

# CG020 Genomika

## Přednáška 2 – dokončení

### Identifikace genů

Jan Hejátko

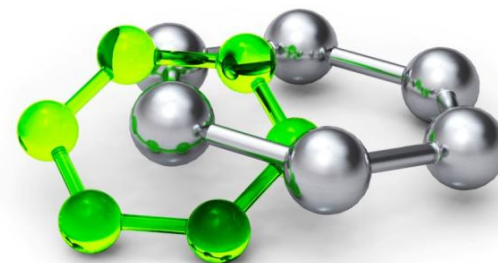
**Funkční genomika a proteomika rostlin,**  
Středoevropský technologický institut (CEITEC)

a

**Národní centrum pro výzkum biomolekul,**  
Přírodovědecká fakulta,

Masarykova univerzita, Brno  
[hejatko@sci.muni.cz](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.eu](http://www.ceitec.eu)

**M U N I**  
**S C I**



# 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

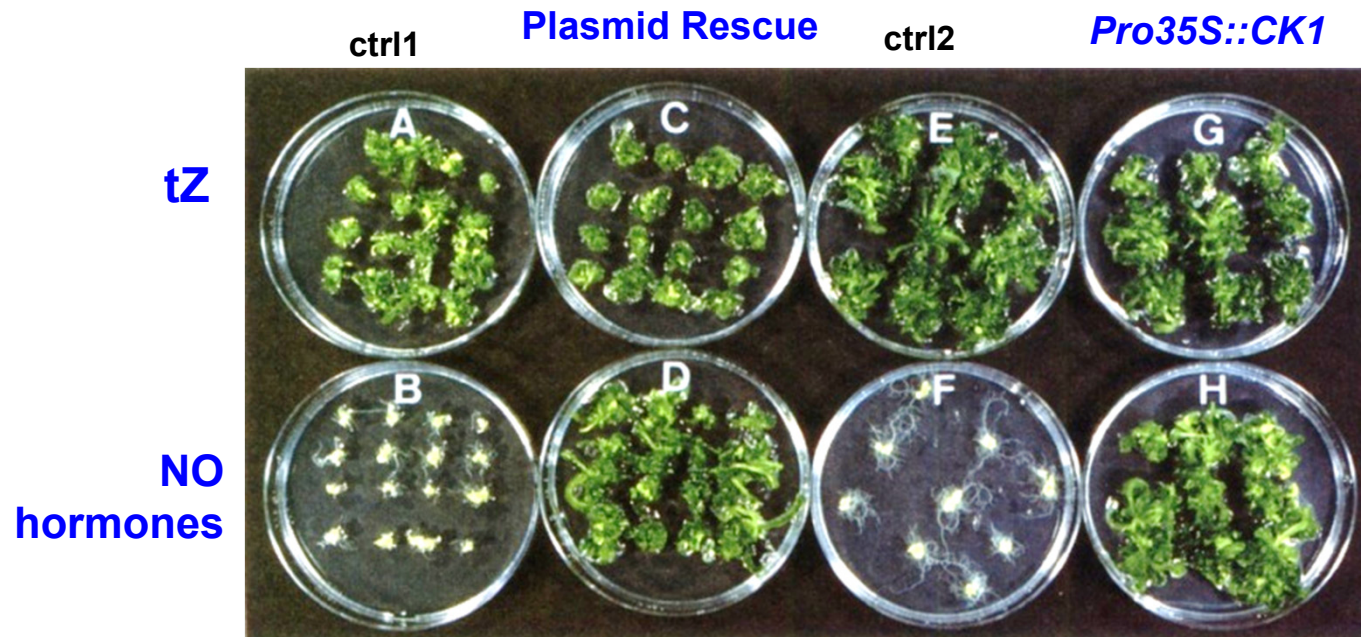
- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
  - Změna fenotypu po mutagenezi
    - **Genetika přímá**

# Přímá a reverzní genetika

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

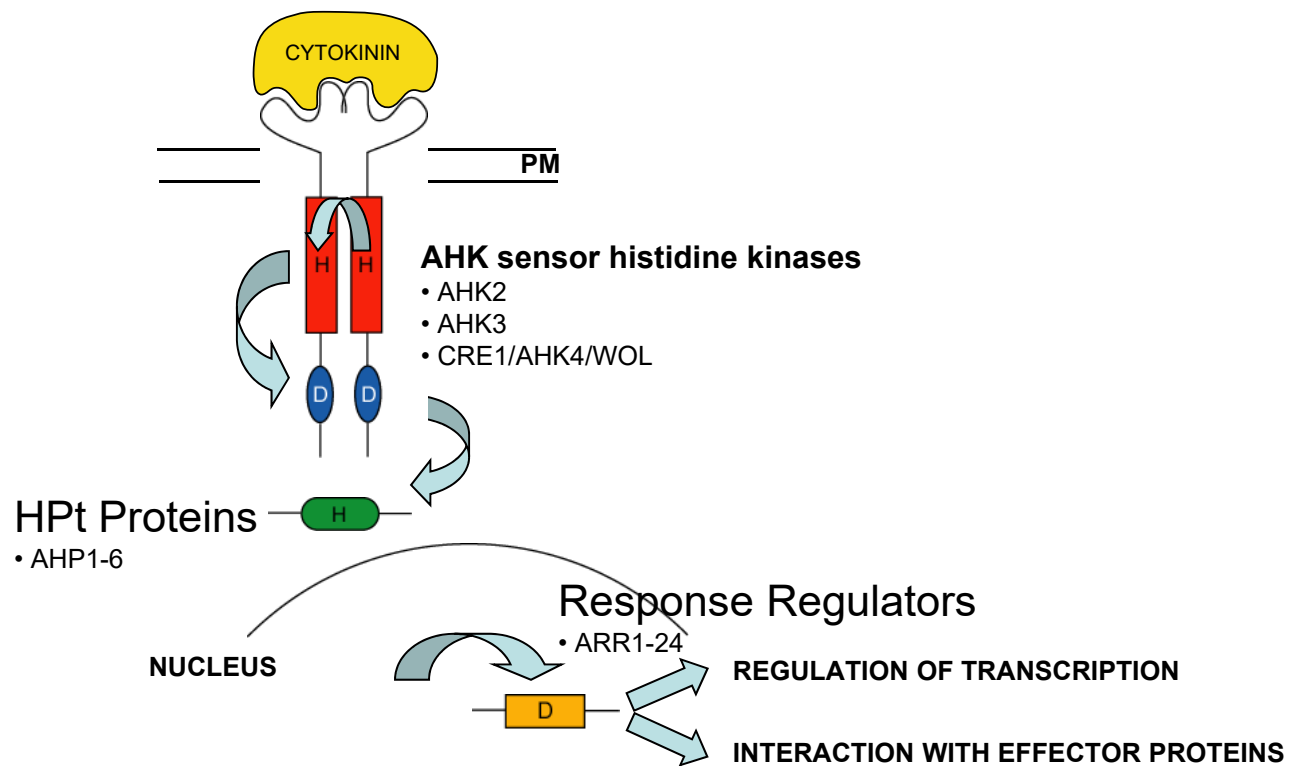
# Identifikace *CK1* aktivační mutagenezí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



Kakimoto, *Science*, 1996

# Signal Transduction via MSP

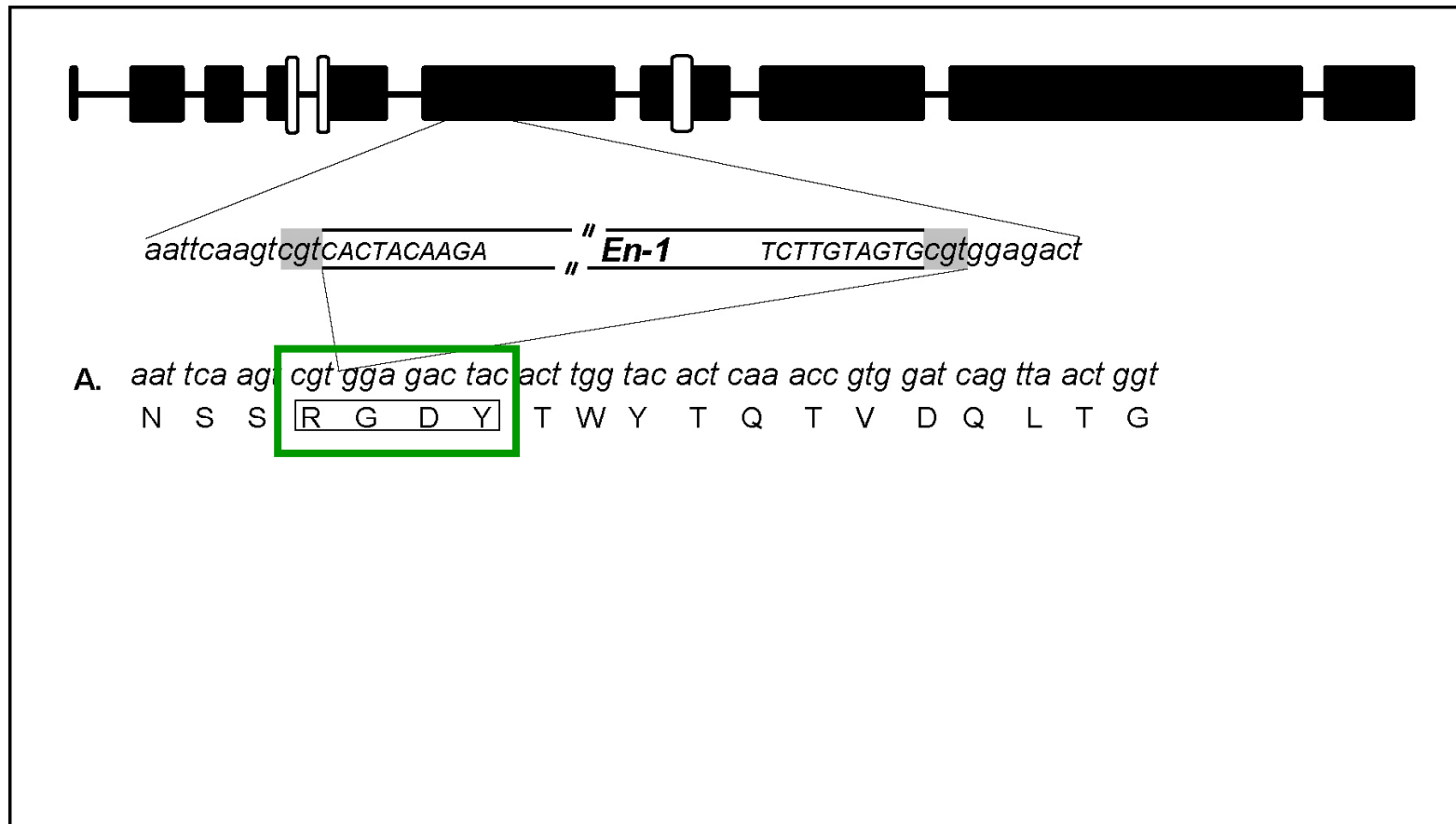


# Přímá a reverzní genetika

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

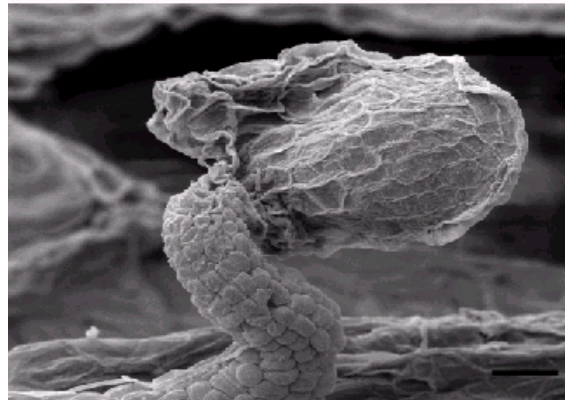


# Identification of insertional *cki1* mutant allele

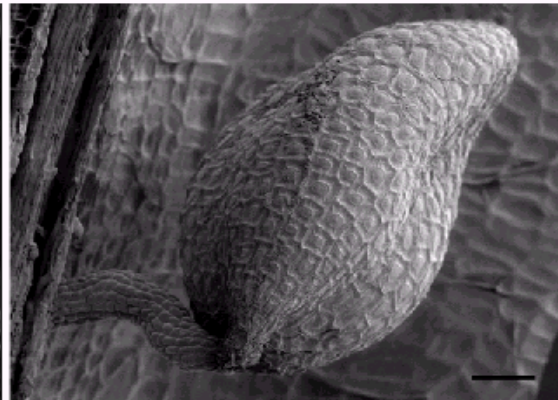


# CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

*CKI1/cki1-i*



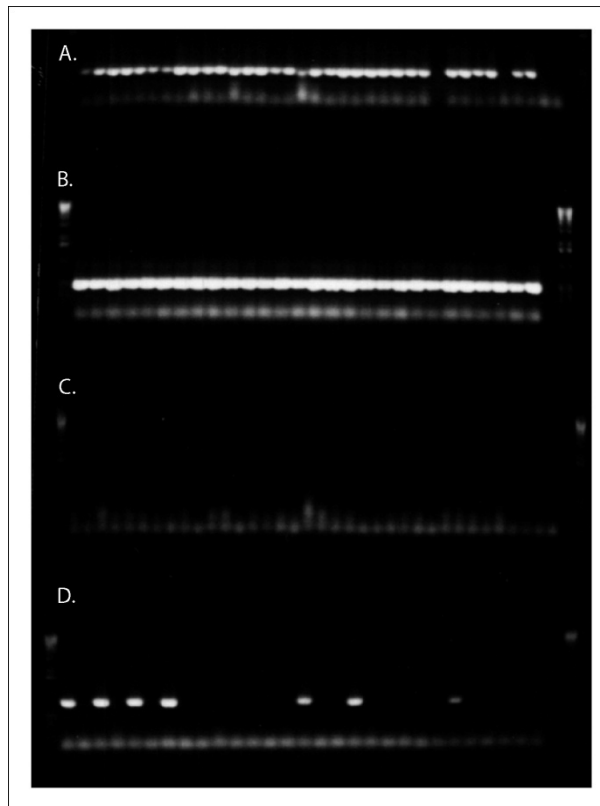
*CKI1/CKI1*



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*

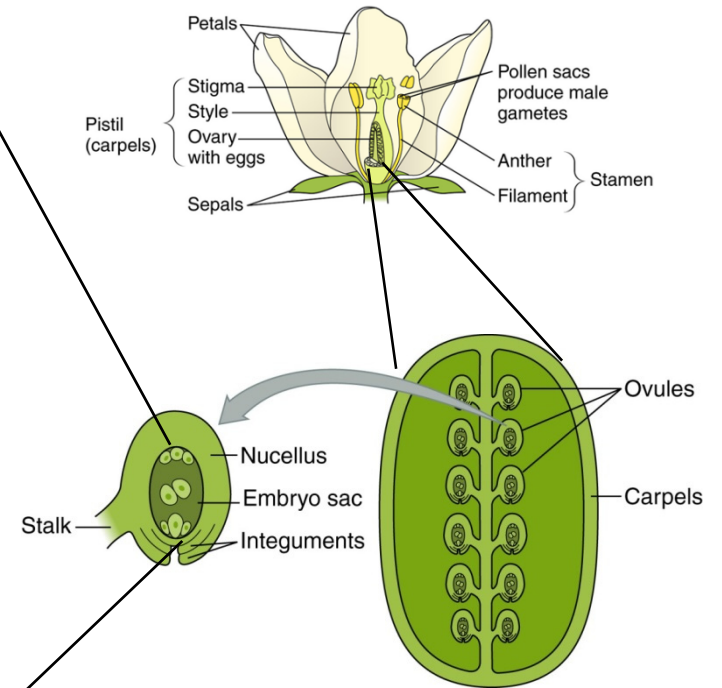
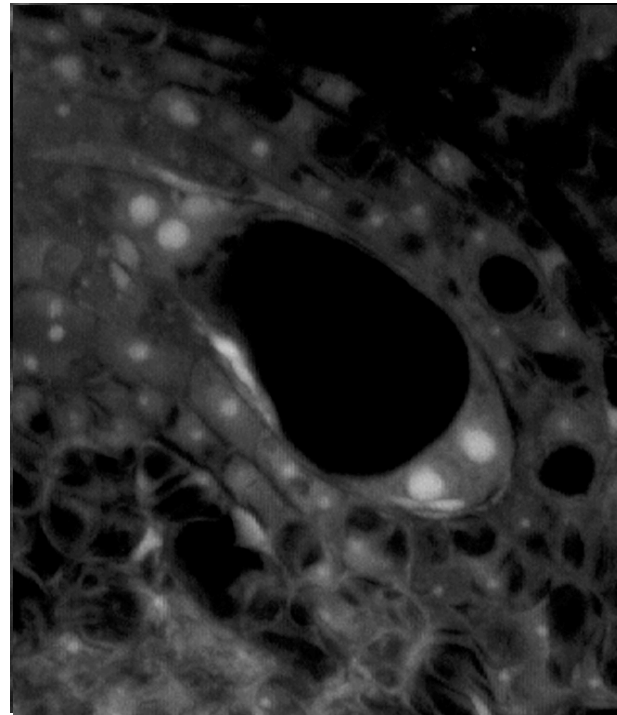


*cki1-i* specific primers

D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

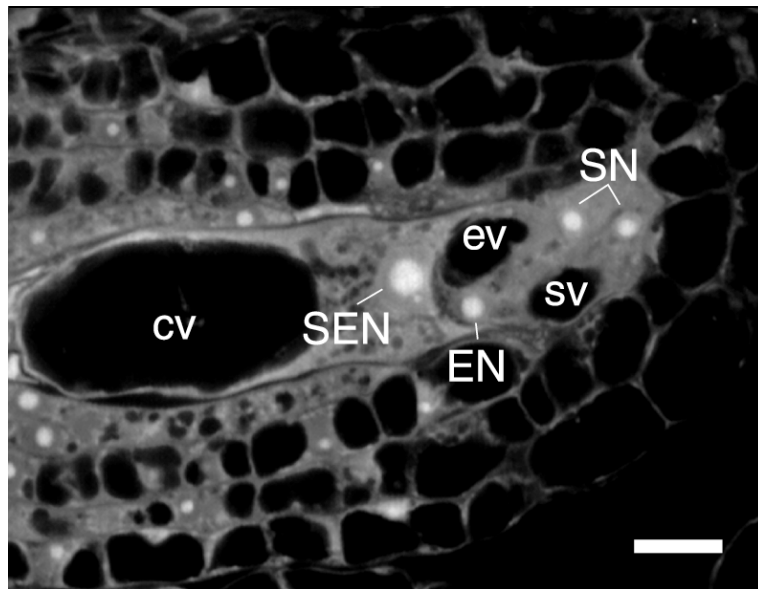
# CKI1 and Megagametogenesis

FG 1

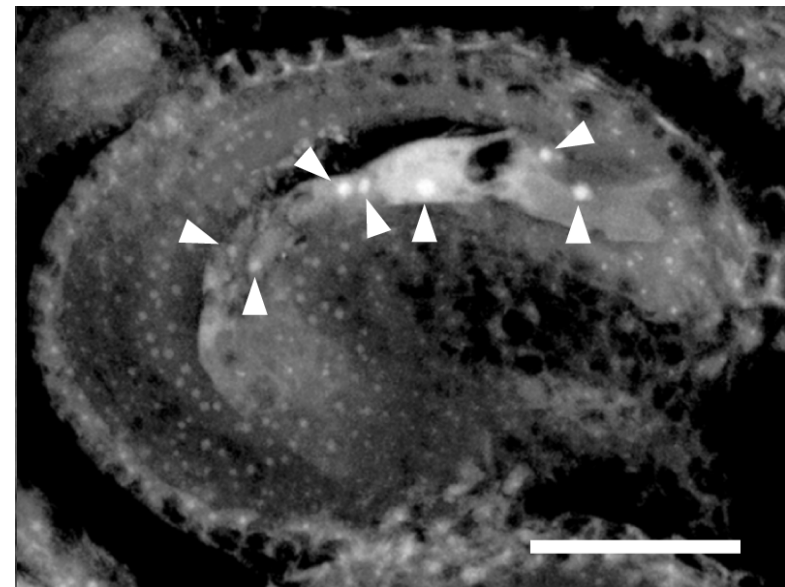


# CKI1 and Megagametogenesis

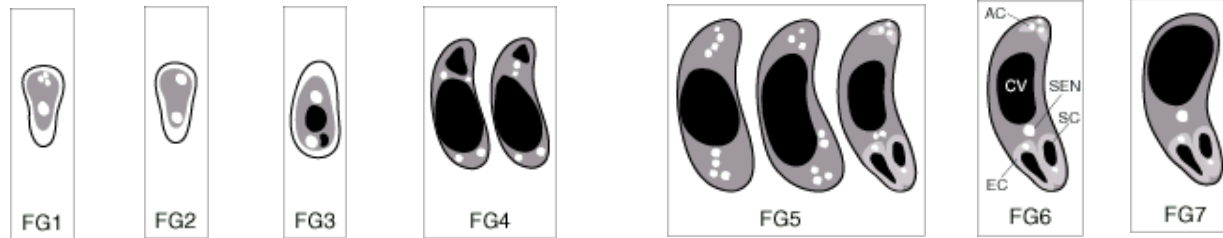
*CKI1* FG4 to FG5



*cki1-i* 28 HAE



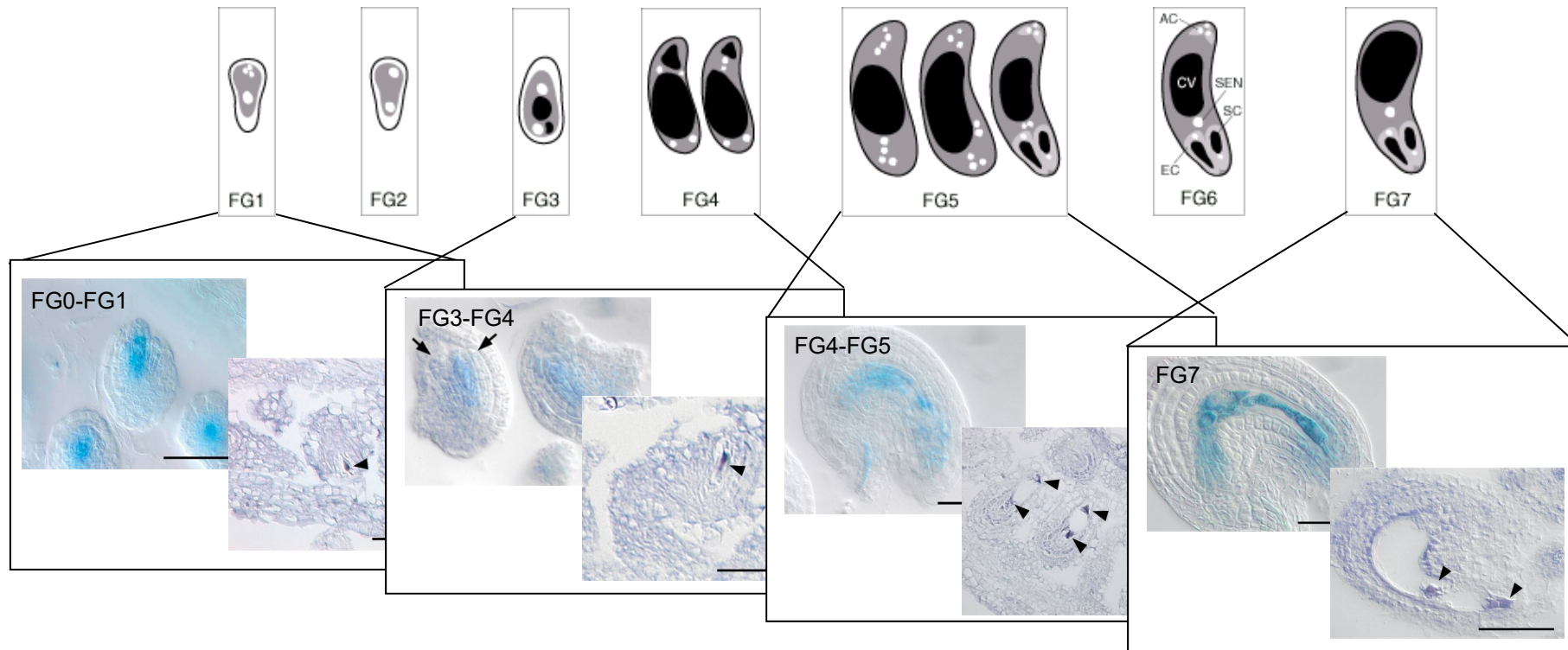
Hejatko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)



# Přímá a reverzní genetika

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

# *CKI1* is Expressed During Megagametogenesis



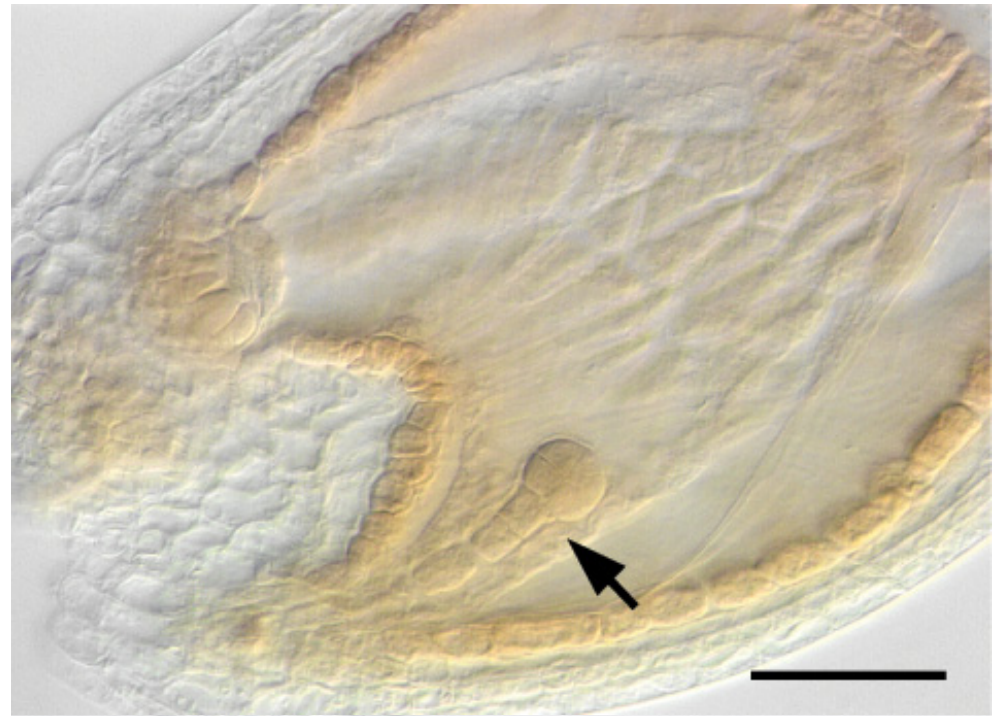


# Paternal *CKI1* is Expressed in the *Arabidopsis* Sporophyte Early after Fertilization

♀ 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

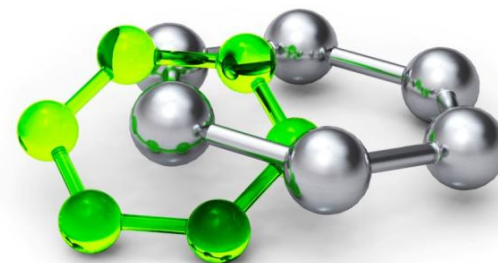
**Funkční genomika a proteomika rostlin,**  
Středoevropský technologický institut (CEITEC)

a

**Národní centrum pro výzkum biomolekul,**  
Přírodovědecká fakulta,

Masarykova univerzita, Brno  
[hejatko@sci.muni.cz](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.eu](http://www.ceitec.eu)

**M U N I**  
**S C I**



# 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



$h \times n$

T-DNA

### „Reverzně genetický“ přístup

1. IZOLACE SEKVENČNĚ SPECIFICKÉHO MUTANTA
2. IDENTIFIKACE FENOTYPU
3. PRŮKAZ KAUZÁLNÍ SOUVISLOSTI MEZI INZERCÍ A FENOTYPEM

(retro)transposons



# 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

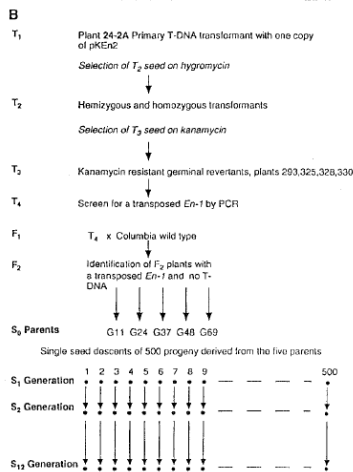
- Mobilní elementy
  - **Autonomní transpozony (*En-1*)**
    - obsahují gen pro transponázu, umožňující excizi a opětovné začlenění do genomu
    - na obou koncích obsahují krátké obrácené repetice, které jsou transponázou rozpoznávány
- Stabilní elementy
  - **Neautonomní transpozony (*dSpm*)**
    - 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)

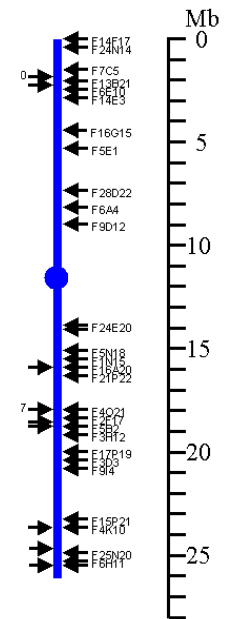
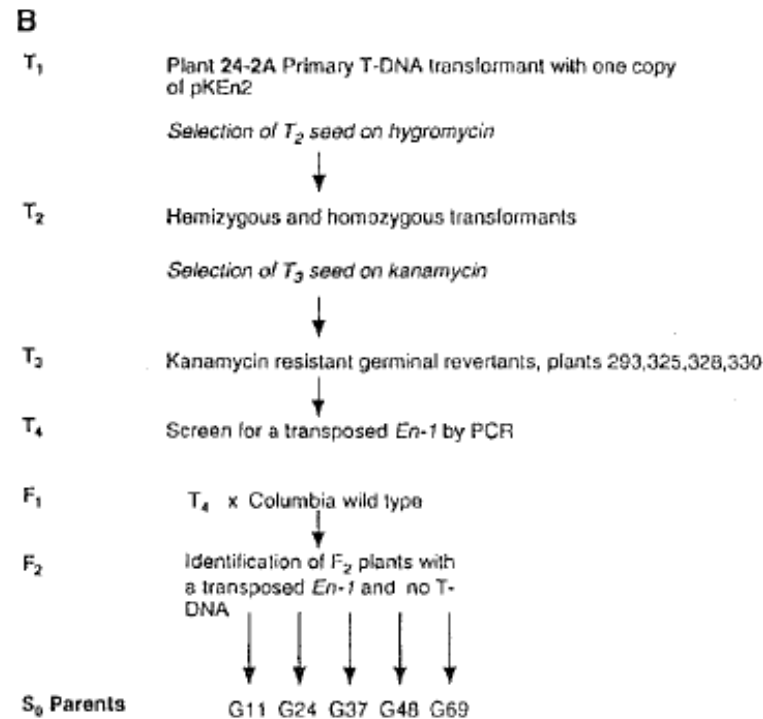


připrava transgenních rostlin

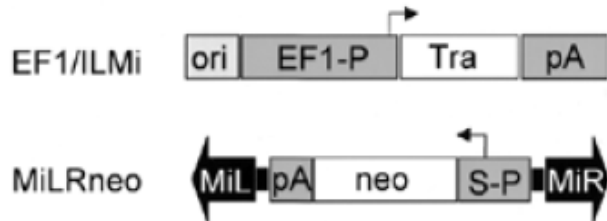
vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



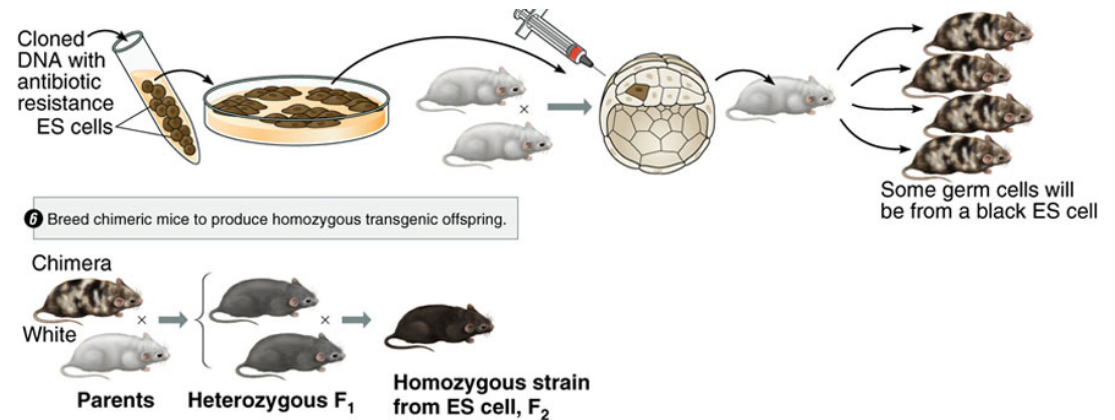
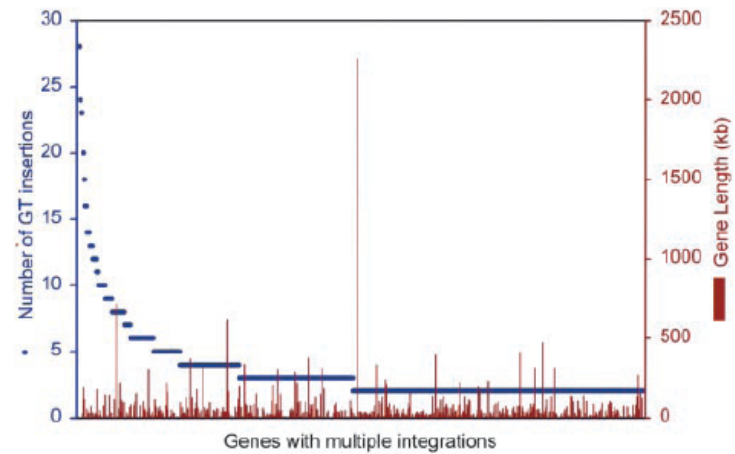
# Knihovny inzerčních mutantů (u živočichů)



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

vytvoření populace mutantních buněčných linií a analýza frekvence inzercí

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



# Osnova

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



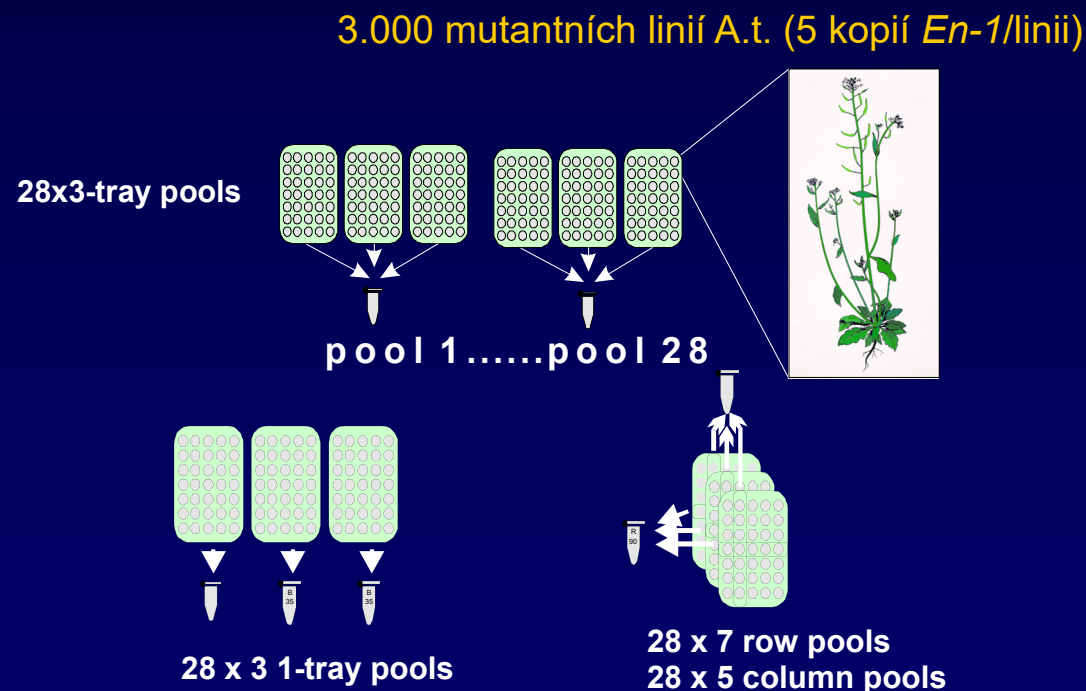
# Izolace sekvenčně specifických mutantů

## 1. Knihovna *En-1* inzerčních mutantů

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

# Izolace sekvenčně specifických mutantů

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



# Izolace sekvenčně specifických mutantů

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

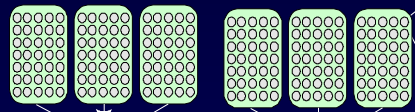


# Izolace sekvenčně specifických mutantů

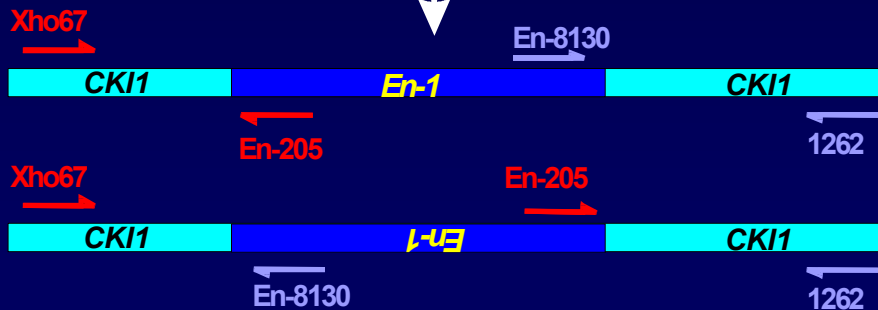
## 1. Vyhledávání pozitivní trojice

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

28x3-tray pools

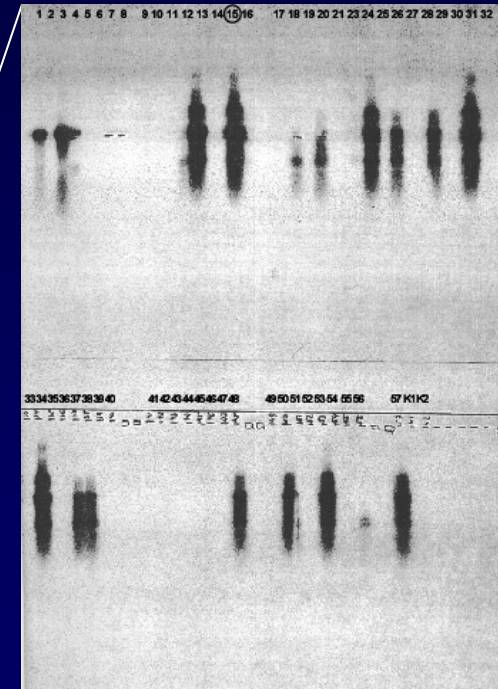


pool 1 ..... pool 28



(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou



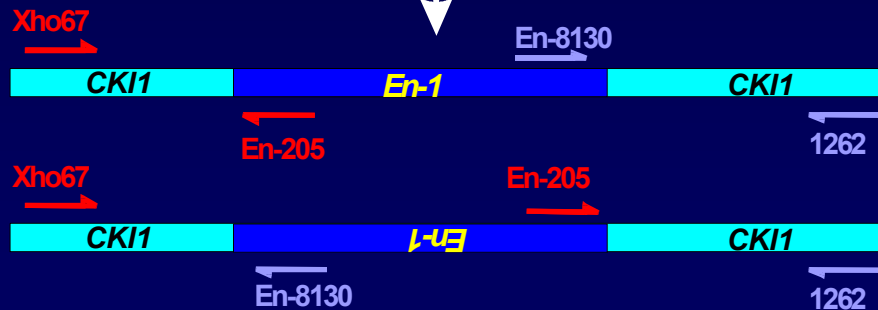
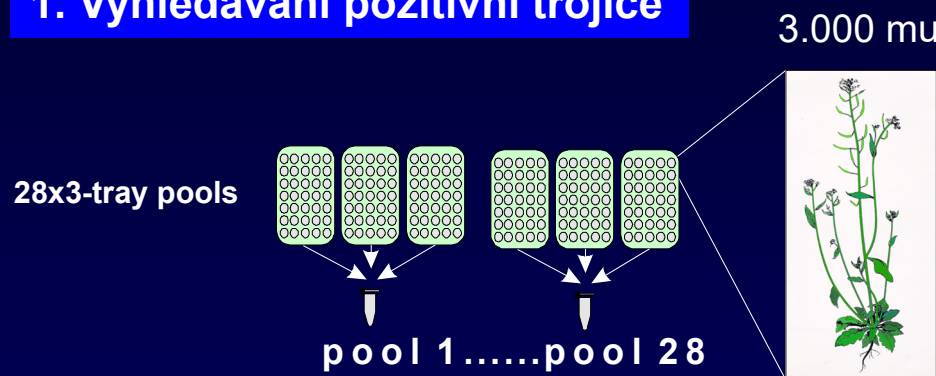
# Izolace sekvenčně specifických mutantů

- „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



# Izolace sekvenčně specifických mutantů

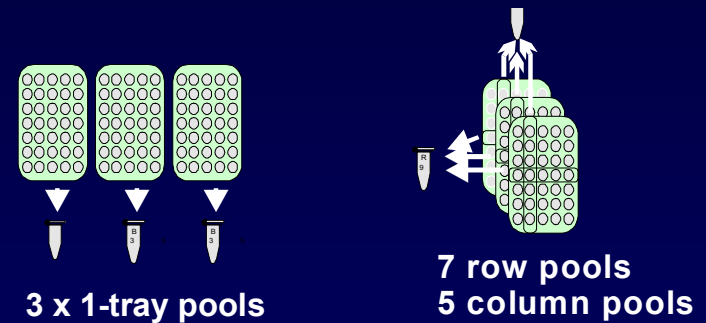
## 1. Vyhledávání pozitivní trojice



( $2 \times 2 \times 28 = 112$  PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

## 2. Identifikace linie nesoucí inzerci



(dalších  $5 + 7 + 3 = 15$  PCR reakcí)

**Celkem  $112 + 15 = 127$  PCR reakcí**

# 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

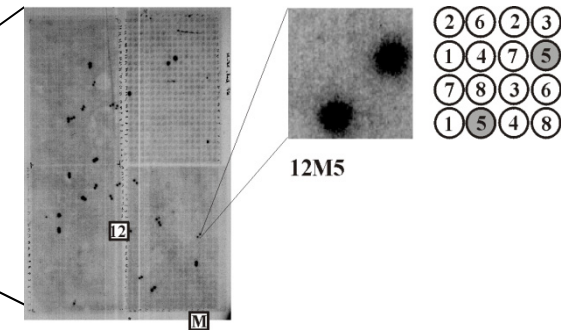
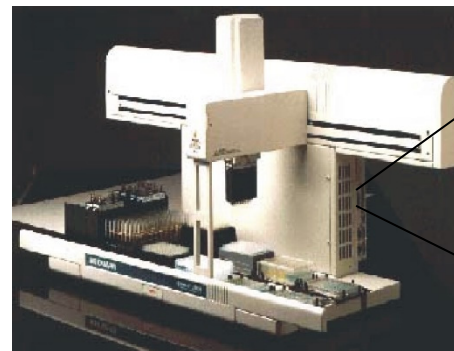
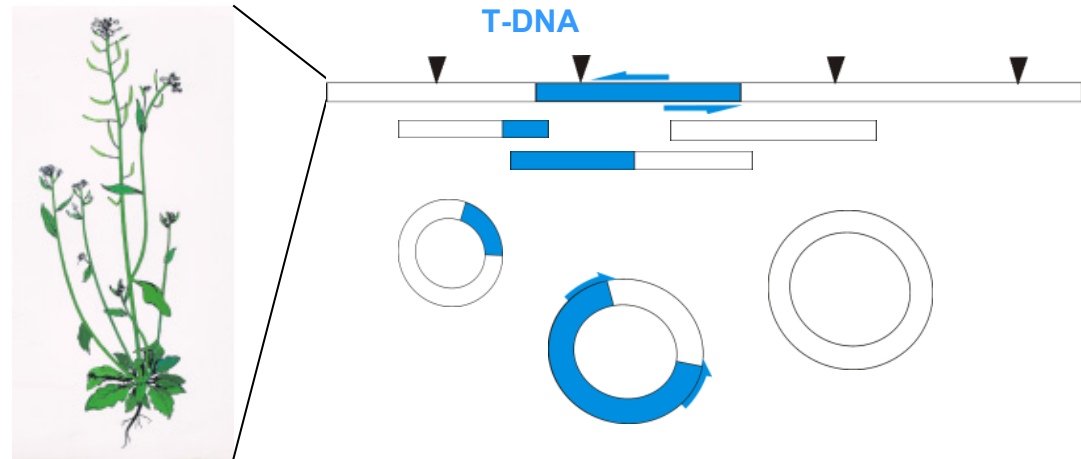
<http://nasc.nott.ac.uk>



# 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



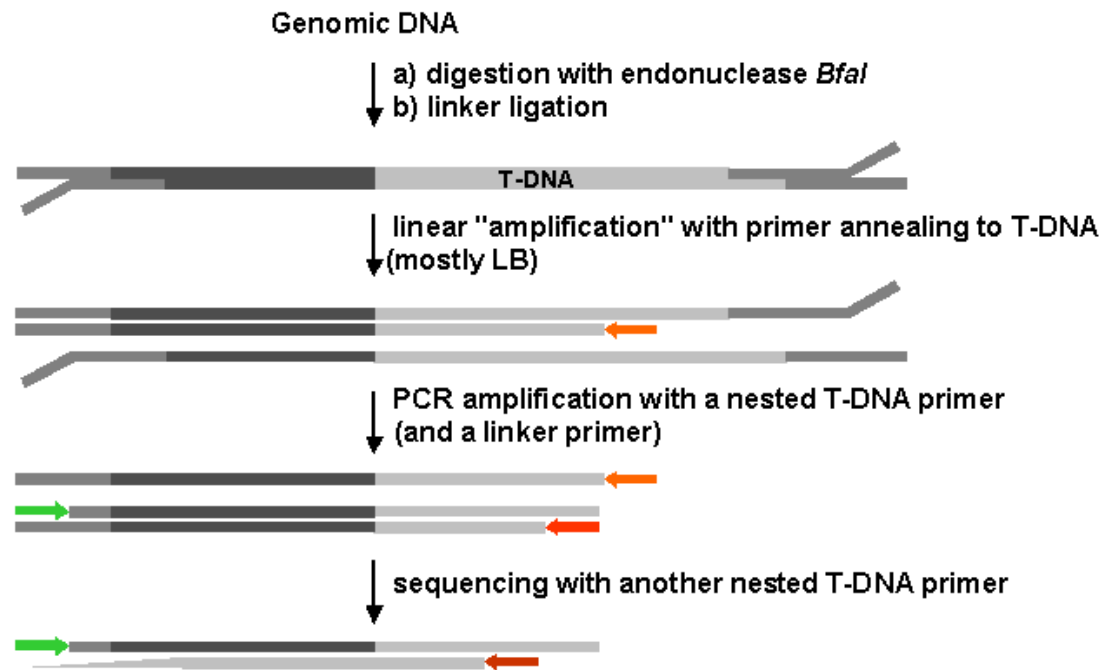
# Osnova

- 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



GABI-Kat (MPIZ, Köln)

# 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 attagagtttgattgaagtgtgttttatattgatagtgggacattacttataaaaagc 1509
      |||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcgcgttttatattgatagtgggacattacttataaaaagc 400

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

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

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

Query: 1690 atgattccaaac 1701
      |||
Sbjct: 219 atgattccaaac 208

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

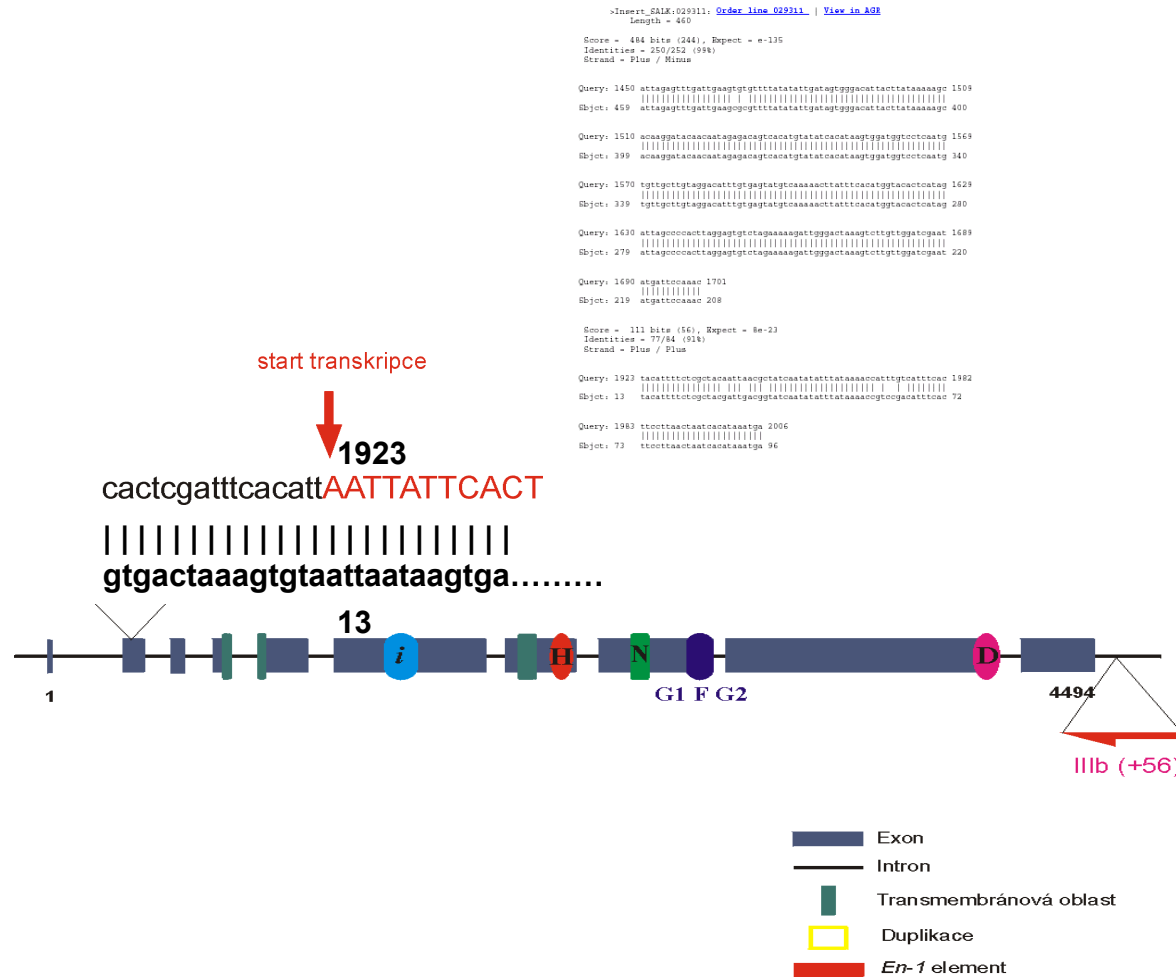
Query: 1923 tacattttctogctacaattaacgctatcaatatatttataaaaaccatttgcatttcac 1982
      |||
Sbjct: 13 tacattttctogctacgattgaoggtatcaatatatttataaaaaccgctcagacatttcac 72

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

Sbjct: 292 ccagcttctagaagcttcttgggtcaagttccagtagcgggacogatctogagaatcaca 233

LINK INSER PAGE view detailed information on inser sequences in AGR
```

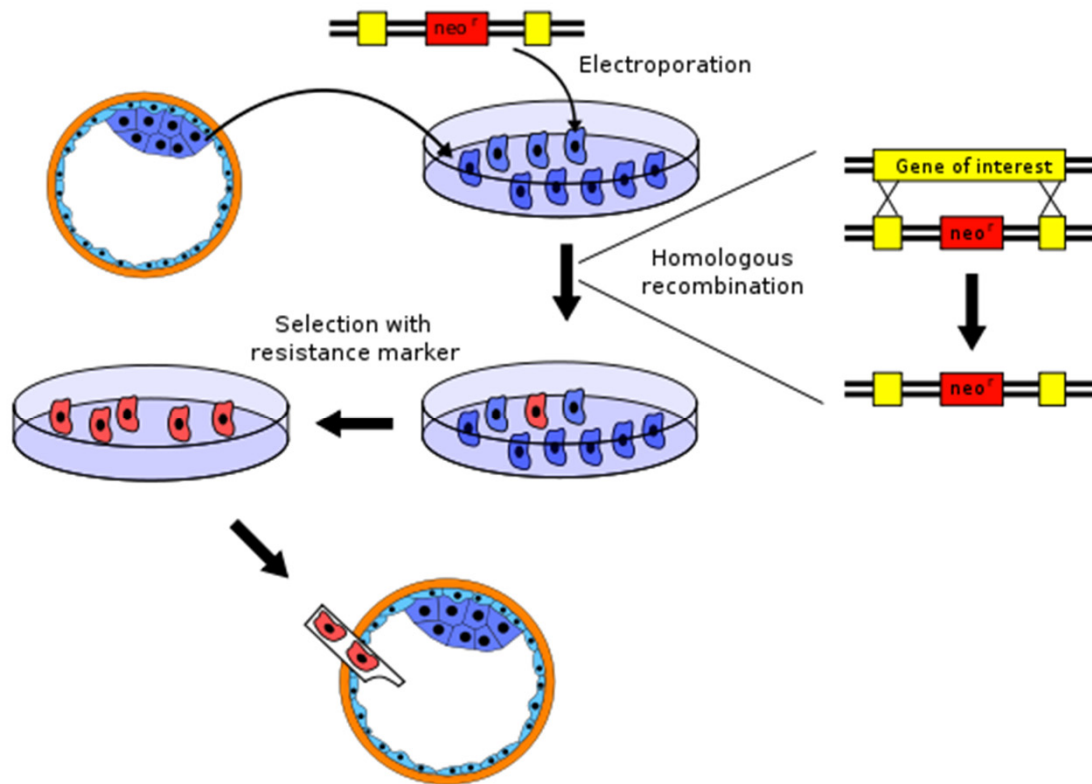
# Vyhledávání v elektronických knihovnách inzerčních mutantů



# 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 mutantu pomocí transgenu



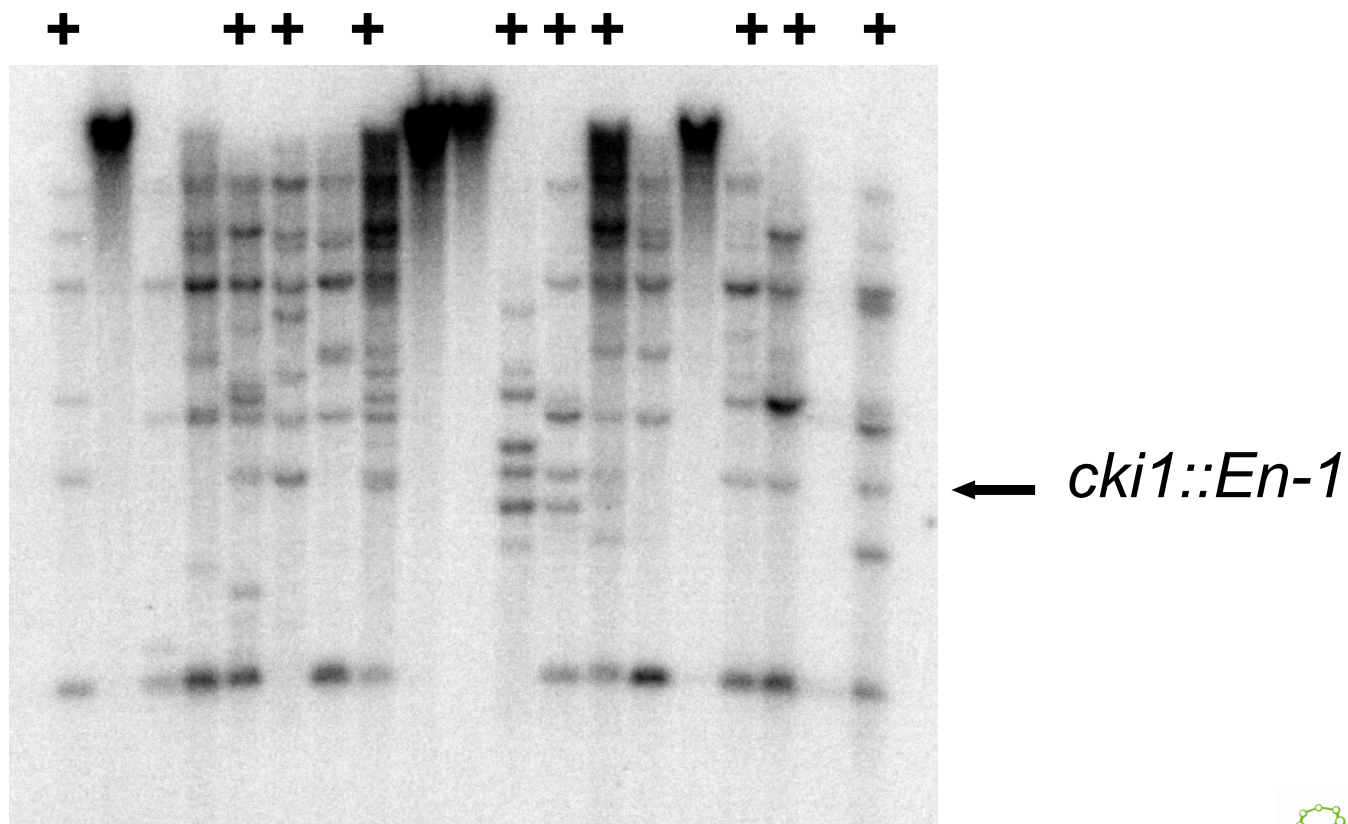
# Proč je nutné analyzovat příčinnou souvislost mezi inzercí a pozorovaným fenotypem ?

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

# Kauzalita mezi inzercí a fenotypem

- **Kosegregační analýza**

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



# Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

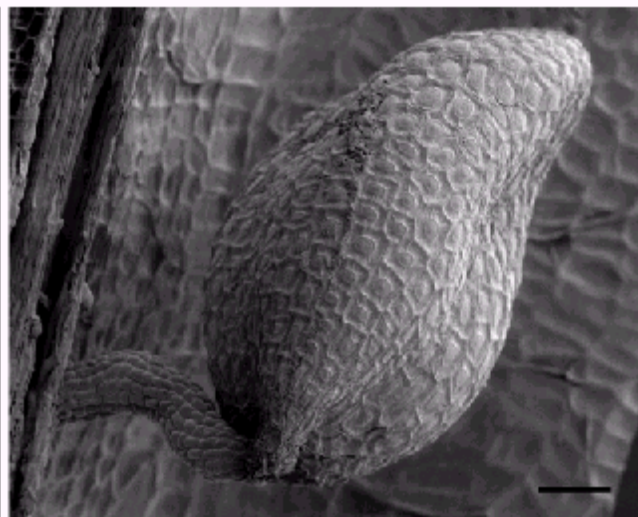
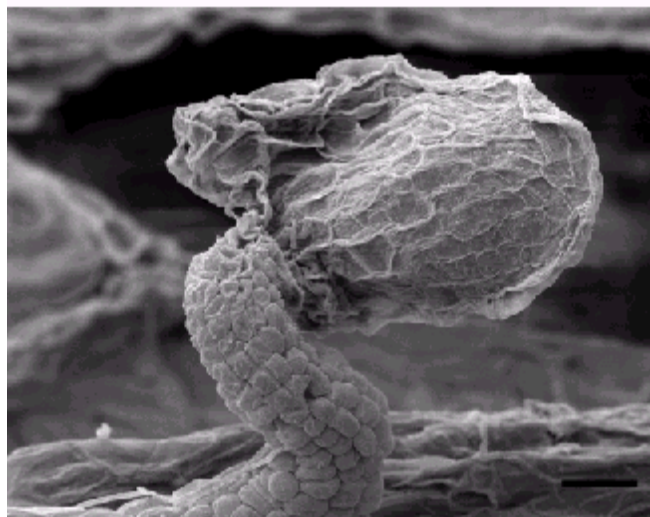
- transpozony se často vyznačují excizí a reinzercí do blízké oblasti-využití při izolaci nových mutantních alel
- excize transpozonů není vždy zcela přesná-vznik bodových mutací - izolace revertantních linií s tichou mutací i stabilních mutantů

# Fenotyp šesulí *cki1::En-1/CKI1*

*cki1::En-1/CKI1*



*CKI1/CKI1*



# Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

## 1. Izolace revertantních linií

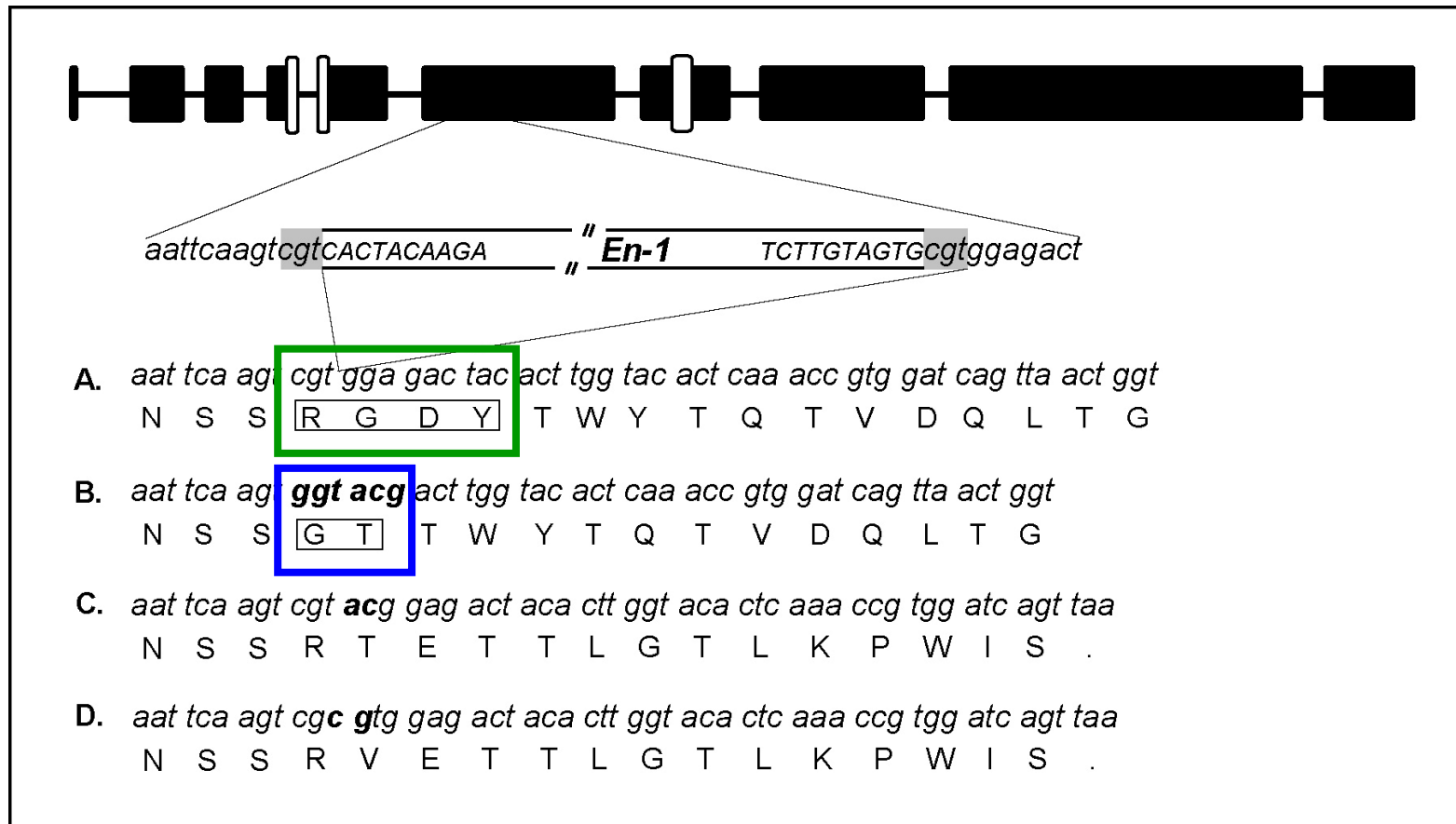
- PCR vyhledávání ve **246** rostlinách segregující populace
- z **90** *cki1::En-1* pozitivních **9** rostlin mělo kromě šešulí mutantních i šešule standardního typu



### 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



# 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

*aattcaagtcgtCACTACAAGA* " **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

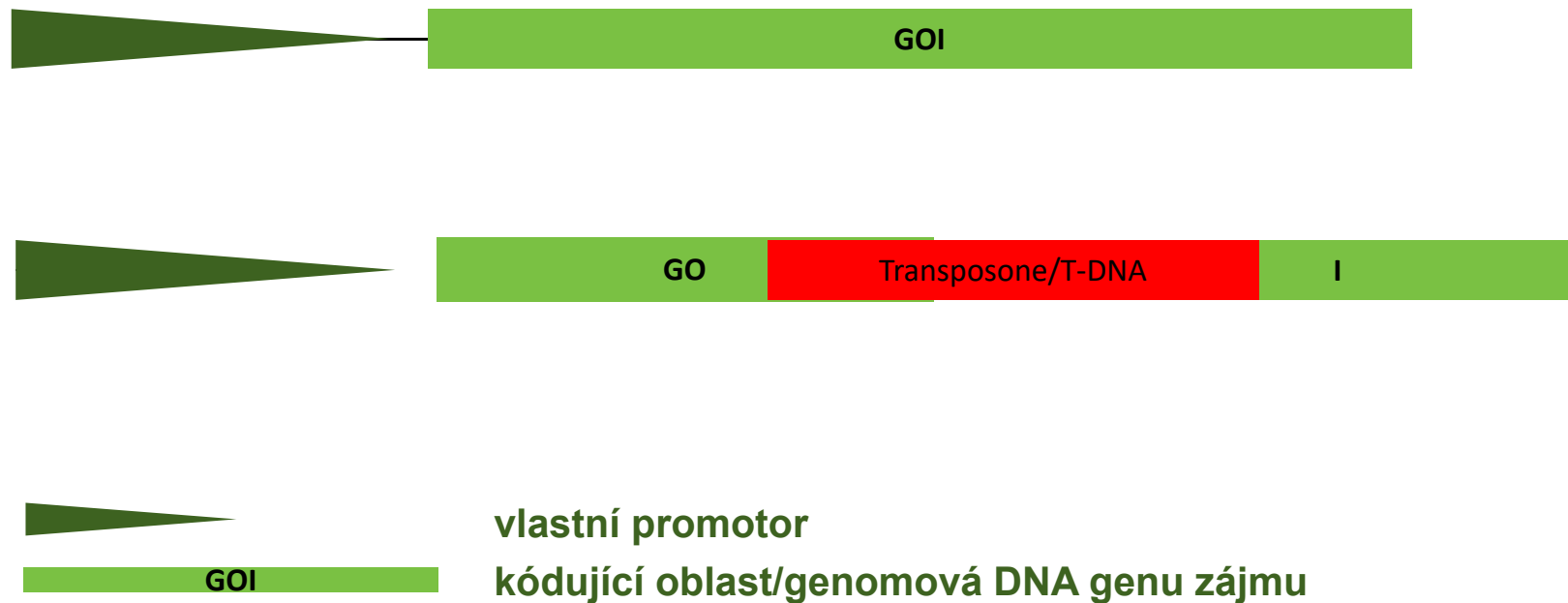
**B.** *aat tca agt **gg**t **ac**g act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*  
 N S S **G T** T W Y T Q T V D Q L T G

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

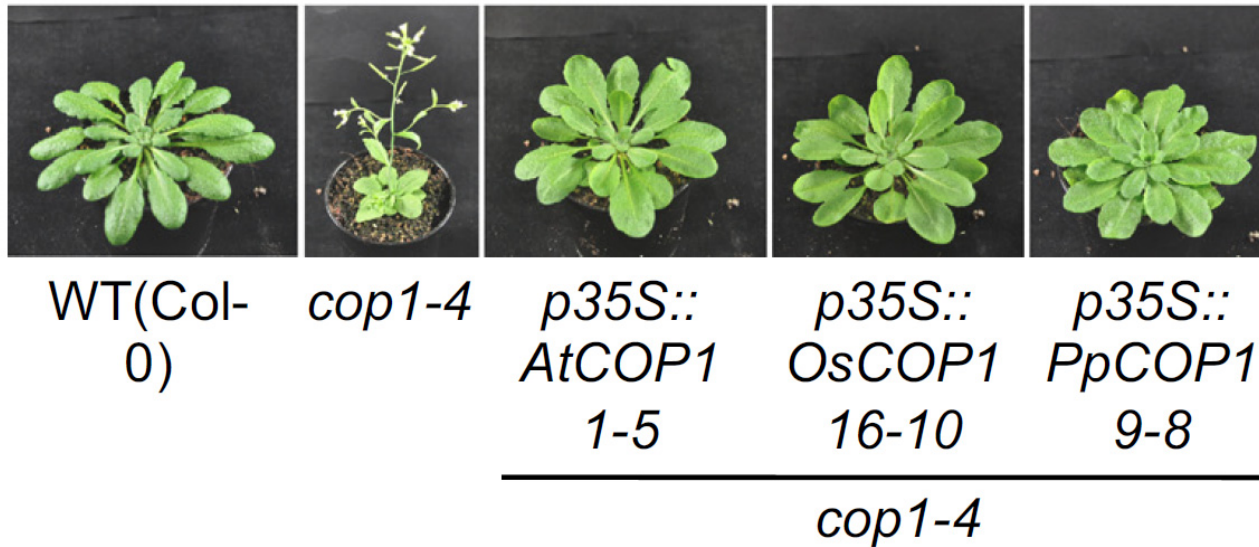
**D.** *aat tca agt **cg**c **gt**g gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*  
 N S S **R V** E T T L G T L K P W I S .



# 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 mutantu pomocí transgenu

# Diskuse