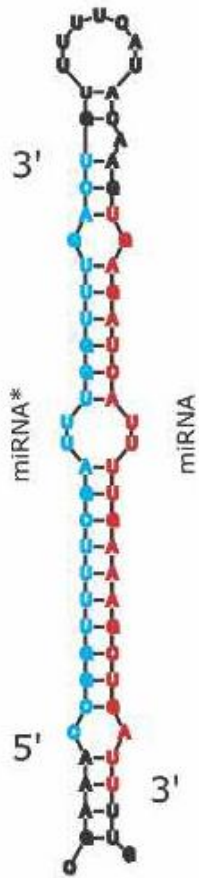
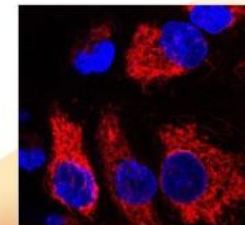


# RNS-ek kimutatása



## Régi és új módszerek

SmartFlare™  
RNA Detection Probes



Live cell imaging of DU145 human  
prostate cancer cells.

Hegyesi Hargita OSSKI  
hegyesi.hargita@osski.hu

# mRNS stabilitás:

## mRNS féléletidő

sejt	Generáció idő	Átlag
<i>Escherichia coli</i>	20 – 60 min	3 – 5 min
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 h	22 min
Humán vagy emlős sejtek in-vitro kultúrában	16 – 24 h	10 h

Destabilizáció: AUUUA a 3' nem-transzlálódó régióban

# A nem-kódoló RNS forradalma

## Housekeeping

- transzfer RNS
- riboszómális RNS
- small nuclear RNS
- small nucleolar RNS

## **Nem-kódoló RNS**

=RNS, amelyből nem lesz fehérje

## Szabályozó

- piRNS
- rasiRNS
- mikroRNS
- lncRNS

## **Piwi-interacting RNS**

(Drosophila, egér, patkány)  
hiszton és DNS-metiláció→  
mobilis genetikai elemek csendesítése

## **MikroRNS**

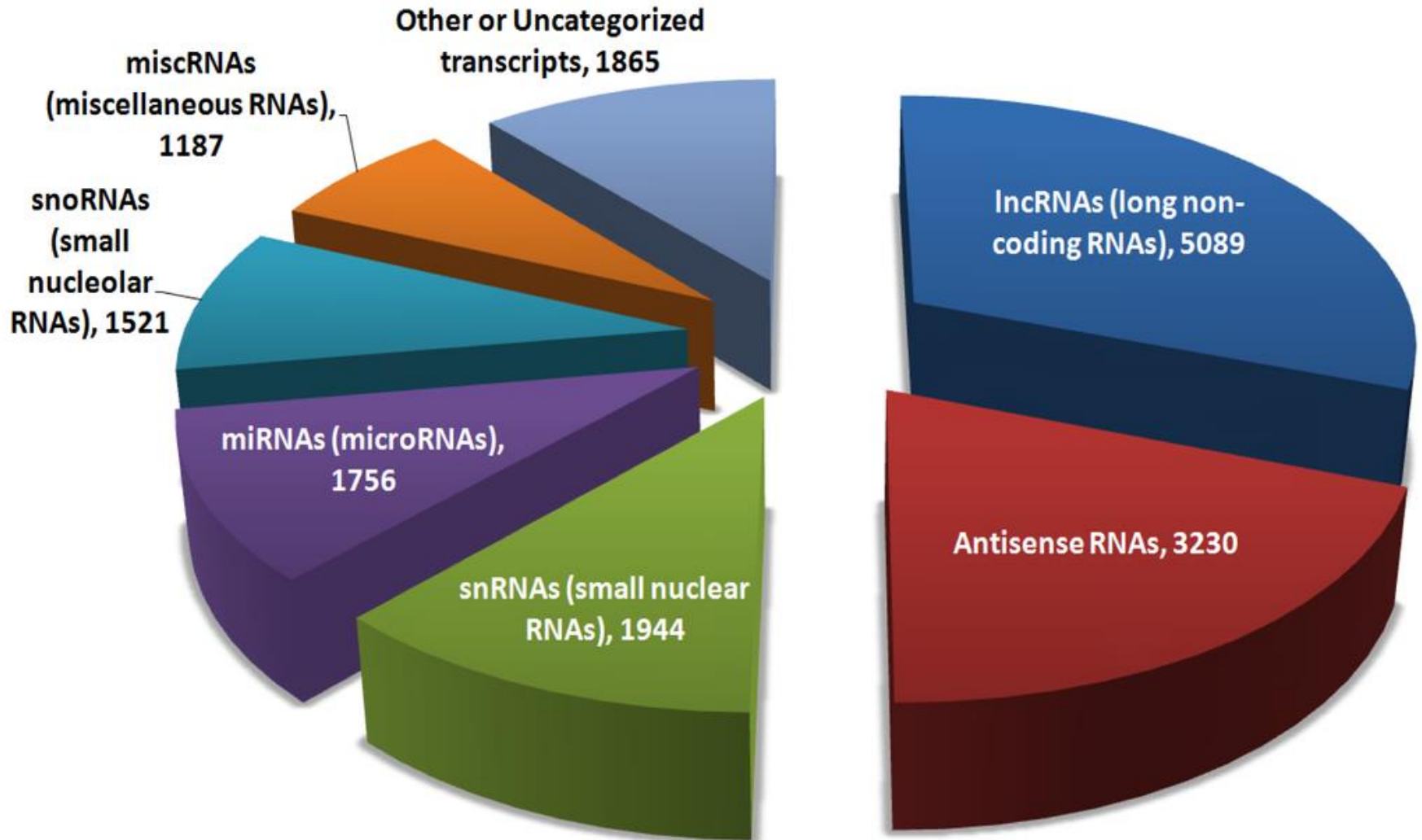
(növények és állatok)  
RNS-degradáció és/vagy  
transzlációgátlás→ a génexpresszió  
szabályozásás

## **Long noncoding RNS**

Transzkripció minden szintjén

tasi..., natsi..., PINK (XIST) és így tovább

# Nem-kódoló RNS család



# LncRNS funkció

Kicsit hasonlít a kódolókhöz:

Pol2 írja át

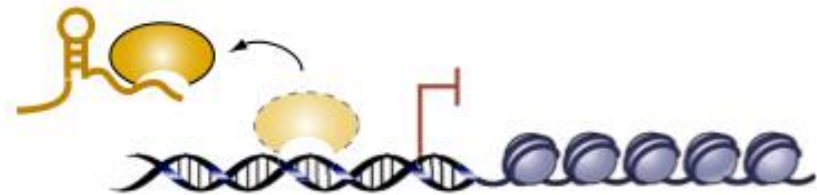
TF kell az átíráshoz

polyA farka van

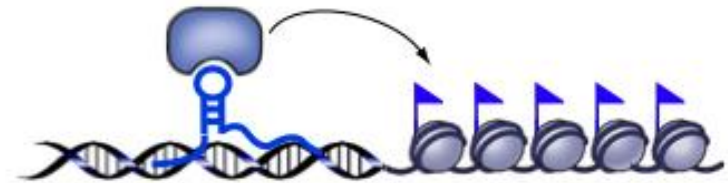
## I. Signal



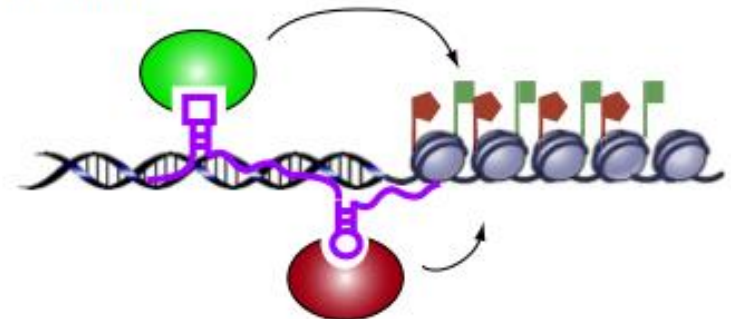
## II. Decoy



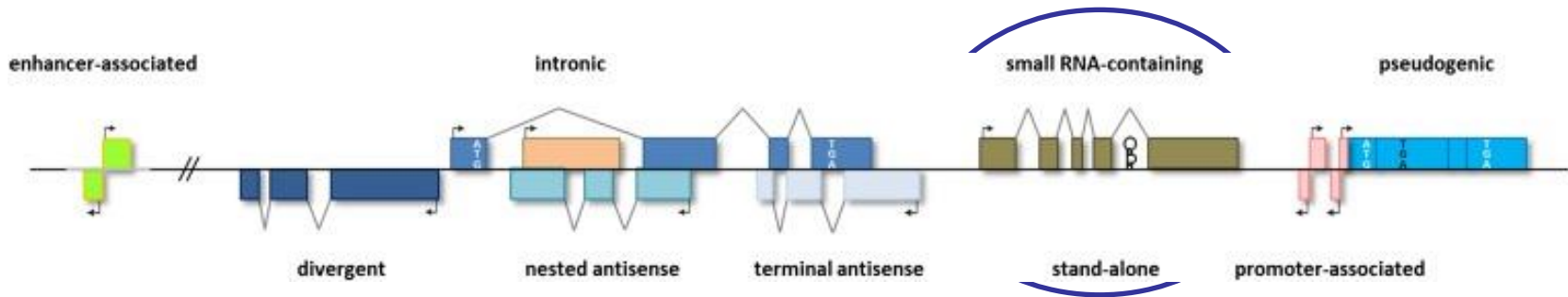
## III. Guide



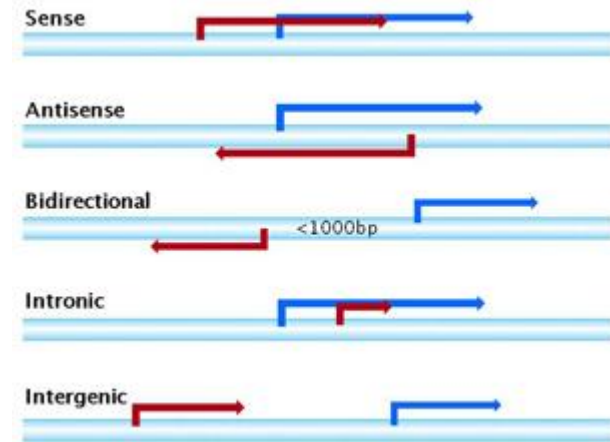
## IV. Scaffold



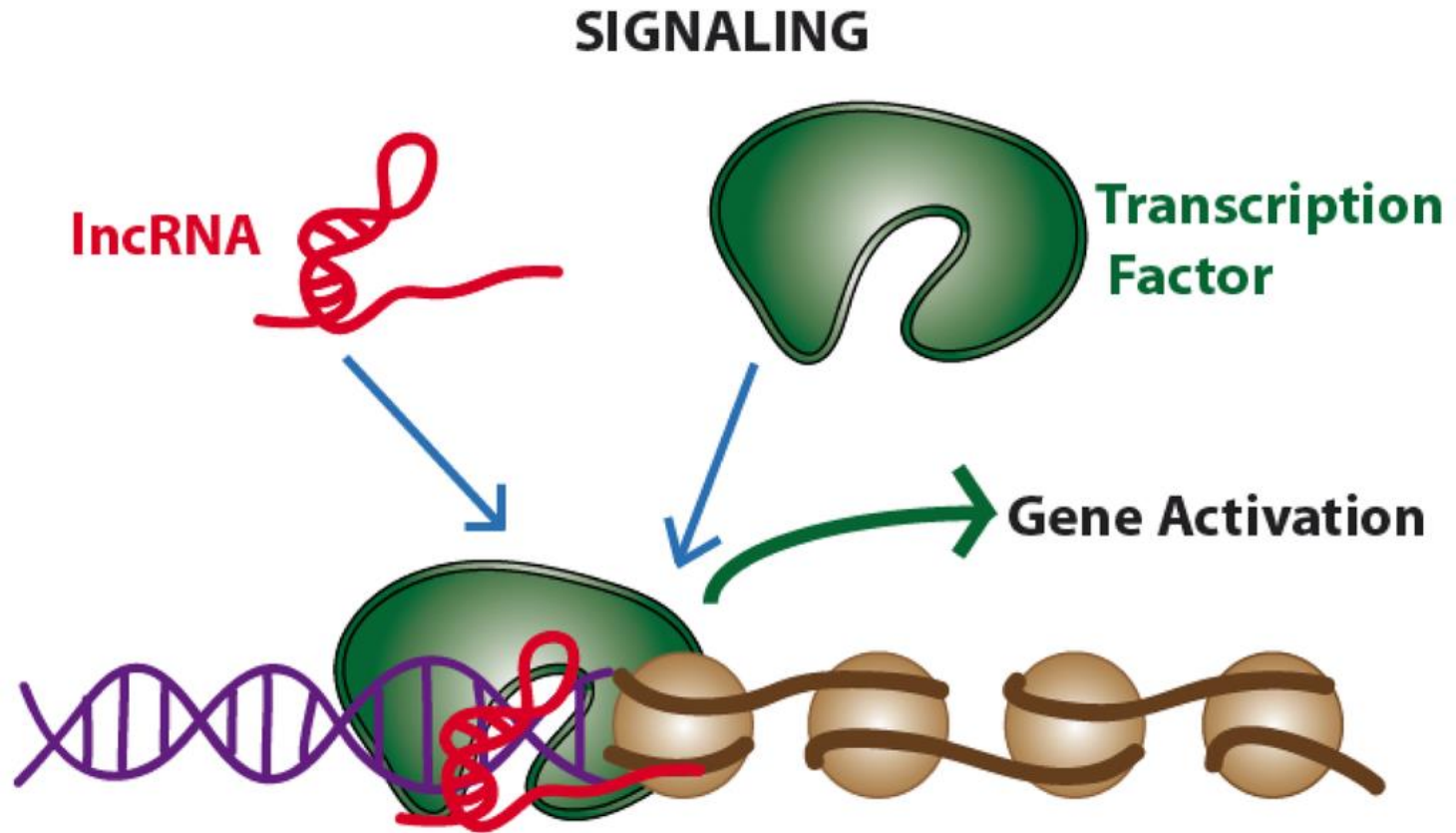
# IncRNS a genomban



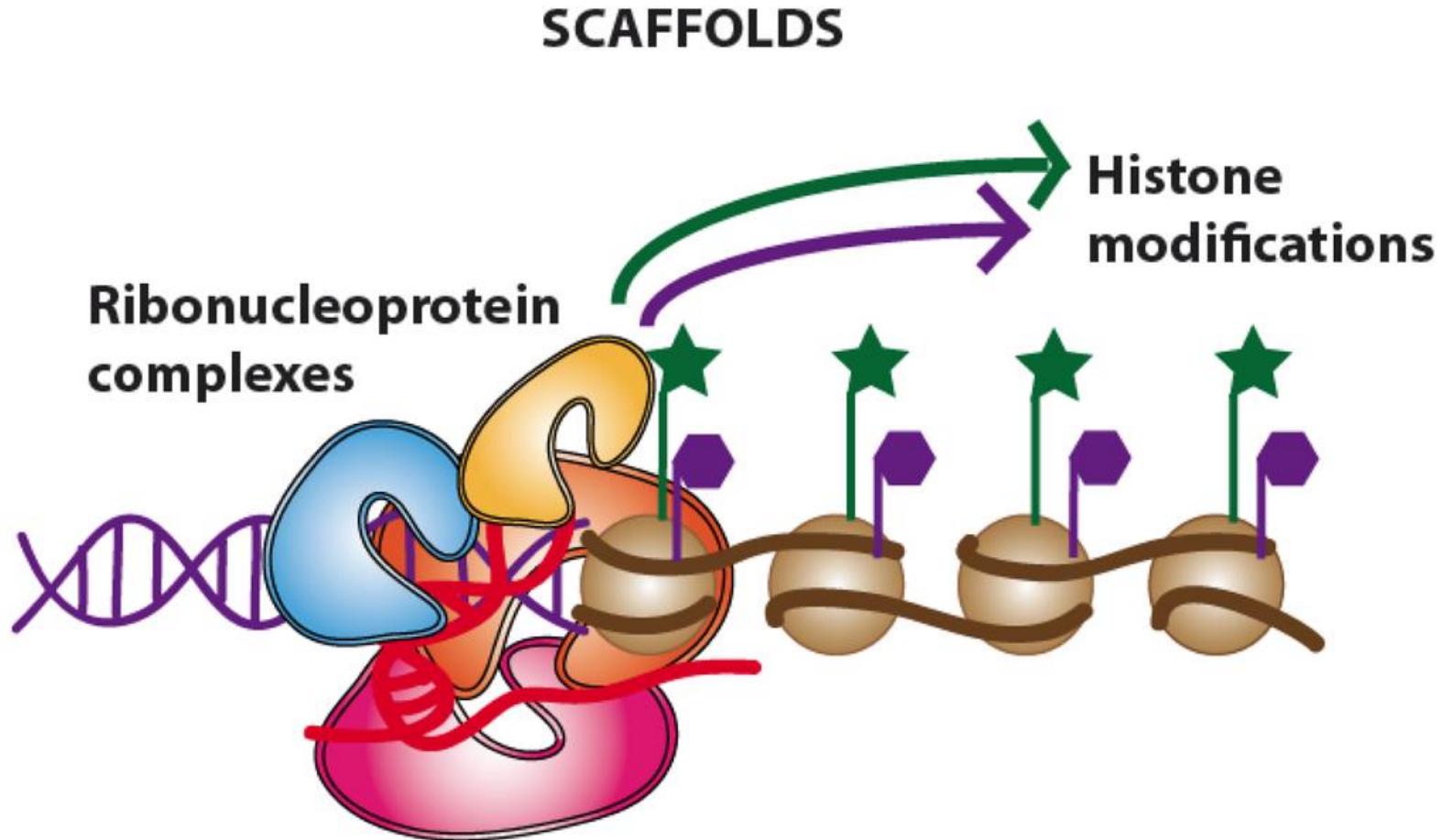
- Önálló transzkripció egység
- Enhancer-ről
- Antiszenz
- Pszeudogén promóterről



# IncRNS mint génaktivátor



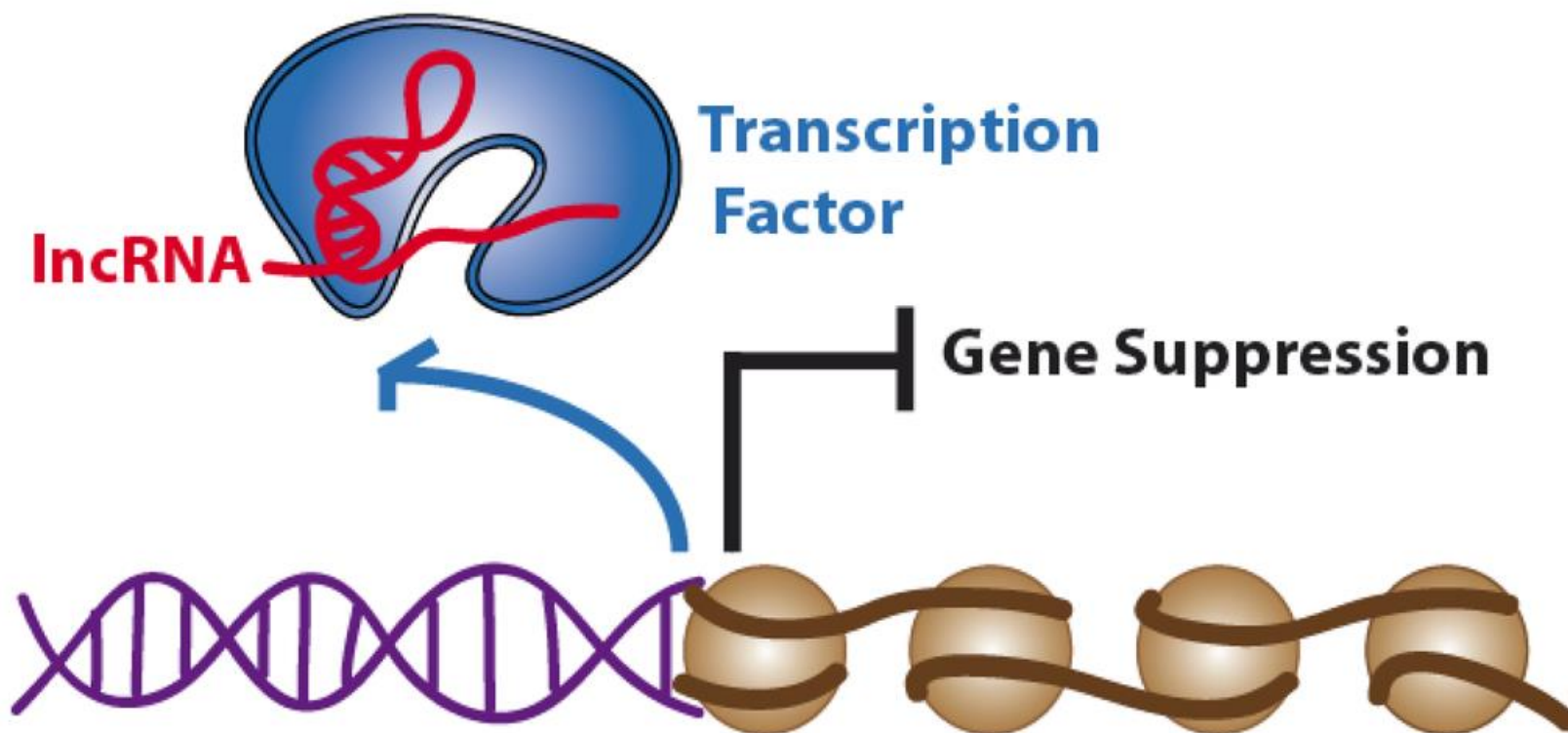
# IncRNS mint kromatin módosító



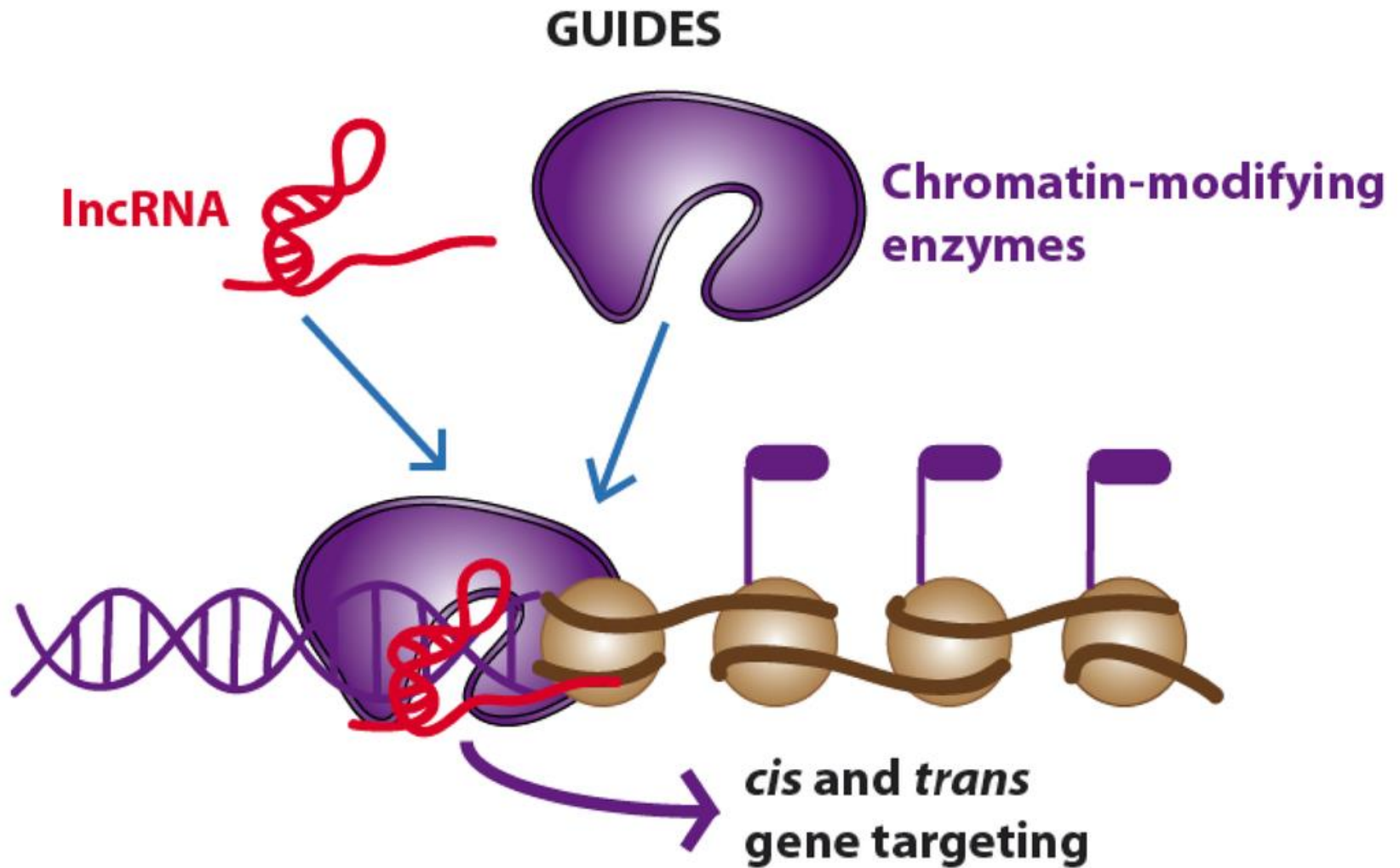


# IncRNS mint génszupresszor

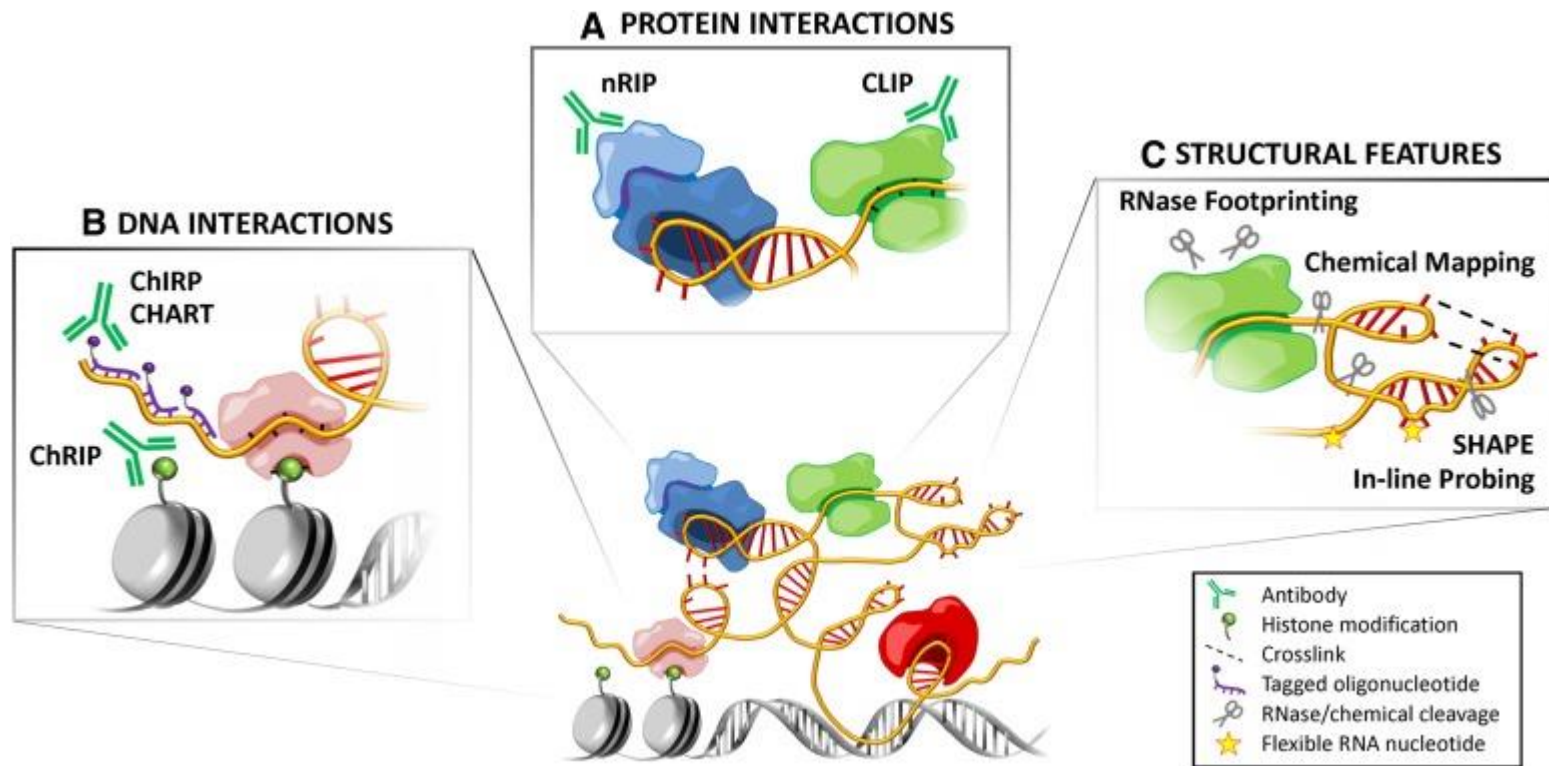
**DECOY**



# IncRNS cisz transz regulátor



# IncRNS kimutatás

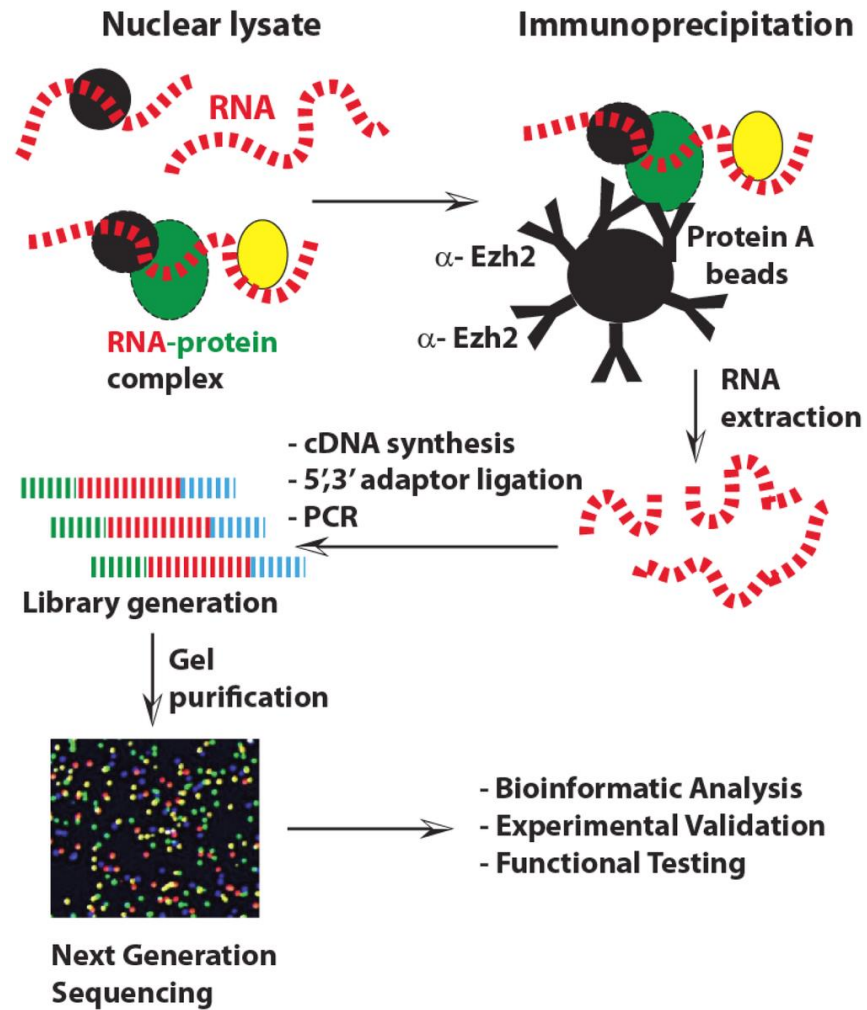


**A: kapcsolódó fehérje alapján (RIP CLIP)**

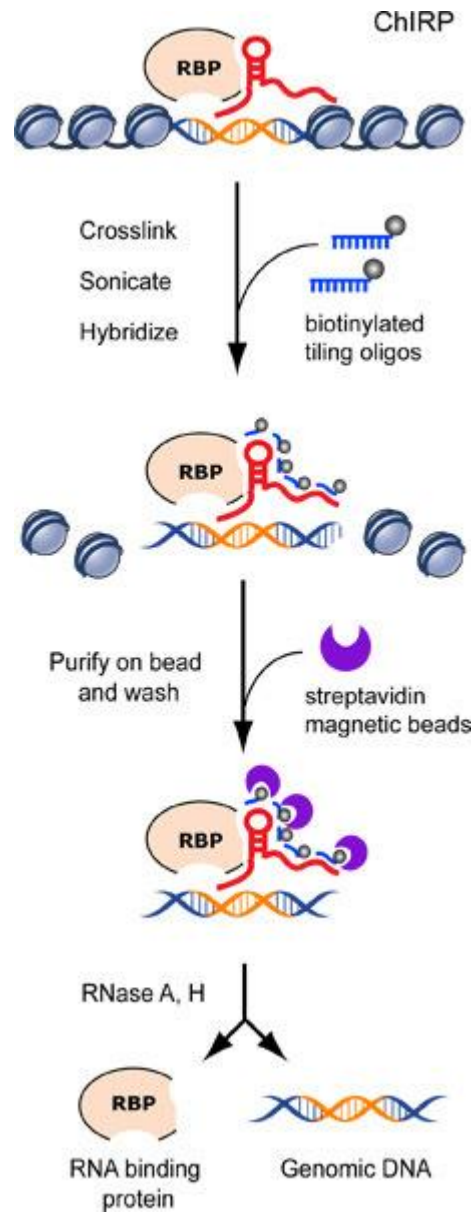
**B: kapcsolódó Hiszton-DNS alapján (ChRIP)**

**C: szerkezet alapján (SHAPE)**

# RIP (RNS és immunprecipitáció)

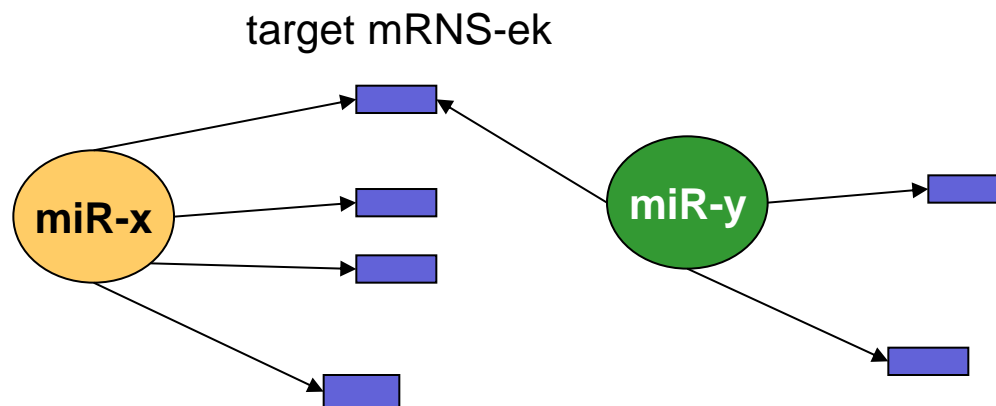


# ChIRP (kromatin immunoprecipitáció)

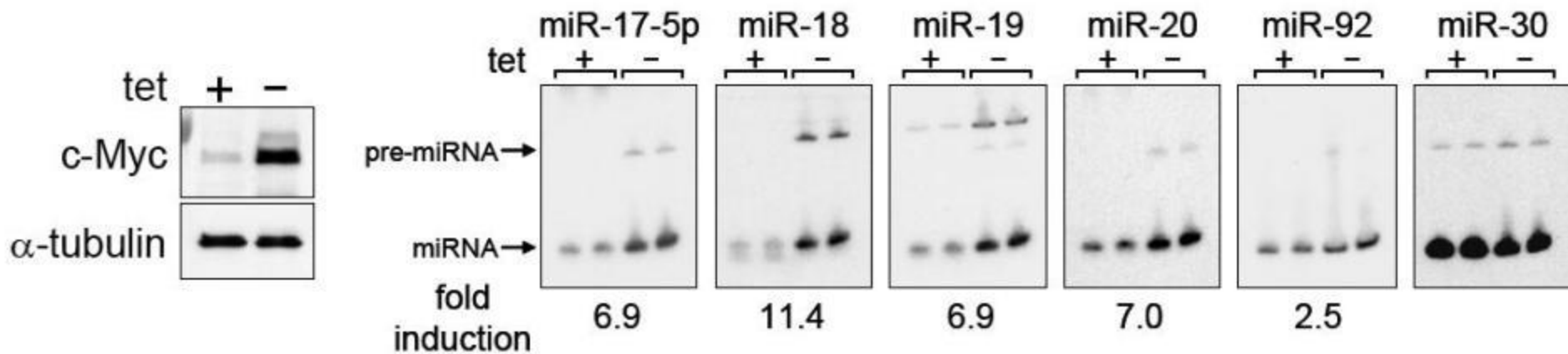
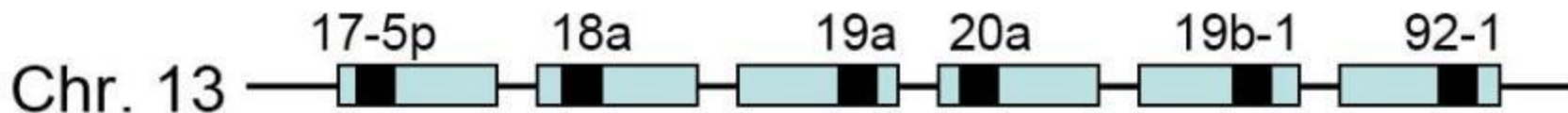


## A mikroRNS az RNS-világ tagja

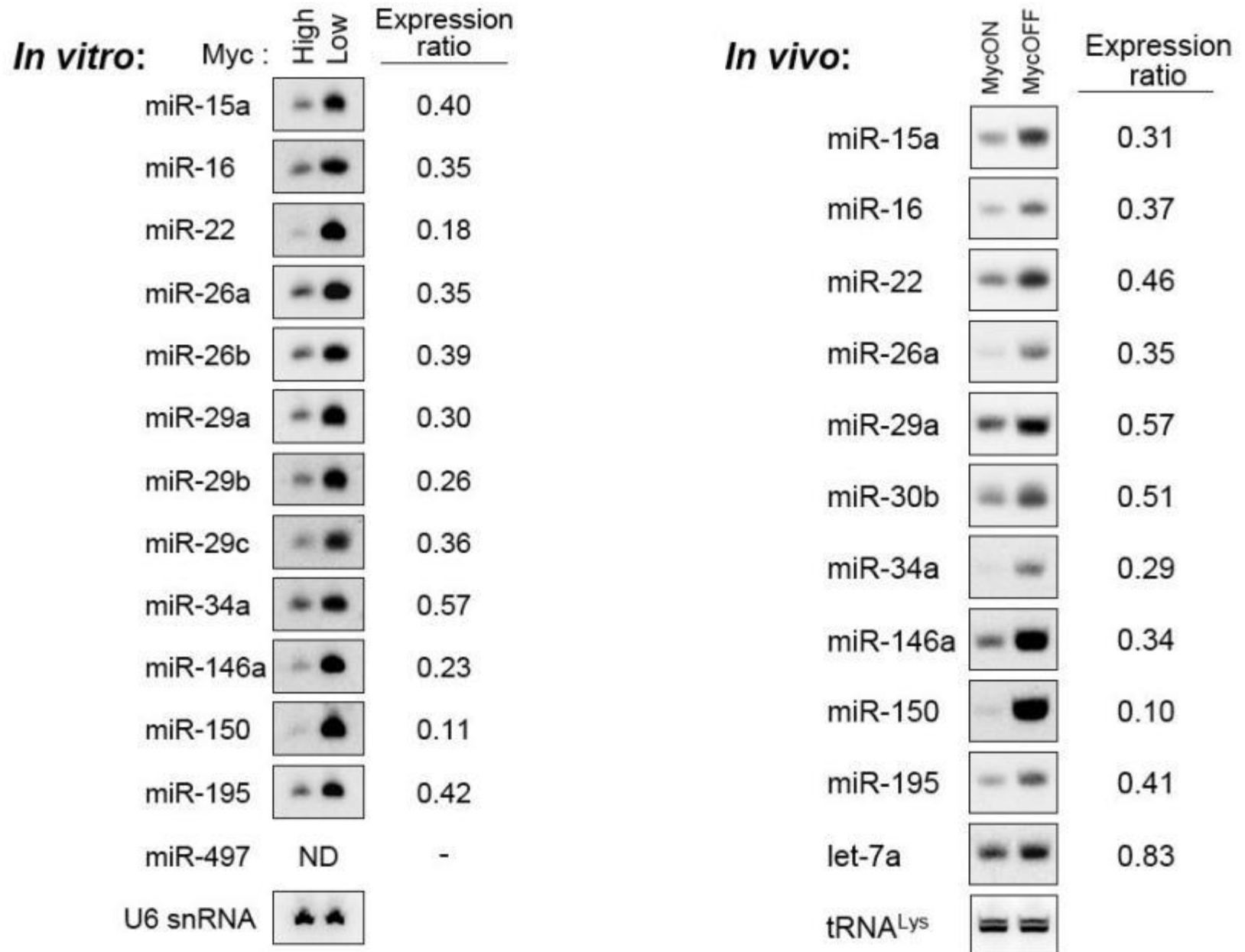
- ✓ Ezen rövid láncú (~22 nukleotid) nem kódoló RNS-típust megtalálhatjuk a növényi és állati szervezetekben is.
- ✓ Több száz emberi (1100, egér 717) miRNS szerepel jelenleg a miRANDA-adatbázisban, amelyek 80%-a legalábbis az emlősök körében erősen konzervált.
- ✓ Becslések szerint számuk a gének majdnem 3-4%-a
- ✓ Mindegyik miRNS több gén működését szabályozza és a humán gének 1/3-a miRNS-ek által szabályozott.



# A miR-17-92 csoportot a Myc aktiválja

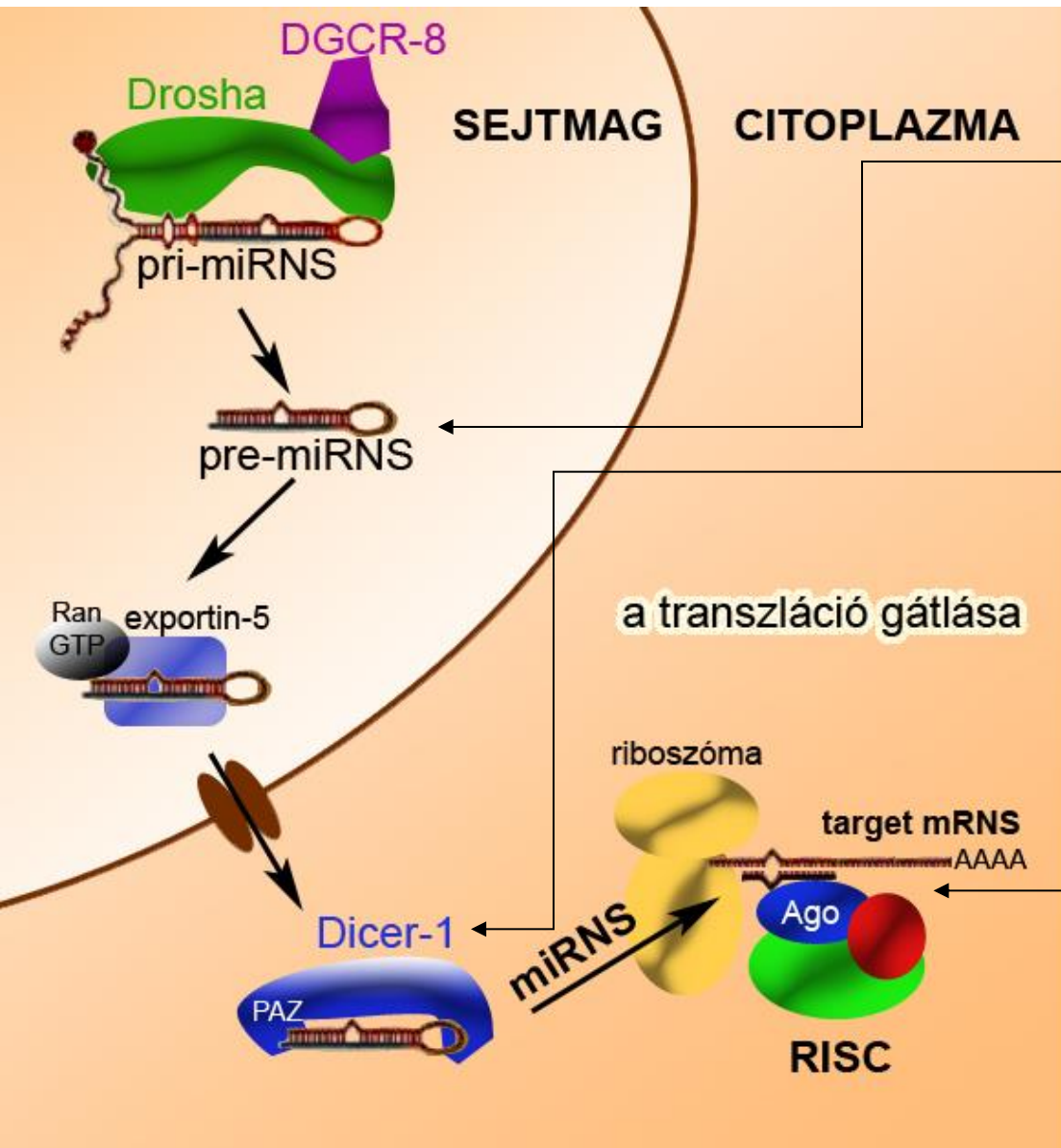


# A Myc miR gátlást is indukál





# A miRNS-ek szintézise és támadáspontja



A prekurzorokat a hajtűszerű (hairpin, stem-loop) másodlagos szerkezet jellemzi.

Dicer-1: miR-útvonal (Dicer-2: siR-útvonal)

A génexpressziót szabályozó működés a megfelelő cél-messenger RNS(ek) le nem fordítódó régiójához (3'-UTR) kapcsolódásával valósul meg.

# RNAi : RNS interferencia

**siRNA : small interfering RNA:** 21-23 nukleod hosszú, RNS, ami a Dicer enzim hasításával jön létre (dsRNS-ből hajtú szerkezetet tartalmazó hosszabb RNS-ből). A RISC részeként specifikus mRNS-ek degradációját vagy transzlációjuk represszióját eredményezi

**Drosha:** sejtmagi, RNáz III aktivitású fehérje, ami a miRNS érés első lépéseiben játszik szerepet - a mikroprocesszornak nevezett sejtmagi komplex része, a komplex egy másik komponense

**Pasha,** egy dsRNS-kötő fehérje

**Exportin-5:** transzmembrán fehérje, ami a miRNS prekursorok sejtmagból citoplazmába történő transzportjában játszik szerepet

**Dicer (DCR) :** több domént tartalmazó, RNáz III aktivitású citoplazmatikus fehérje, ami a hosszú dsRNS molekulákat és a hajtú szerkezetű prekursor miRNS-eket 21-25 nukleotidos siRNS-sé és miRNS-sé darabolja

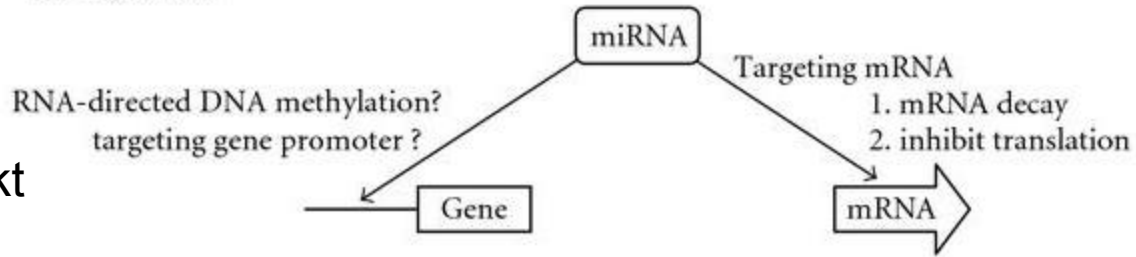
**RLC :** RISC loading complex

**RISC :** RNA-induced silencing complex (siRISC és miRISC)

**Argonaute fehérjék :** nagy számú tagot tartalmazó fehérje család, amelynek tagjai kulcsszerepet játszanak a RISC-ben. Kötődik a miRNS ill. siRNS 3' végéhez, biztosítja a kölcsönhatást a target RNS-sel és részvesz a hasításban ill. transzkripció represszió létrehozásában.

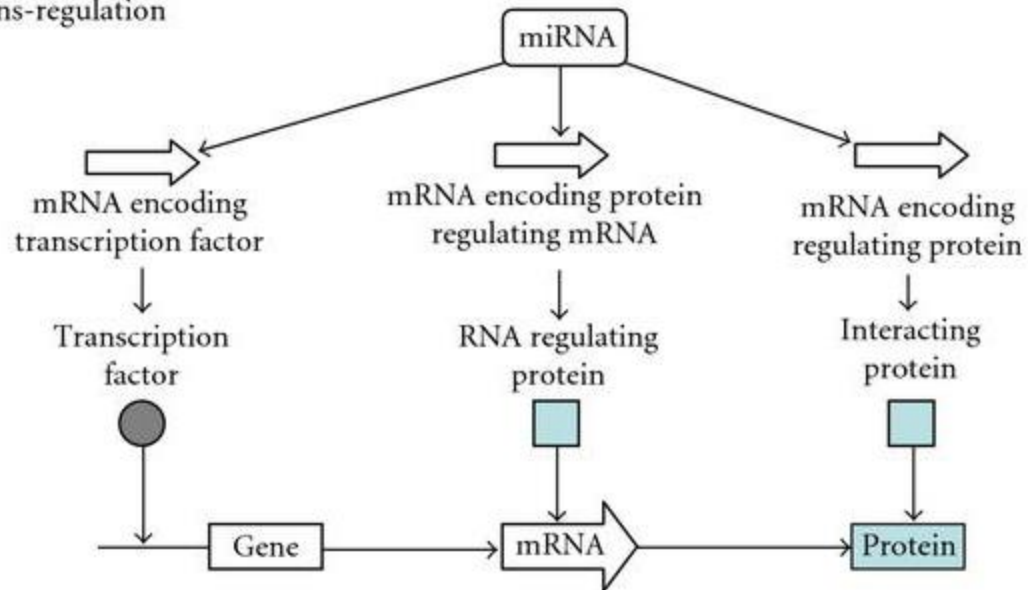
# Micro RNS : cis/transz hatás

Cis-regulation



Közvetlen/Direkt  
hatás

Trans-regulation

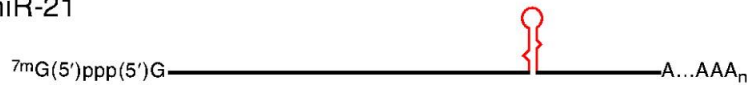


Közvetett

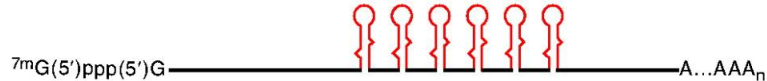
# Pri-miR transzkripció egységek

A

miR-21



miR-17~18~19a~20~19b-1~92-1



B

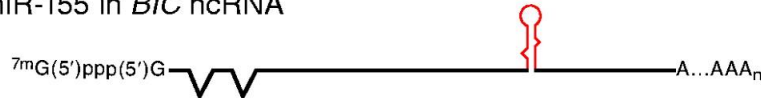
miR-15a~16-1 in *DLEU2* ncRNA intron



miR-106b~93\*~25 in *MCM7* pre-mRNA intron



miR-155 in *BIC* ncRNA



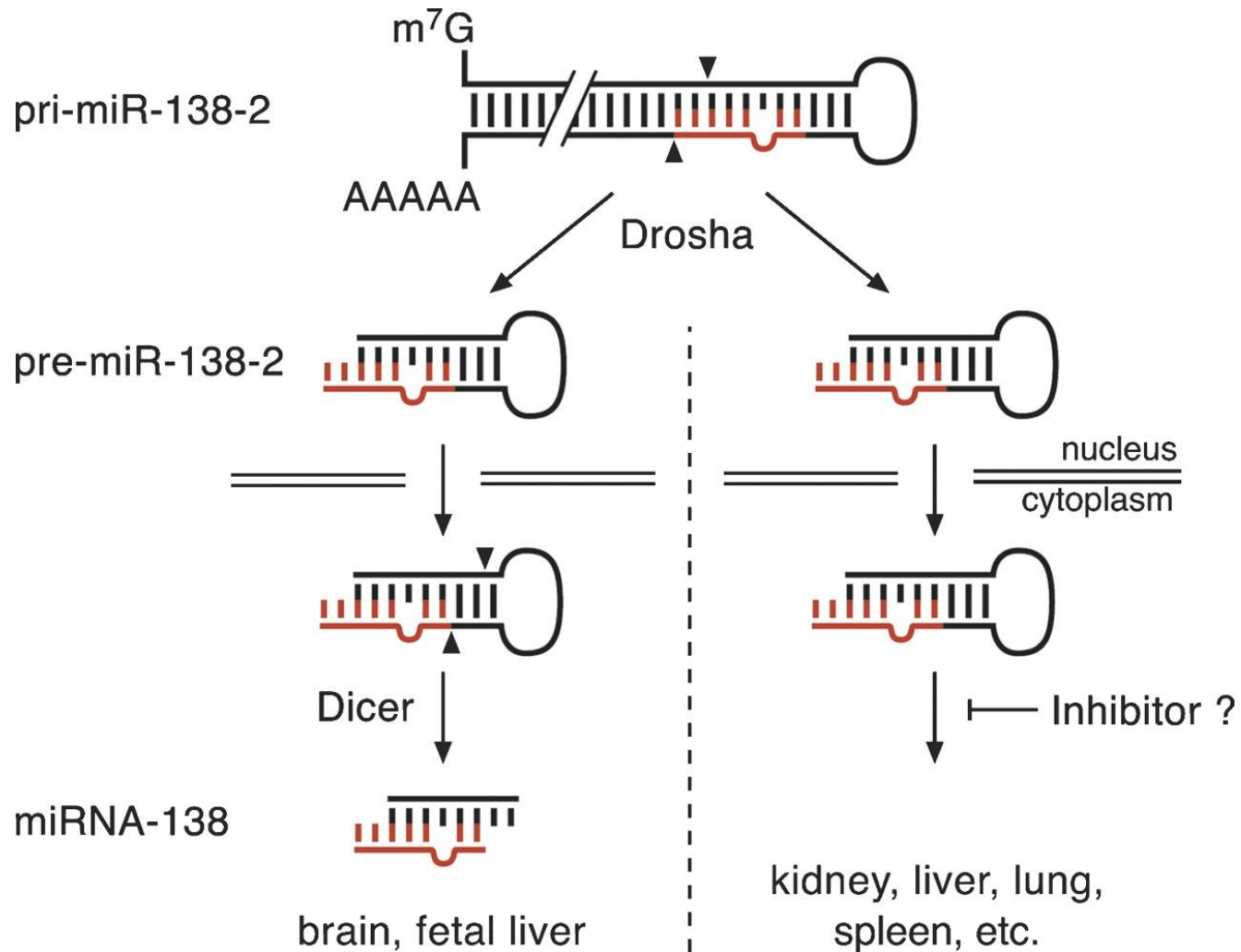
miR-198 in *FSTL1* mRNA 3' UTR



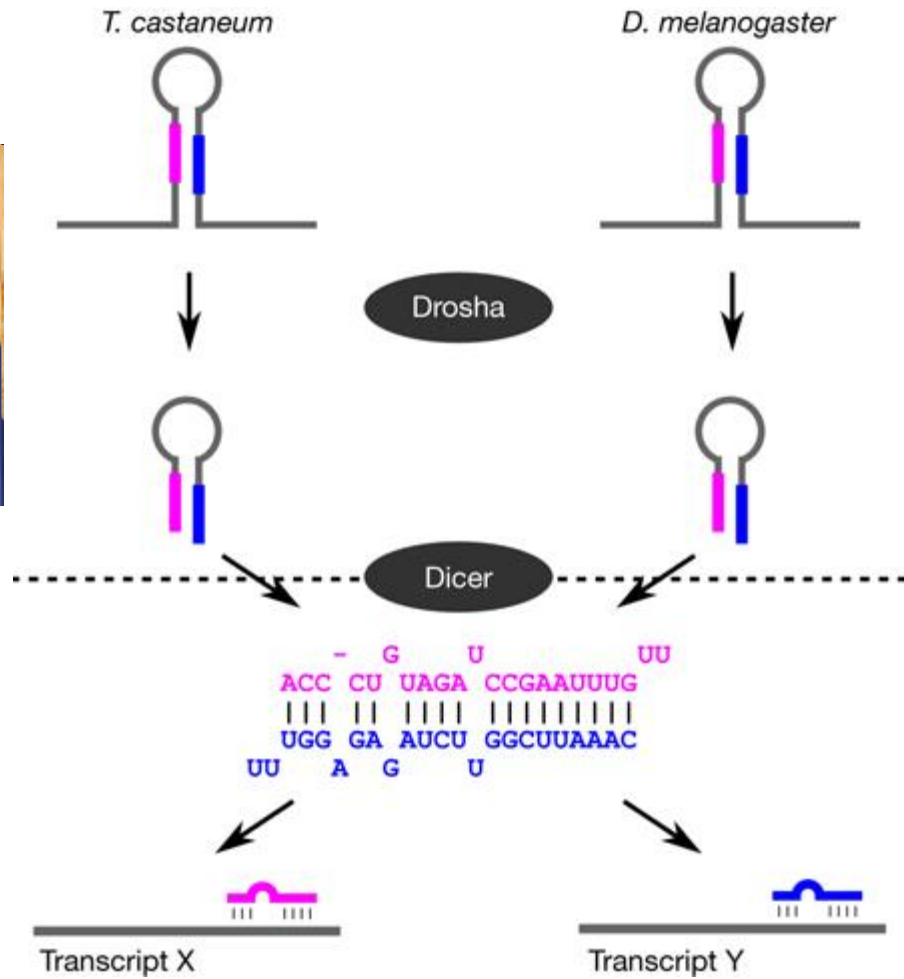
(A) Két példa: ahol a miR önálló transzkripció egység miR-21 és a policisztron miR-17–92-1 (Cai et al., 2004 ; He et al., 2005 ).

(B) (B) Példák ahol a miR-ek más génekből íródnak át. miR-15a 16-1 és miR-106b-93-25 intronból (Calin et al., 2004) (Rodriguez et al., 2004). \* miR-155 a ncRNS exonjában (Eis et al., 2005), miR-198 is mRNS UTR(Cullen, 2004).

# miR –ek szövetspecifikus processzálása

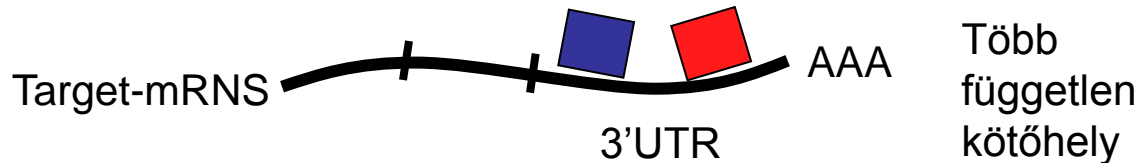


# miR –ek faj specifikus processzálása

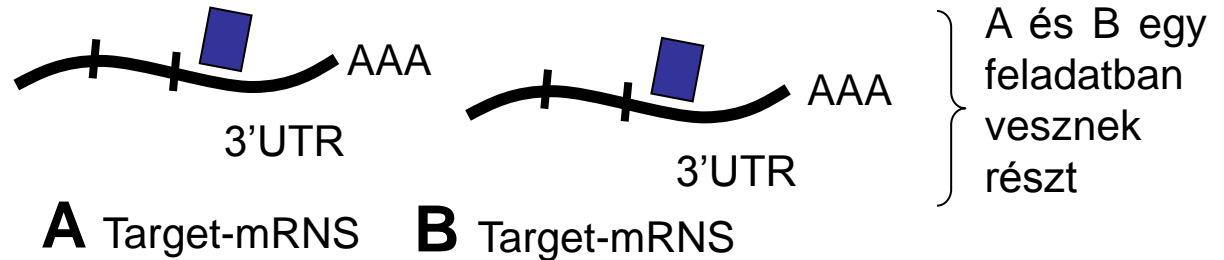


# A miRNS-közvetített szabályozásban megfigyelt törvényszerűségek

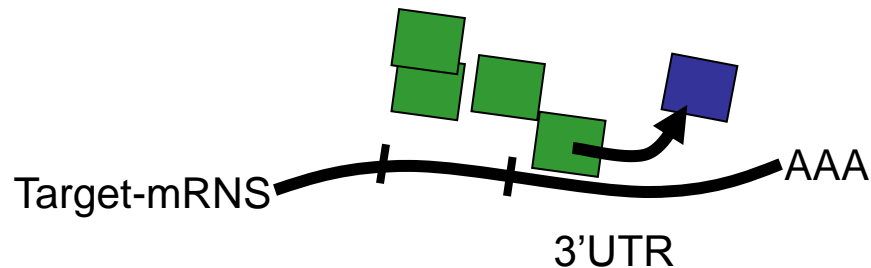
• együttműködés  
(kooperativitás)



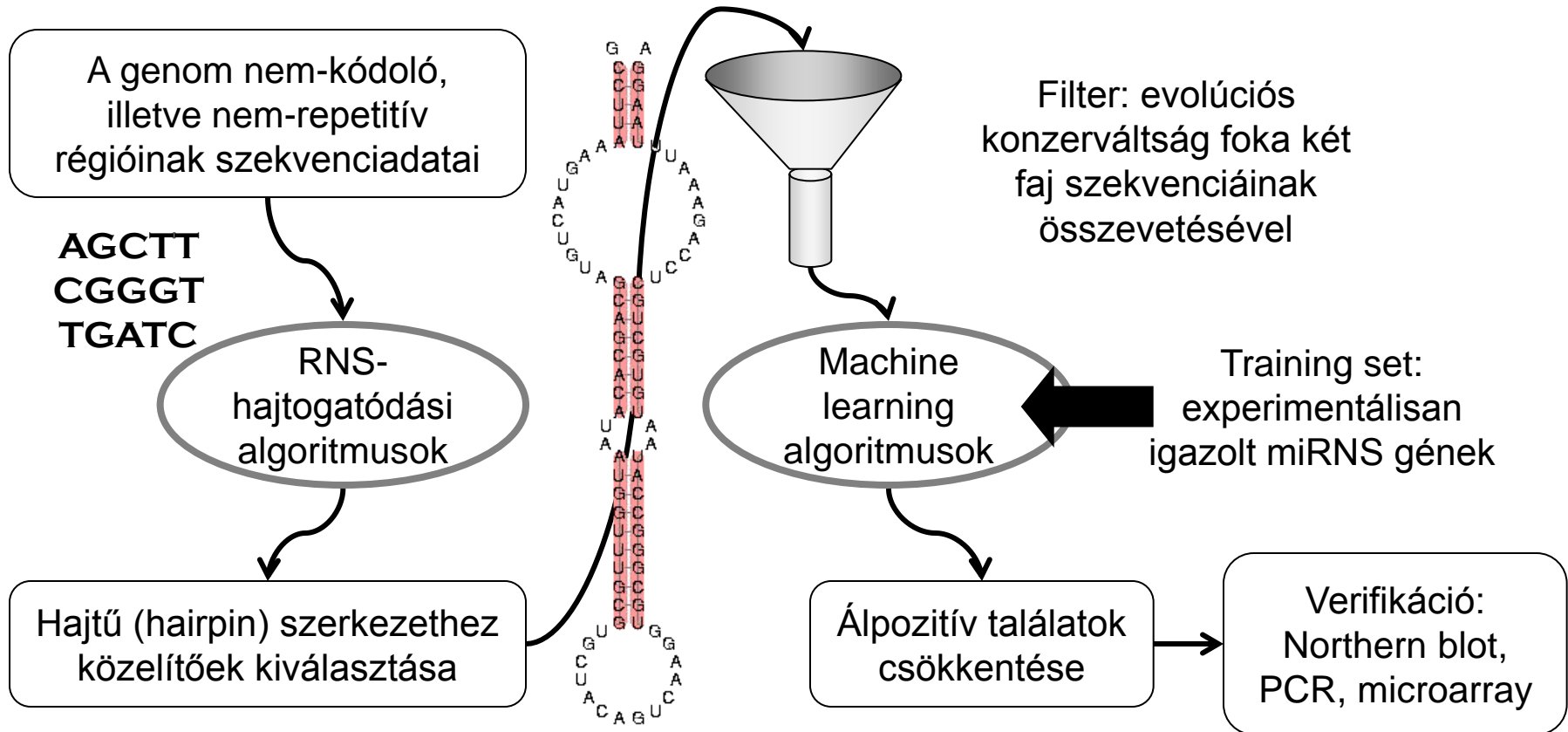
• összehangolás  
(koreguláció)



• kompetíció



# Számítógépes jóslatok: új miRNS gének azonosítása



A módszer (in silico cloning) hiányosságai:

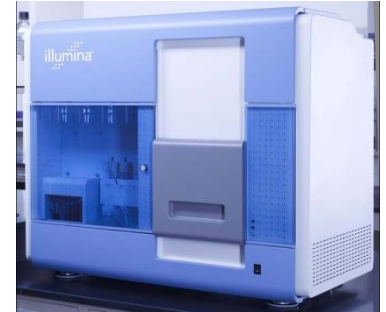
- a fajra specifikus miRNS-találatok száma csökken, magas álpozitív arány

Az experimentális azonosítás:

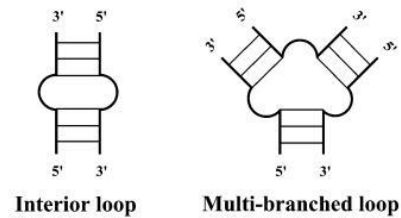
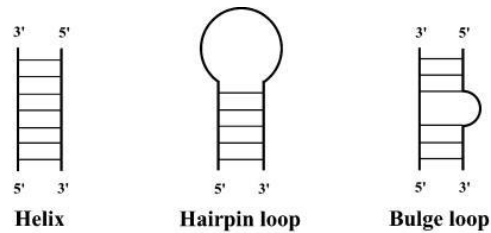
- fajspecifikus, de az alacsony szinten, illetve kevés sejtben, vagy éppen csak adott körülmények között expresszálódók kimutatásának esélye alacsonyabb



# miR keresés a genomban

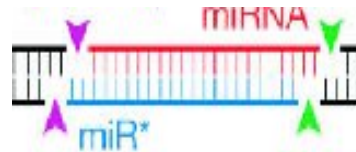


1. nyers szekvencia adatok szűrése „rövid” jellegzetes másodlagos szerkezet alapján



# Egy kis nomenklatúra

miR	mature miRNA sequence	example: hsa-miR-100
mir	precursor hairpin sequence	example: hsa-mir-100



## hsa-miR-9a

Species

Distinguishes **paralogous** sequences that differ by 1-2 bases in the mature miRNA

## hsa-miR-17-3p

Two mature miRNA can be excised from the 5' or 3' end of the hairpin precursor

# A homológia típusai

A homológia két típusa

**Ortológia:** két gén ortológ, ha két különböző fajban találhatóak, és egy közös ős-génből származnak, mely a két faj közös ősében volt jelen. Ugyanazt a funkciót szolgálják, a két fajban. Példa: laktát dehidrogenáz (ill. génje) az emberben és az egérben.

**Paralógia:** két gén paralóg, ha ugyanabban az organizmusban találhatóak, és egy közös ős-génből génduplikáció és azt követő divergens evolúció útján alakultak ki. Többnyire különböző, de egymással összefüggésben lévő funkciójuk van. Példa: a hisztidin-bioszintézis enzimei (ill. ezek génjei) emberben (nagyon hasonló szerkezetűek, de más-más reakciót katalizálnak).

# Egy kis nomenklatúra II

miR	mature miRNA sequence	example: hsa-miR-100
mir	precursor hairpin sequence	example:



**hsa-mir-19b-1**

Distinguishes identical mature miRNAs that arise from different hairpins

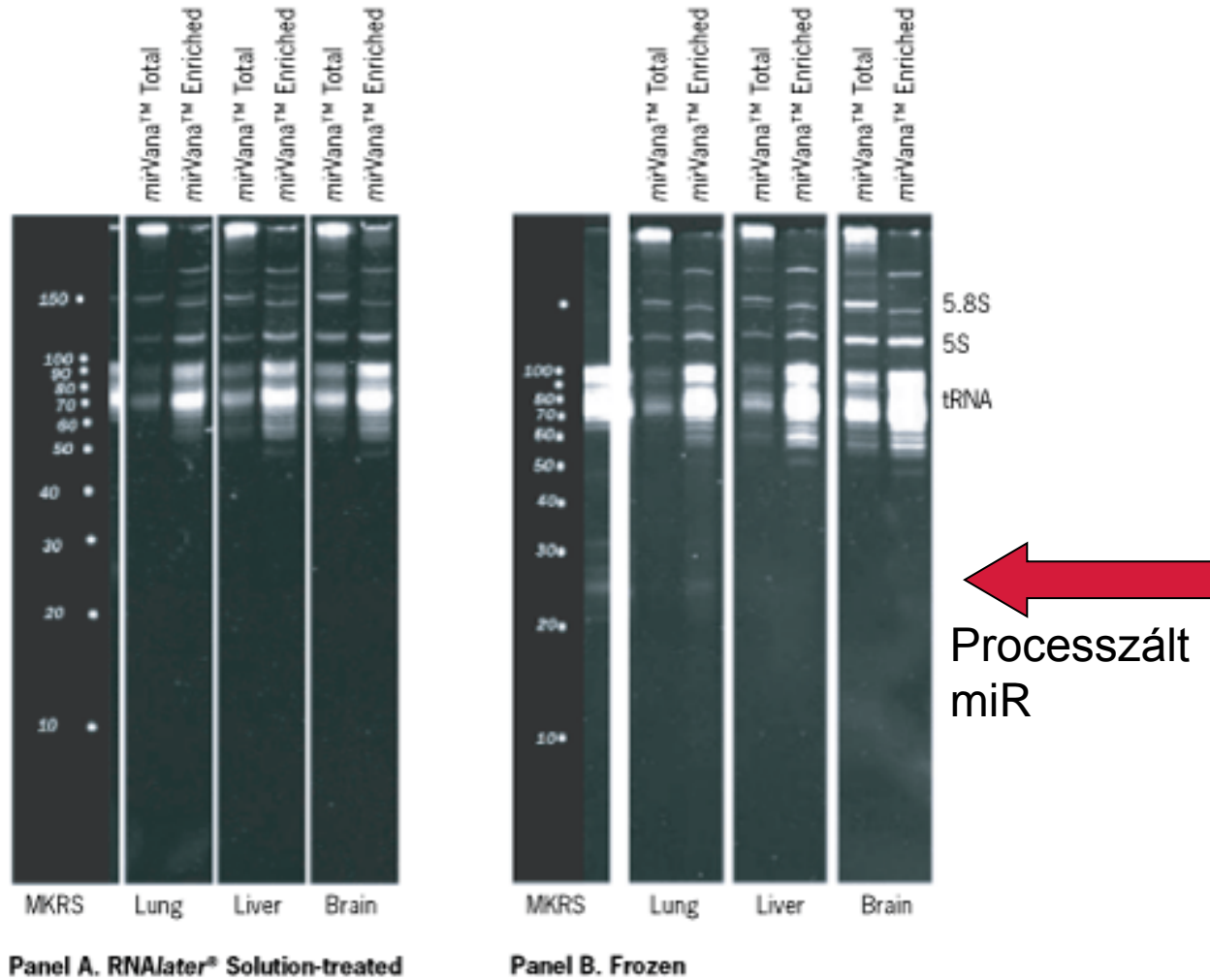
**hsa-miR-33a\***

Minor, complementary strand to the mature miRNA.

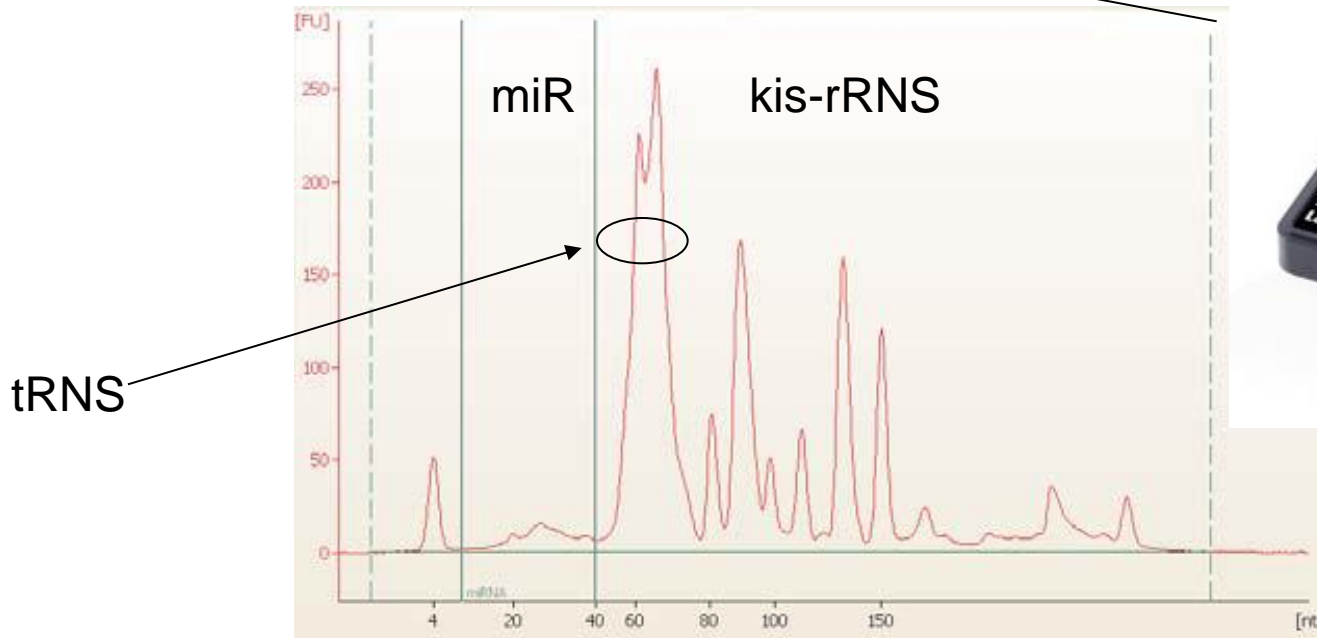
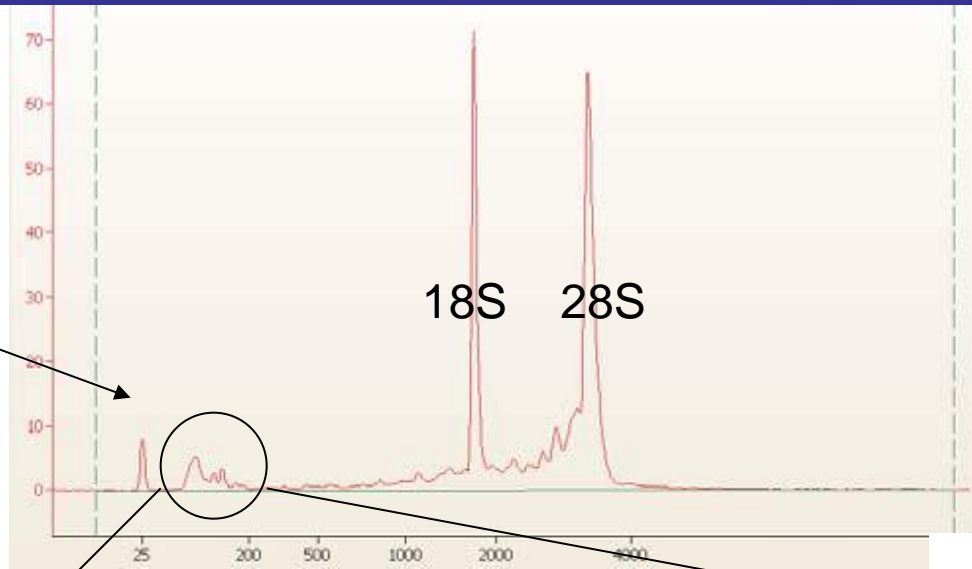
## Rövidláncú RNS azonosítás

- Northern-blot
- Array
- Mikrogyöngy
- PCR alapú kimutatás
- Direkt szevenálás

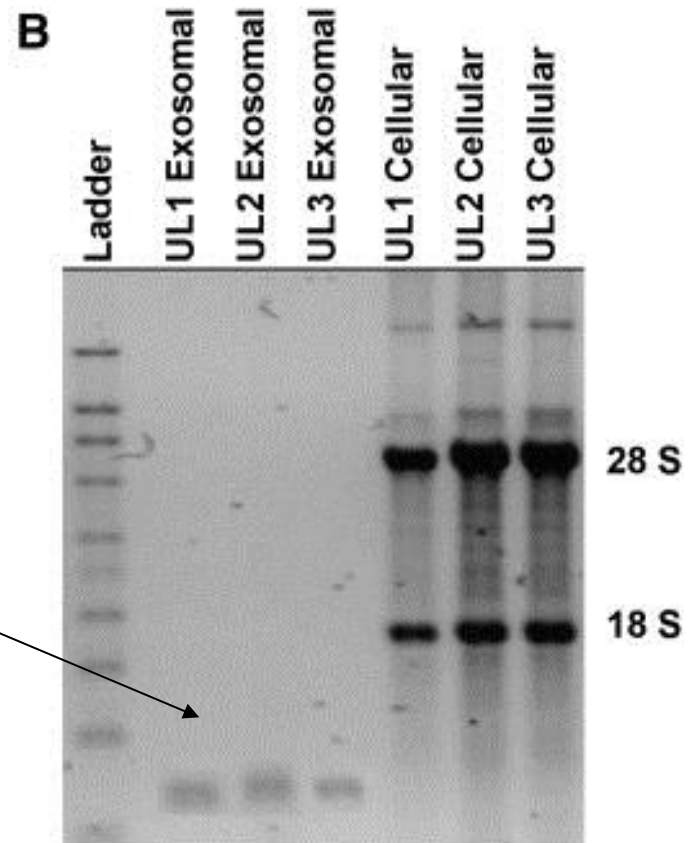
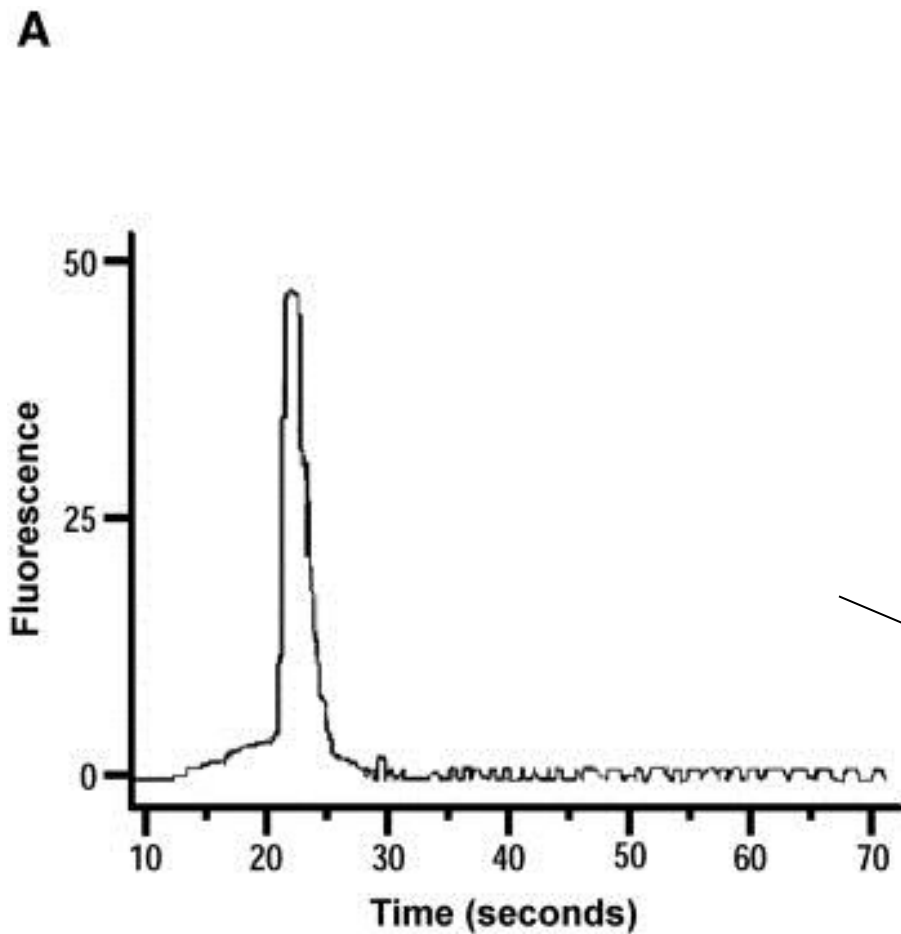
# Rövidláncú RNS izolálás



# Kapilláris gélelektroforézis

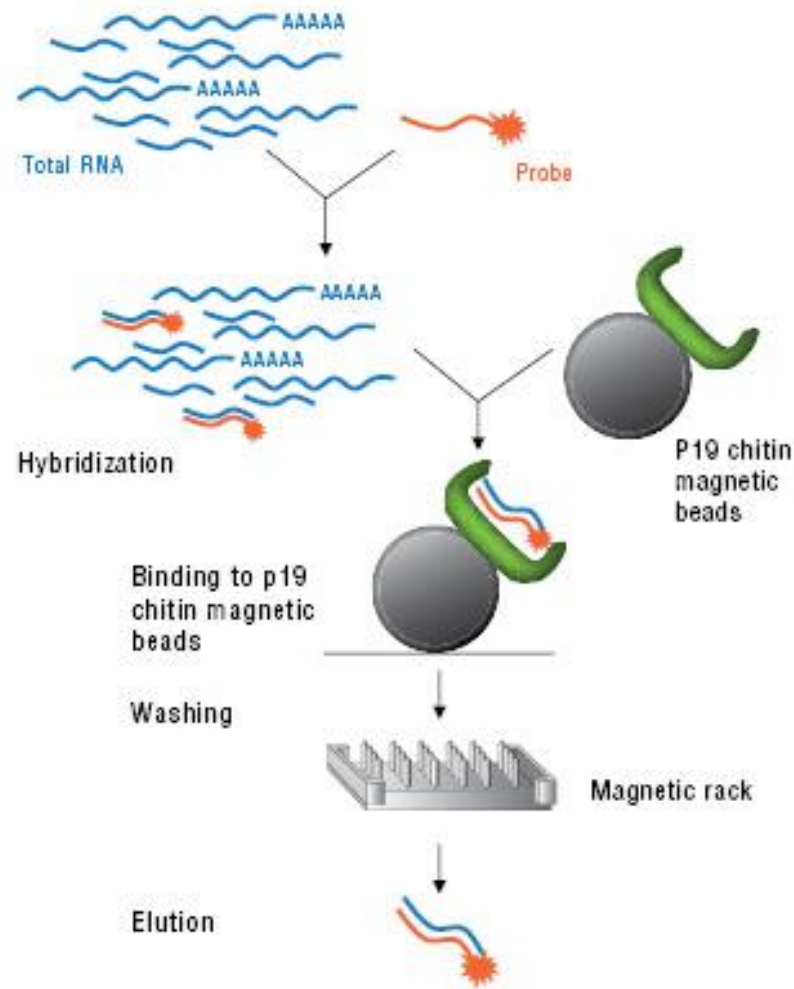


# miR izolálás exoszomából ovárium tumoros betegek szérumból

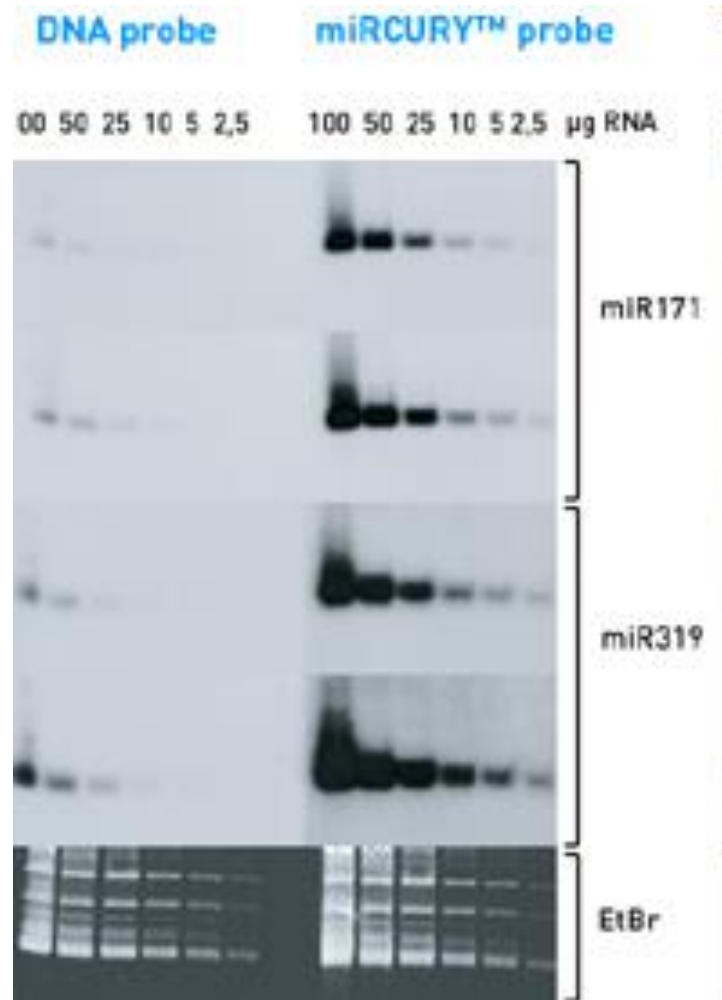




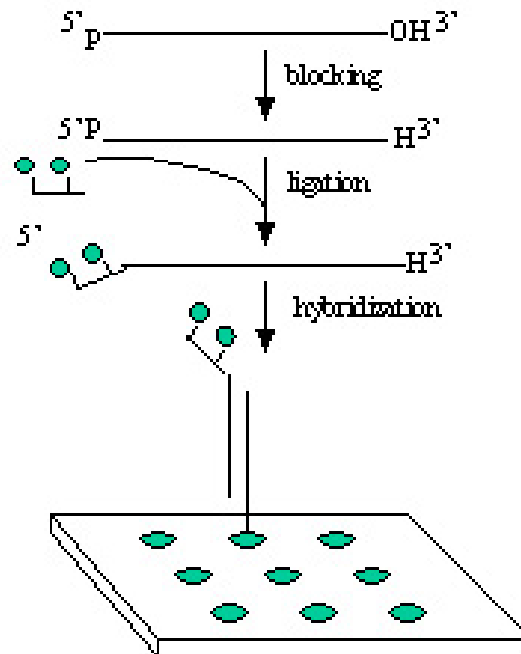
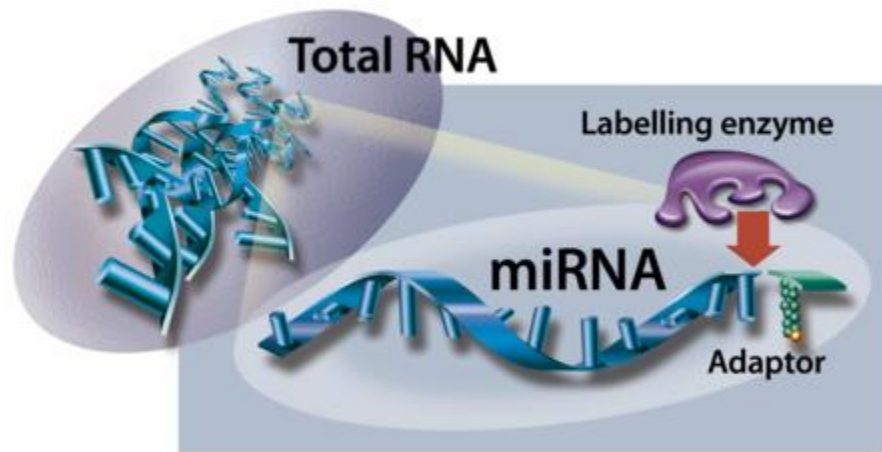
# miR izolálás mágneses gyöngyökön



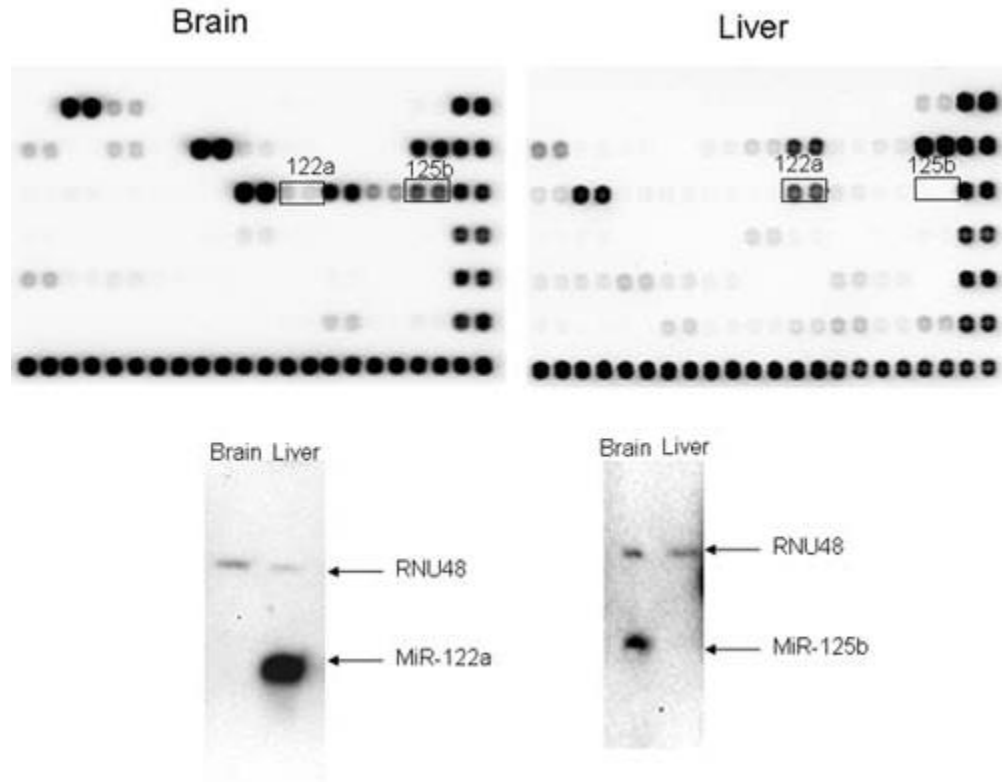
# Northern blot



# Array



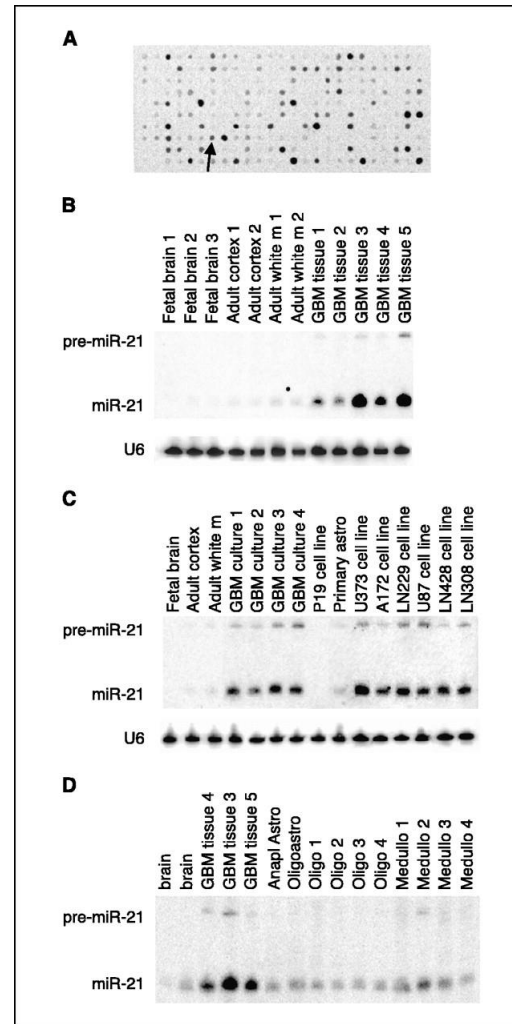
# Array



**Szövetspecifikus expresszió**

# Egyszínű array/ Validálás : Northern blot

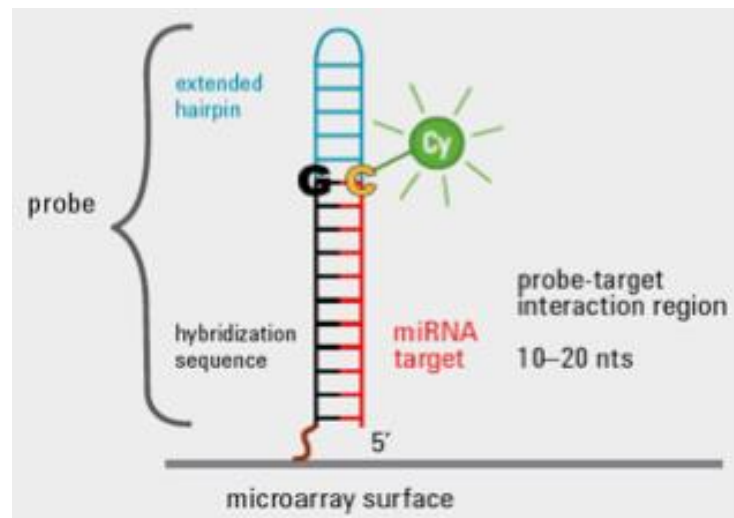
miR-21 is overexpressed  
in glioblastoma tissues and cells



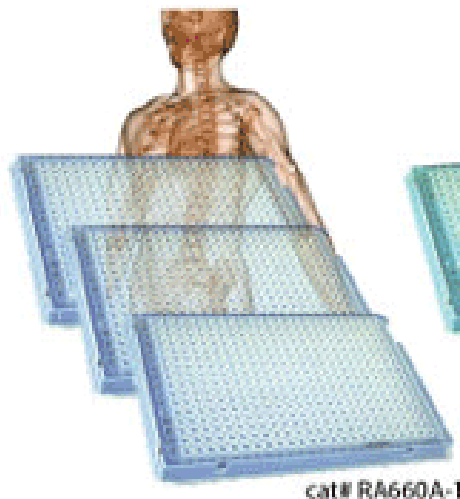
Chan, J. A. et al. Cancer Res 2005;65:6029-6033

# miR array

Ez is hibridizáció elvén működik, de 96 lyukú plate formátumban



**Human complete set**  
All microRNAs



**Mouse complete set**  
All microRNAs



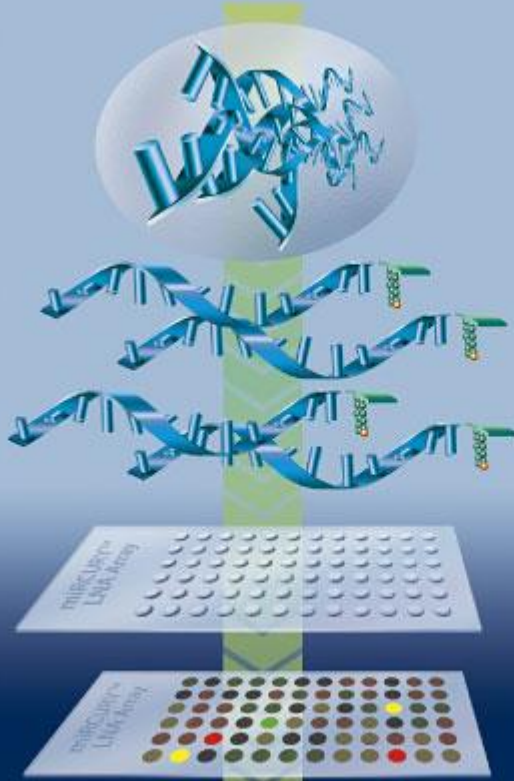
**Rat complete set**  
All microRNAs



All miR major and minor miR\* forms

# Kétszínű Array

24 hours

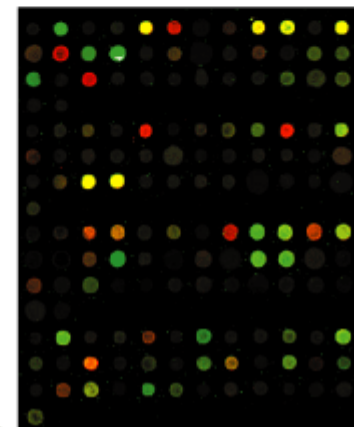
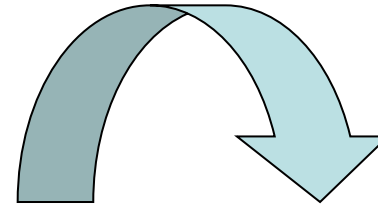


**1. Prepare RNA sample**  
Total RNA sample  
(Use 1 – 10 µg, total RNA).  
miRNA enrichment is optional.

**2. Label RNA sample with Hy3™/Hy5™ dyes.**  
Uniform and robust miRNA labeling in 90 minutes

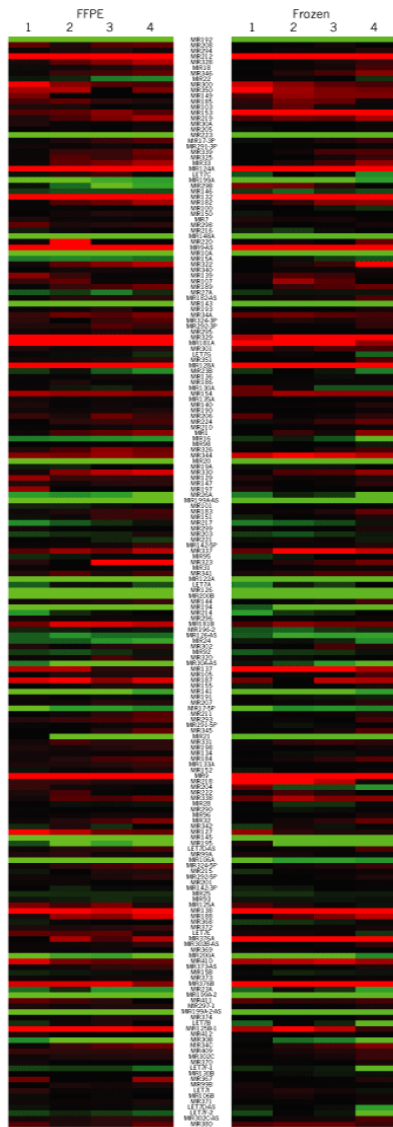
**3. Hybridize overnight**

**4. Obtain the microRNA profile of your sample**

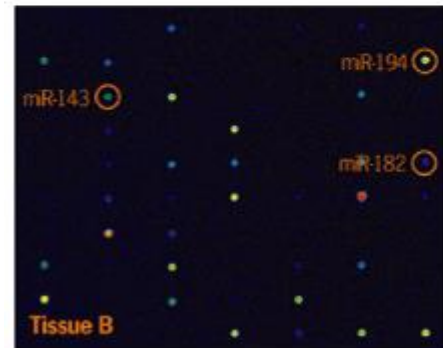
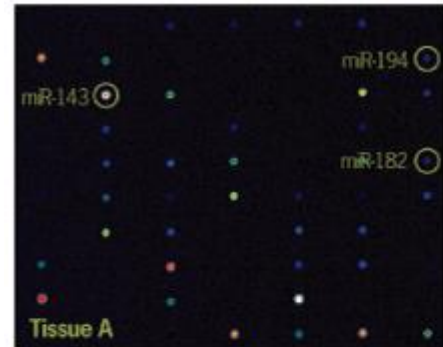


Panel B.

# Kétszínű Array: Összehasonlításra jó



Panel D. Brain

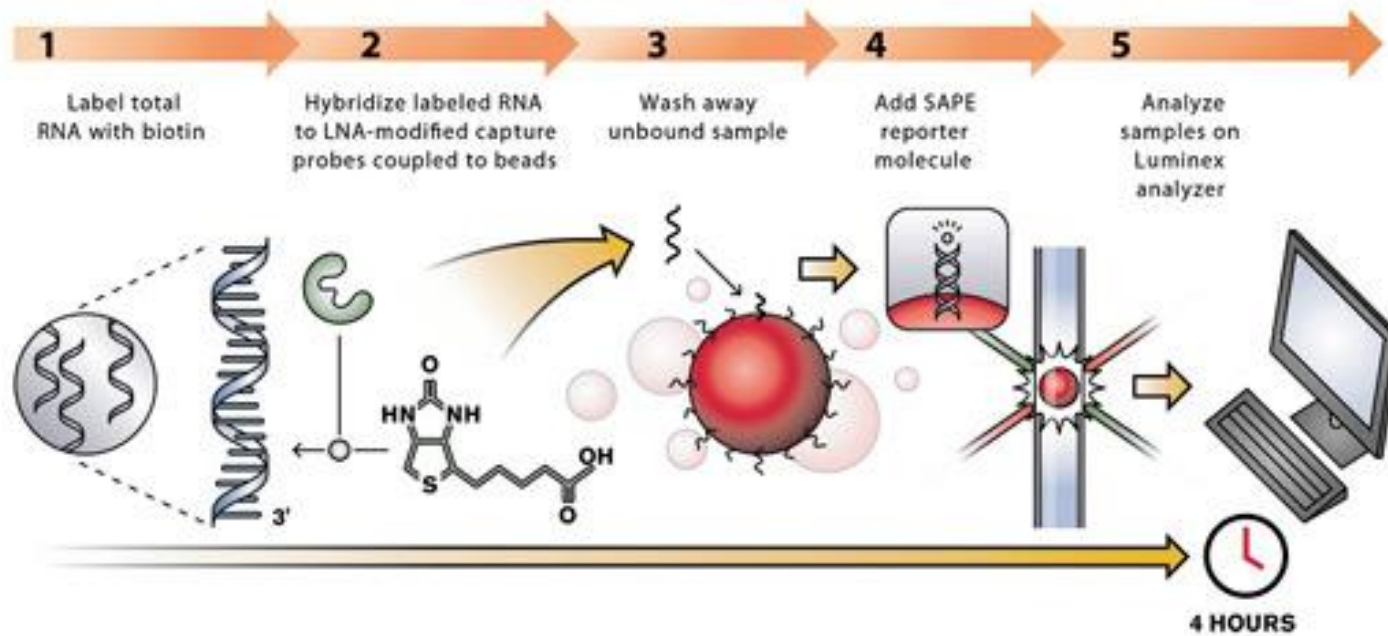
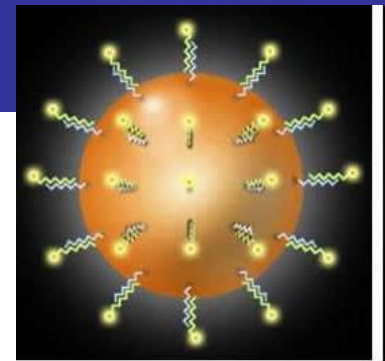


Panel B. Tissue B Bioarray

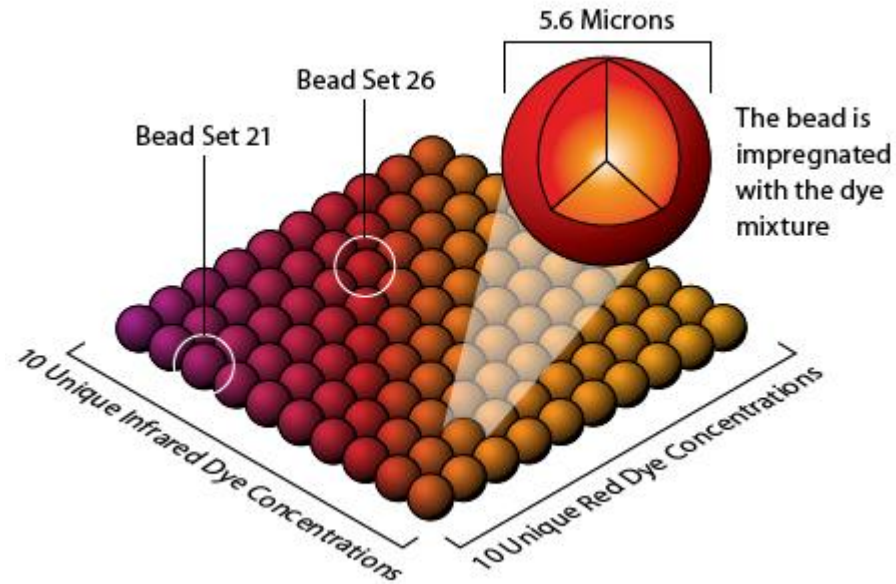
Szövet-specifikus profil



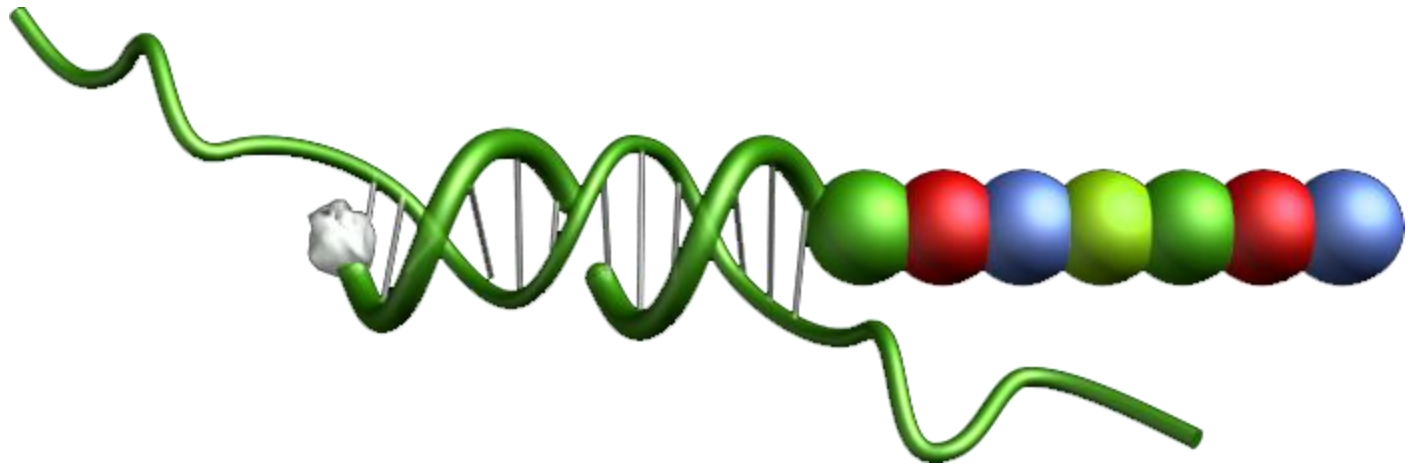
# Gyöngy alapú multiplex analízis



# Gyöngy alapú multiplex analízishez festett gyöngy kell



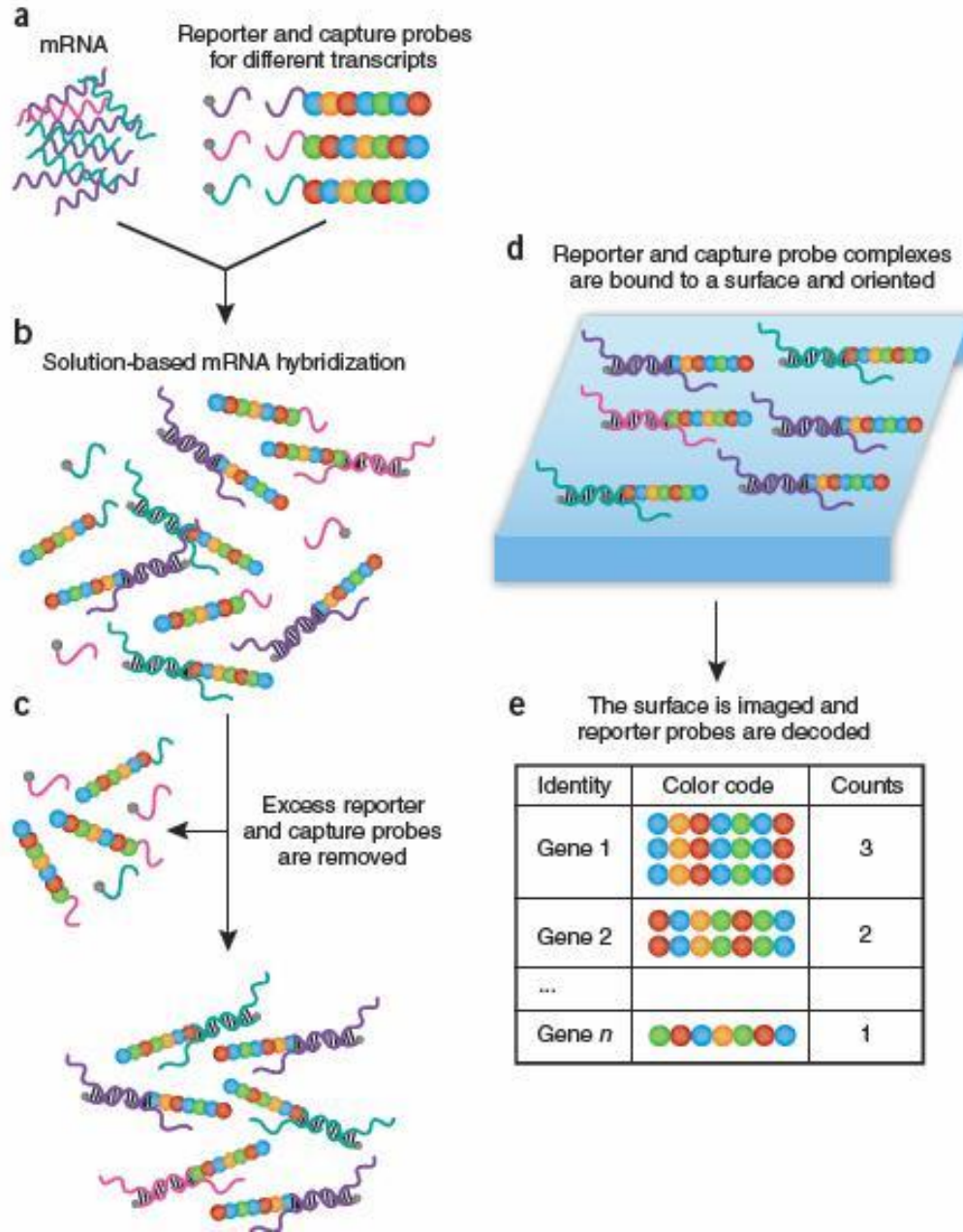
# Molekuláris színekód



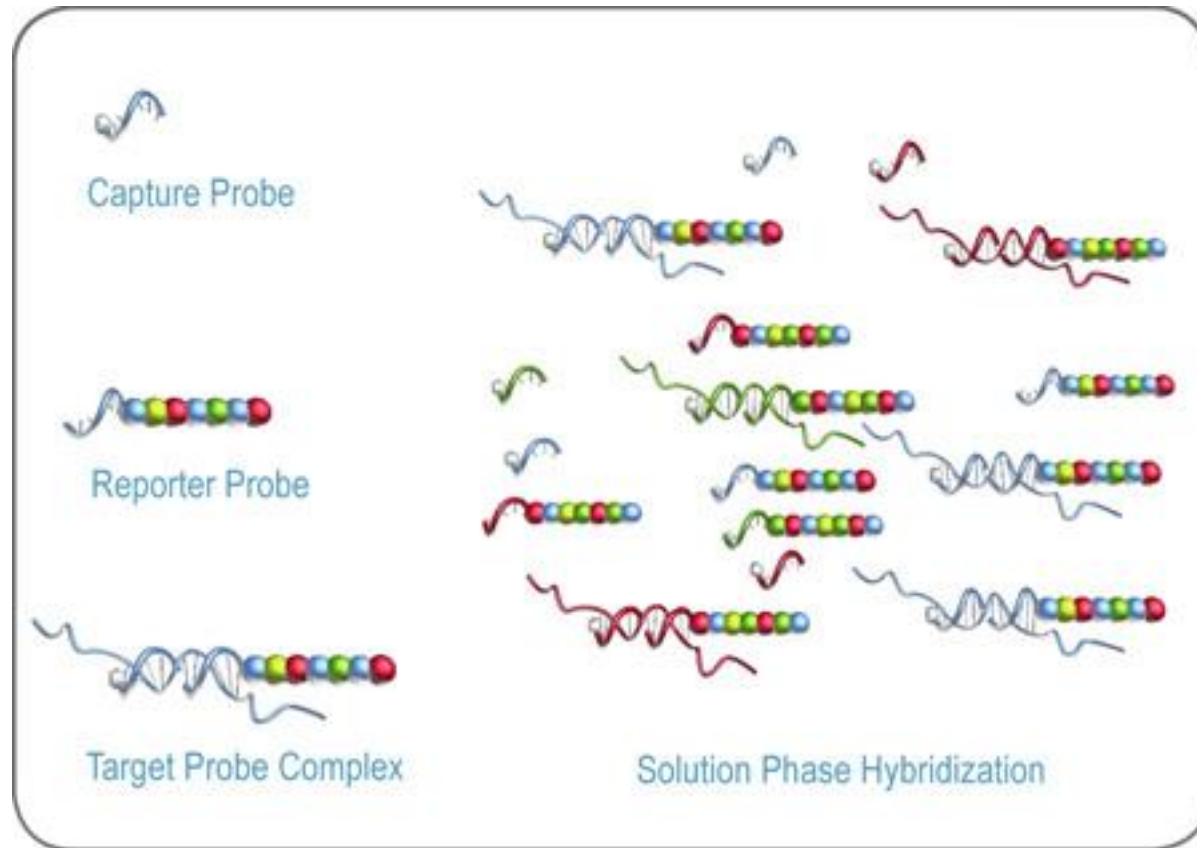
NanoString technology

Target Specific Capture & Reporter Probes are created to bind to the mRNA transcript

# NanoString Technológia

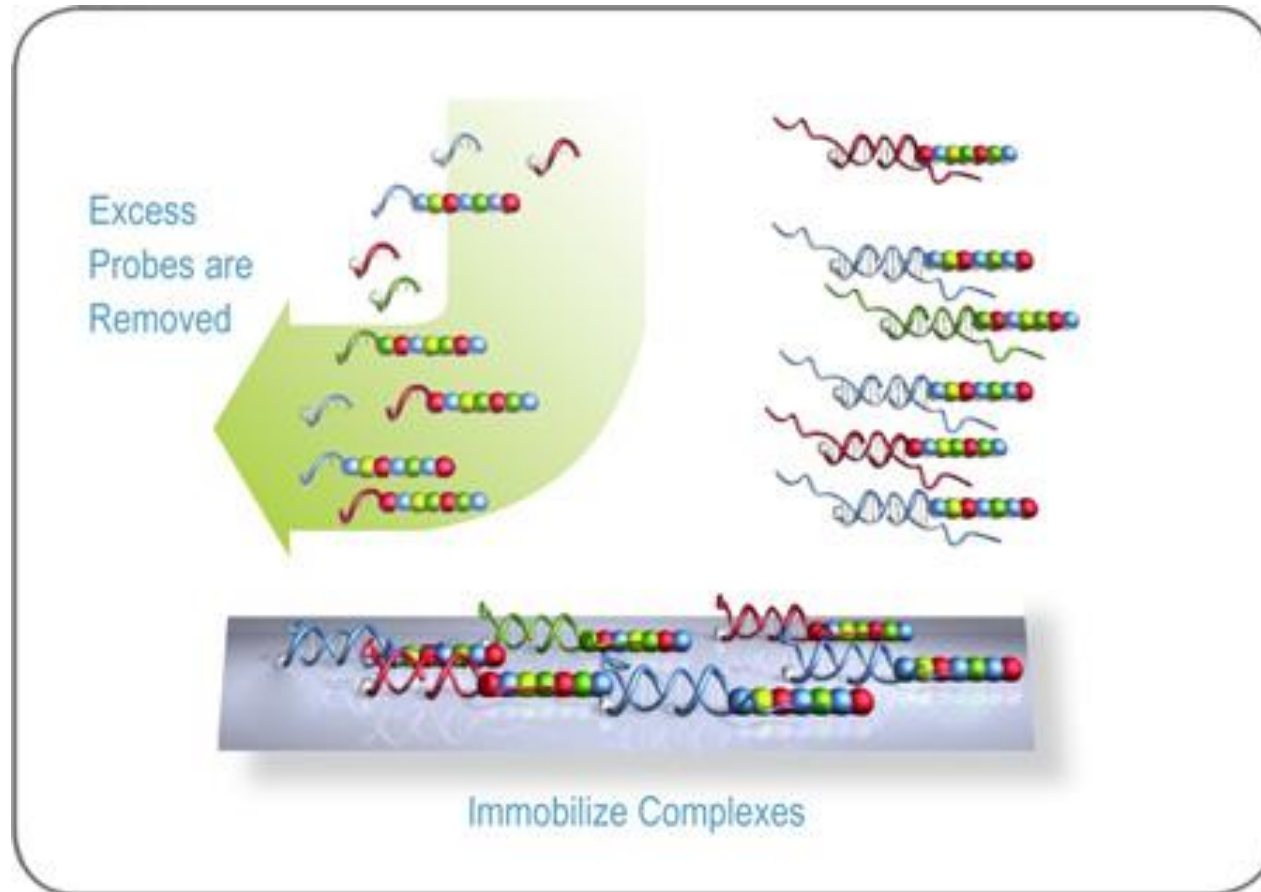


# NanoString Technológia



NanoString's Technology employs two ~50 base probes per mRNA that hybridize in solution. The Reporter Probe carries the signal; the Capture Probe allows the complex to be immobilized for data collection

# NanoString Technológia



After hybridization, the excess probes are removed and the probe/target complexes aligned and immobilized in the nCounter Cartridge.

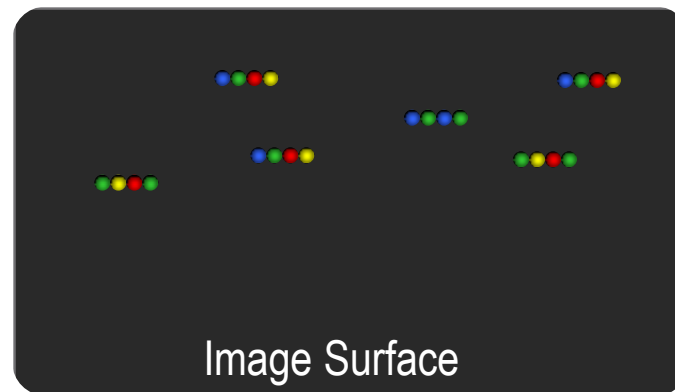
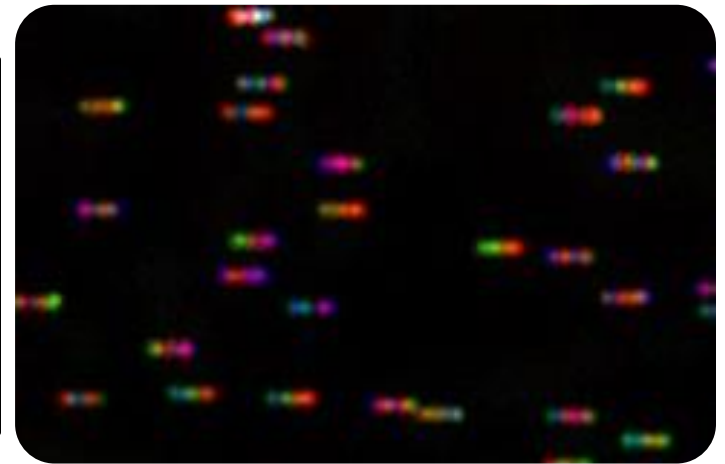
## nCounter Analysis System

- Nagy pontosság
- Nagy érzékenység (<1 copy per cell)
- Nincs enzimreakció és amplifikáció
- Kvantitatív



# Molekuláris színekód

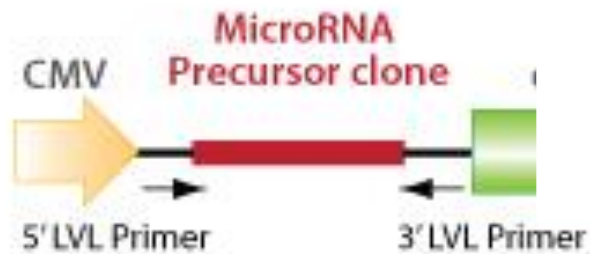
Code	Gene	Count
	x	3
	y	1
	z	2





# Hagyományos PCR

Simple genomic PCR to identify MicroRNA



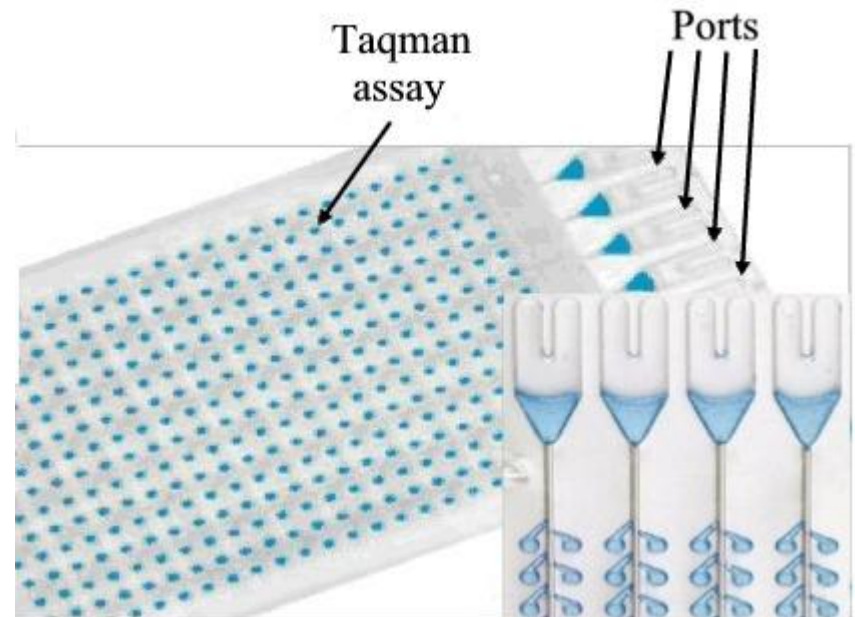
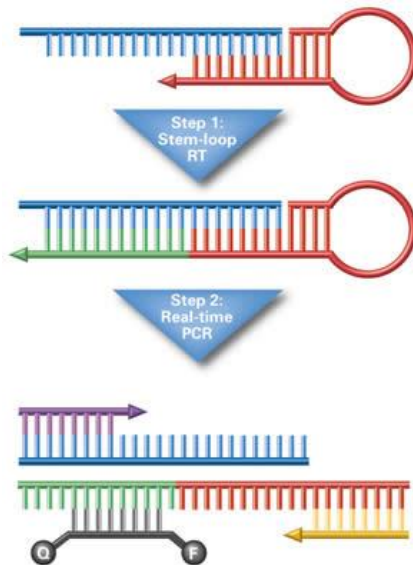
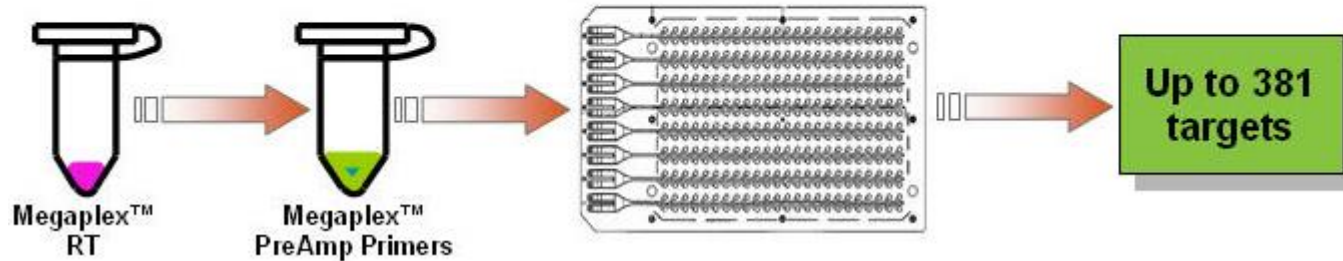
MicroRNAs



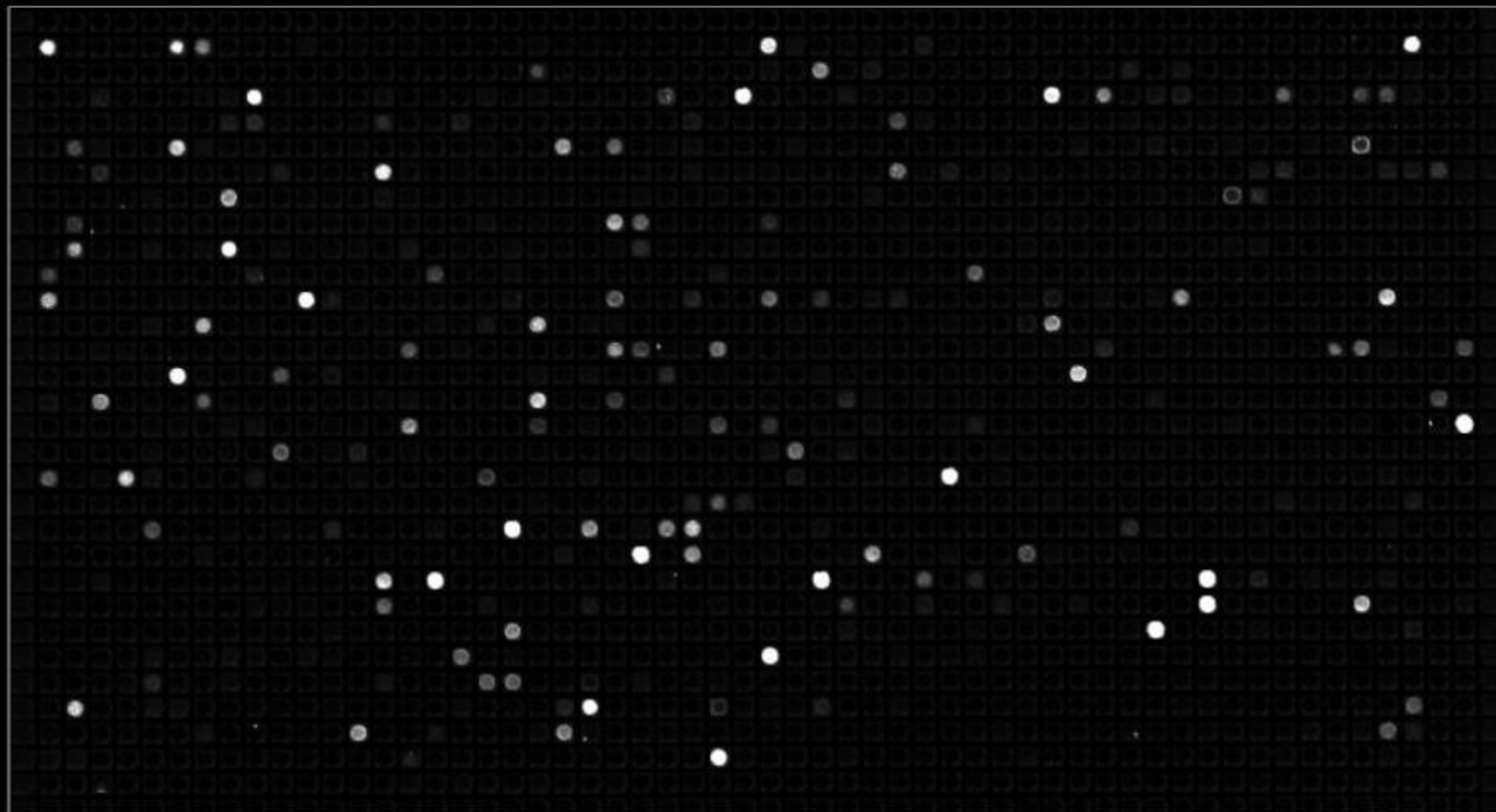


# TaqMan PCR array :specifikus miR kimutatás

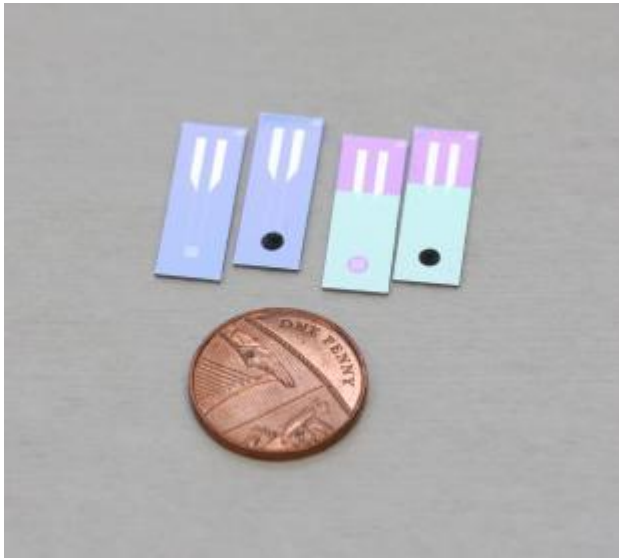
Overview of basic product workflow. The A and B content is fixed, and each is comprised of a Megaplex RT pool, a Megaplex PreAmp Primer pool (optional), and a TaqMan MicroRNA Array enabling the quantitation of up to 381 miRNAs



# Betegségsspecifikus egyéni array



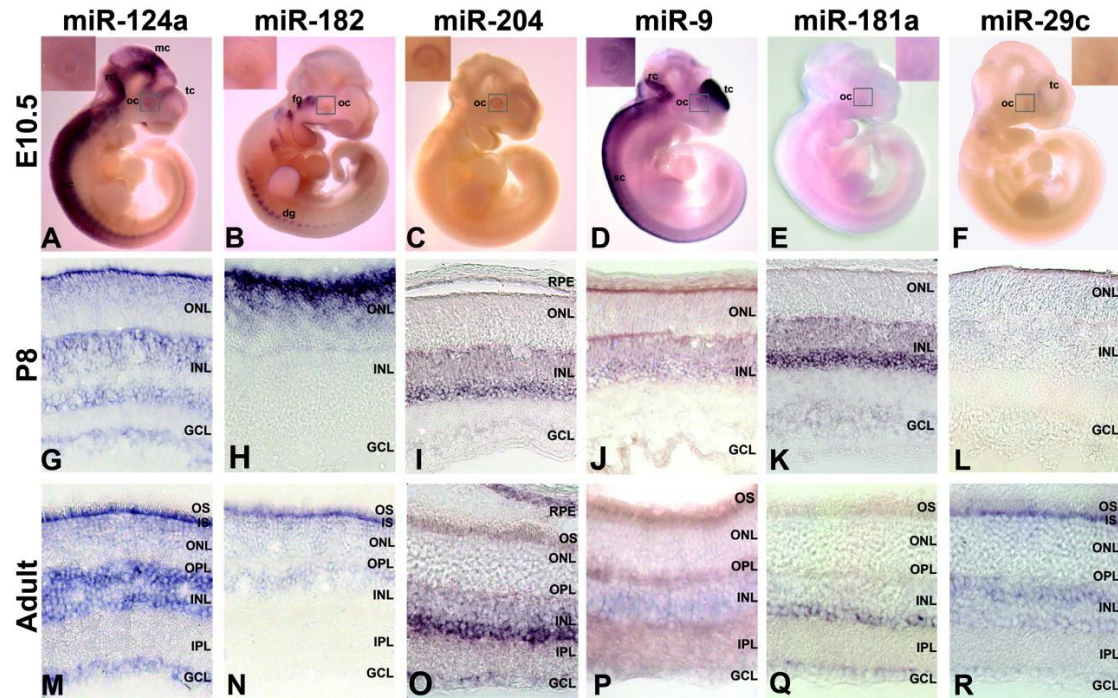
# Betegségsspecifikus egyéni array



THE UNIVERSITY  
*of* EDINBURGH

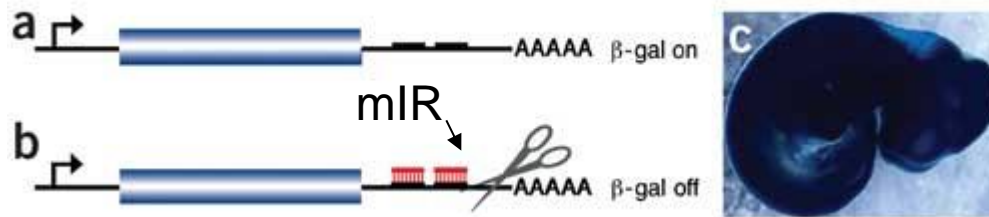
*Prototype low-cost micro-RNA sensors for the detection of acute leukaemia.*

# In-situ hibridizáció



Expression analysis of six miRNAs during retina development in mouse. Expression analysis of six miRNAs by RNA ISH on whole E10.5 embryos (A–F) and on eye sections from P8 (G–L) and adult (M–R). All miRNAs were expressed in the different retina cell layers with diverse and partially overlapping patterns, in both P8 and adult retinas. oc, optic cup; tc, telencephalon; mc, mesencephalon; rc, rhombencephalon; sc, spinal cord; fg, facial ganglia; dg, dorsal root ganglia.

# miR szöveti expresszió



LacZ transzgén, melyik sejtben szabályozza miR?



# miR direkt szekvenálás

## Workflow

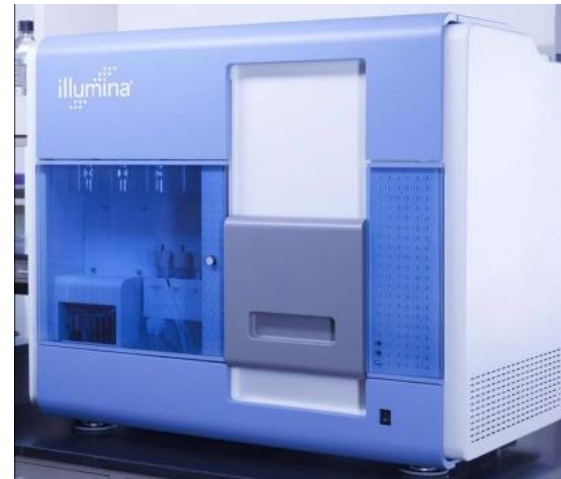
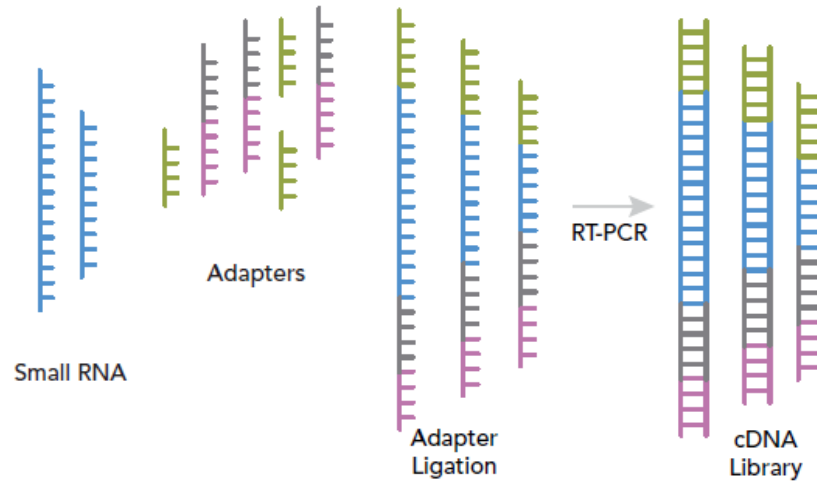
3' RNA adapter ligation

5' RNA adapter ligation

RT-PCR amplification

Purify small RNA library

Cluster generation and sequencing (Cluster Station and Genome Analyzer )





# A miRNS-ek a génexpresszió „finomhangolói”

- ✓ A génexpresszió beállítása a sejtosztódásban, a sejthalálban, és a differenciálódásban (a **többszintű szabályozás igénye?**)
- ✓ a **növényektől a gerincteleneken át az emlősökig**, az ismert miRNS-mediált szabályozó folyamatok olyan fenotípusok **érzékeny beállításában** vesznek részt, mint a fejlődés, vagy a differenciálódás.
- ✓ Sejt, illetve **szövetspecifikus expresszió**
- ✓ A differenciálódás azonos fokán hasonló mikroRNS-ek expresszálódnak a különféle vérképzőrendszeri fejlődési vonalakban (Monticelli et al.)
- ✓ Onkogének és tumorszuppresszor gének működésének szabályozása

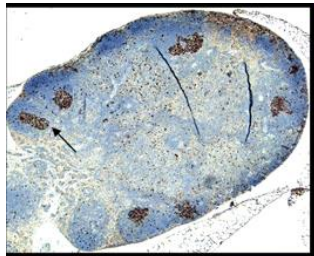
# Néhány dolog vegyünk figyelembe

(BIC) noncoding szekvencia : 1 copia **miR-155** az exonban

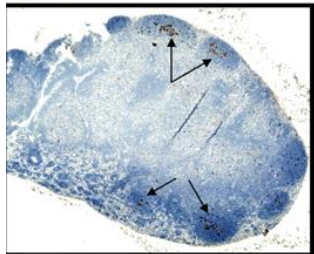
Aktivált immunsejtekben expresszálódik

**Hodgkin limfóma** diffúz nagy sejtés B sejt limfóma ; oncomir

**miR-155** null egér semmi baja a hematopoezisnek **DE** Immunfunkciós defekt  
Nincs normális B sejt funkció



WT

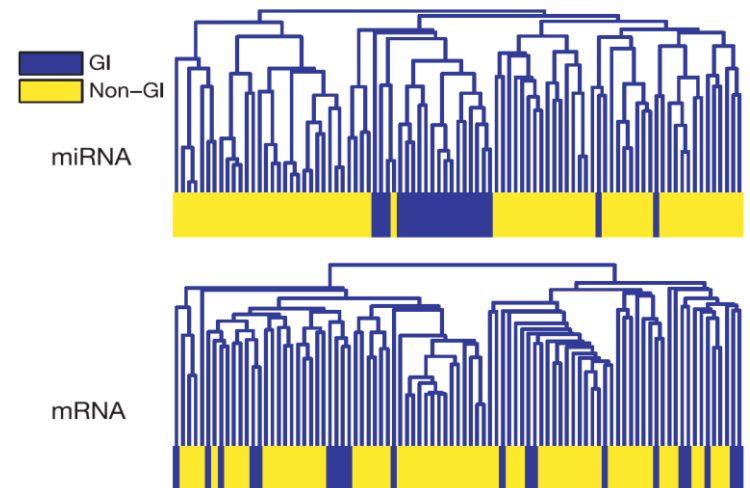
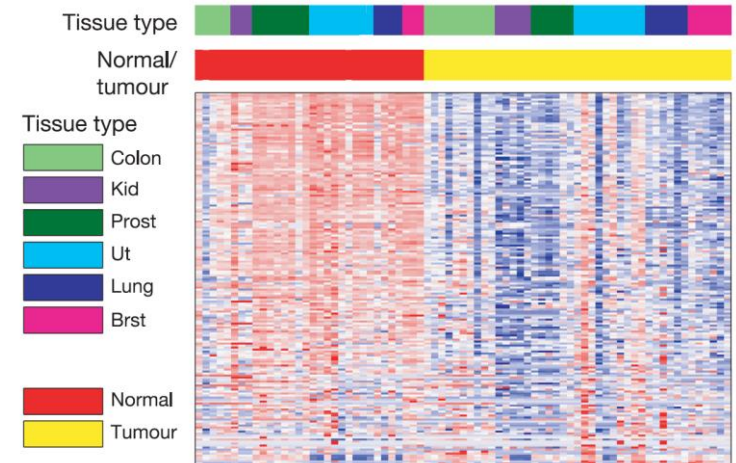


KO mir-155

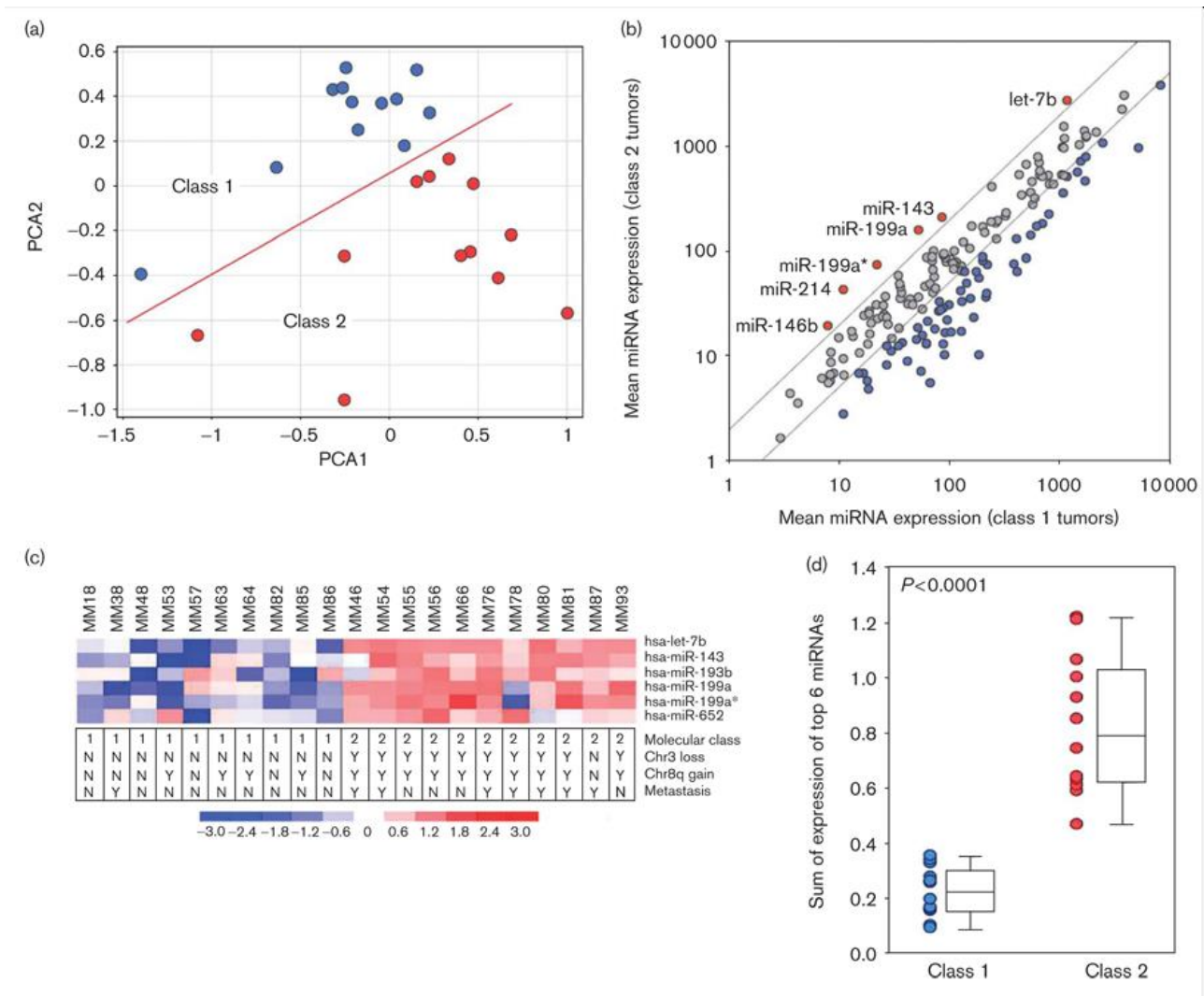
**Egyéb KO újragondol**

# A miRNS-ek daganatok klasszifikációjában

- A különböző tumortípusok miRNS-profiljainak összevetése: **hasonló differenciáltsági állapottal és fejlődési eredettel rendelkezők hasonlítanak egymásra**
- Az egyes típusok miRNS-profilja megbízhatóbban klasszifikálja a tumort, mint a mRNS-mintázat
- A szövettanilag nem diagnosztikus, **differenciálatlan daganatokban igen eredményes** az eredet meghatározásában
- Gyakorlati előny: a rutinszerűen feldolgozott (formalinnal fixált, paraffinba-ágyazott) mintákban a miRNS-ek jórészt intaktak maradnak



# Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Research*. 2008 18:184-190.







# miRBase

<http://www.mirbase.org/>

**miRBase** MANCHESTER

Home Search Browse Genomics Help Download Submit

miRBase has moved to <http://www.mirbase.org/> - please update your links.

**News - release 14**

The miRBase database has moved to a new location at <http://www.mirbase.org/>, hosted in the [Faculty of Life Sciences, University of Manchester](#). All pre-existing URLs should forward to their new locations. Please update your links, and note the new contact email address ([mirbase@manchester.ac.uk](mailto:mirbase@manchester.ac.uk)).

With release 14, the miRBase sequence database has broken through the 10000 entries barrier!

**miRNA count: 10883 entries**  
Release 14: Sept 2009

**Search by miRNA name or keyword**

**Download published miRNA data**  
[Download page](#) | [FTP site](#)

**This site is featured in:**  
[NetWatch - Science 303:1741 \(2004\)](#)  
[Highlights, Web watch - Nature Reviews Genetics 5:244 \(2004\)](#)

## miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

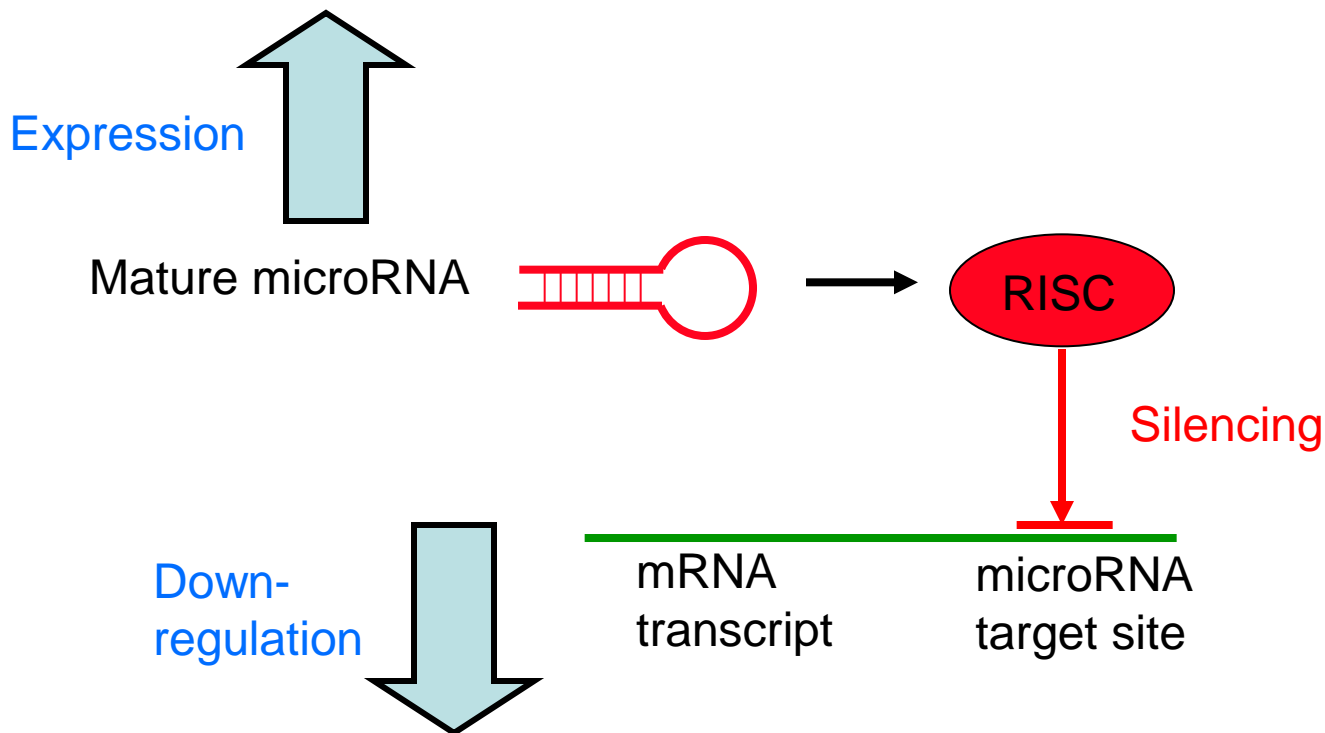
- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed mir in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed miR). Both hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also [available for download](#).
- The [miRBase Registry](#) provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the [help pages](#) for more information about the naming service.
- The miRBase Targets database and pipeline has been rebranded as [microCosm](#), and is now hosted at the [EBI](#). The microCosm resource continues to be maintained by the [Enright group](#). miRBase currently links miRNAs to targets predicted by [microCosm](#), [TargetScan](#) and [Pictar](#), and aims to provide a more extensive target prediction aggregation service in the future.

To receive email notification of data updates and feature changes please subscribe to the [miRBase announcements mailing list](#). Any queries about the website or naming service should be directed at [mirbase@manchester.ac.uk](mailto:mirbase@manchester.ac.uk).

miRBase is hosted and maintained in the [Faculty of Life Sciences](#) at the [University of Manchester](#) with funding from the [BBSRC](#), and was previously hosted and supported by the [Wellcome Trust Sanger Institute](#).

## Hogy keressünk miR targeteket?

- Mindegyik elméleti target lehetséges?
- **ÖTLET: Vessük össze a két array adatot**



# Általános modell

Get candidate targets

mRNA  
sequence data

microRNA  
sequence data

GCATCAT

AACTGCA

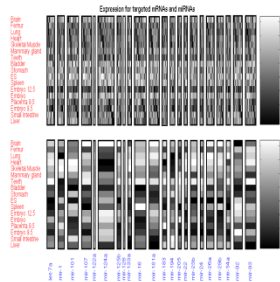
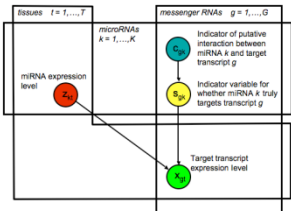
...

mRNA  
expression data

microRNA  
expression  
data

GenMiR

Detected microRNA  
targets





## Ismert miR célgének és funkciók

miRNA	Target	Function
miR-15/miR-16	Bcl2	Apoptosis
miR-1	GJA1/KCNJ2	Cardiac Arrhythmia
miR-146	IRAK1/TRAF6	Bacterial Infectious Response; TLR-NF $\kappa$ B
miR-520h	ABCG2	Stem Cell Differentiation
miR-106a	Rb1	Cancer Pathogenesis
miR-let7	Multiple	Cell Cycle Regulation
miR-155	-	Adaptive Immunity
miR-223	-	Granulocyte Regulation
miR-208	-	Stress Response (Heart)

# Hogyan szabályozódik a microRNS

- transzkripció faktorok
- promóter metiláció

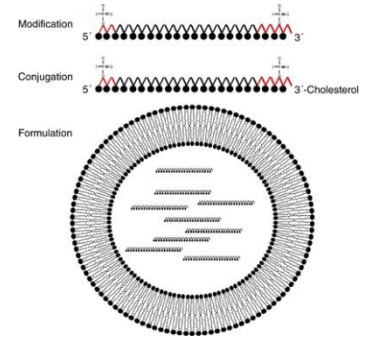
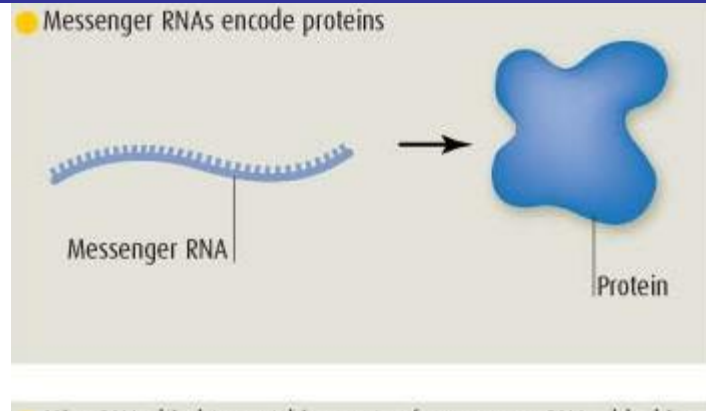


negatív/pozitív feedback

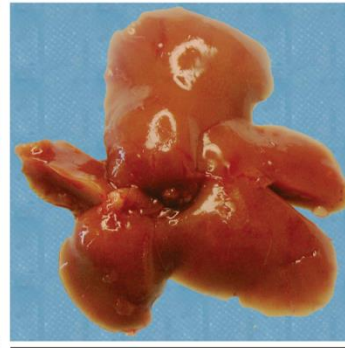
# Alkalmazási lehetőségek a közeljövőben

- ❑ A génszabályozás újonnan felismert szintje: a miRNS-ekkel számolni kell a biológiai szabályozásban
- ❑ A komplexitás megismerhető?
  - Teljes genom szekvenálás
  - Bioinformatika
  - Kondicionális knock-out és transzgenikus állatmodellek
- ❑ Biomarker, diagnózis, klasszifikáció
- ❑ Terápia: tartós és hatékony onkomir-csendesítés, tumorszuppresszor miRNS exogén bevitele

# antagomiR terapia???



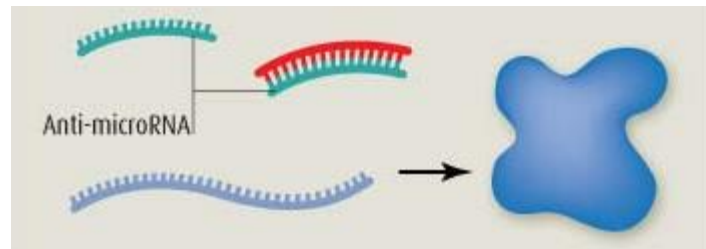
miR-10b



HoxD10

Control

microRNA



Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model  
Li Ma et al Nature Biotechnology Volume: 28,341–347,2010

# antagomiR terapia???

overexpression of miR-155  
can induce lymphoma



① miR-155-addicted  
lymphoid cells  
are tumorigenic

model for anti-tumor miRNA inhibition

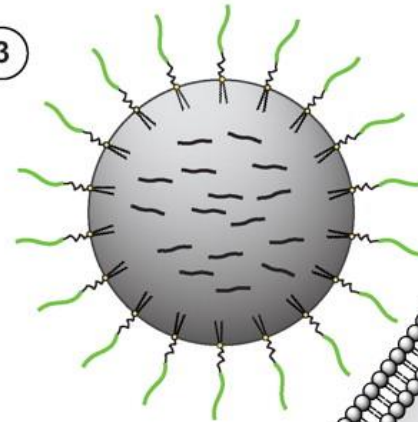


② inhibition of miR-155 overexpression  
leads to tumor regression

ANTP-coated nanoparticles  
deliver anti-miR-155 molecules

100-150 nm

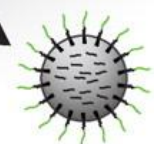
③



ANTP-facilitated  
cellular uptake

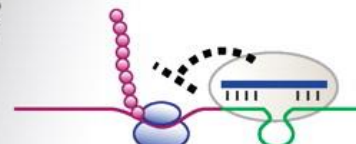
④

intracellular  
anti-miR release



miR-155  
oncomiR

⑤

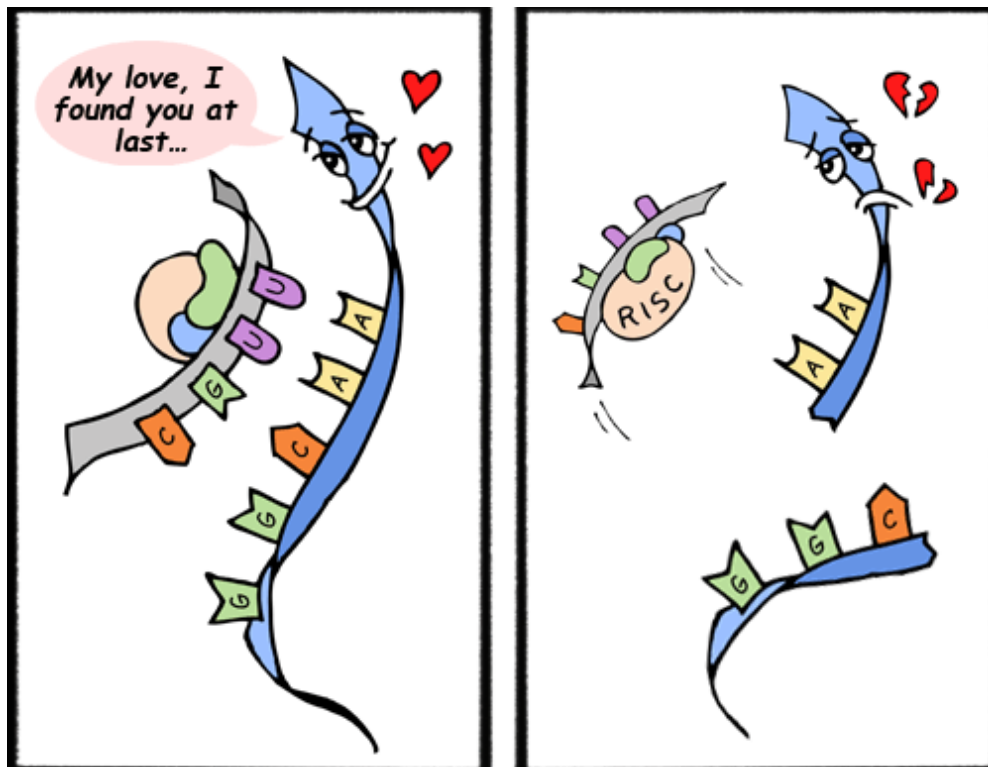


repression of endogenous  
miR-155 targets,  
e.g. tumor suppressors

miRNA inhibition

anti-miR binding  
to miR-155





**Köszönöm a figyelmet!**

<http://www.merckmillipore.com/HU/hu/life-science-research/genomic-analysis/SmartFlare-Live-Cell-RNA-Detection/ZdGb.qB.KCcAAAFLAQs0i.s1,nav?bd=1>

