

Analiza końców RNA; techniki badania transkrypcji

Michał Koper, IGiB UW

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)



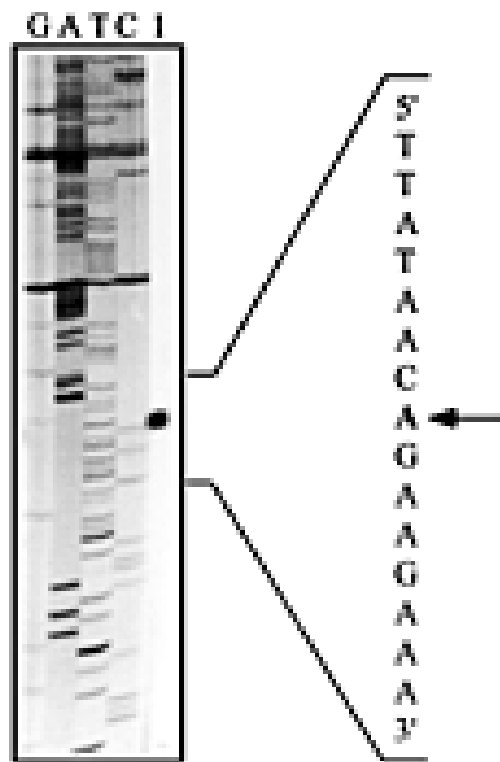
Badania oddziaływań białek-DNA/RNA *in vivo*:

- **ChIP** (ImmunoPrecypitacja Chroamtyny), np. obecność Pol RNA na genie; oddz. TFs – DNA; „**ChIP on CHIP**”
- **RIP** (ImmunoPrecypitacja RNA), np. oddziaływania białek RRM z RNA
- **DIP** (ImmunoPrecypitacja DNA)
- **CLIP** (*in vivo Cross-Linking and ImmunoPrecipitation; kompleksy RNA-białka*)

Analiza końców 5' i 3' RNA

Technika „wydłużania startera”

Wyznaczanie miejsca startu transkrypcji (ang. „primer extension”)



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



Odwrotna transkrypcja



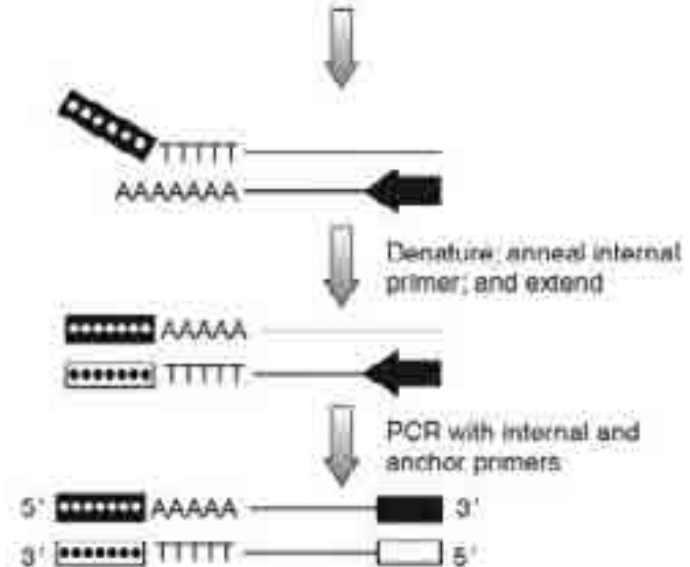
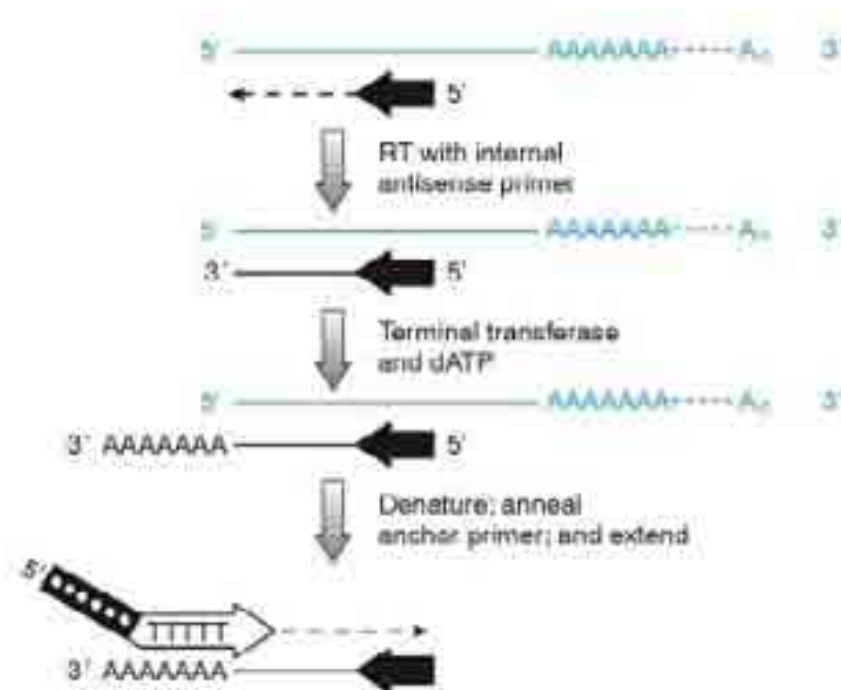
**Rozdział w żelu poliakrylamidowym razem z
reakcjami sekwencjonowania prowadzonymi z tego
samego startera**

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

Analiza końców 5' RNA – 5' RACE

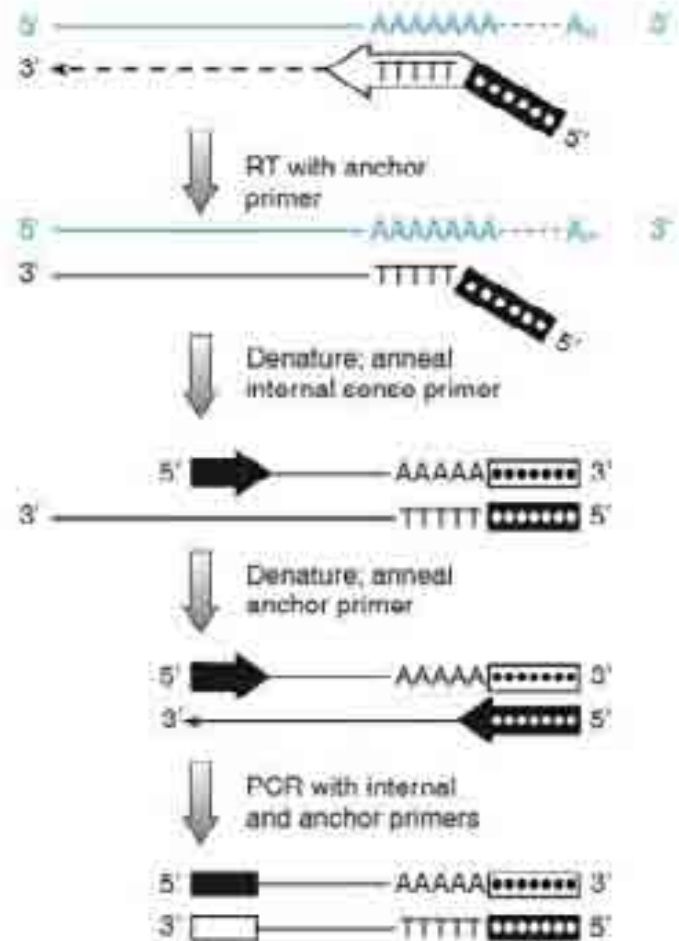
Rapid Amplification of 5'cDNA Ends

jednostronny PCR
zakotwiczony PCR



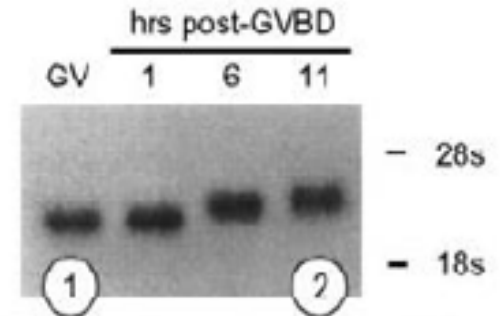
Analiza końców 3' poliadelynowanych RNA – 3' RACE

Rapid Amplification of 3'cDNA Ends

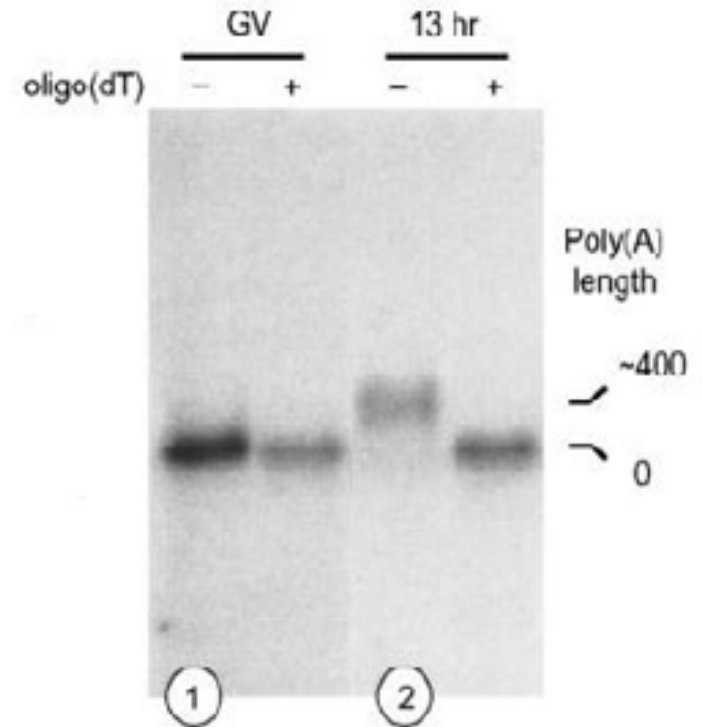
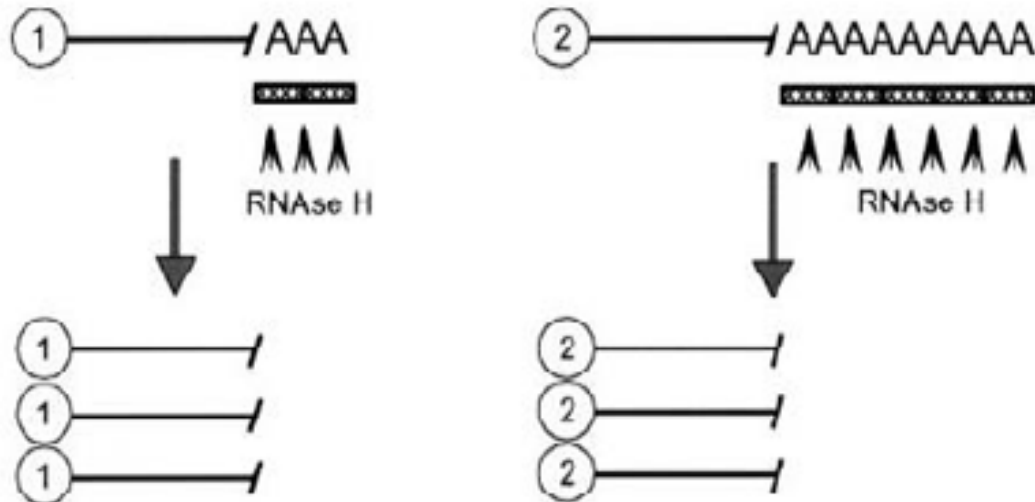


Metody analizy końców poliA - 1

Northern



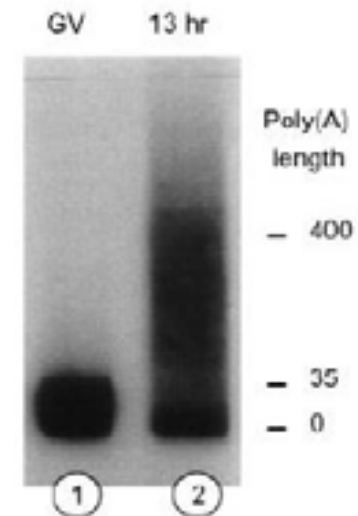
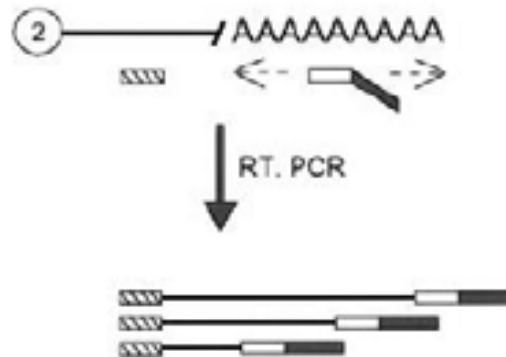
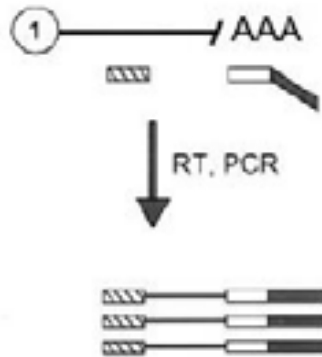
Oligo(dT)/RNase H Northern



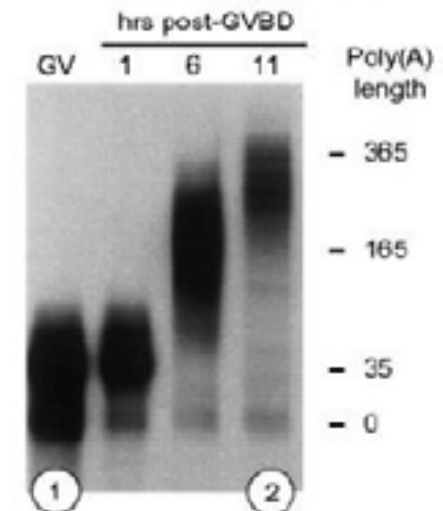
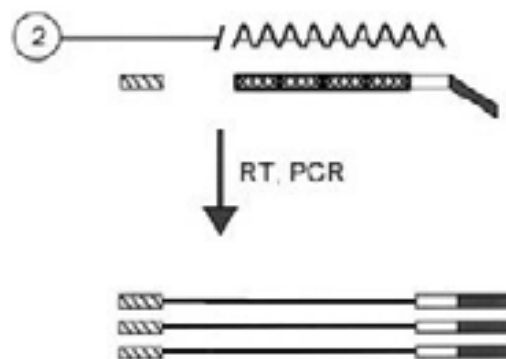
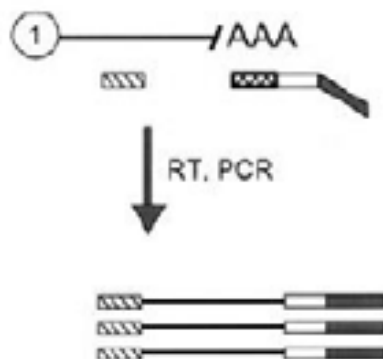
Metody analizy końców poliA - 2

RACE-PAT

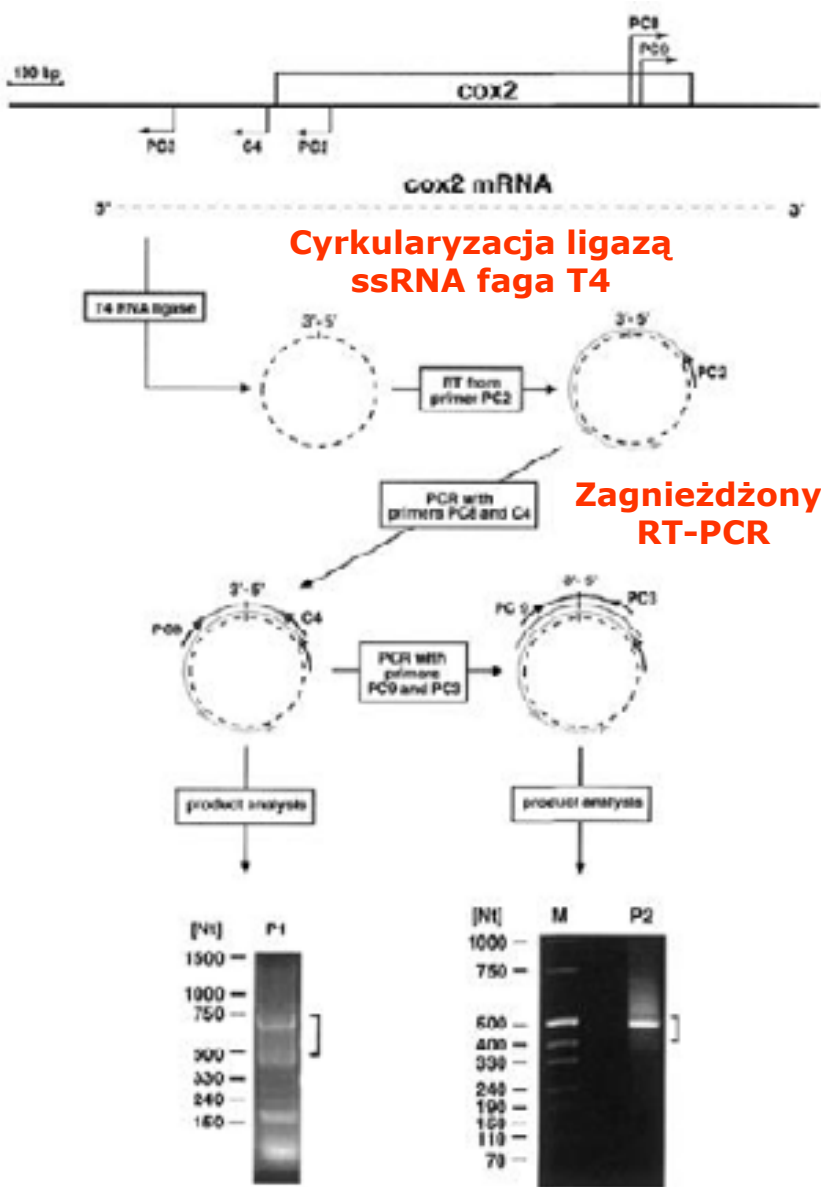
PAT = **Poly(A) Test**



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.

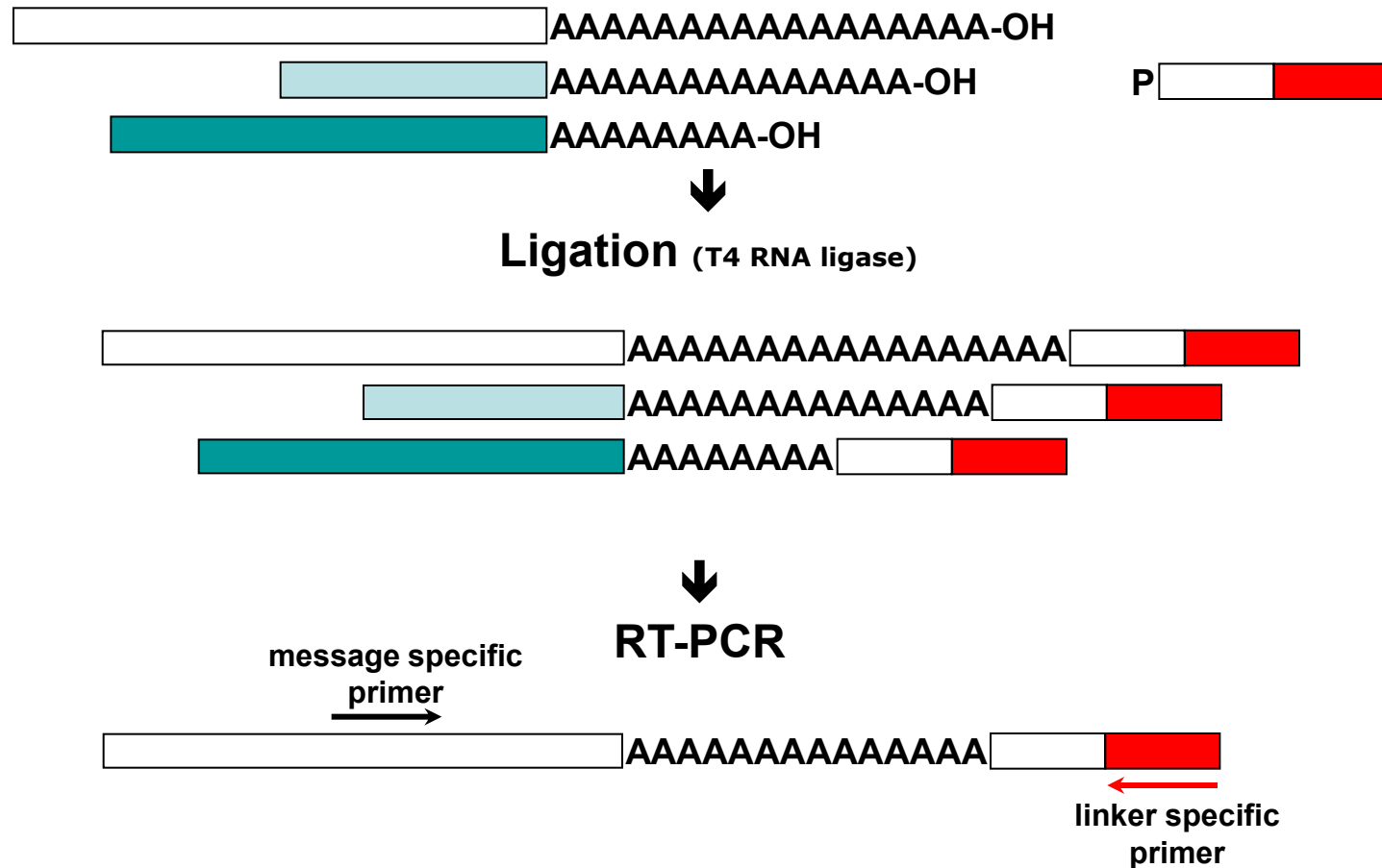
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+300	-277	AGAAAGAA....
3	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299	-280	GATAGAAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299	-278	TAGAAAGA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299	-277	AGAAAGAA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299	-273	AGAATCGT....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299	-270	ATCGTTCA....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+299	-269	TCGTTTCAG....
1	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+298	-291	ATCACGTA....
2	TCGCAATAGCGAGCCTACTTATCGCTTTTTT	+296	-269	TCGTTTCAG....
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 **kwaśną pirofosfatazą z tytoniu** (TAP, bardzo drogi enzym) lub **trawiąc** **dupleksy RNA-DNA RNazą H** (ma sens gdy RNA jest wysoko ekspresjonowany, znamy dokładnie 5' koniec transkryptu i nie interesują nas alternatywne 5' końce)

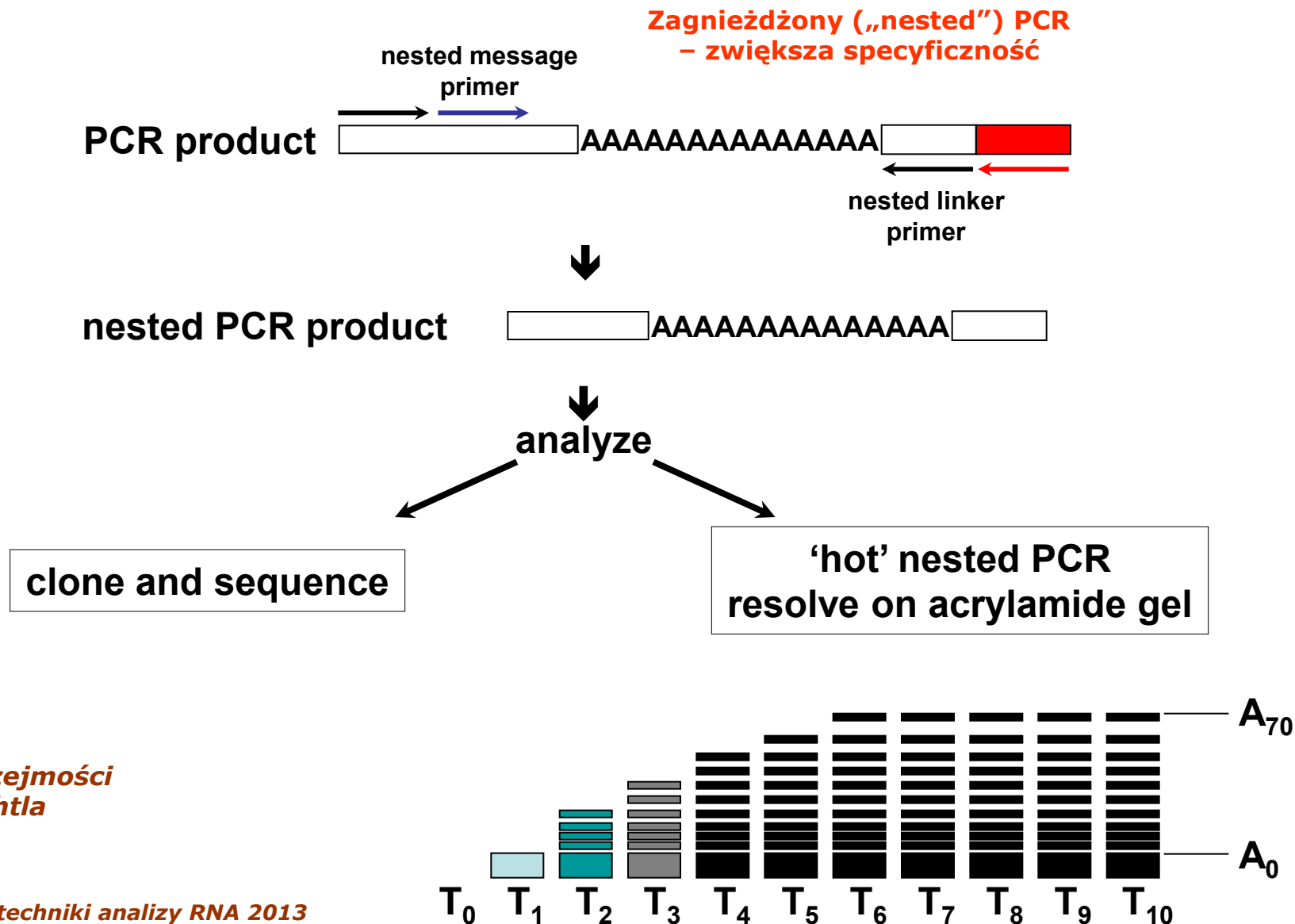
PASE: Poly(A) status examination



Dzięki uprzejmości B. Dichtla

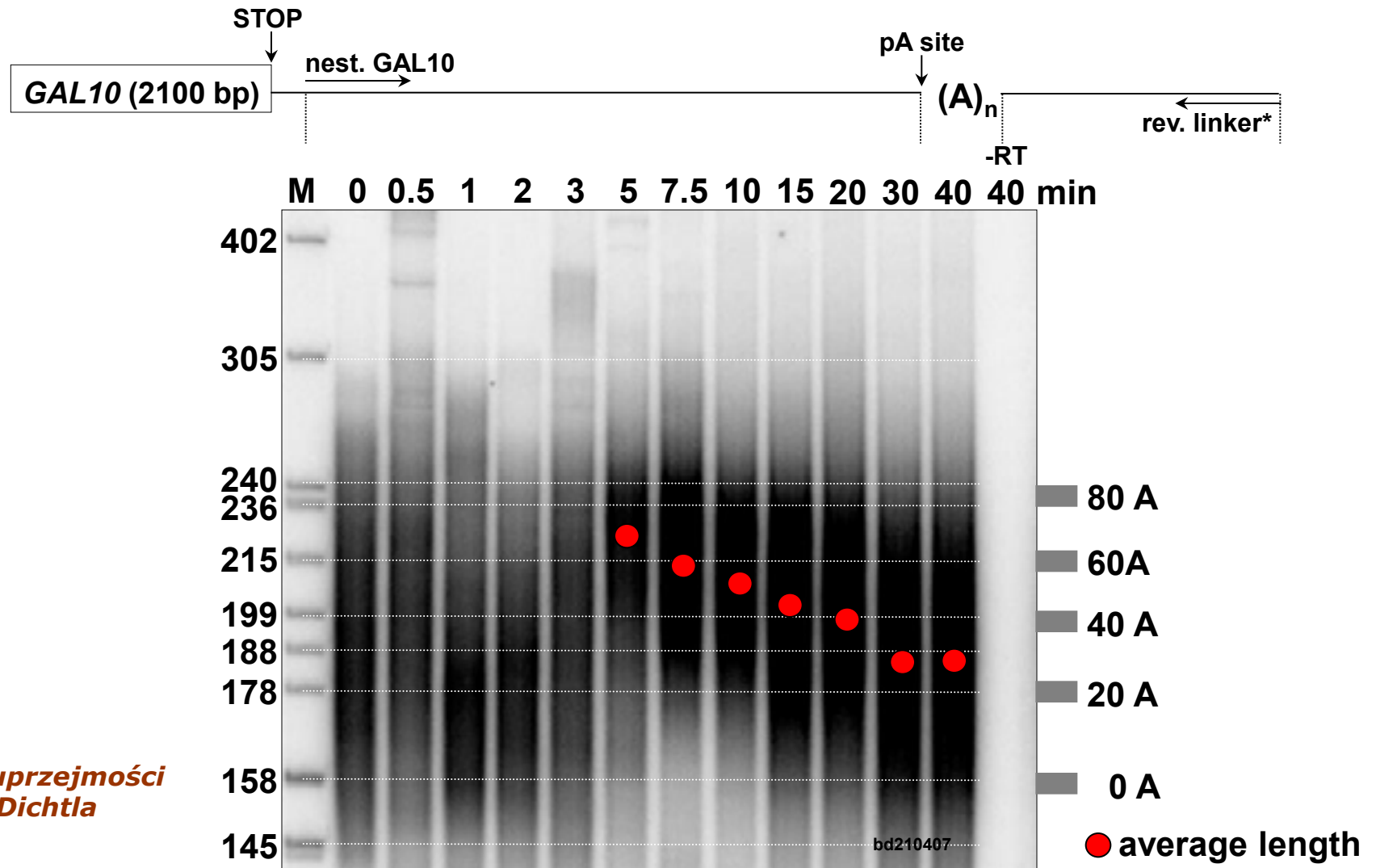
Mariconti et al., RNA, 2010

PASE: Poly(A) status examination



*Dzięki uprzejmości
B. Dichtla*

Badanie PASE długości końców poliA mRNA *GAL10*



Dzięki uprzejmości
B. Dichtla

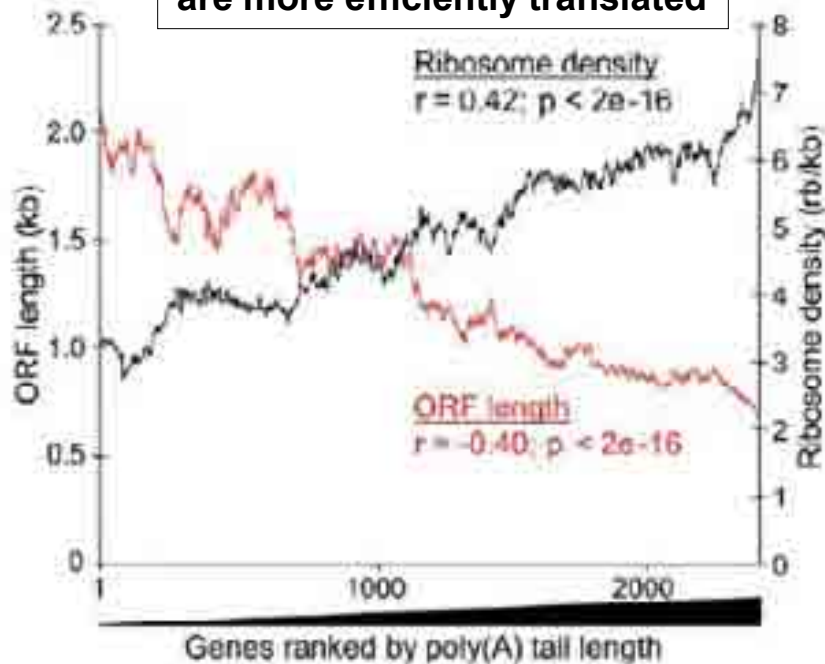
Znaczenie długości końców poliA

Za: Lackner et al., Mol. Cell, 2007

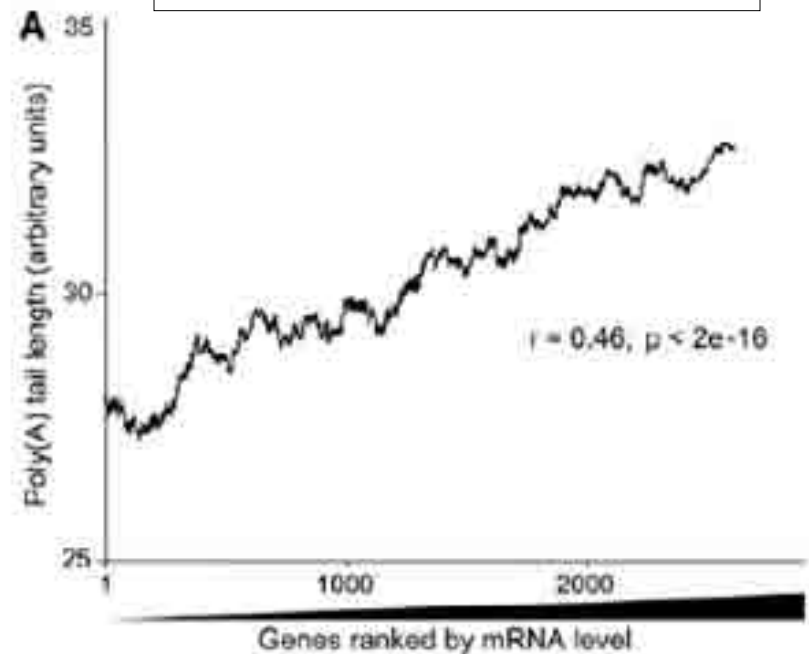
- 20% mRNAs with longest poly(A)
GO: biosynthesis, cytoplasm, ribosome
- 20% mRNAs with shortest poly(A)
GO: nuclear lumen, nucleolus, RNA metabolism, ribosome biogenesis

NO correlation of poly(A) length and mRNA stability!

mRNAs with long poly(A) tails are more efficiently translated



mRNAs with longer poly(A) tails are more abundant



Polecane publikacje

Published as: *Mol Cell*. 2008 October 24; 32(2-3): 247–258.

Polyadenylation Linked to Transcription Termination Directs the Processing of snoRNA Precursors in Yeast

Paweł Grzechnik¹ and Joanna Kufel^{1*}

Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Pawłowskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland

Published as: *Mol Cell*. 2007 April 13; 26(1): 145–155.

A Network of Multiple Regulatory Layers Shapes Gene Expression in Fission Yeast

Daniel H. Lackner¹, Traude H. Beilharz^{2,3}, Samuel Marguerat¹, Juan Mata^{1,4}, Stephen Watt¹, Falk Schubert¹, Thomas Preiss^{2,3}, and Jürg Bähler^{1*}

¹Cancer Research UK Fission Yeast Functional Genomics Group, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge CB10 1HH, UK.

²Molecular Genetics Program, Victor Chang Carlin Research Institute, Darlinghurst, NSW 2010, Australia.

³St Vincent's Clinical School and School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia.

Techniki badania transkrypcji

Technika

„Transcription Run ON”

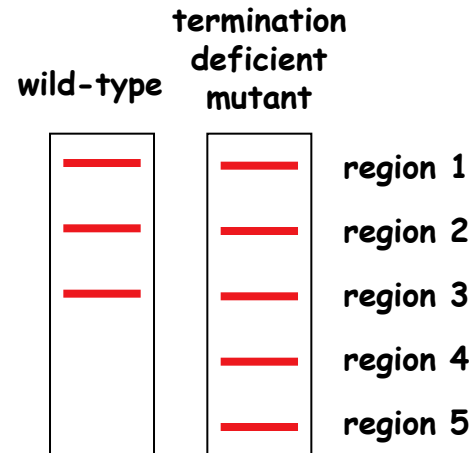
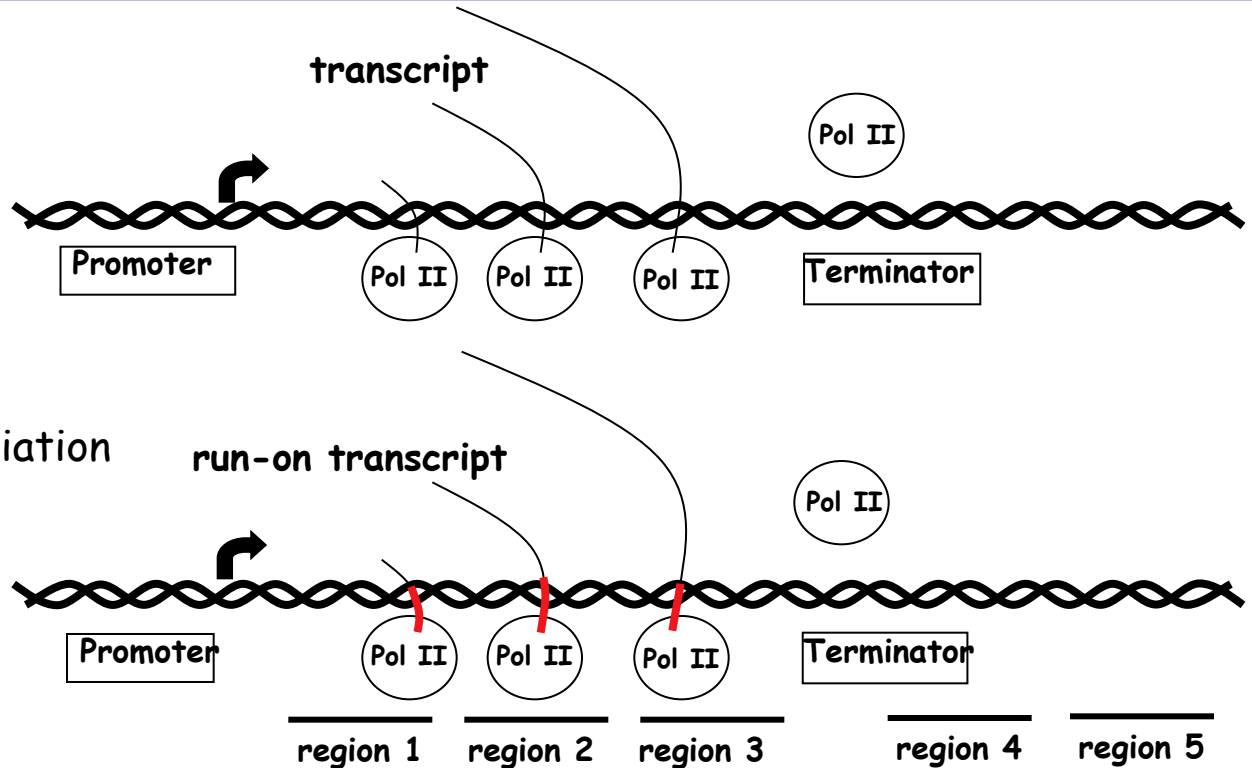
Transcription Run-On (TRO)

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:

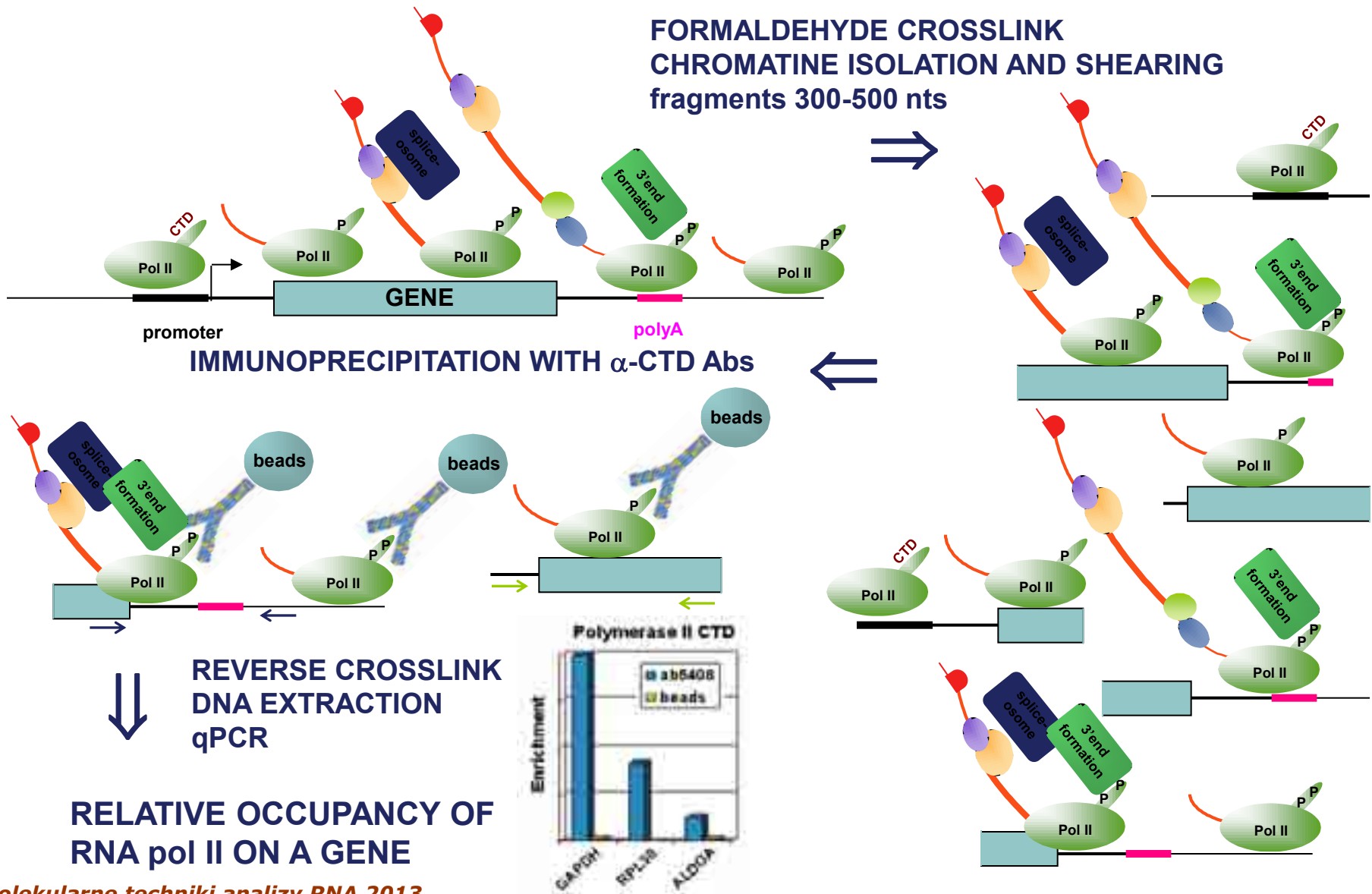
- Badanie defektów terminacji transkrypcji (*read-through*)
- Rozróżnienie pomiędzy samą obecnością RNA Pol a synteza RNA

Warianty TRO:

- Jądrowy Run-On, na izolowanych jądrach komórkowych: Gariglio (1981) i Brown (1984)
- Mitochondrialny Run-On, na izolowanych mitochondriach

Immunoprecypitacja chromatyny - ChIP

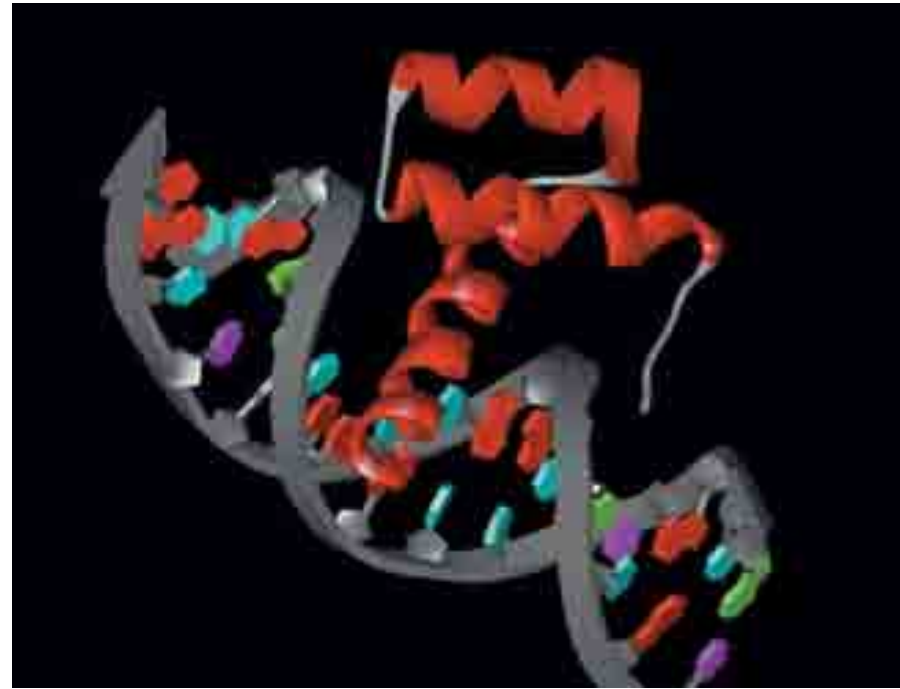
Immunoprecipitacja chromatyny - ChIP



Zastosowania ChIP

Badanie oddziaływań białka-DNA *in vivo*!

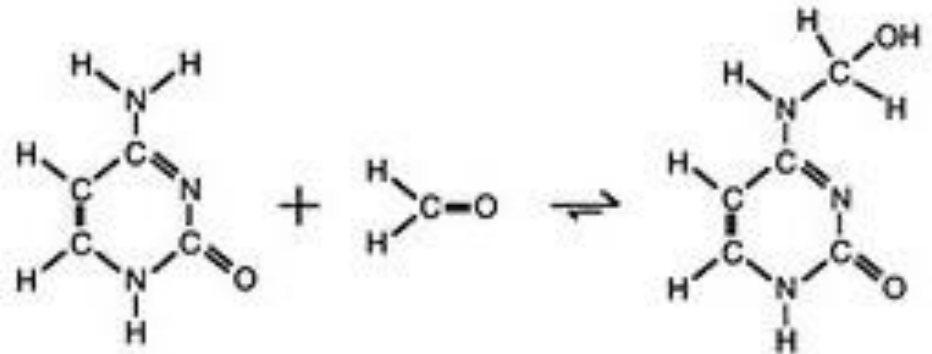
- Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych
- Obecność (dystrybucja) Pol RNA wzdłuż chromatyny (genów)
- Modyfikacje histonów
- Czynniki remodelujące chromatynę



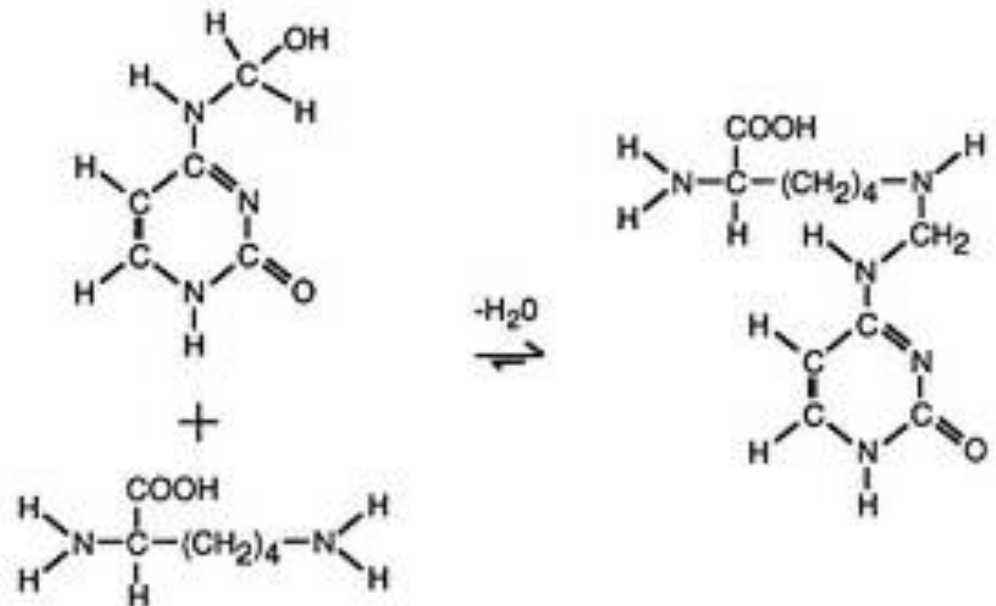
Czynnik sieciujący: formaldehyd



**Reakcja 1 (powstaje
zasada Shiffa)**



Reakcja 2

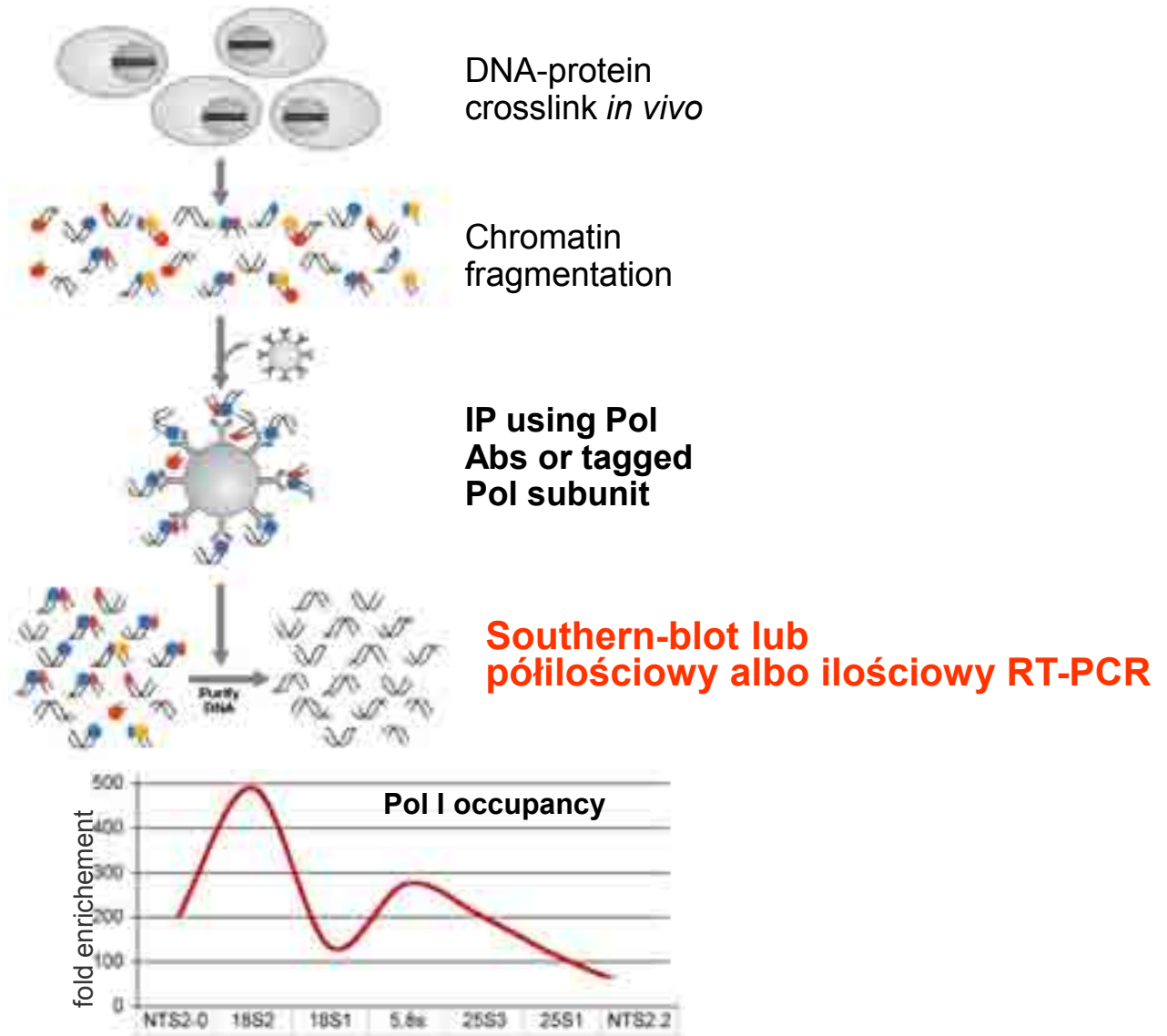


Rozdzielczość a specyficzność sieciowania

- 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)



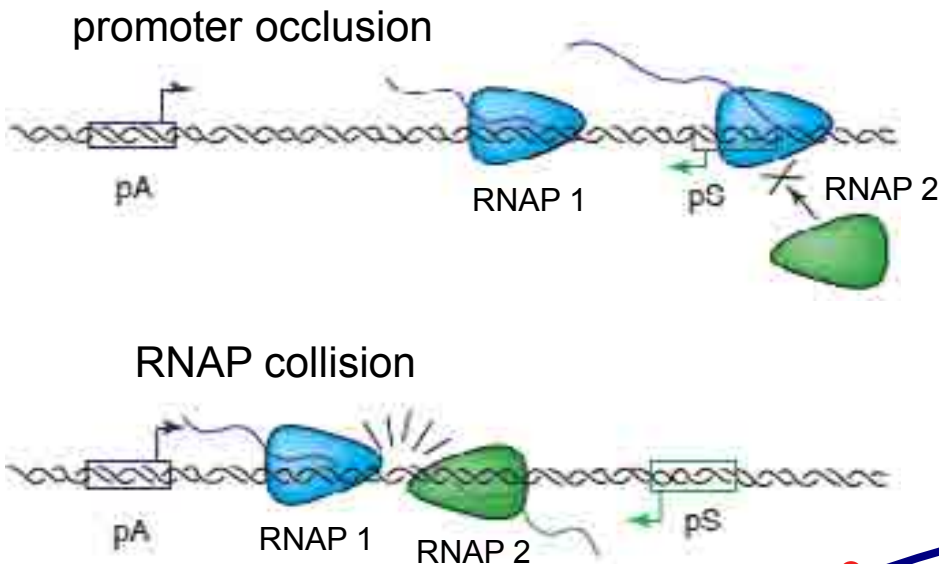
Terminacja transkrypcji Polimerazy I RNA

WHY TERMINATE?

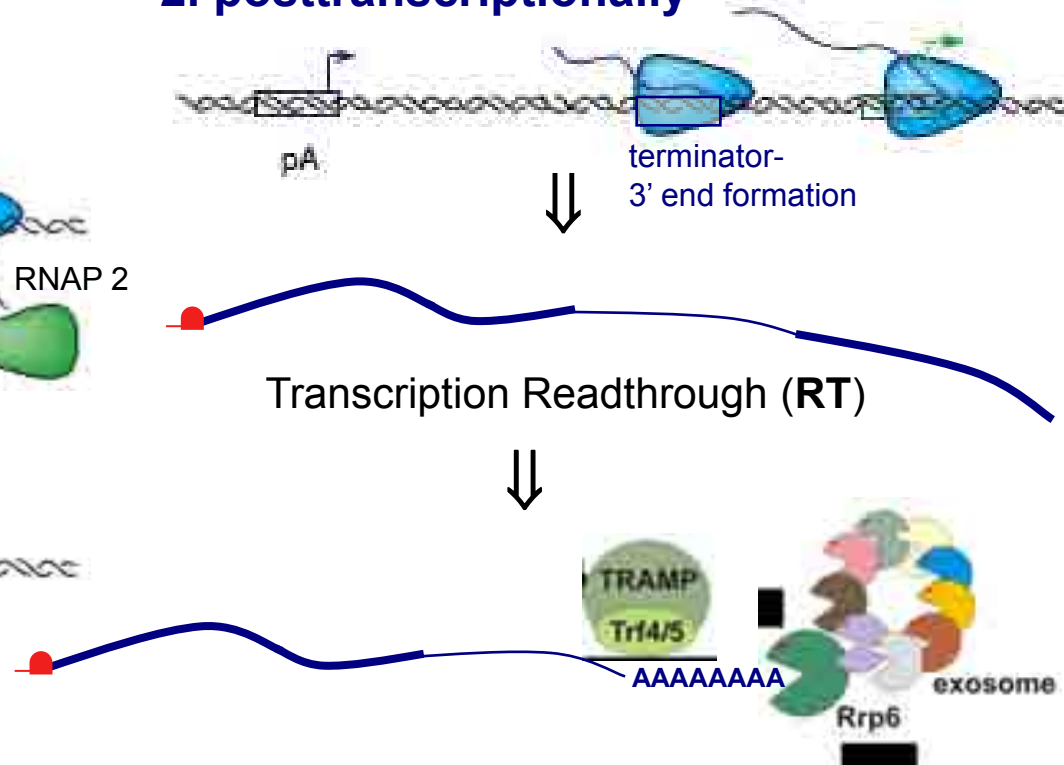
Very few genes in eukaryotic organisms are organized in polycistronic units (exceptions: ncRNAs, mtRNAs)

Defective transcription termination may result in the inhibition of gene expression

1. during transcription



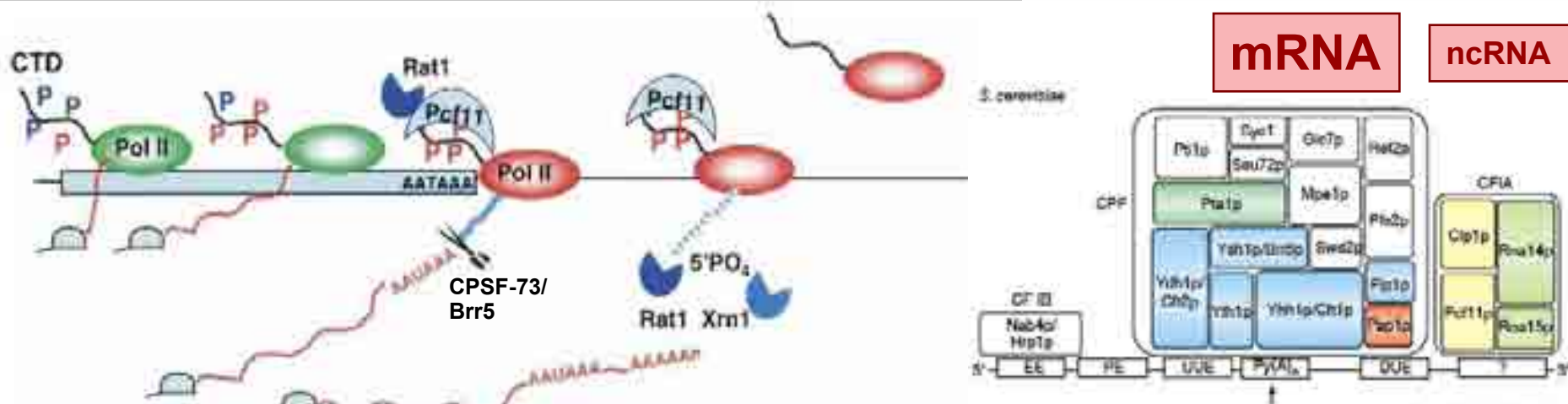
2. posttranscriptionally



The discard pathway by the nuclear RNA surveillance

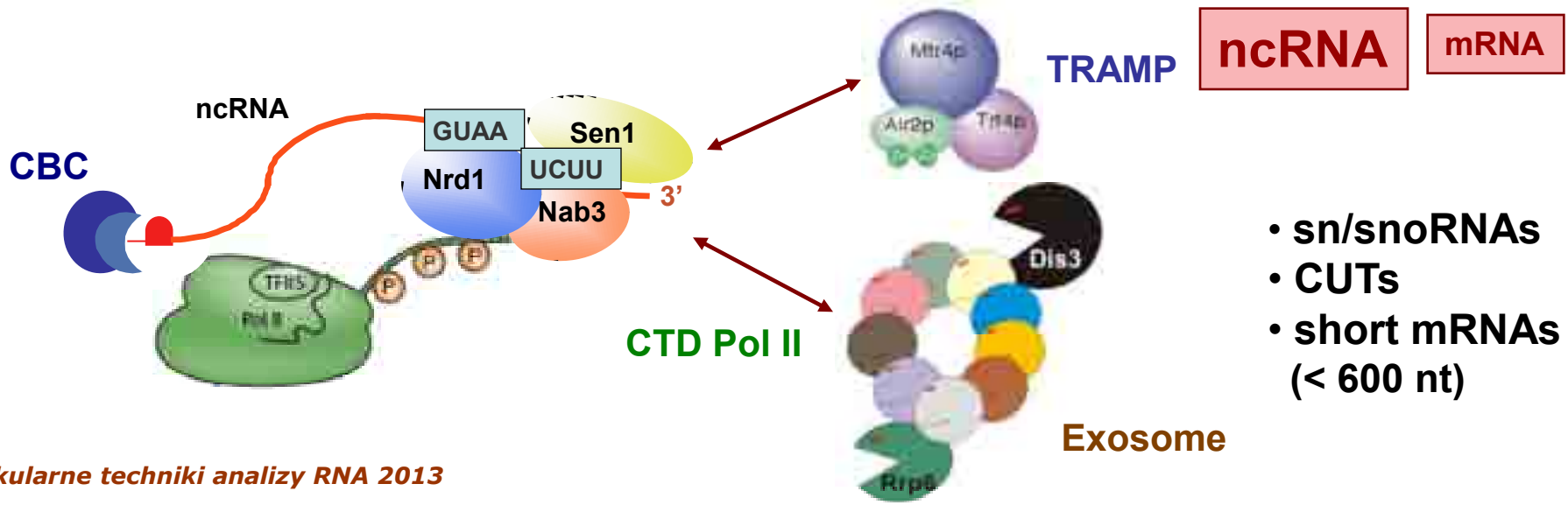
TRANSCRIPTION TERMINATION by Pol II

3' end CLEAVAGE and POLYADENYLATION allosteric::torpedo model



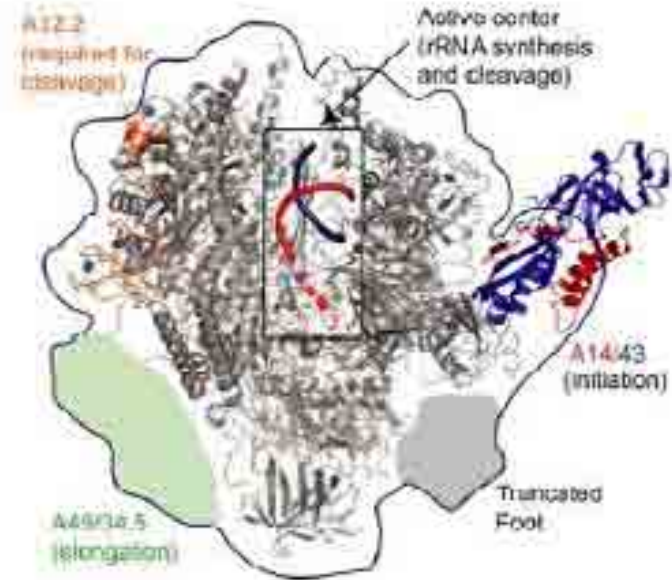
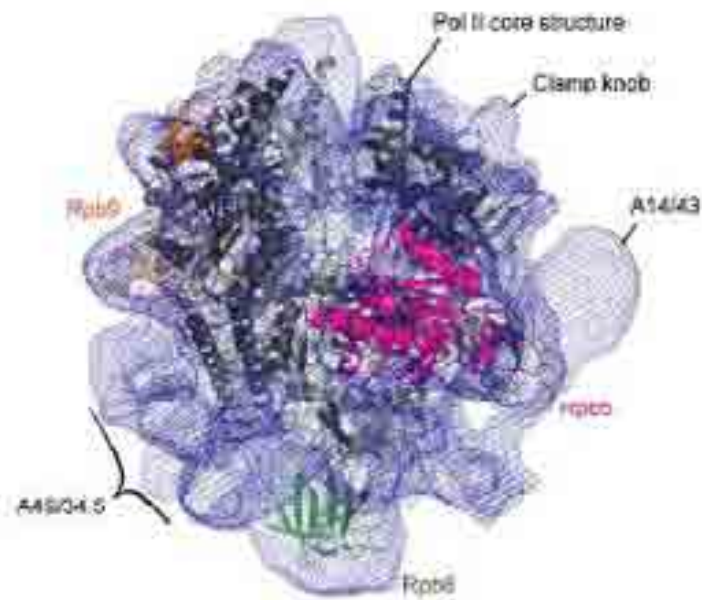
Luo and Bentley, *Gene Dev.*, 2006; Proudfoot, *Curr.Op.Cell.Biol.*, 2004

Nrd1/Nab3/Sen1- DEPENDENT TERMINATION



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

Eukariotyczna RNA Pol I

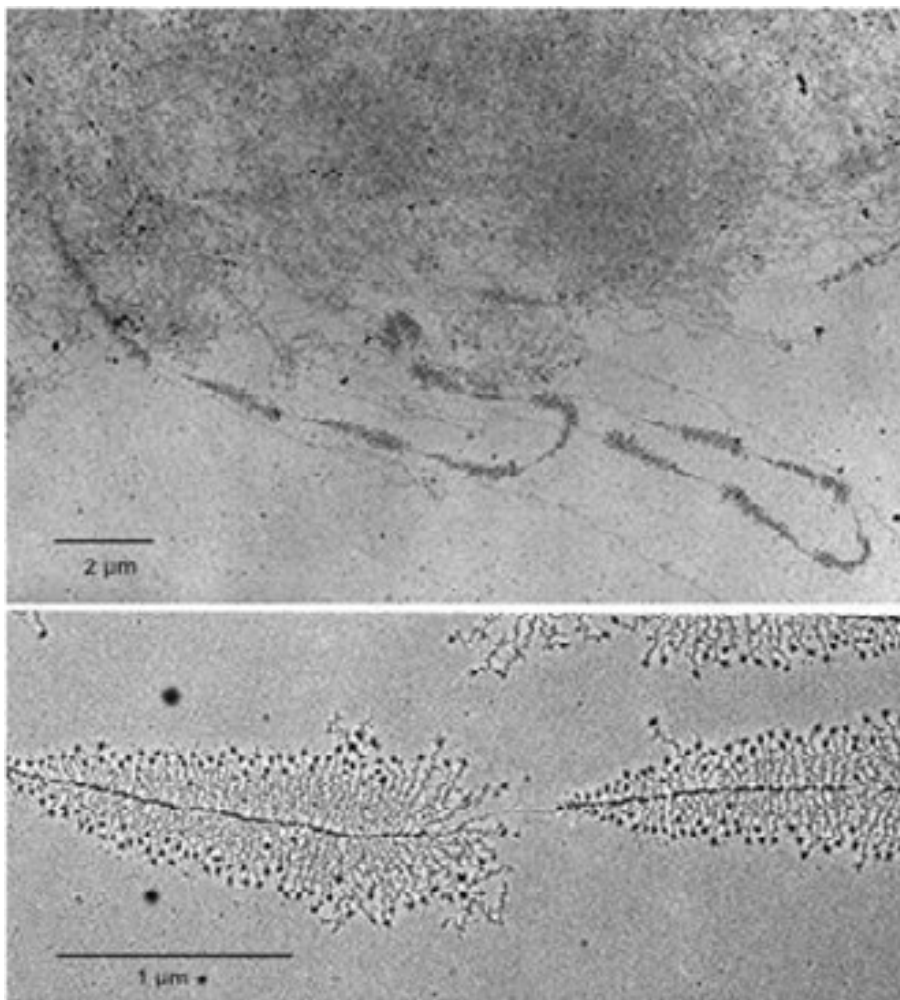


Kuhn et al, Cell, 2007 (Cramer's lab)

- 14 subunits
- core by specific **A190, A135, AC40, AC19, A12.2** subunits
- **Rpb5-6, 8, 10 and 12** - shared by Pol I-III
- specific subcomplexes **A14/A43** and **A49/A34.5**
- **no CTD**
- has intrinsic 3' RNA cleavage activity (**A12.2/Rpa12**) - possible roles in proofreading and **transcription termination**

Geny rDNA zebrane są w jąderku

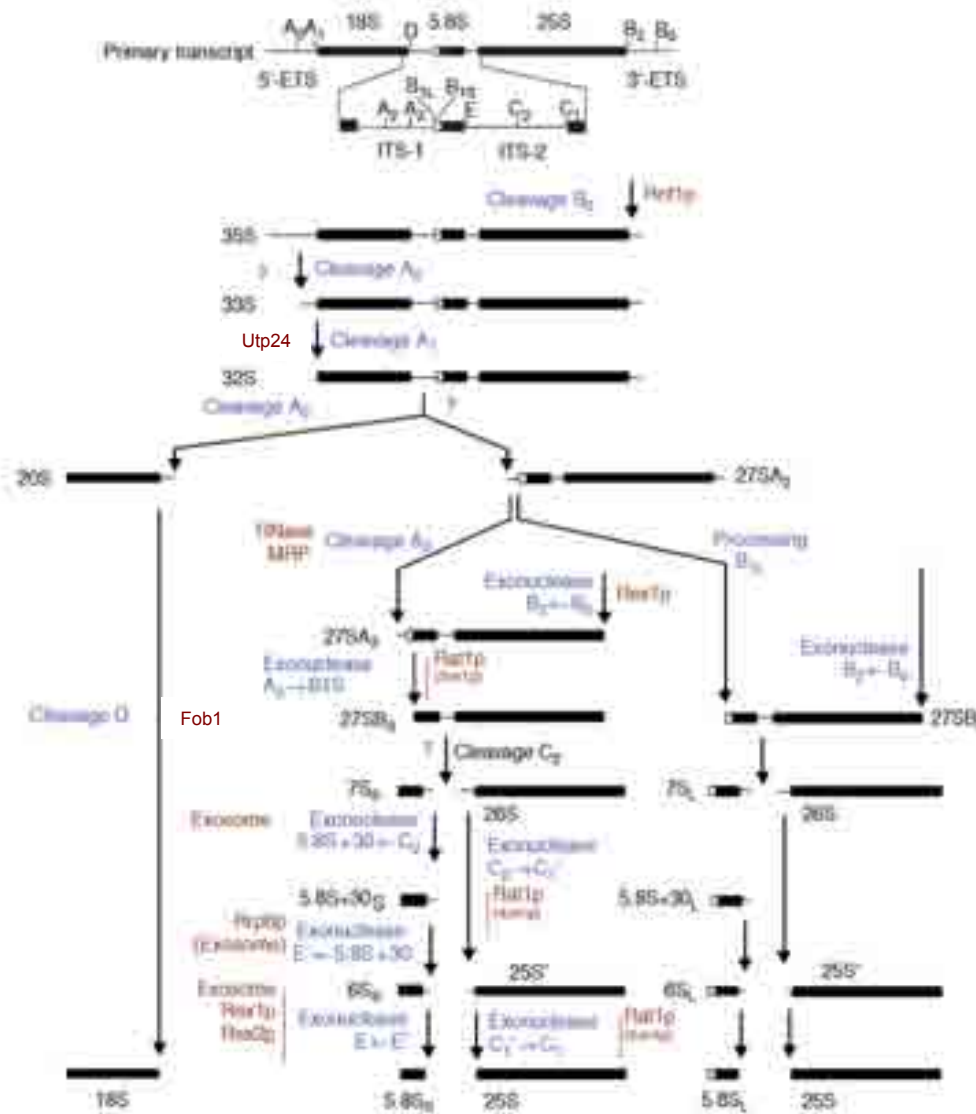
Miller's spreads – „Christmans tree”

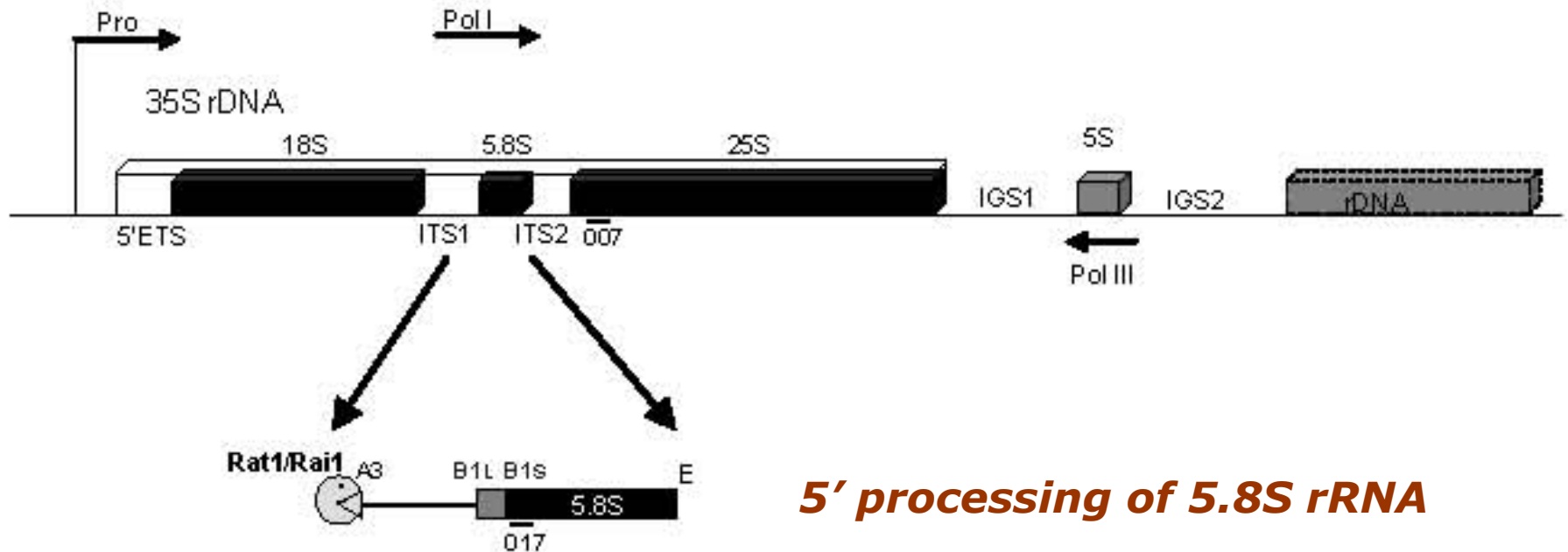


- Pol I transkrybuje rybosomalny RNA (**35S rRNA**)
- Pol I RNA – ok. **80%** całej aktywności transkrypcyjnej jądra komórkowego!!!
- U drożdży geny rDNA w **150-200** tandemowych powtórzeniach

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

Dojrzewanie rRNA

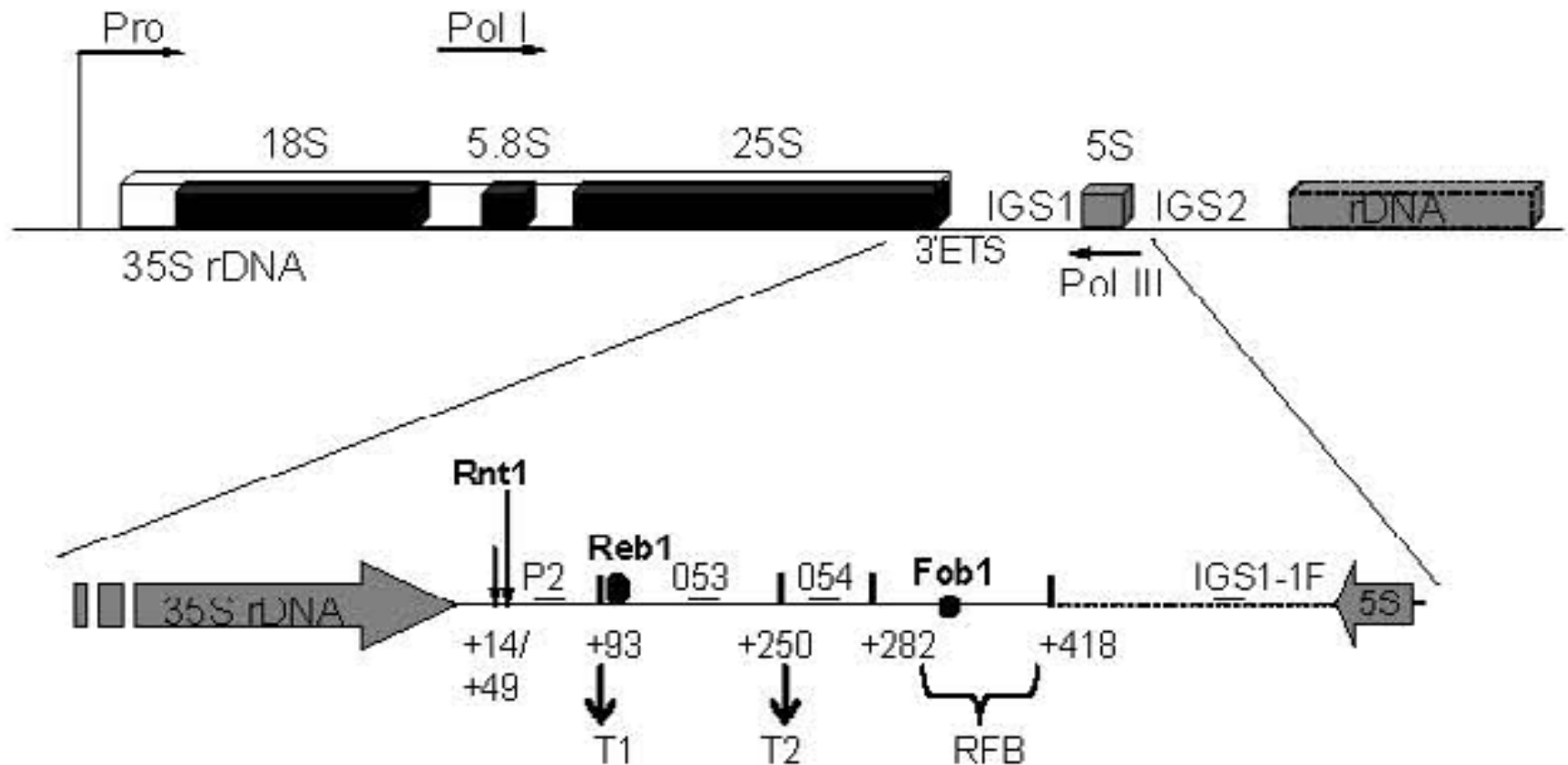




5' processing of 5.8S rRNA

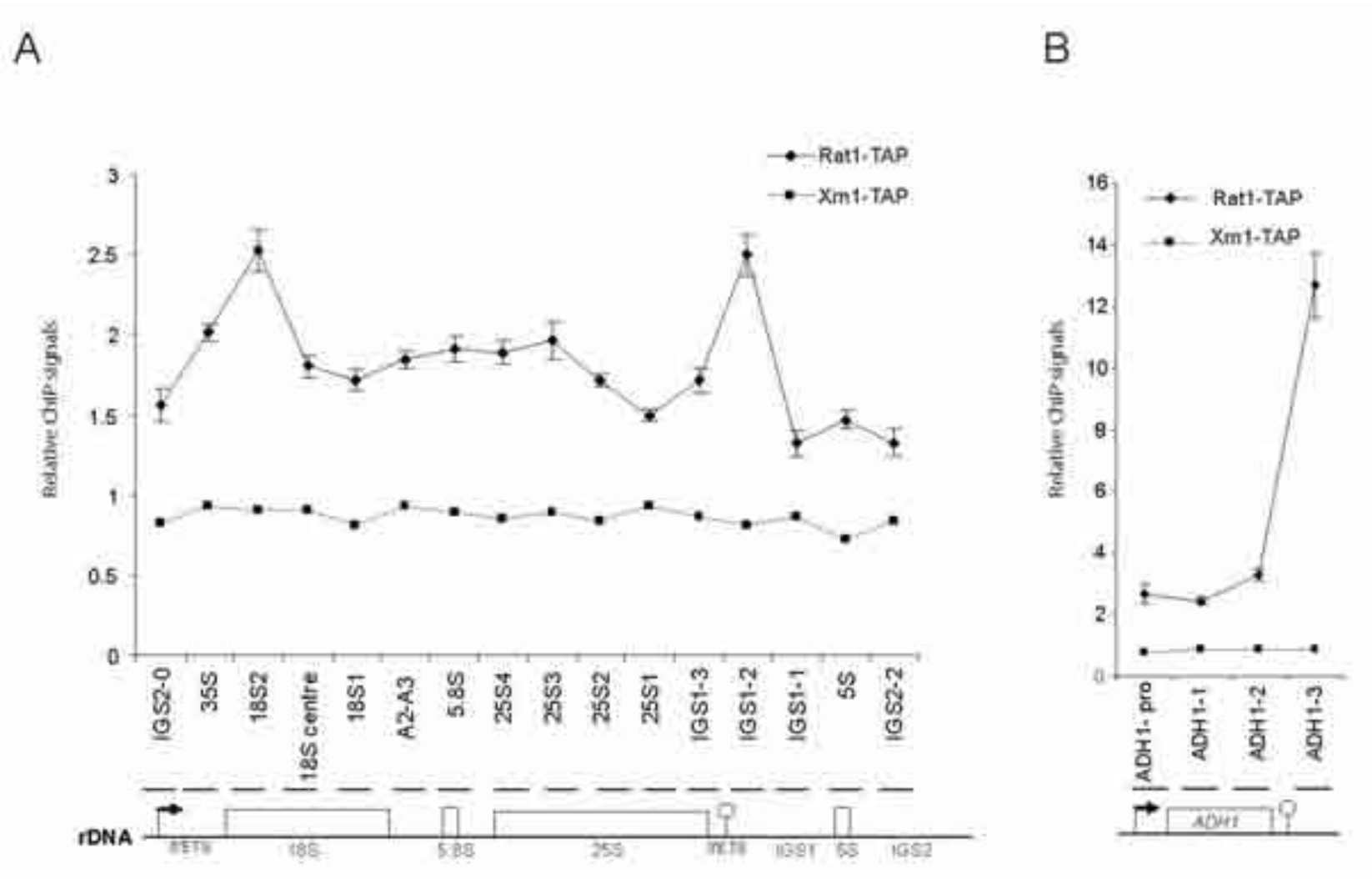
El Hage i wsp., Genes Dev., 2008,15;22(8)

Schematic of an rDNA repeat in *S. cerevisiae* with detailed transcription termination region



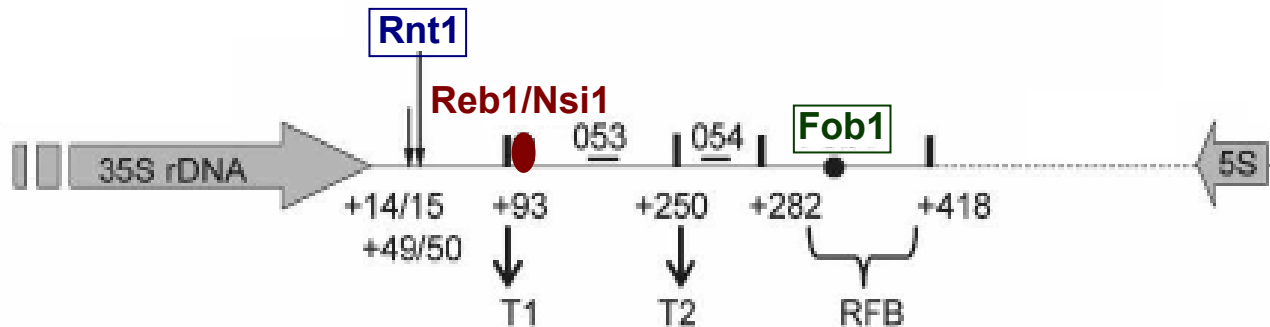
El Hage i wsp., Genes Dev., 2008,15;22(8)

Rat1 associates with the 3'-ETS region of the rDNA



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

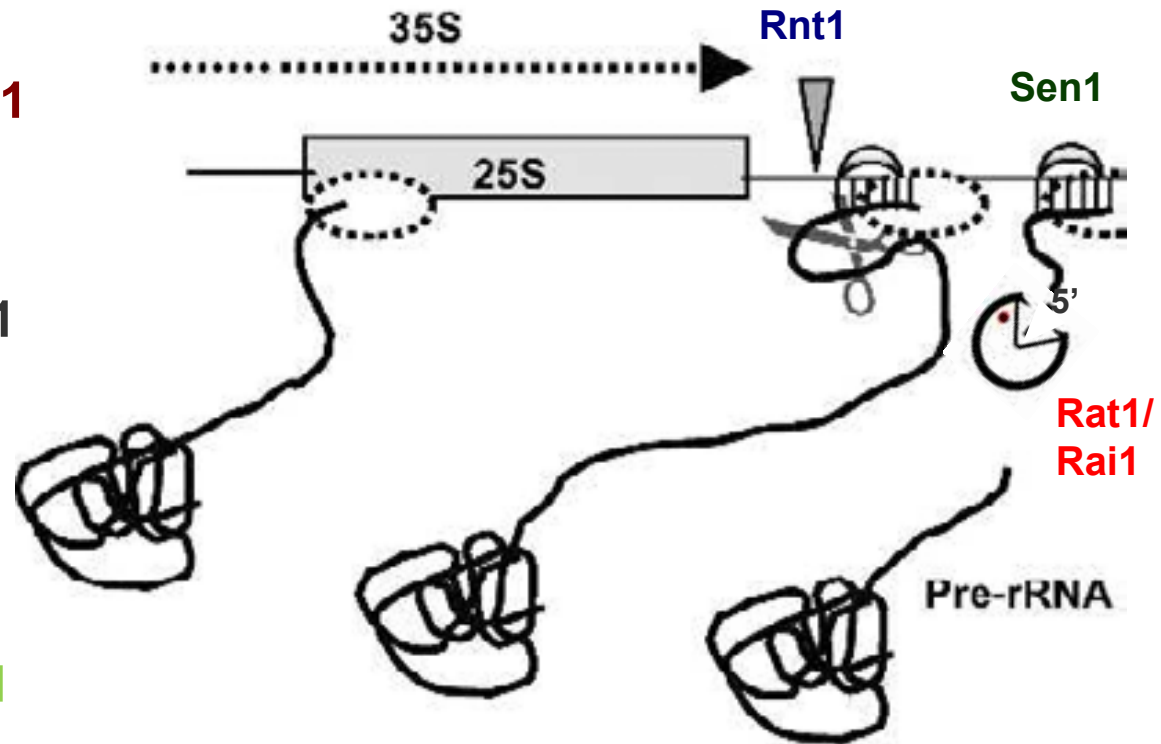
CZYNNIKI TERMINACJI POLIMERAZY RNA I



Pol I termination factors:

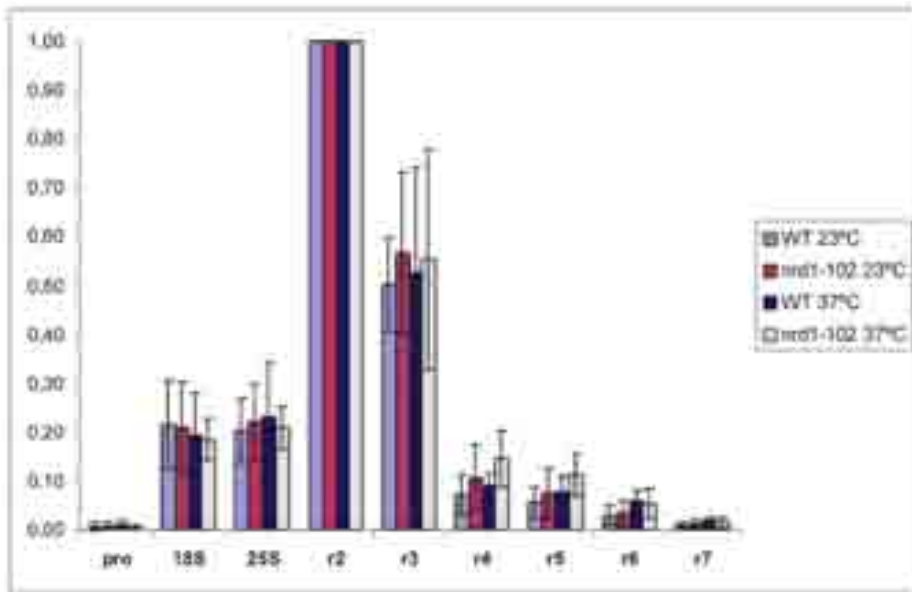
- DNA-binding protein Reb1
- Pol I subunit Rpa12
- endonuclease Rnt1
- RFB binding protein Fob1
- 5'-3' exonuclease Rat1
- + Rai1 cofactor
- RNA helicase Sen1
- DNA-binding protein Nsi1

(Reiter et al., EMBO J, 2012)

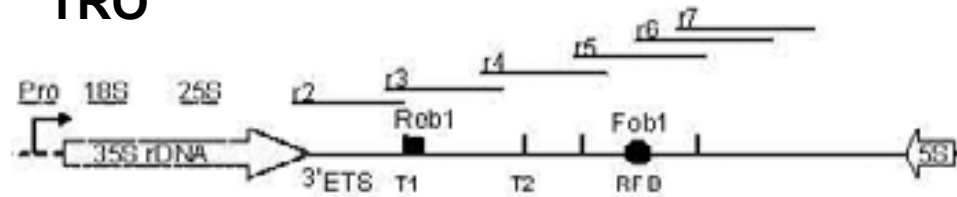


El Hage et al.; Kawauchi et al., Gene&Dev, 2008

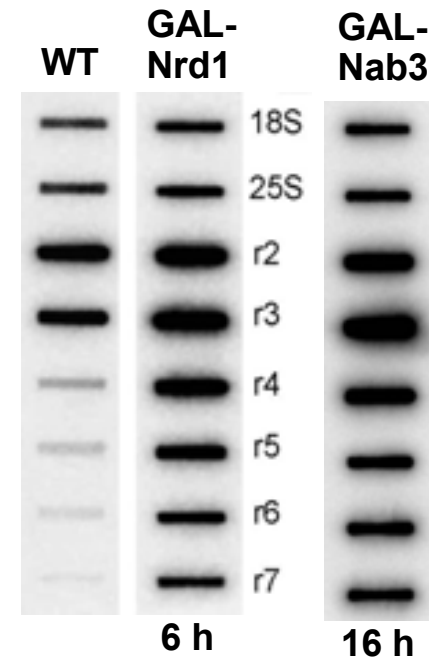
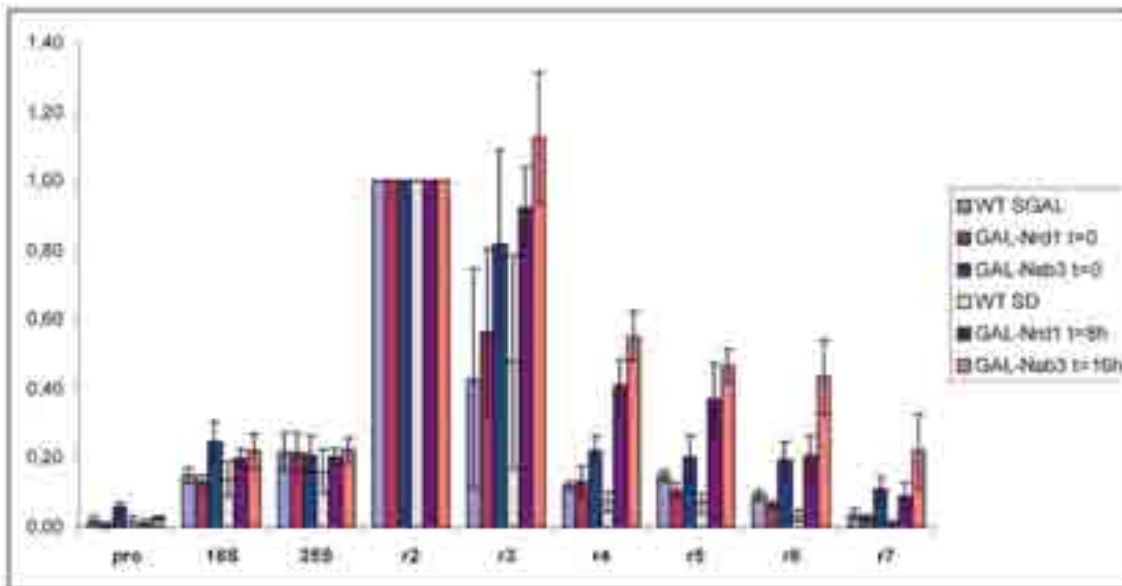
Pol I TERMINATION: Nrd1/Nab3



TRO



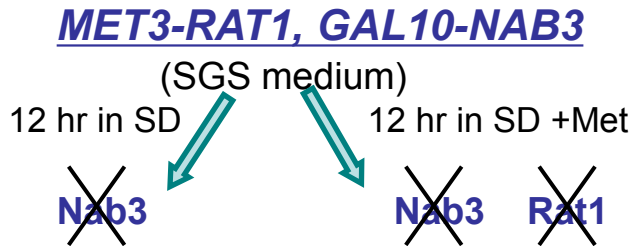
Transcriptional readthrough detected by TRO in *nrd1-102* mutant (RRM domain)



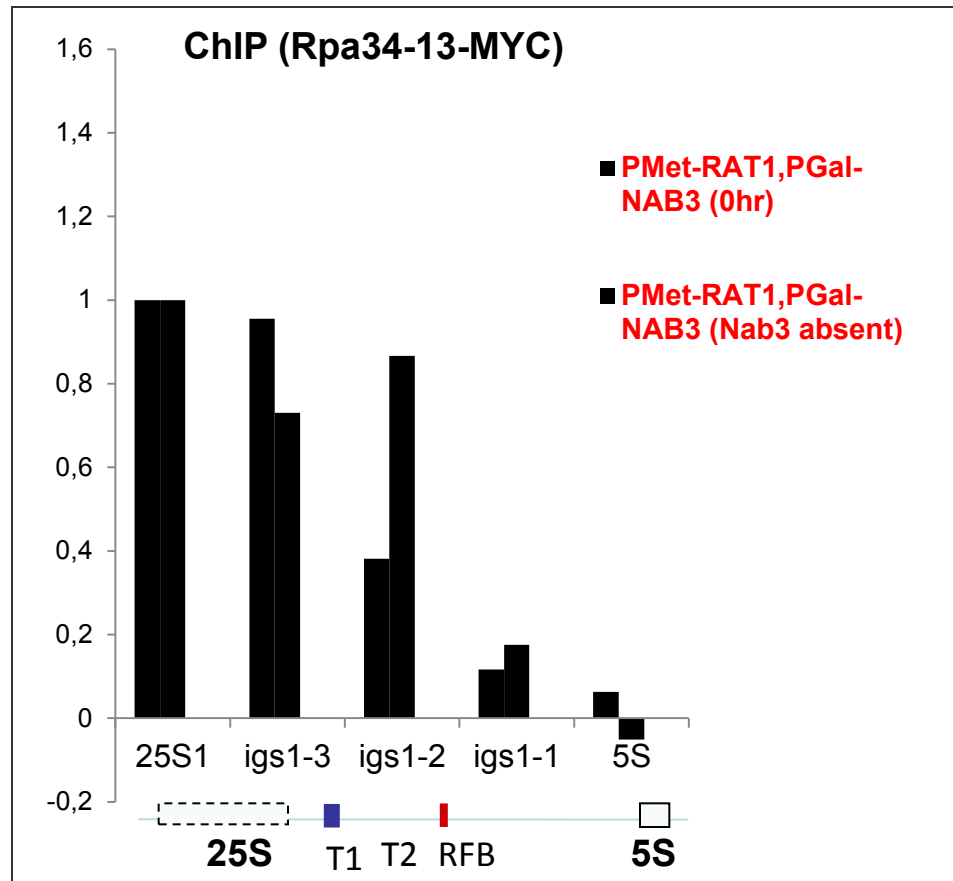
Depletion of Nrd1 or Nab3 results in a marked Pol I termination defect

Pol I TERMINATION: Nrd1/Nab3

Pol I ChIP Rpa34-myc



El Hage & Tollervey

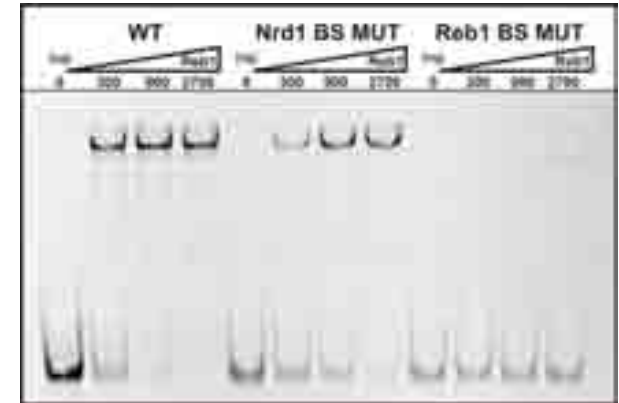


Pol I occupancy downstream of T1 terminator increases on depletion of Nab3
This effect is exacerbated by additional depletion of Rat1

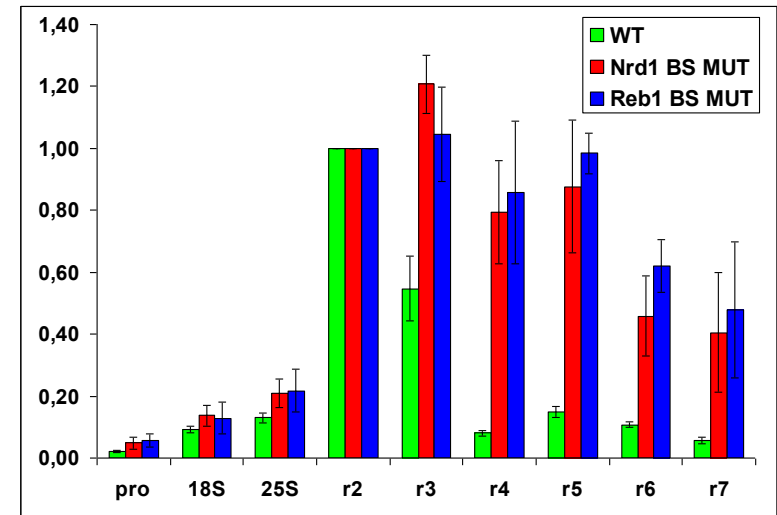
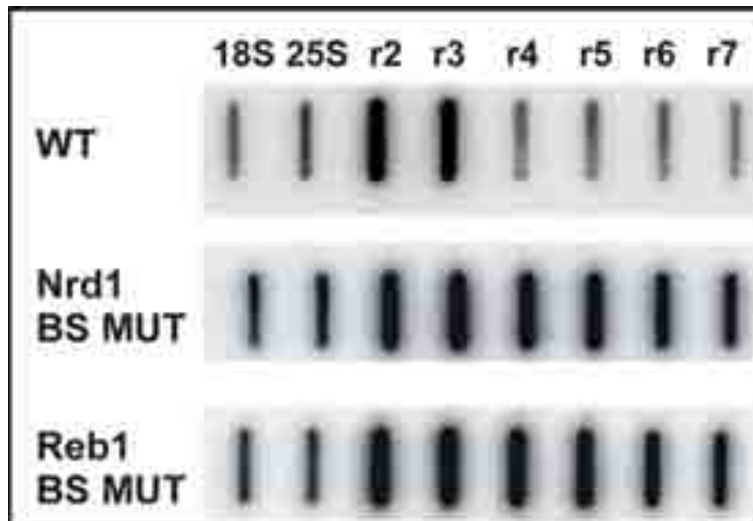
Reb1 AND Nrd1/Nab3 CONTRIBUTE EQUALLY TO Pol I TERMINATION:

rDNA terminator mutants

Reb1 binding to IGS1 variants (EMSA)



TRO profiles of mutated terminators

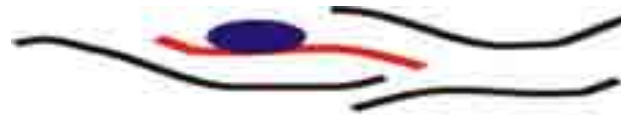


Mutations of Nrd1 or Reb1 binding sites cause strong Pol I readthrough

Immunoprecypitacja RNA - RIP

Immunoprecypitacja RNA jest podobna do ChIP

„cross-link” DNA/RNA-białka



Fragmentacja chromatyny



IP



Izolacja RNA, DNazowanie



Northern-blot lub
półilościowy albo ilościowy RT-PCR

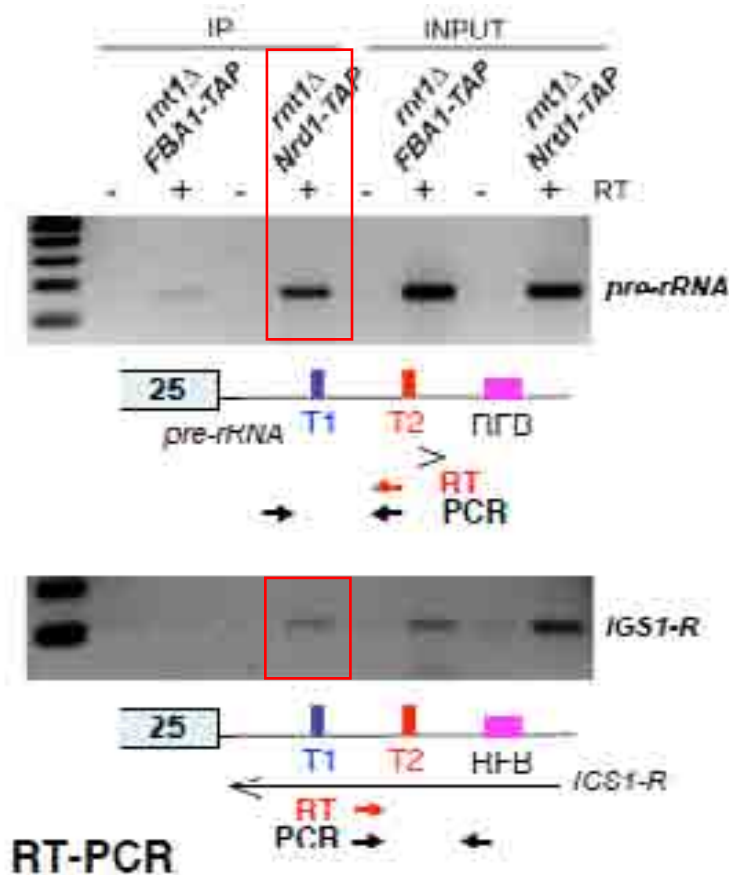


Nrd1 BINDS TO IGS1 IN pre-rRNA

RIP with formaldehyde crosslink

Nrd1-TAP in the absence of Rnt1

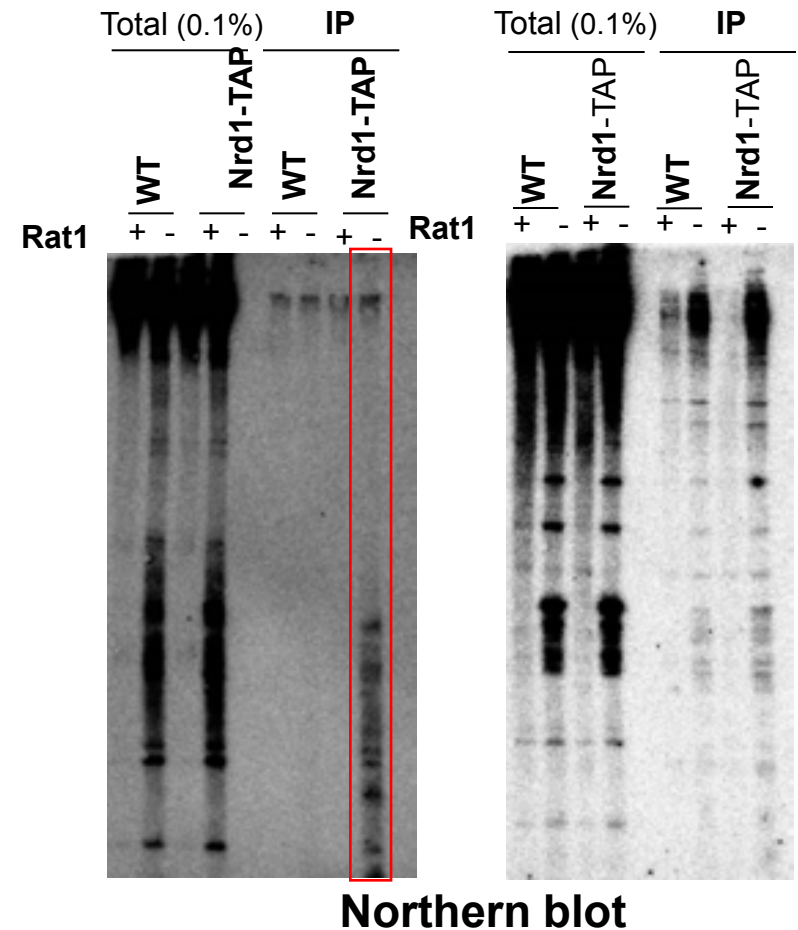
(Nrd1-TAP *rnt1*Δ strain)



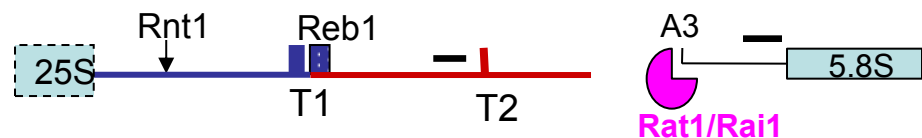
RNA IP

Nrd1-TAP in the absence of Rat1

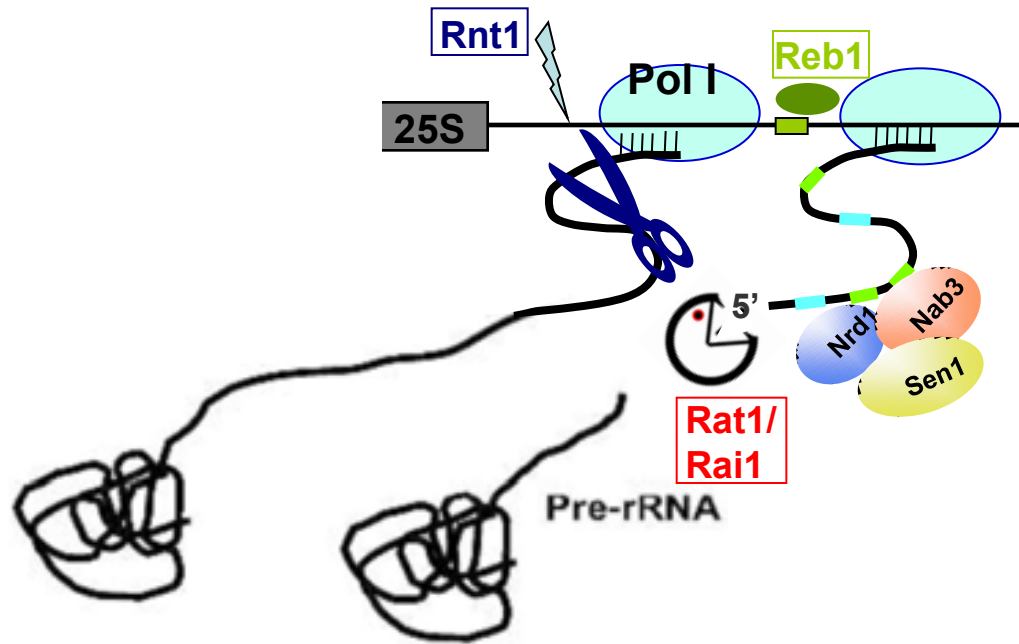
(Nrd1-TAP *MET3::Rat1/xrn1*Δ strain)



El Hage & Tollervey

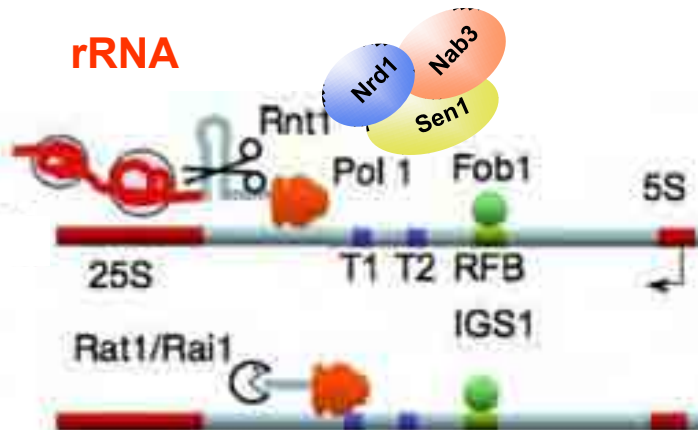
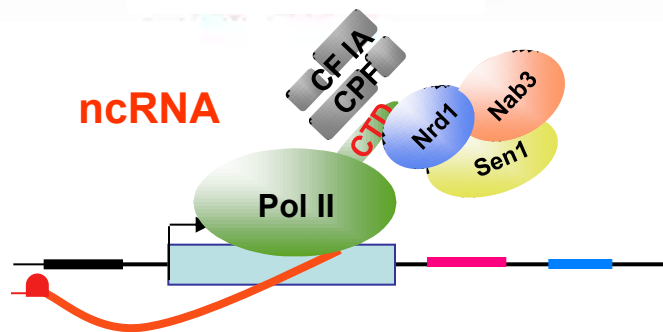
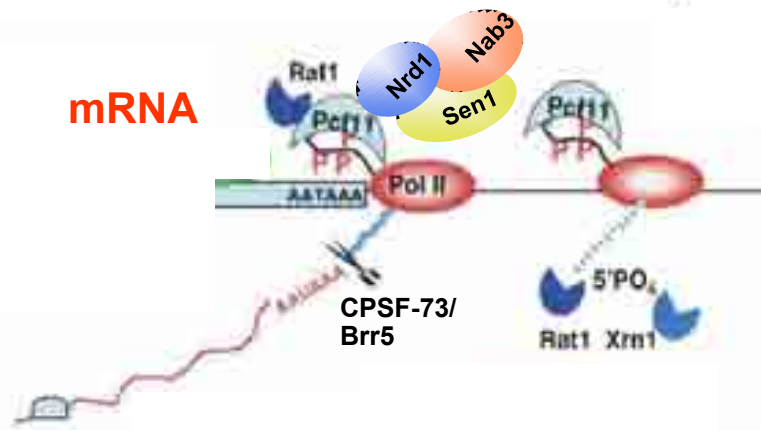


MODEL of Pol I TERMINATION



- **Relative contribution of each termination component**
 - Rat1/Rai1 and Nrd1/Nab3 represent separate mechanisms (additive defects)
- **Additional elements** (other DNA- or RNA- binding proteins?)
- **Links with rDNA silencing**

CONCLUSIONS



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

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.

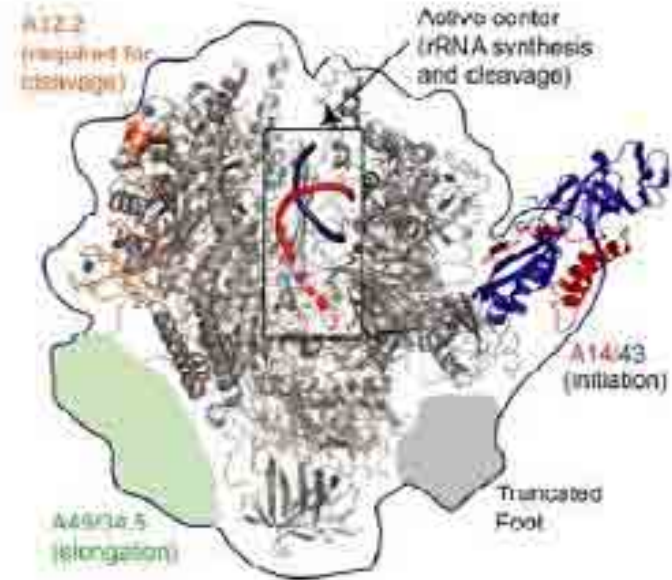
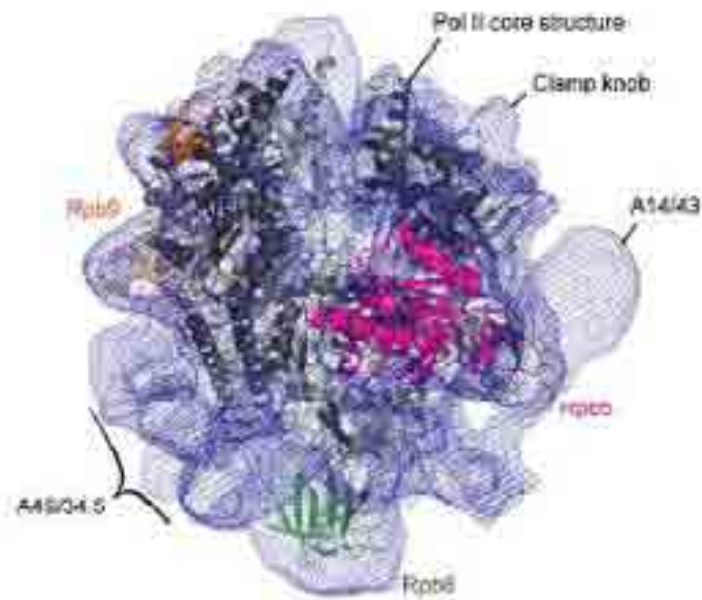
Aby badać transkrypt w chwili jego powstawania należy zastosować różne techniki molekularne:

- 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

Eukariotyczna RNA Pol I



Kuhn et al, Cell, 2007 (Cramer's lab)

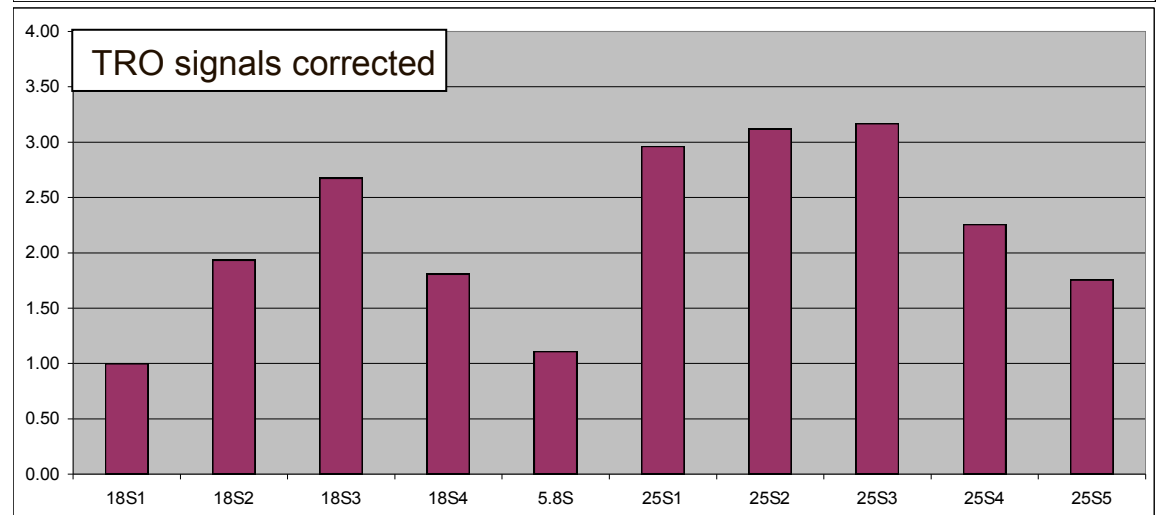
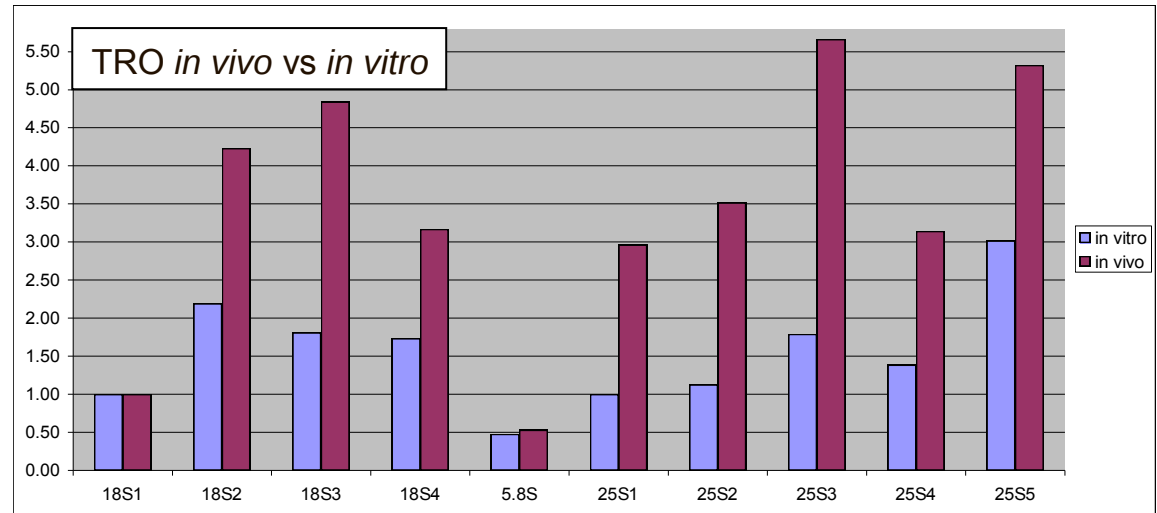
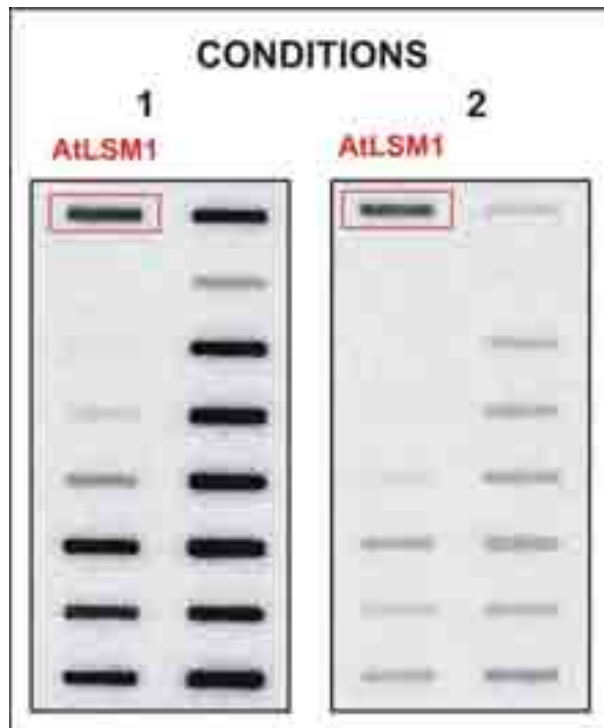
- 14 subunits
- core by specific **A190, A135, AC40, AC19, A12.2** subunits
- **Rpb5-6, 8, 10 and 12** - shared by Pol I-III
- specific subcomplexes **A14/A43** and **A49/A34.5**
- **no CTD**
- has intrinsic 3' RNA cleavage activity (**A12.2/Rpa12**) - possible roles in proofreading and **transcription termination**

Profile transkrypcji rRNA

TRO - using oligo probes against mature rRNAs

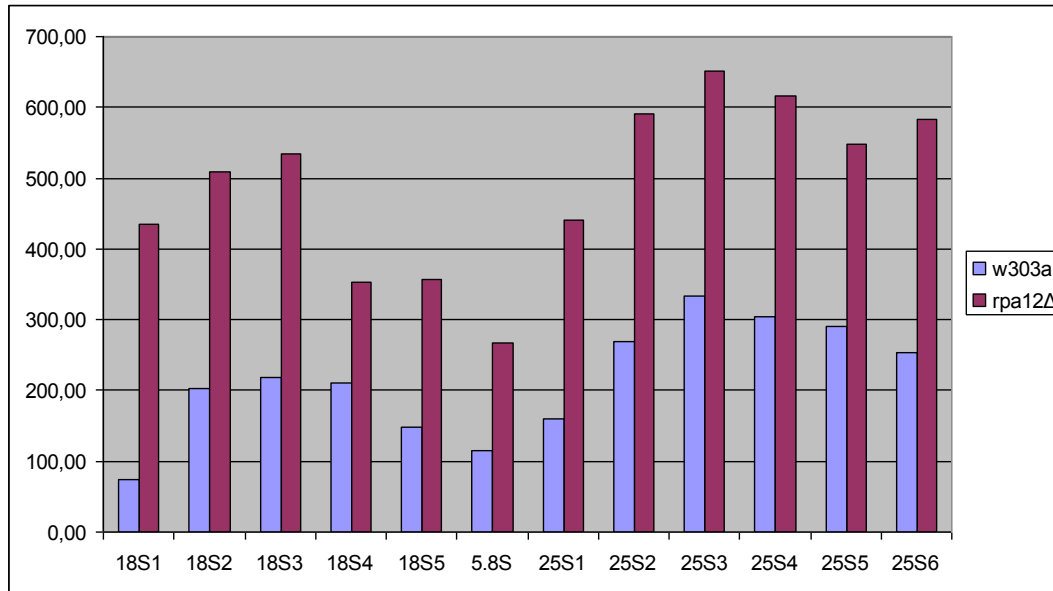
- standardized against exogenous hot *in vitro* transcribed RNA (**SPIKE: AtLSM1**)
- standardized against hybridization using hot *in vitro* transcribed 35S pre-rRNA

W303a rRNA transcription profiles standardized vs 18S1



rRNA transcription rate by TRO in *rpa12Δ*

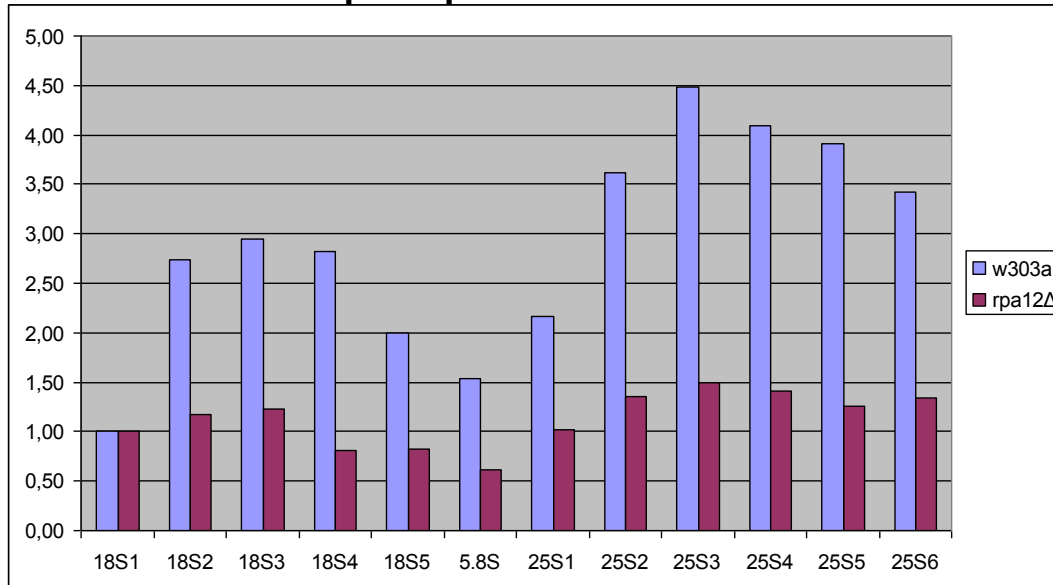
rRNA trascription



Pol I subunit, minor growth effect,
interacts with Rnt1
no pre-rRNA processing defect

Probe	<i>rpa12Δ/w303a</i>
scr1	10,45
5S	8,19
18S1	5,85
18S2	2,50
18S3	2,44
18S4	1,68
18S5	2,40
5.8S	2,33
25S1	2,75
25S2	2,20
25S3	1,95
25S4	2,02
25S5	1,88
25S6	2,30

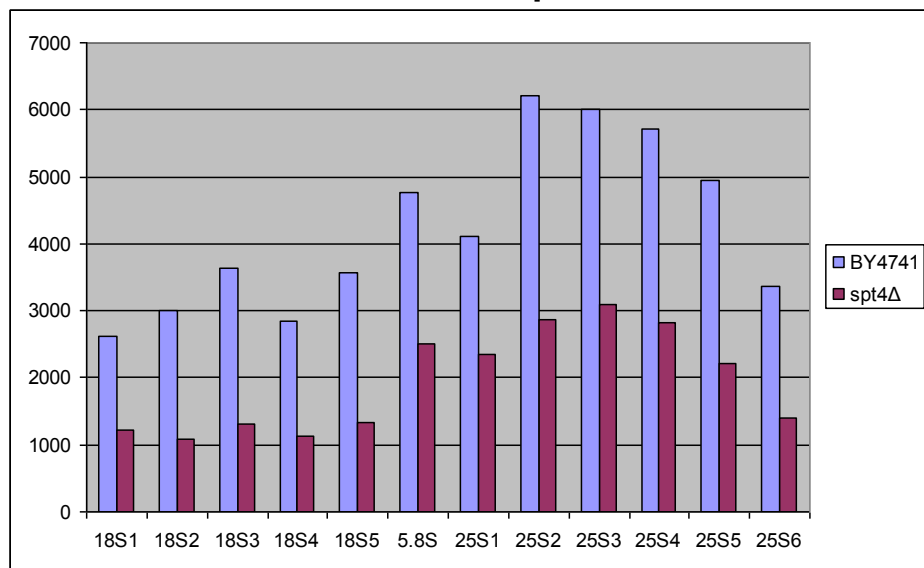
rRNA trascription profiles standarized vs 18S1



	MEAN	SD
18S	2,98	1,64
25S	2,18	0,32
18S+25S	2,54	1,14

rRNA transcription rate by TRO in *spt4Δ*

rRNA trascription

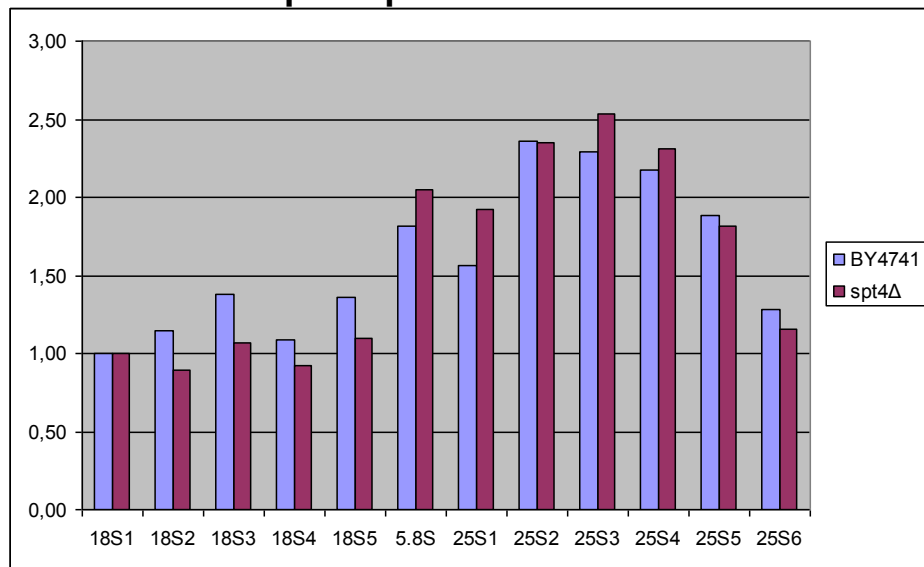


Pol II and I elongation factor,
minor growth effect, ts at 37°C,
pre-rRNA processing defect,
Total RNA synthesis rate is 70% of wt
(Schneider et al., PNAS 2006)

Probe ***spt4 Δ*/BY4741**

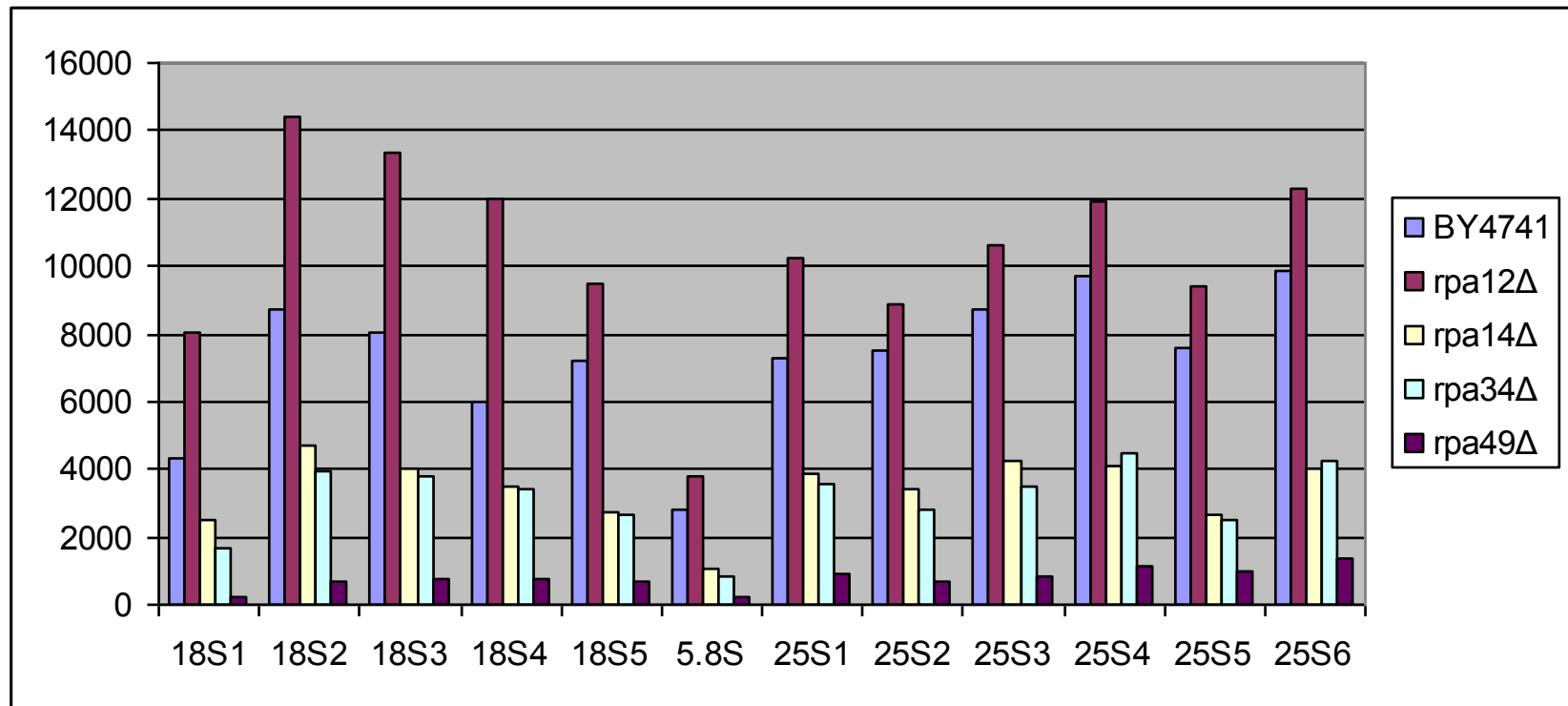
scr1	0,29
5S	0,32
18S1	0,46
18S2	0,36
18S3	0,36
18S4	0,39
18S5	0,37
5.8S	0,52
25S1	0,57
25S2	0,46
25S3	0,51
25S4	0,49
25S5	0,45
25S6	0,42

rRNA trascription profiles standardized vs 18S1



	Mean	SD
18S	0,39	0,04
25S	0,48	0,05
18S+25S	0,44	0,07

rRNA trascription in Pol I subunits mutants



rpa12Δ/BY4147

src1	0,95		
5S	1,15		
	Mean	SD	
18S	1,70	0,26	
25S	1,25	0,07	
18S+25S	1,46	0,31	

rpa14Δ/BY4147

src1	0,49		
5S	0,44		
	Mean	SD	
18S	0,52	0,08	
25S	0,44	0,06	
18S+25S	0,47	0,07	

rpa34Δ/BY4147

src1	0,40		
5S	0,40		
	Mean	SD	
18S	0,45	0,08	
25S	0,41	0,06	
18S+25S	0,43	0,06	

rpa49Δ/BY4147

src1	0,00		
5S	0,23		
	Mean	SD	
18S	0,09	0,03	
25S	0,12	0,02	
18S+25S	0,10	0,05	