

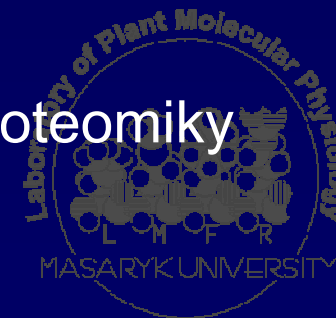
# Základy genomiky

## III. Přístupy reverzní a přímé genetiky



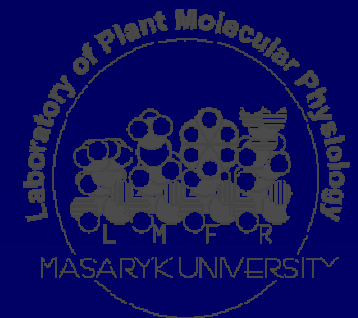
Jan Hejátko

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



# Základy genomiky III.

- Zdrojová literatura ke kapitole III:
  - 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.



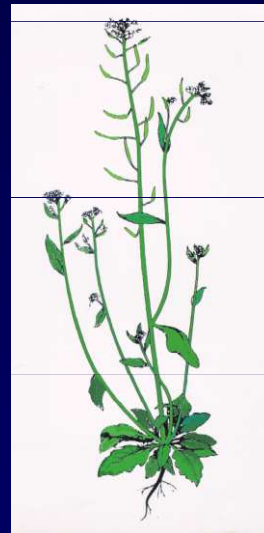
# Přístupy „klasické“ genetiky *versus* „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice *Arabidopsis thaliana*

## NÁHODNÁ MUTAGENEZE

„Přímě genetický“ přístup

EMS

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



*hxn*

„Reverzně genetický“ přístup

T-DNA

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



# Genomika III.

## Přístupy reverzní genetiky

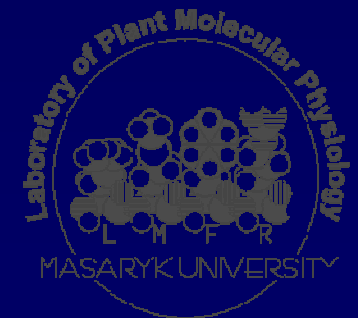
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
  - kosegregační analýza
  - identifikace nezávislé inzerční alely
  - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi



# Genomika III.

## Přístupy reverzní genetiky

- 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*)**

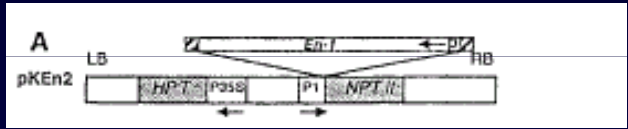
- mutant *En/Spm* transpozonu, který mutací v genu pro transponázu ztratil autonomii
    - může být aktivován křížením s linií nesoucí *En/Spm* transpozon

- **T-DNA**

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

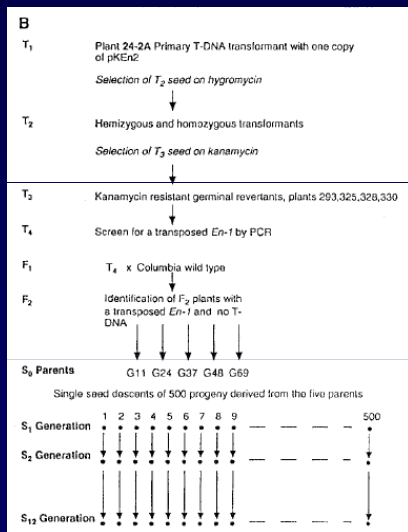


# Vytváření knihoven inserčních mutantů

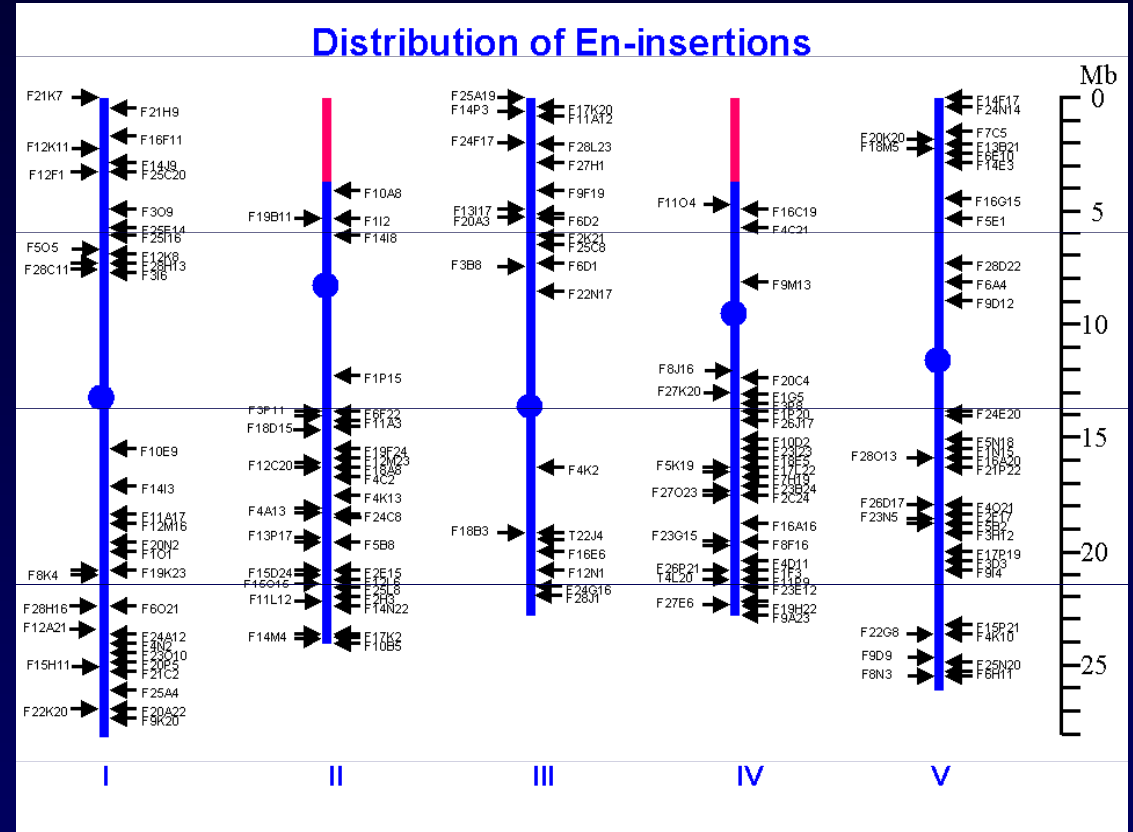


↓  
příprava transgenických rostlin

↓  
vytvoření populace mutantních jedinců



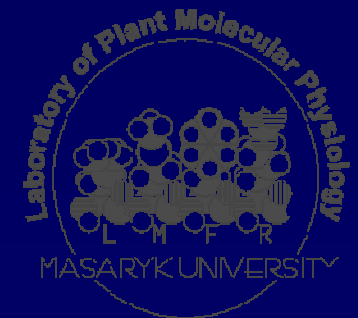
↓  
vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



# Genomika III.

## Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů
    - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
    - hybridizace s produkty iPCR na filtrech

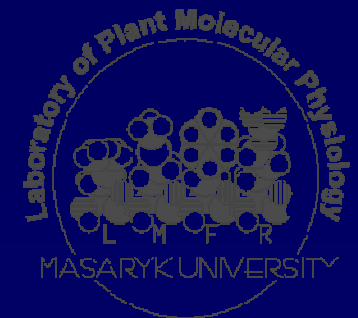




# „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR

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

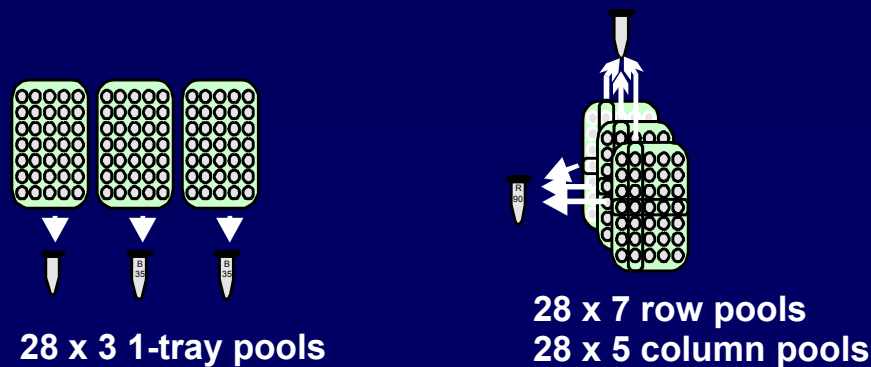
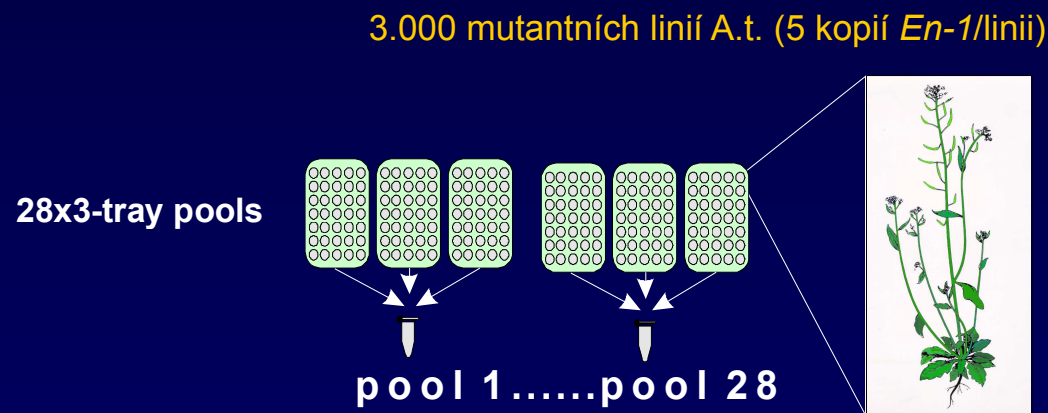
- autonomní *En/Spm*, bez selekce
- 3000 nezávislých linií
- průměrně 5 kopií na linii
- trojrozměrné vyhledávání pomocí PCR



# Genomika II.

## Přístupy reverzní genetiky

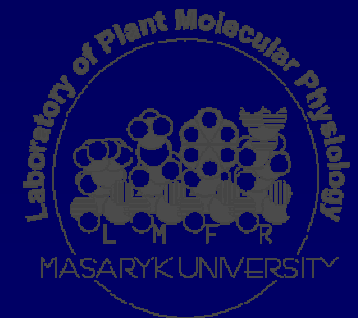
- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
  - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)



# Genomika III.

## Přístupy reverzní genetiky

- „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

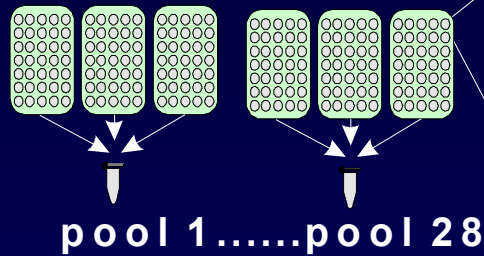


# „Třírozměrné“ vyhledávání v knihovně inzerčních mutantů pomocí PCR

## 1. Vyhledávání pozitivní trojice

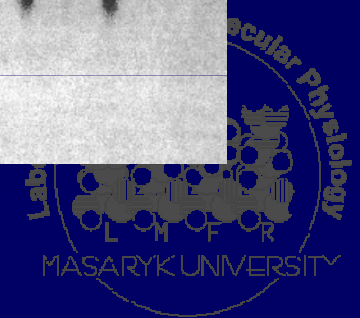
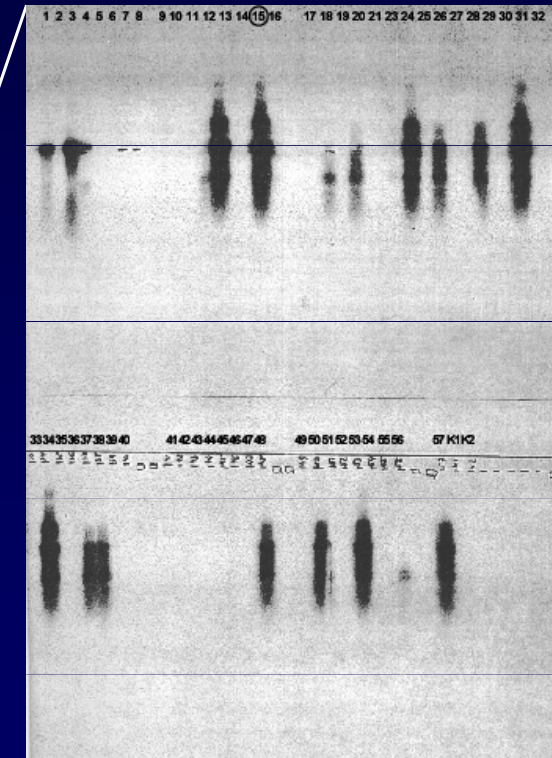
3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)

28x3-tray pools



(2x2x28=112 PCR reakcí)

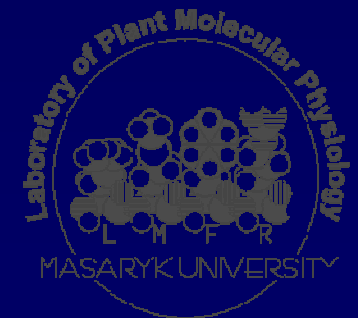
Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou



# Genomika III.

## Přístupy reverzní genetiky

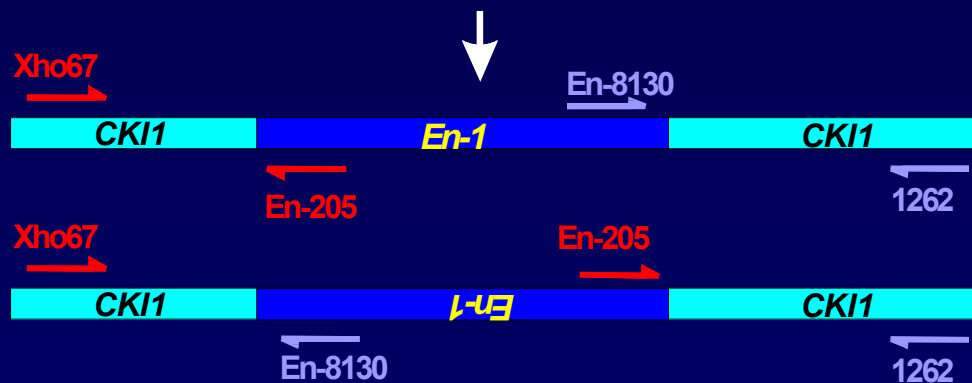
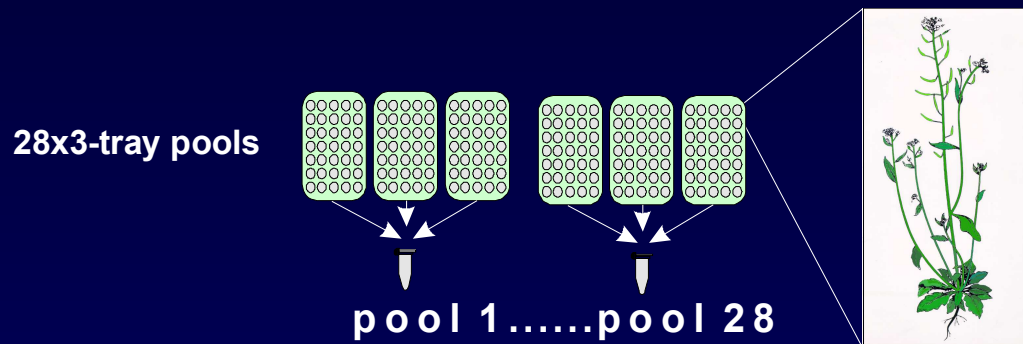
- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
  - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
  - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou sondou
  - identifikace pozitivní linie pomocí Identifikace pozitivního „tácu“, řady a sloupce



# „Třírozměrné“ vyhledávání v knihovně inzerčních mutantů pomocí PCR

## 1. Vyhledávání pozitivní trojice

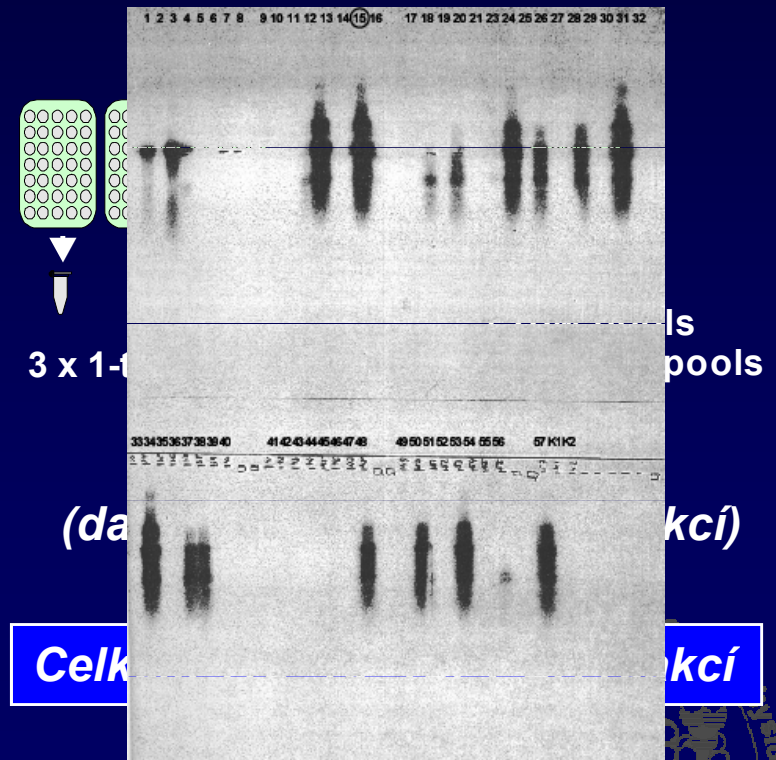
3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)



(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

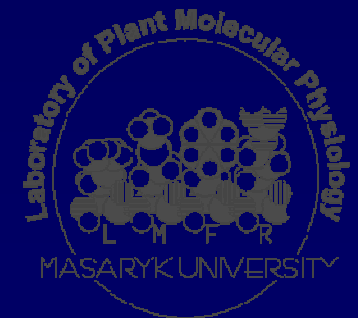
## 2. Identifikace linie nesoucí inzerci



# Genomika III.

## Přístupy reverzní genetiky

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů
    - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
    - hybridizace s produkty iPCR na filtrech

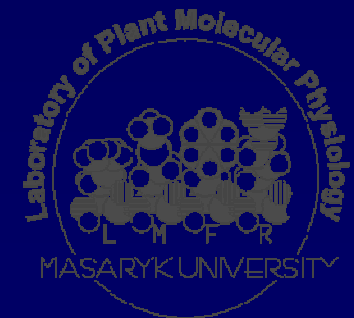


# Hybridizace s produkty iPCR na filtrech

## 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>



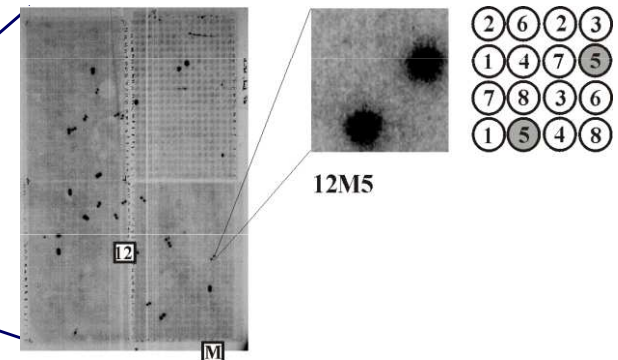
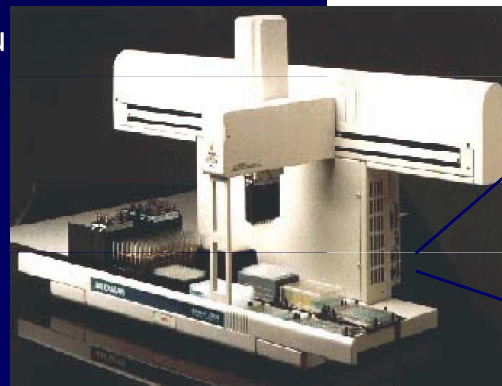
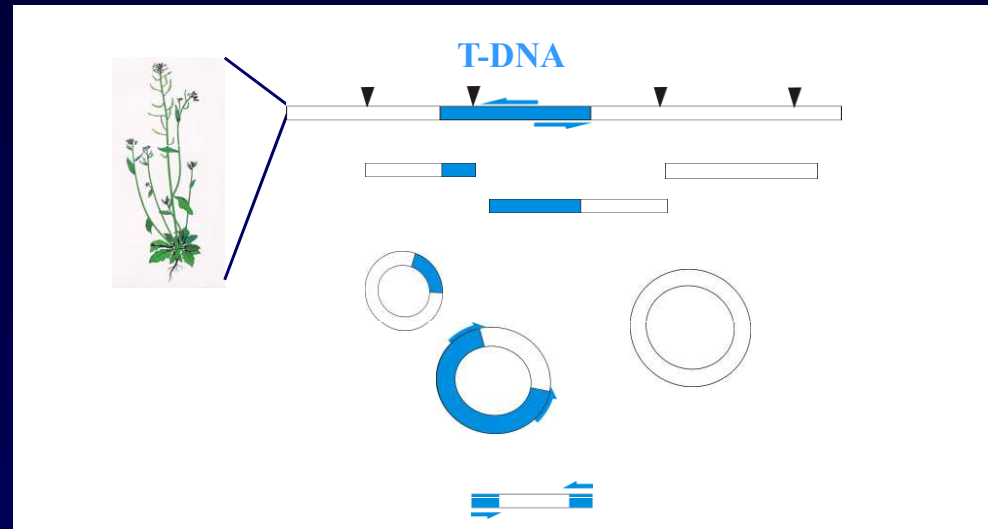


# Přístupy reverzní genetiky

## Identifikace 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



# Genomika III.

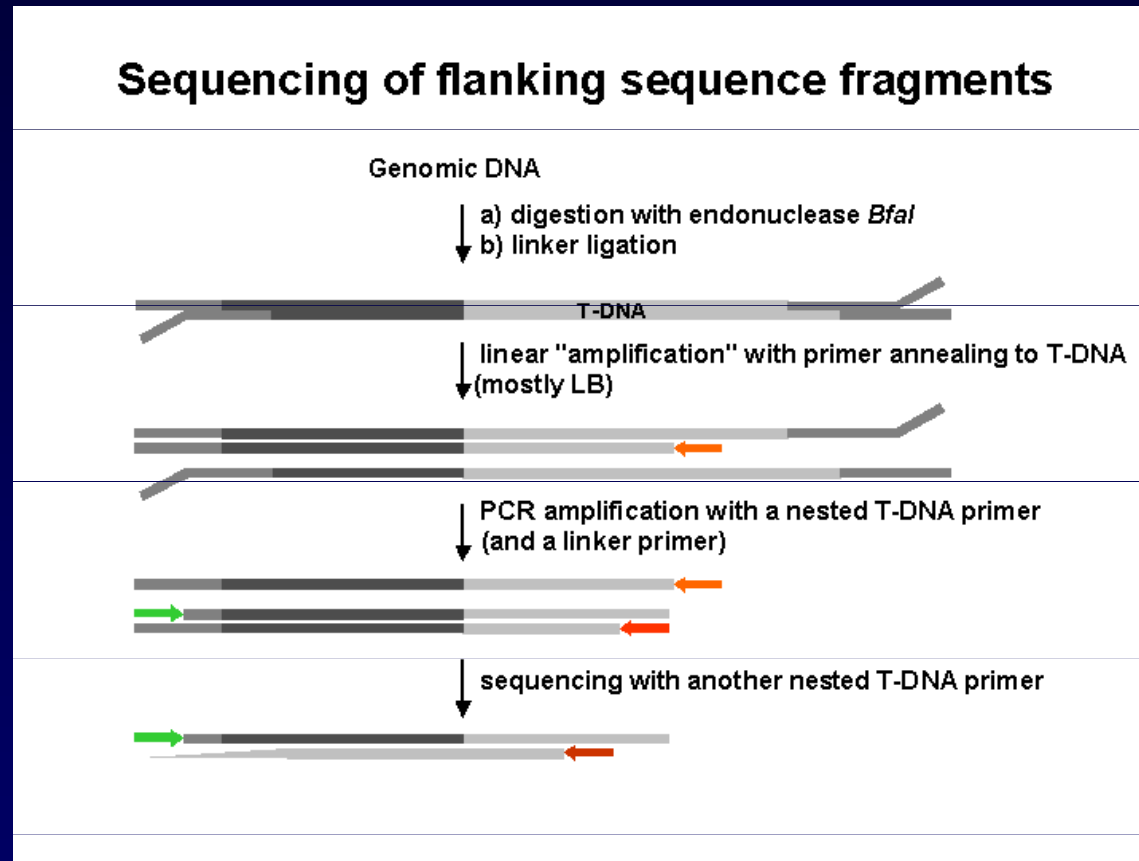
## Přístupy reverzní genetiky

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

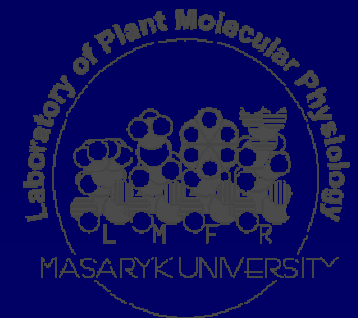


# Příprava FST knihoven z populace *A. thaliana* mutované pomocí T-DNA

## Sequencing of flanking sequence fragments



GABI-Kat (MPIZ, Köln)



# Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

## Results of Blast search against sequenced inserts

>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 attagagtttgattgaagtgtgttttatatattgatagtgaggacattacttataaaaaagc 1509  
|||||  
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcggttttatatattgatagtgaggacattacttataaaaaagc 400

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

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

Query: 1630 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatggaat 1689  
|||||  
Sbjct: 279 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatggaat 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 tacatctctctgctacaattaacgctatcaaatatatttataaaaaccatttgcatttcac 1982  
|||||  
Sbjct: 13 tacatctctctgctacgattgacggtatcaaatatatttataaaaaccgctcagacatttcac 72

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

# Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

```

>Insert_SAK.029311: Order_line_029311 | View in AOR
Length = 460
Score = 484 bits (244), Expect = e-135
Identities = 250/252 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1450 attagatttgattgaagtggttttatattgatagtgggacattacttataaaaagc 1509
Ebjct: 459 attagatttgattgaagcgcgttttatattgatagtgggacattacttataaaaagc 400

Query: 1510 acaaggatcaacaatagagacagtcacatgttatatcaataaagtgatgtctcaatg 1569
Ebjct: 399 acaaggatcaacaatagagacagtcacatgttatatcaataaagtgatgtctcaatg 340

Query: 1570 tttgtgttaggacatttggatgtgcaaaaacttattccatgttcaactcag 1629
Ebjct: 339 tttgtgttaggacatttggatgtgcaaaaacttattccatgttcaactcag 280

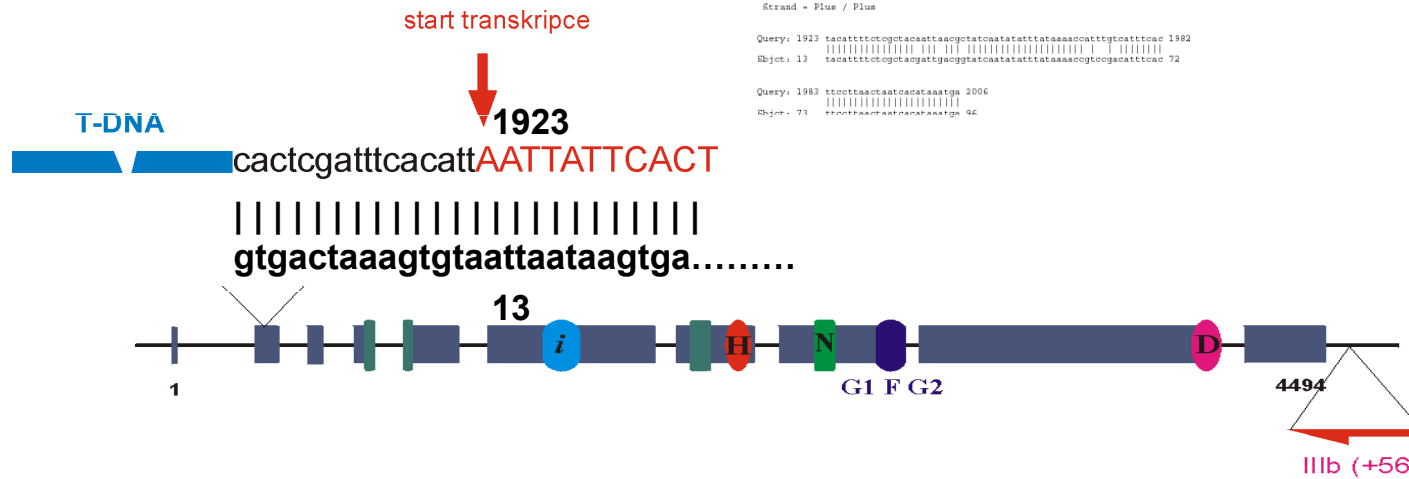
Query: 1630 attagcccacttaggagtgctagaaaaagattggactaaagctctgttgatcgaat 1689
Ebjct: 279 attagcccacttaggagtgctagaaaaagattggactaaagctctgttgatcgaat 220

Query: 1690 atgattccaaac 1701
Ebjct: 219 atgattccaaac 208

Score = 111 bits (56), Expect = 8e-23
Identities = 77/84 (93%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1923 tacattttcogctacaattaaogctatcaatattttataaaaacccttgcatttcaac 1982
Ebjct: 13 tacattttcogctacaattaaogctatcaatattttataaaaacccttgcatttcaac 72

Query: 1983 ttcttaactaaatcaataaagta 2006
Ebjct: 73 ttcttaactaaatcaataaagta 96
    
```



- Exon
- Intron
- Transmembránová oblast
- Duplikace
- En-1* element



# Genomika III.

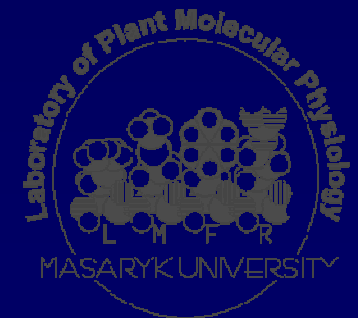
## Přístupy reverzní genetiky

- 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 ?

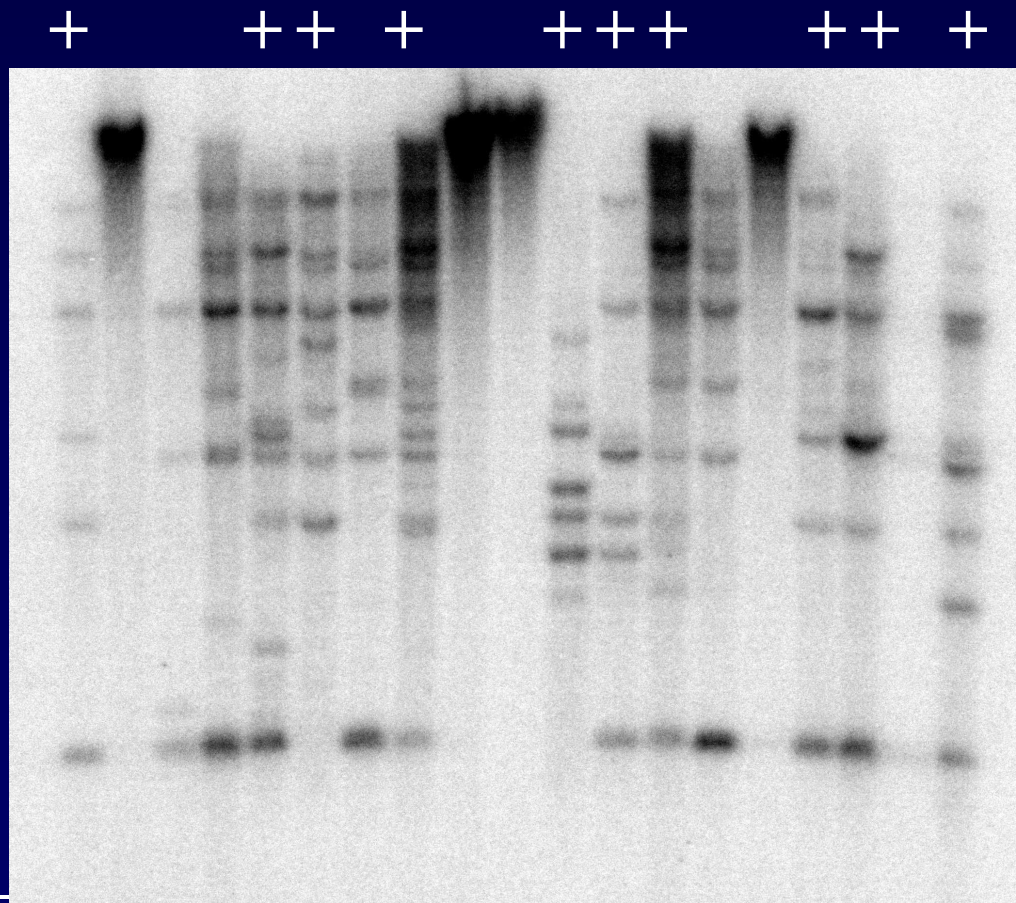
- přítomnost více inzercí v jedné linii
- možnost vzniku nezávislé bodové mutace
- s inzercí T-DNA jsou často asociovány chromozomové aberace a přestavby (duplikace, inverze, delece)



# Genomika II.

- Kosegregační analýza

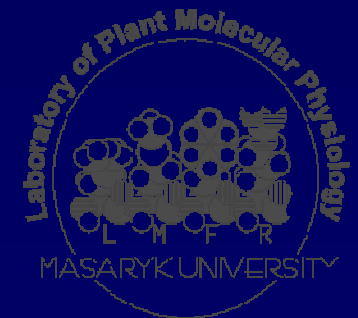
- kosegregace specifického fragmentu např. po inzerci T-DNA (nebo působení EMS atd.) do genomu s pozorovaným fenotypem





# Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

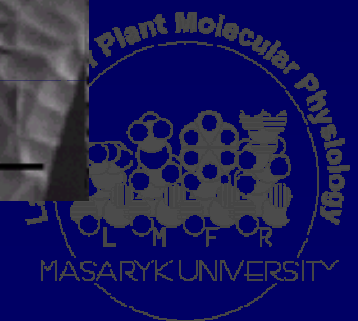
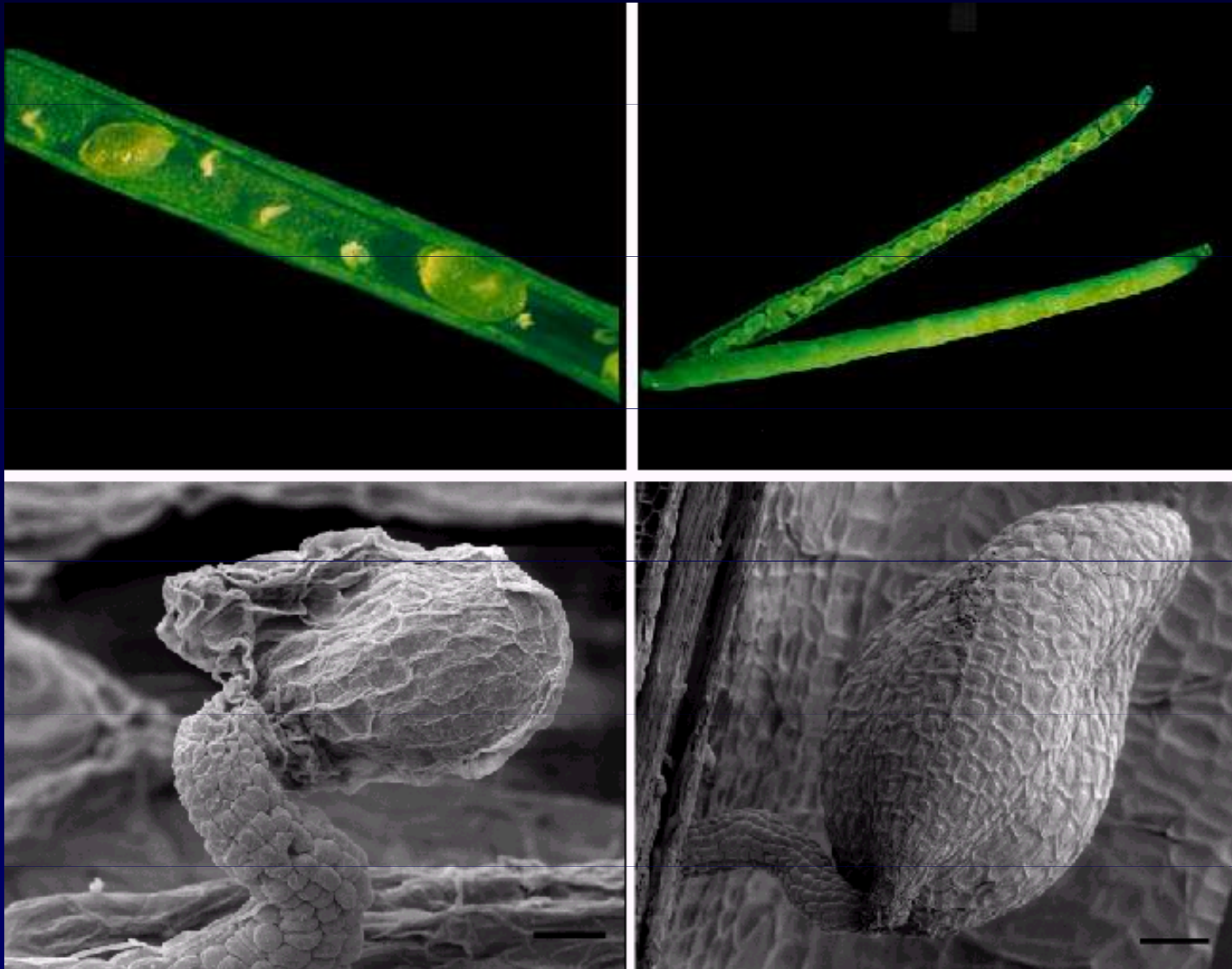
- transpozony se často vyznačují excizí a reinzercí do blízké oblasti-využití při izolaci nových mutantních alel
- excize transpozonů není vždy zcela přesná-vznik bodových mutací - izolace revertantních linií s tichou mutací i stabilních mutantů



# Fenotyp šesulí *cki1::En-1*

*cki1::En-1*

*En-1*



# Potvrzení fenotypu *cki1::En-1*

## 1. Izolace revertantních linií

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



### Analýza potomstva

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



# Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

*aattcaagtcgctCACTACAAGA "En-1" TCTTGTAGTGcgtggagact*

**A.** *aat tca agt **cgt 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 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 .

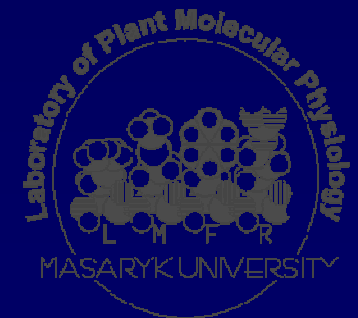
**D.** *aat tca agt cgc **ggt** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*  
 N S S R V E T T L G T L K P W I S .



# Potvrzení fenotypu *cki1::En-1*

## 2. Izolace stabilní mutantní linie

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



# Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

*aattcaagtcgctCACTACAAGA "En-1" TCTTGTAGTGcgtggagact*

**A.** *aat tca agt **cgt 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 **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 .

# Genomika III.

## Přístupy reverzní genetiky

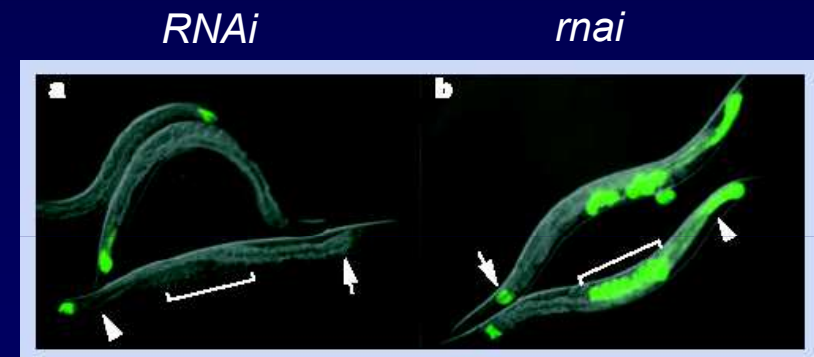
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
  - příprava sbírky mutantů
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
  - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
  - identifikace nezávislé inzerční alely
  - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
- Umlčování genů pomocí RNAi
  - mechanismus účinku RNAi



# Genomika III.

## mechanismus RNA interference

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





# Genomika II.

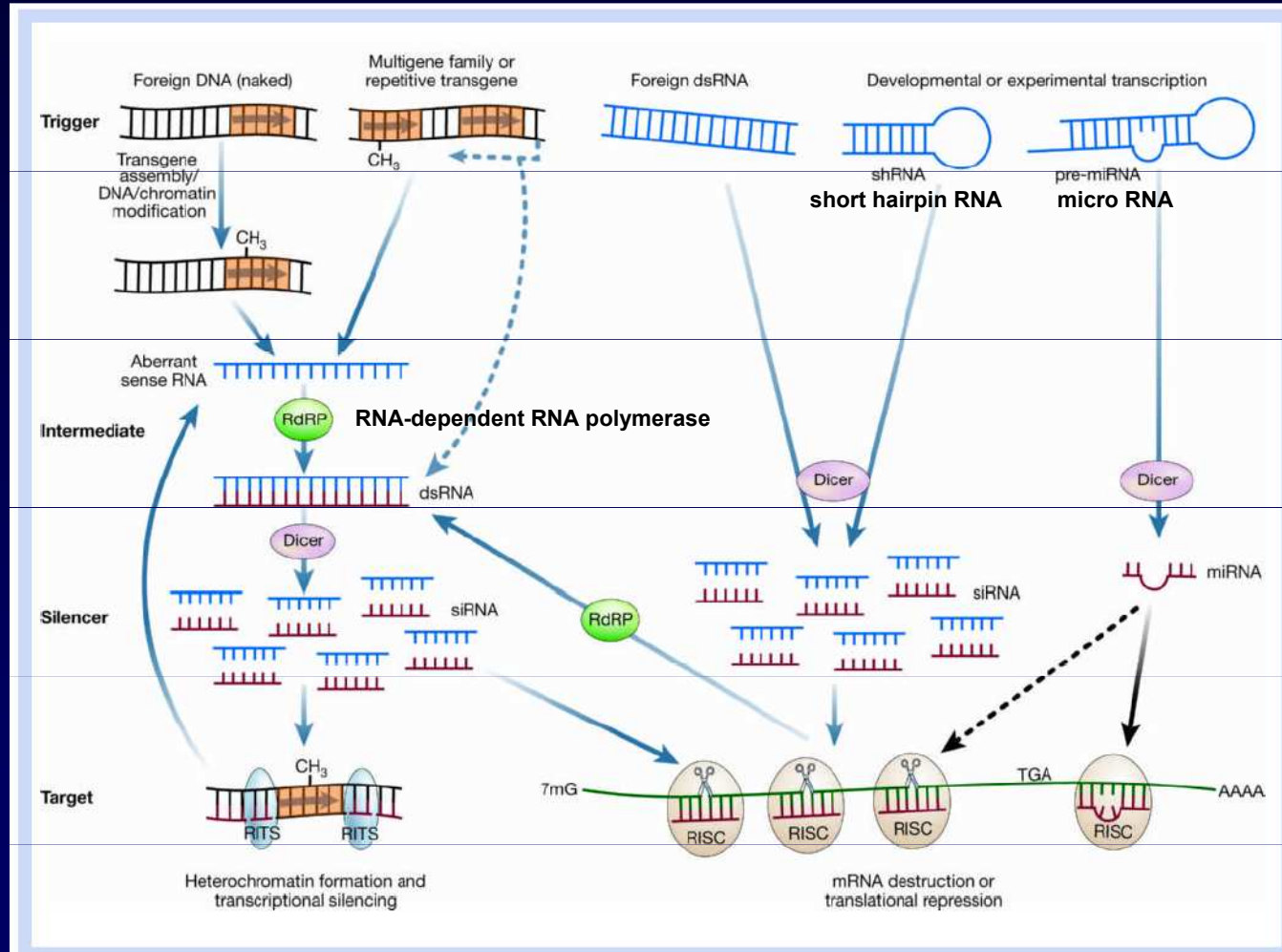
## mechanismus RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
  - RNAi objevena u *Caenorhabditis elegans*
  - 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)

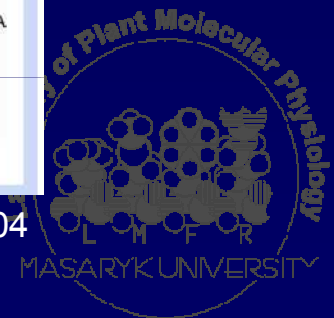


# Genomika II.

## mechanismus RNA interference



Mello, 2004



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"



**Andrew Z. Fire**

USA

Stanford University School of  
Medicine  
Stanford, CA, USA

b. 1959



**Craig C. Mello**

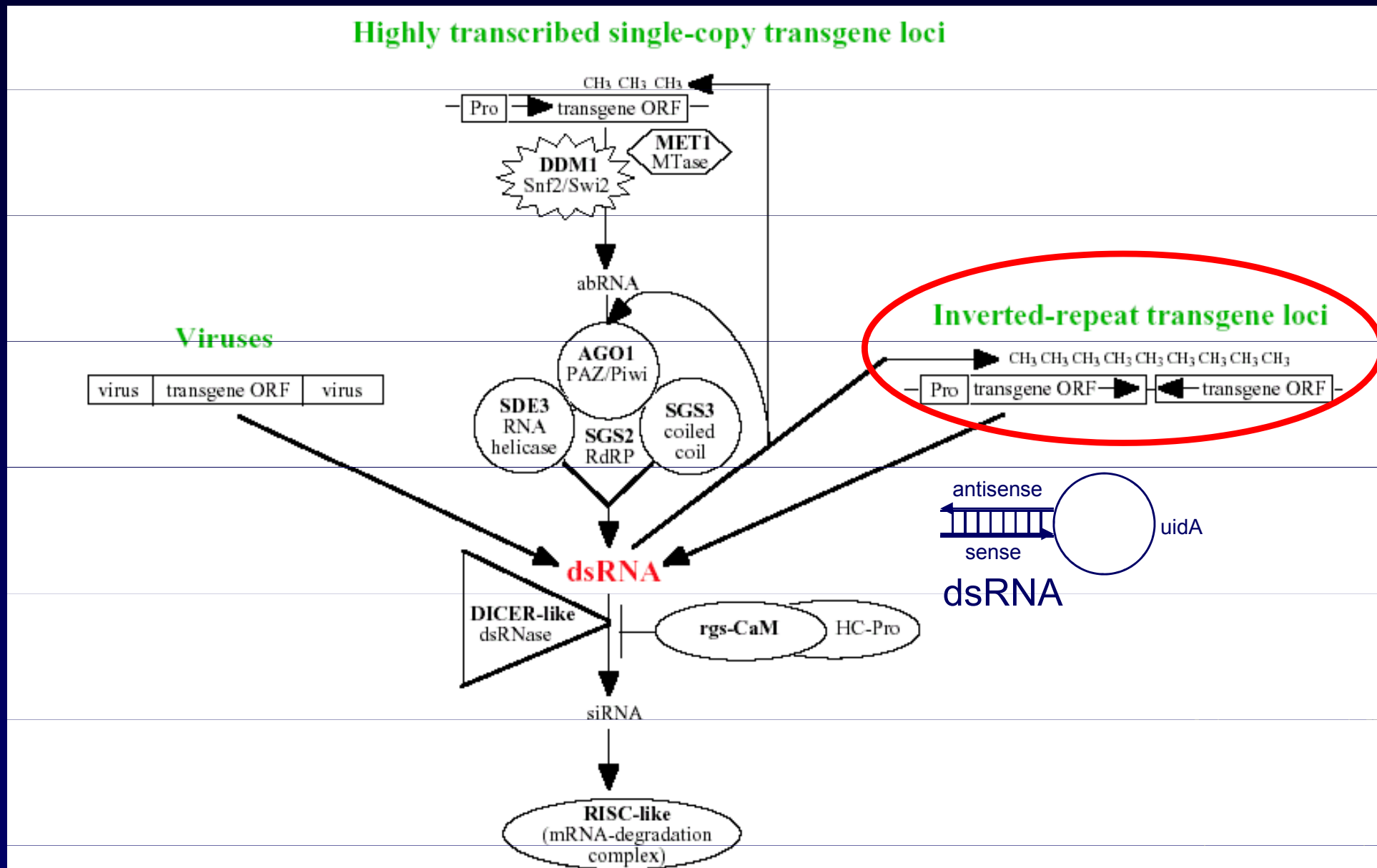
USA

University of Massachusetts  
Medical School  
Worcester, MA, USA

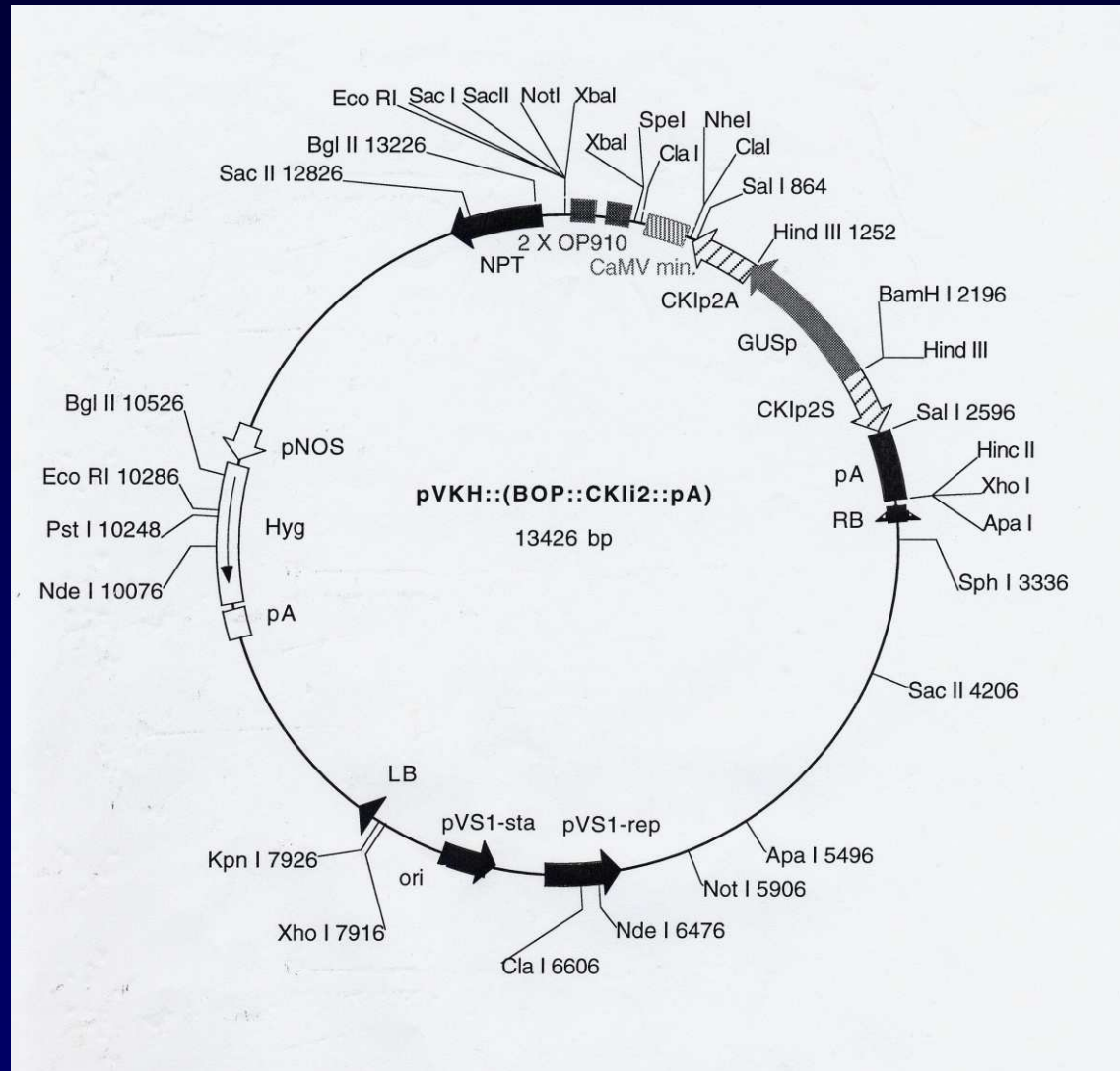
b. 1960



# Mechanismus posttranskripčního umlčování genů pomocí RNA interference (iRNA)



- 2. RNAi approach using regulated expression system



# Genomika III.-shrnutí

## Přístupy reverzní genetiky

- 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



# Genomika III.-diskuse

## Přístupy reverzní genetiky

