

Praktikum

Genomika a bioinformatika

Kamila Novotná a Zdeněk Sedláček

Obsah učebního textu:

1. ZAMĚŘENÍ A ORGANIZACE PRAKTIKA
2. PRAKTICKÉ ÚLOHY
3. SEZNAM INTERNETOVÝCH ADRES POUŽÍVANÝCH V PRAKTIKU

1. ZAMĚŘENÍ A ORGANIZACE PRAKTIKA

1.1 Zaměření praktika

Dnešní doba je charakterizována bouřlivým rozvojem molekulární genetiky. V návaznosti na nedávno dokončené sekvenování genomu člověka, ale i dalších organismů, a vzhledem k rostoucí technické a finanční dostupnosti analýzy kompletních genomů narůstá role genomiky. To je nový vědní obor zabývající se analýzou nikoliv jednotlivých genů, ale celých genomů. Produkce obrovských množství dat plynoucí z těchto genomových projektů a z analýz využívajících jejich výsledků (např. expresní profilování s použitím kompletního souboru genů organismu, nebo vazebné či asociační studie se stovkami či tisíci polymorfních DNA markerů, pokrývajících celý genom), si vynucuje hledání efektivních možností skladování, distribuce a analýzy těchto informací. To je úkolem s genomikou velmi úzce souvisejícího oboru, bioinformatiky.

Velice důležitým aspektem moderní lékařské genetiky a genomiky je také to, že již není v možnostech jedince obsáhnout kompletní záběr těchto oborů. O to důležitější se proto stává schopnost potřebné informace mezi obrovskými objemy dostupných dat vyhledat a umět využít i nabízené možnosti jejich analýzy.

Praktikum Genomika a bioinformatika je zaměřeno na práci s internetem při řešení problémů v molekulární genetice člověka. Seznámíte se s některými databázemi a servery umožňujícími on-line analýzu dat. Podobně jako v praktiku z molekulární genetiky jsou úlohy zaměřeny klinicky a diagnosticky.

1.2 Struktura a časový rozvrh praktika

Praktikum sestává z tříhodinového bloku. Předpokladem Vaší smysluplné účasti na praktiku je znalost a zvládnutí látky předcházejících přednášek kursu lékařské biologie a předcházejících praktik. Předpokládá se nejen to, že bez zaváhání okamžitě víte, co je gen, intron, genetický kód, mutace, PCR, sekvenování atd., ale i znalost rodokmenových značek a zásad kreslení (a chápání) rodokmenů, nebo charakteristických rysů jednotlivých typů mendelistické dědičnosti.

1.3 Obecné zásady

- Neprovádějte prosím na počítačích jiné úkony či manipulace než ty, ke kterým Vás vyzvou vyučující nebo sám výukový program.
- Vlastní počítačové praktikum není nijak hodnoceno. Přestože se výukový program jistě dá mnoha způsoby ošidit, nedělejte to prosím. Svůj mozek zaměstnejte řešením úloh, a vychutnejte si celé praktikum včetně dobrého pocitu, až vlastní pílí a obratností úspěšně dorazíte do jeho závěru.
- Nekažte proto tuto radost ani těm, kteří budou praktikum absolvovat po Vás, a neprozrazujte jim způsob řešení či výsledky úloh.
- Je jistě prestiž Vaší skupiny, aby prošla výukovým programem elegantněji, rychleji a úspěšněji než skupiny ostatní. Mělo by to ale být kolektivní vítězství, a proto zaměstnejte i kolegy, kteří jsou snad v práci s internetem méně zruční.

PODĚKOVÁNÍ

Děkujeme našim kolegům Mgr. Petru Novotnému, Zdeňku Procházkovi, MUDr. Jitce Feberové, Mgr. Šárce Bendové, Aleně Finkové a Ondřeji Hrachovinovi za to, že programem zkušebně prošli, a pomohli nám jej doladit. Praktikum bylo v roce 2005 podpořeno grantem FRVŠ 535/2005. Výukový program získal na celostátní soutěži eLearning 2005, konané ve dnech 8. – 10.11. 2005 v rámci festivalu Techfilm 2005 na Univerzitě Hradec Králové, první místo a cenu EUNIS - CZ (European University Information Systems).

2. PRAKTICKÉ ÚLOHY

2.1 Technický princip výukového programu

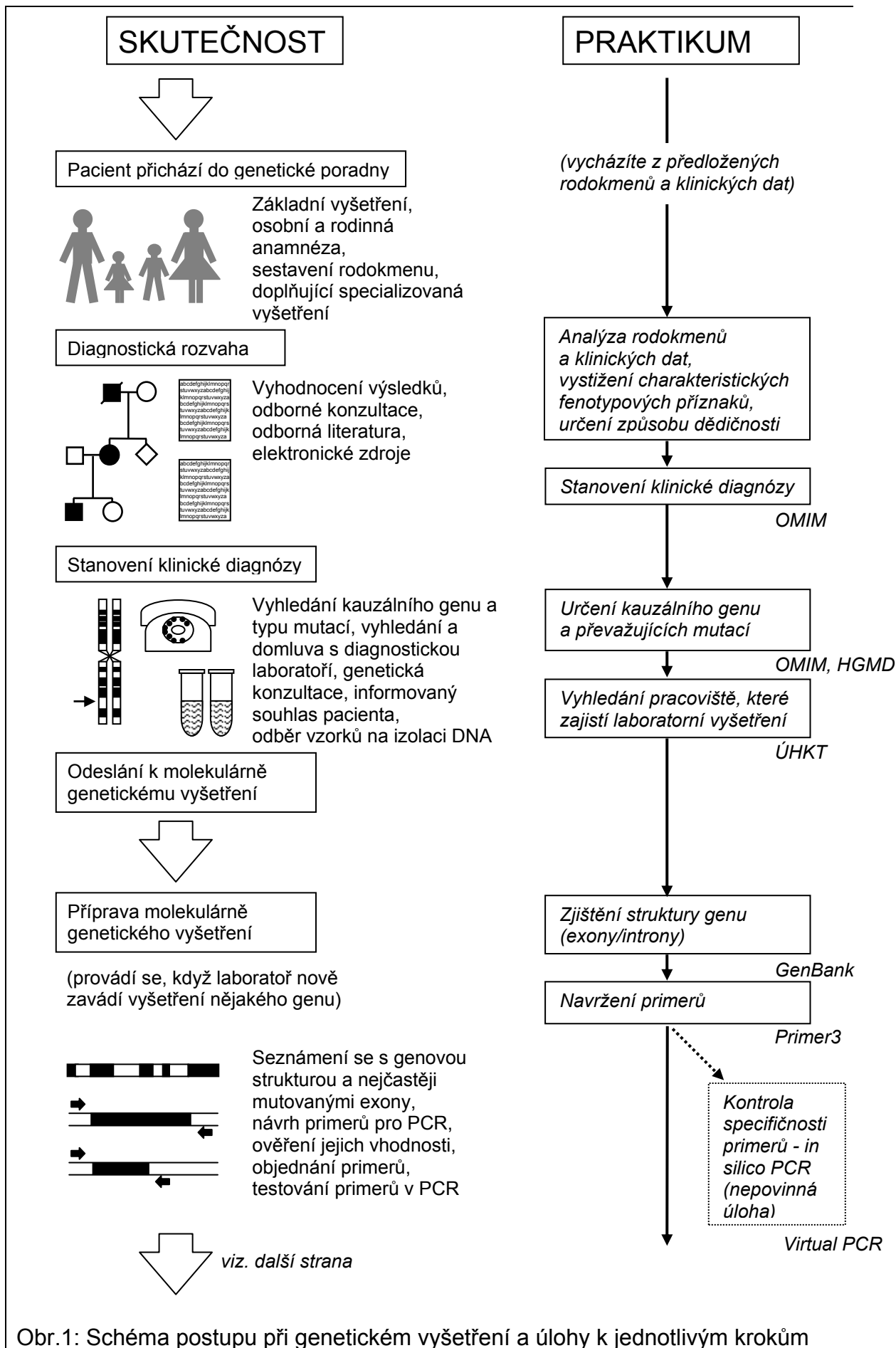
Výukový program je tvořen posloupností html souborů, kterými budete postupně procházet v prohlížeči Vám přiděleného počítače. Jednotlivé stránky obsahují zadání úloh a odkazy na databáze a severy umožňující on-line analýzu dat, které budete pro řešení úloh používat. Stránky většinou obsahují rámeček, do

kterého napíšete svoji odpověď. Pokud bude Vaše řešení správné, posunete se automaticky na další úlohu, která vždy na předchozí úlohu logicky navazuje. Celý systém obsahuje nápovědu (označeno "Nápověda") a také další internetové odkazy, které pro řešení bezprostředně nepotřebujete, ale které většinou představují alternativu nebo nadstavbu k odkazu, který jste použili (označeno "Pro pokročilé"). Tyto odkazy můžete navštívit hned, nebo, zejména pokud budete cítit časový tlak, se k nim můžete vrátit po absolvování všech základních úloh.

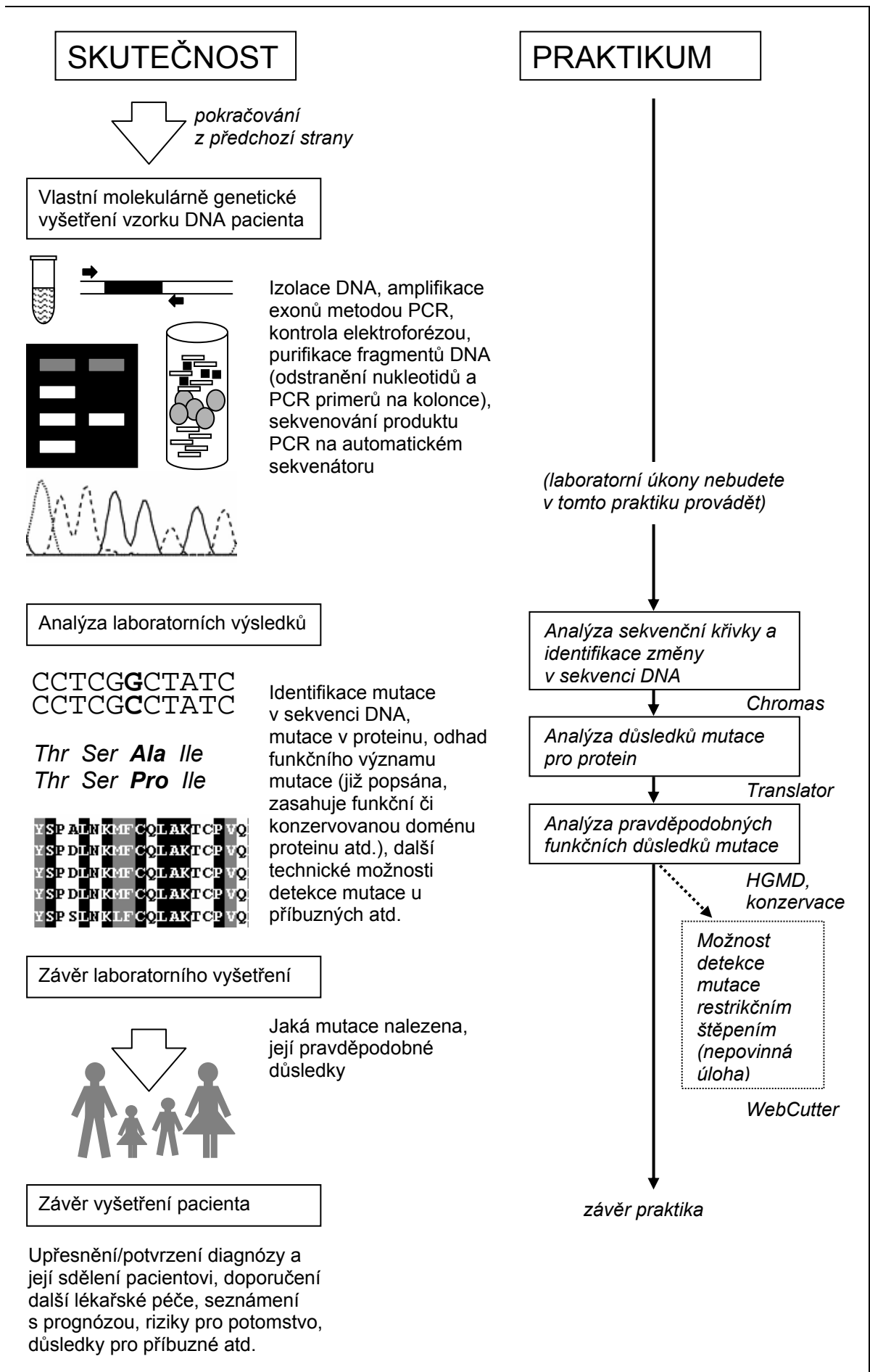
2.2 Úlohy, které budete řešit, a jejich návaznost

Praktikum obsahuje 9 úloh (plus dvě úlohy nepovinné), které přesně kopírují skutečný postup při záchytu rodiny s podezřením na monogenní dědičnou chorobu (Obr. 1), počínaje seznámením se s rodokmeny a s klinickými příznaky objevujícími se u postižených, a konče celkovým závěrem vyšetření, který se opírá o výsledky molekulárně genetické analýzy. Jednotlivé úlohy jsou zaměřeny na:

- 1) přesné vystižení typických fenotypových příznaků a způsobu dědičnosti choroby
- 2) stanovení klinické diagnózy choroby
- 3) zjištění kauzálního genu choroby a povahy nejčastějších mutací v něm
- 4) vyhledání laboratoří provádějících molekulárně genetickou diagnostiku choroby
- 5) zjištění genové struktury (exony a introny) a nukleotidové sekvence genu
- 6) návrh primerů pro amplifikaci vybraných exonů metodou PCR
 - 6a) ověření funkčnosti primerů pomocí in silico PCR (nepovinná úloha)
- 7) analýza výstupu z automatického sekvenátoru a nalezení mutace u pacienta
- 8) ověření, zda je mutace v exonu a zda vede k záměně aminokyseliny
- 9) odhad pravděpodobného vlivu mutace na funkci proteinu
 - 9b) detekce mutace restrikcí štěpením (nepovinná úloha)



Obr.1: Schéma postupu při genetickém vyšetření a úlohy k jednotlivým krokům



3. SEZNAM INTERNETOVÝCH ADRES POUŽÍVANÝCH V PRAKTIKU

1) vystižení typických fenotypových příznaků a způsobu dědičnosti choroby

2) stanovení klinické diagnózy choroby

- On line Mendelian Inheritance in Man – OMIM (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- Medline (NCBI, Bethesda, USA)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=PubMed>
- GeneClinics (University of Washington, Seattle, WA, USA)
<http://www.geneclinics.org/servlet/access?submit=Disease+&id=8888892&db=genestar%22&site=gc&fcn=y&filename=%2Freviewsearch%2Fsearchdz.html>
- NCBI Genes and Diseases (NCBI, Bethesda, USA)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=gnd.TOC&depth=1>

3) zjištění kauzálního genu choroby a povahy nejčastějších mutací v něm

- On line Mendelian Inheritance in Man – OMIM (NCBI, Bethesda, USA)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- Medline (NCBI, Bethesda, USA)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=PubMed>
- GeneCards (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael)
<http://genecards.weizmann.ac.il/>

4) vyhledání laboratoří pro molekulárně genetickou diagnostiku choroby

- databáze DNA laboratoří vedená na ÚHKT v Praze
<http://www.uhkt.cz/nrl/db/index.html?lang=cs>
- GeneTests (University of Washington, Seattle, WA, USA)
<http://www.geneclinics.org/servlet/access?id=8888892&key=IVwlgC86tqleb&fcn=y&fw=xrQb&filename=/labsearch/searchdztest.html>

5) zjištění genové struktury (exony a introny) a nukleotidové sekvence genu

- GenBank (NCBI, Bethesda, USA)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term>
- NCBI Map Viewer (NCBI, Bethesda, USA)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
- UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz, CA, USA)
<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr17:7512463-7531642&hgsid=59971372&rmsk=full>
- Ensembl (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK)
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=OTTHUMG00000142618;db=vega

6) návrh primerů pro amplifikaci vybraných exonů metodou PCR

- Primer 3 (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA)
http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
- Gene Fisher (Universita Bielefeld, Německo)
<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>

7) ověření vhodnosti primerů pomocí in silico PCR

- UCSC in silico PCR (University of California, Santa Cruz, CA, USA)
<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
- RepeatMasker (Institute for Systems Biology, Seattle, WA, USA)
<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>

8) analýza výstupu z automatického sekvenátoru a nalezení mutace

- Chromas (Technelysium Pty Ltd. Tewantin, Austrálie) - stažení programu
http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html

9) ověření, zda je mutace v exonu a zda vede k záměně aminokyseliny

- Six-Frame Translation (Zbio.net , Rusko)
http://www.molbiol.ru/eng/scripts/01_13.html
- Genetic Code Viewer (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK)
<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/mutations/trtables.cgi>
- ClustalW (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK)
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>
- Transseq (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK)
<http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>

10) odhad pravděpodobného vlivu mutace na funkci proteinu

- Human Gene Mutation Database (HGMD) (Cardiff University, UK)
<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120445.html>
- Database of Germline TP53 Mutations (2. LF UK Praha)
http://www.lf2.cuni.cz/projects/dbu06_05.xls
- ClustalW (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK)
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>

restrikční štěpení – nepovinná úloha

- Webcutter (Universita Göteborg, Švédsko)
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>
- REBASE (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>
- NEB Cutter (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

stránky či databáze shrnující bioinformatické odkazy

- Introduction to Bioinformatics: online tools (Přírodovědecká fakulta UK Praha)
<http://kfrserver.natur.cuni.cz/cz/edu/bioinfo/shared/links.html>
- Bioinformatics Links (Ústav molekulární genetiky AV ČR Praha)
<http://bio.img.cas.cz/links/>
- ExPASy Life Sciences Directory (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Švýcarsko)
<http://www.expasy.org/links.html>
- 123 Genomics
<http://www.123genomics.com/>
- Clinical Genetics Computer Resources (University of Kansas, Kansas City, USA)
<http://www.kumc.edu/gec/prof/genecomp.html>
- The Sequence Manipulation Suite (University of Alberta, Edmonton, Kanada)
<http://bioinformatics.org/sms2/>

Prostor pro Vaše poznámky: