

CG020 Genomika

Přednáška 2 – dokončení

Identifikace genů

Jan Hejátko

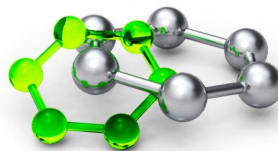
Funkční genomika a proteomika rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC)

a

Národní centrum pro výzkum biomolekul,
Přírodovědecká fakulta,

MUNI
SCI

Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.eu



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 mutantu a analýza jeho fenotypu
 - **Genetika reverzní**
 - Analýza exprese daného genu a jeho časoprostorové specifity

Přímá a reverzní genetika

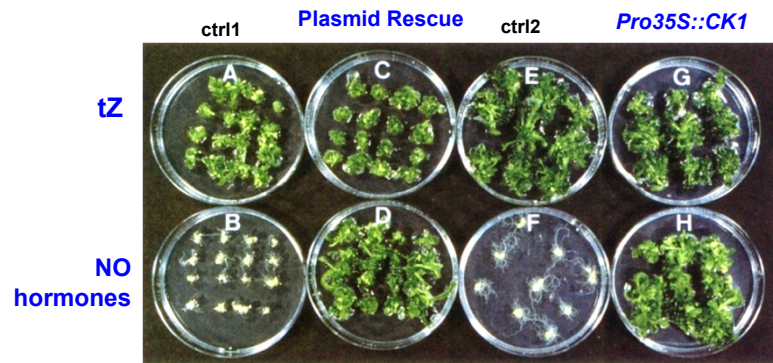
- Principy experimentální identifikace genů prostřednictvím přímé a reverzní genetiky
 - Změna fenotypu po mutagenezi
 - **Genetika přímá**

Přímá a reverzní genetika

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

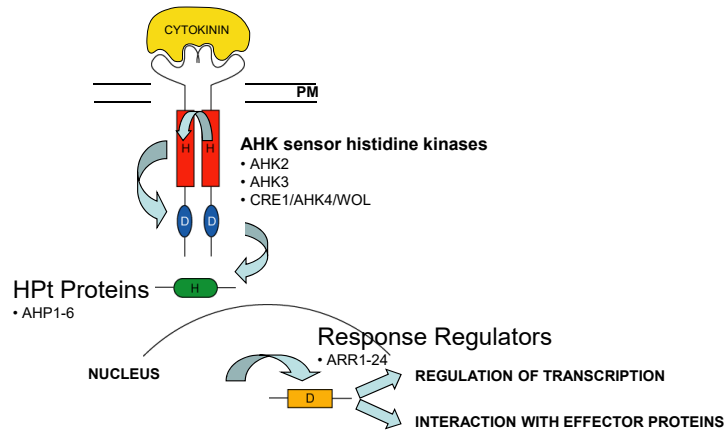
Identifikace *CK1* aktivační mutagenezí

- *CK1* overexpression mimics cytokinin response



Kakimoto, Science, 1996

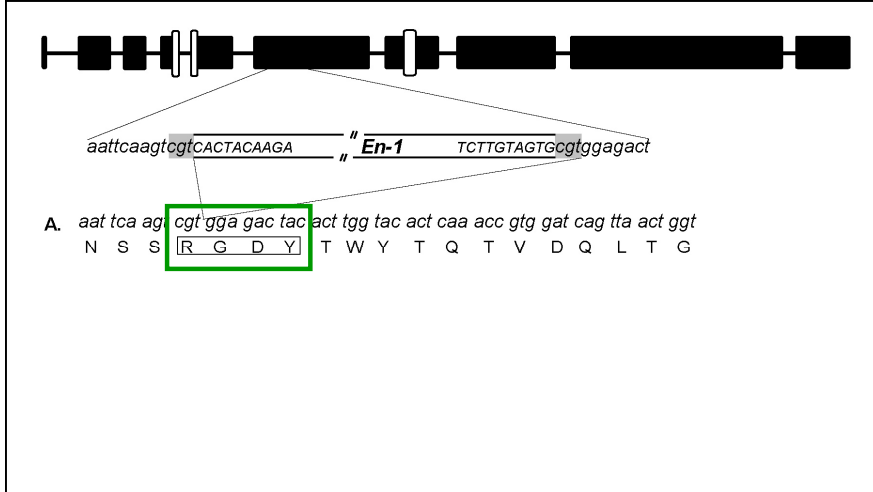
Signal Transduction via MSP



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

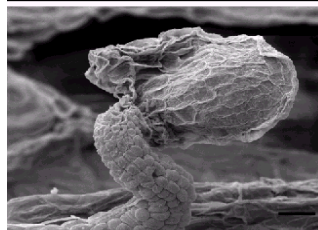


CKI1 Regulates Female Gametophyte Development

CKI1/cki1-i



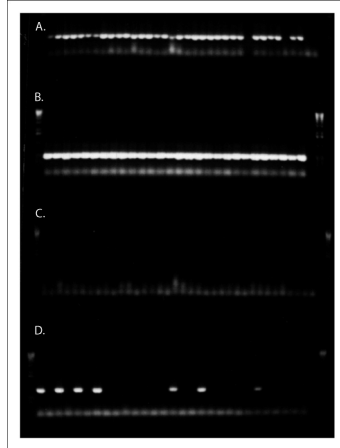
CKI1/CKI1



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*

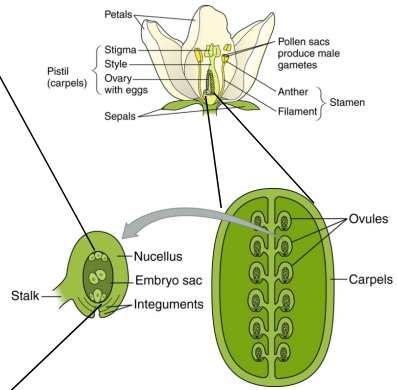
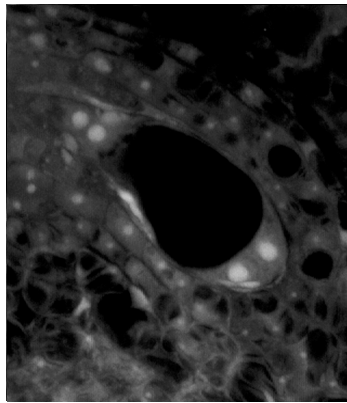


cki1-i specific primers

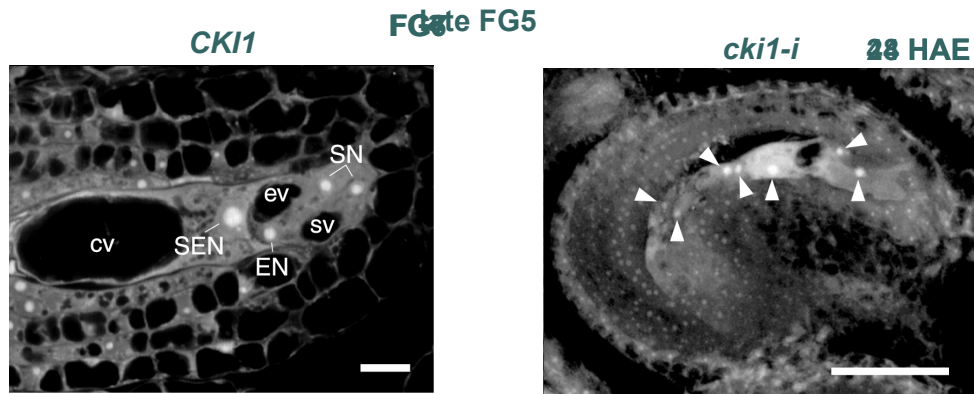
D. ♂ *CKI1/cki1-i* x ♀ wt

CKI1 and Megagametogenesis

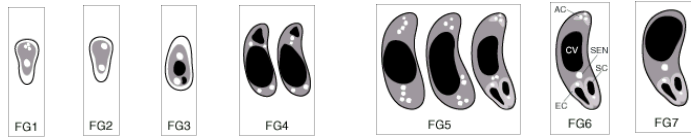
FG 1



CKI1 and Megagametogenesis



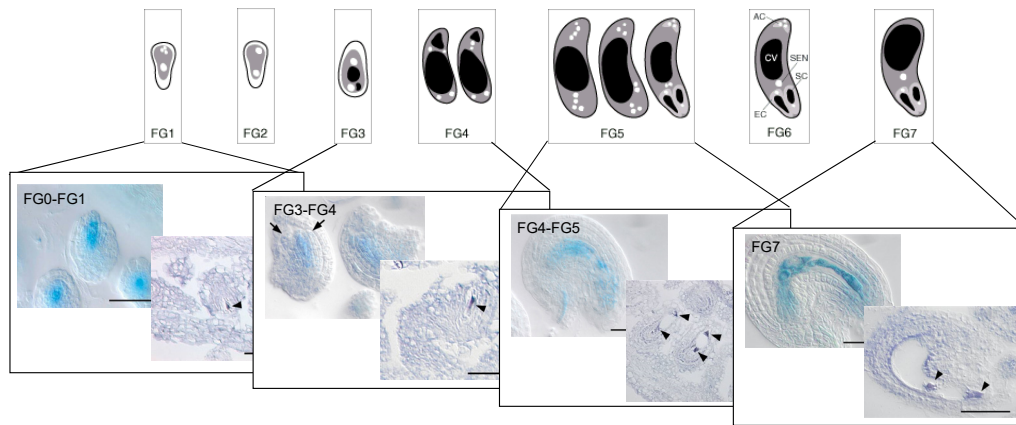
Hejätko et al., *Mol Genet Genomics* (2003)



Přímá a reverzní genetika

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

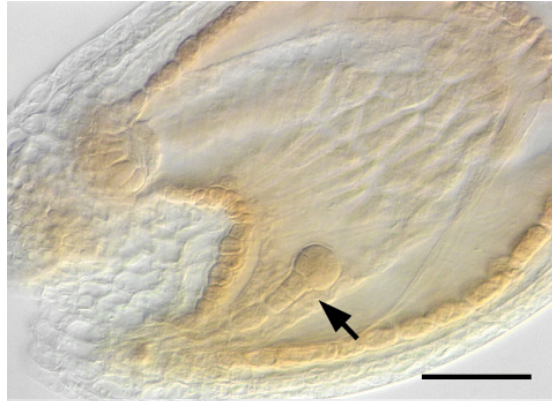
CKI1 is Expressed During Megagametogenesis



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

♀ wt x ♂ Pro*CKI1*:*GUS*

22 HAP
(hours
after
pollination)



Hejätko 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,

MUNI
SCI

Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.eu



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

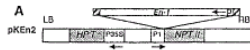
- **Neautonomní transpozony (*dSpm*)**

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

- **T-DNA**

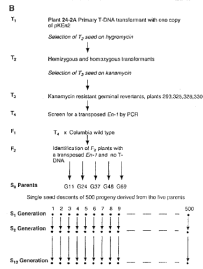
- zcela stabilní, její inserce však může vést k chromozomovým přestavbám (inverze, delece, transpozice)

Knihovny inzerčních mutantů (u rostlin)

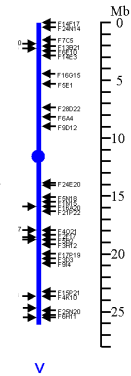
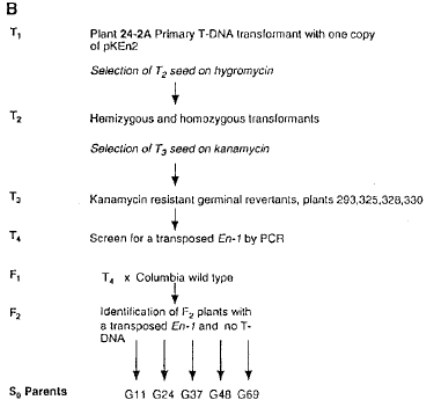


připrava transgenních rostlin

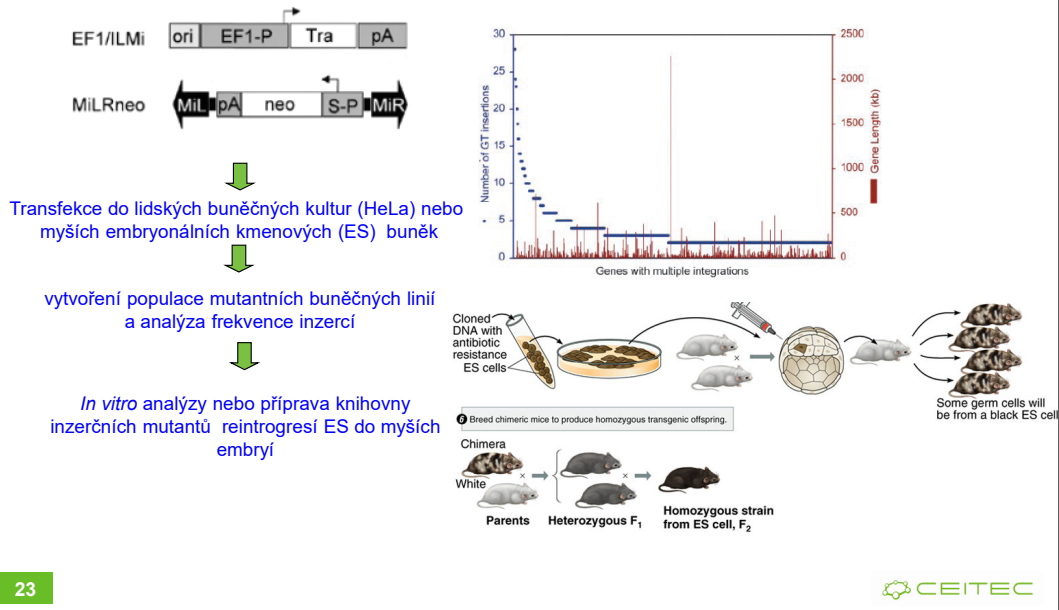
vytvoření populace mutantních jedinců



vyhledávání sekvenčně specifických mutantů pomocí PCR



Knihovny inzerčních mutantů (u živočichů)



Technologii inzerční mutagenéze lze využít i u živočichů. Zda se využívají např. transpozony odvozené z *Drosophily* (transpozon Minos, viz schéma vlevo nahoře (Klinakis et al., 2000)). V tomto případě bylo nutné provést kotransfekci s tzv. helper plasmidem, kódujícím transponázu (neautonomní transpozon). Neo kóduje rezistenci k neomycinu, šipky ukazují směr transkripce řízený příslušnými promotory, pA je polyadenylační signál, ori je počátek replikace viru SV40, S-P je promotor téhož viru. Pro identifikaci insercí „in frame“ se zasaženými geny lze využít transpozony, obsahující fúzi akceptorových míst sestřihu s ORF reportérového genu, např. lacZ-neo (bez AUG kodonu). Tento přístup umožňuje identifikovat inserce do aktivních genů prostřednictvím selekce inzerčních mutantů na rezistenci k neomycinu, resp. vykazující β -galaktozidázovou aktivitu (Klinakis et al., 2000).

Osnova

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

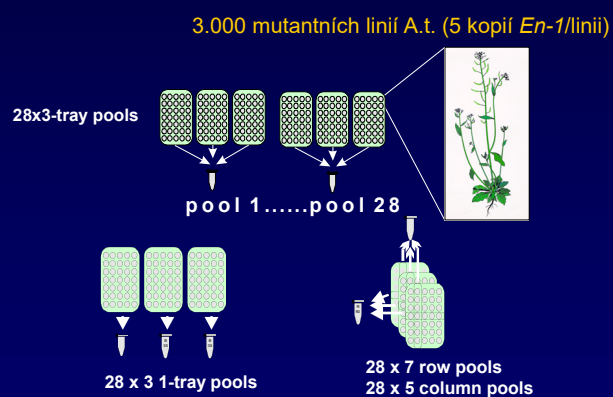
Izolace sekvenčně specifických mutantů

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

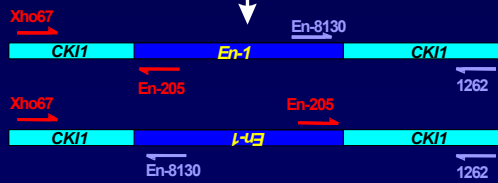
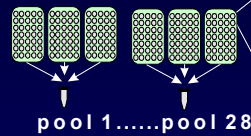


Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

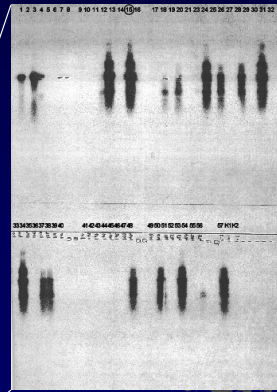
3.000 mutantních linií A.t. (5 kopií *En-1*/linii)

28x3-tray pools



(2x2x28=112 PCR reakcí)

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou



Izolace sekvenčně specifických mutantů

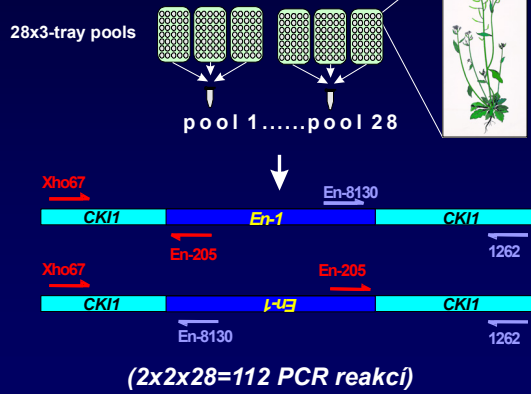
- „Trojrozměrné“ vyhledávání pomocí PCR
 - izolace genomové DNA z jednotlivých rostlin mutantní populace a vytvoření souhrnných souborů DNA („trojice“, řady a sloupce trojic a jednotlivé podnosy)
 - identifikace pozitivní „trojice“ pomocí PCR, blotování PCR produktů a hybridizace s genově specifickou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



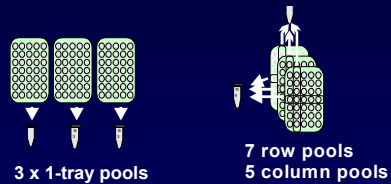
Izolace sekvenčně specifických mutantů

1. Vyhledávání pozitivní trojice

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



2. Identifikace linie nesoucí inserci



(dalších 5+7+3=15 PCR reakcí)

Celkem 112+15=127 PCR reakcí

Identifikace PCR produktu pomocí hybridizace s genově spec. sondou

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

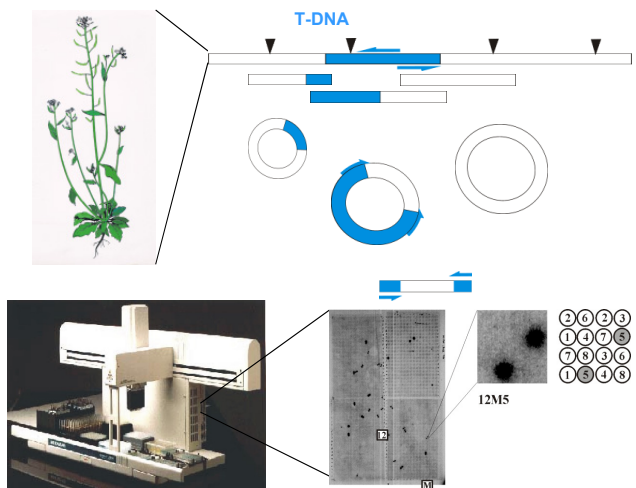
- The Sainsbury Laboratory (SLAT-lines),
John Innes Centre, Norwich Research Park
- DNA a semena v Nottingham Seed Stock Centre
- 48.000 linií
- průměrně 1.2 izerce na linii
- neautonomní transposon
- PCR vyhledávání nebo hybridizace s iPCR filtry
- SINS (sequenced insertion sites) databáze

<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



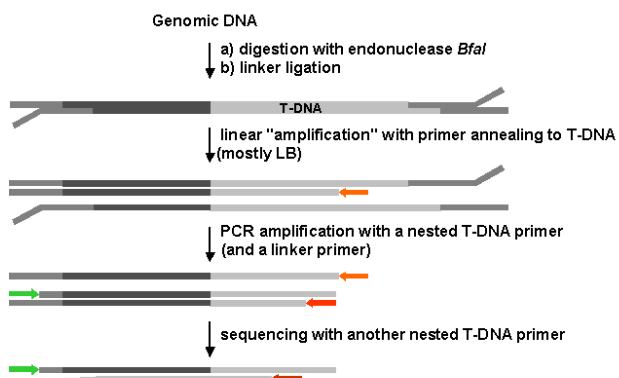
Osnova

- 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 AGE
Length = 460

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

Query: 1450 attagagtttgattgaagtgtgttttatattatattgatagtgggacattacttataaaaagc 1509
      |||
Sbjct: 459 attagagtttgattgaagcgcgttttatattatattgatagtgggacattacttataaaaagc 400

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

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

Query: 1630 attagcccaacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaaat 1689
      |||
Sbjct: 279 attagcccaacttaggagtgctagaaaaagattgggactaaagtcttggatcgaaat 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 tacattttctcgtcacattaacgctatcaatatatttataaaacatttgcatttcaac 1982
      |||
Sbjct: 13 tacattttctcgtcagattgcggtatcaatatatttataaaacgctcagatttcaac 72

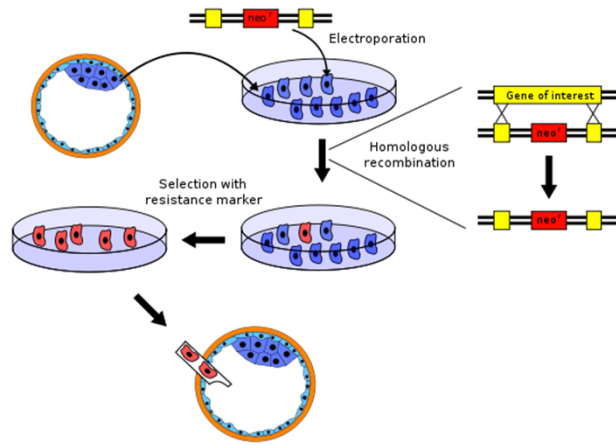
Query: 1983 ttccttaactaatcacataaatga 2006
      |||
Sbjct: 73 ttccttaactaatcacataaatga 96

Sbjct: 494 ccagctttagaagctcttggtaagtttcagtaacgggacagatctcagagaatcaca 213
AMIK JINRII ENRCE view detailed information on insert sequences in AMIK
```


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

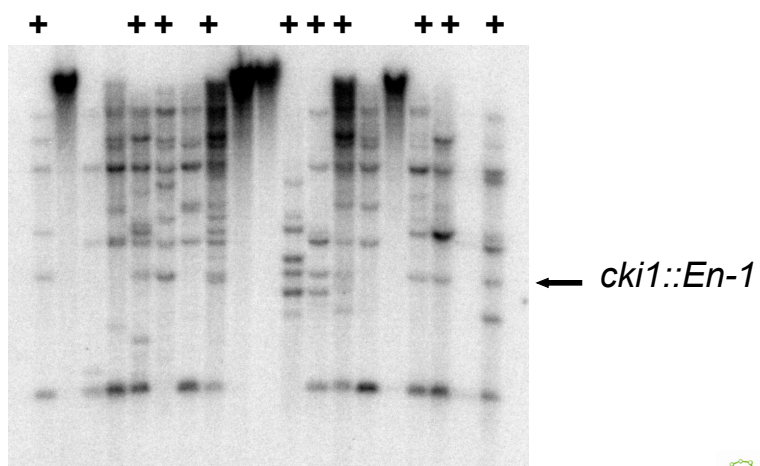
Proč je nutné analyzovat příčinnou souvislost mezi inzercí a pozorovaným fenotypem ?

- 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



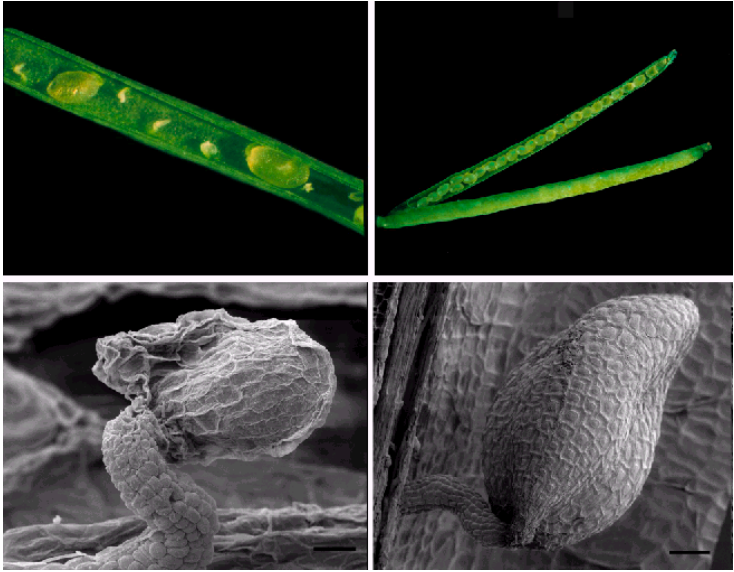
Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

- 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 šišulí *cki1::En-1/CKI1*

cki1::En-1/CKI1

CKI1/CKI1



Potvrzení fenotypu *cki1::En-1/CKI1*

1. Izolace revertantních linií

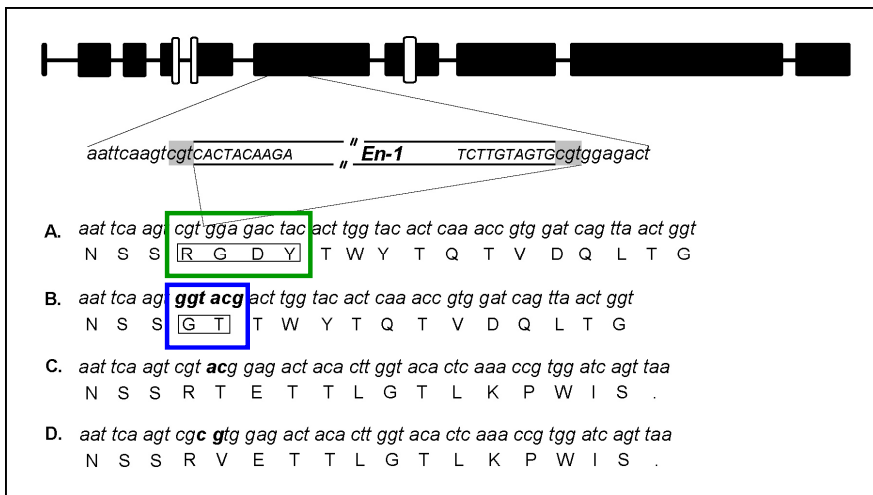
- PCR vyhledávání ve **246** rostlinách segregující populace
- z **90** *cki1::En-1* pozitivních **9** rostlin mělo kromě šešulí mutantních i šešule standardního typu



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

Využití autonomních transpozonů pro izolaci nových stabilních mutací a revertantních linií

aattcaagtcgtCACTACAAGA "En-1" TCTTGTAGTgcgtggagact

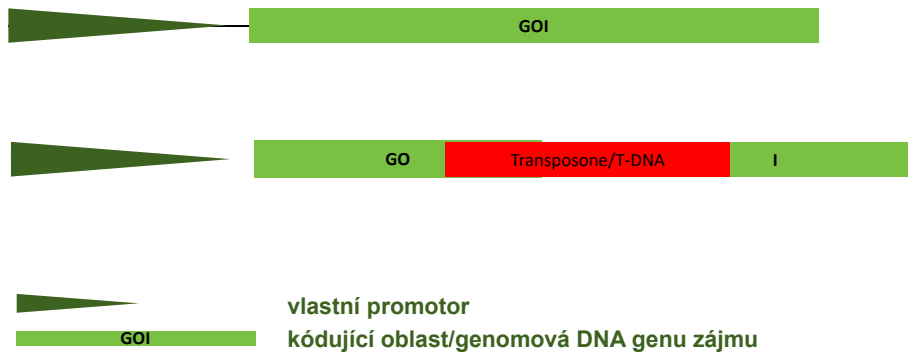
A. *aat tca agt **cg**t **gg**a gac tac act tgg tac act caa acc gtg gat cag tta act ggt*
 N S S **R G D Y** T W Y T Q T V D Q L T G

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

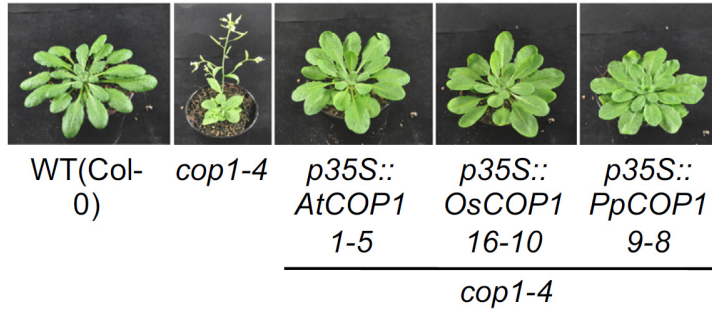
C. *aat tca agt **cg**t **ac**g gag act aca ctt ggt aca ctc aaa ccg tgg atc agt taa*
 N S S **R T** E T T L G T L K P W I S .

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 mutantů pomocí transgenu

Diskuse