

# 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
  - GWAS



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



T-DNA

### „Reverzně genetický“ přístup

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



(retro)transposons



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

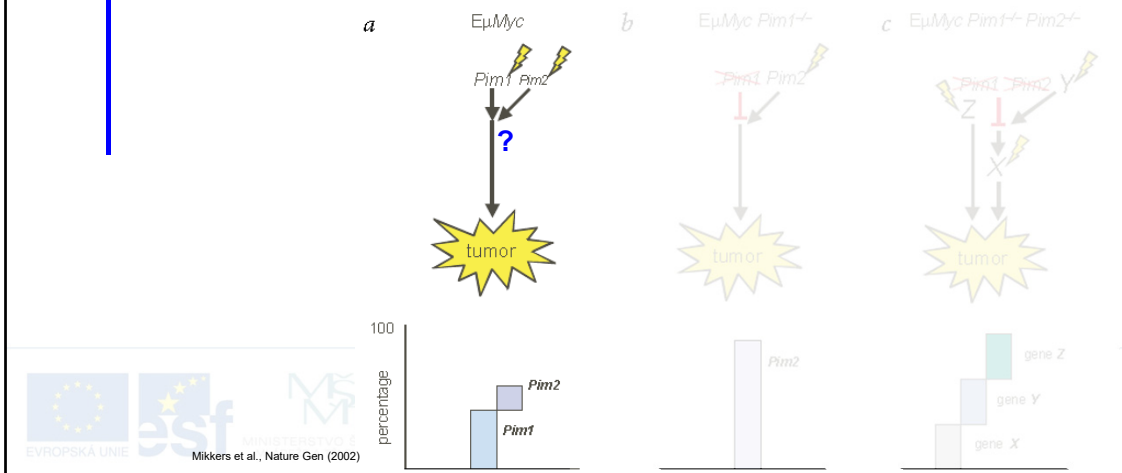


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

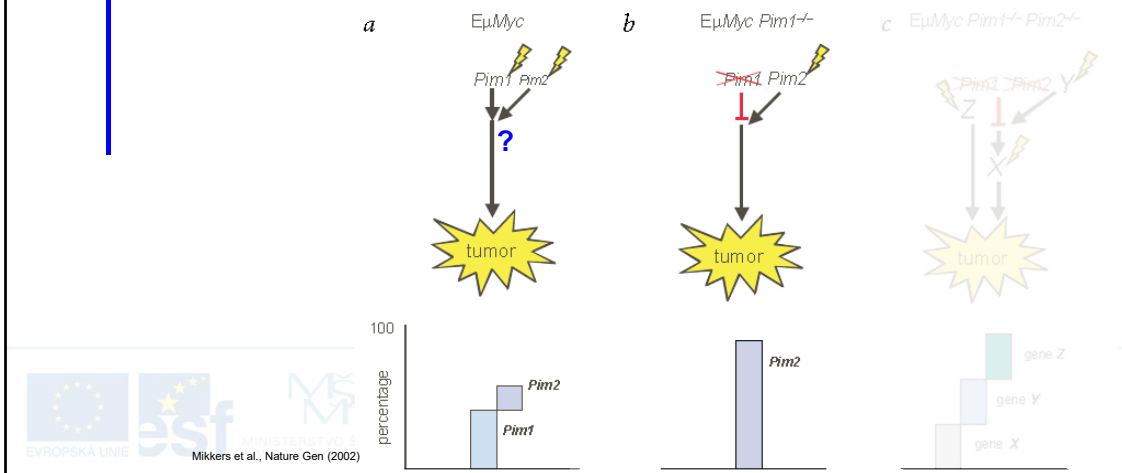
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce EμMyc 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**



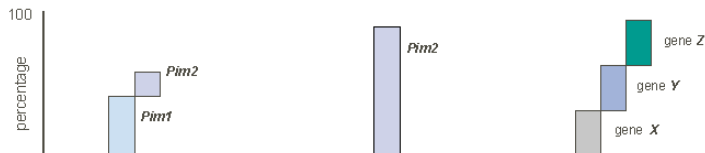
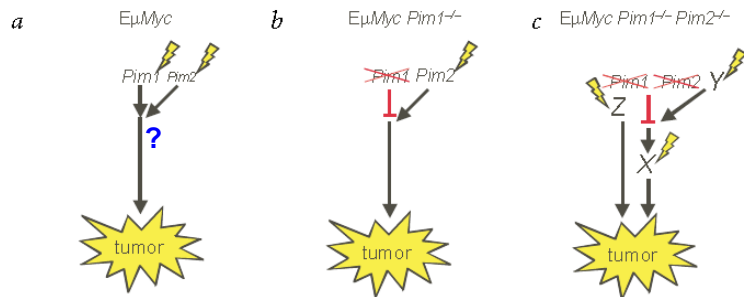
# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



# Inzerční mutagenese v přímé genetice

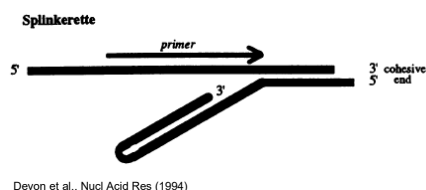
- Využití inzerční mutagenese ve studiu kancerogeneze
  - Infekce EμMyc dvojnásobných mutantů *pim1*, *pim2* retrovirem MoMuLV vede k tvorbě lymfomů, u kterých lze očekávat aktivaci buď některého ze **signálních partnerů Pim proteinů (Y)**, některého z **proteinů Pim signální dráhy (X)** nebo k **aktivaci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



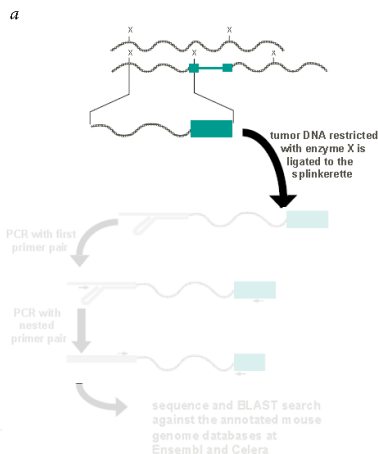


# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



a

PCR with first primer pair

PCR with nested primer pair

sequence and BLAST search against the annotated mouse genome databases at Ensembl and Celera



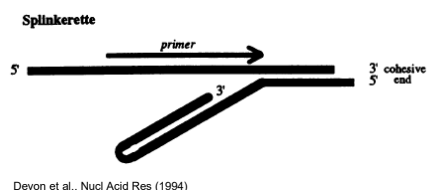
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VÁNI

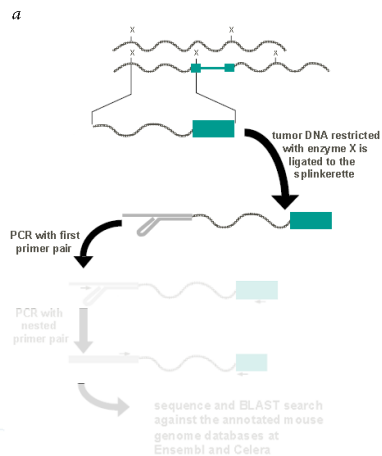
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



Mikkers et al., Nature Gen (2002)

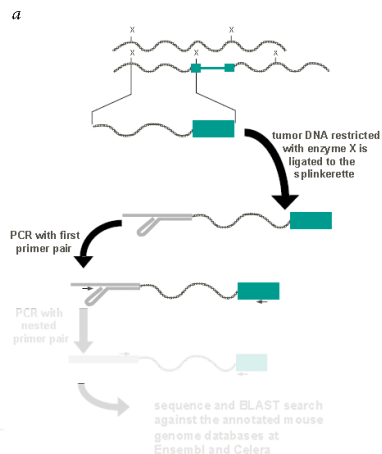
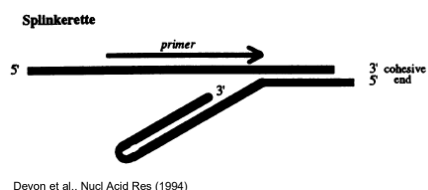


VÁNI

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
  - Druhá amplifikace pomocí „nested“ primerů (zvýšení specificity)



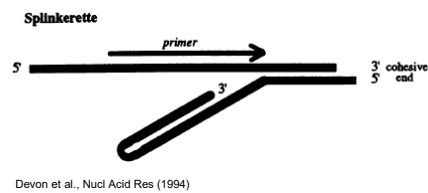
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VÁNI

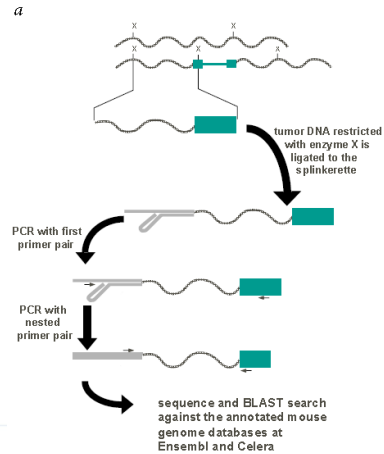
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



Mikkers et al., Nature Gen (2002)

VÁNI

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

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

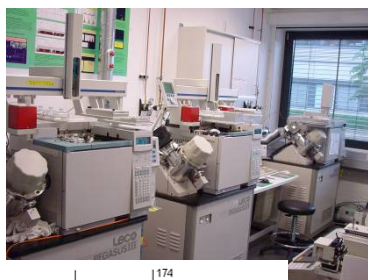


## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

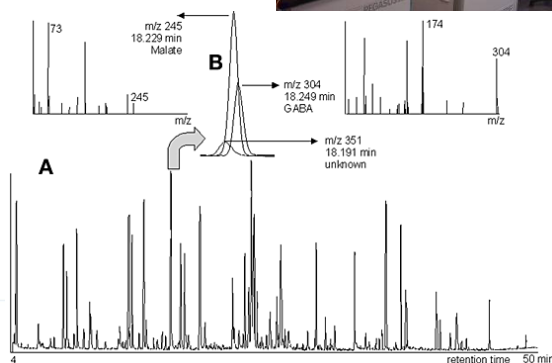
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# 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) | m/z | Abundance | Identification |
|----------------------|-----|-----------|----------------|
| 4.123                | 73  | 100       |                |
| 4.123                | 245 | 10        |                |
| 18.229               | 174 | 10        | Malate         |
| 18.229               | 304 | 10        |                |
| 18.249               | 304 | 10        | GABA           |
| 18.191               | 351 | 10        | unknown        |



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



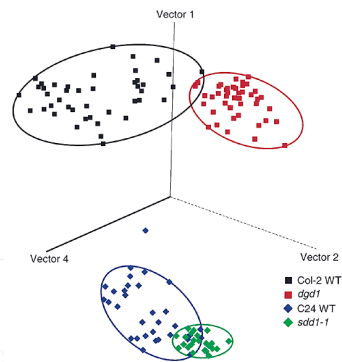
JYVÄSKYLÄN  
YLIOPISTO

OJE VZDĚLÁVÁNÍ

tohoto 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



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



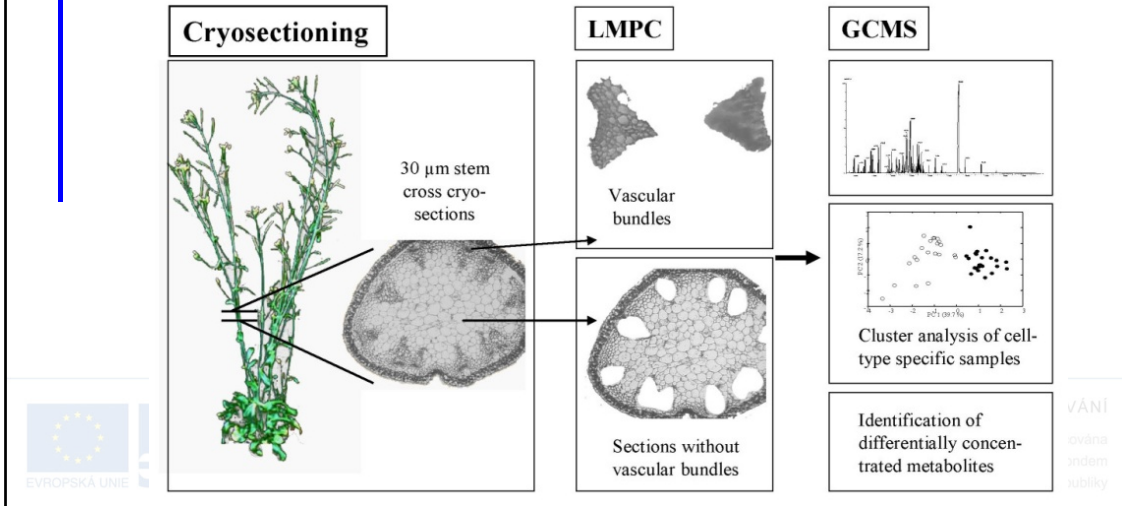
ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

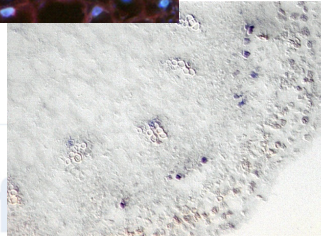
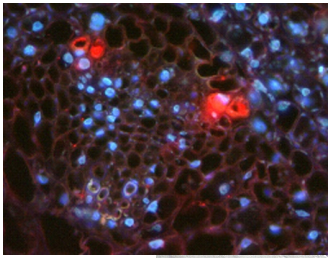


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# 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 VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Vyhledávání pomocí automatické mikroskopie

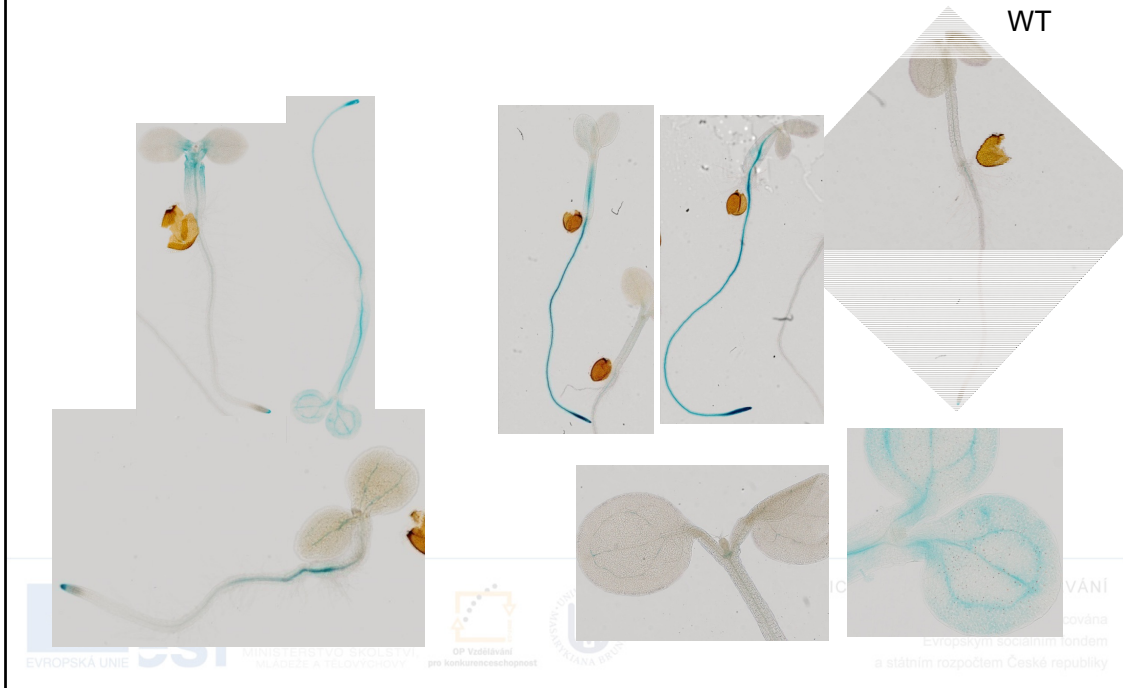


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Dobisova and Hejalko, *Methods in Mol Biol* 2014

# 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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



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

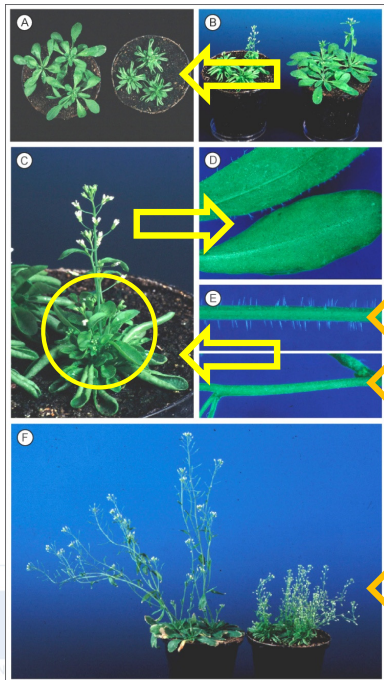


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



## Identifikace mutanta



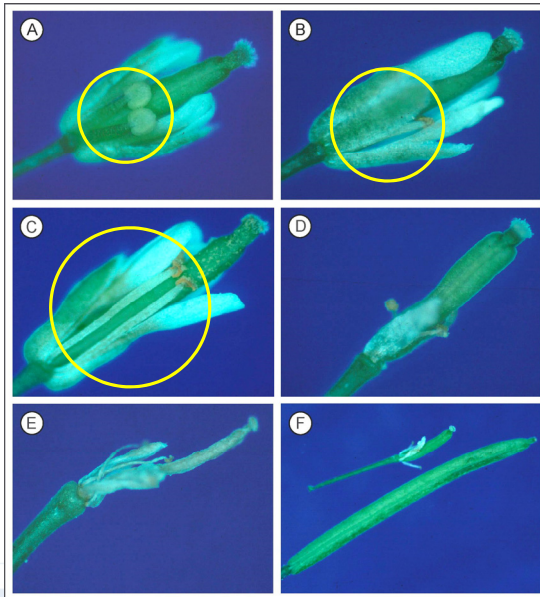
- zvlňné listy
- keřčkovitý fenotyp (poruchy větvení)
- chybějící trychomy na listech a na stonku
- opožděné stárnutí



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

## 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

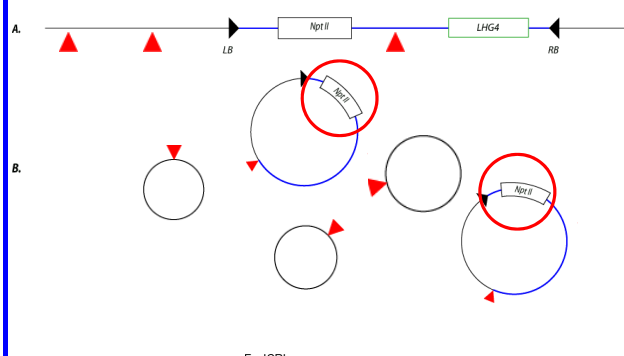


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

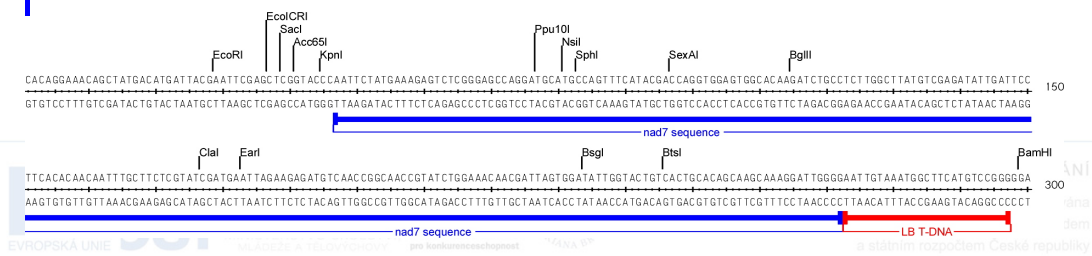
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Identifikace mutovaného lokusu

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

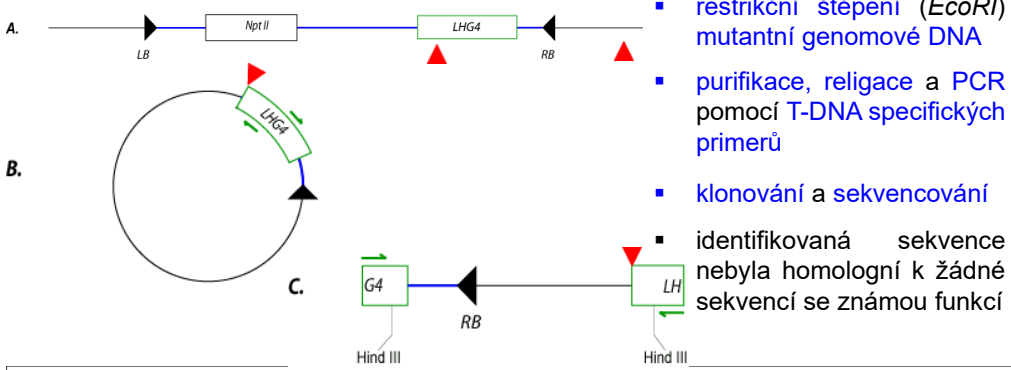


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E.coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro *NAD7* kódovaným na *mtDNA*

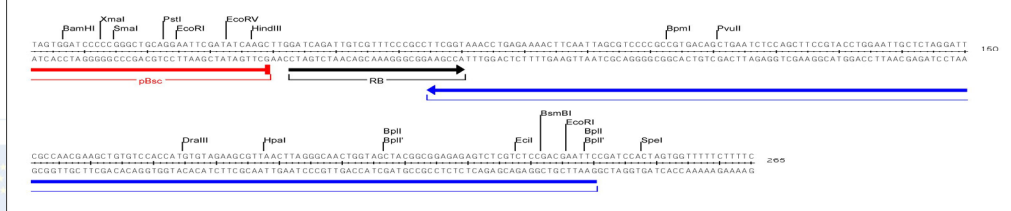


# Identifikace mutovaného lokusu

## 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*

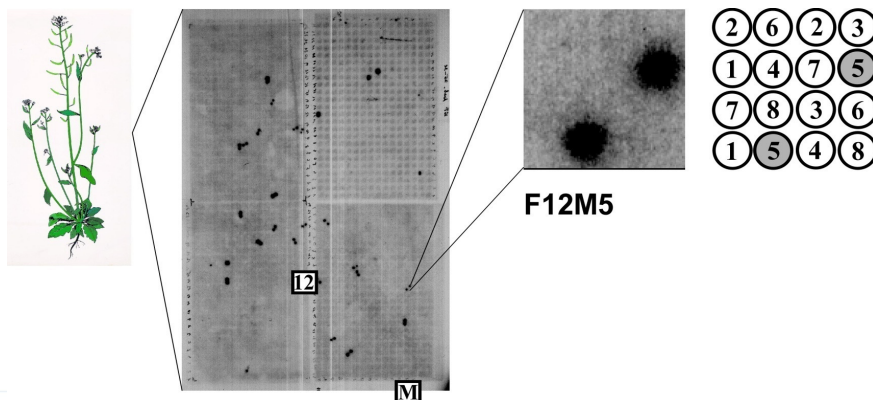


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



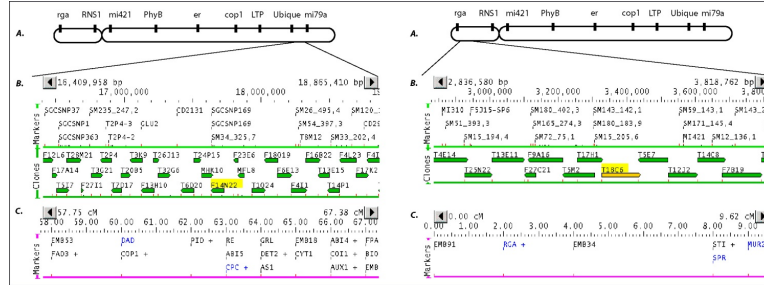
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

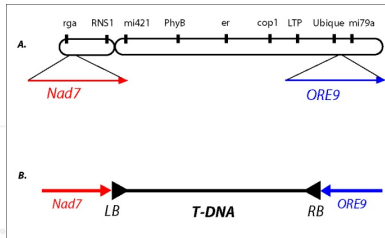


## Lokalizace genomové T-DNA přiléhající k levé i pravé hranici T-DNA na chromozomu 2

### Sekvence přiléhající k **pravé** a **levé** hranici T-DNA



- pravděpodobně došlo k inverzi téměř celého chromozómu 2



CE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je 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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



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 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**

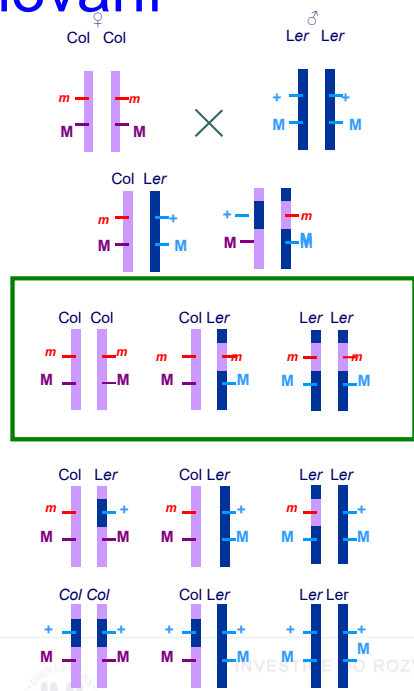
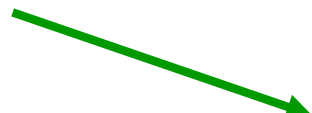


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Poziční klonování

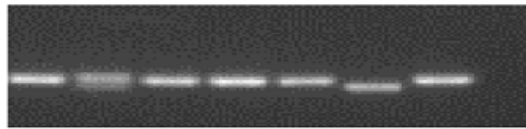
Příprava mapovací populace



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

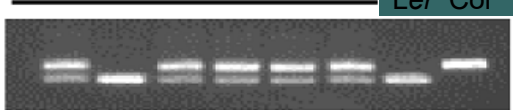
$$r [\%] = \frac{\text{počet chomozomů Col I}}{\text{počet všech chromozomů}} \times 100$$

**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



esf

MINISTERSTVO ŠKOLETVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

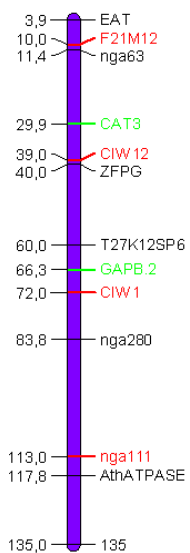


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

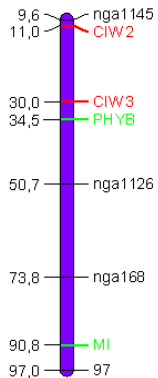
Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Mapa DNA molekulárních markerů

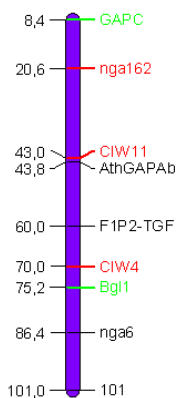
1CH



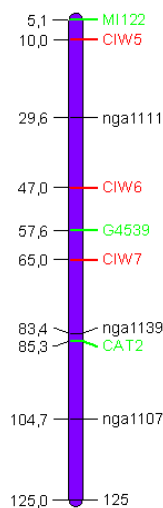
2CH



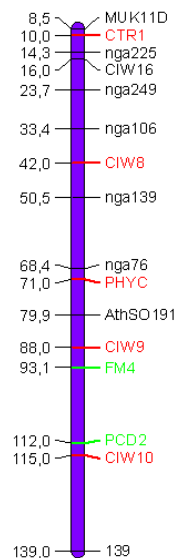
3CH



4CH



5CH



EVROPSKA UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



NÁRODNÍ ÚSTAV PRO BIOLOGICKÉ EXPERIMENTY

podporováno státním rozpočtem České republiky

# Markery pro jemné mapování

- AGI Map
- Lister & Dean RI
- Classical
- mi-RFLP
- Goodman
- GoodmanBAC
- TIGR
- Finkelstein
- Altman

## Maps for Chromosome 2

for all Maps: [Search Options](#)

Selected Maps



[MapViewer Home](#)  
[Release Note](#)  
[View Print-Version](#)

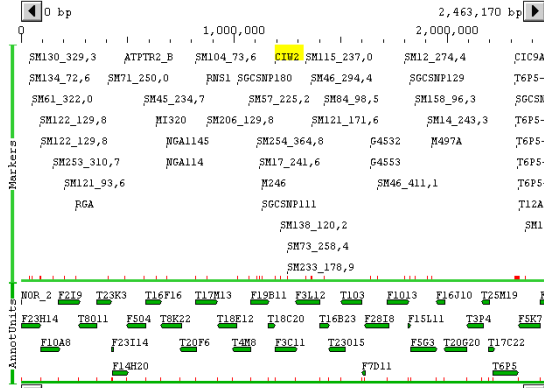
### AGI Map

Zoom to:

Zoom up to 200x to see genes!

Select range (e.g. 1500-2000)

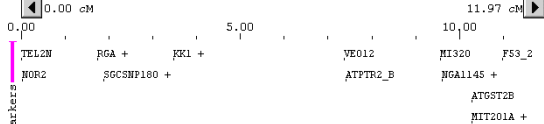
[AGI Map color key](#)



### Lister & Dean RI

Zoom to:

Select range (e.g. UFO)



IE VZDĚLÁVÁNÍ  
 je spolufinancována  
 čim 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

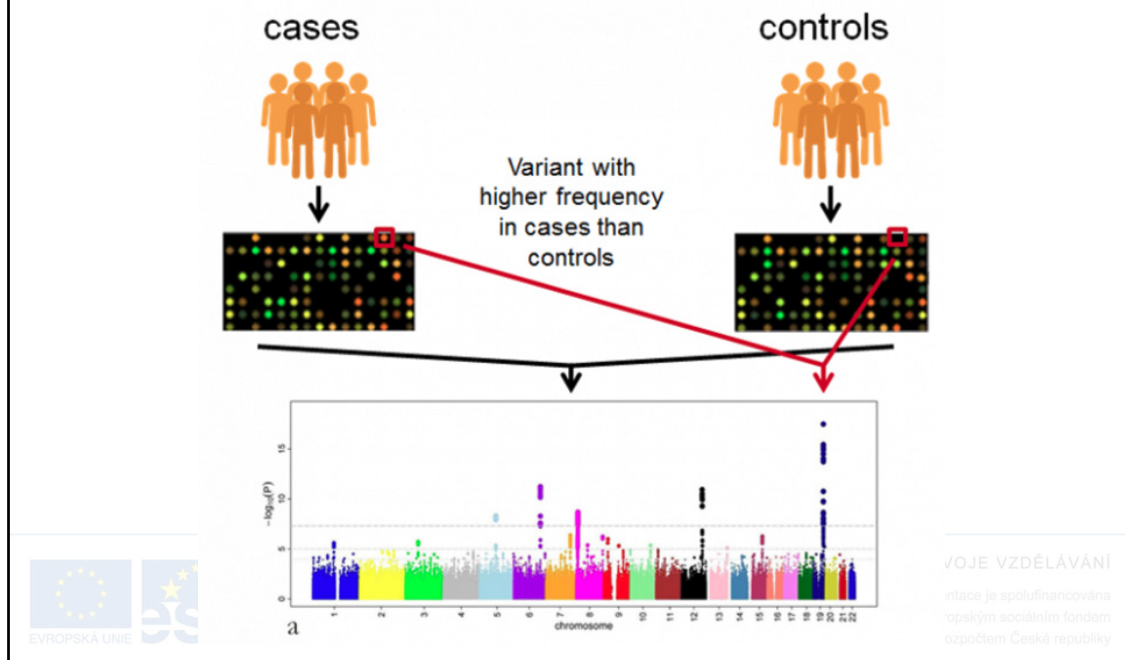


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# Genome Wide Association Study - GWAS



<https://www.ebi.ac.uk/training-beta/online/courses/gwas-catalogue-exploring-snp-trait-associations/what-is-gwas-catalog/what-are-genome-wide-association-studies-gwas/>

A typical GWAS study collects data to find out the common variants in a number of individuals, both with and without a common trait (e.g. a disease), across the genome, using genome wide SNP arrays. Variants associated with the disease, or within the same haplotype as a variant associated with a disease, will be found at a higher frequency in cases than in controls. Statistical analysis is carried out to indicate how likely a variant is to be associated with a trait.

As GWAS analyse common variants, usually typed on commercial SNP arrays (Figure 3), they do not generally identify causal variants. GWAS identify common variants which tag a region of linkage disequilibrium (LD) containing causal variant(s). Additional or follow-on studies are usually required to narrow the region of association and identify the causal variant

# Klíčové koncepty

- **Přímá genetika** 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**



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