

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, 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
 - GWAS

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



(retro)transposons



„Reverzně genetický“ přístup

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

T-DNA

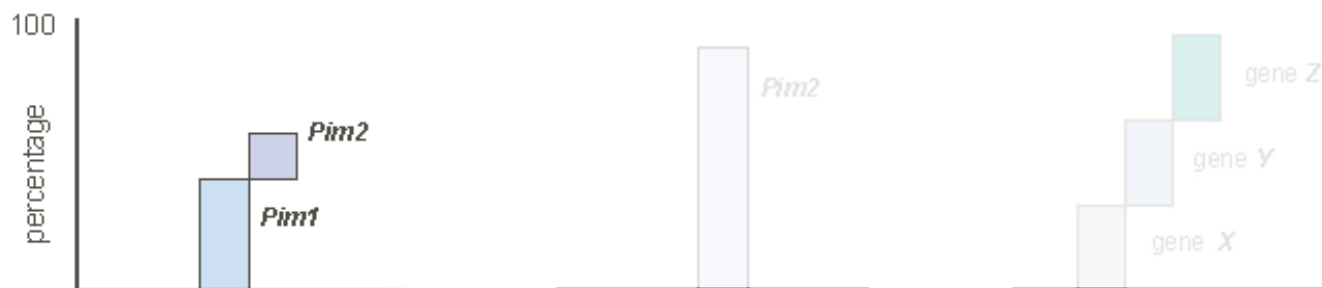
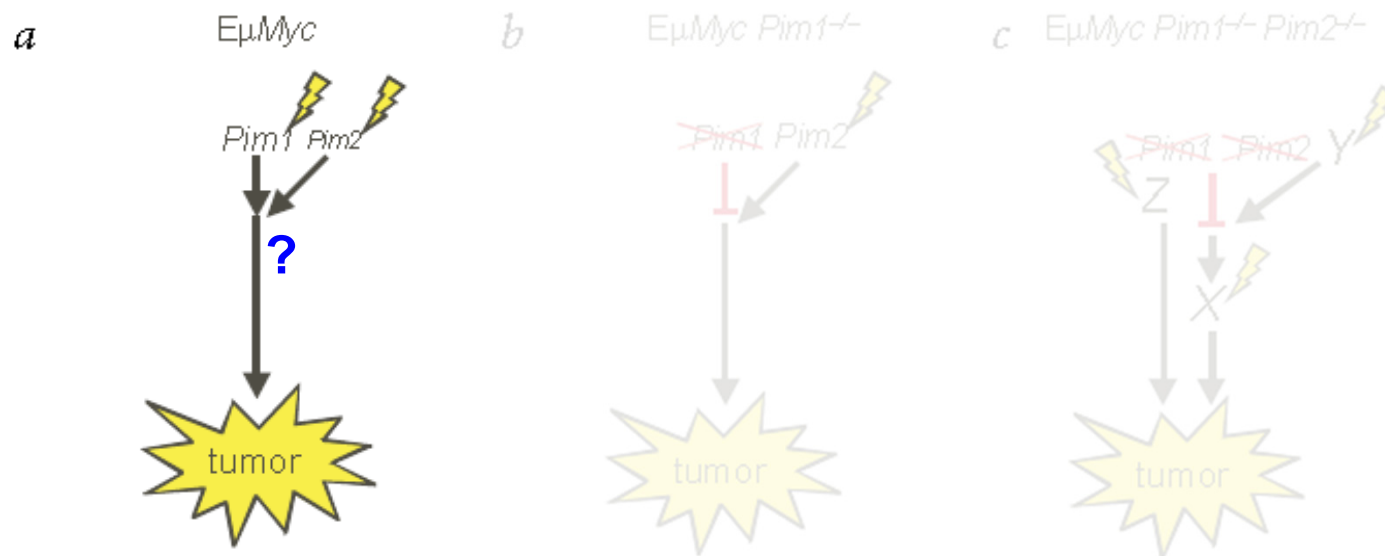


Osnova

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

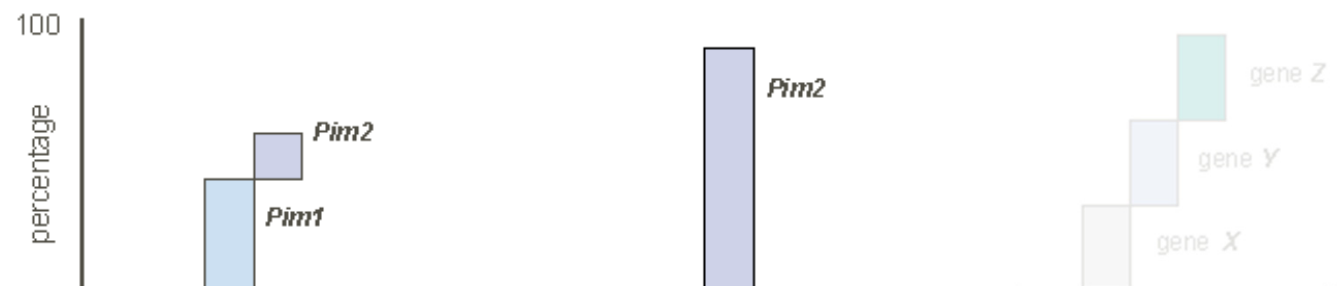
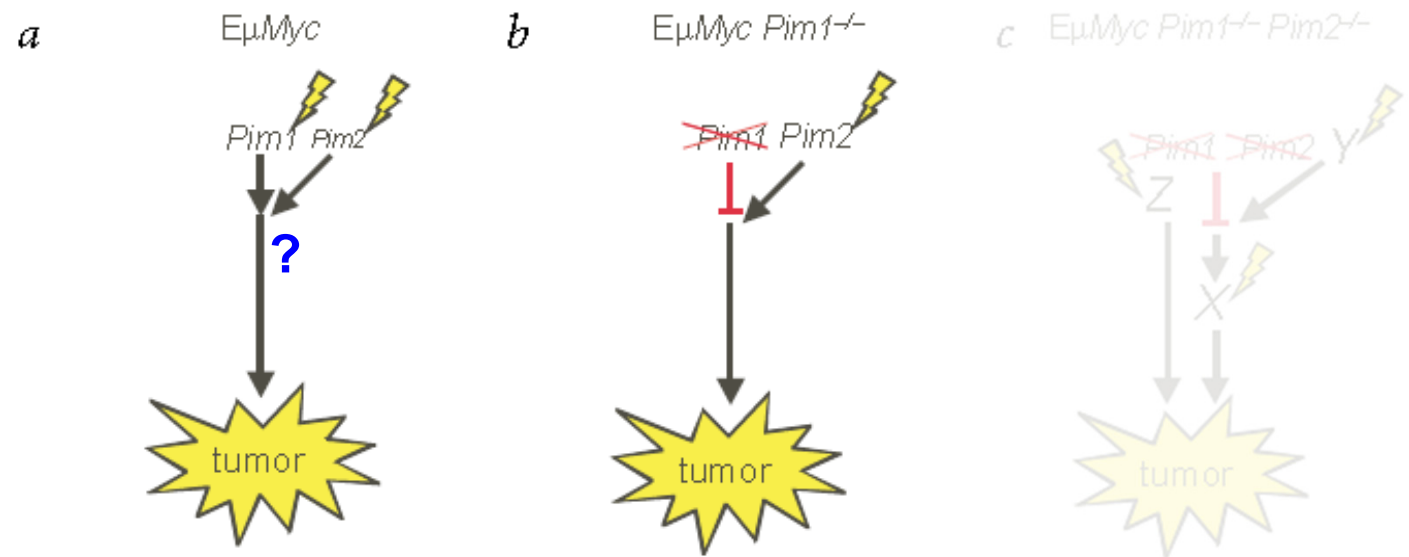
Inzerční mutageneze v přímé genetice

- 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**



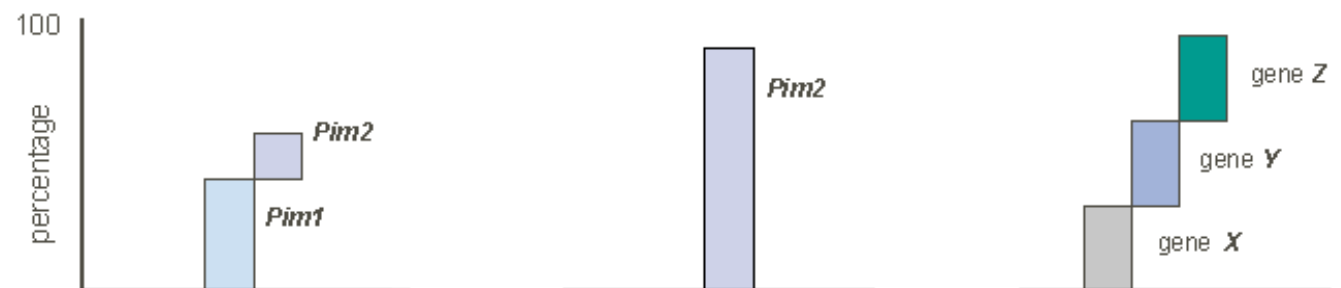
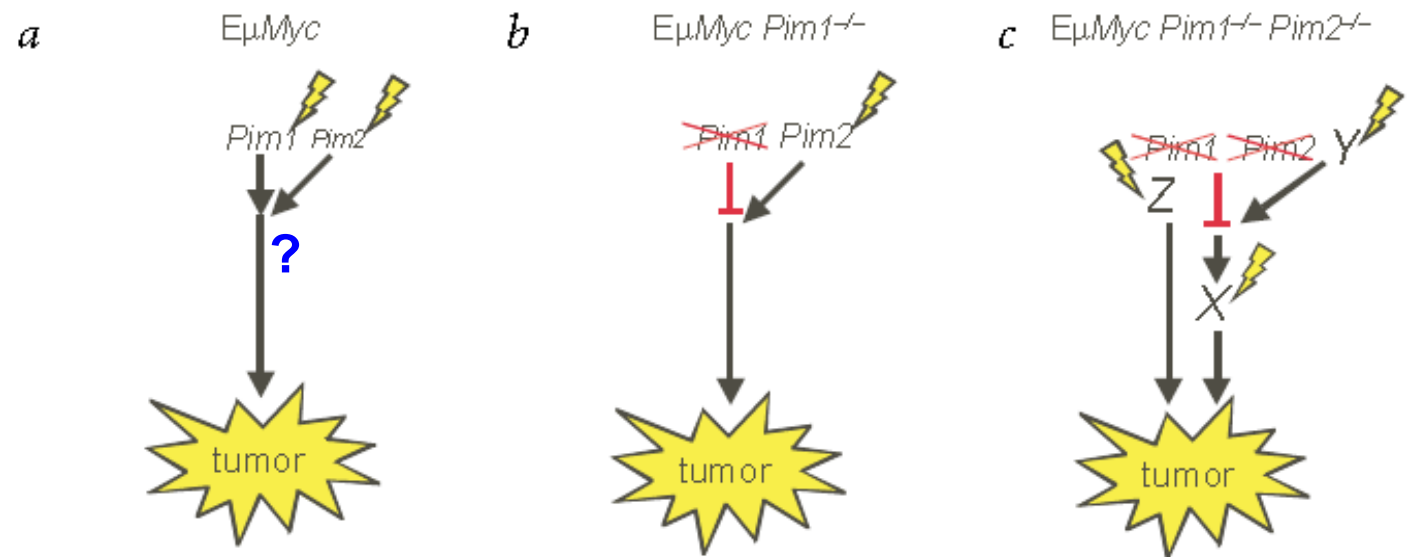
Inzerční mutageneze v přímé genetice

- Využití inzerční mutageneze ve studiu kancerogeneze
 - Infekce $E\mu\text{Myc}$ *pim1* mutantů retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, které obsahují v **90% inzerci** v blízkosti (aktivaci) **Pim2**



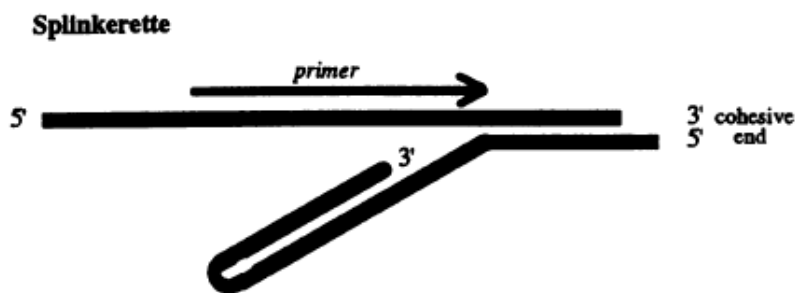
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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**)

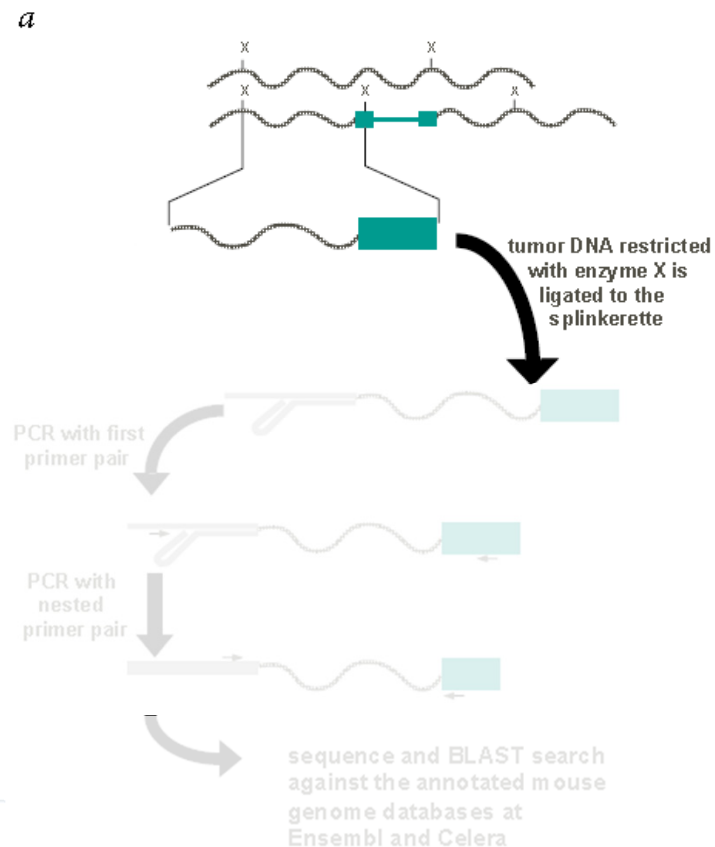


Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



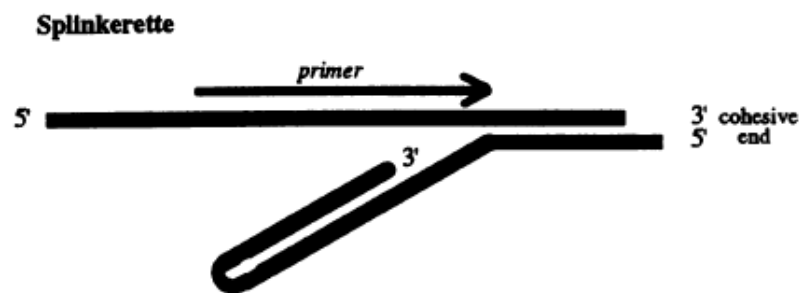
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



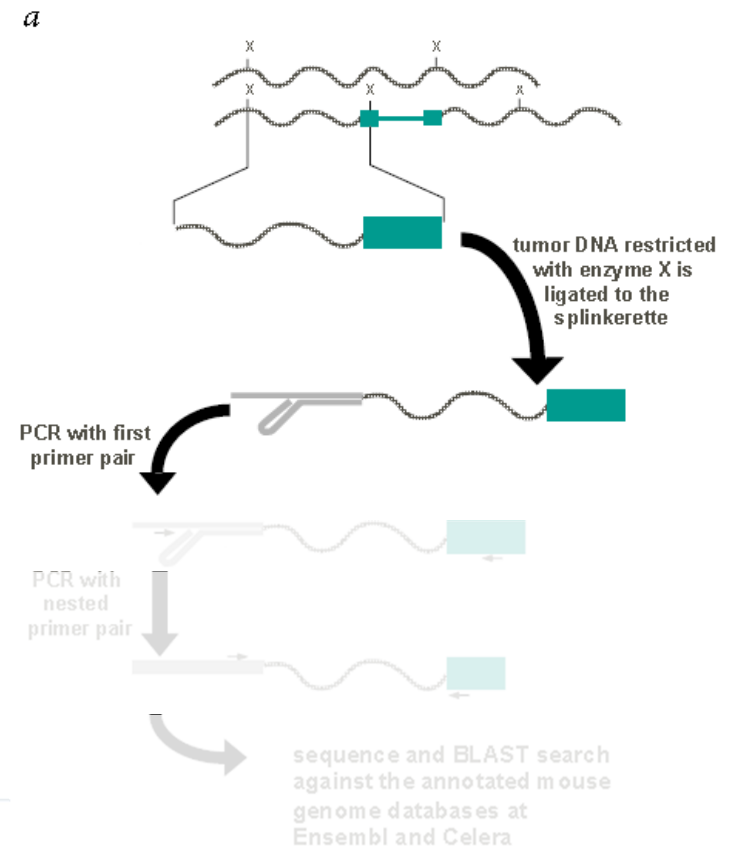
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Inzerční mutageneze v přímé genetice

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



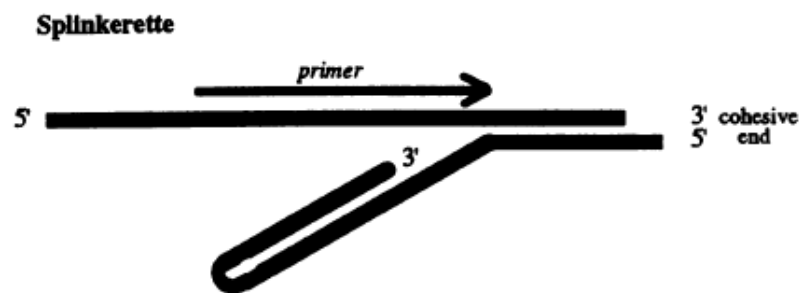
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



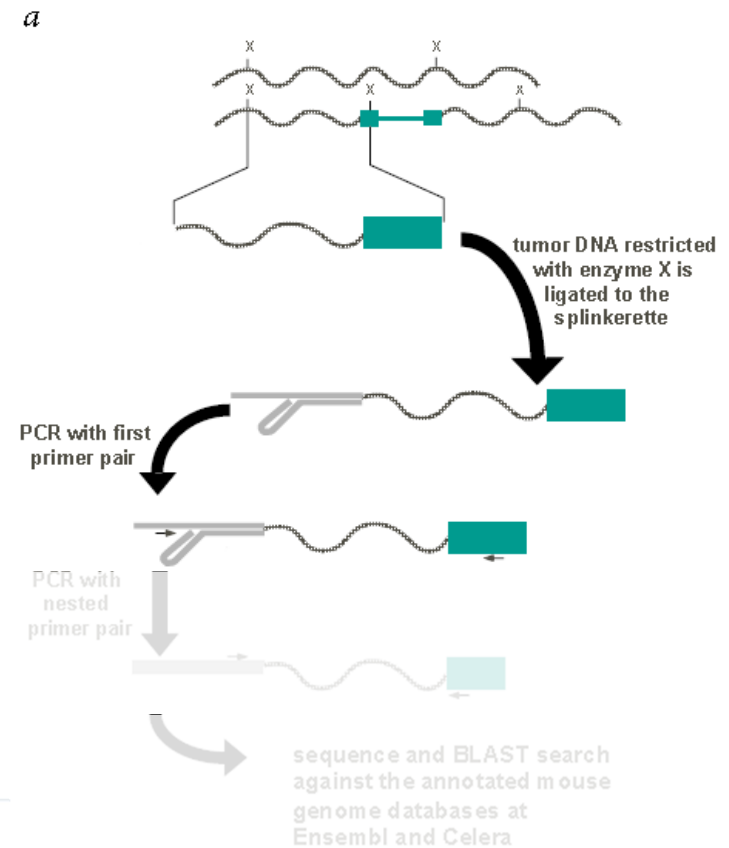
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Inzerční mutageneze v přímé genetice

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



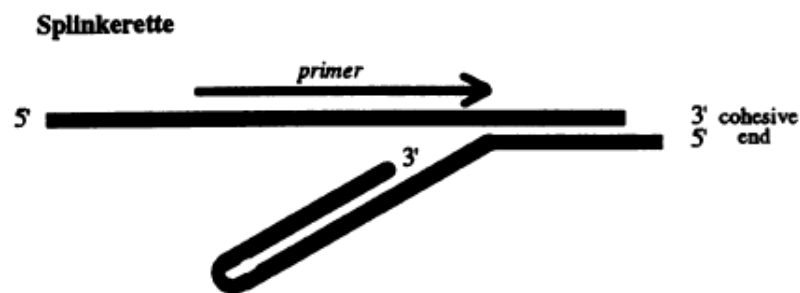
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



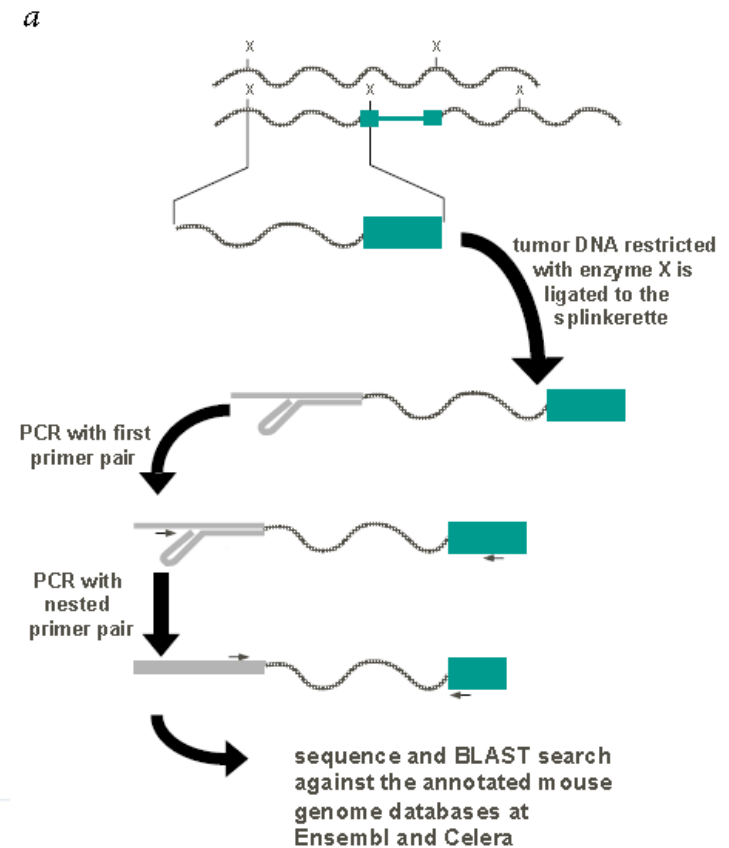
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

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)



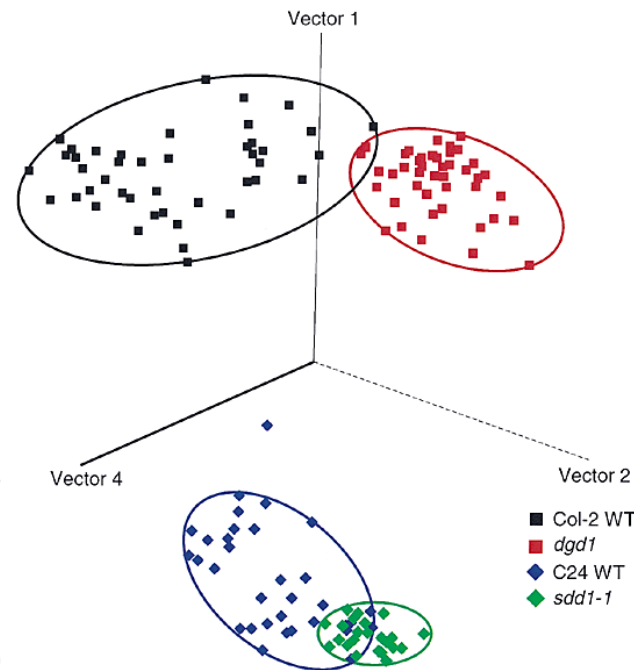
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

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



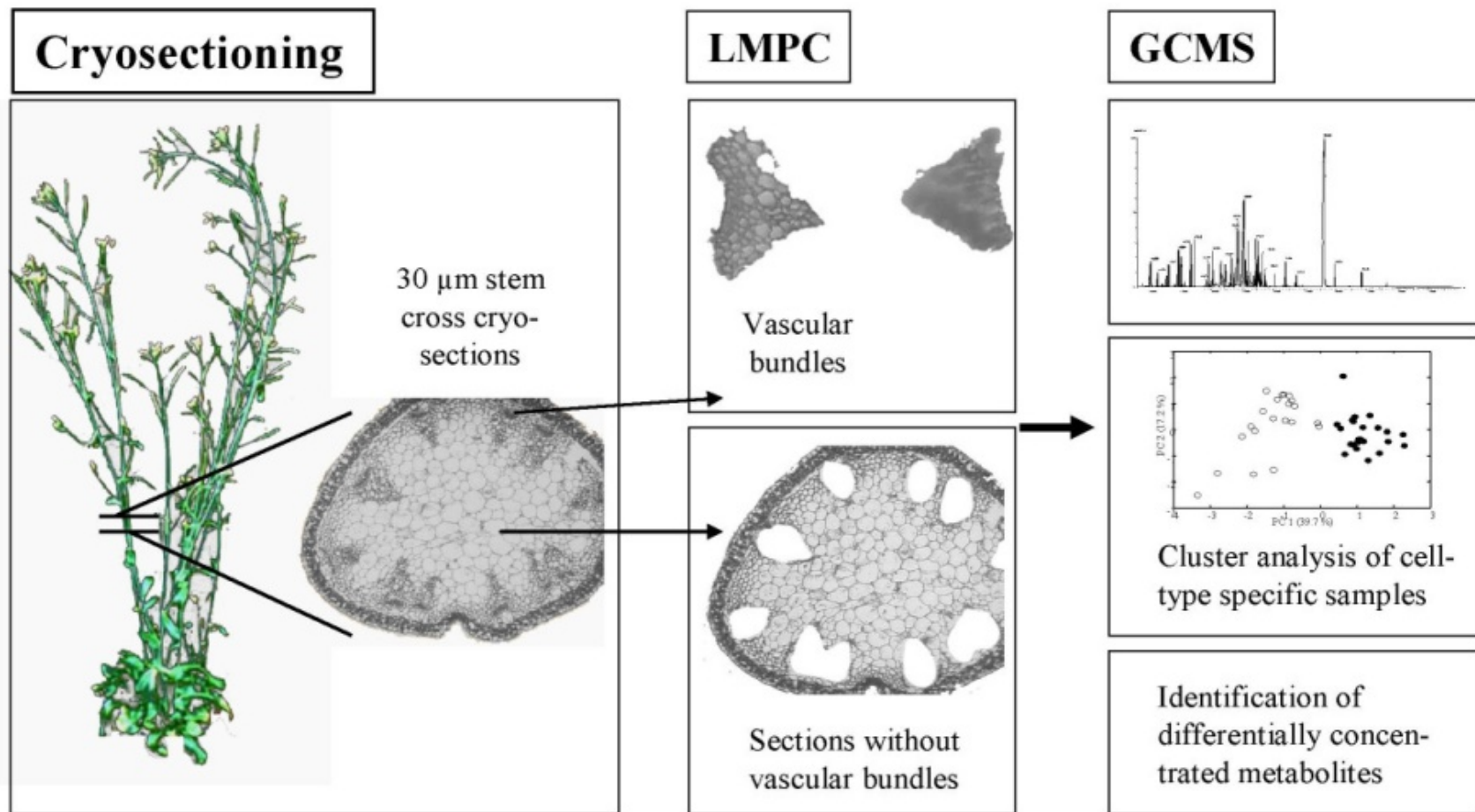
Metabolické profilování

- 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](#)

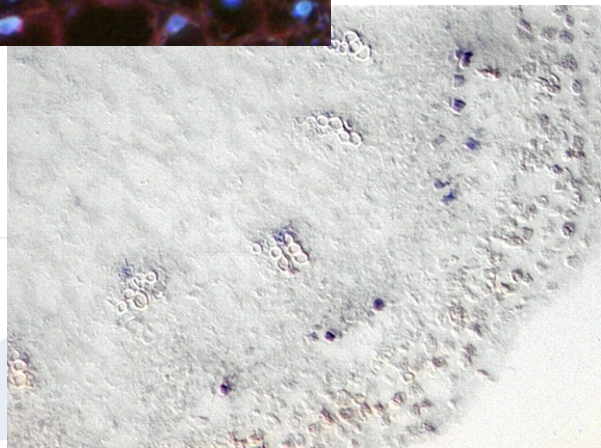
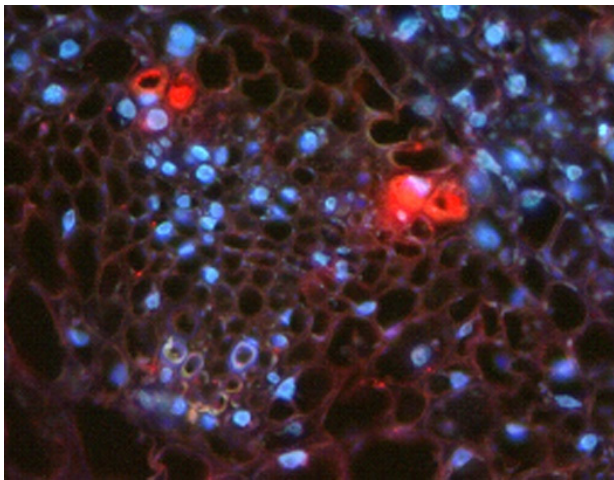


Osnova

- 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

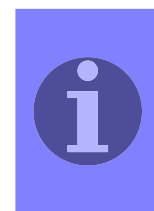
- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
 - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese



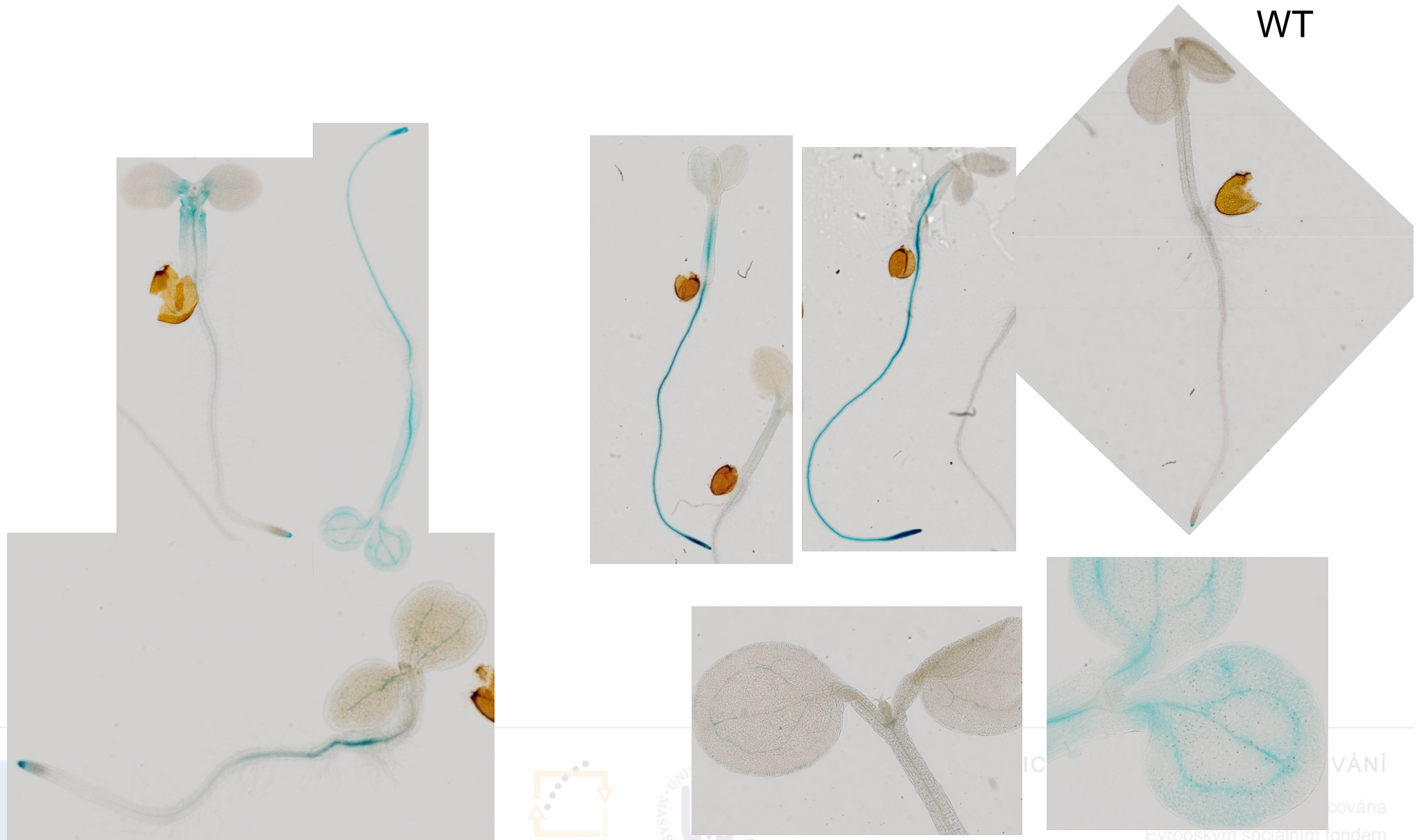
Expresní profil

- 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



Expresní profil



WT

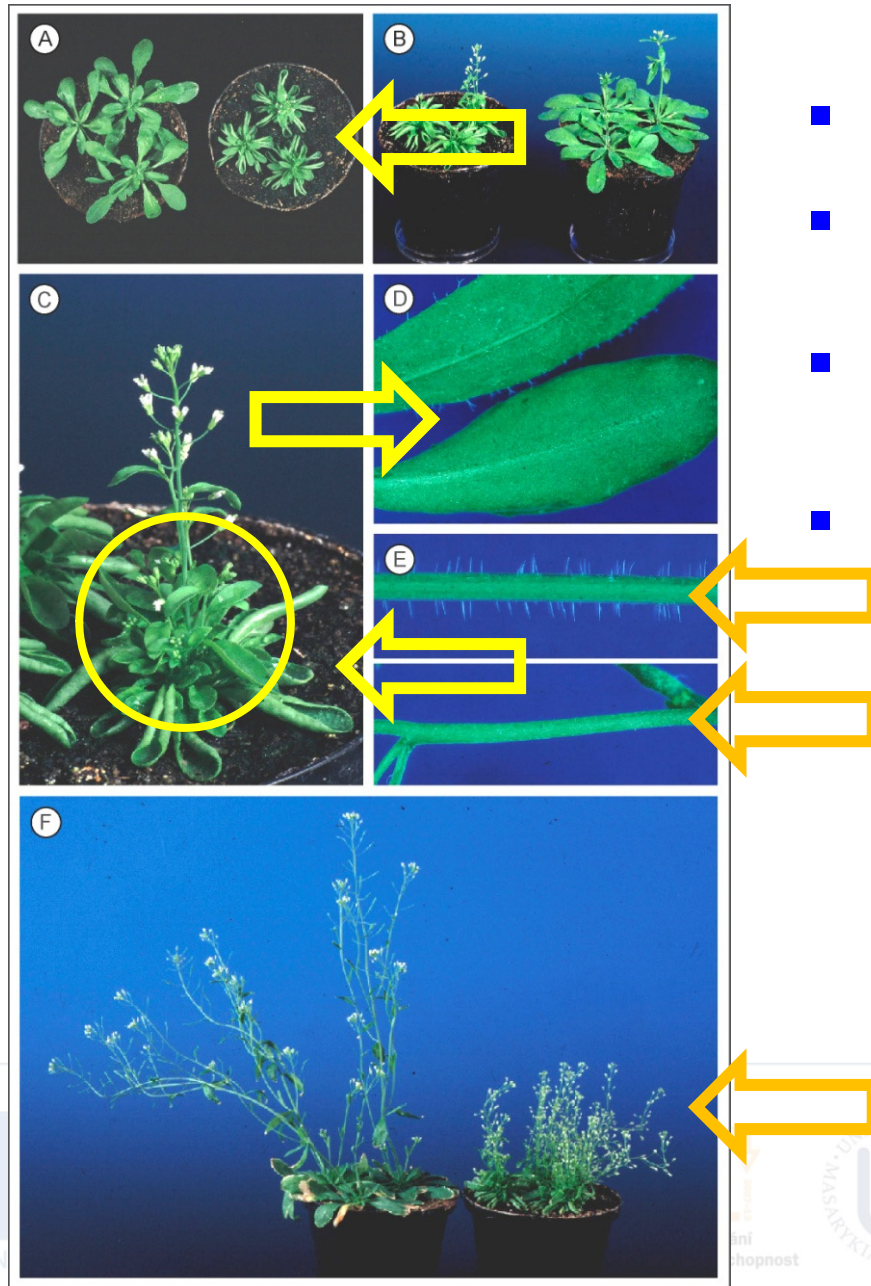
Osnova

- 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

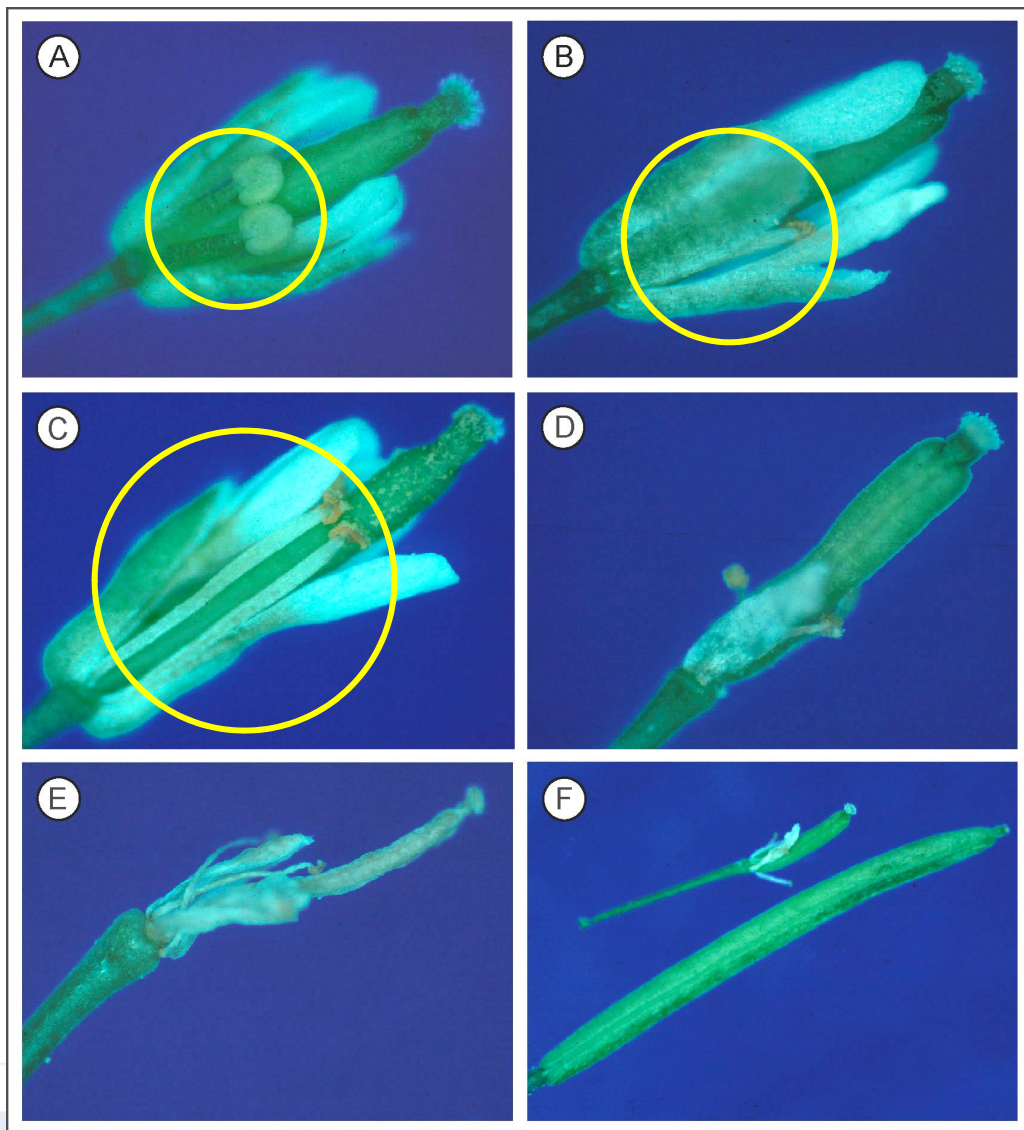
Identifikace mutanta



- 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

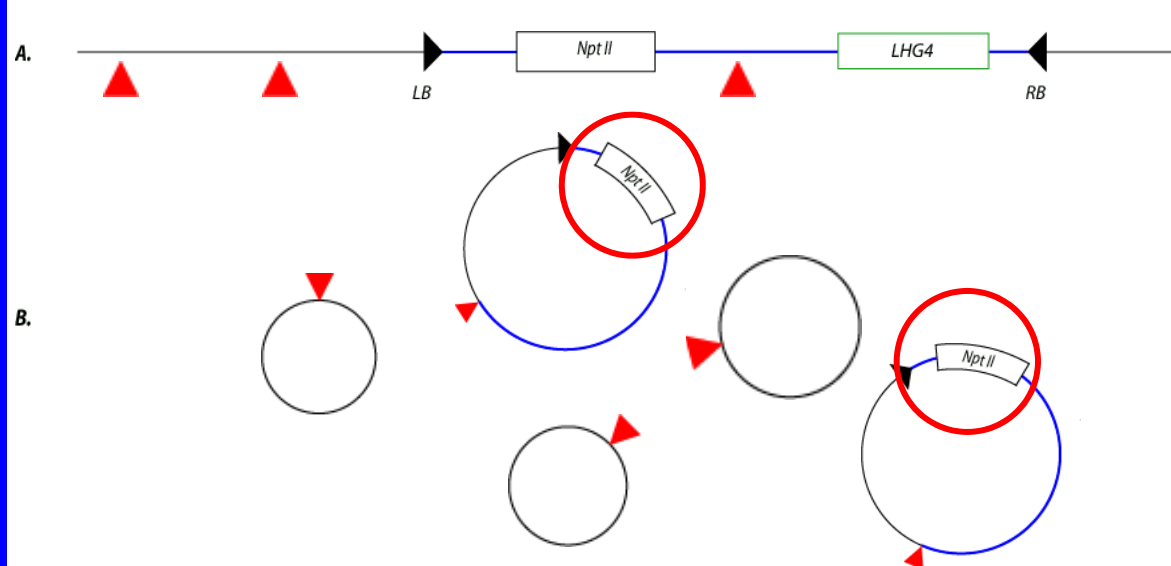
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Identifikace mutovaného lokusu

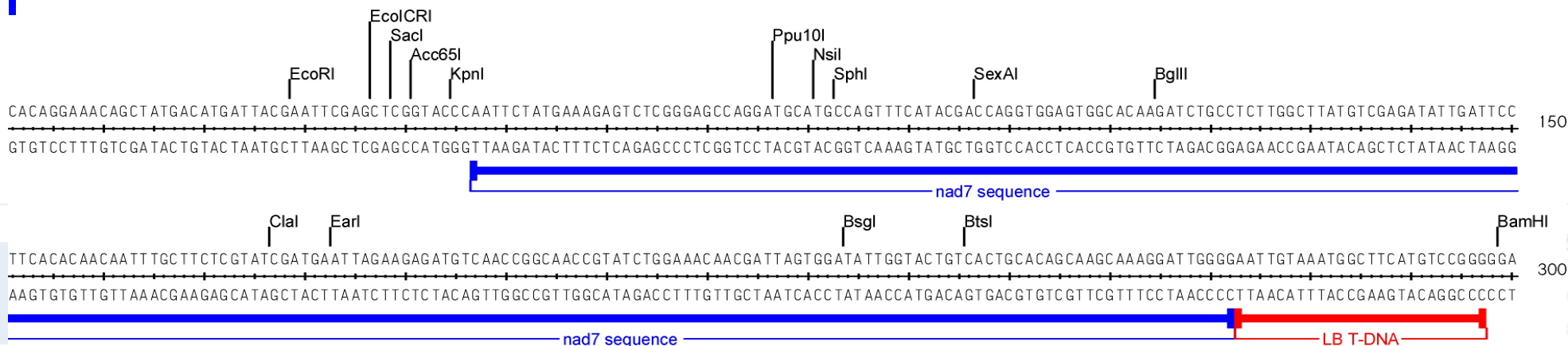
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu
 - identifikace T-DNA mutované oblasti

Identifikace mutovaného lokusu

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

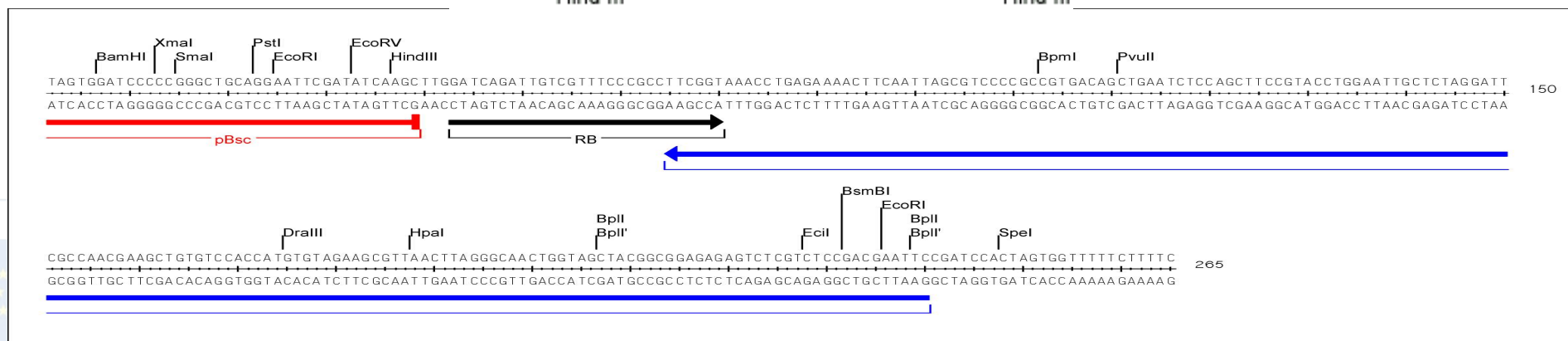
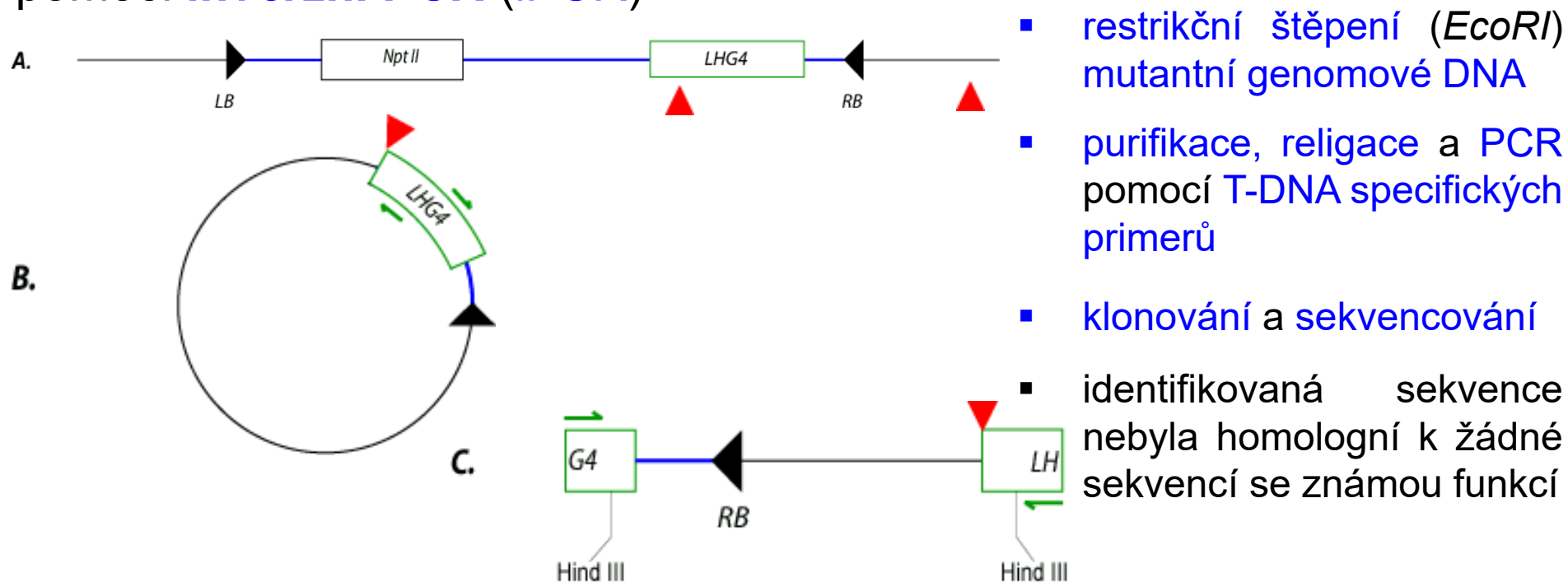


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E. coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro *NAD7* kódovaným na *mtDNA*



Identifikace mutovaného lokusu

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

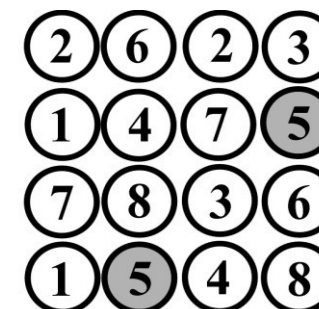
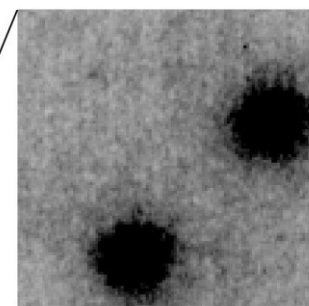
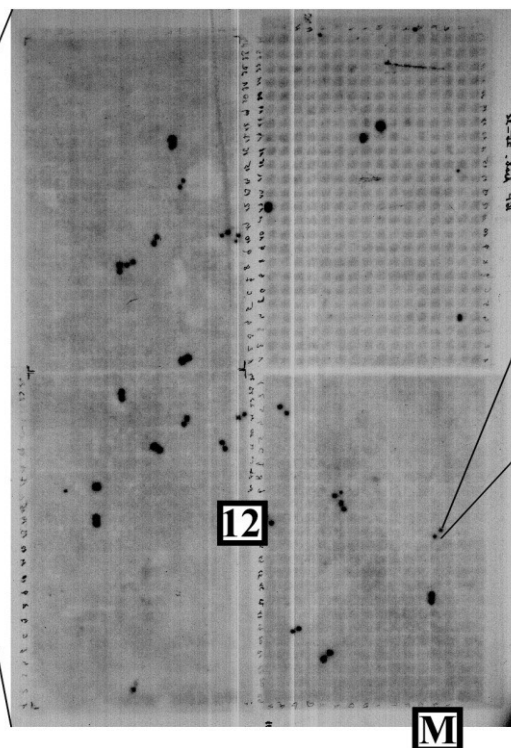


Identifikace mutovaného lokusu

- 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

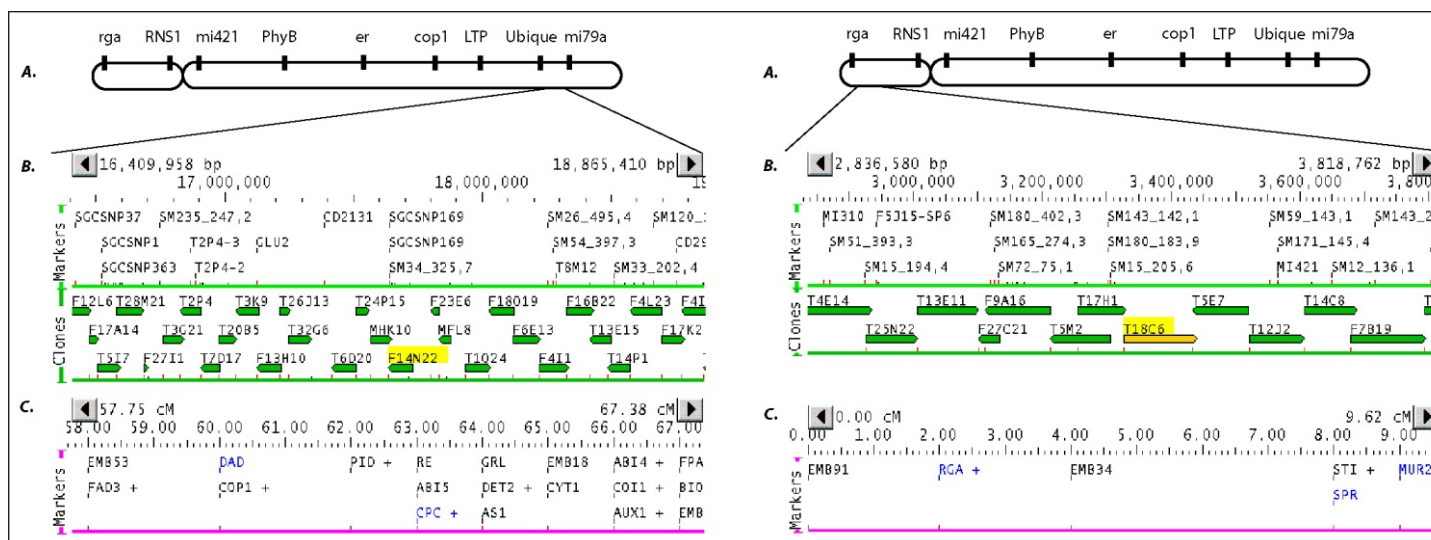


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

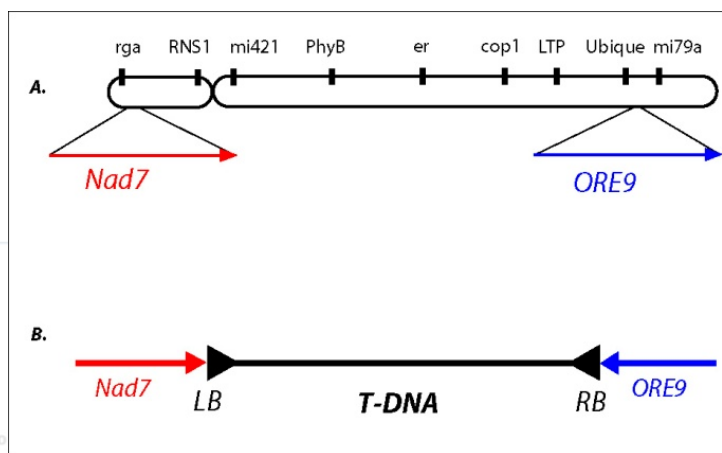
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

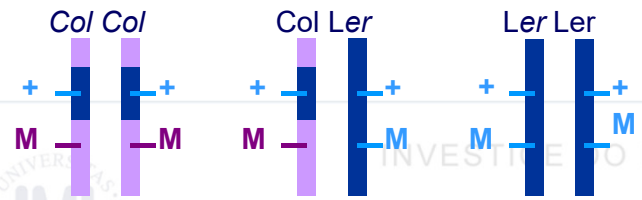
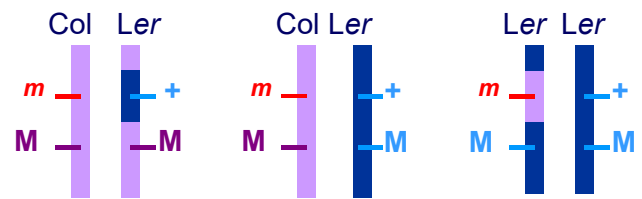
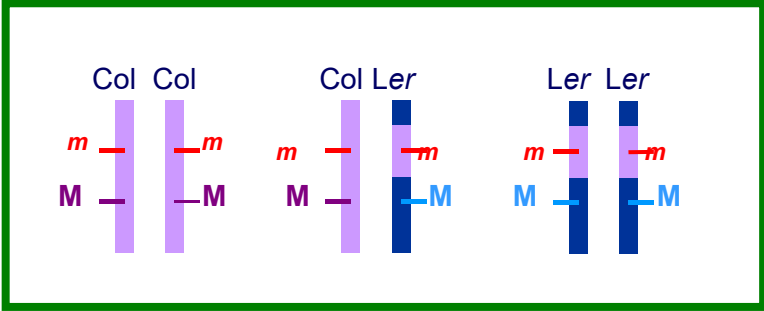
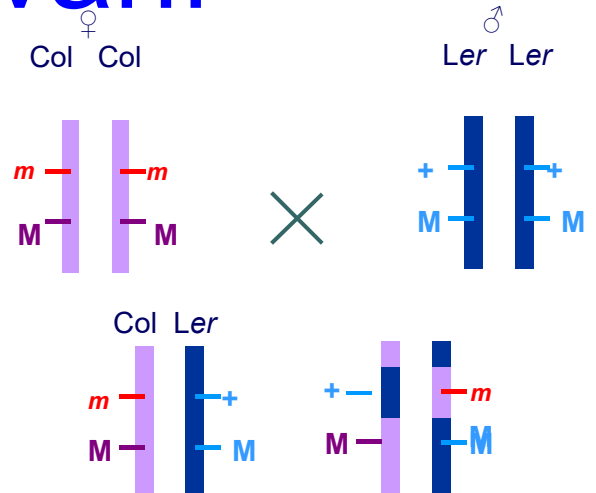
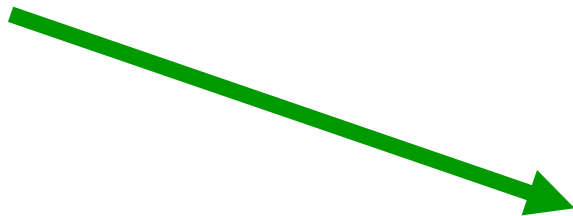
Identifikace mutovaného lokusu

■ 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

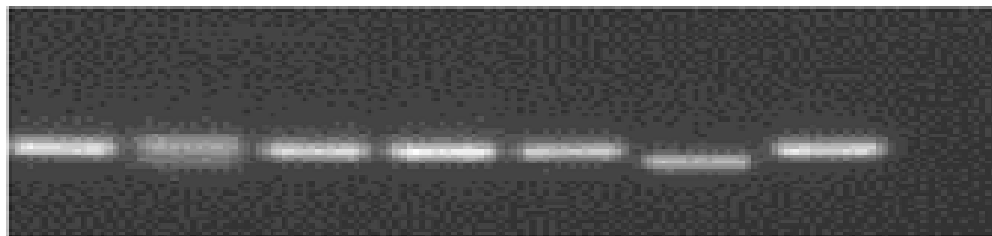


Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

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

F2 mutanti

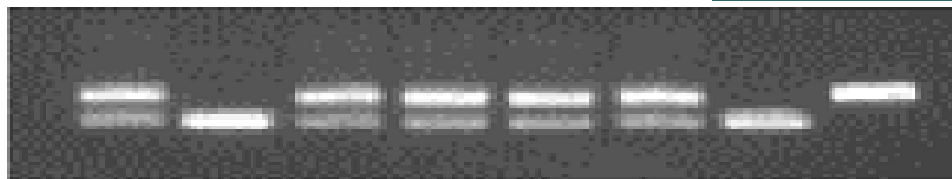
Ler Col



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

F2 mutanti

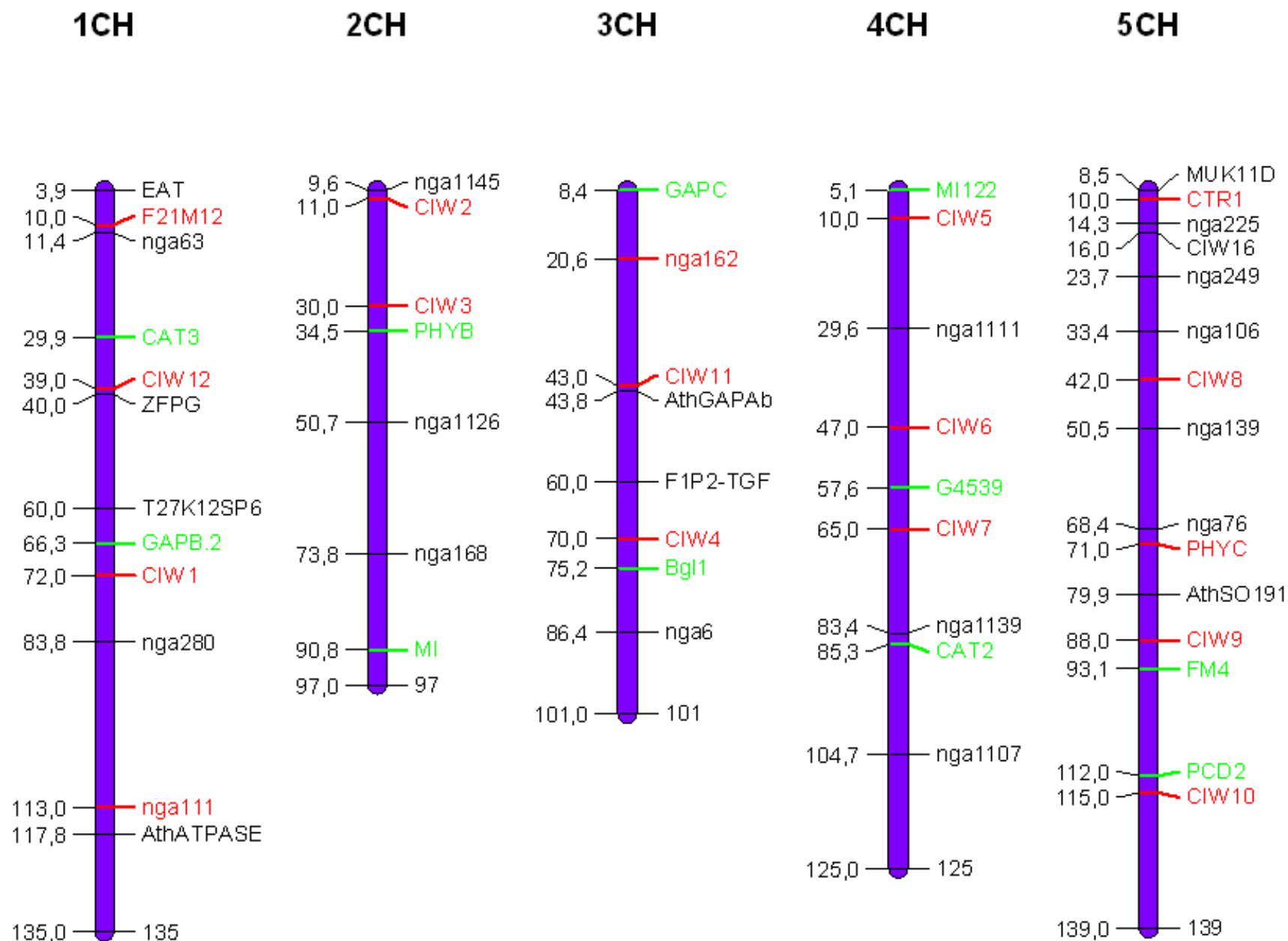
Ler Col



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

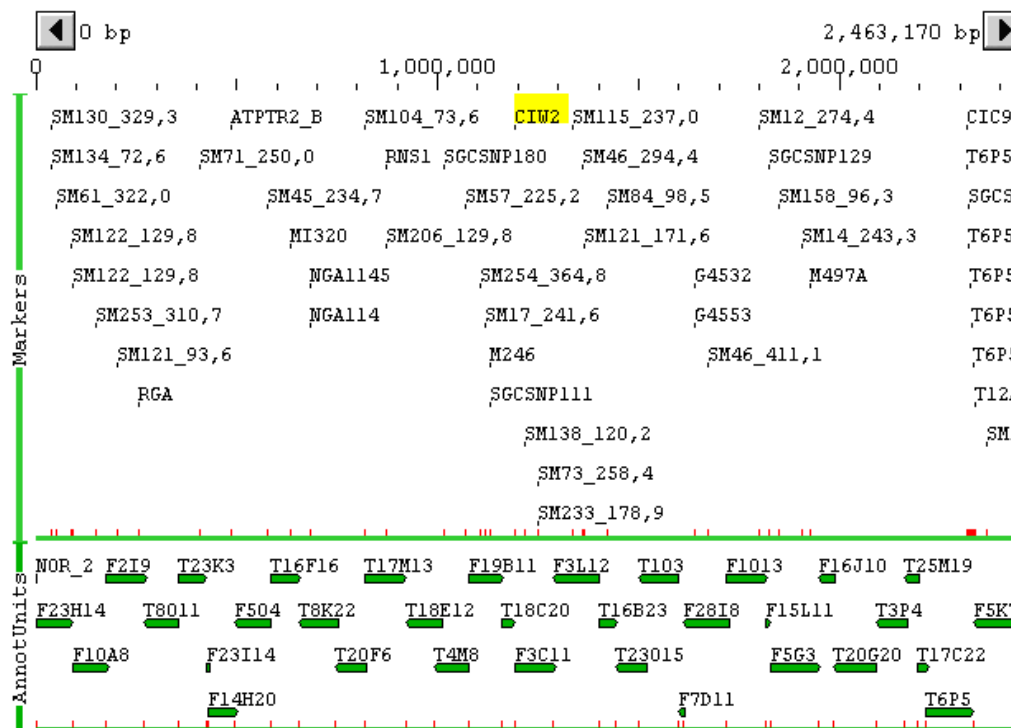
Zoom to:

Zoom up to 200x to see genes!

Search by name (e.g. UFO)

Select range (e.g. 1500-2000)

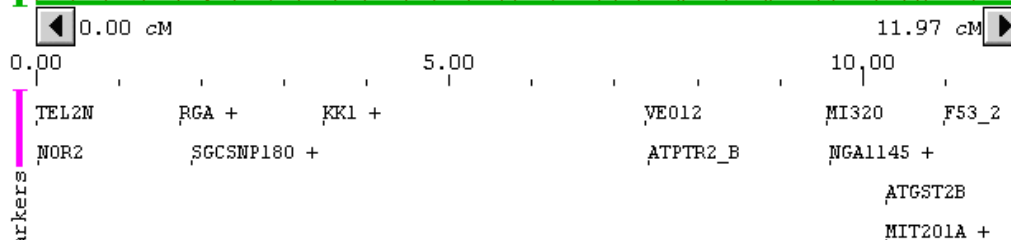
[AGI Map color key](#)



Lister & Dean RI

Zoom to:

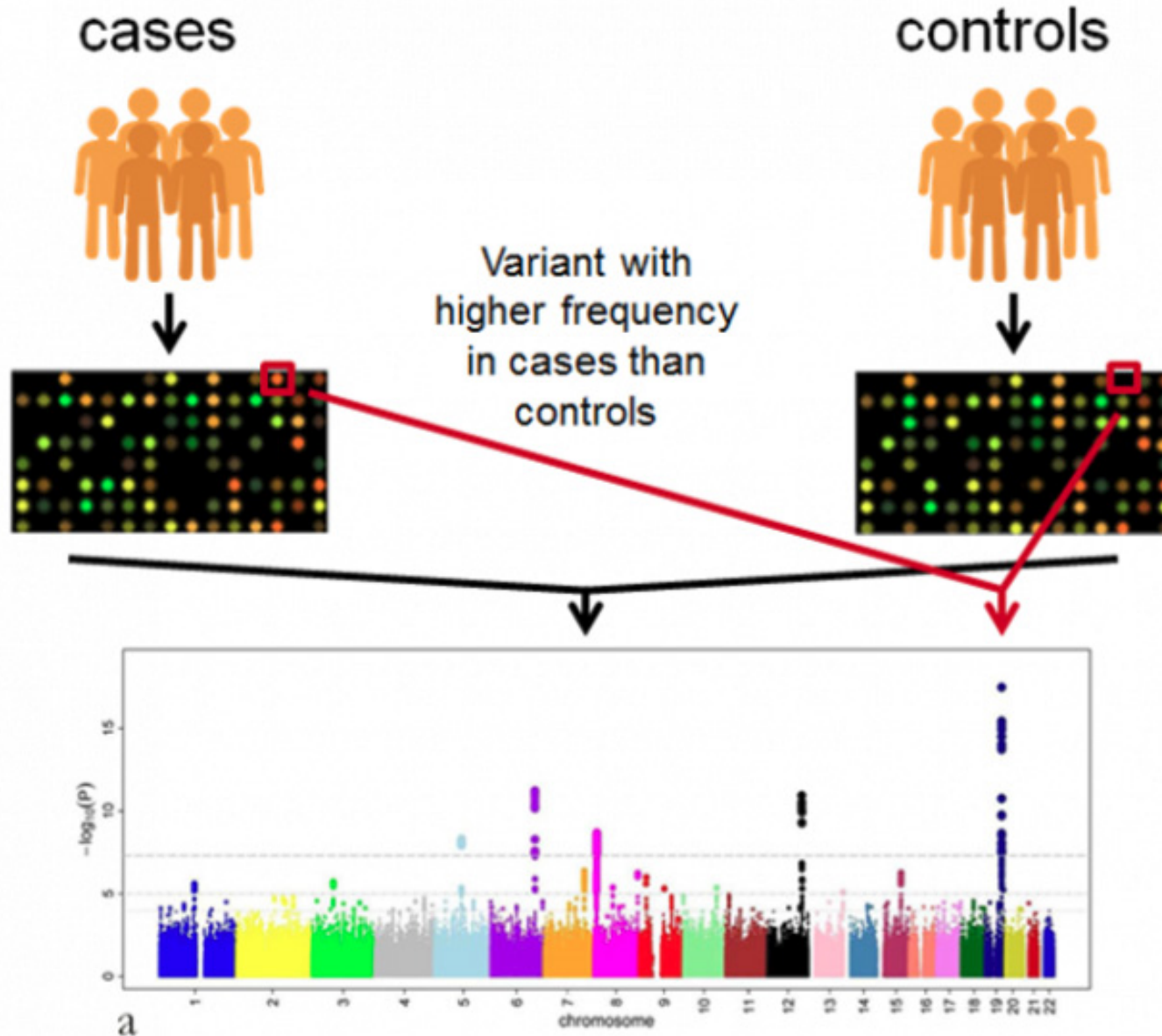
Search by name (e.g. UFO)



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
 - GWAS

Genome Wide Association Study - GWAS



Klíčové koncepty

- **Přímá genetik**a umožňuje cíleně vyhledávat **zajímavé fenotypy**, jejichž **asociace s určitým genem/lokusem** není dosud známa
 - Lze využít jak **inzerční mutageny**, tak **mutace bodové**
 - **Inzerční mutace**
 - (většinou) mutace se **ztrátou funkce** (loss-of-function)
 - iPCR
 - plasmid rescue
 - **Bodové mutace**
 - Jak **mutace se ztrátou funkce** (loss-of-function), tak i
 - Mutace se **získanou funkcí** (gain-of-function)
 - **poziční klonování**
 - **GWAS**

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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