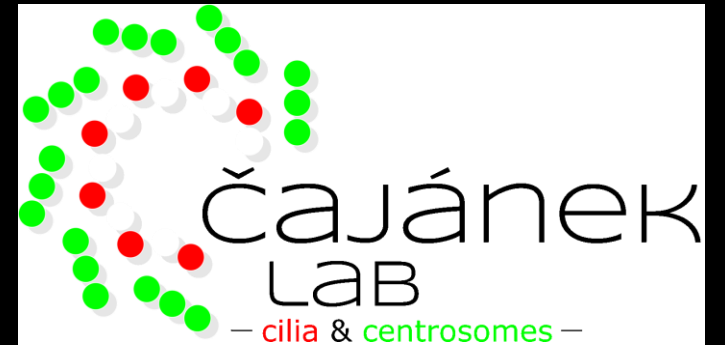


Lukáš Čajánek – Primární cilium: mechanismy a funkce



- Ph.D.: Karolinska Institute, Švédsko
- Postdoc: University of Basel, Švýcarsko
- Vlastní výzkum (PI): LF & PŘF MUNI

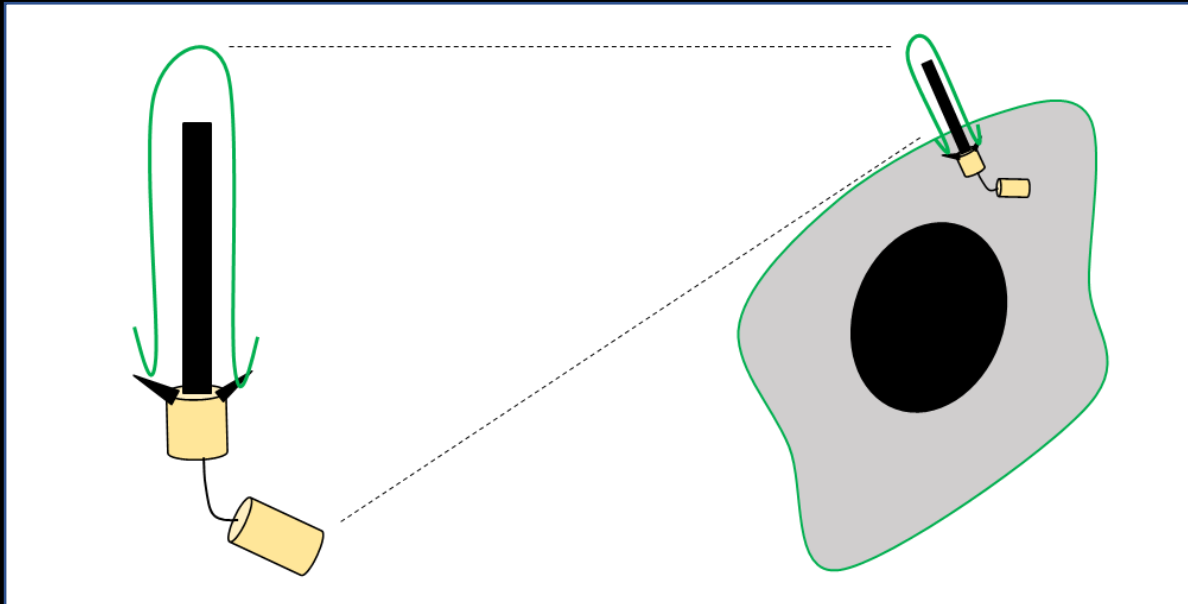


lukas.cajanek@gmail.com cajanek@med.muni.cz

www.cajaneklab.com

Primární cilium: mechanismy a funkce

- organela na povrchu buněk umožňující reagovat na podněty z okolí („buněčná anténa“)



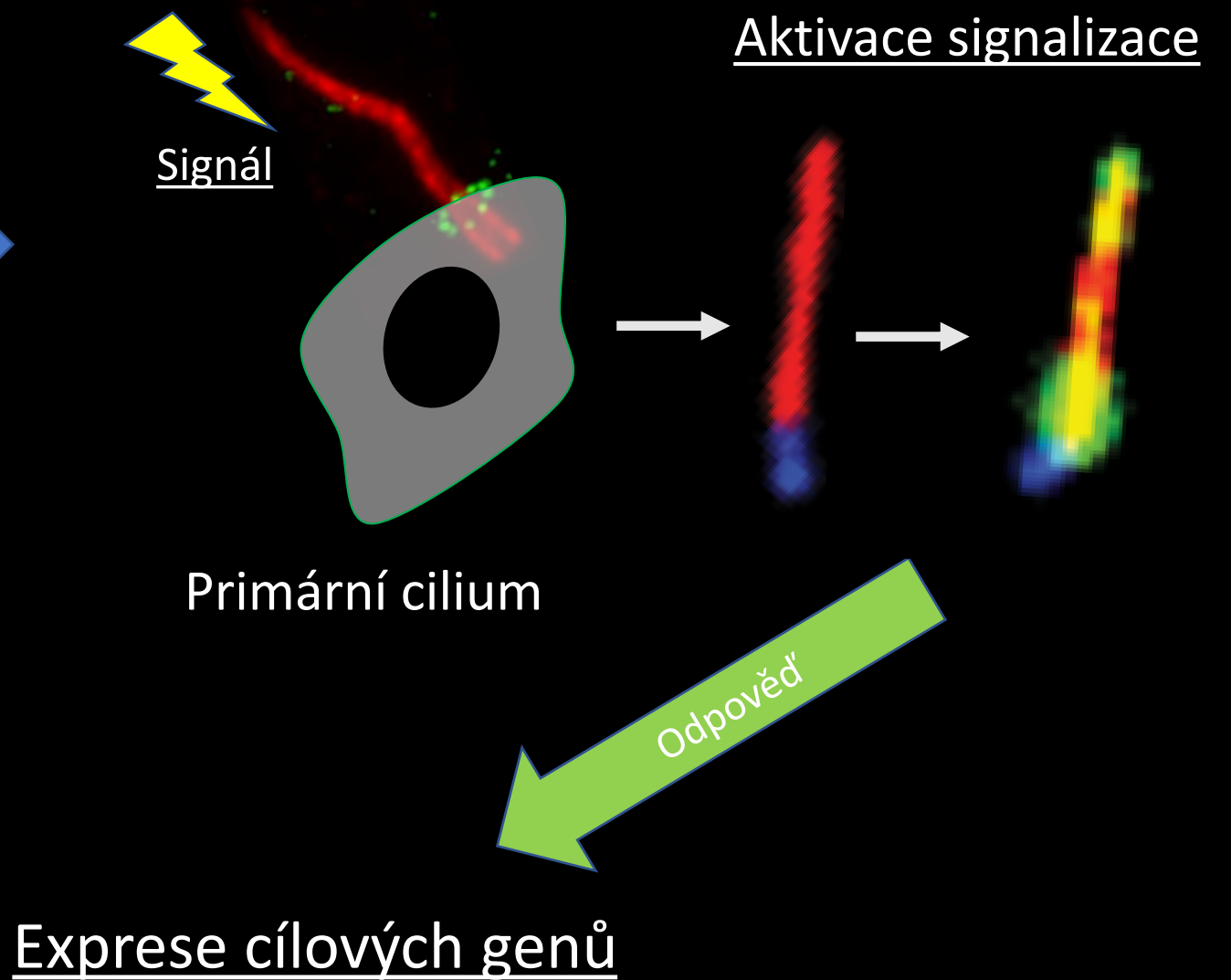
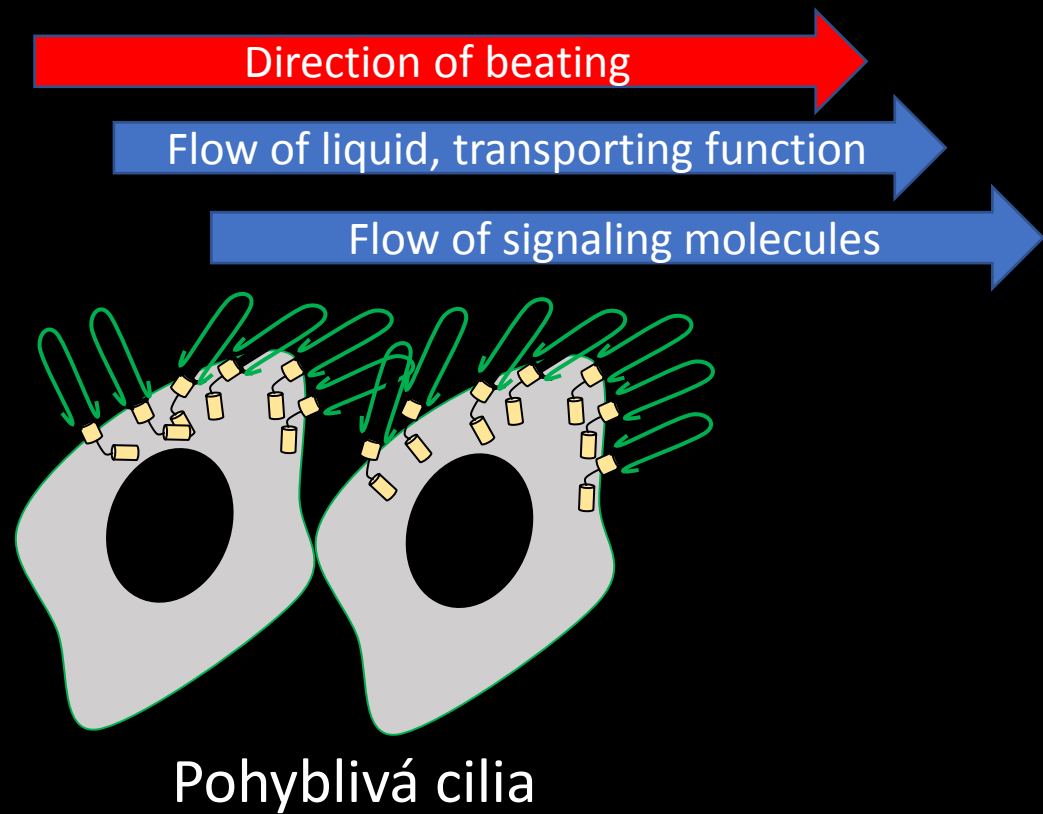
SIGNÁL



ODPOVĚD

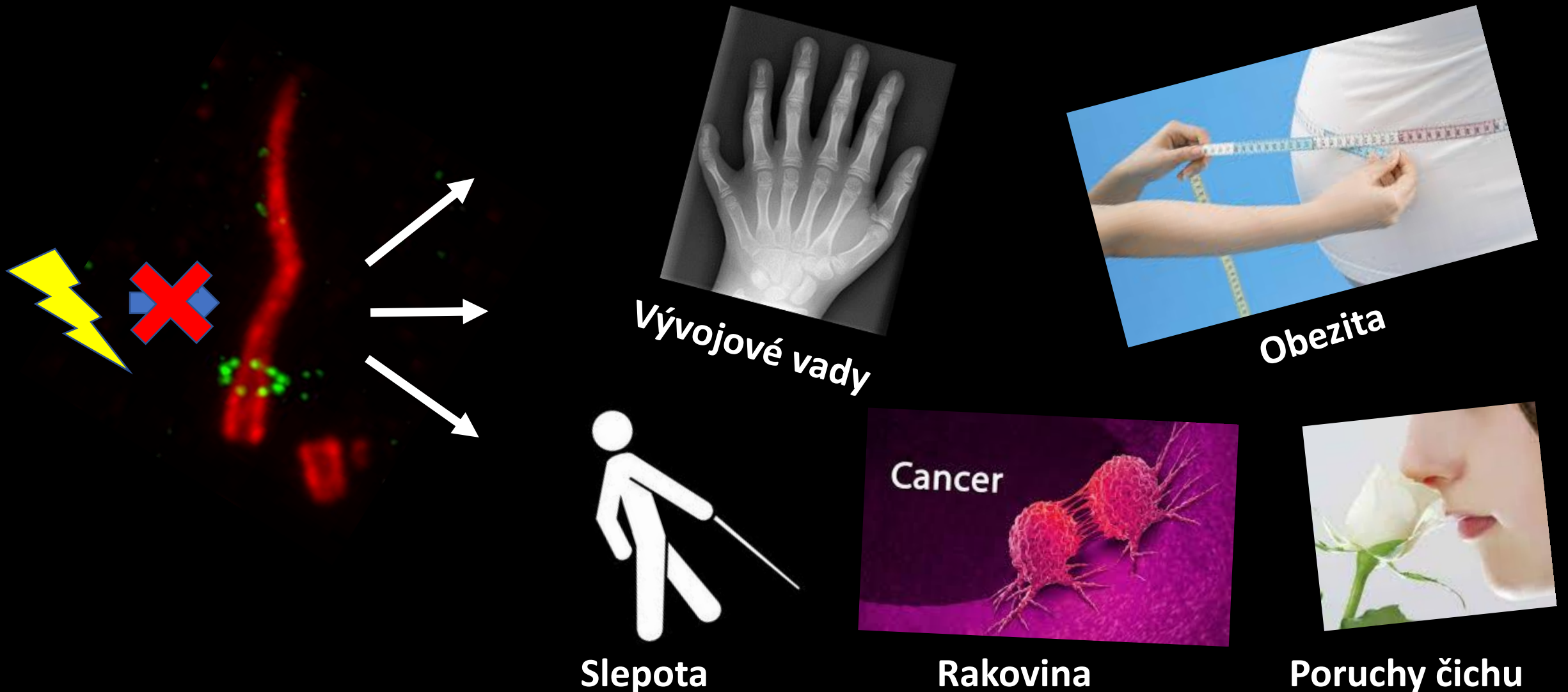


Primární a pohyblivá cilia



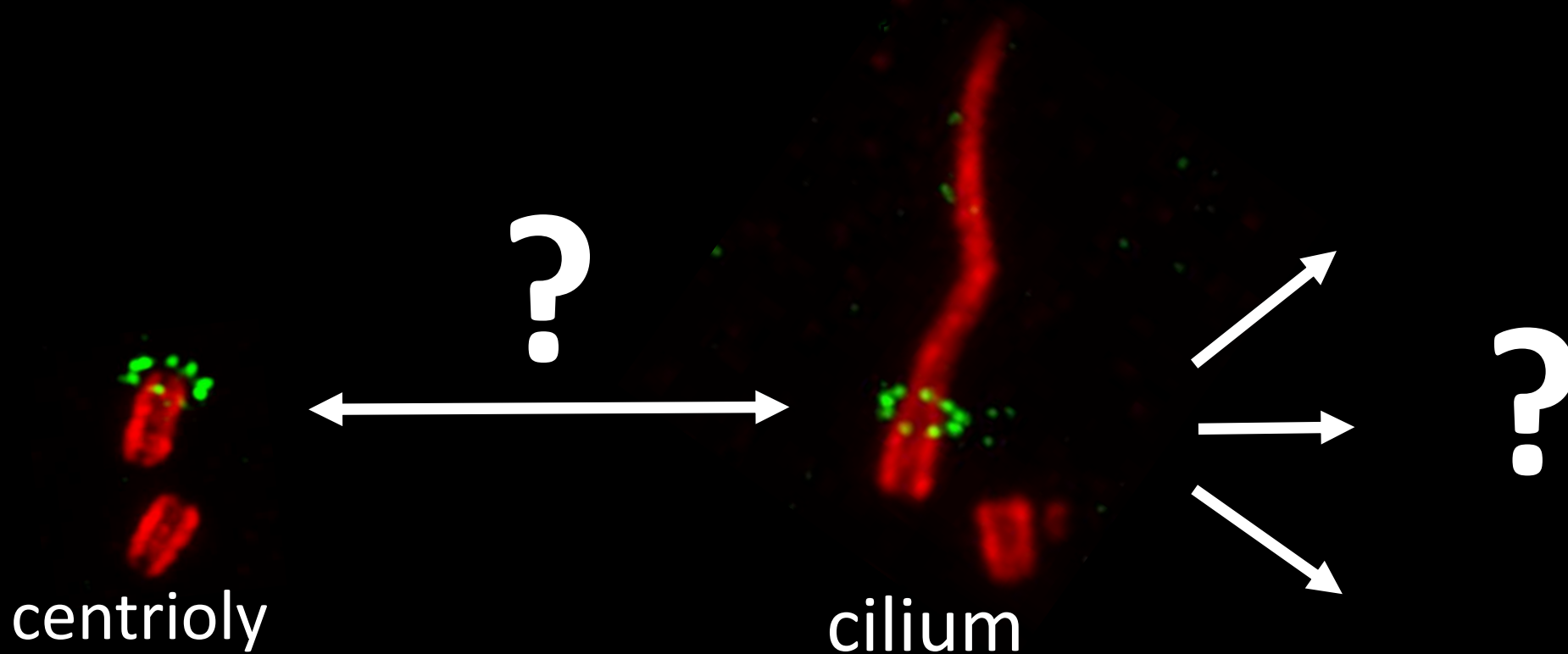
Poruchy primárních cilií: dopad na lidské zdraví

- 100+ chorob spojených s poruchami cilií



Naše klíčové otázky

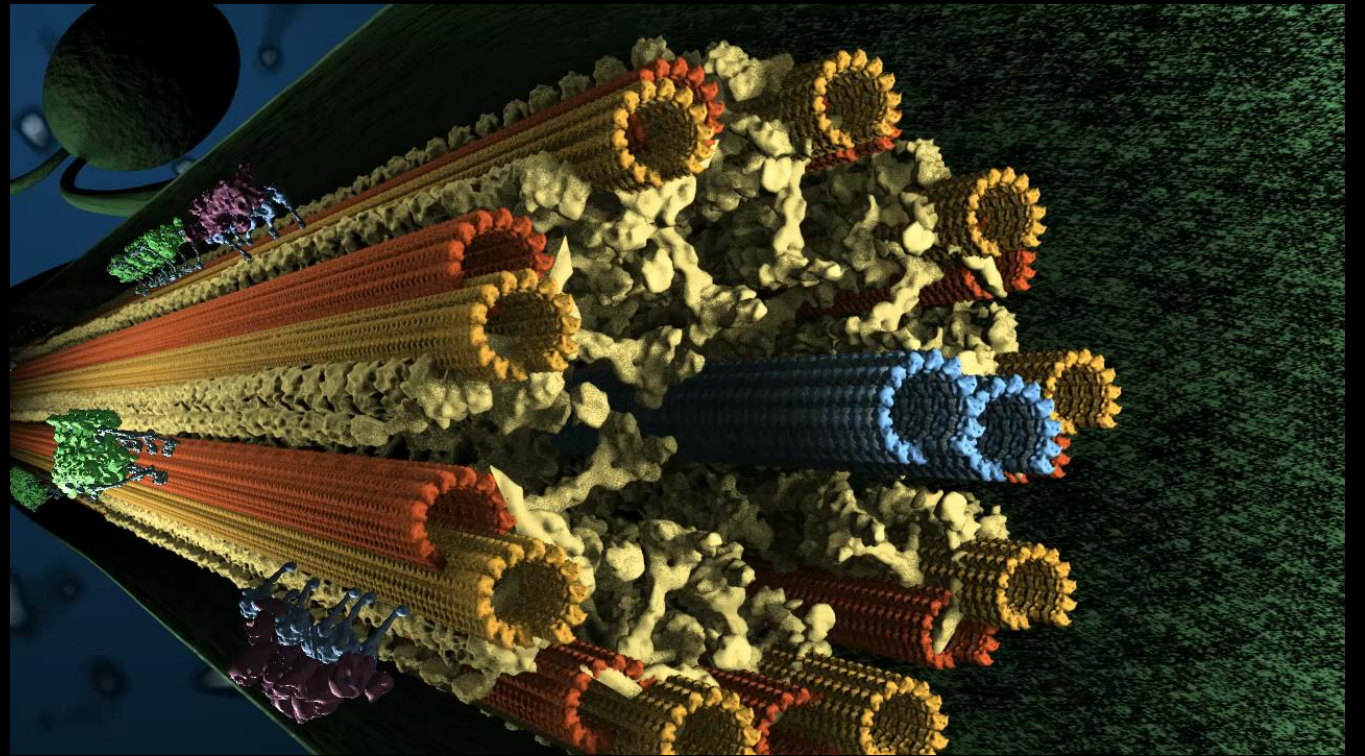
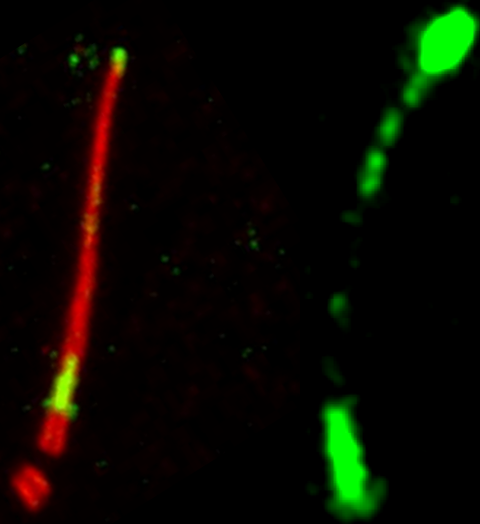
- Pro jaké procesy v buňce je primární cilium důležité?
- Jaké mechanismy řídí tvorbu a funkci této organely ?



Naše experimentální přístupy - mikroskopie

- Kde se protein X nachází a co různých situacích „dělá“?

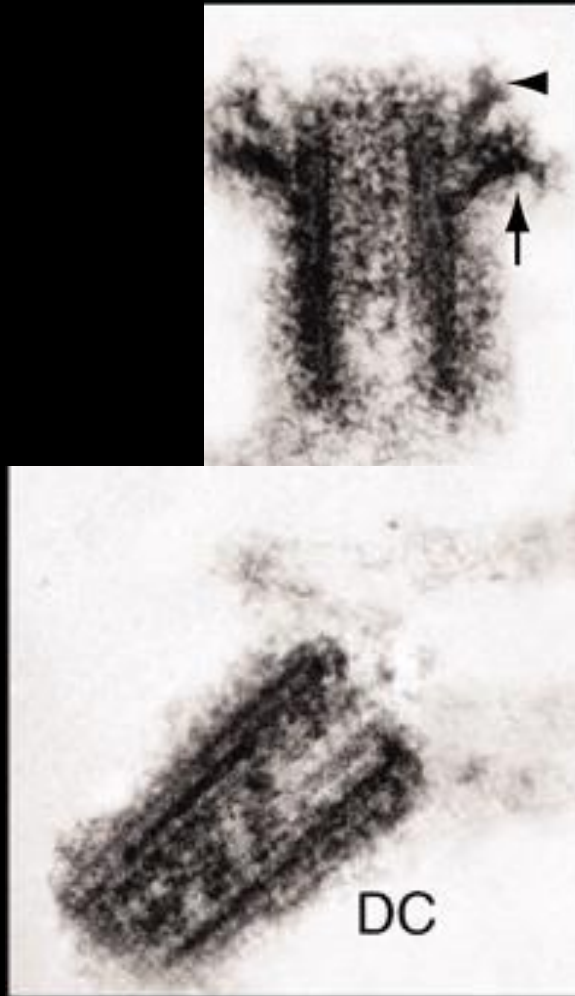
Protein X



(c) Gaia Pigino MPI- CBG

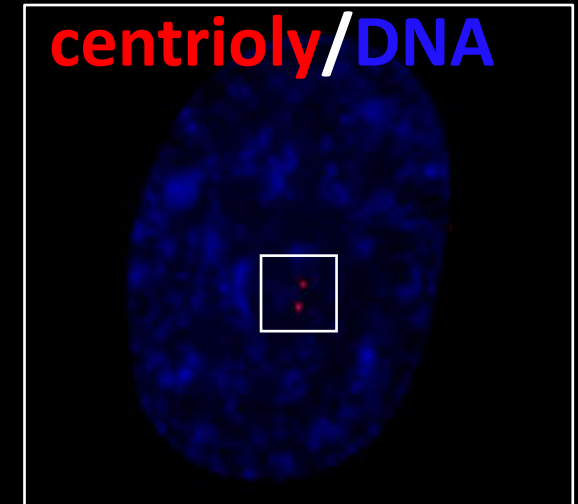
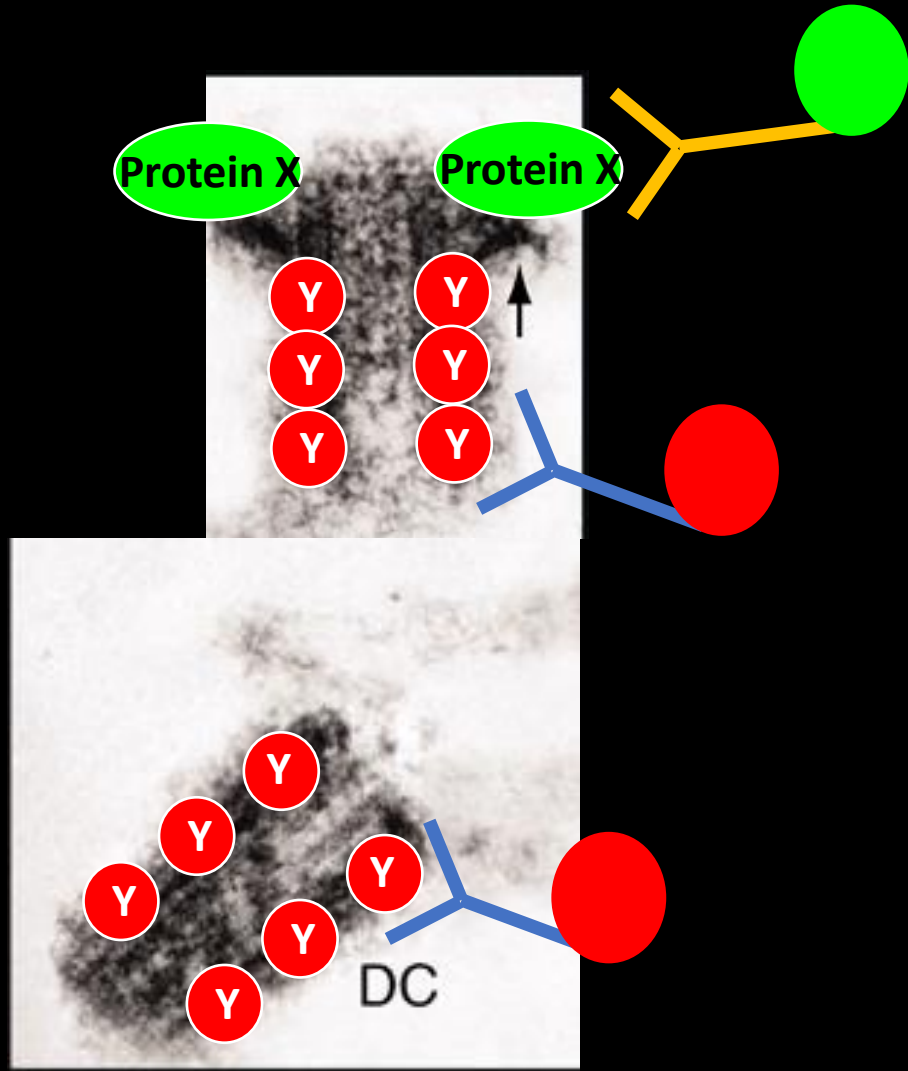
IF (imunofluorescenční) mikroskopie - princip

Detekce a vizualizace proteinů pomocí protilátek



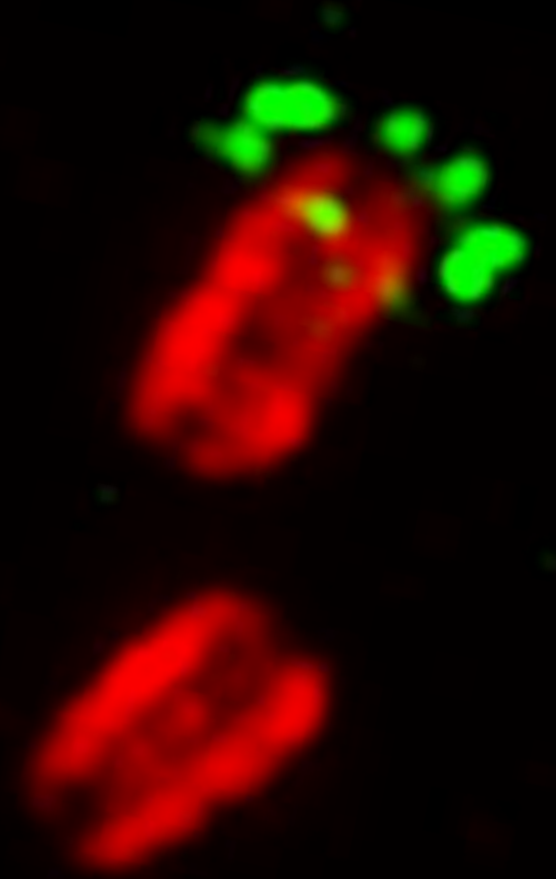
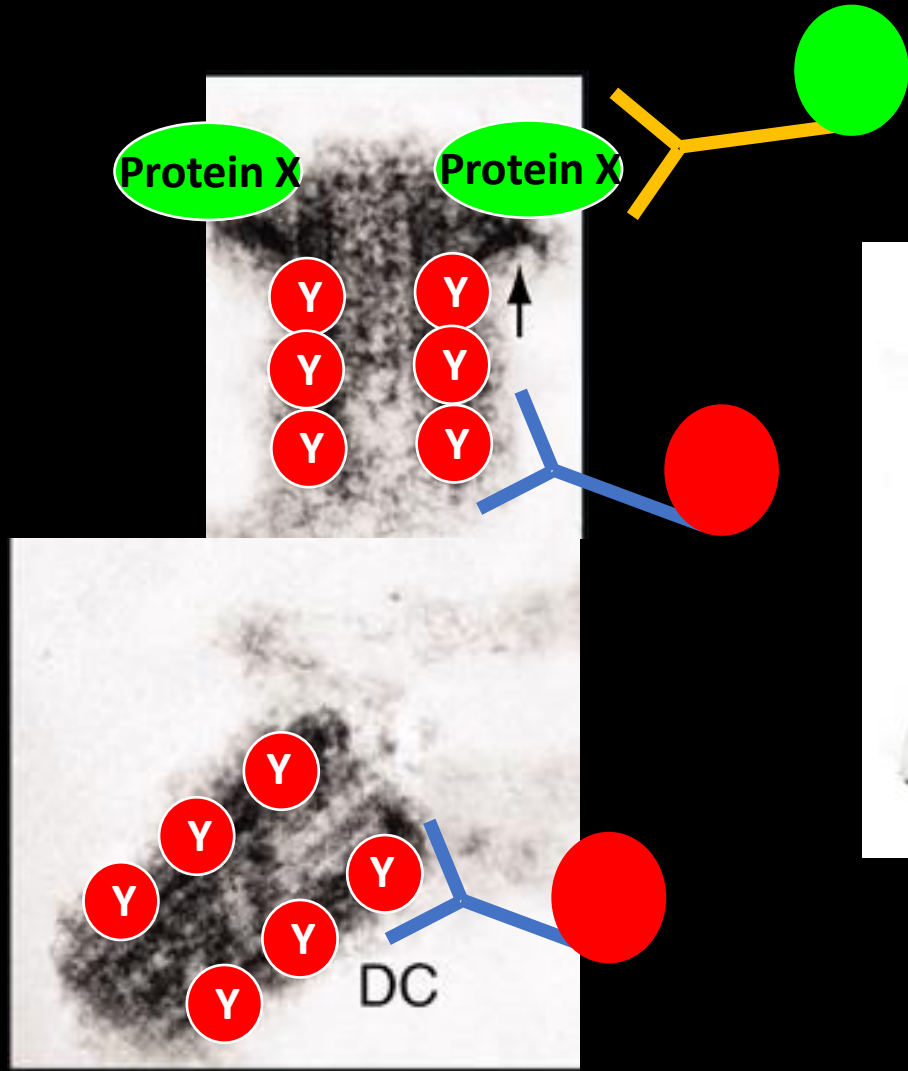
IF (imunofluorescenční) mikroskopie - princip

Detekce a vizualizace proteinů pomocí protilátek



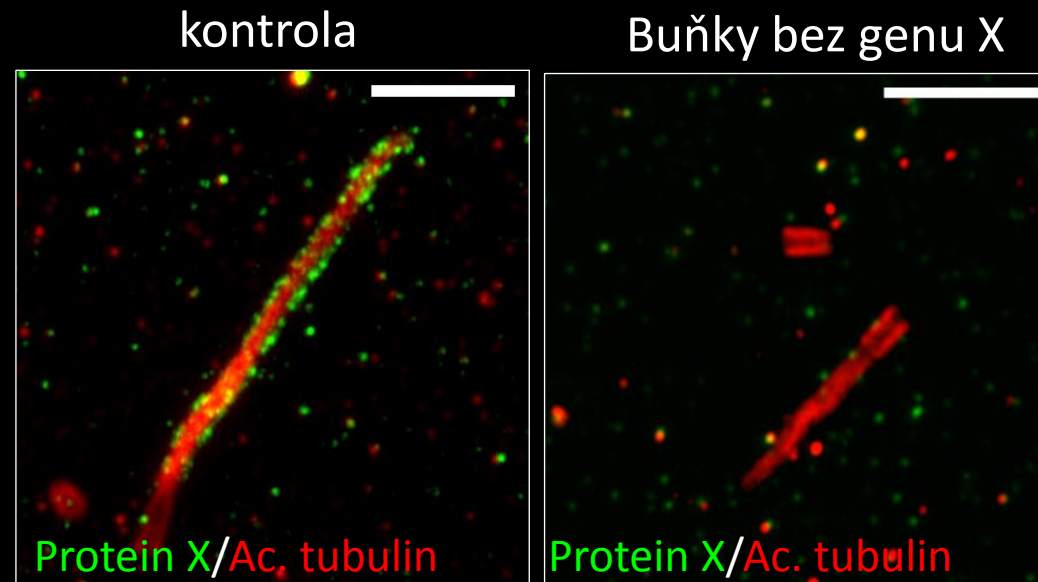
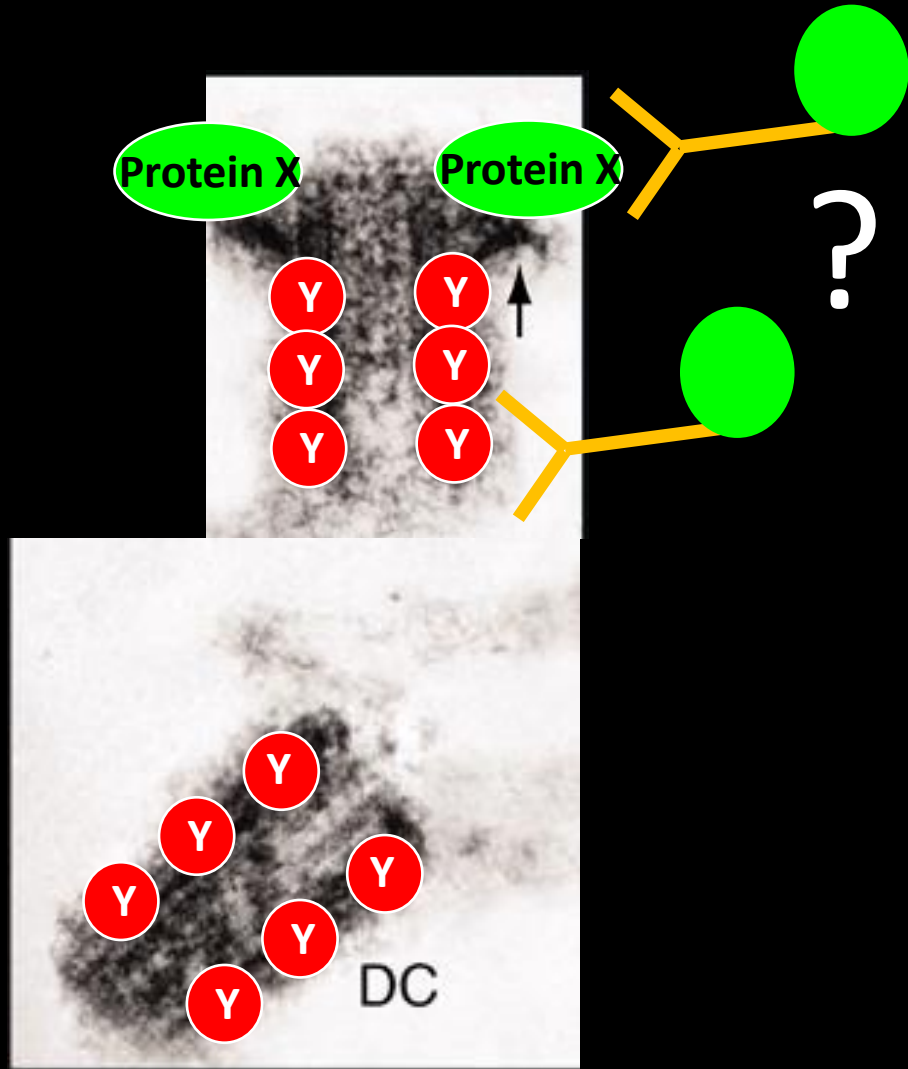
IF (imunofluorescenční) mikroskopie - princip

Detekce a vizualizace proteinů pomocí protilátek

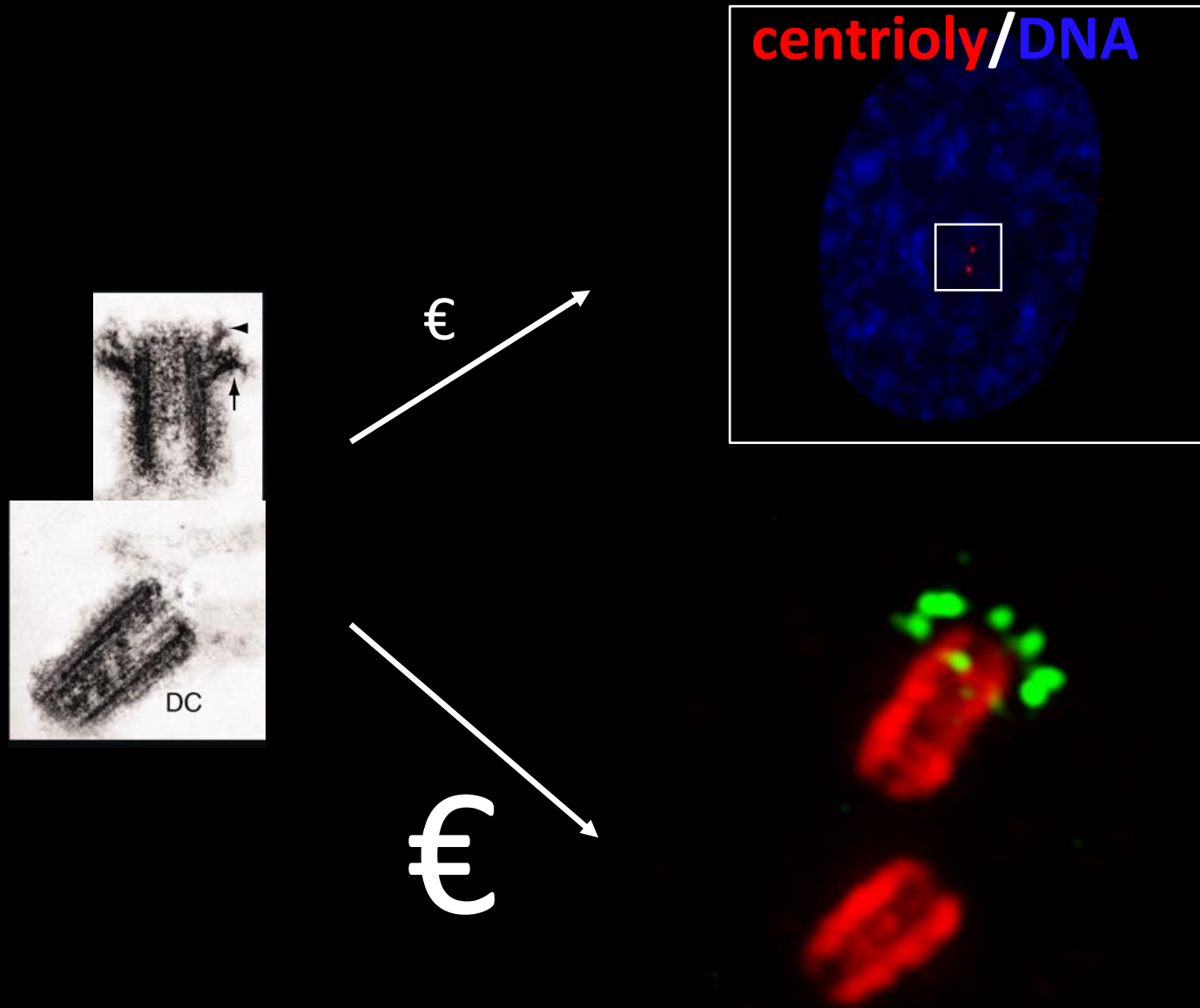


IF mikroskopie - důvěřuj ale prověřuj

Validace specificity protilátek (signál vs „šum“)



Expanzní mikroskopie – za málo peněz hodně muziky

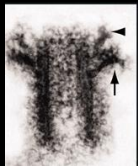


Expanzní mikroskopie – za málo peněz hodně muziky



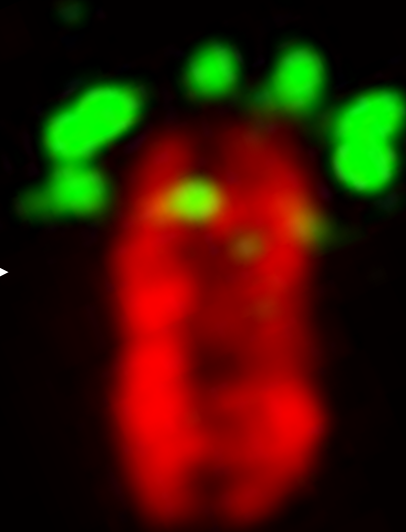
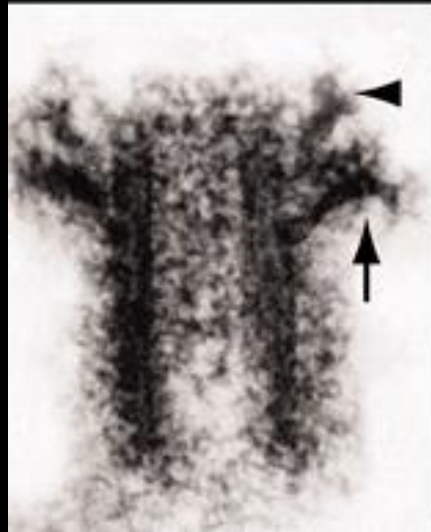
Edward Boyden, MIT, USA

- “prostě zvětším preparát“
- extrémně vysoké rozlišení i na „běžných“ mikroskopech



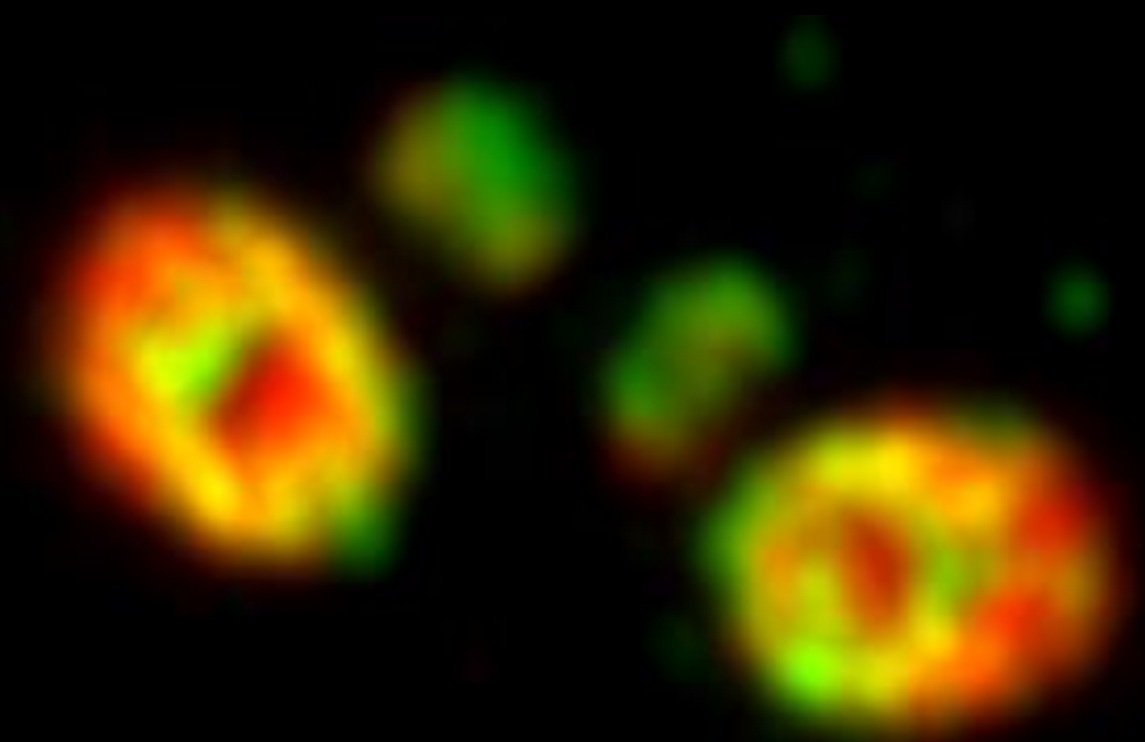
Expanze (4.2x)

Spec. Polymer

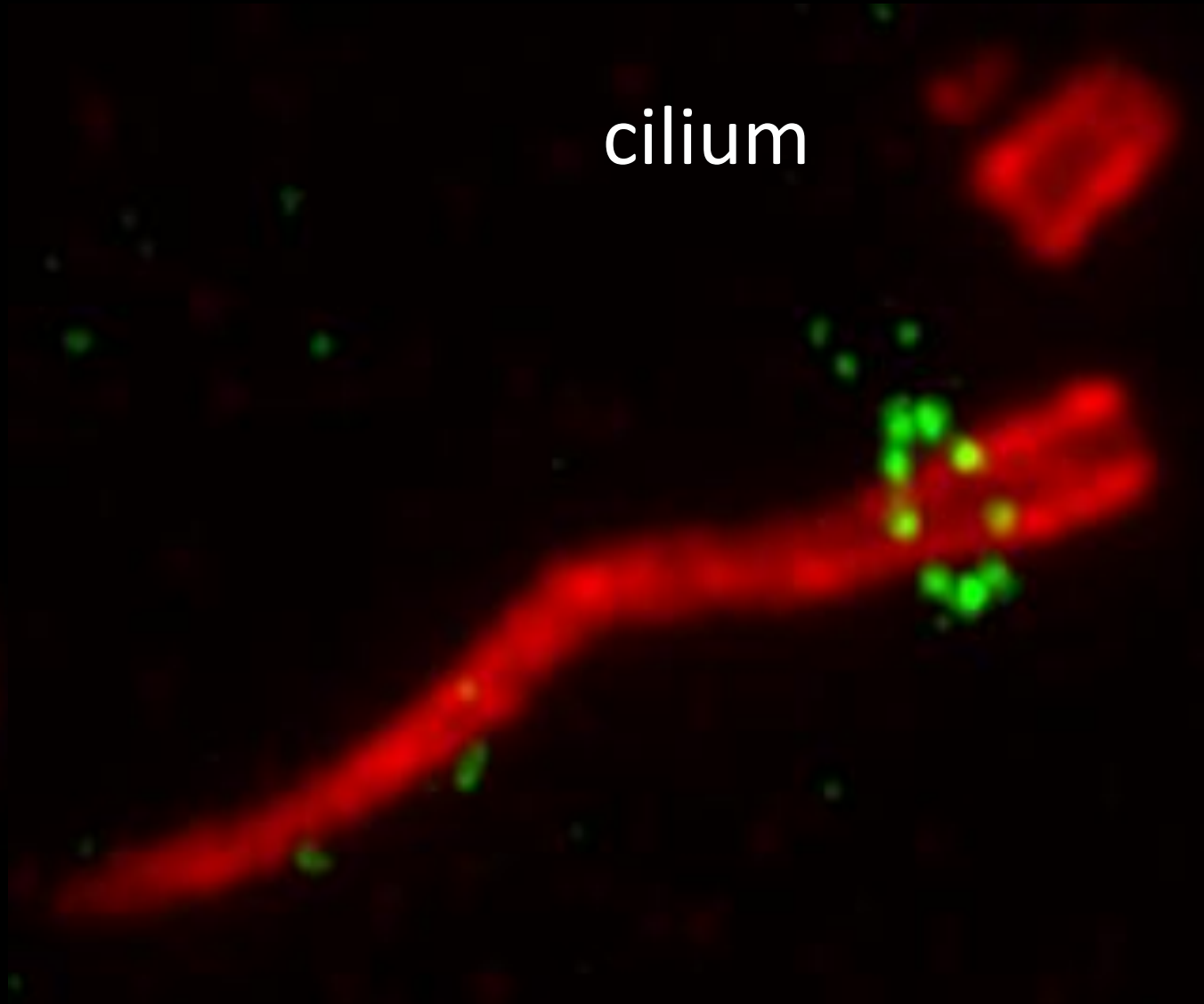


Expanzní mikroskopie – příklady

centrioly



cilium



Mikroskopické přístupy

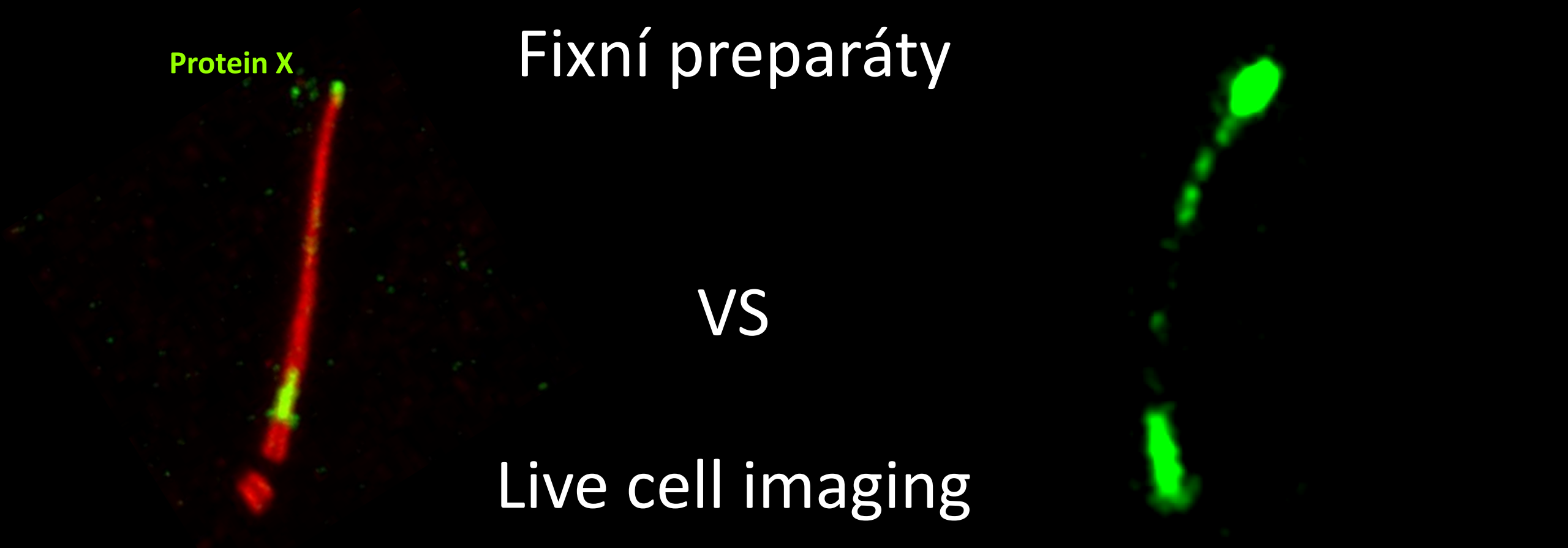
- Kde se protein X nachází a co různých situacích „dělá“?

Protein X

Fixní preparáty

VS

Live cell imaging



„Live cell imaging“ mikroskopie

+ práce s živými buňkami – pozorování změn a jejich dynamiky v různých podmínkách (např. růst cilia v čase)



Kontrolní buňky – cilium „roste“



Buňky bez genu X – cilium „moc neroste“



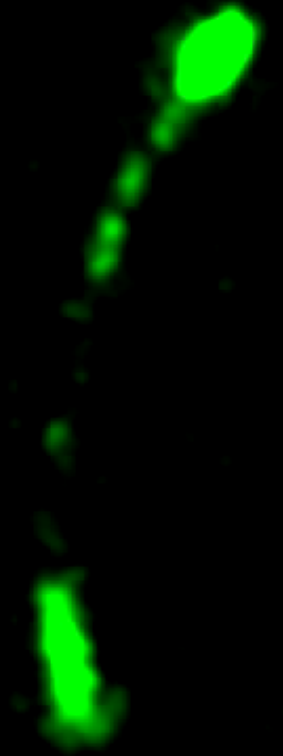
„Live cell imaging“ mikroskopie

- práce s živými buňkami – problém vizualizace
→ fúze proteinu zájmu s fluorescenčním proteinem



Protein X

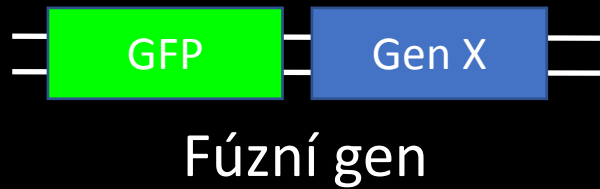
GFP



Aequorea victoria, tvorba fluorescenčních proteinů (např. GFP – „green fluorescence protein“)

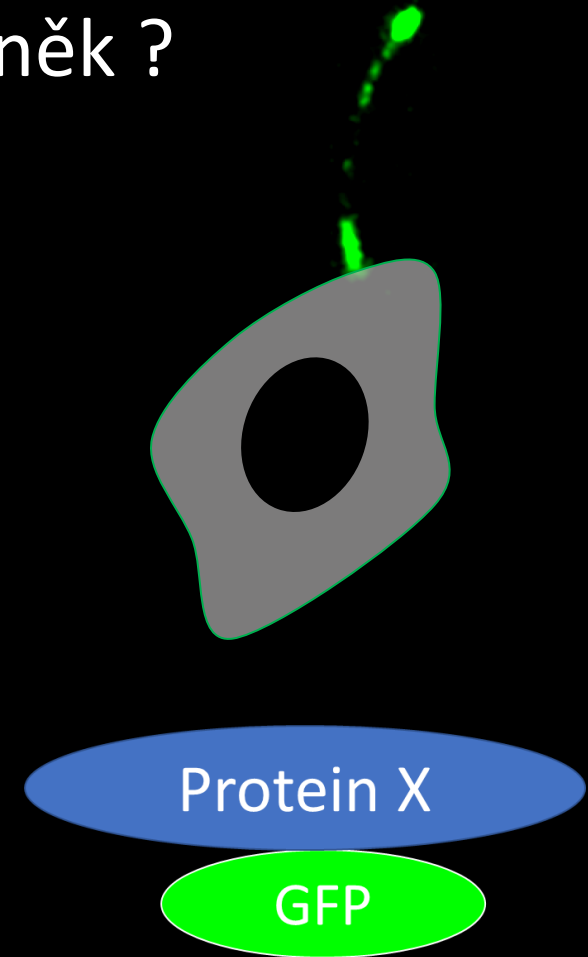
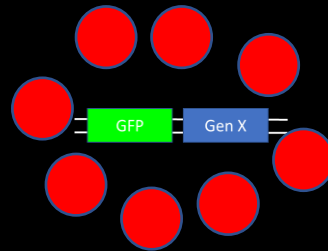
„Live cell imaging“ mikroskopie

- Jak dostat fluorescenční protein do živých buněk ?



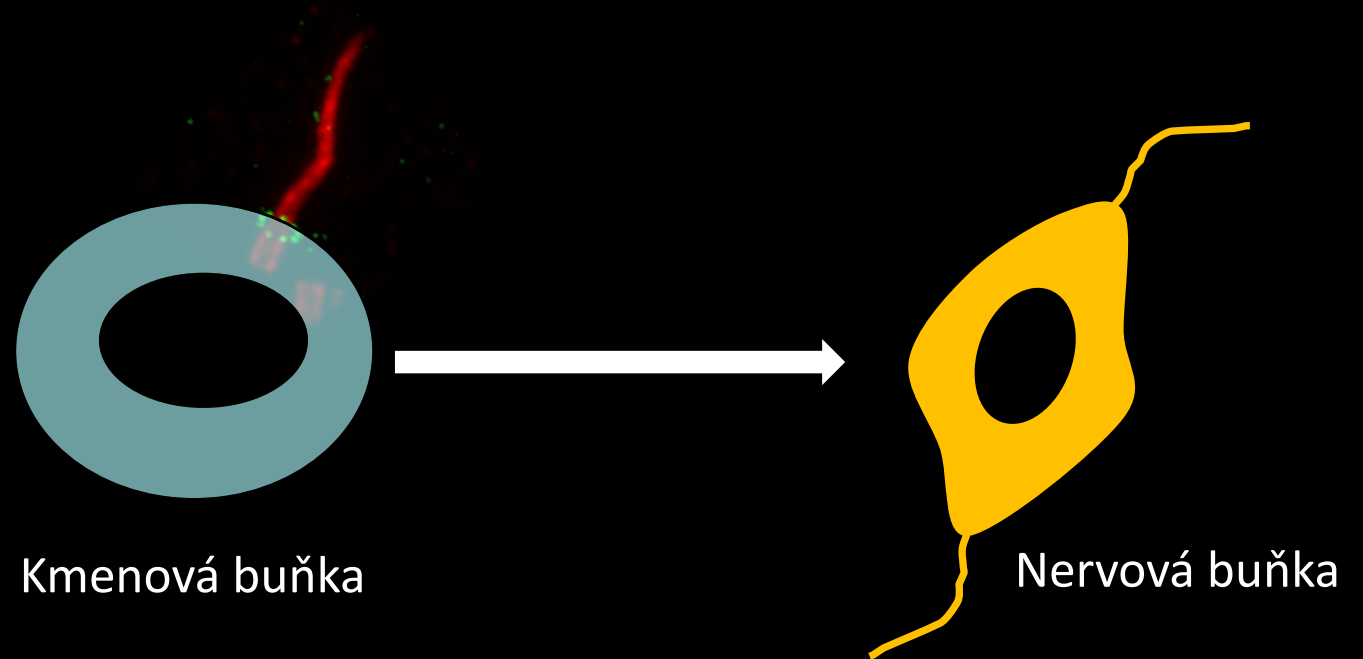
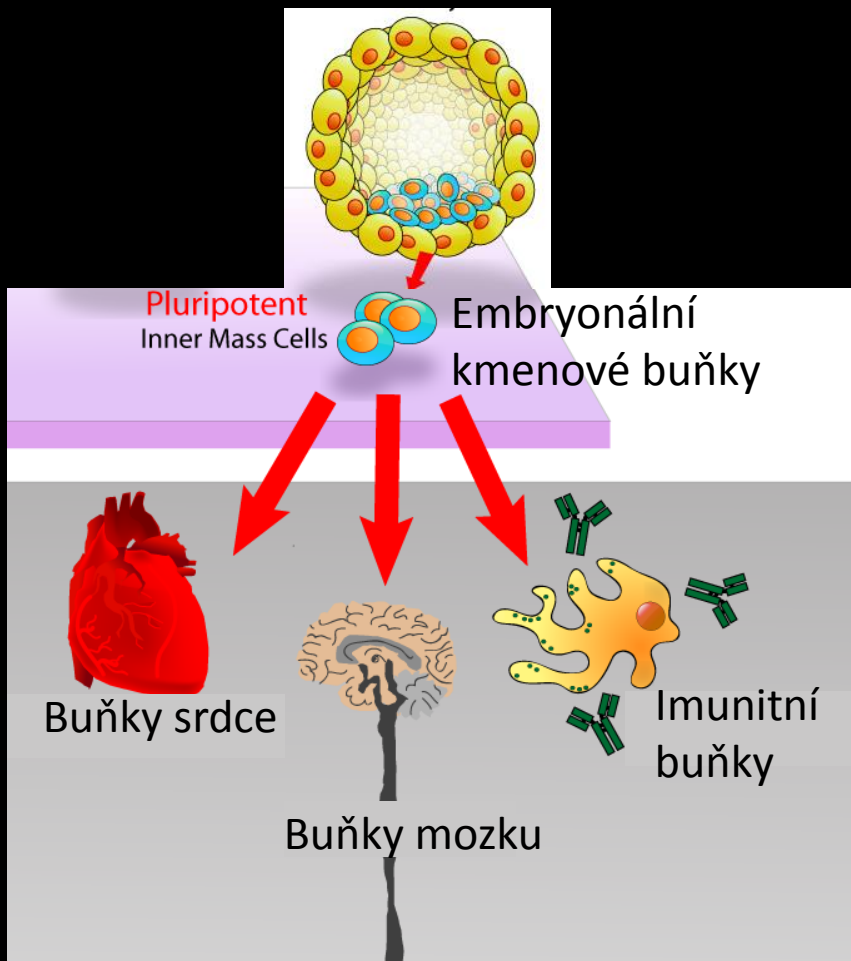
Transfekce

(„obalená“ DNA projde membránou)



Naše experimentální přístupy

Studium významu cilií pomocí embryonálních kmenových buněk



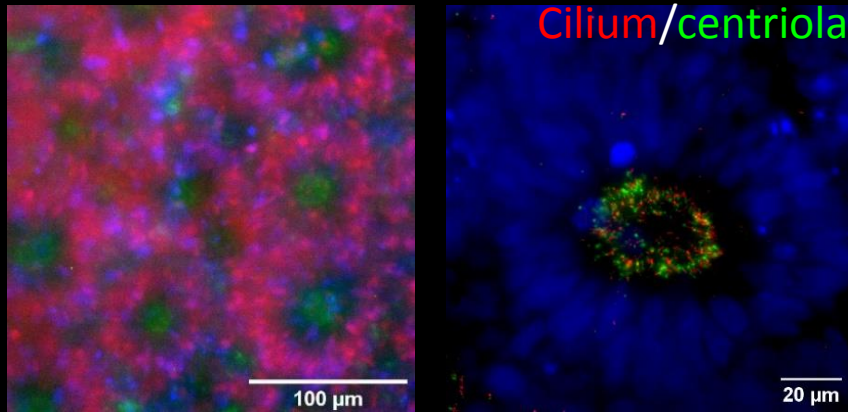
Proč ?

Defekty v CNS u některých typů ciliopatií

Naše experimentální přístupy



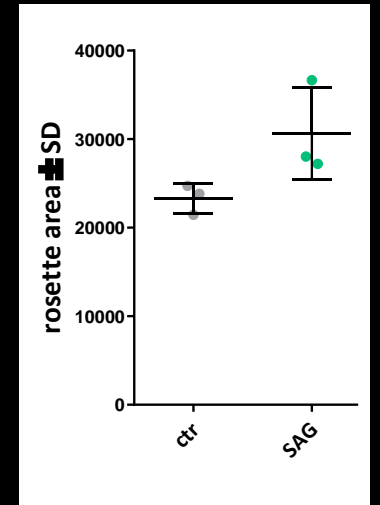
Neurální Rozety – neurální trubice „in vitro“



Kontrola

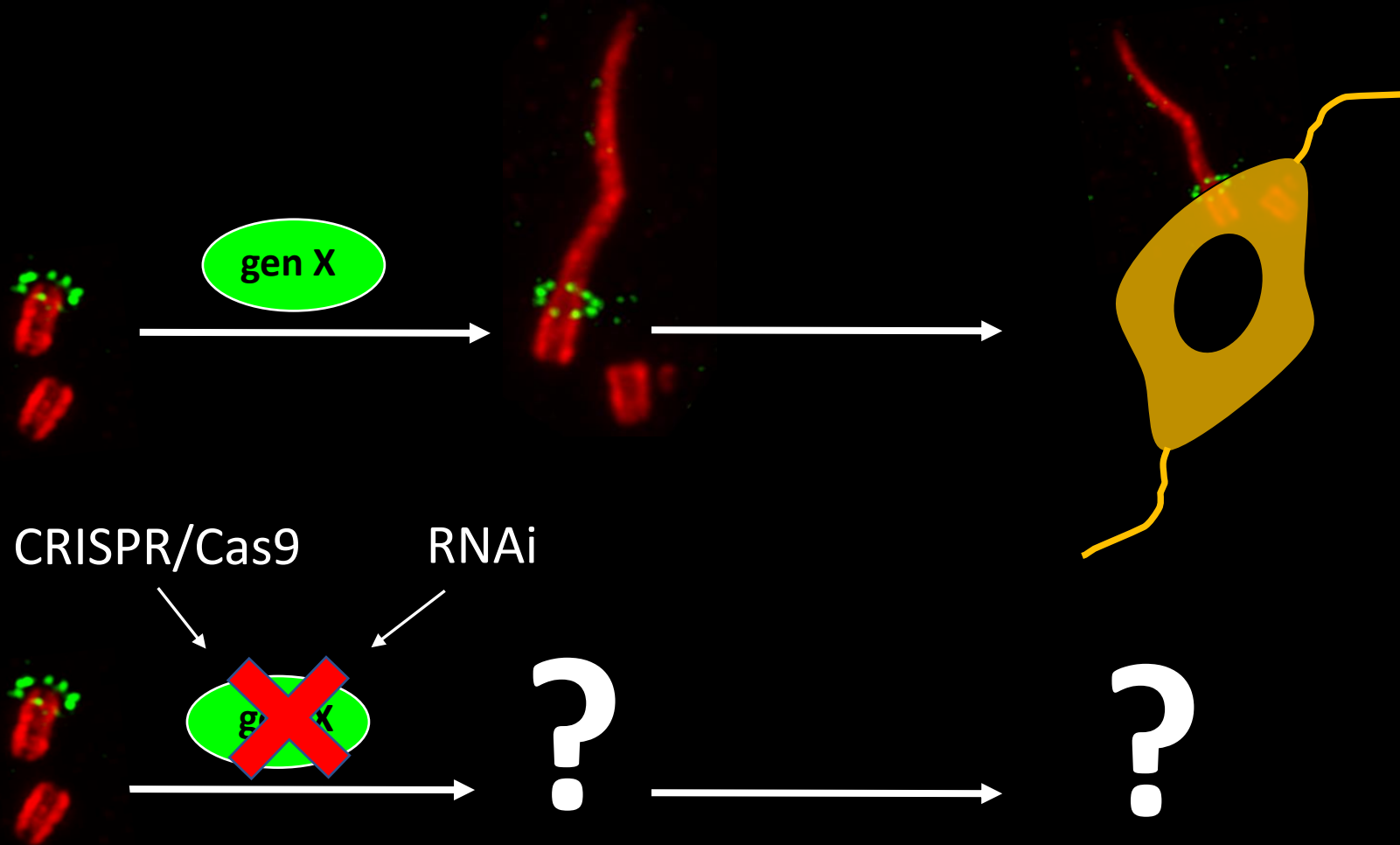


Aktivace signalizace



Experimentální strategie pro regulaci genové exprese (nejen) v kmenových buňkách

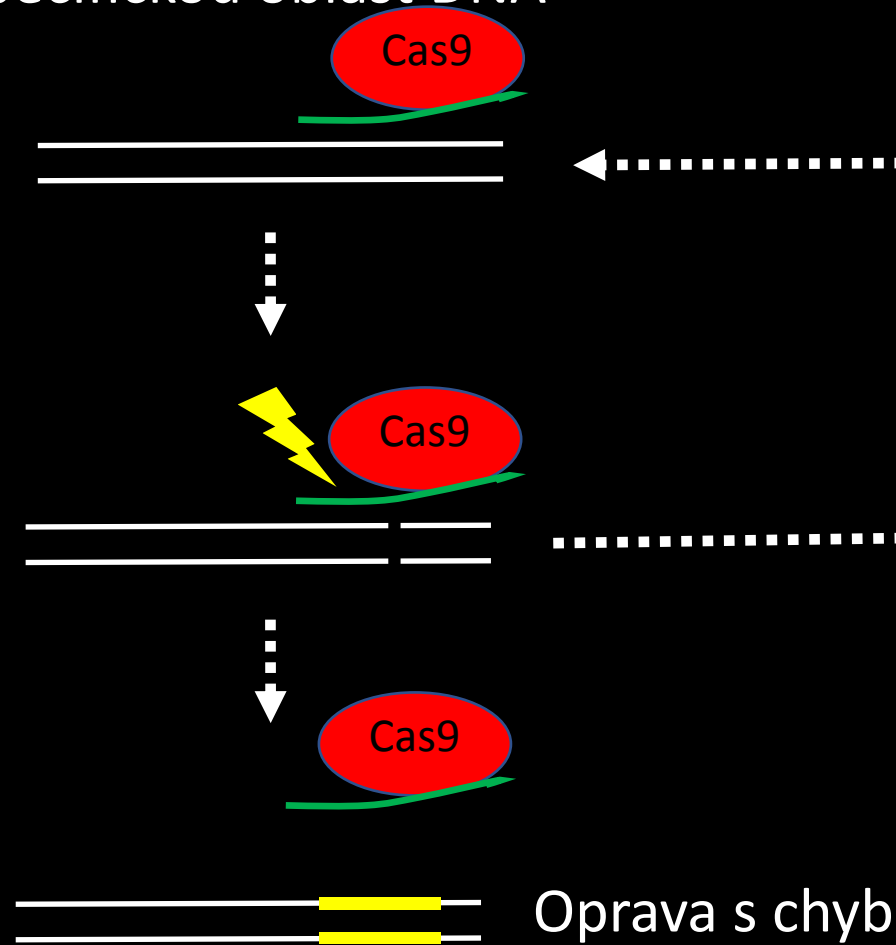
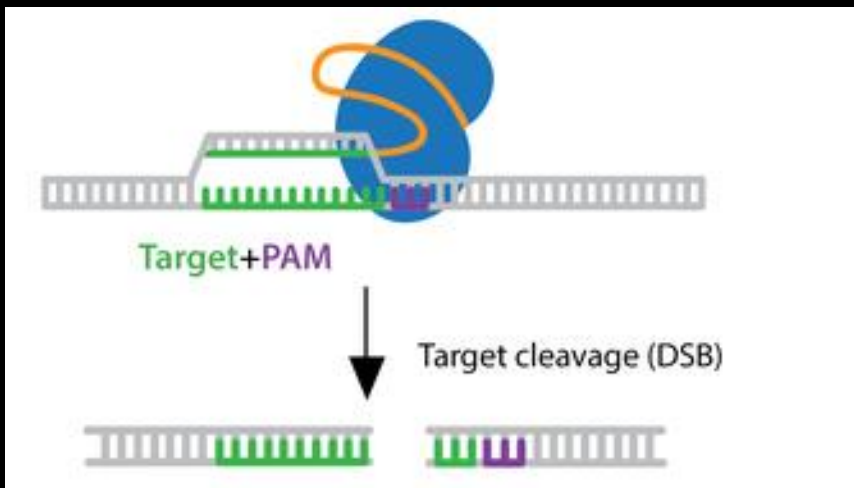
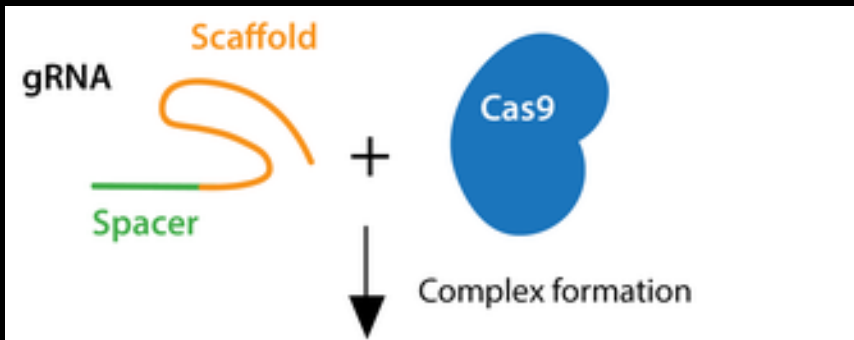
> Jakou má daným gen/protein funkci a jak je důležitý ?



Editace genů pomocí CRISPR/Cas9

Cas9 – nukleáza – zlomy v DNA řetězci

gRNA – „guide“/průvodce – cílení na specifickou oblast DNA



Editace genů pomocí CRISPR/Cas9

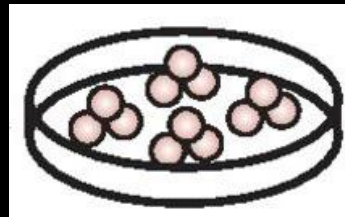
STEM CELLS AND DEVELOPMENT
Volume 26, Number 21, 2017
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/scd.2017.0058

TECHNICAL NOTE

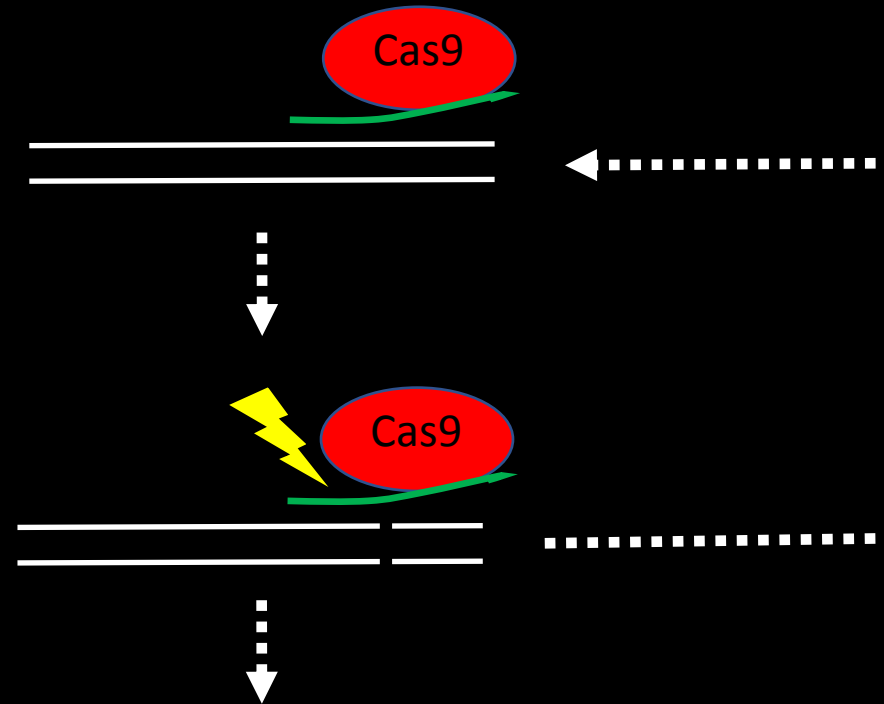
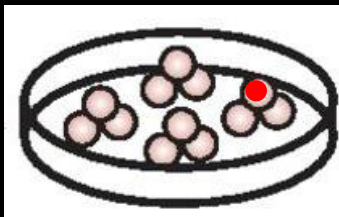
An Efficient Method for Generation of Knockout Human Embryonic Stem Cells Using CRISPR/Cas9 System

Dasa Bohaciakova,¹ Tereza Renzova,¹ Veronika Fedorova,¹ Martin Barak,¹
Michaela Kunova Bosakova,² Ales Hampel,^{1,3} and Lukas Cajanek¹

- Typická účinnost editace u kmenových buněk 2-8% (účinnost transfekce, efektivita oprav DNA, toxicita,...)

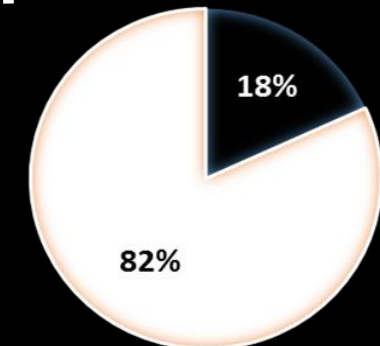


CRISPR/Cas9

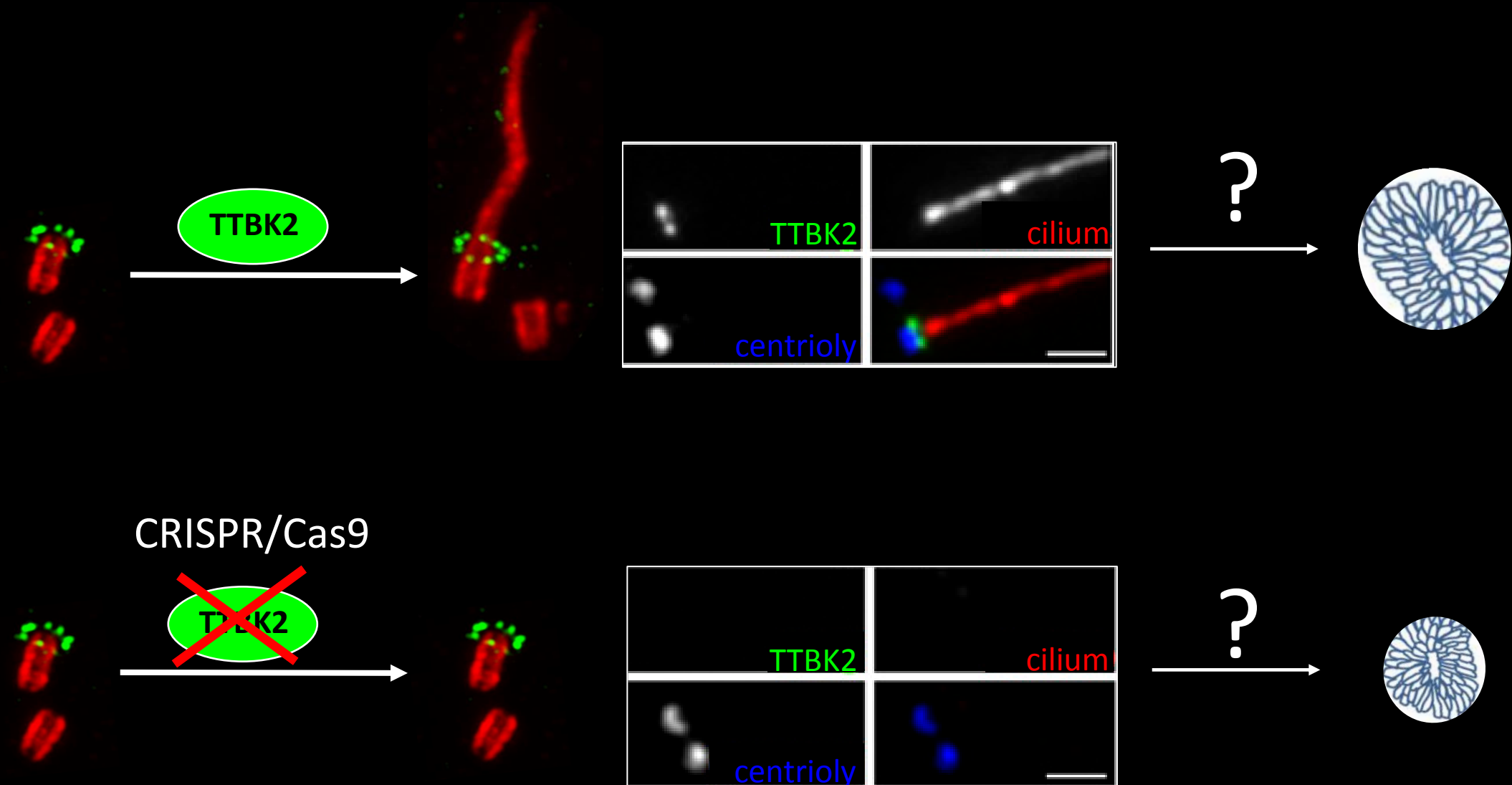


Re-transfekce 3x-4x

~ 80% buněk s inaktivovaným genem zájmu



Editace genů pomocí CRISPR/Cas9 - Kmenové buňky bez cilií



Regulace genové exprese pomocí siRNA

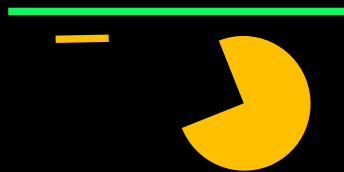


Regulace genové exprese pomocí siRNA

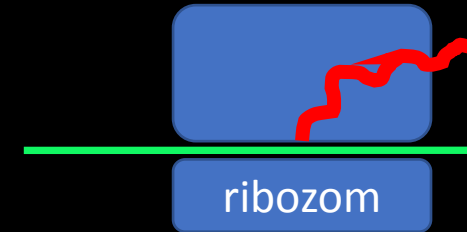
DNA



RNA



protein



siRNA – „small interfering“ RNA —

RISC – nukleáza – zlomy v RNA



Regulace genové exprese pomocí siRNA

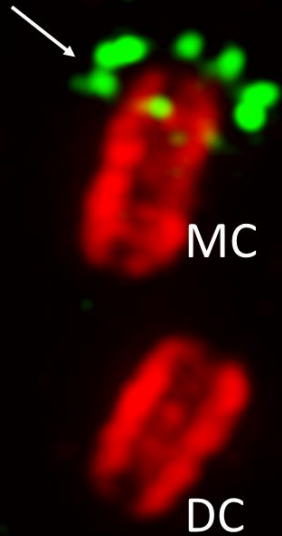
DNA

RNA

protein



CEP164



MC

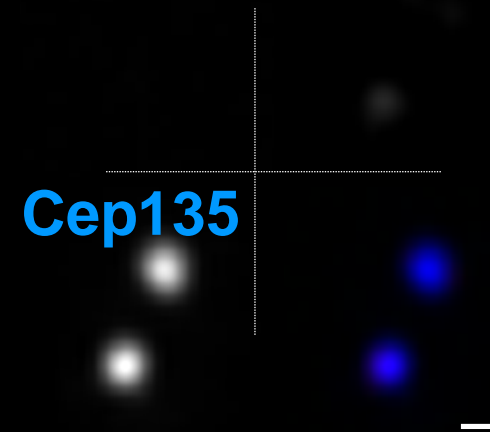
DC

Control siRNA

CEP164 siRNA

Cep164 TTBK2

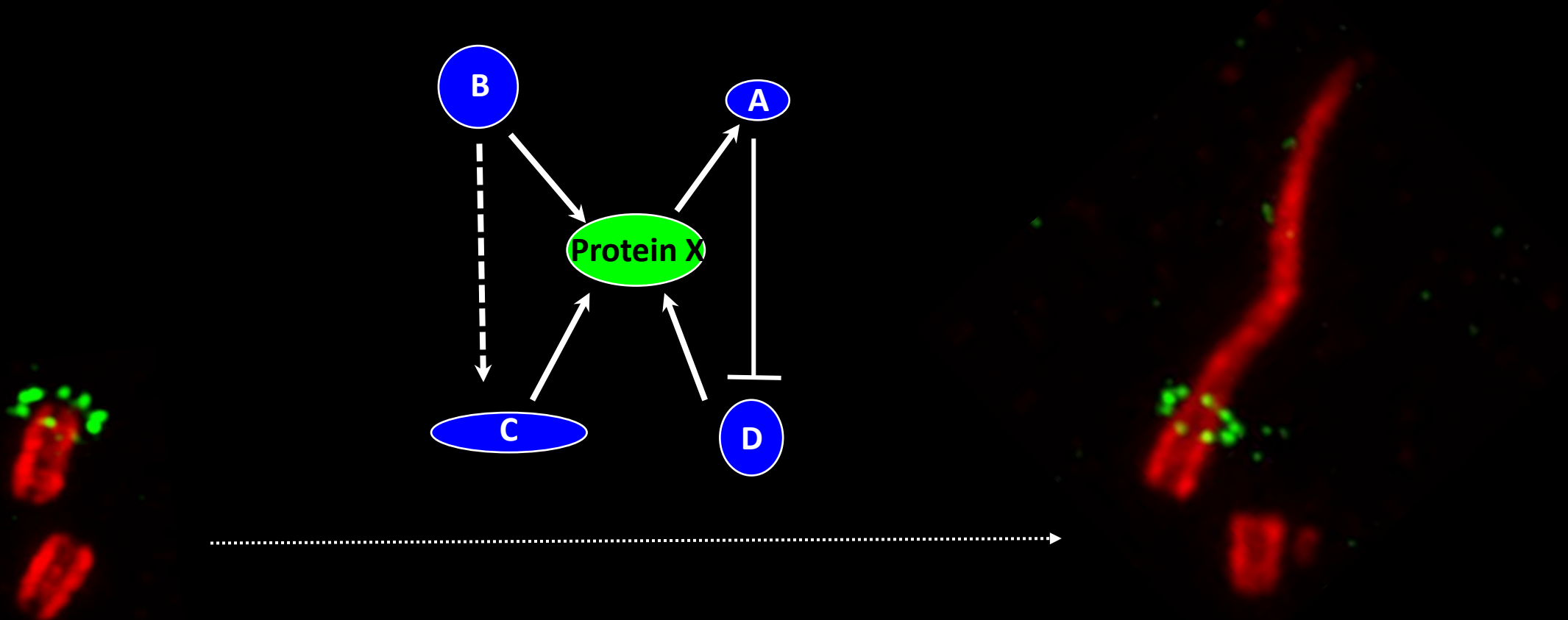
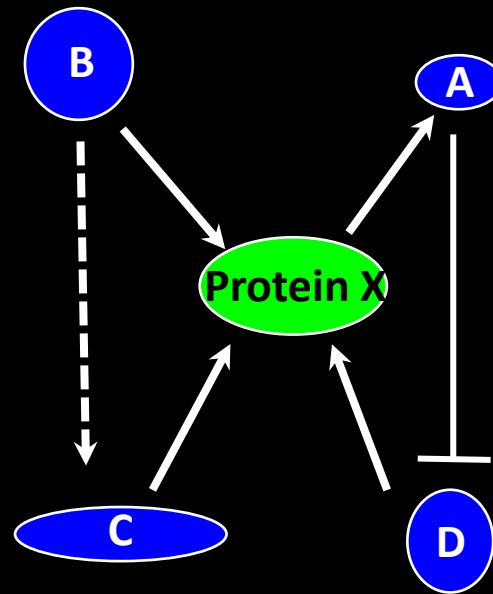
Cep164 TTBK2



Naše experimentální přístupy

Studium mechanismu kontroly tvorby primárních cilií

- Jaké proteiny řídí tvorbu cilií a jak se vzájemně ovlivňují?



Proč se zabývat „mechanismy“?

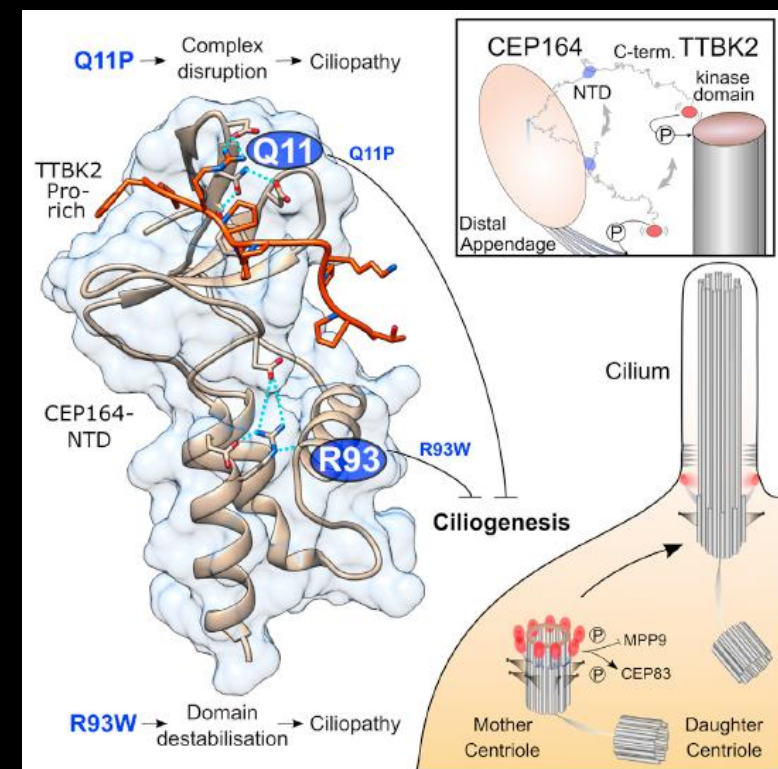
Jediný způsob jak opravdu přijít na
to jak vlastně daná věc funguje

... a následně být schopen „něco
udělat“ když to nefunguje.

Ivan Rosa e Silva, Lucia Binó,
Christopher M. Johnson, ...,
Antonina Andreeva, Lukáš Čajánek,
Mark van Breugel

Structure

Molecular mechanisms underlying the role of the centriolar CEP164-TTBK2 complex in ciliopathies



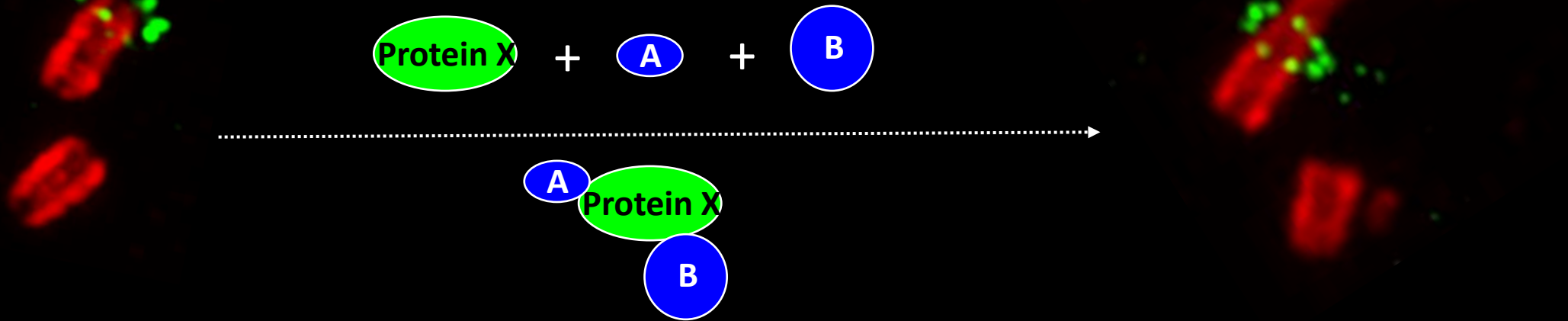
mechanismus ↔ funkce

Q11, R93 – mutace u pacientů s ciliopatií

Pochopení mechanismu (**struktura daného proteinu**) a funkce (**co v ciliích pacientů nefunguje**) nezbytné pro možnou terapeutickou intervenci

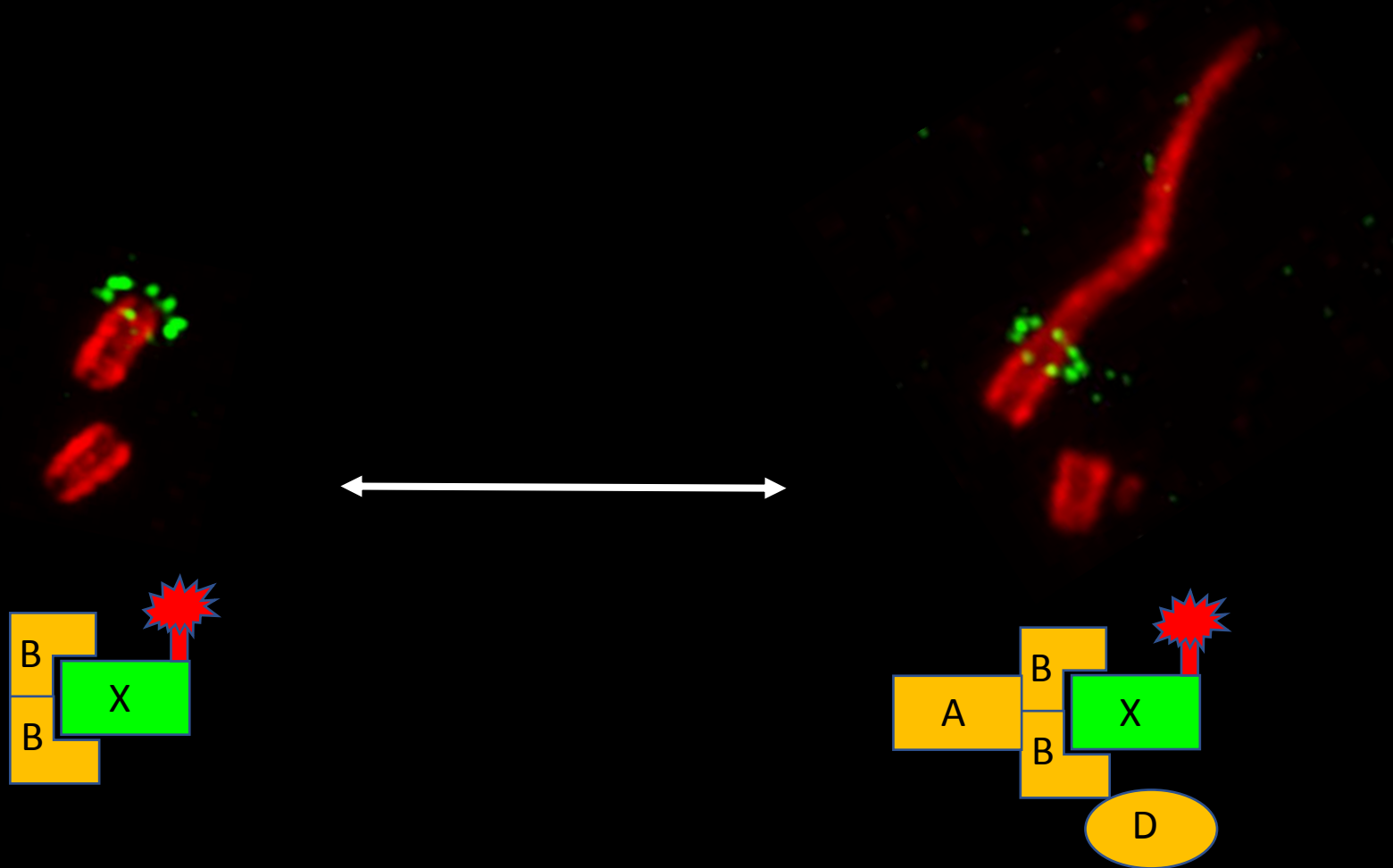
(„small molecule“ která napraví defekt v daném proteinu)

Identifikace proteinových komplexů a jejich změn



Identifikace proteinových komplexů a jejich změn

→ metoda „proximity labeling“ – označení proteinů daného komplexu přímo v buňce a jejich následná izolace a identifikace

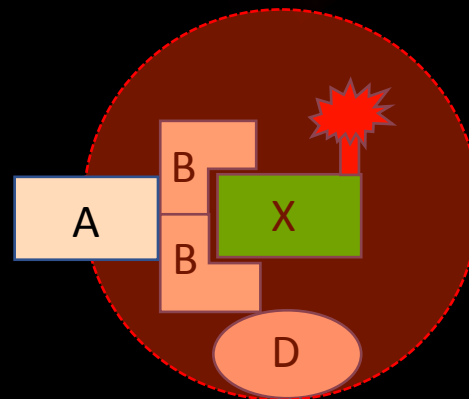
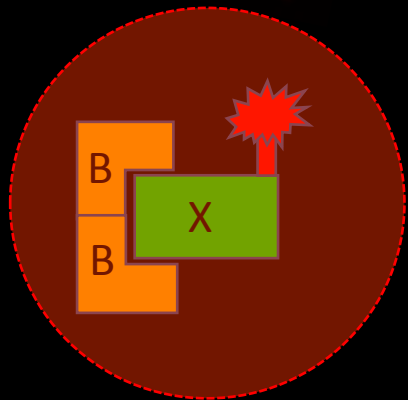


Identifikace proteinových komplexů a jejich změn

→ metoda „proximity labeling“ – označení proteinů daného komplexu přímo v buňce a jejich následná izolace a identifikace



BirA – enzym, který „označí“ všechny proteiny ve svém okolí



Rozdíly?

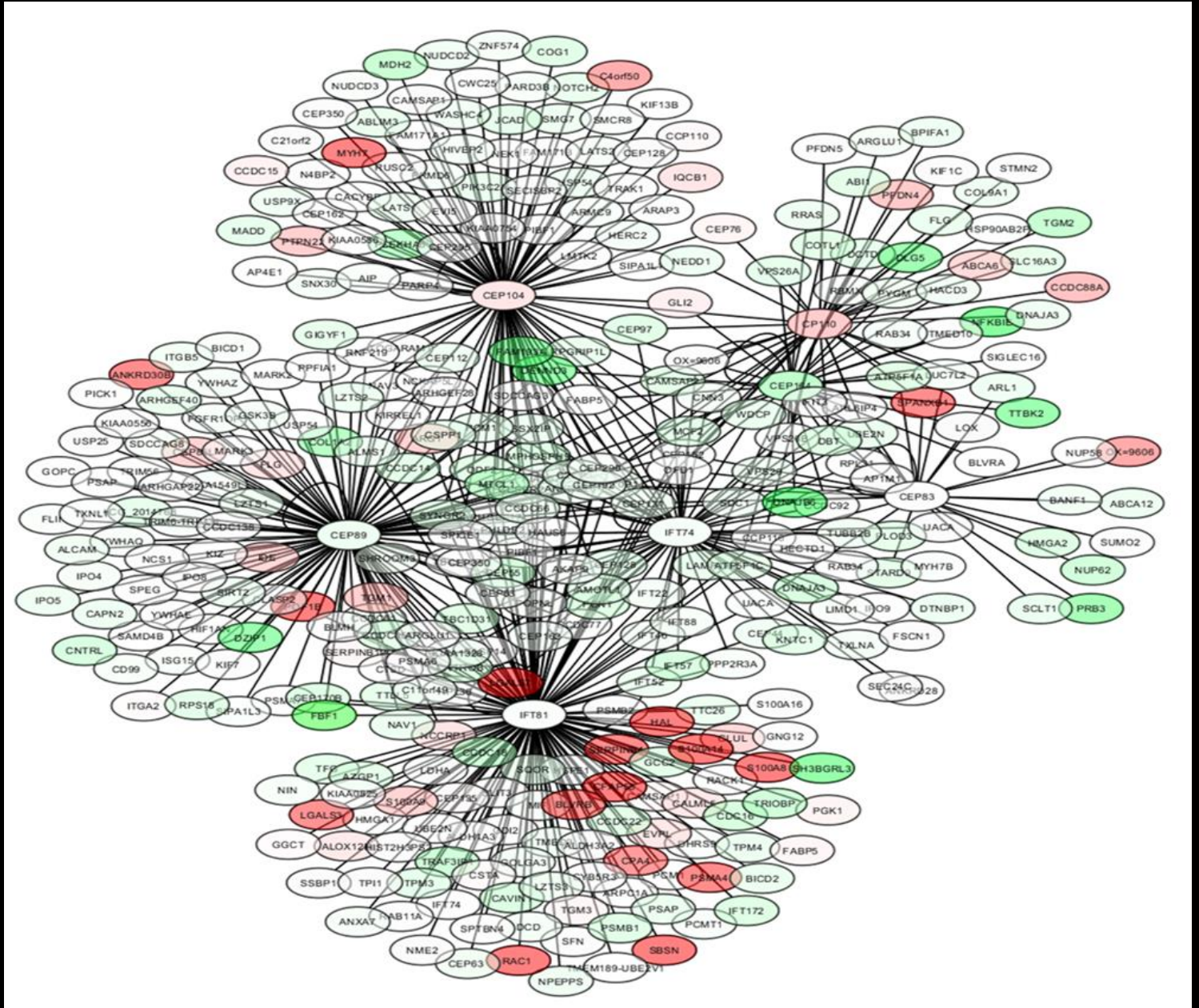
Identifikace proteinových komplexů a jejich změn

 Více když

→ pozitivní funkce?

 Více když

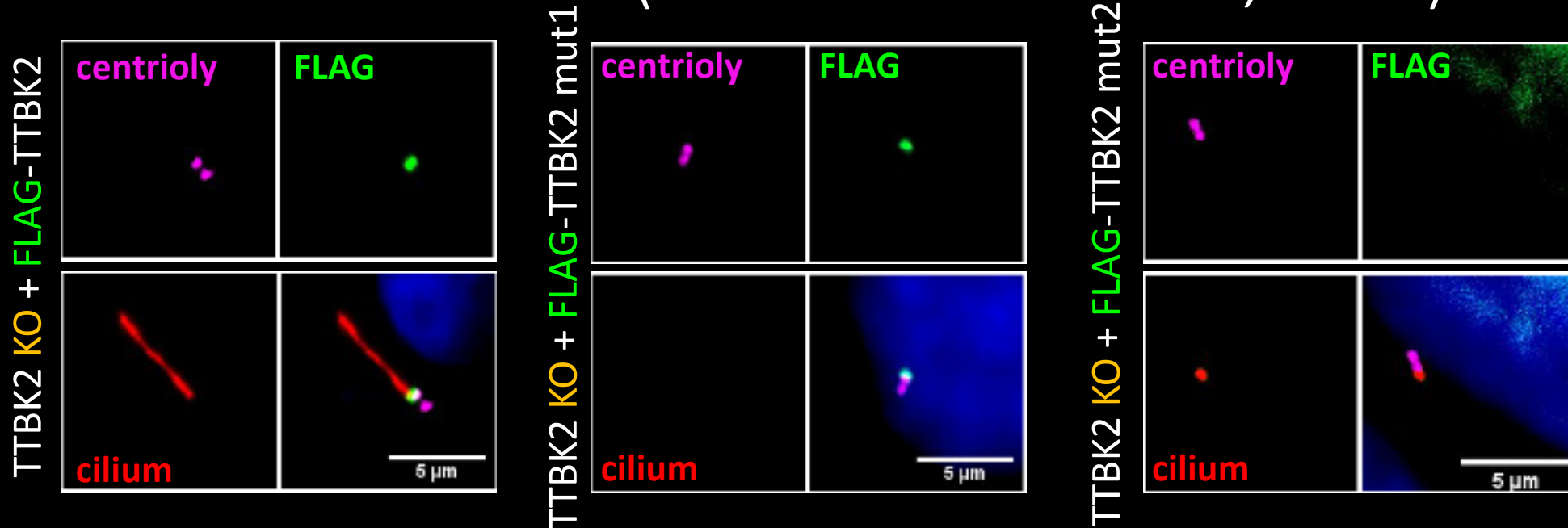
→ negativní funkce?



Testování významu/funkce proteinu X

JAK?

siRNA/CRISPR + „rescue“ – specificita efektu a srovnání různých variant proteinu X
(zde Tau Tubulin kinase 2, TTBK2)



KO – knockout – gen X byl inaktivován

Mut2 – patientská mutace

Proč bádát právě u nás?

- Základní výzkum s možným terapeutickým přesahem
- Mezinárodní spolupráce : Harvard Medical School (USA), Imagine Institute (France), Queen Mary University (UK), Brunel University (UK)
- Naše dosavadní výsledky jsou mezinárodně konkurenceschopné



PNAS

Proceedings of the
National Academy of Sciences
of the United States of America

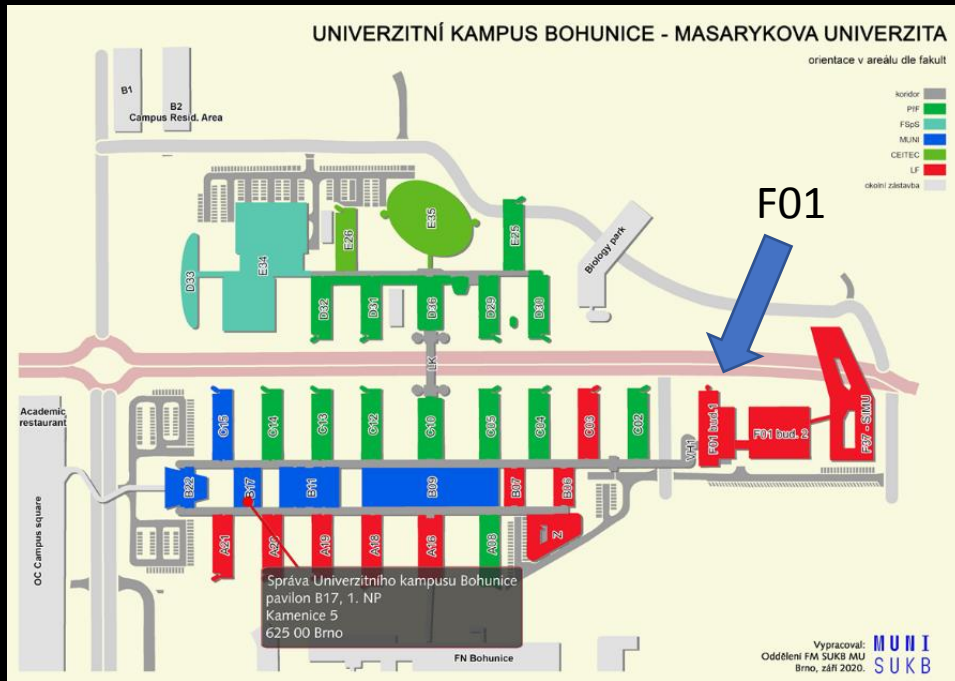
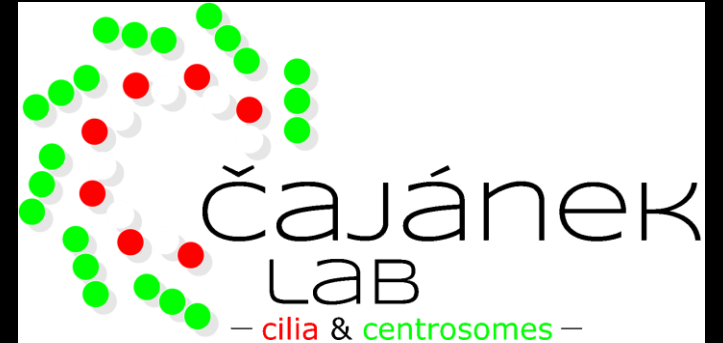


STEM CELL
REPORTS

Lukáš Čajánek – Primární cilium: mechanismy a funkce



www.cajaneklab.com



lukas.cajanek@gmail.com cajanek@med.muni.cz