CG920 Genomics

Finishing 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

Outline

(finishing Lesson 02)

- 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

Forward and Reverse Genetics

- Principles of experimental identification of genes using forward and revers genetics
  - Alteration of phenotype after mutagenesis
    - **Forward genetics**
  - Identification of sequence-specific mutant and analysis of its phenotype
    - **Reverse genetics**
  - Analysis of expression of a particular gene and its spatiotemporal specifity

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

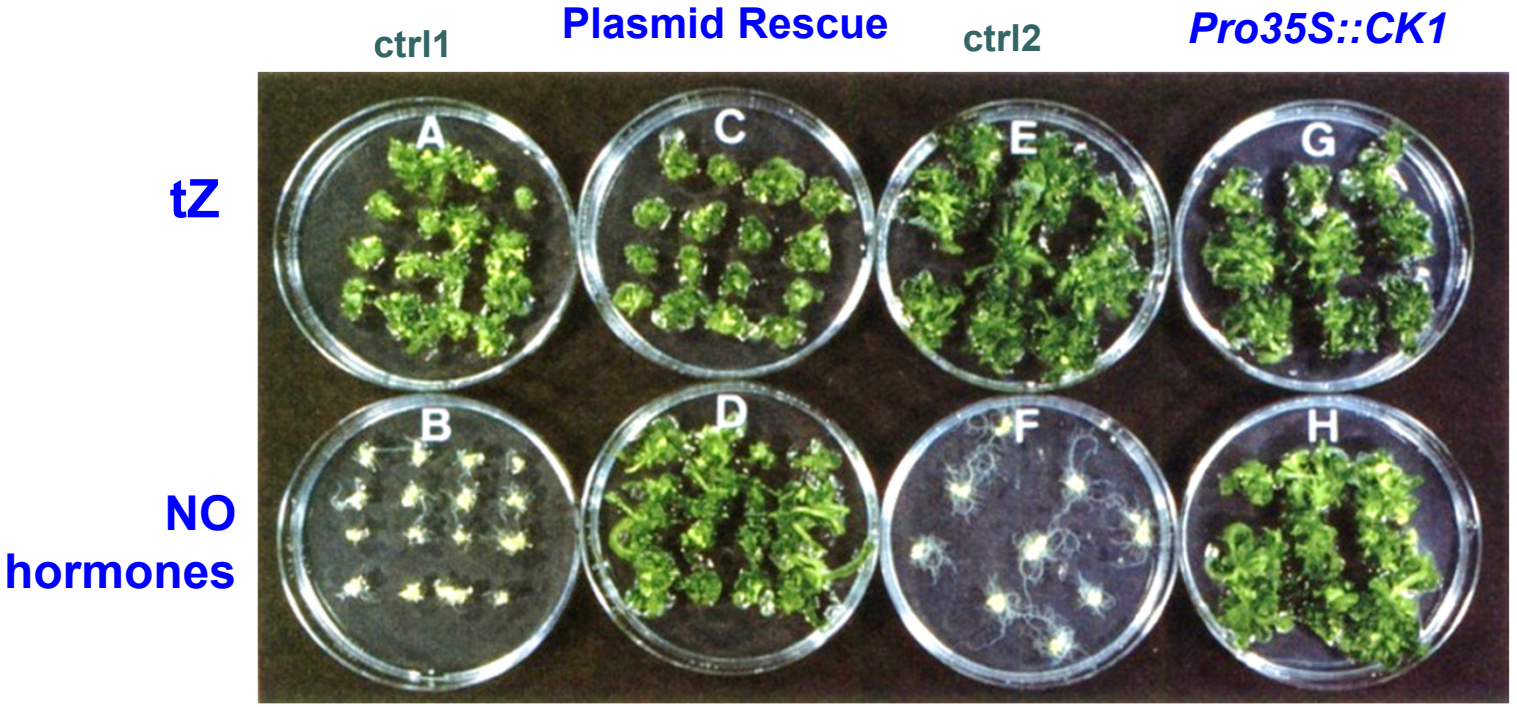
Forward Genetics

- Principles of experimental identification of genes using forward and reverse genetics
  - Alteration of phenotype after mutagenesis
    - **Forward 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

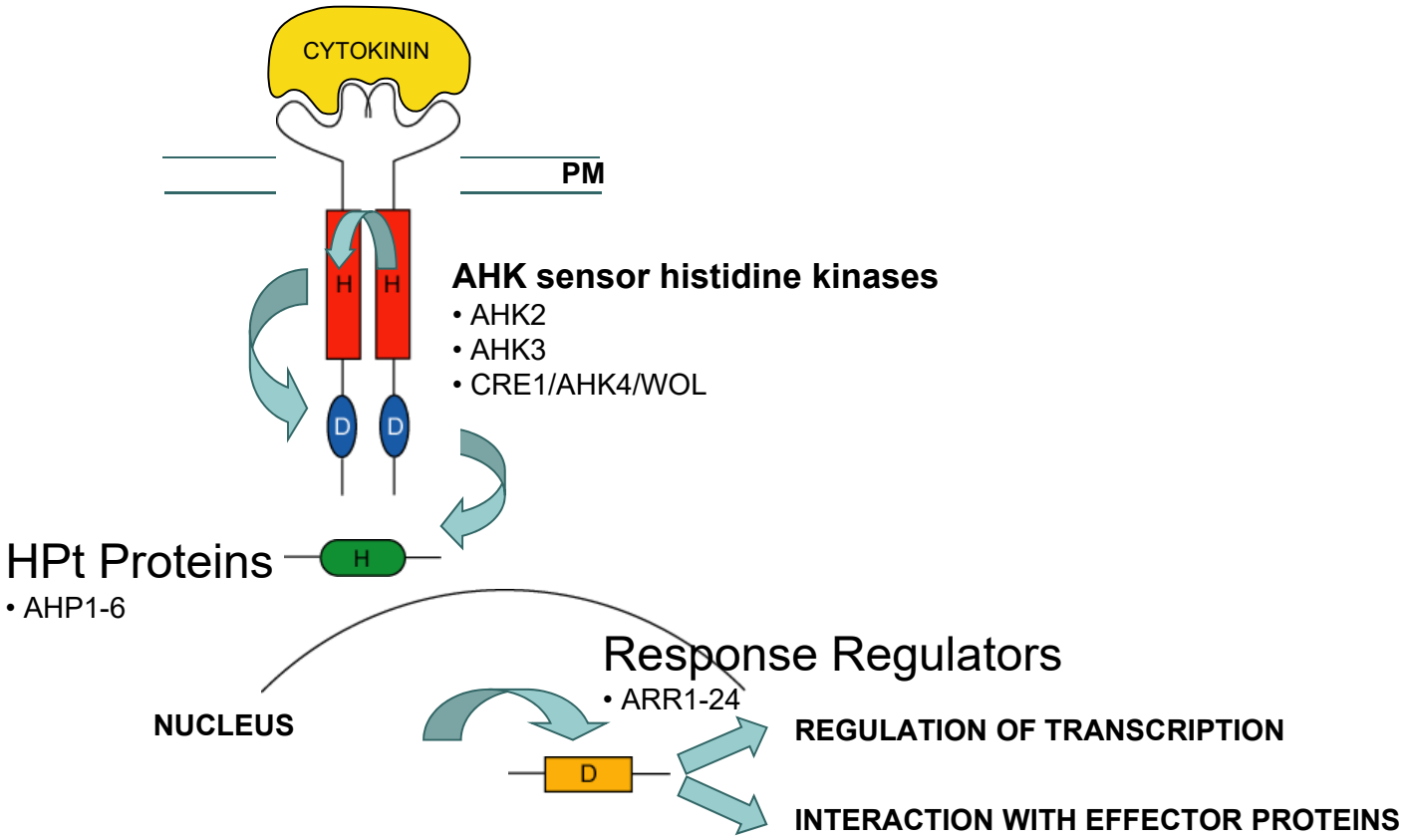
Identification of *CKI1* via Activation Mutagenesis

- *CKI1* overexpression mimics cytokinin response



Kakimoto, *Science*, 1996

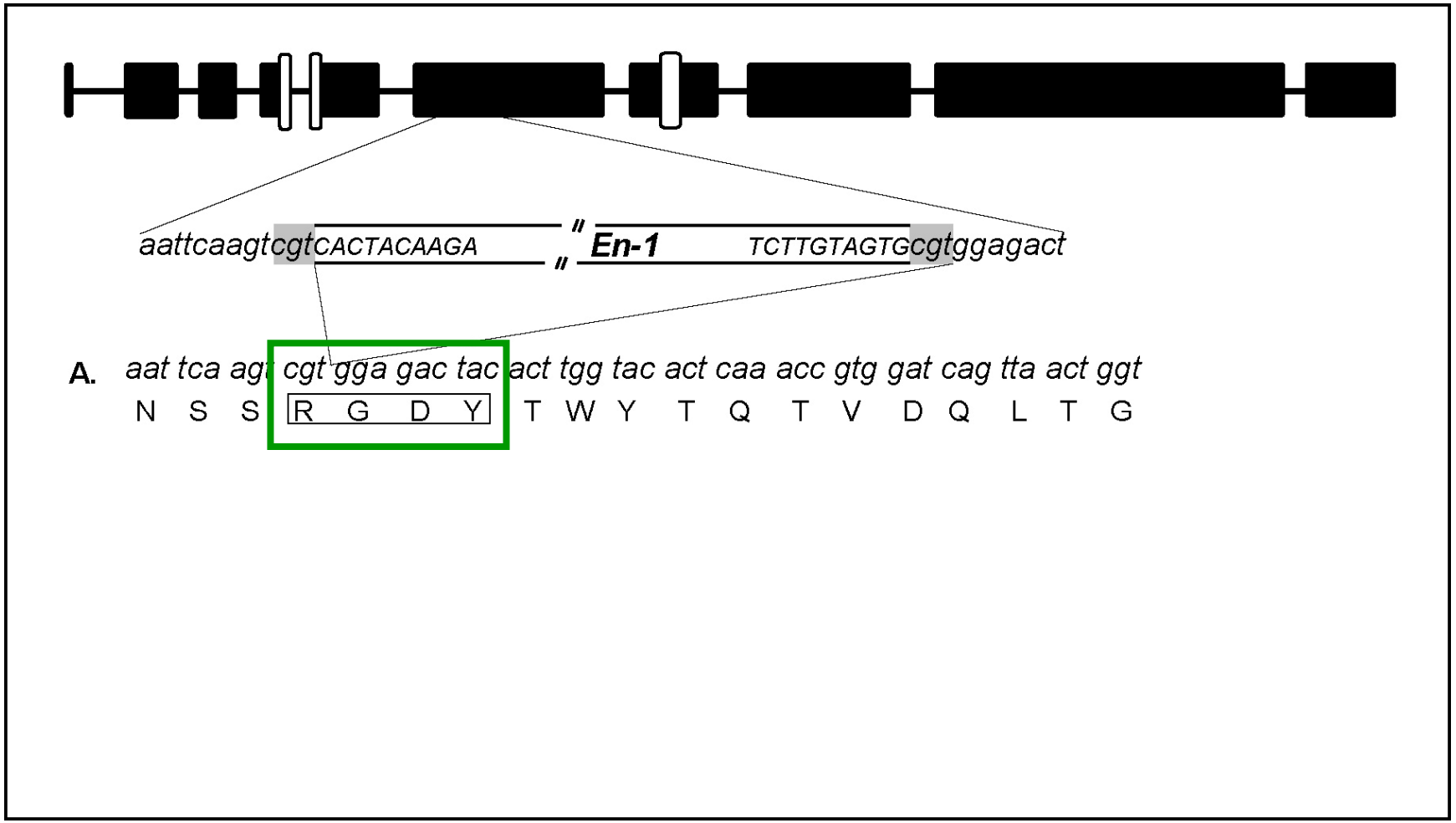
Signal Transduction via MSP



Reverse Genetics

- Principles of experimental identification of genes using forward and revers genetics
  - Alteration of phenotype after mutagenesis
    - **Forward genetics**
  - Identification of insertional mutant and analysis of its phenotype
    - **Reverse genetics**

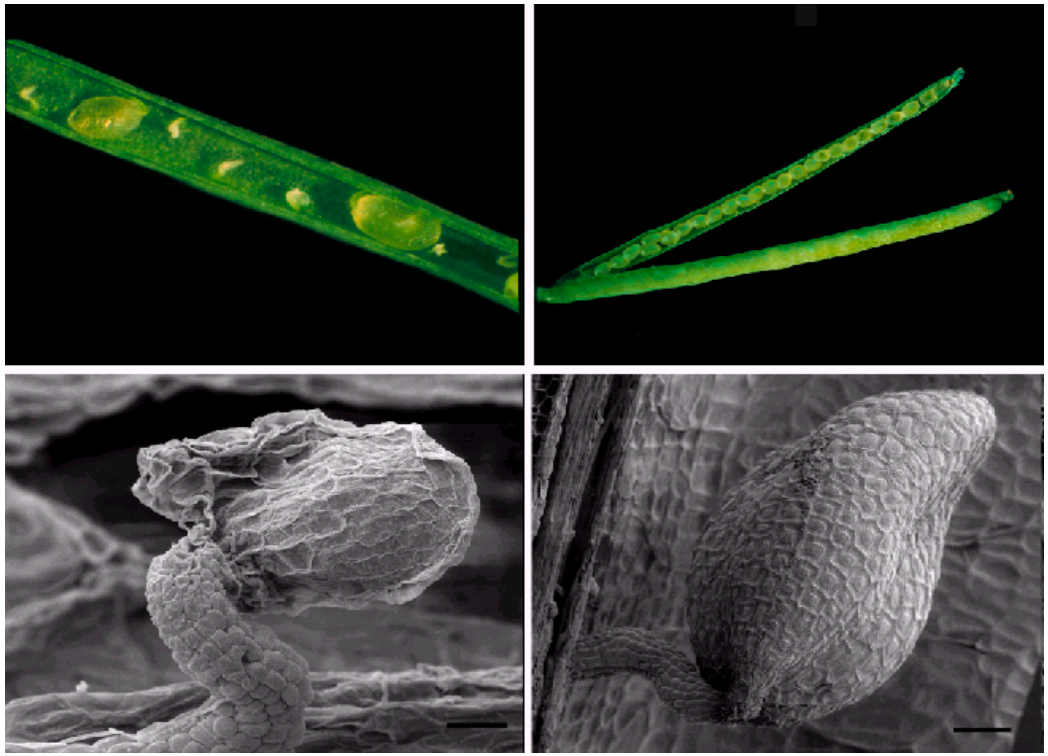
Identification of insertional *cki1* mutant allele



CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

- CKI1 is necessary for proper megagametogenesis in *Arabidopsis*

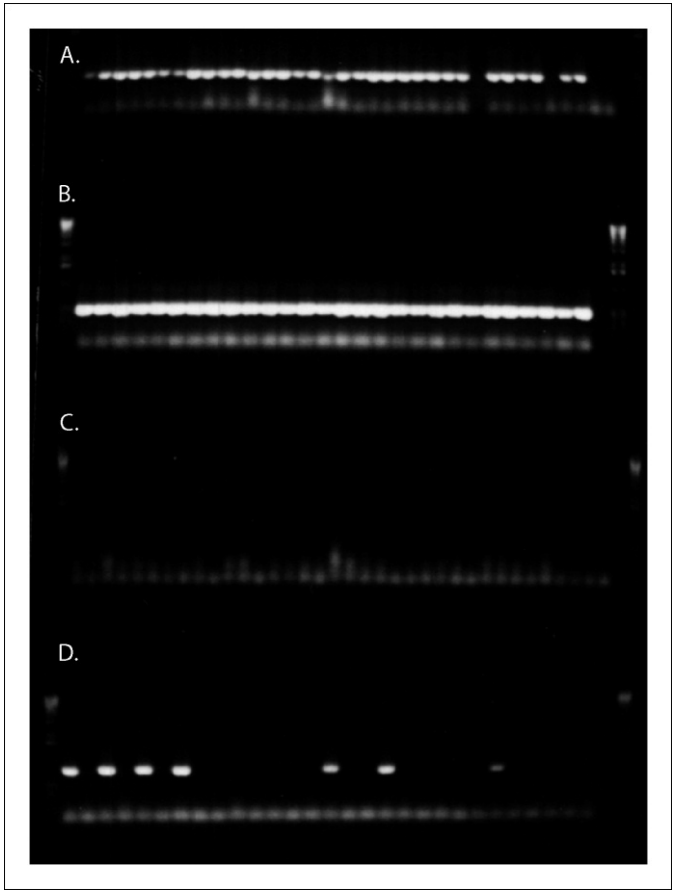
CKI1/cki1-i ***CKI1/CKI1***



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

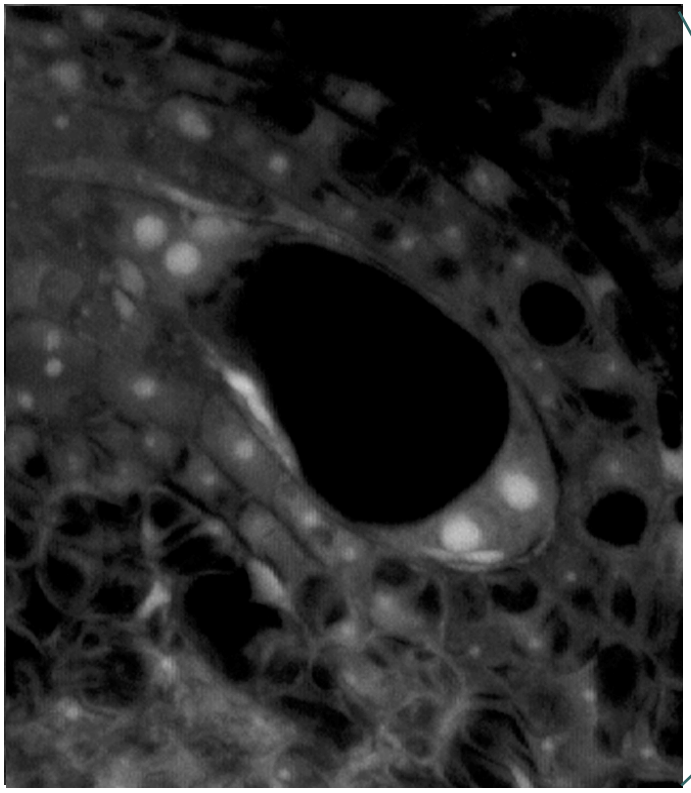
C. ♂ wt x ♀ *CKI1/cki1-i*

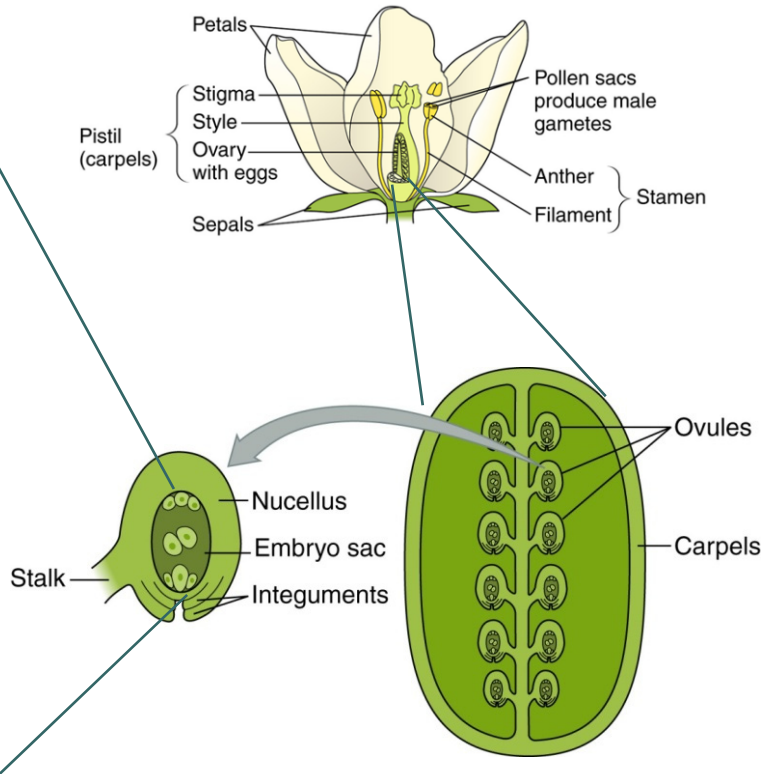
↕ ***cki1-i* specific primers**

D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

CKI1 and Megagametogenesis

FG 4





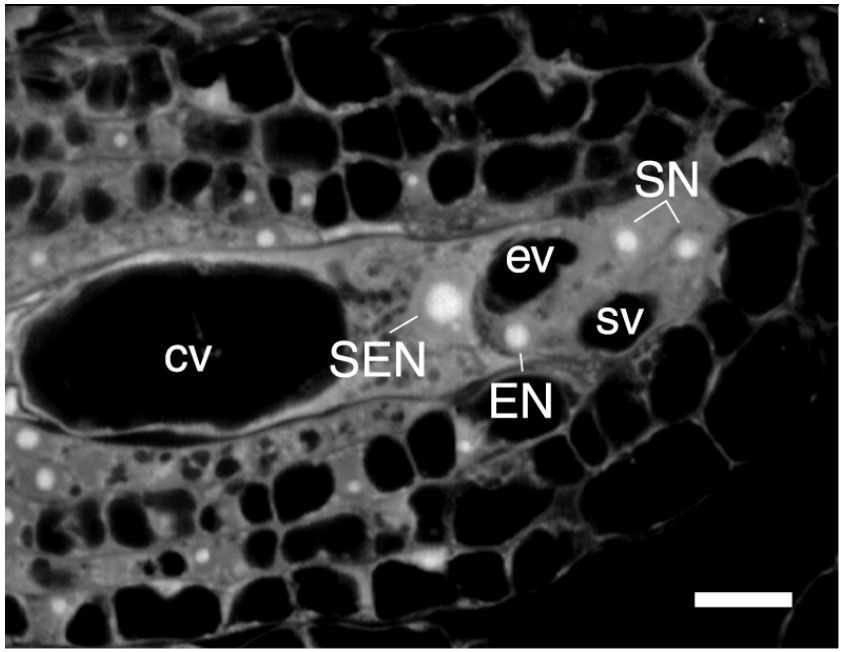
CKI1 and Megagametogenesis

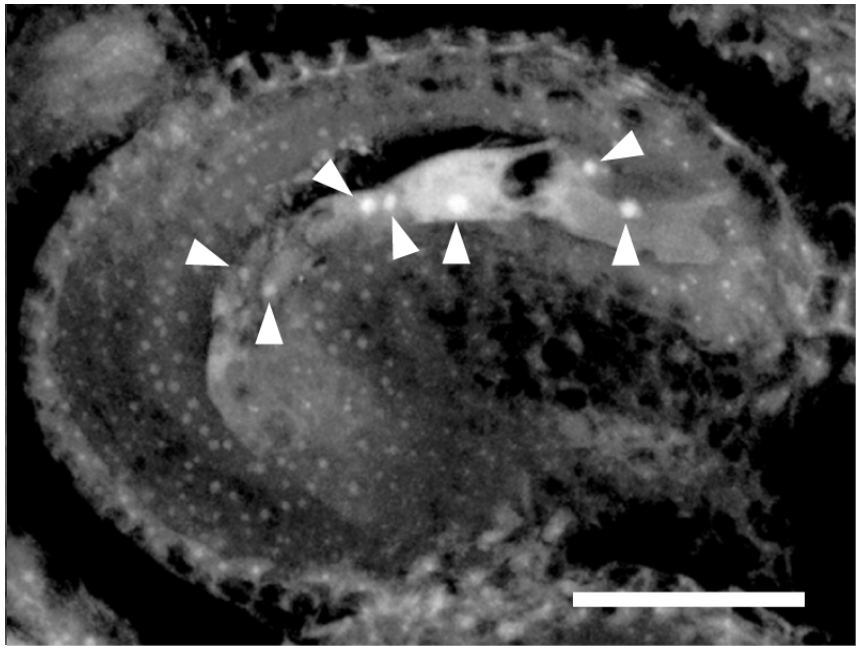
CKI1

Late FG5

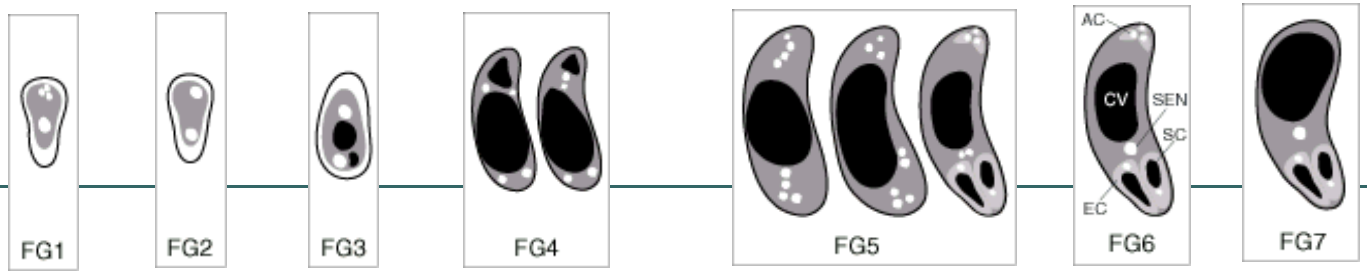
cki1-i

28 HAE





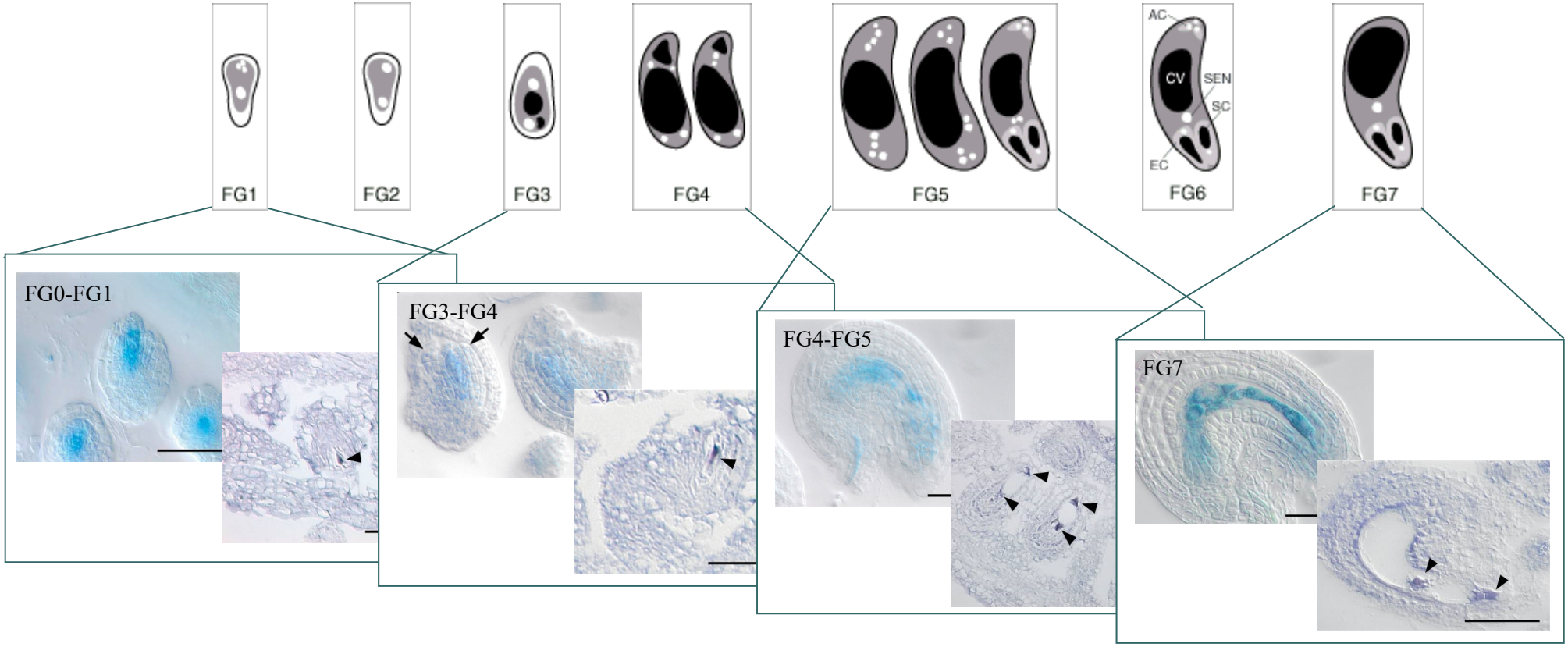
Hejátko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)



Forward and Reverse Genetics

- Principles of experimental identification of genes using forward and reverse genetics
  - Alteration of phenotype after mutagenesis
    - **Forward genetics**
  - Identification of insertional mutant and analysis of its phenotype
    - **Reverse genetics**
  - Analysis of expression of a particular gene and its spatiotemporal specifity

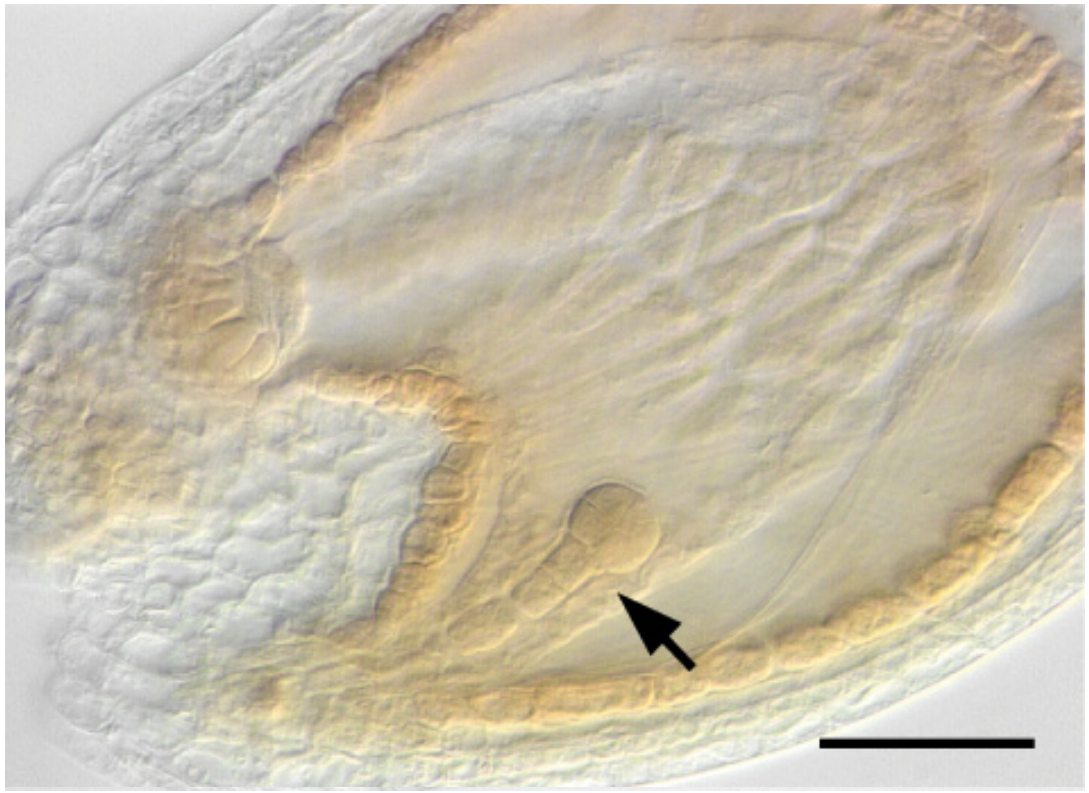
CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



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

♀ wt x ♂ Pro*CKI1:GUS*

~~12~~ ~~24~~ HAP
(hours
after
pollination)



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

CG020 Genomics
Bi7201 Genomics – a basic course

Lesson 3

Reverse Genetics

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

Literature

- Literature sources for Chapter 03:

  - **Bioinformatics and Functional Genomics**, 2009, Jonathan Pevsner, Willey-Blackwell, Hobocken, 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*, **43**1, 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.

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

„Classical“ genetics *versus* „reverse genetics“ approaches in functional genomics

RANDOM MUTAGENESIS

h x n

„Classical genetics“ approach

EMS →

1. IDENTIFICATION OF PHENOTYPE

2. GENE MAPPING

3. GENE IDENTIFICATION
   - position cloning

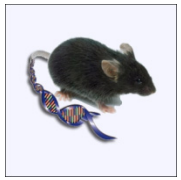
„Reverse genetics“ approach

← T-DNA

1. ISOLATION OF SEQUENCE--SPECIFIC MUTANT

2. IDENTIFICATION OF PHENOTYPE

3. PROOF OF CAUSAL RELATIONSHIP BETWEEN INSERTION AND PHENOTYPE



← (retro)transposons

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

- Methods for Identification of Sequence-Specific Mutants
  - Preparation of mutants collection
  - Searching for sequence-specific mutants using PCR
  - Searching for sequence-specific mutants in electronic databases
  - Knocking-out the gene using homologous recombinantion
- Analysis of Phenotype and Confirmation of Causality Between Phenotype and Insertional Mutation
  - Co-segregation analysis
  - Identification of independent insertional allele
  - Using unstable insertional mutagens and isolation of revertant lines
  - Mutant complementation by the transgene

Outline

- Gene Silencing Using RNA Interference
  - Mechanism of RNA interference
- Genome Editing via CRISPR/Cas9

Outline

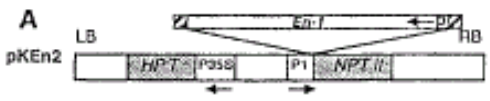
- Methods of identification of sequence-specific mutants
  - Preparation of mutants collection

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

Types of Insertional Mutagens

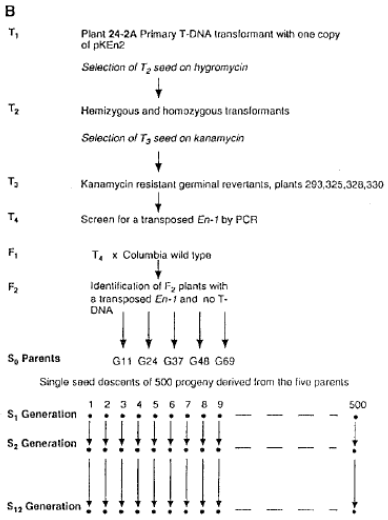
- Mobile elements
  - **Autonomous transposons (*En-1*)**
    - They contain a gene for transponase, enabling excision and reintegration into the genome
    - At both ends they contain short inverted repeat, which are recognized by transponase
- Stable elements
  - **Non-autonomous transposons (*dSpm*)**
    - mutant of En/Spm transposon, which has lost autonomy because of mutation in a gene for transponase
    - It can be activated by crossing with a line carrying the En/Spm transposon
  - **T-DNA**
    - completely stable, however, its insertion can lead to chromosome rearrangements (inversions, deletions, transpositions)

Libraries of Insertional Mutants (plants)

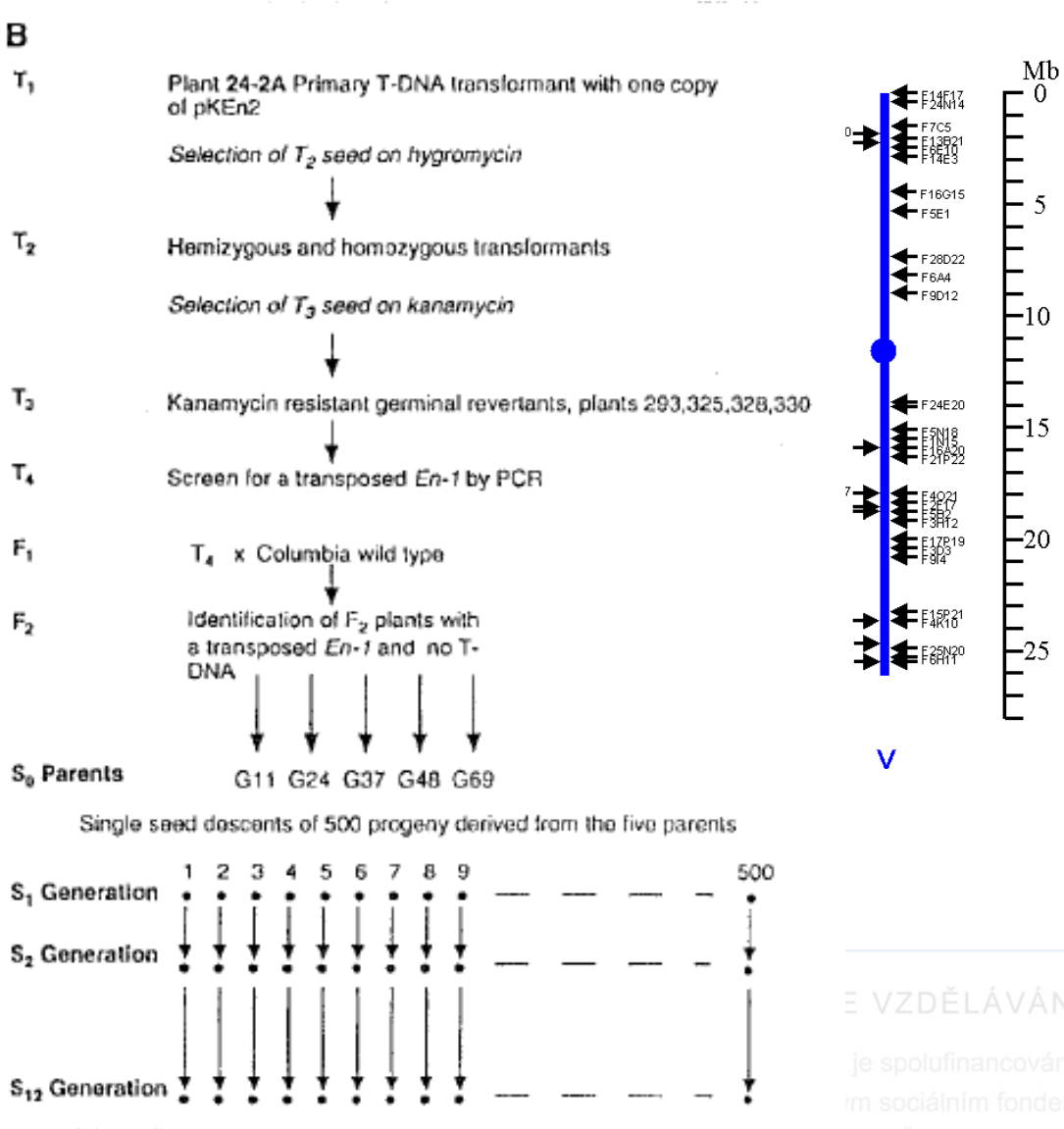


Preparation of transgenic plants

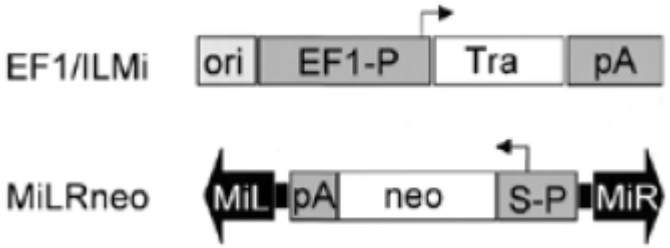
Creating the population of mutants



Searching for sequence-specific mutants by PCR



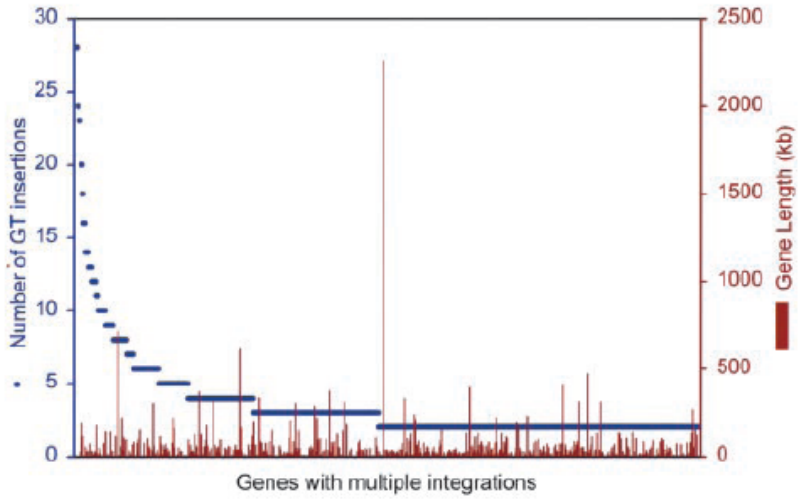
Libraries of Insertional Mutants (animals)

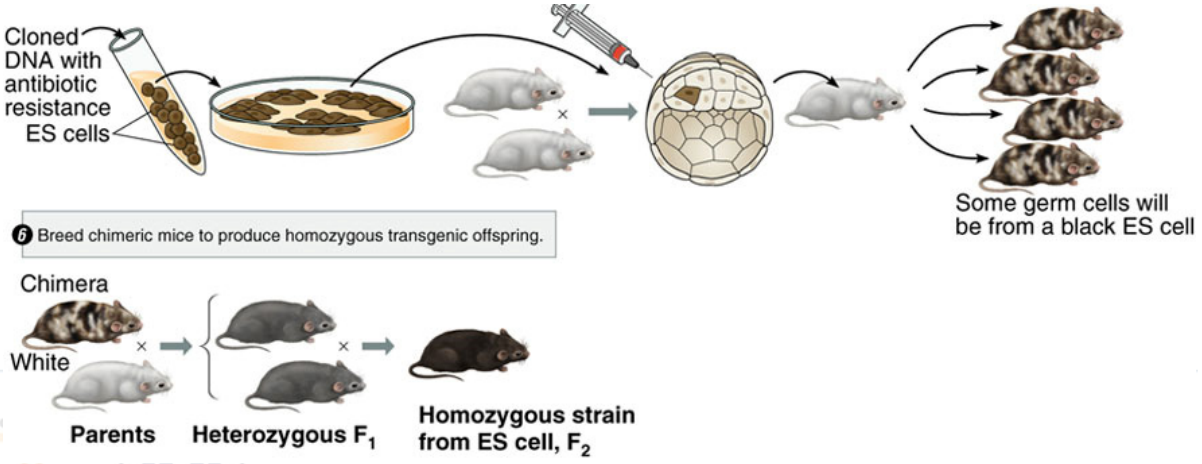


Transfection into human cell cultures (HeLa) or mouse embryonic stem (ES) cells

Generating a population of mutant cell lines and frequence-analysis of insertions

in vitro analysis or preparation of library of insertional mutants by reintroingression ES into mouse embryos





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

Outline

- Methods of identification of sequence-specific mutants
  - Preparation of mutants collection
  - Searching for sequence-specific mutants using PCR
    - PCR-based three-dimensional screening

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

Isolation of sequence-specific mutants

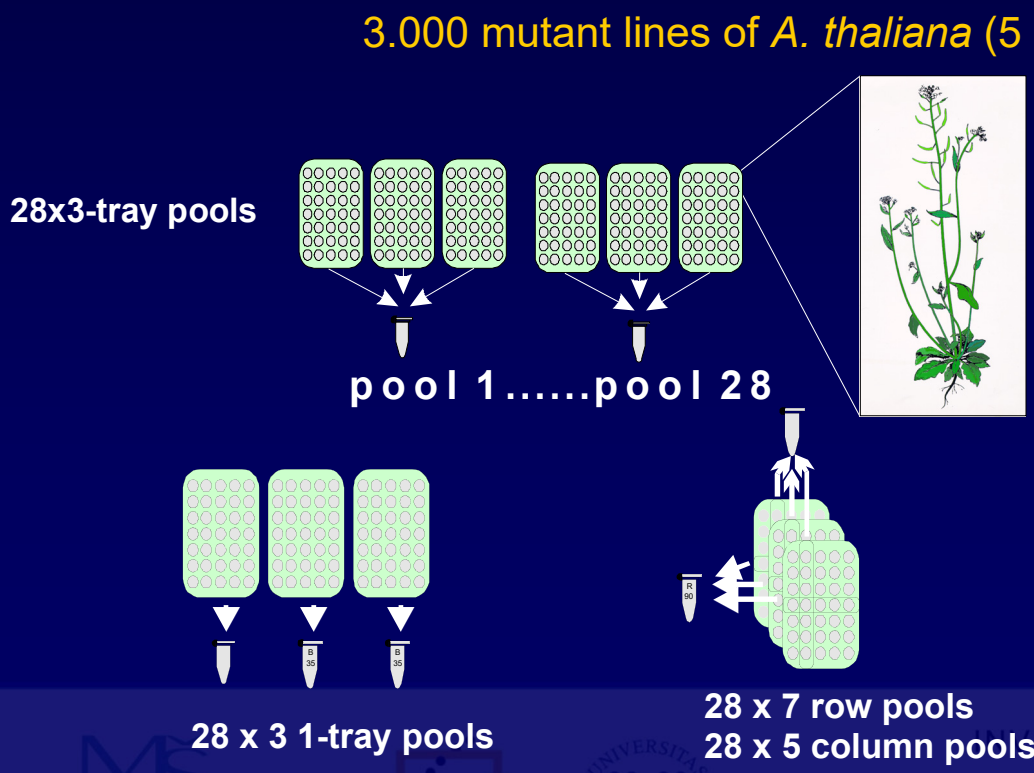
1. Library of *En-1* insertional mutants

- autonomous En/Spm, without selection
- 3000 independent lines
- 5 copies per line on average
- PCR-based three-dimensional screening

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

Isolation of sequence-specific mutants

- PCR-based three-dimensional screening
  - Isolation of genomic DNA from the individual plants of mutant population and creating sets of DNA („triads“, rows and columns of triads and individual trays)



Isolation of sequence-specific mutants

- PCR-based three-dimensional screening
  - Isolation of genomic DNA from the individual plants of mutant population and creating sets of DNA („triads“, rows and columns of triads and individual trays)
  - Identification of positive „triad“ with PCR, blotting of PCR products and hybridization of the PCR products with gene-specific probe

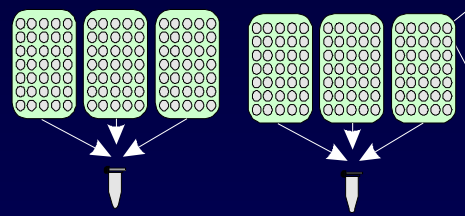
EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Isolation of sequence-specific mutants

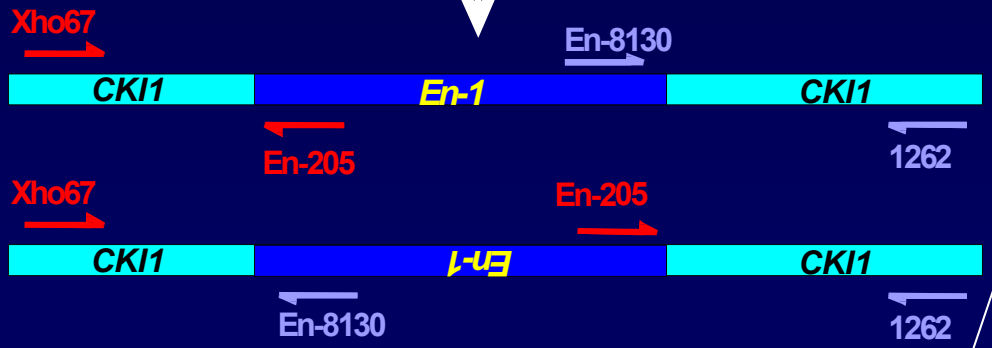
1. 3-tray pools screen

3.000 mutant lines of *A. thaliana* (5 copies of En-1/line)

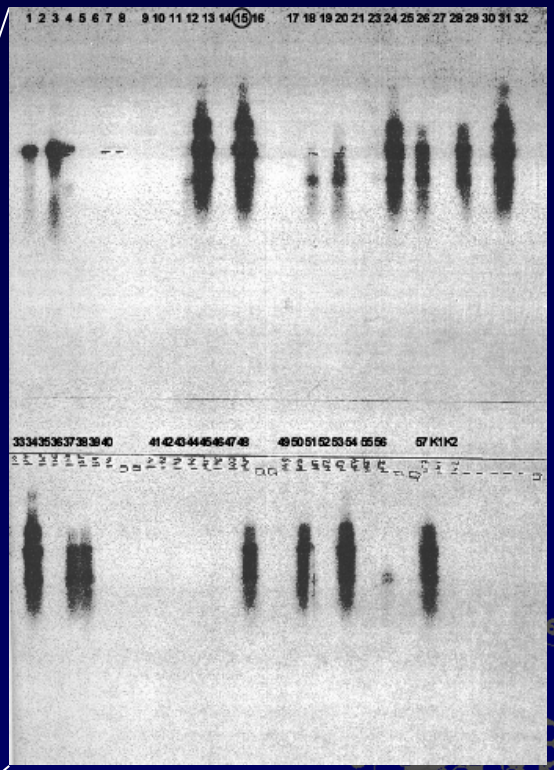
28x3-tray pools



pool 1.....pool 28



(2x2x28=112 PCR reactions)



Identification of the PCR product by hybridization with a gene-specific probe

Isolation of sequence-specific mutants

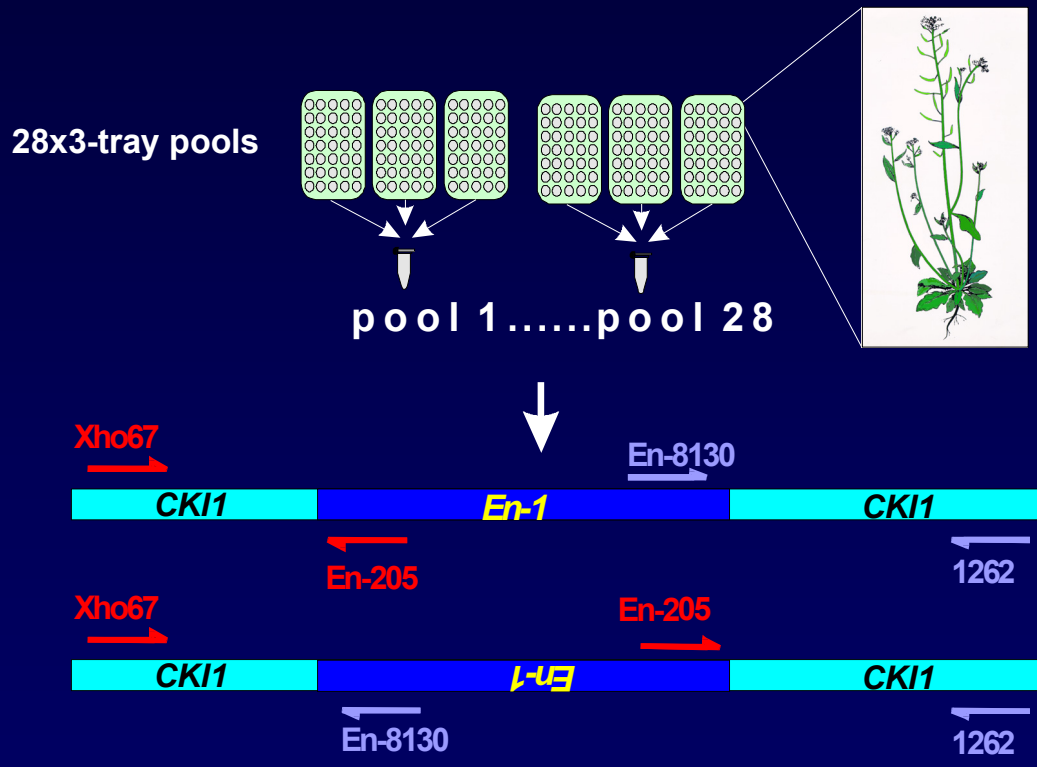
- PCR-based three-dimensional screening
  - Isolation of genomic DNA from the individual plants of mutant population and creating sets of DNA („triads“, rows and columns of triads and individual trays)
  - Identification of positive „triad“ with PCR, blotting of PCR products and hybridization of the PCR products with gene-specific probe
  - Identification of the positive line through identification of positive tray, row and column

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

Isolation of sequence-specific mutants

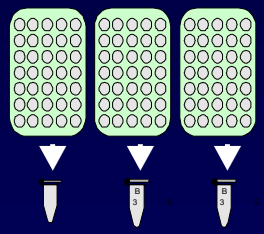
1. 3-tray pools screen

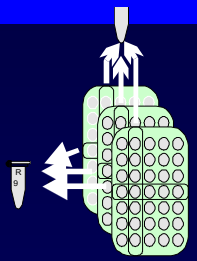
3.000 mutant lines of *A. thaliana* (5 copies of En-1/line)



(2x2x28=112 PCR reactions)

2. Identification of line carrying the insertion





(another 5+7+3=15 PCR reactions)

In total: 112+15=127 PCR reactions

Identification of the PCR product by hybridization with a gene-specific probe

Outline

- Methods of identification of sequence-specific mutants
  - Preparation of mutants collection
  - Searching for sequence-specific mutants using PCR
    - PCR-based three-dimensional screening
    - Hybridization with iPCR products on filters

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

Isolation of sequence-specific mutants

Insertion library of dSpm mutants

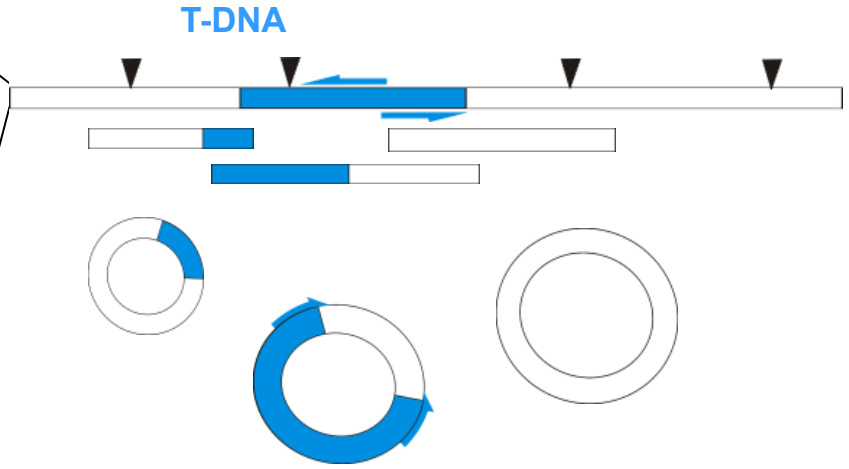
- The Sainsbury Laboratory (SLAT-lines), John Innes Centre, Norwich Research Park
- DNA and seeds in Nottingham Seed Stock Centre
- 48.000 lines
- 1.2 insertion per line on average
- non-autonomous transposon
- PCR searching or hybridization with iPCR filters
- SINS (sequenced insertion sites) database

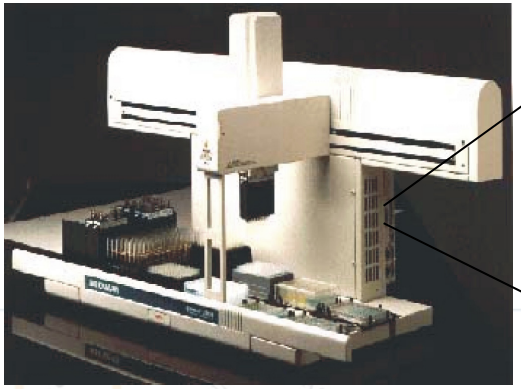
http://nasc.nott.ac.uk

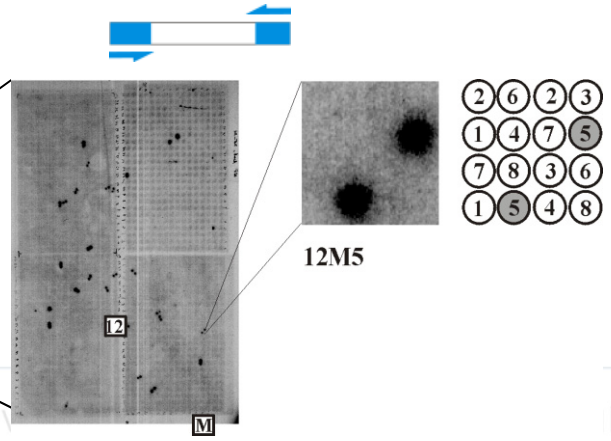
Isolation of sequence-specific mutants

- Hybridization with products of iPCR on filters

  - Isolation of genomic DNA from the individoul plants of mutant population
  - Restriction endonuclease cleavage
  - Ligation, formation of circular DNA
  - Inverse PCR (iPCR) using the T-DNA specific primers
  - Preparation of nylon filters with PCR products in the exact position using a robot
  - Hybridization with a gene-specific probe







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

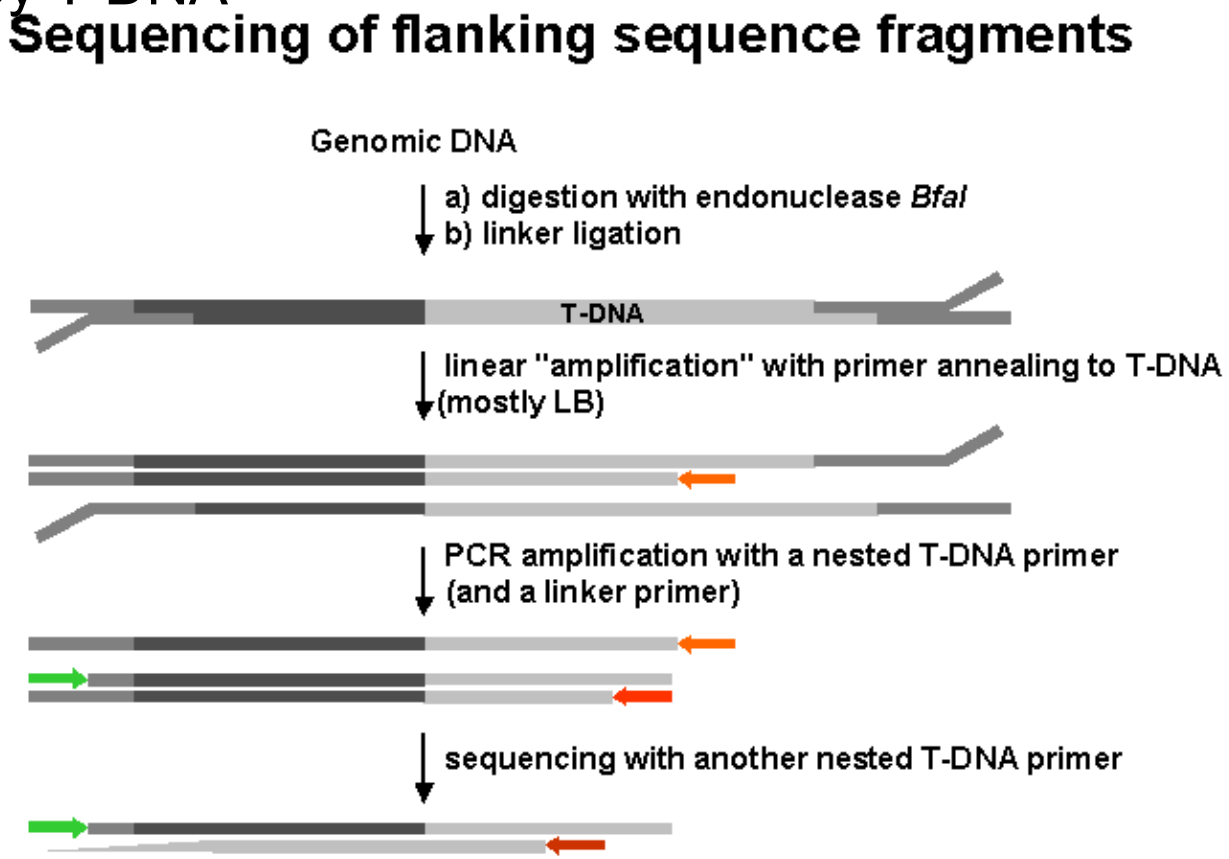
Outline

- Methods of identification of sequence-specific mutants
  - Preparation of mutants collection
  - Searching for sequence-specific mutants using PCR
  - Searching for sequence-specific mutants in electronic databases

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

Isolation of sequence-specific mutants

Preparation of librares from population of *A. thaliana* mutated by T-DNA



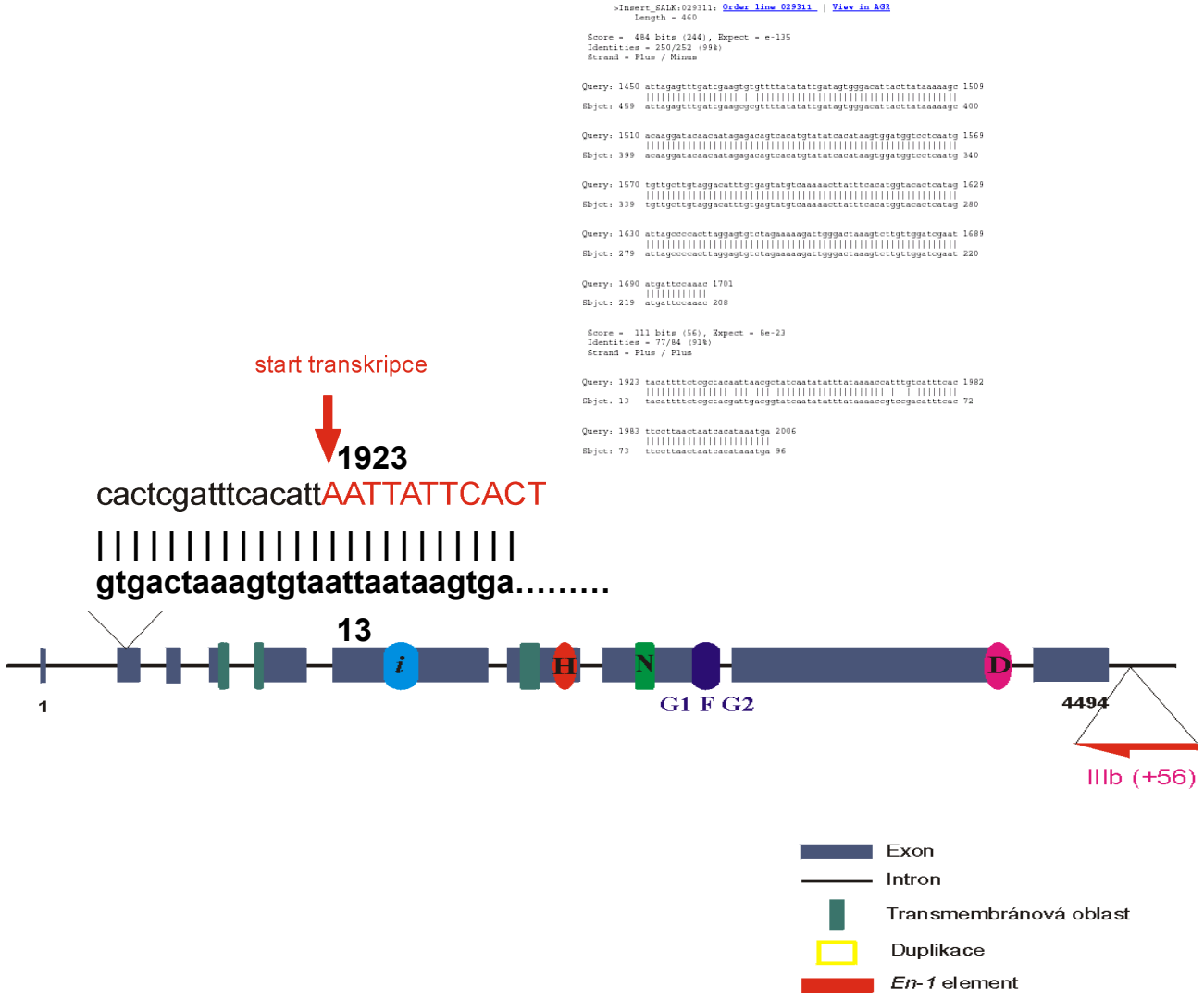
GABI-Kat (MPIZ, Köln)

Searching in electronic libraries of insertional mutants

```
>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 attagagtttgattgaagtgtgttttatatattgatagtgggacattacttataaaaagc 1509
            |||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 459  attagagtttgattgaagcgcgttttatatattgatagtgggacattacttataaaaagc 400


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


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


Query: 1630 attagccccacttaggagtgtctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 1689
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 279  attagccccacttaggagtgtctagaaaaagattgggactaaagtcttgttggatcgaat 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 tacatttttctgctacaattaacgctatcaatatatttataaaaccatttgtcatttcac 1982
            |||||||||||||||| ||| ||| |||||||||||||||||||| |   | ||||||||
Sbjct: 13   tacatttttctgctacgattgacggtatcaatatatttataaaaccgtccgacatttcac 72


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


Sbjct: 292  ccagcttctagaagcttcttggtcaagtttccagtaccgggacgatctcgagaatcaca 233
```

AGR insert page View detailed information on insert sequences in AGR

Searching in electronic libraries of insertional mutants

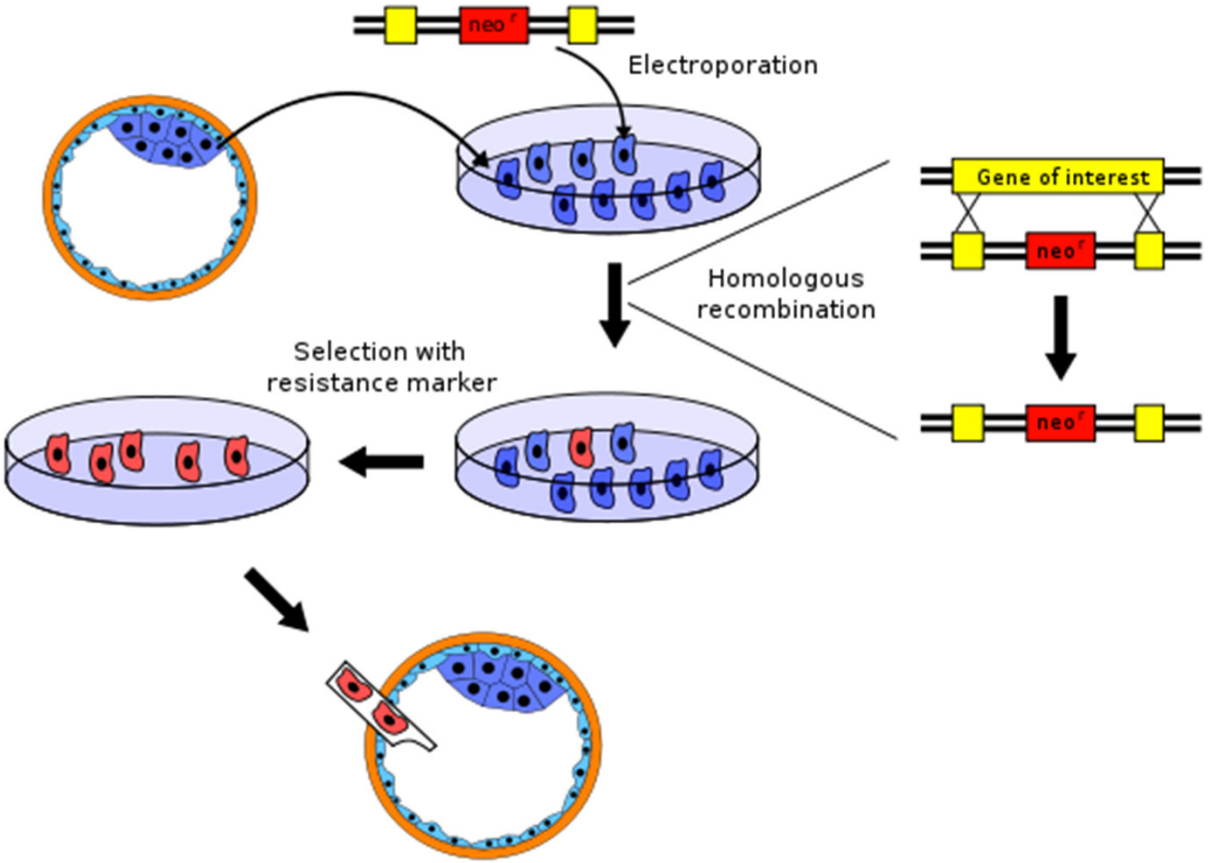


EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Outline

- Methods for Identification of Sequence-Specific Mutants
  - Preparation of mutants collection
  - Searching for sequence-specific mutants using PCR
  - Searching for sequence-specific mutants in electronic databases
  - Knocking-out the gene using homologous recombinantion

Knocking-Out the Gene



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

- Methods for Identification of Sequence-Specific Mutants
  - Preparation of mutants collection
  - Searching for sequence-specific mutants using PCR
  - Searching for sequence-specific mutants in electronic databases
  - Knocking-out the gene using homologous recombinantion
- Analysis of Phenotype and Confirmation of Causality Between Phenotype and Insertional Mutation
  - Co-segregation analysis
  - Identification of independent insertional allele
  - Using unstable insertional mutagens and isolation of revertant lines
  - Mutant complementation by the transgene

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

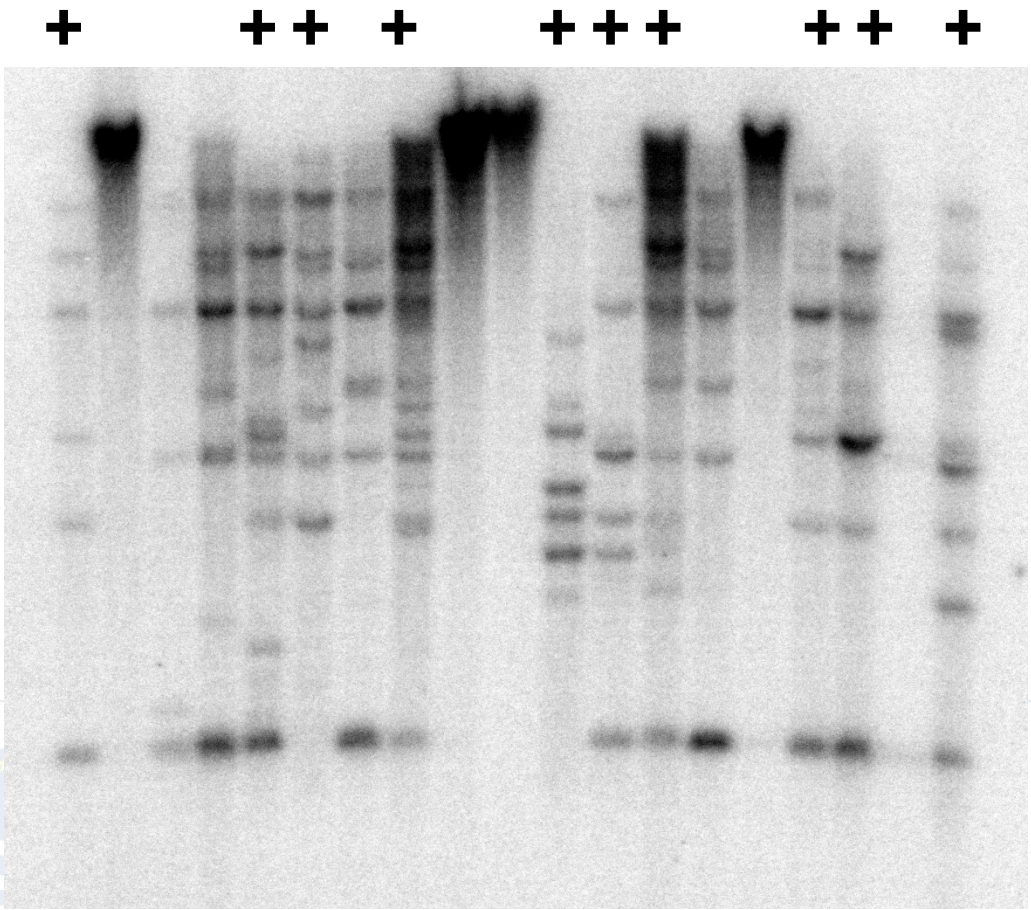
Why is it necessary to analyze the causality between the insertion and the observed phenotype?

- Presence of multiple insertions in one line
- Posibility of independent point mutation occurrence
- Insertions of T-DNA are often associated with chromosomal aberrations (duplications, inversions, deletions)

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

Causality between insertion and phenotype

- **Co-segregation analysis**
  - Co-segregation of specific fragment, e.g. after insertion of T-DNA (or exposure to EMS etc.) into the genome of the observed phenotype



Use of autonomous transposons for the isolation of new stable mutations and of revertant lines

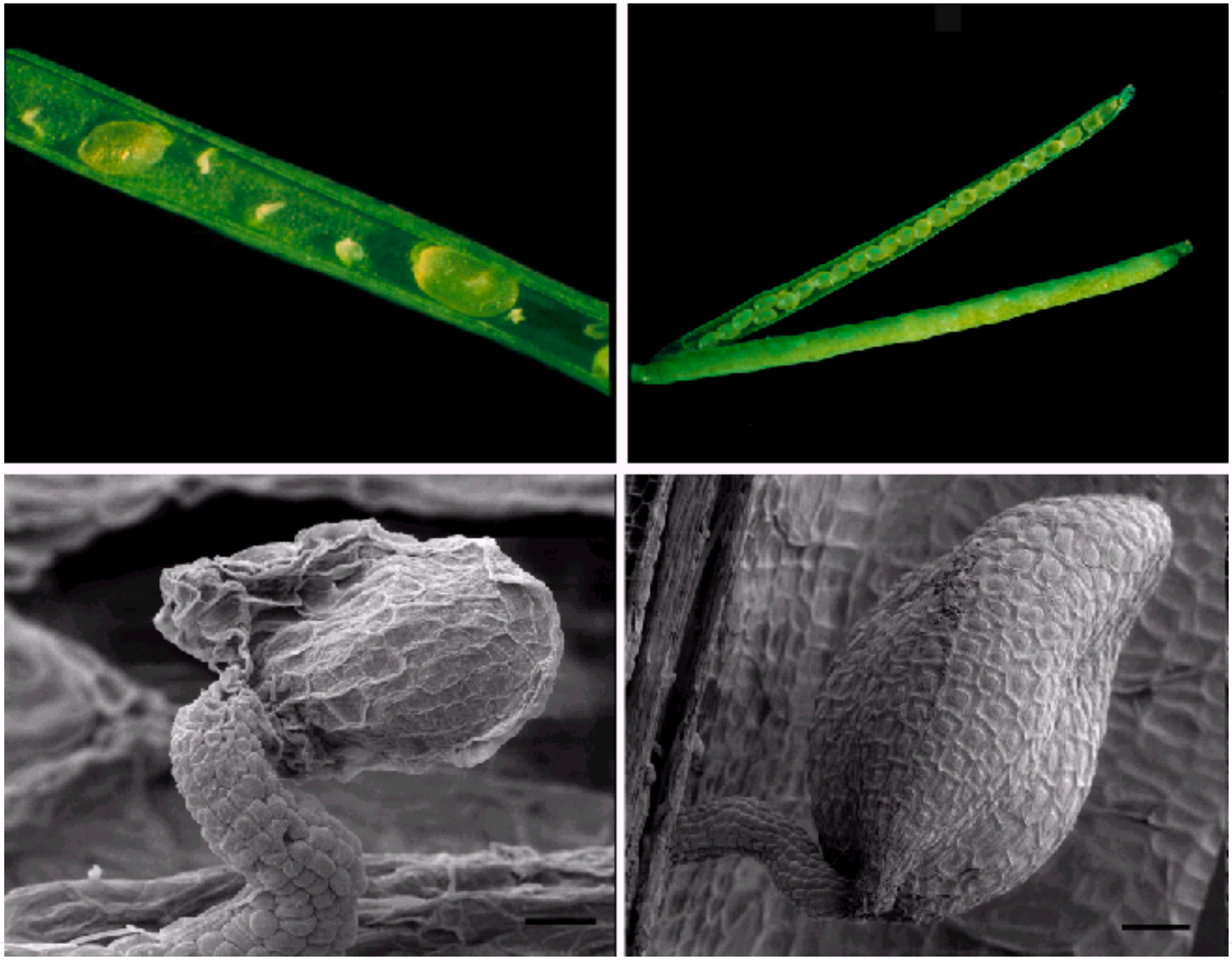
- Transposons are often characterized by excision and reinsertion into a nearby region – use for the isolation of new mutant alleles
- However, excision of transposons is not always entirely accurate – point mutations occurr – isolation of revertant lines with silent mutation, or even isolation of the stable mutants

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

Phenotype of silicles *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1

CKI1/CKI1



Confirmation of phenotype *cki1::En-1/CKI1*

1. Isolation of revertant lines

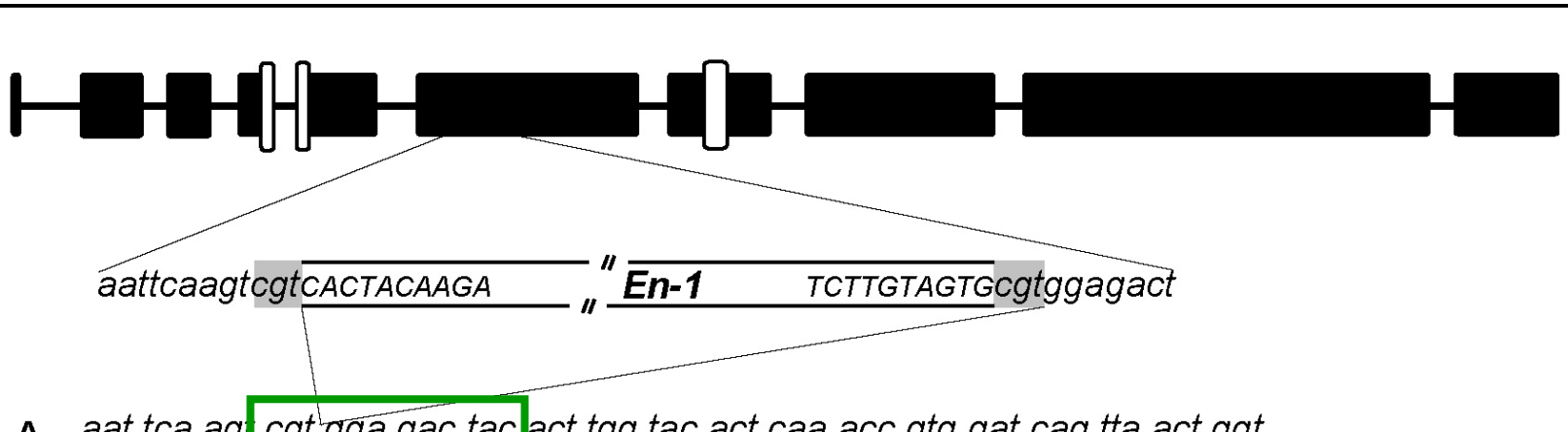
- PCR-searching in 246 plants of segregating population
- from 90 *cki1::En-1* positive plants, 9 plants had both mutant and standard silicles

Offspring analysis

- confirmation of absention of insertion using PCR
- PCR amplification and cloning the part of the genomic DNA at the insertion site
- sequencing

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

Use of autonomous transposons for the isolation of new stable mutations and revertant lines



A. *aat tca agt cgt gga gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*

N S S R G D Y T W Y T Q T V D Q L T G

B. *aat tca agt **ggt acg** act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*

N S S G T T W Y T Q T V D Q L T G

C. *aat tca agt cgt **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** **g**tg 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 .

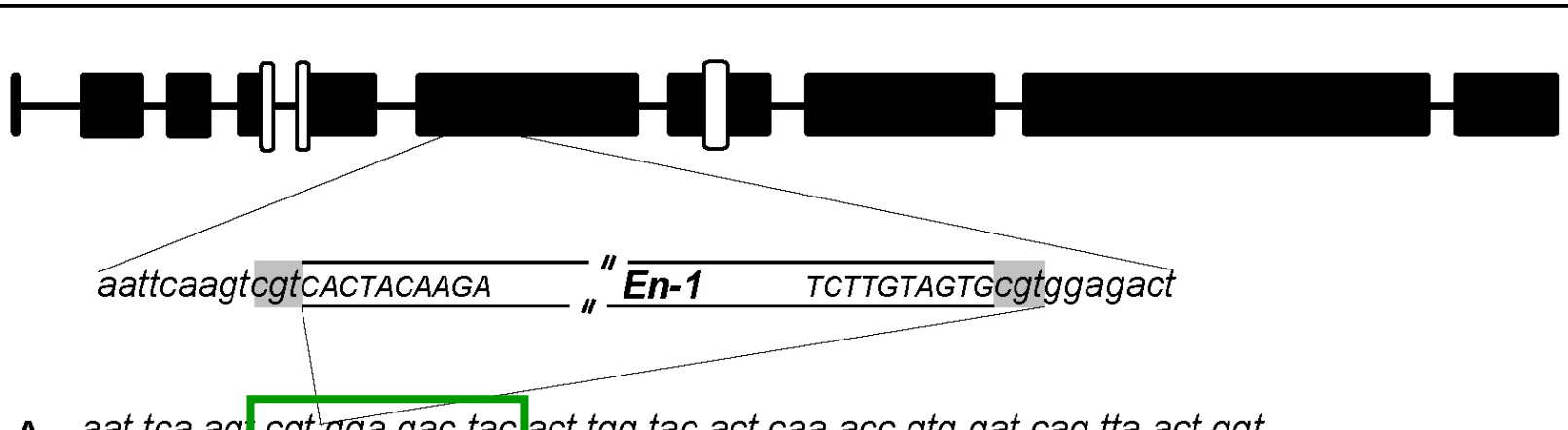
Confirmation of phenotype *cki1::En-1/CKI1*

2. Isolation of a stable mutant line

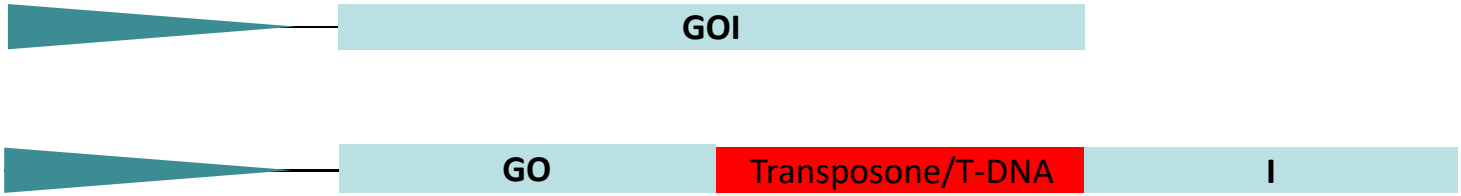
- analysis of the phenotype of the segregating population (*CKI1/CKI1 CKI1/cki1::En-1)*
- PCR analysis of plants with the mutant phenotype – identification of plants without insertion
- PCR amplification and cloning the part of the genomic DNA at the insertion site
- sequencing

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

Use of autonomous transposons for the isolation of new stable mutations and revertant lines



Mutant Line Complementation



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

Mutant Line Complementation

Ranjan et al., 2014

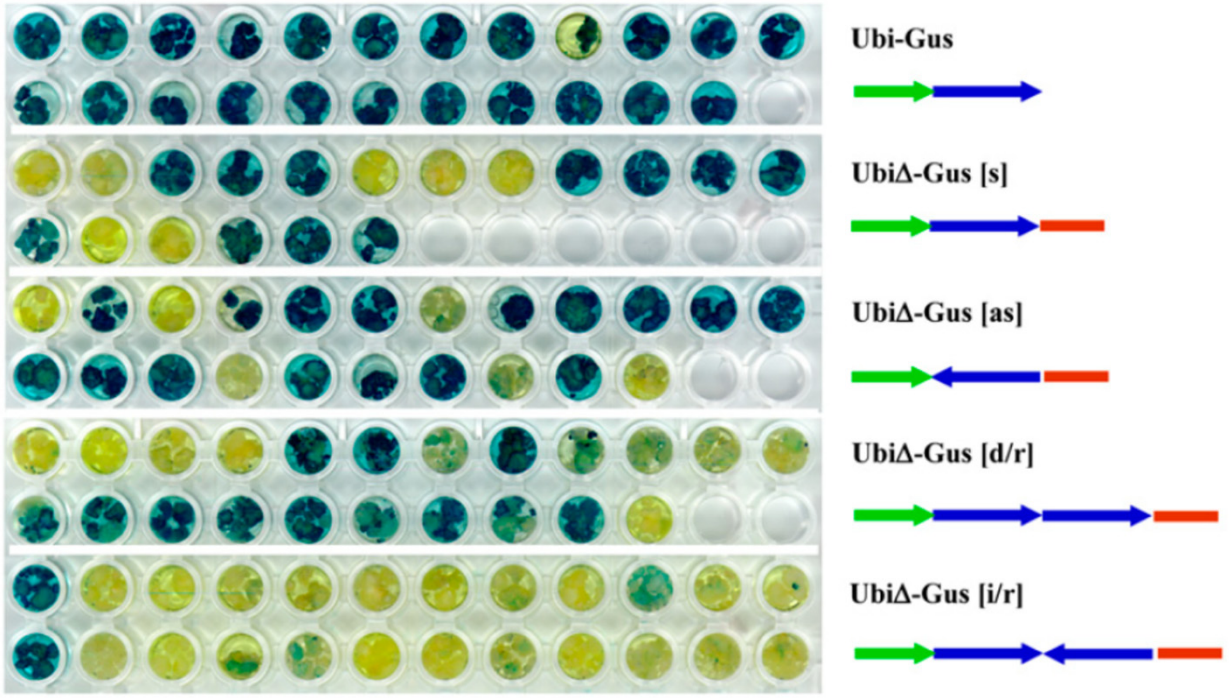
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Outline

- Gene Silencing Using RNA Interference
  - Mechanism of RNA interference

RNA interference

- **Molecular basis of posttranscriptional gene silencing (PTGS)**
  - RNAi found in plants and in *Coenorhabditis elegans*
    - Silencing was induced by both sense and antisense RNA (probably contamination by both during *in vitro* transcription)
    - dsRNA induced silencing about 10-100 times more effectively

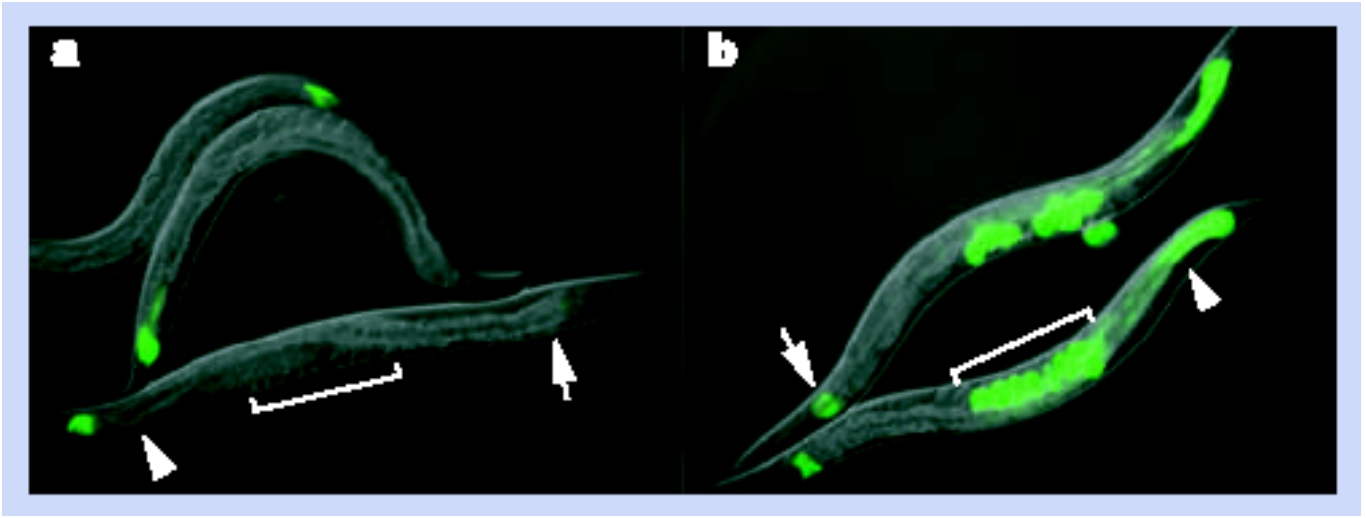


Waterhaus et al., *PNAS* (1998)

RNA interference

- **Molecular basis of posttranscriptional gene silencing (PTGS)**
  - dsRNA induction is dependent on its own genes – gene searching

RNAi *rnai*



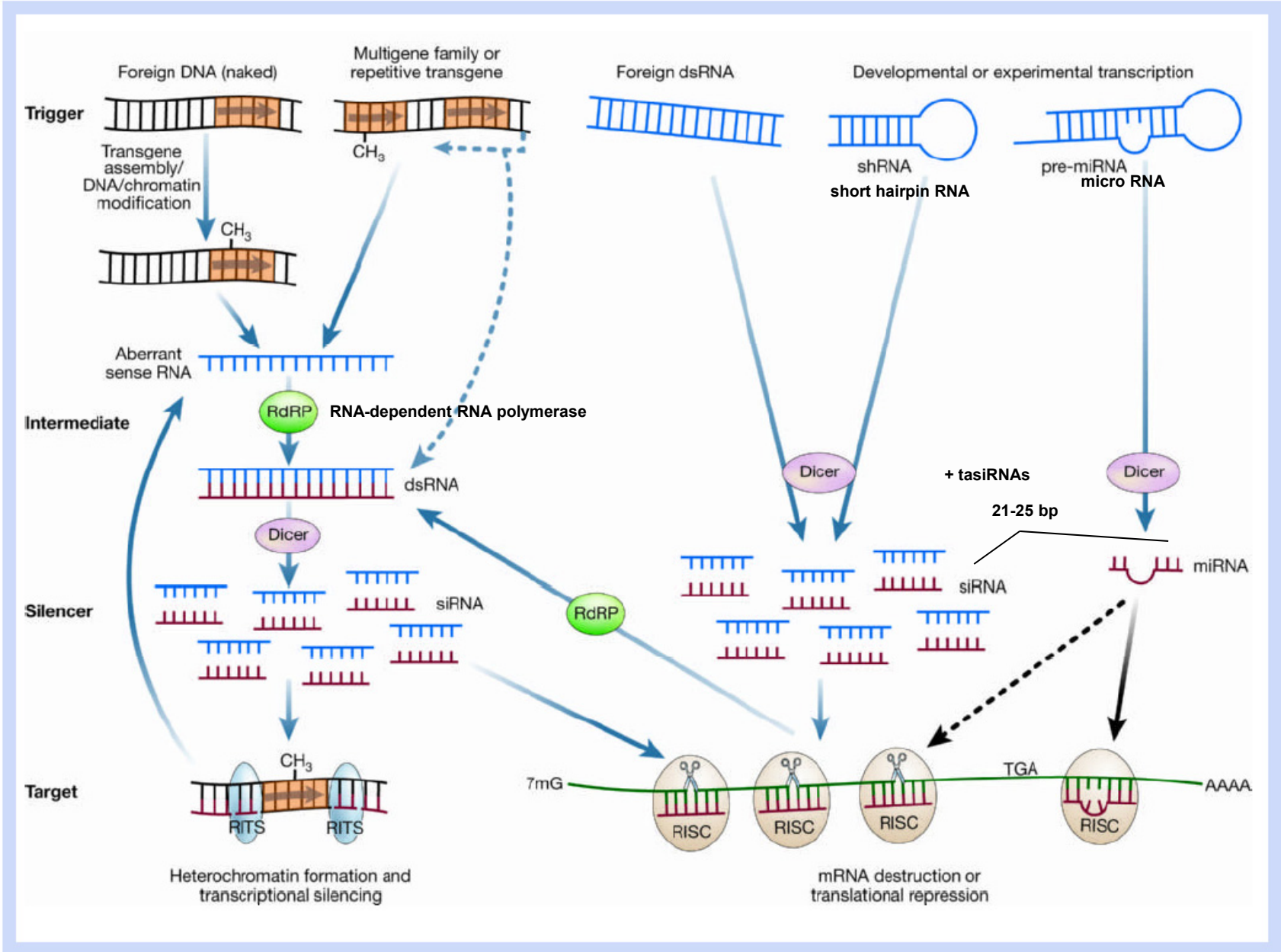
Mello and Conte, *Nature* (2004)

RNA interference

- **Molecular basis of posttranscriptional gene silencing (PTGS)**
  - RNAi found in *Coenorhabditis elegans* and in plants
  - It is a **natural mechanism** of regulation of gene expression in all eukaryotes
  - The principle is **creating dsRNA**, which can be triggered in several ways:
    - By presence of **foreign „aberrant“ DNA**
    - **Specific transgenes** containing **inverted repeats** of the cDNA parts
    - Transcription of own genes for **shRNA** (short hairpin RNA) or **miRNA** (micro RNA, endogenous hairpin RNA)
  - dsRNA is processed by enzyme complex (DICER), which leads to the formation of **siRNA** (short interference RNA), which is then bound to enzyme complex **RITS** (RNA-induced transcriptional silencing complex) or **RISC** (RNA-induced silencing komplex)
  - **RISC** mediates either **degradation of mRNA** (in case of full similarity of siRNA and the target mRNA) or leads only to **termination of translation** (in case of incomplete homology, e.g. as in the case of miRNA)
  - **RITS** mediates **reorganization of genomic DNA** (heterochromatin formation and inhibition of transcription)

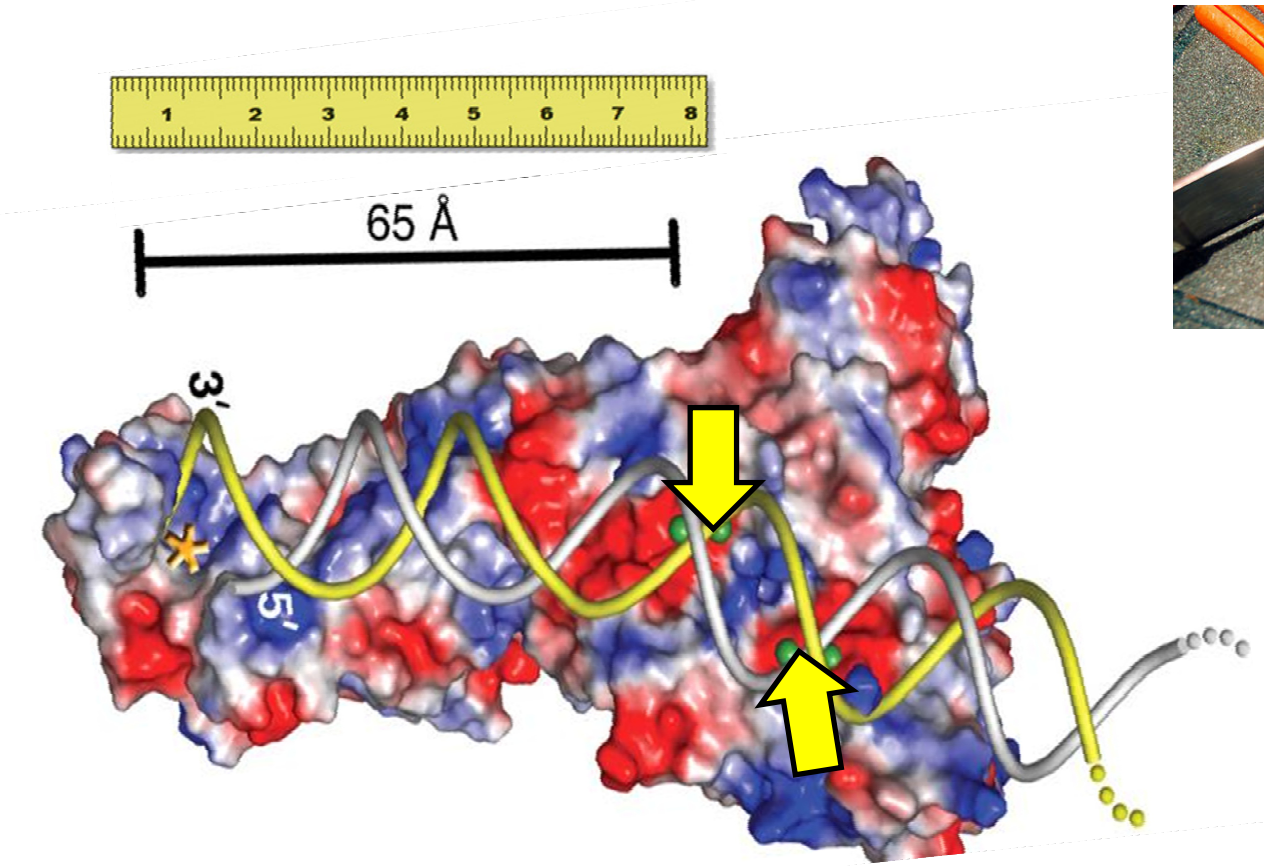
EVROPSKÁ UNIE
DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Mechanism of RNA interference



Mello and Conte, *Nature* (2004)

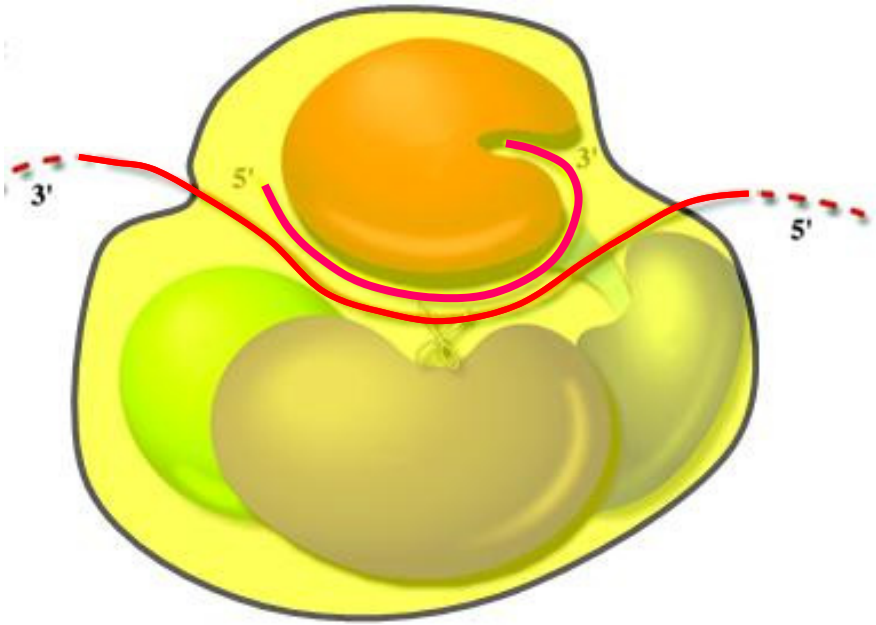
Dicer and Dicer-like proteins



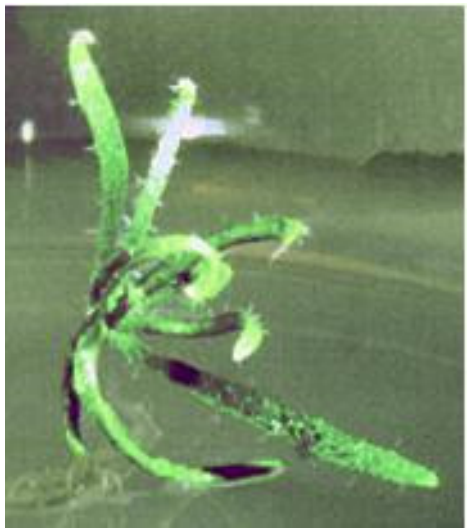
From MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. Science 311: 195 -198. Reprinted with permission from AAAS. Photo credit: Heidi

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

Argonaute proteins



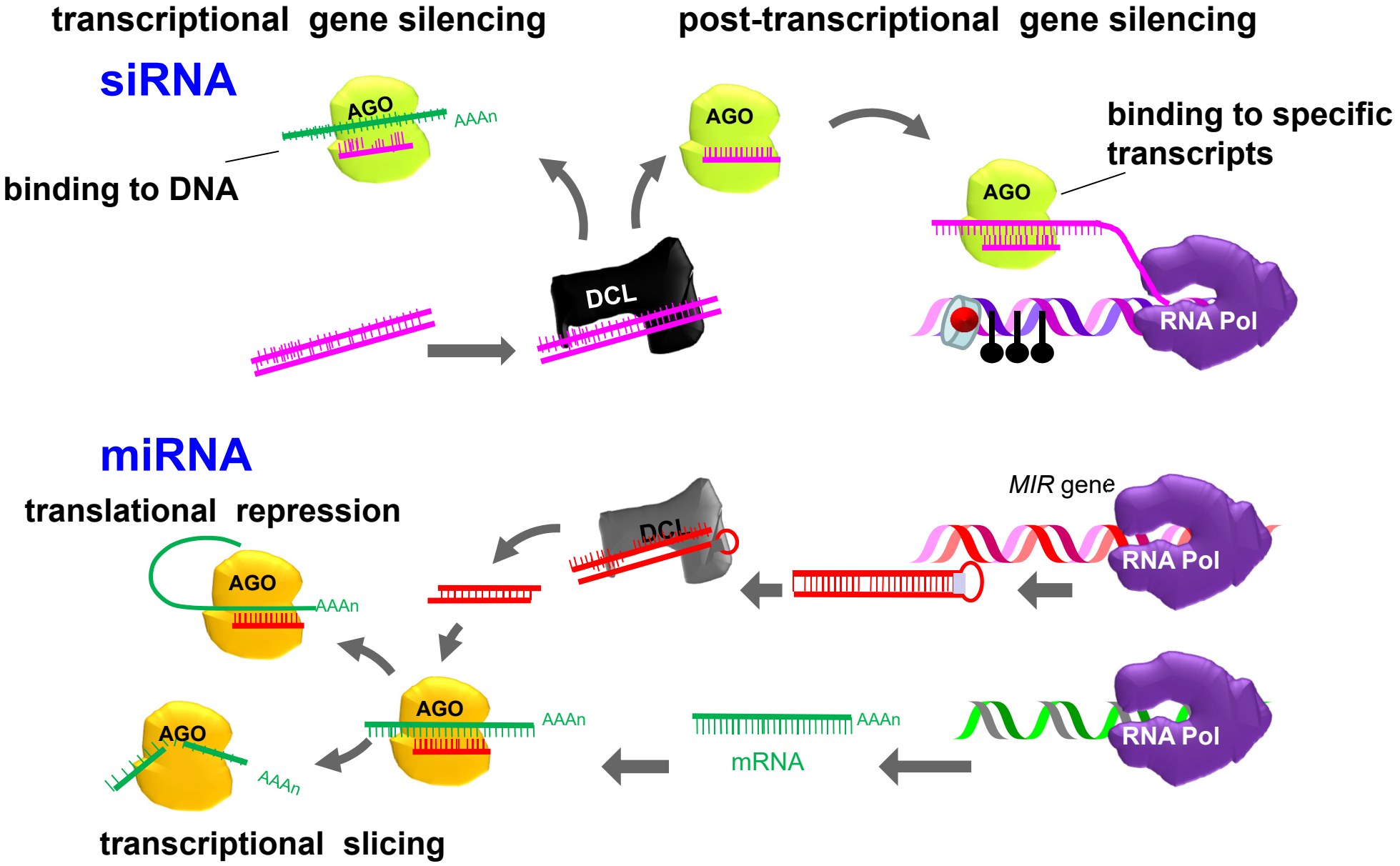
ago1



Argonauta argo

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.

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



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

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

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

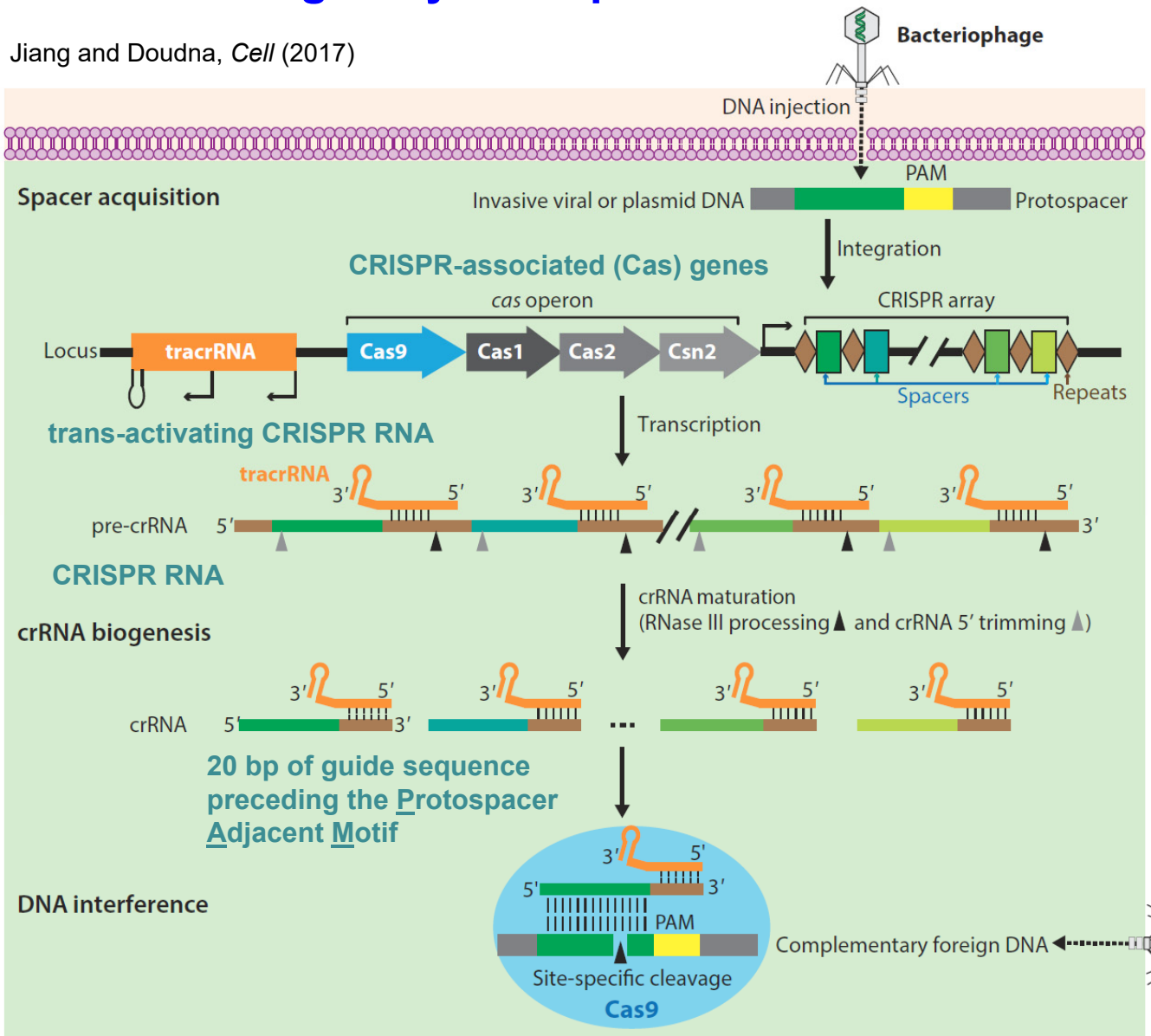
Outline

- Gene Silencing Using RNA Interference
  - Mechanism of RNA interference
- Genome Editing via CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 - Mechanism

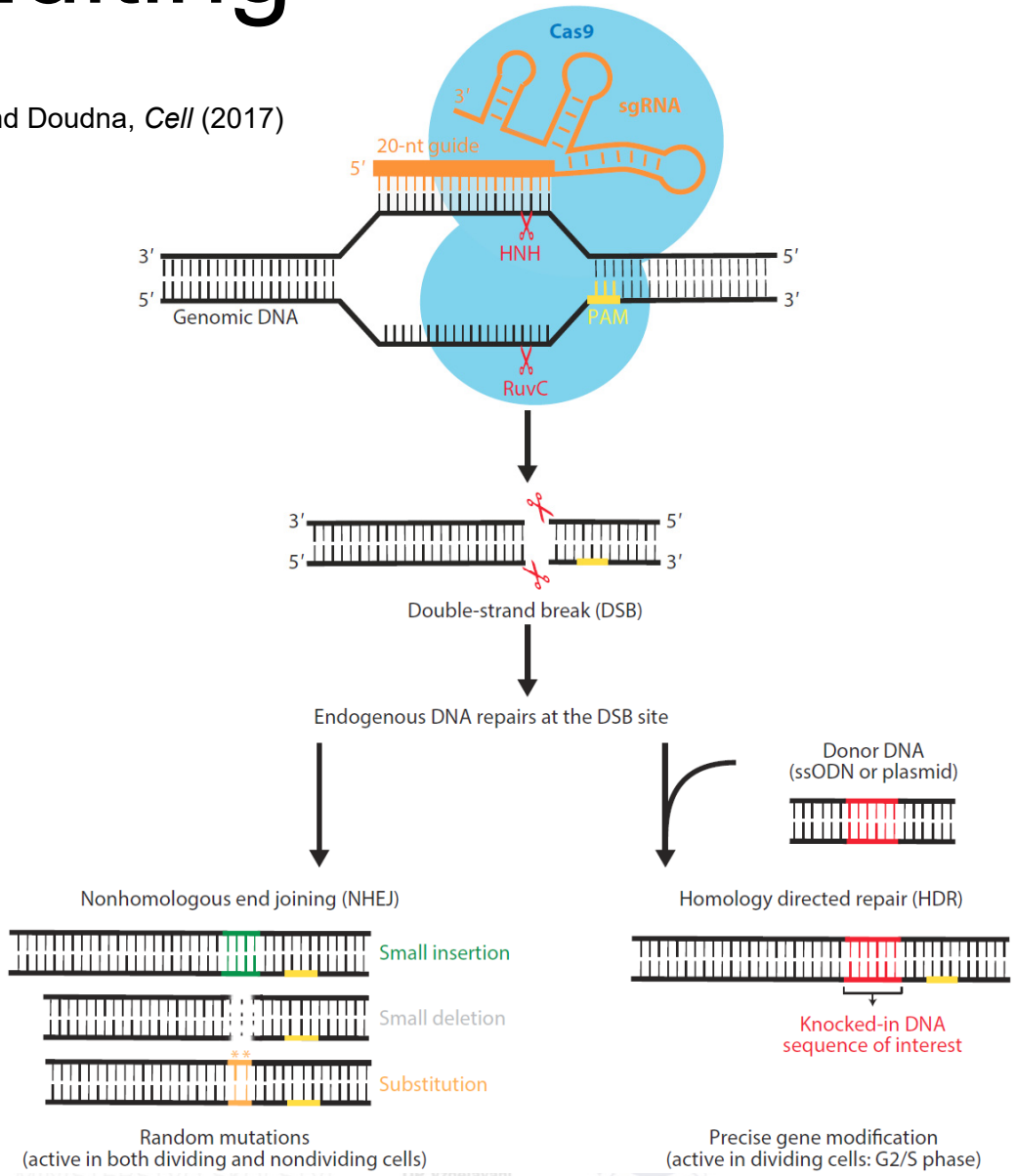
- **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**

Jiang and Doudna, *Cell* (2017)



CRISPR/Cas9 – Genome Editing

Jiang and Doudna, *Cell* (2017)



CRISPR/Cas9 – Nobel Prize in 20..2x?

Francisco Mojica

Emmanuelle Charpentier

Jenifer Doudna

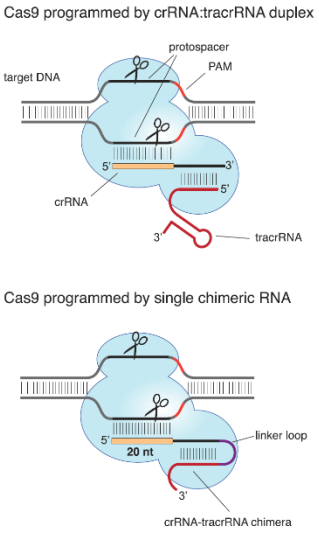
Martin Jinek

RESEARCH ARTICLE

A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

Martin Jinek,[1,2]* Krzysztof Chylinski,[3,4]* Ines Fonfara,[4] Michael Hauer,[2]† Jennifer A. Doudna,[1,2,5,6]‡ Emmanuelle Charpentier[4]‡

Jinek et al, *Science* (2012)



Summary

- Methods for Identification of Sequence-Specific Mutants
  - Preparation of mutants collection
  - Searching for sequence-specific mutants using PCR
  - Searching for sequence-specific mutants in electronic databases
  - Knocking-out the gene using homologous recombinantion
- Analysis of Phenotype and Confirmation of Causality Between Phenotype and Insertional Mutation
  - Co-segregation analysis
  - Identification of independent insertional allele
  - Using unstable insertional mutagens and isolation of revertant lines
  - Mutant complementation by the transgene

Summary

- Gene Silencing Using RNA Interference
  - Mechanism of RNA interference
- Genome Editing via CRISPR/Cas9

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