

CG020 Genomika

Přednáška 4

Genetika přímá

Jan Hejátko

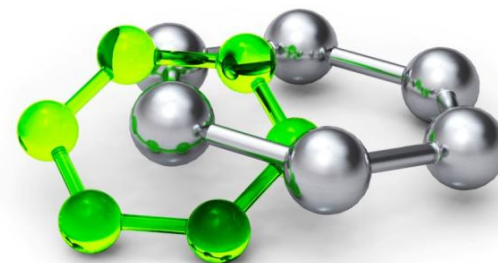
Funkční genomika a proteomika rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC)

a

Národní centrum pro výzkum biomolekul,
Přírodovědecká fakulta,

Masarykova univerzita, Brno
hejatk@sci.muni.cz, www.ceitec.eu

M U N I
S C I



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

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 x f

„Reverzně genetický“ přístup

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

T-DNA

(retro)transposons

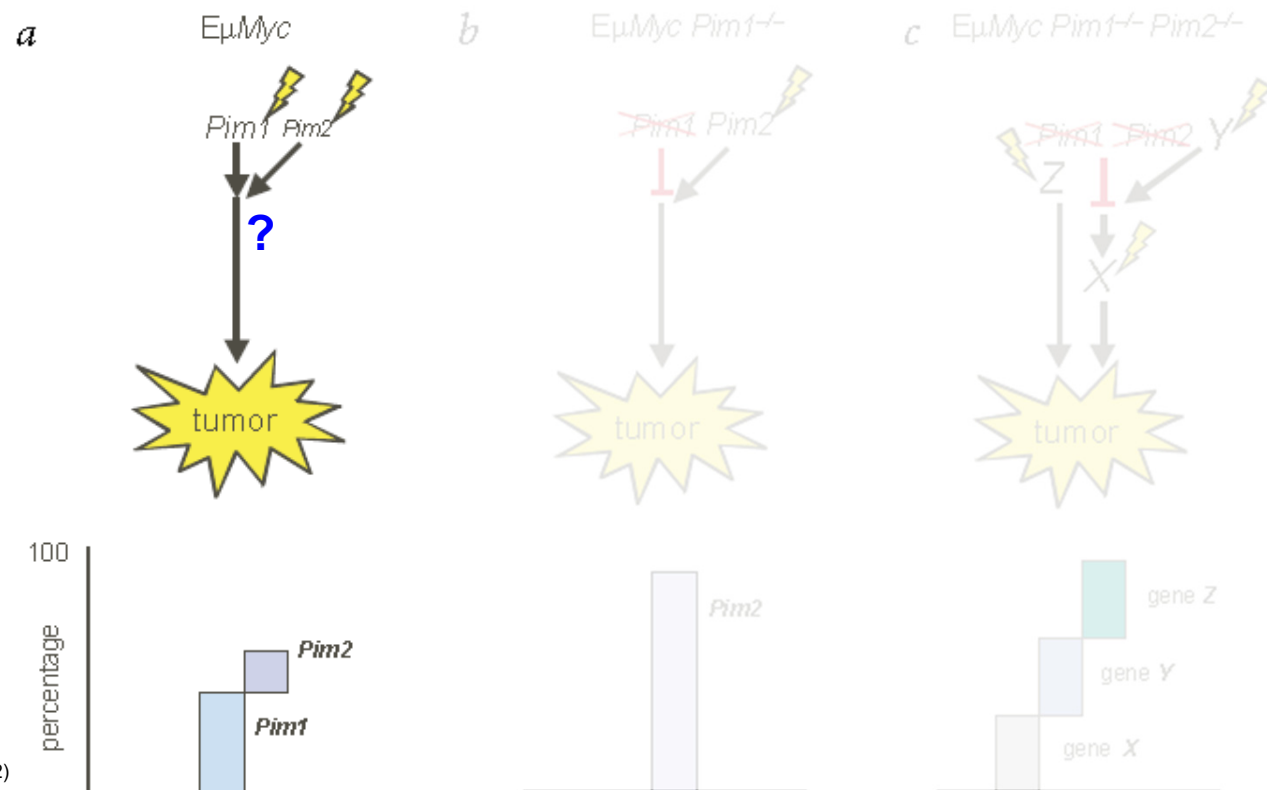


Osnova

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

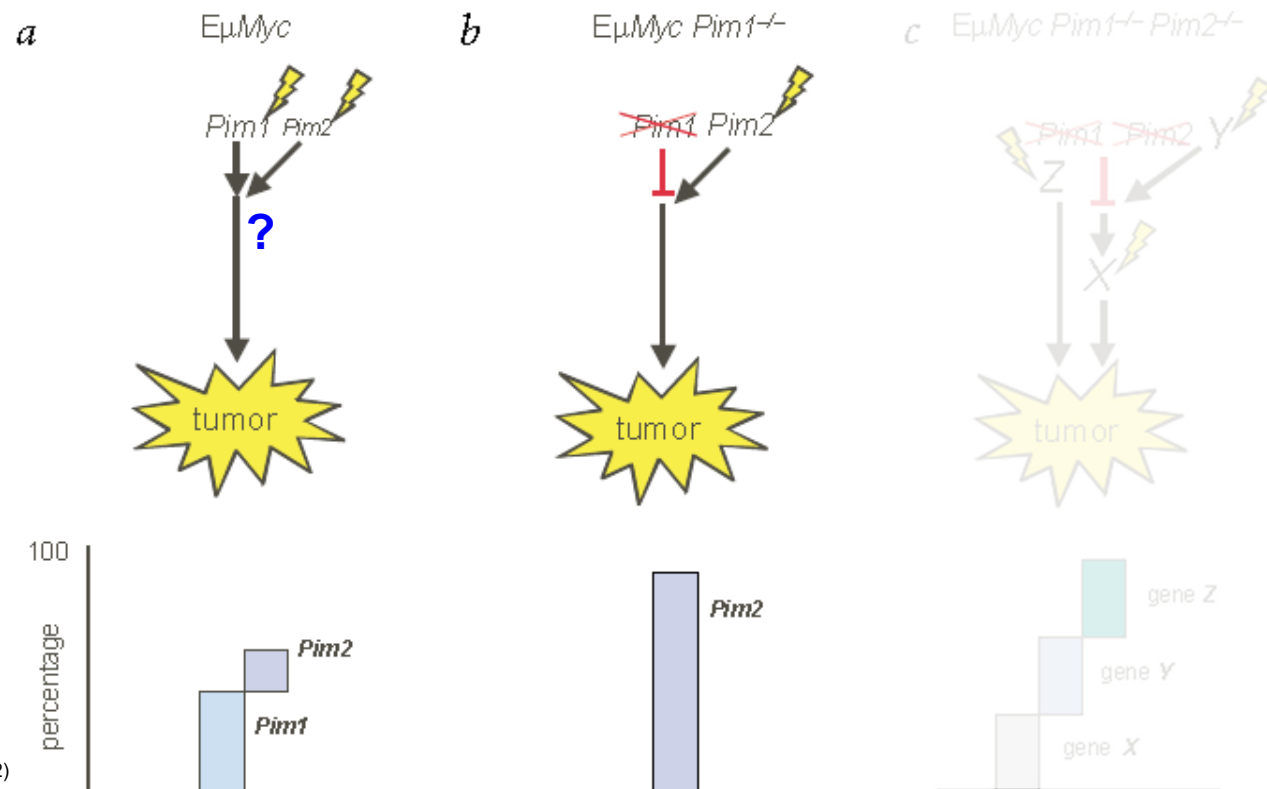
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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**



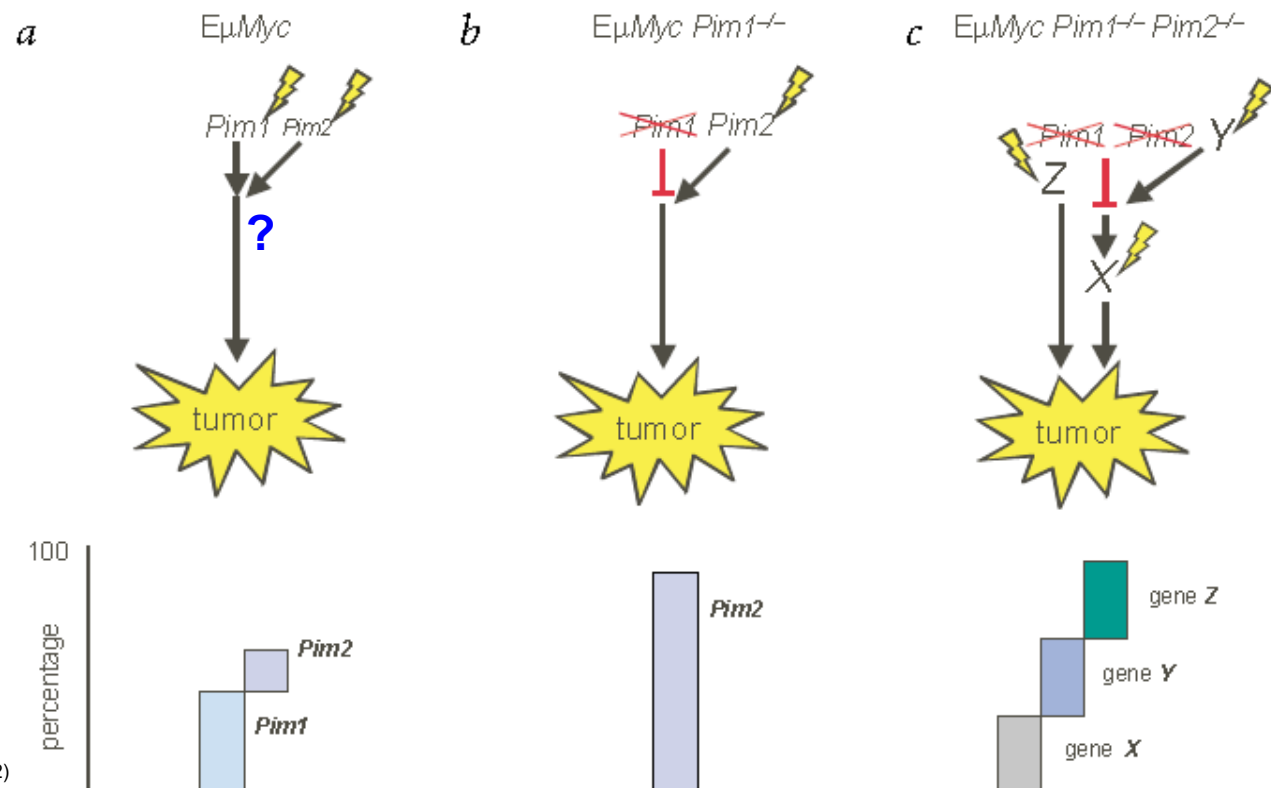
Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



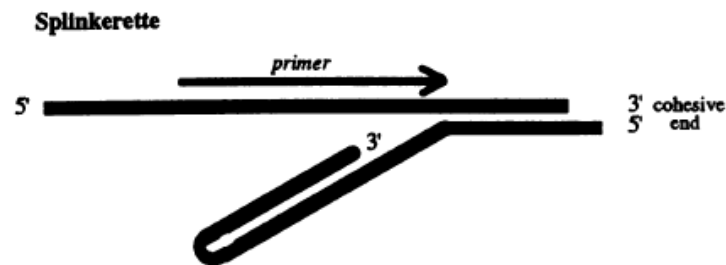
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- 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**)

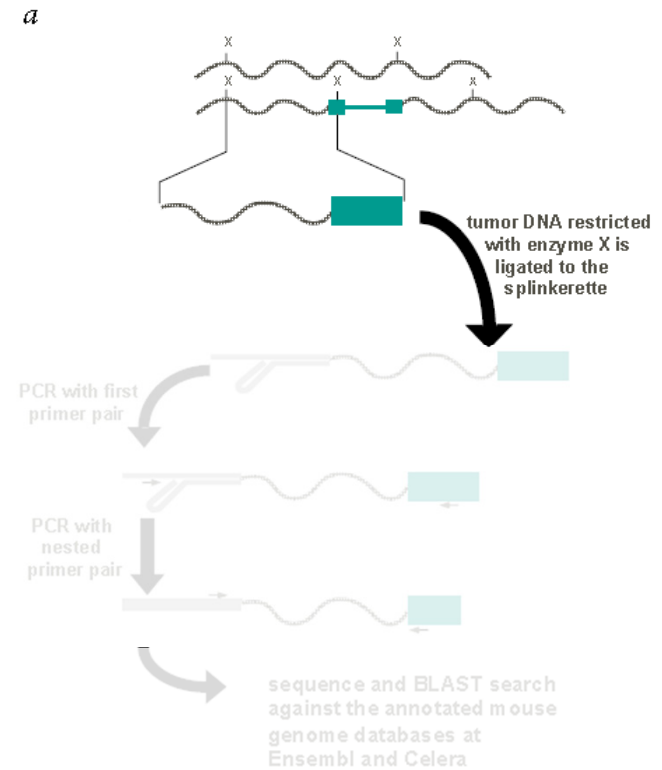


Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



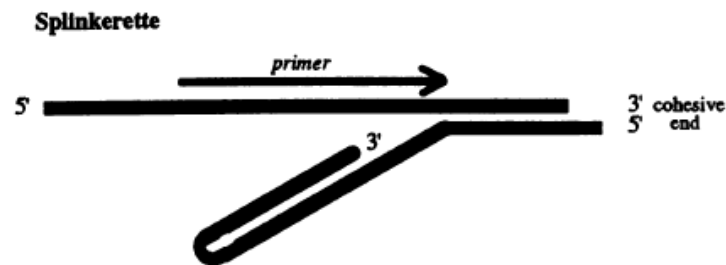
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



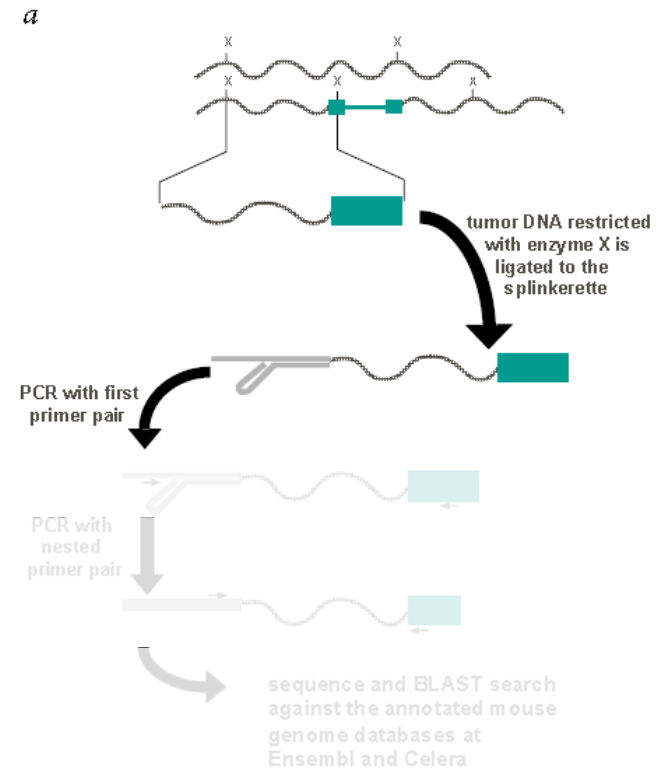
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Inzerční mutagenese v přímé genetice

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



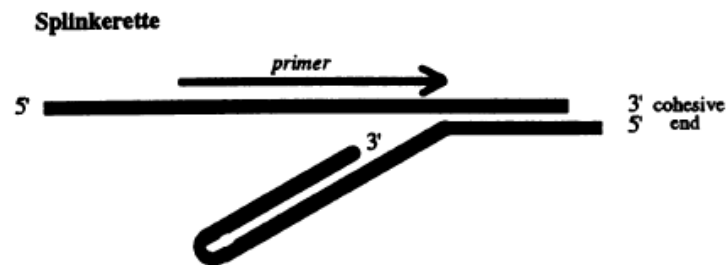
Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



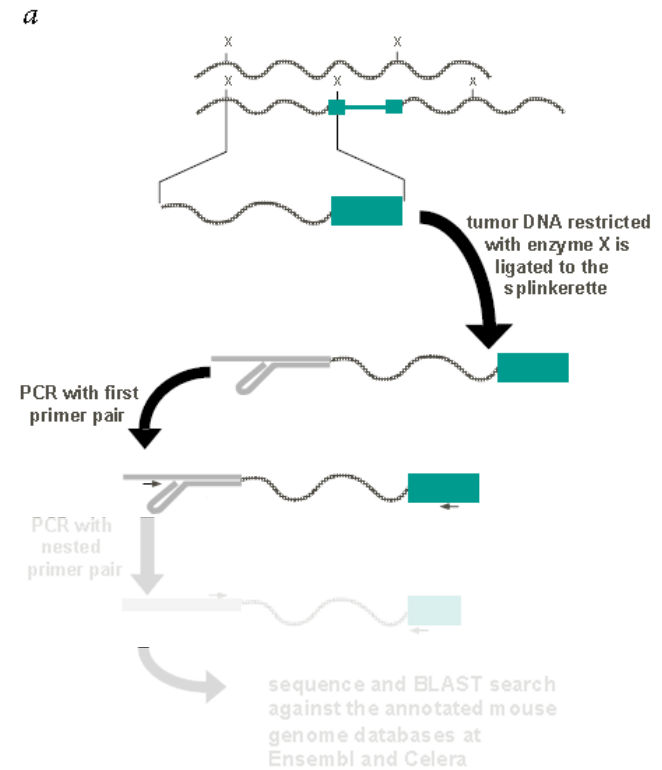
Mikkers et al., Nature Gen (2002)

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)

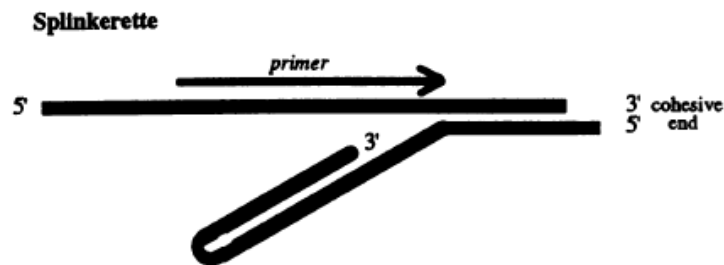


Mikkers et al., Nature Gen (2002)

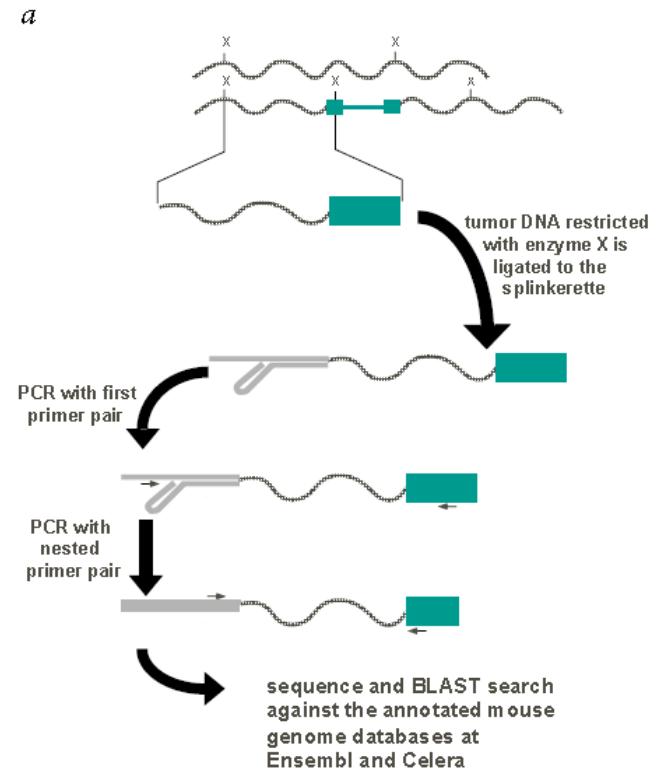
Inzerční mutagenese v přímé genetice

- Izolace genomových oblastí přiléhajících k místu inzerce proviru

- Sekvence a lokalizace oblastí přiléhajících k protoviru vyhledáváním v anotovaných databázích myšního genomu



Devon et al., Nucl Acid Res (1994)



Mikkers et al., Nature Gen (2002)

Osnova

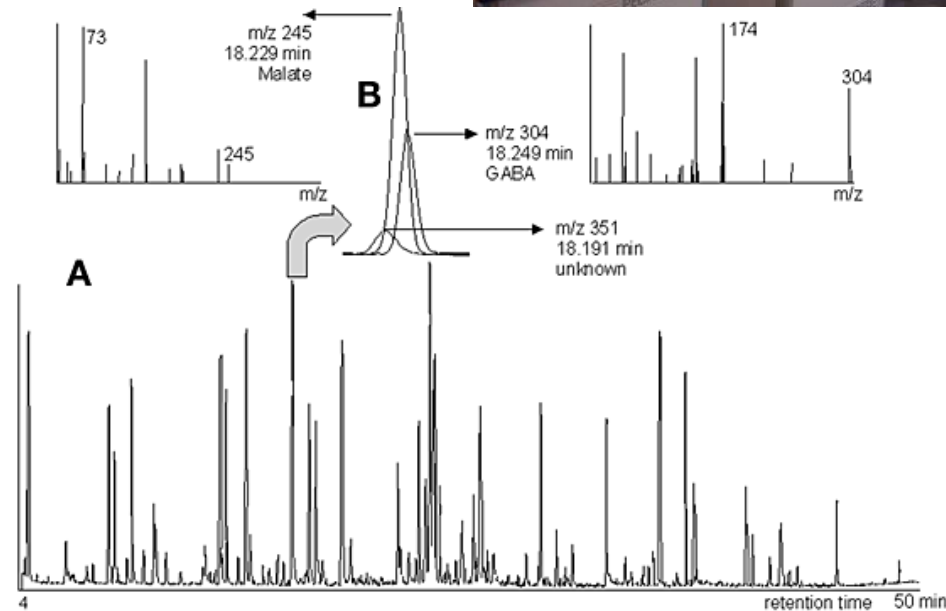
- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu

Metabolické profilování

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

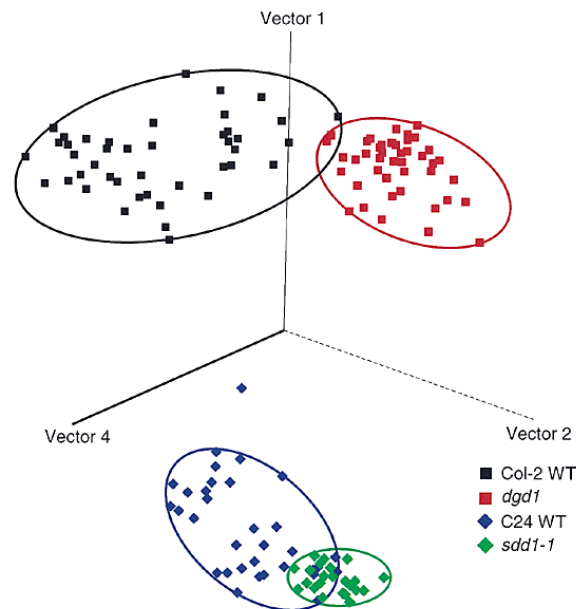


Metabolite	RT	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS11	MS12	MS13	MS14	MS15	MS16	MS17	MS18	MS19	MS20	MS21	MS22	MS23	MS24	MS25	MS26	MS27	MS28	MS29	MS30	MS31	MS32	MS33	MS34	MS35	MS36	MS37	MS38	MS39	MS40	MS41	MS42	MS43	MS44	MS45	MS46	MS47	MS48	MS49	MS50																																																									
1. glucose	100.0	102.0	174.0	175.0	185.0	186.0	206.0	207.0	215.0	216.0	231.0	232.0	247.0	248.0	263.0	264.0	279.0	280.0	295.0	296.0	311.0	312.0	327.0	328.0	343.0	344.0	359.0	360.0	375.0	376.0	391.0	392.0	407.0	408.0	423.0	424.0	439.0	440.0	455.0	456.0	471.0	472.0	487.0	488.0	503.0	504.0	519.0	520.0	535.0	536.0	551.0	552.0	567.0	568.0	583.0	584.0	599.0	600.0	615.0	616.0	631.0	632.0	647.0	648.0	663.0	664.0	679.0	680.0	695.0	696.0	711.0	712.0	727.0	728.0	743.0	744.0	759.0	760.0	775.0	776.0	791.0	792.0	807.0	808.0	823.0	824.0	839.0	840.0	855.0	856.0	871.0	872.0	887.0	888.0	903.0	904.0	919.0	920.0	935.0	936.0	951.0	952.0	967.0	968.0	983.0	984.0	999.0	1000.0



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



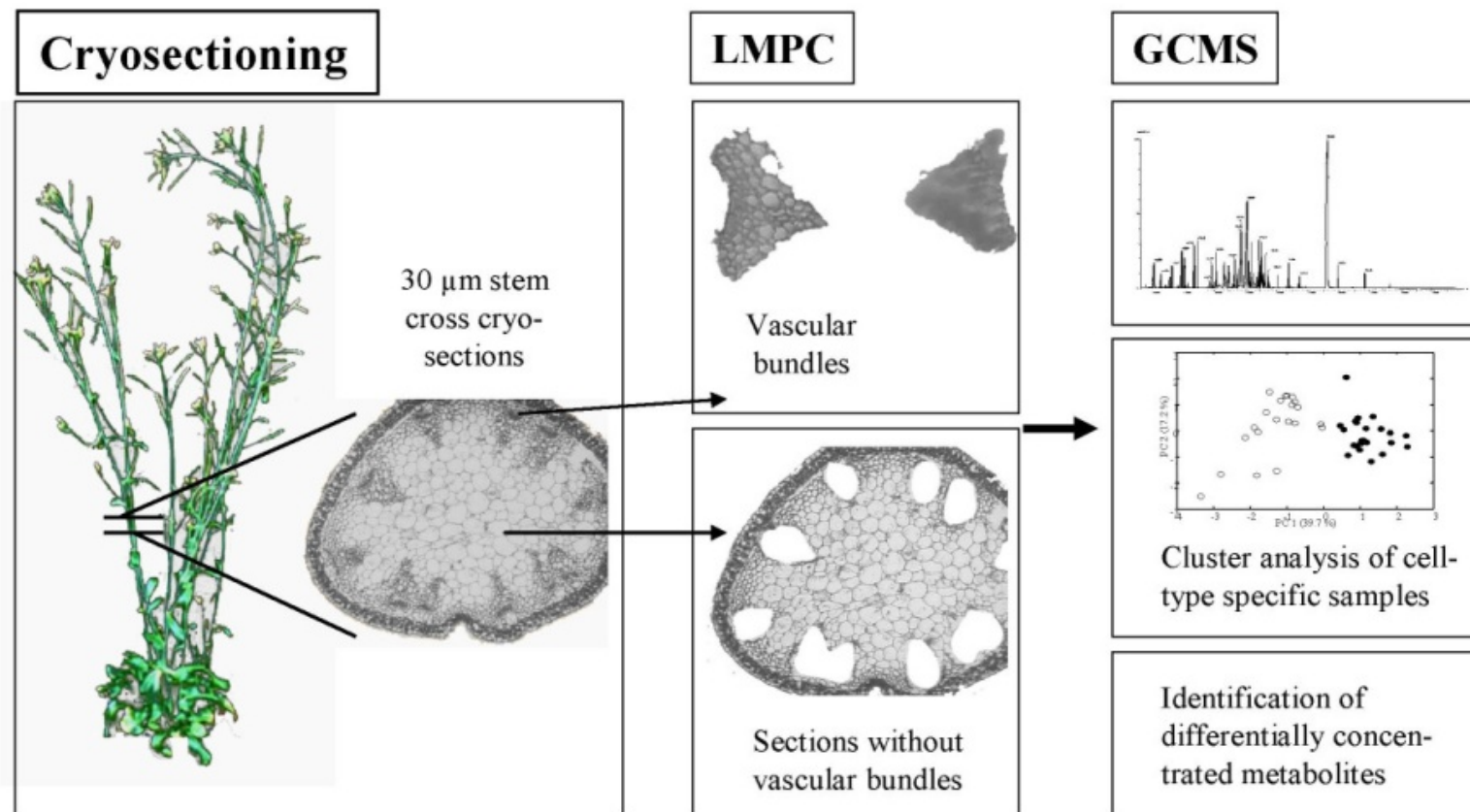
Metabolické profilování

- 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](#)

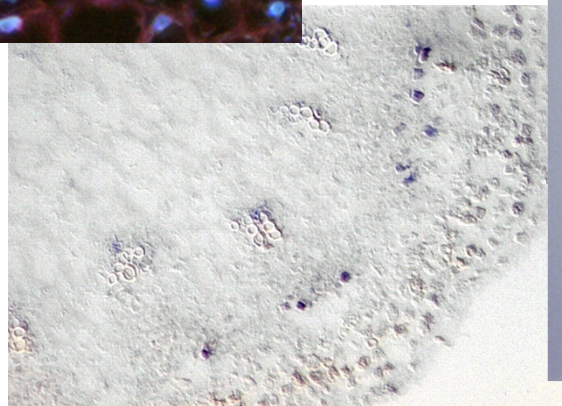
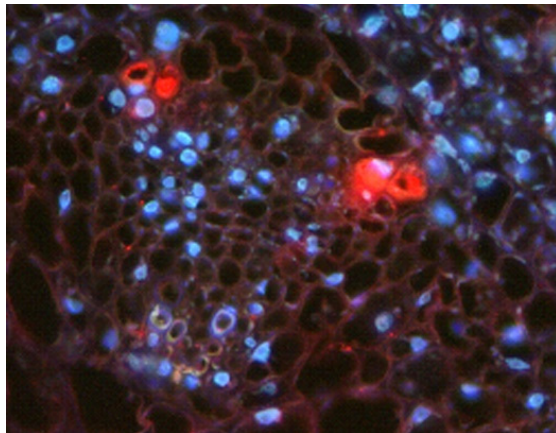


Osnova

- 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

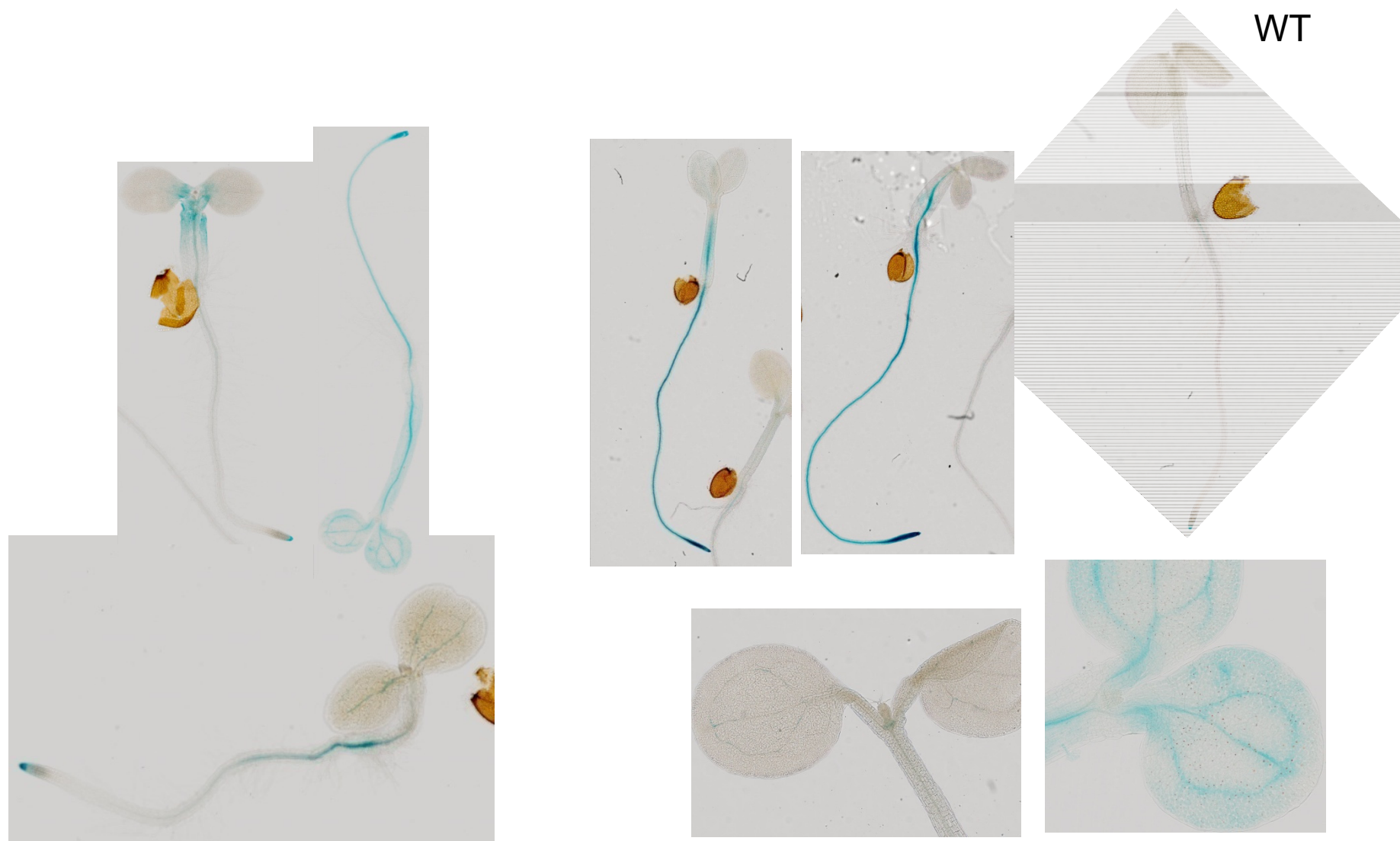
- Identifikace mutantů se **změnou expresního profilu**
 - analýza **expresního profilu** (vzorce) daného genu a identifikace **mutantů se změnou exprese**
 - možnost **částečné automatizace** (virtuální digitální mikroskopie)

Vyhledávání pomocí automatické mikroskopie



Dobisova and Hejtko, *Methods in Mol Biol*, 2014

Expresní profil



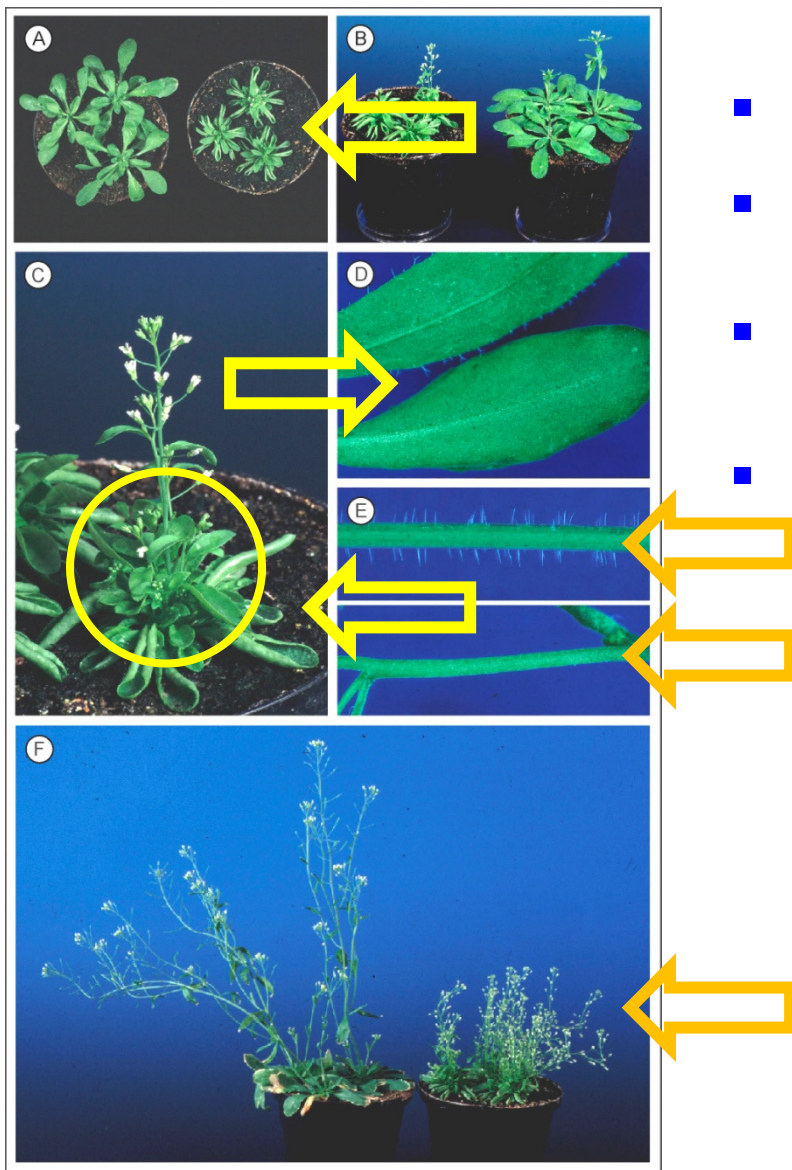
Osnova

- 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

Identifikace mutovaného lokusu

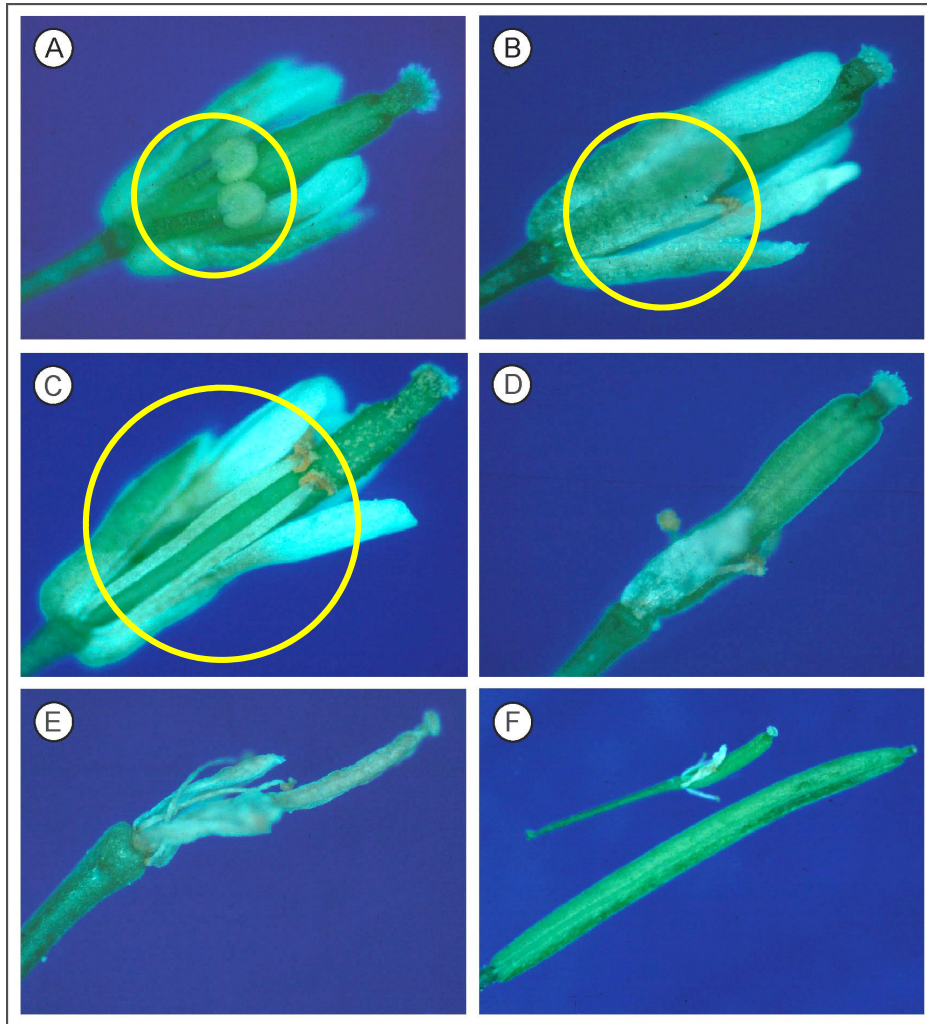
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu

Identifikace mutanta



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

Identifikace mutanta



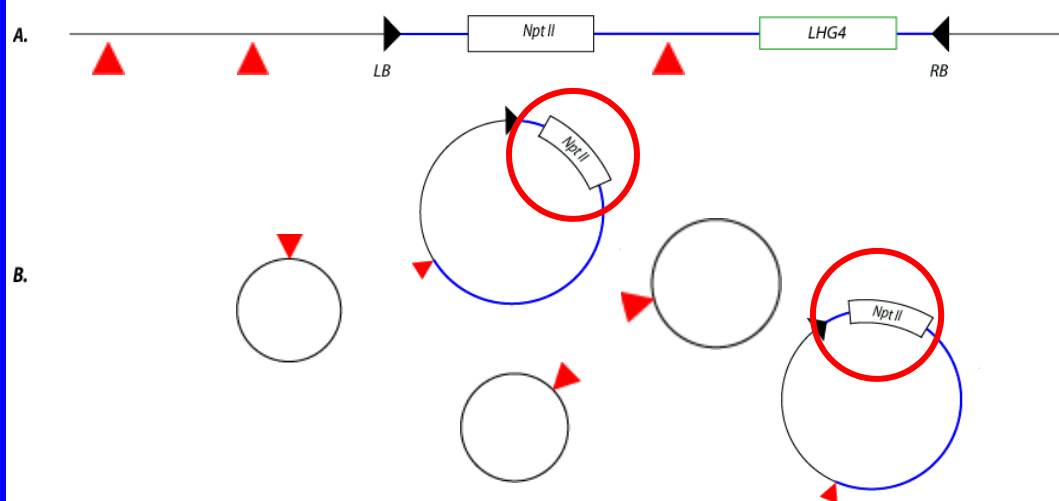
- samčí sterilita, poruchy v prodlužování tyčinek (A,B) (porovnej se standardním typem C)

Identifikace mutovaného lokusu

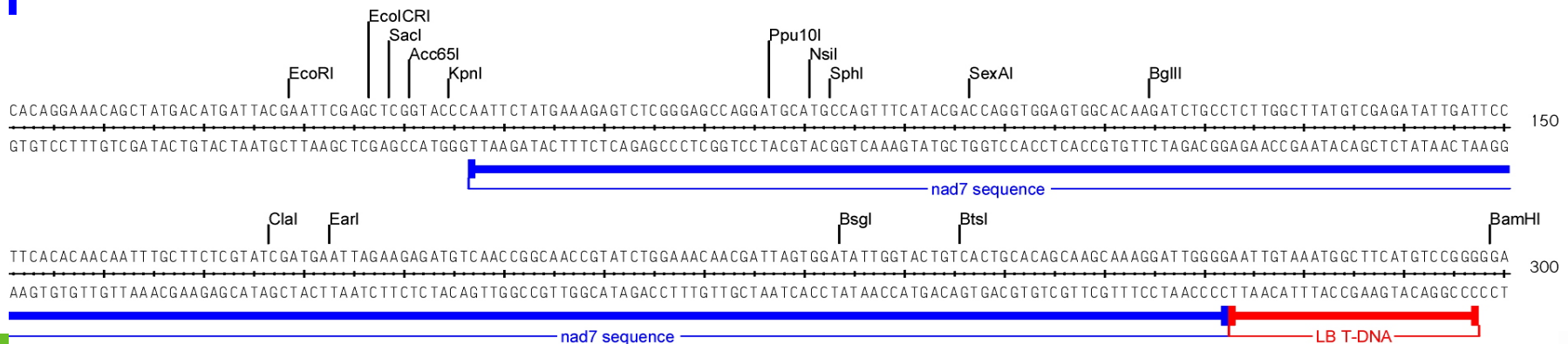
- Identifikace chromozomální přestavby zodpovědné za keříčkovitý fenotyp u *Arabidopsis*
 - popis fenotypu
 - identifikace T-DNA mutované oblasti

Identifikace mutovaného lokusu

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

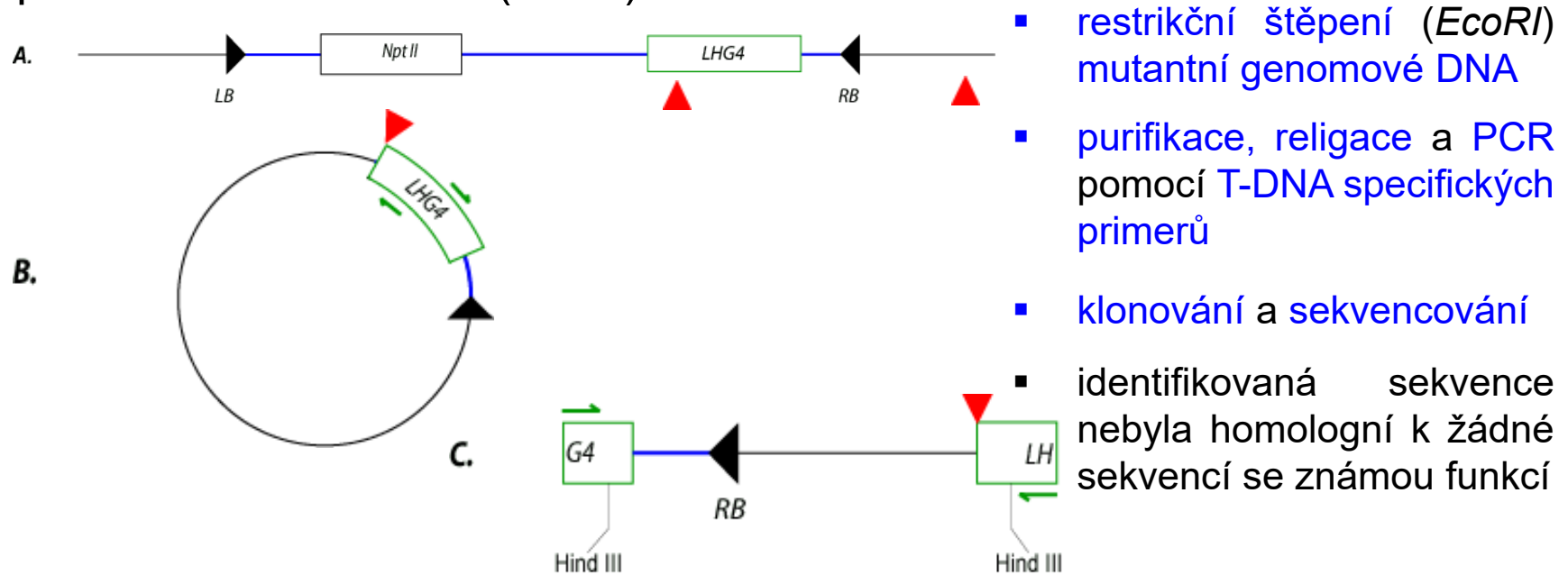


- restrikční štěpení (*EcoRI*) mutantní genomové DNA
- religace a transformace *E.coli*
- izolace plazmidové DNA z pozitivně selektovaných klonů
- identifikovaná sekvence byla identická s genem pro *NAD7* kódovaným na *mtDNA*

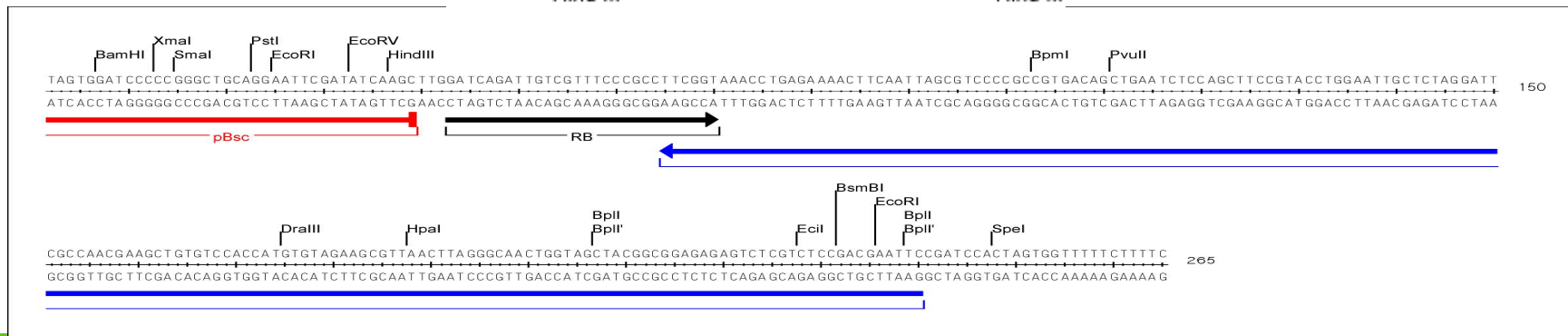


Identifikace mutovaného lokusu

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

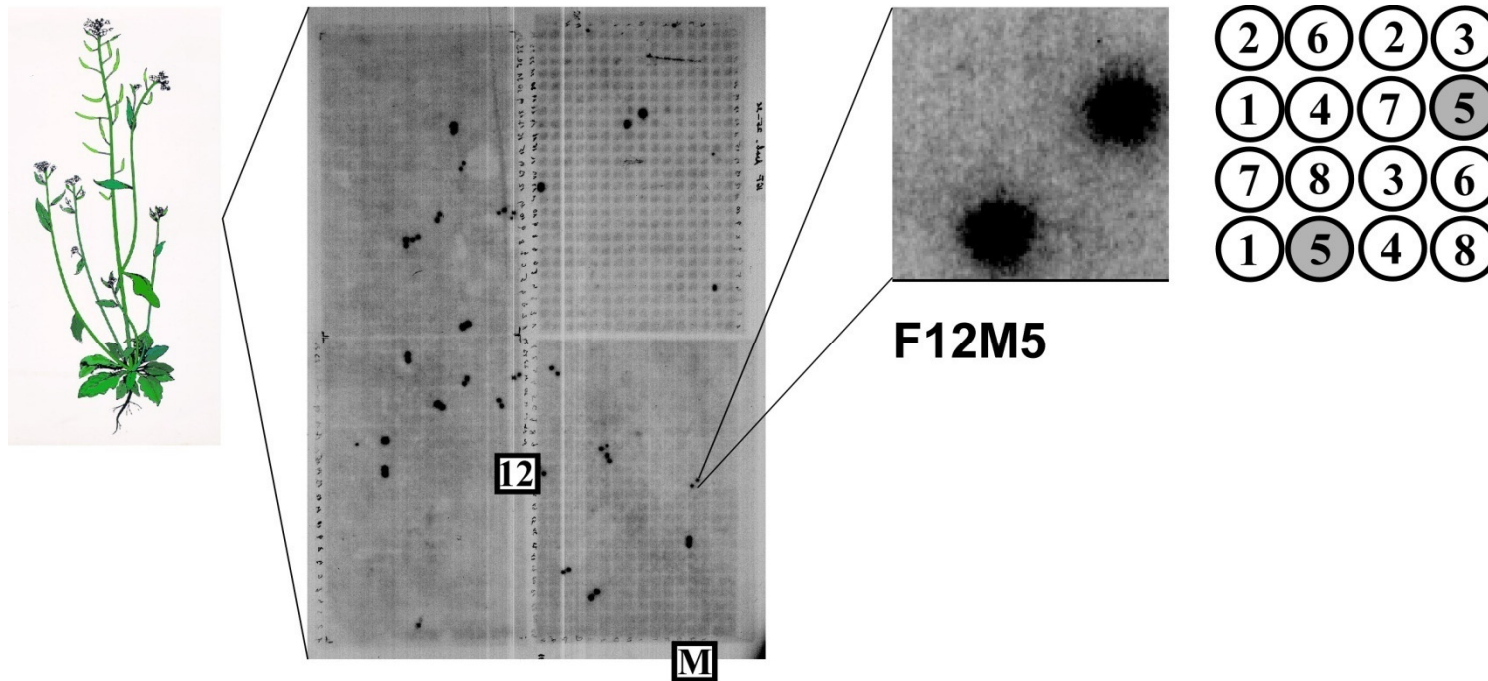


Identifikace mutovaného lokusu

- 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 nanesena na nylonové filtry pro hybridizaci s radioaktivně značenou sondou



Mapování pomocí IGF-BAC databáze

I. Sekvence přiléhající k levé hranici T-DNA

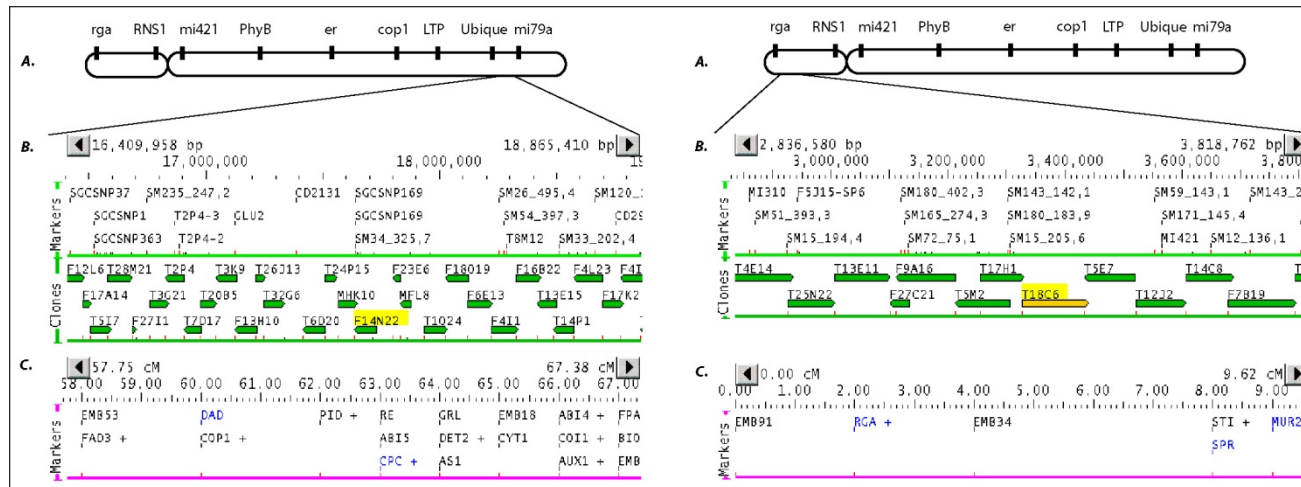
- celkem 28 pozitivně hybridizujících klonů
- 19 z nich lokalizováno na chromozomu 2
- 18 s podobností k mtDNA

II. Sekvence přiléhající k pravé hranici T-DNA

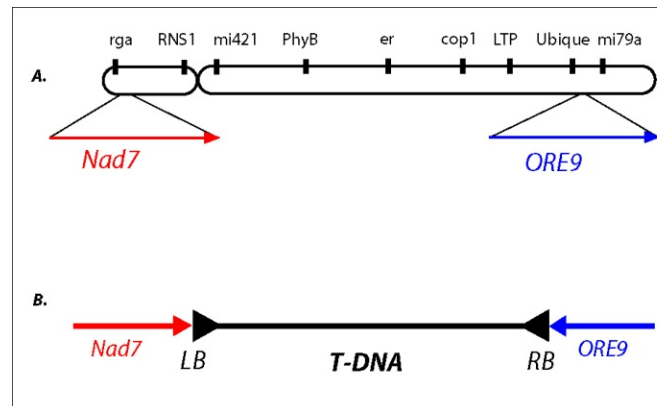
- celkem 6 pozitivně hybridizujících klonů
- všechny lokalizovány na chromozomu 2

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

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



- praviděpodobně došlo k inverzi téměř celého chromozómu 2



Osnova

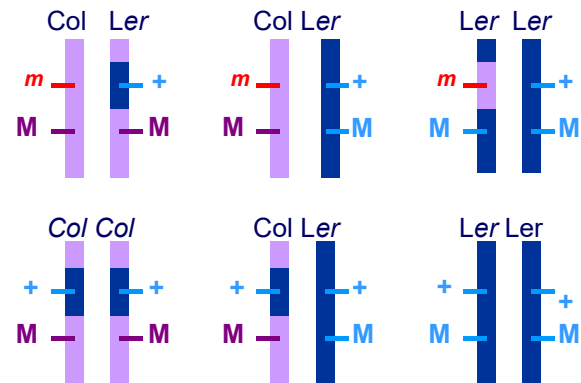
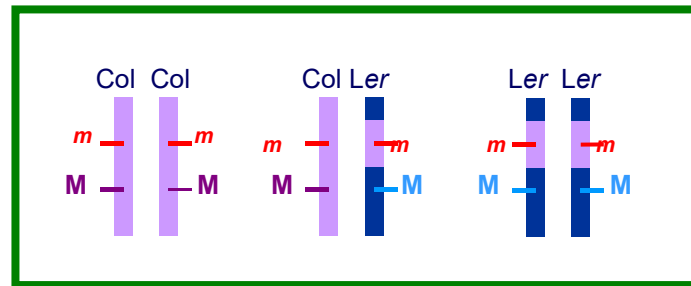
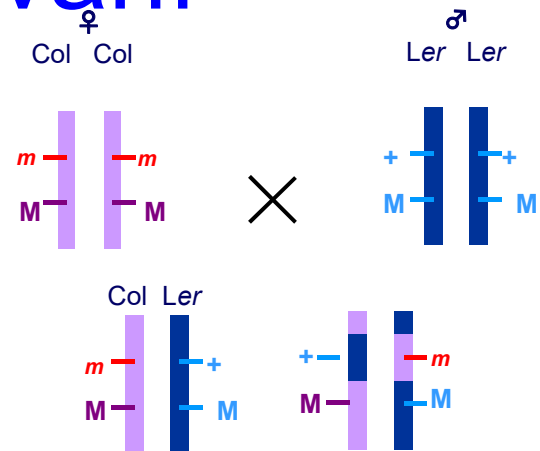
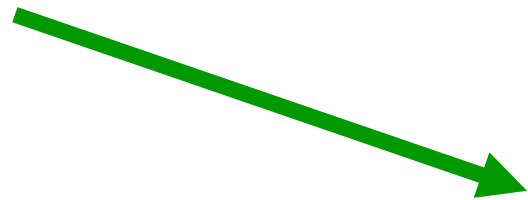
- Přímá vs. reverzní genetika
- Využití knihoven inzerčních mutantů v postupech přímé genetiky
 - vyhledávání v knihovnách inzerčních mutantů podle
 - anatomicky nebo morfologicky detekovatelného fenotypu
 - metabolického profilu
 - exprese zajímavých genů
 - identifikace mutovaného lokusu
 - plasmid 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 genu** (PCR produktů) **amplifikovaného** pomocí specifických **primerů**
 - **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - **polymorfismus délky restričních fragmentů** úseků genu, detekce pomocí Southern blotu (PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů)
 - **CAPS** (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
 - **polymorfismus délky restričních fragmentů** úseků genu amplifikovaných pomocí **PCR**
 - **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
 - **polymorfismus délky náhodně** (pomocí krátkých primerů, 8-10 bp) **amplifikovaných úseků genu**

Poziční klonování

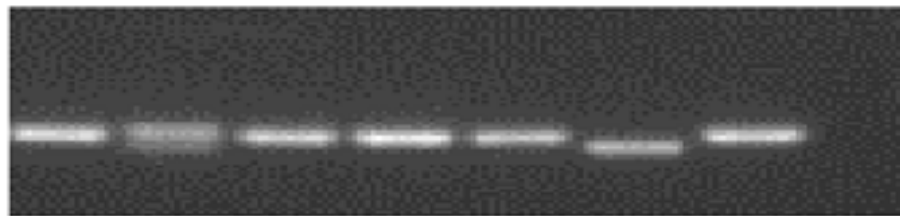
Příprava mapovací populace



Rekombinantní analýza – určení procenta rekombinace mezi mutací a molekulárním markerem

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

F2 mutanti



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

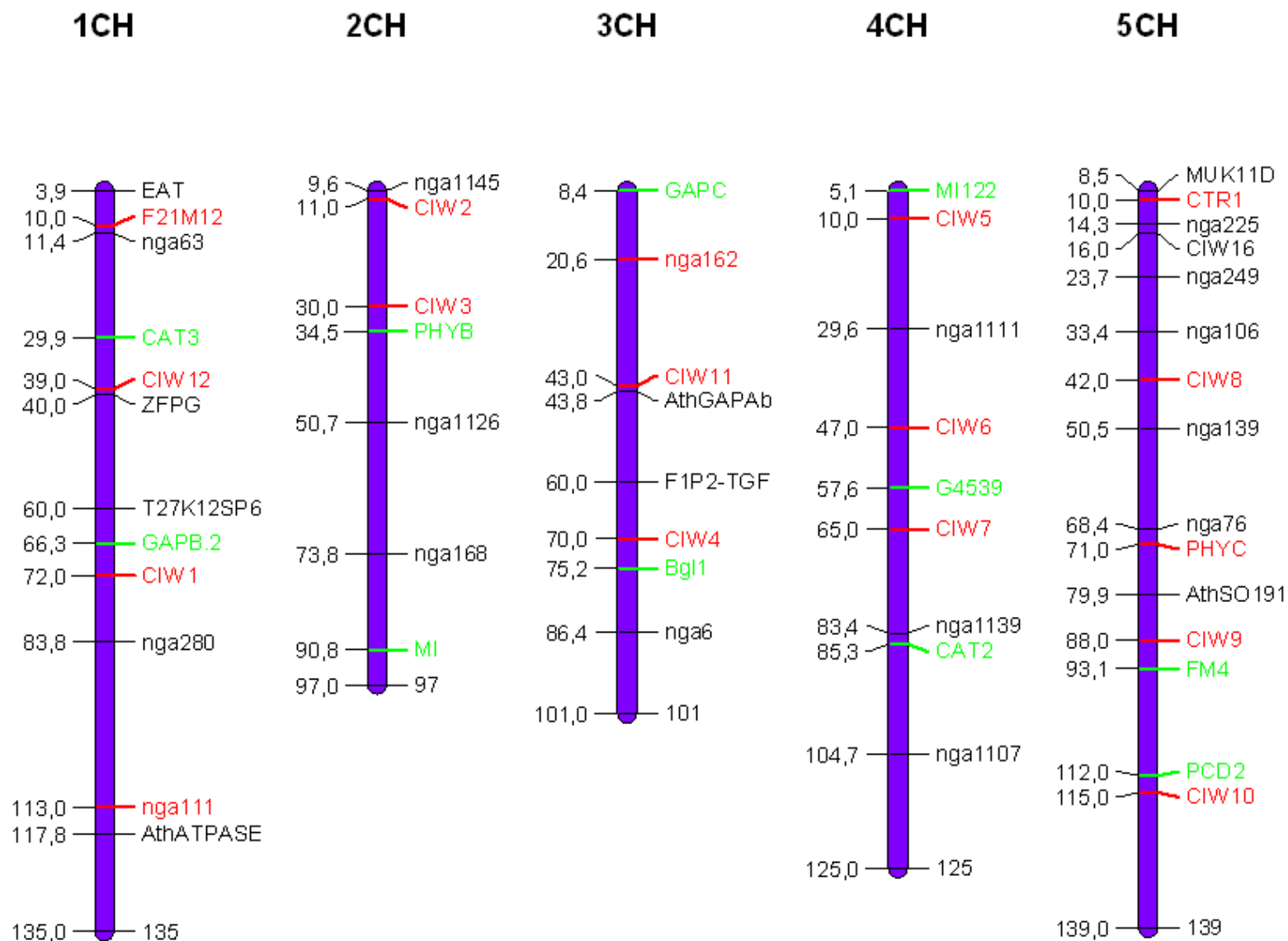
F2 mutanti



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

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:](#)

◀ ▶ Selected Maps ▾

Find

Display All Rows ▾



[MapViewer Home](#)

[Release Note](#)

[View Print-Version](#)

AGI Map

Zoom to: ▾

Zoom up to 200x to see genes!

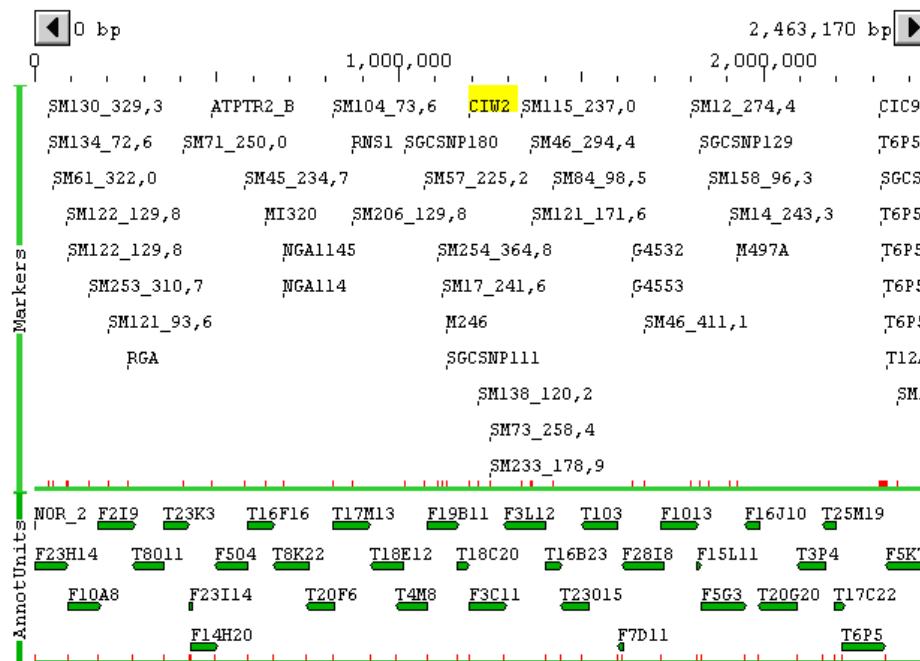
Find

Search by name (e.g. UFO)

Go

Select range (e.g. 1500-2000)

[AGI Map color key](#)



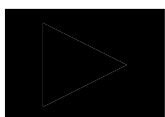
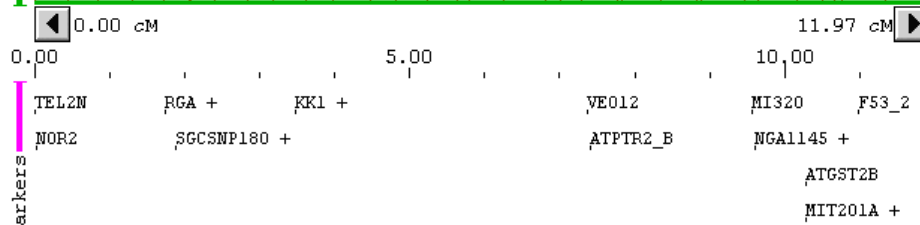
Lister & Dean RI

Zoom to: ▾

Find

Search by name (e.g. UFO)

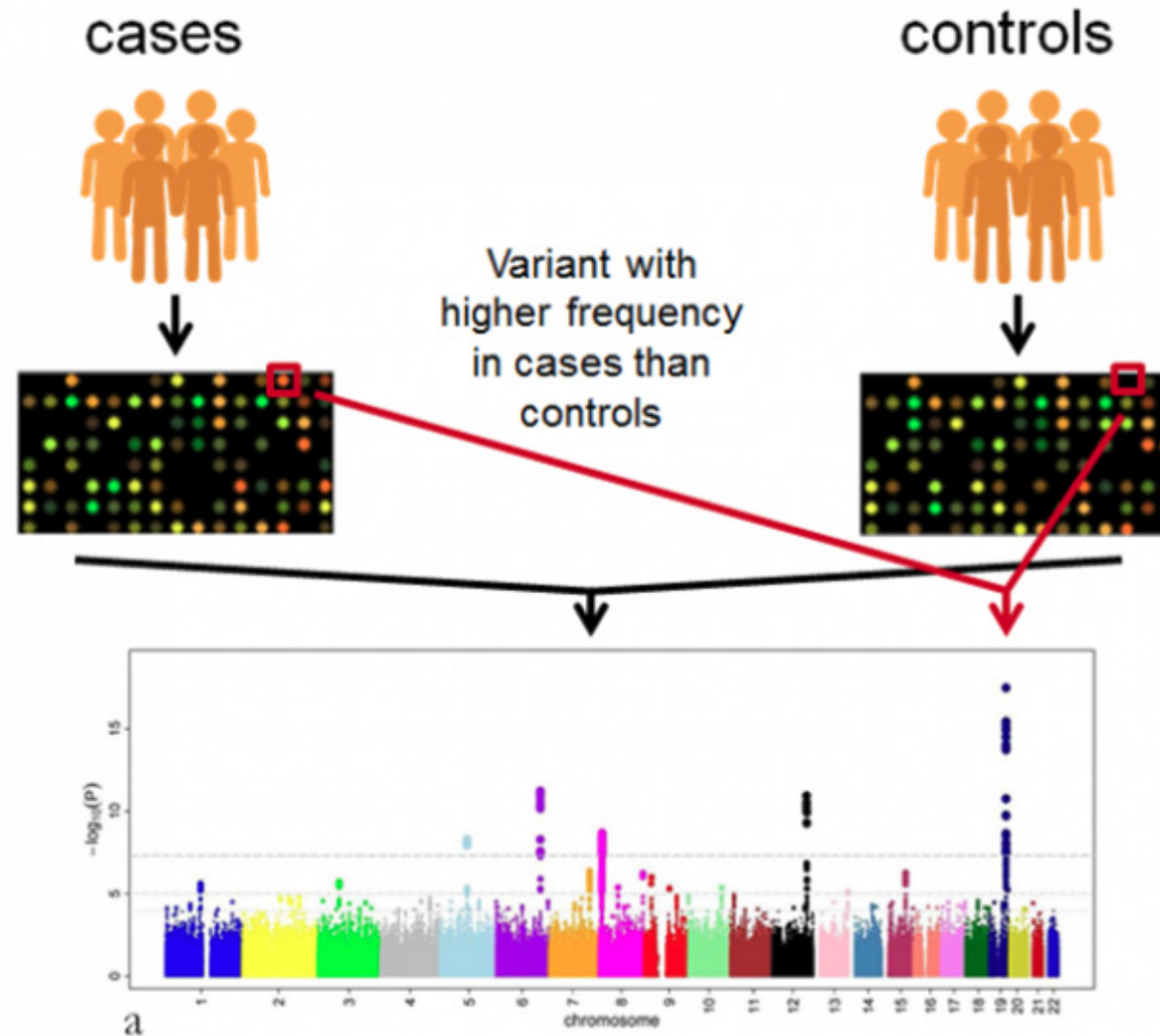
Go



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