CG920 Genomics

Lesson 2

Genes Identification

Jan Hejátko

Functional Genomics and Proteomics of Plants,
Mendel Centre for Plant Genomics and Proteomics,
Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Literature

- Literature sources for Chapter 02:

- 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)
- de Souza et al. (1998) Toward a resolution of the introns earlyylate debate: Only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins *PNAS*, **95**, (5094)
- Feuillet and Keller (2002) Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution *Ann Bot,* 89 (3-10)
- Frobius, A.C., Matus, D.Q., and Seaver, E.C. (2008). Genomic organization and expression demonstrate spatial and temporal Hox gene colinearity in the lophotrochozoan Capitella sp. I. PLoS One 3, e4004

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Outline

- Forward and Reverse Genetics Approaches
  - Differences between the approaches used for identification of genes and their function
- Identification of Genes *Ab Initio*
  - Structure of genes and searching for them
  - Genomic colinearity and genomic homology
- Experimental Genes Identification
  - Constructing gene-enriched libraries using methylation filtration technology
  - EST libraries
  - Forward and reverse genetics

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Outline

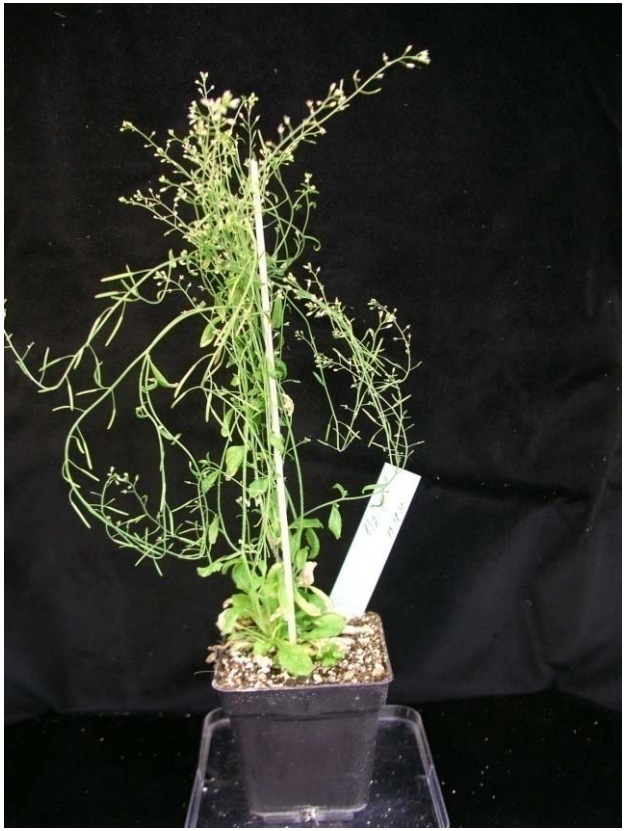
- Forward and Reverse Genetics Approaches
  - Differences between the approaches used for identification of genes and their function

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Forward vs. Reverse Genetics

Revolution in understanding the term „gene“

„classical“ genetics approaches



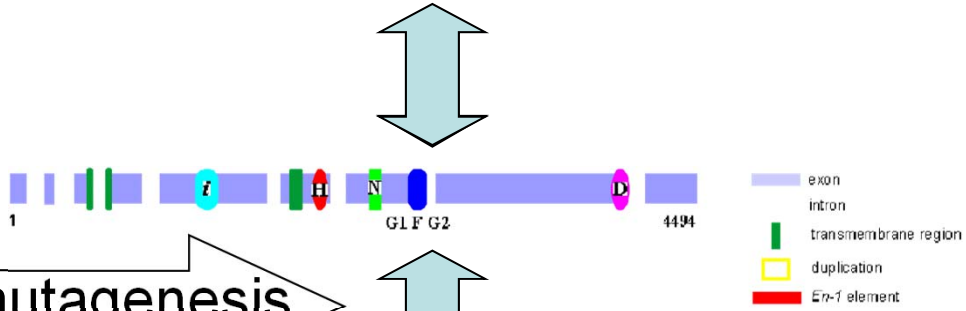
3 : 1

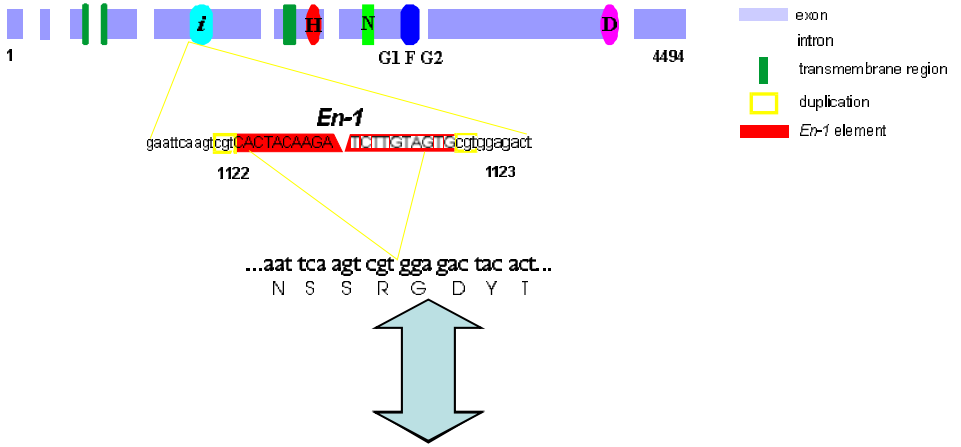
?

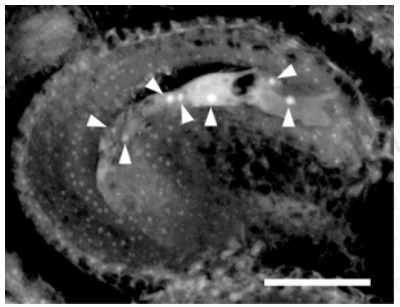
insertional mutagenesis

„reverse genetics“ approaches

5‘TTATATATATATATTAAAAAATAAAATAAAA
GAACAAAAAAGAAAATAAAATA….3‘







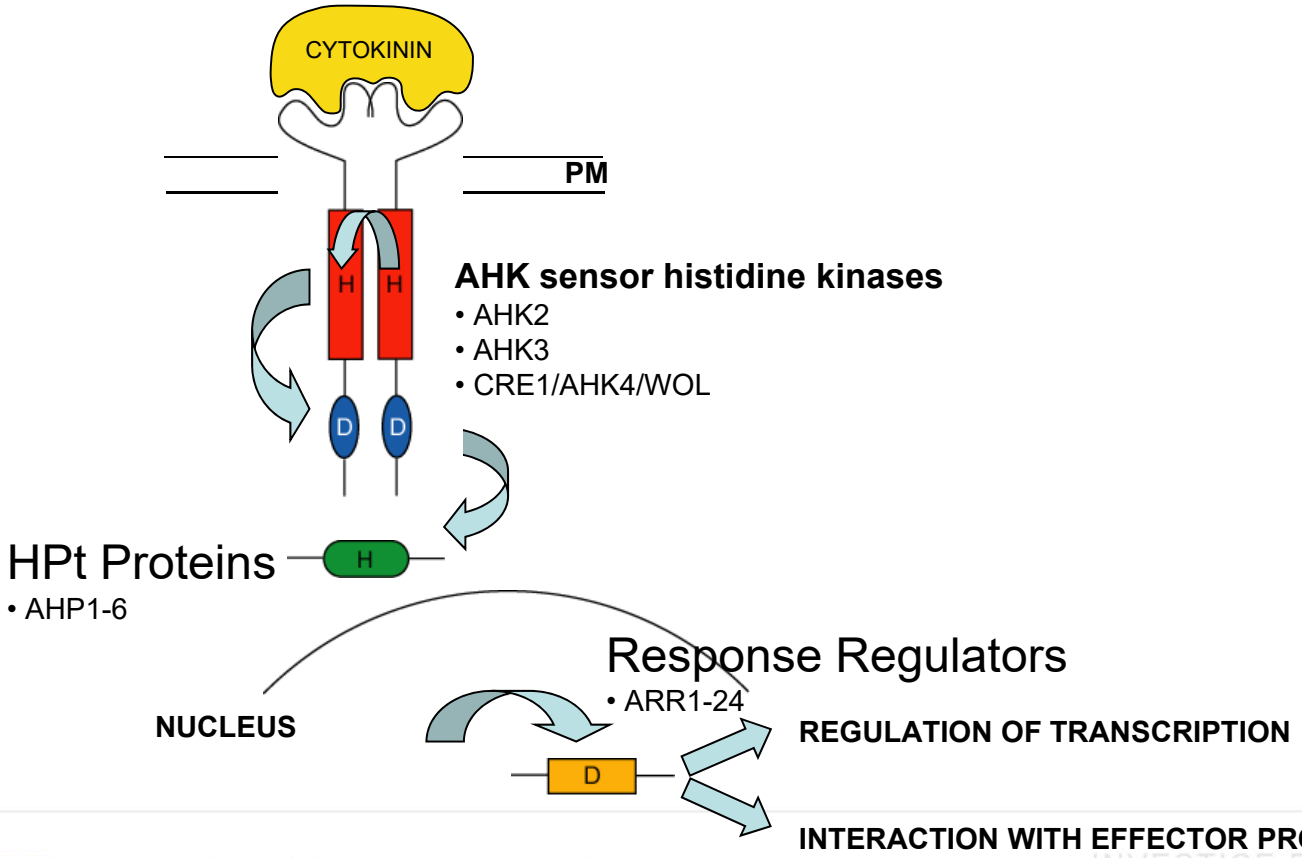
Identification of the role of *ARR21* gene

- Hypothetical signal transducer in two-component system of *Arabidopsis*

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene

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



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene

- Hypothetical signal transducer in two-component system of *Arabidopsis*
- Mutant identified by searching in databases of insertional mutants (SINS-sequenced insertion site) using BLAST

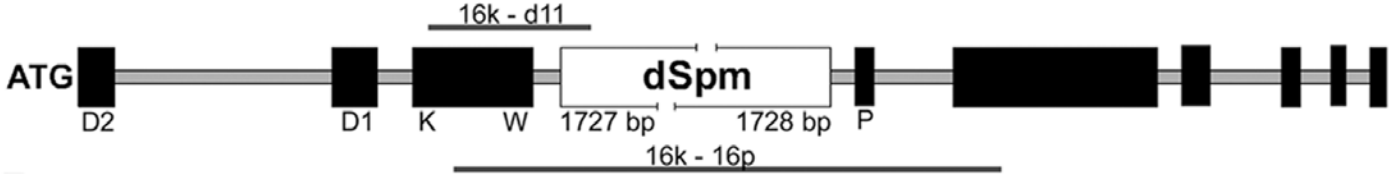
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene – isolation of insertional mutant

- **Searching in databases of insertional mutants (SINS)**

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

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

- **Localization of *dSpm* insertion in genome sequence of *ARR21* using sequenation of PCR products**



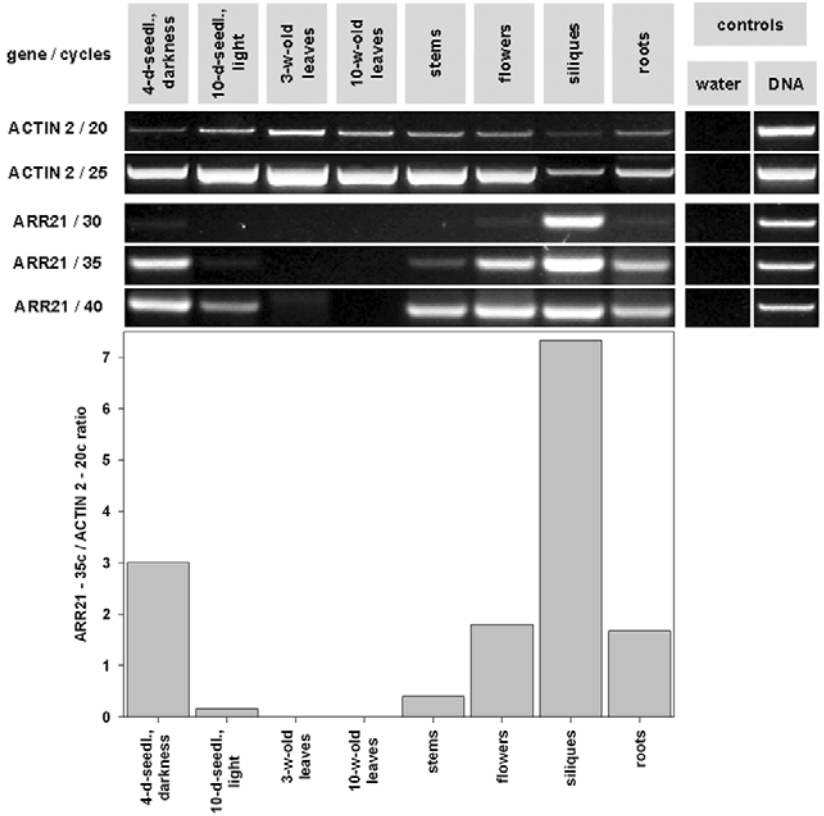
Identification of the role of *ARR21* gene

- Hypothetical signal transducer in two-component system of *Arabidopsis*
- Mutant identified by searching in databases of insertional mutants (SINS-sequenced insertion site) using BLAST
- Expression of *ARR21* in wild-type and inhibition of expression of *ARR21* in insertional mutant confirmed at the RNA level

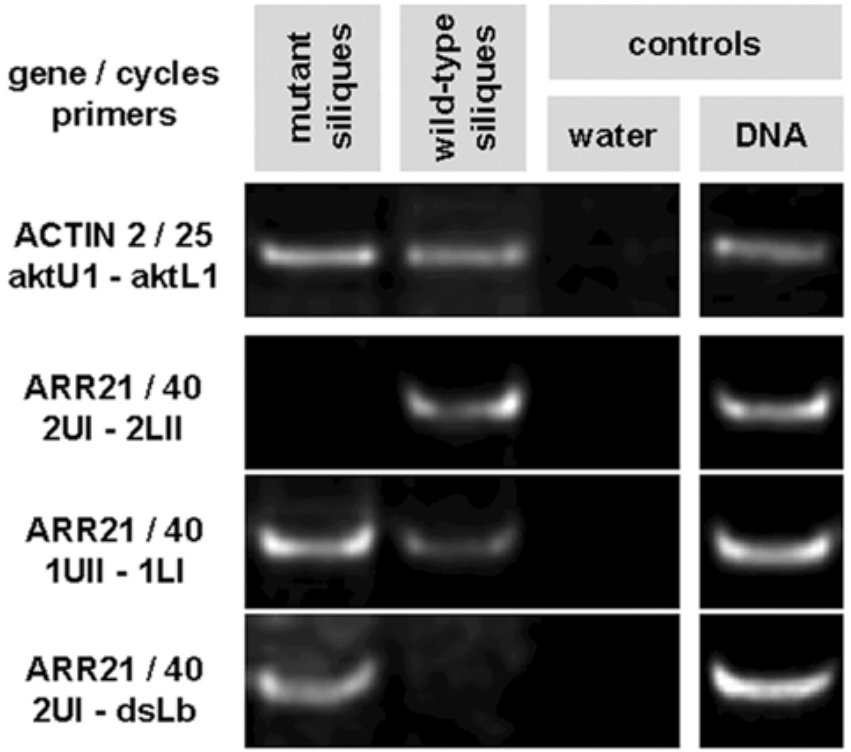
EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene – analysis of expression

wild type expression



insertional mutant vs wild type



EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene

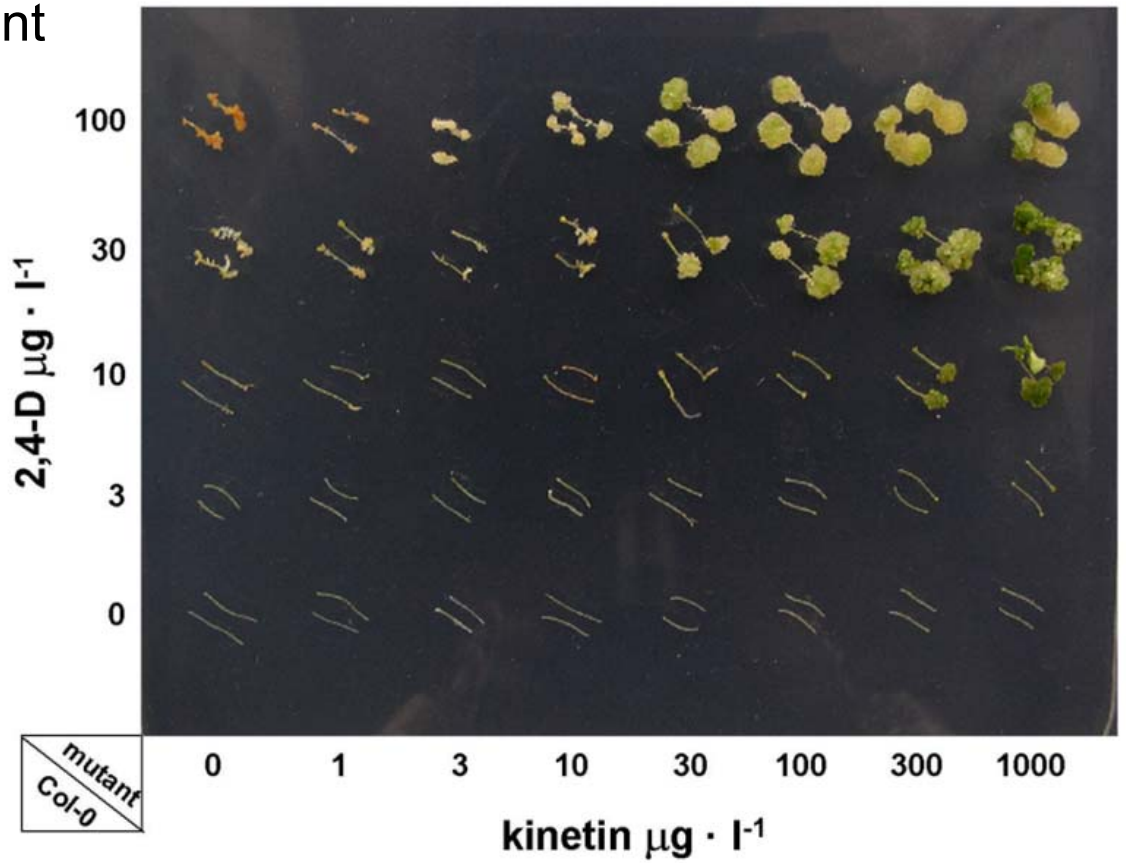
- Hypothetical signal transducer in two-component system of *Arabidopsis*
- Mutant identified by searching in databases of insertional mutants (SINS-sequenced insertion site) using BLAST
- Expression of *ARR21* in wild-type and inhibition of expression of *ARR21* in insertional mutant confirmed at the RNA level
- Phenotype analysis of insertional mutant

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene – phenotype analysis of mutant

- Analysis of sensitivity to plant growth regulators
  - 2,4-D a kinetin
  - ethylene
  - Light of various wavelengths

- No alterations - nor in flowering, neither in the number of the seeds



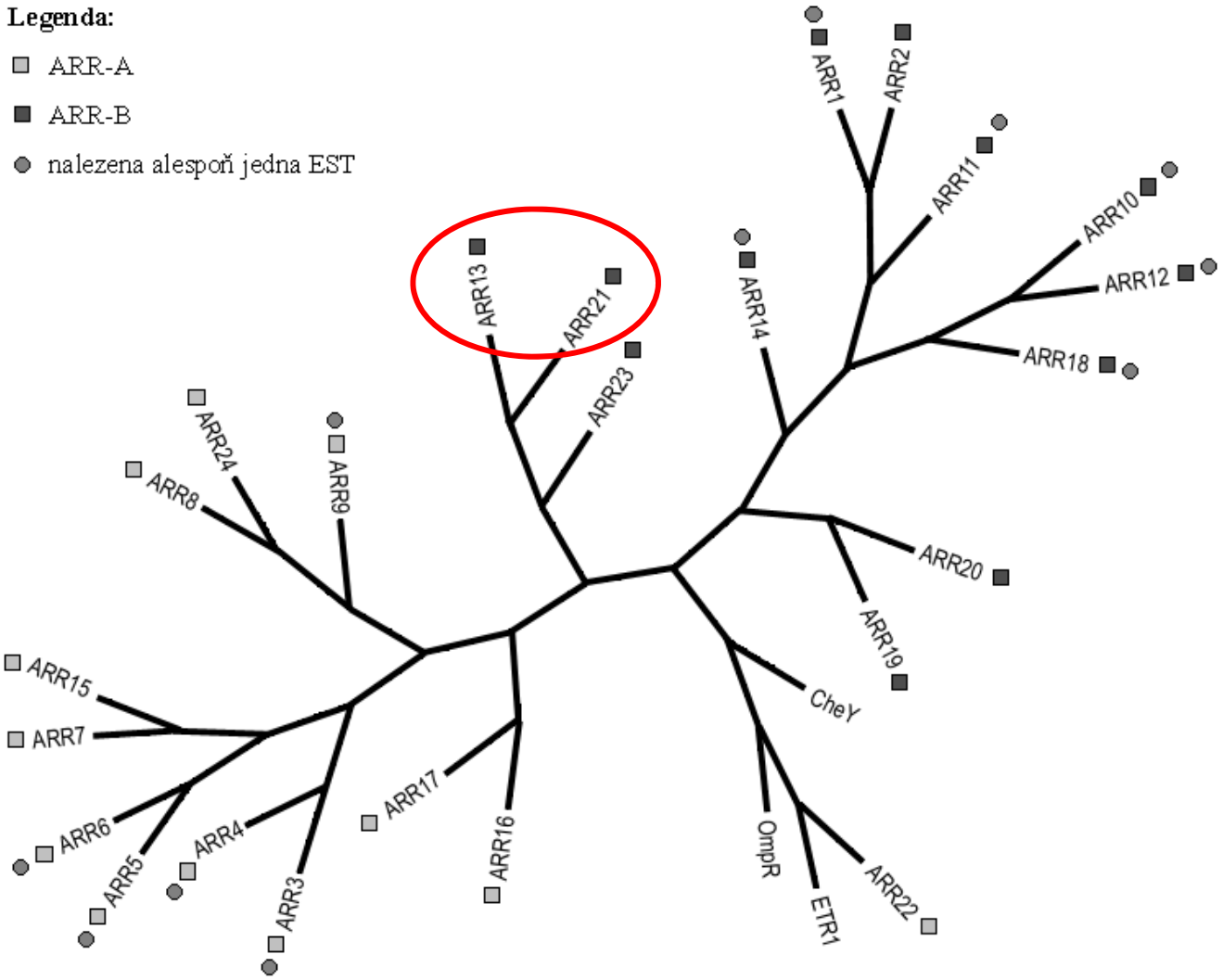
EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene – possible reasons for the absence of the phenotype

- Functional redundance within the gene family

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene – homology of *ARR* genes



Identification of the role of *ARR21* gene – causes of absence of the phenotype

- Functional redundance within the gene family?
- Phenotype only under specific conditions

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of the role of *ARR21* gene – summary

- Gene *ARR21* identified by comparative analysis of *Arabidopsis* genome
- Based on sequence analysis, its function was predicted
- Site-specific expression of *ARR21* gene was proved at the RNA-level
- Identification of gene function by insertional mutagenesis in case of *ARR21* in development of *Arabidopsis* was not successful, probably because of functional redundancy within the gene family

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

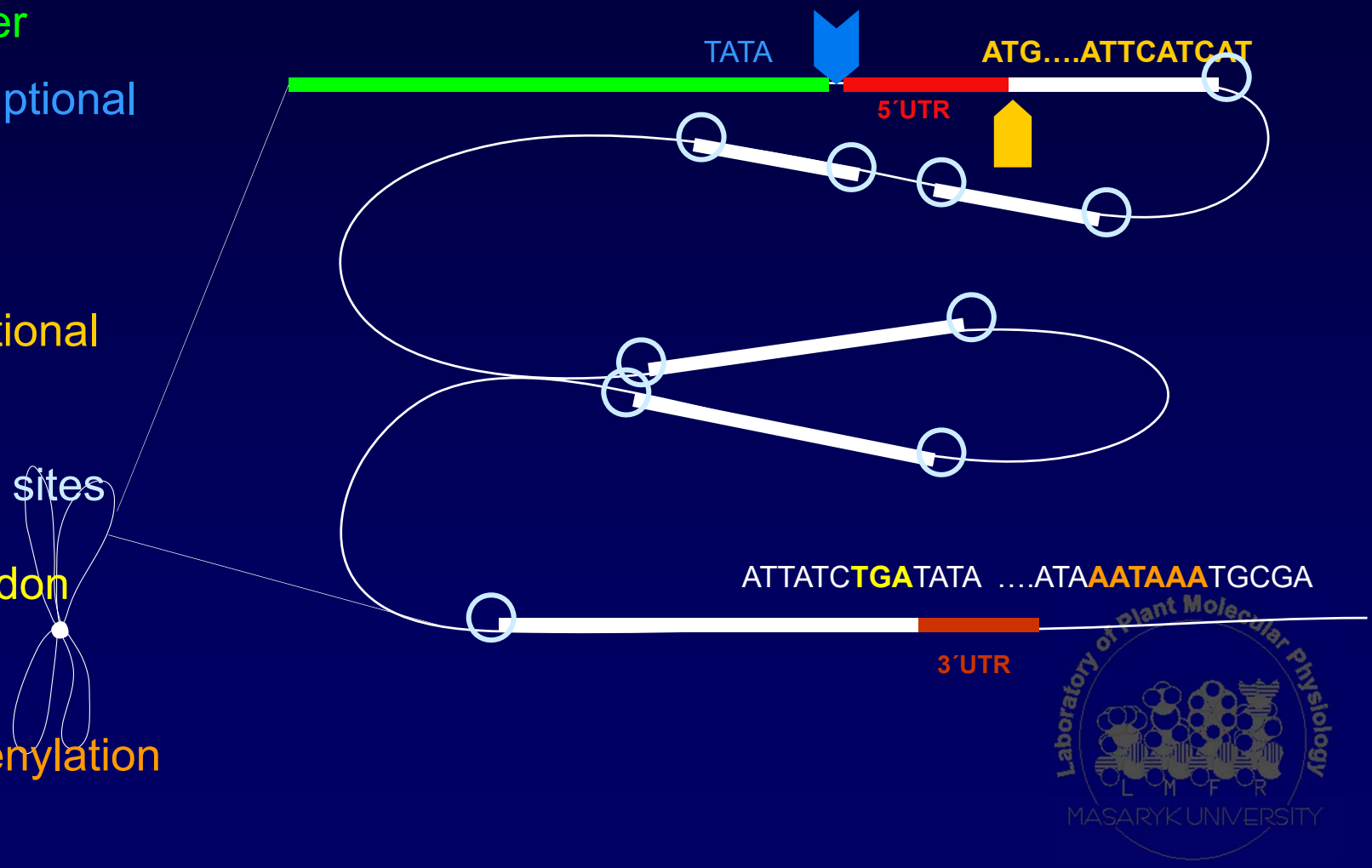
Outline

- Forward and Reverse Genetics Approaches
  - Differences between the approaches used for identification of genes and their function
- Identification of Genes *Ab Initio*
  - Structure of genes and searching for them

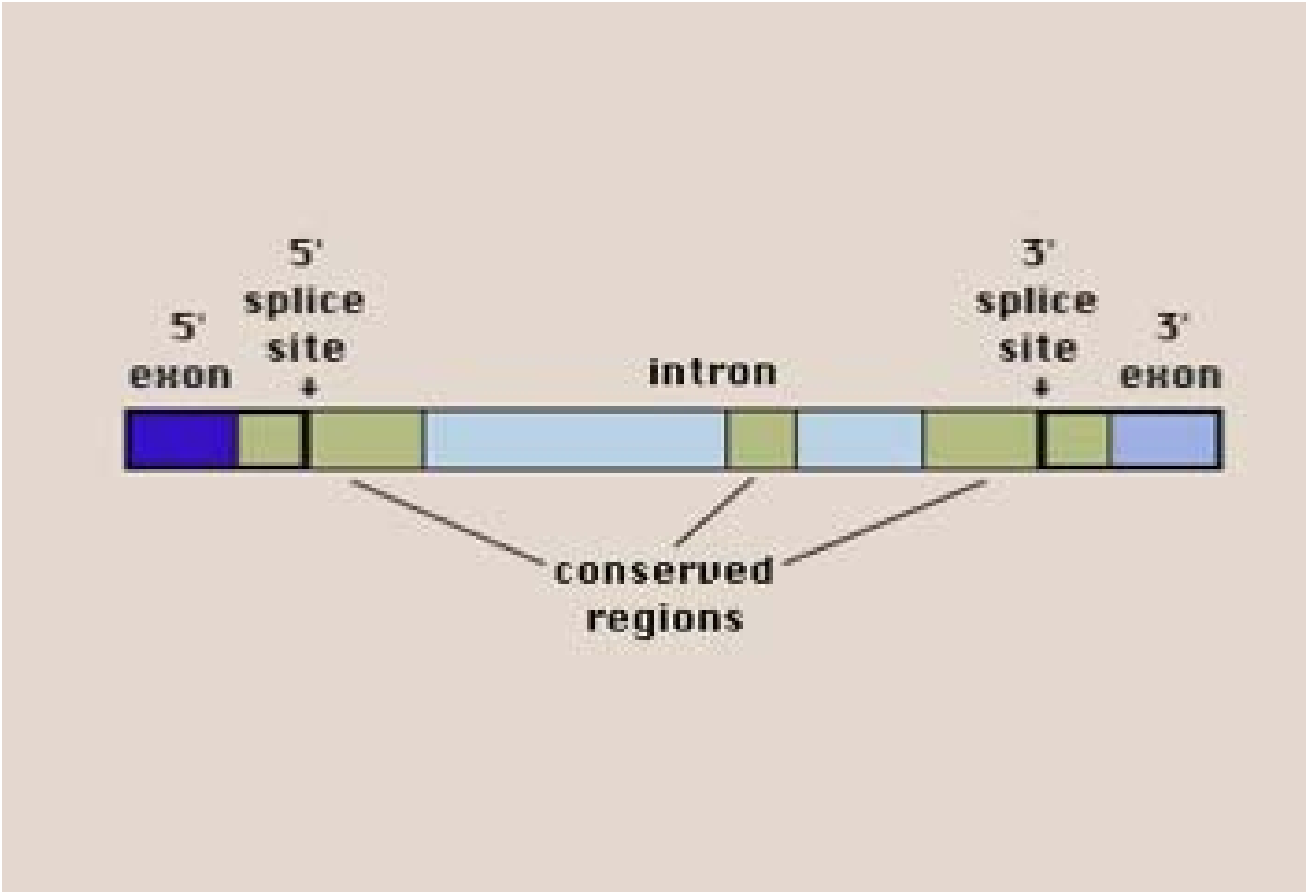
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Genes Structure

- Promoter
- Transcriptional start
- 5´UTR
- Translational start
- Splicing sites
- Stop codon
- 3´UTR
- Polyadenylation signal



RNA Splicing



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Identification of Genes *Ab Initio*

- Omitting 5‘ and 3‘ UTR
- Identification of translation start (ATG) and stop codon (TAG, TAA, TGA)
- Finding donor (typically GT) and acceptor (AG) splicing sites
- Many ORFs are not real coding sequences – in *Arabidopsis*, there are on average approximately 350 milion ORFs in every 900 bp of sequence(!)
- Using various statistic models (e.g. Hidden Markov Model – HMM, see recommended literature, Majoros *et al.*, 2003) to evaluate and score the weight of identified donor and acceptor sites

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Splicing Site Prediction

- Programs for splice site prediction (specifity approximately 35 %)
  - GeneSplicer (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)
  - SplicePredictor (http://deepc2.psi.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi)

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

SplicePredictor

BCB @ ISU | Bioinformatics 2 Go | Download | Help | Tutorial | References | Contact

SplicePredictor

- a method to identify potential splice sites in (plant) pre-mRNA by sequence inspection using Bayesian statistical models
(click here to access the older method using logitlinear models)

Sequences should be in the one-letter-code ({a,b,c,g,h,k,m,n,r,s,t,u,w,y}), upper or lower case; all other characters are ignored during input. Multiple sequence input is accepted in FASTA format (sequences separated by identifier lines of the form ">SQ;name_of_sequence comments") or in GenBank format.

Paste your genomic DNA sequence here:

```
GAGGAGGCACAAAATGACGAATATACAAAATGATCTTAAACAGCTAAACTATATTGGACATTTTTTCGATCTCAGATATA
AAAGATTTCATTCAATATAATACTTGGATAAATACTCTTATTATTTTTCTTTAGTTTATTAAAAAAAACCTCTAATAAAT
ACGAGTTTAAGTCCACAAAATCGCTTAGACTAAAATACACCATATAATTTCAAACGATAAAGTTTACAAAAGTAATATCC
AAGTATCTCATAGTCAACATATATATAGTAATAATTAGTTGACGTATAAGAAAATAAAAATAAATAAATTAGTATCTTAT
TTTGGGTGGTGCTGACTGGTGACTGGTGACTGCAGAATGCTCGGCAAATGGAACCATATCCCAAGACATGGGTTTTAGAT
```

... or upload your sequence file (specify file name):

Browse...

... or type in the GenBank accession number of your sequence:

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

SplicePredictor

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.

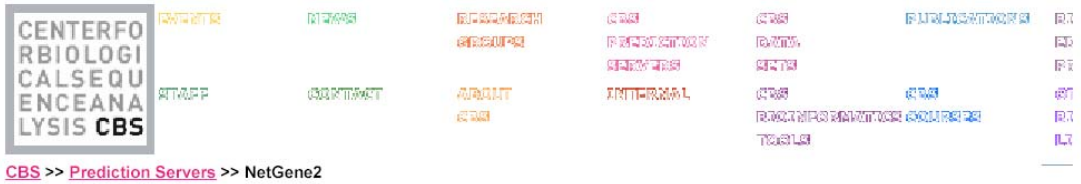
Potential splice sites

t	q	loc	sequence	P	c	rho	gamma	*	P*R*G*
A	<--	75	ttttttcgatctcAGat	0.973	7.16	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	134	attatttttctttAGtt	0.999	14.86	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	500	gattttgttgtttAGtc	0.977	7.48	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	780	tctgttattgtatAGct	0.986	8.56	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	848	tatttttttgaaatAGat	0.968	6.80	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	1051	caatttatttttaAGaa	0.930	5.19	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	1213	ttatttatttttttAGtt	0.998	12.14	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	1373	tttcctctctcacAGga	0.999	13.17	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	1487	tttatatattgatAGtg	0.883	4.04	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	1581	atgtgttgcttgtAGga	0.982	8.03	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	1781	ggttgtgcgaaatAGgg	0.886	4.10	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	2440	taattaaaaatttAGat	0.939	5.46	0.000	0.000	7	(5 1 1)
A	<--	2479	catctaaaattttAGat	0.942	5.59	0.000	0.000	7	(5 1 1)
D	----->	2546	aagGTagta	0.909	4.61	0.885	1.903	15	(5 5 5)
A	<--	2572	ttttttttttggcAGca	0.930	5.16	0.000	0.000	7	(5 1 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	ttttttttttgccAGag	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)

Splicing Site Prediction

- Programs for splice site prediction (specifity approximately 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/)

NetGene2



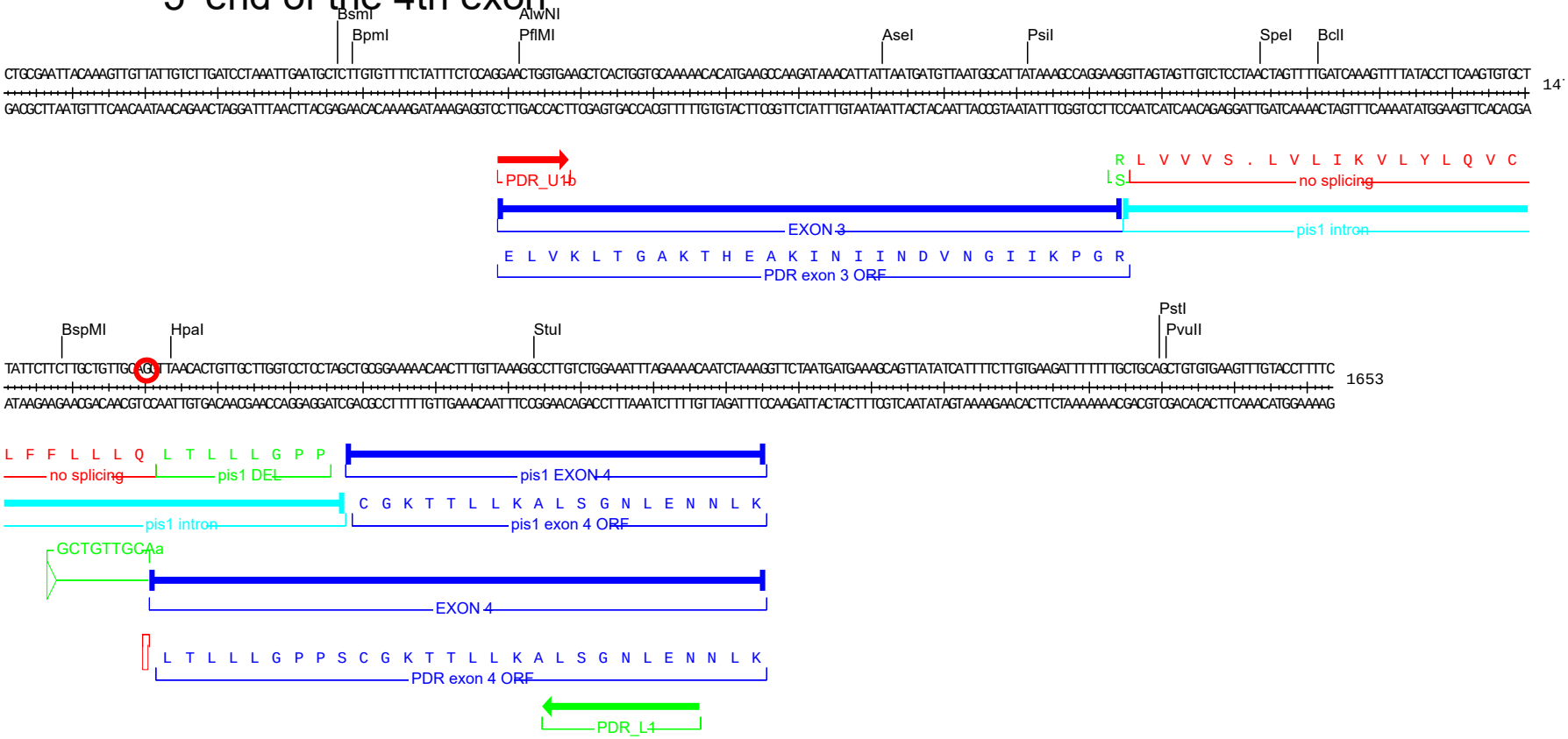
NetGene2

Prediction done

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


The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 9490 nucleotides.
31.8% A, 17.0% C, 19.6% G, 31.7% T, 0.0% X, 36.5% G+C

Donor splice sites, direct strand
---------------------------------
                pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'      exon intron    3'
                      1704      0      +        0.87       TTCCAAACAC^GTTAATATTT
                      1906      0      +        0.99       CGGTGAACGG^GTCAGAACAT
                      3582      1      +        1.00       GCCGTTCTAG^GTAATCTTGC H
                      3765      1      +        1.00       TTGCGTCCTG^GTAATTCTGC H
                      4134      0      +        0.74       TCAAACACAG^GTTGTTAAAA
                      4619      1      +        0.74       AGCAAGAAAG^GTCTTGTTTC
                      4915      0      +        0.94       CGTTCCTCTG^GTAAATACTG
                      5356      0      +        0.87       TCTCAACCAA^GTGAATGTTT
                      5384      1      +        1.00       GATTTGGTTG^GTAAGACTCT H
                      5809      1      +        1.00       TATCCTAAAG^GTGTGTCCAA
                      6057      0      +        1.00       GCAGTCTTTG^GTAAGCTACT H
                      6096      1      +        0.74       CTCTTCACAA^GTAAATCTAG
                      7369      0      +        1.00       GGACTGCCAA^GTAAGTTTAA H
                      7886      0      +        0.74       GAACAAAATG^GTTAGATGAA
                      9323      0      +        0.74       GAAGATTAGG^GTTTTTCTCT

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

Acceptor splice sites, direct strand
------------------------------------
                pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'    intron exon      3'
                      1213      0      +        0.59       TATTTTTTAG^TTATGGAGAC
                      1221      2      +        0.87       AGTTATGGAG^ACAAGAATCG
                      1373      0      +        0.71       TCTCTCACAG^GACACAGAAT
                      1487      1      +        0.81       ATATTGATAG^TGGGACATTA
                      3284      0      +        0.87       GTTATCAAAG^GGTTTCGACT
                      4254      0      +        1.00       TGTTCTTCAG^ATCGCACCAT H
                      4832      2      +        0.54       AAAATTGCAG^TTCCAGTGGC
                      5004      0      +        0.94       TTTTTGCCAG^AGATACACAC
                      5472      1      +        0.96       AAAATTACAG^CTCTGCTCAA
                      6135      0      +        1.00       ATTATTATAG^GTAAGATTAA H
                      6490      1      +        0.90       AAAGTTACAG^TGGTGGAGAA
                      6744      0      +        0.59       TGTCAAACAG^TTTCGTAGAG
                      7447      0      +        0.96       TTCTGCACAG^ATGCCAGAAA
                      7780      2      +        0.76       TCCATTTCAG^ATACAGAACA
                      7786      2      +        0.92       TCAGATACAG^AACACATGCA
```

RNA Splicing and Adaptation

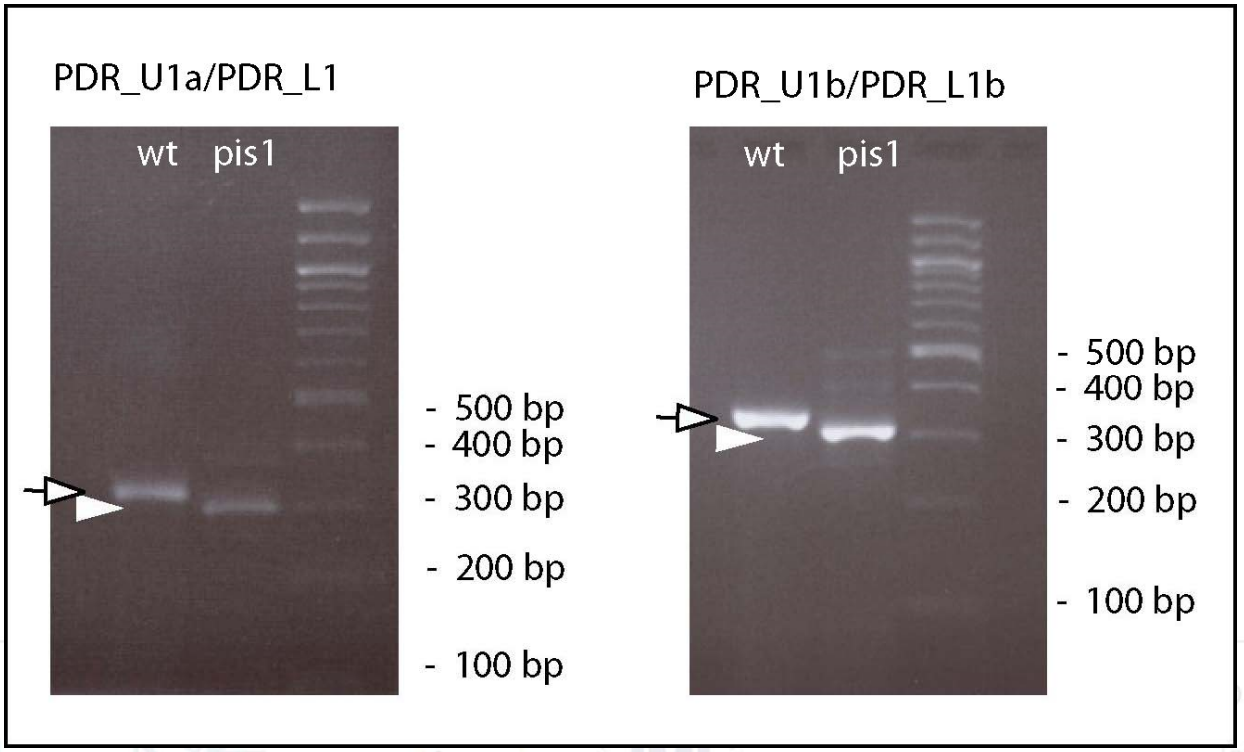
- Flexibility in splicing site recognition in plants in practice – example of developmental plasticity of (not only) plants
  - Identification of mutant with point mutation (transition G→A) exactly at the splice site at the 5‘ end of the 4th exon



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
a státním rozpočtem České republiky

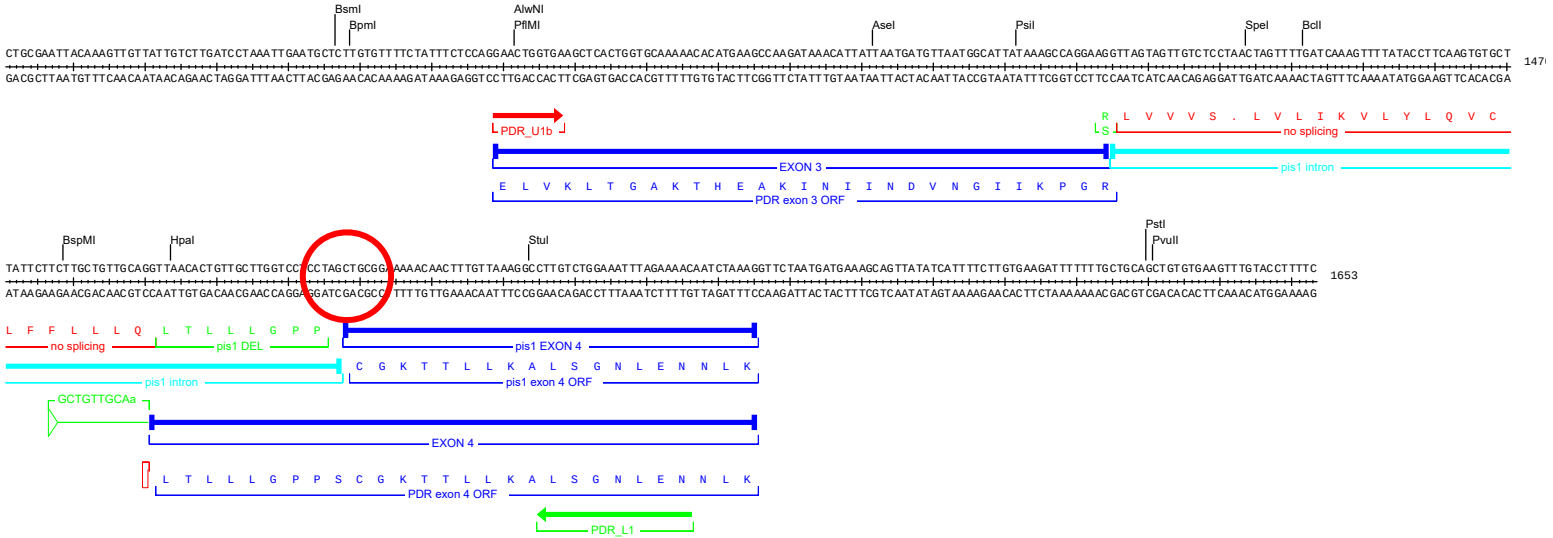
RNA Splicing and Adaptation

- Identification of mutant with point mutation (transition G→A) exactly at the splice site at the 5‘ end of the 4th exon
- Analysis by RT PCR proved the presence of a fragment shorter than cDNA should be after the typical splicing event



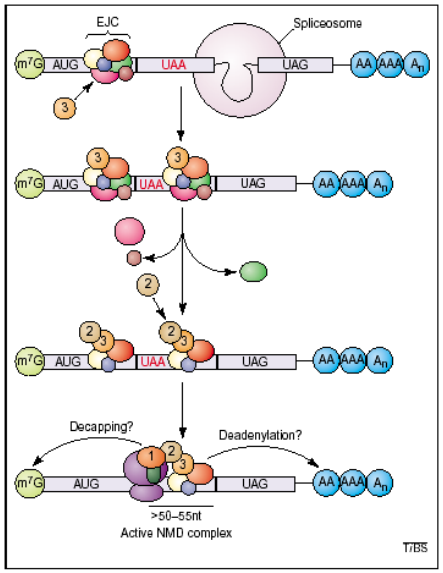
RNA Splicing and Adaptation

- Flexibility in splicing site recognition in plants in practice – example of developmental plasticity of (not only) plants
  - Identification of mutant with point mutation (transition G→A) exactly at the splice site at the 5‘ end of the 4th exon
  - Analysis by RT PCR proved the presence of a fragment shorter than cDNA should be after the typical splicing event
  - Sequenation of this fragment then suggested alternative splicing with the closest possible splice site in exon 4



RNA Splicing and Adaptation

- Divergencies at splice site recognition in plants in practice – example of developmental plasticity of (not only) plants



  - Identification of mutant with point mutation (transition G→A) exactly at the splice site at the 5‘ end of the 4th exon
  - Analysis by RT PCR proved the presence of a fragment shorter than cDNA should be after the typical splicing event
  - Sequenation of this fragment then suggested alternative splicing with the closest possible splice site in exon 4
  - Existence of similar defense mechanisms was proven in different organisms as well (e.g. Instability of mutant mRNA with early stop codon formation (> 50 - 55 bp before typical stop codon) in eukaryotes, see recommended literature – Singh and Lykke-Andersen, 2003

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

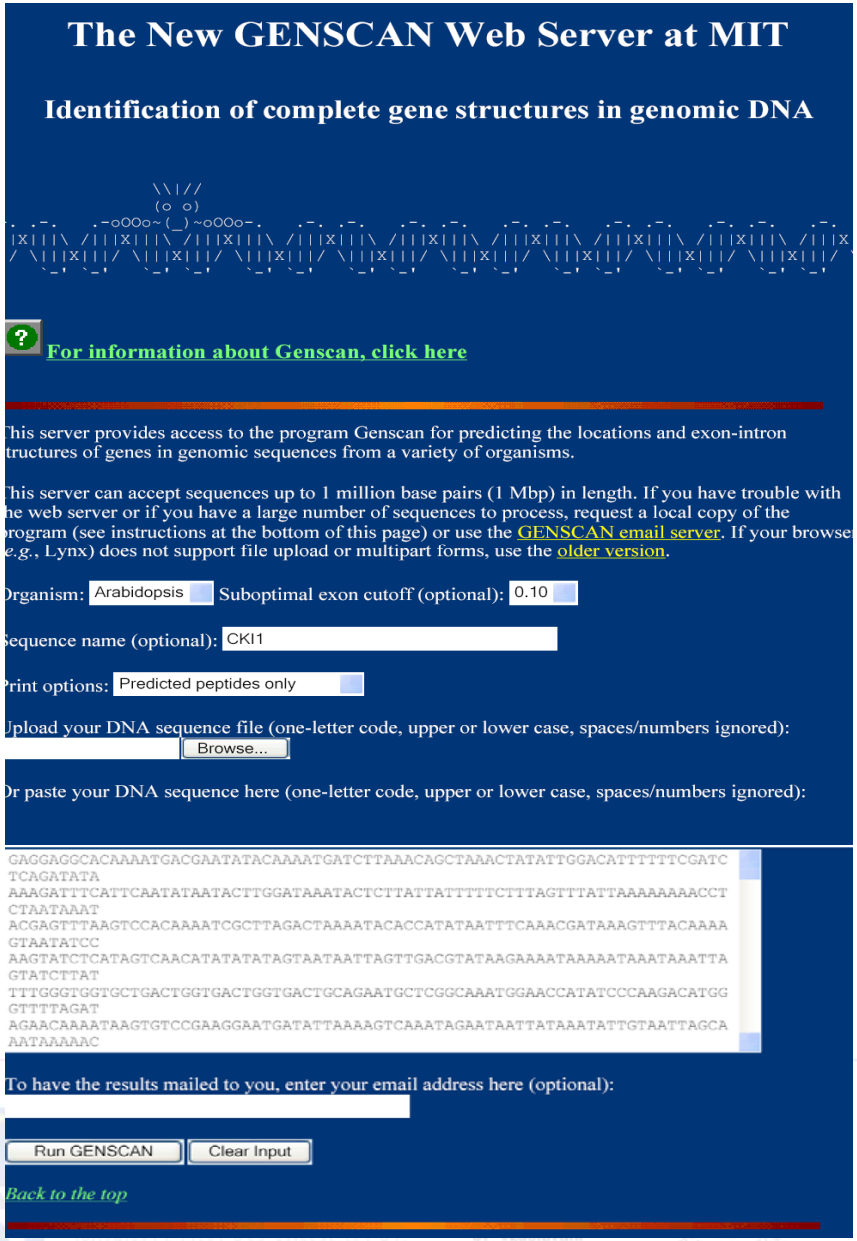
Identification of Genes *Ab Initio*

- Programs for exon prediction
  - 4 types of exons (according to location in the gene):
    - initial
    - internal
    - terminal
    - single
  - Programs predict splice sites and they take into account the structure of the type of exon as well

- initial:
  - Genescan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html)
  - GeneMark.hmm (http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/)
- internal:
  - MZEF (http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/)

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

GENSCAN



The New GENSCAN Web Server at MIT

Identification of complete gene structures in genomic DNA

For information about Genscan, click here

This server provides access to the program Genscan for predicting the locations and exon-intron structures of genes in genomic sequences from a variety of organisms.

This server can accept sequences up to 1 million base pairs (1 Mbp) in length. If you have trouble with the web server or if you have a large number of sequences to process, request a local copy of the program (see instructions at the bottom of this page) or use the GENSCAN email server. If your browser (e.g., Lynx) does not support file upload or multipart forms, use the older version.

Organism: Arabidopsis Suboptimal exon cutoff (optional): 0.10

Sequence name (optional): CKI1

Print options: Predicted peptides only

Upload your DNA sequence file (one-letter code, upper or lower case, spaces/numbers ignored):
Browse...

Or paste your DNA sequence here (one-letter code, upper or lower case, spaces/numbers ignored):

GAGGAGGCACAAAATGACGAATATACAAAATGATCTTAAACAGCTAAACTATATTGGACATTTTTTCGATC
TCAGATATA
AAAGATTTCATTCAATATAATACTTGGATAAATACTCTTATTATTTTTCTTTAGTTTATTAAAAAAAACCT
CTAATAAAT
ACGAGTTTAAGTCCACAAAATCGCTTAGACTAAAATACACCATATAATTTCAAACGATAAAGTTTACAAAA
GTAATATCC
AAGTATCTCATAGTCAACATATATATAGTAATAATTAGTTGACGTATAAGAAAATAAAAATAAATAAATTA
GTATCTTAT
TTTGGGTGGTGCTGACTGGTGACTGGTGACTGCAGAATGCTCGGCAAATGGAACCATATCCCAAGACATGG
GTTTTAGAT
AGAACAAAATAAGTGTCCGAAGGAATGATATTAAAAGTCAAATAGAATAATTATAAATATTGTAATTAGCA
AATAAAAAC

To have the results mailed to you, enter your email address here (optional):

Run GENSCAN Clear Input

Back to the top

GENSCAN

GENSCANW output for sequence CKI1

GENSCAN 1.0 Date run: 10-Nov-105 Time: 02:24:26

Sequence CKI1 : 9490 bp : 36.53% C+G : Isochore 1 (0 - 43 C+G%)

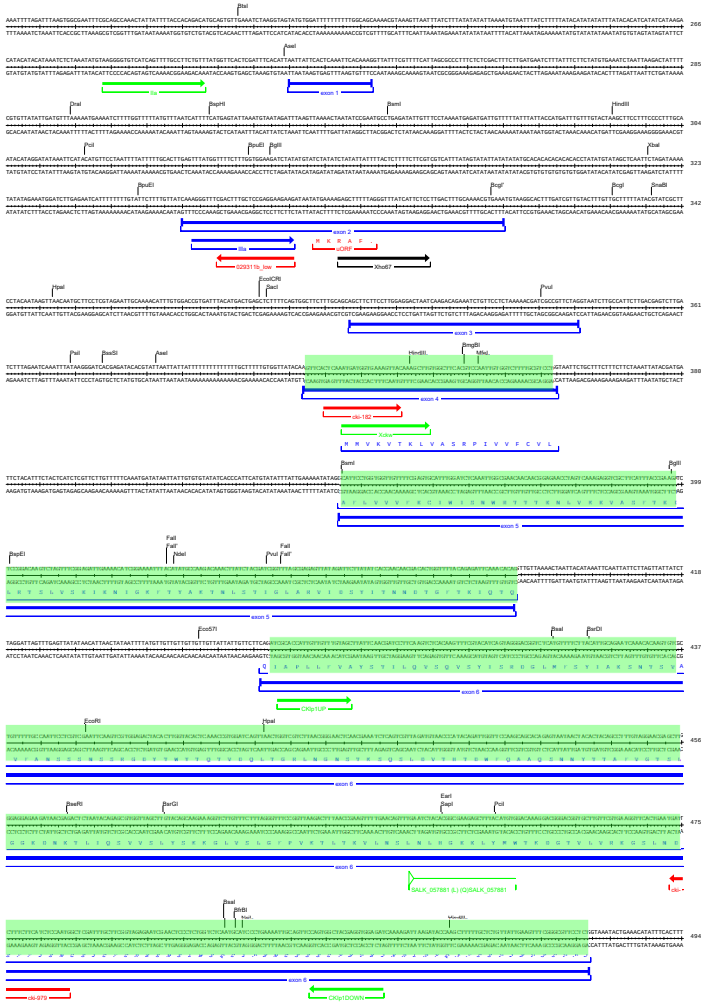
Parameter matrix: Arabidopsis.smat

Predicted genes/exons:

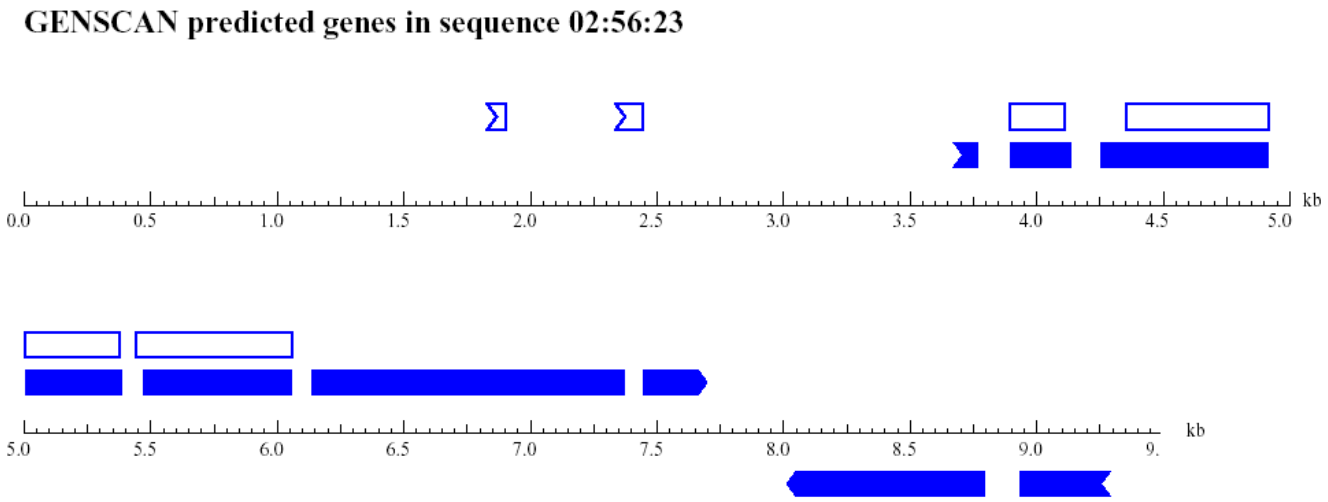
Gn.Ex	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
1.00	Prom	+	1497	1536	40							-3.85
1.01	Init	+	3708	3764	57	2	0	63	51	37	0.499	4.03
1.02	Intr	+	3894	4133	240	2	0	-3	7	327	0.713	17.32
1.03	Intr	+	4255	4914	660	0	0	86	59	296	0.771	22.57
1.04	Intr	+	5005	5383	379	0	1	70	91	343	0.772	31.41
1.05	Intr	+	5473	6056	584	2	2	38	99	582	0.722	50.76
1.06	Intr	+	6136	7368	1233	0	0	68	108	655	0.977	56.86
1.07	Term	+	7448	7660	213	1	0	43	35	212	0.999	12.65
1.08	PlyA	+	7910	7915	6							-0.45
2.03	PlyA	-	7976	7971	6							-4.83
2.02	Term	-	8793	8050	744	0	0	107	37	542	0.997	48.46
2.01	Init	-	9253	8936	318	1	0	105	73	386	0.999	41.18

Suboptimal exons with probability > 0.100

Exnum	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	B/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
S.001	Init	+	1867	1905	39	0	0	64	40	57	0.298	3.74
S.002	Init	+	2374	2442	69	0	0	55	95	-11	0.132	2.40
S.003	Intr	+	3894	4110	217	2	1	-3	-34	307	0.177	11.55
S.004	Intr	+	4352	4914	563	0	2	75	59	338	0.187	26.20
S.005	Intr	+	5005	5379	375	0	0	70	8	335	0.212	22.99
S.006	Intr	+	5442	6056	615	2	0	95	99	589	0.208	57.32



GENSCAN



Regulation of Translation

- Splicing in Untranslated Regions – important regulation part of genes

- Translational repression by short ORFs in 5‘ UTR
- Identified e.g. in maize (Wang and Wessler, 1998, see recommended literature for additional info.)
- In case of CKI1 there was an attempt to prove this mechanism of regulation using transgenic lines carrying *uidA* under control of two versions of promoter (unconfirmed so far)

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Gene Modelling

- Programs for gene modelling
  - Those that take into account other parameters as well, e.g.continuity of ORFs
    - Genescan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html) – very good foor prediction of exons in coding regions (tested for gene *PDR9*, Genescan identified all of the 23 (!) exons)
    - GeneMark.hmm (http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/)
    - GlimmerHMM (http://http://ccb.jhu.edu/software/glimmerhmm/

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

GeneMark

GeneMark™
A family of gene prediction programs provided by Mark Borodovsky's Bioinformatics Group at the Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia.

What's New: - *November, 2005*
Prokaryotes: predicted gene **database**.
Prokaryotes: models for **GeneMark** *and* **GeneMark.hmm**.

Supported by NIH

Gene Prediction in Bacteria and Archaea

For bacterial and archaeal gene prediction, you can use the parallel combination of the GeneMark and GeneMark.hmm programs here.

If the DNA sequence of interest belongs to a species whose name is not in the list of available models, you should use either the Heuristic models option or, if the sequence is longer than 1 Mb, generate models with the self-training program GeneMarkS. Both options will allow you to generate models and then to use GeneMark.hmm and GeneMark in parallel.

Gene Prediction in Eukaryotes

For eukaryotic gene prediction, you can use the parallel combination of the GeneMark and GeneMark.hmm programs here.

Gene Prediction in EST and cDNA

To analyze ESTs and cDNAs, please follow this link.

Gene Prediction in Viruses

For viral gene prediction, or to access our virus database VIOLIN, please follow this link.

What the programs do:

Borodovsky Group

Gene Prediction Programs
- GeneMark
- GeneMark.hmm
- Frame-by-Frame
- GeneMarkS
- Heuristic models

Statistics
- Documented GeneMark.* usage

Help
- References
- Papers
- FAQ
- Contact

Databases of predicted genes
- Prokaryotes New!
- Viruses/Phages (VIOLIN)

Bioinformatics Resources
- Links

Bioinformatics Studies at Georgia Tech
- MS Degree Program
- PhD Program
- Lectures
- Seminars
- Center for Bioinformatics and

Eukaryotic GeneMark.hmm(1,2) (Reload this page)

References:

[1]Borodovsky M. and Lukashin A. (unpublished)
[2]Lomsadze A., Ter-Hovhannisyan V., Chernoff Y. and Borodovsky M., "Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm", **Nucleic Acids Research**, 2005, Vol. 33, No. 20, 6494-6506

Accuracy comparison

UPDATE October 2005. Added pre-built models of eukaryotic GeneMark.hmm ES-3.0 (E - eukaryotic; S - self-training; 3.0 - the version)

Listing of previous updates

Input Sequence

Title (optional):

CK1

Sequence:

Sequence File upload:

Procházet...

Species: Athaliana ES-3.0 Model description

Output Options

Email Address: (required for graphical output or sequences longer than 400000 bp)

- [x] Generate PDF graphics (screen)
- [ ] Generate PostScript graphics (email)
- [ ] Print GeneMark 2.4 predictions in addition to GeneMark.hmm predictions
- [ ] Translate predicted genes into protein

Run Default Start GeneMark.hmm

LÁVÁNÍ
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

GeneMark

Result of last submission:

View PDF Graphical Output

GeneMark.hmm Listing

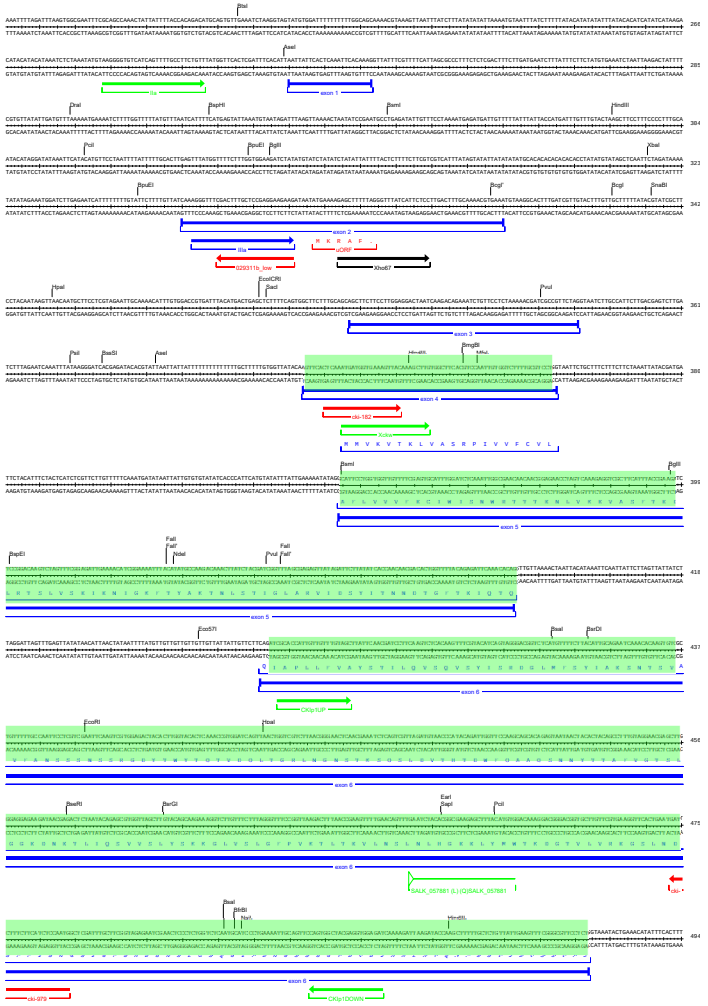
Go to: GeneMark.hmm Protein Translations

Go to: Job Submission

```
Eukariotyc GeneMark.hmm version bp 3.9 April 25, 2008
Sequence name: CKI1
Sequence length: 5043 bp
G+C content: 38.79%
Matrices file: /home/genmark/euk_ghm.matrices/athaliana_hmm3.0mod
Thu Oct  1 11:09:24 2009
```

Predicted genes/exons

Gene #	Exon #	Strand	Exon Type	Exon Range	Exon Length	Start/End Frame
1	1	+	Initial	969 1025	57	1 3 - -
1	2	+	Internal	1155 1394	240	1 3 - -
1	3	+	Internal	1516 2175	660	1 3 - -
1	4	+	Internal	2266 2644	379	1 1 - -
1	5	+	Internal	2734 3317	584	2 3 - -
1	6	+	Internal	3397 4629	1233	1 3 - -
1	7	+	Terminal	4709 4921	213	1 3 - -



EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

/ZDĚLÁVÁNÍ

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

GeneMark

Result of last submission:

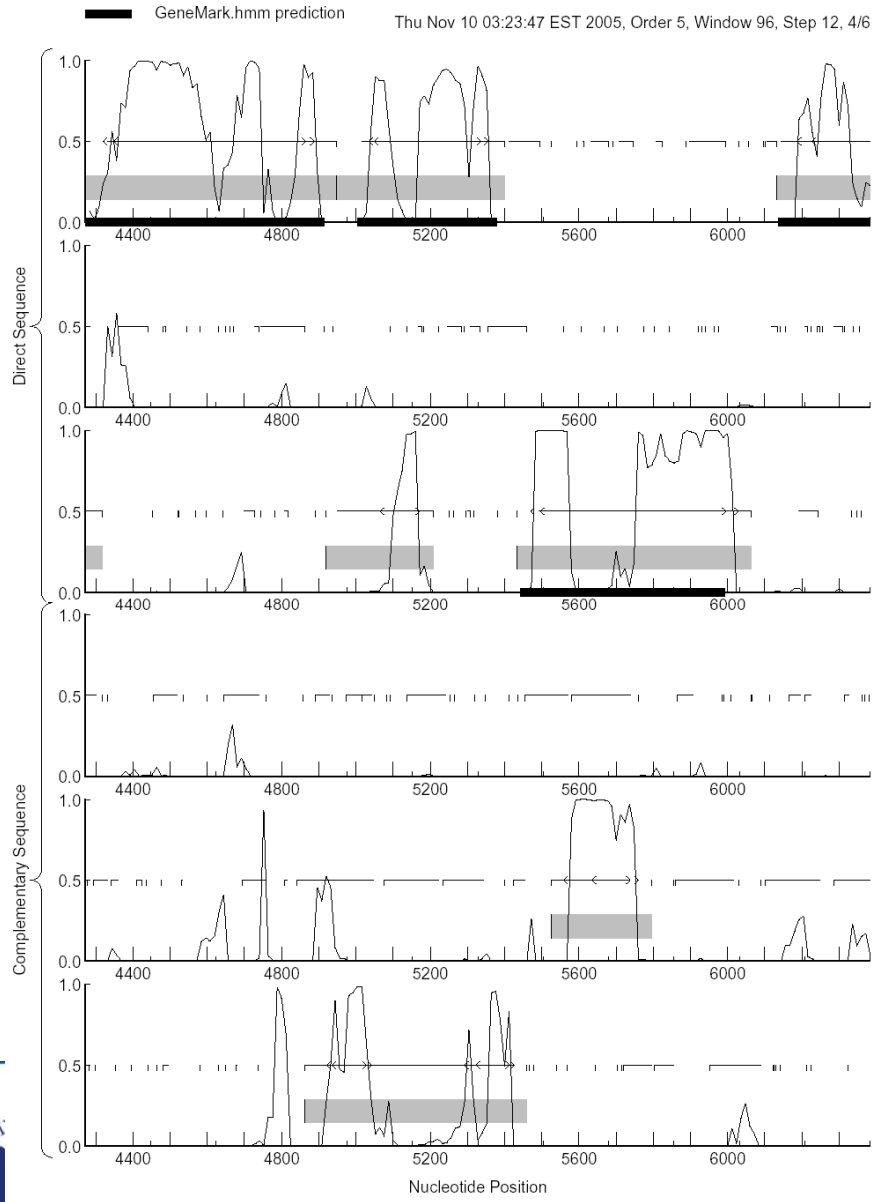
View PDF Graphical Output

GeneMark.hmm Listing

Go to: GeneMark.hmm Protein Translations

Go to: Job Submission

```
Eukariotyc GeneMark.hmm version bp 3.9 April 25, 2008
Sequence name: CKI1
Sequence length: 5043 bp
G+C content: 38.79%
Matrices file: /home/genmark/euk_ghm.matrices/athaliana_hmm3.0mod
Thu Oct  1 11:09:24 2009


Predicted genes/exons

Gene Exon Strand Exon          Exon Range          Exon      Start/End
  #    #         Type                             Length      Frame

  1    1    +   Initial          969 1025 57 1 3 - -
  1    2    +   Internal        1155       1394       240        1 3 - -
  1    3    +   Internal        1515       2175       660        1 3 - -
  1    4    +   Internal        2266       2644       379        1 1 - -
  1    5    +   Internal        2734       3317       584        2 3 - -
  1    6    +   Internal        3397       4629      1233        1 3 - -
  1    7    +   Terminal        4709       4921       213        1 3 - -
```



EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
-ÁVÁNÍ
ancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomic Homologies

- Searching for genes according to homologies with known sequences
  - Comparison with EST databases
    - BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, http://workbench.sdsc.edu/
  - Comparison with protein databases
    - BLASTX (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, http://workbench.sdsc.edu/
    - Genewise (http://www.ebi.ac.uk/Wise2/)

    They compare protein sequence with genomic DNA (after reverse transcription), therefore the aminoacid sequence is needed
  - Comparison with homologous genome sequences from related species
    - VISTA/AVID (http://www.lbl.gov/Tech-Transfer/techs/lbnl1690.html)

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Outline

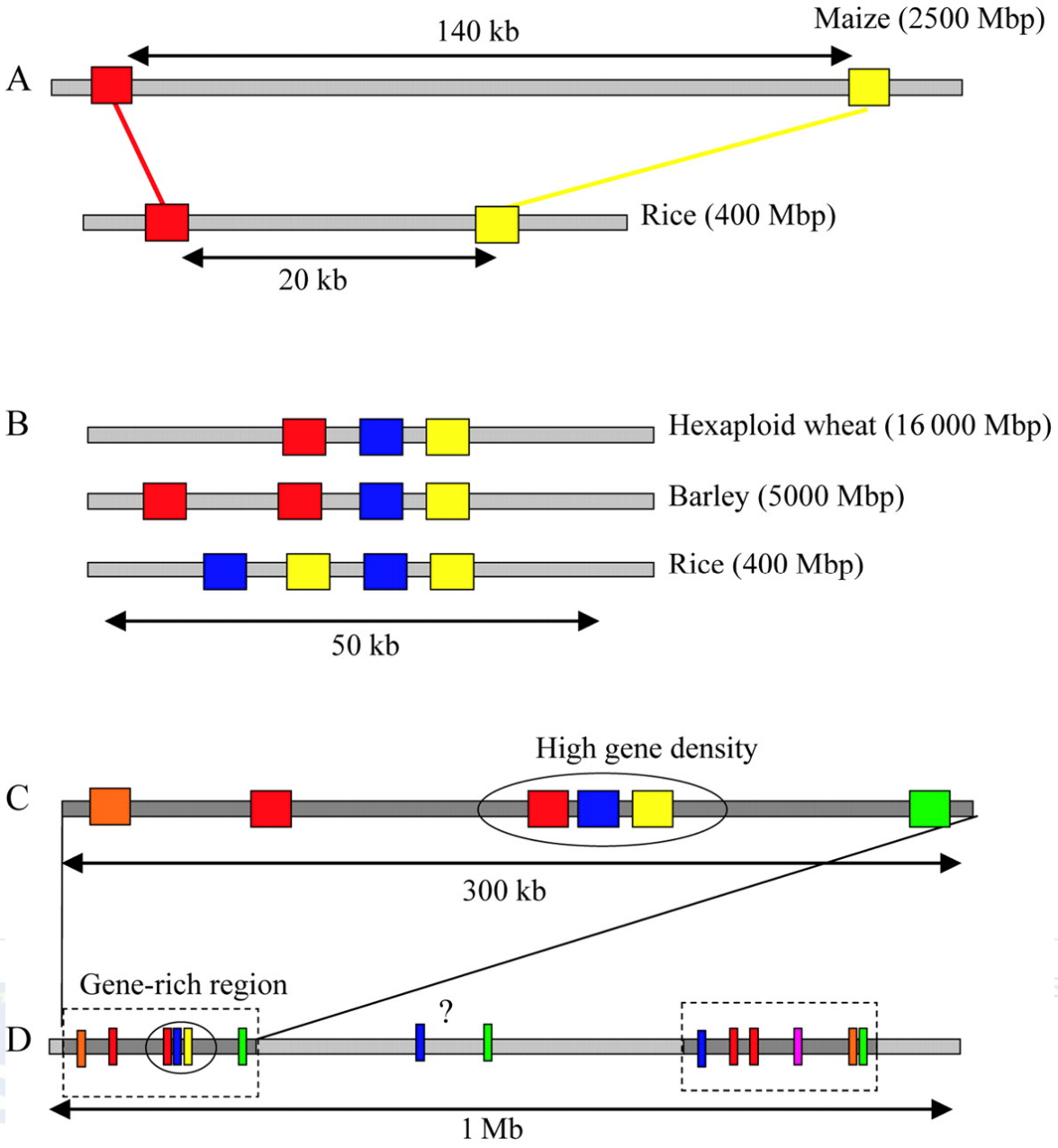
- Forward and Reverse Genetics Approaches
  - Differences between the approaches used for identification of genes and their function
- Identification of Genes *Ab Initio*
  - Structure of genes and searching for them
  - Genomic colinearity and genomic homology

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Genomic Colinearity

- Genomes of related species (despite large differencies) are characterized by similarities in sequence organization -> possibility to use this information for identification of genes in related species when searching in databases
- General scheme of work while applying genomic colinearity (also called „comparative genomics“) for experimental identification of genes in related species:
  - Mapping small genomes using low-copy DNA markers (e.g. RFLP)
  - Using these markers for identification of orthologous genes (genes with the same or similar function) of related species
  - Small genome (e.g. rice, 466 Mbp) can be used as a guide: molecular low-copy markers (e.g. RFLP) bound to gene of interest are identified and these regions are then used as a probe for searching in BAC libraries during identification of orthologous regions of large genomes (e.g. barley: 5 Gbp, or wheat: 16 Gbp)

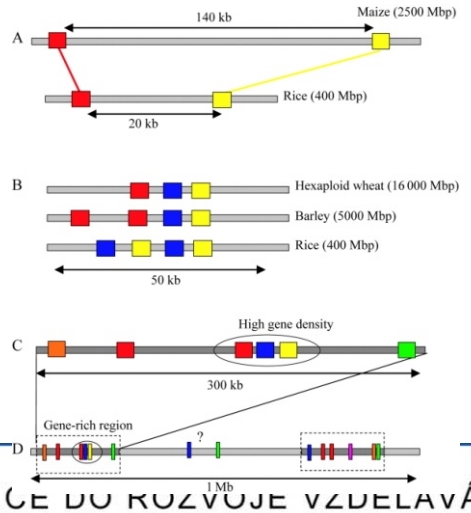
Genomic Colinearity



Feuillet and Keller, 2002

Genomic Colinearity

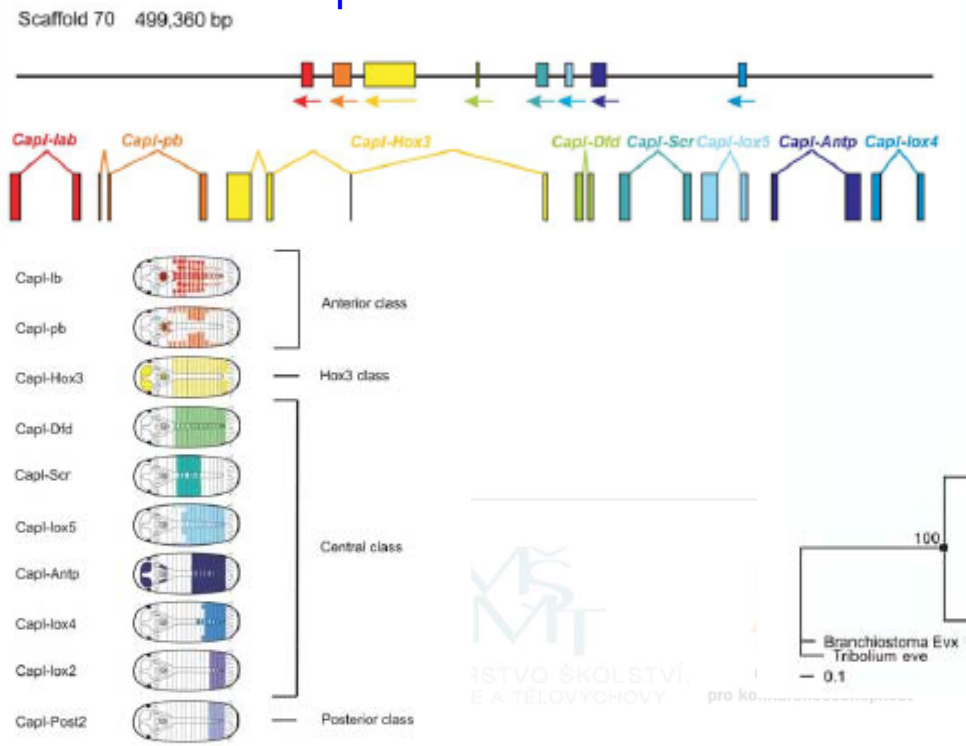
- Can be mostly used for the species of grass (e.g. using related genes of species of barely, wheat, rice, maize)
- Small genome reorganizations (deletions, duplications, inversions, translocations smaller than a few cM) are then detected by detailed sequentional comparative analysis
- During evolution there‘s occured some divergencies in related species, mostly in non-coding regions (invasion of retrotransposons etc.)

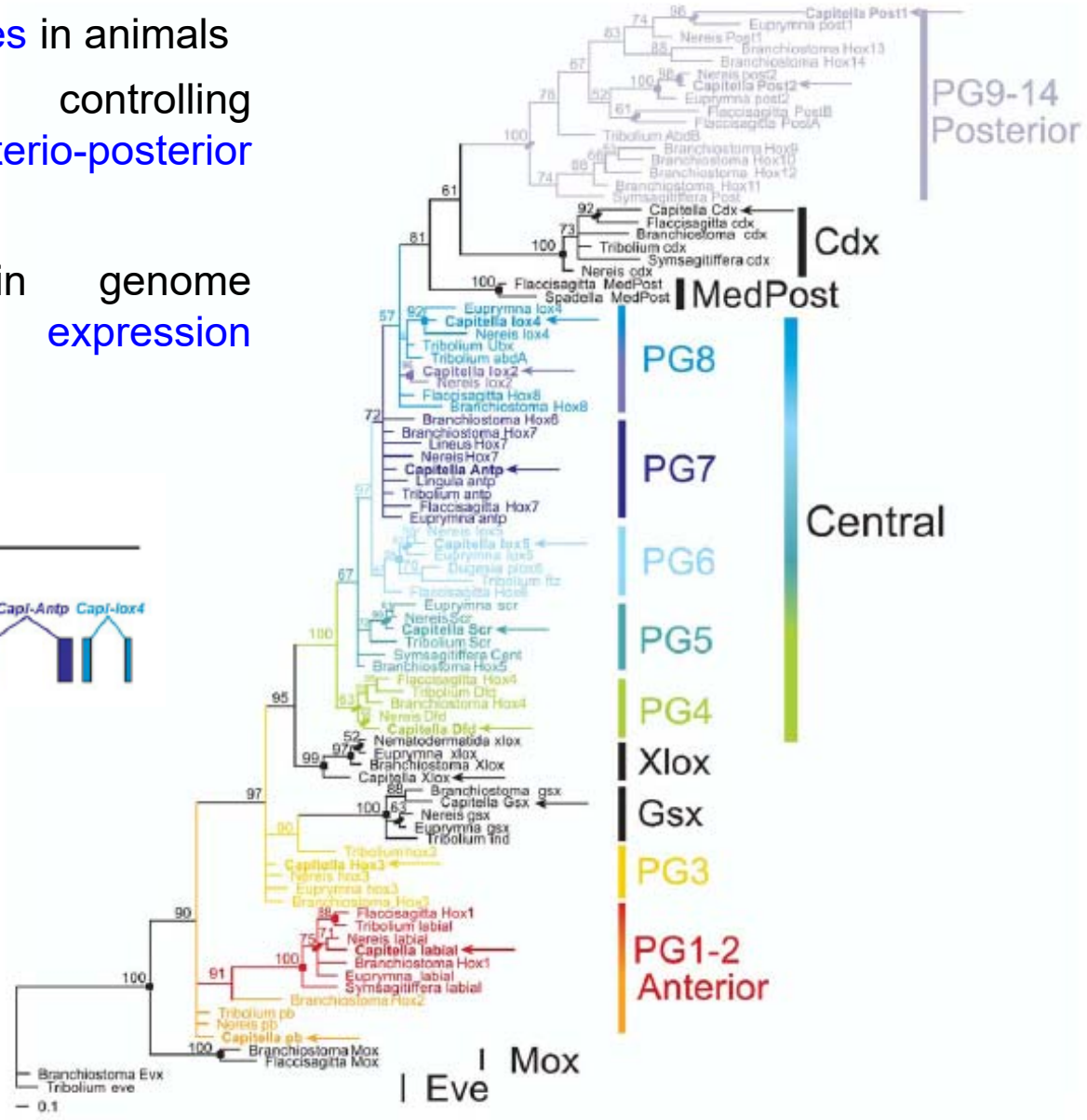


EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Genomic Colinearity

- Genomic colinearity of HOX genes in animals
  - Transcription factors controlling organisation of body in anterio-posterior axis
  - Position of genes in genome corresponds with spatial expression during development
  - Interspecies conservation





Outline

- Forward and Reverse Genetics Approaches
  - Differences between the approaches used for identification of genes and their function
- Identification of Genes *Ab Initio*
  - Structure of genes and searching for them
  - Genomic colinearity and genomic homology
- **Experimental Genes Identification**
  - Constructing gene-enriched libraries using methylation filtration technology

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Methylation Filtration

- Preparation of gene-enriched libraries by technology of methylation filtration
  - genes are (mostly!) hypomethylated, noncoding regions are methylated
  - using bacterial restriction-modification system, which recognizes methylated DNA with restriction enzymes McrA a McrBC
    - McrBC recognizes methylated cytosin (in DNA), which comes after purine (G or A)
    - For cleavage the distance of these sites 40-2000 bp is necessary

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Methylation Filtration

- Preparation of gene-enriched libraries by technology of methylation filtration
  - Scheme of work during preparation of BAC genome libraries using methylation filtration:
    - preparation of genomic DNA without addition of organelle DNA (chloroplasts and mitochondria)
    - fragmentation of DNA (1-4 kbp) and ligation of adaptors
    - preparation of BAC libraries in *mcrBC*+ strain of *E. coli*
    - selection of positive clones
  - Limitied usage: enrichment of coding DNA only approx. 5 -10 %

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

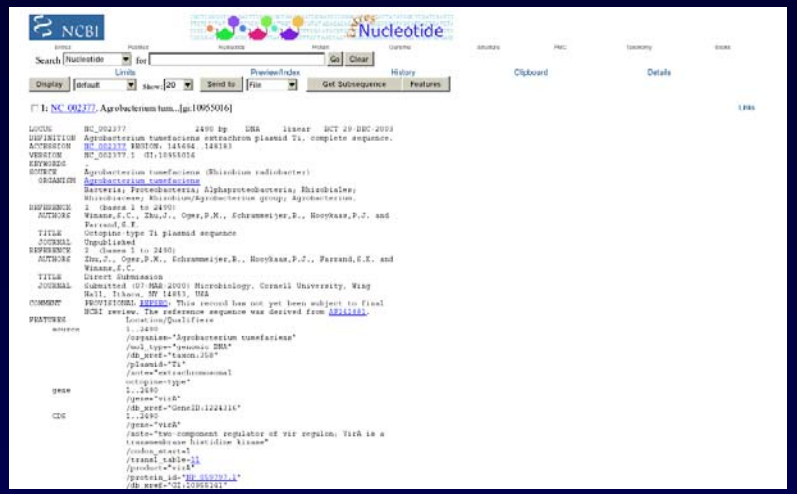
Outline

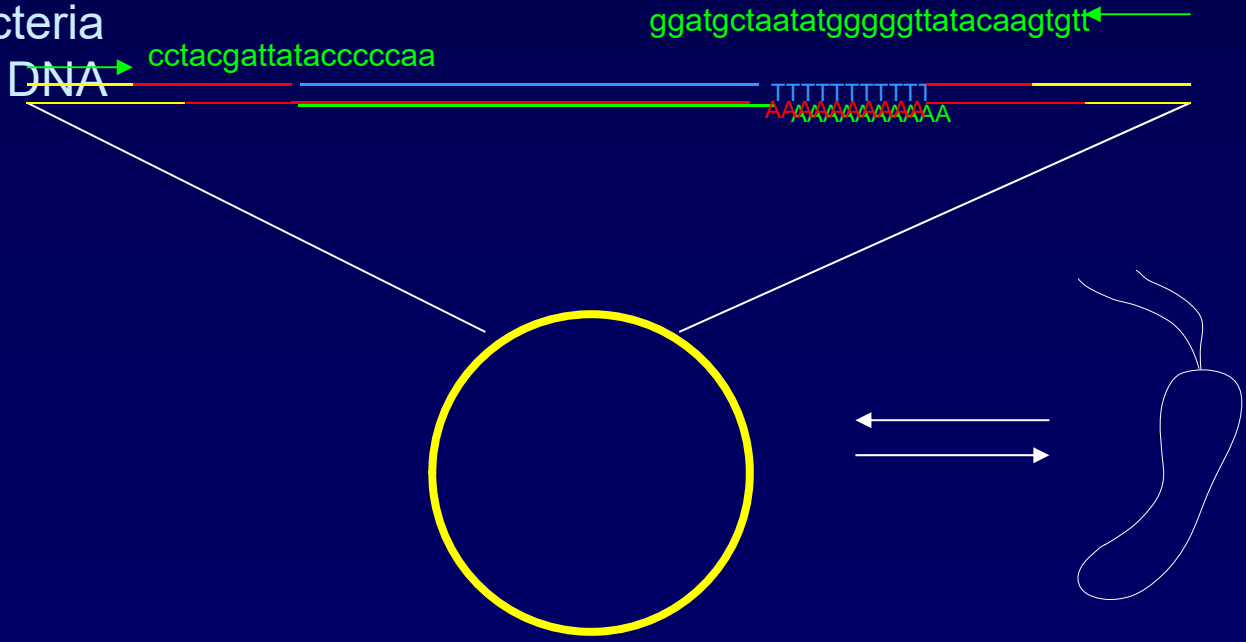
- Forward and Reverse Genetics Approaches
  - Differences between the approaches used for identification of genes and their function
- Identification of Genes *Ab Initio*
  - Structure of genes and searching for them
  - Genomic colinearity and genomic homology
- **Experimental Genes Identification**
  - Constructing gene-enriched libraries using methylation filtration technology
  - EST libraries

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

EST Libraries

- Preparation of EST libraries
  - Isolation of mRNA
  - Reverse transcription
  - Ligation of linkers and synthesis of second cDNA strand
  - Cloning into suitable bacterial vector
  - Transformation into bacteria and isolation of DNA (amplification of DNA)
  - Sequencing using primers specific for used plasmid
  - Saving the results of sequencing into public database





Outline

- Forward and Reverse genetics approaches
  - Differences between the approaches used for identification of genes and their function
- Identification of Genes *Ab Initio*
  - Structure of genes and searching for them
  - Genomic colinearity and genomic homology
- Experimental Genes Identification
  - Constructing gene-enriched libraries using methylation filtration technology
  - EST libraries
  - Forward and reverse genetics

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Discussion

EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky