

RNA interference v reprodukční biologii savců

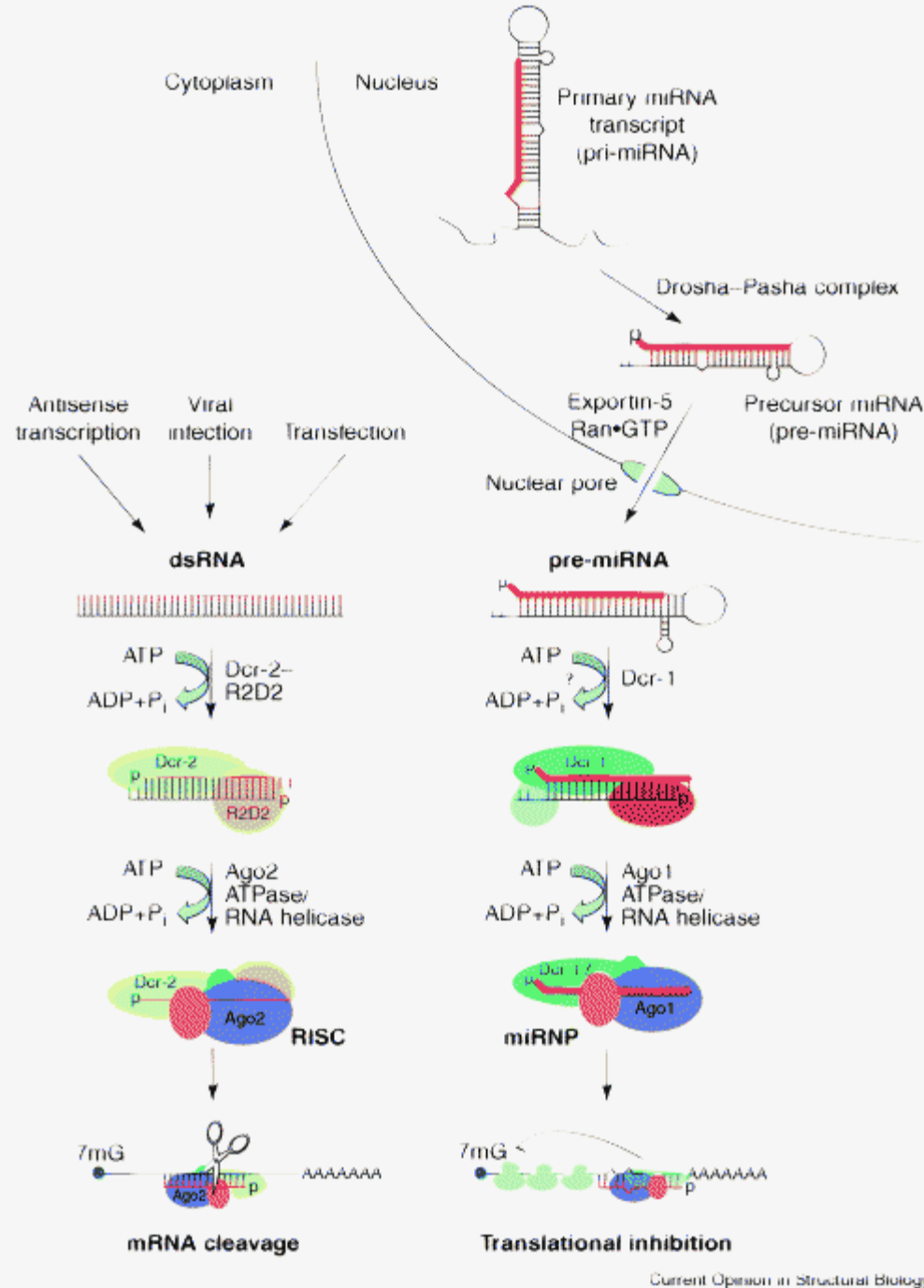


Liběchov, 29. 11. 2013

RNA interference (RNAi)

- post-transkripční umlčení genové exprese
- přirozený mechanismus
 - regulace genové exprese a genomové stability
 - obranný antivirový mechanismus
- konzervovaný mechanismus u všech eukaryot
 - není u *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzii*, *S.cerevisiae* a některých dalších kvasinek
 - podobné i u prokaryot, ale není homologní
- Andrew Z. Fire a Craig C. Mello (popsání RNAi u *C. elegans*, 1998)
 - Nobelova cena za Fyziologii a lékařství - 2006

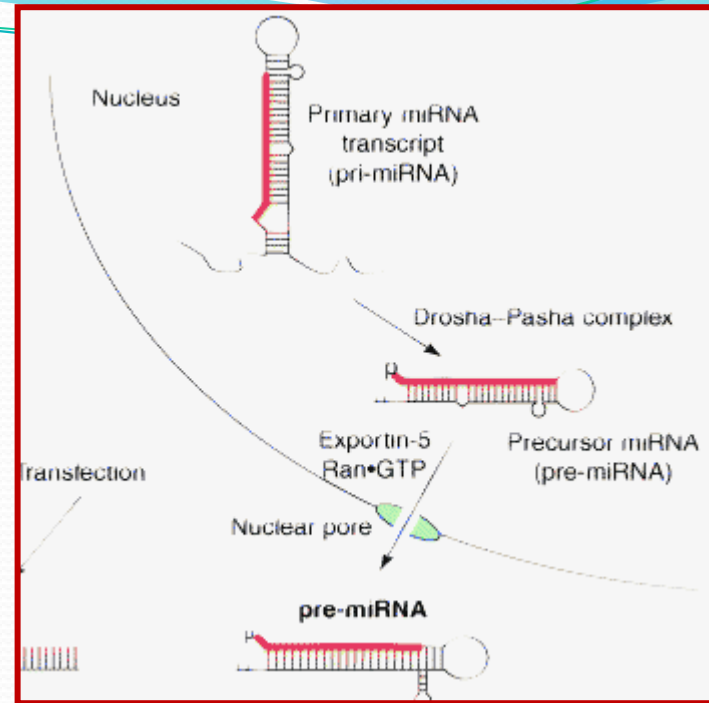
- sekvenčně specifické
- spouštěn různými RNA molekulami – RNA viry, transposony, exogenní dsRNA, endogenní nekódující RNA

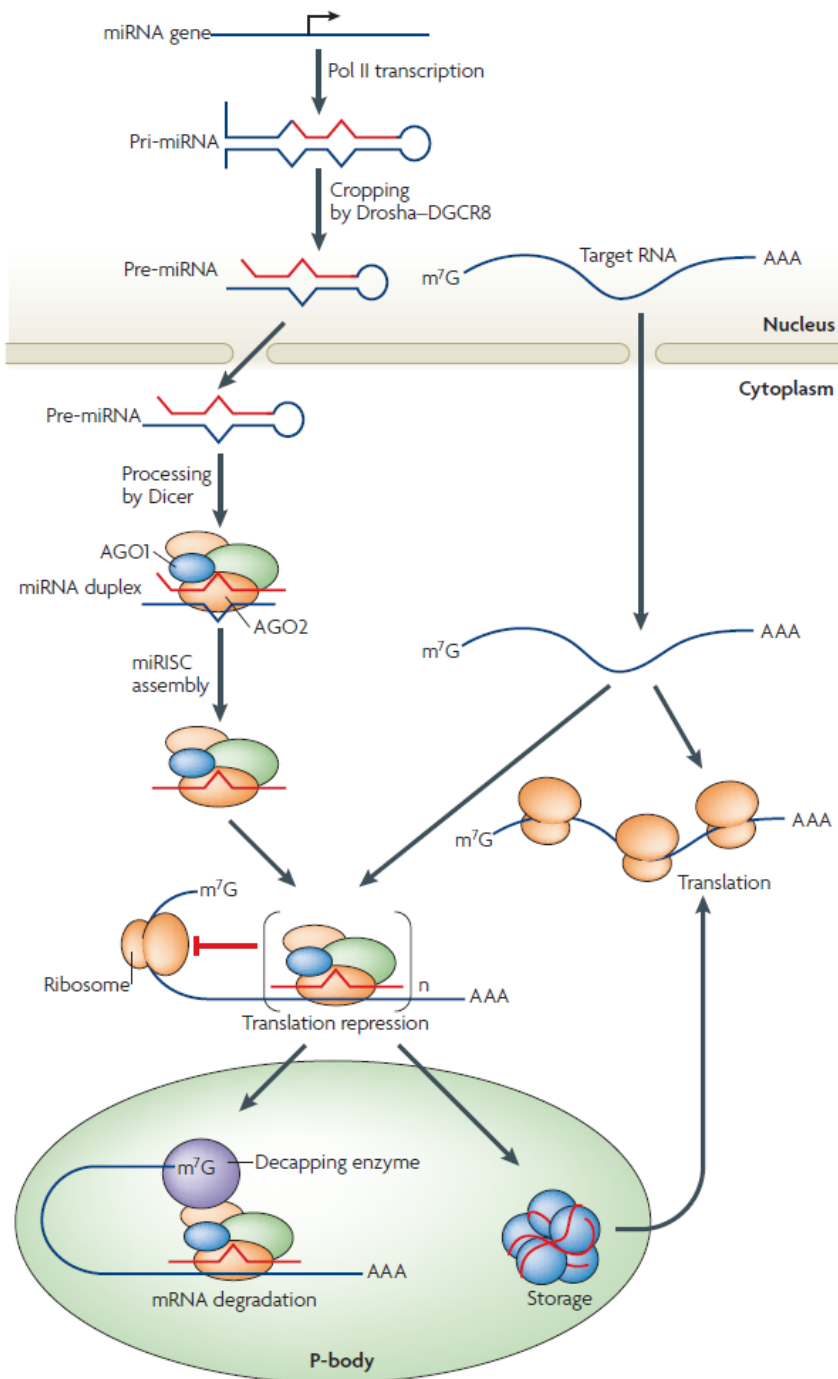


- dlouhá dsRNA $\xrightarrow{\text{Dicer}}$ kratší úseky (21-23 nt)
- antisense řetězec (guide strand) – do RISC (RNA-induced silencing complex) si/miRISC (RNA-protein complex) $\xrightarrow{\text{vazba na cílovou mRNA}}$ štěpení mRNA nebo potlačení translace
- sense řetězec (passanger strand) - degradován

micro (mi)RNA

- endogenní
- 19 – 25 nt
- nekódující
- fce: proliferace, kontrola správného vývoje, diferenciace hematopoetických bb, apoptóza
- potlačení translace mRNA

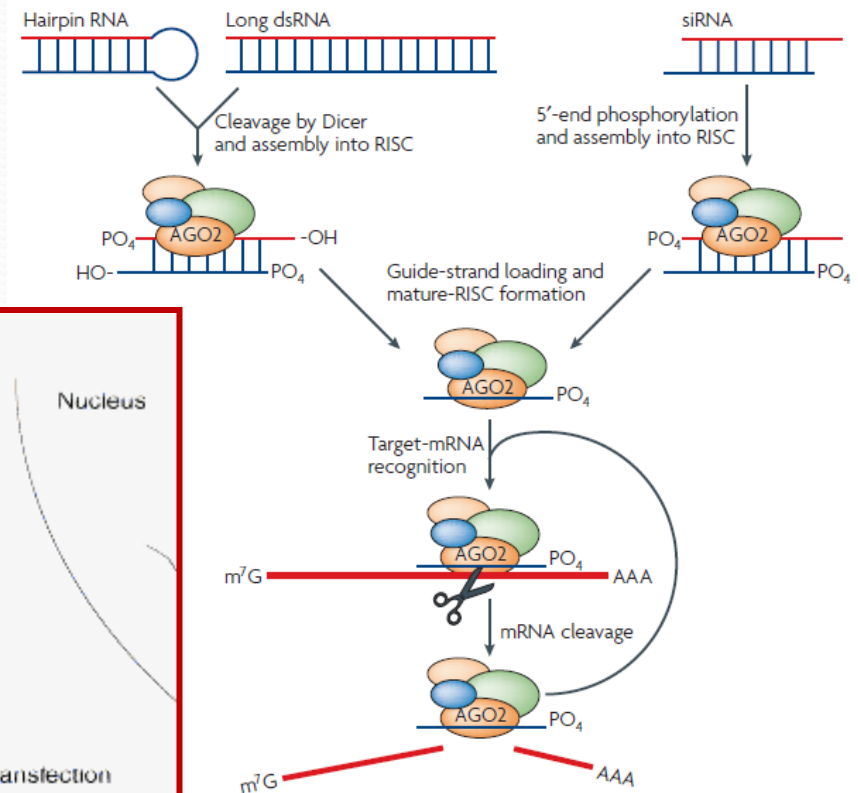
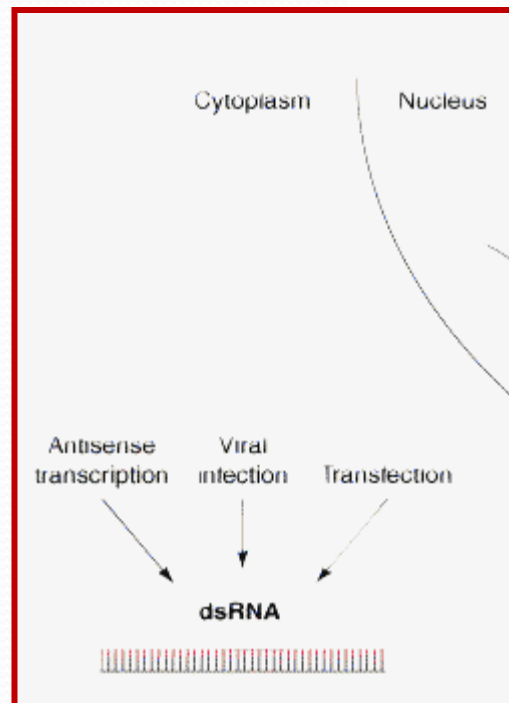




- P-body - v cytoplazmě
- uchovávání a degradace cílové mRNA

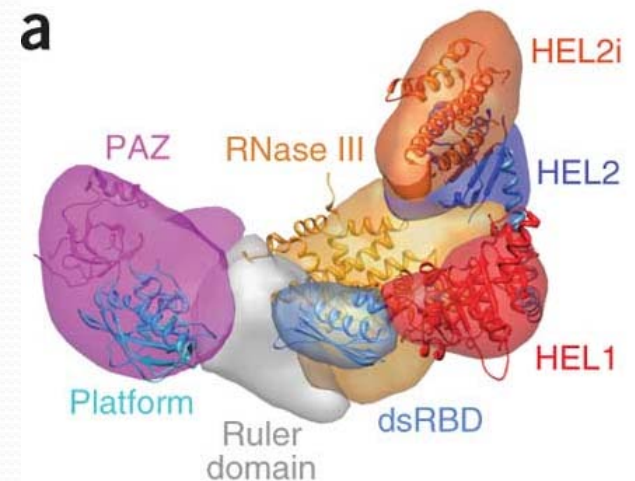
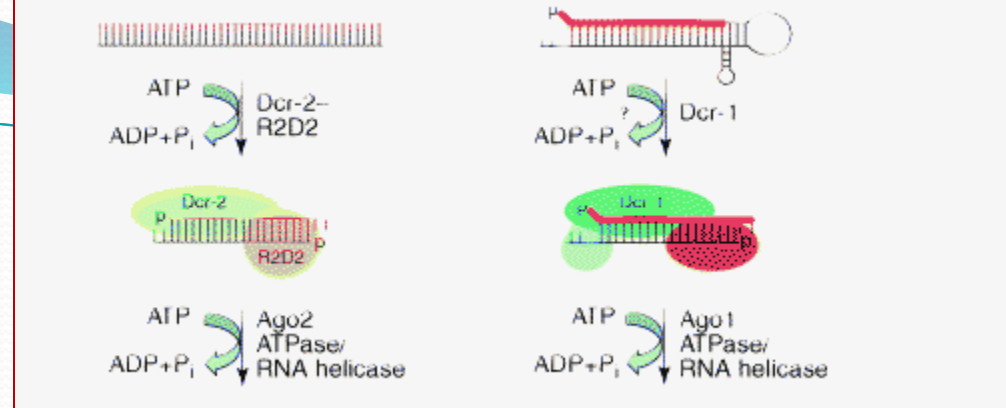
small interfering (si)RNA

- v cytoplasmě
- 21 nt
- experimentální využití
- 2nt 3' přesahy

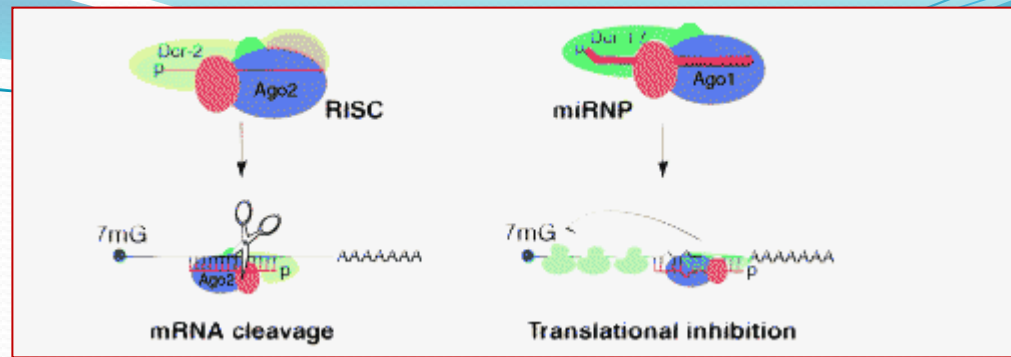


Dicer

- RNáza III
- v cytoplazmě
- PAZ doména – rozeznává konec dsRNA
- dsRNA vázající doména (dsRBD)
- ATPázová/RNA-helikázová doména
- 2RNázové domény
 - štěpí 22 nt od 3' konce
- vznik siRNA a miRNA



RISC



- RNA-induced silencing complex
- guide strand + Dicer + TRBP + Ago
- TRBP (transactivating response RNA binding domain)
- proteiny Argonaute rodiny (Ago)
 - **PAZ** doména (jako u Diceru)
 - střední doména - interakce s bazí a fosfátem na 5' konci si/miRNA
 - **PIWI** doména (RNaseH-like) – odpovídá za štěpení mRNA
 - katalytická komponenta RISCu – v P-bodies (RISC komplexy cíleny do P-bodies; poškození P-bodies snižuje účinnost RNAi)

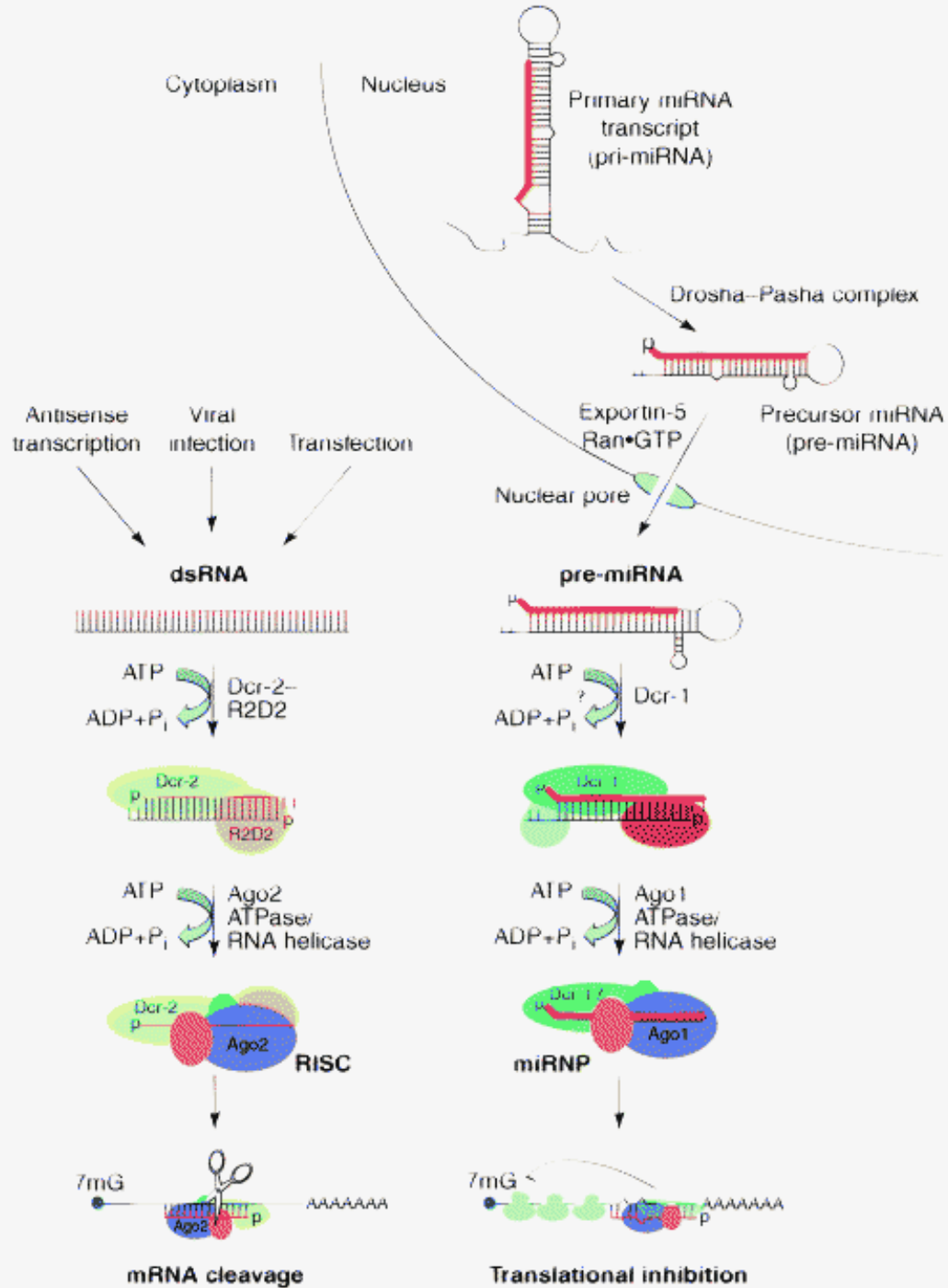
siRNA

- zcela komplementární k cílové mRNA
- Ago2 (v RISCu)
- štěpí mRNA 10 nt od 5' konce guide řetězce
- mRNA dále štěpeny endonukleázami



miRNA

- NE zcela komplementární (seed region – heptamer nukleotidů 2-8 – důl. komplementarita)
- váže se na 3' UTR oblast
- potlačení translace mRNA



Využití

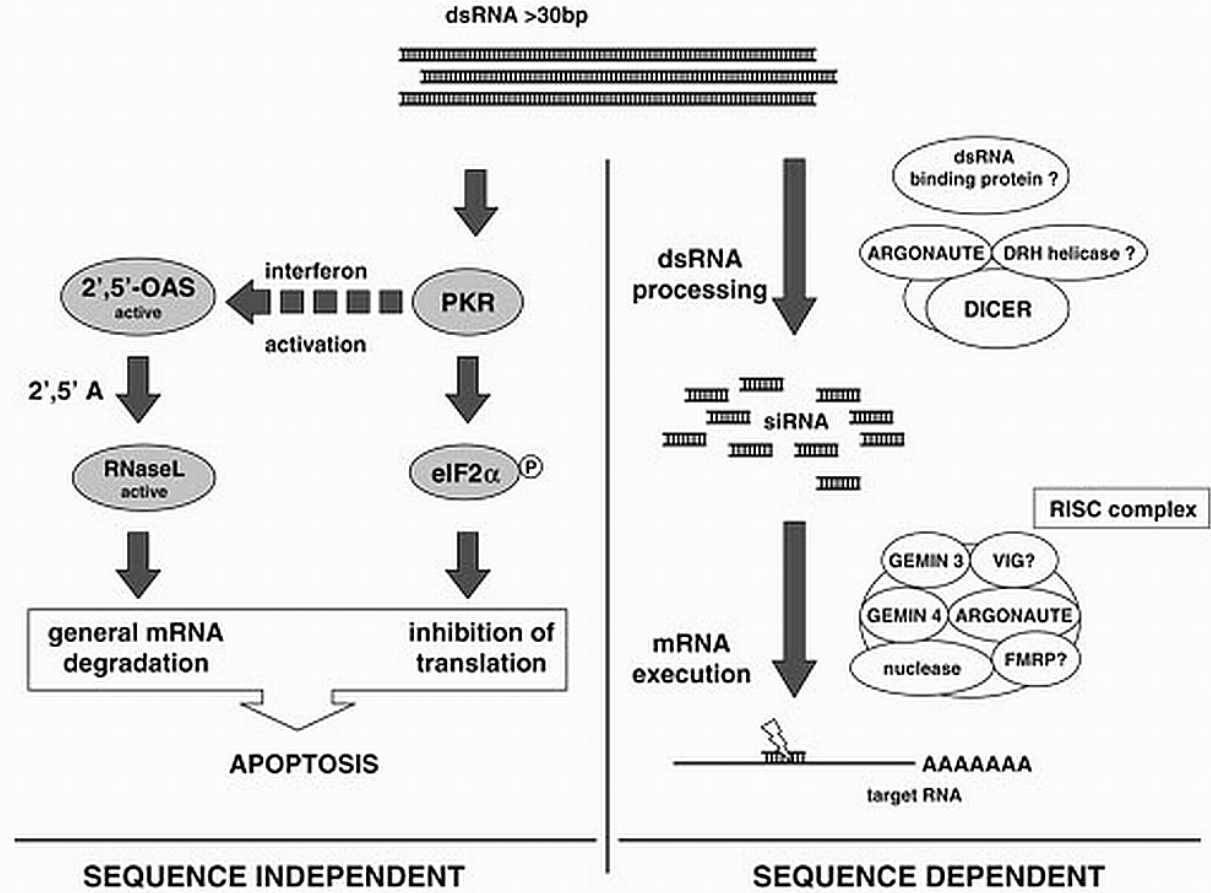
- charakterizace fce určitého genu
 - umožňuje umlčet gen i pokud není proveditelný knock-out
- léčba rakoviny, hepatitidy B, HIV/AIDS - budoucnost

- **Interferonová odpověď**

- savci
- dlouhá dsRNA spouští i protein kinasu R (PKR)

- **Off-target efekt**

- umlčení exprese jiných genů než byl původně zamýšlený gen



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.

RNAi dráha v oocytech a preimplantačních embryích

- nemají vyvinutou IFN odpověď
- oocyty pravděpodobně speciálně přizpůsobeny využití dsRNA v RNAi dráze
 - dsRNA lépe zpracována, lepší odpověď
- (nediferenciované ES bb, embryonální karcinogenní bb, diferenciované myotube, bb linie – NIH 3T3, HEK 293)

dlouhá dsRNA

- větší specifita
- vyšší funkčnost
- více zatěžuje RNAi aparát bb
- použitelné jen u některých modelů

siRNA

- častěji nefční (nutné používat 3-4 typy)
- méně zatěžuje aparát bb

→ 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
 - siRNA proti 2-4 sekvencím na různých místech mRNA
 - Je možné nechat nasyntetizovat komerčně
 - Existuje řada on-line programů pro design siRNA (Ambion, Dharmacon, Qiagen...)
-
- http://www.protocol-online.org/prot/Research_Tools/Online_Tools/SiRNA_Design/
 - http://www.rnaiweb.com/RNAi/RNAi_Web_Resources/RNAi_Tools___Software/Online_siRNA_Design_Tools/index.html
 - <http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>
 - <https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>
 - <https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/Default.aspx?gaw=flexiplate>

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
- Správné umlčení >80%

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)
atgatggtgctacagcaacaacaacaacagcgtctctctgggatgcaacaacaacgagcaacacaaatacacaacacagcaat
```



Drosophila melanogaster

length: 100

design [\[help\]](#)

Drosophila melanogaster

Caenorhabditis elegans

Arabidopsis thaliana

Oryza sativa

Rattus norvegicus

powered by siDirectCore.

T., 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 aqqtcaaaqg tatcaqaaqg tacaqaqaa attaaaaaqg ttaqaaacaa ataaqqaqa</u> <u>ttctqccaaa acgattaqaa qattaqaaq aqaagtaaaq atacaaacaa atctqcttga qactqcaaaq</u> <u>tctqatacaq atcaqctatc aqqcqaiaaa qatcaccttc tacaaaactt qcaaaqtta qaaaaqatg ccttgcttt</u> <u>caqqtqaa qaaqaaaaac tccaaaacca aqtqcaqat ttqaaacaaq aqaaqaqqt ccttatqaa</u> <u>qaatctqaaa tqatqcaqg taaactqaqt qcattqaaa ttqaaaattc aaaqctttcc aqatattqg acqcttqat</u> <u>aacaqaaaa cqtqaacttg 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

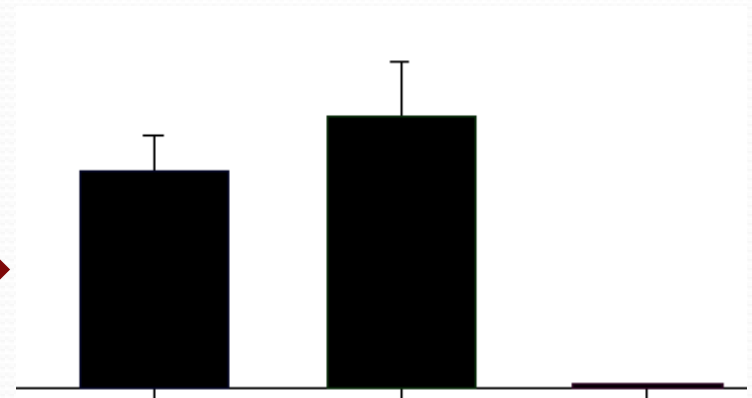
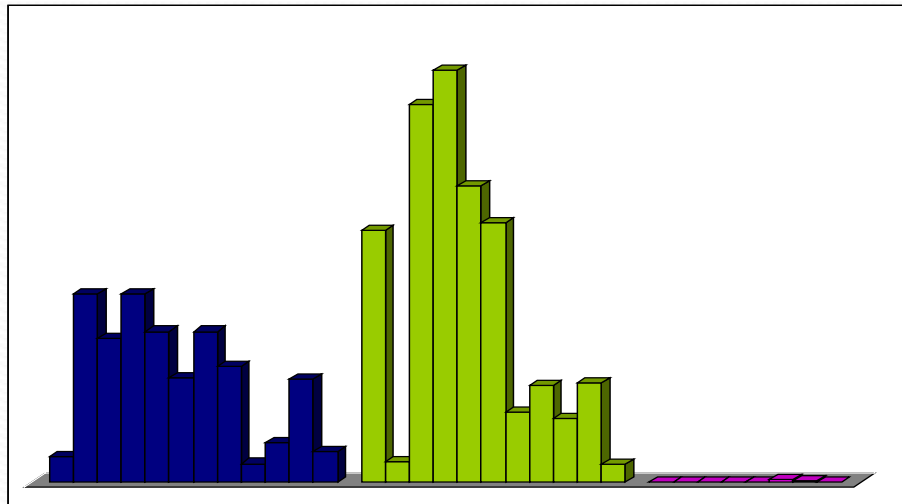
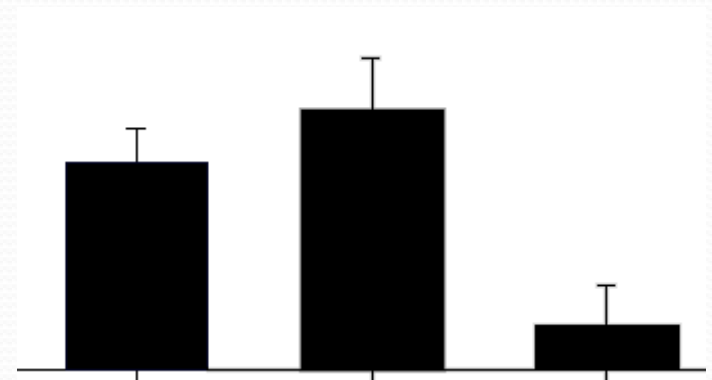
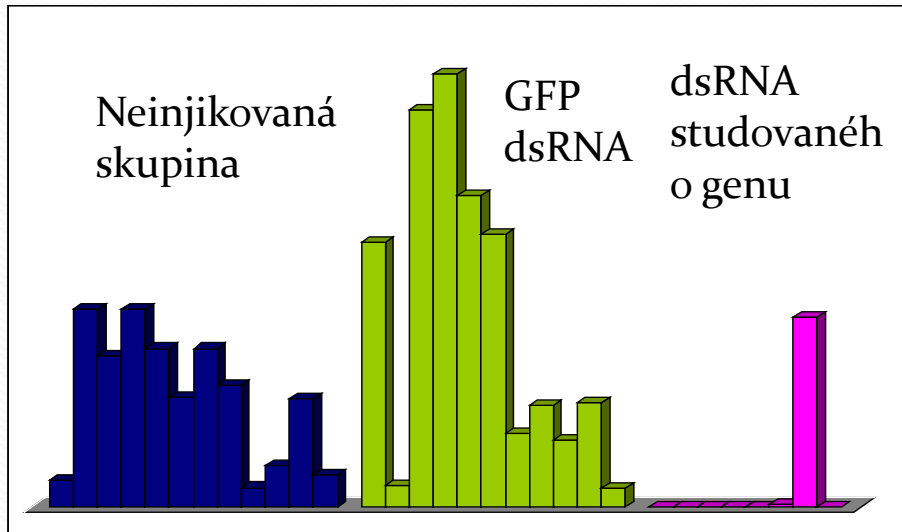


- Stačí poměrně nízké výchozí koncentrace siRNA (rozdíly mezi umlčoványými geny, modely...)

Kontroly

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

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



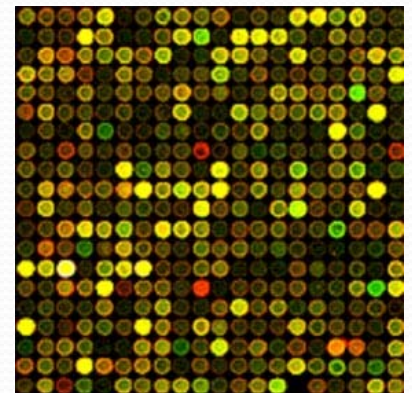
• Single-embryo

- + 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

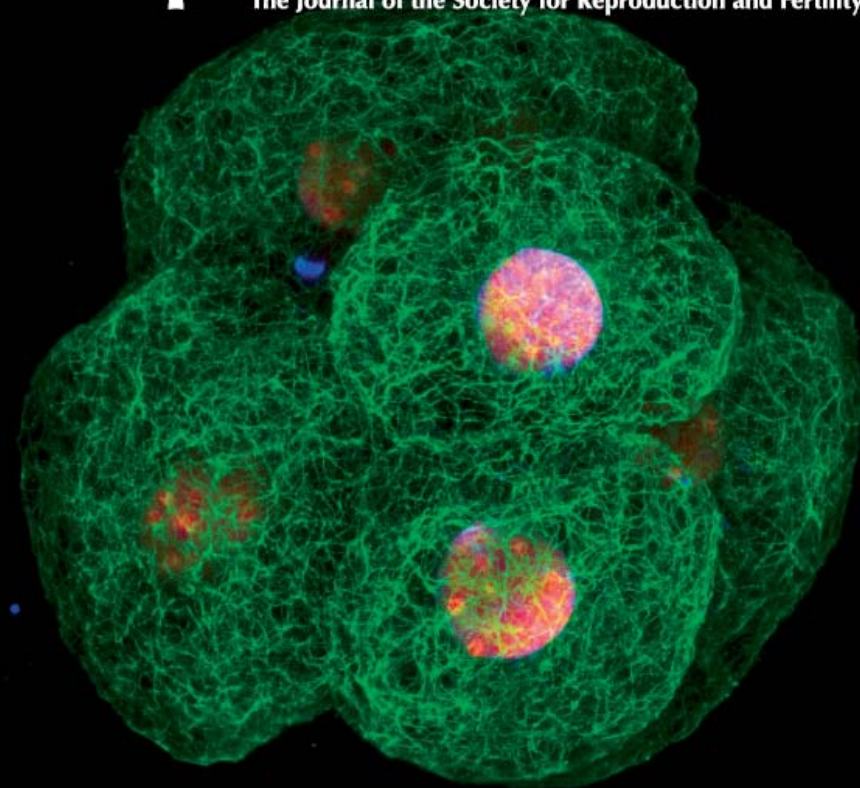
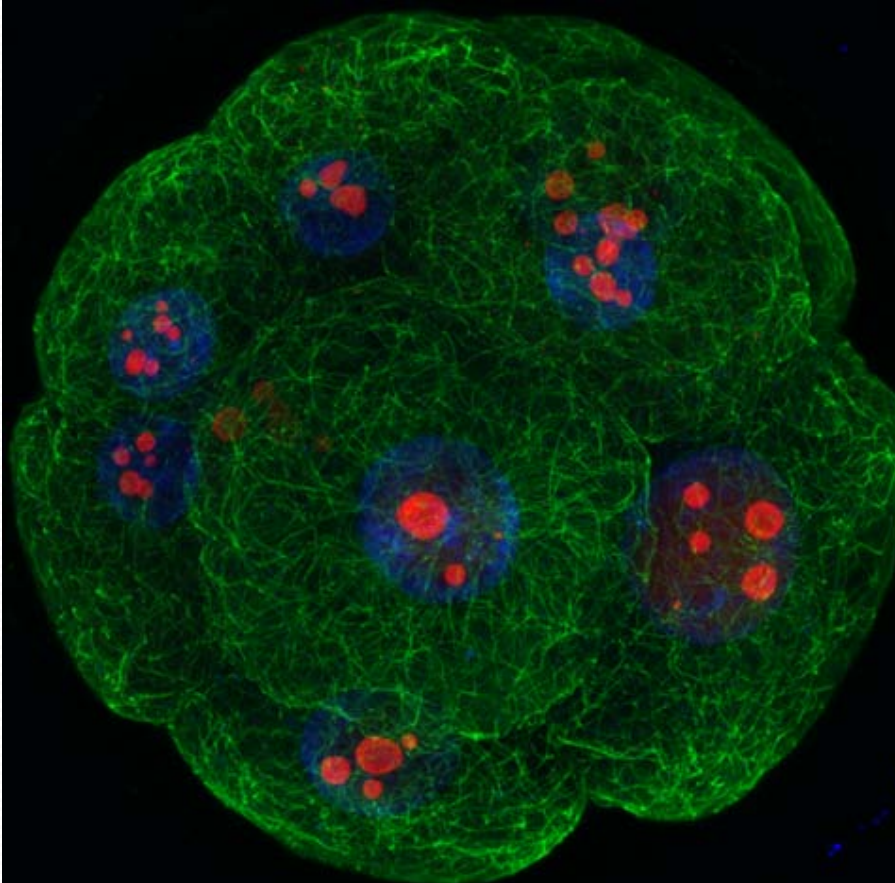
- Sekvence, výsledky, anotace mi/si/shRNA
 - miRBase pro mnoho druhů
 - siRNA Database
 - RNAiDB (C.elegans)

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

Vol 146 • No 2 • August 2013

Reproduction

The Journal of the Society for Reproduction and Fertility



 published by
bioscientifica

www.reproduction-online.org

ISSN 1470-1626 (paper)
ISSN 1741-7899 (online)

Děkuji za pozornost

- Rana T. M. (2007), Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs; Nature
- Filipowicz W. et al. (2005), Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs; Current Opinion in Structural Biology 15: 331-341
- Kim N. V. (2005), MicroRNA Biogenesis: coordinated cropping and dicing; Nature
- Svoboda P. (2004), Long dsRNA and silent genes strike back: RNAi in mouse oocytes and early embryos; Cytogenet Genome Res 105: 422-434

