



Plant Cell Biology

Department of Experimental Biology, MU

GENOMIKA (GENOMICS)

▶ Zásadní pro buněčnou a molekulární biologii

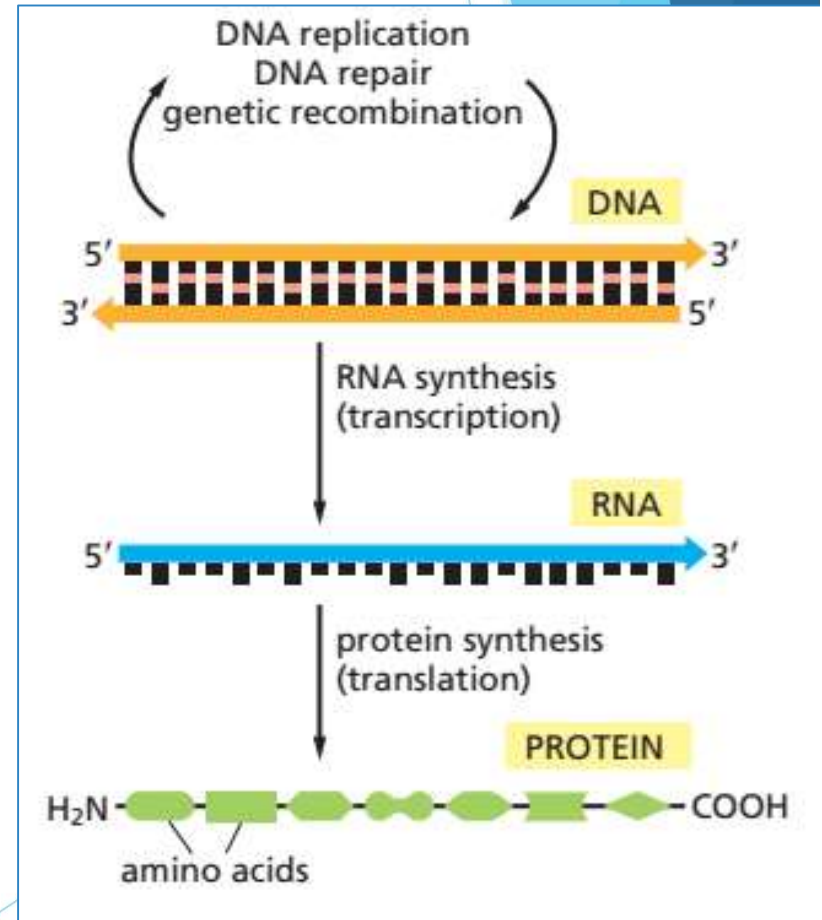
▶ Analýza a manipulace s DNA:

- ▶ DNA amplifikace (pomocí PCR)
- ▶ Štěpení DNA (na specifických místech restrikními nukleázami)
- ▶ Ligace DNA
- ▶ Klonování DNA
- ▶ Syntéza DNA
- ▶ Sekvenování DNA (nebo RNA)
- ▶ Hybridizace DNA (nebo RNA)

▶ **Transkriptomika**

▶ **Proteomika**

▶ **Další „omiky“**

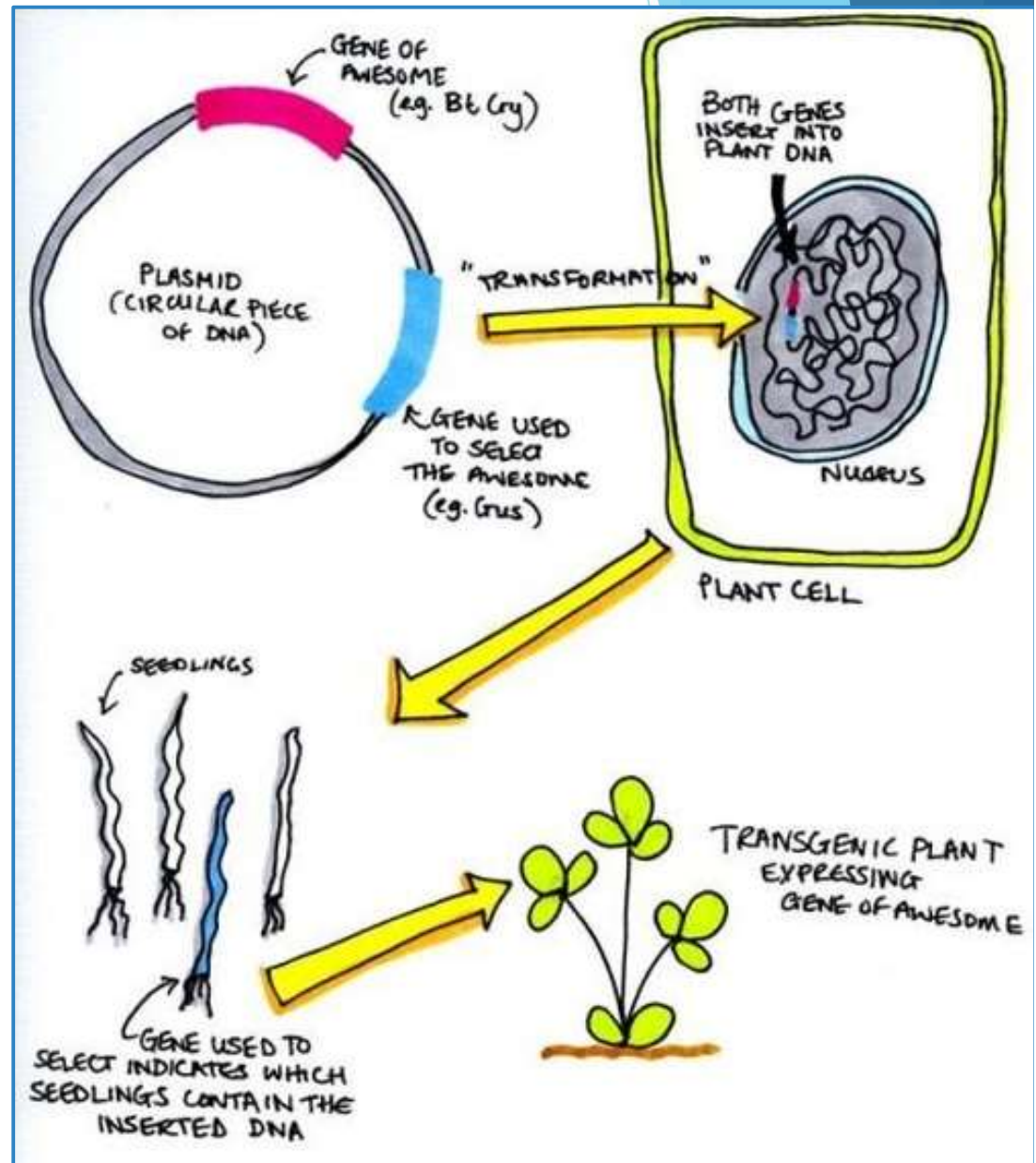




Jak vyrobit transgenní rostlinu?

Kroky při tvorbě transgenní/GMO rostliny

- ▶ 1. Výběr genu (např. z databáze)
- ▶ 2. Navržení klonovací strategie a primerů (= oligos)
- ▶ 3. PCR a klonování genu do plazmidu (= vektoru)
- ▶ 4. Transformace *E. coli* a replikace plazmidu
- ▶ 5. Izolace plazmidu
- ▶ 6. Sekvenování genu (DNA)
- ▶ 7. (Re-klonování do binárního vektoru pro transformaci rostlin)
- ▶ 8. Transformace *Agrobacterium*
- ▶ 9. Transformace rostlin
 - ▶ *Arabidopsis* - "floral dip"
 - ▶ Tabák, rýže - techniky tkáňových kultur
 - ▶ Transientní exprese
- ▶ 10. Selektce transformantů





Proč vyrobit transgenní rostlinu?

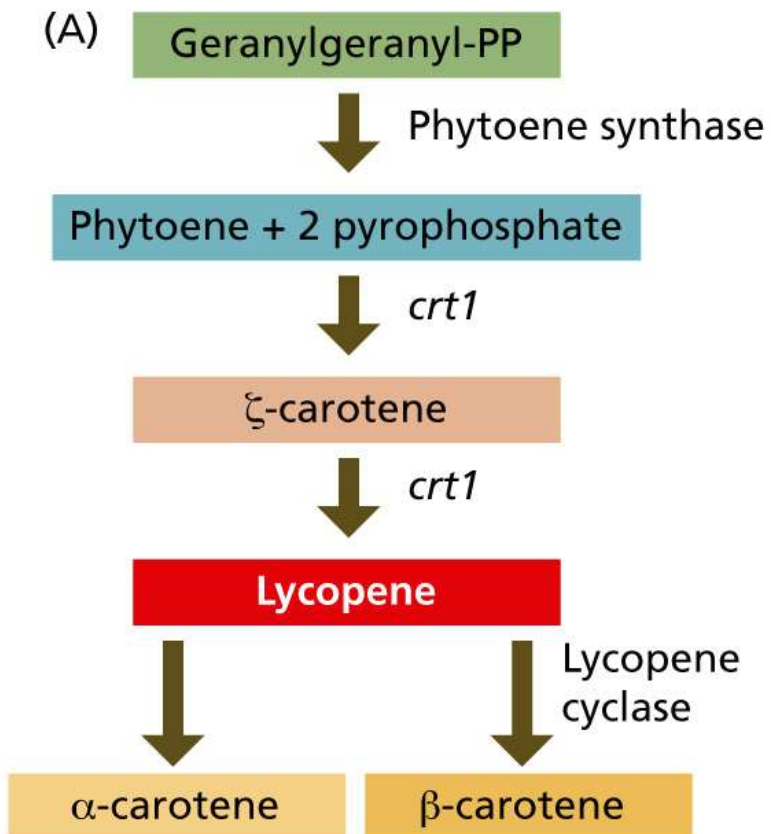
Proč vyrobit transgenní rostlinu nebo *GMO*?

- ▶ Pro studium exprese a funkce genu
 - ▶ Kdy a kde je gen exprimován?
 - ▶ Role promotoru a reportérových genů
 - ▶ Co se stane, když zvýšíme expresi genu?
 - ▶ Chemicky regulovatelné transkripční aktivační systémy
 - ▶ Co se stane, když snížíme expresi genu nebo jej vyřadíme z funkce?
 - ▶ amiRNA, CRISPR/Cas9
- ▶ Pro zlepšení vlastností rostlin
 - ▶ Klasické šlechtění a domestikace divoké trávy *teosinte* (vlevo) vedly po stovky let k plodině *Zea mays* (kukuřice, vpravo).



„Zlatá rýže“ byla vyrobena vložením 2 cizích genů zapojených do syntézy β -karotenu

Golden Rice



(B)



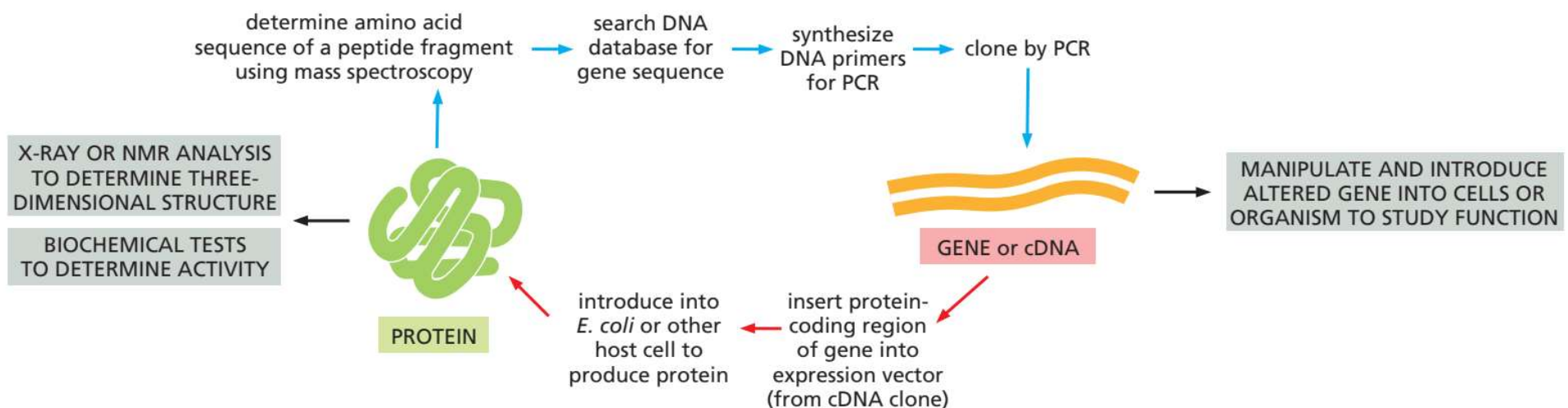
- ▶ **Golden Rice** je nutričním zdrojem pro-vitaminu A, který zlepšuje imunitní odpověď člověka na běžná onemocnění a významně snižuje dětskou slepotu, jejíž hlavní příčinou je nedostatek vitamínu A.
- ▶ *Byla získána již před 20 lety, ale stále je zakázána.....*

Studium genové exprese a funkce

- ▶ **Klasická genetika** začíná mutantem, tedy narušením buněčného procesu **náhodnou mutagenezí**.
 - ▶ Genetické skříninky identifikovaly mutanty se specifickými abnormalitami.
 - ▶ Byly vytvořeny komplexní knihovny mutantů v různých modelových organismech, včetně *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* a dokonce i myši.
- ▶ **Reverzní genetika** začíná známým genem a určuje, které buněčné procesy vyžadují jeho funkci.
 - ▶ Tento přístup obrací tradiční směr genetického objevování - postupuje od genů k mutacím, tedy reverzní genetikou.
- ▶ Genom organismu je záměrně pozměněn specifickým způsobem, tento přístup se také nazývá **genomové inženýrství nebo editace genomu**.
 - ▶ Zisk funkce (gain of function)
 - ▶ Ztráta funkce (loss of function), např. amiRNA, CRISPR/Cas9
- ▶ **Technologie rekombinantní DNA**
- ▶ Schopnost přesně manipulovat s DNA ve zkušence nebo v organismu
 - ▶ Geneticky modifikovaný organismus (GMO): bakterie, houby, rostlina, živočich
- ▶ Techniky rekombinantní DNA umožňují experimentální přechod z genu na protein a z proteinu na gen...

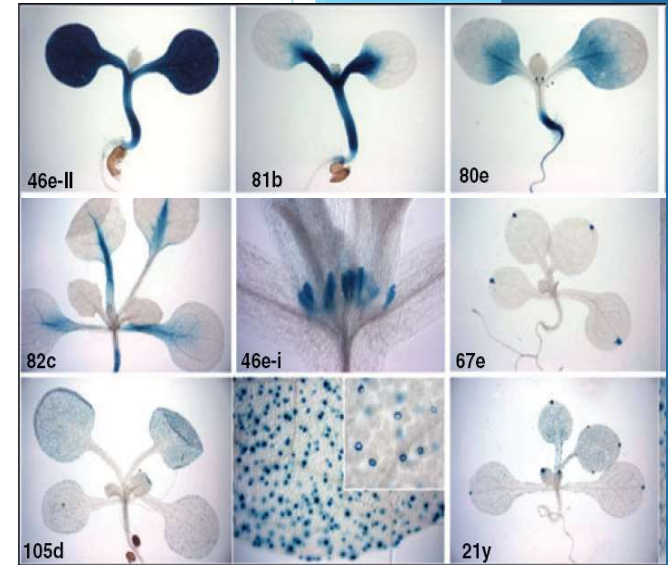
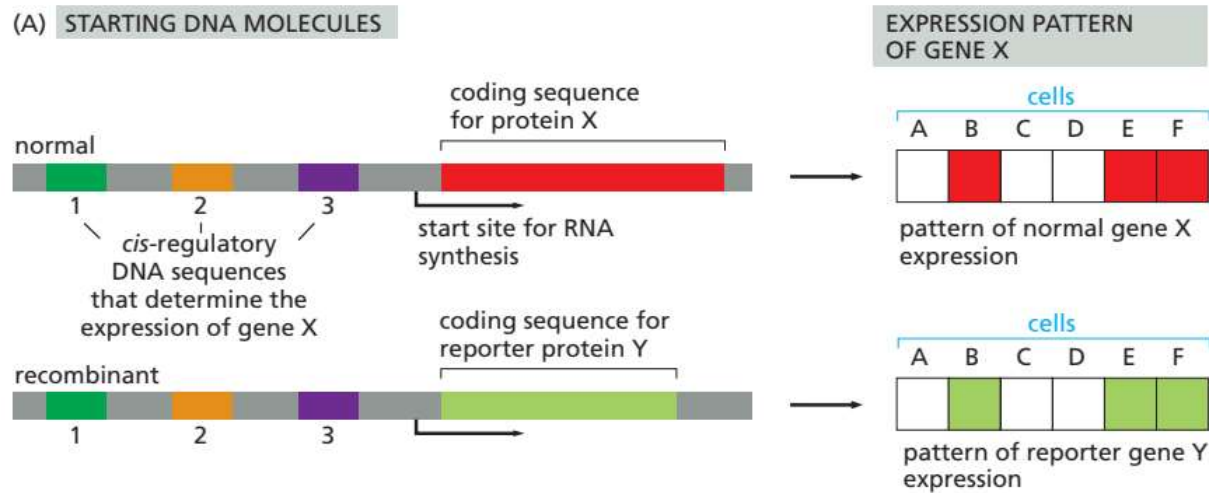
Studium genové exprese a funkce

- ▶ **Klasická genetika** začíná mutantem, tedy narušením buněčného procesu **náhodnou mutagenézí**.
 - ▶ Genetické skríninky identifikovaly mutanty se specifickými abnormalitami.
 - ▶ Byly vytvořeny komplexní knihovny mutantů v různých modelových organismech, včetně *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* a dokonce i myši.
- ▶ **Reverzní genetika** začíná známým genem a určuje, které buněčné procesy vyžadují jeho funkci.
 - ▶ Tento přístup obrací tradiční směr genetického objevování - postupuje od genů k mutacím, tedy reverzní genetice.
- ▶ Genom organismu je záměrně pozměněn specifickým způsobem, tento přístup se také nazývá **genomové inženýrství nebo editace genomu**.



Reportérové geny odhalují, KDY a KDE je gen exprimován a to je dáno promotorem

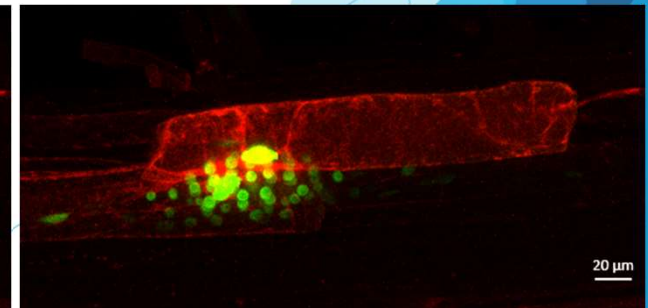
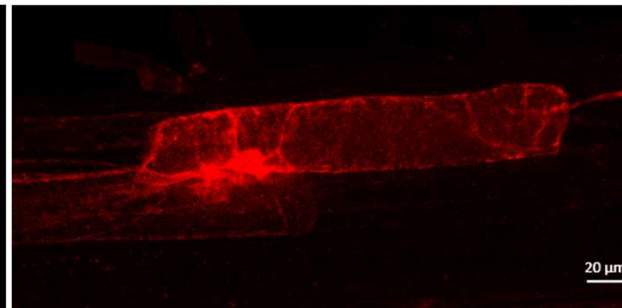
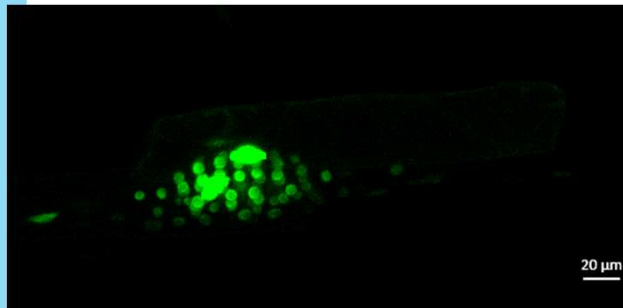
- ▶ Fluorescenční proteiny (např. GFP, RFP), GUS (β -glucuronidase, *uidA*)



▶ Transcripční vs translační fúze s FP

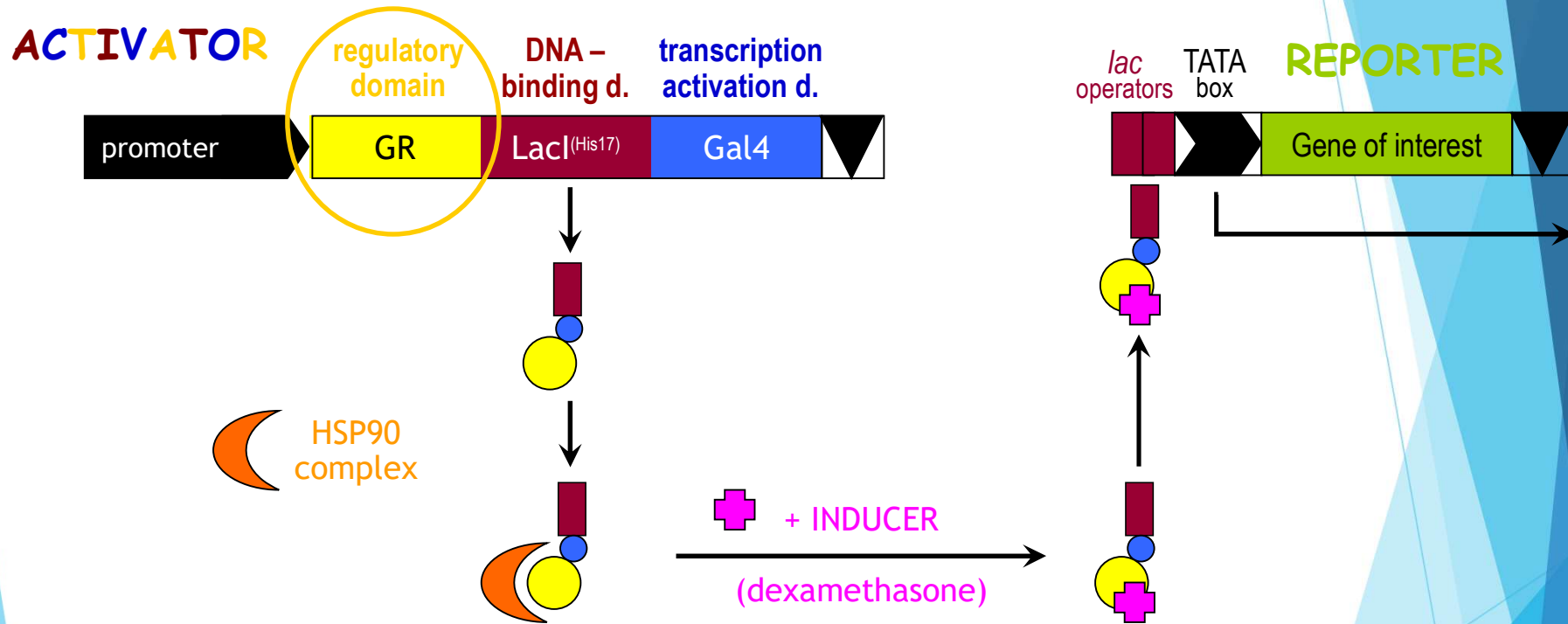
- ▶ Promotor + FP

Promotor + *GENE* + FP

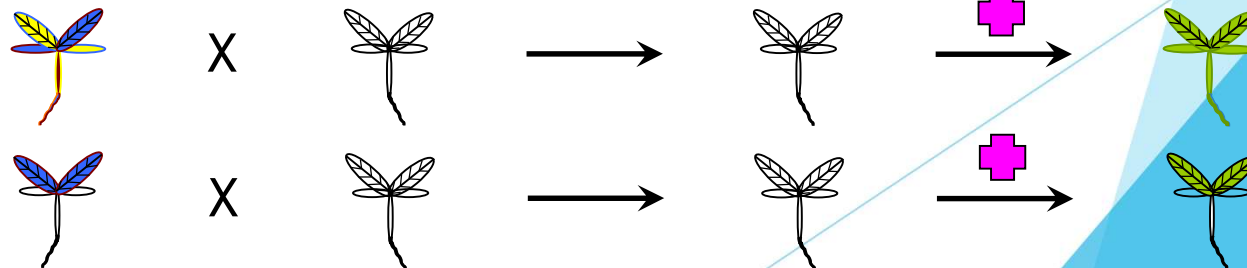


Chemicky indukovatelná genová exprese

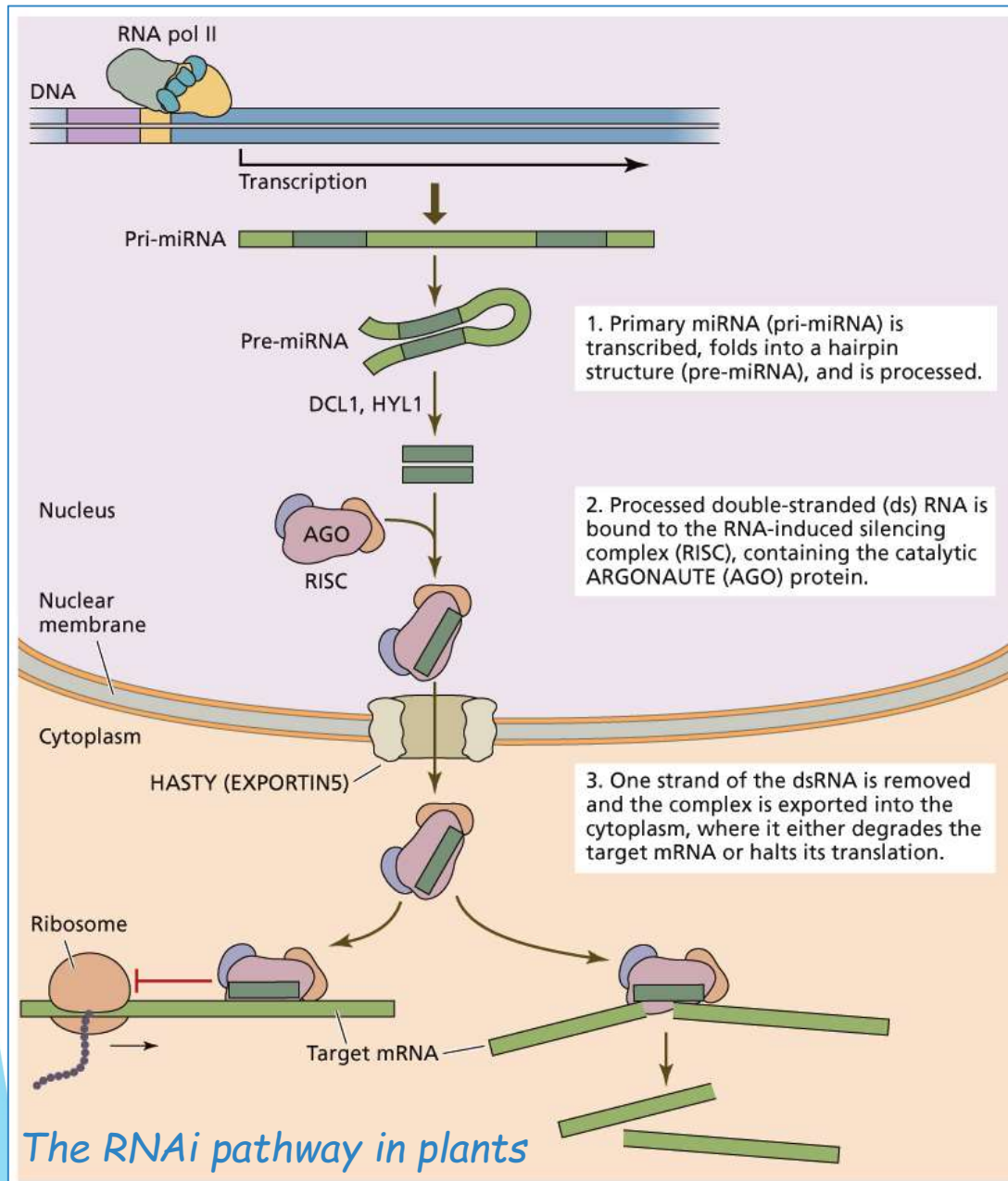
- ▶ Regulovaná genová exprese genu v určitém vývojovém stádiu a po určitou dobu, pomocí chemických induktorů, např. pOp6/LhGR systém



▶ Tkáňově specifické promotory aktivátoru!

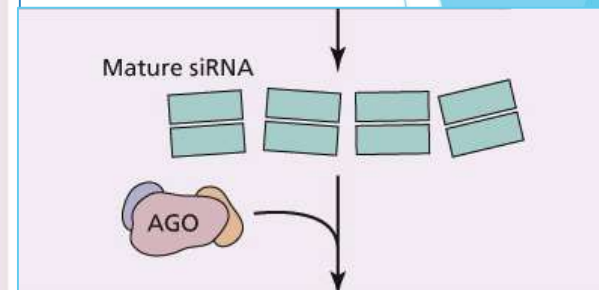


RNA interference (RNAi) se používá k umlčování genů



„knock-down“ mutanti

- ▶ **short interfering (siRNA) RNAs - exogenous ds RNA**

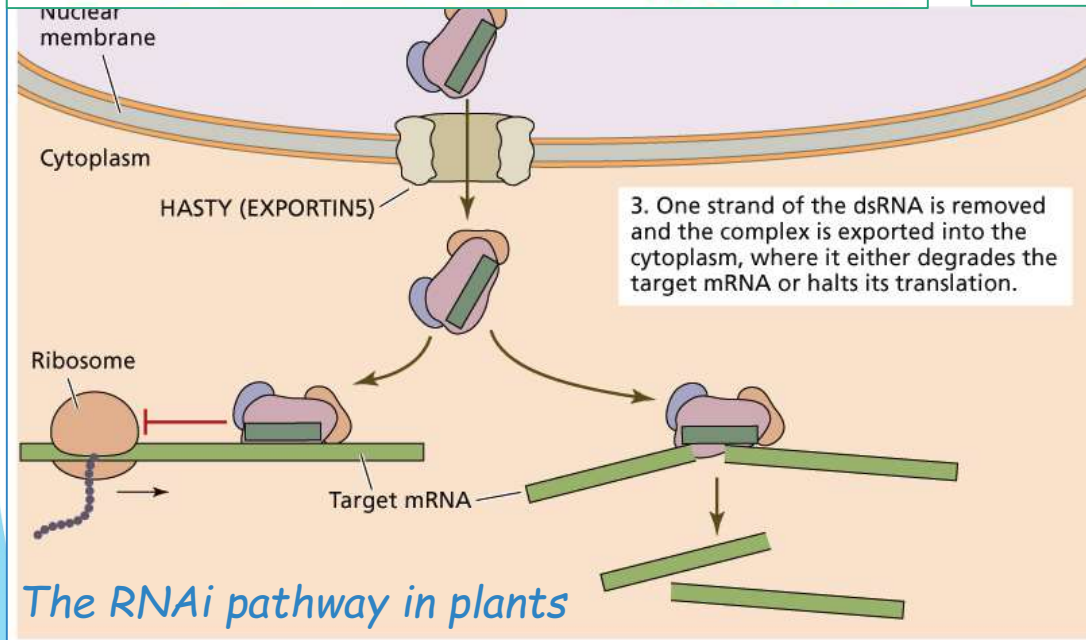
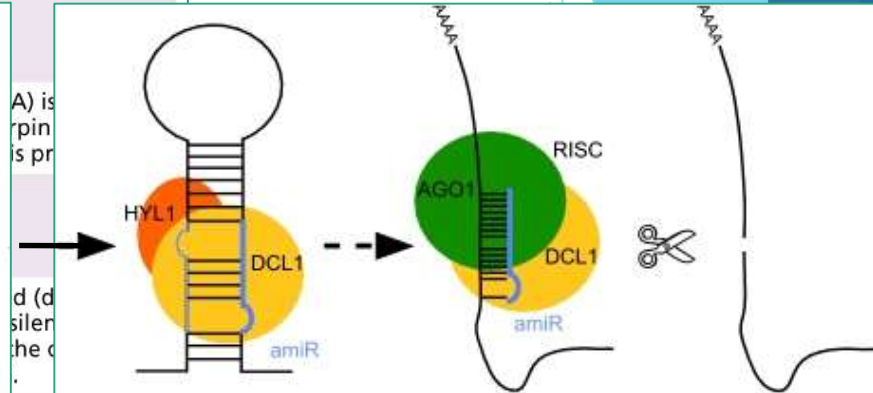
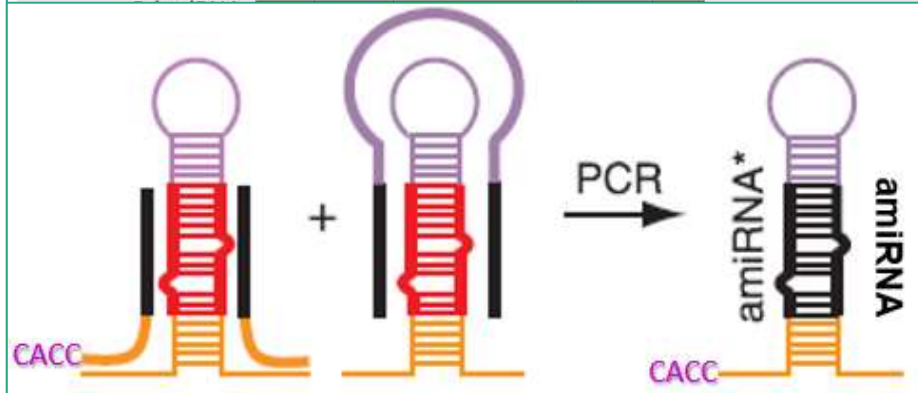
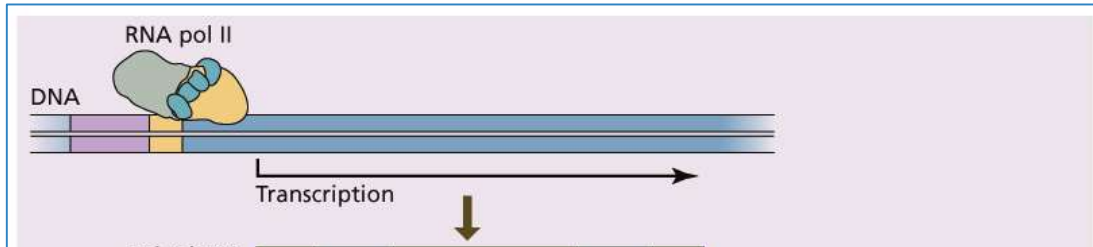


- ▶ **micro-RNA (miRNA) - single-stranded RNA**

- ▶ endogenní, z nekódující oblasti RNA
- ▶ blokuje translaci genu
- ▶ destabilizuje mRNA

- ▶ **artificial micro-RNA (amiRNA)**

RNA interference se používá k umlčování genů



„knock-down“ mutanti

- ▶ short interfering (siRNA) RNAs -

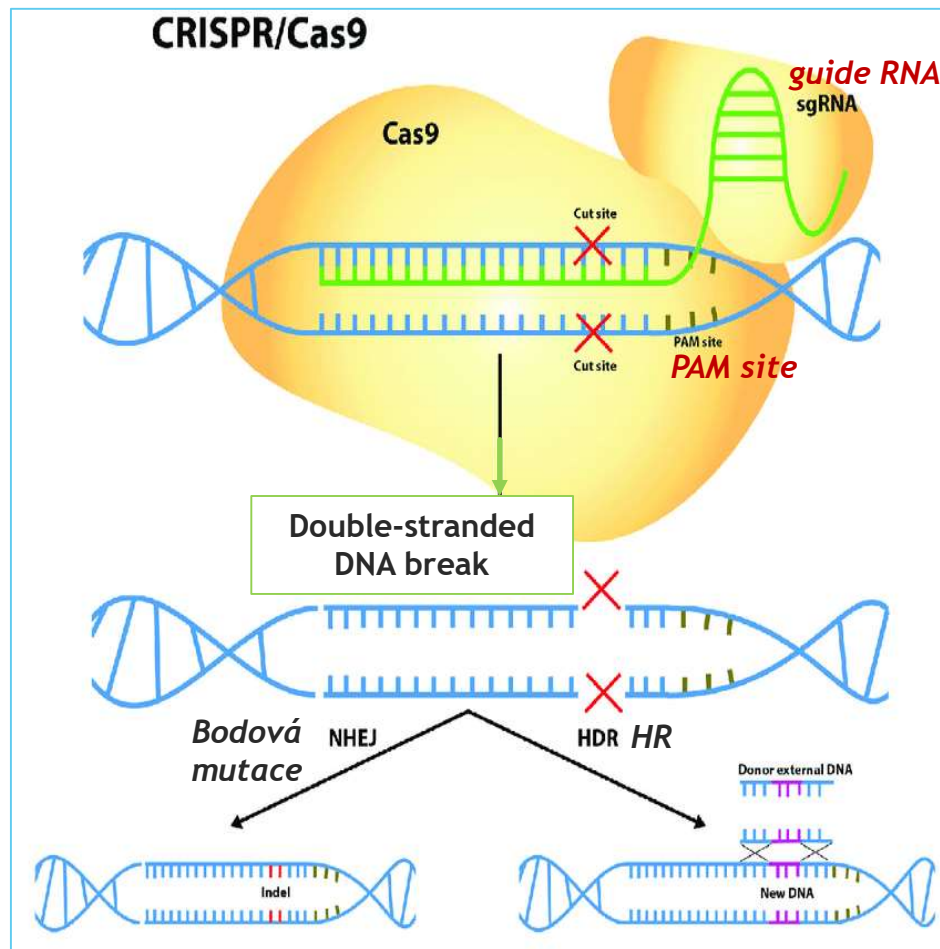
- ▶ micro-RNA (miRNA) - single-stranded RNA

- ▶ endogenní, z nekódující oblasti RNA
- ▶ blokuje translaci genu
- ▶ destabilizuje mRNA

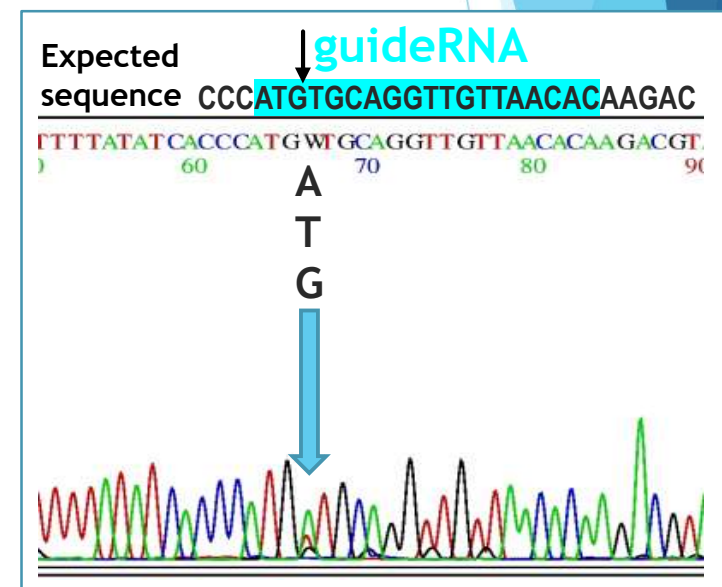
- ▶ artificial micro-RNA (amiRNA)

Bakteriální systém CRISPR/Cas9 byl přizpůsoben k editaci genomu různých druhů ~ *genetické nůžky*

- ▶ Schopnost Cas9 (nukleáza) zacílit specifické místo genomové DNA
 - ▶ 2020 Nobelova cena za chemii udělena E. Charpentier a J. Doudna



- ▶ Příklad použití CRISPR/Cas9
 - ▶ narušení ORF a vytvoření KO „knock-out“ mutantu

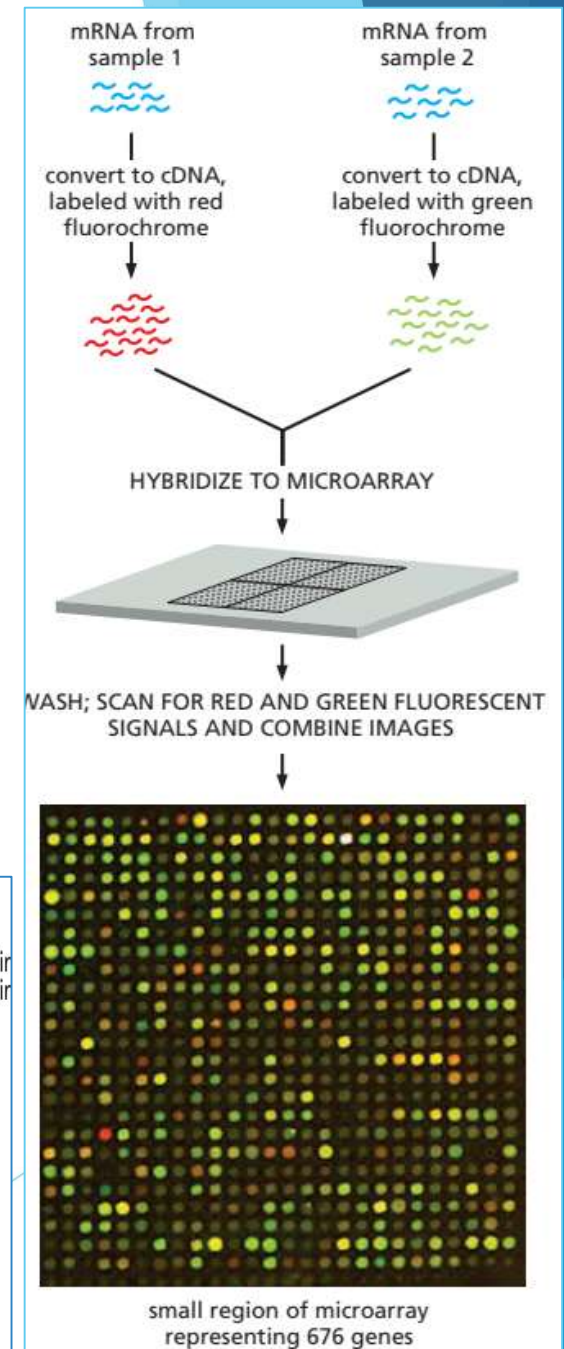
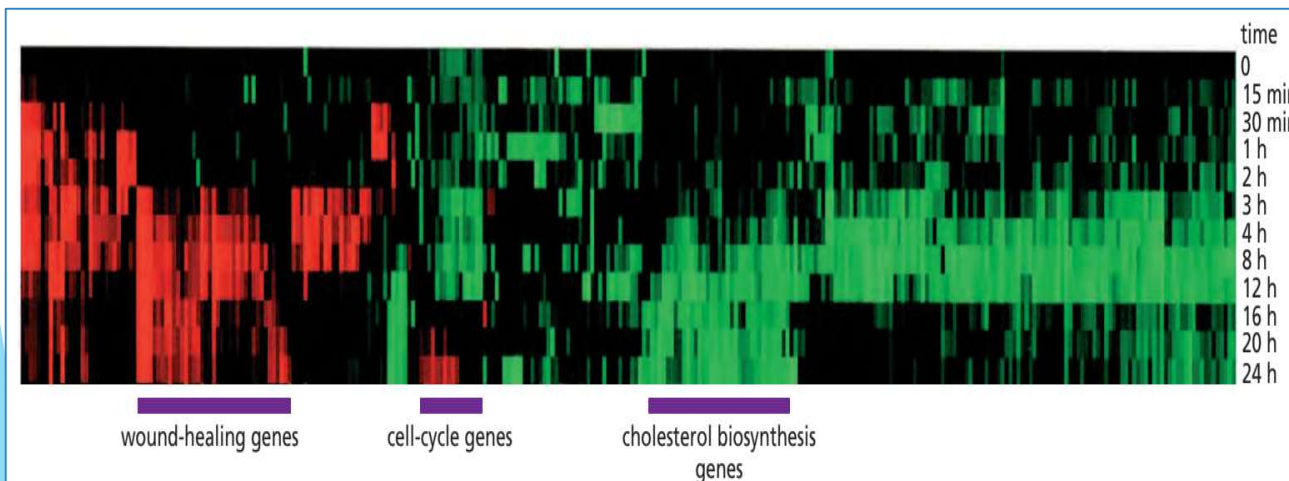


CRISPR:
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o&ab_channel=naturevideo

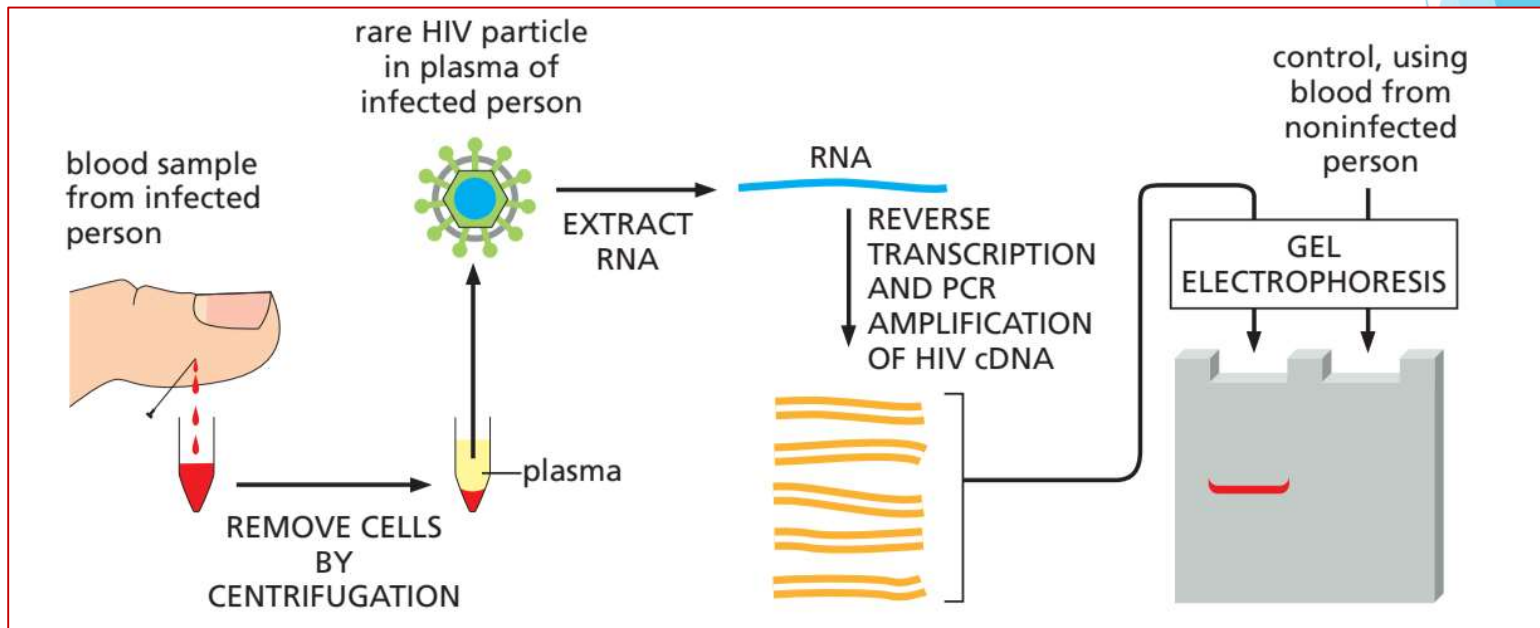
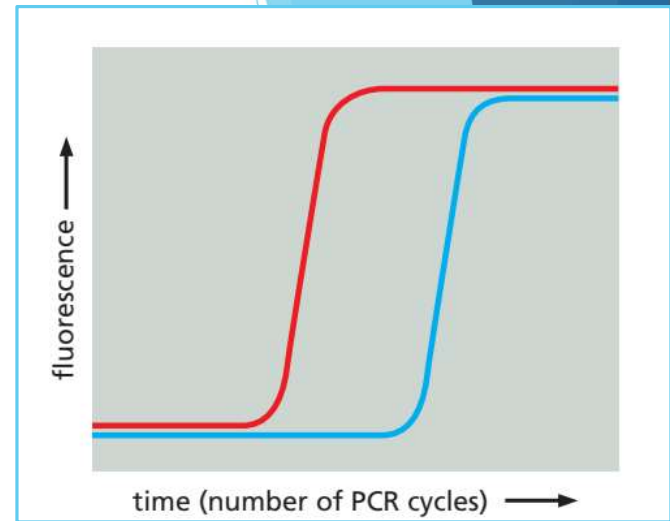
TRANSKRIPTOMIKA (TRANSCRIPTOMICS)

- ▶ Analýza mRNA pomocí:
 - ▶ microarrays,
 - ▶ kvantitativní RT-PCR
 - ▶ nebo RNA-sekvenování (RNAseq)
- ▶ poskytuje obraz genové exprese.
- ▶ DNA microarrays se používají k analýze produkce tisíců různých mRNA v jediném experimentu.
 - ▶ Použití *cluster analýzy* vede k identifikaci sad genů, které jsou koordinovaně regulovány.

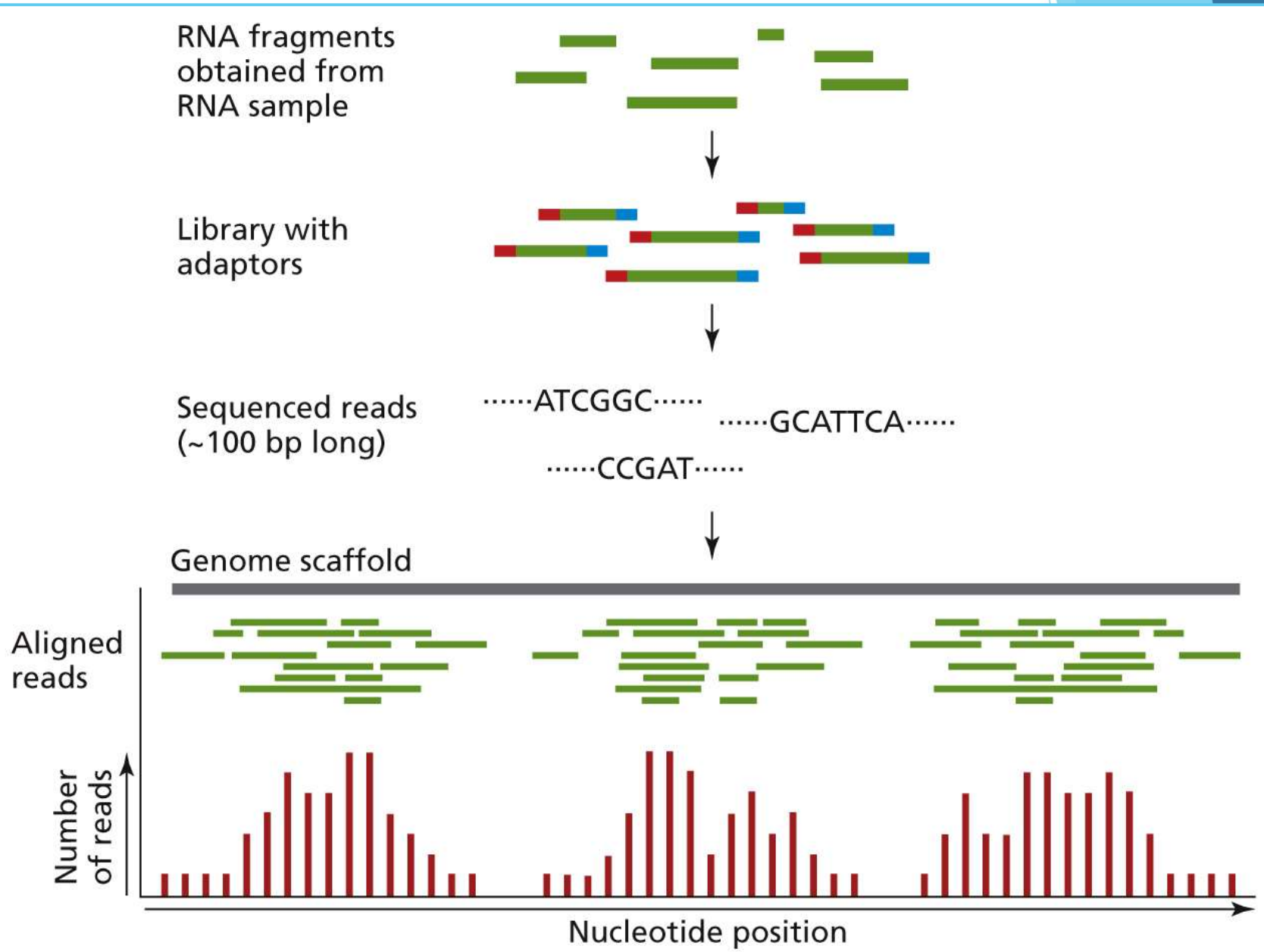


Kvantitativní *real-time* PCR (RT qPCR)

- ▶ Expresi jednotlivých genů lze měřit pomocí kvantitativní RT-PCR (real time-qPCR)
 - ▶ Měřená fluorescence je generována barvivem (např. SYBR Green I), které fluoreskuje pouze tehdy, je-li navázáno na dsDNA produkty qRT-PCR.
 - ▶ např. červený vzorek - vyšší koncentrace mRNA, vyžaduje méně cyklů PCR k dosažení maximální dsDNA
- ▶ RT-qPCR se používá v diagnostických aplikacích
 - ▶ např. COVID-19 PCR testování

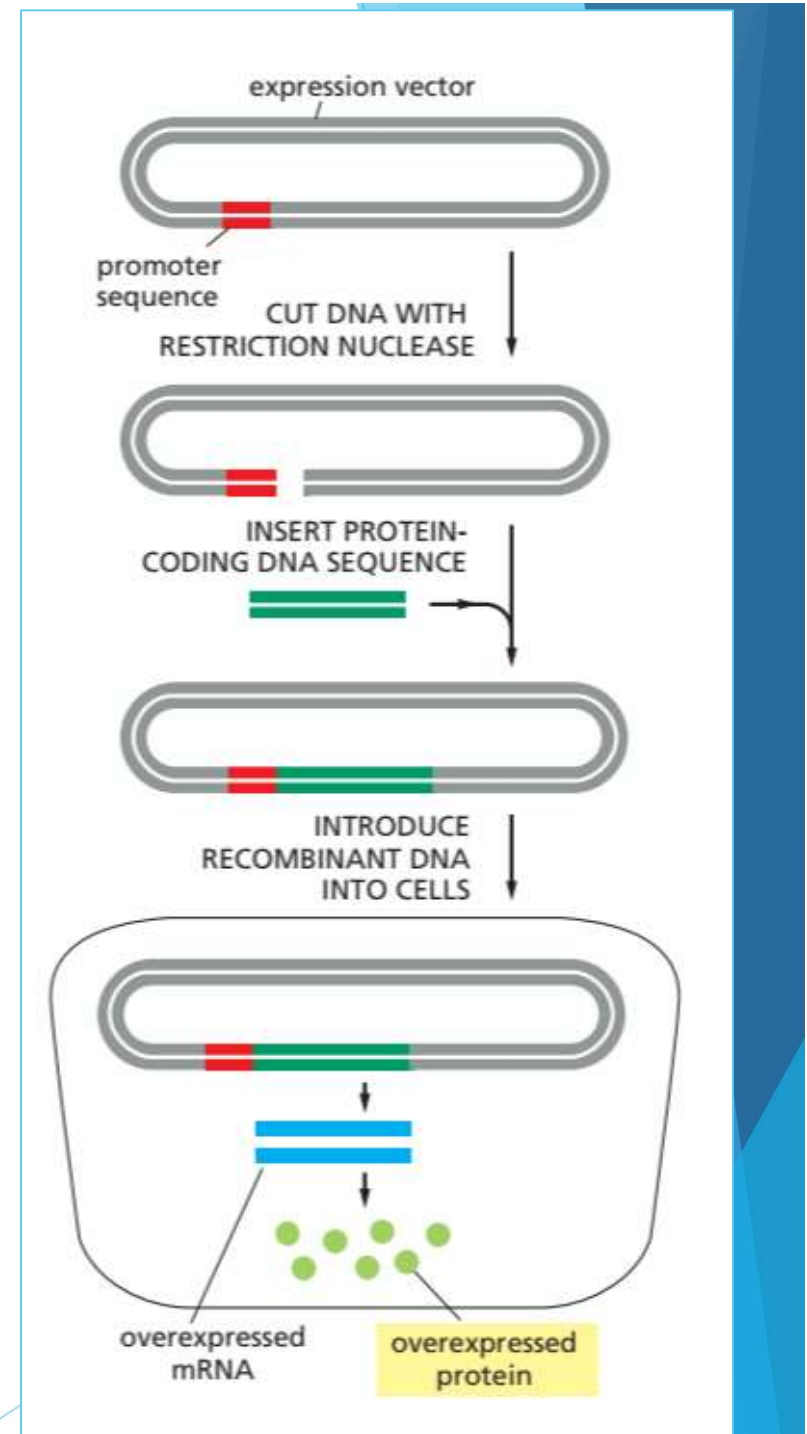


RNAseq analýza genové exprese



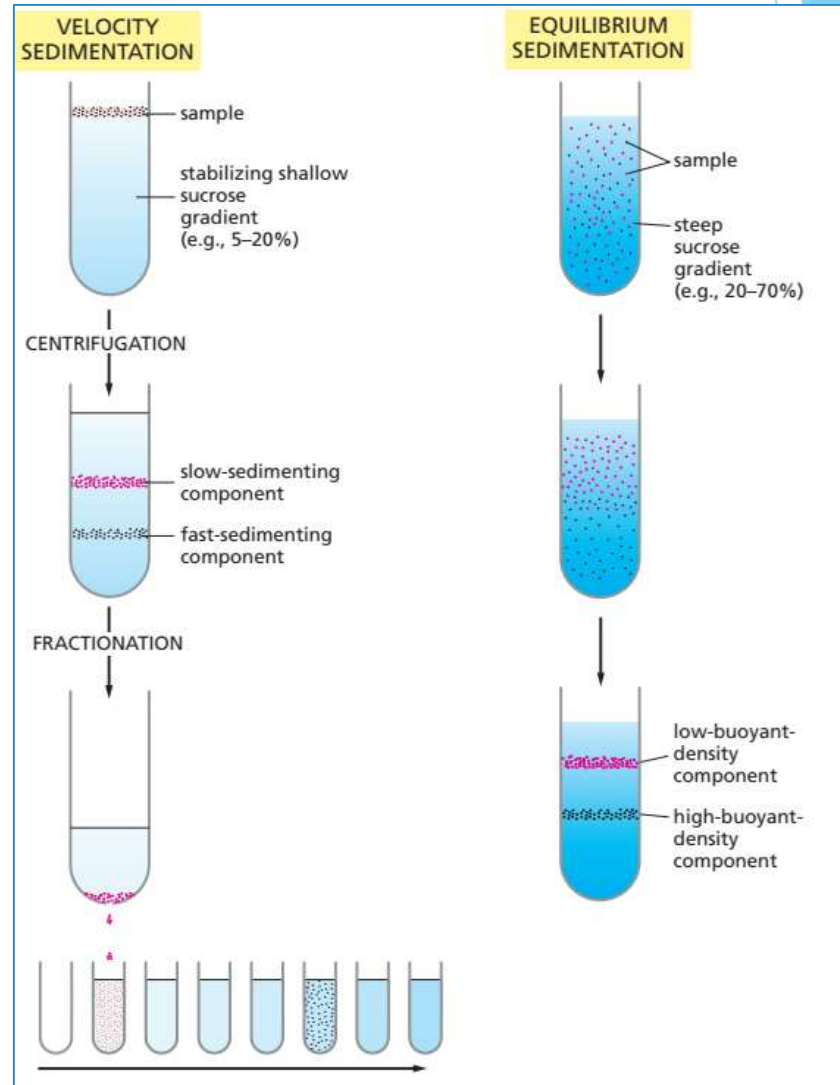
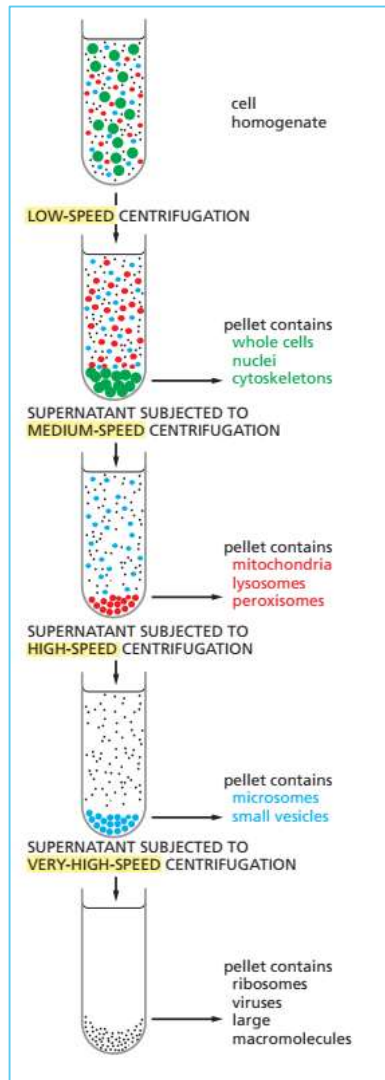
PROTEOMIKA (PROTEOMICS)

- ▶ *Klonování DNA umožňuje produkovat jakýkoliv protein ve velkém množství*
- ▶ DNA sekvence kódující protein jsou naklonovány do expresního vektoru a transformovány do buněk.
 - ▶ *E. coli* - např. produkce inzulínu
 - ▶ Kvasinkové buňky - např. etanol
 - ▶ Tabákové buňky BY2 - (*Bright Yellow 2*, nediferencované meristemické buňky) např. HIV protilátky
 - ▶ Savčí buňky - např. výroba vakcín



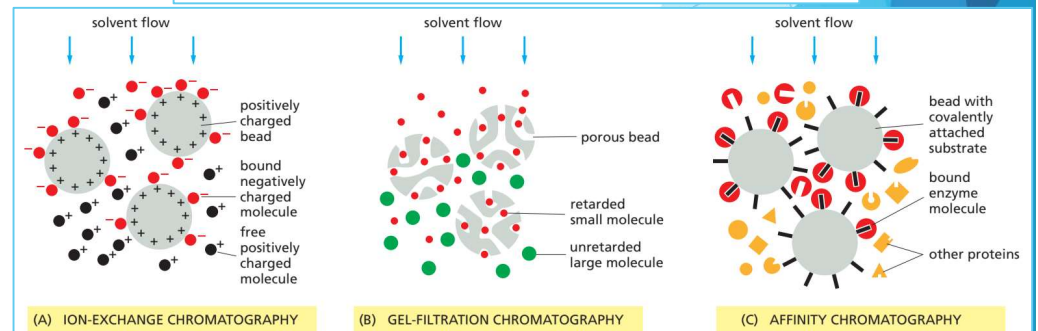
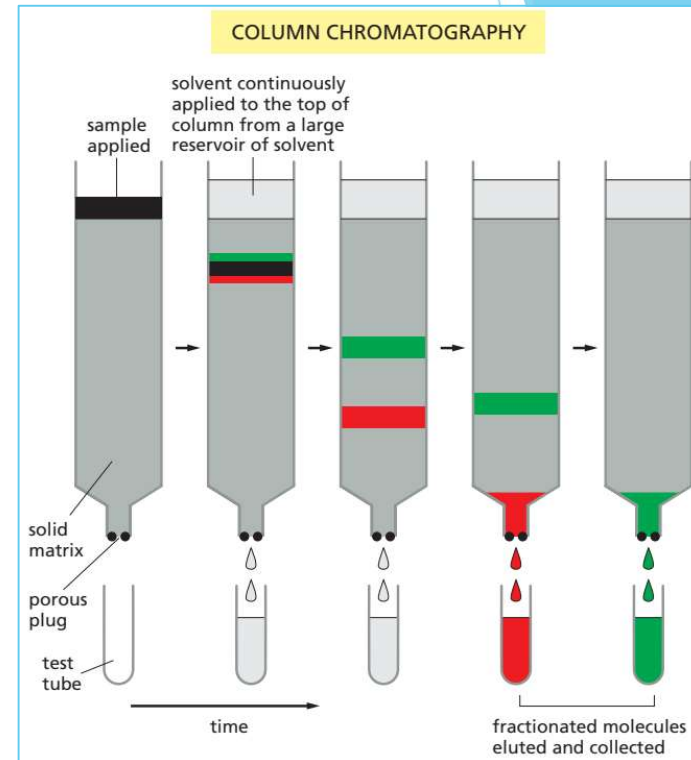
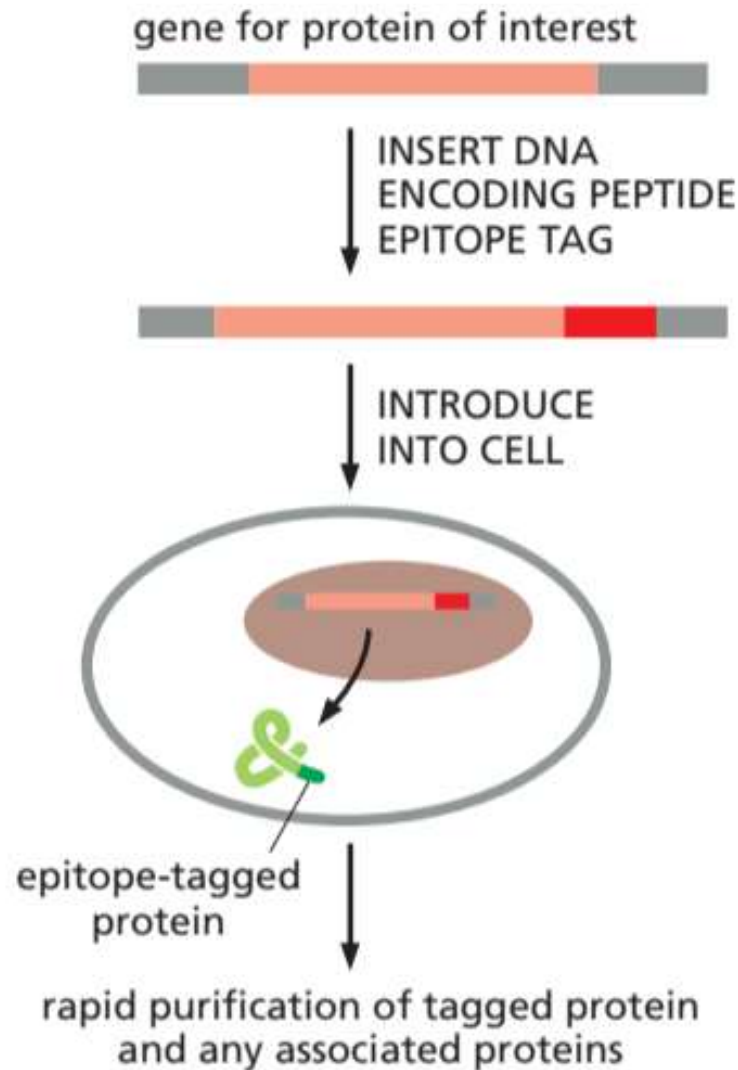
Purifikace proteinů

- ▶ Buňky mohou být rozděleny na jednotlivé frakce centrifugací.
- ▶ Buněčné extrakty poskytují systémy pro studium buněčných funkcí.



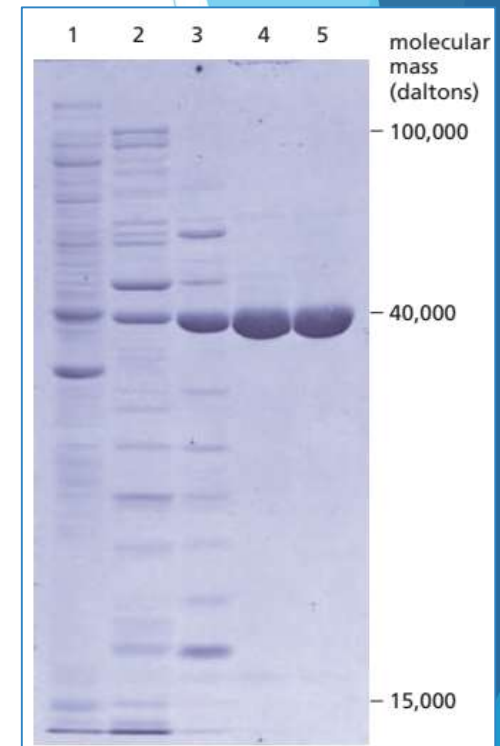
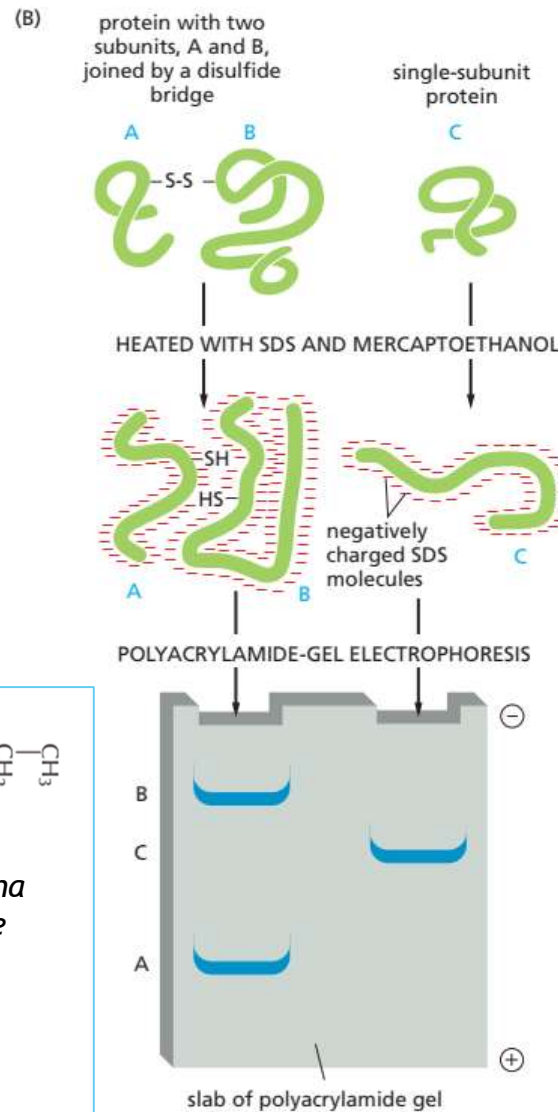
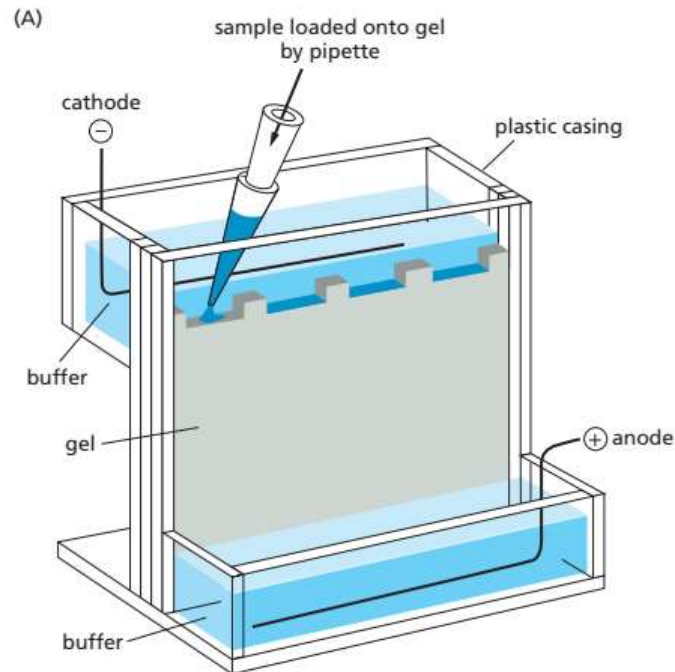
Proteiny jsou separovány chromatografií

- ▶ Purifikované bezbuněčné systémy umožňují přesnou analýzu molekulárních funkcí.
- ▶ Geneticky upravené značky (*tags*) poskytují snadný způsob pro čištění proteinů.



Proteiny jsou separovány podle velikosti

- Separace proteinů pomocí *SDS polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE)*

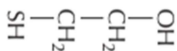


Coomassie blue dye (or silver or fluorescent dye)



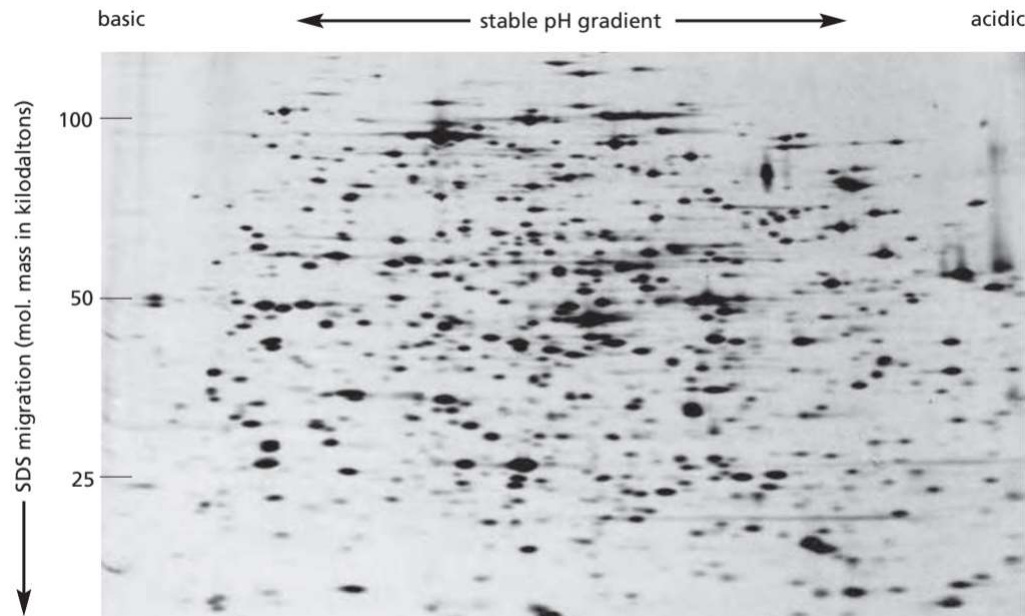
- Denaturaci proteinů a poskytnutím jim záporného náboje je možné je oddělit na základě jejich velikosti, během migrace směrem ke kladné elektrodě.

β-mercaptoethanol



Separace bílkovin na základě velikosti a pI

▶ Two-dimensional (2D) gel electrophoresis 2D-PAGE

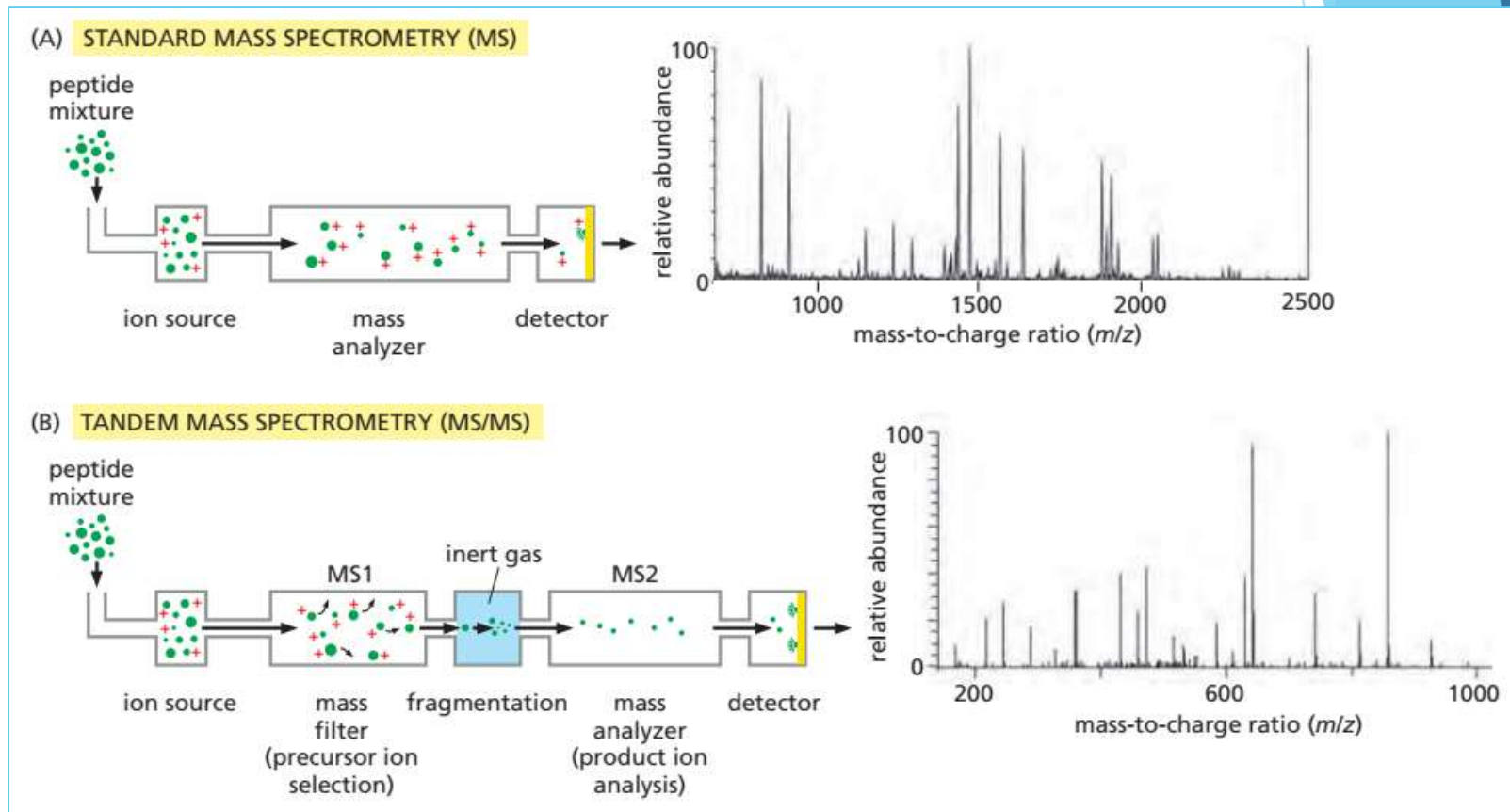


- ▶ **Poskytuje lepší separaci proteinů**
- ▶ **pI = isoelectric point**
- ▶ **Obrazovou analýzou se dá zjistit počet proteinů exprimovaných, např. v určitých pletivech.**

- ▶ ***Specifické proteiny lze detekovat pomocí protilátek (WESTERN BLOT analysis = immunoblotting)***

Mass Spectrometry (MS) je vysoce citlivá metoda pro identifikaci neznámých proteinů

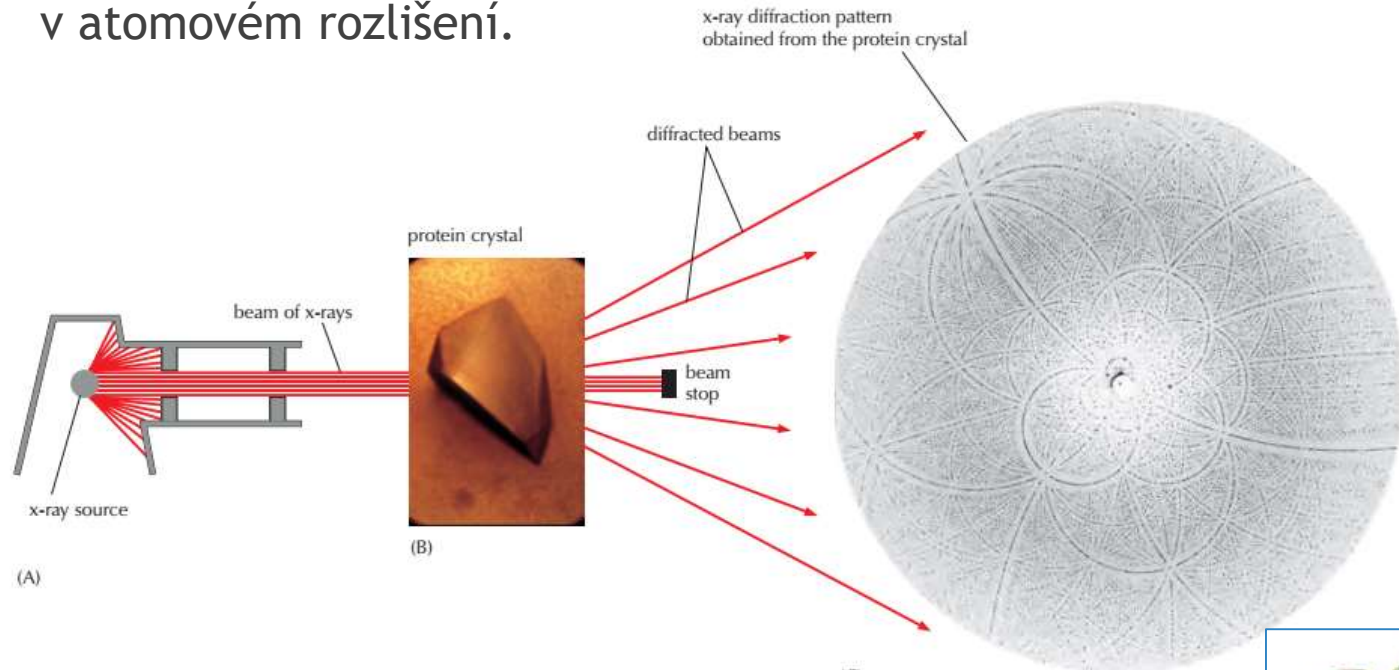
- ▶ Proteiny ve vzorku nejprve štěpeny na krátké peptidy proteázou, např. trypsinem.



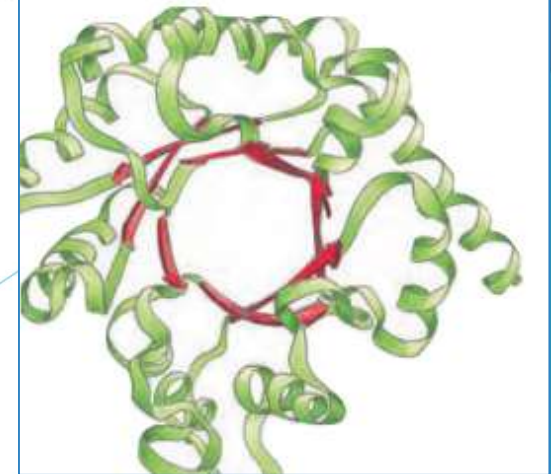
- ▶ Iontové zdroje závisí na technice *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI).
- ▶ MALDI je spojen s *time-of-flight* (TOF) analyzátozem, což je dlouhá komora, kterou jsou ionizované peptidy urychlovány elektrickým polem směrem k detektoru. Jejich hmotnost a náboj určují dobu, za kterou se dostanou k detektoru.

Struktura proteinu může být stanovena pomocí rentgenové krystalografie (x-ray crystallography)

- ▶ Hlavní technika používaná k objevování 3D struktury molekul v atomovém rozlišení.

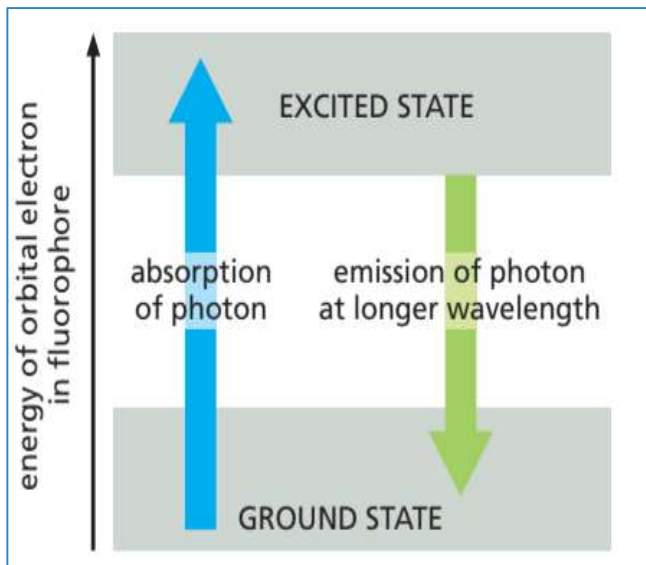


- ▶ **Nuclear magnetic resonance (NMR) spektroskopie**, lze použít ke stanovení struktury proteinu v roztoku, není potřeba krystalický vzorek.
 - ▶ Struktura proteinu a sekvence uložené v databázích poskytují vodítka o funkci proteinu.
 - ▶ BLAST - program pro zarovnání sekvencí.

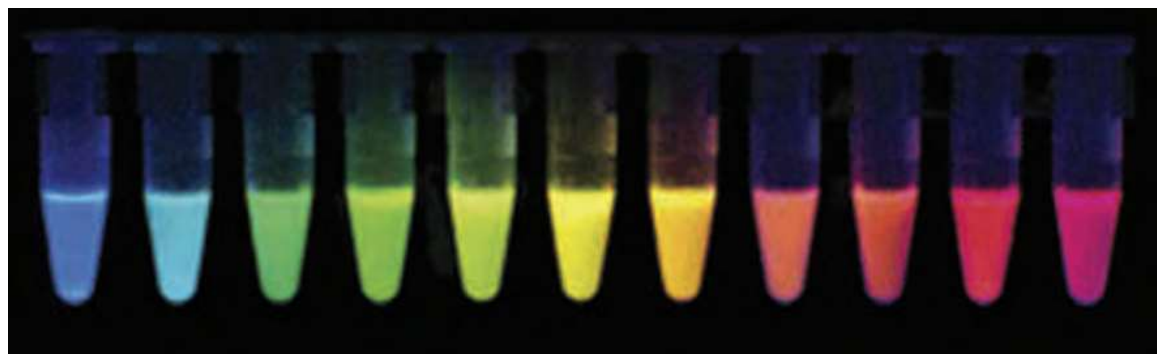
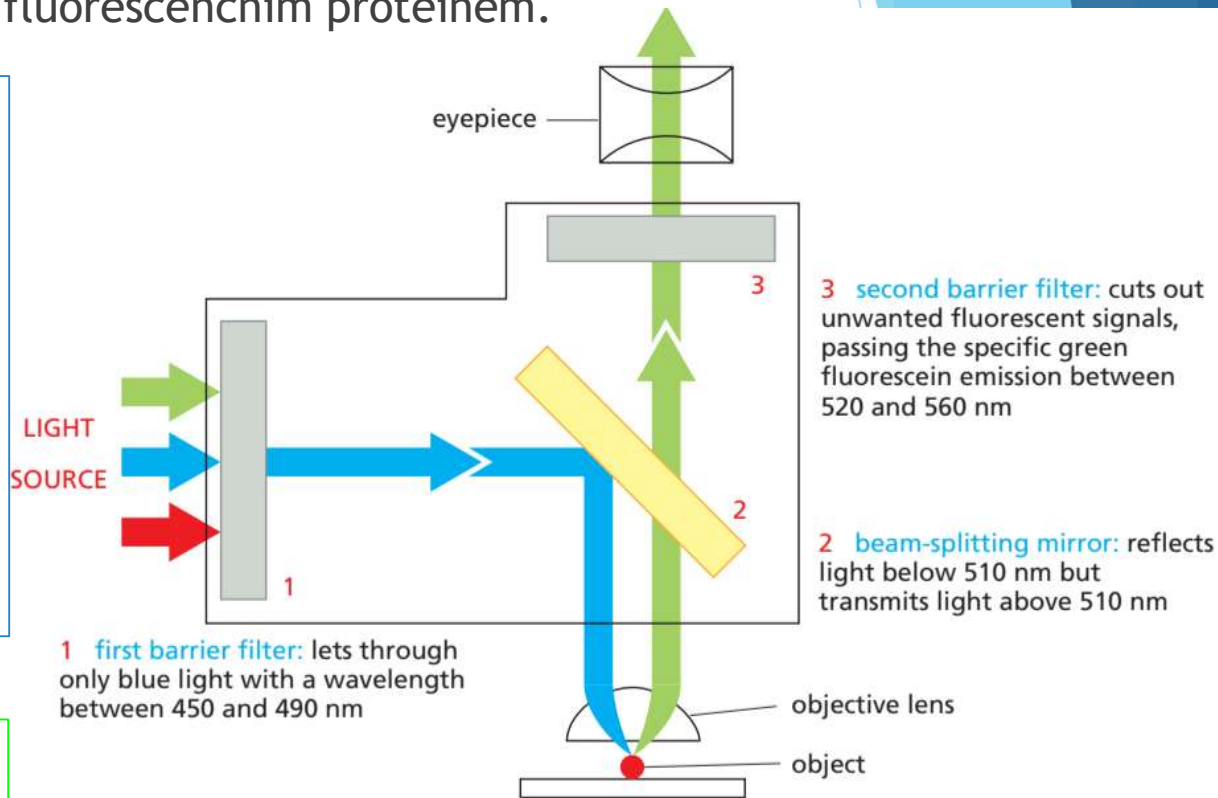
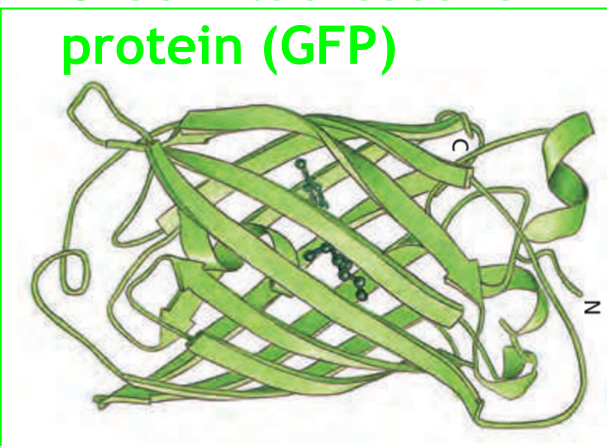


Fluorescenční mikroskopy a fluorescenční proteiny (FP)

- ▶ Proteiny mohou být fluorescenčně označeny v živých buňkách *geneticky kódovaným markerem* = fluorescenčním proteinem.



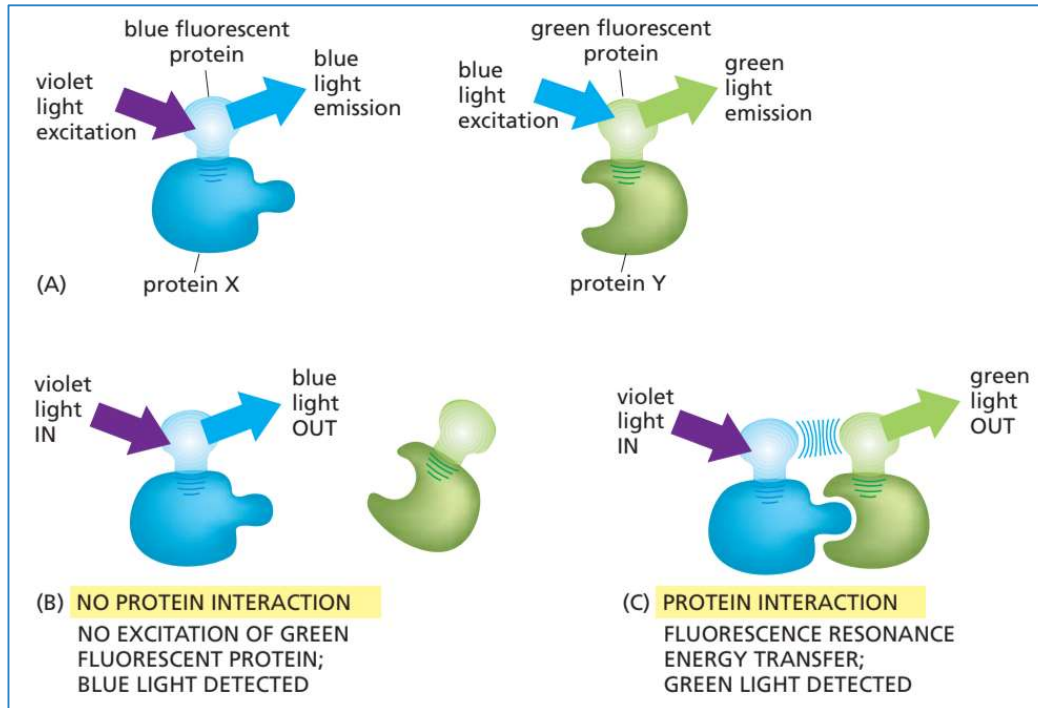
Green fluorescent protein (GFP)



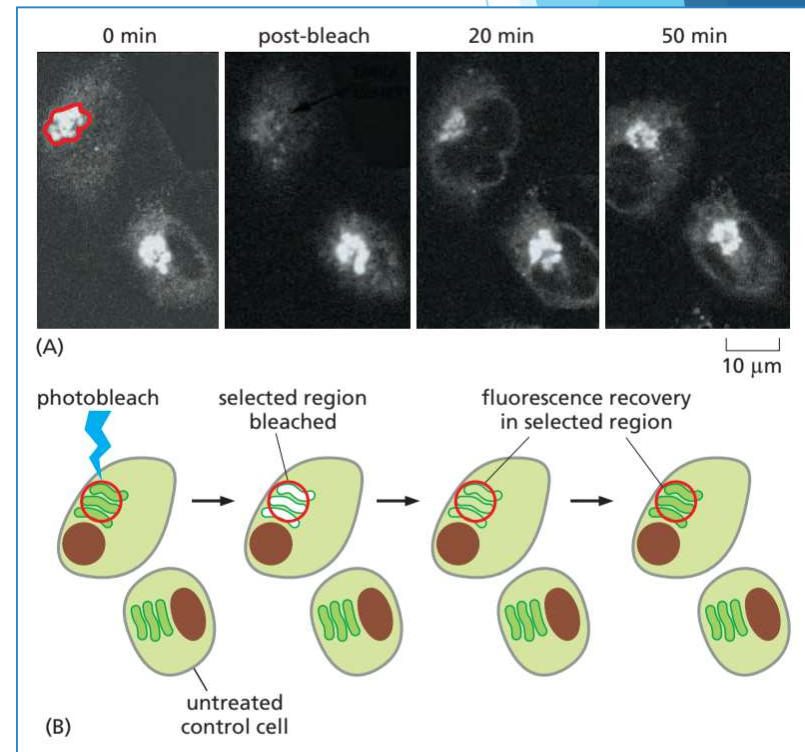
Dynamiku proteinů lze sledovat v živých buňkách!

► *Fluorescence (or Förster) resonance energy transfer (FRET) často kombinovaná s*

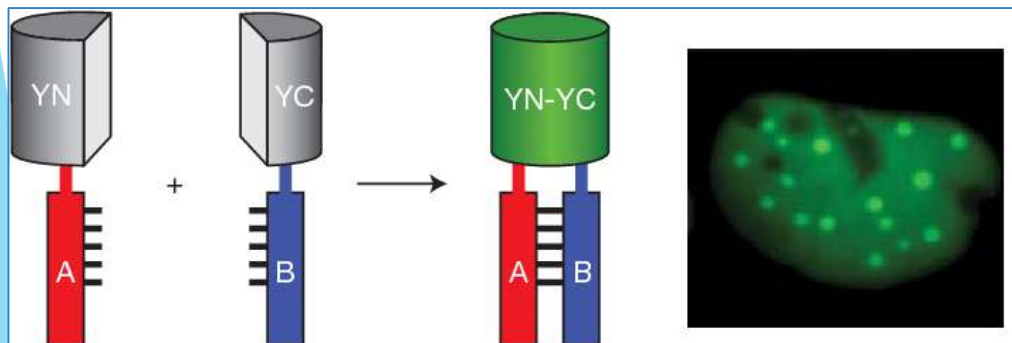
FLIM (fluorescent life-time imaging)



► *Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).*

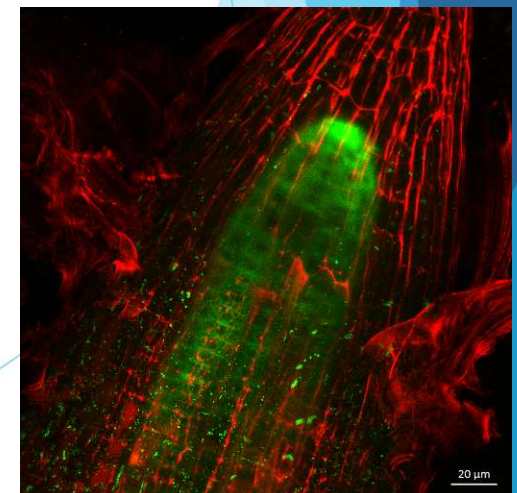
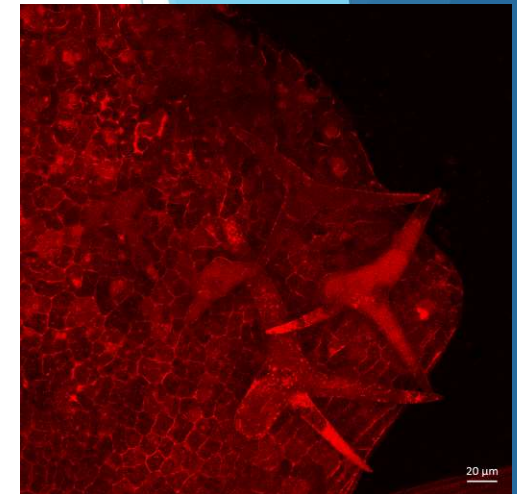
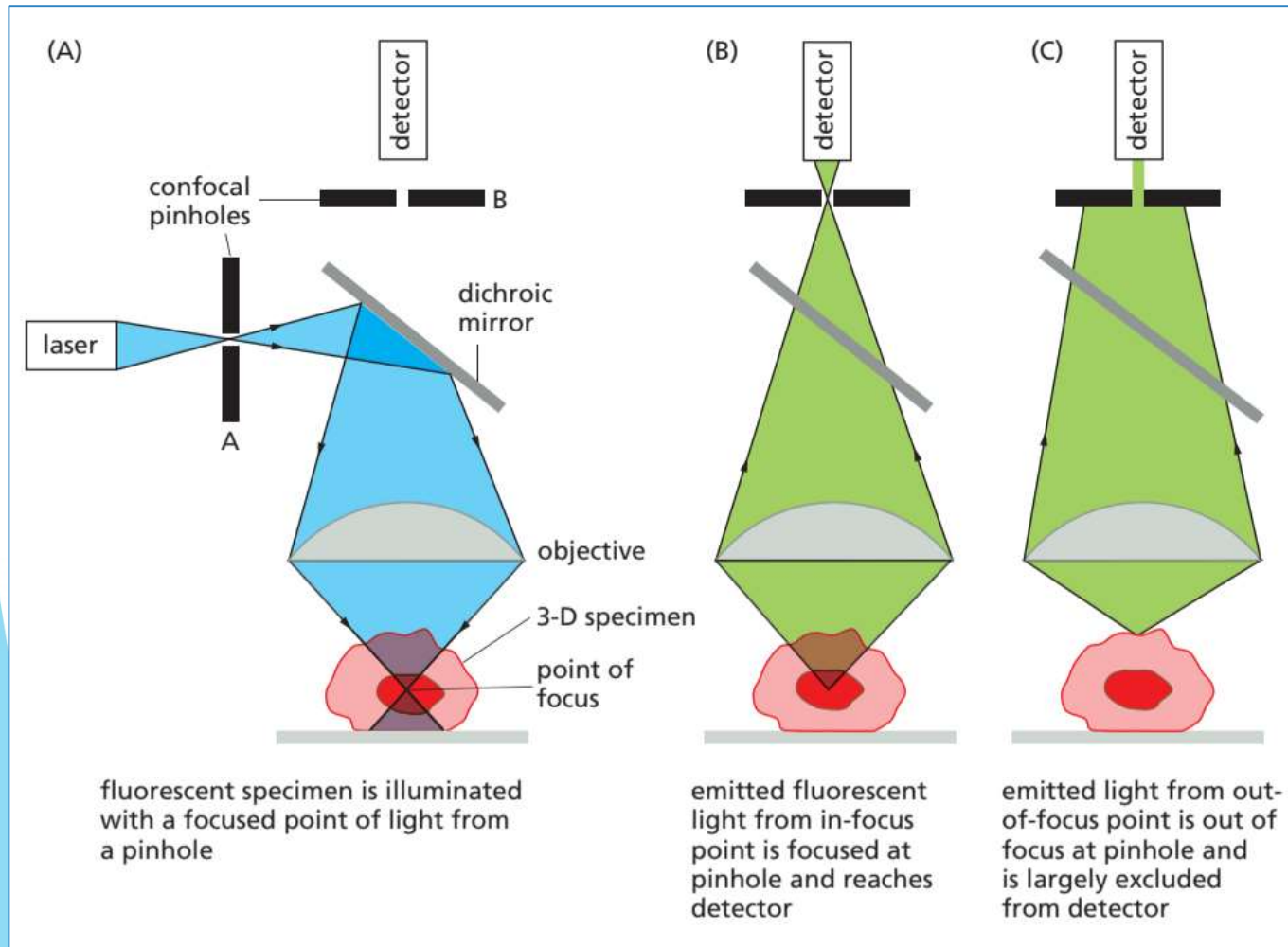


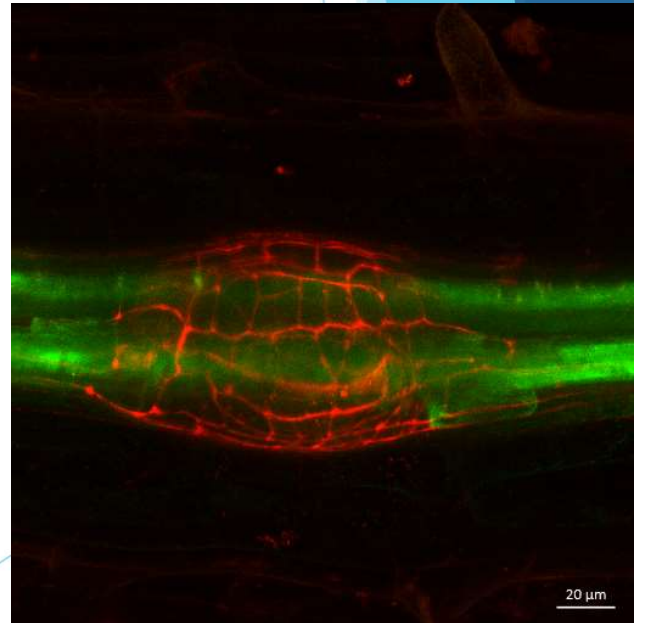
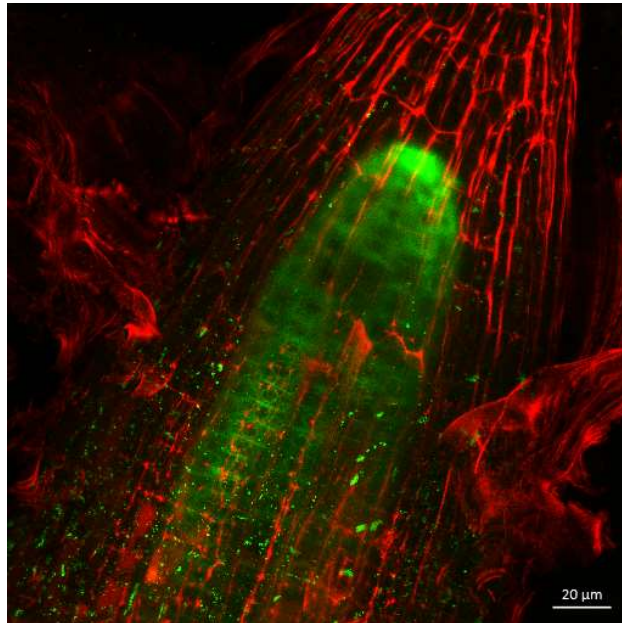
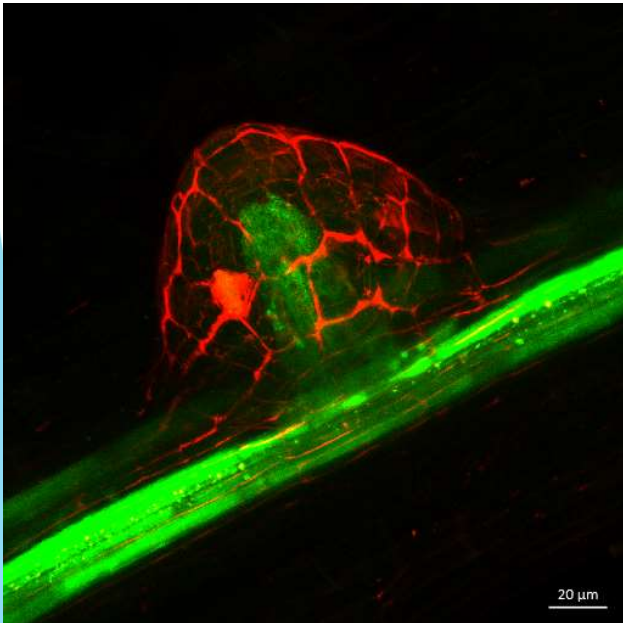
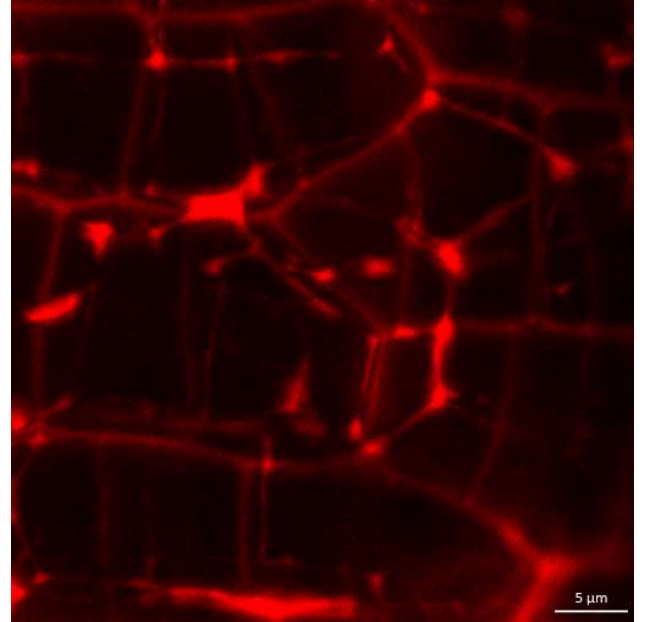
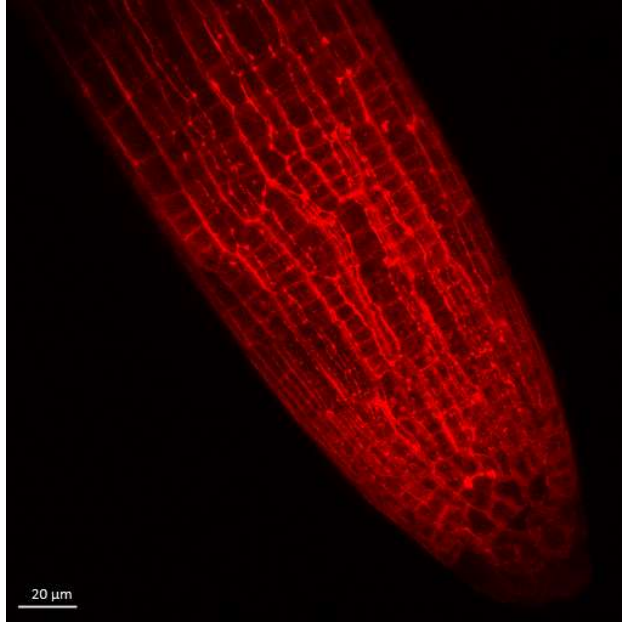
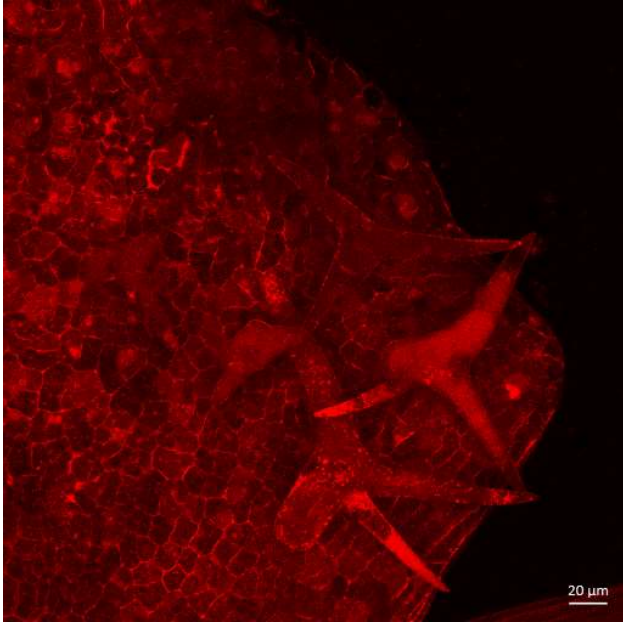
► *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)*


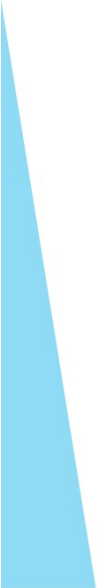


Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

- ▶ vytváří optické řezy (3D struktury) vyloučením *out-of-focus* světla pomocí *pinhole*





- 
- 
- ▶ “hypothesis-driven experimentation... is being replaced by cook-book and largely automated isolations, purifications and rote characterizations of genes and their function.”

Celý genom může být reprezentován v DNA knihovně (*genomové nebo cDNA*)

► Knihovny (*DNA libraries*) mají různé výhody a nevýhody

