

CG020 Genomika

Přednáška 2 – dokončení

Identifikace genů

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

Osnova

(dokončení přednášky 02)

- Postupy „přímé“ a reverzní genetiky
 - rozdíly v myšlenkových přístupech k identifikaci genů a jejich funkcí
- Identifikace genů *ab initio*
 - struktura genů a jejich vyhledávání
 - genomová kolinearita a genová homologie
- Experimentální identifikace genů
 - příprava genově obohacených knihoven pomocí technologie metylačního filtrování
 - EST knihovny
 - přímá a reverzní genetika

Přímá a reverzní genetika

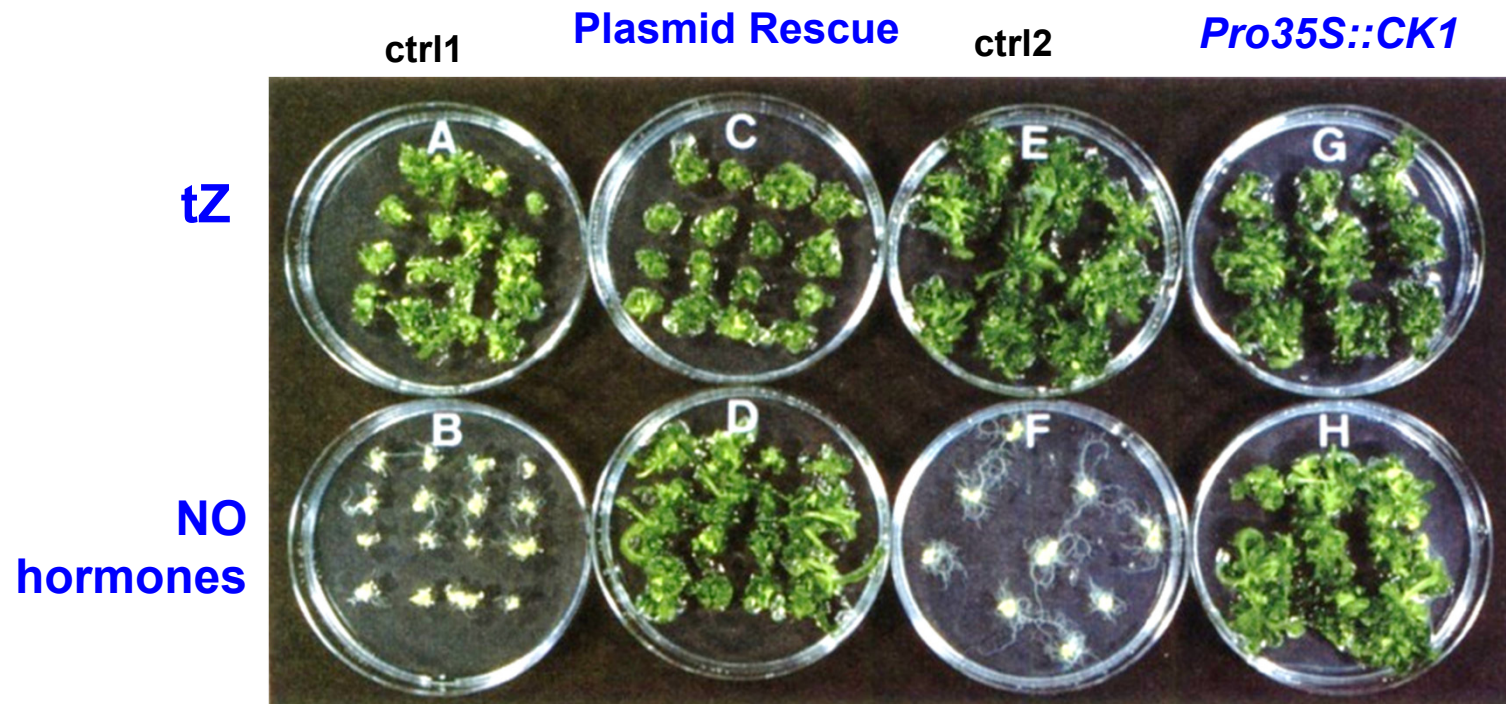
- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**
 - Identifikace sekvenčně-specifického mutanta a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifiity

Přímá a reverzní genetika

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

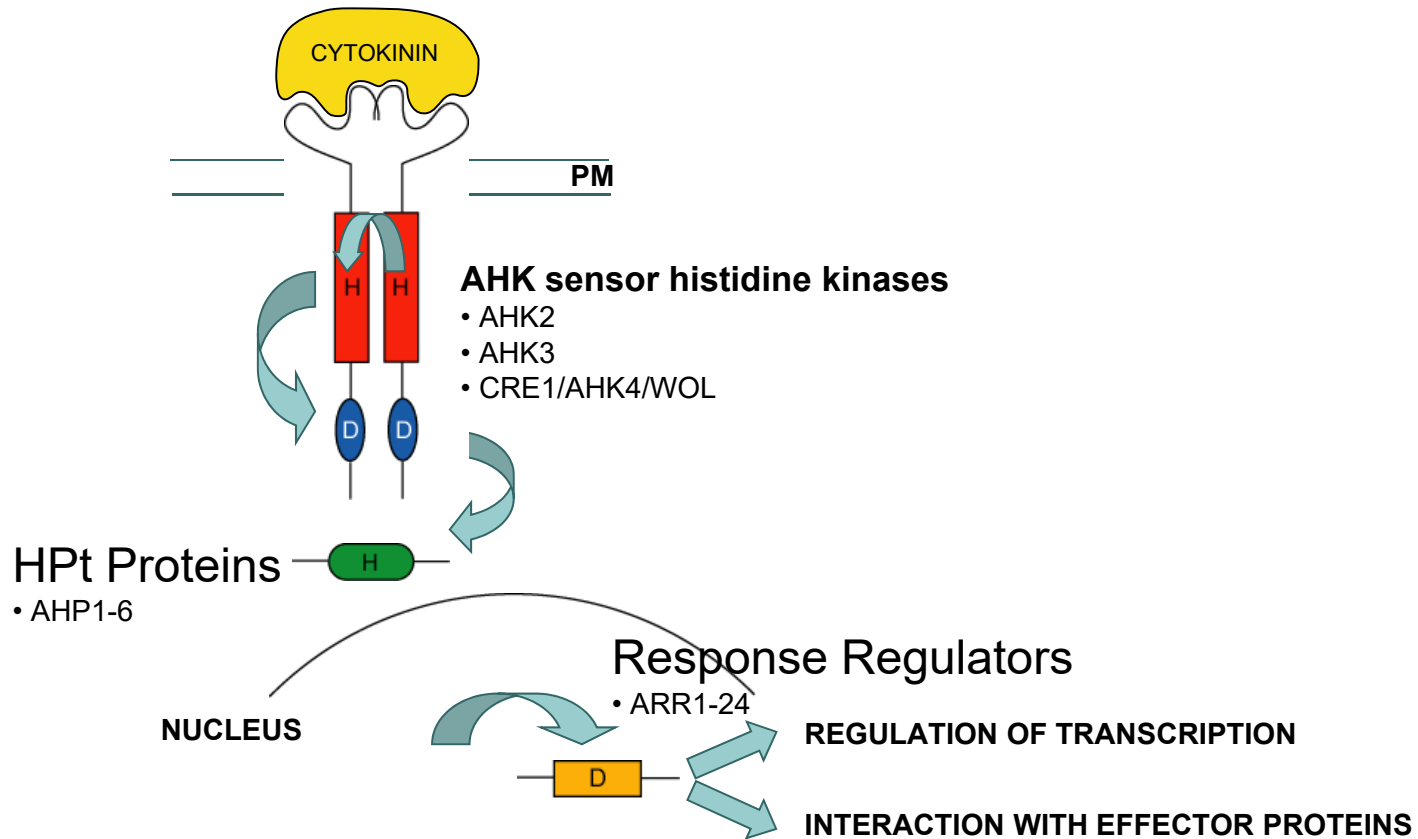
Identifikace *CK1* aktivační mutagenezí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



Kakimoto, *Science*, 1996

Signal Transduction via MSP

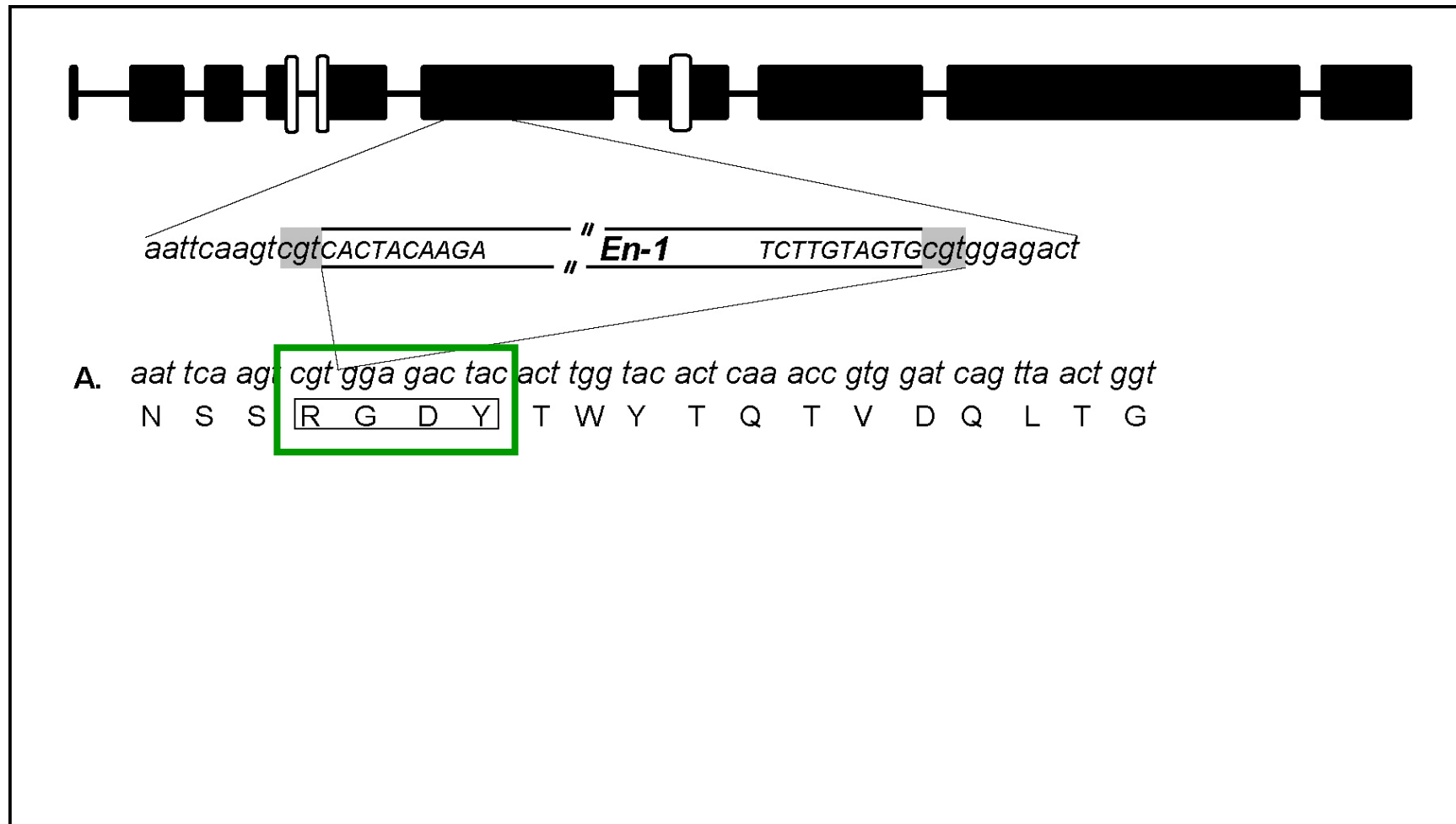




Přímá a reverzní genetika

- 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

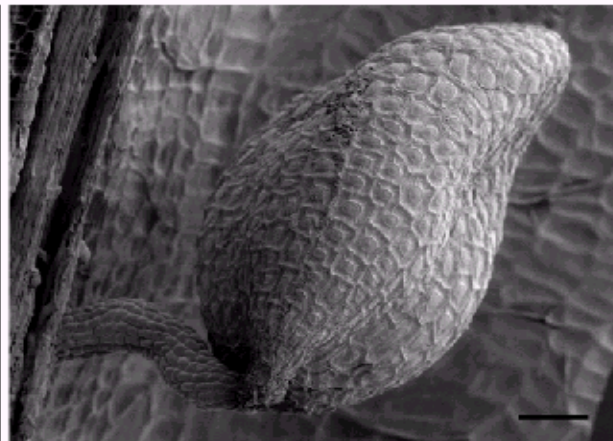
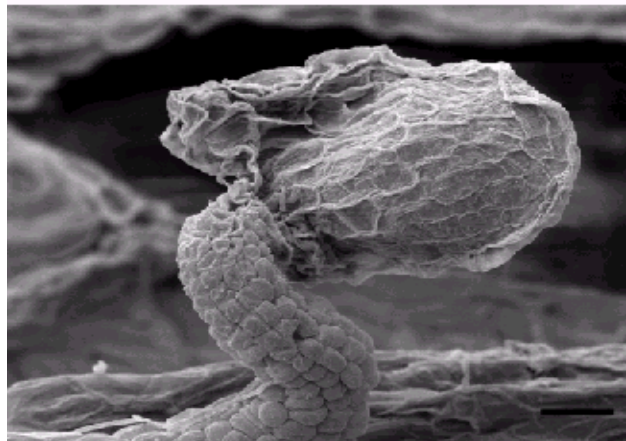


CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

CKI1/cki1-i



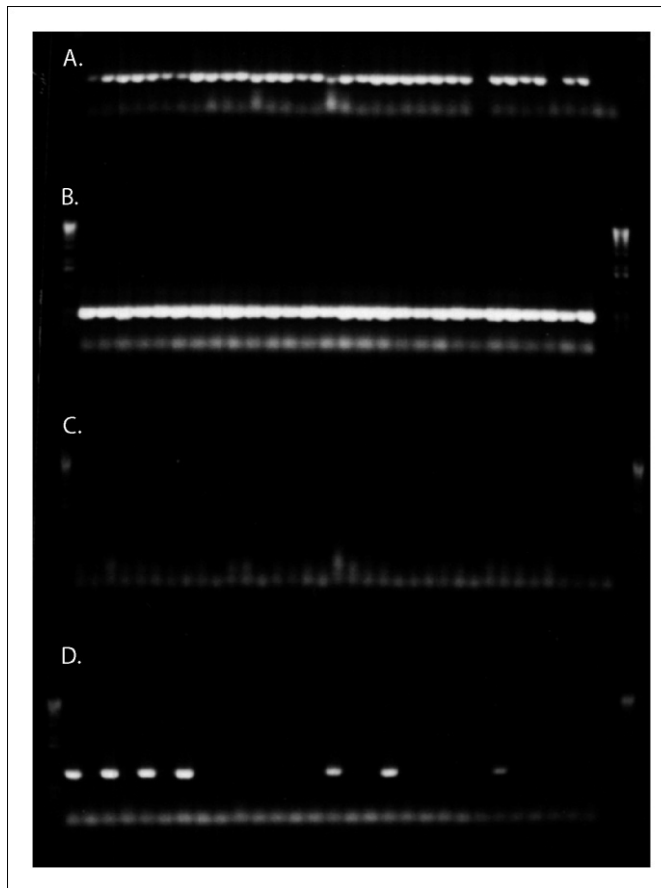
CKI1/CKI1



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**

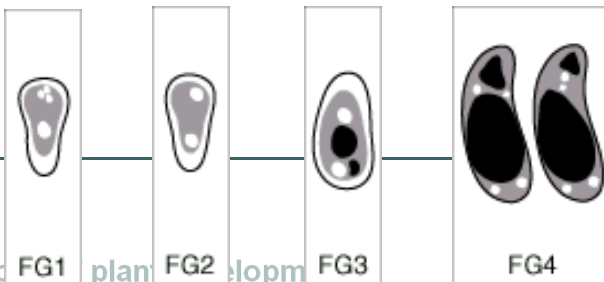
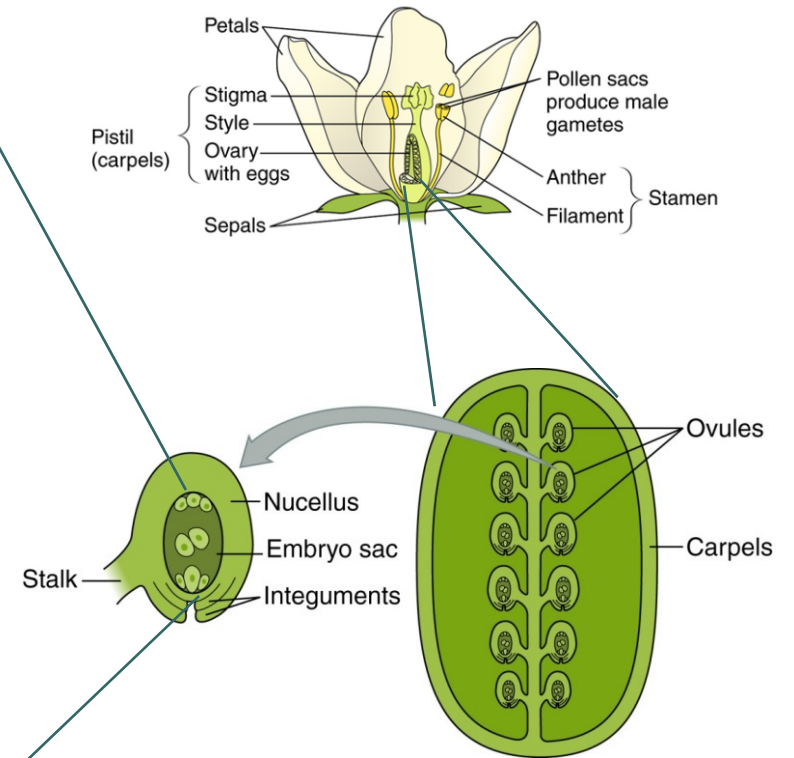
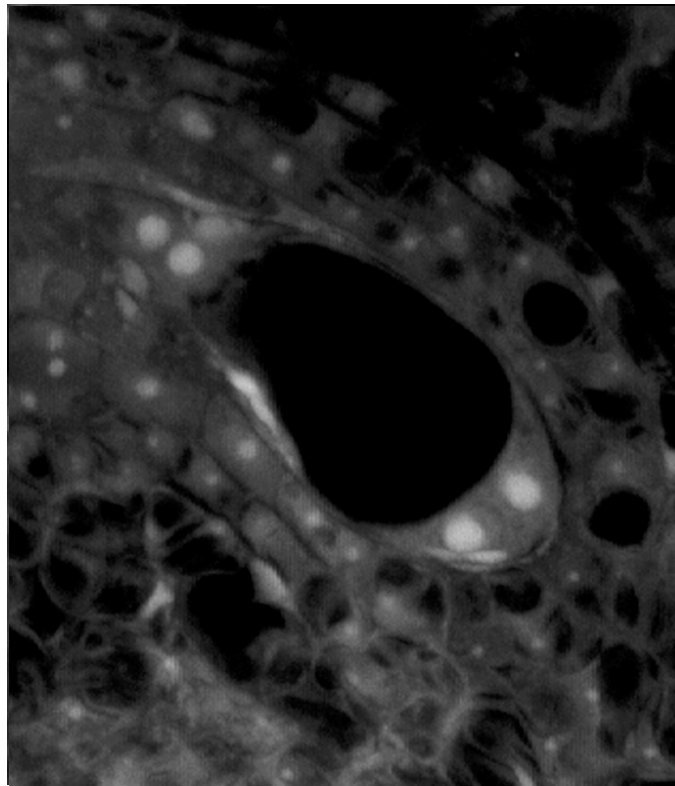


cki1-i specific primers

D. ♂ **CKI1/cki1-i** x ♀ wt

CKI1 and Megagametogenesis

FG 4



Hormonal regulation of plant development



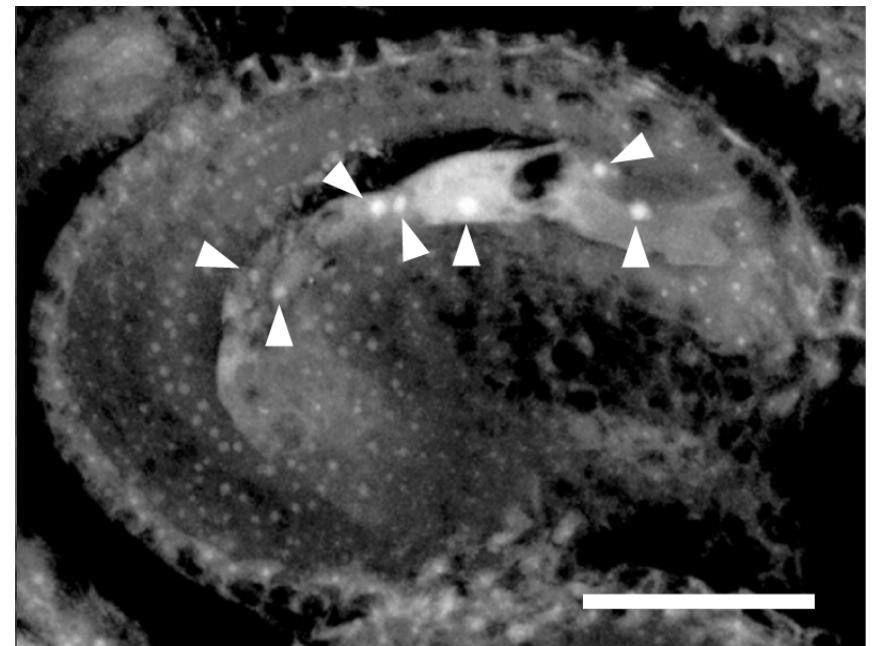
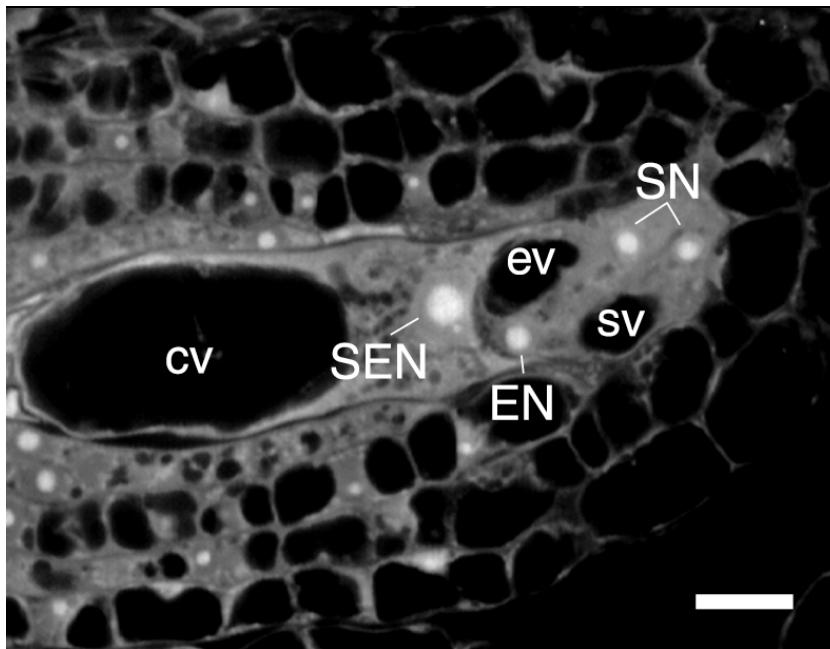
CKI1 and Megagametogenesis

CKI1

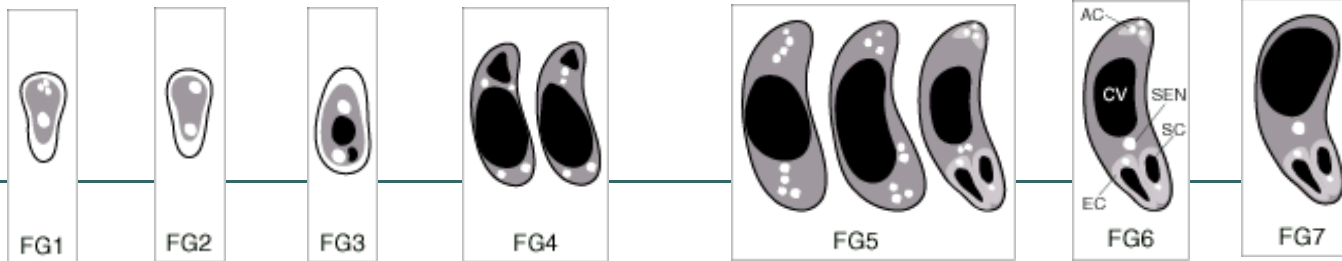
FG4 to FG5

cki1-i

28 HAE



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



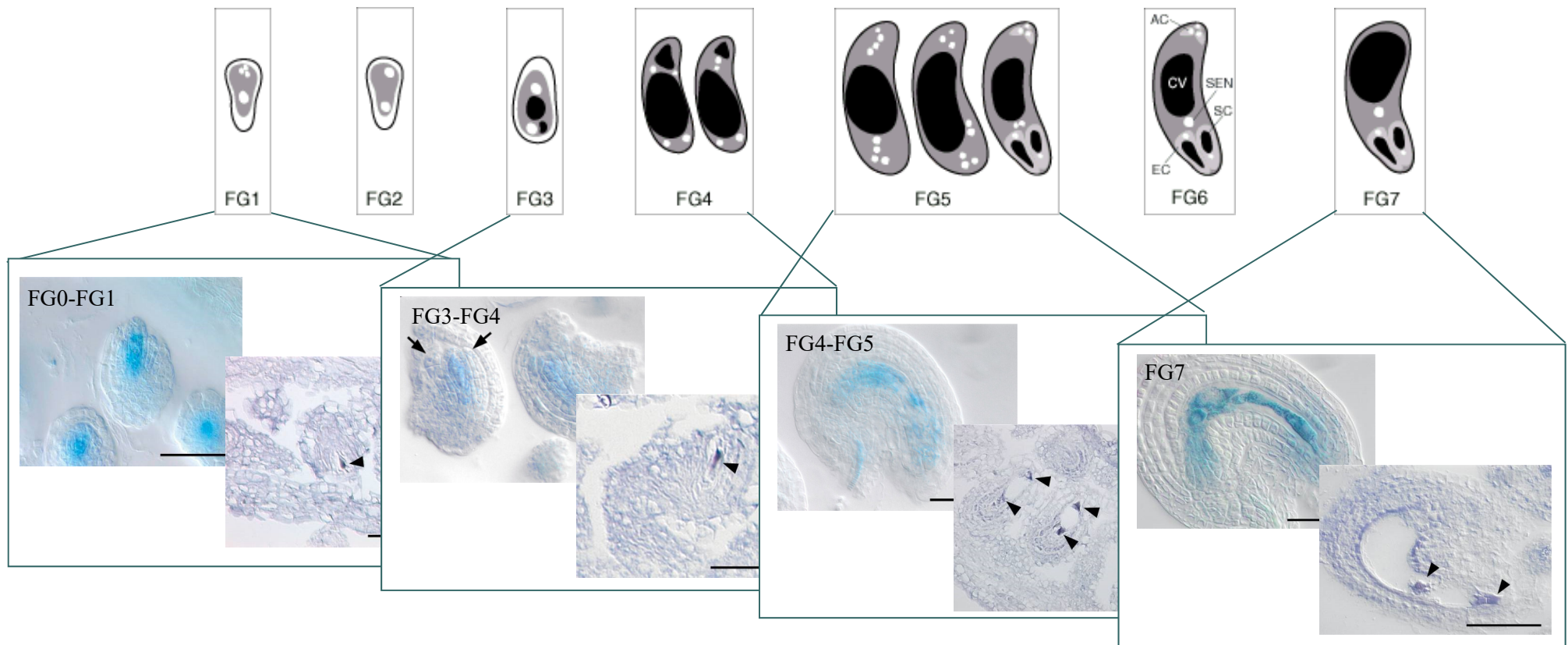
Hormonal regulations of plant development



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

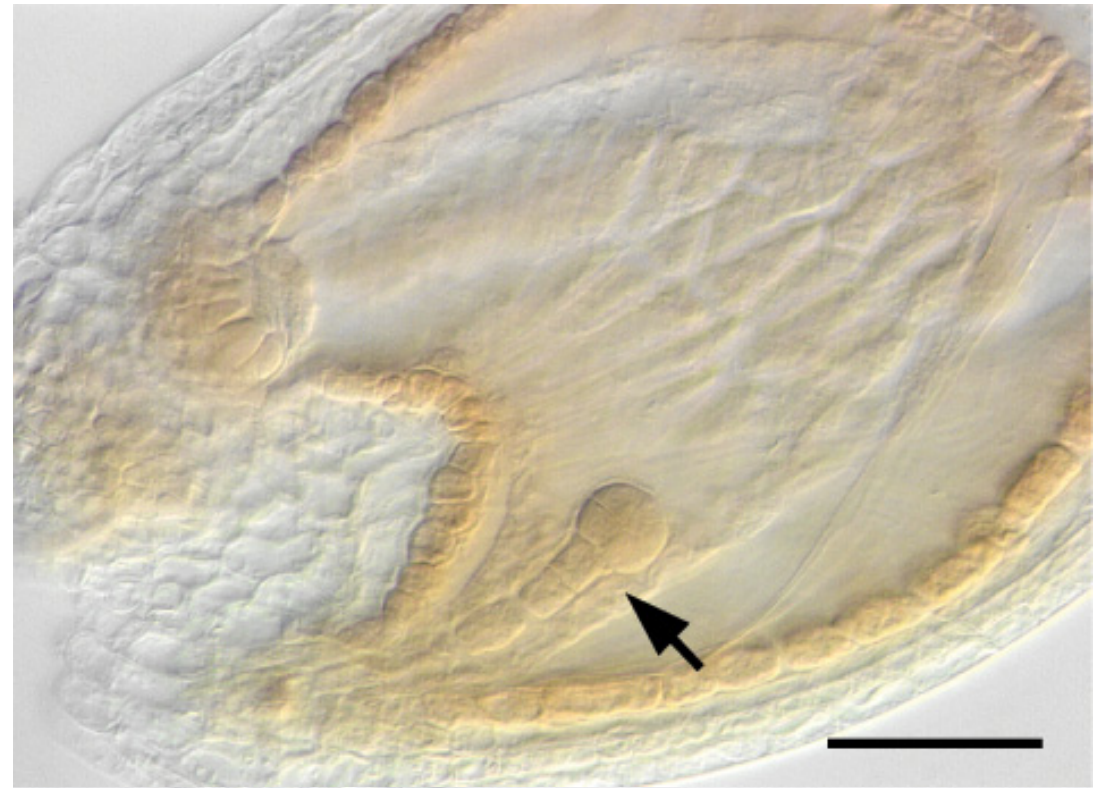
CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



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

♀ wt x ♂ Pro*CKI1*:*GUS*

22 HAP
(hours
after
pollination)



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



CG020 Genomika

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



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

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

EMS



T-DNA



(retro)transposons



„Reverzně genetický“ přístup

1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA

2. IDENTIFIKACE FENOTYPU

3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

Osnova

- **Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů**
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace
- **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
 - komplementace mutantu pomocí transgenu

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

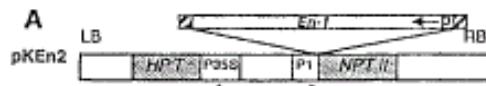
- **Neautonomní transpozony (*dSpm*)**

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

- **T-DNA**

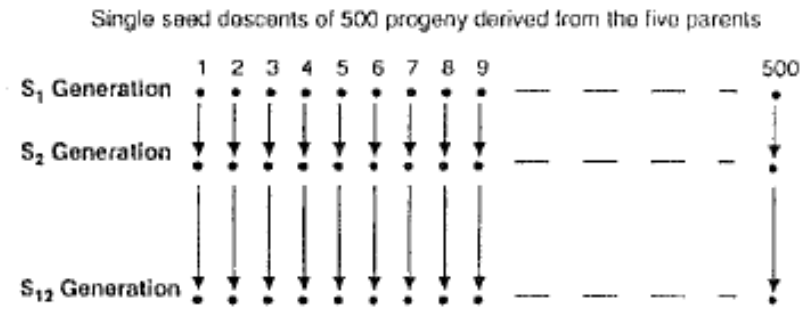
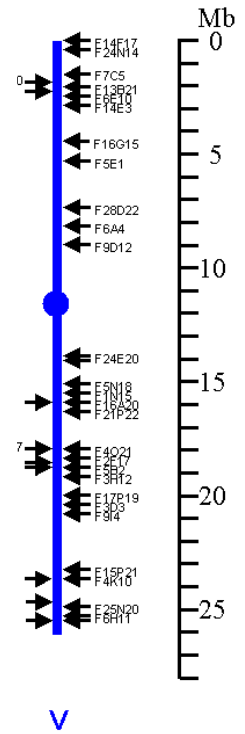
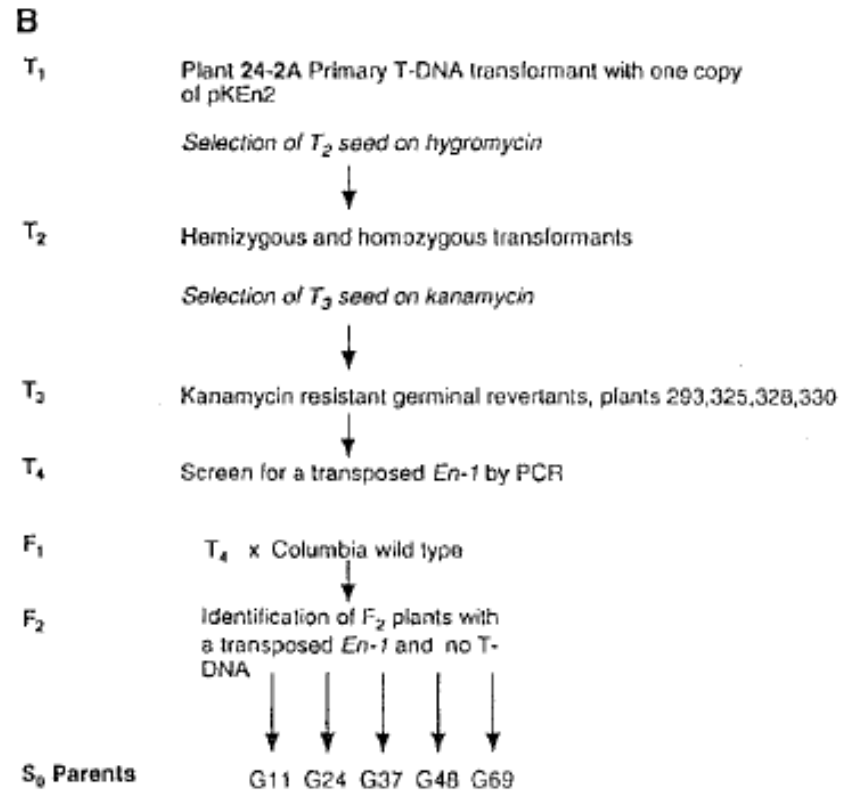
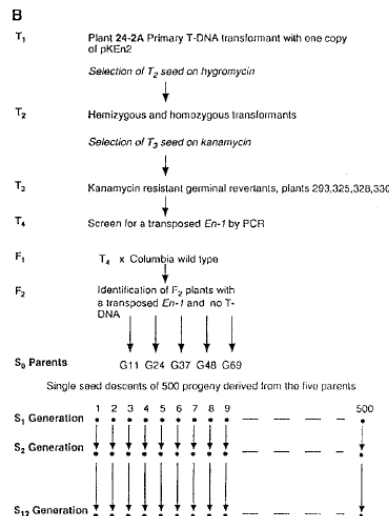
- zcela stabilní, její inzerce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)

Knihovny inzerčních mutantů (u rostlin)

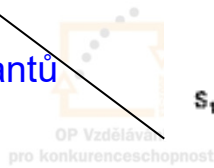


příprava transgenních rostlin

vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR

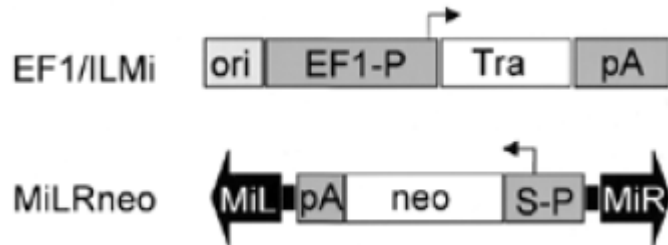


EVROPSKÉ VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancována
m sociálním fondem

a státním rozpočtem České republiky

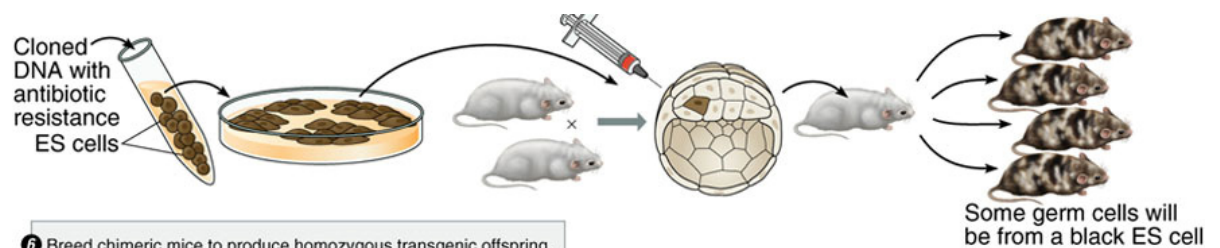
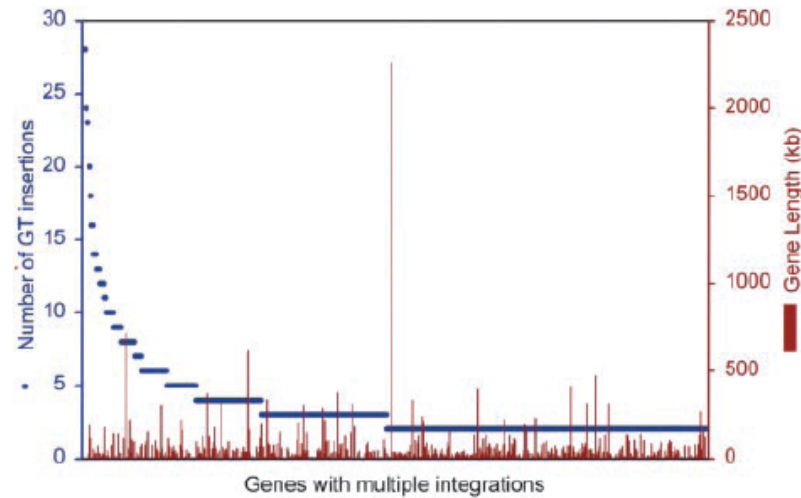
Knihovny inzerčních mutantů (u živočichů)



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

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - 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



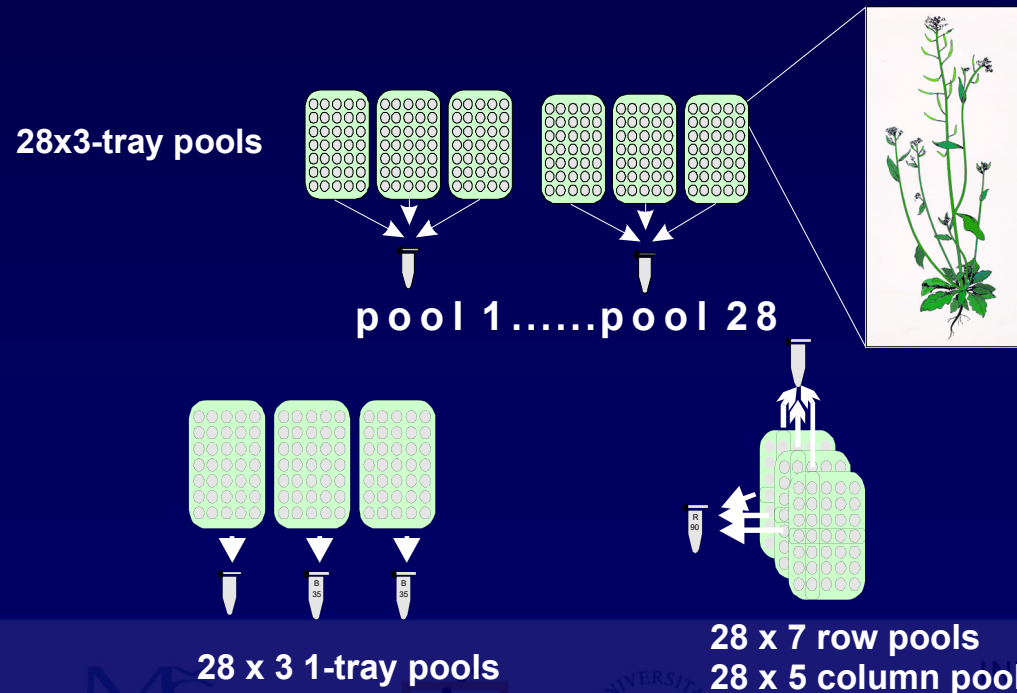
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)

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



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

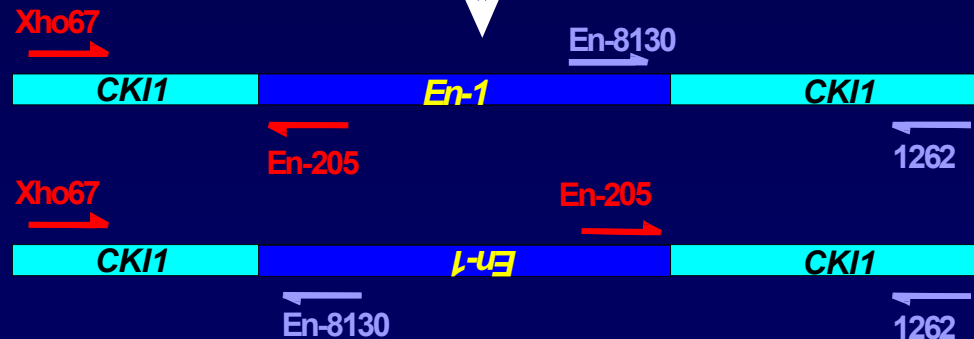
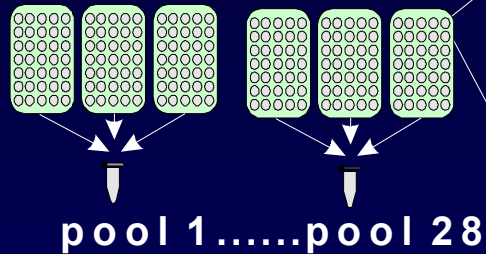
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace sekvenčně specifických mutantů

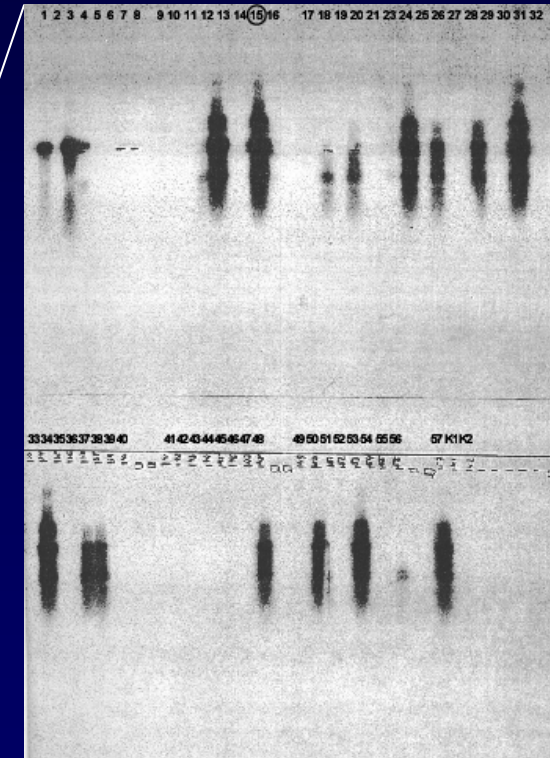
1. Vyhledávání pozitivní trojice

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

28x3-tray pools



(2x2x28=112 PCR reakcí)



Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

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



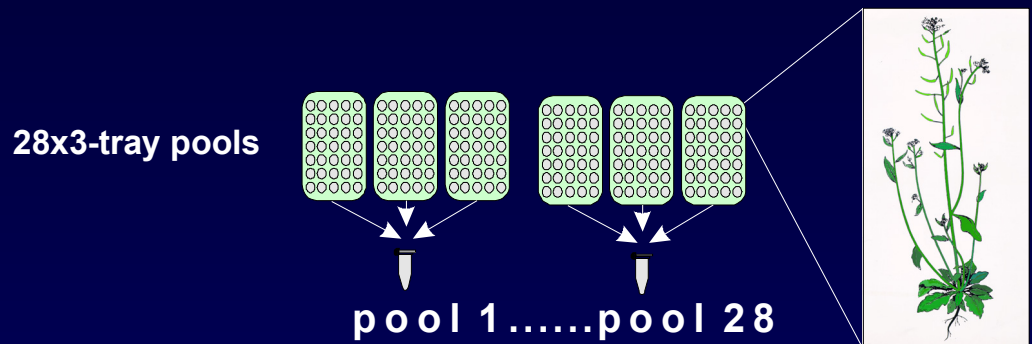
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Izolace sekvenčně specifických mutantů

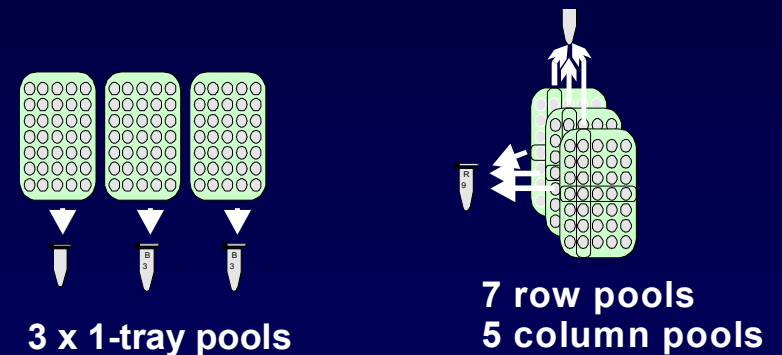
1. Vyhledávání pozitivní trojice

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



(2x2x28=112 PCR reakcí)

2. Identifikace linie nesoucí inzerci



(dalších 5+7+3=15 PCR reakcí)

Celkem 112+15=127 PCR reakcí

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - „trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - 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>



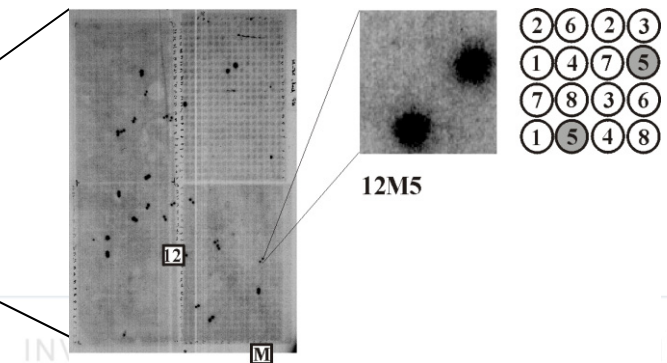
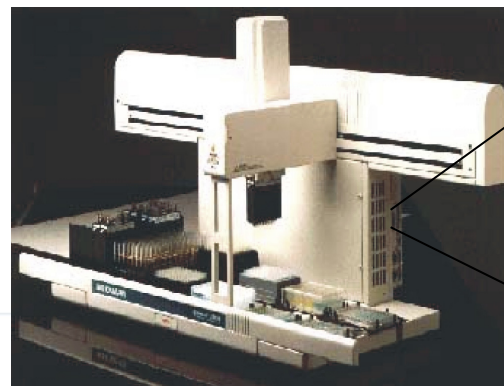
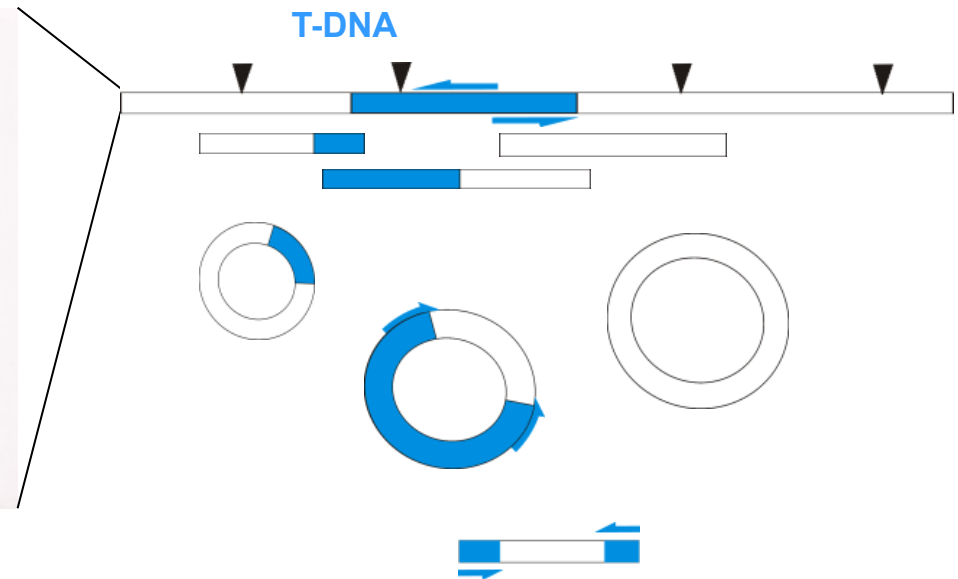
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



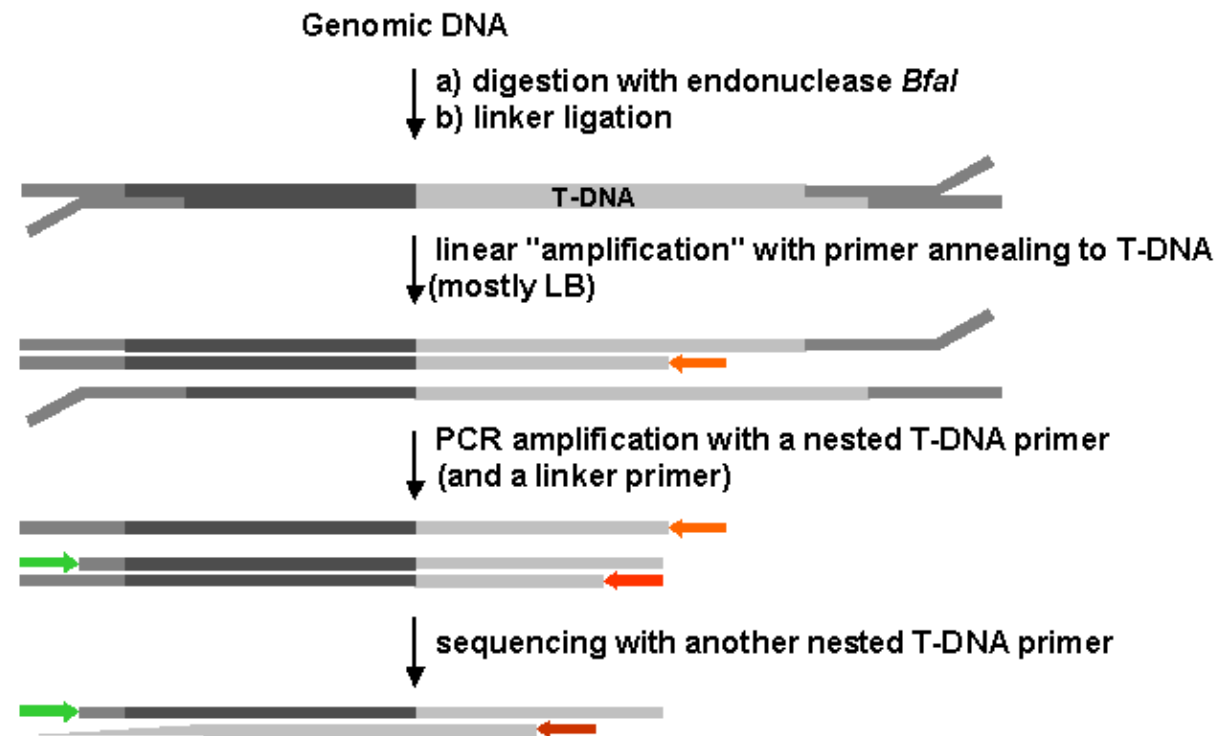
Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - 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 attagagtttgattgaagtgtgttttatatattgatagtgaggacattactataaaaaagc 1509
|||||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcgcttttatatattgatagtgaggacattactataaaaaagc 400

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

Query: 1570 tgttgctttaggacatttgtgagtatgtcaaaaaacttattccacatggtacactcatag 1629
|||||
Sbjct: 339 tgttgctttaggacatttgtgagtatgtcaaaaaacttattccacatggtacactcatag 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 tacattttctcgtacacaattaacgctatcaaatatatttataaaaccatttgcatttccac 1982
|||||
Sbjct: 13 tacattttctcgtacagattgacggtatcaaatatatttataaaaccgtagacatttccac 72

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

Sbjct: 292 ccagctcttagaagctcttgggtaagttccagtagcgggacogattctcgagaatecaca 233

[AGK insert page](#)

view detailed information on insert sequences in AGR



Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů

```

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

Query: 1450 attagatttgattgaagtgtgttttatattgatagtgaggacattacttataaaaagc 1509
      |||
Sbjct: 459 attagatttgattgaagcgttttatattgatagtgaggacattacttataaaaagc 400

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

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

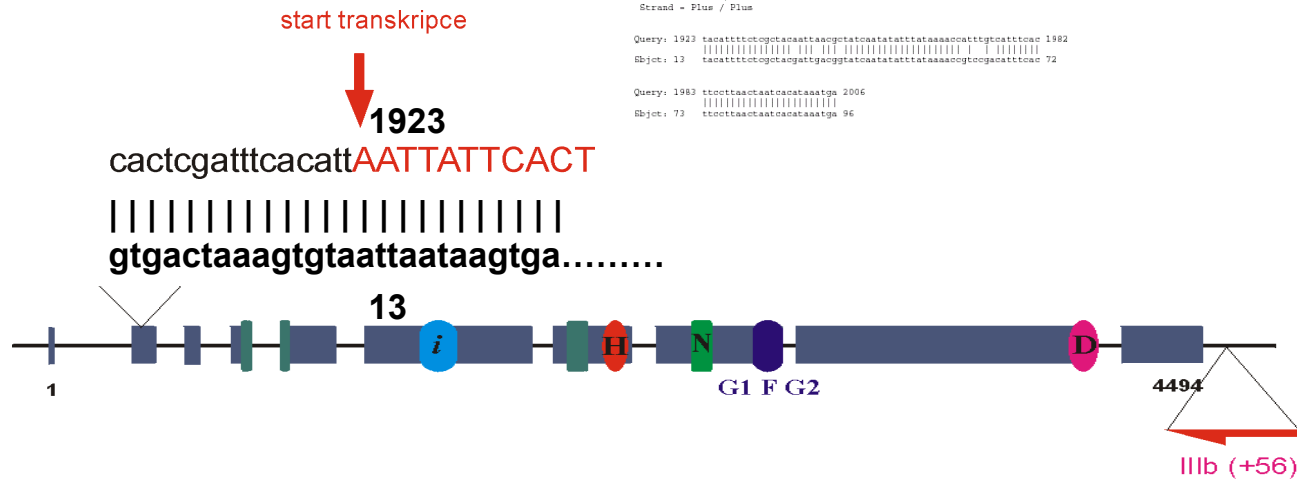
Query: 1630 attagcccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatgcaat 1689
      |||
Sbjct: 279 attagcccacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatgcaat 220

Query: 1690 atgattccaaac 1701
      |||
Sbjct: 239 atgattccaaac 208

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

Query: 1923 tacattttctogtacaattaacgtatcaatatttataaaaacctgttcttccac 1982
      |||
Sbjct: 13 tacattttctogtacaattaacgtatcaatatttataaaaacctgttcttccac 72

Query: 1983 ttccctaactaatccataaatga 2006
      |||
Sbjct: 73 ttccctaactaatccataaatga 96
    
```



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



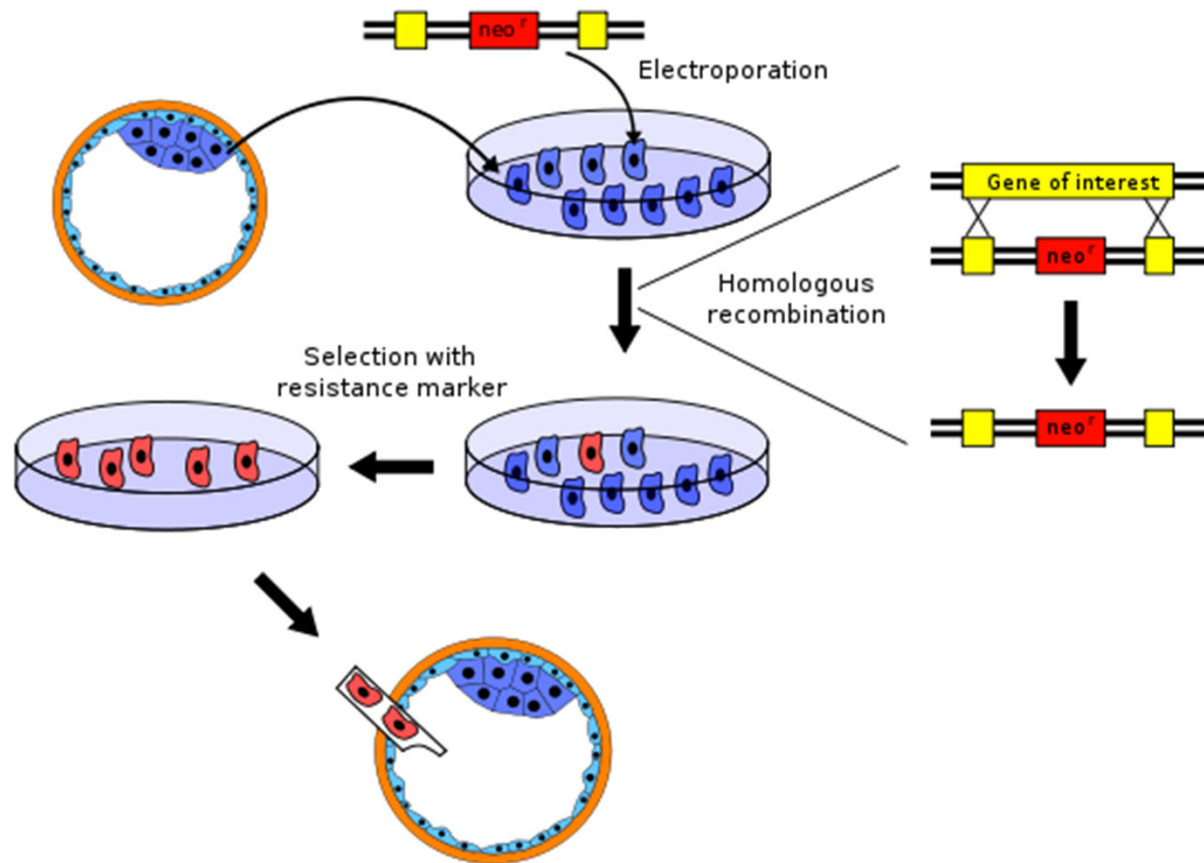
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace

Knocking-Out the Gene



Osnova

- Metody identifikace sekvenčně specifických mutantů
 - příprava sbírky mutantů
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR
 - vyhledávání sekvenčně specifických mutantů v elektronických databázích
 - vypínání genů (knocking-out) pomocí homologní rekombinace
- 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
 - komplementace mutantů pomocí transgenů

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)



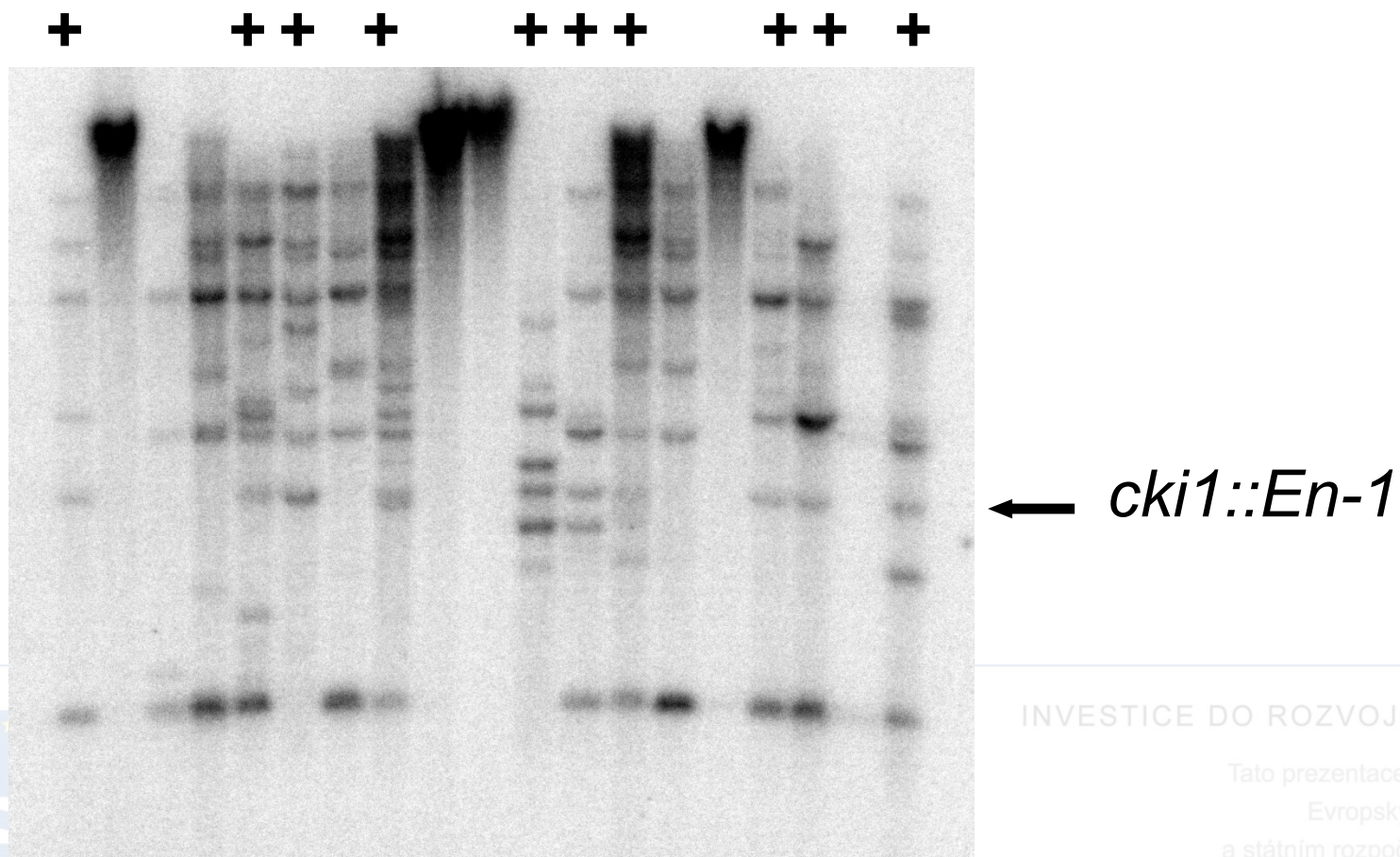
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Kauzalita mezi inzercí a fenotypem

- Kosegregační analýza

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



Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

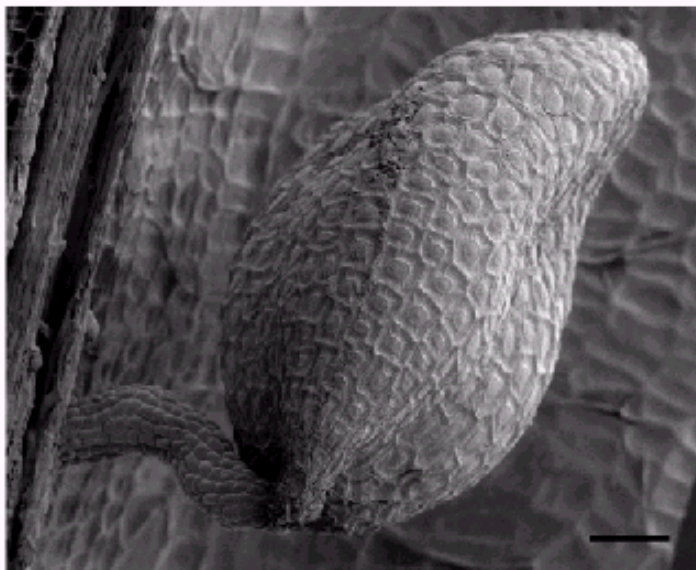
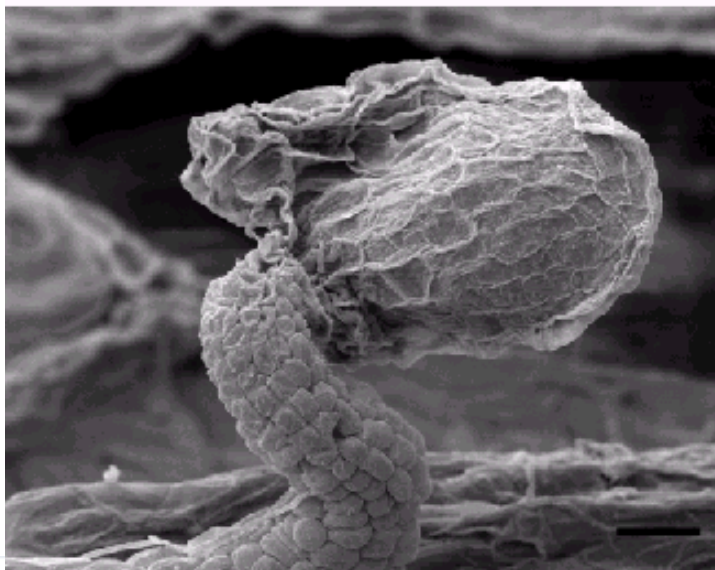
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Fenotyp šešulí *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1



CKI1/CKI1



Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

1. Izolace revertantních linií

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



Analýza potomstva

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

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

$aattcaagtcgt$ **CACTACAAGA** " **En-1** " $TCTTGTAGTGCgtggagact$

A. $aat\ tca\ agt\ cgt\ gga\ gac\ tac\ act\ tgg\ tac\ act\ caa\ acc\ gtg\ gat\ cag\ tta\ act\ ggt$
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

B. $aat\ tca\ agt\ ggt\ acg\ act\ tgg\ tac\ act\ caa\ acc\ gtg\ gat\ cag\ tta\ act\ ggt$
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G

C. $aat\ tca\ agt\ cgt\ acg\ gag\ act\ aca\ ctt\ ggt\ aca\ ctc\ aaa\ ccg\ tgg\ atc\ agt\ taa$
 N S S R T E T T L G T L K P W I S .

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

Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

2. Izolace stabilní mutantní linie

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

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

aattcaagtcgctCACTACAAGA " **En-1** *TCTTGTAGTGcgtggagact*

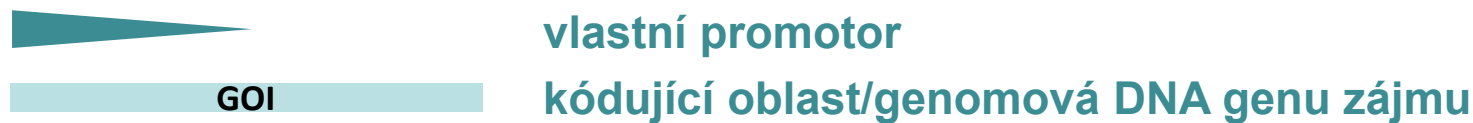
A. *aat tca agt **cg**t **gga** gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

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

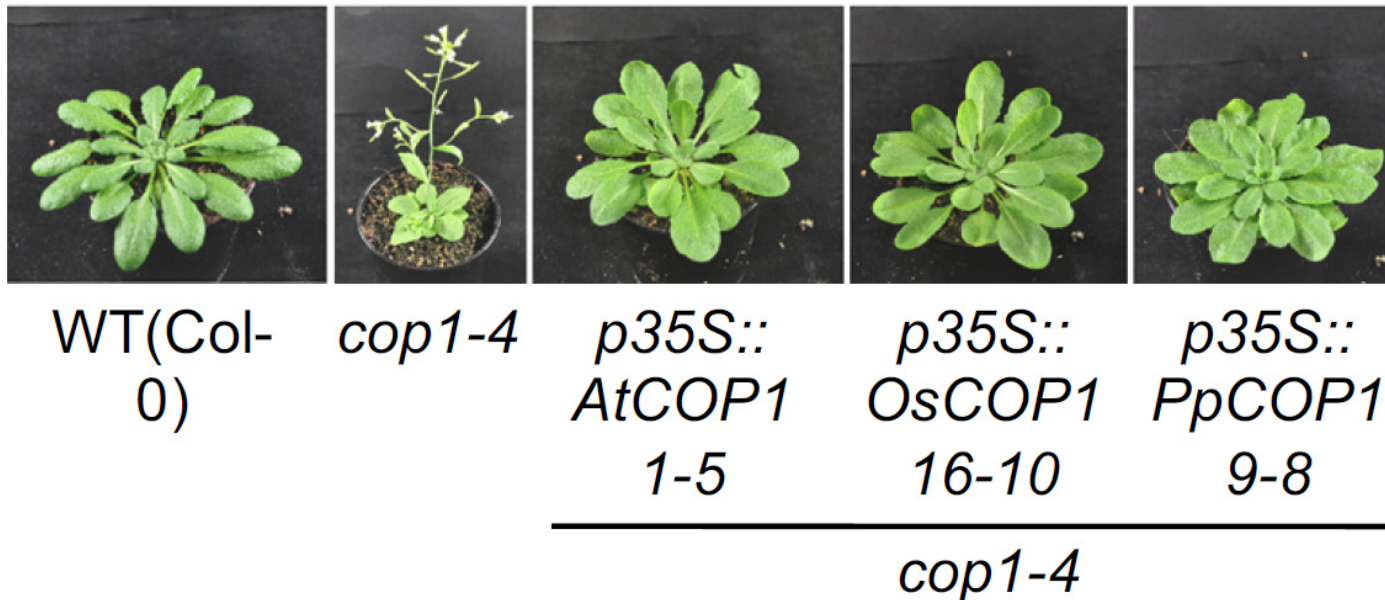
C. *aat tca agt **cg**t **acg** gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*
 N S S **R T** E T T L G T L K P W I S .

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 .

Komplementace mutantní linie



Komplementace mutantní linie



Ranjan et al., 2014

Klíčové koncepty

- Jak reverzní genetika zkoumá gen a jeho funkci?
 - Cílené umlčení genu
 - Vyhledání v knihovnách inzerčních mutantů
 - Homologní rekombinace
 - Analýza fenotypu
 - Potvrzení příčinné souvislosti mezi fenotypem a inzerční mutací
 - kosegregační analýza
 - identifikace nezávislé inzerční alely
 - využití nestabilních inzerčních mutagenů a izolace revertantních linií
 - komplementace mutantů pomocí transgenu

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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