

# Gene silencing

Umlčení genové exprese

Novák, Ondris, Pavlicová, Šabacký, Trávníčková,  
Vavrušáková

# Motivace: K čemu je to vlastně dobrý?

- ◇ Přístupy reverzní genetiky (funkční genomika)
  - ◇ Identifikace funkce genu
  - ◇ Studium signálních drah, vývojových procesů
- ◇ (Potenciální) terapie

# mutageneze

## fyzikální

### radiace

UV,  $\gamma$ , RTG

### částice

$\alpha$ ,  $\beta$ , neutrony

## chemická

### alkylační činidla

EMS ENU

### analogy bází

5-BU 2AP

## biologická

### inzerční

transpozon virus

### programované nukleázy

ZFN TALEN CRISPR/Cas9 RNAi

# Fyzikální a chemická mutagenze

## Chemická

- ◆ Náhodné bodové mutace
- ◆ Nutná vysoká dávka mutagenu
- ◆ Nežádoucí mutace nutno zpět eliminovat (např. křížením)
- ◆ Etylenmetansulfonát, etylnitrosomočovina, 5-bromuracil, 2-aminopurin

## Fyzikální

- ◆ Pro naše účely naprosto nevhodné

# Biologická mutagenéze

## Inzerční

- ◆ Transpozon
- ◆ Virus

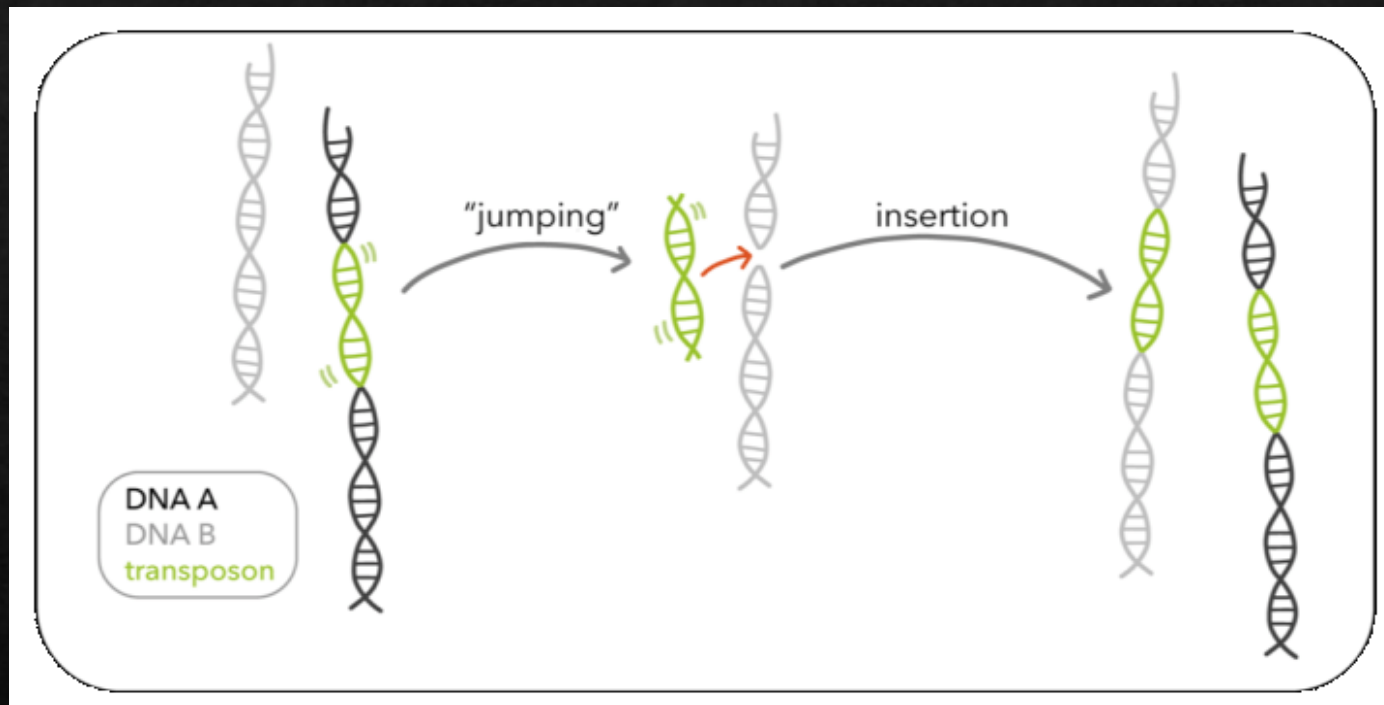
## Programované nukleázy

- ◆ ZFN
- ◆ TALEN
- ◆ CRISPR/Cas 9
- ◆ RNAi



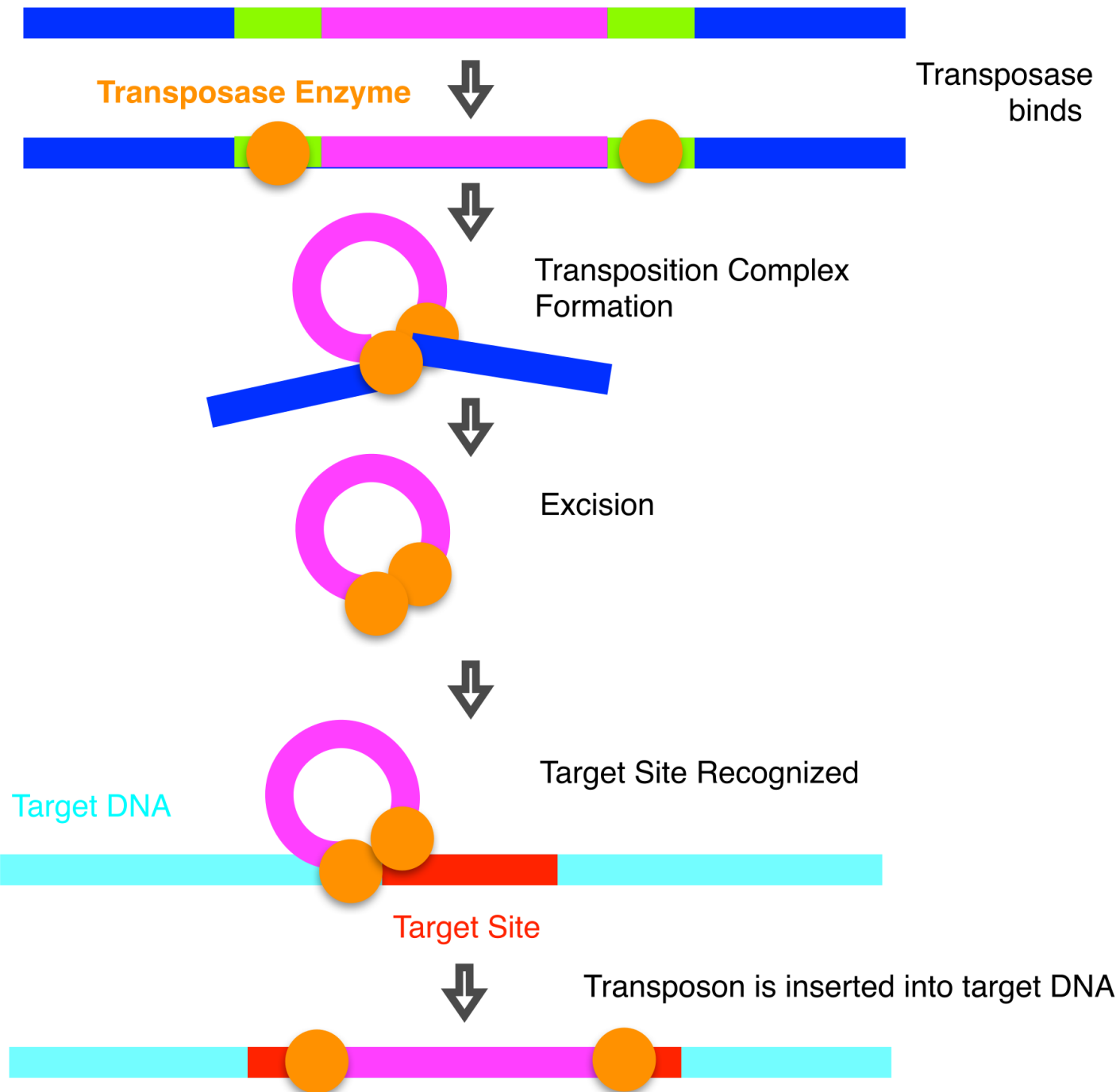
# Transpozon

- ◆ Mobilní elementy, které se mohou pohybovat a množit v rámci genomu („jumping genes“)
- ◆ Navozují mutace genů (inzerční inaktivace, změny exprese)
- ◆ DNA transpozony a retrotranspozony
- ◆ Využití jako nevirové vektory a pro genovou terapii



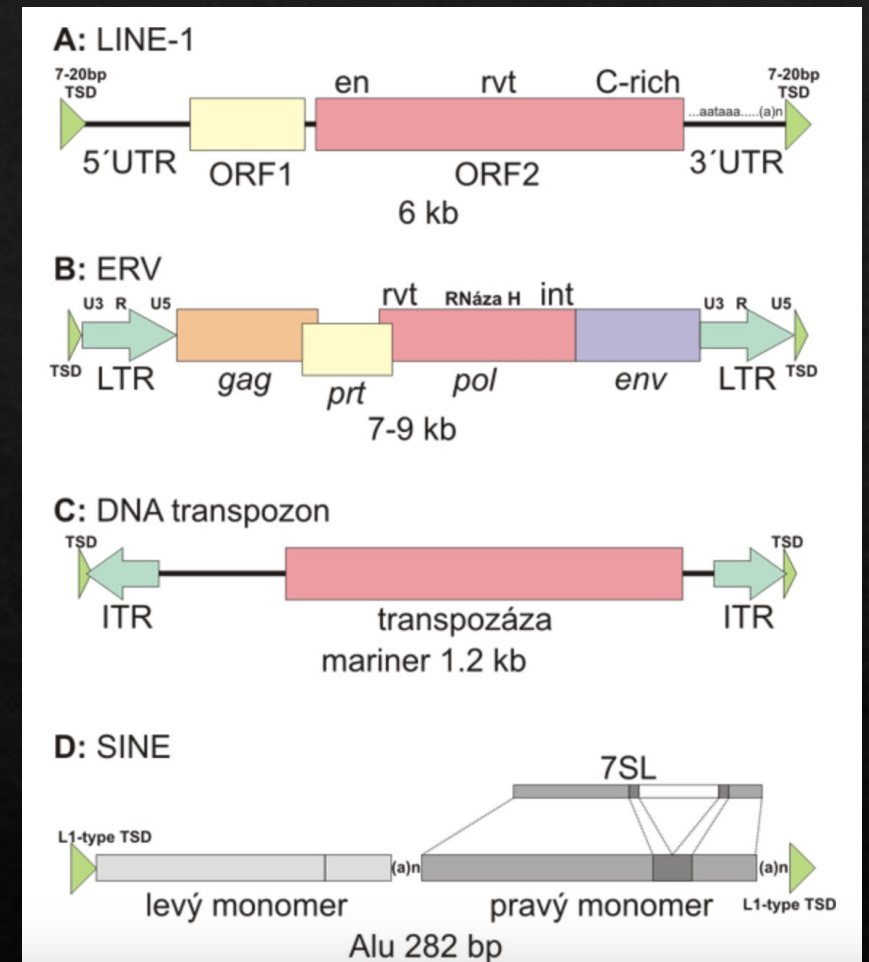
# DNA Transpozony

- ◇ V lidském genomu inaktivní
- ◇ Sekvence kódující transposázu
- ◇ Enzym se váže na oba konce repetitivního elementu tvořené IR
- ◇ Transposáza vyštěpí transpozon a liguje volné konce DNA
- ◇ Komplex transpozon-transposáza se pak váže na motiv jinde v genomu
- ◇ Transposáza štěpí DNA a liguje transpozon na nové místo
- ◇ „cut and paste“
- ◇ „Sleeping Beauty“



# Retrotranspozony

- ◆ Mnohem důležitější v lidském genomu
- ◆ Tvoří nejméně 45 % lidského genomu
- ◆ Vyžadují RNA polymerázu II/III pro přepis do RNA (původní kopie zůstává na místě)
- ◆ Posléze je RNA kopie přeměněna na DNA reverzní transkriptázou a vložena na nové místo v genomu
- ◆ LTR, (long terminal repeats, dlouhé terminální repetice), LINE (long interspersed nuclear elements = dlouhé rozptýlené jaderné elementy), SINE ((short interspersed nuclear elements = krátké rozptýlené jaderné elementy)





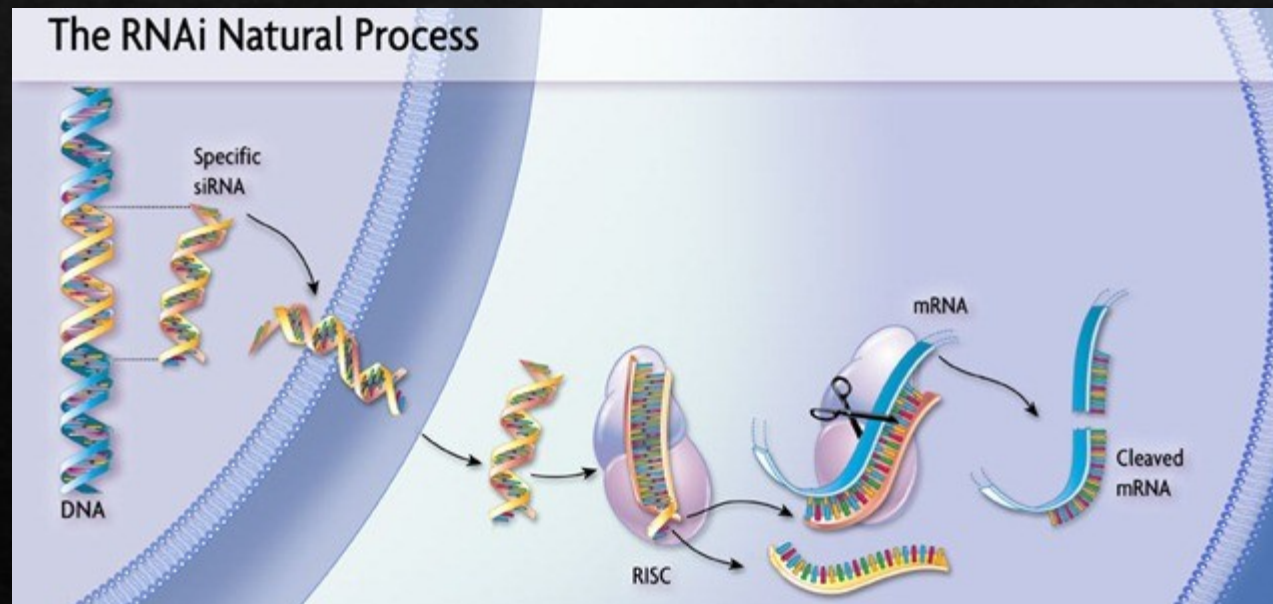
# Virus

- ◆ Virus-induced gene silencing (VIGS)
- ◆ Technológia využívaná zatiaľ len u rastlín
- ◆ Kľúčová úloha *Nicotiana benthamiana*, používajú sa aj iné druhy (*Arabidopsis*)
- ◆ Teoretická možnosť použitia aj u živočíchov, zatiaľ nedokázaná



# Virus

- ◇ VIGS je technológia zahrňajúca antivirálne obranné mechanizmy sprostredkované RNA (RNAi)
- ◇ Produkcia supresorov



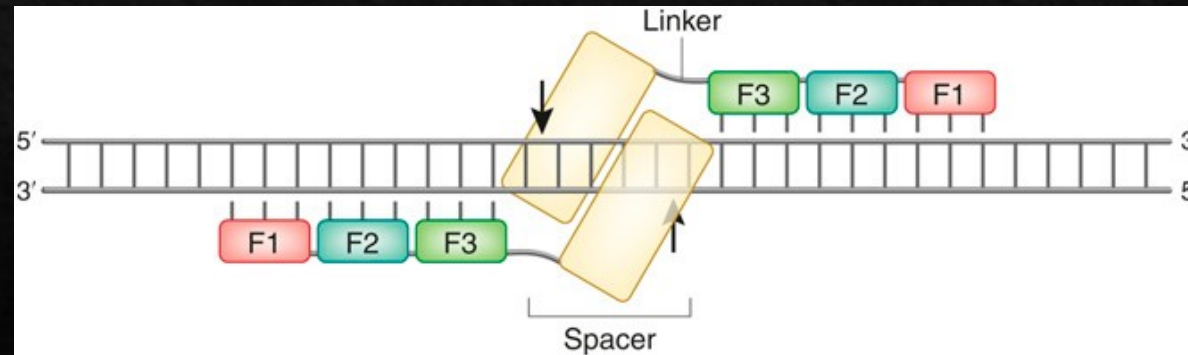
# Virus

- ◊ Použitie vírusov ako vektorov na prenos inzertov odvodených od hostiteľa
- ◊ Vírus tabakovej mozaiky s inzertom enzýmu syntetizujúcim chlorofyl  
chlorotické symptómy
- ◊ Možnosť prenosu aj génov zodpovedných za rezistenciu k ochoreniam vyššia  
citlivosť k patogénom

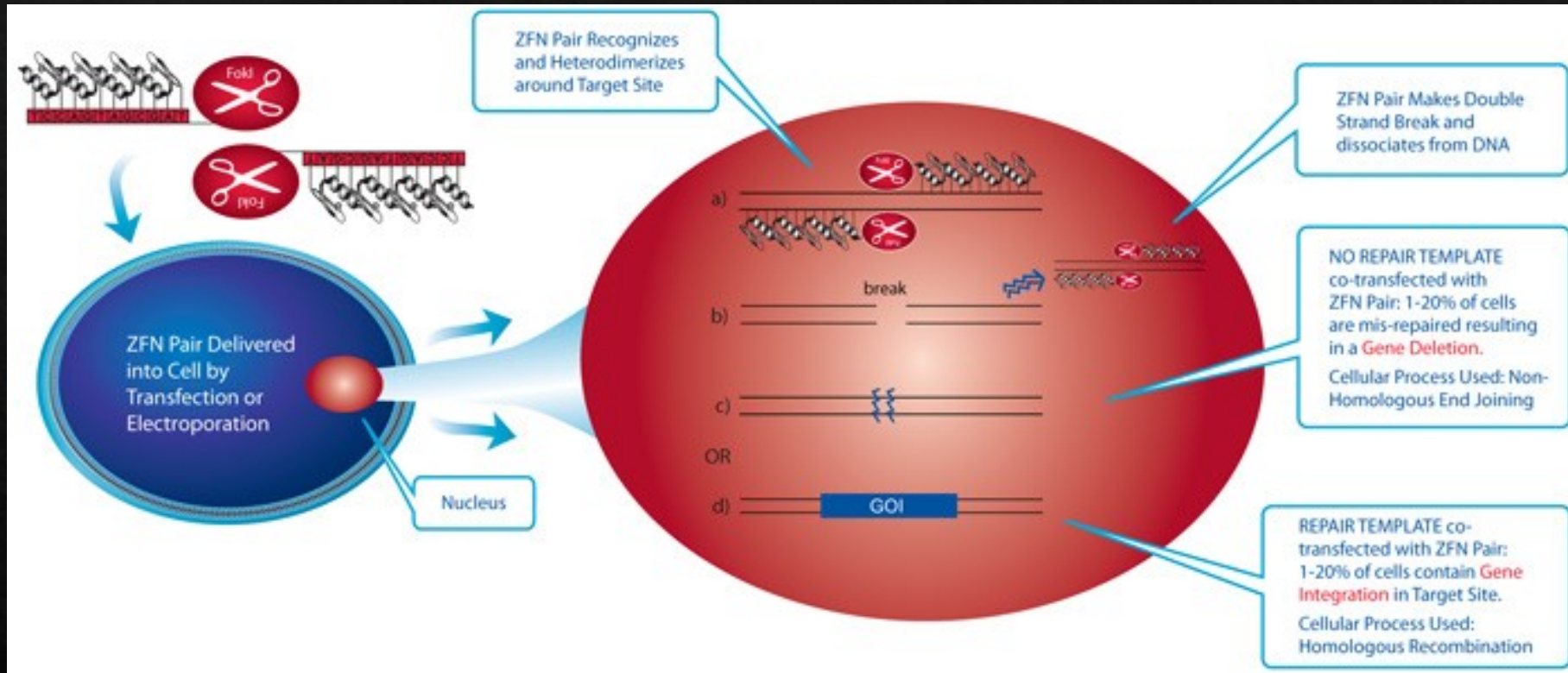


# ZFN

- ◇ Zinc Finger Nucleázy
- ◇ 1<sup>st</sup> generace syntetických nukleáz
- ◇ DNA vazebný modul: Zinkové prsty – 30 AA držených zinkovým iontem, rozpoznává 3 bp cílové sekvence
- ◇ Doména štěpící DNA: restriční endonukleáza Fok1



# ZFN





# ZFN

- ◊ + Ověřeně funguje v mnoha buňkách a organismech
- ◊ - Relativně nízké rozlišení cílové sekvence
- ◊ - Relativně nízká specificita

# TALEN

- ◇ Transcription Activator-Like Effector Nucleases
- ◇ Metoda přesné úpravy genomu (Nature methods 2011)
- ◇ Historie vývoje tohoto systému je spojena se studiem bakterie *Xanthomonas*

# Xanthomonas

Gram – negativní bakterie tyčinkovitého tvaru

Patogeny plodin – rýže, rajče, pepř

Sekrece efektorových proteinů – TALE do cytoplasmy rostlinné buňky → ovlivnění procesů v rostlině a zvyšují její citlivost na patogen

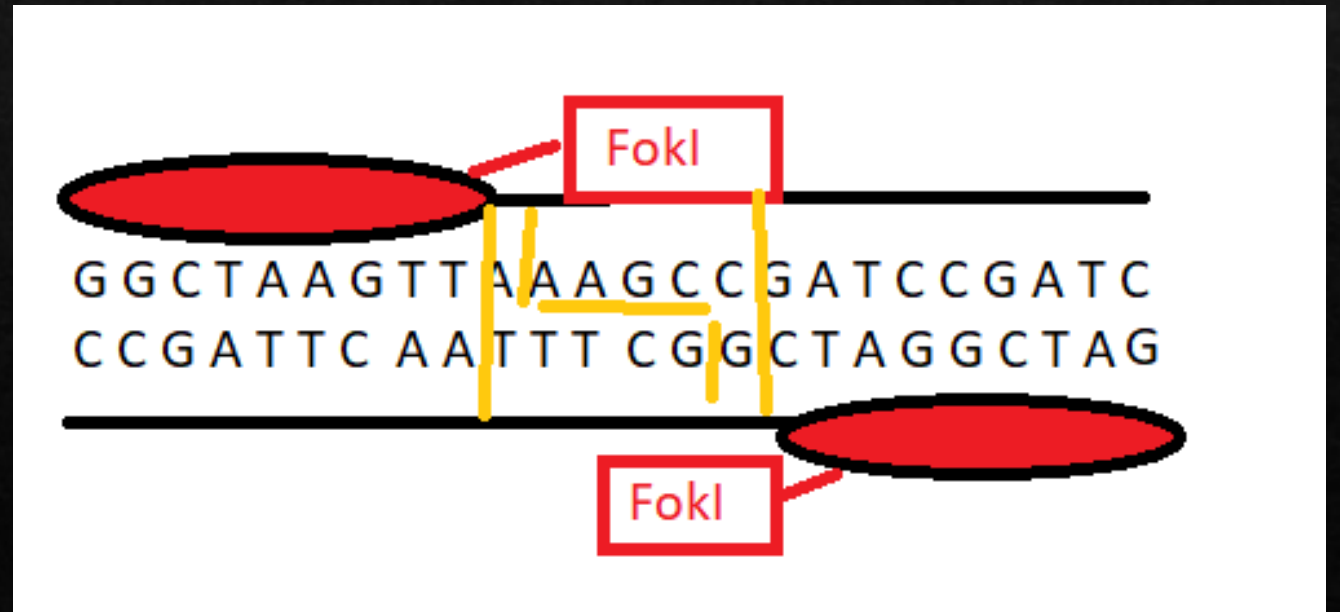
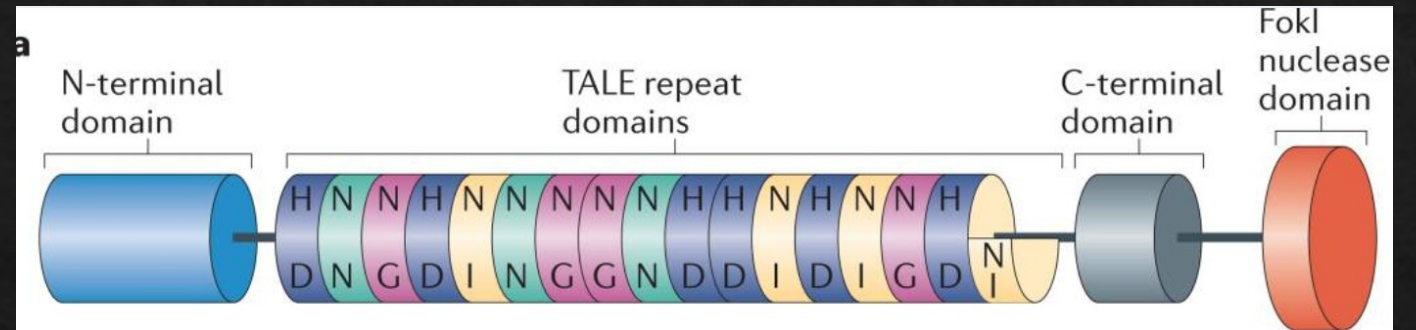
TALE jsou schopny se vázat na DNA a aktivovat expresi svých cílových genů napodobováním eukaryotních transkripčních faktorů



# TALEN

- ◆ Složeny z

- ◆ Hlavní domény → vazba a rozpoznání cílové sekvence DNA
- ◆ Štěpící doména – FokI
- ◆ Jaderná signalizační sekvence → přenos TALE do jádra buňky (C-konec)





# Výhody vs. nevýhody

+

- ◆ Schopnost změřit téměř jakoukoliv cílenou sekvenci včetně krátkých úseků
  - ◆ miRNA, zesilovače transkripce

-

- ◆ Potřeba thyminu na 5'-konci
- ◆ Neschopnost štěpení DNA s vysokým obsahem methylovaného cytosinu
- ◆ Složitost a časová náročnost přípravy sekvence DNA
- ◆ Může docházet při přenosu k vzájemným rekombinacím díky obsahu homologických sekvencí



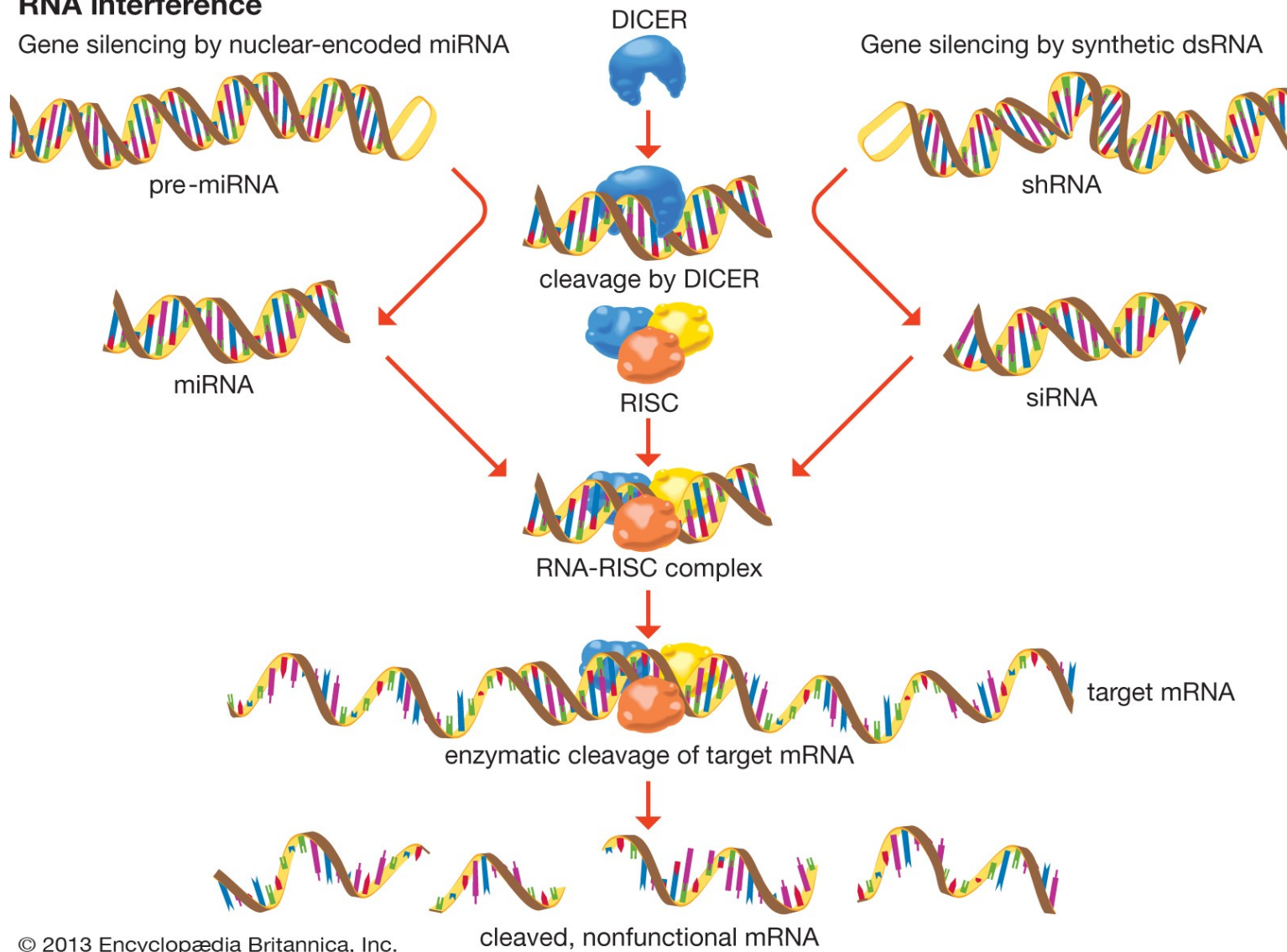
# RNAi

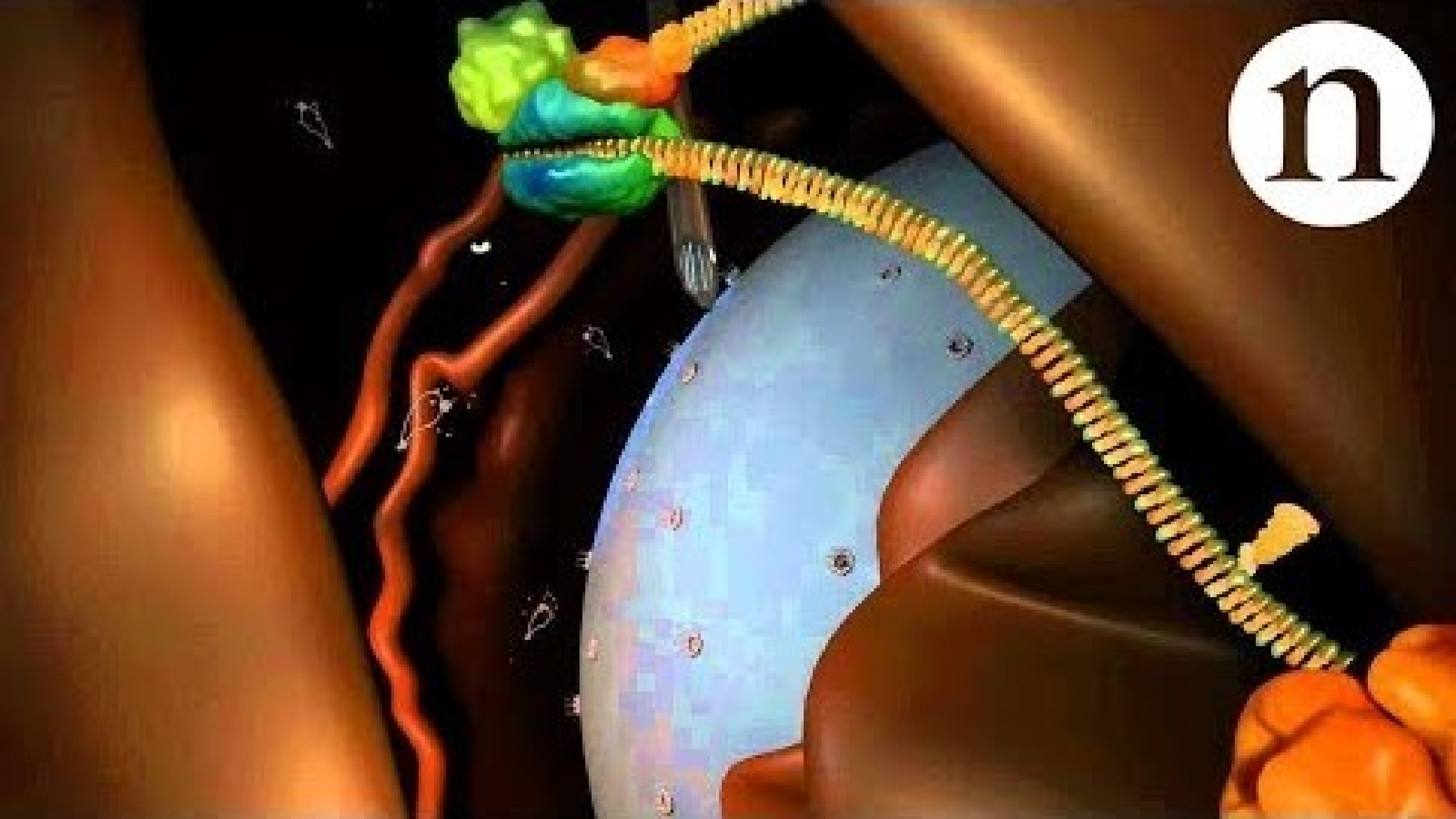
- ◆ **RNA** interference
- ◆ Sekvenčně specifické umlčování genové exprese indukované přítomností dsRNA
- ◆ dsRNA rozpoznána specifickými proteiny – **Dicer** rozštěpí dsRNA na siRNA (21-28bp)
- ◆ **RISC** = RNA induced silencing komplex, váže se na siRNA, separuje řetězce
- ◆ Následně se páruje s cílovou ssRNA (mRNA) – **Slicer** degraduje

## RNA interference

Gene silencing by nuclear-encoded miRNA

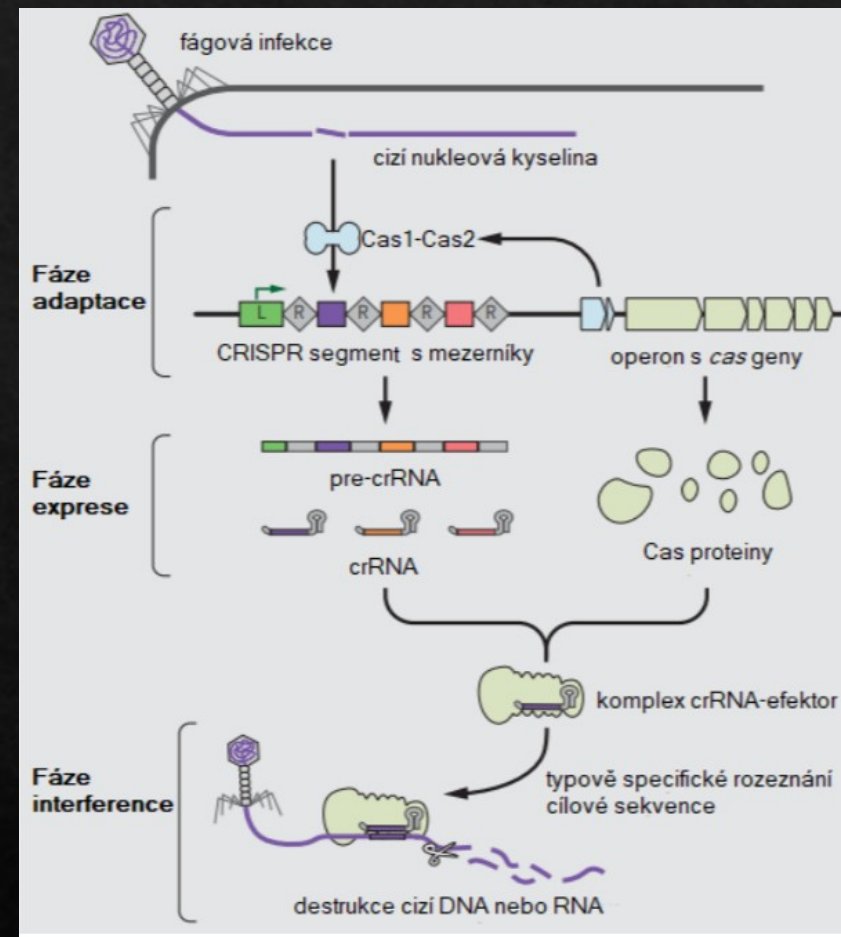
Gene silencing by synthetic dsRNA





# CRISPR/Cas9

- ◆ **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats
- ◆ Sekvence DNA, které se pravidelně opakují a obsahují sekvence cizorodé DNA = mezeríky
- ◆ U bakterií a archeí slouží jako ochrana před viry
- ◆ *Cas* = „**CRISPR associated**“

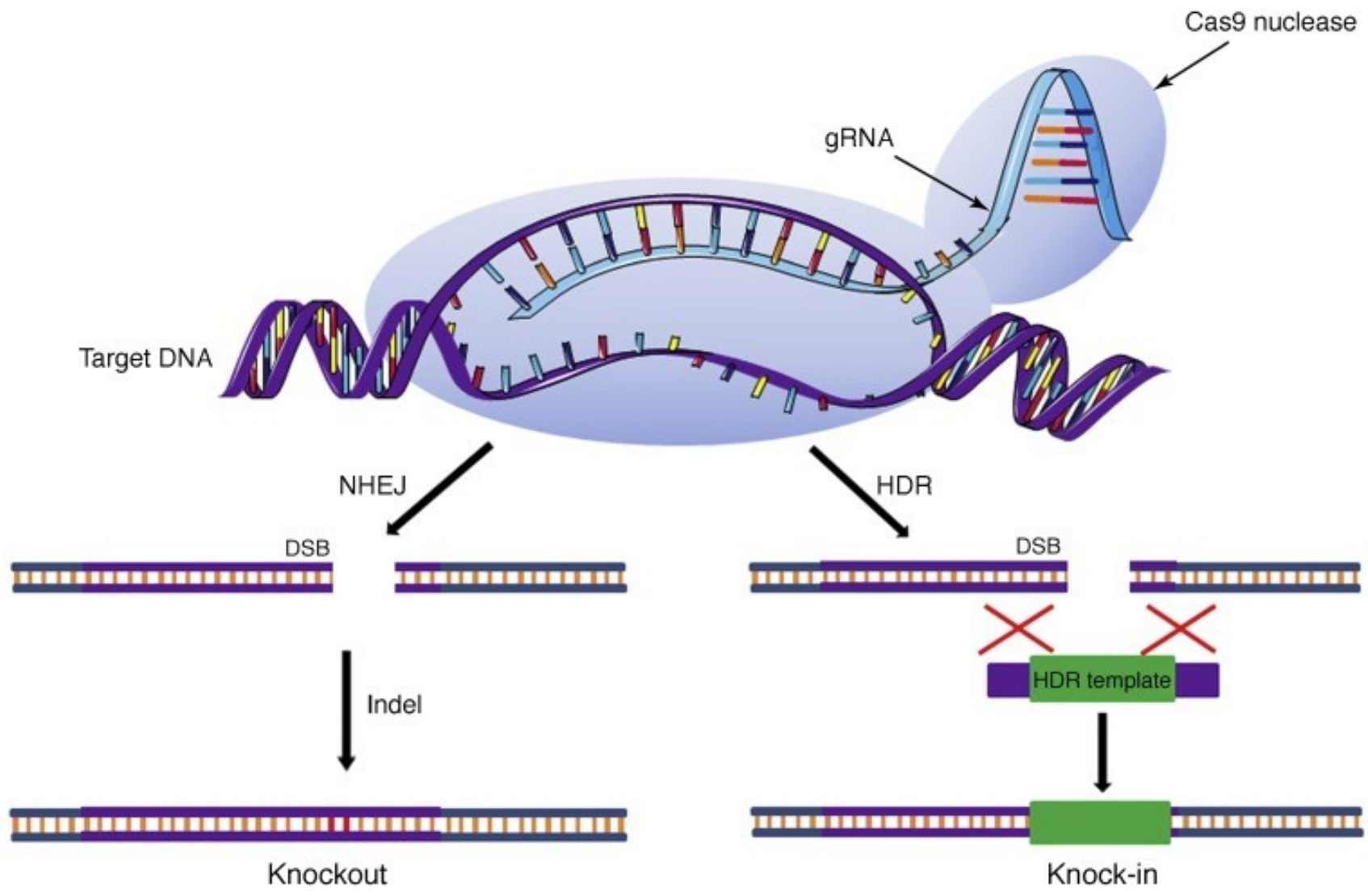




# CRISPR/Cas9

1. gRNA – naváděcí RNA – lokalizuje cílové geny
2. Cas9 – slouží k vystřížení nežádoucí DNA
3. Žádoucí úsek DNA





# Potenciální léčba

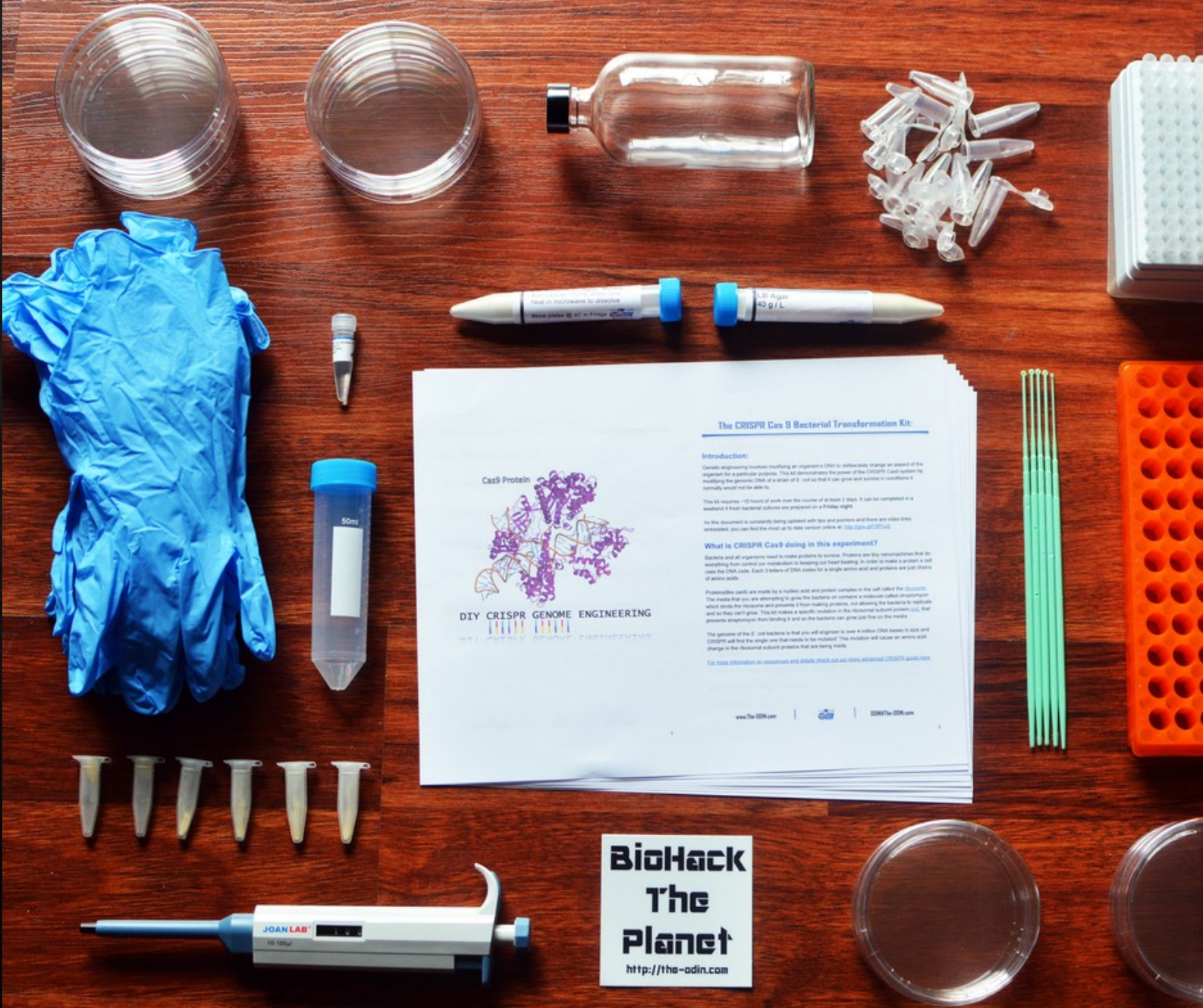
- ◇ Duchennova svalová dystrofie (DMD)
- ◇ Huntingtonova choroba
- ◇ HIV
- ◇ Xenotransplantace

# Možné nežádoucí účinky

- ◆ Nespecifická aktivita – změna jednoho genu může způsobit nežádoucí aktivitu jinde v genomu
- ◆ Mozaicismus – pacient může mít směs upravených a původních buněk
- ◆ Reakce imunitního systému



# DIY Bacterial Gene Engineering CRISPR Kit



Děkujeme za pozornost!