

CG920 Genomics

Lesson 4 Forward 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
hejatk@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Outline

- Forward vs. Reverse Genetics
- Use of Libraries of Insertional Mutants in Forward Genetics
 - Searching in Libraries of Insertional Mutants According to:
 - anatomically or morphologically detectable phenotype
 - metabolic profile
 - expression of genes of interest
 - Identification of the Mutated Locus
 - plasmid rescue
 - iPCR
- Use of Libraries of Point Mutants in Forward Genetics
 - Positional Cloning



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Outline

- Forward vs. Reverse Genetics



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

„Classical genetics“ approach

- EMS →
1. IDENTIFICATION OF PHENOTYPE
 2. GENE MAPPING
 3. GENE IDENTIFICATION
- position cloning



(retro)transposons ←

„Reverse genetics“ approach

- T-DNA ←
1. ISOLATION OF SEQUENCE-SPECIFIC MUTANT
 2. IDENTIFICATION OF PHENOTYPE
 3. PROOF OF CAUSAL RELATIONSHIP BETWEEN INSERTION AND PHENOTYPE



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Outline

- Forward vs. Reverse Genetics
- Use of Libraries of Insertional Mutants in Forward Genetics
 - Searching in Libraries of Insertional Mutants According to:
 - anatomically or morphologically detectable phenotype

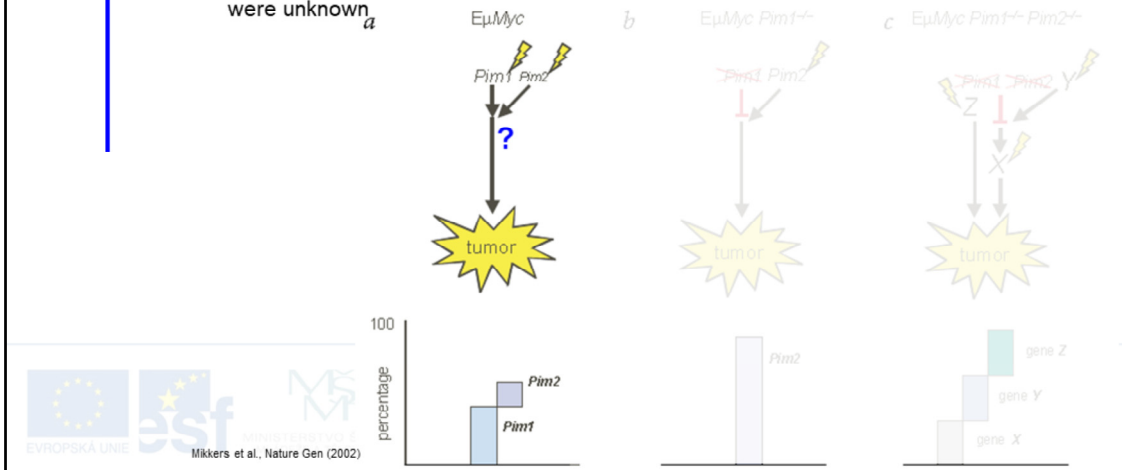


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

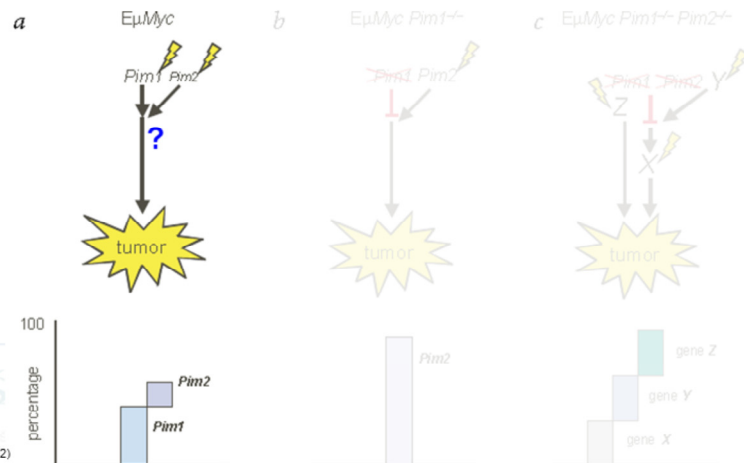
Insertional mutagenesis in forward genetics approaches

- Use of insertional mutagenesis for study of carcinogenesis
 - Infection of EμMyc mice by MoMuLV retrovirus leads to lymphomas formation, which arose due to activation of Pim kinases (40 % activation of Pim1, 15 % activation of Pim2), molecular targets of these kinases were unknown



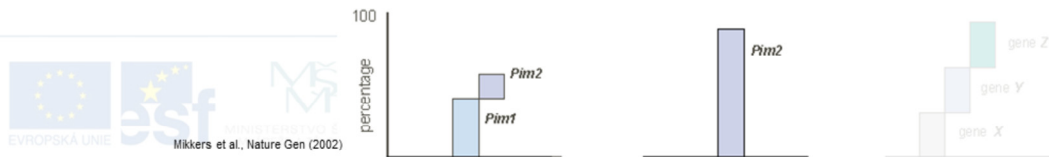
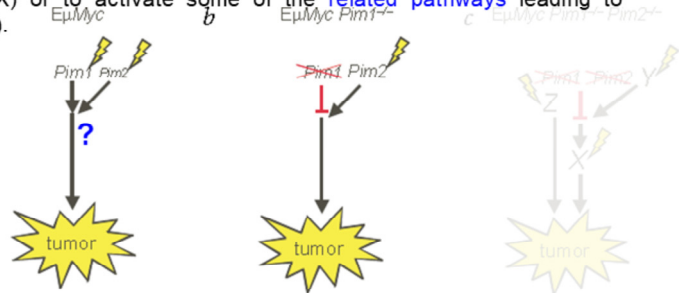
Insertional mutagenesis in forward genetics approaches

- Use of insertional mutagenesis for study of carcinogenesis
 - Infection of EμMyc *pim1* mutants by MoMuLV retrovirus leads to lymphomas formation, which in 90 % contain insertion nearby (activation) *Pim2*



Insertional mutagenesis in forward genetics approaches

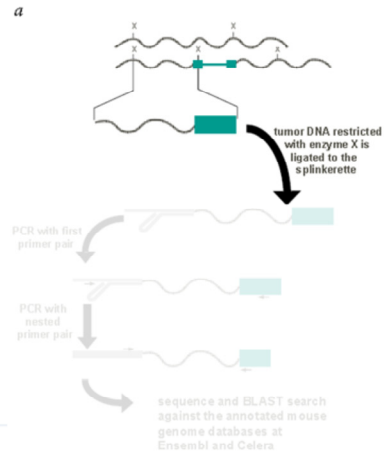
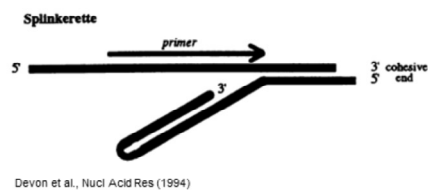
- Use of insertional mutagenesis for study of carcinogenesis
 - Infection of EμMyc double mutants *pim1*, *pim2* by MoMuLV retrovirus leads to lymphomas formation, which can be expected to activate either one of the signalling partner of Pim proteins (Y), one of the downstream proteins of Pim signalling pathway (X) or to activate some of the related pathways leading to lymphomagenesis (Z).



EVROPSKA UNIE
 esf
 MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ
 Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Insertional mutagenesis in forward genetics approaches

- Isolation of genomic regions adjacent to the insertion site of the provirus
 - Cleavage of genomic DNA and ligation of special linkers, so-called *splinkerettes* (increasing the specificity of amplification)

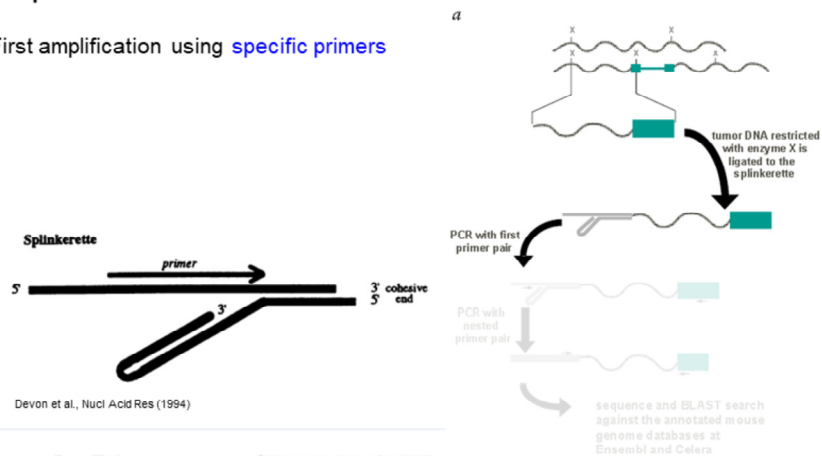


VÁNI

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

Insertional mutagenesis in forward genetics approaches

- Isolation of genomic regions adjacent to the insertion site of the provirus
 - First amplification using specific primers

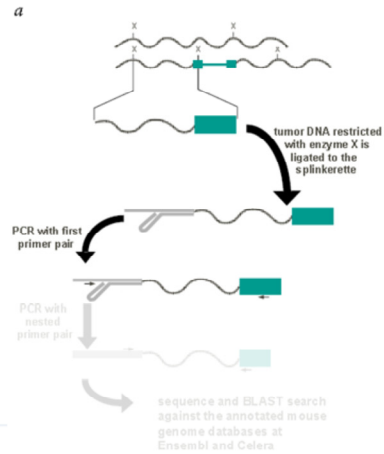
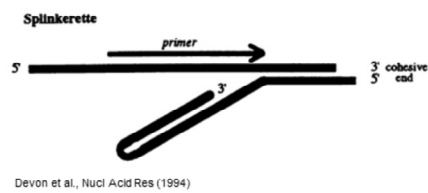


VÁNI

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

Insertional mutagenesis in forward genetics approaches

- Isolation of genomic regions adjacent to the insertion site of the provirus
 - Second amplification using **nested primers** (increasing the specificity)

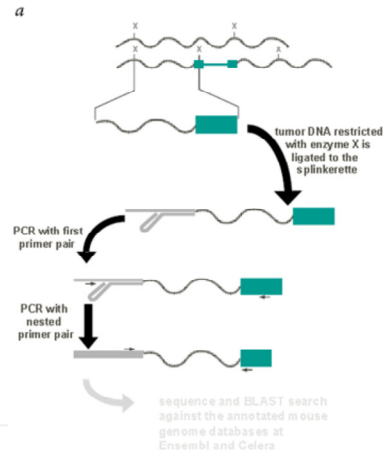
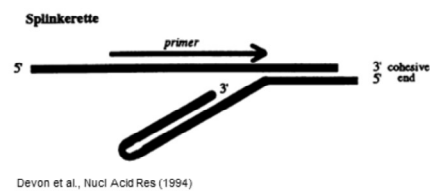


VÁNI

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

Insertional mutagenesis in forward genetics approaches

- Isolation of genomic regions adjacent to the insertion site of the provirus
 - Sequencing and localization of regions adjacent to provirus by searching in annotated databases of mouse genome



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

In case of splinkerette, the primer is of the same sequence as the top strand and therefore it is unable to act as a primer until the complement of this strand has been synthesized (from the insert-specific primer at the right-hand side).

Outline

- Forward vs. Reverse Genetics
- Use of Libraries of Insertional Mutants in Forward Genetics
 - Searching in Libraries of Insertional Mutants According to:
 - anatomically or morphologically detectable phenotype
 - metabolic profile

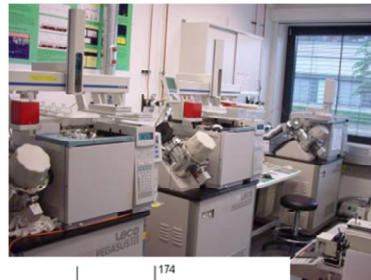


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

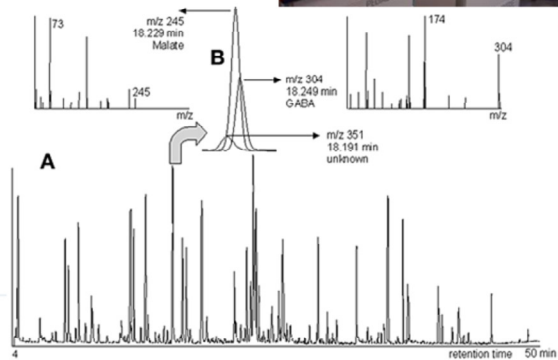
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Metabolic profiling

- Metabolic profiling of plants
 - Automated analysis of metabolites (up to 25.000) by GC-MS techniques in libraries of T-DNA mutants



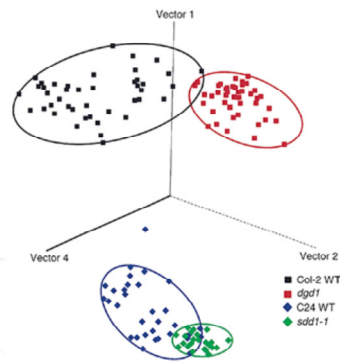
Retention time (min)	m/z	Abundance	Library match
4.123	73	100	73
4.123	245	100	245
18.229	245	100	Maltol
18.229	304	100	304
18.249	304	100	GABA
18.191	351	100	unknown
17.4	174	100	174
30.4	304	100	304



OJE VZDĚLÁVÁNÍ
 tato je spolufinancována
 Evropským sociálním fondem
 a státním rozpočtem České republiky

Metabolic profiling

- Metabolic profiling of plants
 - Automated analysis of metabolites (up to 25.000) by GC-MS techniques in libraries of T-DNA mutants
 - Identification of interesting (even commercially interesting) mutants



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Metabolic profiling

- Metabolic profiling of plants
 - Automated analysis of metabolites (up to 25.000) by GC-MS techniques in libraries of T-DNA mutants
 - Identification of interesting (even commercially interesting) mutants
 - Fast and easy isolation of genes through identification of sequences adjacent to T-DNA

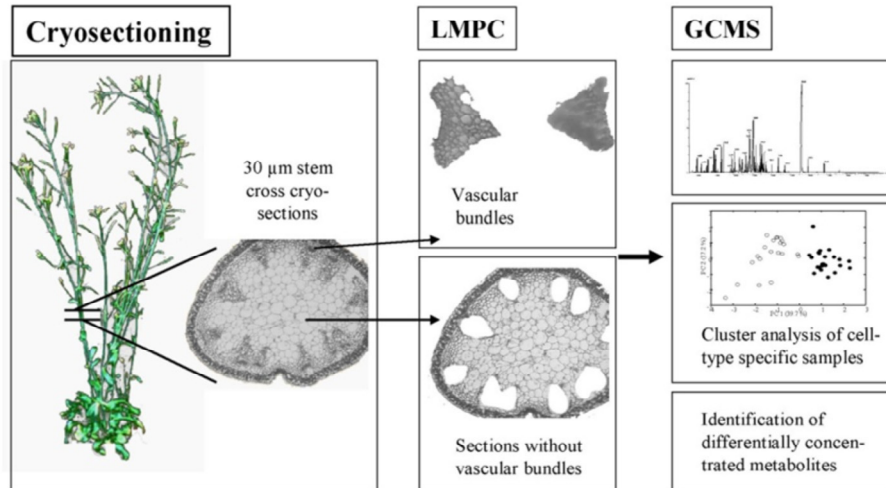


OP ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Metabolic profiling

- Metabolic profiling of plants
 - Possibility to use special techniques, e.g. [microdissection](#)



Outline

- Forward vs. Reverse Genetics
- Use of Libraries of Insertional Mutants in Forward Genetics
 - Searching in Libraries of Insertional Mutants According to:
 - anatomically or morphologically detectable phenotype
 - metabolic profile
 - expression of genes of interest

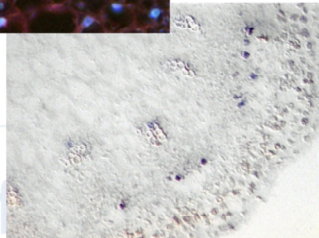
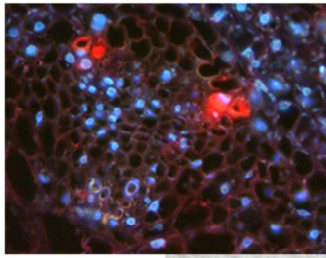


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Expression profile

- Identification of mutants with a **change in the expression profile**
 - Analysis of *expression profile (pattern)* of the gene and identification of **mutants with altered expression pattern**



a státním rozpočtem České republiky

Expression profile

- Identification of mutants with a change in the expression profile
 - Analysis of *expression profile (pattern)* of the gene and identification of *mutants with altered expression pattern*
 - Possibility of *partial automation* (virtual digital microscopy)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

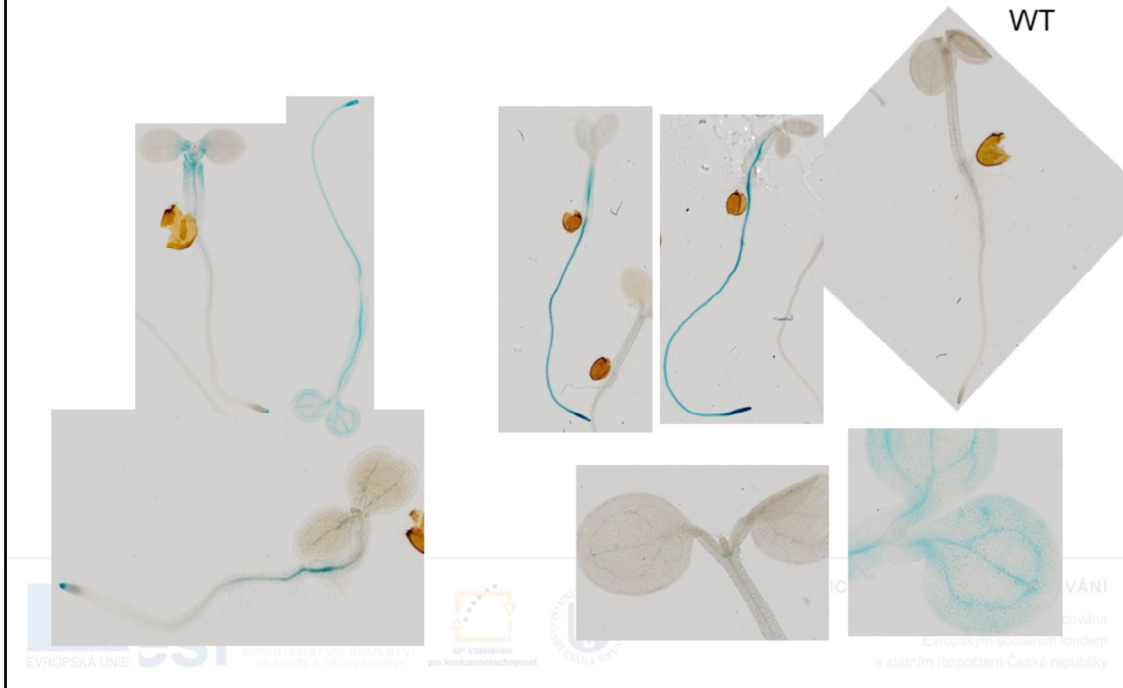
Automated Microscopy Screening



Tady by mohla být reference zpět na CEITEC, jaké skvělé vybavení v něm je a jak dobře se vám s tím pracuje

Pokud tam nezůstane video, ikonu bych dala pryč

Expression profile



Outline

- Forward vs. Reverse Genetics
- Use of Libraries of Insertional Mutants in Forward Genetics
 - Searching in Libraries of Insertional Mutants According to:
 - anatomically or morphologically detectable phenotype
 - metabolic profile
 - expression of genes of interest
 - Identification of the Mutated Locus
 - plasmid rescue
 - iPCR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identification of mutated locus

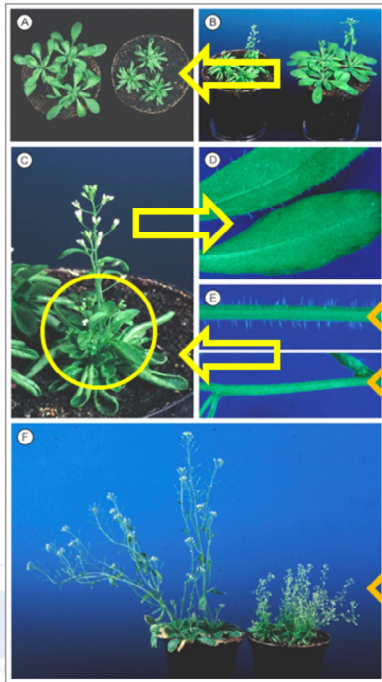
- Identification of chromosomal rearrangements responsible for bushy phenotype of *Arabidopsis*
 - Description of phenotype



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identification of mutant



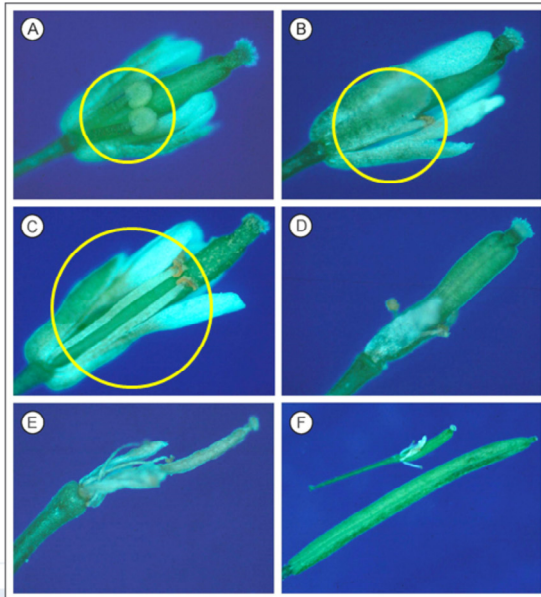
- Crinkled leaves
- Bushy phenotype (branching defective)
- No trichomes on leaves and stems
- Late senescence



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identification of mutant



- Male sterility, defects in stamen filament elongation (A,B)
(compare with wild type C)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identification of mutated locus

- Identification of chromosomal rearrangements responsible for bushy phenotype of *Arabidopsis*
 - Description of phenotype
 - Identification of T-DNA mutated region

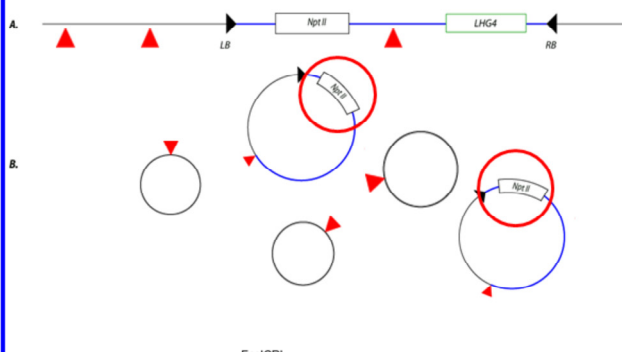


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identification of mutated locus

1. Identification of region of genomic DNA adjacent to the *left border* using *plasmid rescue*

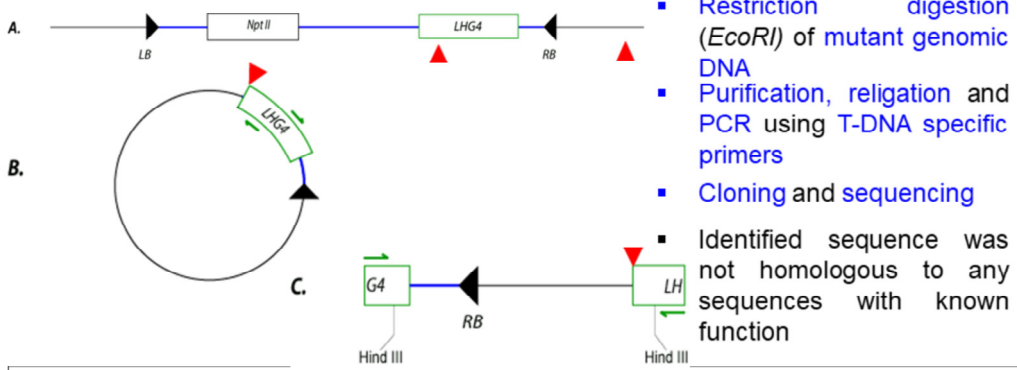


- Restriction digestion (*EcoRI*) of mutant genomic DNA
- Religation and transformation of *E. coli*
- Isolation of plasmid DNA from positively selected clones
- Identified sequence was identical to gene for *NAD7* coded by *mtDNA*



Identification of mutated locus

2. Identification of region of genomic DNA adjacent to the *right border* using *inversion PCR* (iPCR)



Identification of mutated locus

- Identification of chromosomal rearrangements responsible for bushy phenotype of *Arabidopsis*
 - Description of phenotype
 - Identification of T-DNA mutated region
 - Localization of T-DNA insertion site in *Arabidopsis* genome

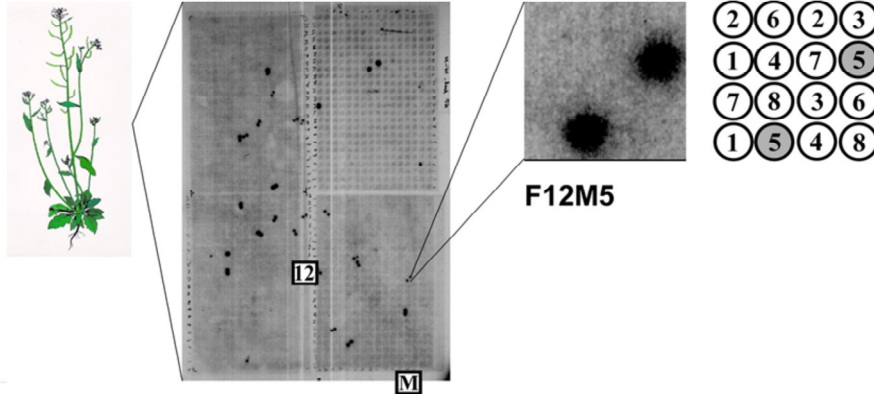


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Searching in library IGF-BAC

- Genome library containing 10.752 clones with an average size of an insert of 100 kb
- Bacterial clones arranged in the microtiter plates
- Library loaded onto nylon filters for hybridization with the radiolabeled probe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Mapping with IGF-BAC database

I. Sequences adjacent to the left border of T-DNA

- 28 positively hybridizing clones in total
- 19 of them located on chromosome 2
- 18 of them similar with mtDNA

II. Sequences adjacent to the right border of T-DNA

- 6 positively hybridizing clones in total
- all of them located on chromosome 2

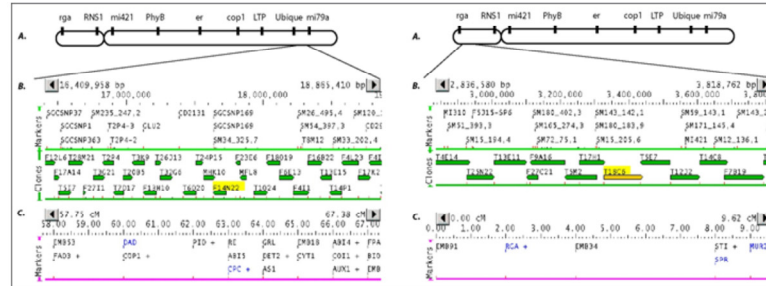


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

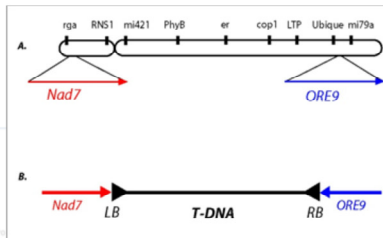
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Localization of genomic T-DNA adjacent to both left and right T-DNA borders on chromosome 2

Sequences adjacent to *right* and *left* border of T-DNA



- There was probably an inversion of almost entire chromosome 2



CE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Outline

- Forward vs. Reverse Genetics
- Use of Libraries of Insertional Mutants in Forward Genetics
 - Searching in Libraries of Insertional Mutants According to:
 - anatomically or morphologically detectable phenotype
 - metabolic profile
 - expression of genes of interest
 - Identification of the Mutated Locus
 - plasmid rescue
 - iPCR
- Use of Libraries of Point Mutants in Forward Genetics
 - Positional Cloning



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identification of mutated locus

■ Positional cloning

- Principle: **co-segregation analysis** of **segregating population** (mostly of offspring of backcrosses) with **molecular markers**
- **SSLP** (Simple Sequence Length Polymorphism)
 - Polymorphism of genome (PCR products) length, amplified using specific primers
- **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - Detection by Southern blot (PCR after digestion of the genomic DNA and ligation of adapters)
- **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
 - Restriction fragment length polymorphism, genome segments amplified by PCR
- **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
 - Polymorphism of length of randomly amplified genome segments, using short 8-10bp primers

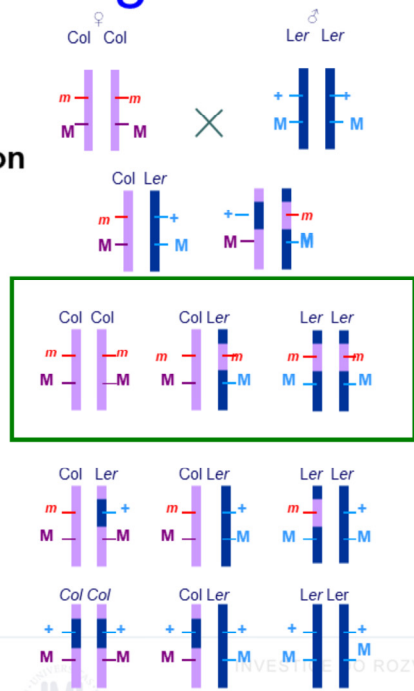


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Positional cloning

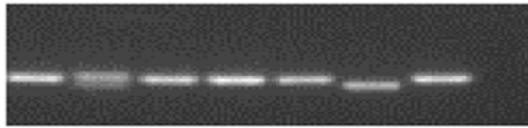
Preparation of mapping population



Recombinant analysis – determining the percentage of recombination between mutation and molecular marker

$$r [\%] = \frac{\text{number of chromosomes of Col}}{\text{number of all the chromosomes}} \times 100$$

F2 mutants



marker I – linked

5 mutants

$$1/10 \times 100 = 10\%$$

F2 mutants



marker II - no linkage

6 mutants

$$7/12 \times 100 = 58\%$$

- Analysis of approximately 2000 mutant plants
- Determining the closest (still segregating) marker
- Identification of mutation by sequencing

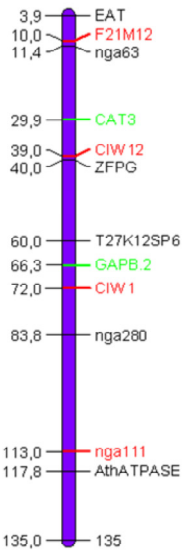


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

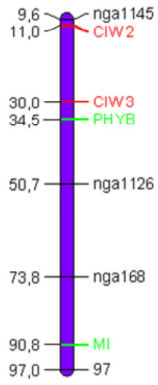
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Map of DNA molecular markers

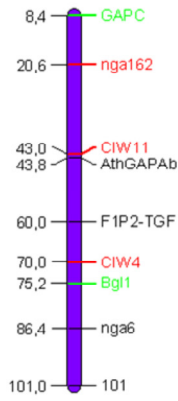
1CH



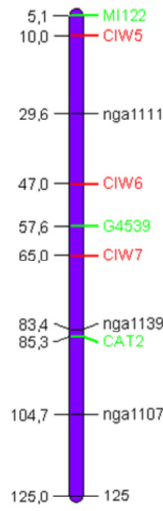
2CH



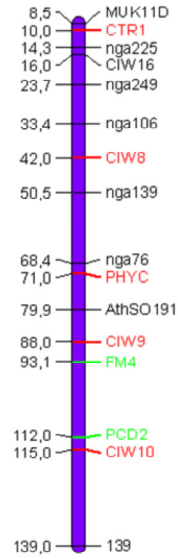
3CH



4CH



5CH



EVROPSKA UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



MŠMT

z státním rozpočtem České republiky

Markers for fine mapping

- AGI Map
- Lister & Dean RI
- Classical
- mi-RFLP
- Goodman
- GoodmanBAC
- TIGR
- Finkelstein
- Altman

Maps for Chromosome 2

for all Maps: [Search Options](#)

Selected Maps

Display All Rows



- [MapViewer Home](#)
- [Release Note](#)
- [View Print-Version](#)

AGI Map

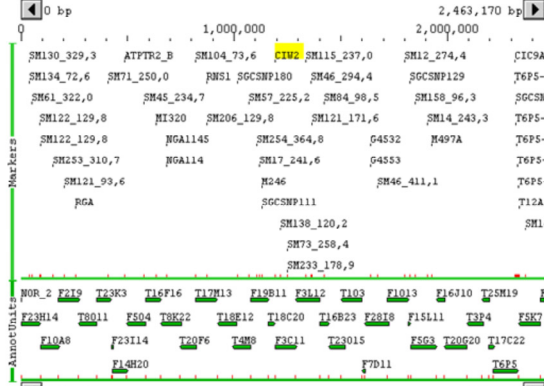
Zoom to:

Zoom up to 200x to see genes!

Search by name (e.g. UFO)

Select range (e.g. 1500-2000)

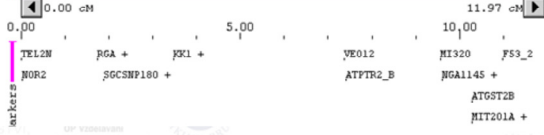
[AGI Map color key](#)



Lister & Dean RI

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)



IE VZDĚLÁVÁNÍ
je spolufinancována
čím sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Summary

- Forward vs. Reverse Genetics
- Use of Libraries of Insertional Mutants in Forward Genetics
 - Searching in Libraries of Insertional Mutants According to:
 - anatomically or morphologically detectable phenotype
 - metabolic profile
 - expression of genes of interest
 - Identification of the Mutated Locus
 - plasmid rescue
 - iPCR
- Use of Libraries of Point Mutants in Forward Genetics
 - Positional Cloning



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Discussion



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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