

Podzim 2015, Kurz pro středoškolské učitele

# Nové metody molekulární biologie

Petr Beneš  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta MU



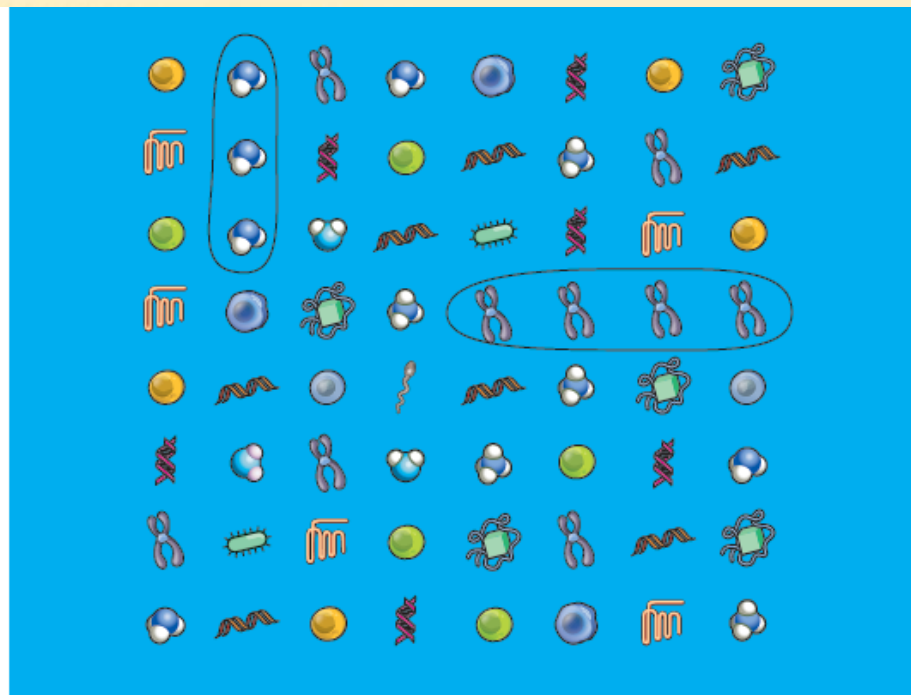
# High-throughput methods

---

- zvýšení rychlosti
- zvýšení počtu analyzovaných vzorků
- zlevnění analýzy na jeden vzorek
- miniaturizace (nano, piko ...)
- automatizace (robotizace)

„large scale biology“ - Genome, Proteome, Transcriptome,  
Interactome, Metabolome, Epigenome ...

**Systemová biologie** - studium komplexních interakcí v  
biologických systémech



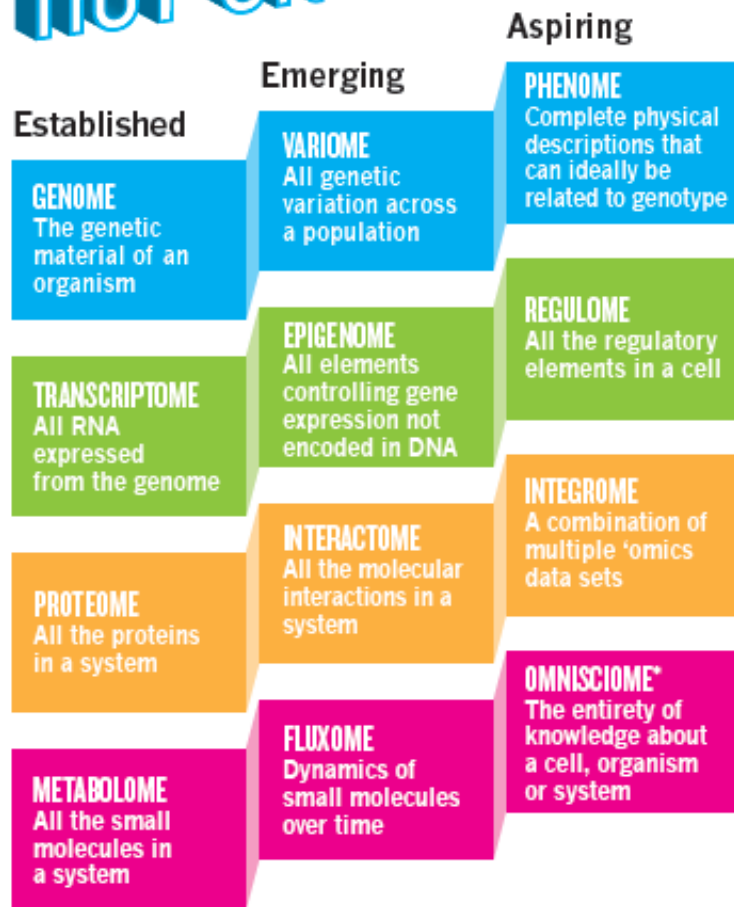
# THE 'OMES PUZZLE

Where once there was the genome,  
now there are thousands of 'omes.  
*Nature* goes in search of the  
ones that matter.

BY MONYA BAKER

**O**mic bashing is in fashion. In the past year, *The New York Times* and *The Wall Street Journal* have run pieces poking fun at the proliferation of scientific words ending in -ome, which now number in the thousands. One scientist has created a bad-omics generator, which randomly adds the suffix to a list of biological terms and generates eerily plausible titles for scientific papers (example: 'Sequencing the bacteriostaticome reveals insights into evolution and the environment'). Jonathan Eisen, a microbiologist at the University of California, Davis, regularly announces awards for unnecessary additions to the scientific vocabulary on his blog (recent winner: CircadiOmics, for genes involved in daily circadian rhythms).

## HOT OR NOT



\**Nature's* proposed addition to the scientific nomenclature.

“BY VIRTUE OF  
THAT SUFFIX,  
YOU ARE SAYING  
THAT YOU ARE  
PART OF A BRAND  
NEW EXCITING  
SCIENCE.”

# THE GOOD, THE BAD AND THE UGLY

Does your 'ome  
meet the criteria?

## GOODOME

**Encapsulates a new focus**  
(Interactome: all interactions  
between biomolecules)

**Refers to a comprehensive  
collection** (Transcriptome:  
everything transcribed from  
DNA to RNA)

**Easy to say** (Phenome:  
comprehensive physical  
characteristics of an  
organism)

**Easy to understand**  
(Lipidome: all an organism's  
fatty molecules)

## BADOME

**Renames existing field**  
(Nutriome: study of  
nutrients)

**Limited in scope**  
(Museome: sequenced DNA  
from objects in museum  
archives)

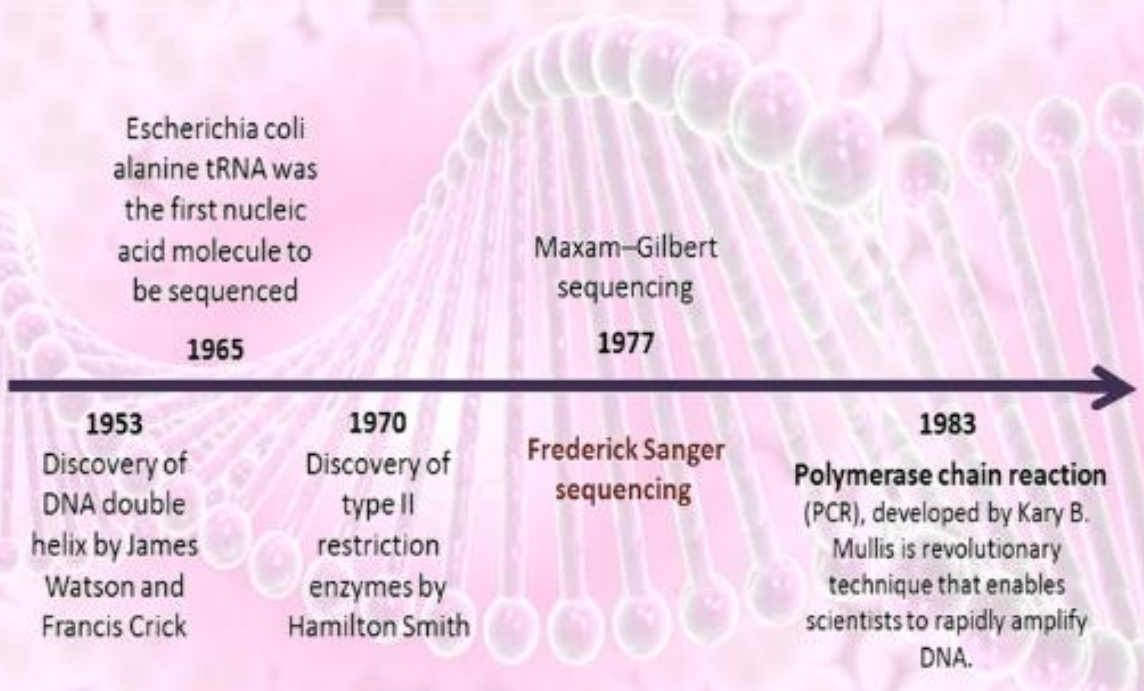
**Unpronounceable**  
(tRNome: collection of  
transfer RNAs)

**Obscure**  
(Predatasome: genes used  
by predatory proteobacteria  
while invading other bacteria)

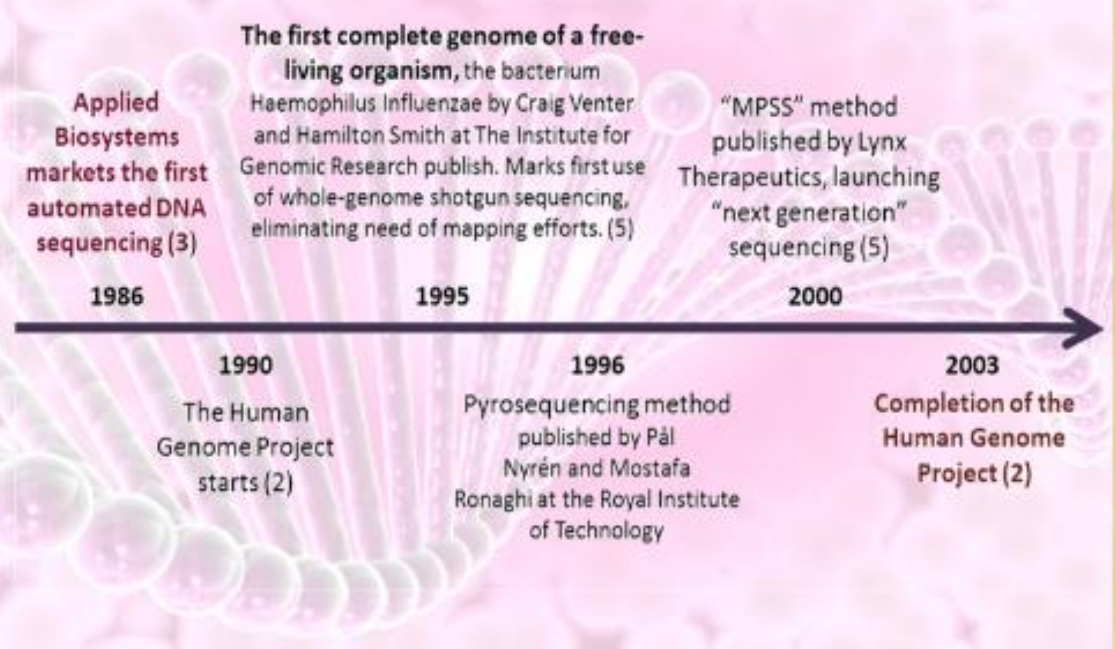
---

# Genomika

# Genomika



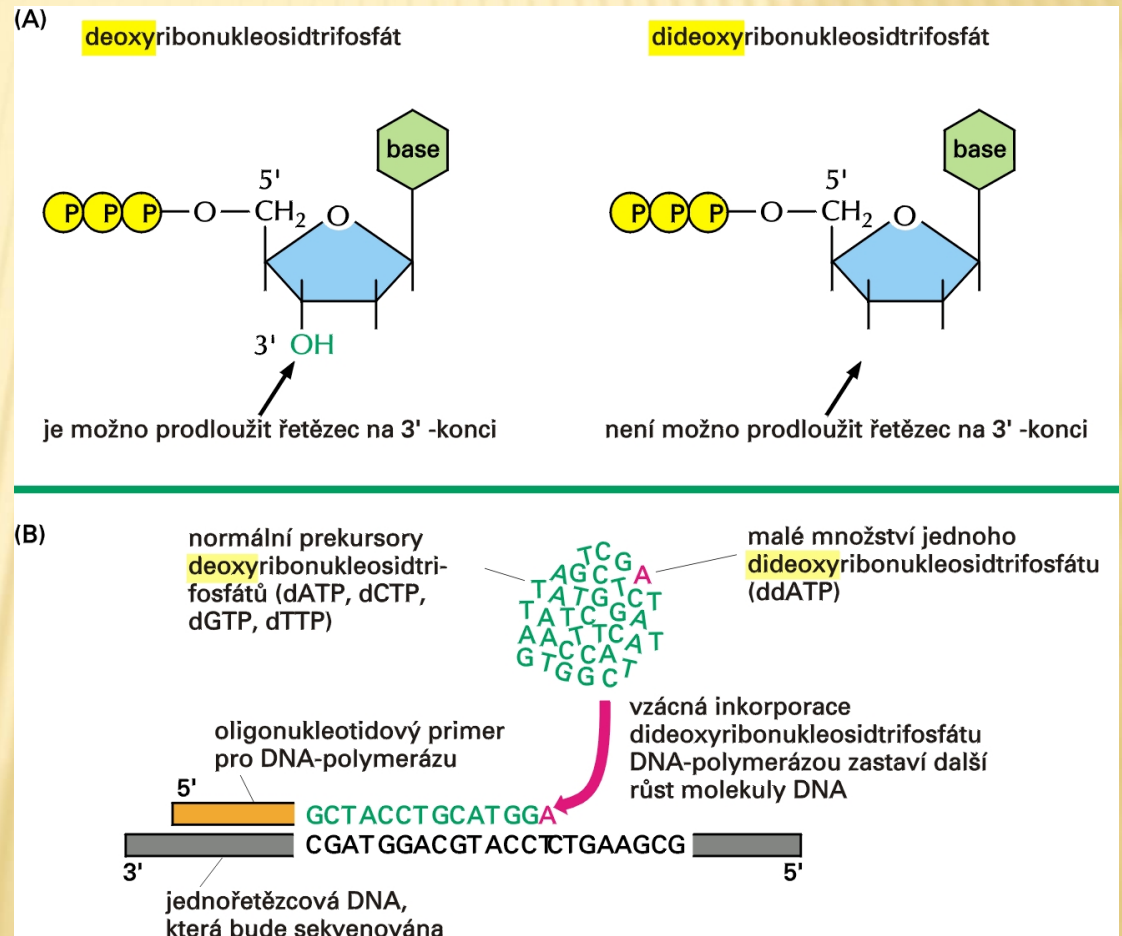
# historie



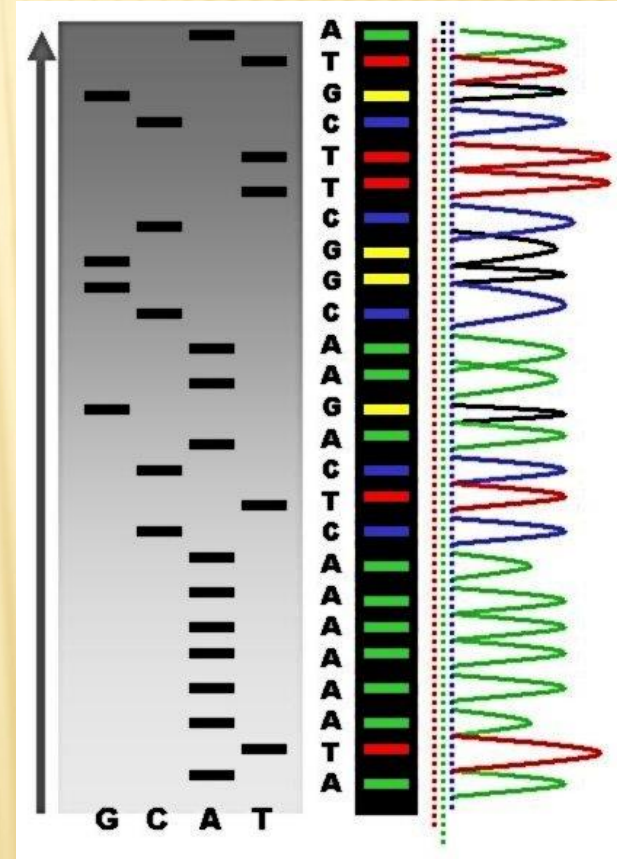
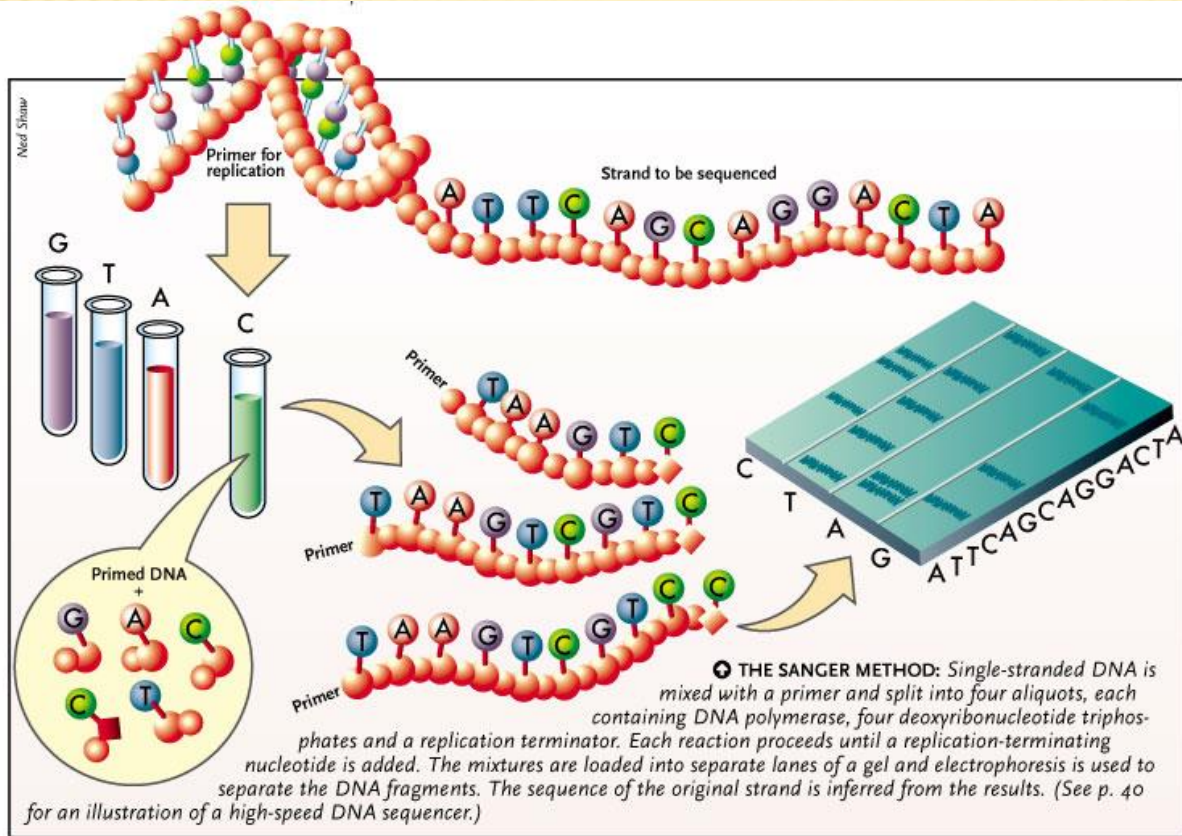
# Genomika - sekvenování

→ stanovení primární struktury DNA (pořadí bází)

## Sangerova metoda

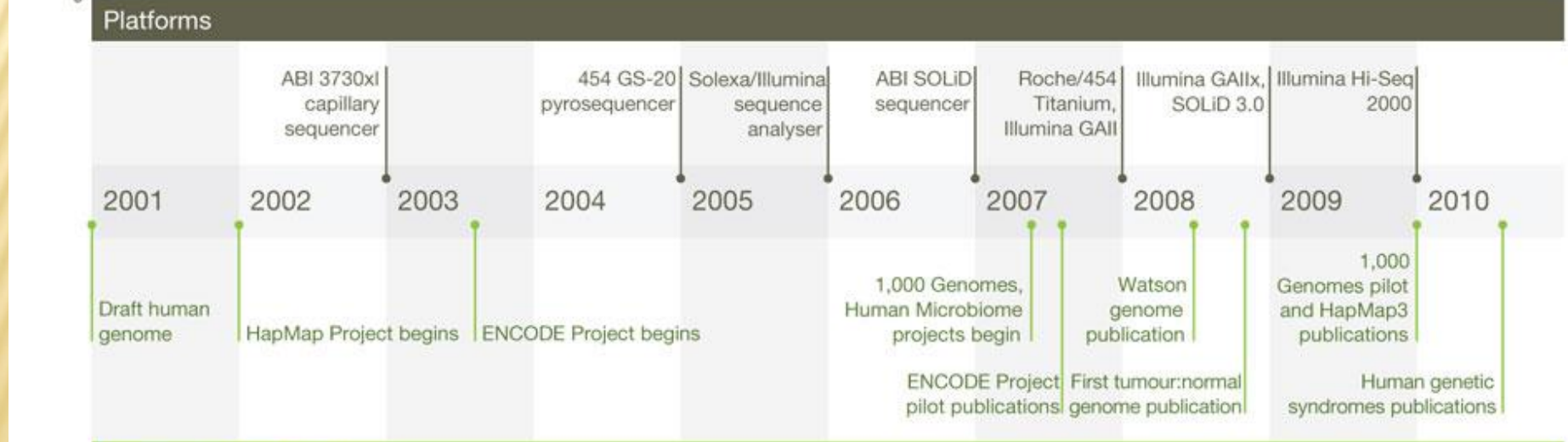
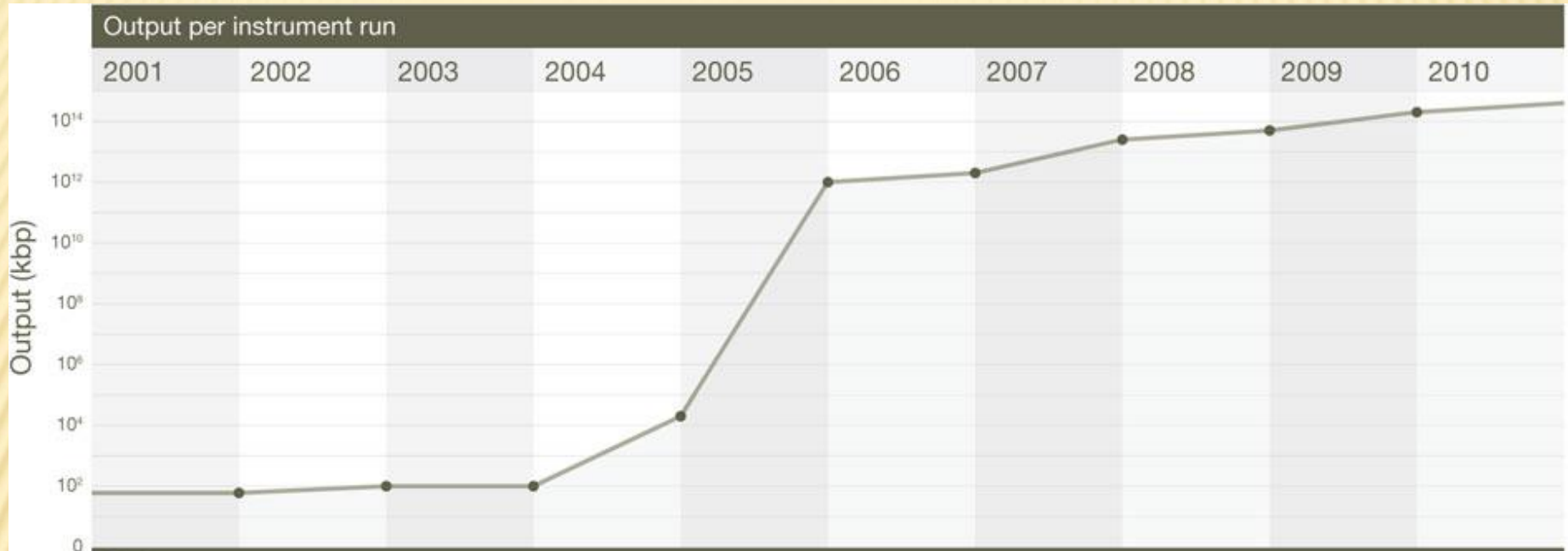


# Sangerova metoda sekvenování



- Automatické sekvenování - v 1 zkumavce - různě značené ddNTP



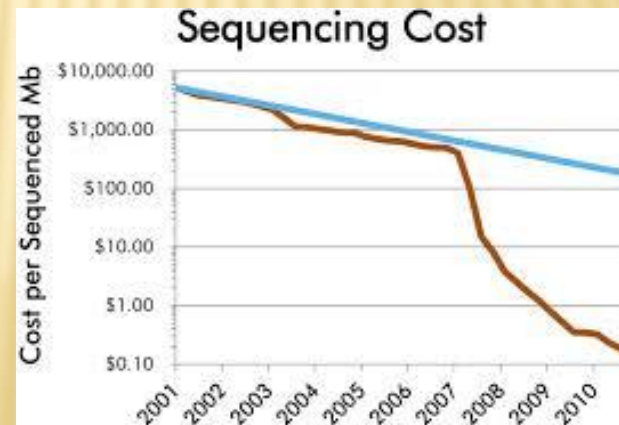
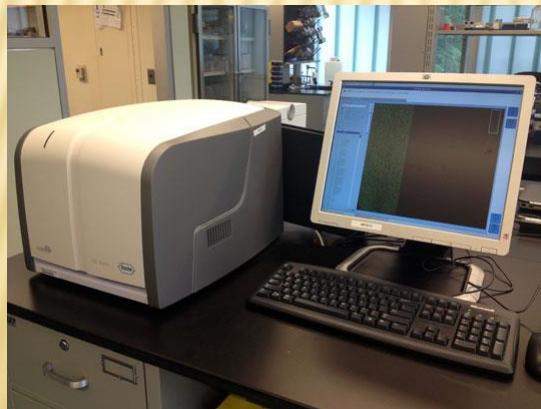


# Genomika - sekvenování nové generace

**Table 1**

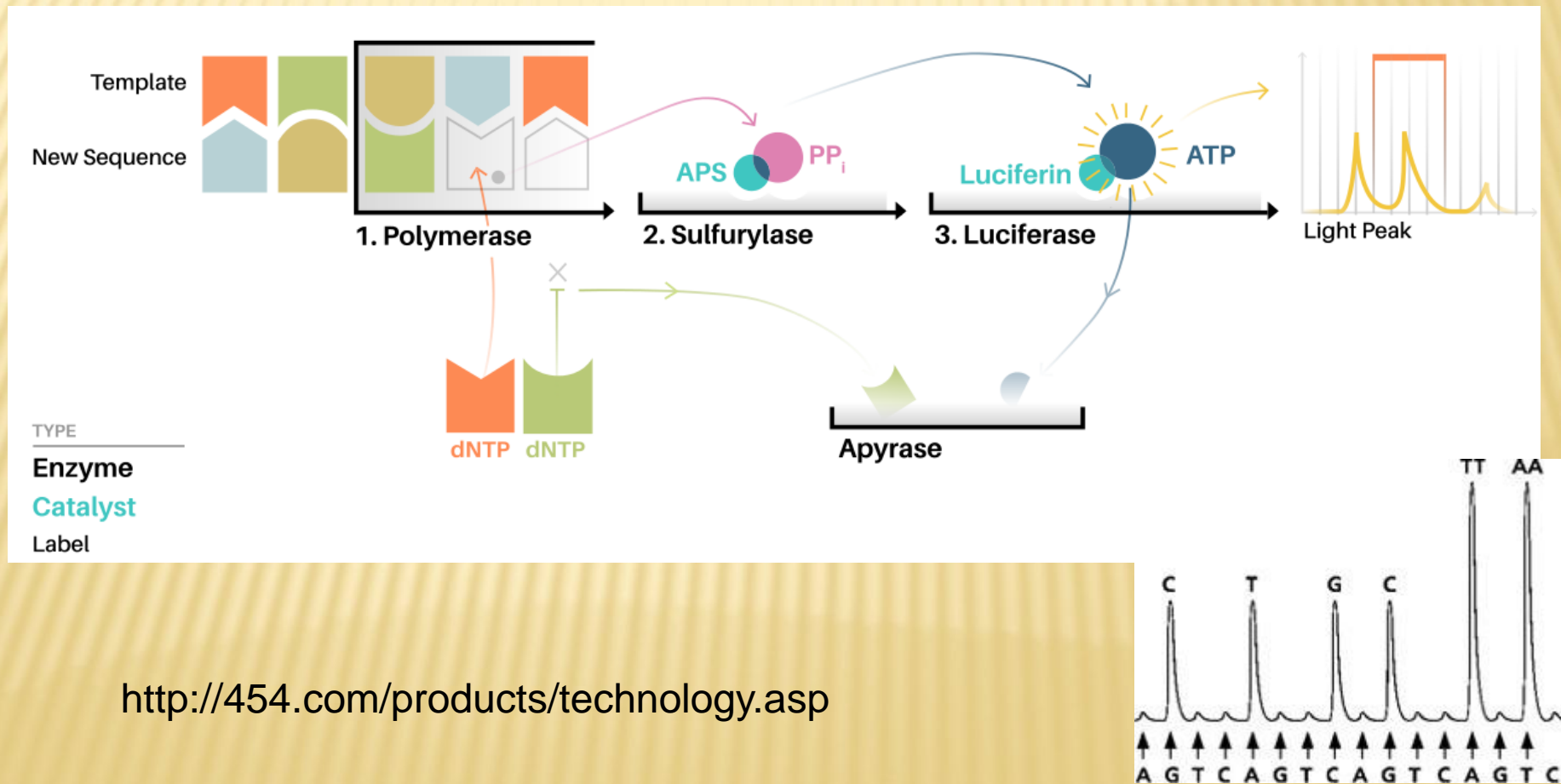
Comparison of next-generation sequencing techniques.

Sequencing devices	Chemistry	Read length (bp)	Run time	Throughput per run
<i>High-end instruments</i>				
454 GS FLX + (Roche)	Pyrosequencing	700	23 h	700 Mb
HiSeq 2000/2500 (Illumina)	Reversible terminator	2 × 150	High output: ~11 days Rapid run: ~27 h	High output: 600 Gb Rapid run: 120 Gb
5500xl W SOLiD (Life Technologies)	Ligation	1 × 75 Frag, 2 × 50 MP	8 days	~320 Gb
<i>Bench-top devices</i>				
454 GS Junior (Roche)	Pyrosequencing	400	8 h	35 Mb
Ion PGM (Life Technologies)	Proton detection	100 or 200	3 h	100 Mb (314 chip) 1 Gb (316 chip) 2 Gb (318 chip)
MiSeq (Illumina)	Reversible terminator	2 × 250	27 h	835 Gb



# Pyrosekvenování

- sekvenování syntézou DNA - bez elektroforézy či jiné separace fragmentů
- **Princip:** uvolnění pyrofosfátu při enzymatické syntéze a jeho následná detekce



<http://454.com/products/technology.asp>

# Pyrosekvenování

2005 - GS20 firmy 454 Life Sciences (Roche)

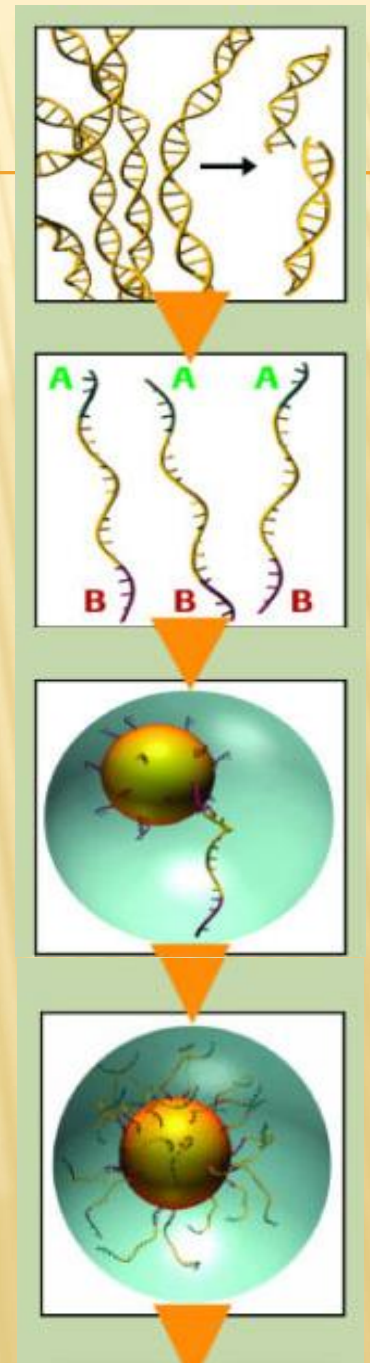
2008 - GS FLX (Roche)

2009 - GS Junior (Roche)

... PyroMark Q24 a Q96 (Qiagen)

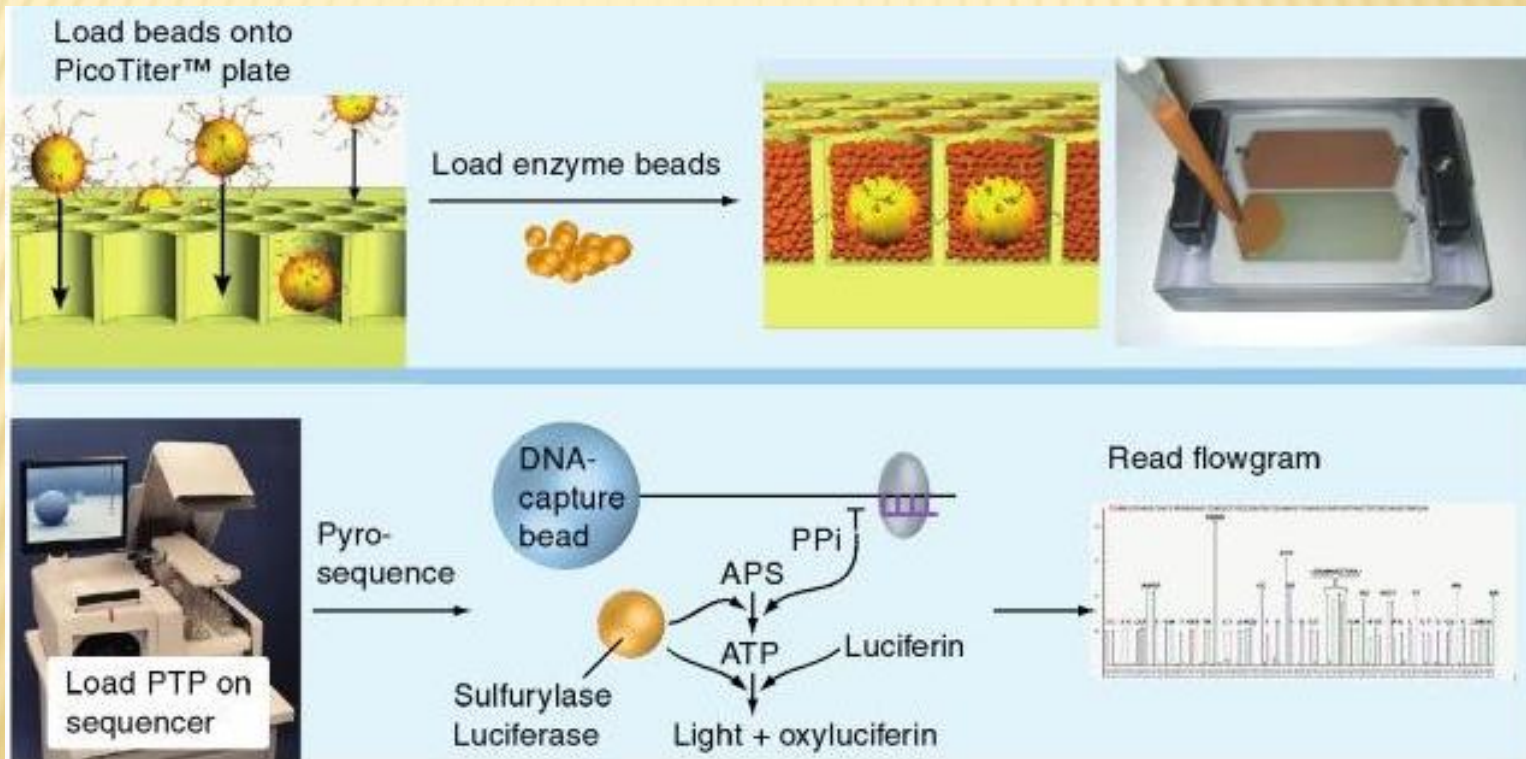
454

- fragmentace genomové DNA (300-800 bp)
- navázání adaptorů (A - pro primer, B - značený biotinem)
- vazba oligonukleotidů na streptavidinové kuličky (1 na 1)
- PCR amplifikace v mikro-reaktorech (kulička „obalená“  
1 typem DNA)



# Pyrosekvenování

- centrifugace kuliček do PicoTiter destičky (do 1 jamky se vejde jen 1)
- PicoTiter destička - 1600 tis jamek
- pyrosekvenování v každé jamce



... až stovky Mbp v jednom běhu

# Illumina (Solexa)

1996 - Pascal Mayer, Laurent Farinelli

- Glaxo Wellcome's Geneva Biomedical Research Institute

Solexa → Illumina

<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>



MiSeq

**Focused power.** Speed and simplicity for targeted and small genome sequencing.

▶ REQUEST PRICING



MiSeqDx

**Focused Dx power.** The first FDA-cleared IVD next-generation sequencing system.

▶ REQUEST PRICING



MiSeq FGx

**Focused forensic power.** First fully validated system for forensic genomics.

▶ REQUEST PRICING



NextSeq 500

**Flexible power.** Speed and simplicity for everyday genomics.

▶ REQUEST PRICING



HiSeq 2500

**Production power.** Power and efficiency for large-scale genomics.

▶ REQUEST PRICING



HiSeq 3000/HiSeq 4000

**Production power.** Maximum throughput and lowest cost for production-scale genomics.

▶ REQUEST PRICING



HiSeq X Five

**Population power.** Maximum throughput and lowest cost for production-scale human whole genome sequencing.



HiSeq X Ten

**Population power.** Maximum throughput and lowest cost for population-scale human whole genome sequencing.



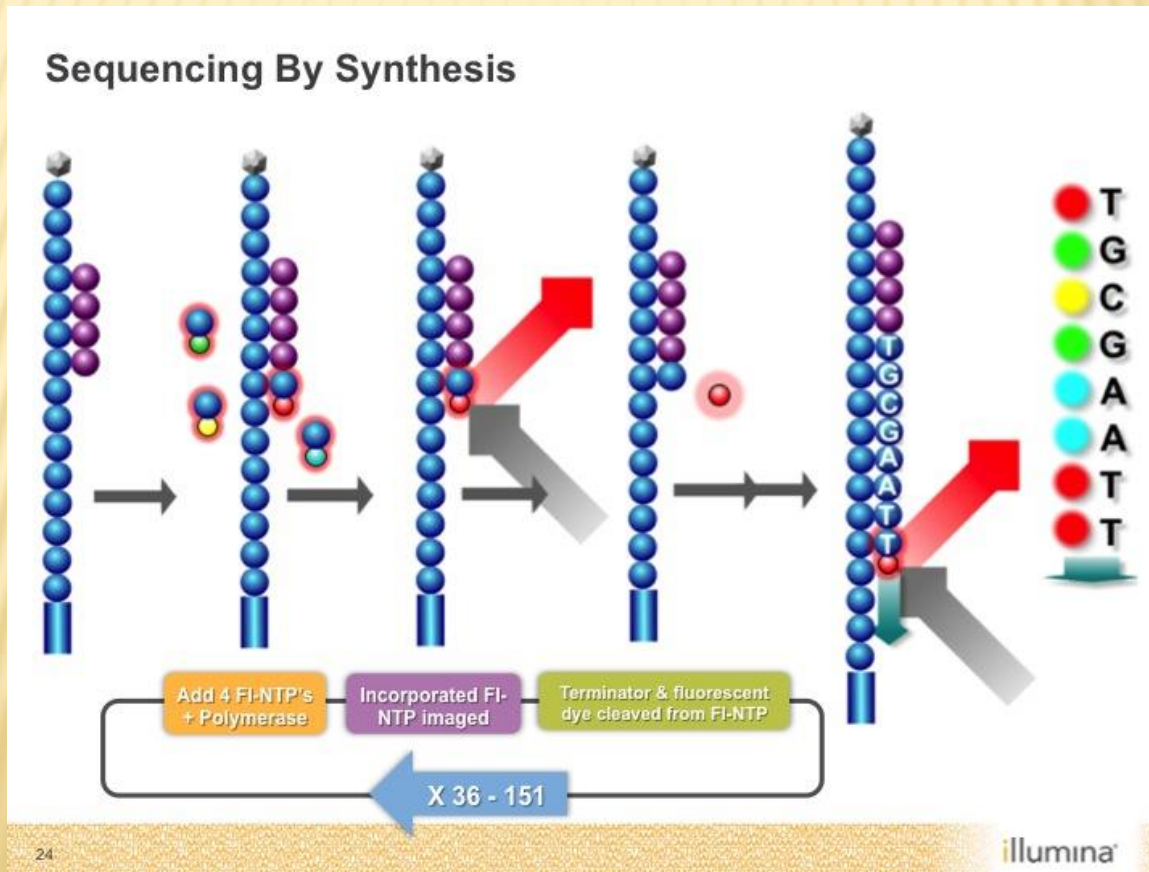
NeoPrep

**Powerfully Simple.** Library prep reimaged.

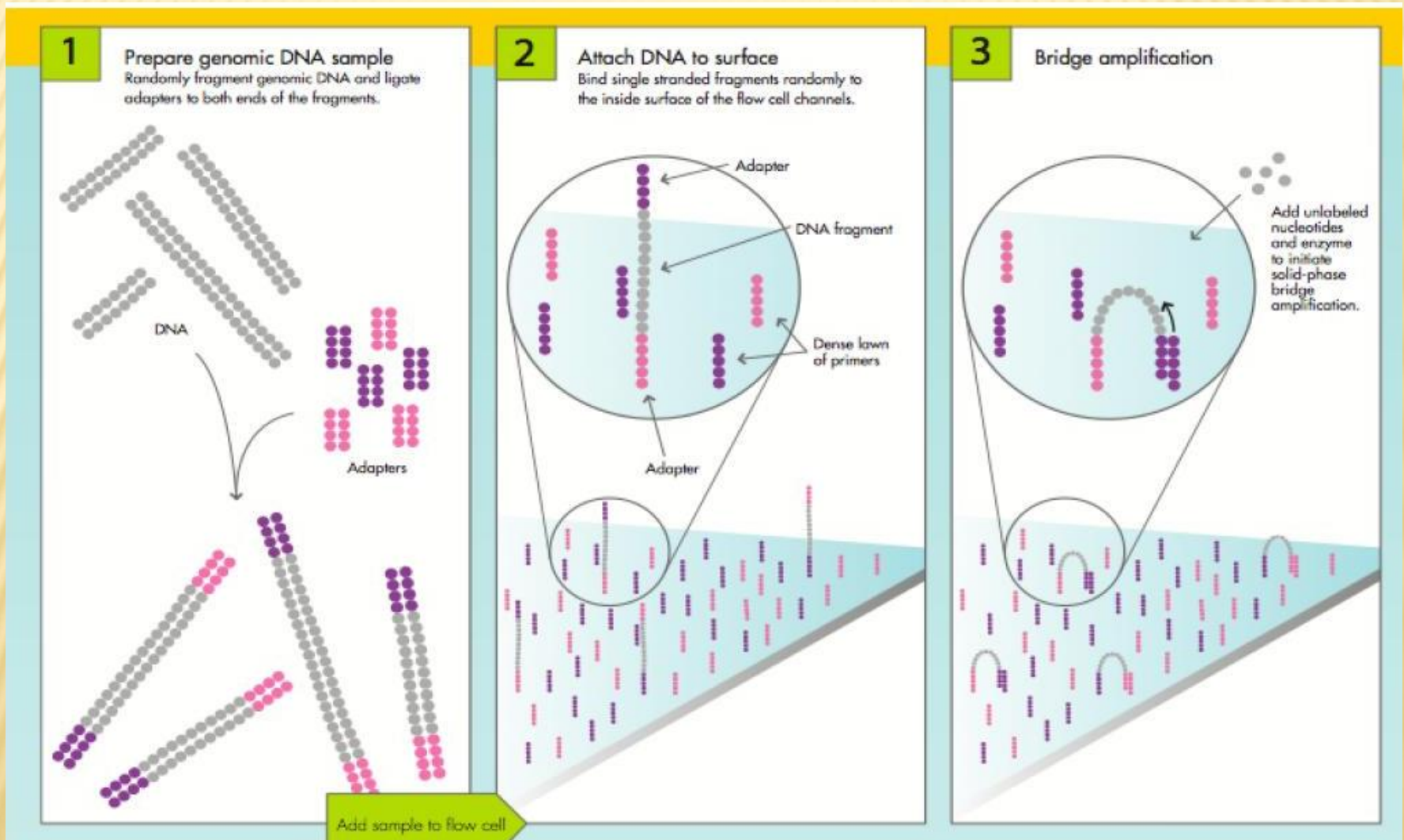
# Illumina (Solexa)

- sekvenování syntézou DNA - bez elektroforézy či jiné separace fragmentů

**Princip:** začlenění značených reverzibilních terminatorů a jejich následná detekce



# Illumina (Solexa)

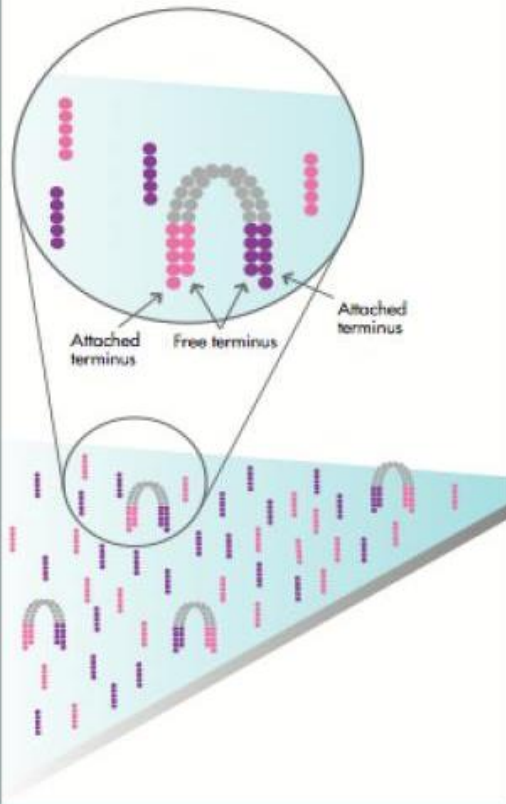




# Illumina (Solexa)

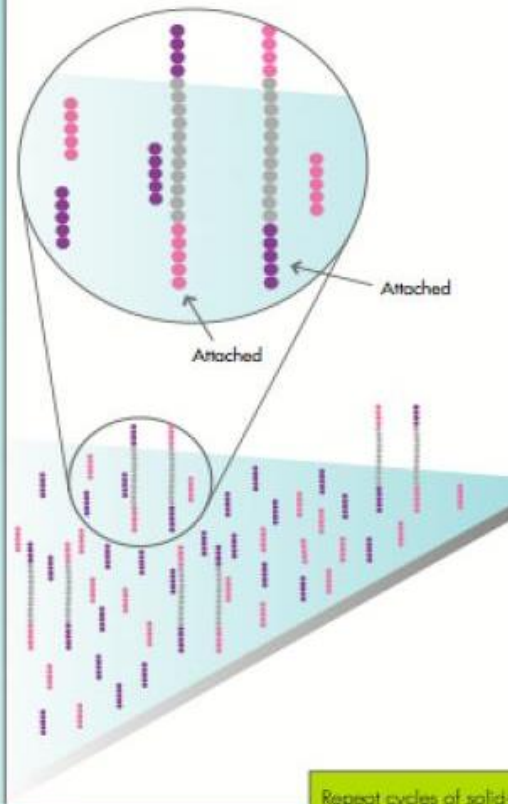
4

Fragments become double stranded



5

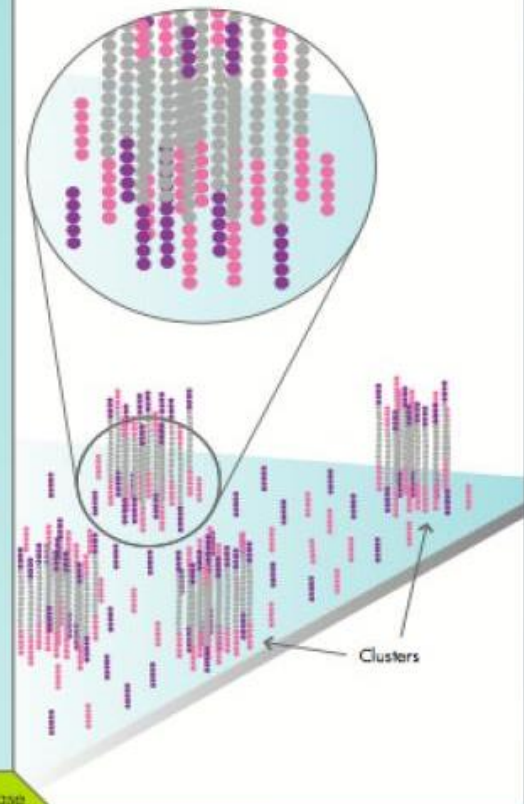
Denature the double stranded molecules



6

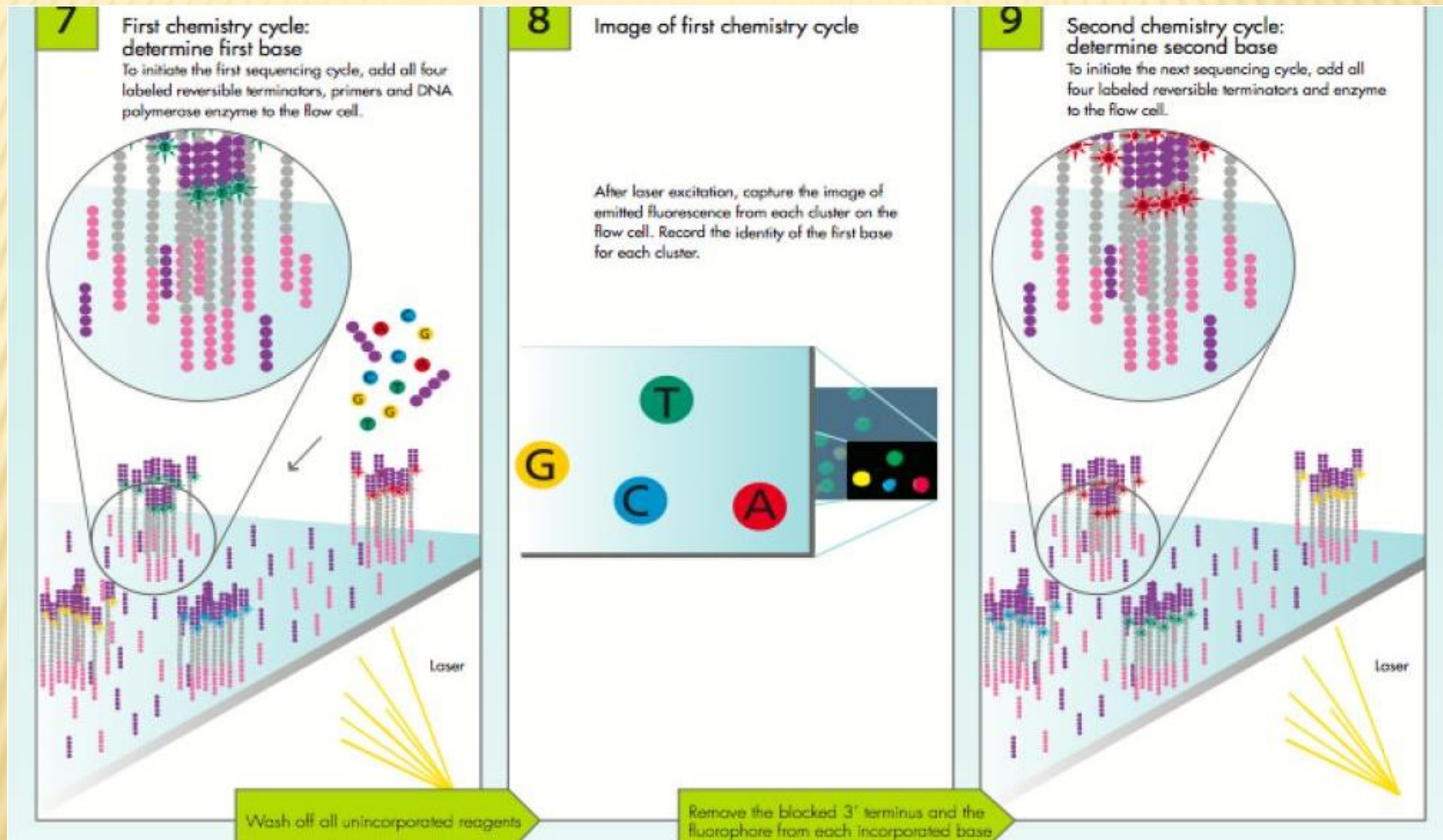
Completion of amplification

On completion, several million dense clusters of double stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

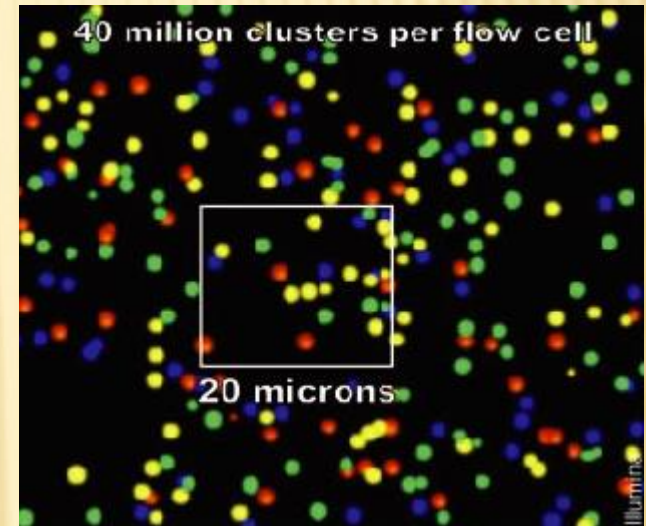
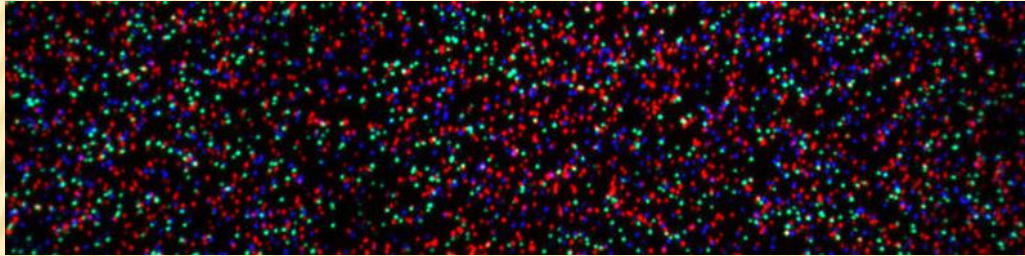


Repeat cycles of solid-phase bridge amplification

# Illumina (Solexa)



# Illumina (Solexa)



... až **desítky Gbp za den** na jednom přístroji

... Leden 2014 - Illumina - **lidský genom lze osekvenovat za ~ 1000\$**  
(přístrojovým vybavením za 10 milionů \$)

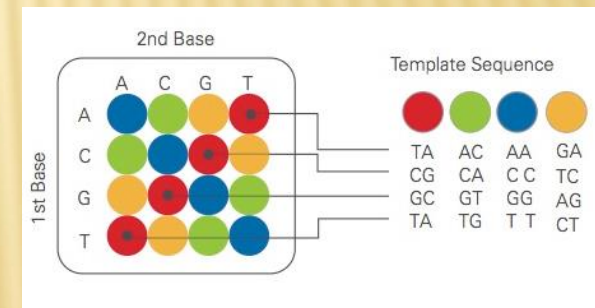
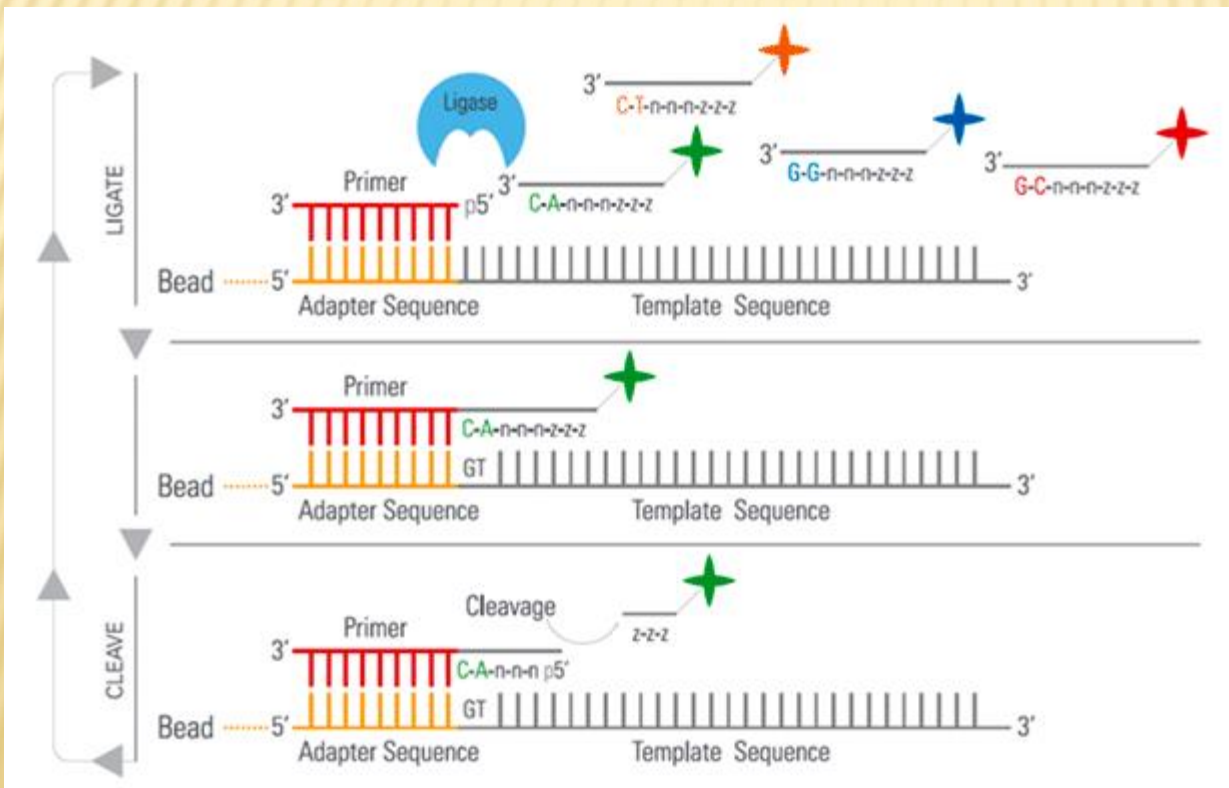
„the **first sequenced human genome** cost nearly **\$3 billion**“

# SOLID

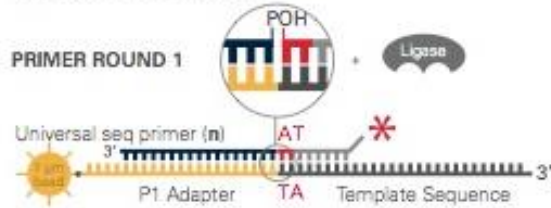
„Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection“

2006 - Life Technologies (Applied Biosystems)

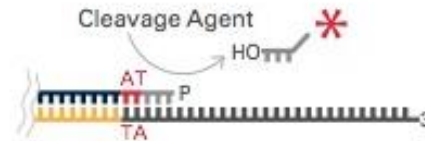
**Princip:** ligace značených oligonukleotidů dle sekvence templátové DNA + detekce



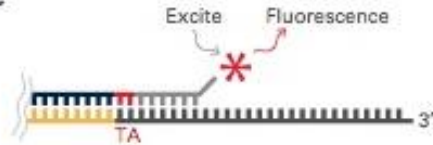
### 1. Prime and Ligase



### 4. Cleave off Fluor



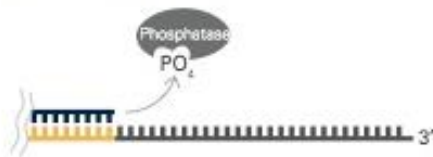
### 2. Image



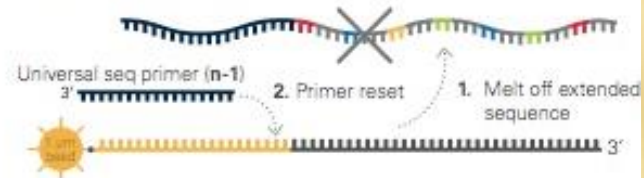
### 5. Repeat steps 1-4 to Extend Sequence



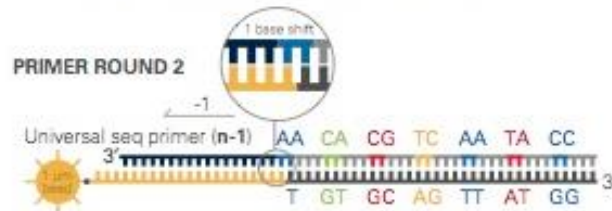
### 3. Cap Unextended Strands



### 6. Primer Reset



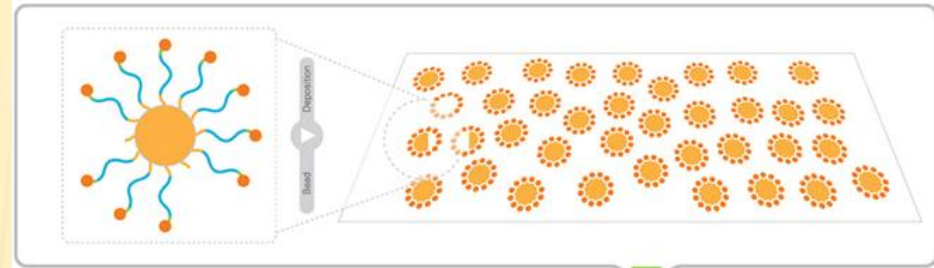
### 7. Repeat steps 1-5 with new primer



### 8. Repeat Reset with , n-2, n-3, n-4 primers

# SOLID

- adaptory
- vazba na kuličky, klonální amplifikace
- vazba kuliček na skleněný čip
- chemické reakce + detekce



# Technologie Ion-Torrent

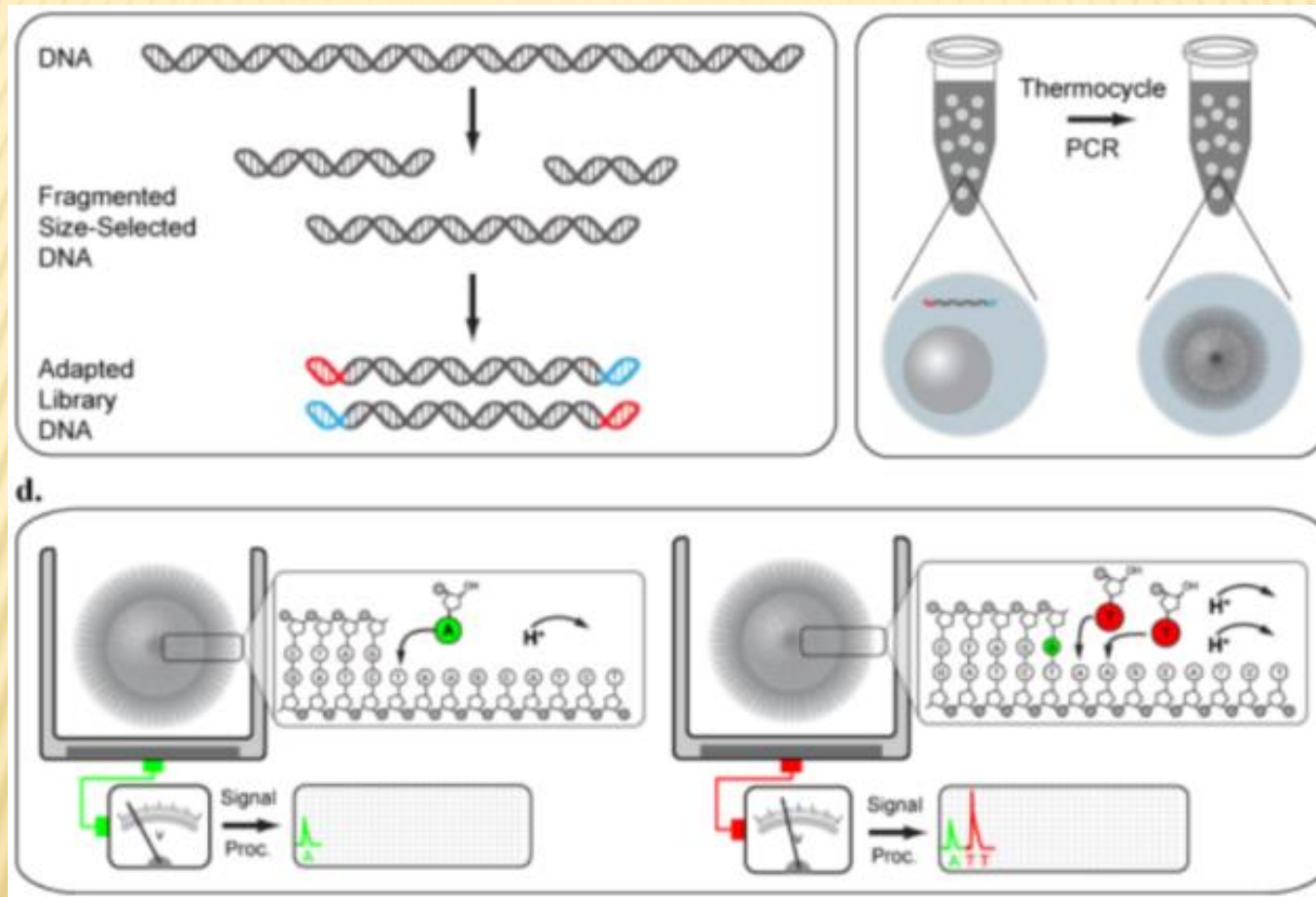
- sekvenování syntézou DNA

**Princip:** detekce vodíkového iontu uvolněného při začlenění dNTP do DNA

- od roku 2010
- postup přípravy vzorků analogický jako u předchozích metod  
(fragmentace DNA, adaptory, klonální amplifikace na kuličkách, chemická syntéza DNA na čipu a detekce)
- detekce: **ISFET** („ion-sensitive field-effect transistor) senzor



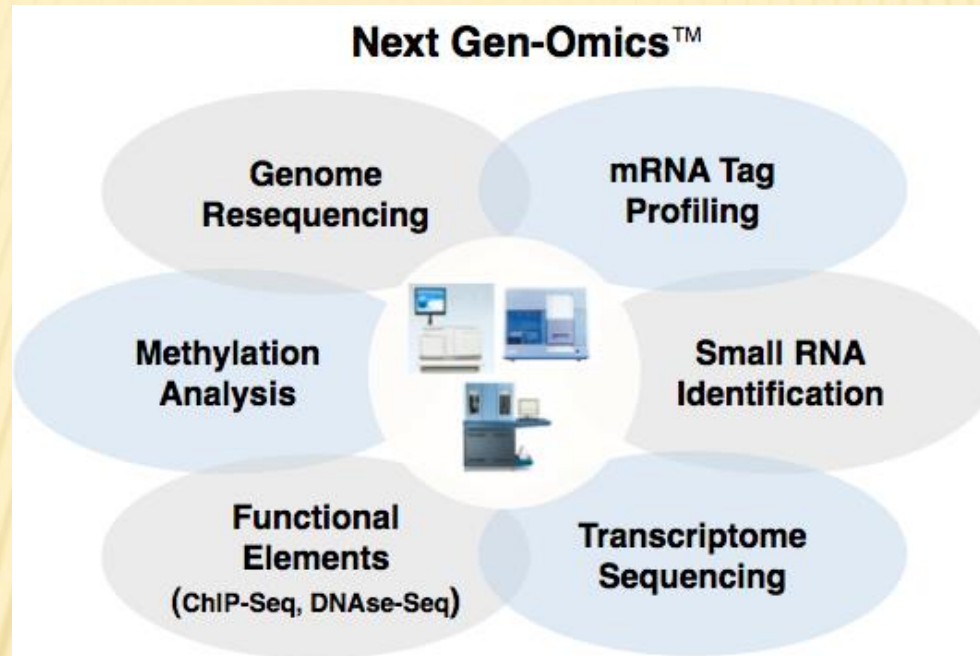
# Technologie Ion-Torrent



... až 10 GB za 2 hodiny



# NGS - využití



DNA - identifikace SNP, mutací, polymorfismů

- identifikace mikrobiomu, heterogenita nádorů → terapie

RNA - analýza transkriptomu, mikroRNA, identifikace variant sestřihu ...

Funkční elementy - promotory, transkripční faktory, nukleosomy ...

---

# Epigenetika

# Epigenetická regulace exprese

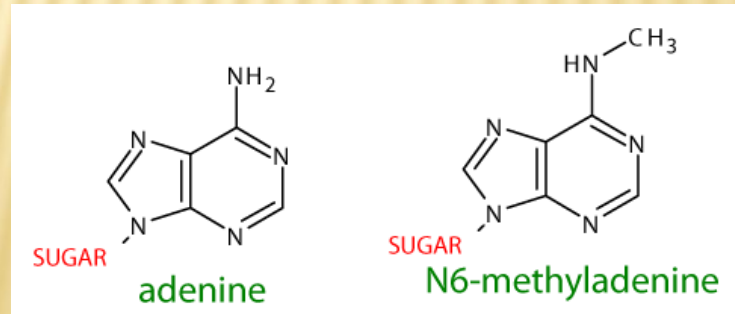
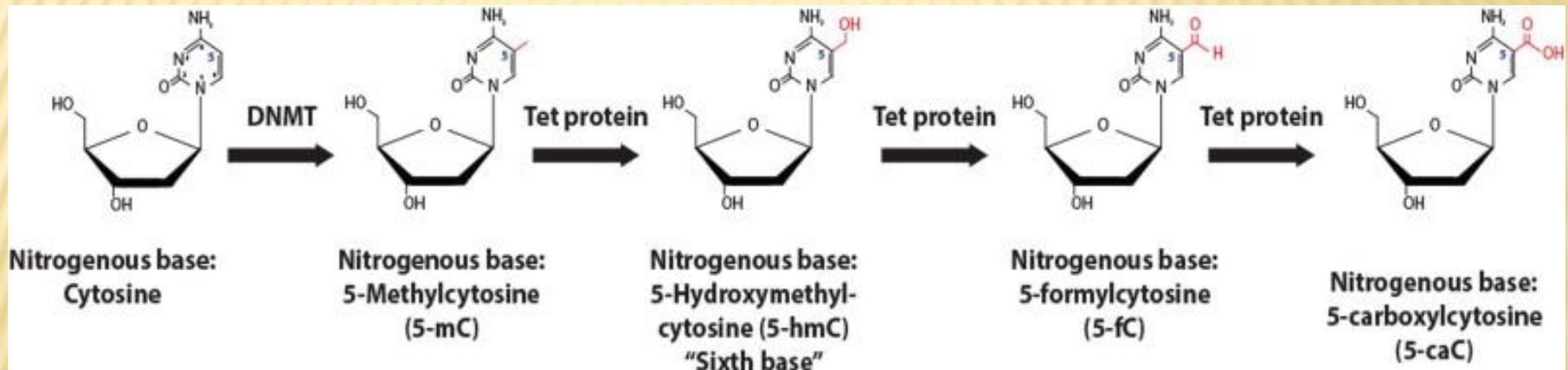
---

- bez zásahu do nukleotidové sekvence DNA
  - metylace DNA
  - modifikace histonů
  - nekódující RNA

# Metylace DNA

Připojení metylové skupiny na C5 cytozinu: vznik **5-metylcytozinu**  
„pátá báze“

**Reverzibilní** - odstranění pasivně (replikací) nebo aktivně enzymaticky reparací



# Metylace DNA

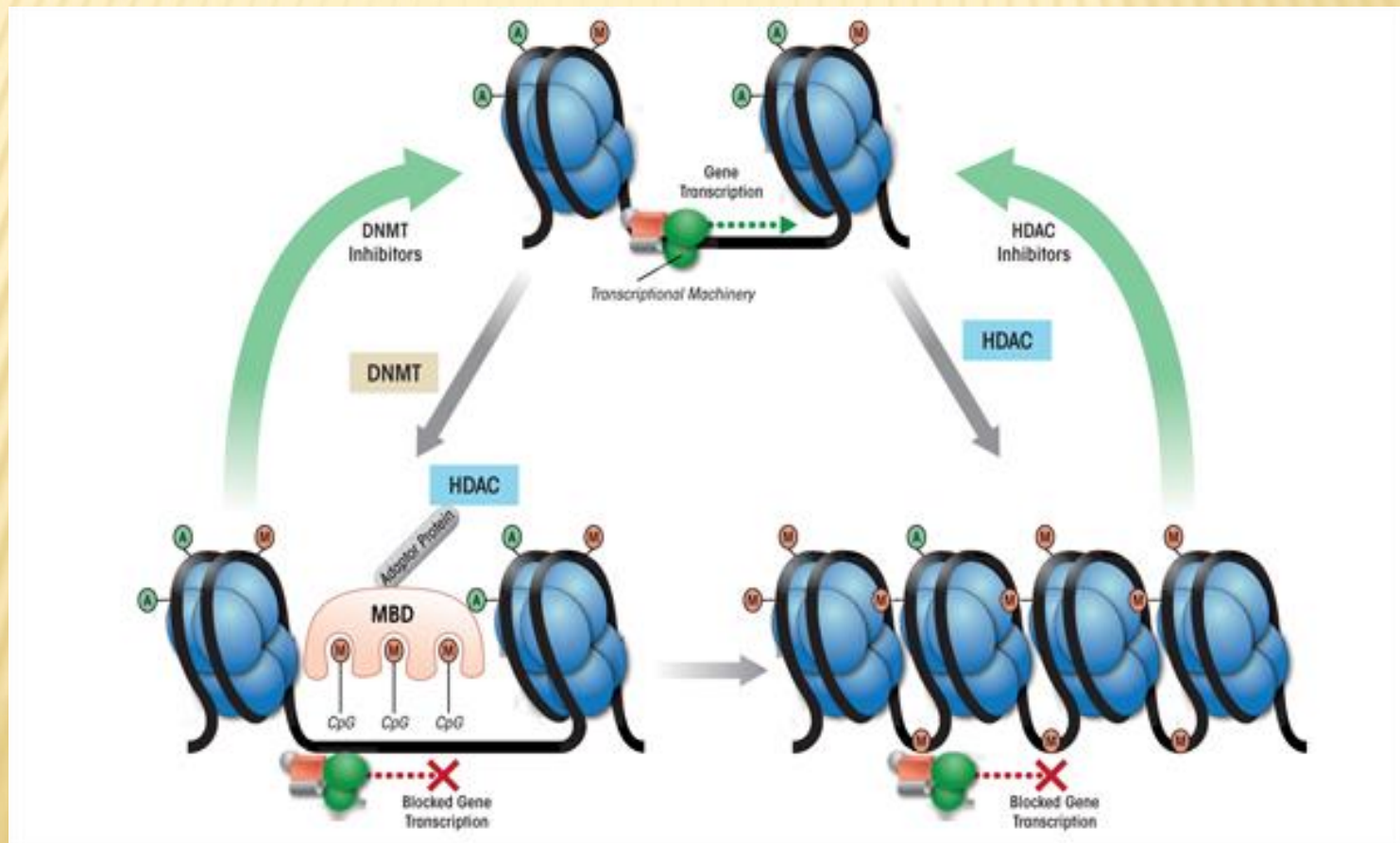
## Frekvence výskytu a význam:

- 5-metylcytosin tvoří 1-6% bází DNA většiny eukaryot
- v genomu obratlovců se 5-metylcytosin objevuje **především** v dinukleotidech **5'-CpG-3'**
- 60-90% dinukleotidů CpG je v genomu obratlovců metylovaných
- dinukleotidy CpG nejsou zastoupeny v genomu rovnoměrně, ale tvoří tzv. **CpG ostrovy**, které se objevují převážně v oblastech **promotorů** (60% promotorů)
- **hypermethylace DNA** v těchto oblastech obvykle způsobuje **zastavení transkripce** příslušných genů

**Deregulace metylace DNA - deregulace genové exprese - vznik chorob**

# Zastavení transkripce metylací cytosinu

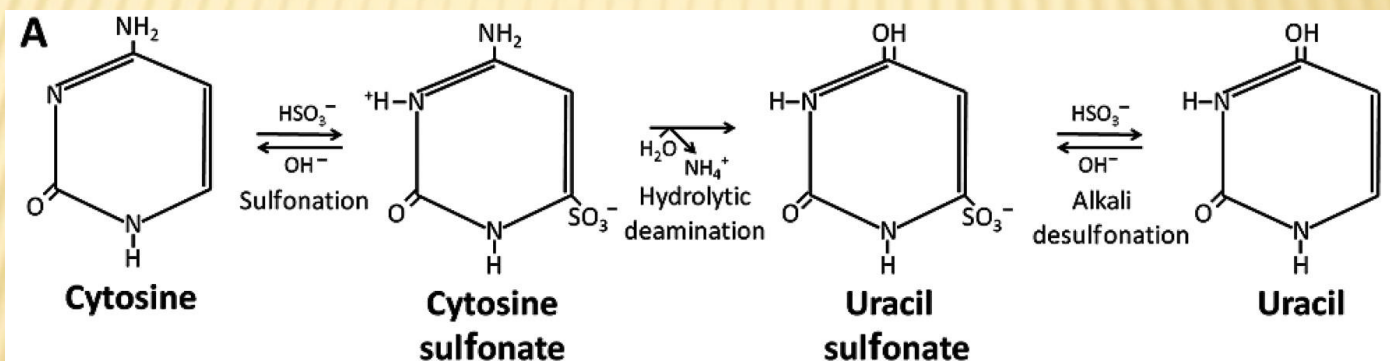
- proteiny vážící se metylované CpG sekvence
  - konformace DNA
  - vazba TF, které nejsou citlivé k metylaci
  - kondenzace/relaxace chromatinu



# Metody studia DNA metylace

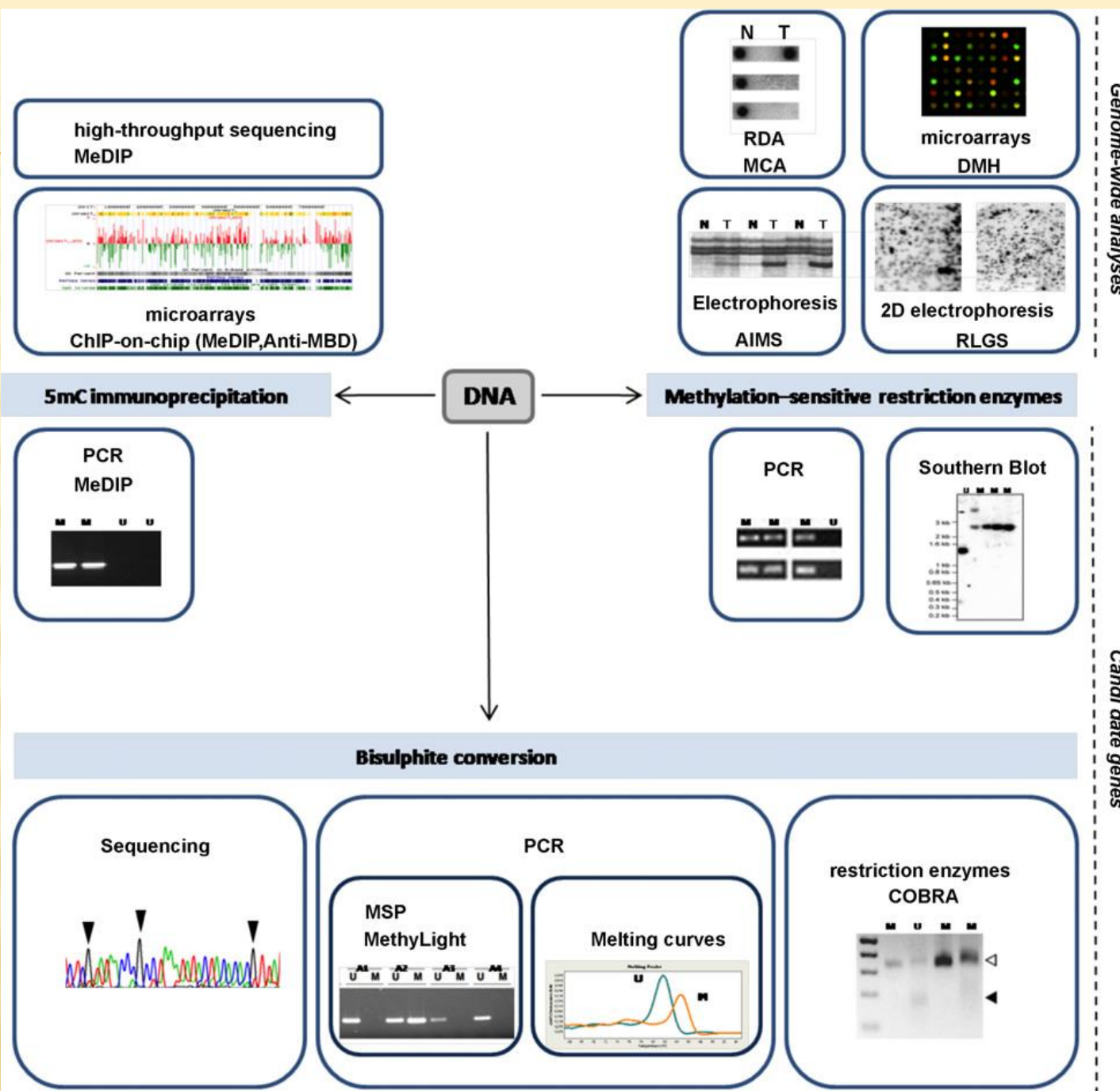
- Enzymy citlivé k metylaci
- Specifické protilátky proti metyl-cytosinu
- Konverze demetylovaného metyl-cytosinu bisulfitem na uracil

(případně kombinace těchto metod)



**B**

	Original sequence	Sequence after bisulfite treatment
<b>Unmethylated DNA</b>	A-T-C-G-G-T-C-A-T-C-G-C-A-T	A-T-U-G-G-T-U-A-T-U-G-U-A-T
<b>Methylated DNA</b>	A-T-C-G-G-T-C-A-T-C-G-C-A-T	A-T-C-G-G-T-U-A-T-C-G-U-A-T



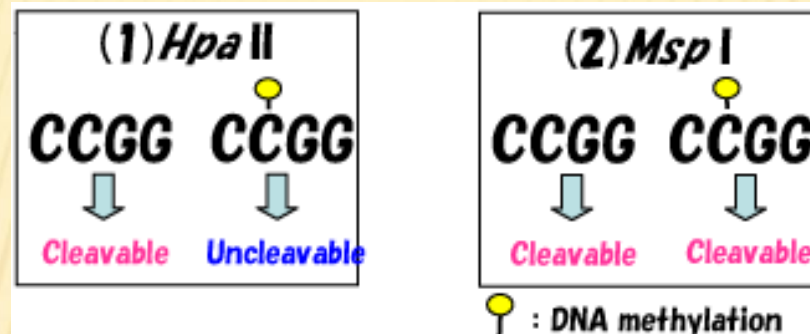
Genome-wide analyses

Candidate genes

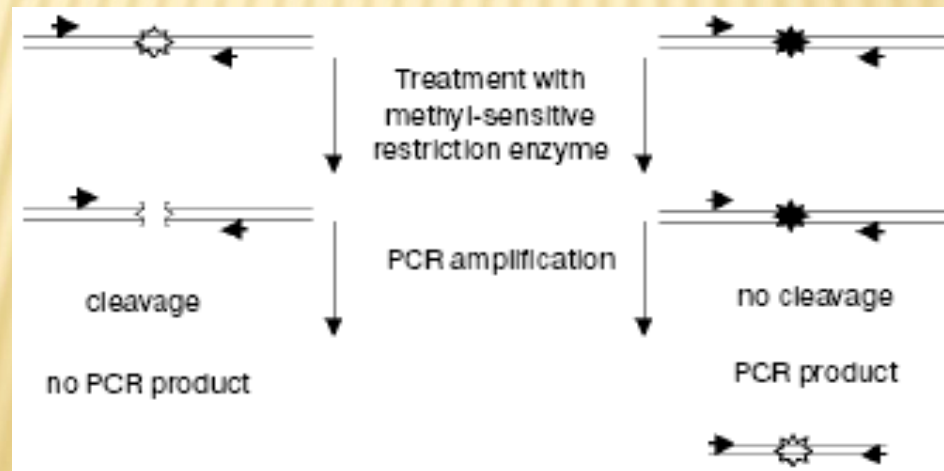


# Restriční endonukleázy citlivé k metylaci DNA

- velká skupina enzymů - schopnost štěpit ovlivněna (zablokována) dam nebo dcm metylací DNA

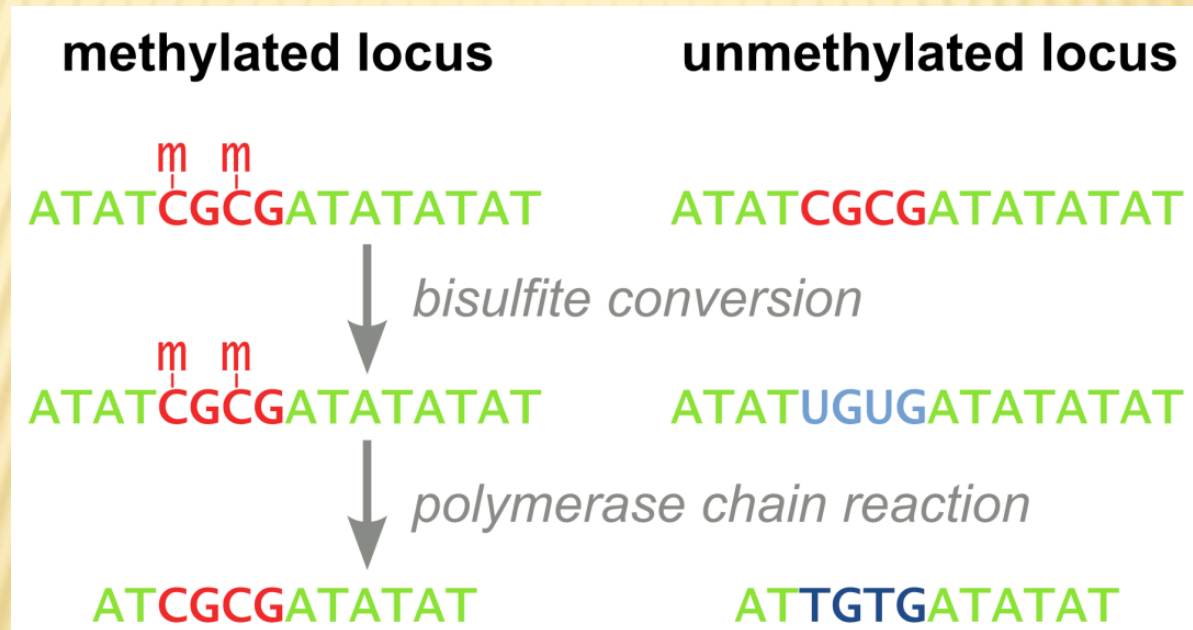


- využití pro určení metylace určitého genu/promotoru nebo celého genomu



# Konverze demetylovaného metyl-cytosinu bisulfitem

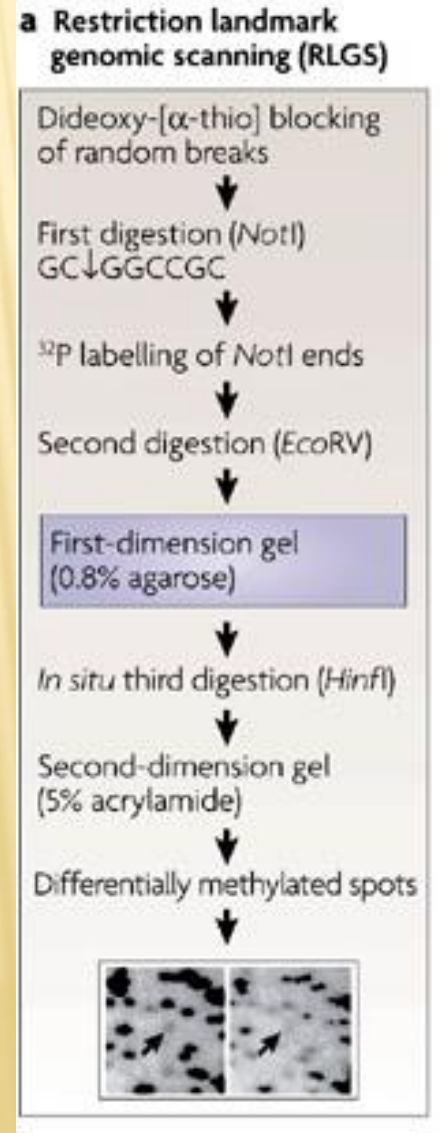
- reakce se provádí s ssDNA po předchozí denaturaci
- následuje PCR a sekvenace



# DNA metylace - analýza na úrovni genomu

## Restriction landmark genomic scanning (RLGS)

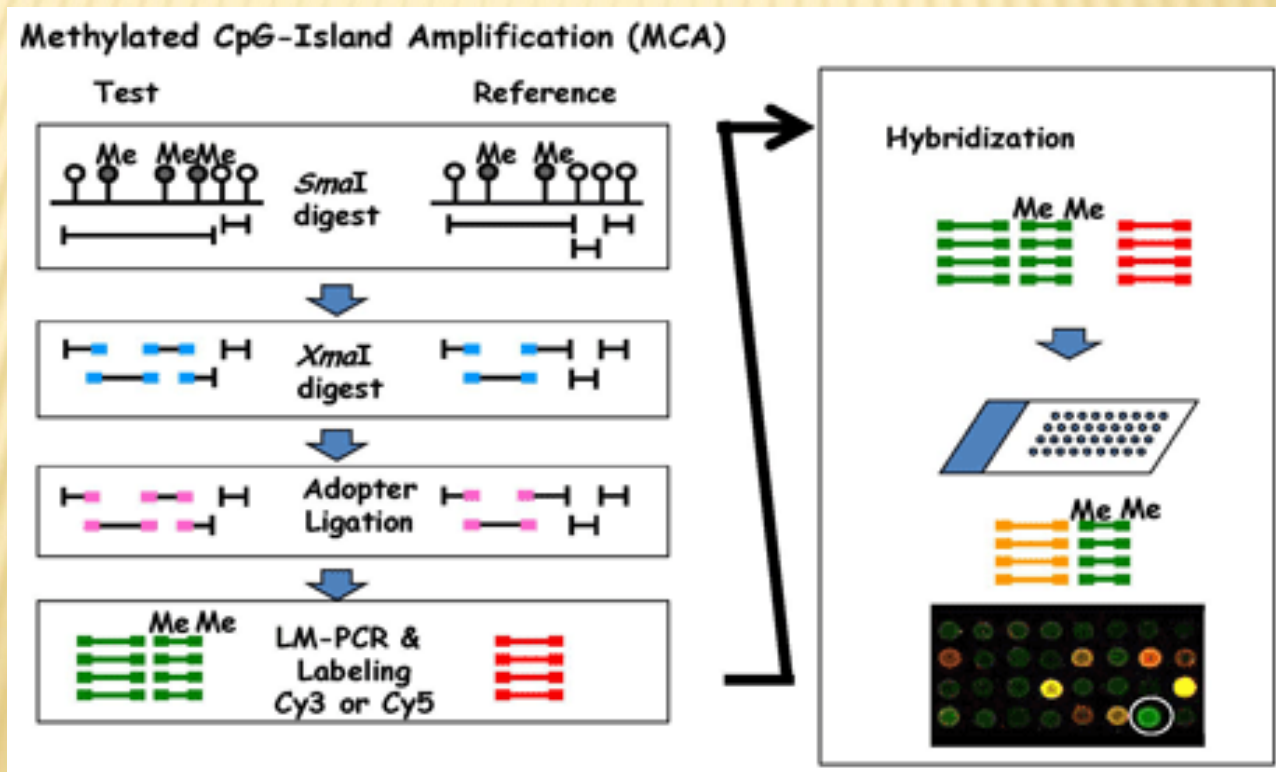
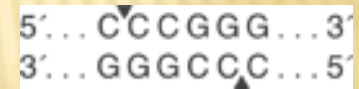
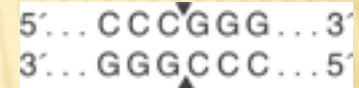
- kombinace štěpení různými RE s různou citlivostí k metylaci
- rozdělení elektroforézou ve dvou rozměrech
- odečet spotů s různou intenzitou
- izolace spotu a jeho charakterizace (klonování d plazmidu a sekvenace)



# DNA metylace - analýza na úrovni genomu

## Amplifikace metylovaných CpG ostrůvků (MCA)

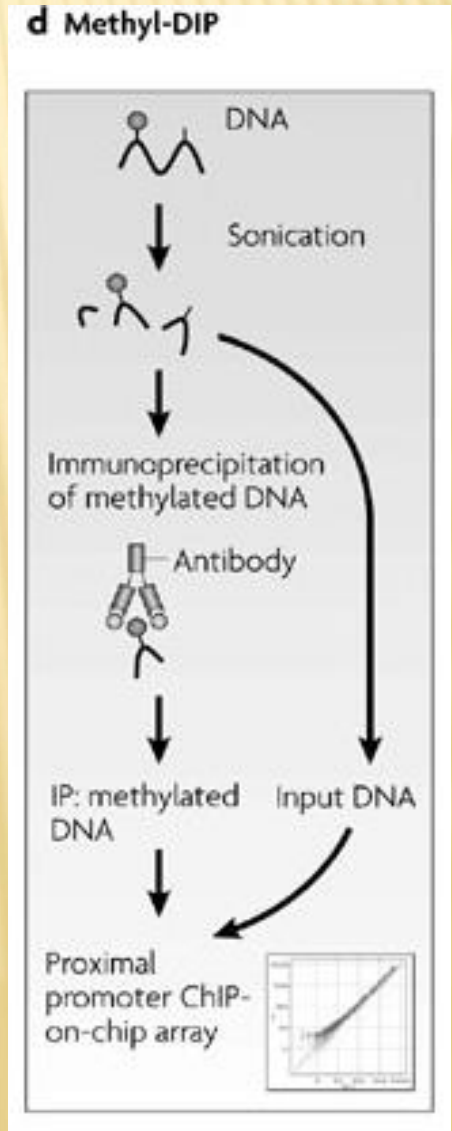
- SmaI - pouze nemetylovaná sekvence CCGGG, tupé konce
- XmaI - i metylované sekvence CCGGG, 5' - překrývající konce
  - připojení linkerů, PCR, obohacení metylovaných sekvencí při hybridizaci



# DNA metylace - analýza na úrovni genomu

## methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP)

- fragmentace DNA sonikací
- imunoprecipitace protilátkou specifickou pro metylcytosin
- detekce specifické sekvence - PCR
- hybridizace na čipu nebo sekvenace



# Modifikace histonů: „histonový kód“

- pozměňuje strukturu chromatinu
- modifikace obvykle nastává na N-koncích histonů, které jsou dobře přístupné

## Typy modifikací:

- |                |             |                 |               |
|----------------|-------------|-----------------|---------------|
| ▪ acetylace    | ribosylace  | malonylace      | propionylace  |
| ▪ metylace     | butyrylace  | sukcinylace     | O-glcNAcylace |
| ▪ fosforylace  | formylace   | krotonylace     |               |
| ▪ ubikvitinace | hydroxylace | glutathionylace |               |

## „Histonový kód“:

vliv posttranslačních modifikací histonů na genovou expresi

- specifická kombinace modifikací má určitý vliv na genovou expresi
- vliv na strukturu chromatinu, vazbu proteinů, vazbu na DNA, ...

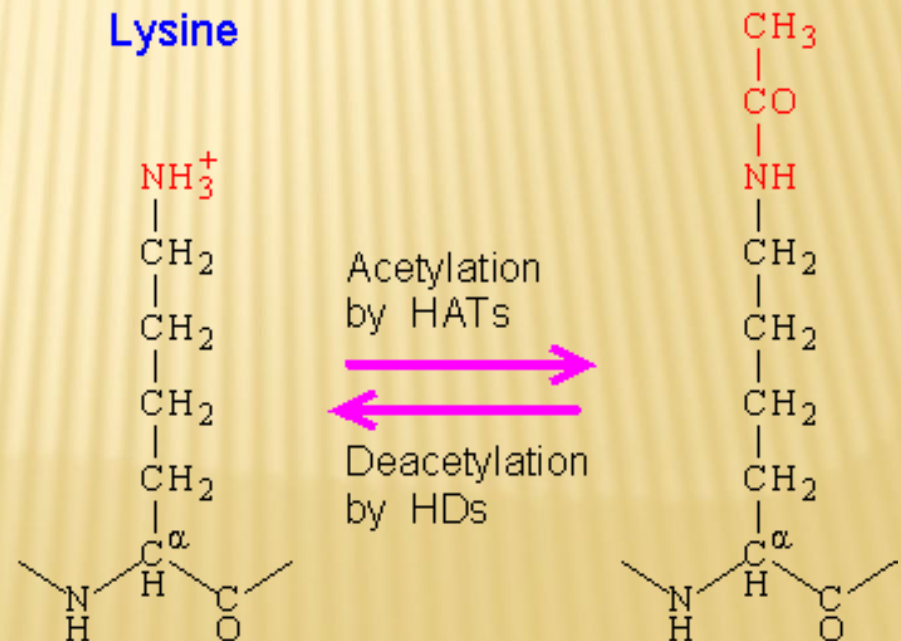


# Acetylace histonů

- přenos acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na lysin histonů
- úroveň acetylace histonu vyplývá ze směru vychýlení rovnováhy aktivit histonových acetyltransferáz (HAT) a histonových deacetyláz (HDAC)

Ovlivňuje

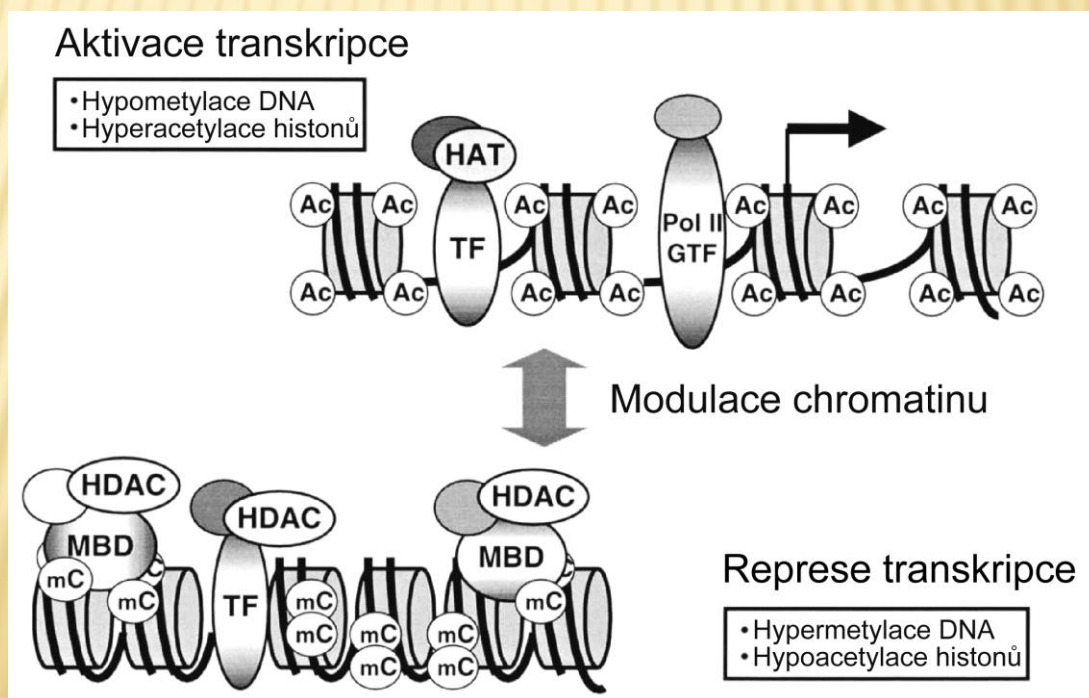
- genovou expresi
- sestavování nukleozomů
- interakce s DNA





# Acetylace histonů má vliv na strukturu chromatinu

- **acetylované histony** usnadňují přístup transkripčních faktorů k DNA - spjatý s **transkripčně aktivním chromatinem**
- **odstraněním acetylové skupiny** získá lyzin pozitivní náboj - umožněna elektrostatická interakce mezi pozitivně nabitými histony a negativně nabitou DNA (kompaktní chromatin **neumožňuje transkripci**)



# Regulace acetylace histonů

U nádorových onemocnění je častá nadměrná aktivita HDAC (umlčení nádorových supresorů)

## Inhibitory HDAC (terapeutický potenciál):

**Table 2**

HDACis in current clinical trials

HDACi	Highest phase trial	Cancer type	Best clinical outcome	Reference
Panobinostat (LBH-589)	III	CTCL	Ongoing; promising in phase II against CTCL (74% tumor reduction), HL (74% tumor reduction and 27% OR), and WM (MR or better in 47% of patients, 50% SD)	122–124
Belinostat (PXD101)	II	Thymoma	Significantly enhanced survival	125
Entinostat (MS275)	II	Melanoma	Some clinical activity, promising PK and PD values	126–128
Mocetinostat (MGCD01030)	II	B cell malignancies	Disease control (35% rate) in HL	129
Givinostat (ITF2357)	II	JAK2 <sup>V617F</sup> -expressing myeloproliferative neoplasms	Pruritus relief (~100%), splenomegaly reduction (75% of PV/ET and 38% of MF patients)	130
Practinostat (SB939)	II	Prostate cancer	Limited clinical efficacy to date but promising PK values	131, 132
Chidamide (CS055/HBI-8000)	II	Solid tumors and lymphomas	Ongoing; PR was observed in 5/31 patients during phase I	61
Quisinostat (JNJ-26481585)	II	CTCL	Ongoing; 31.6% reduction in mSWAT score of tumor burden, 1/19 CR, 4/19 PR	63
Abexinostat (PCI- 24781)	II	FL	Tumor reduction in 86%, ORR of 64%	64
CHR-3996	I	Various (mostly solid tumors)	Favorable PK and PD values	60
AR-42	I	Hematological malignancies	Ongoing, minor clinical responses in myeloma and T cell lymphoma	62

CR, complete response; ET, essential thrombocythemia; FL, follicular lymphoma; MF, myelofibrosis; MR, minimal response; OR, overall response; ORR, overall response rate; PD, pharmacodynamic; PK, pharmacokinetic; PR, partial response; PV, polycythaemia vera; SD, stable disease; WM, Waldenström macroglobulinemia.

**Table 1 Selected Epigenetic Drugs**

Drug	Compound	Study Phase
DNMT inhibitors	Azacitidine (Vidaza)	US FDA-approved in MDS
	Decitabine (Dacogen)	US FDA-approved in MDS
	S110	Phase I
	CP-4200 (elaidic azacytidine)	Preclinical
	Nanaomycin A	Preclinical
HDAC inhibitors	Vorinostat (Zolinza)	US FDA-approved in CTCL
	Romidepsin (Istodax)	US FDA-approved in CTCL
	Panobinostat	Phase II
	Belinostat	Phase I/II
	Valproic acid	Phase II
	Belinostat	Phase II/III
HMT inhibitors	Deazaneoplanocin A (DZNep)	Preclinical
	Quinazoline derivatives	Preclinical
	Ellagic Acid	Preclinical
Histone demethylase inhibitors	Polyamine analogues	Preclinical
	Hydroxamate analogues	Preclinical
HAT inhibitors	Spermidinyl-CoA derivatives	Preclinical
	Hydrazinocurcumin	Preclinical
	Pyrazolone-containing small molecules	Preclinical

CoA = coenzyme A; CTCL = cutaneous T-cell lymphoma; DNMT = DNA methyltransferase; HAT = histone acetyltransferase; HDAC = histone deacetylase; HMT = histone methyltransferase; MDS = myelodysplastic syndrome.



Feb 23, 2015 03:18 PM EST

FEATURE

## Novartis receives FDA approval of Farydak®, the first HDAC inhibitor for patients with multiple myeloma



• Farydak, an HDAC inhibitor with epigenetic activity, approved in combination for patients who received at least two prior regimens including bortezomib and IMiD<sup>1</sup>

• Farydak prolonged median PFS benefit when used with bortezomib and dexamethasone combination versus combination alone (from 6 to 11 months)<sup>2</sup>

• Multiple myeloma is an incurable blood cancer and there is an urgent need for new treatments<sup>2</sup>

• Farydak is approved under FDA's accelerated approval program; regulatory applications are underway in the EU, Japan and worldwide

### Navigating Multiple Myeloma

As a leader in oncology, Novartis is committed to better understanding multiple myeloma.



Photo: **Infographic: Multiple Myeloma by the Numbers**  
See below for PDF version

RELATED DOCUMENTS

**Backgrounder: Multiple Myeloma**

182.39 kb PDF | [Download](#)

**Basel, February 23, 2015** – Novartis announced today that the US Food and Drug Administration (FDA) has approved Farydak® (panobinostat, previously known as LBH589) capsules in combination with bortezomib\* and dexamethasone for the treatment of patients with multiple myeloma who have received at least two prior regimens, including bortezomib and an immunomodulatory (IMiD) agent<sup>1</sup>.

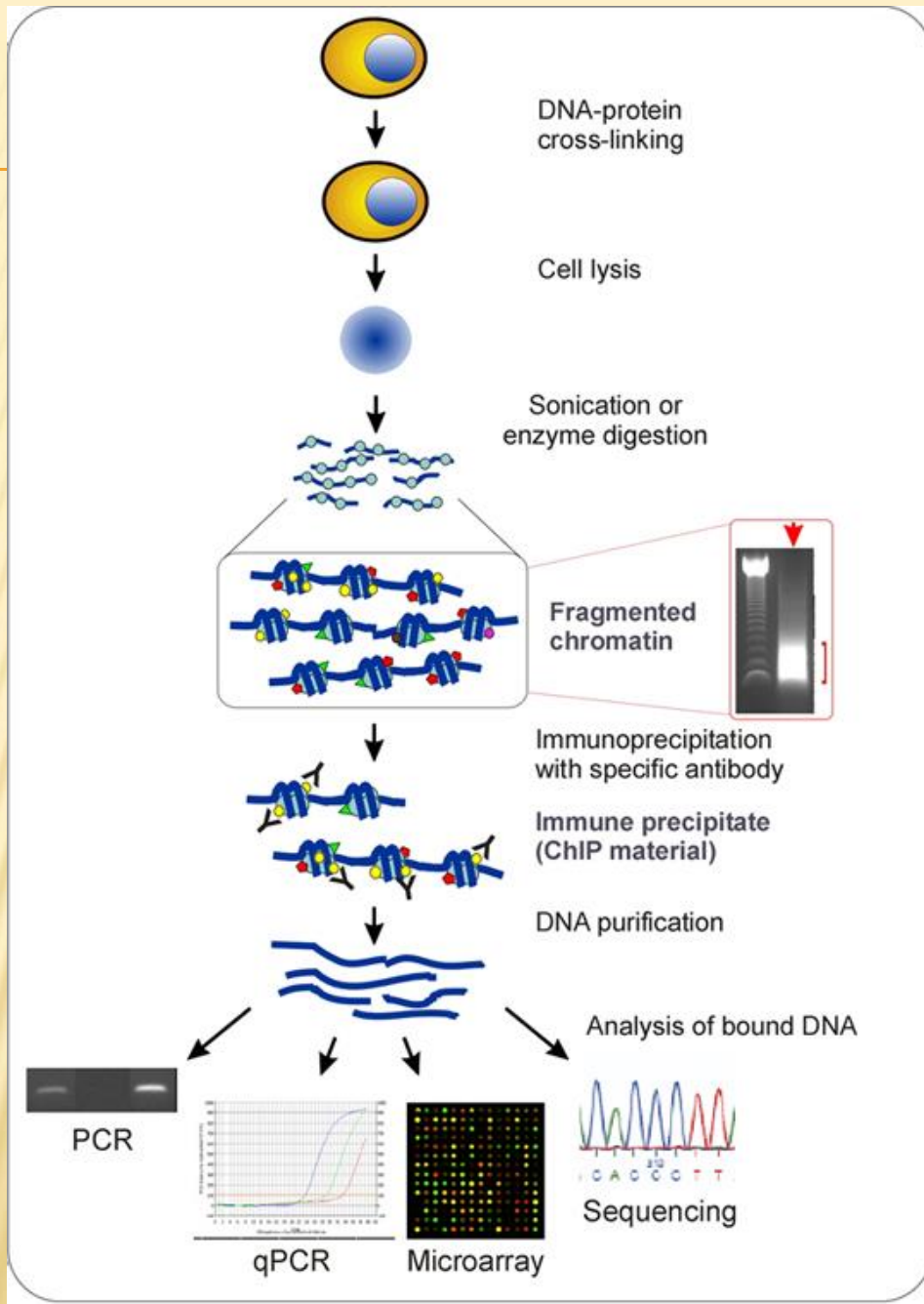
# Modifikace histonů - metodologie

---

- využití specifických protilátek proti modifikovaným formám histonů
  1. **Izolace a purifikace histonů**
  2. **Analýza jejich modifikací**

ChiP-qPCR - modifikace histonů v blízkosti konkrétního genu

ChiP-on-chip - modifikace histonů v blízkosti mnoha genů naráz



---

# Nové možnosti regulace genové exprese



# RNA interference

1990 - Napoli, Jorgensen - snaha zvýšit fialové zabarvení petunií  
zvýšenou expresí enzymu chalkonové syntázy → výsledek opačný



- následně popsáno u *Neurospora crassa* (1992 - Romano, Macino)
- Cenorhabditis elegans* (1995 - Guo, Kemphues)
- savčí buňky (2001 - Elbashir, Tuschl)



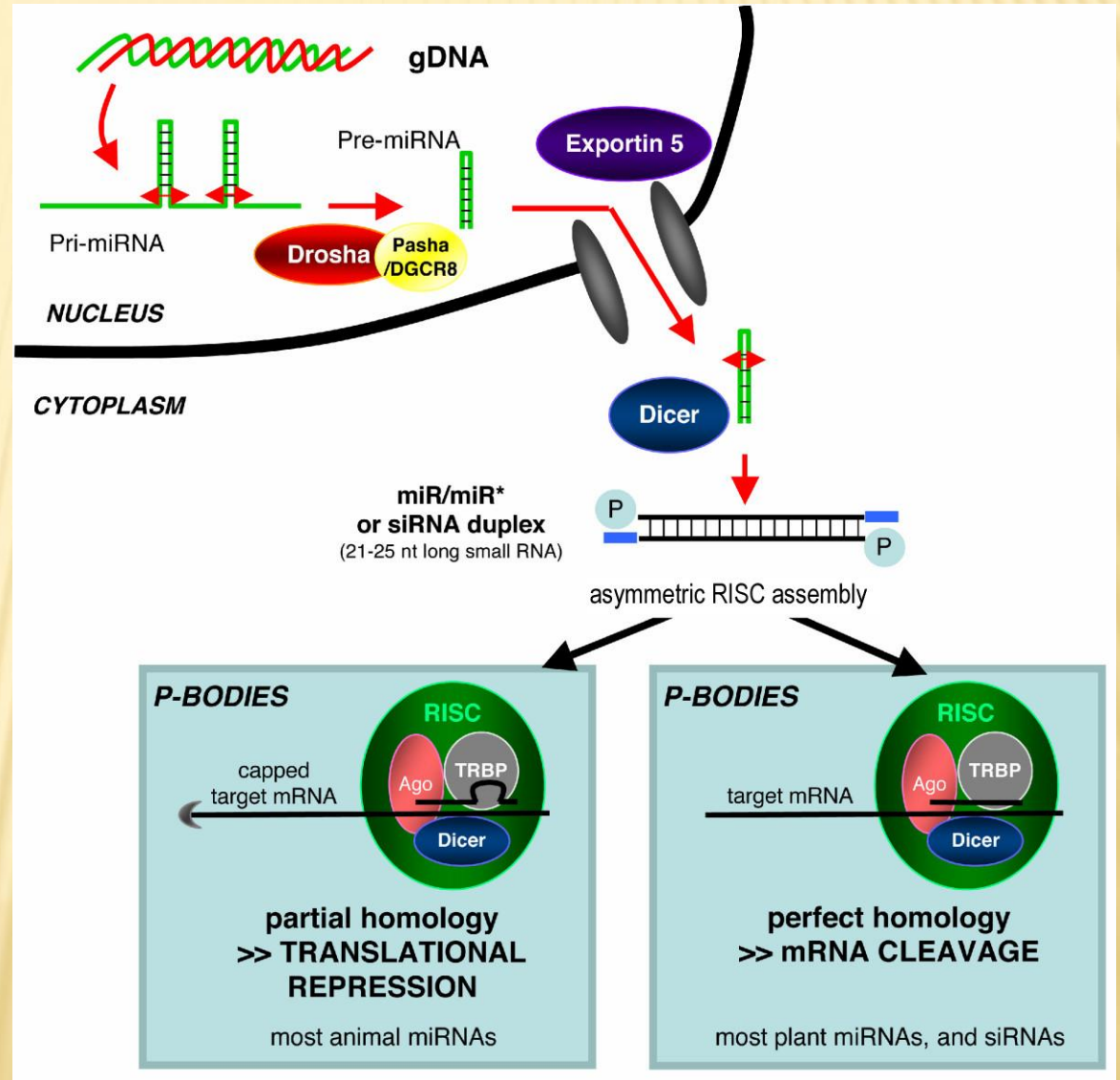
# RNA interference

- <http://www.nature.com/nrg/multimedia/rnai/animation/index.html>
- mechanismus **post-transkripčního** umlčování genů
- využívá **dvouřetězcové RNA** pro interferenci s genovou expresí
- za objasnění tohoto procesu u hlístice získali v roce 2006 **Andrew Fire** a **Craig C. Mello** Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství  
(dsRNA efektivnější než ssRNA)

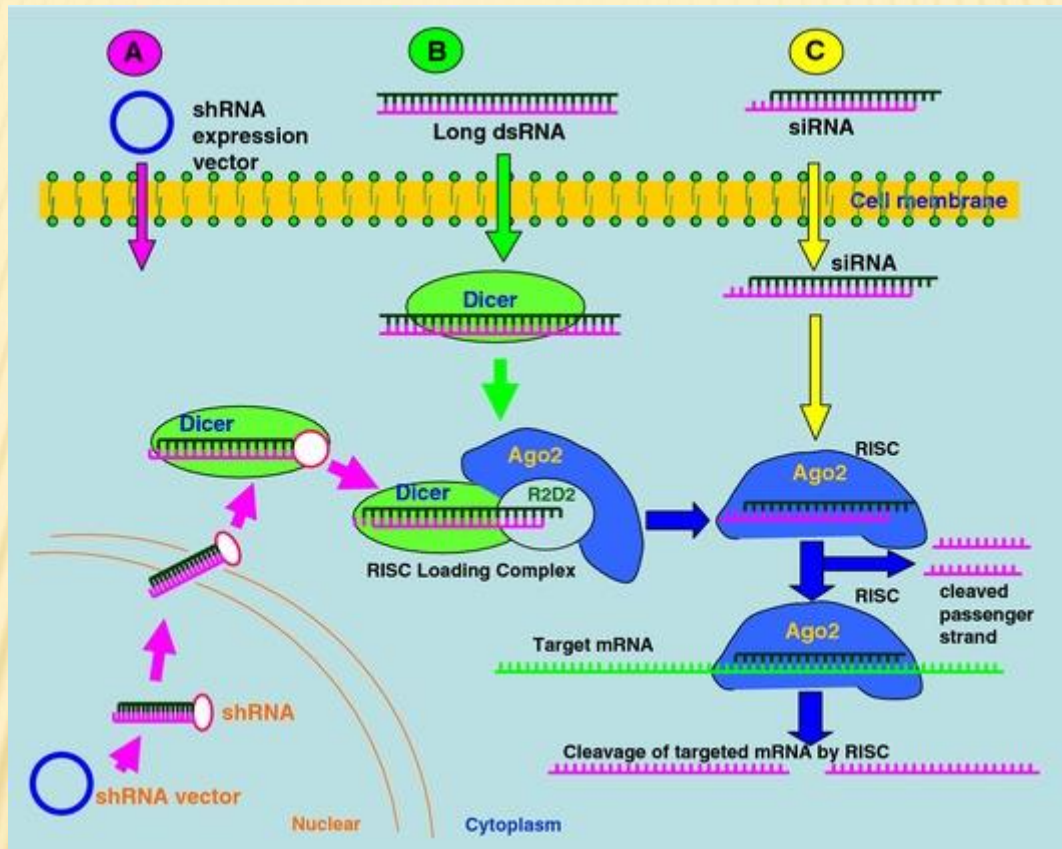


# RNA interference

podstatou je enzymová  
degradace nebo  
zastavení translace  
specifické mRNA



# RNA interference

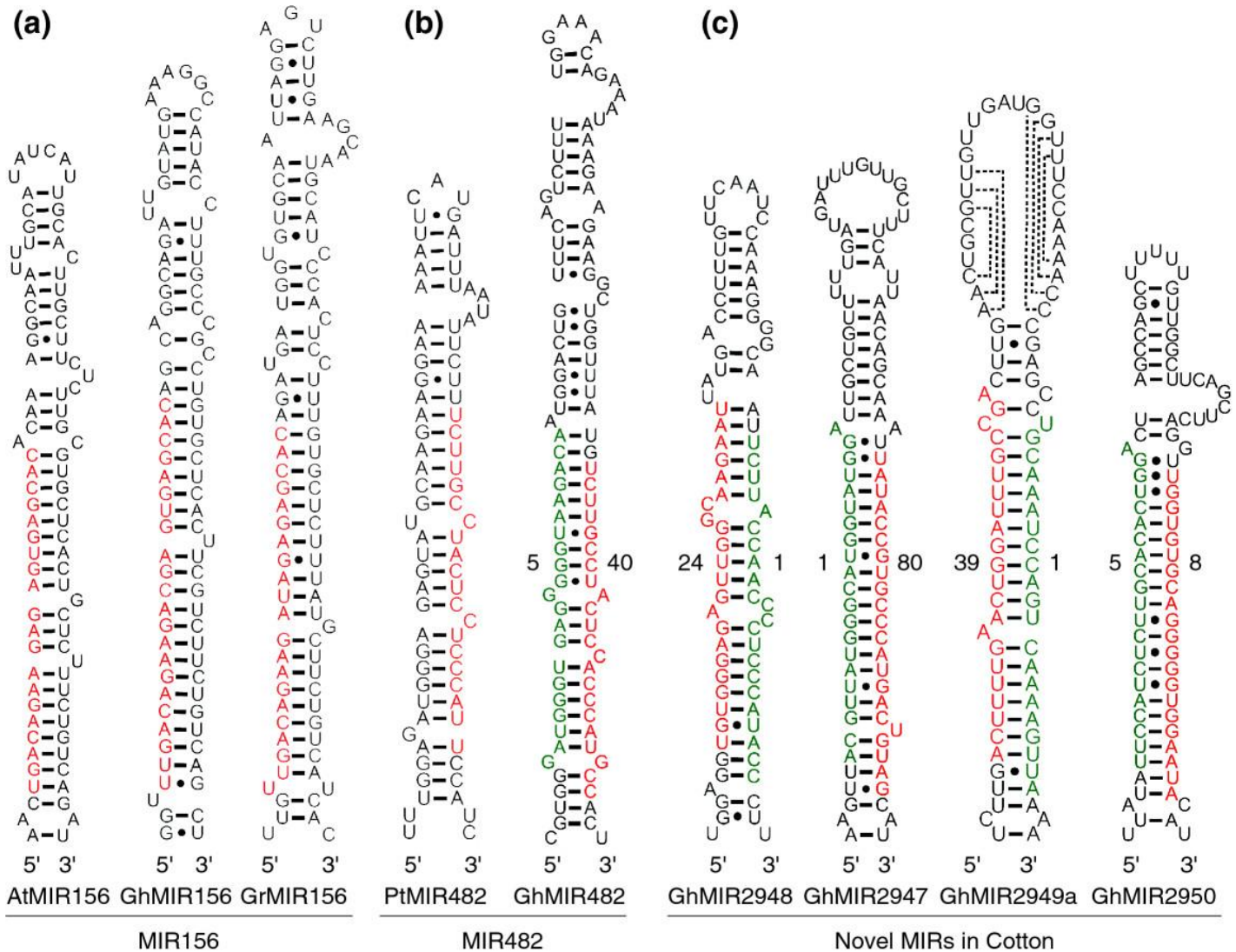


- zřejmě část buněčného obranného mechanismu proti virům
- perspektivní využití v lékařství - obdoba genové terapie
- siRNA (miRNA) lze přenést jako **exogen**

# mikroRNA

---

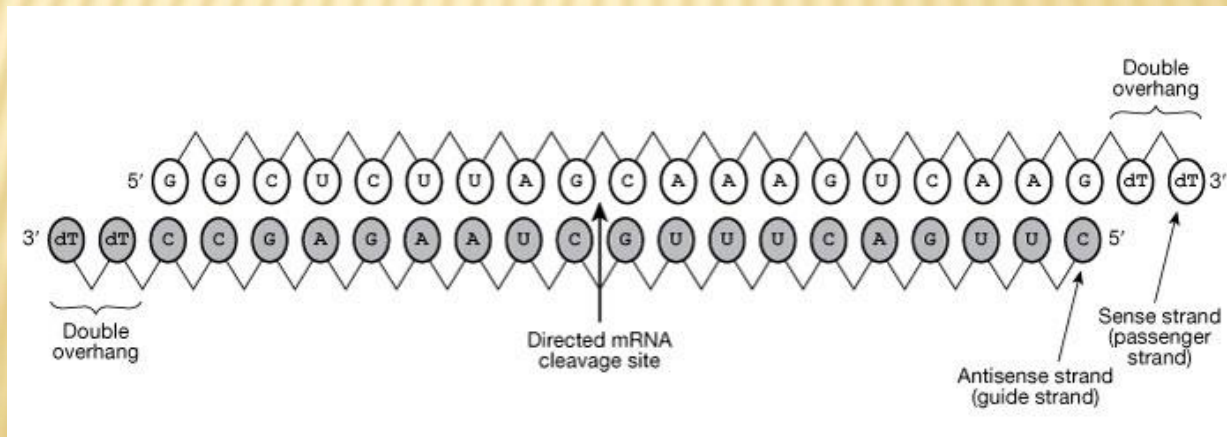
- malé nekódující endogenní dsRNA o velikosti 18-25 nukleotidů
- jejich původ je ale v ssRNA (vlásenková struktura)
- negativní regulátory genové exprese, které obvykle blokují translaci cílové mRNA (neúplná homologie)
- **mikroRNA** vznikají z primárních transkriptů **pri-miRNA**, které jsou relativně velké (i několik kb)
- pri-miRNA se **v jádře** zpracovávají RNAázou **Drosha** a proteinem **Pasha** vázajícím dsRNA na **pre-miRNA** dlouhé cca 70 nukleotidů s nedokonalou vlásenkovou strukturou
- pre-miRNA se exportují do cytoplazmy **Exportinem 5** a štěpí se nukleázou **Dicer** na konečné duplexy miRNA
- miRNA se váže k RISC, jedno vlákno se degraduje a druhé zprostředkovává degradaci nebo inhibici translace příslušné mRNA



... přes 28 tis v databázi MiRBase (<http://www.mirbase.org/>)

# siRNA

- malé nekódující dsRNA o velikosti 21-25 nukleotidů
- negativní regulátory genové exprese, které obvykle zprostředkovávají degradaci cílové mRNA (úplná homologie)
- exogenní původ (viry, syntetické)
- v cytoplazmě procesovány proteinem Dicer
- siRNA se váže k RISC, jedno vlákno se degraduje a druhé zprostředkovává degradaci nebo inhibici translace příslušné mRNA

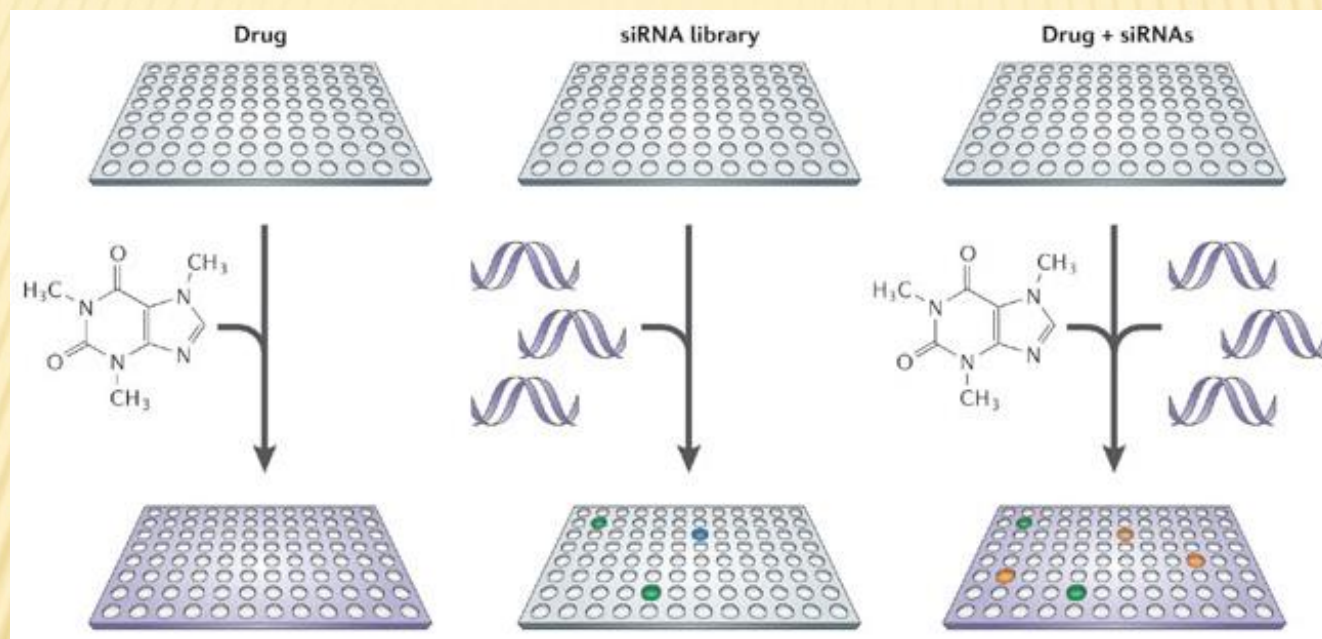


# miRNA versus siRNA

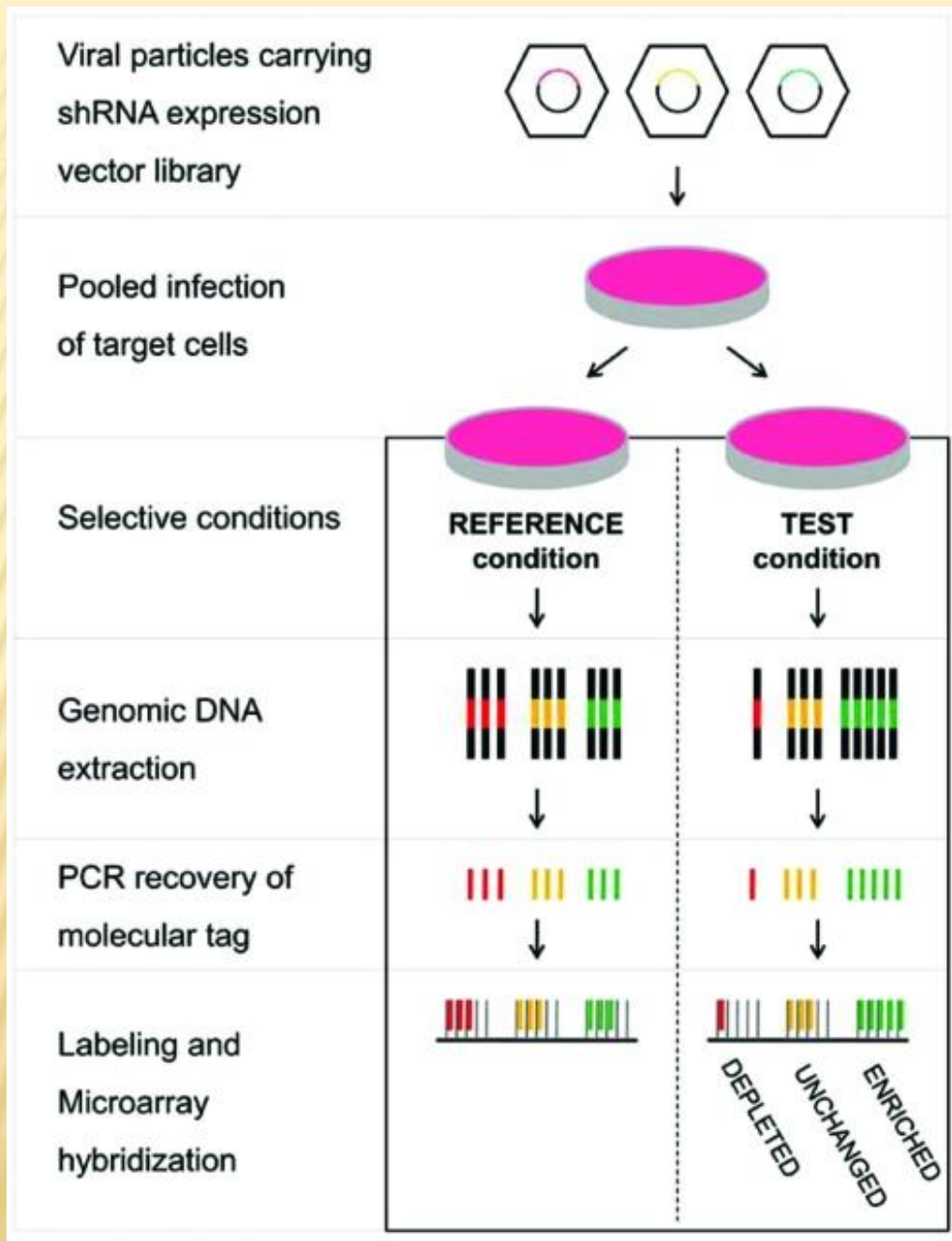
---

- obě RNA negativně regulují translaci
- miRNA je endogenní, siRNA je exogenní
- miRNA může, ale obvykle není úplně komplementární určitému transkriptu, proto jedna miRNA může blokovat translaci několika/mnoha transkriptů (desítky až stovky)
- siRNA je obvykle zcela komplementární - obvykle štěpení jediné cílové mRNA

# RNAi screening







## Vyhodnocení

kompetitivní hybridizace na DNA mikroerejích

RNA sekvenování

# Genetické přístupy

---

- × přenos genů
- × cílené mutace

## Metody genového inženýrství

- zavádění cílených mutací in vitro
- příprava transgenních organizmů (knock-out, knock-in)
  - exprese - trvalá
  - inducibilní
  - tkáňově specifická
- zavádění cílených mutací přímo v genomech

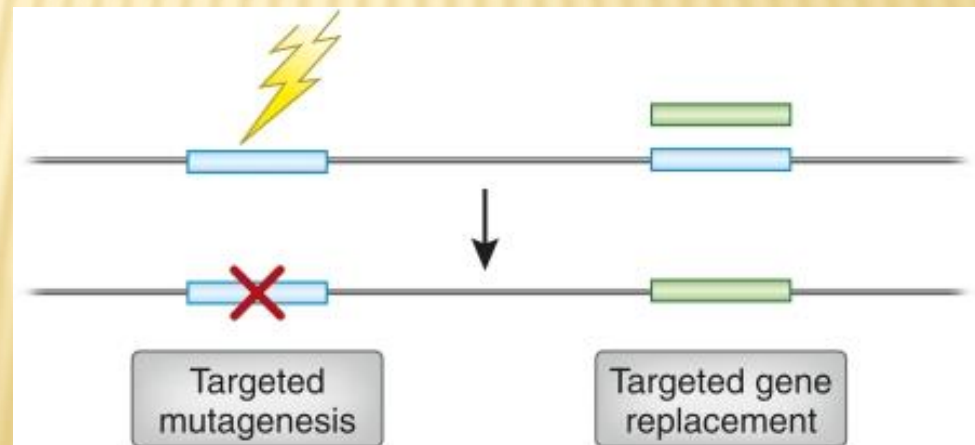
# Cílená mutageneze přímo v genomech

- × Homologní rekombinace
- × Umělé restriční enzymy

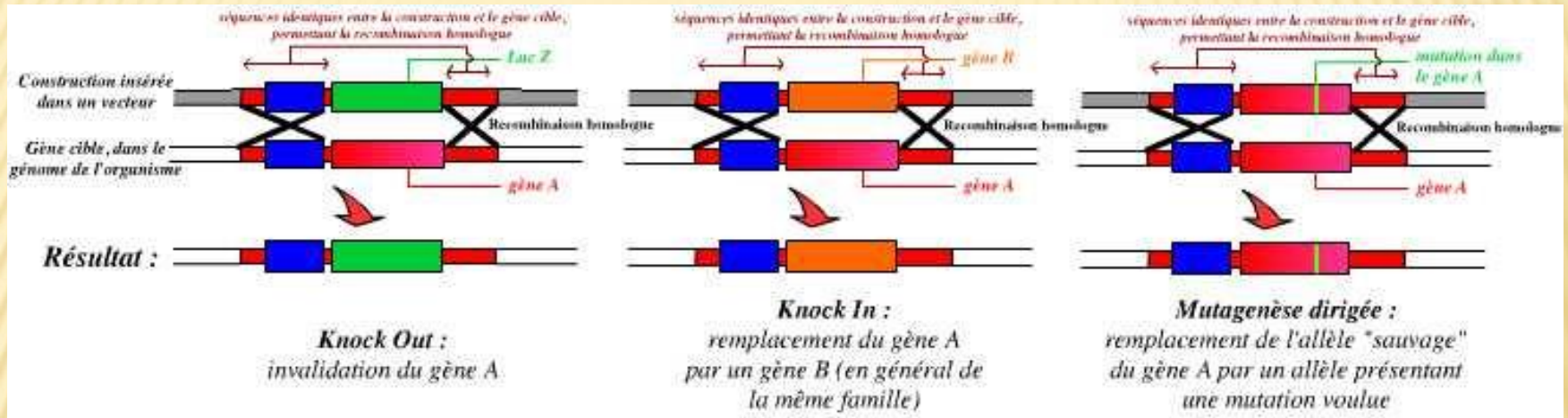
ZFN (zinc-finger nucleases)

TALENs (transcription activator-like effector nuclease)

- × CRISPR/Cas9



# Homologní rekombinace



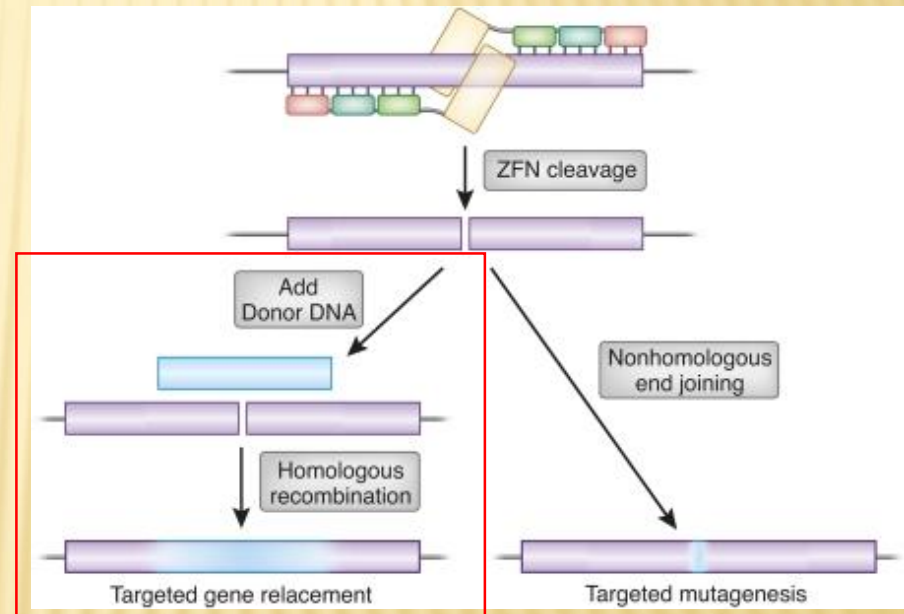
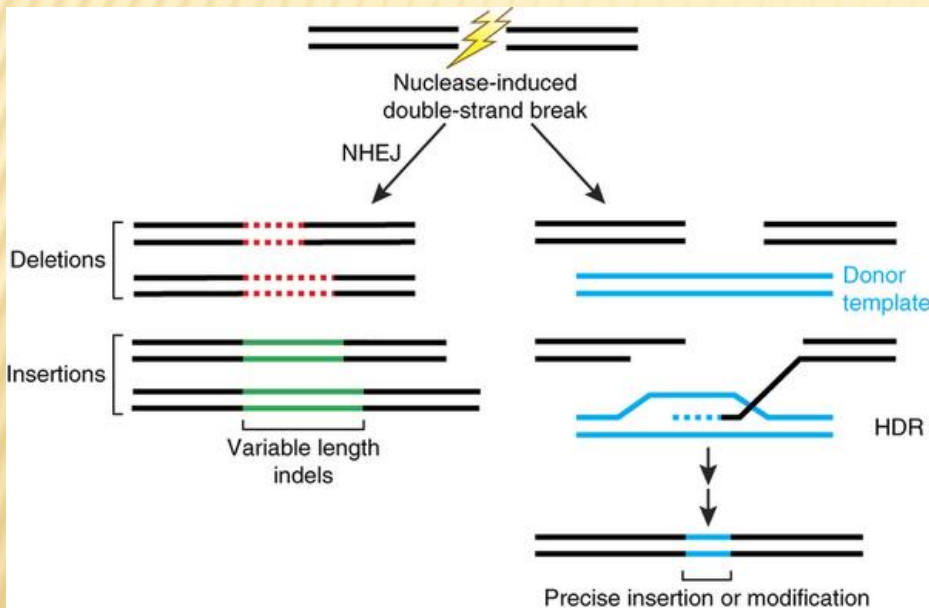
- různá účinnost u různých organismů
- nejvíce využívány u bakterií, kvasinek a myší (nízká účinnost ale vhodné metody selekce)

Myš - dvojitá selekce

- pozitivní selekční marker - mezi homologickými oblastmi
- negativní selekční marker - vně homologických oblastí
- protokoly po práci s myšími ES buňkami (pluripotence)

# Nukleázy s motivem zinkových prstů

od 80. let - četnost homologické rekombinace je zvýšena indukcí dsDNA zlomů



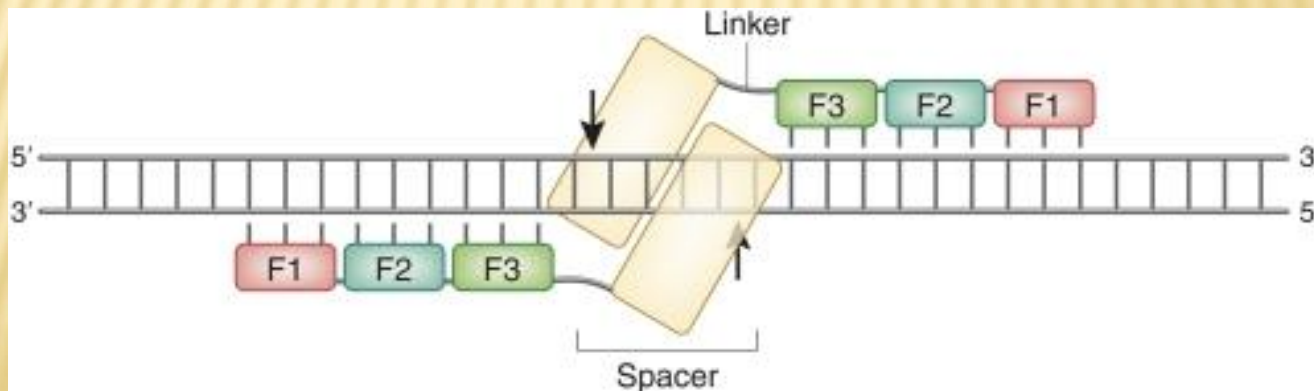
- snaha o vývoj systému pro sekvenčně specifickou tvorbu dsDNA zlomů

# Nukleázy s motivem zinkových prstů

Molekuly se 2 doménami - vazba na DNA  
- štěpení DNA

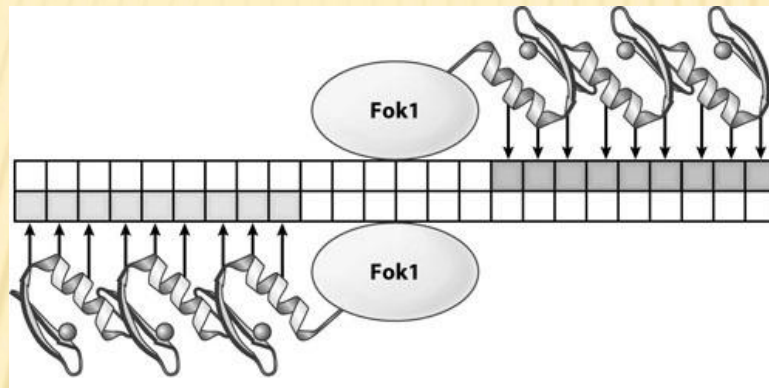
RE *FokI* (třída IIS - štěpí mimo rozpoznávací sekvenci)

- DNA vazebná doména rozeznává sekvenci 5'-GGATG-3'
- DNA štěpicí doména nemá žádnou sekvenční specifitu
- ds zlomy vytváří ve formě dimeru



# Nukleázy s motivem zinkových prstů

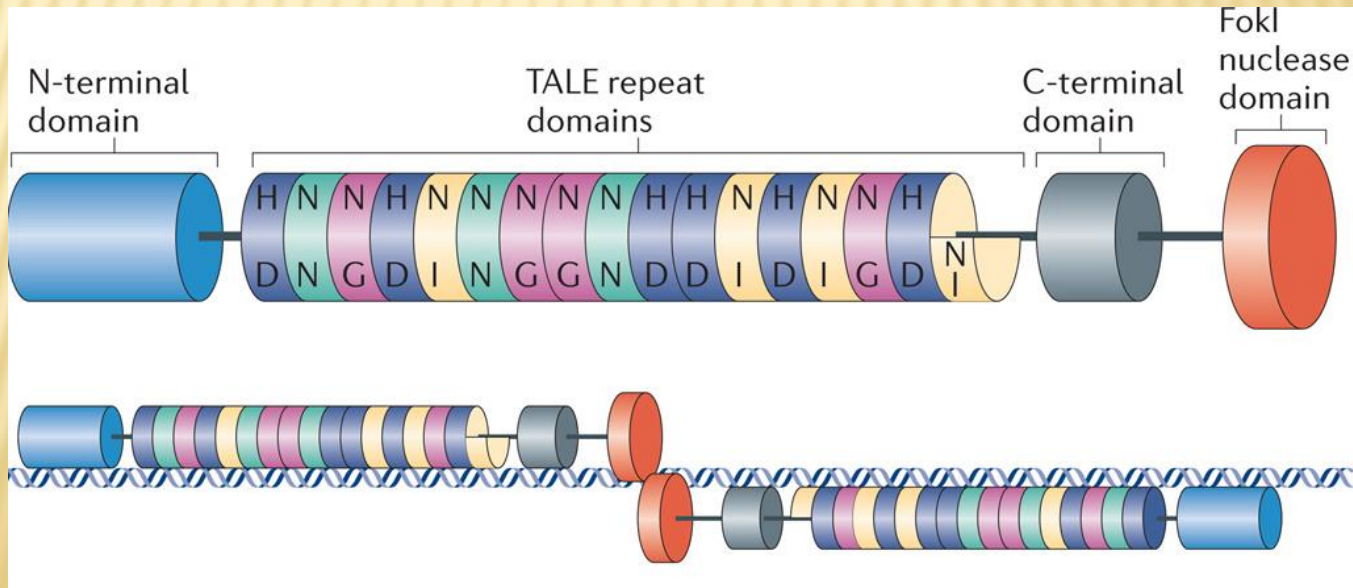
- modifikací DNA vazebné domény - regulace specifity
- obvykle se používají min 3 motivy zinkových prstů
  - 18bp rozpoznávací sekvence (jedinečnost v genomu)



- specificita se následně musí experimentálně ověřit
- produkovány již otestované firmami: Sigma-Aldrich  
Sangamo BioSciences
- metoda funguje u mnoha typů organismů (rostliny, živočichové) ...

# TALENs

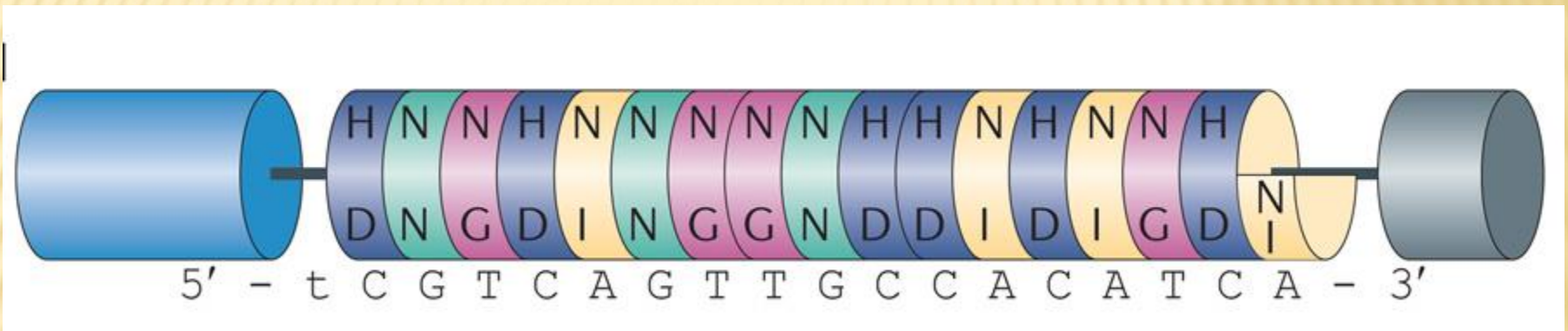
- obdoba k ZFN
- transcription activator-like effectors (TALEs) - proteiny sekretované bakteriemi *Xanthomonas* - ovlivňují transkripci v hostitelských rostlinách
- účinnost obdobná jako u ZFN, ale jednodušší design





# TALENs

- TALE repetice v DNA vazebné doméně rozpoznávají specifický nukleotid



- výsledkem je jakási skládačka pro libovolnou sekvenci
- každý si může sám vytvořit (<http://www.addgene.org/TALEN/>)
- podobně jako u ZFN - nutno přenést do buněk na expresním vektoru

# Cílená mutagenese umělými nukleázami

---

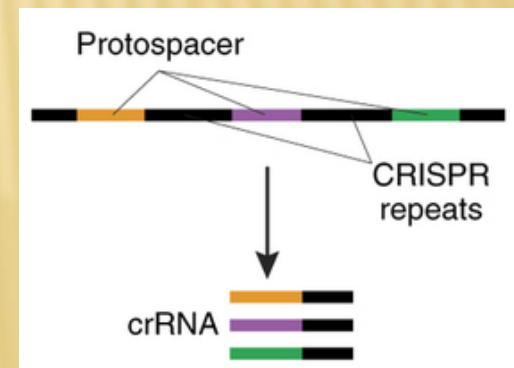
- umělé restriční endonukleázy
- vazba na specifické místo v genomu
- do buněk se obvykle dopravují na expresních vektorech
- lze je využít pro tvorbu - bodových mutací ...
  - delecí
  - inzercí
  - inverzí
  - duplikací
  - translokací
- podstatou je tvorba dsDNA zlomu a jeho oprava
- sekvenční specifita je dána **DNA-protein interakcí**

# CRISPR/Cas9

- ✗ CRISPR-associated protein 9 - nukleáza ze *Streptococcus pyogenes*
- ✗ adaptivní imunita bakterií proti virům
- ✗ RGN - RNA-guided nuclease
- ✗ sekvenční specifita je dána **interakcí DNA-RNA**

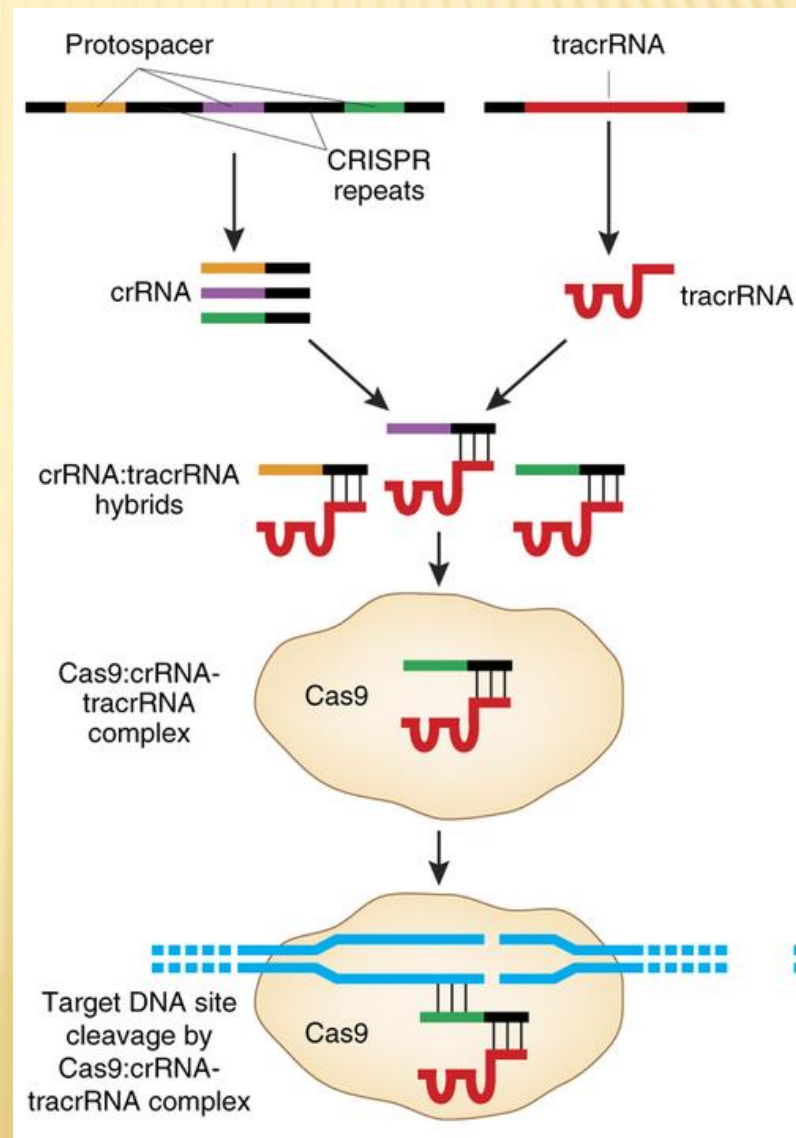
Bakterie - inkorporace cizorodé DNA do CRISPR repetit v genomu  
- tyto následně přepsány do RNA (crRNA)

crRNA - protospacer - fragment cizorodé DNA  
- CRISPR



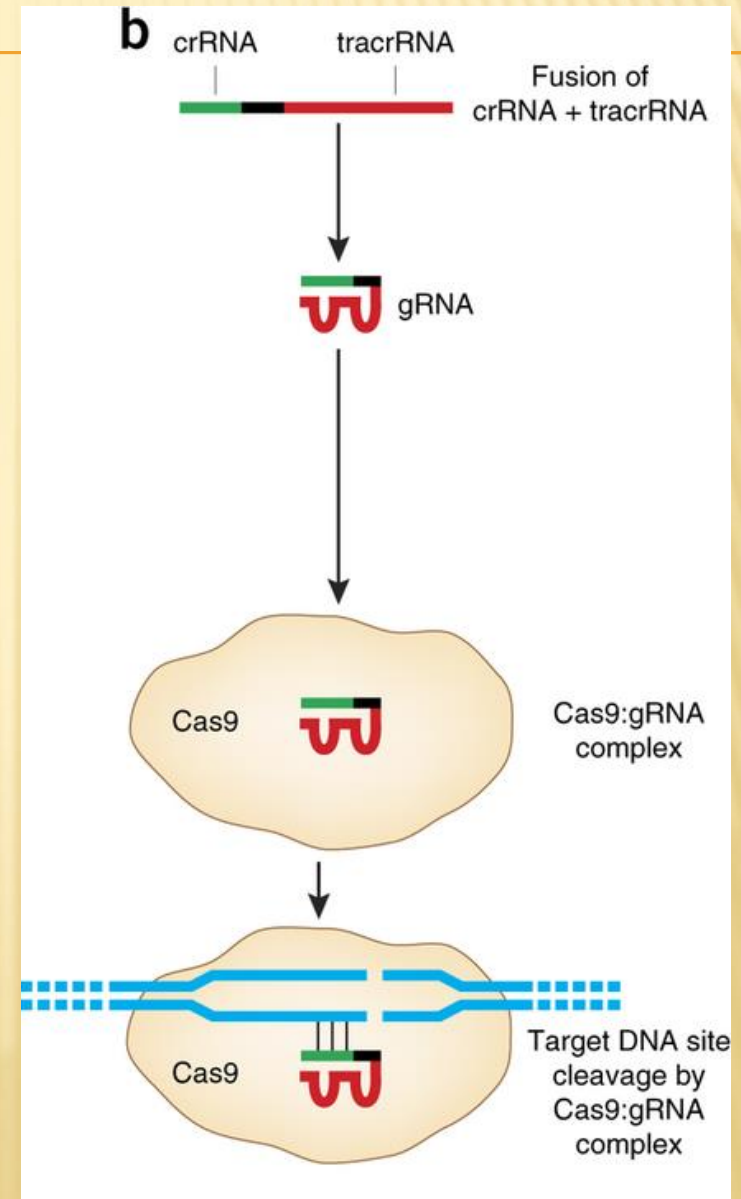
# CRISPR/Cas9

- crRNA poté hybridizuje s transaktivující CRISPR RNA (tracrRNA)
- tento komplex RNA interaguje s Cas9 nukleázou
- Protospacer RNA navede celý komplex k cizorodé DNA (komplementarita sekvencí)
- výsledný ribonukleoproteinový komplex štěpí cizorodou komplementární DNA



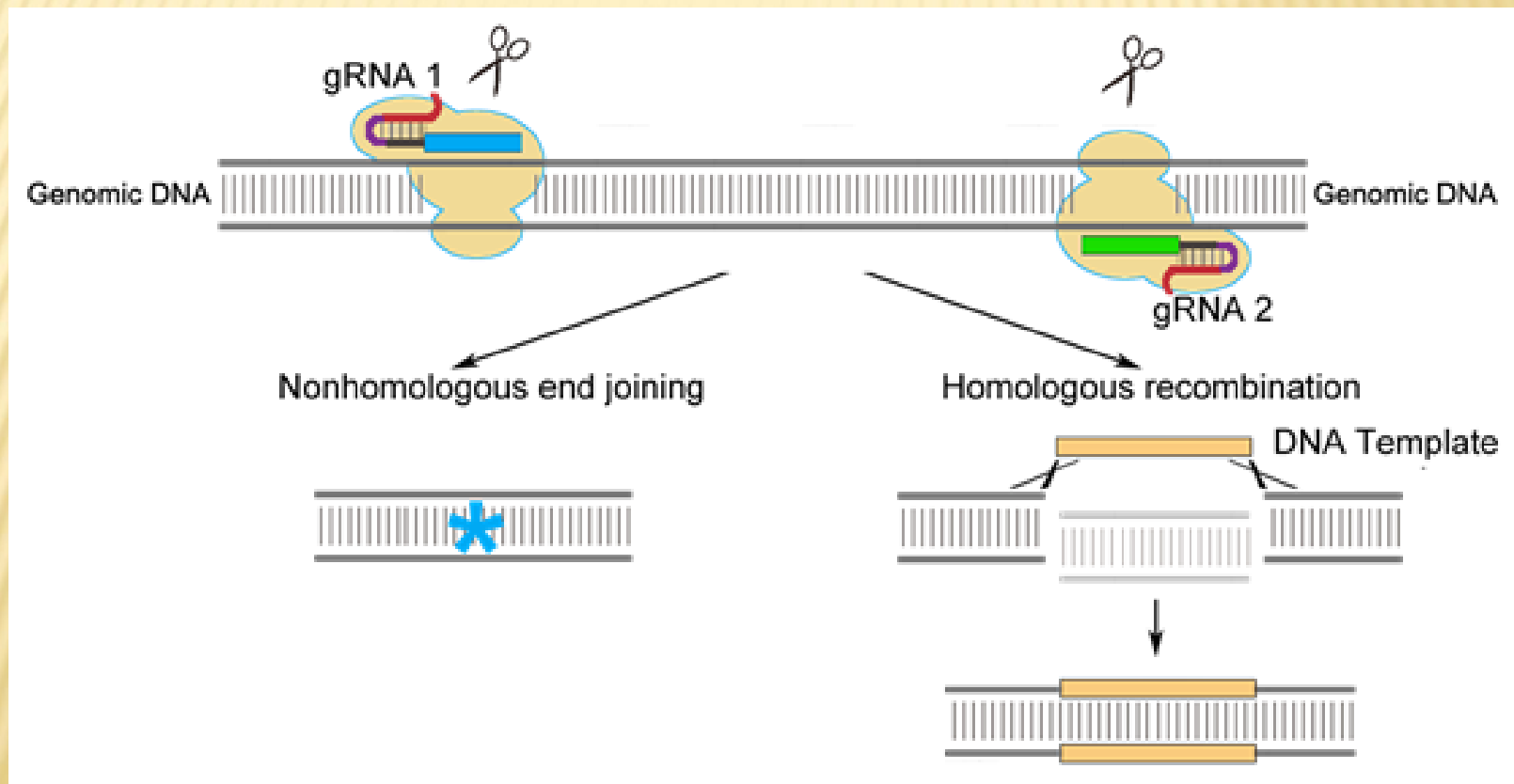
# CRISPR/Cas9

- celý systém modifikován pro cílenou mutagenezi
- vektor - gRNA = crRNA + tracrRNA
- součástí gRNA i 20nt komplementární úsek k cílovému místu v genomové DNA
- + koexprese Cas9 nukleázy



# CRISPR/Cas9

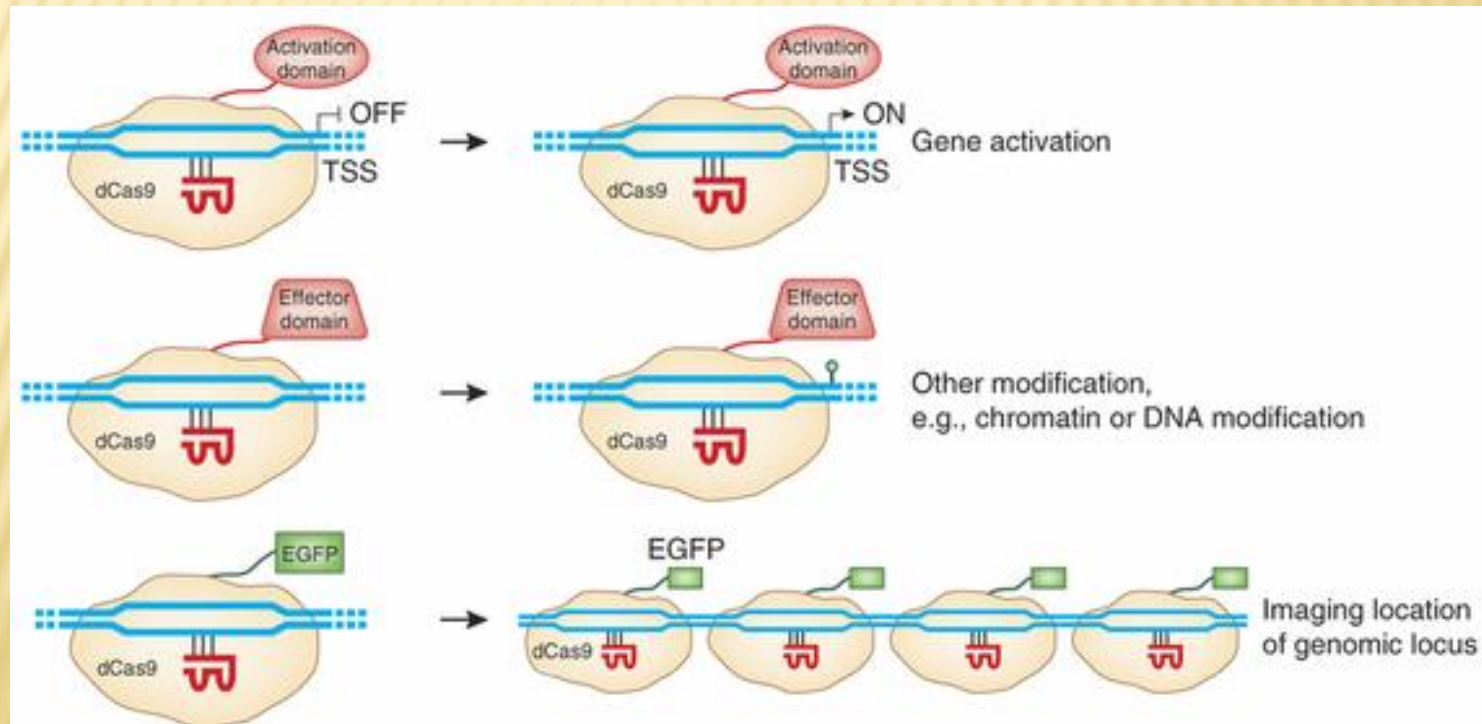
- editace genomu - lidská embrya, etika ...



# CRISPR/Cas9 - další způsoby využití

## Nukleáza-defektní systém

- fúze s transkripční doménou - aktivace transkripce
- fúze s epigenetickými regulátory (metylázy) - epigenetické regulace
- vizualizace sekvencí na DNA (repetice, telomér, ...)



---

# Proteomika



# Historie proteomiky

---

1970 - SDS-PAGE

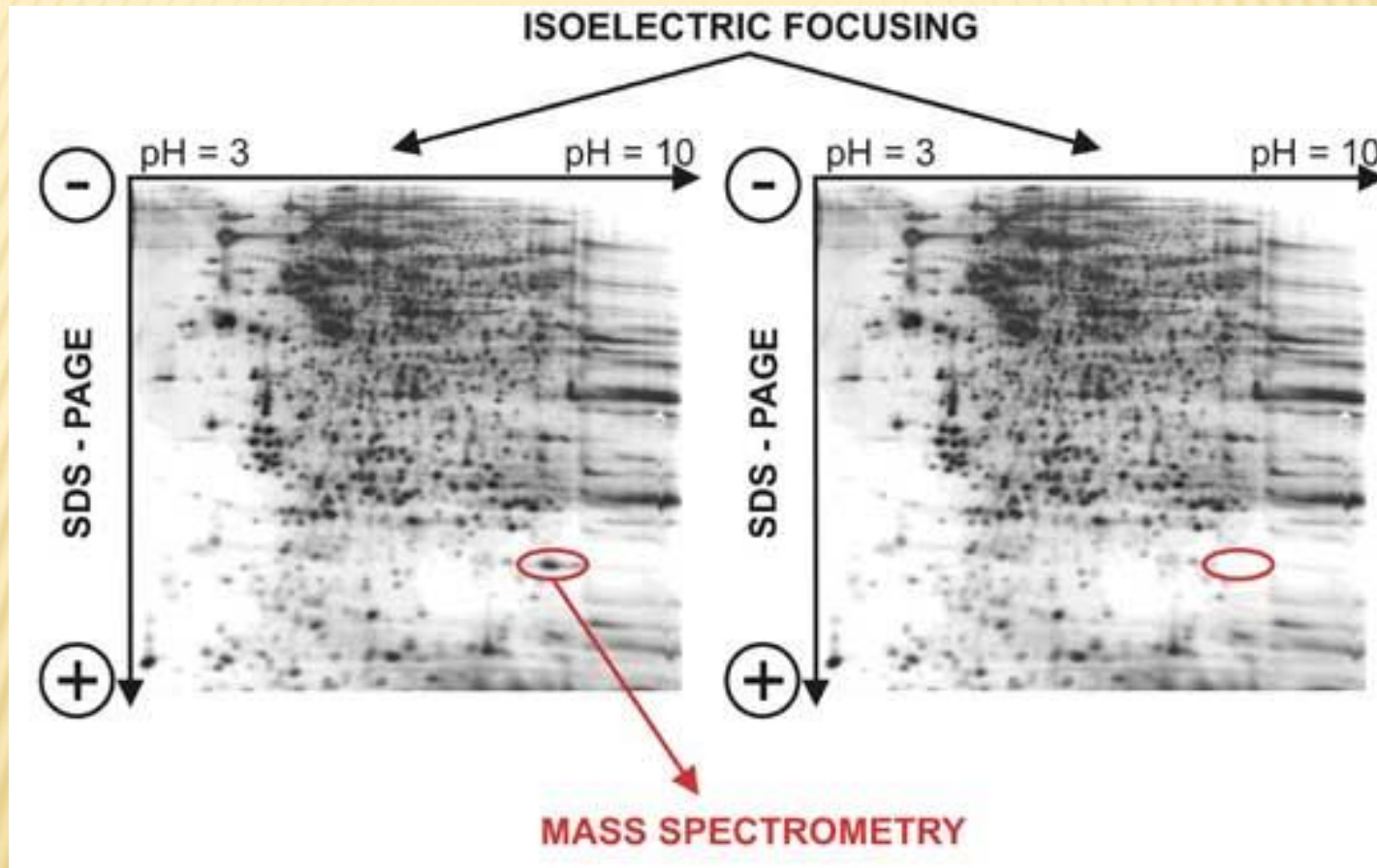
1975 - 2D SDS-PAGE

1986 - sekvenování proteinů - tandemová hmotnostní spektrometrie

1988 - MALDI MS (matrix-assisted laser desorption/ionization)

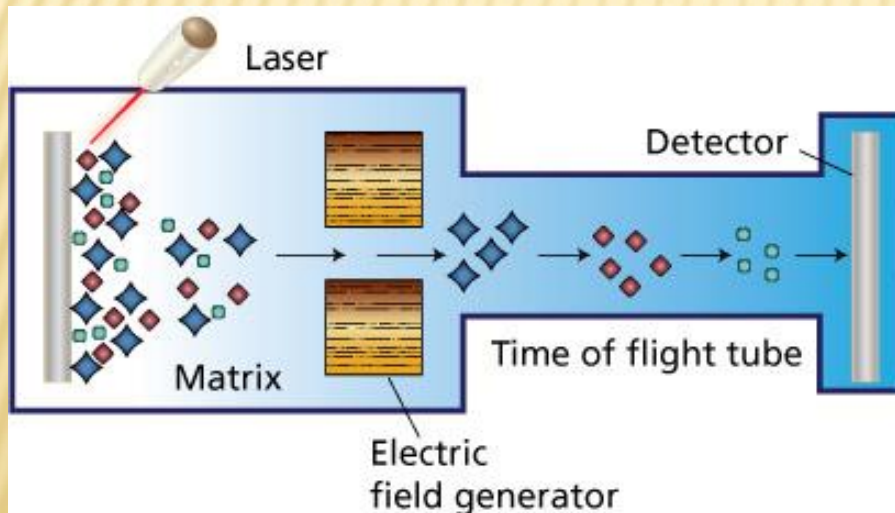
1993/1994 - algoritmus pro korelace sekvence proteinů a MS dat  
- 1. identifikovaný protein z 2D

# Historie proteomiky

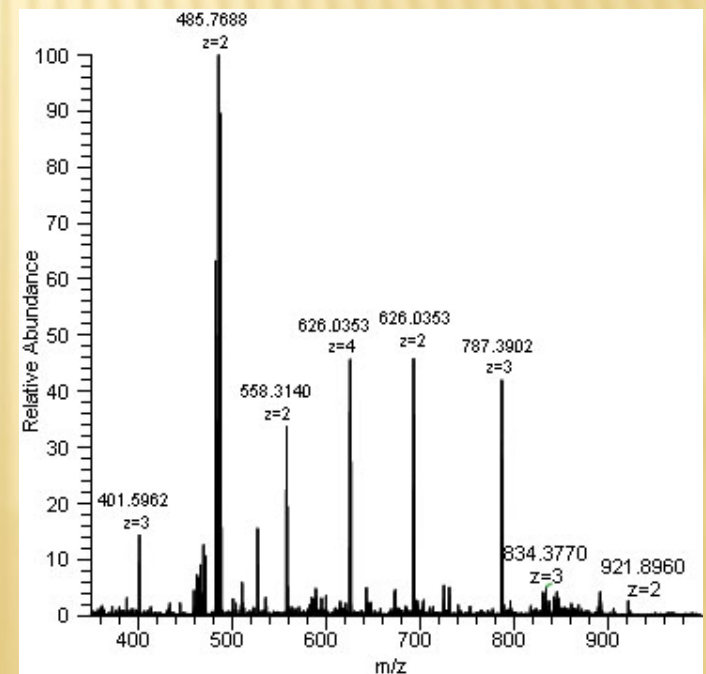


# Hmotnostní spektrometrie

- umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu látek
- principem je tvorba pozitivně či negativně nabitých částic (iontů), které se rozliší na základě poměrů jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a poté jsou zaznamenány detektorem
- výsledkem je hmotnostní spektrum, které graficky znázorňuje četnost iontů na hodnotě  $m/z$



MALDI



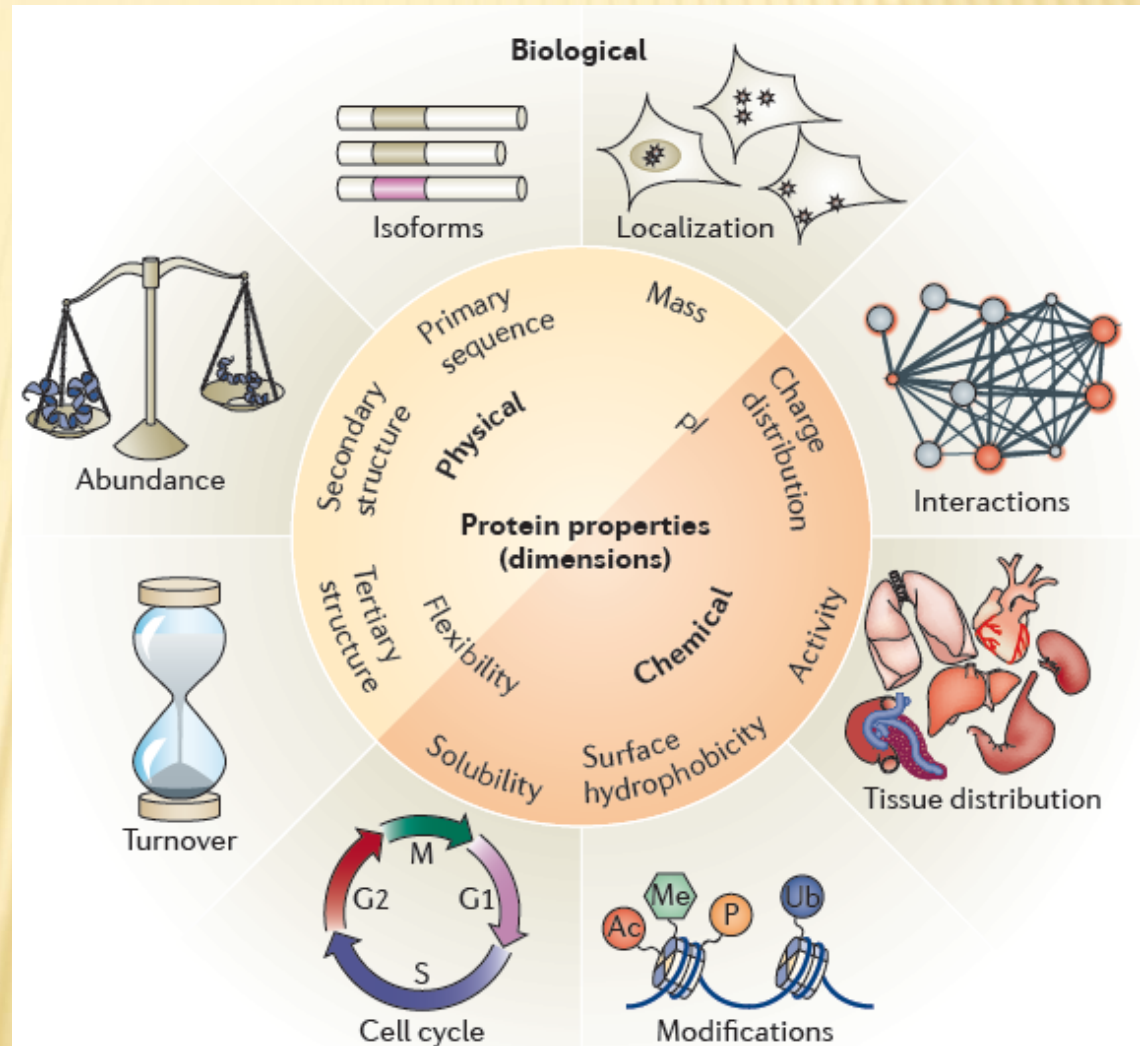
# Proteomika

Nové metody:

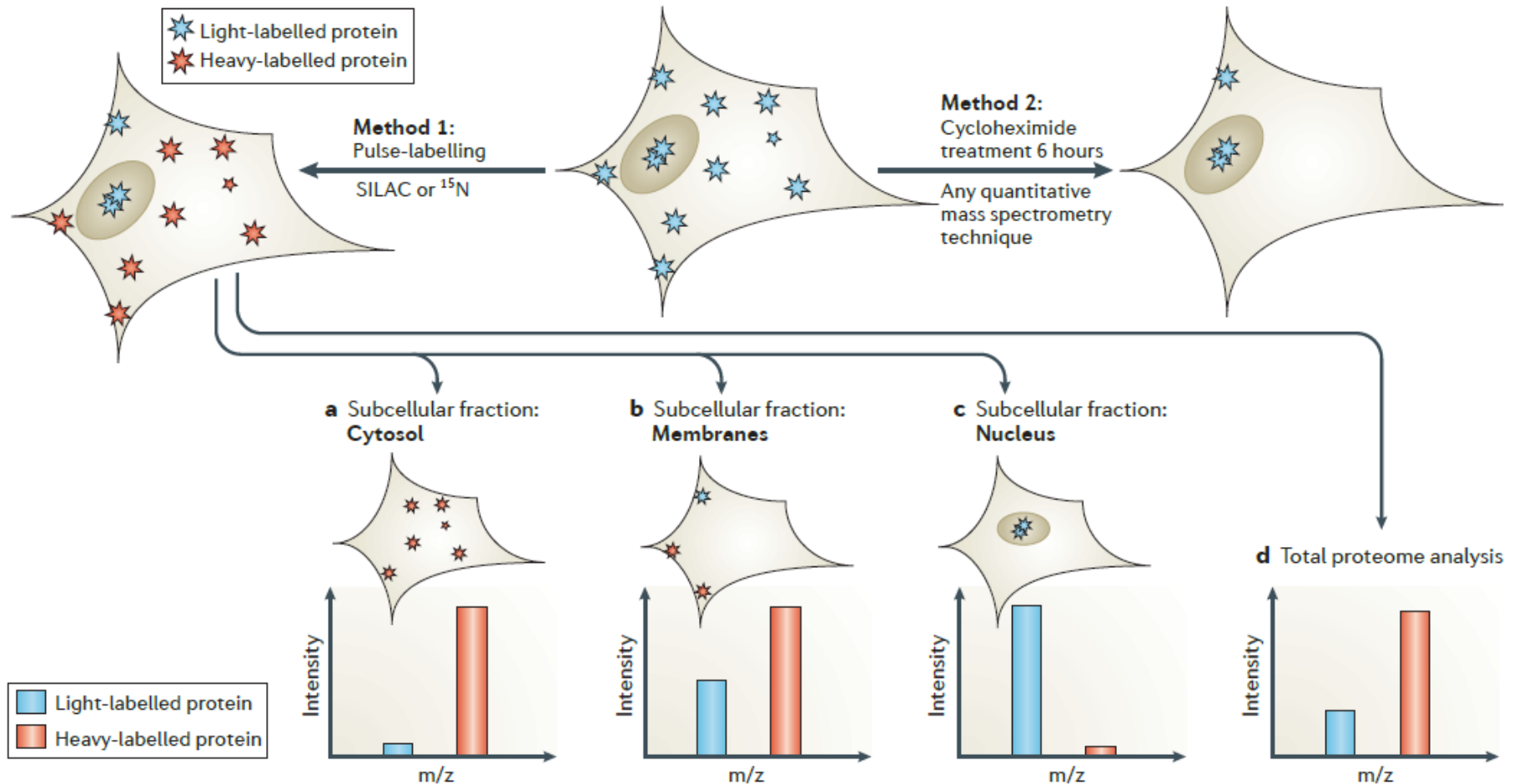
- příprava vzorku
- značení proteinů
- separace proteinů
- hmotnostní spektrometrie

- rychlost
- kapacita
- citlivost
- rozlišení

„ proteom organismu za 1. den“



# Protein turnover

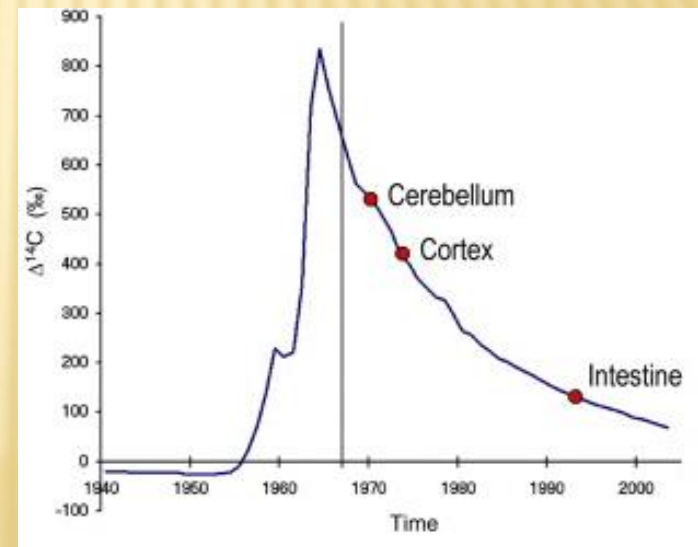
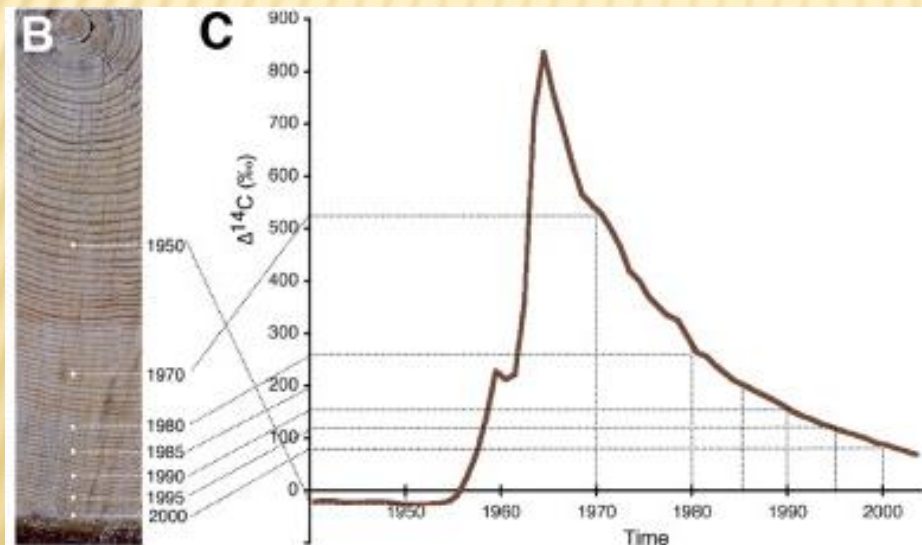


# Jak staré jsou buňky v lidském těle?

- hladina izotopu  $^{14}\text{C}$  v přírodě v historii konstantní
- testy nukleárních bomb (1955-1963) - nárůst  $^{14}\text{C}$
- množství  $^{14}\text{C}$  v určité oblasti lze určit analýzou letokruhů (MS)



Jonas Frisén



# Databáze

---

- obrovské množství dostupných informací

[https://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_biological\\_databases](https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_biological_databases)

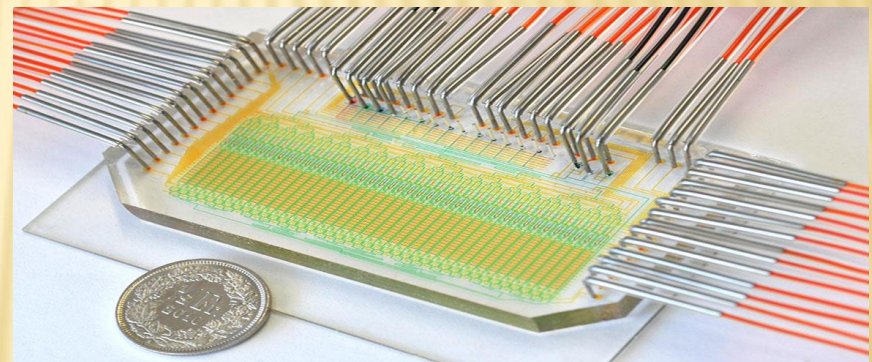
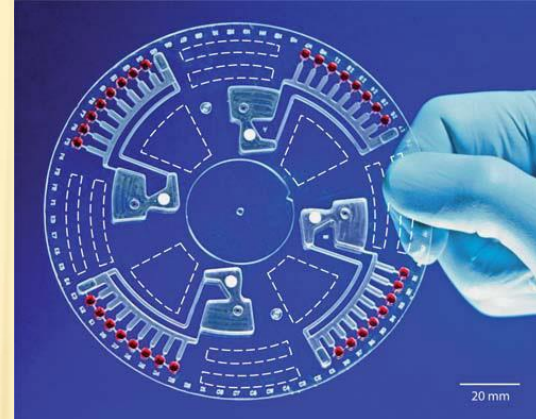
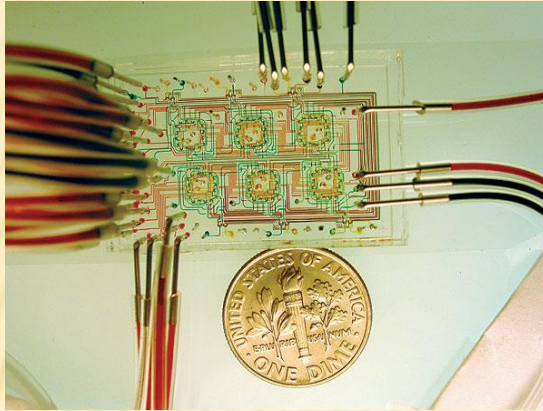
Genomy - organismy, sekvence, mutace, polymorfismy

Proteomy - organismy, sekvence, struktury, interakce

Transkriptomy - expresní databáze, izoformy, sestřih ...

Signální dráhy, metabolické dráhy, choroby, fenotypy, organismy, ...

# Mikrofluidika



## Lab-on-a-chip

- zařízení, které v sobě integruje různé laboratorní funkce v jediném čipu o velikosti několik mm až cm čtverečnicích



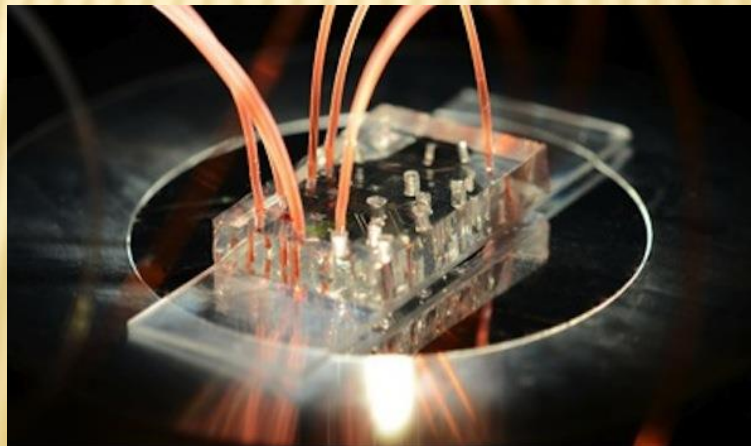
# Mikrofluidika

## × Biologické aplikace:

- PCR, imunoanalýzy, elektroforézy, detekce bakterií, kultivace a kokultivace buněk, single-cell analýzy, simulace proudění krve, analýza mechanických vlastností buněk, migrace buněk, intravazace/extravazace, funkce a struktura proteinů ...

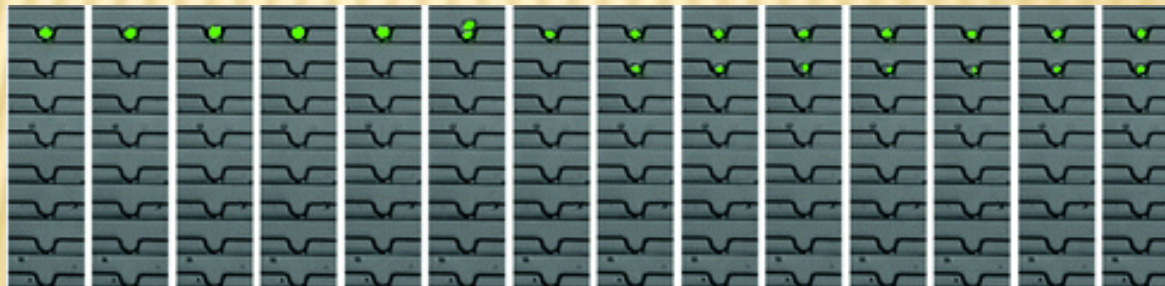
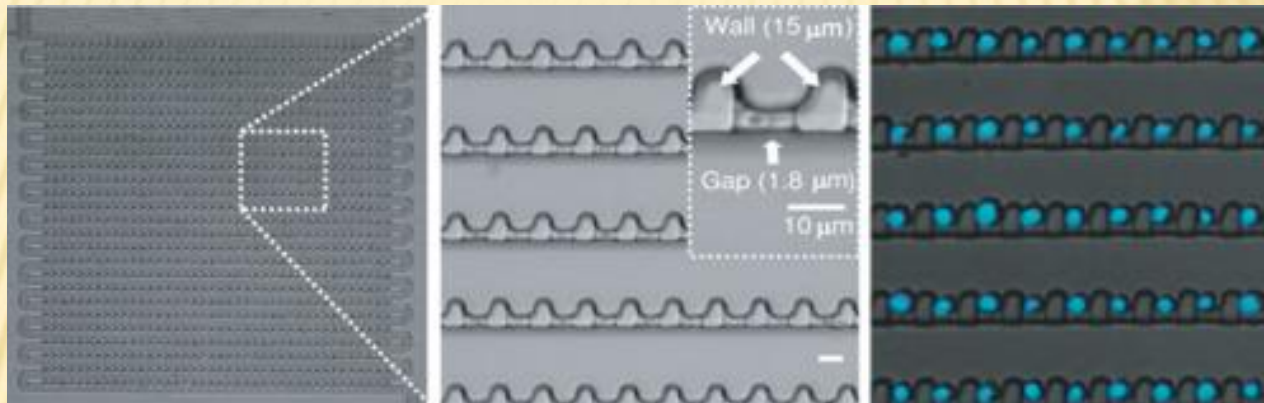
## × Chemické aplikace:

- separace molekul, chemické reaktory, detekce chemikálií, biosenzory, skřínínek léčiv, ...



# Mikrofluidika

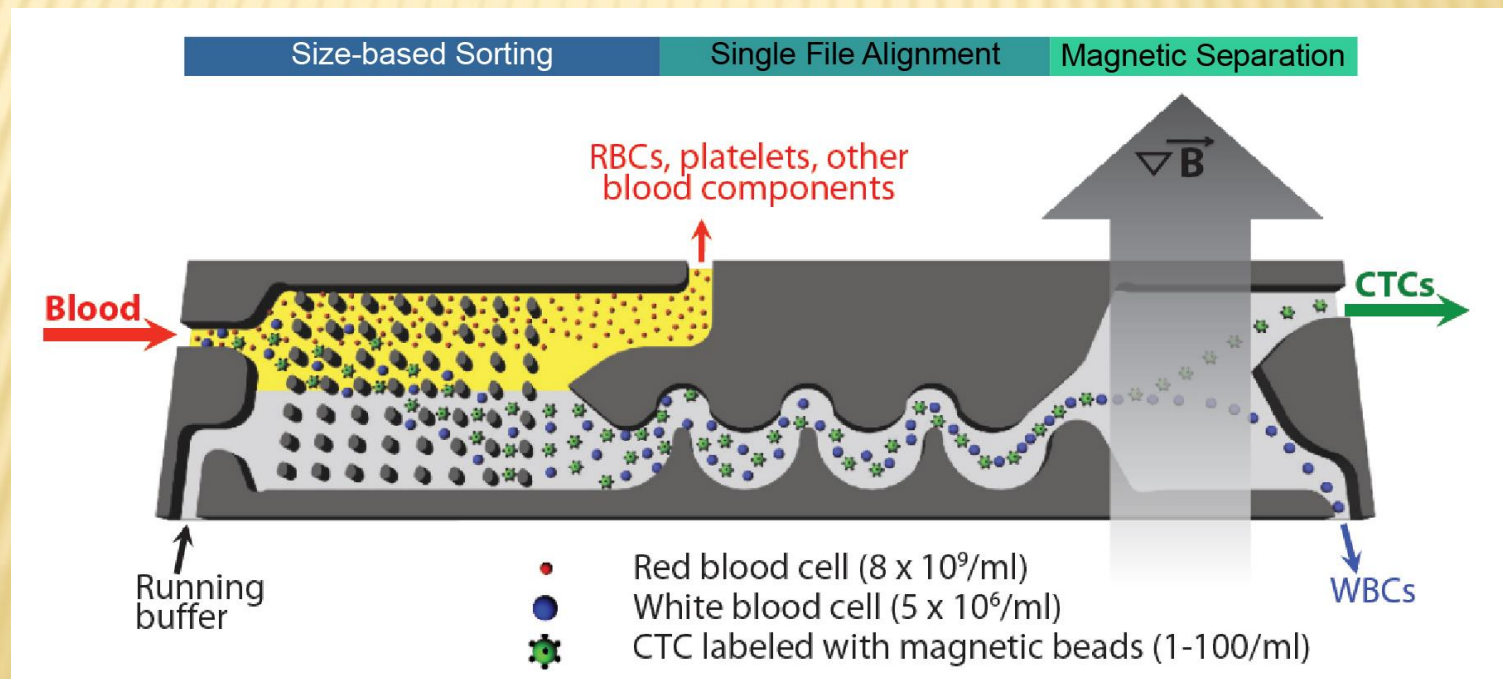
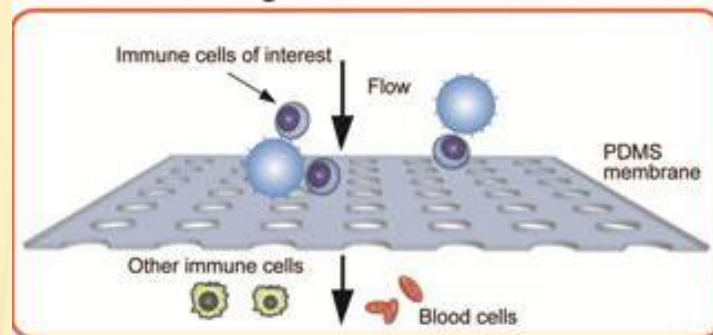
## Single-cell analýzy



# Mikrofluidika

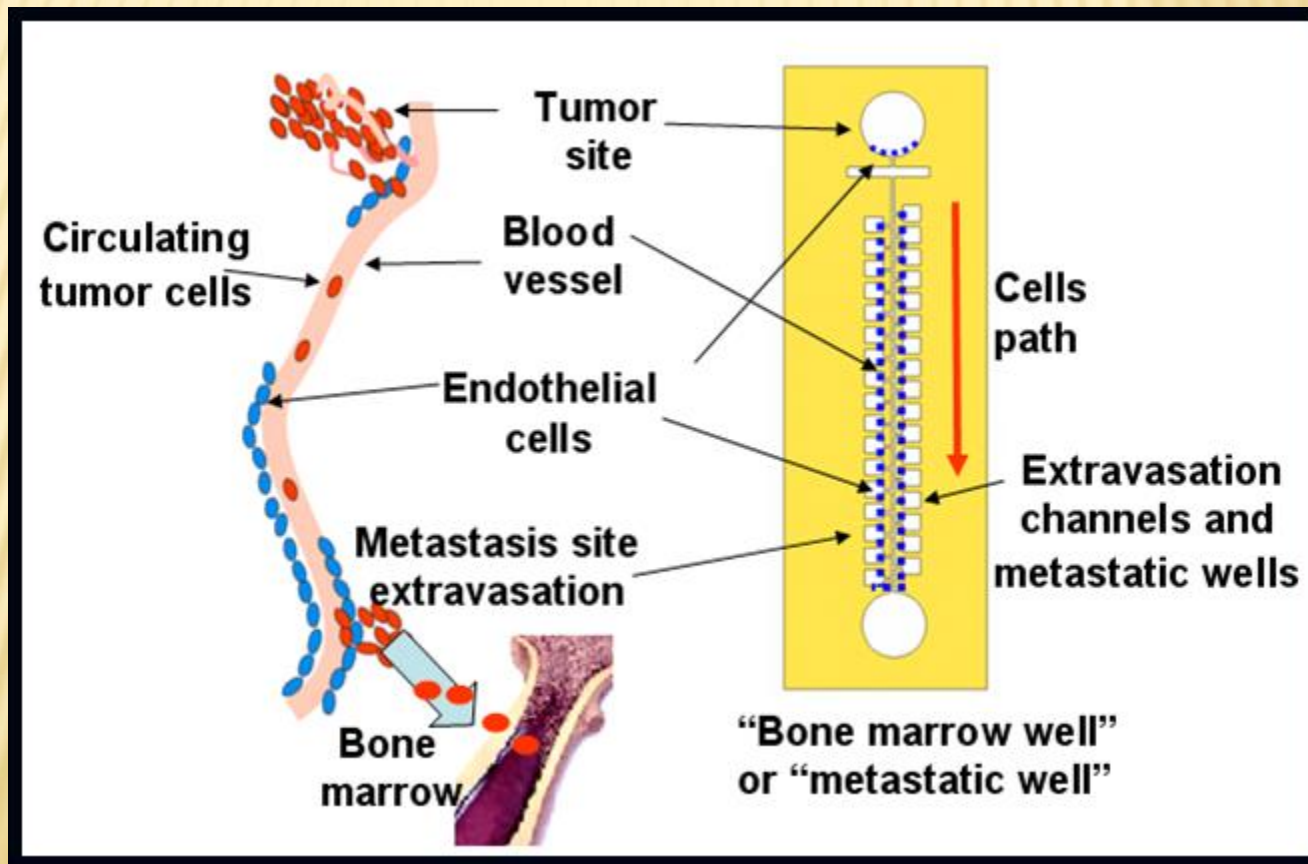
## Sortování buněk

Cell isolation using PDMS microfiltration membrane



# Mikrofluidika

## Analýza extravazace



Děkuji za pozornost

