Základy genomiky

II. Identifikace genů

Jan Hejátko

Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a proteomiky
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin

Základy genomiky II.

- Zdrojová literatura ke kapitole II:
  - Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
  - Majoros, W.H., Pertea, M., Antonescu, C. and Salzberg, S.L. (2003) GlimmerM, Exonomy, and Unveil: three *ab initio* eukaryotic genefinders. *Nucleic Acids Research*, **31**(13).
  - Singh, G. and Lykke-Andersen, J. (2003) New insights into the formation of active nonsensemediated decay complexes. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **28** (464).
  - Wang, L. and Wessler, S.R. (1998) Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene. *Plant Cell*, **10**, (1733)

Základy genomiky II.

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

Základy genomiky II.

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

Základy genomiky II.

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí

Přímá vs. reverzní genetika

Revoluce v chápání pojmu genu

Přístupy „klasické“ genetiky

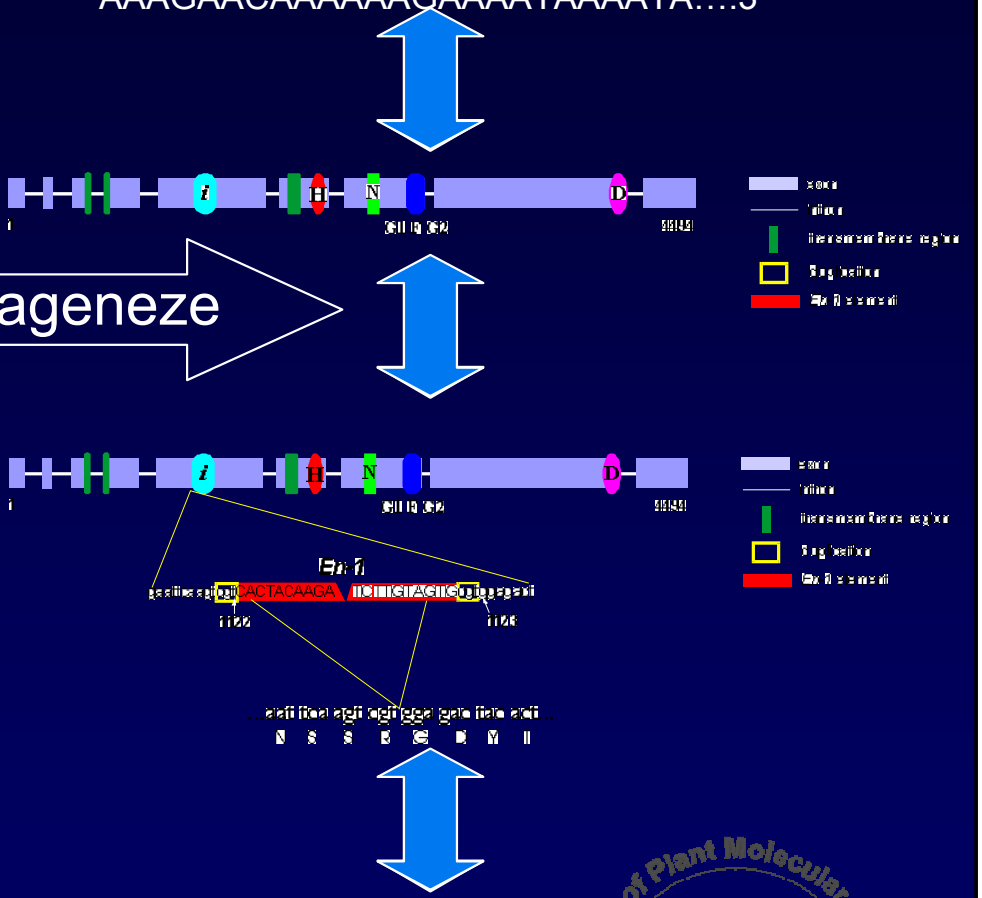
3 : 1

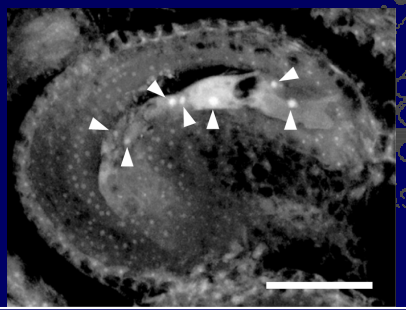
?

„Reverzně genetický“ přístup

5‘TTATATATATATATTAAAAAATAAAATA
AAAGAACAAAAAAGAAAATAAAATA….3‘

inzerční mutageneze



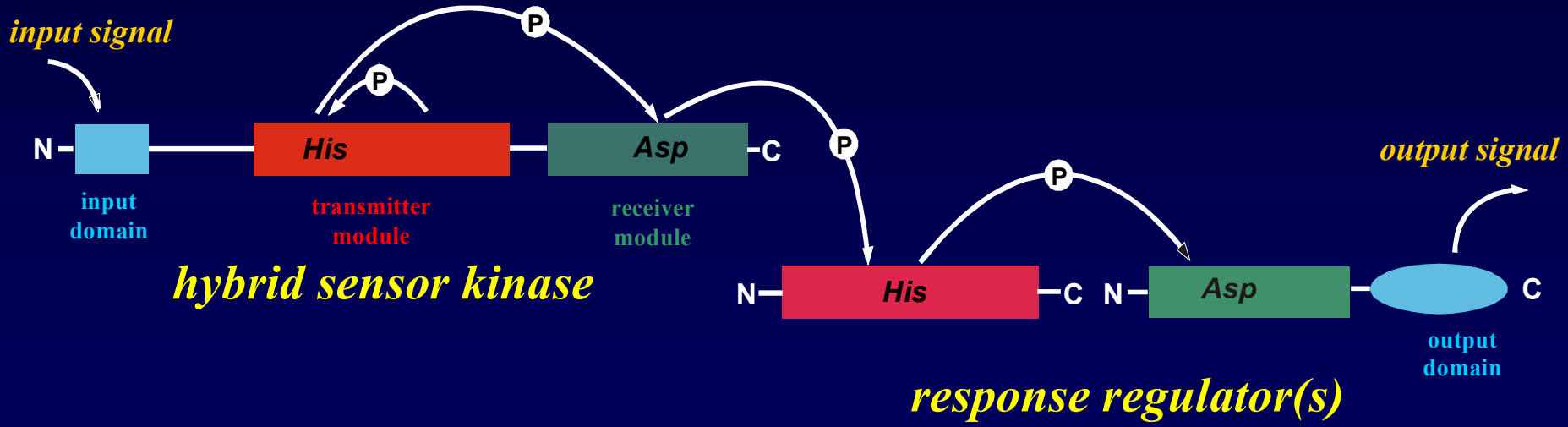


Identifikace role genu *ARR21*

- Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*

Identifikace role genu *ARR21*

regulátor odezvy v dvoukomponentním signálním systému



Identifikace role genu *ARR21*

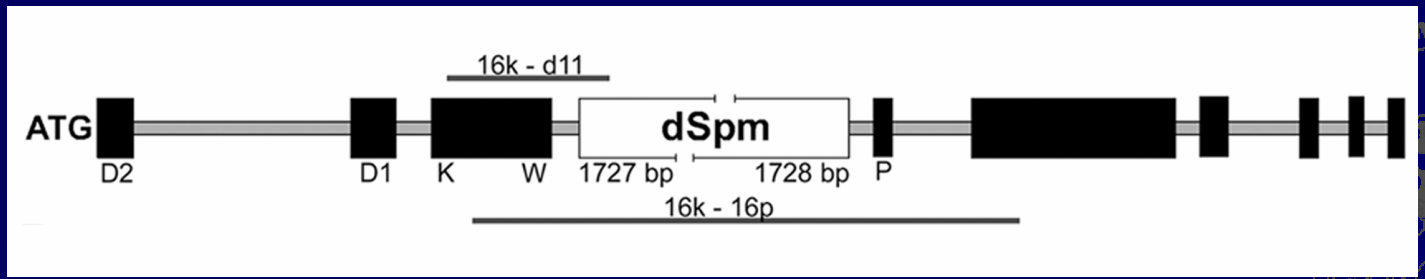
- Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*
- Mutant identifikován vyhledáváním v databázi inzerčních mutantů (SINS-sequenced insertion site) pomocí programu BLAST

Identifikace role genu *ARR21*
identifikace inzerčního mutanta

- **vyhledávání v databázi inzerčních mutantů (SINS)**

```
Insert_SINS: 01_09_64
Query: 80    tcctagcgttcatgagcgtaccatacttgacaanagagaacgtagccagccatttacagg 139
             ||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 58319 tcctagcgttcatgagcgtaccatacttgacaagagagaacgtagccagccatttacagg 58378
Arr21:  1830

Insert_SINS: 01_09_64
Query: 140   tttgatatctcttgtcaaaaatgttttggattttactgt 179
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 58379 tttgatatctcttgtcaaaaatgttttggattttactgt 58418
Arr21:  1890
```

- **lokalizace inzerce *dSpm* v genomové sekvenci *ARR21* pomocí sekvenace PCR produktů**



Identifikace role genu *ARR21*

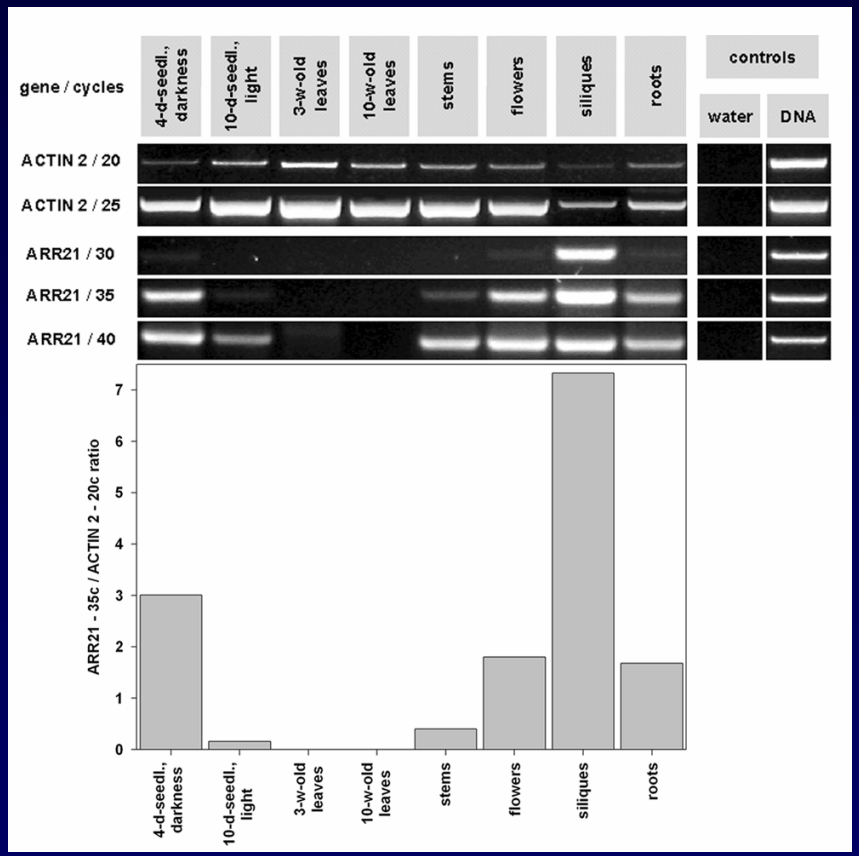
- Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*

- Mutant identifikován vyhledáváním v databázi inzerčních mutantů (SINS-sequenced insertion site) pomocí programu BLAST

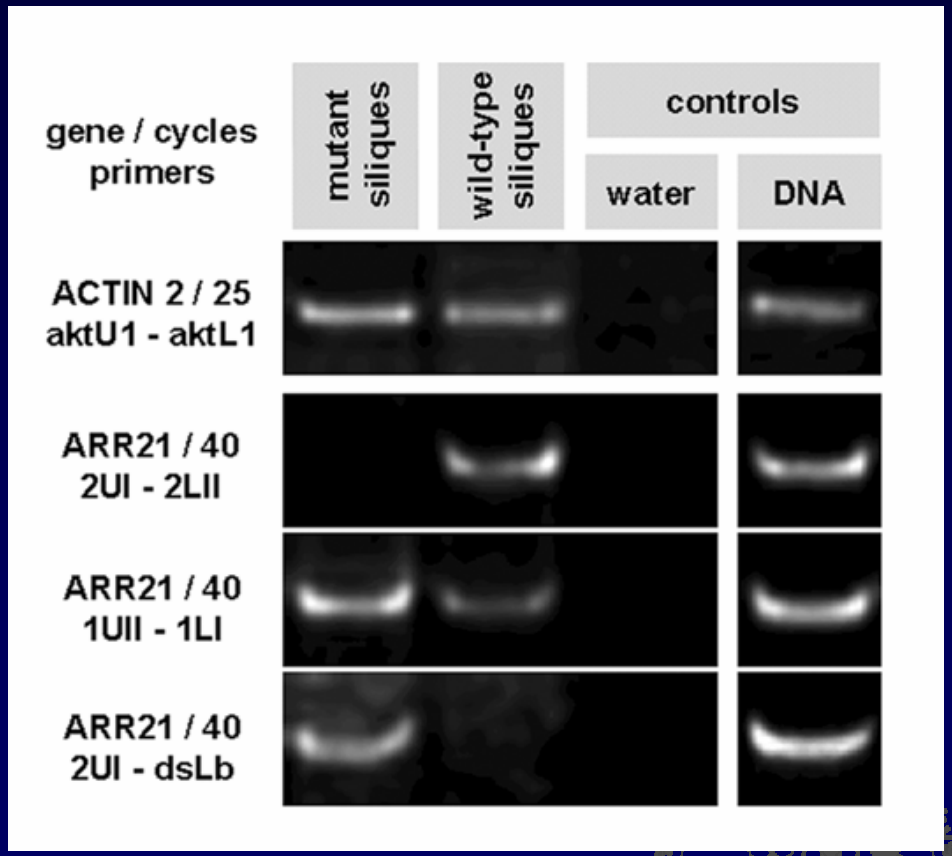
- Exprese *ARR21* u standardního typu a Inhibice exprese u inzerčního mutanta potvrzena na úrovni RNA

Identifikace role genu *ARR21*
analýza expresního profilu

Standardní typ



Inzerční mutant

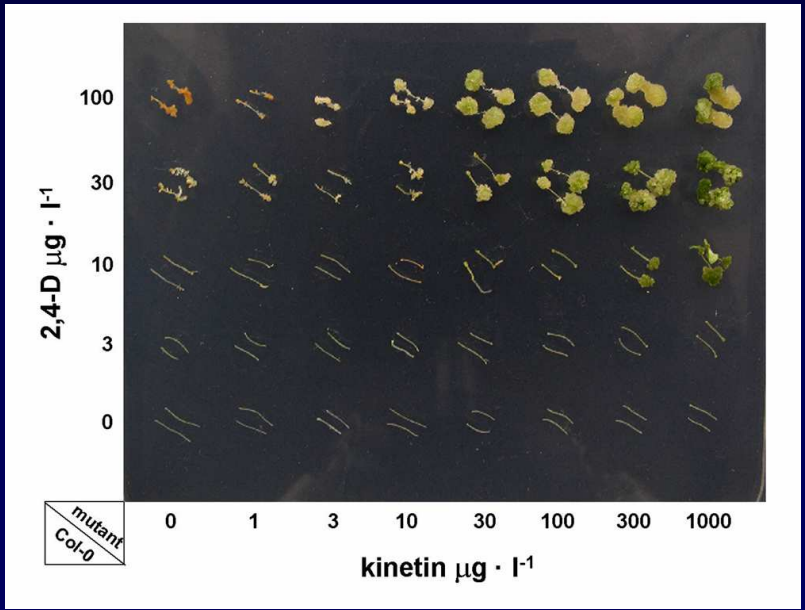


Identifikace role genu *ARR21*

- Předpokládaný přenašeč signálu u dvoukomponentního signálního systému *Arabidopsis*
- Mutant identifikován vyhledáváním v databázi inzerčních mutantů (SINS-sequenced insertion site) pomocí programu BLAST
- Exprese *ARR21* u standardního typu a Inhibice exprese u inzerčního mutanta potvrzena na úrovni RNA
- Analýza fenotypu inzečního mutanta

Identifikace role genu *ARR21*
analýza fenotypu inzerčního mutanta

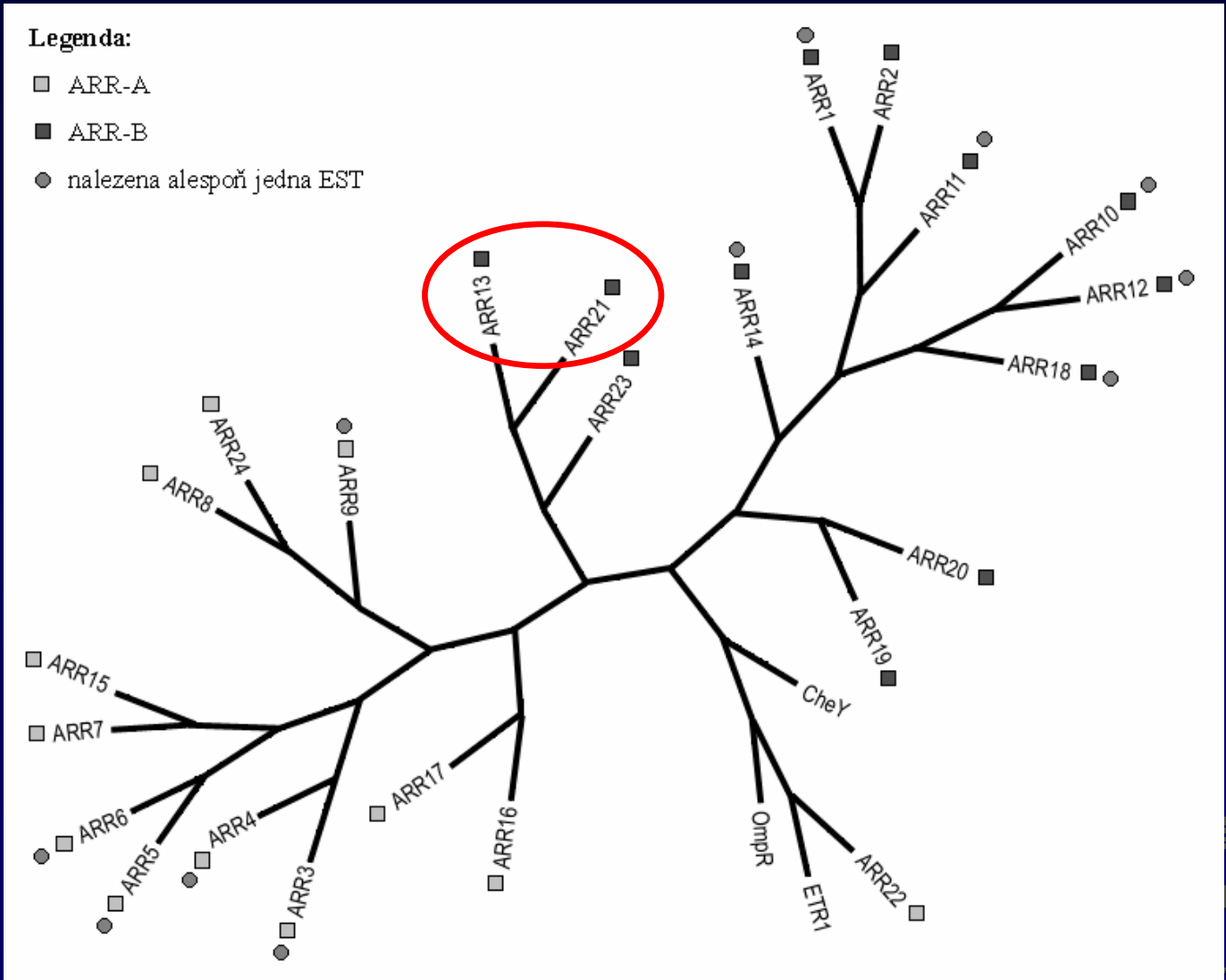
- Analýza citlivosti k regulátorům růstu rostlin
  - **2,4-D a kinetin**
  - **etylén**
  - **světlo různých vlnových délek**
- Doba kvetení i počet semen nezměněn



Identifikace role genu *ARR21*
možné příčiny absence odchylek fenotypu u inzerčního mutanta

- Funkční redundance v rámci genové rodiny?

Identifikace role genu *ARR21*
příbuznost jednotlivých ARR genů u *Arabisopsis*



Identifikace role genu *ARR21*
možné příčiny absence odchylek fenotypu u inzerčního mutanta

- Funkční redundance v rámci genové rodiny?
- Fenotypový projev pouze za velmi specifických podmínek (?)

Inzerční mutageneze ve funkční genomice *Arabidopsis thaliana*

- Gen *ARR21* identifikován pomocí srovnávací analýzy genomu *Arabidopsis*
- Na základě analýzy sekvence byla předpovězena jeho funkce
- Byla prokázána místně specifická exprese genu *ARR21* na úrovni RNA
- Inzerční mutageneze v případě identifikace funkce genu *ARR21* ve vývoji *Arabidopsis* byla neúspěšná, pravděpodobně v důsledku funkční redundance v rámci genové rodiny

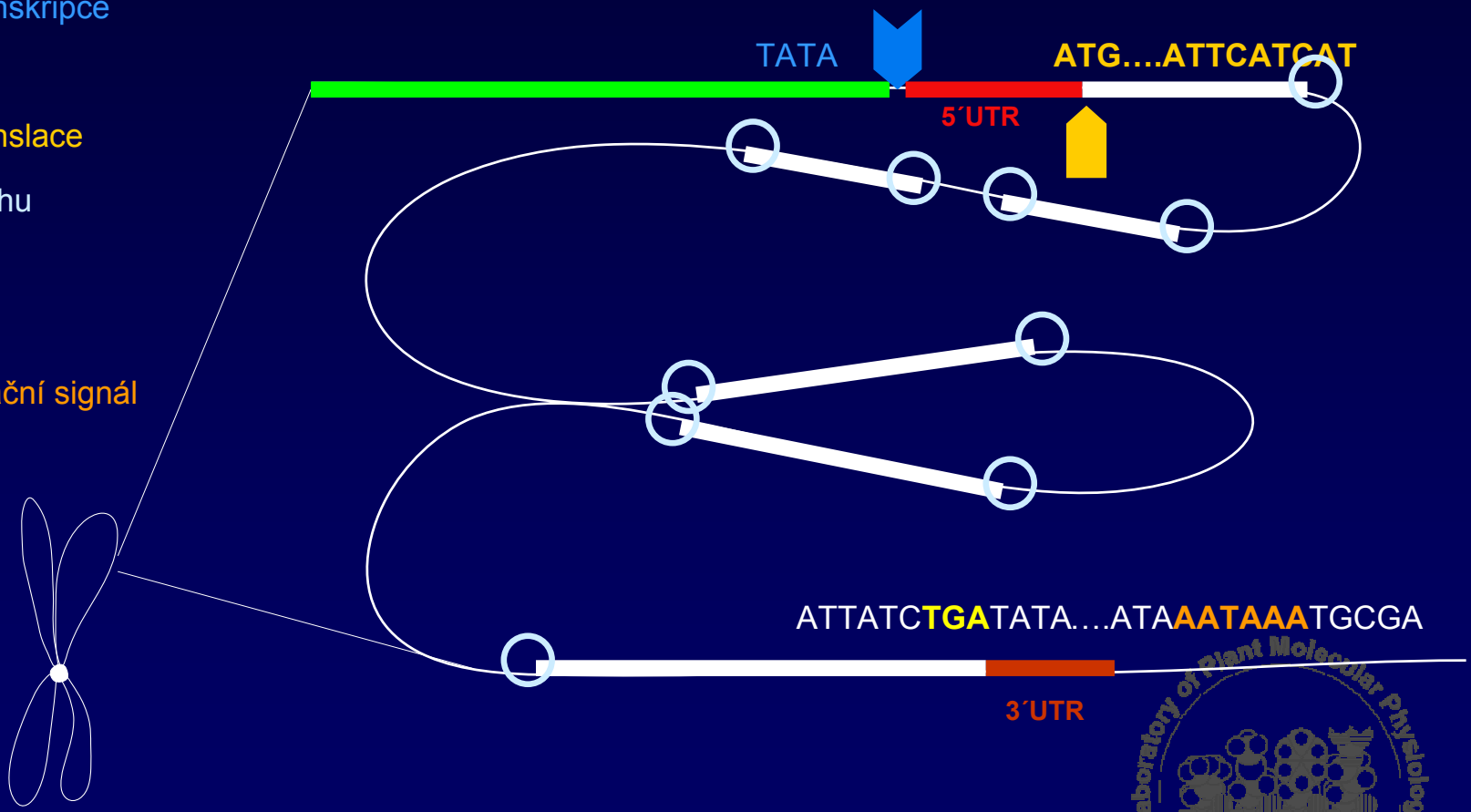
Základy genomiky II.

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Predikce funkce genů *in silico*
  - struktura genů a jejich vyhledávání

Predikce funkce genů *in silico*

struktura genů

- struktura genů
  - promotor
  - počátek transkripce
  - 5´UTR
  - počátek translace
  - místa sestřihu
  - stop kodon
  - 3´UTR
  - polyadenylační signál



Predikce funkce genů *in silico*
vyhledávání genů

- vyhledávání genů *ab inicio*
  - zanedbání 5‘ a 3‘ UTR
  - identifikace počátku translace (ATG) a stop kodonu (TAG, TAA, TGA)
  - nalezení donorových (většinou GT) a akceptorových (AG) míst sestřihu
  - většina ORF není skutečně kódujícími sekvencemi – u *Arabidopsis* je asi 350 mil. ORF na každých 900 bp (!)
  - využití různých statistických modelů (např. Hidden Markov Model, HMM, viz doporučená studijní literatura, Majoros et al., 2003) k posouzení a ohodnocení váhy identifikovaných donorových a akceptorových míst

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

- vyhledávání genů *ab inicio*
  - programy pro predikci míst sestřihu (specificita přibližně 35%)
    - GeneSplicer (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)
    - SplicePredictor (http://deepc2.psi.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi)

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

What do the output columns mean?

```
SplicePredictor.   Version of February 13, 2005.
Date run: Wed Nov  9 11:30:14 2005

Species:                        Homo sapiens
Model:                          2-class Bayesian
Prediction cutoff (2 ln[BF]):     3.00
Local pruning:                  on
Non-canonical sites:            not scored

Sequence    1:   your-sequence, from 1 to 9490.

Potential splice sites

t    q      loc     sequence          P       c      rho   gamma   *  P*R*(

A    <--     75 ttttttcgatctcAGat    0.973   7.16   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--    134 attatttttctttAGtt    0.999  14.86   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--    500 gattttgttgtttAGtc    0.977   7.48   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--    780 tctgttattgtatAGct    0.986   8.56   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--    848 tatttttgaaatAGat     0.968   6.80   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   1051 caatttatttttaAGaa    0.930   5.19   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   1213 ttatttatttttAGtt     0.998  12.14   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   1373 tttcctctctcacAGga    0.999  13.17   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   1487 tttatatattgatAGtg    0.883   4.04   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   1581 atgtgttgcttgtAGga    0.982   8.03   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   1781 ggttgtgcgaaatAGgg    0.886   4.10   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   2440 taattaaaaatttAGat    0.939   5.46   0.000  0.000   7 (5 1
A    <--   2479 catctaaaattttAGat    0.942   5.59   0.000  0.000   7 (5 1
D -----> 2546           aagGTagta    0.909   4.61   0.885  1.903  15 (5 5
A    <--   2572 tttttttttggcAGca    0.930   5.16   0.000  0.000   7 (5 1
A  <----   2763 ctcaaattcacaaAGgt    0.873   3.86   0.185  0.000  11 (5 5 1
A  <----   2782 tttcgttttcattAGcg    0.952   5.98   0.220  0.000  11 (5 5 1
A  <----   3022 tttgtttgtactaAGct    0.956   6.16   0.221  0.000  11 (5 5 1
A  <----   3048 ctttgcaatacatAGga    0.973   7.15   0.229  0.000  11 (5 5 1
A    <--   3171 cgtcgtcatttatAGta    0.988   8.74   0.000  0.000   7 (5 1 1
A   <---   3284 cttttgttatcaaAGgg    0.993  10.03   0.000  0.006   8 (5 1 2
D -----> 3372           aatGTaagg    0.933   5.28   0.855  1.849  15 (5 5 5
A  <----   3451 aatgcttcctcgtAGaa    0.916   4.77   0.293  0.065  12 (5 5 2
A    <--   3581 cgatcgccgttctAGgt    0.850   3.47   0.000  0.000   7 (5 1 1
D ---->   3649           cacGTatta    0.933   5.25   0.000  1.848  11 (5 1 5
A    <--   3695 ttgtggttatacaAGtt    0.907   4.56   0.000  0.000   7 (5 1 1
A   <---   4254 attattgttcttcAGat    0.998  12.82   0.000  0.002   8 (5 1 2
A    <--   4351 tttcttacattgcAGaa    0.991   9.42   0.000  0.000   7 (5 1 1
A    <--   4633 gtcttgtttctttAGgg    0.879   3.97   0.000  0.000   7 (5 1 1
A    <--   4976 cttgttgtttctcAGct    0.952   5.98   0.000  0.000   7 (5 1 1
A    <--   5004 tttttttttgccAGag    0.996  11.17   0.000  0.000   7 (5 1 1
D ---->   5356           caaGTgaat    0.821   3.04   0.387  0.000  11 (5 5 1
D ---->   5384           ttgGTaaga    0.941   5.54   0.478  0.090  13 (5 5 3
A    <--   5403 actctgtttctttAGct    0.894   4.26   0.000  0.000   7 (5 1 1
A  <----   5441 ctttctctctaacAGaa    0.995  10.43   0.387  0.000  11 (5 5 1
A  <----   5472 ttgttaaaattacAGct    0.965   6.62   0.478  0.090  13 (5 5 3
D -----> 5745           gcgGTaaga    0.991   9.48   0.990  1.956  15 (5 5 5
A  <----   5808 catcatatcctaaAGgt    0.948   5.83   0.458  0.000  11 (5 5 1
A  <----   6135 ggtctattattatAGgt    0.999  13.59   0.508  0.050  12 (5 5 2
A    <--   6552 ggattttcacctcAGag    0.938   5.42   0.000  0.000   7 (5 1 1
```

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

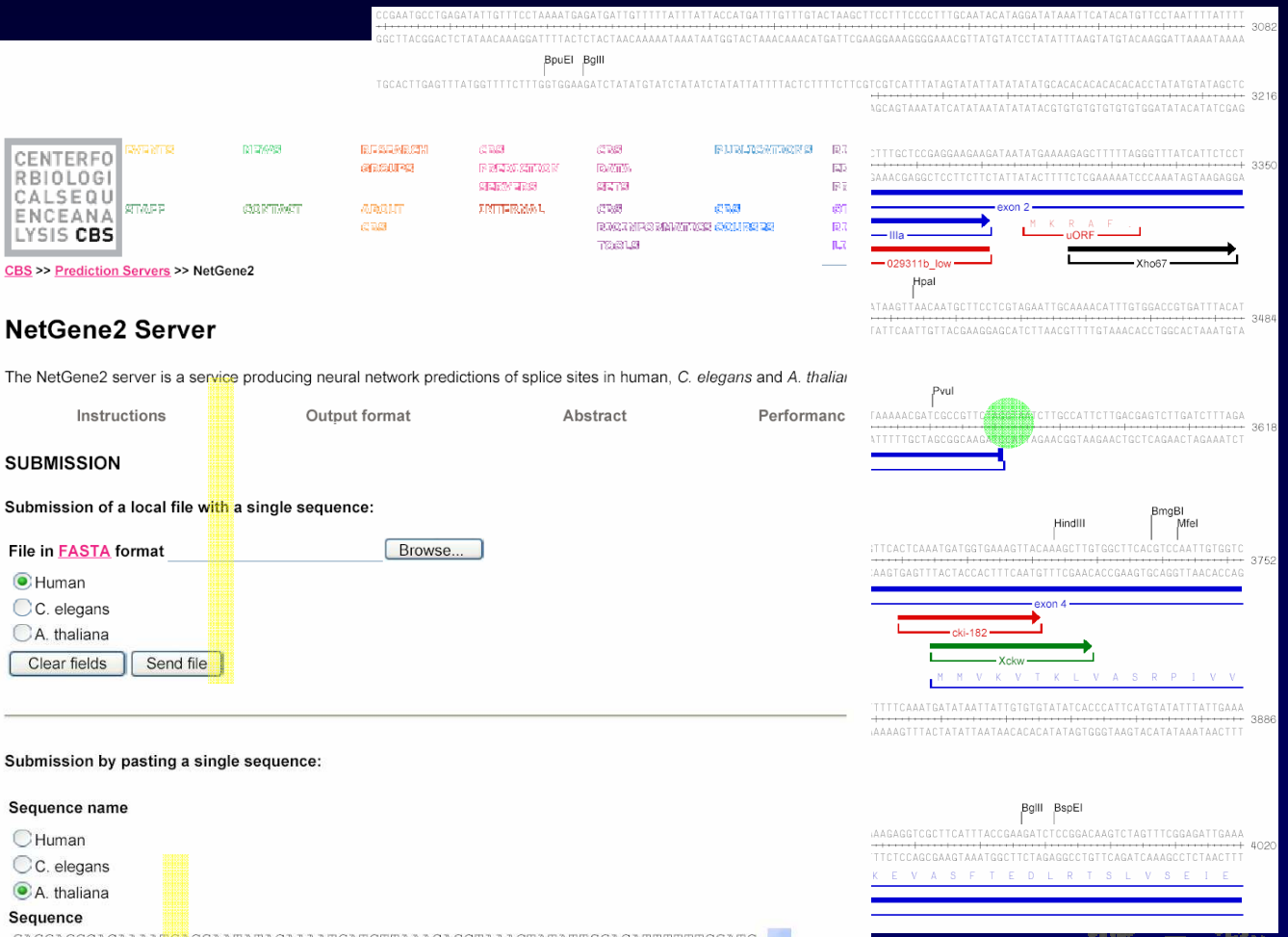
- vyhledávání genů *ab inicio*
  - programy pro predikci míst sestřihu (specificita přibližně 35%)
    - GeneSplicer (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)
    - SplicePredictor (http://deepc2.psi.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi)
    - NetGene2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

Prediction done

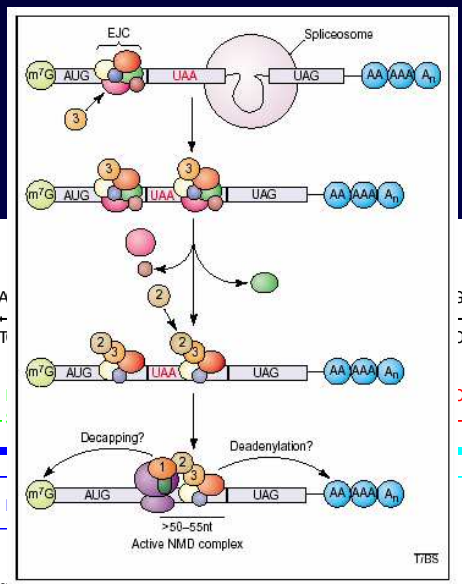
```
********** NetGene2 v. 2.4 **

The sequence: Sequence has the following

Length: 9490 nucleotides.
31.8% A, 17.0% C, 19.6% G, 31.7% T, 0.0%

Donor splice sites, direct strand
---------------------------------
                pos 5'->3'  phase strand
                   1704       0      +
                   1906       0      +
                   3582       1      +
                   3763       1      +
                   4134       0      +
                   4619       1      +
                   4915       0      +
                   5356       0      +
                   5384       1      +
                   5809       1      +
                   6057       0      +
                   6096       1      +
                   7369       0      +
                   7886       0      +
                   9323       0      +

Donor splice sites, complement strand
-------------------------------------
   pos 3'->5'  pos 5'->3'  phase strand

Acceptor splice sites, direct strand
------------------------------------
                pos 5'->3'  phase strand  con
                   1213       0      +
                   1221       2      +
                   1373       0      +
                   1487       1      +
                   3284       0      +
                   4254       0      +
                   4832       2      +
                   5004       0      +
                   5472       1      +
                   6135       0      +
                   6490       1      +
                   6744       0      +
                   7447       0      +
                   7780       2      +
                   7786       2      +        0.92        TCAGATACAG^AACACATGCA
```

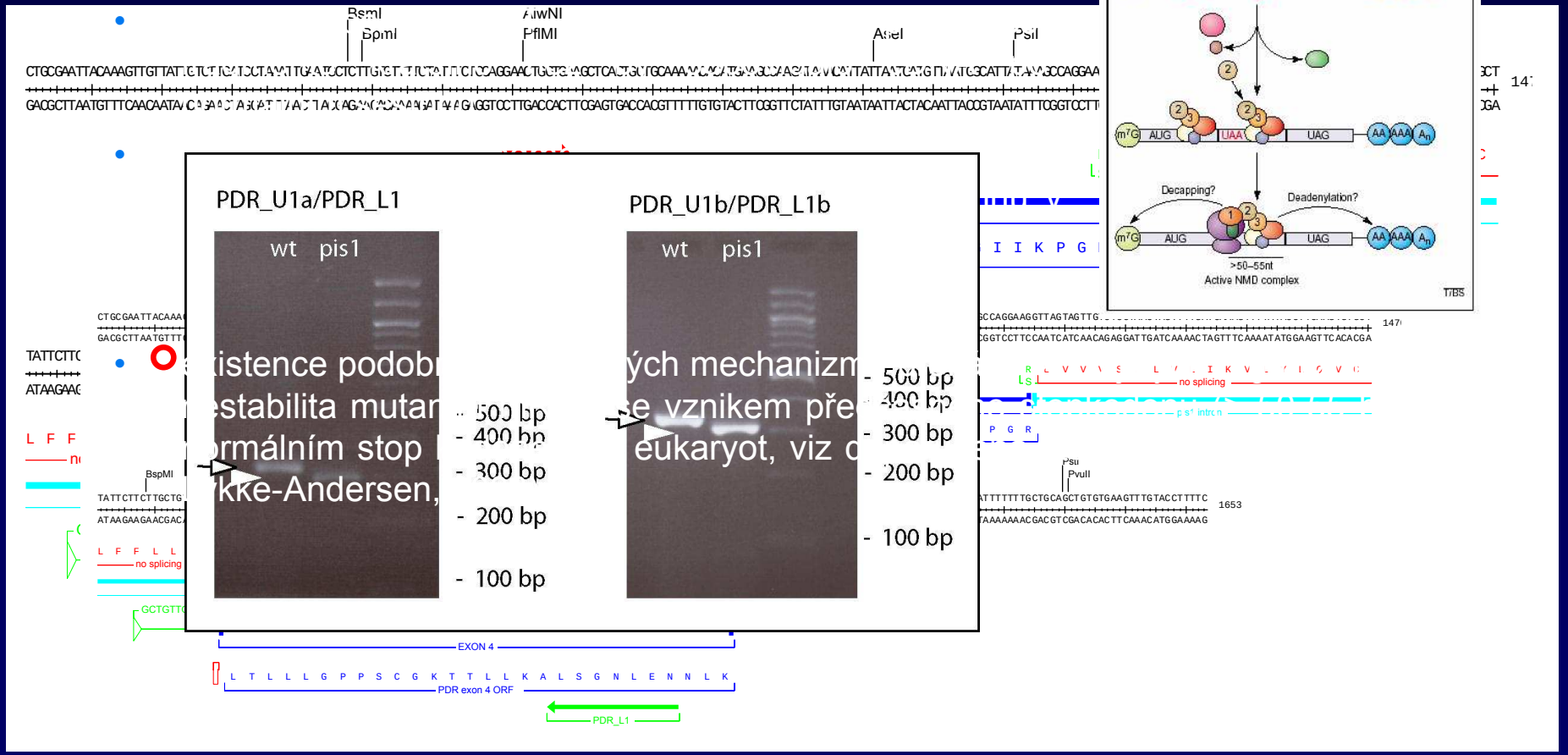


Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

- odchylky rozpoznávání míst sestřihu u rostlin v praxi - příklad vývojové plasticity (nejen) rostlin
  - identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5‘ konci 4. exonu

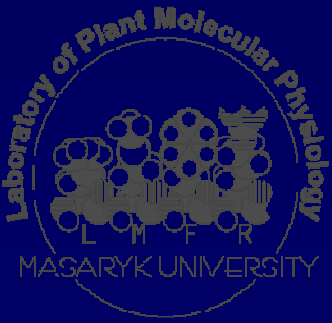




Predikce funkce genů *in silico*

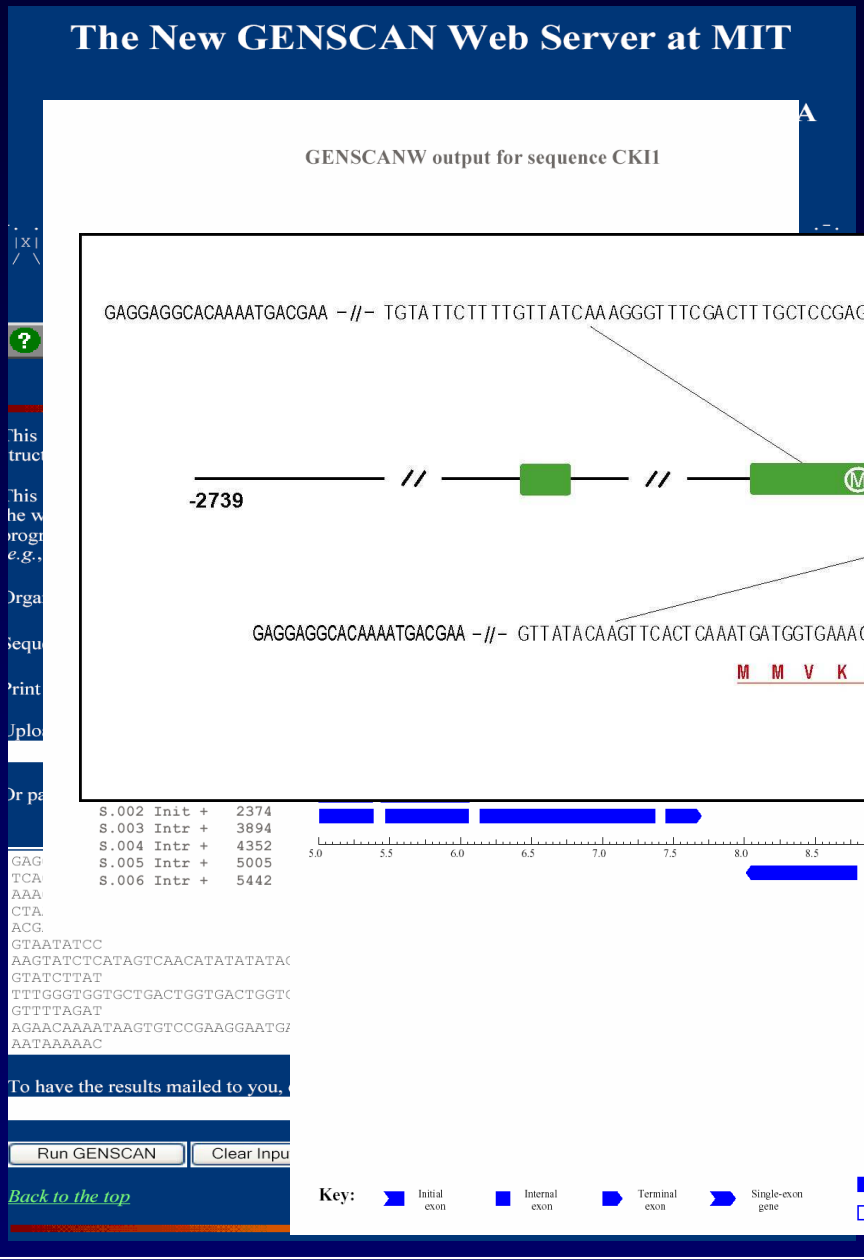
vyhledávání genů

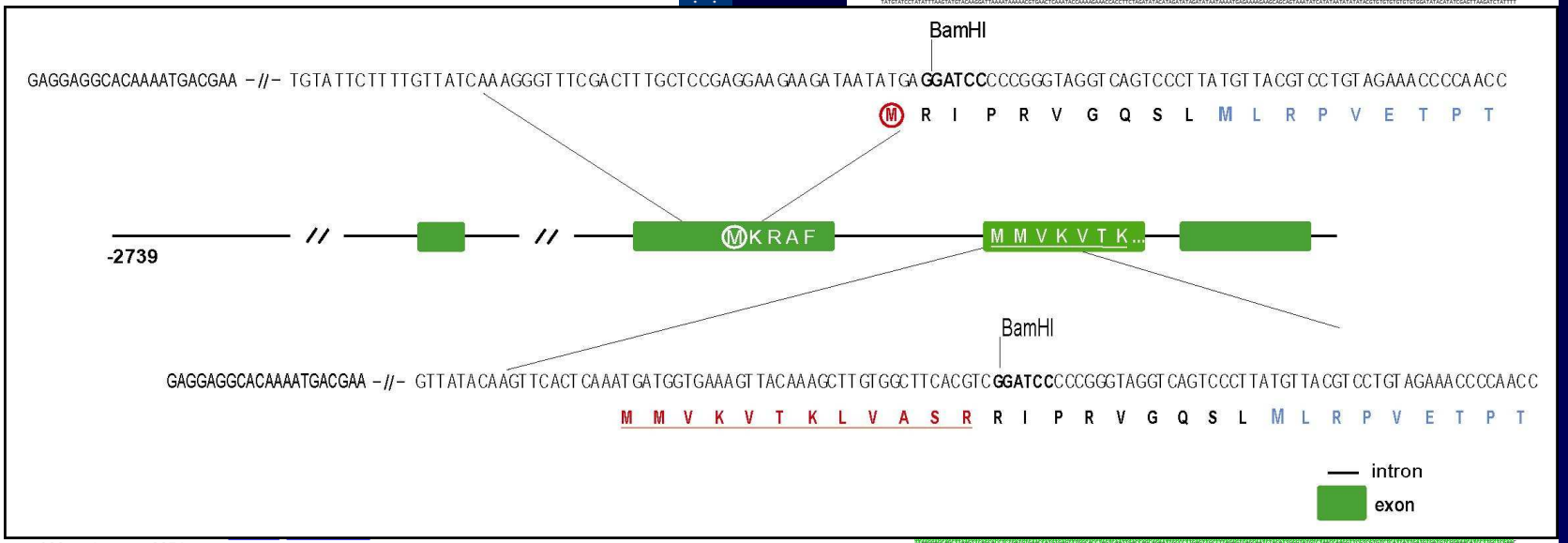
- vyhledávání genů *ab inicio*
  - programy pro predikci míst sestřihu (specificita přibližně 35%)
    - GeneSplicer (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)
    - SplicePredictor (http://deepc2.psi.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi)
    - NetGene2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)
  - programy pro predikci exonů
    - 4 typy exonů (podle polohy):
      - iniciační
      - vnitřní
      - terminální a
      - jednoduché
    - programy kromě rozpoznávání míst sestřihu zohledňují i strukturu jednotlivých typů exonů
    - iniciační:
      - Genescan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html)
      - GeneMark.hmm (http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/)
    - interní:
      - MZEF (http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/)

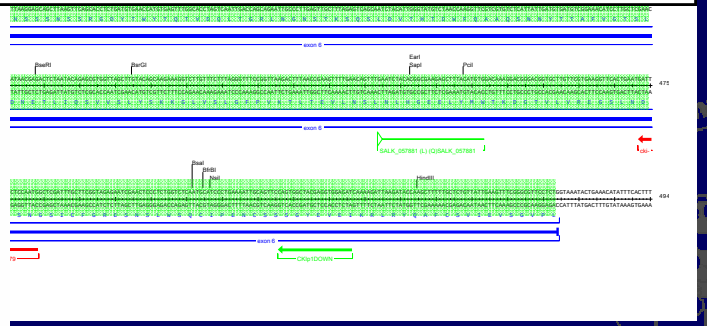


Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů





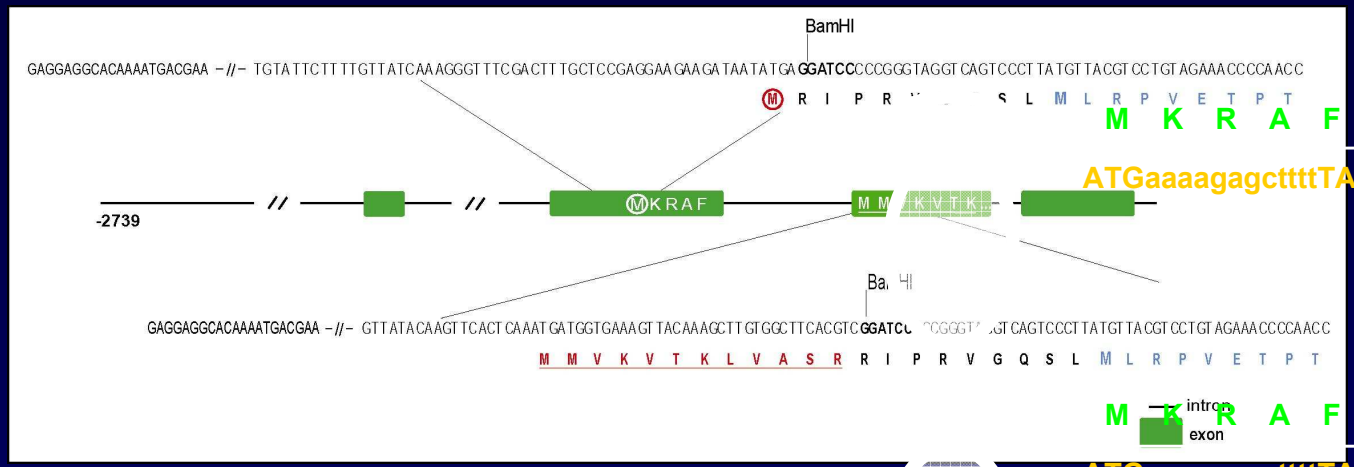


..\..\..\..\..\sequences\CKI1\cki_genomic.mpd

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

• Funkční význam sestřihu v nepřekládaných oblastech - důležitá regulační součást genů



M K R A F .

ATGaaaagagcttttTAG

ATGatggtgaaagttaca….

M M V K V T…

ATGaaaagagcttttTAG

ATGatggtgaaagttaca….

- V případě CKI1 pokus prokázat tento způsob regulace genové exprese pomocí transgenních linií nesoucích *uidA* pod kontrolou dvou verzí promotoru, zatím nepotvrzeno

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

- vyhledávání genů *ab inicio*
  - programy pro genové modelování
    - zohledňují také další parametry, např. návaznost ORF

- Genescan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html)
  velice dobrý pro predikci exonů v kódujích oblastech (testováno na genu *PDR9*, identifikoval všech 23 (!) exonů
- GeneMark.hmm (http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/)

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

Result of last submittal:

View PDF Graphical Output

GeneMark.hmm Listing

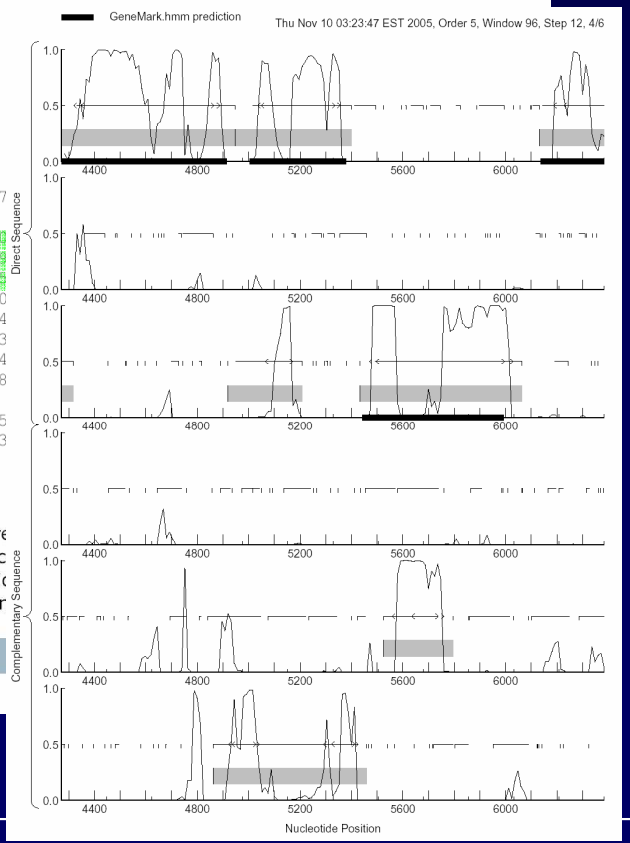
Go to: GeneMark.hmm Protein Translations

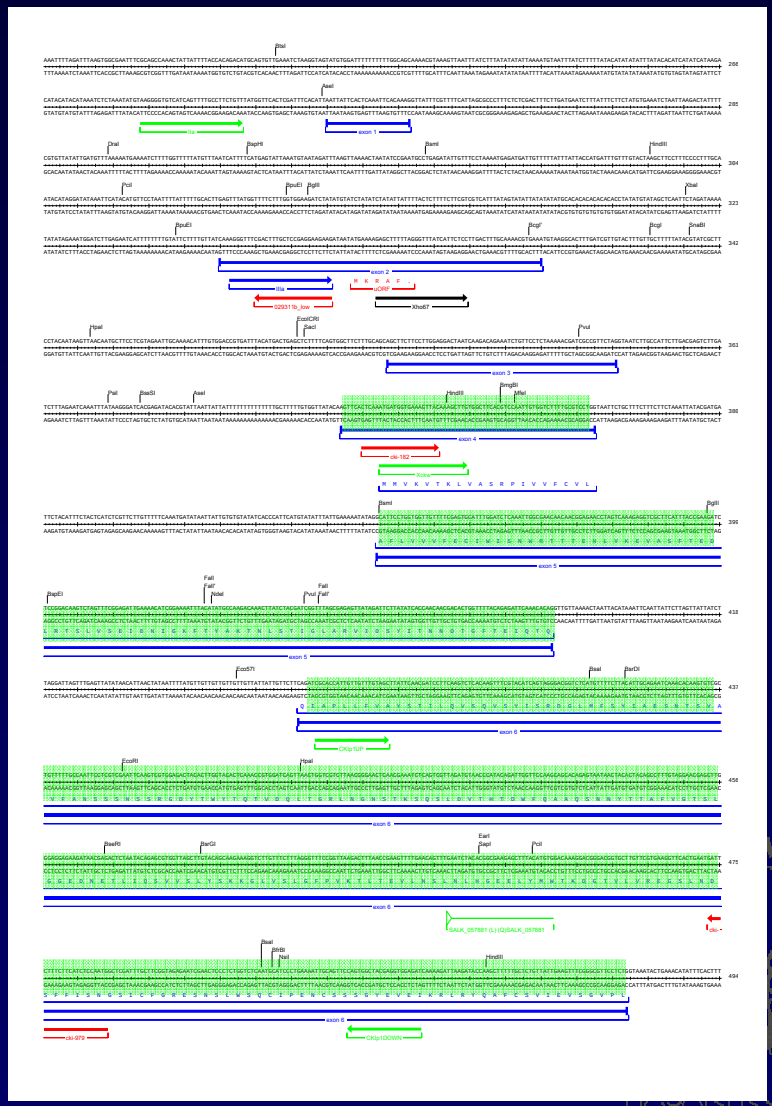
Go to: Job Submittal

```
GeneMark.hmm (Version 2.2a)
Sequence name: Thu Nov 10 03:24:47 EST 2005
Sequence length: 9490 bp
G+C content: 36.53%
Matrix: Homo sapiens
Thu Nov 10 03:24:48 2005

Predicted genes/exons

Gene  Exon  Strand  Exon
  #     #           Type

  1     1     +   Terminal      137

  2     1     +   Initial       370
  2     2     +   Internal      388
  2     3     +   Internal      423
  2     4     +   Internal      500
  2     5     +   Internal      544
  2     6     +   Internal      613
  2     7     +   Internal      744
  2     8     +   Terminal      778

  3     2     -   Terminal      805
  3     1     -   Initial       893
```

Generate PDF graphics (scre
Generate PostScript graphic
Print GeneMark 2.4 predictic
Translate predicted genes ir

Run





Predikce funkce genů *in silico*
vyhledávání genů

- vyhledávání genů podle homologií
  - porovnávání s EST databázemi
    - BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, http://workbench.sdsc.edu/)
  - porovnávání s proteinovými databázemi
    - BLASTX (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, http://workbench.sdsc.edu/)
    - Genewise (http://www.ebi.ac.uk/Wise2/)
      - porovnávají proteinovou sekvenci s genomovou DNA (po zpětném překladu), je nutná znalost aminokyselinové sekvence
  - porovnávání s homologními genomovými sekvencemi z příbuzných druhů
    - VISTA/AVID (http://www.lbl.gov/Tech-Transfer/techs/lbnl1690.html)

Základy genomiky II.

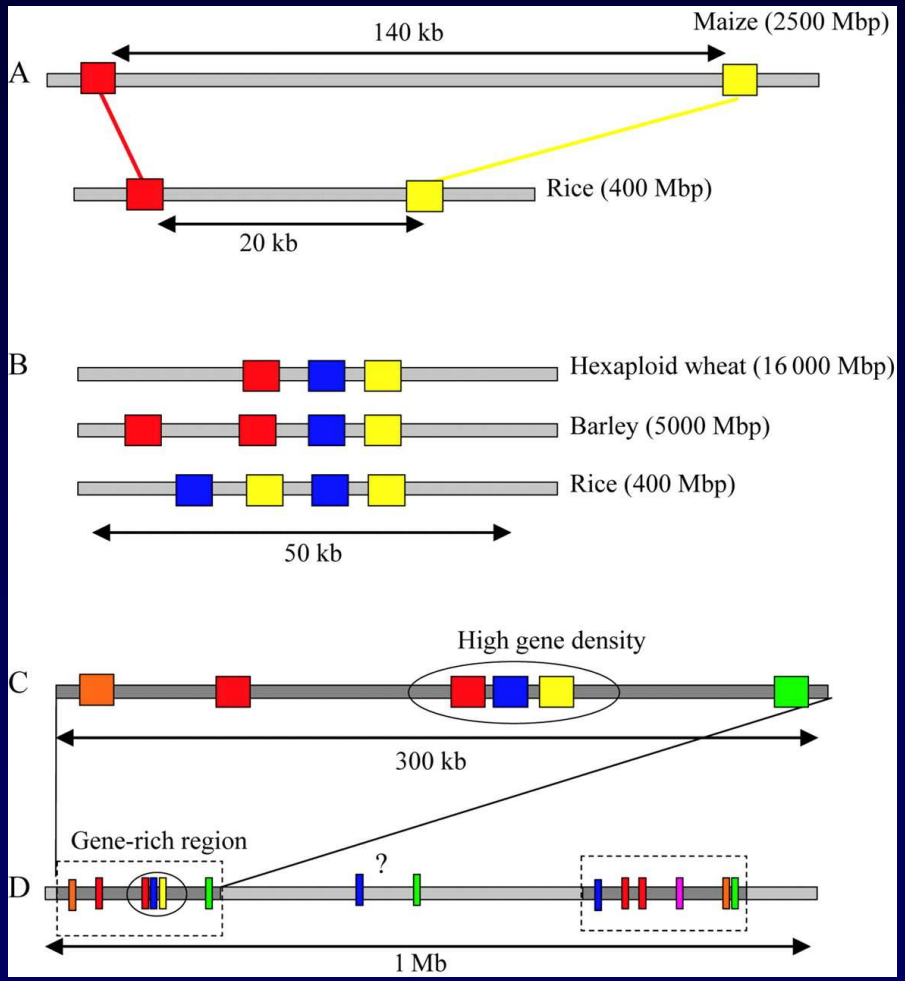
- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Predikce funkce genů *in silico*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie

Predikce funkce genů *in silico*
vyhledávání genů

- genomová kolinearita a genová homologie
  - genomy příbuzných druhů se přes značné odlišnosti vyznačují podobnostmi v uspořádání i sekvencích, možnost využití při identifikaci genů u příbuzných organizmů pomocí vyhledávání v databázích
  - obecné schéma postupu při využívání geonomové kolinearity (také „komparativní genomika“) při experimentální identifikaci genů příbuzných organizmů:
    - mapování malých genomů s využitím nízkokopiových DNA markerů (např. RFLP)
    - vvyužití těchto markerů k identifikaci orthologních genů (genů se stejnou nebo podobnou funkcí) příbuzného organizmu
    - malý genom (např. rýže, 466 Mbp, 46-55 tis. genů) může sloužit jako vodítko, kdy jsou identifikovány molekulární nízkokopiové markery (např. RFLP) ve vazbě s genem zájmu a tyto oblasti jsou pak použity jako sonda při vyhledávání v BAC knihovnách při identifikaci orthologních oblastí velkých genomů (např. ječmene nebo pšenice, 5000, resp. 16000 Mbp)

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů-genomová kolinearita



Feuillet and Keller, 2002

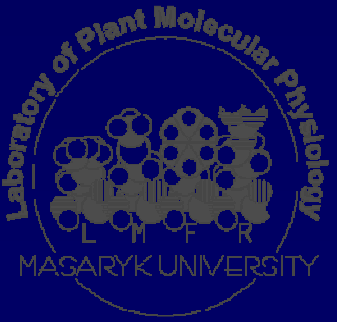
Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

- genomová kolinearita a genová homologie
  - genomy příbuzných druhů se přes značné odlišnosti vyznačují podobnostmi v uspořádání i sekvencích, možnost využití při identifikaci genů u příbuzných organizmů pomocí vyhledávání v databázích
  - obecné schéma postupu při využívání geonomové kolinearity (také „komparativní genomika“) při experimentální identifikaci genů příbuzných organizmů:
    - mapování malých genomů s využitím nízkokopiových DNA markerů (např. RFLP)
    - vvyužití těchto markerů k identifikaci orthologních genů (genů se stejnou nebo podobnou funkcí) příbuzného organizmu
    - malý genom (např. rýže, 466 Mbp, 46-55 tis. genů) může sloužit jako vodítko, kdy jsou identifikovány molekulární nízkokopiové markery (např. RFLP) ve vazbě s genem zájmu a tyto oblasti jsou pak použity jako sonda při vyhledávání v BAC knihovnách při identifikaci orthologních oblastí velkých genomů (např. ječmene nebo pšenice, 5000, resp. 16000 Mbp)
  - zejména využitelné u trav (např. využití příbuznosti u ječmene, pšenice, rýže a kukuřice)
  - malé geonomové přestavby (dalece, duplikace, inverze a translokace menší než několik cM) jsou pak detekovány podrobnou sekvenční komparativní analýzou
  - během evoluce dochází u příbuzných druhů k odchylkám především v nekódujících oblastech (invaze retrotranspozonů atd.)

Základy genomiky II.

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Predikce funkce genů *in silico*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
  - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování



Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů

- příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
  - geny jsou (většinou!) hypometylované, kdežto nekódující oblasti jsou metylované
  - využití bakteriálního RM systému, který rozpoznává metylovanou DNA pomocí rest. enzymů McrA a McrBC
    - McrBC rozpoznává v DNA metylovaný cytozin, který předchází purin (G nebo A)
    - pro štěpení je nutná vzdálenost těchto míst z 40-2000 bp
  - schéma postupu při přípravě BAC genomových knihoven pomocí metylačního filtrování:
    - příprava genomové DNA bez příměsí organelární DNA (chloroplasty a mitochondrie)
    - fragmentace DNA (1-4 kbp) a ligace adaptorů
    - příprava BAC knihovny v *mcrBC+* kmeni *E. coli*
    - selekce pozitivních klonů
  - omezené využití: obohacení o kódující DNA o pouze cca 5-10´%

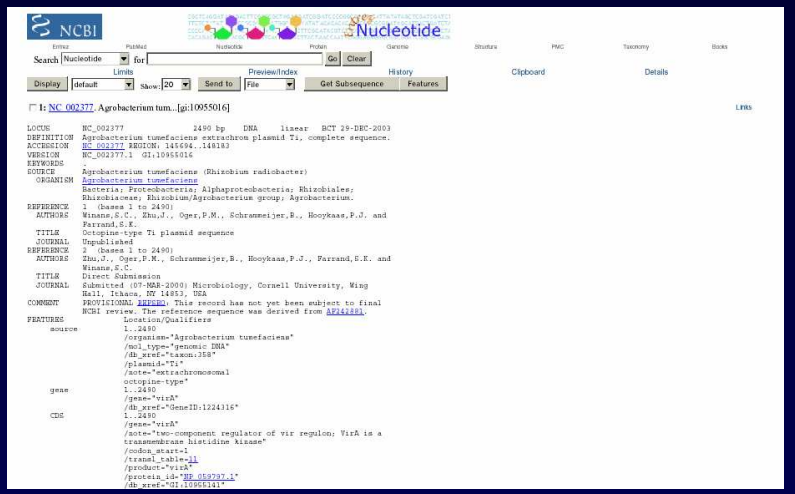
Základy genomiky II.

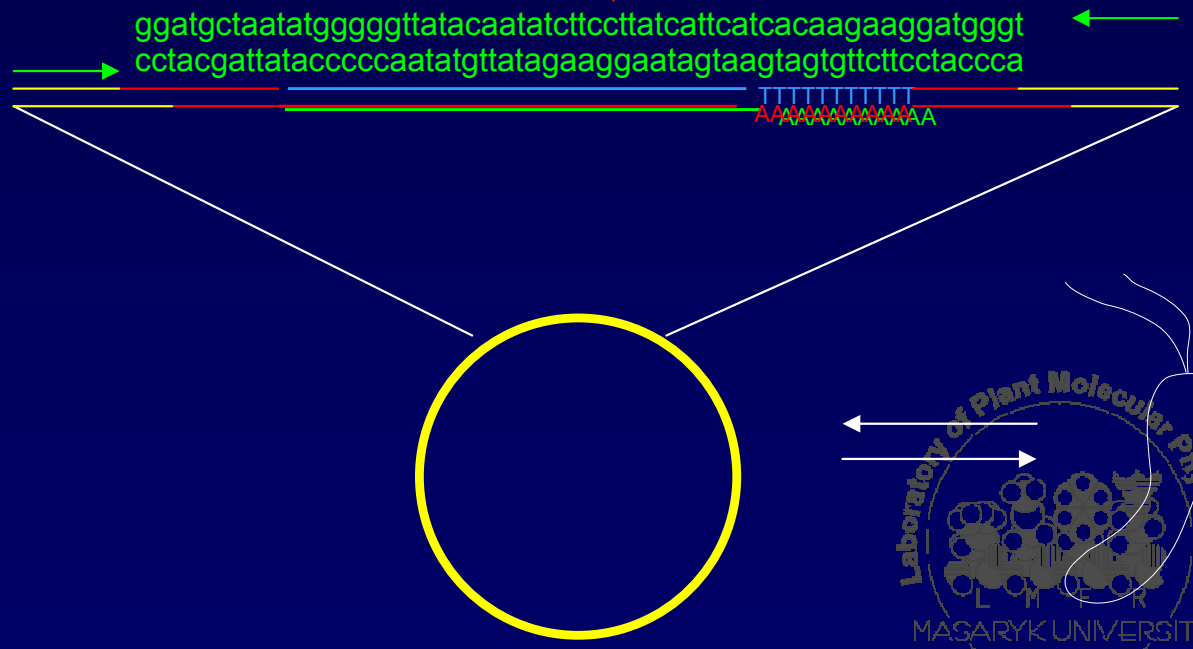
- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
  - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Predikce funkce genů *in silico*
  - struktura genů a jejich vyhledávání
  - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
  - příprava genově obohacených knihoven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

Predikce funkce genů *in silico*

vyhledávání genů-EST knihovny

- příprava EST knihoven
  - izolace mRNA
  - RT PCR
  - ligace linkerů a syntéza druhého řetězce cDNA
  - klonování do vhodného bakteriálního vektoru
  - transformace do bakterií a izolace DNA (amplifikace DNA)
  - sekvenace s použitím primerů specifických pro použitý plasmid
  - uložení výsledků sekvenace do veřejné databáze





Základy genomiky II.
shrnutí

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

Základy genomiky II.

diskuse