

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
hejatk@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 genetiky



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Přímá a reverzní genetika

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

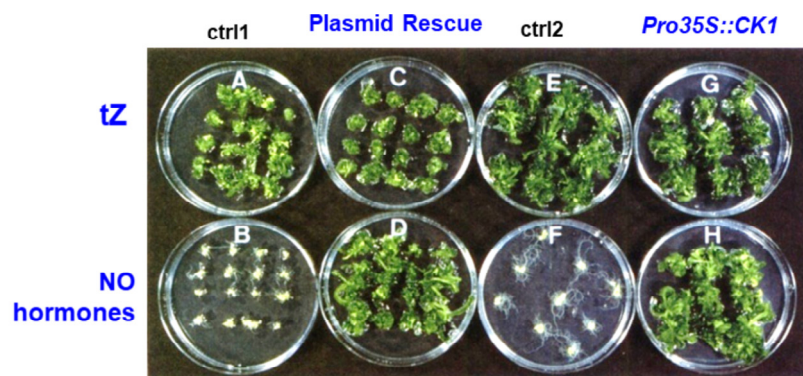


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identifikace *CK1* aktivační mutagenézí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



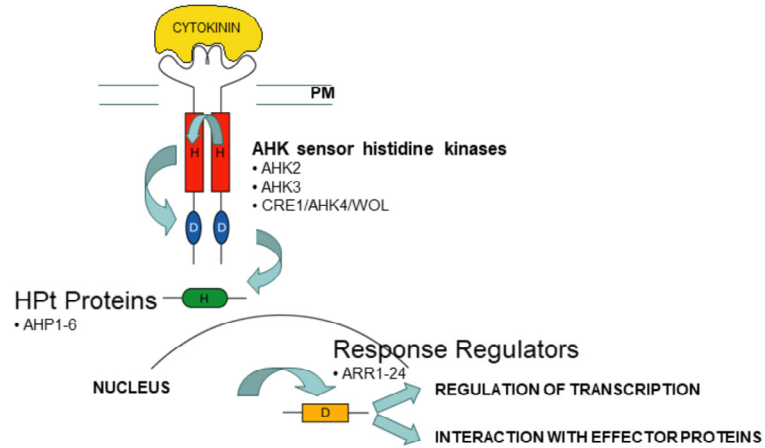
Kakimoto, *Science*, 1996



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Signal Transduction via MSP

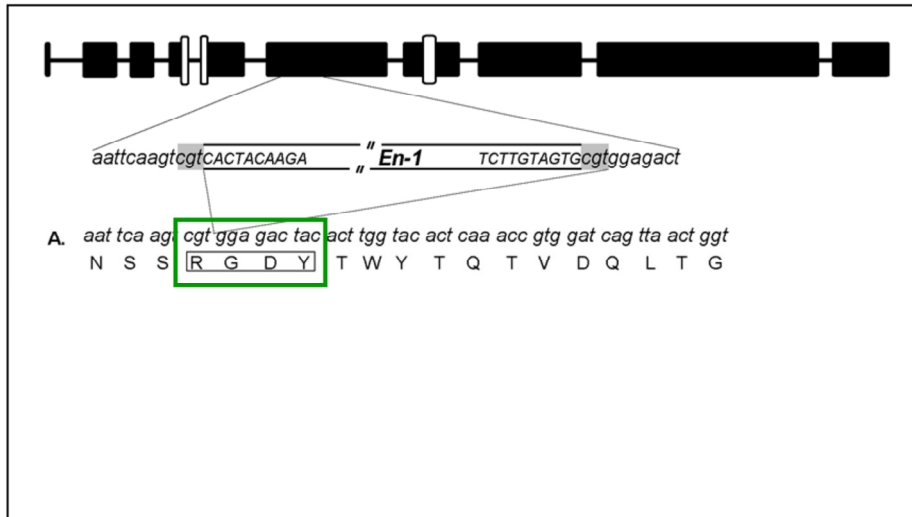




Přímá a reverzní genetika

- 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



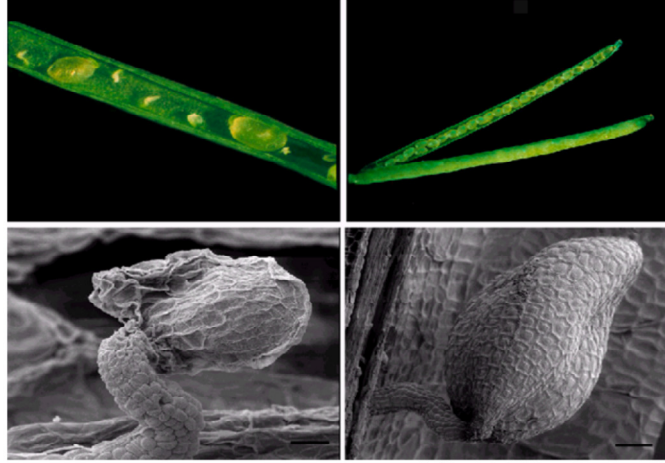
Hormonal regulations of plant development



CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

CKI1/*cki1-i*

CKI1/CKI1



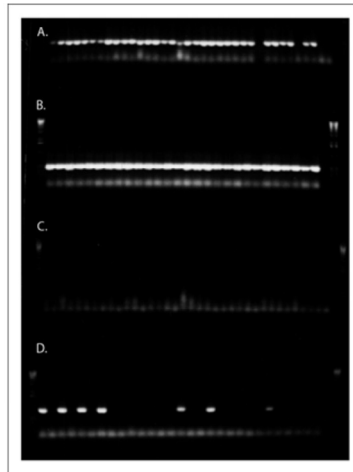
Hejálko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

Hormonal regulations of plant development



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*

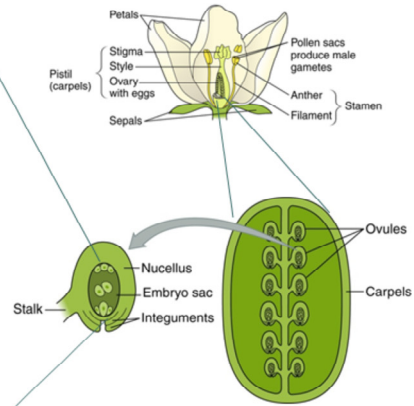
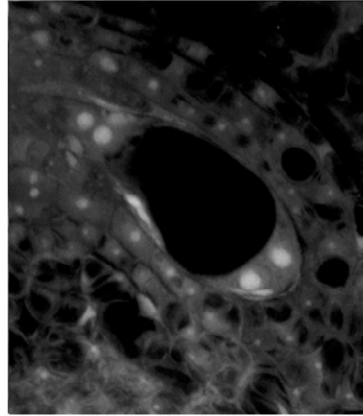


cki1-i specific primers

D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

CKI1 and Megagametogenesis

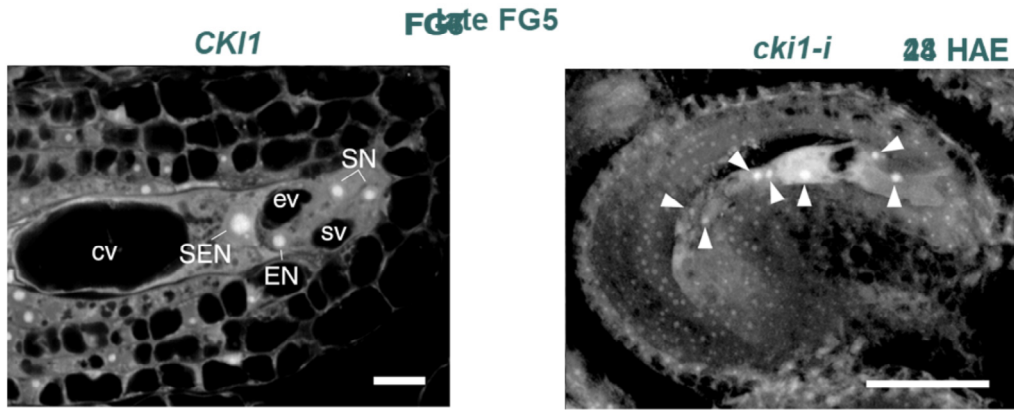
FG 4



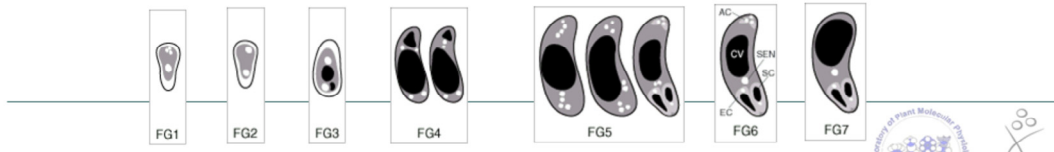
Hormonal regulation



CKI1 and Megagametogenesis



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



Hormonal regulations of plant development

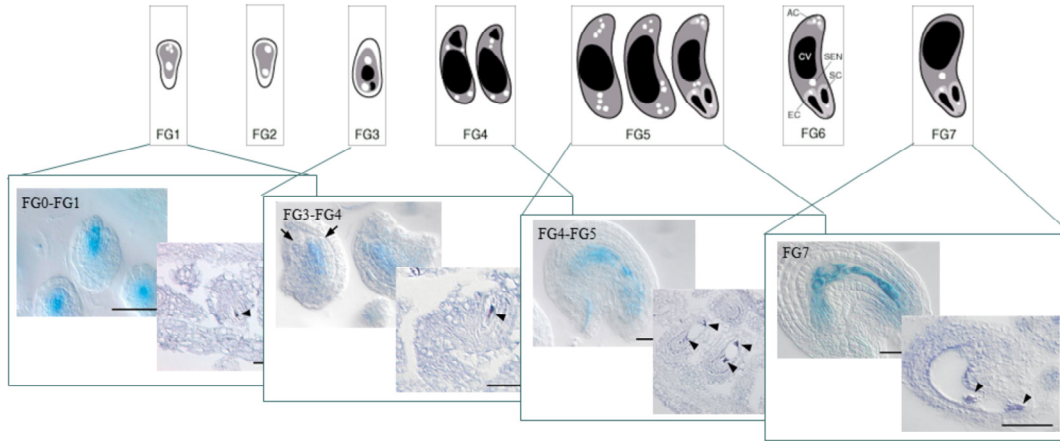




Přímá a reverzní genetika

- 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



Hormonal regulations of plant development

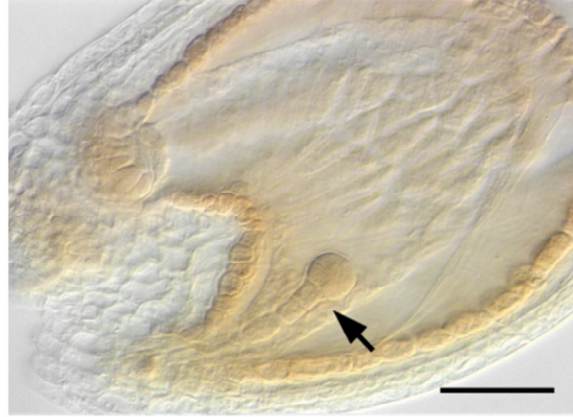


● ● ●

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

♀ wt x ♂ Pro*CKI1*:*GUS*

22 HAP
(hours
after
pollination)



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

Hormonal regulations of plant development





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



Hormonal regulations of plant development



Genomika 03

▪ Zdrojová literatura

- **Bioinformatics and Functional Genomics**, 2009, Jonathan Pevsner, Wiley-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.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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



$h \times n$

T-DNA

(retro)transposons

„Reverzně genetický“ přístup

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

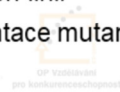
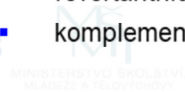


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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
- **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 mutanta pomocí transgenu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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**

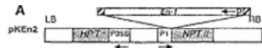
- zcela stabilní, její inzerce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

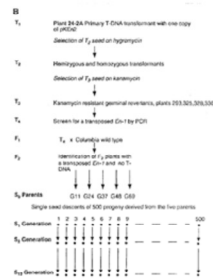
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Knihovny inserčních mutantů (u rostlin)

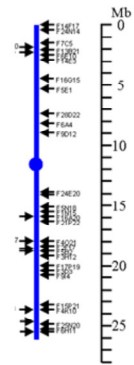
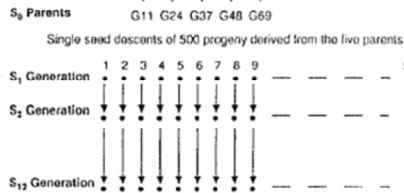
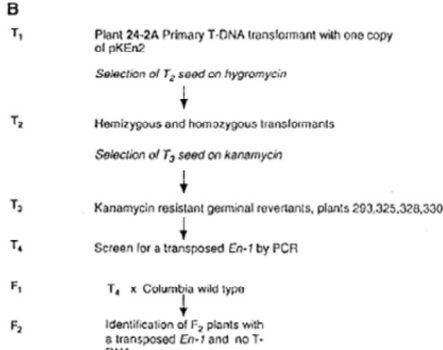


příprava transgenických rostlin

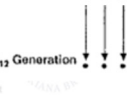
vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



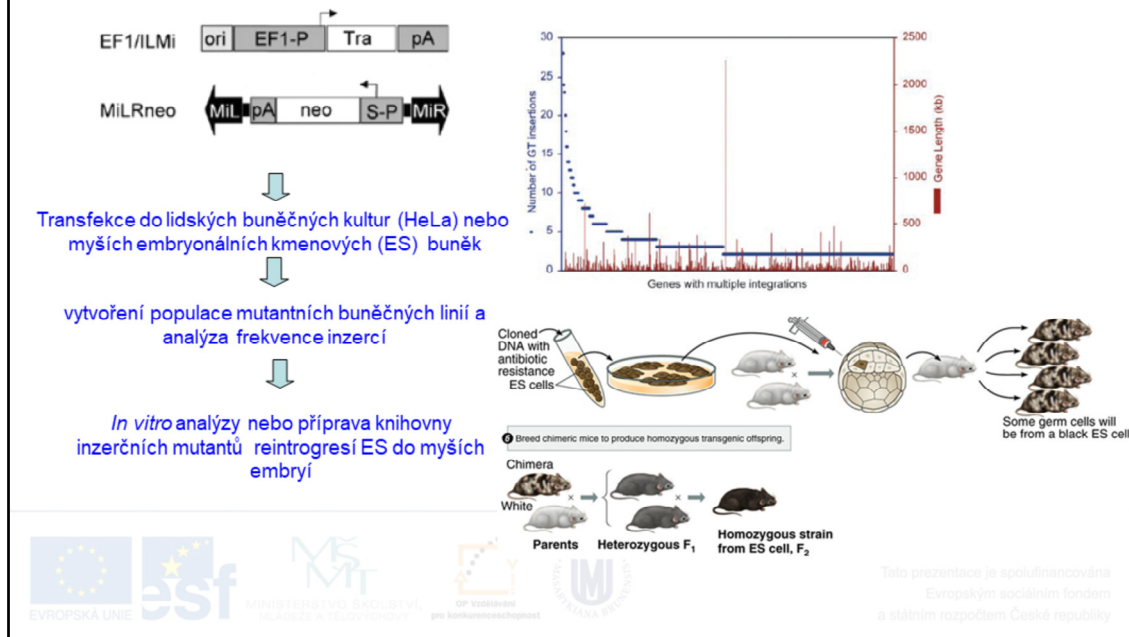
V



E VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancována
m sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Knihovny inzerčních mutantů (u živočichů)



Technologii inzerční mutagenese lze využít i u živočichů. Zda se využívají např. transpozony odvozené z *Drosophily* (transpozon Minos, viz schéma vlevo nahoře (Klinakis et al., 2000)). V tomto případě bylo nutné provést kotransfekci s tzv. helper plasmídem, kódujícím transponázu (neautonomní transpozon). Neo kóduje rezistenci k neomycinu, šipky ukazují směr transkripce řízený příslušnými promotory, pA je polyadenylační signál, ori je počátek replikace viru SV40, S-P je promotor téhož viru. Pro identifikaci inzercí „in frame“ se zasaženými geny lze využít transpozony, obsahující fúzi akceptorových míst sestřihu s ORF reportérového genu, např. lacZ-neo (bez AUG kodonu). Tento přístup umožňuje identifikovat inserce do aktivních genů prostřednictvím selekce inzerčních mutantů na rezistenci k neomycinu, resp. vykazující β -galaktozidázovou aktivitu (Klinakis et al., 2000).

Osnova

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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

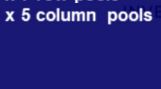
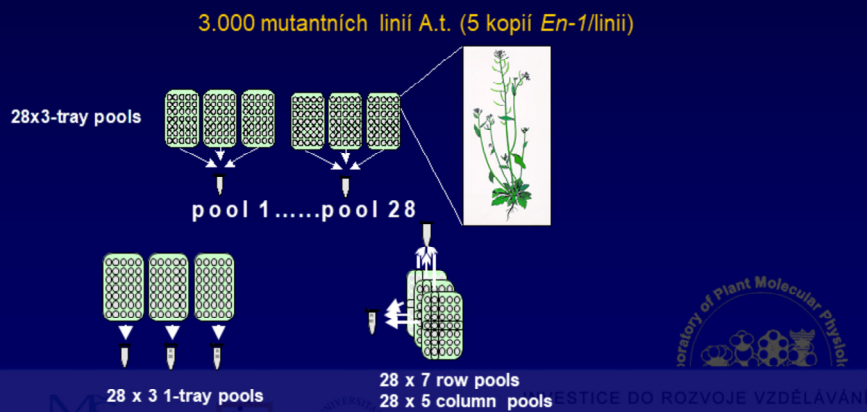


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)



ESTICE 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



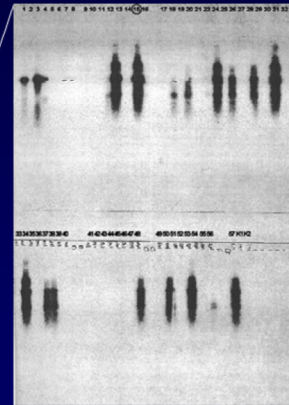
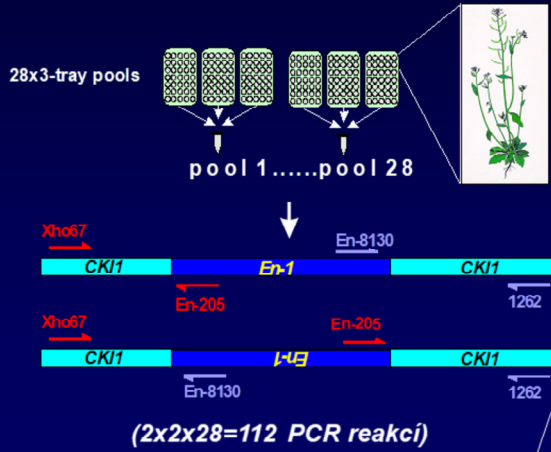
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)



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



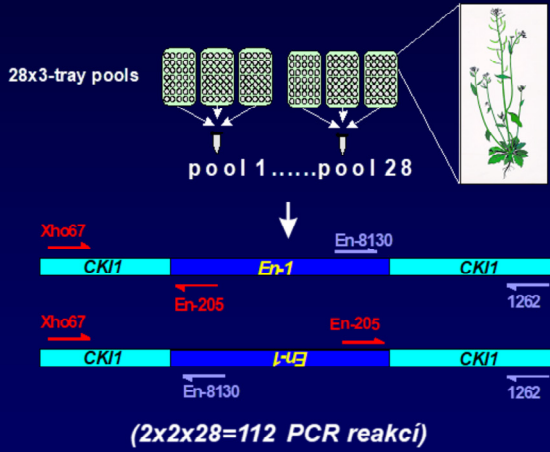
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

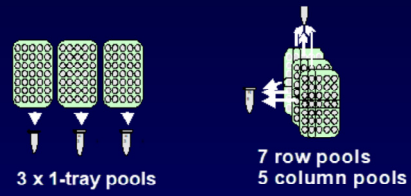
Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

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



2. Identifikace linie nesoucí inzerci



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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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>



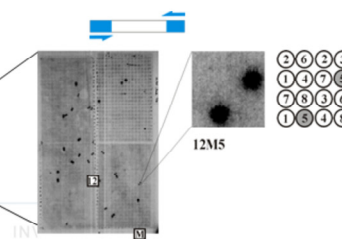
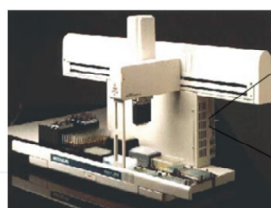
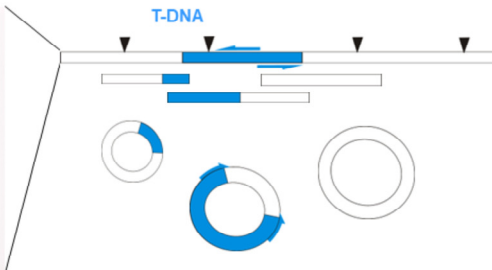
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



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



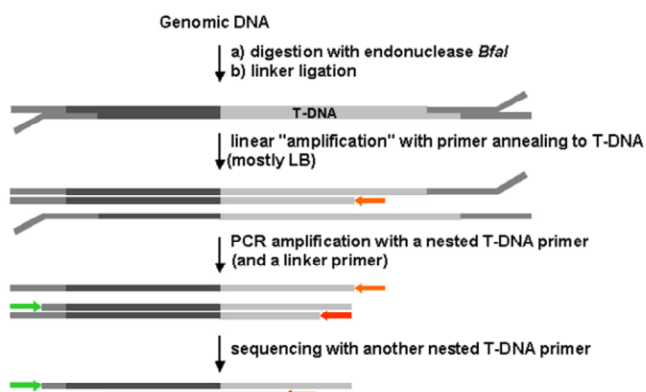
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Izolace sekvenčně specifických mutantů

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

Sequencing of flanking sequence fragments



GABI-Kat (MPIZ, Köln)

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



EVROPSKÁ UNIE

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

je spolufinancována evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

```
>Insert_SALK.029311: Order\_line\_029311 | View in AGE
Length = 460

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

Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatattgatagtgaggacctacttataaaaagc 1509
      |||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagocgcttttatattgatagtgaggacctacttataaaaagc 400

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

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

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

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

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

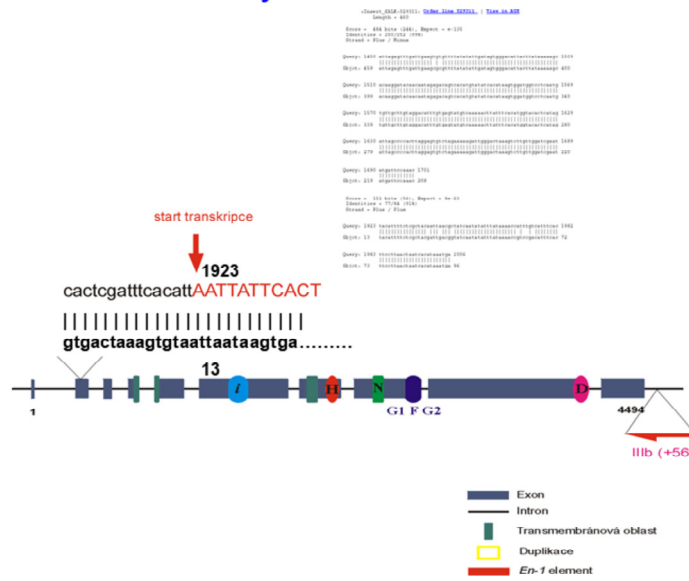
Query: 1923 tacattttctogtacaattaacggtatcaatattttataaaaaccttggcatttccac 1982
      |||
Sbjct: 13 tacattttctogtacaattaacggtatcaatattttataaaaaccttggcatttccac 72

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

EVROPSKÁ UNIE  **est** [EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND](#)
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY  **OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost**  **SLOVAKIA BRUNEN**

.NI
šna
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

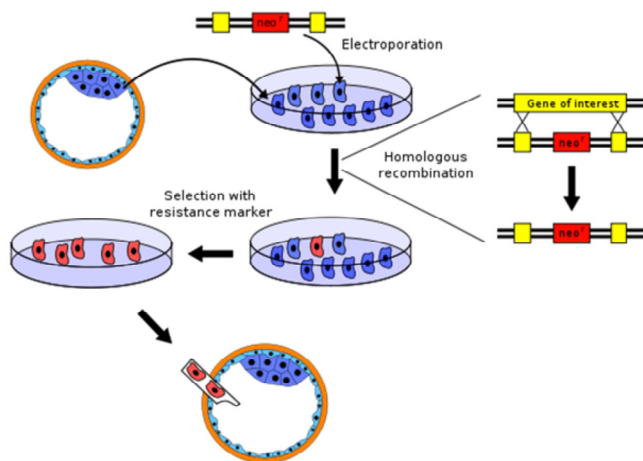
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Knocking-Out the Gene

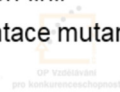
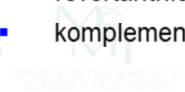


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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
- **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 transgeneru



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

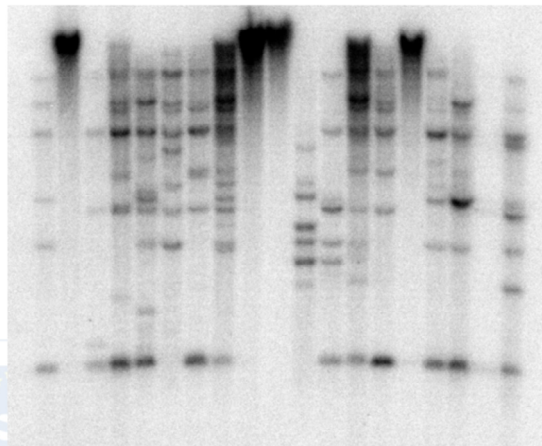
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Kauzalita mezi inzercí a fenotypem

- Kosegregační analýza

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

+ ++ + +++ ++ +



← *cki1::En-1*



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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



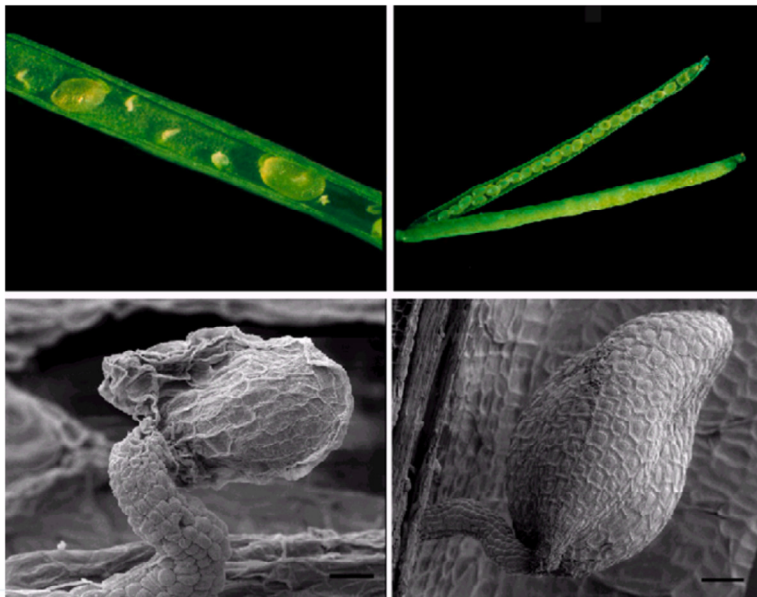
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Fenotyp šesulí *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1

CKI1/CKI1



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

aattcaagtcgtCACTACAAGA " **En-1** TCTTGTAGTcgtggagact

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 .



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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 inserce
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inserce
- sekvenování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



aattcaagtcgtCACTACAAGA "En-1" TCTGTAGTcgtggagact

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 .



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

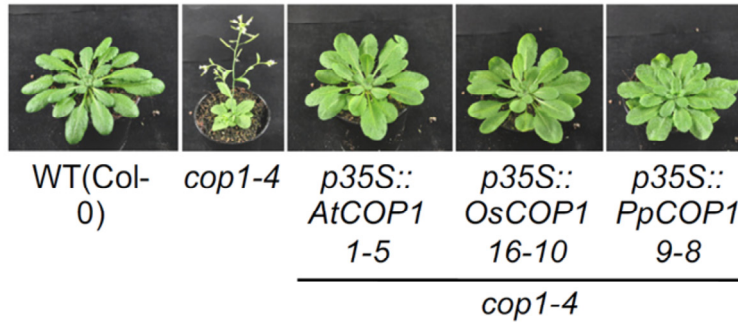
Komplementace mutantní linie



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Komplementace mutantní linie



Ranjan et al., 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
 - Mechanismus RNAi



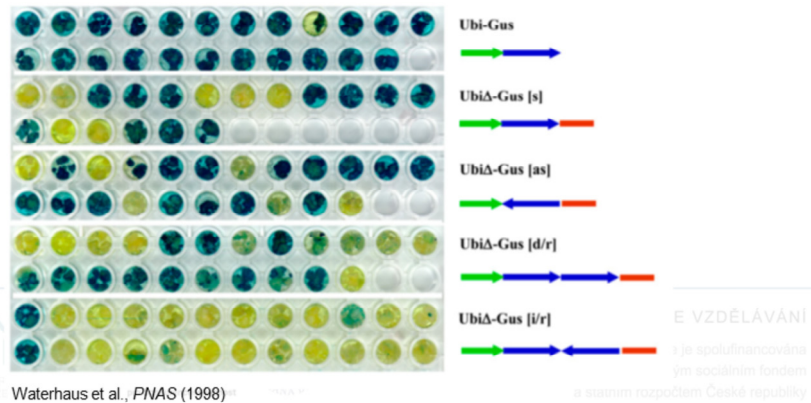
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**

- RNAi objevena u rostlin a *Coenorhabditis elegans*
 - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravd' kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
 - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji



Analysis of GUS expression of supertransformed rice callus. Transgenic rice tissue containing a single Gus transgene supertransformed with UbiDGus[s], UbiDGus[ays], UbiDGus[iyr], DGus[iyr].

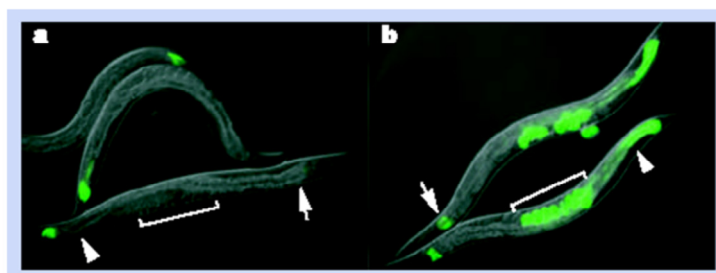
RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**

- dsRNA indukce je závislá na vlastních genech - gen. vyhledávání

RNAi

rna1



Mello and Conte, *Nature* (2004)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

RNA interference

▪ Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)

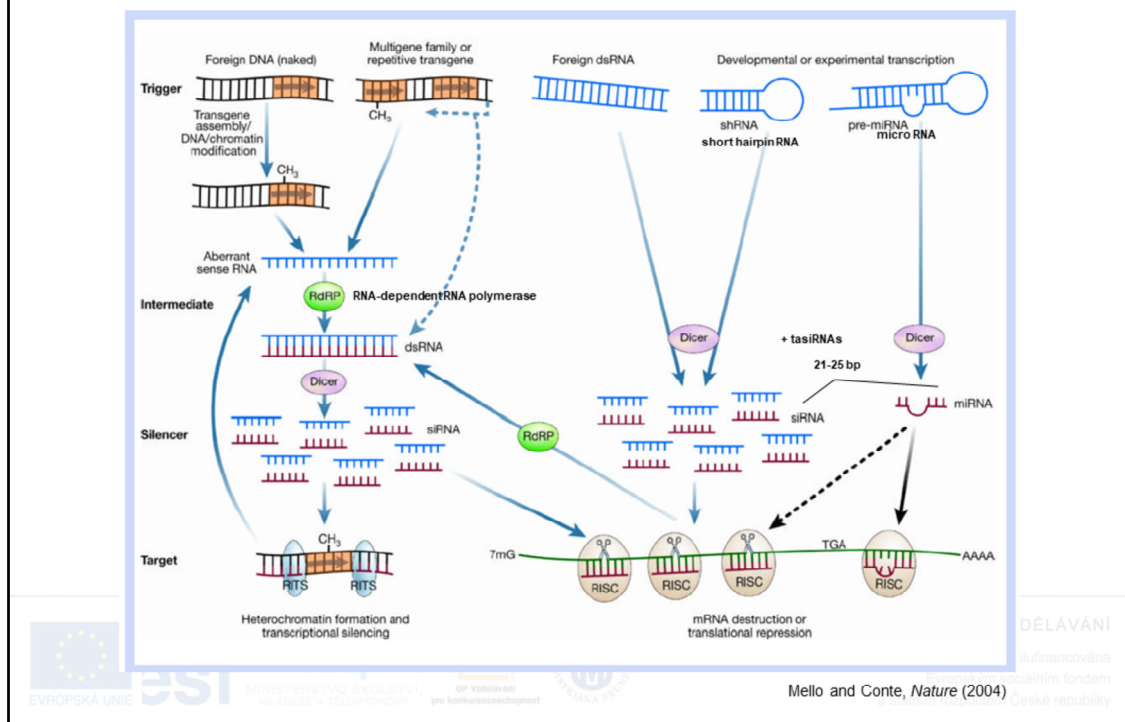
- RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans* a u rostlin
- je to **přírozený mechanismus** regulace genové exprese u všech eukaryot
- podstatou je **tvorba dsRNA**, která může být spuštěna několika způsoby:
 - přítomnost **cizí „aberantní“ DNA**
 - **specifické transgeny** obsahující **obrácené repetice** částí cDNA
 - transkripce vlastních genů pro **shRNA** (short hairpin RNA) nebo **miRNA** (micro RNA, endogenní „lásenková“ 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)



DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Mechanism of RNA interference



It has been found that dsRNA might be either an intermediate or a trigger in PTGS.

In the first case, dsRNA is formed by the action of RNA-dependent RNA polymerases (RdRPs), which use specific transcripts as a template. It is still not clear, how these transcripts are recognized, but it might be e.g. abundant RNA that is a result of viral amplification or transcription of foreign DNA.

It is not clear, how the foreign DNA might be recognized, possibly, lack of bound proteins on the foreign “naked” DNA and its subsequent “signature” (e.g. by specific methylation pattern) during packing of the foreign DNA into the chromatin structure might be involved.

The highly abundant transcripts might be recruited to the RdRPs by the defects in the RNA processing, e.g. lack of polyadenylation.

In the case when dsRNA is a direct trigger, there are two major RNA molecules involved in the process: Short interference RNA (siRNA) and micro RNA (miRNA), both encoded by the endogenous DNA.

These two functionally similar molecules differ in their origin:

siRNAs are dominantly product of the cleavage of the long dsRNA that are produced by the action of cellular or viral RdRPs. However, there are also endogenous genes, e.g. short hairpin RNAs (shRNAs) allowing production of the siRNA (see the figure).

miRNAs are involved in the developmental-specific regulations and are product of transcription of endogenous genes encoding for small dsRNAs with specific structure (see the figure).

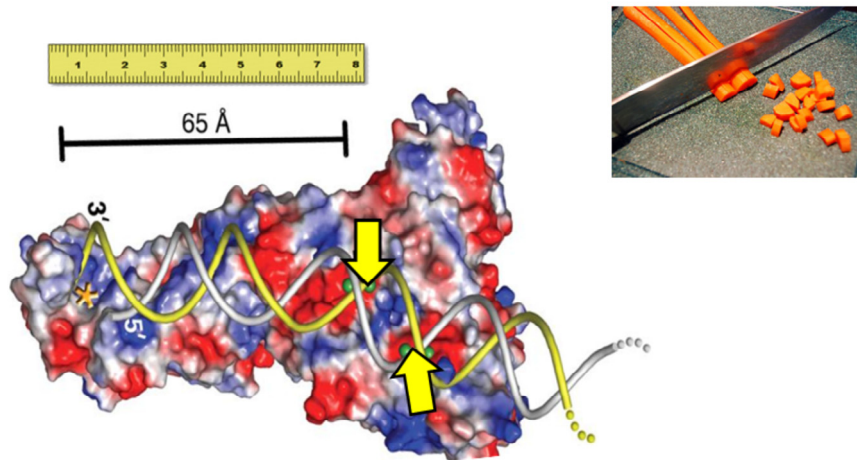
In addition to siRNAs, there are trans-acting siRNAs (tasiRNAs) that are a special class of siRNAs that appear to function in development (much like miRNAs) but have a unique mode of origin involving components of both miRNA and siRNA pathways.

Developmental regulations via miRNAs are more often used in animals than in plants.

The dsRNAs of all origins and pre miRNAs are cleaved by DICER or DICER-like (DCL) enzyme complexes with RNase activity, leading to production of siRNAs and miRNA, respectively.

These small RNAs are of 21-24 bp long and bind either to RNA-induced transcriptional silencing complex (RITS) or RNA-induced silencing complex (RISC).

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

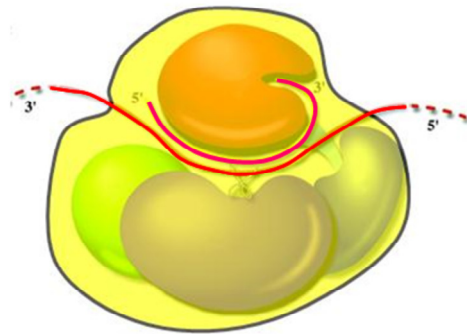
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

In siRNA and miRNA biogenesis, DICER or DICER-like (DCL) proteins cleave long dsRNA or foldback (hairpin) RNA into ~ 21 – 25 nt fragments.

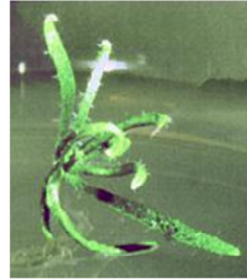
Dicer's structure allows it to measure the RNA it is cleaving. Like a cook who "dices" a carrot, DICER chops RNA into uniformly-sized pieces.

Note the two strands of the RNA molecule. The cleavage sites are indicated by yellow arrows.

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.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

ARGONAUTE proteins bind small RNAs and their targets and it is an important part of both RITS and RISC complexes.

ARGONAUTE proteins are named after the *argonaute1* mutant of *Arabidopsis*; *ago1* has thin radial leaves and was named for the octopus *Argonauta* which it resembles (see the figure).

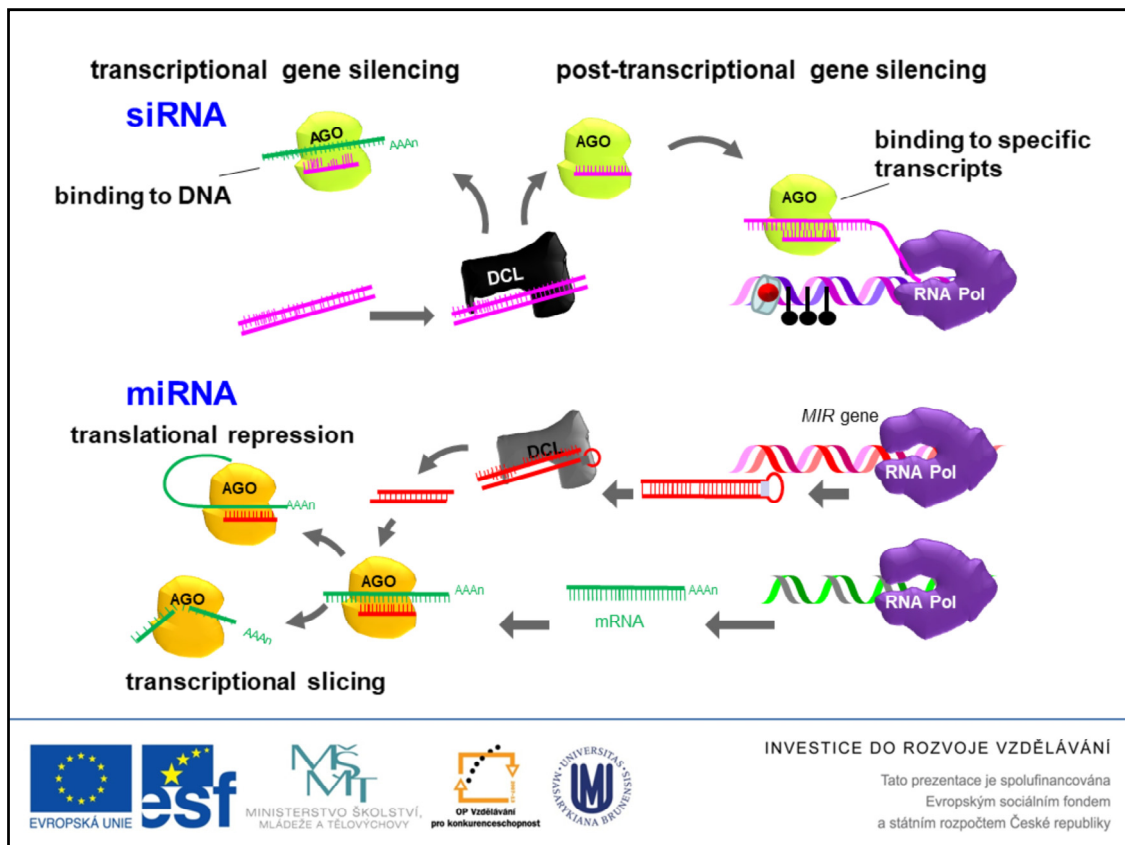
ARGONAUTE proteins were originally described as being important for plant development and for germline stem-cell division in *Drosophila melanogaster*.

ARGONAUTE proteins are classified into three paralogous groups: Argonaute-like proteins, which are similar to *Arabidopsis thaliana* *AGO1*; Piwi-like proteins, which are closely related to *D. melanogaster* *PIWI* (P-element induced wimpy testis); and the recently identified *Caenorhabditis elegans*-specific group 3 Argonautes.

Members of a new family of proteins that are involved in RNA silencing mediated by Argonaute-like and Piwi-like proteins are present in bacteria, archaea and eukaryotes, which implies that both groups of proteins have an ancient origin.

The number of Argonaute genes that are present in different species varies. There are 8 Argonaute genes in humans (4 Argonaute-like and 4 Piwi-like), 5 in the *D. melanogaster* genome (2 Argonaute-like and 3 Piwi-like), 10 Argonaute-like in *A. thaliana*, only 1 Argonaute-like in *Schizosaccharomyces pombe* and at least 26 Argonaute genes in *C. elegans* (5 Argonaute-like, 3 Piwi-like and 18 group 3 Argonautes).

<http://youpreferanargonaute.com/2009/06/>



MicroRNAs are encoded by MIR genes, fold into hairpin structures that are recognized and cleaved by DCL (Dicer-like) proteins.

In summary, **siRNAs**-mediates silencing via post-transcriptional and transcriptional gene silencing, while **miRNAs** -mediate slicing of mRNA and translational repression.

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

In 2006, Andrew Z. Fire and Craig C. Mello were honored by the Nobel prize “for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA”.

Osnova

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

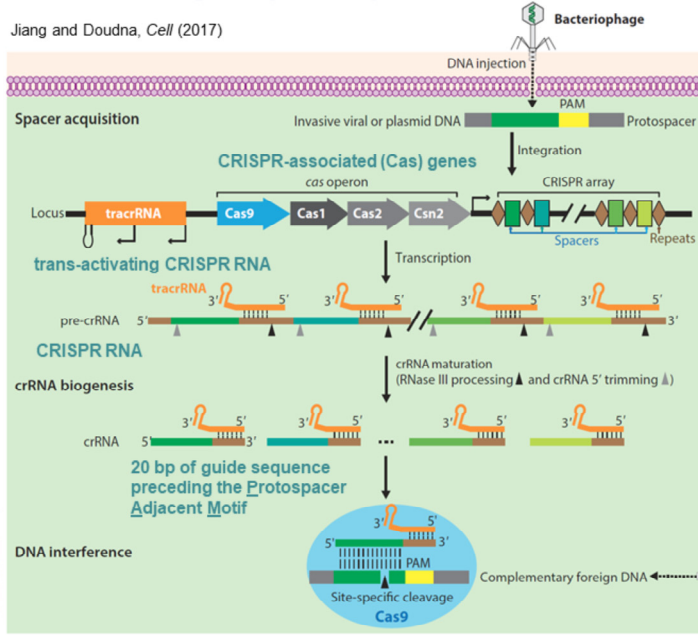


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

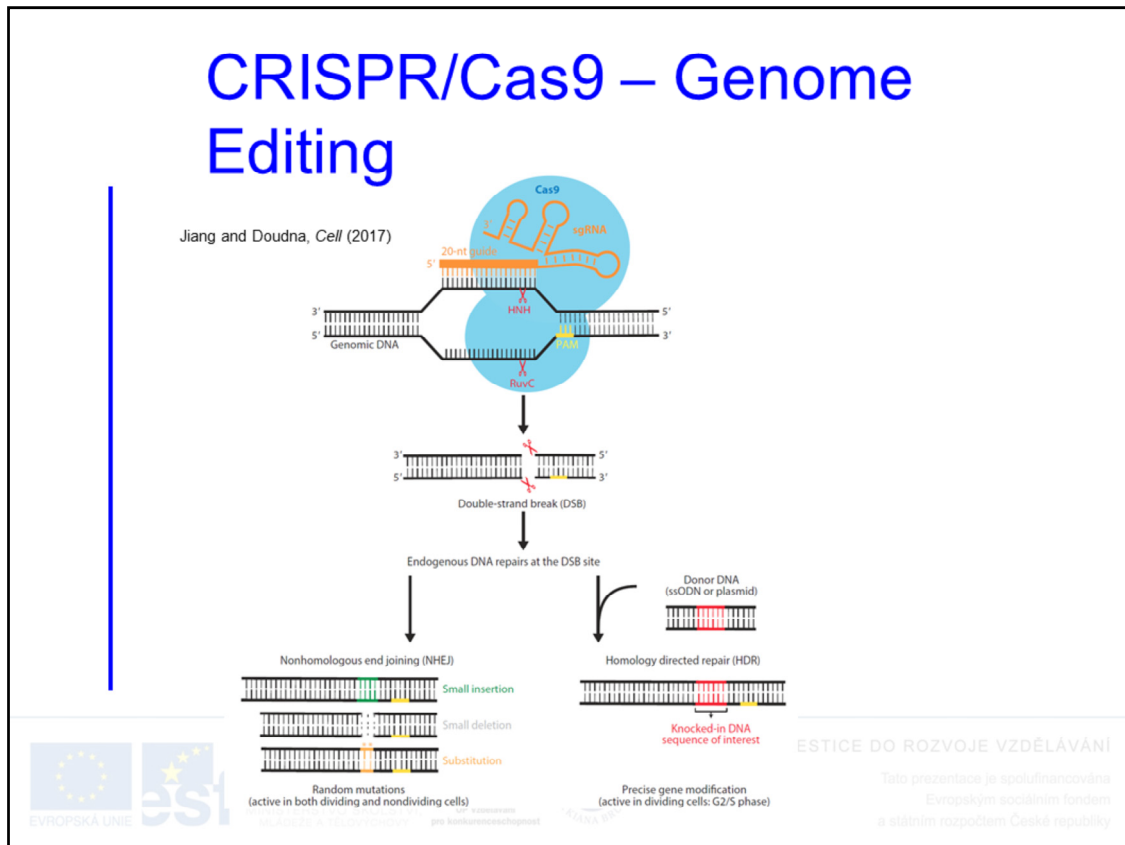
CRISPR/Cas9 - Mechanism

- **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**



CRISPR–Cas9-mediated DNA interference in bacterial adaptive immunity. A typical CRISPR locus in a type II CRISPR–Cas system comprises an array of repetitive sequences (repeats, brown diamonds) interspaced by short stretches of nonrepetitive sequences (spacers, colored boxes), as well as a set of CRISPR-associated (*cas*) genes (colored arrows). Preceding the *cas* operon is the trans-activating CRISPR RNA (*tracrRNA*) gene, which encodes a unique noncoding RNA with homology to the repeat sequences. Upon phage infection, a new spacer (dark green) derived from the invasive genetic elements is incorporated into the CRISPR array by the acquisition machinery (*Cas1*, *Cas2*, and *Csn2*). Once integrated, the new spacer is cotranscribed with all other spacers into a long precursor CRISPR RNA (pre-crRNA) containing repeats (brown lines) and spacers (dark green, blue, light green, and yellow lines). The *tracrRNA* is transcribed separately and then anneals to the pre-crRNA repeats for crRNA maturation by RNase III cleavage. Further trimming of the 5' end of the crRNA (gray arrowheads) by unknown nucleases reduces the length of the guide sequence to 20 nt. During interference, the mature crRNA–*tracrRNA* structure engages *Cas9* endonuclease and further directs it to cleave foreign DNA containing a 20-nt crRNA complementary sequence preceding the PAM sequence. Asterisks denote conserved, key residues for *Cas9*-mediated DNA cleavage activity. Abbreviations: Arg, arginine-rich bridge helix; crRNA, CRISPR RNA; CTD, C-terminal domain; nt, nucleotide; NUC, nuclease lobe; PAM, protospacer adjacent motif; REC, recognition lobe; *tracrRNA*, trans-activating CRISPR RNA.

CRISPR/Cas9 – Genome Editing



The mechanism of CRISPR–Cas9–mediated genome engineering. The synthetic sgRNA or crRNA–tracrRNA structure directs a Cas9 endonuclease to almost arbitrary DNA sequence in the genome through a user-defined 20-nt guide RNA sequence and further guides Cas9 to introduce a double-strand break (DSB) in targeted genomic DNA. The DSB generated by two distinct Cas9 nuclease domains is repaired by host-mediated DNA repair mechanisms. In the absence of a repair template, the prevalent error-prone nonhomologous end joining (NHEJ) pathway is activated and causes random insertions and deletions (indels) or even substitutions at the DSB site, frequently resulting in the disruption of gene function. In the presence of a donor template containing a sequence of interest flanked by homology arms, the error-free homology directed repair (HDR) pathway can be initiated to create desired mutations through homologous recombination, which provides the basis for performing precise gene modification, such as gene knock-in, deletion, correction, or mutagenesis. CRISPR–Cas9 RNA-guided DNA targeting can be uncoupled from cleavage activity by mutating the catalytic residues in the HNH and RuvC nuclease domains, making it a versatile platform for many other applications beyond genome editing. Abbreviations: crRNA, CRISPR RNA; nt, nucleotide; PAM, protospacer adjacent motif; sgRNA, single-guide RNA; tracrRNA, *trans*-activating CRISPR RNA.

CRISPR/Cas9 – Nobel Prize in 20..2x?



Francisco Mojica



Emmanuelle Charpentier



Jenifer Doudna



Martin Jinek

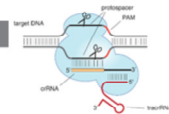
RESEARCH ARTICLE

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

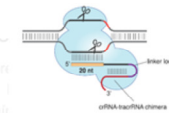
Martin Jinek,^{1,2*} Krzysztof Dyrliko,^{1,2*} Ines Fofana,² Michael Haer,^{2†} Jennifer A. Doudna,^{1,2,3,4} Emmanuelle Charpentier^{1,2}

Jinek et al, *Science* (2012)

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cas9 programmed by single chimeric RNA



EVROPSKA UNIE
esf
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

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 mutanta pomocí transgenu



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Shrnutí

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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