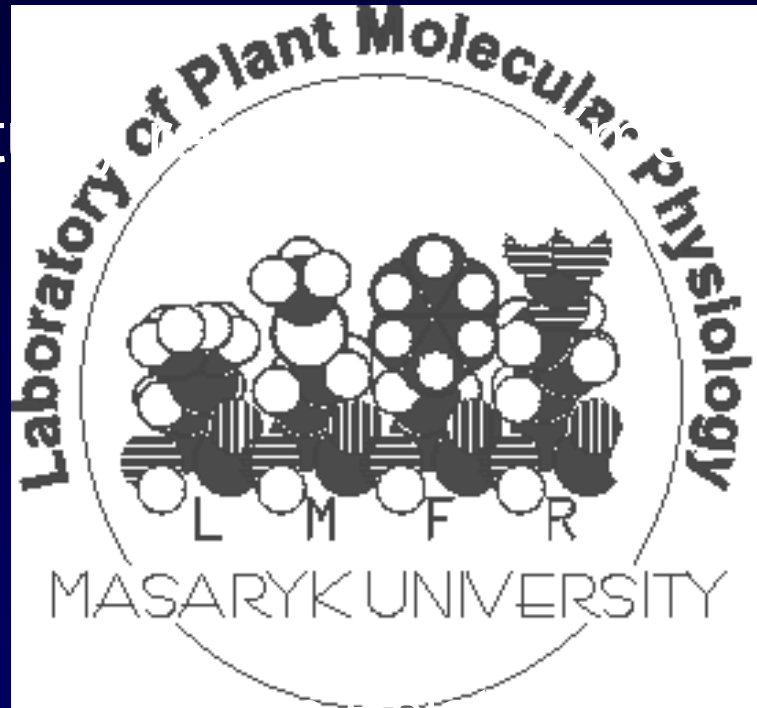


Základy genomiky

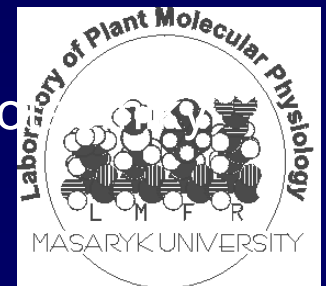
III. Příst

genetiky



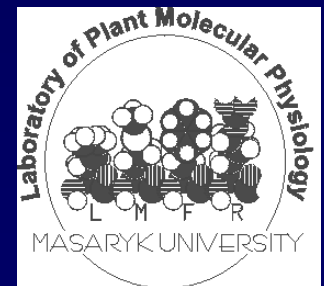
Jan Hejato

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

„Reverzně genetický“ přístup

T-DNA ←

1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA

2. IDENTIFIKACE FENOTYPU
3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

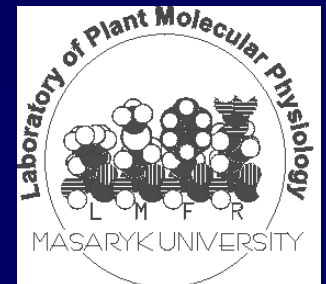
h x n



Genomika III.

Přístupy reverzní genetiky

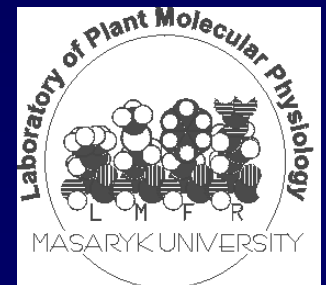
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
 - kosegregační 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

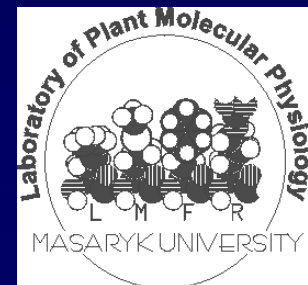
- Stabilní elementy

- **neautonomní transpozony (*dSpm*)**

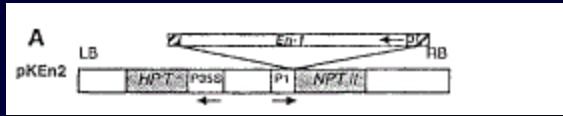
- mutant *En/Spm* transpozonu, který mutací v genu pro transponázu ztratil autonomii
 - může být aktivován křížením s linií nesoucí *En/Spm* transpozon

- **T-DNA**

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

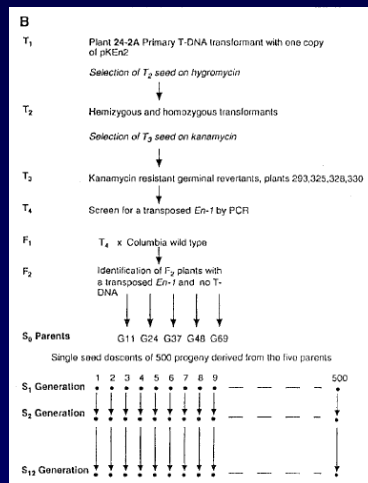


Vytváření knihoven inzerčních mutantů

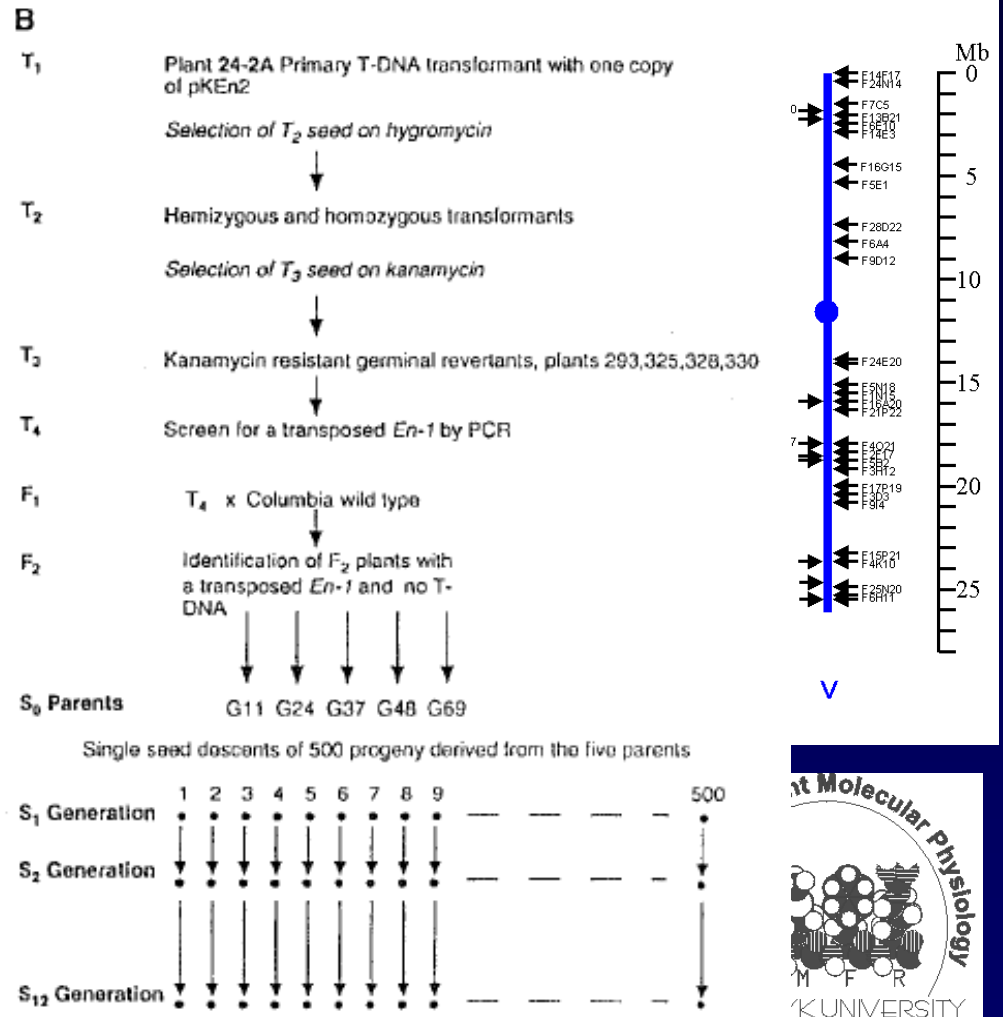


příprava transgenních rostlin

vytvoření populace mutantních jedinců



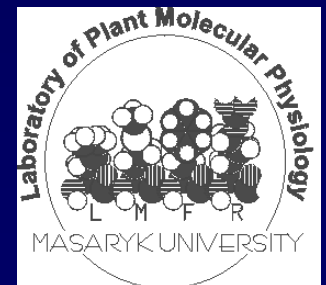
vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



Genomika III.

Přístupy reverzní genetiky

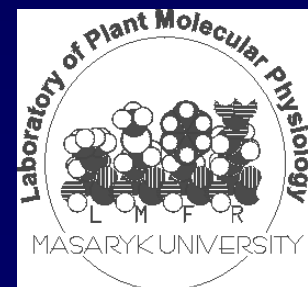
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů
 - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - hybridizace s produkty iPCR na filtrech



„Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR

1. Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

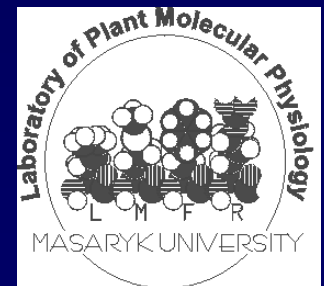
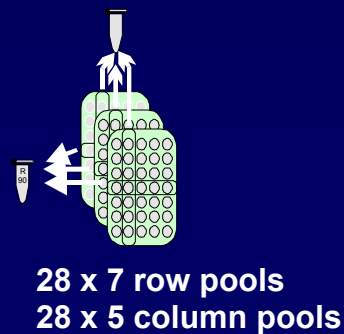
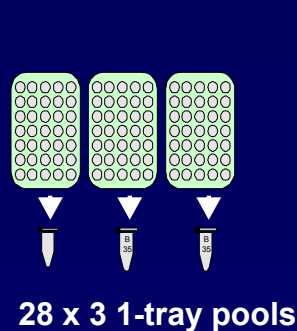
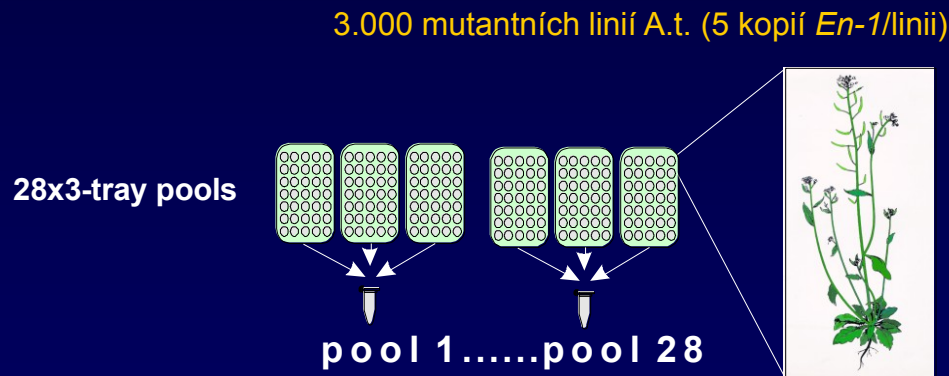
- autonomní *En/Spm*, bez selekce
- 3000 nezávislých linií
- průměrně 5 kopií na linii
- trojrozměrné vyhledávání pomocí PCR



Genomika III.

Přístupy reverzní genetiky

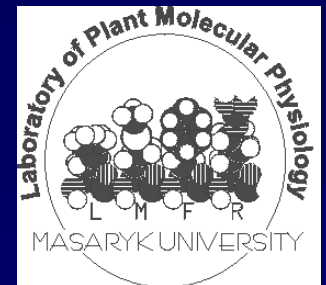
- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)



Genomika III.

Přístupy reverzní genetiky

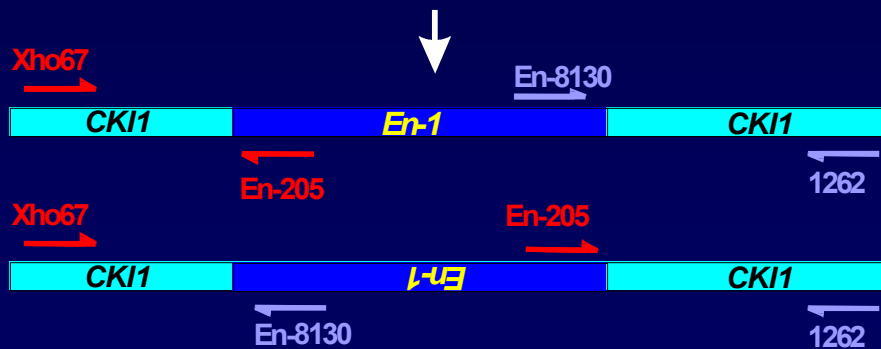
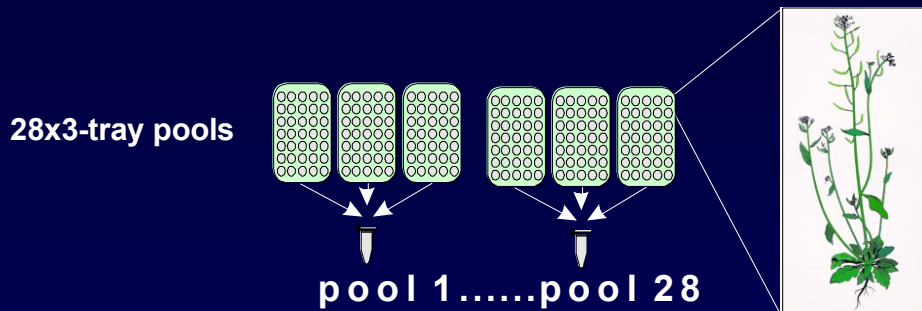
- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
 - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou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



„Třírozměrné“ vyhledávání v knihovně inzerčních mutantů pomocí PCR

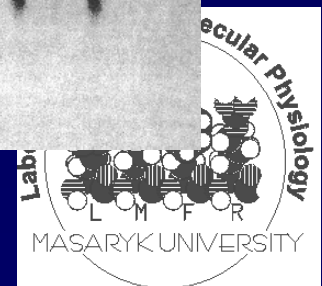
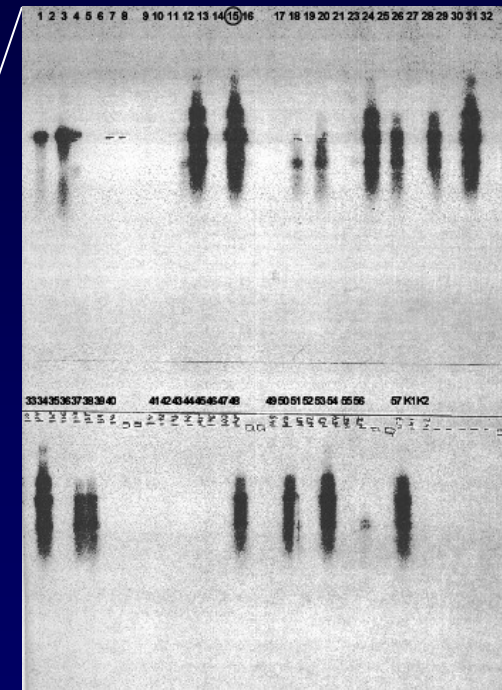
1. Vyhledávání pozitivní trojice

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



(2x2x28=112 PCR reakcí)

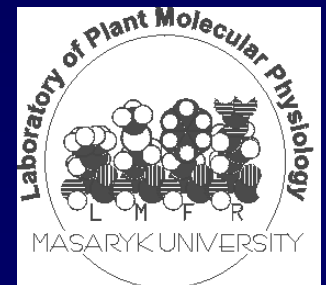
Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou



Genomika III.

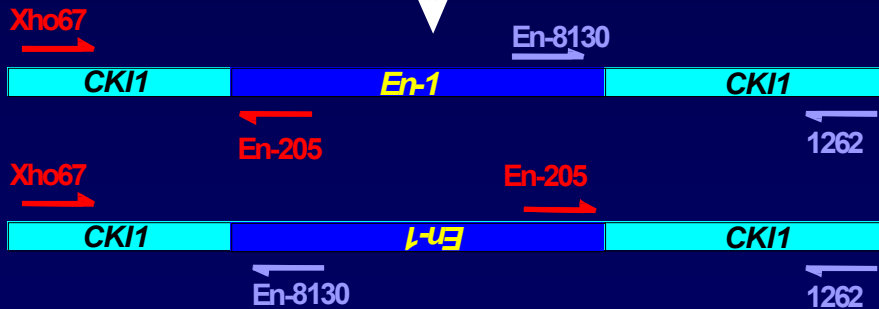
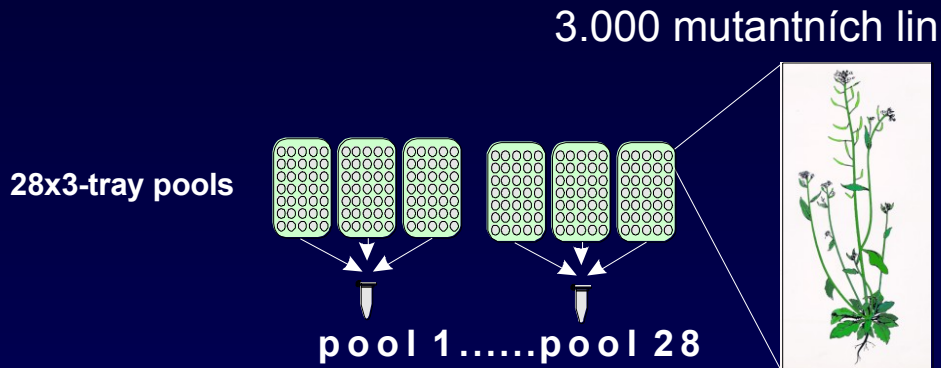
Přístupy reverzní genetiky

- „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

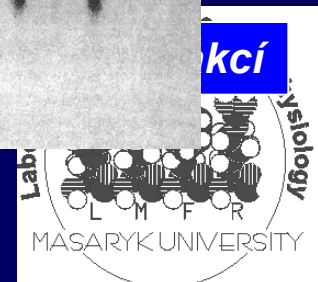
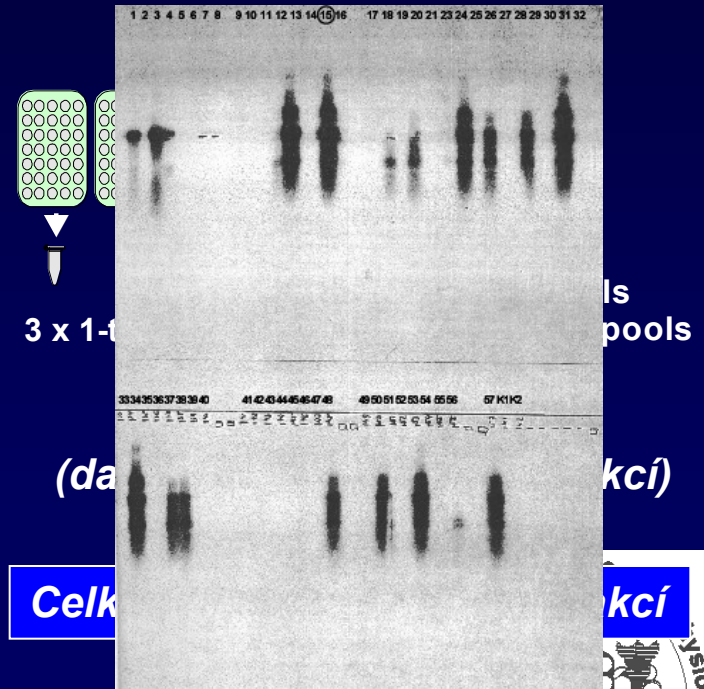
1. Vyhledávání pozitivní trojice



(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

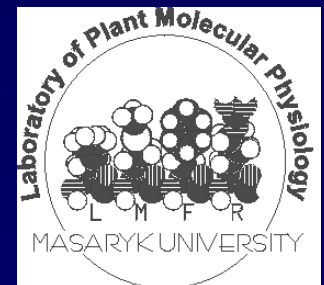
2. Identifikace linie nesoucí inzerci



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

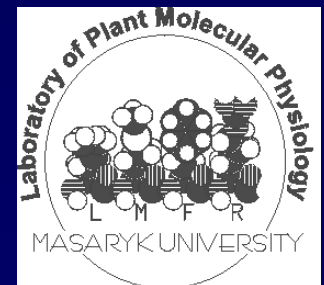


Hybridizace s produkty iPCR na filtrech

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>

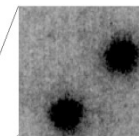
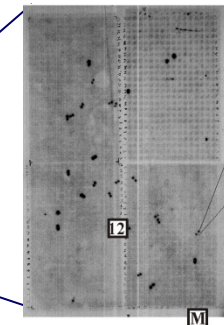
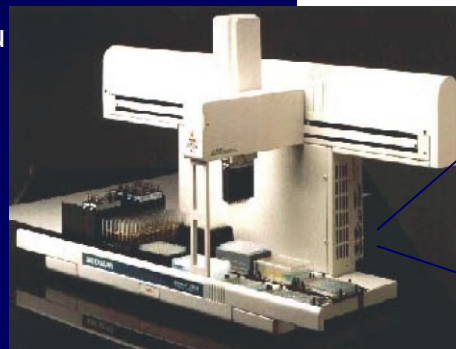
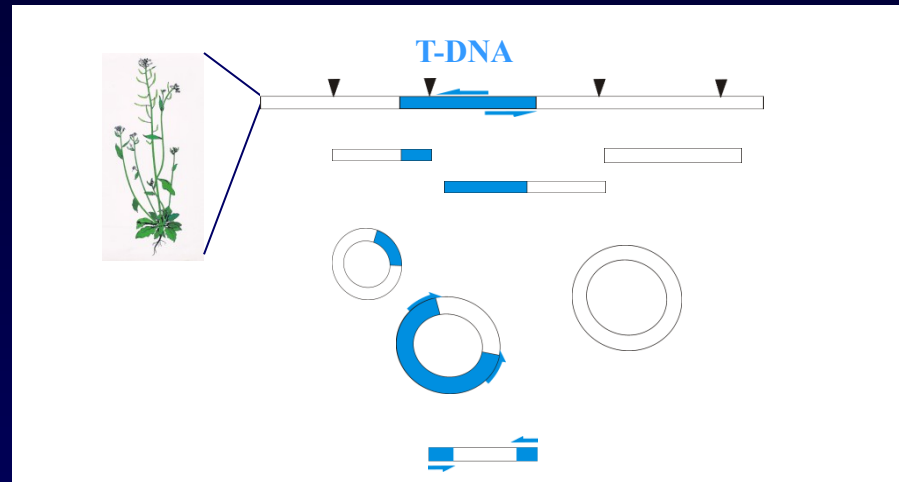


Přístupy reverzní genetiky

Identifikace sekvenčně specifických mutantů

Hybridizace s produkty iPCR na filtrech

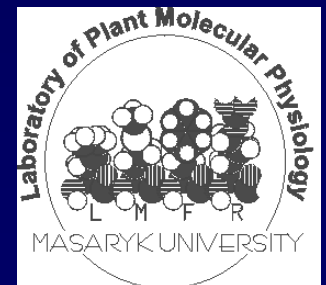
- izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace
- štěpení restriční endonukleázou
- ligace, vznik cirkulární DNA
- inverzní PCR (iPCR) pomocí T-DNA specifických primerů
- příprava nylonových filtrů s produkty iPCR v přesně daném vzorci (poloze) pomocí robota
- hybridizace s genově specifickou sondou



Genomika III.

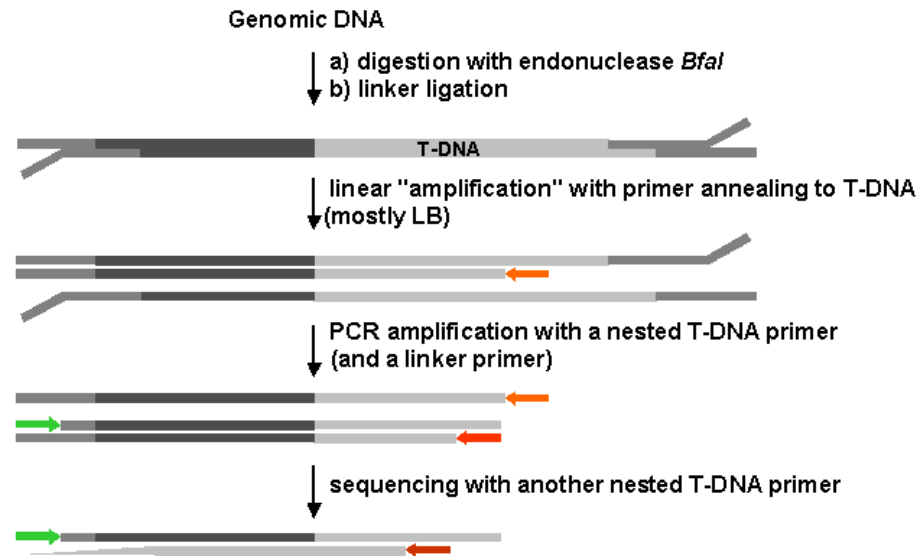
Přístupy reverzní genetiky

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

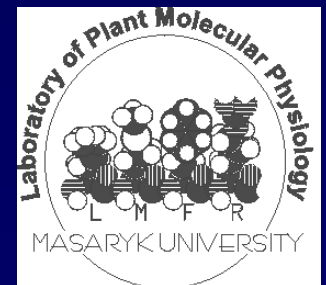


Příprava FST knihoven z populace *A. thaliana* mutované pomocí T-DNA

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 AGP](#)
Length = 460

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

Query: 1450 attagagtttgattgaagtggttttatattgatagtgggacattactataaaaaagc 1509
|||||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcgcttttatattgatagtgggacattactataaaaaagc 400

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

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

Query: 1630 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 1689
|||||
Sbjct: 279 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 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 tacattttctogctacaattaacgctatcaatatatttataaaaccatttgcatttcac 1982
|||||
Sbjct: 13 tacattttctogctacgattgacgggatcaatatatttataaaaccgctcgcacatttcac 72

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

Vyhledávání v elektronických knihovnách inserčních mutantů

```

>Insert_EALK:029311; Order_line_029311 | View in ABL
Length = 460

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

Query: 1450 attagagttgattggaagtgtctttatattgatagtggaacattactataaaaagc 1109
Sbjct: 459 attagagttgattggaagtgtctttatattgatagtggaacattactataaaaagc 400

Query: 1510 acaggatanaaacatagapacagtcacatgtatatacactaagtggatggcctcaatg 1169
Sbjct: 399 acaggatanaaacatagapacagtcacatgtatatacactaagtggatggcctcaatg 340

Query: 1570 tgttgcttgaggacatttggagtatgtcaaaaactatttcaactggtcaactcatag 1429
Sbjct: 339 tgttgcttgaggacatttggagtatgtcaaaaactatttcaactggtcaactcatag 280

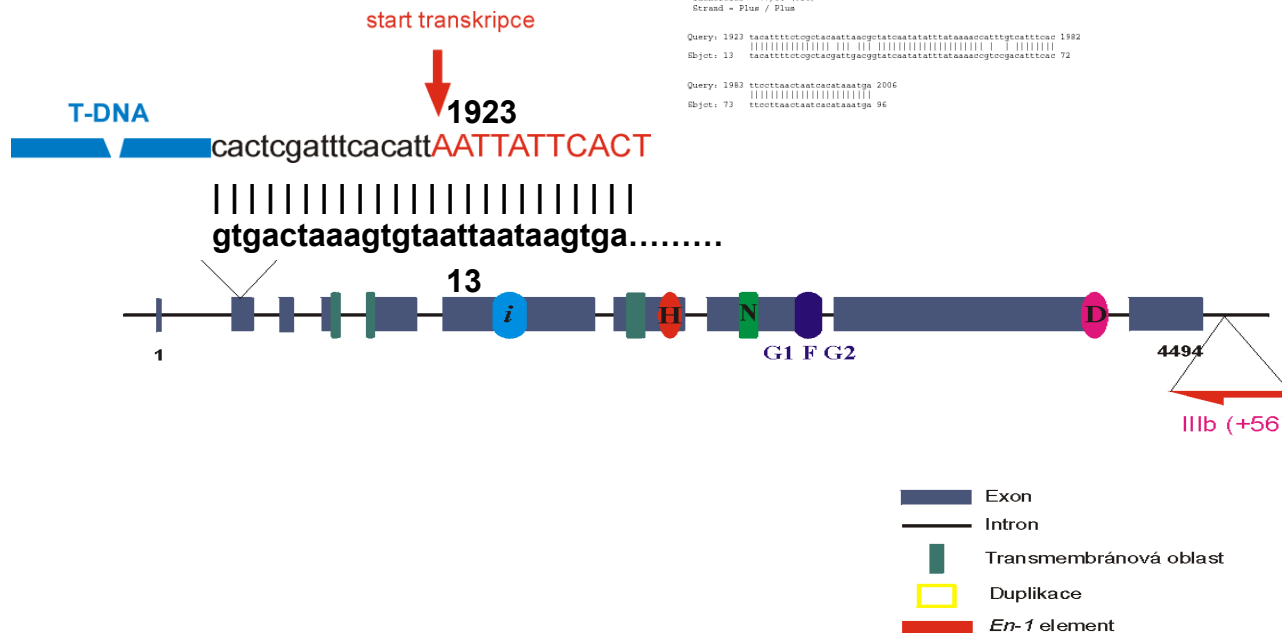
Query: 1630 attagcccacttggaggtgtctagaaaaagattggactaaagtcttggctggcaat 1489
Sbjct: 279 attagcccacttggaggtgtctagaaaaagattggactaaagtcttggctggcaat 220

Query: 1690 atgattccaaac 1701
Sbjct: 219 atgattccaaac 208

Score = 111 bits (56), Expect = 8e-23
Identities = 77/84 (91%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1923 taacatttcctggtacattaaagctatcaatattattataaaaacattgtcattcaac 1982
Sbjct: 13 taacatttcctggtacattaaagctatcaatattattataaaaacattgtcattcaac 72

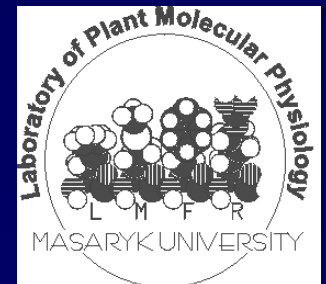
Query: 1983 ttccctaactaaacacataatg 2006
Sbjct: 73 ttccctaactaaacacataatg 96
    
```



Genomika III.

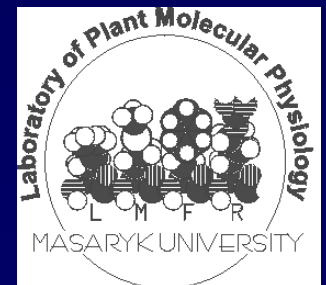
Přístupy reverzní genetiky

- 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 ?

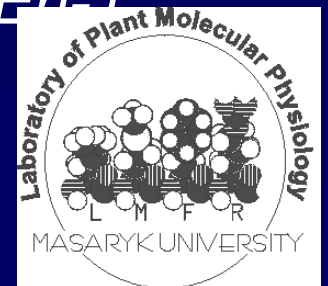
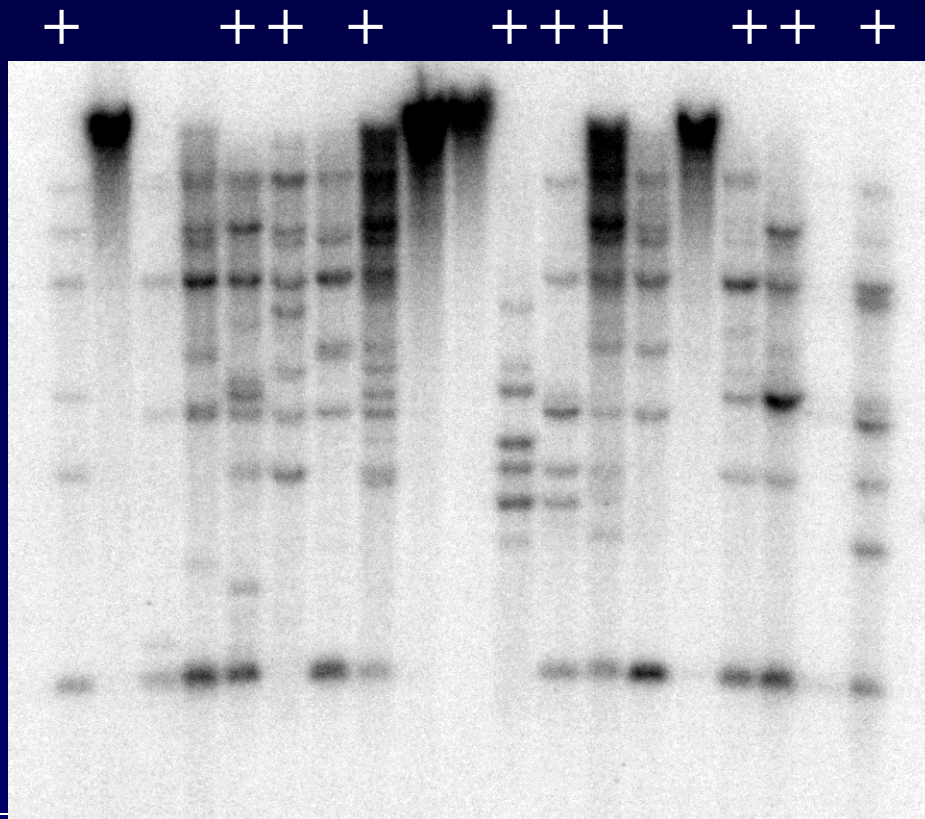
- přítomnost více inzercí v jedné linii
- možnost vzniku nezávislé bodové mutace
- s inzercí T-DNA jsou často asociovány chromozomové aberace a přestavby (duplikace, inverze, delece)



Genomika III.

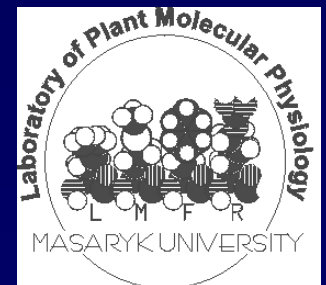
- Kosegregační analýza

- 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

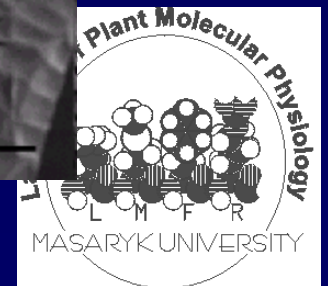
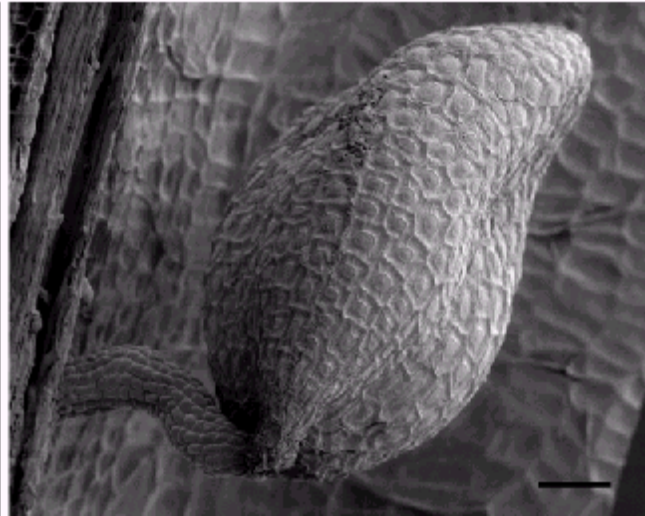
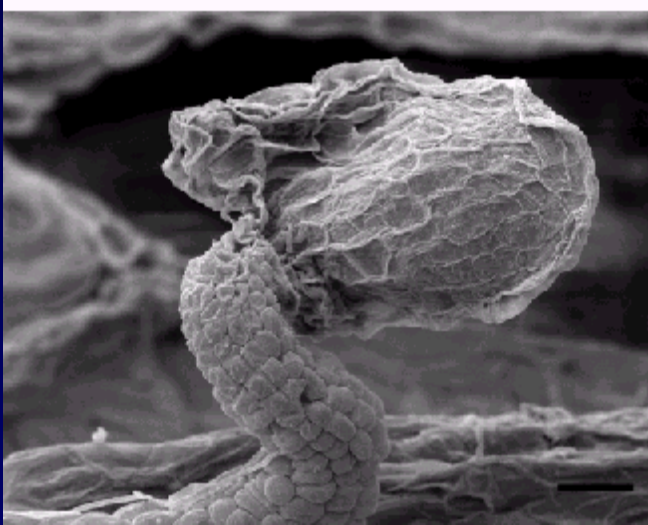


Fenotyp šešulí *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1



CKI1/CKI1



Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

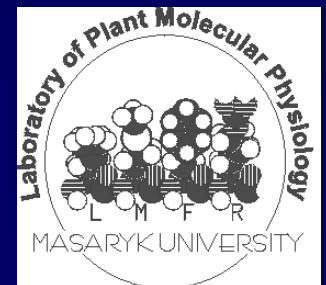
1. Izolace revertantních linií

- 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



Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



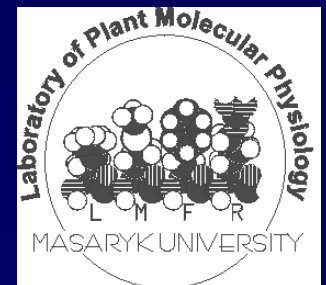
*aattcaagtcg*CACTACAAGA " **En-1** TCTTGAGT*gcgtggagact*

- A. *aat tca agt **cg**t 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 **gg**t **ac**g 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 **ac**g 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 **gt**g 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/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
- sekvencování

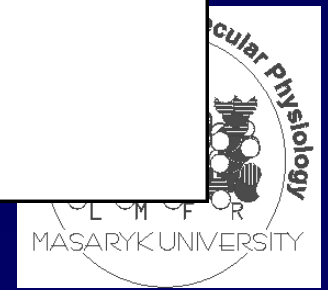


Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



aattcaagtcgctCACTACAAGA " **En-1** TCTTGAGTGcgtggagact

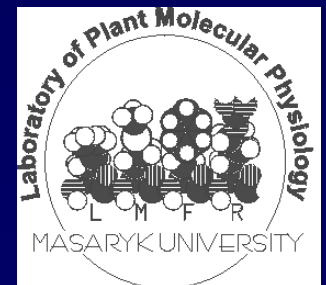
- A. aat tca agt **cg**t gga gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G
- B. aat tca agt **gg**t **ac**g act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G
- C. aat tca agt **cg**t **ac**g gag act aca ctt ggt 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 **gt**g 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

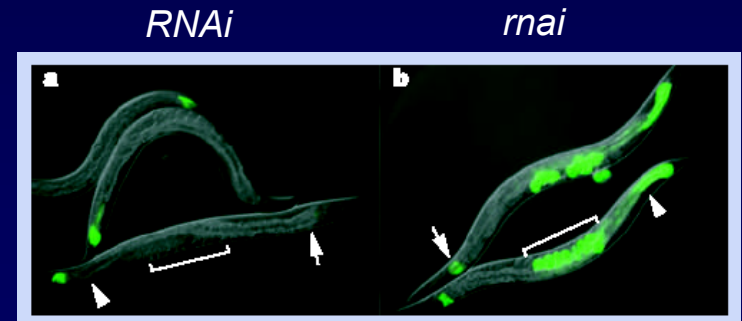
- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
- Analýza fenotypu a potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
 - identifikace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



Genomika III.

mechanismus RNA interference

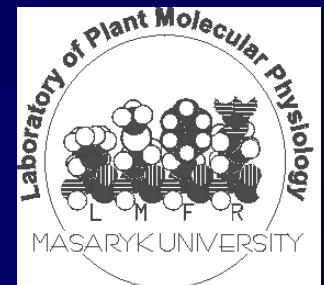
- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
 - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
 - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravd'. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
 - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji
 - dsRNA indukce je závislá na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



Genomika III.

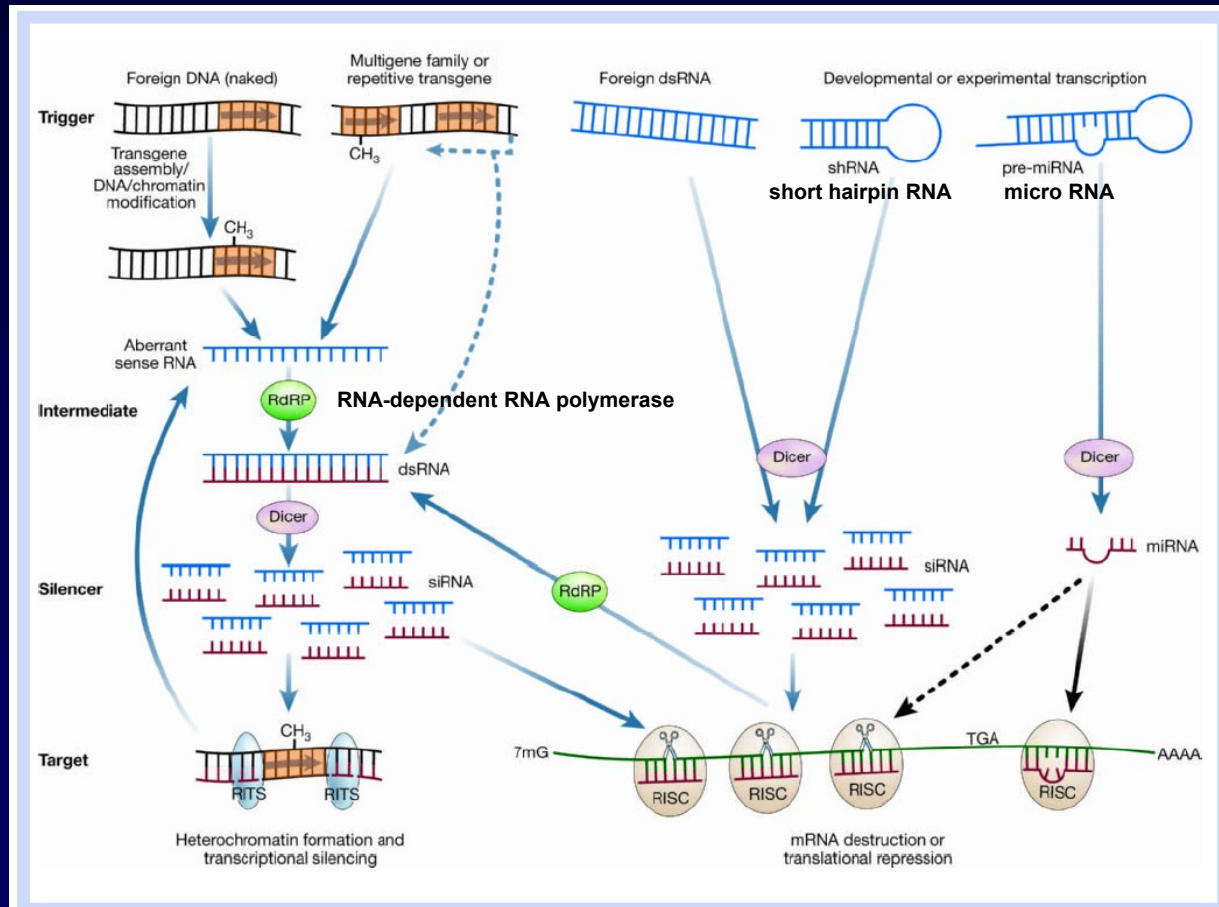
mechanismus RNA interference

- 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)

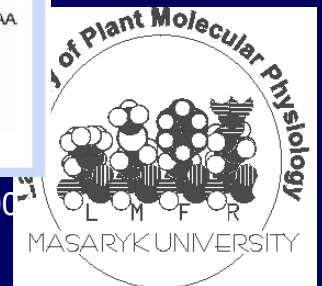


Genomika III.

mechanismus RNA interference



Mello, 2001



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

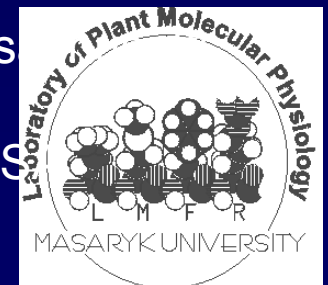


Craig C. Mello

USA

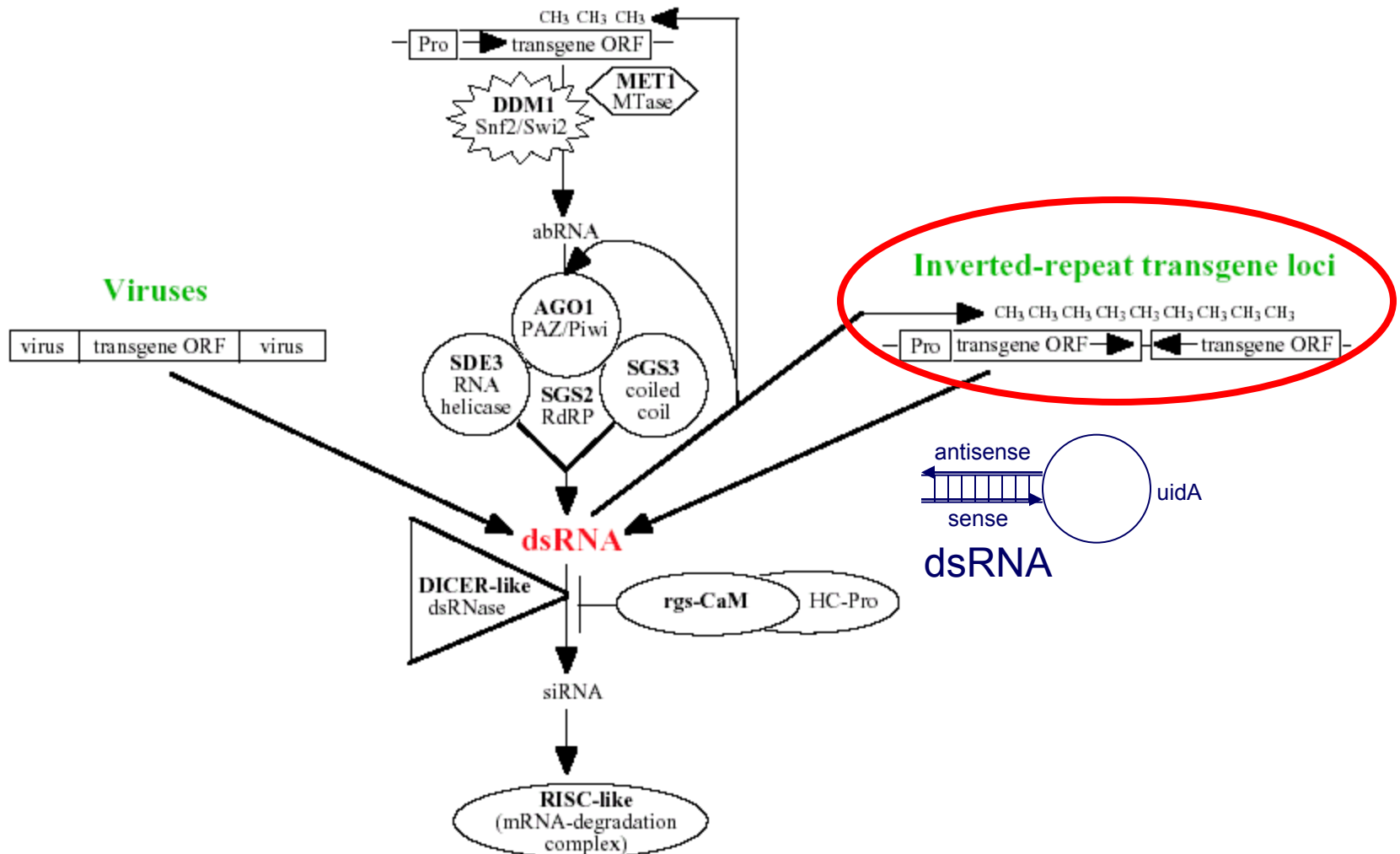
University of Mass
Medical School
Worcester, MA, US

b. 1960

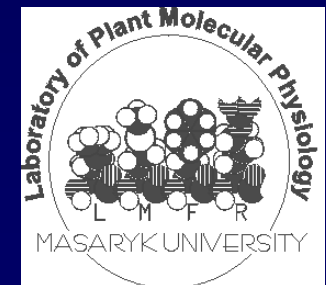
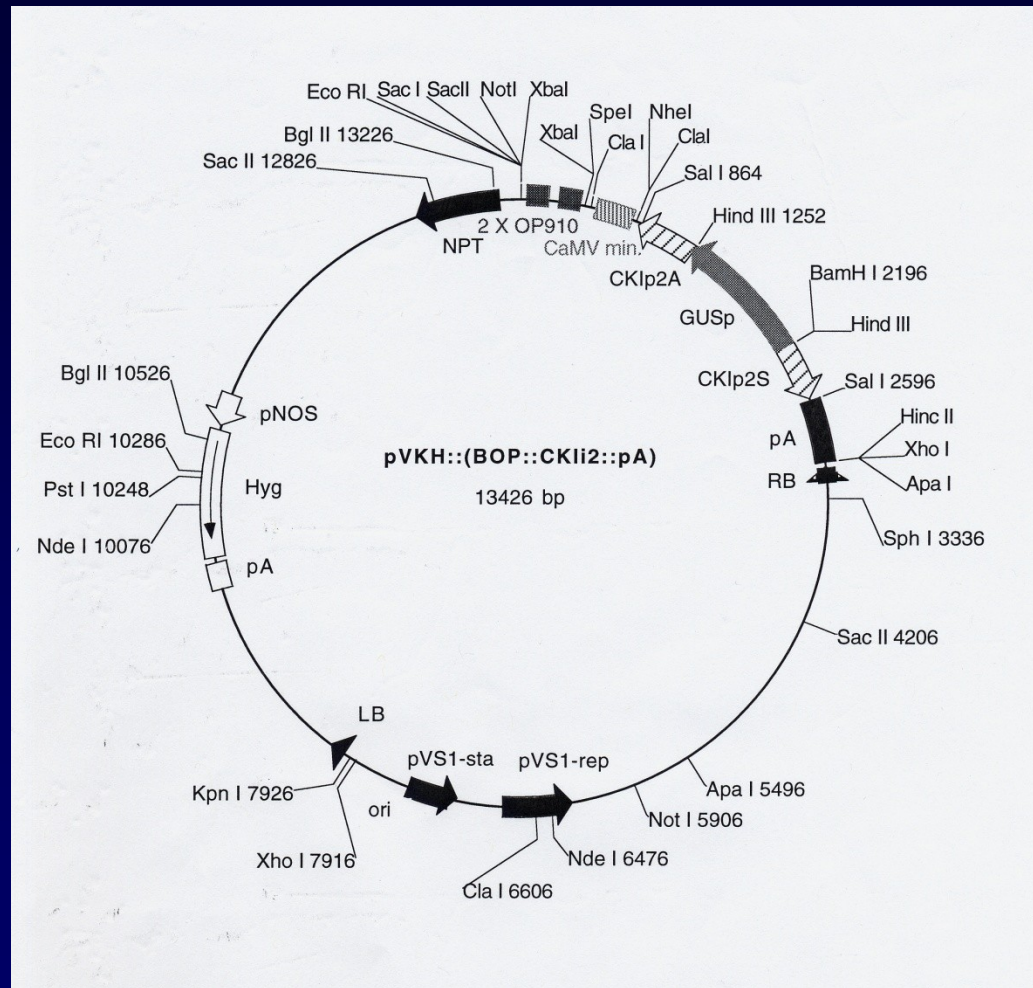


Mechanismus posttranskripčního umlčování genů pomocí RNA interference (iRNA)

Highly transcribed single-copy transgene loci



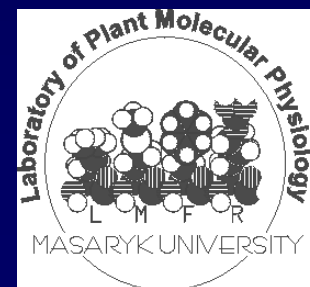
- 2. RNAi approach using regulated expression system



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

