

# CG020 Genomika Bi7201 Základy genomiky

## Přednáška 2 Identifikace genů

Jan Hejátko

**Funkční genomika a proteomika rostlin,**  
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,  
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno  
[hejatko@sci.muni.cz](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.muni.cz](http://www.ceitec.muni.cz)



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

(dokončení přednášky 02)

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
  - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
  - EST knihovny
  - přímá a reverzní genetika



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 specifiity



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**



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

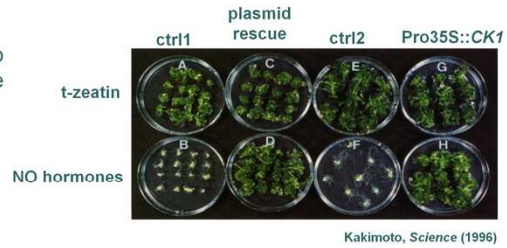
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



# Cloning of CKI1

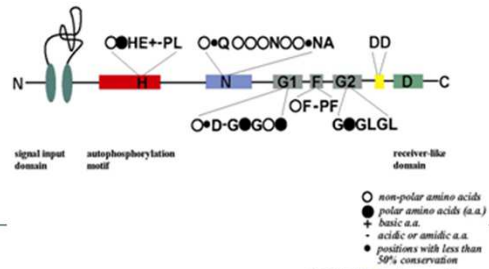
□ CKI1 was identified via activation mutagenesis in *Arabidopsis*

▪ Overexpression of *CKI1* leads to CK-like response in the hypocotyl explants



Kakimoto, *Science* (1996)

▪ *CKI1* encodes a protein with similarity to bacterial histidine kinases



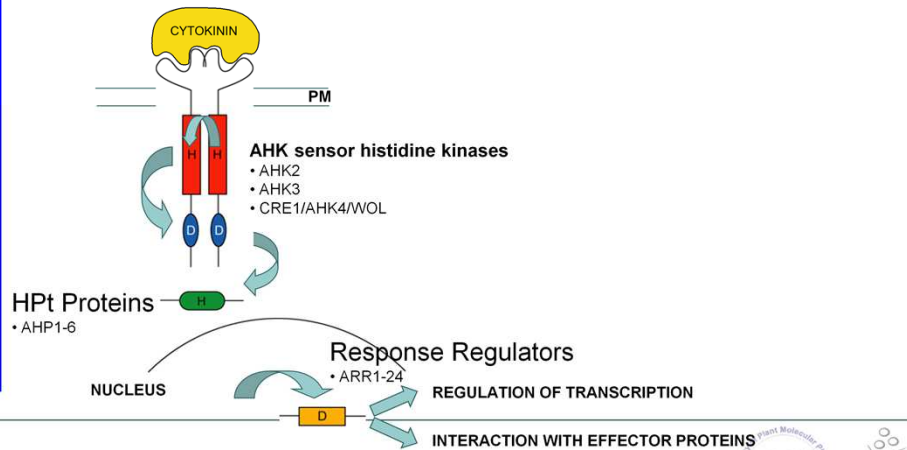
Hormonal regulations of plant development





# Signal Transduction via MSP

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



Hormonal regulations of plant development



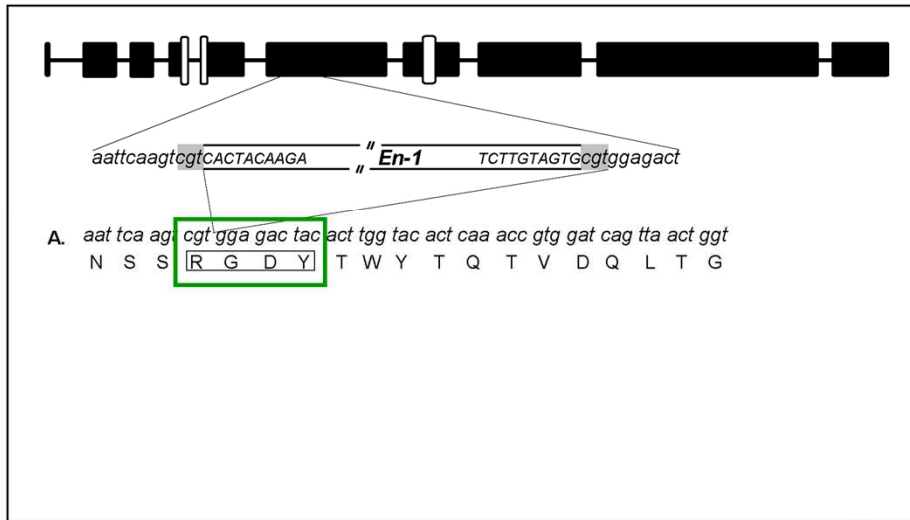


# Přímá a reverzní genetika

- 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







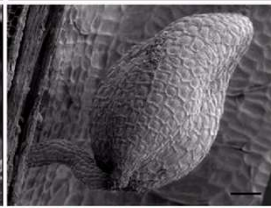
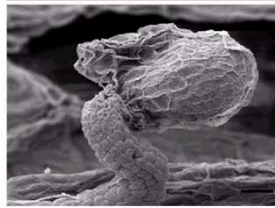
# CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

- CKI1 is necessary for proper megagametogenesis in *Arabidopsis*

*CKI1/cki1-i*



*CKI1/CKI1*



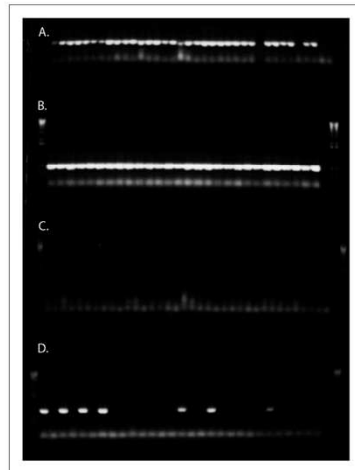
Hejätö et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

Hormonal regulations of plant development



# 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*



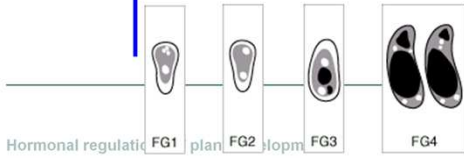
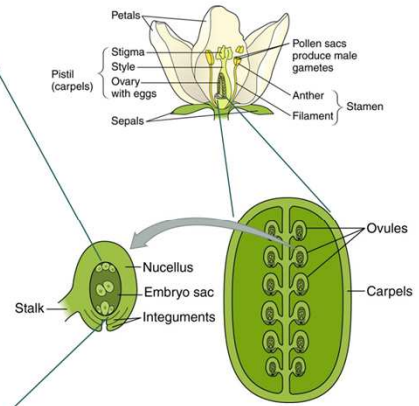
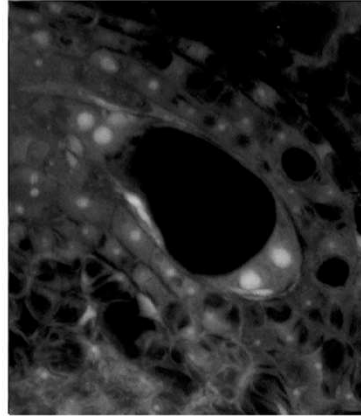
*cki1-i* specific primers

D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ *wt*



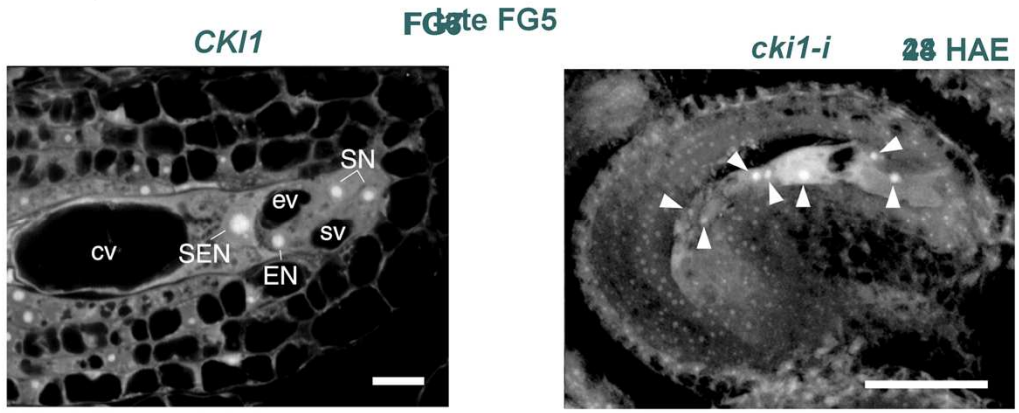
# CKI1 and megagametogenesis

FG 4

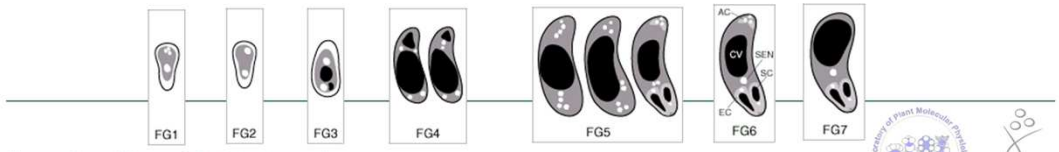




# CKI1 and megagametogenesis



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



Hormonal regulations of plant development



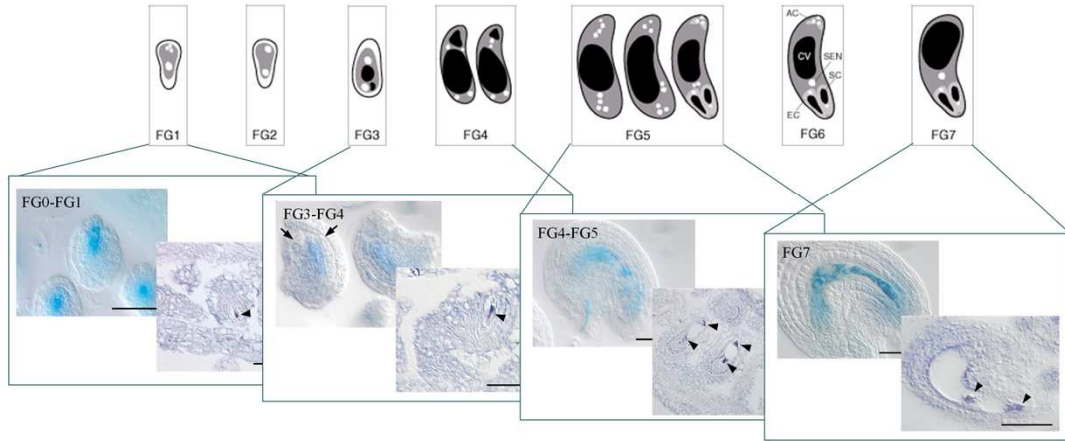


# Přímá a reverzní genetika

- 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 specifiity



# CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



Hormonal regulations of plant development

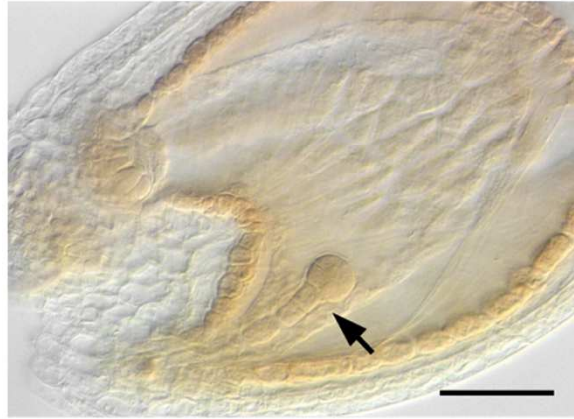




# Paternal *CK11* is Expressed in the *Arabidopsis* Sporophyte Early after Fertilization

♀ wt x ♂ Pro*CK11*:*GUS*

**48 HAP**  
(hours  
after  
pollination)



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



# 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](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.muni.cz](http://www.ceitec.muni.cz)



---

Hormonal regulations of plant development





# Genomika 03

## ▪ Zdrojová literatura

- **Bioinformatics and Functional Genomics**, 2009, Jonathan Pevsner, Wiley-Blackwell, Hoboken, 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.



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

#### „Přímě genetický“ přístup

1. IDENTIFIKACE FENOTYPU
2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ
3. GENOVÁ IDENTIFIKACE  
-poziční klonování

EMS



(retro)transposons

T-DNA

#### „Reverzně genetický“ přístup

1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA
2. IDENTIFIKACE FENOTYPU
3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM



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



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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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**

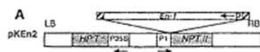
- zcela stabilní, její inzerce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

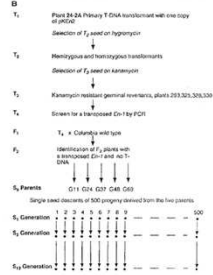
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Knihovny inzerčních mutantů u rostlin

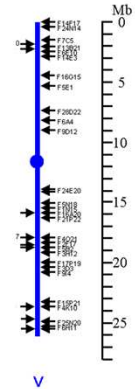
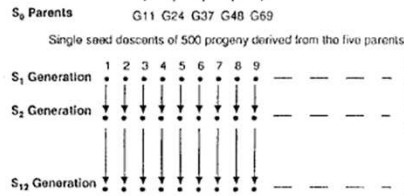
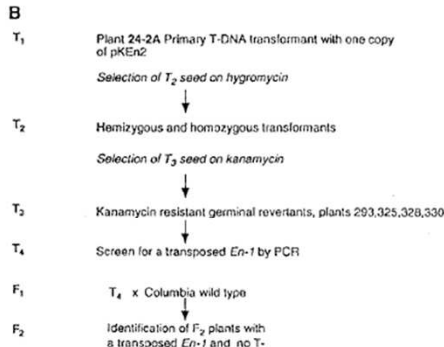


příprava transgenních rostlin

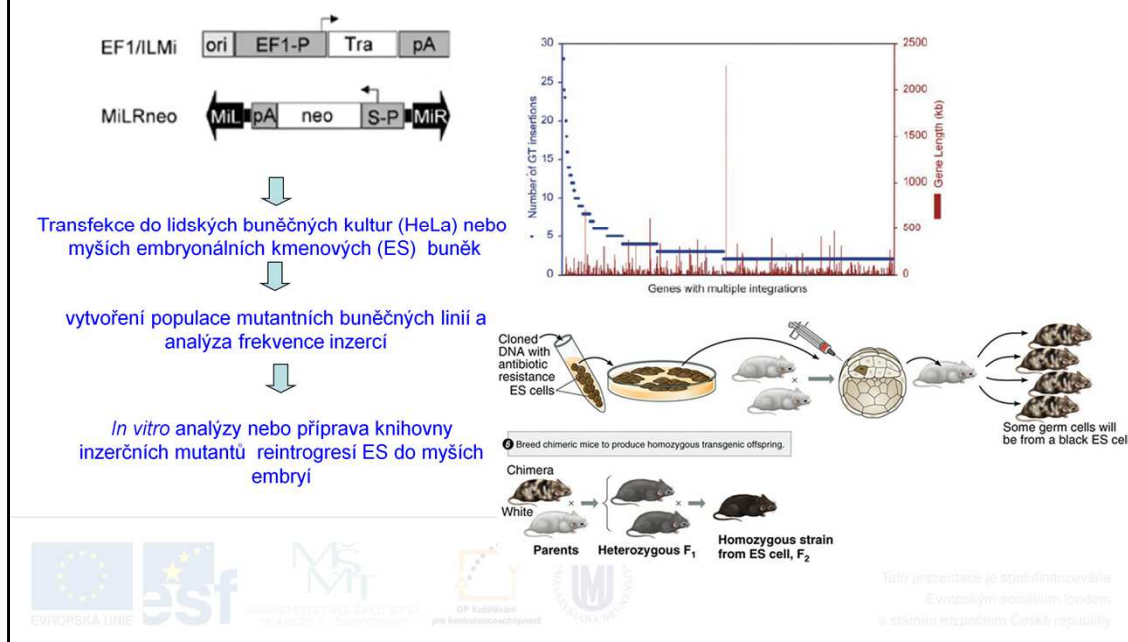
vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



# Knihovny inzerčních mutantů u živočichů



Technologii inzerční mutagenézy 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 nutno provést kotransfekci s tzv. helper plasmidem, kódujícím transponázu (neautonomní transpozón). Neo kóduje rezistenci k neomycinu, šipky ukazují směr transkripce řízený příslušnými promotory, pA je polyadenylační signál, ori je počátek replikace viru SV40, S-P je promotor téhož viru. Pro identifikaci insercí „in frame“ se zasaženými geny lze využít transpozony, obsahující fúzi akceptorových míst sestřihu s ORF reportérového genu, např. lacZ-neo (bez AUG kodonu). Tento přístup umožňuje identifikovat inserce do aktivních genů prostřednictvím selekce inzerčních mutantů na rezistenci k neomycinu, resp. vykazující  $\beta$ -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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# Izolace sekvenčně specifických mutantů

## 1. Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

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

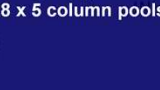
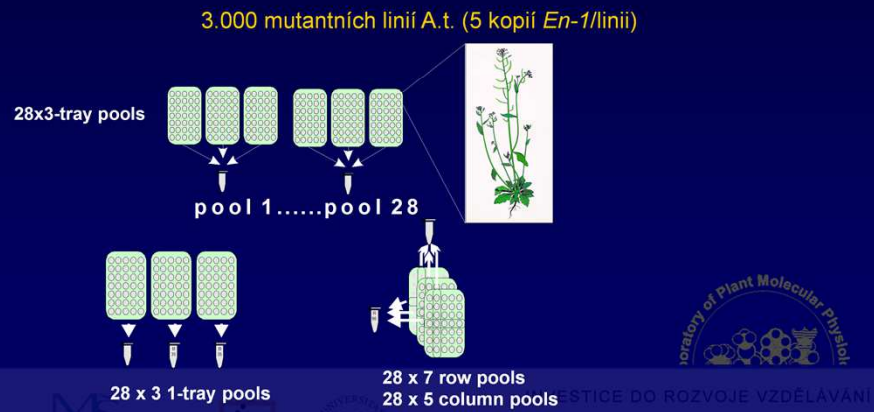


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)



STICE 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)
  - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou



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)
  - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou
  - identifikace pozitivní linie pomocí Identifikace pozitivního „tácu“, řady a sloupce



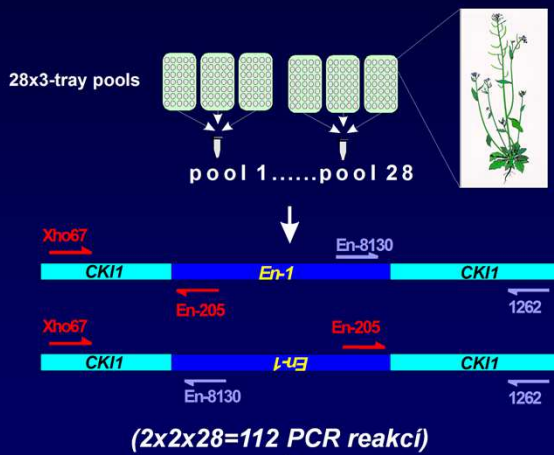
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

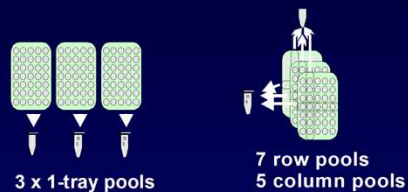
# Izolace sekvenčně specifických mutantů

## 1. Vyhledávání pozitivní trojice

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



## 2. Identifikace linie nesoucí inzerce



**Celkem 112+15=127 PCR reakcí**

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

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
    - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
    - hybridizace s produkty iPCR na filtrech



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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>



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

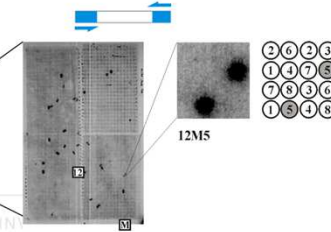
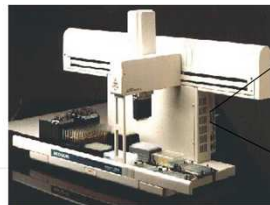
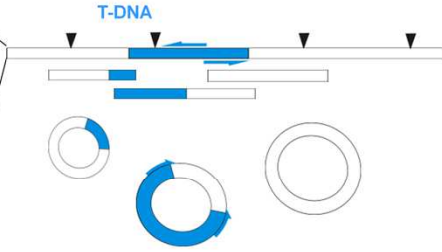
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



# 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



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



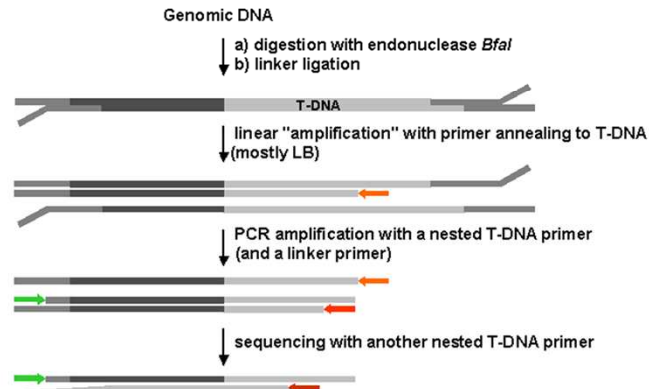
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)

MINISTERSTVO AGRÁRNÍHO VÝVOJE A TĚŽBY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



EVROPSKÝ FOND PRO VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancováno

evropským sociálním fondem

a státním rozpočtem České republiky

# Vyhledávání v elektronických knihovných inzerčních mutantů

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

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

Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatatattgatagtgaggacattacttataaaaaagc 1509
      |||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcogcttttatatattgatagtgaggacattacttataaaaaagc 400

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

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

Query: 1630 attagcccacttagaggtgtctgaaaaagatgggactaaagtcttggatgcaat 1689
      |||
Sbjct: 279 attagcccacttagaggtgtctgaaaaagatgggactaaagtcttggatgcaat 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 tacattttctogtacaattaacgtatcaatatattataaaaaccatttgcatttcaac 1982
      |||
Sbjct: 13 tacattttctogtacaattaacgtatcaatatattataaaaaccatttgcatttcaac 72

Query: 1983 ttccctaaactaatcacataaatga 2006
      |||
Sbjct: 73 ttccctaaactaatcacataaatga 96
```

EVROPSKÁ UNIE  [est](#)  [view details information on insect sequences in AMN](#)   

.Ni  
řna  
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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

## 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)



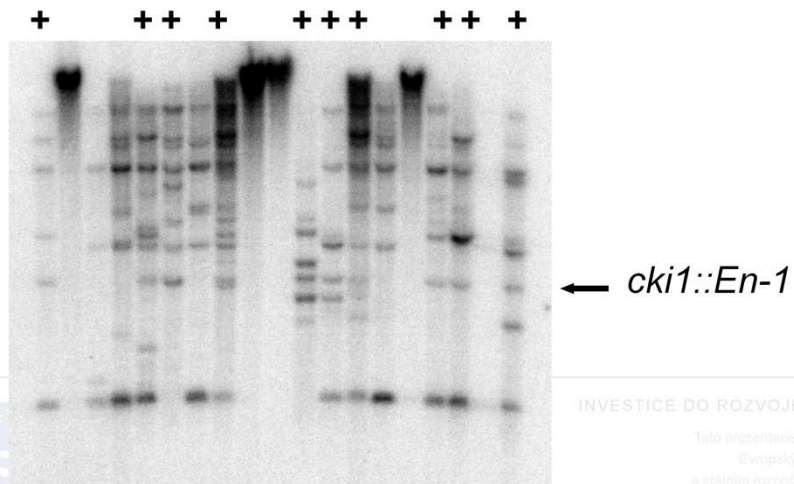
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



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

- 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



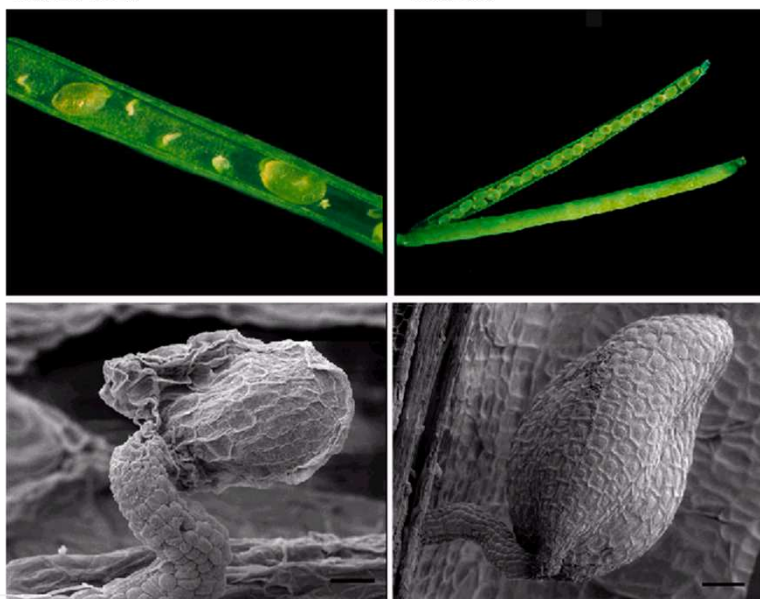
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

## Fenotyp šišulí *cki1::En-1/CK11*

*cki1::En-1/CK11*

*CK11/CK11*



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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



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



aattcaagtcgtCACTACAAGA "En-1" TCTTGAGTgcgtggagact

A. aat tca agt **cg**gga gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt  
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

B. aat tca agt **ggf acg** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt  
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G

C. aat tca agt cgt **acg** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa  
 N S S R T E T T L G T L K P W I S .

D. aat tca agt cgc **gtg** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa  
 N S S R V E T T L G T L K P W I S .



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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 inserce
- PCR amplifikace a klonování části genomové DNA v místě inserce
- sekvenování



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

*aattcaagtcgtCACTACAAGA "En-1" TCTTGAGTgcgtggagact*

**A.** *aat tca agt **cg**gga gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*  
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

**B.** *aat tca agt **ggt acg** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*  
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G

**C.** *aat tca agt **cg**t **acg** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*  
 N S S **R T** E T T L G T L K P W I S .

**D.** *aat tca agt **cg**c **gtg** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*  
 N S S **R V** E T T L G T L K P W I S .



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



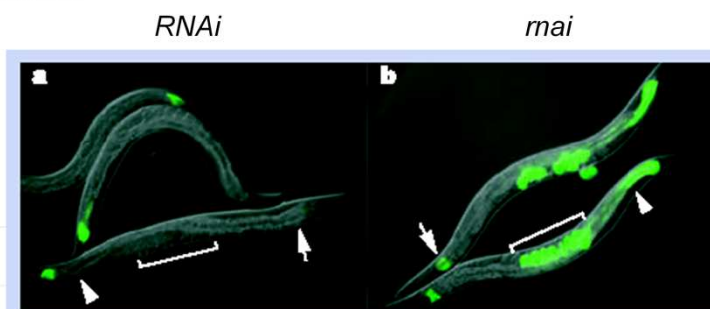
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# RNA interference

- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**

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



pro konkurenceschopnost "ERA"

z státním rozpočtem České republiky



# RNA interference

## ▪ Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)

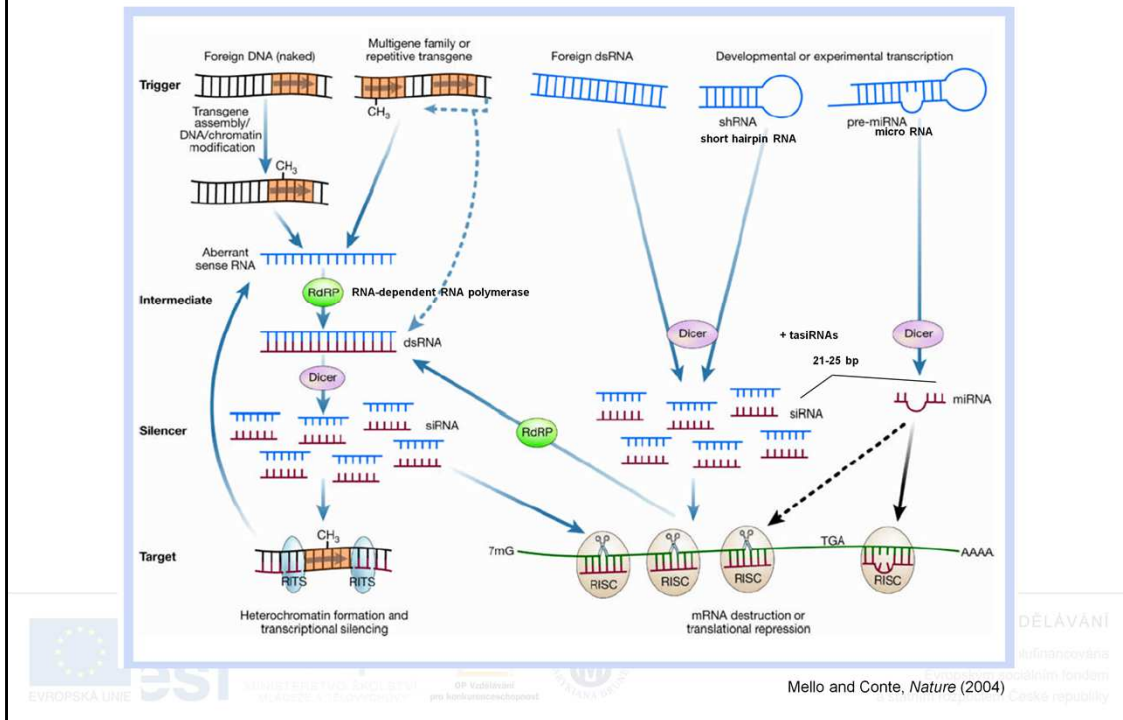
- RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans* a u rostlin
- je to přirozený mechanismus regulace genové exprese u všech eukaryot
- podstatou je tvorba dsRNA, která může být spuštěna několika způsoby:
  - přítomnost cizí „aberrantní“ DNA
  - specifické transgeny obsahující obrácené repetice částí cDNA
  - transkripce vlastních genů pro **shRNA** (short hairpin RNA) nebo **miRNA** (micro RNA, endogenní „vlásečková“ RNA)
- dsRNA je procesována enzymovým komplexem (DICER), což vede k tvorbě **siRNA** (short interference RNA), která se pak váže buď na enzymový komplex **RITS** (RNA-induced transcriptional silencing complex) nebo **RISC** (RNA-induced silencing complex)
- **RISC** zprostředkovává buď **degradaci mRNA** (v případě úplné similarity siRNA a cílové mRNA) nebo vede pouze k **zastavení translace** (v případě neúplné homologie jako je tomu např. v případě miRNA)
- **RITS** zprostředkovává **reorganizaci genomové DNA** (tvorba heterochromatinu a inhibice transkripce)



DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Mechanism of RNA interference



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).

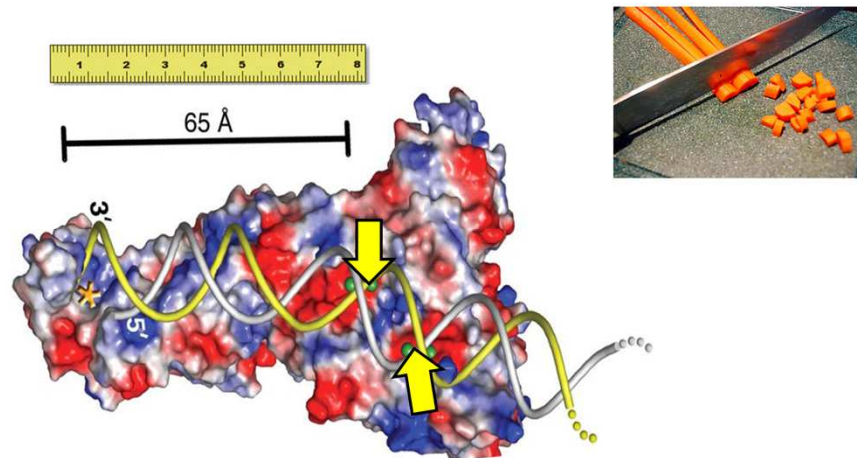
In addition to siRNAs, there are trans-acting siRNAs (tasiRNAs) that are a special class of siRNAs that appear to function in development (much like miRNAs) but have a unique mode of origin involving components of both miRNA and siRNA pathways.

Developmental regulations via miRNAs are more often used in animals than 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 complex (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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

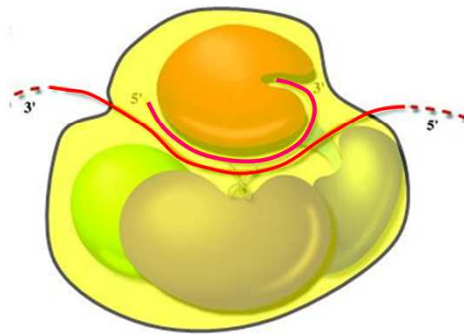
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

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



*ago1*



*Argonauta argo*  
argonaut pelagický



Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: EMBO J. Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. EMBO J. 17: 170–180. Copyright 1998; Reprinted from Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 305: 1434–1437. with permission of AAAS.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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).

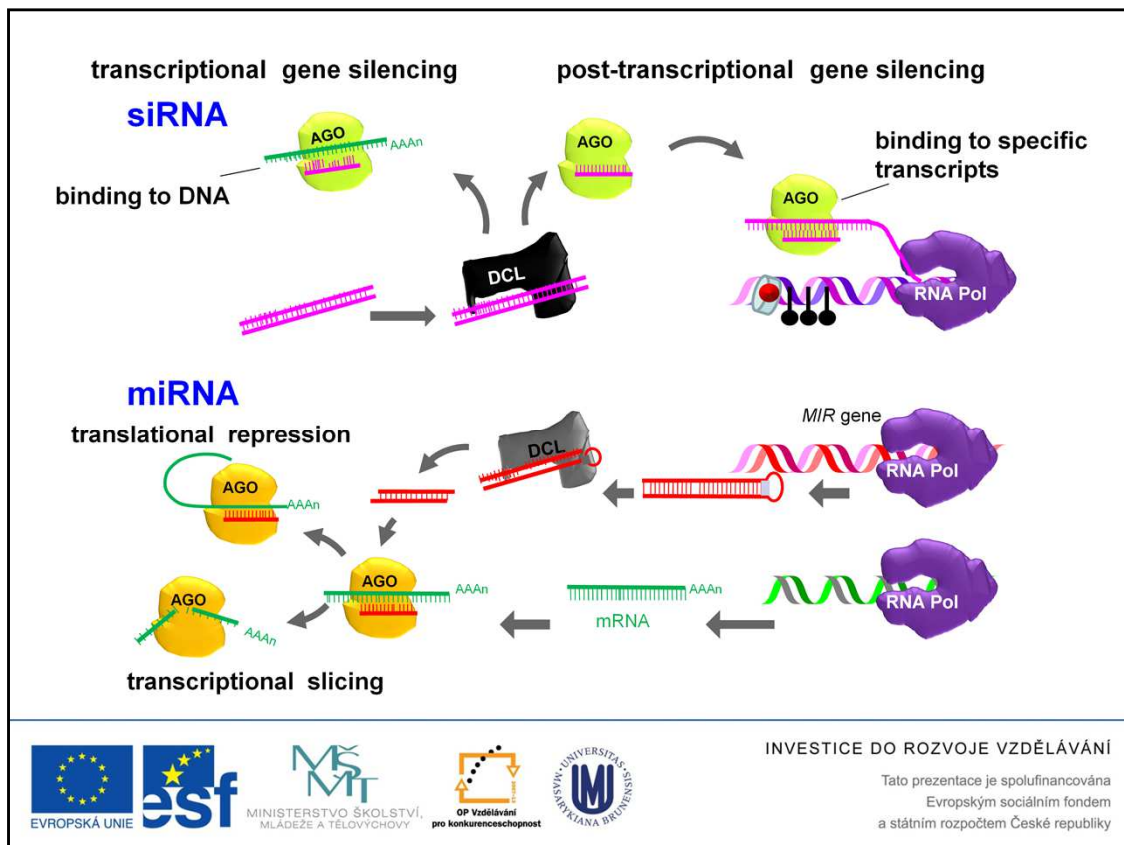
ARGONAUTE proteins were originally described as being important for plant development and for germline stem-cell division in *Drosophila melanogaster*.

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://youpreferanargonaute.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



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

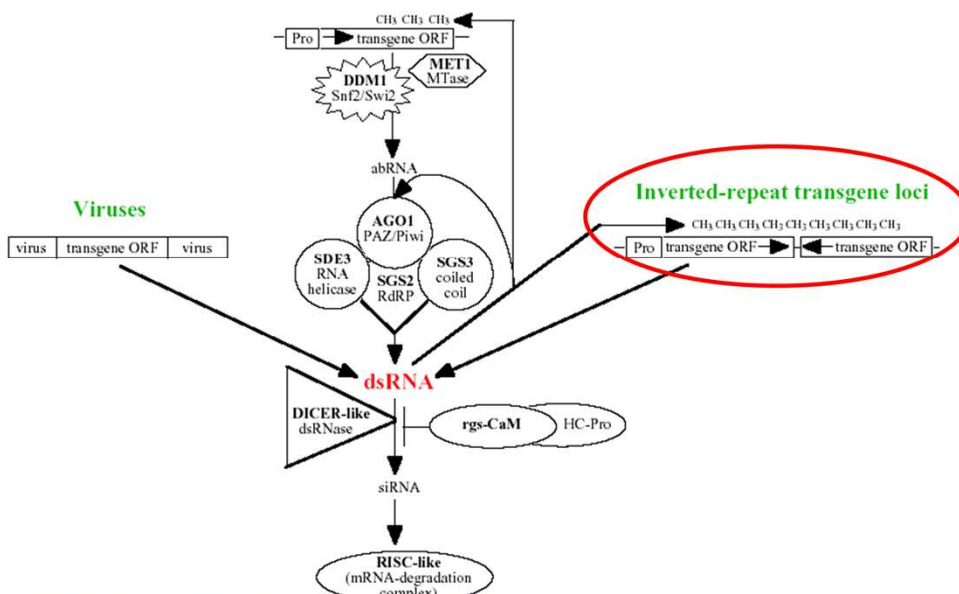
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

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



# Mechanismus posttranskripčního umlčování genů pomocí RNA interference (iRNA)

## Highly transcribed single-copy transgene loci



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

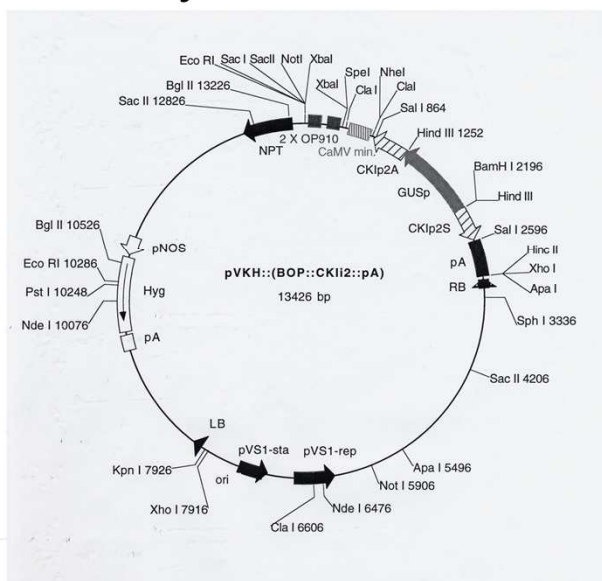


ÁNI

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



# RNAi approach using regulated expression system



EVROPSKÁ UNIE  
ESF

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY  
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Diskuse



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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