

Inovace studia molekulární a buněčné biologie reg. č. CZ.1.07/2.2.00/07.0354

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Genomika (KBB/GENOM)

Investice do rozvoje vzdělávání



INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Funkční genomika

Ing. Hana Šimková, CSc.

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Cíl přednášky

- seznámení s metodami funkční genomiky

Klíčová slova

- přímá saturační genetika, reverzní genetika, genetika jemné struktury

Investice do rozvoje vzdělávání



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

FUNKČNÍ GENOMIKA

- cílem je určení funkce všech genů v genomu

Tři přístupy:

A) přímá genetika (forward genetics)

fenotyp (znak) → gen

- vychází z náhodné mutageneze celého genomu

B) reverzní genetika

sekvence DNA → fenotyp

C) genetika jemné struktury

manipulace se strukturou a regulací určitých genů

→ odhalení nové funkce a interakcí

Investice do rozvoje vzdělávání

Saturační přímá genetika

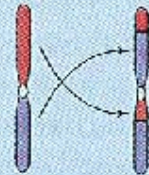

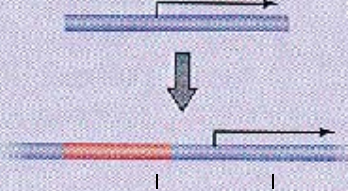
- založena na **saturační mutagenezi** – cílem je dosažení **saturačního bodu** – existuje mutace pro každý lokus → je možné určit skupinu genů odpovědných za daný znak

Typy mutagenů:

- 1) chemické (nitrosoetylmočovina, etylmetansulfonát)
hlavně bodové mutace – obtížně se detekují – využívá se TILLING
- 2) záření (rentgenové, γ)
způsobuje větší inserce a přestavby chromozómů, mohou odstranit celý gen nebo vnést nové regulační sekvence
- 3) transponovatelné elementy, T-DNA
- inzerční mutageneze

- ☺ mutace reverzibilní, snadno se vyhledá a zaklonuje
- ☹ inserce není náhodná

Gibson a Muse, 2004

γ rays	Chemicals (e.g., RNU)	Insertions
		
<ul style="list-style-type: none">▶ Strong mutations▶ May disrupt multiple genes▶ Laborious cloning	<ul style="list-style-type: none">▶ Full spectrum of mutations▶ Random distribution▶ Mutation detection difficult	<ul style="list-style-type: none">▶ Mutation is tagged▶ Reversible▶ Nonrandom distribution

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Hledání místa mutace:

a) menší mutace

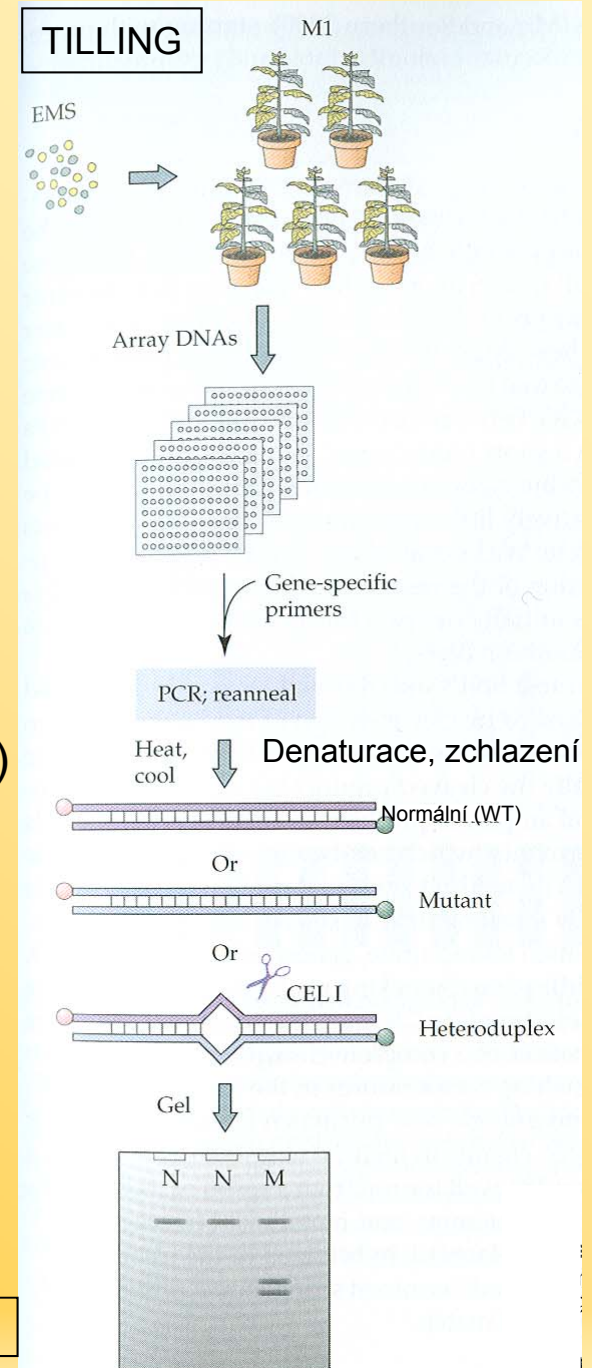
- hledání nových SNP ve vytipované oblasti
- hledání změněného transkripčního profilu
- pokus o komplementaci mutace transgenozí různých kandidátních genů ve WT formě

b) chromozomální přestavby (např. spojené s různými typy rakoviny)

- *velké přestavby* – pomocí *in situ* hybridizace na metafázních chromozómech (rozlišení 5 Mbp)
- *menší přestavby*

komparativní genomová hybridizace (CGH)

- DNA microarraye se sondami pokrývajícími různé části genomu → hybridizace s genomickou DNA (rozlišení desítky kb)



Gibson a Muse, 2004

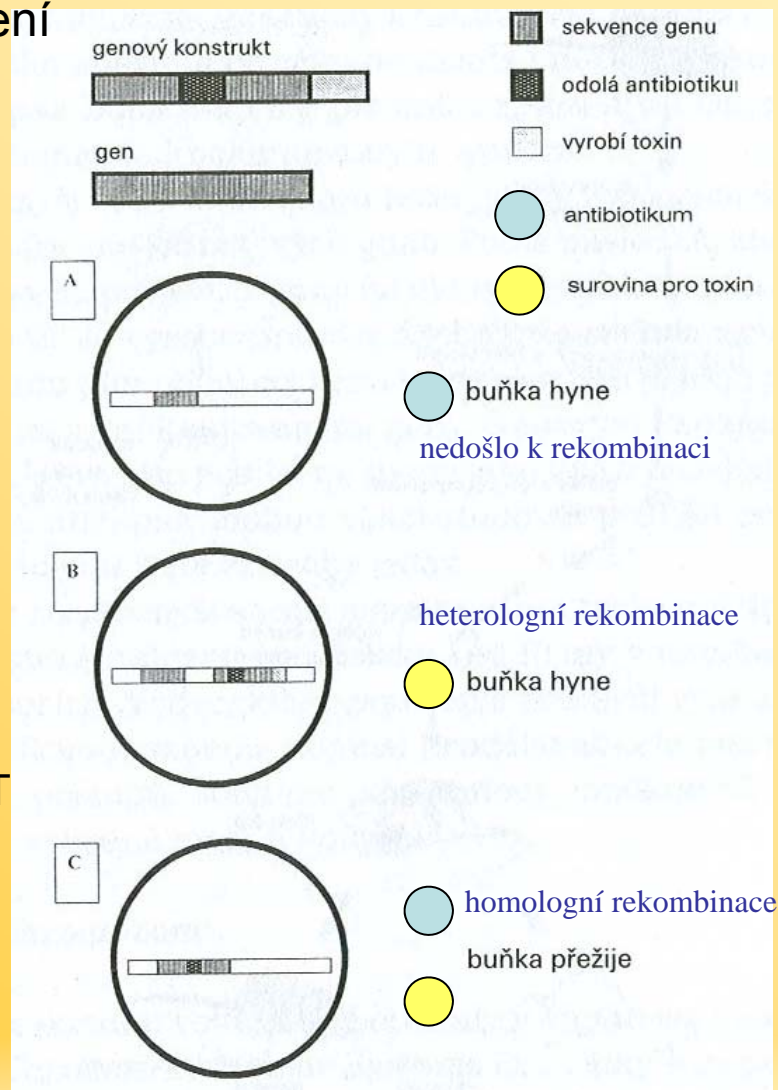
Vysokokapacitní reverzní genetika

- systematická mutagenese – postupné vyřazování z funkce celé série kandidátních genů – pro případy, kdy počet kandidátních genů není velký.

Cílená mutagenese nejčastěji využívá narušení určitého ORF za pomoci **homologní rekombinace** (genetický *knock-out* a *knock-in*)

➤ **genetický *knock-out*** – vnesení inzertu (nesoucího selektovatelné markery), který se díky částečné sekvenční homologii vloží do místa endogenní kopie genu a nahradí jej. Markery umožní selekci chromozómů s homologně vneseným inzertem.

➤ **genetický *knock-in*** – vnesení modifikované varianty genu nebo změněné regulační sekvence – využívá se pro genovou terapii – mutantní (např. nefunkční) gen je nahrazen WT alelou (funkční)



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

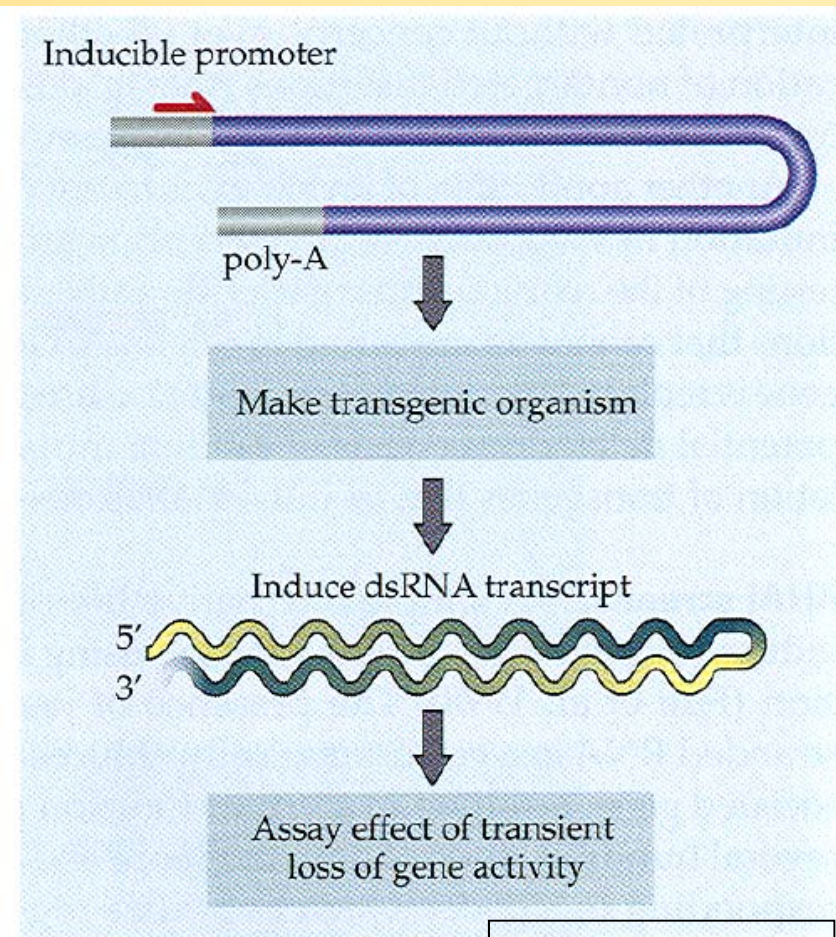
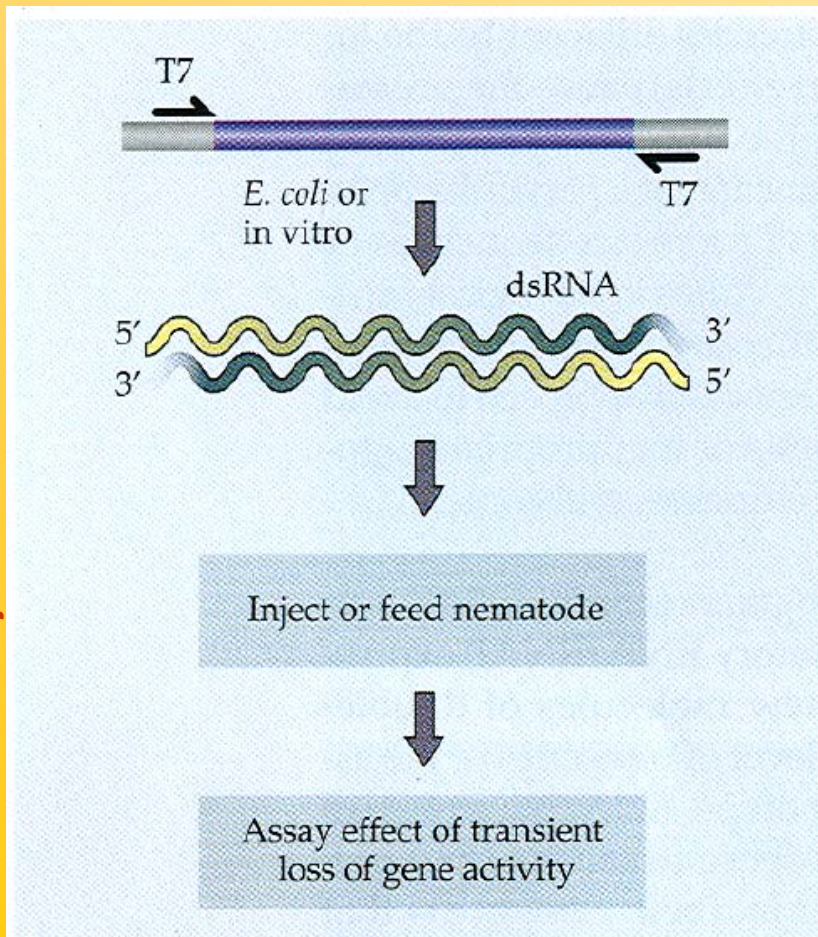


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

➤ **využití RNA interference (RNAi)** – přechodná ztráta funkce genu je indukována prostřednictvím exprese interferující RNA = dsRNA o délce několika set nukleotidů, odvozená z příslušného genu – sense+antisense řetězec – vnášena injekcí nebo elektroporací do embrya, nebo prostřednictvím bakterií do *Caenorhabditis*. Interakce s Dicer a RISC.

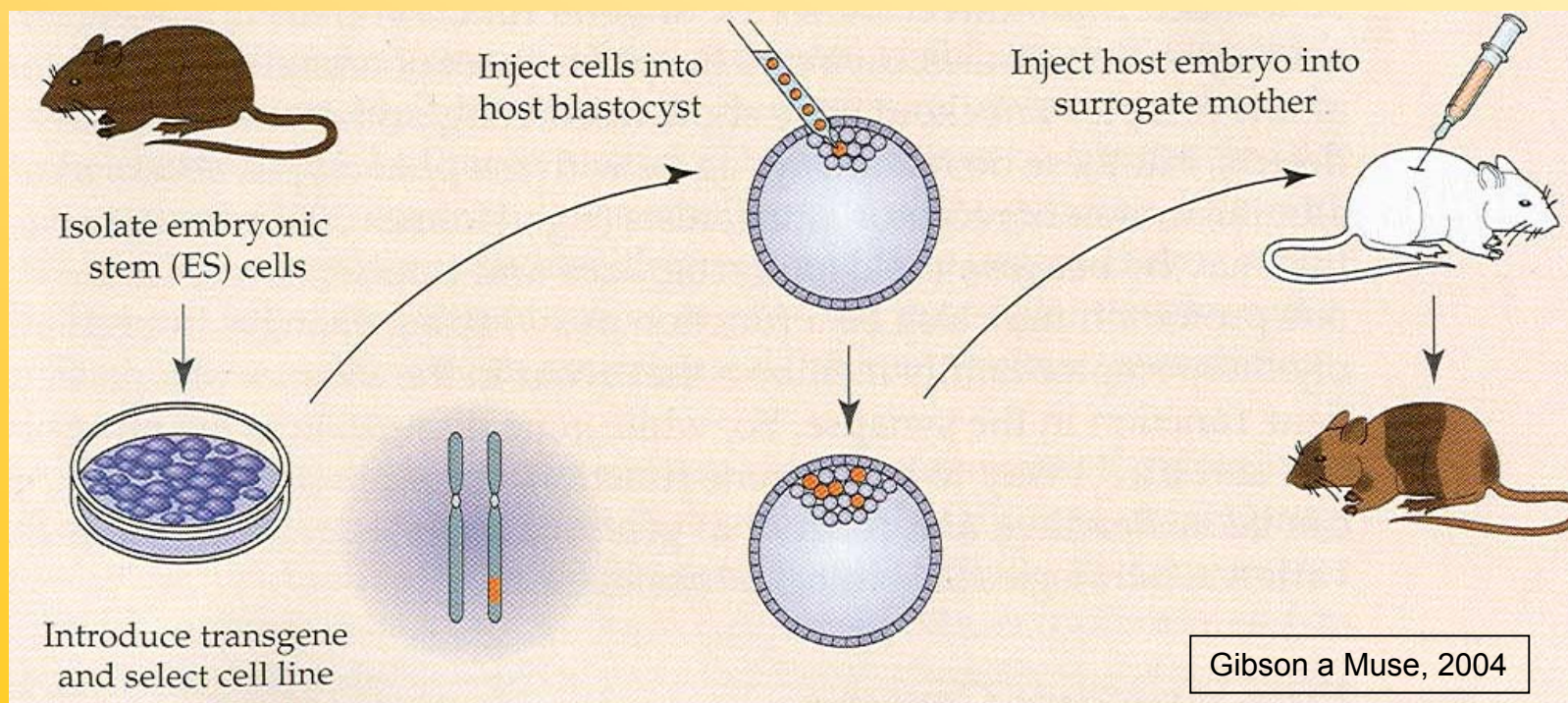


Gibson a Muse, 2004

Investice do rozvoje vzdělávání

Způsoby transgenozy (vnášení cizorodé DNA) u vyšších eukaryot

- chemická transformace nebo elektroporace – pro vnášení DNA do buněčných kultur (protoplasty, embryonální kmenové buňky)



- mikroinjekce – do oocytů savců
- biolista – do rostlinných buněk a organel

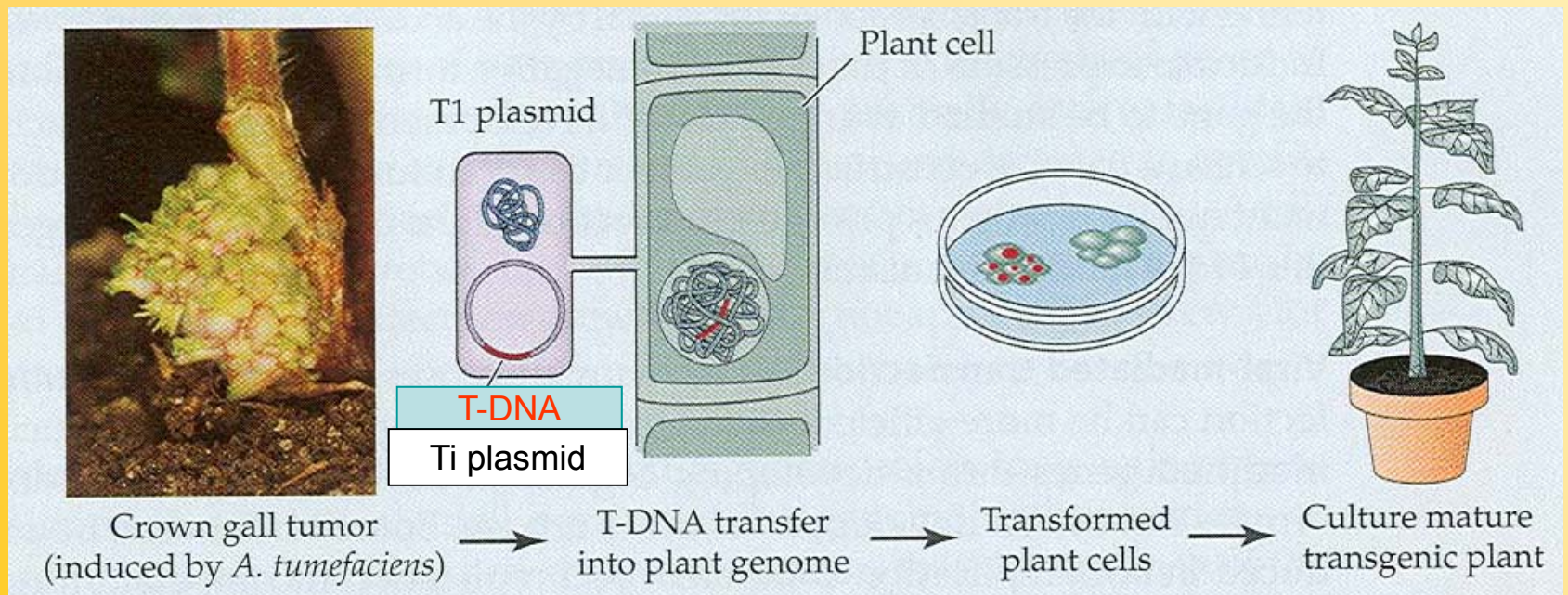
Investice do rozvoje vzdělávání



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

➤ transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (v Ti plazmidu) – do rostlinných buněk – z nich regenerace transformantů somatickou embryogenezí



Gibson a Muse, 2004

➤ transfekce prostřednictvím virového vektoru – např. modifikované retroviry a adenoviry – účinnější, zejména pro dlouhodobé studie

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

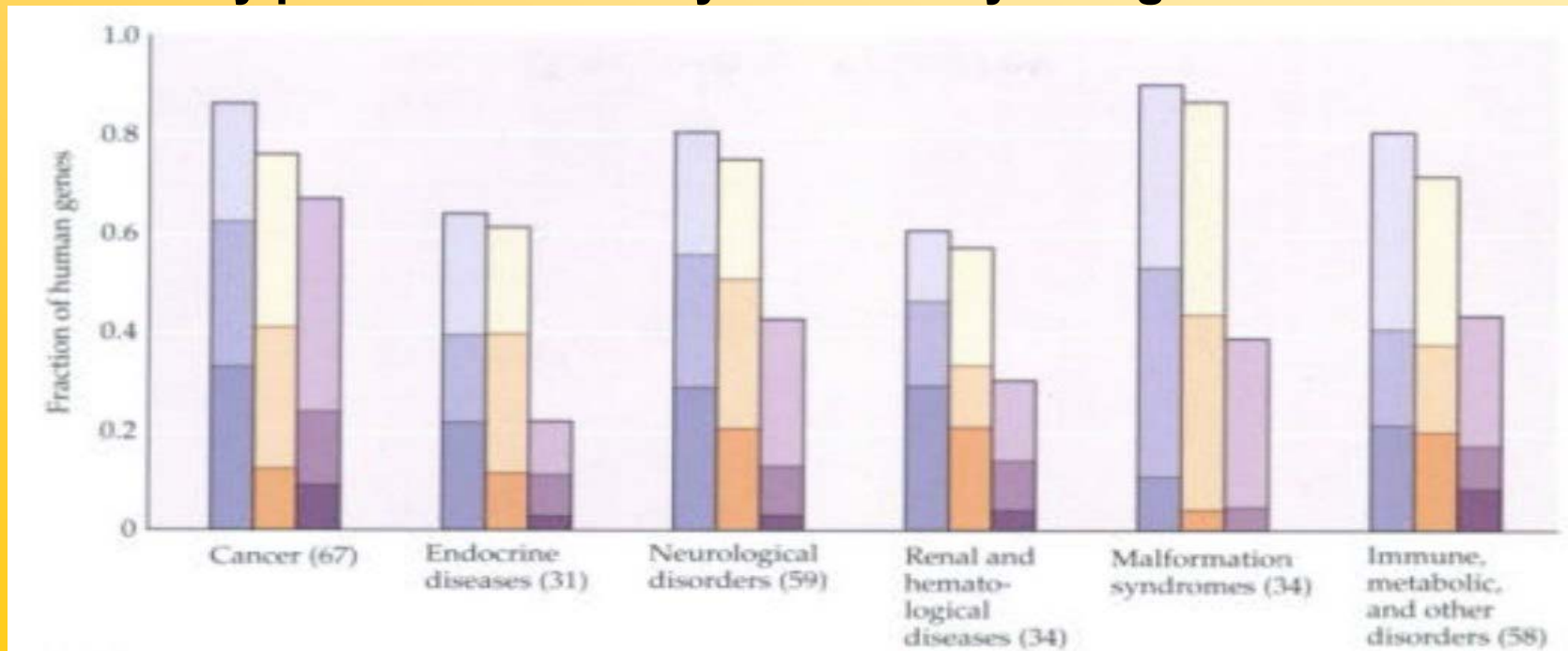


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

➤ **vyhledávání modifikátorů** (modifier screens) – v případech, kdy fenotyp je dán jedinou známou mutací, prozkoumává se celá metabolická dráha, aby se našly další geny, které mohou zeslabovat nebo zesilovat fenotyp (modifikátory). Např. syntetické letální screeny – identifikují páry lokusů, které jsou samostatně životné, v kombinaci neživotné. Můžou se provádět v heterologních systémech (interakce nalezené u nižších modelových organismů jsou obvyklé i u vyšších organismů, i když fenotyp může být odlišný)

Geny pro lidské choroby v modelových organismech



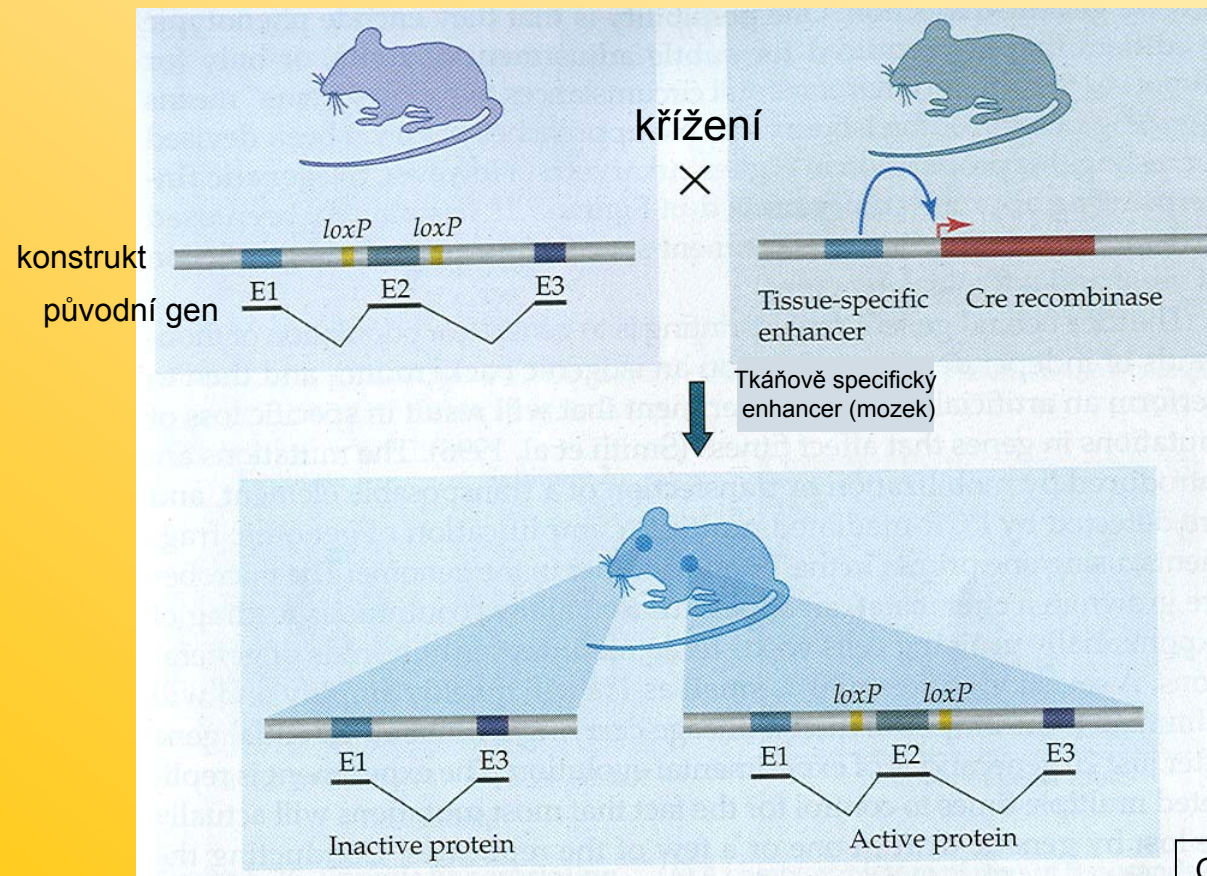
Modrá – *Drosophila*
 Oranžová – *Caenorhabditis*
 Fialová - *Saccharomyces*

Gibson a Muse, 2004

Investice do rozvoje vzdělávání

➤ **floxing** – umožňuje narušit funkci genu v určitém momentu vývoje nebo jen v určitých tkáních. Využívá systému Cre-Lox.

Na základě homologní rekombinace se do organismu vnese exon studovaného genu obklopený z obou stran *lox* místy. Ta jsou rozeznávána rekombinázou Cre → vyštěpení úseku mezi *lox* místy. Gen *Cre* je pod kontrolou specifického promotoru nebo enhanceru → vyštěpení je časově nebo tkáňově omezeno.



Gibson a Muse, 2004

Investice do rozvoje vzdělávání