

CG020 Genomika

Přednáška 2 – dokončení

Identifikace genů

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

(dokončení přednášky 02)

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
 - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
 - struktura genů a jejich vyhledávání
 - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
 - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
 - EST knihovny
 - přímá a reverzní genetika

Přímá a reverzní genetika

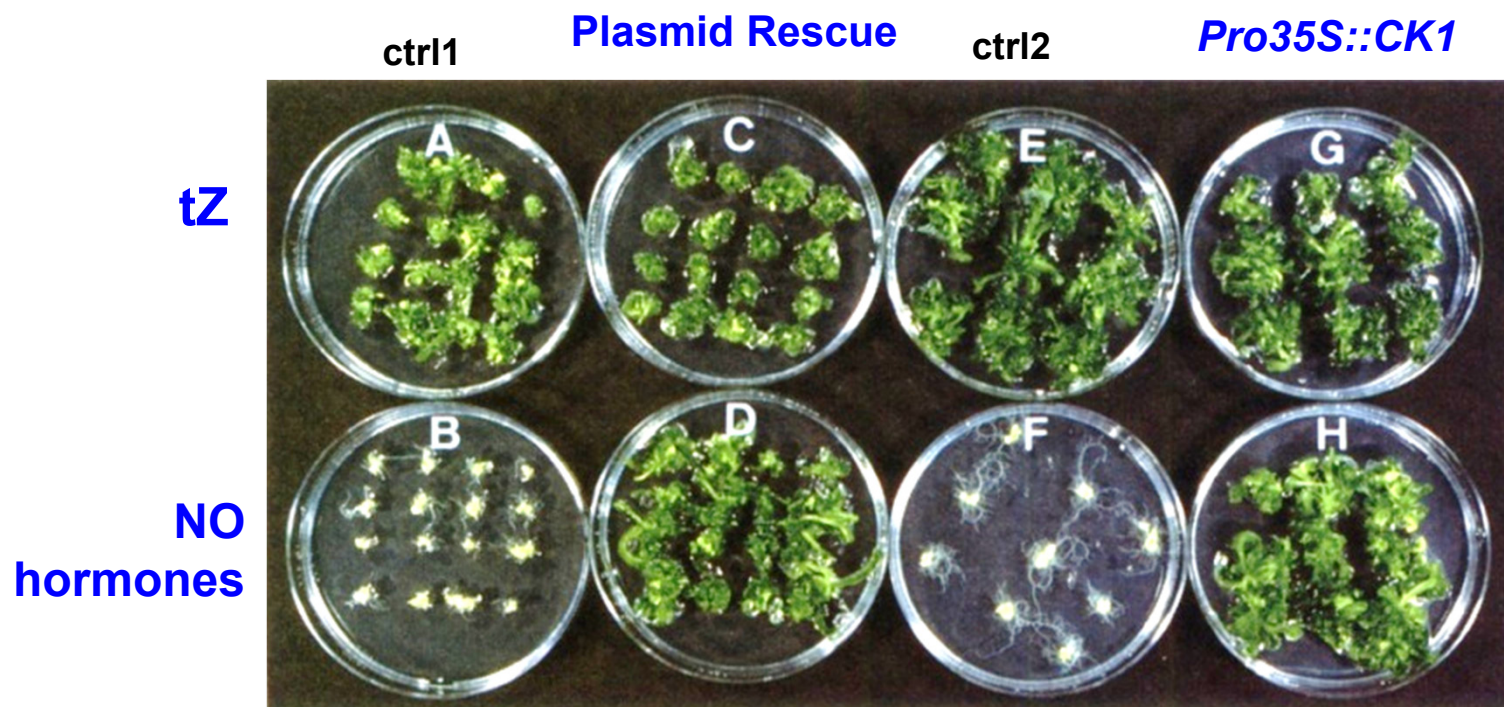
- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace sekvenčně-specifického mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifiity

Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**

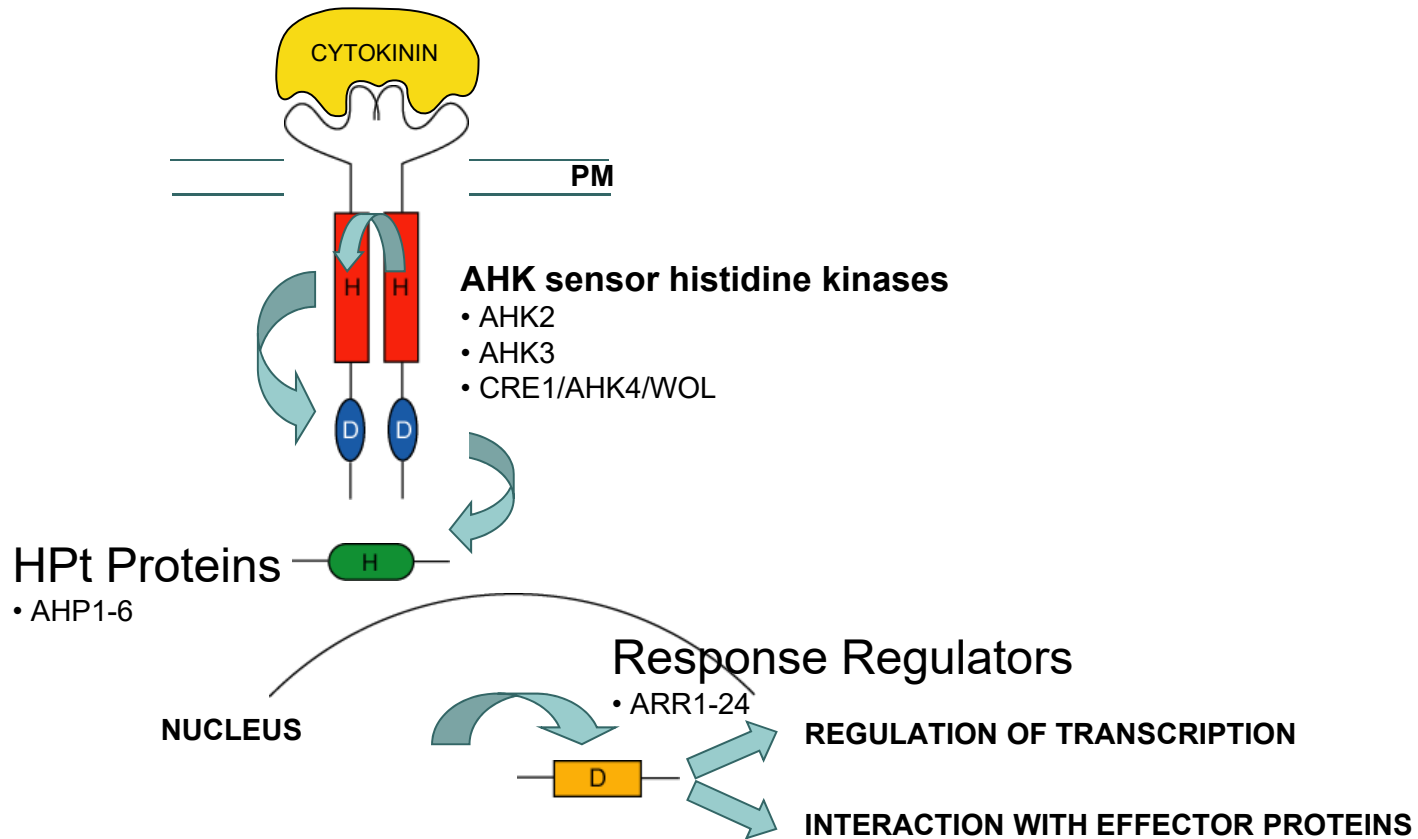
Identifikace *CK1* aktivační mutagenezí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



Kakimoto, *Science*, 1996

Signal Transduction via MSP

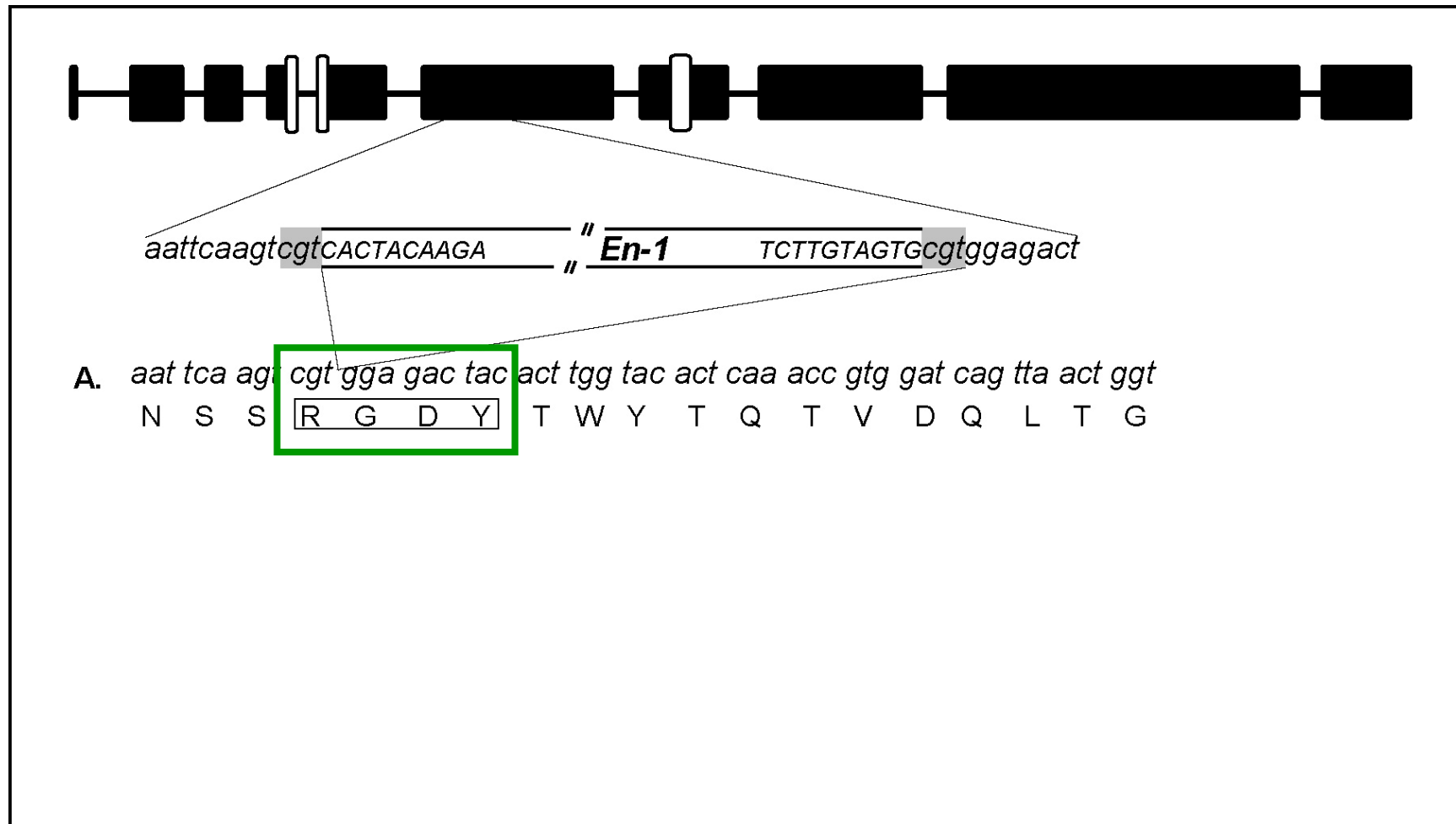




Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**

Identification of insertional *cki1* mutant allele

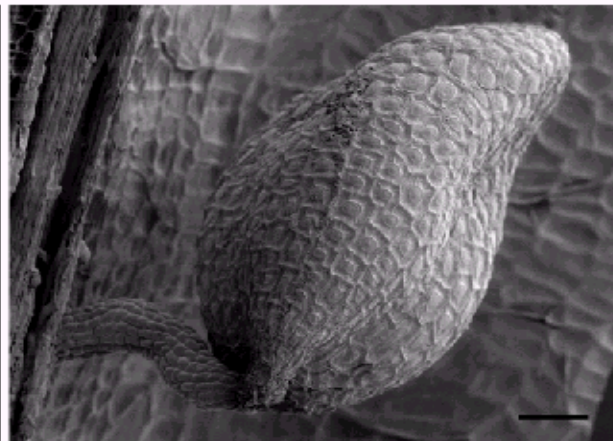
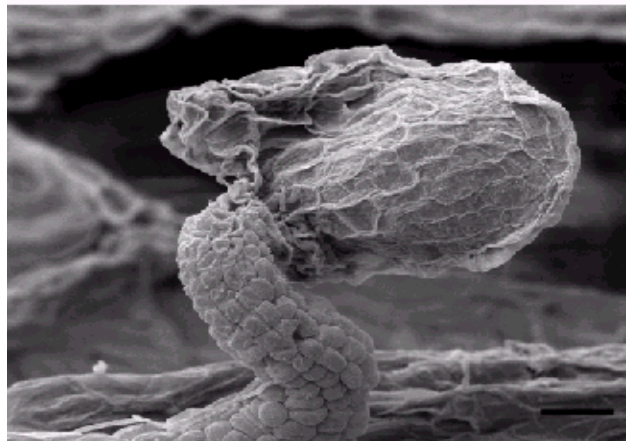


CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

CKI1/cki1-i



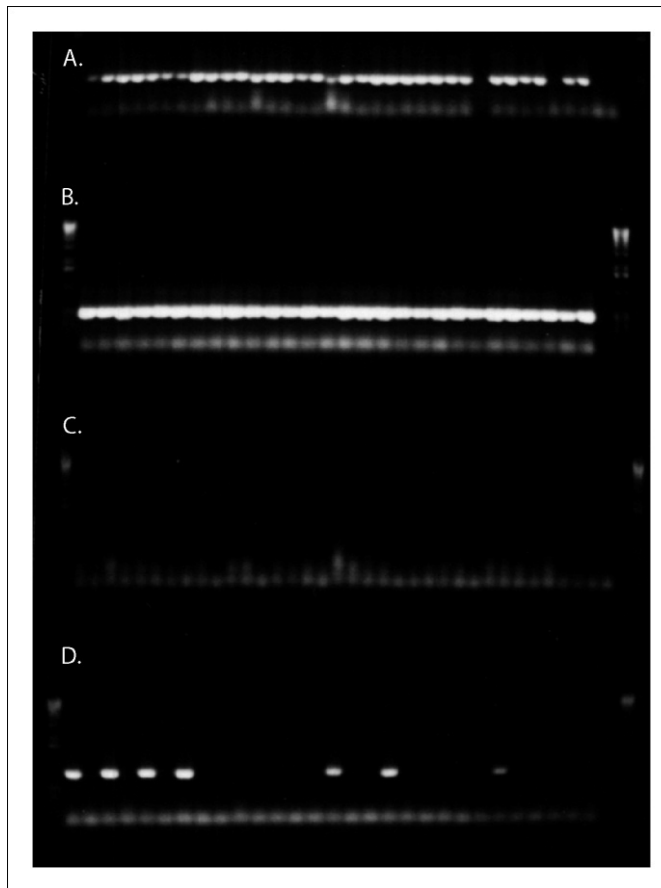
CKI1/CKI1



Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

CKI1 and Megagametogenesis

- *cki1-i* is not transmitted through the female gametophyte



A. ♂ wt x ♀ **CKI1/*cki1-i***



CKI1 specific primers (PCR positive control)

B. ♂ **CKI1/*cki1-i*** x ♀ wt

C. ♂ wt x ♀ **CKI1/*cki1-i***

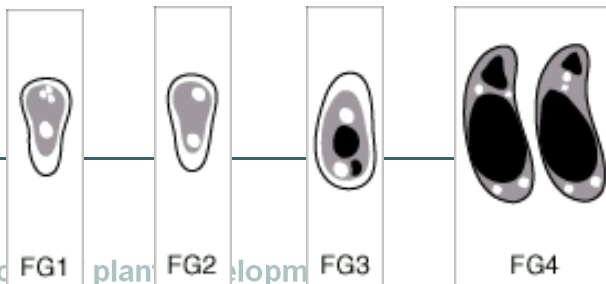
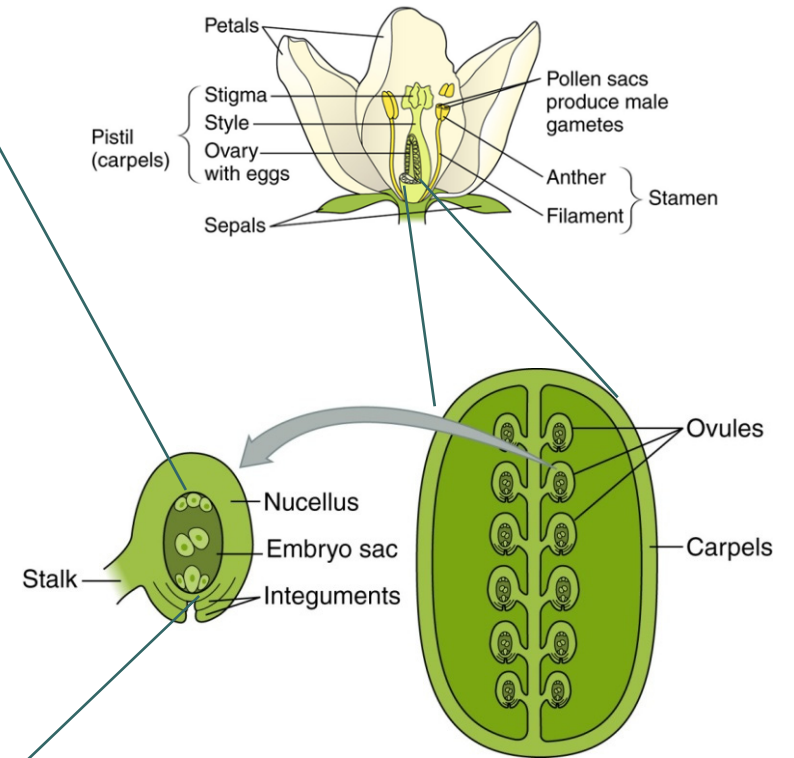
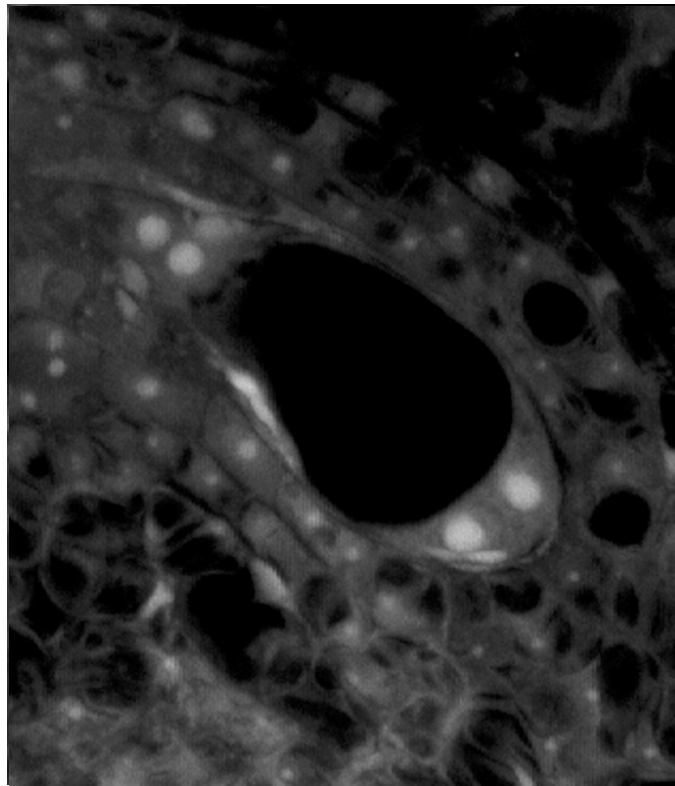


cki1-i specific primers

D. ♂ **CKI1/*cki1-i*** x ♀ wt

CKI1 and Megagametogenesis

FG 4



Hormonal regulation of plant development



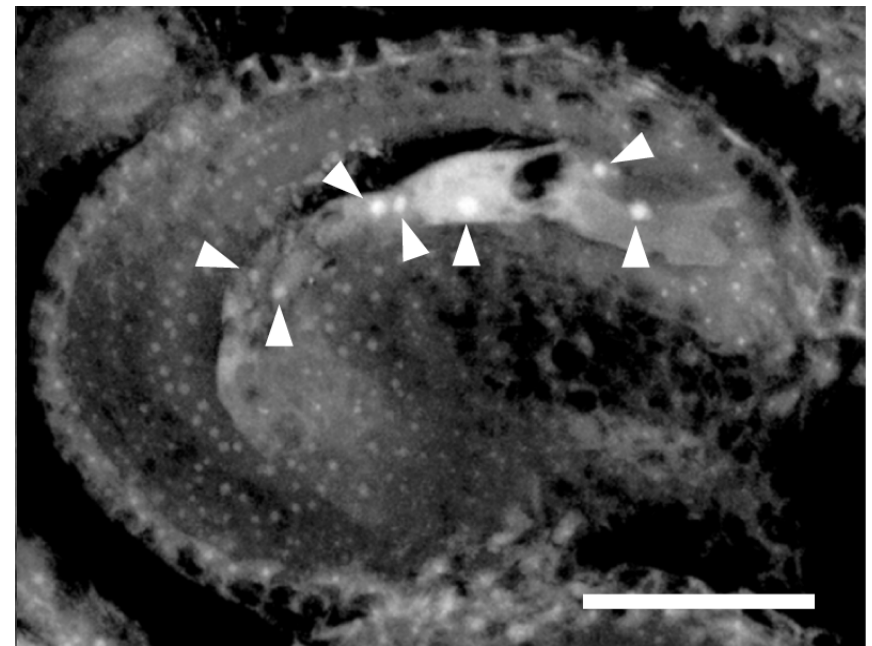
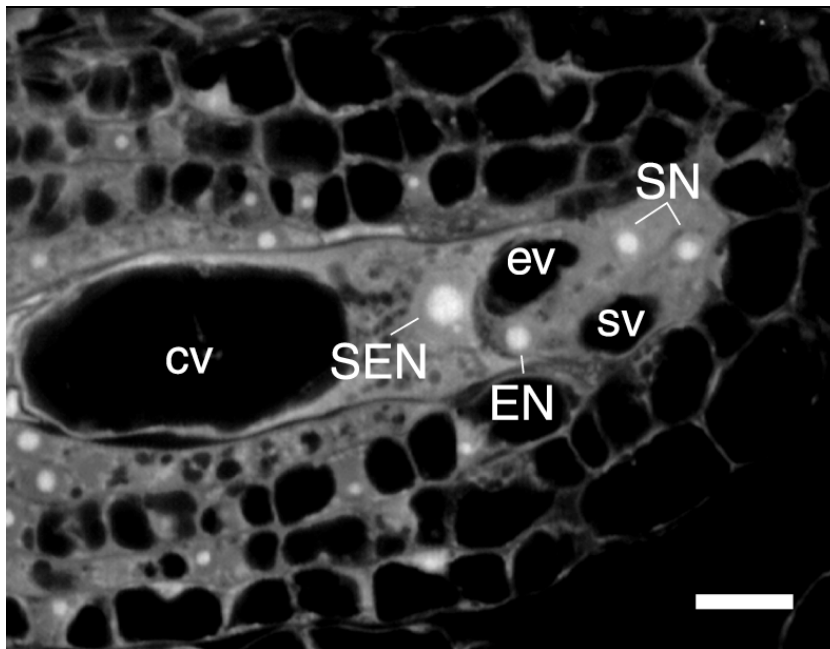
CKI1 and Megagametogenesis

CKI1

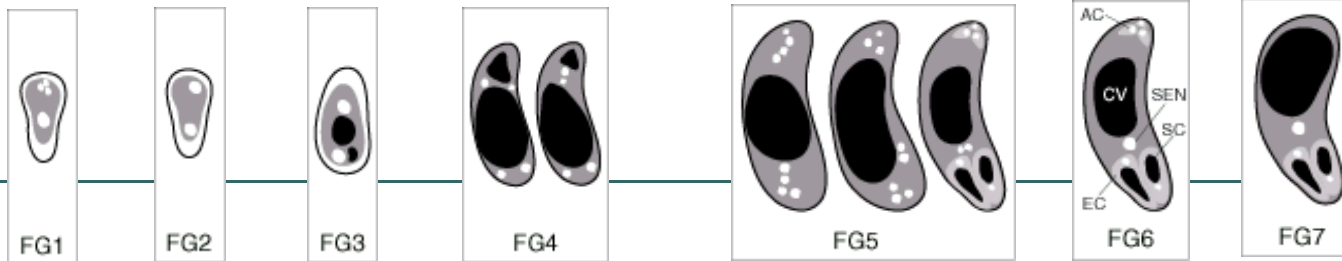
FG4 to FG5

cki1-i

28 HAE



Hejatko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)



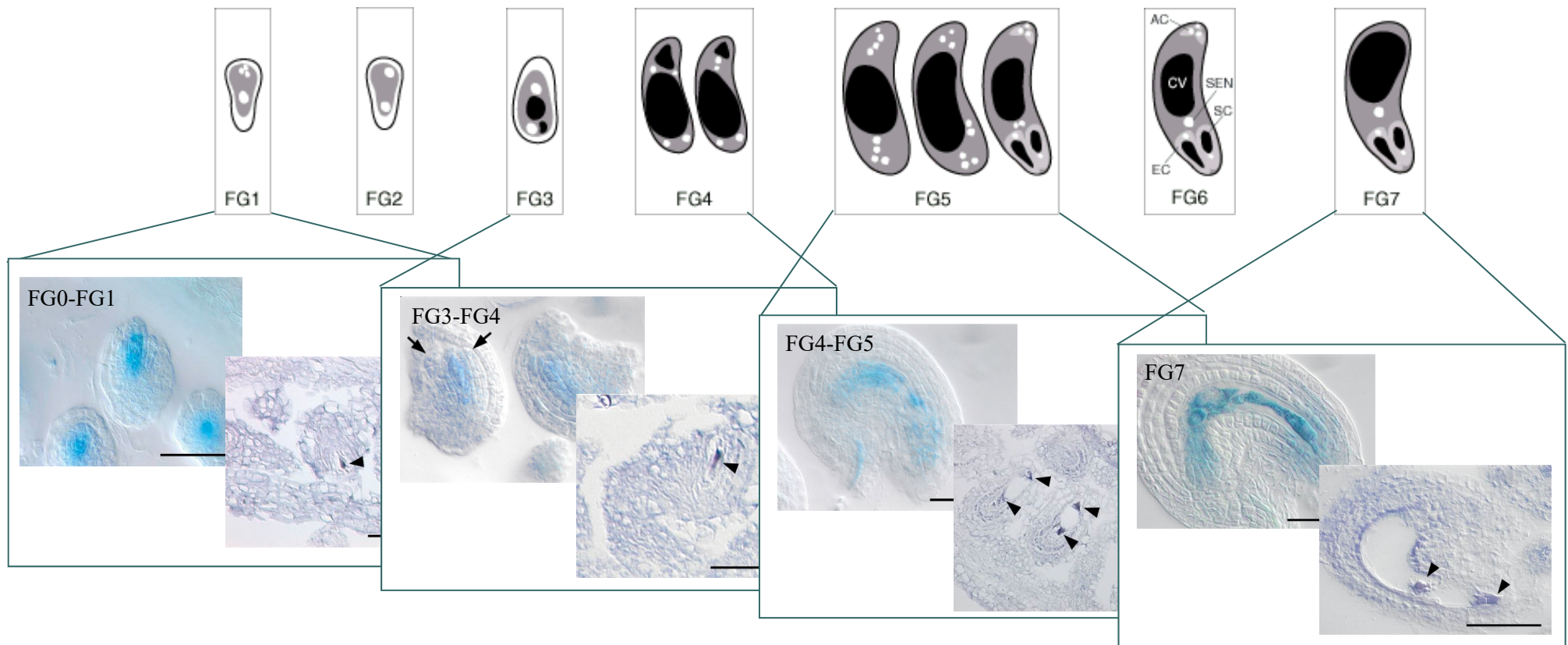
Hormonal regulations of plant development



Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifiity

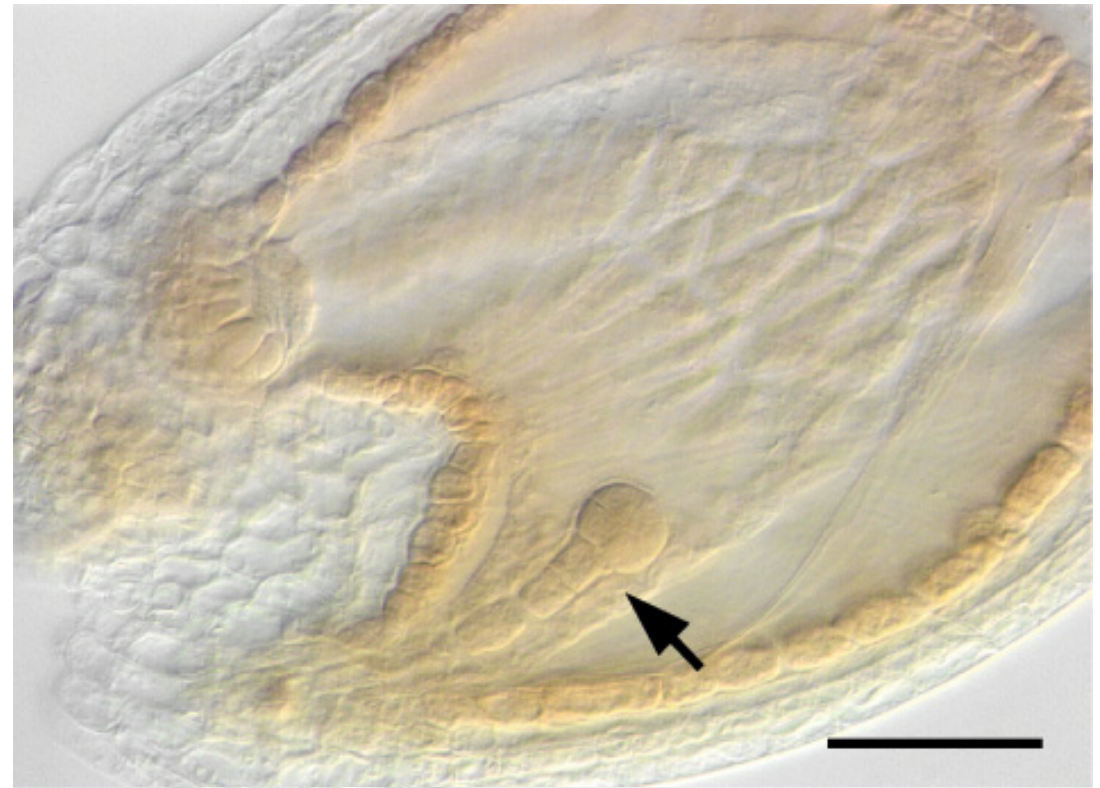
CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



Paternal *CKI1* is Expressed in the *Arabidopsis* Sporophyte Early after Fertilization

♀ wt x ♂ Pro*CKI1*:*GUS*

28 HAP
(hours
after
pollination)



Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)



CG020 Genomika

Přednáška 3

Reverzní genetika

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



Genomika 03

- Zdrojová literatura
 - **Bioinformatics and Functional Genomics**, 2009, Jonathan Pevsner, Willey-Blackwell, Hoboken, New Jersey
<http://www.bioinfbook.org/index.php>
 - **Plant Functional Genomics**, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
 - Mello, C.C. and Conte Jr., D. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **431**, 338-342.
 - Klinakis et al.. (2000) Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element *Minos*. *EMBO Rep*, **1**, 416.
 - Hansen et al.. (2003) A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *PNAS*, **100**, 9918.

Přístupy „klasické“ genetiky versus „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

„Přímě genetický“ přístup

1. IDENTIFIKACE FENOTYPU
2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ
3. GENOVÁ IDENTIFIKACE
-poziční klonování

EMS



T-DNA



(retro)transposons



„Reverzně genetický“ přístup

1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA
2. IDENTIFIKACE FENOTYPU
3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
 - kosegregační analýza
 - identifikace nezávislé inzerční alely
 - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
 - komplementace mutantu pomocí transgenu

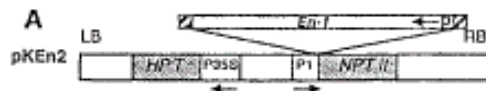
Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
 - Mechanismus RNAi
- Editace genomu pomocí CRISPR/Cas9

Typy inzerčních mutagenů

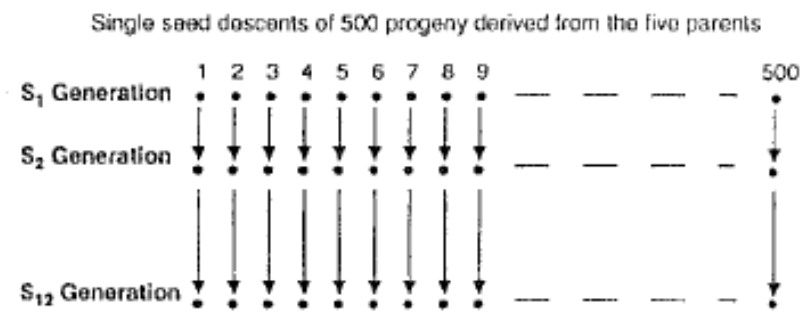
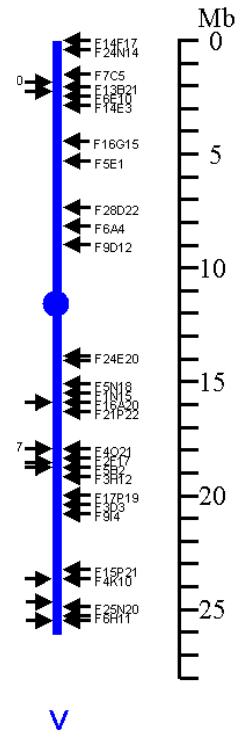
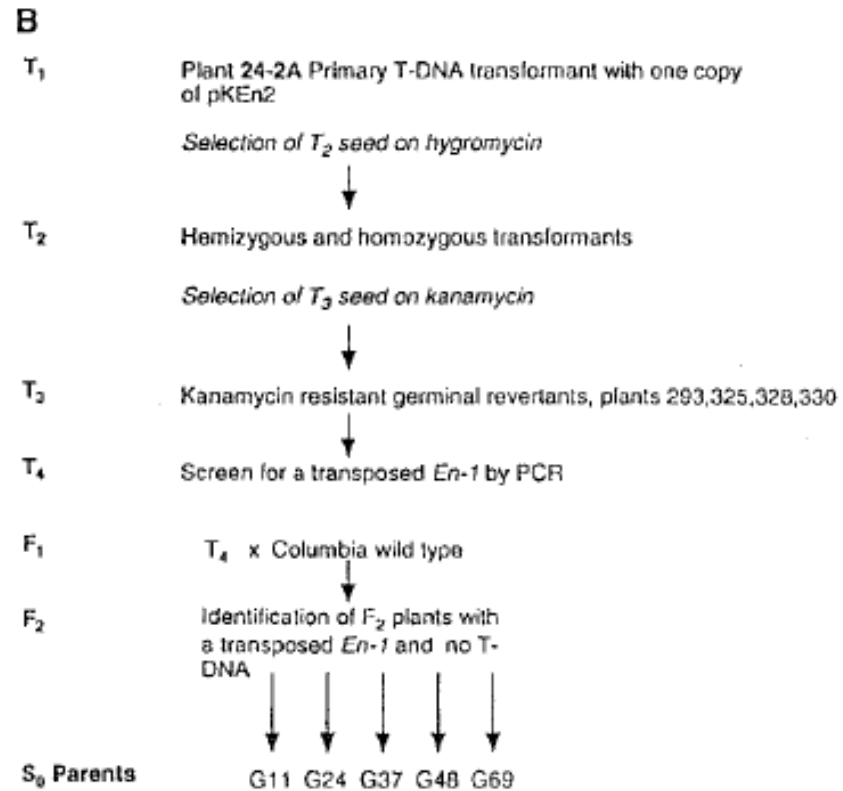
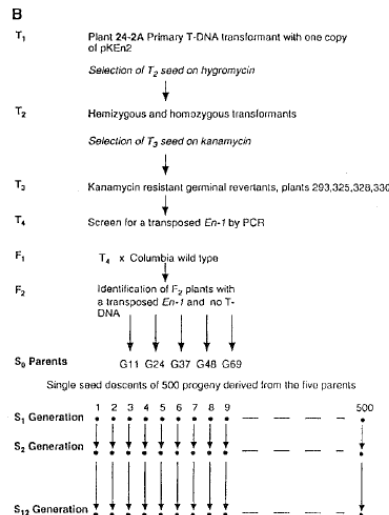
- Mobilní elementy
 - **Autonomní transpozony (*En-1*)**
 - obsahují gen pro transponázu, umožňující excizi a opětovné začlenění do genomu
 - na obou koncích obsahují krátké obrácené repetice, které jsou transponázou rozpoznávány
- Stabilní elementy
 - **Neautonomní transpozony (*dSpm*)**
 - mutant *En/Spm* transpozonu, který mutací v genu pro transponázu ztratil autonomii
 - může být aktivován křížením s linií nesoucí *En/Spm* transpozon
 - **T-DNA**
 - zcela stabilní, její inzerce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)

Knihovny inzerčních mutantů (u rostlin)



příprava transgenních rostlin

vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR

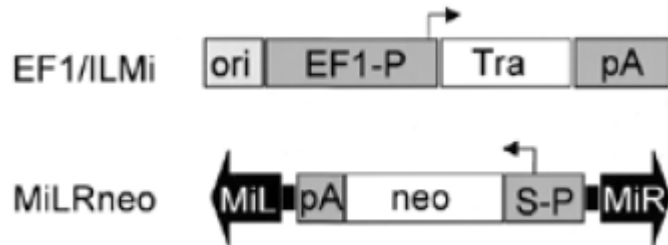


EVROPSKÁ UNIE

je spolufinancována
m sociálním fondem

a státním rozpočtem České republiky

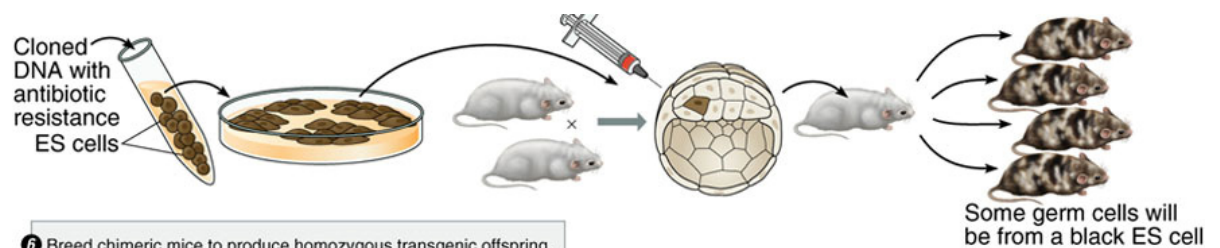
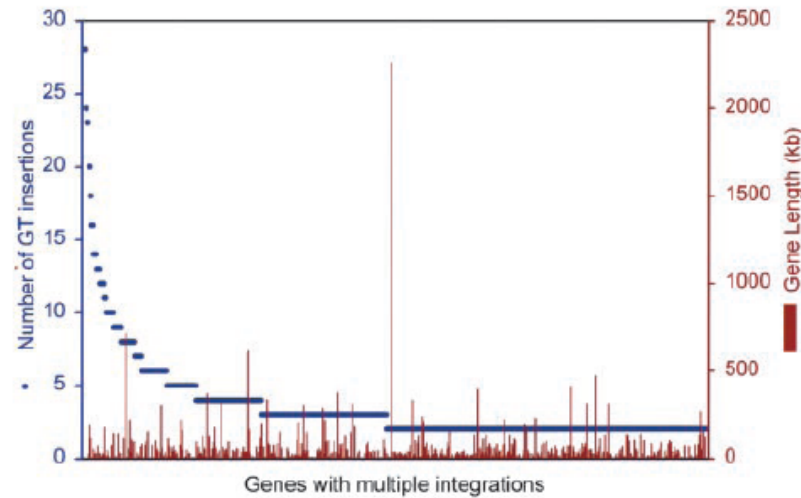
Knihovny inzerčních mutantů (u živočichů)



Transfekce do lidských buněčných kultur (HeLa) nebo myších embryonálních kmenových (ES) buněk

vytvoření populace mutantních buněčných linií a analýza frekvence inzercí

In vitro analýzy nebo příprava knihovny inzerčních mutantů reintrogrací ES do myších embryí



Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR

Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

- autonomní *En/Spm*, bez selekce
- 3000 nezávislých linií
- průměrně 5 kopií na linii
- trojrozměrné vyhledávání pomocí PCR



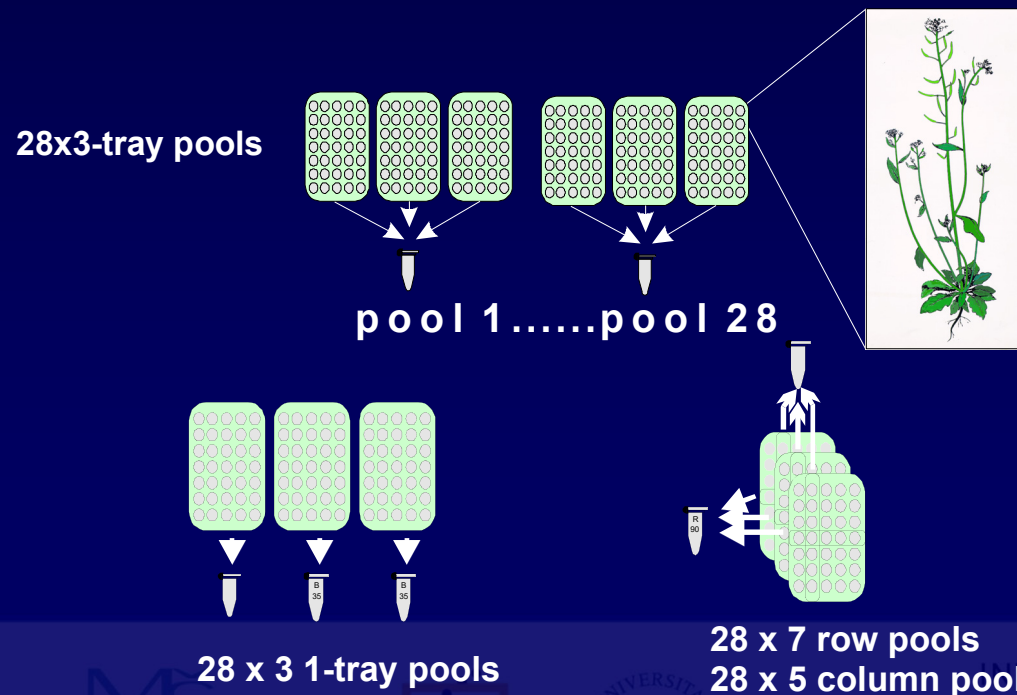
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)

3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)



Izolace sekvenčně specifických mutantů

- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
 - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

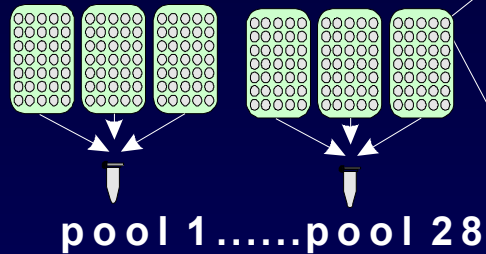
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

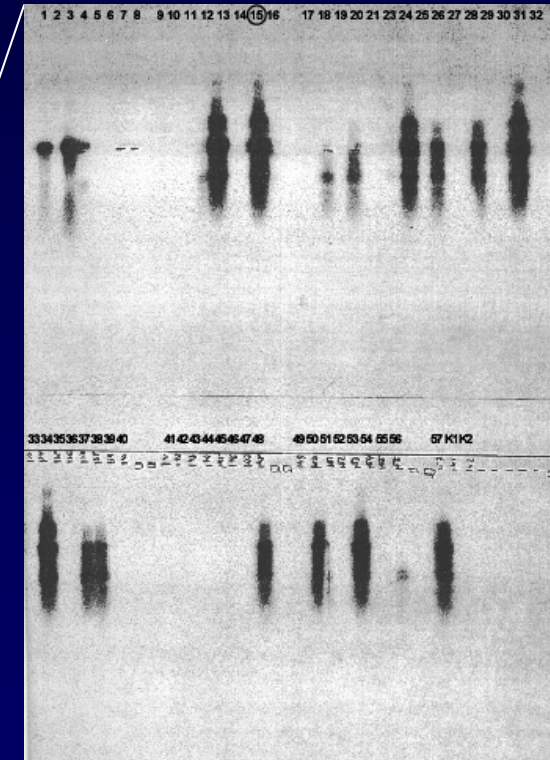
1. Vyhledávání pozitivní trojice

3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)

28x3-tray pools



(2x2x28=112 PCR reakcí)



Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
 - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou
 - identifikace pozitivní linie pomocí Identifikace pozitivního „tácu“, řady a sloupce



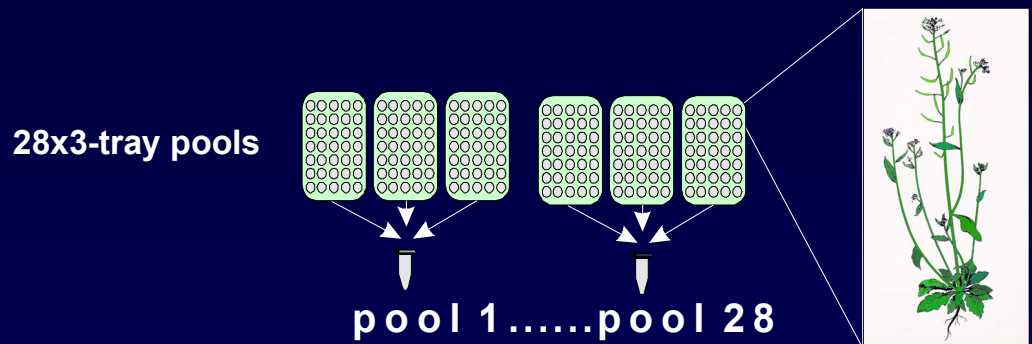
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

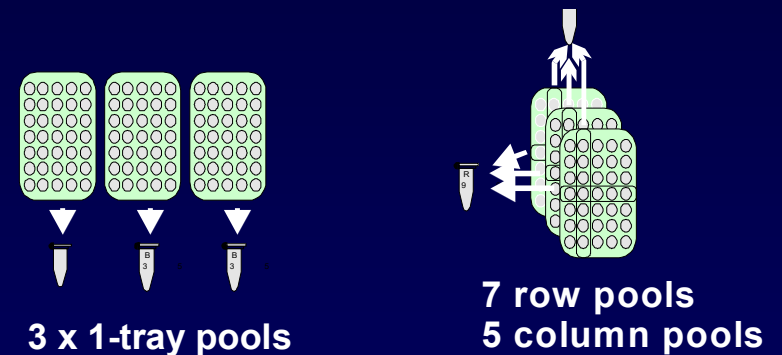
1. Vyhledávání pozitivní trojice

3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)



(2x2x28=112 PCR reakcí)

2. Identifikace linie nesoucí inzerci



(dalších 5+7+3=15 PCR reakcí)

Celkem 112+15=127 PCR reakcí

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - hybridizace s produkty iPCR na filtrech

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Inzerční knihovna dSpm mutantů

- The Sainsbury Laboratory (SLAT-lines), John Innes Centre, Norwich Research Park
- DNA a semena v Nottingham Seed Stock Centre
- 48.000 linií
- průměrně 1.2 izerce na linii
- neautonomní transposon
- PCR vyhledávání nebo hybridizace s iPCR filtry
- SINS (sequenced insertion sites) databáze

<http://nasc.nott.ac.uk>



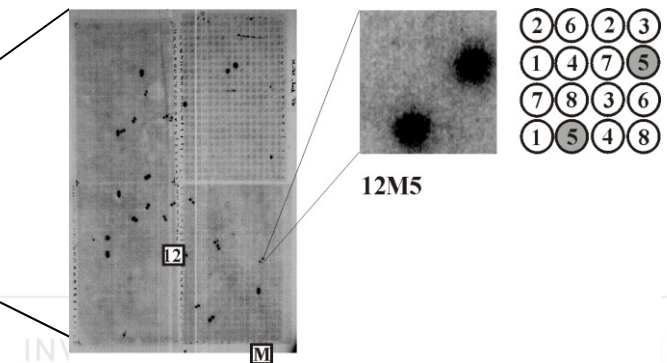
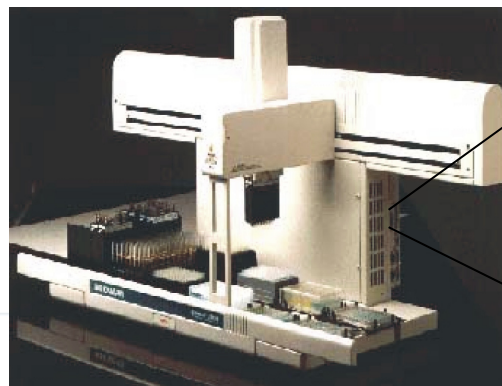
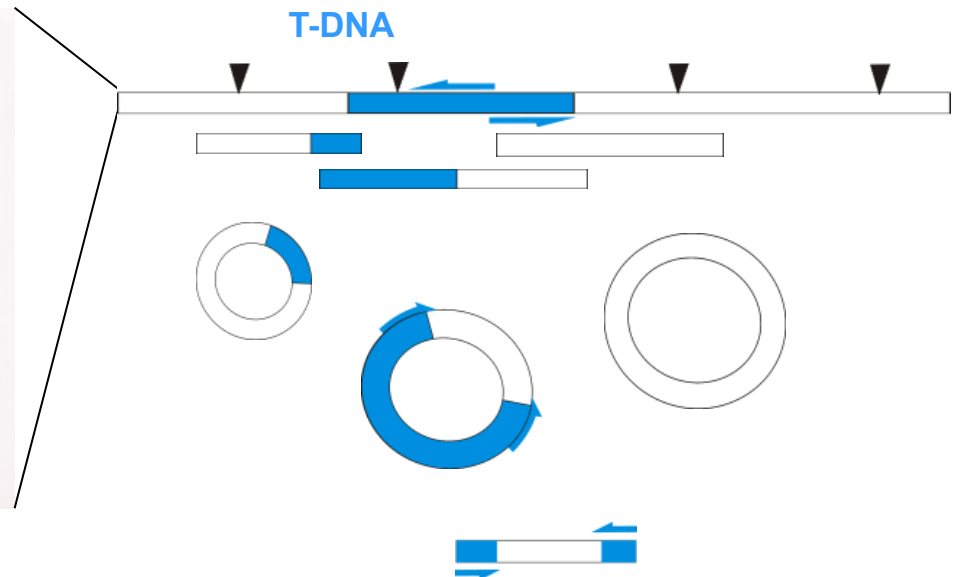
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Hybridizace s produkty iPCR na filtrech

- izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace
- štěpení restriční endonukleázou
- ligace, vznik cirkulární DNA
- inverzní PCR (iPCR) pomocí T-DNA specifických primerů
- příprava nylonových filtrů s produkty iPCR v přesně daném vzorci (poloze) pomocí robota
- hybridizace s genově specifickou sondou



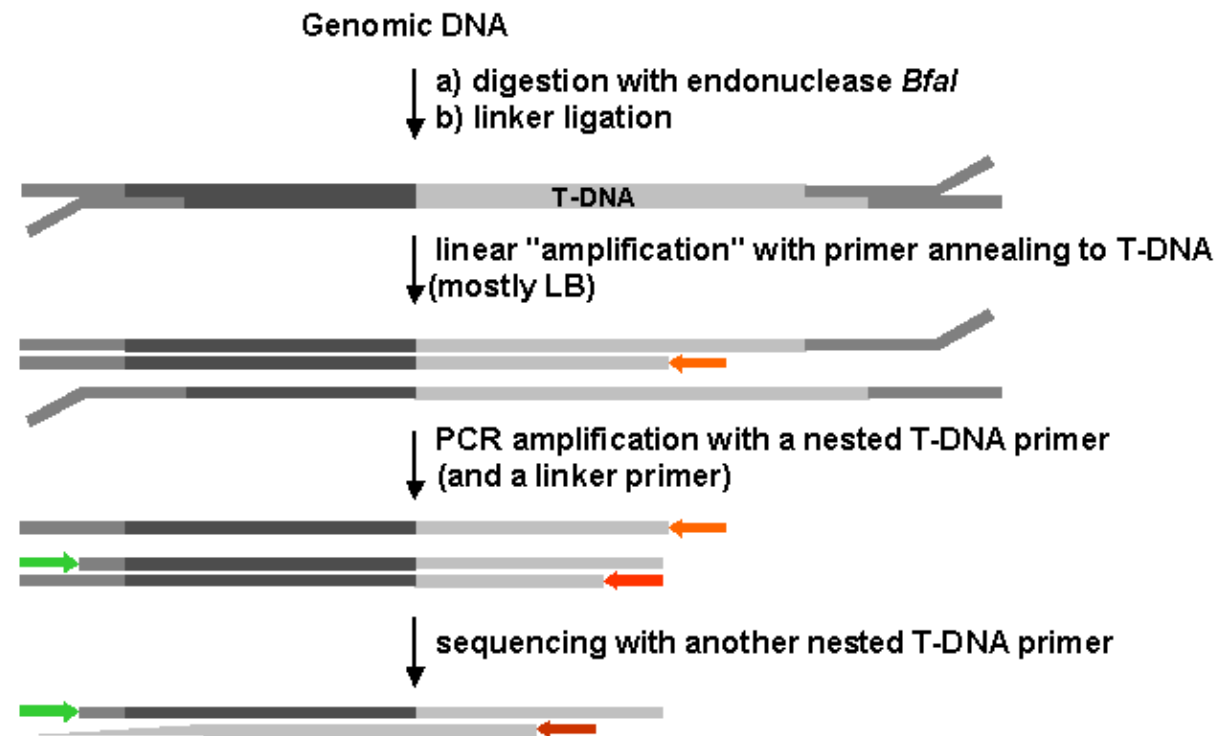
Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Příprava knihoven z populace *A. thaliana* mutované pomocí T-DNA

Sequencing of flanking sequence fragments



Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

>Insert_SALK:029311: [Order line 029311](#) | [View in AGR](#)
Length = 460

Score = 484 bits (244), Expect = e-135
Identities = 250/252 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatatattgatagtgaggacattactataaaaaagc 1509
|||||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcgcttttatatattgatagtgaggacattactataaaaaagc 400

Query: 1510 acaaggatatacaacaatagagacagtcacatgtatatcacataaaggatggatggctcctcaatg 1569
|||||
Sbjct: 399 acaaggatatacaacaatagagacagtcacatgtatatcacataaaggatggatggctcctcaatg 340

Query: 1570 tgttgctttaggacatttgtgagtatgtcaaaaaacttattccacatggtacactcatag 1629
|||||
Sbjct: 339 tgttgctttaggacatttgtgagtatgtcaaaaaacttattccacatggtacactcatag 280

Query: 1630 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaaat 1689
|||||
Sbjct: 279 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaaat 220

Query: 1690 atgattccaaac 1701
|||||
Sbjct: 219 atgattccaaac 208

Score = 111 bits (56), Expect = 8e-23
Identities = 77/84 (91%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1923 tacattttctcgtacacaattaacgctatcaaatatatttataaaaccatttgcatttcc 1982
|||||
Sbjct: 13 tacattttctcgtacagattgacggtatcaaatatatttataaaaccgtagacatttcc 72

Query: 1983 ttcottaactaatcacataaatga 2006
|||||
Sbjct: 73 ttcottaactaatcacataaatga 96

Sbjct: 292 ccagctctagaagctcttgggtaagttccagtagcgggacogatctcgagaateaca 233

[AGK insert page](#)

view detailed information on insert sequences in AGR



Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

```

>Insert_SAIK:029311 | Order_line_029311 | View in AOR
Length = 460
Score = 484 bits (244), Expect = e-135
Identities = 250/252 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1450 attagatttgattgaagtggttttatattgatagtgaggacattacttataaaagc 1509
      |||
Sbjct: 459 attagatttgattgaagtcgcttttatattgatagtgaggacattacttataaaagc 400

Query: 1510 acaaggatcaacaatagagacagtcacatgtatatcaataagtgatggtctctcaatg 1569
      |||
Sbjct: 399 acaaggatcaacaatagagacagtcacatgtatatcaataagtgatggtctctcaatg 340

Query: 1570 tgtgtgttaggacatttggatgtgcaaaaacttatttcaatggtacactctatag 1629
      |||
Sbjct: 339 tgtgtgttaggacatttggatgtgcaaaaacttatttcaatggtacactctatag 280

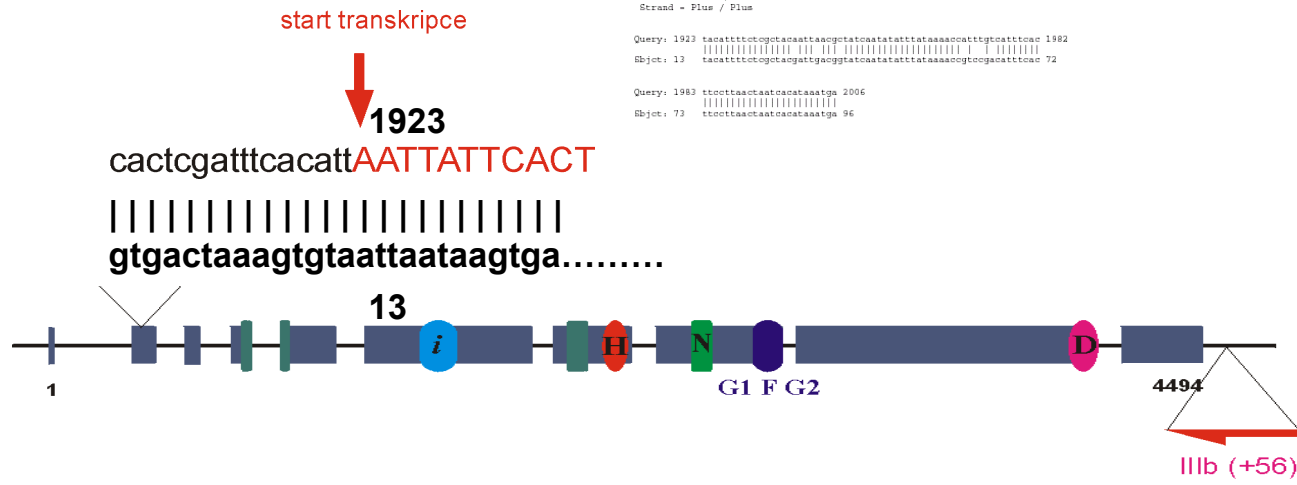
Query: 1630 attagcccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatgcaat 1689
      |||
Sbjct: 279 attagcccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatgcaat 220

Query: 1690 atgattccaaac 1701
      |||
Sbjct: 239 atgattccaaac 208

Score = 111 bits (56), Expect = 8e-23
Identities = 77/84 (91%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1923 tacattttctogtacaattaacgtatcaatatttataaaacctgttcttccac 1982
      |||
Sbjct: 13 tacattttctogtacaattaacgtatcaatatttataaaacctgttcttccac 72

Query: 1983 ttccctaaactaacataaatga 2006
      |||
Sbjct: 73 ttccctaaactaacataaatga 96
    
```



- Exon
- Intron
- Transmembránová oblast
- Duplikace
- Er-1* element



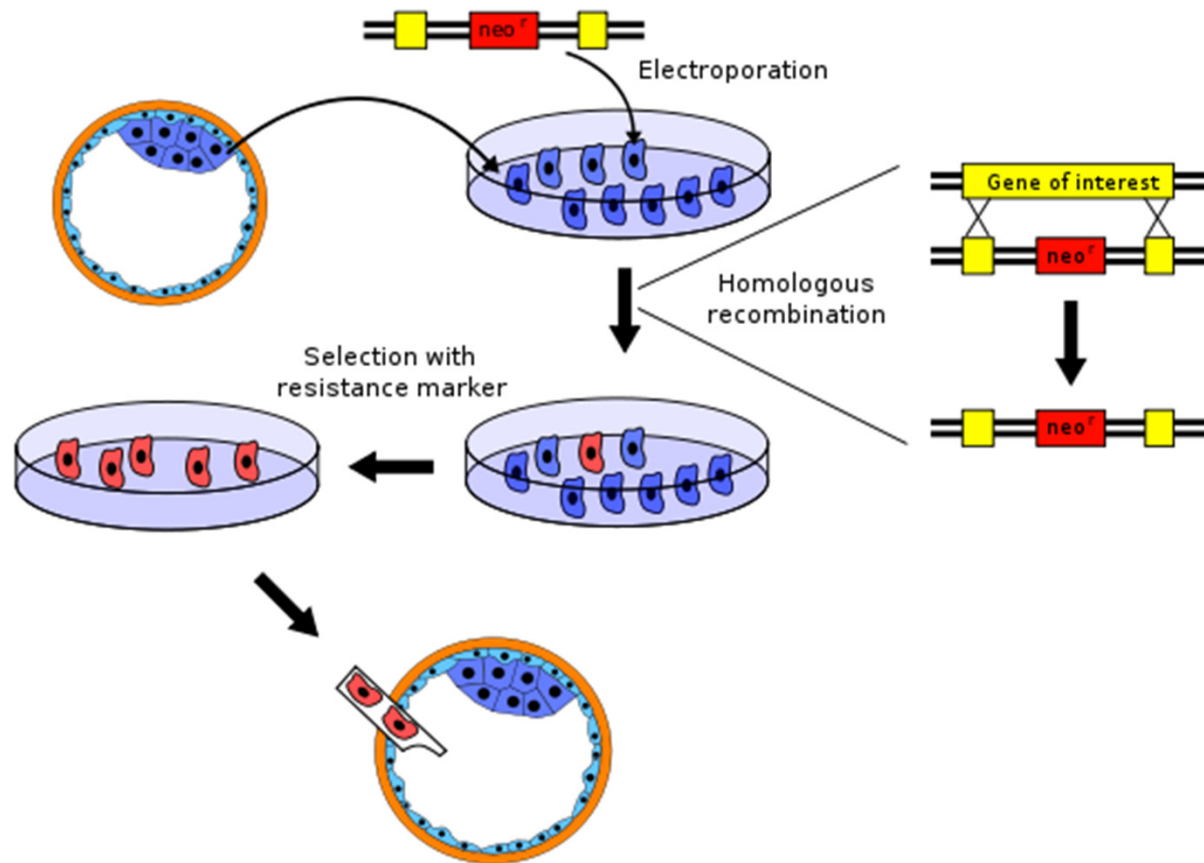
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace

Knocking-Out the Gene



Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
 - kosegregační analýza
 - identifikace nezávislé inzerční alely
 - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
 - komplementace mutantů pomocí transgenů

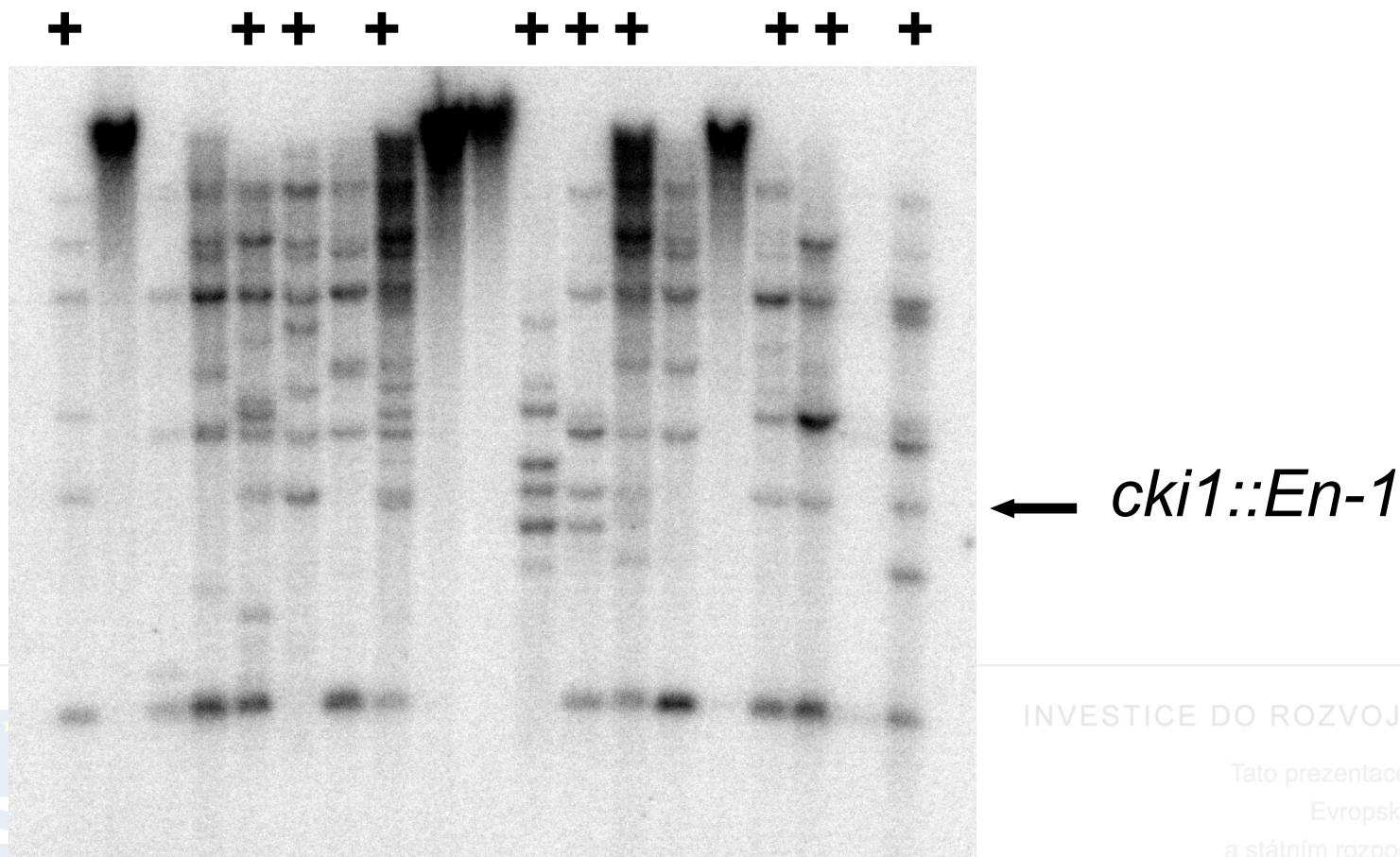
Proč je nutné analyzovat příčinnou souvislost mezi inzercí a pozorovaným fenotypem ?

- přítomnost **více inzercí** v jedné linii
- možnost vzniku **nezávislé bodové mutace**
- s inzercí T-DNA jsou často asociovány **chromozomové aberace** a **přestavby** (duplikace, inverze, delece)

Kauzalita mezi inzercí a fenotypem

- **Kosegregační analýza**

- kosegregace specifického fragmentu např. po inzerci T-DNA (nebo působení EMS atd.) do genomu s pozorovaným fenotypem



Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

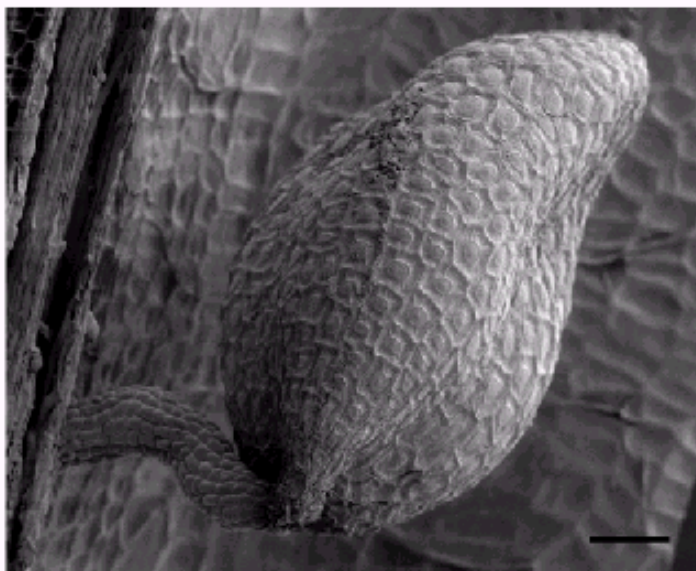
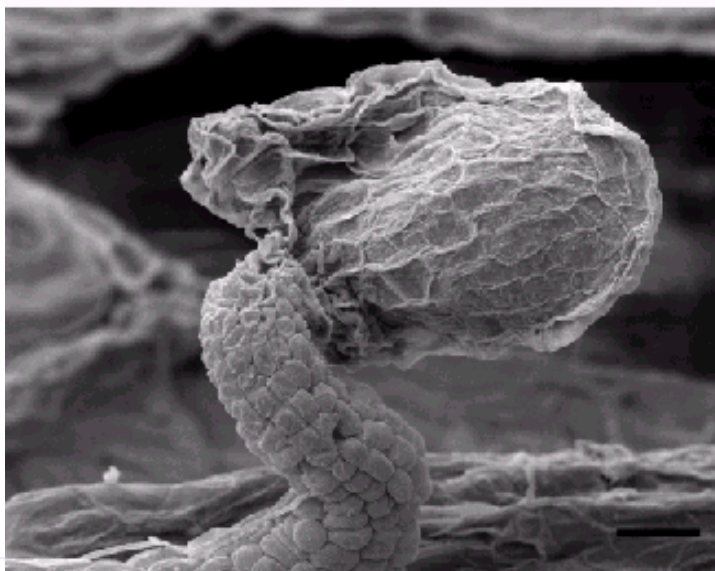
- transpozony se často vyznačují excizí a reinzercí do blízké oblasti-využití při izolaci nových mutantních alel
- excize transpozonů není vždy zcela přesná-vznik bodových mutací - izolace revertantních linií s tichou mutací i stabilních mutantů

Fenotyp šušulí *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1



CKI1/CKI1



Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

1. Izolace revertantních linií

- PCR vyhledávání ve **246** rostlinách segregující populace
- z **90** *cki1::En-1* pozitivních **9** rostlin mělo kromě šešulí mutantních i šešule standardního typu



Analýza potomstva

- potvrzení absence inzerce pomocí PCR
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvenování

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

Diagram showing a gene structure with exons and introns. A specific region is highlighted and expanded into a DNA sequence with four alternative alleles (A, B, C, D).

Genomic context: *aattcaagtcgtCACTACAAGA "En-1" TCTTGTAGTGcgtggagact*

A. *aat tca agt **cg**t **gga** gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

B. *aat tca agt **gg**t **ac**g act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G

C. *aat tca agt cgt **ac**g gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*
 N S S R T E T T L G T L K P W I S .

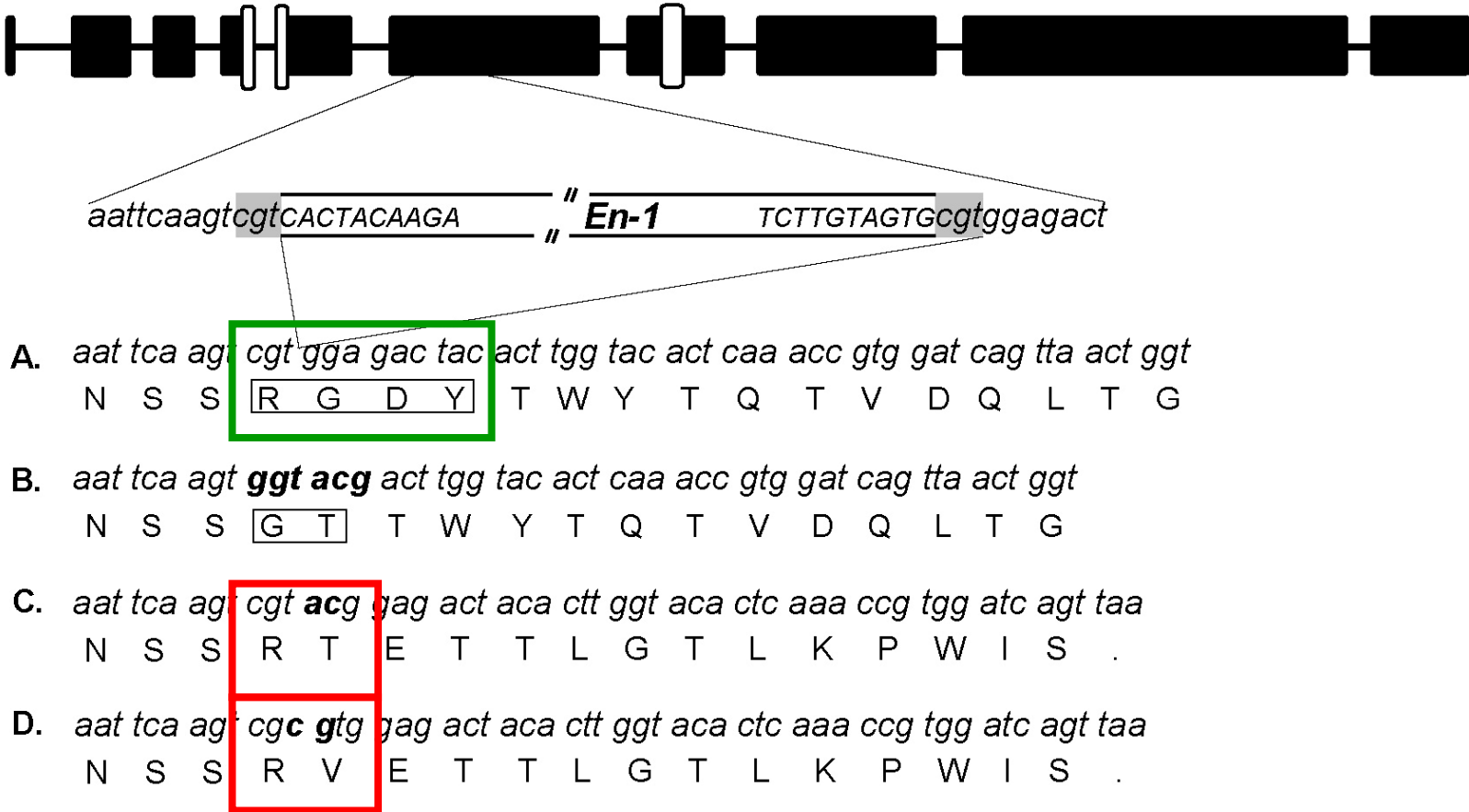
D. *aat tca agt cgc **gt**g gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*
 N S S R V E T T L G T L K P W I S .

Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

2. Izolace stabilní mutantní linie

- analýza fenotypu segregující populace (*CKI1/CKI1 CKI1/cki1::En-1*)
- PCR analýza rostlin s mutantním fenotypem-identifikace rostlin bez inzerce
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvenování

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



aattcaagtcgctCACTACAAGA "En-1" TCTTGTAGTGcgtggagact

A. *aat tca agt **cg**t **gga** gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

B. *aat tca agt **ggt acg** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G

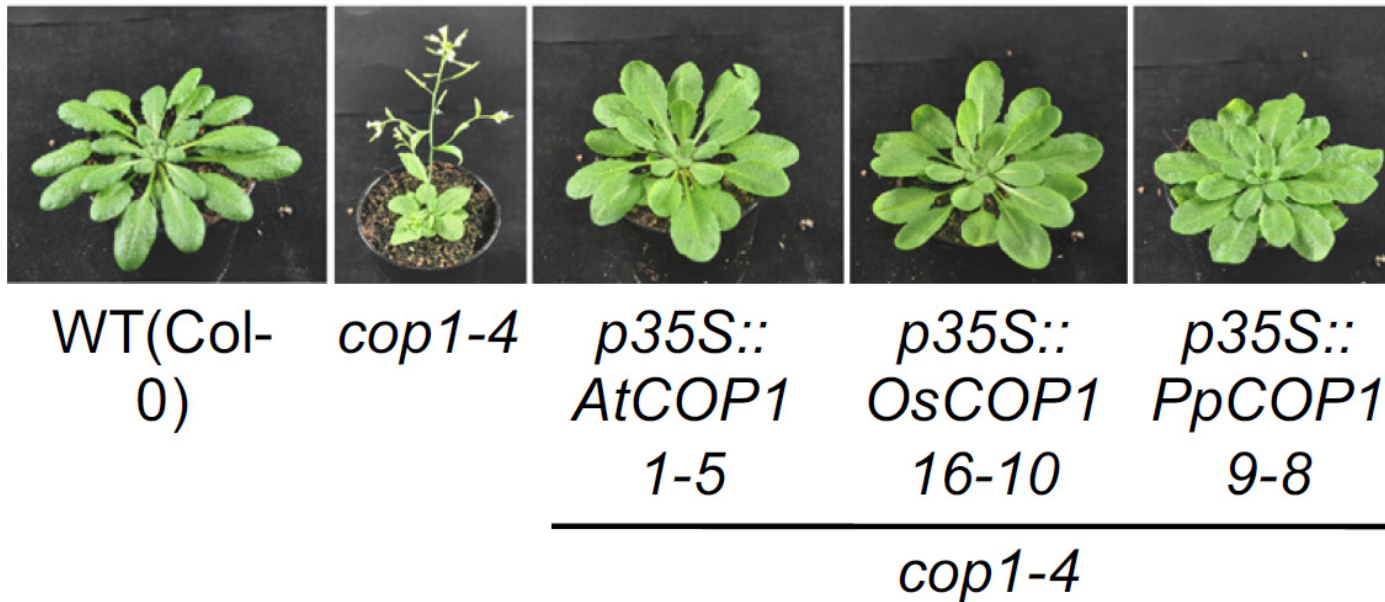
C. *aat tca agt **cg**t **acg** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*
 N S S **R T** E T T L G T L K P W I S .

D. *aat tca agt **cg**c **gtg** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*
 N S S **R V** E T T L G T L K P W I S .

Komplementace mutantní linie



Komplementace mutantní linie



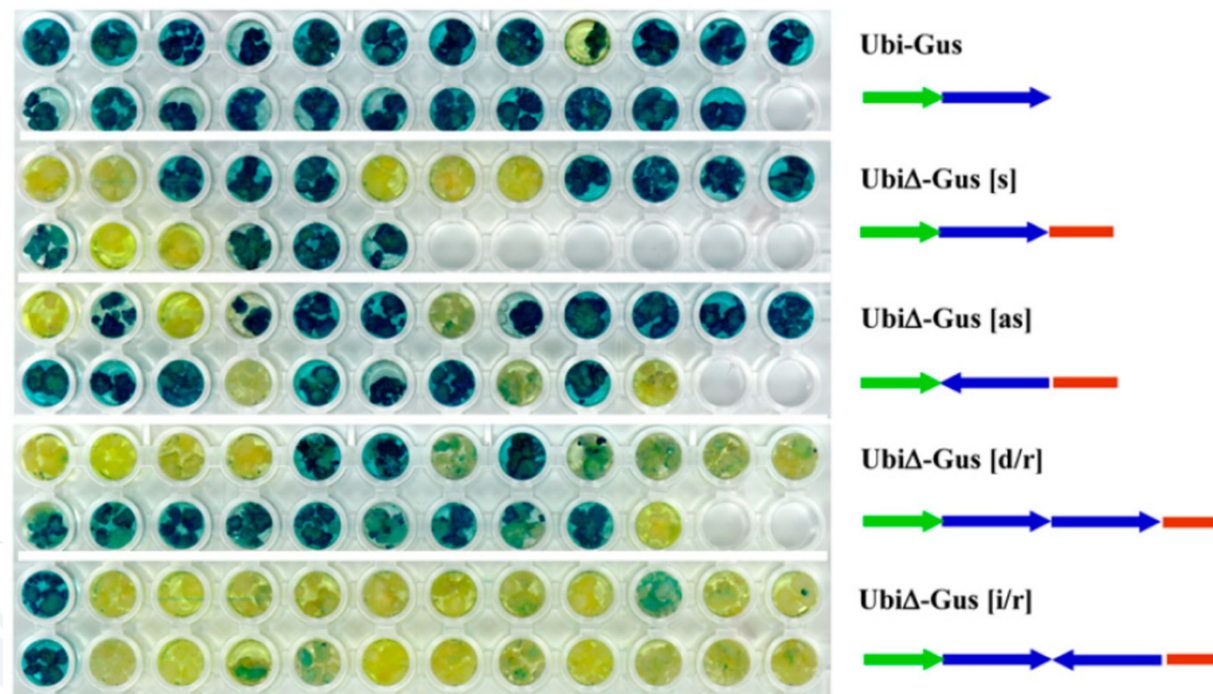
Ranjan et al., 2014

Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
 - Mechanismus RNAi

RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
 - RNAi objevena u rostlin a *Coenorhabditis elegans*
 - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravdř. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
 - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji



Waterhaus et al., PNAS (1998)

10/11/11

E VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancována
ým sociálním fondem

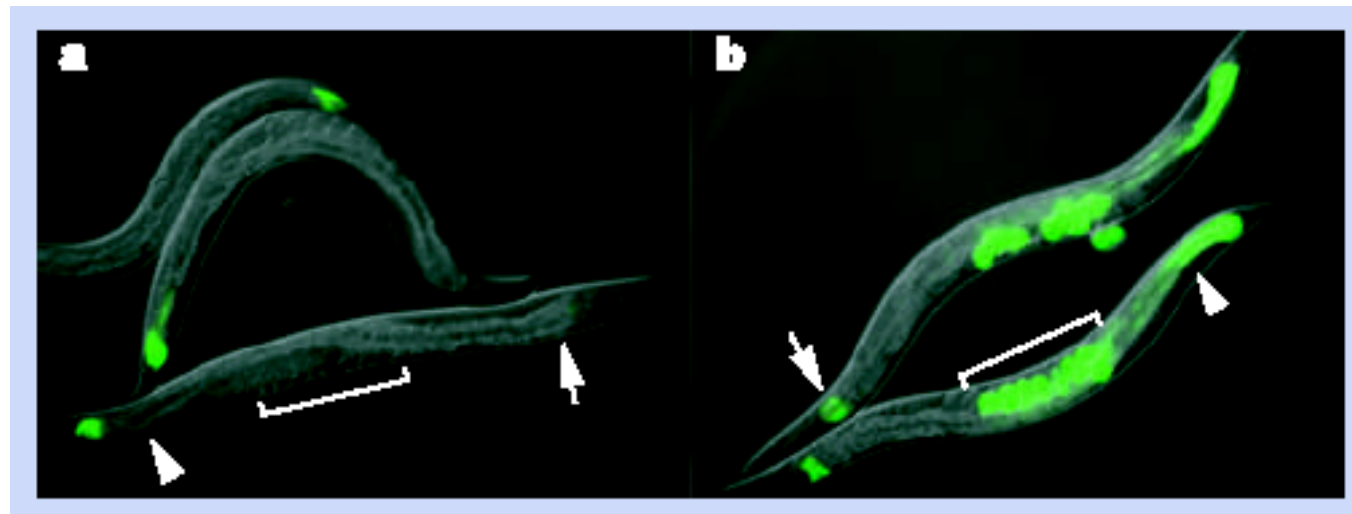
a státním rozpočtem České republiky

RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
 - dsRNA indukce je závislá na vlastních genech - gen. vyhledávání

RNAi

rna1

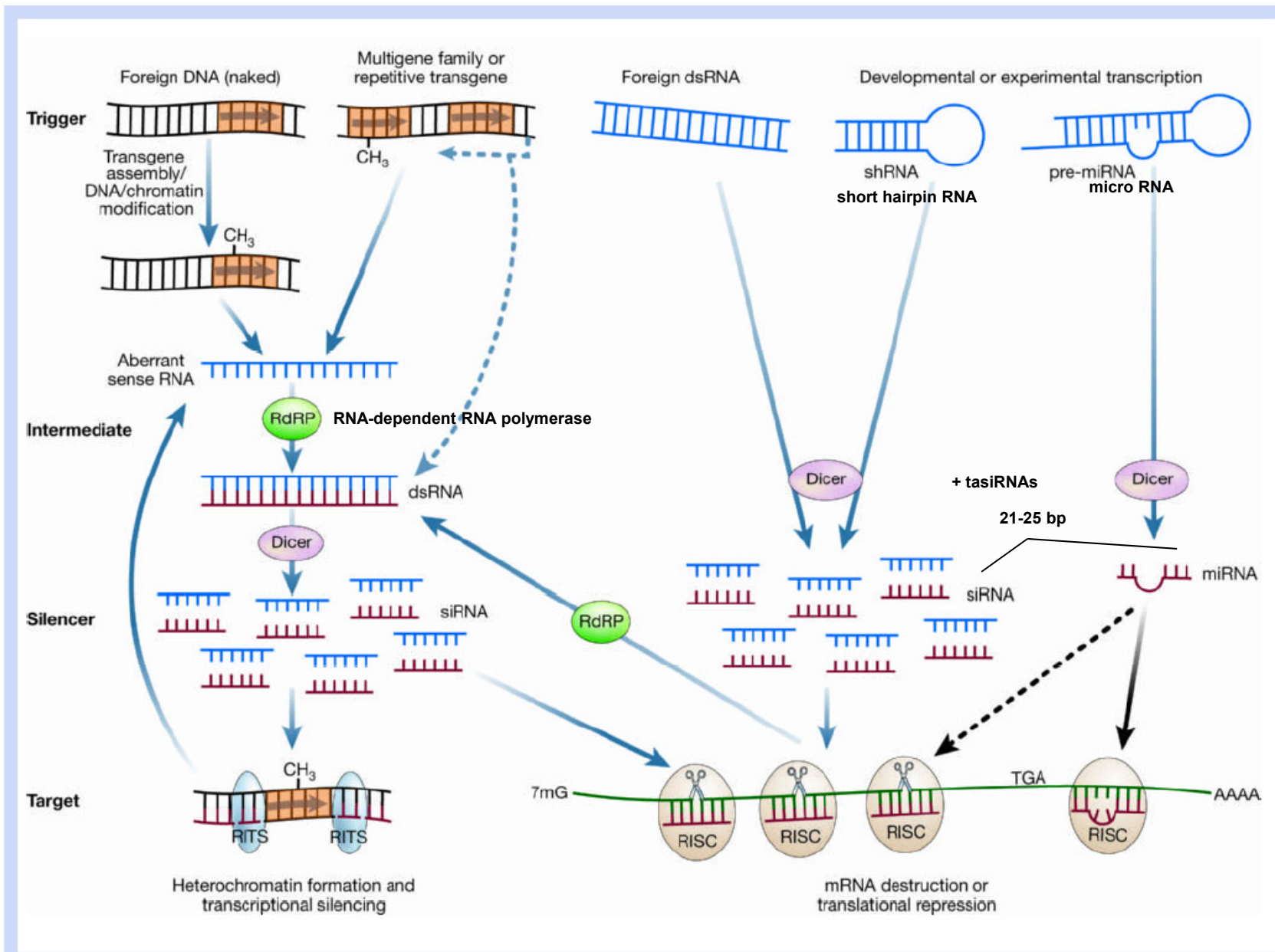


Mello and Conte, *Nature* (2004)

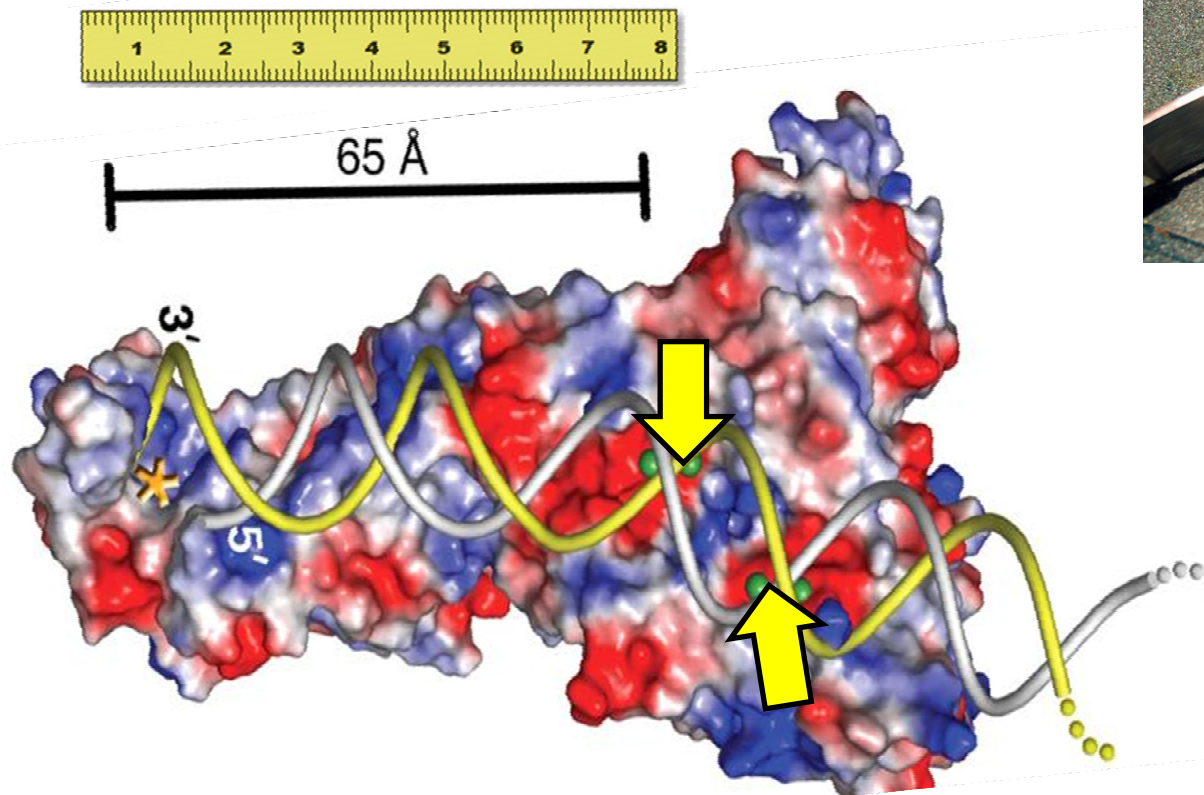
RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
 - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans* a u rostlin
 - je to **přírozený mechanismus** regulace genové exprese u všech eukaryot
 - podstatou je **tvorba dsRNA**, která může být spuštěna několika způsoby:
 - přítomnost **cizí „aberantní“ DNA**
 - **specifické transgeny** obsahující **obrácené repetice** částí cDNA
 - transkripce vlastních genů pro **shRNA** (short hairpin RNA) nebo **miRNA** (micro RNA, endogenní „vlásenková“ RNA)
 - dsRNA je procesována enzymovým komplexem (DICER), což vede k tvorbě **siRNA** (short interference RNA), která se pak váže buď na enzymový komplex **RITS** (RNA-induced transcriptional silencing complex) nebo **RISC** (RNA-induced silencing complex)
 - **RISC** zprostředkovává buď **degradaci mRNA** (v případě úplné similarity siRNA a cílové mRNA) nebo vede pouze k **zastavení translace** (v případě neúplné homologie jako je tomu např. v případě miRNA)
 - **RITS** zprostředkovává **reorganizaci genomové DNA** (tvorba heterochromatinu a inhibice transkripce)

Mechanism of RNA interference

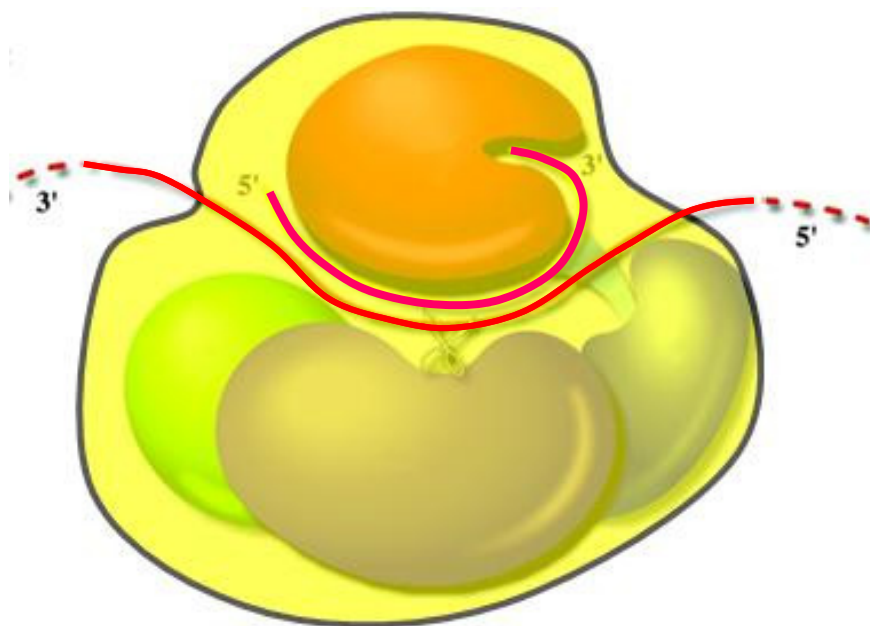


Dicer and Dicer-like proteins

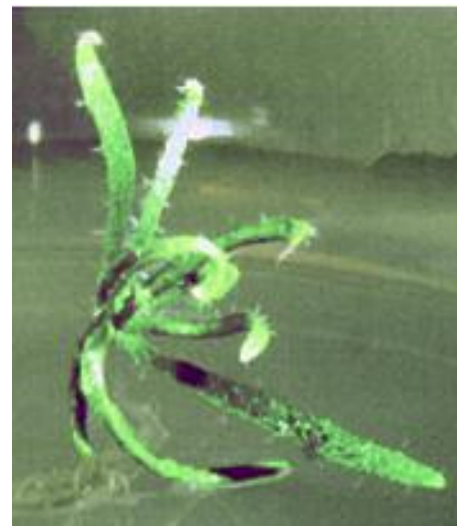


From MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: [195-198](#). Reprinted with permission from AAAS. Photo credit: [Heidi](#)

Argonaute proteins



ago1



Argonauta argo
argonaut pelagický



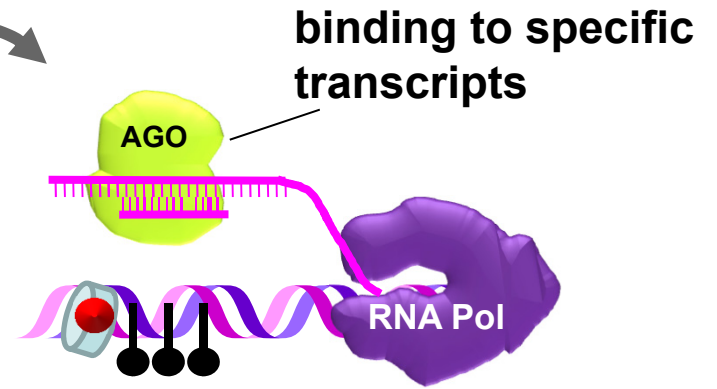
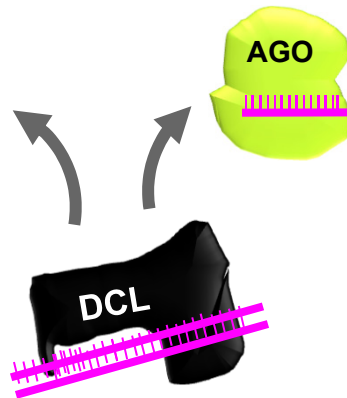
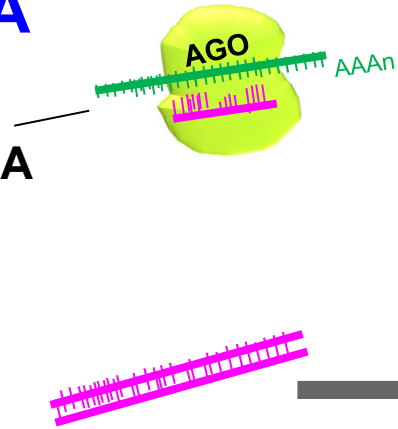
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: EMBO J. Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. EMBO J. 17: [170–180](#). Copyright 1998; Reprinted from Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 305: [1434 – 1437](#). with permission of AAAS.

transcriptional gene silencing

post-transcriptional gene silencing

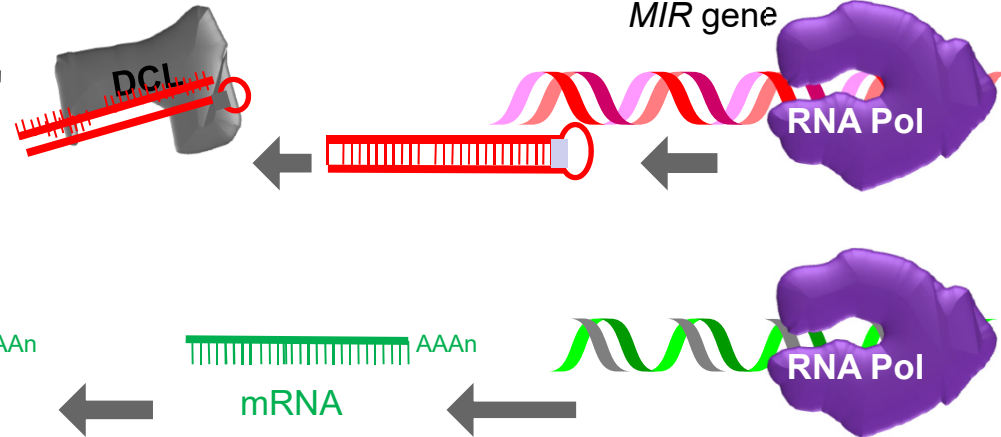
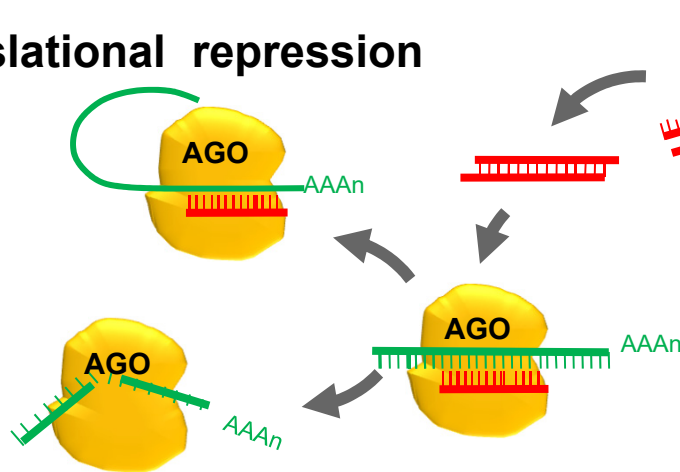
siRNA

binding to DNA



miRNA

translational repression



transcriptional silencing

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



Andrew Z. Fire

USA

Stanford University
School of Medicine
Stanford, CA, USA

b. 1959



Craig C. Mello

USA

University of
Massachusetts Medical
School
Worcester, MA, USA

b. 1960

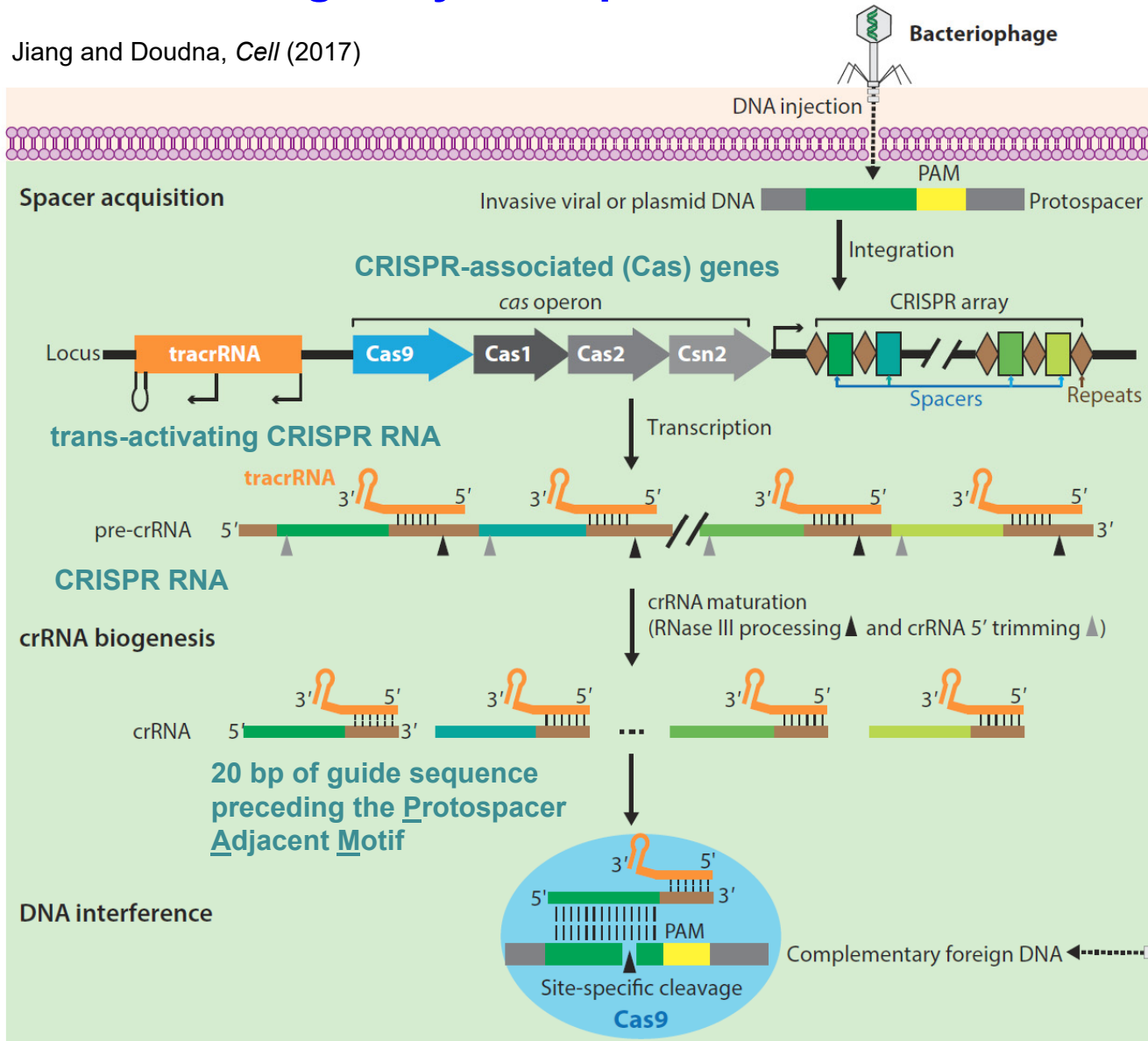
Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
 - Mechanismus RNAi
- Editace genomu pomocí CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 - Mechanism

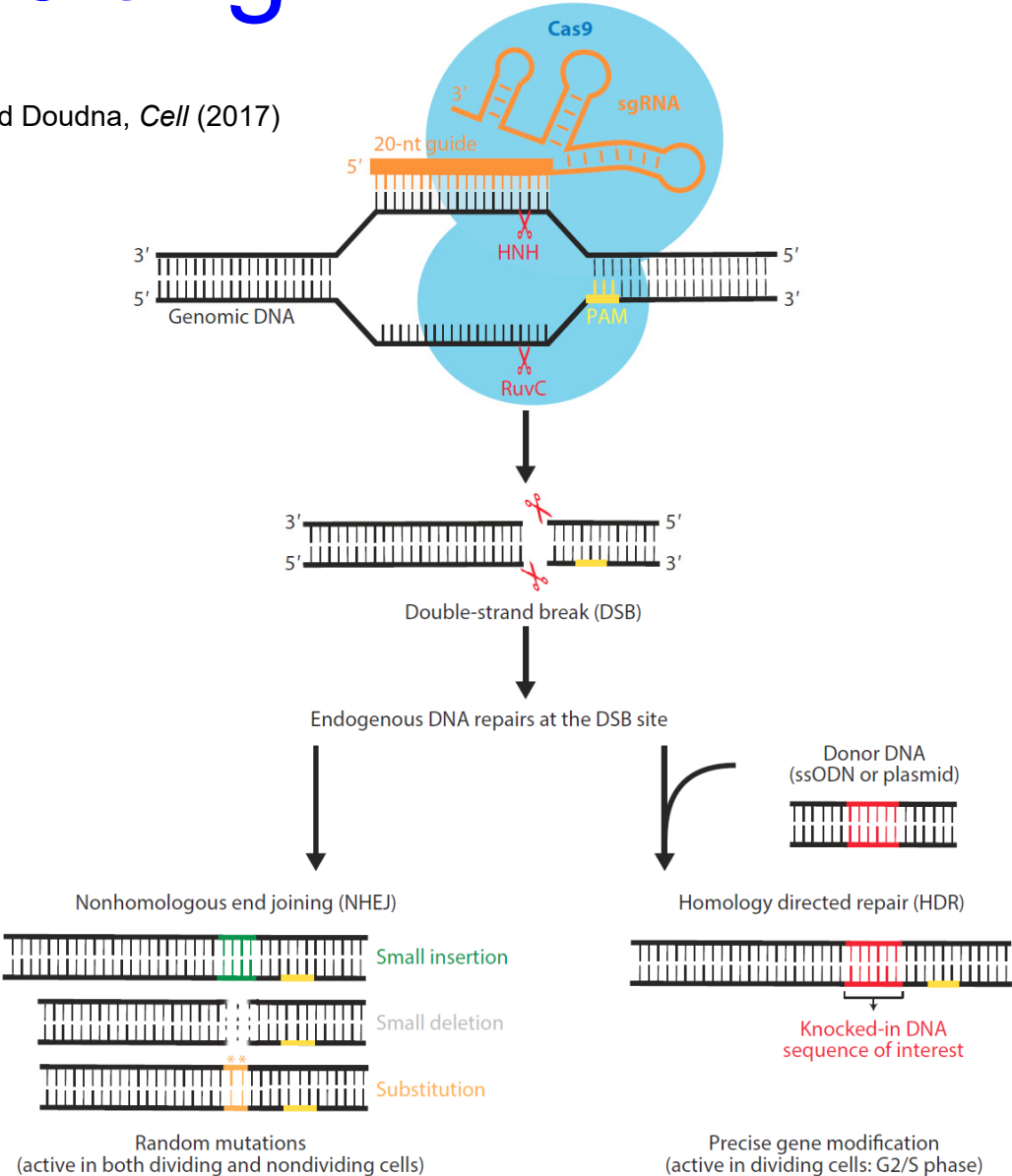
- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Jiang and Doudna, *Cell* (2017)



CRISPR/Cas9 – Genome Editing

Jiang and Doudna, *Cell* (2017)



CRISPR/Cas9 – Nobel Prize in 20..2x?



Francisco Mojica



Emmanuelle Charpentier



Jenifer Doudna



Martin Jinek

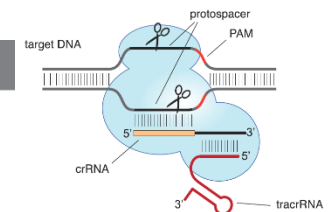
RESEARCH ARTICLE

A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

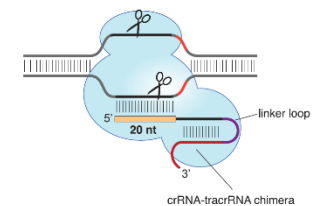
Martin Jinek,^{1,2*} Krzysztof Chylinski,^{3,4*} Ines Fonfara,⁴ Michael Hauer,^{2,†} Jennifer A. Doudna,^{1,2,5,6,‡} Emmanuelle Charpentier^{4,‡}

Jinek et al, *Science* (2012)

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cas9 programmed by single chimeric RNA



Shrnutí

- **Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů**
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace
- **Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací**
 - kosegregační analýza
 - identifikace nezávislé inzerční alely
 - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
 - komplementace mutantů pomocí transgenů

Shrnutí

- Umlčování genů pomocí RNA interference
 - Mechanismus RNAi
- Editace genomu pomocí CRISPR/Cas9

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky