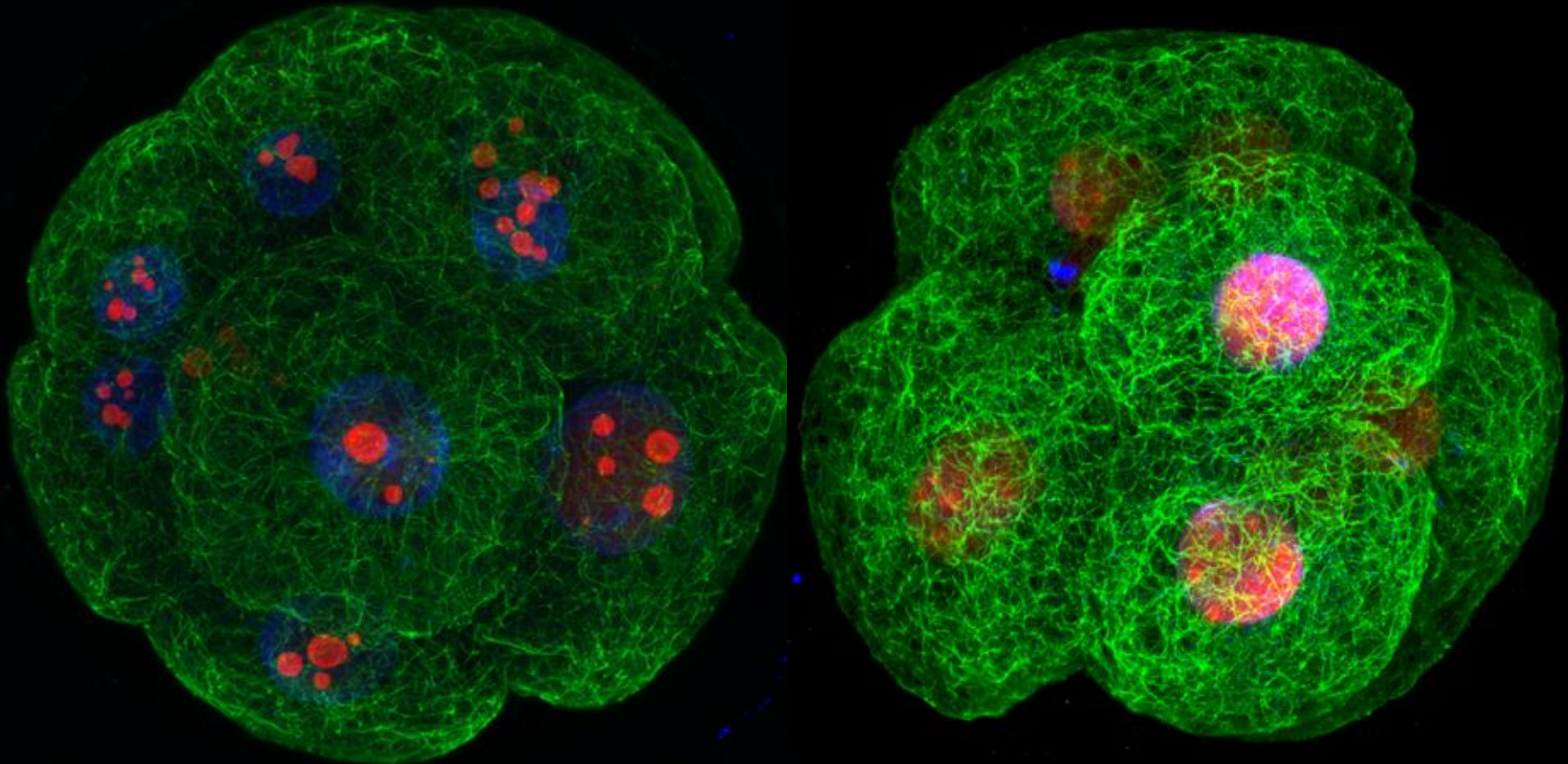


*Využití RNA interference v
reprodukční biologii savců*

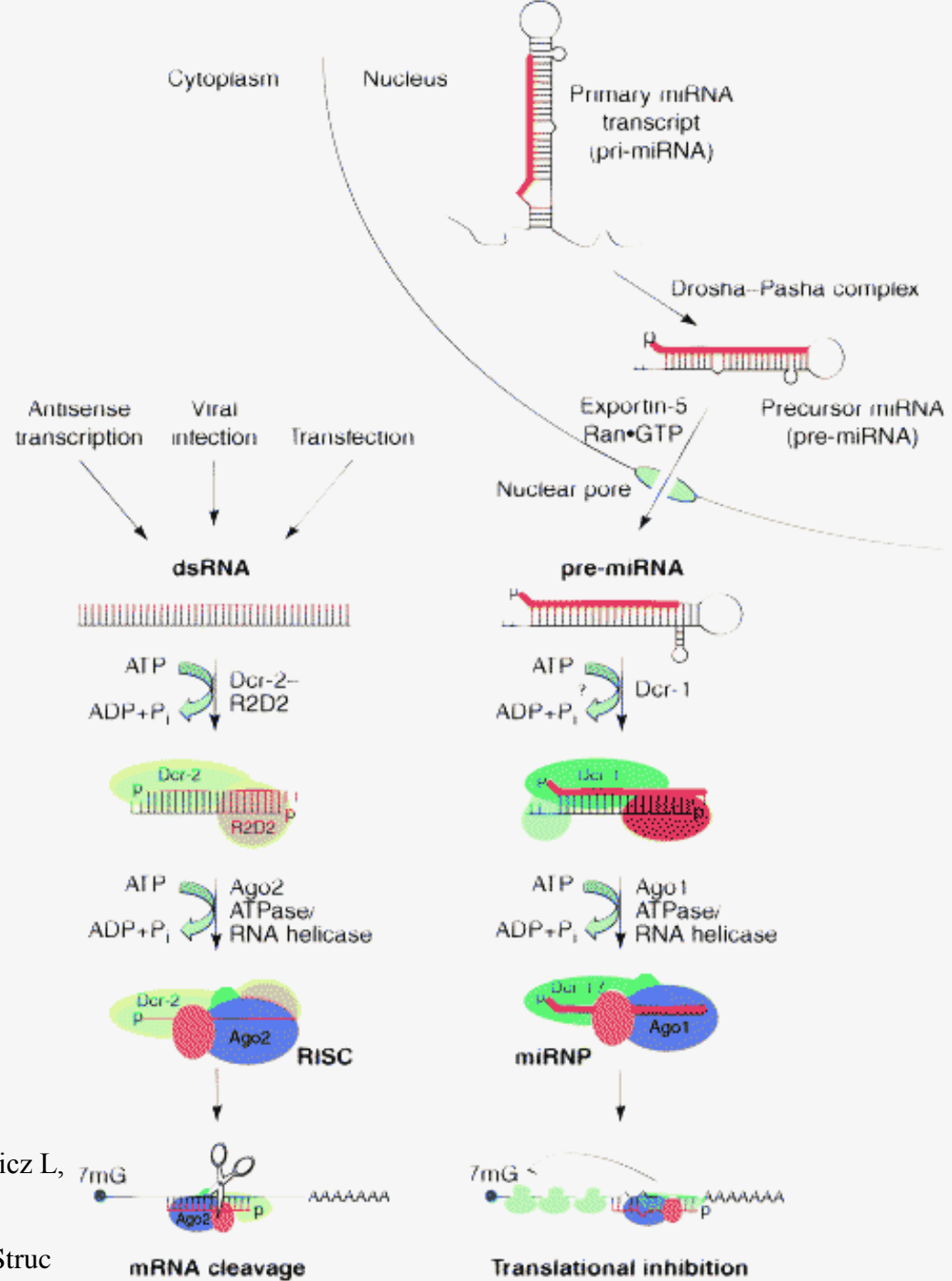


RNA interference

- **Post-transkripční** umlčení genové exprese
 - **dsRNA** (siRNA, miRNA, shRNA...)
- **Sekvenčně** specifické
- Pozorováno u všech skupin eukaryot
 - Konzervovaný mechanismus
 - Není u *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzii*, *S.cerevisiae* a některých dalších kvasinek
 - Podobné i u prokaryot, ale není homologní
- Přirozený mechanismus/experimentální metoda
 - Spouští endo- i exogenní nukl. kyselina

Přirozené uplatnění RNAi

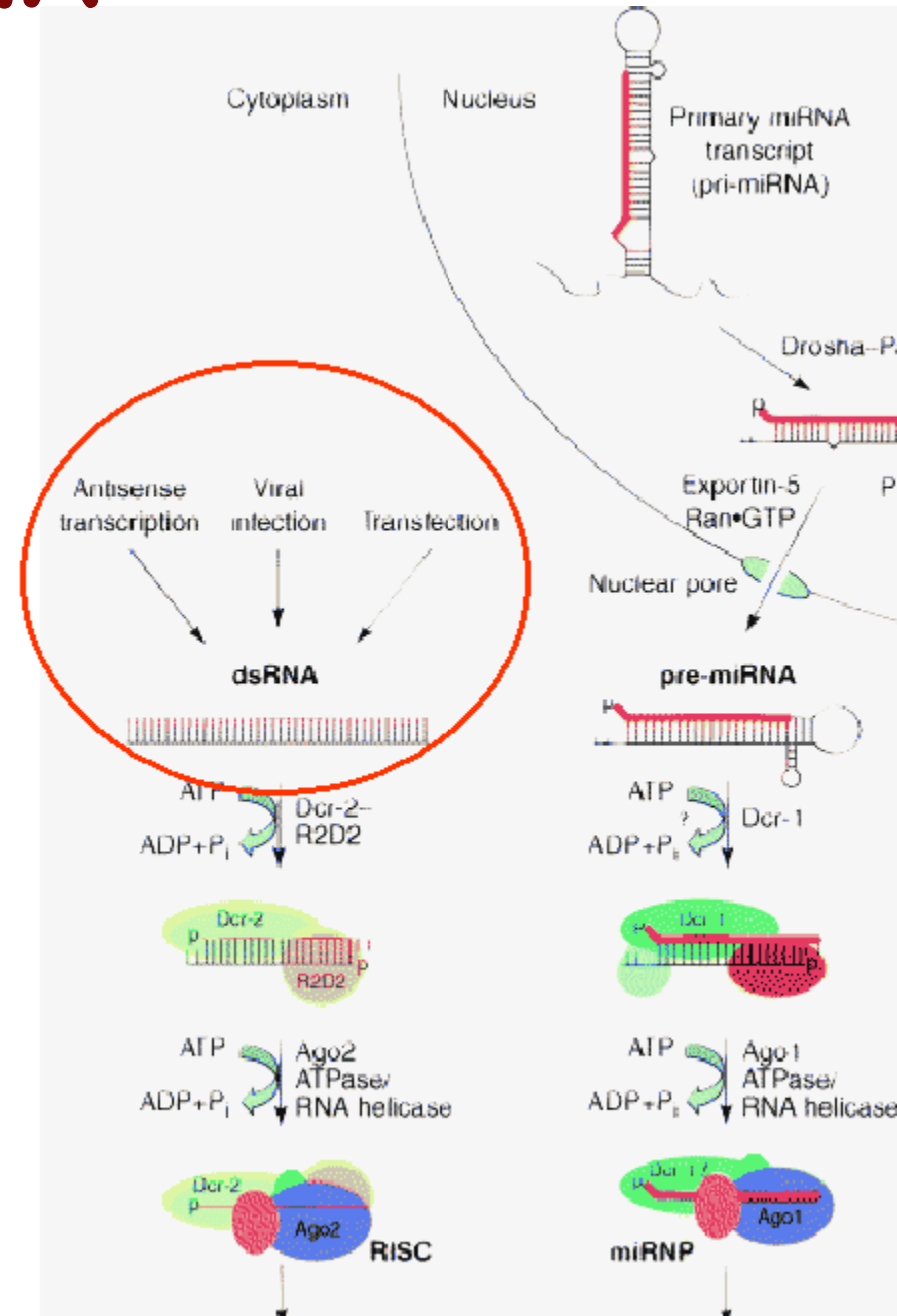
- Přirozený mechanismus imunity - likvidace endogenních parazitů
 - Antivirová obrana u eukaryot, pravděpodobně s výjimkou savců
- Ontogenetický vývoj, proliferace, apoptóza
- Nobelova cena za Fyziologii a lékařství - 2006
Andrew Z. Fire a Craig C. Mello (popsání RNAi u *C. elegans*, 1998)



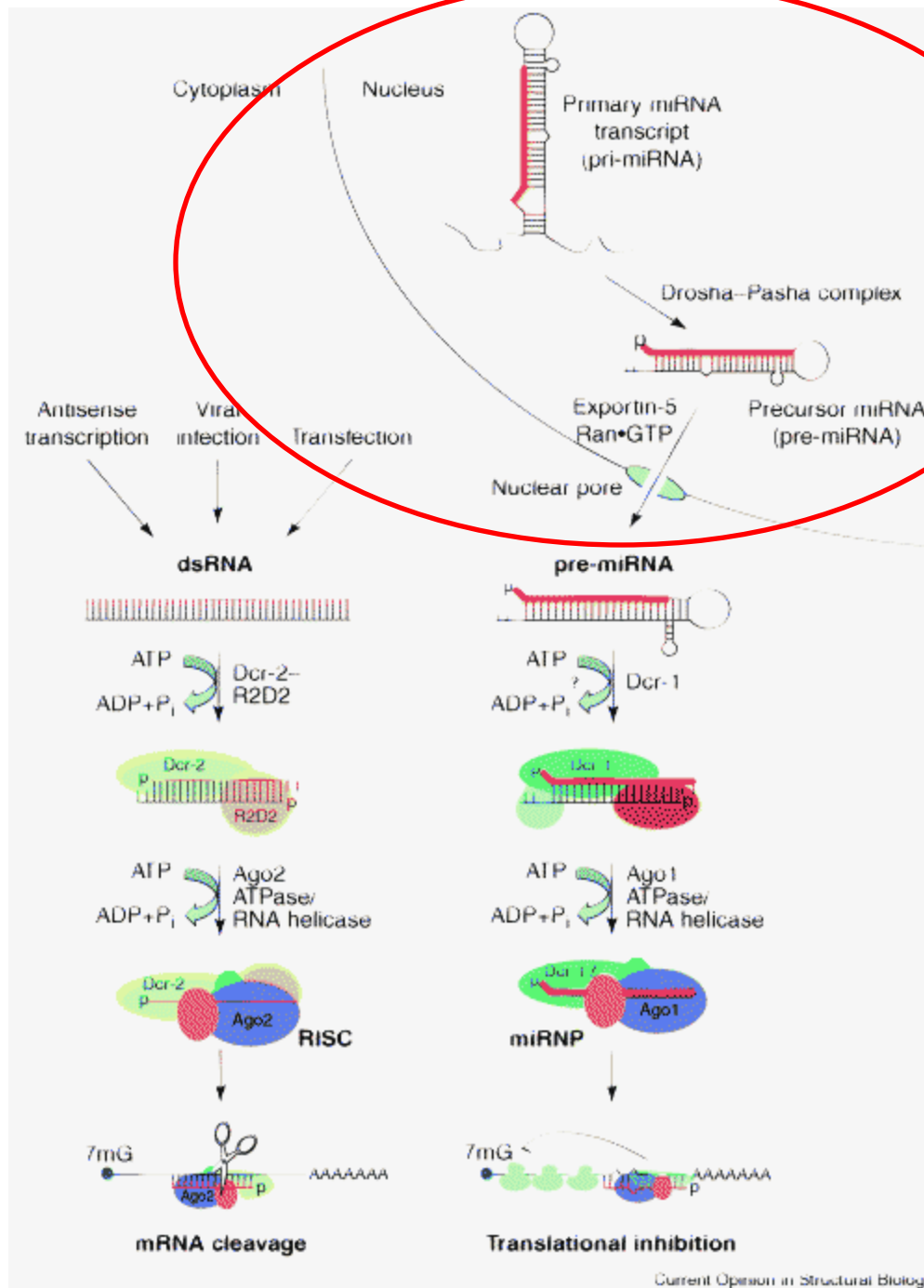
Převzato z: Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. 2005 Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15:331-341

siRNA

- ~ 21nt
- 2nt 3' přesahy
- V cytoplasmě
- Experimentální využití

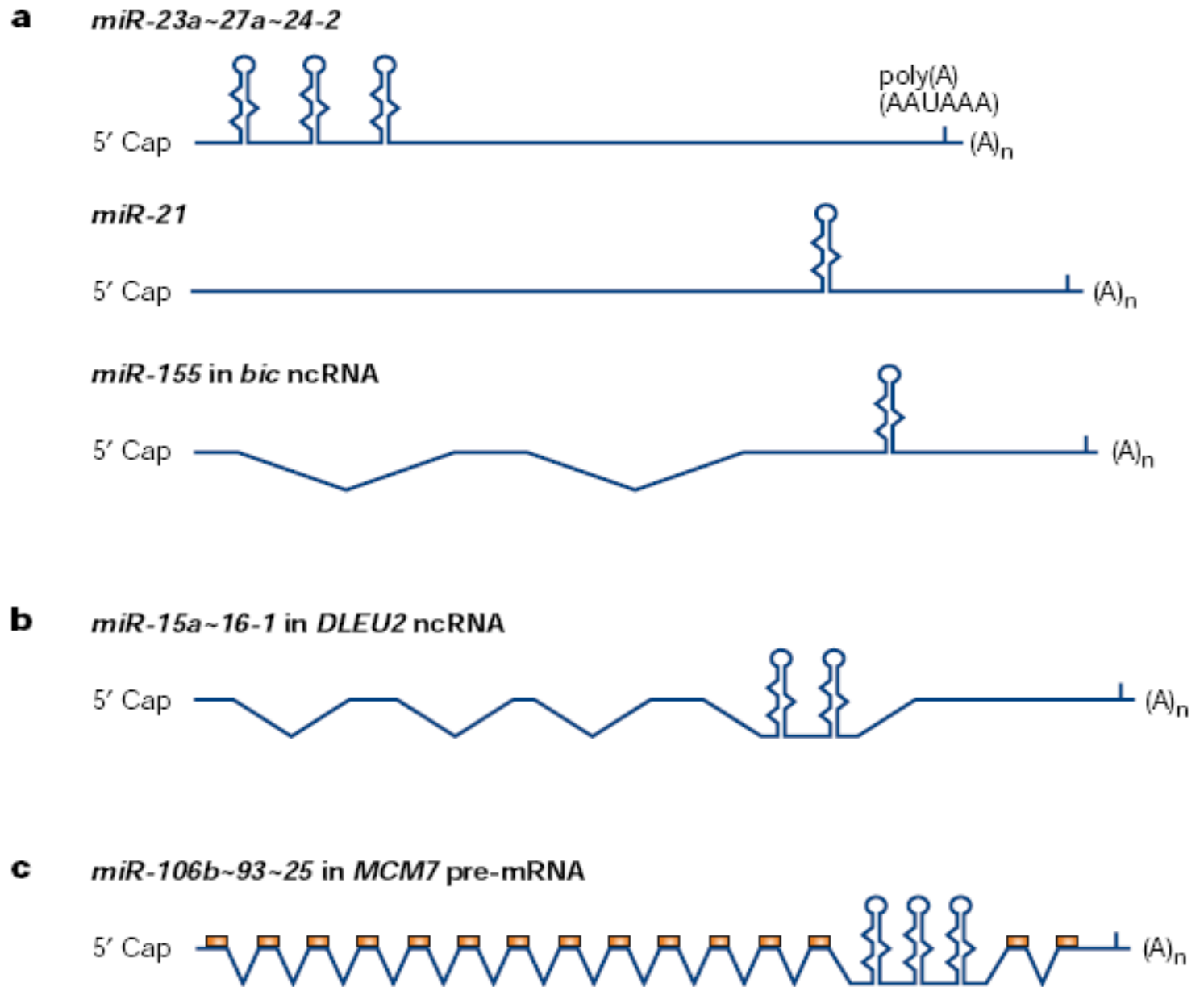


miRNA



miRNA

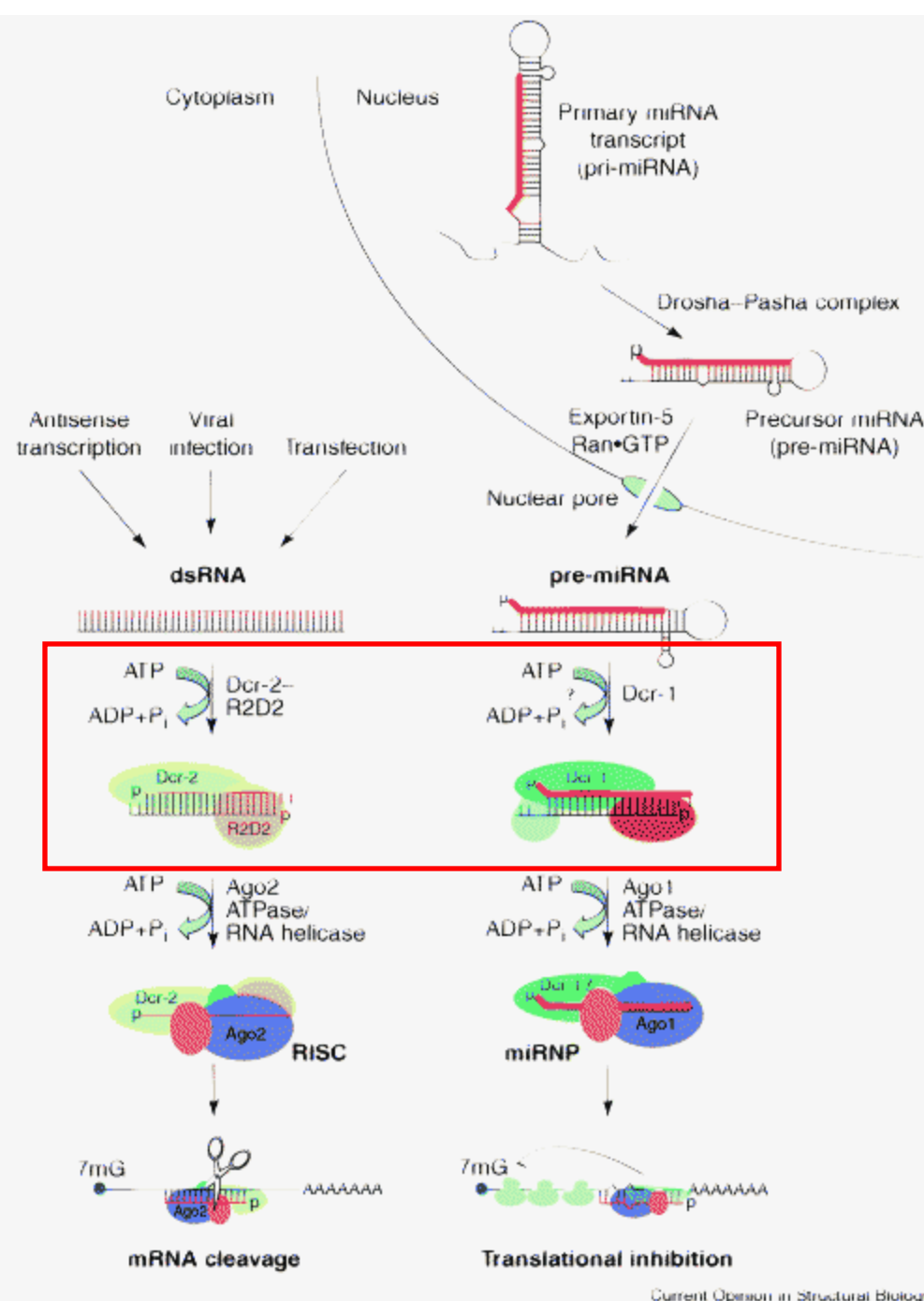
- Role ve vývoji, diferenciaci, proliferaci, apoptóze → endogenní (ovlivňují až 60% genů)
- Funkce potlačena v oocytech a preimpl. embryích
 - ale i tak nezbytné (např. miR-34 rodina)
- Sledovány u mnoha chorob (např. leukémie); onkogeny
- Transkribovány RNA polymerázou II
- Biogeneze
 - Původně ssRNA - vlásenkou „dsRNA“
 - v jádře; prekurzor primární microRNA (pri-miRNA)
 - Drosha + Pasha (DGCR8) → na pre-miRNA (~70 nt; hairpin loop; 3' 2 nt přesah)
 - Opouští jádro pomocí exportinu 5 a Ran-GTP



- Převzato z Kim VN, 2005 MicroRNA BIOGENESIS:COORDINATED CROPPING AND DICING. Mol Cel Biol 6:376-385

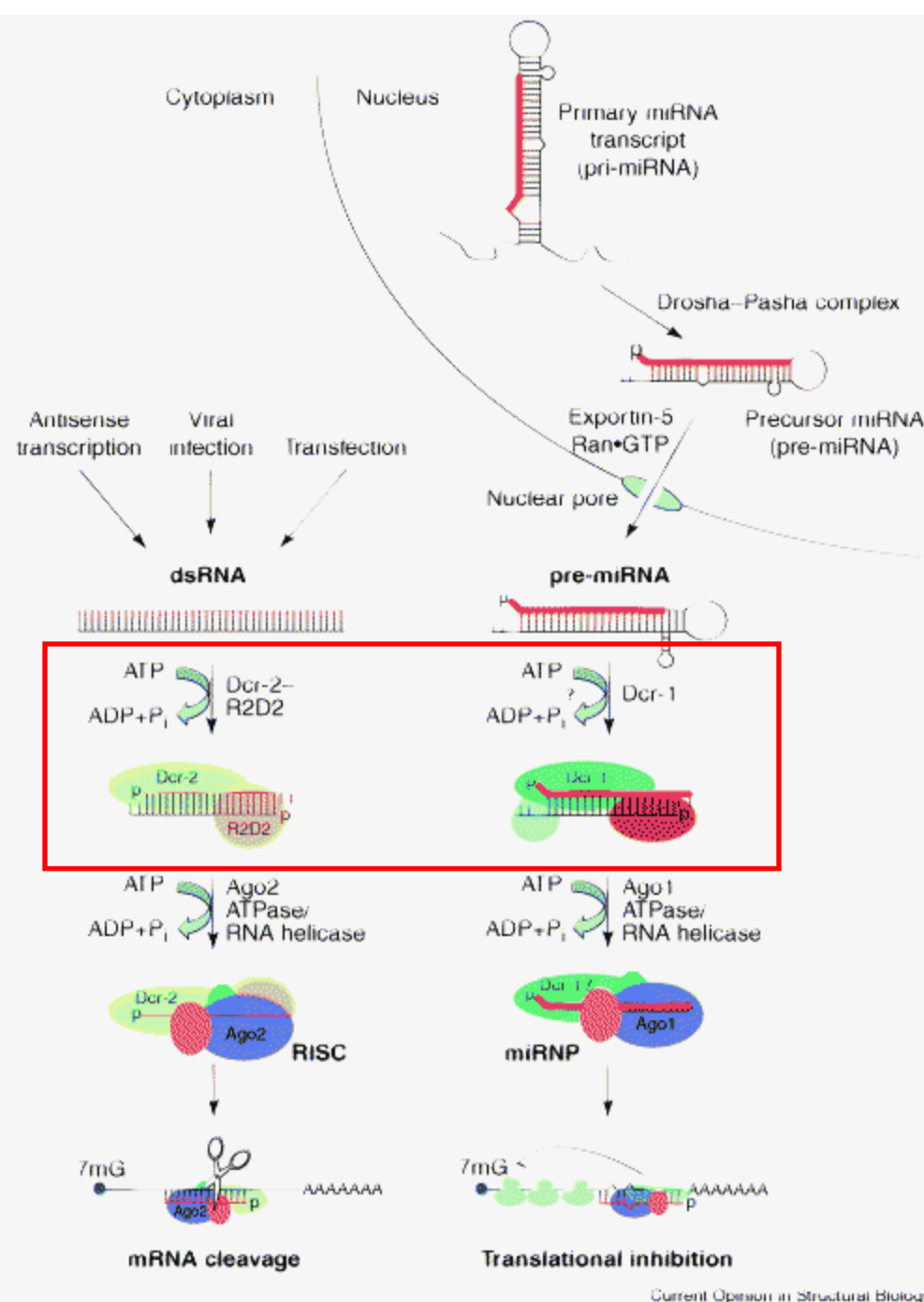
RNAi dráha

- Zahájena enzymem **Dicer** (RNáza III)
 - Štěpí dlouhou **dsRNA** na **~21nt** úseky
- Jeden z řetězců (**guide strand**) je začleněn do **RISC** (RNA-induced silencing complex)
 - Navádí ke štěpení komplementární mRNA



DICER

- V cytoplasmě
- ATPázová/RNA-helikázová doména
- **PAZ doména** (rozpoznává přesahy pre-miRNA)
- dsRNA binding domain
- 2 RNázové domény
 - štěpí 22nt od 3' konce
 - 3' 2 nt přesah
 - Vznik siRNA a miRNA



- siRNA

- guide strand/passenger strand
- Guide strand - menší stabilita pár. bází
5' konec

- Guide strand

- vázán Dicer_{em}
- zainkorporován do RISCu

- Passenger strand

- Vázán TRBP (transactivating response RNA binding domain)
- degradován

RISC

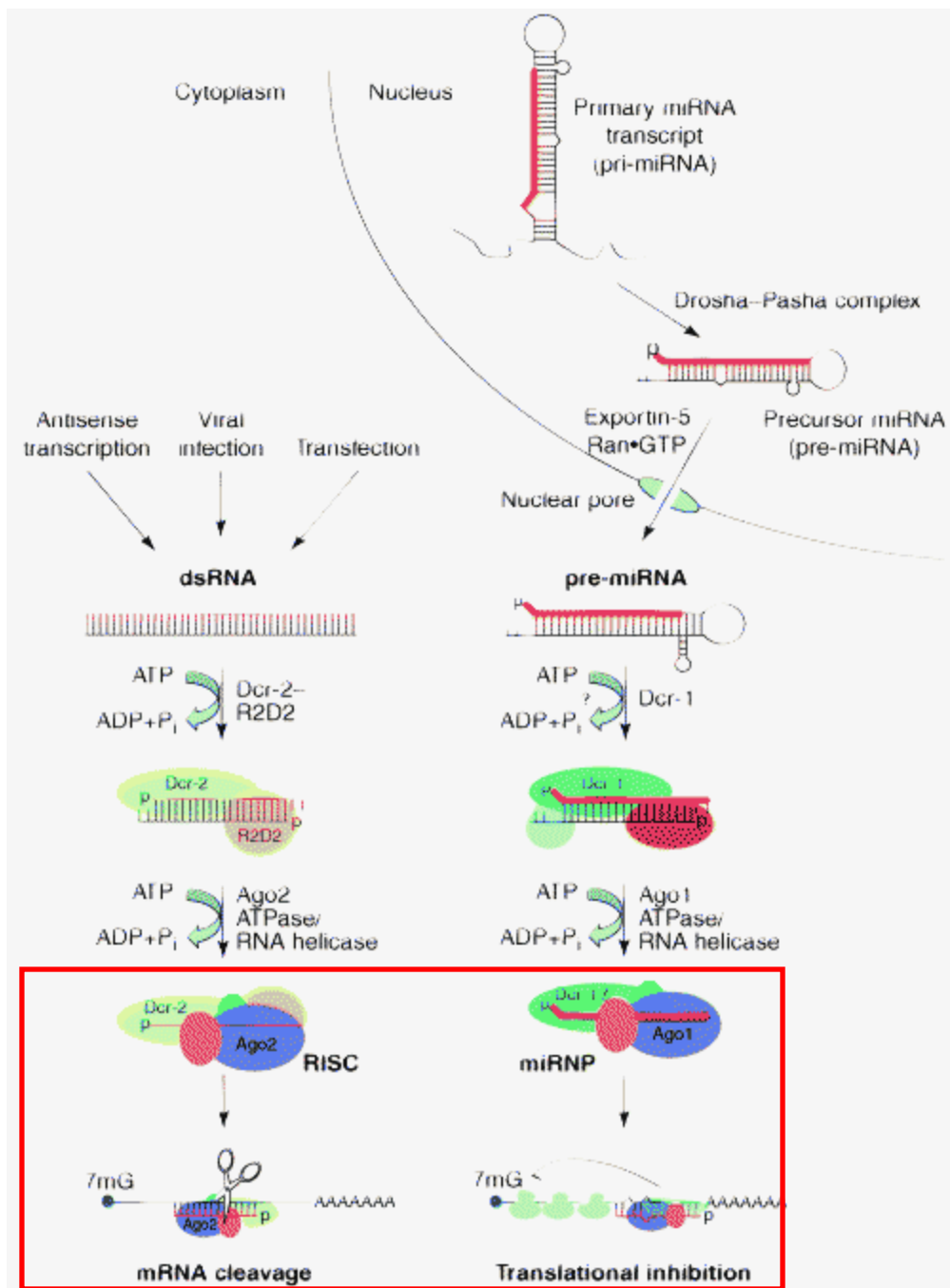
- Argonaute proteiny (Ago)
 - PAZ doména (jako u Dicer)
 - Střední doména (interakce s bazí a fosfátem na 5' konci si/miRNA)
 - PIWI doména (RNaseH-like) - odpovídá za štěpení mRNA
- Ago + guide strand (+ TRBP + Dicer) → RISC
- Argonaute proteiny - katalytická komponenta RISCu
 - nachází se v P-bodies (RISC komplexy cíleny do P-bodies; poškození P-bodies snižuje účinnost RNAi)

• siRNA

- zcela komplementární k cílové mRNA
- v RISCu je Ago2
- štěpí mRNA mezi 10.-11. nt od 5' konce guide strandu
- mRNA jsou dále štěpeny exonukleázami

• miRNA

- váže se na 3' UTR
- ne zcela komplementární (důl. 5' komplementarita; seed region)
 - U rostlin větš. zcela komplementární, indukuje degrad. mRNA
- váže enzymaticky neaktivní Ago
 - Inhibice translace/indukce deadenylace → většinou ne štěpení mRNA



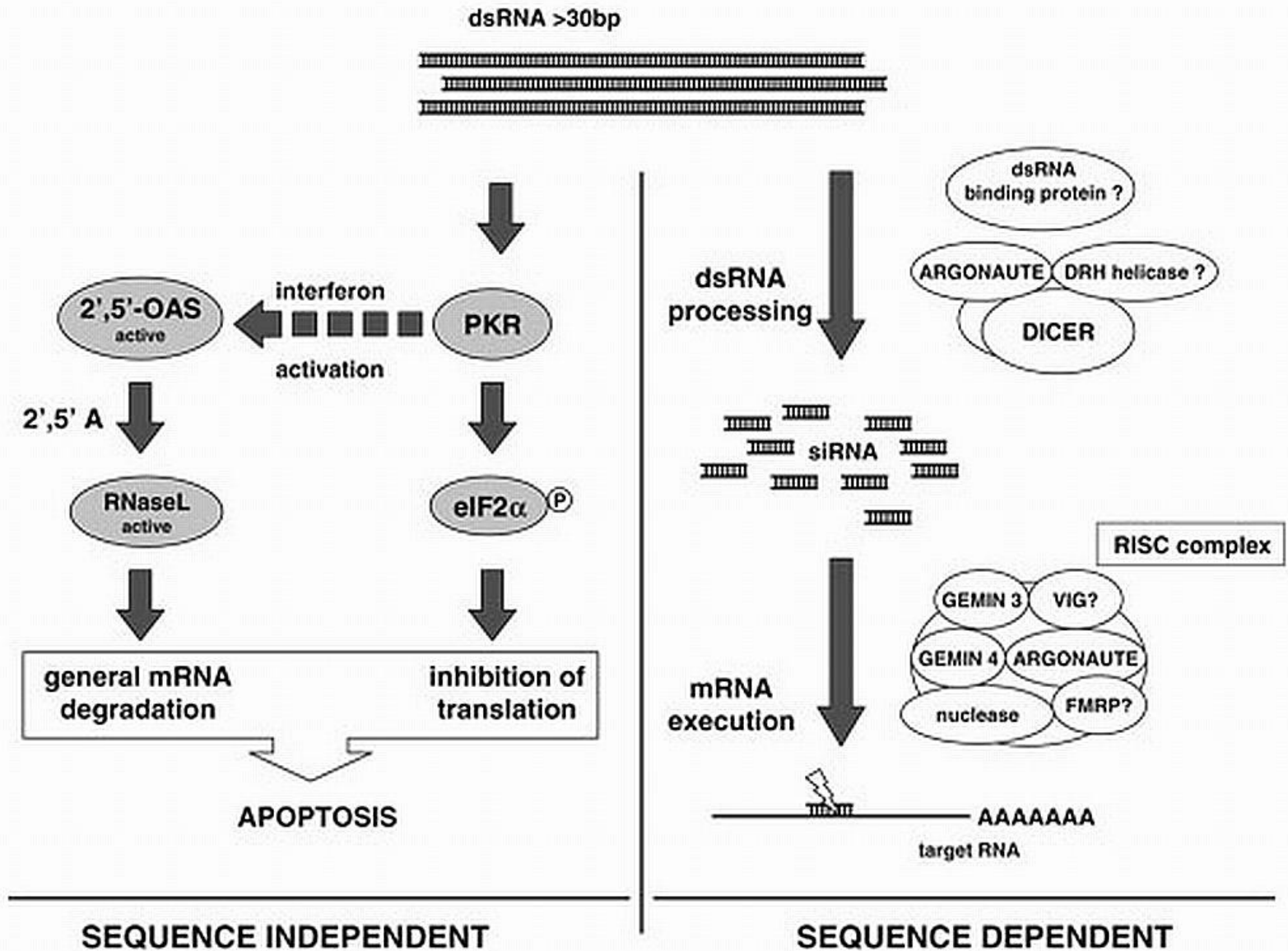
Využití

- Charakterizace funkce určitého genu → umožňuje umlčet gen i pokud není proveditelný knock-out
- Léčba rakoviny, hepatitidy typu B, HIV/AIDS... (spíše budoucnost)
- Zejména siRNA/shRNA
 - Dlouhá dsRNA
 - Savci - interferonová odpověď (ale pravděpodobně ji spouští i vyšší koncentrace si/shRNA)

Interferonová odpověď

- Viry - dsRNA hraje roli při antivirové odpovědi
 - U savců: **interferonová odpověď**
 - znemožňuje využití dlouhé dsRNA v savčích buňkách
- Lze sledovat transkripční aktivaci asociovaných genů (např. *Oas1*, *Pkr*, *Ifit1*, *NFκB1*...)
- Není u oocytů a preimplantačních embryí

Převzato z Svoboda P. 2004 Long dsRNA and silent genes stike back: RNAi in mouse oocytes and early embryos. Cytogenet. Genome Res. 105: 422-34.



RNA editing

- Adenosine deaminases acting on RNA (**ADARs**)
 - V dsRNA přeměňují adenosin na inosin
- Míra editace ovlivní osud mRNA

RNAi dráha v oocytech a preimplantačních embryích

- Oocyty a preimplantační embrya nemají vyvinutou IFN dráhu
- Oocyty pravděpodobně speciálně uzpůsobeny pro využití dsRNA v RNAi dráze
 - dsRNA lépe zpracována, lepší odpověď

Dlouhá dsRNA

- Větší specifita, vyšší funkčnost
- Více zatěžuje RNAi aparát buňky
- Použitelné jen u některých modelů

siRNA

- Častěji nefunkční (nutné používat 3-4 typy)
- Méně zatěžuje aparát buňky

→ Je možné nasyntetizovat dsRNA a tu in vitro sestříhat na siRNA

Pravidla pro siRNA design

- 30-60% GC párů
- v antisense řetězci alespoň 5 A/U na 5' konci
- v target sekvenci ne shluk >4 T nebo A
- mimo sekundární struktury mRNA
- Ideálně 21 nt
- 3' dinukleotidový přesah, ideálně UU, ne G
- Existuje řada on-line programů pro design siRNA (Ambion, Dharmacon, Qiagen...)
- siRNA proti 2-4 sekvencím na různých místech mRNA
- Je možné nechat nasyntetizovat komerčně

Design dlouhé dsRNA

- Min. 200 bp (nejlépe 500-800) bp
- Nesmí obsahovat homologii s úsekem žádného jiného genu ani po rozštěpení na siRNA (jednotlivé siRNA)
 - Není reálné projít „ručně“
 - dscheck.rnai.jp/
 - e-rnai.dkfz.de



dsCheck

– sensitive off-target search website for dsRNA-mediated RNAi [\[help\]](#)

[dsRNA Design page](#) / [dsRNA Verification page](#)

Enter an accession number and retrieve sequence

retrieve sequence

or Paste in a nucleotide sequence

```
>sample sequence (Drosophila pou2; NM_078834.2, CDS)
atgatggtgctacagcaacaacaacacagcgtctctgggatgcaacaacaacgagcaacacaaatacacaacacagcaat
```



Drosophila melanogaster

length: 100

design [\[help\]](#)

Drosophila melanogaster

Caenorhabditis elegans

Arabidopsis thaliana

Oryza sativa

Rattus norvegicus

powered by siDirectCore.

F., Ui-Tei,K., Saigo,K. and Morishita,S. (2005)

search software for dsRNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Res.* in press.

[dsRNA Design page](#) / [dsRNA Verification page](#)

Off-target minimized dsRNA sequence (400 nt) [\[help\]](#)

region	mis=0	mis=1	mis=2	sequence
5991 - 6390	0	1	3	<u>aaaaaqaatt aqqtcaaaq tatcaqaaqc tacaqaqaa attaaaaaq ttaqaaacaa ataaqqaqa</u> <u>ttctqccaaa acgattaqaa qattaqaaq aqaagtaaaq atacaaacaa atctqcttqa qactqcaaaq</u> <u>tctqatacaq atcaqctatc aqqcqaiaaa qatcaccttc tacaaaactt qcaaaqtta qaaaaqatq ccttqtctt</u> <u>caqqtqqaa qaagaaaaac tccaaaacca aqtqqcaqat ttqaaacaaq aqaaaaqqt ccttatqaa</u> <u>qaatctqaaa tqatqcaqaa taaactqaqt qcattqaaa ttqaaaattc aaaqctttcc aqatatttq acqcttqat</u> <u>aacaqaaaa cqtqaacttq ctqctaqa</u>

following genes that are highly similar to your query sequence are treated as target sequences.

off-target candidate sequences [\[help\]](#)

mis=0	mis=1	mis=2	name of off-target candidate sequence
1	3	2	gi 24656023 ref NM_139460.1 Drosophila melanogaster CG9004-PA (CG9004) mRNA, complete cds
0	2	9	gi 45549350 ref NM_132280.3 Drosophila melanogaster CG10648-PA (CG10648) mRNA, complete cds
0	2	8	gi 21357802 ref NM_143372.1 Drosophila melanogaster CG9995-PA (huntingtin) mRNA, complete cds
0	2	5	gi 24667485 ref NM_140966.1 Drosophila melanogaster CG5262-PA (CG5262) mRNA, complete cds
0	2	4	gi 24639336 ref NM_166937.1 Drosophila melanogaster CG2841-PA, isoform A (ptr) mRNA, complete cds
0	2	4	gi 45549273 ref NM_080220.2 Drosophila melanogaster CG4429-PA, isoform A (Rbp2) mRNA, complete cds
0	2	4	gi 24639338 ref NM_080022.2 Drosophila melanogaster CG2841-PB, isoform B (ptr) mRNA, complete cds
0	2	4	gi 24639339 ref NM_166938.1 Drosophila melanogaster CG2841-PC, isoform C (ptr) mRNA, complete cds
0	2	4	gi 45555735 ref NM_206764.1 Drosophila melanogaster CG4429-PC, isoform C (Rbp2) mRNA, complete cds
0	2	4	gi 45551472 ref NM_167522.2 Drosophila melanogaster CG4429-PB, isoform B (Rbp2) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 28574016 ref NM_134896.3 Drosophila melanogaster CG17219-PA (CG17219) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24582243 ref NM_135199.2 Drosophila melanogaster CG31637-PA (CG31637) mRNA, complete cds
0	2	2	gi 24664801 ref NM_140546.1 Drosophila melanogaster CG13445-PA (CG13445) mRNA, complete cds
0	1	8	gi 24653969 ref NM_166127.1 Drosophila melanogaster CG18255-PF, isoform F (Strn-Mlck) mRNA, complete cds
0	1	8	gi 24653967 ref NM_166126.1 Drosophila melanogaster CG18255-PC, isoform C (Strn-Mlck) mRNA, complete cds
0	1	8	gi 56305370 ref NM_166125.2 Drosophila melanogaster CG18255-PA, isoform A (Strn-Mlck) mRNA, complete cds
0	1	7	gi 24583197 ref NM_144306.2 Drosophila melanogaster CG13130-PA (CG13130) mRNA, complete cds
0	1	6	gi 24639231 ref NM_166919.1 Drosophila melanogaster CG32805-PA (CG32805) mRNA, complete cds
0	1	5	gi 24640919 ref NM_167209.1 Drosophila melanogaster CG32694-PA, isoform A (CG32694) mRNA, complete cds
0	1	5	gi 24640921 ref NM_167210.1 Drosophila melanogaster CG32694-PC, isoform C (CG32694) mRNA, complete cds
0	1	5	gi 24649420 ref NM_079741.2 Drosophila melanogaster CG10210-PA (tst) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24650059 ref NM_170656.1 Drosophila melanogaster CG10772-PD, isoform D (Fur1) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24650057 ref NM_170655.1 Drosophila melanogaster CG10772-PC, isoform C (Fur1) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24581872 ref NM_080185.2 Drosophila melanogaster CG18251-PB, isoform B (Msp-300) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 45552220 ref NM_205911.1 Drosophila melanogaster CG18251-PC, isoform C (Msp-300) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24650055 ref NM_170654.1 Drosophila melanogaster CG10772-PA, isoform A (Fur1) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 24650061 ref NM_080146.2 Drosophila melanogaster CG10772-PB, isoform B (Fur1) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 45553512 ref NM_206570.1 Drosophila melanogaster CG10772-PF, isoform F (Fur1) mRNA, complete cds
0	1	4	gi 45553514 ref NM_206571.1 Drosophila melanogaster CG10772-PE, isoform E (Fur1) mRNA, complete cds
0	1	3	gi 24584652 ref NM_057224.3 Drosophila melanogaster CG4694-PA (her) mRNA, complete cds

Transfekce

C. elegans

- krmeny *E. coli*, které nesou zvolenou dsRNA

Buněčné kultury

- Většinou elektroporace (lipofekce; virové tranfekce - možné i trvalá exprese větš. shRNA molekul)

Oocyty/embrya

- hl. pomocí mikroinjikace



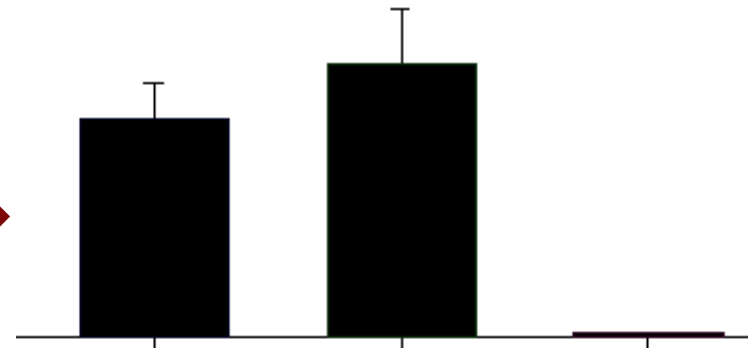
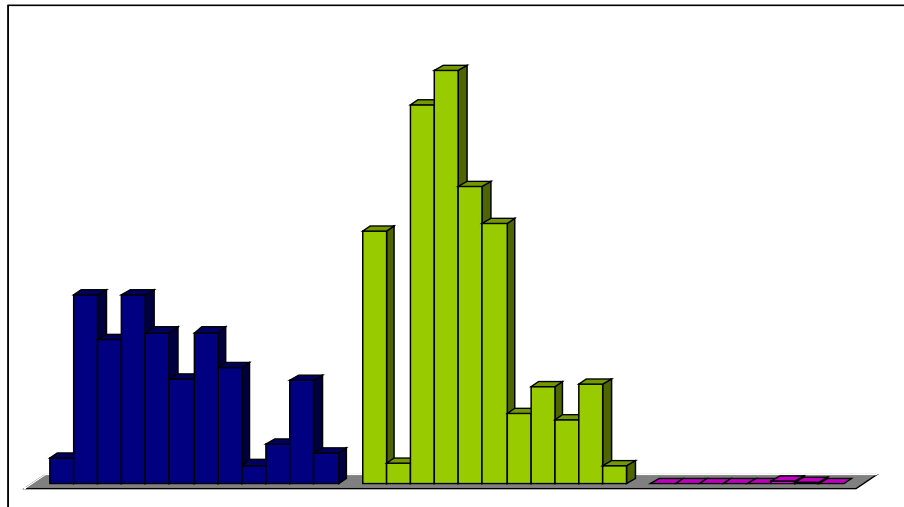
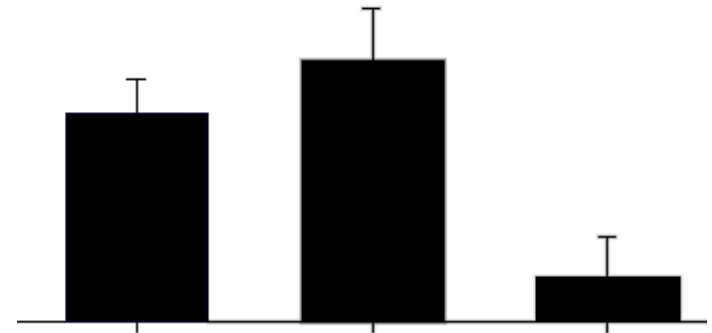
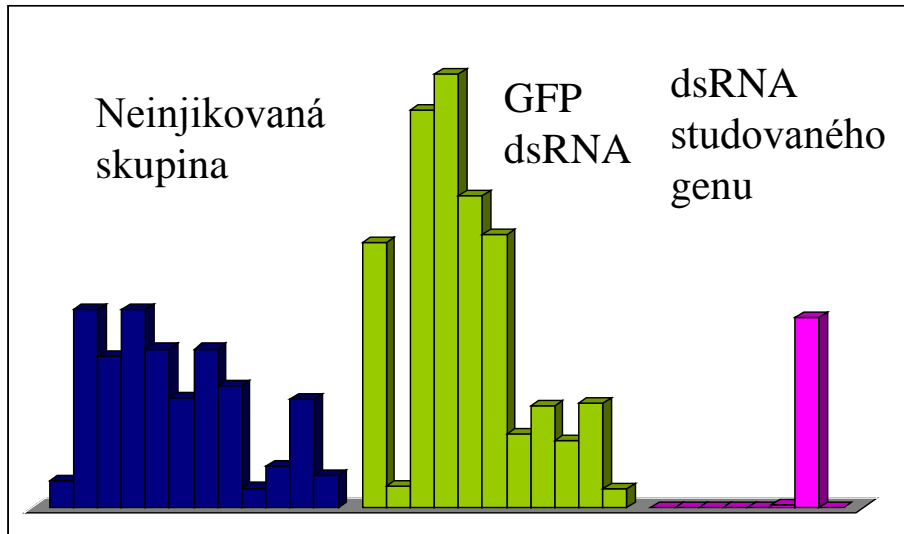
- Stačí poměrně nízké výchozí koncentrace siRNA (rozdíly mezi umlčoványými geny, modely...)

KONTROLY

- Možnost zahlcení RNAi dráhy - použití cizorodé dsRNA ve stejné koncentraci (GFP, luciferáza...)
- Specifita - vytipovat geny, které jsou sekvenčně nejpříbuznější (již při designu)
 - Podle výsledků dsCheck/e-RNAi
- Navrácení fenotypu po vnesení mRNA, která byla předtím umlčena

KONTROLY

- Kontrola degradace mRNA - kvantitativní PCR - nejlépe single-cell (oocyt, embryo...)



• **Single-embryo**

- + Je možné vyřadit embrya, u kterých nedošlo k umlčení mRNA
- + Je možné porovnat fenotyp embrya s mírou exprese
- Malé množství testovaných genů

? **Mikročipy**

- + Analýza velkého množství genů
 - nejen sledování off-target efektů, ale i drah „přirozeně“ ovlivněných umlčením sledovaného genu
- Drahé
- Do jaké míry spolehlivé?

Umlčení proteinu

- Záleží na turnoveru proteinu u sledovaného modelu
 - Možnost umlčení proteinu injekcí protilátek
- Preimplantační embrya velký problém - mnoho proteinů z maternálních zásob (minimálně do EGA, ale často i déle)
 - Některé proteiny mohou být v určitých periodách vývoje/buněčného cyklu maskovány (např. CENPE) → nemusí být možná detekce zejména imunofluorescencí
- Přítomnost proteinu \neq neúspěšnost umlčení mRNA
- Sledování míry využití maternálního proteinu

RNAi databáze

- Sekvence, výsledky, anotace mi/si/shRNA
 - miRBase pro mnoho druhů
 - siRNA Database
 - RNAiDB (*C.elegans*)

- The RNAi Consortium (TCR) shRNA Library
 - sh knihovna pro vědeckou veřejnost