

# CG020 Genomika

## 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](mailto:hejatko@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

# 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



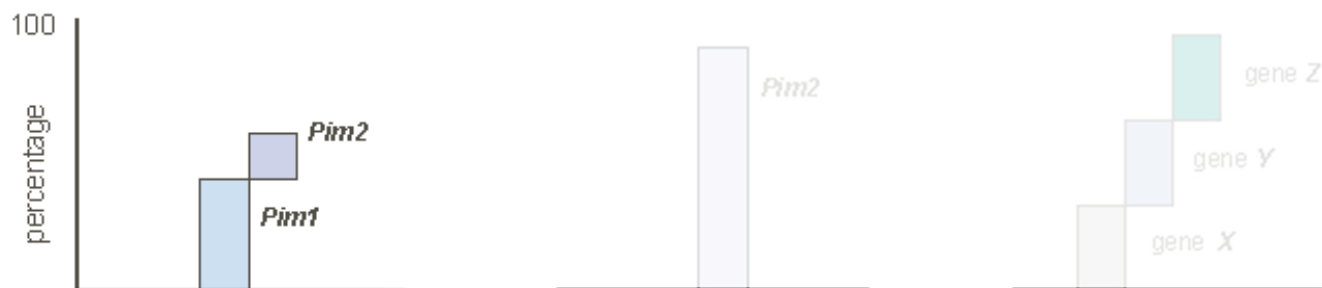
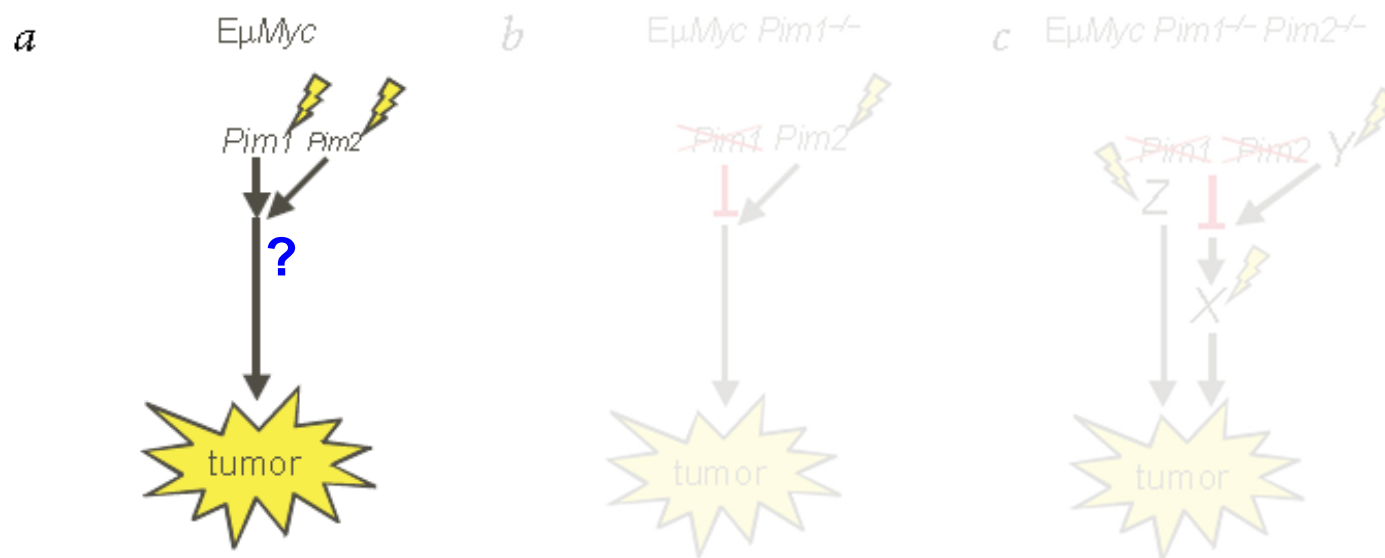


# Osnova

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

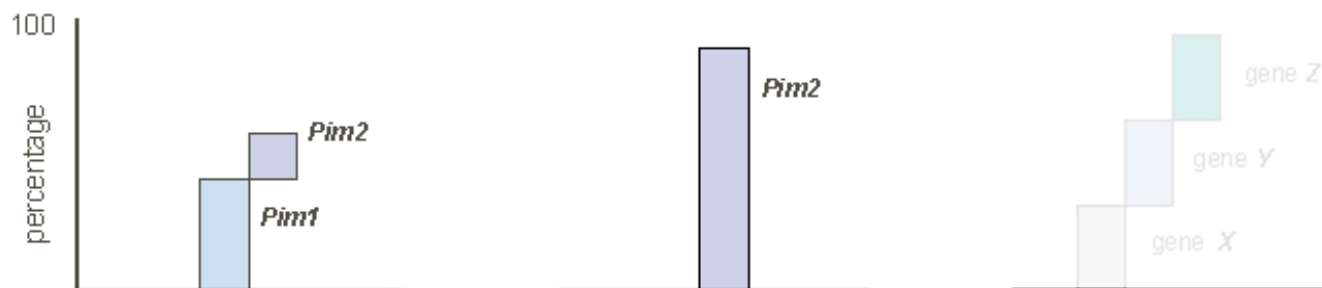
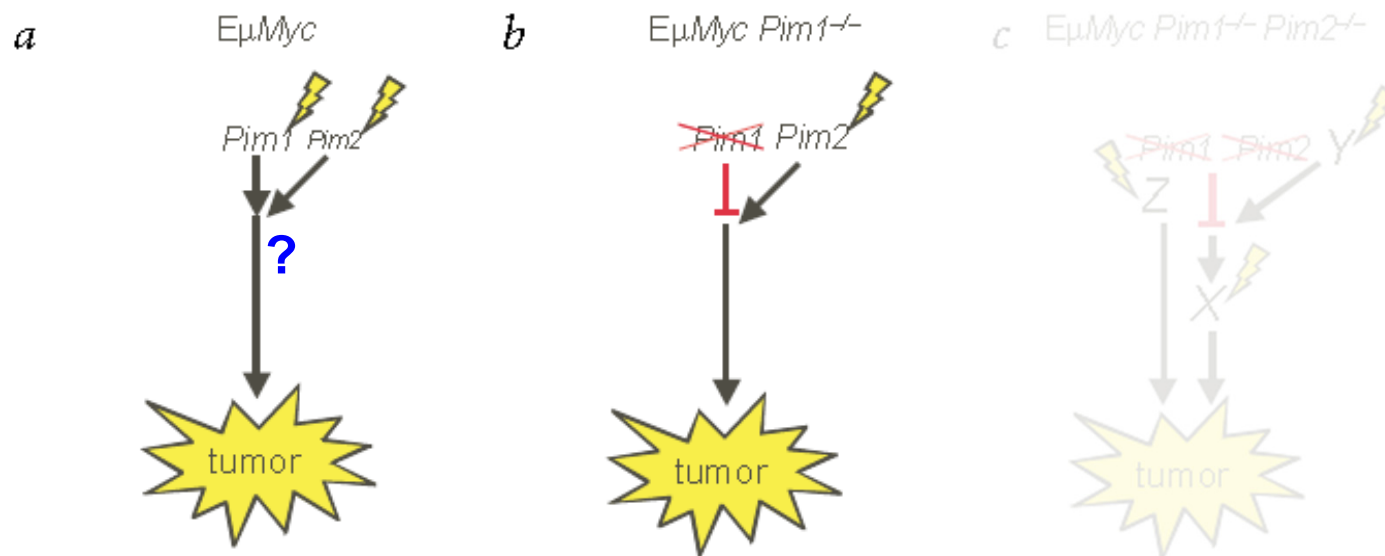
# Inzerční mutageneze v přímé genetice

- Využití inzerční mutageneze ve studiu kancerogeneze
  - Infekce EμMyc myši **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**



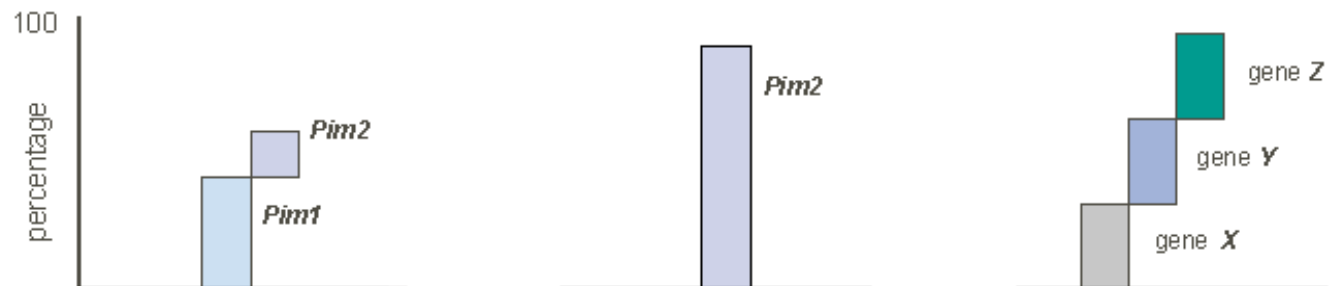
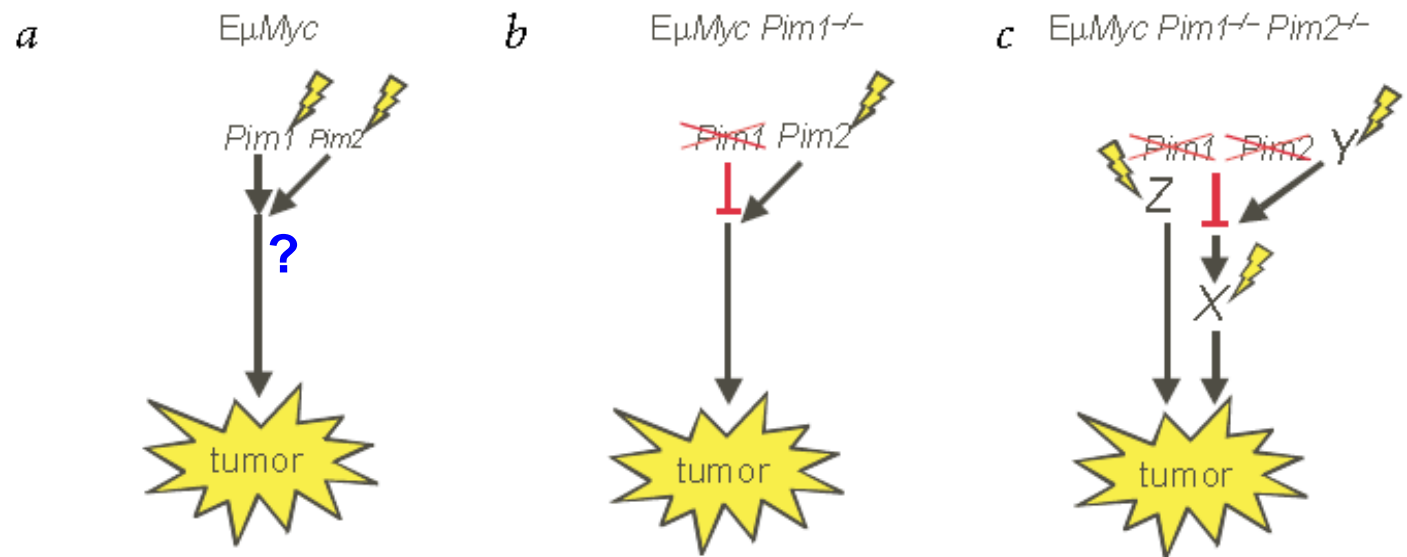
# Inzerční mutageneze v přímé genetice

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



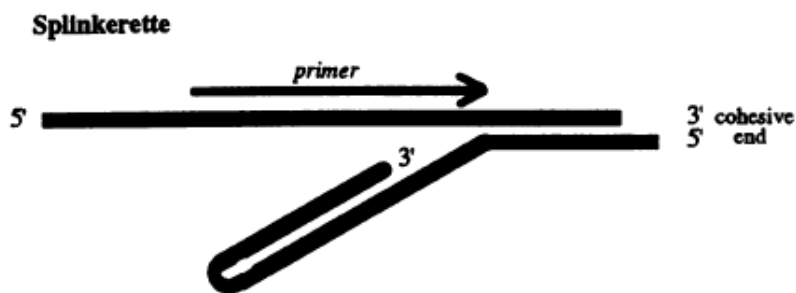
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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**)

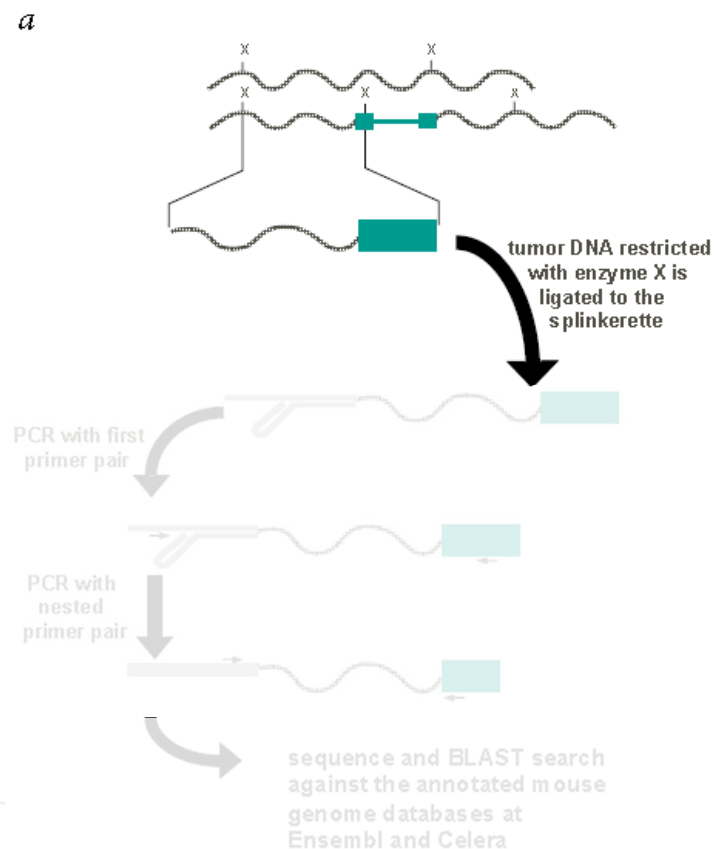


# Inzerční mutageneze v přímé genetice

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



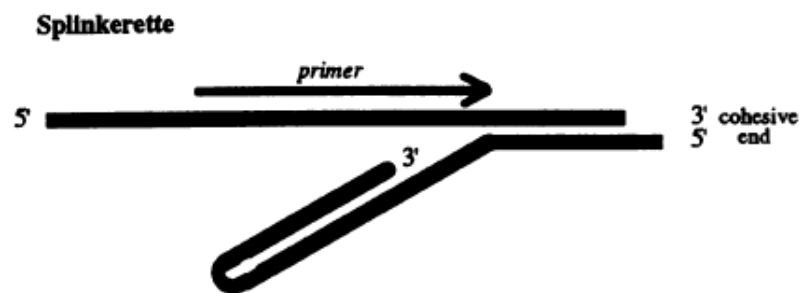
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



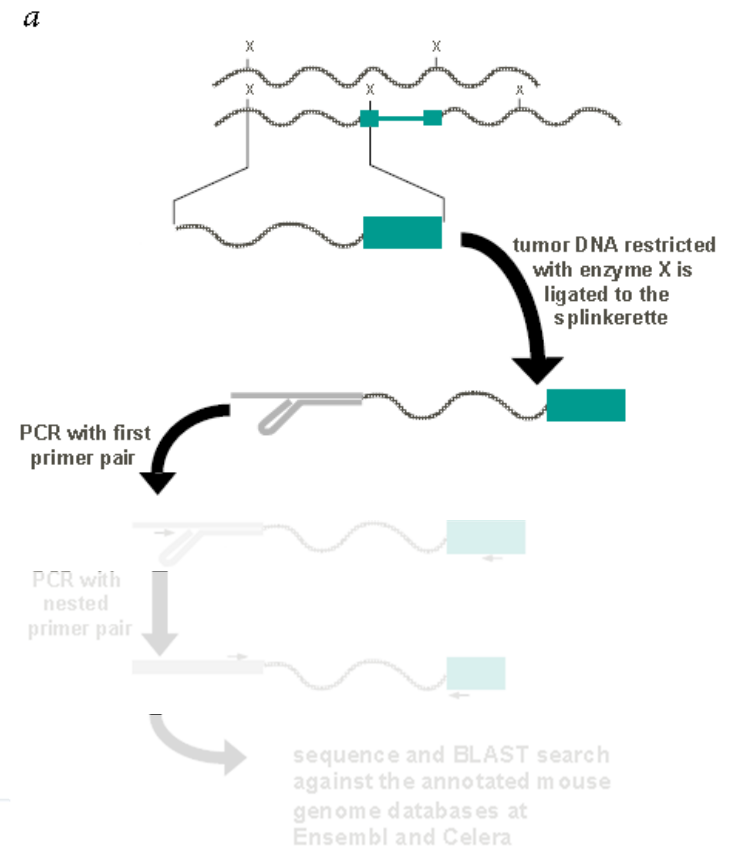
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

# Inzerční mutageneze v přímé genetice

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



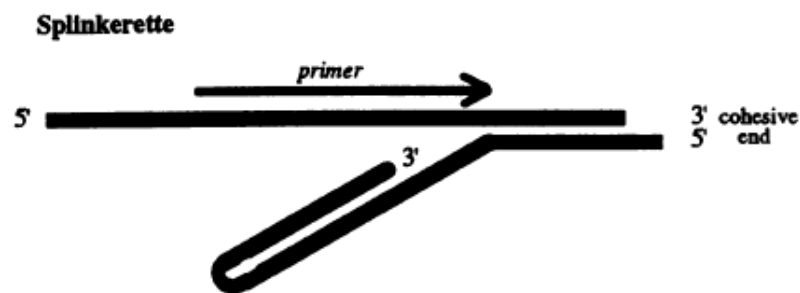
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



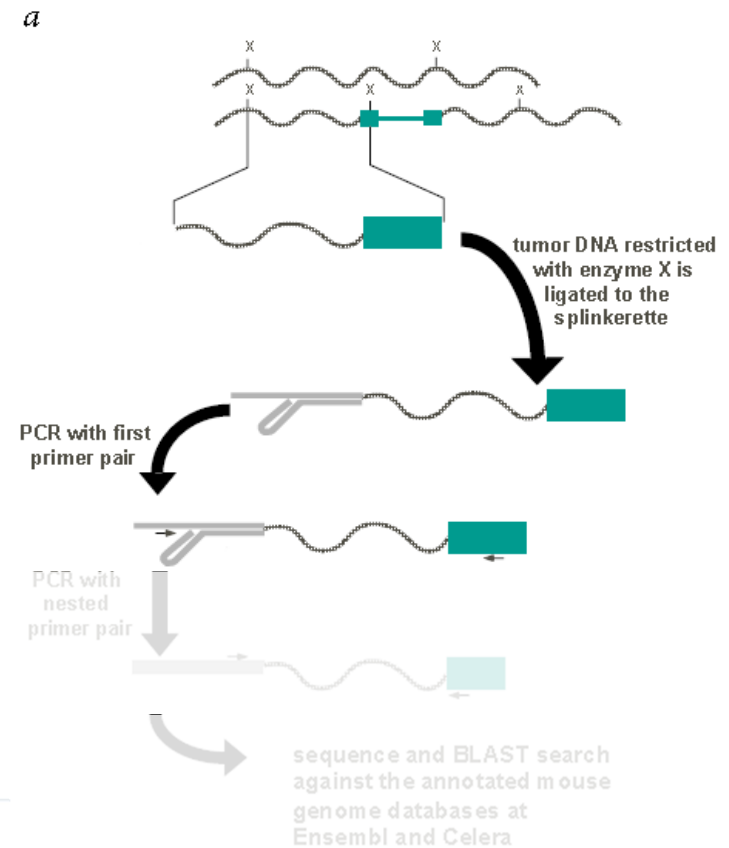
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



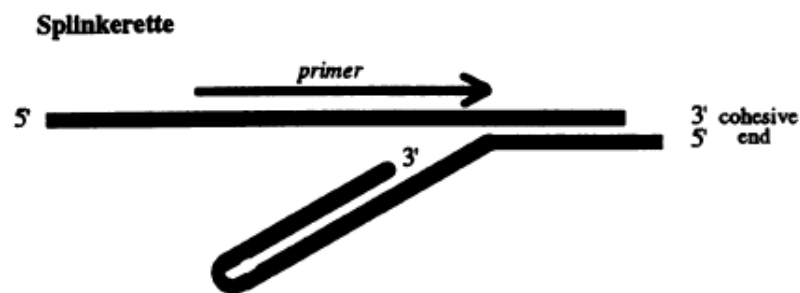
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



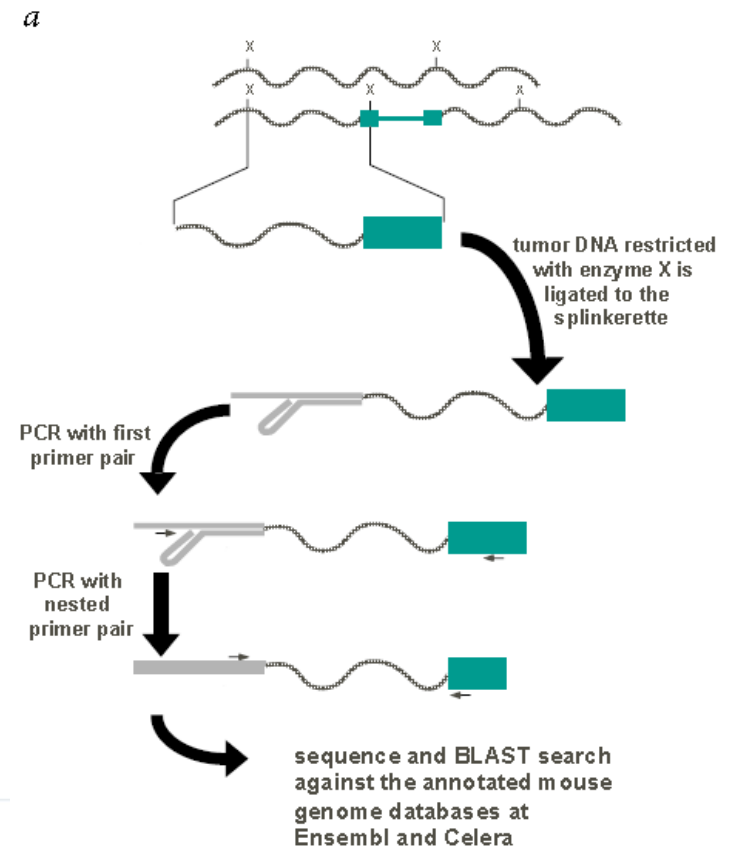
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

# Inzerční mutageneze v přímé genetice

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



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



Mikkers et al., Nature Gen (2002)



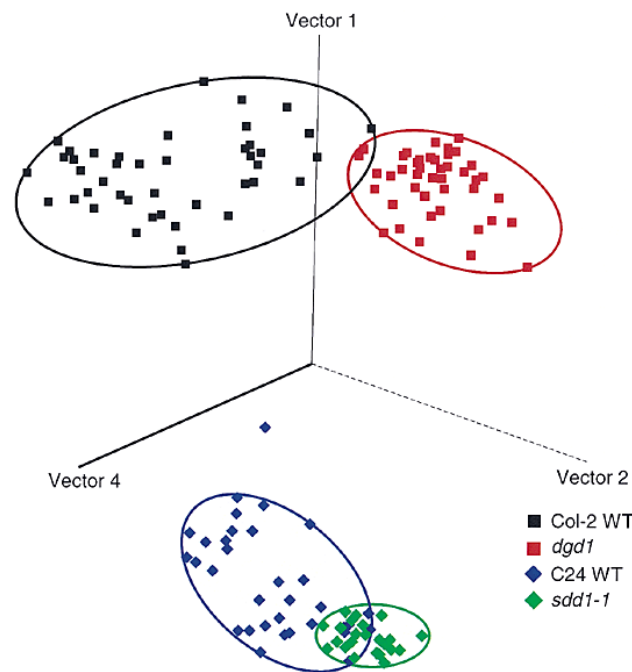
# Osnova

- 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



# 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



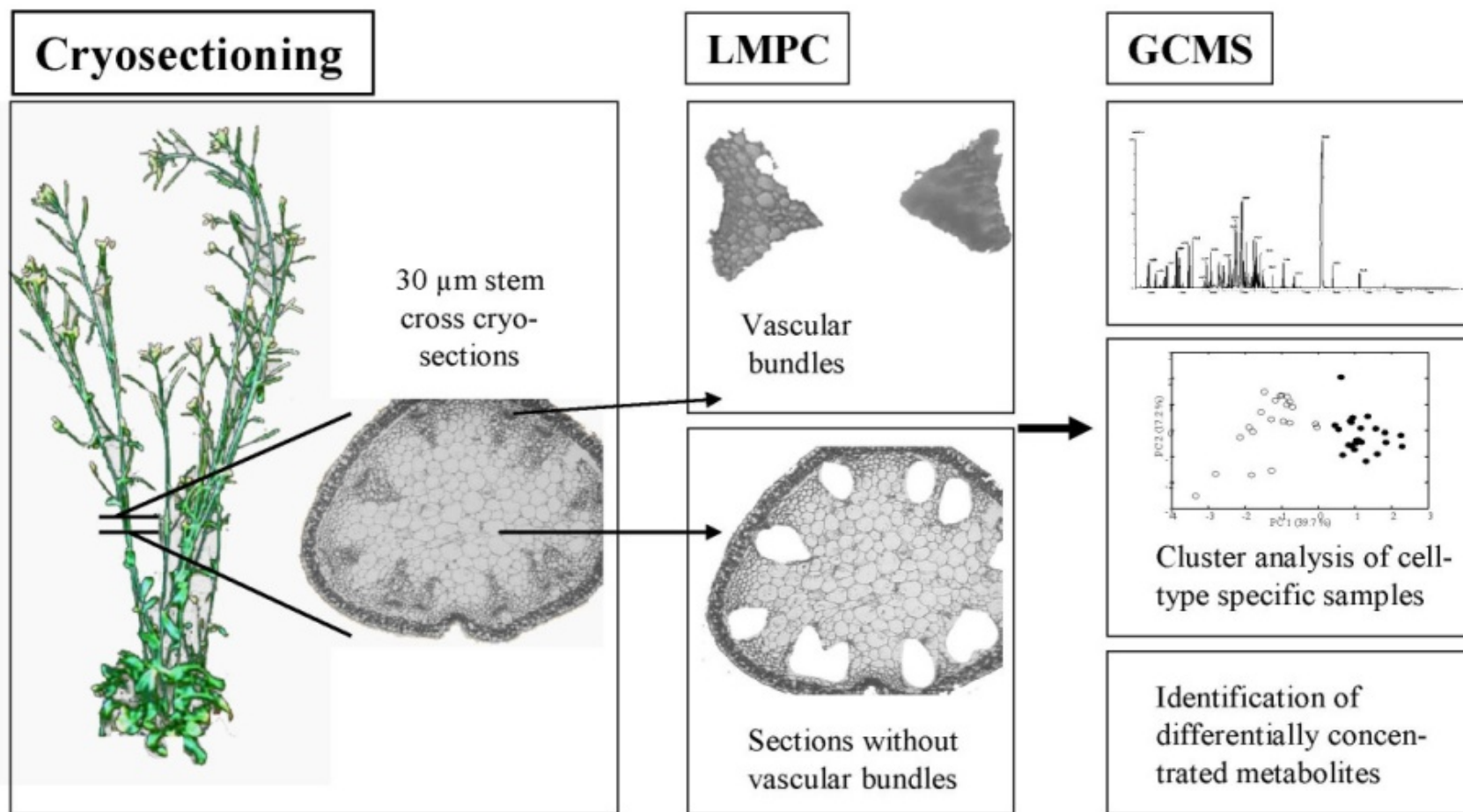
# Metabolické profilování

- 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](#)



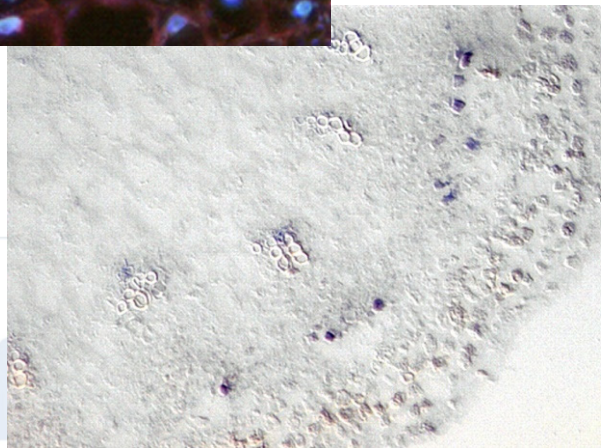
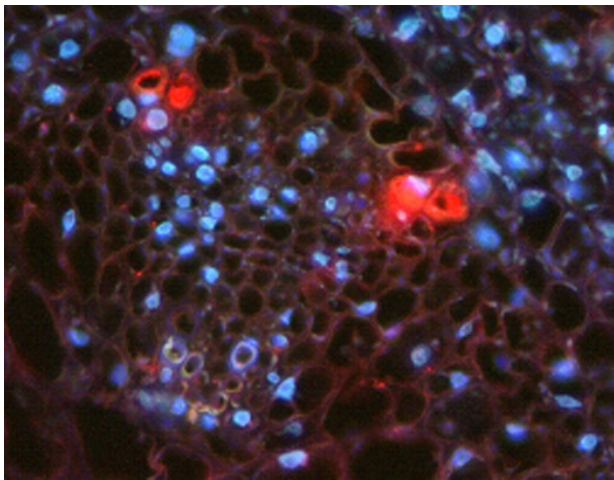
# Osnova

- 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



# Expresní profil

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

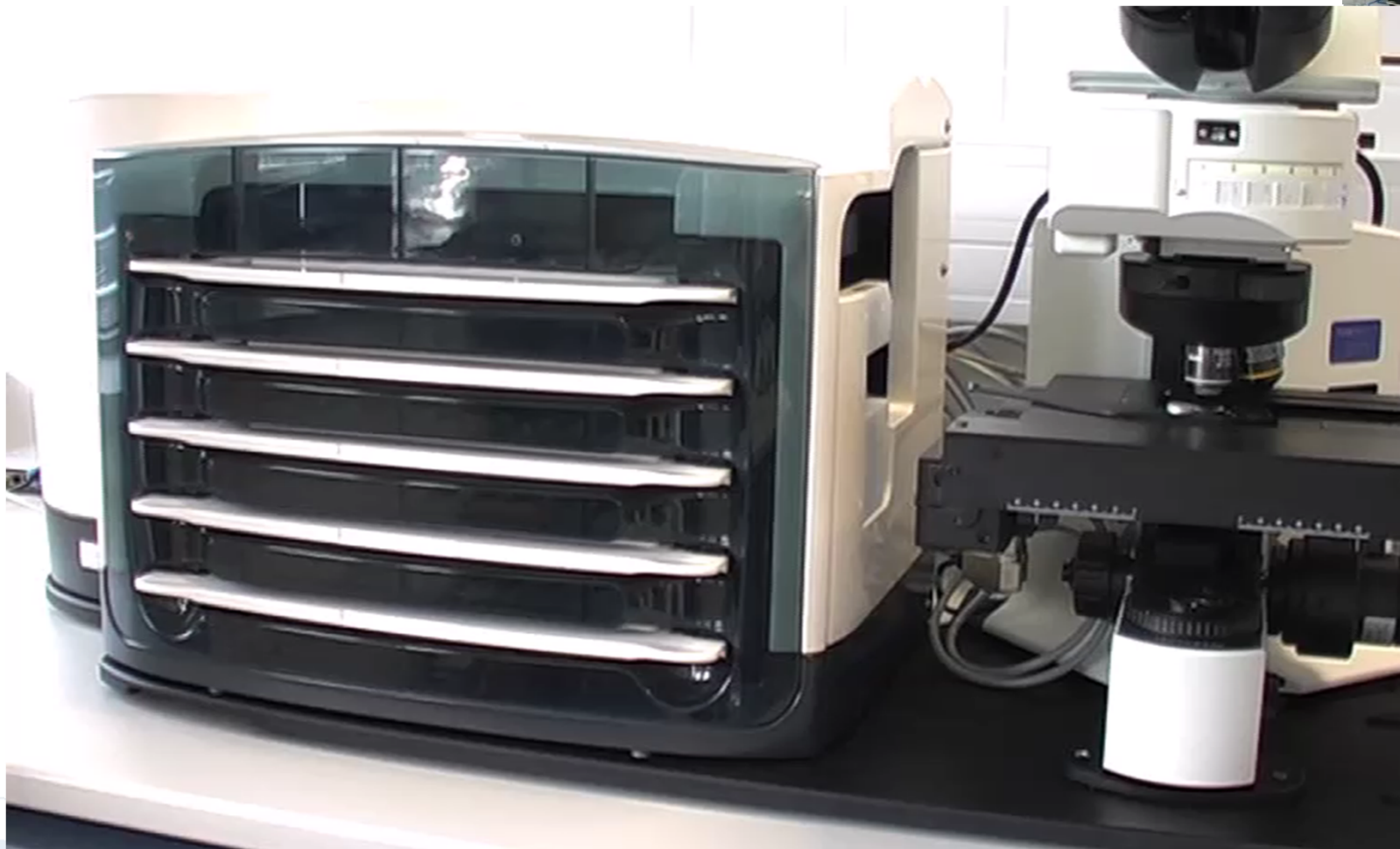
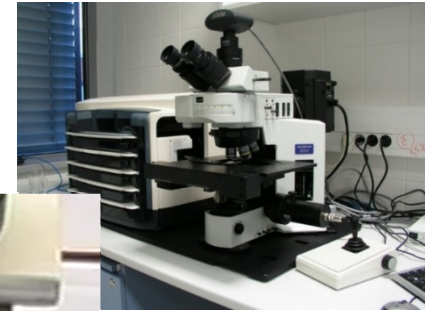


# Expresní profil

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



# Vyhledávání pomocí automatické mikroskopie

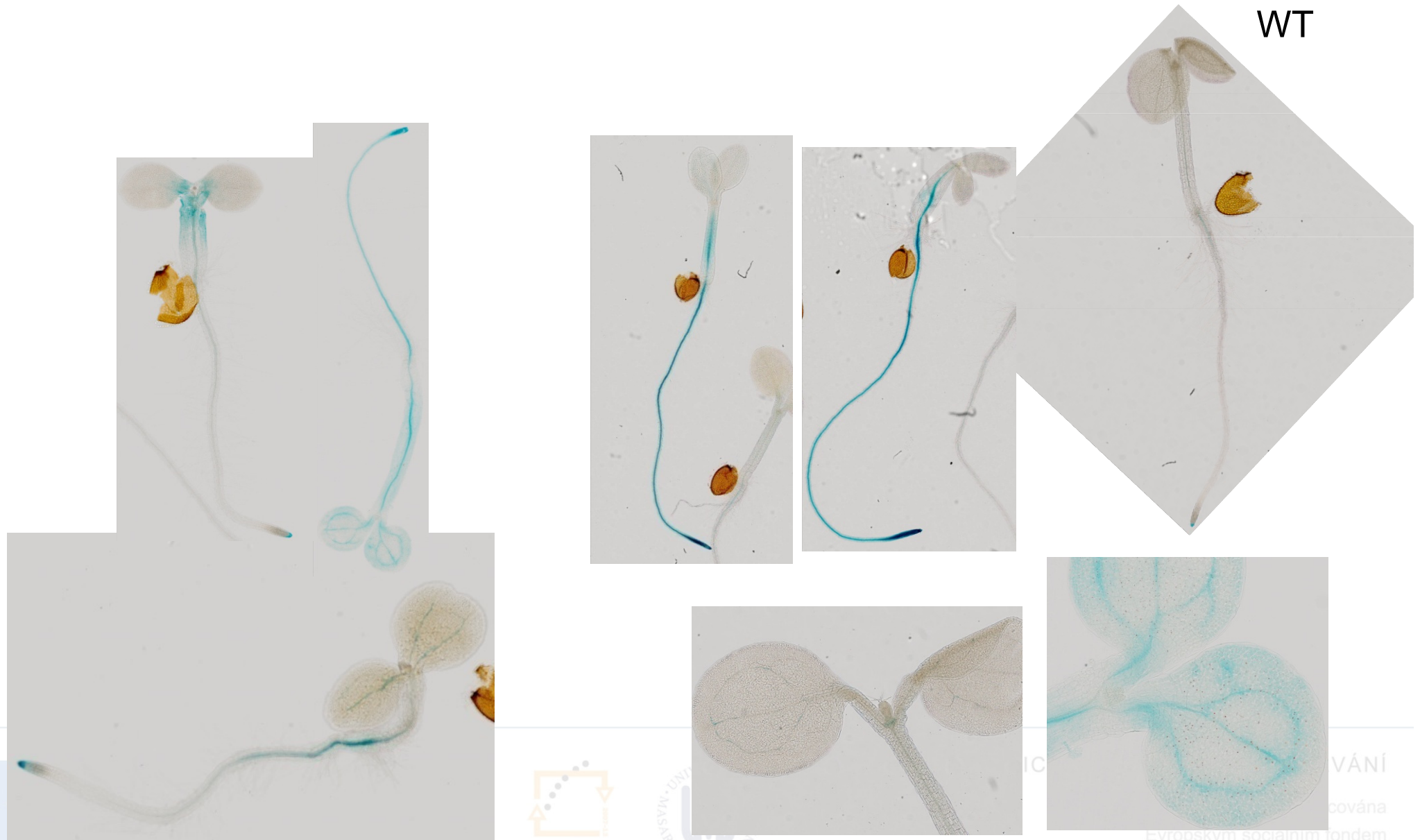


OJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky  
Dobisova and Hejtko, , *Methods in Mol Biol*, 2014

# Expresní profil



WT

# 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

# Identifikace mutovaného lokusu

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

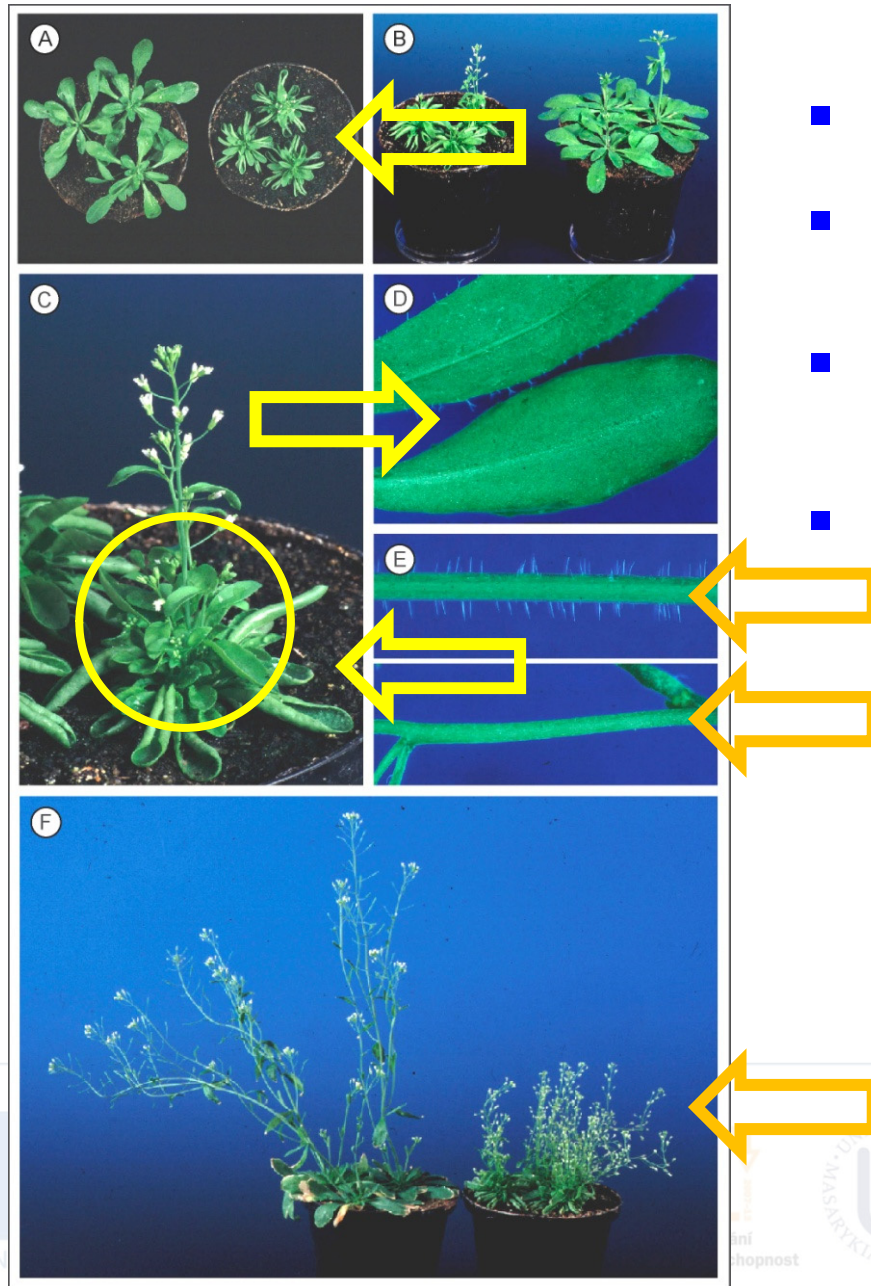


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



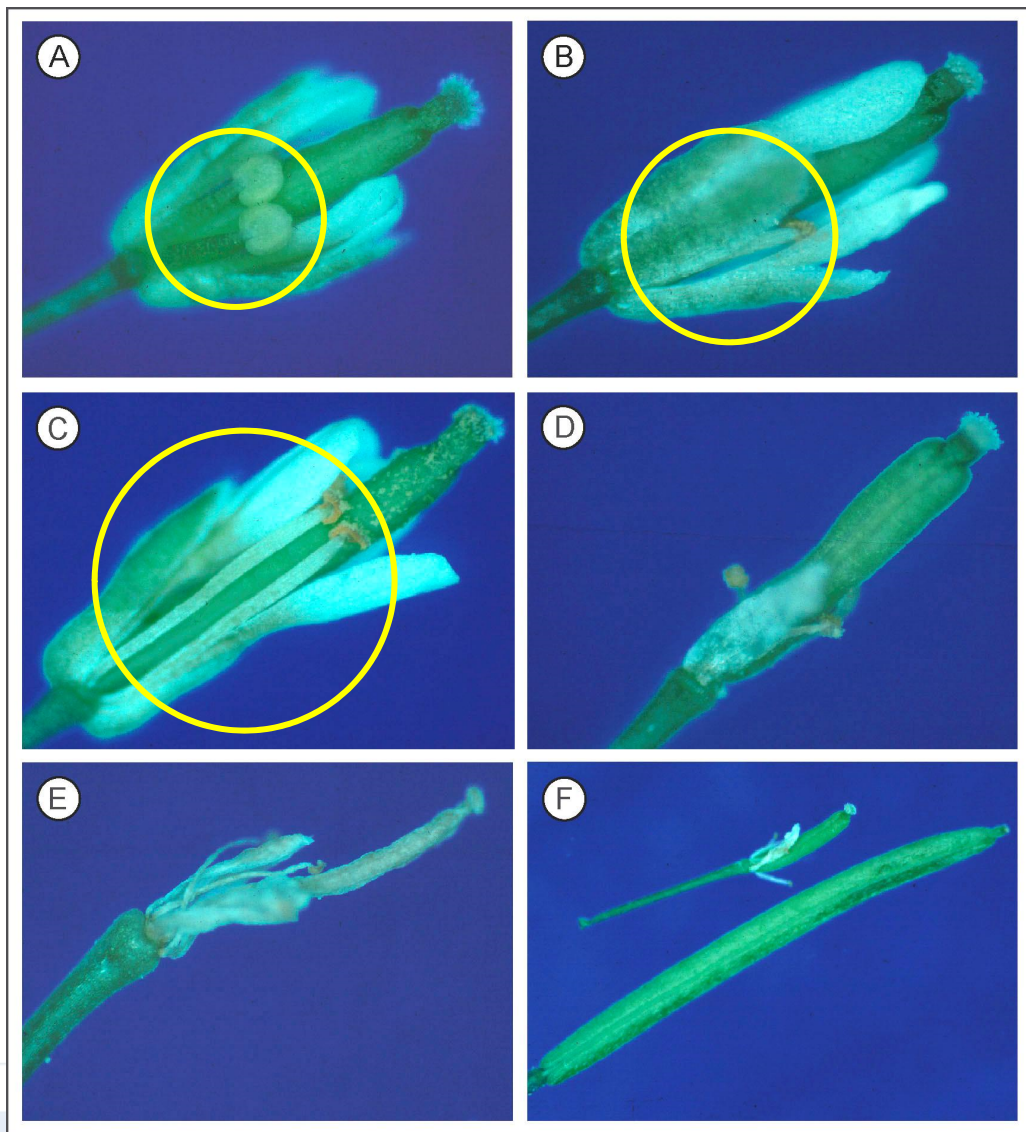
# Identifikace mutanta



- zvlněné listy
- keříčkový 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)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

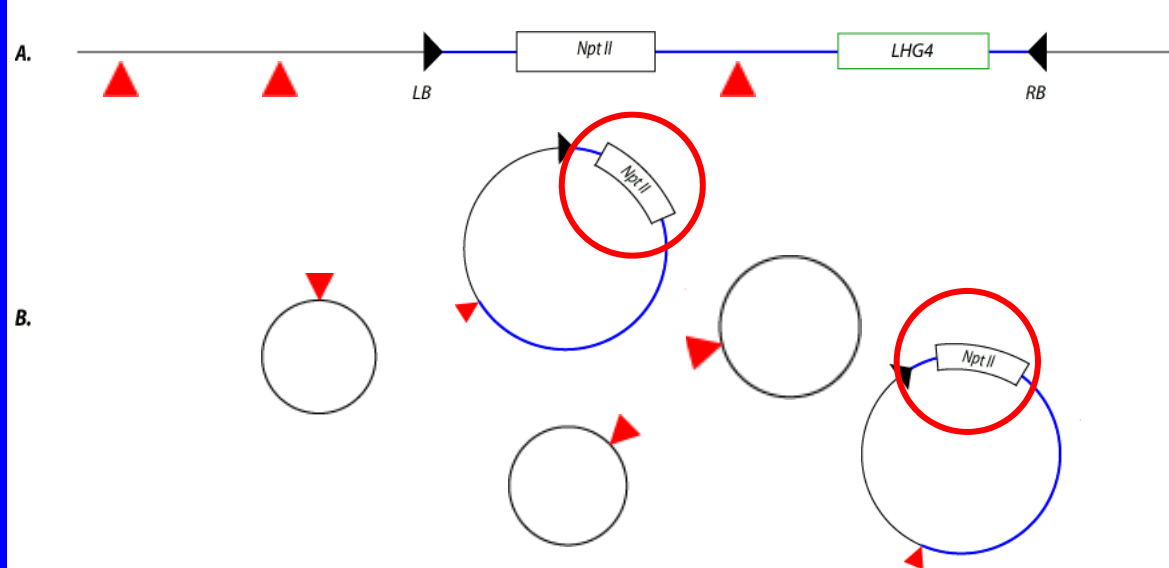
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

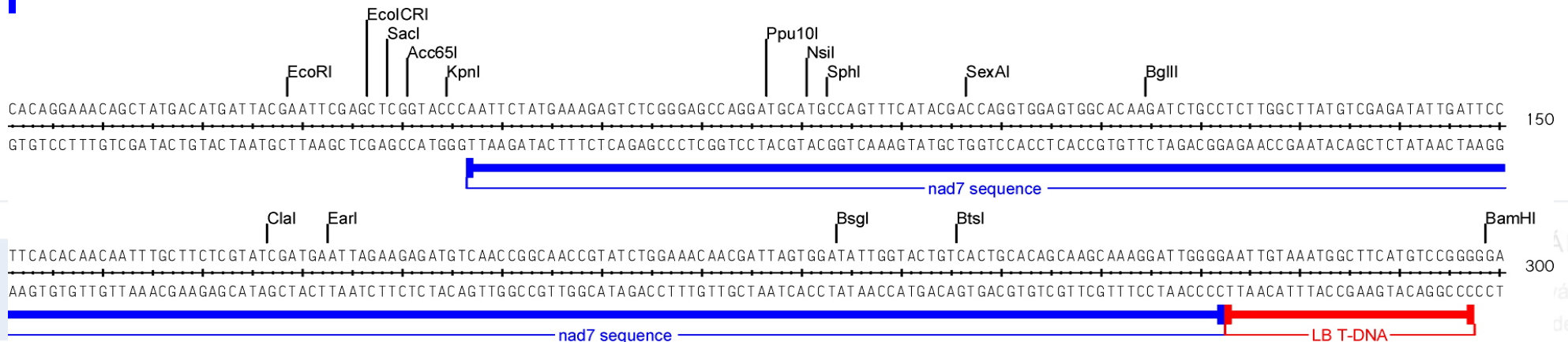
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
  - popis fenotypu
  - identifikace T-DNA mutované oblasti

# Identifikace mutovaného lokusu

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



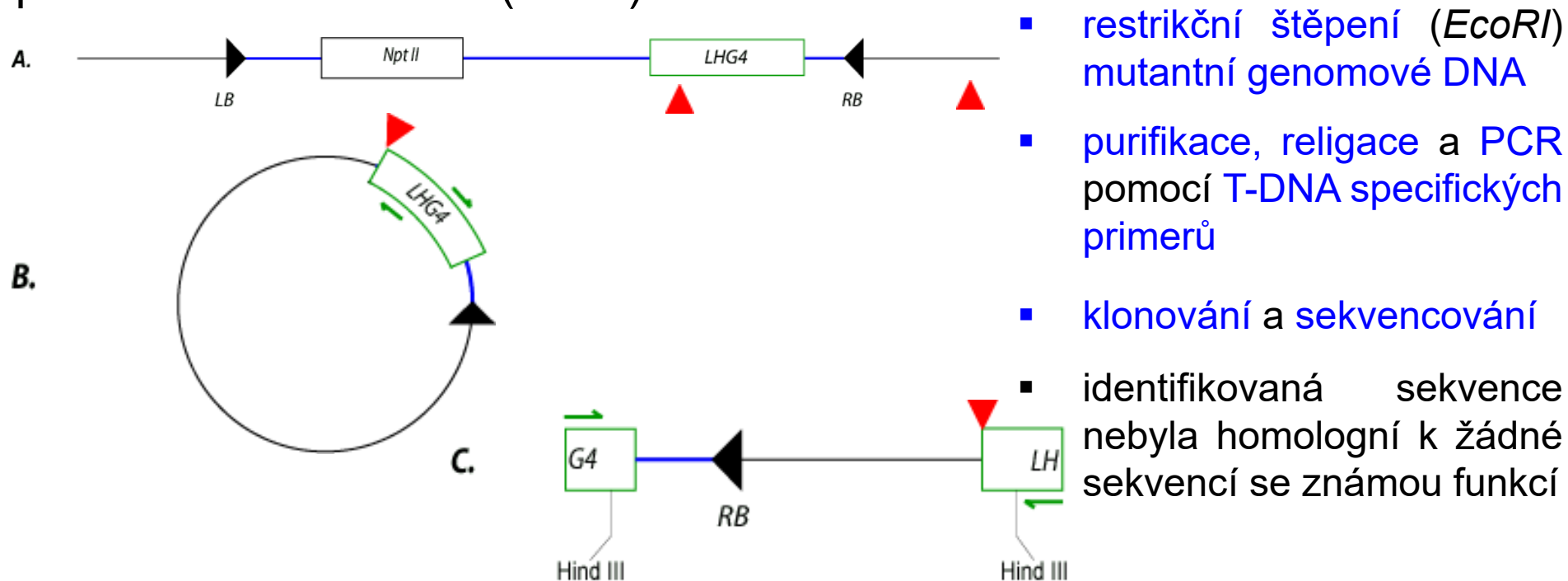
- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E.coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro *NAD7* kódovaným na *mtDNA*



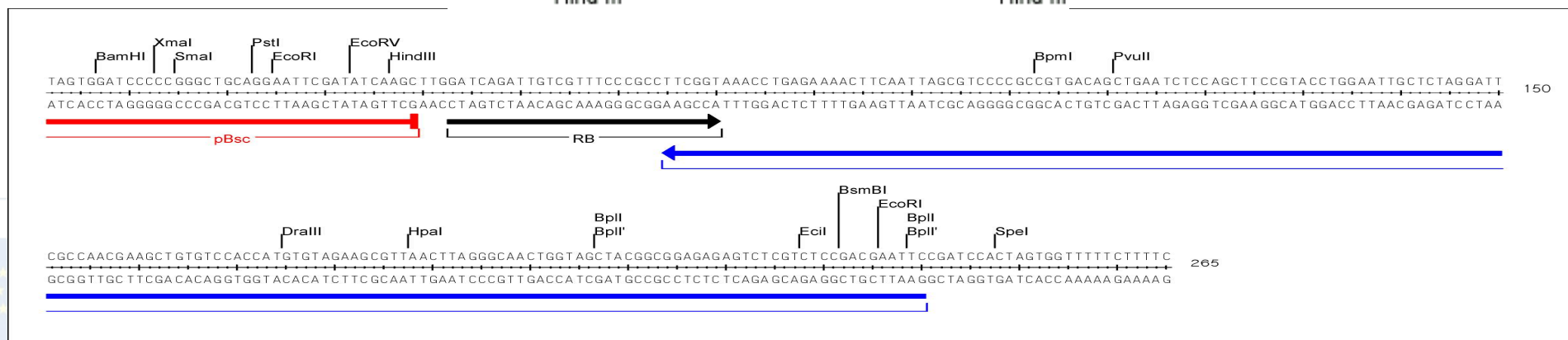


# Identifikace mutovaného lokusu

## 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

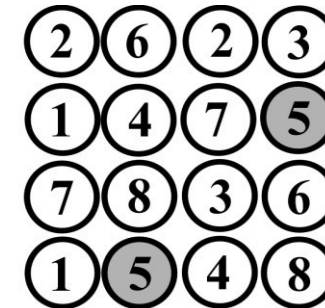
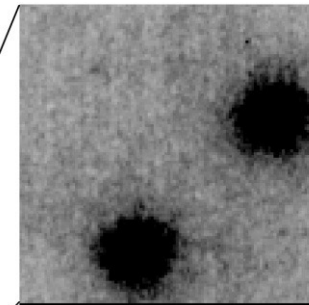
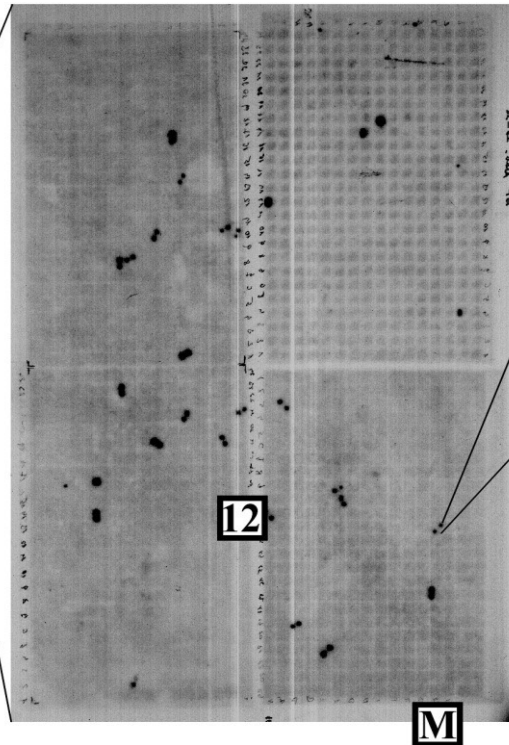


# Identifikace mutovaného lokusu

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

# Vyhledávání v knihovně IGF-BAC

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



# 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

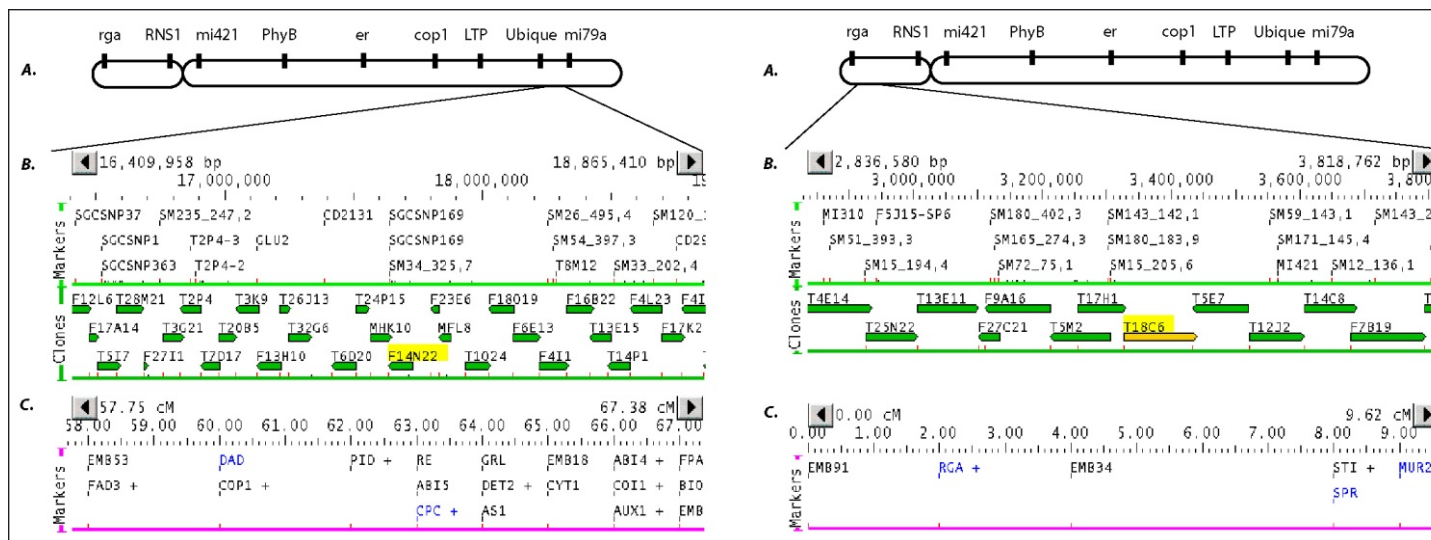


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

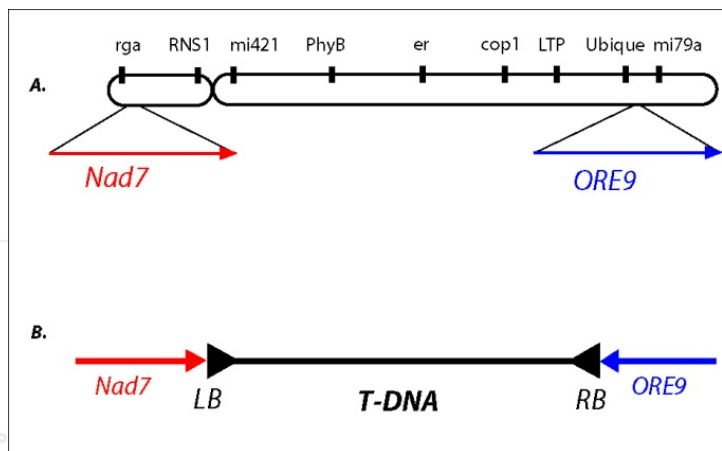
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# 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



# 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

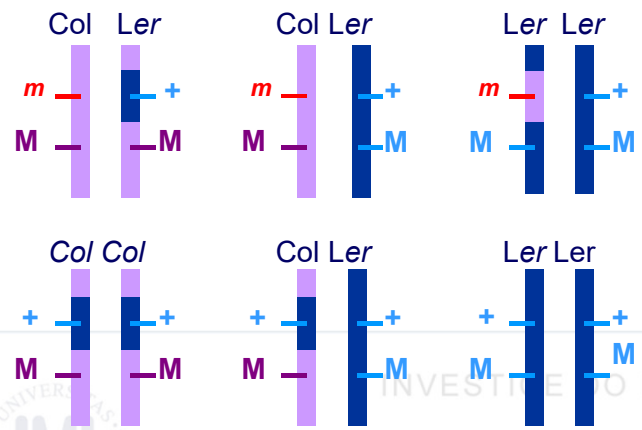
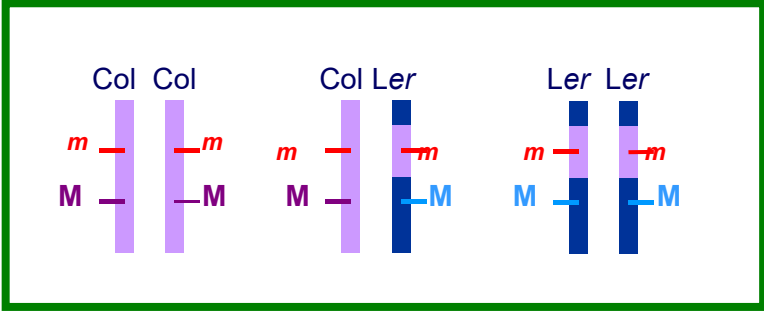
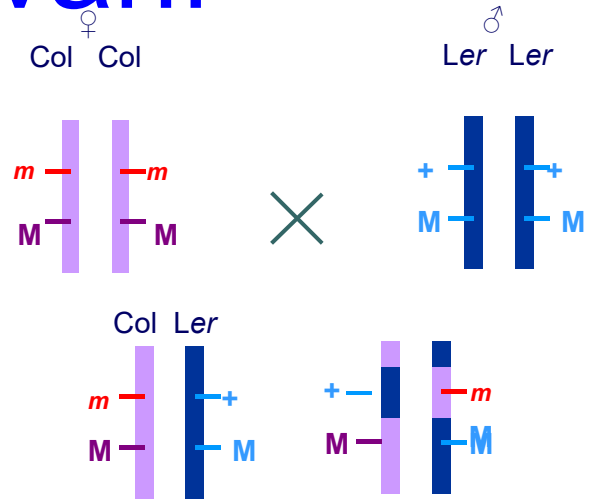
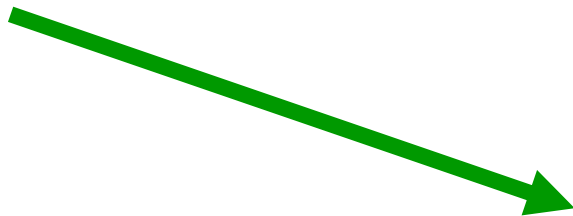
# Identifikace mutovaného lokusu

## ■ 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 restrikčních fragmentů** úseků genomu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů)
- **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
  - **polymorfismus délky restrikčních fragmentů** úseků genomu amplifikovaných pomocí **PCR**
- **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
  - **polymorfismus délky náhodně** (pomocí krátkých primerů, 8-10 bp) **amplifikovaných úseků genomu**

# Poziční klonování

Příprava mapovací populace



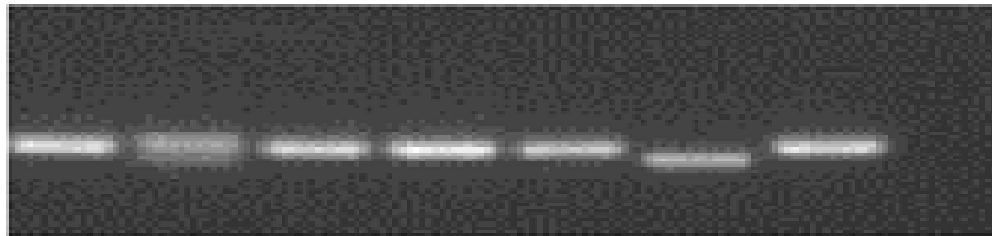


**Rekombinantní analýza** – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

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

**F2 mutanti**

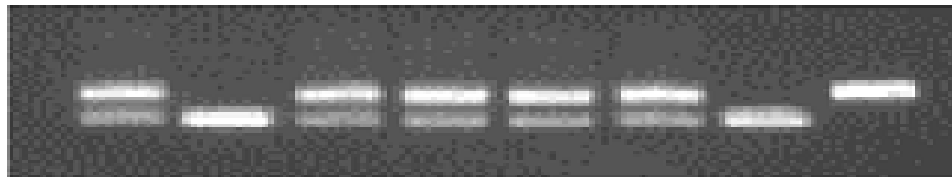
Ler Col



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

**F2 mutanti**

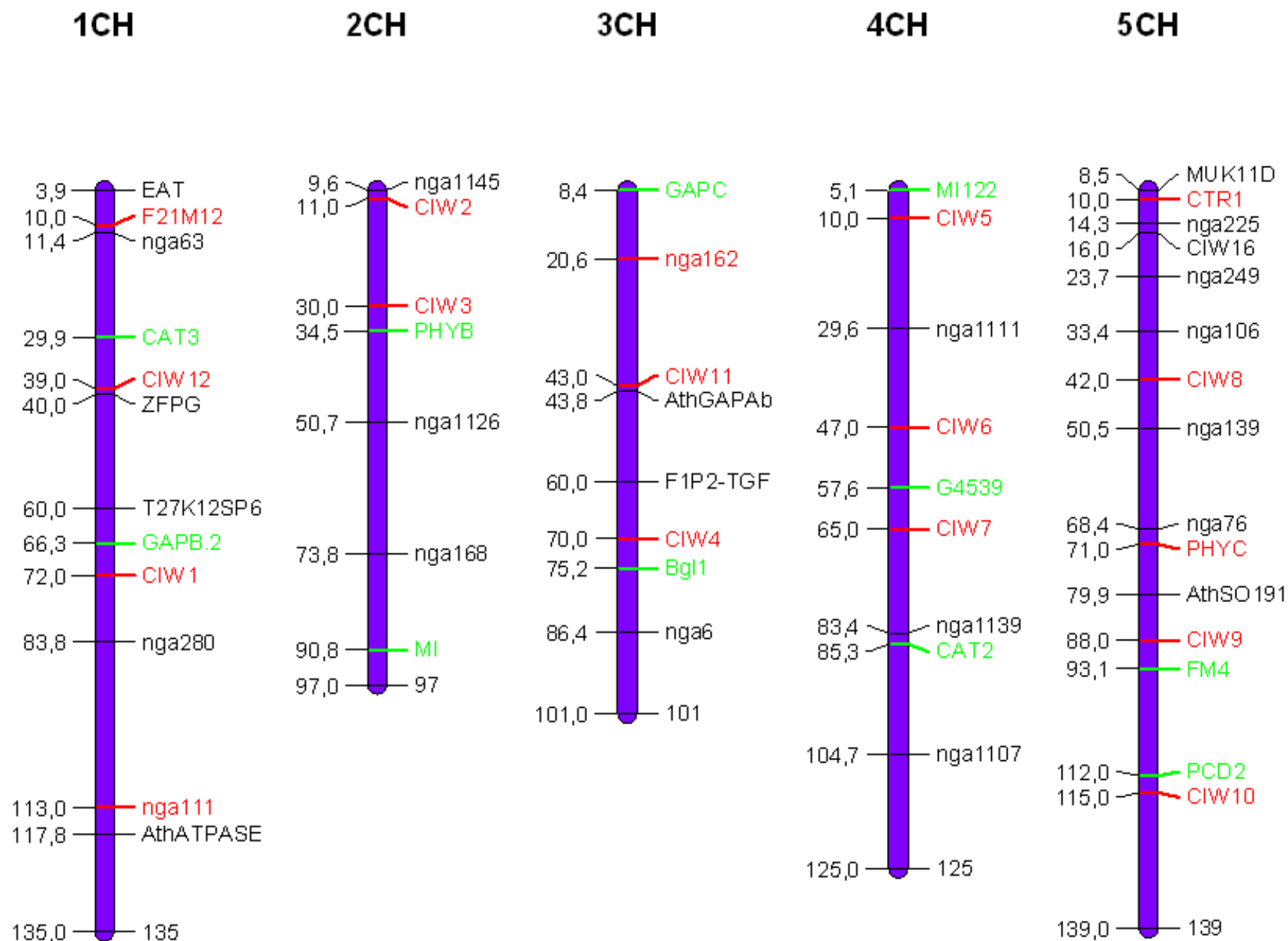
Ler Col



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)

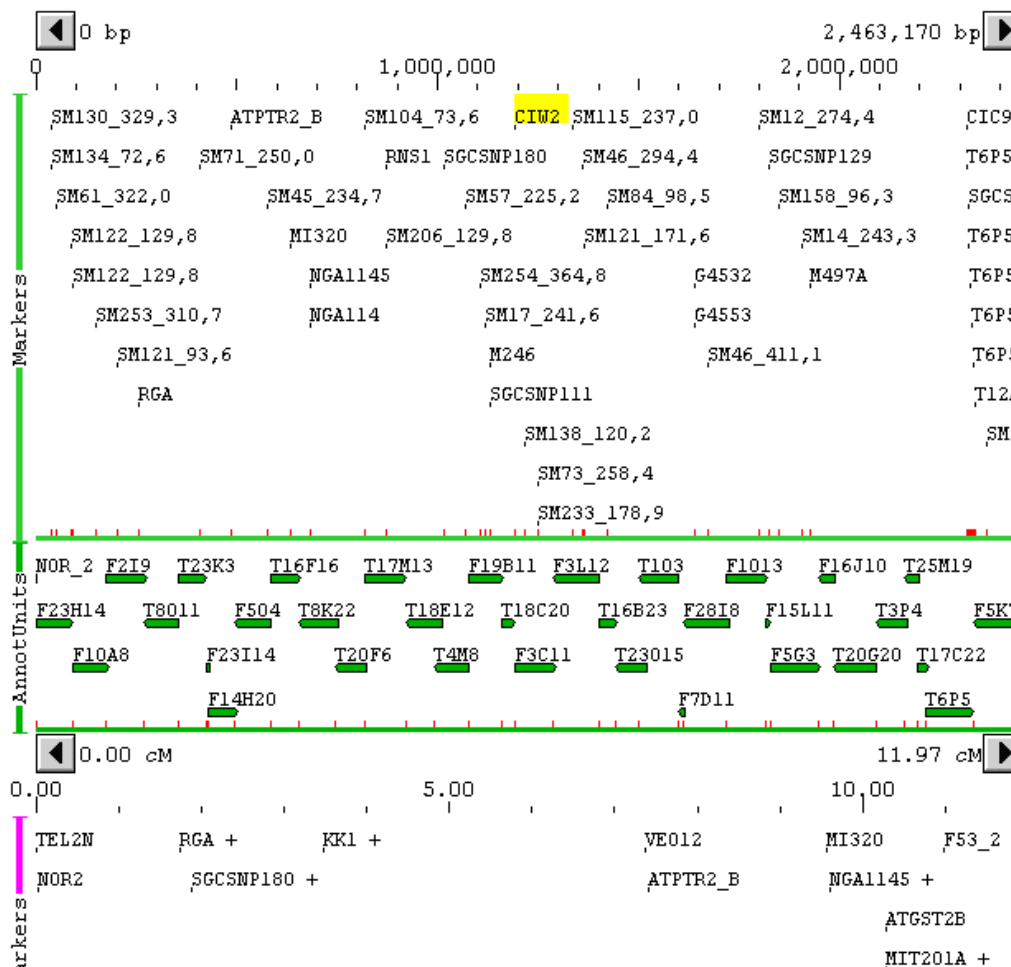
Select range (e.g. 1500-2000)

[AGI Map color key](#)

### Lister & Dean RI

Zoom to:

Search by name (e.g. UFO)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

KAJANA BRU

JE VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancována  
čím sociálním fondem

a 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

# Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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