

Plan wykładów do fakultetu

„MOLEKULARNE TECHNIKI ANALIZY RNA”

semestr zimowy 2022-23r.

(piątek, 16:00, piątek, 16:00, sala nr 7, gmach IBB PAN)

1. (07.10) „Świat RNA” cz. 1 – Joanna Kufel, IGiB UW.

Koncepcja „RNA world”, Noble w dziedzinie RNA. Katalityczne cząsteczki RNA – klasy, mechanizm, występowanie. SELEX. Pozostałości świata RNA - rybosom, splajsosom, wirusy RNA. Różnorodność klas RNA u Eukaryota i ich metabolizm. Podstawowe mechanizmy regulacji ekspresji genów.

2. (14.10) „Świat RNA” cz. 2 – Joanna Kufel, IGiB UW.

3. (21.10) „Przegląd technik opartych o odwrotną transkrypcję. Techniki badania transkrypcji: TRO, ChIP, RIP i DIP. Analiza końców poliA RNA” – Michał Koper, IGiB UW.

Teoria odwrotnej transkrypcji (RT). Przegląd technik opartych o RT: RT-PCR w tym półilościowy, pulsacyjny RT-PCR, RACE, cRT-PCR, technika wydłużania startera ("primer extension"). Techniki badania nowopowstających transkryptów: jądrowy „Transcription Run-On”, immunoprecypitacja chromatyny (ChIP), immunoprecypitacja RNA (RIP). Do zilustrowania powyższych technik posłużą badania terminacji transkrypcji Polimerazy I RNA. Specyficzność wiązania DNA przez czynniki transkrypcyjne: „ChIP on chip”, immunoprecypitacja DNA (DIP). Badanie końców poliA RNA (technika PASE, izolacja frakcji RNA poliA⁺).

4. (28.10) „niekodujące RNA” – Monika Zakrzewska-Płaczek, IGiB UW.

Niekodujące RNA (ang. non-coding RNA; ncRNA). Biogeneza i funkcje małych i długich niekodujących RNA. Mechanizmy wyciszania transkrypcji zależne od niekodujących RNA. Kompleksy RNP biorące udział w wyciszeniu transkrypcji. Rola chromatyny w regulacji ekspresji genów.

5. (04.11) „Świat RNA” cz. 3 – Joanna Kufel, IGiB UW.

6. (18.11) „PCR w czasie rzeczywistym (ilościowy; qPCR)” – Michał Koper, IGiB UW.

Teoria qPCR: sposoby detekcji DNA, podstawy projektowania starterów, sondy hybrydizacyjne, wprowadzenie do obliczeń. Zastosowania: określanie poziomu badanych transkryptów w komórce, wykrywanie kwasów nukleinowych patogenów, detekcja pojedynczych mutacji (SNP). Dobra praktyka laboratoryjna przy doświadczeniach qPCR i najczęstsze „pułapki czekające” na eksperymentatorów.

7. (25.11) „RNA w neuronach” – Magdalena Dziembowska, CeNT UW.

Transport mRNA do wypustek komórek nerwowych i lokalna translacja w odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne. Metody wizualizacji mRNA z żywym neuronem w czasie rzeczywistym, hybrydizacja *in situ*, metody biochemiczne pozwalające na bezpośrednią detekcję transkryptów ulegających lokalnej translacji w neuronach.

8. (02.12) „Udział metabolizmu RNA w procesach fizjologicznych” – Anna Golisz, IGiB UW.

Czynniki metabolizmu RNA i miRNA u roślin – rola w przekazywaniu sygnałów hormonalnych, rozwoju embrionalnym i generatywnym, zegarze dobowym, odporności na stres i patogeny.

9. (09.12) „Badanie enzymów metabolizmu RNA na przykładzie egzosomu” – Rafał Tomecki, IGiB UW/IBB PAN.

Ścieżki rozkładu RNA w organizmach eukariotycznych. Egzo- i endo- nukleazy. Egzom: wielofunkcyjny i wieloskładnikowy kompleks. Badania strukturalne i funkcjonalne egzom u drożdży i w komórkach ludzkich. Mechanizm działania, współpraca aktywności egzo- i endo-nukleolitycznej.

10. (16.12) „Struktura RNA a funkcja. Mapowanie struktury RNA *in vitro*. Metody badania transkryptomów” – Michał Koper, IGiB UW.

Mapowanie struktury RNA *in vitro*: sondy molekularne trawiące specyficznie względem struktury i sekwencji RNA. Przełączniki RNA i aptamery – naturalne oraz wyselekcjonowane na potrzeby leków lub biosensorów. Wysokoprzepustowe metody badania transkryptomów oparte o techniki sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq, ChIP-seq).

11. (13.01) „Metody badań strukturalnych RNA” – Marcin Nowotny, IICMB.

Metody badania struktur kompleksów RNA-białko, metody krystalizacji kompleksów RNP (na przykładzie rybosomu, snRNP, RNazy H). Porównanie krystalografii i badań NMR dla RNA. Technika SAXS. Chemiczne (SHAPE) i bioinformatyczne przewidywanie struktur RNA.

12. (20.01) „Globalne analizy kompleksów rybonukleoproteinowych” – Joanna Kufel, IGiB UW.

Metody biochemiczne czyszczenia kompleksów rybonukleoproteinowych (RNP). Drożdżowy system trzyhybrydowy. Chromatografia RNA w połączeniu ze spektroskopią mas. CRAC („crosslinking and analysis of cRNA”) i CLIP („crosslinking and immunoprecipitation”).

13. (27.01) „RNowe nowości” – Joanna Kufel, IGiB UW.

Nowe klasy ncRNA. RNAi u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*? Fragmenty RNA powstałe z rozkładu stabilnych RNA. Nietypowe funkcje RNP.

Plan zajęć do fakultetu

„MOLEKULARNE TECHNIKI ANALIZY RNA”

semestr zimowy 2022-23r.

(gr. 1 poniedziałki, 10:15-13:30; gr. 2 czwartki, 9:30-12.45 – sala 129 IGiB UW)

- 1. 06 i 10.10.** Podstawy pracy z RNA. Izolacja RNA z drożdży i z roślin.
- 2. 13 i 17.10.** Ocena jakości RNA. Rozdział w żelach. Radioizotopowe i fluorescencyjne metody detekcji RNA. Detekcja miRNA u roślin - wprowadzenie. Detekcja miRNA u roślin, technika Northern-blot (1) z rozdziałem RNA w żelu poliakrylamidowym.
- 3. 20 i 24.10.** Technika Northern-blot (1): hybrydyzacja z sondą oligonukleotydową znakowaną biotyną. Płukania, skan i analiza wyników. Wykrywanie transkryptów CUT u drożdży: technika Northern-blot (2) z rozdziałem RNA w żelu agarozowym.
- 4. 03 i 07.11.** Detekcja CUT u drożdży: znakowanie sondy metodą "asymetryczny PCR" i hybrydyzacja. Eksploracyjna analiza danych transkryptomicznych - wprowadzenie.
- 5. 10 i 14.11.** Eksploracyjna analiza danych transkryptomicznych i translatomicznych pochodzących z eksperymentów opartych na RNA-seq - ćwiczenia bioinformatyczne.
- 6. 17 i 21.11.** Detekcja CUT u drożdży: omówienie wyników hybrydyzacji Northern-blot (2). Analiza końców 3' małych jąderkowych RNA (snoRNA) przy pomocy cRT-PCR. Cięcie Rnazą H dupleksów RNA-oligonukleotyd i ligacja (cyrkularyzacja) RNA.
- 7. 24 i 28.11.** Analiza końców 3' snoRNA: RT + PCR.
- 8. 01 i 05.12.** cRT-PCR: rozdział produktów w żelu i omówienie ich sekwencjonowania. Wykrywanie mRNA metodą RT-qPCR. Projektowanie starterów do qPCR - teoria i praktyka. Konkurs na najwydajniejszą parę starterów, tzn. każdy student zaprojektuje przynajmniej 1 parę starterów, która zostanie zamówiona i przetestowana na następnych zajęciach.
- 9. 08 i 12.12.** Przeprowadzenie reakcji qPCR: testowanie zaprojektowanych starterów dla genów referencyjnych.
- 10. 15 i 19.12.** Oznaczenia biochemiczne aktywności enzymów degradujących RNA. Analiza aktywności rybonukleolitycznych różnych wersji białka Dis3 - głównej podjednostki katalitycznej kompleksu egzozomu; badanie wrażliwości aktywności egzorybonukleolitycznej 5'-3' białka Xrn1 na status fosforylacji końca 5' substratu; reakcje degradacji syntetycznych oligonukleotydów RNA znakowanych fluorescencyjnie, rozdział produktów reakcji w denaturującym żelu poliakrylamidowym.
- 11. 09 i 12.01.** Analiza wyników reakcji qPCR.
- 12. 16 i 19.01.** Oddziaływania białka - kwasy nukleinowe. Wiązania drożdżowego białka Reb1 z rDNA. Fluorescencyjny "gel-shift" (inkubacja prób, rozdział w natywnym żelu poliakrylamidowym). Eksploracyjna analiza danych transkryptomicznych i translatomicznych - wprowadzenie.
- 13. 23 i 26.01.** Prezentacje studentów na zaliczenie ćwiczeń.

Zasady zaliczenia przedmiotu

Ćwiczenia: na podstawie prac domowych oraz prezentacji dotyczących wybranych technik badania RNA.

Cały przedmiot: egzamin pisemny (pytania testowe).

Koordynator przedmiotu:

Michał Koper
m.koper@uw.edu.pl