

# 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  
[hejatk@sci.muni.cz](mailto:hejatk@sci.muni.cz), [www.ceitec.muni.cz](http://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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Osnova

- Přímá vs. reverzní genetika



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

### NÁHODNÁ MUTAGENEZE

#### „Přímě genetický“ přístup

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

EMS



$h \times n$

#### „Reverzně genetický“ přístup

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

T-DNA



(retro)transposons



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Osnova

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

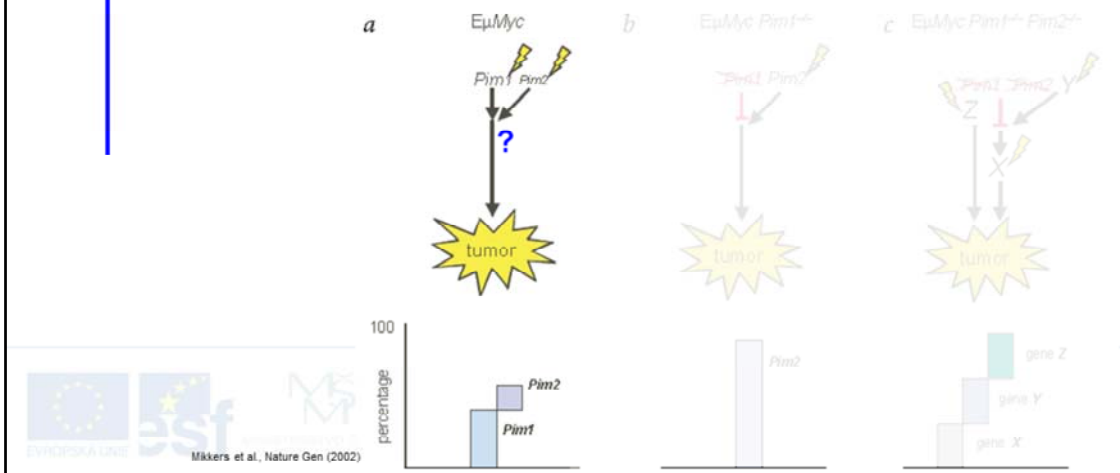


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

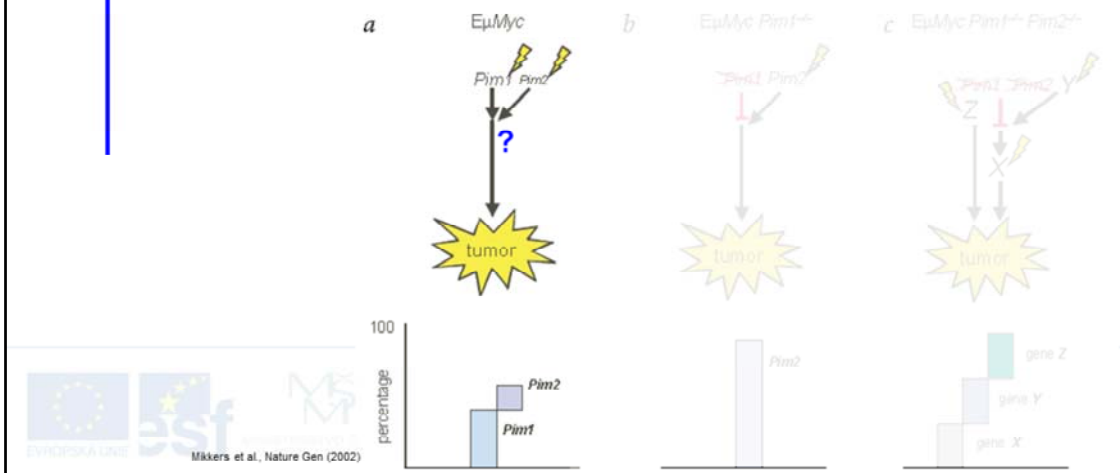
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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



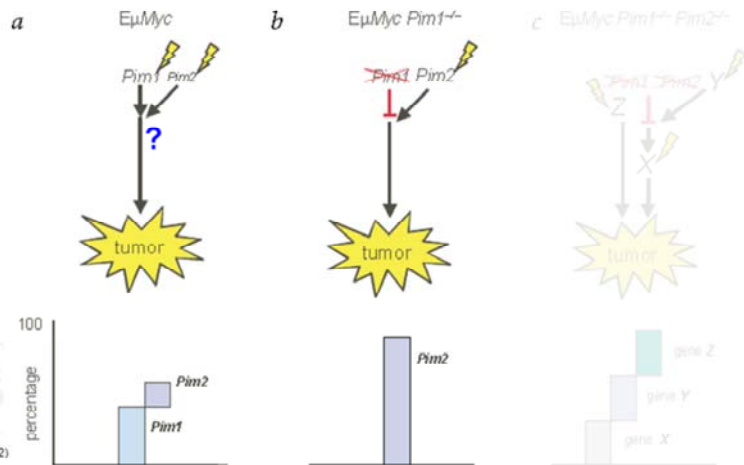
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



# Inzerční mutagenese v přímé genetice

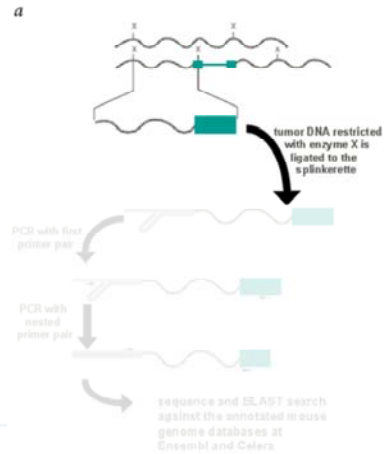
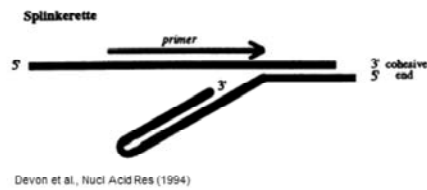
- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce EμMyc dvojnásobných mutantů *pim1*, *pim2* retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, u kterých lze očekávat aktivaci buď některého ze signálních partnerů Pim proteinů (Y), některého z proteinů Pim signální dráhy (X) nebo k aktivaci některé z příbuzných drah vedoucích k lymfomagenezi (Z)





# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



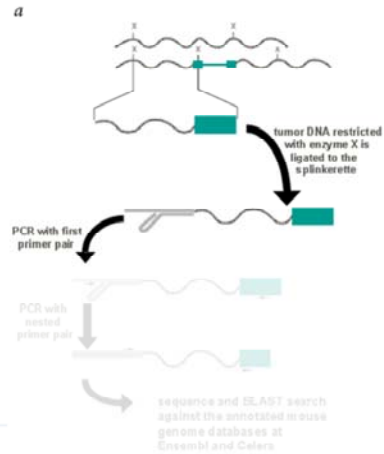
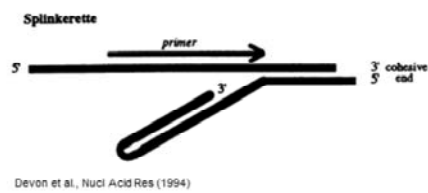
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VANI

Tato prezentace je realizací projektu  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

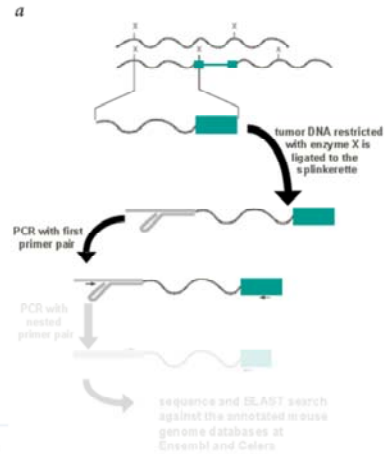
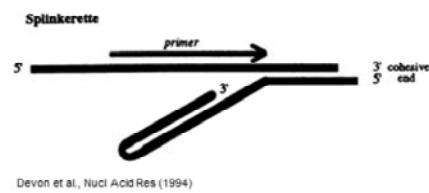
- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru
  - První amplifikace pomocí specifických primerů



Tato prezentace je realizována za podpory Evropské unie prostřednictvím Evropského sociálního fondu a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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

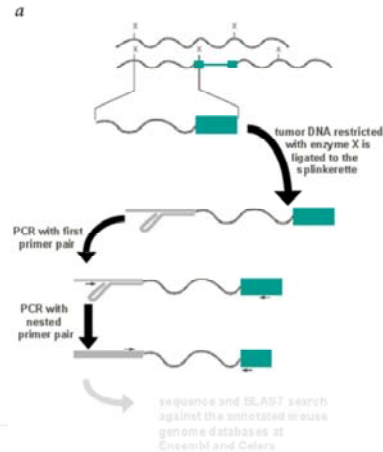
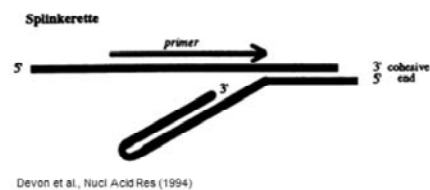


VANI

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

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



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

# 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**

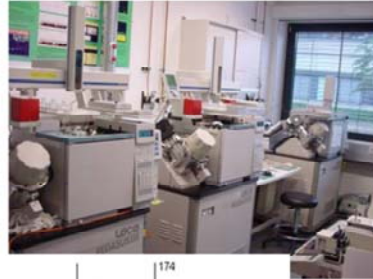


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

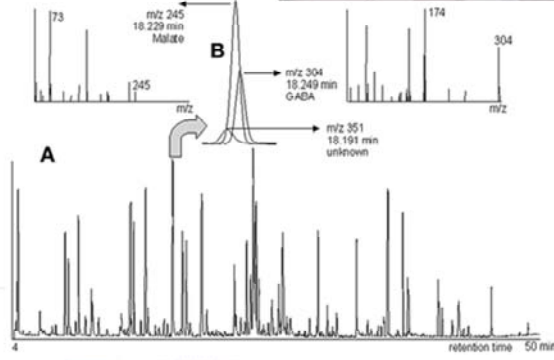
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Metabolické profilování

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



Retention Time (min)	Mass (m/z)	Abundance
18.229	345	High
18.249	304	Medium
18.191	351	Low



EVROPSKA UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



OJĚ VZDĚLÁVÁNÍ

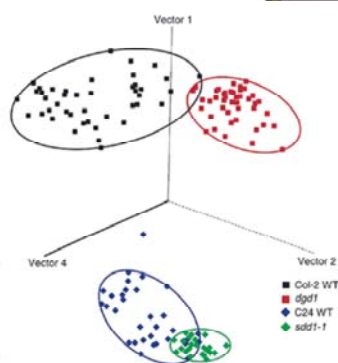
Operační program vzdělávání

Evropským sociálním fondem

a státním rozpočtem České republiky

# 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

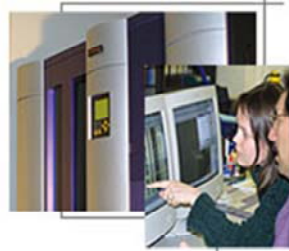


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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



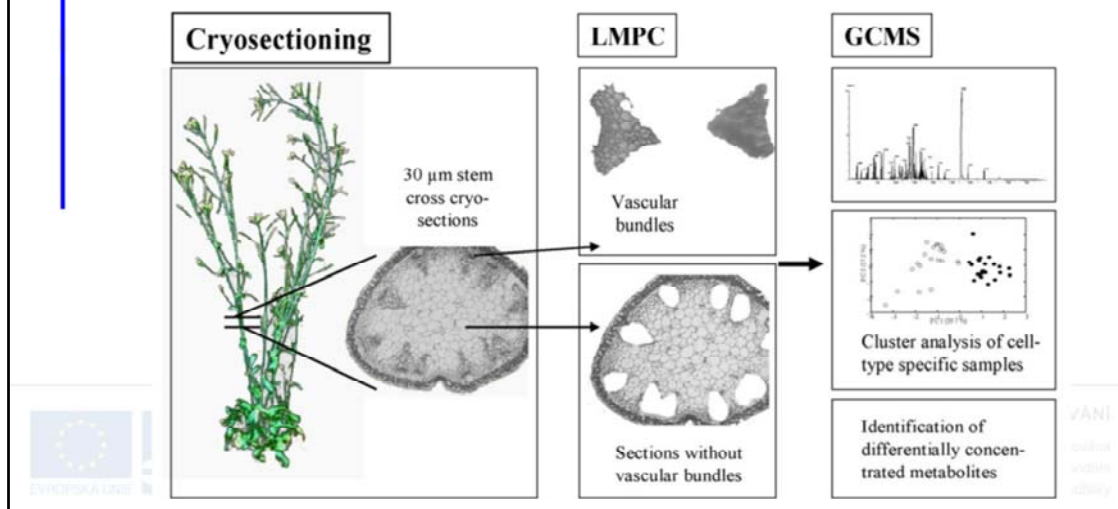
ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# Metabolické profilování

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



# 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

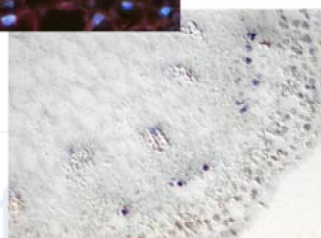
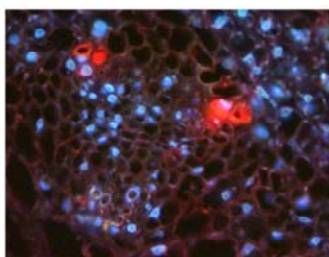


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



© Ministerstvo zemědělství České republiky

# 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)

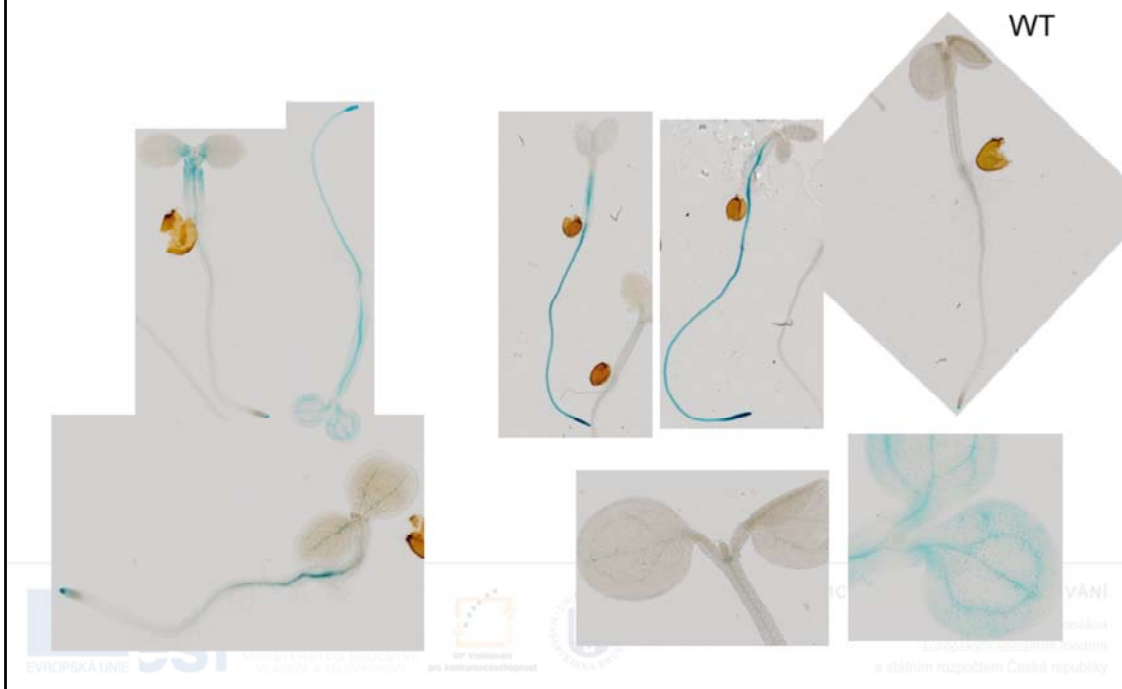


INVESTICE DO ROZVOJE V



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

# Expresní profil



# 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Identifikace mutovaného lokusu

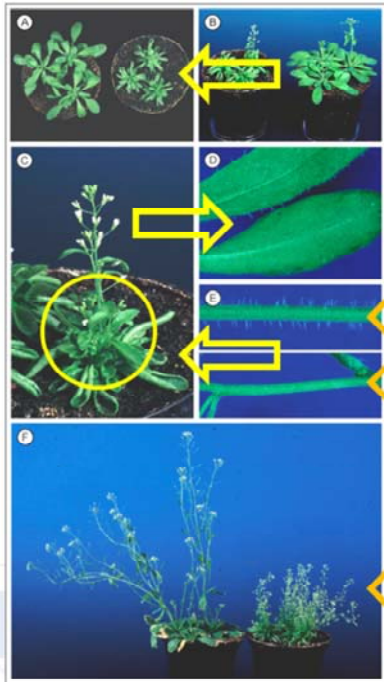
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
  - popis fenotypu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Identifikace mutanta



- zvlňné listy
- keříčkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí

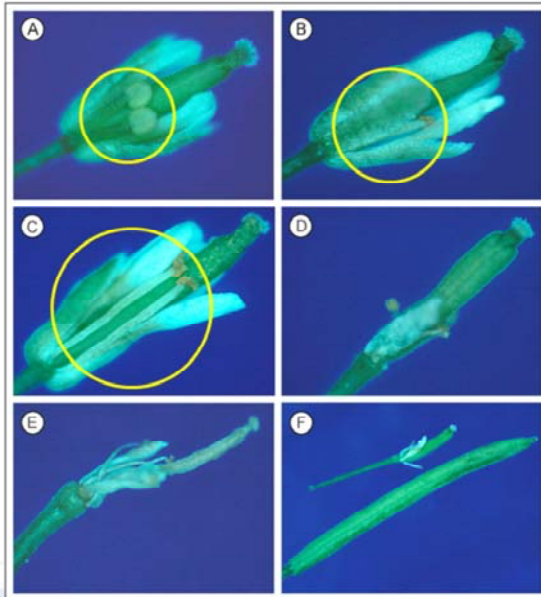


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# Identifikace mutanta



- 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

# Identifikace mutovaného lokusu

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

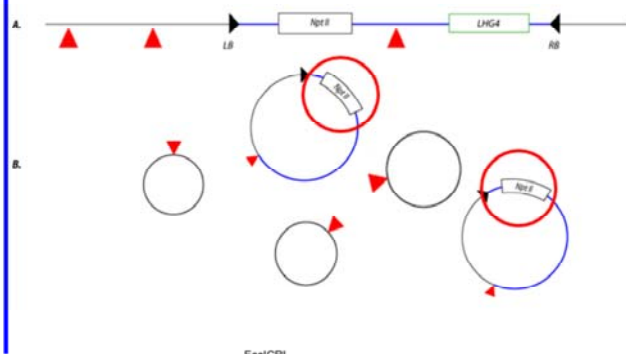


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

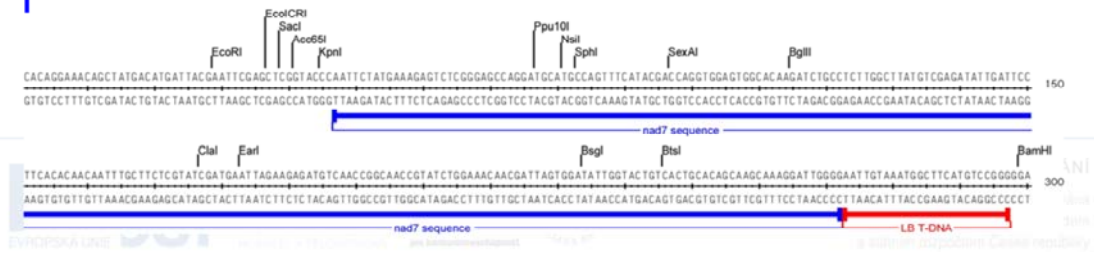
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

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



- restrikční 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

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

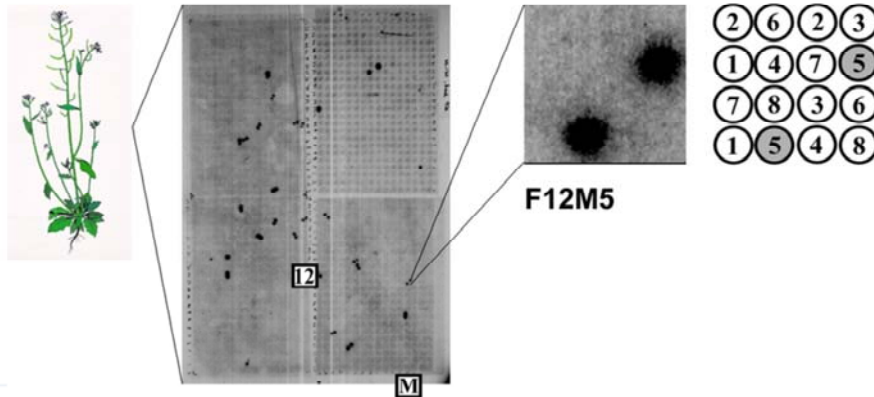


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

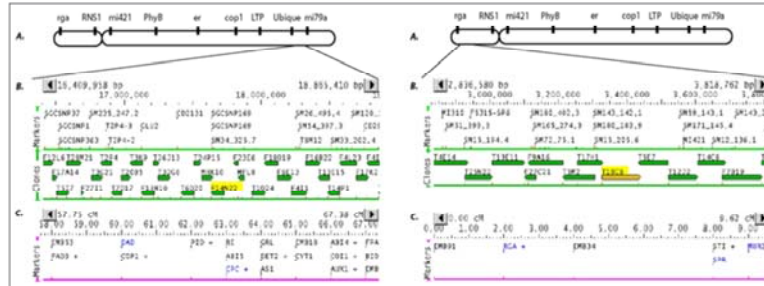


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

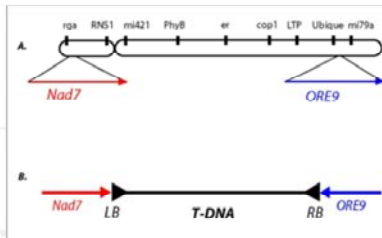
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## 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 2



CE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je realizována v rámci  
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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# 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 genu (PCR produktů) amplifikovaného pomocí specifických primerů
  - **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism)
    - polymorfismus délky restrikčních fragmentů úseků genu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligací adaptorů)
  - **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
    - polymorfismus délky restrikčních fragmentů úseků genu amplifikovaných pomocí PCR
  - **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
    - polymorfismus délky náhodně (pomocí krátkých primerů, 8-10 bp) amplifikovaných úseků genu

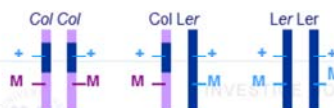
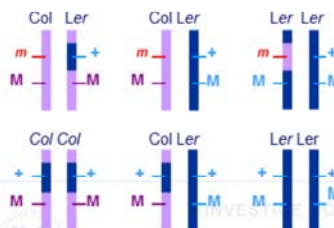
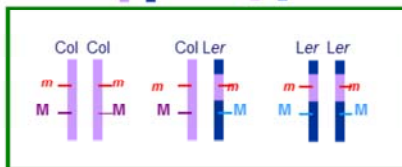
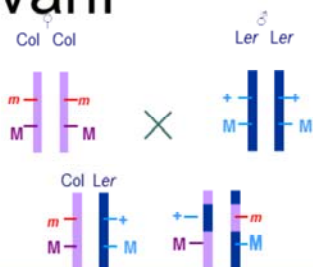


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Poziční klonování

Příprava mapovací populace



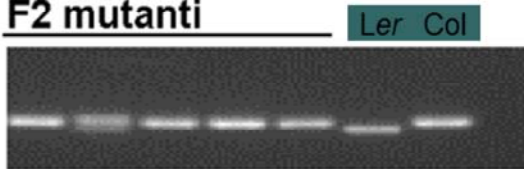
EVROPSKÝ FOND PRO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

**Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem**

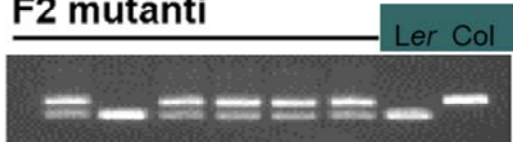
$$r [\%] = \frac{\text{počet chomozomů Col I}}{\text{počet všech chromozomů}} \times 100$$

**F2 mutanti**



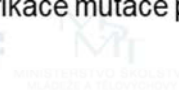
marker I – ve vazbě  
5 mutantů  
 $1/10 \times 100 = 10\%$

**F2 mutanti**



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

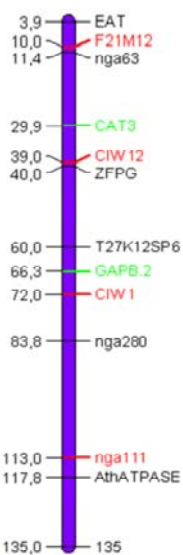


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

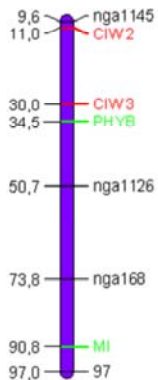
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Mapa DNA molekulárních markerů

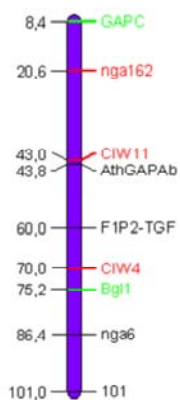
1CH



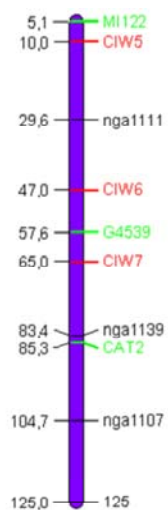
2CH



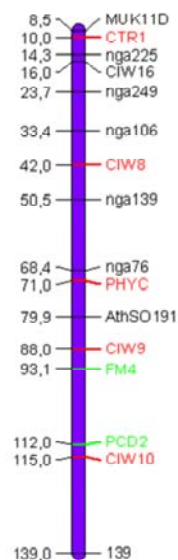
3CH



4CH



5CH



EVROPSKA UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



s státním rozpočtem České republiky



# 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Diskuse



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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