

CG020 Genomika

Bi7201 Základy genomiky

Přednáška 4

Genetika přímá

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.muni.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika
- 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

Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika



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

NÁHODNÁ MUTAGENEZE

„Přímě genetický“ přístup

EMS

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



$h \times n$

„Reverzně genetický“ přístup

T-DNA

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

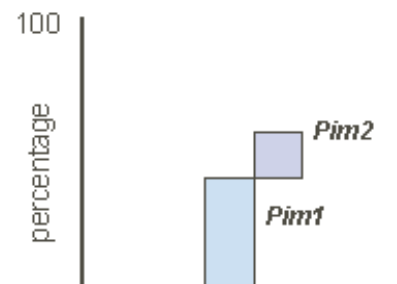
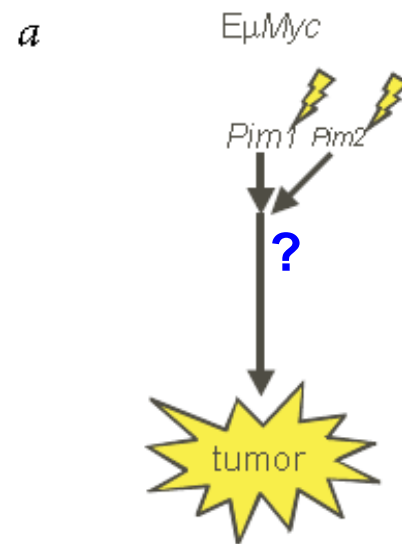
(retro)transposons

Osnova

- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu

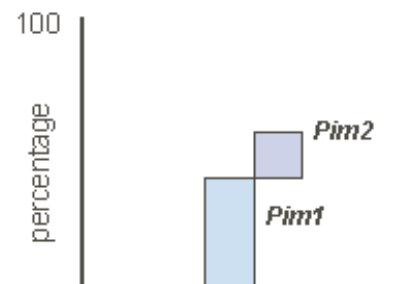
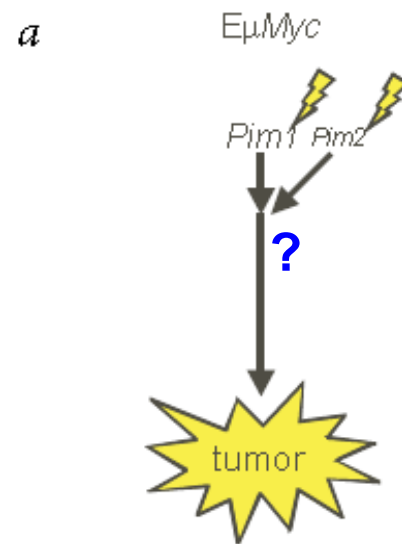
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
 - Infekce E μ Myc 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



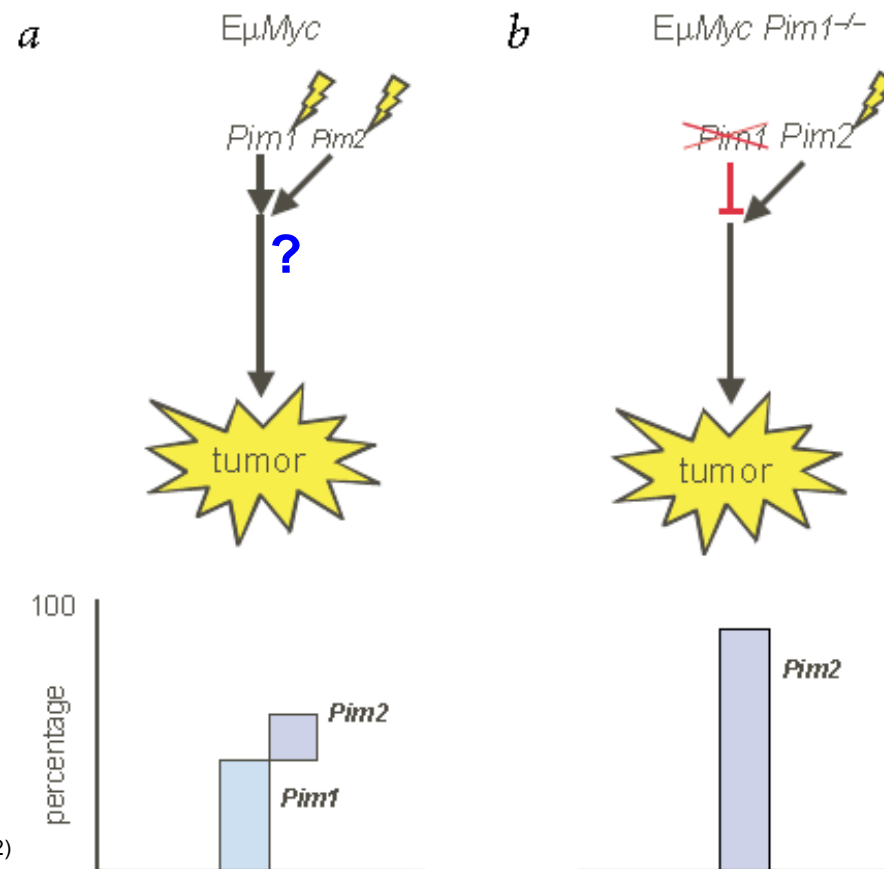
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
 - Infekce E μ Myc *pim1* mutantů retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které obsahují v 90% inzerci v blízkosti (aktivaci) Pim2



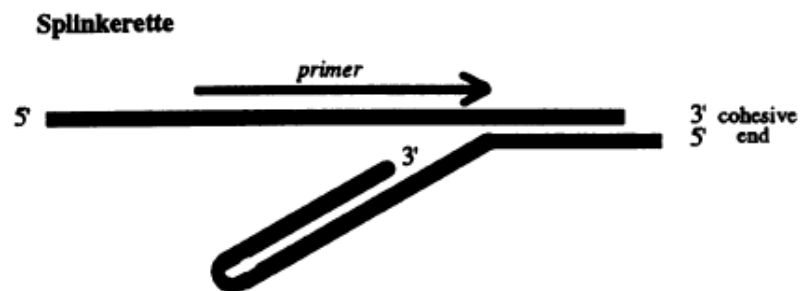
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
 - 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 lymfomagenezi (Z)

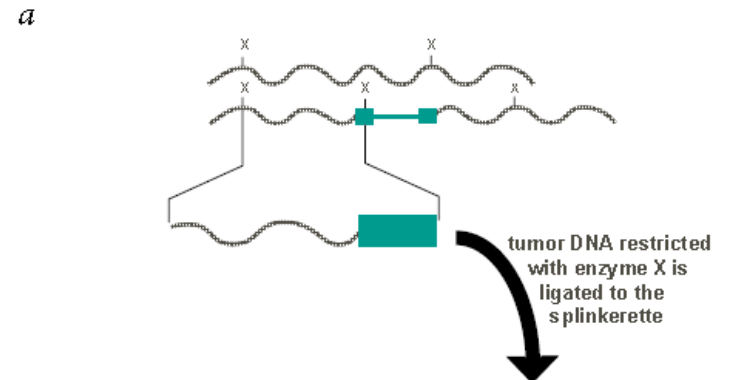


Inzerční mutageneze v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přilehajících k místu inzerce proviru
 - Štěpení genomové DNA a ligace speciálních linkerů, tzv. *splinkerett* (zvýšení specifiity amplifikace)



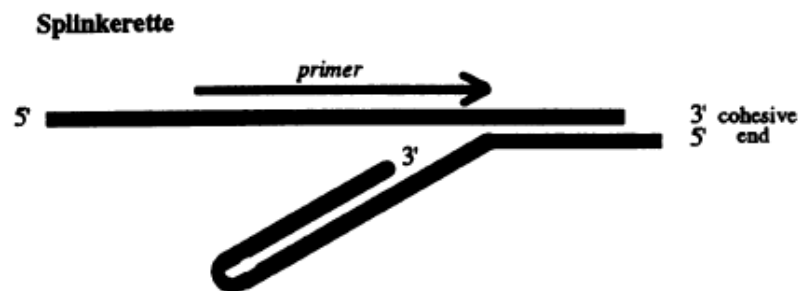
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



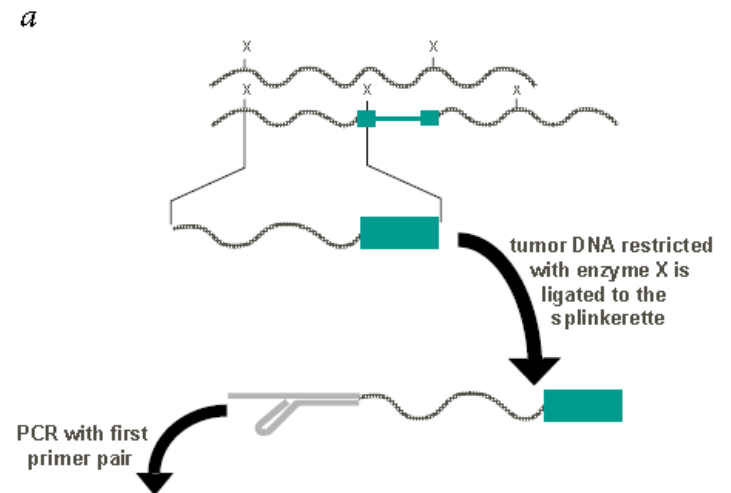
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Inzerční mutageneze v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přilhajících k místu inzerce proviru
 - První amplifikace pomocí specifických primerů



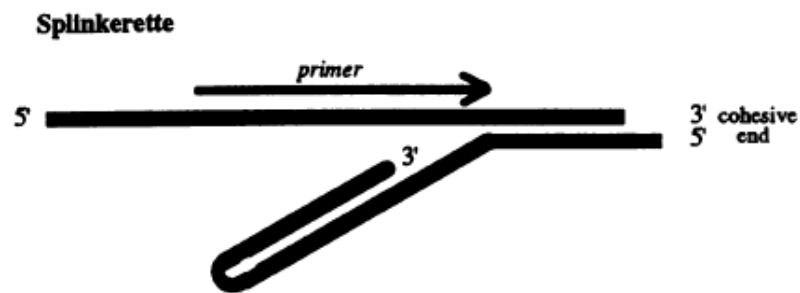
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



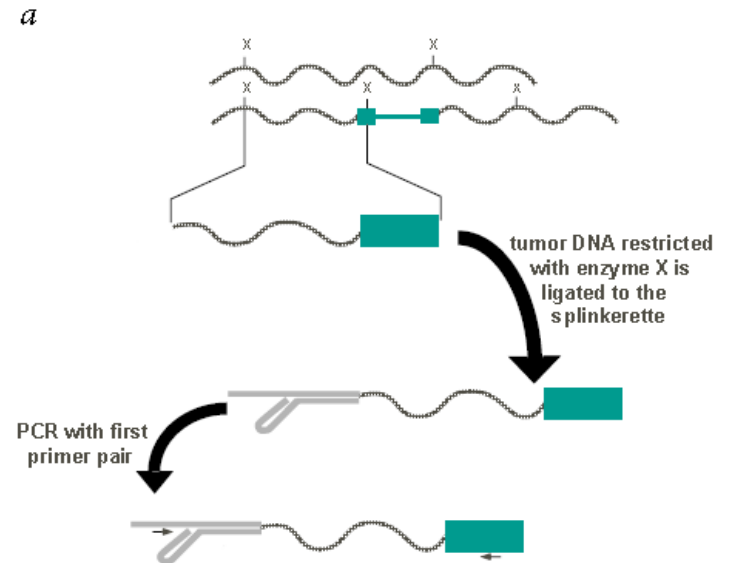
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Inzerční mutageneze v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přilhajících k místu inzerce proviru
 - Druhá amplifikace pomocí „nested“ primerů (zvýšení specifity)



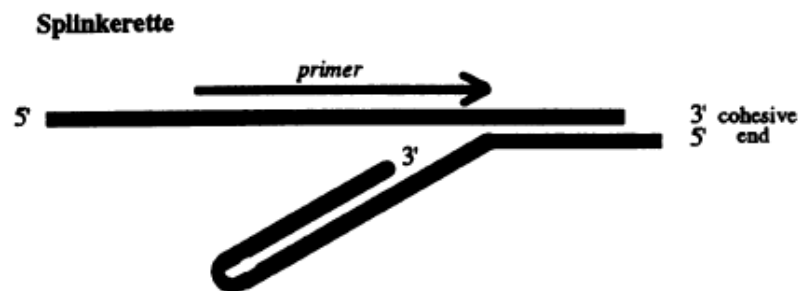
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



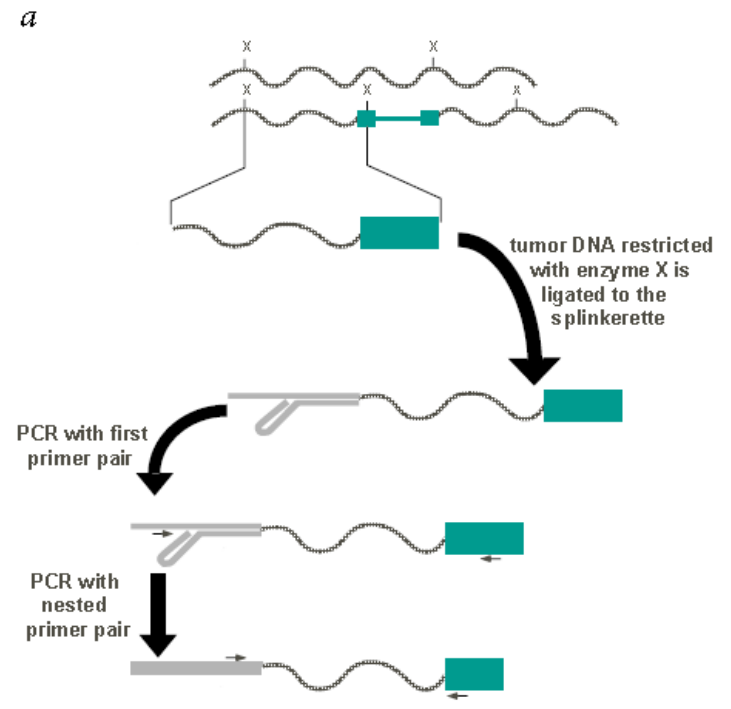
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
 - Sekvence a lokalizace oblastí přiléhajících k protovirus vyhledáváním v anotovaných databázích myšního genomu



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Osnova

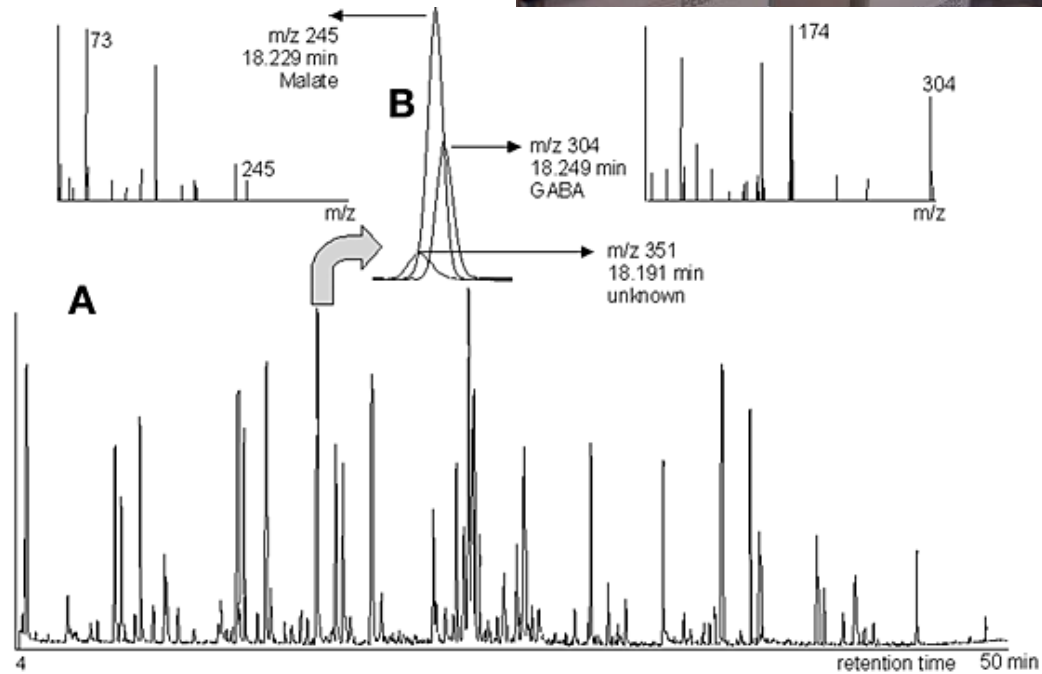
- metabolického profilu

Metabolické profilování

- Metabolické profilování rostlin
 - hromadná a automatizovaná analýza metabolitů (až 25.000) pomocí GC-MS technik v knihovnách T-DNA mutantů



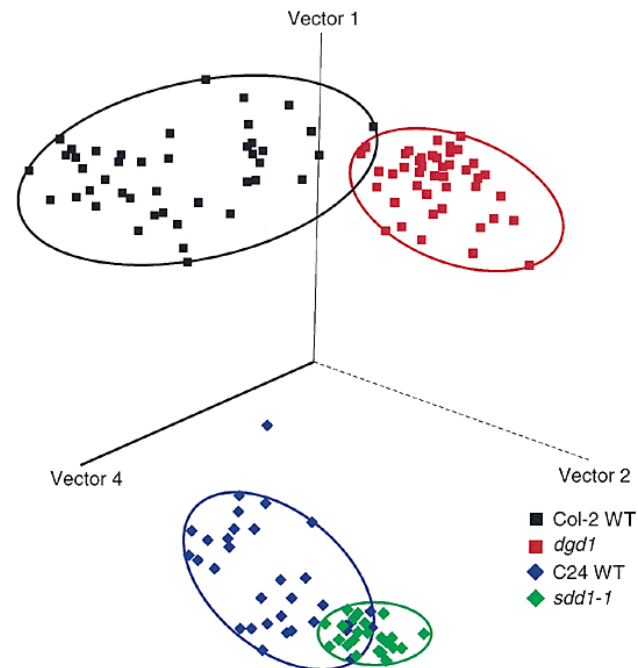
lipidmap	RT	MS%	170	MS%	172	MS%	174	MS%	176	MS%	178	MS%
1 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
2 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
3 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
4 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
5 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
6 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
7 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
8 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
9 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
10 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
11 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
12 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
13 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
14 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
15 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
16 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
17 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
18 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
19 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
20 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
21 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
22 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
23 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
24 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
25 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
26 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
27 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
28 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
29 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
30 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
31 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
32 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
33 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
34 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
35 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
36 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
37 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
38 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
39 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
40 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
41 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
42 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
43 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
44 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
45 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
46 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
47 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
48 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
49 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28
50 acetone	1.00	1.000	170.0132	4.41	172.0132	2.26	174.0132	1.07	176.0132	0.53	178.0132	0.28



Continued

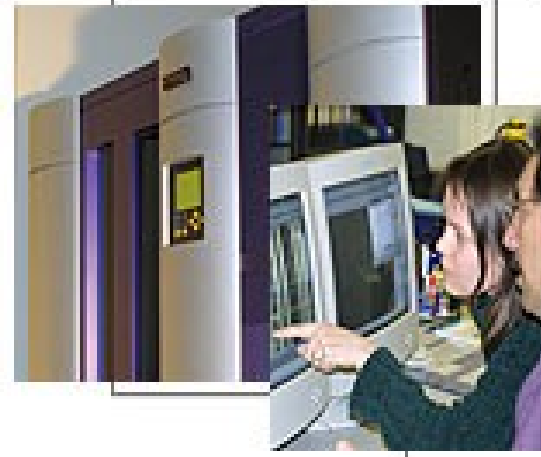
Metabolické profilování

- 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



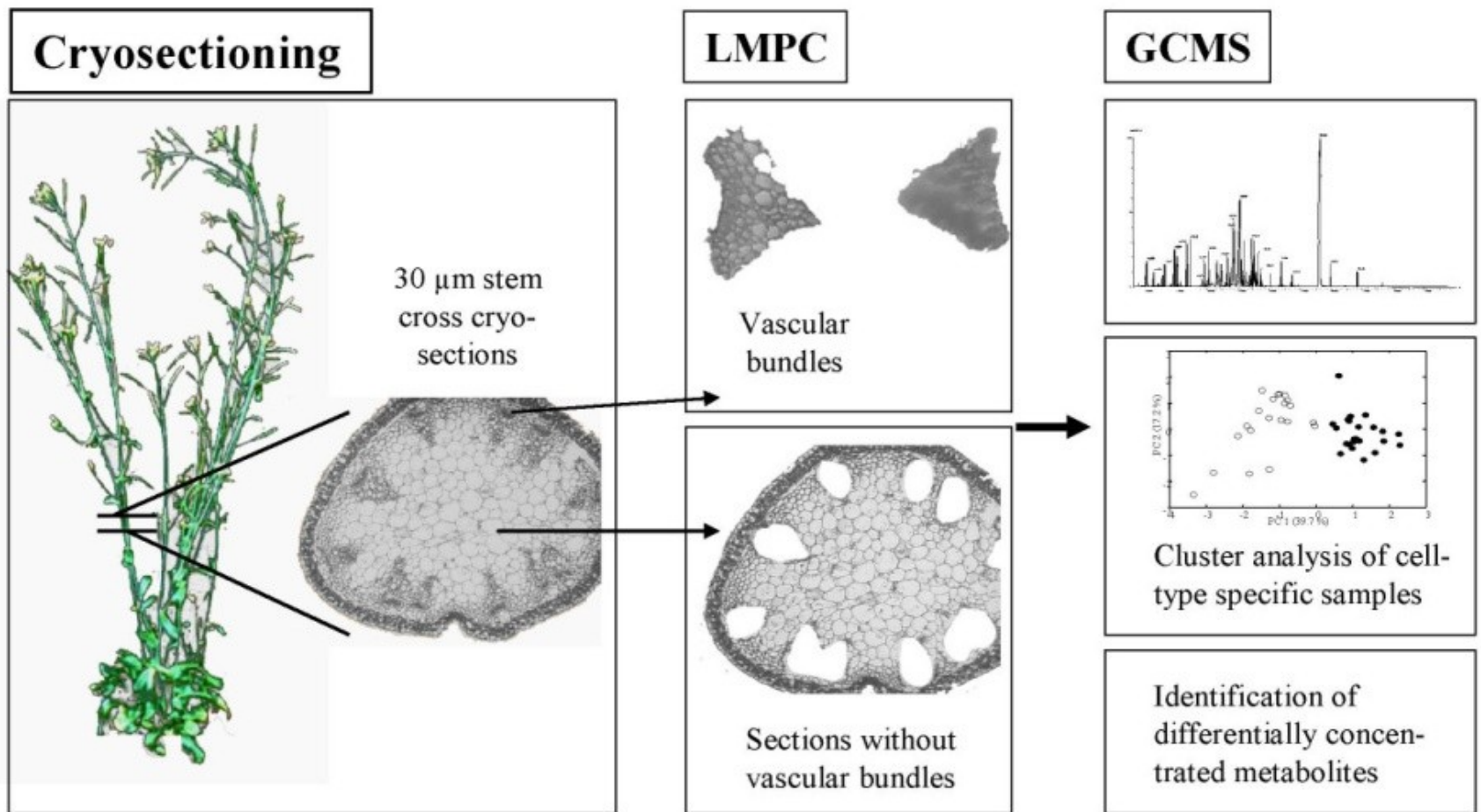
Metabolické profilování

- 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 genů pomocí identifikace T-DNA zasažených sekvencí



Metabolické profilování

- Metabolické profilování rostlin
 - možnost využít i speciální techniky, např. mikrodisekce



Osnova

- exprese zajímavých genů

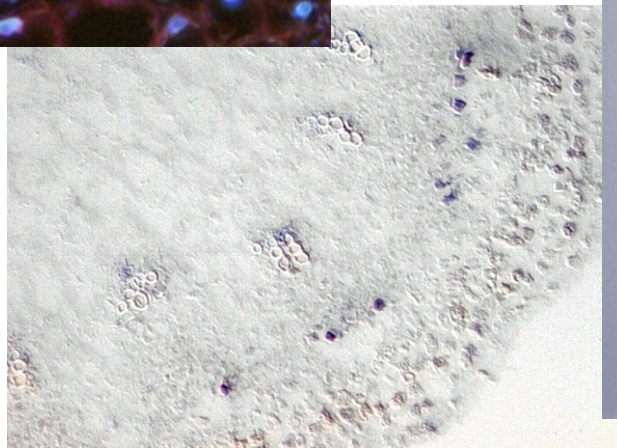
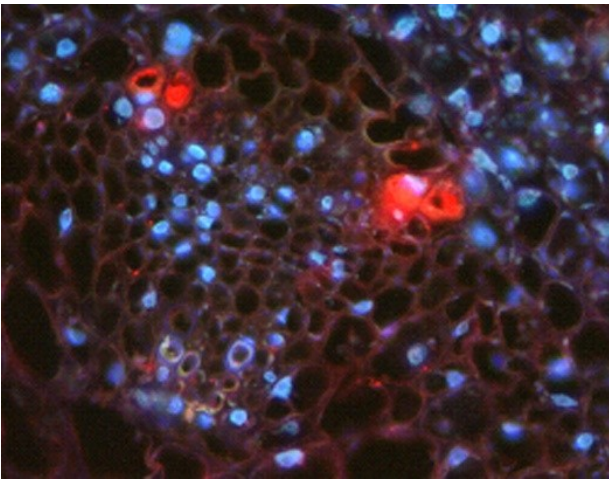


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

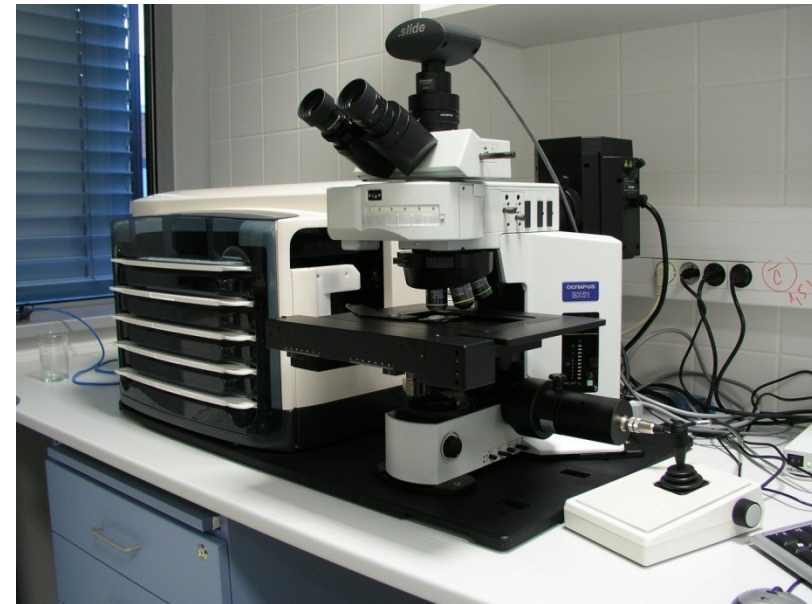
Expresní profil

- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
 - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese

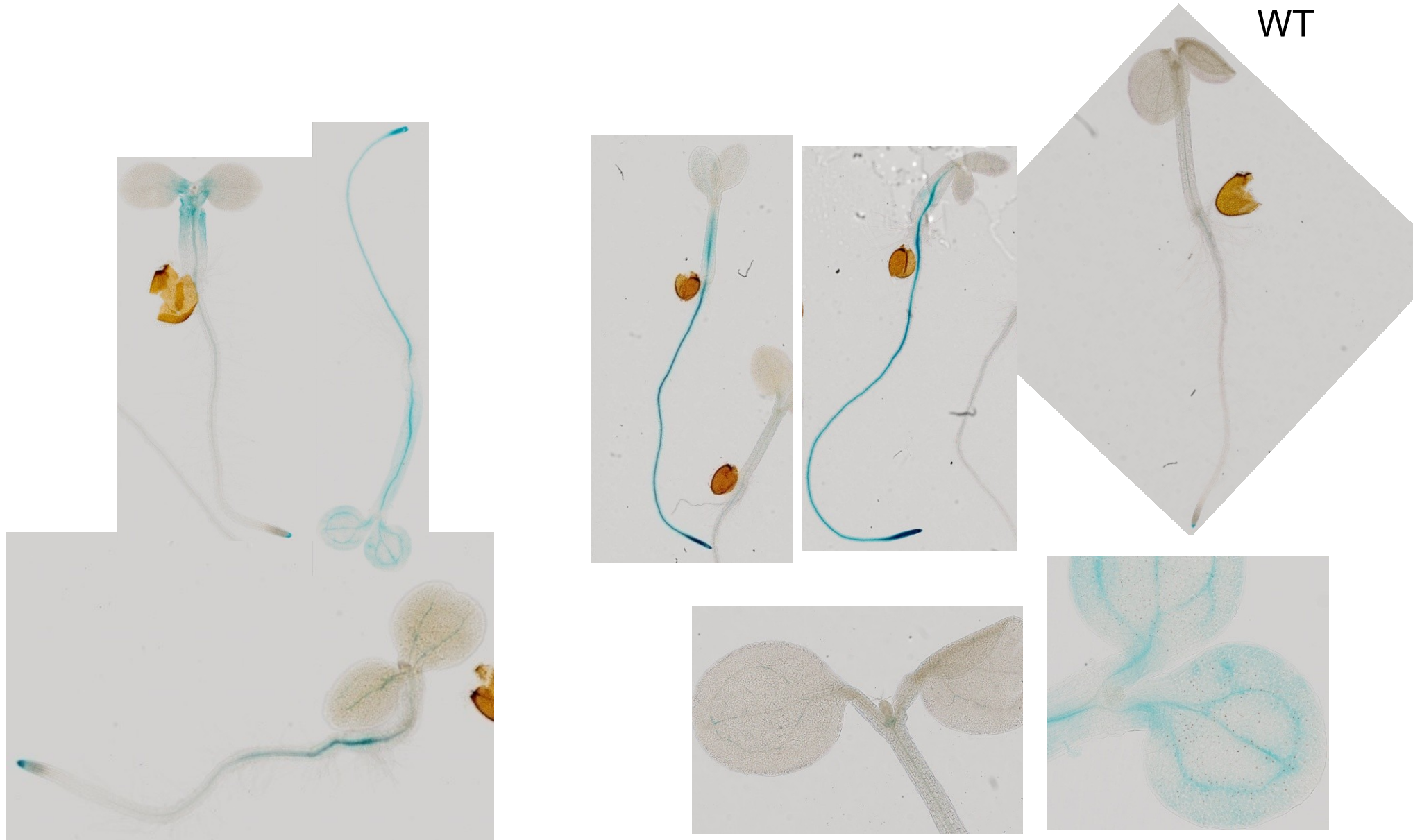


Expresní profil

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



Expresní profil



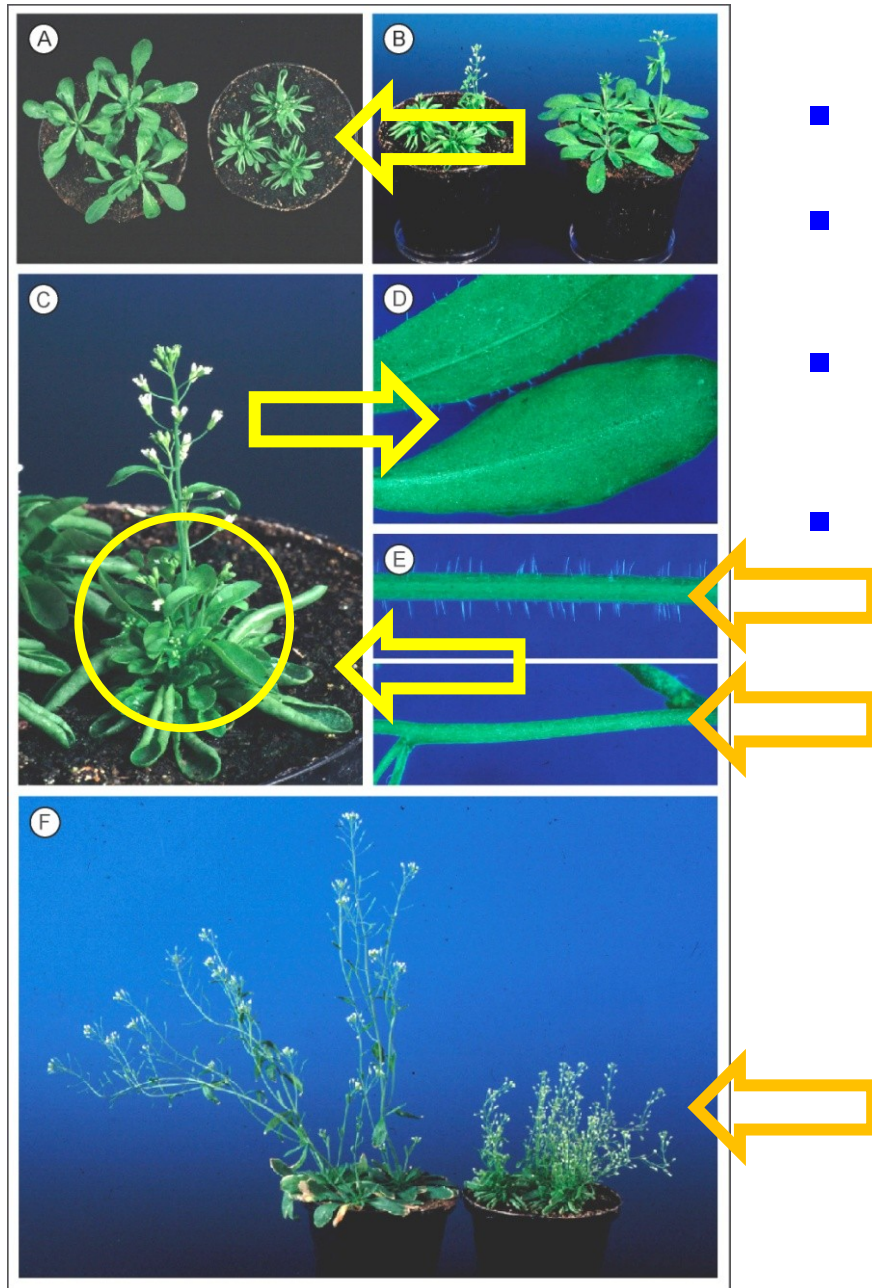
Osnova

- identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid rescue
 - iPCR

Identifikace mutovaného lokusu

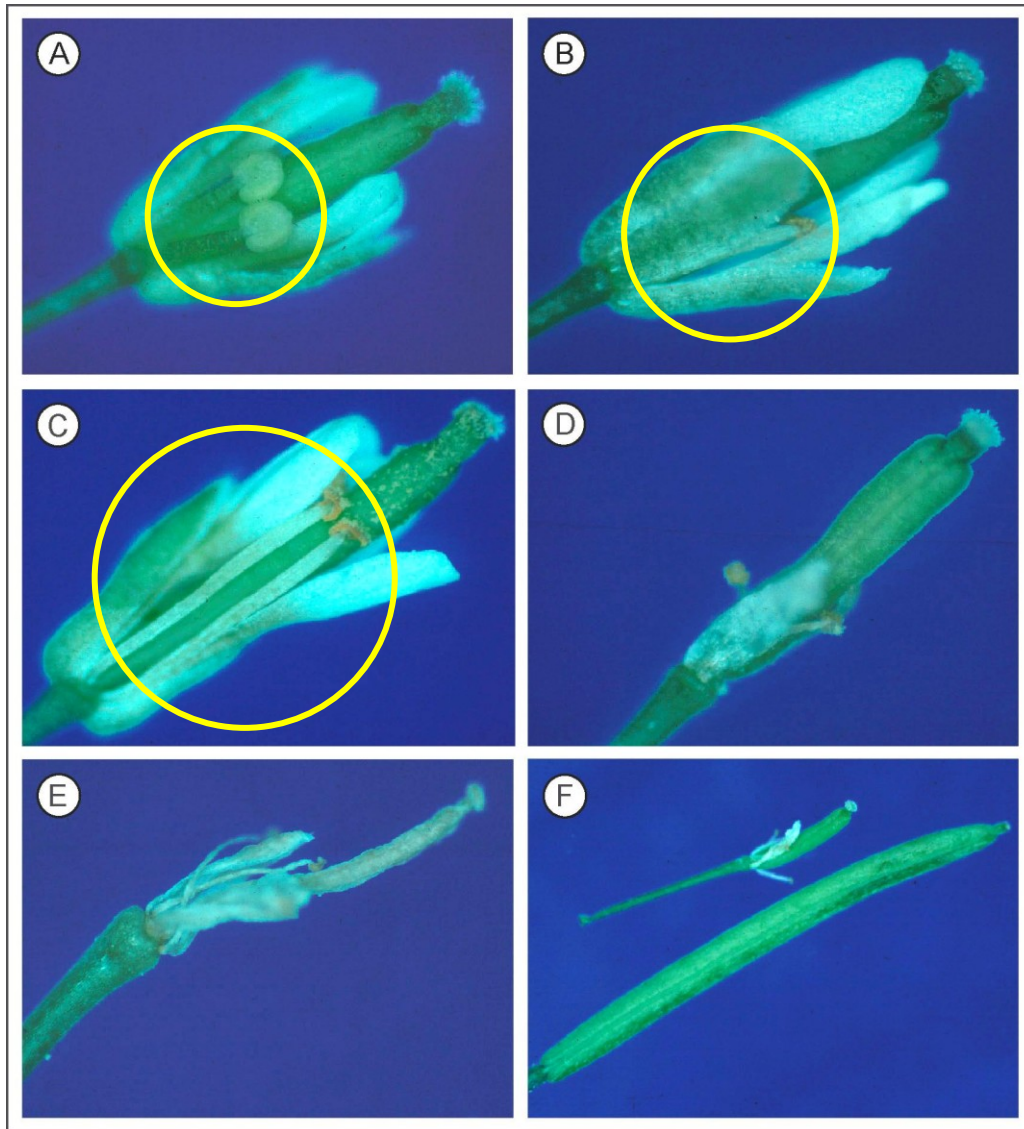
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu

Identifikace mutanta



- zvlňněné listy
- keřičkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí

Identifikace mutanta



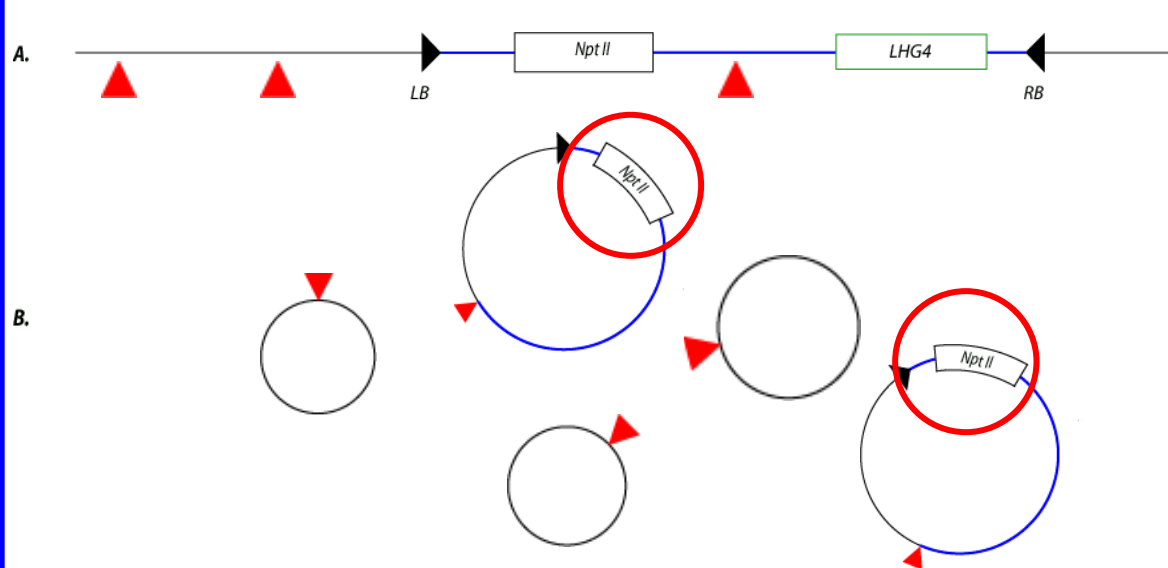
- samčí sterilita, poruchy v prodlužování tyčinek (A,B) (porovnej se standardním typem C)

Identifikace mutovaného lokusu

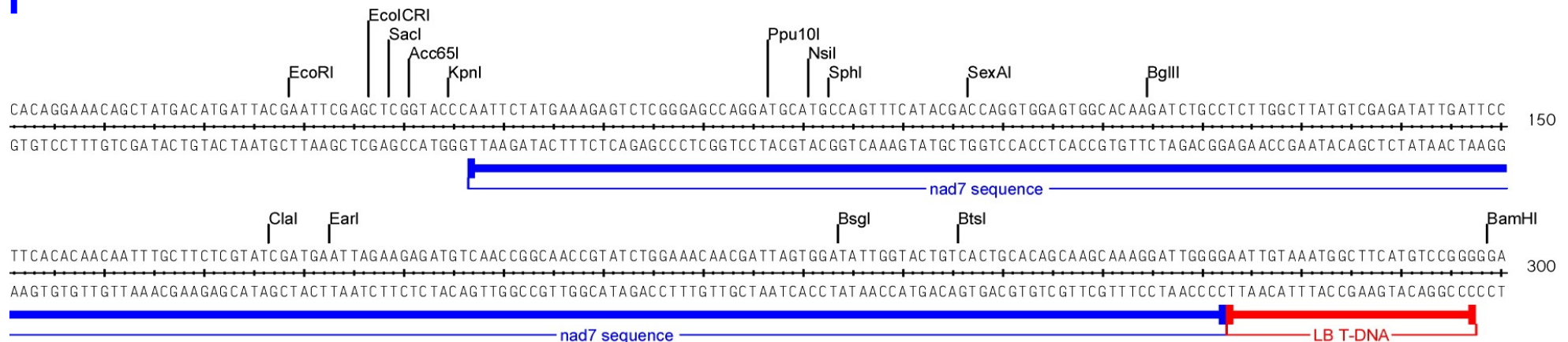
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu
 - identifikace T-DNA mutované oblasti

Identifikace mutovaného lokusu

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

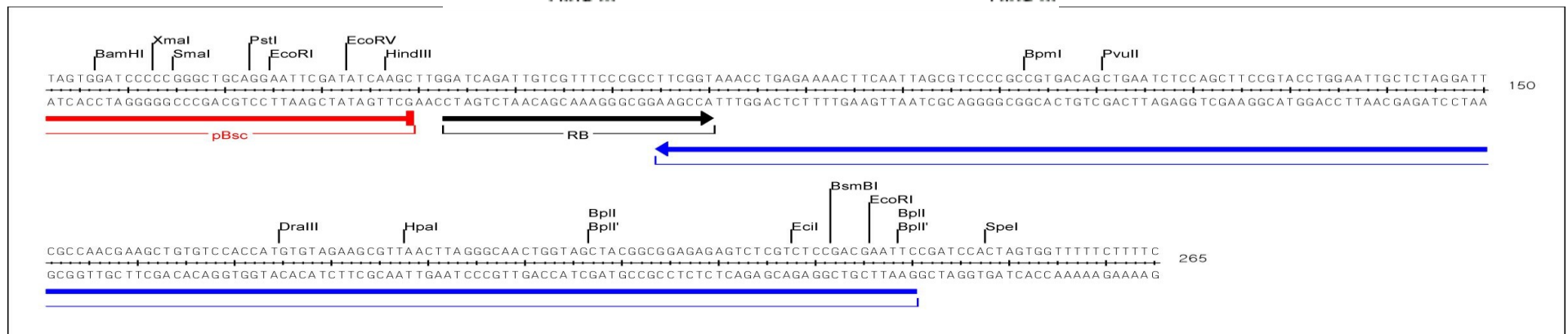
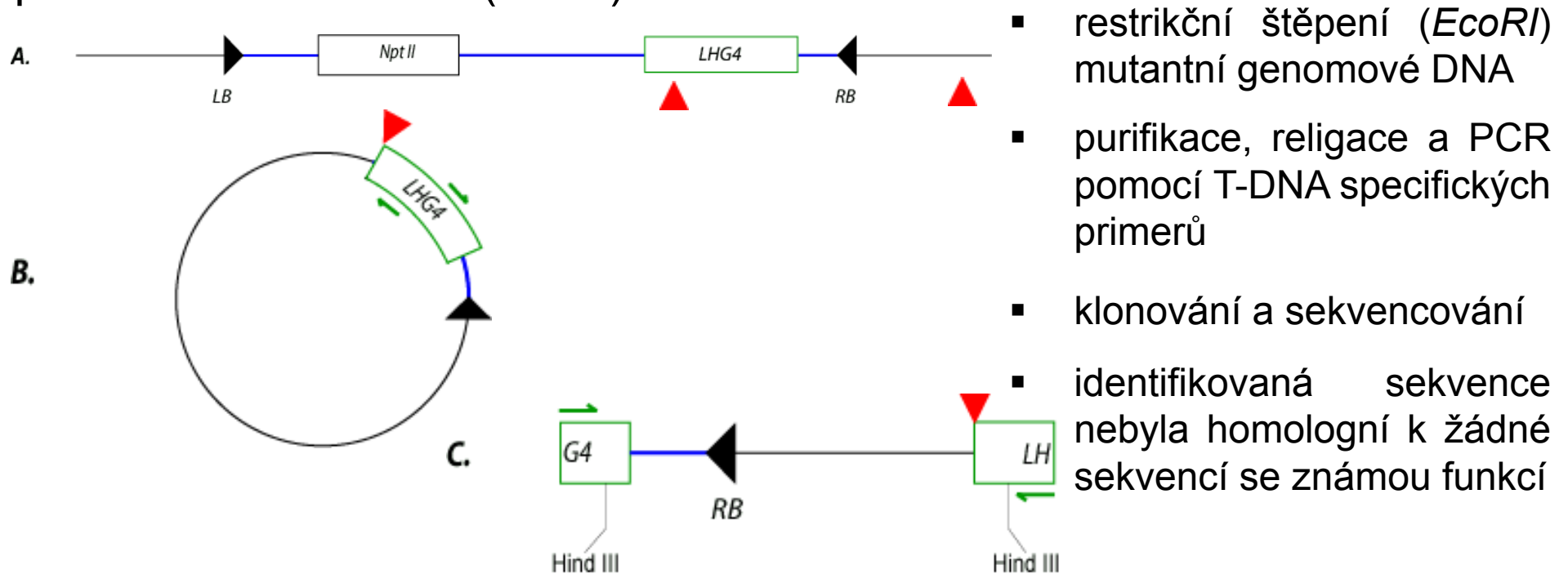


- restriční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E.coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro NAD7 kódovaným na mtDNA



Identifikace mutovaného lokusu

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

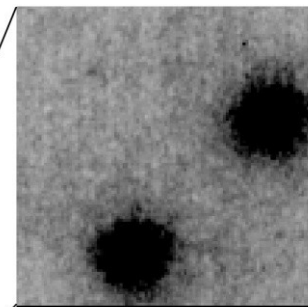
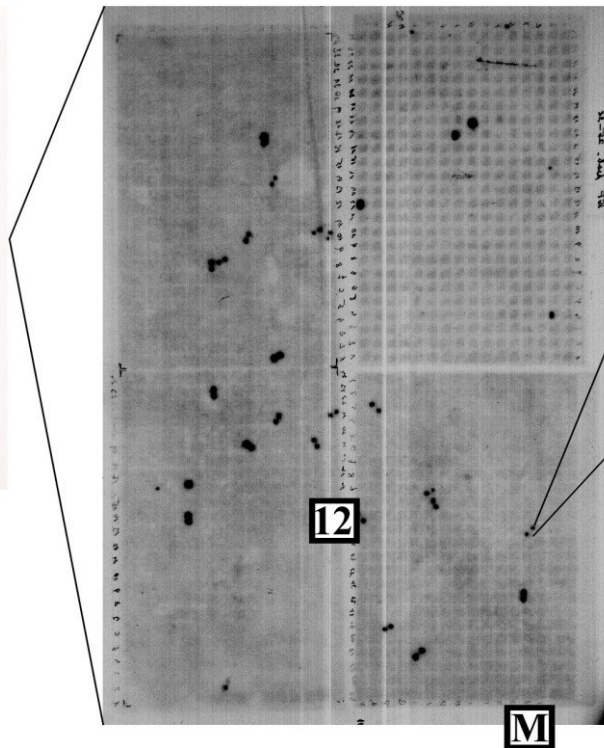


Identifikace mutovaného lokusu

- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu
 - identifikace T-DNA mutované oblasti
 - lokalizace T-DNA inserce v genomu *Arabidopsis*

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



F12M5

2	6	2	3
1	4	7	5
7	8	3	6
1	5	4	8

Mapování pomocí IGF-BAC databáze

I. Sekvence přiléhající k levé hranici T-DNA

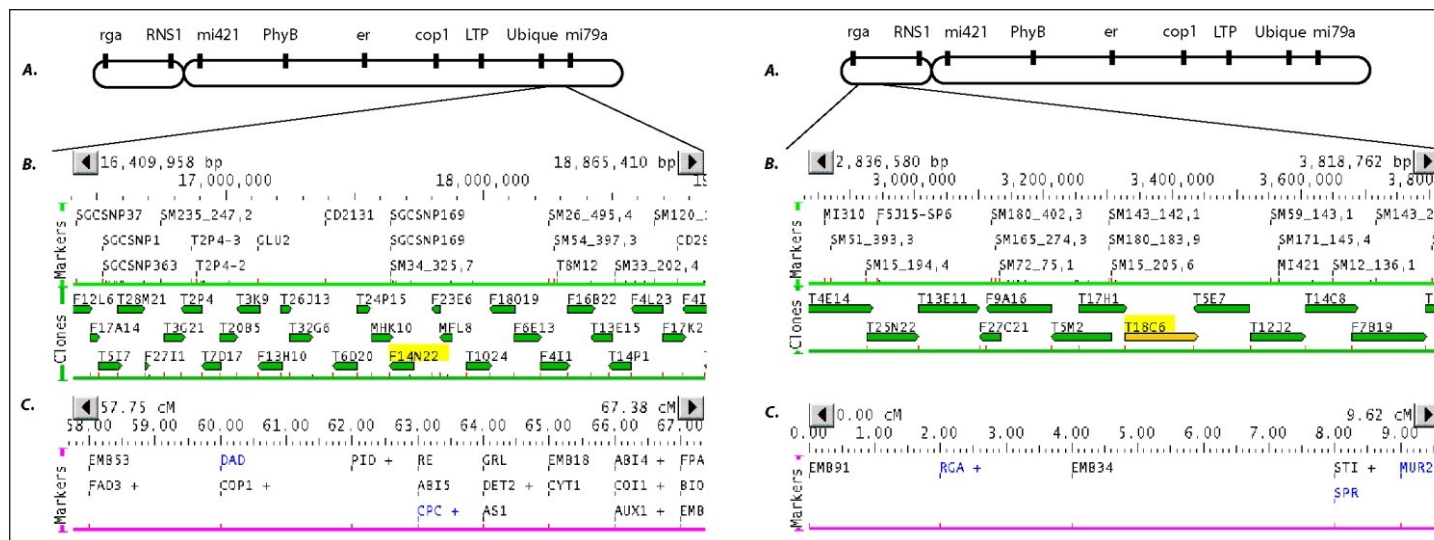
- celkem 28 pozitivně hybridizujících klonů
- 19 z nich lokalizováno na chromozomu 2
- 18 s podobností k mtDNA

II. Sekvence přiléhající k pravé hranici T-DNA

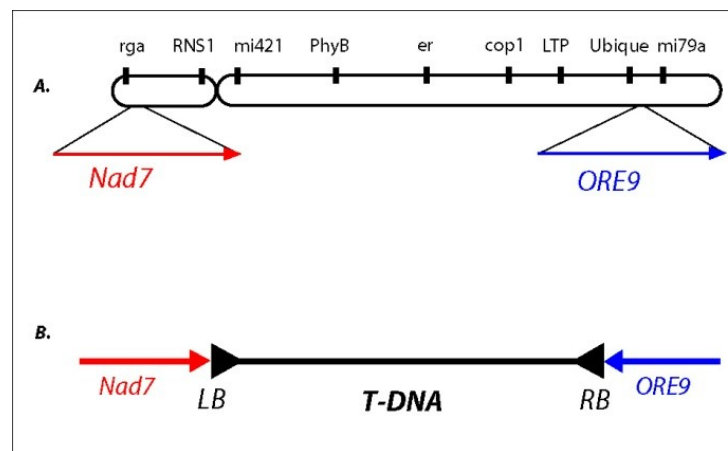
- celkem 6 pozitivně hybridizujících klonů
- všechny lokalizovány na chromozomu 2

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 2



Osnova



- Využití knihoven bodových mutantů v přímé genetice
 - poziční klonování

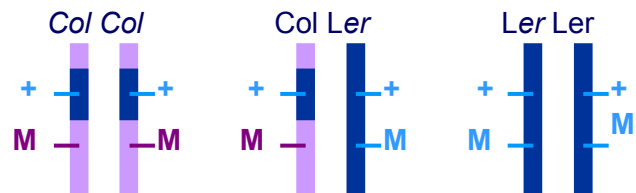
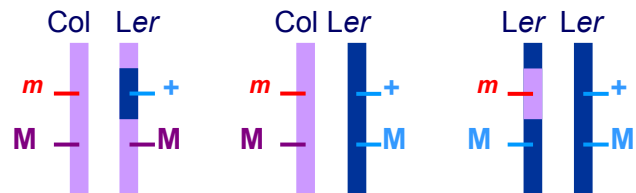
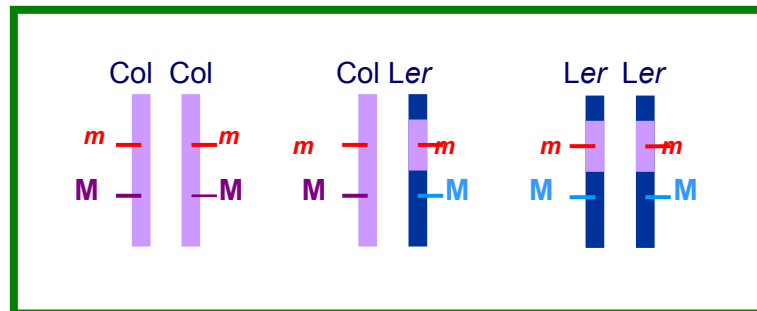
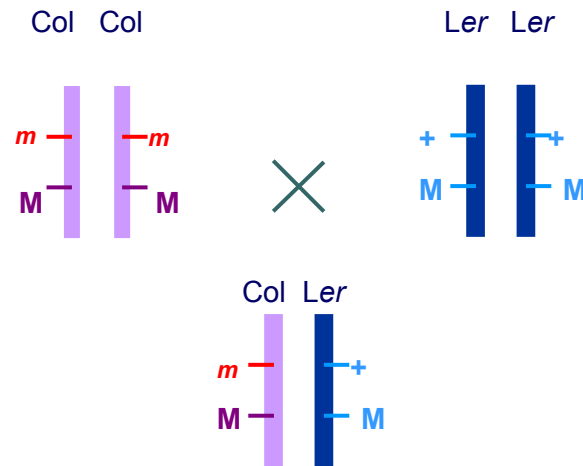
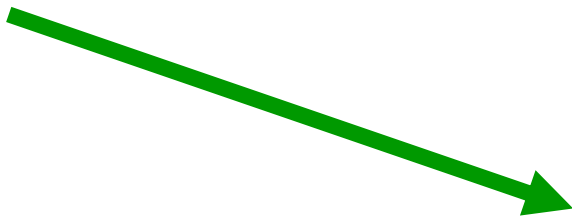
Identifikace mutovaného lokusu

■ Poziční klonování

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

Identifikace mutovaného lokusu

Příprava mapovací populace

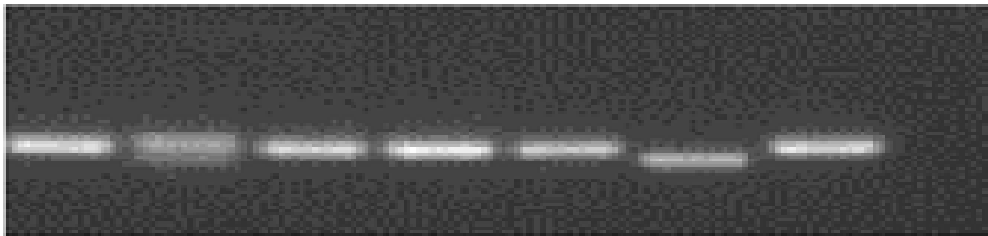


Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

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

F2 mutanti

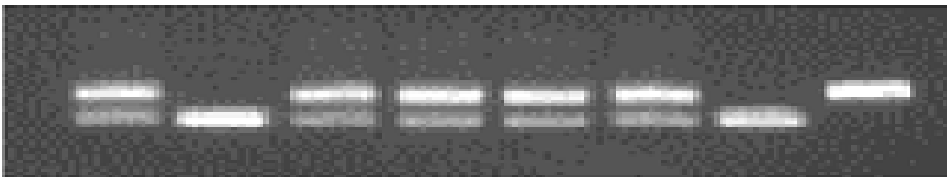
Ler Col



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

F2 mutanti

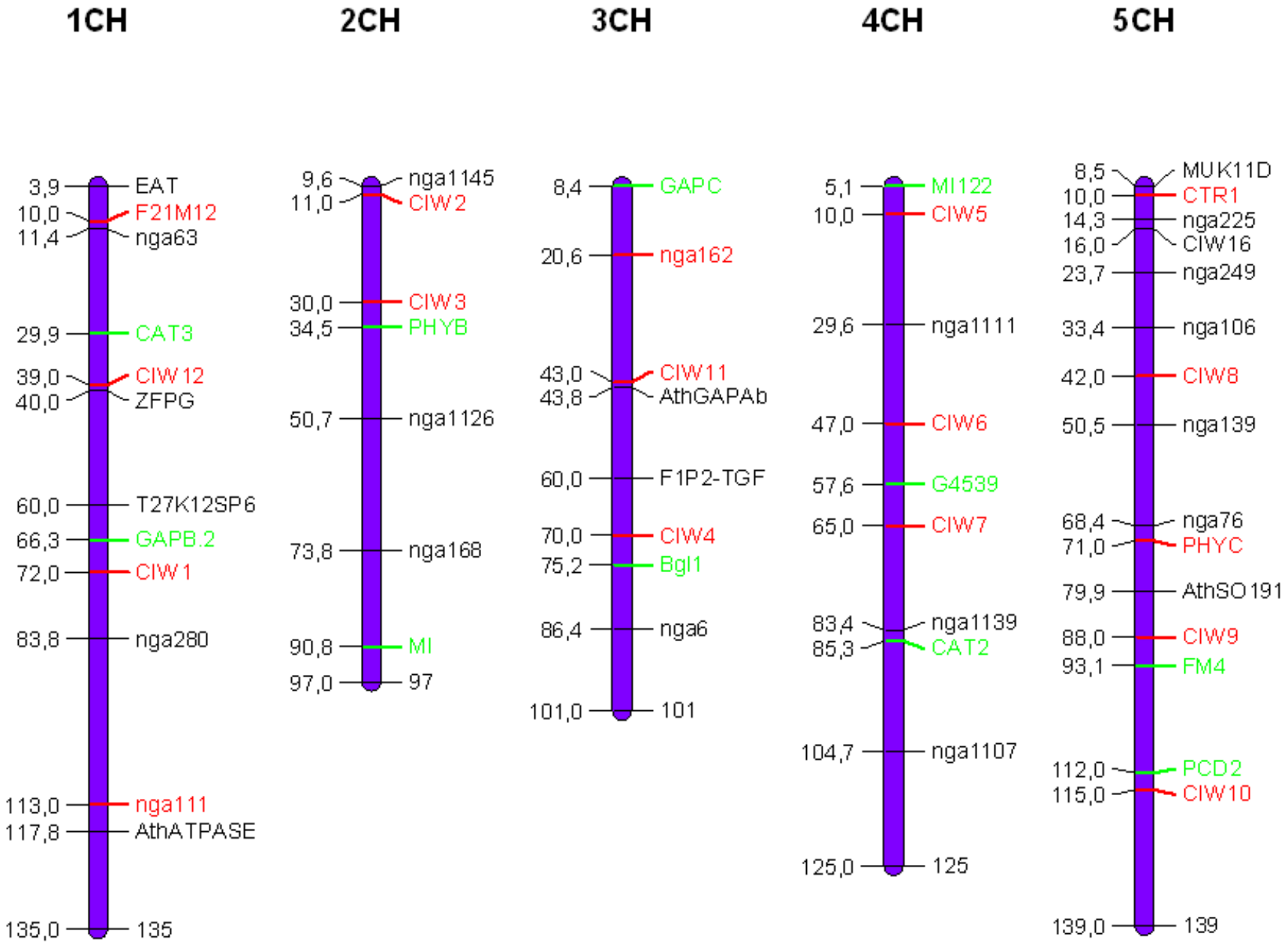
Ler Col



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

- Analýza cca 2000 mutantních linií
- Určení nejbližšího (ještě) segregujícího markeru
- Identifikace mutace pomocí sekvenování

Mapa DNA molekulárních markerů




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:](#)

 [?](#)

[MapViewer Home](#)

[Release Note](#)

[View Print-Version](#)

AGI Map

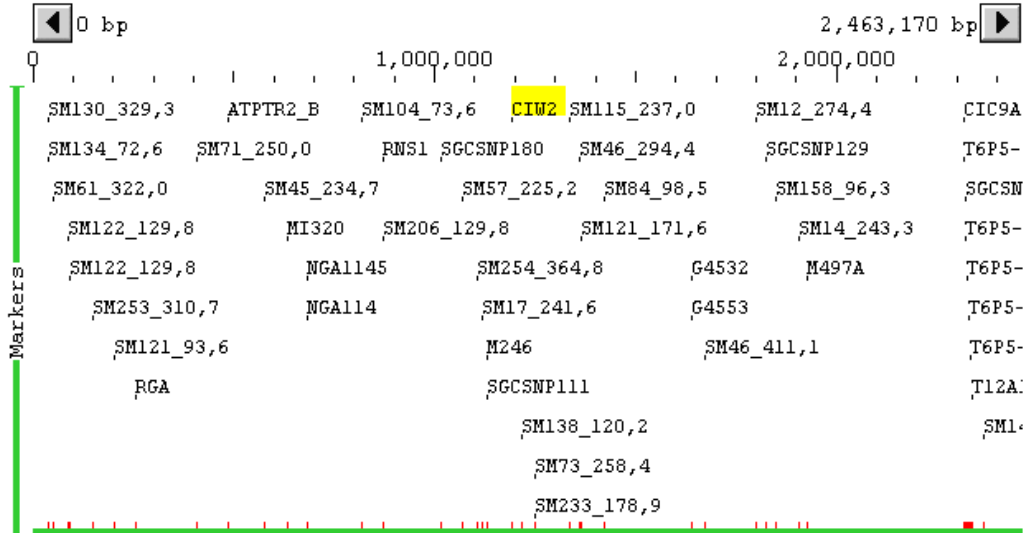
Zoom to:

Zoom up to 200x to see genes!

Search by name (e.g. UFO)

Select range (e.g. 1500-2000)

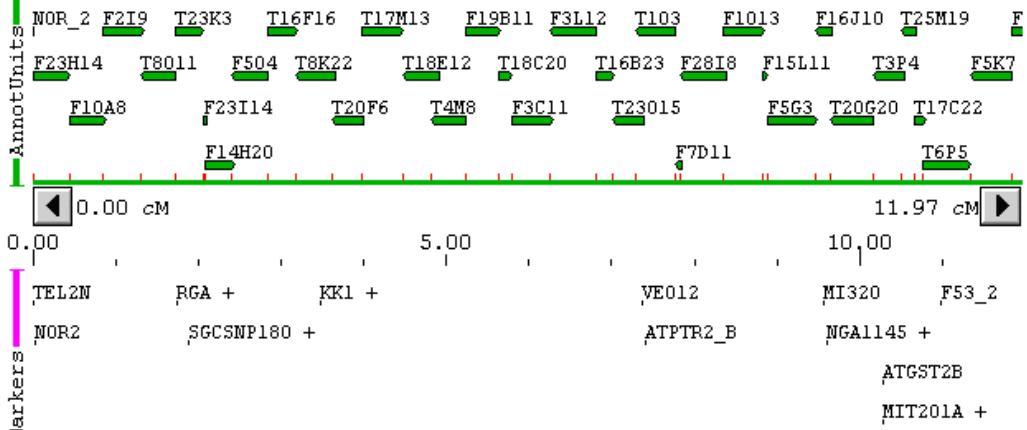
[AGI Map color key](#)



Lister & Dean RI

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)



Shrnutí

- Přímá vs. reverzní genetika
- 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

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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