CG020 Genomika
Bi7201 Základy genomiky

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

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 inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
    - **Genetika reverzní**
  - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifity

EVROPSKÁ UNIE
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

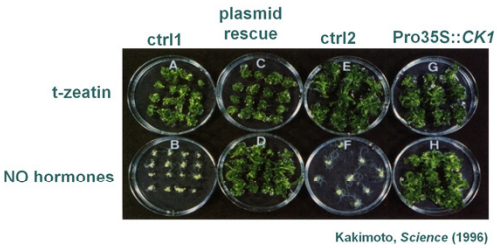
Přímá a reverzní genetika - shrnutí

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

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

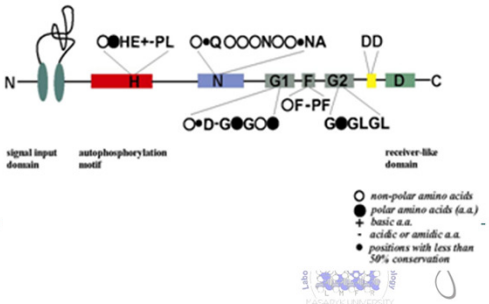
Cloning of CKI1

- CKI1 was identified via activation mutagenesis in *Arabidopsis*
  - Overexpresion of *CKI1* leads to CK-like response in the hypocotyl explants



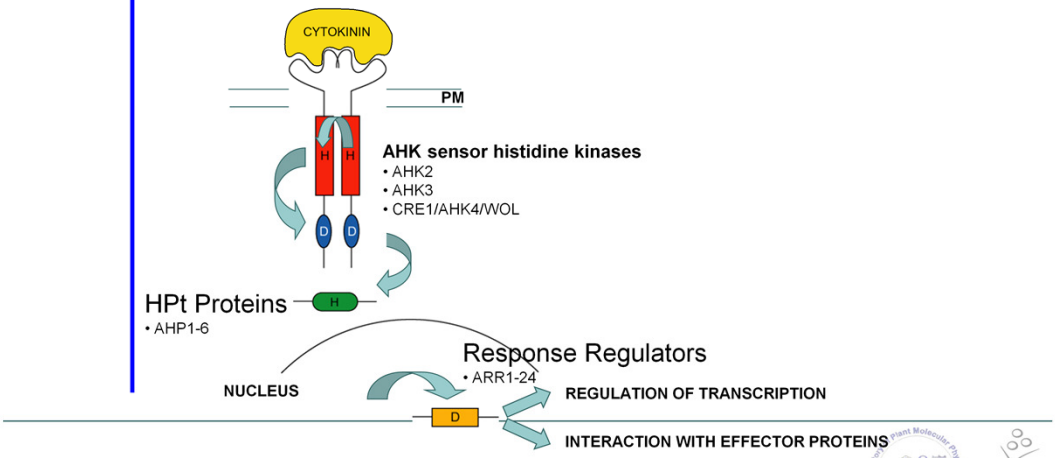
Kakimoto, *Science* (1996)

  - *CKI1* encodes a protein with similarity to bacterial histidine klinases



Signal Transduction via MSP

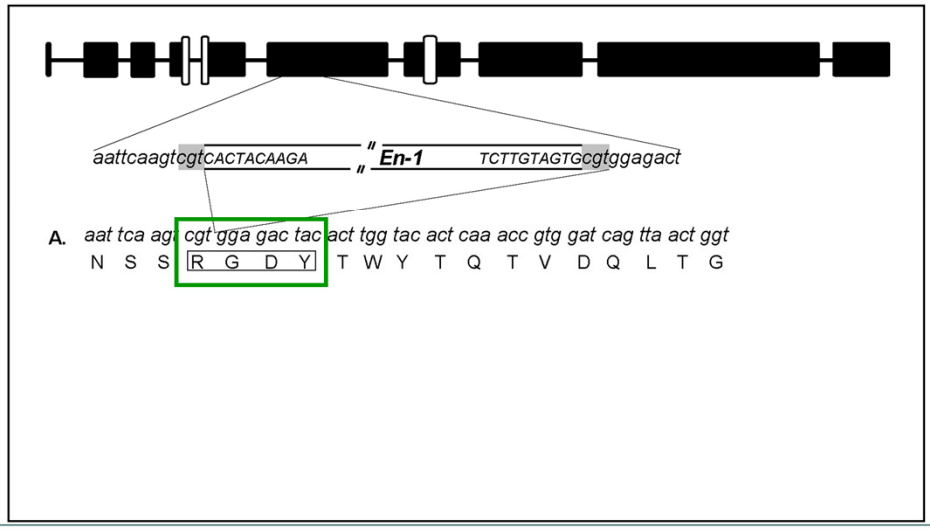
Recent Model of the CK Signaling via Multistep Phosphorelay (MSP) Pathway



Přímá a reverzní genetika

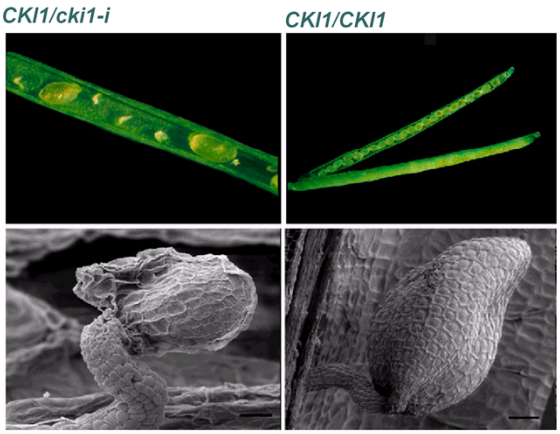
- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
  - Změna fenotypu po mutagenezi
    - **Genetika přímá**
  - Identifikace inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
    - **Genetika reverzní**

Identification of insertional *cki1* mutant allele



CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

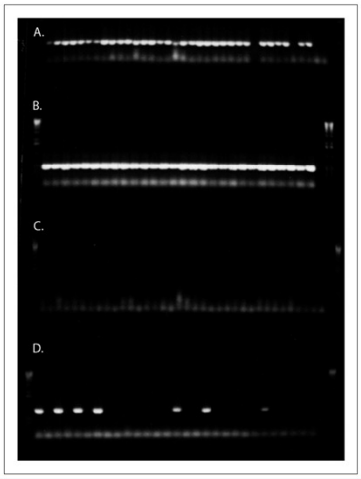
- CKI1 is necessary for proper megagametogenesis in *Arabidopsis*



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

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**

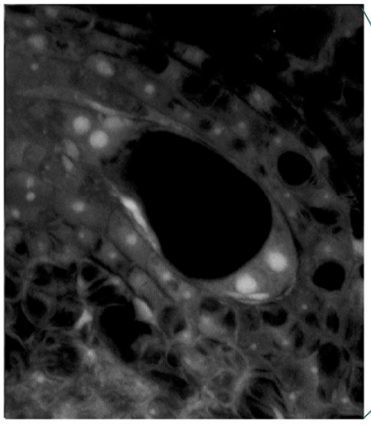
C. ♂ **wt x** ♀ ***CKI1/cki1-i***

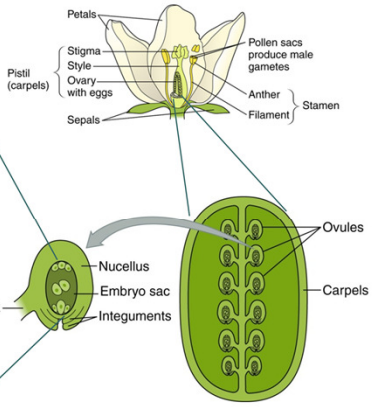
cki1-i **specific primers**

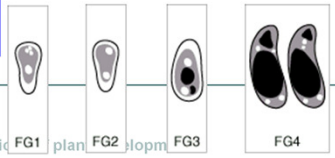
D. ♂ ***CKI1/cki1-i*** **x** ♀ **wt**

CKI1 and megagametogenesis

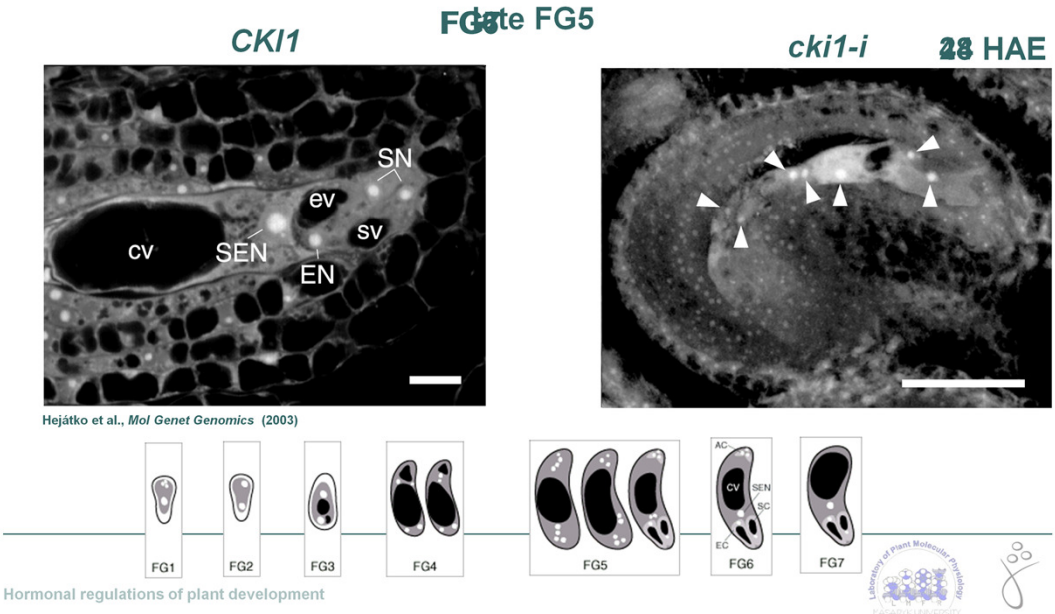
FG 4







CKI1 and megagametogenesis

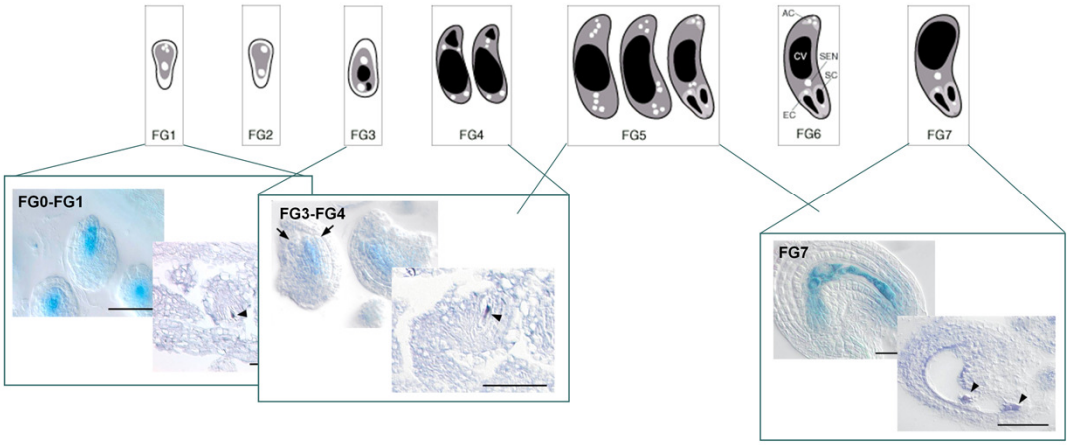


Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

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 specifity

CKI1 is Expressed Throughout Megagametogenesis

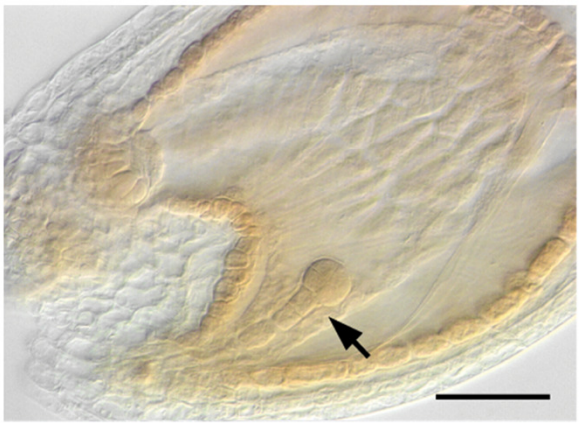


Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

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

♀ wt x ♂ Pro*CKI1:GUS*

~~24~~ 22 HAP
(hours
after
pollination)



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

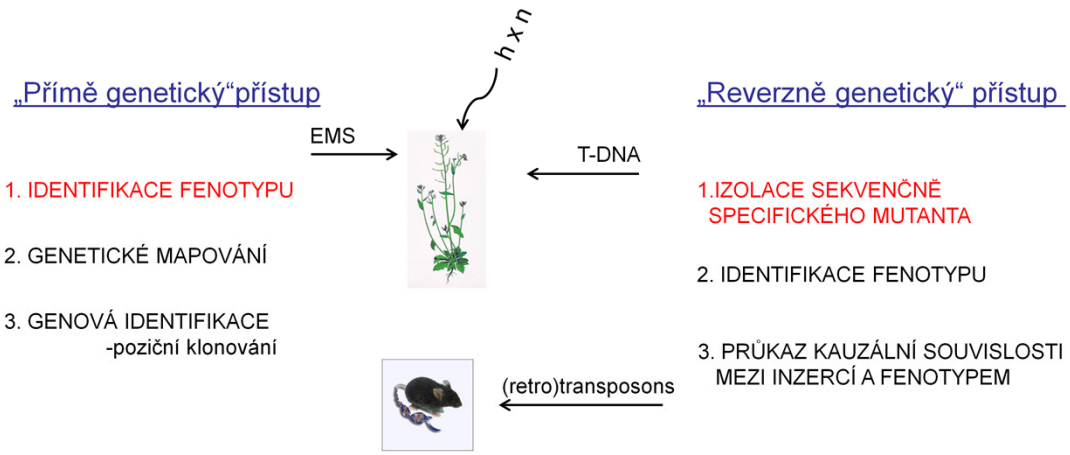
Genomika 03

- Zdrojová literatura
  - **Bioinformatics and Functional Genomics**, 2009, Jonathan Pevsner, Willey-Blackwell, Hobocken, 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.

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
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



EVROPSKÁ UNIE
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

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- 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
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi

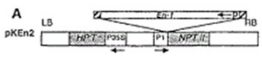
Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů

Typy inzerčních mutagenů

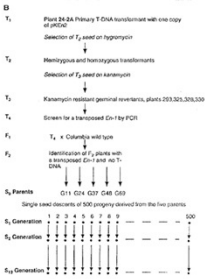
- Mobilní elementy
  - **Autonomní transpozony (*En-1*)**
    - obsahují gen pro transponázu, umožňující excizi a opětovné začlenění do genomu
    - na obou koncích obsahují krátké obrácené repetice, které jsou transponázou rozpoznávány
- Stabilní elementy
  - **Neautonomní transpozony (*dSpm*)**
    - 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)

Knihovny inzerčních mutantů u rostlin

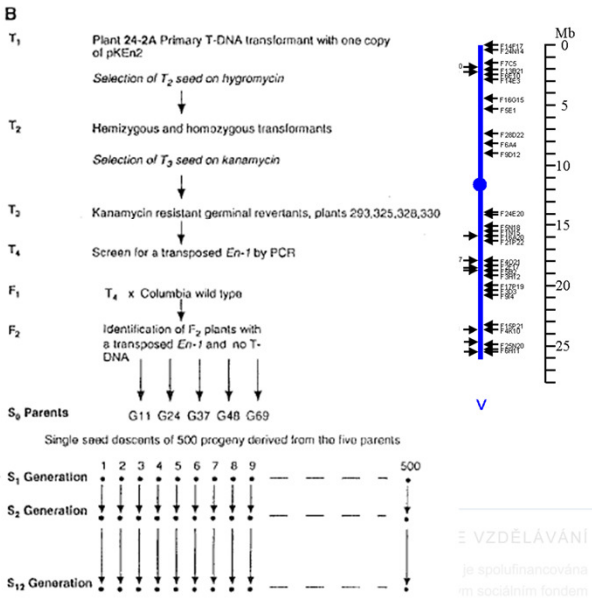


příprava transgenních rostlin

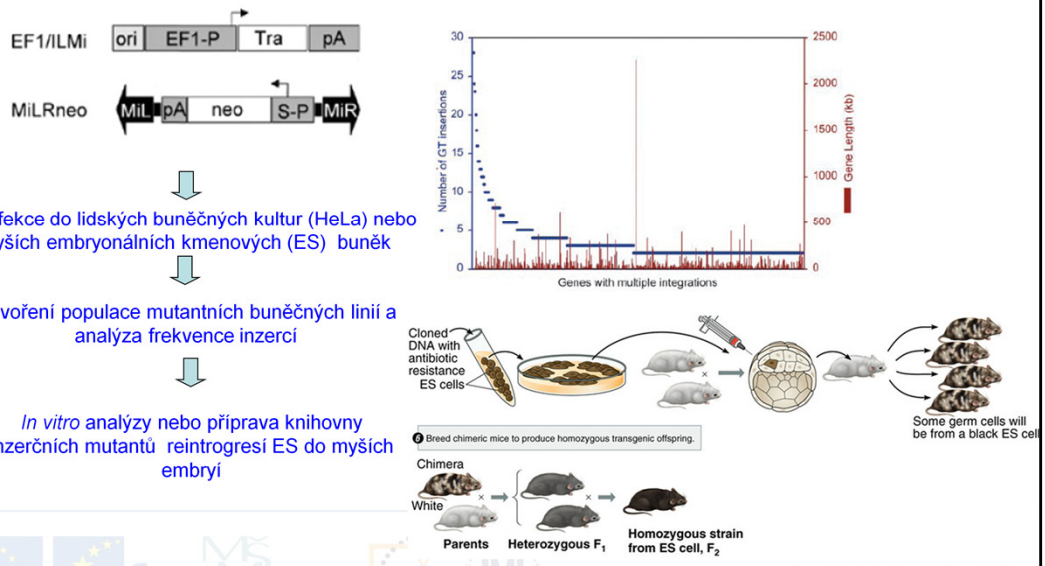
vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



Knihovny inzerčních mutantů u živočichů



Technologii inzerční mutageneze 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 nutne provést kotransfekci s tzv. helper plasmiem, kódujícím transponázu (neautonomní transpozon). Neo kóduje rezistenci k neomycinu, šipky ukazují směr transkripce řízený přislušnými 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 fůzi akceptorových míst sestřihu s ORF reportérového genu, např. lacZ-neo (bez AUG kodonu). Tento přístup umožňuje identifikovat inzerce 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

Izolace sekvenčně specifických mutantů

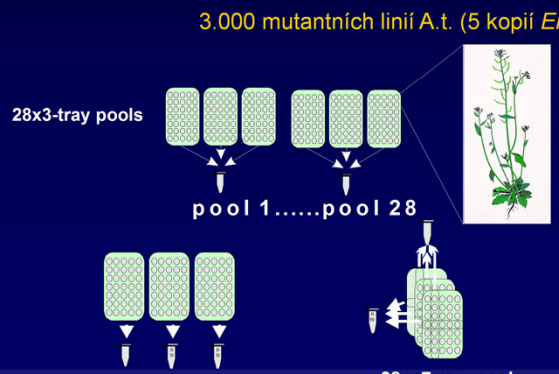
1.Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

- autonomní En/Spm, bez selekce
- 3000 nezávislých linií
- průměrně 5 kopií na linii
- trojrozměrné vyhledáváni pomocí PCR

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
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)



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

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS

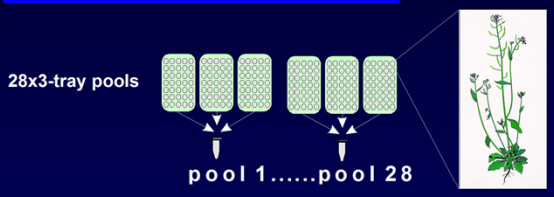
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

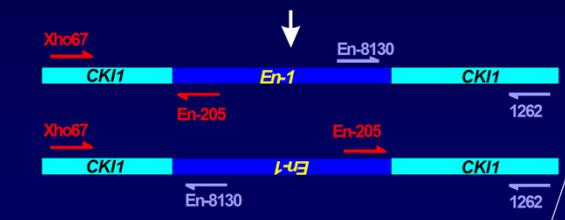
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

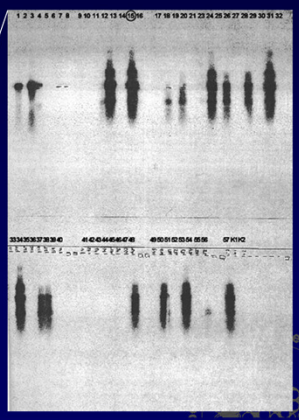
3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)





(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou



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

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS

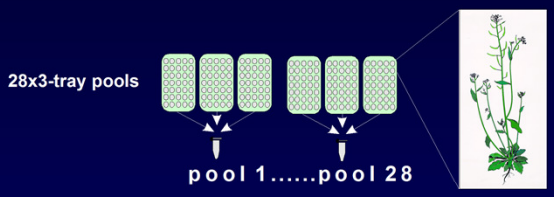
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

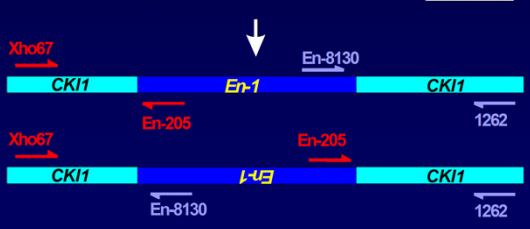
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

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

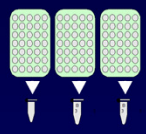


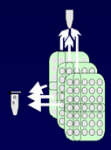


(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

2. Identifikace linie nesoucí inzerci





(dalších 5+7+3=15 PCR reakcí)

Celkem 112+15=127 PCR reakcí

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

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

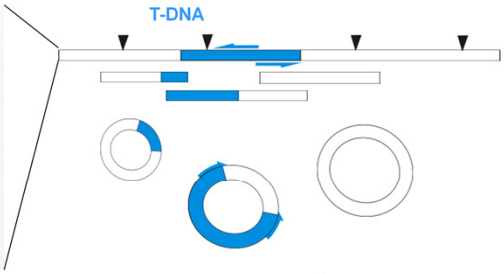
EVROPSKÁ UNIE esf MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS

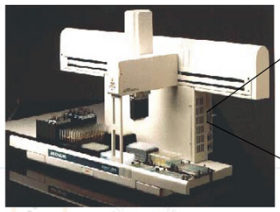
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

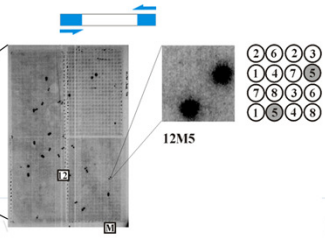
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

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







Osnova

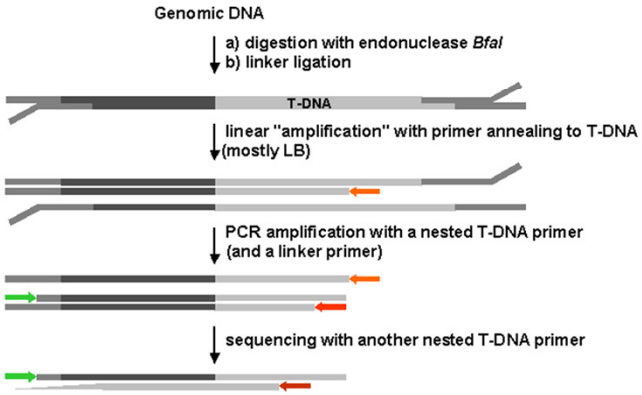
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích

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)

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

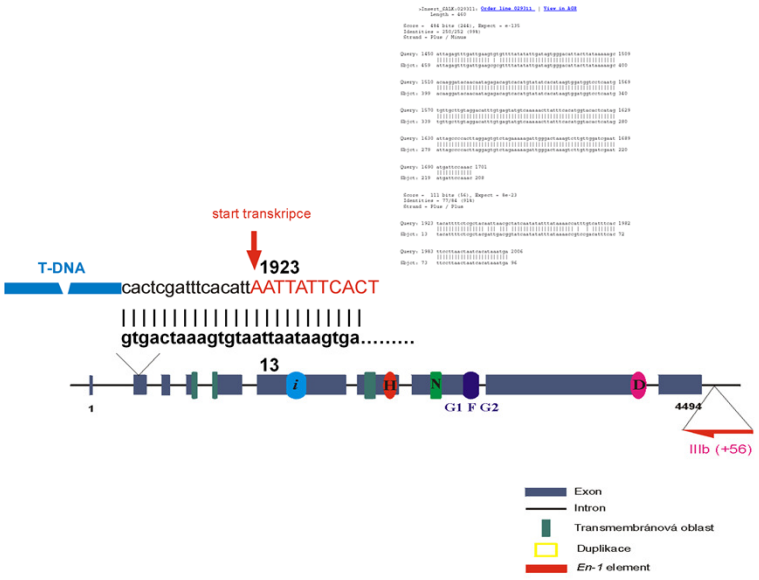
```
>Insert_SALK:029311: Order line 029311 | View in AGR
    Length = 460

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

Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatatattgatagtgggacattacttataaaaagc 1509
            |||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 459  attagagtttgattgaagcgcgttttatatattgatagtgggacattacttataaaaagc 400

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

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

Query: 1630 attagccccacttaggagtgtctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 1689
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 279  attagccccacttaggagtgtctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 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 tacattttctcgctacaattaacgctatcaatatatttataaaaccatttgtcatttcac 1982
            ||||||||||||||| ||| ||| ||||||||||||||||||| | | ||||||||
Sbjct: 13   tacattttctcgctacgattgacggtatcaatatatttataaaaccgtccgacatttcac 72

Query: 1983 ttccttaactaatcacataaatga 2006
            |||||||||||||||||||||||
Sbjct: 73   ttccttaactaatcacataaatga 96

Sbjct: 292  ccagcttctagaagcttcttggtcaagtttccagtacgggacgatctcgagaatcacca 233
```

AGR insert page View detailed information on insert sequences in AGR

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
SAVVKIANA BRUNENSIS

.NÍ
ána
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů



EVROPSKÁ UNIE
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

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- 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

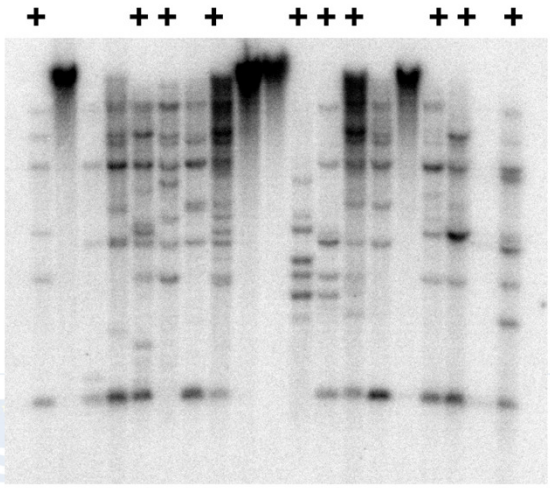
Proč je nutné analyzovat příčinnou souvislost mezi inzercí a pozorovaným fenotypem ?

- 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)

EVROPSKÁ UNIE
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

Kauzalita mezi inzercí a fenotypem

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



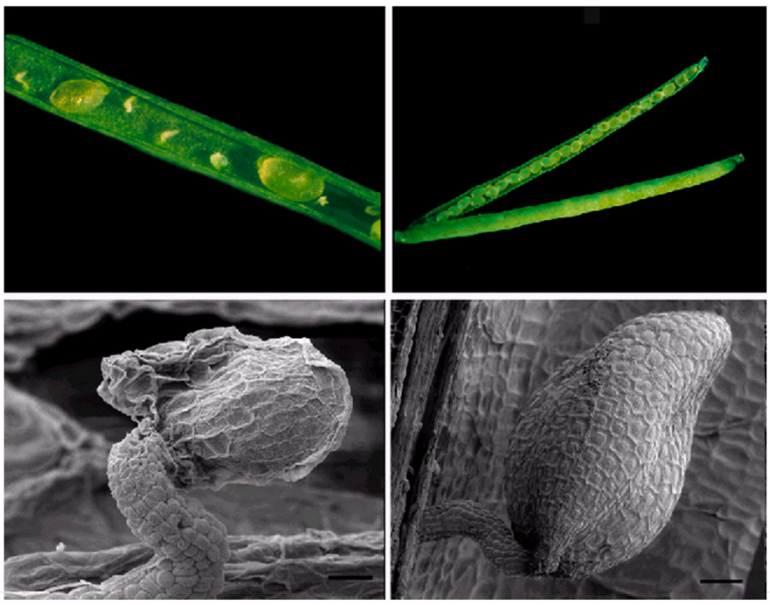
Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

- 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

EVROPSKÁ UNIE
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

Fenotyp šešulí *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1 *CKI1/CKI1*



Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

1. Izolace revertantních linií

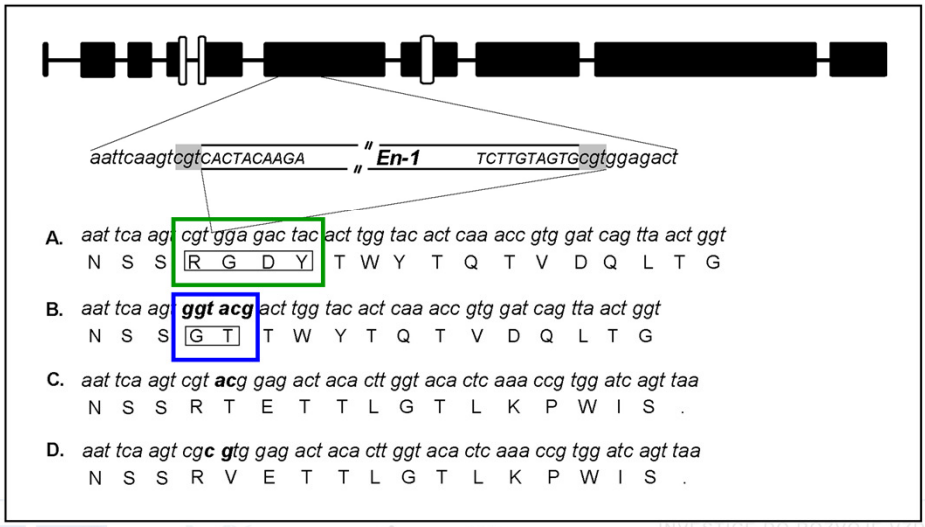
- PCR vyhledávání ve **246** rostlinách segregující populace
- z **90** *cki1::En-1* pozitivních **9** rostlin mělo kromě šešulí mutantních i šešule standardního typu

Analýza potomstva

- potvrzení absence inzerce pomocí PCR
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvenování

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
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



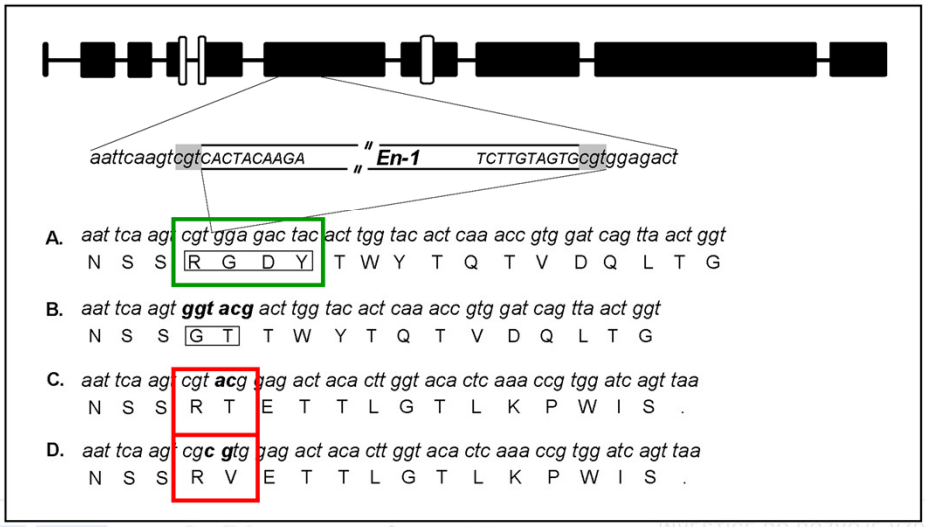
Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

2. Izolace stabilní mutantní linie

- analýza fenotypu segregující populace (*CKI1/CKI1 CKI1/cki1::En-1)*
- PCR analýza rostlin s mutantním fenotypem-identifikace rostlin bez inzerce
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inzerce
- sekvenování

EVROPSKÁ UNIE
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

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



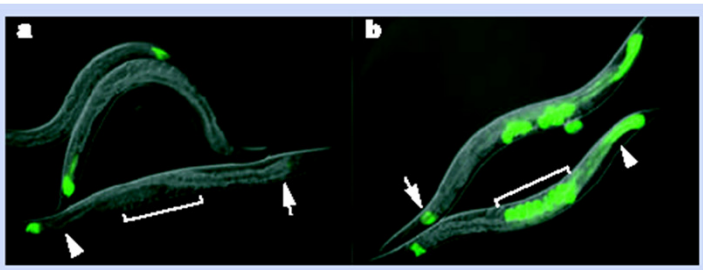
Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- 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
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi

RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
  - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
    - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravď. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
    - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji
    - dsRNA indukce je závislá na vlastních genech - gen. vyhledávání

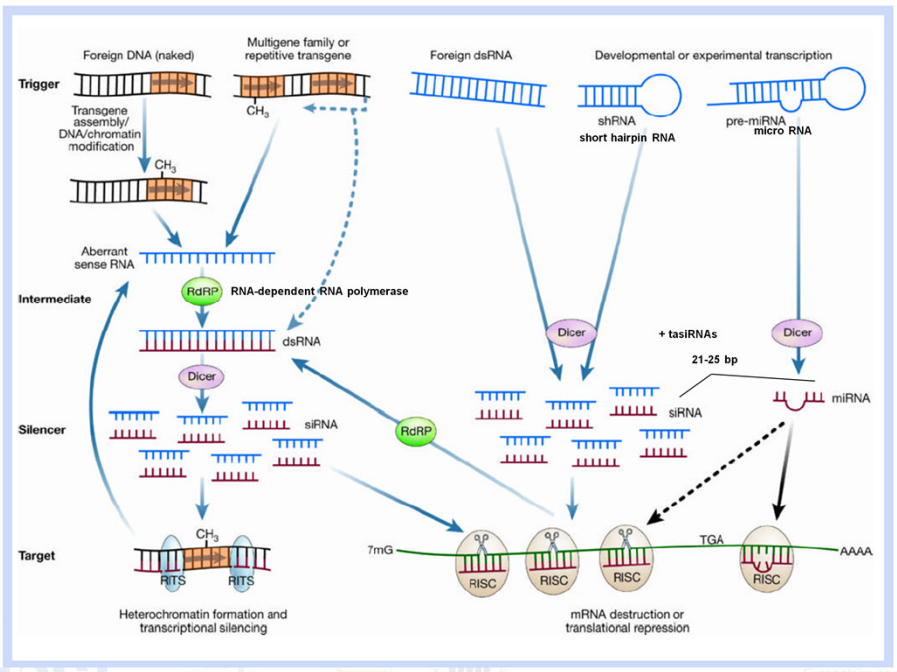
RNAi *rnai*



RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
  - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
  - je to přirozený 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 „vlásenková“ 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 komplex)
  - **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



Mello and Conte, *Nature* (2004)

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).

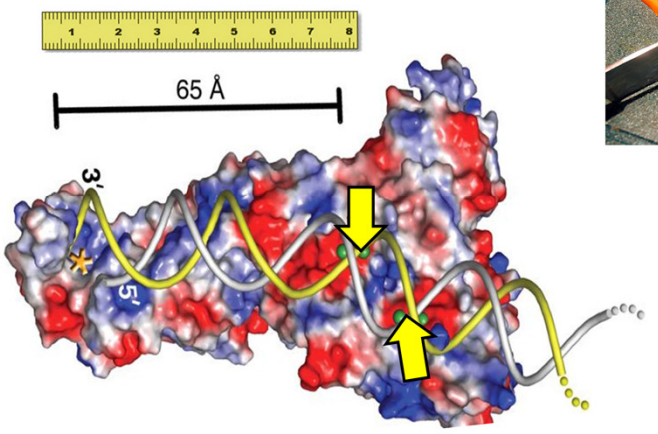
In addition to siRNAs, there are trans-acting siRNAs (tasiRNAs) that are a special class of siRNAs that appear to function in development (much like miRNAs) but have a unique mode of origin involving components of both miRNA and siRNA pathways.

Developmental regulations via miRNAs are more often used in animals then 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 komplex (RISC).

Dicer and Dicer-like proteins

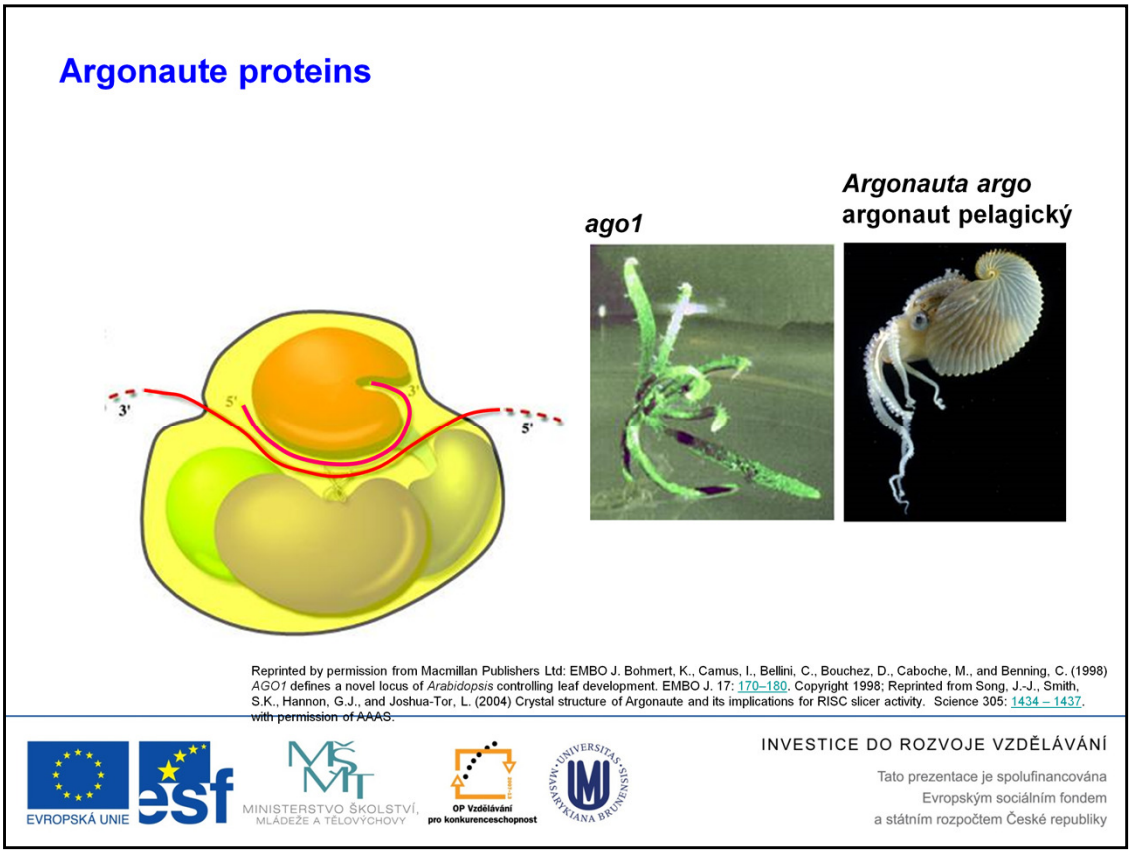


From MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. Science 311: 195 -198. Reprinted with permission from AAAS. Photo credit: Heidi

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 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).

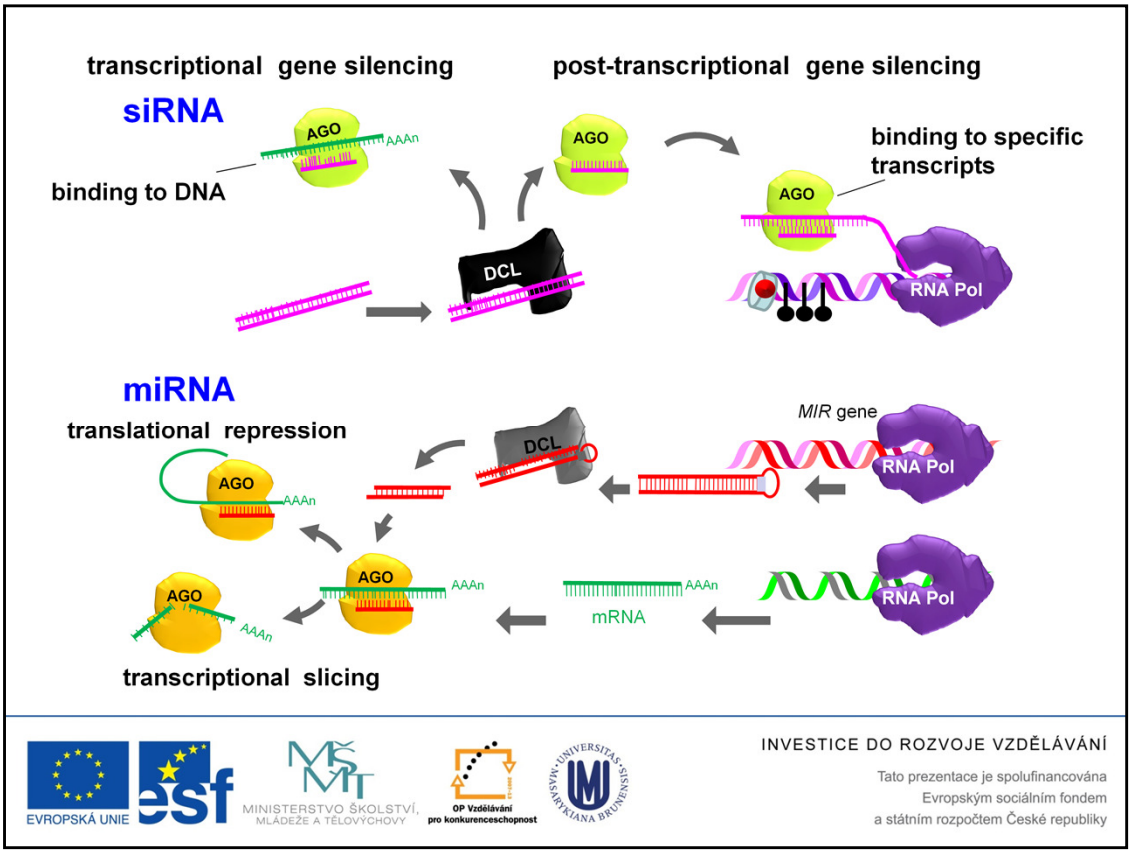
ARGONAUTE proteins were originally described as being important for plant development and for germline stem-cell division in *Drosophila melanogaster.*

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://youdpreferanargonaute.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

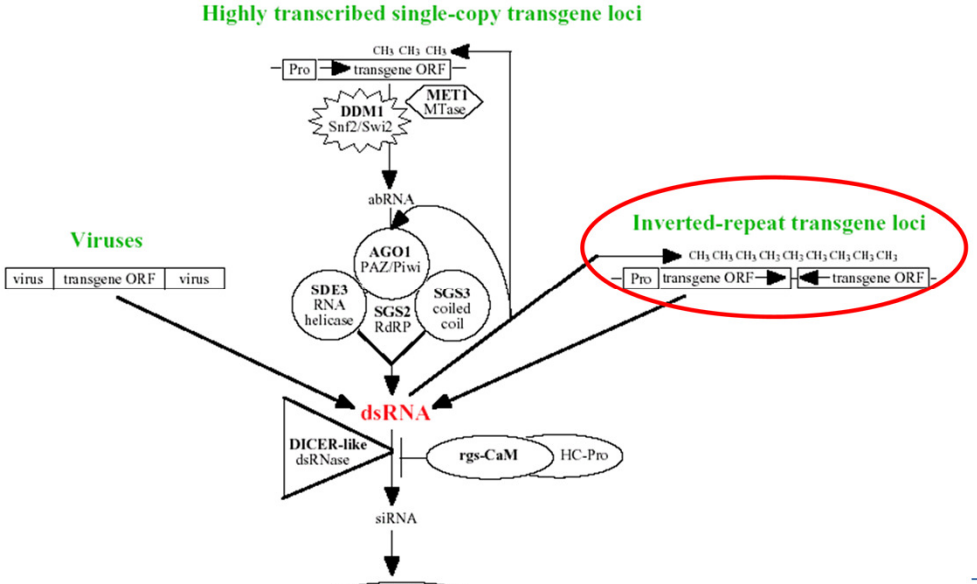
USA

University of
Massachusetts Medical
School
Worcester, MA, USA

b. 1960

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

Mechanizmus posttranskripčního umlčování genů pomocí RNA interference (iRNA)



EVROPSKÁ UNIE

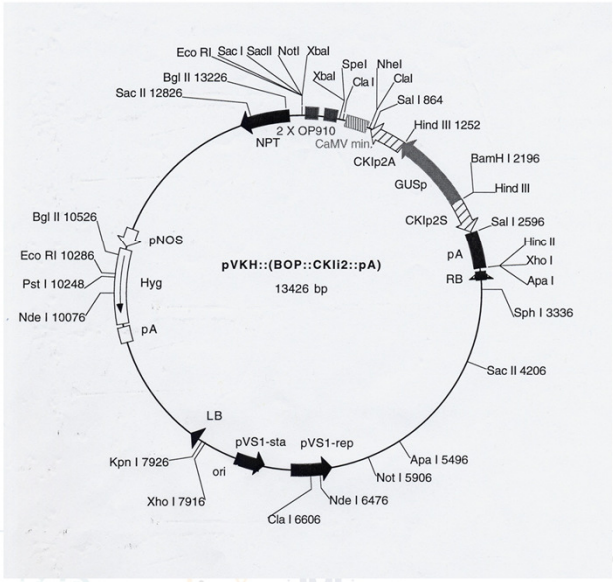
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

ÁNÍ

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

RNAi approach using regulated expression system



Shrnutí

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- 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
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi

Diskuse

EVROPSKÁ UNIE
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