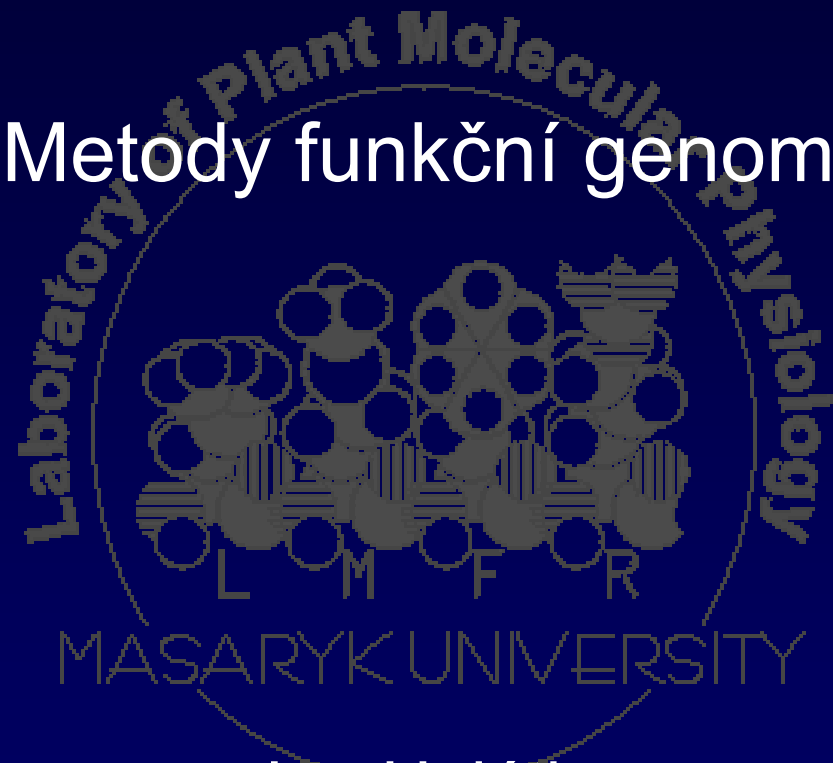


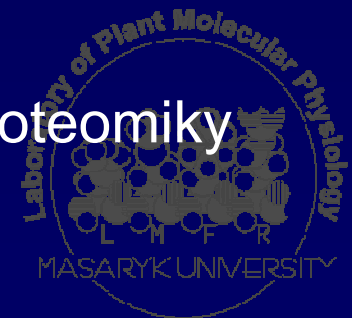
Základy genomiky

IV. Metody funkční genomiky



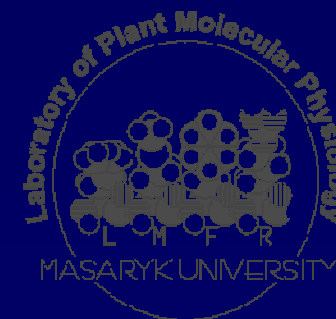
Jan Hejátko

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



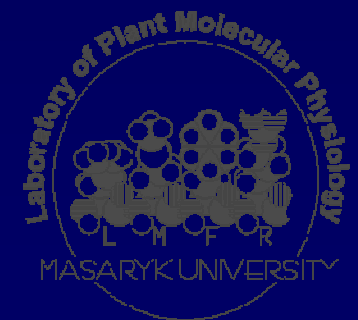
Genomika IV.

- Analýza genové exprese
 - Metody kvalitativní analýzy genové exprese
- 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.

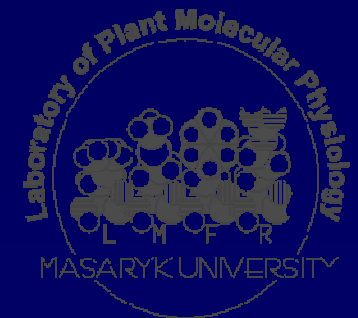
- Nové trendy
 - chemická genetika



Genomika IV.

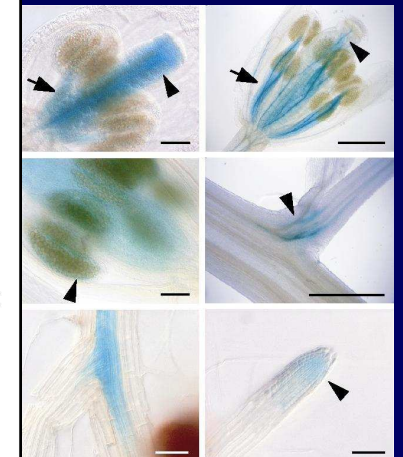
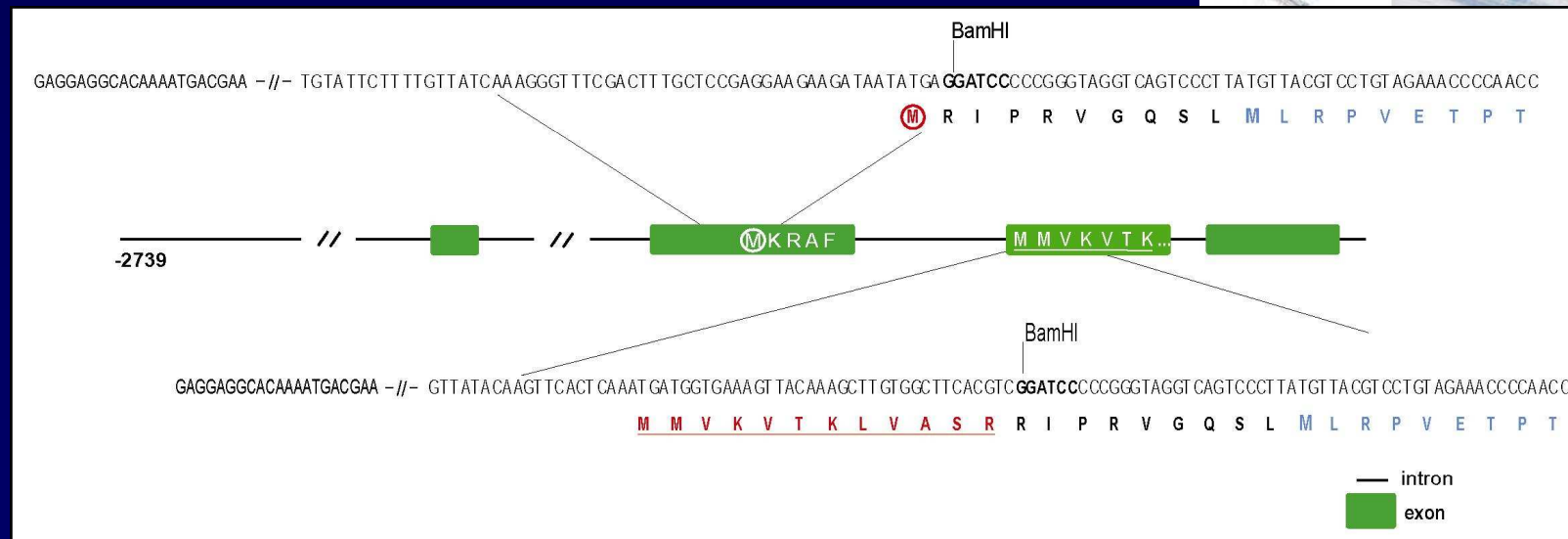
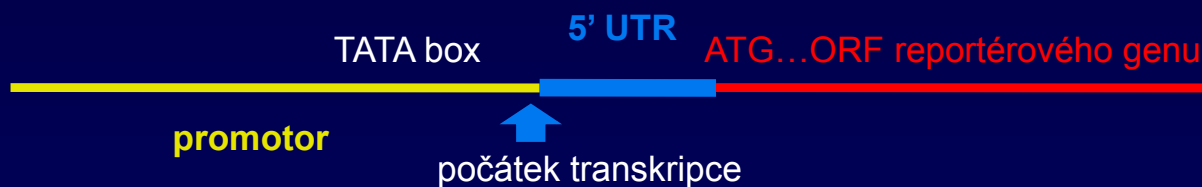
analýza genové exprese

- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)



Genomika IV. analýza genové exprese

- Transkripční fúze s promotorovou oblastí
 - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)
 - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza



Genomika IV.

analýza genové exprese

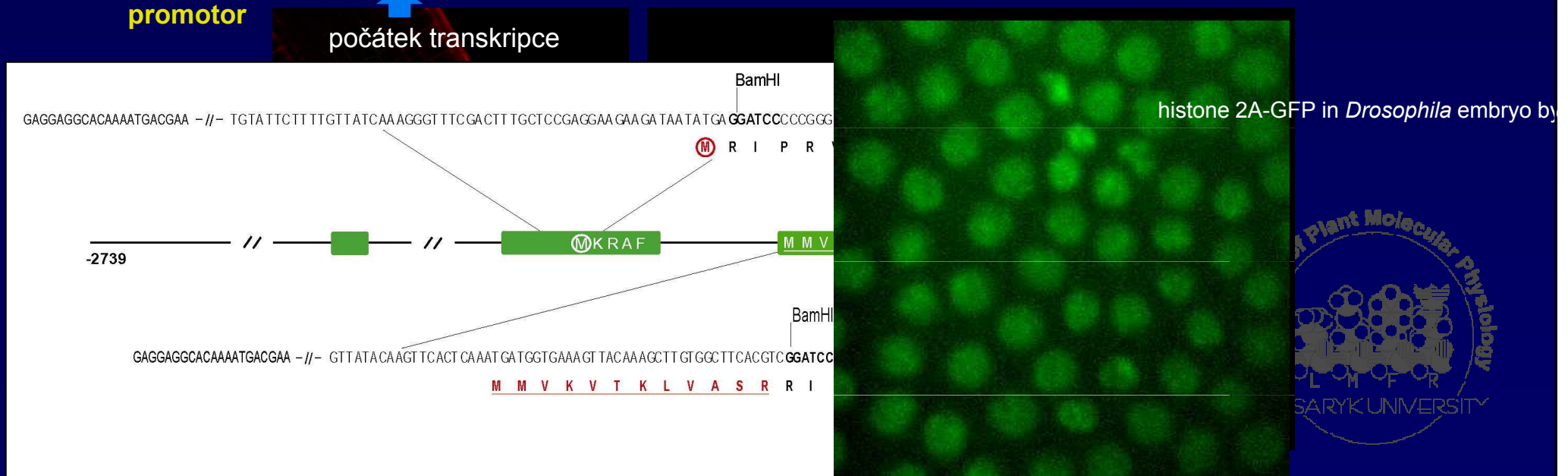
- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem



Genomika IV. analýza genové exprese

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem
 - Identifikace a klonování promotorové a kódující oblasti analyzovaného genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP) ve fúzi s reportérovým genem
 - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza

proti transkripční fúzi umožňuje analyzovat např. intracelulární lokalizaci
genového produktu (proteinu) nebo jeho dynamiku



Genomika IV.

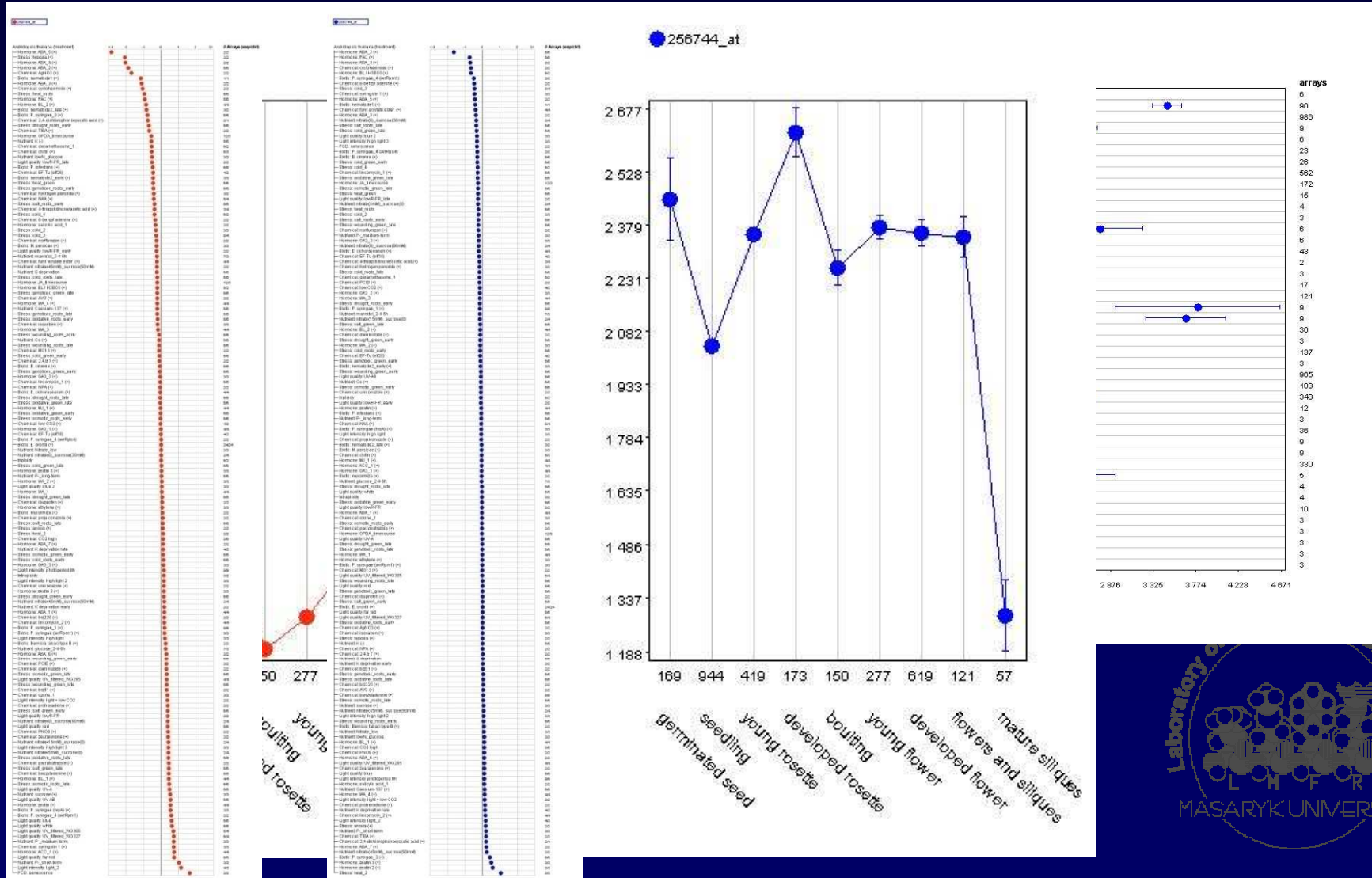
analýza genové exprese

- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných publikovaných dat



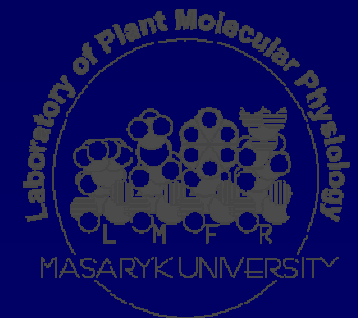
Genomika IV. analýza genové exprese

Analýza exprese pomocí Genevestigator (**AHP1** a **AHP2**, *Arabidopsis*, Affymetrix ATH 22K Array)



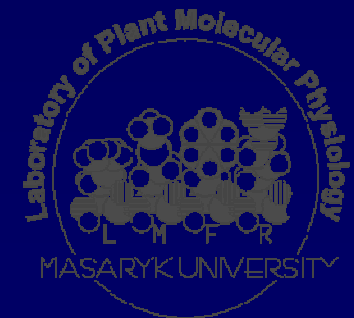
Genomika IV.

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

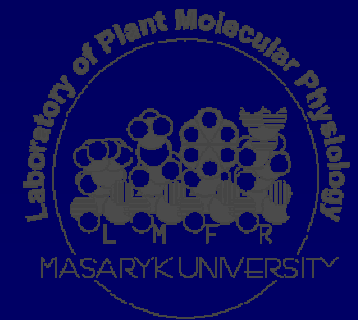
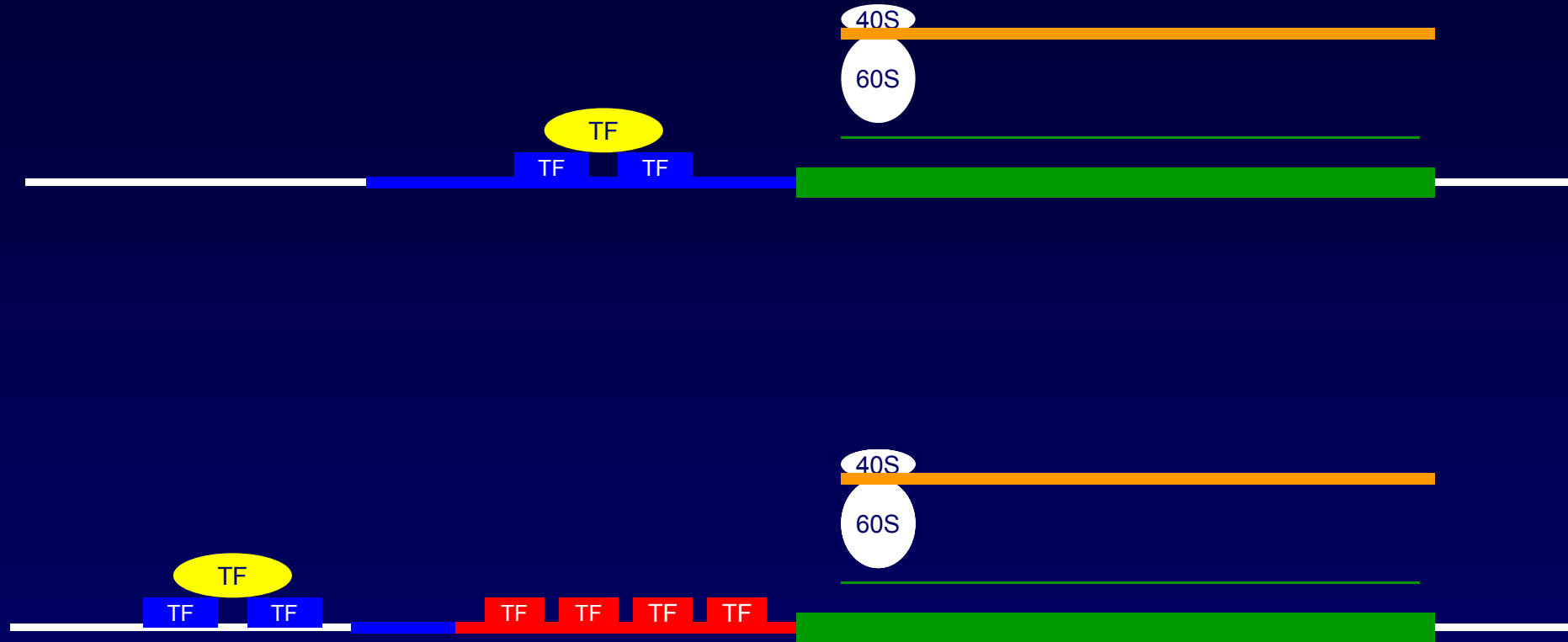


Genomika IV.

- Metody identifikace funkce 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

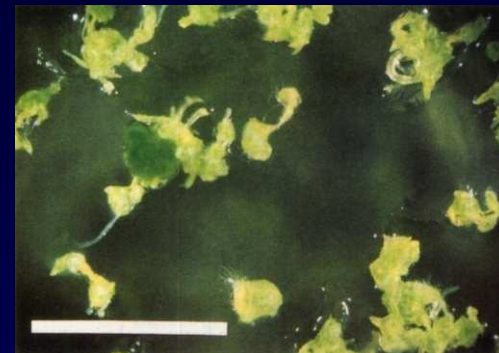


Genomika IV. aktivační mutagenese

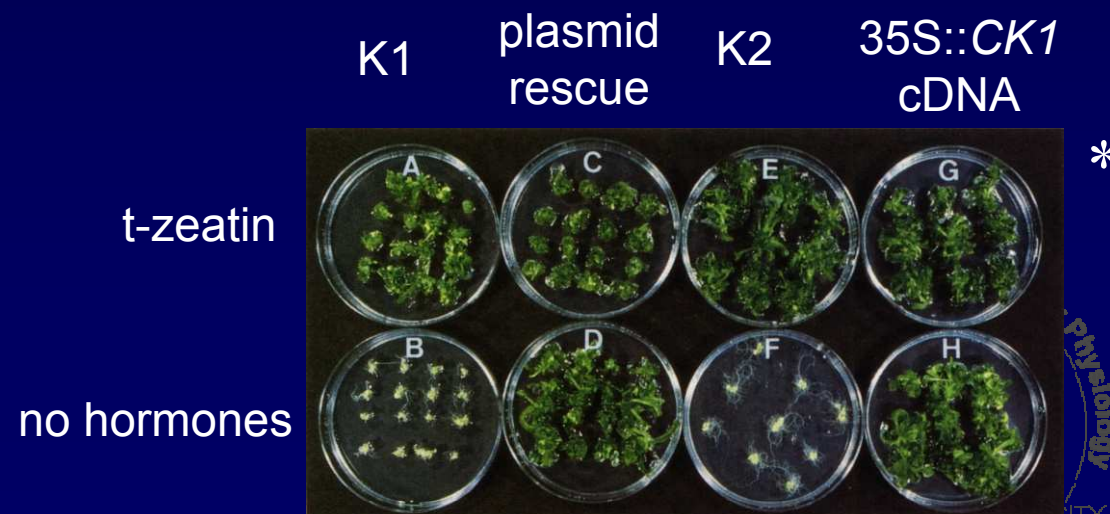


Izolace genu *CK1*

- Tatsuo Kakimoto, *Science* 274 (1996), 982-985 *
- izolace genu pomocí aktivační mutagenese

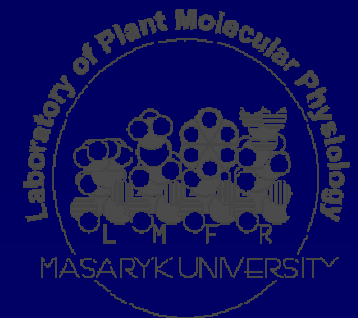


- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CK1*, CYTOKININ INDEPENDENT 1)



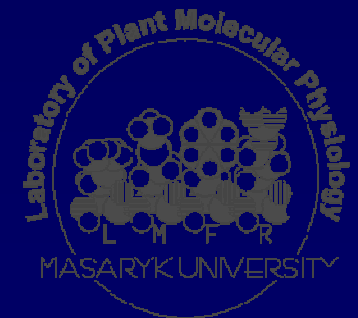
Genomika IV.

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



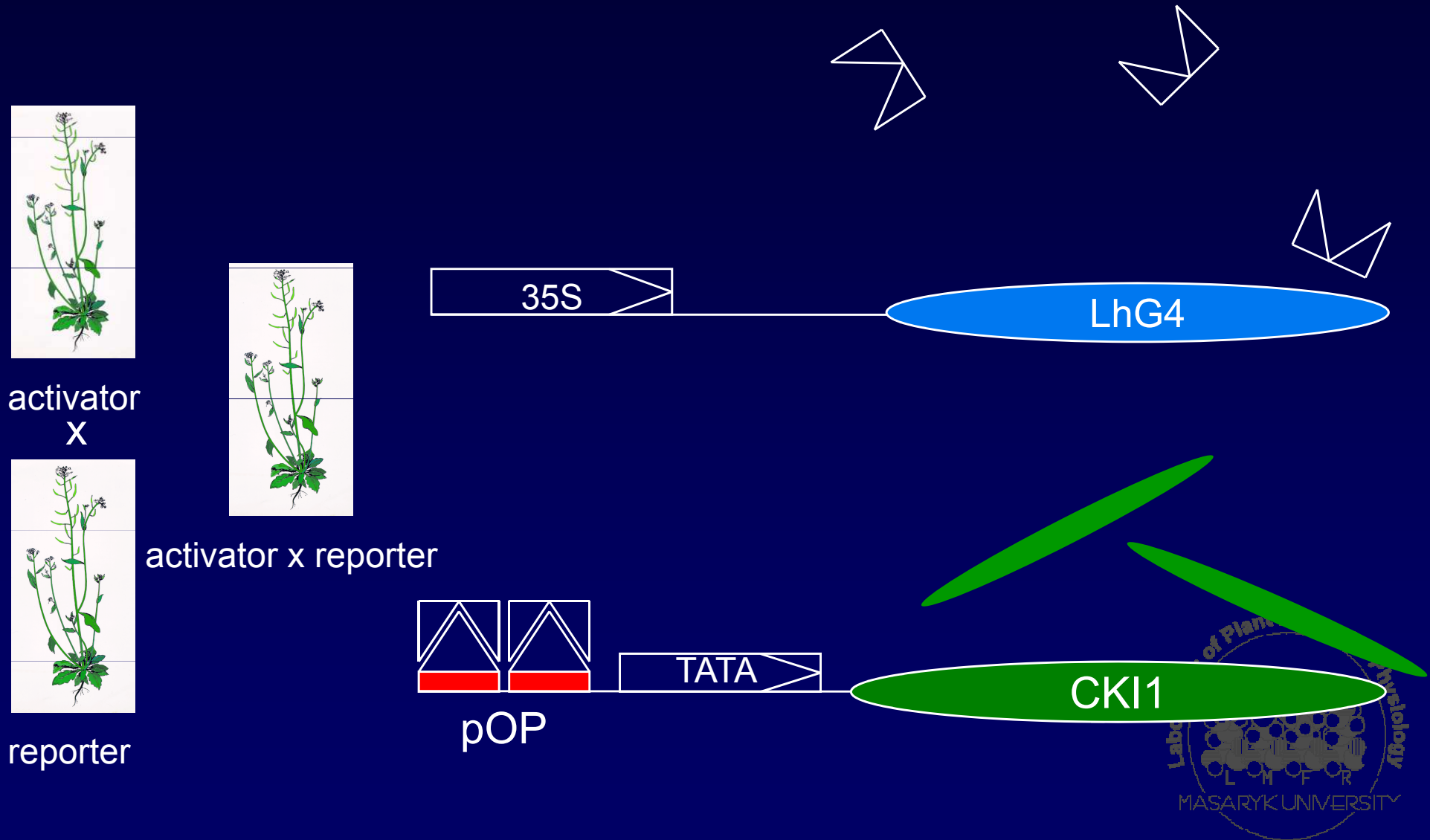
Genomika IV.

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



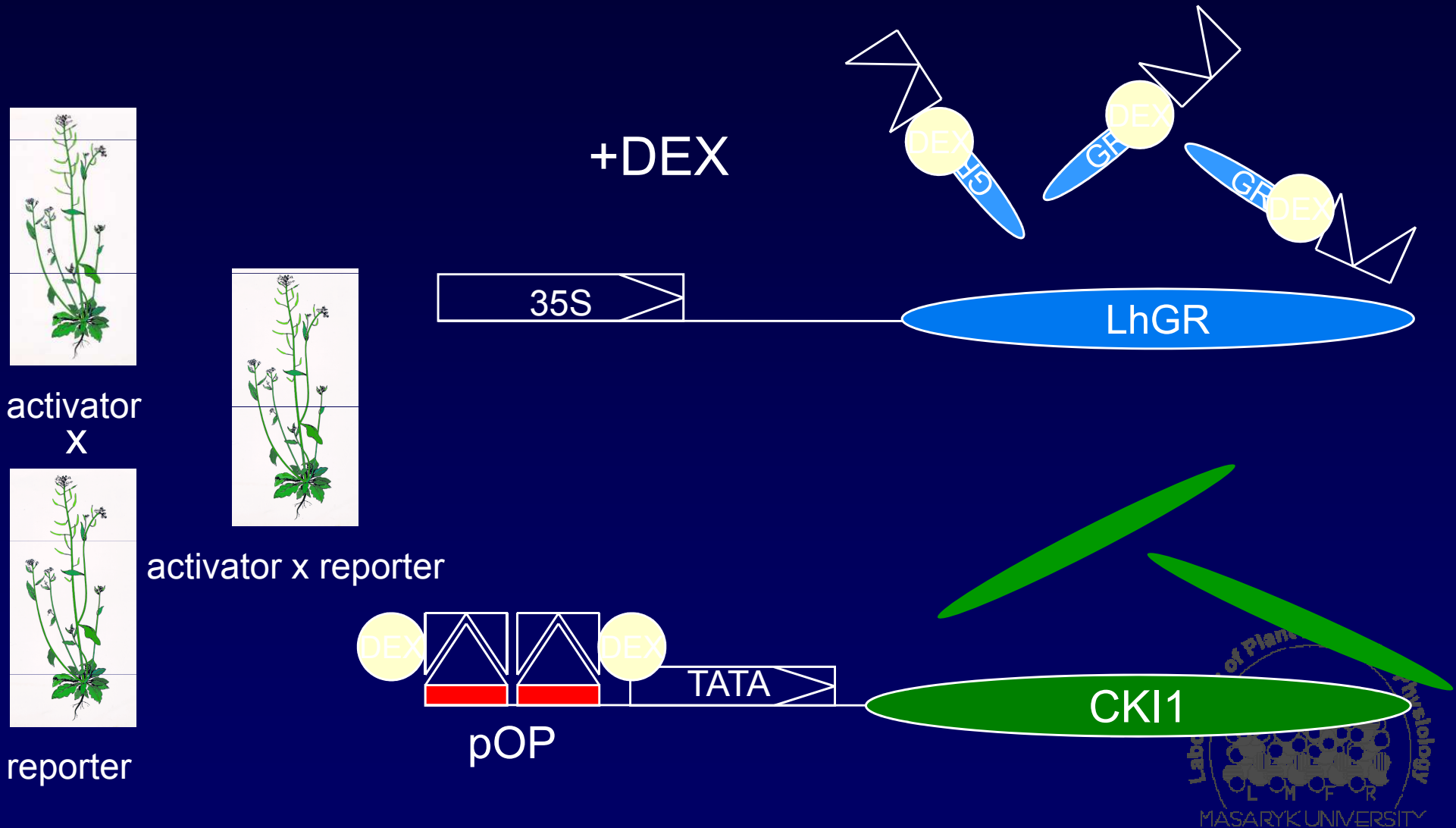
Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, pOP



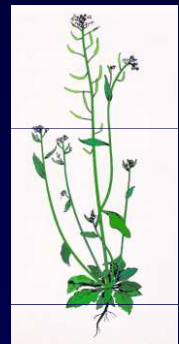
Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, pOP



Genomika IV.

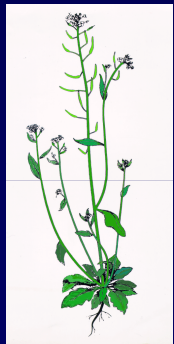
systemy regulovatelne exprese



activator X

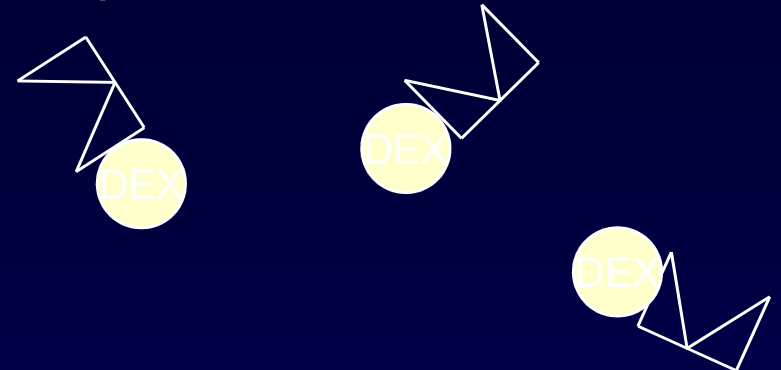


activator x reporter

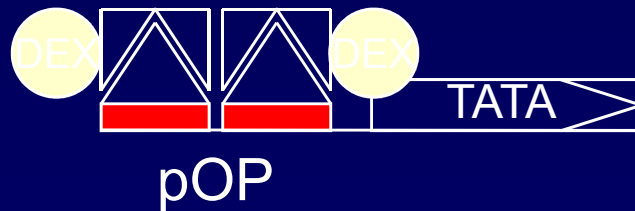


reporter

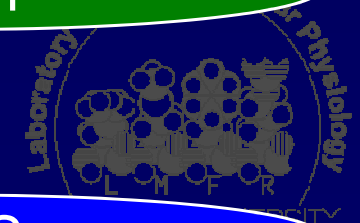
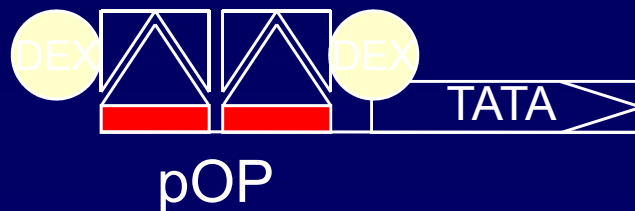
+DEX



wt Col-0

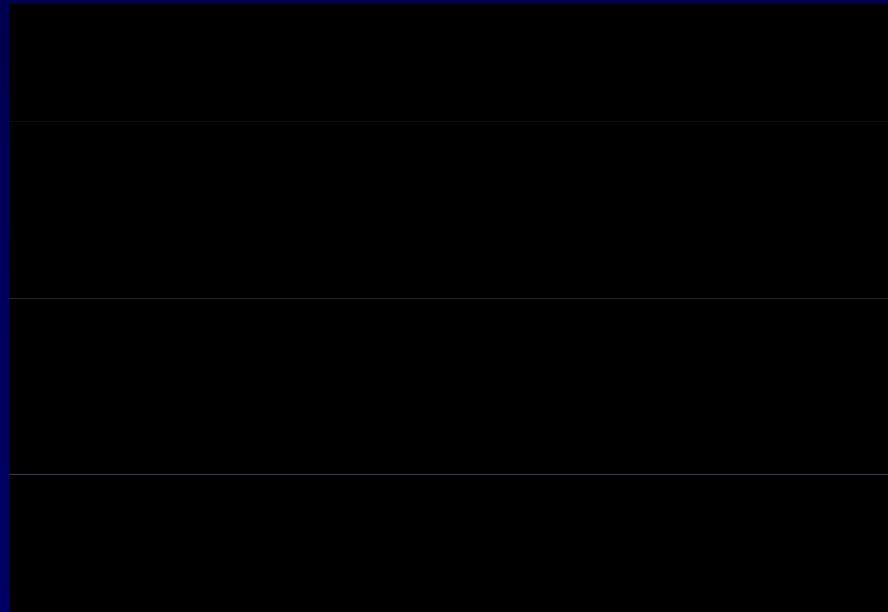


4C



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

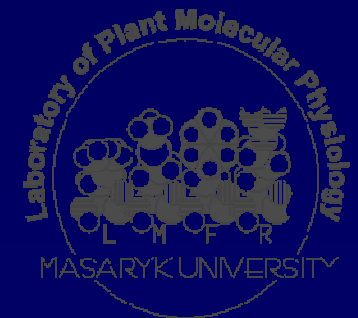


<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/>



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
syntézu oligo
touto technikou

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

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	Download
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	Download

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

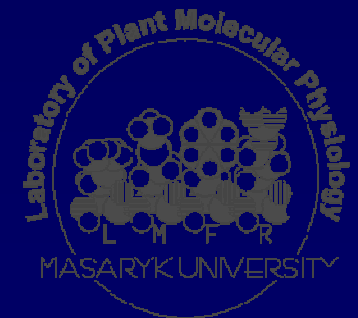


Che et al., 2002
MASARYK UNIVERSITY

Genomika IV.

proteinové čipy

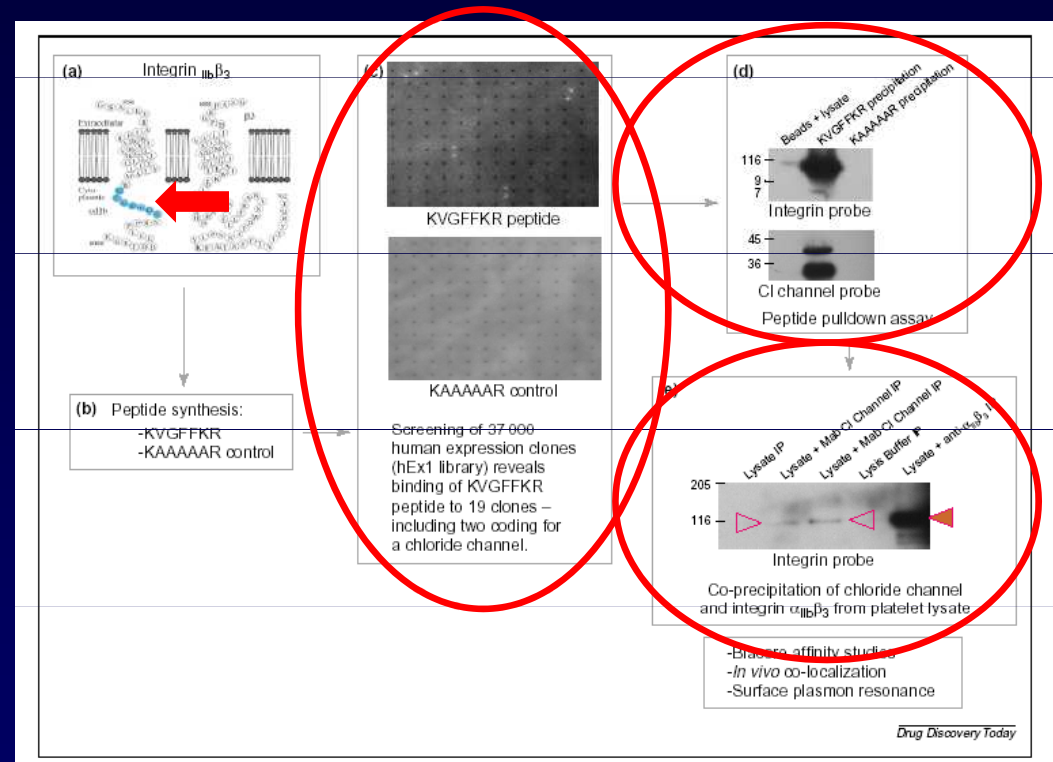
- Proteinové čipy
 - čipy s vysokou denzitou obsahující řádově 10^4 proteinů
 - analýza protein-proteinových interakcí, substrátů kináz a interakcí s malými molekulami
 - možnost použít protilátky – stabilnější než samotné proteiny



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 α , Kramer et al., 2004)



Lueking et al., 2005



Genomika IV.

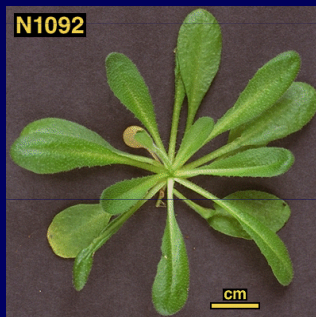
- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
 - DNA a proteinové čipy
 - metabolické profilování
 - metody mikrodisekce
 - proteomické přístupy
- Metody využívané ve funkční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



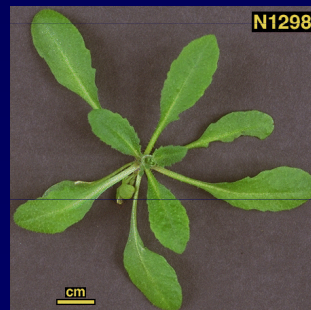
Arabidopsis thaliana

huseníček polní, mouse-ear cress

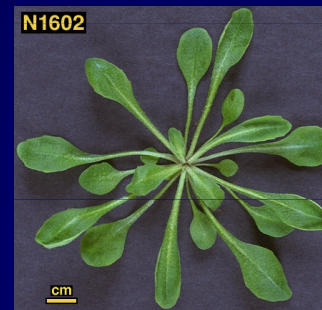
- malé nároky na kultivační plochu
- velké množství semen (20.000/rostlinu a více)
- malý a kompaktní genom, (125 MBp, cca 25.000 genů, prům. velikost 3 kb)
- 5 chromozomů
- vhodná pro široké spektrum fyziologických experimentů
- velká přirozená variabilita (cca 750 ekotypů (Nottingham Arabidopsis Seed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



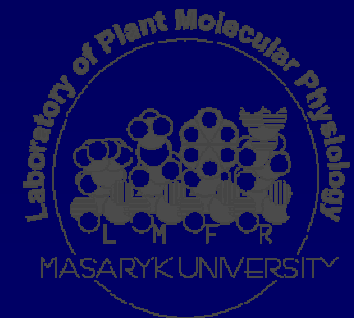
Columbia 0



Landsberg 0



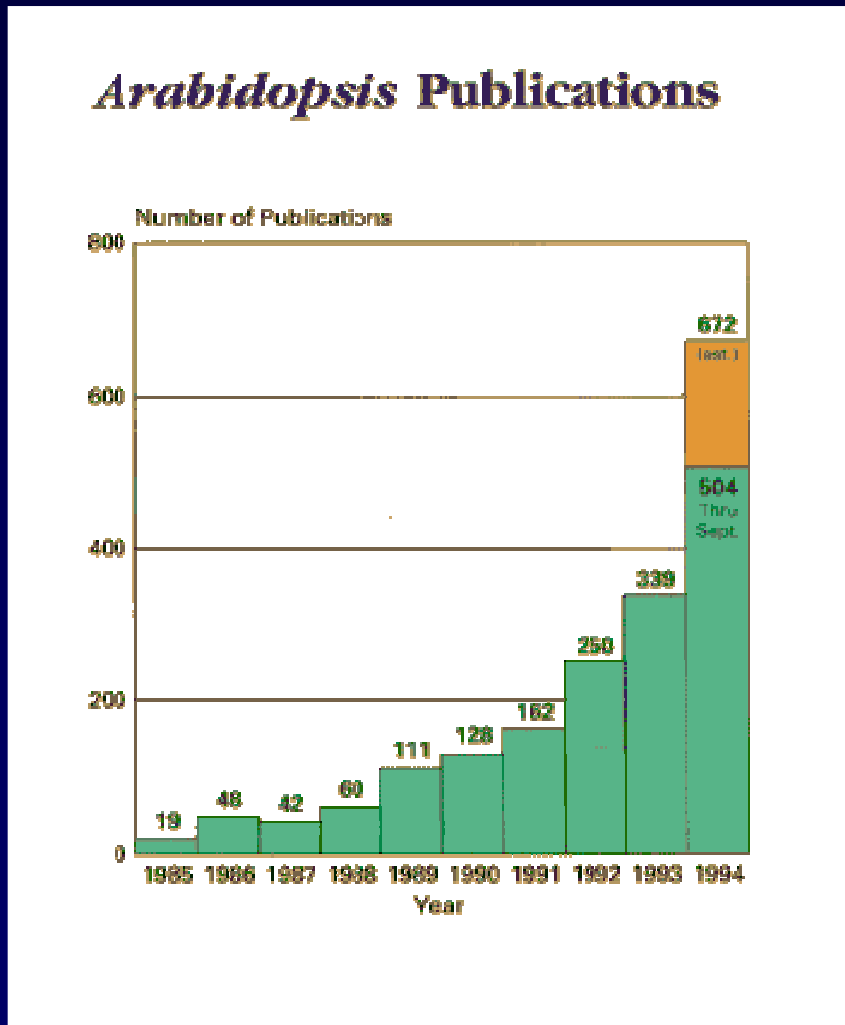
Wassilewskija 0



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

Arabidopsis, významný rostlinný model

Počet záznamů v databázi „PubMed“ (MEDLINE) vyhledaných pod heslem „*Arabidopsis*“ **25.690** (16.10. 2008).
(Pro srovnání, pod heslem „*human*“ nalezeno 10 620 405 záznamů).



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

Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacteria tumefaciens*

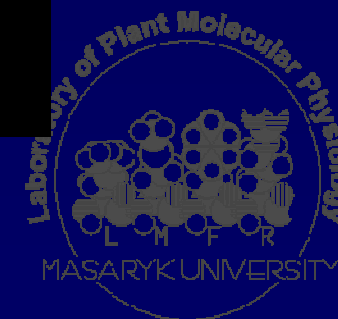
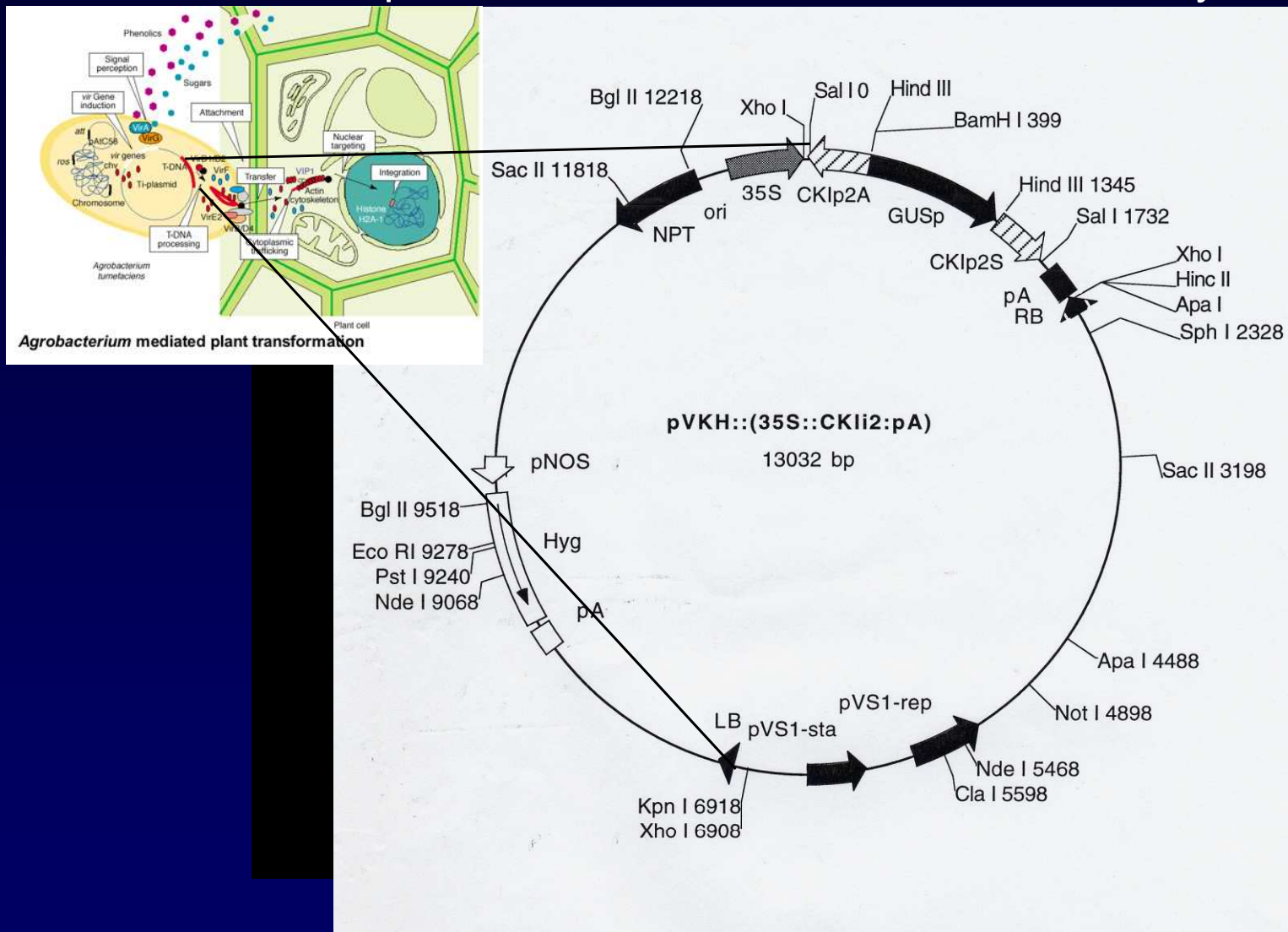


Crown gall of raspberry caused by *Agrobacterium tumefaciens*.



Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

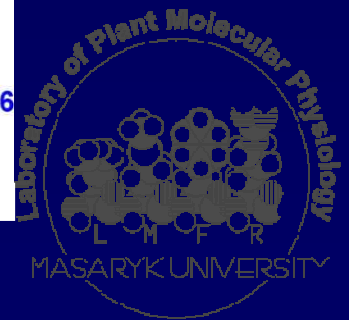
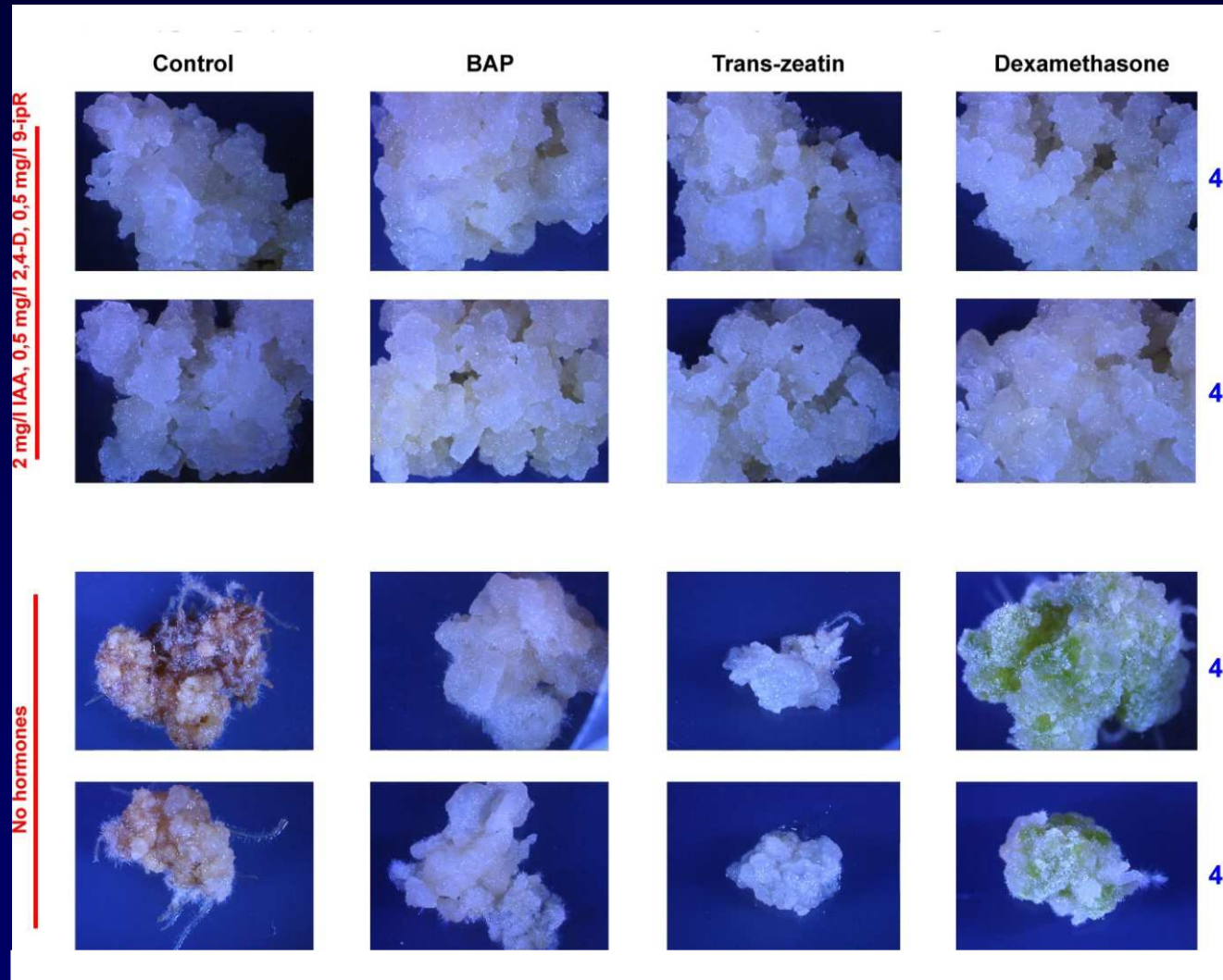
přenos bakteriální DNA do rostlinné buňky



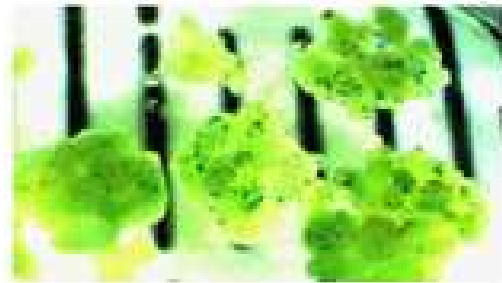
Transformace kokultivací listových disků



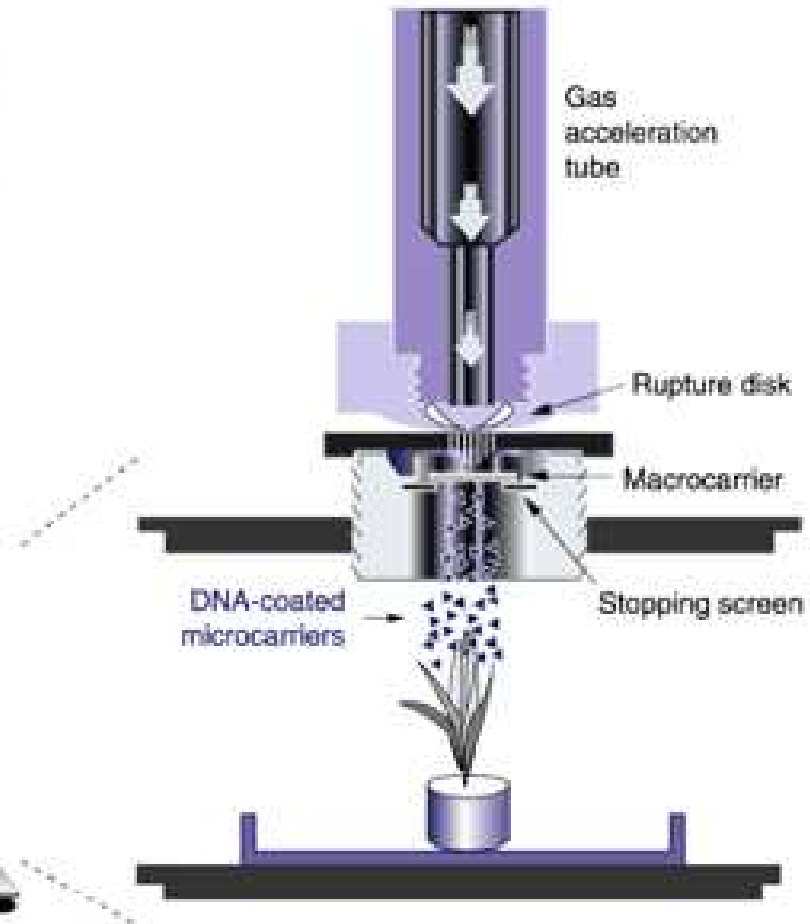
Transformace kokultivací kalusů



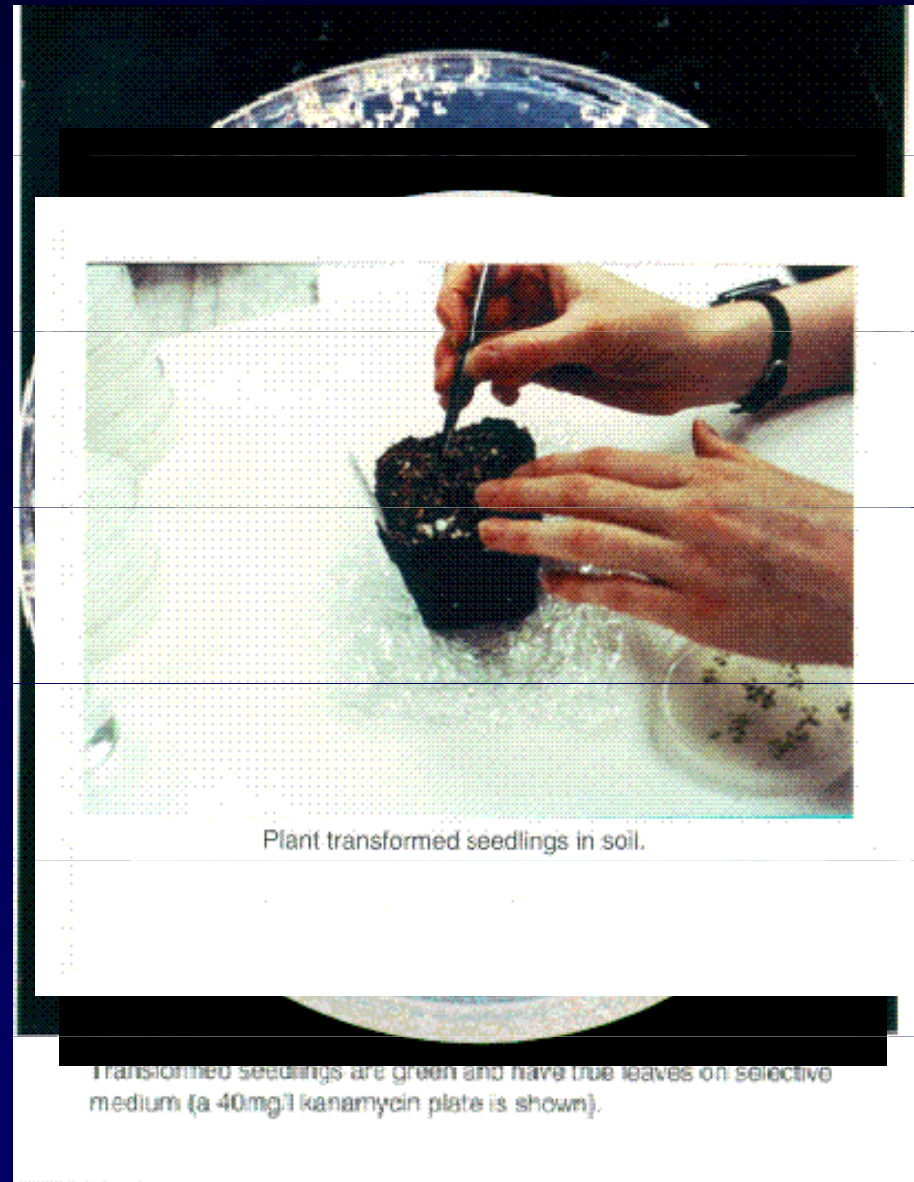
Transformace „nastřelováním“ DNA



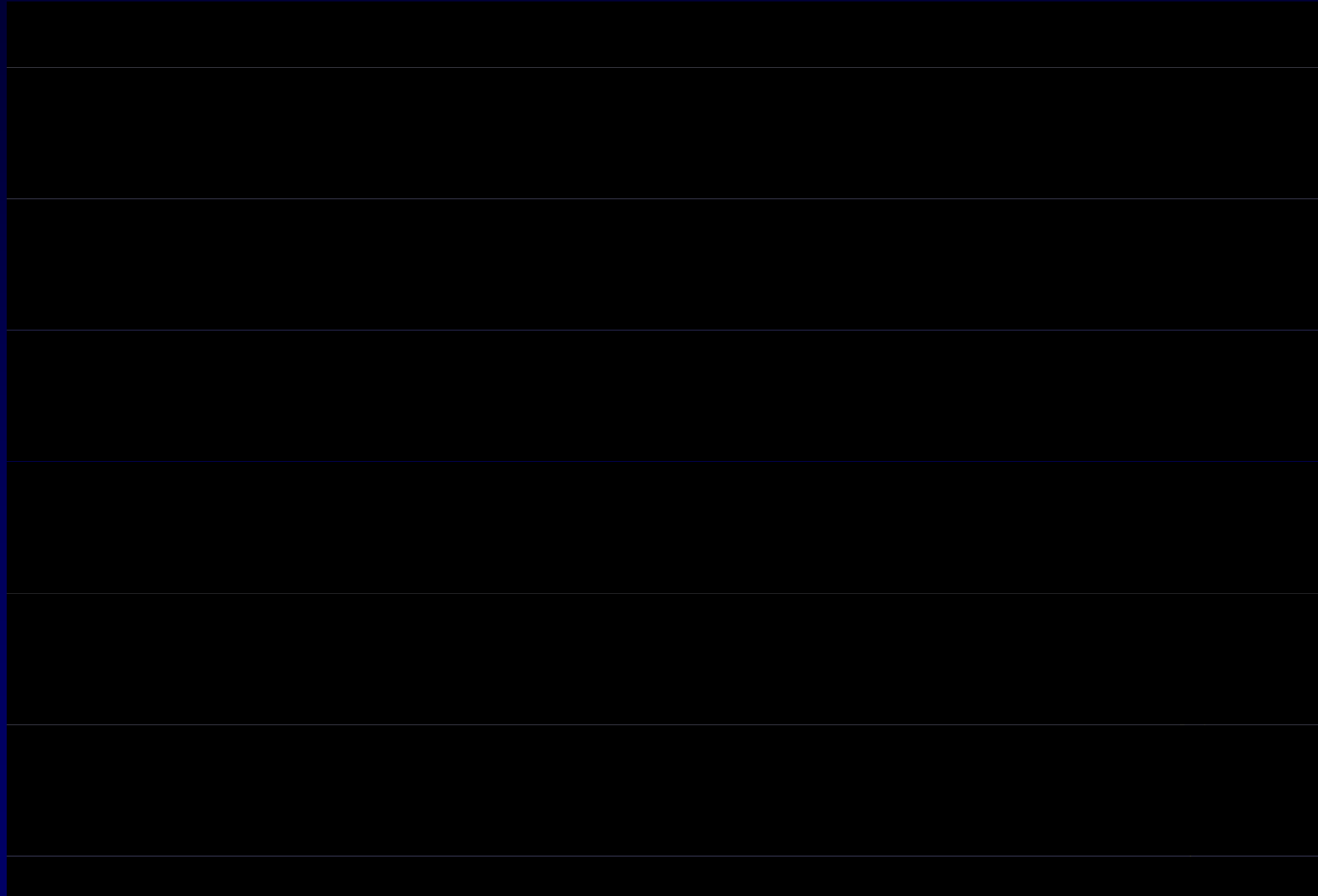
Biolistic delivery of DNA



Transformace květenství



PCR



Genomika IV.

■ Nové trendy

- chemická genetika
- pojem chemická genetika – více než 50.000 záznamů v databázi PubMed (16.10. 2008)

The screenshot displays the PubMed search interface. At the top, the NCBI logo and 'PubMed' text are visible, along with the affiliation 'A service of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health'. The search bar contains the query 'chemical genetics' with 'Go' and 'Clear' buttons. Below the search bar, there are options for 'Limits', 'Preview/Index', 'History', 'Clipboard', and 'Details'. The results section shows 'All: 50407' and 'Review: 5562'. The first three results are listed:

- 1: [Ludowski R, Mateeva EG, Gryczynski J, Tappin-Christy EA, Patankar L, Lasio G, Bomilo J, Gryczynski Z.](#) [Single Molecule Studies of Multiple-Fluorophore Labeled Antibodies. Effect of Homo-FRET on the Number of Photons Available Before Photobleaching.](#) *Curr Pharm Biotechnol.* 2008 Oct;9(5):411-20. PMID: 18833493 [PubMed - in process]
- 2: [Kuban J, Oles M, Iones X, Shinko J.](#) [Five cases of beta-ureidopropionase deficiency detected by GC/MS analysis of urine metabolome.](#) *J Mass Spectrom.* 2008 Oct 14. [Epub ahead of print] PMID: 18833477 [PubMed - as supplied by publisher]
- 3: [Zhou M, Pang Z, Fiver-Taylor P, Wu H.](#) [A conserved C-terminal thirteen amino acid motif of Gap1 is required for the Gap1 function and necessary for biogenesis of a serine-rich glycoprotein of Streptococcus parasanguinis.](#) *Infect Immun.* 2008 Oct 13. [Epub ahead of print] PMID: 18832249 [PubMed - as supplied by publisher]

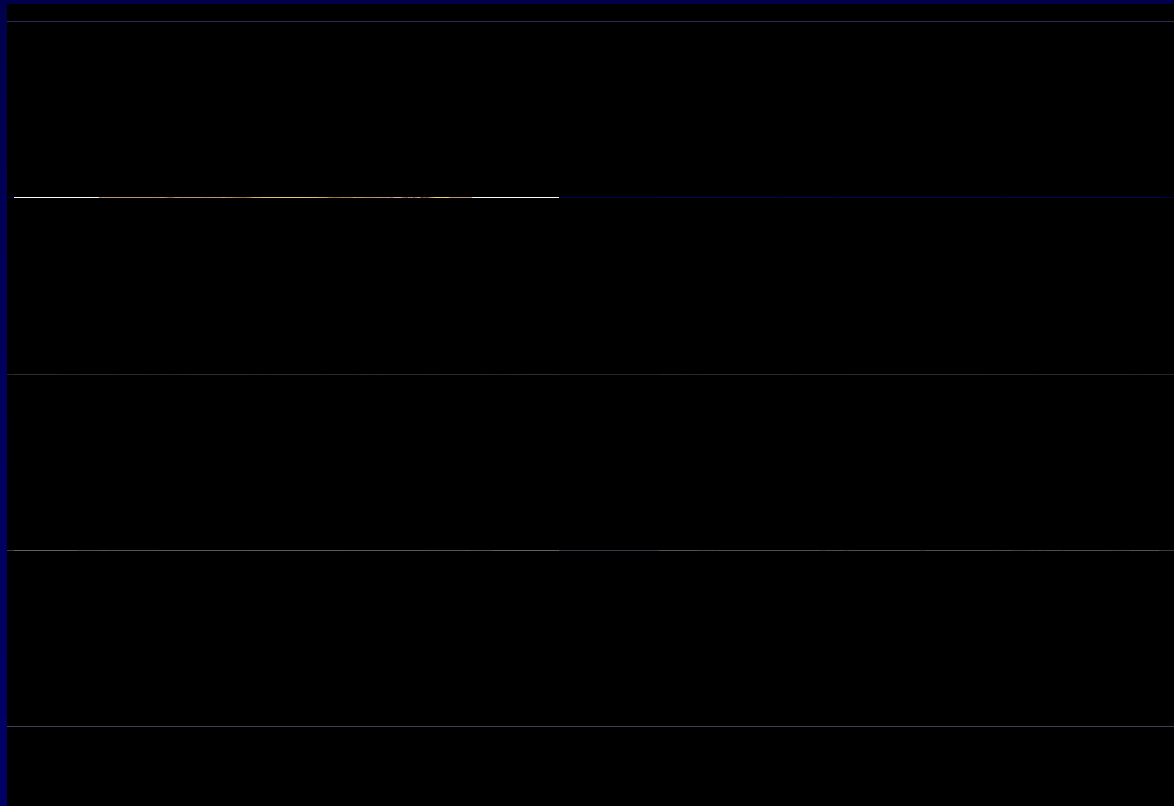
On the right side, there is a 'Recent Activity' box showing a search for 'chemikalgenetik (50407)' on PubMed.



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)



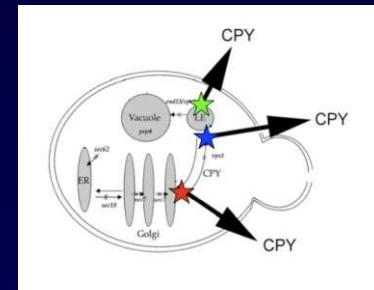
Genomika IV.

chemická genetika

Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů chemické genetiky

- pomocí vyhledávání v „knižovně“ 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



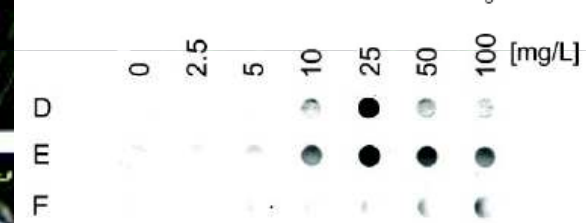
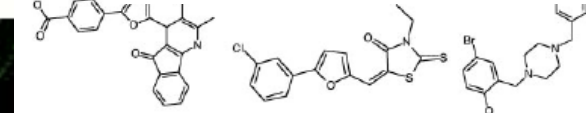
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* (konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin)

- 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 d

- pomocí EMS mutagenese identifikace mutantů se změnou citlivostí k sortinu 1 (hyper- nebo hypersenzitivní mutanti)

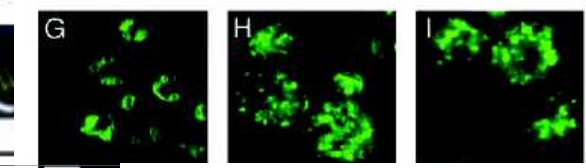
chemická struktura sortinů

A tvar rostlinných vakuol pomocí EGFP:-TIP



Sortin 1

Sortin 2



fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

Zouhar et al., 2004

Genomika IV.

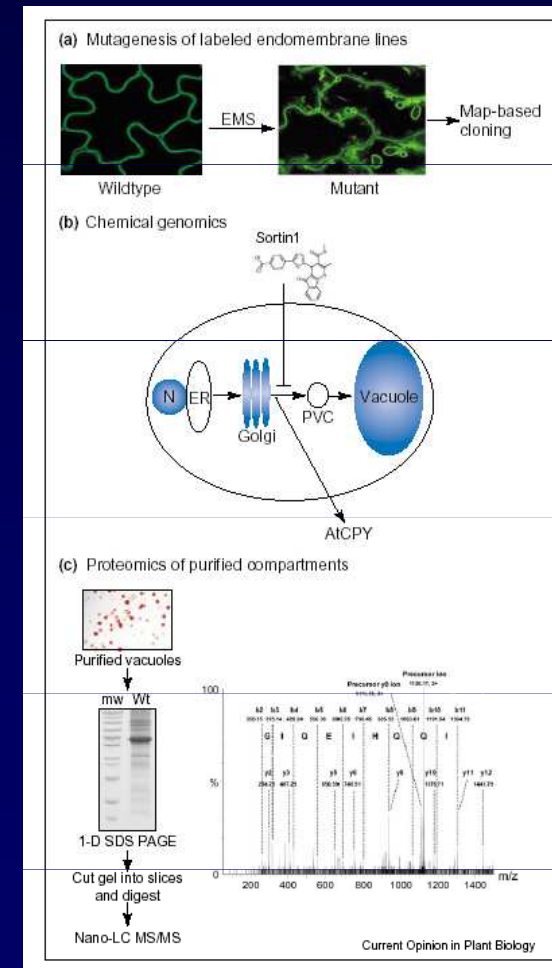
chemická genetika

- 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

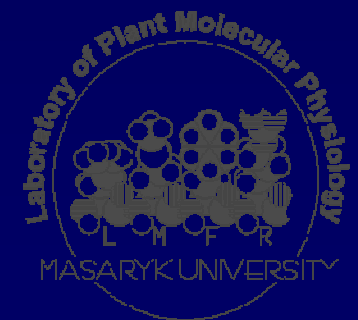
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
 - DNA a proteinové čipy
 - metabolické profilování
 - metody mikrodisekce
- Metody využívané ve funkční genomice rostlin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



Genomika IV.

Shrnutí

- Nové trendy
 - chemická genetika



Genomika IV.

Diskuse

