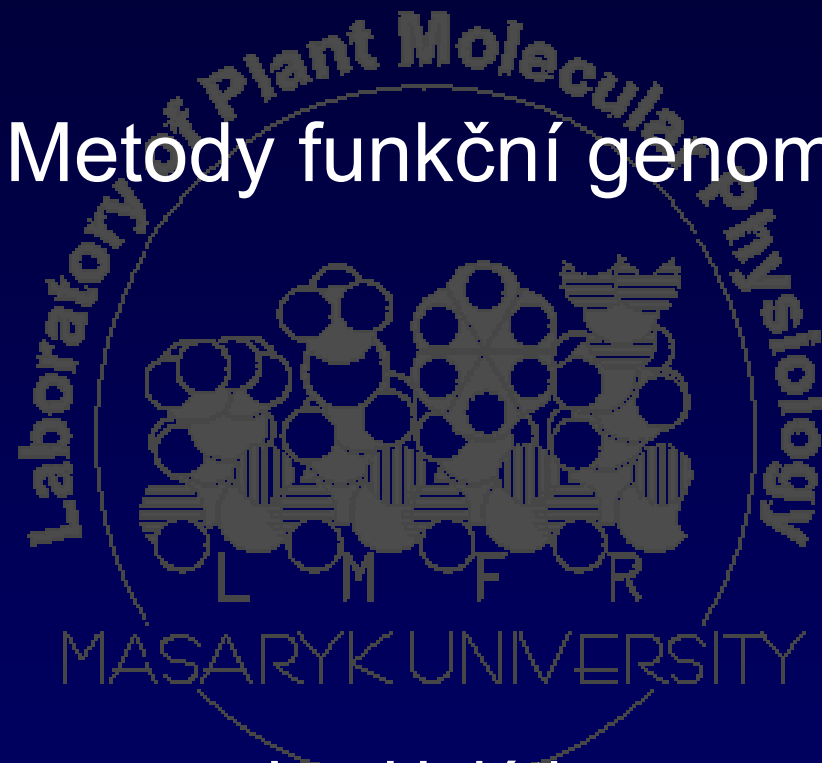


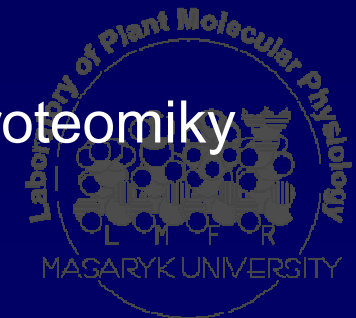
# Základy genomiky

## IV. Metody funkční genomiky



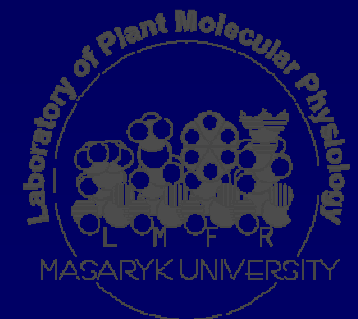
Jan Hejátko

Masarykova univerzita, Laboratoř funkční genomiky a proteomiky  
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin



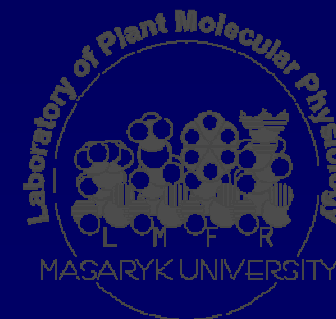
# Základy genomiky IV.

- Zdrojová literatura ke kapitole IV:
  - Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
  - Surpin, M. and Raikhel, N. (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* **5**,100-109
  - Zouhar, J., Hicks, G.R. and Raikhel, N.V. (2004) Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **101**, 9497–9501



# Genomika IV.

- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
  - DNA a proteinové čipy
  - metabolické profilování
  - metody mikrodisekce
- Metody využívané ve funkční genomice rostlin
  - *A. thaliana* jako modelový organizmus funkční genomiky rostlin
  - příprava transgenních rostlin
  - Southern blot a DNA molekulární hybridizace
  - izolace genomové DNA, PCR



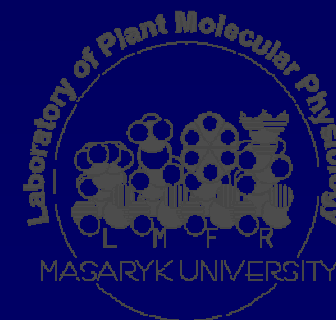
# Genomika IV.

- Nové trendy
  - chemická genetika

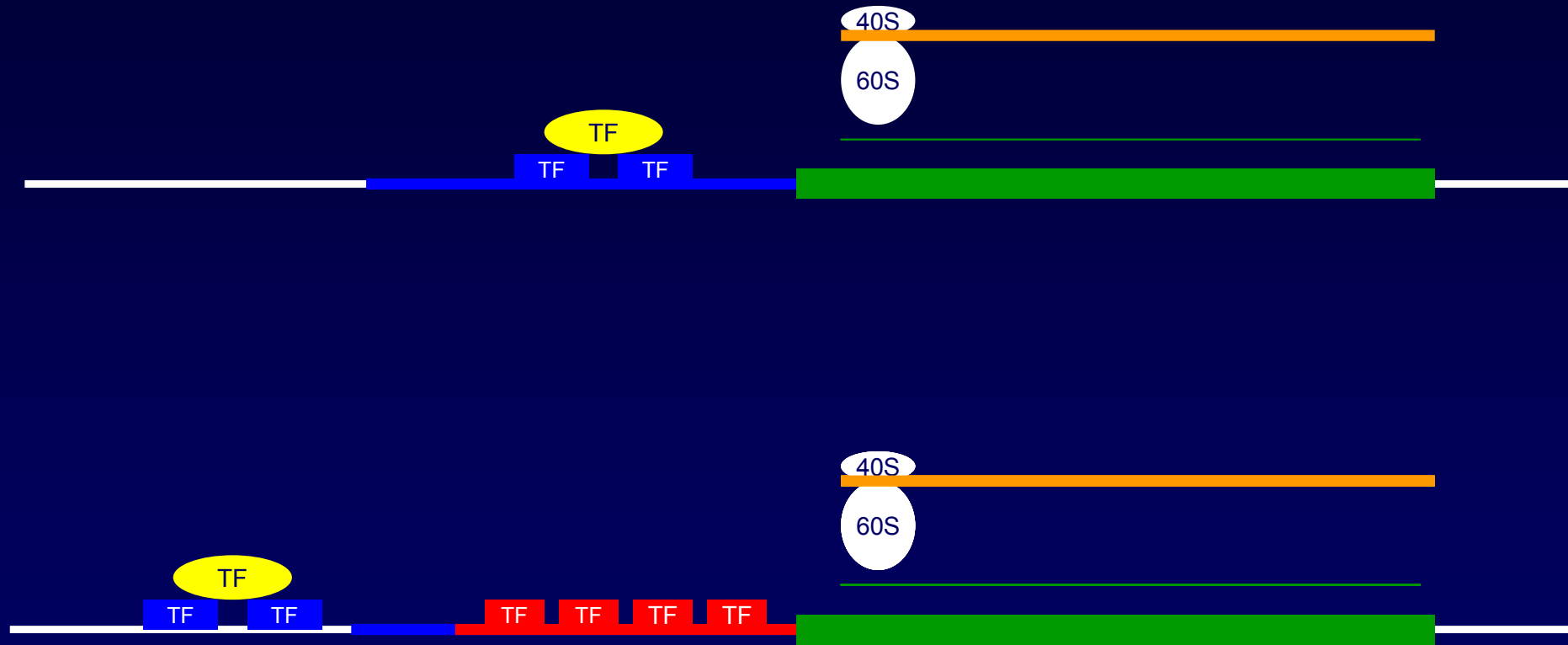


# Genomika IV.

- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
    - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
    - prvním krokem je příprava mutantní knihovny připravené pomocí transformace silného konstitutivního promotoru nebo zesilovače
    - následuje vyhledávání zajímavých fenotypů
    - identifikace zasaženého genu např.pomocí plasmid-rescue

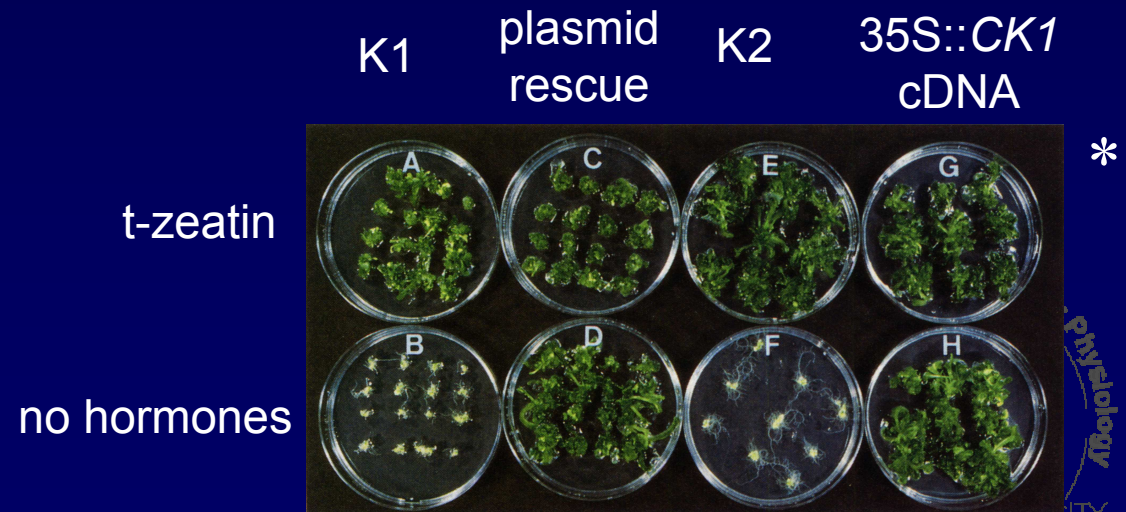
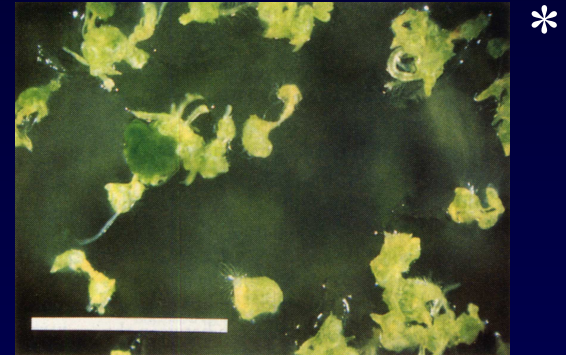


# Genomika IV. aktivační mutagenese



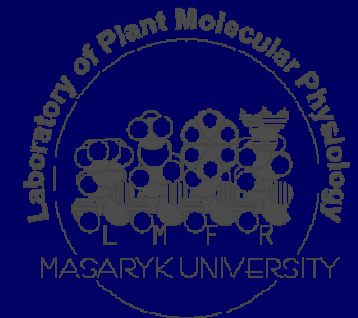
# Isolation of the *CK1* gene

- Tatsuo Kakimoto, *Science* 274 (1996), 982-985 \*
- izolace genu pomocí aktivační mutagenese
- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CK1*, CYTOKININ INDEPENDENT1)



# Genomika IV.

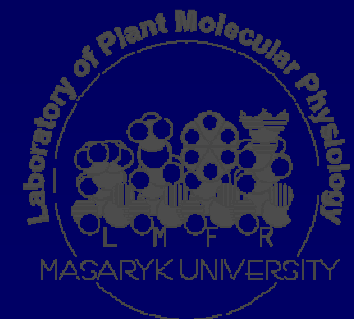
- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese





# Genomika IV.

- Systémy regulovatelné genové exprese
  - umožňují časovou nebo místně specifickou regulaci genové exprese, vedoucí ke změně fenotypu a tím identifikaci přirozené funkce genu
    - pOP systém
    - UAS systém



# Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, pOP



activator  
X



activator x reporter



reporter

35S

LhG4



pOP

TATA

CKI1



# Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, pOP



activator  
X



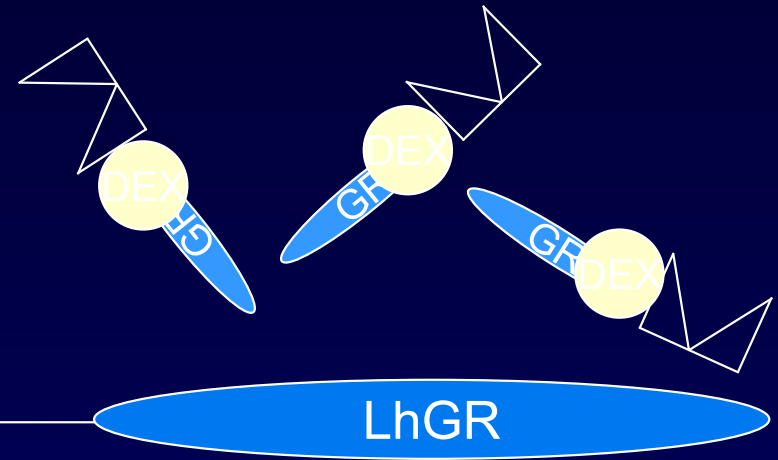
activator x reporter



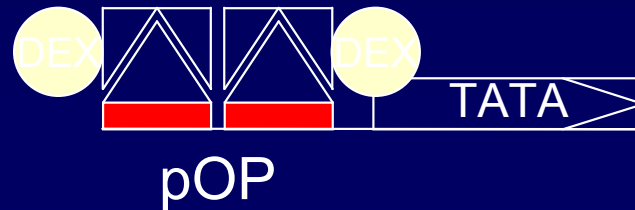
reporter

+DEX

35S

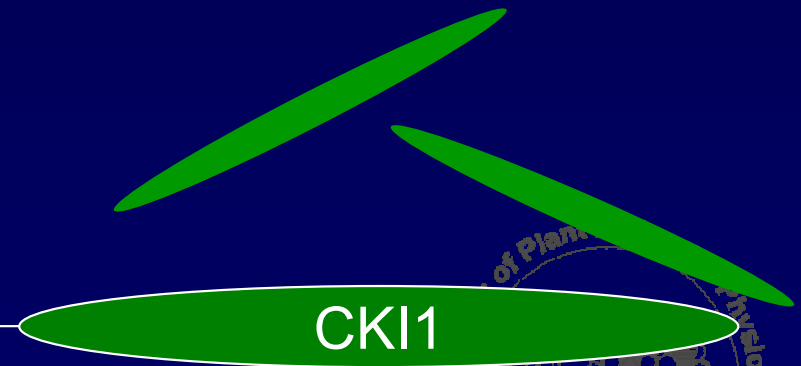


LhGR



pOP

TATA



CKI1



# Genomika IV.

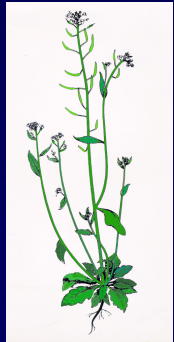
## systemy regulovatelne exprese



activator X



activator x reporter



reporter

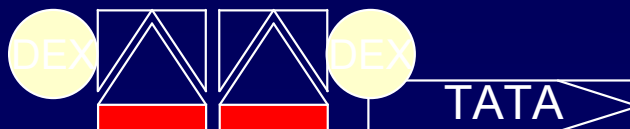
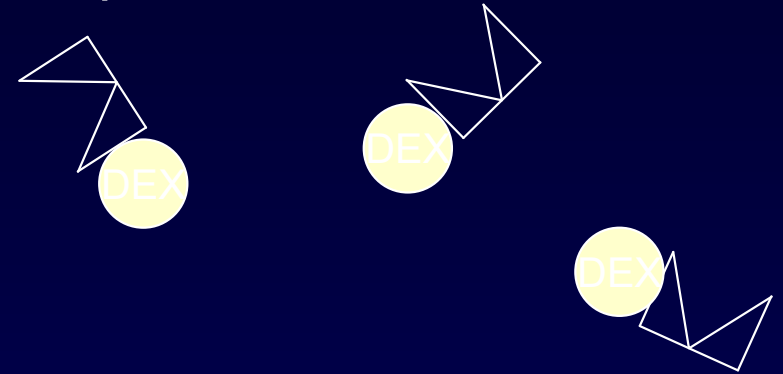
+DEX



35S



LhGR



wt Col-0

pOP

TATA



CKI1



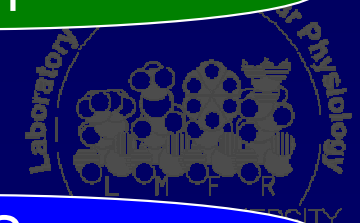
4C

pOP

TATA

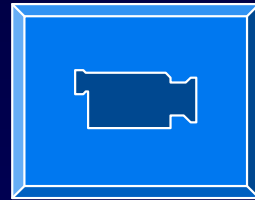


GUS

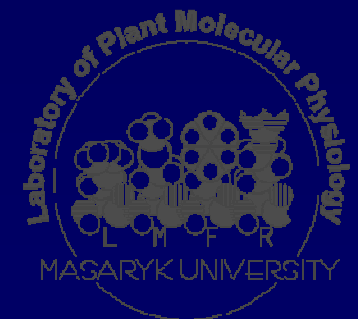


# Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, **UAS**



<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/>



# Genomika IV.

- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
  - DNA a proteinové čipy

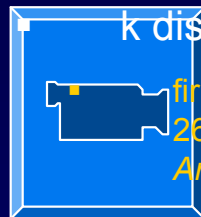


# Genomika IV.

- Fenotypové profilování

- DNA a proteinové čipy

- metoda umožňující rychlé porovnání **velkého množství** genů/proteinů mezi testovaným **vzorkem** a **kontrolou**
    - nejčastěji jsou používány oligo DNA čipy



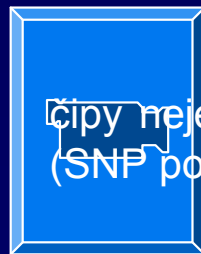
k dispozici komerčně dostupné sady pro celý genom **Affymetrix ATH1 Arabidopsis genome array**

firma Operon  
26.173 genů  
*Arabidopsis thaliana*

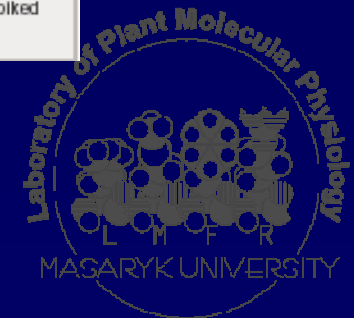
- možnost použít tuto techniku pro syntézu oligonukleotidů

Critical Specifications	
Number of arrays	One
Number of sequence represented	>24,000 gene sequences
Feature size	18 μm
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	11
Control sequences	<i>E. coli</i> genes <i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> . <i>B. subtilis</i> gene <i>lysA</i> . Phage P1 <i>cre</i> gene. <i>Arabidopsis</i> maintenance genes GAPDH, Ubiquitin, and Actin
Detection sensitivity	1:100,000*

\*As measured by detection in comparative analysis between a complex target containing spiked control transcriptions and a complex target with no spikes.



- čipy nejen pro analýzu exprese, ale např. i genotypování (SNP polymorfizmy, sekvenování pomocí čipů, ...)



# Genomika IV.

## DNA čipy

- DNA čipy, analýza výsledků
  - pro správnou interpretaci výsledků je nutná dobrá znalost pokročilých statistických metod
  - je nutné zahrnout dostatečný počet kontrol i opakování

- kontrola na přesnost měření (opakované měření na několika čípech se stejným vzorkem, vynesení **stejných vzorků** analyzovaných na **různých čípech** proti sobě)
- kontrola reproducibility měření (opakované měření s **různými vzorky**, izolovanými za **stejných podmínek** na **stejném čipu**-stejně podmínky proti sobě)
- identifikace **hranice spolehlivého měření**
- konečně vynesení experimentu proti kontrole nebo různých podmínek proti sobě – vlastní výsledek

Expression of 195M6T7 in response to chemical treatment

Home | About TAIR | Sitemap | Contact | Help | Order | Login

Search | Tools | Arabidopsis Info | News | Links | FTP | Stocks

Gene Search

Experiment: Aluminum Stress

Experiment Summary | Samples | Slides & Datasets | Array Design | View All

Slide Details

Slide (name ? : description)	External ID ?	Replicate (id ? : name)	Replicate type ?	Reverse replicate ?	Sample ?	Experimental variables	Label ?	Get Data ?
HoekengaS7 (*) : Aluminum Stress 1 [strong spatial bias]	AFGC: 7304	63: Aluminum Stress	technical		7304_Cy3.7305_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
					7304_Cy5.7305_Cy3	Aluminum (50 5M AlCl3, pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	
HoekengaS8 (*) : Aluminum Stress 2 [strong spatial bias]	AFGC: 7305	64: Aluminum Stress	technical	63	7304_Cy5.7305_Cy3	Aluminum (50 5M AlCl3, pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
					7304_Cy3.7305_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	

- v současnosti je již velké množství výsledků různých experimentů lokalizovaných ve veřejně přístupných databázích



Che et al., 2002  
MASARYK UNIVERSITY



# Genomika IV.

## proteinové čipy

- Proteinové čipy
  - čipy s vysokou denzitou obsahující řádově  $10^4$  proteinů
  - analýza protein-proteinových interakcí, substrátů kináz a interakcí s malými molekulami
  - možnost použít protilátky – stabilnější než samotné proteiny

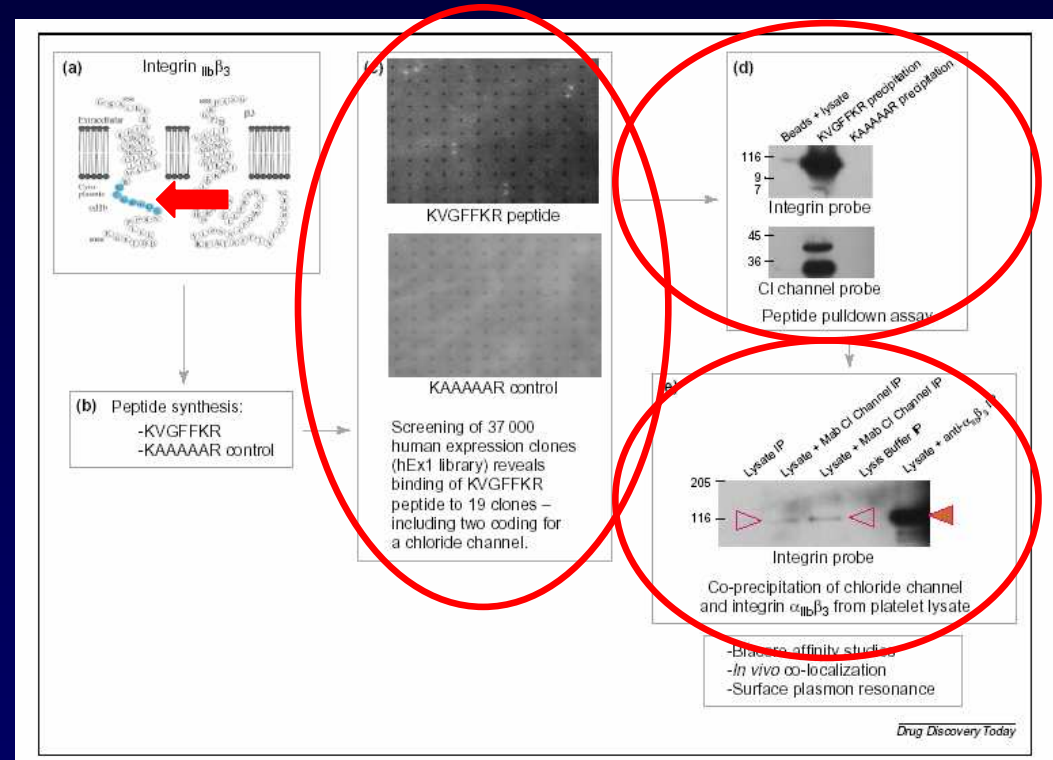


# Genomika IV.

## proteinové čipy

- Identifikace proteinů interagujících s cytoplasmatickou částí integrinu  $\alpha_{IIb}\beta_3$  krevních destiček

- exprese cytoplasmatické části jako fúzního peptidu biotin-KVGFFKR
- analýza vazby s proteinovým čipem obsahujícím 37.000 klonů *E.coli* exprimujících lidské rekombinantní proteiny
- potvrzení interakce pull-down analýzou peptidů i koprecipitací celých proteinů (chloridový kanál ICln)
- další využití např. při identifikaci substrátů kináz, kdy substráty jsou navázány na čip a vystaveny působení kináz za přítomnosti radiokativně značeného ATP (768 purif. proteinů ječmene, z nich 21 identifikováno jako substráty kinázy CK2 $\alpha$ , Kramer et al., 2004)

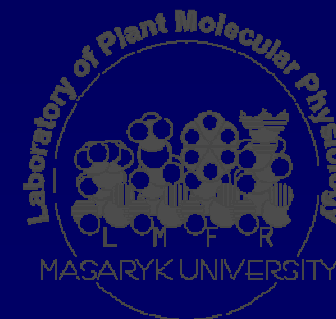


Lueking et al., 2005



# Genomika IV.

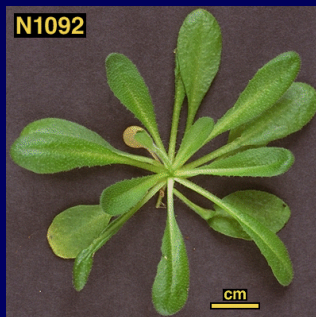
- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
  - DNA a proteinové čipy
  - metabolické profilování
  - metody mikrodisekce
  - proteomické přístupy
- Metody využívané ve funkční genomice rostlin
  - *A. thaliana* jako modelový organizmus funkční genomiky rostlin
  - příprava transgenních rostlin
  - Southern blot a DNA molekulární hybridizace
  - izolace genomové DNA, PCR



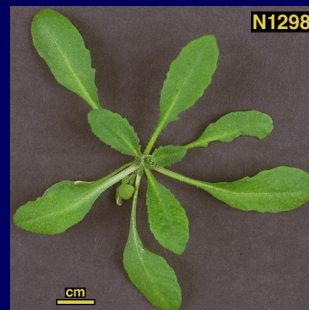
# *Arabidopsis thaliana*

huseníček polní, mouse-ear cress

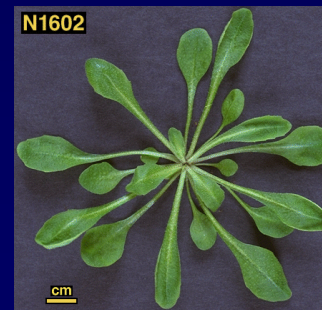
- malé nároky na kultivační plochu
- velké množství semen (20.000/rostlinu a více)
- malý a kompaktní genom, (125 MBp, cca 25.000 genů, prům. velikost 3 kb)
- 5 chromozomů
- vhodná pro široké spektrum fyziologických experimentů
- velká přirozená variabilita (cca 750 ekotypů (Nottingham Arabidopsis Seed Stock Centre))



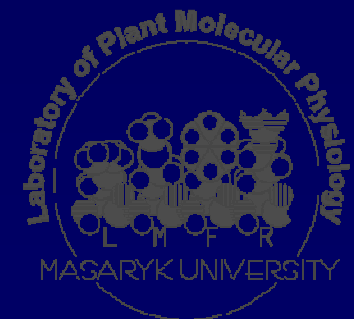
Columbia 0



Landsberg 0



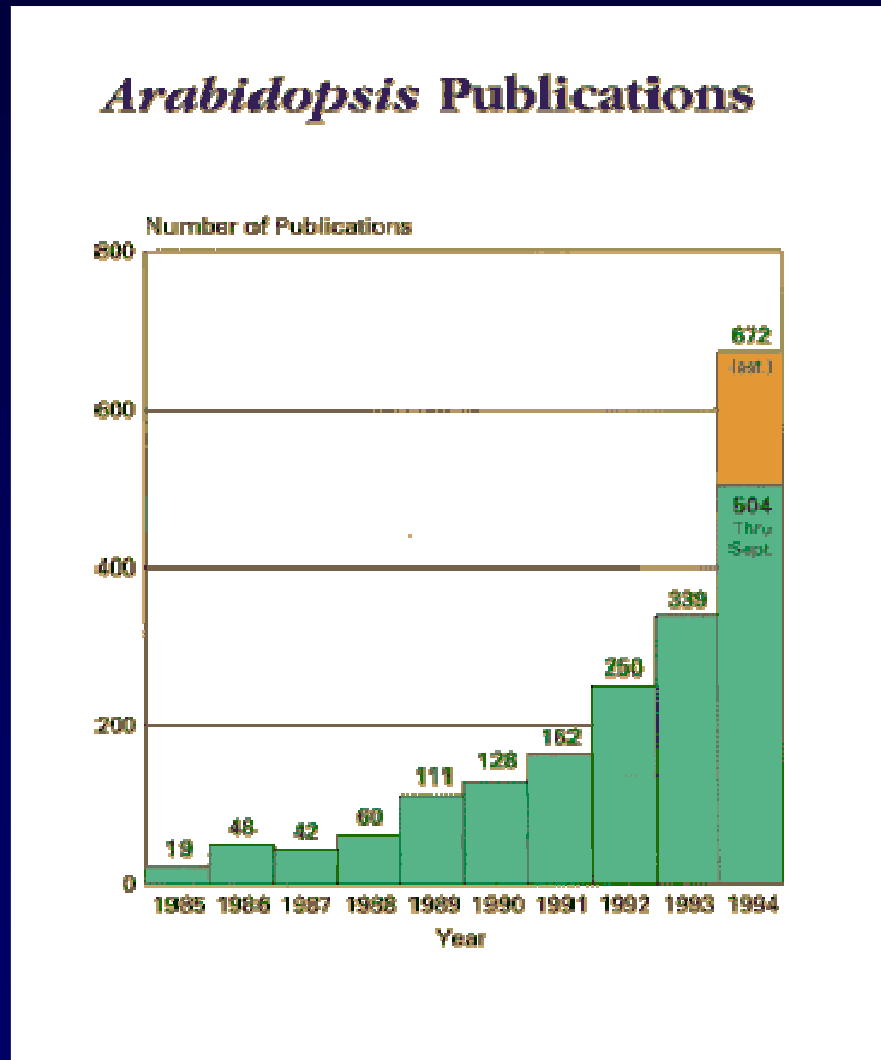
Wassilewskija 0



<http://seeds.nottingham.ac.uk/>

# Arabidopsis, významný rostlinný model

Počet záznamů v databázi „PubMed“ (MEDLINE) vyhledaných pod heslem „*Arabidopsis*“ **12.389**. (Pro srovnání, pod heslem „*human*“ nalezeno 493260 záznamů).



Entrez records	
Database name	Direct links
Nucleotide	<a href="#">618,539</a>
Protein	<a href="#">118,482</a>
Structure	<a href="#">61</a>
Genome	<a href="#">7</a>
Popset	<a href="#">106</a>
SNP	<a href="#">184</a>
3D Domains	<a href="#">162</a>
Domains	<a href="#">47</a>
GEO Datasets	<a href="#">6</a>
GEO Expressions	<a href="#">61,406</a>
UniGene	<a href="#">25,447</a>
UniSTS	<a href="#">612</a>
PubMed Central	<a href="#">3,864</a>
Gene	<a href="#">30,273</a>
Taxonomy	<a href="#">1</a>

## Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacteria tumefaciens*

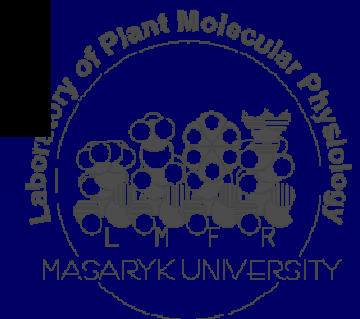
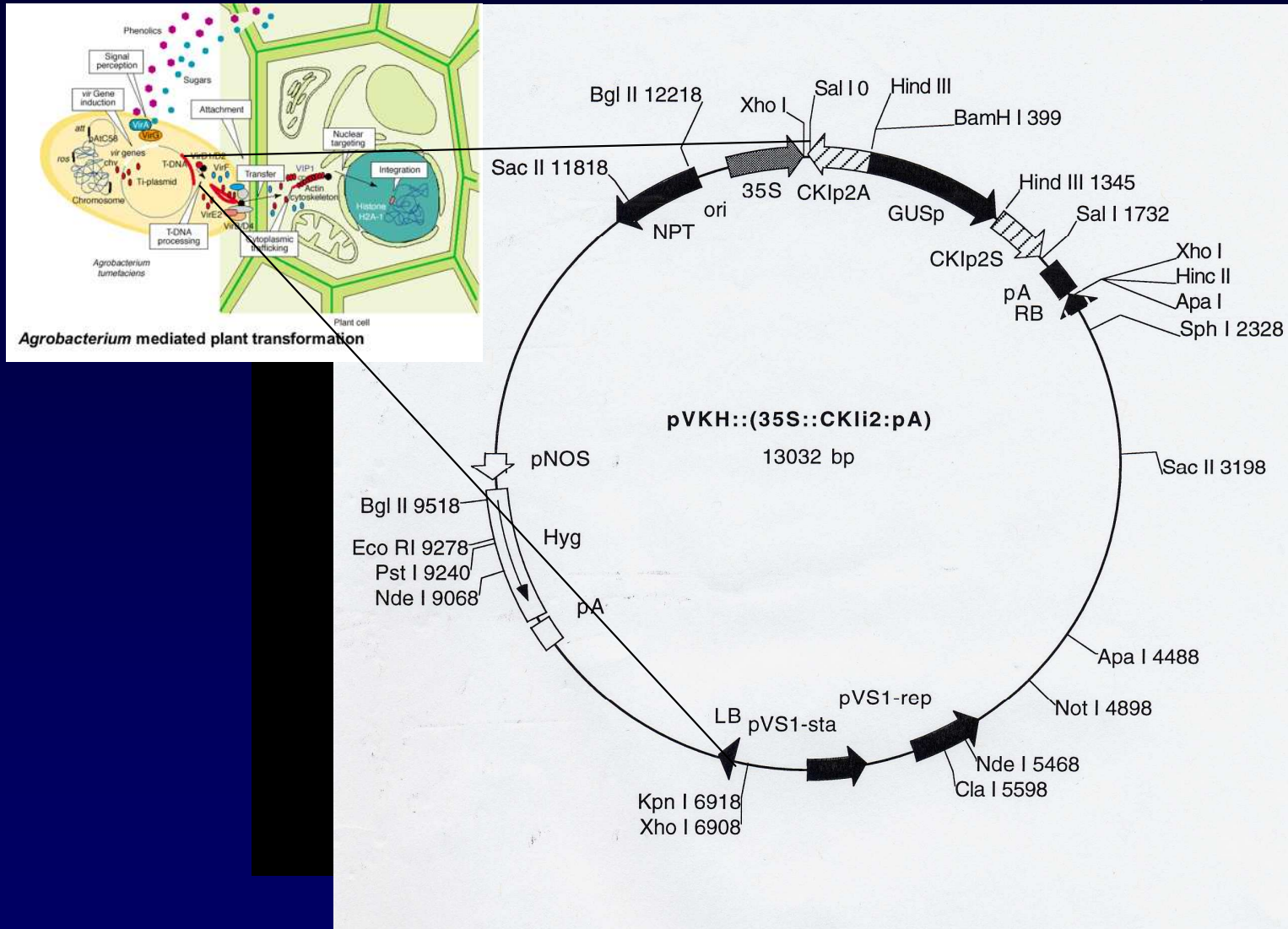


Crown gall of raspberry caused by *Agrobacterium tumefaciens*.



# Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

## přenos bakteriální DNA do rostlinné buňky

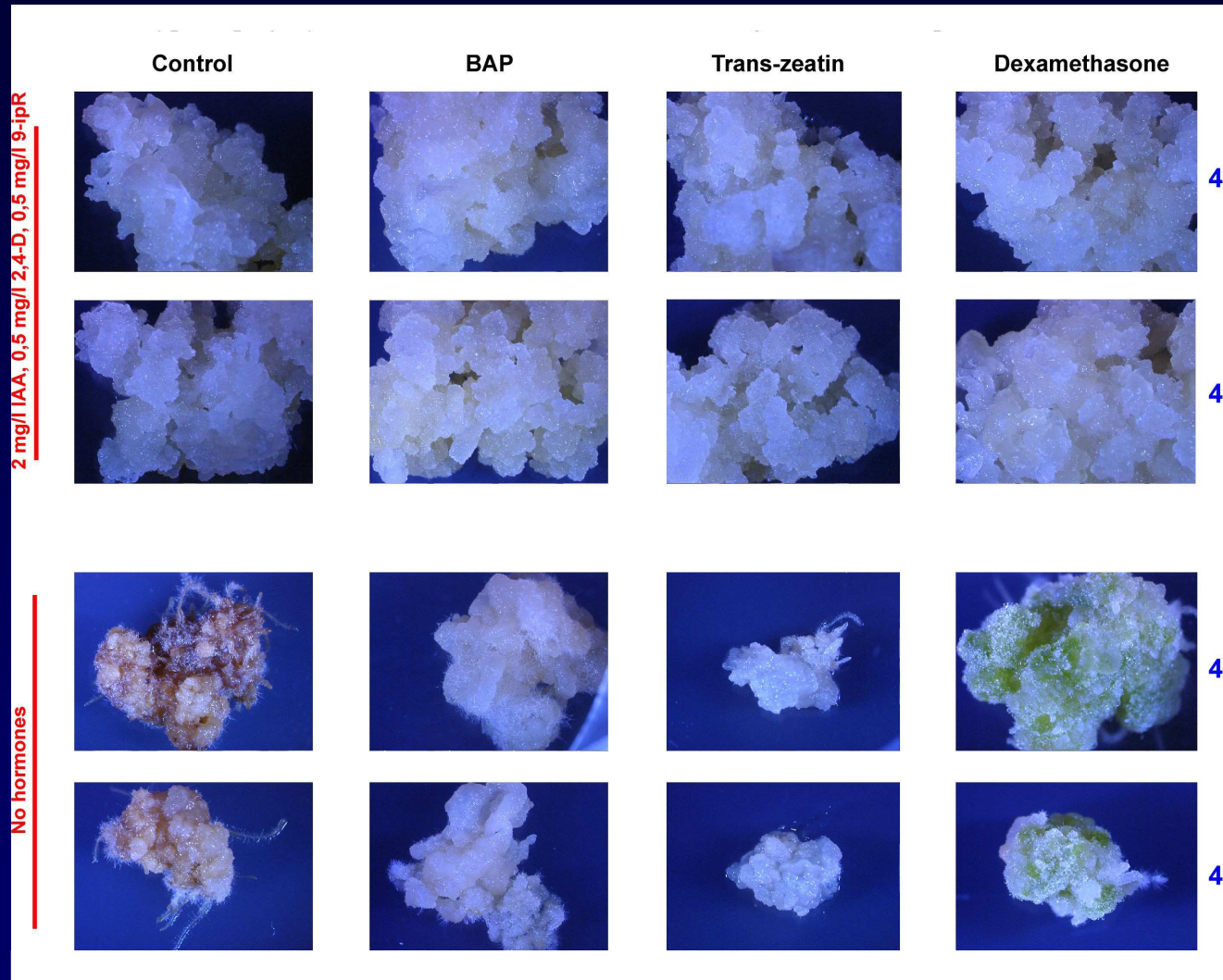


# Transformace kokultivací listových disků





# Transformace kokultivací kalusů

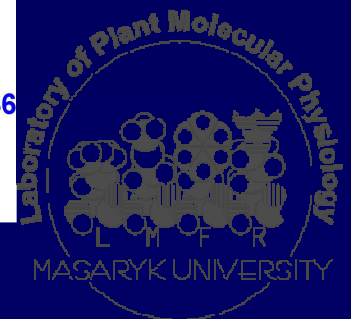


45

46

45

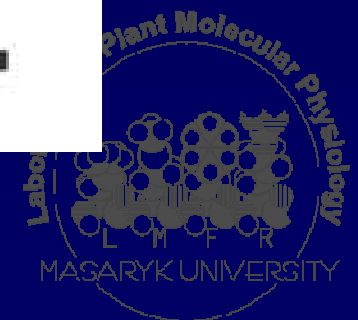
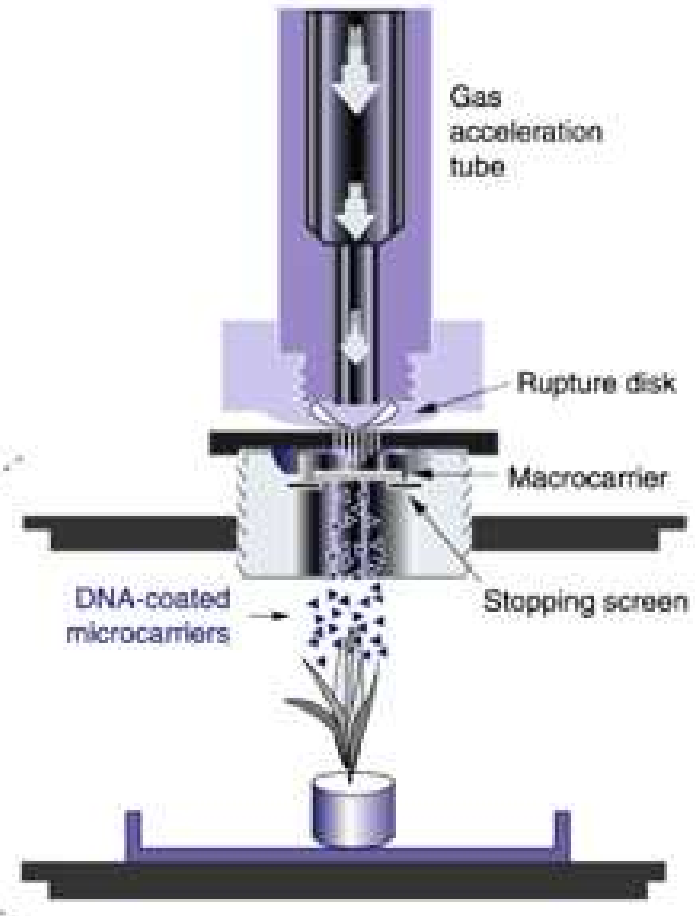
46



# Transformace „nastřelováním“ DNA



## *Biolistic delivery of DNA*



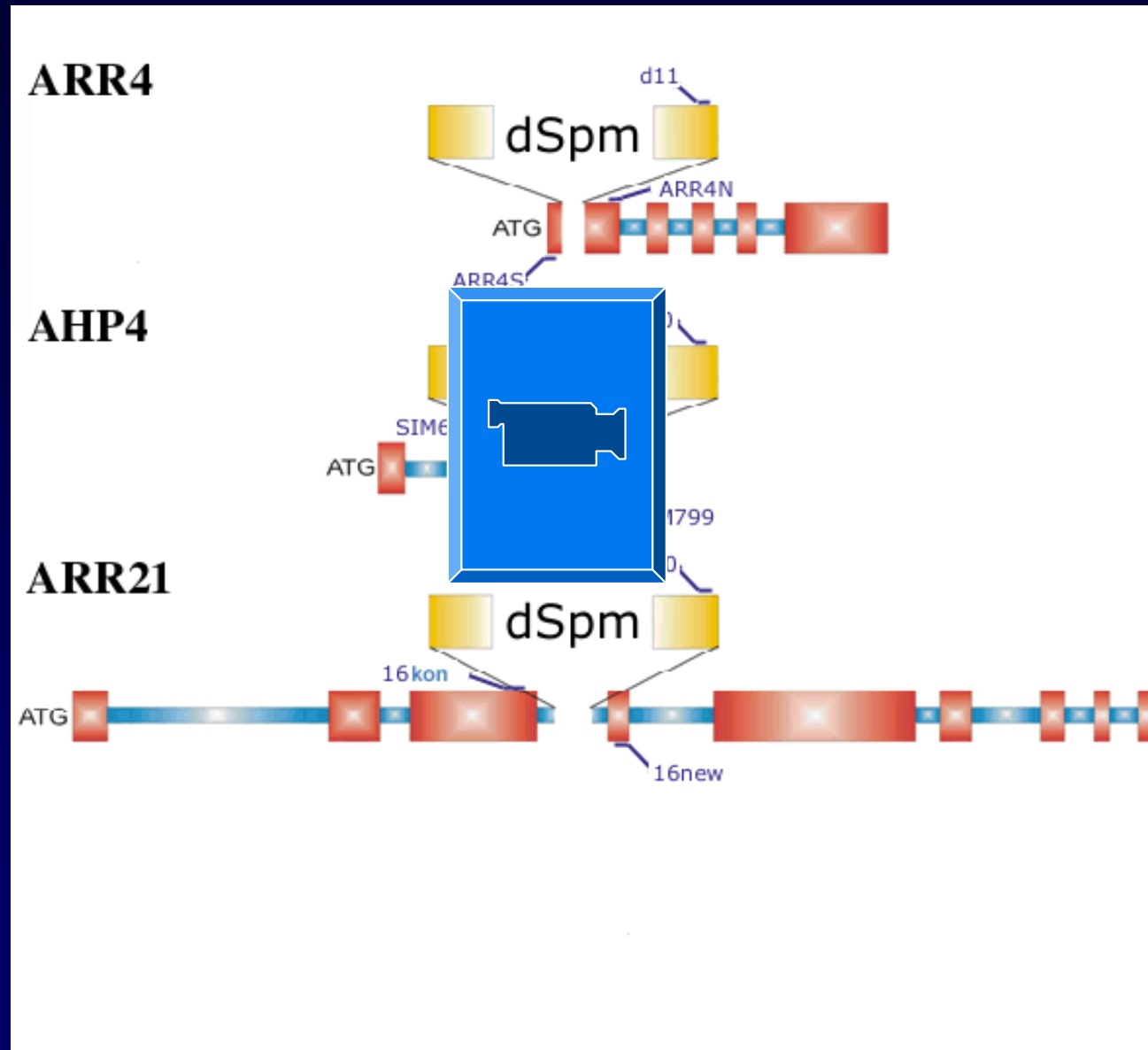


## Rychlá izolace genomové DNA

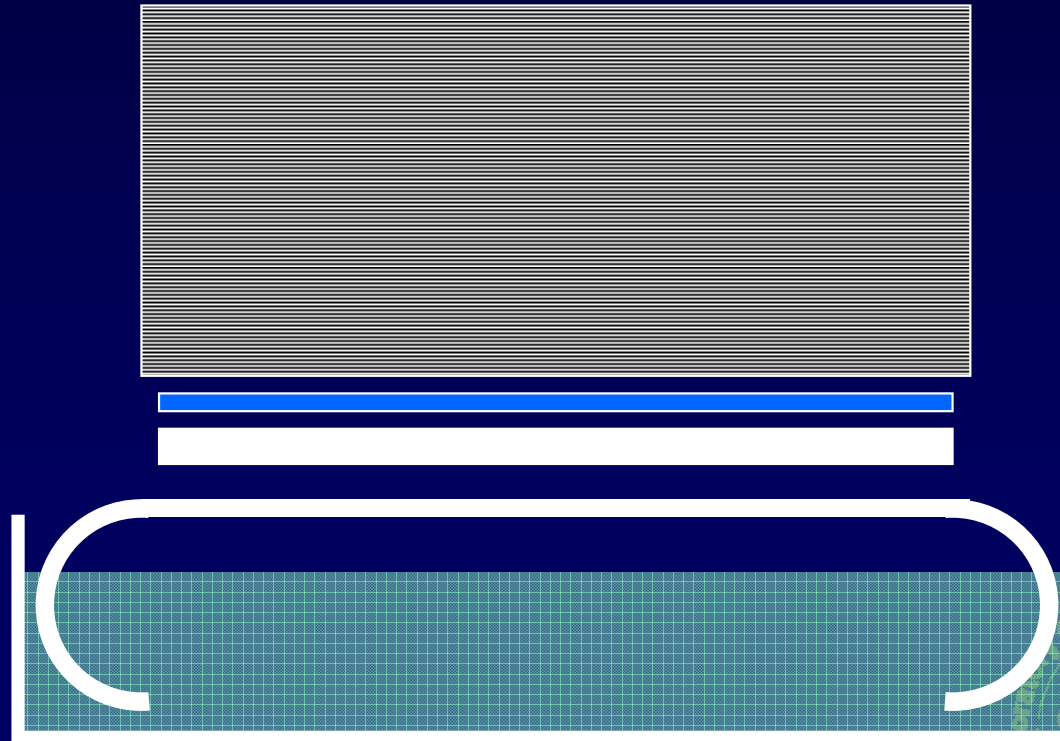
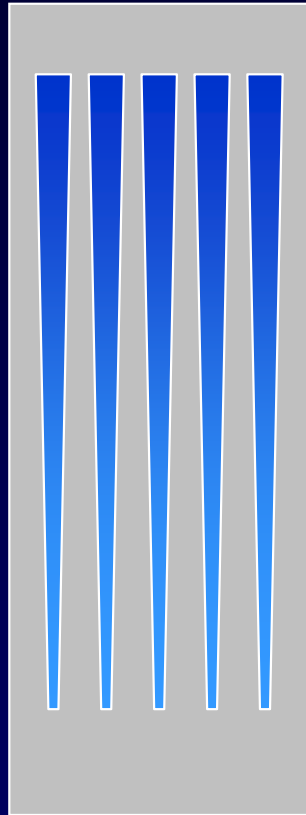
- Homogenizujte rostliny skleněnou tyčinkou v 1.5 ml zkumavce („eppendorfka“) v tekutém dusíku. Použijete jeden až dva středně velké listy
- Přidejte **400  $\mu$ l** extrakčního pufru, vortexujte 5 s a nechte stát při pokojové teplotě .
  - lýza buněčné stěny
- Stočte na stolní odstředivce Eppendorf při 15000 otáčkách po dobu **30 min**, 4 °C.
  - odstranění zbytků buněčné stěny a nelyzovaných pletiv
- Přeneste **300  $\mu$ l** supernatantu do nové zkumavky a přidejte **300  $\mu$ l** izopropanolu. Nechte stát **15 min**.
  - srážení genomové DNA
- Odstřeďte jako v bodě 3. DNA vysrážena izopropanolem bude v peletu.
- Promyjte pelet **500  $\mu$ l** 70% etanolu. Nechte vysušit (SpeedVac, cca **15 min**).
  - vymytí solí
- Pelet rozpustíme v **50  $\mu$ l** vody.



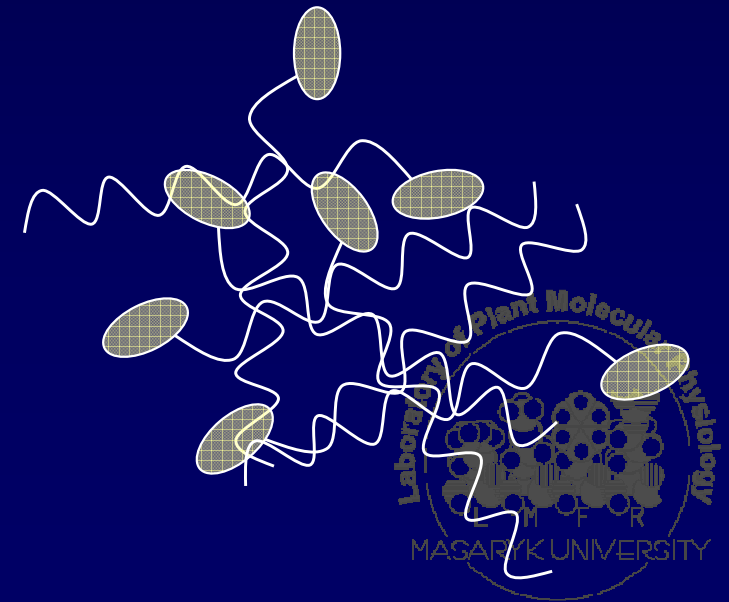
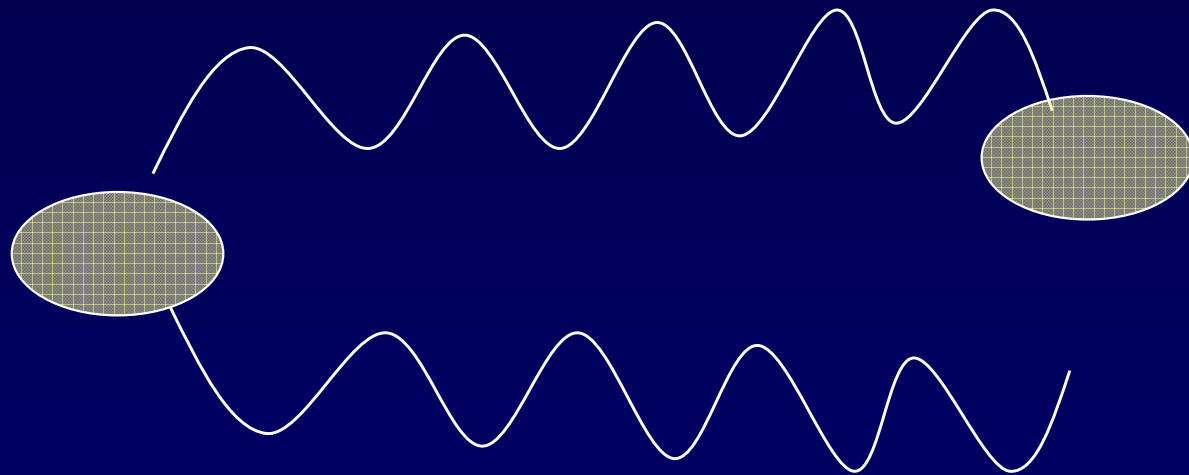
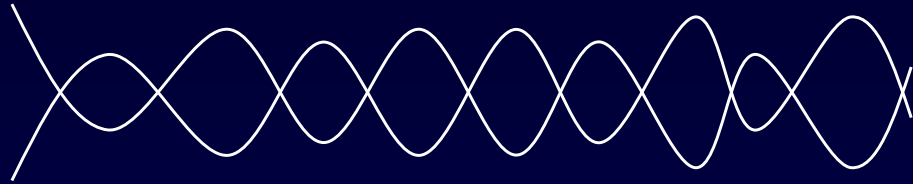
# PCR



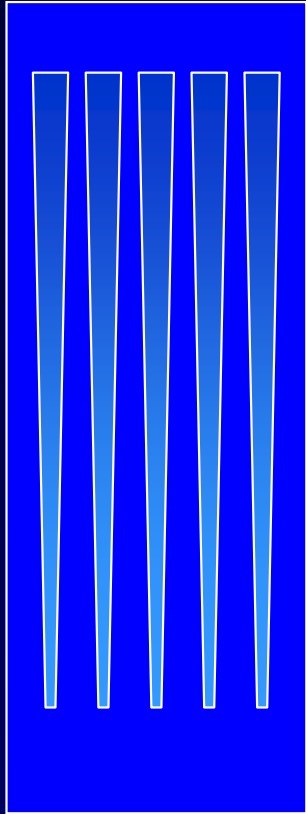
# Separace a Blotování



# Syntéza sondy

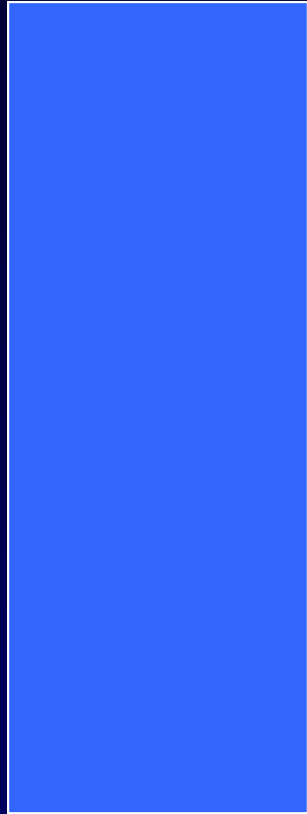


# Hybridizace a Promývání



Separace

Elektroforéza



Blokování

BSA

nasekaná DNA



Hybridizace

teplota

[sonda]



Promývání

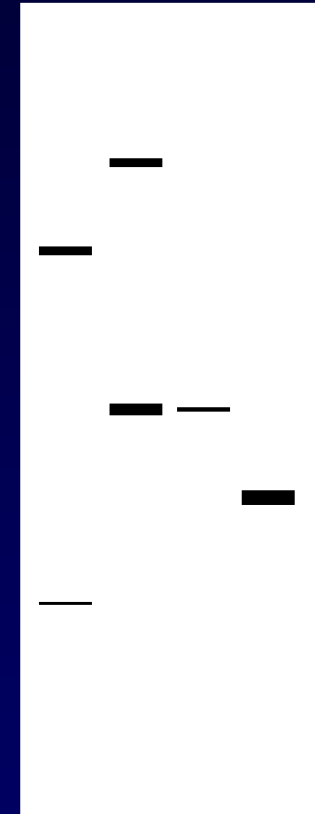
„Stringency“





# Detekce

- Radioaktivní
  - $^{32}\text{P}$
- Neradioaktivní
  - DIG
  - Alkaline Phosphatase
- Doba expozice/reakce



# Genomika IV.

- Nové trendy

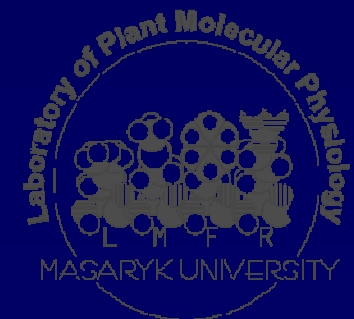
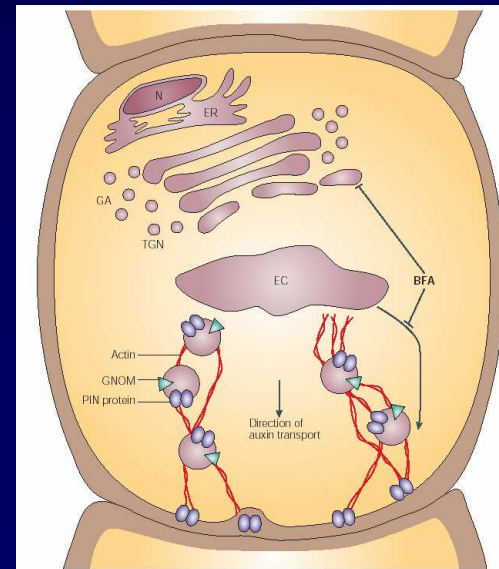
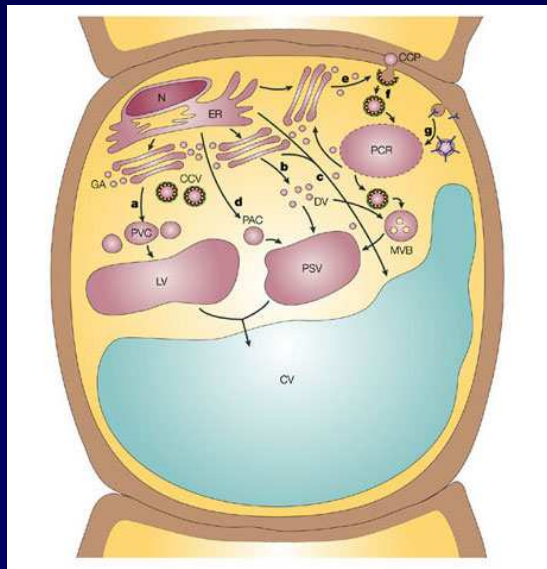
- pojem chemická genetika – více než 36.000 záznamů v databázi PubMed

The screenshot shows the PubMed search interface. The search bar contains the text "chemical genetics". The results section shows "All: 36880" and "Review: 4001". The first result is by Larochelle S, Batliner J, Gamble MJ, Barboza NM, Kraybill BC, et al. (2005), titled "Dichotomous but stringent substrate selection by the dual-function Cdk7 complex revealed by chemical genetics." The second result is by Li F, Palecek SP. (2005), titled "Identification of Candida albicans Genes that Induce Saccharomyces cerevisiae Cell Adhesion and Morphogenesis." The third result is by den Hertog J. (in process).

# Genomika IV.

## chemická genetika

- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy chemické genetiky
  - v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)
  - endomembránový transport je důležitým regulačním mechanismem při přenosu signálu a regulaci buněčných procesů

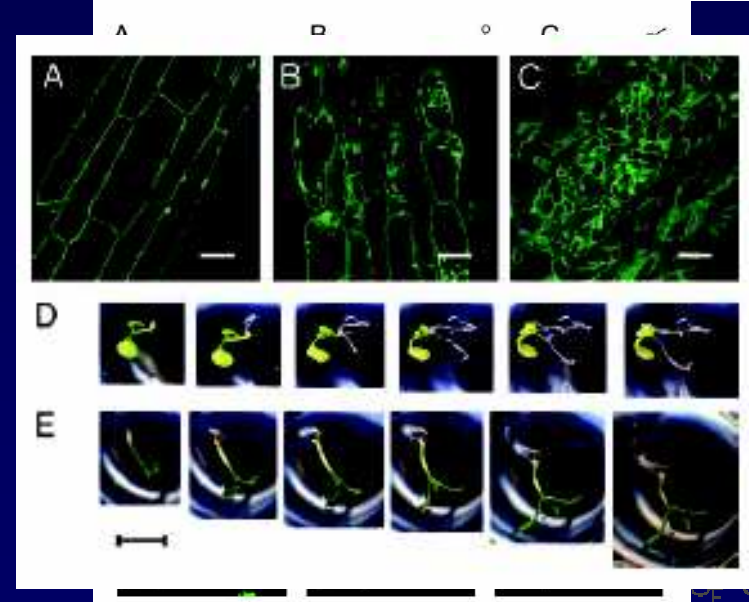
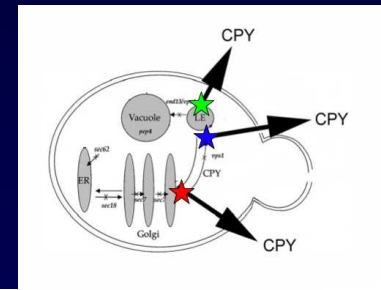


# Genomika IV.

## chemická genetika

### ▪ Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy chemické genetiky

- pomocí vyhledávání v „knihovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly
  - analýza změny sekrece pomocí dot-blotu a imunodetekce karboxipeptidázy Y v kulti-vačním médiu pomocí monoklonálních protilátek
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* (konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin)
- pro bližší identifikaci molekulárního procesu ovlivněného jedním z identifikovaných „sortinů“ byla provedena analýza jeho vlivu na sekreci markerového proteinu (AtCPY) – sortin 1 inhibuje specificky pouze tuto sekreční cestu
- pomocí EMS mutagenese identifikace mutantů se změnou citlivostí k sortinu 1 (hyper- nebo hypo-senzitivní mutanti)



Zouhar et al., 2004

MASARYK UNIVERSITY

# Genomika IV.

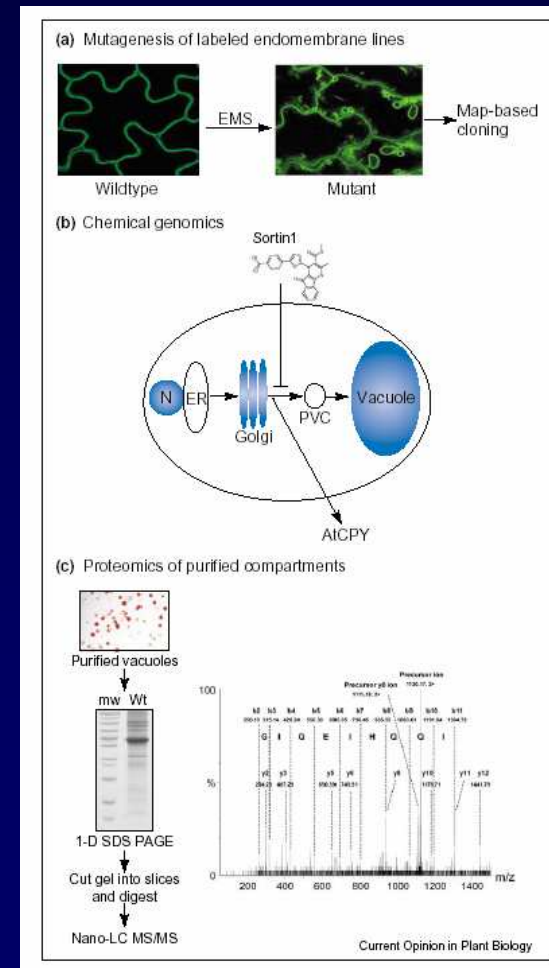
## chemická genetika

- Analýza mechanismů endomembránového transportu pomocí chemické genetiky - shrnutí

- GFP::d-TIP značení membrány vakuoly (tonoplastu) a identifikace mutací vedoucí ke změně morfologie tonoplastu

- chemická genetika v kombinaci s klasickou genetikou - identifikace proteinů zúčastňujících se regulace endomembránového transportu

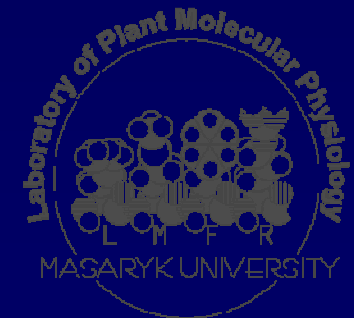
- proteomické přístupy – identifikace a analýza proteomu vakuol



# Genomika IV.

## Shrnutí

- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
  - DNA a proteinové čipy
  - metabolické profilování
  - metody mikrodisekce
- Metody využívané ve funkční genomice rostlin
  - *A. thaliana* jako modelový organizmus funkční genomiky rostlin
  - příprava transgenních rostlin
  - Southern blot a DNA molekulární hybridizace
  - izolace genomové DNA, PCR



# Genomika IV.

## Shrnutí

- Nové trendy
  - chemická genetika



# Genomika IV.

## Diskuse

