

Mapování



Literatura:

- ▣ Molecular genetics of bacteria kap.7 (str.269-271)
- ▣ Molecular Genetics of *Escherichia coli*, P.F. Smith-Keary (Guilford Press, NY, 1989)

Mapování

Proces, ve kterém se experimentátor snaží lokalizovat geny nebo DNA lokusy v konkrétním chromozomu

- pokud je objeven nový gen nebo izolována mutanta s geneticky nepopsaným fenotypem
 - lokalizovat gen zodpovědný za fenotyp
 - stanovit, zda gen je opravdu nepopsaný (někým jiným v jiném kontextu)
 - stanovit okolí genu, to má význam pro odhad jeho funkce a regulace
 - znalost pozice na genetické mapě umožňuje další manipulaci s genem
 - příprava delecí,
 - lokalizovaných mutací
 - konstrukce částečných diploidů ke komplementačním analýzám
 - inserce reportérových genů ke studiu regulace

Mapování

- pokud je potřeba porovnat různé izoláty stejného druhu – klinické, environmentální
 - stejný fenotyp – rozdílný genotyp
 - metabolické degradační dráhy
 - rozdílné fenotypy –
 - faktory virulence, rezistence
- použití typu mapování – každý typ zodpoví jiný druh otázek
 - Celková struktura genomu
 - Určitá struktura – jak velká

Mapování

genetické mapování

- u vyšších organismů je genetická vzdálenost mezi dvěma markery měřena v jednotkách procentuální rekombinace
- u prokaryot je rekombinace řídký proces a je nutno selektovat a identifikovat pouze jeden určitý typ rekombinace
 - určení polohy genu na chromosomu a jeho relativní pozici k ostatním genetickým markerům
 - pomocí přenosu DNA genetickými metodami
 - je třeba selekční strategie, která selektuje rekombinanty donora s recipientem
 - vzdálenost dvou genů je nepřímo úměrná frekvenci přenosu
 - čím menší je vzdálenost mezi geny, tím je menší pravděpodobnost rekombinačních zlomů
 - genetické mapování je závislé na pravděpodobnostních datech

Mapování

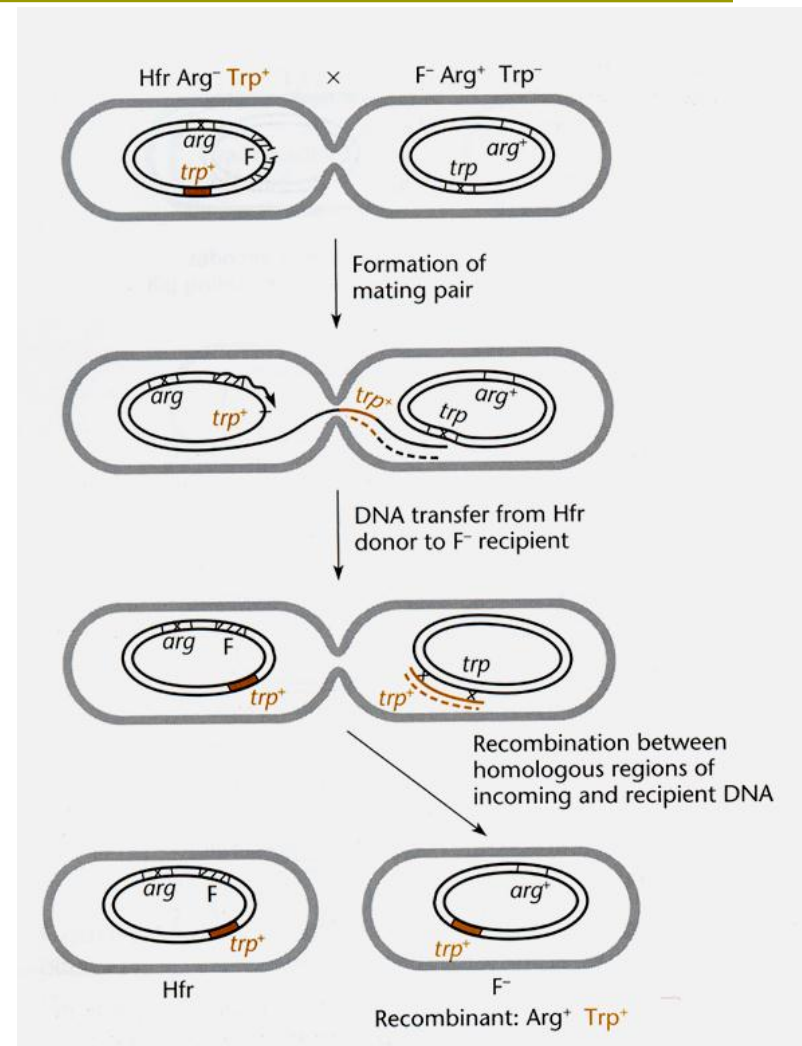
- **mapování na velké vzdálenosti** – předběžná genetická mapování
 - konjugace Hfr kmenů (*E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*),
 - rekombinantní R plazmidy
- **přesné mapování** - transdukcí, transformací
- kombinací dat z mnohočetných loků, lze sestavit kompletní genom
- další využití
 - při přípravě systémů pro konstrukci kmenů
 - při komplementačních analýzách – konstrukce R' a F' plazmidů
 - srovnání geneticky podobných systémů
 - fenotypové souvislosti vzdálených genů

□ Při konjugačních experimentech

- kontraselekce proti donoru i recipientovi,
- zároveň výběr žádoucích rekombinantů.
 - Po vyšetří konjugační směsi, ani donor ani recipient nemá růst.
- Růst by měly pouze vybrané rekombinanty (selektovaný marker).

□ Prakticky se uskutečňuje několika způsoby:

- přidáním antibiotik, na které je donor citlivý a recipient rezistentní
- paralelně je příjemce auxotrofní a vynecháním této auxotrofie jsou selektovány rekombinanty .

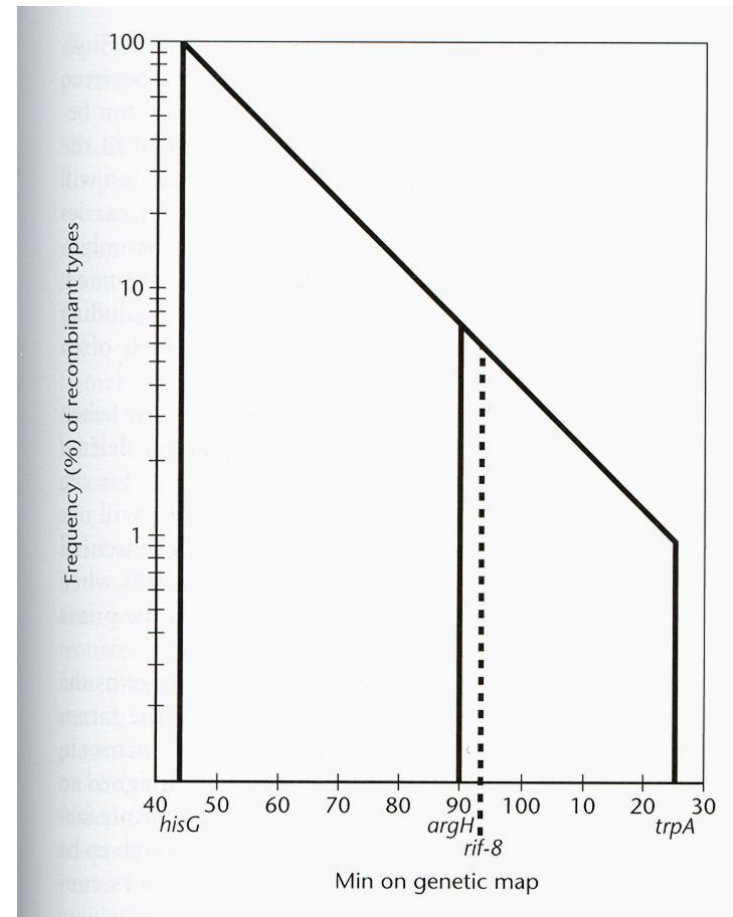


Mapování - konjugace

- **Konjugace je obvykle prováděna smícháním tekutých kultur dvou geneticky rozdílných Hfr a F⁻ kmenů.**
 - Buňkám je umožněno vytvořit konjugační páry
 - poté je suspenze opatrně ředěna a vysevána na pevné selektivní medium
 - medium umožňuje selektivní výběr žádaných mutant (**selektovaných markerů**)
 - poté jsou kolonie testovány na další znaky, které byly zděděny (**neselektované markery**)
 - přenos Hfr kmenu je velmi efektivní, na 10 Hfr kmenů může být vyselektován jeden rekombinant nesoucí proximální marker.

Mapování gradientovým přenosem

- **Orientovaným parciálním přenosem Hfr kmenu se vytvoří populace merozygotních buněk nesoucích různě velké části Hfr chromosomu**
 - začínající ve stejném místě, ale končící v náhodných vzdálenostech chromosomu
 - merozygoty s kratšími segmenty donorové DNA se vyskytují ve vyšší frekvenci a naopak merozygoty s delšími segmenty se vyskytují s nižší frekvencí
 - lze očekávat vyšší frekvenci přenosu genů, které jsou umístěny blíže počátku přenosu -proximální
 - frekvence s jakou se daný marker objevuje mezi rekombinanty je přímo úměrný k frekvenci jeho přenosu



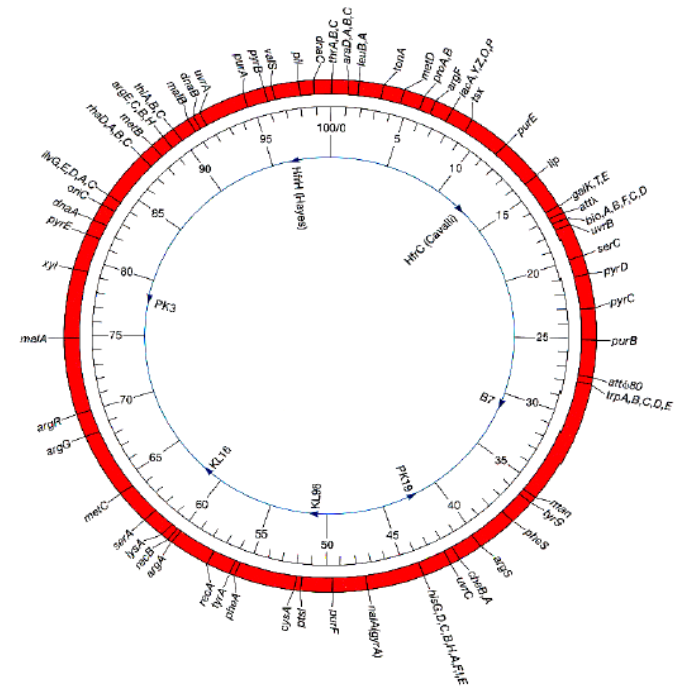
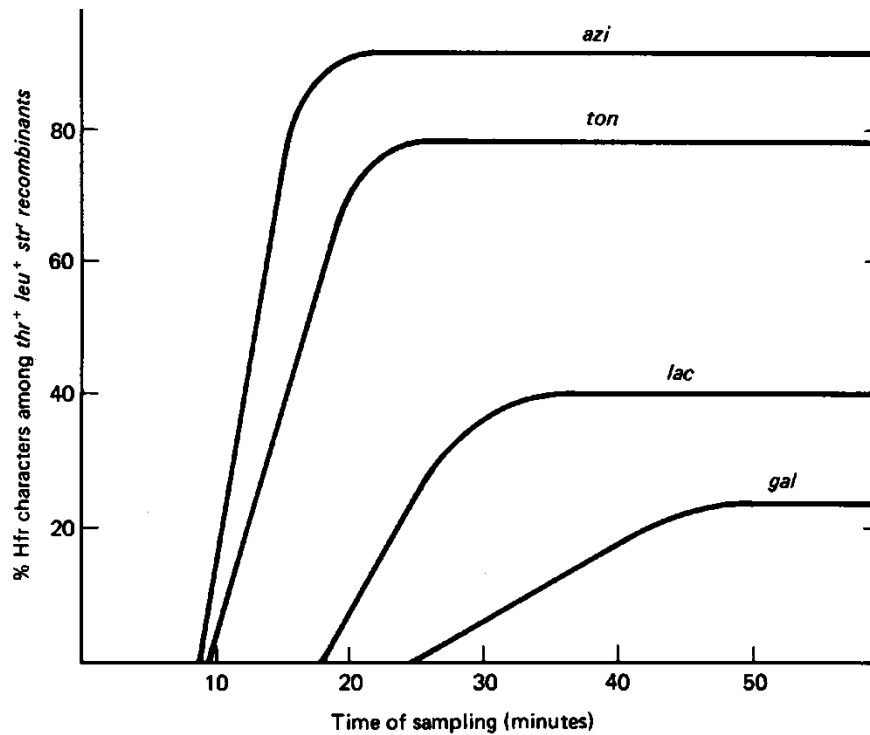
y-souřadnice: frekvence jednotlivých neselektovaných markerů při selekci na histidin
x-souřadnice: vzdálenost od selektovaného markeru (v minutách)

Mapování přerušovanou konjugací

- **princip stejný jako u předchozího způsobu**
 - konjugační páry jsou ale uměle přerušeny rychlým zamícháním buněčné suspenze
 - ta je ihned naředěna, aby se zabránilo znovu vzniku konjugačních párů
 - vyseta a selektována na diferenčním mediu na selektované markery
- **tato metoda určuje čas, kdy marker poprvé vstoupil do F⁻ buněk**
 - umožňuje sestavení genetických map, kdy jsou vzdálenosti na mapě určeny v časových jednotkách
- **nejúživanější metoda konjugačního mapování**
 - každý marker vstoupí do F⁻ v určitém čase, pokud je spojení přerušeno před touto dobou, do buňky nevstoupí (nevznikne příslušný rekombinant)
 - každý marker má určitou hladinu inkorporace. Čím dříve do buňky vstoupí, tím vyšší je max. hladina a tím rychleji je dosažena
 - je naprostý souhlas v konstrukcích map oběma metodami
- **markery pro některé Hfr kmeny**
 - **Hfr H** - thr - leu - azi - ton - pro - lac - pur - gal - (λ)⁻ - mal - str^s - xyl -
 - **Hfr C** - tsx - lac - pro - ton - azi - leu - thr - thi - met - ile - xyl - mal - str^s - gly

Mapování přerušovanou konjugací

Hfr H - thr - leu - azi - ton - pro - lac - pur - gal - (λ)⁻ - mal - str^s - xyl -



Konjugace - příklady

- ❑ **Otázka:** Hfr kmen je His⁺ a Trp⁺, ale je Arg⁻. Je křížen s recipientním kmenem, který je Arg⁺, ale His⁻ a Trp⁻. Po proběhnutí konjugace je směs vyseta na MM medium obsahující histidin a arginin, ale ne tryptofan. Který je selektovaný marker a který neselektovaný?
- ❑ **Odpověď:** tryptofan je selektovaný, arginin a histidin neselektovaný

Konjugace - příklady

- **Problém:** Kmen *E. coli* má dvě auxotrofní mutace metB1 (90 min), LeuA5 (2 min) a resistenci na streptomycin str^R (73 min). Dále má kanamycinovou resistenci na Tn5 v neznámé poloze. Tu je třeba určit.
- **Nástin řešení:** zkřížíte tento kmen s Hfr kmenem který má tyto vlastnosti: str^S, je přenášen od 0 min proti směru hodinových ručiček, má hisG- (44 min). Po inkubaci 100 min vysejete na MM s leucinem a histidinem. Získaných 100 kolonií transkonjugant testujete na ostatní neselektované markery. 15 jich je His-, 2 Met+, 12 kanamycin resistantních.
- **Otázka:**
 - Který je selektovaný a který neselektovaný marker?
 - Kde je přibližně insertován Tn5?

Konjugace - příklady

□ Odpověď:

- Selektovaný marker je Met+, neselektovaný Leu+, His-, kanR.
- Tn5 je insertován v blízkosti před 44 min

Transformační mapování

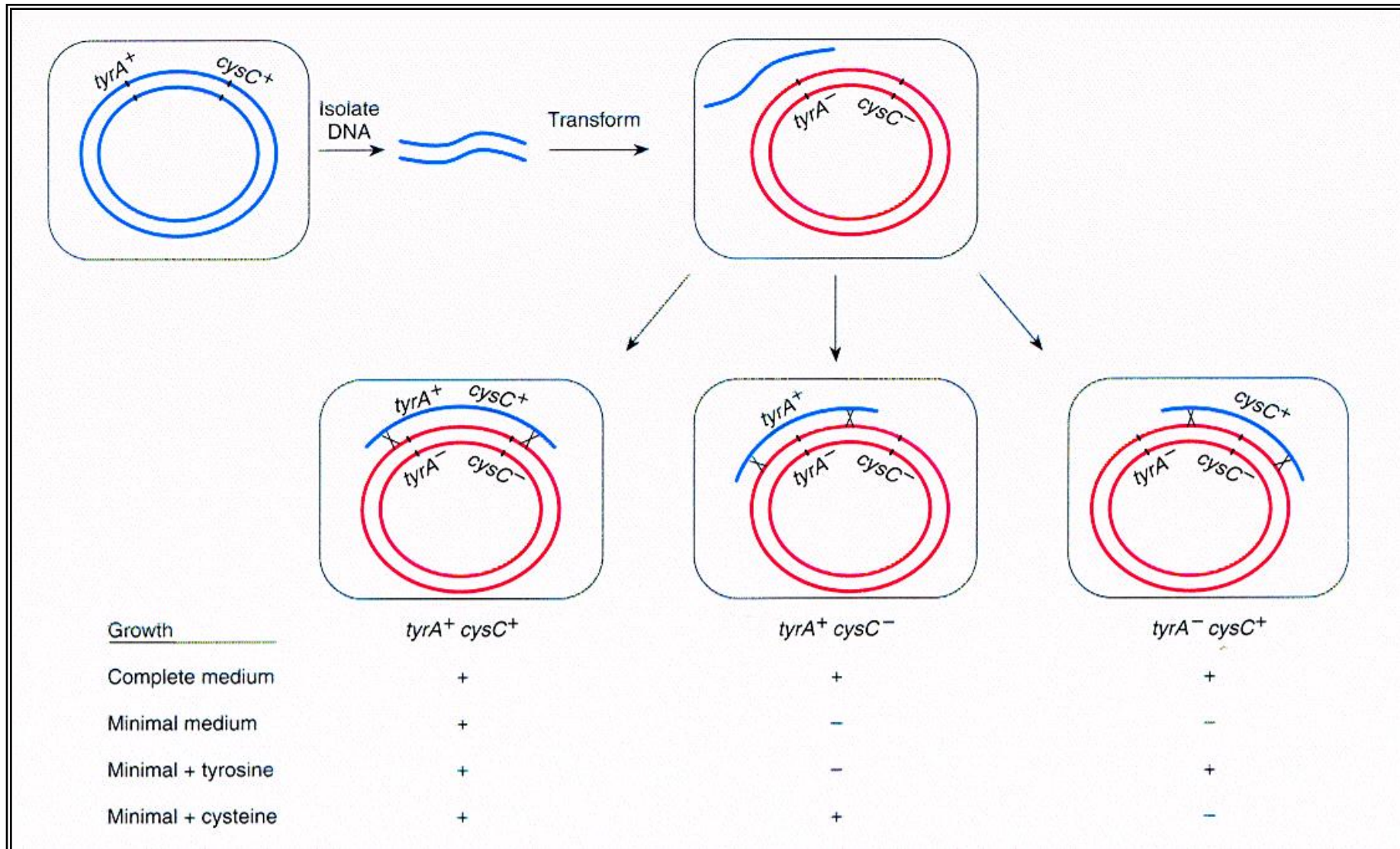
- Základní princip
 - transformovat DNA o známém genotypu do kmene s rozdílnými alelami daného genotypu
 - Sledování inkorporace donorových allel ze dvou lokusů do recipientního kmene
 - Čím častěji je alela se dvěma lokusi inkorporována dohromady, tím blíže sobě musí být

- **Zaveden kotransformační index - r**

$r = \text{počet dvojnásobných transformantů} / \text{počet dvojnásobných transformantů} + \text{počet jednoduchých transformantů}$

- je v inverzním vztahu k vzdálenosti na genetické mapě
 - čím je vyšší, tím je menší vzdálenost dvou studovaných lokusů
- u bakterií vždy vhodný selekční systém
 - pro přesnou identifikaci transformantů
 - vždy negativní kontrola možnosti vzniku revertantů.

Transformační mapování



Transdukční mapování

- Infekce recipienta lysátem z donora
- nutno selektovat a identifikovat pouze jeden určitý typ rekombinace
 - ostatní jsou vyřazeny z analýzy
 - není možné detekovat počet netransdukovaných buněk
 - není možné vyjadřovat genetickou vzdálenost v procentech rekombinace
 - frekvence crossing overu je proporcionální ke genetické vzdálenosti
 - je možné měřit relativní vzdálenost mezi dvěma markery
 - a to v jednotkách transdukční frekvence vyjádřené jako množství transduktantů na infikujícího fága - 10^{-5} až 10^{-7} (u dvou markerů)
 - nepřesnost ve výpočtech frekvence transdukce je vyvážena přesností a vzdáleností na genetické mapě - sousední geny

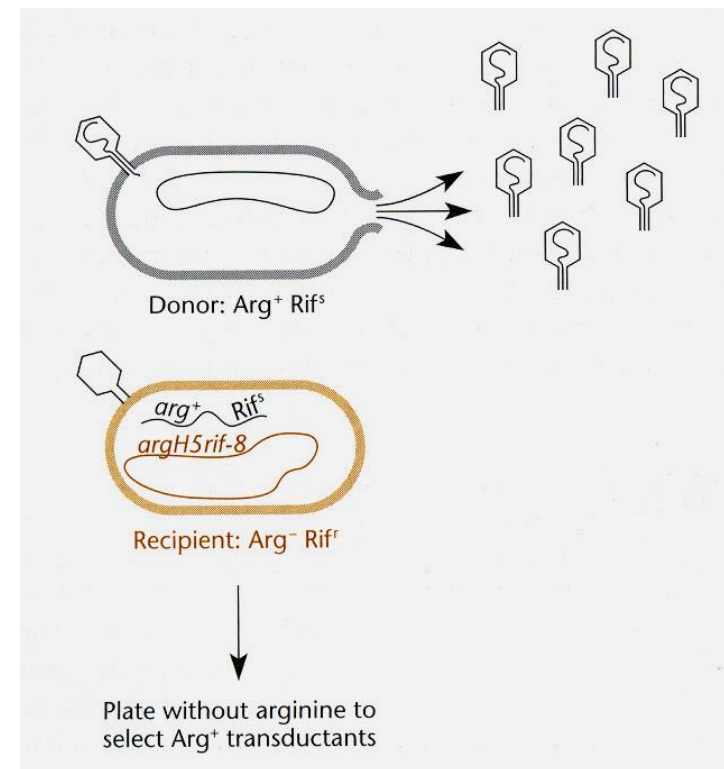
 - př. Při transdukci leuA+leuB- x leuA-leuB+ je třeba selektovat na leucin nezávislé rekombinanty - leuA+leuB+.
 - leuA-leuB- rekombinanty není možno rozlišit od netransdukovaných buněk
- kotransdukční metoda, deleční mapování a třífaktorový test

Transdukční mapování - příklad

stanovení relativní pozice

dvou markerů na genetické mapě:

- zjištění relativní pozice *rif* a *arg* genů na genetické mapě *E. coli*.
 - Kotransdukce *arg*, *rif^r* recipienta *arg*⁺, *rif^s* donorem fágem P1
 - Selektovaný marker Arg⁺ (je výhodnější selektovat Arg⁺ než Arg⁻)
 - Neselektovaný marker Rif^s, (Arg⁺ jsou testovány na Rif^s)
 - Zjištění frekvence kotransdukce obou markerů –
 - vyjádřeno v procentech k selektovanému markeru
 - Pokud je 33% - dva markery jsou kotransdukovatelné s frekvencí 33%
 - Dá se zjistit relativní vzdálenost obou markerů
 - Chromosom – 100 min
 - P1 – 2% délky chromosomu
 - Oba markery nejsou od sebe dál než dvě minuty (90kb)



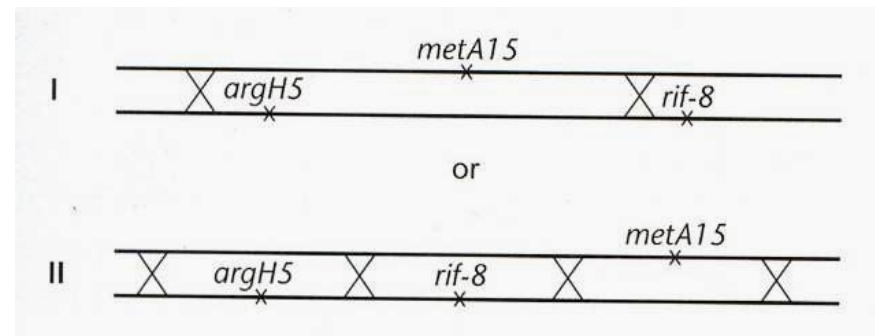
Transdukční mapování - příklad

- stanovení relativní pozice tří markerů na genetické mapě:
 - Kotransdukční frekvence je v korelaci ke vzájemné vzdálenosti dvou a více markerů
 - Sledování třetího markeru – *metA* (recipient *metA*⁻, donor *metA*⁺)
 - *arg* a *metA* - frekvence kotransdukce – 13%
 - *rif* a *met* - frekvence kotransdukce – 80 %
 - *metA* marker je blíže k *rif* (80%) než k *arg* (13%)
 - *rif* marker je blíže k *arg* (33%) než je *metA* marker k *arg* (13%)
 - Relativní pořadí těchto tří genů je: *arg* – *rif* – *metA*
 - Třífaktorové křížení
 - malá část chromosomu je rekombinovaná s chromosomem recipienta
 - jeden crossover zlomí chromosom a je letální
 - životaschopné (selektovatelné) jsou pouze rekombinanty se sudými crossovery
 - sledováním pravděpodobnosti vzniku určitých typů rekombinát umožňuje určení pořadí genů

Transdukční mapování – třífaktorové křížení

- Sledování přenosu tří markerů
 - *Rif*, *arg*, *metA*:
 - Kotransdukce *arg*, *rif^r*, *metA⁻* recipienta *arg⁺*, *rif^s* *metA⁺* donorem fágem P1
 - Selekcce na *arg* – transduktanty testovány na *rif^s* nebo *metA*
 - Možné 4 typy rekombinant – tři vyžadují 1 dvojitý crossing over, jedna vyžaduje 1 čtyřnásobný – nepravděpodobné
 - zjištění, který typ rekombinanty je nejméně častý vede k určení pořadí genů
 - u prokaryot je možno selektovat a identifikovat pouze jeden určitý typ rekombinant
 - není možné detekovat počet netransdukovaných buněk
 - není možné vyjadřovat genetickou vzdálenost v procentech rekombinace
 - frekvence crossingoveru je proporcionální ke genetické vzdálenosti
 - Pořadí genů - *arg* – *rif* – *metA*

Recombinant phenotype	No. of recombinants
Arg ⁺ Met ⁺ Rif ^r	61
Arg ⁺ Met ⁺ Rif ^s	22
Arg ⁺ Met ⁻ Rif ^r	2
Arg ⁺ Met ⁻ Rif ^s	11



Mapování

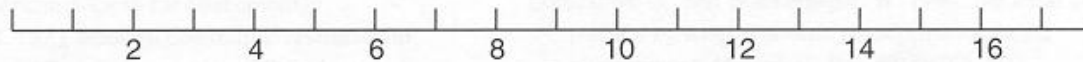
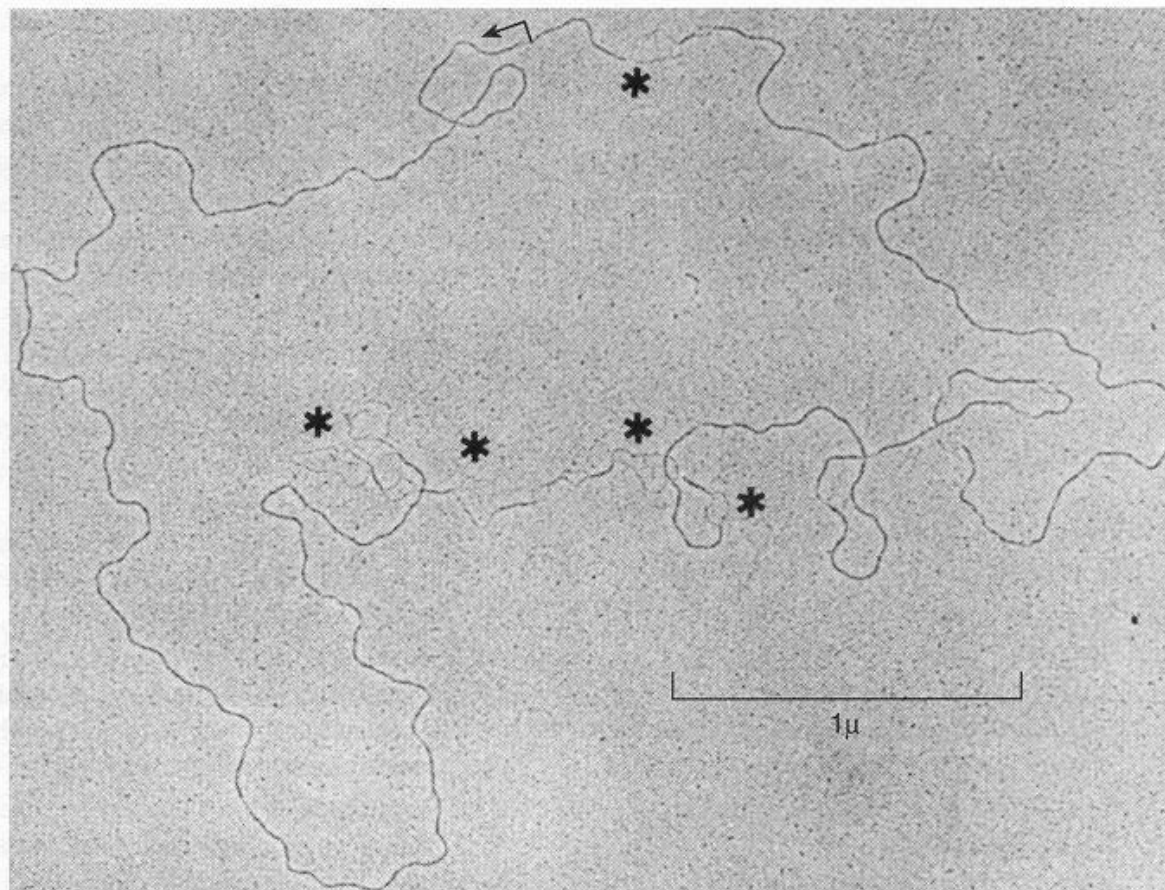
□ fyzikální mapování

- v současnosti větší význam
- mapování na dlouhé vzdálenosti i porovnání mutant
- fyzikální mapování zahrnuje molekulárně biologické techniky (PCR, hybridizace, sekvenování)
- nevyžaduje polymorfní mutanty
- mapování na velké vzdálenosti
 - restrikce chromosomu enzymy s řídkými restrikčními místy (max. 20 na chromosom)
 - separace pulsní elektroforézou (PFG)
 - lokalizace mutací hybridizací
- obsahové mapování
 - náhodně našťipaný chromosom se klonuje do vektoru (cosmidy, BACs, YACs)
 - každý individuální klon může být analyzován a může být stanoveno relativní postavení genů (pokud jsou dva geny lokalizovány na jednom klonu nemohou být dál než je velikost insertu)
 - lokalizace mutace způsobené transposony (transposon jako proba)
 - částečná sekvenace - lokalizace mutace, absolutní pozice mutací

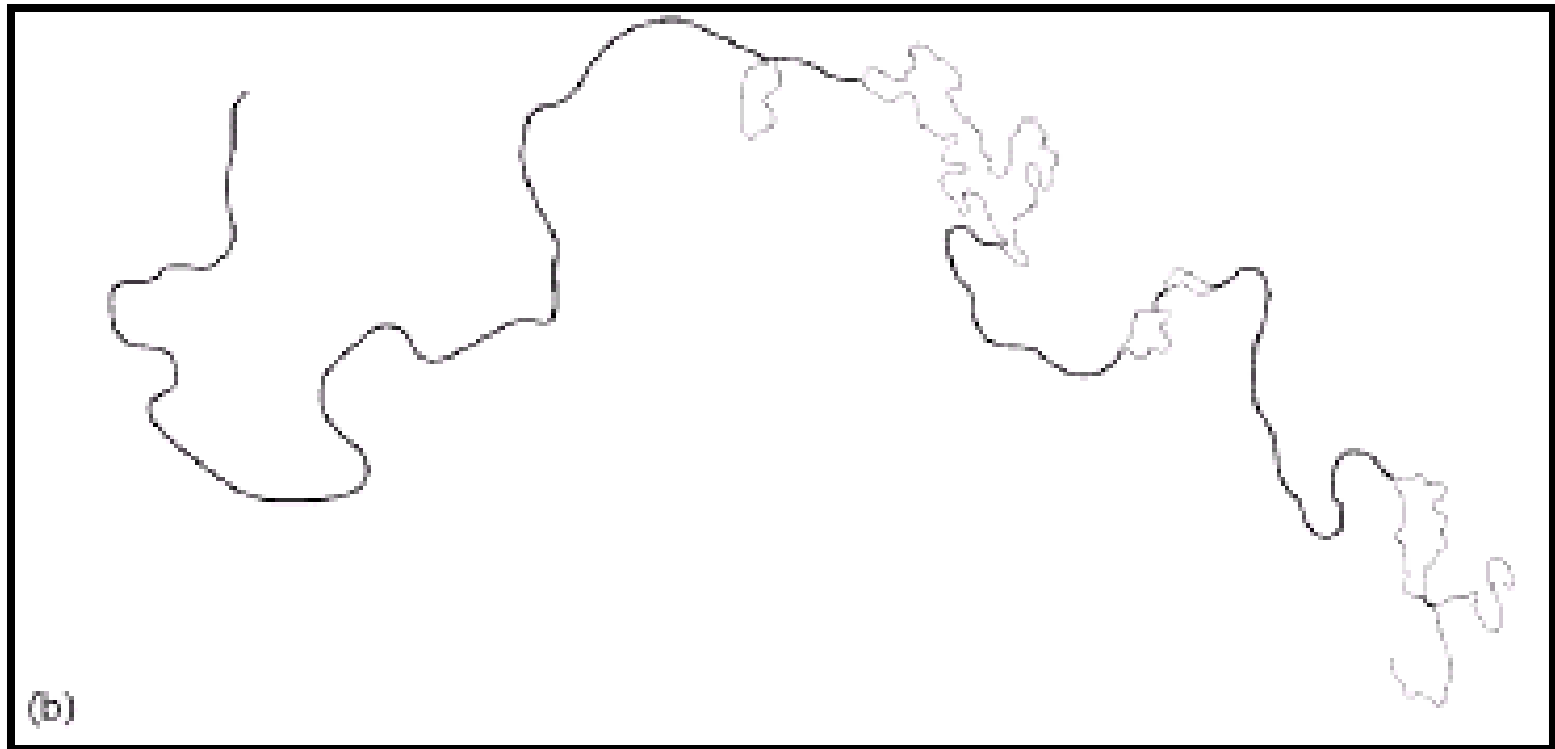
Mapování

- Denaturační mapování
 - částečně denaturovaný chromosom (ATbohatá místa) vytváří „bubliny“
 - ty lze zviditelnit elektronovým mikroskopem
 - porovnání mutanty a wild-type
- Heteroduplexní mapování
 - vytvoření heteroduplexu z mutanty a wild-typu
 - úplná denaturace a kombinace obou chromosomů
 - k analýze inserčních či delečních mutací
 - vytvoření smyčky ze ssDNA části chromosomu
- Restrikční analýza
 - kombinace štěpení restrikčními enzymy a elektroforetické analýzy
 - změna patternu v restrikčních štěpech
 - existence mutace v restrikčním místě
 - (RFLPs - restriction fragment length polymorphism)
 - případná lokalizace hybridizací
 - restrikční analýza klonovaných segmentů

Mapování - denaturační



Mapování

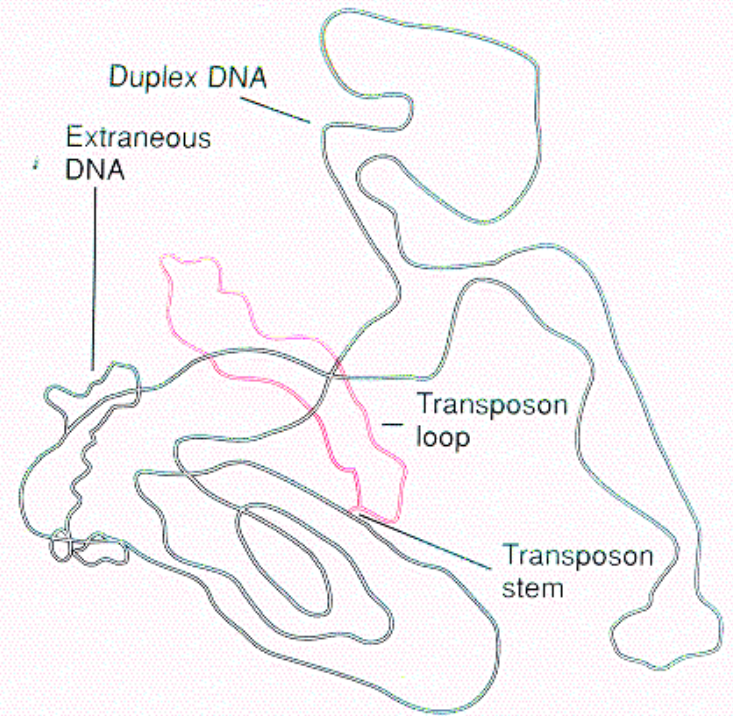


Heteroduplexní mapování

Mapování - heteroduplexní analýza



(a)



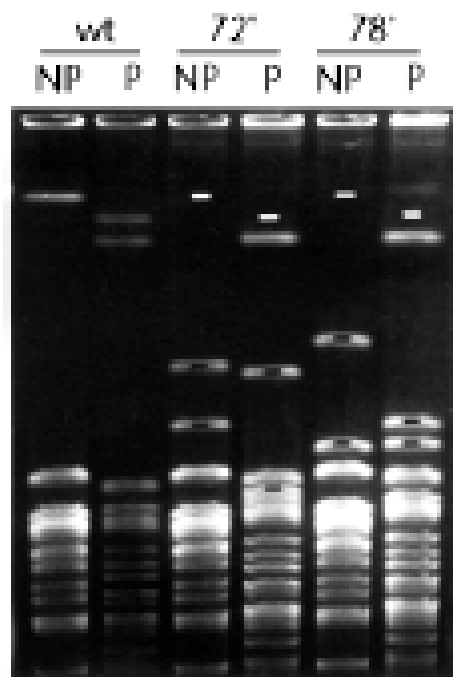
(b)

Mapování

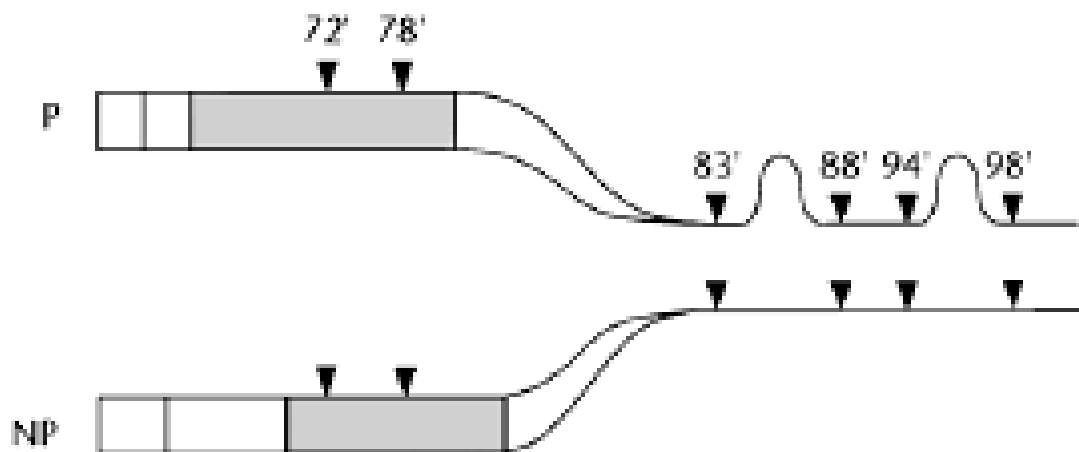
kombinace fyzikálního a genetického mapování

- Inserční mapování pomocí transposonů
 - sloučení genetického a fyzikálního mapování
 - přenesen metodami genetického mapování, lokalizován metodami fyzikálního mapování
 - integrativní mapování genomu
 - vytváření mutant s insertovaným minitransposonem s restričním místem s nízkou frekvencí restrikce (NotI)
 - přenesen metodami genetického mapování do druhého kmene (genetic clamping)
 - restriční analýzou unikátním restričním enzymem se porovnávají různé fenotypické varianty druhu (např. patogenní a nepatogenní kmeny)
 - lokalizace insercí vzniklých horizontálním přenosem (ostrovy patogeneity)

Mapování

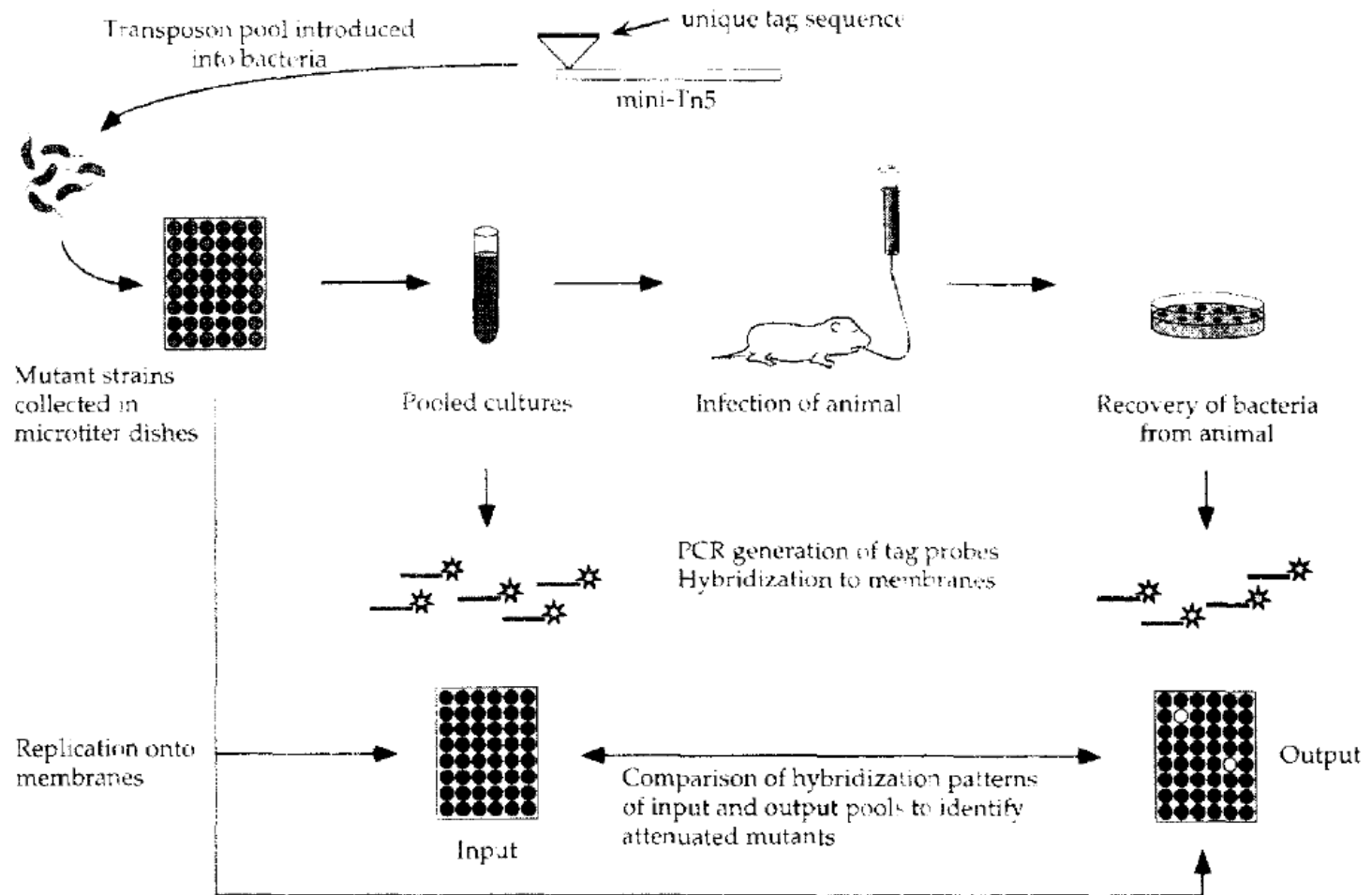


(a)



NotI retriční analýza wild-typu (wt) a mutagenizovaného genomu (72' a 78'] *E.coli* u patogenního (p) a nepatogenního (np) kmene

Schematické znázornění – signature tagged mutagenesis



Mapování

□ **Analýza sekvence nukleotidů**

- rozvojem technik molekulární biologie a bioinformatiky lze získat sekvence nukleových kyselin dlouhých fragmentů DNA až celých genomů (genomové databanky - EMBL, NCBI, NIH, DDBJ)
- shot gun sekvenování
 - náhodně naštípané fragmenty jsou klonovány a sekvenovány, z překryvů stanovena celková sekvence pomocí počítačového programu
- přímá lokalizace mutace
- objevení mnoho nepopsaných genů
- porovnání sekvencí s databází již určených genů u ostatních organizmů
 - sekvence basí malá informační hodnota pro určení funkce
 - fylogenetické informace - dedukce evolučních vztahů mezi taxonomickými skupinami
 - regulační elementy -začátek a konec transkripce, translace, promotory
- předpovědění ORF a sekvence aminokyselin pomocí algoritmů softwaru

Mapování

□ **Analýza sekvence aminokyselin**

- primární struktura udává i strukturu sekundární a terciární
- metody bioinformatiky dokážou simulovat možnou funkci i prostorové uspořádání
- základen jsou znalosti funkcí a struktury již charakterizovaných proteinů
 - proteinová databáze (NETREZ)
 - databáze x - ray struktur
- hledání podobností v konservovaných doménách charakteristických pro danou biochemickou funkci
 - BLAST, FASTA

□ **co nemůže sekvence aminokyselin postihnout**

- regulace na úrovni frameshiftingu - nestandardní začátek translace
- následně biochemická funkce proteinu (jiný ORF)
- regulace transkripce

Mapování

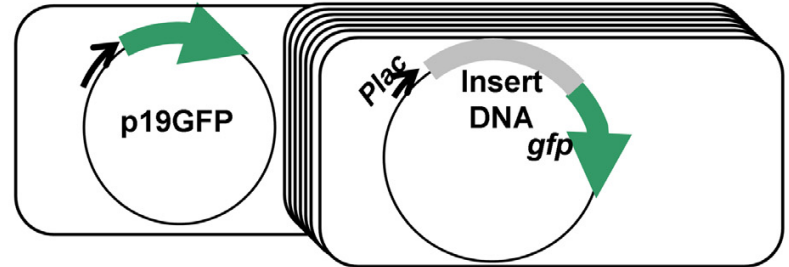
- Studium celých společenstev – metagenomy
 - Metagenomické knihovny – izolace DNA z určitého biotopu – cos knihovny (COSMO)
 - druhové složení společenstva - charakterizace na základě 16S RNA
 - vyhledávání určitých genů, enzymových aktivit
 - vyhledávání u nekultivovatelných bakterií
 - Srovnávání dvou metagenomických knihoven
 - porovnání dvou různých biotopů,
 - microarrays, subtraktivní hybridizace

Princip SIGEX

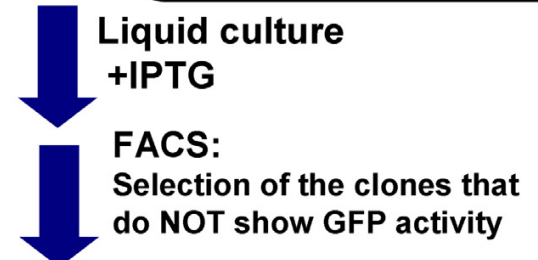
□ termed
substrate-induced
gene-expression
Screening

PubMed Central
Microbial Cell Factories
2005, 4:8 doi

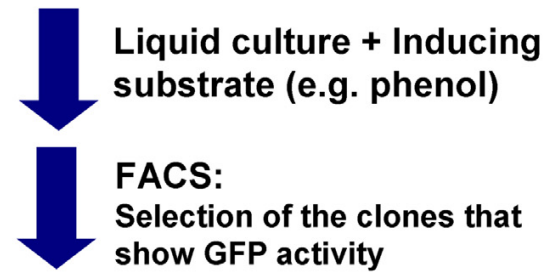
Step 1. Construction of metagenomic libraries using p18GFP in liquid culture.



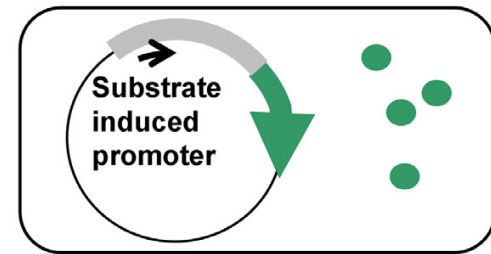
Step 2. Removal of Self-ligated clones and the clones with constitutive expression of GFP.



Step 3. Selection of the clones with expression of GFP in the presence of the inducing substrate.



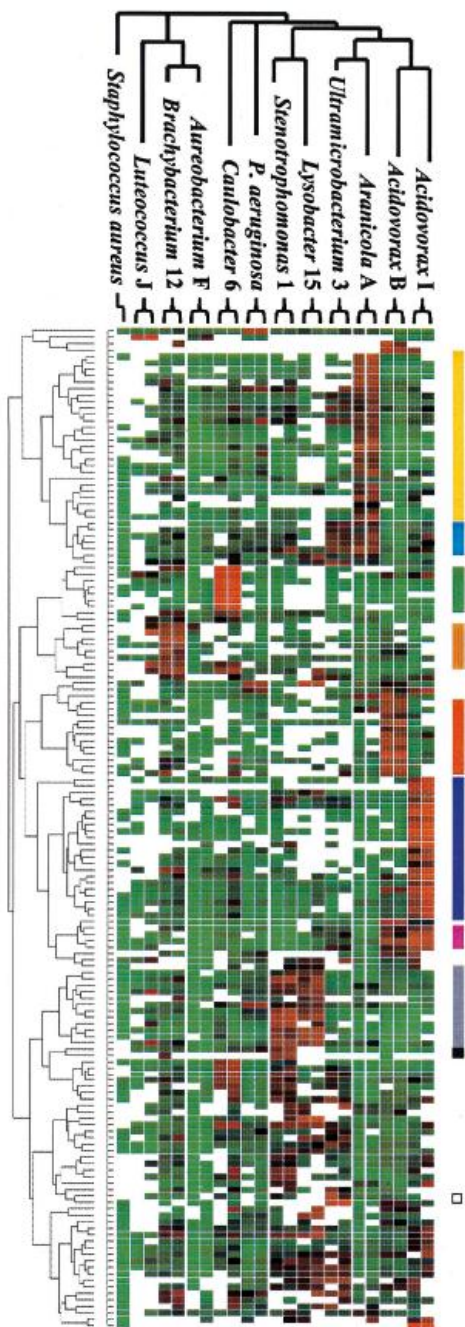
Step 4. Isolation of the sorted clones on agar plates and further characterization.



Positive clones:
GFP is expressed in the presence of the inducing substrate.

Comparison of the screening methods for metagenomic libraries

	<i>Function-based screening</i>	<i>Sequence-based screening</i>	<i>SIGEX</i> <i>substrate-induced gene-expression screening</i>
Screening principle	Detecting changes by enzymatic reactions (e.g. halo formation around the colonies)	PCR or Southern hybridization based on the DNA sequence consensus	Trapping the operon induced by a substrate and sorting using FACS (fluorescence activated cell sorting)
Advantages	Secures a complete form of gene or gene cluster required for desired traits Potentially obtains completely novel genes.	Overcomes the limitations of the heterologous expression	Fast and economical Any substrates that can be introduced into cytoplasm can be used in its native forms.
Disadvantages	Must satisfy the expression conditions (transcription, translation, folding, secretion) in heterologous hosts	Requires a database and analyses of the DNA sequence consensus. Does not guarantee the acquisition of complete forms of genes or gene clusters.	Sensitive to the orientation of the genes with desired traits Cannot use substrates that do not migrate to cytoplasm Sensitive to the initial FACS setting
Examples	antibiotics, genes involved antibiotic resistance agarases , amidases, amylases, esterase/lipases, xylanases, hydroxybutyrate dehydrogenase, alcohol oxidoreductases, pectate lyases	amylases, polyketide synthases	Benzoate-degradative or catechol degradative operon, P450 enzyme



Strain specific clones

- *Acidovorax* B
- *Acidovorax* I
- *Caulobacter* 6
- *Aranicola* A
- *Brachybaceterium* 12
- *Stenotrophomonas* 1
- Ultramicrobacterium* 3

Conserved clones

- *Acidovorax* (genus specific)
- *Stenotrophomonas* and *Ultramicrobacterium*
- *Aranicola* and *Ultramicrobacterium*

FIG. 3. Classification of clones based on hybridization of COSMO with individual genomes. Twelve different strains were analyzed with COSMO in duplicate. Experiments were sorted horizontally according to the phylogenetic relationships of the test strains. Clones were clustered (by rows) according to the correlation coefficients of the microarray data across 23 experiments. *S. aureus* was included to show that cross-hybridization between very distant relatives may not be significant, but one replicate was removed in order to minimize its effect on clustering. Based on the clustered data, distinct classes of clones are apparent. The colored bars on the right indicate the clones with reproducible hybridization patterns specific for one test strain (strain-specific clones) and clones that hybridized to multiple related species (conserved clones).

Hybridizace metagenomické knihovny (COSMO) s celkovými genomy jednotlivých izolovaných druhů

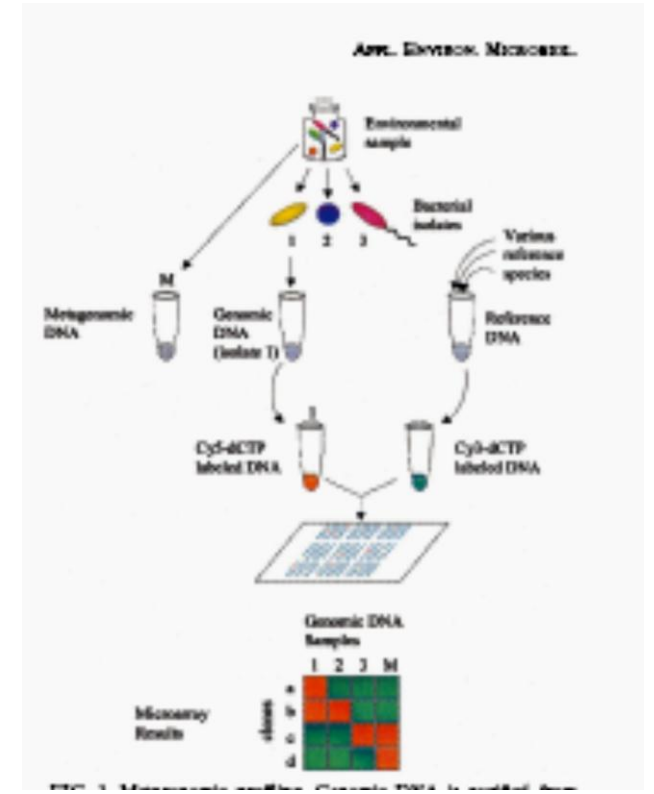


FIG. 1. Metagenomic analysis. Genomic DNA is used to...

Schéma klasterů pro degradaci organohalogenátů.

- ferredoxin; B, small subunit of oxygenase (ISPb); x large subunit of oxygenase (ISPa); R, ferredoxin-reductase;

V. Jencova et al. / Research in Microbiology 159 (2008) 118–127

