

**Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT);
Analiza końców RNA;
Techniki badania transkrypcji**

Michał Koper, IGiB UW

**RNA steady-state level =
equilibrium between
transcription, processing,
and degradation**

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)
- **GRO-Seq** (Global Run-On Sequencing)



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

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

Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

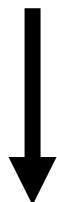
Odkrycie odwrotnej transkryptazy



Nagroda Nobla z Medycyny i Fizjologii 1975

DNA
↓
↑ RT

RNA



BIAŁKO



Howard
M. Temin



David
Baltimore



Renato
Dulbecco

(wirusy onkogenne)

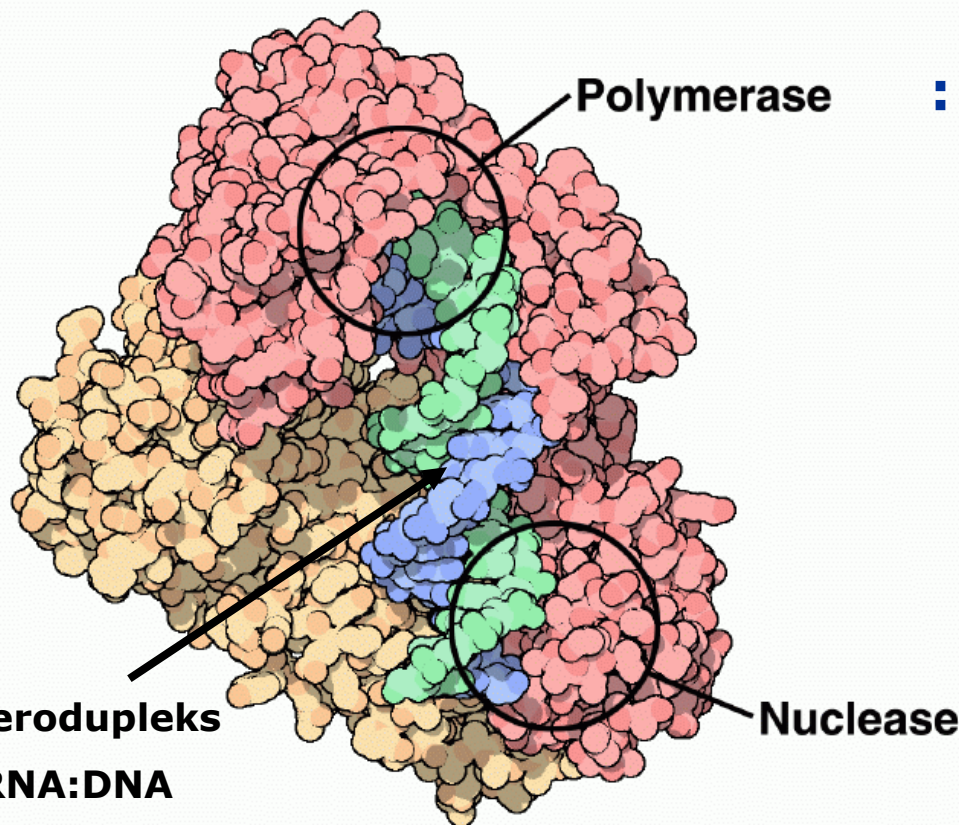
**RNA ZALEŻNA
POLIMERAZA DNA**

Temin, H. M., and S. Mizutani. 1970. **RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.** Nature 226: 121-123.

Odwrotna transkryptaza: 2 enzymy w 1

HIV-1 RT

(heterodimer)



**: aktywność RNA zależnej
polimerazy DNA**
(i DNA zależnej Pol DNA)

: aktywność RNazyH

Ding J. i wsp., 1998, J. Mol. Biol. 284; 1095-1111

RT wymaga startera do rozpoczęcia syntezy DNA

**startery
genowo-specyficzne**



**startery oligodT,
mogą być „kotwiczone”
tzn. TTTTTTTTTT(A/C/G)**



**krótkie startery losowe
np. heksamery, oktamery**



Zastosowania odwrotnej transkrypcji

OZNACZENIA JAKOŚCIOWE:

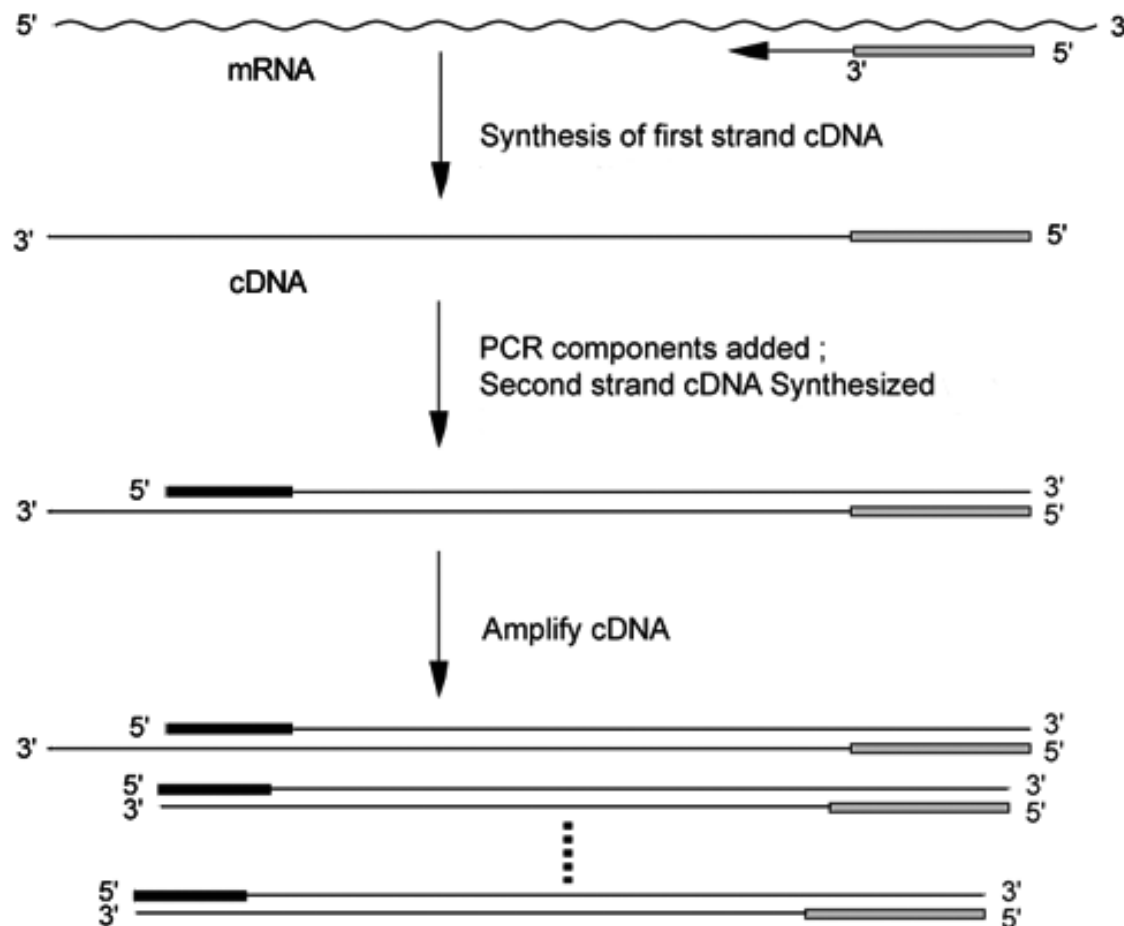
- poznawanie struktury genów (introny)
- wyznaczanie końców 5' RNA
- analiza budowy końców 3'
- wykrywanie ekspresji konstruktów

OZNACZENIA ILOŚCIOWE:

- semiq RT-PCR
- RT-qPCR

Sekwencjonowanie transkryptomów

Podstawy RT-PCR



Oznaczenia ilościowe:

- semiq RT-PCR
- RT-qPCR

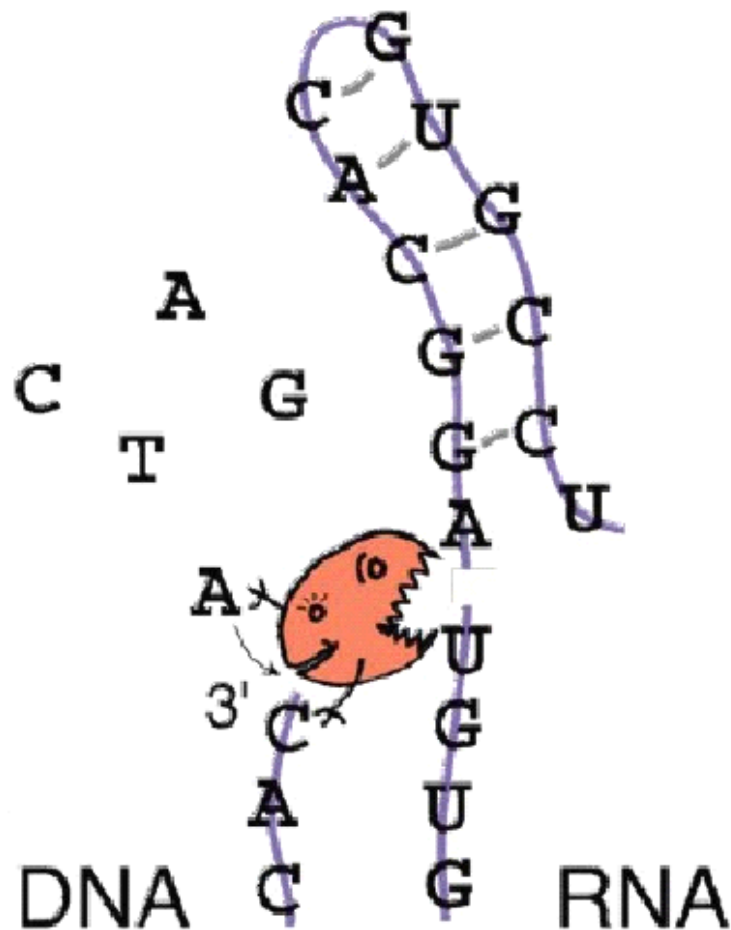
Aktywność RNazy H RT dzikiego typu

Odpowiedzialna za:

- *usuwanie hybryd DNA:RNA*
- *generowanie starterów PPT*
- *usuwanie starterów tRNA i PPT*

Szczególnie aktywna w miejscach gdzie RNA przyjmuje strukturę 2-rzędową a **RT zwalnia.**

W części dostępnych komercyjnie RT aktywność obniżono lub usunięto.



Za TATA Biocenter

Właściwości różnych RT

	Temp
MMLV RNase H- Minus (Promega, Germany)	37
M-MLV (Promega)	45
Avian Myeloblastosis Virus (AMV) (Promega)	37
Improm-II (Promega)	45
Omniscript (Qiagen, Germany)	37
cloned AMV (cAMV) (Invitrogen, Germany)	45
ThermoScript RNase H- (Invitrogen)	50
SuperScript III RNase H- (Invitrogen)	50

Sthalberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

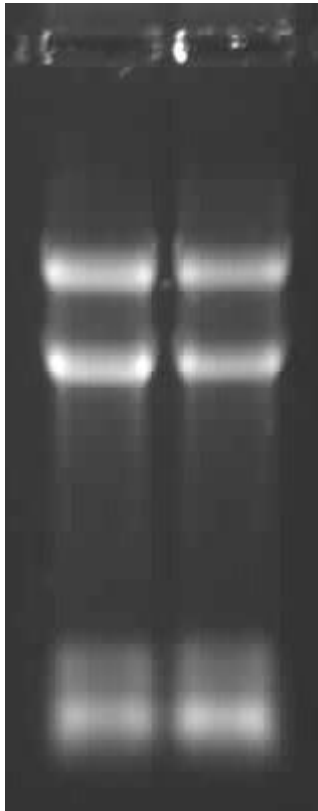
AMV: wirus ptasiej białaczki

MMLV: wirus mysiej białaczki Moloneya

DOBRA PRAKTYKA LABORATORYJNA NA KAŻDYM ETAPIE PRACY Z RNA!

Inkubacja z
DNazą, 1h
37° C

- +



**Dla RT jest kluczowa
jakość RNA!**

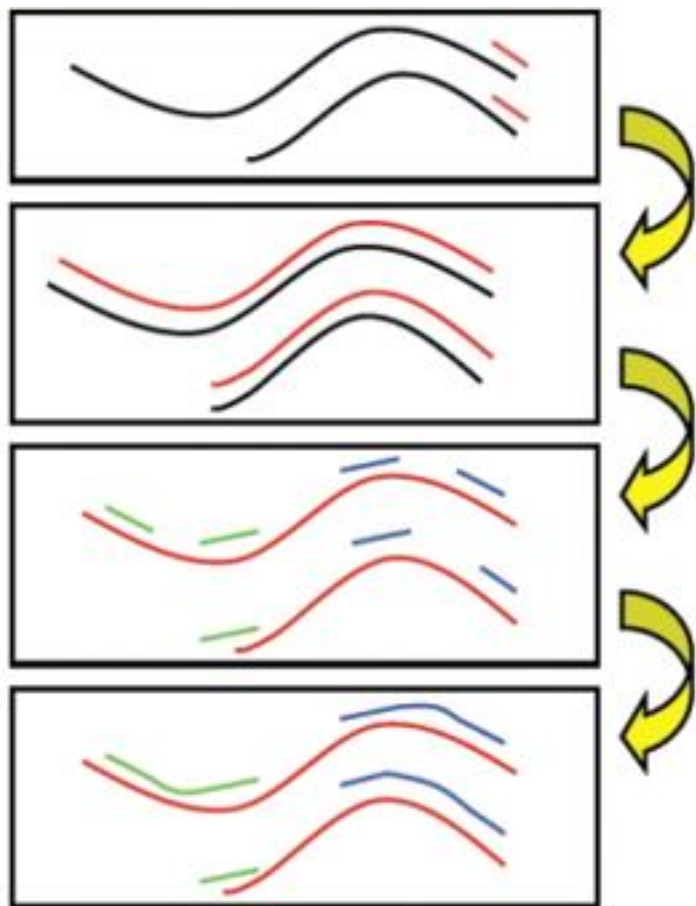
**Konieczna kontrola jakości
RNA po izolacji!**

**Zawsze konieczne
DNazowanie prób!**

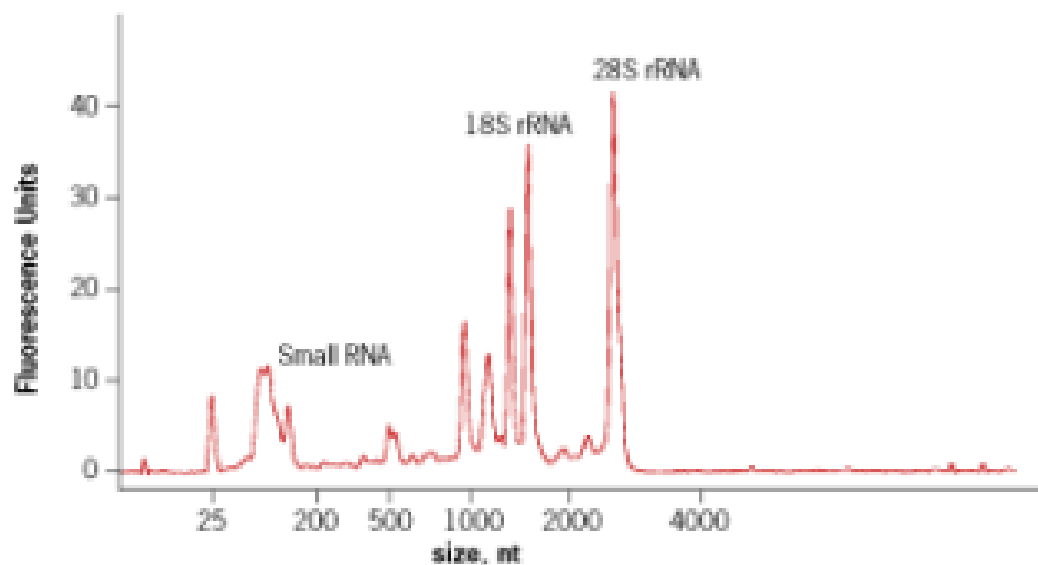
**Zalecane stosowanie
inhibitorów RNaz!**

Ocena jakości RNA

Test integralności końców 5'-3' RNA



Analizatory mikrocieczowe



- Biorad: Experion
- Agilent: Bioanalyzer, Tapestation
- Elektroforeza kapilarna

Wydajność i specyficzność RT

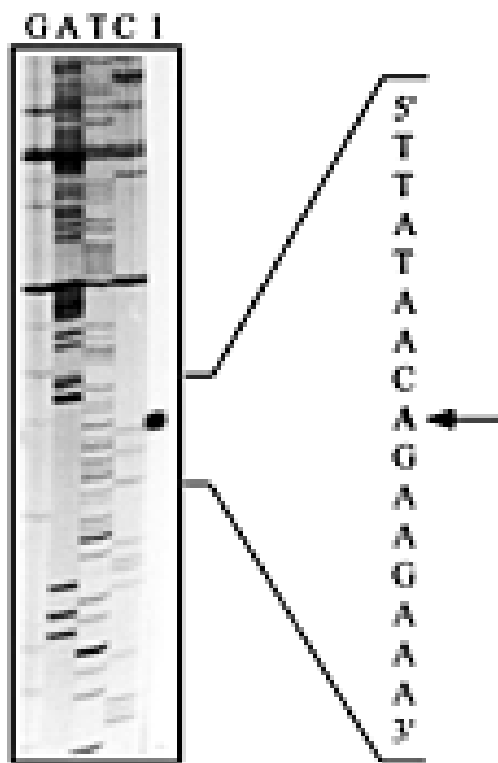
Specyficzność i wydajność reakcji odwrotnej transkrypcji
SILNIE zależy od:

- Metody startowania (primowania) reakcji.
- Rodzaju odwrotnej transkryptazy (cech enzymu).
- Sekwencji **DANEJ** cząsteczki RNA, w szczególności od struktur 2-rzędowych w jej obrębie.
- Różnice wydajności mogą sięgać nawet 100X!!!**
- Optymalne warunki RT zawsze należy wyznaczyć eksperymentalnie.

Analiza końców 5' i 3' RNA

Technika „wydłużania startera”

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



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



Odwrotna transkrypcja



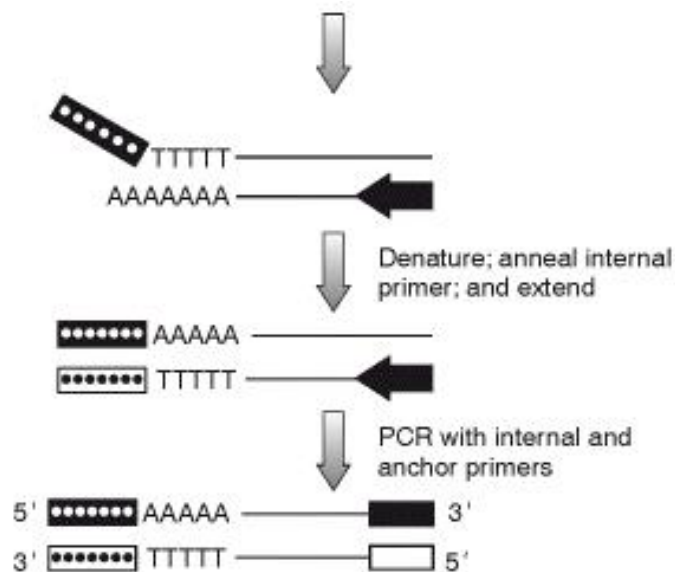
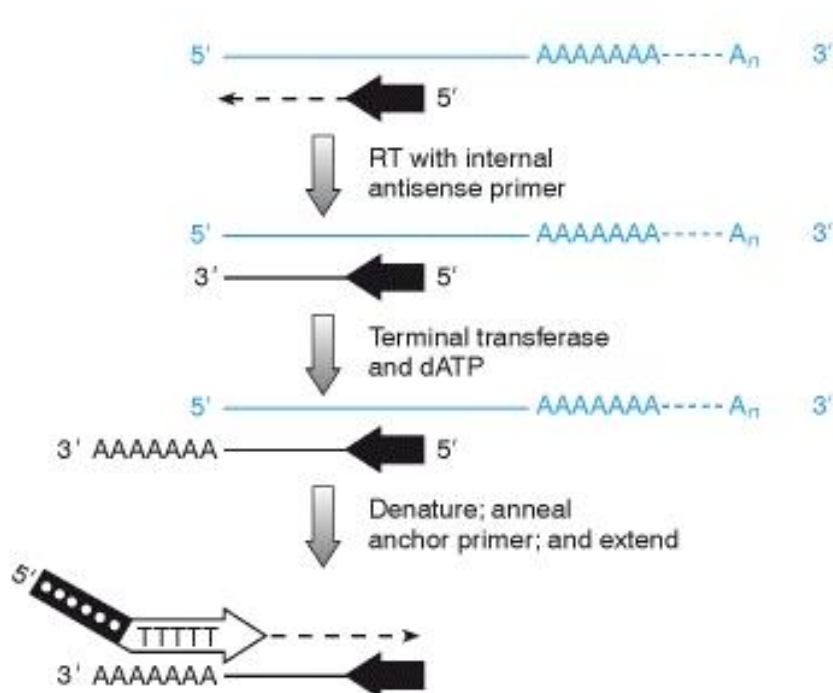
**Rozdział w żelu poliakrylamidowym razem z
reakcjami sekwencjonowania prowadzonymi z tego
samego startera**

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

Analiza końców 5' RNA – 5' RACE

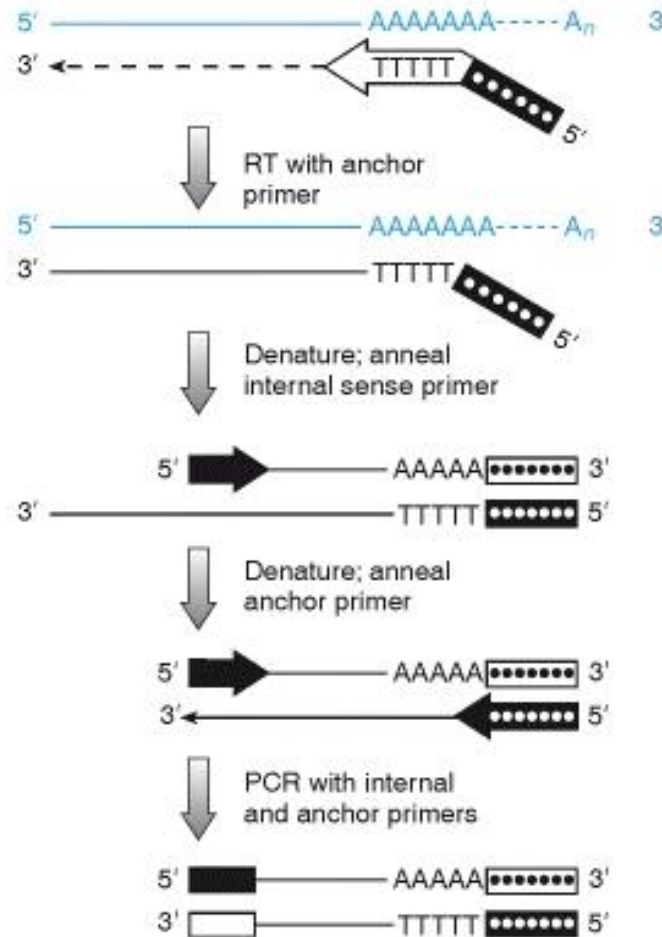
Rapid Amplification of 5'cDNA Ends

jednostronny PCR
zakotwiczony PCR



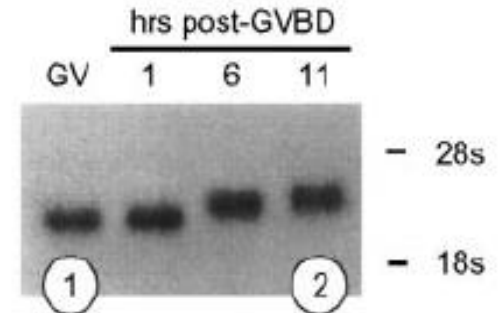
Analiza końców 3' poliadelynowanych RNA – 3' RACE

Rapid Amplification of 3'cDNA Ends

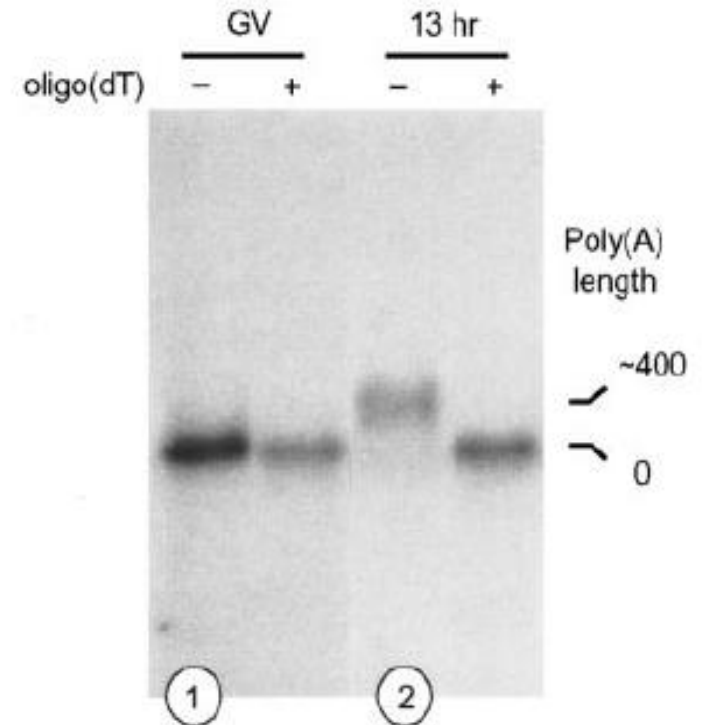
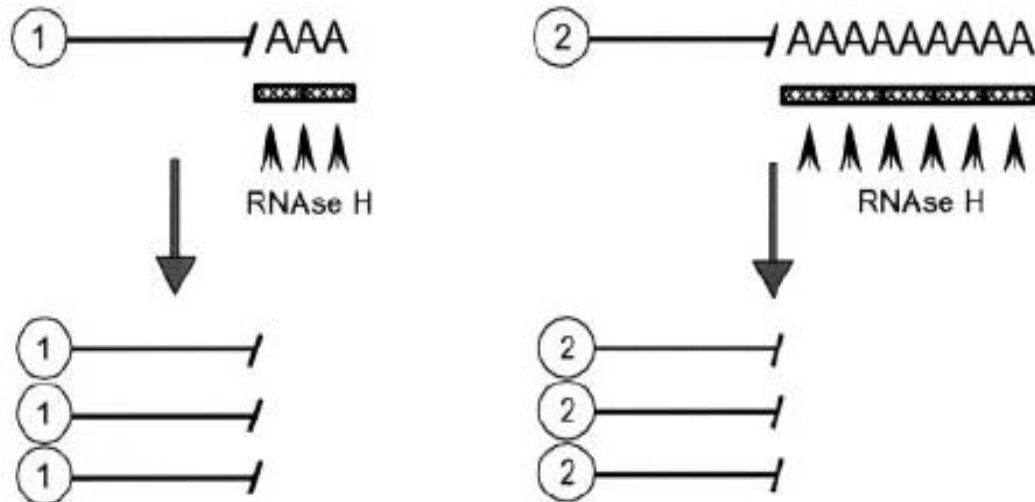


Metody analizy końców poliA - 1

Northern



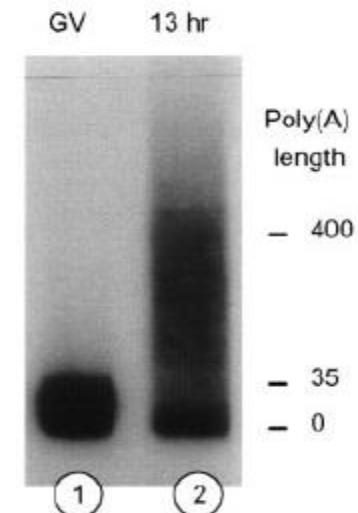
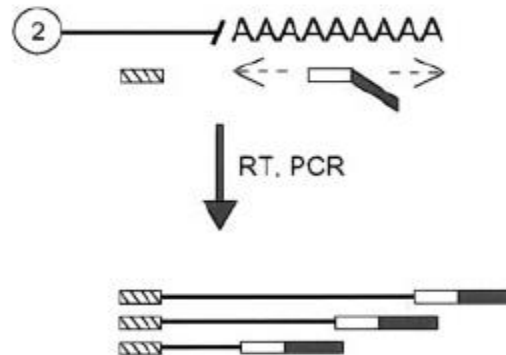
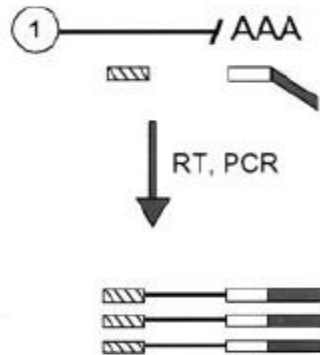
Oligo(dT)/RNase H Northern



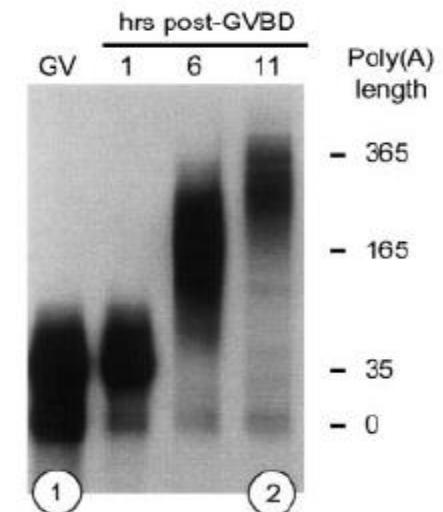
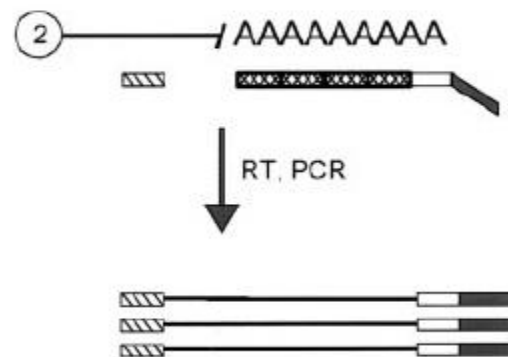
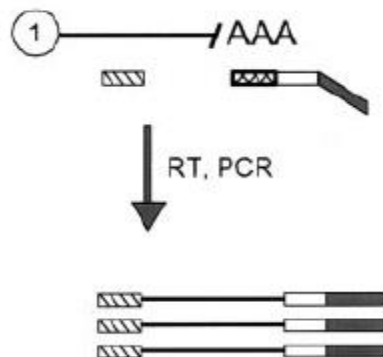
Metody analizy końców poliA - 2

RACE-PAT

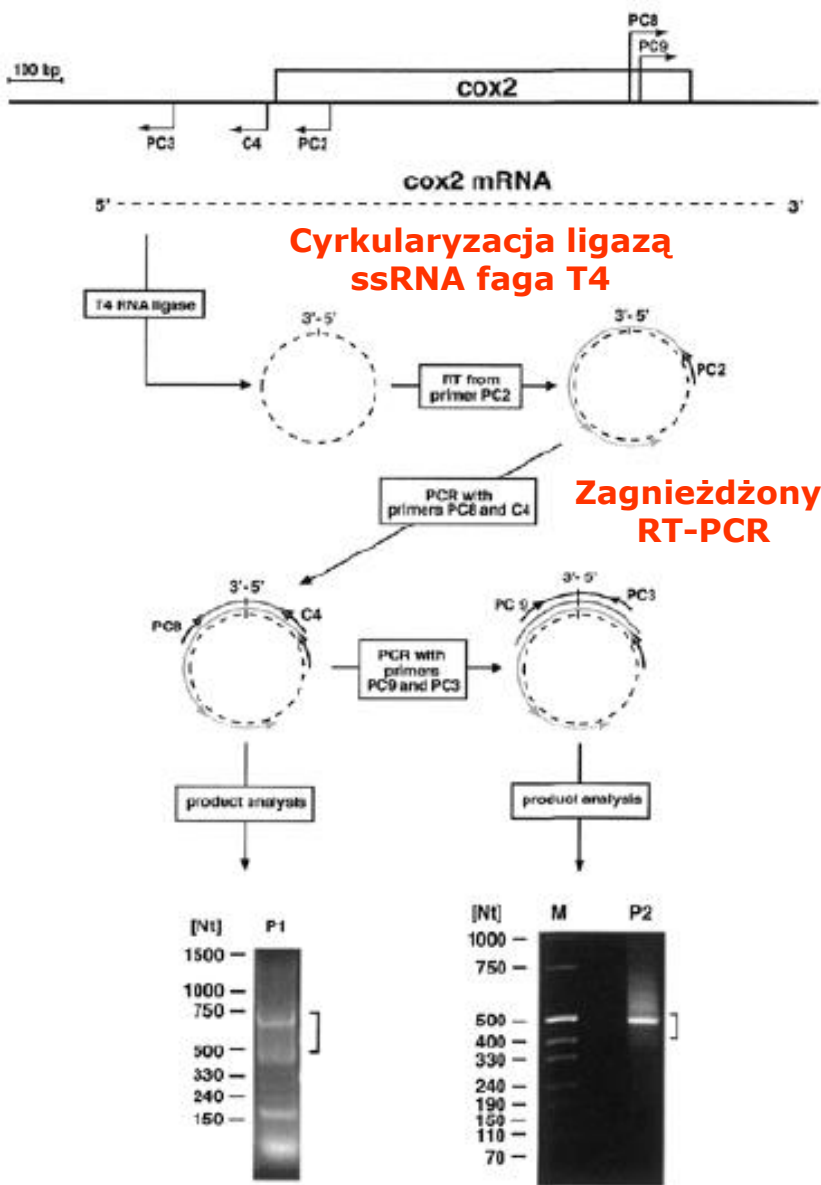
PAT = Poly(A) Test



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 enzymami hydrolizującymi wiązania P-P np. bakteryjną 5' pyrofosfohydrolazą RNA RppH (NEB) lub roślinną kwaśną pirofosfatazą Cap-Clip (CellScript) (niegdyś **kwaśną pirofosfatazą z tytoniu TAP**, obecnie nie produkowaną) lub **trawiąc duplekisy RNA-DNA RNazą H** (ma sens gdy RNA jest wysoko ekspymowany, znamy dokładnie 5' koniec transkryptu i nie interesują nas alternatywne 5' końce)

Techniki badania transkrypcji

Technika *„Transcription Run ON”*

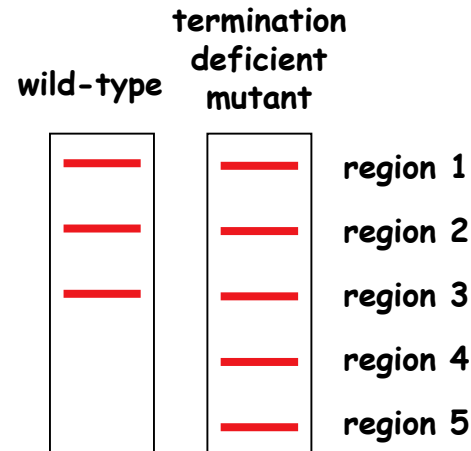
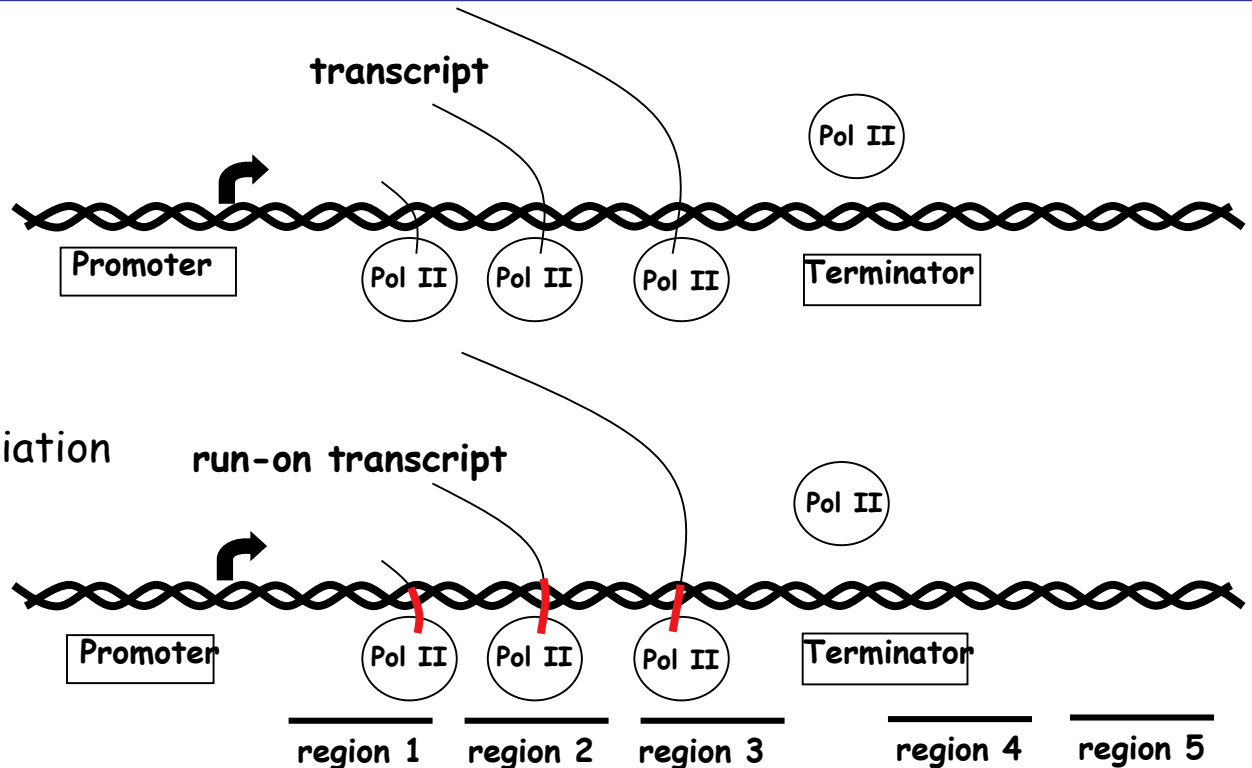
Transcription Run-On (TRO)

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

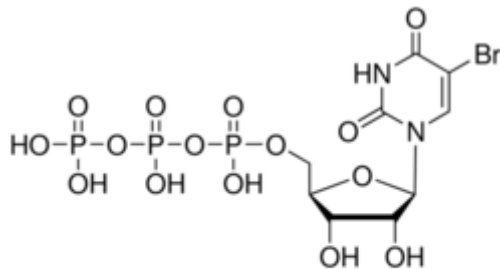
Warianty TRO:

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

GRO-seq: Global (Genomic) Run-On

Znakowanie RNA: Run-On w obecności BrU lub 4tU

5-bromourydyna (BrU)

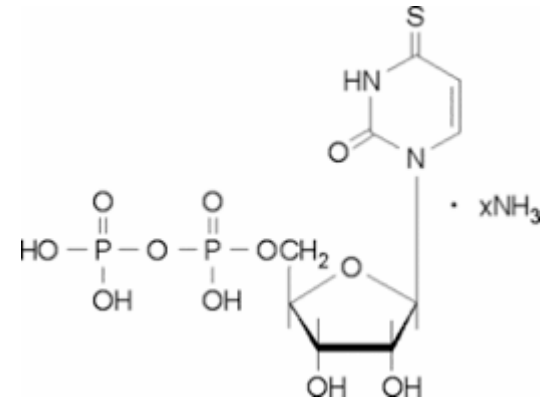


• xNa



fragmentacja RNA i
immunoprecypiacja na
złożu agaroza-antyBrU

4-tiourydyna (4tU)



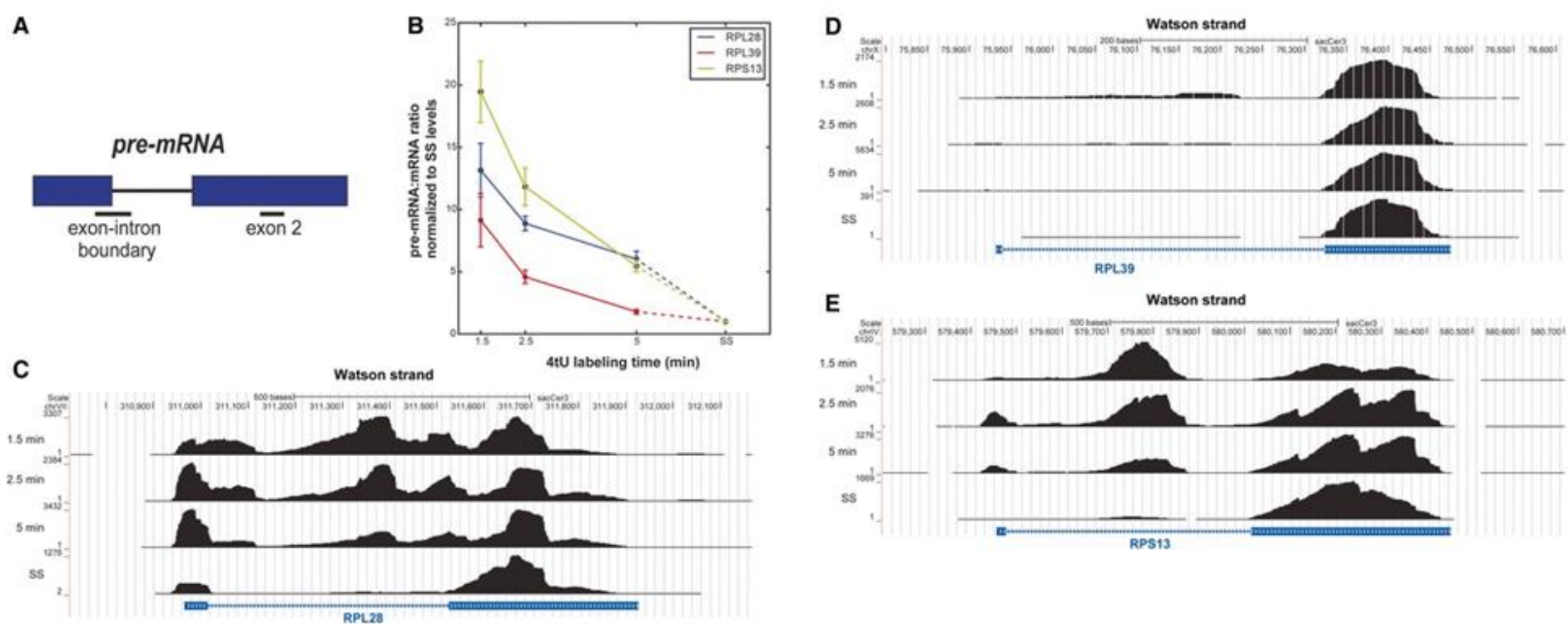
biotynylacja grupy tiolowej
i wiązanie do złoża ze
streptoawidyną



Odwrotna transkrypcja
-> RNAseq

4tU-seq

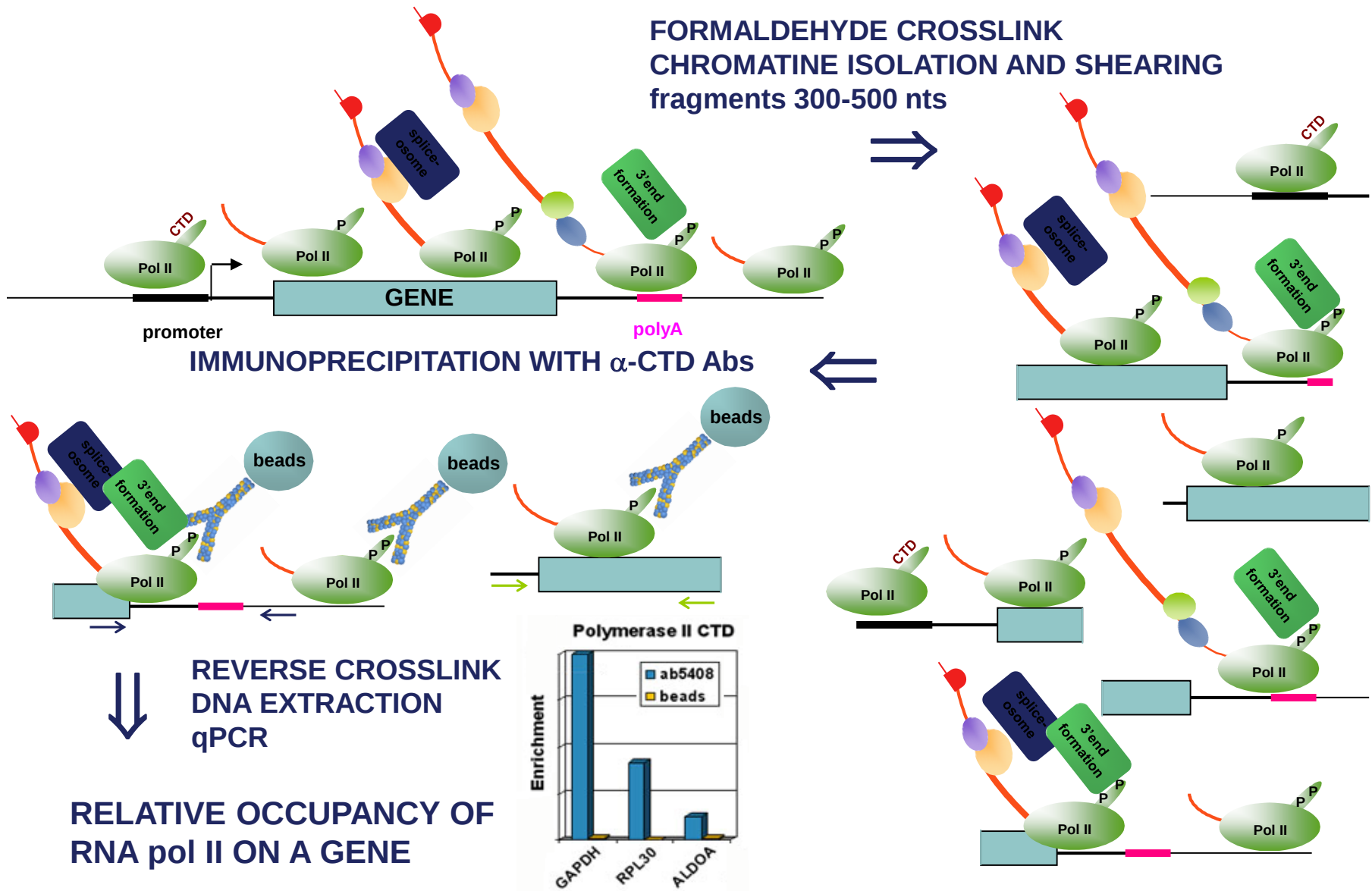
Transcriptome-wide RNA processing kinetics revealed using extremely short 4tU labeling



(Barras i wsp., Genome Biol 2015)

Immunoprecypitacja chromatyny - ChIP

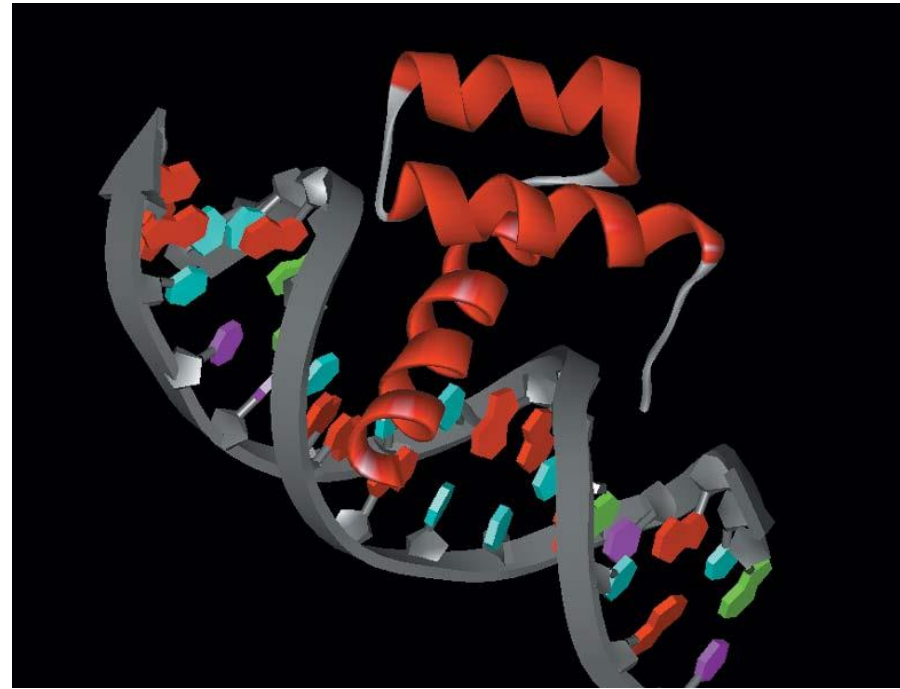
Immunoprecipitacja chromatyny - ChIP



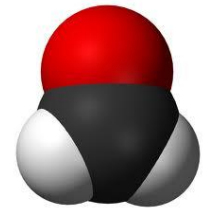
Zastosowania ChIP

Badanie oddziaływań białka-DNA *in vivo*!

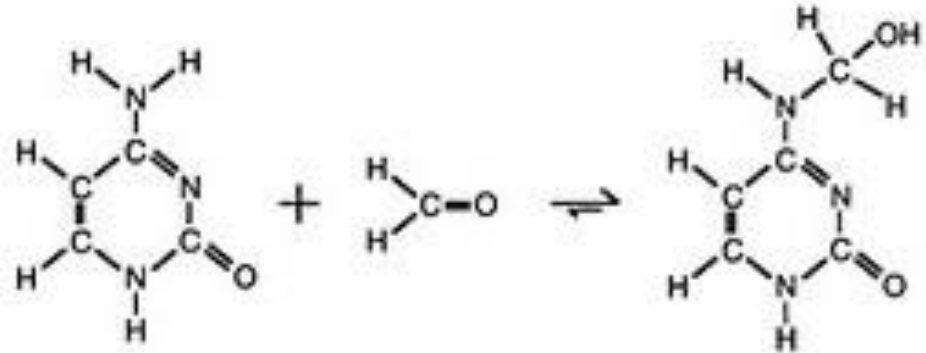
- Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych
- Obecność (dystrybucja) Pol RNA wzdłuż chromatyny (genów)
- Modyfikacje histonów
- Czynniki remodelujące chromatynę



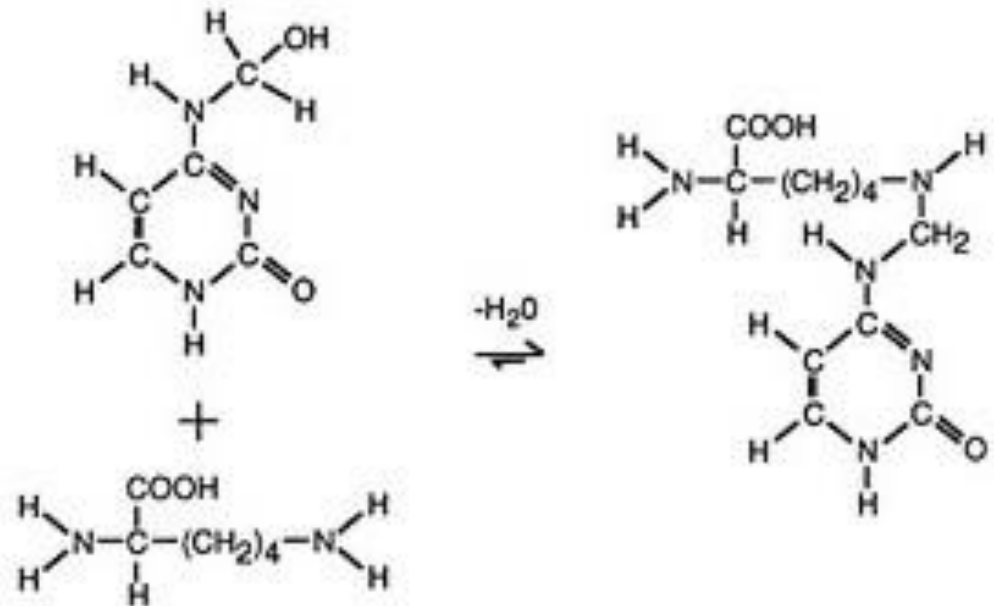
Czynnik sieciujący: formaldehyd



**Reakcja 1 (powstaje
zasada Shiffa)**



Reakcja 2

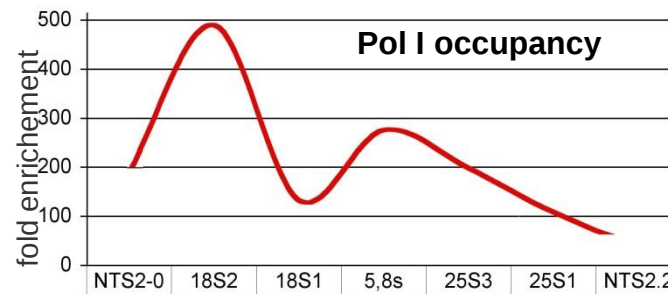
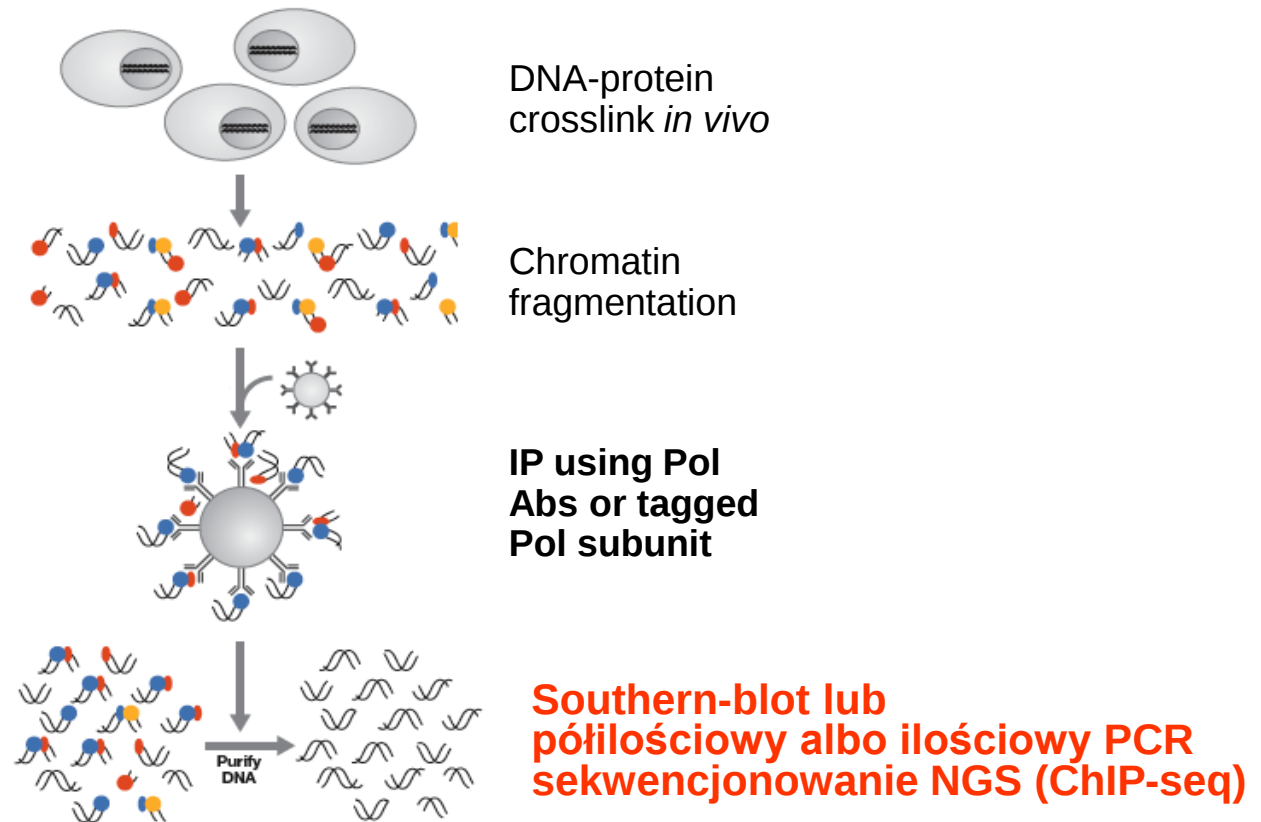


Rozdzielczość a specyficzność sieciowania

- 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)

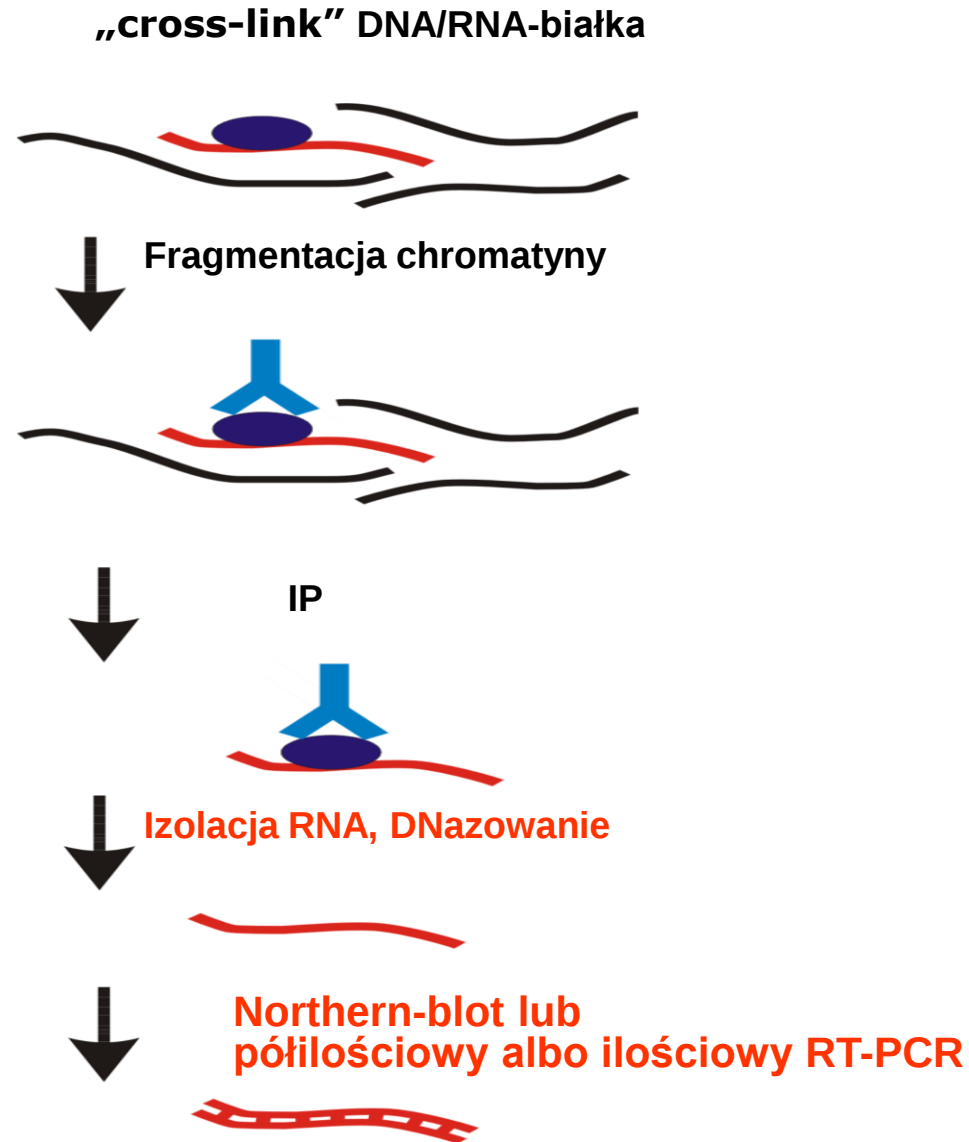
Procedura ChIP

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)



Immunoprecypitacja RNA - RIP

Immunoprecypitacja RNA jest podobna do ChIP



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**