
Μεθοδολογία της Μοριακής Γενετικής Φυτών



ΑΜΒΦ - Κ. Χαρολαμπίδης



Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής



Systems Biology vs.

Candidate Gene Approach



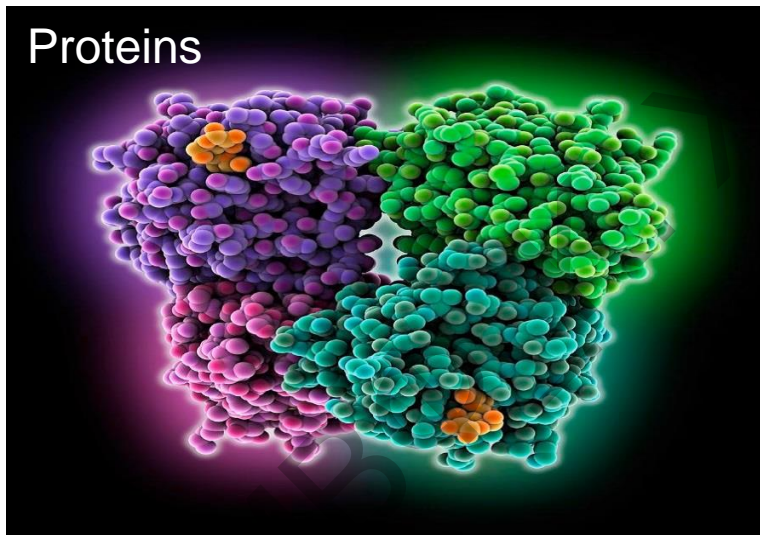
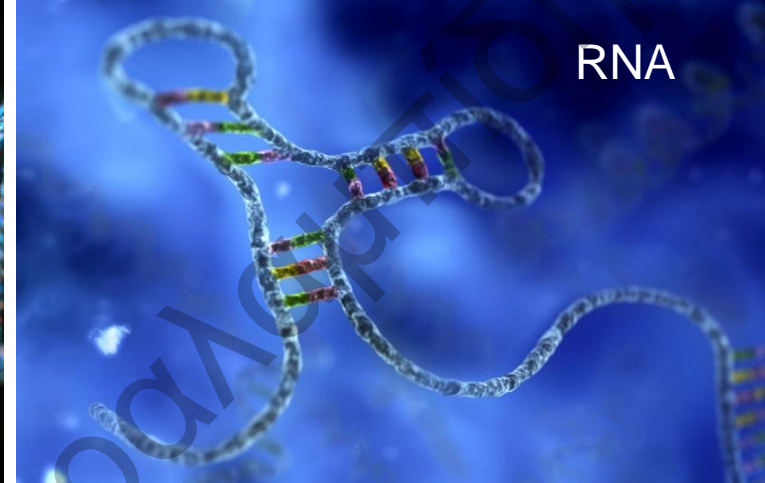
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Κοσμάς Χαραλαμπίδης, Τμήμα Βιολογίας

Biological systems are complex...



What is complex about biological systems?



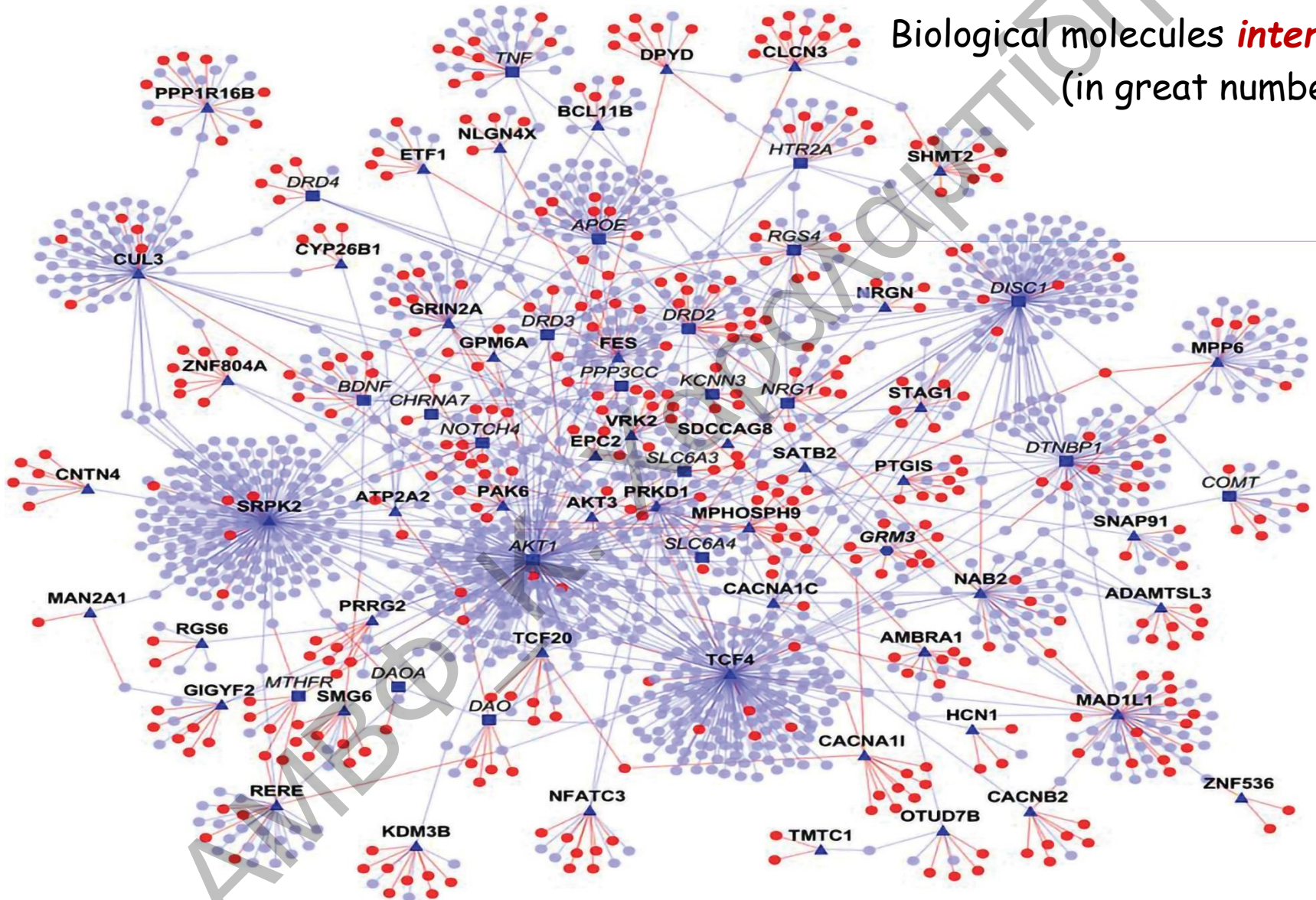
Most of biology is driven by these molecules.

What difficulties do we face thinking about their function?

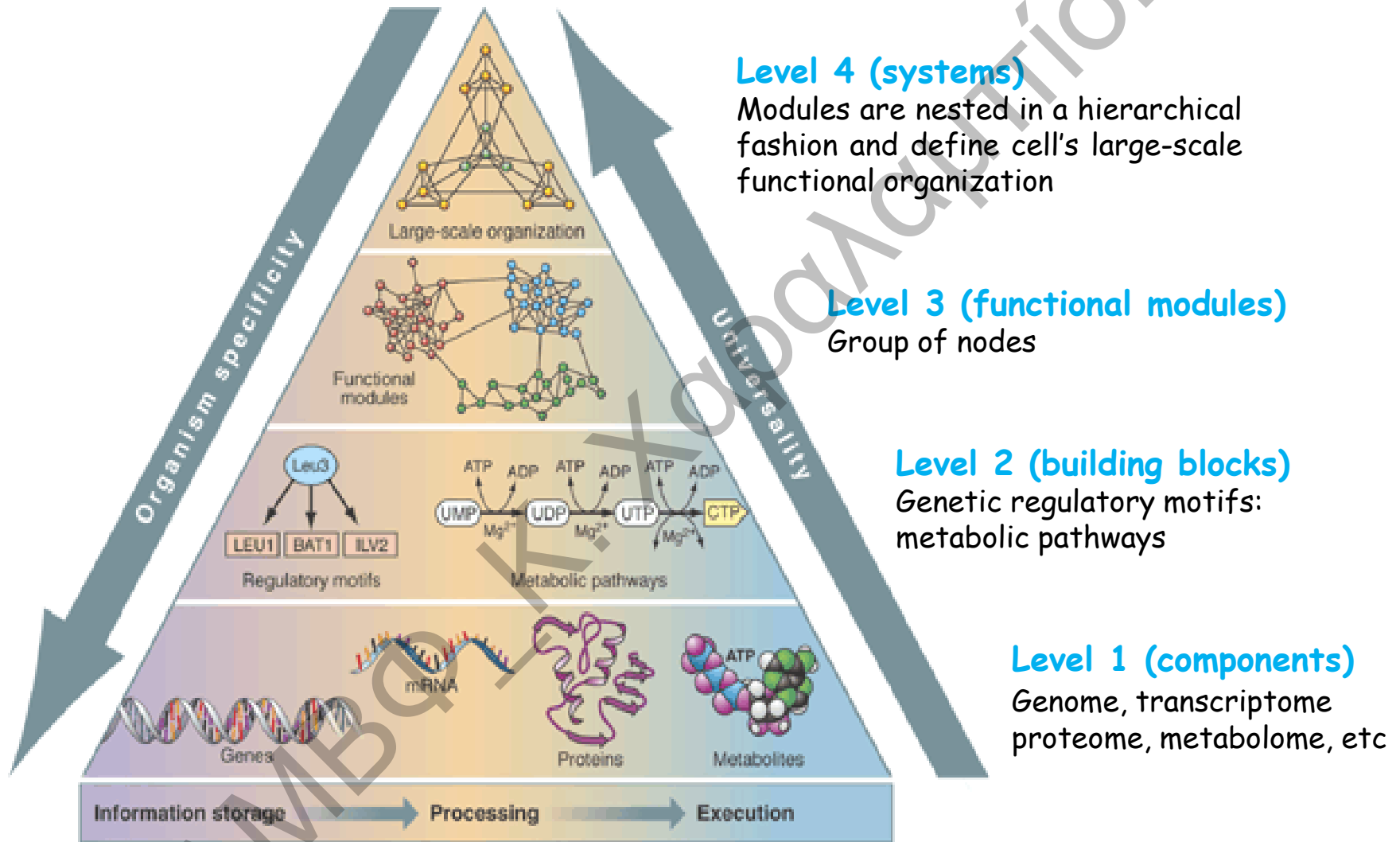


What is complex about biological systems?

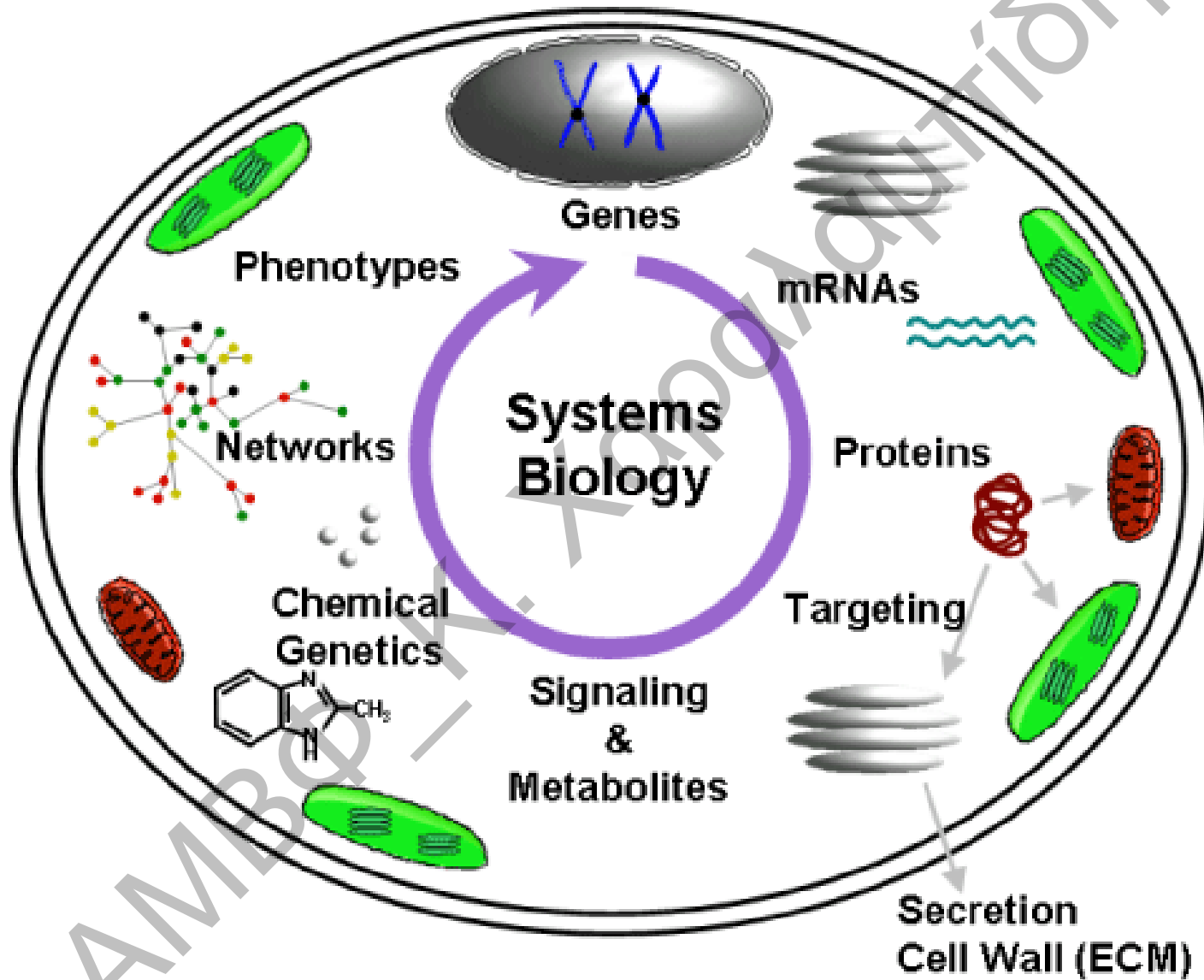
Biological molecules *interact*
(in great numbers)



Life's Complexity Pyramid



Ένας κύκλος χωρίς αρχή, μέση και τέλος...



What is Systems Biology?

The understanding of biology at the system level, *by examining the structure and dynamics of cellular and organismal function, rather than the characteristics of isolated parts* of a cell or organism.



What is Systems Biology?

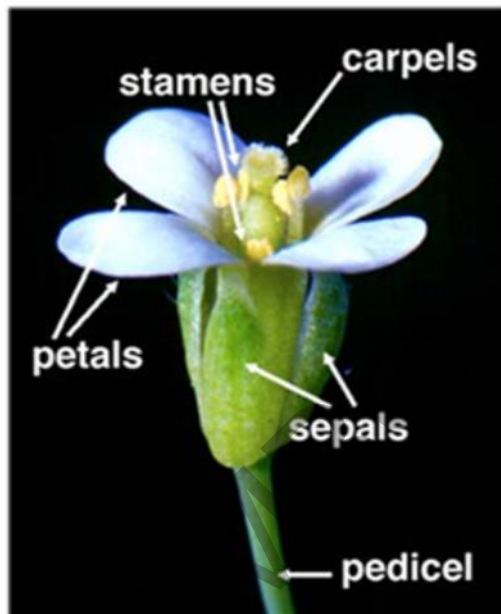
Systems biology seeks to explain biological phenomenon not on a gene by gene basis, but through the interaction of all the cellular and biochemical components in a cell or an organism.



Systems Biology is all about what the system does (cell/organism/ecosystem)



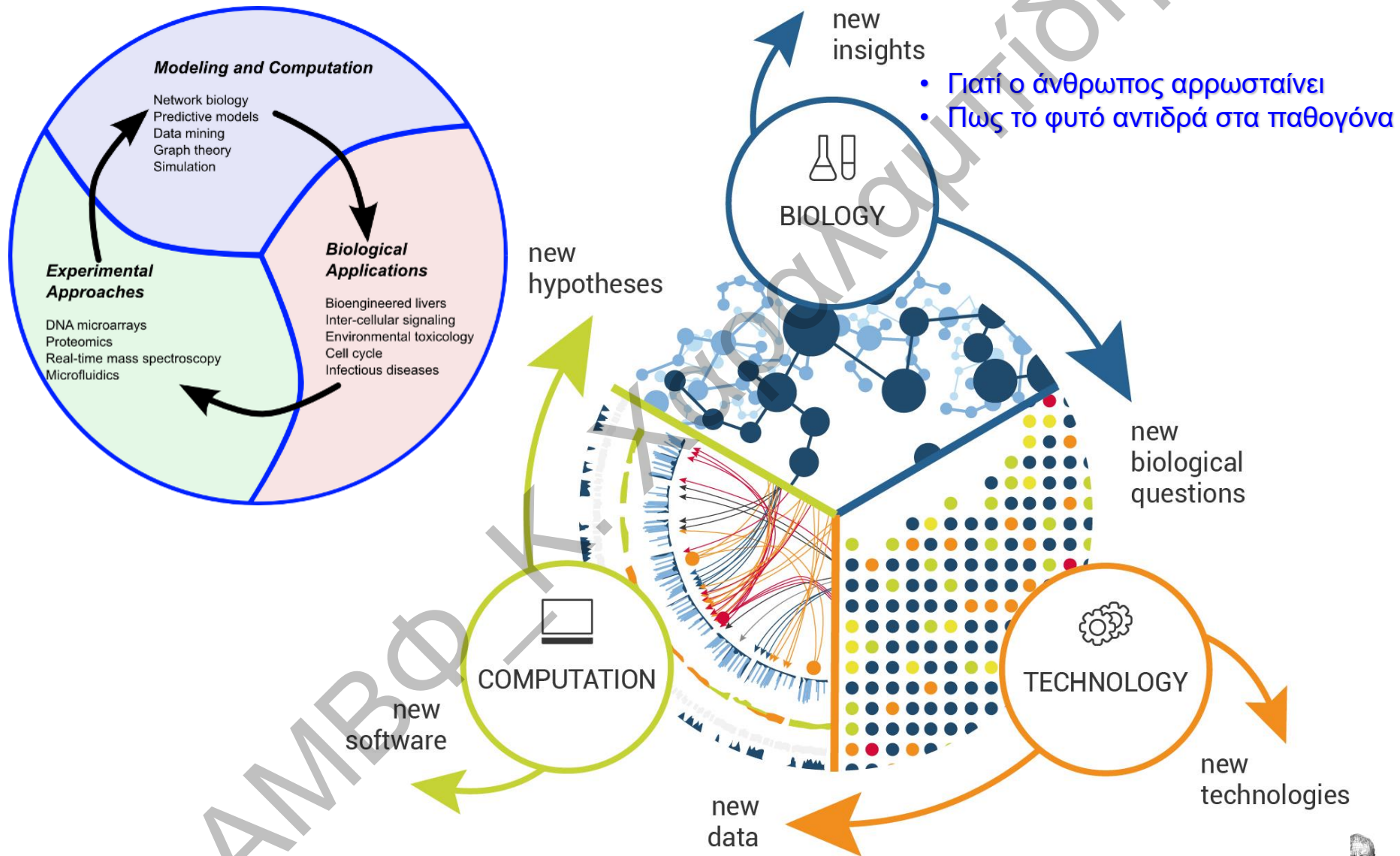
Why this fly has two pairs of wings instead of one



Why this plant has abnormal flowers

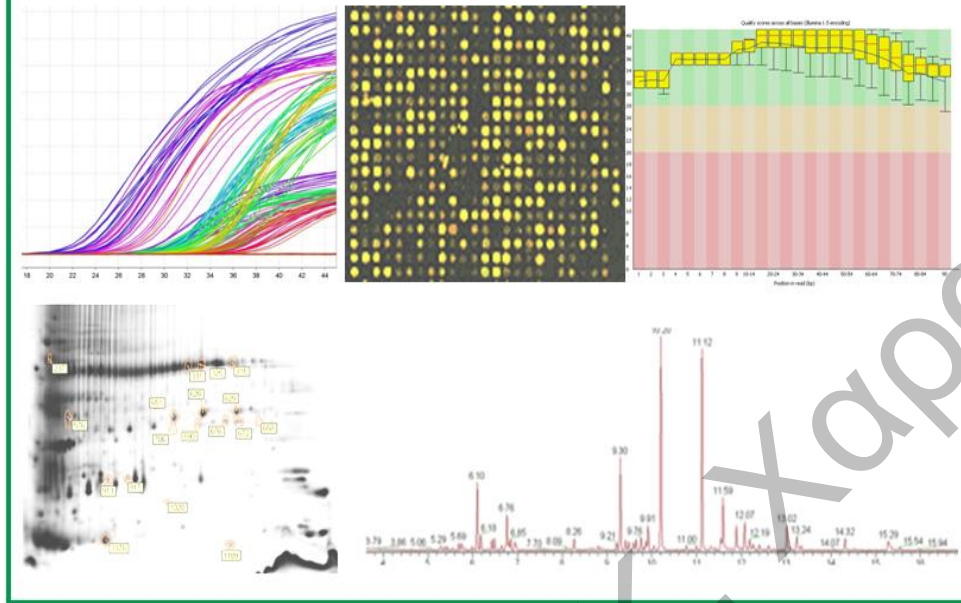


Systems Biology is all about what the system does (cell/organism/ecosystem)

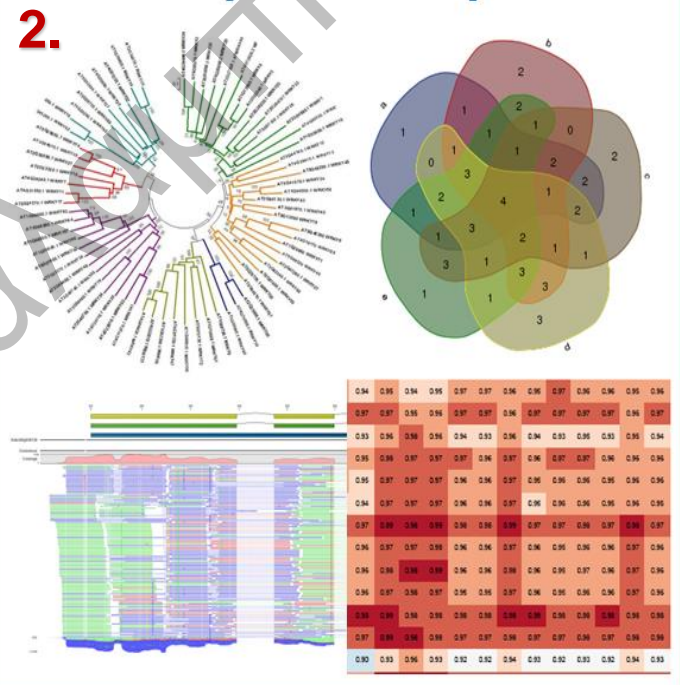


Systems Biology Approach

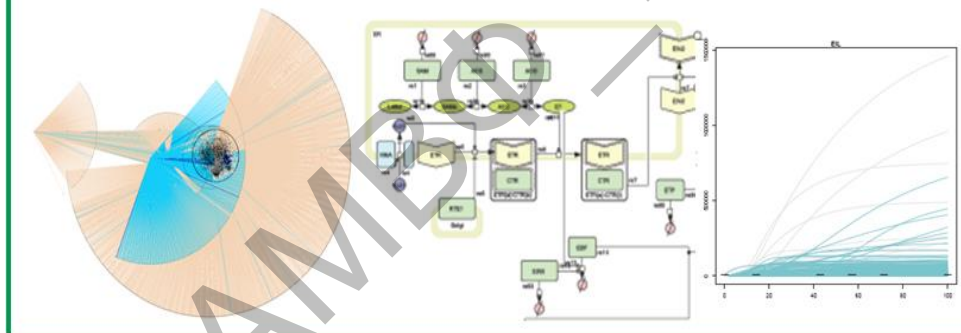
1. Data Acquisition



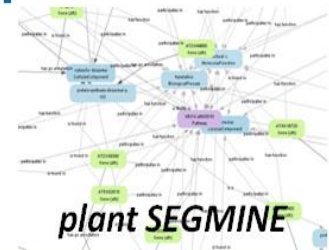
Data Analysis & Interpretation



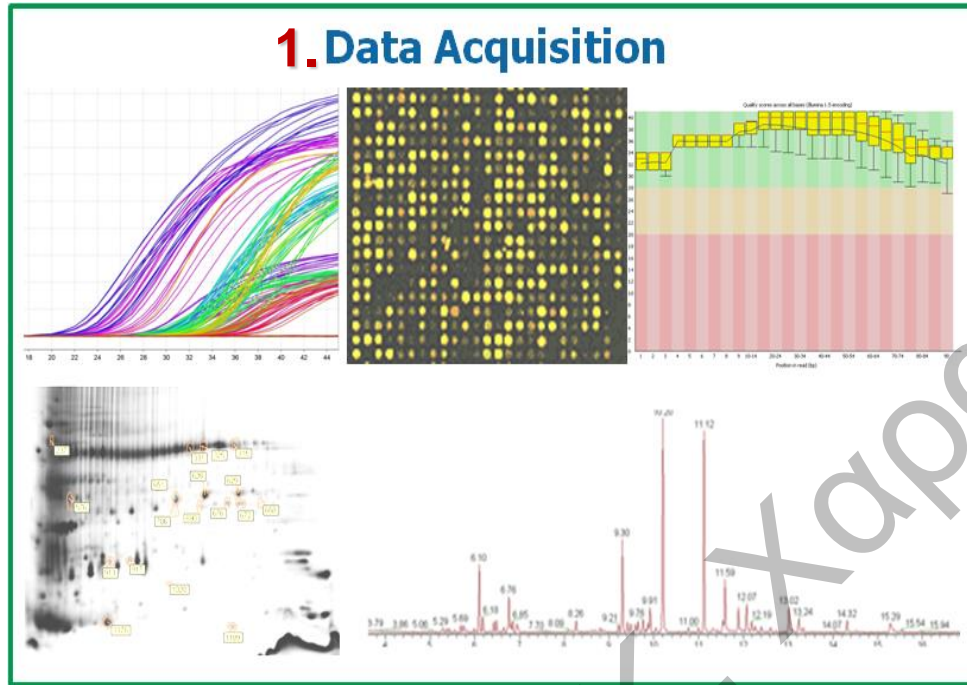
4. Modelling



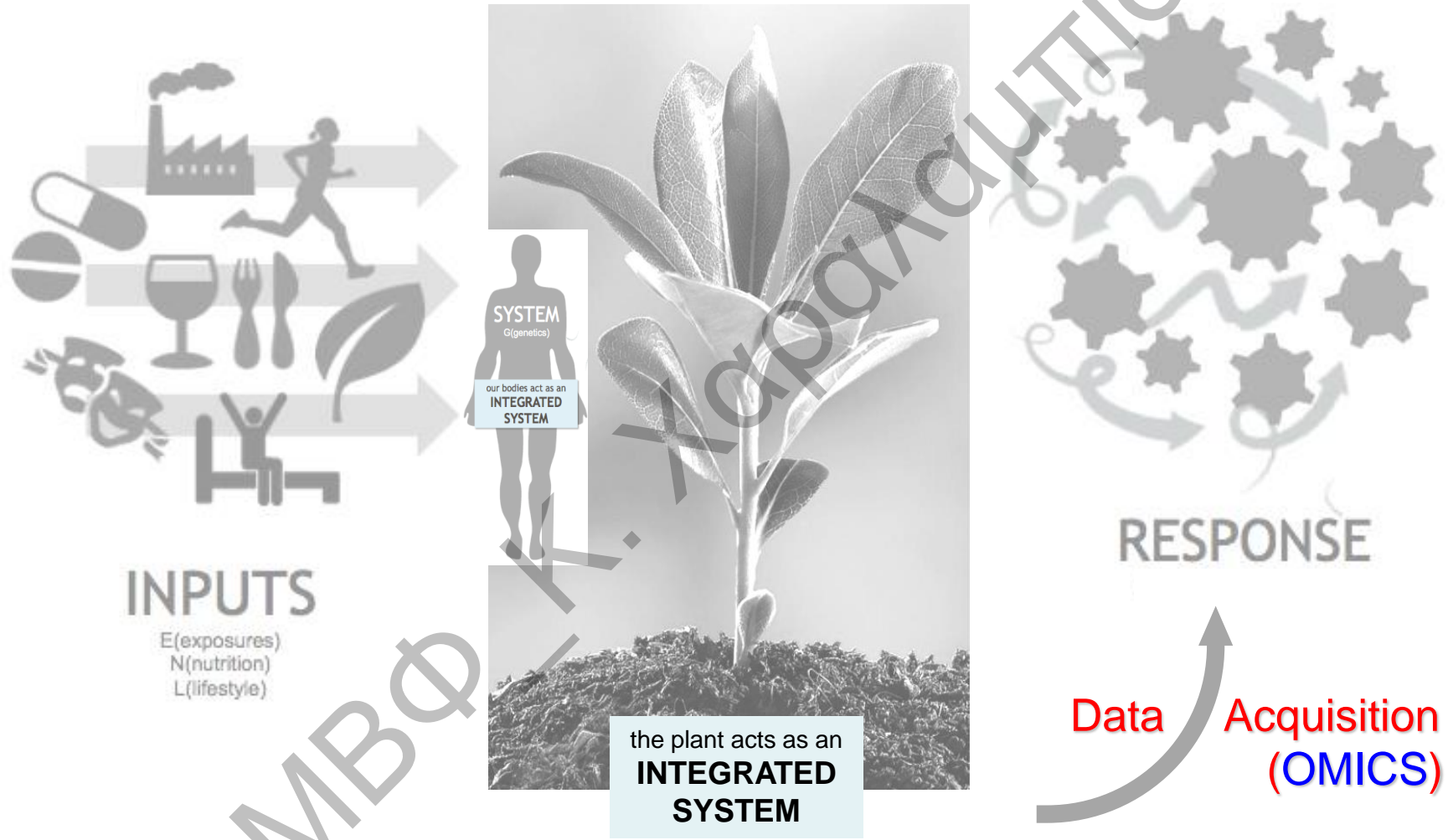
3. Data Interpretation Tools



Systems Biology Approach

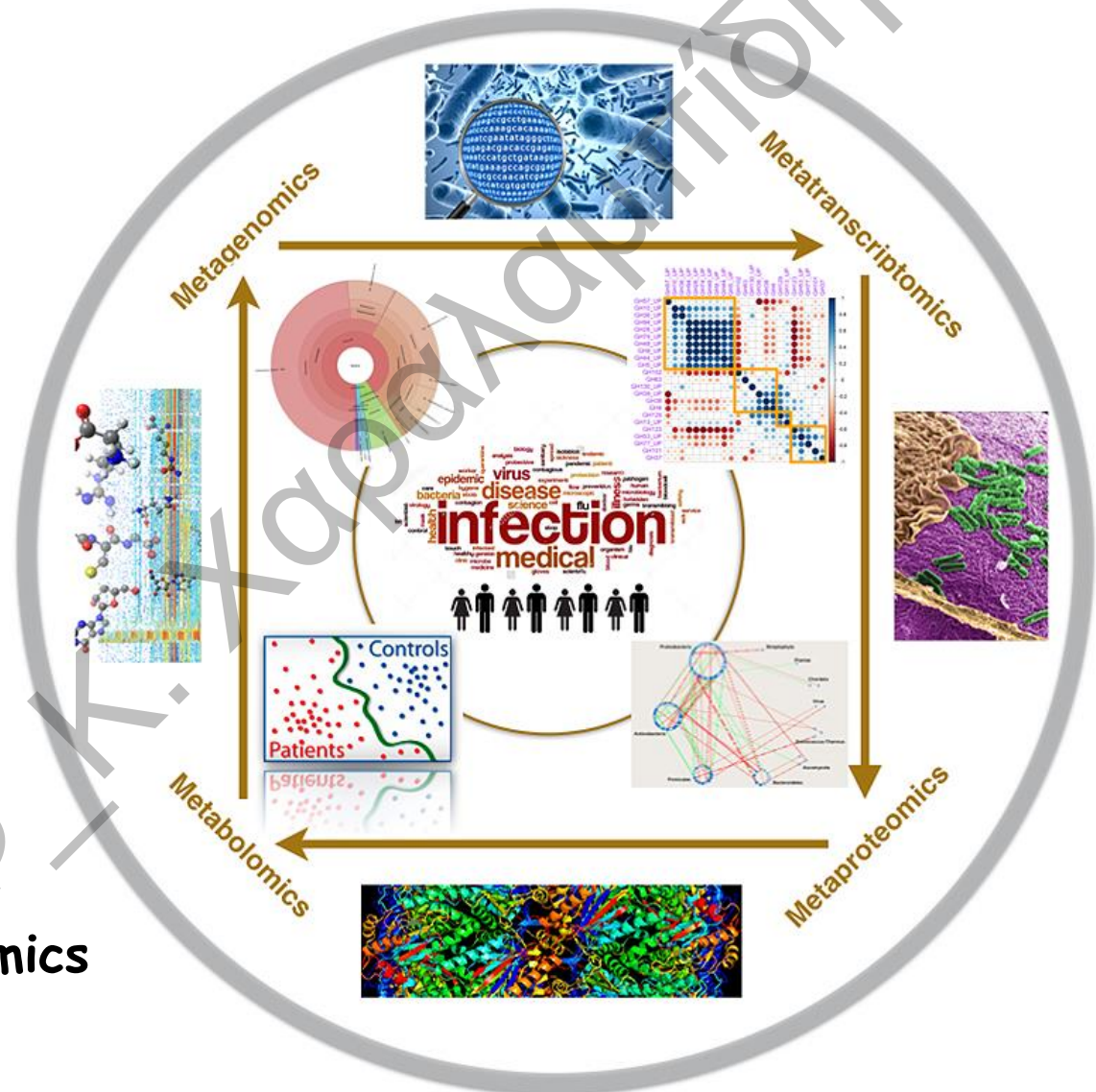


Systems Biology in plants



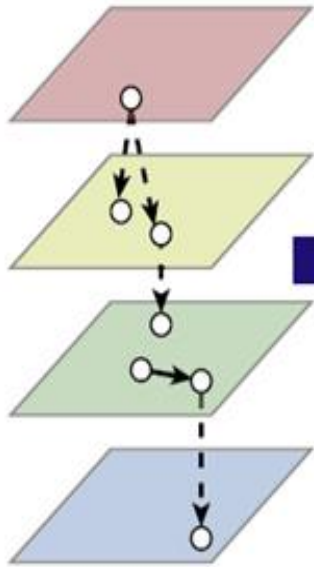
Systems Biology Approach (1. Data Acquisition)

- Genomics
- Transcriptomics
- Epigenomics
- Proteomics
- Lipidomics
- Glycomics
- Metabolomics
- Nutrigenomics
- Pharmacogenomics
- Pharmacomicrobiomics

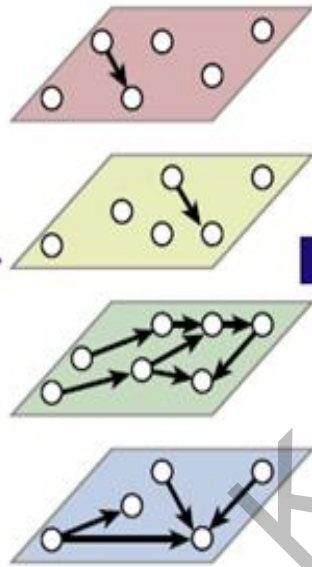


Systems Biology Approach (1. Data Acquisition - combined)

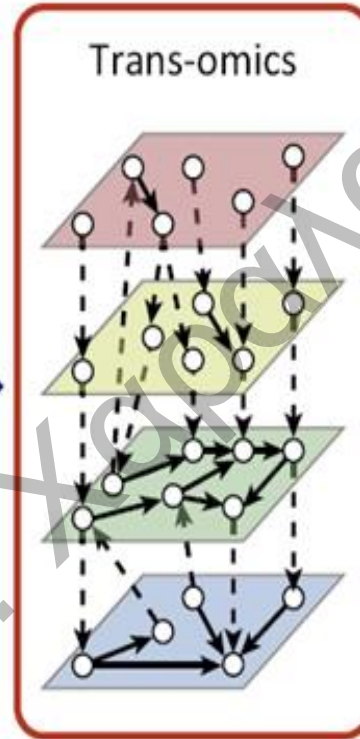
Conventional molecular biology



Single omics



Trans-omics



Genome



Measurement

NGS

Transcriptome



RNA-seq (NGS)

Microarray

Proteome



Mass spectrometry

Metabolome



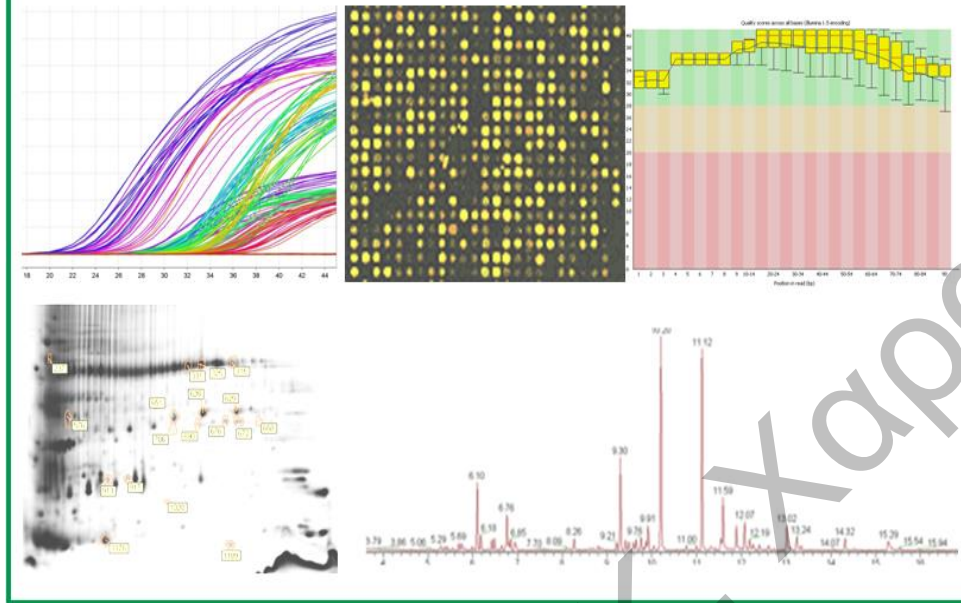
Mass spectrometry

NMR

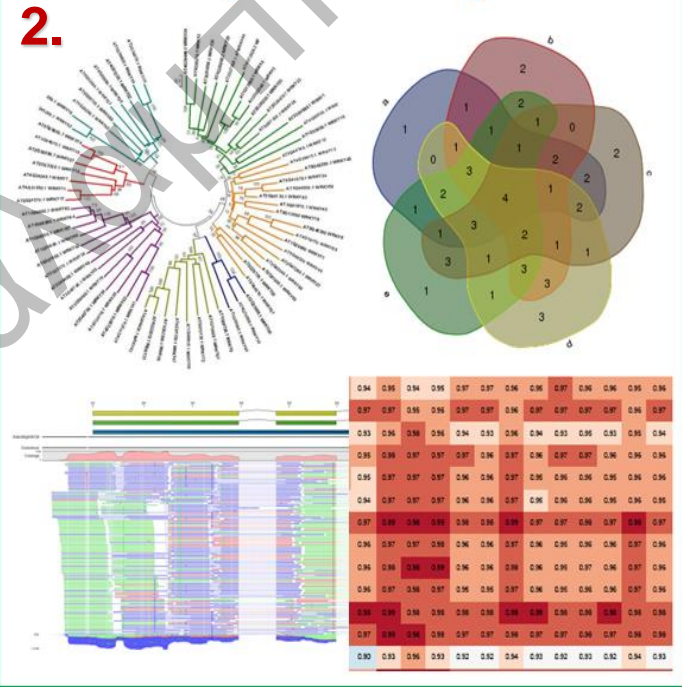


Systems Biology Approach

1. Data Acquisition



2. Data Analysis & Interpretation



AMBΦ - K. Χαρακτηριστικά



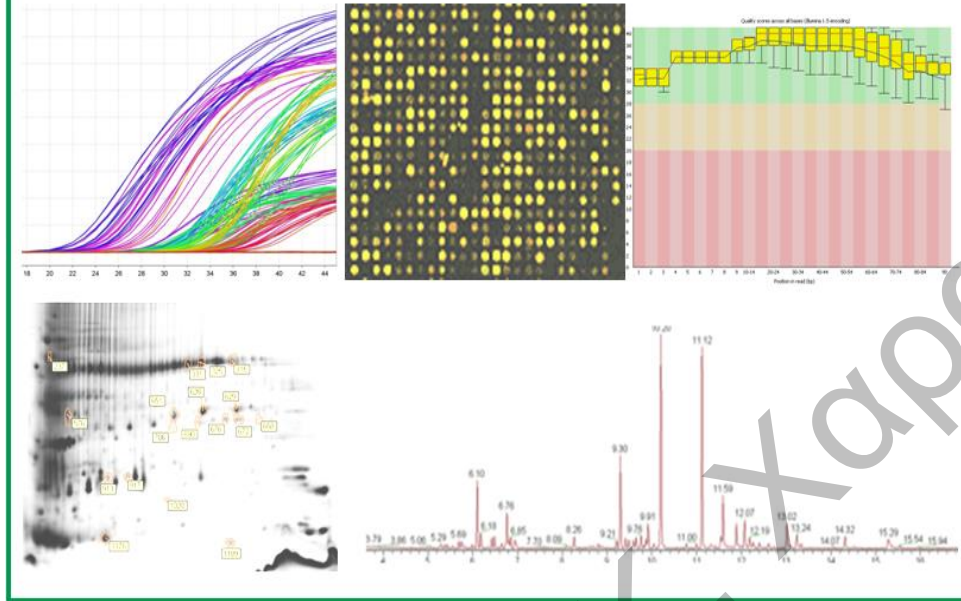
Systems Biology Approach (2. Data Analysis)

Thanks to Systems Biology, we now have a clear picture of complex diseases!

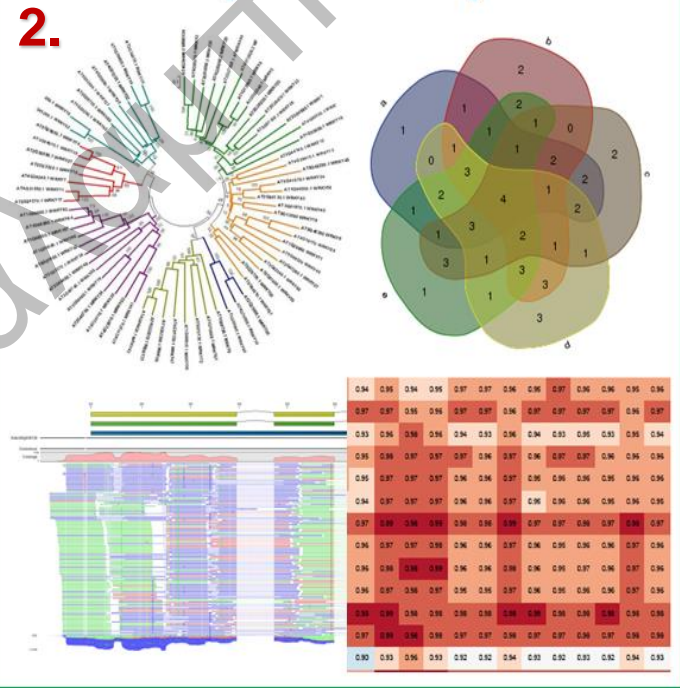


Systems Biology Approach

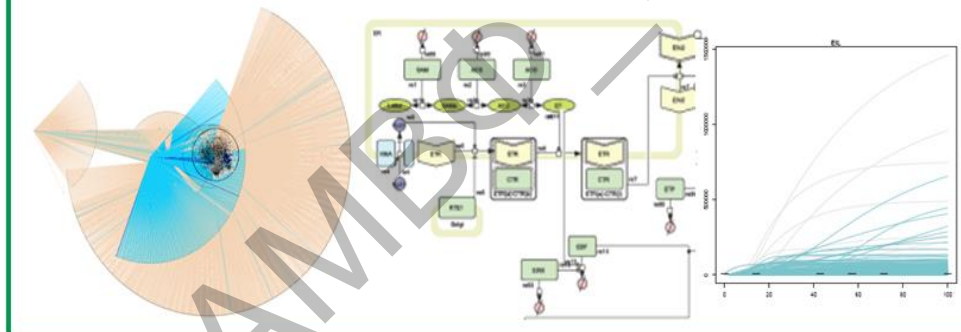
1. Data Acquisition



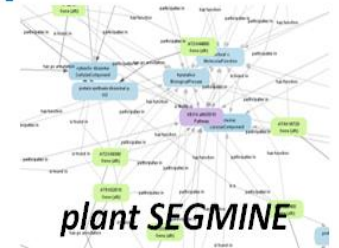
Data Analysis & Interpretation



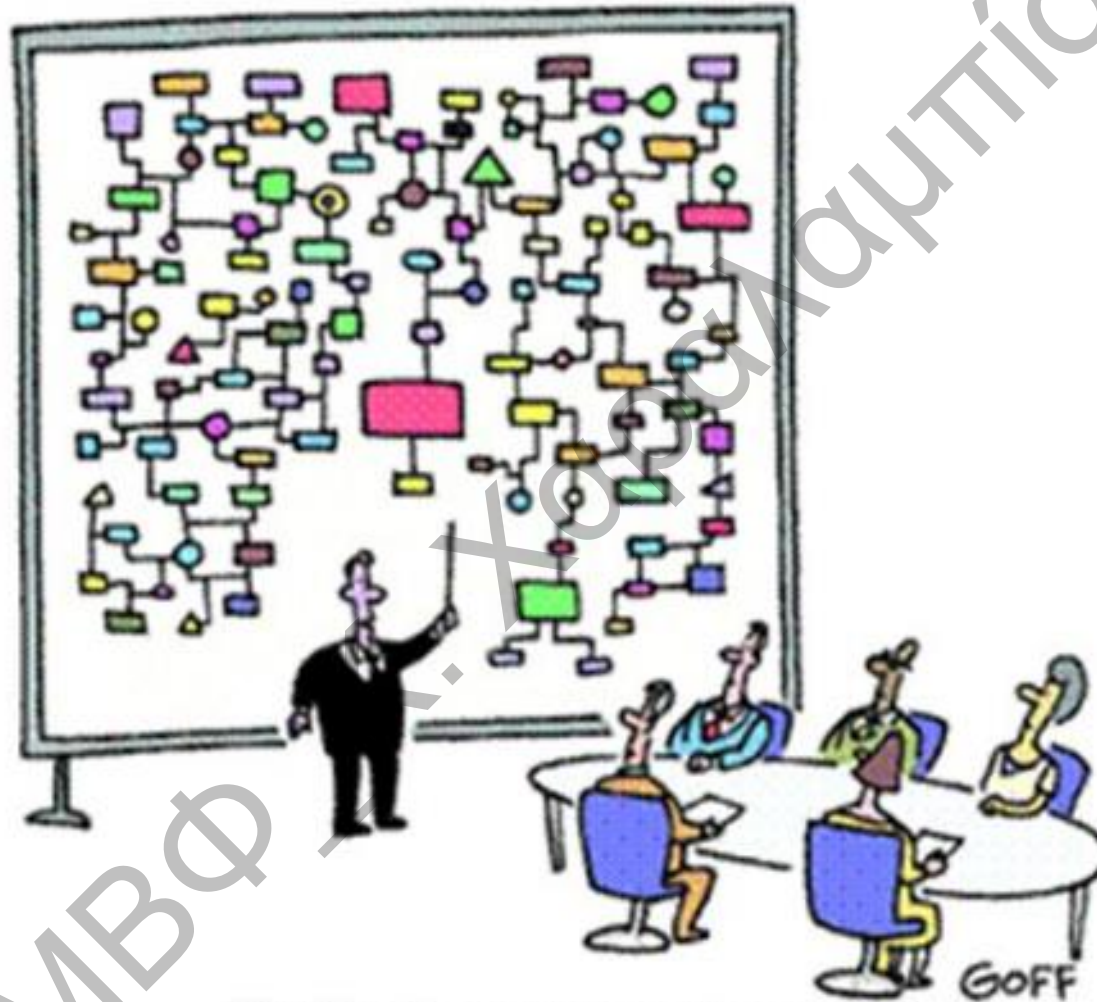
4. Modelling



3. Data Interpretation Tools



Systems Biology Approach (3. Data Interpretation Tools)



“And that’s why we need a computer”



Database resources for System Biology

Microarray gene expression database

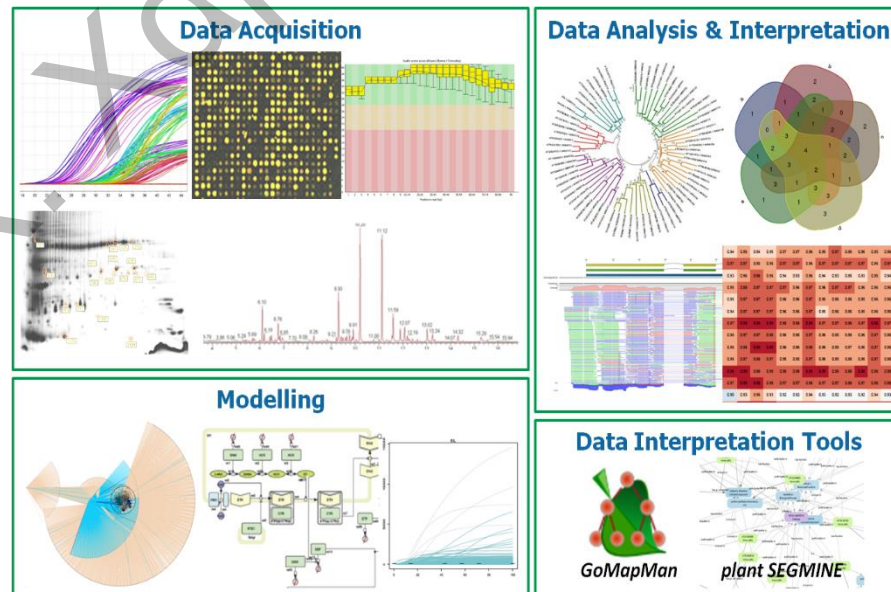
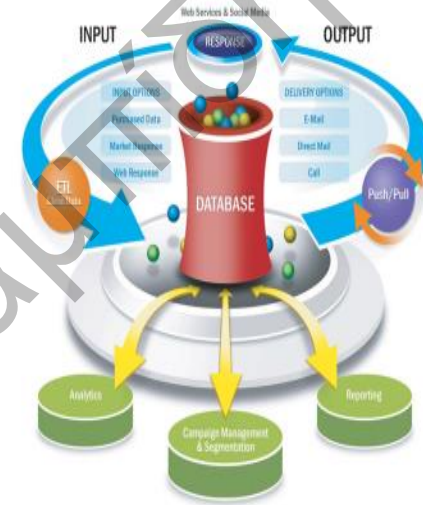
- ArrayExpress
- GEO
- CIBEX

Protein-protein interaction database

- BINDplus
- DIP
- MINT
- STRING

Pathway database

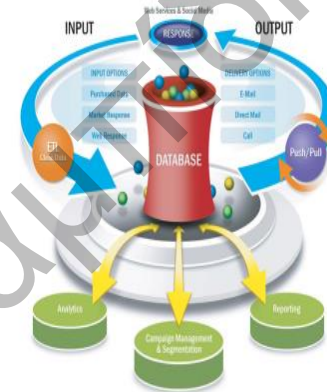
- KEGG
- REACTOME
- MetaCyc
- EcoCyc



Database resources for System Biology

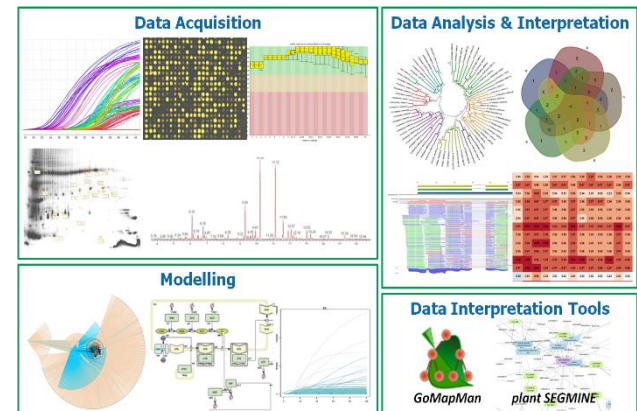
Network Visualization Tools

- Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>)
- BioTapestry (<http://www.biotapestry.org>)
- BioUML (<http://www.biouml.org>)
- CADLIVE (<http://www.cadlive.jp>)
- Edinburgh Pathway Editor (<http://www.bioinformatics.ed.ac.uk>)



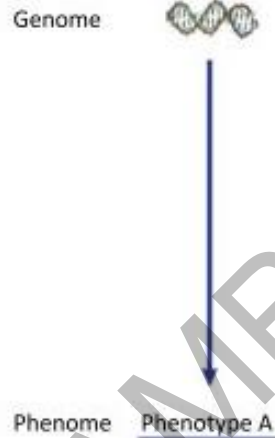
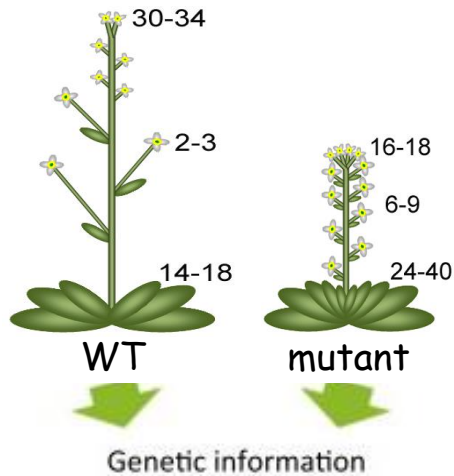
Modeling & Simulation tools

- CellDesigner (<http://www.celldesigner.org>)
- Jarnac/JDesigner (<http://sbw.kgi.edu>)
- COPASI (<http://www.copasi.org>)
- E-Cell (<http://www.e-cell.org>)

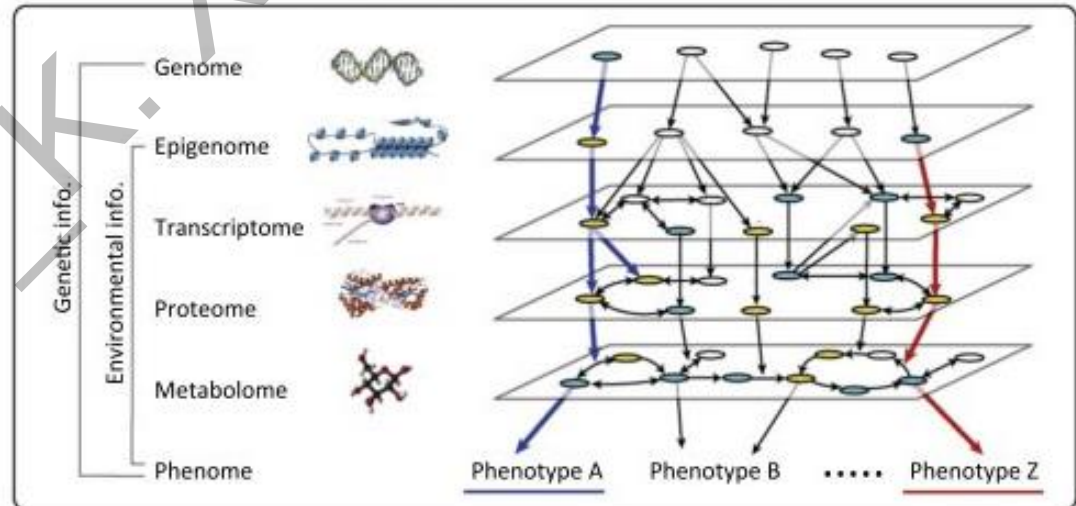
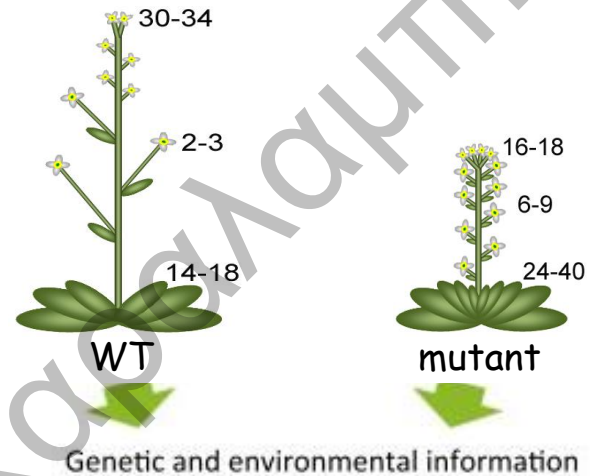


Systems Biology in pleiotropic phenotypes

"past" approach

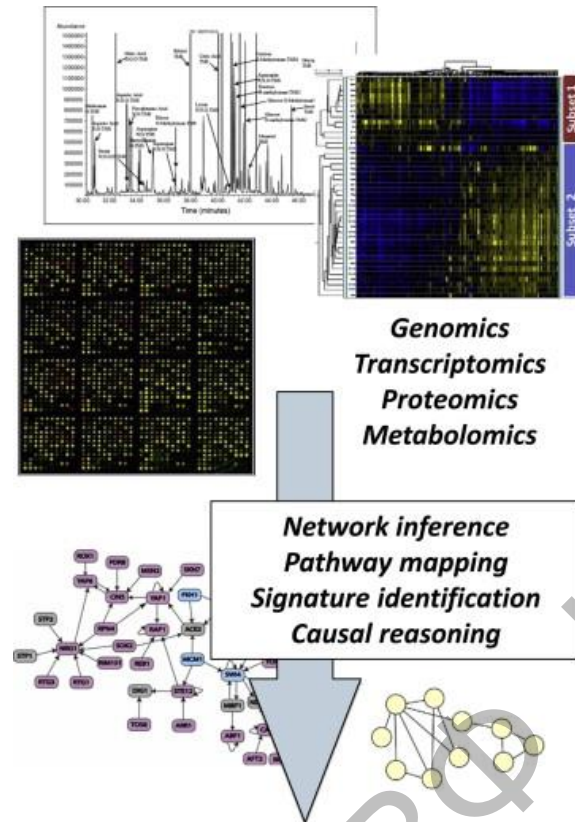


"future" approach



Systems Biology is all about what the system does (cell/organism/ecosystem)

It inspects the status or how the system reacts to a certain condition



*Understand disease, phenotype, behavior
Identify possible means for manipulation*

Systems biology not only looks into these data sets at the individual gene level to identify, for example, genes that are up or down-regulated under a certain condition, but tries to have a **holistic view** of this data **to understand the mechanism(s)** of e.g. a specific disease, disease symptoms, a certain plant or animal phenotype, or a cell/organism/ecosystem behavior.

However, the aim is again to pinpoint **particular genes** in order to engineer strategies for effective interference.



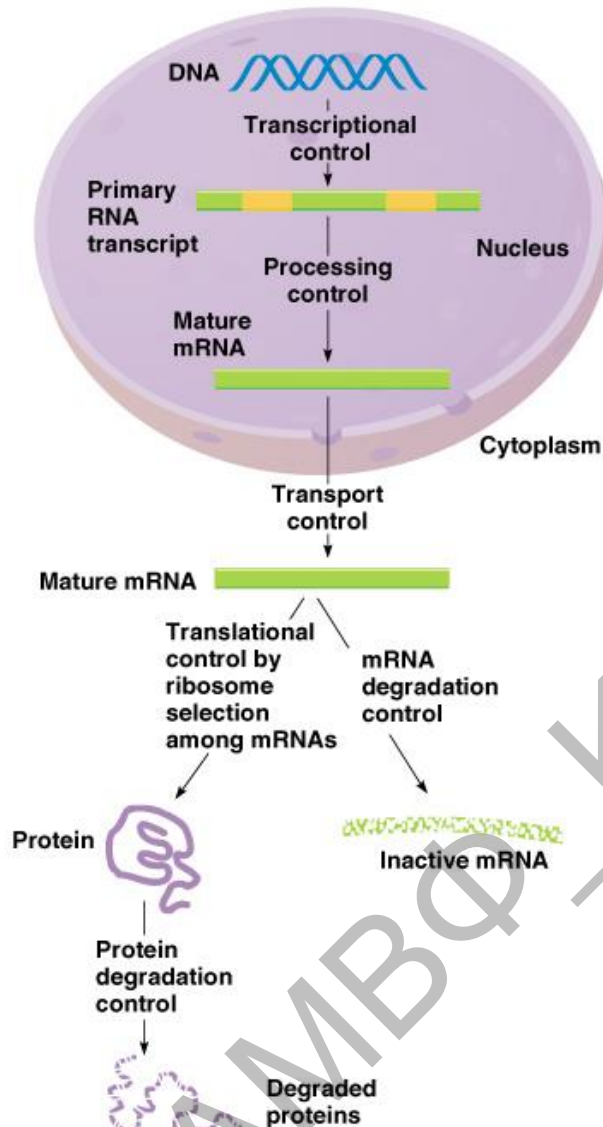
Systems Biology...



Systems Biology...



Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης γίνεται σε πολλά επίπεδα



1. Transcription 1 (promoter)
2. Transcription 2 (epigenetic)
3. mRNA processing
4. mRNA transport
5. mRNA degradation 1 (polyA/CAP)
6. mRNA degradation 2 (RNAi)
7. Nonsense mediated RNA decay
8. mRNA translation 1 (ribosomes)
9. mRNA translation 2 (RNAi)
10. Protein folding
11. Protein degradation



Systems Biology applications in plants



Systems Biology vs.

Candidate Gene Approach



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Κοσμάς Χαραλαμπίδης, Τμήμα Βιολογίας

Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής



Μοριακή γενετική της ανάπτυξης των φυτών

- Οι πολυκύτταροι οργανισμοί παρουσιάζουν μία οργάνωση των ιστών και οργάνων τους, η οποία είναι χαρακτηριστική του είδους στο οποίο ανήκουν.
- Το γονιδίωμα των ανώτερων φυτών περιέχει περισσότερα από 22.000 γονίδια, καθένα από τα οποία μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη με διαφορετικό τρόπο.
- Πολλά γονίδια κωδικοποιούν για συστατικά του βασικού μεταβολισμού κάθε κυττάρου (**housekeeping genes**). Αν και τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα στην ανάπτυξη των φυτών, εντούτοις διαφέρουν από τα αναπτυξιακά γονίδια (**developmental genes**).
- Η απώλεια λειτουργίας ενός αναπτυξιακού γονιδίου οδηγεί σε μία απώλεια του αντίστοιχου αναπτυξιακού μηχανισμού, το οποίο με τη σειρά του επιφέρει μία αλλαγή στο κανονικό πρότυπο ανάπτυξης των φυτών.
- Ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων φυτών αποτελεί το «κλειδί» της μοριακής και γενετικής ανάλυσης, καθώς επιτρέπει την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό ενός γονιδίου, καθώς επίσης και τον προσδιορισμό της λειτουργίας και εμπλοκής του σε βασικούς αναπτυξιακούς μηχανισμούς.



Mutant plants vs. Trans-genic plants vs. Cis-genic plants

Μεταλλαγμένα φυτά: Τροποποίηση του γενετικού υπόβαθρου ενός φυτού.

Διαγονιδιακά φυτά: Τροποποίηση του γενετικού υπόβαθρου ενός φυτού με την εισαγωγή στο γονιδίωμα του ενός διαγονιδίου ή DNA αλληλουχίας.

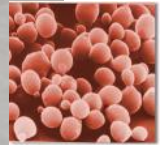
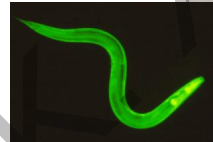
Ενδογονιδιακά φυτά: Τροποποίηση του γενετικού υπόβαθρου ενός φυτού με διαφορεική ρύθμιση, απάλειψη ή βελτίωση ενός ενδογενούς γονιδίου.

Και στις τρεις περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών

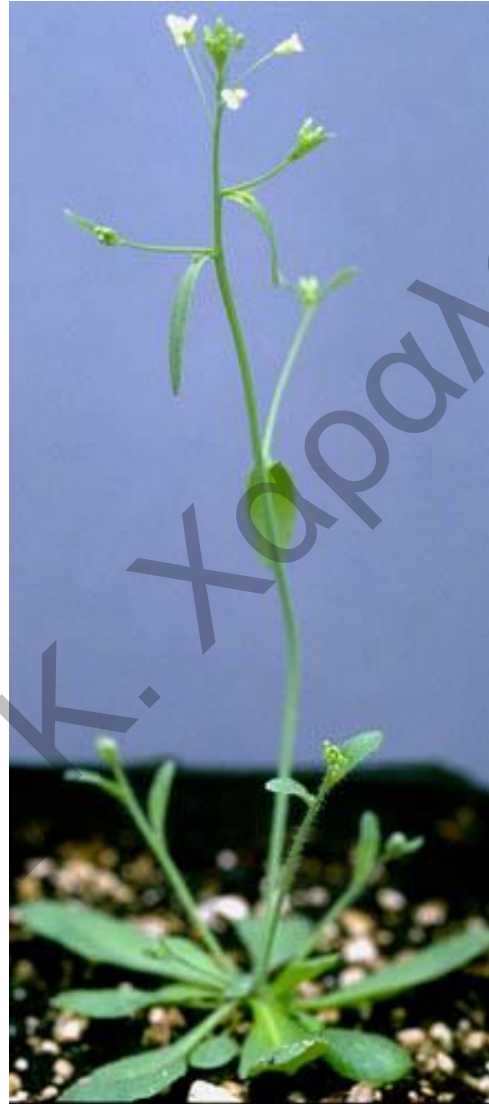
1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής

Current Model Organisms

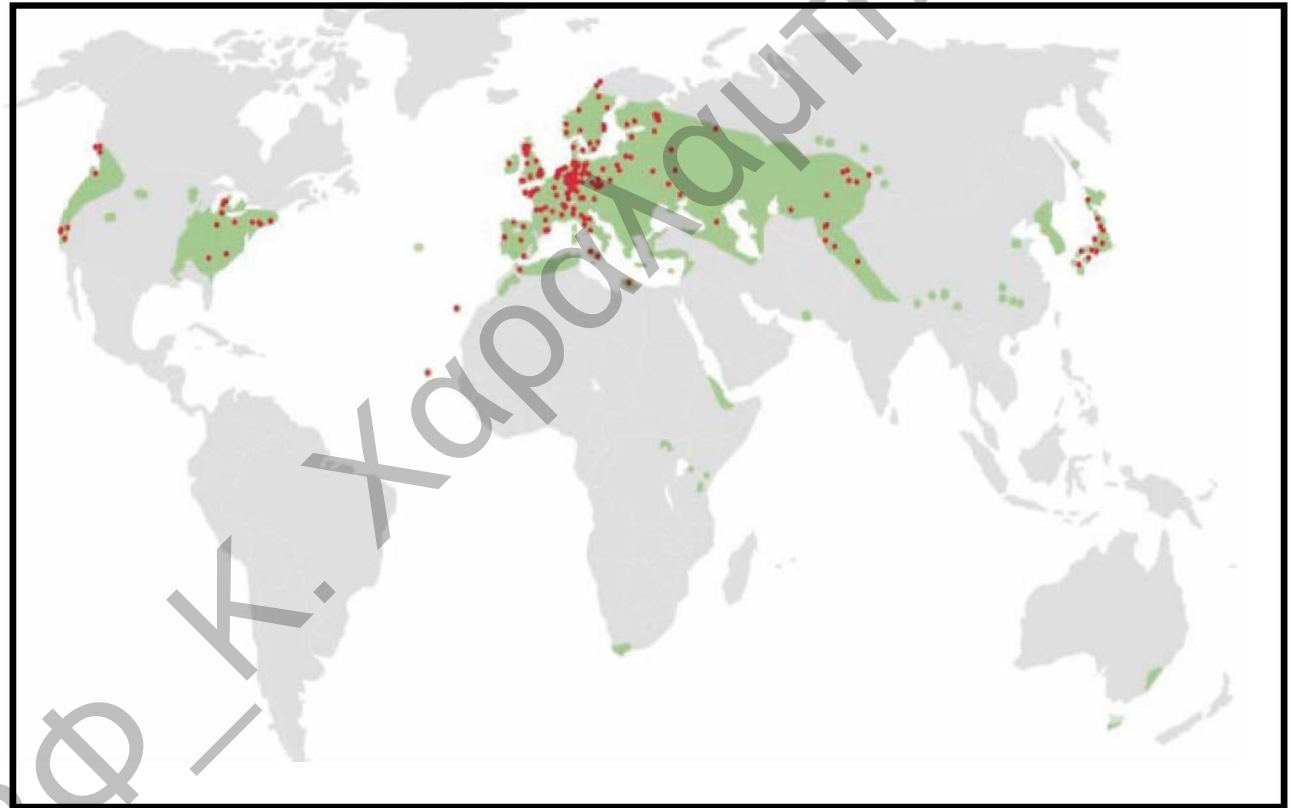
- Drosophila
- Xenopus
- Zebrafish
- Mouse
- C. elegans
- Yeast
- E. coli
- Arabidopsis



The model plant *Arabidopsis thaliana*



Το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*



C24, CS906
unknown location

M7323, CS6184
unknown location



Van-0, CS6884
Vancouver, BC
W123/N49,100m

Col-0, N1092
Columbia, MO
W93/N38,100m

Kin-0, CS6755
Kindalville, MI
W85/N43,250m

Cen-0, CS6661
Caen, FR
W0/N49,-50m

Nok-1, CS6808
Noordwijk, NL
E4/N52,-0m

Est, CS6173
Estonia - EE
E25/N59,150m

Ms-0, CS6797
Moscow, RU
E37/55N,-200m

Ta-0, CS6867
Tabor, CZ
E14/N49,-450m



Dra-1, CS6686
Drahonin, CZ
E16/N49, 450m



En-T, CS6176
Tajikistan - TJ
E71/N39



Sha, CS929
Pamiro-Alay, TJ
E71/N39,3400m



NFE-1, CS22163
United Kingdom - UK
Location unknown



CIBC-10, CS22229
United Kingdom - UK
Location unknown



HR-5, CS22205
United Kingdom - UK
Location unknown



Bla-5, CS6620
Blanes, ES
E3/N41,-50m



Can-0, CS6660
Canary Islands
W15/N26, 1260m



Cvi, CS8500
Cape Verde Islands
W24/N16,1200m



Bay-0, CS954
Bayreuth, DE
E11/N50, ~300m



Ler-2, CS8581
Landsberg, DE
E15/N53, ~100m



Er-0, CS6698
Erlangen, DE
E11/N49,-250m



Fr-2, CS6708
Frankfurt, DE
E8/N50,-50m



Li-2.1, CS6772
Limburg, DE
E8/N50,-150m



Old-2, CS6821
Oldenburg, DE
E8/N53,-50m



Ove-0, CS6823
Ovelgoenne, DE
E8/N53,-50m



Sf-2e, CS6857
San Felix, ES
E3/N41,-50m



Sc-0, CS6852
San Eleno, ES
E2/N41,-50m



Nd-1, CS1636
Niederenz, DE
200-300m



Is-0, CS6741
Isenburg, DE
E7/N50,-150m



GOT-1, CS22277
Goettingen, DE
10E/51N



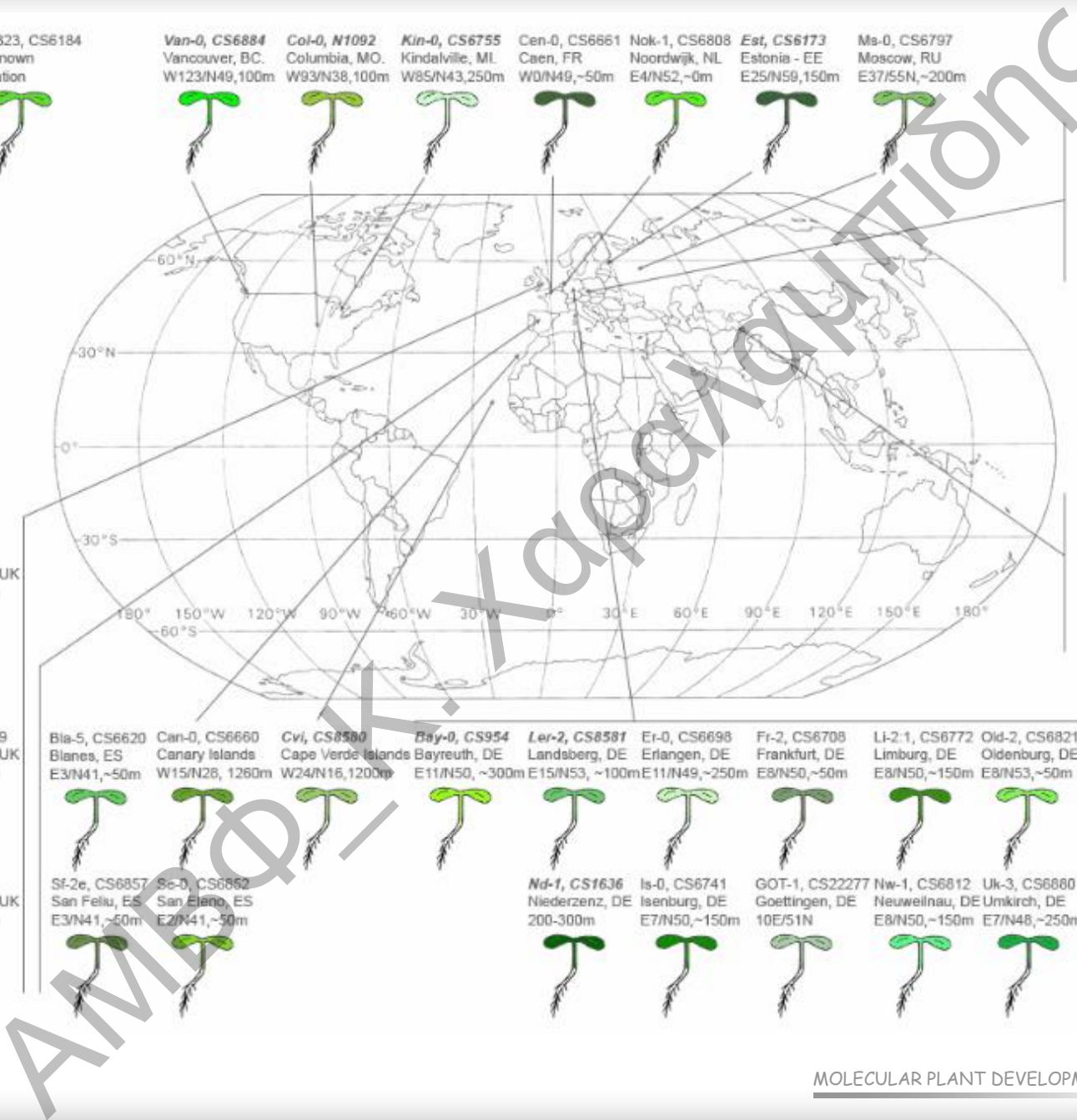
Nw-1, CS6812
Neuweilnau, DE
E8/N50,-150m



Uk-3, CS6880
Umkirch, DE
E7/N48,-250m



AK-1, CS6602
Achkarren, DE
E8/N48,-250m





Οι τρεις κύριοι οικότυποι που χρησιμοποιούνται

Ws-4



Wassilewskija

Col-0



Columbia

Ler-0



Landsberg erecta



Arabidopsis History



- Member of Mustard Family
- Discovered by Johannes Thal in the 1500s
- 1873 First mutant reported
- Chromosome number discovered in 1907 by Friedrich Laibach
- Entire genome sequenced in 2000

**Elliot
Meyerowitz**



**Christopher
Somerville...**

...won the Balzan Prize in 2006 for Plant Molecular Genetics, "for their joint efforts in establishing Arabidopsis as a model organism for plant molecular genetics."



What makes *Arabidopsis thaliana* a model organism?

Arabidopsis: A model plant

Convenience and abundance

Relatively smaller and simpler genome

Susceptible to T-DNA insertions

Small plant belongs to family Cruciferae



Basic similarities to other crops

Larger no. of offsprings & short generation time

Genome size:
Nuclear: 125 Mb
Plastid: 154 Kb
Mitochondria: 367 Kb

Low amount of repetitive DNA



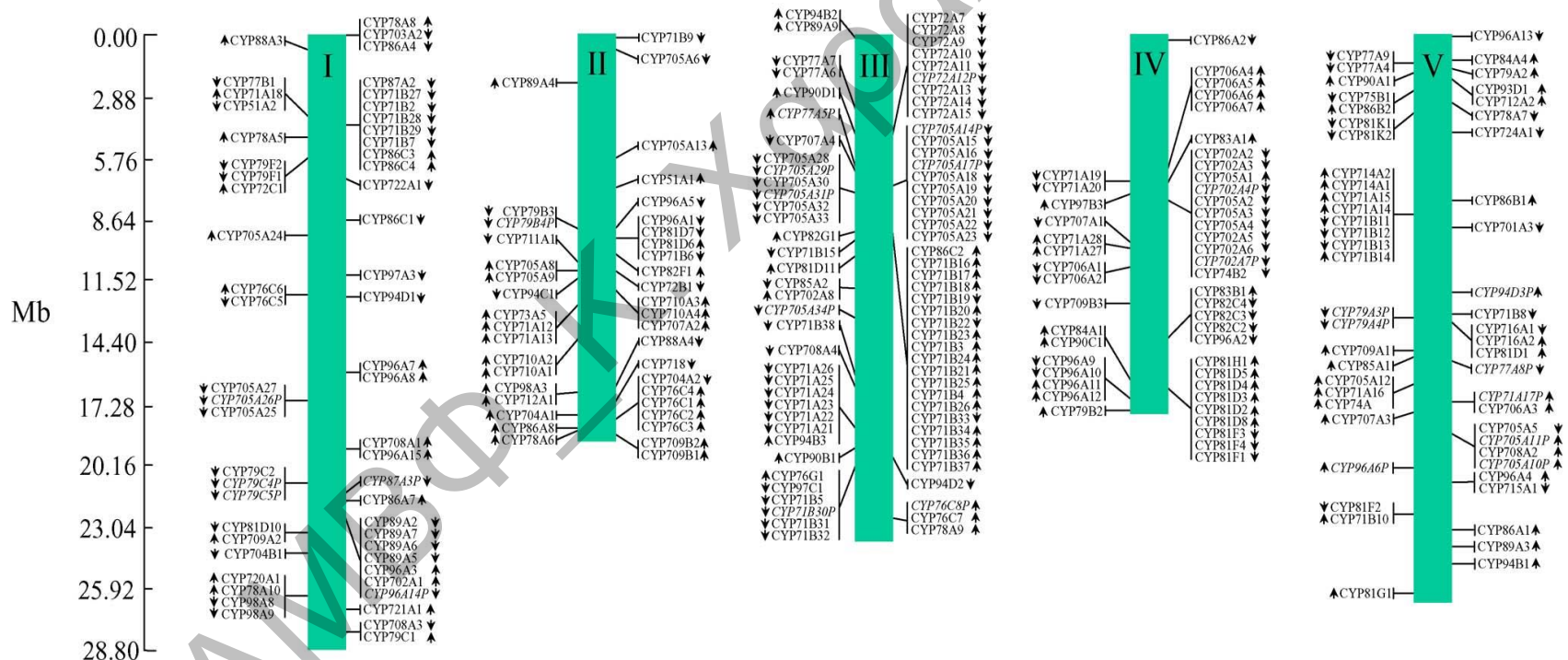
Easy to grow, short life cycle and many offspring

Arabidopsis can be grown in small spaces or indoors. They only require water, soil, and light to reach maturity in 48 days from germination.



Modern Technology

- The Arabidopsis genome was sequenced in 2000 and is readily available to the scientific community.
- Genome is relatively small, compared to other plants.
- Detailed chromosome maps exist for all 5 chromosomes.
- Both physical and genetic maps exist.



Outcomes of the Arabidopsis sequencing project

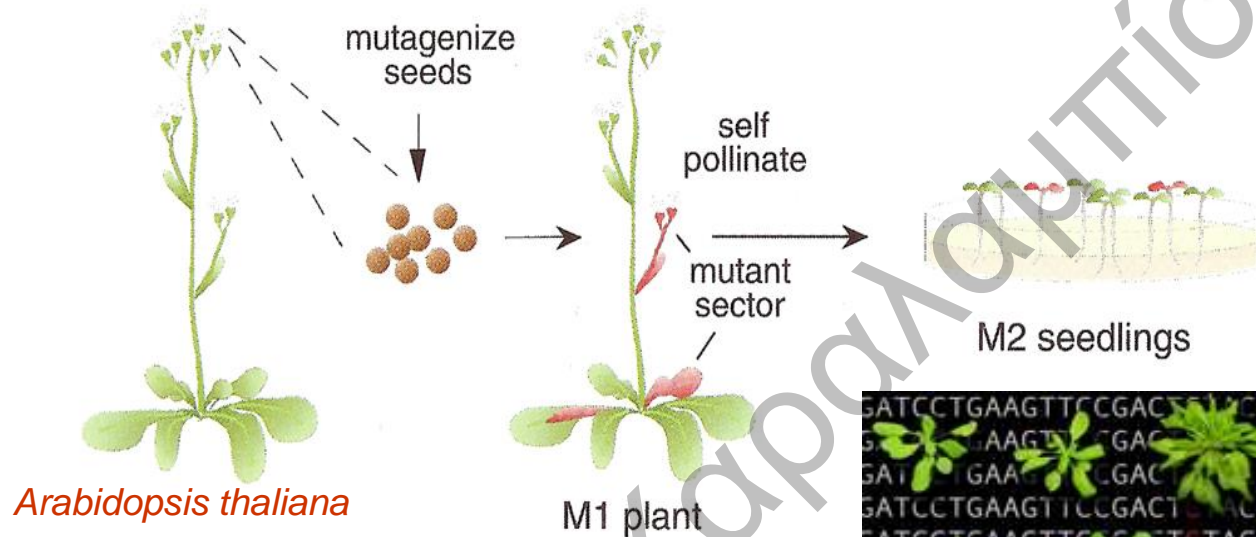
- 115409949 bp (~115.4 Mb) are sequenced
- The unsequenced centromeric and ribosomal DNA repeat regions measures roughly 10 Mb
- 25498 genes are predicted



- Characterization of the coding regions
- Genome organization and duplication
- Comparative analysis of *Arabidopsis* accessions
- Comparison of *Arabidopsis* and other plant genera
- Integration of 3 genomes in the plant cell
- Transposable elements
- rDNA, telomeres and centromeres



Το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*



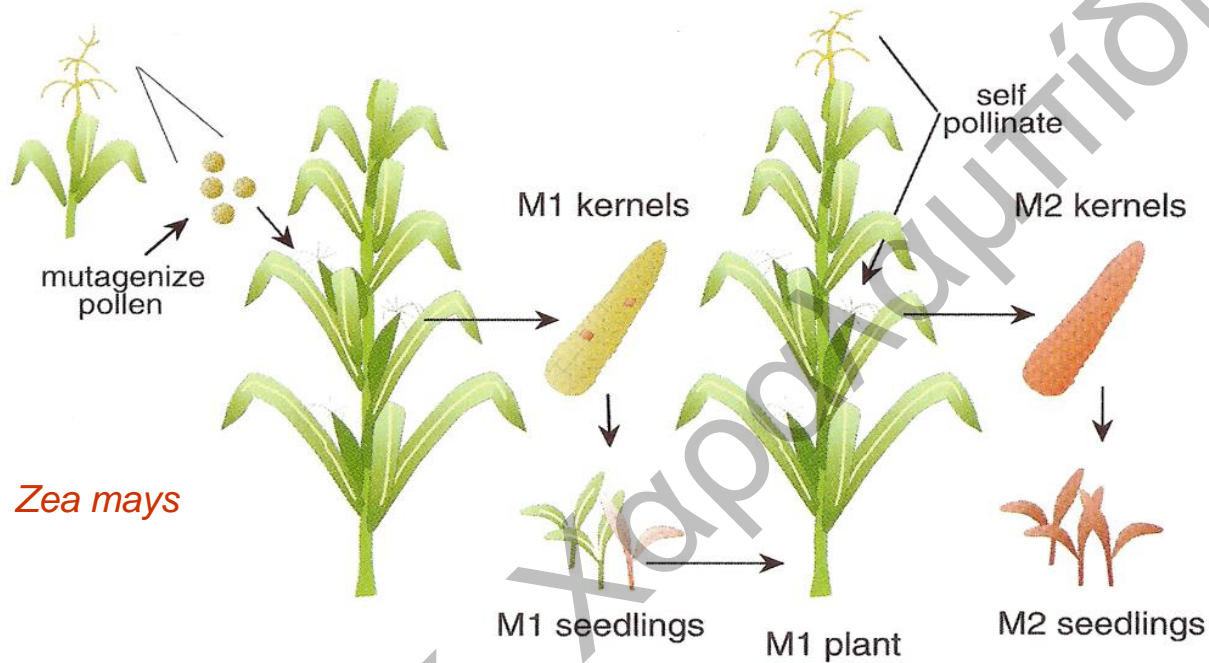
Arabidopsis thaliana

Πλεονεκτήματα

- Μικρό μέγεθος -Εύκολη καλλιέργεια
- Μικρό γονιδίωμα - 5 χρωμοσώματα
- Μεγάλος αριθμός σπερμάτων
- Αυτογονιμοποιούμενο
- Εύκολες γενετικές διασταυρώσεις
- Μεταλλαξιγένεση σπερμάτων
- Εύκολος μετασχηματισμός



Το φυτό μοντέλο *Zea mays*



Πλεονεκτήματα

- Εύκολες γενετικές διασταυρώσεις
- Μεγάλος αριθμός σπερμάτων
- Ενδογενή μεταθετά στοιχεία (As και Ds)
- Εφαρμογή μεταλλαξιγόνων στη γύρη

Μειονεκτήματα

- Μεγάλος κύκλος ζωής
- Χώρος καλλιέργειας
- Κλιματολογικές συνθήκες
- Μετασχηματισμός



Φυτά μοντέλα στη Μοριακή Ανάπτυξη Φυτών

Μονοκότυλα

Zea mays



Oryza sativa



Δικότυλα

Lotus japonicus



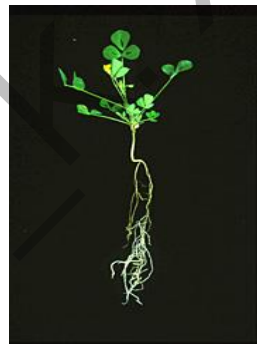
Antirrhinum majus



Pisum sativum



Arabidopsis thaliana



Medicago truncatula



Lycopersicon esculentum



Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

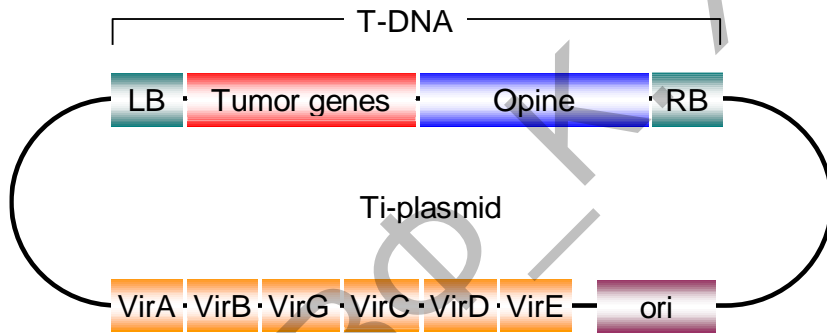
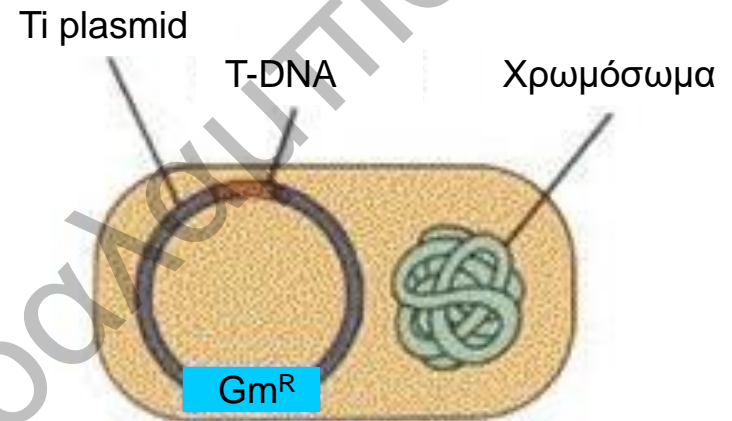
1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής

Genomes sequenced

Γιατί είναι σημαντική η μεταλλαξιγένεση/δημιουργία μεταλλαγμένων και διαγονιδιακών σειρών ή ο εντοπισμός γονιδίων που εμπλέκονται σε ένα μηχανισμό ανάπτυξης ?

Organism	Size (mil. bp)	Genes	Gene density	Chromos
<i>Homo sapiens</i>	2900	~30,000	1/100 Kb	46
<i>Rattus norvegicus</i>	2,750	~30,000	1/100 Kb	42
<i>Mus musculus</i>	2500	~30,000	1/100 Kb	40
<i>Drosophila melanogaster</i>	180	13,600	1/9 Kb	8
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	25,500	1/4 Kb	5
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97	19,100	1/5 Kb	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	6300	1/2 Kb	16
<i>Escherichia coli</i>	4.7	3200	1/1,4 Kb	1
<i>H. influenzae</i>	1.8	1700	1/1 Kb	1

Μετασχηματισμός φυτών με *Agrobacterium tumefaciens*



The Galls Can Be Huge



Gall on stem



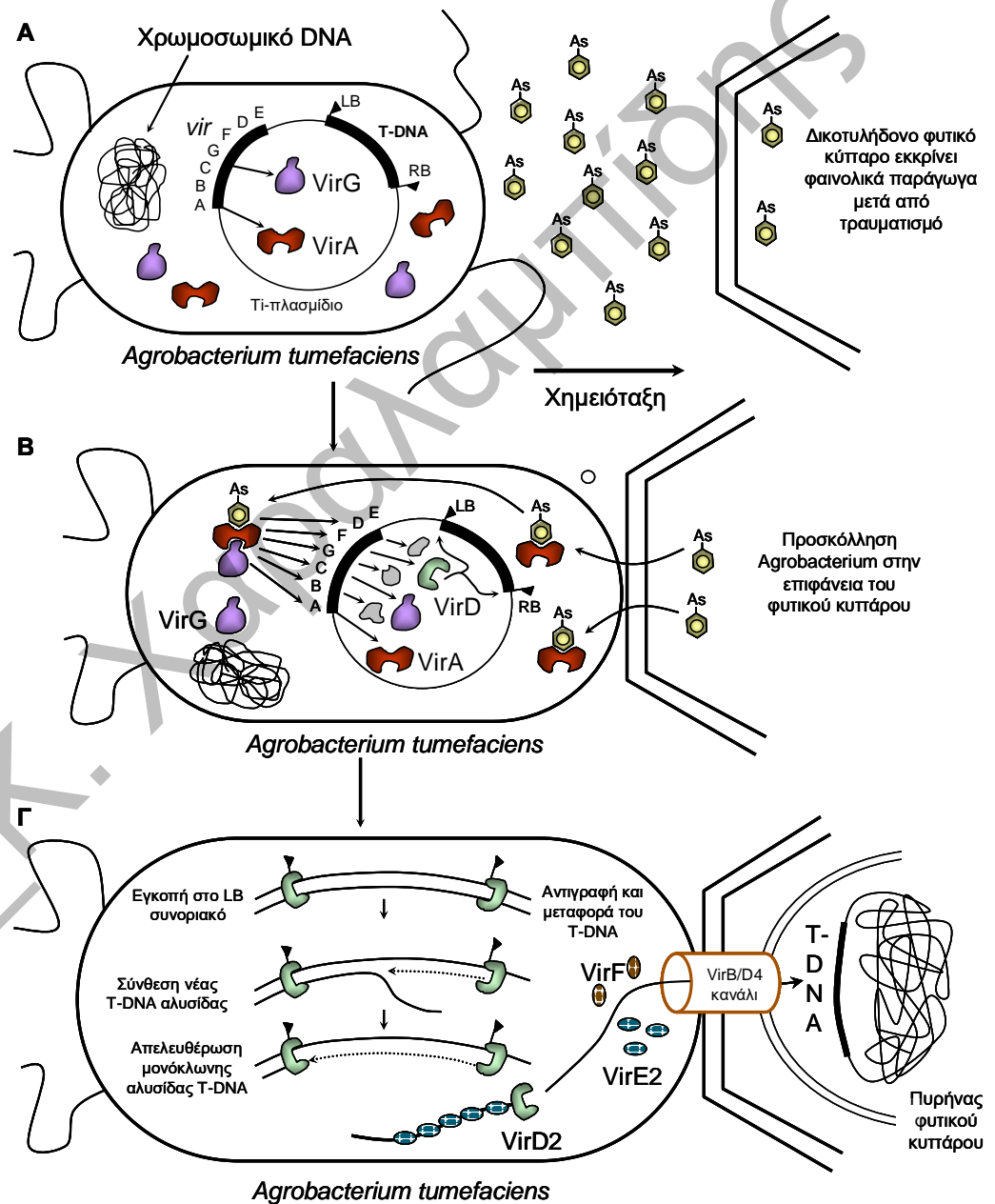
Gall on leaf

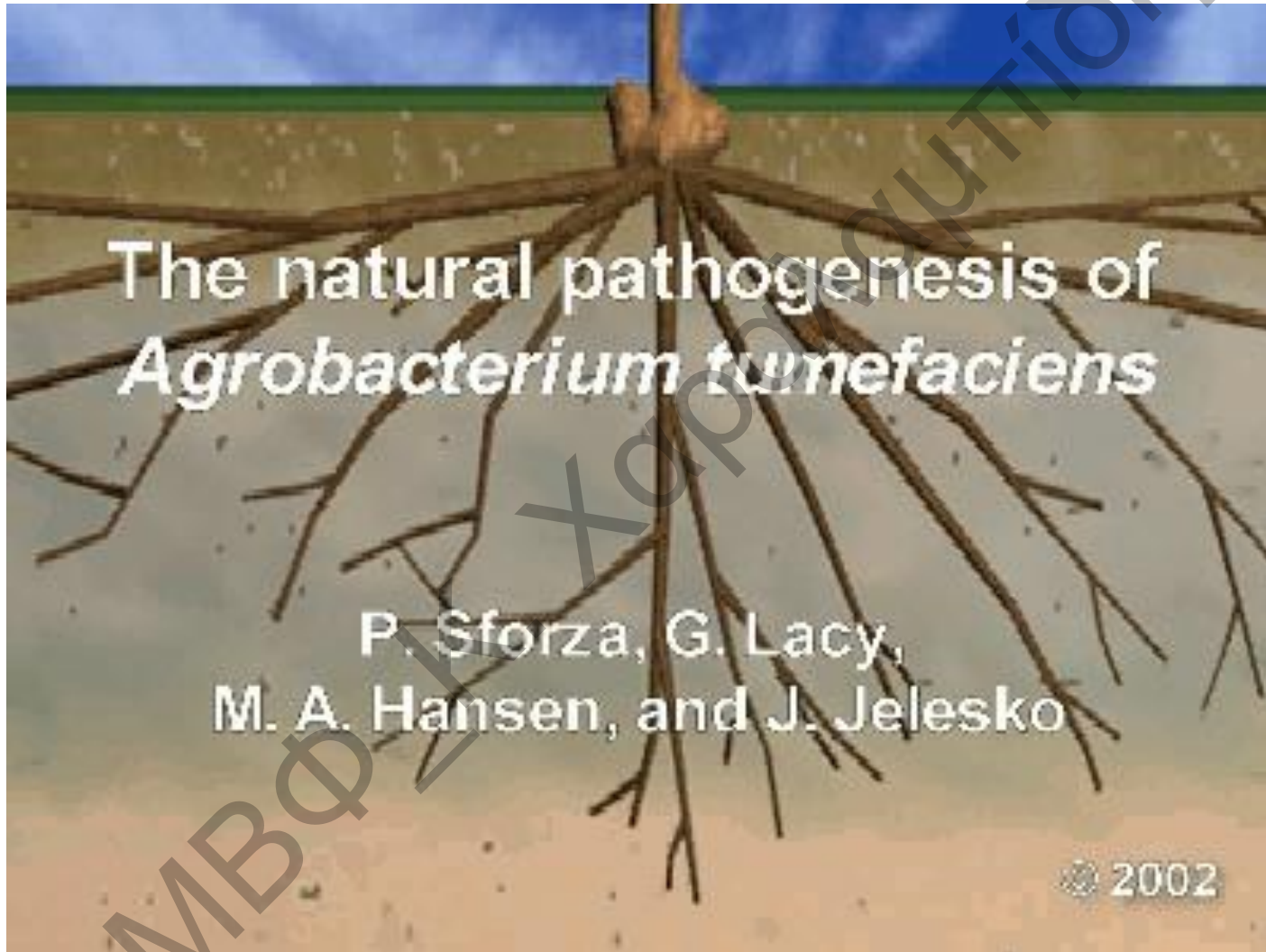


copyright: IFFF (BOKU)



Agrobacterium tumefaciens mediated transformation





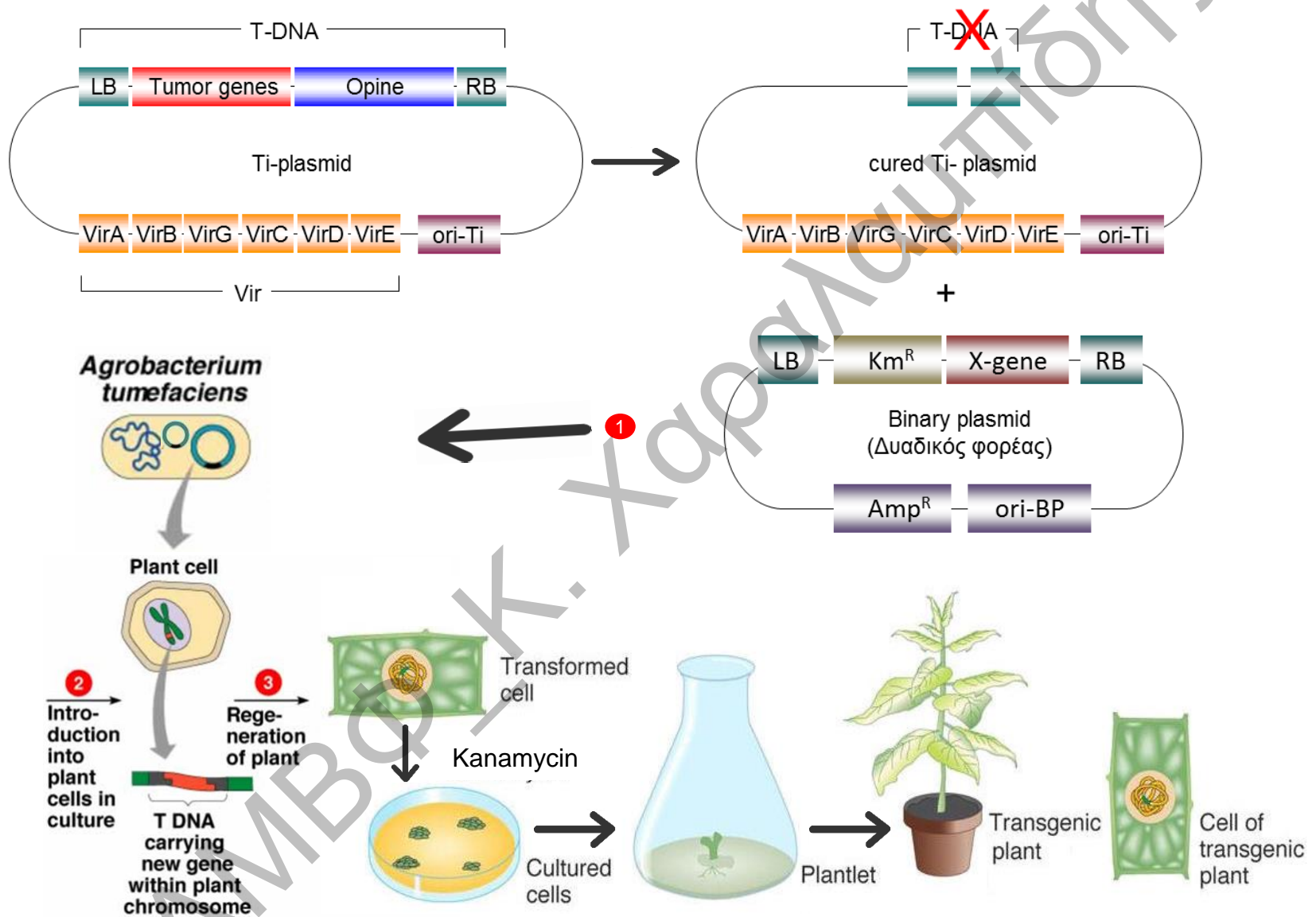
The natural pathogenesis of
Agrobacterium tumefaciens

P. Sforza, G. Lacy,
M. A. Hansen, and J. Jelesko

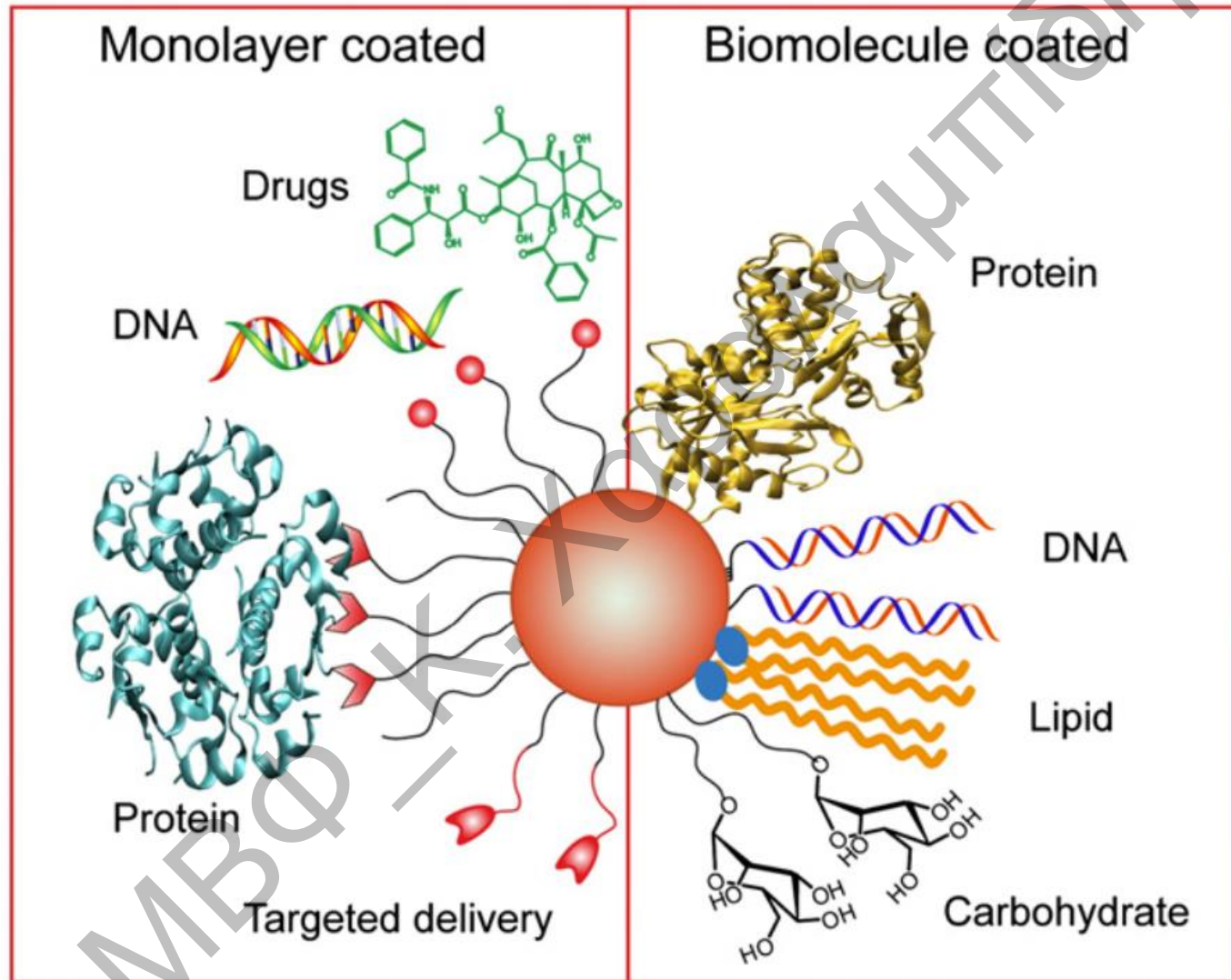
© 2002



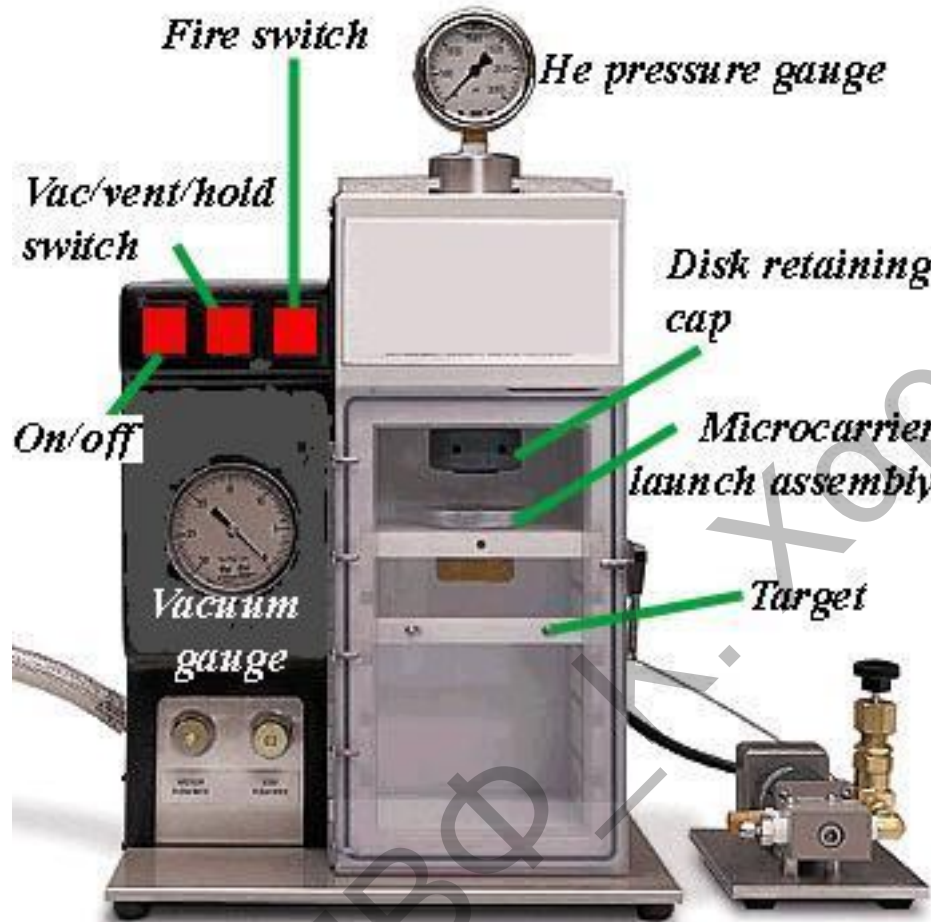
Agrobacterium tumefaciens mediated transformation



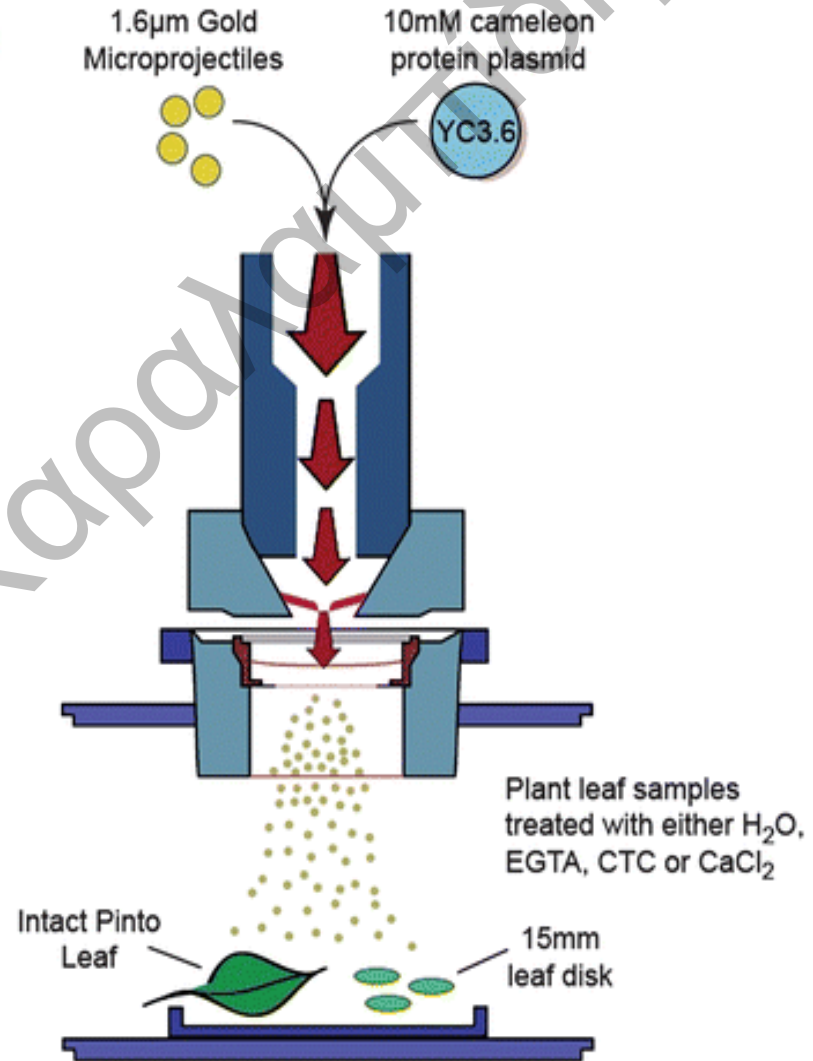
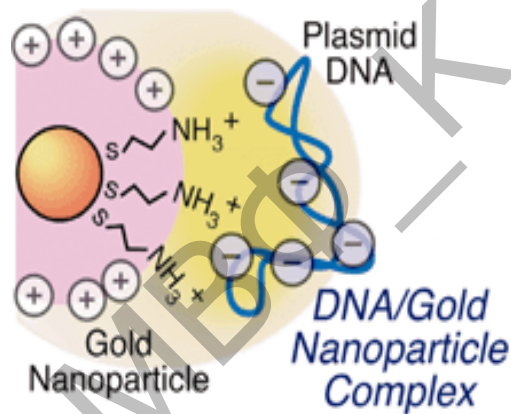
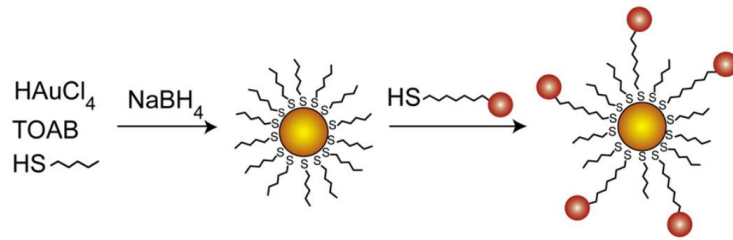
Use of gold or tungsten nanoparticles



Particle bombardment (Biolistics) plant transformation methods

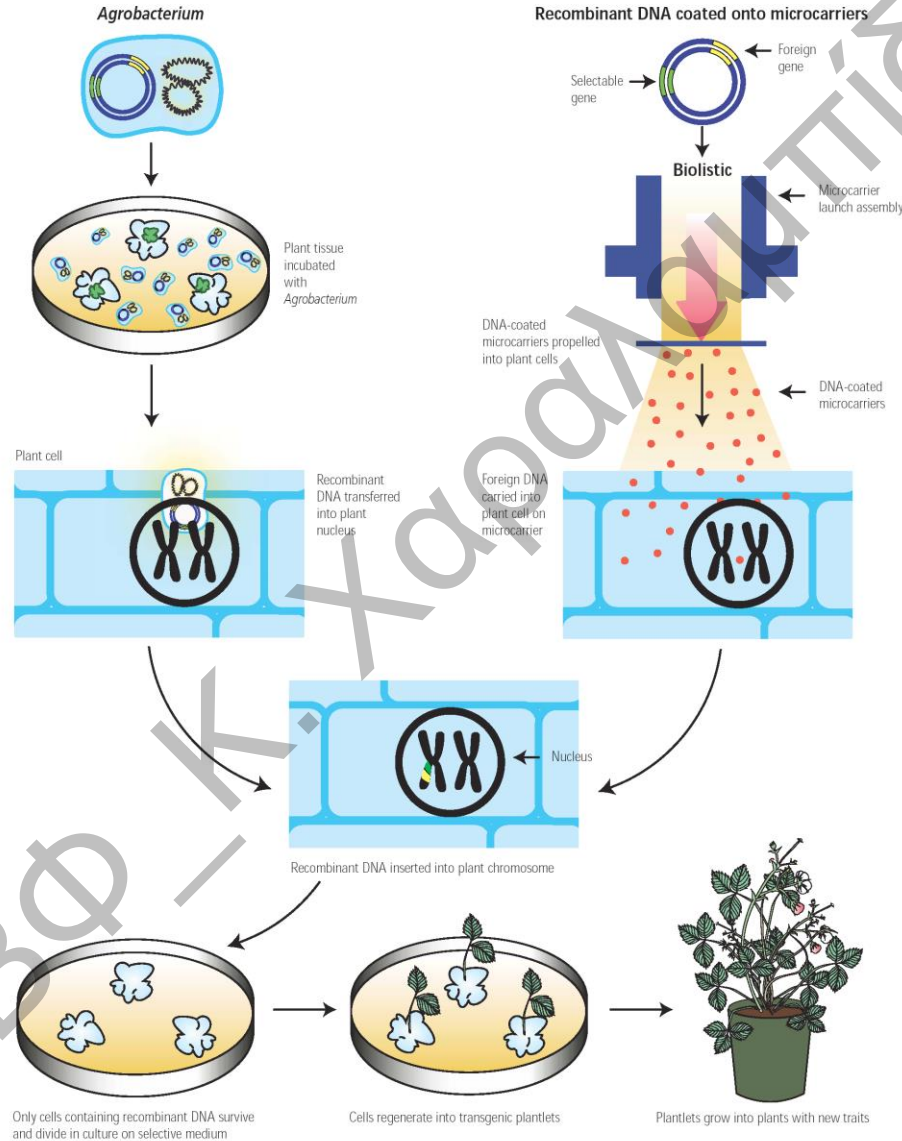
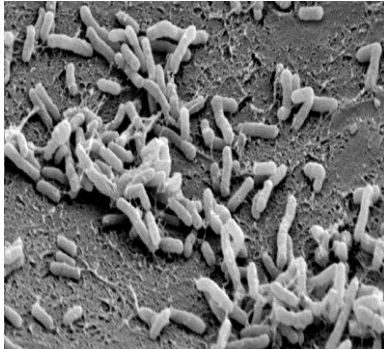


Use of gold nanoparticles in plant transformation

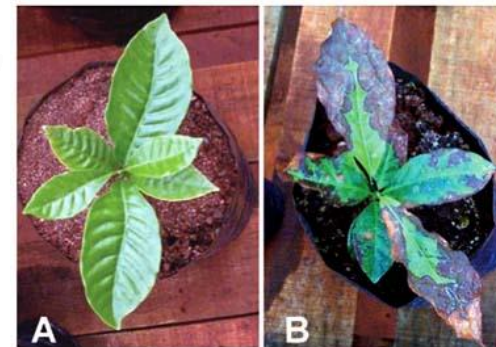
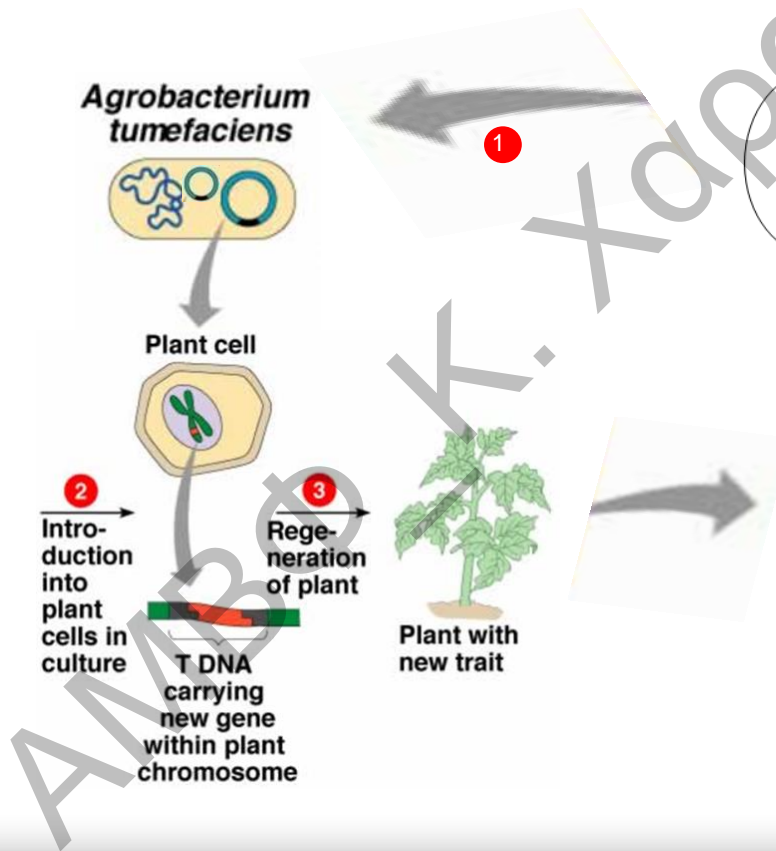
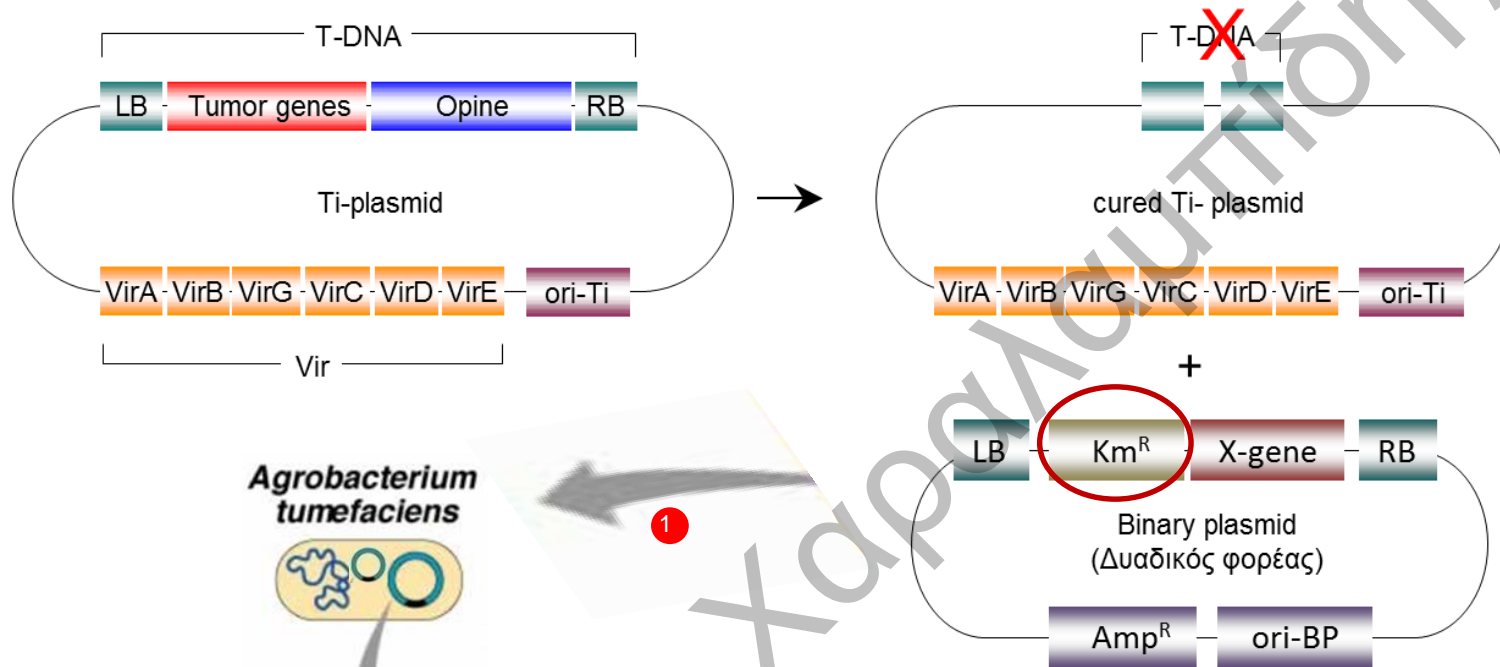


Agrobacterium

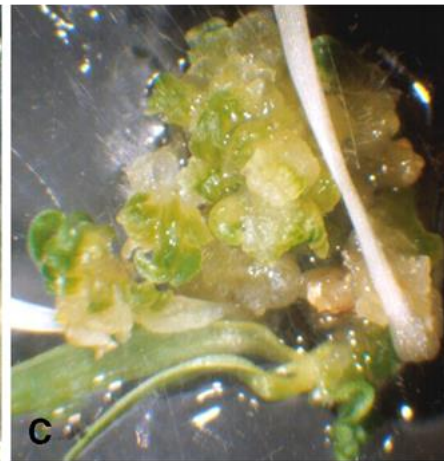
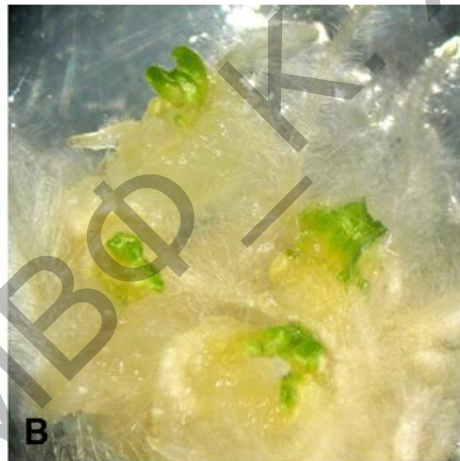
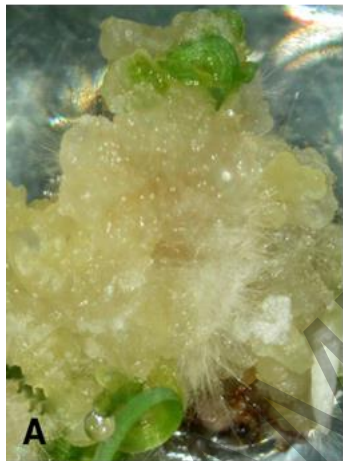
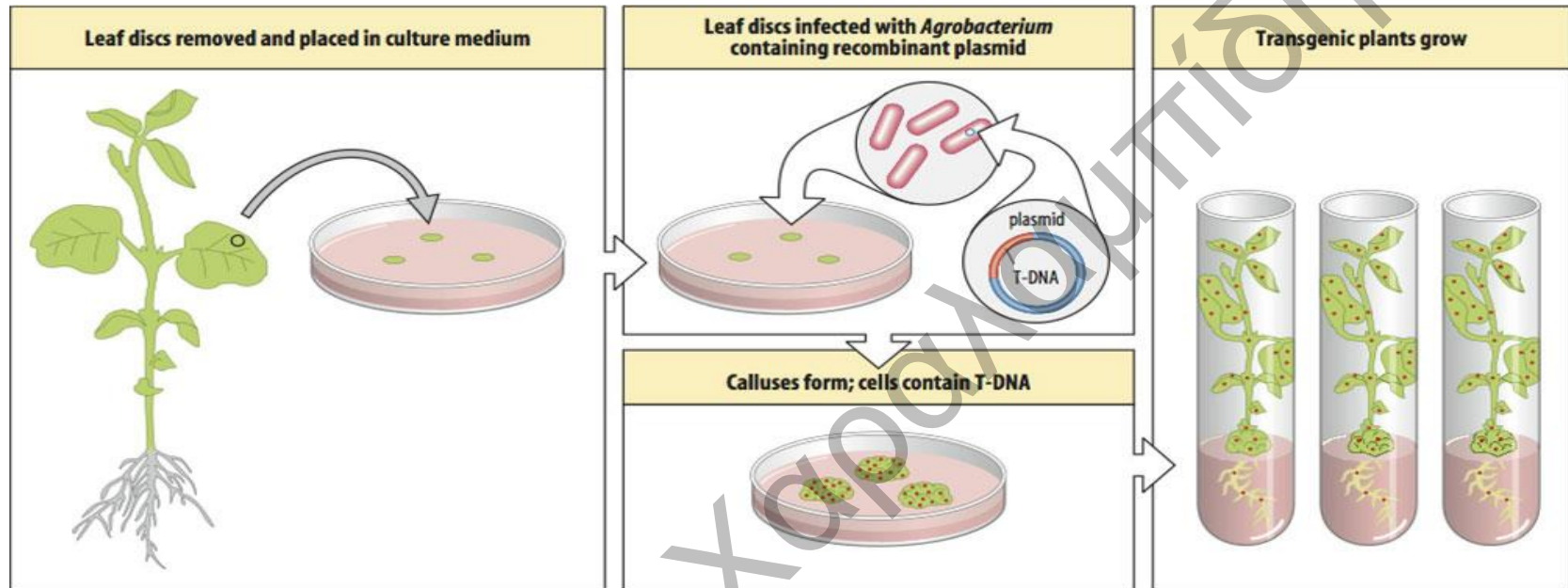
Biolistics



Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation



Selection and plant regeneration by tissue culture



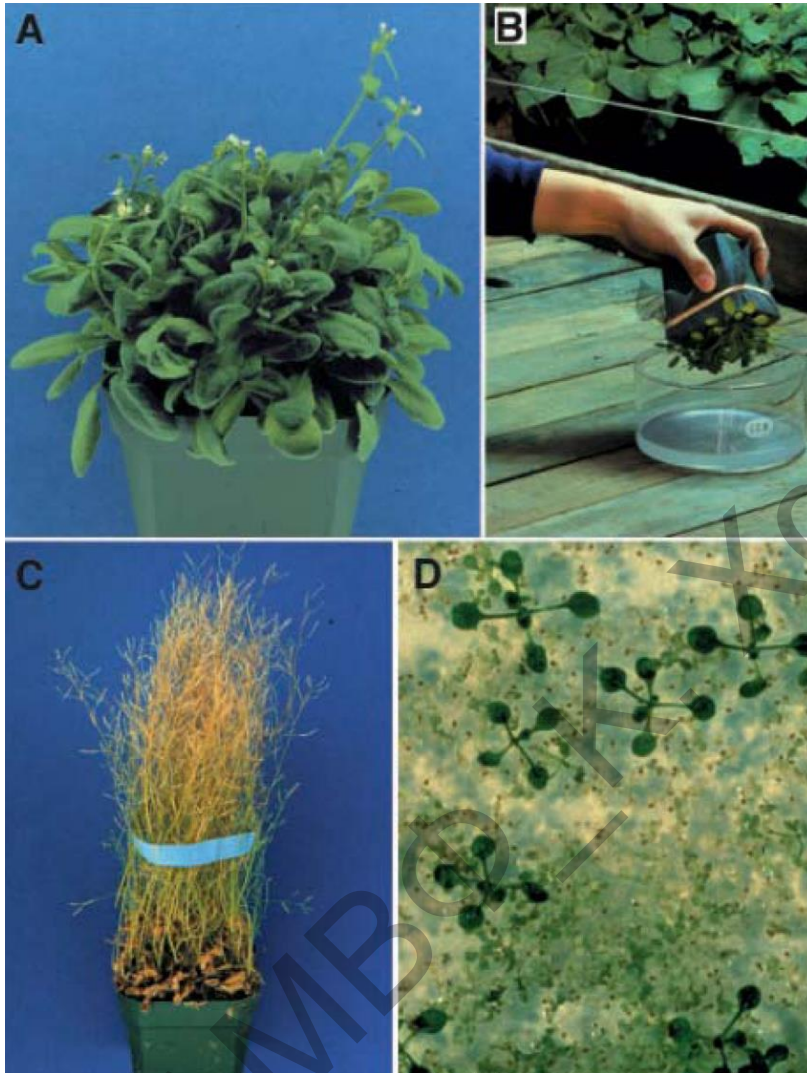


Agrobacterium Mediated Transformation

P. Sforza, D. Tillman, E. McMeans,
F. Medina-Bolivar, J. Jelesko, M. A. Hansen

(c) 2002

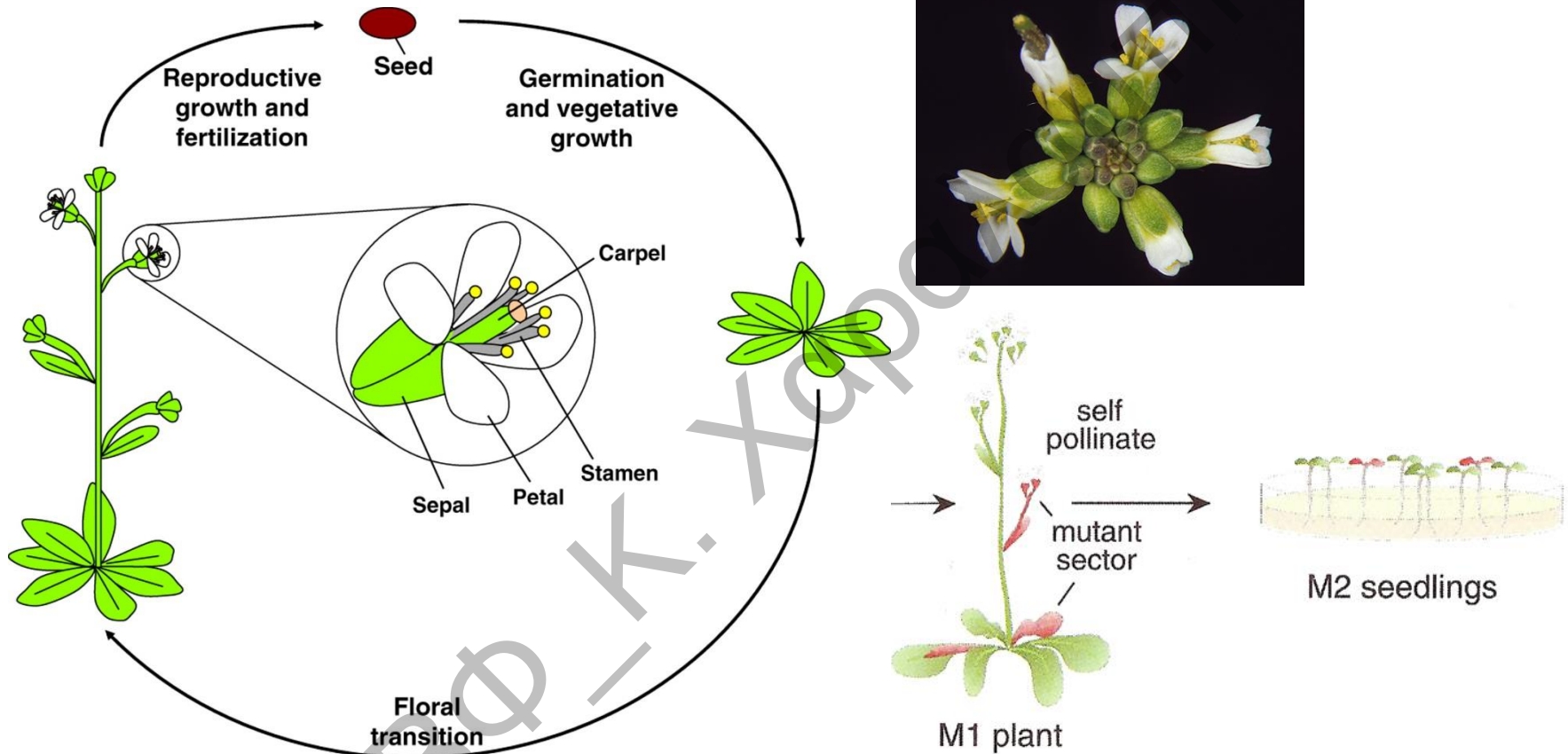
Μετασχηματισμός του *Arabidopsis thaliana*



- A. Ανάπτυξη φυτών
- B. Εμβάπτιση σε *Agrobacterium*
- C. Συλλογή σπερμάτων
- D. Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών

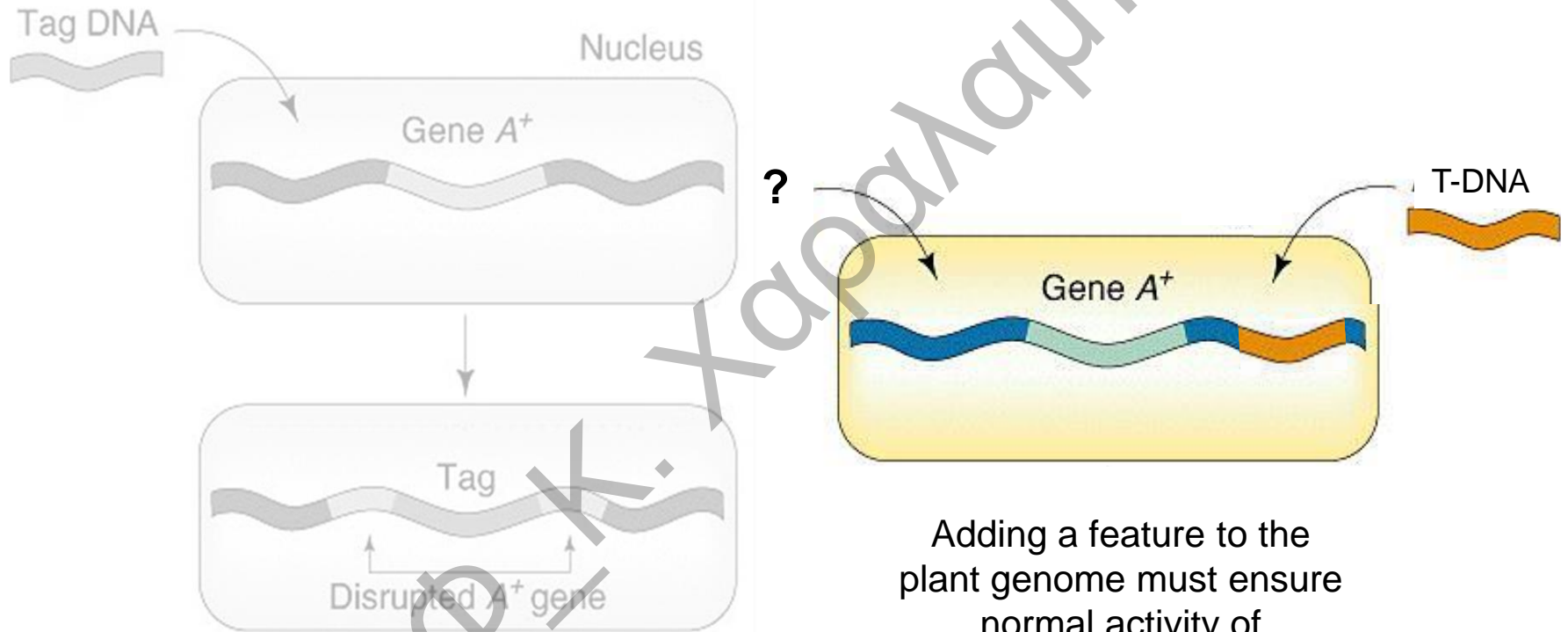


Μετασχηματισμός του *Arabidopsis thaliana*



Agrobacterium transformation to add a sequence into the genome

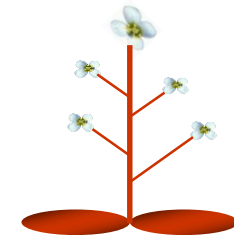
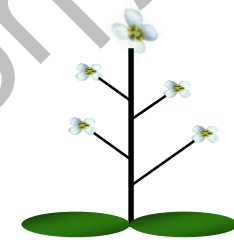
Adding gene function



Adding a feature to the plant genome must ensure normal activity of endogenous gene function

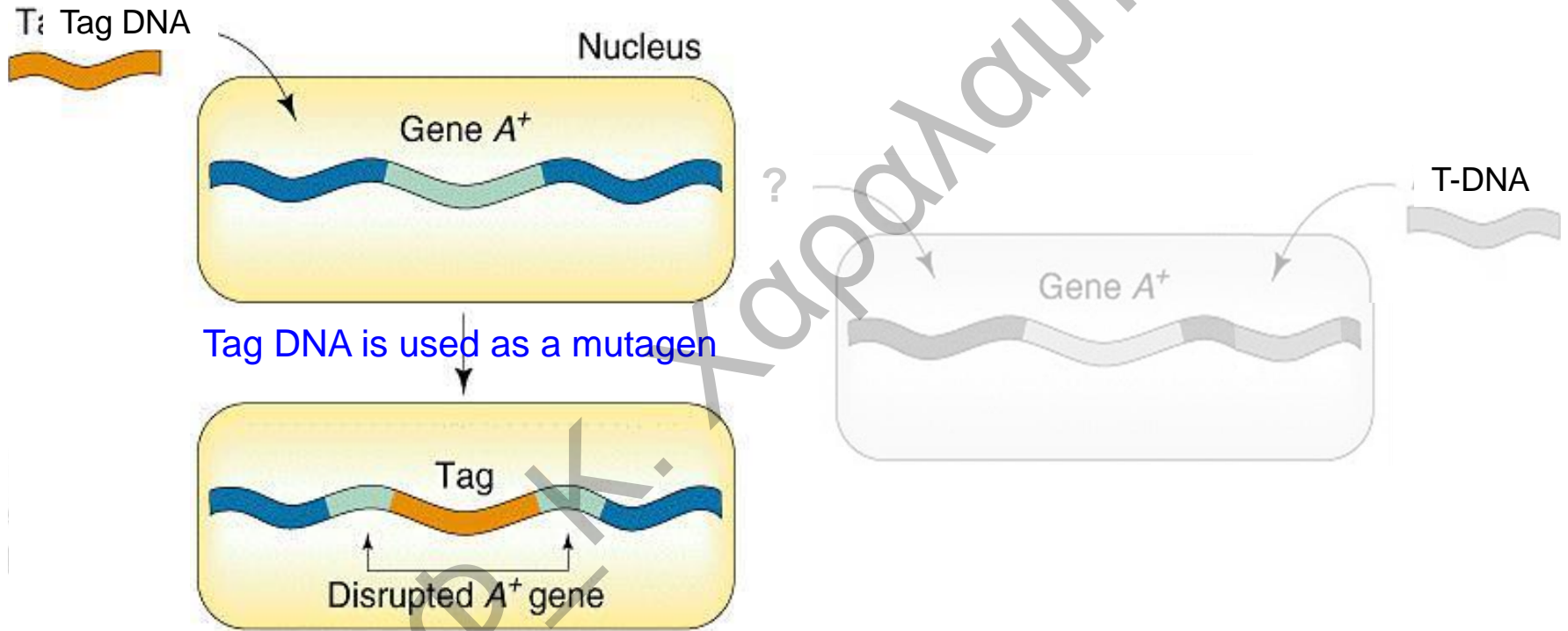


Το *Agrobacterium tumefaciens* για προσθήκη χαρακτήρων/ιδιοτήτων



Agrobacterium transformation to tag a sequence in the genome

Disrupting gene function



Sometimes tag DNA enters gene A⁺ causing A⁻ phenotype



Μέθοδοι Μεταλλαξιγένεσης

Στοιχεία ένθεσης (insertion elements)

απόκτηση λειτουργίας, απώλεια λειτουργίας, εύρεση γονιδίου

Βομβαρδισμός νετρονίων (fast neutral bombardment)

μικρές χρωσωμικές ελλείψεις, απώλεια λειτουργίας

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

μεταλλάξεις σημείου (G σε A), ποικίλες συνέπειες

Oligo-directed mutagenesis (ODM)

synthetic oligonucleotides homologous with a target sequence

Side-directed nucleases (SDNs) for genome editing (MN, ZGNS, TALEN, CRISPR)

γονιδιωματική παρέμβαση/επεξεργασία



Μέθοδοι Μεταλλαξιγένεσης

Στοιχεία ένθεσης (insertion elements)

απόκτηση λειτουργίας, απώλεια λειτουργίας, εύρεση γονιδίου

Βομβαρδισμός νετρονίων (fast neutral bombardment)

μικρές χρωσωμικές ελλείψεις, απώλεια λειτουργίας

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

μεταλλάξεις σημείου (G σε A), ποικίλες συνέπειες

Oligo-directed mutagenesis (ODM)

synthetic oligonucleotides homologous with a target sequence

Side-directed nucleases (SDNs) for genome editing (MN, ZFNs, TALEN, CRISPR)

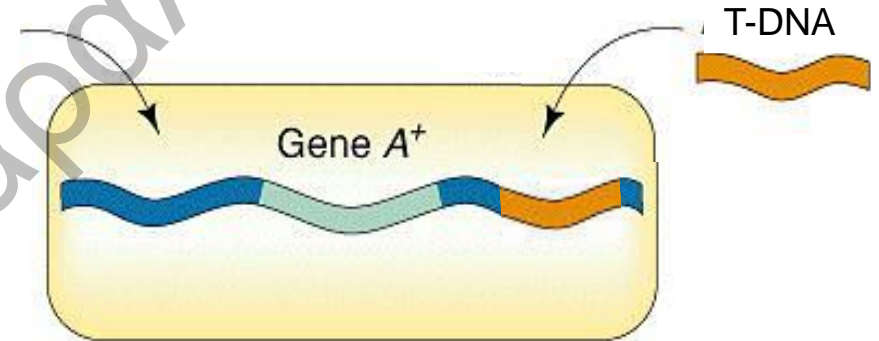
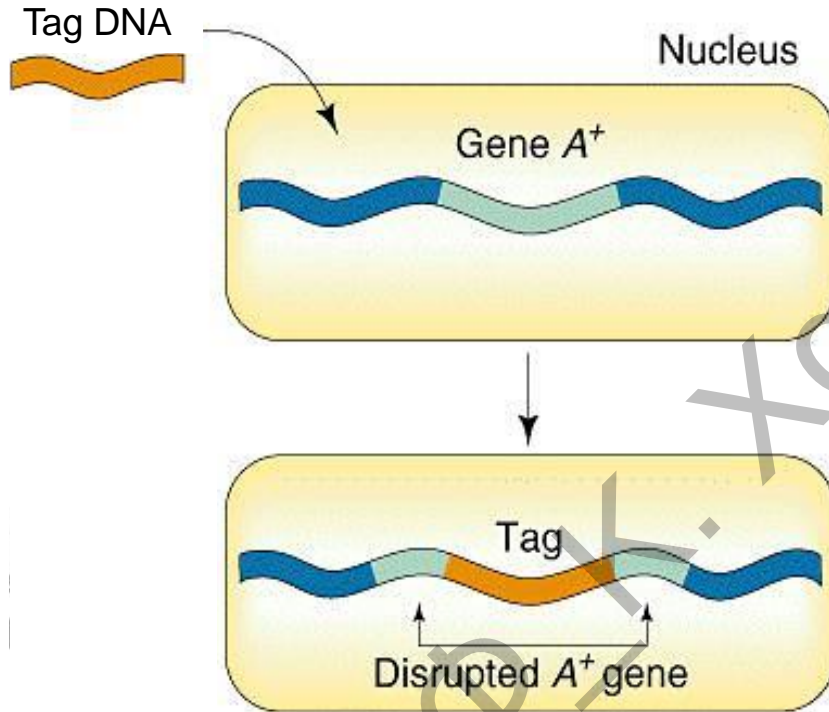
γονιδιωματική παρέμβαση/επεξεργασία



Agrobacterium transformation for adding or mutagenizing

Disrupting gene function

Adding gene function

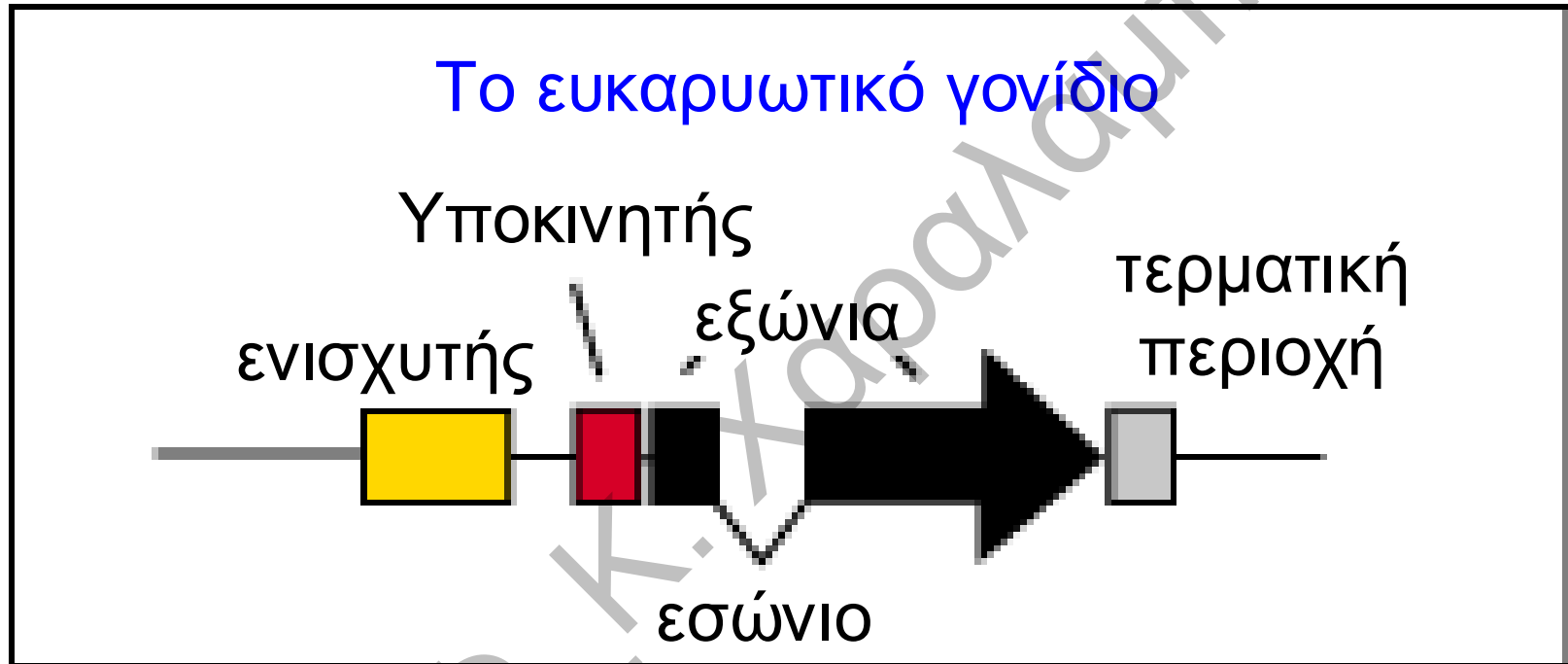


Adding a feature to the plant genome must ensure normal activity of endogenous gene function

Sometimes tag DNA enters gene A⁺ causing A⁻ phenotype



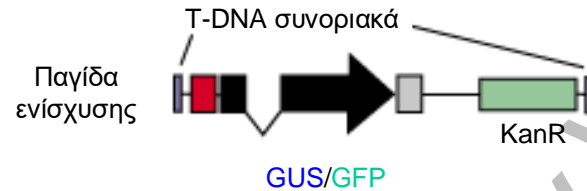
Παραλλαγές των T-DNA μεταλλαζιγόνων ένθεσης



Παραλλαγές των T-DNA μεταλλαξιγόνων ένθεσης

«Παγίδες ενίσχυσης» (enhancer traps)

- Γονίδιο αναφοράς με τμήμα ενός υποκινητή ($\Delta 35S::GUS/GFP$)



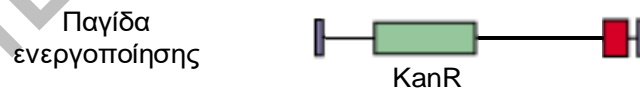
«Παγίδες γονιδίων» (gene/promoter traps)

- Γονίδιο αναφοράς (GUS ή GFP) χωρίς υποκινητή

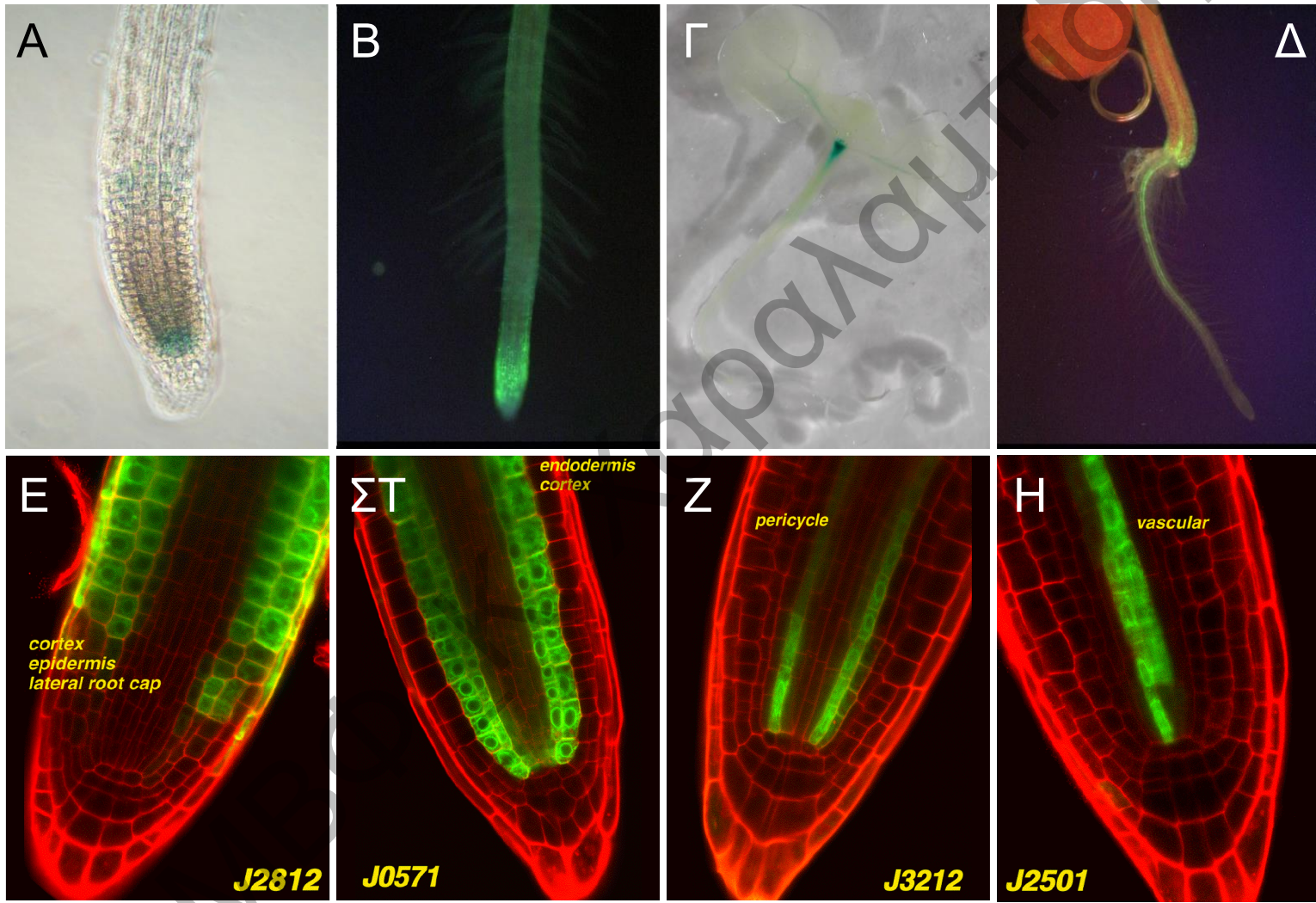


«Παγίδες ενεργοποίησης» (activation traps)

- T-DNA με ισχυρό υποκινητή ή μέρος αυτού (CaMV-35S)



Παραδείγματα "παγίδων" ενίσχυσης και γονιδίων στο *Arabidopsis*



Μέθοδοι Μεταλλαγής

Στοιχεία ένθεσης (insertion elements)

απόκτηση λειτουργίας, απώλεια λειτουργίας, εύρεση γονιδίου

Βομβαρδισμός νετρονίων (fast neutral bombardment)

μικρές χρωσωμικές ελλείψεις, απώλεια λειτουργίας

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

μεταλλάξεις σημείου (G σε A), ποικίλες συνέπειες

Oligo-directed mutagenesis (ODM)

synthetic oligonucleotides homologous with a target sequence

Side-directed nucleases (SDNs) for genome editing (MN, ZGNS, TALEN, CRISPR)

γονιδιωματική παρέμβαση/επεξεργασία



Μέθοδοι Μεταλλαγένεσης

Στοιχεία ένθεσης (insertion elements)

απόκτηση λειτουργίας, απώλεια λειτουργίας, εύρεση γονιδίου

Βομβαρδισμός νετρονίων (fast neutral bombardment)

μικρές χρωσωμικές ελλείψεις, απώλεια λειτουργίας

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

μεταλλάξεις σημείου (G σε A), ποικίλες συνέπειες

Oligo-directed mutagenesis (ODM)

synthetic oligonucleotides homologous with a target sequence

Side-directed nucleases (SDNs) for genome editing (MN, ZGNS, TALEN, CRISPR)

γονιδιωματική παρέμβαση/επεξεργασία



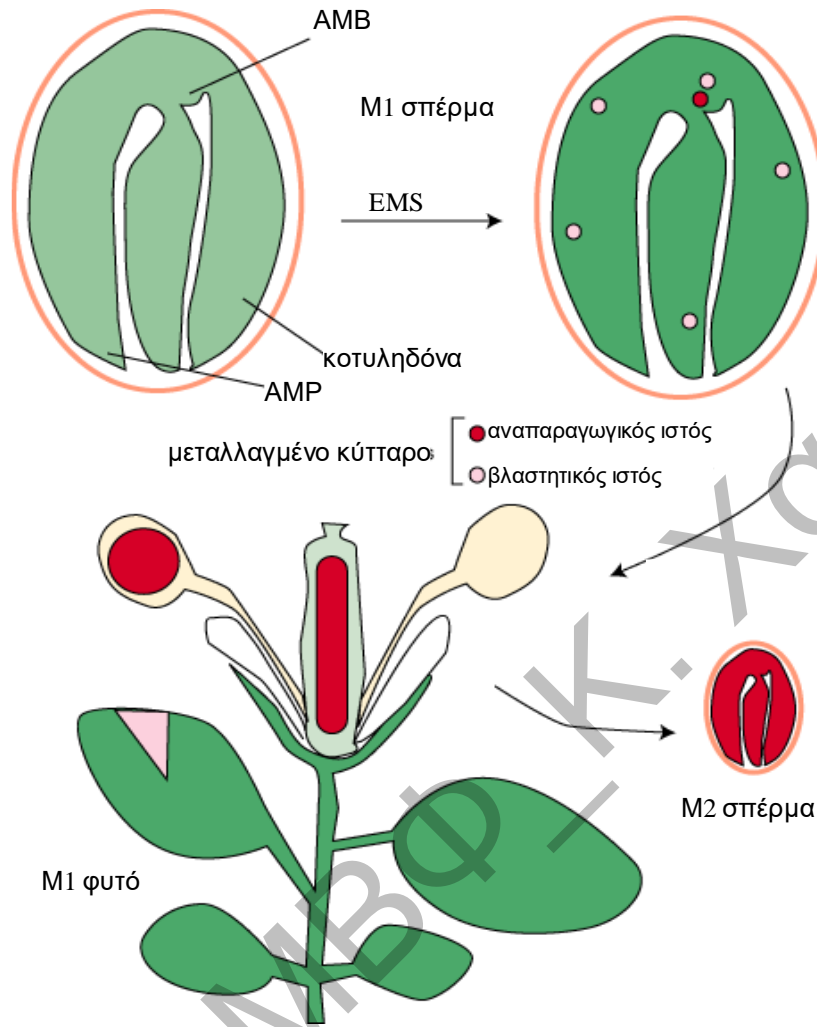
Μεταλλαξινέωση με άλλες μεθόδους

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

μεταλλάξεις σημείου (G σε A), ποικίλες συνέπειες



EMS μεταλλαξιγένεση σε σπέρματα *Arabidopsis*

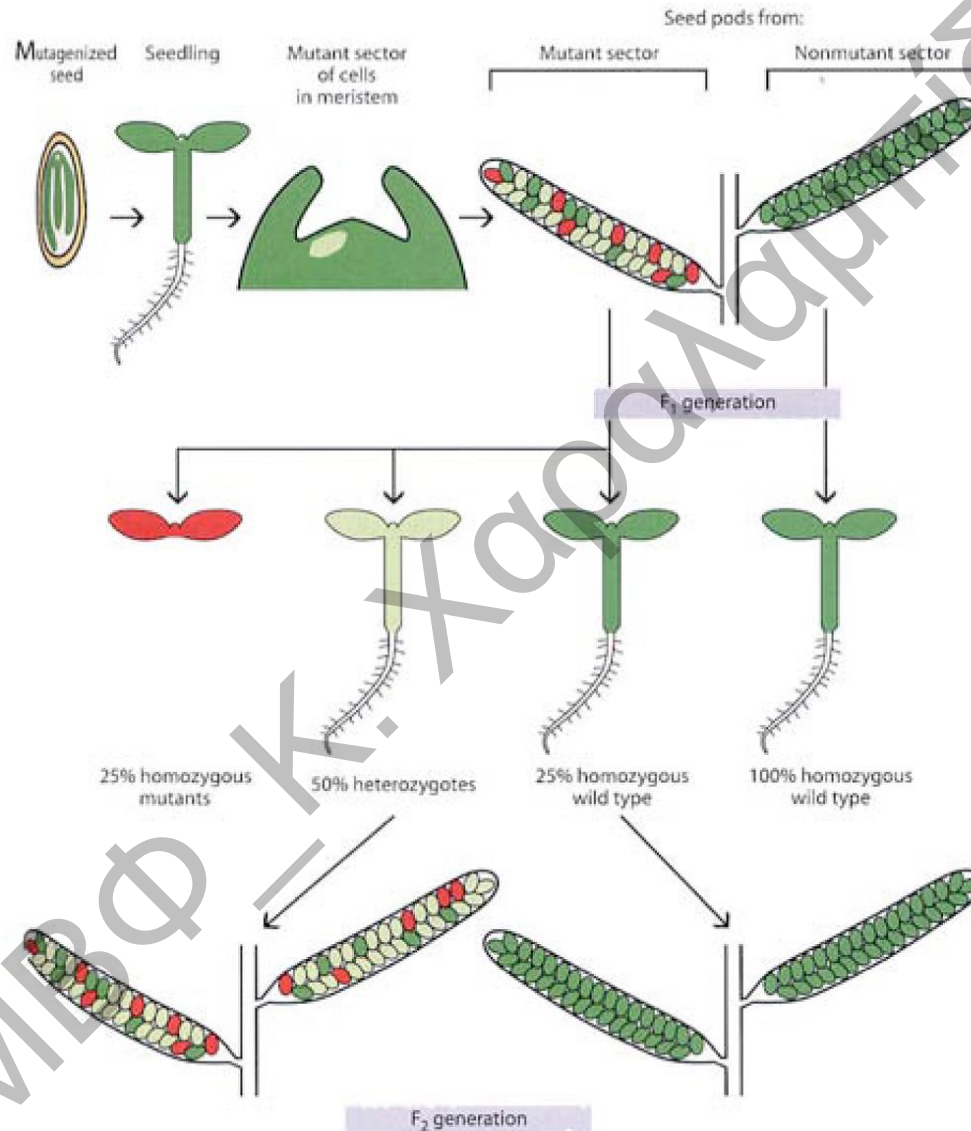


Χαρακτηριστικά της EMS μεταλλαξιγένεσης

- ✓ Μικρές συγκεντρώσεις
- ✓ Υψηλή μεταλλαξιγένεση
- ✓ Διπλά μεταλλάγματα
- ✓ Φαινότυπος ποικίλει
- ✓ Απομόνωση του γονιδίου με "κλωνοποίηση θέσης"



Μεταλλαξιγένεση και σάρωση του πληθυσμού των σπερμάτων



Σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγή του ORF

atcgatcgatcgatc**atg**ccgaagcactacagacctcctggtaagaagaagggaaggcaac
I D R S I M P K H Y R P P G K K K E G N
gccgccagatacatcaccaggtctcaagctgtcaagtaccttcaactcagtcttttctggt
A A R Y I T R S Q A V K Y L Q L S L S V
ttcaggagattatgtatcttcaaaggtatthttcccgcgggatccaaagaaaaagggtgaag
F R R L C I F K G I F P R D P K K K V K
ggaaaccaccatacctattatcacatgaaggatatcttgtttcttaaacatgagccactt
G N H H T Y Y H M K D I L F L K H E P L
cttgataaattccgtgagatgcgagcatacagagaagggtcaagaaagctatthtctaag
L D K F R E M R A Y E K K V K K A I S K
aagaacaaggatctcgctgaacgcttggtgacaagaaagcctacttacactcttgatgatg
K N K D L A E R L L T R K P T Y T L D M
aaacaagctgctgaggcaaaacaaaagatggcacttcatgaaaaacaatatcatgaagag
K Q A A E A K Q K M A L H E K Q Y H E E
agcgatgatgaagaaaatatggacgatgtgtcgcacagcaacttgттаaggatgatgag
S D D E E N M D D V S P Q Q L V K D D E
aatatgaccatggtttcaatgtcccgtaaaaagagaagactttatgaagccatgaagatt
N M T M V S M S R K K R R L Y E A M K I
tcacaaggaaggaaaaaggcaaatgtggaaactctcgagacaaggaagaaaaatattcaa
S Q G R K K A N V E T L E T R K K N I Q
aaaaacaagaaaaagtcatcagat**tga**gtcgcctcgatcagtacgatcgatc
K N K K K S S D - V A R S V R S I



Μέθοδοι Μεταλλαξιγένεσης

Στοιχεία ένθεσης (insertion elements)

απόκτηση λειτουργίας, απώλεια λειτουργίας, εύρεση γονιδίου

Βομβαρδισμός νετρονίων (fast neutral bombardment)

μικρές χρωσωμικές ελλείψεις, απώλεια λειτουργίας

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

μεταλλάξεις σημείου (G σε A), ποικίλες συνέπειες

Oligo-directed mutagenesis (ODM)

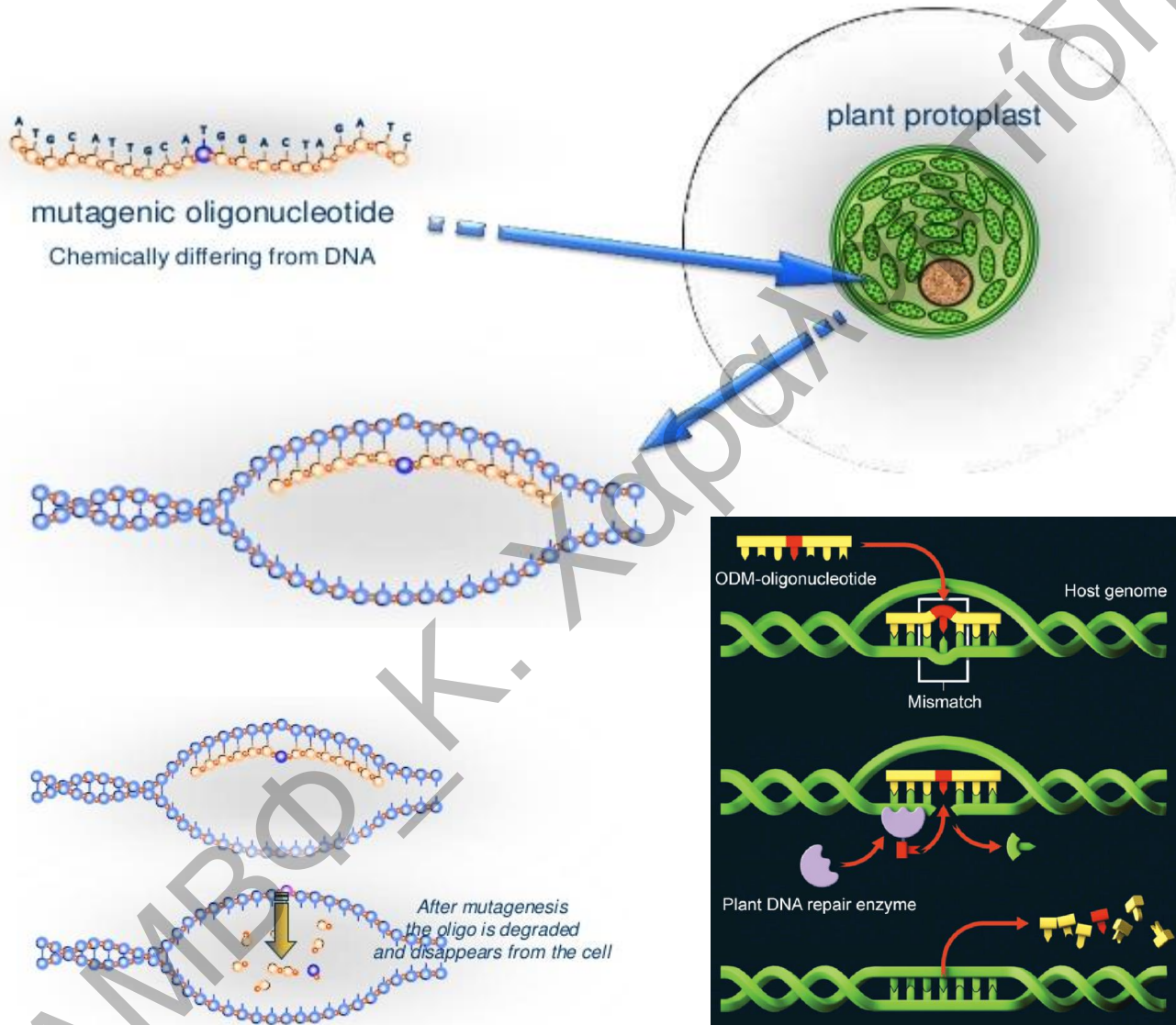
synthetic oligonucleotides homologous with a target sequence

Side-directed nucleases (SDNs) for genome editing (MN, ZGNS, TALEN, CRISPR)

γονιδιωματική παρέμβαση/επεξεργασία (gene drive)



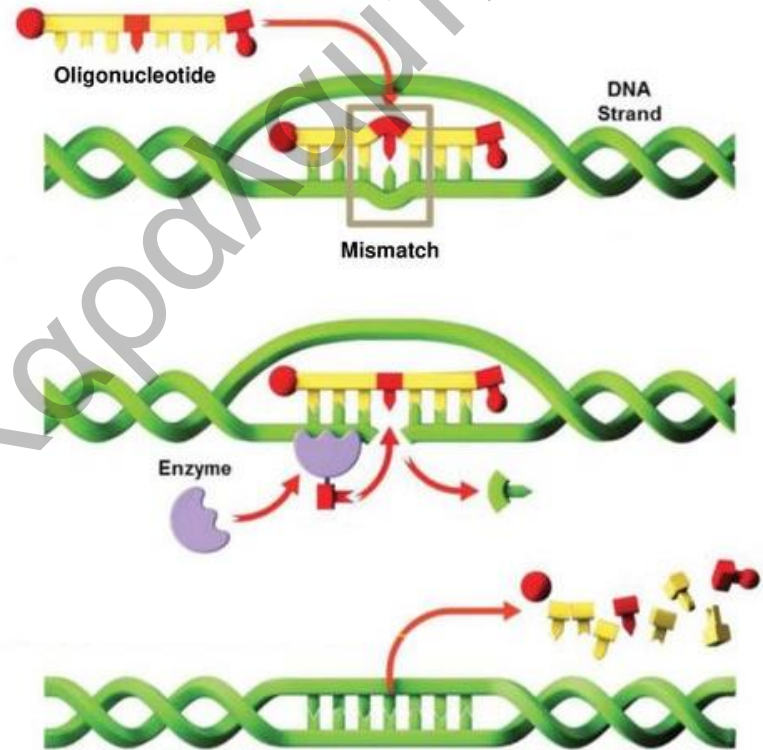
Oligo-directed mutagenesis (ODM)



Oligo-directed mutagenesis (ODM)

The chemically synthesised oligonucleotide (20 – 100 bp) has homology with the target gene except for the nucleotide(s) to be changed.

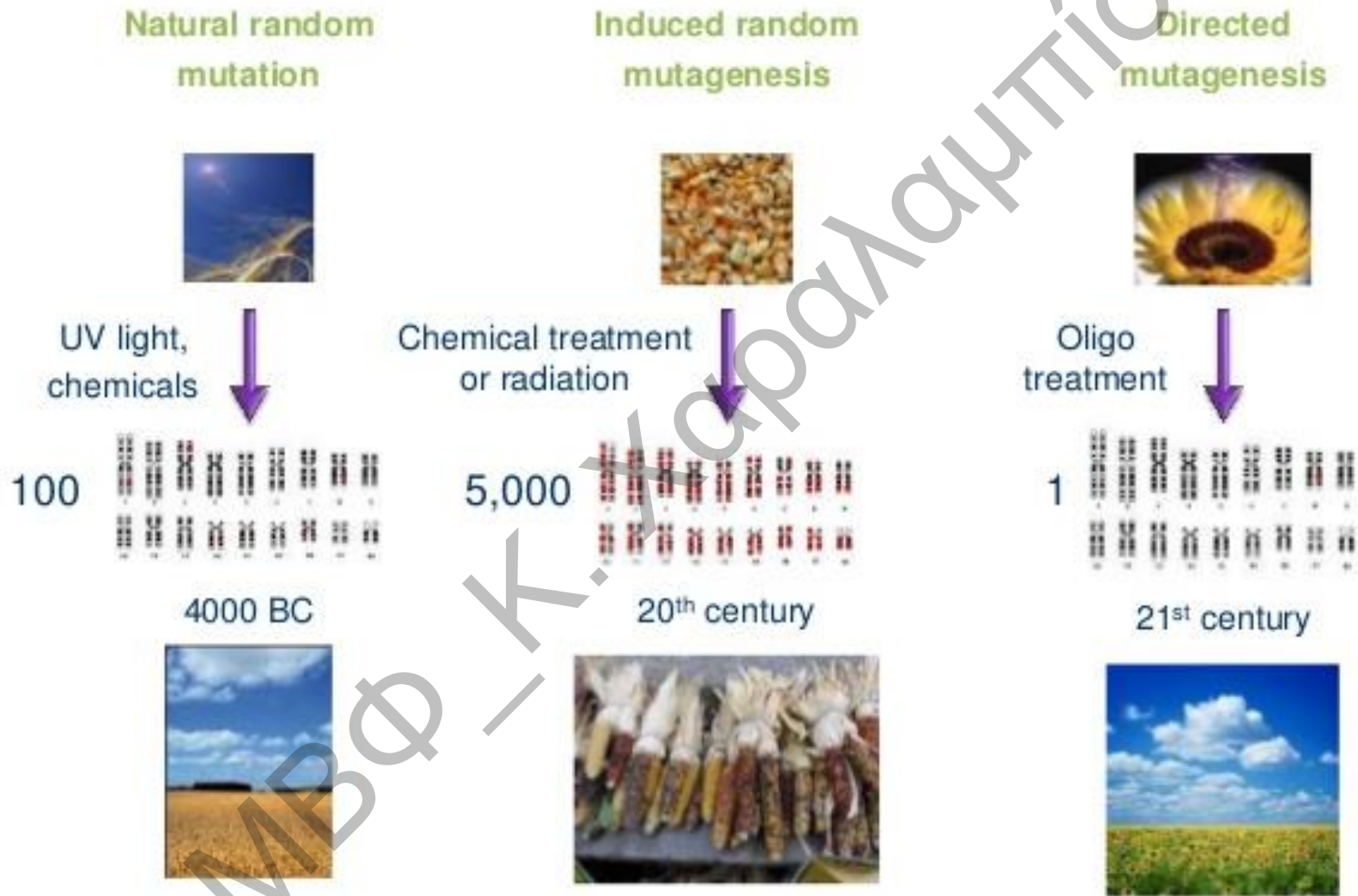
- oligonucleotides are added directly and hence do not involve a transgenic stage
- oligonucleotides themselves are not “heritable material“
- oligonucleotides act like a mutagen, but are sequence specific
- the obtained mutations cannot be distinguished from spontaneous mutations (natural variation) or mutations induced by classical mutagenesis



Modified from Songstad et al (2017) *Critical Reviews in Plant Sciences*



Oligo-directed (ODM) vs. classical mutagenesis



Μέθοδοι Μεταλλαξιγένεσης

Στοιχεία ένθεσης (insertion elements)

απόκτηση λειτουργίας, απώλεια λειτουργίας, εύρεση γονιδίου

Βομβαρδισμός νετρονίων (fast neutral bombardment)

μικρές χρωσωμικές ελλείψεις, απώλεια λειτουργίας

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

μεταλλάξεις σημείου (G σε A), ποικίλες συνέπειες

Oligo-directed mutagenesis (ODM)

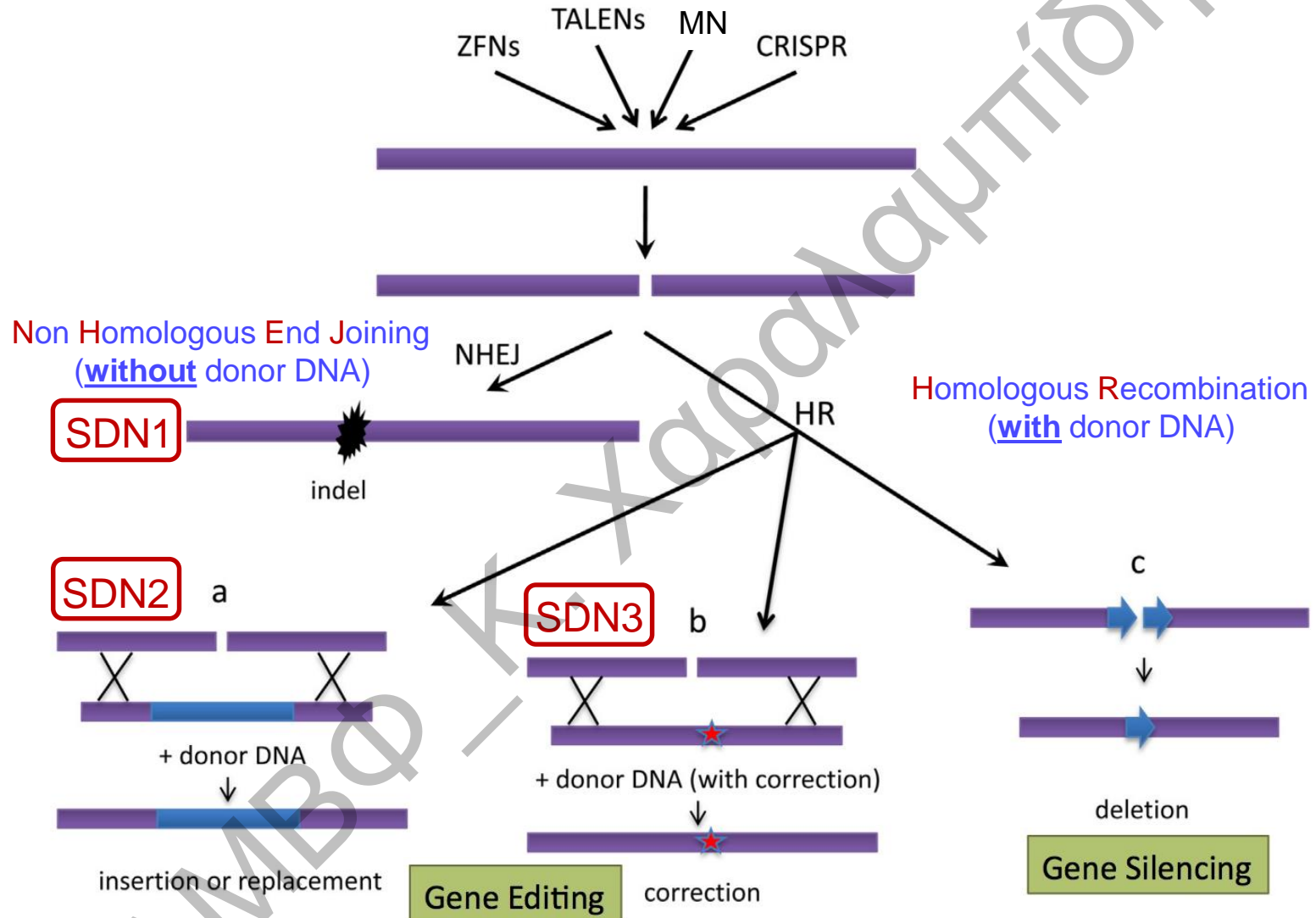
synthetic oligonucleotides homologous with a target sequence

Side-directed nucleases (SDNs) for genome editing (MN, ZGNS, TALEN, CRISPR)

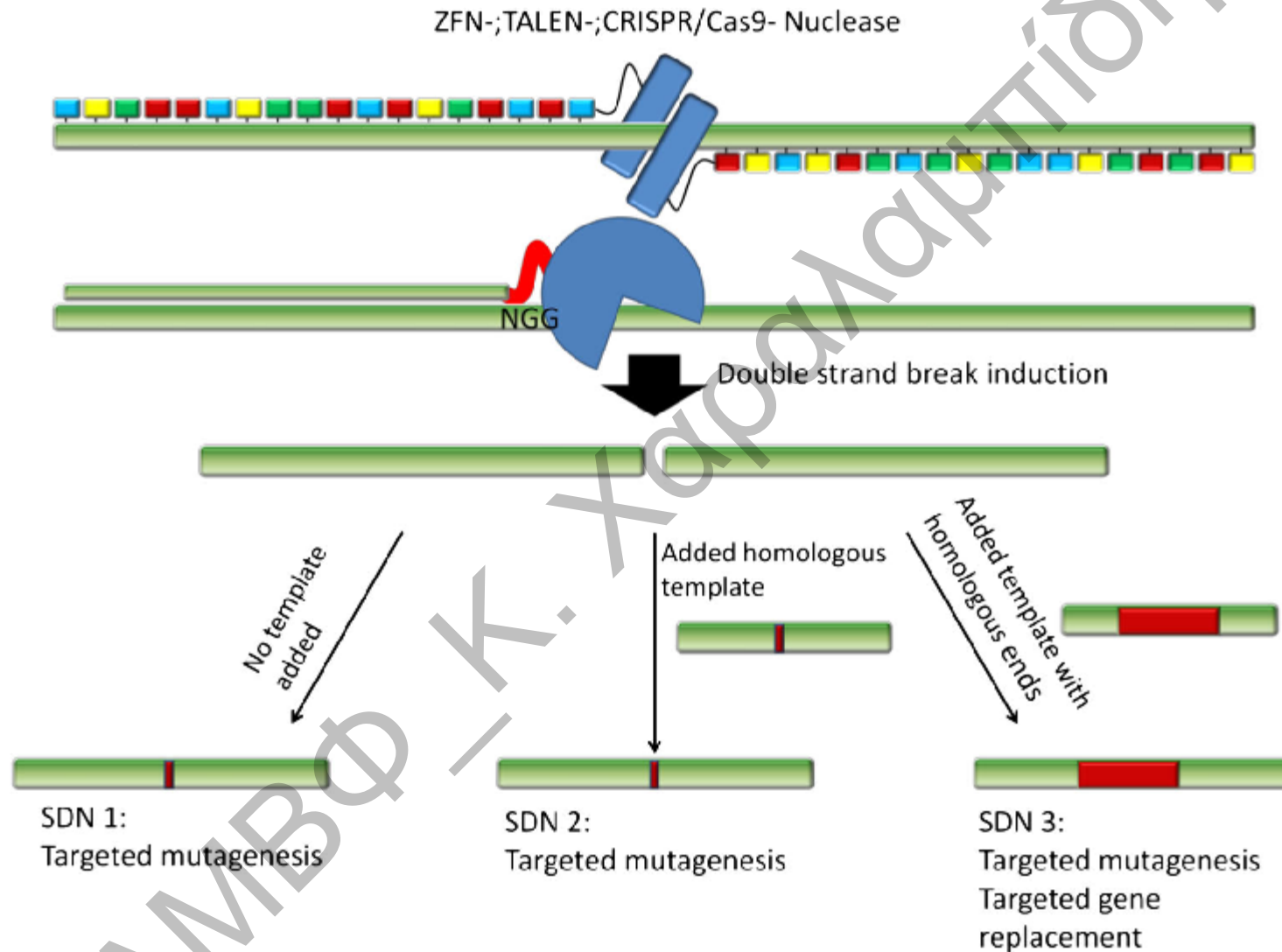
γονιδιωματική παρέμβαση/επεξεργασία



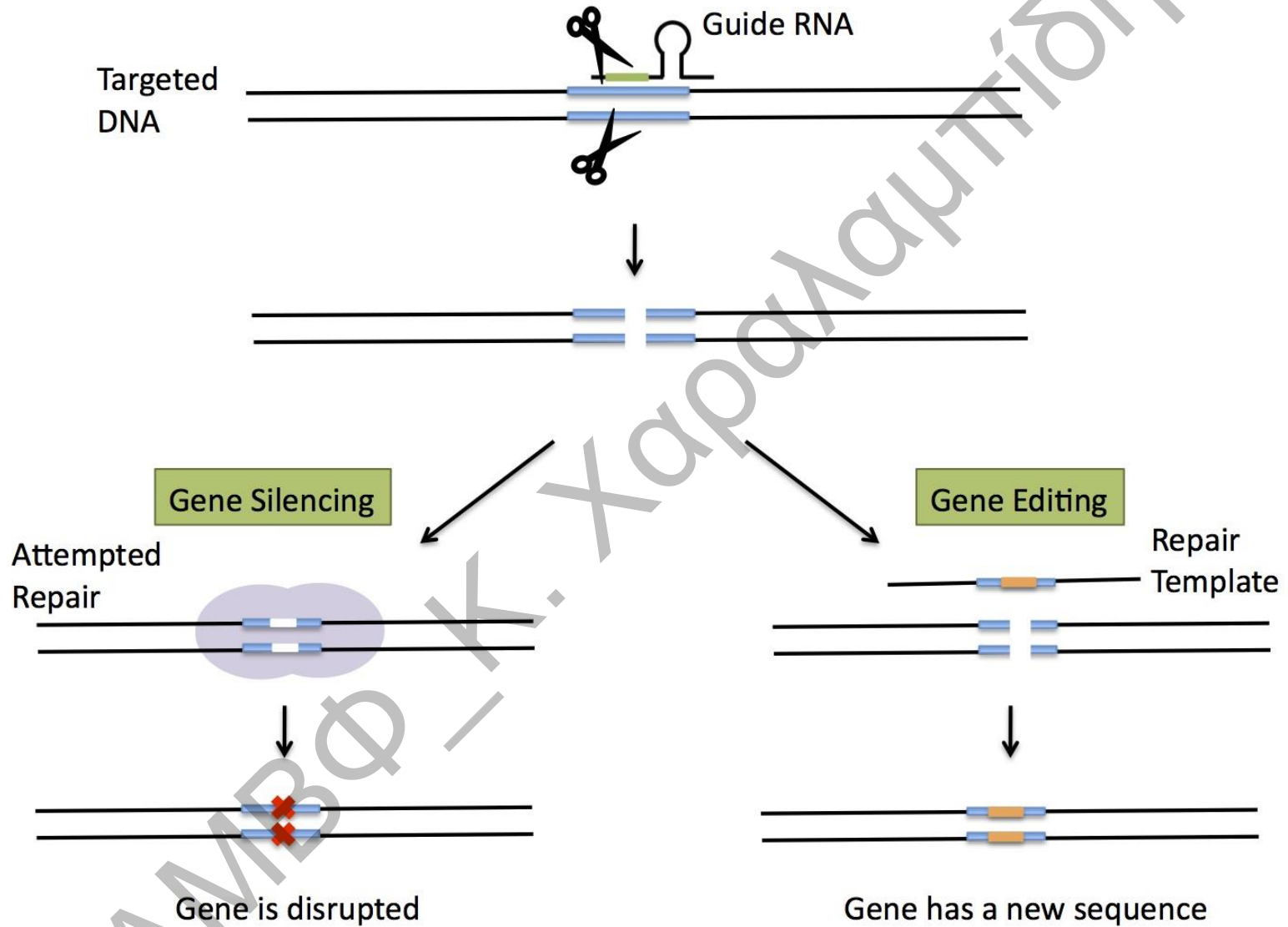
Genome editing by using Site-Directed Nuclease (SDN) technology



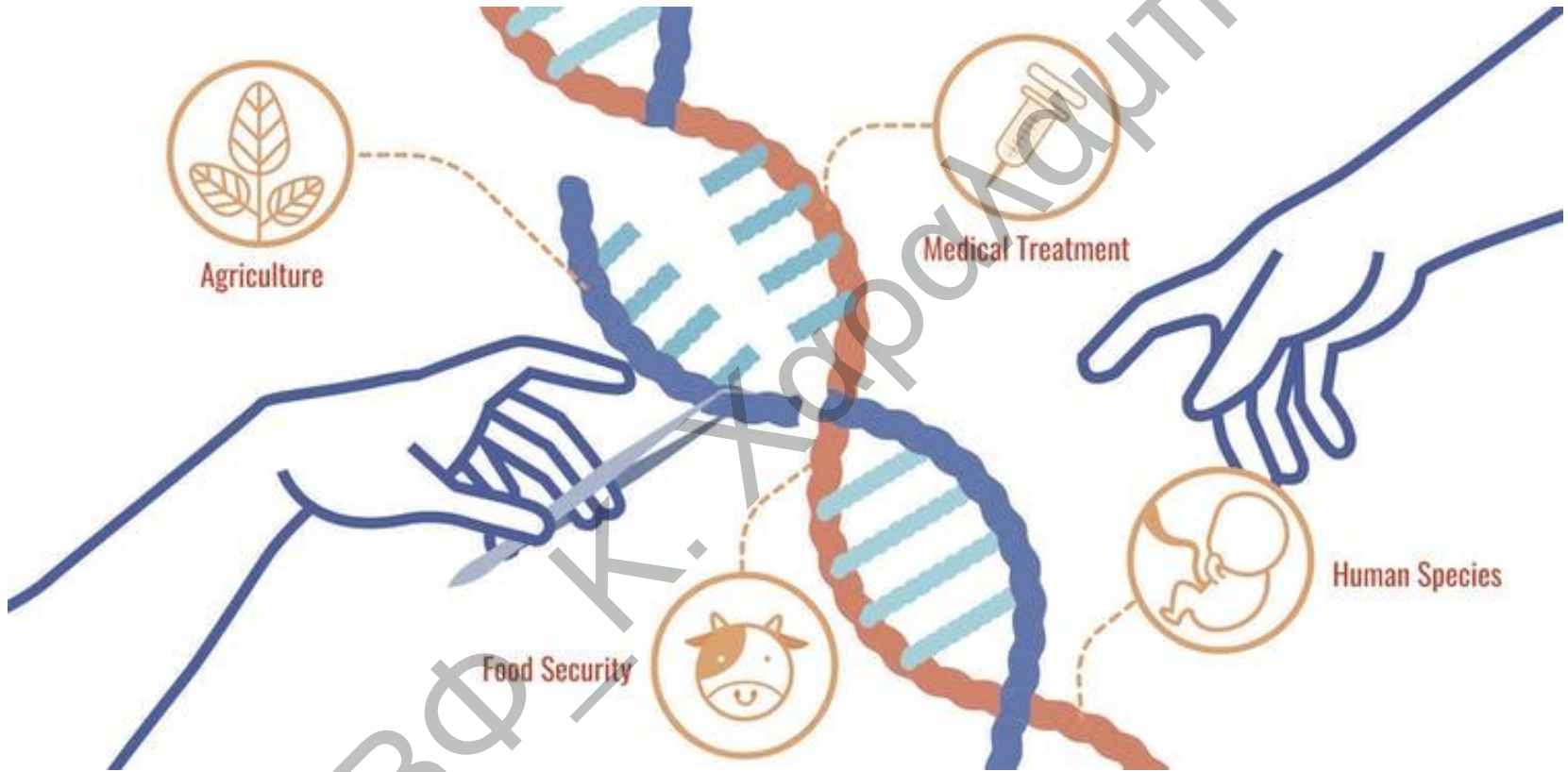
Genome editing by using Site-Directed Nuclease (SDN) technology



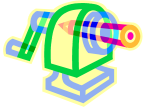
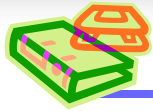
Κυρίαρχη η CRISPR (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats)



CRISPR Applications (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats)



END OF METHODS
(PART I)



Thanks for your attention

ΑΜΒΦ - Κ. Χαραλαμπίδης