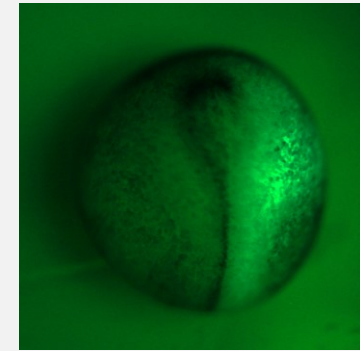


M U N I
S C I



Experimentální embryologie

Bi1130

Metody práce s DNA a RNA – Analýzy genové exprese využívané ve vývojové biologii

Osnova - Metody práce s DNA a RNA – Analýzy genové exprese využívané ve vývojové biologii

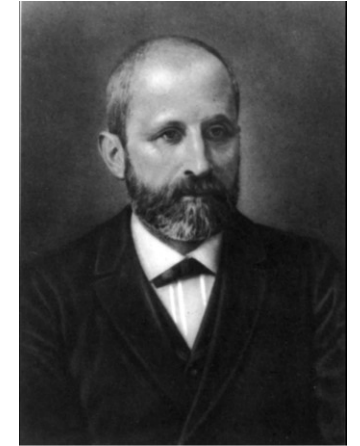
- Izolace nukleových kyselin
- Genotypizace
- PCR, qPCR
- PCR array, microarray
- RNA sekvenace, single cell sequencing
- In situ hybridizace
- RNAScope
- Kombinace proteinové a genové exprese

Izolace nukleových kyselin, historie

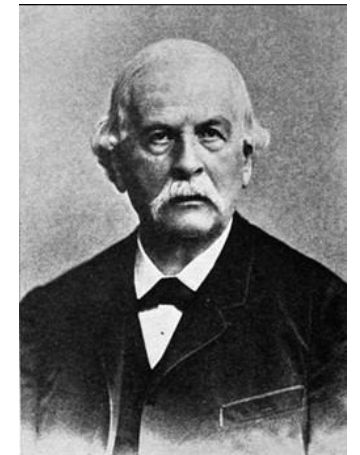
- nejzásadnější a výchozí proces pro použití molekulárně-biologických metod
- možnost izolovat DNA i RNA z různých biologických materiálů – živé nebo fixované tkáně či buňky

Historie

- první izolace DNA – švýcarský lékař **Friedrich Miescher** v roce 1869
- snaha o určení chemického složení buňky
- izolace buněk z lymfatických uzlin – špatná kvalita a nedostatečné množství
- leukocyty z použitých obvazů – vznik precipitátu po přidání kyseliny – zisk surové DNA
- separace jader a zbytku buněk – izolace tzv. nukleinu
- **Richard Altmann** – použití pojmu nukleová kyselina



Friedrich Miescher



Richard Altmann

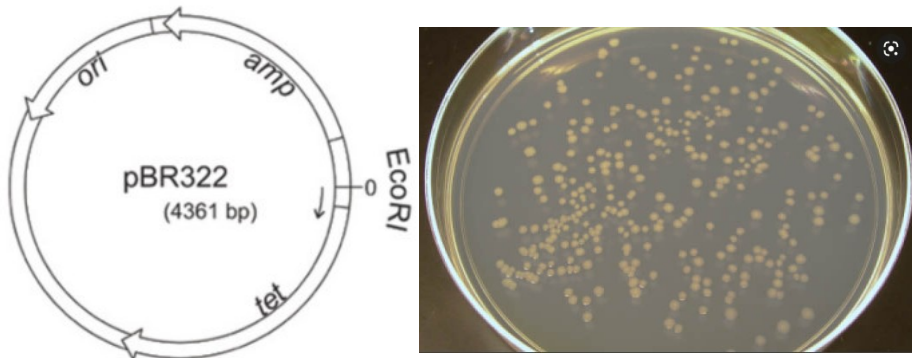
Izolace nukleových kyselin pro potřeby vývojové biologie

- Izolace DNA – rekombinantní DNA konstrukty, chromozomální nebo genomová DNA
- Izolace RNA – mRNA, tRNA, rRNA, nekódující RNA – určení genové exprese
- Izolace pomocí připravovaných chemikálií nebo pomocí předpřipravených komerčních kitů

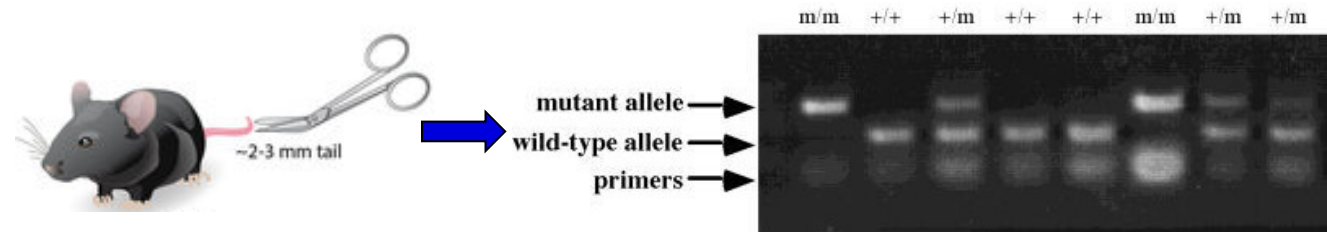
Izolace nukleových kyselin ve vývojové biologii?

Izolace DNA ve vývojové biologii

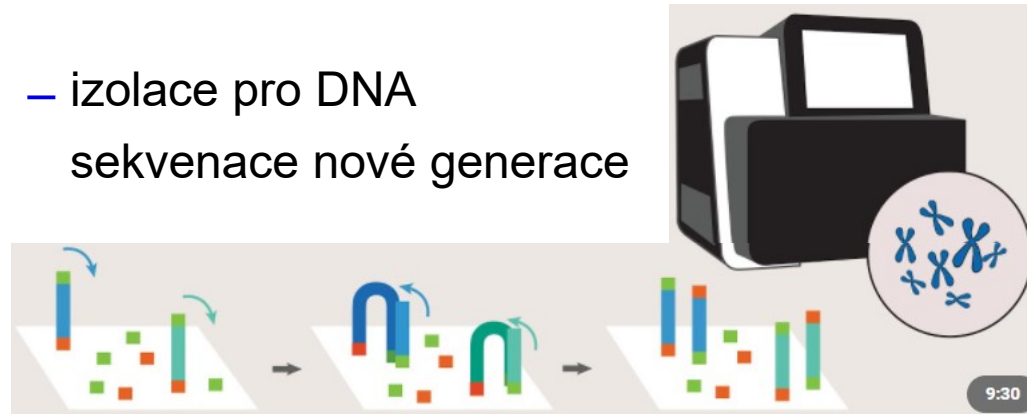
- tvorba plazmidových konstruktů v bakteriích a následná izolace (ovlivnění genové exprese)



- izolace DNA za účelem genotypizace mutantních experimentálních zvířat

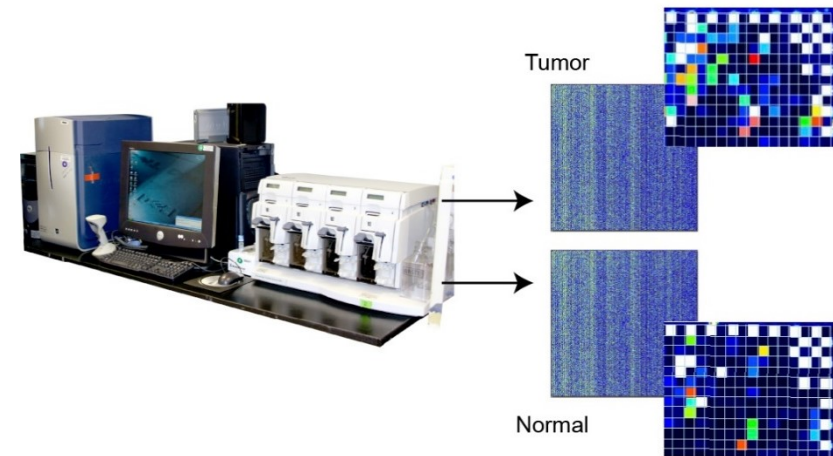
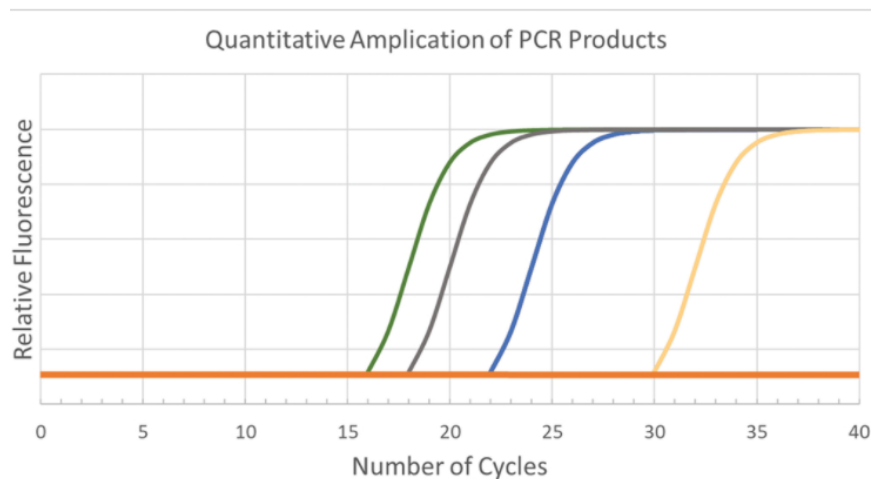


- izolace pro DNA sekvenace nové generace



Izolace RNA ve vývojové biologii

- určování genové exprese (kvantifikace), porovnávání kontrolních a experimentálních skupin
- využití pro **kvantitativní PCR**, PCR Array, **Microarray**, RNA sekvenace



Genotypizace

- technika sloužící k určení genetických rozdílů (genotypu) vedoucích ke změnám ve fenotypu
- Krátké nukleotidové polymorfizmy (SNP) nebo velké strukturální změny v DNA
- Určení genotypu v kolonii zvířat – pro potřeby páření

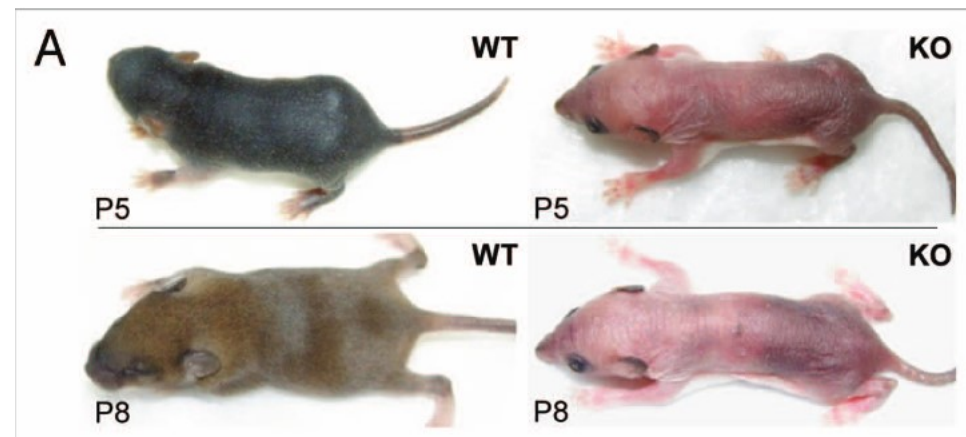
Fyziologické

změny vedoucí ke vzniku unikátních jedinců



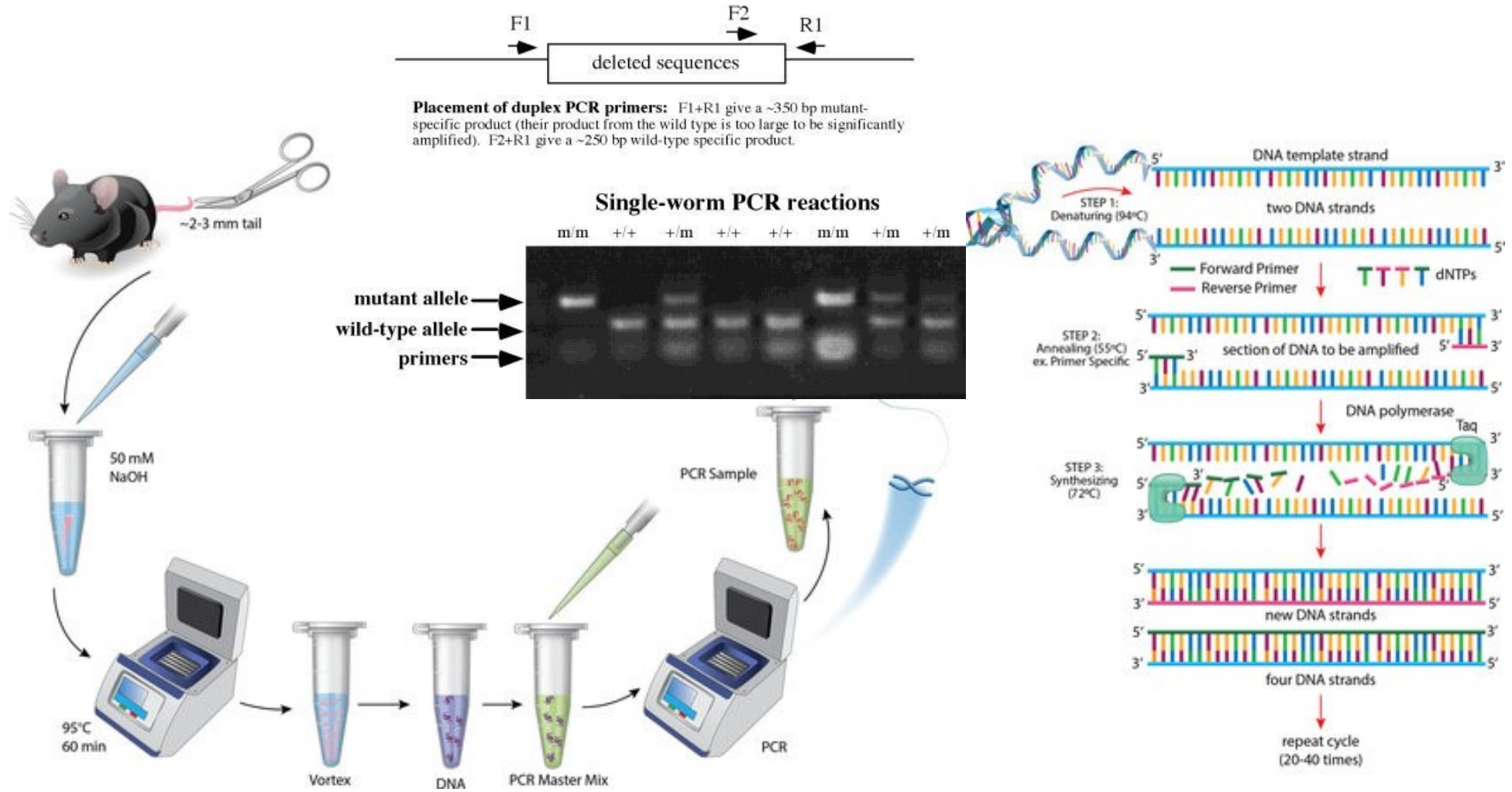
Patologické

změny vedoucí k rozvoji onemocnění nebo vzniku vývojových vad



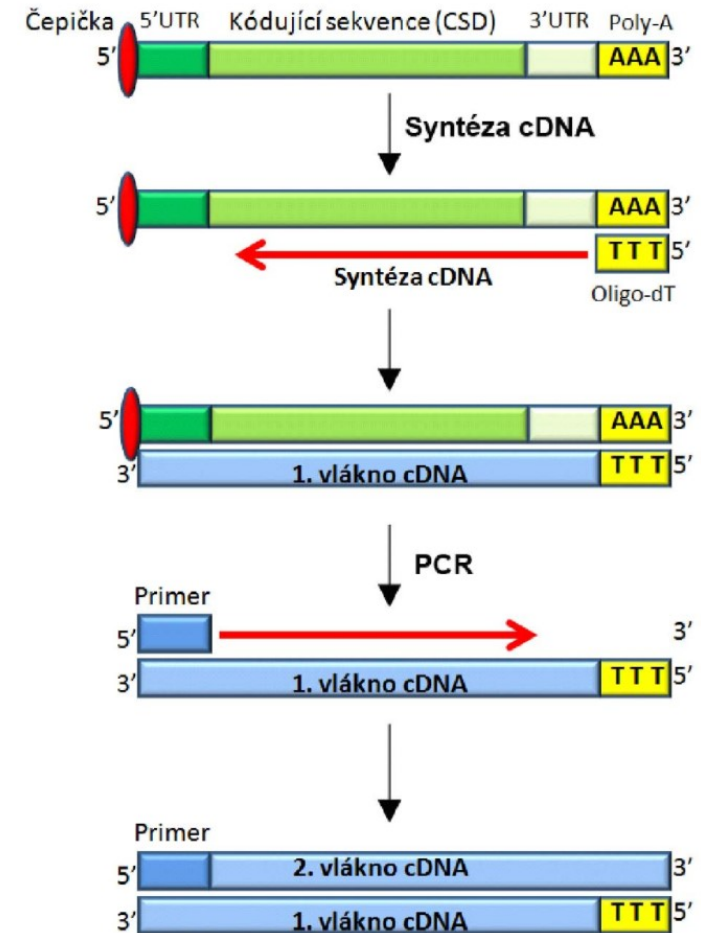
Cui et al. 2011. *Cell Cycle*

Genotypizace



PCR – Polymerázová řetězová reakce

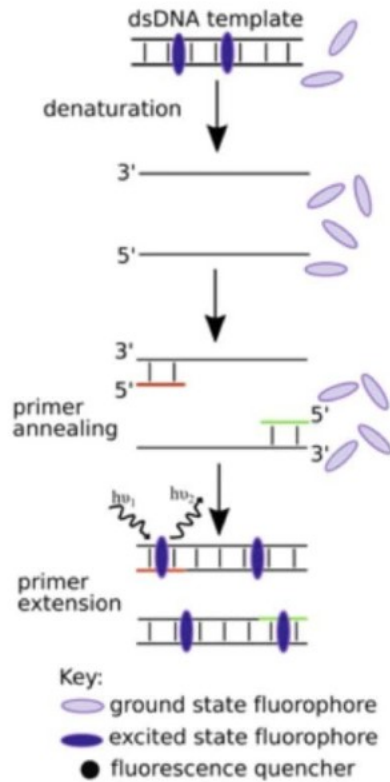
- **izolace RNA** – extrakce mRNA z cílové tkáně, tkáňové kultury nebo buněčné kultury
- **přepis do cDNA** – tzv. reverzní transkripce – syntéza 1. vlákna komplementární DNA (cDNA) – vznik jednovláknové cDNA
- **PCR** – tvorba 2. vlákna cDNA – vznik dvouvláknové cDNA
- **cyklus PCR:**
 - **denaturace** – rozpojení dvojvlákna
 - **annealing** – navázání primerů
 - **prodlužování** – zmnožení vlákna
- každé nově vzniklé vlákno slouží jako templát pro tvorbu dalšího vlákna – **exponenciální amplifikace**



Kvantitativní PCR – qPCR/RT-PCR

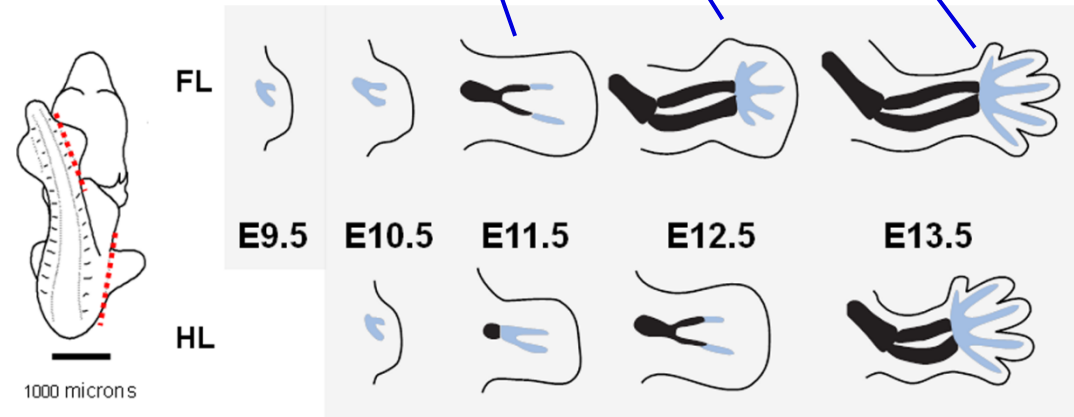
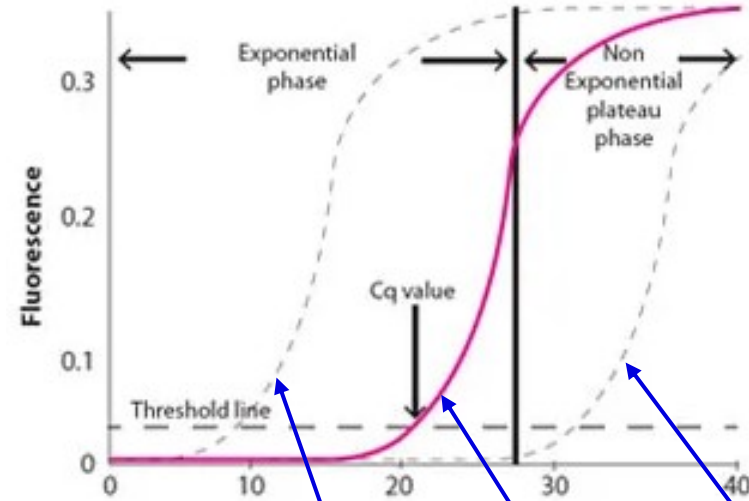
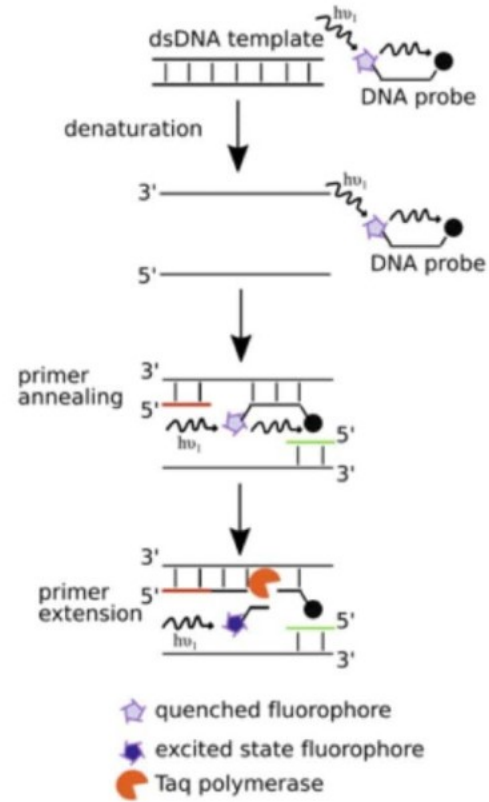
SYBR Green

Fluorescent dye-based real-time PCR



TaqMan Assay

DNA probe-based real-time PCR



Taher et al. 2011. *PLoS One*

The Real time PCR Digest. 2016

PCR array

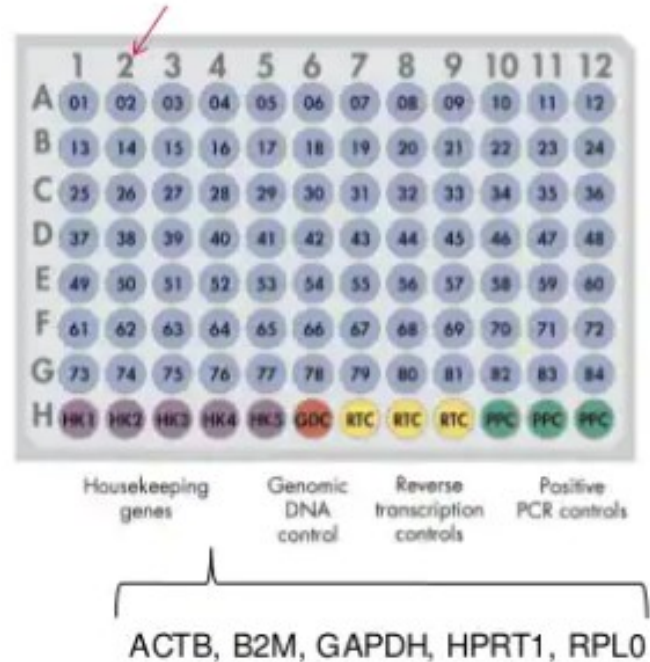
- Princip – kvantitativní PCR
- Hodnocení exprese desítek až stovek genů specifických pro určitý biologický proces
- Ideální pro porovnávání genové exprese menšího množství vybraných genů mezi kontrolním a sledovaným vzorkem (pacient, experimentálně ovlivněné buňky či živočichové)
- **Výhoda** – využití běžného PCR cycleru



PCR Array – RT² Profiler

- Desítky různých genů
- Housekeeping geny
- Kontrola s genomovou DNA
- Kontrola reverzní transkripce
- Pozitivní kontroly

Each well contains lyophilized, verified qPCR assays



- Rows A–G hold your 84 pathway-specific genes of interest
- Five housekeeping genes
- Genomic DNA contamination control (GDC)
- Three reverse transcription controls (RTCS)
- Three positive PCR controls (PPCs)
- Customizable – Add four genes to a catalog RT² Profiler PCR Array or completely customize based on your research

Specifické panely, specifické geny

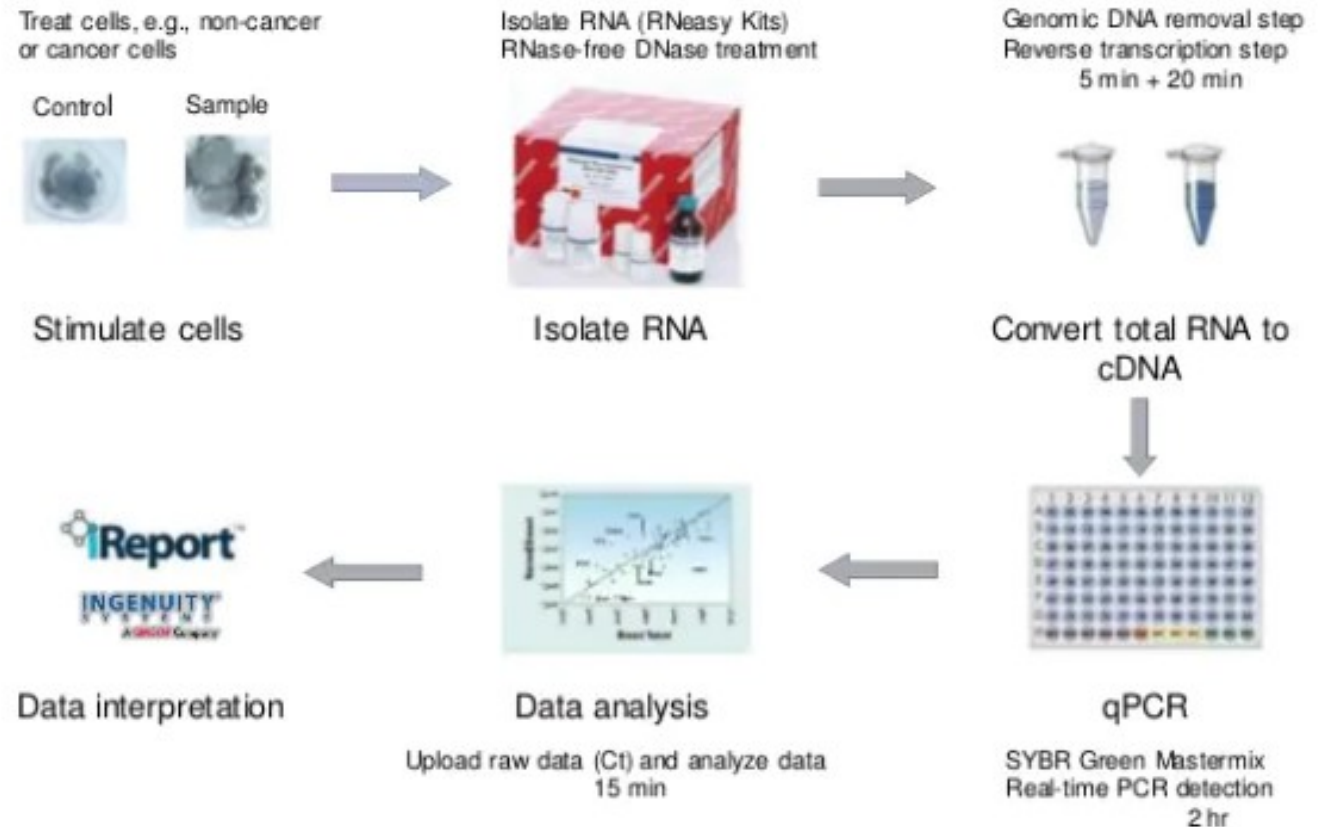
- možnost použití pro různé živočišné druhy:
 - člověk, myš, potkan
 - kuře, zebřička, octomilka, prase, králík, pes, kráva, kůň, makak, ...
- velké množství různých oblastí:
 - Adipogeneze
 - Angiogeneze
 - Apoptóza
 - Buněčný cyklus
 - Embryonální kmenové buňky
 - Hedgehog signální dráha
 - Micro RNA
 - Neurogeneze
 - ...

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bcl2	Bmp2	Bmp4	Bmp5	Bmp6	Bmp7	Bmp8a	Bmp8b	Boc	Bltrc	Cdon	Csnk1a1
B	Csnk1e	Ctnnb1	Dhh	Disp1	Disp2	ErbB4	Fat4	Fbxw11	Fgf9	Fgfr3	Fkbp8	Foxe1
C	Frmd6	Gas1	Gli1	Gli2	Gli3	Grem1	Gsk3b	Hhat	Hhip	Ihh	Kctd11	Lats1
D	Lats2	Lrp2	Mapk1	Mobk1a	Mtss1	Nf2	Npc1	Numb	Otx2	Prkaca	Prkacb	Ptch1
E	Ptch2	Ptchd2	Ptchd3	Rab23	Runx2	Sfrp1	Shh	Shox2	Smo	Stk3	Stk36	Sufu
F	Trp53	Vegfa	Wif1	Wnt1	Wnt10a	Wnt10b	Wnt11	Wnt16	Wnt2	Wnt2b	Wnt3	Wnt3a
G	Wnt4	Wnt5a	Wnt5b	Wnt6	Wnt7a	Wnt7b	Wnt8a	Wnt8b	Wnt9a	Wnt9b	Zic1	Zic2
H	Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Postup metody

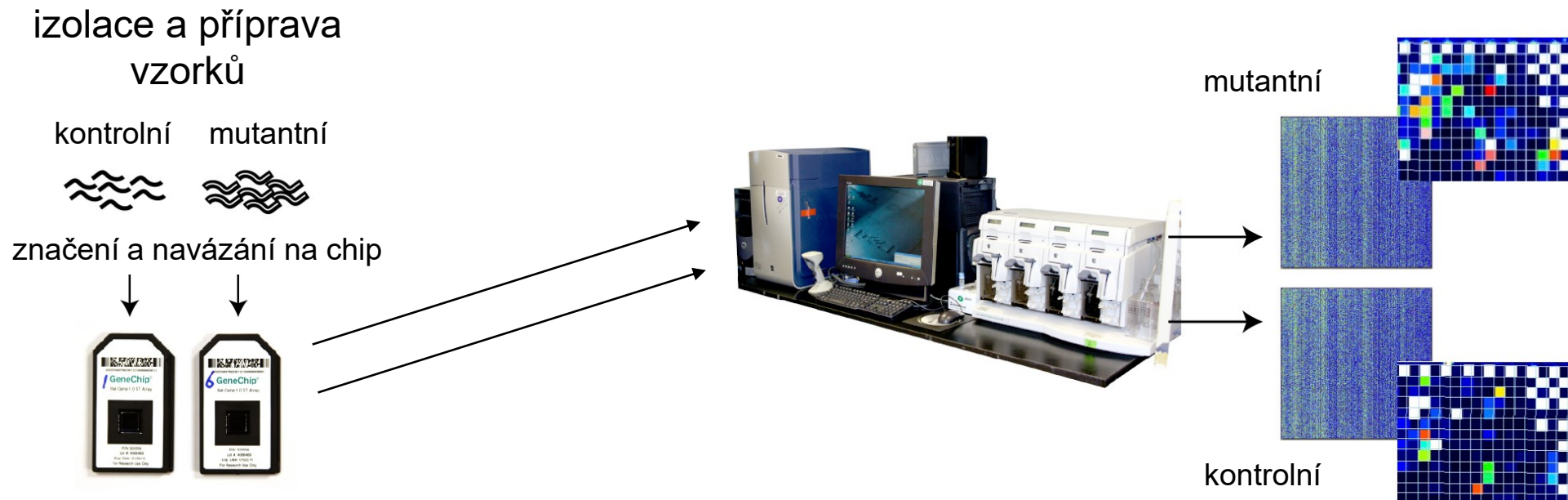
- buňky/tkáně/embrya
- Izolace RNA – přepis do cDNA
- Kvantitativní PCR
- Analýza – využití online vyhodnocení

Experimental workflow



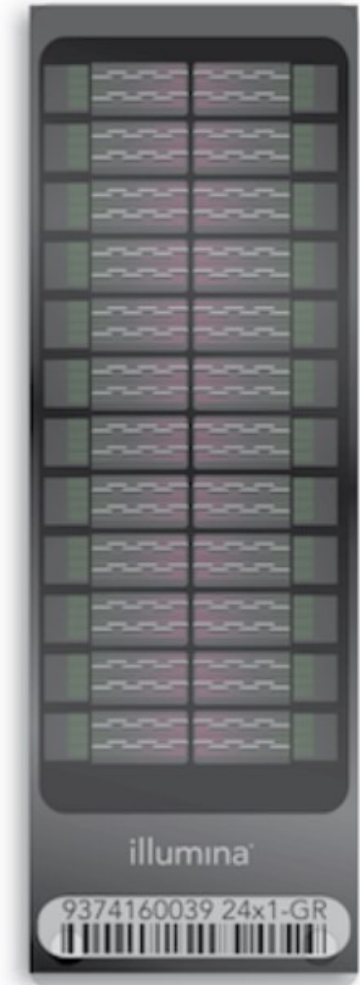
Microarray

- detekce až tisíců různých genů na tzv. DNA, nebo také genovém chipu, nebo biochipu
- ideální pro porovnávání genové exprese obrovského množství genů mezi kontrolním a sledovaným vzorkem (experimentálně ovlivněné buňky či živočichové)
- nutnost opatření microarray scanneru, také možnost skenování chipů na některých sekvenátorech nové generace



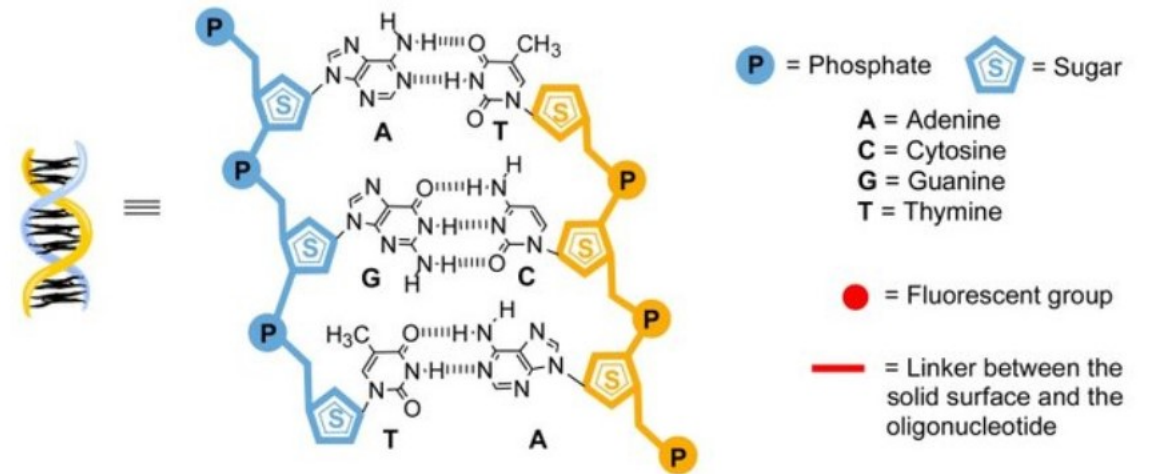
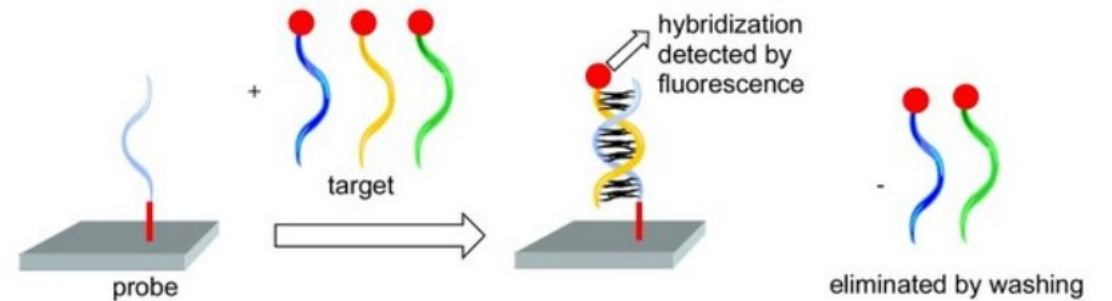
Microarray - úvod

- použití tzv. DNA sond přichycených k pevnému povrchu (sklo nebo křemík) v daných pozicích
- jeden bod (DNA sonda) = jeden gen
- desítky tisíc genů na jednom chipu
- 4 typy DNA microarrayí:
 - cDNA microarray
 - Oligonukleotidová microarray
 - BAC microarrays
 - SNP microarrays



Microarray - princip

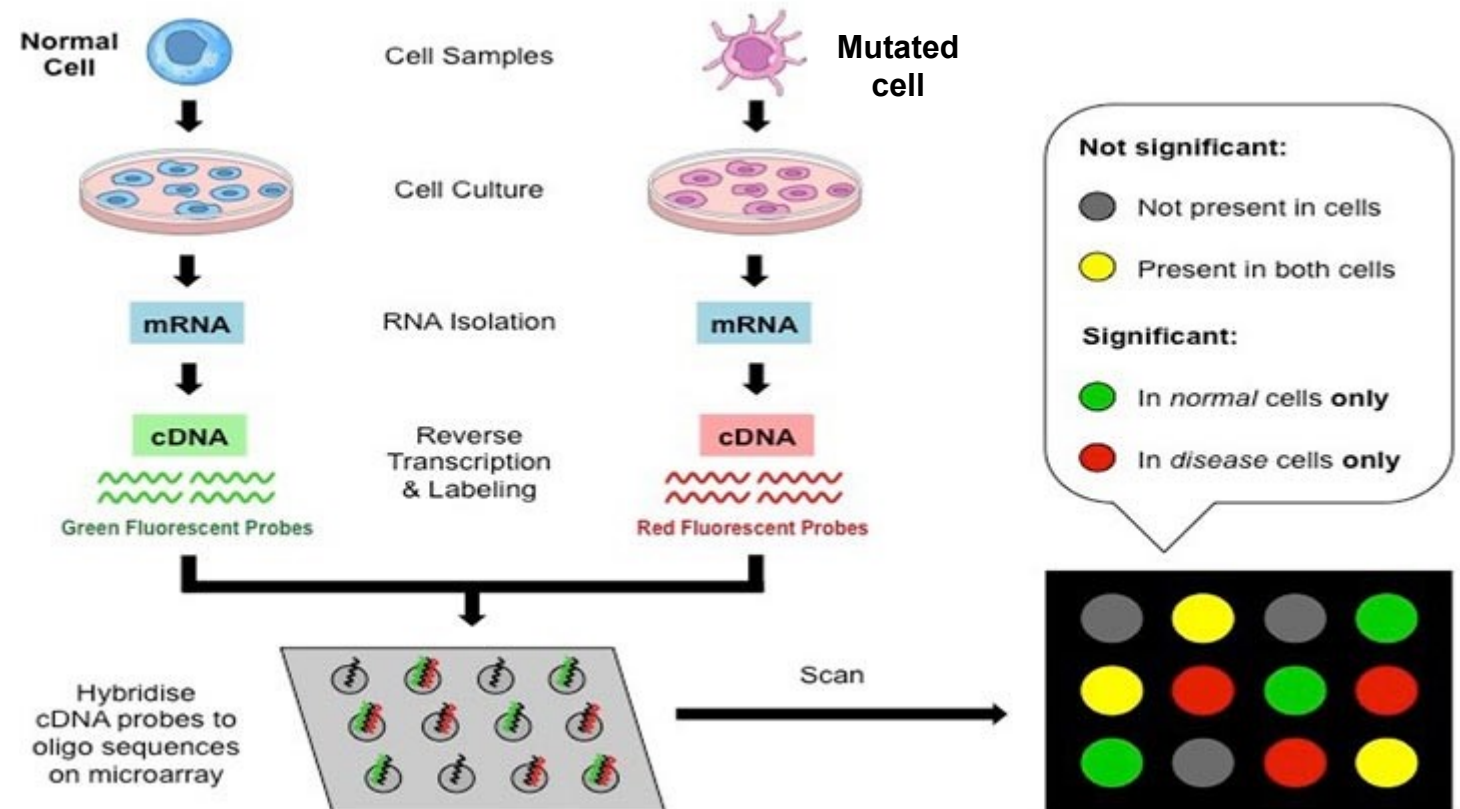
- přichycení fragmentované DNA na substrát a určení sekvence pomocí známé DNA sekvence
- Princip: hybridizace mezi vlákny nukleových kyselin na základě komplementarity bazí
- Hybridizace nukleové kyseliny o neznámé sekvenci na sondu o známé sekvenci



Caminade et al. 2006. *Sensors*

Příprava a průběh cDNA microarray

- vzorky: kontrolní skupina a testovaný vzorek
- Aplikace na DNA chip
- Analýza a hodnocení



RNA sekvenace

- Co je cílem RNA sekvenace?
- určení množství a přesných sekvencí RNA pomocí sekvenace nové generace
- analýza tzv. transkriptomu – které geny v daném vzorku jsou do jaké míry aktivní

Aplikace RNA sekvenace

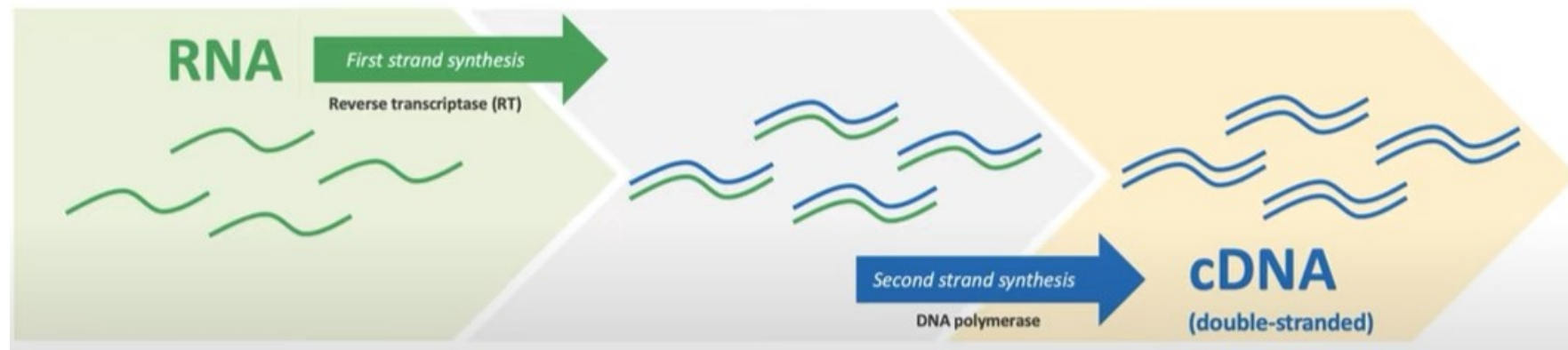
- určení transkriptů specifických genů a jejich sekvence, množství a kdy jsou aktivní – pochopení vývojových procesů a možných změn vedoucích k vývojovým vadám
- **Použití:**
 - Transkripční profily buněčných typů
 - Identifikace nukleotidových polymorfismů
 - Diferenciální genová exprese – rozrůzňování buněk na základě aktivity specifických genů
 - Alternativní splicing – produkce různých transkriptů z jednoho genu
 - Odhalení posttranslačních modifikací – polyadenilace, capping
- **Příklad:**
 - Odhalení funkce specifického genu – transkriptomika odhalí buňky a tkáně s expresí daného genu

Postup RNA sekvenace

- Izolace RNA
- Reverzní transkripce mRNA do cDNA
- Příprava cDNA knihovny – fragmentace, ligace, amplifikace
- cDNA sekvenace
- Alignment k referenčnímu genomu/transkriptomu a analýza dat
- Vytvoření RNA sekvenční mapy pokrývající transkriptom

Izolace RNA, reverzní transkripce

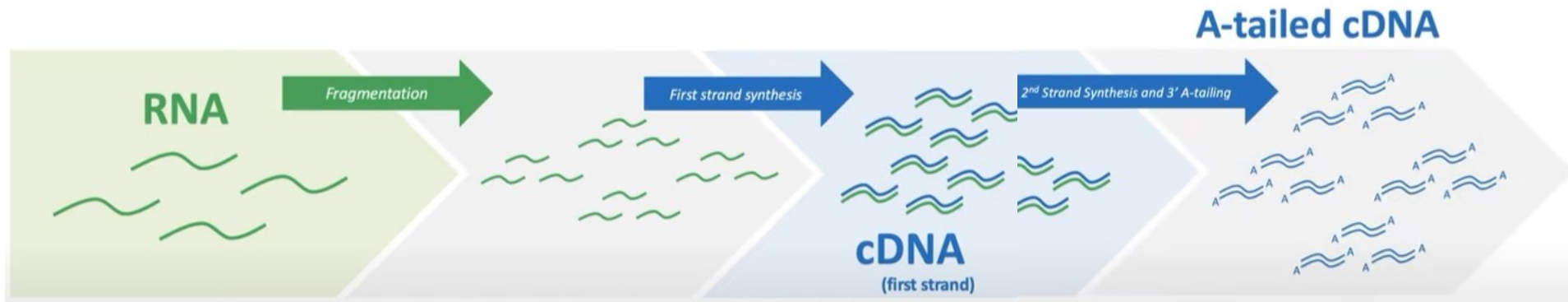
mechanická nebo
enzymatická izolace
nebo kombinace



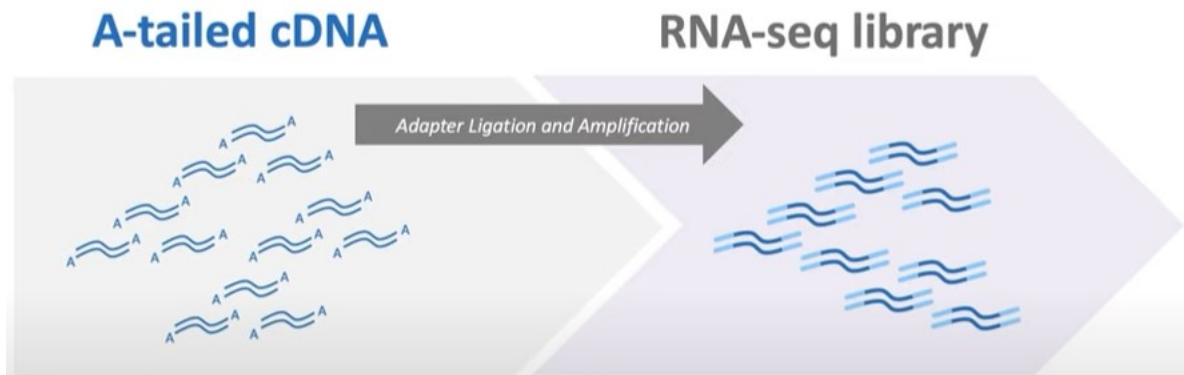
Reverzní transkripce –
přeložení z mRNA do
cDNA

Příprava knihovny – fragmentace, ligace

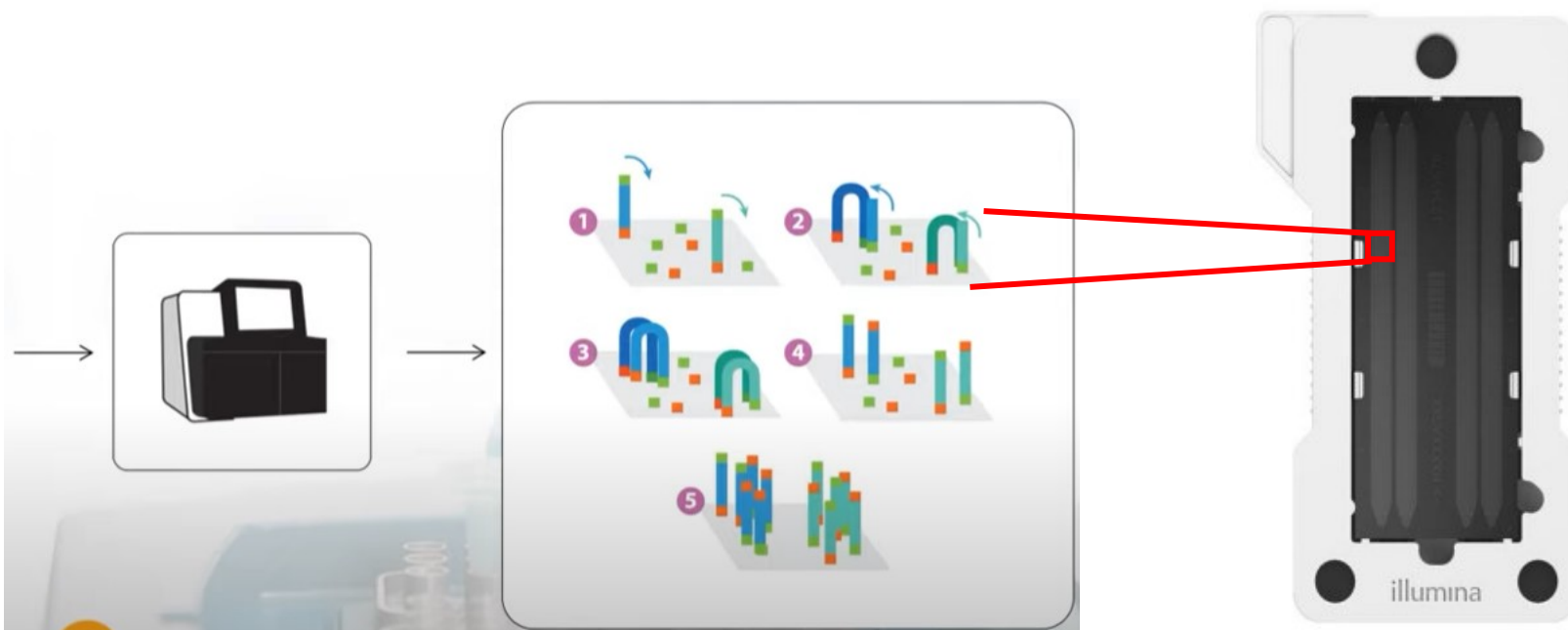
před reverzní transkripcí – **fragmentace** (vznik stejně dlouhých krátkých sekvencí mRNA) → následuje **A-tailing**



Ligace adaptérových sekvencí

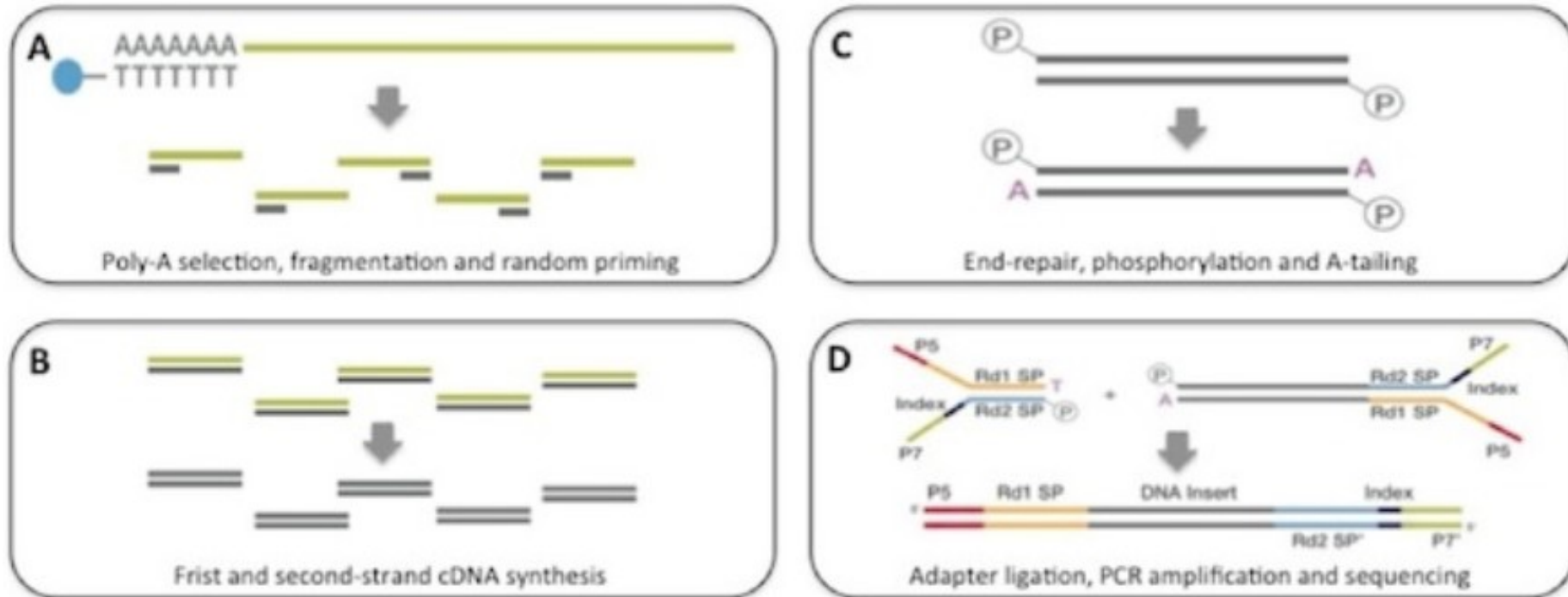


Tvorba klastrů, Bridge PCR



illumina.com

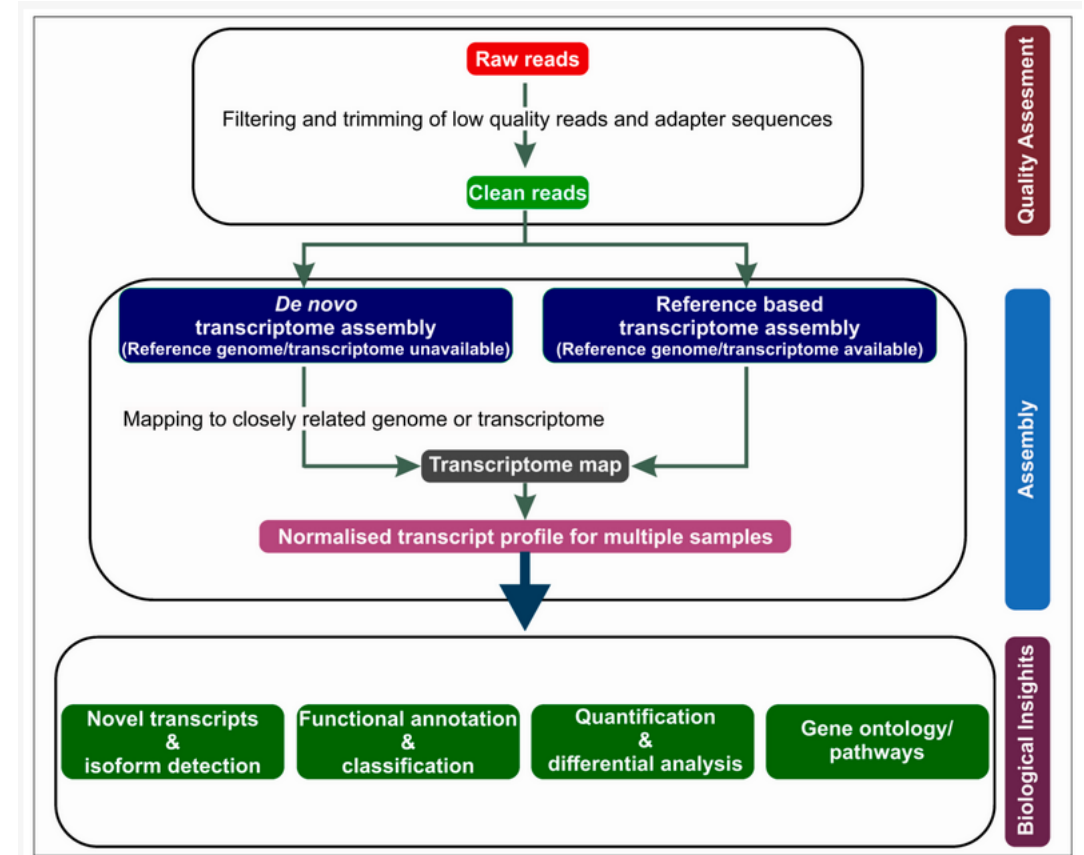
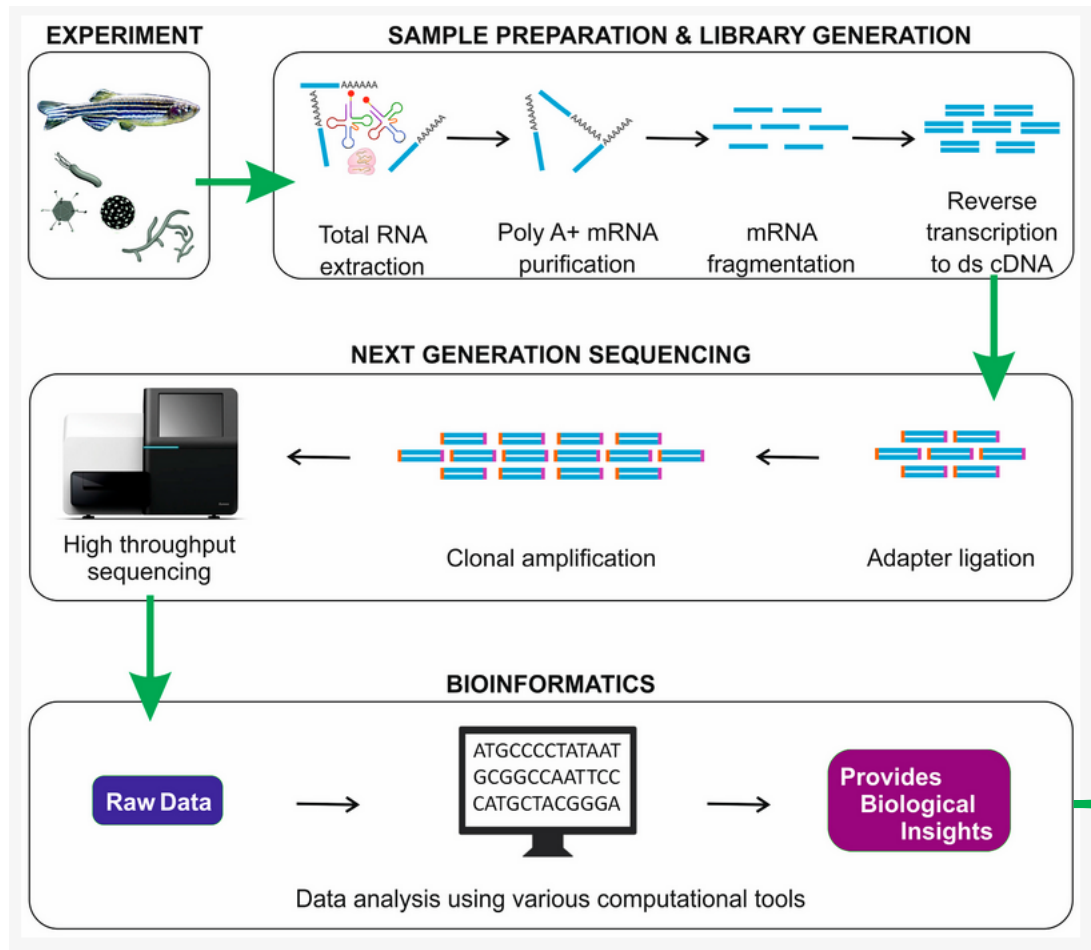
Shrnutí přípravného procesu a následné RNA sekvenace



VIDEO: <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>

Alignment a analýza dat

– porovnání sekvencí ze sekvenace s referenčním genomem/transkriptomem

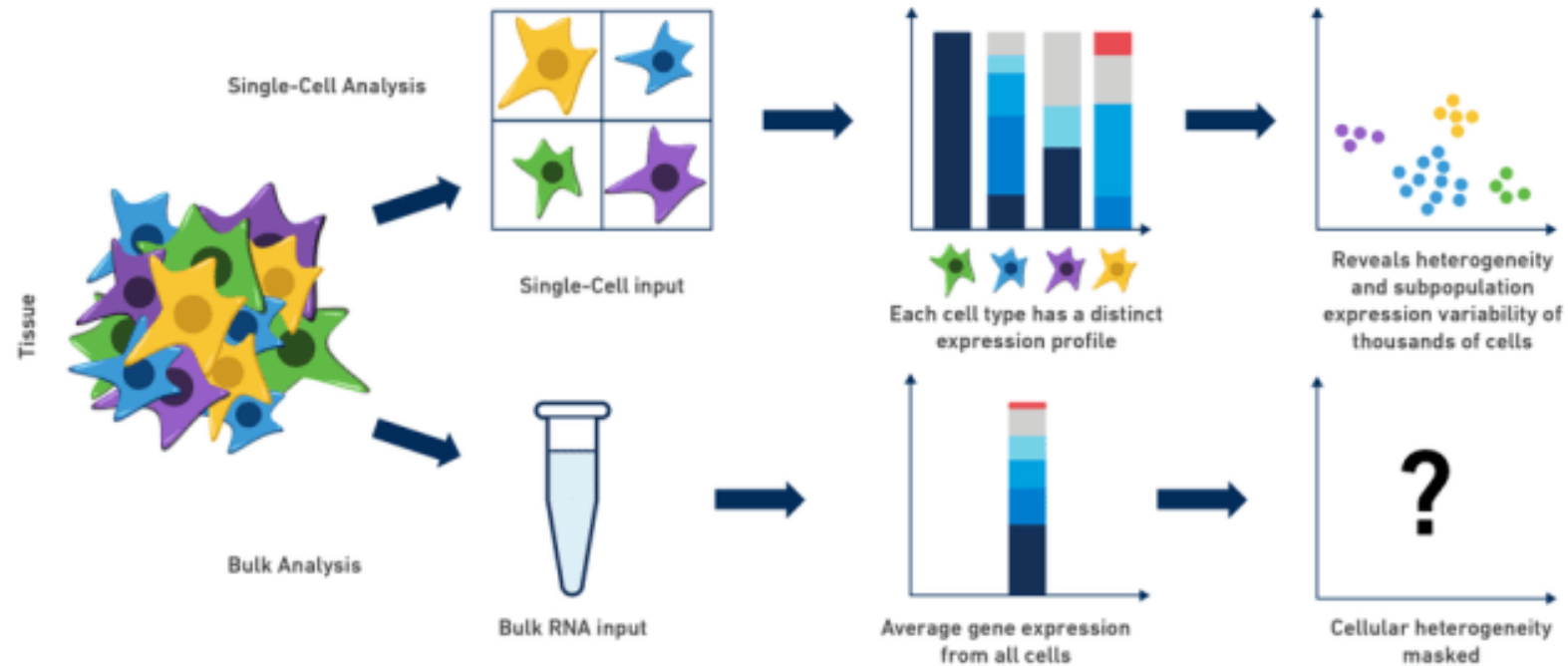


Single-cell RNA sequencing

- **Bulk RNA-sekvenace** – určení transkripčního profilu buněčné populace (zprůměrovaná genová exprese)

- **Single-Cell RNA sekvenace** – určení transkripčního profilu na úrovni jedné buňky
- Výhoda:
 - určení cell-to-cell buněčné transkripční variability - rozrůžňování jednotlivých buněk v raném i pozdějším vývoji
 - Odhalení vzácných buněčných populací

Bulk RNA-seq vs. Single cell RNA-seq

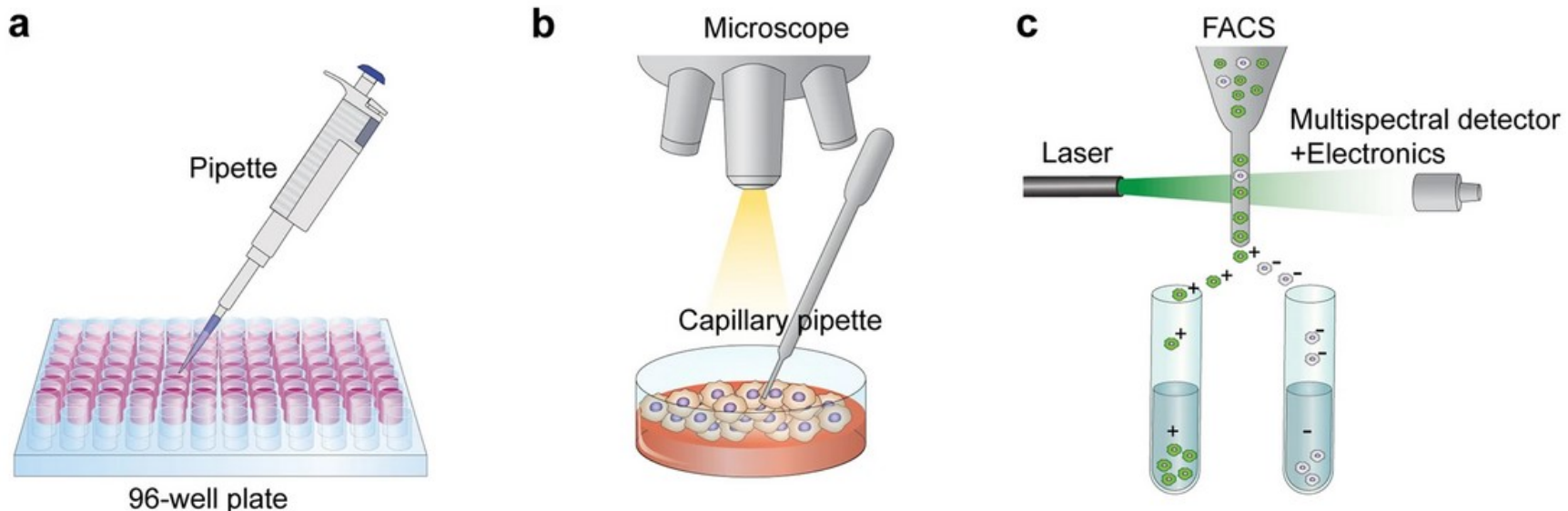


Cesta k Single-Cell RNA sekvenaci

- 1990 – amplifikace cDNA jedné buňky (in vitro transkripce a exponenciální amplifikace pomocí PCR), hematopoetické buňky, Iscove group
- 1992 – analýza genové exprese v jednom neuronu
- 2002 – 2010 – aplikace těchto technologií do DNA chipů
- 2009 – poprvé použita metoda Single-Cell RNA sekvenace na bázi sekvenace nové generace, charakterizace buněk raného vývoje (Tang et. al. *Nature Methods*)

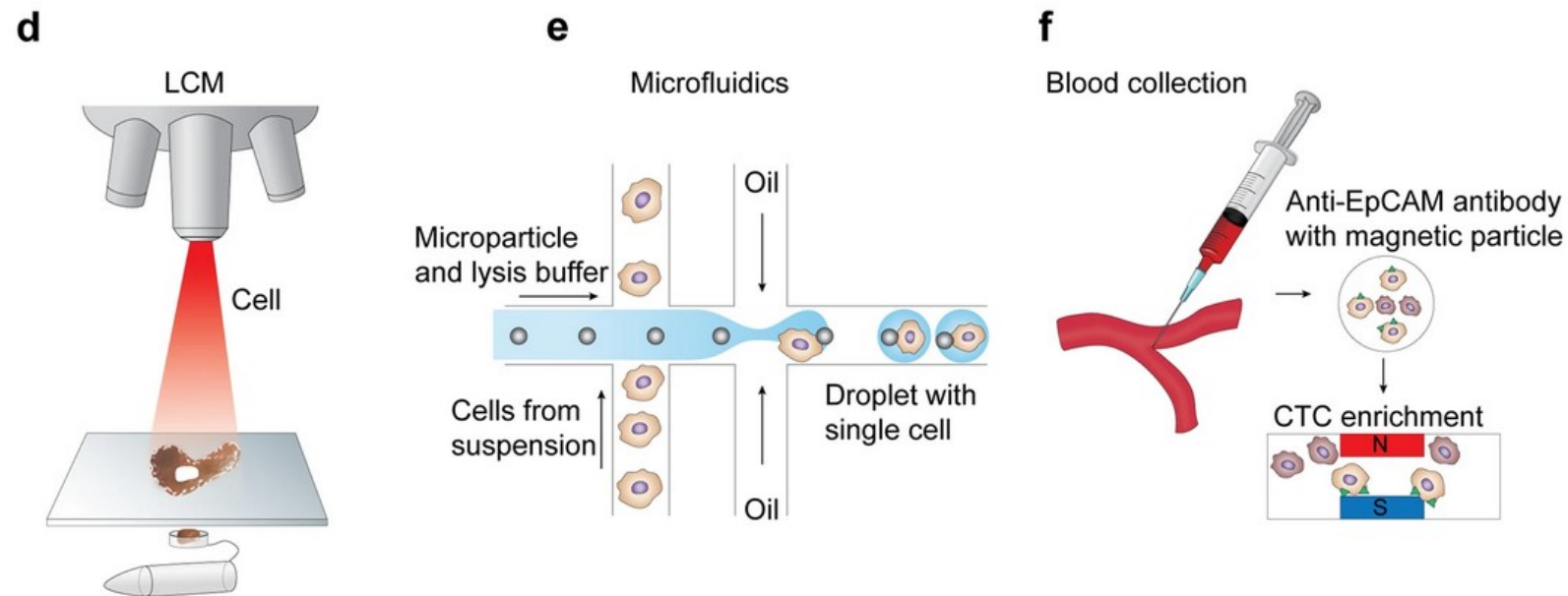
Izolace – základní krok pro Single-Cell transkriptomiku

- A. ředění – izolace jednotlivých buněk postupným ředěním, neefektivní
- B. mikromanipulace – klasická metoda pro izolaci buněk z embryí, pomocí kapilárových pipet pod mikroskopem extrakce jednotlivých buněk ze suspenze, zdlouhavé a málo efektivní
- C. FACS – nejúčinnější strategie, označení buněk fluorescenční protilátkou – sortování specifické buněčné populace, nutnost velkého množství buněk na vstupu (více než 10000)



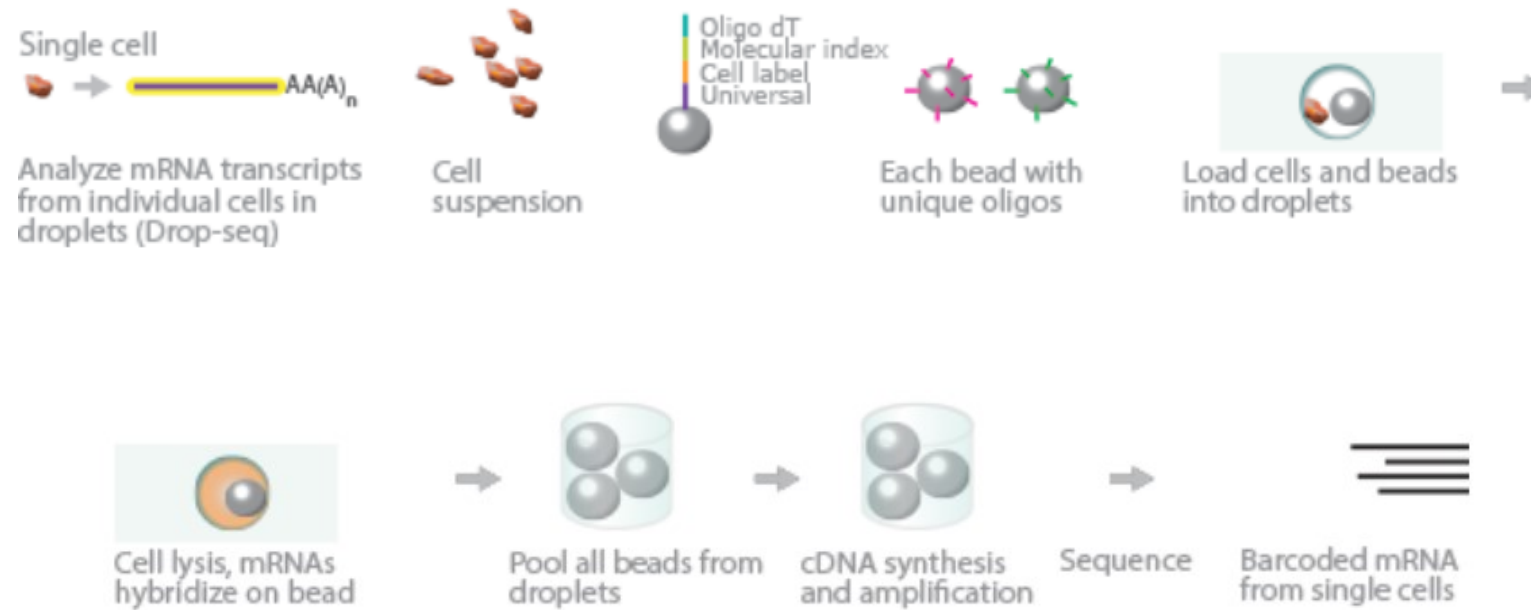
Izolace – základní krok pro Single-Cell transkriptomiku

- D. laserová mikrodisekce – „vystřelení“ buňky z tkáně laserem
- E. mikrofluidika –
- F. magnetické částice a protilátky –



Příprava Single-Cell cDNA knihovny

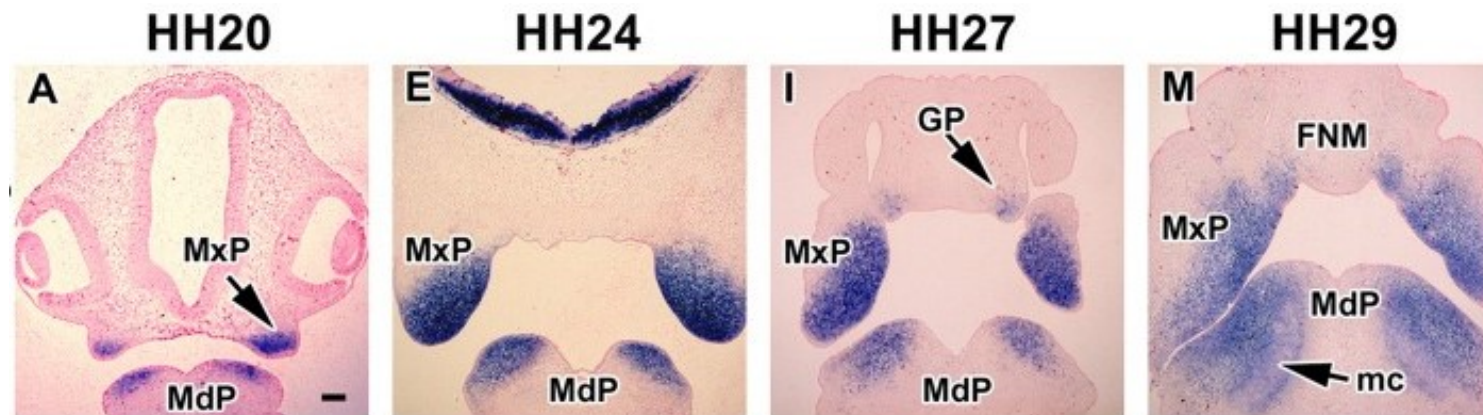
– tzv. droplet based library



illumina.com. Drop-Seq

In situ hybridizace

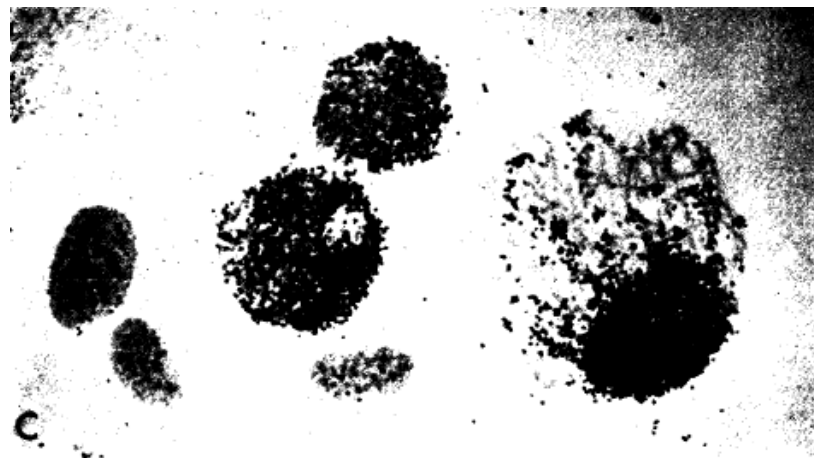
- Princip
- Příprava RNA sondy
- Příprava vzorků
- In situ hybridizace (ISH) na tkáňových řezech
- Whole mount In situ hybridizace (WISH) – kusy tkání nebo celá embrya



Cela et al. 2016. *Front Physiol*

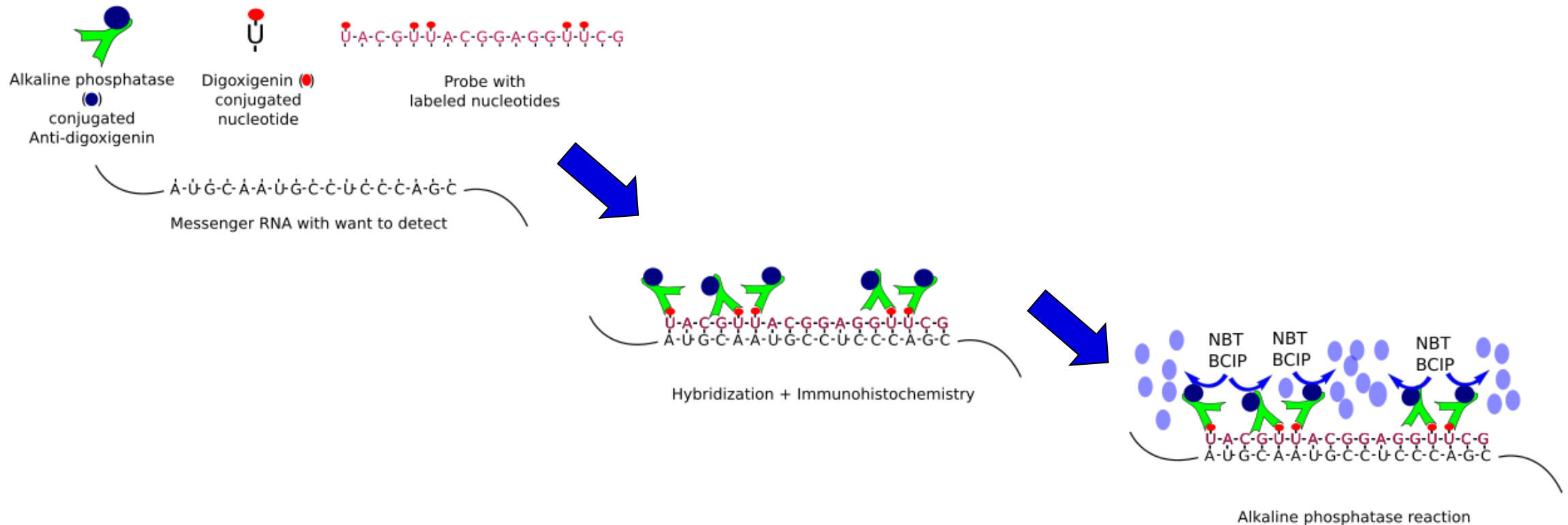
Princip metody – In situ hybridizace

- lokalizace a detekce specifické sekvence nukleové kyseliny v buňkách, v tkáňových řezech nebo v celých kusech tkání či celých zvířatech (embryích)
- vazba komplementárního řetězce nukleotidové sondy na specifickou cílovou sekvenci DNA či RNA
- značení sondy – radioaktivní, fluorescenční, enzymatické
- největší **výhoda** metody – lokalizace genové exprese vzhledem k specifickým buňkám a tkáním
- metoda poprvé použita v roce 1969 (Gall and Pardue, 1969. *PNAS*)



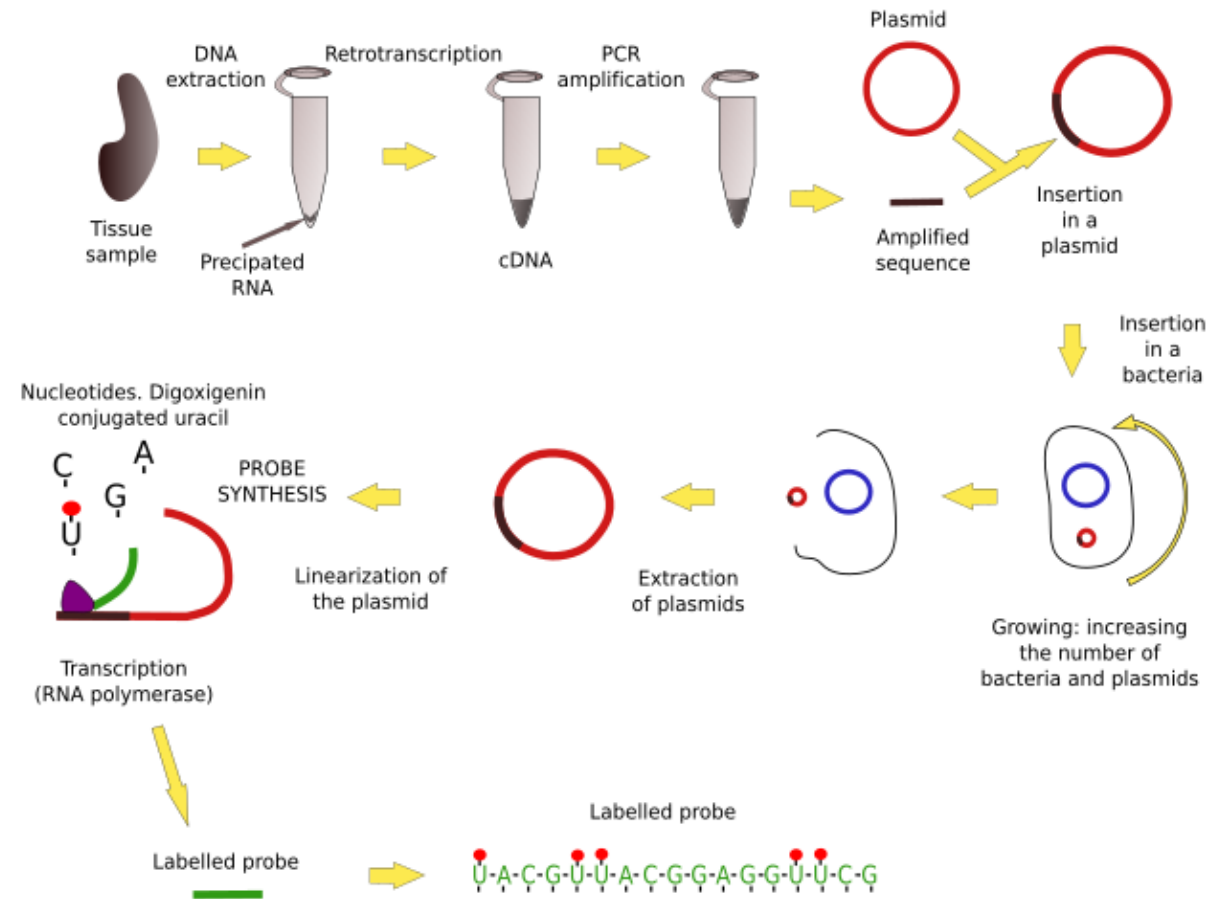
Hybridizace sondy na nukleovou kyselinu

- Cíl – určení přítomnosti nebo absence specifické sekvence (DNA nebo RNA) v buňkách nebo tkáních

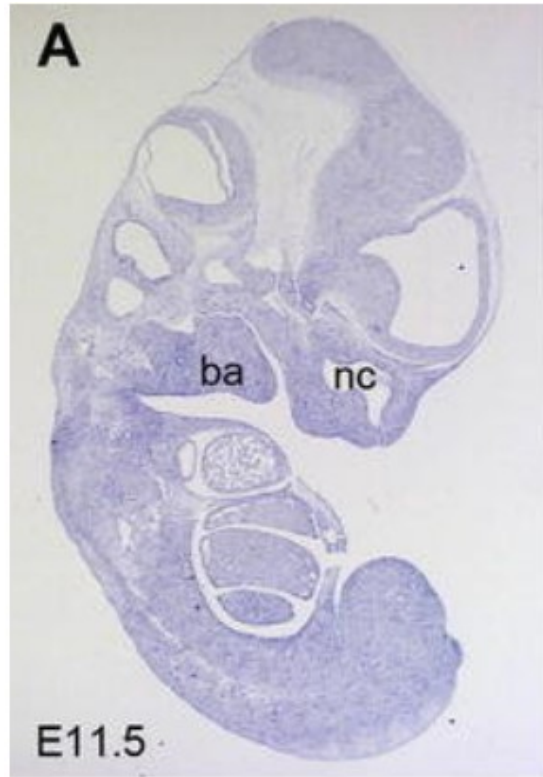


Příprava sondy

- Odběr tkáně – izolace RNA – prepis do cDNA – PCR amplifikace
- Vložení do plazmidu – inzerce do bakterií
- Množení bakterií s plazmidy
- Linearizace plazmidu
- Syntéza próby ze značených nukleotidů
- Vytvoření značené próby



ISH



Völker et al. 2011. *Histo Cell Biol*

WISH

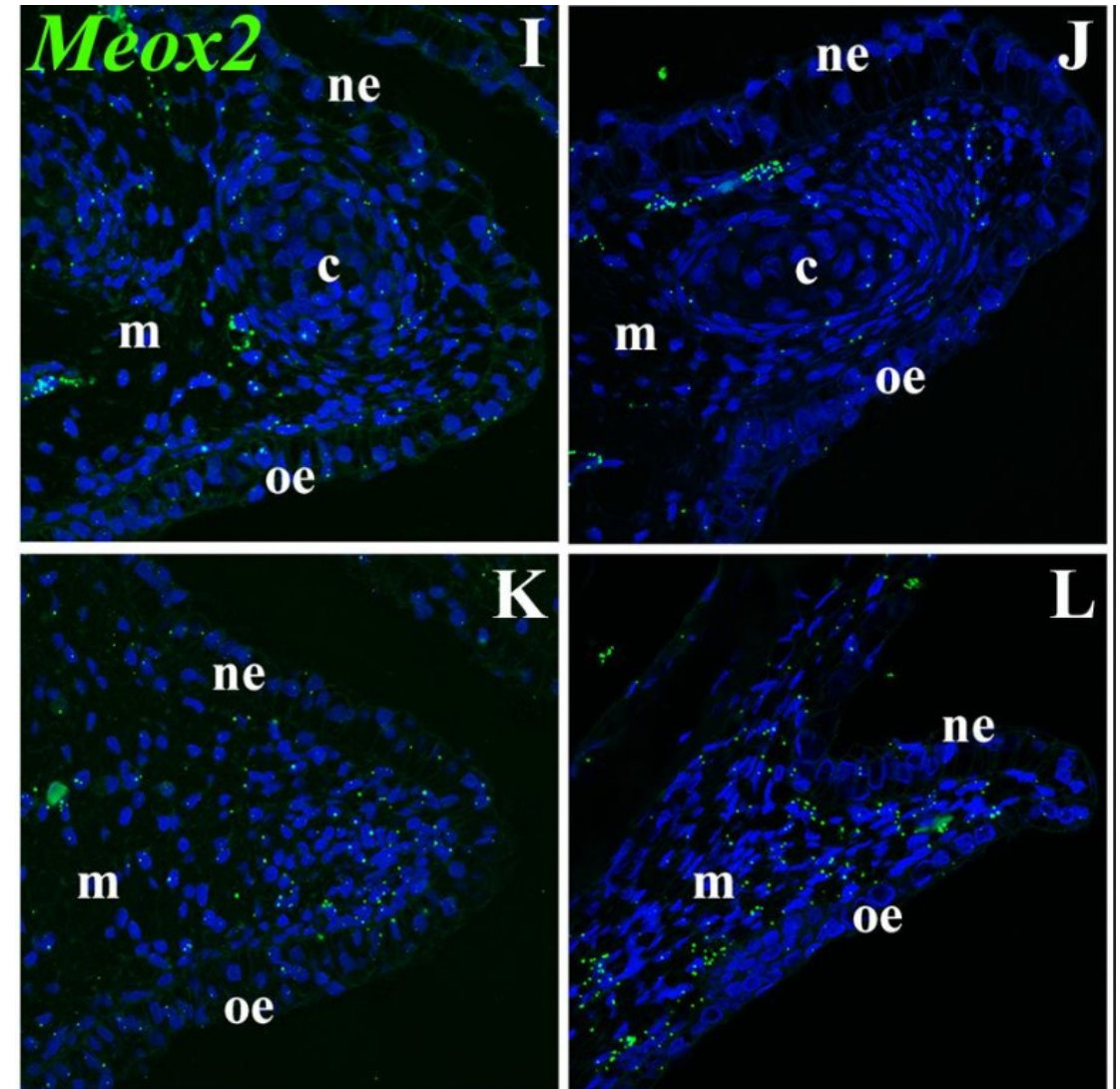


Vendrell et al. 2009. *Gene Exp Patt*

vs.

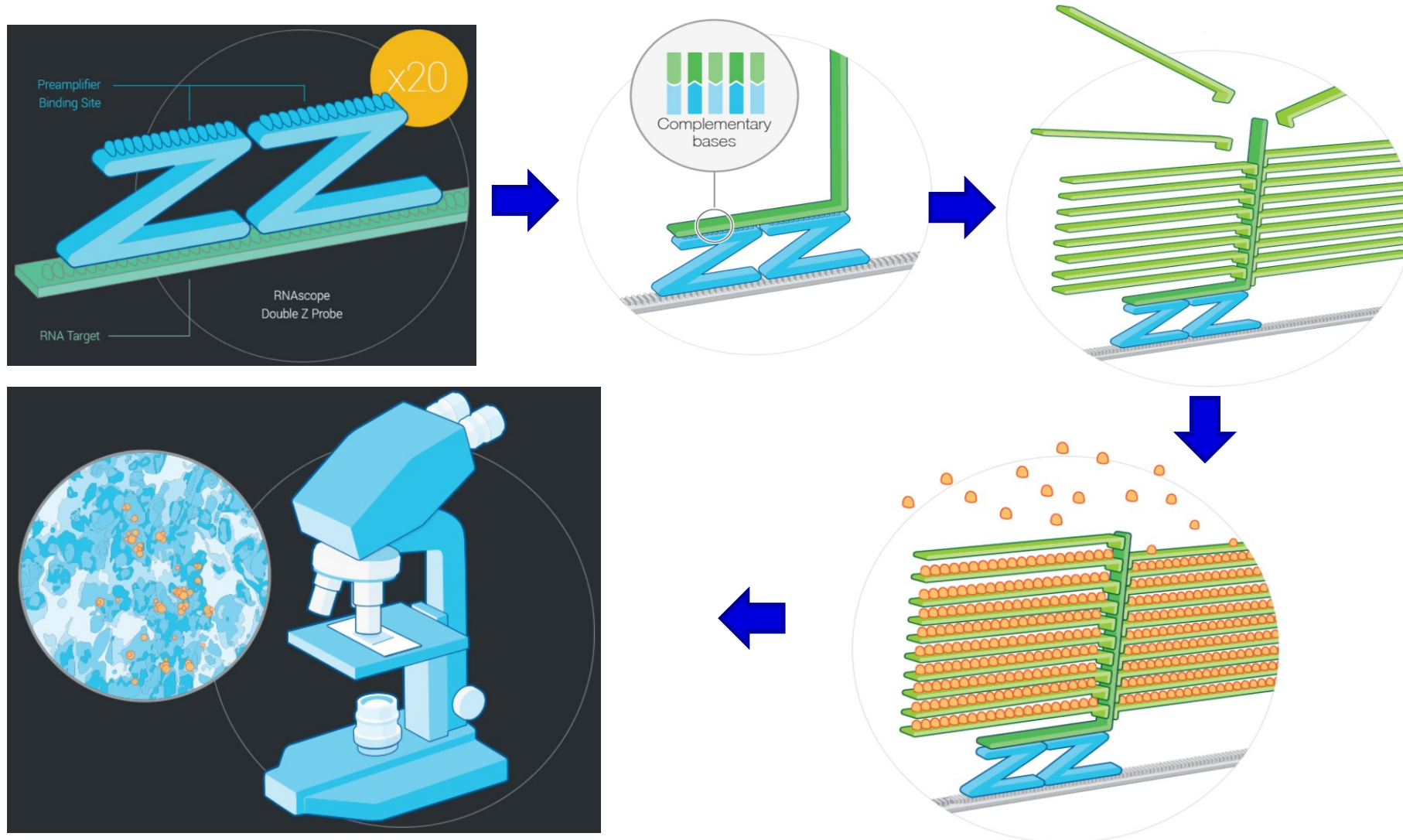
RNAScope

- Využití k detekci genové exprese na tkáňových řezech
- Zaručení vysoké specifiity díky využití nového systému kombinující specifické sekvence a amplifikátory
- Výsledná exprese zobrazena ve formě „teček“
- Chromogenní i fluorescenční systém
- Manuální i automatizované verze



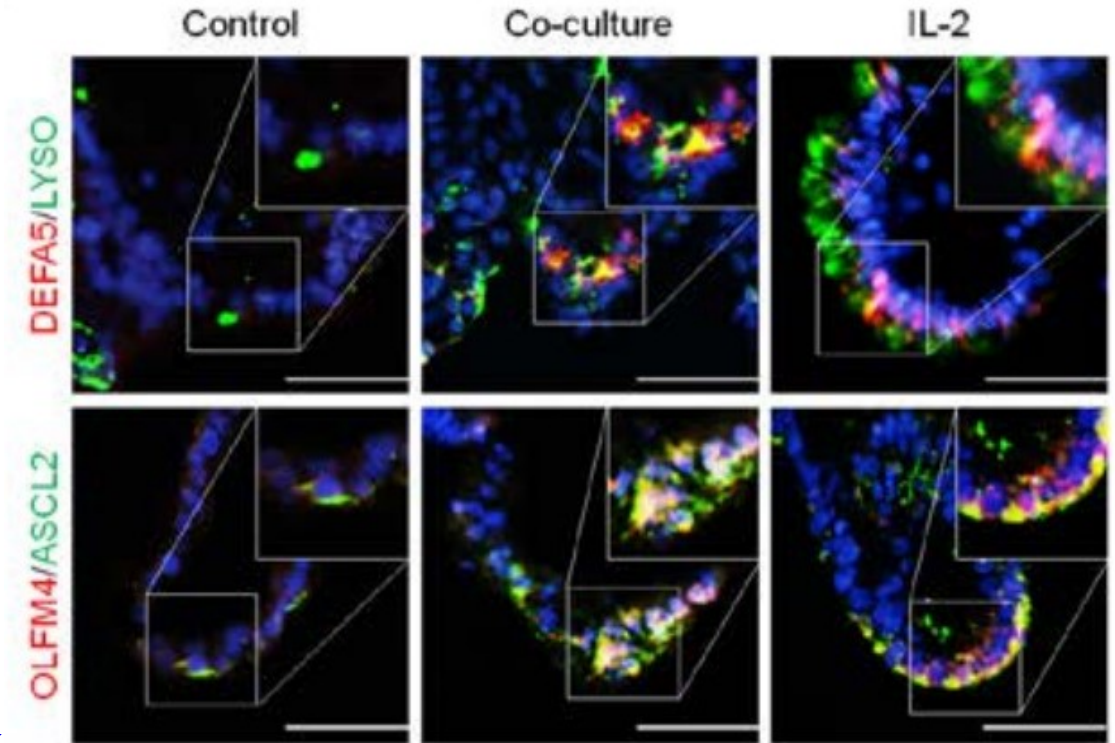
Hampl et al. 2020. *Front Cell Dev Biol*

Princip RNAScope



Kombinace detekce genové a proteinové exprese

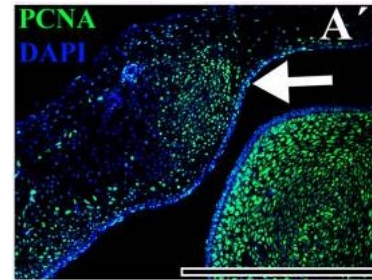
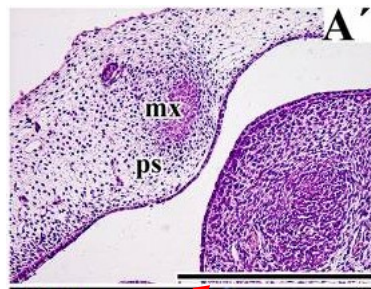
- možnost zároveň detekovat specifickou genovou a proteinovou expresi v buňkách a tkáních
- kombinace použití protilátek a ISH RNA prób
- Využití kitu RNA-Protein Co-Detection Assays:



VIDEO: <https://www.youtube.com/watch?v=zEukqfBDzMw&t=36s>

Jung et al. 2018. *Nat Comm*

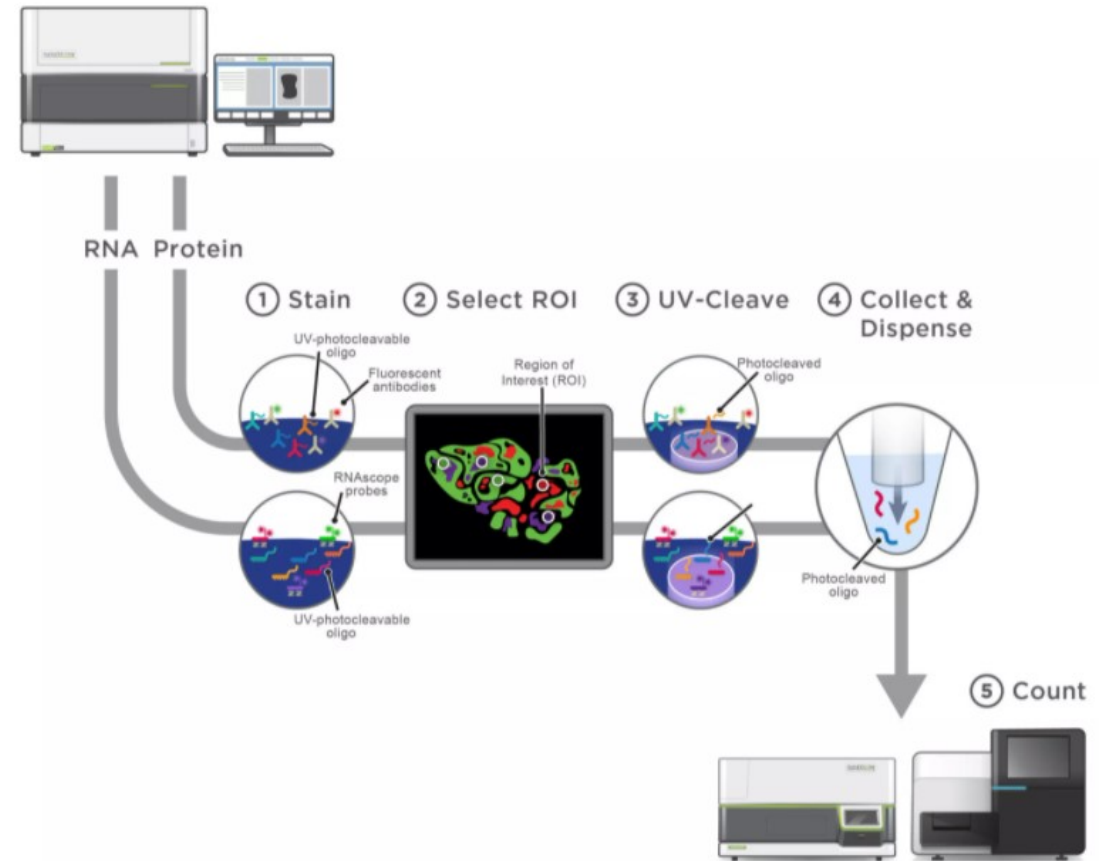
Z jednoho tkáňového řezu histologická analýza, lokalizace exprese proteinu či RNA a navíc proteomové či genomové analýzy?



Ano, to je možné!!!

NanoString – GeoMx^R Digital Spatial Profiler

- spojení histologických metod a genomických či proteomických metod
- použití parafinových i kryo řezů
- barvení proteinů či RNA – použití speciálních fotoštěpicích oligonukleotidů
- výběr oblasti nebo buněk
- z daných oblastí se provede expresní analýza



VIDEO: <https://www.nanostring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-dsp-overview/>

MUNI SCI

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

ODDĚLENÍ FYZIOLOGIE A IMUNOLOGIE
ŽIVOČICHŮ (OFIŽ)



STUDIJNÍ PROGRAM:

EXPERIMENTÁLNÍ A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

SPECIALIZACE:

EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ŽIVOČICHŮ
A IMUNOLOGIE & BUNĚČNÁ BIOLOGIE