

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

Investice do rozvoje vzdělávání



INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika (KBB/GENOM)

Investice do rozvoje vzdělávání



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

Genetické mapování

Mapovací populace

Ing. Hana Šimková, CSc.

Investice do rozvoje vzdělávání



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

Cíl přednášky

- seznámení s problematikou mapovacích populací u rostlin a živočichů, s problematikou asociačního mapování a se strategiemi genetického mapování používanými u člověka

Klíčová slova

- genetické mapování, rekombinační mapování, asociační mapování, mapovací populace

Investice do rozvoje vzdělávání



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

GENETICKÉ MAPOVÁNÍ U ROSTLIN

MAPOVACÍ POPULACE

- populace jedinců jednoho druhu, případně pocházejících z křížení mezi příbuznými druhy, kde rodiče se liší v mapovaném znaku (polymorfismus).

A) Mapovací populace pro samosprašné rostliny **(rodiče jsou homozygotní)**

- F2 populace
- rekombinantní inbrední linie (RIL)
- dihaploidní linie
- populace zpětných kříženců (*back-cross* populace, BC)

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

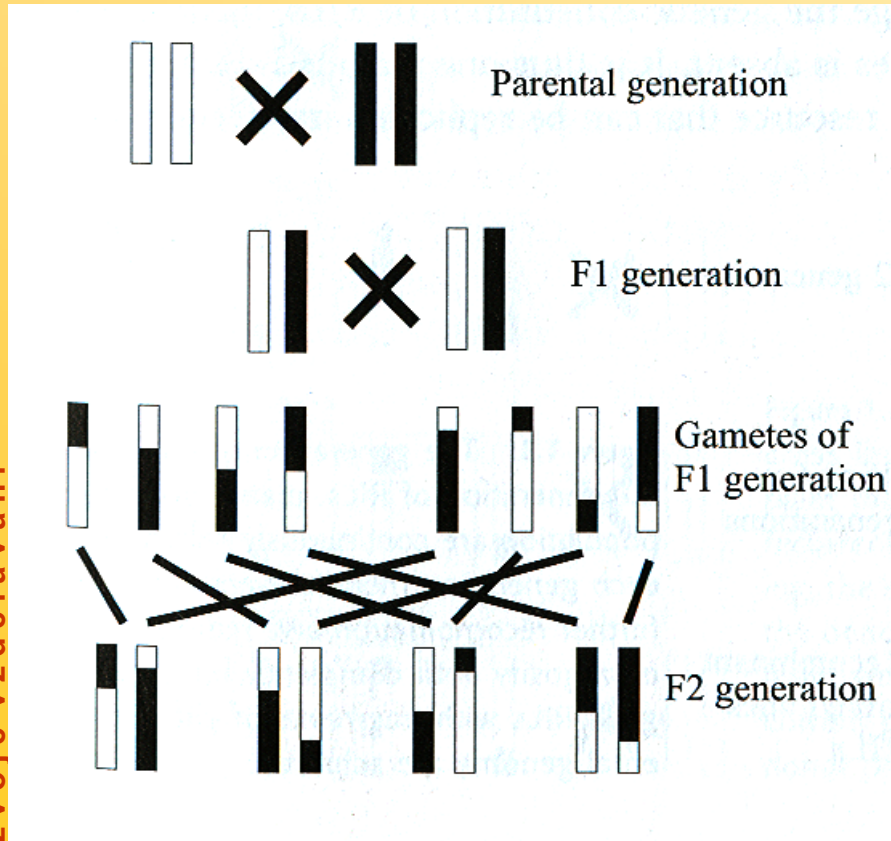


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

F2 populace



Rodičovské linie - homozygotní, liší se ve znacích, které chceme studovat.

Každá rostlina je samosprášena.

Nelze přemnožovat, nelze provést opakování experimentu.

Pro hrubou mapu (monogenní znak) – 100 jedinců F2, pro poziční klonování – tisíce jedinců. Nevhodné pro mapování QTL (nelze provádět opakování).

Rekombinantní inbrední linie

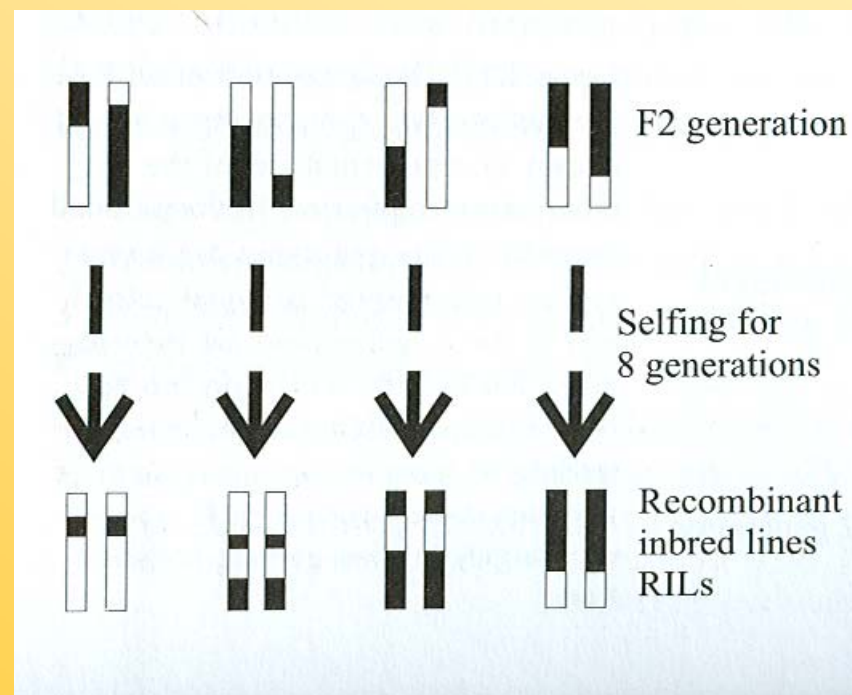
- homozygotní potomstvo jedinců z F2 populace, vzniklé samosprášením (rostliny – nejméně 6 generací) nebo příbuzenským křížením (zvířata – obvykle 20 generací).

Výhody:

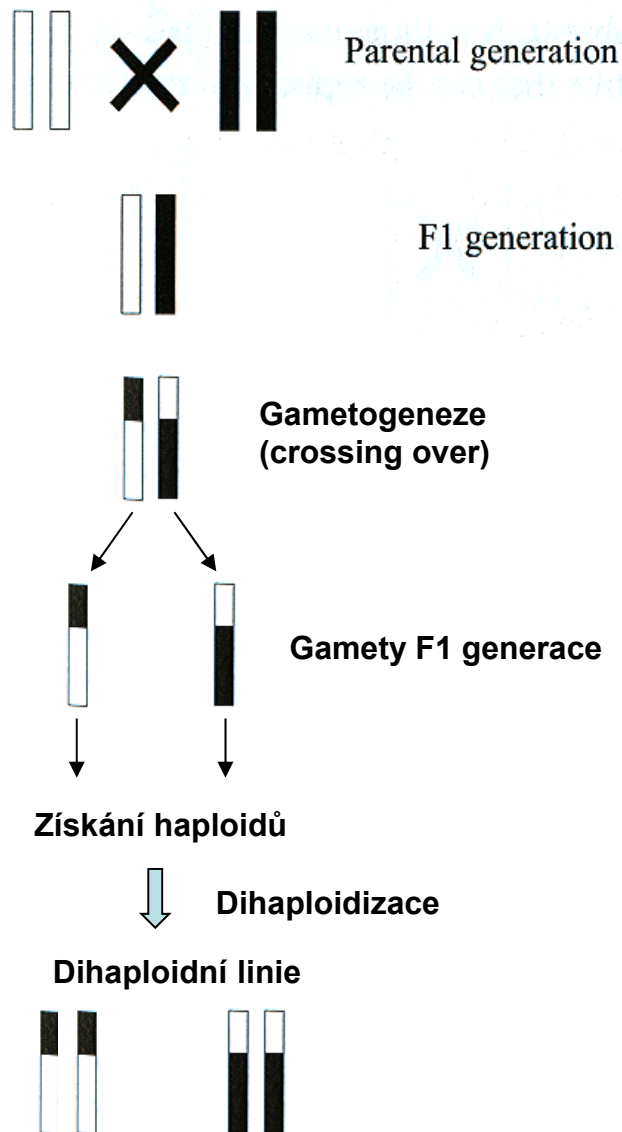
-v dalších generacích už nedochází k segregaci – dá se přemnožovat

- vyšší stupeň rekombinace ve srovnání s F2 – umožňuje mapy s vyšším rozlišením

- vhodné pro mapování QTL



Dihaploidní (DH) linie



– obsahují 2 identické sady chromozomů v každé buňce - nemají zbytkovou heterozygotnost (fixovaný homozygotní stav). Vznikají z haploidních linií.

Haploidní linie vznikají

- spontánně – kukuřice, řepka
- uměle – v *in vitro* kultuře prašníků nebo mikrospor

Dihaploidizace

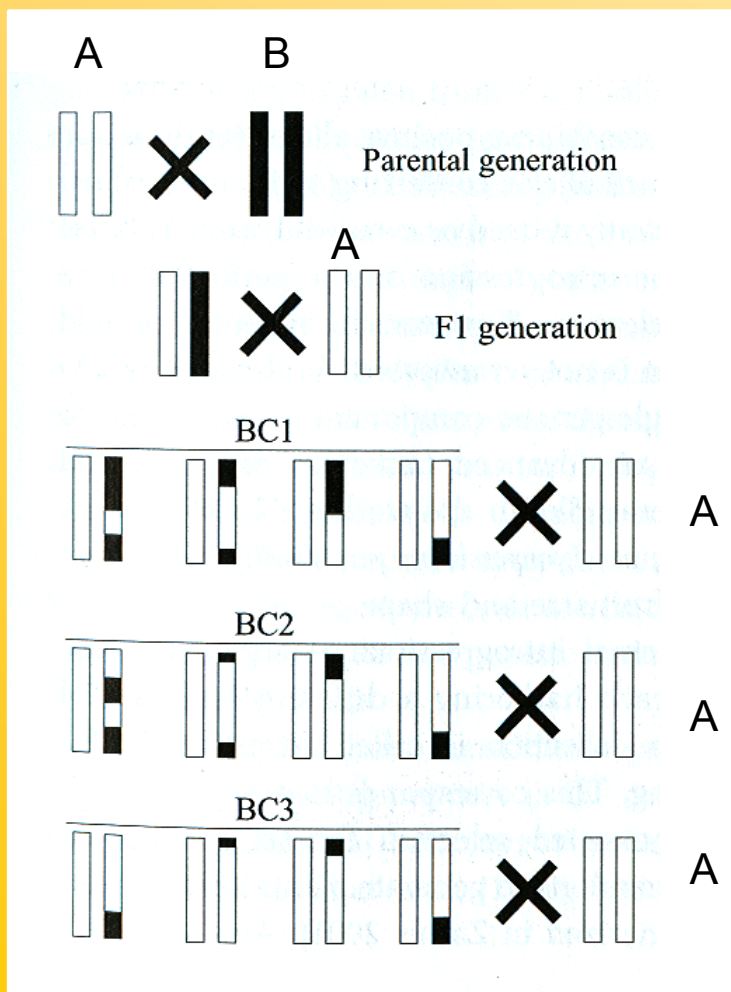
- spontánní – v kalusu – DH regeneranti vznikají somatickou embryogenezí
- umělá – vlivem kolchicinu

DH linie – permanentní zdroj pro mapování. Vhodné pro mapování QTL.

Pro některé druhy se odvozují velmi obtížně, vývoj nákladný.

Populace zpětných kříženců (BC)

- k analýze specifických fragmentů z rodiče B (donor) na pozadí rodiče A (recipient)



Potomstva jsou několikrát zpětně křížena s rodičem A:

- fragmenty z donora, které nebyly ve vazbě, se oddělily

- fragmenty z donora, které byly ve vazbě, se zredukovaly na minimum (při každém křížení o 50%)

Potomstvo z každého zpětného křížení skrínováno na introdukovaný znak (dominantní přímo, recesivní v potomstvu), obvykle za pomoci markerů – selekcí můžeme celý proces urychlit.

Pokročilým zpětným křížením (7-10 generací) a využitím selekce za pomoci markerů (marker-assisted selection, MAS) a kontroly fenotypu (přítomnosti žádoucího znaku) můžeme získat **téměř izogenní linie** (nearly-isogenic lines, **NILs**) – jsou identické s výjimkou fragmentu odpovídajícího 1 až několika lokusům. Proces je zakončen dvěma samosprášenými – fixace donorového segmentu a vizualizace recesivního znaku.

Linie inkorporující fragment DNA

- z odlišné odrůdy = meziodrůdové substituční linie
- z velmi vzdáleného druhu = introgresní linie (pšenice – žito)

Kolekce různých introgresních linií odvozených z křížení kultivovaného a divokého druhu, nesoucích různé fragmenty z donora = exotická knihovna (používá se zejména pro studium QTLs).

Pozor! – u mezidruhových hybridů slabší rekombinace

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

Investice do rozvoje vzdělávání



B) Mapovací populace pro cizosprašné rostliny

- v důsledku inkompatibility nebo inbrední deprese není možné samosprašení, proto se k odvozování mapovacích populací používají heterozygotní rodiče nebo dihaploidní linie (u brambor, trav)

Mapovací populace:

- a) Populace F1 – křížením mezi 2 kultivary – potomstvo množeno klonováním
- b) linie zpětných kříženců (BC)

Investice do rozvoje vzdělávání

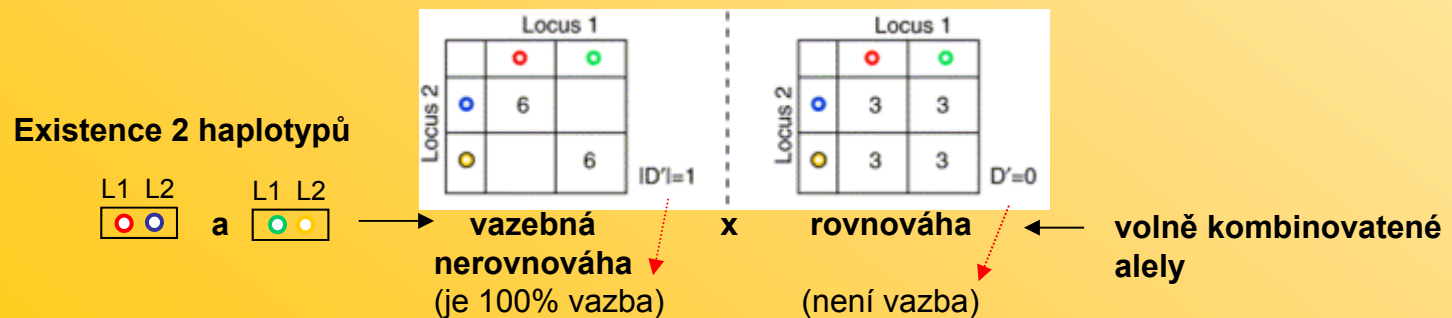


Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Asociační mapování

Procento rekombinací je také možné určovat nepřímo z populačně-genetických dat - určuje se statisticky významná odchylka v hladině **vazebné nerovnováhy** (linkage disequilibrium, LD) podél lokusu v populaci – **asociační mapování**. Hlavně pro mapování kvantitativních znaků (QTL). Využívá variability mezi jedinci v přírozených populacích, případně mezi jednotlivými liniemi u zemědělských plodin – musí se lišit fenotypovým projevem studovaného znaku (hlavně extrémní varianty). Vychází z existence **haplotypů** – úseků DNA (2-100 kb) charakterizovaných určitou sestavou markerů (jejich variantami, nejčastěji SNPs a inzerce/delece). Tyto úseky se přenášejí jako nerekombinující blok. To se projevuje vazebnou nerovnováhou mezi alelickými variantami těsně vázaných genů. Metoda vyžaduje důkladné statistické zpracování.

Investice do rozvoje vzdělávání



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

GENETICKÉ MAPOVÁNÍ U ČLOVĚKA

(- studijní materiál např. na www.entu.cas.cz/fyziol/students/lecture11.html)

K mapování se používají data získaná od velkého počtu rodin – výhodné homogenní izolované populace.

Problémy:

- nesnadná identifikace informativních markerů, penetrance (ne u všech jedinců se genotyp projeví odpovídajícím typickým fenotypem, případně se projeví až ve vyšším věku), expresivita (různá intenzita projevu)
- malé velikosti rodin – nutno sbírat data od velkého počtu rodin
 - nutnost vyvinout statistické metody a efektivní mapovací metody pro paralelní analýzu více markerů

Dvě základní metody:

- Rekombinační mapování – pro mendelistické znaky. Vazba mezi znakem a různými alelami markerového lokusu.
- Asociační mapování – pro komplexní (polygenní) znaky (QTL). Asociace mezi znakem a jednou konkrétní alelou markeru.

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

A) Rekombinační mapování (vazebné mapování, analýza vazby)

- zkoumá se pravděpodobnost, že alely dvou lokusů jsou společně přeneseny na potomstvo. Lokusy jsou ve vazbě, jestliže pravděpodobnost společného přenosu na potomstvo je vyšší než taková, jaká je očekávána u nezávislé segregace – statistická metoda.

Zkoumají se soubory rodinných dat a počítá se podíl potomků, kteří vykazují/nevykazují rekombinace mezi 2 lokusy:

- úplná vazba – frekvence rekombinací $\theta = 0$
- žádná vazba – rekombinantní a nerekombinantní potomci se vyskytují se stejnou frekvencí, $\theta = 0,5$

Měření vazby: zjišťujeme, zda se podíl rekombinantů výrazně liší od 0,5. K tomu se používá statistická metoda založená na výpočtu LOD skóre.

Programy **MAPMAKER**, **JoinMap**

Výpočet LOD skóre

LOD (*likelihood of odds*) - \log_{10} poměru pravděpodobností ($L_x/L_{0,5}$) neboli relativní pravděpodobnost

$$L = \theta^R (1 - \theta)^{NR}$$

θ = frekvence rekombinací (frakce rekombinantů) – odpovídá vazebné vzdálenosti

R = počet rekombinantů

NR = počet nerekombinantů

$$\text{LOD skóre} = \log_{10} \frac{\text{pravděpodobnost } L_x \text{ pozorovaných dat, jestliže lokusy jsou ve vazbě při dané } \theta < 0,5}{\text{pravděpodobnost } L_{0,5} \text{ pozorovaných dat, jestliže lokusy nejsou ve vazbě } (\theta = 0,5)}$$

Jde o **odhad hodnoty parametru θ** - metoda *maximum likelihood* (ML). Za θ se dosazují různé hodnoty a hledá se, jaká hodnota θ je nejpravděpodobnější pro daný soubor dat (vykazuje nejvyšší LOD skóre). Takto zjištěná hodnota θ = genetická vzdálenost. Lokusy jsou ve vazbě, jestliže LOD skóre je větší než 3. LOD skóre klesá se zvyšující se θ a roste se zvyšujícím se počtem jedinců v populaci. \log_{10} – umožňuje kombinovat data od více rodin.

Investice do rozvoje vzdě

B) Asociační mapování (genetická asociace)

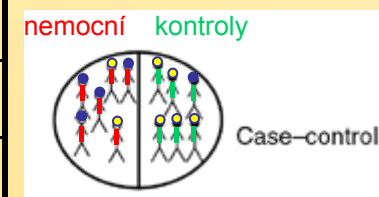
Vyberou se kandidátní lokusy pro daný fenotyp (obvykle chorobu) a testuje se, které alely jsou statisticky spojeny s tímto fenotypem. Frekvence určité alely je porovnávána mezi nemocnými a kontrolními jedinci v populaci.

Síla asociační studie je měřena podle **odds ratio** (poměru pravděpodobností)=OR

OR se počítá z frekvence výskytu specifické alely u nemocných a kontrol

$$OR = a/c : b/d = ad/bc$$

	s alelou ^o	bez alely ^o
nemocní ^o	a	b
kontroly ^o	c	d



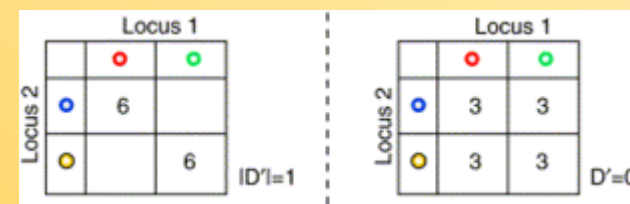
Investice do rozvoje vzdělávání

Vychází z existence **vazebné nerovnováhy** – společný výskyt dvou alel ve vazbě je častější než náhodný. Asociace mezi chorobou a alelou je tedy důsledkem těsné vazby.

Mohou však existovat i jiné příčiny asociace → falešně pozitivní výsledky.

😊 umožňuje mapování s vyšším rozlišením než rekombinační mapování (lepší přiblížení ke genu)

😞 problematická reprodukovatelnost. Často vyžaduje soubory až tisíců pacientů.



nerovnováha x rovnováha



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.