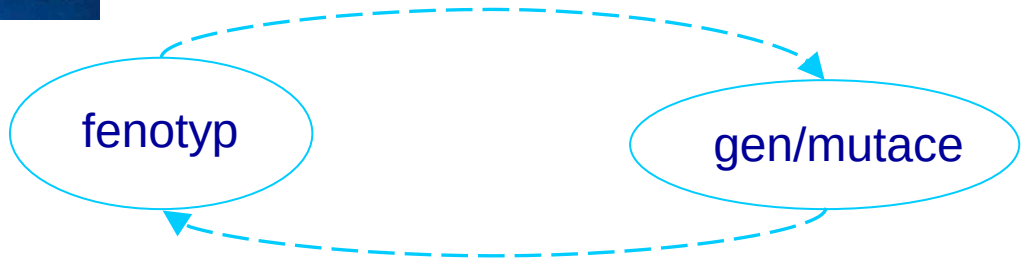
# Funkční genetika

# Funkční genetika

Cílem je propojit konkrétní mutace/geny s fenotypem

„Forward“ genetika




„Reverse“ genetika

# Fenotypy

## Vzniklé pomocí přirozených mutací v přírodě

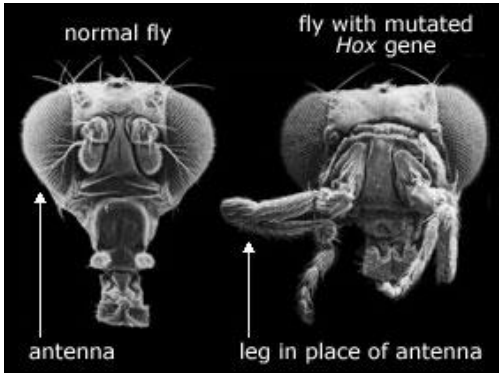
- Lidské choroby, adaptace

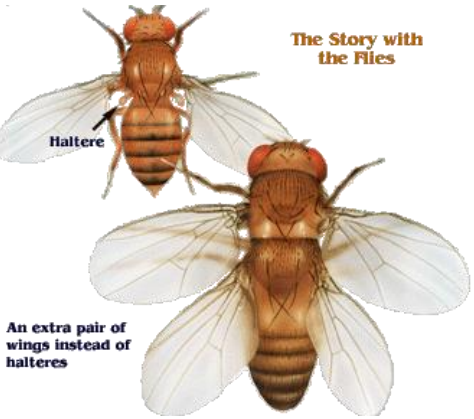
# Fenotypy

## Vzniklé pomocí mutageneze

- náhodná mutageneze
  - fyzikální mutageny: UV, rentgenové záření, γ-záření
  - chemické mutageny: ethylnitrosourea (ENU)
  - inzerční mutageneze: transpozony, retroviry, vektory

**Mutace v Hox genech**



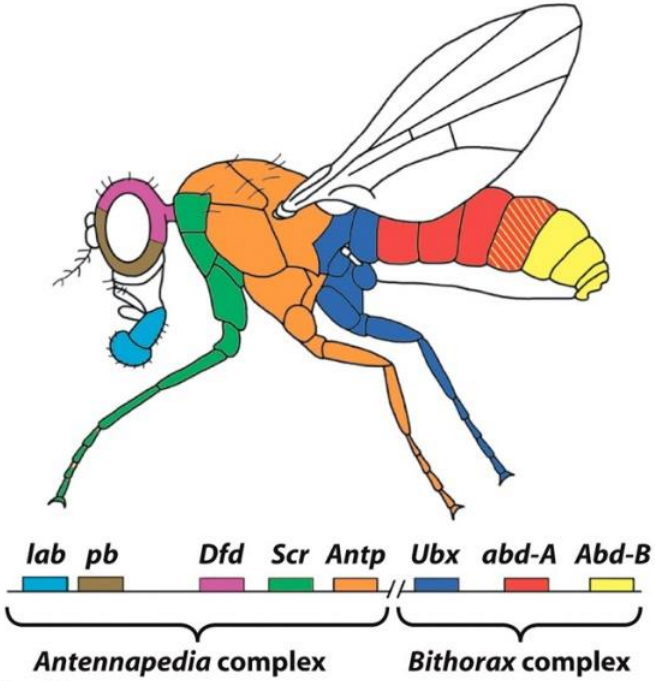
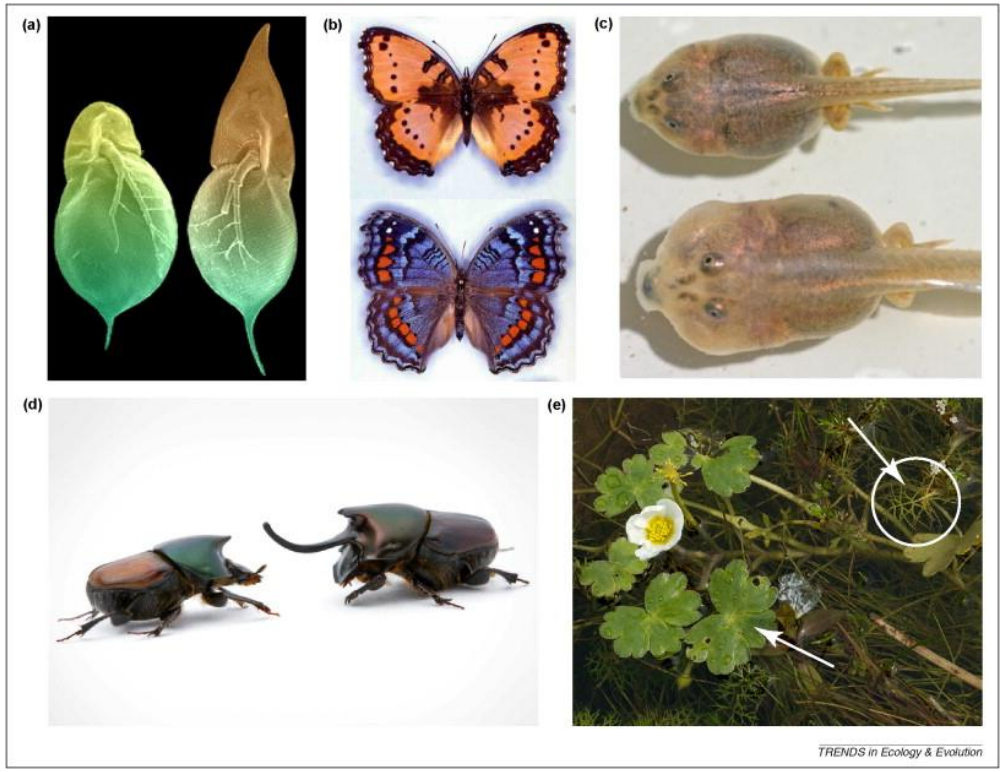




Figure 12-4
*Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition*
© 2008 W. H. Freeman and Company

# Fenotyp musí být geneticky podmíněn

## fenotypová plasticita



# Forward genetika

Jak v genomu nalézt konkrétní mutace/geny odpovědné za určitý fenotyp?

# Metoda „kandidátních genů“

- Vytvoření seznamu kandidátních genů, které by mohly mít nějakou souvislost s pozorovaným fenotypem.
- Hledání polymorfismů a jejich korelace s fenotypem.
- Takto objeveny geny podmiňující některé lidské nemoci (např. geny pro srpkovitou anémii) i některé geny pro adaptivní znaky (např. geny podmiňující různou barvu srsti u hlodavců).

Pytlouš skalní, obvykle světlý, na lávových polích černé populace. Černé zbarvení vzniká mutací v genu melanocortin-1-receptor gene (*Mc1r),* ale jen v některých populacích. V jiných populacích způsobuje černé zbarvení mutace v jiném genu zatím neznámém (Nachman et al. PNAS 2003).

Pytlouš skalní (*Chaetodipus intermedius)*

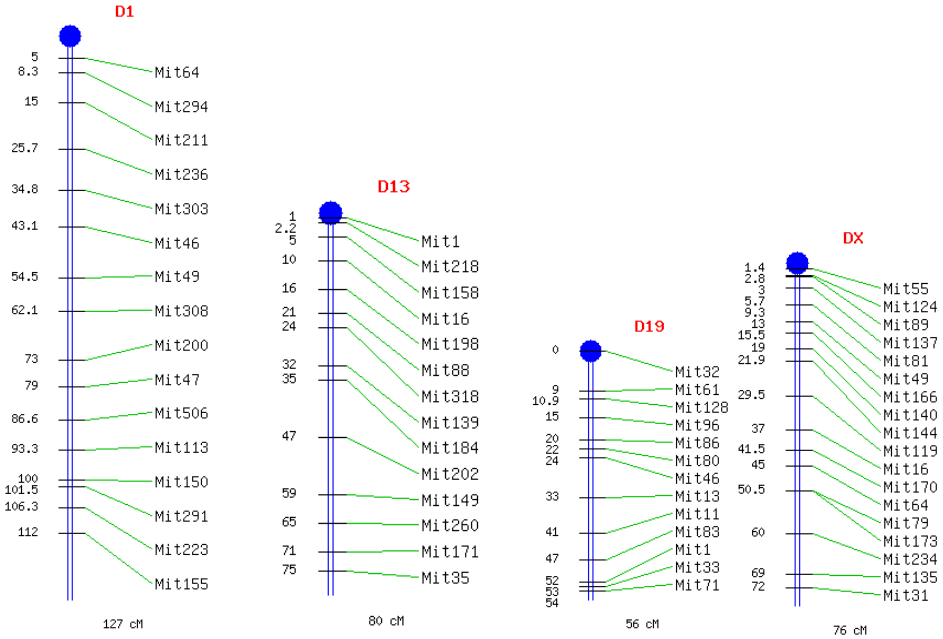
# Genetické mapování

- Cílem nalézt vazbu fenotypu k molekulárním markerům, jejichž pozici v genomu známe (genetická mapa).

1. experimentální křížení
2. rodokmenová analýza
3. asociační mapování v přírodních populacích
4. admixture mapování (v přírodních hybridních populacích)

# Genetické mapování pomocí experimentálního křížení (QTL mapování)

- Zkřížením dvou kmenů, které se liší v námi studovaném znaku, vytvoříme segregující populaci (např. $BC_1$ či $F_2$).
- V segregující populaci hledáme asociaci mezi fenotypem a molekulárními markery (polymorfními mezi danými kmeny – SNP, mikrosatelity).

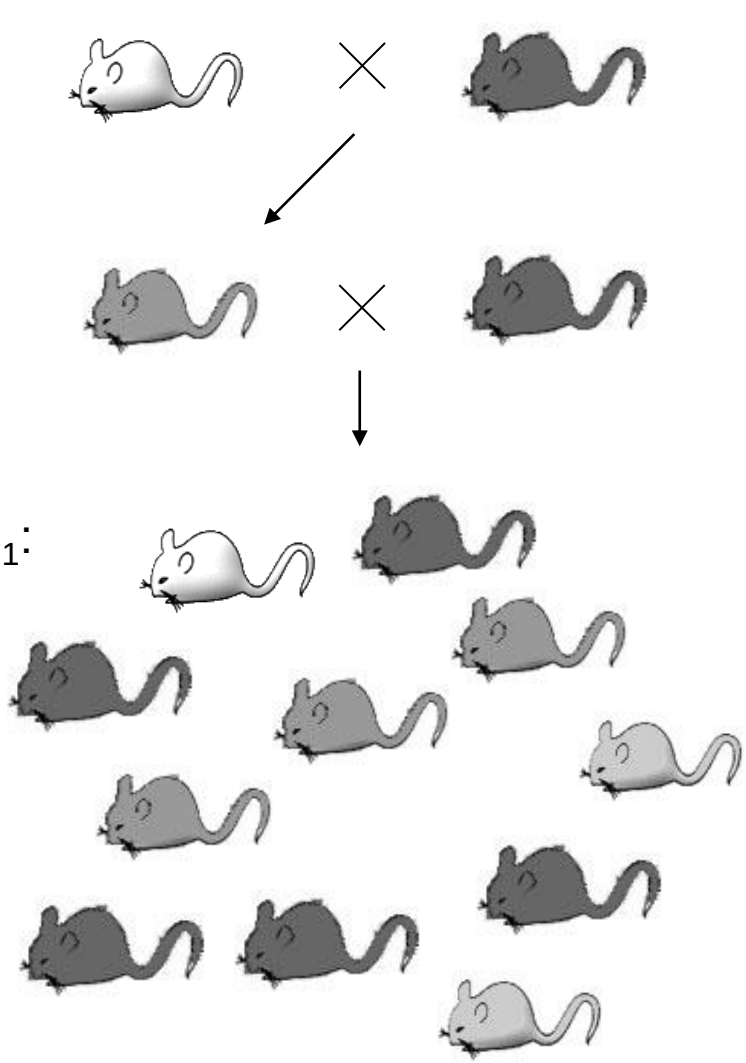


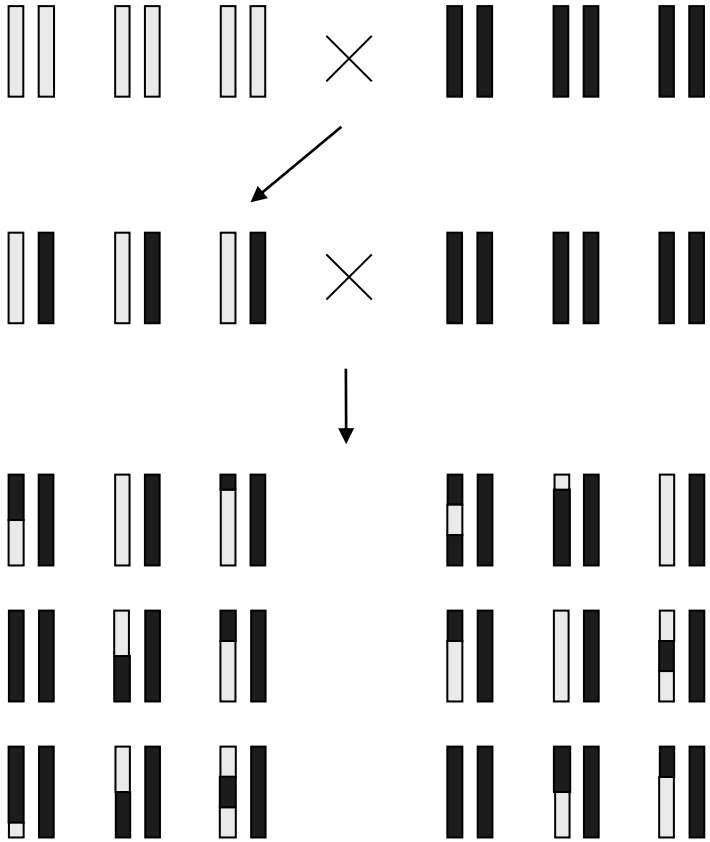
# Zpětné křížení (backcross)

P:

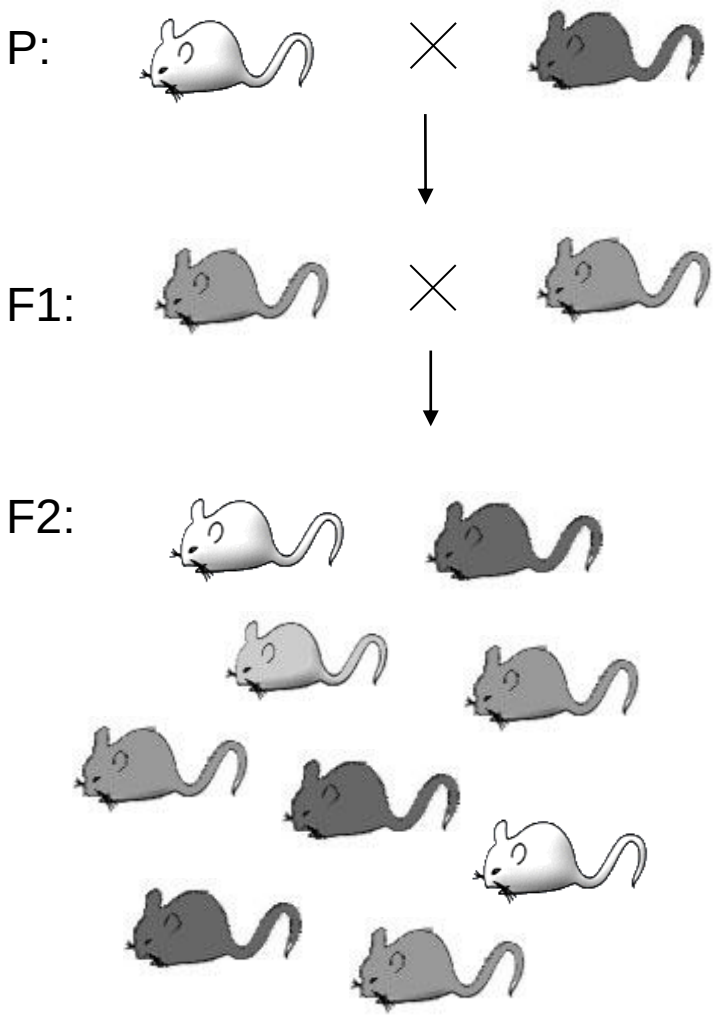
$F_1$:

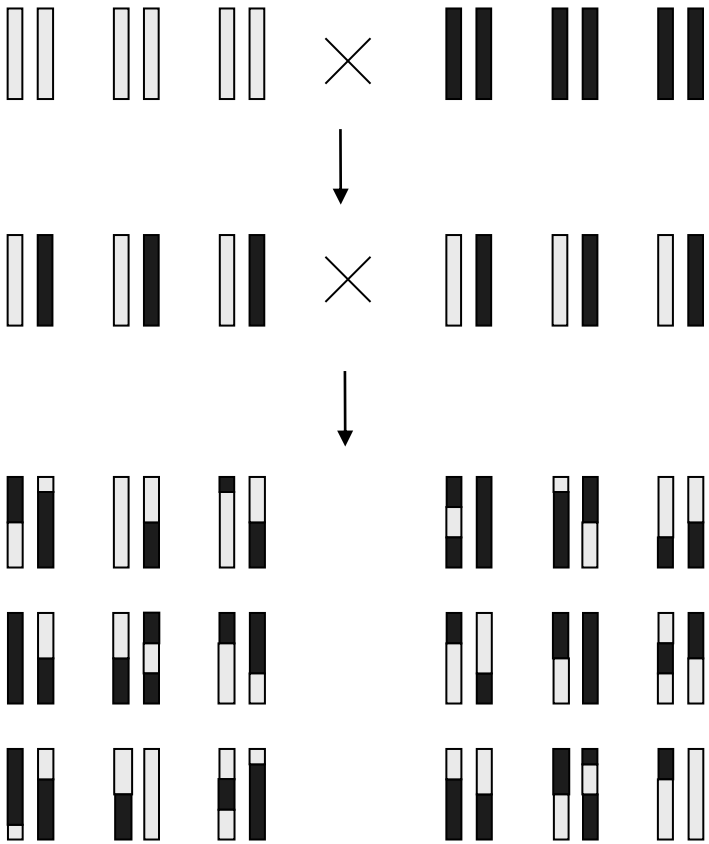
$BC_1$:





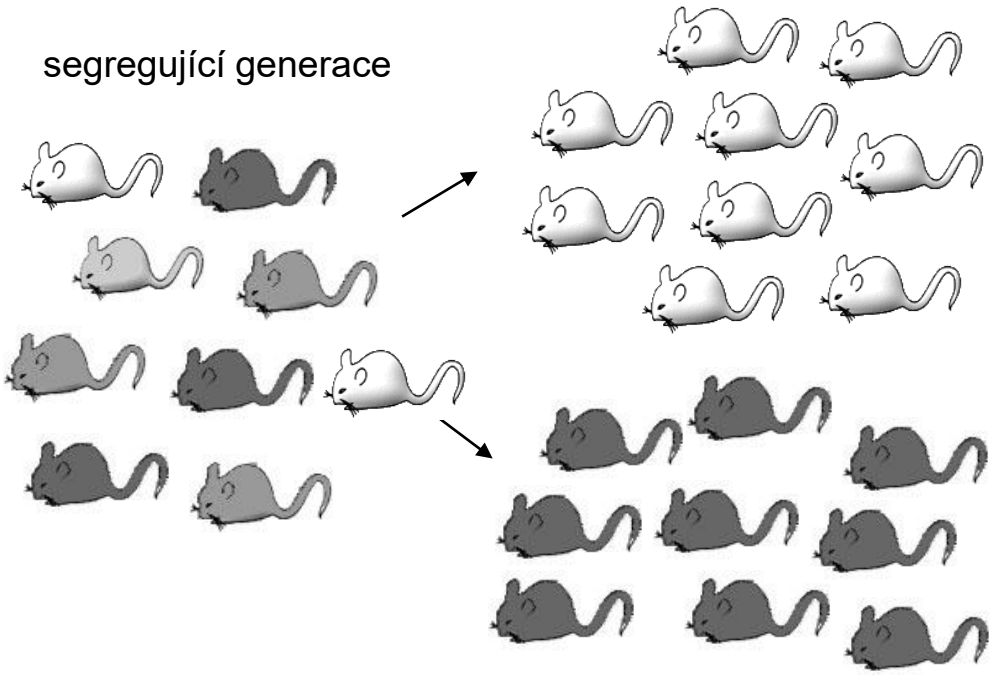
# $F_2$ křížení ($F_2$ intercross)

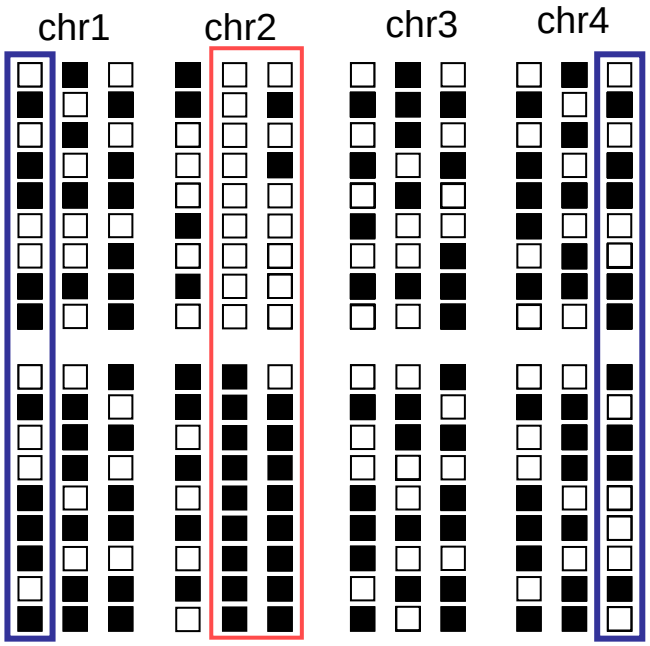


# Genetické mapování pomocí $BC_1$ či $F_2$ křížení

segregující generace



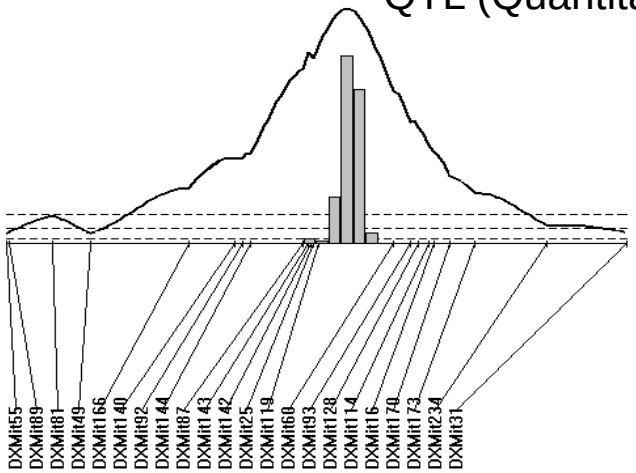



LOD skóre

$$LOD = LOD_a + LOD_i$$

$LOD_a$ additivní efekt
$LOD_i$ genové interakce

QTL (Quantitative Trait Locus)

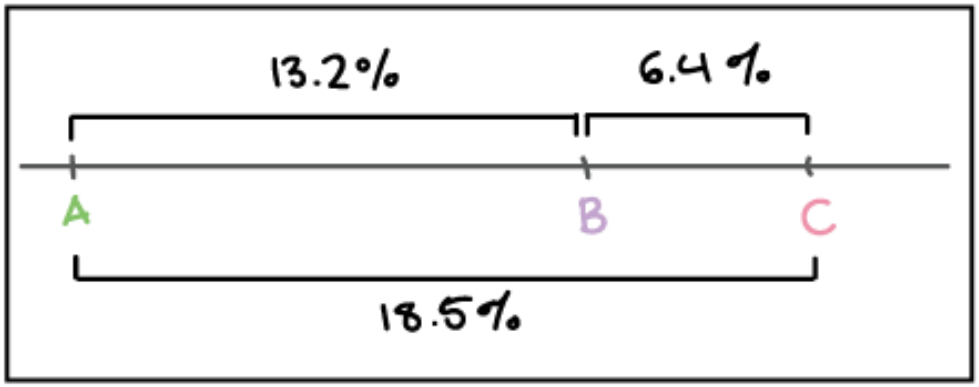


# Jak vytvořit genetickou mapu?

**Recombination frequency (1% = 1cM)**

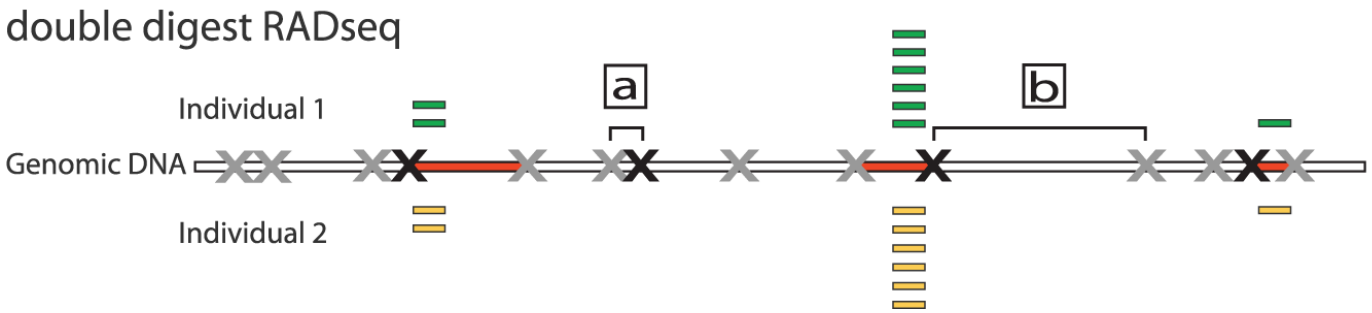
RF (A - B) = 13.2 %
RF (B - C) = 6.4 %
RF (A - C) = 18.5 %

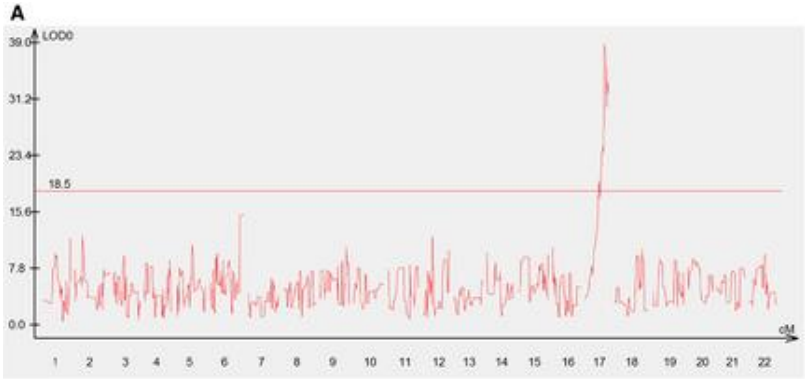
largest RF = outermost genes of trio

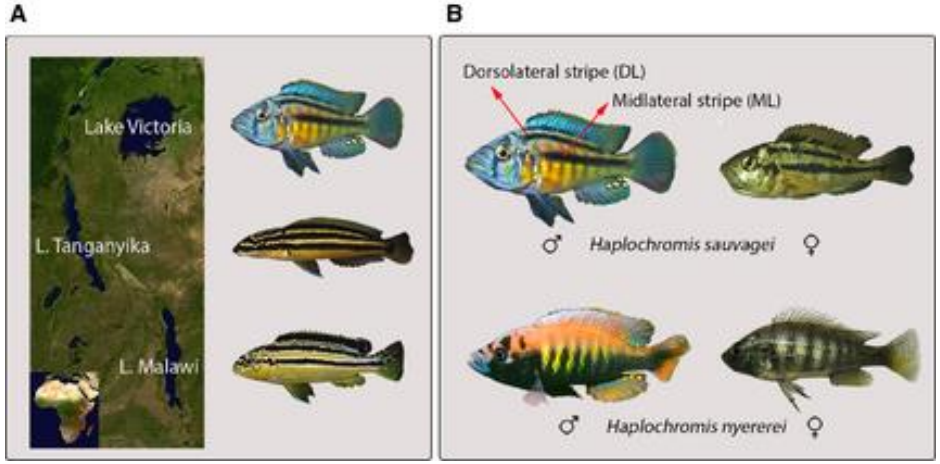


# Genetickou mapu můžeme vytvořit přímo při genetickém mapování

- Díky next-generation sekvenačním metodám snadno vytvoříme i pro nemodelové organismy např. pomocí RAD sekvenování segregující generace.



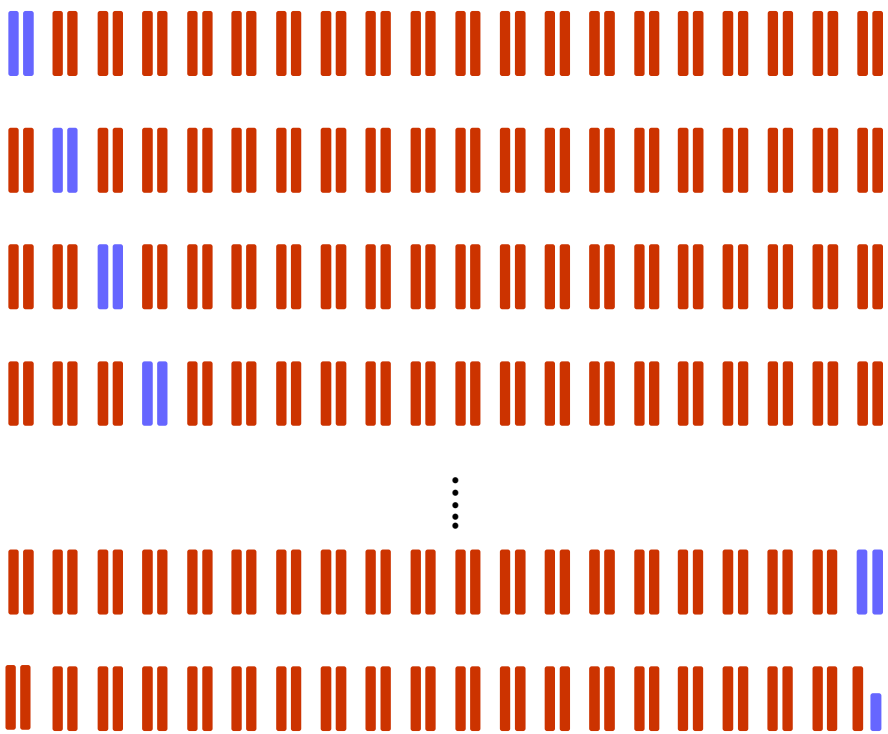




Henning et al. 2014

## QTL mapování

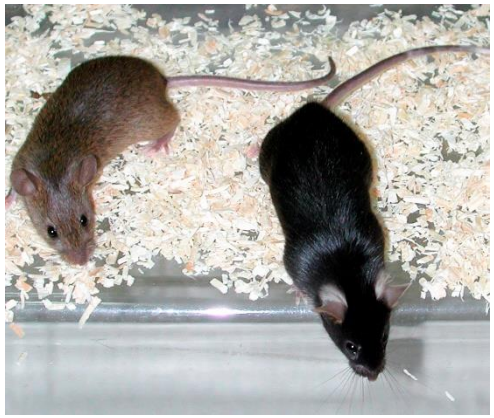
- Náročné na přípravu segregující populace a genotypování (v dnešní době již díky metodám NGS mnohem snadnější).
- Nízká rozlišovací schopnost (cca 10 cM).
- Zjistíme spíše počet lokusů odpovědných za daný znak, interakce mezi nimi, a jejich hrubou lokalizaci v genomu.

# Konsomické kmeny
# (chromosomálně substituční kmeny)



- 10 generací zpětného křížení za současné selekce přenášeného chromosomu

PWD/Ph
(*M.m.musculus*)



*C57BL/6J*
*(M.m.domesticus)*

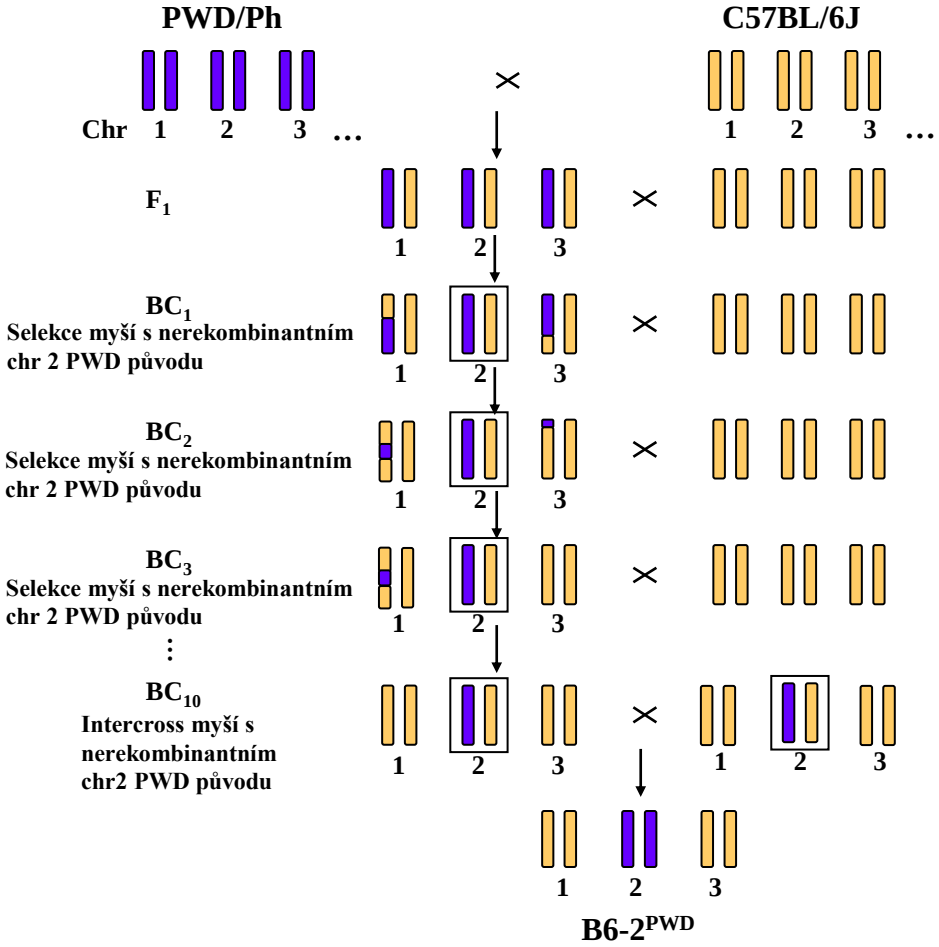
Resource

## Mouse consomic strains: Exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies

Sona Gregorová,[1] Petr Divina,[1] Radka Storchova,[1,3] Zdenek Trachtulec,[1] Vladana Fotopulosova,[1] Karen L. Svenson,[2] Leah Rae Donahue,[2] Beverly Paigen,[2] and Jiri Forejt[1,4]

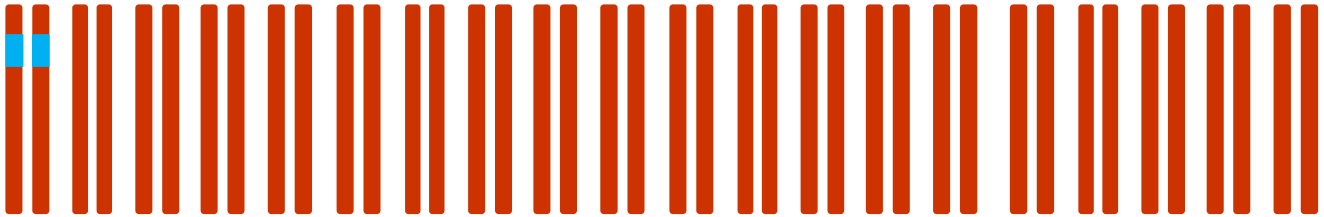
[1]*Institute of Molecular Genetics, Department of Mouse Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague 142 20, Czech Republic;* [2]*The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine 04609, USA*

# Jak vytvořit chromozomálně substituční kmen



## Genetické mapování pomocí konsomických kmenů

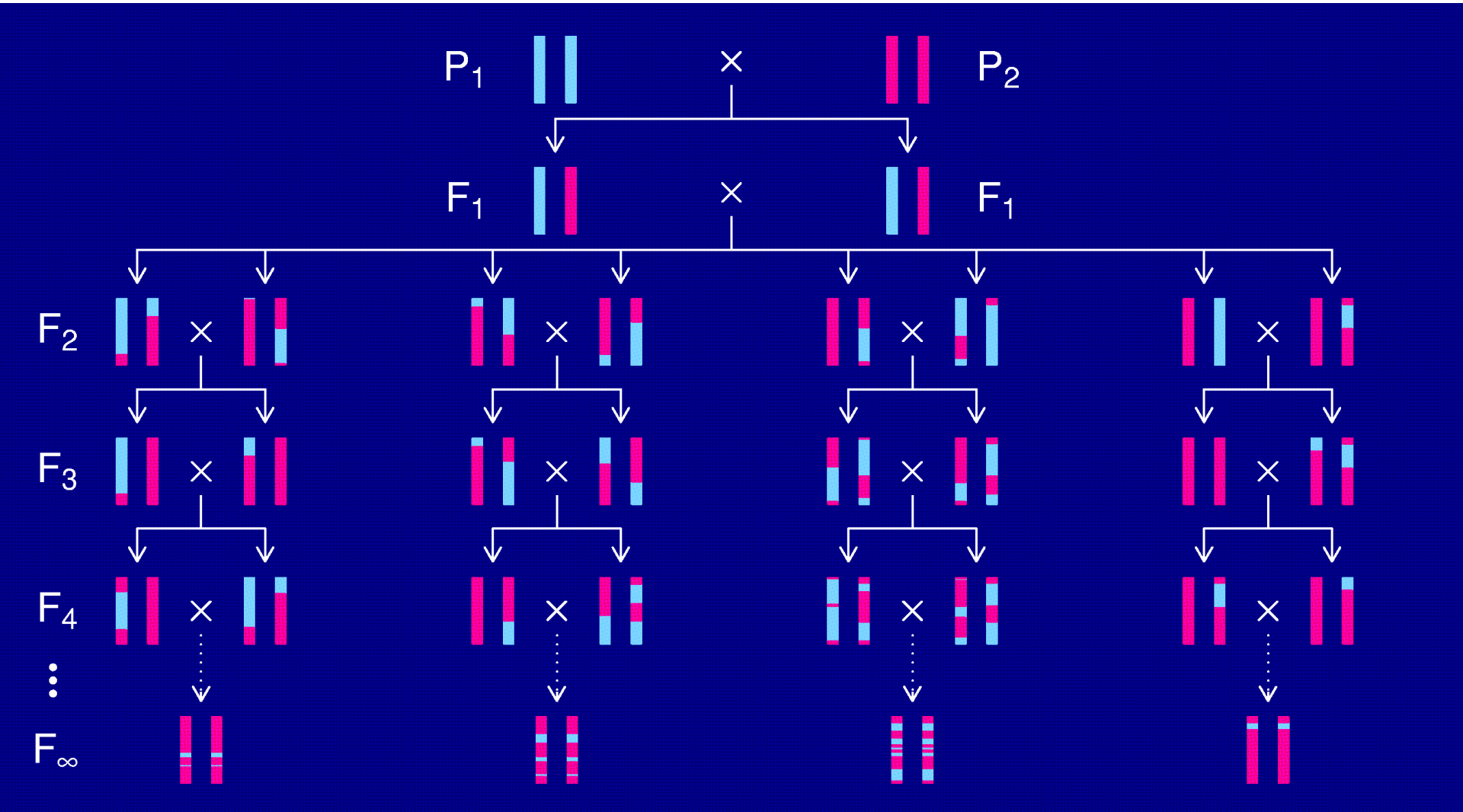
- Příprava kmenů zdlouhavá, pracná, nutno genotypovat
- Jakmile jsou kmeny hotové, rychlé mapování na chromosom bez nutnosti genotypování.
- Pro jemnější mapování potřeba další křížení.
- Z konsomického kmene lze snadno vytvořit **kongenní kmen**.



- Podobné metody se využívají ve šlechtitelství
  – přesun určitého znaku z jednoho druhu rostliny na jiný druh.

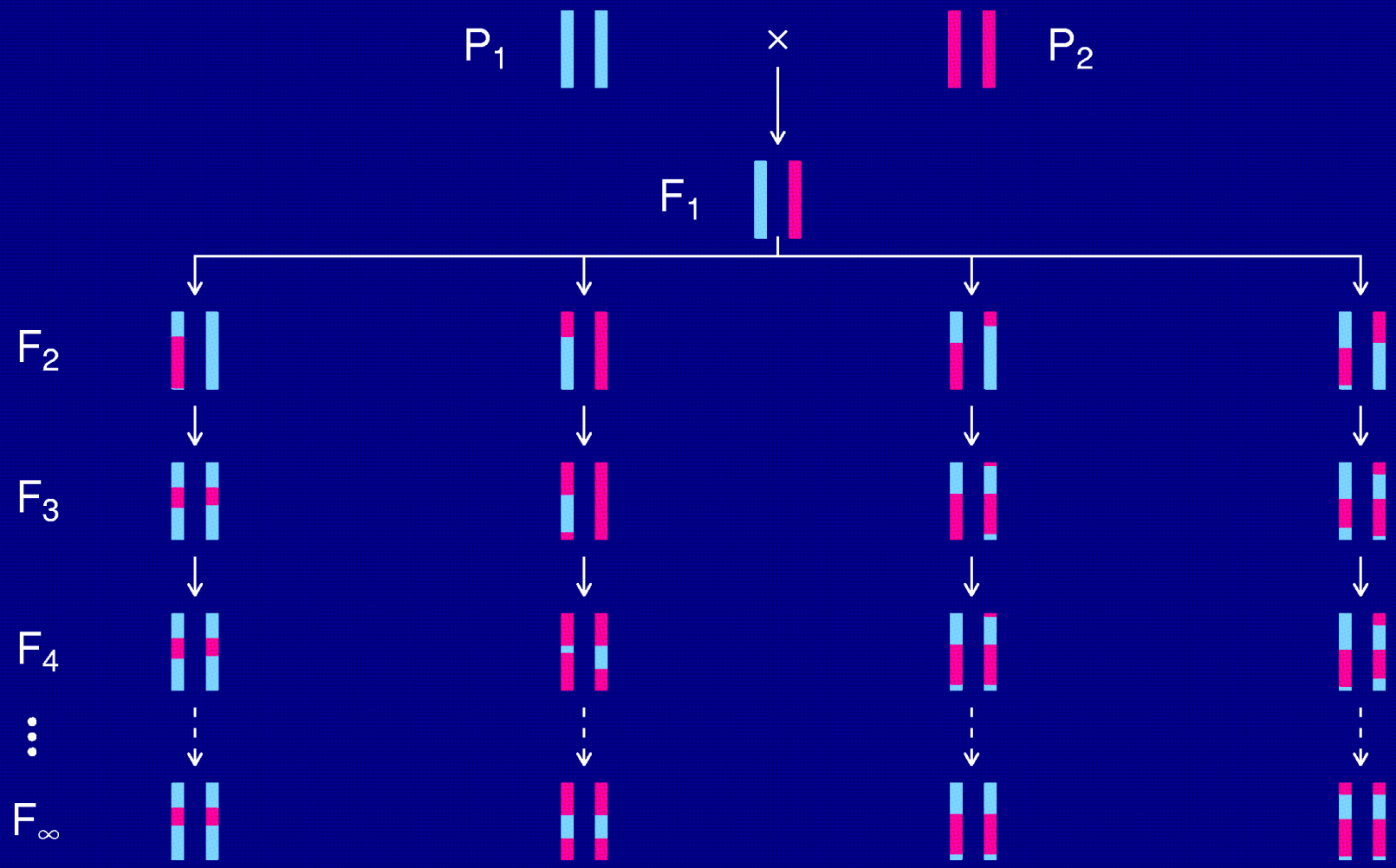
# Rekombinantně inbrední linie

- Vytvoření $F_1$ hybridů a následně opakované křížení bratr-sestra (alespoň 20 generací)



# Rekombinantně inbrední linie

- samoopylení (alespoň 10 generací)

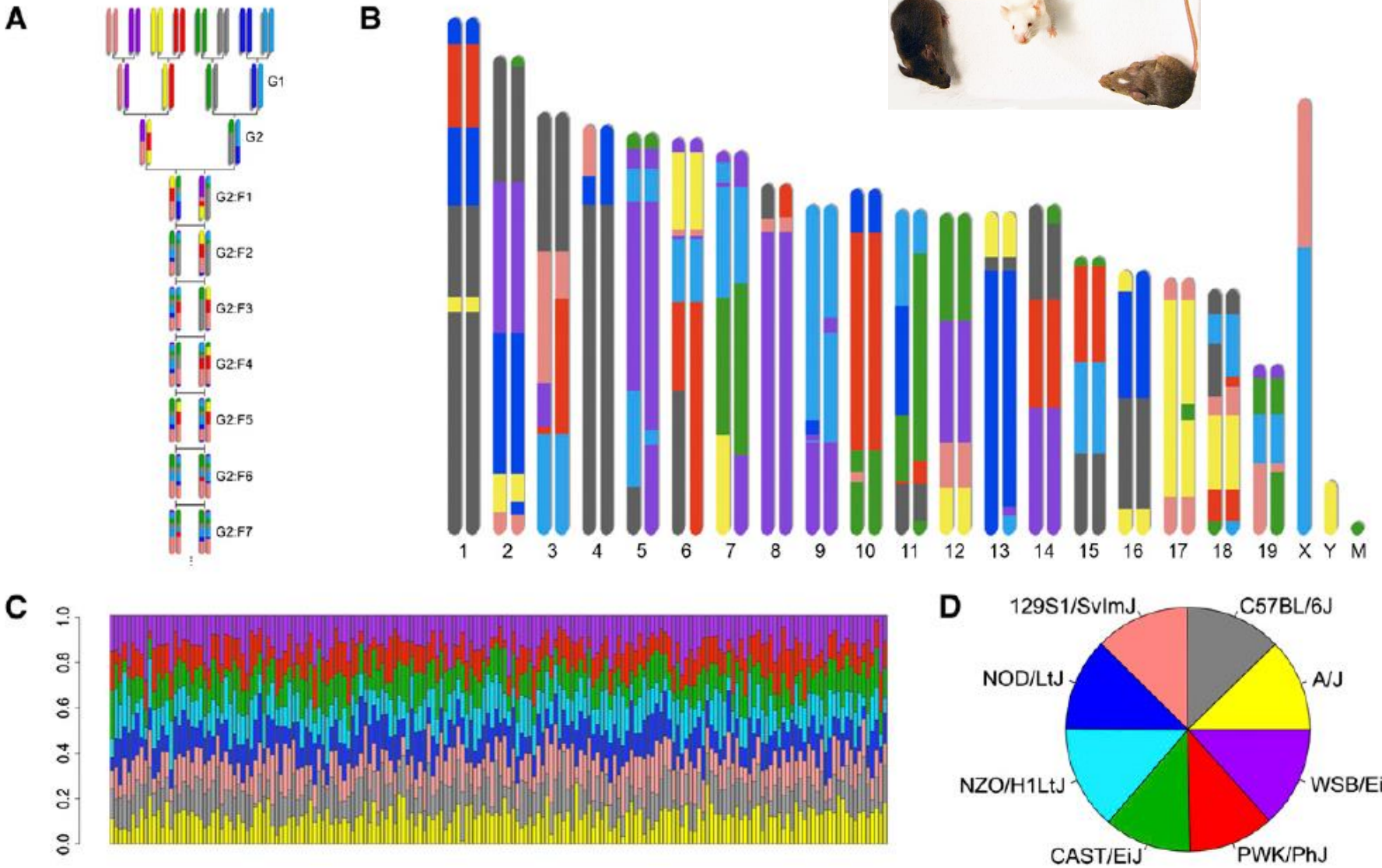


## Genetické mapování pomocí rekombinantě inbredních linií

- Příprava sice zdlouhavá (20 generací křížení), ale nemusí se během ní genotypovat. Genotypuje se až konečná generace.
- Jakmile hotové, rychlé mapování bez genotypování.
- Vysoká rozlišovací schopnost 1cM a méně (záleží na počtu vytvořených RIL).

# Collaborative cross u myší

Zvýšení spektra fenotypů, které lze mapovat



# Mapování genů podmiňujících bílou korunku u WSB/EiJ pomocí collaborative cross

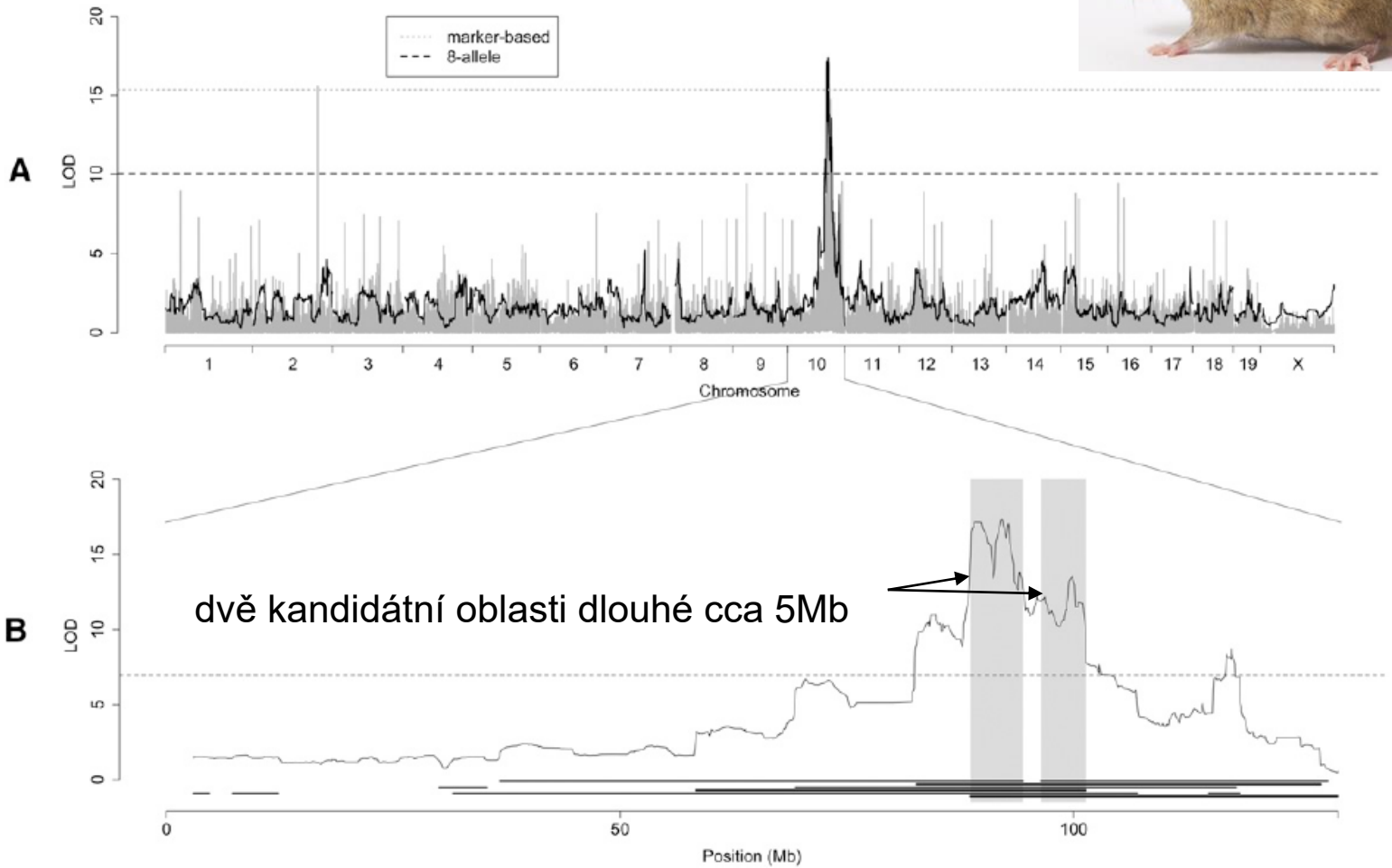
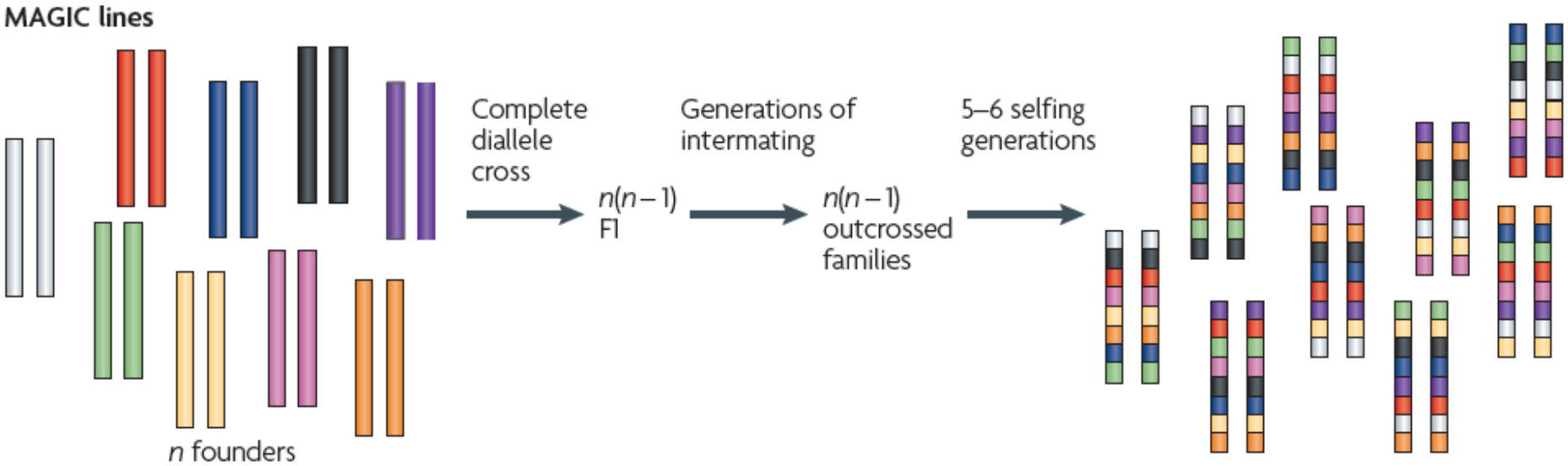



**Figure 3.** White head-spot genome scan. (*A*) Marker-based (light gray) and eight-allele (black) models implicate an allele on Chr 10. (*B*) Superimposing WSB/EiJ homozygous regions from white head-spotted samples reveals two candidate regions from 88.6 to 94.3 Mb and from 96.4 to 101.3 Mb.

## MAGIC lines u *Arabidopsis thaliana*



# Databáze QTL

**AnimalQTLdb**

Release 15
(Sep 22, 2011)

This Animal Quantitative Trait Locus (QTL) database (**AnimalQTLdb**) is designed to house all publicly available QTL data on livestock animal species for easily locating and making comparisons within and between species. The database tools are also added to link the QTL data to other types of genome information, such as RH maps, physical maps, and human genome maps. Besides the QTL data from species listed below, we also plan to apply the tool to other animal species where feasible. JAS, among other journals requires that new QTL data be entered into a QTL database as part of the publication requirements.

**Pig QTL**
There are **6,347** QTLs from **281** publications curated into the database. Those QTLs represent **593** different traits (see **data summary** for details).

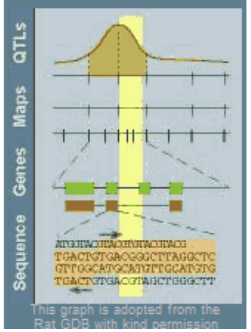
**Cattle QTL**
There are **4,802** QTLs from **285** publications curated into the database. Those QTLs represent **382** different traits (see **data summary** for details).

**Chicken QTL**
There are **2,451** QTLs from **125** publications curated into the database. Those QTLs represent **248** different traits (see **data summary** for details).

**Sheep QTL**
There are **639** QTLs from **74** publications curated into the database. Those QTLs represent **184** different traits (see **data summary** for most recent updates).

**Database summary:**

| | |
|---|---|
| Publications: | 765 |
| Species: | 4 |
| Traits: | 1,407 |
| QTL: | 14,239 |




This graph is adopted from the Rat GDB with kind permission.

---

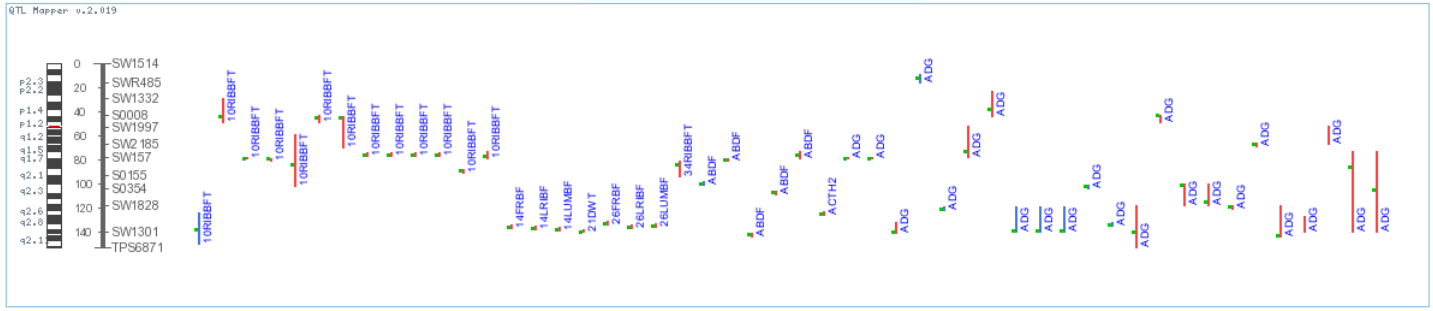
**PigQTLdb** Browse | Search | View Maps | F A Q

Search for QTL: Chromosome: 1 Order by: Traits Map size: Small Marker density: Filled GO

## A Snapshot of QTL on Pig Chromosome 1

( There are too many QTL to display; Use the browse hint below the graph to see more )

Align QTL from: (cM) to: (cM)
to Human map via RH maps



# Fyzikální mapování a ověřování kandidátních genů

- Vymezení kritické oblasti na fyzikální mapě (fyzikální mapování)
- Vytvoření seznamu kandidátních genů v kritické oblasti
- Hledání polymorfismů korelujících se sledovaným genotypem

  - nesynonymní mutace v kódujících oblastech

  - změny genové exprese
- Testování vlivu jednotlivých genů či SNP na fenotyp pomocí transgeneze či genových knockoutů.

Genetická mapa (cM) → Fyzikální mapa (bp)

např. u myši 1cM ~ 2 Mb

# Genetické mapování a identifikace genů F1 hybridní sterility

PWD/Ph
(*M.m.musculus*)

*C57BL/6J*
*(M.m.domesticus)*

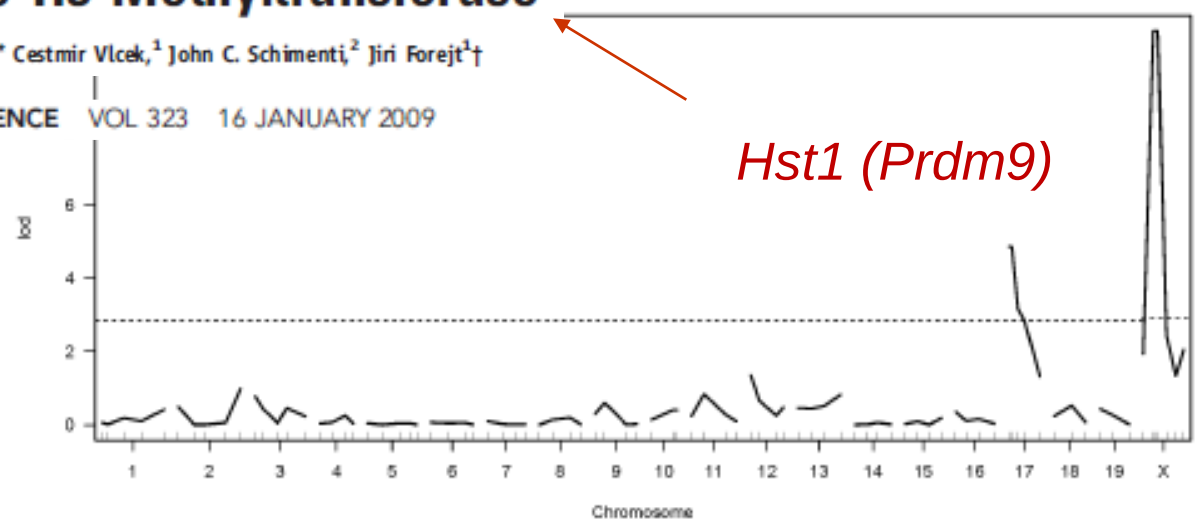
**A Mouse Speciation Gene Encodes a Meiotic Histone H3 Methyltransferase**

Ondrej Mihola,[1*] Zdenek Trachtulec,[1*] Cestmir Vlcek,[1] John C. Schimenti,[2] Jiri Forejt[1]†

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 323 16 JANUARY 2009

*Hstx2*

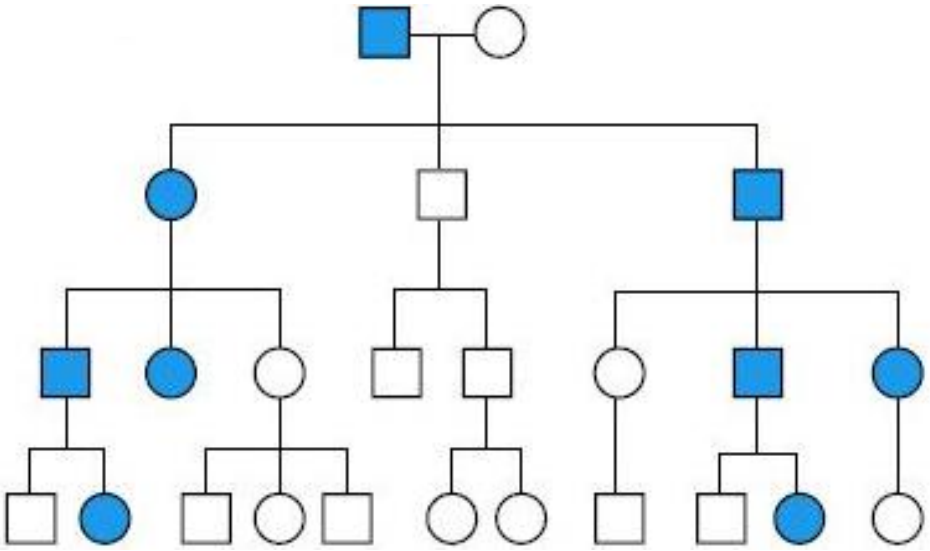
*Hst1 (Prdm9)*




*Dzur-Gejdošová et al. (2012) Evolution*

# Analýza rodokmenů

- Je třeba dostatek rodokmenů, ve kterých segreguje studovaný znak (např. choroba).
- Rozlišovací schopnost daná počtem meióz zachycených v rodokmenech. Obvykle nízká (~1-10cM).
- Vhodné pro mapování znaků s jednoduchou Mendelovskou dědičností, ne však kvantitativních znaků.
- Hodí se pro oragnismy, které nelze křížit v laboratoři.



Identifikace genu odpovědného za cystickou fibrózu pomocí analýzy rodokmenů.

# Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis

BAT-SHEVA KEREM, JOHANNA M. ROMMENS, JANET A. BUCHANAN, DANUTA MARKIEWICZ, TARA K. COX, ARAVINDA CHAKRAVARTI, MANUEL BUCHWALD, LAP-CHEE TSUI

Approximately 70 percent of the mutations in cystic fibrosis patients correspond to a specific deletion of three base pairs, which results in the loss of a phenylalanine residue at amino acid position 508 of the putative product of the cystic fibrosis gene. Extended haplotype data based on DNA markers closely linked to the putative disease gene locus suggest that the remainder of the cystic fibrosis mutant gene pool consists of multiple, different mutations. A small set of these latter mutant alleles (about 8 percent) may confer residual pancreatic exocrine function in a subgroup of patients who are pancreatic sufficient. The ability to detect mutations in the cystic fibrosis gene at the DNA level has important implications for genetic diagnosis.

Science (1985)

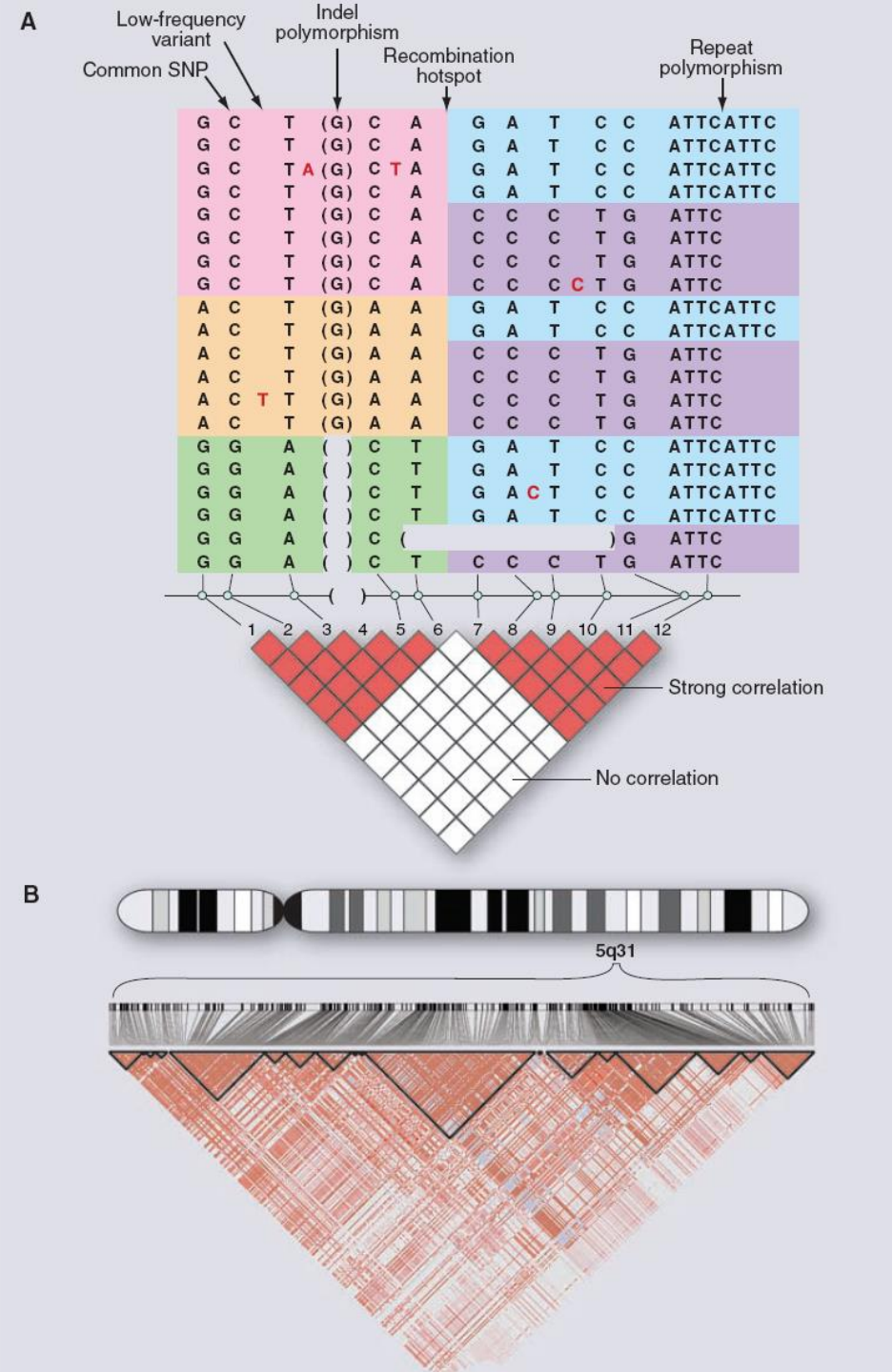
# Asociační mapování

- Mapování v přírodních populacích na základě vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium, LD).
- Ke zjištění vazby znaku ke genetickým markerům je potřeba velmi vysoký počet markerů (~ 1 mil).
- Přesný počet markerů závisí na míře LD v genomu (čím větší LD tím méně je potřeba markerů).

# Haplotypová mapa lidského genomu (HapMap projekt)

- určen genotyp 1 mil SNP rozmístěných každých 5 kb v genomu u více než 250 jedinců z několika populací.
- zjištěno, že genom je rozdělen do bloků (haplotypů) s vysokým LD. Hranice mezi jednotlivými bloky korelují mezi populacemi a odpovídají rekombinačním hotspotům.
- Pro asociační mapování je třeba genotypovat ~ 0.5 mil SNP u Evropské populace a 1 mil SNP u Africké populace
  (tj. kapacita jednoho SNP genotypovacího čipu )

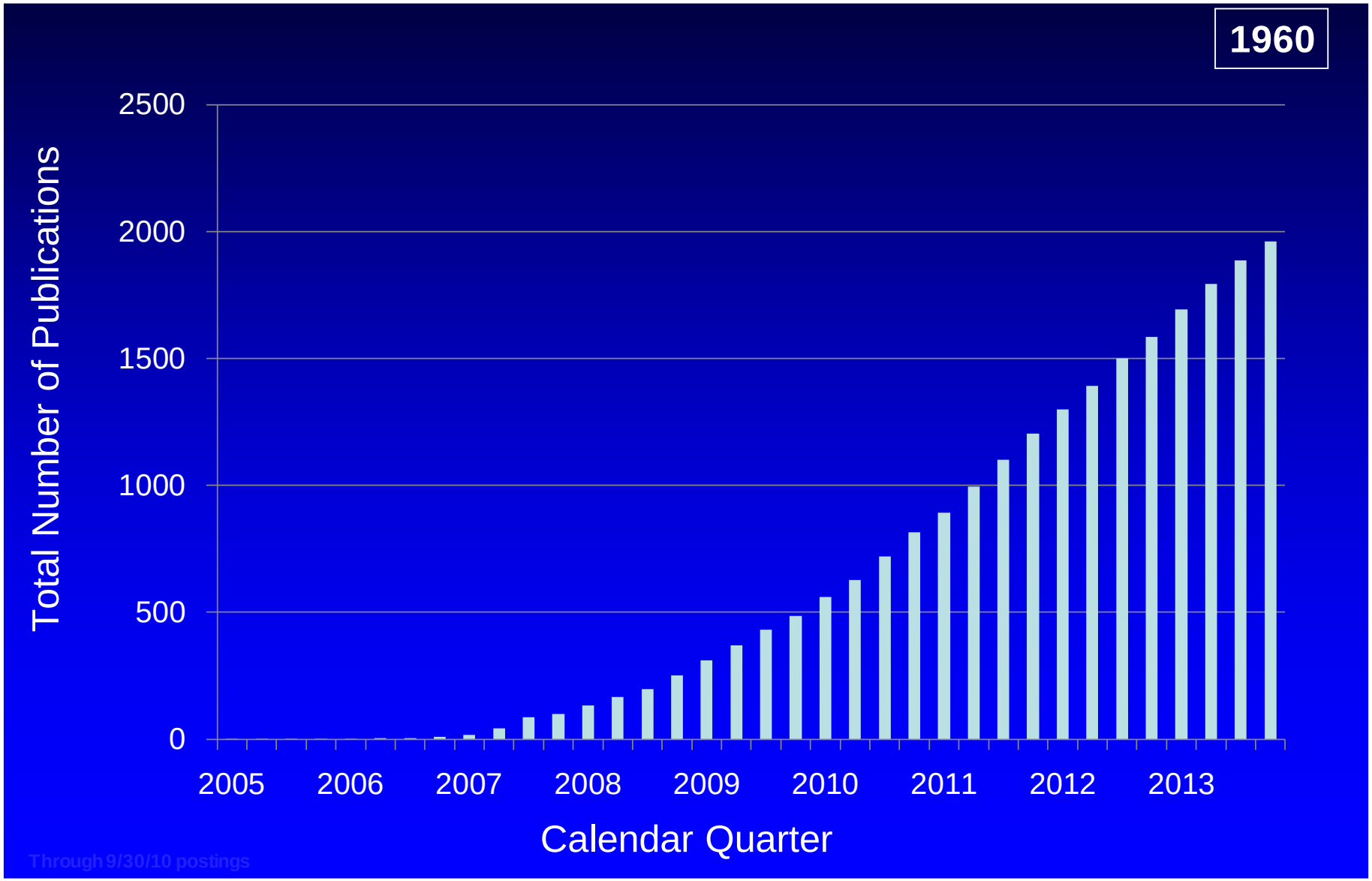
*Nature* 437, 1299-1320. 2005

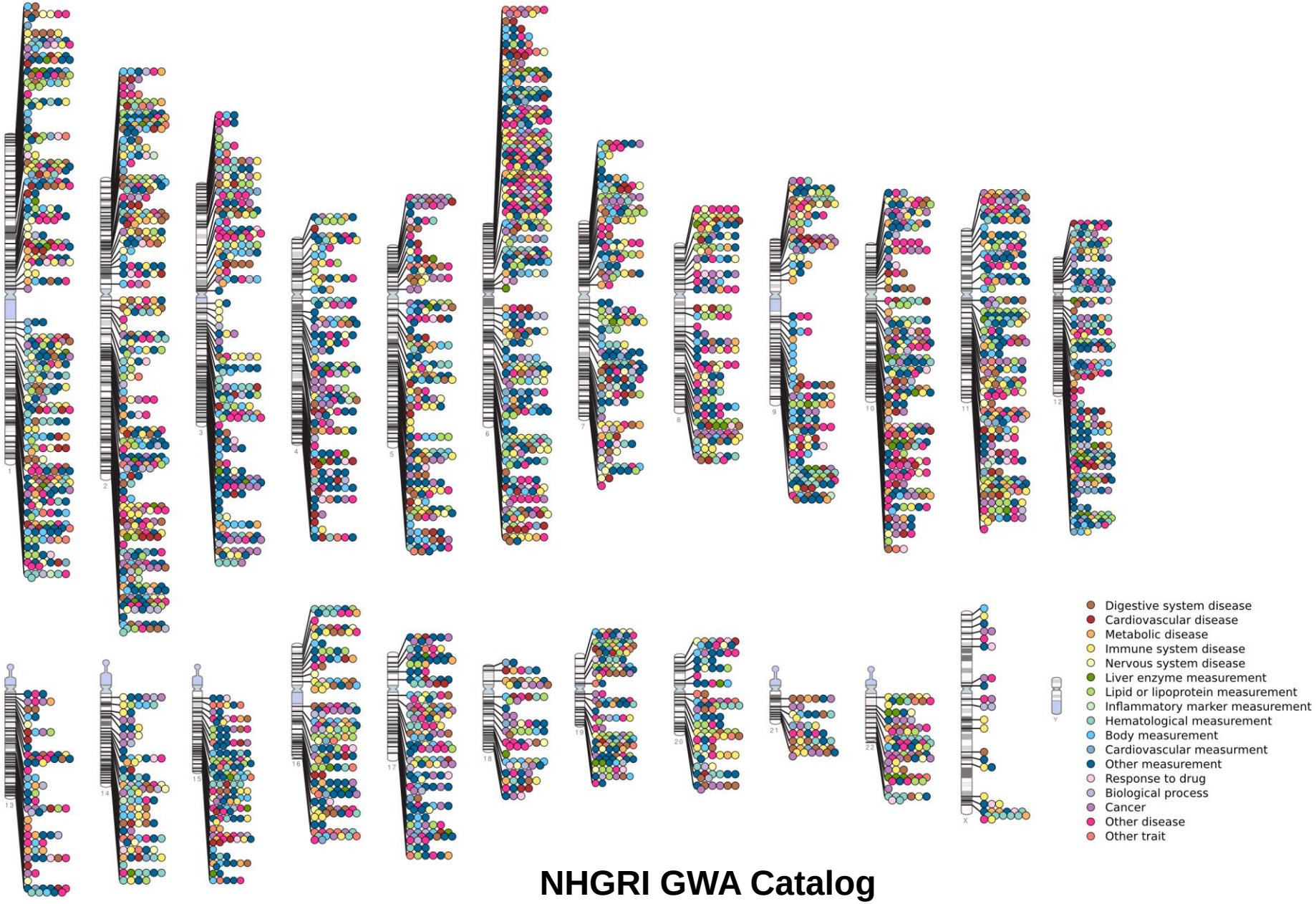


# Asociační mapování

- Má vysokou rozlišovací schopnost (~10kb).
- Vhodné i pro mapování kvantitativních znaků.
- Třeba analyzovat velký počet jedinců (~ 1000).
- Důležité mít správnou kontrolní skupinu
  (pozor na populační strukturu).
- Málo účinné pouze při mapování alel s velmi nízkou frekvencí v populaci a velmi komplexních fenotypů podmíněných velmi velkým množstvím genů s malými účinky.

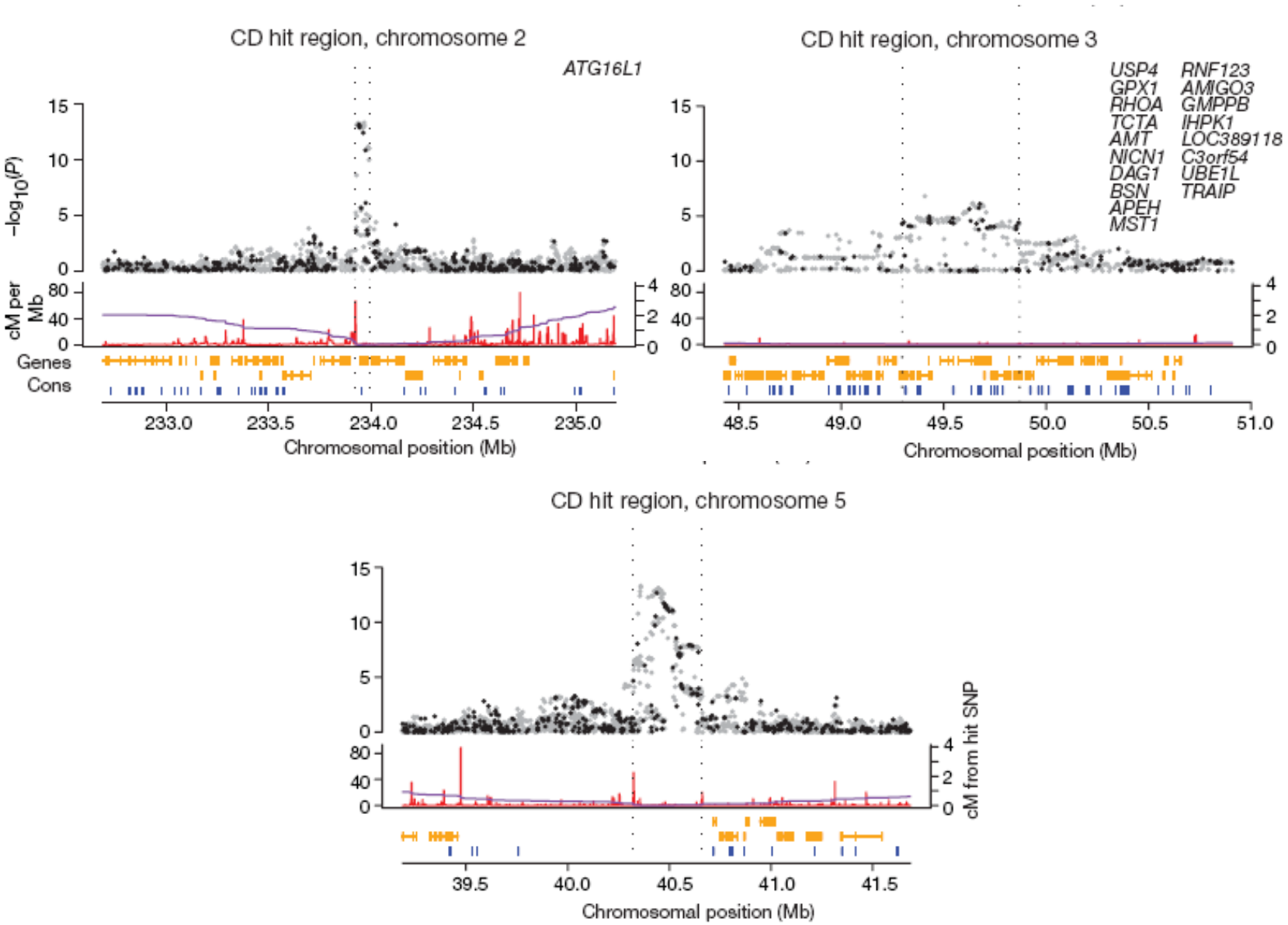
# Published genome-wide association studies (GWA)






**NHGRI GWA Catalog**
**www.genome.gov/GWAStudies**
**www.ebi.ac.uk/fgpt/gwas/**

# Asociační studie sedmi chorob v britské populaci




The Wellcome Trust Case Control Consortium, Nature 2007

# Personal Genome Project

Personal Genome Project: PersonalGenomes.org

PersonalGenomes.org Participate Global Network Donate

## Sharing Personal Genomes

The Personal Genome Project was founded in 2005 and is dedicated to creating public genome, health, and trait data. Sharing data is critical to scientific progress, but has been hampered by traditional research practices—our approach is to invite willing participants to publicly share their personal data for the greater good.

Learn more ›

### Participation

Donating your genome and health data to science is a great way to enable advances in understanding human genetics, biology, and health. We seek volunteers willing to donate diverse personal information to become a public resource.

Learn about participating ›

### Open Data

Open data is a critical component of the scientific method, but genomes are both identifiable and predictive. As a result, many studies choose to withhold data from participants and restrict access to researchers. The PGP's public data is a common ground to collaborate and improve our understanding of genomes.

Use PGP data ›

### Global Network

We are a member of the Global Network of Personal Genome Projects. Since the Personal Genome Project was launched at Harvard Medical School in 2005, the network has grown to include researchers at many leading institutions around the globe.

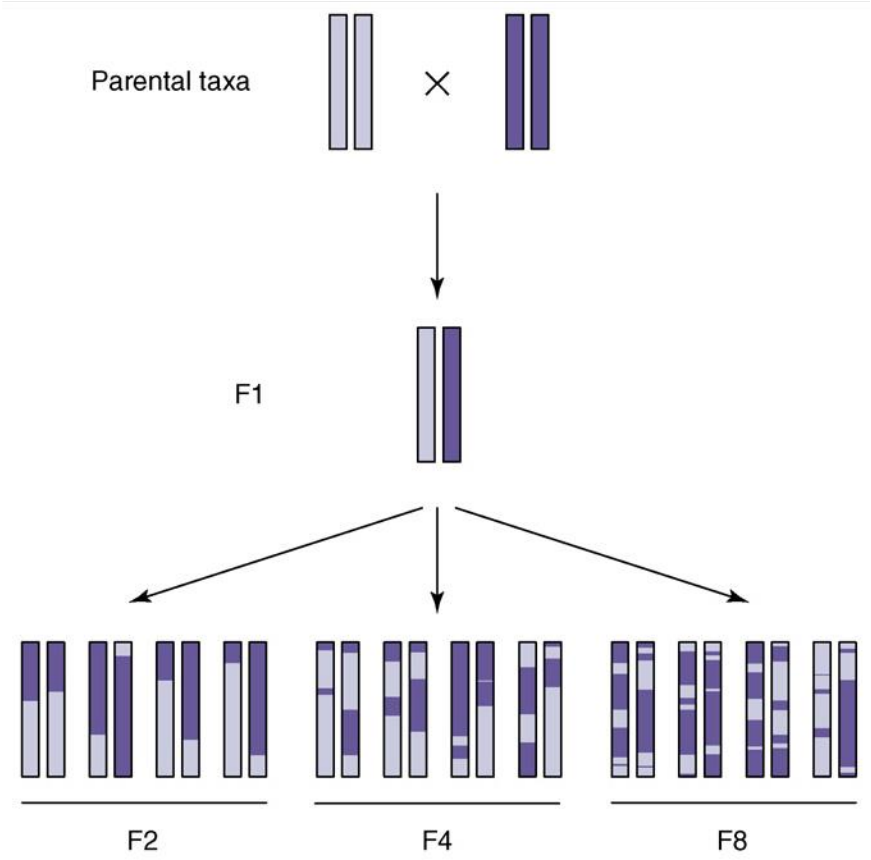
Find out about the network »

## Risk of participation

- infer paternity or other features of the participant's genealogy
- claim statistical evidence that could affect employment or insurance or the ability to obtain financial services for the participant
- claim relatedness to criminals or incriminate relatives
- make synthetic DNA corresponding to the participant and plant it at a crime scene
- reveal propensity for a disease currently lacking effective treatment options

# Admixture mapování

- Genetické mapování v přírodních hybridních populacích.
- Vyšší rozlišovací schopnost než klasické mapování pomocí laboratorního křížení, ale nižší než asociační mapování.
- Potřeba ~ 1000 - 5000 markerů.



| | Laboratorní křížení | Admixture mapování | Asociační mapování |
|---|---|---|---|
| Počet markerů | ~100 | ~1 000 | ~ 1 000 000 |
| Rozlišovací schopnost | ~10 cM | ~1 cM, ~1 Mb | ~10 kb |

Ideální kombinace více přístupů

1. Laboratorní křížení → 2. asociační mapování

Hrubé genetické mapování

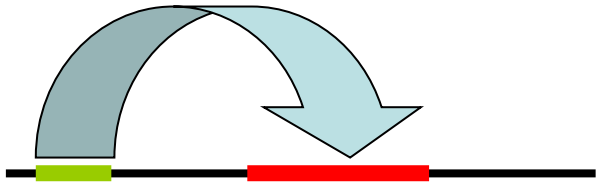
- na úrovni celého genomu

Jemné genetické mapování

- lze omezit jen na určitou předem vybranou oblast

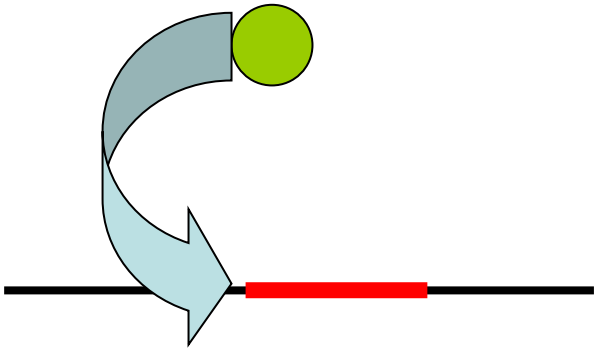
# Expression (e) QTL mapování

- Rozdíl v genové expresi jako kvantitativní znak.
- Pomocí eQTL mapování lze identifikovat regulační oblasti odpovědné za změnu v expresi daného genu (cis i trans).



**cis regulace**

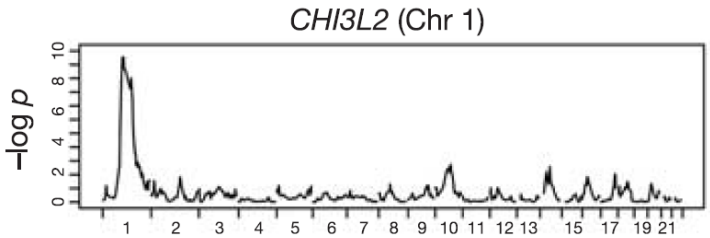
promotory,
enhancery,
miRNA



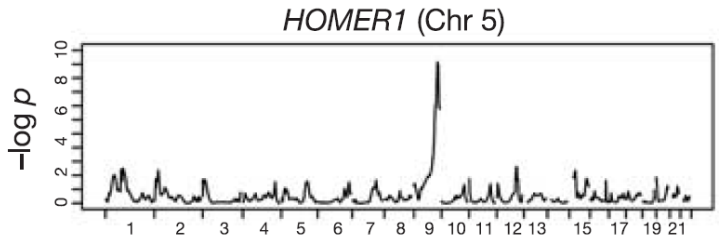
**trans regulace**

transkripční faktory,
siRNA, miRNA

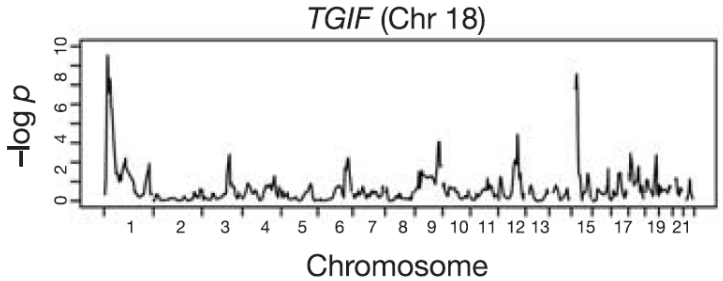
cis e-QTL




trans e-QTL




multiple e-QTL

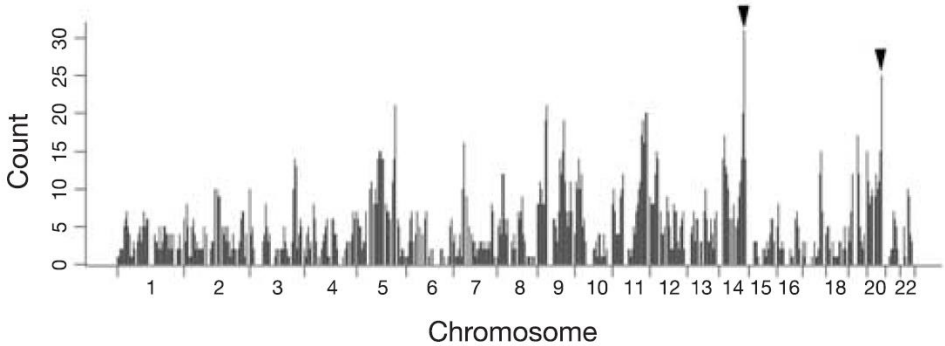



Morley et al. 2004, Nature

**Pokud sledujeme v jednom experimentu expresi všech či většiny genů v genomu, lze vytvořit regulační sítě.**

Některé trans eQTL ovlivňují expresi mnoha genů

**„Master transkriptional regulators“**



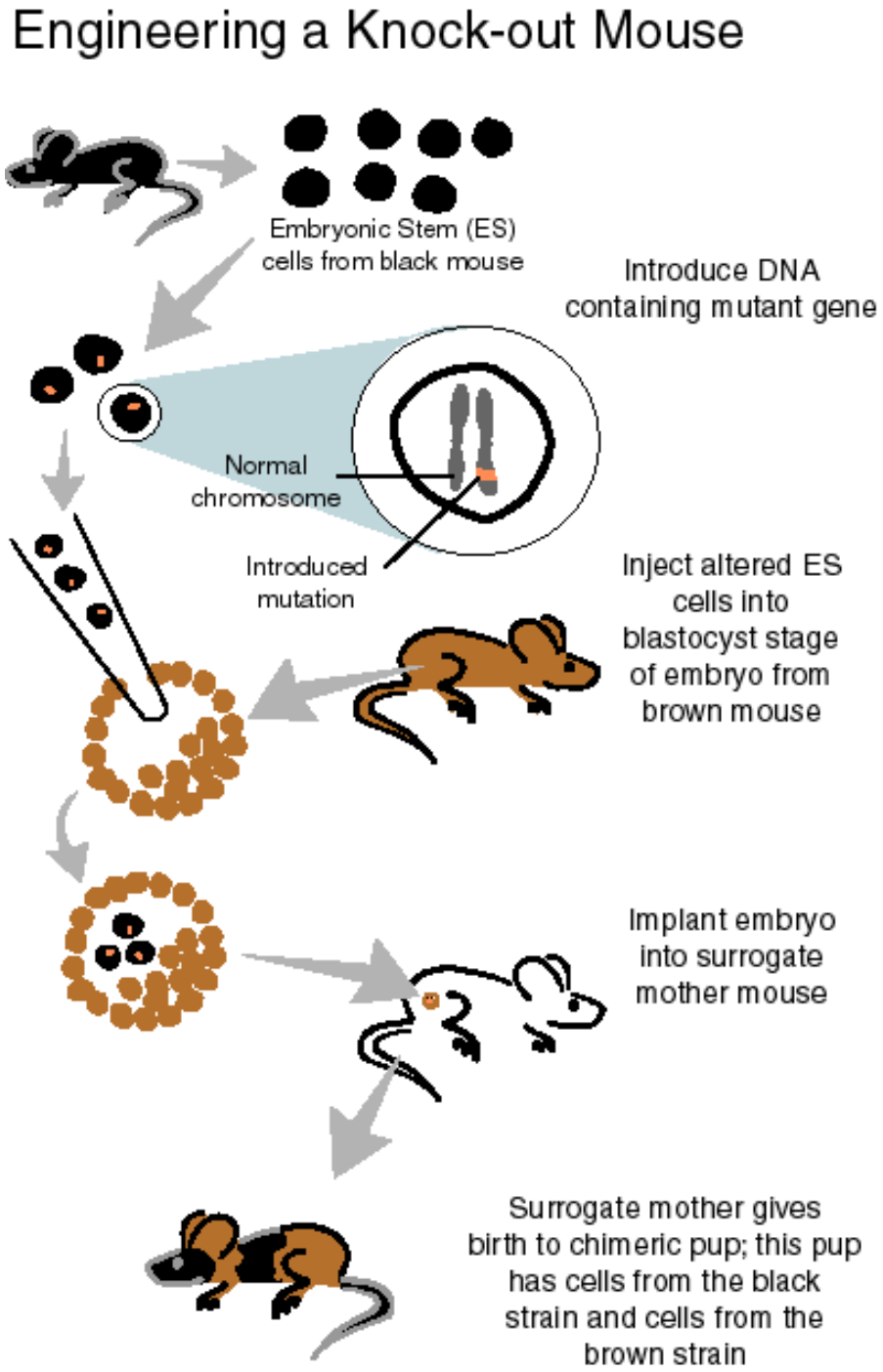

Morley et al. 2007, Nature

# Reverse genetika

## Metody cílené mutageneze

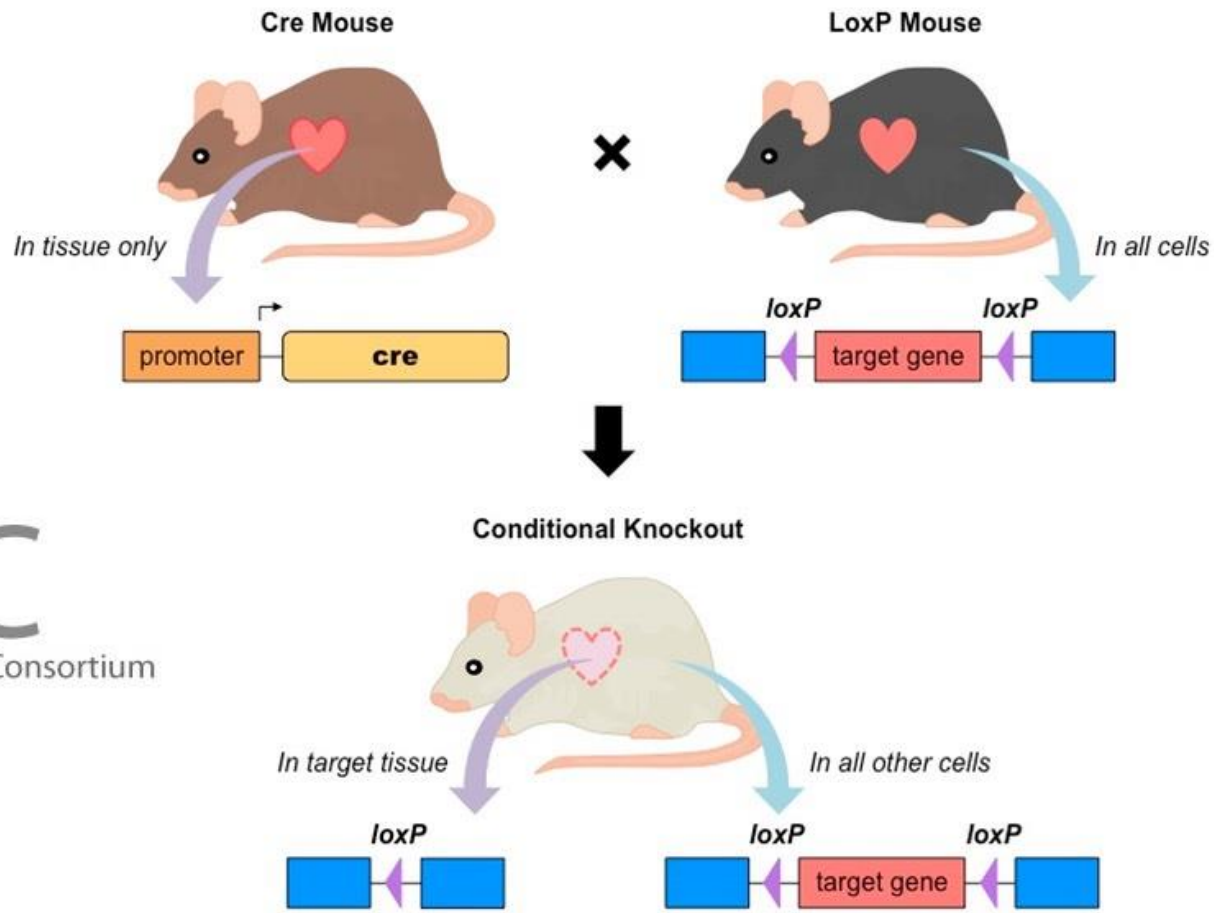
### Genový knockout

- Jedinec u kterého byl určitý gen inaktivován či odstraněn.
- Využívá homologní rekombinaci v embryonálních kmenových buňkách.
- Změna ve fenotypu takového jedince poskytuje informaci o funkci genu.



# Podmíněný genový knockout

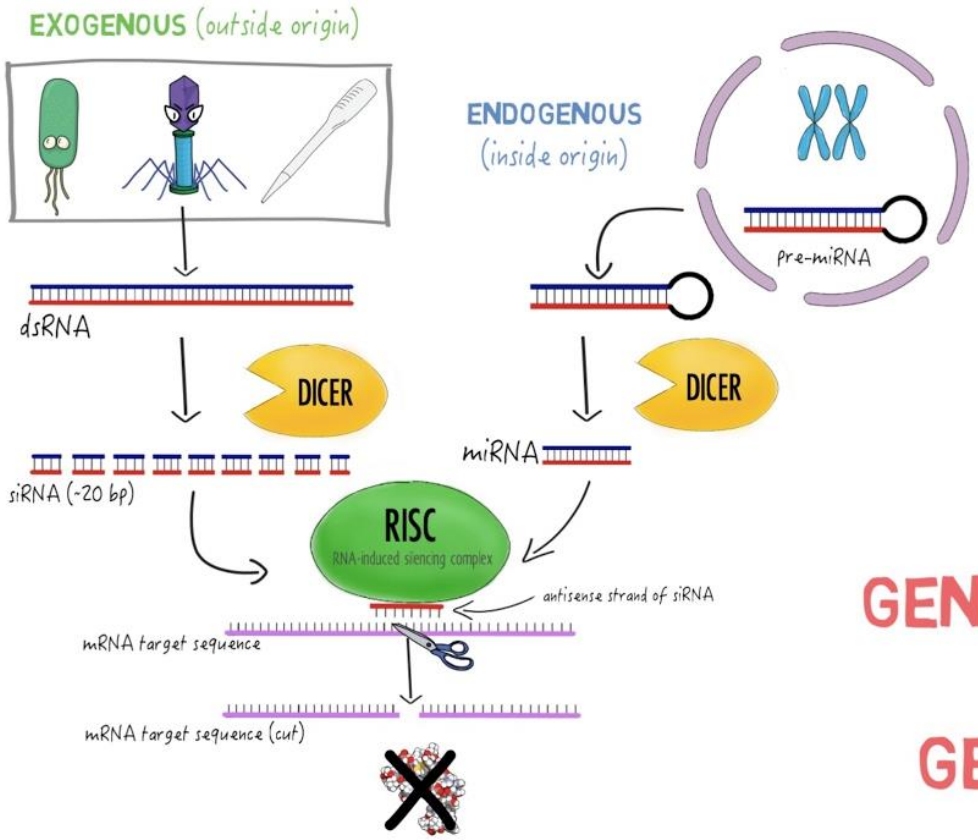
- Umožňuje inaktivovat určitý gen pouze v určité tkáni.
- Využívá Cre-lox systém.

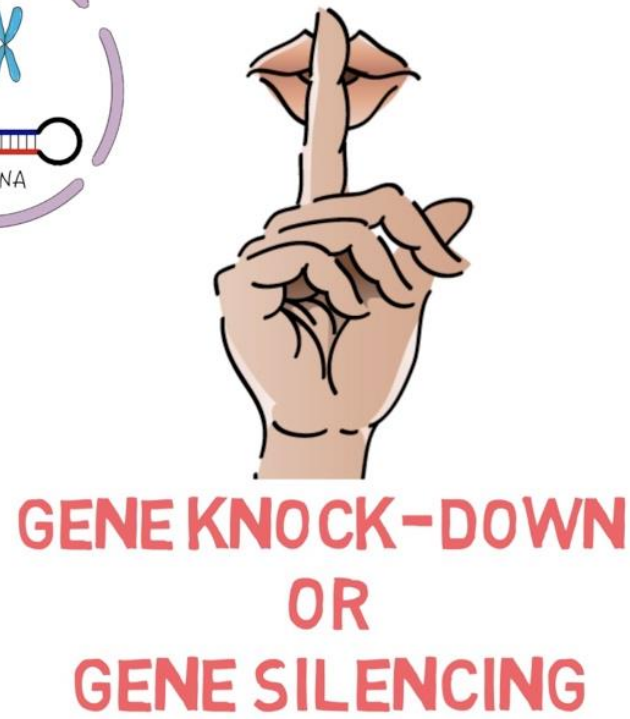



IMPC
International Mouse Phenotyping Consortium

# Genový knockdown

- Snížení exprese určitého genu.
- Využití mechanismu RNA interference.



Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:7091–7111
DOI 10.1007/s00253-017-8433-z

MINI-REVIEW

# Therapeutic potentials of short interfering RNAs

Chit Tam[1] · Jack Ho Wong[1] · Randy Chi Fai Cheung[1] · Tao Zuo[2] · Tzi Bun Ng[1]

Critical Reviews in Oncology/Hematology 98 (2016) 159–169

Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology/Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

# Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy?

Samuel Wang Sherng Young[a], Martina Stenzel[b], Jia-Lin Yang[a,*]

[a] Adult Cancer Program, Lowy Cancer Research Centre, Prince of Wales Clinical School, Faculty of Medicine, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia
[b] Centre for Advanced Macromolecular Design, Faculty of Science, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia

## Genový knockin

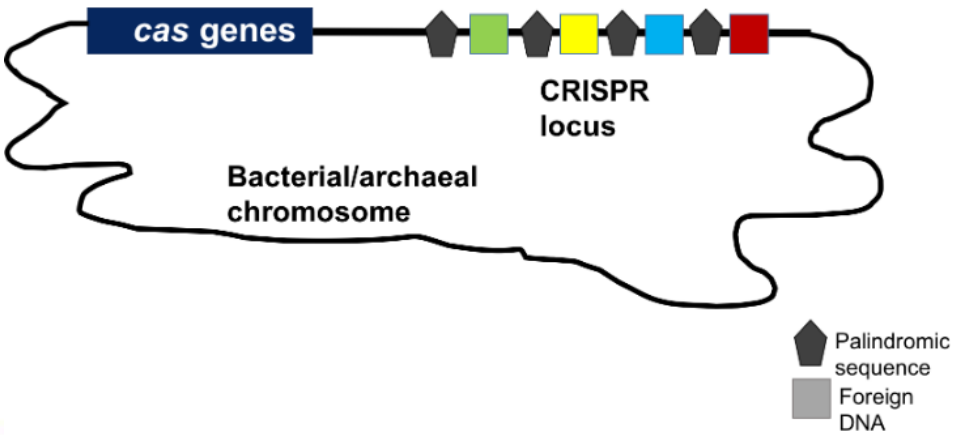
- Pomocí homologní rekombinace dojde k úpravě sekvence genu. Vytvoření nové funkce.

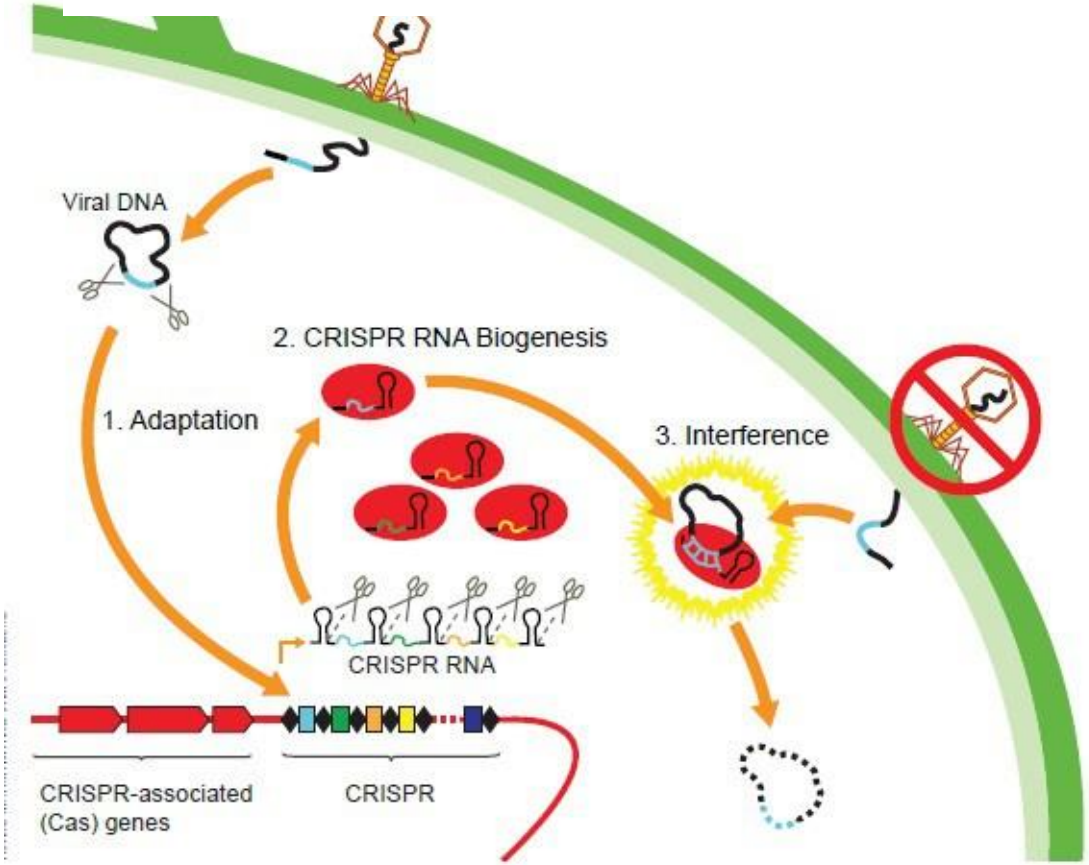
## Transgen

- Vložení jedné či více kopií určitého genu do genomu. Integrace je náhodná.

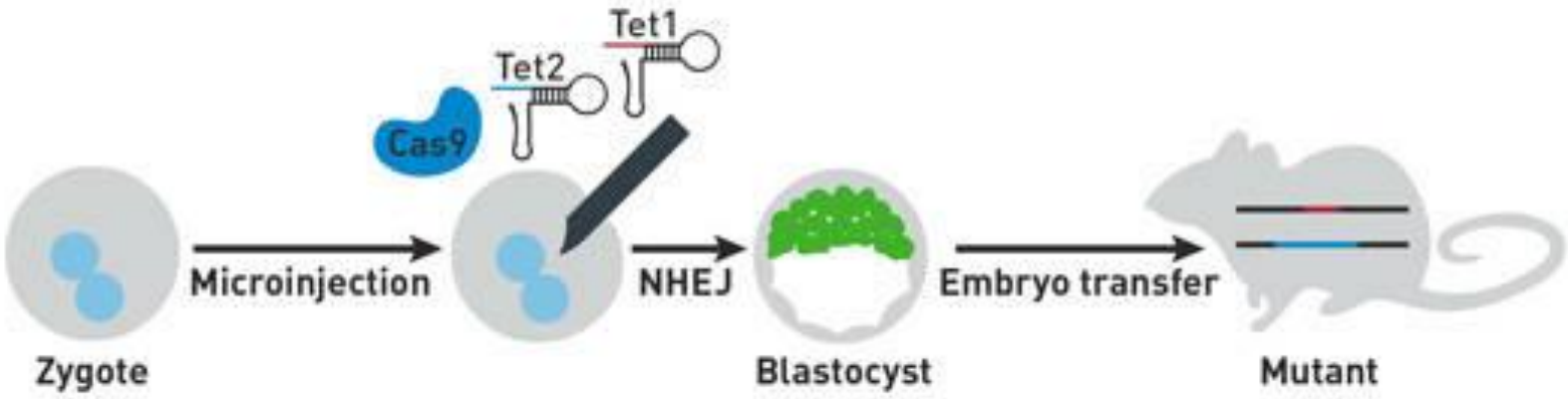
# CRISPR-Cas

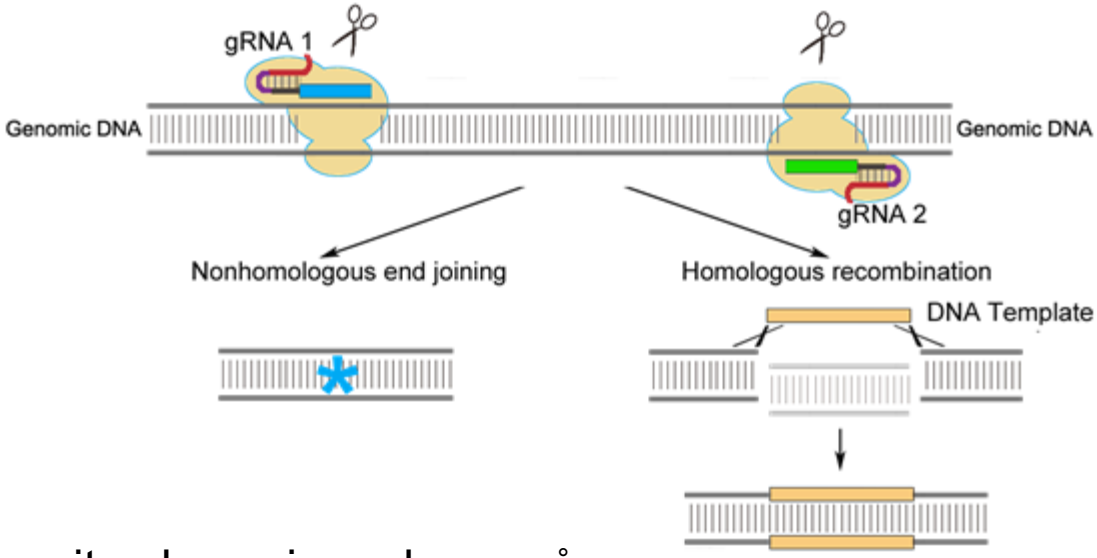
- CRISPER (Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.
- Cas (CRISPER-associated) genes. Nukleázy.
- Bakteriální imunitní systém



# Editování genomu pomocí Crisper-Cas9




- V jednom kroku lze upravit sekvenci mnoha genů.
- Stačí dodat Cas9 + gRNA pro jeden či více genů.
- Lze provést knock-out i knock-in.

# CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'*

Henry T. Greely †

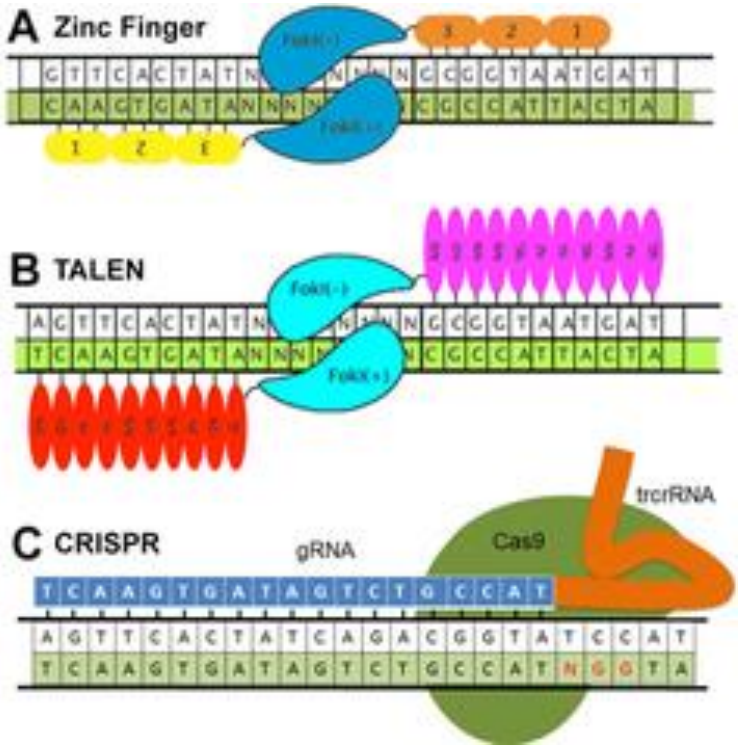
Corresponding author. E-mail: hgreely@stanford.edu

**ABSTRACT**

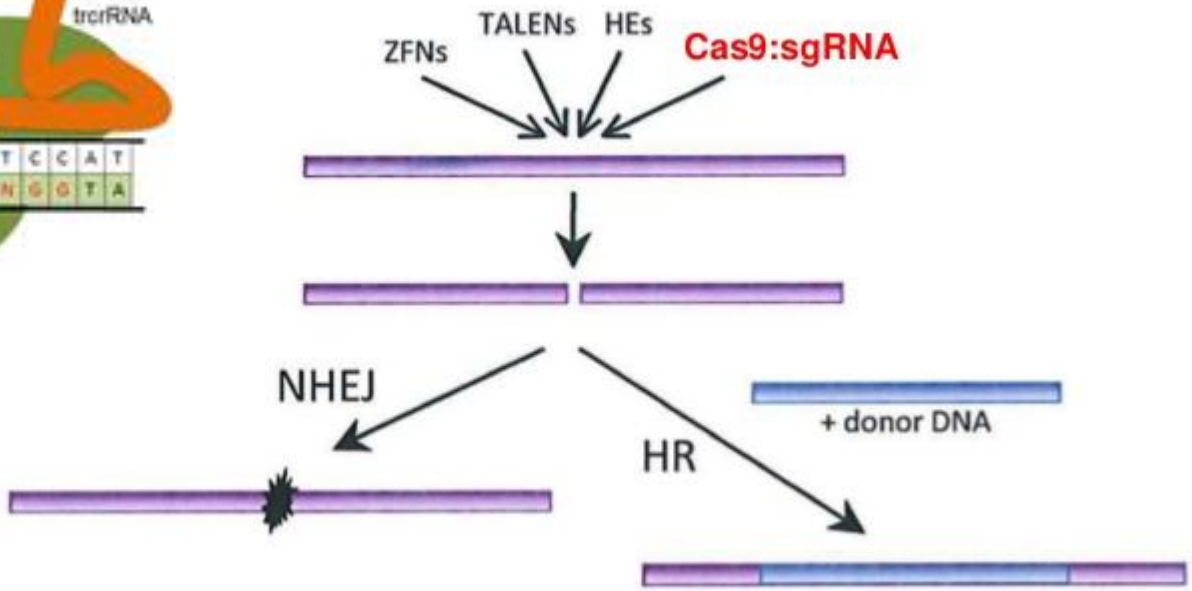
The world was shocked in Nov. 25, 2018 by the revelation that He Jiankui had used clustered regularly interspaced short palindromic repeats ('CRISPR') to edit embryos—two of which had, sometime in October, become living babies. This article is an effort to provide some deep context for the He Jiankui affair and to begin analyzing it. It focuses on He's experiment, without delving into the broader ethical issues around 'human germline genome editing' in the abstract. It begins by carefully defining 'human germline genome editing'. It then describes the little we know about the experiment before providing background on CRISPR, the pre-He ethical and legal status of human germline genome editing, and on He himself. The fourth, and longest, section provides a detailed narrative of the revelation of the He experiment and its fallout. The fifth section critiques the experiment, which I believe merits unequivocal condemnation on several grounds. The last section suggests some important immediate reactions, by 'Science' and by China.

# Vědci žádají EU o změnu předpisů pro moderní úpravy genomu rostlin

# Technologie umožňující cílené editování genomu.




- Klíčovým 1. krokem je dsDNA zlom



AP

AP NEWS

Top Stories Topics Video Listen

# AP Exclusive: US scientists try 1st gene editing in the body

MARILYNN MARCHIONE November 15, 2017

Léčba Hunterova syndromu pomocí editace DNA