

# CG020 Genomika

## Přednáška 5

### RNA interference a editování genomu

Jan Hejátko

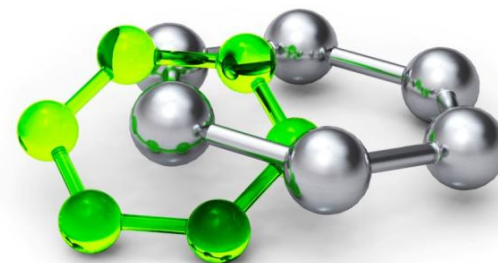
**Funkční genomika a proteomika rostlin,**  
Středoevropský technologický institut (CEITEC)

a

**Národní centrum pro výzkum biomolekul,**  
Přírodovědecká fakulta,

Masarykova univerzita, Brno  
[hejatko@sci.muni.cz](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.eu](http://www.ceitec.eu)

**M U N I**  
**S C I**



# Osnova

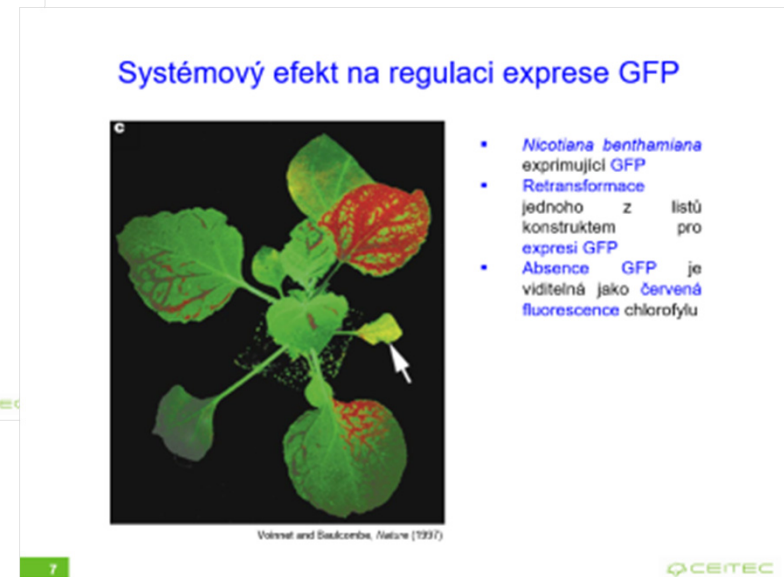
- Umlčování genů pomocí RNA interference
  - Mechanismus RNAi
- Editace genomu
  - Princip editace genomu prostřednictvím místně specifických nukleáz (Site Directed Nucleases, SDNs)
  - Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)
  - Transcription Activator-Like Effectors (TALENs)
  - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9)

# Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
  - Mechanismus RNAi

# RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
  - RNAi objevena u rostlin, později u *Coenorhabditis elegans*
    - U rostlin identifikována jako „sense effect“ v systémové negativní regulaci genové aktivity



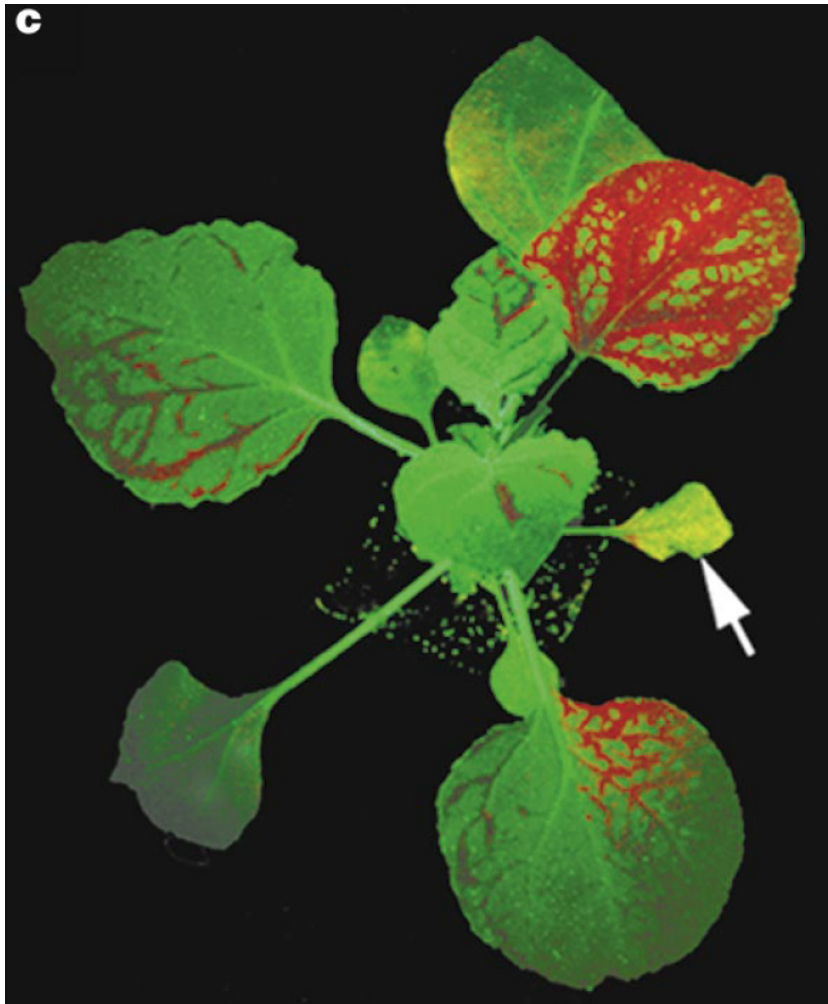
# Umlčování exprese vnesením další kopie genu pro biosyntézu flavonoidů

p35S::DFR



van der Krol et al., *Plant Cell* (1990)

# Systemový efekt na regulaci exprese GFP

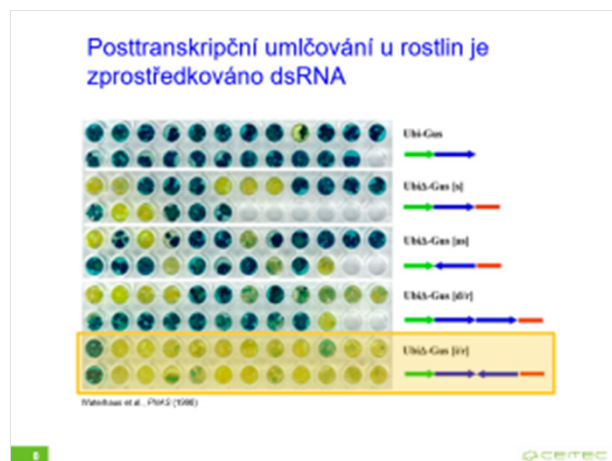


Voinnet and Baulcombe, *Nature* (1997)

- *Nicotiana benthamiana* exprimující GFP
- Retransformace jednoho z listů konstruktem pro expresi GFP
- Absence GFP je viditelná jako červená fluorescence chlorofylu

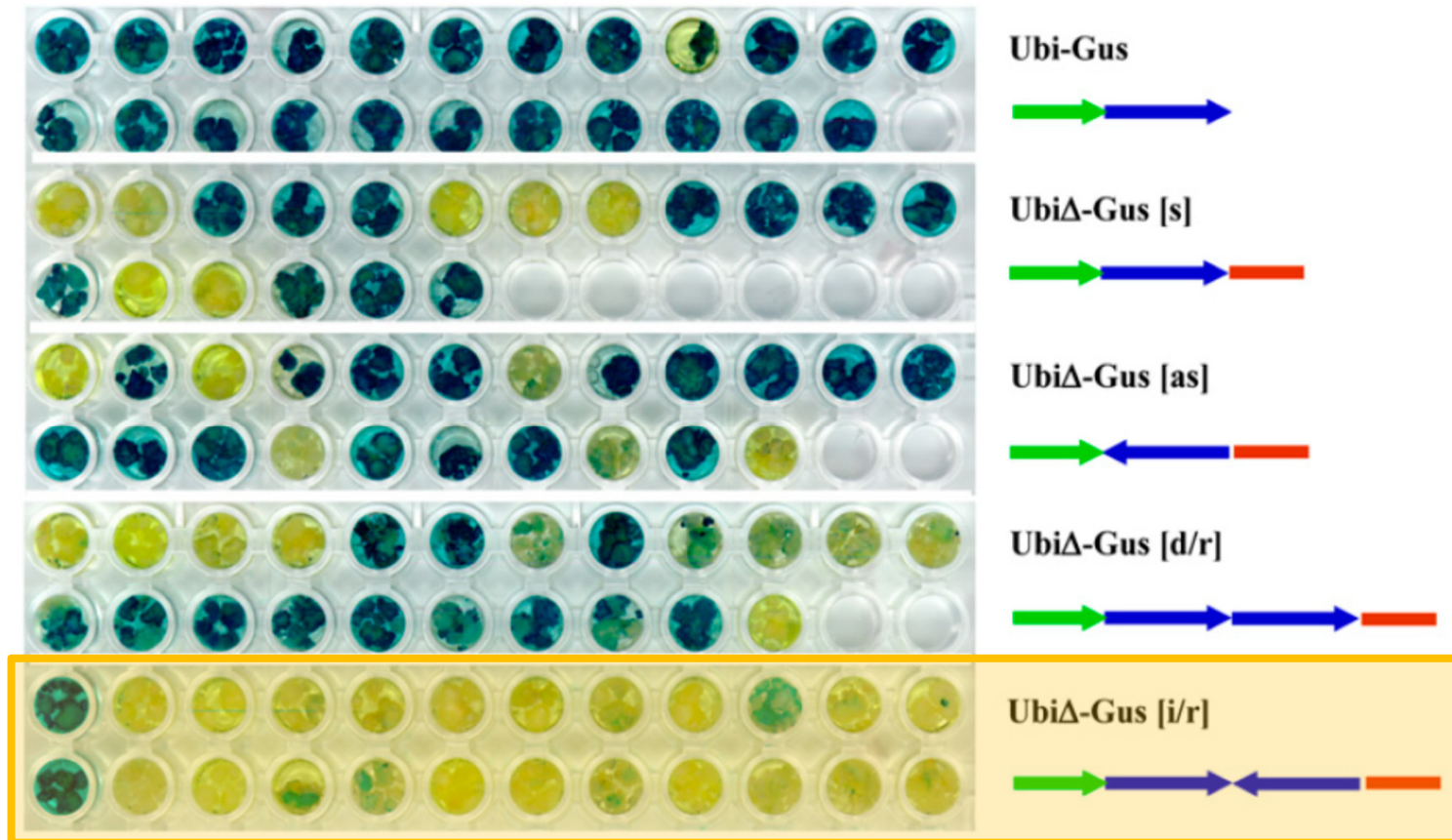
# RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
  - RNAi objevena u rostlin a později u *Coenorhabditis elegans*
    - U rostlin identifikována jako „sense effect“ v **systemové negativní regulaci** genové aktivity
    - umlčování bylo indukováno jak **sense** tak **antisense** RNA (pravd. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
    - **dsRNA** indukovala **umlčování cca 10-100x účinněji**





# Posttranskripční umlčování u rostlin je zprostředkováváno dsRNA



Waterhaus et al., *PNAS* (1998)

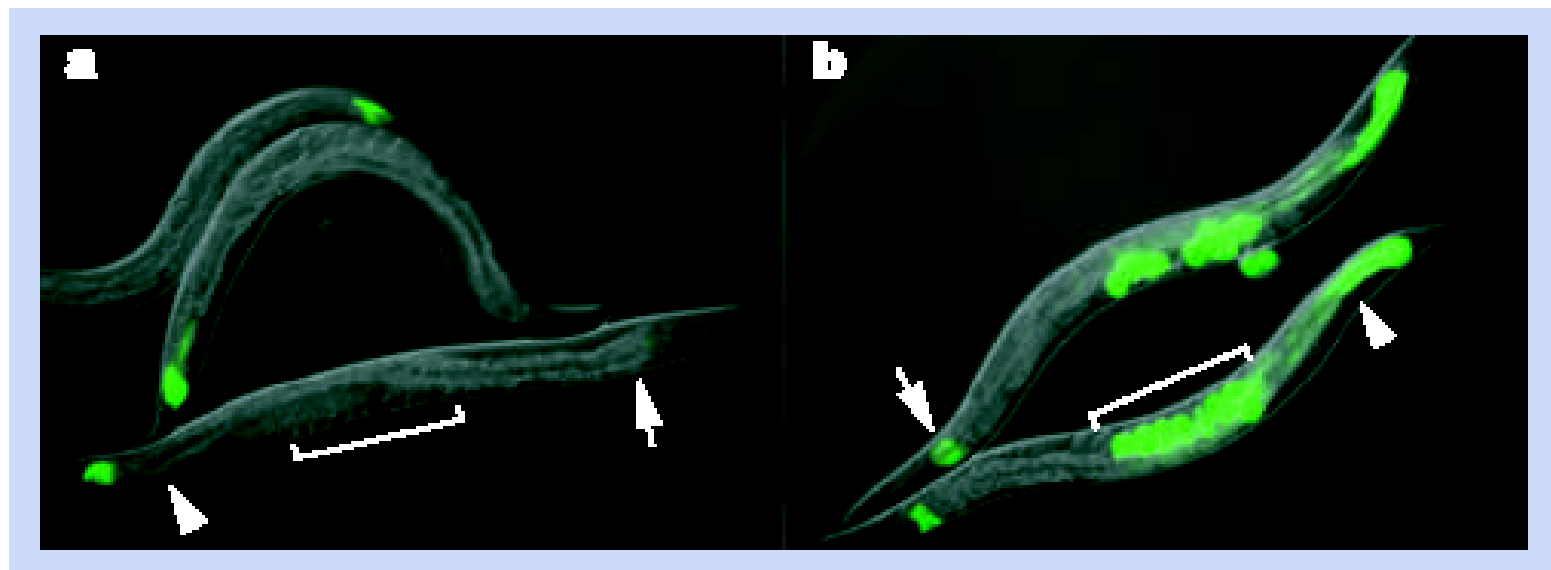


# RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
  - Umlčování genové exprese prostřednictvím dsRNA je závislé na vlastních genech
  - vyhledávání pomocí přímé genetiky

*RNAi*

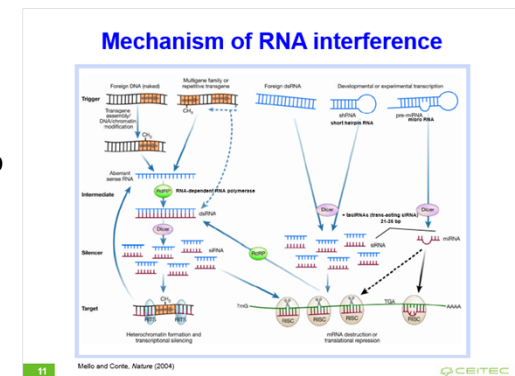
*rna1*



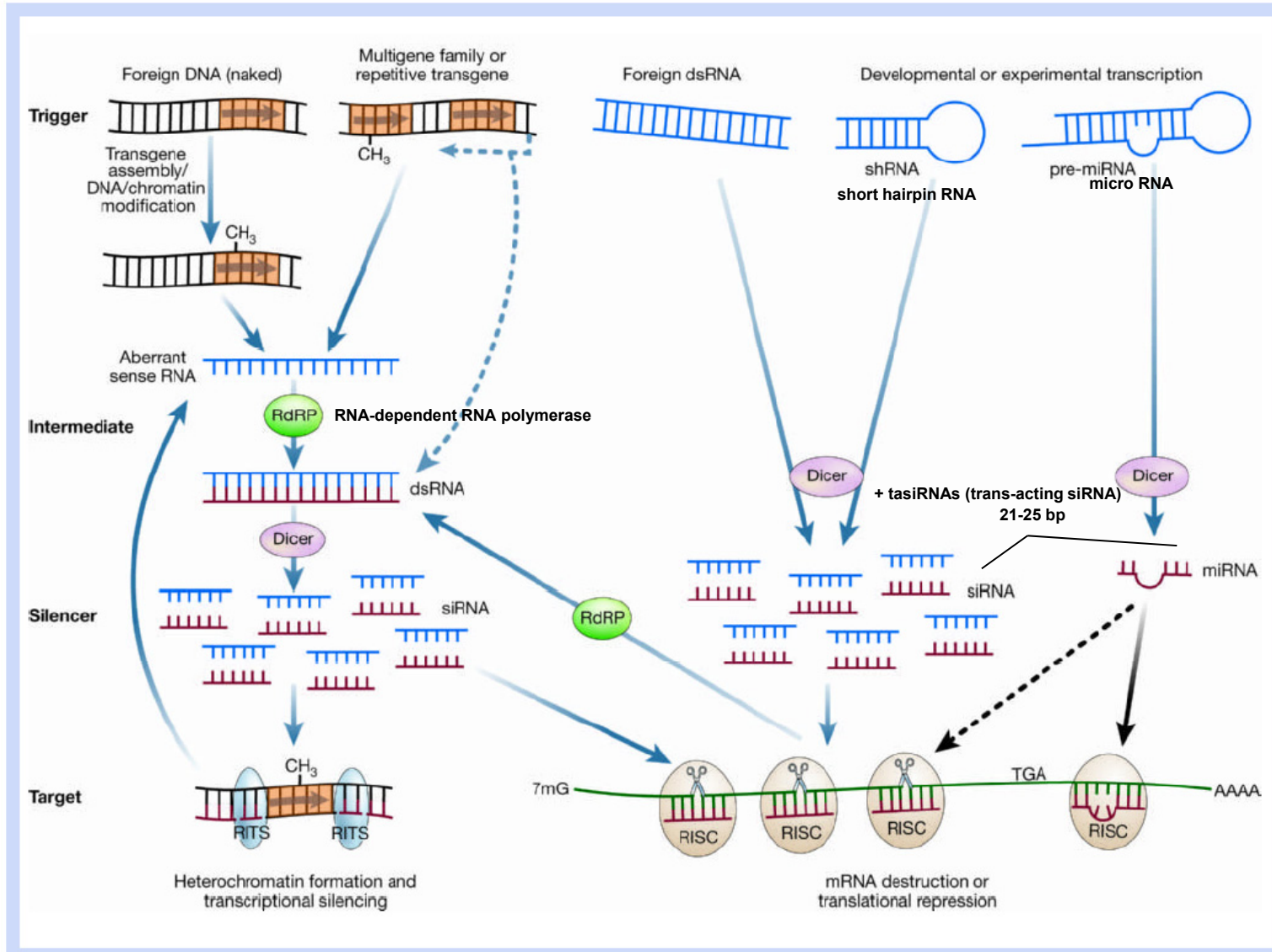
Mello and Conte, *Nature* (2004)

# RNA interference

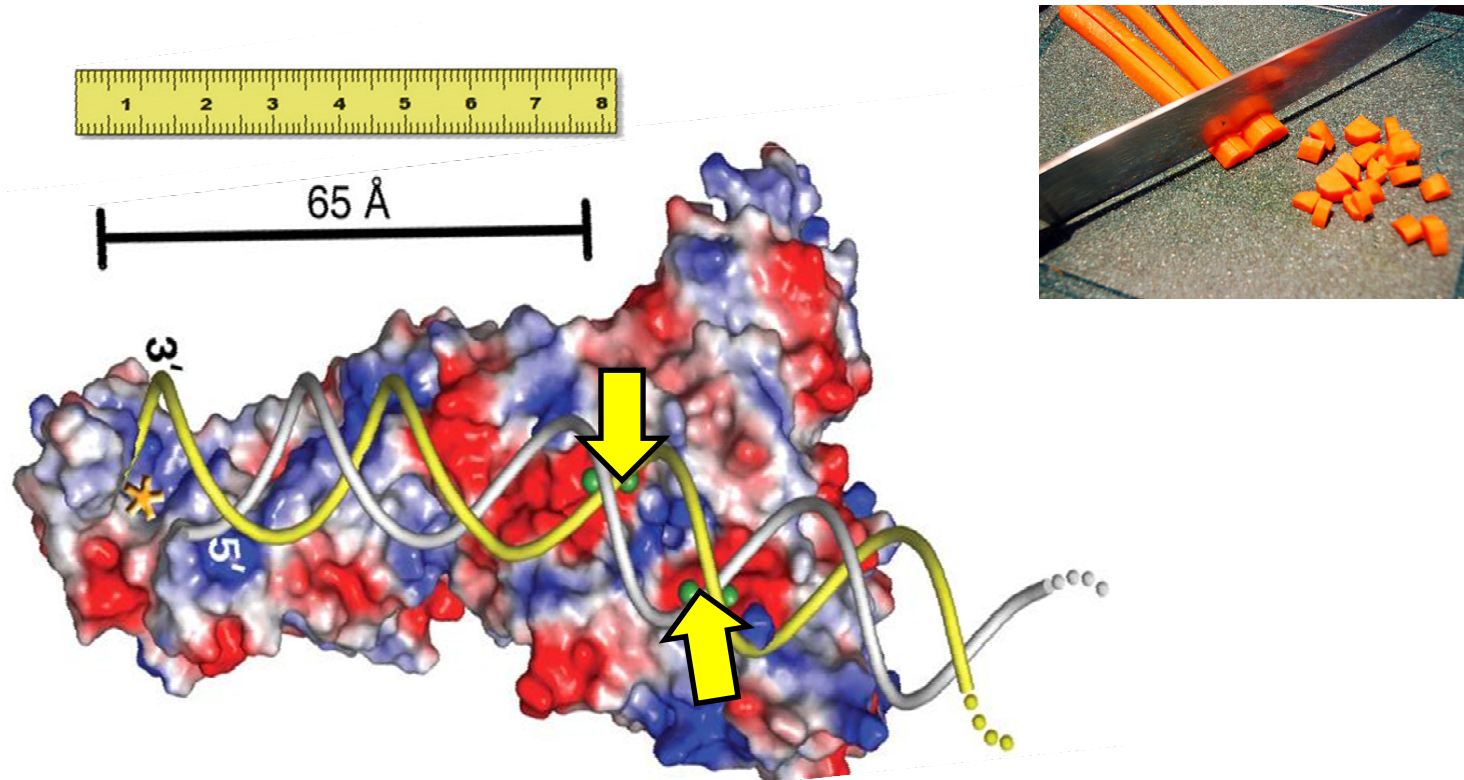
- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
  - je to **přírozený mechanismus** regulace genové exprese u všech eukaryot
  - podstatou je **tvorba dsRNA**, která může být spuštěna několika způsoby:
    - přítomnost **cizí „aberantní“ DNA**
    - **specifické transgeny** obsahující **obrácené repetice** částí cDNA
    - transkripce vlastních genů pro **shRNA** (short hairpin RNA) nebo **miRNA** (micro RNA, endogenní „vlásečková“ 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

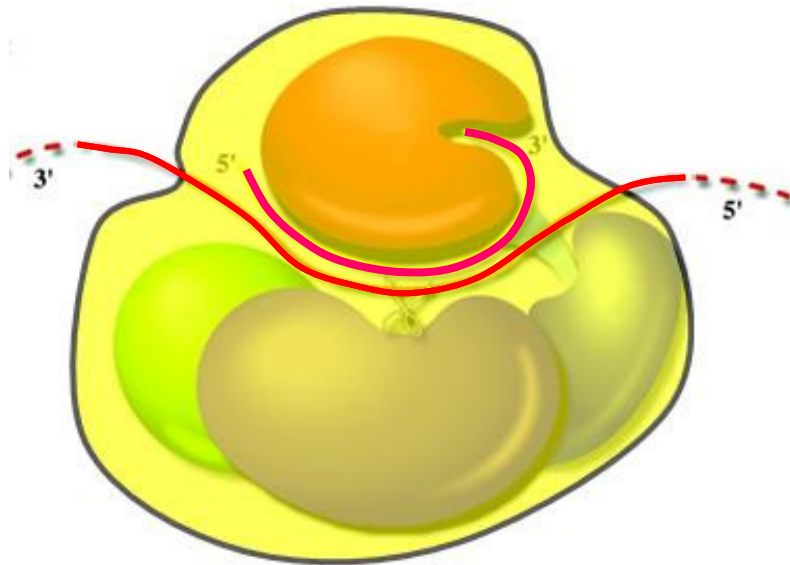


# Dicer and Dicer-like proteins

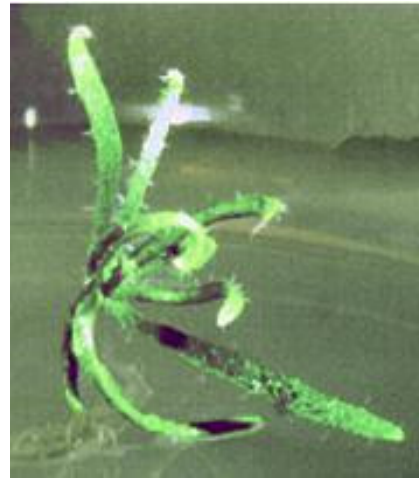


From MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: [195-198](#). Reprinted with permission from AAAS. Photo credit: [Heidi](#)

# Argonaute proteins



*ago1*



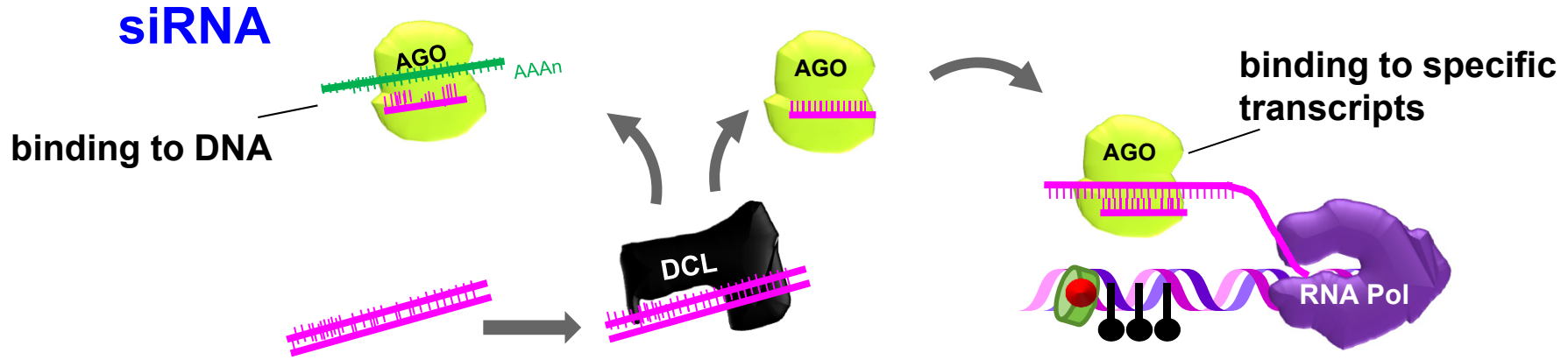
*Argonauta argo*  
argonaut pelagický



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.

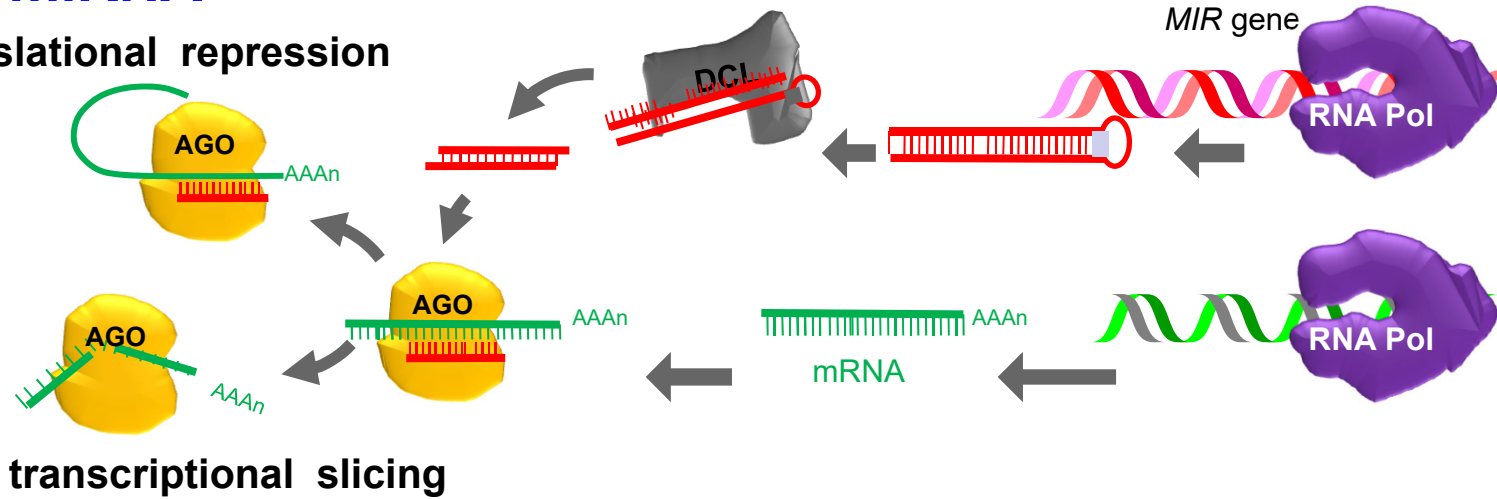
**transcriptional gene silencing**

**post-transcriptional gene silencing**



**miRNA**

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

# The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



**Andrew Z. Fire**

USA



**Craig C. Mello**

USA



**David Baulcombe**

UK

## CORRESPONDENCE

NATURE|Vol 443|26 October 2006

### RNAi Nobel ignores vital groundwork on plants

SIR — The Nobel prize, by recognizing the individuals behind breakthroughs, inspires all scientists to do great science. The discovery of RNA interference (RNAi) changed the face of gene regulation, a feat deservedly recognized with this year's Nobel Prize in Physiology or Medicine<sup>1</sup>.

As undergraduates, we witnessed with great excitement the discovery of gene silencing. At that time, almost all research in that area was being conducted by plant

values at the centre of the prize and is sending a discouraging message, especially to young researchers.

**Marc Bots\***, **Spencer Maughan†**,  
**Jeroen Nieuwland†**

\*Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology,  
Technologiepark 927, BE-9052 Gent, Belgium

†Institute of Biotechnology, University of  
Cambridge, Cambridge CB2 1QT, UK

1. *Nature* **443**, 488 (2006).
2. Baulcombe, D. C. *Plant Mol. Biol.* **32**, 79–88 (1996).
3. Van der Krol, A. R. et al. *Plant Cell* **2**, 291–299 (1990).
4. Voimmet, O. & Baulcombe, D. C. *Nature* **389**, 553 (1997).
5. Metzlaiff, M., O'Dell, M., Cluster, P. D. & Flavell, R. B. *Cell* **88**, 845–854 (1997).

will not do so in the future. We believe that Iranian scientists can and will respond appropriately to the country's needs.

**Kamran B. Lankarani**  
Ministry of Health and Medical Education  
of I. R. Iran, Tehran, I. R. Iran

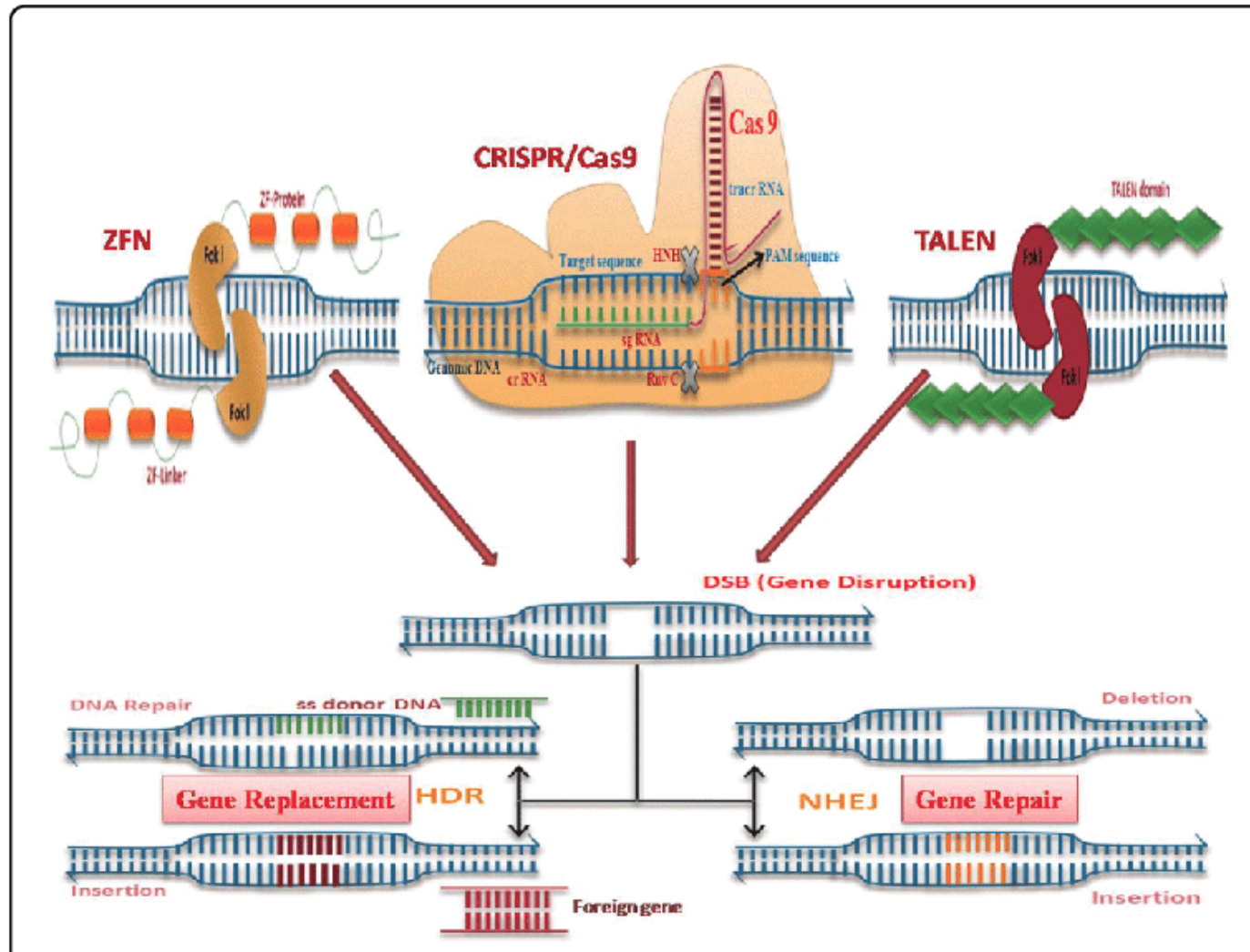
### Iran: productivity is not simple to evaluate

SIR — Eran Meshorer, in Correspondence ("Iran is sixth, not second, in Middle East publication list" *Nature* **443**, 271; 2006), states:

# Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
  - Mechanismus RNAi
- Editace genomu
  - Princip editace genomu prostřednictvím místně specifických nukleáz (Site Directed Nucleases, SDNs)

# Editace genomu pomocí SDNs

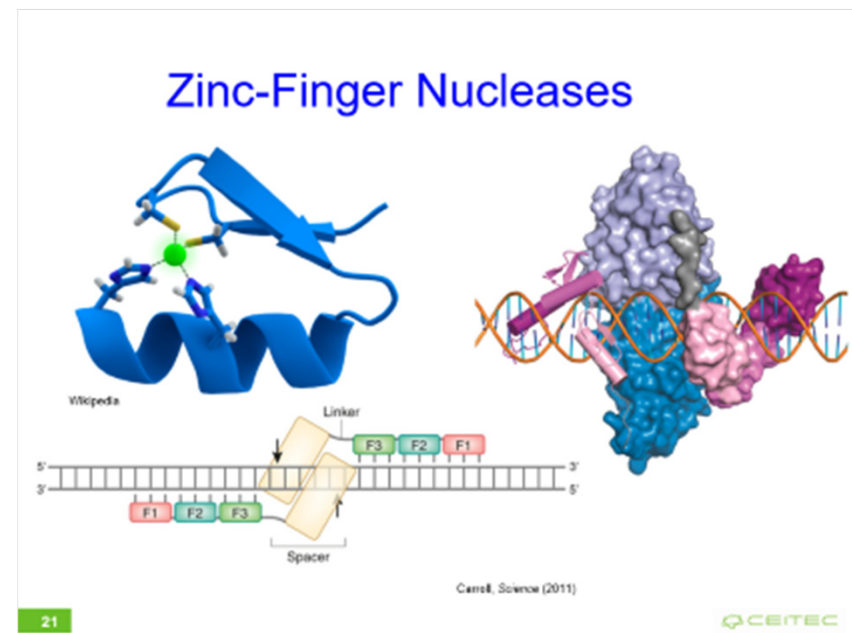


# Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
  - Mechanismus RNAi
- Editace genomu
  - Princip editace genomu prostřednictvím místně specifických nukleáz (Site Directed Nucleases, SDNs)
  - Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)

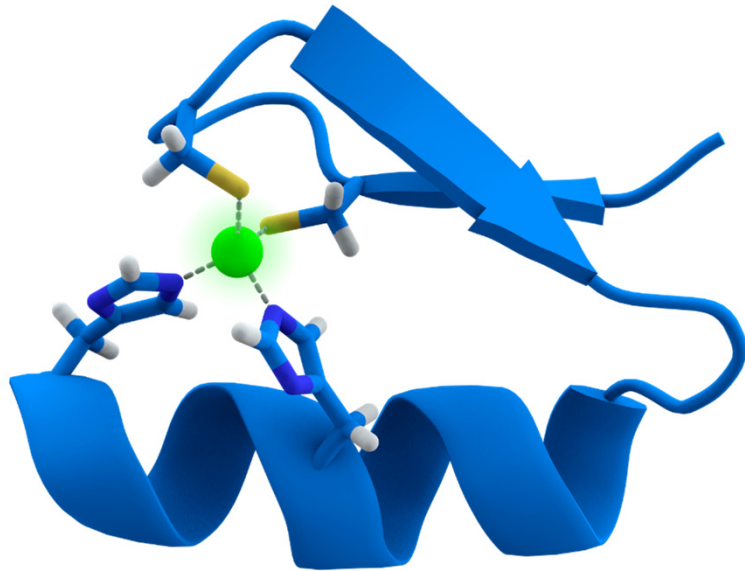
# Zinc-Finger Nucleases - ZFNs

- **Místně specifické endonukleázy, schopné rozpoznat cílovou sekvenci prostřednictvím sady „zinkových prstů“**
  - Každý zinkový „prst“ je schopen rozpoznat nukleotidový triplet
  - Nukleázová doména funguje jako heterodimer – možnost zvýšení specifity navržením sady „prstů“ rozpoznávajících 9 bp z každé strany cílové sekvence
- **Nevýhody**
  - Špatně se „programuje“
  - Omezená specifita

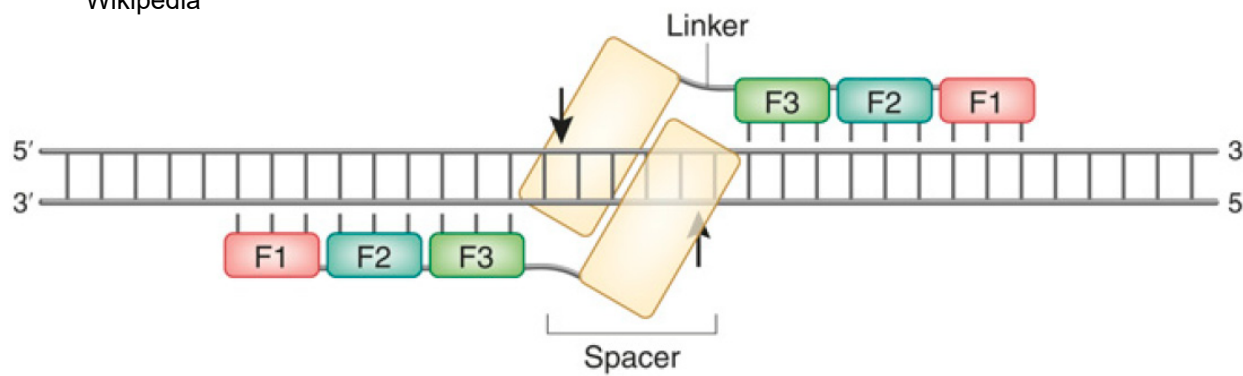
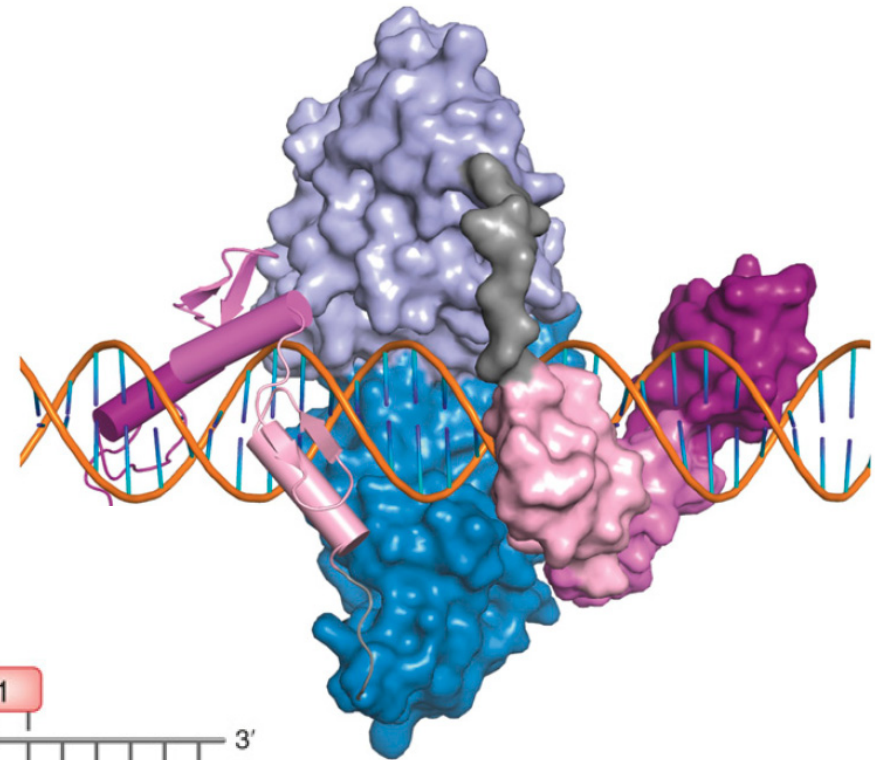




# Zinc-Finger Nucleases



Wikipedia



Carroll, *Science* (2011)

# Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
  - Mechanismus RNAi
- Editace genomu
  - Princip editace genomu prostřednictvím místně specifických nukleáz (Site Directed Nucleases, SDNs)
  - Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)
  - Transcription Activator-Like Effectors (TALENs)

# Transcription Activator-Like Effectors - TALENs

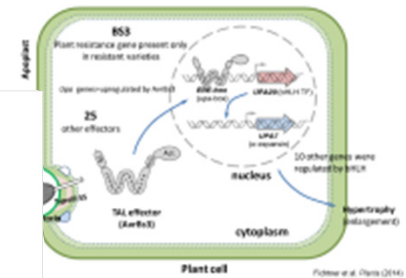
- Proteiny odvozené od sekvence specifických transkripčních aktivátorů

- Identifikovány (zatím pouze) u rostlinných patogenních bakterií *Xanthomonas sp.* jako bakteriální efekty, schopné regulovat transkripci cílových genů rostlin
- Sekvenční specifita určena aminokyselinovou sekvencí DNA vazebných repetit
- Lze využít k různým typům modifikací

- Nevýhody**

- Špatně se „programuje“
- Omezená specifita

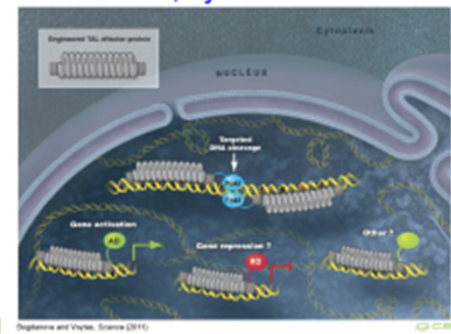
TALENs, původ



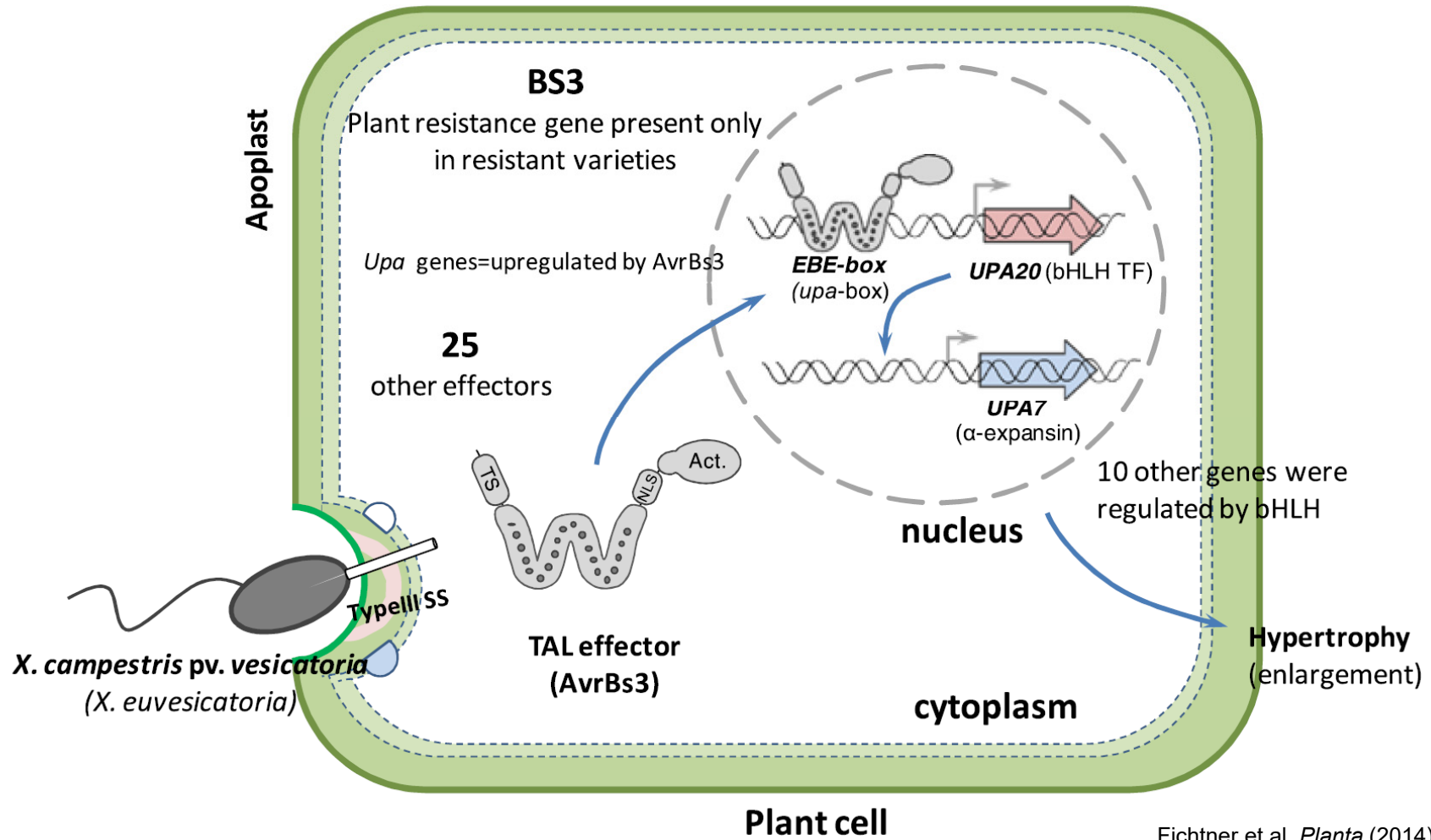
TALENs, určení specifity



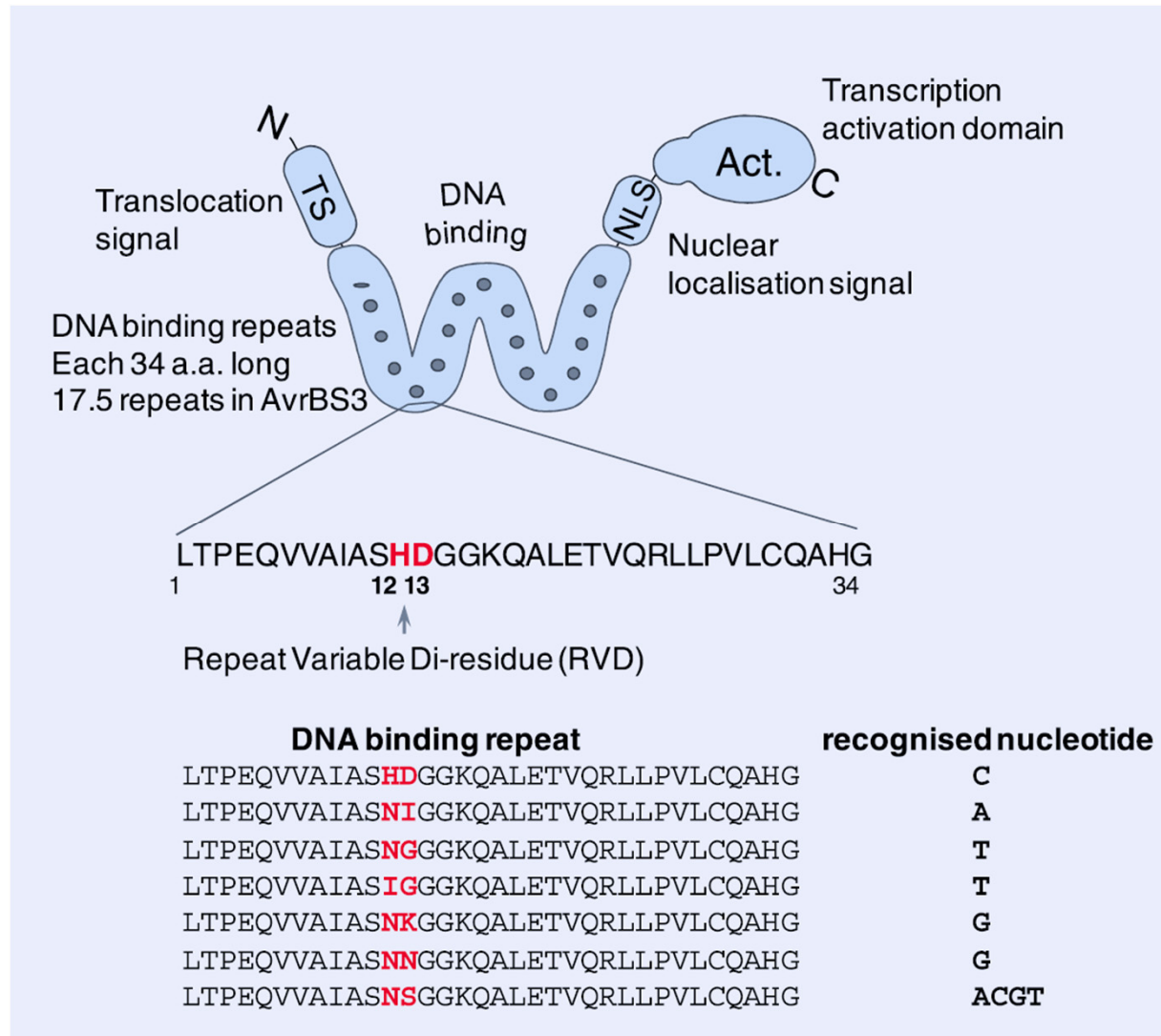
TALENs, využití



# TALENs, původ



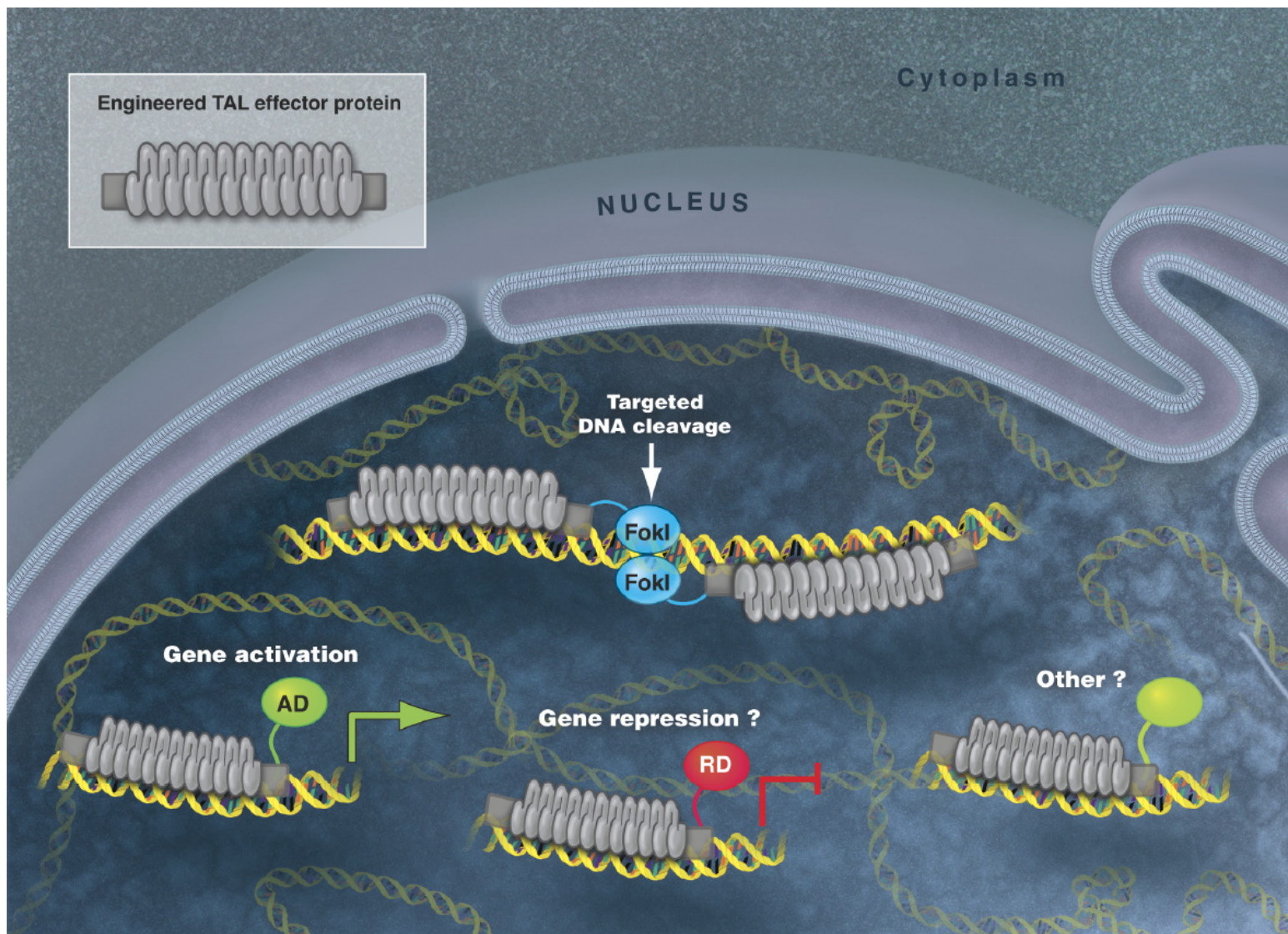
# TALENs, určení specifity



Fichtner et al. *Planta* (2014)



# TALENs, využití



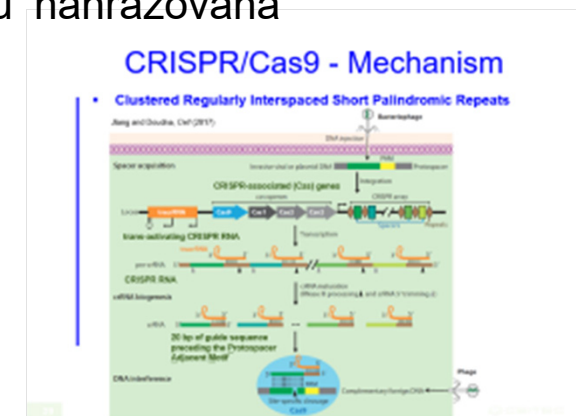


# Osnova

- Umlčování genů pomocí RNA interference
  - Mechanismus RNAi
- Editace genomu
  - Princip editace genomu prostřednictvím místně specifických nukleáz (Site Directed Nucleases, SDNs)
  - Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)
  - Transcription Activator-Like Effectors (TALENs)
  - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9)

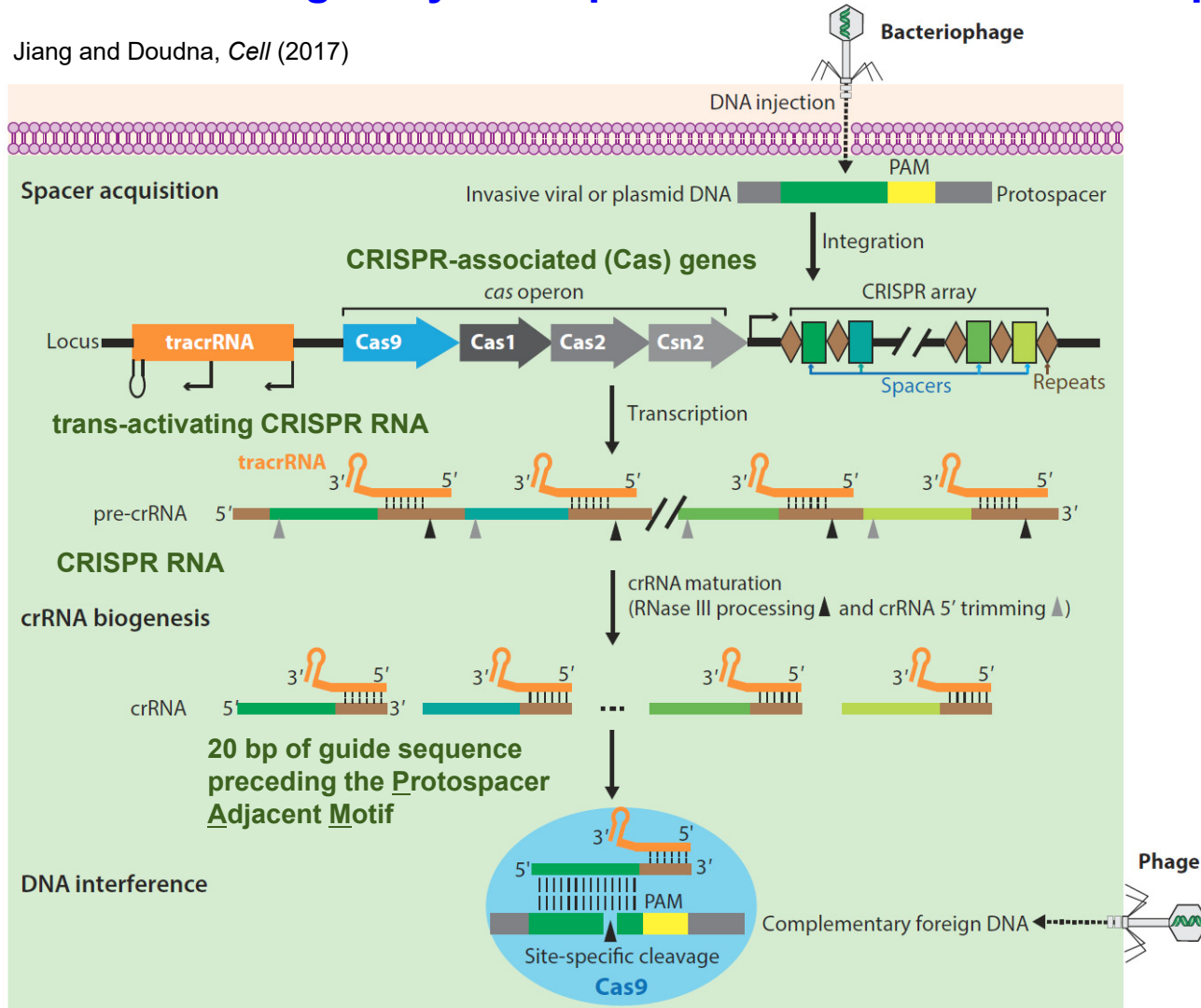
# Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 - CRISPR/Cas9

- **Objevena jako součást imunitního systému bakterií**
  - Principem je cílené začlenění cizorodé DNA (typicky fágové DNA) do specifických oblastí genomu bakterií
  - Po přepisu genů pro trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) a oblasti se začleněnými částmi cizorodé DNA a následném procesování vzniklé RNA dojde k tvorbě komplexu crRNA–tracrRNA
  - crRNA–tracrRNA váže Cas9 nukleázu a navádí ji na komplementární (cizorodou/fágovou) DNA, kterou pak Cas9 štěpí
  - crRNA–tracrRNA je v cíleném editování genomu nahrazována single guide RNA (sgRNA nebo také gRNA)
- **Výhody**
  - Snadno se „programuje“
  - Značná specifita
  - Možná celá řada dalších aplikací



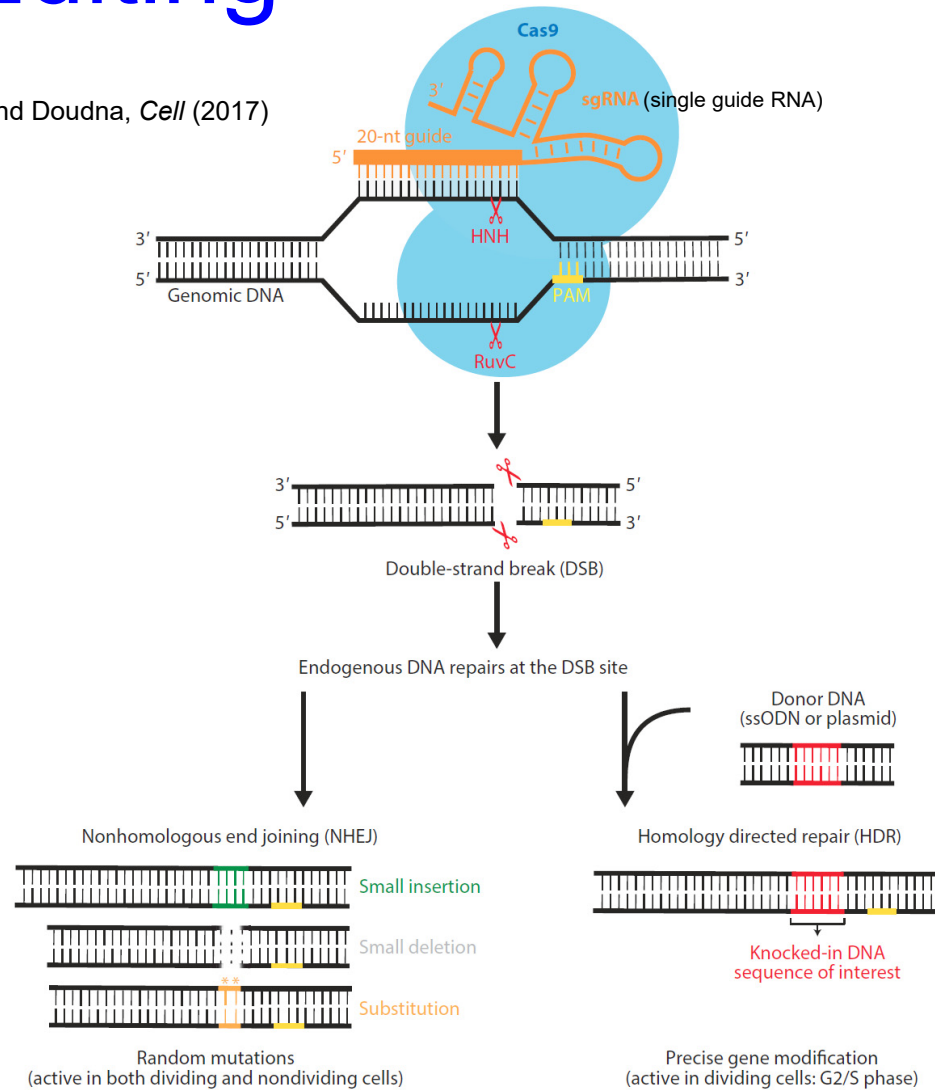
# CRISPR/Cas9 - Mechanism

- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



# CRISPR/Cas9 – Genome Editing

Jiang and Doudna, *Cell* (2017)



# CRISPR/Cas9 – Nobel Prize in 2020!



Francisco Mojica



Emmanuelle Charpentier



Jenifer Doudna



Martin Jinek

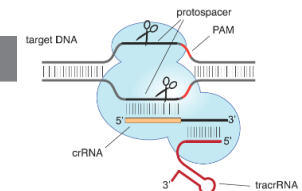
## RESEARCH ARTICLE

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

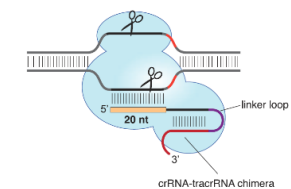
Martin Jinek,<sup>1,2\*</sup> Krzysztof Chylinski,<sup>3,4\*</sup> Ines Fonfara,<sup>4</sup> Michael Hauer,<sup>2,†</sup> Jennifer A. Doudna,<sup>1,2,5,6,‡</sup> Emmanuelle Charpentier<sup>4,‡</sup>

Jinek et al, *Science* (2012)

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cas9 programmed by single chimeric RNA



# Základní koncepty

- RNAi
  - Přirozený způsob regulace genové exprese, vyžadující vlastní geny a vysvětlující přítomnost velkého množství DNA nekódující proteiny
  - Možno využít pro cílenou regulaci genové exprese
- Editování genomu
  - Sekvenčně-specifické modifikace genomu s velkou přesností
  - Umožňuje jak vznik náhodných mutací v daném lokusu, tak
  - Cílené vkládání definovaných sekvencí – ideální nástroj pro cílené modifikace genomu včetně genové terapie
  - CRISPR/Cas9 otevřel cestu snadné, rychlé a zejména přesné editaci genomu a dalším odvozeným modifikacím s velkým aplikačním potenciálem



# Diskuse