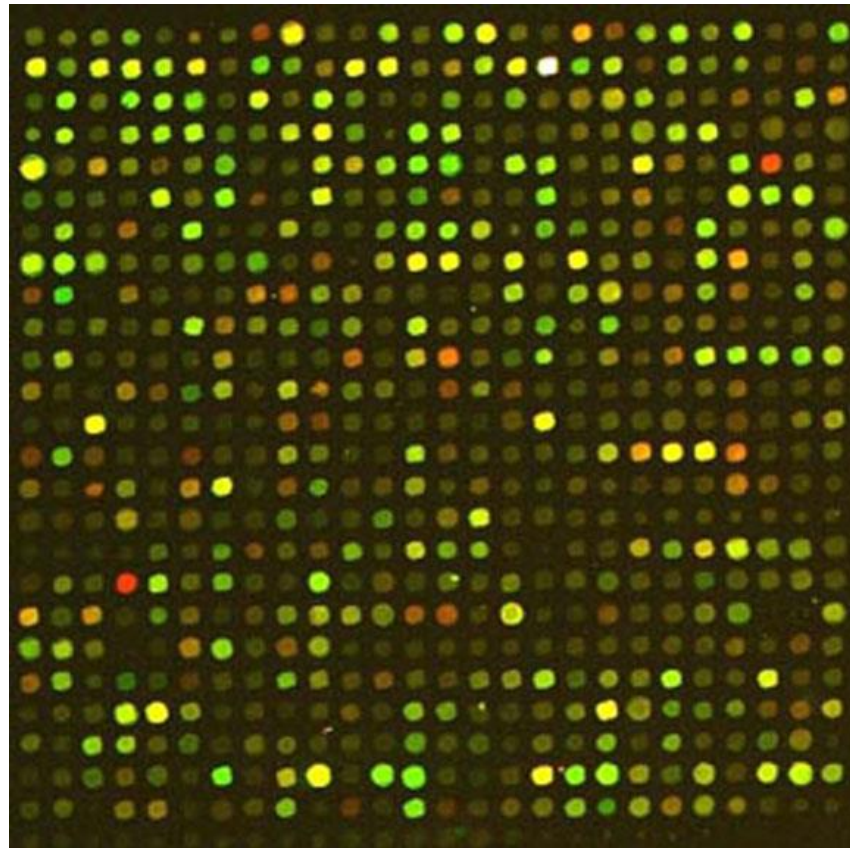
Proton



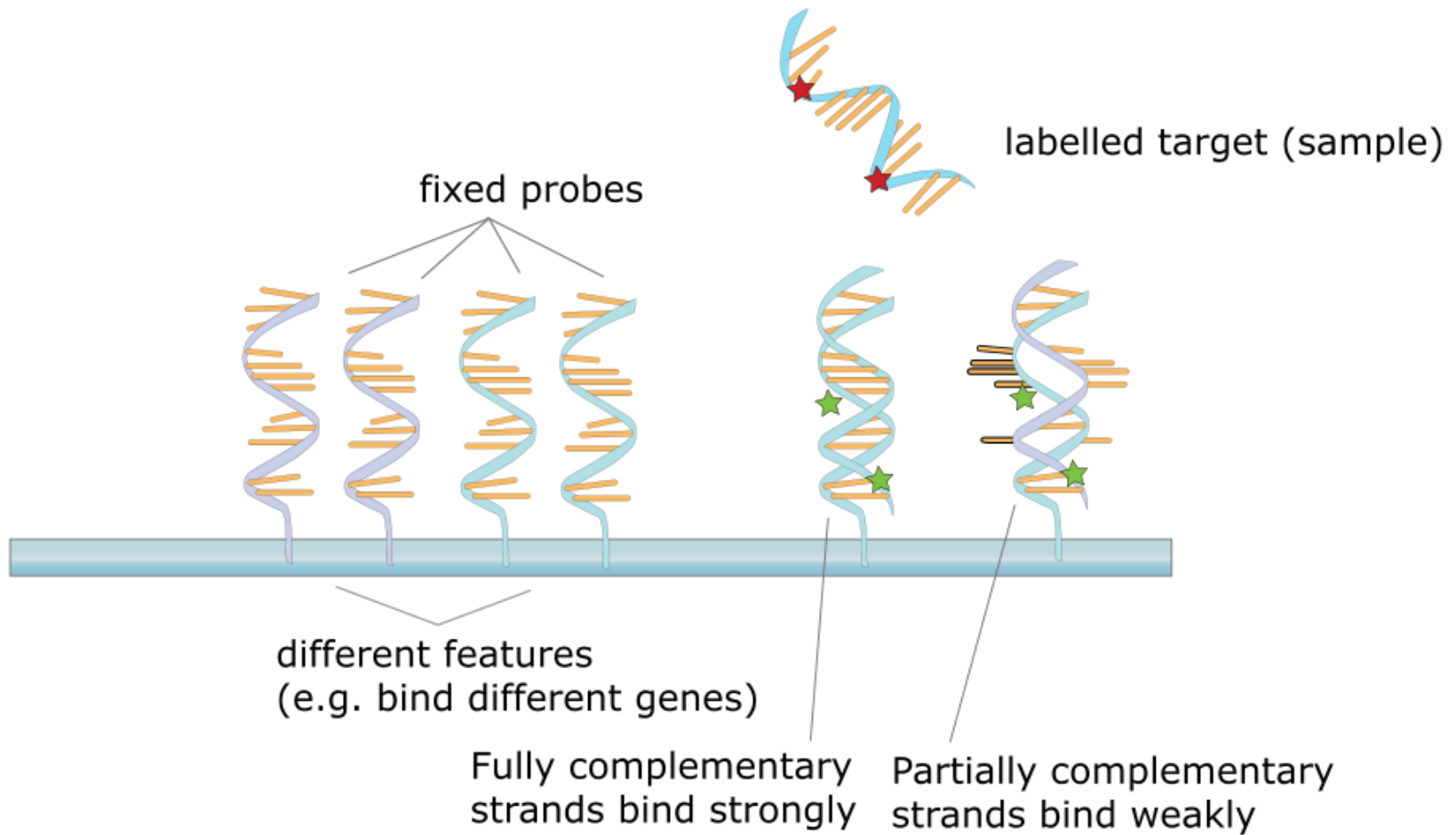
Ion S5

Mikromaczierze

(„chip” not „ChIP”)



Podstawa techniki - hybrydyzacja



Za: Wikipedia

Historia

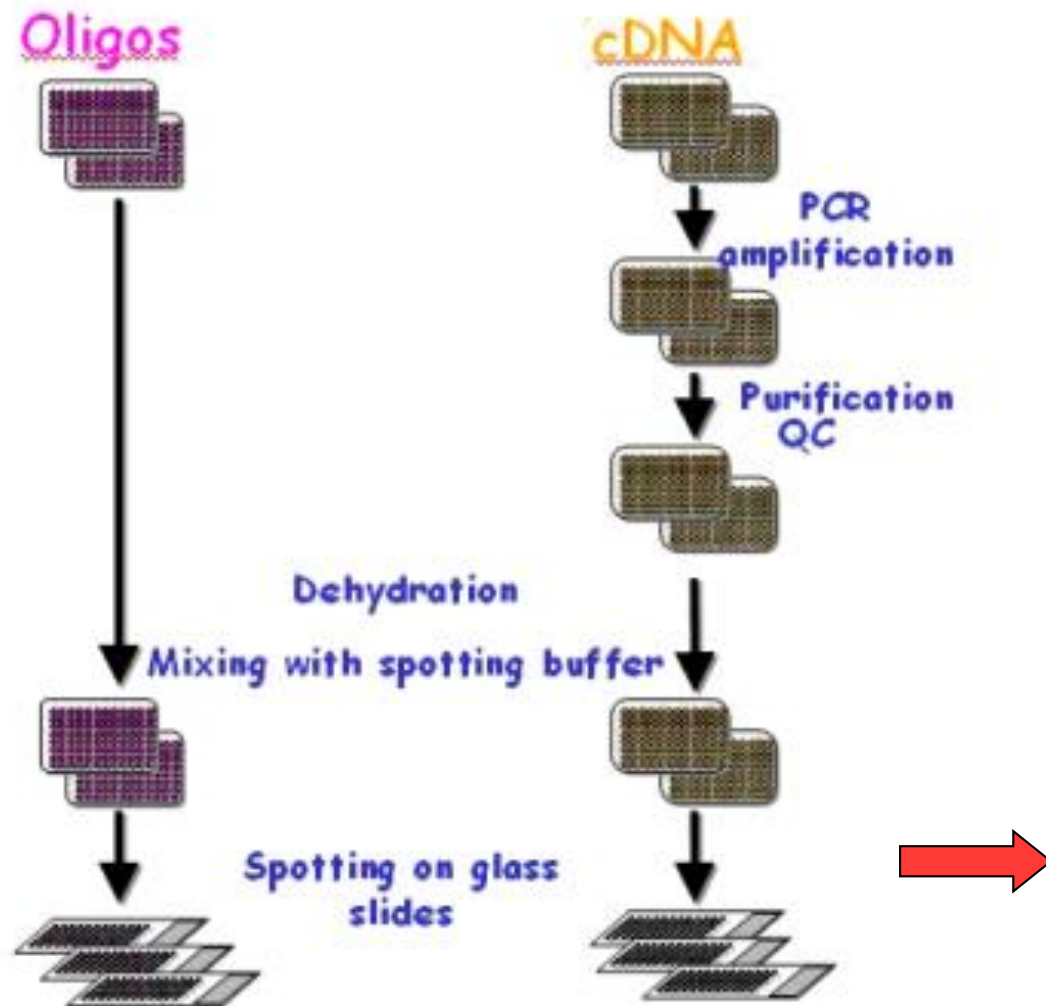
- **Lata 80-te XX w. – wczesne próby z nanoszeniem DNA na filtry (rozwijanie techniki Southerna)**
- **1995: pierwszy nowoczesny, skomputeryzowany, wysokorozdzielczy „chip” z zastosowaniem skanowania laserowego**
(Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO, "Quantitative monitoring of gene expression patterns 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

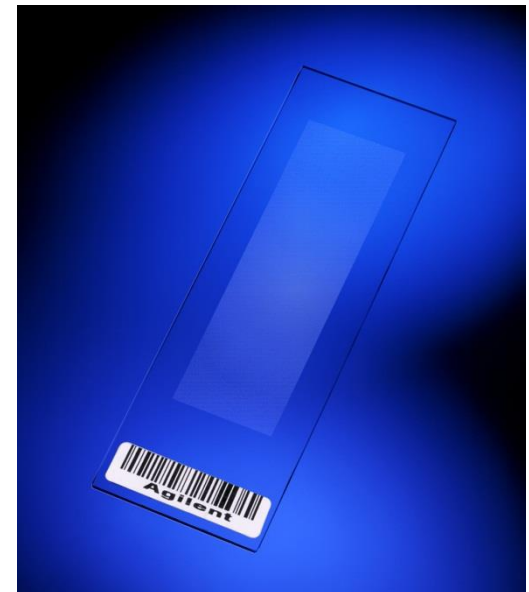
(ang. „DNA Microarrays”, „DNA-chip”)

- 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”)

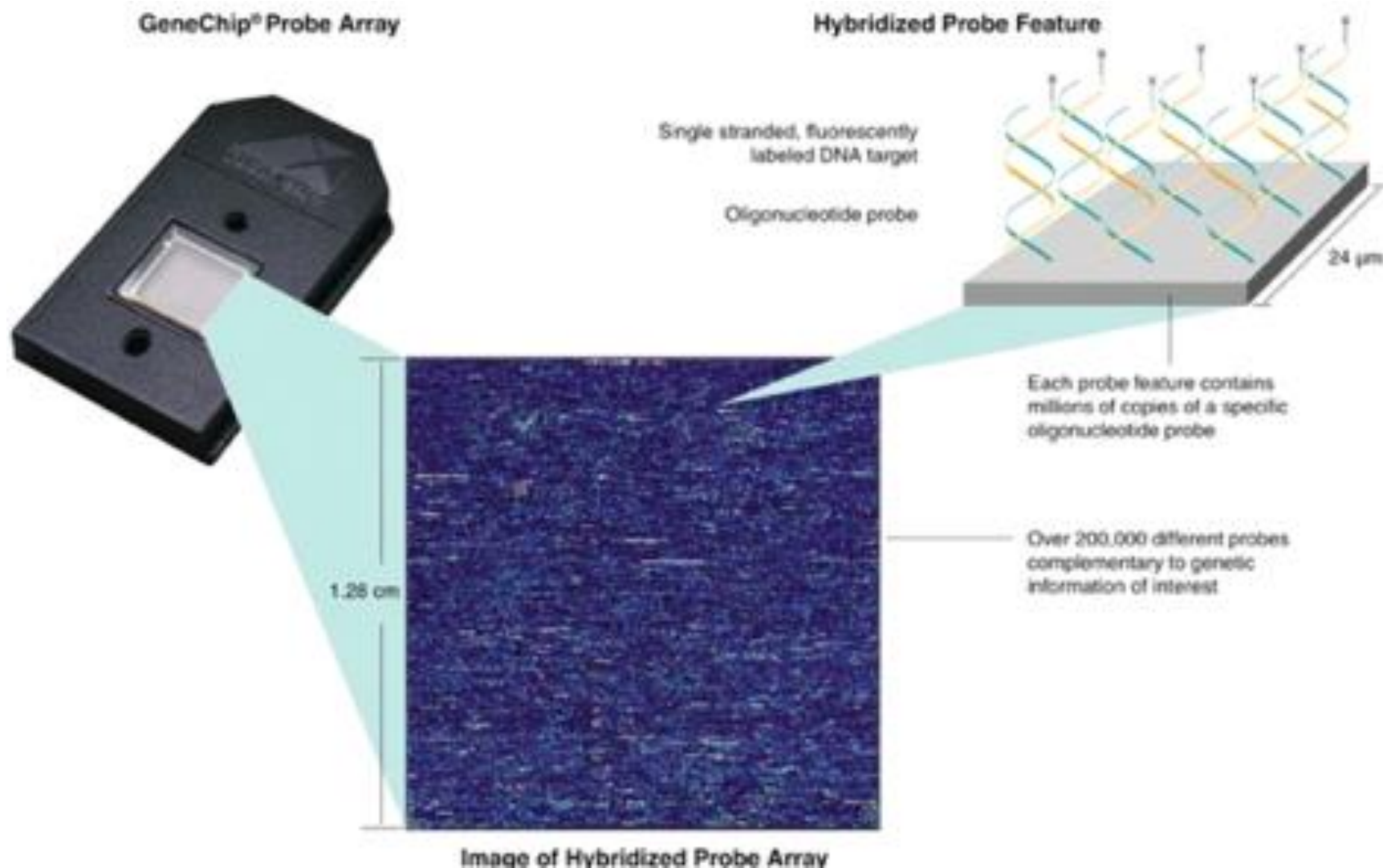
Przygotowanie mikromacierzy



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



Przygotowanie mikromacierzy Affymetrix



Znakowanie prób

1. Bezpośrednio

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

2. Pośrednio

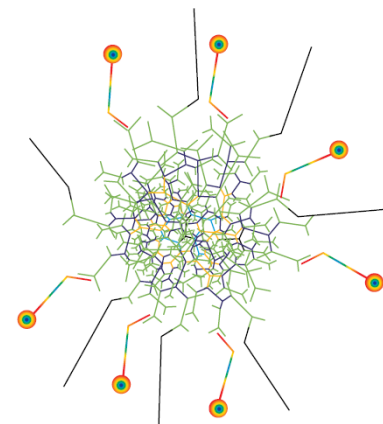
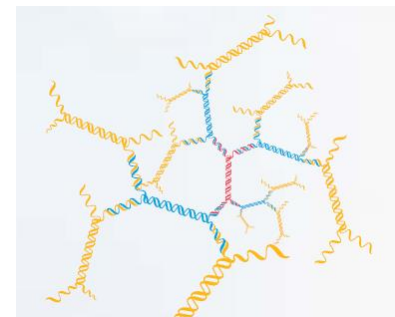
- inkorporacja modyfikowanych dNTP (amino-allyl dGTP) podczas syntezy cDNA;
- przyłączenie barwnika fluorescencyjnego (Cy3, Cy5)

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

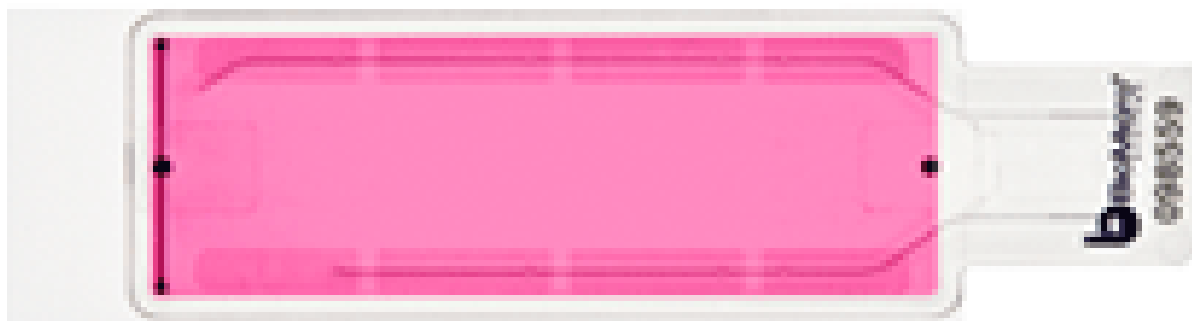
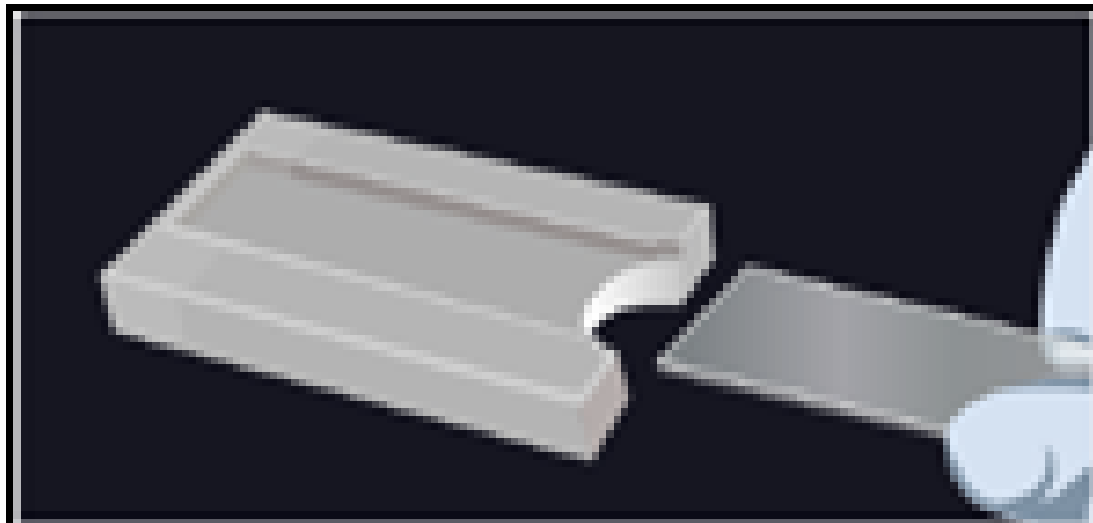


Doświadczenia wymagające technicznie

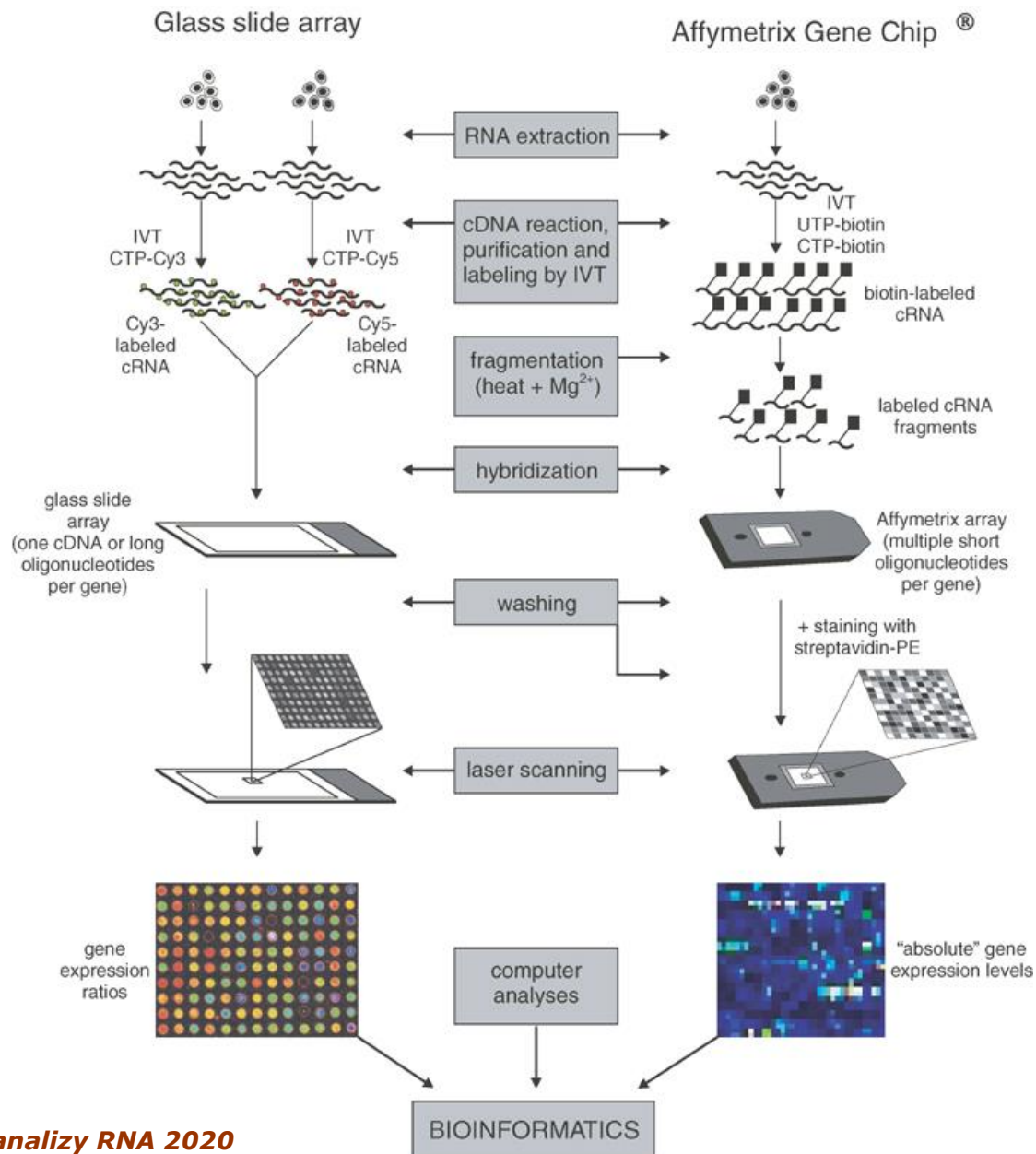
Bardzo istotne:

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

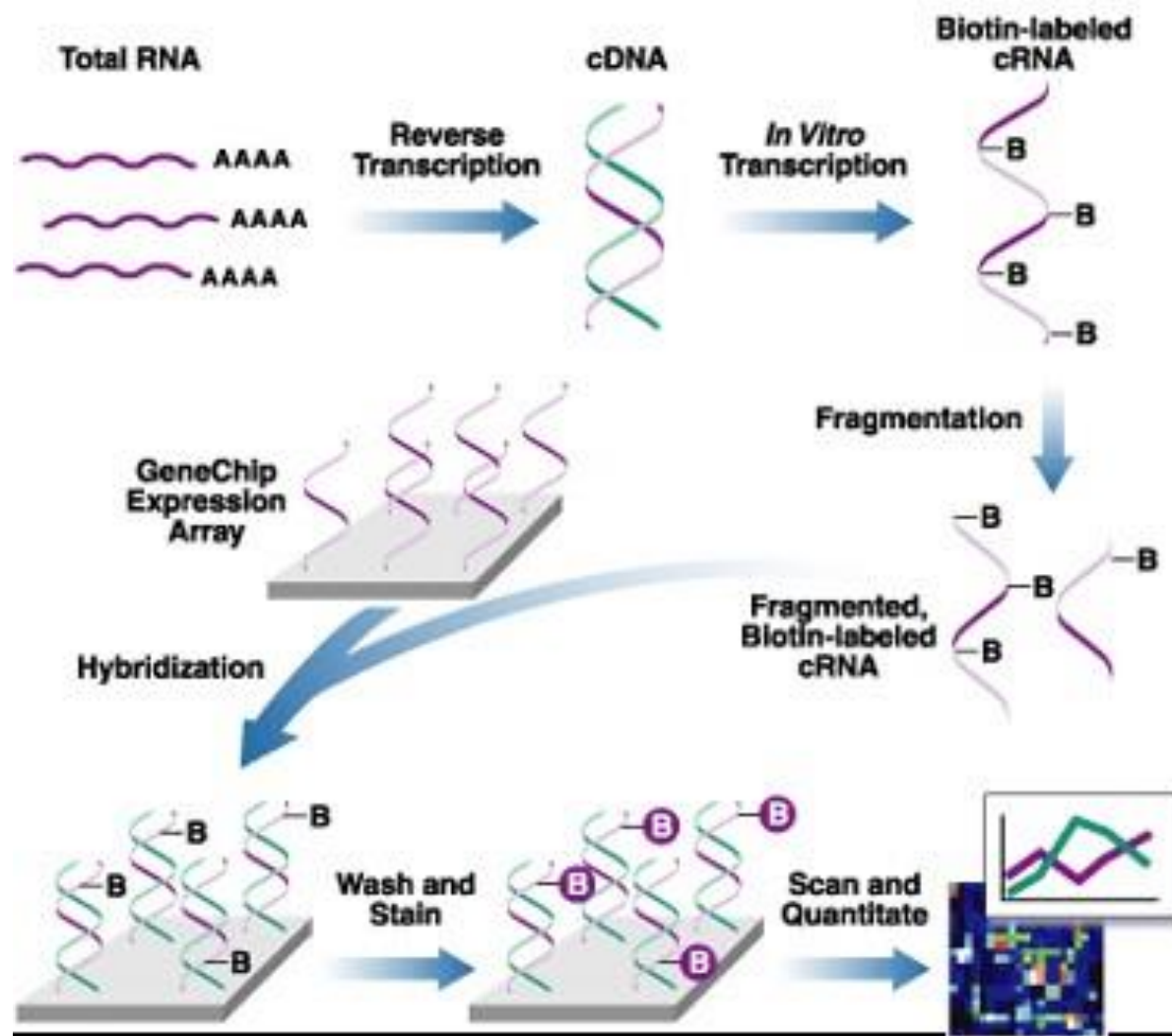
MAUI MIXER (Agilent)



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)**

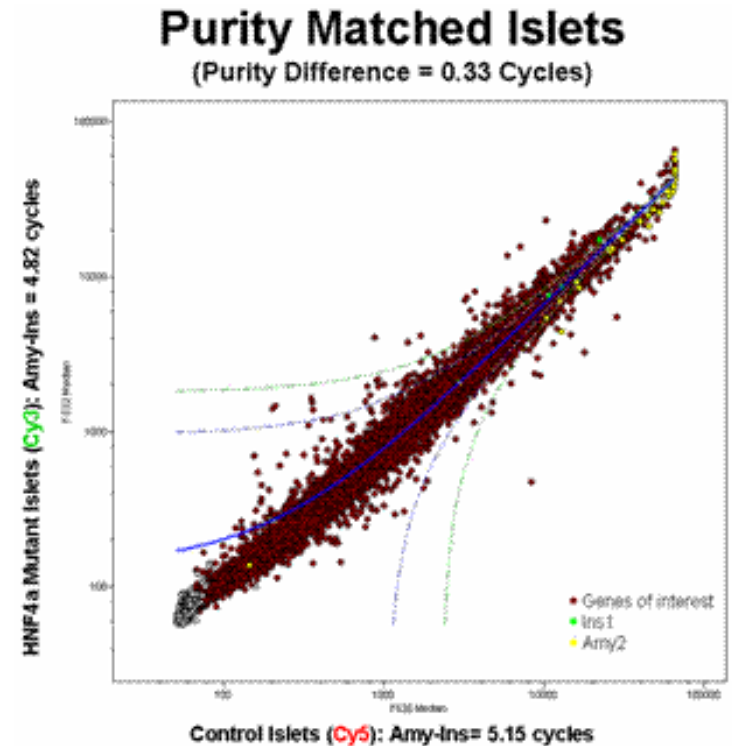
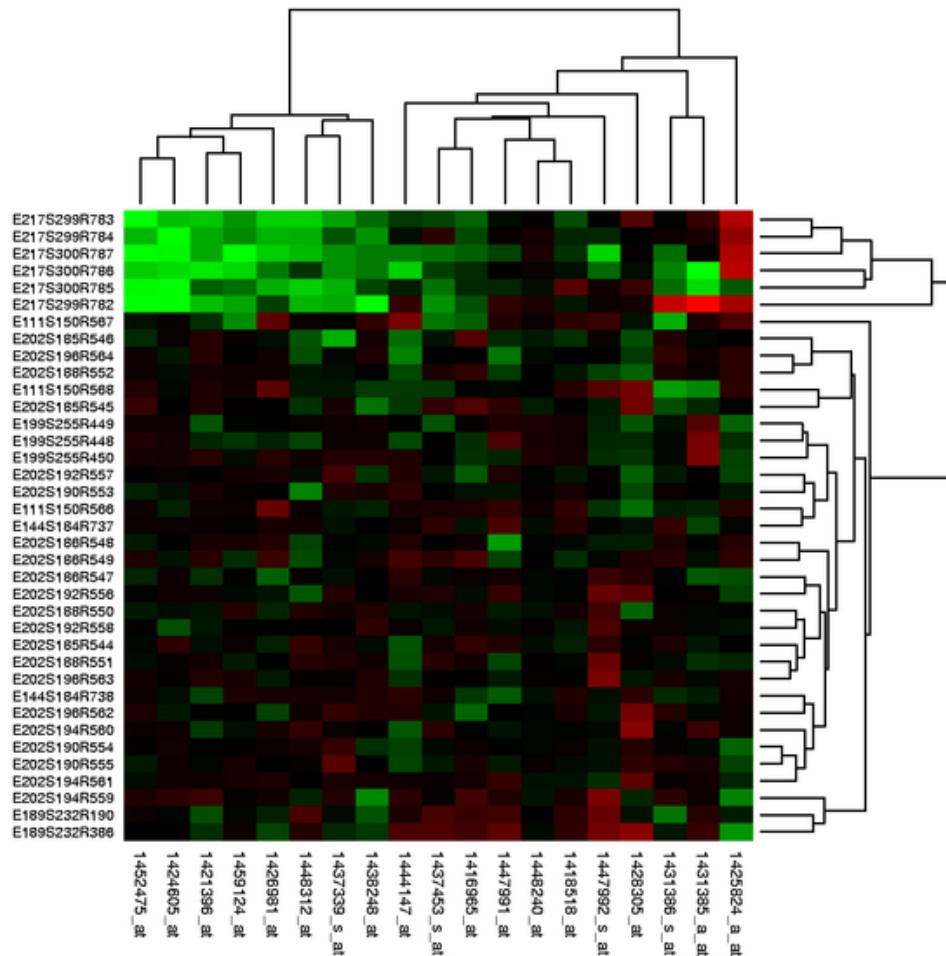


TECAN PowerScanner



Skaner Axon GenePix

Analiza statystyczna danych



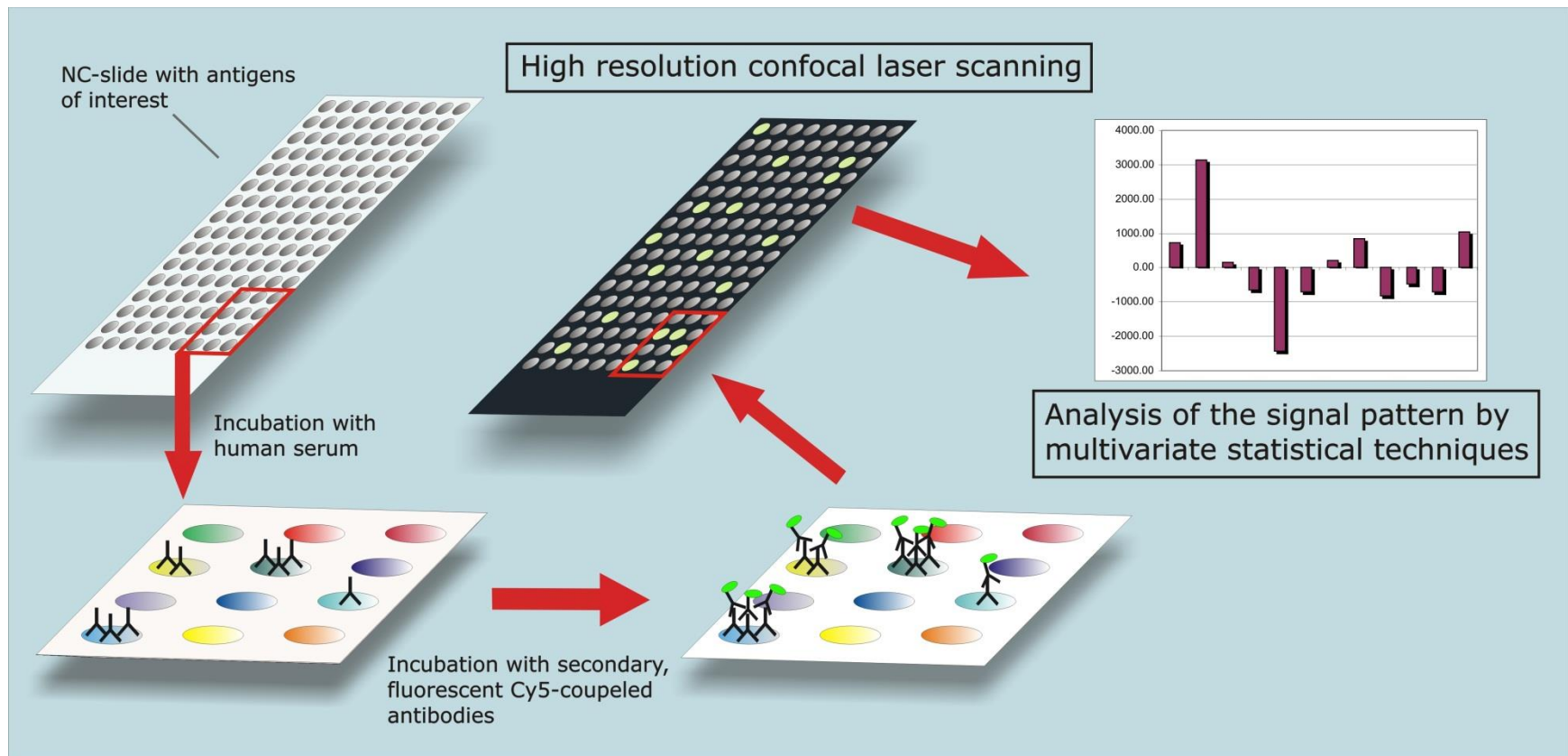
Zastosowania i warianty mikromacierzy DNA

- 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 wzbogacania 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:

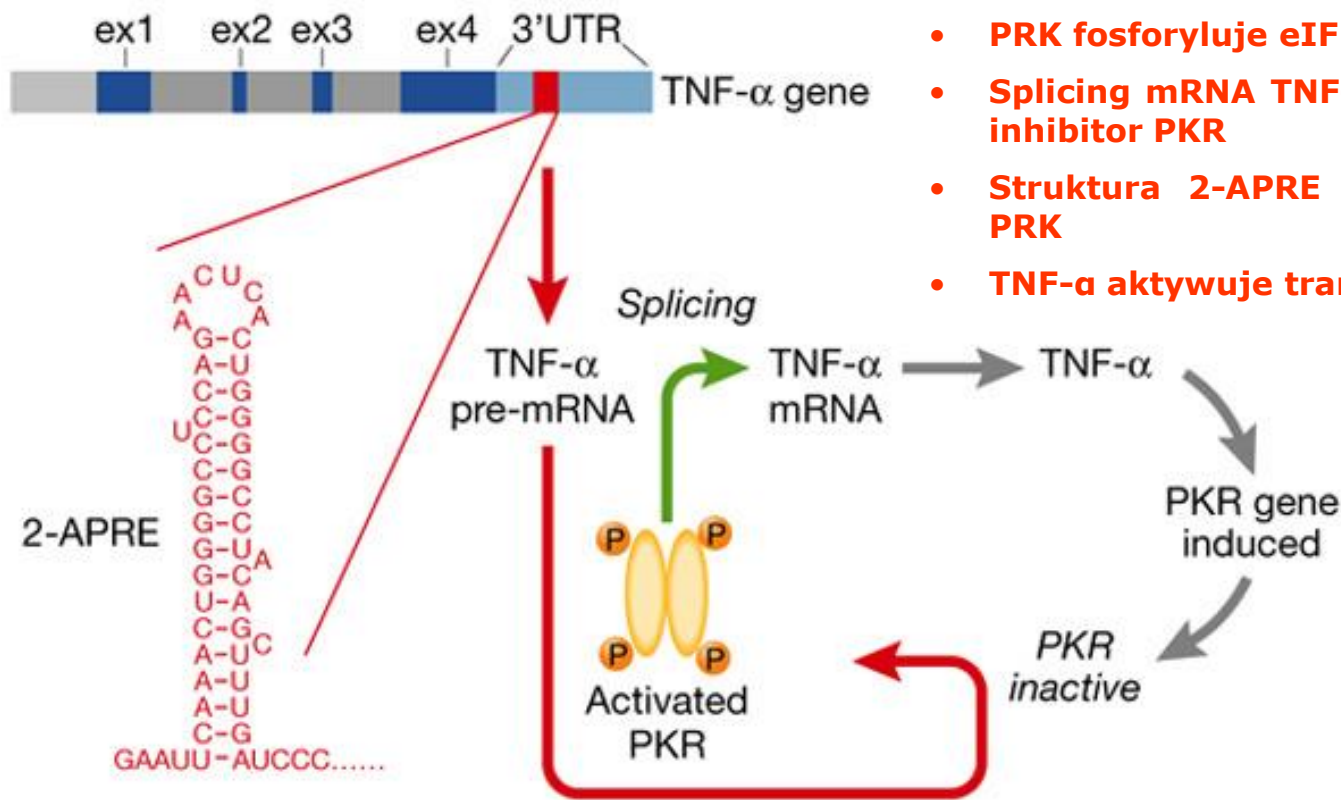
- Przeciwciała – „przepłukiwanie ekstraktem”
- Białka – „przepłukiwanie przeciwciałami”
- Badanie oddziaływań białka - białka



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

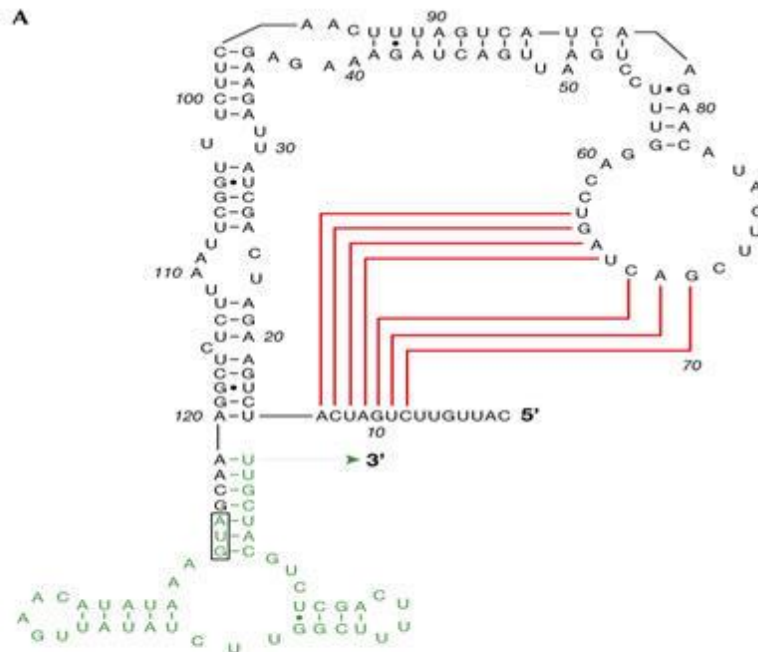
Przykłady ryboprzełączników u eukariontów

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 PRK**
- **Struktura 2-APRE w mRNA TNF- α aktywuje PRK**
- **TNF- α aktywuje transkrypcję genu PRK**

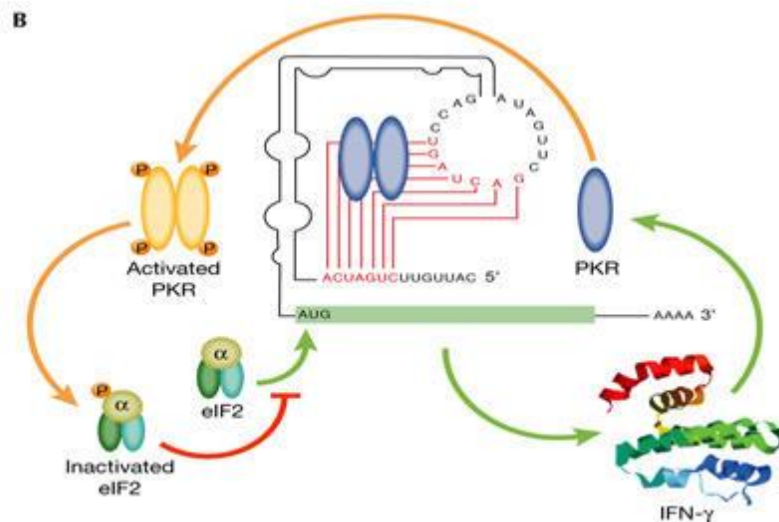
Negatywna pętla zwrotna w translacji mRNA IFN- γ



- **Pseudowęzeł typu H w 5'UTR mRNA IFN- γ aktywuje PRK**

- **PRK poprzez fosforylację eIF2 hamuje translację mRNA IFN- γ**

- **IFN- γ wzmacnia ekspresję PRK**



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