

CG020 Genomika

Bi7201 Základy genomiky

Přednáška 3

Reverzní genetika

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifiity

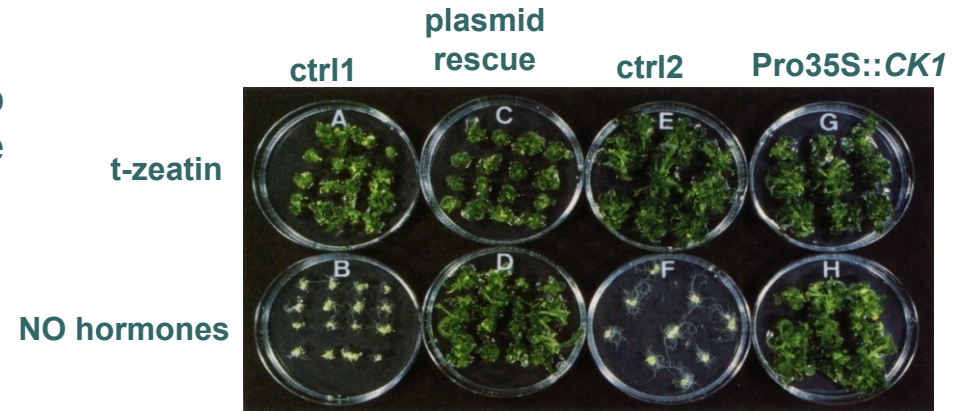
Přímá a reverzní genetika - shrnutí

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

Cloning of CKI1

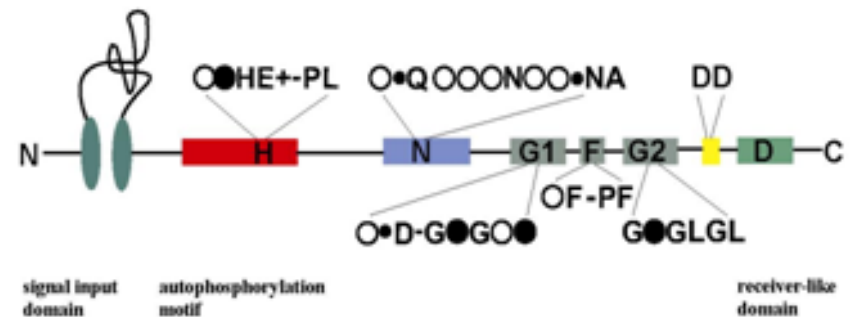
- CKI1 was identified via activation mutagenesis in *Arabidopsis*

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



Kakimoto, *Science* (1996)

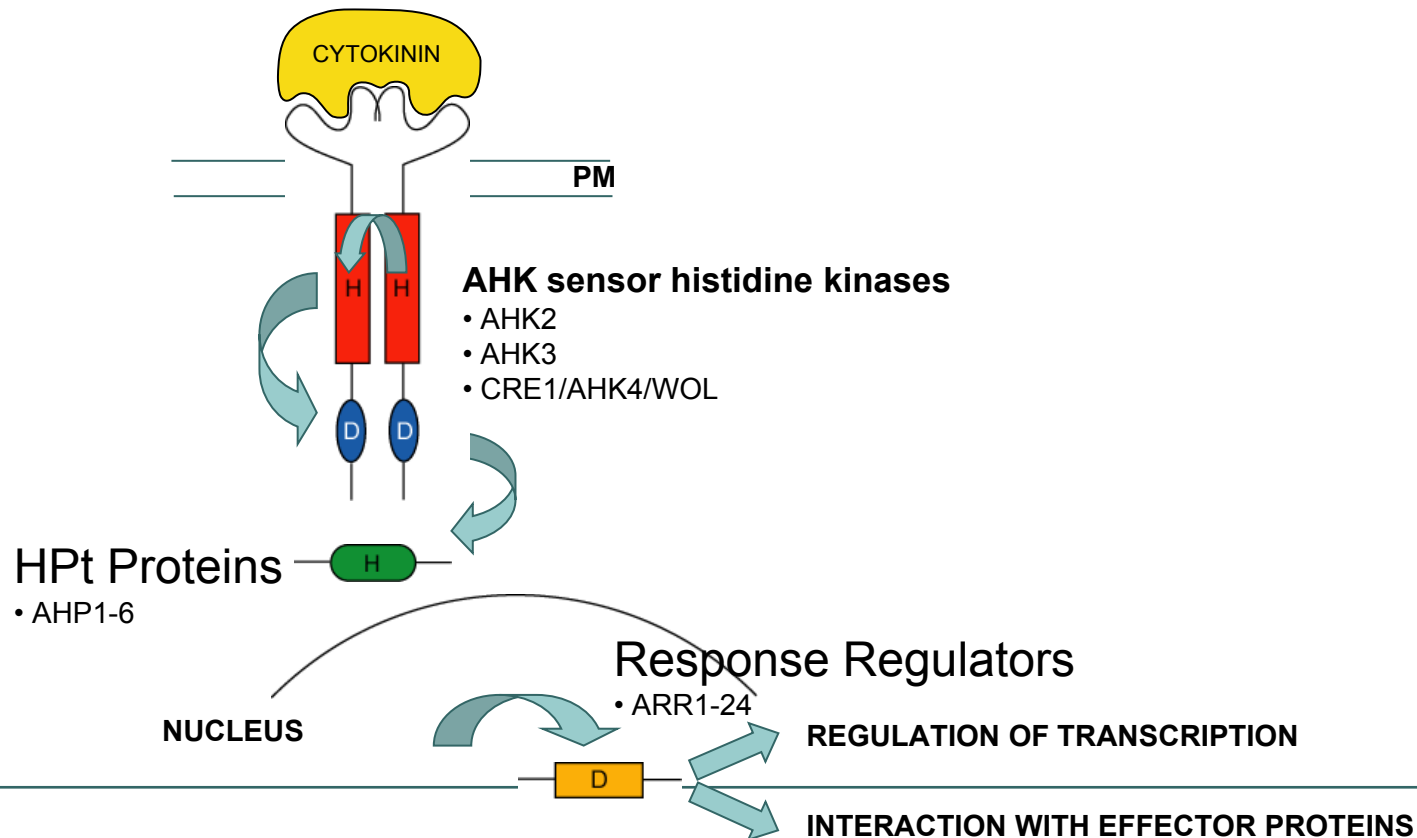
- CKI1* encodes a protein with similarity to bacterial histidine kinases



- non-polar amino acids
- polar amino acids (a.a.)
- + basic a.a.
- acidic or amidic a.a.
- positions with less than 50% conservation

Signal Transduction via MSP

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





Přímá a reverzní genetika

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

Identification of insertional *cki1* mutant allele



aattcaagtcgctCACTACAAGA " **En-1** TCTTGTAGTGCgtggagact

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

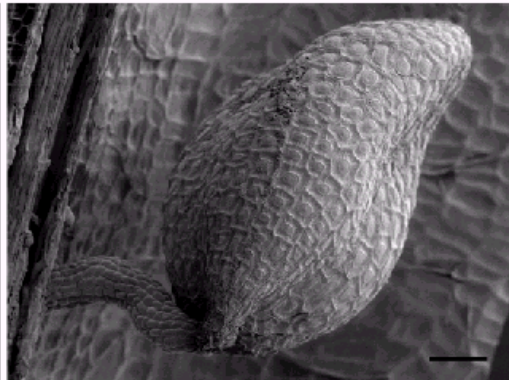
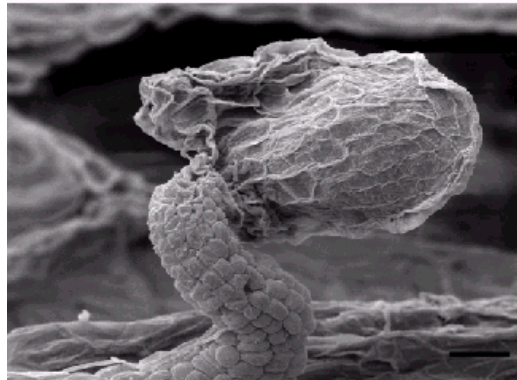
CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

- CKI1 is necessary for proper megagametogenesis in *Arabidopsis*

CKI1/cki1-i



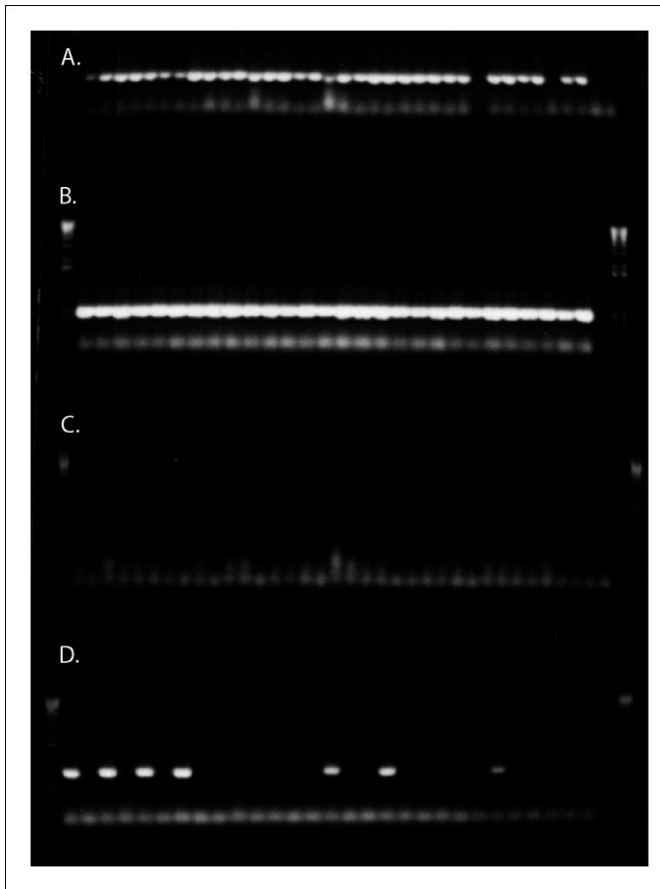
CKI1/CKI1



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

CKI1 and megagametogenesis

- *cki1-i* is not transmitted through the female gametophyte



A. wt x *CKI1/cki1-i*



CKI1 specific primers (PCR positive control)

B. *CKI1/cki1-i* x wt

C. wt x *CKI1/cki1-i*

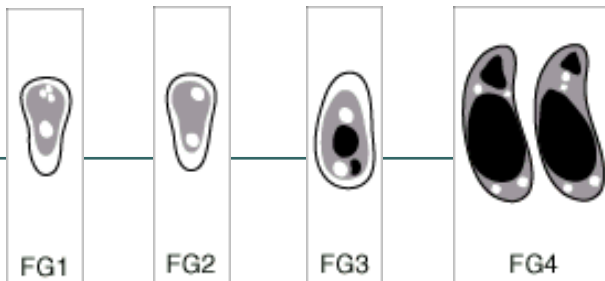
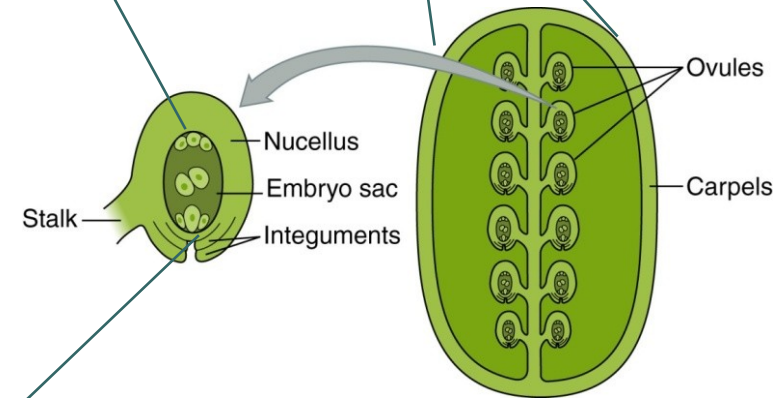
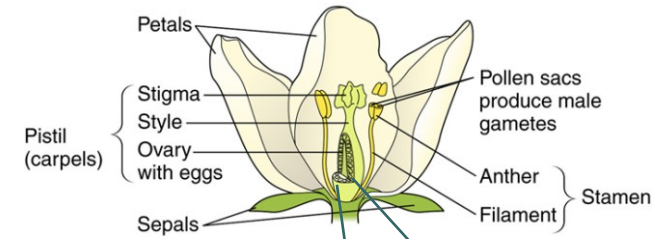
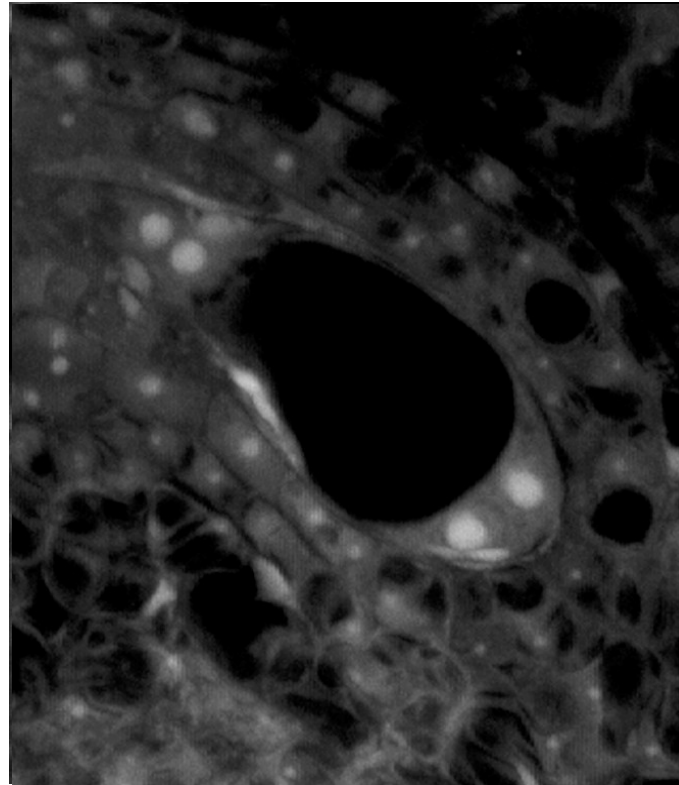


cki1-i specific primers

D. *CKI1/cki1-i* x wt

CKI1 and megagametogenesis

FG 4



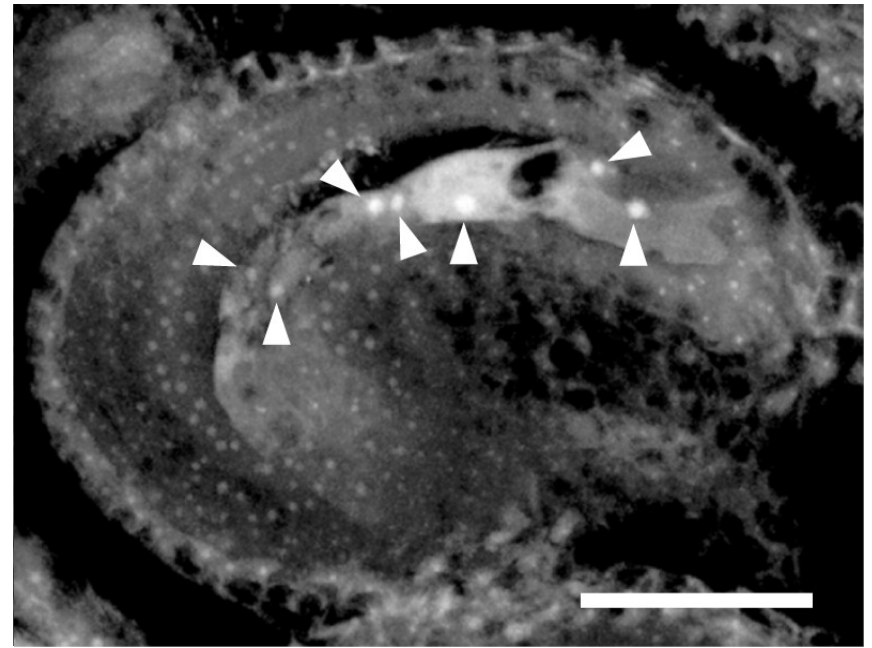
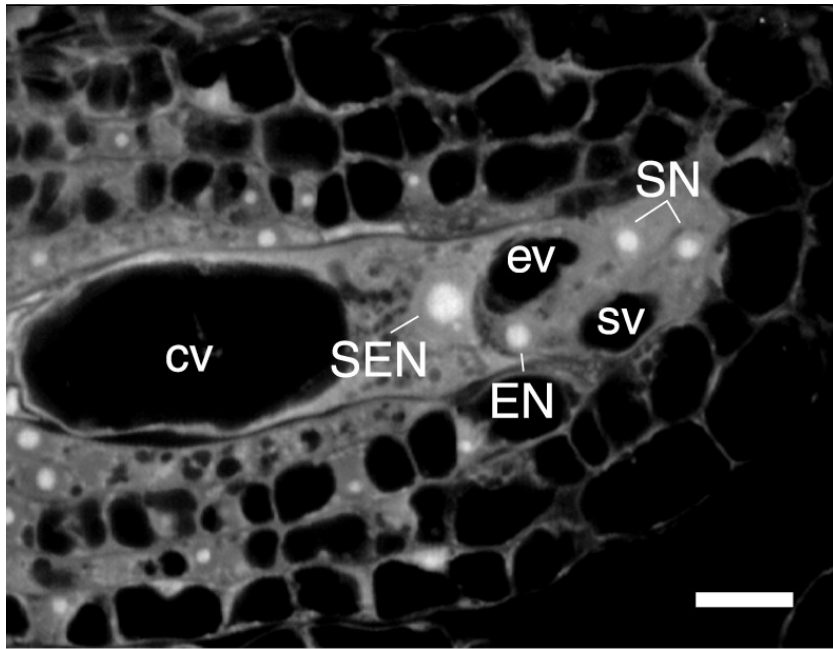
CKI1 and megagametogenesis

CKI1

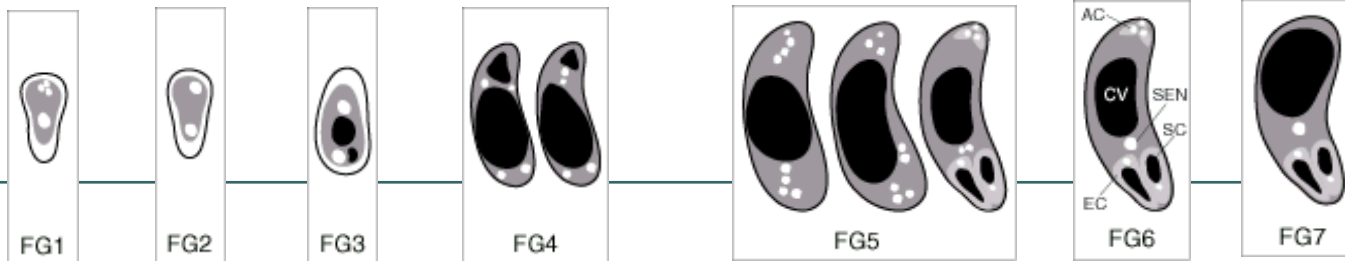
FG4 to FG5

cki1-i

28 HAE



Hejatko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)

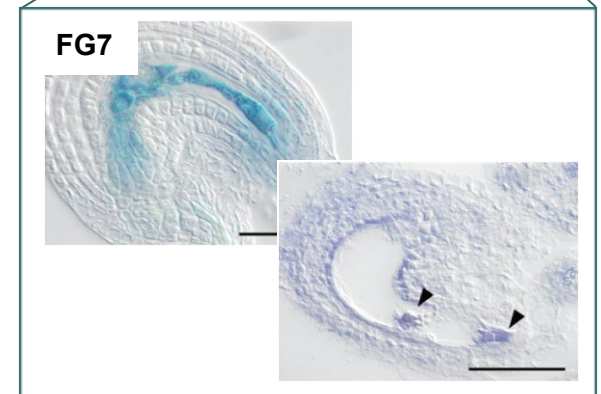
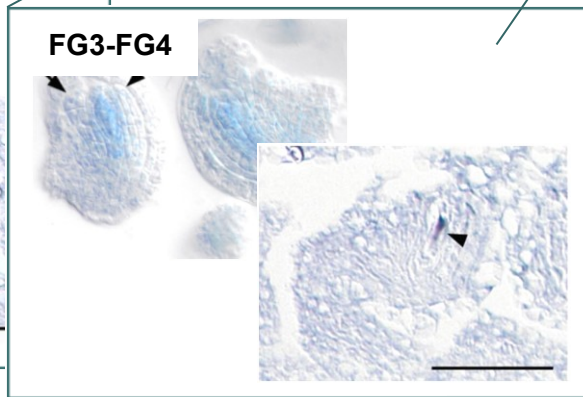
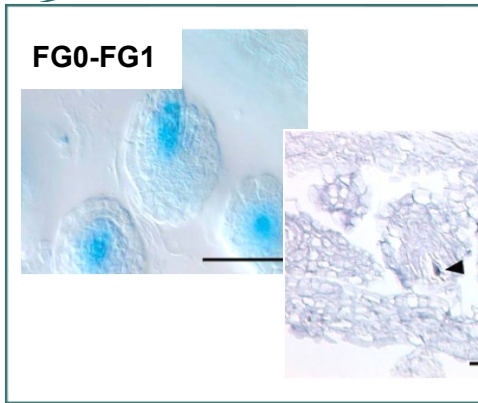
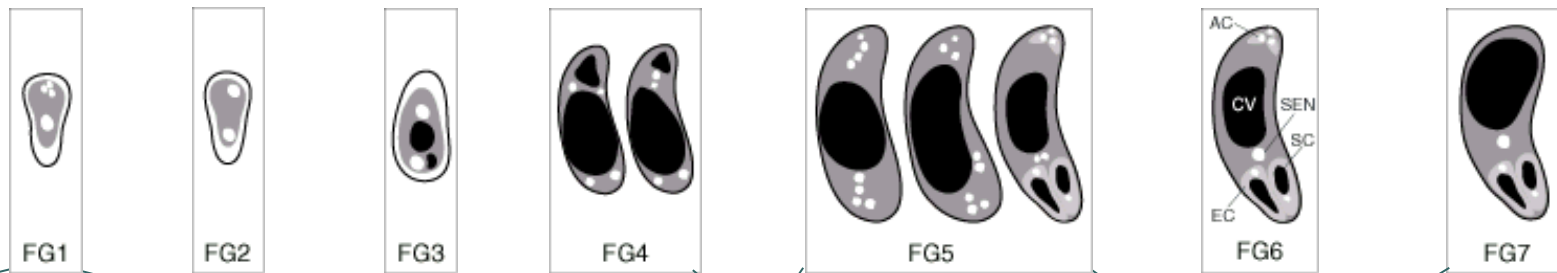




Přímá a reverzní genetika

- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace inzerčního mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifity
-

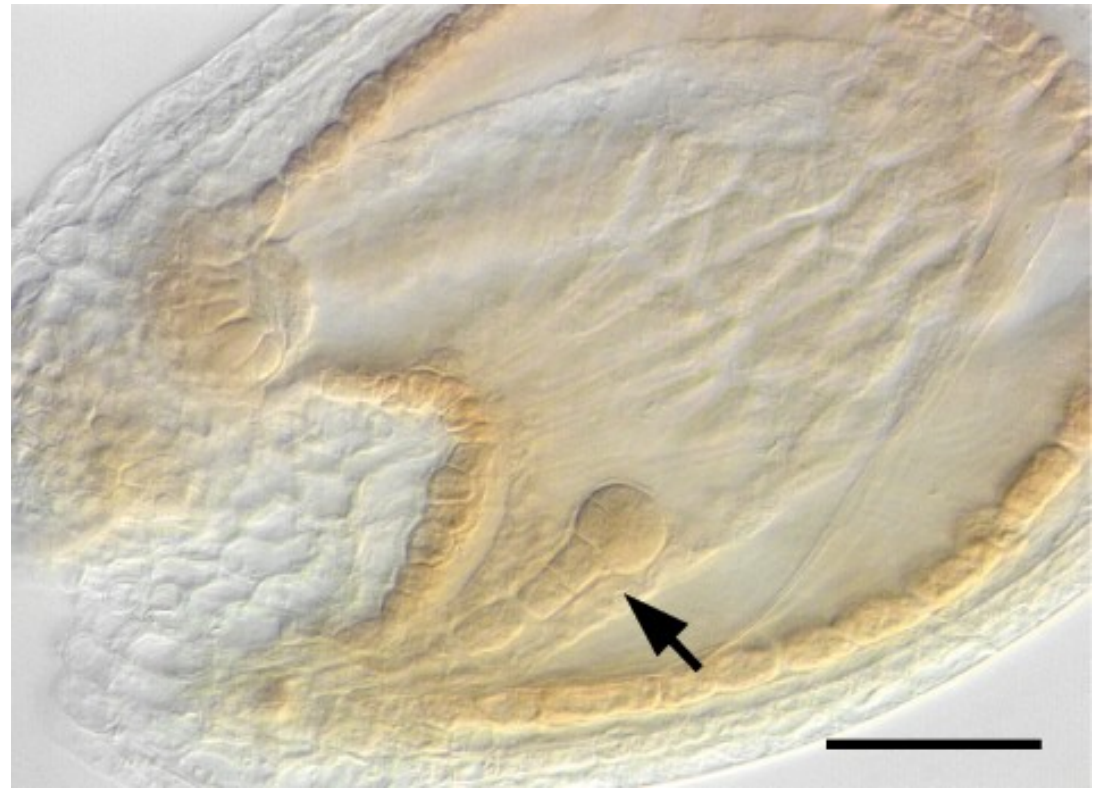
CKI1 is Expressed Throughout Megagametogenesis



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

wt x Pro*CKI1*:*GUS*

22 HAP
(hours
after
pollination)



Genomika 03

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

Přístupy „klasické“ genetiky versus „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice

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

← (retro)transposons




h x n

Osnova

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

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
- 

Typy inzerčních mutagenů

- Mobilní elementy

- **Autonomní transpozony (*En-1*)**

- obsahují gen pro transponázu, umožňující excizi a opětovné začlenění do genomu
 - na obou koncích obsahují krátké obrácené repetice, které jsou transponázou rozpoznávány

- Stabilní elementy

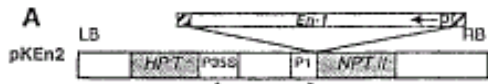
- **Neautonomní transpozony (*dSpm*)**

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

- **T-DNA**

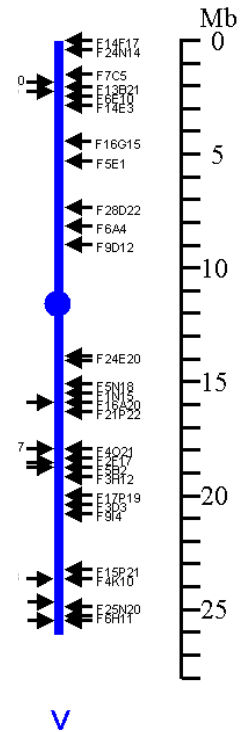
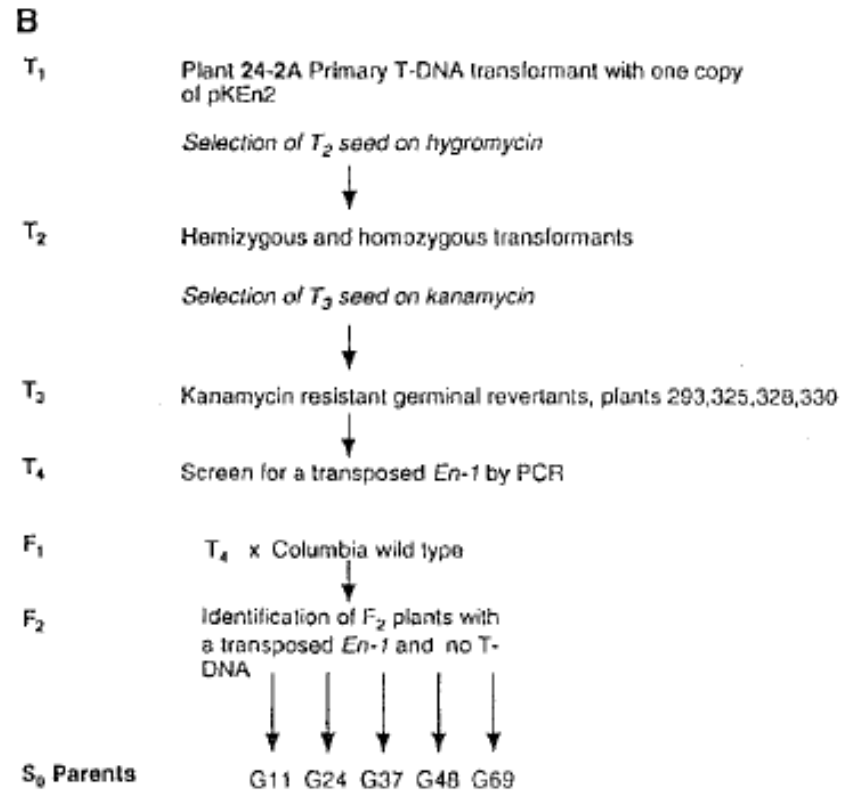
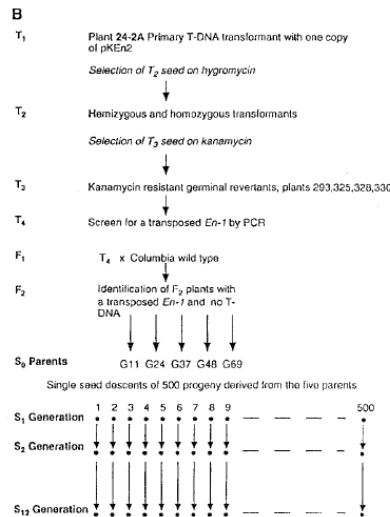
- zcela stabilní, její inzerce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)

Knihovny inzerčních mutantů u rostlin

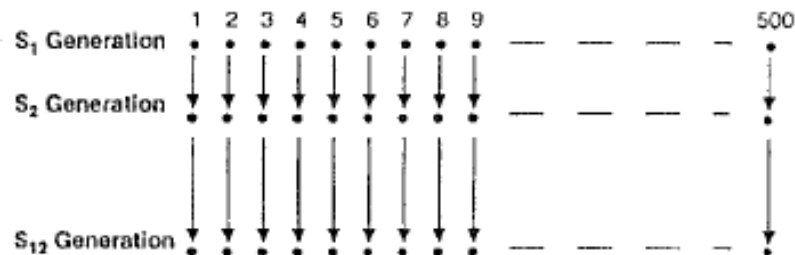


příprava transgenních rostlin

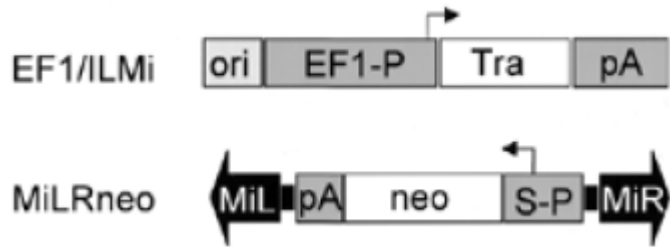
vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



Knihovny inzerčních mutantů u živočichů



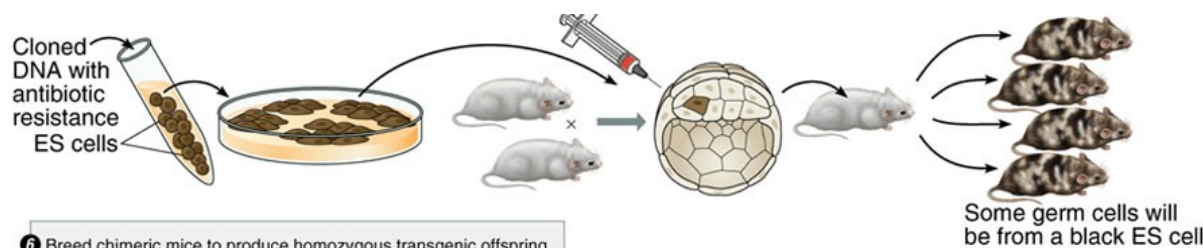
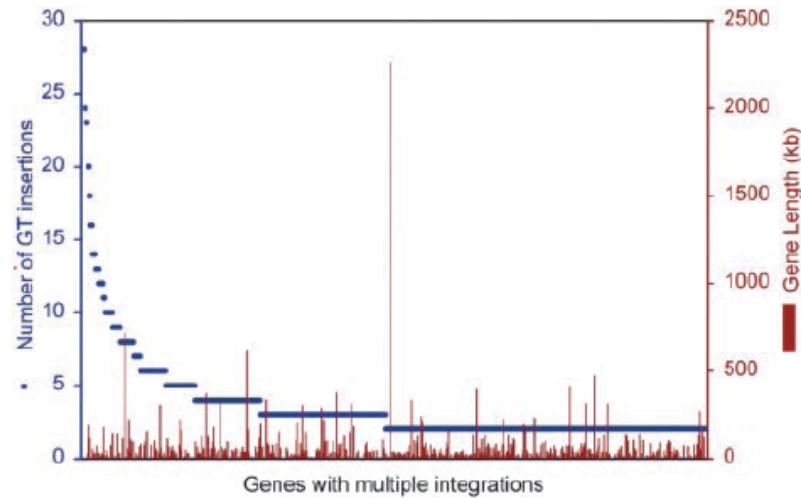
Transfekce do lidských buněčných kultur (HeLa) nebo myších embryonálních kmenových (ES) buněk



vytvoření populace mutantních buněčných linií a analýza frekvence inzercí



In vitro analýzy nebo příprava knihovny inzerčních mutantů reintrogrací ES do myších embryí



Osnova

- vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR

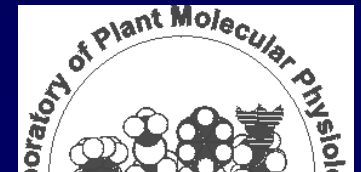
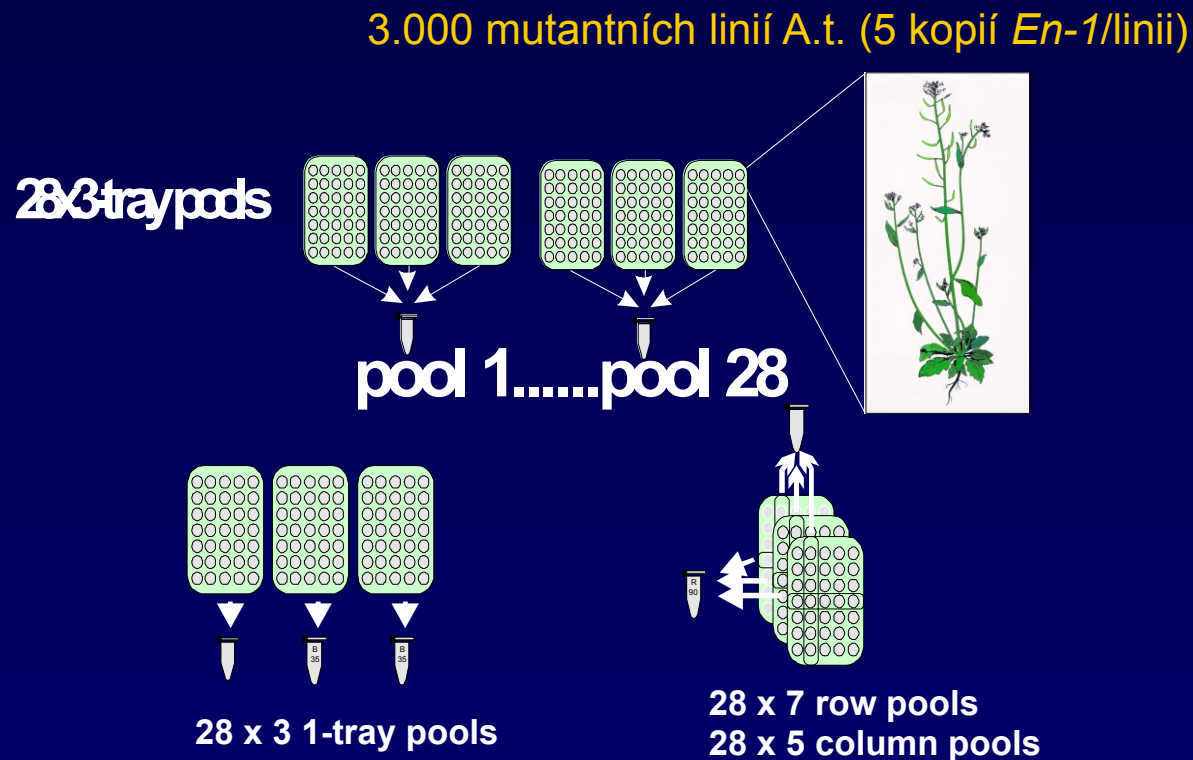
Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

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

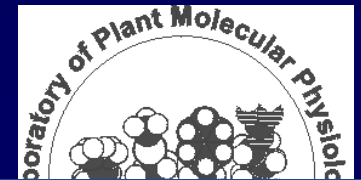
Izolace sekvenčně specifických mutantů

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



Izolace sekvenčně specifických mutantů

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

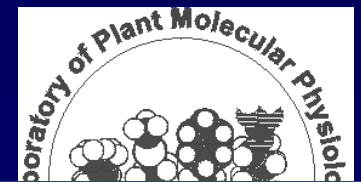


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



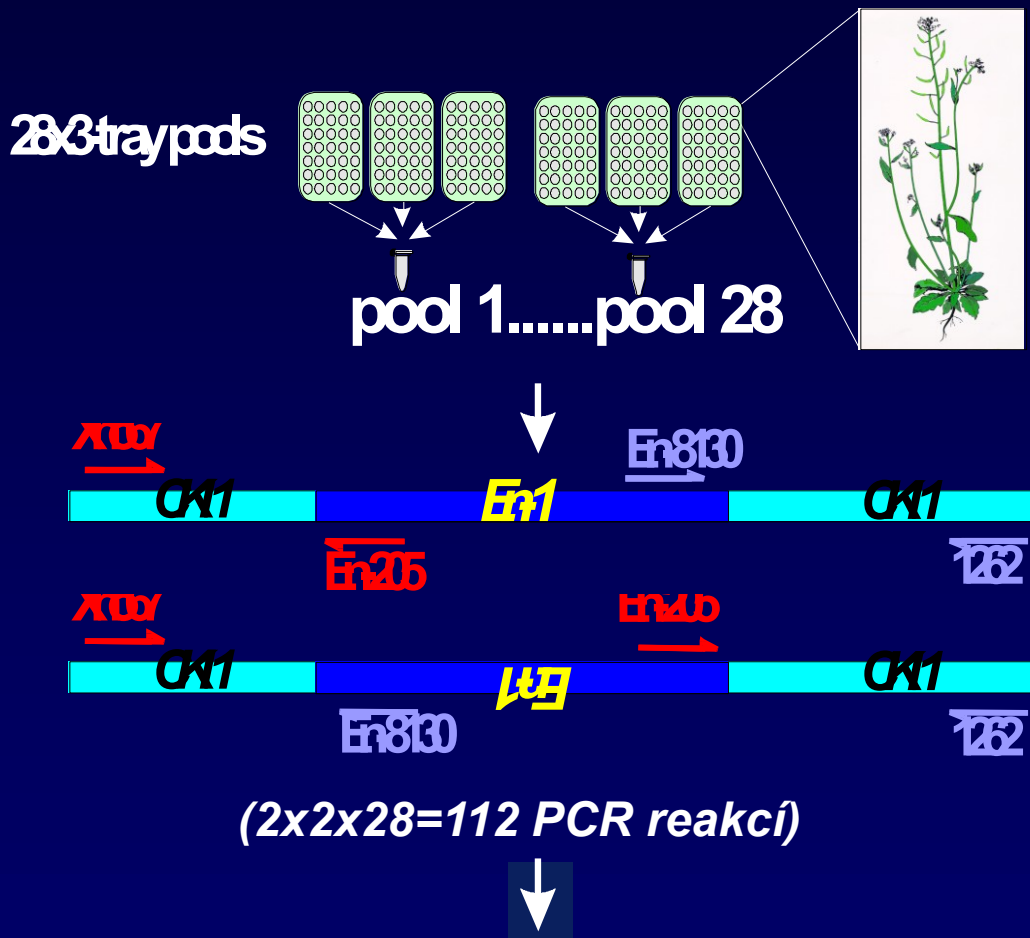
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

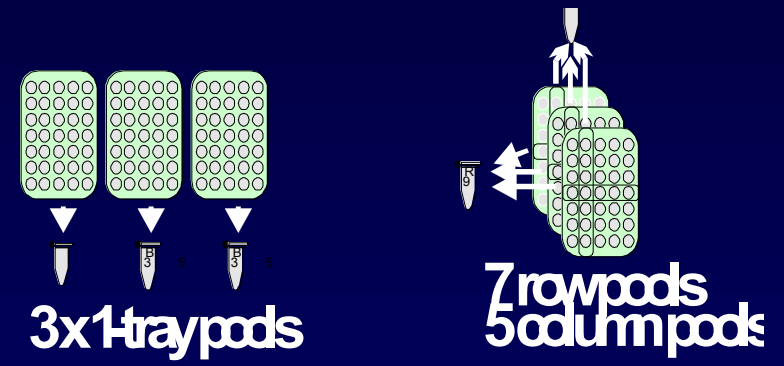
Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

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



2. Identifikace linie nesoucí inzerci



Celkem 112+15=127 PCR reakcí

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

Osnova

- hybridizace s produkty iPCR na filtrech

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Inzerční knihovna dSpm mutantů

- The Sainsbury Laboratory (SLAT-lines), John Innes Centre, Norwich Research Park
- DNA a semena v Nottingham Seed Stock Centre
- 48.000 linií
- průměrně 1.2 izerce na linii
- neautonomní transposon
- PCR vyhledávání nebo hybridizace s iPCR filtry
- SINS (sequenced insertion sites) databáze

<http://nasc.nott.ac.uk>



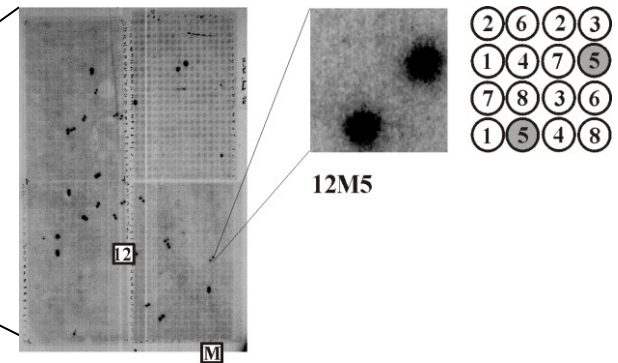
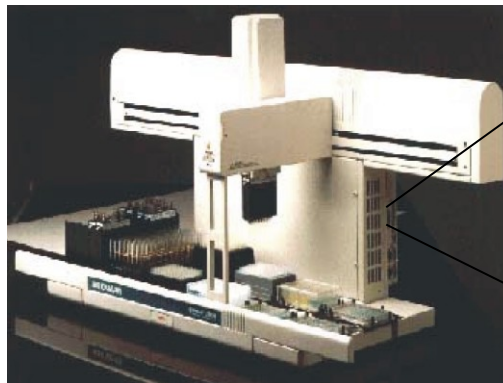
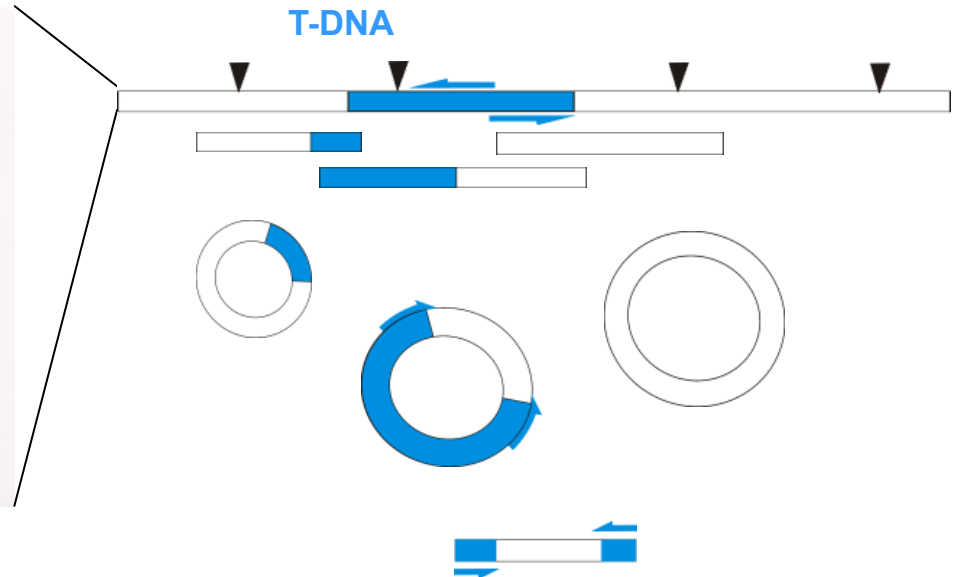
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Izolace sekvenčně specifických mutantů

Hybridizace s produkty iPCR na filtrech

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



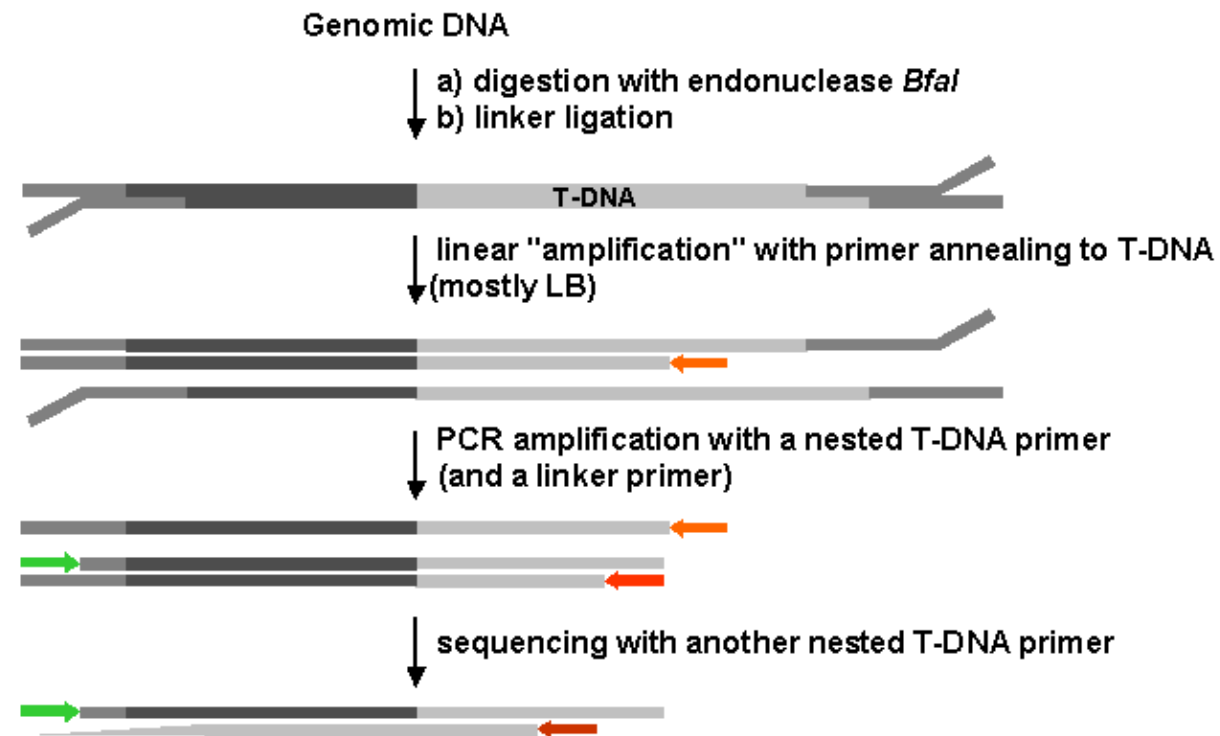
Osnova

- vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích

Izolace sekvenčně specifických mutantů

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

Sequencing of flanking sequence fragments



Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

>Insert_SALK:029311: [Order line 029311](#) | [View in AGR](#)
Length = 460

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

Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatattgatagtgaggacattactataaaaaagc 1509
|||||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcgcgttttatattgatagtgaggacattactataaaaaagc 400

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

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

Query: 1630 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaaat 1689
|||||
Sbjct: 279 attagccccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaaat 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 tacattttctogctacaattaacgctatcaaatatatttataaaaaccatttgcatttcac 1982
|||||
Sbjct: 13 tacattttctogctacgattgacggtatcaaatatatttataaaaaccgtagacatttcac 72

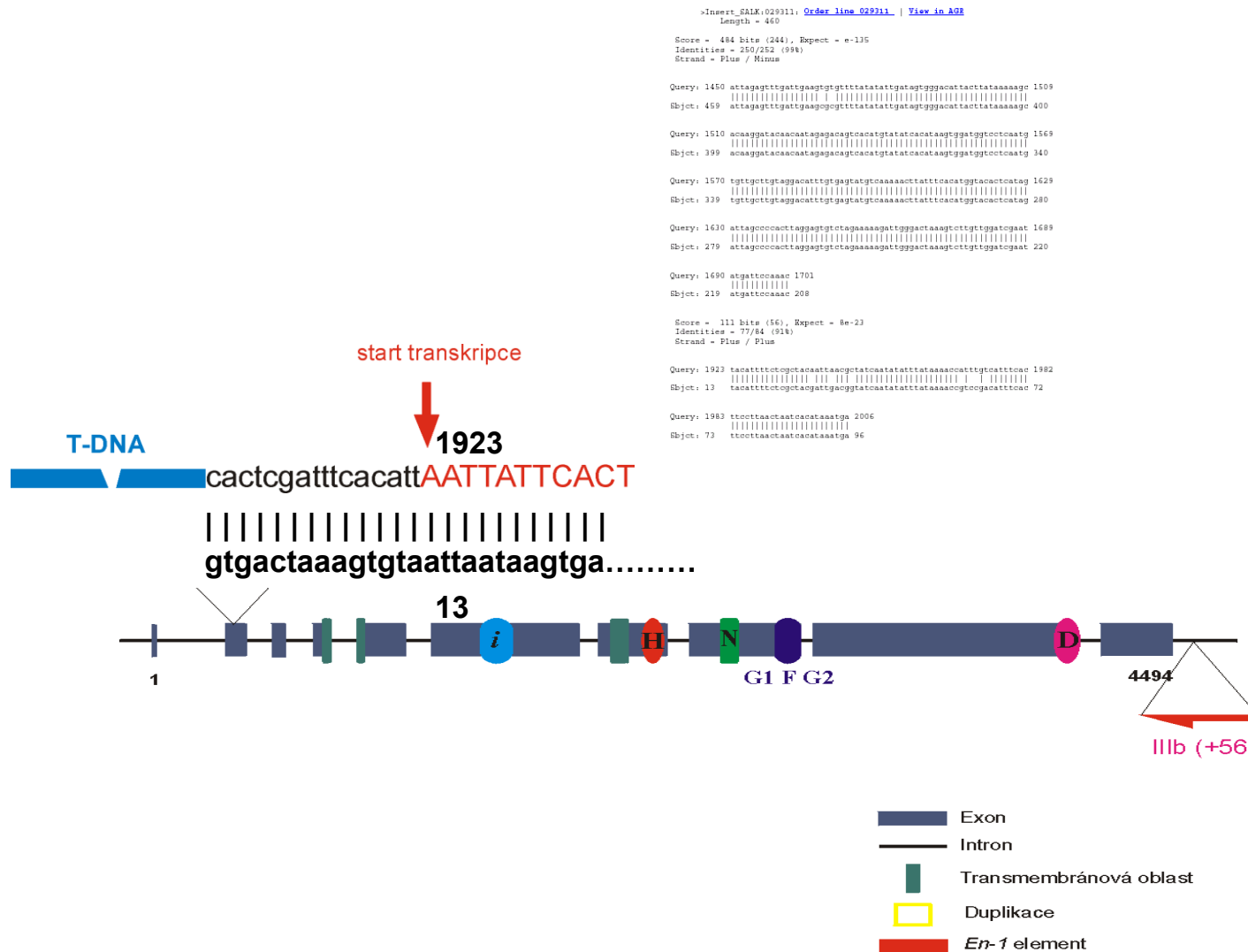
Query: 1983 ttcottaactaatcacataaatga 2006
|||||
Sbjct: 73 ttcottaactaatcacataaatga 96

Sbjct: 292 ccagctcttagaagctcttgggtaagttccagtagcgggacogatctcgagaateaca 233

[FASTA insert image](#)

[View detailed information on insert sequences in AGR](#)

Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů



Osnova

- 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 ?

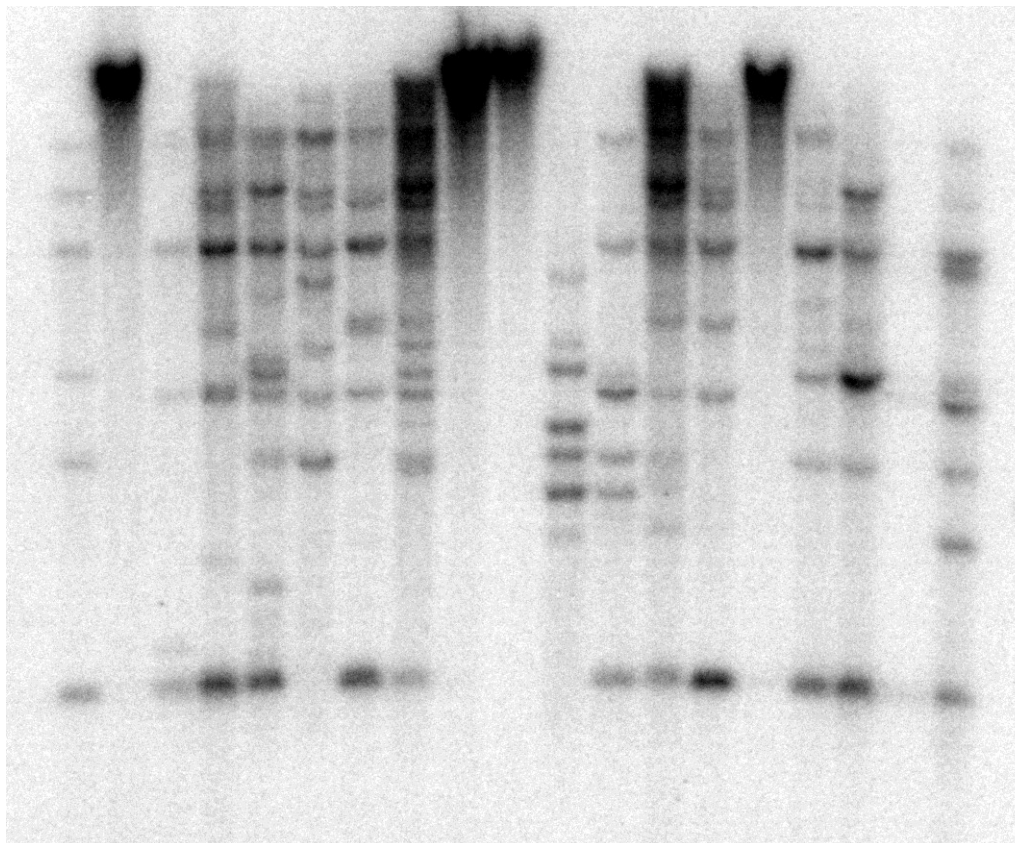
- přítomnost více inzercí v jedné linii
- možnost vzniku nezávislé bodové mutace
- s inzercí T-DNA jsou často asociovány chromozomové aberace a přestavby (duplikace, inverze, delece)

Kauzalita mezi inzercí a fenotypem

- **Kosegregační analýza**

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

+ ++ + +++ ++ +



← *cki1::En-1*

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

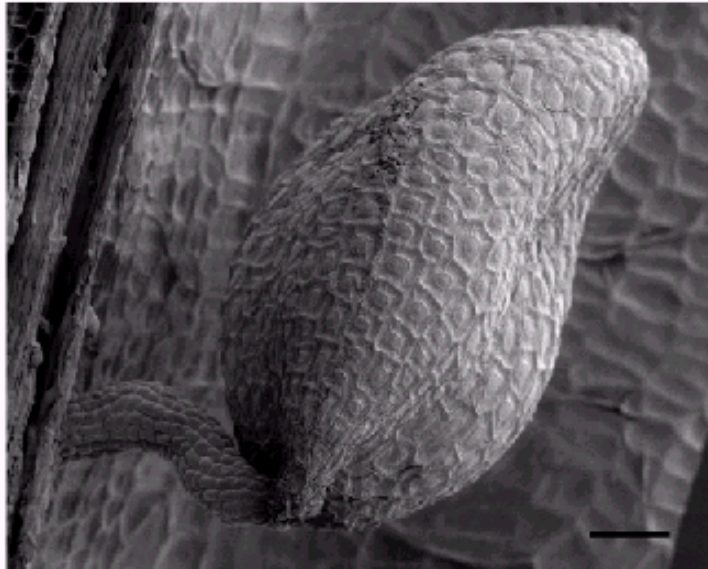
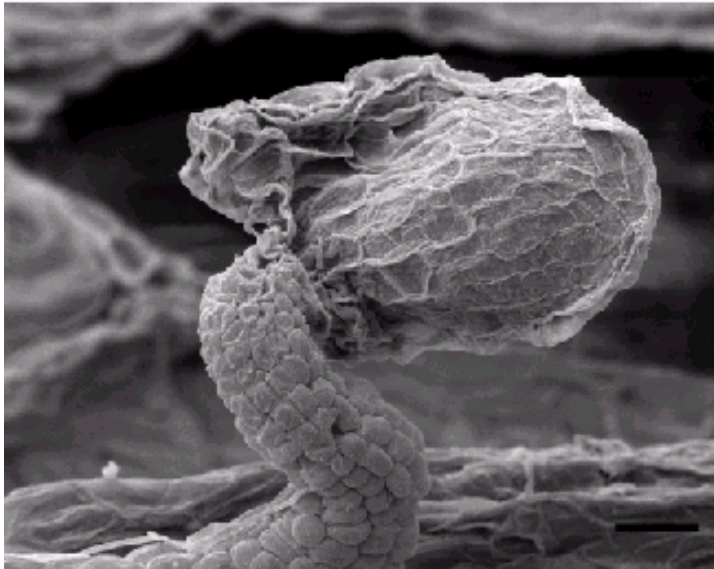
- transpozony se často vyznačují excizí a reinzercí do blízké oblasti-využití při izolaci nových mutantních alel
- excize transpozonů není vždy zcela přesná-vznik bodových mutací - izolace revertantních linií s tichou mutací i stabilních mutantů

Fenotyp šušulí *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



aattcaagtcgctCACTACAAGA " **En-1** TCTTGTAGTGCgtggagact

- 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 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 .

Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

2. Izolace stabilní mutantní linie

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

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií



aattcaagtcgctCACTACAAGA " **En-1** TCTTGTAGTGcgtggagact

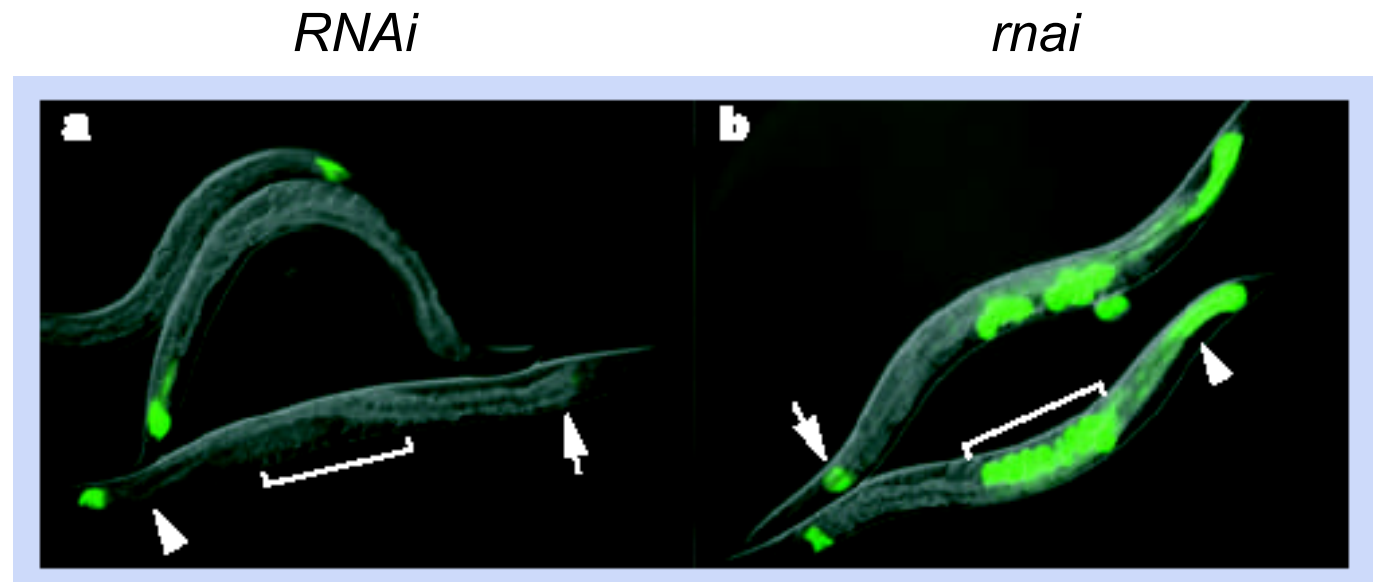
- A. aat tca agt **cg**t **gga** gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G
- B. aat tca agt **ggt acg** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G
- C. aat tca agt **cg**t **acg** gag act aca ctt ggt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

Osnova

- Umlčování genů pomocí RNAi
 - mechanismus účinku RNAi

RNA interference

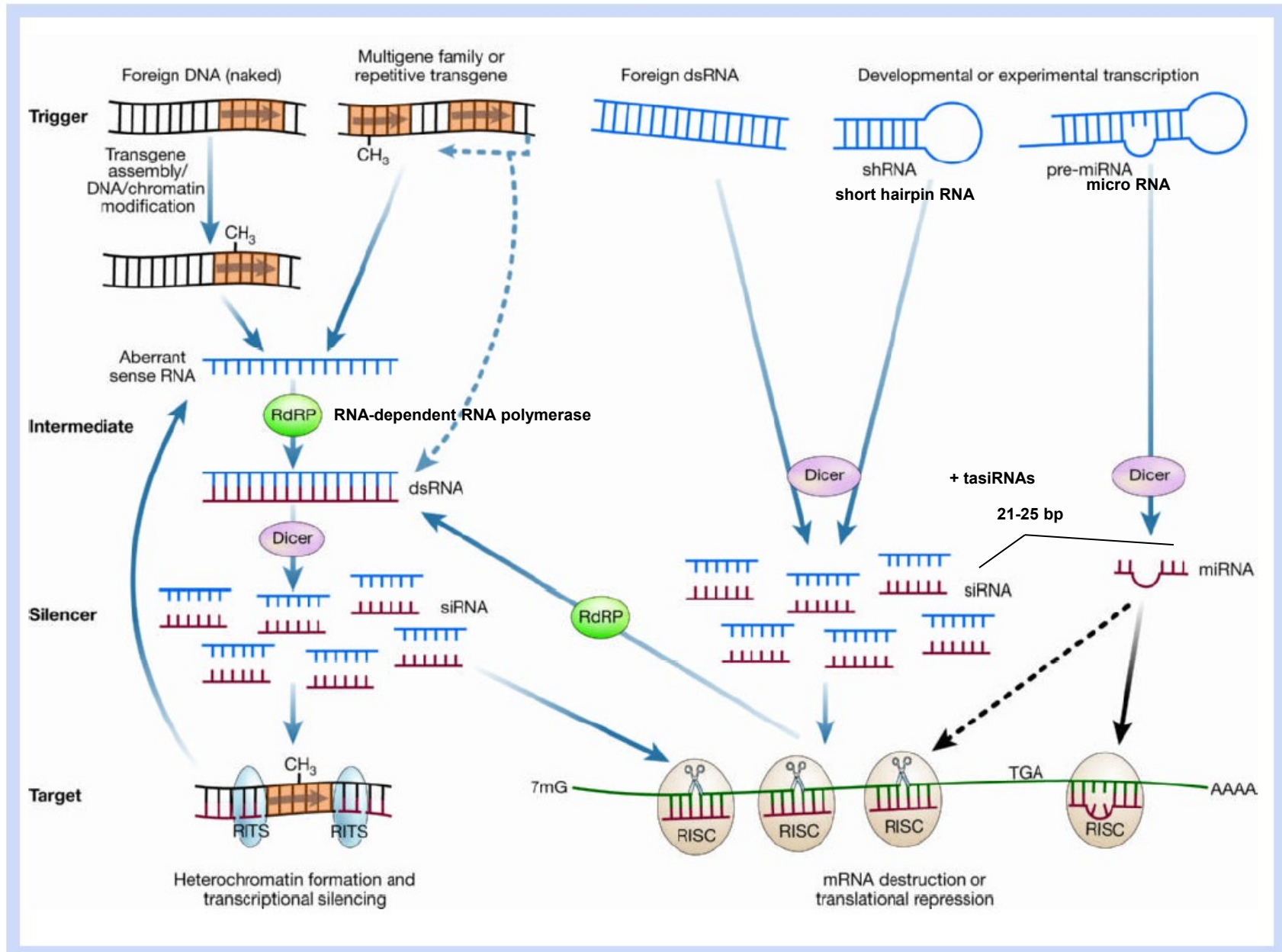
- **Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)**
 - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
 - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravdř. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
 - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji
 - dsRNA indukce je závislá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



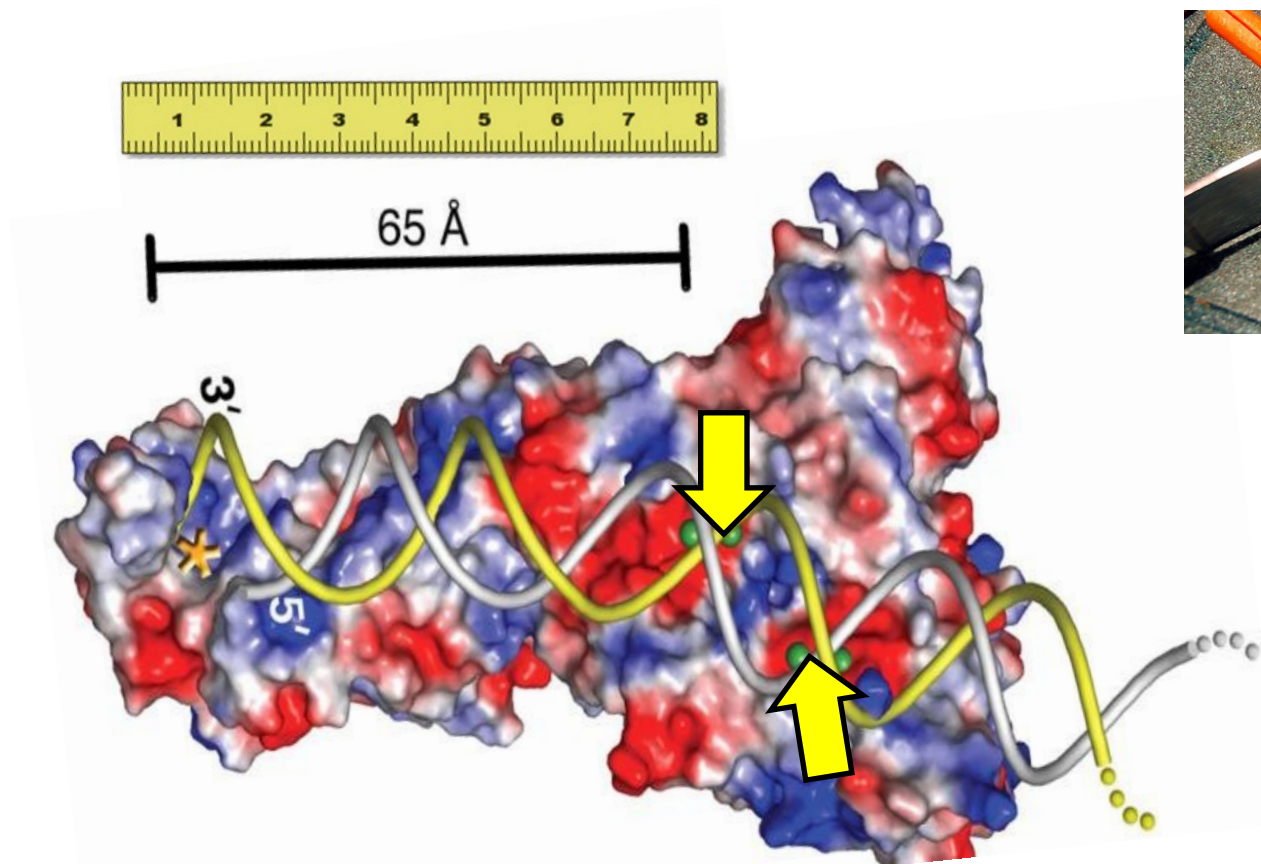
RNA interference

- **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 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)

Mechanism of RNA interference

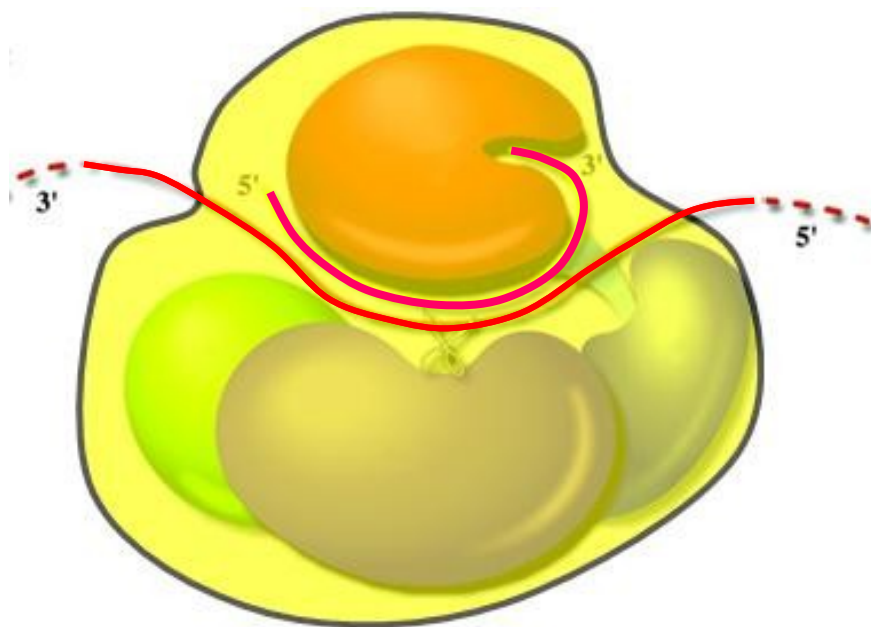


Dicer and Dicer-like proteins



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](#)

Argonaute proteins



ago1



Argonauta argo
argonaut pelagický



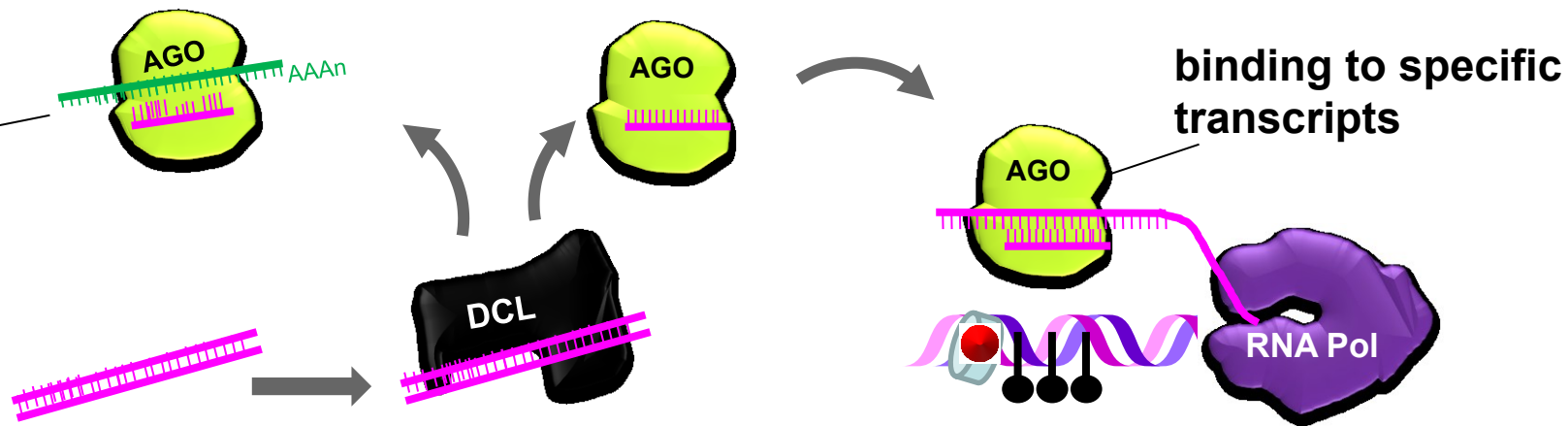
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: EMBO J. Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. EMBO J. 17: [170–180](#). Copyright 1998; Reprinted from Song, J.-J., Smith, 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.

transcriptional gene silencing

post-transcriptional gene silencing

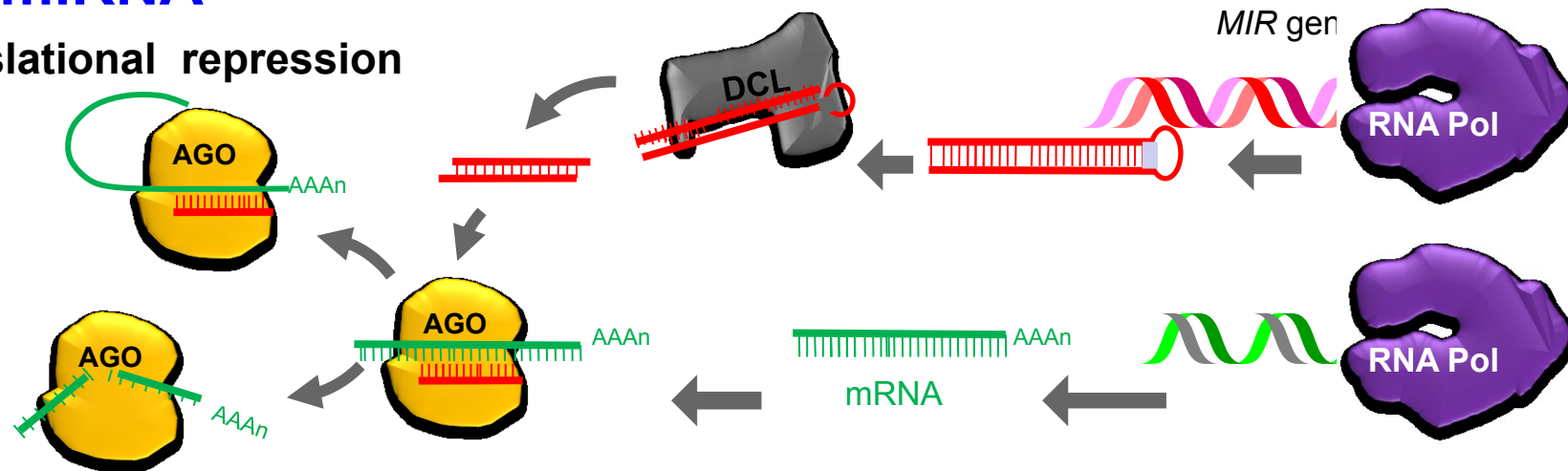
siRNA

binding to DNA



miRNA

translational repression



transcriptional slicing

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

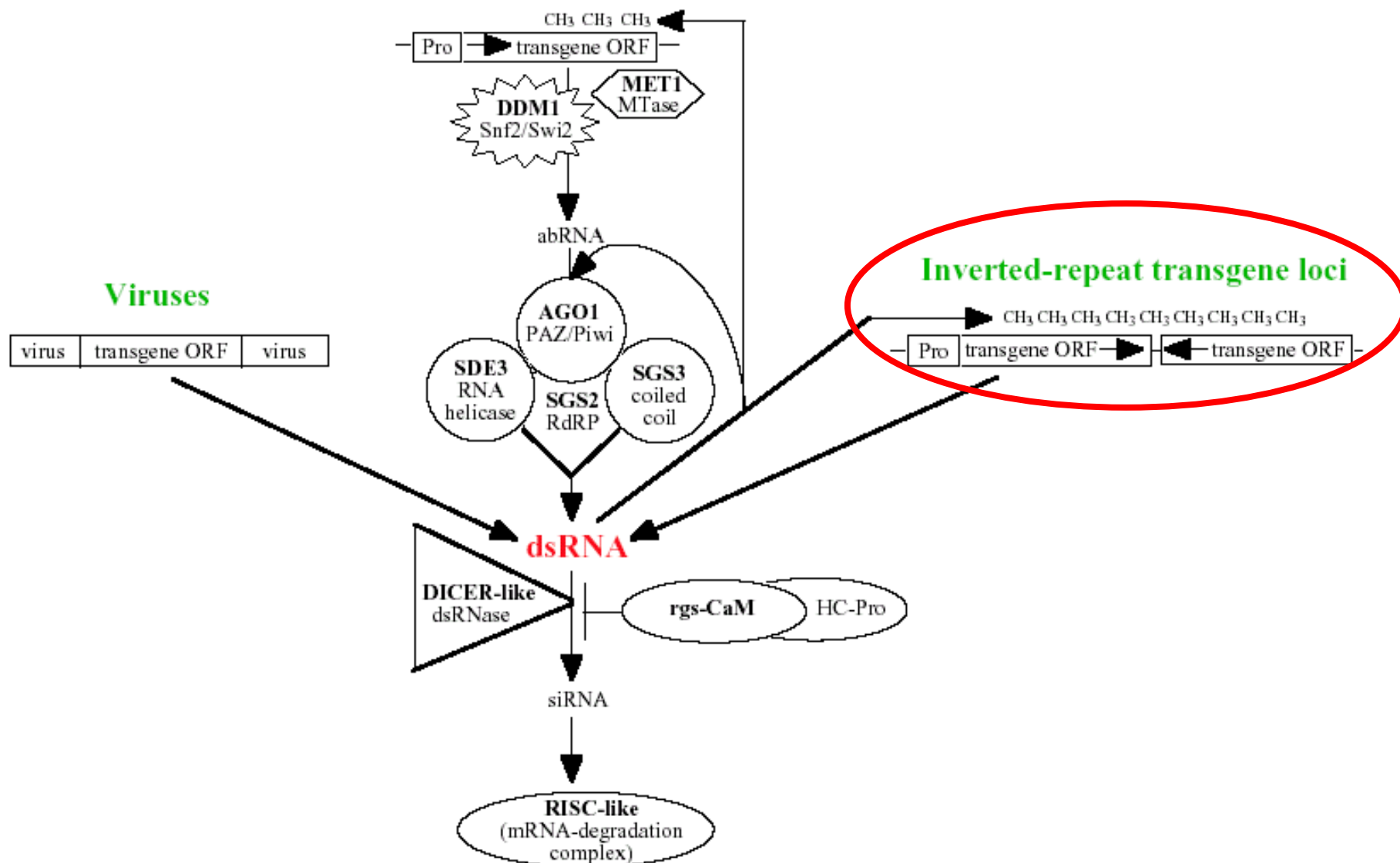
USA

University of
Massachusetts Medical
School
Worcester, MA, USA

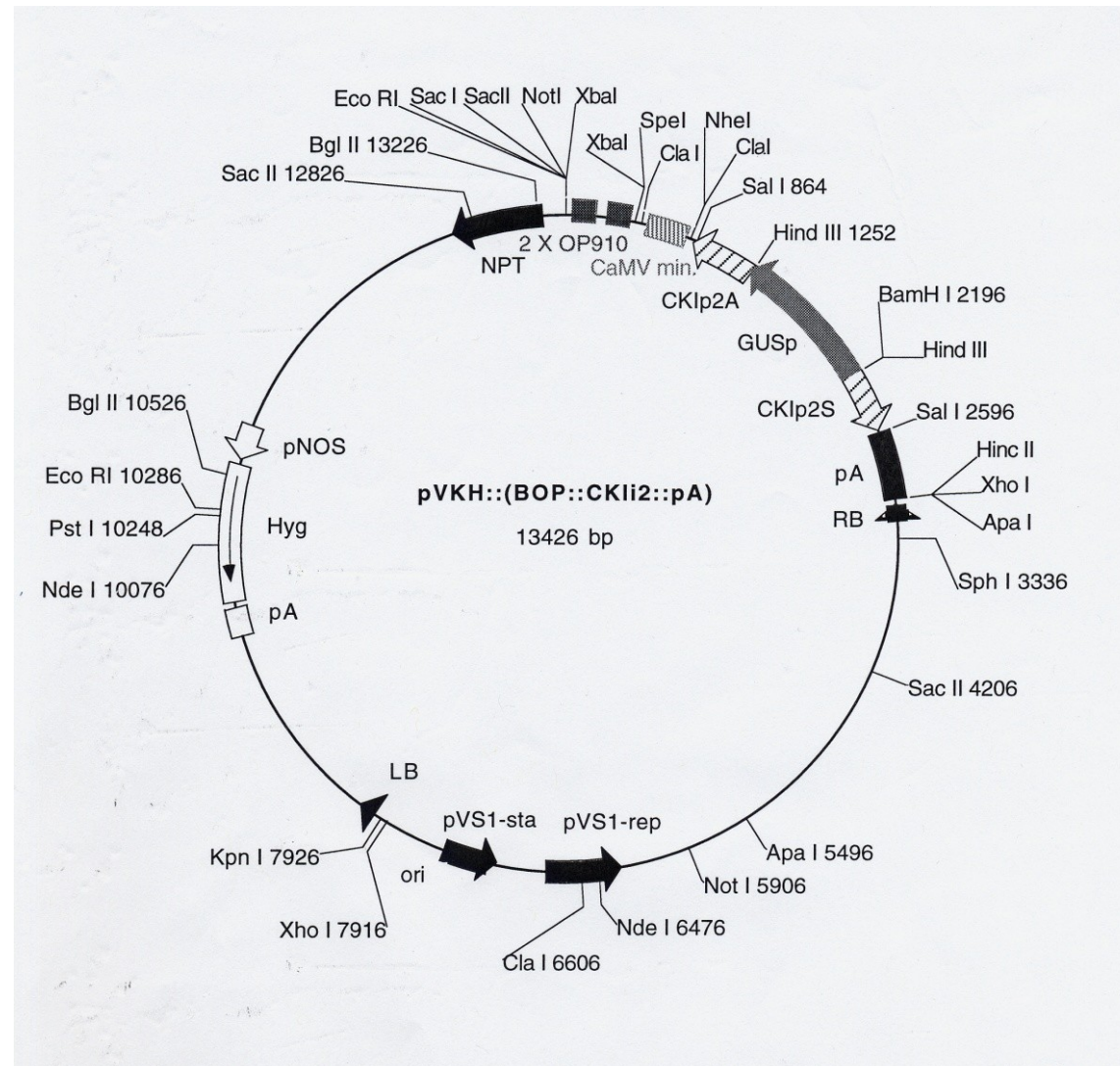
b. 1960

Mechanismus posttranskripčního umlčování genů pomocí RNA interference (iRNA)

Highly transcribed single-copy transgene loci



RNAi approach using regulated expression system



Shrnutí

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

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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