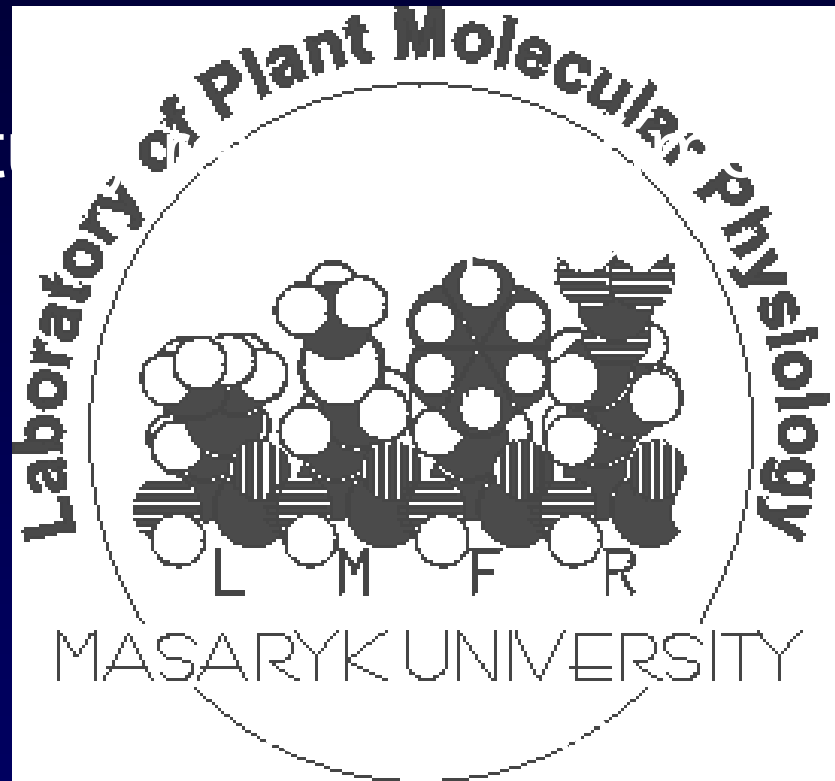


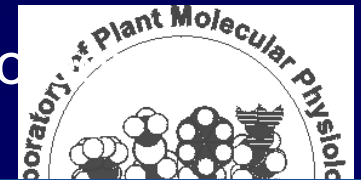
Základy genomiky

IV. Příst

genetiky



Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a pro
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin



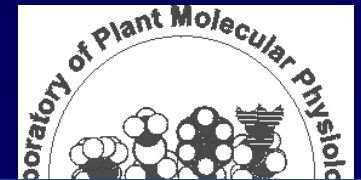
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika IV.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - poziční klonování



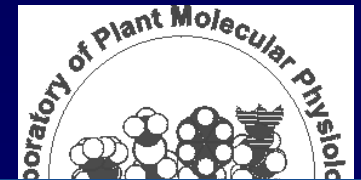
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Přístupy „klasické“ genetiky *versus* „reverzně genetický“ přístup ve funkční genomice *Arabidopsis thaliana*

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

„Přímě genetický“ přístup

EMS



1. IDENTIFIKACE FENOTYPU
2. GENETICKÉ MAPOVÁNÍ
3. GENOVÁ IDENTIFIKACE
-poziční klonování

„Reverzně genetický“ přístup

T-DNA

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

h x n

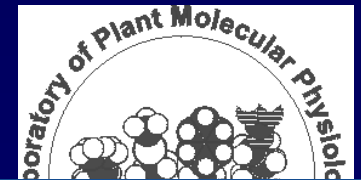
(retro)transposons



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu



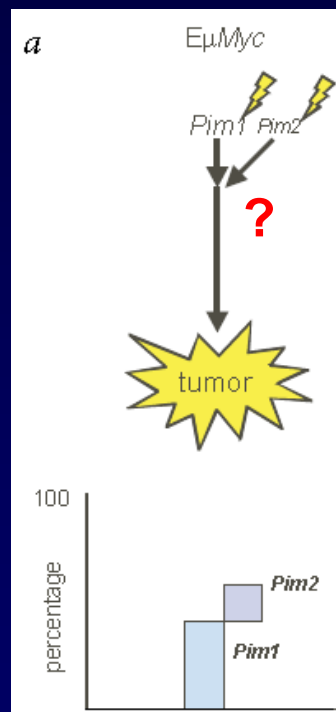
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
 - Infekce EμMyc myší retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které vznikly díky aktivaci Pim kináz (ve 40% aktivaci *Pim1* a v 15% aktivaci *Pim2*), molekulární cíle těchto kináz byly neznámé
 - Infekce EμMyc *pim1* mutantů retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které obsahují v 90% inzerci v blízkosti (aktivaci) *Pim2*
 - Infekce EμMyc dvojnásobných mutantů *pim1*, *pim2* retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, u kterých lze očekávat aktivaci buď některého ze signálních partnerů Pim proteinů (Y), některého z proteinů Pim signální dráhy (X) nebo k aktivaci některé z příbuzných drah vedoucích k lymfomogenezi (Z)



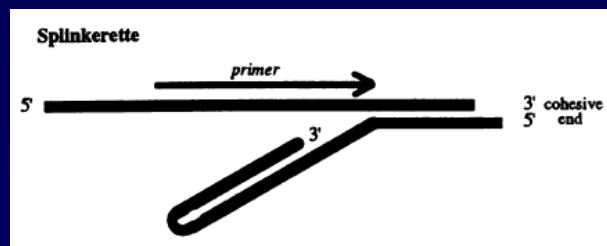
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

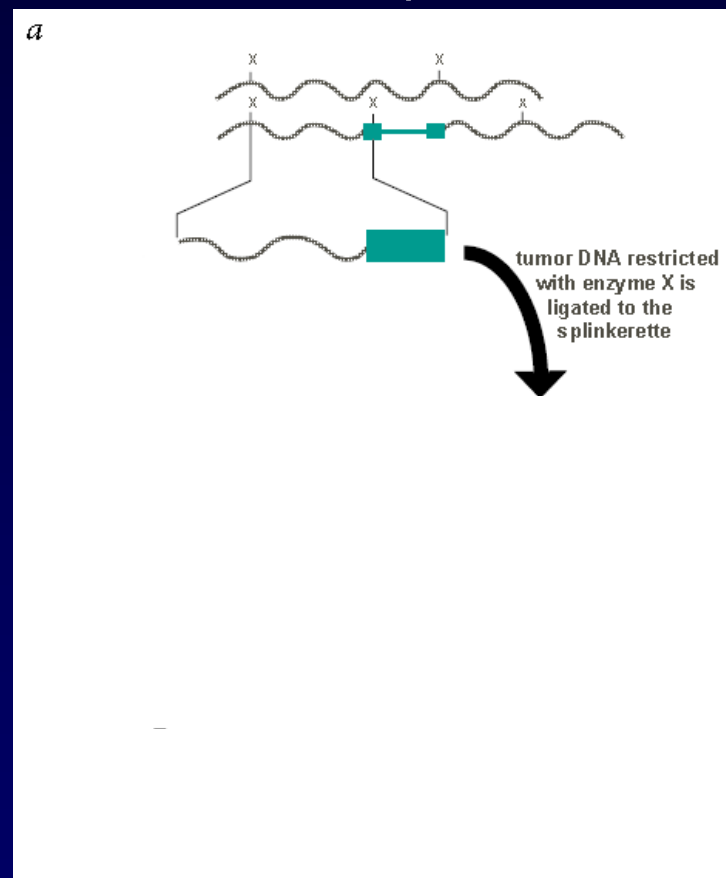
Izolace genomových oblastí přilehajících k místu inzerce proviru

- Štěpení genomové DNA a ligace speciálních linkerů, tzv. *splinkerett* (zvýšení specificity amplifikace)
- První amplifikace pomocí specifických primerů
- Druhá amplifikace pomocí „nested“ primerů (zvýšení specificity)
- Lokalizace oblastí přilehajících k provirusu vyhledáváním v anotovaných databázích myšního genomu



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)

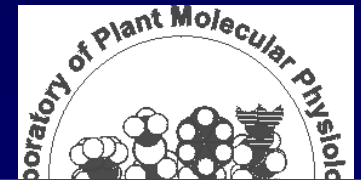
Mikkers et al., Nature Gen (2002)



Genomika III.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

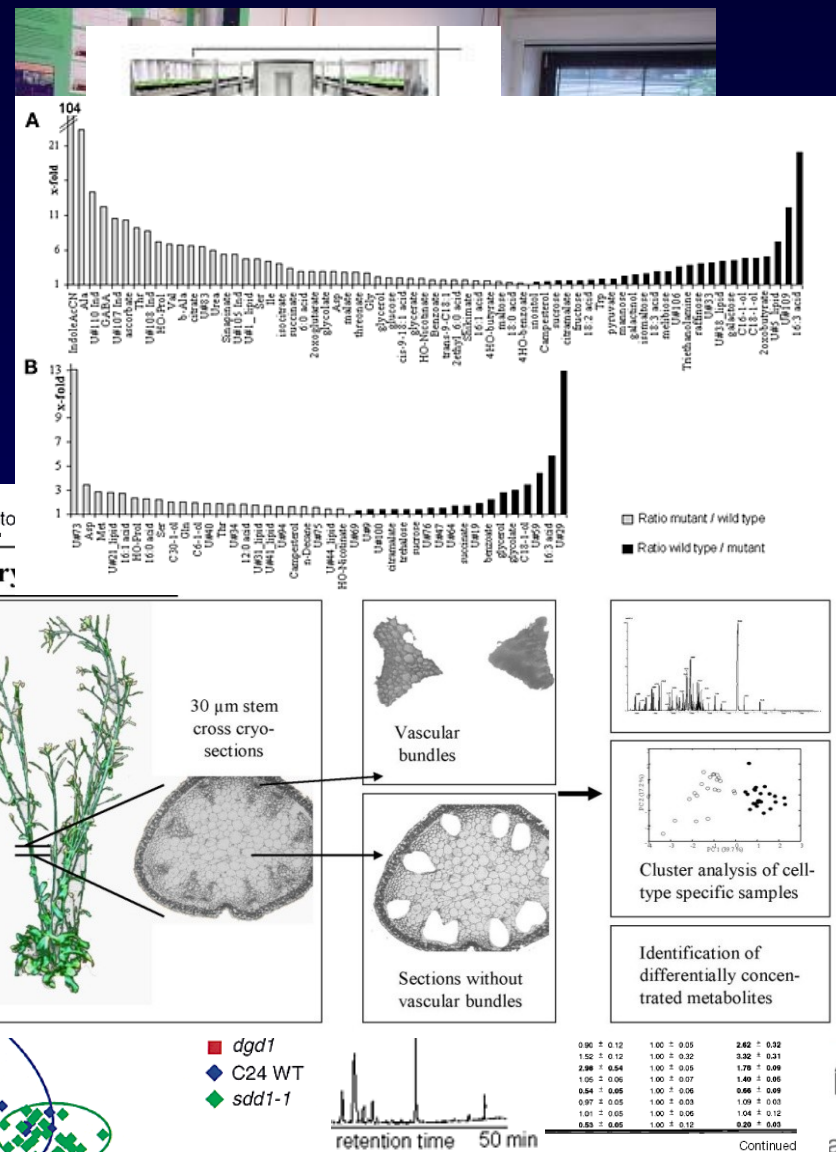
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

Přístupy genetiky přímé-metabolomika a metabolické profilování

Metabolické profilování rostlin

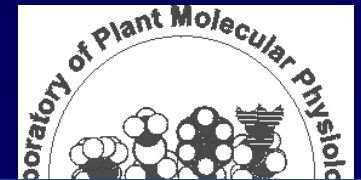
- hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů
- identifikace (např. i komerčně) zajímavých mutantů
- snadná a rychlá izolace a identifikace T-DNA zasažených mutantů
- možnost využít i speciální mikrodisekce



Genomika IV.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů a molekulárních markerů



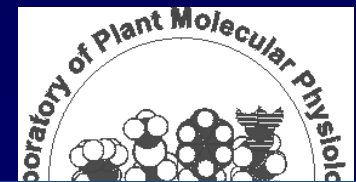
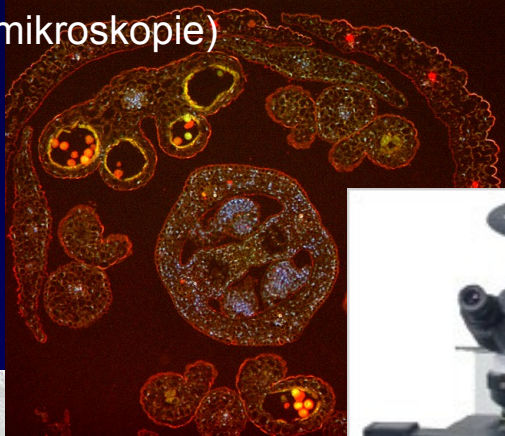
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika IV.

Identifikace mutantů se změnou expresního profilu

- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
 - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese
 - možnost částečné automatizace (virtuální digitální mikroskopie)





.slide microscope



EVROPSKÁ UNIE

est

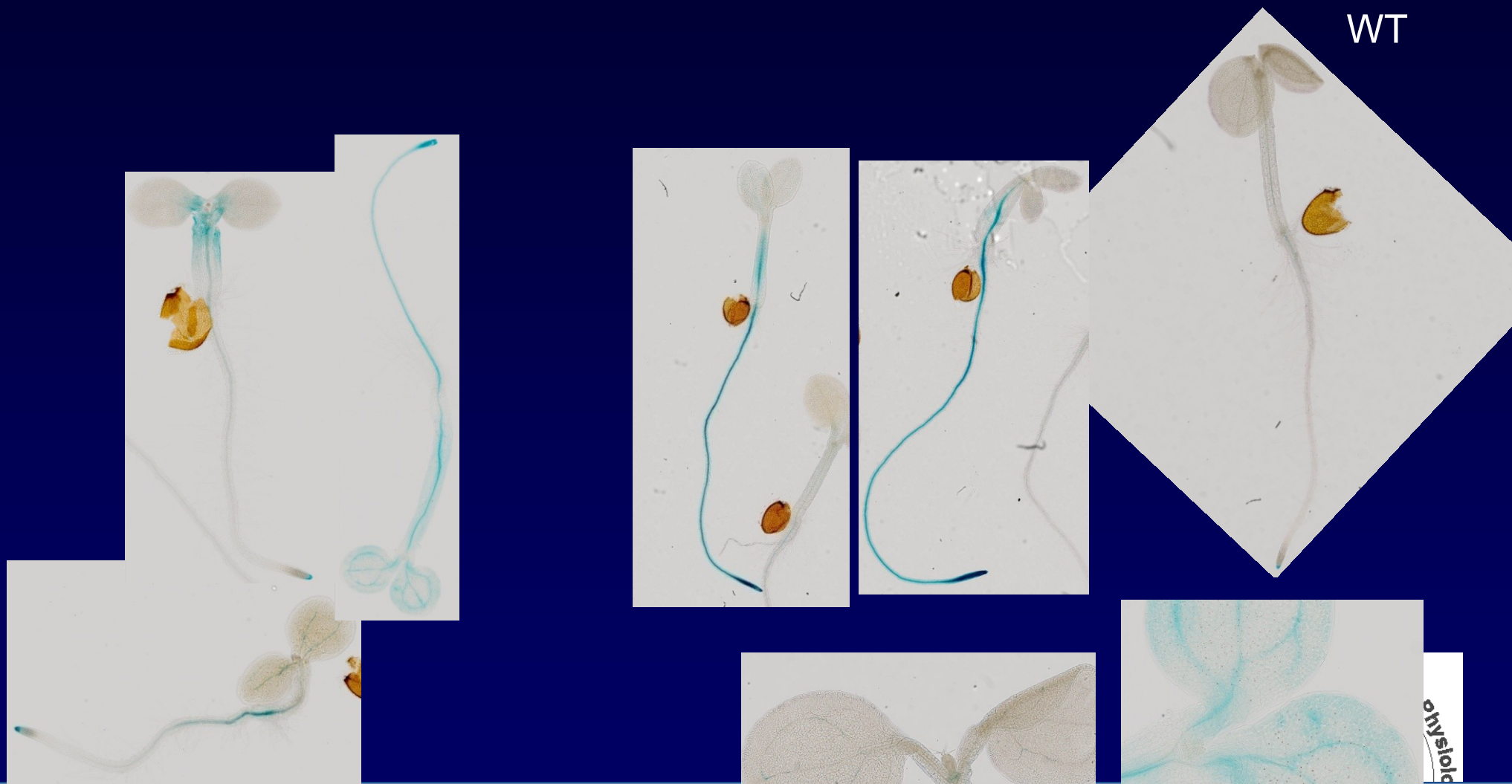


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

pro ka

Genomika IV.

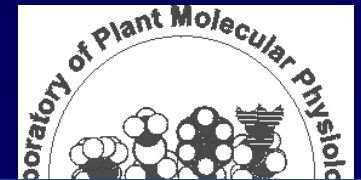
Identifikace mutantů se změnou expresního profilu



Genomika IV.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

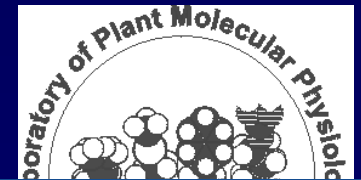
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

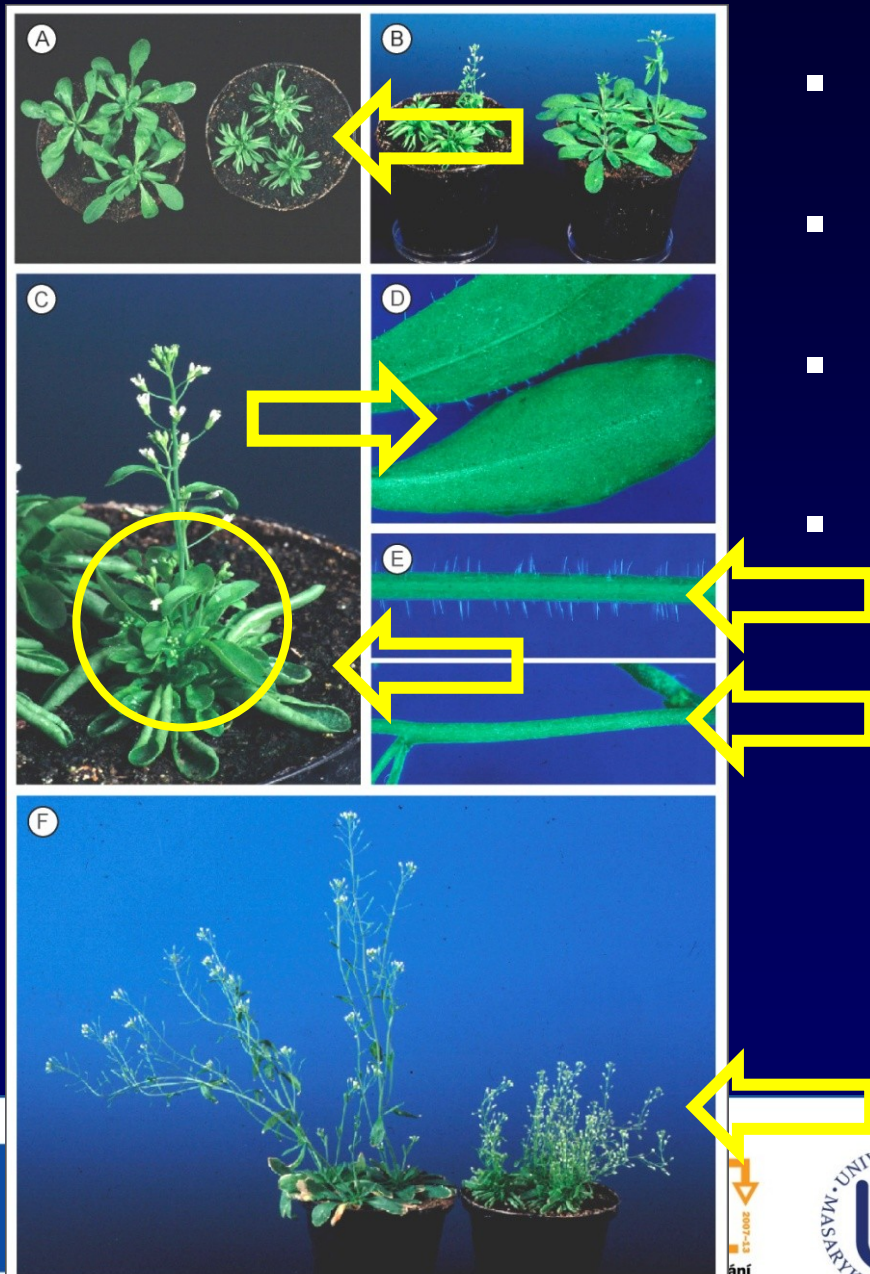
- popis fenotypu



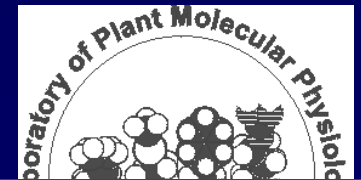
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Identifikace mutantního fenotypu



- zvlňené listy
- keřčkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí

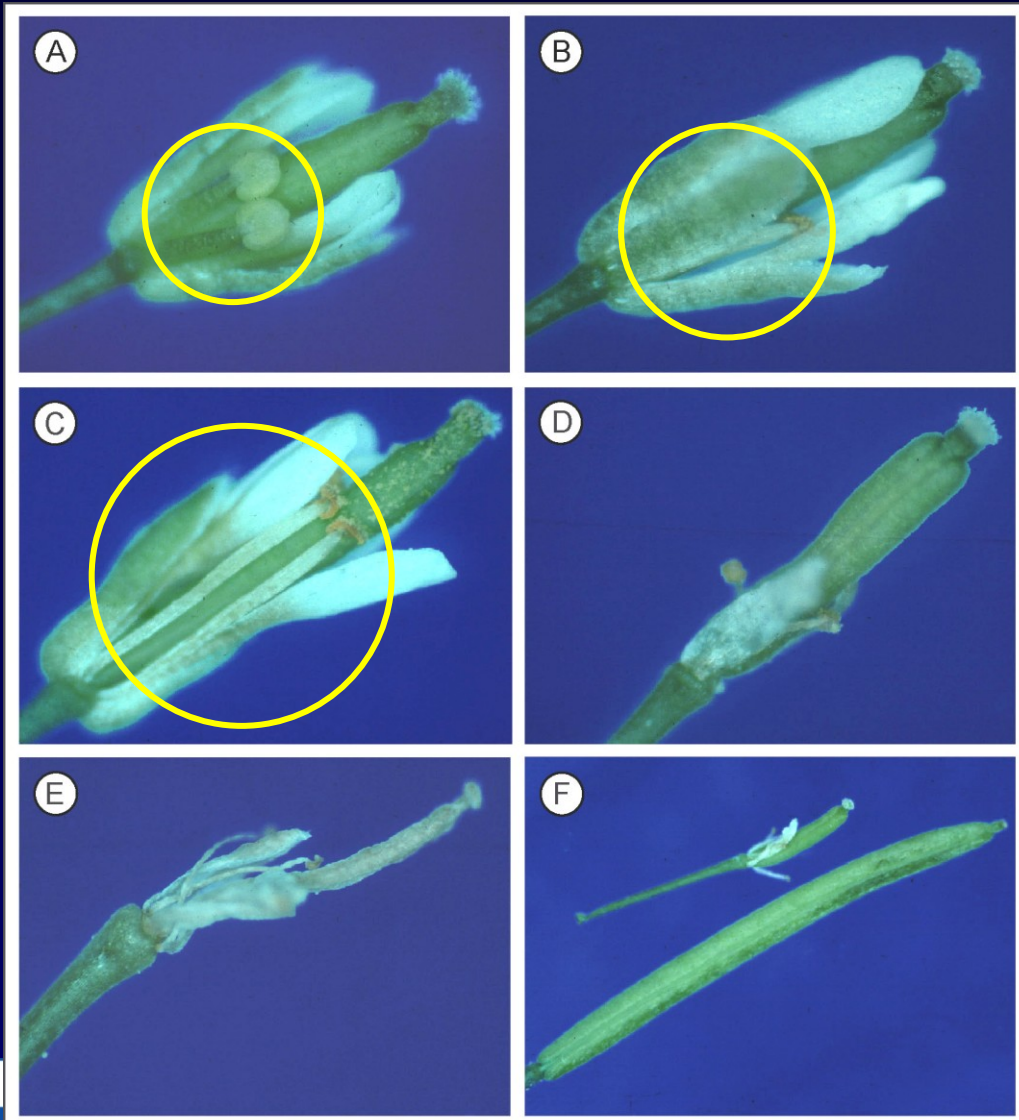


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

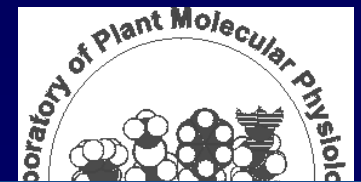
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



The Mutant Phenotype Identification



- Samčí sterilita, poruchy v prodlužování tyčinek (A,B) (porovnej se standardním typem C)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

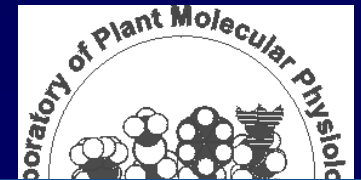
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

- popis fenotypu
- identifikace T-DNA mutované oblasti

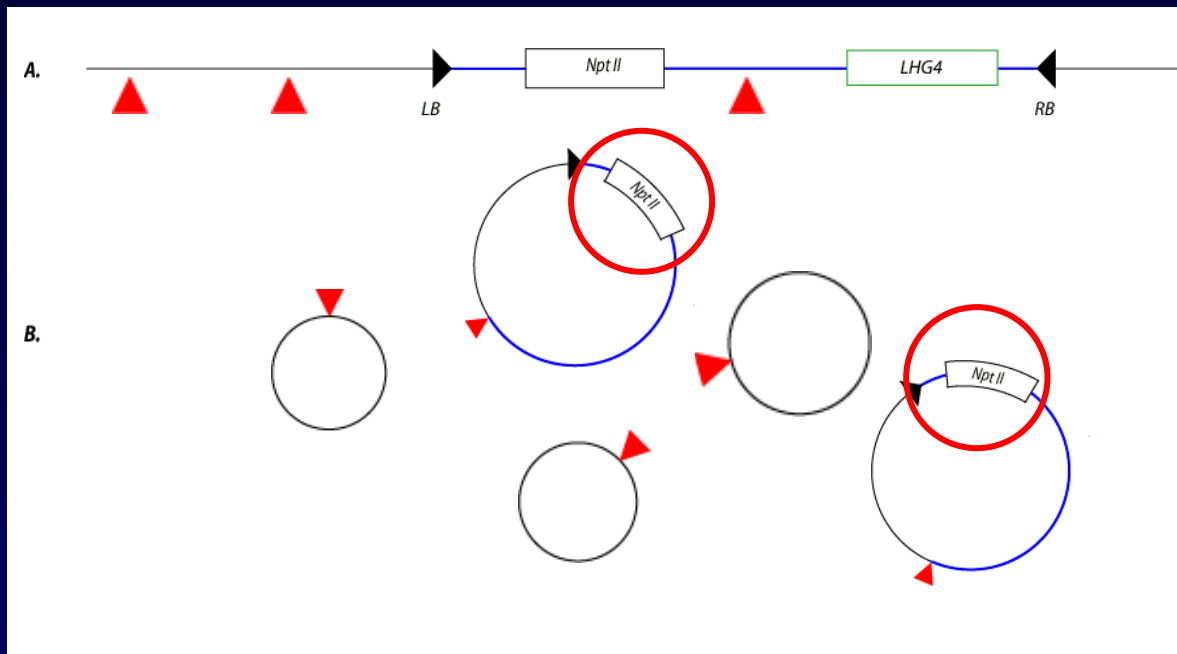


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

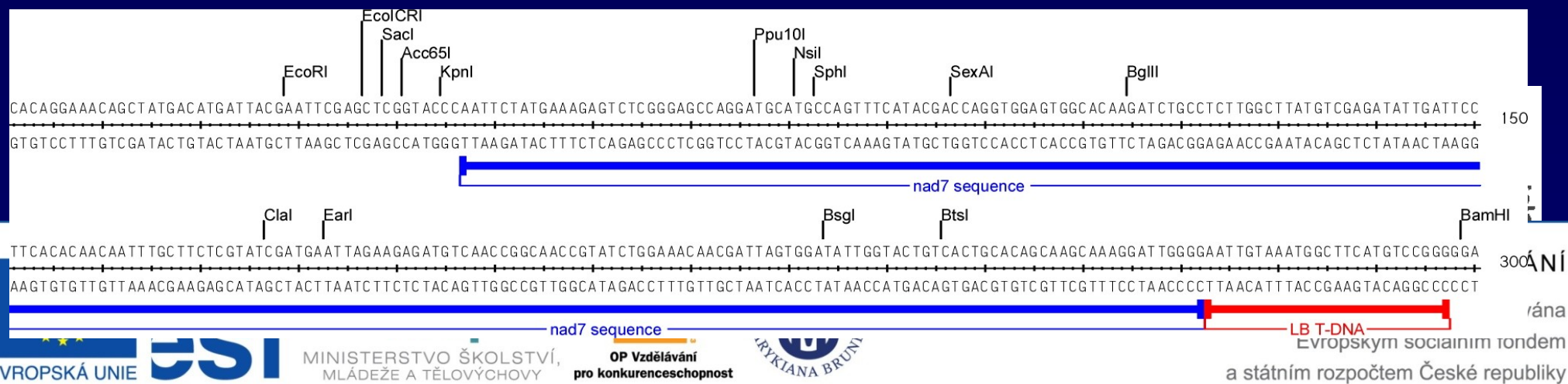
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Mutant Locus Identification

1. Identifikace oblasti genomové DNA přiléhající k *levé hranici* pomocí *plasmid rescue*

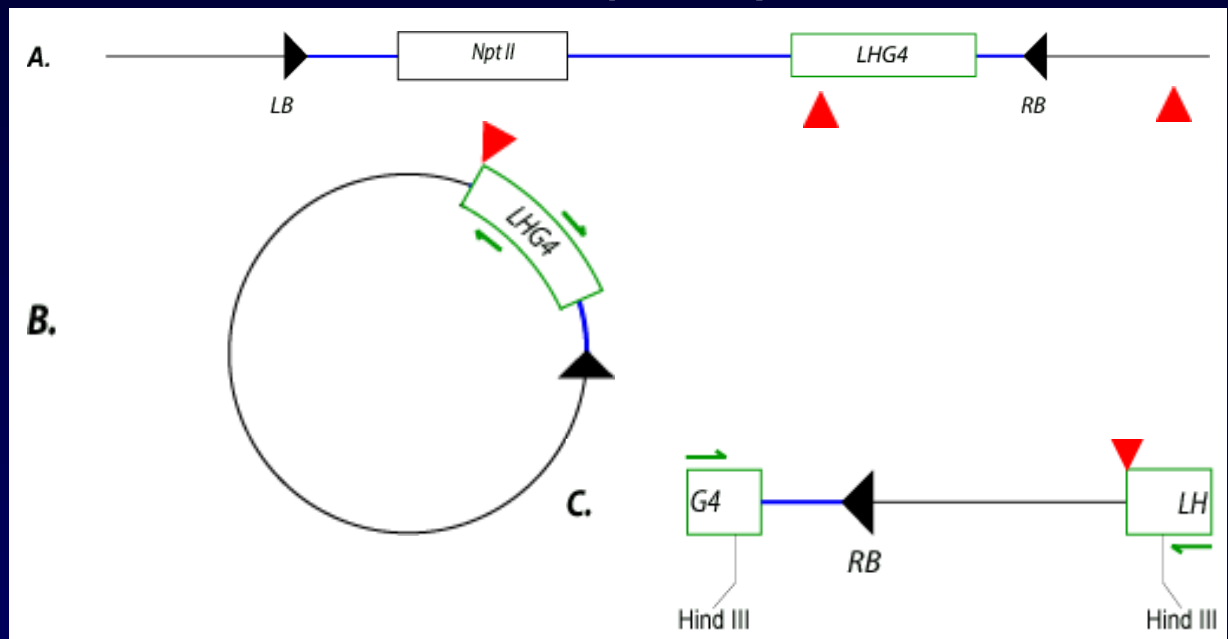


- restriční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence je identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA

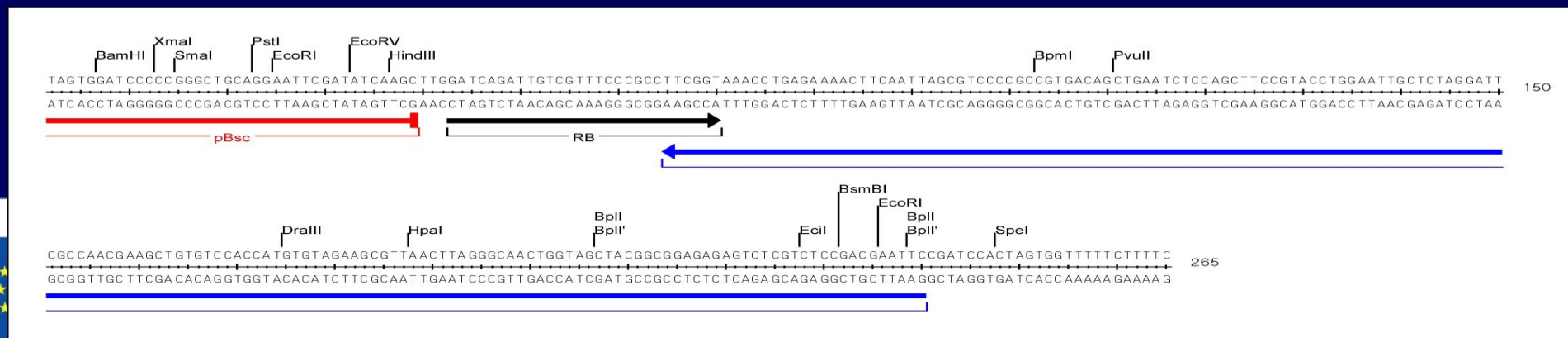


Mutant Locus Identification

2. Identifikace oblasti genomové DNA přiléhající k *pravé hranici* pomocí *inverzní PCR (iPCR)*



- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- purifikace, religace a PCR pomocí T-DNA specifických primerů
- klonování a sekvencování
- identifikovaná sekvence nebyla homologní k žádné sekvenci se známou funkcí

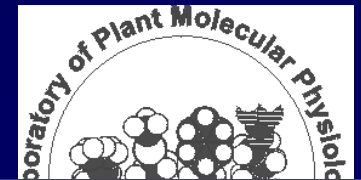


Genomika IV.

Přístupy genetiky „přímé“ – využití T-DNA mutageneze

Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*

- popis fenotypu
- identifikace T-DNA mutované oblasti
- lokalizace T-DNA inzerce v genomu *Arabidopsis*

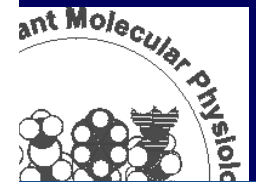
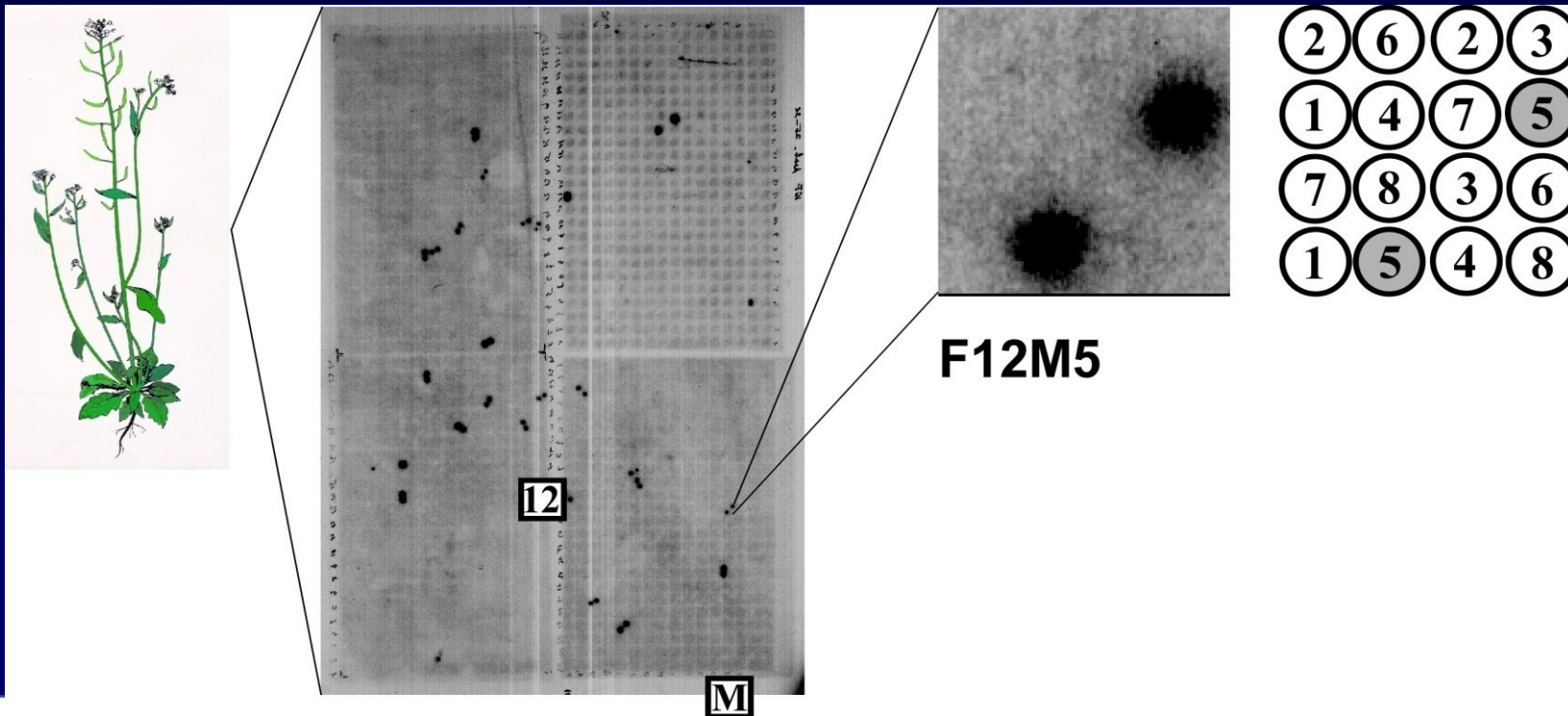


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Vyhledávání v knihovně IGF-BAC

- genomová knihovna obsahující 10,752 klonů s průměrnou velikostí inzertu 100 kb
- bakteriální klony uspořádané v mikrotitračních deskách
- knihovna nanesena na nylonové filtry pro hybridizaci s radioaktivně značenou sondou



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

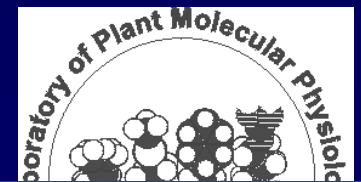
Mapování pomocí IGF-BAC databáze

I. Sekvence přiléhající k levé hranici T-DNA

- celkem 28 pozitivně hybridizujících klonů
- 19 z nich lokalizováno na chromozomu 2
- 18 s podobností k mtDNA

II. Sekvence přiléhající k pravé hranici T-DNA

- celkem 6 pozitivně hybridizujících klonů
- všechny lokalizovány na chromozomu 2



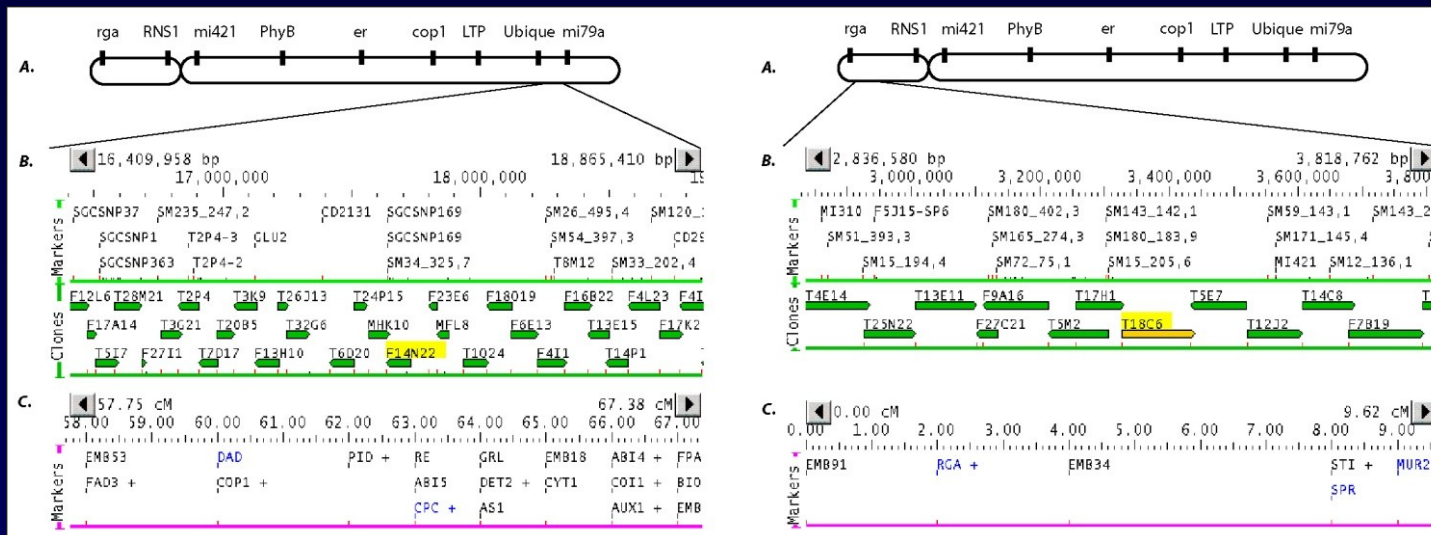
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

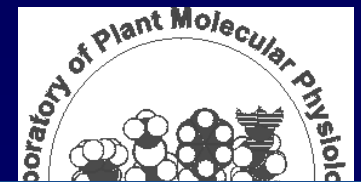
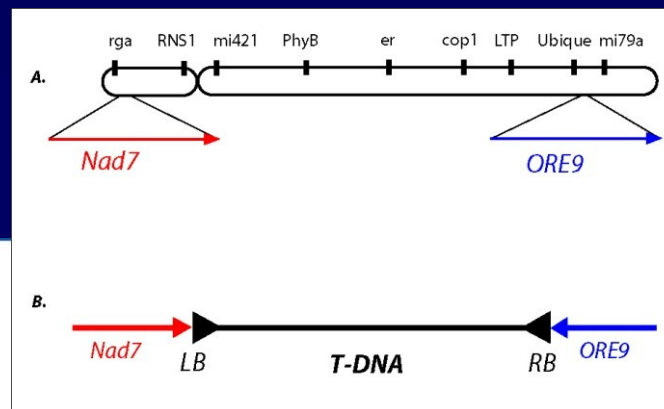
Lokalizace genomové T-DNA přiléhající k levé i pravé hranici T-DNA na chromozomu 2

Sekvence přiléhající k **pravé** a

levé hranici T-DNA



- pravděpodobně došlo k inverzi téměř celého chromozómu



VESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
pro konkurenceschopnost

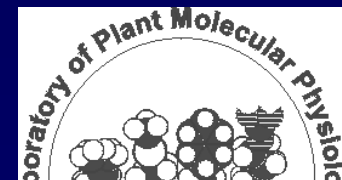
pro konkurenceschopnost

KIANA BRU

Genomika IV.

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - vnějšího fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - poziční klonování



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

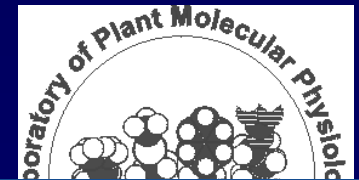
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

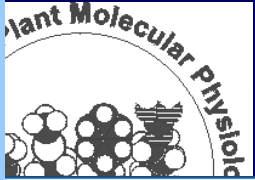
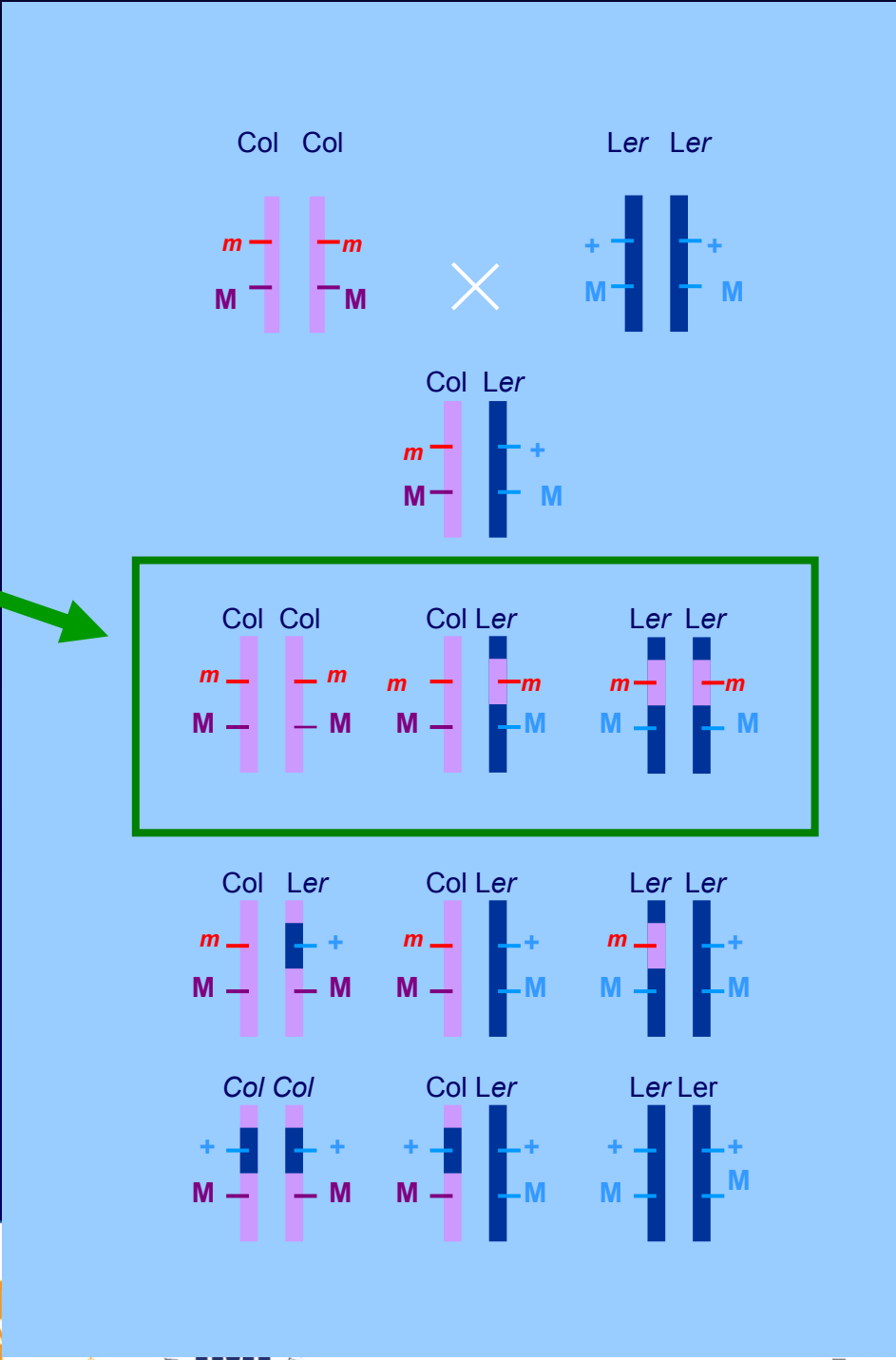
Přístupy genetiky přímé-fragmentační analýza a poziční (map-based) klonování

■ Poziční klonování

- podstatou je kosegregační analýza segregující populace (většinou potomstva informativního zpětného křížení) s molekulárními markery
 - SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism)
 - polymorfismus délky genu (PCR produktů) amplifikovaného pomocí specifických primerů
 - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - polymorfismus délky restričních fragmentů úseků genu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů)
 - CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
 - polymorfismus délky restričních fragmentů úseků genu amplifikovaných pomocí PCR
 - RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
 - polymorfismus délky náhodně (pomocí krátkých primerů, 8-10 bp) amplifikovaných úseků genu
 - AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
 - polymorfismus délky fragmentů genu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů)



Příprava mapovací populace

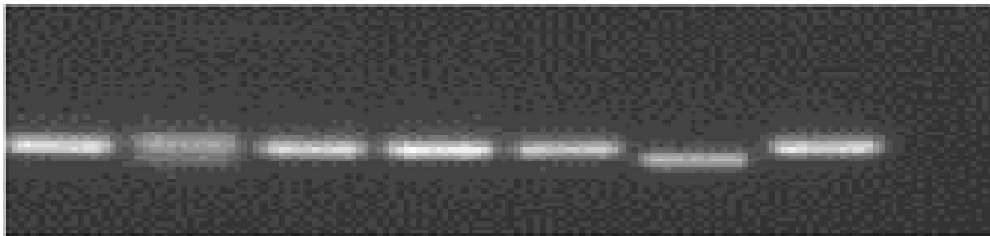


Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

$$r [\%] = \frac{\text{počet chomozomů Col}}{\text{počet všech chromozomů}} \times 100$$

F2 mutanti

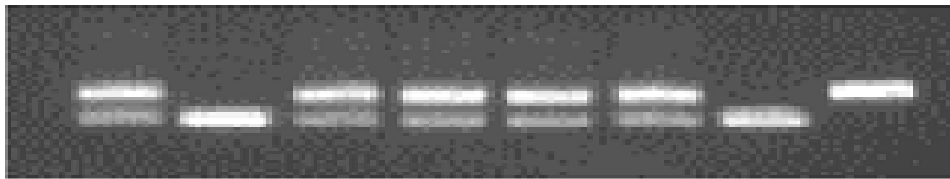
Ler Col



marker I – ve vazbě
5 mutantů
 $1/10 \times 100 = 10\%$

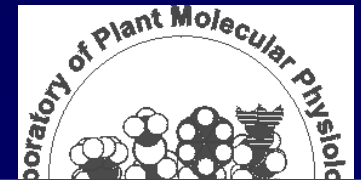
F2 mutanti

Ler Col

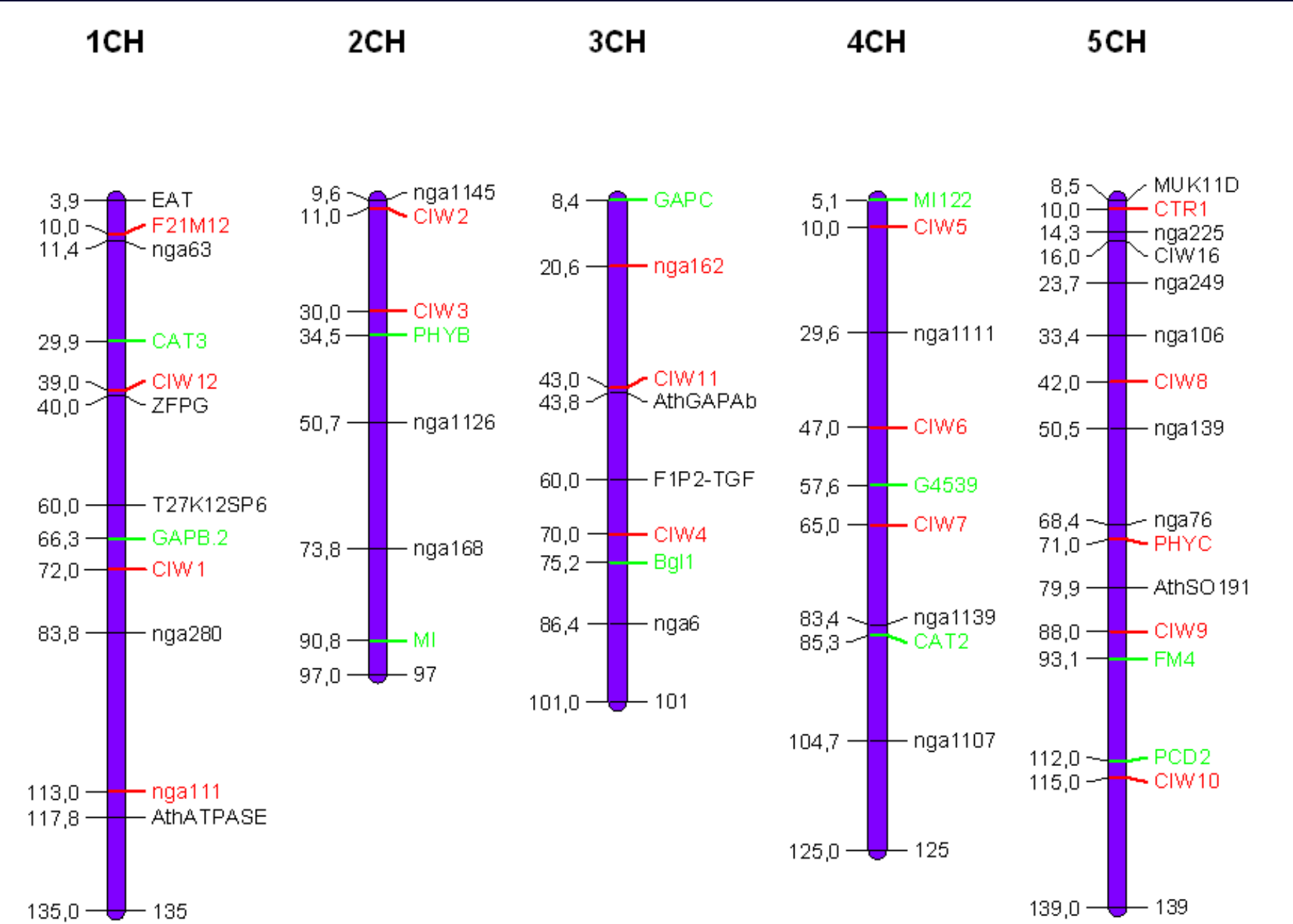


marker II - žádná vazba
6 mutantů
 $7/12 \times 100 = 58\%$

- Analýza cca 2000 mutantních linií
- Určení nejbližšího (ještě) segregujícího markeru



Mapa DNA molekulárních markerů



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Markery pro jemné mapování

AGI Map

Lister & Dean RI

Classical

mi-RFLP

Goodman

GoodmanBAC

TIGR

Finkelstein

Altmann

Maps for Chromosome 2

for all Maps: [Search Options:](#)

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](#)

0 bp 2,463,170 bp

0 1,000,000 2,000,000

SM130_329,3	ATPTR2_B	SM104_73,6	CIW2	SM115_237,0	SM12_274,4	CIC9A
SM134_72,6	SM71_250,0	RNS1	SGCSNP180	SM46_294,4	SGCSNP129	T6P5-
SM61_322,0	SM45_234,7	SM57_225,2	SM84_98,5	SM158_96,3	SGCSN	
SM122_129,8	MI320	SM206_129,8	SM121_171,6	SM14_243,3	T6P5-	
SM122_129,8	NGA1145	SM254_364,8	G4532	M497A	T6P5-	
SM253_310,7	NGA114	SM17_241,6	G4553		T6P5-	
SM121_93,6		M246	SM46_411,1		T6P5-	
RGA		SGCSNP111			T12A:	
		SM138_120,2			SM1:	
		SM73_258,4				
		SM233_178,9				

Markers

AnnotUnits

NOR_2	F2I9	T23K3	T16F16	T17M13	F19B11	F3L12	T103	F10I3	F16J10	T25M19	F
F23H14	T80I1	F504	T8K22	T18E12	T18C20	T16B23	F28I8	F15L11	T3P4	F5K7	
F10A8	F23I14	T20F6	T4M8	F3C11	T230I5	F5G3	T20G20	T17C22			
	F14H20					F7D11		T6P5			

Lister & Dean RI

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)

0.00 cM 11.97 cM

0.00 5.00 10.00

TEL2N	RGA +	KK1 +	VE012	MI320	F53_2
NOR2	SGCSNP180 +		ATPTR2_B	NGA1145 +	
				ATGST2B	
				MIT201A +	

Markers

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

KVAVIANA BRU

JE VZDĚLÁVÁNÍ

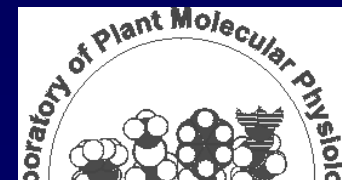
je spolufinancována
kým sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Genomika IV.-shrnutí

Přístupy genetiky přímé

- Přímá vs. reverzní genetik
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - vnějšího fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR
- využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - poziční klonování

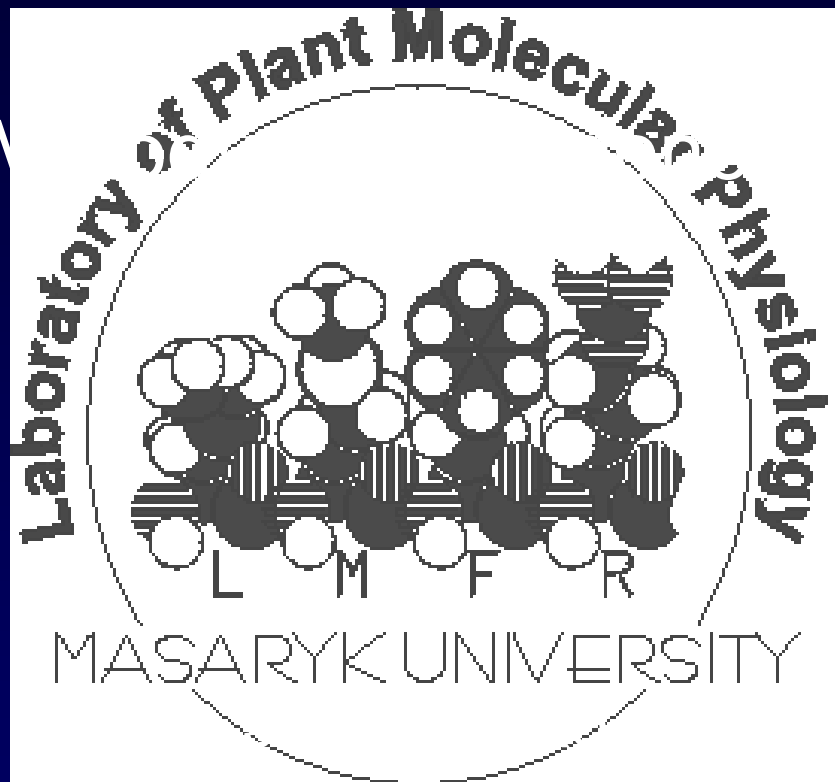


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Základy genomiky

V. M. ... ky



Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a pro
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin



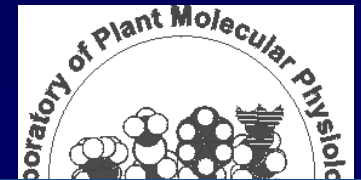
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Základy genomiky V.

- Zdrojová literatura ke kapitole IV:

- Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Surpin, M. and Raikhel, N. (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* 5,100-109
- Zouhar, J., Hicks, G.R. and Raikhel, N.V. (2004) Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 101, 9497–9501

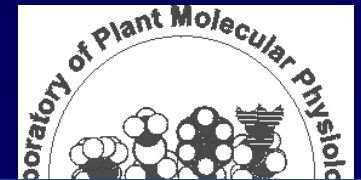


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika V.

- Analýza genové exprese
 - Metody kvalitativní analýzy genové exprese

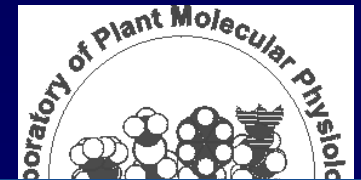


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika V. analýza genové exprese

- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)

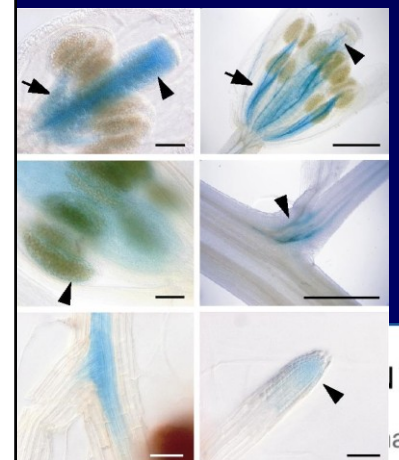
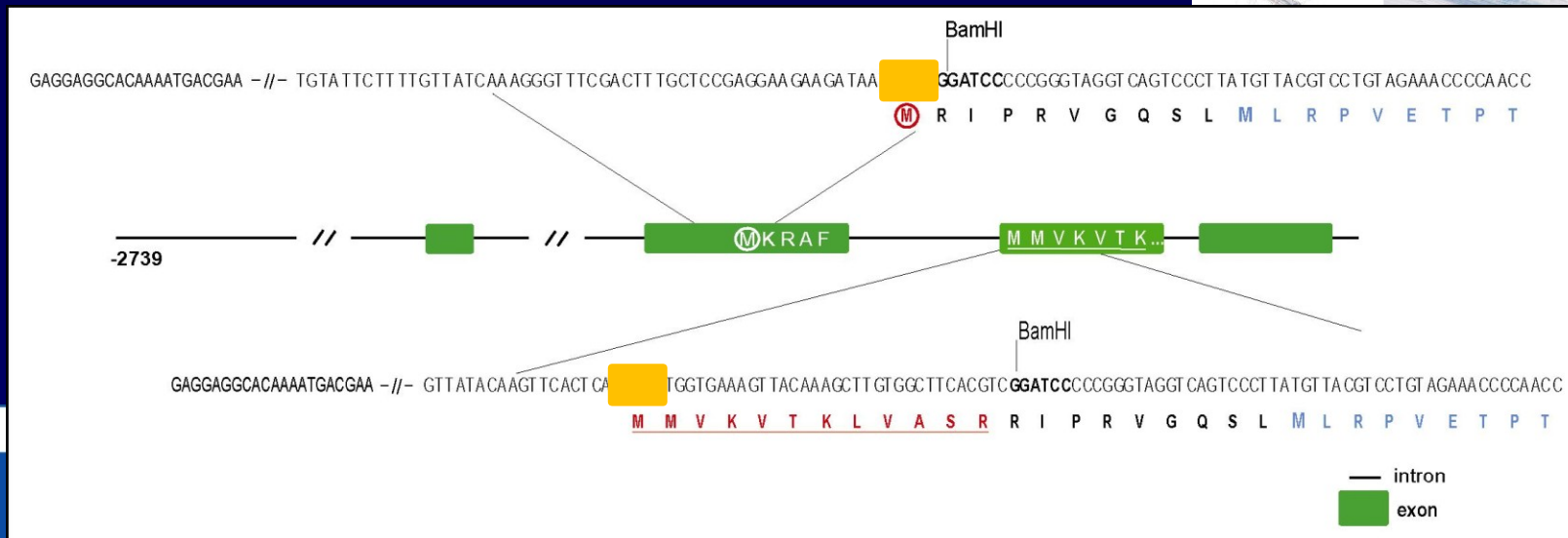
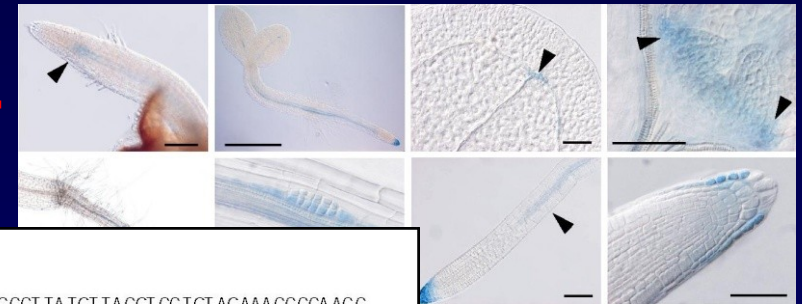


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

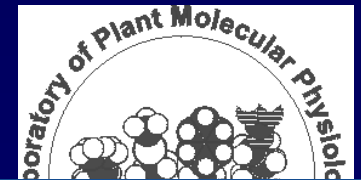
Genomika V. analýza genové exprese

- Transkripční fúze s promotorovou oblastí
 - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)
 - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza



Genomika V. analýza genové exprese

- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

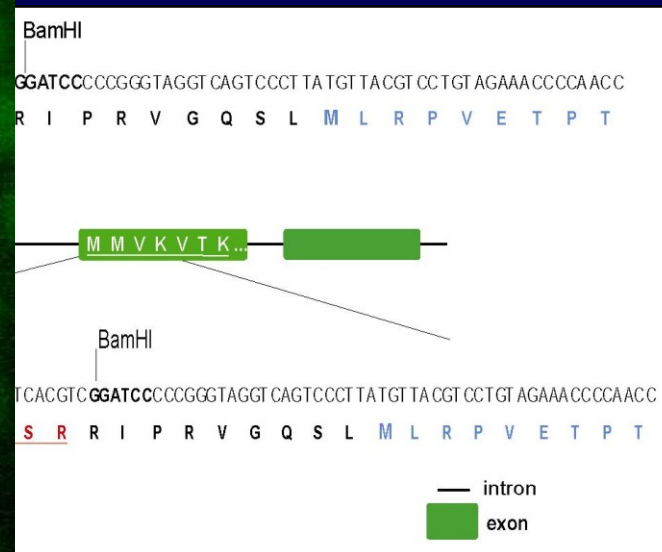
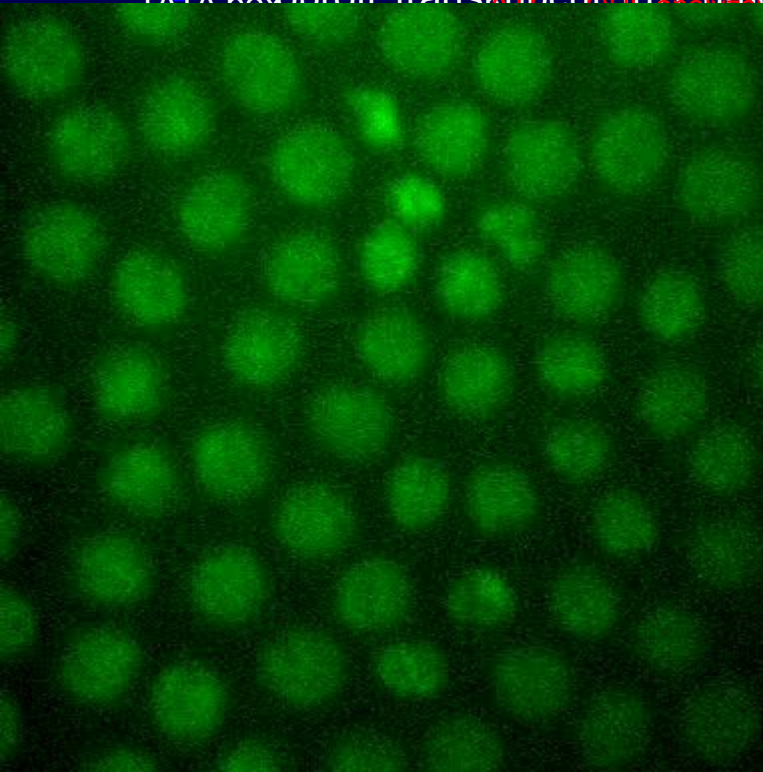
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika V. analýza genové exprese

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem
 - Identifikace a klonování promotorové a kódující oblasti analyzovaného genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a kódující sekvenci studovaného genu ve fúzi s reportérovým genem (uidA, GFP)
 - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza

TATA box proti 5' UTR transkripční fúzi umožňuje analyzovat např. intracelulární lokalizaci (u) nebo jeho dynamiku

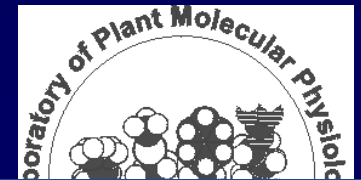
GAGGAGGCACAAAATC
-2739
GA



ila embryo by PAM
Laboratory of Plant Molecular Biology
ROZVOJE
prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika V. analýza genové exprese

- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných publikovaných dat

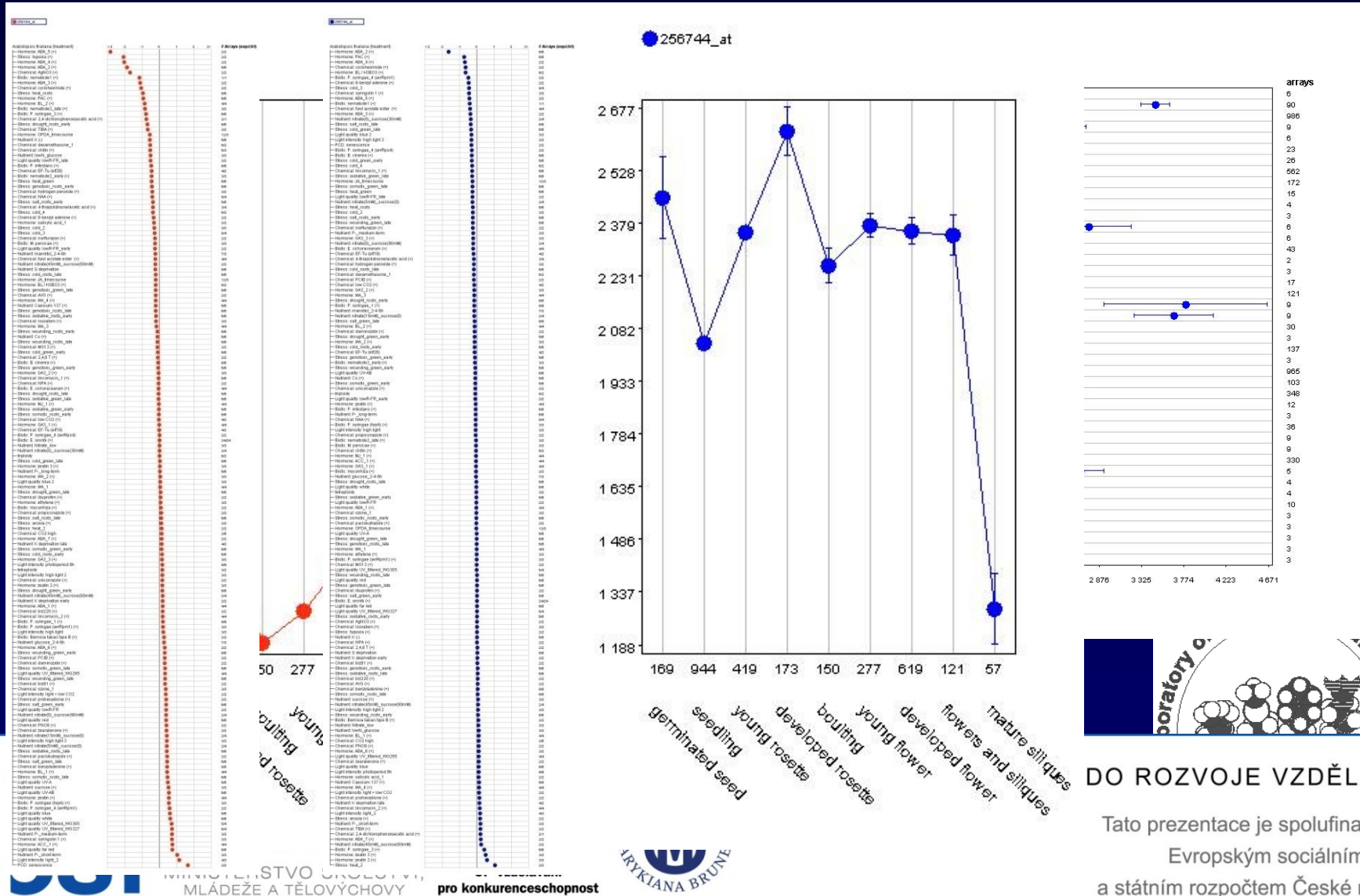


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika V. analýza genové exprese

Analýza exprese pomocí Genevestigator (**AHP1** a **AHP2**, Arabidopsis, Affymetrix ATH 22K Array)



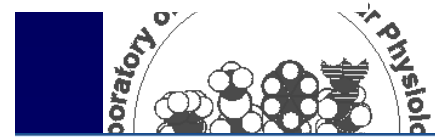
EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

pro konkurenceschopnost



BRNO UNIVERZITA VE VĚDÁCH A PŘÍRODNÍCH VĚDÁCH

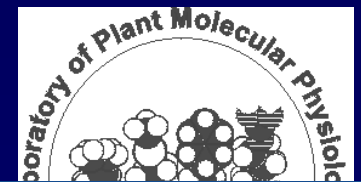


DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika IV.

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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